

通过睾丸内注射转染外源 DNA 在小鼠精子的表达

谢 畅 于明举 惠 楠 王岭斌 李文杰 赵永聚*

(西南大学动物科技学院 重庆市牧草与草食家畜重点实验室 重庆 400716)

摘要:为研究睾丸内注射外源 DNA 法生产转基因小鼠 (*Mus musculus*) 的可行性,并探讨注射 DNA 的最佳浓度。将环形的质粒 DNA pEGFP-N₁ 与脂质体混合制备 DNA-脂质体复合物,按 DNA 浓度不同分为 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 和 0.24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 3 组,分别注射入成年 SPF 级昆明小鼠睾丸内,同时设空白对照;每组处理小鼠 2 只,注射 5 d 后每只与 3 只成年母鼠同笼,20 d 后在荧光显微镜下检测小鼠附睾精子,并制作睾丸石蜡切片,检测绿色荧光蛋白 (GFP) 的表达;PCR 法检测各组后代阳性率。结果显示,3 组小鼠附睾荧光精子比例分别为 9.09%、47.06% 和 27.78%。3 组小鼠的睾丸石蜡切片中均可看到不同程度的 GFP 表达。后代经 PCR 检测阳性率分别为 17.26%、47.61% 和 22.11%。本实验证实了睾丸注射法能使外源 DNA 整合进入精子基因组,并能在自身和后代中得到表达,本研究中外源 DNA 注射浓度以 0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 效果为最佳。

关键词:pEGFP; 睾丸注射; 精子介导基因转移; 转基因小鼠

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2010)02-151-07

Testis Injection of Exogenous DNA Results in Expression in Mouse Sperm

XIE Chang YU Ming-Ju HUI Nan WANG Ling-Bin LI Wen-Jie ZHAO Yong-Ju*

(College of Animal Science and Technology, Chongqing Key Laboratory of Forage & Herbivore,
Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: The aim of this study is to produce transgenic mice by testis-mediated gene transfer and investigate the suitable concentration of exogenous DNA for injection. A total of six SPF KM male mice were divided into three groups and liposome-treated exogenous DNA was directly injected into testis at three different concentrations: 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ and 0.24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, respectively. Every treated mouse was naturally mated with 3 female mice on the 5th day after the injection. The spermatozoa were detected on the 20th day after injection under the fluorescence microscope, and mouse testicular paraffin sections were prepared for detection of green fluorescent protein (GFP) expression under fluorescence microscope. The integration of pEGFP-N₁ in the F1 was determined by PCR. The results showed that the proportion of fluorescent sperm in 3 groups were 9.09%, 47.06% and 27.78% respectively. Expression of GFP in different degrees was also found in three groups of paraffin sections. The PCR positive rates of offspring were 17.26%, 47.61% and 22.11%, respectively. It is concluded that the transgenic mouse could be produced by direct injection of foreign DNA into mouse testis, and 0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ was the suitable concentration of exogenous DNA for injection in this study.

Key words: pEGFP; Testis injection; SMGT; Transgenic mice

基金项目 国家科技重大专项项目 (No. 2008ZX08008-004), 国家自然科学基金项目 (No. 30600430);

* 通讯作者, E-mail: zyongju@163.com;

第一作者介绍 谢畅, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物遗传育种与繁殖; E-mail: xiechang_sd@163.com。

收稿日期: 2009-09-10, 修回日期: 2009-12-28

精子介导基因转移 (sperm-mediated gene transfer, SMGT) 是目前获得转基因动物简单而高效的方法之一,其原理是精子具有主动结合、转运、整合外源 DNA 的能力,并可在受精时导入卵母细胞,进而获得转基因动物^[1]。睾丸注射法作为 SMGT 的一种,是将外源目的基因直接注入动物睾丸内,使之与精子染色体进行整合,然后通过自然交配、人工授精、胞浆内注射等多种途径使外源目的基因进入胚胎,获得转基因动物。此法避免了精子与外源 DNA 共孵育时精浆的抑制作用,无需复杂的体外处理过程,而且耗费小、操作简便,是近年来颇受关注的一种方法^[1-2]。

