评述

狨猴生殖工程与基因修饰研究进展

张晓辉^①, 卢红宇^②, 黄群山^②, 杨世华^{①②*}^① 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500;^② 华南农业大学兽医学院, 广东省兽医临床重大疾病综合防控重点实验室, 广州 510642

* 联系人, E-mail: yangsh@scau.edu.cn

收稿日期: 2014-10-26; 接受日期: 2015-01-07

科技部重大科学研究计划重大科学问题导向项目(批准号: 2012CBA01302)、教育部“新世纪国家优秀人才”支持计划项目(批准号: NCET-12-1078)、国家自然科学基金(批准号: 31071279)和广东省教育厅科技创新项目(批准号: 2013KJCX0029)资助

doi: 10.1360/N052014-00266

摘要 人类疾病相关基因修饰动物模型已成为研究人类疾病分子机理和治疗靶点的重要途径和材料。狨猴是最小型实验灵长类动物, 其体型小、繁殖快、遗传进化及生理生化方面与人类接近, 是人类疾病动物模型研究的理想实验动物之一。因此, 利用高效的生殖工程技术和基因编辑技术创制基因修饰狨猴具有巨大的生物医药价值。本文就狨猴生殖工程技术和基因修饰进行综述, 旨在开拓人类疾病动物模型, 推动疾病机理和新药创制的突破性发展。

关键词狨猴
生殖工程
基因修饰

越来越多的研究表明, 基因突变或修饰是人类疾病的重要病因之一。因此, 人类疾病相关基因修饰动物模型成为研究人类疾病分子机理和治疗靶点的重要途径和实验材料^[1,2]。基因修饰灵长类动物在遗传进化及生理生化方面与人类接近, 相对于啮齿类及其他模式动物, 灵长类动物更能准确模拟人类疾病病理及发生机制, 尤其在神经和代谢性疾病方面^[3,4]。国际上现存灵长类动物约 224 种, 用于实验研究的有猕猴(恒河猴(*Macaca mulatta*))、食蟹猴(*M. fascicularis*)和狨猴(普通狨猴(*Callithrix jacchus*))。其中, 狨猴是小型新大陆灵长类动物, 目前广泛用于人类疾病的研究, 如生殖生物学^[5]、药物动力学及毒性筛查^[6]、免疫学^[7]、神经生物学与认知及睡眠行为^[8]等领域。在狨猴生殖生物学方面, 诸如成年动物体重小(300~500 g)、生殖周期 28 天、窝产仔 2~4 只、性成熟年龄为 14~18 个月、妊娠期 142~146 天、无生殖季节性、寿命约 15 年等生理特性为制作基因修饰

狨猴和人类疾病动物模型创造了有利条件^[9]。目前已建立了比较完善的狨猴辅助生殖技术、基因编辑技术, 也建立了狨猴胚胎干细胞和诱导多潜能干细胞系, 这些技术的成熟, 为制作基因修饰狨猴和建立人类疾病非人灵长类模型搭建了技术平台^[9-12]。本文就国际上狨猴生殖工程技术及转基因研究进行较全面的综述, 为基因工程狨猴平台的创建和发展提供思路。

1 狨猴生殖工程技术

生殖工程技术是创制基因修饰狨猴的基础, 包括精液获取与低温保存、超数排卵、卵母细胞收集与体外成熟、人工授精、体外受精与胚胎培养、体内胚胎的获取和胚胎移植。

1.1 狨猴精子获取与冷冻保存

除从离体的狨猴附睾中采集精液^[13]之外, 直肠

引用格式: 张晓辉, 卢红宇, 黄群山, 等. 狨猴生殖工程与基因修饰研究进展. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 635–642

Zhang X H, Lu H Y, Huang Q S, et al. Progress of assisted reproductive technology and genetic modification in marmoset (*Callithrix jacchus*). SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 635–642, doi: 10.1360/N052014-00266

电刺激法^[14]、阴道冲洗法^[15,16]和阴茎振动刺激法^[17]都可以重复采集精液, 这些方法具有不同优缺点(表 1)。从实际应用的可操作性和精液质量方面考虑, 阴茎振动刺激法更适合于狨猴。

狨猴精液冷冻保存通常以 TEST-yolk 为稀释液, 终浓度 5% 的甘油为防冻剂, 0.25 mL 冷冻麦管为容器。程序化冷冻步骤: 15℃~5℃, -0.5℃/min 速率降温; 5℃~25℃, -4℃/min 速率降温; -25℃~100℃, -25℃/min 速率降温; 或直接 5℃~80℃, -40℃/min 速率降温; 之后投入液氮保存。室温快速解冻 2 min 即可完成精子复苏, 复苏精子的运动度最低为 33%^[18-20]。

