

利用 Cre/LoxP 系统删除转基因山羊体内的选择标记基因

兰翀^{1,2*}, 任丽娜^{2*}, 吴敏^{1,2}, 刘思国², 刘国辉², 徐旭俊², 陈建泉², 马恒东¹, 成国祥²

1 四川农业大学动物遗传育种研究所, 四川 雅安 625014

2 上海转基因动物育种与制药工程技术研究中心 上海杰隆生物工程股份有限公司, 上海 201210

兰翀, 任丽娜, 吴敏, 等. 利用 Cre/LoxP 系统删除转基因山羊体内的选择标记基因. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1847-1854.

Lan C, Ren LN, Wu M, et al. Deletion of marker gene in transgenic goat by Cre/LoxP system. Chin J Biotech, 2013, 29(12): 1847-1854.

摘要: 在制备转基因家畜过程中的一个关键步骤是使用选择标记基因 (Selectable marker genes, SMGs) 将转基因整合细胞从大量的正常细胞中筛选出来, 这导致了 SMGs 整合入家畜的基因组内持续传递给后代。SMGs 已被证明能够显著影响基因组内整合位点处的基因调控, 也增加了对转基因动物安全评价的复杂性。为了确定转基因山羊制备过程中 SMGs 的删除时机和删除方法, 在体细胞克隆前后两个时段内, 利用 Cre/LoxP 系统删除 SMGs 的可行性, 同时比较了蛋白转导和质粒共转染两种 Cre 导入方式的删除效率。结果表明: 尽管在首次对山羊成纤维细胞进行遗传修饰后即可进行 SMGs 删除, 但两次遗传修饰导致细胞严重老化, 无法用于后续的体细胞克隆羊制备。在转基因山羊的成体细胞中删除 SMGs 不存在上述问题, 成功率高, 缺点是试验周期长、耗资增大。Cre 表达质粒瞬时转染能够删除 SMGs, 但有超过 30% 的无 SMGs 细胞克隆中整合有质粒序列。TAT-CRE 蛋白质转导方法可以避免引入的新外源基因, SMGs 删除率达到 43.9%~72.8%, 是一种较佳的 SMGs 删除手段。

关键词: 转基因山羊, Cre/LoxP, 基因敲除, 标记基因

Received: March 10, 2013; **Accepted:** August 2, 2013

Supported by: Program of Shanghai Technology Chief Scientist (No. 11XD1422000), Shanghai Technique Innovative Plan (No. 11431921400), Shanghai R&D Base Construction Projects (No. 10dz2251700).

Corresponding author: Siguo Liu. Tel: +86-21-51380637; Fax: +86-21-58951012; E-mail: lsg@cngenon.com

* These authors contributed equally to this study.

上海市科技带头人 (No. 11XD1422000), 上海市“科技创新行动计划” (No. 11431921400), 上海市科委研发基地建设项目 (No. 10dz2251700) 资助。

网络出版时间: 2013-10-09

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131009.1942.001.html>

Deletion of marker gene in transgenic goat by Cre/LoxP system

Chong Lan^{1,2*}, Lina Ren^{2*}, Min Wu^{1,2}, Siguo Liu², Guohui Liu², Xujun Xu²,
Jianquan Chen², Hengdong Ma¹, and Guoxiang Cheng²

1 Institute of Animal Genetics and Breeding, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China

2 Shanghai Engineering Research Center of Transgenic Animal breeding and Pharmaceutical / Shanghai Genon Bioengineering Co. Ltd., Shanghai 201210, China

Abstract: In producing transgenic livestock, selectable marker genes (SMGs) are usually used to screen transgenic cells from numerous normal cells. That results in SMGs integrating into the genome and transmitting to offspring. In fact, SMGs could dramatically affect gene regulation at integration sites and also make the safety evaluation of transgenic animals complicated. In order to determine the deletion time and methods in the process of producing transgenic goats, the feasibility of deleting SMGs was explored by Cre/LoxP before or after somatic cell cloning. In addition, we compared the efficiency of protein transduction with plasmids co-transduction. We could delete 43.9% SMGs after screening out the transgenic cell clones, but these cells could not be applied to somatic cells cloning because of serious aging after two gene modifications. The SMG-free cells suitable for nuclear transfer were accessible by using the cells of transgenic goats, but this approach was more time consuming. Finally, we found that the Cre plasmid could delete SMGs with an efficiency of 7.81%, but about 30% in SMG-free cells had sequences of Cre plasmid. Compared with Cre plasmid, the integration of new exogenous gene could be avoided by TAT-CRE protein transduction, and the deletion rate of TAT-CRE transduction was between 43.9 and 72.8%. Therefore, TAT-Cre transduction could be an effective method for deleting selectable marker genes.