自 1997 年 Kim 等^[3]率先使用睾丸注射法后,其他实验室也相继用此法生产转基因动物。1999 年 Farre 等进行猪 (*Sus domestica*) 睾丸内转染,得到 47% 的阳性精子和 22% 的阳性胚胎^[4];2002 年沈新明等应用此法获得了 34.8% 的转基因阳性小鼠 (*Mus musculus*)^[5];2005 年李福兵等通过山羊 (*Capra hircus*) 双侧睾丸注射 GFP 质粒,得到了 66.7% 的阳性胚胎^[6];2006 年肖红卫等获得了 4.3% 的转基因阳性猪^[7]。虽然以上研究取得了一定成果,但不同实验室报道的结果存在较大差异,且一般没有产生存活的转基因后代。另外,睾丸注射法体系目前尚不稳定,诸如实验动物的选择、外源 DNA 浓度、注射时间及部位,是否需要脂质体介导等都有待于进一步研究。

本实验以 SPF 级成年昆明小鼠为研究对象,按脂质体 (μl) 与 DNA (μg) 为 3:1 的比例配制不同 DNA 浓度的注射液,探讨注射不同浓度的外源 DNA 对转染效率的影响,优化睾丸内注射操作方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年 SPF 级昆明小鼠,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 药品试剂 pEGFP-N₁ 质粒为本实验室保存, Lipofectamine™ 2000 购于 Invitrogen 公

司。质粒小量提取试剂盒购于 V gene 公司, Marker DL2000 Plus 购于北京全式金公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 DNA-脂质体混合物的制备 pEGFP-N₁ 转化大肠杆菌 DH5 α , 卡那霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 筛选阳性菌落, LB 培养基扩大培养, 用质粒提取试剂盒提取 pEGFP-N₁ 质粒, 测定浓度为 2.1 ~ 2.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。脂质体 (μl) 与质粒 (μg) 比例为 3:1, 按 Lipofectamin Reagent 说明书进行混合孵浴。各试剂具体剂量见表 1。

1.2.2 睾丸内注射质粒 DNA 用眼科手术刀于阴囊开一小口, 将单侧睾丸通过开口裸露于体外, 用微量注射器吸取相应剂量 (表 1) 的试剂, 穿过附睾头刺入睾丸实质 5 ~ 6 mm, 将试剂缓缓注射入相应组别小鼠的睾丸; 对另一侧睾丸进行相同操作。

1.2.3 F1 代鼠的产生 将处理过的公鼠单独饲养 5 d 后, 于 2008 年 12 月 14 日每只公鼠分别与 3 只成年健康空怀母鼠同笼; 见阴道栓者, 分笼继续饲养, 于 2009 年 1 月 1 ~ 3 日获得各实验组及对照组 F1 代小鼠。

1.2.4 转染效果检测 睾丸注射后 20 d, 取公鼠两侧附睾, 剪碎, 加入 1 ml PBS, 室温放置 10 min, 使其中的精游离出来; 吸取 10 μl 抹片, 自然风干; 荧光显微镜 488 nm 激发波长观察精子绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的表达情况。取睾丸组织做常规石蜡包埋, 然后对切片进行脱蜡, 水化; 用 EDTA (pH 9.0) 进行 92 ~ 98℃ 的抗原热修复, 用缓冲甘油 (pH 9.5) 进行封片; 荧光显微镜观察 GFP 在睾丸中的表达情况。

1.2.5 F1 代鼠 pEGFP-N₁ 质粒 PCR 检测 剪取 5 ~ 10 日龄小鼠的尾巴 0.5 ~ 1.0 cm, 按酚-氯仿法提取基因组 DNA。pEGFP-N₁ 上游引物为 5'-ACGGCCACAAGTTCAGC-3', 下游引物为 3'-CGTCGCCGATGGGTGGTGTCT-5', 由上海英骏生物技术有限公司合成, 理论扩增片段长度为 507 bp。取 1.5 μl DNA 制备总体积为 25 μl 的 PCR 反应体系: 1.5 μl 模板 DNA、2.5 μl

10 × buffer (包含 15 mmol/L $MgCl_2$)、1 μ l 10 pmol/L 引物、2 μ l 2.5 mmol/L dNTP、0.5 μ l *Taq* 酶 (5 U/ μ l) ,加灭菌双蒸水至 25 μ l。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min;进入循环 (94℃ 45 s、60℃ 45 s、72℃ 75 s) ,35 次循环;72℃ 延伸 10 min、4℃ 保存。70 V 电压,电泳 45 min,凝胶成像系统成像。

