

早期胚胎血管显微注射慢病毒载体制备转基因禽类的研究

张自富*, 赵瑜, 刘锦妮, 李洵, 彭新亮, 章平, 胡静,
贺东阳, 常姣姣, 谷梦迪, 金楠楠, 王亚芳

(信阳农林学院动物科学系 生物技术与动物繁殖实验室, 信阳 464000)

摘要: 根据禽类独特的生殖生理特点及特殊的胚胎发育模式, 把原始生殖细胞法、显微注射法和慢病毒载体法 3 种转基因技术结合起来, 以期探索出简便、高效的生产转基因禽类新方法。在鹌鹑胚胎发育至第 13~15 期, 血液循环中的原始生殖细胞(Primordial germ cells, PGCs)数目达到最高值, 血管显微注射携带增强型绿色荧光蛋白基因(Enhanced green fluorescent protein, *eGFP*)的人类免疫缺陷病毒 I 型(Human immunodeficiency virus-1, HIV-1)慢病毒载体, 每枚胚胎注入 1 μ L, 滴度为 1×10^9 TU \cdot mL⁻¹。80 枚鹌鹑种蛋, 孵化出雏 48 只, 孵化率为 60%; 对新生鹌鹑解剖后, 在荧光显微镜下检测, 其喙部、羽毛、眼部、大脑、血管、心、肝、脾、肺、肾、腺胃、肠系膜、小肠、大肠、输卵管、肌肉及爪上检测到绿色荧光蛋白表达, 特别是在性腺中观察到绿色荧光蛋白广泛性表达。G0 代 28 只雄性鹌鹑中, 成功采集到 21 只精液, 其中 5 只个体精子基因组经聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)检测阳性, 阳性率为 23.8%(5/21); 在 5 只阳性个体的 G1 代 46 只后代中, 有 6 只经 PCR 及印迹杂交(Southern blot)检测均为阳性, 阳性率为 13.0%(6/46)。利用胚胎发育至第 13~15 期血管显微注射慢病毒载体能够有效感染此时期迁移的 PGCs, 获得性系嵌合体个体, 最终成功获得转基因后代。该方法简便、高效的生产出转基因禽类, 必将为禽类转基因研究提供一种新的思路和方法。

关键词: 显微注射; 慢病毒载体; 转基因禽类; 增强型绿色荧光蛋白

中图分类号: S814.8

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)12-2185-07

Producing Transgenic Avian by Microinjection of Lentiviral Vector into the Early Embryo Blood Vessels

ZHANG Zi-fu*, ZHAO Yu, LIU Jin-ni, LI Xun, PENG Xin-liang, ZHANG Ping, HU Jing,
HE Dong-yang, CHANG Jiao-jiao, GU Meng-di, JIN Nan-nan, WANG Ya-fang

(Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction, Department of Animal Science,
Xinyang College of Agricultural and Forestry, Xinyang 464000, China)

Abstract: This study was aimed to identify the availability of early embryo blood vessels microinjection of lentiviral vector as a new, effective way in making transgenic birds, here, we combined some of the transgenic technology such as primordial germ cells(PGCs), microinjection and lentiviral vector together according to the characteristic of bird development. The number of PGCs in the bloodstream was maximal when the chicken embryos developed to Hamburger-Hamilton stage 13-15(HH13-15), 1 μ L lentiviral vector, containing an enhanced-green fluorescent protein (*eGFP*), was microinjected into the blood vessels of quail embryos at stage HH13-15 with a titer

收稿日期: 2015-03-04

基金项目: 信阳农林学院博士基金项目(201201020); 河南省博士后研发基地项目(2014-69); 河南省基础与前沿技术研究计划项目(B20143690)

作者简介: 张自富(1974-), 男, 河南信阳人, 讲师, 博士, 主要从事动物转基因研究

* 通信作者: 张自富, 博士, E-mail: zzf5205@126.com

of 1×10^9 TU \cdot mL⁻¹. A total of 80 embryos were injected and 48 quails (60%) were successfully hatched. In newly hatched quails, eGFP expression was shown as the presence of green fluorescence in the beak, feather, eye, brain, blood vessels, heart, liver, spleen, lung, kidney, glandular stomach, mesenterium, small intestine, large intestine, oviduct, muscle and claws, especially in gonads. In 5 out of 21 mature G0 male quails, the semen was eGFP-positive (5/21, 23.8%), as detected by polymerase chain reaction (PCR). Southern blot and genetic analyses revealed that in the 46 G1 offspring produced by G0 quail, 6 were transgenic (6/46, 13.0%) according to the PCR and Southern blot results. In conclusion, transgenic germ line chimeras was successfully generated by injection of lentiviral vector into embryonic blood vessel at stage HH 13-15. It indicated that infection of PGCs with lentiviral vector via direct injection into blood vessels has the potential to provide a more convenient and efficient way to produce transgenic birds.