1.2 生殖周期与超数排卵

依据外周血黄体酮浓度的变化, 发现狨猴生殖周期为(28.6±1.0)天, 卵泡期(8.3±0.3)天(黄体酮浓度低于 10 ng/mL), 黄体期(19.2±0.6)天(黄体酮浓度高于 10 ng/mL), 排卵当日(第 0 天)则为外周血黄体酮浓度首次超过 10 ng/mL 的前 1 天^[21]。另外, 用超声诊断法来监视卵泡发育, 显示优势卵泡消失与排卵前的促黄体激素(luteinizing hormone, LH)峰相一致(发情周期的第 9~11 天), 排卵后的 1~2 天, 黄体酮水平也会随之增高(第 11~13 天)^[22]。用腹腔镜重复检查卵泡期的卵泡发育, 显示排卵卵泡在第 6 天直径为 1.0 mm, 第 8 天为 2.0 mm^[23,24]; 同时, 排卵卵泡分布也服从于 Lacker 等人^[25]的卵泡选择数学模型。

在研究性成熟狨猴卵巢卵泡发育周期中, 发现在 10 天的卵泡期中有 2 次促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)峰值(即第 2~6 天), 而雌二醇水平在第 5 天显著高于基础值水平(如第 1~4 天), 在排卵前继续升高到峰值(第 8~9 天)。FSH 第 1 次峰值的第 2 天出现了中等体积的有腔卵泡, 第 2 次峰值(第 6 天)与升高的雌二醇水平、排卵前卵泡相一致, 血浆中黄体酮浓度首次超过 10 ng/mL 在第 9~10 天^[26]。

狨猴自然生殖周期平均排出 2.7 枚卵母细胞^[5], 远不能满足生产和实验需求。早期, 用克罗米酚(clomiphene citrate)或人绝经期促性腺激素(human menopausal gonadotrophin)对狨猴进行超数排卵(简称超排), 但未成功^[27]。用 rhFSH(recombinant human follicle stimulating hormone)对狨猴进行超排, 自注射氯前列烯醇(0.75 μg)同步进行 rhFSH 注射处理, 每天注射 rhFSH 25 IU 2 次, 持续 6 天, 第 6 天用低剂量 75 IU hCG(human chorionic gonadotropin)诱导卵泡成熟, 排卵前卵泡及排卵点数量平均分别为 9.9 和 4.0 个, 平均获得 5.1 枚 GV(germinal vesicle)期卵母细胞, 相对于自然周期平均排出的卵母细胞(2.7 枚)多出 2.4 枚^[23], 而当用同样的 FSH 处理, 将 hCG 剂量增加到 500 IU, 平均获得(23.5±9.3)个卵丘-卵母细胞复合体^[28], 这种方法已达到超排的效果, 并已经应用于科研生产。

1.3 卵母细胞获取与体外成熟培养

相对于猕猴, 狨猴在无外源生殖激素处理的条件下, 可以获取较多未成熟的卵母细胞, 这是狨猴成为研究灵长类卵母细胞成熟条件及成熟机制动物模型的重要因素^[29]。目前已有多种获取狨猴卵母细胞的方法: (i) 排卵当日, 钳住子宫颈和对侧输卵管, 从子宫注射取卵液, 从输卵管全部收集取卵液; 同时, 也可吸取卵泡中未成熟卵母细胞^[21,30]; (ii) 黄体期用前列腺素 F_{2α}类似物(prosta-glandin F_{2α} analogue)诱导黄体退化后, 排卵前摘除卵巢, 或注射 hCG 75 IU 诱导排卵, hCG 处理后 21~24 h 手术暴露卵巢, 吸取卵泡液^[31,32]; (iii) 用腹腔镜在注射 hCG 75 IU 18 h 后实施活体取卵^[23]; (iv) 直接摘除因病、事故或其他实验中造成死亡狨猴的卵巢, 分离卵泡和卵母细胞^[33]。

