

# 跨膜蛋白 66 生物信息学分析及其突变体转基因小鼠构建

李新云<sup>1,2</sup>, 王趁芳<sup>1</sup>, 任红艳<sup>1</sup>, 赵书红<sup>2</sup>, 杨述林<sup>1</sup>,  
崔文涛<sup>1</sup>, 牟玉莲<sup>1</sup>, 李奎<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 家养动物遗传资源与种质创新重点开放实验室, 北京 100193;  
2. 华中农业大学 动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** 跨膜蛋白 66(TM66)是与细胞凋亡以及癌症发生密切相关的重要功能基因,为了在个体水平研究其生物学功能,我们进行了 TM66 基因突变体(TM66V)转基因小鼠的构建。本研究通过原核注射法进行转基因操作,将获得的 312 个受精卵移植到 13 只代孕母鼠中,运用 PCR、Southern blotting 对出生的小鼠进行转基因鉴定,对于转基因阳性小鼠通过传代试验研究外源基因是否稳定整合,并通过反向 PCR 方法研究外源基因的整合方式。结果显示在出生的 55 只小鼠中有 6 只为转基因阳性,其中 3 只转基因小鼠可以稳定传代,表明这些小鼠中外源基因发生了稳定整合。反向 PCR 检测结果发现外源片段是以串联重复的方式整合到转基因小鼠的基因组中。本研究成功构建了 TM66 基因突变体转基因小鼠,为进一步研究 TM66 基因的功能奠定了基础。

**关键词:** TM66 基因;跨膜蛋白;转基因小鼠

中图分类号:Q78

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2010)01-0033-06

## Bioinformatic Analysis of TM66 Gene and Construction of TM66 Mutant Transgenic Mice

LI Xin-yun<sup>1,2</sup>, WANG Chen-fang<sup>1</sup>, REN Hong-yan<sup>1</sup>, ZHAO Shu-hong<sup>2</sup>, YANG Shu-lin<sup>1</sup>,  
CUI Wen-tao<sup>1</sup>, MU Yu-lian<sup>1</sup>, LI Kui<sup>1\*</sup>

(1. *The Key Laboratory of Domestic Animal Genetic Resources and Germplasm Innovation, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China*; 2. *Key Laboratory of Animal Heredity and Breeding of Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*)

**Abstract:** Transmembrane protein 66 play important roles in cell apoptosis and tumorigenesis. In order to investigate the function of TM66 gene, the transgenic mouse model containing the mutant TM66 gene was constructed in this study. The transgenic mice were generated by using microinjection method and 312 injected zygotes were implanted into 13 foster mothers. The positive transgenic mice were confirmed by PCR and Southern blotting. Also, the stability of the transgene was confirmed by passage and the way of integration of the transgene was studied using inverse PCR method. In this study, 6 positive individuals among the 55 neonatal pups were found by Southern blotting. Three positive mice were found to be able to transfer the transgene to next generation. This result indicted that the transgene was integrated into host genome stably. Inverse PCR results indicated that the transgenic DNA fragment was integrated into the host ge-

收稿日期:2009-01-03

基金项目:国家 863 计划(2006AA10Z135;2008AA10Z143);国家 973 计划(2006CB102105);国家自然科学基金(30830080);中国农业科学院北京畜牧兽医研究所科技创新团队基金资助项目(ywf-td-1)

作者简介:李新云(1976-),男,湖北襄樊人,博士,主要从事动物遗传育种研究,E-mail: hzaulxy@163.com

\* 通讯作者:李奎,E-mail: kuili@iascaas.net.cn

nome in a serial multi-copy manner. Therefore, the transgenic mice model containing the mutant *TMEM66* gene was constructed successfully. This study offered useful model for further investigation of the function of *TMEM66* gene.