Keywords: transgenic goat, Cre/LoxP, knockout genes, selectable marker genes

转基因技术是当今基因工程领域中的重要应用性新技术。在植物新品种培育方面,利用转基因技术已获得了许多植物新品种,显著改善了农艺性状^[1]。但在家畜新品种培育方面,转基因技术的成功案例仅局限在牛、羊上的几例^[2],还需要进行完善和优化。目前,转基因家畜主要是通过体细胞遗传修饰联合体细胞克隆技术获得的^[3]。在细胞遗传修饰期间不可避免的需要用筛选标记基因 (Selectable marker genes, SMGs) 来富集转基因成功的细胞,之后不仅不再需要 SMGs,还可能因其整合位点毗邻目的基因而影响目的蛋白的表达^[4]。此外,我国的转基因安全

评价政策将 SMGs 视同目的基因,要求进行复杂的安全评价^[5]。

由上可见,删除 SMGs 不仅可以优化转基因的表达,还可以简化转基因动物的安全评价过程,加快转基因动物新品种的培育和产业化进程。之前,我们曾利用 Cre/LoxP 系统成功删除了人溶菌酶转基因山羊体内的 SMGs^[6]。但该过程需要两轮细胞遗传修饰和体细胞克隆过程,周期长,获得 SMGs 删除的转基因山羊至少需要 2 年才能完成。本文研究了在体细胞克隆前后两个时段内,利用 Cre/LoxP 系统删除标记基因的可行性,比较了蛋白转导和质粒共转染两种 CRE

蛋白导入方式的删除效率,获得了删除转基因山羊体内 SMGs 的时机和方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

人溶菌酶转基因山羊 (Human lysozyme transgenic goats, hLYZ-G)人溶菌酶基因与 SMGs 紧密连锁,整合于山羊的 5 号染色体上,排列顺序为 5'-[LoxP⁻-neo-TK-LoxP⁻]-[人溶菌酶表达框架]-3'^[6]; sCT-G, hLYZ-G 为上海杰隆生物工程股份有限公司/上海转基因研究中心研制。SMGs 载体质粒为 *pGH4*, 实验室自存,内含有 *neo^R* 和 *TK* 两种筛选基因以及 LoxP 位点,排列方式为: 5'-LoxP⁻-neo-TK-LoxP⁻-3'。表达 Cre 蛋白的质粒 *pBS185* (Addgene)。GMEM 完全培养液: 添加有 10% FBS、青链霉素和非必需氨基酸的 GMEM 培养液 (GIBCO); GMEM 筛选培养液: 含有 1 000 μg/mL G418 的 GMEM 完全培养液。

1.2 TAT-Cre 酶的制备、活性测定与细胞转染

TAT-Cre 酶的表达与纯化方法参照文献[6]进行。TAT-Cre 酶的活性测定: 在酶切反应液 (33 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 10 mmol/L MgCl₂) 中加入 1 μg 的 *pGH4* 质粒和 0.1 μg 的 TAT-Cre 酶, 37 °C 温育 4 h, 琼脂糖凝胶电泳检测酶切情况。

TAT-Cre 蛋白转染按文献[6]进行, 简述为: 细胞生长至 90% 汇合度时, PBS 洗 3 次, 加入 2 μmol/L 的 TAT-Cre 酶, 37 °C、5% CO₂ 培养 3 h 后, PBS 洗 3 次, 换 GMEM 完全培养液培养 1 d, 之后按 100 个细胞/皿传至 100 mm 细胞培养皿中, 添加 GMEM 选择培养液培养 10 d 后, 利用克隆环法挑取单克隆细胞并进行扩大培养。