Key words: microinjection; lentiviral vector; transgenic birds; enhanced green fluorescent protein

禽类独特的生殖生理特点以及禽类胚胎的体外发育方式与哺乳动物有很大不同,禽类受精卵产出体外时已发育到囊胚期,传统的哺乳动物转基因方法不适合在家禽中应用。慢病毒(Lentivirus)属于逆转录病毒科(Retroviridae),不仅具有逆转录病毒的基本特性,还具有广泛感染各种非分裂期细胞的特性,克服了逆转录病毒表达易沉默的缺陷,可以整合到宿主细胞的基因组上长期稳定表达,宿主免疫反应小等优点^[1-4]。应用慢病毒载体介导对禽类胚胎的遗传操作,无疑具有极大的优势。将包装好的病毒颗粒导入禽类胚胎,使其感染原始生殖细胞或生殖干细胞,通过病毒感染将目的基因整合到其基因组中,孵出后获得性系嵌合体,再将这些嵌合体家禽与同种野生型个体交配,在子代中就可能获得携带有外源基因的转基因个体,慢病毒载体法已成为制备转基因禽类最有效和最成功的方法之一^[5]。

目前报道的利用慢病毒载体介导制备转基因禽类都是将慢病毒载体注射到发育第X期的胚盘下腔中,通过感染胚盘中的原始生殖细胞制备转基因禽类^[6-15]。这种方法一般要通过3期培养体系对鸡胚胎进行孵化^[7],过程繁琐,往往导致胚胎孵化率较低。为了获得更多的个体不仅需要包被大量的高滴度慢病毒颗粒,而且由于胚盘上下胚层细胞间距离很近,注射时显微注射玻璃针非常容易刺破下层细胞,将液体注入卵黄中,致使病毒颗粒无法作用于胚盘原始生殖细胞而导致试验失败^[16]。

在禽类胚胎血液循环系统建立后,其PGCs会进入血管随血液循环迁移至原始生殖嵴部位,而后穿过血管壁进入原始生殖嵴中定居,并在其中生长、分裂、分化成配子。有研究表明^[17-18],将脂质体包裹

的外源基因直接注射入第14期胚胎血液,转染循环期的PGCs,在受体性腺区域可检测到外源基因的表达。在胚胎发育至13~15期对胚胎血管进行显微注射操作后,不仅不需要将胚胎换入代用蛋壳中培养,而且注射对胚胎生命力的影响要远远小于胚盘期注射的影响,孵化率相对较高^[19]。因此,本研究在胚胎发育至13~15期时将慢病毒载体通过血管微注射方法导入鹌鹑胚胎,以期感染血液循环中的正在迁移的PGCs,通过孵化得到性系嵌合体个体,经过交配繁殖后代最终获得转基因个体。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 种蛋及 HIV-1 型慢病毒载体 鹌鹑种蛋购自宏达鹌鹑种场。所用 HIV-1 型慢病毒载体购自纽恩(上海)生物科技有限公司。载体信息见图 1。

1.1.2 试剂盒、耗材及工具酶 PCR 预混液购自天泽生物技术有限公司,血液及精液基因组提取试剂盒、RNase A 酶购自天根生物科技有限公司,精子基因组 DNA 提取试剂盒购自 Promega 公司, Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 购自罗氏公司, Southern 杂交膜(Amersham-XL 尼龙膜)购自 GE 公司, X 光片购自 Kodak 公司,显影浓缩液及定影浓缩液购自乐凯公司,PCR 引物的合成由上海英骏生物技术有限公司完成,限制性内切酶 *EcoR* I、*Pst* I 购自 NEB 公司。

