

## 敲除 $\alpha$ -1,3-半乳糖基转移酶基因 五指山小型猪的繁育和鉴定

龙川 高景波 唐雨婷 杜敏杰 石宁宁 冯冲 鲁琳 潘登科

**【摘要】** 目的 总结  $\alpha$ -1,3-半乳糖基转移酶(GGTA1)基因敲除(GTKO)五指山小型猪的繁育和鉴定。方法 统计 GTKO 五指山小型猪的繁育结果及窝产仔数;采用聚合酶链反应(PCR)技术对 GTKO 五指山小型猪 GGTA1 基因敲除类型进行鉴定;采用荧光显微镜和流式细胞术对人、野生型五指山小型猪、GTKO 五指山小型猪外周血单核细胞(PBMC)的  $\alpha$ -1,3-半乳糖( $\alpha$ Gal)表型进行检测;比较 GTKO 五指山小型猪与野生型五指山小型猪血常规指标的差异。结果 GGTA1 基因型的遗传符合孟德尔定律;GGTA1<sup>-/-</sup>猪的 PBMC 流式检测无荧光表达,与基因型鉴定结果一致;GTKO 五指山小型猪雌性猪初产窝产仔数为(6.8±1.8)只,经产窝产仔数为(8.3±2.2)只;血常规检测的各项指标与野生型五指山小型猪差异均无统计学意义(均为  $P>0.05$ )。结论 连续2代 GTKO 五指山小型猪遗传稳定,繁殖力正常。GTKO 五指山小型猪可作为异种器官移植研究的可靠供体。

**【关键词】**  $\alpha$ -1,3-半乳糖基转移酶;基因敲除;五指山小型猪;繁殖性能; $\alpha$ -1,3-半乳糖表型;外周血单核细胞

**【中图分类号】** R-332 ,R617 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445(2017)02-0006-06

Breeding and identification of Wuzhishan miniature pigs with  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase gene-knockout Long Chuan<sup>1</sup>, Gao Jingbo, Tang Yuting, Du Minjie, Shi Ningning, Feng Chong, Lu Lin, Pan Dengke. <sup>1</sup>Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Corresponding authors: Pan Dengke, Email: pandengke2002@163.com

Lu Lin, Email: lulin1209@163.com

**【Abstract】** **Objective** To summarize the breeding and identification of Wuzhishan miniature pig models with  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase (GGTA1) gene-knockout (GTKO). **Methods** The breeding and reproduction perform of GTKO Wuzhishan miniature pigs were assessed and the quantity of piglets was counted. The GTKO Wuzhishan miniature pig models with GGTA1 gene knockout were validated by polymerase chain reaction(PCR). The  $\alpha$ Gal phenotype of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in human, wild-type Wuzhishan miniature pigs and GTKO Wuzhishan miniature pigs was detected by fluorescent microscope and flow cytometry. Routine blood test parameters were statistically compared between the GTKO and wild-type Wuzhishan miniature pigs. **Results** The inheritance of GGTA1 genotype complied with Mendel's law. Flow cytometry detected no fluorescent expression of PBMC in GGTA1<sup>-/-</sup> pig models, which were consistent with the genotype identification results. The mean piglets of the primiparous GTKO Wuzhishan miniature pigs were (6.8±1.8) and (8.3±2.2) for the multiparous Wuzhishan miniature pigs. No statistical significance was noted in routine blood test parameters between the GTKO and wild-type Wuzhishan miniature pigs (all  $P>0.05$ ). **Conclusions** Stable inheritance and normal reproductive capacity are observed in two generations of Wuzhishan miniature pigs continuously.

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2017.02.006

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2015CB554103)

作者单位:100193 北京,中国农业科学院北京畜牧兽医研究所(龙川、高景波、唐雨婷、杜敏杰、石宁宁、冯冲、潘登科);北京农学院动物科学技术学院(龙川、鲁琳)

通讯作者:潘登科,Email: pandengke2002@163.com;鲁琳,Email: lulin1209@163.com

GTKO Wuzhishan miniature pig is a reliable donor for heterogeneous organ transplantation.

