

鸡鸭异种间转基因嵌合体的制备

李林凤¹, 浦亚斌², 宫雪莲², 白春雨², 白秀娟^{1*}, 关伟军^{2*}

(1. 东北农业大学动物科技学院, 哈尔滨 150000; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 为研究异种间嵌合体的制作方法及供体和受体的嵌合情况, 同时探讨绿色荧光蛋白(pEGFP-N₃)基因作为报告基因在转基因动物制作中的应用价值。本研究利用脂质体介导法将外源 pEGFP-N₃ 质粒转入到北京鸭原始生殖细胞(PGCs)中, 将转染后的 PGCs 以微注射法转移至受体北京油鸡的胚下腔, 探索转基因鸡鸭嵌合体的制作方法。结果显示: PGCs 在转染后 6 h 开始有外源基因的表达, 体外培养 24 h 后获得了 33.6% 的转染效率。120 枚蛋在整个孵化期中共有 33 枚鸡胚发育, 但最终无孵化成活鸡。在 13 个鸡胚中检测到有外源基因的存在, 阳性率为 10.8%。PCR 扩增禽类 W 染色体特异性的重复序列发现, 8 只嵌合体公鸡的性腺都嵌入了供体异性的细胞。研究结果表明所采用的嵌合体制作方法制备转基因禽类是可行的。鸭 PGCs 能够迁移并定居到鸡胚性腺中, 并有可能在鸡性腺中增殖分化成有功能的配子。

关键词: 鸡; 鸭; 原始生殖细胞; 种间嵌合体; 转基因鸡; pEGFP-N₃

中图分类号: S83; S813.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)01-0010-06

Production of Interspecies Duck/Chicken Transgenic Chimeras

LI Lin-feng¹, PU Ya-bin², GONG Xue-lian², BAI Chun-yu², BAI Xiu-juan^{1*}, GUAN Wei-jun^{2*}

(1. College of Animal Science & Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150000, China; 2. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: In this study, plasmid pEGFP-N₃ was introduced into the duck PGCs via lipofectamine *in vitro*. The transfected PGCs were injected into the subgerminal cavity of the recipient chicken to find a kind of method which would produce interspecies duck/chicken chimeras and contribute to transgenic study via chimeras. The Beijing duck was used as the donor and the Beijing Fatty chicken was the recipient, the duck/chicken chimeras were constructed via Windowing technique. The exogenous gene was expressed in PGCs transfected for 6 h later, and cultured for 24 h *in vitro*, the transfection rate reached 33.6%. 33 chicken embryos of 120 chicken eggs were obtained. Eventually 13 chimeric embryos were obtained, but there was no a surviving chicken. The exogenous gene were detected in 10.8% (13/120) of the embryos examined. Heterosexual cells were found in the gonads of 8 chimeras through PCR to amplify the W-specific repeating sequences. The results indicated that it was possible to produce transgenic avians by constructing chimeras with the method adopted in this study. Furthermore, these results suggested that duck PGCs could migrate, colonize and proliferate in chicken gonads together with chicken's PGCs during development.

Key words: chicken; duck; primordial germ cells; inter-species chimeras; transgenic chicken; pEGFP-N₃

收稿日期: 2009-02-13

基金项目: 国家“863”研究项目(2006AA10Z198, 2007AA10Z170)

作者简介: 李林凤(1974-), 女, 山西忻州人, 博士, 主要从事遗传育种与繁殖方面的研究, E-mail: lilinfeng219@126.com; 浦亚斌(1977-), 男, 北京人, 助理研究员, 主要从事遗传育种与繁殖方面的研究, E-mail: binbin_pu@iascaas.net.cn, 二者并列第一作者

