

赵为民,任守文,方晓敏,等. 肌肉中特异表达真核载体的构建及表达特异性验证[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(6): 1359-1366.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.06.025

肌肉中特异表达真核载体的构建及表达特异性验证

赵为民, 任守文, 方晓敏, 李碧侠, 涂枫, 付言峰, 赵芳, 王学敏

(江苏省农业科学院畜牧研究所/动物品种改良和繁育重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 为构建肌肉中特异表达真核载体,本试验以 PGL4.10 质粒为骨架,利用基因合成、酶切连接方法获得重组载体,同时利用红色荧光蛋白基因 *DsRed2* 作为标记基因来检测重组载体在非肌源细胞和肌细胞中的表达情况。结果表明,成功构建了含有肌球蛋白轻链基因 *MLC* 启动子及其增强子的肌肉中特异表达载体,通过 mRNA 和蛋白水平检测,该表达载体在非肌源性细胞和肌细胞中均不表达 *DsRed2*,只在分化的肌细胞中表达 *DsRed2*。该表达载体的构建为制备肌肉中特异表达的转基因动物奠定了基础。

关键词: 肌肉; 表达载体; *MLC*; 启动子; *DsRed2*; 肌细胞

中图分类号: Q782 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)06-1359-08

Construction and verification of muscle-specific expression eukaryotic vector

ZHAO Wei-min, REN Shou-wen, FANG Xiao-min, LI Bi-xia, TU Feng, FU Yan-feng, ZHAO Fang, WANG Xue-min

(Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Science/Key Laboratory of Animal Breeding and Reproduction, Nanjing 210014, China)

Abstract: To construct a muscle-specific eukaryotic expression vector and to verify its specific expression, a recombinant vector was constructed using gene synthesis and enzyme digestion ligation method based on PGL4.10 plasmid as a backbone. Meanwhile, a red fluorescent protein (*DsRed2*) was used as a marker to detect the expression of the recombinant vector in non-muscle-derived cells and muscle cells. The results showed that the muscle-specific eukaryotic expression vector containing the promoter and enhancer of myosin light chain (*MLC*) gene was successfully constructed. This expression vector did not express *DsRed2* in non-myogenic cells and muscle cells, and could only express in differentiated muscle cells at mRNA and protein levels. The results provide a solid foundation for the preparation of muscle-specific expression for transgenic animal.

Key words: muscle; expression vector; myosin light chain(*MLC*); promoter; red fluorescent protein(*DsRed2*); myoblasts

在转基因动物的研究和生产中,往往需要借助表

达载体来实现宿主中外源基因的表达,从而使宿主获得由该基因表达而带来的新表型。自从 1980 年 Gordon 首次获得转基因小鼠后^[1],人们迅速运用转基因技术在改变动物的生长性能上做了尝试并取得了较好的结果^[2]。然而随后发现这些表达载体采用的都是无组织特异性的启动子,由此导致外源基因在宿主内的其他组织中以及胚胎发育阶段中持续表达,反而使机体出现一系列异常,对转基因动物自身的生长发

收稿日期:2016-09-22

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08006-003);国家生猪现代产业技术体系(CARS-36)

作者简介:赵为民(1983-),男,湖北钟祥人,博士,助理研究员,主要从事转基因与育种研究。(Tel)025-84391941;(E-mail)zhao_weimin1983@aliyun.com

通讯作者:王学敏,(Tel)025-84391941;(E-mail)wxm116@sina.com

育造成损害^[3-4]。因此,构建有组织表达特异性启动子的载体能避免目的基因表达紊乱带来的危害。

中外猪种在生长速度以及瘦肉率上有明显差别,通过转基因技术将一些对肌肉生长发育有明显促进作用的基因(如 *Follistatin*^[5])转到本地猪中,对其瘦肉率等的改善具有重要意义。此外,还可以利用一些基因(*fat-1*^[6]、*DGAT1*^[7])来改善三元猪高瘦肉率的肉质品质。借助肌肉特异表达载体,不仅可以达到上述目的,还能尽量保障转基因动物生长发育的安全。

肌球蛋白轻链(MLC)是肌纤维粗丝的主要成分,通过与细丝滑动为肌肉收缩提供动力。有研究表明,MLC 基因中的启动子和增强子使其特异表达于终端分化的肌纤维中,其转录活性要比肌细胞以及非肌肉组织高出许多倍^[8]。由 MLC 启动子和增强子构建的肌肉表达载体可避免目的基因表达对肌细胞自身增殖分化和其他组织发育可能造成的不利影响,而且 MLC 在胚胎发育晚期才开始表达^[8-9],进一步避免了目的基因表达对胚胎早期发育造成的危害^[4]。此外,MLC 增强子在物种间具有较强的保守性^[10-11],在不同物种上都能发挥相似的功能,因此其顺式作用元件可以作为一个理想的肌肉特异表达元件。