**[Key words]**  $\alpha$ -1,3 galactosyltransferase; Gene knockout; Wuzhishan miniature pig; Reproduction performance;  $\alpha$ -1,3 galactosyl phenotype; Peripheral blood mononuclear cell

供体器官的严重短缺使许多患者因等不到所需的器官而死亡,成为亟待解决的社会问题,解决这一问题的重要途径是利用基因修饰猪的器官作为供体进行异种移植。猪有望成为异种器官移植的理想供体<sup>[1-2]</sup>,猪的器官移植到人体发生多种免疫排斥反应,首先是超急性排斥反应(hyperacute rejection, HAR),移植器官与受体血管接通数分钟至 24 h 内发生排斥反应而丧失功能。导致 HAR 的主要原因是受体体内天然抗体识别猪细胞表面的  $\alpha$ -1,3-半乳糖( $\alpha$ Gal),  $\alpha$ Gal 是由  $\alpha$ -1,3-半乳糖基转移酶( $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase, GGTA1)催化合成的<sup>[3]</sup>。猪 GGTA1 基因敲除可去除  $\alpha$ Gal 抗原,解决 HAR<sup>[4]</sup>。本实验室于 2010 年建立了同源重组技术敲除 GGTA1 基因和体细胞克隆获得单等位基因敲除小型猪技术<sup>[5]</sup>,2012 年建立了类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)技术敲除 GGTA1 基因和利用体细胞克隆获得双等位基因敲除小型猪<sup>[6]</sup>。通过基因敲除和体细胞克隆技术获得了 3 只健康并能正常繁育的 GGTA1 基因敲除(GTKO)五指山小型猪,由 3 只 GTKO 五指山小型猪繁育建立了 GTKO 五指山小型猪家系。国外对 GTKO 大白猪的繁育进行了研究<sup>[7]</sup>,本研究对 GTKO 五指山小型猪的遗传和繁育进行探讨,为 GTKO 猪的繁育和进一步多基因修饰奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

GTKO 五指山小型猪和野生型五指山小型猪均饲养在北京安定猪选育有限公司普通级猪舍,自由采食。

### 1.2 主要试剂与仪器

Premix LA TaqDNA 聚合酶、ZR Genomic DNA™-

Tissue MiniPrep 试剂盒、BD Pharm Lyse™、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的植物凝集素(FITC-BS-I-B<sub>4</sub>)、杜氏磷酸盐缓冲液(Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS)。倒置显微镜(Nikon Eclipse Ti)、流式细胞仪(BD Biosciences)、光电血液分析仪(MEK-7222K)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 GTKO 五指山小型猪的繁育 由体细胞核移植技术获得 GGTA1 单等位基因敲除(GGTA1<sup>-/-</sup>)五指山小型猪 2 只(雌性、雄性各 1 只)和 GGTA1 双等位基因敲除(GGTA1<sup>-/-</sup>)五指山小型猪 1 只(雄性)组成 F0 代群体,繁育获得 F1 代 GTKO 五指山小型猪群,选育母性好、繁殖性能良好的 F1 代雌性个体进行繁育获得 F2 代猪群。

1.3.2 窝产仔数统计 记录连续 2 代 GTKO 五指山小型猪繁育情况,统计窝产仔数和断奶后仔猪存活情况,分析初产和经产雌性猪窝产仔数、断奶后仔数存活的平均值和标准差。

1.3.3 仔猪 GGTA1 基因敲除类型鉴定 同源重组 GGTA1 基因敲除类型鉴定,剪取五指山小型猪的耳朵,使用 ZR Genomic DNA™-Tissue MiniPrep 试剂盒提取 DNA 进行聚合酶链反应(PCR),然后将产物进行电泳。PCR 反应条件:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,67℃退火 30 s,72℃延伸 2 min,32 个循环,72℃终延伸 10 min,4℃保存。引物信息见表 1。

