动 物 学 研 究 2011，Dec. 32(6): 617−623 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.06617

体细胞核移植生产绵羊转 h*ALR* 基因囊胚

马玉珍[1,2,*], 任 宇[2], 周雪原[2], 刘东军[2], 旭日干[2]

(1. 内蒙古自治区人民医院, 呼和浩特 010017; 2. 内蒙古大学 哺乳动物繁殖生物学与生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010017)

摘要：扩增人肝细胞再生增强因子(human augmenter of liver regeneration, *ALR*)基因, 利用质粒 pIRES$_2$-EGFP 构建新霉素(Neo)、增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein, EGFP)双标记基因且 EGFP 和 *ALR* 基因为双顺反子的真核表达载体。LipofectAMINE^{TM} 介导其转染体外培养的绵羊胎儿成纤维细胞(sheep fetal fibroblast cells, sFFCs); 经 G418 筛选转基因细胞; 激光共聚焦显微镜挑选绿色荧光单克隆细胞。PCR、RT-PCR 和免疫组织化学方法进一步检测 *ALR* 基因及其表达; 稳定表达外源基因的 sFFCs 作供体, 移入去核的绵羊卵母细胞中, 进行体细胞核移植。通过激光共聚焦显微镜和 *ALR* 抗体检测 EGFP、*ALR* 基因在胚胎水平上的表达，其结果表明：由 IRES 连接的 EGFP 和 *ALR* 基因可在绵羊胎儿成纤维细胞内同时表达，由此细胞核移植产生的转基因胚胎在发育的各阶段均可见绿色荧光; 囊胚中所有细胞表达 EGFP 基因; 发绿色荧光的胚胎中 *ALR* 基因同时存在。因此，由 IRES 连接标记基因和目的基因, 以标记基因指示目的基因的表达, 可简化检测目的基因的繁琐手段; 用筛选的转基因早期胚胎进行移植, 可提高制备转基因动物的效率。

关键词：绵羊; 转基因; 体细胞; 核移植
中图分类号：Q813; S826.2; Q291 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2011)06-0617-07

Production of transgenic embryos through nuclear transfer using ovine fetal fibroblasts transferred with foreign genes

MA Yu-Zhen[1,2,*], REN Yu[2], ZHOU Xue-Yuan[2], LIU Dong-Jun[2], XU Ri-Gan[2]

(1. *Inner Mongolia Hospital, Hohhot,* 010017*, China,* 2. *Key Laboratory of Ministry of Education of China for Mammal Reproduction Biology and Biotechnology of Inner Mongolia University, Huhhot* 010021*, China)*

Abstract: Human *ALR* gene sequence was amplified by PCR from human total DNA and inserted into pIRES$_2$-EGFP vector. The bicistronic eukaryotic expression vector, pIRES-EGFP/*ALR*, expressing EGFP, Neo^r and *ALR* genes was constructed. Sheep fetal fibroblast cells (sEFCs) were transfected with pIRES-EGFP/*ALR* by the induction of lipofectAMINE^{TM}. The positive cell clones were selected with medium containing G418 (800 μg/mL). The fluorescence of transgenic cells was examined with a confocal laser scanning microscope. The expression of *ALR* gene was tested by PCR, RT-PCR and immuno-histochemical staining. The transgenic cells were used as donors for nuclear transfer to enucleated ovine oocytes. Transgenic embryos were tested by confocal laser scanning microscope and immuno-histochemical staining. Results showed that the EGFP and *ALR* genes linked with IRES were coexpressed simultaneously in sFFCs; the blastocysts formed by nuclear transfer using tranfected donor cells are all transgenic blastocysts. EGFP, *ALR* and Neo^r gene were all expressed in the transgenic embryos. In conclusion that a method to construct the positive embryos before pre-implantation which stably express *ALR* gene by the indication of EGFP expression has been successfully established. The application of this method can simplify the procedure of testing the targets and contribute to the efficiency increasing of transgenic domestic animal production.

