

## *fat-1* 基因脂肪组织特异性表达载体的构建 及其山羊转基因细胞系的建立

陈建文<sup>1</sup>, 刘 星<sup>1</sup>, 桂 涛<sup>1</sup>, 李运生<sup>1</sup>, 章孝荣<sup>1</sup>, 张 瑾<sup>2</sup>, 张运海<sup>1\*</sup>

(1. 安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室, 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036;

2. 河北科技师范学院生命科学学院, 秦皇岛 066000)

**摘 要:** 旨在构建一种筛选标记可全部去除的脂肪组织特异性表达 *fat-1* 基因的载体, 将其转染山羊胎儿成纤维细胞, 筛选出稳定整合 *fat-1* 基因的转基因细胞系。首先将人工合成的 *fat-1* 基因连接至 L28-Wnt10b 载体 (1 种带有小鼠脂肪组织特异性启动子 *Fabp4* 的载体) 上, 构建成 *fat-1* 基因脂肪组织特异性表达载体 L28-fat1; 同时经多次克隆构建成 1 种筛选标记可全部去除的骨架载体 MCS-3s-LoxP-RFP; 然后, 利用 *Hind* III 和 *Not* I 对上述 2 种载体进行双酶切, 接着进行连接, 构建出筛选标记可全部去除的脂肪组织特异性表达 *fat-1* 基因的表达载体。采用脂质体介导的方法转染山羊胎儿成纤维细胞, 通过 G418 筛选转基因细胞。酶切鉴定及 PCR 检测结果表明, 成功构建了 3s-LoxP-RFP-FABP4-*fat-1* 表达载体, 并首次获得了脂肪组织特异性表达 *fat-1* 基因的山羊胎儿成纤维转基因细胞系, 为将来通过体细胞核移植创制脂肪组织特异表达 *fat-1* 基因的优质肉用转基因山羊新材料奠定了基础。

**关键词:** 不饱和脂肪酸脱氢酶; 脂肪组织特异性表达; 脂肪酸结合蛋白 4 启动子; 转基因山羊; 标记去除

中图分类号: S827

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)05-0746-05

### Construction of *fat-1* adipose tissue specific expression vector and production of goat transgenic fibroblast cell line

CHEN Jian-wen<sup>1</sup>, LIU Xing<sup>1</sup>, GUI Tao<sup>1</sup>, LI Yun-sheng<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-rong<sup>1</sup>, ZHANG Jin<sup>2</sup>, ZHANG Yun-hai<sup>1</sup>

(1. Anhui Provincial Lab for Local Livestock and Poultry Genetic Resource Conservation and Biobreeding,

School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Life Science and Technology, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao 066000)

**Abstract:** The aim of this study is to construct a marker removable, *fat-1* adipose tissue specific expression vector and produce the transgenic goat fibroblast cell line for nuclear transfer. Firstly, the *fat-1* gene was synthesized and a *fat-1* adipose tissue specific expression vector was constructed. Secondly, the adipose tissue specific expression cassette was subcloned into a marker removable backbone vector (MCS-3s-LoxP-RFP) to construct a *fat-1* marker removable adipose tissue specific expression vector driven by mouse *Fabp4* promoter. Finally, the goat fetal fibroblasts was transfected with the vector by Lipofectmine<sup>TM</sup> 2000 and selected in medium with G418 for two weeks, and then G418 resistant transfectants were identified by PCR. The results showed that the *fat-1* marker removable adipose tissue specific expression vector was successfully constructed and the transgenic goat fibroblast cell lines were well established. It would pave the way for obtaining the marker-free *fat-1* transgenic goat by SCNT.