利用 TALEN 敲除 GGTA1 基因的仔猪类型鉴定,提取 DNA 方法如上,PCR 纯化回收目的片段进行 TA 克隆,涂板培养 12 h 后,每板挑取 10 个菌落送至公司测序。MagAlign 软件比对序列信息确定 GGTA1 基因敲除类型<sup>[8]</sup>。PCR 扩增反应体系(20  $\mu$ L):上下游引物 F/R (10 pmol/ $\mu$ L)各 1  $\mu$ L, DNA 模板(85 ng/ $\mu$ L)1  $\mu$ L, Premix LA Taq (LA Taq) 10  $\mu$ L, 双

表 1 本研究中使用的引物信息

Table 1 Information of primers used in the study

引物名称	引物序列(5'-3')	引物用途	产物长度(bp)	退火温度(℃)
TALEN-F1/R1	F1 :AGGGACAGTAGACCTAGGAAAC R1 :GATCCTAATTGGGTTTGCTGCC	鉴定 TALEN 敲除类型	652	60
Neo-F/R	F :GGATGCTTCCTCTAGTCTGTGATG R :CTCTAGCCTACCCAGAACTGCAGAG	鉴定同源重组敲除类型	942/2 005	67

蒸水(ddH<sub>2</sub>O)7  $\mu$ L。PCR 反应条件 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 32 个循环, 72  $^{\circ}$ C 终延伸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。引物信息见表 1。

1.3.4  $\alpha$ Gal 表型鉴定 全血裂解法分离外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 利用 FITC-BS-I-B<sub>4</sub> 染色, 荧光显微镜和流式细胞术检测荧光强度鉴定  $\alpha$ Gal 表型, 分析 GGTA1 基因敲除情况。吸取 0.1 mL 五指山小型猪全血及 0.1 mL 志愿者全血作为对照, 加入 1 mL 1 $\times$ BD Pharm Lyse™ 裂解红细胞, 常温裂解 15 min, 离心后去除上清, 加入 2 mL DPBS, 离心后去除上清, 重复 2 次; 获得混合碎片的 PBMC; 用 1~2  $\mu$ L 含量为 1 g/L 的 FITC-BS-I-B<sub>4</sub> 与 PBMC 冰上避光孵育 30 min, 加入 2 mL DPBS, 离心后去除上清, 重复 2 次; 500  $\mu$ L DPBS 重悬细胞, 倒置荧光显微镜和流式细胞仪观察。

1.3.5 血常规检测 随机挑选 3 只成年 GTKO 五指山小型猪, 另选 3 只成年野生型五指山小型猪为对照, 采血前禁食 16 h, 清醒状态下前腔静脉采集 2 mL 全血, 置于 EDTA-K2 抗凝管中。使用光电血液分析仪检测白细胞计数、红细胞计数、血红蛋白、红细胞比容、红细胞平均容积、红细胞平均血红蛋白含量、红细胞平均血红蛋白浓度、红细胞分布宽度、血小板计数、血小板比容、血小板平均容积、血小板分布宽度、淋巴细胞计数、单核细胞计数、中性粒细胞计数、淋巴细胞百分数、单核细胞百分数、中性粒细胞百分数共 18 项指标, 参考值见文献[8]。

1.4 研究方法

统计 GTKO 五指山小型猪的繁育结果及窝产

仔数; 采用 PCR 技术对 GTKO 五指山小型猪 GGTA1 基因敲除类型进行鉴定, 采用荧光显微镜和流式细胞术对人、野生型五指山小型猪、GTKO 五指山小型猪 PBMC 的  $\alpha$ Gal 表型进行检测; 比较 GTKO 五指山小型猪与野生型五指山小型猪血常规指标的差异。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示, 多组之间比较采用方差分析。率的比较采用  $\chi^2$  检验分析。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GTKO 五指山小型猪的繁育结果

F0 代雌性猪(编号 1)繁育 3 胎共获得 22 只 F1 代 GGTA1 基因敲除五指山小型猪, 选出 4 只雌性猪(编号 21、71-3、1212、1316)建立 F1 代基础雌性猪群, F1 代配种后获得 F2 代 GGTA1 基因敲除五指山小型猪 56 只。部分五指山小型猪系谱图(图 1)。