1.3 统计方法 荧光显微镜下的荧光精子数与普通光下精子数的比值为荧光精子比例;用

SPSS for Windows 13.0 对 PCR 结果进行统计分析。

2 结 果

2.1 睾丸注射后精子 GFP 的表达检测结果 3 组小鼠精液抹片中均能看到荧光精子,其中低、中、高浓度注射组的小鼠附睾精子显示荧光比例分别为 9.09%、47.06% 和 27.78% ,对照组未观察到荧光精子 (图 1)。

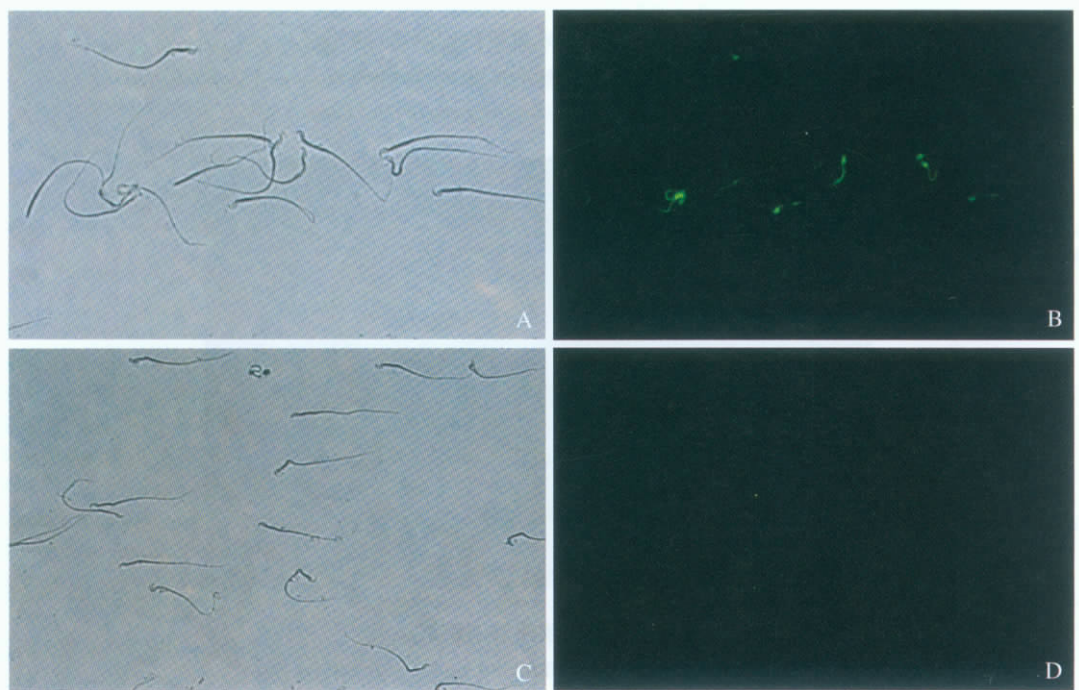


图 1 光镜和荧光显微镜下的精子 (200 ×)

Fig.1 Spermatozoa transfected with pEGFP-N1 under light- and fluorescence-microscope at 20 d

A:光镜 (实验组); B:荧光显微镜 (实验组); C:光镜 (对照组); D:荧光显微镜 (对照组)。

A:Light microscope (Test group); B:Fluorescence microscope (Test group); C:Light microscope (Control group);

D:Fluorescence microscope (Control group)。

2.2 睾丸注射后睾丸 GFP 荧光检测 荧光显微镜下可以看到 3 个实验组小鼠睾丸组织均有绿色荧光蛋白表达,间质细胞、精原细胞、精子等部位绿色荧光蛋白明亮,表达量较高,在精母细胞和精细胞中也有表达,但量较少 (图 2);3 组相比,中浓度组的小鼠睾丸荧光强度略高于低、高浓度组。

2.3 F1 代转基因小鼠检测 将 F1 代小鼠置

于紫外灯下检测,未发现荧光 (图 3)。通过引物对 F1 代进行 PCR,检测基因的整合,结果见图 4。第 1~6 泳道 (琼脂糖凝胶):与 DNA 分子量标准对照,1、2、4、5、6 泳道中的片段大小位于 500 bp 下方,产物长度约为 507 bp,与目的片段大小一致,判断为转基因阳性;3 泳道中未发现与目的条带大小相似的片段,判断为转基因阴性。

