

## 转基因动物研究进展

郭 黠, 谢 辉(综述), 何承伟(审校)

(广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东 湛江 524023)

中国分类号: Q95

文献标识码: A

文章编号: 1006-2084(2006)05-0268-03

**摘要:**转基因动物就是指通过人工的方法将外源基因导入动物染色体基因组,使之稳定表达并能遗传给后代的一类动物。目前制备转基因动物的方法主要有显微注射法,反转录病毒感染法,胚胎干细胞法等。转基因动物技术已广泛渗透于分子生物学、免疫学、生物制药、畜牧育种以及器官移植等研究领域。本文通过对当前转基因动物的研究进展做出分析,以探讨当前转基因动物的发展方向 and 展望未来转基因动物的前景。

**关键词:**转基因动物;基因工程;动物模型

**The Progress in the Study of Transgenic Animal** GUO Xia, XIE Hui, HE Cheng-Wei. (Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

**Abstract:** A transgenic animal is one that carries a foreign gene that has been deliberately inserted into its genome. Several techniques have been reported to produce transgenic animals including Pronuclear microinjection, Retrovirus-mediated techniques, Embryonic stem cell-mediated techniques and etc. Transgenic animal has been extended to various areas such as molecular biology, immunology, manufacture of pharmaceuticals and medicines, prologue breeding and organ transplantation. This article summarizes the progress about transgenic animal in recent years in order to discuss the current development direction and look into the future of transgenic animal.

**Key words:** Transgenic animal; Genetic engineering; Animal model

因技术进行疫苗研究<sup>[4]</sup>和利用体细胞核移植技术在反刍动物身上进行的应用研究<sup>[5]</sup>也取得重要进展。科学家确信,癌细胞是由于原癌基因的激活而产生的,因此有学者提出,在 2 年之内,会发现一种将癌细胞矫正为正常细胞的方法,同时研究成功一种可满足患者需要的疫苗,可望为防治癌症开辟新途径。转基因动物应用正走向产业化的道路,具有十分广阔的前景。

### 2 转基因动物制备的几种方法

#### 简介

**2.1 显微注射法** 显微注射法(microinjection)是指通过显微操作仪把外源基因注入受体动物的受精卵,外源基因整合到受体细胞染色体上,发育成转基因动物的技术<sup>[6]</sup>。这是发展最早、目前使用最为广泛,也是最有效的方法,已经生产出转基因小鼠及兔、绵羊、猪、牛、鱼和鸡等各种转基因动物。

这种方法的特点是外源基因的导入整合效率较高,不需要载体,直接转移目的基因,目的基因的长度可达 100kb。它可以直接获得纯系,所以实验周期短。但需要贵重精密仪器,技术操作较难,并且外源基因的整合位点和整合的拷贝数都无法控制,易造成宿主动物基因组的插入突变,引起相应的性状改变,重则致死。

**2.2 逆转录病毒感染法** 逆转录病毒感染法(retrovirus-mediated gene transfer)主要是利用逆转录病毒 DNA 的长末端重复序列(LTR)区域具有转录启动子活性这一特点,将外源基因连接到 LTR 下部进行重组后,包装成高滴度病毒颗粒,直接感染受精卵,或微注入囊胚腔中,携带外源基因的逆转录病毒 DNA 可以整合到宿主染色体上<sup>[7]</sup>。

逆转录病毒感染法优于微注射法之处为:无需重排,可在整合点整合单个拷贝的外源基因;将胚胎置于高浓度病毒培养液中,或者与被感染的细胞共同培养,或微注射鸡胚盘中,整合有逆转录病毒 DNA 的胚胎比率高。缺点是:需要生产带有转基因的逆转录病毒;插入逆转录病毒的基因有一定的大小限度;所得转基因家畜的嵌合性很高,而需要广泛的杂交,以建立转基因系;转基因的表达问题尚未解决。