2.2 窝产仔数统计结果

GTKO 五指山小型猪中, 初产(第 1 胎)雌性猪窝产仔数量为(6.8 $\pm$ 1.8)只, 存活仔猪数量为(6.4 $\pm$ 2.1)只, 经产(已分娩 1 胎及以上)雌性猪窝产仔数量为(8.3 $\pm$ 2.2)只, 存活仔猪数量为(6.6 $\pm$ 1.6)只(表 2)。

2.3 GGTA1 基因敲除类型鉴定结果

GGTA1<sup>-/-</sup>雌性猪与 GGTA1<sup>-/-</sup>雄性猪配种 3 窝, 共产仔 23 只, GGTA1<sup>-/-</sup>8 只、GGTA1<sup>+/-</sup>15 只; GGTA1<sup>+/-</sup>雌性猪与 GGTA1<sup>-/-</sup>雄性猪配种 7 窝, 共产仔 47 只, GGTA1<sup>-/-</sup>15 只、GGTA1<sup>+/-</sup>20 只、

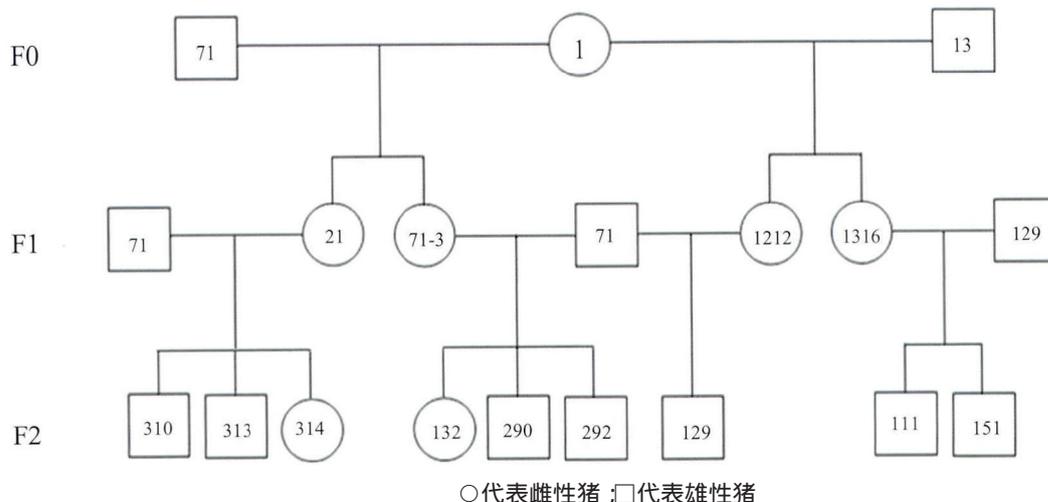


图 1 GTKO 五指山小型猪繁育系谱图(部分)

Figure 1 Pedigree of GTKO Wuzhishan miniature pigs(section)

GGTA1<sup>+/+</sup> 12只。GGTA1 基因型能稳定遗传给后代,基本符合孟德尔遗传定律。

### 2.4 αGal 表型检测

荧光显微镜和流式细胞术检测结果显示 αGal 表型(图 2.3) 野生型五指山小型猪 PBMC 的荧光强度高;人 PBMC 未检测到荧光信号;GTKO 五指山小型猪 PBMC 的荧光强度与人 PBMC 的荧光强度几乎一致,表明 GGTA1 基因敲除,彻底去除了猪

细胞表面的 αGal 表型。

### 2.5 GTKO 五指山小型猪血常规检测结果

血常规结果显示(表 3),GTKO 五指山小型猪与野生型五指山小型猪的各项血液生理指标比较,差异均无统计学意义(均为  $P>0.05$ ),表明 GGTA1 基因敲除对猪的生理状况无明显影响。

## 3 讨论

猪作为异种器官移植的供体,不仅需要解决超急性排斥反应,还需解决急性血管性排斥反应、细胞性排斥反应和一系列慢性排斥反应。解决这些排斥反应需要在 GTKO 猪的基础上进行敲除抗原或人源化基因修饰<sup>[9-11]</sup>,并转入人的补体调控因子、血栓调节蛋白等基因<sup>[12-14]</sup>。因此,GTKO 猪的繁育非常重要。