1.3 体细胞克隆山羊的制备和山羊成纤维细胞的分离

人工合成鲑鱼降钙素 (Salcalcitonin, sCT) 基因(5'-atgaaggtcctcatccttgcctgtctgtggcttgccattgca caccaccaccaccacagaagaagaagaagtgcagcaacctgag cacctgcgtgctggcaagctgagccaggagctgcacaagctgcagacctaccccgtagcaacaccggcagcgccacccccggctaa-3'), 将之装入牛 β-乳球蛋白启动子调控的乳腺特异表达载体 *pBLG* 内, 成为鲑鱼降钙素乳腺特异表达载体 *pBLG-sct*。将 *pBLG-sct* 与 SMGs 载体 *pGH4* 共转染山羊胎儿成纤维细胞, 经筛选和鉴定获得 *sCT* 基因整合细胞株并制备出体细胞克隆山羊, 具体方法参见文献[9]。

按照文献[7]提供的方法分离鲑鱼降钙素转基因山羊 (Salcalcitonin transgenic goats, sCT-G) 和人溶菌酶转基因山羊的耳皮成纤维细胞, 分别命名为 sCT-G-EFC 和 hLYZ-G-EFC。按照文献[8]分离正常山羊的 32 d 胎儿成纤维细胞 (Fetal fibroblasts of normal goat, G-FF)。

1.4 TAT-Cre 蛋白转导细胞

细胞在培养皿中生长至 90% 汇合时弃去培养液, PBS 清洗细胞, 加入 OPTI-MEM 培养液 (GIBCO) 稀释的 TAT-Cre 酶, 使酶终浓度为 2 μmol/L, 37 °C、5% CO₂ 培养 3 h 后, PBS 清洗细胞, 换 GMEM 完全培养液培养, 24 h 后按 100 个细胞传至 1 个 100 mm 细胞培养皿的密度分板, 添加 GMEM 选择培养液培养 10 d, 利用克隆环法挑取单克隆细胞, 按 96 孔-48 孔-24 孔-12 孔-6 孔的顺序进行扩大培养。

1.5 脂质体转染细胞

按照 Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen 11668) 的说明进行转染。简

述为：在 24 孔细胞板中，细胞生长至 90%汇合时，用 OPTI-MEM 培养液稀释 *pBS185* 质粒至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，每 100 μL DNA 中加入 1 μL PLUS 和 3 μL 脂质体，混匀后获得 DNA-lipid 复合物；在 24 孔细胞板中加入 DNA-lipid 复合物 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养，6 h 后换 GMEM 完全培养基培养，12 h 后按 100 个细胞/皿的密度传至 100 mm 细胞培养皿中，按 1.4 方法进行单克隆细胞的筛选和培养。

1.6 PCR 检测

按照细胞基因组提取试剂盒 (TIANGEN Cat No. DP304-03) 说明提取细胞基因组，溶于 50 μL 超纯水中，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。利用表 1 中的引物检测 *neo^R*、 *β -actin*、*sCT*、*cre* 四种基因进行 PCR 扩增，条件为：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min，94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，退火温度为表 1 列示，扩增 30 个循环，LA *Taq* 酶为 TaKaRa 公司产品。

表 1 PCR 检测检测所需引物序列

Table 1 Sequences of detection primers for PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
neo469-F	CTGCTATTGGGCGAAGTGC	469
neo469-R	CGGCGATACCGTAAAGCAC	
β -actin-F	CGCAGACAGGATGCAGAAAGA	148
β -actin-R	GCTGATCCACATCTGCTGGAA	
sCT-F	ACCTACTCAGACAATGCGATGC	1 100
sCT-R	CGGAGCCCTAGTGCTACTCA	
cre-F	TTACGGCGCTAAGGATGA	357
cre-R	CTTTACAGTGACAATGACGGC	

2 结果与分析

2.1 TAT-Cre 的纯化、浓度与活性测定结果

大肠杆菌中表达纯化的 TAT-Cre 酶有良好的纯度生物学活性，可有效地将 *pGH4* 中 3.2 kb 的筛选基因切出 (图 1A 和图 1B)。经 TAT-Cre 转染的人溶菌酶转基因山羊成纤维细胞失去了对