**Key words:** *TMEM66* gene; transmembrane protein; transgenic mouse

膜蛋白是一类重要的功能蛋白,它们构成了多种离子的跨膜通道以及多种信号分子的受体,参与调节细胞间物质和信息的交换,在机体中执行代谢调节、生长调控、免疫应答等多种生物学功能。据估计,膜蛋白约占所有编码蛋白的30%。在目前的药物开发中,有近70%的药物靶点为膜蛋白<sup>[1]</sup>。跨膜蛋白66基因(transmembrane protein 66, *TMEM66*)是一个新的功能基因,目前该基因的专门研究报道还很缺乏。研究发现人长期接触致癌物质苯其外周血单核细胞中该基因表达下调2倍以上<sup>[2]</sup>。HEK293T细胞中过表达*TMEM66*基因,细胞凋亡增加约2倍<sup>[3]</sup>。酵母双杂交研究发现*TMEM66*蛋白与IFIT5蛋白(interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5)发生相互作用<sup>[4]</sup>。我们通过对*TMEM66*基因表达规律分析发现,人*TMEM66*基因在发育过程中呈现明显的上调表达模式;对比分析正常与癌变组织中*TMEM66*基因的表达水平,发现癌变组织中该基因呈下调表达。另外,芯片杂交数据显示*TMEM66*基因在分化成熟的免疫细胞中高表达,而在白血病细胞、恶性淋巴瘤等未分化成熟的免疫细胞中低表达(<http://genome.ucsc.edu/>)。以上研究表明*TMEM66*基因可能是和细胞凋亡、癌症发生相关的重要功能基因。我们对人*TMEM66*蛋白结构进行了分析,结果显示人*TMEM66*蛋白包括339aa,属于三跨膜蛋白,含有1个DUF1183功能域,目前此功能域的功能未知。为了研究*TMEM66*基因的生物学功能,我们构建了鼠*TMEM66*基因突变体(*TMEM66V*)转基因小鼠。*TMEM66V*蛋白是鼠的*TMEM66*蛋白缺失掉第一跨膜域与第一膜内域的突变体,我们分析认为它可以通过与*TMEM66*竞争上游信号分子进而抑制*TMEM66*蛋白功能。*TMEM66V*转基因小鼠的构建为*TMEM66*基因功能研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

试验所用SPF级C57BL/6和ICR小鼠(*Mus mus-*

*culus*)由中国医学科学院实验动物研究所提供。

### 1.2 试剂

试验所用CMV-PAAV载体质粒为本实验室保存。胚胎培养M16、操作液M2及其他用于胚胎操作的分子生物学试剂均购自Sigma公司(美国)。Southern blotting检测所用的DIG试剂盒购自Roche公司(德国)。DNA聚合酶、T4连接酶、限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司。质粒提取和凝胶纯化试剂盒购自Qiagen公司(德国)。引物合成、DNA测序由上海英骏公司提供。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 人*TMEM66*基因表达谱、蛋白质结构分析

利用NCBI数据库中人*TMEM66* Unigene信息(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.521487>)对其表达特征进行分析。运用Expasy网站中的蛋白功能域分析程序SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)以及NCBI中蛋白质结构域数据库信息(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)对人*TMEM66*蛋白的功能域进行分析。运用转膜蛋白分析工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)对人*TMEM66*蛋白进行跨膜结构分析。

#### 1.3.2 PAAV-*TMEM66V*载体构建 *TMEM66V*

片段PCR扩增所用的左引物为5'-AAGCTTATGTC-CTGTGGCTTTATTACCATTGC-3',包含起始密码子ATG;右引物为5'-GTCGACTTACCGTCTTCTGGT-GCCAC-3',包含终止密码子TAA以及限制性内切酶*Sal*I(GTCGAC)位点。PCR扩增条件为95℃ 5 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,循环34次。*TMEM66V*片段长度为519 bp,克隆在T载体中。由于T载体上存在1个*Sal*I位点,因此用*Sal*I单酶切即可回收*TMEM66V*片段,进而克隆到*Sal*I酶切的PAAV-MCS载体中构建PAAV-*TMEM66V*重组质粒,菌液PCR筛选出阳性克隆子并进行测序验证。

#### 1.3.3 显微注射用DNA片段制备及原核注射

大量提取PAAV-*TMEM66V*重组质粒,用*Not*I

酶切线性化质粒,回收 2 290 bp DNA 片段,溶于 TE 溶液中,调整浓度到  $3 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,经  $0.22 \mu\text{m}$  的滤器过滤后,用于显微注射。显微注射前  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 30 min,吸取上清进行显微注射。将浓度为  $3 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的 DNA 注入到雄原核,见到原核膨大后,迅速退针,注射下一个。挑选注射后状态良好的受精卵移植到假孕的 ICR 鼠双侧输卵管中,每只鼠约移植 25 个受精卵。

