

精子介导的转基因技术*

梁丽韞^① 陈晓峰^① 孟安明^②

(^①中国科学院动物研究所 北京 100080; ^②清华大学生物科技系 北京 100084)

摘要: 精子介导的转基因技术是近十几年发展起来的一种新技术。从各个种的实验证明,精子有瞬间吸收外源 DNA 的能力。这一过程由一系列因子起重要调节作用。一种特异的 DNA 结合蛋白介导了外源 DNA 与精子的结合,同时精浆中存在一种因子起抑制两者结合的拮抗作用。CD4 分子与外源基因的内化有关。内化的 DNA 可能与精子核支架结构(nuclear scaffold)结合,并整合或重排。但仍需要大量实验数据进一步证明是否产生真正可遗传的转基因后代,及如何提高转基因效率,以使这一方法得到普遍的推广及应用。

关键词: 精子介导;外源 DNA;精子入卵注射法;游离基因

中图分类号: Q812 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)04-89-07

Research Progress in Sperm-mediated Gene Transfer

LIANG Li-Yun^① CHEN Xiao-Feng^① MENG An-Ming^②

(^①*Institute of Zoology, Chinese Academy of Science Beijing 100080; ^②Tsinghua University Beijing 100084, China*)

Abstract: The idea of using a sperm cell for introducing exogenous DNA into an oocyte at the time of fertilization has been paid attention and applied because of its advantages since 1990. It has been proved in almost most species that sperm cells have the spontaneous ability to take up foreign DNA. Numerous factors appear to modulate the interaction of sperm cells with exogenous DNA. The binding is mediated by specific DNA-binding proteins and is antagonized by an inhibitory factor in the seminal fluid. A portion of sperm-bound DNA is internalized in the nuclei, a process medi-

* 国家杰出青年科学基金资助(No. 30025020);

第一作者介绍 梁丽韞,女,28岁,硕士研究生;研究方向:分子发育生物学。

收稿日期:2001-07-15,修回日期:2001-08-30

ated by CD4 molecules. Internalized foreign DNA sequences reach the nuclear scaffold and may undergo recombination with chromosomal DNA. But the generation of real transgenic individuals need to be presented further in order to provide the tools for an objective evaluation of the efficiency of this method.

Key words: Sperm-mediated gene transfer; Exogenous DNA; Intracytoplasmic sperm injection; Episome

将外源基因引入基因组的转基因技术是现代生命科学中的一项重要技术,它不仅广泛地应用于研究基因的功能,也已用来快速地改变生物的遗传性状如奶质、肉质等。在动物上,常用的转基因方法包括显微注射法、反转录病毒感染法、胚胎干细胞法。显微注射法的主要缺点是操作比较繁琐,对技术、设备要求高,易对胚胎造成机械性损伤,而且 DNA 整合效率较低;反转录病毒法虽增加了 DNA 整合效率,但反转录病毒基因组的大小受到限制,且易将病原体基因序列引入宿主基因组中^[1];胚胎干细胞法则工作量巨大,且筛选出转基因后代的周期较长。近十几年发展起来的精子介导(sperm-mediated)的转基因技术,以精子作为外源基因的载体,在受精过程中将外源基因导入动物胚胎,从而使外源基因进入子代的基因组中。因此,这种方法一经问世就以其操作简便、成本低廉、便于大量筛选等优点而受到人们的重视^[2]。本文就这一领域的研究成果及发展方向作一介绍。

1 精子介导转基因的原理

长期以来,人们一直认为受精反应是一个能与生俱来地防止外界微生物侵染的过程,以保护胚胎基因组的“圣洁”。但是,在一些鼠类和鱼类中发现病毒能吸附在精子表面并侵染后代,这一现象表明精子可以作为侵染卵子的载体^[3]。早在 1971 年,Brackett 等人就报道过精子能运载外源遗传信息进入兔的卵细胞中^[4],更支持了这一观点。

意大利罗马大学实验动物研究所的 Lavitrano 等人首次报道了大鼠精子可以吸收外源 DNA 并产生转基因后代。他们将鼠类成熟的精子与一个含报告基因氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyl transferase, CAT)基因的 pSV2CAT 线状或环状质粒 DNA 与精子共培养,用这种处理过的精子做人工授精产生子一代。从后代鼠的尾巴中抽提 DNA,并以 pSV2CAT 做探针进行 Southern blotting 检测,结果 250 个后代个体中 30% 的后代中检测到 pSV2CAT 互补序列。为了确定阳性鼠基因组中是否整合了外源 DNA,他们利用 Southern 杂交阳性鼠的 DNA 建立了基因组文库,并检测到 pSV2CAT DNA 阳性克隆。这说明,来自亲代的转基因在子代中是通过父系和母系传递的,并嵌合到基因组 DNA 中。CAT 的活性在后