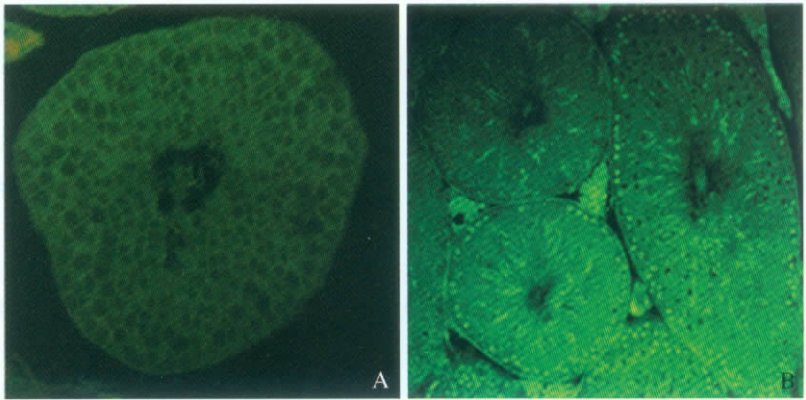


图 2 GFP 在小鼠睾丸组织中的表达 (200 ×)

Fig. 2 GFP expression in mouse testis

A:对照组;B:实验组。A:Control group;B:Test group.



图 3 F1 小鼠紫外灯下拍照结果

Fig. 3 The photo of F1 offspring under ultraviolet light

2.4 公鼠的交配和受精能力 公鼠和母鼠合笼 7 d 后,若母鼠没有怀孕,则认为公鼠没有正常的交配和受精能力。本实验显示,注射后的公鼠能使母鼠受孕,各组母鼠受孕数见表 1,表明小鼠睾丸注射后性欲和交配能力没有受到明显影响。

2.5 睾丸注射法建立 EGFP 转基因小鼠结果

用 SPSS for Windows 13.0 统计分析 F1 代中 PCR 扩增检测 pEGFP-N₁ 的阳性率。结果显示中浓度组阳性率最高(表 1)。

3 讨 论

3.1 睾丸注射法生产转基因鼠的可行性 辜

丸介导的基因转移就是将外源 DNA 直接注射到雄性动物睾丸内,转染各个发生阶段的精子细胞,转染精子经体内成熟后采用自然交配或人工授精获得转基因动物。这是一项曾经让人振奋同时又备受质疑的技术。让人振奋的是 Kim 等^[3]、Muramastu 等^[8]和 Yamazaki 等^[9]通过睾丸注射外源基因的研究证实了在精子发生过程中能整合外源基因,并且 Yamazaki 等^[9]发现有一群分化的生精细胞在转染 2 个月后仍能表达外源基因。但 Yamazaki 等^[9]在后续的实验通过小鼠曲细精管注射外源基因和体内电穿孔 10 d 后进行自然交配,结果不能从交配所得的后代精子中检测出外源基因的表达。

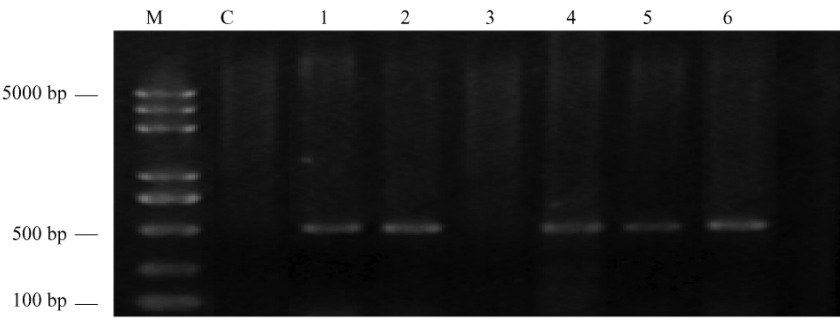


图 4 F1 小鼠基因组 PCR 检测结果

Fig. 4 The results of genomic DNA PCR test

M. DL2000 Plus DNA 分子量标准; C. 对照; 1、2、4、5、6 为实验组阳性 PCR 结果; 3 为实验组阴性 PCR 结果。
M:DL2000 Plus DNA marker; C:Control group; 1 2 4 5 6:Positive PCR product; 3:Negative PCR product.