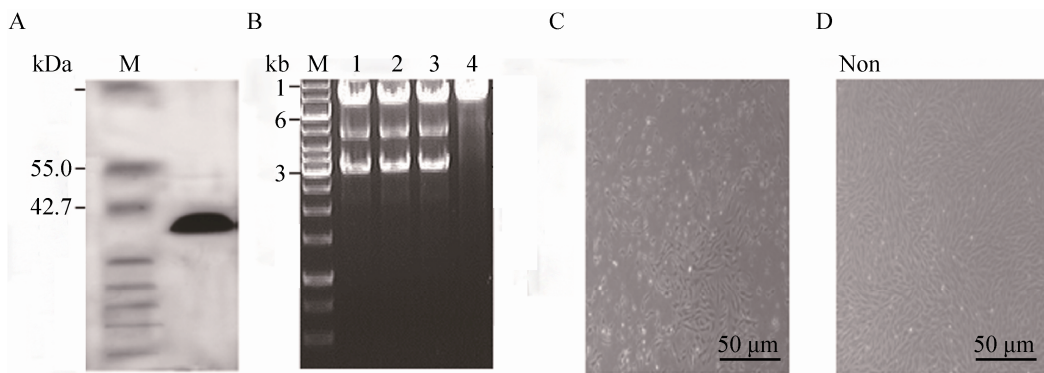


图 1 TAT-Cre 酶的纯化与活性检测

Fig. 1 Purification and activity detection of TAT-CRE enzyme. (A) Identification of TAT-Cre through SDS-PAGE. 1: TAT-Cre; M: protein marker. (B) The activity detection of TAT-Cre *in vitro*. M: DNA marker; 1-3: the vector digested with TAT-Cre; 2: negative control. (C) TAT-Cre-treated cells with resistance of G418. (D) Normal cells with resistance of G418.

G418 的抵抗能力,筛选培养 4 d 后出现了大面积的死亡 (图 1C), 说明所纯化的 TAT-Cre 具有穿透细胞膜, 进入细胞发挥作用的功能。

2.2 体细胞克隆前删除标记基因

利用 TAT-Cre 处理 sCT-G 的制备过程中得到的 7 个单克隆细胞株。随后在处理完的 7 株细胞中各取了 100 个细胞铺板于 100 mm 培养皿, 10 d 后挑出了 57 个单克隆。经检测, 这 57 株细胞中有 25 株细胞中的 *neo^R* 基因被删除 (图 2), 删除效率达到 43.9%。这证明 TAT-Cre 在第一次细胞转染后即可有效删除与目的基因共整合的标记基因。但这一过程经历了连续两次低密度传代和单细胞克隆的挑取, 所获得单细胞克隆严重老化, 无法进一步传代, 最终未获得可供克隆用的 sCT 转基因整合的单克隆细胞。

本研究尝试利用 *pBS185* 瞬间表达法删除首次转基因克隆内的标记基因, 但因细胞老化严重, 最终未获得可供检测用的 sCT 转基因整合的单克隆细胞。

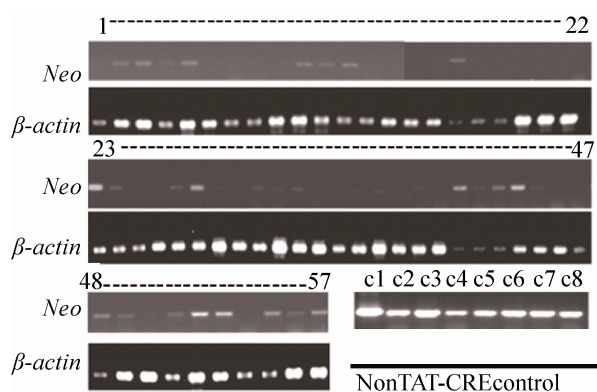


图 2 TAT-Cre 酶对体细胞克隆前标记基因的删除
Fig. 2 Deletion of TAT-Cre on somatic cell marker gene. 1-58: cell clones treated by TAT-Cre; c1-c8: positive cell without TAT-Cre selected by G418.

