

动物及兽医生物技术

小鼠睾丸注射不同转染试剂和注射方法对外源基因表达的影响

戴建军^{1,2}, 李翔^{1,2}, 吴彩凤^{1,2}, 张树山^{1,2}, 张廷宇^{1,2}, 张德福^{1,2}

1 上海农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106

2 上海农业遗传育种重点实验室 动物遗传工程研究室, 上海 201106

戴建军, 李翔, 吴彩凤, 等. 小鼠睾丸注射不同转染试剂和注射方法对外源基因表达的影响. 生物工程学报, 2014, 30(10): 1522–1530.

Dai JJ, Li X, Wu CF, et al. Effect of different transfection reagents and injection methods in mice testicular injection on the expression of exogenous gene. Chin J Biotech, 2014, 30(10): 1522–1530.

摘要: 为探讨不同转染试剂 (LipofectamineTM LTX & PLUSTM、Lipofectamine2000 和纳米化聚酰胺-胺型树枝状聚合物 (PAMAM-D)) 和睾丸注射方法 (睾丸网注射、曲精细管注射和间质注射) 对转基因小鼠生产效率的影响, 将 pEGFP-C1 质粒分别与不同转染试剂混合后, 按照不同的注射方法注入小鼠睾丸内, 30 d 后检测小鼠精子密度、活力、精子阳性率以及配种后仔鼠转基因阳性率。结果 3 种转染试剂对小鼠繁殖性能影响由小到大依次为 LipofectamineTM LTX & PLUSTM、Lipofectamine 2000 和 PAMAM-D。转染后 LipofectamineTM LTX & PLUSTM、Lipofectamine 2000 和 PAMAM-D 组精子的 GFP 阳性率分别为 35.65%±0.69%、12.86%±0.35%和 10.04%±0.20%。配种后仔鼠的 PCR 阳性率分别为 29.17%、13.70%和 5.88%。3 种不同注射方法对小鼠睾丸都造成损伤, 由小到大依次为睾丸网注射、曲精细管注射和睾丸间质注射, 三者的阳性精子比例分别为 35.13%±1.727%、15.13%±1.457%和 0%, 配种后仔鼠的 PCR 阳性率分别为 33.3%、12.5%和 0%。结果表明, LipofectamineTM LTX & PLUSTM 和睾丸网注射对小鼠睾丸的损伤最小, 并能获得较高的转染效率。

关键词: 小鼠, 转基因, 转染试剂, 睾丸注射

Received: December 30, 2013; **Accepted:** March 24, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31372315), Special Projects for the Development of National New GM Crops (No. 2013ZX08006-005), Projects for Agriculture Achievement Transformation from Shanghai Science and Technology Committee (Nos. 123919N0700, 133919N1700).

Corresponding author: Defu Zhang. Tel: +86-21-52235475; Fax: +86-21-62207858; E-mail: zhangdefuzdf@163.com

国家自然科学基金 (No. 31372315), 国家转基因重大专项 (No. 2013ZX08006-005), 上海市科委农业成果转化项目 (Nos. 123919N0700, 133919N1700) 资助。

Effect of different transfection reagents and injection methods in mice testicular injection on the expression of exogenous gene

Jianjun Dai^{1,2}, Xiang Li^{1,2}, Caifeng Wu^{1,2}, Shushan Zhang^{1,2}, Tingyu Zhang^{1,2}, and Defu Zhang^{1,2}

1 Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

2 Division of Animal Genetic Engineering, Shanghai Municipal Key Laboratory of Agri-genetics and Breeding, Shanghai 201106, China