代成体尾部组织和肌肉中检测到,说明由精子介导的外源基因可以在宿主中表达^[5]。在这一具有开创性的工作之后,人们通过大量的研究初步阐明了精子与 DNA 的相互作用的分子机制。

1.1 成熟精子具有吸收外源 DNA 的能力 Lavitrano 和 French 发现,成熟精子头部具有瞬间吸收外源 DNA 的能力。其吸收区域是特异性的,位于精子头部的顶体后区(post-acrosomal region),即靠近精核的区域^[6]。DNA 分子与精子特异结合是一种离子作用,这一过程是可逆的,不依赖特定的序列。而且除 DNA 外,其它一些带负电的分子如肝素(heparin)、硫酸右旋糖苷(dextran sulphate)或等电点低于 7 的蛋白都可以特异与这一区域结合。经 Southwestern 分析发现,精子头部蛋白抽提物中有一种 30~35 ku 的蛋白起 DNA 结合底物的作用,而且这种蛋白只存在于哺乳动物如小鼠、猪、牛、人以及鱼类和海胆纲动物中。通过 Gel Shift 分析发现,纯化的 30~35 ku 蛋白可与 DNA 形成蛋白-DNA 复合体。

1.2 精液中存在能抑制精子对 DNA 吸收的因子 在哺乳动物中进行的所有实验已清楚地表明,只有精浆被彻底去除,精子才能吸收 DNA。从哺乳动物精液中分离出一种抑制因子,命名为抑制因子 I(IF-1),这种抑制因子最初是在海胆纲动物的精子和小鼠的精液中发现的,它是一种 37 ku 的 DNA 结合糖蛋白,位于完整精子细胞的顶体后区。IF-1 存在时,30~35 ku DNA 蛋白会失去结合外源 DNA 的能力,导致外源 DNA 不能进入。因此精子与 DNA 的结合并不是一个偶然事件,而是由一些相互作用的特定蛋白因子调控的一个主动过程^[7]。

1.3 精子与外源 DNA 结合及外源 DNA 的内化与 MHC II 和 CD4 分子有关 II 型主要组织相容性复合体分子(MHC II)可能在精子-DNA 结合中起作用,其证据是 MHC II 基因敲除小鼠的精子细胞与 DNA 结合的能力比野生型小鼠精子的结合力低^[8]。但是,利用 MHC II 单克隆抗体并不能在精子头部检测到 MHC II 分子。因此,精子细胞吸收外源 DNA 的能力是否依赖 MHC II 分子还有待进一步证明。

CD4 分子是 T 淋巴细胞的一种表面标识抗原,免疫荧光和 Western 分析证明它也存在于野生型小鼠的精细胞表面。尽管 CD4 基因敲除小鼠的精子能结合外源

DNA,但外源 DNA 不能进入精子核内,即失去进一步内化(internalization)的能力,表明存在于精子表面的 CD4 分子能促进与精子结合的外源 DNA 内化^[8]。

1.4 外源 DNA 的内化与整合 研究表明,附睾中的精子在大量外源 DNA 侵入时,大量核酸酶被激活,不仅导致外源 DNA 的降解,同时还导致精子染色体 DNA 的降解,最终引起精细胞的程序性死亡。而射出的精子不发生类似现象,外源 DNA 进入精子后不仅稳定,而且不会引起程序性死亡^[9]。

外源 DNA 进入射出的精细胞后,紧密地与核支架结构(nuclear scaffold)结合,并与精子基因组 DNA 整合重排^[10]。整合过程并不是随机的,而是有选择性的。在整合位点附近结合有拓扑异构酶 II,这种酶识别和切割的 DNA 序列与核支架区(scaffold-associated regions, SARs)的 DNA 序列同源,而且拓扑异构酶 II 优先选择与

