

广西巴马小型猪 PERV-env 基因克隆及其组织表达谱分析

钟 华¹, 潘汉世², 马 玲², 龙 寒¹, 陈凤莲², 廖艳娟¹, 唐海波², 吴健敏²

(1. 广西民族大学海洋与生物技术学院, 南宁, 广西 530006; 2. 广西兽医研究所
广西兽医生物技术重点实验室, 南宁, 广西 530001)

【摘要】 目的 克隆广西巴马小型猪 PERV-env 部分基因, 并研究其在不同组织中的表达差异。**方法** 利用 RT-PCR 方法从巴马小型猪外周血白细胞中扩增 PERV-env 基因, 并与部分国内外已发表的 PERV-env 基因序列进行同源性及遗传进化分析。以扩增获得的广西巴马小型猪 PERV-env 基因为模板设计引物, 利用半定量 RT-PCR 的方法对广西巴马小型猪不同组织中 PERV mRNA 表达情况进行分析。**结果** 在所检测的 9 个组织样品中 PERV mRNA 相对表达水平存在差异, 肾及外周血淋巴细胞中 PERV mRNA 丰度最高, 肺、心、肝、脾、胸腺、卵巢次之, 且表达丰度差异不显著 ($P > 0.05$), 胰腺 PERV mRNA 表达丰度最低。**结论** 以巴马小型猪胰岛细胞进行异种移植发生 PERV 感染的潜在危险性可能要低于其它器官, 但仍需进一步研究证实。

【关键词】 巴马小型猪; PERV-env 基因; 半定量 RT-PCR; 组织表达谱

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 02-0001-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.02.001

Cloning of PERV-env in GXBM minipig and analysis of its tissue expression profile

ZHONG Hua¹, PAN Han-shi², MA Ling², LONG Han¹, CHEN Feng-lian²,
LIAO Yan-juan¹, TANG Hai-bo², WU Jian-min²

(School of Marine Sciences and Biotechnology, Guangxi University for Nationalities, Nanning 53001, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Guangxi Veterinary
Research Institute, Nanning 53001)

【Abstract】 Objective To clone partial env genes of porcine endogenous retrovirus (PERV) isolated from Guangxi Bama minipigs and study their expression differences in different organ tissues. **Method** The PERV-env genes from peripheral blood leukocytes of Bama minipigs were amplified by RT-PCR, and their homology and phylogenetic analysis were compared with those of some other PERV-env genes published home and abroad. The PERV-env genes obtained by amplification from Bama minipig were used as templates to design primers for analysis on the expressions of

【基金项目】 国家自然科学基金(31260613); 广西自然科学基金(2013GXNSFBA019123); 广西兽医生物技术重点实验室开放基金(12-071-28-B-3)。

【作者简介】 钟华(1981-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 生物化学与分子生物学。Email: 17737290@qq.com。

【通讯作者】 吴健敏(1963-), 女, 研究员, 博士生导师, 研究生方向: 动物传染病与分子免疫学。E-mail: wu-jm20@163.com。

PERV mRNA in different tissues of the Bama minipig with a semi-quantitative RT-PCR analysis. **Result** Differences in the expression levels of PERV mRNA were detected in nine organ tissues of Bama minipig, in which the abundance of PERV mRNA in kidney and peripheral blood lymphocytes was the highest, followed by that in lung, heart, liver, spleen, thymus and ovary, but the expression differences among the six organs were not significant ($P > 0.05$), while the expression abundance of PERV mRNA in pancreas was the lowest. **Conclusions** The potential risk of PERV infection in using the islet cells of Bama mini pig for xenotransplantation is probably lower than using the other organs. However, further research is still needed.