Abstract: The purpose of this study was to study the effect of three different transfection reagents (LipofectamineTM LTX & PLUSTM, Lipofectamine 2000 and Nano-PAMAM-D) and three different testicular injection methods (rete testicular injection, seminiferous tubules injection and testicular interstitial injection) on the efficiency of production transgenic mice. After the mixtures of plasmid DNA (pEFP-C1) and transfection reagent were injected with different testicular injection methods, the sperm density, vitality, positive sperm rates and PCR positive transgenic mice rate were examined 30 days after injection. The results showed that the damage degree from slight to serious of three transfection reagents was LipofectamineTM LTX & PLUSTM, Lipofectamine 2000, and PAMAM-D. The sperm positive rates with green fluorescence of these three groups were 35.65%±0.69%, 12.86%±0.35% and 10.04%±0.20%, respectively. The PCR positive rates of transgenic newborn mice were 29.17%, 13.70% and 5.88%, respectively. Among the groups of different testicular injection methods, the damage degree from slight to serious was rete testicular injection, seminiferous tubules injection, and testicular interstitial injection, whereas the sperm positive rates with green fluorescence were 35.13%, 15.13%, and 0%, respectively. The PCR positive rates of transgenic newborn mice among different testicular injection groups were 33.3%, 12.5%, and 0.0%. The combination of rete testicular injection and LipofectamineTM LTX & PLUSTM had the lowest toxicity and highest transgenic efficiency in the production of transgenic mice.

Keywords: mice, transgenic, transfection reagents, testicular injection

睾丸注射是一种操作简便、成本低和适宜于大群生产的精子介导的转基因方法。1999年, Sato等^[1]将外源基因注入小鼠睾丸,成功获得了转基因小鼠,并且转基因可以稳定遗传到下一代,证实了睾丸注射可以制备转基因动物。此后睾丸注射法制备转基因动物取得较快发展,目前已经获得了转基因小鼠^[2-3]、兔^[3]、猪^[4]、绵羊^[5]和鸡^[6-7]等动物。但是睾丸注射法仍然存在不足,主要表现在转基因效率不稳定、目的基因随机插入、片段容易丢失和不能准确表达等。

精子虽具有捕获外源基因的能力,但效率相对较低,需利用一些试剂辅助以提高转染效率。Kim等^[8]首先在小鼠和猪睾丸注射中利用商业化的脂质体,证实了其可以成功对动物体内生精细胞进行转染。此后,研究者相继发现了多种可以提高动物生精细胞体内转染效率的转染试剂,如DMSO(二甲基亚砜, Dimethyl sulfoxide)和DMN(2,6-萘二甲酸二甲酯, 2,6-Naphthalenedicarboxylic acid)等,但是转染效率仍不高,相关研究仍需深入进行^[3,9]。睾丸注射主要有睾丸网注射、曲精细管注射和间质

注射 3 种方法。丁晓麟等利用睾丸网注射法获得了转基因小鼠,63 只仔鼠中有 2 只 PCR 鉴定呈阳性^[10]。Kanatsu -Shinohara 等利用逆转录病毒作为载体注入未成熟小鼠曲精细管亦获得转基因仔鼠,平均效率为 2.8%^[11]。Shen 等使用 DMSO 处理外源 DNA,通过睾丸间质注射后收集小鼠精子后进行体外授精,结果 41.7%的胚胎表达绿色荧光;在兔睾丸进行注射后,56.3%的仔兔 PCR 鉴定呈阳性^[3]。孙敏等采用睾丸间质注射的方法,成功获得了转基因鸡,后代 PCR 检测的阳性率为 27.27%^[6]。然而,不同的睾丸注射方法所获得的转染效率差异很大,且不同文献中所获得的结果也不一致。

本研究拟从睾丸组织损伤和转基因效率两个方面,对 3 种转染试剂(两种脂质体 LipofectamineTM LTX & PLUSTM 和 Lipofectamine 2000,一种纳米化载体 PAMAM-D)和 3 种睾丸注射方法(睾丸网注射、曲精细管注射和睾丸间质注射)进行对比,旨在探索一种对小鼠睾丸损伤小、转基因效率高的注射方法,为睾丸注射法在猪等大家畜中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

6-7 周龄昆明小白鼠由复旦大学医学院实验动物中心提供;pEGFP-C1 质粒由上海市农业科学院畜牧兽医研究所易建中研究员惠赠,该质粒具有卡那霉素抗性,EGFP 基因在细胞中由 CMV 启动子启动,大小 4.7 kb;LipofectamineTM LTX & PLUSTM 和 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;纳米化 PAMAM-D 购自 Qiagen 公司;其余生化试剂均购自 Sigma 公司;引物合成和测序由生工生物工程股份有限公司完成。