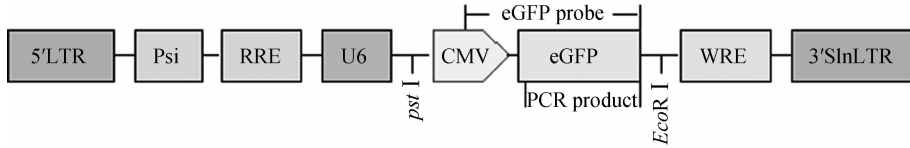
1.2 方 法

1.2.1 鹌鹑种蛋的处理 新鲜鹌鹑种蛋取回后,先用 0.1% 的新洁尔灭溶液清洗,除去表面污迹,然后用 70% 酒精喷洒消毒,待蛋壳表面晾干后放进孵

化器里进行孵化,孵化温度为 37.5 °C,相对湿度为 55%~65%,每 2 h 90°自动翻蛋。

1.2.2 胚胎血管显微注射慢病毒 将发育至 13~15 期的鹌鹑种蛋取出,上下轻轻晃动使胚胎脱离内层壳膜,通过纤维光源照蛋确定胚胎所处位置并用

铅笔在蛋壳上做好标记,用牙科钻在记号附近打出一个直径为 4 mm 左右的小孔;在解剖显微镜下用显微注射器将 1 μ L(滴度为 1×10^9 TU \cdot mL $^{-1}$)慢病毒溶液缓慢注射到鹌鹑胚胎血管中,用 parafilm 膜封闭开口,标记后放回孵化器,继续孵化至出雏。



LTR. 长末端重复序列;Psi. 包装信号序列;RRE. 呼长孤病毒应答元件;U6. U6 启动子;CMV. 巨细胞病毒启动子;eGFP. 增强型绿色荧光蛋白基因序列;WRE. 早獭肝炎病毒转录后调控原件;SinLTR. 自我灭活长末端重复序列。上面标示为以绿色荧光蛋白基因序列做探针检测 DNA 杂交的大致位置;下面标示为限制性内切酶 *Pst* I 和 *EcoR* I 大致的酶切位点

LTR. Long terminal repeat;Psi. Packaging signal;RRE. Rev responsive element;U6. U6 promoter;CMV. Cytomegalovirus promoter;eGFP. Enhanced green fluorescent protein gene;WRE. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element;SinLTR. Self-inactivating LTR. The approximate position of the probe for detecting the eGFP gene by Southern blotting analysis were indicated above the sequence. Restriction enzyme sites *Pst* I and *EcoR* I and locations of probe used for Southern blotting are depicted

图 1 质粒载体 pGCL-eGFP 原理结构示意图

Fig. 1 Diagram of the relevant regions of the pGCL-eGFP vector

1.2.3 外源基因 *eGFP* 在鹌鹑体内表达检测

根据 HIV-1 慢病毒载体的表达特性,对胚胎血管显微注射慢病毒后,分别在孵化第 4 天、刚孵化出 3 d 鹌鹑进行解剖后,在荧光显微镜下对各个组织器官内的绿色荧光蛋白的表达情况进行检测。

1.2.4 PCR 检测 根据基因组提取试剂盒方法,对 G0 代雄性鹌鹑精液基因组及 46 只 G1 后代血液基因组提取后进行 PCR 检测。参照慢病毒载体 pGCL-eGFP 中 *eGFP* 序列信息,利用 Primer 5.0 软件设计引物,进行 PCR 扩增。上游引物:5'-CGGCCACAAGTTCAGCGTGTC-3';下游引物:5'-CGATGGGGGTGTTCTGCTGGT-3';扩增长度为 497 bp 的 *eGFP* 基因内部片段。PCR 扩增体系 25 μ L;基因组 DNA 2 μ L,上下游引物 (10 μ mol \cdot L $^{-1}$)各 1.5 μ L,PCR 预混液 12.5 μ L,ddH₂O 7.5 μ L。PCR 反应程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,64 °C 45 s,72 °C 30 s,共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。取 PCR 产物 5 μ L,1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 Southern blot 分析 对 PCR 检测阳性的 G1 代个体及阴性对照个体,提取血液基因组 10~20 μ g,37 °C 水浴条件下,*EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切消化过夜,1%琼脂糖凝胶电泳分离后,转移到尼龙膜上。根据质粒载体 pGCL-eGFP 序列,随机引物法标记探针,PCR 扩增长 876 bp DNA 片段,

作为 Southern blot 的探针。地高锌核酸探针标记 Southern blot 按罗氏公司 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 说明操作。