### 1.3.4 鼠尾 DNA 提取及 PCR 鉴定转基因阳性鼠

鼠尾 DNA 采用常规的酚/氯仿法进行抽提,TE 溶解鼠 DNA, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。转基因阳性检测时 PCR 扩增所用左引物为  $5' \text{-CTTATCTTCCTCCCA-CAGCTC-3'}$ ;右引物为  $5' \text{-CACAGGGATGCCAC-CCGTAG-3'}$ ,预期扩增片段长度为 699 bp。

### 1.3.5 Southern blotting 鉴定转基因阳性鼠

将转基因小鼠 DNA 用 *EcoR* I 内切酶酶切,同时酶切 PAAV-TMEM66V 质粒作为阳性对照,酶切非转基因鼠 DNA 作为阴性对照。测定 DNA 浓度,每只鼠取  $20 \mu\text{g}$  DNA 样品用于转膜、杂交。杂交探针的制备、杂交操作以及显色检测均按照罗氏 DIG High Prime DNA Labeling and Detection starter Kit I 说明书进行。DIG 探针引物合成所用左引物为  $5' \text{-CATAGAAGACACCGGGACCGATC-3'}$ ;右引物为  $5' \text{-CAGCACACAGACCAGCACGT-3'}$ ,探针长度为 504 bp。

### 1.3.6 反向 PCR(Inverse PCR)检测转基因整合方式

转基因鼠基因组 DNA 用 *EcoR* I 单酶切后,DNA 纯化试剂盒纯化回收 DNA。取纯化后的 DNA  $2 \mu\text{g}$  于  $200 \mu\text{L}$  的 EP 管中,加入 T4 连接酶  $1 \mu\text{L}$ , $10 \times$  缓冲液  $1 \mu\text{L}$ ,然后加入双蒸水至  $10 \mu\text{L}$ 。 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜连接使基因组 DNA 环化。以环化后的 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增采用了一套反向 PCR 引物分别为 IVL1:  $5' \text{-GGTATGGAG-CAAGGGGCAAG-3'}$ ;IVR1:  $5' \text{-CACAGGGATGC-CACCCGTAG-3'}$ 。IVL2:  $5' \text{-TGGCACAATCTT-GGCTCACTG-3'}$ ; IVR2:  $5' \text{-CCTCTGAGAGT-GCTCTGAGTATG-3'}$ 。IVL2 与 IVR2 是一对嵌套引物,它以 IVL1 和 LVR1 的扩增产物为模板进行第二轮 PCR 扩增。反向 PCR 扩增条件为: $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min; $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$  80 s,循环 34 次。

## 2 结果

### 2.1 TMEM66 基因表达谱分析

根据人 TMEM66 Unigene(Hs. 521487)信息分析发现在达到成年以前该基因随着生长发育呈上调表达趋势(图 1),在青少年时期达到高峰,到成年时期又有所下降。对比分析肾上腺、子宫颈、结肠、食管、肝、胰腺、前列腺、皮肤、膀胱、子宫的正常组织与癌变组织中 TMEM66 表达变化,发现在癌变组织中 TMEM66 基因表达都呈现下调表达趋势(图 2)。

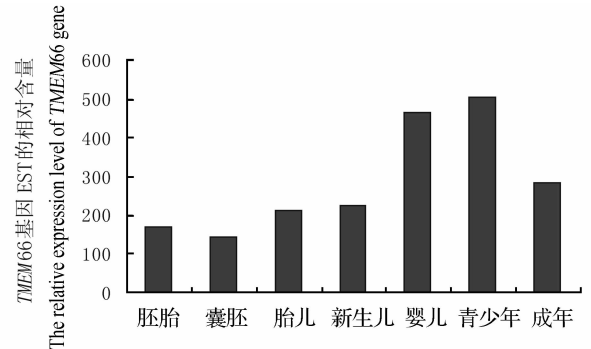
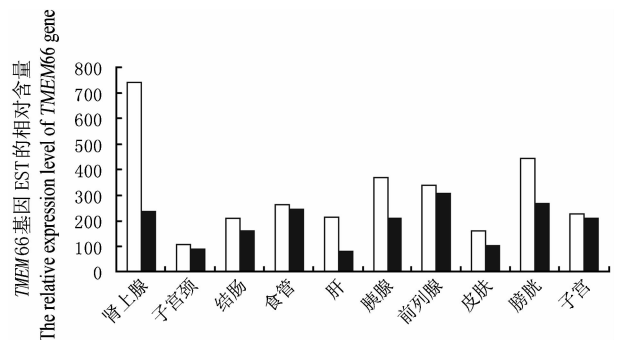