表 1 睾丸内注射法转基因小鼠试验设计和结果

Table 1 The experimental design and results

	低浓度组	中浓度组	高浓度组	对照组
	Low concentration group	Middle concentration group	High concentration group	Control group
注射剂量 Injection dose (μl)	50	50	50	50
质粒 Plasmid (μg)	4	6	12	0
脂质体 Liposome volume (μl)	12	18	36	0
处理公鼠数 No. of male mice	2	2	2	2
与配母鼠数 No. of female mice	6	6	6	6
受孕母鼠数 No. of pregnant	4	5	3	5
F1 代小鼠数 No. of offspring	52	61	38	59
PCR 阳性数 No. of PCR positive	9	29	8	0
PCR 阳性率 Rate of PCR positive (%)	17. 26	47. 61	22. 11	0

因此 ,Yamazaki 等^[9]认为睾丸内直接注射外源基因可能不能用于制备转基因动物 ,或需要其他方法辅助。但这种说法并没有让众多研究者气馁 ,反而出现更多的实验室来尝试和验证此项技术。Farre^[4]行睾丸体内转染 ,得到 47% 的精子阳性率和 22% 的猪胚胎表达阳性率; Sato^[10]利用睾丸注射成功制备转基因小鼠 ,基因从 F0 传到 F2 代 ,并建立了转基因小鼠品系; Yonezawa 等^[11]等利用脂质体包裹的外源基因注射入大鼠 (*Rattus norvegicus*) 睾丸内 ,受精后的桑葚胚 80% 表达 EGFP ,后代经 PCR 和 Southern blotting 检测出阳性鼠; Huang 等^[12]行曲细精管注射 ,从精液中筛选表达报告基因的精子行卵胞浆注射 (intracytoplasmic sperm injection , ICSI) ,出生的 4 只小鼠全部是转基因

鼠;赵君等^[13]以逆病毒载体行小鼠睾丸内注射 ,得到 1 只转基因 (tPA) 后代;沈新明等^[5]等采用曲细精管微注射法生产绿色荧光蛋白转基因小鼠 ,共获仔数 382 只 ,PCR 检测阳性小鼠 133 只 ,Southern blotting 分析阳性为 15 只;高华颖等^[14]将脂质体包裹的重组质粒 PLNCXHCF 注射到兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 睾丸中 ,得到 85% 的转基因仔兔 (11/13) 。以上的这些研究结果均证实了睾丸或曲细精管注射外源基因生产转基因动物的方法是可行的。对于阴阳性结果之间和阳性率数据之间的差异 ,一些实验室解释为是由于实验条件、技术方法及供体动物选择的差异所致^[15]。

本研究组采用脂质体介导转染雄性生殖细胞的方法 ,然后通过自然交配 ,从而获得转基因

后代。为了比较外源 DNA 的浓度对转染效率的影响,按脂质体(μl)与 DNA(μg)为 3:1 的比例分别配制了 DNA 浓度为 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 和 0.24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的注射液。结果显示,0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的注射液的转染效率最高,后代经 PCR 检测阳性率达 47.61%。对于 DNA 的浓度,Sciamanna 等^[16]有过类似的报道,其用小鼠和猪进行实验,将射出的精子分别与不同浓度的携带有外源 DNA 的两种质粒进行孵育,然后分别进行人工授精,发现质粒诱导死亡在小鼠和猪上均是由 DNA 的浓度引起。最高的 DNA 浓度(500 ng/ 10^6 个精子)会导致大量的胚胎死亡,而较低 DNA 浓度则和胚胎的发育相适应。马百超等^[17]研究表明目的基因剂量越多,转染的细胞数量也越多,但是浓度过高时,过量的 DNA 或脂质体沉积于细胞表面,会对细胞造成诸如细胞收缩,有丝分裂减少等一些毒性作用。在探索外源基因较适浓度的同时,本研究也观察到了行体内转染后外源基因对精子发生的影响。印证了雄体内转染后的生殖细胞在相当长的时间内能够保持受精能力的报道^[18-19]。在注射后 20 d,取小鼠睾丸制备石蜡切片,在荧光显微镜下仍能看到大量的处于不同分化阶段的生精细胞,精原细胞部位绿色荧光蛋白亮度较强,可随着精子发生周期的循环,将外源基因传递给精子,并且精子的活力和受精能力均不受影响^[20]。