**2.3 精子载体法** 精子载体法(sperm mediated gene transfer)就是使具有受精能力的精子与外源 DNA 一起孵育,然后将该精子用于体外受精,并进行胚胎移植,使外源基因得到表达<sup>[8]</sup>。

这种方法简单、方便,依靠生理受精过程,免去了原核的损伤。转基因效率高达 30%,外源基因稳定整合到生殖细胞

转基因动物是指以实验方法导入外源基因,在染色体内稳定整合并能遗传给后代的一类动物。1981 年,研究者第一次成功地将外源基因导入动物胚胎,创立了转基因动物技术,1982 年第一只转基因鼠问世,自此转基因动物研究在许多研究领域取得了令人瞩目的成就。转基因动物技术不但是常规分子生物学技术的延伸和拓展,为生命科学的研究提供了一个更有效的工具,而且随着转基因动物技术的发展,转基因产品已经广泛渗透到医疗、卫生、农产品和食品等中,具有广泛的应用前景。

### 1 转基因动物研究概况

转基因动物是指通过重组 DNA 技术,将外源基因导入生物体内,外源性基因稳定整合在染色体基因组上并传给下一代<sup>[1]</sup>。转基因动物起源于 20 世纪 80 年代,由于转基因动物体系打破了自然繁殖中的种间隔离,使基因能在种系关系很远的机体间流动,它将对整个生命科学产生全局性影响。因此,转基因动物技术在 1991 年第一次国际基因定位会议上被公认为是遗传学中继连锁分析、体细胞遗传和基因克隆之后的第四代技术,被列为生物学发展史 126 年中 14 个转折点之一。Palmiter 于 1982 年将大鼠生长激素基因与金属硫蛋白基因启动子拼接成融合基因,导入小鼠受精卵后,获得了称为“硕鼠(super mouse)”的转基因小鼠,被认为是世界上首批转基因动物<sup>[2]</sup>。一般来讲,根据不同的目的,转基因动物操作可以简单地划分为四种类型:①疾病模型转基因动物;②利用转基因动物制药;③动物改良型;④基础生物学研究。目前转基因技术已经广泛应用到分子生物学、免疫学、生物制药、医学及动植物的各个方面。1997 年 2 月 Wilmut 研究小组在英国《自然》杂志上报告第一例克隆绵羊“多利”后,转基因动物和克隆技术取得了前所未有的进展,转基因兔<sup>[3]</sup>、转基因猪、转基因牛、转基因猴、转基因鱼等都陆续被研制成功。利用转基因技术建立疾病动物模型与基因治疗动物模型业已成为转基因动物研究的热点,有的已经进入应用阶段。同时,用转基

中,由此获得了转基因株系。1989年 Lavitrano 等<sup>[9]</sup>首次利用小鼠附星精子与 DNA 温育产生转基因小鼠。

**2.4 胚胎干细胞介导法** 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES)是多潜能细胞,可以传代增殖。当这些细胞被注入另一囊胚期胚胎的囊胚腔之后,会很快与胚胎内细胞团(inner cell mass, ICM)的受体聚集在一起,共同参与正常胚胎的发育,产生一部分细胞含有外源基因的嵌合体,再将这种嵌合体动物与正常动物连续交配,则可生产出转基因动物<sup>[10]</sup>。

其优点是:在将胚胎干细胞植入胚胎前,可以在体外选择一个特殊的基因型,用外源 DNA 转染以后,胚胎干细胞可以被克隆,继而可以筛选含有整合外源 DNA 的细胞用于细胞融合,由此可以得到很多遗传上相同的转基因动物。缺点就是许多嵌合体转基因动物生殖细胞内不含有转基因。目前,胚胎干细胞介导法在小鼠上应用比较成熟,在大动物上应用较晚。

**2.5 人工酵母染色体法** 人工酵母染色体载体是近年发展起来的新型载体,具有克隆百万碱基对(Mbp)级的大片段外源 DNA 的能力,可以保证巨大基因的完整性;保证所有顺式作用因子的完整并与结构基因的位置关系不变;保证较长的外源基因片段在转基因动物研究中整合率的提高;鉴于基因的完整性,目的基因上下游的侧翼序列可以消除或减弱基因整合的位置效率。

**2.6 电转移法** 电转移法就是将生殖细胞或体细胞置于电场中,同时加入外源基因,利用短暂电脉冲使外源基因透过细胞膜,因而能允许完整的大分子渗入细胞内。

在制备转基因动物时,上述6种方法是常用的转基因方法,除此以外,人们还探索了一些其他方法。例如畸胎瘤细胞介导法、受体介导法、高效微弹法、针刺法、激光导入法、原生质细胞介导法、磷酸钙共沉淀法等。