多种培养液曾用于狨猴体内未完全成熟卵母细胞的体外成熟, 如 Waymouth medium, G2MM(G2-

表 1 几种狨猴精液采集方法及精液特性

精液采集方法	优点	缺点	文献
离体附睾采精	精液采集容易, 精子运动度高(65.4%~97.7%)	无法重复采精, 动物利用率低	[13]
直肠电刺激法	精子浓度较高, 精子运动度高(70.7%), 可重复采精	侵入性, 精液采集的成功率较低(30%)	[14]
阴道冲洗法	精液采集的成功率高(86.1%), 精子运动度高(74.8%), 可重复采精	侵入性, 精子浓度较低, 存在微生物污染风险	[15]
阴茎振动刺激法	非侵入性, 操作方便, 精液量大, 精子浓度较高, 精子运动度较好(59.6%), 可重复采精	精液采集成功率较低(35%)	[17]

maturation medium)^[28], α -MEM(alpha-modified minimum essential medium)^[32,34], G1.2^[23], 其中 Waymouth medium 添加 20%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)作为卵母细胞成熟培养液, 成熟率达 93%, 但胚胎发育到囊胚的比率仅为 4%^[35]. 用猪卵母细胞成熟液(porcine oocyte medium, POM)培养猕猴卵母细胞, 证实在这种化学物质成分明确的 POM 中, 卵母细胞发育至 MI 期的比例显著高于 Waymouth medium(62.9% vs. 51.6%), 且卵母细胞退化率显著低于 Waymouth medium(2.9% vs. 18.4%), 囊胚率提高到 13.3%, 移植 11 个受体猕猴, 2 个怀孕, 产生 3 个子代^[33].

1.4 人工授精技术

在猕猴人工授精中, 用长 30 mm、直径 0.8 mm 硅胶管将 70 μ L 附睾精液输入成年雌性猕猴阴道 30 mm 深处, 结果妊娠率达到 33%^[36]. 用阴道冲洗法获得的鲜精进行 2 次人工授精, 即在排卵前 1 天和其后 48 h 分别授精, 结果妊娠率为 100%, 平均窝产仔数(2.7 胎/雌性)与自然交配相似(2 胎/雌性), 平均妊娠期((142 $\pm$ 1.3)天)与正常妊娠期((144 $\pm$ 2)天)相似^[20].

1.5 体外受精与胚胎发育

猕猴体外受精的方法有精卵共培养(*in vitro* fertilization, IVF)和单精子注射法(intracytoplasmic sperm injection, ICSI). 目前已有不同的受精液和胚

胎培养液用于猕猴卵母细胞受精和培养, 例如, G2-HSA^[28], MEM(minimum essential medium)^[32], TALP (tyrode-albumin-lactate-pyruvate)^[35], G1.2^[23], TYH^[33] 作为受精液, G1-HAS/G2-HAS/G2-HAS-FBS, TL/CMRL-1066, G1.2/G2.2, ISM1/ISM2 作为胚胎培养液, 其发育率如表 2.

体外受精(IVF)的受精率可达 57%以上, 多精受精率达到 2.3%^[32]. 单精子注射不仅可以解决以上问题, 而且易于探究精卵相互作用和产生以精子介导的转基因动物等^[38]. 体外成熟排出第一极体 2 h 后的卵母细胞进行 ICSI, 产生了比 IVF 更高的受精率(93.2%), 移植 ICSI 胚胎, 产生 4 个健康后代^[37].

由表 2 可知, 各国学者不断对猕猴胚胎培养进行优化. Gilchrist 等人^[35]运用基于 TL(Tyrodes-Lactate)和 CMRL-1066 两步培养法对体外成熟卵母细胞受精获得的胚胎进行培养, 只获得 4%的囊胚. 而 Marshall 等人^[23]运用改进的两步培养法(G1.2 和 G2.2)获得了 47%的囊胚, 34%的孵化囊胚. 最近, Ishibashi 等人^[39]对胚胎透明带开口进行猕猴胚胎的辅助孵化, 用 PIZEO 对透明带 80 μ m 开口将孵化囊胚率提高到 87%.

1.6 体内受精胚胎获取

猕猴体内受精胚胎获取有手术法和非手术法.