本研究发现 GGTA1 基因敲除没有影响猪的繁殖和健康。连续 2 代 GGTA1 基因敲除五指山小型猪繁育正常,窝产仔数符合普通五指山小型猪初产雌性猪窝产仔 4-6 只,经产雌性猪窝产仔 6-8 只的生产规律<sup>[15]</sup>。F0 代 GGTA1<sup>+/+</sup>雌性(编号 1) 6 岁时配种正常妊娠。子代 GGTA1<sup>-/-</sup>雄性猪、GGTA1<sup>+/+</sup>雄性猪和 GGTA1<sup>+/+</sup>雌性猪均能正常繁育,但获得的部分 GGTA1<sup>-/-</sup>雌性猪不能正常繁育,可能的原因是 GGTA1 基因纯合敲除影响雌性猪的繁育,关于

表 2 GTKO 五指山小型猪产仔数量及存活仔数

Table 2 Litter and survival amount of piglets of GTKO Wuzhishan miniature pigs

代系	雌性猪	雄性猪	胎次(胎)	窝产仔数(只)	存活仔猪(只)
F1	1(F0)	13	1	8	8
		13	2	8	8
		71	3	11	6
	71-3(F1)	71	1	4	3
		71	2	10	7
F2	1212(F1)	71	3	10	9
		71	1	8	8
	129	129	2	8	6
		129	1	6	6
	1316(F1)	129	2	5	4
		32	3	6	6
	21(F1)	71	1	8	7

表 3 GTKO 与野生型五指山小型猪血液生理指标的比较

Figure 3 Comparison of blood routine indexes between GTKO and wild-type Wuzhishan miniature pig

血液生理指标	GTKO 五指山小型猪(n=3)	野生型五指山小型猪(n=3)	五指山小型猪参考值 <sup>[8]</sup>
白细胞计数( $\times 10^9/L$ )	20.8±10.0	18.4±2.1	10.2-24.6
红细胞计数( $\times 10^{12}/L$ )	9.2±1.9	8.2±1.3	6.4-9.5
血红蛋白(g/L)	166±37	177±62	142-217
红细胞比容(%)	45.6±9.4	50.1±18.4	38.4-69.2
红细胞平均容积(FL)	49.6±2.9	47.1±5.1	54.5-73.2
红细胞平均血红蛋白含量(pg)	18.0±0.9	16.7±1.5	16.5-22.5
红细胞平均血红蛋白浓度( $\times 10^9/L$ )	363±9	355±7	299-329
红细胞分布宽度(%)	16.4±1.5	16.0±1.3	15.6-19.3
血小板计数( $\times 10^9/L$ )	409±32	345±61	144-387
血小板比容(%)	0.33±0.24	0.27±0.03	0.12-0.29
血小板平均容积(FL)	8.0±1.1	8.1±0.8	7.3-14.1
血小板分布宽度(%)	14.7±0.5	13.9±1.1	14.3-18.2
淋巴细胞计数( $\times 10^9/L$ )	7.3±3.9	9.9±3.7	3.5-15.7
单核细胞计数( $\times 10^9/L$ )	2.2±1.0	1.7±0.3	0.5-2.0
中性粒细胞计数( $\times 10^9/L$ )	7.5±2.6	6.4±1.7	1.3-8.2
淋巴细胞百分数(%)	34.9±6.2	44.8±6.2	32.8-71.5
单核细胞百分数(%)	7.0±0.3	6.6±0.1	0.2-4.5
中性粒细胞百分数(%)	48.3±11.4	32.5±15.9	19.6-63.8