### 3 转基因实验动物模型的建立和应用

转基因技术的出现,为人类精确地研究基因与疾病的相关关系提供了可能,而且可以在个体发育的每个阶段进行遗传功能的分析。因此,转基因疾病动物模型的开发成为转基因动物的热点,有的已进入应用阶段。众所周知,人类基因组序列精细图已于2003年完成,但是要从基因组系列的破译转向功能的分析定位,通过整体动物模型进行研究是理想的方法,人类重大疾病的预测、诊断与治疗都将在此基础上取得新的突破。在模型动物中,最适合作整体研究的材料就是小鼠。小鼠是继人类之后第二个完成基因组测序工程的哺乳类动物,其基因与人类的同源性高达90%以上。目前,小鼠的遗传研究已经成为生命科学的前沿,以小鼠为基本材料的遗传资源的保护和开发,直接影响基因药物产业和相关医疗领域的研究,其社会效益和经济效益不可估量。目前我国的实验动物科学仍处于初级阶段,同时我国又是非健康人群较多的国家之一。因此,我国迫切需要运用各种人类疾病的动物模型、药物筛选模型来研究我国人群中遗传性疾病的病因及治疗手段,研制具有独立知识产权的新型药物,特别是传统中药的标准化和国际化研究。转基因动物模型能够最大限度地模拟体内基因发挥作用的真实环境,从而更加容易和准确地探讨该基因的生物学功能及表达调控机制,因而倍受遗传学者的青睐<sup>[11]</sup>。我国在实验动物模型领域长期受制于人的现

象有望在未来的三五年得到改变,南京大学与扬州大学共同承担的国家“十五”科技攻关项目“国家遗传工程小鼠资源库”于2004年11月底正式启动。这是国家“十五”科技攻关计划中第一个启动的重点项目。近年来,针对胰岛素样生长因子-1(IGF-1)在中枢神经系统中的生物学作用<sup>[12]</sup>,构建了 IGF-1 的转基因鼠模型;利用转基因技术全面的转移重复能力、较高的外显率及较短的病程等优点,科学家建立了前列腺癌动物模型<sup>[13]</sup>,并且成为研究前列腺癌转移过程的首选模型<sup>[14]</sup>;转基因动物模型在肾脏病方面的研究有助于从分子水平阐明疾病发生的机制,从整体水平观察疾病的发展过程,并为今后的基因干预治疗产生积极推动作用<sup>[15,16]</sup>。总之,目前已有的动物模型约400多种,其中应用基因剔除的方法制作的转基因动物疾病模型约310种,基因过量表达的动物模型约有40种,鼠、兔、牛、鸡、羊及鱼等转基因动物模型的建立得到广泛应用<sup>[17]</sup>。

### 4 转基因动物研究的前景和展望

利用转基因技术,人们可以改良果蔬品种,提高农作物的品质,更多的转基因植物和动物将问世,人类可能在新世纪里培育出超级作物。目前人们的研究主要集中在猪、牛、羊、鼠及兔等动物身上。美国科学家2004年1月宣布培育出了世界上首只转基因猴。这是世界上首次培育成功转基因灵长类动物,此项成果将为人类最终战胜糖尿病、乳腺癌、帕金森症和艾滋病等顽症提供帮助。科学家分析说,此次转基因猴所采用的技术也可以用于其他动物,一旦技术成熟,即可用来培育具有药用价值甚至可提供人类移植用器官的转基因动物。据估计,人用蛋白药物的全球市场每年可达2000亿美元,而且还在持续增长。在这种巨大利益的驱动下,世界各大制药公司竞相投入巨资,培育含有人体蛋白的转基因动物。通过控制人体的生化特性,人类将能够恢复或修复人体细胞和器官的功能,甚至改变人类的进化过程。转基因动物在诸多领域具有广阔的应用前景:①转基因动物是对多种生命现象本质深入了解的工具,如研究基因结构与功能的关系,细胞核与细胞质的相互关系,胚胎发育调控以及肿瘤等;②可以用来建立多种疾病的动物模型,进而研究这些疾病的发病机制及治疗方法,例如,美国和韩国的科学家最近通过转基因技术,对人类胚胎干细胞进行改造,使其具有抗癌作用,并在患有脑瘤的老鼠身上证明了这种方法的疗效<sup>[18]</sup>;③由于转基因动物技术可以改造动物的基因组,使家畜、家禽的经济性状改良更加有效,如使生长速度加快、瘦肉率提高,肉质改善,饲料利用率提高,抗病力增强等。对于动物遗传资源保护的意义更加深远,对挽救濒危物种是必不可少的;④转基因动物可作为医用或食用蛋白的生物反应器。目前应用比较广泛的是动物乳腺生物反应器来大规模生产供人类疾病治疗和保健用的药用蛋白或其他生物活性物质。转基因动物的乳腺可代替细菌和细胞等生物发酵,并且可以有效地对所产出的蛋白质进行后加工和修饰。因而,动物乳腺生物反应器被国际上公认为是转基因动物研究中最具有发展前景的方向之一,也是实现基因工程制药的重要途径。