* 通讯作者: 关伟军, E-mail: wjguan86@126.com; 白秀娟, E-mail: bxj630306@163.com

转基因技术已在许多哺乳动物和鱼类上取得成功^[1],但是,由于禽类生殖生理结构及其卵的特殊性,禽类的转基因工作面临着许多困难。目前,已有多种方法被应用于禽类的转基因研究,例如原核显微注射法、胚体直接转染法、精子载体转基因法和嵌合体法等。其中,利用嵌合体途径制作转基因禽的方法,因具有可对供体细胞进行遗传修饰而得到纯合的转基因个体^[2]等独特的优点而越来越受到研究者的关注。ES 细胞介导的转基因动物制作途径建立于 1986 年^[3]。Petitte 等^[4]、Thoraval 等^[5]、Ono 等^[6]又分别运用 BCs 制作了芦花鸡与白来航、野生羽色鹌鹑与白羽鹌鹑的嵌合体。Yasuda 等^[7]将鸡 PGCs 移植入鹌鹑中制作了种间嵌合体。英国和加拿大实验室^[8]将表达 GFP 的 ES 细胞与 8~16 细胞期胚胎聚合,得到绿色荧光蛋白嵌合体小鼠。国内近年来也开始进行将 GFP 基因引入 ES 细胞的研究^[9-10]。

通过 PGCs 途径建立表达 GFP 的鸡鸭嵌合体在国内尚未见报道。本试验中,以北京鸭为供体,北京油鸡为受体,将 pEGF-N₃ 基因转入鸭 PGCs,并进行 PGCs 囊胚腔注射,以期获得 PGCs 介导的绿色荧光鸡鸭嵌合体,对 GFP 基因在禽体内表达的安全性、嵌合体的制作及转基因禽进行了探索和研究,以期为转基因禽的生产打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供体北京鸭(白羽)受精蛋,受体北京油鸡(褐色羽)受精蛋均购自中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。DMEM、0.05% trypsin/0.02% EDTA、质粒 pEGFP-N₃ 和脂质体 Lipofectamine 2000 均为 Invitrogen 公司产品,FBS 为德国血清。1%明胶、Taq 酶为 Promega 产品,W 染色体上重复序列特异性引物和 GFP 基因特异性引物由北京赛百盛公司合成。主要仪器设备包括凝胶成像系统(GIS-700D)、细胞培养箱、体视镜、荧光显微镜(Olympus)等。

1.2 鸭 PGCs 的分离与培养

取孵化 7 d 的鸭胚,在无菌条件下去除内脏,用眼科镊挑取生殖腺及其周围组织,PBS 冲洗 2~3 次;用 0.25% 胰酶(含 0.04% EDTA)消化 5~10 min;中和胰酶,800 r·min⁻¹ 离心 5~8 min;去上清,加入新鲜的培养液,移入铺有饲养层的培养板上

培养。不同代次的 PGCs 可以冷冻保存在液氮中。

1.3 鸭 PGCs 未分化状态及多能性的鉴定

碱性磷酸酶检测采用 BCIP/NBT 法进行染色;糖原(PAS)检测采用高碘酸-Schiff 试剂进行染色^[11];体内成瘤试验,将含有 1×10^6 个 PGCs 的悬液 0.1 mL 接种于 1 周龄雏鸭腹股沟皮下,观测畸胎瘤的形成;体外类胚体形成试验,将 PGCs 消化成单细胞悬液,加不含 LIF 的培养液在培养皿内培养,每天定时摇晃培养皿数次。

1.4 鸭 PGCs 的体外转染

先将 1×10^5 个细胞用 200 μ L DMEM 悬浮起来,并将细胞悬液加入到预先用 1%明胶处理的 24 孔培养板中;将不同比例的质粒和脂质体混合孵育 15 min,然后用 200 μ L DMEM 稀释并加入到上述细胞转染皿里;把转染细胞在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中孵育 6 h;用含有 10%胎牛血清的 DMEM 400 μ L 代替转染液,细胞孵育在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中过夜;荧光显微镜下观察,计算转染率。

1.5 鸡鸭嵌合体的制备

1.5.1 蛋壳膜的制备 取新鲜鸡蛋若干,用 0.2%的新洁尔灭溶液浸泡灭菌 5 min,取出,无菌条件下在蛋的气室端敲一小孔,让其内容物流出,去壳,留膜,将膜洗干净后浸泡于含抗生素的生理盐水中,放于 4 $^{\circ}$ C 冰箱待用。

1.5.2 受体种蛋预处理 受体(北京油鸡)的种蛋不孵化,直接放在外面锐端向上偏 15 $^{\circ}$ ~20 $^{\circ}$ 角,静置 5~6 h。注射前先用 0.2%的新洁尔灭清洗,然后依次用碘酒和酒精擦拭消毒鸡蛋表面。