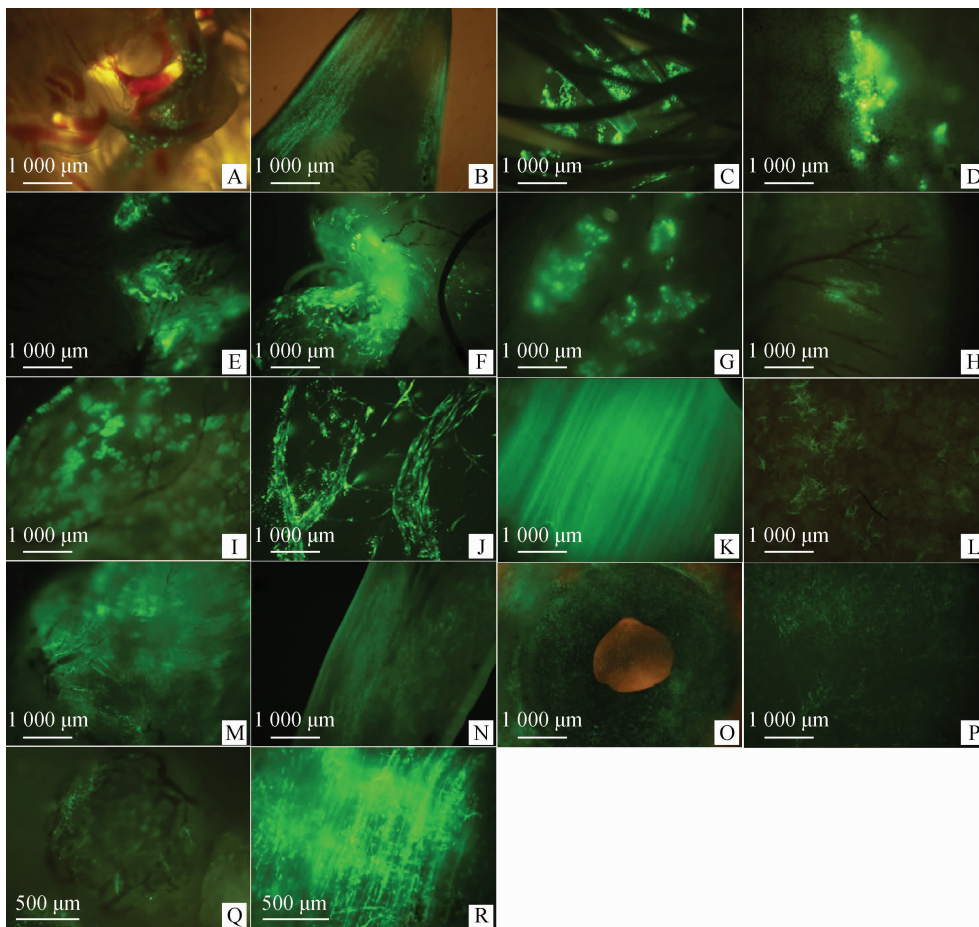
2 结果

2.1 胚胎血管显微注射慢病毒后孵化率统计

在进行正式试验之前,对病毒载体进行了浓度梯度注射试验,以便确定合适的剂量、滴度使试验达到预期最佳效果。从孵化率、发育到性成熟期的成活率及性腺中绿色荧光蛋白的表达强弱等指标,确立孵化温度为 37.5 °C,相对湿度 55%~65%,每隔 2 h 90°自动翻蛋,孵化 46~48 h,注射剂量 1 μ L,病毒滴度 1×10^9 TU \cdot mL $^{-1}$ 时试验综合效果最佳。病毒滴度过高,孵化率及成活率低;病毒滴度过低,性腺中绿色荧光蛋白的信号很弱。在该试验中,胚盘下腔显微注射体积 1 μ L、病毒滴度为 1×10^9 TU \cdot mL $^{-1}$ 鹌鹑种蛋 80 枚,孵化出雏 48 只,孵化率为 60%。

2.2 血管显微注射慢病毒早期绿色荧光蛋白基因表达的检测

在注射慢病毒后的 96 h 即胚胎孵化的第 6 天,对操作过的胚胎进行了随机解剖,在倒置荧光显微镜下对卵黄膜进行观察,结果显示:在随机抽检的胚胎中,全部生长发育正常,且在胚胎卵黄膜血管上观察到绿色荧光蛋白的表达(图 2A),说明在显微注射



A. 6 d 的胚胎卵黄膜; B. 喙部; C. 羽毛; D. 肝; E. 肾; F. 肠系膜; G. 腺胃; H. 小肠; I. 大肠; J. 血管; K. 胸肌; L. 脾; M. 心; N. 输卵管; O. 眼部; P. 大脑; Q. 卵泡; R. 骨骼肌