2.3 体细胞克隆后删除标记基因

用 TAT-Cre 酶处理 hLYZ-G-EFC, 挑取了共 114 个单克隆细胞株, *neo^R* 基因检测表明, 其中有 83 个克隆细胞的 *neo^R* 被成功删除 (图 3), 删除效率为: 83/114=72.81%。

利用 *pBS185* 质粒瞬间表达法检测 SMGs 的删除效率。用 *pBS185* 质粒瞬时转染 hLYZ-G-EFC, 共挑取了 64 个单克隆细胞株, G418 杀伤试验表明, 其中 5 个克隆株细胞被杀死, 删除效率为 7.81% (5/64)。

为进一步验证 TAT-Cre 蛋白转导法删除标记基因的适用性。用 TAT-Cre 处理 SCT-G-EFC, 共挑取了 16 个克隆, 经检测其中有 13 株细胞克隆中的标记基因被成功删除 (图 4), 效率 46.2% (6/13)。这表明, TAT-Cre 介导标记基因删除是一种广适性的方法。

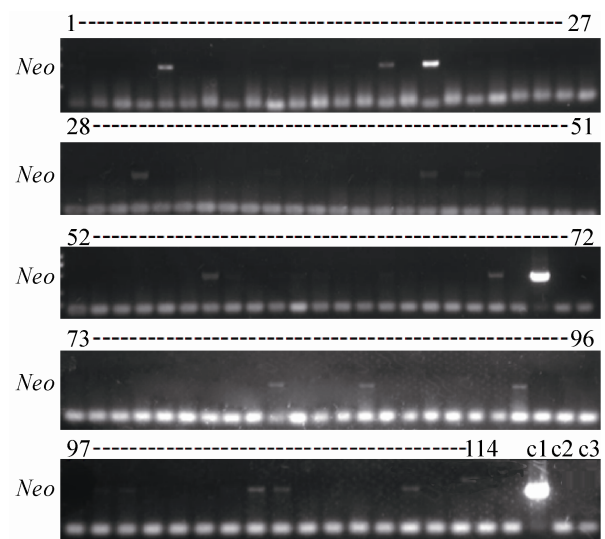


图 3 TAT-Cre 介导的克隆羊体细胞中 *neo^R* 基因的删除
Fig. 3 Deletion of *neo^R* gene in selected clone mediated by TAT-Cre. 1-114: selected clone; C1: positive control; C2, C3: blank.

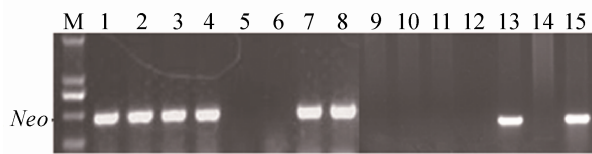


图4 *sCT* 转基因山羊体细胞内标记基因的删除

Fig.4 Deletion of marker gene in *sCT* transgenic goat's somatic cells. 1-13: selected *sCT* transgenic fibroblast cell clone; 14: blank; 15: plasmid control.

2.4 Cre 质粒瞬时转染方法的载体掺入率

pBS185 瞬时转染的方法也可以对 SMGs 有效删除, 但所获得的部分克隆中难免整合有 Cre 表达质粒的序列。以该法获得 9 株删除了标记基因的 ChLYZ-G-EFC, 检测细胞中来自 *pBS185* 的 Cre 基因: 有 3 株细胞整合了 Cre 基因 (图 5), 掺入率为 33.3%。

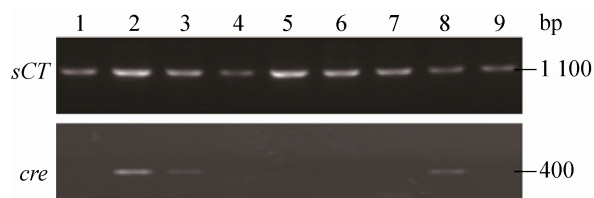


图5 *pBS185* 质粒瞬时转染中的质粒序列掺入情况

Fig. 5 Condition of plasmid *pBS185* sequences enter cell in transient transfection. 1-9: *sCT* transgenic integrated positive monoclonal cell strains; 2, 3 and 8: *pBS185* plasmid sequences exist in clones.

3 讨论

SMGs 删除在转基因植物中已较为成熟, 主要有转座子介导基因再定位系统、共转化和遗传分离系统、重组酶介导的基因剪切系统和依赖染色体同源重组的 SMGs 切除系统等 4 种技术^[10]。在转基因动物中, SMGs 删除多在 ES 细