【Key words】 Bama minipig; PERV-env genes; Semi-quantitative RT-PCR; Tissue expression profile; Xenotransplantation

广西巴马小型猪具有遗传性能稳定,遗传相似性及近交系数高等优点,是国家重点扶持发展的小型猪种之一。目前在医学及生物学方面的应用涉及到肿瘤、心血管病、糖尿病、皮肤烧伤、血液病、遗传病、营养代谢病、新药评价等等。它不仅是发展高级医学实验用猪的优良品系,同时也有望成为异种移植的最佳供体之一。

自从猪内源性反转录病毒(Porcine endogenous retrovirus, PERV)被认为在猪—人异种移植中存在潜在危险以来,有关 PERV 病原安全性问题成为研究的热点^[1]。PERV 基因组结构由 5'、3'非编码区及 gag、pol、env 3 个编码基因组成,它能够以前病毒 DNA 形式整合进猪细胞基因组中,并随细胞染色体复制而复制。PERV-env 基因编码病毒的囊膜蛋白(Env 蛋白),由贯穿病毒囊膜的穿膜(transmembrane, TM)蛋白及暴露于囊膜表面的表面蛋白(surface glycoprotein, SU)组成。SU 有许多糖基化位点,不但具有受体结合的功能,与 PERV A、B、C 亚型的分类、细胞的嗜性、宿主感染范围等相关,还具有诱导宿主产生中和抗体的作用,同时还非常容易变异^[2]。而 TM 蛋白则相对保守,参与感染过程中病毒与宿主细胞膜的融合,因此 Env 蛋白一直是 PERV 研究的重点。

本试验通过 RT-PCR 技术从巴马小型猪外周血淋巴细胞中克隆 PERV-env 基因,并以巴马小型猪 PERV-env 基因中 TM 蛋白编码区为模板设计引物,应用半定量 RT-PCR 方法对巴马小型猪各个组织中 PERV-env 基因的 mRNA 丰度进行检测,以了解广西巴马小型猪各组织器官中 PERV 的表达情况,为临床异种移植选择低拷贝负载的猪器官、组织或细胞提供依据,同时也为进一步开展异种移植的安全性评估打下基础。

1 材料和方法

1.1 检测样品

6 月龄的巴马小型猪 3 头,由广西大学巴马小型猪封闭养殖场提供[SCXK 桂 2013-0003]。实验在广西丽原生物股份有限公司实验动物中心内进行[SYXK 桂 2012-0002],所有的操作必须遵守实验动物中心的规章制度和操作规程(SOP)进行。猪宰杀后迅速采集肺、心、肝、肾、脾、胰、胸腺、卵巢、外周血,液氮速冻, -80℃ 冰箱保存,用于总 RNA 的提取。

1.2 工具酶及试剂

M-MLV 反转录酶、Pyrobest Taq DNA 聚合酶、pGEM-T 载体、琼脂糖等购自 Promega 公司,Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品,Bioered™ 全血基因组 DNA 小量纯化试剂盒、DNA marker DL2000 购自大连宝生物公司(TaKaRa),*E. coli* DH 5α 为本室保存。

1.3 基因的选择及引物设计

根据 Genbank 已发表的 PERV 核苷酸序列(登录号:AJ133817),设计一对引物,用于扩增 PERV-env 全基因。此外,由于 PERV 有 A、B、C 三种亚型,其分型主要由 Env 蛋白中的 SU 蛋白的差异来决定^[2],因此本试验以扩增获得的巴马小型猪 PERV-env 基因为模板,选择避开 SU 蛋白编码区,以相对保守的 TM 蛋白编码区设计引物,扩增 PERV-env 部分基因作为检测 PERV 表达谱的待测目的基因。同时以管家基因(house-keeping genes)β 肌动蛋白(β-actin)为内参基因。β-actin 是细胞的一种重要骨架蛋白,在不同物种之间高度保守。因此在进行半定量 RT-PCR 时,选择管家基因可以通过计算目的基因和内参的比值,得到基因表达的相对浓度。根据 Genebank 已发表的 β-actin 基因序列(登录号:U07786)设计引物,引物序列见表 1。

表 1 PERV-env 基因和 β -actin 基因引物序列
Tab. 1 Primer sequences for PERV-env and β -actin