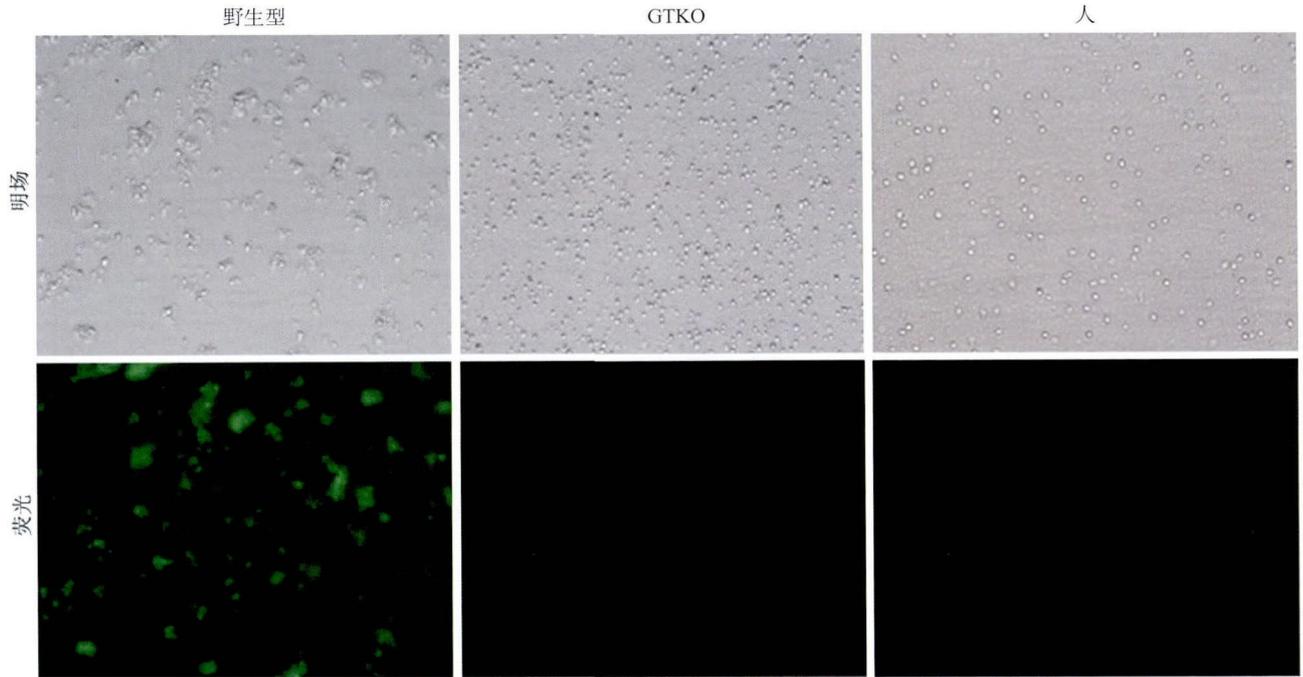
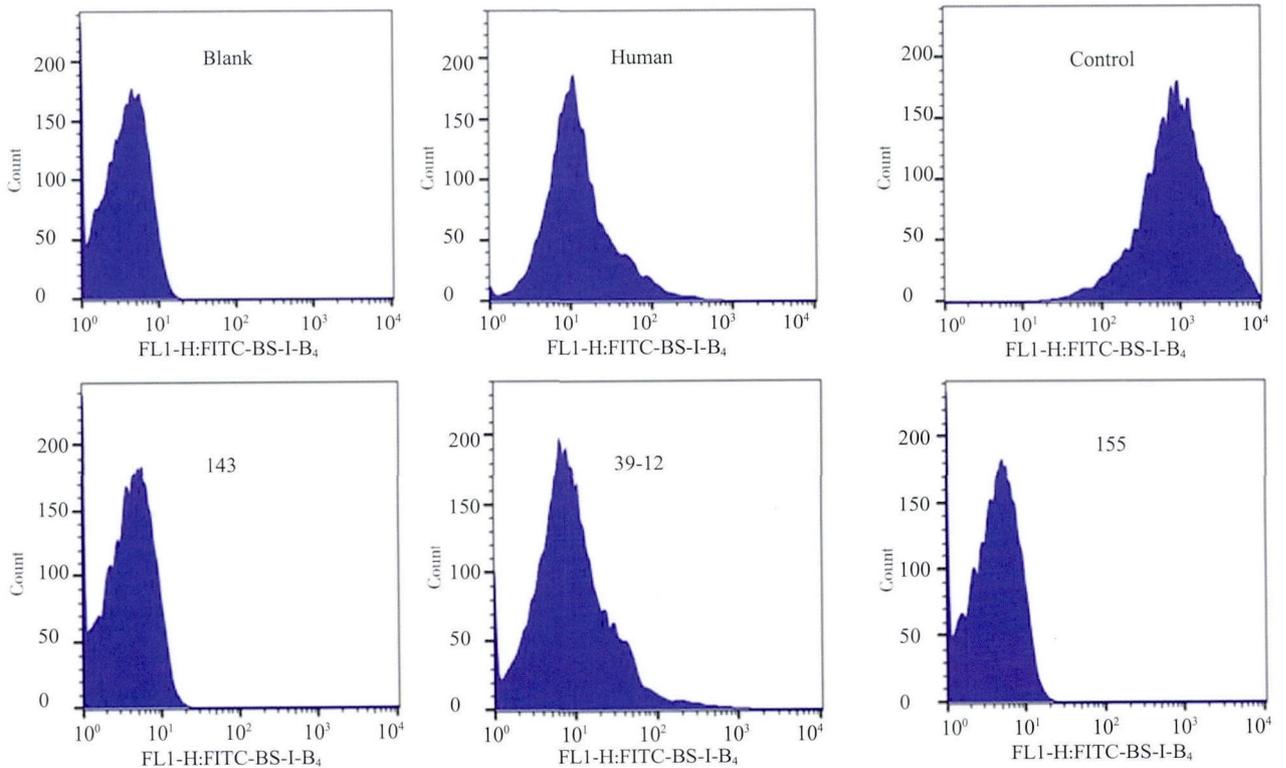