1.5.3 显微注射 选取已转染 pEGFP-N₃ 的生长良好的 PGCs,加入 0.5 mL 左右 0.25%胰蛋白酶-0.04% EDTA 消化液,将 PGCs 分散成单个细胞后 800 r·min⁻¹ 离心 5 min,去上清,用培养液重悬,制成细胞密度为 $10^6 \sim 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液,以备显微注射用。

在无菌条件下,用镊子在受体种蛋锐端偏下方敲开一直径为 0.5~1 cm 的切口,并用显微注射针(尖端直径为 25~30 μ m 并呈 30 $^{\circ}$ 角)进行显微注射,将 2 μ L(100~200 个 PGCs· μ L⁻¹)供体鸭 PGCs 注射至受体种蛋的鸡胚胚下腔。

1.5.4 封口及孵化 注射后先注射少许抗生素,随后用蛋壳膜和蛋壳进行封口。然后钝端向上孵化,前 18 d 孵化温度为 38.5 $^{\circ}$ C,相对湿度为 60%,翻蛋角度 $\pm 45^{\circ}$,每隔 2 h 翻蛋 1 次,后 3 d 停止翻

蛋。孵化期间定期观察胚胎发育情况。

1.6 嵌合体性腺 RNA 的提取及 W 染色体上特异性重复序列的检测

取出胚胎的性腺,以 Trizol 试剂盒常规提取总 RNA。W 染色体上重复序列(315 bp)特异性引物为上游引物 F1: 5'-CCCAAATATAACACGCT-TCACT-3' 和下游引物 R1: 5'-GAAATGAAT-TATTTTCTGGCGAC-3'。逆转录反应为 10 μ L 体系。PCR 反应为 50 μ L 体系,30 个循环,反应条件和操作均参照试剂盒说明。

1.7 外源基因 pEGFP-N₃ 在早期嵌合体胚中的 RT-PCR 检测

在胚胎各脏器中随机部分取材,以 Trizol 试剂盒常规提取总 RNA,GFP(716 bp)基因特异性引物上游为引物 F1: 5'-CACCATGGTGAG-CAAGGGCGAG-3' 和下游引物 R1: 5'-CTTGTA-CAGCTCGTCCATGCCGA-3'。具体步骤同上。

2 结果

2.1 PGCs 的分离、保存与鉴定

PGCs 克隆在倒置光镜下呈岛屿状隆起,边缘整齐,表面平滑,结构致密,细胞间界限不清(图 1A)。经台盼蓝染色后显示,冷冻 3 个月后解冻的 PGCs 成活率达到 85% 以上。PGCs 碱性磷酸酶染色阳性,细胞克隆呈深黑色(图 1B)。PAS 染色后 PGCs 集落和单个 PGCs 呈深紫红色,显阳性;而饲养层细胞不着色(图 1C)。在成瘤试验中,畸胎瘤显示绿色荧光,肿瘤组织含有来源于 3 个胚层的多种细胞类型。类胚体形成试验中,3~5 d 细胞团开始分层,形成简单类胚体,外层细胞大而松散,内层细胞小而紧密,6~12 d 分层增多,出现囊胚腔,成圆泡状,胚体贴壁培养后 2~3 d,细胞团周边可自发分化为多种形态的细胞(图 1D)。

2.2 鸭 PGCs 的体外转染

本试验通过各种条件优化,采用 6 μ L 脂质体介导 2 μ g 重组质粒 pEGFP-N₃ 转染鸭 PGCs,温育时间为 6 h,转染 24 h 时荧光表达率最高达 33.6%。荧光显微镜下可见克隆发出较强绿色荧光,表面荧光强度均匀(图 2),传代后荧光强度未见衰减。消化成单细胞悬液后,细胞小、圆而亮,几乎所有单个 ES 细胞均发出绿色荧光。

2.3 嵌合体制作结果

本试验采用了 Speksnijder 等^[12]改进的方法,

通过在赤道部打孔将 PGCs 注射到 120 枚受体的胚下腔(图 3A-C)。在整个孵化期中共有 33 枚鸡胚发育(图 3D),但最终无孵化成活鸡。在孵化的前 1~8 d 和第 14~18 天,胚胎出现了 2 个死亡高峰期,这与 Bednarczyk 等^[13] 和刘士寻等^[14] 的研究结果一致。造成孵化前期的高胚胎死亡率的原因可能与不同品种间的免疫排斥反应和外源基因对 PGCs 活力的影响有关,具体原因有待进一步研究。