胞相关的研究^[11], 所用技术以同源重组和重组酶系统为主^[12]。在大家畜上, 因目前还未能建立有效的家畜 ES 细胞系, 利用寿命有限的体细胞难以实现多次遗传修饰。本研究尝试了在体外对山羊胎儿成纤维细胞进行两次遗传修饰, 均因细胞老化问题未能获得可供体细胞克隆用的 SMGs 删除的转基因细胞株。由此, 对 SMGs 的删除不得不推迟到体细胞克隆之后。在小鼠上, 有通过显微注射方法将 Cre 表达质粒注射入转基因小鼠受精卵内, 通过 Cre 酶的瞬时表达来删除两侧装接 loxP 的 DNA 序列的报道^[13-14], 但该方法低效且存在注射入的质粒整合入基因组内的风险, 不适合转基因家畜。Kaartinen 等报道通过携带表达 Cre 的腺病毒感染 16-细胞期桑椹胚来删除 SMGs^[15], 显然病毒载体的安全性问题也不适合用于以产业化为目的的家畜转基因。目前在家畜上成功删除 SMGs 的报道均是在获得转基因动物或转基因动物的胚胎后, 再在分离出的转基因家畜成体细胞上进行的。Wang 等在转基因牛成纤维细胞中瞬时转染 Cre 和 eGFP 共表达载体, 以 eGFP 的表达指示 Cre 的表达, 通过 FACS 技术筛选出了表达 Cre 的细胞, 其中有 80% 的细胞内 SMGs 被删除^[16]。Kuroiwa 等通过在转基因牛成纤维细胞中转染 Cre 瞬时表达质粒获得了无 SMGs 的免疫球蛋白 μ 链和 *PRNP* 双基因敲除的牛^[17]。

但是上述通过转染 Cre 表达质粒成功删除转基因家畜体内 SMGs 的研究均指出: Cre 表达质粒有较高的掺入率, Wang 等报道为 1/3^[16], Kuroiwa 等报道为 4/5^[17], 本研究用同样方法证明其掺入率为 1/3。为了优化这一过程, 本研究使用了 TAT-Cre 蛋白直接转染细胞方法克服了

质粒转染的不足。TAT-Cre 是在野生型 Cre 蛋白的 N 端引入了 HIV 的蛋白转导结构域 (Protein transduction domains)——TAT 序列形成的, 它可以直接穿透细胞膜进入细胞内发挥功能, 目前 TAT-Cre 已经得到了许多成功应用^[18-19]。利用该方法获得的删除了 SMGs 的羊成纤维细胞可用于体细胞克隆获得转基因山羊^[6]。

Nolden 研究显示血清的存在能够抑制 TAT-Cre 的细胞穿透活性, 并表明 TAT-Cre 与胚胎干细胞孵育 3 h 可产生最大的重组效率^[20]。本研究尝试了用 100、200、300、400、500 的 TAT-Cre 酶对山羊成纤维孵育 3 h, 发现高于 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$

时, TAT-Cre 会对细胞产生毒害作用, 最终确定了 TAT-Cre 的作用浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (结果未给出)。最终结果表明, 这一条件可以获得较高的删除效率 (表 2)。

表 2 比较了删除 SMGs 的不同时机和方法的优缺点。从表中可见, 尽管在体细胞克隆前删除 SMGs 最经济, 但连续两次遗传修饰会导致细胞发生严重的老化, 无法继续完成体细胞克隆工作。在转基因山羊获得后再进行 SMGs 删除不存在上述问题, 但缺点是试验周期长、耗资大。因 TAT-CRE 转导方法对细胞损伤小, 且不会引入新的外源基因, 是一种较佳的 SMGs 删除手段。

表 2 删除标记基因的不同时机和方法比较

Table 2 Comparison of deleting marker gene between different times and methods

Time	Method	Efficiency (%)	Advantage	Disadvantage
Before somatic cell clone	Transduction of TAT-Cre	43.9	1) More simple operation; higher efficiency of deletion; no new exogenous gene introduced 2) Shorter cycle; non-replicated clones; lower cost	1) Needs high purify TAT-CRE for cell culture 2) It's difficult to obtain monoclonal cells for SCNT, because of seriously cell aging
	Transient transfection of plasmid Cre	No detected	1) No need to purify protein 2) Shorter cycle; non-replicated clones; lower cost	1) It can introduce new exogenous gene and have lower efficiency of deletion 2) It's difficult to obtain monoclonal cells for SCNT, because of seriously cell aging
After somatic cell clone	Transduction of TAT-Cre	72.8	1) More simple operation; higher efficiency of deletion; no new foreign gene introduced 2) Better growth of cells; more easily obtain monoclonal cell strains	1) Longer test cycles and higher cost 2) It needs high purify TAT-CRE for cell culture
	Transient transfection of plasmid Cre	7.8	1) There is no need to purify protein in this method 2) It may be known the function of transgene	1) New foreign gene introduced; lower efficiency of deletion, more mixed clones 2) Longer test cycle and higher cost price