图 1 生长发育不同时期人 TMEM66 基因表达变化

Fig. 1 The expression pattern of human TMEM66 gene at different development stages



白色是正常组织;黑色是癌变组织

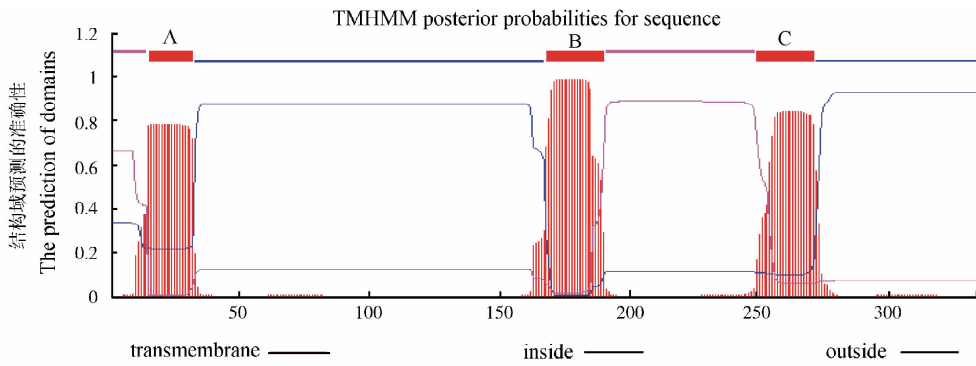
Opened bars represent normal tissues; Solid bars represent malignant tissues

图 2 人 TMEM66 在正常与癌变组织中表达水平比较

Fig. 2 The expression level of human TMEM66 gene in normal tissues and their counterpart cancers

### 2.2 人 TMEM66 蛋白质结构分析

人 TMEM66 蛋白包含 339 个氨基酸残基,分子量为 36.98 ku,等电点为 7.5([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html))。功能域分析结果表明 TMEM66 蛋白包含 1 个 DUF1183 功能域,该功能域功能尚且未知。人 TMEM66 是 1 个三跨膜蛋白,具有 3 个跨膜结构( $10 \sim 32$ 、 $172 \sim 194$  和  $260 \sim 279$ ),1 个主要的膜外域( $195 \sim 259$ )和 2 个膜内域( $33 \sim 171$  和  $280 \sim 339$ )(图 3)。



A. 代表跨膜域; B. 代表膜内域; C. 代表膜外域  
 A. Transmembrane domain; B. Inside domain ; C. Outside domain

图3 人 TMEM66 蛋白跨膜域分析

Fig. 3 Analysis of transmembrane domains in human TMEM66 protein

2.3 转基因片段特征

*Not I* 酶切 PAAV-TMEM66V 表达载体回收 2 290 bp 的转基因片段, 该片段从左至右依次为 CMV 启动子、珠蛋白内含子、TMEM66V 片段以及 PolyA 加尾信号。限制性内切酶位点、转基因检测所用的引物、探针的位置见图 4。

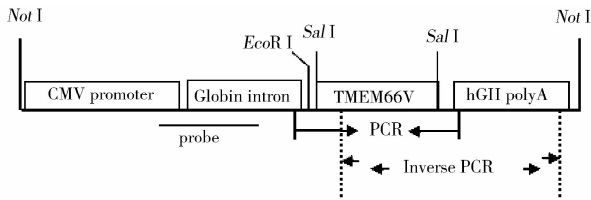


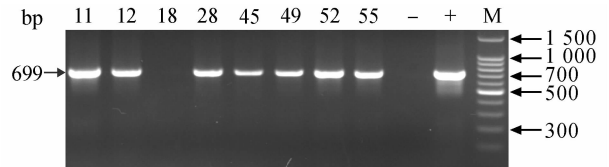
图4 转基因片段限制性酶切图谱及引物、探针所在位置  
 Fig. 4 The restrictive enzyme map of transgenic DNA fragment and the corresponding site of the probe and primers