**Key words:** *fat-1*; adipose tissue specific expression; *Fabp4* promoter; transgenic goat; marker-free

心血管类疾病是一类困扰了人们多年的世界性  
疾病<sup>[1]</sup>。在 20 世纪 70 年代, Dyerberg 等发现爱斯

基摩人抗心血管疾病的能力与他们日常饮食丰富的  
鱼油摄入密切相关<sup>[2-3]</sup>。对日本人及荷兰人的研究进

收稿日期: 2012-04-23

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08006-007B)资助。

作者简介: 陈建文, 男, 硕士研究生。E-mail: chenjianwen2049@126.com

\* 通讯作者: 张运海, 男, 博士, 副教授。E-mail: yunhaizhang@ahau.edu.cn

一步发现, 鱼油中富含的 *n-3* 多不饱和脂肪酸 (*n-3* PUFAs) 可以有效地减少心血管疾病的发生<sup>[4-5]</sup>。*n-3* PUFAs 对人体具有重要的生理功能, 能够调节人体的脂质代谢、治疗和预防心脑血管疾病、促进生长发育, 但是人体自身不能合成 *n-3* PUFAs, 而必须从食物中摄取, 但大量食用鱼油很明显不太现实, 而且家畜禽体内缺乏 *n-3* PUFAs 脂肪酸脱氢酶基因, 无法将 *n-6* PUFAs 转变为 *n-3* PUFAs。1997 年, Spychalla 等从线虫中克隆得到了 *fat-1* 基因, 它位于线虫的第 4 号染色体上, 其编码的不饱和脂肪酸脱氢酶能够识别 18 和 20 碳的脂肪酸, 使得 *n-6* PUFAs 转变成 *n-3* PUFAs<sup>[6]</sup>。康景轩等最早利用腺病毒介导的方法将 *fat-1* 基因转入鼠心肌细胞中, 发现转基因细胞中的 *n-3* PUFAs 含量明显增加, 同时来源于 *n-6* PUFAs 的二十碳稀酸含量明显下降<sup>[7]</sup>, 随后该小组分别将 *fat-1* 基因转入小鼠和猪体内, 发现在转基因小鼠和猪的多个组织中, *n-3* PUFAs 含量明显高于野生型个体, 而 *n-6* PUFAs 含量明显降低, 证明了 *fat-1* 编码的不饱和脂肪酸脱氢酶可以在哺乳动物中将 *n-6* PUFAs 有效地转化为 *n-3* PUFAs<sup>[8-9]</sup>。2011 年, Wu 等在牛上也得到了类似的结果<sup>[10]</sup>, 但截至目前国内外尚无有关生产脂肪组织特异性表达 *fat-1* 的转基因克隆山羊的报道。

为了探索利用体细胞核移植技术制备全部筛选标记可去除的脂肪组织特异性表达 *fat-1* 基因的转基因山羊, 作者对 *fat-1* 基因编码区进行了密码子优化, 构建了一个筛选标记可全部去除的脂肪组织特异性表达 *fat-1* 基因的表达载体, 利用脂质体介导的方法转染山羊的胎儿成纤维细胞, 并通过 G418 药物筛选, 成功获得了山羊胎儿成纤维转基因细胞系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

L28-Wnt10b (一种由 Invitrogen 公司的 pCRII 表达载体插入带有小鼠脂肪组织特异性启动子 *Fabp4* 后带有 *Wnt10b* 的载体)、MCS-3s-LoxP-GFP 和 pBud4.1-EGFP-MCS-2A-RFP 质粒由本实验室保存。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司, 大肠杆菌感受态 *DH5α*、DNA Marker 购自天根生物技术有限公司, 2×HiFi Taq Mix、6×DNA Loading Buffer 购自 Transgen 生物技术有限公司, DNA 质粒提取试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司, Lipofectamin<sup>TM</sup>2000 及转染试剂购自于 Invitrogen, 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 *fat-1* 基因密码子优化与合成** 根据线虫 *fat-1* 不饱和脂肪酸脱氢酶基因 (GenBank 登录号: NM\_001028389.3) 序列, 利用哺乳动物密码子的偏好性、GC 含量、mRNA 二级结构和重复序列等对该基因序列进行密码子优化。为了增强目的基因的转录水平和翻译终止效率, 在起始密码子前增加了 Kozak 序列(GCCACC), 并改变了终止密码子(TAA → TGA), 人工合成的基因片段克隆至 pUC19 载体上, 命名为 pUC19-*fat1*。

**1.2.2 脂肪组织特异性表达 *fat-1* 基因表达载体的构建** 用 *Sal* I 和 *Xho* I 分别酶切 pUC19-*fat1* 和 L28-Wnt10b 载体, 切胶除去 L28-Wnt10b 载体上的 *Wnt10b* 基因片段, 回收载体部分 L28, 并将 *fat-1* 基因片段和 L28 载体进行连接, 进行菌液 PCR、酶切、测序鉴定, 构建脂肪组织特异性表达 *fat-1* 基因表达载体 L28-*fat1*。