3.2 外源 DNA 体内转染时脂质体的作用

研究表明,精子受到外源 DNA 侵入时,大量核酸酶被激活,不仅导致外源 DNA 的降解,同时还能导致精子染色体 DNA 的降解,最终引起精细胞的程序性死亡。根据细胞转化的原理,Brachiller 等^[21]于 1991 年首次将脂质体应用到精子介导法生产转基因动物中。其后,Rottman 等^[22]也利用脂质体对精子载体法进行了改进,外源 DNA 在与免精子混合培养之前先用脂质体包裹,脂质体自发地与 DNA 相互作用而形成 DNA-脂质体复合物。脂质体膜和精子质膜因相似而相融合,并且避免了 DNA 与细胞膜直接相互作用而引起的凋亡级联反应,大大提高了

外源基因的转染效率。应用这种改良的精子载体法在转基因鸡(*Gallus gallus*)生产上获得满意的结果^[23]。Nakinishi 等^[24]使用电穿孔法和脂质体介导生产转基因鸡,证明电穿孔效率较低,脂质体介导效率最高。脂质体与 DNA 的比例对转染的效率起着决定性作用。不适的比例会造成转染低下或对细胞造成一定的毒性。马百超等^[17]采用 DNA 延滞实验观察阳离子脂质体与 DNA 的结合能力,然后进行细胞转染实验研究脂质体的转染效率,结果表明,Lipofectamine 2000 与 DNA 有很强的结合力;与 DNA 质量比为 3:1 时转染效率最高,为 72%;对细胞的毒性较小,在最佳转染剂量时,细胞存活率在 75% 以上。

3.3 睾丸内注射制备转基因动物的优势 在以往的 SMGT 中,精子转染外源基因的操作都是在体外进行,比如说将精子直接或间接与外源 DNA 共孵育,利用电穿孔法协助 DNA 进入精子等。但是在哺乳动物中进行的所有实验均已清楚地表明,其精浆中存在一种拮抗 DNA 结合的抑制因子(inhibitory factor, IF-1),只有通过冷冻-加热处理或用洗涤剂处理的方法把精浆彻底去除,精子才能吸收 DNA。电穿孔则是利用高电场暂时性地破坏精子质膜,从而使外源 DNA 比较容易地进入细胞核内,多用于鱼类和鸡。相对于精子直接与外源 DNA 共孵育方法而言,一般能将精子对外源 DNA 的携带率提高 10%~15%。但 Nakinishi 等^[24]对鸡的研究结果表明,电穿孔法会过早的引起精子顶体的损坏,虽然对精子的活力影响不大,但受精率却明显下降。考虑到体外精子载体法会对精子造成一定的损伤,并且转染效率较低,一些学者探究在精子发生及成熟部位进行体内精子转染外源基因,体内精子载体法介导基因转移可以弥补体外精子载体法的部分不足。

体内精子载体法只需注射、交配、检测 3 个步骤,简单方便,便于推广。目前应用较多的是睾丸注射或曲细精管注射,其特点是通过注射外源 DNA 转染精原细胞或其他生精细胞,随着精子发生周期的循环,可连续不断地获得携带

外源 DNA 的精子。转染后的精子可在附睾内成熟,经过生理状态的调整,其活力与未转染精子相同,Villuendas 等^[20]研究已经证实了这一观点。另外,睾丸注射后转染精子在数量上较体外孵育法多,并且此项操作对卵原核无损害,符合生理受精过程,所以最终获得转基因动物的几率也会增多。Kim 等^[3]将脂质体包裹后的外源 DNA 注射到猪睾丸组织内,获得的阳性精子率高于体外孵育及电穿孔等方法。

3.4 今后需继续开展的研究工作 本论文探讨了睾丸内注射外源 DNA 法生产转基因小鼠的可行性,并探讨注射 DNA 的最佳浓度。由于时间关系,本研究只用 PCR 方法检测了转基因小鼠,今后应对转基因 F1 作进一步的检测,并检测外源基因的传代情况。