Key words: Sheep; Transgenic; Somatic cells; Nuclear transfer

1997 年 Wilmut et al (1997)利用核移植技术, 成功的克隆了绵羊(*Ovis aries*)Dolly, 促进了体细胞基因转移和克隆技术的结合, 利用这一技术 1997 年英国的 PPL Therapeutics 公司和罗斯林研究所的科学家率先培育出表达人凝血因子Ⅸ(FⅨ)的转基因克隆绵羊(Schnieke et al, 1997), 但是用该方法研

收稿日期：2011-07-11；接受日期：2011-10-08
基金项目：国家自然科学基金项目“间隙连接蛋白在绵羊胚胎发育过程中的功能研究”资助（30660123）
*通讯作者(Corresponding author)，Tel/Fax: +86-0471-6619236; E-mail: mayz@imnu.edu.cn

制的转基因绵羊具有 Neo 抗性基因存在和表达, 以及目的基因 FⅨ缺失或不表达等问题。鉴于由脊髓灰质炎病毒内部核糖体进入位点 IRES(Internal ribosome entry site)连接的两个不同的基因可以共同转录、各自翻译。本实验构建了荧光蛋白、新霉素基因双标记选择载体, 并且利用 IRES 将增强绿色荧光蛋白基因(Enhanced green fluoresceng protein, EGFP) 与目的基因人肝细胞再生增强因子 h*ALR*(human Augmenter of liver regeneration, *ALR*) 连接, 构建成 EGFP、*ALR* 双顺反子真核表达载体; 探讨 EGFP 和 *ALR* 基因在细胞水平上共表达的概率和可行性，并且将转基因细胞进行核移植, 实现在胚胎水平上通过绿色荧光筛选转基因阳性胚胎的目的。Kato et al (1999)研究表明, 用表达 EGFP 的小鼠胚胎移植产生的后代中, 77%为 EGFP 阳性。因此，在细胞和胚胎水平上对转基因动物进行筛选, 可减少移植的盲目性、节约代孕母畜、降低成本, 对于提高转基因动物效率具有非常重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

人血液来自内蒙古中心血站。质粒 pIRES$_2$-EGFP 购自 Clontech 公司, 质粒提取纯化试剂盒购自 Promega 公司。RNA 提取试剂盒、SuperScipt^{TM} first-strand synthesis system、细胞培养液 DMEM、G418、PBS 粉、Lipofectamine^{TM} 等购自 Gibco BRL 公司。 限制性内切酶和 T_4 连接酶购自华美生物工程公司。鼠抗人 ALR 单克隆抗体 IC_3 由解放军军事医学科学院放射二所惠赠。免疫组化试剂盒购自迈新生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 pIRES2-EGFP/*ALR* 双顺反子真核表达载体的构建 根据 GeneBank 数据库 *ALR* 基因组序列设计引物(P1: 5′- *AGAGACGTGGATGCGGACG* -3′/P2: 5′- *GACTGGCTGTGATGCACTTTAA* -3′), 预期产物为 1 786 bp。 利用淋巴细胞分离液梯度离心分离人血液白细胞, 提取总 DNA 为模板, PCR 扩增 *ALR* 基因。反应体系(1×反应缓冲液、1 mmol/L dNTP、0.5 μmol/L 上下游引物、1.5 mmol/L $MgCl_2$、1 U Taq 酶、100 ng DNA 模板)总体积为 25 μL。反应条件为：94 ℃预变性 3 min 后进入循环, 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 40 s, 72 ℃ 2 min, 30 个循环, 反应结束后 72 ℃延伸 7 min。扩增产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳分析。用胶回收试剂盒回收目的片断, 连接于 T 载体, DNA 测序确定目的基因 *ALR* 的序列, 测序正确的质粒经 SalI 和 EcoRI 酶切回收 *ALR* 片段, 定向连入由相同酶切的 pIRES$_2$-EGFP 质粒的多克隆位点中, PCR 和酶切检测载体构建是否正确。AflⅡ酶切使质粒 pAIE 线性化, 试剂盒纯化回收线性化的质粒, 溶于灭菌超纯水中, 用于转基因。

1.2.2 绵羊胎儿成纤维细胞转基因及阳性克隆筛选

取冷冻保存第 3 代根据性别基因判断为雌性的绵羊胎儿成纤维细胞(Sheep fetal fibroblast cells, sFFCs), 复温培养。Lipofectamine^{TM} 用于把 pIRES2-EGFP/*ALR* 转入 sFFCs, 转基因步骤参见说明书。为了获得稳定的转染子, 转染后的 sFFCs 在含 800 μg/mLG418 的 DMEM 培养液持续筛选 14 d。抗性克隆形成, 荧光显微镜下观察, 大部分克隆表达绿色荧光; 挑选 3 个绿色荧光克隆扩大培养; 一部分细胞用于转基因检测；一部分细胞经 0.5% FCS 的 DMEM 饥饿培养 3～5 d, 用于核移植。