**1.2.3 MCS-3s-2A-RFP 多功能全筛选标记可去除骨架载体的构建** 根据 MCS-3s-loxP-GFP 和 pBud4.1-EGFP-MCS-2A-RFP 载体上都具有 *Bst*B I 酶切位点的特点, 分别使用 *Bst*B I 内切酶进行酶切, 回收 pBud4.1-EGFP-MCS-2A-RFP 上 2A-RFP 片段(783 bp); 切除 MCS-3s-loxP-GFP 载体上 IRES-EGFP(1 314 bp)序列, 回收大片段(3 509 bp); 将此 2 个片段进行连接, 进行酶切、测序鉴定, 构建成 MCS-3s-2A-RFP 多功能全筛选标记可去除骨架载体。

**1.2.4 筛选标记可全部去除的脂肪组织特异性表达 *fat-1* 基因表达载体的构建** 用 *Hind* III 和 *Not* I 分别酶切 L28-*fat1* 和 MCS-3s-2A-RFP 载体, 切胶回收 L28-*fat1* 表达载体上的 FABP4-*fat1* 片段, 连接至 MCS-3s-2A-RFP 载体上, 进行菌液 PCR、酶切鉴定, 并在接头处进行测序, 构建成筛选标记可全部去除脂肪组织特异性表达 *fat-1* 基因表达载体 (图略)。

**1.2.5 山羊胎儿成纤维转基因细胞系的建立** 取生长状态良好的山羊胎儿成纤维原代细胞, 培养至第 2 代。利用脂质体介导的方法进行转染, 参照 Lipofectamin<sup>TM</sup>2000 说明书进行转染, 转染后 48~72 h 后, 根据实验室前期摸索的山羊成纤维细胞 G418 最低致死浓度, 加入终浓度为 600 μg·mL<sup>-1</sup> G418 进行筛选, 每 2~3 d 换液 1 次, 连续筛选 14 d 后, 加入不含 G418 的完全培养基进行培养, 以此获得转基因阳性细胞。

**1.2.6 山羊胎儿成纤维转基因细胞系的 PCR 鉴定** 提取转基因细胞的基因组 DNA, 以其为模板进行 PCR 扩增鉴定目的基因, 鉴定引物序列如下:

F1: 5'-ATGGTCGCTCATAGTTCTGA-3'

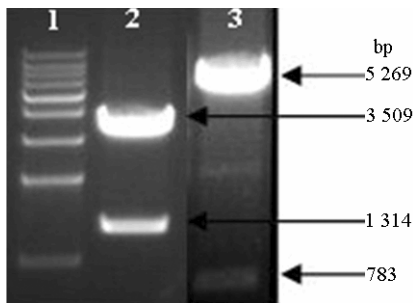
R1: 5'-CTATTTAGAAGGCACAGTCG-3'

1%琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 MCS-3s-LoxP-2A-RFP 载体的鉴定

如图 1 所示, MCS-3s-LoxP-GFP 和 pBud4.1-EGFP-MCS-2A-RFP 载体分别用 *Bst*B I 酶切后, 分别出现预期的目的片段: 小片段 IRES-EGFP(1 314 bp)和大片段(3 509 bp)小片段 2A-RFP 片段(783 bp)和大片段(5 269 bp)。利用 *Nhe* I 和 *Bgl* II 对 MCS-3s-LoxP-2A-RFP 进行了双酶切鉴定, 获得了预期的目的片段大片段(2 854 bp)和小片段(1 430 bp) (见图 2), 测序结果也显示正确连接, 表明 MCS-3s-LoxP-2A-RFP 多功能筛选标记可全部去除的骨架载体构建成功。



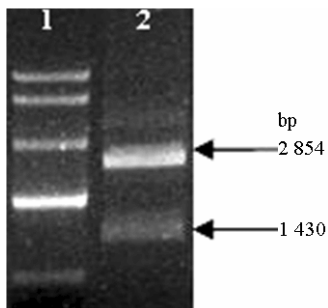
泳道 1: Marker 10000 (10000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000,3000, 2000, 1000 bp)