(1) 手术法输卵管获取胚胎^[40]. (i) 自排卵及受精的第 4 天(已怀孕), 麻醉和经腹部手术暴露出卵

表 2 IVF, ICSI 受精与胚胎发育

受精液	胚胎培养液	卵母细胞来源	受精时间(h)	受精率(%)	卵裂率(%)	囊胚率(%)	文献
G2-HSA	72 h: G1-HSA 24 h: G2-HSA 至囊胚: G2-HAS-FBS	体内成熟	14~16	66.9 $\pm$ 6.4 ^{a)}	44.7 $\pm$ 14.4	46.7 $\pm$ 26.7	[28]
MEM	MEM+10%猕猴血清	超排(PG+HCG)+ 体外成熟 2~29 h	6~8	82	91	0	[32]
TALP	48 h: TL 至囊胚: CMRL-1066	超排(PG+hFSH)+ 体外成熟 22 h	18~24	84	81	4	[35]
G1.2	48 h: G1.2 至囊胚: G2.2	超排(PG+rhFSH+HCG)+ 体外成熟 24~26 h	18~20	57	84	47	[23]
TYH	48 h: ISM1 至囊胚: ISM2	体外培养 30 h 或超排 (PG+rhFSH+HCG)+ 体外成熟 27 h	12~18	60~82.2	92.7~95.6	9.1~39.2	[33,37]
ICSI	48 h: ISM1 至囊胚: ISM2	超排(PG+rhFSH+HCG)+ 体外成熟 27 h	—	93.2	97.6	35.4	[37]

a) 受精率与发育率是 IVF 和 ICSI 的平均值

巢、输卵管、子宫, 从子宫灌入冲洗液, 由输卵管全部收集胚胎, 获取胚胎的成功率 67.3%, 平均每次手术获取胚胎数 1.6 枚; (ii) 子宫获取胚胎. 自排卵及受精的第 7 天, 自子宫颈注入冲洗液, 经子宫底吸取冲洗液, 获取胚胎成功率为 74.7%, 平均每次手术获取胚胎数 1.8 枚.

(2) 微创手术法冲洗胚胎^[41]. 借助从阴道引入内窥镜的精确定位, 将注射器针头(23G)经皮肤穿刺入子宫腔并注入冲洗液, 从阴道由玻璃管引出冲洗液到真空管, 获取胚胎成功率达 77.8%, 平均每次冲洗获胚胎数 1.8 枚, 且移植受体获得 57% 的着床率. 相对于腹部切口手术法, 微创手术法获取胚胎成功率及平均获胚胎数没有差异, 但经腹部微创侵入法可以降低动物手术风险, 缩短恢复时间, 减少组织黏连, 操作简单, 此方法在狢猴胚胎获取上被大量应用.

(3) 借助阴道镜和耳镜进行非手术法获取胚胎. 将内外套管插入子宫颈并进入子宫, 冲洗子宫, 插管成功率 90%, 每次冲洗平均获取 1 枚胚胎^[42]. 近期有利用超声介导法进行子宫冲洗, 经子宫颈插入导管成功率达 99%. 排卵的第 6 天, 冲洗子宫, 可获得 90% 的排卵产物, 甚至在排卵后 4~5 天也可以获得 8 细胞胚胎或更早期的胚胎^[43].

相对于手术法, 非手术法获取胚胎对动物生殖系统造成损伤小, 重复性好, 甚至重复收集胚胎也不影响胚胎产生的质量和数量^[43].

1.7 胚胎移植

胚胎移植技术分为手术法和非手术法胚胎移植. 最早研究通常利用手术法进行狢猴胚胎移植, 即经麻醉和开腹暴露出子宫, 用 23G 注射针头从子宫底部扎孔, 将盛有胚胎的玻璃管经穿刺孔移入子宫并推出胚胎, 获得 66.6%~100% 的怀孕率^[40]. 非手术胚胎移植始于 1987 年, 之后借助耳镜观察子宫颈, 将套管和移植管置于子宫颈, 在腹部触诊的介导下将移植管插入子宫并排出胚胎. 9 个受体在排卵后的 2~4 天被移植 17 个发育晚期胚胎, 4 只动物怀孕(怀孕率 44%), 其中 3 个受体成功分娩 6 只胎猴^[40,44]. 同样经子宫颈实施胚胎移植, 在超声检测仪介导下精确定位移植套管, 插管成功率 100%, 将胚胎移植液体积缩小在 1 μ L 以下, 获得了 80% 的怀孕率和 75% 的

出生率^[45].

2 基因修饰狢猴的研究

2.1 转基因研究

相对于小鼠(*Mus musculus*), 研制基因修饰灵长类动物较为缓慢, 已报道的基因修饰灵长类动物及应用见表 3. 在转基因动物方面, 2001 和 2008 年分别诞生转基因狢猴, 通过构建 VSV-G(vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G)包被的 hEF-1 α 启动子(human elongation factor-1 alpha promoter), 启动表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因的逆转录病毒载体和携带人 *HTT*(human huntingtin)基因第 1 个外显子和 84 个谷氨酰胺重复基因的载体, 将载体注射卵母细胞卵周隙和 ICSI 受精, 经胚胎移植成功制作了转 GFP 狢猴胎儿和产下转亨廷顿基因狢猴^[4,46], 但不具备遗传的稳定性. 后来, 尝试建立种系遗传转基因狢猴, 即将携带有 EGFP(enhanced green fluorescent protein)的 SIV(simian immunodeficiency virus)慢病毒载体注射至早期卵裂胚胎(1~8 细胞)卵周隙, 虽然产生了全身表达 EGFP 的后代, 但是否具有 GFP 表达的遗传性尚需进一步研究^[47].