1.2.3 单克隆细胞中 ALR 基因的 PCR 检测 各组取约 2～3×10^3 细胞离心收集, 置于 20 μL 细胞裂解液中, 37 ℃消化 3 h, 离心, 取 5 μL 上清液进行 PCR 反应, 反应体系中加入 *ALR* 基因引物, 反应条件同上, 以未转基因的 sFFCs 为阴性对照。

1.2.4 单克隆细胞中 ALR 基因的 RT-PCR 检测 根据 *ALR* 基因的 cDNA 序列设计引物(P3: 5′-*CGCCGACCTCCGATTC*-3′/P4: 5′-*TGAGTGCCCTG CCCCTA* -3′), 预期产物为 522 bp。 约 4×10^7 个细胞用于提取 RNA, 提取方法和 cDNA 第一链的合成按试剂盒说明操作。取 2 μL cDNA 为模板进行 *ALR* cDNA 扩增，产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.5 单克隆细胞中 ALR 基因的免疫组织化学检测

取单克隆细胞用胰蛋白酶消化后, 以 1×10^5/孔接种于盖玻片上进行细胞爬片, 38 ℃, 5% CO_2 培养 48 h 后, SP 法进行免疫组化染色, 一抗为鼠抗人 ALR 单克隆抗体 IC3, 相差显微镜下观察、照相。

1.2.6 卵母细胞的体外成熟、克隆程序、重构胚的融合和激活及克隆胚胎的体外培养

将绵羊卵巢浸入盛有采卵液的玻璃培养皿中, 用无菌手术刀片释放出卵泡液和卵丘−卵母细胞复合体(cumulus oocyte complexes, COCs)。显微镜下挑选形态良好、卵丘细胞完整、包裹致密、至少带有 3 层卵丘细胞的卵丘-卵母细胞复合体, 在 38.5 ℃、5% CO_2 和饱和湿度的条件下成熟培养 18 h 后

观察挑选排出第一极体且胞质匀称形态良好的去卵丘细胞的卵母细胞用于细胞核移植。将卵母细胞–核供体细胞复合体用成熟液洗 3 次，在 38.5 ℃、5% CO_2 和饱和湿度条件下恢复培养 0.5～1 h 后进行电融合操作。以 190 V/mm，两次直流脉冲、20 μs/次，间隔 100 ms 电脉冲的融合条件进行融合。融合后的重构胚放入发育液中，于 5% CO_2 培养箱中恢复培养 30 min 后检查融合情况。将已经融合的重构胚置于含 5 μmol/L IA23187 的 SOFaa 中激活 5 min，再将其置于含 2 mmol/L 6-DMAP 的 SOFaa 培养液中，在 38.5 ℃、5% CO_2 和饱和湿度条件下培养 4 h 后用发育液洗重构胚 5 次后将其放入含 500 μL 发育液的四孔板中，在 38.5 ℃、5% CO_2 和饱和湿度条件下培养 48 h 后检查卵裂率，挑取卵裂球均匀，形态正常的胚胎用于胚胎移植。部分胚胎继续培养，6 d 之后观察囊胚发育情况(Kang et al, 2009)。

1.2.7 激光共聚焦显微镜观察转基因克隆胚胎及 ALR 蛋白免疫组化检测

分别于 24、48 和 96 h 统计卵裂率、8-细胞期胚胎和囊胚发育率，同时在激光共聚焦显微镜下观察胚胎中绿色荧光的表达，挑选荧光胚胎和克隆胚胎经过固定后，用 Hoechest33342 和 10 μg/mL PI 进行核染色并于激光共聚焦显微镜下观察细胞数。免疫组化检测荧光克隆胚中 ALR 蛋白的表达，将胚胎置于 0.25%链霉蛋白酶中去除透明带，其余步骤同转基因 sFFCs 免疫组化检测方法。

2 结　果

2.1 pIRES-EGFP/*ALR* 表达载体的构建

PCR 扩增出 1.7 kb 的 DNA 条带，序列测定表明，与 h*ALR* 已知序列符合率达 99.6%以上，含 3 个外显子和 2 个内含子且外显子及剪切位点没有碱基改变。图 1 所示为 PCR 和酶切检测空载体 pIRES2-EGFP 和构建的真核表达载体 pIRES-EGFP/*ALR*，结果表明，*ALR* 基因定向插入 pIRES2-EGFP 载体中。