2.4 F<sub>0</sub> 代转基因小鼠产生

本研究共注射 427 个卵, 移植 312 个卵到 13 只代孕母鼠, 出生 55 只小鼠, PCR 检测出阳性鼠 7 只, 分别为 11 号、12 号、28 号、45 号、49 号、52 号和 55 号, “-”为阴性对照; “+”为阳性对照(图 5)。进一步对转基因小鼠进行 Southern blotting 验证发现有 6 只为转基因阳性鼠, 分别为 11、12、28、49、52 和 55 号(图 6)。

2.5 反向 PCR 扩增

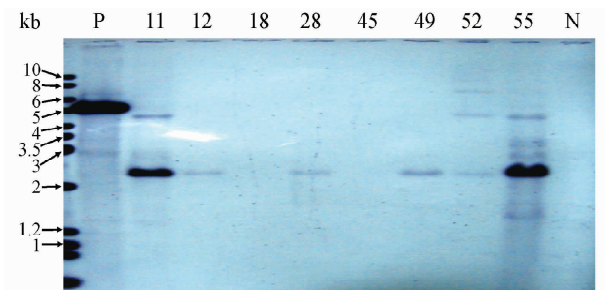
通过嵌套引物进行反向 PCR 扩增, 结果得到 1 644 bp 片段(图 7), 测序结果发现这个片段是转基因片段首尾相联的结果, 包括 288 bp 的尾部, 1 356 bp 的头部。利用 IVL2 和 IVR2 反向引物直接



11, 12, 18, 28, 45, 49, 52, 55. 分别为各转基因小鼠的 DNA; - 为非转基因小鼠 DNA 作为阴性对照; + 为带有转基因片段的质粒 DNA 作为阳性对照; M. Marker

图5 转基因小鼠 PCR 检测结果

Fig. 5 The PCR results of transgenic mice

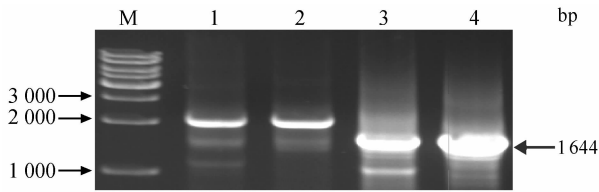


11, 12, 18, 28, 45, 49, 52, 55. 分别为各转基因小鼠的 DNA; P. 为带有转基因片段的质粒 DNA 作为阳性对照; N. 为非转基因小鼠 DNA 作为阴性对照

图6 转基因小鼠 Southern blotting 检测

Fig. 6 The Southern blotting results of transgenic mice

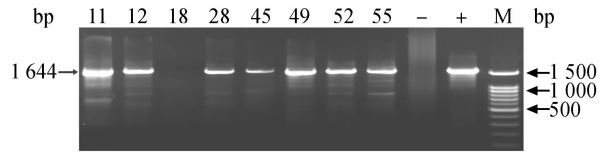
扩增转基因小鼠的 DNA, 结果发现各个转基因小鼠中转基因片段都存在串联重复的整合方式(图 8)。



M. DNA Marker; 1,2. 利用第一对反向 PCR 引物扩增后电泳结果; 3,4. 利用第二对反向 PCR 引物扩增后电泳结果  
M. DNA Marker; 1, 2. The PCR result using the first pair of primers of inverse PCR; 3, 4. The PCR result using nest primer of the inverse PCR

图 7 反向 PCR 结果

Fig. 7 The result of inverse PCR



11,12,18,28,45,49,52,55. 分别为各转基因小鼠的 DNA; - . 为非转基因小鼠 DNA 作为阴性对照; + . 为带有转基因片段的质粒 DNA 作为阳性对照; M. DNA Marker

11, 12, 18, 28, 45, 49, 52, 55. Represents different transgenic mice DNA sample, respectively; - . The negative control; + . The positive control

图 8 反向 PCR 嵌套引物扩增转基因小鼠 DNA 电泳结果

Fig. 8 The PCR result using nest primer of the inverse PCR

## 2.6 转基因小鼠传代研究

转基因阳性鼠传代结果如表 1 所示,在  $F_0$  代转基因鼠 52 号、49 号、55 号、11 号的后代中检测到了转基因阳性小鼠,其中 11 号鼠的后代中只有 1 只是阳性,阳性率为 7.69%;而在 52 号、49 号、55 号的后代中检测到多只阳性鼠,阳性率范围为 30%~86%,12 号、28 号转基因小鼠后代中没有检测到阳性鼠。