相对于狢猴, 近年来迅猛发展的生殖工程技术推动了比较系统的狢猴转基因研究. 日本科学家构建了分别以 CAG(cytomegalovirus enhanced chicken β -actin promoter), CMV(cytomegalovirus promoter)和 EF1- α (elongation factor-1 alpha promoter)启动子驱动并携带 *EGFP* 基因的 HIV-1(human immunodeficiency virus type 1)灭活慢病毒载体, 高滴度注射到不同早期胚胎阶段的卵周隙中, 产生了 5 个子代(3 只 CAG 启动子载体, 2 只 CMV 启动子载体), 在胎儿胎盘和不同组织中表达 EGFP. 雄性转基因狢猴性成熟后与野生型狢猴的卵母细胞进行体外受精, 产生了表达 EGFP 的后代, 表明产生了稳定遗传的转基因灵长类^[12]. 然而, 在胚胎水平上, 转基因技术以随机的方式插入外源基因, 且插入基因片段长度限制在 8 kb 以内, 可见由此技术获得的转基因动物具有局限性.

2.2 基因敲除研究

近年来, 国际上创建了能够在胚胎上直接完成

基因修饰的转基因载体和基因敲除技术，如 ZFNs(zinc finger nucleases), TALENs(transcription activator-like effector nucleases)和 CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeat)基因编辑技术，这完全避免了利用基因重组技术和全能性胚胎干细胞产生基因修饰动物的低效性，将极大改变基因修饰灵长类动物的研究现状^[8,51]。最近，我国科学家利用 TALENs 和 CRISPR/Cas9 基因编辑技术

针对不同基因成功创制了定点基因敲除猕猴^[48,49]，此外，还利用 CRISPR/Cas9 成功敲除食蟹猴 *p53* 基因，并且高效(22%)地在胚胎水平的 *p53* 突变位点成功靶向敲入 TAA 终止密码子和 2 个核苷酸^[50]。这些研究成果开启了灵长类动物基因定向修饰的新纪元，为猕猴的基因修饰创制，尤其是利用此项技术建立准确模拟人类重大疾病的动物模型并应用于新药研发和疾病机理研究提供了可能(图 1)。

表 3 基因修饰灵长类动物及其应用

灵长类动物	被修饰的基因(转基因启动子)	基因修饰技术	结果	不足	文献
狨猴	<i>GFP</i> (CMV)	HIV-1 慢病毒载体	首次产生稳定遗传转基因灵长类动物	尚未有功能性转基因动物	[12]
猕猴	<i>GFP</i> (hEF-1 α)	逆转录病毒载体	首次产生转 <i>GFP</i> 猕猴	效率不稳定且较低(25%)，稳定遗传性尚未检测	[46]
猕猴	<i>EGFP</i> (CAG)	SIV 慢病毒载体	首次生下并存活转基因猕猴，效率较高(50%)	稳定遗传尚未检测	[47]
猕猴	<i>HTT</i> 和 <i>EGFP</i> (human polyubiquitin-C)	慢病毒	成功建立人类亨廷顿病转基因动物模型	表型不一，且效率较低(22%)，不稳定遗传	[4]
食蟹猴	<i>Ppar-γ</i> 与 <i>Rag1</i>	CRISPR/Cas9	获得 CRISPR/Cas9 靶向突变 2 个基因的食蟹猴	靶向效率较低(2/19)，稳定遗传待定，存在脱靶风险与嵌合体，重复性较低	[48]
猕猴与食蟹猴	<i>MECP2</i> (methyl-CpG binding protein 2)	TALENs(质粒)或(mRNA)	获得 TALENs 靶向基因修饰动物，脱靶性较低，突变雄性表现出类似人的胚胎致死表型	效率较低，存在一定脱靶风险与嵌合体，稳定遗传未知	[3,49]
食蟹猴	<i>p53</i>	CRISPR/Cas9	突变 <i>p53</i> 基因，定点插入 TAA	稳定遗传未知，存在脱靶风险	[50]