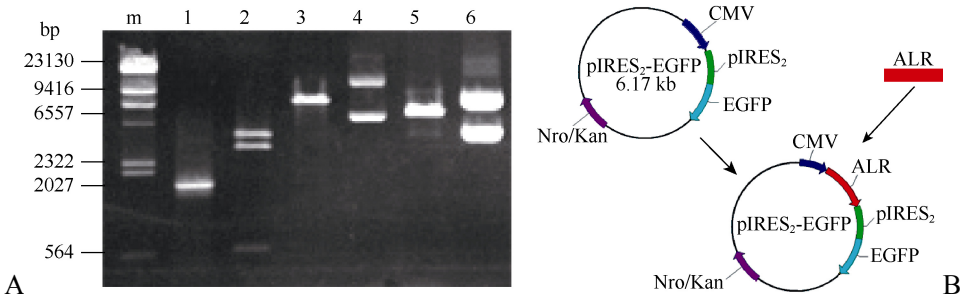

图 1　pIRES-EGFP/*ALR* 酶切检测及载体构建

Fig.1　Restriction endonuclease digestion and the building of expression vector pIRES$_2$-EGFP/*ALR*

A) pIRES-EGFP/*ALR* 酶切检测；B) pIRES-EGFP/*ALR* 载体构建 (M：λDNA/HindIII 标记，1：*ALR* 基因，2：pIRES$_2$-EGFP/*ALR*/PvuII 酶切条带，3：pIRES$_2$-EGFP/*ALR*/EcoRI 酶切条带，4：pIRES$_2$-EGFP/*ALR* 质粒，5：pIRES$_2$-EGFP/EcoRI 酶切条带，6：pIRES$_2$-EGFP 质粒)。

A) Restriction endonuclease digestion of expression vector pIRES$_2$-EGFP/*ALR*; B) The expression vector pIRES$_2$-EGFP/*ALR* (M:λDNA/HindIII marker, 1: *ALR* gene PCR, 2: pIRES$_2$-EGFP/*ALR*/PvuII, 3: pIRES$_2$-EGFP/*ALR*/EcoRI, 4: pIRES$_2$-EGFP/*ALR* plasmids, 5: pIRES$_2$-EGFP/EcoRI, 6: pIRES$_2$-EGFP plasmia).

2.2 pIRES-EGFP/*ALR* 转染绵羊胎儿成纤维细胞及阳性克隆的筛选

脂质体 Lipofectamine™ 介导 pIRES-EGFP/*ALR* 载体转染 sFFCs 8 h 后，在激光共聚焦显微镜下可见荧光细胞，细胞胞浆中出现弥散的微弱荧光，随后荧光细胞数目增多，荧光明显增强。在转染 48 h 时荧光细胞数目最多，荧光最亮，均匀分布于细胞胞浆和细胞核中，核仁区无(图 2A)。经含 800 μg/mL G418 的 DMEM 培养液筛选 2 d 后大约 60%的细胞死亡，继续培养 12 d，形成多个单克隆细胞系，计数 100 个克隆，其中 67%克隆细胞发绿色荧光，33%的克隆经 G418 筛选，虽然能够存活，但是细胞没有绿色荧光(图 2)。

2.3 PCR 鉴定单克隆细胞中 *ALR* 基因的存在

从细胞系提取 DNA 进行 PCR，3 个绿色荧光细胞单克隆全部显示 1.7 kb *ALR* 条带，与阳性对照 PCR 结果相同，未转基因的 sFFCs 阴性细胞没有特异性条带，初步证明 *ALR* 基因已整合到绵羊 sFFCs 中(图 3)。

2.4 RT-PCR 鉴定单克隆细胞中 *ALR* 基因的转录

3 个荧光细胞单克隆进一步进行 RT-PCR，电泳检测可见 522 bp *ALR* cDNA 条带，未转基因的

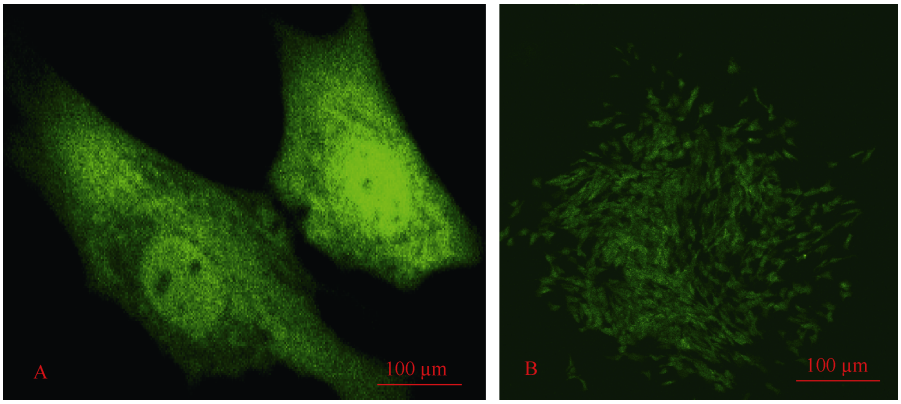

图 2 激光共聚焦显微镜下观察 p*ALR*-IRES-EGFP 转染的绵羊胎儿成纤维细胞(A×400, B×100)