含 SAR 序列的 DNA 结合^[11]。这不仅说明这种酶在非同源重组中可能起一定作用,而且整合位点可能就在 SAR 区域^[12]。

2 精子介导转基因技术的研究进展

1971 年,Brackett 发现将兔精子暴露于含有³H-胸苷的 SV40 的 DNA 中,在精子头部探测到了辐射物,并产生转基因的胚胎,病毒 DNA 的存在引起了 1~2 细胞期胚胎的细胞毒反应。这一工作成为精子介导转基因研究及人工授精研究领域中的先驱^[13]。随后,这一技术的适用性在多个物种上得到研究。目前,从低等的海胆纲动物到高等的哺乳动物如鼠类、牛、甚至到人的各种实验表明,精子确实具备与外源 DNA 结合并将其整合到自己的基因组中的能力。表 1 列出了精子介导成功并在体内检测到外源基因的物种。

表 1 不同物种上精子介导的转基因研究概况

物种	检测时期	转基因率(%)	介导、检测方法、表达情况及参考文献
海胆	胚胎		有 CAT 基因表达 ^[19]
蜜蜂	幼虫		PCR 检测 ^[20]
鲍鱼	幼虫	65	PCR 和 Southern 杂交检测;CAT 表达 ^[21]
蚕	受精卵/幼虫		有微弱的 CAT 表达 ^[18]
兔	1~2 细胞期胚胎	39	SV40 DNA 的显性表达,引起 1~2 细胞期胚胎的细胞毒反应 ^[4]
	囊胚	19.3	LacZ 表达 ^[22]
	成体		脂质体介导;PCR,SB 检测;检测到转基因中所含的鼠 DNA 扩增成分表达(murine amplification element);产生 F1 转基因后代 ^[23]
鼠	成鼠	30	CAT 表达;产生 F1 转基因后代 ^[5]
	幼鼠	7.4	成鼠均为阴性 ^[24]
	成鼠	17~21	去除精子膜 + ICSI 法;产生 F1 转基因后代 ^[14]
鸡	胚胎	23~67	脂质体介导效率最高,电穿孔效率最低。PCR、SB 检测;但外源基因以游离基因(episome)存在,而不与基因组 DNA 整合 ^[25]
	成体		PCR、SB 检测;产生 F1 转基因后代 ^[26]
牛	胚胎细胞	22	^[27]
	胚胎	22	精子电穿孔;PCR 检测 ^[28]
	成体		脂质体介导;检测到转基因中所含的鼠 DNA 扩增成分(murine amplification element)的表达 ^[23]
猪	成体		SB 检测;无外源基因转入 F1 代 ^[29]
	胚胎细胞	6	^[27]
	成体		SB、PCR 检测 ^[30,31]
爪蟾	胚胎	23	PCR 检测;劳氏肉瘤病毒转基因引起 25%~30% 胚胎畸形 ^[32]
泥鳅	成体		SB、GE 检测;精子电穿孔;引起畸形;后代产生 75% 嵌合体 ^[33]
斑马鱼	成体	23.5~37.5	线状或环状质粒 DNA 均可;无电穿孔;DB 检测;产生 F1、F2 转基因后代,但无 CAT 表达;大部分转基因后代中外源 DNA 不与染色体 DNA 整合,而是以游离基因(episome)存在 ^[18]
鲤鱼,非洲鲶鱼	鱼苗	14.5	精子电穿孔 ^[34]
	鱼苗		精子电穿孔;DB 检测 ^[35]
鲑鱼	鱼苗	7.5	精子电穿孔 ^[36] ;SB 检测
	鱼苗	85	精子电穿孔;SB 检测-,PCR 检测+;无表达 ^[37]

CAT:氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyl transferase);PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction);SB:Southern 印迹(Southern blot);ICSI:精子入卵注射法(intracytoplasmic sperm injection);DB:点印迹(Dot blot);GE:基因表达(gene expression)

从表 1 可见,所有的被试物种中,外源 DNA 均可内化进入精子核内整合或不整合,并通过授精作用带入卵细胞中产生转基因的胚胎或转基因动物。其中,直链 DNA 均可被精子细胞吸收而引起遗传物质的改变。但在斑马鱼中,线形 DNA 与环状 DNA 都可产生转基因后代^[18]。在鲍鱼^[21]、鲑鱼^[36]、斑马鱼^[34]及鲤鱼、鲶鱼^[35]中精子电穿孔可以增加外源 DNA 的吸收。在鸡中^[25],脂质体转染则更有效。而在牛中^[28],精子电穿孔则可以得到较高比率的转基因胚胎。