1.2 转染液制备

1) LipofectamineTM LTX & PLUSTM 转染液配制方法如下:在 100 μ L OPTI-MEM 中按照顺序加入 1 μ L pEGFP-C1 质粒 (1 μ g/ μ L), 1.0 μ L PLUS, 轻轻混匀,静置 5 min, 1.5 μ L LTX, 混匀,静置 30 min, 注射前加入终浓度 0.2%的台盼蓝为指示剂。

2) Lipofectamine 2000 转染液配制方法如下:分别取两管 50 μ L OPTI-MEM, 分别加入 2 μ L pEGFP-C1 质粒 (1 μ g/ μ L) 和 2 μ L Lipofectamine 2000, 室温放置 5 min 将两者温和混匀,静置 30 min; 注射前加入终浓度 0.2%的台盼蓝为指示剂。

3) PAMAM-D 转染液配制方法如下:在 100 μ L OPTI-MEM 中加入 3 μ L pEGFP-C1 质粒 (1 μ g/ μ L), 混匀, 3 μ L PAMAM-D 混匀, 短暂离心, 室温下静置 10-15 min, 注射前加入终浓度 0.2%的台盼蓝为指示剂。

1.3 睾丸注射

小鼠麻醉后进行术部消毒,用眼科剪在小鼠下腹部两侧分别纵切 0.8-1 cm 切口,暴露睾丸和附睾,利用外径 60 μ m 显微注射针和自制口吹注射管进行注射。睾丸网注射方法如下:显微镜下找出睾丸血管蒂,其正下方 0.2 mm 的池状结构即是睾丸网,将显微注射针平行进针插入睾丸网腔内进行注射。曲精细管注射方法如下:显微镜下观察睾丸内曲精细管走向,顺曲精细管方向将显微注射针插入曲精细管内进行注射。睾丸间质注射方法如下:取睾丸长轴两端为注射位点,避开血管垂直进行注射。

小鼠每侧睾丸分别注入约为 30 μ L 转染液,当大部分睾丸变成蓝色时注射完成,两侧睾丸利用相同的方法注射。注射小鼠单笼饲养 30 d

后, 每组 10 只小鼠随机选取 5 只与发情母鼠 1 2 合笼, 次日检查阴道栓, 见栓者单笼饲养, 产仔后检测仔鼠转基因阳性率和 EGFP 表达情况; 每组剩余 5 只小鼠解剖, 附睾取精, 计算精子总数、活力和精子 EGFP 阳性率。

1.4 小鼠精子检测睾丸注射

小鼠精子检测方法如下: 小鼠颈椎脱臼处死, 打开腹部, 取出小鼠附睾尾部及输精管, 快速置于 37 °C, 1 mL 预热 HTF 培养液中, 用针头撕碎附睾和输精管使精子游出, 放入 1.5 mL 的 EP 管中, 37 °C 的二氧化碳培养箱中孵育 10 min, 吸取上清液用于精子密度、活力和精子荧光检测。

1) 精子密度与精子活力检测: 精子在二氧化碳培养箱中孵育 10 min 后, 立即取 10 μ L 精液于 490 μ L 的 HTF 中等温稀释, 采用精子全自动分析仪检测精子密度和精子活力。

2) 精子荧光检测: 取 10 μ L 精液于 490 μ L 多聚甲醛中固定, 混匀, 取 10 μ L 含精子的多聚甲醛液体置于载玻片上, 加盖玻片后于荧光显微镜下统计 EGFP 阳性精子比例。

1.5 仔鼠基因组提取及 PCR 检测

按照 Axygen 基因组 DNA 提取试剂盒使用说明, 提取仔鼠尾尖基因组 DNA。根据 pEGFP-C1 载体序列 (GenBank Accession No. U55763.1), 利用 primer5 软件设计引物, 上游引物:

5'-CCTGGTCGAGCTGGAAGGCGA-3', 下游引物: 5'-ACGAACTCCAGCACCATG-3'。反应长度: 528 bp, 反应条件: 94 °C 10 min; 94 °C 45 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min, 1.5% 凝胶电泳检测。将 PCR 产物直接测序, 测序结果与目的序列比对。

1.6 统计分析

统计分析用 SPSS 19 软件包, 数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析对试验结果进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同转染试剂对小鼠精子密度和活力的影响

采用睾丸网注射的方法对 3 种转染试剂的转染效率进行比较, 结果见表 1。与对照组相比, 3 个实验组的精子总数和精子活力均有所降低, 下降的程度由小到大依次为 LipofectamineTM LTX & PLUSTM、Lipofectamine 2000 和 PAMAM-D。数据统计见表 1。