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences	产物大小 Product length	用途 Purpose
PERV-env	F: 5'-ATGCATCCCACGTTAAACCG-3' R: 5'-CCTTTCATTCCCACCTTCTTC-3'	1965 bp	扩增 env 全长 To amplify the full length of env
β -actin	F: 5'-GATCGTGCGGGACATCAAGG-3' R: 5'-CACATCTGCTGGAAGGTGGACAG-3'	447 bp	内参基因 To provide reference genes
PERV-env'	F: 5'-GCTACCTCTTCTTGTGGCTATGC-3' R: 5'-CACCACCTGTCATAACCAGGTACC-3'	265 bp	扩增 env 部分基因 To amplify partial env genes 分析表达谱 To analyze expression profiles

1.4 RNA 的制备及含量测定

总 RNA 的制备:按 Trizol 试剂盒说明书进行操作,提取巴马小型猪各种组织及外周血白细胞的总 RNA,取 5 μ L 按一定的倍数稀释,以紫外分光光度计检测总 RNA 纯度并进行 RNA 含量的测定。总 RNA 含量计算方法:($A_{260} \times$ 核酸稀释倍数 $\times$ 40)/1000,单位为 μ g/ μ L。提取的总 RNA 储存于 -80°C 备用。

1.5 cDNA 的合成

分别取巴马小型猪各个组织提取的总 RNA 2 μ g,分别加到 1.5 mL EP 管中,然后各加 1 μ L 的 Oligo(dT)17 (50 pmol/ μ L) 混匀,再加无 RNA 酶水至 15 μ L,于 PCR 仪中 70°C 变性 5 min 后,迅速冰浴 2 min。短暂离心后再加入 $5 \times$ buffer 5 μ L、dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L、RNasin 0.5 μ L、M-MULV 0.5 μ L。于 PCR 仪中 42°C 作用 1 h 后, 70°C 15 min 灭活反转录酶。再加入 1 μ L RNase H (2U/ μ L) 37°C 消化 20 min,立即使用或 -20°C 保存备用。

1.6 PCR 扩增

1.6.1 PERV-env 全基因扩增及分析:参照文献 [3] 的方法,利用 PERV-env 全基因引物,从巴马小型猪外周血白细胞中扩增 PERV-env 全基因。具体扩增条件为: 94°C 5 min, 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 2 min 循环 35 次,最后 72°C 延伸 10 min。扩增产物经克隆后送北京奥科生物有限公司测序。测序结果登录 GenBank 并与国内外已发表的 PERV-env 全基因序列进行同源性及遗传进化分析。

1.6.2 PERV-env 部分基因及 β -actin 基因的扩增:
1.6.2.1 PCR 反应条件:PERV-env 部分基因与 β -actin 基因 PCR 反应条件为:0.5 μ L cDNA 模板,0.25 μ L Taq 酶,上、下游引物各 0.25 μ L (50 pmol),dNTP (2.5 mmol/L each) 1 μ L,10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L, MgCl_2 (25 mmol/L) 1.5 μ L,最后加无 RNA 酶水至 25 μ L。将上述各成分置 PCR 管混匀后于 PCR

仪上进行反应,反应程序: 94°C 4 min; 94°C 30 s,退火温度 45 s (温度待定), 72°C 30 s; 72°C 5 min。PCR 产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6.2.2 最佳 Mg^{2+} 浓度的确定:在其它条件相同的情况下,观察 Mg^{2+} 终浓度在 1.0、1.25、1.5、1.75、2.0 mmol/L 的情况下,PCR 扩增结果。根据其亮度和特异性,确定适宜的 MgCl_2 浓度。

1.6.2.3 PCR 扩增最佳循环数的确定:循环次数决定 PCR 扩增程度。在其它条件相同的情况下,观察 PERV-env 部分基因在循环数为:26、28、30、32、34; β -actin 基因在循环数为 22、24、26、28、30 时 PCR 扩增结果。根据其亮度确定适宜的 PCR 扩增循环数。

1.7 电泳图片的获得和定量分析

将 PCR 产物按常规方法电泳,经凝胶成像仪拍照后,用定量分析软件 UN-SCAN-IT 分别测定目的基因片段 OD 值和内参 β -actin 基因片段 A 值。以待测目的基因片段实测 A 值/ β -actin 基因片段实测 A 值的比值,代表目的基因片段 mRNA 的相对含量。每个反应重复 3 次,然后用 SAS 软件对数据进行统计分析。