图 1 制作基因修饰猕猴的技术路线图

3 展望

基于狨猴相对成熟的辅助生殖技术和自身在创制基因修饰动物方面的优势条件, 以及狨猴与人类进化的亲缘性, 狨猴将极有可能成为 21 世纪生物学领域最有潜力的研制人类疾病模型的动物之一, 特别是在阿尔茨海默症等疾病动物模型方面具有重要地位. 至今, 已经成功建立了狨猴胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 系^[52,53]和不同细胞来源的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, IPS cell)系^[54,55], 由于尚未证明形成嵌合体能力, 还不能开展基因敲除/敲入研究. 最近的研究已表明, 可以将人始发态的 IPS“复位”到原始态的 IPS^[56], 倘若未来的灵长类多能干细胞能从始发态转化为原始态的

ES/IPS, 那么则有可能获得精确的基因敲除/敲入的狨猴^[8].

但是, 狨猴疾病模型及转基因疾病模型方面还有许多不足: (i) 旧大陆猴在模拟 HIV/AIDS^[57]、视网膜黄斑变性^[58]、结核病^[59]等相应人类疾病病理生理及机制有其独特优势, 狨猴无法替代; (ii) 狨猴生物技术不具有普遍性, 尤其是辅助生殖技术和转基因技术目前仅限于日本、德国、美国的一个或几个实验室. 已报道的技术被模仿或重复的可能性有待证明; (iii) 动物资源相对有限, 尤其是我国狨猴资源匮乏, 且养殖条件和技术参差不齐; (iv) 对于我国来说, 尚未形成狨猴研究团队, 成果较少, 研究方向和领域定位不清, 尚需加大合作力度; (v) 狨猴研究重视度不够, 经费不足.

参考文献

- 1 Li Z, Liu X, Wen J, et al. DRUMS: a human disease related unique gene mutation search engine. *Hum Mutat*, 2011, 32: E2259-E2265
- 2 Erickson R P. Somatic gene mutation and human disease other than cancer. *Mutat Res*, 2003, 543: 125-136
- 3 Liu Z, Zhou X, Zhu Y, et al. Generation of a monkey with *MECP2* mutations by TALEN-based gene targeting. *Neurosci Bull*, 2014, 30: 381-386
- 4 Yang S H, Cheng P H, Banta H, et al. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature*, 2008, 453: 921-924
- 5 Wilton L J, Marshall V S, Piercy E C, et al. *In vitro* fertilization and embryo development in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J Reprod Fertil*, 1993, 97: 481-486
- 6 Smith D, Trennery P, Farningham D, et al. The selection of marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) in pharmaceutical toxicology. *Lab Anim*, 2001, 35: 117-130
- 7 Pinto M, Marchevsky R, Baptista M, et al. Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in *Callithrix jacchus*: early detection of HAV antigen and viral fate. *Exp Toxicol Pathol*, 2002, 53: 413-420
- 8 Kishi N, Sato K, Sasaki E, et al. Common marmoset as a new model animal for neuroscience research and genome editing technology. *Dev Growth Differ*, 2014, 56: 53-62
- 9 Tomioka I, Sasaki E. Recent progress in reproductive technologies based on the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Mamm Ova Res*, 2008, 25: 143-149
- 10 Summers P, Wennink C J, Hodges J. Cloprostenol-induced luteolysis in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J Reprod Fertil*, 1985, 73: 133-138
- 11 Hearn J, Abbott D, Chambers P, et al. Use of the common marmoset, *Callithrix jacchus*, in reproductive research. *Primates Med*, 1977, 10: 40-49
- 12 Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, et al. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature*, 2009, 459: 523-527
- 13 Morrell J. CASA as an aid to selecting sperm suspensions for artificial insemination in *Callithrix jacchus*. *Int J Androl*, 1997, 20: 287-296
- 14 Morrell J M, Küderling I, Hodges J K. Influence of semen collection method on ejaculate characteristics in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. *J Androl*, 1996, 17: 164-172
- 15 Kuederling I, Morrell J, Nayudu P. Collection of semen from marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) for experimental use by vaginal washing. *Lab Anim*, 1996, 30: 260-266
- 16 Hearn J, Lunn S, Burden F, et al. Management of marmosets for biomedical research. *Lab Anim*, 1975, 9: 125-134
- 17 Kuederling I, Schneiders A, Sønksen J, et al. Non-invasive collection of ejaculates from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using penile vibrostimulation. *Am J Primatol*, 2000, 52: 149-154
- 18 Morrell J. Cryopreservation of marmoset sperm (*Callithrix jacchus*). *Cryoletters*, 1997, 18: 45-54