2.2 不同转染试剂对精子转染效率和仔鼠 EGFP 基因表达效率

睾丸网注射后, 不同转染试剂对转基因效率的影响见表 2、图 1 和图 2。图 1 为荧光下精子头部绿色荧光表达, 图 2 为部分仔鼠 PCR 检测结果。表 1 中 LipofectamineTM LTX & PLUSTM 组的阳性

表 1 不同转染试剂对小鼠精子密度和活力的影响 ($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of different transfection reagents on sperm density and motility of male mice ($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Sperm density (10^6 /mL)	Sperm motility (%)
Control	11.34 \pm 0.03 ^a	88.11 \pm 1.61 ^a
PAMAM-D	8.05 \pm 0.05 ^b	75.50 \pm 1.68 ^c
Lipofectamine 2000	10.43 \pm 0.11 ^a	81.14 \pm 0.62 ^b
Lipofectamine TM LTX & PLUS TM	10.11 \pm 0.52 ^a	83.72 \pm 0.51 ^b

Notes: values with different alphabet in the same column are significantly different ($P < 0.05$); the same as other tables.

精子率 (35.65%) 和仔鼠 PCR 阳性率 (29.17%) 均要显著高于其他两组 ($P < 0.05$)。部分仔鼠尾尖和脚趾在荧光下观察可见绿色荧光蛋白表达 (图 3), 其

中 Lipofectamine™ LTX & PLUS™ 组的 EGFP 表达率为 6.94%, Lipofectamine 2000 组为 2.74%, PAMAM-D 组为 4.41%。

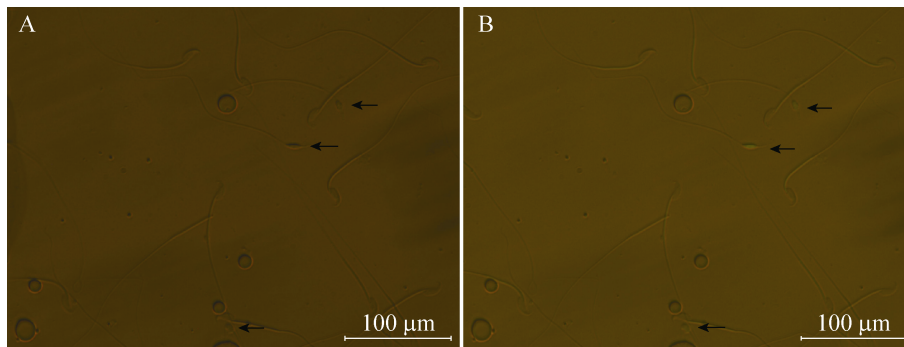


图 1 EGFP 阳性表达精子 (200×)

Fig. 1 Positive sperms with EGFP expression. (A) Sperm under visible light. (B) Sperm under fluorescent.

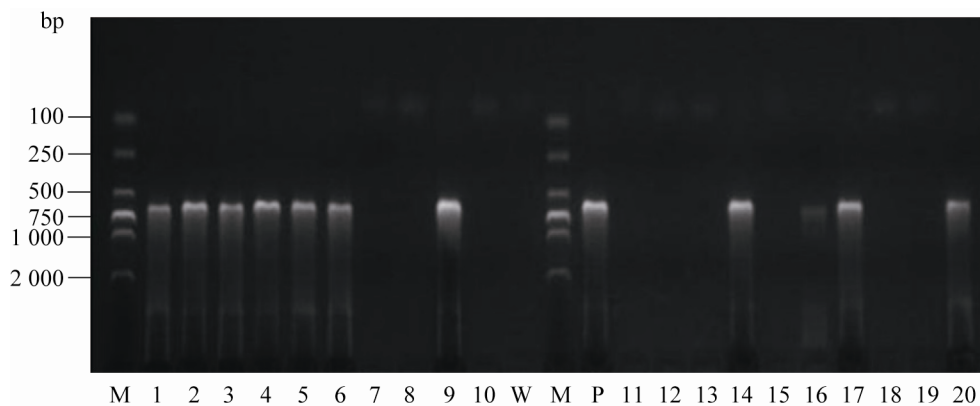


图 2 EGFP 基因 PCR 扩增电泳图

Fig. 2 The electrophoretogram of EGFP production amplified by PCR. 1–20: PCR production of newborn mice; M: DL2000 marker; P: plasmid; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 14, 16, 17 and 20 were PCR positive newborn mice.