本研究拟利用大鼠 MLC 基因的启动子和增强子构建肌肉特异表达载体,并利用红色荧光蛋白基因 *DsRed2* 验证其在肌肉中表达的特异性,为下一步制备在肌肉中特异表达的转基因动物提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 细胞 猪肾上皮细胞 PK15、小鼠胚胎成纤维细胞 NIH-3T3、大鼠 L6 肌细胞购于中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心,猪肺泡巨噬细胞 3D4/21 为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购于 NEB 公司, DNA marker、primerSTAR Max Premix 购于 TaKaRa 公司,感受态细胞购于北京全式金公司,质粒提取试剂盒购于 Omega 公司,胶回收试剂盒购于北京天漠科技开发有限公司,DMEM 培养基、胎牛血清、青链霉素和 Lipofectamine 3000 购于 Thermo Fisher 公司,PGL4.10 载体、Dual-Luciferase Reporter Assay System 购于 Promega 公司,MLC

基因启动子 5Promoter 和增强子 3Ehancer 的合成、引物合成、基因测序均由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 PGL4.10-5Promoter 以及 PGL4.10-5Promoter-3Ehancer 质粒构建 以 PGL4.10 质粒为骨架载体,同时双酶切 PGL4.10 质粒和 pUC-5Promoter(*Sac* I+*Xho* I),分别将切下的 PGL4.10 线性载体和 5Promoter 进行回收,然后以 T4 连接酶连接,转化大肠杆菌 Trans5a,培养并挑菌,进行 PCR 与测序鉴定,将该重组载体命名为 PGL4.10-5Promoter。利用 PGL4.10-5Promoter 质粒为骨架载体,同时双酶切 PGL4.10-5Promoter 质粒与 pUC-3Ehancer(*Bam* H I+*Sal* I),分别将切下的 PGL4.10-5Promoter 线性载体和 3Ehancer 进行回收,然后以 T4 连接酶连接,转化大肠杆菌 Trans5a,培养并挑菌,进行 PCR 与测序鉴定,将该重组载体命名为 PGL4.10-5Promoter-3Ehancer。

1.2.2 红色荧光蛋白基因 *DsRed2* 的克隆 根据 pIRES2-*DsRed2* 质粒上 *DsRed2* 基因序列,分别设计编码区上下游引物并引入酶切位点 *Xho* I、*Eco* R I、*Bgl* II 和 *Hid* III、*Xma* I、*Xba* I 以及保护碱基。上游引物(5'-CCGCTCGAGGAATTTCAGATCTGCCACCATGGCCTCCTCC-3')和下游引物(5'-GCTCTAGACCCGGAAGCTTCTACAGGAACAGGTGGTGGC-3')均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。以 pIRES2-*DsRed2* 质粒为模板,用 primerSTAR Max Premix 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:2 μ l 上游引物(10 μ mol/L),2 μ l 下游引物(10 μ mol/L),20 ng 质粒,25 μ l primerSTAR Max Premix,添加 ddH₂O 至总体积为 50 μ l。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 复性 15 s,循环 30 次后于 4 $^{\circ}$ C 下保存。

1.2.3 PGL4.10-5Promoter-*DsRed2*-3Ehancer 质粒构建 琼脂糖凝胶回收 *DsRed2* 基因的 PCR 产物,用 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切 PCR 产物和 PGL4.10-5Promoter-3Ehancer,然后再进行琼脂糖凝胶回收。将回收的 PCR 酶切产物和 PGL4.10-5Promoter-3Ehancer 酶切产物用 T4 DNA 连接酶连接,然后转化大肠杆菌 Trans5a,随机挑取 5 个克隆,PCR 鉴定为阳性后送去测序,待测序正确后再进行酶切鉴定。将该重组载体命名为 PGL4.10-5Promoter-*DsRed2*-3Ehancer。

1.2.4 细胞培养、分化和转染 L6 细胞的培养基为含有 10% FBS 和 1% 青链霉素的 DMEM 培养基,置于含有 5% CO₂的培养箱中,于 37 ℃ 下培养。细胞密度为 70% 时按 1:3 传代。L6 细胞分化为肌管时,换成含 2% 马血清的 DMEM 培养基。转染按照 Lipofectamine 3000 说明书进行,12 孔板步骤主要如下:在 50 μl opti-MEM 中加入 1 μg 质粒和 2 μl P3000™并混匀,在 50 μl opti-MEM 中加入 3 μl Lipofectamine 3000 混匀,然后再相互混匀并在室温下孵育 5 min 后滴加到细胞培养基中。