- 19 Holt W, Wilton L, Marshall V. Cryopreservation of spermatozoa from the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). In: Proceedings of the 7th International Symposium on Spermatology, 1994 October 9–14, Cairns
- 20 Morrell J, Nubbemeyer R, Heistermann M, et al. Artificial insemination in *Callithrix jacchus* using fresh or cryopreserved sperm. *Anim Reprod Sci*, 1998, 52: 165–174
- 21 Harlow C, Gems S, Hodges J, et al. The relationship between plasma progesterone and the timing of ovulation and early embryonic development in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J Zool*, 1983, 201: 273–282
- 22 Oerke A K, Einspanier A, Hodges J. Noninvasive monitoring of follicle development, ovulation, and corpus luteum formation in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) by ultrasonography. *Am J Primatol*, 1996, 39: 99–113
- 23 Marshall V, Browne M, Knowles L, et al. Ovarian stimulation of marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) using recombinant human follicle stimulating hormone. *J Med Primatol*, 2003, 32: 57–66
- 24 Tardif S D, Lacker H M, Feuer M. Follicular development and ovulation in the marmoset monkey as determined by repeated laparoscopic examination. *Biol Reprod*, 1993, 48: 1113–1119
- 25 Lacker H M, Beers W H, Meuli L E, et al. A theory of follicle selection: I. Hypotheses and examples. *Biol Reprod*, 1987, 37: 570–580
- 26 Gilchrist R B, Wicherek M, Heistermann M, et al. Changes in follicle-stimulating hormone and follicle populations during the ovarian cycle of the common marmoset. *Biol Reprod*, 2001, 64: 127–135
- 27 Harlow C R. Endocrine and morphological aspects of pre-implantation development in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). Doctoral Thesis. London: University of London, 1990
- 28 Grupen C G, Gilchrist R B, Nayudu P, et al. Effects of ovarian stimulation, with and without human chorionic gonadotrophin, on oocyte meiotic and developmental competence in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Theriogenology*, 2007, 68: 861–872
- 29 Schramm R D, Paprocki A M. Birth of rhesus monkey infant after transfer of embryos derived from *in-vitro* matured oocytes: short communication. *Hum Reprod*, 2000, 15: 2411–2414
- 30 Hearn J P. Endocrinology and timing of implantation in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. *Progr Reprod Biol*, 1980, 7: 262–269
- 31 Tkachenko O, Delimitreva S, Isachenko E, et al. Epidermal growth factor effects on marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) oocyte *in vitro* maturation, IVF and embryo development are altered by gonadotrophin concentration during oocyte maturation. *Hum Reprod*, 2010, 25: 2047–2058
- 32 Wilton L, Marshall V, Piercy E, et al. *In vitro* fertilization and embryo development in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J Reprod Fertil*, 1993, 97: 481–486
- 33 Tomioka I, Takahashi T, Shimada A, et al. Birth of common marmoset (*Callithrix jacchus*) offspring derived from *in vitro*-matured oocytes in chemically defined medium. *Theriogenology*, 2012, 78: 1487–1493
- 34 Marshall V S, Wilton L J, Moore H D. Parthenogenetic activation of marmoset (*Callithrix jacchus*) oocytes and the development of marmoset parthenogenones *in vitro* and *in vivo*. *Biol Reprod*, 1998, 59: 1491–1497
- 35 Gilchrist R B, Nayudu P L, Hodges J K. Maturation, fertilization, and development of marmoset monkey oocytes *in vitro*. *Biol Reprod*, 1997, 56: 238–246
- 36 Morrell J, Nowshari M, Rosenbusch J, et al. Birth of offspring following artificial insemination in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. *Am J Primatol*, 1997, 41: 37–43
- 37 Takahashi T, Hanazawa K, Inoue T, et al. Birth of healthy offspring following ICSI in *in vitro*-matured common marmoset (*Callithrix jacchus*) oocytes. *PLoS One*, 2014, 9: e95560
- 38 Perry A C, Wakayama T, Kishikawa H, et al. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*, 1999, 284: 1180–1183
- 39 Ishibashi H, Motohashi H H, Kumon M, et al. Effect of the size of zona pellucida opening on hatching in the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) embryo. *Anim Sci J*, 2013, 84: 740–743
- 40 Summers P, Shephard A, Taylor C, et al. The effects of cryopreservation and transfer on embryonic development in the common marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. *J Reprod Fertil*, 1987, 79: 241–250
- 41 Hanazawa K, Mueller T, Becker T, et al. Minimally invasive transabdominal collection of preimplantation embryos from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Theriogenology*, 2012, 78: 811–816
- 42 Thomson J, Kalishman J, Hearn J. Nonsurgical uterine stage preimplantation embryo collection from the common marmoset. *J Med Primatol*, 1994, 23: 333–336
- 43 Ishibashi H, Motohashi H H, Kumon M, et al. Ultrasound-guided non-surgical embryo collection in the common marmoset. *Reprod Biol*, 2013, 13: 139–144
- 44 Marshall V, Kalishman J, Thomson J. Nonsurgical embryo transfer in the common marmoset monkey. *J Med Primatol*, 1997, 26: 241–247
- 45 Ishibashi H, Motohashi H H, Kumon M, et al. Efficient embryo transfer in the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) with a reduced transfer volume: a non-surgical approach with cryopreserved late-stage embryos I. *Biol Reprod*, 2013, 88: 1–5
- 46 Chan A, Chong K Y, Martinovich C, et al. Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science*, 2001,