目的基因 mRNA 相对含量 =
$$\frac{\text{待测目的基因片段实测 A 值}}{\beta\text{-actin 基因片段实测 A 值}}$$

2 结果

2.1 PERV-env 全基因扩增及分析结果

通过 RT-PCR 从巴马小型猪外周血白细胞中扩增得到长度约 2 000 bp 的片段,将该片段克隆、测序,结果获得的广西巴马小型猪 PERV-env 全长基因大小为 1 983 bp,编码 660 aa,GenBank 登录号为:EU086225。将该毒株序列与国外 AF417232 (美国)、AY534306 (德国)、EU789636 (俄国)、LC03396 (日本)、HQ540591 (韩国)、AJ288588 (法国)、

AF014162(英国)及国内 AY751803(中国版纳小型猪)、AF507940(中国实验小型猪)、AY850198(中国五指山小型猪)进行同源性比较,结果同源性在 75.7 – 99.3 之间,与法国毒株同源性最低,与中国实验小型猪及韩国毒株同源性最高,与国内五指山猪 PERV 及版纳猪 PERV 的同源性分别为 96.2 和 95.4。遗传进化分析亦可看出巴马小型猪 PERV 与中国实验小型猪及韩国毒株位于同一簇(图 1)。由此看出要想较准确的测定广西巴马小型猪 PERV 组织表达谱,应该选用来自广西巴马小型猪 PERV-env 基因序列设计引物。

2.2 半定量 RT-PCR 反应条件的筛选

2.2.1 内参基因 β -actin 及目的基因 PERV-env 退火温度的确定 : β -actin 基因扩增片段大小为 447 bp,经测序证实扩增得到的基因序列与参考序列同源性为 99%。按方法 1.6.2.1,选择了 58℃、60℃、62℃、64℃ 等 4 个退火温度,经 PCR 反应后,通过测

定目的片段的净灰度,确定其最佳退火温度为 64℃(图 2A)。按同样的方法,PERV-env 部分基因 PCR 扩增片段大小约 265 bp,通过测定目的片段的净灰度,确定其最佳退火温度为 58℃(图 2B)。

2.2.2 Mg^{2+} 浓度对 PERV-env 部分基因和 β -actin 扩增效率的影响 :扩增结果显示:PERV-env 部分基因和 β -actin 基因在 Mg^{2+} 浓度为 1.0、1.25、1.5 和 2.0 mmol/L 时 PCR 扩增效率均过低,只有在 1.75 mmol/L 时 PCR 的特异性和扩增效率良好(图 3 A; B)。

2.2.3 PCR 扩增循环数对 PERV-env 部分基因和 β -actin 扩增产物的影响:试验结果显示目的基因 PERV-env 和内参 β -actin PCR 产物量均随着 PCR 循环数的增加而增强(图 4A, B),说明 PCR 反应均未达到反应的平台期。为避免平台效应的影响,选择扩增反应在到达平台期前的线性范围内且电泳条带清晰的相应循环数作为 PCR 反应最佳循环数。