但是,转基因动物目前仍然存在下列一些问题,需要我们进一步研究和解决。其一,转基因动物的成功率和成活率极低,这是限制转基因动物发展的主要因素。通过实验资料统

计表明,小鼠成活率仅为 2.6%,大鼠 4.4%,兔 1.5%,羊 0.9%,猪 0.7%,牛 0.7%,造成这种结果的主要原因可能是与各种操作过程中的胚胎损伤有关;其二,外源基因在目的基因中的整合率低,效果不稳定,可能是因为外源基因在宿主细胞基因组中的插入和整合具有很大的随机性,不好控制,另外,即使已整合的外源基因很容易从宿主基因组中消失,遗传给后代的概率很低;其三,转基因在宿主基因组中的行为难以控制,转基因在宿主基因组中的插入可能造成内源基因的破坏,还可能激活原本已关闭的基因,使其进行表达,致使动物出现异常;其四,对转基因过程中的精细理论及其过程不甚清楚,例如整合的拷贝数,整合的机制,宿主染色体之间的相互作用,相同的基因表达调控元件在不同种系的差异与其宿主的遗传背景、外源基因的结构及其各种调控因子结合位点之间的关系都不是很清楚;其五,转基因动物的安全性问题,例如基因的插入突变、基因异位表达、基因表达产物等都可能对动物产生一定的危害<sup>[19,20]</sup>。

总之,转基因动物研究是一个艰辛而复杂的系统工程,发展过程中可能存在着一定的问题,需要我们探讨和研究,但不能否认,随着科学技术的发展,转基因动物正以它特有的、潜在的优势蓬勃发展,转基因动物及其相关产品必将进入真正的产业化和市场化阶段,为人类的生产和发展起着推动作用,给人类带来更大的利益。