Fig. 2 sFFCs transfected with p*ALR*-IRES-EGFP were observed under confocal laser microscope (A×400, B×100)

A）两个荧光细胞；B）荧光细胞单克隆。

A) Two fluorescence cells；B) A fluorescence cloned cell.

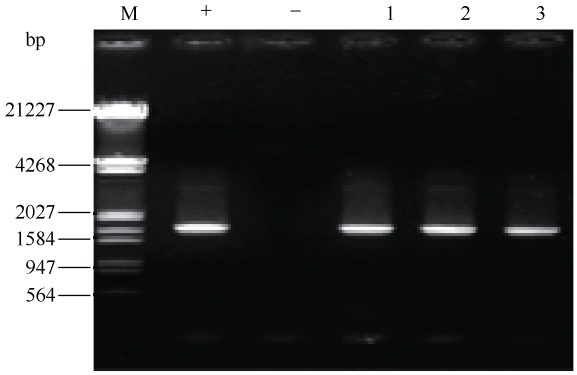

图 3 PCR 检测 *ALR*

Fig.3 PCR results of *ALR*

M：λDNA/EcoRI/HindIII 标记；+：阳性对照；－：阴性对照；1～3：绵羊胎儿成纤维细胞荧光克隆。

M: λDNA/EcoRI+HindIII marker, +: positive control; －: negative control; 1-3: fluorescence clons of sFFCs.

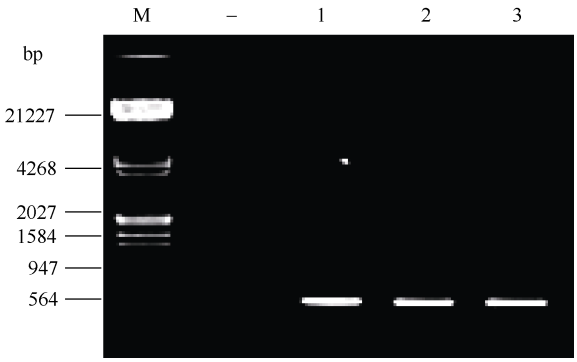

图 4 RT-PCR 检测 *ALR* mRNA

Fig.4 RT-PCR results of *ALR* mRNA

M：λDNA/EcoRI+HindIII 标记；－：阴性对照；1～3：绵羊胎儿成纤维细胞荧光克隆。

M: λDNA/EcoRI+HindIII marker; －: negative control; 1～3: fluorescence clons of sFFCs.

SFFC 没有特异性条带(图 4)。因为重组质粒中通过荧光观察已知 EGFP 基因表达，说明 EGFP 和 *ALR* 基因已整合入 SFFC 基因组中并被转录，且基因重组没有造成 EGFP 和 *ALR* 基因的缺失断裂或突变。

2.5 免疫组化鉴定 ALR 蛋白的表达

对荧光单克隆细胞进行 ALR 蛋白检测，相差显微镜下 sFFCs 中有棕色颗粒分布于核内和胞浆(图 5A)，对照组细胞未着色(图 5B)。以上结果表明，在 EGFP 表达的阳性克隆中同时有 ALR 蛋白的形成，体现了 IRES 的功能特征，即由其连接的两个不同基因表达高度相关。实验中共得到 14 枚囊胚，5 枚胚胎进行 *ALR* 基因免疫组化检测，均有 ALR 蛋白表达，说明在胚胎水平上 *ALR* 基因表达。