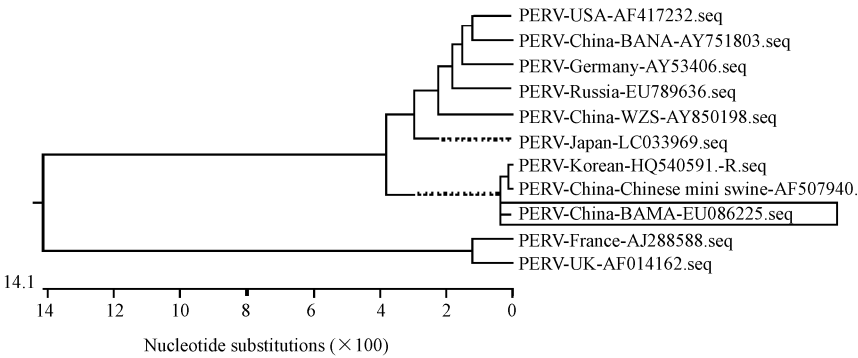
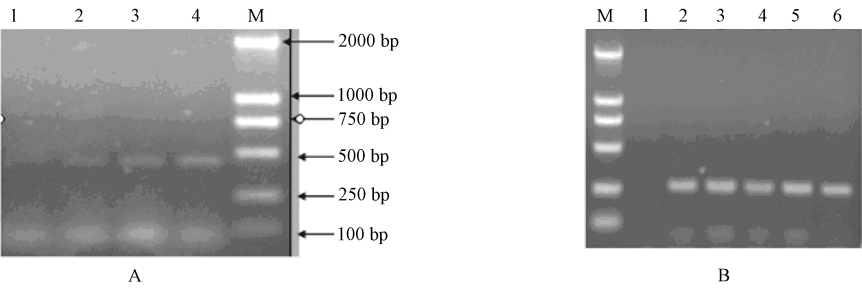


图 1 巴马小型猪 PERV-env 基因遗传进化树分析

Fig.1 Phylogentic analysis of PERV-env genes in the Bama minipigs



A: β -actin 基因; B: PERV-env 部分基因

图 A 泳道:1. 58℃;2. 60℃;3. 62℃;4. 64℃;M. DL-2000 DNA marker

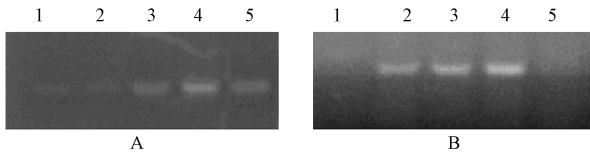
图 B 泳道:M. DL-2000 DNA marker;1. 54℃;2. 56℃;3. 58℃;4. 60℃;5. 62℃;6. 64℃

图 2 不同退火温度下 β -actin 基因及 PERV-env 部分基因扩增结果

A: β -actin;1. 58℃;2. 60℃;3. 62℃;4. 64℃;M. DL-2000 DNA marker.

B: PERV-env;M. DL-2000 DNA marker;1. 54℃;2. 56℃;3. 58℃;4. 60℃;5. 62℃;6. 64℃.

Fig.2 Amplification products of β -actin and PERV-env at different annealing temperatures



A:PERV-env 部分基因;B:β-actin 基因

图 A、图 B 泳道(相同):1. 1.0 mmol/L;2. 1.25 mmol/L;

3. 1.5 mmol/L;4. 1.75 mmol/L;5. 2.0 mmol/L

图 3 不同 Mg²⁺ 浓度对 PERV-env 部分基因和 β-actin 基因扩增效率的分析

Note. A:PERV-env; B:β-actin. 1. 1.0 mmol/L; 2. 1.25 mmol/L;

3. 1.5 mmol/L; 4. 1.75 mmol/L; 5. 2.0 mmol/L.

Fig. 3 Analysis of amplification efficiency of

PERV-env and β-actin with different Mg²⁺ concentration

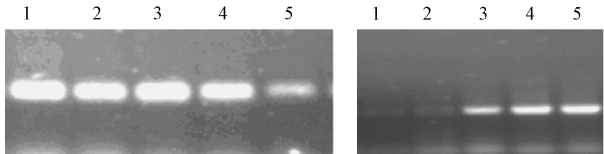
本试验选取 30 个循环作为待测 PERV-env 基因的最佳循环数;而选取 28 个循环为内参 β-actin 基因最佳循环数。

2.3 以 β-actin 为内参对 PERV-env 部分基因定量测定

以 β-actin 为内参,采用双管法对不同组织样品进行半定量 RT-PCR 分析,分别测定各自 PCR 产物电泳条带的 OD 值,每个反应重复 3 次取均值,经计算各个组织 mRNA 相对含量分别为:肝脏:0.85;心脏:0.90;胰腺:0.70;肾脏:1.31;脾脏:0.89;胸腺:0.86;肺:0.85;卵巢:0.84;外周血:1.28。以 SAS 软件统计分析结果表明 PERV-env 在 mRNA 上述组织中均有表达,但在不同组织中表达存在明显差异,肾脏和外周血白细胞表达丰度最高($P < 0.05$),胰腺的表达丰度最低,其它组织表达丰度差异无显著性($P > 0.05$)。