A. eGFP expression in the vitelline membrane of 6 day-old embryo; B. Beak; C. Feather; D. Liver; E. Kidney; F. Mesenterium; G. Glandular stomach; H. Small intestine; I. Large intestine; J. Blood vessel; K. Breast muscle; L. Spleen; M. Heart; N. Oviduct; O. Eye; P. Brain of newly hatched G0 quails; Q. The follicle of sexually matured G0 quail; R. The skeletal muscle of G0 progeny

图 2 血管微注射慢病毒载体嵌合体鹌鹑各组织中绿色荧光蛋白表达

Fig. 2 Expression of eGFP in tissues of hatched transgenic chimeric quail under the fluorescence microscopy. Lentiviral vector was injected into the blood vessels of embryos

体积 $1 \mu\text{L}$ 、病毒滴度为 $1 \times 10^9 \text{ TU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，对早期胚胎发育没有造成明显的不良影响，且慢病毒载体携带的外源基因没有出现基因沉默现象。

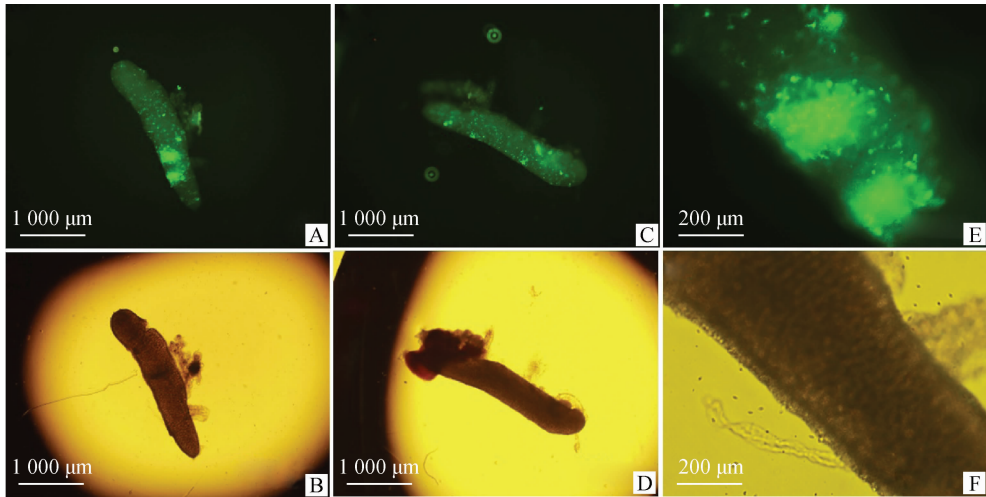
2.3 新生鹌鹑不同内脏组织器官中绿色荧光蛋白基因表达的检测

为了进一步验证慢病毒载体携带的外源基因是否能够持续表达，对试验组出雏 3 d 鹌鹑随机解剖后，将各组织脏器置于荧光显微镜下观察，结果显示：在新生鹌鹑的喙部、羽毛、肝、肾、肠系膜、腺胃、小肠、大肠、血管、胸肌、脾、心、输卵管、眼部、大脑、卵泡及骨骼肌均检测到绿色荧光的表达（图 2 B~R）。其中在眼部、心中的绿色荧光表达信号最强。另外，重点检测了性腺中绿色荧光蛋白的表达情况，

观察到性腺（睾丸）中的绿色荧光蛋白广泛性表达，说明在胚胎发育至 13~15 期，血管显微注射慢病毒颗粒感染了此时期血液循环中正在迁移的原始生殖细胞，并通过血液循环迁移到性腺，并在性腺中分裂、增殖（图 3）。

2.4 G0 代雄性鹌鹑精液、G1 代鹌鹑血液基因组的 PCR 及 Southern blot 检测

80 枚鹌鹑种蛋，孵化出雏 48 只，至性成熟阶段，用按压式采精法对雄性鹌鹑进行采精，取 21 只雄性鹌鹑的精液，提取基因组后进行 PCR 检测，其中 5 只个体精液基因组经 PCR 检测为阳性，阳性率为 23.8% (5/21)（图 4），初步判定这 5 只雄性鹌鹑的部分精子中携带有外源目的基因。针对 5 只阳性



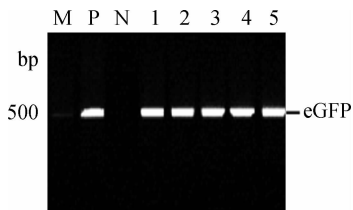
A. 出雏 3 d 雄性鹌鹑左侧睾丸的暗场;C. 出雏 3 d 雄性鹌鹑右侧睾丸的暗场;E. 放大后雄性鹌鹑睾丸的暗场;B、D、F. 3 d 雄性鹌鹑睾丸对应的明场