#### 参考文献:

- [1] Radder H. Exploiting abstract possibilities: a critique of the concept and practice of product patenting [J]. *J Agric Environ Ethics*, 2004, 17(3): 275-291.
- [2] Palmeter RD, Brinster RL, Hammer RE, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs micro injected with a metallothionein growth hormone fusion gene [J]. *Nature*, 1982, 300(5893): 611-615.
- [3] Nagueh SF, Chen S, Patel R, et al. Evolution of expression of cardiac phenotypes over a 4-year period in the beta-myosin heavy chain-Q403 transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 36(5): 663-673.
- [4] 胡永浩,沈正达. 反向疫苗学: 后基因组时代疫苗研究新途径 [J]. *中国兽医学报*, 2004, 24(7): 414-416.
- [5] 赵学军,刘建新,吴跃明. 基因工程技术在反当动物上的应用研究 [J]. *中国饲料*, 2004, (11): 18-19.
- [6] Chang P, Torres J, Lewis RA, et al. Localization of RNAs to the Mitochondrial Cloud in *Xenopus* Oocytes through Entrapment and Association with Endoplasmic Reticulum [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(10): 4669-4681.
- [7] Koo BC, Kwon MS, Choi BR, et al. Retrovirus-mediated gene transfer and expression of EGFP in chicken [J]. *Mol Reprod Dev*, 2004, 68(4): 429-434.
- [8] Zhao J, Liu B, Ren WZ, et al. Production of transgenic mice by in vivo sperm atonia-mediated gene transfer [J]. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, 2003, 36(3): 197-201.
- [9] Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, et al. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice [J]. *Cell*, 1989, 59(2): 239-241.
- [10] Gerald D, Fischbach and Ruth L, et al. Stem cells: science, policy, and ethics [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(10): 1364-1370.
- [11] 绳纪坡,邓继先. 利用转基因动物模型研究胰岛素样生长因子-1(IGF-1)在中枢神经系统中的生物学作用 [J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(4): 12-15.
- [12] Lai M, Hibberd CJ, Gluckman PD, et al. Reduced expression of insulin-like growth factor 1 message RNA in the hippocampus of aged rats [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 288(1): 66-70.
- [13] Gingrich JR, Barrios RJ, Morton RA, et al. Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(18): 4096-4102.
- [14] 张晓毅. 前列腺癌转移转基因动物模型 [J]. *国外医学泌尿系统分册*, 2004, 24(5): 592-594.
- [15] Wadia JS, Dowdy SF. Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(4): 579-596.
- [16] Liu Y, Saxena A, Zheng C, et al. Combined alpha tumor necrosis factor gene therapy and engineered dendritic cell vaccine in combating well-established tumors [J]. *J Gene Med*, 2004, 6(8): 857-868.
- [17] Zermann DH, Ishigooka M, Doggweiler-Wiygul R, et al. Central autonomic innervation of the kidney. What can we learn from a transneuronal tracing study in an animal model [J]. *J Urol*, 2005, 173(3): 1033-1038.
- [18] Homma R, Yoshikawa H, Takeno M, et al. Induction of epithelial progenitors in vitro from mouse embryonic stem cells and application for reconstruction of damaged cornea in mice [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(12): 4320-4326.
- [19] Overbeek PA, Lai SP, Van Quill KR, et al. Tissue-specific expression in transgenic mice of a fused gene containing RSV terminal sequences [J]. *Science*, 1986, 231(4745): 1574-1577.
- [20] Bartke A, Cecim M, Tang K, et al. Neuroendocrine and reproductive consequences of overexpression of growth hormone in transgenic mice [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1994, 206(4): 345-359.

收稿日期: 2005-03-04 修回日期: 2005-12-21

## “2006 年全国时间生物医学学术会议”通知

经中国中西医结合学会批准,将于 2006 年 6 月下旬召开 2006 年全国时间生物医学学术会议并正式成立中国中西医结合学会时间生物医学专业委员会,有关会议内容及征文通知如下:

一、会议时间: 2006 年 6 月 28 日 - 7 月 1 日,会期 4 天。

二、会议地点: 江苏省苏州市苏州大学东吴饭店。

三、会议内容: 1) 时间医学与时间生物学的临床、基础研究与教学等方面学术交流,包括: 时间生理学、时间药理学、时间毒理学、时间中医学、针灸时间治疗(子午流注、灵龟八法等)、时间养生学、肿瘤时间治疗、生物节律研究、生物钟基因研究、动态血压及动态心电图研究与应用、睡眠研究等; 2) 邀请国际时间生物学著名专家作有关时间生物学研究进展学术报告; 3) 正式成立中国中西医结合学会时间生物医学专业委员会。

四、会议主办单位: 中国中西医结合学会及其时间生物医学专业委员会筹委会; 由苏州大学承办, 山东省医学科学院山东省抗衰老研究中心协办。

五、会议费用: 注册费: 代表 800 元/人; 学生 500 元/人。

六、征稿要求:

1. 关于时间医学与时间生物学方面(具体见上条)的研究论文、综述等。论文全文(包括 1000 字以内的摘要, 研究性论文请按目的、方法、结果、结论四部分撰写), 以电子邮件附件方式(Word 或纯文本文件)或 A4 纸打印件和软盘寄送会议联系人, 可参见网址: [www.chrono-biology.net](http://www.chrono-biology.net);

2. 寄文地址: 山东省医学科学院抗衰老研究中心赵子彦, 电子信箱: [ziyanzhao@163.com](mailto:ziyanzhao@163.com) 或 [ziyanzhao@sina.com.cn](mailto:ziyanzhao@sina.com.cn); 地址: 山东省济南市经十路 89 号抗衰老研究中心, 邮编: 250062; 电话: 0531-82919892; 传真: 0531-82601295; 请自留底稿, 恕不退稿;

3. 截稿日期: 2006 年 5 月 15 日。

中国中西医结合学会时间生物医学专业委员会筹委会