表 2 不同转染试剂对精子阳性率和仔鼠 EGFP 基因表达率的影响 ($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of different transfection reagents on the rates of positive sperm and newborn EGFP expression ($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

Transfection reagents	Positive sperm rate (%)	PCR positive rate of newborn mice (%)	EGFP expression rate of newborn mice (%)
PAMAM-D	10.04±0.20 ^a	5.88 (4/68) ^a	4.41 (3/68)
Lipofectamine 2000	12.86±0.35 ^a	13.70 (10/73) ^b	2.74 (2/73)
Lipofectamine™ LTX & PLUS™	35.65±0.69 ^b	29.17 (21/72) ^c	6.94 (5/72)

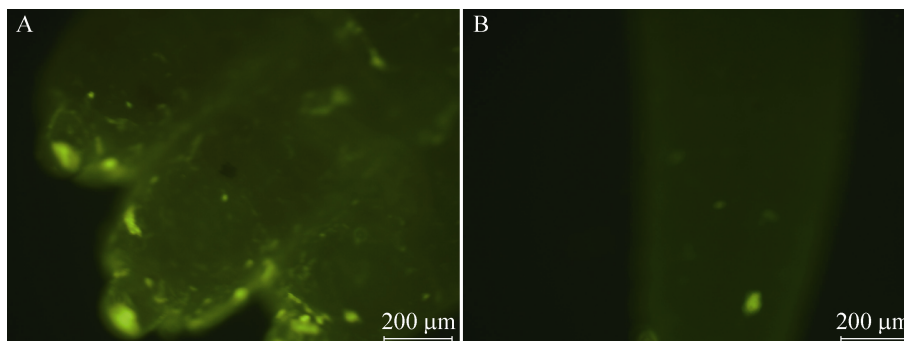


图3 EGFP 转基因阳性仔鼠 (40×)

Fig. 3 EGFP positive newborn mice expressed EGFP. (A) Toes of newborn mice express green fluorescence under fluorescent. (B) Tail end of newborn mice express green fluorescence under fluorescent.

2.3 不同睾丸注射方法对公鼠精子密度和活力的影响

使用 Lipofectamine™ LTX & PLUS™ 转染试剂, 3 种不同睾丸注射方法处理的小鼠睾丸与正常小鼠睾丸相比较均发生萎缩, 睾丸萎缩程度由小到大依次为睾丸网注射、曲精细管注射和睾丸间质注射 (图 4)。不同睾丸方法注射后, 3 者的精子密度和精子活力均有所下降, 其中曲精细管注射法和睾丸间质注射法下降显著 ($P < 0.05$), 睾丸网注射法与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$) (表 3)。

2.4 不同睾丸注射方法对精子转染效率和仔鼠 EGFP 基因表达效率的影响

使用 Lipofectamine™ LTX & PLUS™ 转染试剂进行不同睾丸注射方法对精子转染效率的比较。睾丸网注射后阳性精子的比例为

35.13%, 显著高于曲精细管组 (15.13%, $P < 0.05$)。配种后两组的仔鼠的 PCR 阳性率分别为 30.77% 和 12.50%, 差异显著 ($P < 0.05$)。仔



图4 注射后小鼠睾丸形态

Fig. 4. Mouse testicular morphology after injection. (A) Testes from rete testicular injection method. (B) Testes from seminiferous tubules injection method. (C) Testes from testicular interstitial injection method. (D) Testes from control with physiological saline.