- 291: 309–312
- 47 Niu Y, Yu Y, Bernat A, et al. Transgenic rhesus monkeys produced by gene transfer into early-cleavage-stage embryos using a simian immunodeficiency virus-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 17663–17667
- 48 Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, 156: 836–843
- 49 Liu H, Chen Y, Niu Y, et al. TALEN-mediated gene mutagenesis in rhesus and cynomolgus monkeys. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 323–328
- 50 Wan H, Feng C, Teng F, et al. One-step generation of *p53* gene biallelic mutant *Cynomolgus* monkey via the CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2015, 25: 258–261
- 51 Ma Y H, Yang S H. Advances in genetically modified chinese macaques. *Prog Biochem Biophys*, 2014, 41: 1089–1098
- 52 Sasaki E, Hanazawa K, Kurita R, et al. Establishment of novel embryonic stem cell lines derived from the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Stem Cell*, 2005, 23: 1304–1313
- 53 Müller T, Fleischmann G, Eildermann K, et al. A novel embryonic stem cell line derived from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) exhibiting germ cell-like characteristics. *Biol Reprod*, 2009, 24: 1359–1372
- 54 Tomioka I, Maeda T, Shimada H, et al. Generating induced pluripotent stem cells from common marmoset (*Callithrix jacchus*) fetal liver cells using defined factors, including Lin28. *Genes Cells*, 2010, 15: 959–969
- 55 Wu Y, Zhang Y, Mishra A, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from newborn marmoset skin fibroblasts. *Stem Cell Res*, 2010, 4: 180–188
- 56 Gafni O, Weinberger L, Mansour A A, et al. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*, 2013, 504: 282–286
- 57 Kamada K, Igarashi T, Martin M A, et al. Generation of HIV-1 derivatives that productively infect macaque monkey lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 16959–16964
- 58 Umeda S, Suzuki M T, Okamoto H, et al. Molecular composition of drusen and possible involvement of anti-retinal autoimmunity in two different forms of macular degeneration in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *FASEB J*, 2005, 19: 1683–1685
- 59 Walsh G P, Tan E V, Cruz E C D, et al. The Philippine cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) provides a new nonhuman primate model of tuberculosis that resembles human disease. *Nat Med*, 1996, 2: 430–436

Progress of Assisted Reproductive Technology and Genetic Modification in Marmoset (*Callithrix jacchus*)

ZHANG XiaoHui¹, LU HongYu², HUANG QunShan² & YANG ShiHua^{1,2}

¹ Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, KunMing 650500, China;

² Guangdong Provincial Key Laboratory of Prevention and Control for Severe Clinical Animal Diseases, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

More and more researches have demonstrated that genetic mutation or modification is an important cause of human diseases. Thus, genetically modified animal models associated in human diseases become one of the important ways and experimental materials to study the molecular mechanisms and therapeutic targets of human diseases. Marmoset is the smallest primate in the world. The characteristics of small body size, prolificacy, genetic evolution and physiology and biochemistry close to human make it to be one of the ideal experimental animals in studying animal models of human diseases. Therefore, genetically modified marmosets created by combining efficient assisted reproductive technology with gene editing technology show the great value in biomedicine. The assisted reproductive technology and genetic modification in marmoset are reviewed to develop animal models of human diseases, promote the breakthrough of studying mechanisms and the drug discovery in human diseases.

marmoset, assisted reproductive technology, genetic modification

doi: 10.1360/N052014-00266