1.2.5 双荧光素酶活性检测 12 孔板转染前 1 d 铺 L6 细胞,待密度为 80% 左右时分别转染 PGL4. 10-5Promoter 和 PGL4. 10-5Promoter-3Ehancer 质粒,同时分别加入 pRL-TK 质粒作为内参。转染 24 h 后换成含 2% 马血清的 DMEM 培养基分化 3 d,每孔用 PBS 洗 3 次后加入 250 μl 1×PLB 溶液,室温下摇晃 15 min 后根据 Dual-Luciferase Reporter Assay System 说明书进行测定。

1.2.6 RNA 的提取、cDNA 合成及 PCR 扩增 RNA 提取的主要步骤为:12 孔板中吸取培养基后用 PBS 洗 1 遍,加入 1 ml 裂解液并于室温下裂解 5 min,然后加入 200 μl 氯仿混匀后静止 3 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min 后取约 400 μl 上清液,转

移到新的 1.5 ml EP 管中,加入等体积的 70% 乙醇,颠倒混匀,10 000 r/min 离心 45 s,弃掉废液。加 500 μl 去蛋白液 RE,12 000 r/min 离心 45 s,弃掉废液,加入 700 μl 漂洗液 RW,12 000 r/min 离心 60 s,弃掉废液,加入 500 μl 漂洗液 RW,12 000 r/min 离心 60 s,弃掉废液。将吸附柱 RA 放回收集管中,12 000 r/min 离心 2 min,在吸附膜的中间部位加 35 μl RNase free water,室温放置 2 min,12 000 r/min 离心 1 min,-80 ℃ 冰箱中保存备用。

采用 TaKaRa cDNA 合成试剂盒进行反转录,主要步骤为:1 μl Oligo dT primer、1 μl dNTP mixture 和 1 μg RNA 加入 0.2 ml EP 管中,补水至 10 μl,置于 PCR 仪中,于 65 ℃ 下作用 5 min 后立即冰浴 2 min,然后加入 4 μl 5×primerscript II buffer、0.5 μl RNase inhibitor 和 1 μl primerscript II RTase,补水至 20 μl,混匀离心后于 42 ℃ 下反应 60 min,最后以 70 ℃ 热处理 15 min,-80 ℃ 冰箱中保存备用。

PCR 反应条件及体系:10.0 μl premix、0.5 μl 上游引物(10 μmol/L)、0.5 μl 下游引物(10 μmol/L)、2.0 μl cDNA、7.0 μl ddH₂O,总体积 20 μl。PCR 反应条件为:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 20 s,循环 32 次,4 ℃ 保存。引物序列见表 1。

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 The sequence of primer for PCR

基因	GenBank 登录号	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)	产物大小(bp)
<i>HPRT</i> (pig)	NM_001032376.2	CCCAGCGTCGTGATTAGTGA TTGAGCACACAGAGGGCTAC	60	191
<i>HPRT</i> (mouse)	NM_013556.2	CCATCACATTGTGGCCCTCT TTATGTCCCCCGTTGACTGA	60	167
<i>HPRT</i> (rat)	NM_012583.2	ACCACTCAACGGGGGACATA TCCAACACTTCGAGAGGTCC	60	197
<i>EGFP</i>		ATCATGGCCGACAAGCAGAA TCTCGTTGGGGTCTTTGCTC	60	187
<i>DsRed2</i>		CCGACATCCCCGACTACAAG ACGCCGATGAACCTTCACCTT	60	151

2 结果与分析

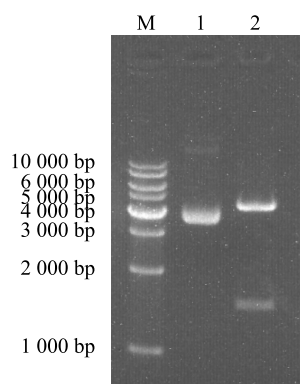
2.1 PGL4. 10-5Promoter 质粒的酶切鉴定

PGL4. 10-5Promoter 质粒经 *Sac* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,切出了约 4 200 bp 的 PGL4. 10 骨架与 1 500

bp 的 5Promoter 条带(图 1),此结果与预期相符。

2.2 PGL4. 10-5Promoter-3Ehancer 质粒的酶切鉴定

图 2 显示,PGL4. 10-5Promoter-3Ehancer 质粒经过 *Bam* H I 和 *Sal* I 双酶切,切出了约 5 700 bp 的

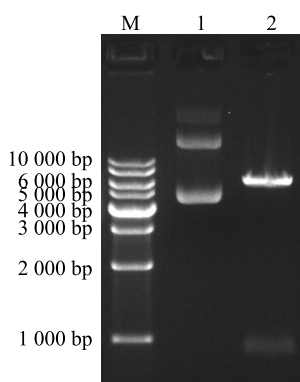


M:1 000 bp DNA ladder;1:PGL4.10-5Promoter 质粒电泳图;2:PGL4.10-5Promoter 质粒 *Sac* I 和 *Xho* I 双酶切。