表3 不同睾丸注射方法对公鼠精子密度和活力的影响 ($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of different testicular injection methods on sperm density and sperm of male mice ($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

Injection methods	Sperm density ($10^6/\text{mL}$)	Sperm motility (%)
Control	11.49 ± 0.13^a	89.54 ± 1.48^a
Rete testicular injection	10.21 ± 0.27^a	86.28 ± 1.19^a
Seminiferous tubules injection	8.73 ± 0.11^b	80.55 ± 0.91^b
Testicular interstitial injection	8.09 ± 0.32^b	78.39 ± 0.41^b

表 4 不同转染试剂对精子转染效率和仔鼠 EGFP 基因表达效率 ($n=15$, $\bar{x} \pm s$)Table 4 Effect of different testicular injection methods on the rates of positive sperm and newborn EGFP expression ($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

Injection methods	Positive sperm rate (%)	PCR positive rate of newborn mice (%)	EGFP expression rate of newborn mice (%)
The rete testicular injection	35.13±1.73 ^a	30.77 (24/78) ^a	5.13 (4/78)
Seminiferous tubules injection	15.13±1.46 ^b	12.50 (9/72) ^b	2.78 (2/72)
Testicular interstitial injection	0 ^c	0 (0/54) ^c	0 (0/54)

鼠脚趾和尾尖经荧光检测, 睾丸网注射法有 4 只小鼠呈绿色荧光表达 (5.13%), 曲精细管注射有 2 只呈荧光表达 (2.78%)。睾丸间质注射法未能获得 EGFP 阳性精子, 也未能获得 PCR 阳性和 EGFP 表达后代。

3 讨论

睾丸注射法是一种简单、高效的转基因动物制备方法。睾丸注射法通过对雄性动物睾丸内生精细胞的转染, 使生殖细胞携带外源基因, 从而实现转基因动物的生产。Kim 等^[12]最早研究证实, 小鼠睾丸注射后精原干细胞可以转染外源基因。Li 等^[13]利用睾丸注射法获得转基因鸡, 并且对转基因鸡进行了大群繁殖。但是睾丸注射法仍存在一些不足, 如易造成对动物的睾丸损伤、转染效率较低和不能稳定遗传等问题。本研究从不同转染试剂和注射方法的角度系统探讨睾丸注射对小鼠转基因效率的影响因素。

转染试剂的使用可以提高精子捕获外源基因的能力。Kim 等^[12]将脂质体应用到睾丸注射中, 结果提高了小鼠和猪阳性精子的比例, 成功获得了转基因动物。Celebi 等^[14]利用睾丸注射将 DNA-脂质体混合物注入小鼠睾丸, 通过组织切片观察到外源基因在未成熟的精子和不同阶段生精细胞中均获得表达。Amaral 等^[15]发现, DMSO 也可增加精子捕获外源基因的能力, 提

高睾丸注射后的转基因效率。国内阴彦辉等^[16]结合小鼠的睾丸冰冻切片, 经荧光观察和 PCR 检测, 也证实外源基因经过脂质体包裹后可以在小鼠睾丸内获得表达, 并可传递给下一代。然而不同的转染试剂有着不同的转染原理和效率, 何种转染试剂最适合在睾丸注射中进行应用的研究仍很少。Miao 等利用 Lipofectamine 2000 与 Thanatin 基因相混合进行睾丸注射, 结果获得了 38.46% 的 F1 代仔鼠 PCR 阳性率^[17]。Yonezawa 等^[18]将 8 种商业化的转染试剂与 DNA 混合后注入小鼠睾丸中, 结果显示转染试剂自身特性影响转基因效率, 仅有两种脂质体获得了相对较高的精子阳性率。本研究选择了 3 种常用的转染试剂在小鼠睾丸注射中进行应用, 比较其转染效率的差异, 结果 LipofectamineTM LTX & PLUSTM 组获得的转染效率最高。LipofectamineTM LTX & PLUSTM 和 Lipofectamine 2000 属于同一类转染试剂, 前者是在后者的基础上改良而成, 具有毒性小、转染效率高的特点, 本研究在小鼠的睾丸注射中也证实了这一点。PAMAM-D 是一种纳米化聚酰胺-胺型树枝状聚合物, 已经在动物和人类基因治疗方面取得了良好的应用, 在精子孵育法建立转基因动物研究中也有不错的表现^[19-20], 但在睾丸注射中的应用鲜有人报道。本研究表明 PAMAM-D 可用于小鼠的睾丸注射, 但转染效率不如

Lipofectamine™ LTX & PLUS™ 和 Lipofectamine 2000, 且细胞毒性较大。

除了常用的脂质体法介导外源基因导入, 还有 DMSO 处理法^[3]、慢病毒载体法^[11]、电穿孔法^[21]和直接外源基因注入法^[22]等均可用于睾丸注射。这些方法各有利弊, 实际使用中应根据需求选择合适的方法。