2.4 禽类 W 染色体上重复序列的 PCR 检测

对上述 33 只鸡胚中 18 只雄性鸡胚的睾丸进行 W 染色体上特有重复序列的 PCR 检测表明,在 8 只雄性嵌合体的性腺中都存在有 W 染色体特异重复序列,这表明在嵌合公鸡的性腺中都嵌合了供体鸭的雌性细胞(图 4)。

2.5 外源基因在 12 日龄鸡胚中的表达

本试验共操作了 120 枚鸡蛋,经过孵化共得到 33 枚发育的鸡胚。通过 PCR 扩增,我们在 13 个鸡胚中检测到了外源 pEGFP-N₃ 基因的存在,阳性率为 10.8%(13/120)。从 13 个鸡胚中随机取材检测 pEGFP-N₃ 基因在嵌合体的心、肺、肾、脑和性腺等 5 种组织中的差异表达(图 5)。从图中可明显看出 pEGFP-N₃ 基因在嵌合体不同组织中呈差异性表达,在心脏和肾脏中表达率较高,在肺和大脑中表达相对较弱,在性腺中没有表达,说明要真正达到生殖系的嵌合是很困难的。

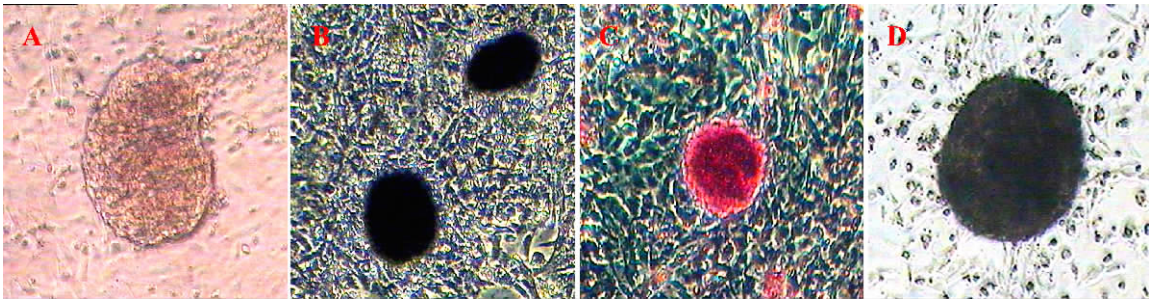
3 讨论

近年来研究资料表明 PGCs 是一种多潜能的细胞,为研究细胞的分化、决定方面提供了重要材料。目前,利用移植冷冻保存的种内血液和性腺 PGCs 都已获得供体后代^[15-16]。由于禽类胚胎和卵子不能象哺乳动物那样冷冻保存,PGCs 的分离冷冻保存对鸟类物种保护有很大的应用价值。

GFP 基因来源于低等水生动物水母,普遍认为此基因的整合不影响胚胎的正常发育。为探讨这一问题,我们进行了未转染 GFP 基因的 PGCs 囊胚腔注射作为对照,数据显示转染 GFP 基因组囊胚存活率较未转染 GFP 基因组明显降低,提示 GFP 基因的表达可能在一定程度上对胚胎存在毒性作用。本试验采用脂质体介导法将质粒 pEGFP-N₃ 转入 PGCs,导入 pEGFP-N₃ 基因的 PGCs 克隆在形态上与转染前无明显差异,碱性磷酸酶染色、成瘤试验、胚体形成试验均为阳性,表明 GFP 的表达对 ES 细