图 2 荧光显微镜观察 PBMC 的  $\alpha$ Gal 表型

Figure 2  $\alpha$ Gal phenotype in PBMC detected by fluorescence microscopy



Blank 为未染色五指山小型猪 PBMC ;Human 为人 PBMC ;Control 为野生型五指山小型猪 PBMC ;样品(143、39-12、155)为 GTKO 五指山小型猪 PBMC

图 3 流式细胞术检测  $\alpha$ Gal 表型

Figure 3 Flow cytometry analysis of  $\alpha$ Gal phenotype

GGTA1 基因纯合敲除如何对雌性猪繁殖产生影响有待进一步观察。GGTA1 基因型遗传稳定,基本符合孟德尔遗传定律。杂合子雌性猪与纯合子雄性猪

繁育的后代纯合子与杂合子的比例为 8:15, 偏离孟德尔遗传学的分离定律 1:1 的比例, 主要原因是繁殖样本较少。血常规检测表明 GTKO 五指山小型猪

生理健康良好。

窦科峰等<sup>[10]</sup>采用 GGTA1<sup>-/-</sup>五指山小型猪为供体,藏酋猴为受体完成异种肝移植实验,受体和移植肝存活 2 周,无超急性排斥反应,间接表明了本实验室培育的 GTKO 五指山小型猪去除了细胞表面的  $\alpha$ Gal 表型。猪-猴异种肝移植研究的肝供体最好为 1~2 月龄仔猪,在移植时肝脏大小比较合适。移植前猪  $\alpha$ Gal 表型鉴定,常规方法是分离血液中 PBMC,至少需要 1~2 mL 全血,仔猪前腔采血容易损伤脏器产生应激反应。全血裂解分离 PBMC,仅需 0.1 mL 全血,从而减小对供体的伤害。

总之,本实验系统研究了 GGTA1 基因敲除五指山小型猪的繁育和鉴定,连续 2 代跟踪研究表明遗传稳定、繁殖正常,并建立了 GTKO 五指山小型猪家系及微量血液检测  $\alpha$ Gal 表型的方法。