3 讨论

目前用于定量分析 mRNA 表达量主要方法有:半定量 RT-PCR、Northern 印迹杂交、cDNA 微阵列和寡聚核苷酸微阵列技术以及目前发展迅速的实时荧光定量 PCR 等。后几种方法特异性好、具有较高的敏感性和准确性,但是成本高,对仪器设备和样品处理要求高且步骤繁琐。半定量 RT-PCR 以其简单、快速、方便、可同时测定几个基因且所需费用低、普通实验室均可开展等优点而被广泛应用。但利用半定量 RT-PCR 法分析基因表达水平的影响因素较多,要提高半定量 RT-PCR 法的准确性,最关键的是优化试验条件。首先必须选择一个表达稳定的基因作为参照,如常用的有 GAPDH、β-actin、18S 等;其次所提的 mRNA 纯度要高,完整性要好并达



A:PERV-env 部分基因;B:β-actin 基因

图 A 泳道:1. 34 循环;2. 32 循环;3. 30 循环;4. 28 循环;5. 26 循环

图 B 泳道:1. 22 循环;2. 24 循环;3. 26 循环;4. 28 循环;5. 30 循环

图 4 不同循环数对 PERV-env 部分基因及 β-actin 扩增效率影响

Note. A:PERV-env;1. 34 cycles; 2. 32 cycles;

3. 30 cycles; 4. 28 cycles; 5. 26 cycles.

B:β-actin;1. 22 cycles; 2. 24 cycles; 3. 26 cycles;

4. 28 cycles; 5. 30 cycles.

Fig. 4 Effects of different cycles on the amplification efficiency of PERV-env partial gene and β-actin.

到一定的浓度,以紫外分光光度计测定,其吸光度值 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8 ~ 2.0 时,符合实验要求。在优化试验条件中,选择合适的循环数是 PCR 半定量方法的关键因素,但它必须在指数内进行 PCR 扩增,保证产物与循环数呈线性关系。此外合适的退火温度与 Mg²⁺ 浓度也会对试验结果造成影响。

自从发现 PERV 对异种移植存在潜在的病毒生物安全性以来,寻找无 PERV 或低拷贝 PERV 的小型猪,开展小型猪中内源性反转录病毒的存在状况调查及其潜在的危害性的研究一直是研究的热点^[4-6]。目前的研究发现 PERV 在不同的猪种之间负载不平衡,不同猪种携带 PERV 亚型也不尽相同^[7,8]。虽然 PERV 在肾、肝、脾、肺、胸腺、胰腺、卵巢、脑神经、外周血白细胞及内皮细胞等组织均有表达,但表达的拷贝数有差异。靳二辉^[9]采用 RT-PCR 技术对近交系五指山小型猪 15 种组织内 PERV 的表达情况进行了检测,发现 PERV 在心脏、肝脏、肾脏表达较弱,在免疫组织表达较强。因此检测 PERV mRNA 在不同猪种、不同组织中的表达情况对医学实验用猪的挑选及猪—人异种器官移植均具有重要意义。在进行猪—人异种移植时,可以选用病毒负载较低组织作为供体,可以降低异体移植潜在的危险性。

本试验采用半定量 RT-PCR 方法,首次对 PERV-env mRNA 在巴马小型猪各个组织中表达量进行测定。结果发现在所采集的十个组织样品中均可以检测到 PERV-env mRNA 的表达。SAS 软件统计分析结果表明,肾、外周血白细胞中 PERV 表达丰度最高,肺、心、肝、脾、胸腺、卵巢次之,胰腺中