胞的生长及未分化状态和全能性无明显影响,但 *GFP* 基因对 ES 的活力是否真正有影响还有待进一

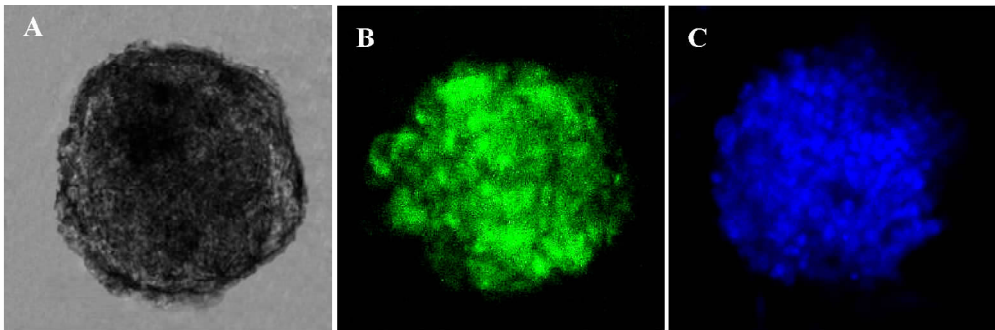
步研究,这也是本试验未获得出壳嵌合体的原因之一。



A. 原代 PGCs; B. BCIP/NBT 染色; C. PAS 染色; D. 类胚体
A. PGCs; B. BCIP/NBT staining; C. PAS staining; D. Embryoid

图 1 AKP 和 PAS 染色(100×)

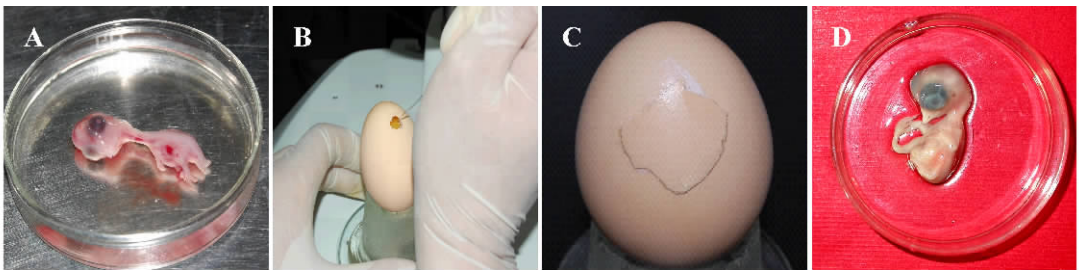
Fig. 1 AKP and PAS staining(100×)



A. PGCs; B. pEGFP-N₃ 的表达; C. DAPI 复染转染细胞
A. PGCs; B. The expression of pEGFP-N₃; C. DAPI nuclear counterstained

图 2 转染后 24 h 绿色荧光蛋白基因 pEGFP-N₃ 的表达(200×)

Fig. 2 The expression of pEGFP-N₃ in PGCs at 24 h after transfection(200×)



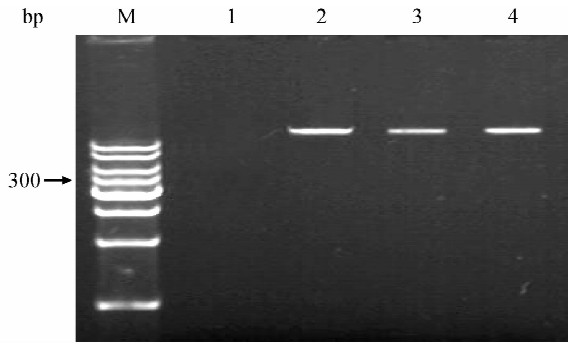
A. 获取 PGCs 的 8 日龄鸭胚; B. 显微注射鸭 PGCs; C. 代用蛋壳封口; D. 12 日龄鸡鸭嵌合体胚胎
A. Eight days old duck embryo; B. Microinjection of duck PGCs; C. Sealing with substitute eggshell; D. Twelve days old chimera embryo

图 3 嵌合体的制备

Fig. 3 Chimeric preparation

易学瑞等^[17]用 LipofectamineTM 和 pEGFP-C₁ 质粒转染鸡胚盘细胞的最高效率达到了 6%。本次试验中我们的转染效率(33.6%)明显高于前人的结果,分析可能的原因,首先是所用的脂质体质量所导致的;其次是受精蛋的新鲜程度。受精蛋刚产出时,

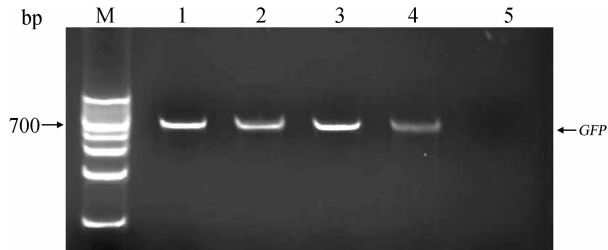
胚盘细胞处于 X 期,但是即使在低温下,胚盘也可缓慢发育,所以受精蛋的新鲜程度可影响到转染时胚盘细胞所处的状态,从而也会对转染产生影响。在本试验中,随着培养时间的延长,表达外源基因的 PGCs 数量减少,外源基因的表达强度也随之减弱。