睾丸注射过程本身会对睾丸造成一定的机械损伤, 加上转染试剂的化学毒性, 注射后动物往往出现繁殖性能下降等问题, 因此选择一个对睾丸损伤较小, 转染效率更高的睾丸注射方法尤为重要。Blanchard 等^[23]比较了睾丸网注射和睾丸间质注射对大鼠生精细胞的转染效果, 发现只有睾丸网注射可以成功转染大鼠生精细胞。Park 等^[24]利用重组 EGFP 基因杆状病毒作为表达载体, 对睾丸间质注射和曲精细管注射两者的转染效率进行了比较, 得出曲精细管更适宜对睾丸内生精细胞转染的结论。由于杆状病毒只能在节肢动物中复制, 因此其在脊椎动物的应用中具有较高的生物安全性。Kim 等^[25]通过实时荧光成像系统, 比较了曲精细管注射和睾丸间质注射对 EGFP 基因表达的影响, 结果获得了与 Park 相似的结论。不同的报道有着不同的实验结果, 这可能与每个实验有着不同的操作手法和使用不同的转染试剂有关。本研究比较了睾丸网注射、曲精细管注射和睾丸间质注射 3 种方法对转基因小鼠生产效率的影响, 结果睾丸网注射对小鼠睾丸损伤程度较小, 且获得的转基因效率最高, 睾丸间质由于采用了多点注射的方法, 对睾丸的损伤最大, 未能获得阳性的精子和阳性仔鼠后代。

此外, 本研究还发现仔鼠的 PCR 阳性率与精子的阳性率比较相近, 但成功表达 EGFP 基因的仔鼠比例却不是很高, 表明外源基因在随

后的受精和发育过程中可能发生了丢失或缺失, 影响了外源基因的表达, 需进一步对此种现象形成的机理进行更深入研究。

本研究结果表明, 采用 Lipofectamine™ LTX & PLUS™ 作为转染试剂, 结合睾丸网注射可最大程度降低睾丸注射对小鼠睾丸的损伤, 提高转基因生产效率。

REFERENCES

- [1] Sato M, Yabuki K, Watanabe T, et al. Testis-mediated gene transfer (TMGT) in mice: successful transmission of introduced DNA from F0 to F2 generations. *Transgenics*, 1999, 3(1): 11–22.
- [2] Yamazaki Y, Yagi T, Ozaki T, et al. *In vivo* gene transfer to mouse spermatogenic cells using green fluorescent protein as a marker. *J Exp Zool*, 2000, 286(2): 212–218.
- [3] Shen W, Li L, Pan Q, et al. Efficient and simple production of transgenic mice and rabbits using the new DMSO-sperm mediated exogenous DNA transfer method. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73(5): 589–594.
- [4] Xiao HW, Zheng XM, Chen SH, et al. Sperm-mediated gene transfer to produce hCD59 transgenic porcine. *J Huazhong Agri Univ*, 2006, 25(2): 170–173 (in Chinese).
肖红卫, 郑新民, 陈思怀, 等. 精子介导生产转 hCD59 基因猪. *华中农业大学学报*, 2006, 25(2): 170–173.
- [5] He X, Li H, Zhou Z, et al. Production of brown/yellow patches in the SLC7A11 Transgenic Sheep via testicular injection of transgene. *J Genet Genomics*, 2012, 39(6): 281–285.
- [6] Sun M, Ni LG, Shi QQ, et al. Transfection of Mx gene by testis-mediated method to produce disease resistance transgenic chickens. *J Yangzhou Univ: Agri Life Sci Ed*, 2010, 31(2): 14–18 (in Chinese).
孙敏, 倪黎刚, 施青青, 等. 睾丸注射 Mx 基因生产抗病转基因鸡初探. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2010, 31(2): 14–18.
- [7] Min S, Qing SQ, Hui YY, et al. Generation of