参 考 文 献

- [1] Wall R J. New gene transfer methods. *Theriogenology*, 2002, 57(1): 189–201.
- [2] 赵永聚. 精子因素对精子载体法制备转基因山羊的影响. *动物学杂志*, 2009, 44(3): 141–145.
- [3] Kim J H, Jung-Ha H S, Lee H T, et al. Development of a positive method for male stem cell-mediated, gene transfer in mouse and pig. *Mol Reprod Dev*, 1998, 46(4): 515–526.
- [4] Farre L, Rigau T, Mogas T, et al. Adenovirus-mediated introduction of DNA into pig sperm and offspring. *Mol Reprod Dev*, 1999, 53(2): 149–158.
- [5] 沈新明, 乔贵林, 张玲, 等. 用曲细精管微注射法建立绿色荧光蛋白转基因小鼠. *第一军医大学学报*, 2002, 22(3): 250–253.
- [6] 李福兵, 魏泓, 孙新民, 等. 睾丸内注射 pEGFP-N₁ 体内转染精子并在山羊早期胚胎成功表达. *中国实验动物学报*, 2005, 13(2): 110–113.
- [7] 肖红卫, 郑新民, 陈思怀, 等. 精子介导生产转 *hCD 59* 基因猪. *华中农业大学学报*, 2006, 25(2): 170–173.
- [8] Muramatsu T, Shibata O, Ryoki S, et al. Foreign gene expression in the mouse testis by localized *in vivo* gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 233: 45–49.
- [9] Yamazaki Y, Yagi T, Ozaki T, et al. *In vivo* gene transfer to mouse spermatogenic cells using green fluorescent protein as a marker. *Exp Zool*, 2000, 286(2): 212–218.
- [10] Sato M. Testis-mediated gene transfer (TMGT) in mice: successful transmission of introduced DNA from F0 to F2 generations. *Transgenics*, 1999, 3: 11–22.
- [11] Yonezawa T, Furuhashi Y, Hirabayashi K, et al. Detection of transgene in progeny at different development stages following testis-mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60(2): 196–201.
- [12] Huang Z, Tamura M, Sakurai T, et al. *In vivo* transfection of testicular germ cells and transgenesis by using the mitochondrially localized jellyfish fluorescent protein gene. *FEBS Letters*, 2000, 487(2): 248–251.
- [13] 赵君, 乔桂林, 赖良学, 等. 精子睾丸内转染生产转基因小鼠的研究. *中国兽医学报*, 2001, 22: 288–301.
- [14] 高华颖, 曹阳, 李世辉, 等. 精子介导转基因动物的制备. *遗传*, 2003, 25(3): 283–290.
- [15] Smith K R. Sperm cell mediated transgenesis: a review. *Anim Biotechnology*, 1999, (10): 1–13.
- [16] Sciamanna I, Piccoli S, Barberi L, et al. DNA dose and sequence dependence in sperm-mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev*, 2000, 56: 301–305.
- [17] 马百超, 张树彪, 段艳, 等. 细胞种类对阳离子脂质体介导基因转染的影响. *安徽农业科学*, 2008, 36(14): 5779–5781.
- [18] Yamazaki Y, Fujimoto H, Ando H, et al. *In vivo* gene transfer to mouse spermatogenic cells by deoxy ribonucleic acid injection into seminiferous tubules and subsequent electroporation. *Biology of Reproduction*, 1998, 59: 1439–1444.
- [19] Cao Y, Li Q, Yuan X, et al. Cloning of human lactoferritin gene and construction of expression vector. *Journal of Dalian University of Technology*, 2000, 40(6): 696–701.
- [20] Villuendas G, Gurierrez A, Jimenez A, et al. 1MV-driven expression of green fluorescent protein in male germ cells of transgenic mice and its effect on fertility. *International Journal of Andrology*, 2001, 24(5): 300–305.
- [21] Brachiller D, Schellander K, Peli J. Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells. *Mol Reprod Dev*, 1991, 30: 194–200.
- [22] Rottmann O J, Antes R, Hofer P, et al. Liposome mediated gene transfer via spermatozoa into avian egg cells. *J Anim Breed Genet*, 1992, 109: 64–70.
- [23] 李碧春, 钱菊汾. 精子介导外源 DNA 转移的研究进展. *动物医学进展*, 2000, 21(4): 13–17.
- [24] Nakanishi A, Iritani A. Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods. *Mol Reprod*, 1993, 36(2): 258–261.