A. Left testis of a 3 day-old male quail (Dark-field);C. Right testis of 3 day-old male quail (Dark-field);E. Enlargement of part of the testis;B,D,F. Bright-field images

图 3 血管显微注射慢病毒载体后性腺中绿色荧光蛋白的表达

Fig. 3 Expression of eGFP in the gonads. Lentiviral vector was injected into the blood vessels of embryos

鹌鹑, 每只配对 3 只野生型雌性鹌鹑, 分单笼饲养, 每天收集产出的种蛋, 标记后进行孵化。对新出雏的 G1 代鹌鹑饲养一周后腿部静脉采血 10 μ L, 提取基因组后进行 PCR 检测, 在 5 只雄性鹌鹑的 46 只 G1 后代中, 有 6 只经 PCR 检测为阳性, 阳性率为 13.0%(6/46)(图 5A)。为了进一步验证试验结果, 对 6 只阳性个体进行了 Southern blot 检测, 杂交结果显示 6 只阳性个体均为转基因鹌鹑后代(图 5B), 说明在胚胎发育至 13~15 期血管显微注射慢病毒载体成功制备出转基因鹌鹑。



1~5. PCR 检测阳性个体;M. DNA 相对分子质量标准;P. 阳性对照;N. 阴性对照

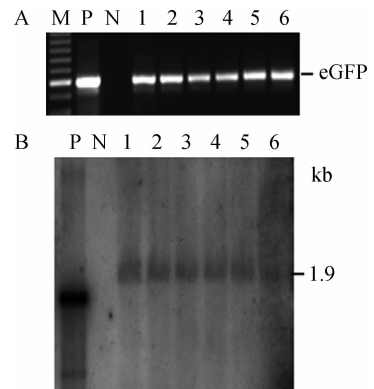
1-5. PCR products of sexually matured G0 males produced by microinjection under the subgerminal cavity of the blastoderm embryo;M. DNA markers;P. Positive control;N. Negative control without microinjection of lentiviral vector

图 4 G0 代雄性鹌鹑精液基因组 DNA 的 PCR 检测

Fig. 4 PCR analysis of genomic DNA extracted from semen of transgenic germ line chimeric(G0) quail

3 讨论

为了验证胚胎早期血管显微注射法的有效性,



A. PCR 检测。1~6. G1 代的 6 只阳性个体。M. DNA marker;P. 阳性对照;N. 阴性对照;B. 6 只阳性个体 G1 代血液基因组 DNA 的 Southern blot 检测,1~6. 血液基因组 DNA(10 μ g)经 *Pst* I 和 *Eco*R I 双酶切后用引物做探针杂交;P. 80 μ g 的 pGCL-eGFP 质粒;N. 未注射慢病毒鹌鹑血液基因组 DNA

A. PCR analysis. 1-6. The transgenic quails; M. DNA markers; P. Positive control; N. Negative control. B. Southern blot results. 1-6 indicate G1 transgenic quails 1-6 (as in A). Genomic DNA(10 μ g) was digested with *Pst* I and *Eco*R I and hybridized with the eGFP probe;P. 80 μ g of pGCL-eGFP vector;N. Negative control without injection of lentiviral vector

图 5 G1 代鹌鹑血液基因组 DNA 的 PCR(A)及 Southern blot(B)检测

Fig. 5 PCR and Southern blot analysis of genomic DNA from the blood of G1 transgenic quails

本试验选择了 eGFP 作为报告基因, 通过荧光显微镜下的观察可以直观、快速地检测到外源基因是否在受体表达。本试验中, eGFP 基因的表达是由

CMV 启动子驱动,通过荧光显微镜检测,在 G0 代新生鹌鹑的喙部、羽毛、肝、肾、肠系膜、腺胃、小肠、大肠、血管、胸肌、脾、心、输卵管、眼、大脑、卵泡及骨骼肌中都检测到了 *eGFP* 的表达(图 2)。特别是在胸肌、心及眼部观测到 *eGFP* 的广泛性表达(图 2)。这与 M. J. McGrew 等^[7]报道的结果不同:由 CMV 启动子驱动的 *eGFP* 在胰腺中阳性信号最强,在其它组织中只检测到很弱的阳性信号。这种 *eGFP* 表达的组织差异及强度差异可能是由于试验所使用的慢病毒载体不同造成的,本试验所使用的慢病毒载体中包含了 WRE 调控元件,WRE 是美洲旱獭肝炎病毒转录后调节元件,基因转录后 WRE 可以促进转录物出核,还可以通过上调初级转录物的多聚腺苷化来增加胞内信使核糖核酸的总量,最终提高外源基因的表达效率^[20-21]。而 M. J. McGrew 等^[7]所使用的慢病毒载体没有此元件。