图1 PGL4.10-5Promoter 质粒的酶切鉴定

Fig.1 Identification of PGL4.10-5Promoter plasmid by enzyme digestion

PGL4.10-5Promoter 骨架与900 bp 的3Ehancer 条带,此结果与预期相符。



M:1 000 bp DNA ladder;1:PGL4.10-5Promoter-3Ehancer 质粒电泳图;2:PGL4.10-5Promoter-3Ehancer 质粒 *Bam* H I 和 *Sal* I 双酶切。

图2 PGL4.10-5Promoter-3Ehancer 质粒的酶切鉴定

Fig.2 Identification of PGL4.10-5Promoter-3Ehancer plasmid by enzyme digestion

2.3 不同载体转录活性的比较

图3显示,加入 *MLC* 增强子后,PGL4.10-5Promoter-3Ehancer 载体的转录活性比只有 *MLC* 启动子的 PGL4.10-5Promoter 载体高出4.5倍,而PGL4.10载体作为参照显示出极低的转录活性。

2.4 *DsRed2* 基因的克隆

以 pIRES2-*DsRed2* 为模版,获得的 *DsRed2* 基因产物经琼脂糖凝胶电泳后大小约为700 bp(图4),此结果与预期相符。

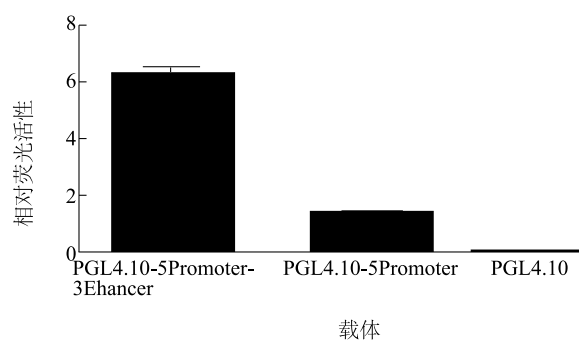
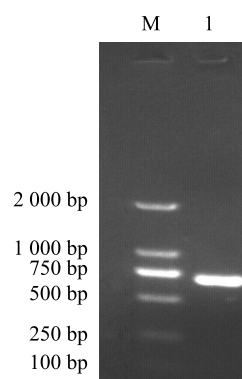


图3 不同载体转录活性的比较

Fig.3 Comparison of transcriptional activity for different vectors



M:DL2000;1:*DsRed2*。

图4 *DsRed2* 的PCR扩增

Fig.4 Amplification of *DsRed2* gene by PCR

2.5 PGL4.10-5Promoter-*DsRed2*-3Ehancer 的酶切鉴定

构建好的重组质粒 PGL4.10-5Promoter-*DsRed2*-3Ehancer(图5)经过 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切后得到约4 900 bp 的 PGL4.10-5Promoter-3Ehancer 骨架与700 bp 的 *DsRed2* 条带(图6),此结果与预期相符。

2.6 PGL4.10-5Promoter-*DsRed2*-3Ehancer 肌肉特异性表达的验证

将 PGL4.10-5Promoter-*DsRed2*-3Ehancer 与 pEGFP-C1 质粒按照4:1的比例进行转染,转染3种非肌源性细胞(猪肺泡巨噬细胞,3D4/21;猪肾上皮细胞,PK15;小鼠胚胎成纤维细胞,NIH-3T3)和大鼠肌细胞L6后检测。从图7的RT-PCR结果中可以看出,在mRNA水平上,非肌源性细胞、大鼠肌细胞和分化的肌细胞中增强型绿色荧光蛋白基因 *EGFP* 都转录表达,而红色荧光蛋白基因 *DsRed2* 不转录表达,当肌细胞开始分化为肌纤维时红色荧光蛋白基因 *DsRed2* 才开始转录表达。*HPRT* 基因为内参基因。