转基因的表达在海胆^[19]、鲍鱼^[21]和蚕^[18]胚胎及非洲鲶鱼鱼苗^[35]中有报道。两栖类中,通过带有整个劳氏肉瘤病毒基因的质粒与爪蟾精子共培养,人工授精得到了转基因的胚胎。Northern 杂交检测到劳氏肉瘤病毒基因的表达,导致 25%~30% 的 5 天龄胚胎出现严重的畸形^[32]。哺乳动物中,在兔胚胎中检测到 SV40 DNA 的显性表达,引起 1~2 细胞期胚胎的细胞毒反应^[4]和 *LacZ* 基因的表达^[22]。*CAT* 基因的表达在成鼠的肌肉中也检测到^[5]。

值得一提的是 Perry 等人的新方法。他们将带有报告基因 GFP 或 *LacZ* 的外源 DNA 与经“死亡”处理过的鼠精子共注射卵细胞,即精子入卵注射法(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)。所谓精子的“死亡”处理就是将精子在注射时经冰冻融解、冰冻干燥或用 TritonX-100 处理,去除表面的外膜。将这样的精子与带有报告基因 GFP 的外源 DNA 共培养大约 1 min 后再注射,胚胎人工培养 3.5 d 后利用荧光显微镜观察 GFP 的表达。结果表明,未经处理的精子共注射后 GFP 表达率是 26%,而处理过的精子共注射后有 64%~94% 的鼠胚胎表达转基因产物,这表明精子膜结构可能是外源重组 DNA 与精子稳定结合的障碍。

为了确定是否产生转基因后代,他们将在体外人工培养 3.5~4 d 的胚胎植入“代理母亲”的子宫中。对后代进行长波紫外线照射,发现在 17%~21% 的后代的皮肤中检测到荧光。对这些个体进行 Southern 杂交,结果都检测到转基因的存在,且转基因的拷贝数范围是从 ≤ 1 到 > 50 。Southern 杂交对外源基因在基因组中特性和转基因的表达分析说明整合的转基因没有进行重排。

从显性后代中随机挑选 12 个 GFP 表达个体与野生型交配,结果 11 个受孕个体中有 8 个能将外源基因按孟德尔定律传给 F_2 代并在子二代中表达。这种方法由于去除了精子外膜,并且在 25℃ 时去膜的精子很快失去进一步发育的能力,精子核内的核酸内切酶就有

可能起作用,在精子基因组 DNA 上产生切口形成局部的单链,这样有利于外源基因的整合,而大大地易化了外源 DNA 进入卵细胞及与核 DNA 的整合,进而提高了转基因的效率^[14]。

此外,国内在这一领域也有一些成果。例如,1991 年,刘汉勤等人尝试利用精子介导的转基因法将鲫鱼肝总 DNA 转入红鲤体内,后代中有 0.69% 的个体体色中产生了鲫鱼黑色素^[2]。1997 年,章怀云等人以草鱼精子与红鲤鱼肝脏总 DNA 共培养,再与草鱼卵受精,获得了体形、体色变异的个体^[15]。由于草鱼和鲤鱼间亲缘关系较近,两者遗传物质有很大的同源性,因此整合几率很高。而且总 DNA 的平均分子量约为 30 kb,最大分子量接近 100 kb,因此在精子或受精卵内受核酸内切酶的降解对基因造成的损伤程度较单基因的情况要小的多,所以能得到性状的转移^[2]。除了鱼类,周荣家还证明了小鼠精子能捕获乙肝病毒 DNA^[16]。

3 展 望

虽然国内外在精子介导的转基因研究方面已有较多报道,并取得一些可喜的成果,但仍存在很多问题值得人们继续探索。

首先,在很多物种上,精子介导的外源基因只在胚胎时期能检测到,而在其后代中则检测不到^[11]。例如,在鸡中,由于外源 DNA 在胚胎中以游离体(episome)存在,不与核 DNA 整合,而在其后代中也没有检测到外源基因,因此也就不能产生转基因后代^[23,25]。H. W. Khoo 等人早在 1992 年就成功地利用精子载体法将带有报告基因 *CAT* 的质粒转入斑马鱼中,但外源基因不能在后代中表达^[18]。但是,1990 年 Stuart 等人^[39]报道了利用微注射法引入同样的质粒,却产生了 *CAT* 基因的表达。两种方法产生不同的结果可能与外源 DNA 进入的时间有关。微注射时质粒 DNA 是在受精卵进行有丝分裂时进入,而精子载体法则是在减数分裂时引入外源基因。基因不表达的另一个假定的原因可能是质粒的启动子和增强子不是来源于斑马鱼的。虽然在 F_1 、 F_2 代中都检测到外源基因,但是它们大多以游离基因或嵌合体形式存在,这可能也是引起转基因不表达的原因之一^[18]。而很多大型哺乳动物如猪、牛,精子介导的转基因仅在胚胎时期稳定表达。相对于两栖类和水生类,迄今对大型动物所做研究的个体数还很少,不能得到足够有代表性的数据^[12]。因此,外源基因在宿主基因组中的整合特别是在高等哺乳类动物中的整合及在后代中的表达问题是今后研究的重点。