2.6 转基因细胞克隆胚胎的体外检测

绵羊卵子-卵丘复合体经 22 h 培养后，发育状况良好，卵丘细胞均匀扩散。去卵丘细胞后，74.4%(160/215)的卵母细胞在相差显微镜下可见第一极体，挑取形态较好的 146 枚用于核移植。融合处理卵 141 枚，融合成功卵数 109 枚，融合率 77.3%。48 h 后 75 枚重构胚卵裂，卵裂率为 68.8%，8-细胞 62 枚，8-细胞率为 82.7%。52 枚具有荧光表达，其中 14 枚发育至囊胚期，囊胚发育率为 26.9%。在激光共聚焦显微镜下观察，供体细胞融合后的克隆胚胎在体外发育的各个时期都能表达 EGFP 基因，在桑椹胚和囊胚的每个细胞都能表达绿色荧光，说明克隆胚胎是纯合的，不是嵌合体。图 6A、B 所示为发绿色荧光的转基因胚胎 (其中 A、B 为同一胚胎)，图 6C 显示 8-细胞绿色荧光胚胎经 ALR 抗体免疫组化染色细胞胞浆及核内可见棕色

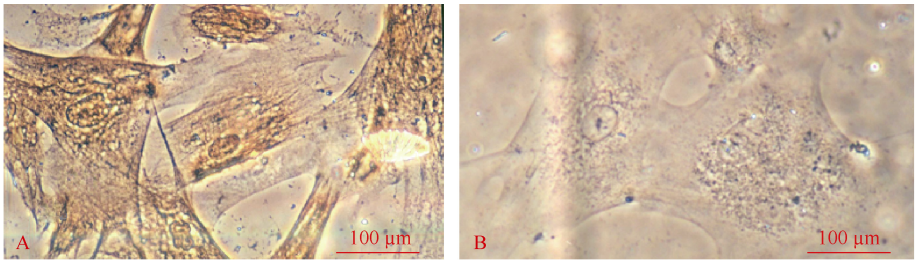

图 5　相差显微镜下观察 ALR 蛋白在转基因细胞中的表达(×400)

Fig.5　The expression of ALR protein in the SFFcells were observed by a contranst phase microscope (×400)

A) 有荧光的转基因细胞; B) 对照组转基因细胞。

A) Transgenic cells with fluorescence; B) Transgenic cells without fluorescence.

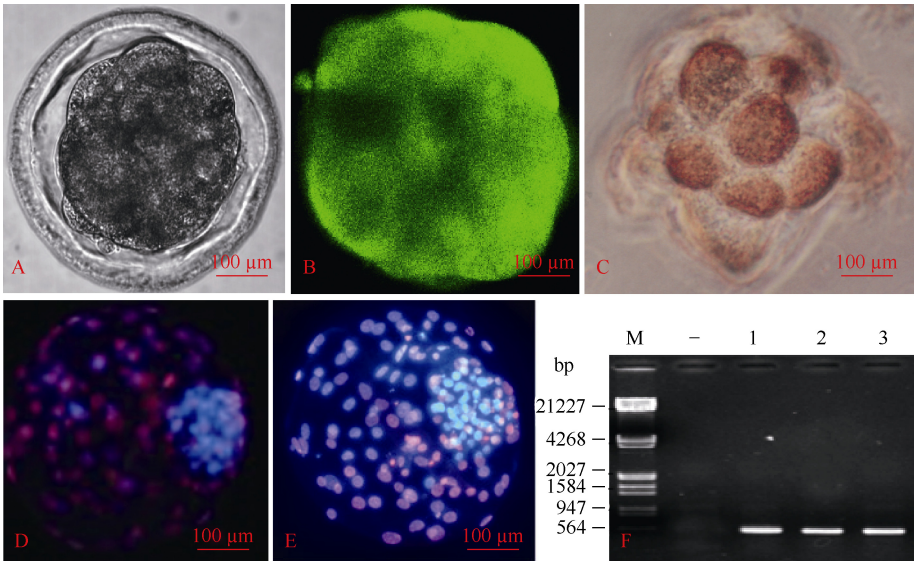

图 6　转基因胚胎检测

Fig.6　Detection of cloned embryos

A）普通视野下的重构胚; B) 激发光下的重构胚；C) hALR 抗体免疫组化染色重构胚；D) PI 和 Hoechest33342 染色转基因克隆胚胎；E) PI 和 Hoechest33342 染色对照组克隆胚胎；F) *ALR* RT-PCR 结果。M：λDNA/EcoRI+HindIII 标记；—：阴性对照；1～3：绵羊胎儿成纤维细胞荧光克隆胚胎。

A) transgenic embryo in common visual field; B) transgenic embryo in excitation light; C) immunohistochemisty of transgenic embryo; D:)PI and Hoechest 33342staining of transgenic embryo; E) PI and Hoechest 33342staining of control embryo; F) RT-PCR of *ALR*,. M: λDNA/EcoRI+HindIII marker, —: negative control, 1-3: fluorescence transgenic embryo.