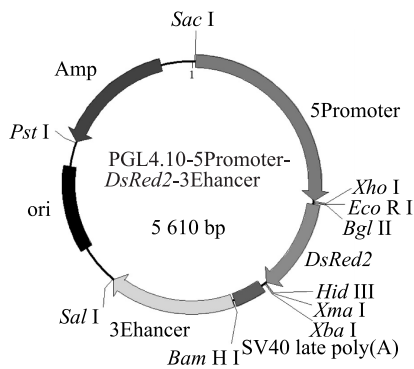
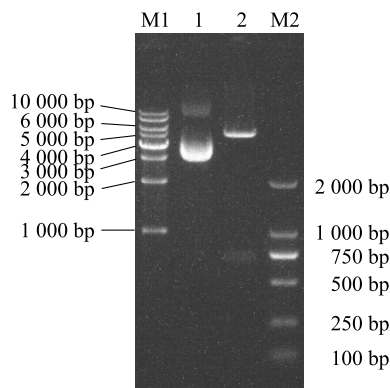


图5 PGL4.10-5Promoter-DsRed2-3Ehancer 质粒图谱

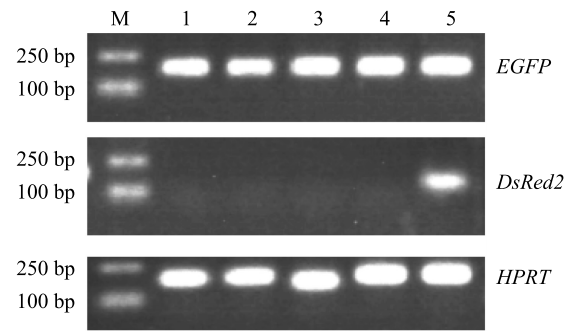
Fig. 5 The map of PGL4.10-5Promoter-DsRed2-3Ehancer plasmid



M1:1000DNA ladder; M2:DL2000;1:PGL4.10-5Promoter-DsRed2-3Ehancer 质粒;2:PGL4.10-5Promoter-DsRed2-3Ehancer 质粒Xho I和Xba I 双酶切。

图6 PGL4.10-5Promoter-DsRed2-3Ehancer 的酶切鉴定

Fig. 6 Identification of PGL4.10-5Promoter-DsRed2-3Ehancer plasmid by enzyme digestion



M: DL2000;1:3D4/21 细胞;2:PK15 细胞;3:NIH-3T3 细胞;4:L6 细胞;5:L6 细胞分化 3 d。

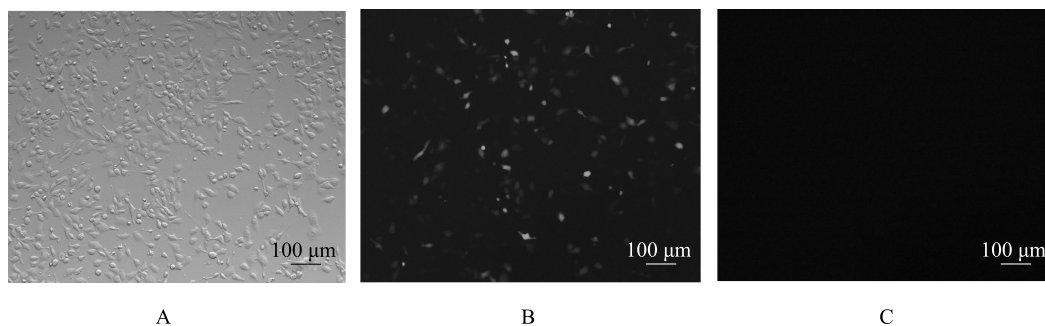
图7 PGL4.10-5Promoter-DsRed2-3Ehancer 转染非肌源细胞和肌细胞后 DsRed2 的 mRNA 水平检测

Fig. 7 DsRed2 mRNA detection in non myogenic cells and muscle cells transfected with PGL4.10-5Promoter-DsRed2-3Ehancer

从图8至图12中可以看出,在蛋白水平上,非肌源性细胞与大鼠肌细胞中绿色荧光蛋白都表达,而红色荧光蛋白不表达,当肌细胞开始分化为肌纤维时该载体才开始表达红色荧光蛋白。