M. DNA 相对分子质量标准; 1. 北京油鸡 (♂); 2. 北京鸭 (♀); 3. 嵌合体 1 (♂); 4. 嵌合体 2 (♂)

M. DNA marker; 1. Beijing Fatty chicken (♂); 2. Beijing duck (♀); 3. Chimera 1 (♂); 4. Chimera 2 (♂)

图 4 睾丸中禽类 W 染色体特异重复序列的 PCR 检测图
Fig. 4 PCR analysis of the W chromosome-specific repeating sequences in the testis of male chimeras



M. DNA 相对分子质量标准; 1. 心; 2. 肺; 3. 肾; 4. 脑; 5. 性腺

M. DNA marker; 1. Heart; 2. Lung; 3. Kidney; 4. Brain; 5. Gonads

图 5 pEGFP-N₃ 基因在嵌合体心、肺、肾、脑和性腺等 5 种组织中的差异表达

Fig. 5 Expression of pEGFP-N₃ mRNA in a panel of tissues from chimeras

荧光强度减弱的原因可能是外源基因并没有整合到所转染细胞的基因组中,而是游离在基因组之外,随着细胞的增殖和分化,这些外源基因被细胞的核酸酶降解掉了。

种间嵌合体制备的可行性与否主要取决于以下 3 个关键问题:(1)外源 PGCs 能否迁移到异种胚胎性腺中定居。胚胎生殖原基释放的趋化因子在 PGCs 的定向迁移中起重要作用,生殖原基对异种 PGCs 同样具有趋化作用。PGCs 的迁移机制可能存在超越物种界限的共同模式。(2)外源 PGCs 进入异种性腺后是否引起免疫排斥反应。近年来免疫学研究表明眼球、脑、性腺为免疫特赦器官^[18],即处于该部位内部的抗原不会引发免疫排斥反应。本试

验 PGCs 转移时期是在 15 期(50 h),禽类的胚胎免疫系统发生开始于胚胎孵化 5~6 d^[19],因此在免疫系统建立以前外源 PGCs 已经进入了受体性腺。究竟进入性腺后的 PGCs 是否被免疫排斥掉,程度如何,外源 PGCs 是否与内源 PGCs 有相同的增殖能力,尚需进一步研究。(3)外源 PGCs 在受体性腺内能否发育成有功能的配子。种内移植鹌鹑和鸡性腺或血液 PGCs 均得到了后代。Li 等^[20]于 1999 年转移胚盘细胞制备出一只鸭鸡嵌合体,并得到后代,表明外源 PGCs 的发育分化是有可能的。

另外,目前嵌合体的制备存在供受体性别的不一致性。由于本试验中转移的是混合性别 PGCs,不可避免的有一些 PGCs 进入异性性腺中。Kagami 等^[21]移植胚盘细胞制备嵌合体时,发现雄性胚盘细胞移植到雌性个体中,雌性受体 50%发育成雄性,雌性胚盘细胞移植到雄性时,受体性别不发生改变。本试验取 33 枚各期鸡胚胎,检查发现雄性 18 枚占 64%,雌性 15 枚占 36%,偏离正常雌雄比例 1:1。说明鸭 PGCs 的移植有可能影响了鸡性腺分化。此外在雄性鸡胚性腺中也发现阳性结果,证明雌性 PGCs 能够进入雄性鸭胚性腺中。

胚胎种间移植对保存濒临灭亡的动物、克服杂交不育等方面具有重要意义,但是由于种特异性抗原的相互作用关系使胚胎种间移植受到极大限制。如果种间嵌合体制备方法在濒危动物种类上可行的话,有可能为“挽救”濒危动物开辟一条全新的途径,可望在实际应用中不断扩大珍稀动物数量。

4 结论

本研究通过将 pEGF-N₃ 基因转入鸭 PGCs,并将 PGCs 注入鸡囊胚腔来获得 PGCs 介导的绿色荧光鸡鸭嵌合体,虽未获得成活的嵌合体,但是从蛋白和核酸水平上证明鸭 PGCs 能够迁移并定居到鸡胚性腺中,并有可能在鸡性腺中增殖分化成有功能的配子。进一步说明通过制备异种间嵌合体来获得转基因禽类的方法是可行的,这将为今后 GFP 基因在禽体内表达的安全性和转基因禽的进一步研究提供一定的借鉴。

参考文献:

- [1] WALL R J. Transgenic livestock: progress and prospects for future [J]. *Theriogenology*, 1996, 45: 57-68.