颗粒。经 RT-PCR 检测 *ALR* 基因有表达，说明在胚胎水平上 EGFP 和 *ALR* 基因同时表达。以正常未做转基因的成纤维细胞的克隆做对照，转基因细胞和正常细胞两者所得到的克隆胚胎在发育各个时期并无显著差异，且对照组重构胚在发育各个时期均无绿色荧光表达。两组间在细胞数上没有显著性差异(图 6D、E)。

3　讨　论

肝炎、肝硬化在我国发病率高、危害严重，尤其是急性肝功能衰竭，有起病急、预后差、病死率高的特点，其预后主要取决于病损肝细胞的坏死程度和再生能力。利用肝细胞再生的特性，缓解病毒对肝的损害是肝再生研究的热点之一。研究发现，肝细胞再生增强因子(*ALR*)能有效的促进肝细胞的再生。肝细胞表面存在 ALR 受体，与 ALR 特异性结合，促进肝细胞从 G1 期进入 S 期，完成细胞的增殖。目前重组的 ALR 已经应用于临床治疗肝损伤相关疾病，并取得了一定的治疗效果，但是由原核编码的蛋白质不能进行翻译后修饰，影响蛋白的作用效果. 因此，用转基因动物真核细胞表达 h*ALR*，能够促进蛋白翻译后的修饰，在结构和生物活性上与天然的蛋白分子相同，从而在临床中提高治疗效果。

在转基因动物的制备过程中，转基因效率低、成本高仍然是限制转基因动物发展的瓶颈。用绿色荧光蛋白作为分子标记，可以显著提高转基因效率。以 EGFP 基因作为标记基因，用显微原核注射法产生的转基因小鼠中，囊胚中全部细胞表达绿色荧光为转基因阳性胚胎，部分细胞表达荧光是嵌合体胚胎，其中转基因囊胚，占21%，嵌合胚，占79% (Wang et al, 2000)。许多研究结果均表明，通过显微注射产生的转基因囊胚阳性率平均为 20%～30%。Takada et al (1997)将显微注射产生的阳性胚胎移植到小鼠体内，产生的小鼠中，只有 70%为转基因小鼠。随着体细胞核移植技术的建立及在转基因动物中的应用，使转基因的筛选提前到细胞水平，用转基因细胞进行核移植使转基因动物生产效率得到进一步提高， Keiser et al (2001)利用体细胞核移植产生的转基因荧光小鼠中，阳性率达 92%。因此，用绿色荧光蛋白作为标记基因进行转基因胚胎的筛选，移植后可大大提高制备转基因动物的效率，但是在转基因动物的检测中发现仍然存在着标记基因与目的基因不能同时表达的现象。 Trouet et al (1997) 利用内部核糖体进入位点 (Internal ribosome entry site, IRES) 连接标记基因和目的基因，选择 32 枚荧光克隆和 24 枚非荧光克隆进行 IRES 上下游基因相关性分析，结果表明，由 IRES 连接的上下游基因同时表达。

IRES 是从细小 RNA 病毒中发现的，该病毒以新的5′-帽子非依赖的形式进行翻译，其核糖体结合位点位于细小病毒 RNA5′非编码区内部的一个区域 (Jackson et al, 1990)。这一区域包括 450 个核苷酸长度，核糖体与其 3′端结合后扫描 RNA 到达翻译起始点。由它连接的开放阅读框架可以同时翻译，IRES 上游阅读框架的翻译采用常规的帽子结构扫描翻译起始模式。下游阅读框架的翻译由 IRES 引导翻译，IRES 元件能够启动真核细胞的多顺反子转录单位的两个或多个蛋白同时分别表达，而且蛋白之间互不影响彼此功能(Venkatesan & Dasgupta, 2001; Wang et al, 2000)。