泳道 2: MCS-3s-LoxP-GFP *Bst*B I 酶切

泳道 3: pBud4.1-EGFP-MCS-2A-RFP *Bst*B I 酶切

图 1 MCS-3s-LoxP-GFP 酶切鉴定电泳图

Figure 1 MCS-3s-LoxP-GFP restriction endonuclease



泳道 1: Marker 7000 (7000, 5500, 3500,2000,1000 bp)

泳道 2: MCS-3s-LoxP-2A-RFP *Nhe* I/*Bgl* II 酶切

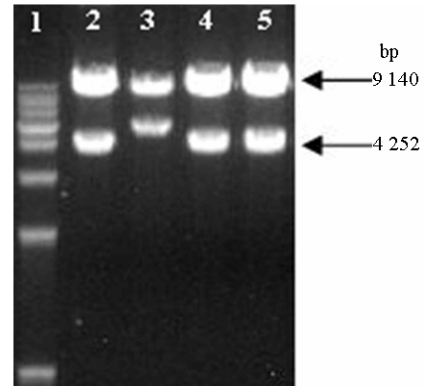
图 2 MCS-3s-LoxP-2A-RFP 酶切鉴定电泳图

Figure 2 MCS-3s-LoxP-2A-RFP restriction endonuclease

### 2.2 3s-LoxP-2A-RFP-FABP4-fat1 载体的鉴定

利用 *Hind* III 和 *Not* I 对 3s-LoxP-2A-RFP-

FABP4-fat1 进行了双酶切鉴定, 获得了预期的目的片段: 大片段 (9 140 bp) 和小片段 (4 252 bp) (见图 3), 测序结果也显示正确连接, 表明筛选标记可全部去除脂肪组织特异性表达 *fat-1* 基因表达载体构建成功。



泳道 1: Marker 10000 (10000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000,3000,2000,1000 bp)

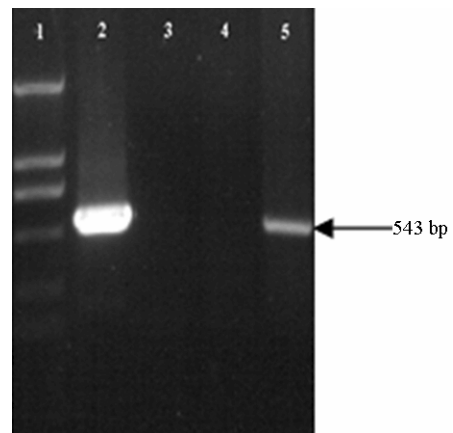
泳道 2-5: 3s-LoxP-2A-RFP-FABP4-fat1 *Hind* III/*Not* I 酶切

图 3 3s-LoxP-2A-RFP-FABP4-fat1 酶切鉴定电泳图

Figure 3 3s-LoxP-2A-RFP-FABP4-fat1 restriction endonuclease

### 2.3 羊胎儿成纤维转基因细胞系的建立及鉴定

经 G418 筛选 12~14 d 后出现细胞克隆, 消化后扩大至 6 孔板待其长满时, 取部分细胞提取基因组, 进行 PCR 鉴定, 结果出现预期大小为 543 bp (*fat-1* 基因部分) 的阳性条带 (见图 4), 将鉴定为阳性的转基因细胞继续扩大培养后一部分提取基因组 DNA 进行鉴定, 一部分冻存。



泳道 1: Marker 2000 (2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp)

泳道 2~5: 阳性对照 (Positive control, plasmid), 阴性对照 (Negative control, untransgenic goat cell DNA), 空白对照 (Blank, ddH<sub>2</sub>O), 转基因细胞 DNA (Transgenic cell DNA)