#### 参考文献:

- [1] Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, et al. The pig: a model for human infectious diseases [J]. Trends Microbiol, 2012, 20(1): 50-57. DOI: 10.1016/j.tim.2011.11.002.
- [2] Tuggle CK, Green JA, Fitzsimmons C, et al. EST-based gene discovery in pig: virtual expression patterns and comparative mapping to human [J]. Mamm Genome, 2003, 14(8): 565-579.
- [3] Denning C, Burl S, Ainslie A, et al. Deletion of the  $\alpha$  (1, 3) galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19 (6): 559-562.
- [4] Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, et al. Production of  $\alpha$ -1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning [J]. Science, 2002, 295(5557): 1089-1092.
- [5] 郑道山, 冯冲, 朱彦宾, 等. 利用启动子缺陷型打靶载体敲除五指山小型猪 GGTA1 基因 [J]. 生物技术通讯, 2011, 22(4): 458-462. DOI:10.3969/j.issn.1009-0002.2011.04.002. Zheng DS, Feng C, Zhu YB, et al. Knockout of GGTA1 Gene by Promoter-Trap Strategy in Wuzhishan Miniature Pig [J]. Lett Biotechnol, 2011, 22 (4): 458-462. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0002.2011.04.002.
- [6] Feng C, Li XR, Cui HT, et al. Highly efficient generation of GGTA1 knockout pigs using a combination of TALEN mRNA and magnetic beads with somatic cell nuclear transfer [J]. J Integr Agr, 2016, 15(7): 1540-1549.
- [7] Nottle MB, Beebe LF, Harrison SJ, et al. Production of homozygous alpha-1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer [J]. Xenotransplantation, 2007, 14(4): 339-344.
- [8] 杨述林, 任红艳, 王恒, 等. 中国实验用小型猪种群血液生理指标分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34 (2): 38-41. DOI:10.3969/j.issn.1671-7236.2007.02.013.
- [9] 曾国敏, 蒋应弟, 冯冲, 等. 表达人 CD47 基因的巴马小型猪创建及其表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2016, 24 (8): 1251-1258. DOI:10.3969/j.issn.1674-7968.2016.08.017. Zeng GM, Jiang YD, Feng C, et al. Generation and expression analysis of human (homo sapiens) CD47 transgenic bama miniature pig (sus scrofa) [J]. J Agric Biotechnol, 2016, 24 (8): 1251-1258. DOI:10.3969/j.issn.1674-7968.2016.08.017.
- [10] Burlak C, Bern M, Brito AE, et al. N-linked glycan profiling of GGTA1/CMAH knockout pigs identifies new potential carbohydrate xenoantigens [J]. Xenotransplantation, 2013, 20 (5): 277-291. DOI: 10.1111/xen.12047.
- [11] Estrada JL, Martens G, Li P, et al. Evaluation of human and non-human primate antibody binding to pig cells lacking GGTA1/CMAH/ $\beta$  4GalNT2 genes [J]. Xenotransplantation, 2015, 22 (3): 194-202. DOI: 10.1111/xen.12161.
- [12] Van Der Windt DJ, Bottino R, Casu A, et al. Long-term controlled normoglycemia in diabetic non-human primates after transplantation with hCD46 transgenic porcine islets [J]. Am J Transplant, 2009, 9 (12): 2716-2726. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2009.02850.x.
- [13] Sun X, Funk CD, Deng C, et al. Role of decay-accelerating factor in regulating complement activation on the erythrocyte surface as revealed by gene targeting [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(2): 628-633.
- [14] Esmon CT. The protein C pathway [J]. Chest, 2003, 124(3 suppl): 26S-32S.
- [15] 闵凡贵, 潘金春, 袁文, 等. 五指山小型猪繁殖性能测定 [J]. 实验动物与比较医学, 2011, 31 (5): 349-351. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2011.05.009. Min FG, Pan JC, Yuan W, et al. Determination of reproductive performance of outbred wuzhishan minipigs [J]. Lab Anim Comp Med, 2011, 31 (5): 349-351. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2011.05.009.
- [16] 窦科峰, 李霄, 陶开山, 等. 异种肝移植现状与未来 [J]. 中国实用外科杂志, 2014, 34(1): 14-18. Dou KF, Li X, Tao KS, et al. The status quo and future of xenotransplantation [J]. Chin J Pract Surg, 2014, 34(1): 14-18.

(收稿日期 2016-12-28)

(本文编辑 郭加佳 朱佩玲)