表 1 转基因小鼠传代研究结果

Table 1 The transmission results of transgenic mice

首建鼠 Founder	胎次 Parity No.	$F_1$ 代/只 $F_1$ No.	阳性鼠/只 Positive No.	阳性率/% Positive rate
52	1	7	6	85.71
	2	10	3	30
49	1	7	死亡	
	2	16	9	56.25
55	1	14	8	57.14
	2	16	9	56.25
11	1	13	1	7.69
	2	9		
12	1	7		
28	1	10		

## 3 讨论

### 3.1 关于 *TMEM66* 基因的突变体

我们扩增了鼠 *TMEM66* 基因的突变体 *TMEM66V* 片段,该片段包括 *TMEM66* 基因第二跨膜域及以后的部分,缺失掉了第一跨膜域和第一膜内域。对 *TMEM66* 蛋白中保守氨基酸及功能域分析发现,第一膜内域在不同物种间非常保守,包含部分 DUF1183 功能域和重要的活性位点。因此,突变体很可能是没有活性的。但是其膜外域完整,这表明其具有结合上游信号分子的能力。因此,推测 *TMEM66V* 蛋白只具有结合上游信号分子的能力,但不能向下传递信号。这样,通过对上游信号分子的竞争结合,就可以抑制 *TMEM66* 蛋白的功能。前人的研究已经证实了这种调控机制的存在,即缺失的膜蛋白受体通过对上游信号分子的竞争性结合来调节信号的传递。Trail(TNF-related apoptosis inducing ligand)是 TNF(肿瘤坏死因子)超家族成员,主要诱导细胞凋亡。目前已经鉴定出 5 种 Trail 受体(TrailR1~R4,OPG),Trail 受体 R1 和 R2 具有完整的膜内域和膜外域,当结合 Trail 时,可诱导细胞凋亡;而受体 R3 和 R4 只具有完整的膜外域,膜内域缺失,可以结合 Trail 但不诱导细胞凋亡;OPG (osteoprotegerin)是可溶形式的受体与 Trail 结合也不诱导细胞凋亡。Trail 受体 R3、R4 和 OPG 通过与 R1、R2 竞争 Trail 来抑制细胞凋亡<sup>[5-7]</sup>。在人中我们发现 *TMEM66* 基因存在 *TMEM66V* 的转录本,并且 *TMEM66V* 在肺癌组织中的表达量比正常肺组织中表达量高。为了研究 *TMEM66* 基因的功能及调节机制。本研究在鼠中构建第一跨膜域与第一膜内域缺失的 *TMEM66V* 转基因小鼠。

### 3.2 转基因效率分析

显微注射法制作转基因小鼠效率较低,一般为 5%~10%。转基因效率低的主要原因有两个,一是注射后的受精卵发育过程中死亡率较高,二是受精卵原核内核酸酶对外源基因的降解<sup>[8]</sup>。本研究共注射 427 个卵,移植 312 个卵,出生 55 只小鼠,杂交检测阳性鼠为 6 只,其中 12 号、28 号 2 只转基因阳性鼠不能传代,因此它们可能为嵌合体小鼠;在另外 4 只转基因鼠(11 号、49 号、52 号、55 号)的后代中检测到了阳性个体,其中 11 号转基因鼠的后代中仅检测到了 1 只阳性,可能是假阳性,其余 3 只转基因鼠