图 4 转基因细胞 PCR 鉴定电泳图

Figure 4 Identification of transgenic fibroblast cells

### 3 讨论

外源基因的异位表达可能会对转基因动物本身造成一些负面效应, 即外源基因在它原本不表达的组织器官中发生表达, 脱离了正常的生殖生理轴制约, 使其生殖生理功能发生改变, 从而导致转基因动物生殖生理功能出现异常。有研究显示: 生长激素 (growth hormone, GH) 的异位表达使转基因小鼠和转基因猪的健康水平下降, 出现生殖异常、寿命缩短、关节炎、肾炎和肠胃病等疾病<sup>[11-13]</sup>, 而童佳等生产的具有组织特异性表达 GH 的转基因小鼠则克服了上述缺点, 小鼠生殖生理未出现异常<sup>[14]</sup>。虽然先前的诸多研究尚未发现 *fat-1* 转基因动物个体具有明显生殖生理变化<sup>[8-10, 15]</sup>, 但是最近也有研究显示 *fat-1* 等一些与脂肪酸调控相关的基因和前列腺素的生成似乎有一定的关系, *fat-1* 基因的异位表达会造成一些转基因小鼠的生殖功能障碍<sup>[16-17]</sup>。目前, 解决异位表达的一个有效途径就是使用组织特异性启动子构建外源基因的组织特异性表达载体, 将目的基因的表达限制在单一或少数必要的组织器官中, 这样既可实现目的基因的表达, 又可避免目的基因在不必要的组织器官中由于异位表达而带来的负面效应。有研究表明: 5.4 kb 的 *Fabp4* 启动子对于脂肪组织特异性是足够的<sup>[18-20]</sup>。本研究采用的脂肪组织特异性启动子是长度为 7.9 kb 的小鼠 *Fabp4* 启动子<sup>[21]</sup>, 作者前期的试验结果显示该启动子具有较好的活性 (未发表资料)。脂肪酸主要存在于脂肪组织中, 因此希望 *fat-1* 基因能够在山羊脂肪组织中特异性表达, 以此来减少其他组织由于异位表达所带来的潜在危害, 提高转基因动物自身的福利和健康水平。

虽然世界上首次报道的转基因羊是用原核注射技术得到的, 但是原核显微注射法生产转基因大动物效率低、成本高、周期长, 如果将转基因克隆应用于转基因动物生产, 理论上生产出的克隆后代 100% 是转基因动物, 而且预先决定转基因动物性别的优势而降低转基因动物制作成本<sup>[22]</sup>, 因此, 在牛、羊、猪等转基因大动物制备上体细胞克隆技术明显优于传统的原核注射法。但是, 制作转基因动植物的过程中, 尤其在体细胞转基因的动物克隆中, 由于外源基因的整合效率较低, 不得不使用一些选择性标记基因和报告基因来提高转基因动植物的制作效率。然而, 当获得了真正的转基因动植物后, 选择标记就失去了其存在意义, 其继续表达的产物也会对环境及动植物体生长发育产生不良影响<sup>[23-24]</sup>,

并且近年来, 随着转基因动植物的不断出现, 人们对遗传工程生物的环境安全和食品安全问题的关注越来越多, 因此去除转基因动植物标记基因已成为研究的焦点之一。在本研究中, 表达载体上有 2 个同向的 34 bp 的 LoxP 位点, 在 Cre 重组酶的作用下通过位点特异性重组系统将 2 个 LoxP 位点之间的筛选标记 *Kan/neomycin* 和 *RFP* 序列去除, 仅仅保留一些功能基因片段 (*Fabp4* 启动子和目的基因 *fat-1* 等), 这种策略可以在获得转基因细胞后, 直接添加一种商业化的能穿透细胞膜的 Cre 蛋白<sup>[25-26]</sup>, 将 LoxP 中间的标记基因进行去除, 在细胞水平实现标记基因的去除, 大大节约胚胎生产的成本, 提高转基因动物的安全性, 缩短育种周期。

总之, 本研究首次把 *fat-1* 这一具有广阔前景的功能基因在山羊上做了尝试, 希望利用脂肪组织特异性表达 *fat-1* 基因来为实验室生产筛选标记全部去除的转基因山羊奠定一定的基础, 尽快获得不携带任何筛选标记的优质肉用转基因山羊, 提高转基因动物的安全性, 并提高转基因动物自身的福利和人类的健康水平。