本试验采取血管显微注射法将慢病毒载体导入胚胎早期的血液循环系统,目的是使注入的慢病毒颗粒感染此时期在血液中正在迁移的 PGCs。这种方法需要操作精细,技术条件要求较高。由于在注射时必须要在蛋壳上开一个小孔并剪开蛋壳膜,破坏了胚胎发育的正常结构,改变了蛋壳内外的压力平衡,容易造成胚胎血管与蛋壳的黏连,从而影响胚胎的正常发育。所以操作时需要显微注射操作熟练,尽量减少开口种蛋停放时间;另外在蛋壳上打孔面积越小越好,尽量降低对种蛋完整性的破坏,才能保证注射过种蛋孵化率达到 60% 以上,远高于周振明^[19]的胚胎血管注射试验的孵化率。目前报道较多的是通过胚盘下腔注射法导入病毒载体^[6-7,22-24],其胚胎孵化率为 10%~40%,仅有一组研究人员报道了使用胚胎期血管微注射的方法制备转基因禽类,其孵化率最高组可达 89%,平均孵化率为 63%^[25]。在本试验结果中,孵化率显然高于胚盘下腔注射法,相比 M. Kamihira 等^[26]血管注射法孵化率相近,结果是一致的。另外,有可能与 *eGFP* 在细胞内表达产生的毒性作用影响孵化率有关^[27],M. S. Kwon 等^[6]胚盘下腔显微注射携带 *eGFP* 的逆转录病毒载体,鸡胚孵化率仅为注射不含病毒液体组孵化率的 1/3 左右。从试验结果看,胚胎血管显微注射法与胚盘显微注射法相对胚胎发育的影响更小,胚胎孵化率高,在操作同样数量的种蛋时,能够获得更多的 G0 个体。

在本试验中,首先检测了 G0 代雄性鹌鹑精液

基因组 *eGFP* 的阳性率,在 21 只雄性鹌鹑中 5 个个体的精子基因组 DNA 经 PCR 检测为阳性,阳性率为 23.8%(5/21),与一些报道^[7,28-29]中的阳性率相比稍低,这可能与注射方式的不同以及慢病毒载体种类的不同有关。对 5 只阳性雄性鹌鹑测交 46 只后代检测,有 6 只经 PCR 及 Southern blot 检测为阳性,G1 代转基因的阳性率为 13%(6/46)(图 5)。根据 L. Pardanaud 等^[30]研究表明,鹌鹑第 X 期胚盘中仅有几个 PGCs,发育至 12~13 期时 PGCs 增加到 90 个左右,14~15 期胚胎血液中的 PGCs 数量达到最高值。说明在胚胎发育不同时期,PGCs 数目高低不同阶段注射慢病毒感染 PGCs 可以获取效果差异较大的转染效率,从而最终影响转基因效率。这也正是胚胎发育至 13~15 期血管显微注射慢病毒载体后孵化出的 G0 代新生个体性腺中(图 3)*eGFP* 基因广泛性表达的主要原因。

4 结 论

本研究将慢病毒载体通过血管微注射方法导入发育至 13~15 期的鹌鹑胚胎,感染血液循环中正在迁移的 PGCs,孵化后得到性系嵌合体,成功制备了转基因鹌鹑后代。今后需进一步完善血管微注射法导入慢病毒载体的方法,并通过检测转基因后代中外源基因表达情况,改进并设计输卵管特异性表达的慢病毒载体,为制备转基因禽类生物反应器提供新的方法。

参考文献(References):

- [1] PFEIFER A, IKAWA M, DAYN Y, et al. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4): 2140-2145.
- [2] KATZOURAKIS A, TRISTEM M, PYBUS O G, et al. Discovery and analysis of the first endogenous lentivirus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(15): 6261-6265.
- [3] CHAI N, CHANG H E, NICOLAS E, et al. Assembly of hepatitis B virus envelope proteins onto a lentivirus pseudotype that infects primary human hepatocytes[J]. *J Virol*, 2007, 81(20): 10897-10904.
- [4] PHILIPPE S, SARKIS C, BARKATS M, et al. Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression *in vitro* and *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(47):