3 讨论

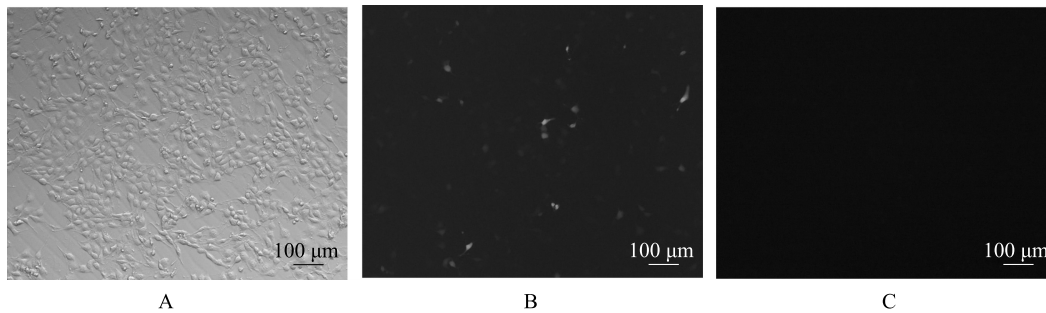
PGL载体系列被专门用来研究一些顺式作用元件(包括启动子和增强子等)的活性,利用其骨架作为转基因表达载体的研究也有过报道^[4]。PGL4是新一代载体,与以往的PGL2和PGL3载体相比,其骨架上又进行了进一步的优化,去除了一些潜在的转录因子结合位点,从而使该载体的表达更为严谨、可靠^[12],这也是本研究选用PGL4.10作为骨架来



A:明场下的3D4/21细胞;B:470 nm光波激发下的3D4/21细胞;C:554 nm光波激发下的3D4/21细胞。

图8 PGL4.10-5Promoter-DsRed2-3Ehancer 转染3D4/21细胞48 h后的DsRed2荧光检测

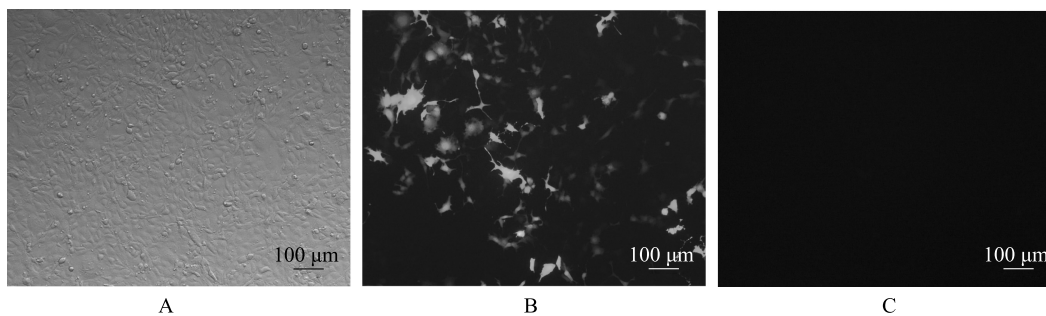
Fig. 8 DsRed2 fluorescence detection for 3D4/21 cells transfected with PGL4.10-5Promoter-DsRed2-3Ehancer after 48 h



A: 明场下的 PK15 细胞; B: 470 nm 光波激发下的 PK15 细胞; C: 554 nm 光波激发下的 PK15 细胞。

图 9 PGL4. 10-5Promoter-*DsRed2*-3Ehancer 转染 PK15 细胞 48 h 后的 *DsRed2* 荧光检测

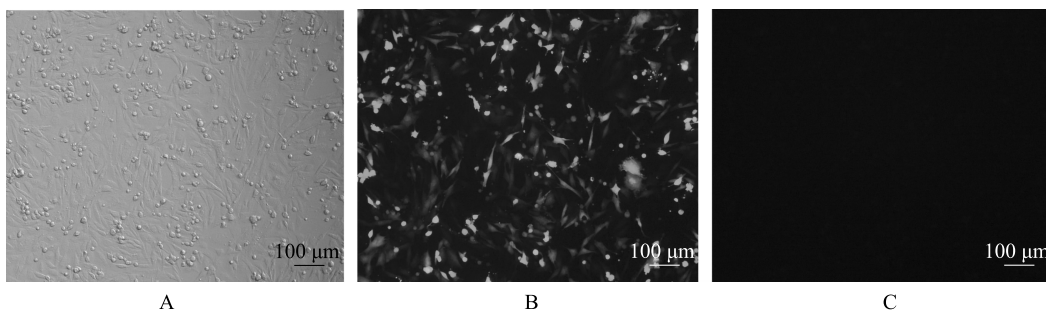
Fig. 9 *DsRed2* fluorescence detection for PK15 cells transfected with PGL4. 10-5Promoter-*DsRed2*-3Ehancer after 48 h



A: 明场下的 NIH-3T3 细胞; B: 470 nm 光波激发下的 NIH-3T3 细胞; C: 554 nm 光波激发下的 NIH-3T3 细胞。

图 10 PGL4. 10-5Promoter-*DsRed2*-3Ehancer 转染 NIH-3T3 细胞 48 h 后的 *DsRed2* 荧光检测

Fig. 10 *DsRed2* fluorescence detection for NIH-3T3 cells transfected with PGL4. 10-5Promoter-*DsRed2*-3Ehancer after 48 h