其次,虽然 Lavitrano 等人对精子与外源 DNA 作用原理做了大量深入细致的研究,但其很多实验证据仅仅来自于鼠中的研究。鉴于各个物种在转基因率、DNA 进入精子的介导方式及外源 DNA 在后代中的表达上都存在很大的差异,很有必要对各个物种的精子对 DNA 的吸收和内化及整合的生化、分子生物学特征与机制进行深入研究。

第三,Perry 创立的失活精子入卵法的最大优点就是由于精子去膜处理大大提高了转基因效率,但此方法也有其局限性。首先,精子仍需要注射进入卵细胞。其次,该方法还没有广泛应用于其它物种中^[1]。所以,这一方法在其它物种上的适用性的研究,也许会为阐明外源基因不整合及不表达等问题开辟一种新的思路与方法。

第四,精子介导法的一个潜在的作用就是基因治疗。例如,有人将人类乳头瘤病毒(papillomavirus, HPV)通过精子介导转入小鼠胚胎,会引起胚胎中内细胞团及滋养层变形^[38]。这提示我们,也许可以利用精子的 DNA 运载特性来将特定的基因导入有缺陷的胚胎内,从而达到基因治疗的目的。

4 结 论

综上所述,外源基因与精子细胞的互作不再被看作是偶然事件,而是由一些特异的因子调控的过程;精子结合外源基因的能力已经在许多物种中得到证明。同时,在很多物种中利用精子的介导得到了后代遗传性状的改变。随着对精子介导法的更深入研究,特别是在提高转基因的表达率方面取得突破后,这一方法可望成为转基因的重要手段。

参 考 文 献

- [1] James M. Robl New life for sperm-mediated transgenesis. *Nature Biotechnology*, 1999, **17**:636 ~ 637.
- [2] 刘汉勤 郭文等. 总 DNA 介导鱼类基因转移的初步研究. *水生生物学报*, 1991, **15**(3):287 ~ 288.
- [3] Maione B, Lavitrano M *et al.* Sperm-mediated gene transfer in mice. *Mol Reprod Devel*, 1998, **50**:406 ~ 409.
- [4] Brackett B G, Boranska W *et al.* Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, **68**:353 ~ 357.
- [5] Lavitrano M, Camaioni A *et al.* Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs-genetic transformation of mice. *Cell*, 1989, **57**:717 ~ 723.
- [6] Lavitrano M, French K *et al.* The interaction between exogenous DNA and sperm cells. *Mol Reprod Evol*, 1992, **31**:161 ~ 169.
- [7] Zani M, Lavitrano M *et al.* The mechanism of binding of exogenous DNA to sperm cells: factors controlling the DNA uptake. *Exp Cell Res*, 1995, **217**:57 ~ 64.
- [8] Lavitrano M, Maione B *et al.* The interaction of sperm cells with exogenous DNA: a role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules. *Exp Cell Res*, 1997, **233**:56 ~ 62.
- [9] Maione B, Pitoggi C *et al.* Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA & Cell Biol*, 1997, **16**:1 087 ~ 1 097.
- [10] Zoraci G, Spadafora C *et al.* Intergration of foreign DNA sequences into mouse sperm genome. *DNA Cell Biol*, 1997, **16**:291 ~ 300.
- [11] Adachi Y, Kas E. Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold attachment regions. *EMBO J*, 1989, **8**:3 997 ~ 4 006.
- [12] Spadafora C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioessays*, 1998, **20**:955 ~ 964.
- [13] Gandolfi F. Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals. *Transg Res*, 1998, **7**:147 ~ 155.
- [14] Perry A, Wakayama T *et al.* Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*, 1999, **284**: 1 180 ~ 1 183.
- [15] 章怀云, 张学文等. 精子载体法将外源 DNA 导入草鱼受精卵获得性状转移. *水产学报*, 1997, **21**(1):75 ~ 76.
- [16] 周荣家, 张思仲等. 小鼠精子捕获外源 DNA 的研究. *科学通报*, 1992, **13**:1 246 ~ 1 247.
- [17] Shamila Y, Mathavan S *et al.* Sperm-mediated gene transfer in the silkworm *Bombyx mori*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 1998, **37**:168 ~ 177.
- [18] Khoo H W, Ang L H *et al.* Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. *Aquaculture*, 1992, **109**: 1 ~ 19.
- [19] Arezzo F. Sea urchin sperm as a vector of foreign genetic information. *Cell Biol Int Rep*, 1989, **13**:391 ~ 404.
- [20] Milne C P, Elschen F A *et al.* Preliminary Evidence for Honeybee Sperm Mediated DNA Transfer. International Symposium on Molecular Insect Science, Tucson, Arizona, 1989. 120 ~ 125.
- [21] Tsai H J, Lai C H, Yang H S *et al.* Sperm as a carrier to introduce an exogenous DNA fragment into the oocyte of Japanese abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Transgenic Res*, 1997, **6**:85 ~ 95.
- [22] Kuznetsov A V, Kuznetsova I V *et al.* Binding of exogenous DNA pRK3lacZ by the rabbit spermatozoa, its transfer in the oocytes, and expression in the preimplantation embryos. *Rus-*