PERV 表达丰度最低。肺、心、肝、脾、胸腺、卵巢表达丰度差异不显著($P > 0.05$),这与国内外的研究结果基本一致^[10,11]。

关于选择 PERV 低拷贝猪及 PERV 表达丰度较低的器官进行异种移植,以降低其潜在的危害性问题学者们进行了大量研究。Patience 等^[1]在 1997 年首先提出 PERV5'端或部分结构基因的缺失会造成部分拷贝失去转录活性和功能,因此并不是所有的拷贝都具有感染活性。然而,PERV 各基因可以通过互补或重组产生具有生物活性的病毒颗粒,因此可以通过选择性育种降 PERV 的拷贝数以达到降低异种移植风险的目的。Clemenceau 等^[10]在 1999 年通过试验发现,猪胰岛细胞和脑神经细胞所含 PERV 前病毒的负荷相对较低,认为进行猪胰岛细胞和脑神经细胞异种移植发生 PERV 感染的潜在危险性可能要比移植猪肾、肝等器官要小。最近,国际异种器官移植协会发表了一份联合声明,启动在上个世纪九十年代被停止的猪胰岛产品在 1 型糖尿病治疗方面的临床试验,重新评价胰岛在异种移植方面的安全性^[12]。总之,在未来的 5 到 10 年,在适当的指导和监管控制下,猪的胰岛异种移植材料被认为是一种可行的手段,解决临床上胰岛远远不能满足需求的问题^[13]。本研究发现巴马小型猪胰腺中 PERV 表达丰度最低,可初步认为以巴马小型猪胰岛细胞进行异种移植发生 PERV 感染的潜在危险性可能要低于其它器官。由于本实验所用动物个体数量有限,只得出了初步的结论,还需要做更多细致的工作。

参考文献:

- [1] Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs [J]. Nat Med, 1997, 3(3): 282 - 286.
- [2] Takeuchi Y, Patience C, Magre S, et al. Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus [J]. J Virol, 1998, 72: 9986 - 9991.
- [3] 吴健敏,吕茂民,陈凤莲,等. 中国特有小型猪内源性反转录病毒囊膜基因的克隆及进化分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22 (10): 925 - 928.
- [4] Ma Y, Yang Y, Lv M, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction with SYBR green I detection for estimating copy numbers of porcine endogenous retrovirus from Chinese miniature pigs [J]. Transplant Proc, 2008, 28(3): 160 - 163.
- [5] 李金泽,岳敏,张建明,等. 四种小型猪内源性逆转录病毒基因研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(3): 160 - 163.
- [6] 连正兴, C. Rogel-Gaillard, 李宁, 等. 利用半定量 PCR 方法分析中国地方猪种内源病毒序列拷贝数的多态性 [J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(6): 521 - 524.
- [7] Heneine W, Tibell A, Switzer WM, et al. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts [J]. Lancet, 1998, 352 (9129): 695 - 699.
- [8] Blusch JH, Roos C, Nitschko H. A polymerase chain reaction-based protocol for the detection of transmission of pig endogenous retroviruses in pig to human xenotransplantation [J]. Transplantation, 2000, 69(10): 2167 - 2172.
- [9] 靳二辉. 近交系五指山小型猪解剖和组织学研究及内源性反转录病毒(PERV)的检测 [D]. 华中农业大学, 2008.
- [10] Clemenceau B, Lalain S, Martignat L, et al. Porcine endogenous retroviral mRNA in pancreas and a panel of tissues from specific pathogen free pig [J]. Diabetes Metab, 1999, 25 (6): 518 - 525.
- [11] 丁生财,陈意生,魏私,等. PERV 在猪外周血白细胞 DNA 和组织 mRNA 中的表达及其差异性分析 [J]. 实验生物学报, 2004, 37(5): 351 - 358.
- [12] Matsumoto S, Tomiya M, Sawamoto O. Current status and future of clinical islet xenotransplantation [J]. J Diabetes. 2016, 10: 1753 - 0407.
- [13] Spizzo T, Denner J, Gazda L, et al. First update of the International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes — Chapter 2a: source pigs-preventing zoonoses [J]. Xenotransplantation, 2016, 23(1): 25 - 31.

[修回日期] 2016 - 08 - 05