A: 明场下的 L6 细胞; B: 470 nm 光波激发下的 L6 细胞; C: 554 nm 光波激发下的 L6 细胞。

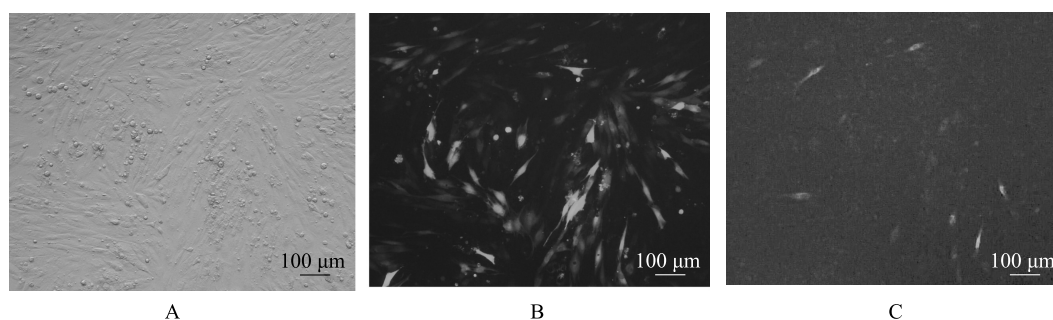
图 11 PGL4. 10-5Promoter-*DsRed2*-3Ehancer 转染 L6 48 h 后的 *DsRed2* 荧光检测

Fig. 11 *DsRed2* fluorescence detection for L6 cells transfected with PGL4. 10-5Promoter-*DsRed2*-3Ehancer after 48 h

构建重组载体的原因。增强子是一段能增强基因转录的元件,与其在基因座位上的方向和位置关系不大^[13],但是在构建载体过程中,考虑到 *MLC* 基因座位上增强子原本的位置结构^[14],因而还是将增强子序列构建到了转录终止序列的下游端,从荧光活性结果可知,这段增强子确实起到了增强基因转录的

作用。

红色荧光蛋白可在 554 nm 左右光波的激发下显现红色荧光,由于其检测的直观性和便捷性,因此红色荧光蛋白基因 *DsRed2* 已被广泛用于转基因^[15-16]和一些基础生物学^[17-18]的研究中。本试验利用 *DsRed2* 基因这一特点有效评估了重组载体在



A:明场下分化3 d的L6细胞;B:470 nm光波激发下分化3 d的L6细胞;C:554 nm光波激发下分化3 d的L6细胞。

图12 PGL4. 10-5Promoter-*DsRed2*-3Enhancer 转染L6细胞分化3 d后的*DsRed2*荧光检测

Fig. 12 *DsRed2* fluorescence detection for 3d-differentiated L6 cells transfected with PGL4. 10-5Promoter-*DsRed2*-3Enhancer

肌肉中表达的特异性。pEGFP-C1质粒的启动子为组成性启动子,可在多种细胞系中表达绿色荧光蛋白。试验中将PGL4. 10-5Promoter-*DsRed2*-3Enhancer质粒与pEGFP-C1质粒按照4:1的比例进行共转染,这样如果少量的pEGFP-C1质粒能表达EGFP,那么就说明PGL4. 10-5Promoter-*DsRed2*-3Enhancer质粒大都转染到细胞里了。研究结果表明,无论是非肌源性细胞、肌细胞和分化的肌细胞,通过与明场比较,EGFP表达的细胞数占总数比例较高,说明PGL4. 10-5Promoter-*DsRed2*-3Enhancer质粒的转染效率较高,避免了由于转染效率低而带来的假阴性结果。通过对*DsRed2*表达的分析发现,PGL4. 10-5Promoter-*DsRed2*-3Enhancer质粒在肌细胞开始分化为肌纤维时才开始表达*DsRed2*,验证了该质粒肌肉表达的高特异性。本试验在验证该质粒肌肉表达的特异性时,虽然只选取了数量不多的3种细胞类型,然而这3种细胞类型也代表了常见的成纤维细胞、上皮细胞以及免疫细胞等,因而在一定程度上可以说明该载体肌肉表达的特异性较强。

在以往的转基因研究中,外源基因是以随机插入方式整合到基因组中,而这种随机方式往往导致外源基因表达的可控性差甚至不表达^[19],因而导致后代外源基因表达水平的差异较大^[20],很难获得表达稳定且整齐性好的个体。定点整合因为其表达稳定而且不易沉默^[19]等特点成为当前转基因动物生产中较好的方法。外源基因片段的大小是影响其整合到基因组效率的一个重要因素,本试验构建的载体大小适中,利于细胞转染和基因组整合,可适当提高由CRISPR/Cas9介导的定点敲入效率^[21-22]。此外,我们在*DsRed2*两侧还额外引入了多个酶切位