- 17684-17689.
- [5] CLARK J, WHITELAW B. A future for transgenic livestock[J]. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(10):825-833.
- [6] KWON M S, KOO B C, CHOI B R, et al. Development of transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(2):442-448.
- [7] MCGREW M J, SHERMAN A, ELLARD F M, et al. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors[J]. *EMBO Rep*, 2004, 5(7):728-733.
- [8] CHAPMAN S C, LAWSON A, MACARTHUR W C, et al. Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector[J]. *Development*, 2005, 132(5):935-940.
- [9] SCOTT B B, LOIS C. Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(45):16443-16447.
- [10] LILLICO S G, SHERMAN A, MCGREW M J, et al. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(6):1771-1776.
- [11] KWON S C, CHOI J W, JANG H J, et al. Production of biofunctional recombinant human interleukin 1 receptor antagonist (rhIL1RN) from transgenic quail egg white[J]. *Biol Reprod*, 2010, 82(6):1057-1064.
- [12] KALINA J, SENIG F, MICÁKOVÁ A, et al. Retrovirus-mediated *in vitro* gene transfer into chicken male germ line cells[J]. *Reproduction*, 2007, 134(3):445-453.
- [13] MOTONO M, YAMADA Y, HATTORI Y, et al. Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector[J]. *J Biosci Bioeng*, 2010, 109(4):315-321.
- [14] LI H C, KANJI M, TAMAO O, et al. Population of circulating primordial germ cells in early Japanese quail embryos[J]. *J Poult Sci*, 2001, 38(2):175-180.
- [15] VAN DE LAVOIR M C, DIAMMOND J H, LEIGHTON P A, et al. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells[J]. *Nature*, 2006, 441(7094):766-769.
- [16] TOBA M, EBARA F, FURUTA H, et al. Introduction of DT40 cells into chick embryos[J]. *Asian J Androl*, 2001, 3(1):49-53.
- [17] WATANABE M, NAITO M, SASAKI E, et al. Liposome-mediated DNA transfer into chicken primordial germ cells *in vivo*[J]. *Mol Reprod Dev*, 1994, 38(3):268-274.
- [18] ONO T, MUTO S, MATSUMOTO T, et al. Gene transfer into circulating primordial germ cells of quail embryos[J]. *Exp Anim*, 1995, 44(4):275-278.
- [19] 周振明. 采用转染血液循环期原始生殖细胞方法和鸡-兔异种动物核移植方法制备转基因鸡[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- ZHOU Z M. Production of transgenic chicken by transfection of circulating PGCs and chicken-rabbit interspecies nuclear transfer[D]. Beijing: China Agricultural University, 2004. (in Chinese)
- [20] MORISE H, SHIMOMURA O, JOHNSON F H, et al. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*[J]. *Biochemistry*, 1974, 13(12):2656-2662.
- [21] DONELLO J E, LOEB J E, HOPE T J. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element[J]. *J Virol*, 1998, 72(6):5085-5092.
- [22] ZUFFEREY R, DONELLO J E, TRONO D, et al. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors[J]. *J Virol*, 1999, 73(4):2886-2892.
- [23] HARVEY A J, SPEKSNIJDER G, BAUGH L R, et al. Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(4):396-399.
- [24] MOZDZIAK P E, POPHAL S, BORWORNPINYO S, et al. Transgenic chickens expressing β -galactosidase hydrolyze lactose in the intestine[J]. *J Nutr*, 2003, 133(10):3076-3079.
- [25] KOO B C, KWON M S, CHOI B R, et al. Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector[J]. *FASEB J*, 2006, 20(13):2251-2260.
- [26] KAMIHIRA M, ONO K, ESAKA K, et al. High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector[J]. *J Virol*, 2005, 79(17):10864-10874.
- [27] PERRY A C, WAKAYAMA T, KISHIKAWA H, et al. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection[J]. *Science*, 1999, 284(5417):1180-1183.
- [28] SWARTZ W J. Acid and alkaline phosphatase activity in migrating primordial germ cells of the early chick embryo[J]. *Anat Rec*, 1982, 202(3):379-385.
- [29] JALLAT S, PERRAUD F, DALEMANS M, et al. Characterization of recombinant human factor IX expressed in transgenic mice and in derived trans-immortalized hepatic cell lines[J]. *EMBO J*, 1990, 9(10):3295-3301.
- [30] PARDANAUD L, BUCK C, DIETERLEN-LIÈVRE F. Early germ cells segregation and distribution in the quail blastodisc[J]. *Cell Differ*, 1987, 22(1):47-59.