**致谢:** 感谢中国农业大学连正兴教授、李萌、张伟、贾晴和林佳丽等在实验上提供的帮助。

### 参考文献:

- [1] Swedberg K. *n-3* Fatty acids in cardiovascular disease [J]. The New England Journal of Medicine, 2011, 365, 12: 1159.
- [2] Dyerberg J, Bang H O. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos [J]. Lancet, 1979, 2(8140): 433-435.
- [3] Dyerberg J, Bang H O. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos [J]. Nutrition, 1995, 11(5): 475.
- [4] Hirai A, Hamazaki T, Terano T, et al. Eicosapentaenoic acid and platelet function in Japanese [J]. Lancet, 1980, 2 (8204): 1132-1133.
- [5] Kromhout D, Bosschieter E B, de Lezenne Coulander C. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease [J]. The New England Journal of Medicine, 1985, 312(19): 1205-1209.
- [6] Sychalla J P, Kinney A J, Browse J. Identification of an animal omega-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in Arabidopsis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(4): 1142-1147.
- [7] Kang Z B, Ge Y, Chen Z, et al. Adenoviral gene transfer of *Caenorhabditis elegans n-3* fatty acid desaturase optimizes fatty acid composition in mammalian cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(7): 4050-4054.

- [8] Kang J X, Wang J, Wu L, et al. Transgenic mice: fat-1 mice convert *n*-6 to *n*-3 fatty acids [J]. *Nature*, 2004, 427(6974): 504.
- [9] 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.
- [10] Wu X, Ouyang H, Duan B, et al. Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids[J]. *Transgenic research*, 2012, 21(3): 537-543
- [11] Naar E M, Bartke A, Majumdar S S, et al. Fertility of transgenic female mice expressing bovine growth hormone or human growth hormone variant genes[J]. *Biology of Reproduction*, 1991, 45(1): 178-187.
- [12] Cecim M, Fadden C, Kerr J, et al. Infertility in transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone gene: disruption of the neuroendocrine control of prolactin secretion during pregnancy[J]. *Biology of Reproduction*, 1995, 52(5): 1187-1192.
- [13] Pursel V G, Pinkert C A, Miller K F, et al. Genetic engineering of livestock[J]. *Science*, 1989, 244(4910): 1281-1288.
- [14] Tong J, Lillico S G, Bi M J, et al. Tissue-specific and expression of porcine growth hormone gene in BAC transgenic mice[J]. *Transgenic Research*, 2011, 20(4): 933-938.
- [15] 潘登科, 张莉, 周艳荣, 等. 体细胞核移植生产转 $\omega$ -3脂肪酸去饱和酶基因 sFat-1 克隆猪[J]. *中国科学*, 2009, 39(3): 295-302.
- [16] 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.
- [17] Pohlmeier W E, Hovey R C, Van Eenennaam A L. Reproductive abnormalities in mice expressing omega-3 fatty acid desaturase in their mammary glands[J]. *Transgenic Research*, 2011, 20(2): 283-292.
- [18] Ross S R, Graves R A, Greenstein A, et al. A fat-specific enhancer is the primary determinant of gene expression for adipocyte P2 in vivo[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(24): 9590-9594.
- [19] Graves R A, Tontonoz P, Platt K A, et al. Identification of a fat cell enhancer: analysis of requirements for adipose tissue-specific gene expression [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1992, 49(3): 219-224.
- [20] Rival Y, Stennevin A, Puech L, et al. Human adipocyte fatty acid-binding protein (aP2) gene promoter-driven reporter assay discriminates nonlipogenic peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands[J]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2004, 311(2): 467-475.
- [21] Longo K A, Wright W S, Kang S, et al. Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(34): 35503-35509.
- [22] Brink M F, Bishop M D, Pieper F R. Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk[J]. *Theriogenology*, 2000, 53(1): 139-148.
- [23] Baens M, Noels H, Broeckx V, et al. The dark side of EGFP: defective polyubiquitination [J]. *PloS one*, 2006, 1: e54.
- [24] Miki B, Abdeen A, Manabe Y, et al. Selectable marker genes and unintended changes to the plant transcriptome[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2009, 7(3): 211-218.
- [25] Nolden L, Edenhofer F, Haupt S, et al. Site-specific recombination in human embryonic stem cells induced by cell-permeant Cre recombinase[J]. *Nature Methods*, 2006, 3(6): 461-467.
- [26] Xu Y, Liu S, Yu G, et al. Excision of selectable genes from transgenic goat cells by a protein transducible TAT-Cre recombinase [J]. *Gene*, 2008, 419(1/2): 70-74.