点,方便其他目的基因的置换和引入,从而使该载体被更广泛地应用于转基因以及组织特异疾病模型构建等研究中。

参考文献:

- [1] GORDON J W, SCANGOS G A, PLOTKIN D J, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980, 77 (12): 7380-7384.
- [2] PALMITER R D, BRINSTER R L, HAMMER R E, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes [J]. *Nature*, 1982, 300(5893): 611-615.
- [3] MAYO K E, HAMMER R E, SWANSON L W, et al. Dramatic pituitary hyperplasia in transgenic mice expressing a human growth hormone-releasing factor gene [J]. *Molecular Endocrinology*, 1988, 2(7): 606-612.
- [4] JI S, HARDY R W, WOOD P A. Transgenic expression of n-3 fatty acid desaturase (*fat-1*) in C57/BL6 mice: Effects on glucose homeostasis and body weight [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2009, 107(4): 809-817.
- [5] LEE S J, MCPHERRON A C. Regulation of myostatin activity and muscle growth [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(16): 9306-9311.
- [6] LAI L, KANG J X, LI R, et al. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids [J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(4): 435-436.
- [7] LI T, XU D, ZUO B, et al. Ectopic overexpression of porcine DGAT1 increases intramuscular fat content in mouse skeletal muscle [J]. *Transgenic Research*, 2013, 22(1): 187-194.
- [8] ROSENTHAL N, KORNHAUSER J M, Donoghue M, et al. Myosin light chain enhancer activates muscle-specific, developmentally regulated gene expression in transgenic mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989, 86(20): 7780-7784.

- [9] GAUTHIER G F, LOWEY S. Distribution of myosin isoenzymes among skeletal muscle fiber types[J]. The Journal of Cell Biology, 1979, 81(1): 10-25.
- [10] ROSENTHAL N, BERGLUND E B, WENTWORTH B M, et al. A highly conserved enhancer downstream of the human *MLC1/3* locus is a target for multiple myogenic determination factors[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(21): 6239-6246.
- [11] WENTWORTH B M, DONOGHUE M, ENGERT J C, et al. Paired MyoD-binding sites regulate myosin light chain gene expression[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991, 88(4): 1242-1246.
- [12] ZHUANG Y, BUTLER B, HAWKINS E, et al. New synthetic Renilla gene and assay system increase expression, reliability and sensitivity[J]. Promega Notes, 2001, 79: 6-11.
- [13] BANERJI J, RUSCONI S, SCHAFFNER W. Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences[J]. Cell, 1981, 27(2): 299-308.
- [14] DONOGHUE M, ERNST H, WENTWORTH B, et al. A muscle-specific enhancer is located at the 3' end of the myosin light-chain 1/3 gene locus[J]. Genes & Development, 1988, 2(12b): 1779-1790.
- [15] NISHIZAWA K, KITA Y, KITAYAMA M, et al. A red fluorescent protein, *DsRed2*, as a visual reporter for transient expression and stable transformation in soybean[J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(12): 1355-1361.
- [16] SATO Y, IGARASHI Y, HAKAMATA Y, et al. Establishment of Alb-*DsRed2* transgenic rat for liver regeneration research[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 311(2): 478-481.
- [17] SHCHERBO D, MERZLYAK E M, CHEPURNYKH T V, et al. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging[J]. Nature Methods, 2007, 4(9): 741-746.
- [18] WEBER J, WEBEROVA J, CAROBENE M, et al. Use of a novel assay based on intact recombinant viruses expressing green (*EGFP*) or red (*DsRed2*) fluorescent proteins to examine the contribution of pol and env genes to overall HIV-1 replicative fitness[J]. Journal of Virological Methods, 2006, 136(1): 102-117.
- [19] IRION S, LUCHE H, GADUE P, et al. Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(12): 1477-1482.
- [20] MURRAY J D, NANCARROW C D, MARSHALL J T, et al. Production of transgenic merino sheep by microinjection of ovine metallothionein-ovine growth hormone fusion genes[J]. Reproduction, Fertility and Development, 1989, 1(2): 147-155.
- [21] RUAN J, LI H, XU K, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated transgene knockin at the H11 locus in pigs[J]. Scientific Reports, 2015, 5:14253.
- [22] PLATT R J, CHEN S, ZHOU Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling[J]. Cell, 2014, 159(2): 440-455.

(责任编辑:王 妮)