- sian Journal of Developmental Biology*, 1995, **26**:300 ~ 309.
- [23] Rottmann O, Antes R, Hofer P *et al.* Liposome-mediated gene transfer via sperm cells-high transfer efficiency and persistence of transgenes by use of liposomes and sperm cells and a murine amplification element. *J Anim Breed Genet*, 1996, **113**:401 ~ 411.
- [24] Hochi S, Ninomiya T *et al.* Fate of exogenous DNA carried into mouse eggs by spermatozoa. *Anim Biotech*, 1990, **26**:83 ~ 92.
- [25] Nakanishi A, Iritani A *et al.* Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods. *Mol Reprod Dev*, 1993, **36**:258 ~ 261.
- [26] Gruenbaum Y, Revel E *et al.* Sperm cells as vectors for the generation of transgenic chickens. *J Cell Biochem*, 1991, **15** (suppl.):E, 194.
- [27] Seperandio S, Lulli V *et al.* Sperm-mediated DNA transfer in bovine and swine species. *Anim Biotechnol*, 1996, **7**:59 ~ 77.
- [28] Gagne M B, Pothier F *et al.* Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. *Mol Reprod Dev*, 1991, **29**:6 ~ 15.
- [29] Gandolfi F, Lavitrano M *et al.* The use of sperm-mediated gene transfer for the generation of transgenic pigs. *J Reprod Fert Abstr Ser*, 1989, **4**:10(abst.).
- [30] Lavitrano M, Forni M *et al.* Sperm-mediated gene transfer: production of pigs transgenic for a human regulator of complement activation. *Transpl Proc*, 1997, **29**:3 508 ~ 3 509.
- [31] Lavitrano M, Stoppacciaro A *et al.* Human decay accelerating factor transgenic pigs for xenotransplantation obtained by sperm-mediated gene transfer. *Transpl Proc*, 1999, **31**:972 ~ 974.
- [32] Habrova V, Takac M *et al.* Association of Rous sarcoma virus DNA with *X. Laevis* spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Mol Reprod Dev*, 1996, **44**:332 ~ 342.
- [33] Tsai H J, Tseng F S *et al.* Electroporation of sperm to introduce foreign DNA into the genome of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Can J Fish Aqu Sci*, 1995, **52**:776 ~ 787.
- [34] Patil J G, Khoo H W *et al.* Nuclear internalization of foreign DNA by zebrafish spermatozoa and its enhancement by electroporation. *J Exp Zool*, 1996, **274**:121 ~ 129.
- [35] Mueller F, Lvics Z *et al.* Introduction of foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1992, **1**:276 ~ 281.
- [36] Sin F Y T, Bartley A L *et al.* Gene transfer in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by electroporating sperm in the presence of pRSV-lacZ DNA. *Aquaculture*, 1993, **117**:57 ~ 69.
- [37] Symonds J E, Walker S P *et al.* Development of a mass gene transfer method in Chinook salmon: optimization of gene transfer by electroporated sperm. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, **3**:104 ~ 111.
- [38] Chan P J, Seraj I M *et al.* Evidence for ease of transmission of human papillomavirus DNA from sperm to cells of the uterus and embryo. *J Assist Reprod Genet*, 1996, **13**:516 ~ 519.
- [39] Stuart G W, Vielkind J R *et al.* Stable lines of transgenic zebrafish exhibit reproducible patterns of transgene expression. *Development*, 1990, **109**:577 ~ 584.