- antiviral transgenic chicken using spermatogonial stem cell transfected *in vivo*. *Afric J Biotech*, 2013, 10(70): 15678–15683.
- [8] Kim TS, Lee SH, Gang GT, et al. Exogenous DNA uptake of boar spermatozoa by a magnetic nanoparticle vector system. *Reprod Domest Anim*, 2010, 45(5): 201–206.
- [9] Collares T, Campos VF, de Leon PMM, et al. Transgene transmission in chickens by sperm-mediated gene transfer after seminal plasma removal and exogenous DNA treated with dimethylsulfoxide or N,N-dimethylacetamide. *J Biosci*, 2011, 36(4): 613–620.
- [10] Ding XL, Zhang HY, Xu X, et al. Construction of transgenic mice by testis rete injection. *Natl J Androl*, 2008, 22(7): 5–8 (in Chinese).
丁晓麟, 张寒莹, 许欣, 等. 睾丸网注射法建立转基因小鼠. *中国男科学杂志*, 2008, 22(7): 5–8.
- [11] Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ line stem cells *in vivo*. *Biol Reprod*, 2004, 71(4): 1202–1207.
- [12] Kim JH, Jung-Ha HS, Lee HT, et al. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. *Mol Reprod Dev*, 1997, 46(4): 515–526.
- [13] Li BC, Sun GB, Sun HC, et al. Efficient generation of transgenic chickens using the spermatogonial stem cells *in vivo* and *ex vivo* transfection. *Sci China C Life Sci*, 2008, 51(8): 734–742.
- [14] Celebi C, Auvray P, Benvegna T, et al. Transient transmission of a transgene in mouse offspring following *in vivo* transfection of male germ cells. *Mol Reprod Dev*, 2002, 62(4): 477–482.
- [15] Amaral MG, Campos VF, Seixas FK, et al. Testis-mediated gene transfer in mice: comparison of transfection reagents regarding transgene transmission and testicular damage. *Biol Res*, 2011, 44(3): 229–234.
- [16] Yin YH, Sun M, Chen TF, et al. Generation of goat H-FABP overexpression transgenic mice by testicular injection. *Hereditas*, 2012, 34(6): 727–735 (in Chinese).
阴彦辉, 孙敏, 陈庭锋, 等. 睾丸注射法制备携带山羊 H-FABP 基因的转基因小鼠. *遗传*, 2012, 34(6): 727–735.
- [17] Miao XY, Zhang X. Production of transgenic mice carrying the Thanatin gene by intratesticular injection. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 415(3): 429–433.
- [18] Yonezawa T, Furuhashi Y, Hirabayashi K, et al. Detection of transgene in progeny at different developmental stages following testis-mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60(2): 196–201.
- [19] Campos VF, Komninou ER, Urriaga G, et al. NanoSMGT: transfection of exogenous DNA on sex-sorted bovine sperm using nanopolymer. *Theriogenology*, 2011, 75(8): 1476–1481.
- [20] Wu B, Dai JJ, Zhang TY, et al. Positive effects of PAMAM-D on the efficiency of boar sperm-mediated gene transfer. *Chin J Vet Sci*, 2013, 33(3): 466–471 (in Chinese).
吴斌, 戴建军, 张廷宇, 等. 纳米化聚酰胺-胺型树状聚合物对猪精子介导基因转移效率的影响. *中国兽医学报*, 2013, 33(3): 466–471.
- [21] Parrington J, Coward K, Hibbitt O, et al. *In vivo* gene transfer into the testis by electroporation and viral infection—a novel way to study testis and sperm function. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 2007, 65: 469–474.
- [22] Yamazaki Y, Fujimoto H, Ando H, et al. *In vivo* gene transfer to mouse spermatogenic cells by deoxyribonucleic acid injection into seminiferous tubules and subsequent electroporation. *Biol Reprod*, 1998, 59(6): 1439–1444.
- [23] Blanchard KT, Boekelheide K. Adenovirus-mediated gene transfer to rat testis *in vivo*. *Biol Reprod*, 1997, 56(2): 495–500.
- [24] Park HJ, Lee WY, Kim JH, et al. Interstitial tissue-specific gene expression in mouse testis by intra-tunica albuginea injection of recombinant baculovirus. *Asian J Androl*, 2009, 11(3): 342–350.
- [25] Kim TS, Choi HS, Ryu BY, et al. Real-time *in vivo* bioluminescence imaging of lentiviral vector-mediated gene transfer in mouse testis. *Theriogenology*, 2010, 73(1): 129–138.

(本文责编 陈宏宇)