的后代中阳性率为 30%~80%，符合孟德尔遗传规律，初步说明外源基因稳定整合到了鼠的基因组中。

### 3.3 外源基因片段整合方式以及位点分析

前人研究表明，显微注射法制作转基因小鼠，外源基因片段多以串联重复的方式整合到基因组中<sup>[9-11]</sup>。本研究中，用 *EcoR* I 单酶切基因组后，杂交出现了一条与外源基因片段大小相等的主带，提示外源基因片段可能是以串联重复的方式整合到小鼠基因组中的。我们通过反向 PCR 克隆出了首尾相接的外源基因片段，证实了外源基因片段是以串联重复的方式整合到小鼠的基因组中，任红艳等<sup>[12]</sup>制备的转基因小鼠中外源基因同样是以串联重复的方式整合。至于外源基因整合位点，多数学者认为是随机整合，但也有证据表明整合位点序列可能具有某些共同特征。Makarova 等<sup>[13]</sup>研究发现外源基因的整合位点处有一些正向和反向重叠序列；Hamada 等<sup>[10]</sup>研究发现外源基因整合位点与拓扑异构酶-I 识别位点相关；Zoraqi 等<sup>[14]</sup>研究发现外源基因整合位点与拓扑异构酶-II 识别位点相关；Gutierrez-Adan 等<sup>[15]</sup>将 *GFP* 接上 MAR 元件后显微注射转到小鼠受精卵中，结果发现 *GFP* 基因整合的时间提前，效率提高。所以外源基因可能是有限的随机整合，整合位点多发生在重复区段、拓扑异构酶识别位点或一些特定结构域 MAR 等附近<sup>[16]</sup>。本次试验所构建的转基因小鼠中外源基因整合位点还有待于进一步的研究。

## 4 结 论

本研究通过原核注射法成功构建了 6 只 *TMEM66* 突变体转基因小鼠，其中 3 只可以稳定传代，表明外源基因稳定整合到了鼠基因组中。反向 PCR 结果表明外源片段是以串联重复的方式整合到小鼠的基因组中。研究结果为进一步研究 *TMEM66* 基因的功能奠定了重要基础。

### 参考文献：

[1] STAHLBERG H, FOTIADIS D, SCHEURING S, et al. Two-dimensional crystals: a powerful approach to assess structure, function and dynamics of membrane proteins[J]. *FEBS Lett*, 2001, 504(3): 166-172.

[2] FORREST M S, LAN Q, HUBBARD A E, et al. Discovery of novel biomarkers by microarray analysis of peripheral blood mononuclear cell gene expression in ben-

zene-exposed workers [J]. *Environ Health Perspect*, 2005, 113(6): 801-807.

[3] MANNHERZ O, MERTENS D, HAHN M, et al. Functional screening for proapoptotic genes by reverse transfection cell array technology[J]. *Genomics*, 2006, 87(5): 665-672.

[4] STELZL U, WORM U, LALOWSKI M, et al. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome[J]. *Cell*, 2005, 122(6): 957-968.

[5] PAN G, O'ROURKE K, CHINNAIYAN A M, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL[J]. *Science*, 1997, 276(5309): 111-113.

[6] WALCZAK H, DEGLI-ESPOSTI M A, JOHNSON R S, et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL[J]. *Embo J*, 1997, 16(17): 5386-5397.

[7] GRIFFITH T S, RAUCH C T, SMOLAK P J, et al. Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies[J]. *J Immunol*, 1999, 162(5): 2597-2605.

[8] 赵永贞, 肖 邦, 张兴举, 等. RECA 蛋白介导的转基因小鼠制备[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(3): 309-313.

[9] BISHOP J O, SMITH P. Mechanism of chromosomal integration of microinjected DNA[J]. *Mol Biol Med*, 1989, 6(4): 283-298.

[10] HAMADA T, SASAKI H, SEKI R, et al. Mechanism of chromosomal integration of transgenes in microinjected mouse eggs: sequence analysis of genome-transgene and transgene-transgene junctions at two loci [J]. *Gene*, 1993, 128(2): 197-202.

[11] PALMITER R D, BRINSTER R L. Transgenic mice [J]. *Cell*, 1985, 41(2): 343-345.

[12] 任红艳, 张兴举, 杨述林, 等. 皮肤特异表达 C-MYC 转基因小鼠的建立与分析[J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(1): 37-40.

[13] MAKAROVA I V, TARANTUL V Z, GAZARIAN K G. Structural features of the integration site of foreign DNA in the transgenic mouse genome [J]. *Mol Biol (Mosk)*, 1998, 22(6): 1553-1561.

[14] ZORAQI G, SPADAFORA C. Integration of foreign DNA sequences into mouse sperm genome [J]. *DNA Cell Biol*, 1997, 16(3): 291-300.

[15] GUTIERREZ-ADAN A, PINTADO B. Effect of flanking matrix attachment regions on the expression of microinjected transgenes during preimplantation development of mouse embryos [J]. *Transgenic Res*, 2000, 9(2): 81-89.

[16] 吴 波, 朱作言. 转基因动物整合位点的研究进展 [J]. *遗传*, 2003, 25(1): 77-80.