本实验利用 IRES 连接 EGFP、*ALR* 基因，实现 EGFP、*ALR* 基因同时表达，且以 Neo、EGFP 作为双标记基因进行双重筛选。转基因细胞首先经新霉素抗性基因筛选，得到的单克隆细胞中 67%的克隆表达绿色荧光，33%的克隆不表达绿色荧光，可能是旁观效应造成假阳性细胞的存活。再经过荧光显微镜挑选表达 EGFP 基因的荧光单克隆细胞，经过 RT-PCR 和免疫组化实验证明 EGFP、*ALR* 基因同时表达。进一步利用荧光细胞进行绵羊体细胞核移植，8-细胞胚胎发育率为 82.7%，其中表达绿色荧光的占 83.9%，随着克隆胚胎体外发育时间的延长，绿色荧光蛋白在克隆胚胎中的表达也逐渐增强，到桑椹胚时，表达量达到最高，荧光最亮，这可能与绿色荧光蛋白的逐渐积累有关。实验中共得到 14 枚囊胚，在激光共聚焦显微镜下观察，囊胚中每个细胞表达绿色荧光。其中 3 枚胚胎利用 RT-PCR 检测、5 枚胚胎进行 ALR 基因免疫组化检测，均有 ALR 蛋白表达，说明在胚胎水平上 EGFP、*ALR* 基因同时表达。绿色荧光蛋白作为一种可见的基因转移标记已广泛用于转基因动物的研究与生产中，但对于它是否会影响到胚胎的发育研究者们观点不一，Roh et al (2000)研究表明，绿色荧光蛋白不会影响到转基因胚胎的发育，Takada（1997）的实验还表明，不但 GFP 本身对胚的发育无害，同时每天用 470～490 nm 光检查对胚的发育亦没有影响；而 Arat et al (2002)的研究结果则相反(Zhang et al, 2005; Adams & Briegel, 2005; Denning et al, 2001)。本实验的结果显示绿色荧光蛋白对转基因克隆胚胎的早期发育没有明显影响，在胚胎发育速度和内细胞团细胞数上均没有显著性差异。因此，我们认为利用体细胞核移植是一条切实可行的制备转基因大家畜的途径。

参考文献：

Adams NR, Briegel JR. 2005. Multiple effects of an additional growth hormone gene in adult sheep[J]. *J Animal Sci,* **83**: 1868-1874.

Arat S, Gibbons J, Rzucidlo SJ, Respess DS, Tumlin M, Stice SL. 2002. In vitro development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype[J]. *Biol Reprod*, **66**(6): 1768-1774.

Denning C, Burl S, Ainslie A, Bracken J, Dinnyes A, Fletcher J, King T, Ritchie M, Ritchie WA, Rollo M, de Sousa P, Travers A, Wilmut I, Clark AJ. 2001. Deletion of the α (1, 3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein(PrP) gene in sheep[J]. *Biotechnology*, **19**: 559-562.

Jackson RJ, Howell MT, Kaminski A. 1990. The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation[J]. *Trends Biochem Sci*, **16**(12): 477-483.

Kang L, Wang J, Zhang Y, Kou Z, Gao S. 2009. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos[J]. *Cell Stem Cell* **5**(2): 135-138.

Kato M, Yamanouchi K, Ikawa M, Okabe M, Naito K, Tojo H. 1999.

Efficient selection of transgenic mouse embryos using EGFP as a marker gene[J]. *Mol Rep Dev*, **54**: 43-48.

Keiser JT, Jobst PM, Garst AS, Boone JT, Geyer CB, Phelps C, Ayares DL, Page RL. 2001. Preimplantation screening for transgenesis using an embryonic specific promoter and green fluorescent protein[J]. *Cloning* **3**(1):23-30

Roh S, Shim H, Hwang WS, Yoon JT. 2000. *In vitro* development of green fluorescent protein (GFP) transgenic bovine embryos after nuclear transfer using different cell cycles and passages of fetal fibroblasts[J]. *Reprod Fertil Dev* ***12***(1-2): 1-6.

Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KH. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts[J]. *Science* **278**: 2130.

Takada T. 1997. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker[J]. *Nat Biotechnol*, **15**: 453-461.

Trouet D, Nilius B, Voets T, Droogmans G, Eggermont J. 1997. Use of a bicistronic GFP-expression vectorto characterize ion channels after transfection in mammalian cells[J]. *P flugers Arch*, **434**(5): 632-638.

Venkatesan A, Dasgupta A. 2001. Novel fluorescence based screen to identify small synthetic internal ribosome entry site elements[J]. *Mol Cell Biol* **21**(8): 2826-2837.

Wang X, Wan H, Korzh V, Gong Z. 2000. Use of an IRES bicistronic construct to trace expression of exogenously introduced mRNA in zebrafish embryos[J]. *Biotechniques* **29**(4): 814-816,818,820.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *Nature*, **385**: 810-813.

Zhang R, Xu WZ, Kong P. Xu GT, Li N. 2005. The current status of research and development in transgenic animals[J]. *Chn Biotechnol*, **25**(8): 16-24.