- [2] ETCHES R J, CARISIEN R S, CLARK M E, et al. Chimeric chickens and their use in manipulation of the chicken genome [J]. *Poultry Science*, 1993, 72(5): 882-889.
- [3] ROBERTSON E, BRADLEY A, KUEHN M, et al. Germ-line trans-mission of gene introduced into culture pluripotential cells by retro-viral vector [J]. *Nature*, 1986, 323(6078): 445-448.
- [4] PETITTE J N, CLARK M E, LIU G, et al. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells [J]. *Development*, 1990, 108(1): 185-195.
- [5] THORAVAL P, LASSERRE F, COUDERT F, et al. Somatic and germline chicken chimeras obtained from Brown and White Leghorns by transfer of early blastodermal cells [J]. *Poultry Science*, 1994, 73(12): 1897-1905.
- [6] ONO T, MUTO S, MIZUTANI M. Production of quail chimera by transfer of early blastodermal cells and its use for transgenesis [J]. *Japanese Poultry Science*, 1994, 31(2): 119-129.
- [7] YASUDA Y, TAJIMA A, FUJIMOTO T. A method to obtain avian germ line chimeras using isolated primordial germ cells [J]. *Reprod Fertil*, 1992, 96: 521-528.
- [8] ZERNCKA-GOETZ M, PINES J, MCLEAN HUNTER S, et al. Following cell fate in the living mouse embryo [J]. *Development*, 1997, 124: 133-137.
- [9] 杨 桦, 傅继梁. 表达 GFP 的小鼠 ES 细胞系的生物学特性 [J]. 第二军医大学学报, 2001, 22(4): 319-321.
- [10] 沈 干, 丛笑倩, 汪 铮. 小鼠 ES 建系及 GFP 标记 [J]. 东南大学学报(医学版), 2003, 22(2): 71-74.
- [11] 张淑波, 康文喜. 糖原染色 PAS 法的改良 [J]. 海军医学杂志, 2004, 25(4): 384.
- [12] SPEKSNIJDER G, IVARIE R. A modified method of shell windowing for producing somatic or germline chimeras infertilized chicken eggs [J]. *Poultry Science*, 2000, 79(10): 1430-1433.
- [13] BEDNARCZYK M, LAKOTA P, SIWEK M. Improvement of hatchability of chicken eggs injected by blastoderm cells [J]. *Poultry Science*, 2000, 79(12): 1823-1828.
- [14] 刘士寻, 燕海峰, 肖兵南, 等. 鸡蛋开窗法导入供体胚盘细胞对家鸡胚胎发育的影响研究 [J]. 生命科学研究, 2001, 5(3): 270-274.
- [15] CHANG I K, NAITO M, KUWANA T, et al. Production of germline chimeric quail by transfer of gonadal primordial germ cells preserved in liquid nitrogen [J]. *Jap Poult Sci*, 1998, 35: 321-328.
- [16] NAITO M, TAJIMA A, TAGAMI T. Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring [J]. *Reprod Fertil*, 1994, 102: 321-325.
- [17] 易学瑞, 祖 萍, 刘慧萍, 等. 增强型绿色荧光蛋白基因在鸡胚盘细胞中的表达 [J]. 上海实验动物科学, 2001, 24(3): 137-140.
- [18] ROSSINI A. Induction of immunologic tolerance for transplantation [J]. *Physiology Reviews*, 1999, 79(1): 99-141.
- [19] 阴天榜, 刘兴友. 家禽免疫学 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1999: 2-10.
- [20] LI Z D, DENG H, LIU C H, et al. Production of duck-chicken chimeras by transferring early blastoderm cells (abstract) [J]. *Trans Res*, 1999, 8: 463.
- [21] KAGAMI H, CLARK M E, GIBBINS V A M. Sexual differentiation of chimeric chickens containing ZZ and ZW cells in the germline [J]. *Mol Reprod Dev*, 1995, 42: 379-387.