REFERENCES

- [1] Lawlor DW. Genetic engineering to improve plant performance under drought: hysiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *J Exp Bot*, 2013, 64(1): 83–108.
- [2] Kues WA, Niemann H. Advances in farm animal transgenesis. *Prev Vet Med*, 2011, 102(2): 146–156.
- [3] Samiec M, Skrzyszowska M. Transgenic mammalian species, generated by somatic cell cloning, in biomedicine, biopharmaceutical industry and human nutrition/dietetics--recent achievements.

- Pol J Vet Sci, 2011, 14(2): 317–328.
- [4] Lanza AM, Kim DS, Alper HS. Evaluating the influence of selection markers on obtaining selected pools and stable cell lines in human cells. *Biotechnol J*, 2013, 8(7): 811–821
- [5] Lian Q, Wang WW. Research progress and safety evaluation management of transgenic animals in China. *Jiangsu Agric Sci*, 2012, 40(8): 287–288 (in Chinese).
连庆, 王伟威. 我国转基因动物研究进展及安全评价管理. *江苏农业科学*, 2012, 40(8): 287–288
- [6] Xu Y, Liu S, Yu G, et al. Excision of selectable genes from transgenic goat cells by a protein transducible TAT-Cre recombinase. *Gene*, 2008, 419(1/2): 70–74.
- [7] Behboodi E, Memili E, Melican DT, et al. Viable transgenic goats derived from skin cells. *Transgenic Res*, 2004, 13(3): 215–224.
- [8] Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(5): 456–461.
- [9] Chen JQ, Chen J, Xu XJ, et al. Effect of cytoplasm on the development of inter-species nuclear transfer reconstructed goat embryo. *Mol Reprod*, 2007, 74(5): 568–573.
- [10] Darbani B, Eimanifar A, Stewart CN Jr, et al. Methods to produce marker-free transgenic plants. *Biotechnol J*, 2007, 2(1): 83–90.
- [11] Abuin A, Bradley A. Recycling selectable markers in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(4): 1851–1856.
- [12] Seibler J, Schübeler D, Fiering S, et al. DNA cassette exchange in ES cells mediated by FLP recombinase: an efficient strategy for repeated modification of tagged loci by marker-free constructs. *Biochemistry*, 1998, 37(18): 6229–6234.
- [13] Sunaga S, Maki K, Komagata Y, et al. Efficient removal of loxP-flanked DNA sequences in a gene-targeted locus by transient expression of Cre recombinase in fertilized eggs. *Mol Reprod Dev*, 1997, 46(2): 109–113.
- [14] Araki K, Araki M, Miyazaki J, et al. Site-specific recombination of a transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(1): 160–164.
- [15] Kaartinen V, Nagy A. Removal of the floxed neo gene from a conditional knockout allele by the adenoviral Cre recombinase *in vivo*. *Genesis*, 2001, 31(3): 126–129.
- [16] Wang S, Sun X, Ding F, et al. Removal of selectable marker gene from fibroblast cells in transgenic cloned cattle by transient expression of Cre recombinase and subsequent effects on re-cloned embryo development. *Theriogenology*, 2009, 72(4): 535–541.
- [17] Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H, et al. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin- μ and prion protein in cattle. *Nat Genet*, 2004, 36(7): 775–780.
- [18] Grisanti L, Corallini S, Fera S, et al. Inactivation of *numb* and *numblike* in spermatogonial stem cells by cell-permeant Cre recombinase. *Differentiation*, 2009, 78(2/3): 131–136.
- [19] Peitz M, Jäger R, Patsch C, et al. Enhanced purification of cell-permeant Cre and germline transmission after transduction into mouse embryonic stem cells. *Genesis*, 2007, 45(8): 508–517.
- [20] Nolden L, Edenhofer F, Haupt S, et al. Site-specific recombination in human embryonic stem cells induced by cell-permeant Cre recombinase. *Nat Methods*, 2006, 3(6): 461–467.

(本文责编 陈宏宇)