

转基因动物技术及其应用

张 涛

(北京医科大学生物遗传教研室 北京 100083)

关键词 转基因动物

80年代初期,由于分子生物学和动物实验胚胎学的发展和相互渗透,使科学家可以借助实验手段,将特定的目的基因从某一动物体分离出来,进行扩增或加工,再导入另一动物的早期胚胎细胞中,使其整合到宿主动物的染色体上,在动物的发育过程中表达,并通过生殖细胞传给后代。这种在基因组中稳定地整合有人工导入的外源基因的动物称转基因动物(Transgenic Animal)。

1974年,Jaenisch^[1]应用显微注射法,在世界上首次成功地获得了SV40 DNA转基因小鼠。1981年,Costantini^[2]将兔 β -珠蛋白基因注入小鼠的受精卵,使受精卵发育成小鼠,表达出了兔 β -珠蛋白。这些开创性的工作使人们可能从分子水平、细胞水平、个体水平多层次,从发育时间和组织生理空间多角度,同时“立体”地研究基因的功能,使人类可能按照自己的意愿修正和改造物种。本文主要介绍转基因动物技术及其应用前景。

1 转基因动物技术

生产转基因动物的关键技术包括:1.外源目的基因的获得和结构。2.将外源目的基因有效地导入生殖细胞或胚胎干细胞,经选择获得转目的基因的细胞。3.选择合适的体外培养系统和宿主动物,使转基因胚胎发育。4.鉴定、筛选所得的转基因动物品系。

目前,生产转基因动物的基因转移技术主要有以下几种:1.基因显微注射法。2.胚胎干细胞移植法。3.逆转录病毒感染法。4.精子载体导入法。

1.1 基因显微注射法 在显微镜下,借助显微操作仪,将吸有外源基因的毛细玻璃管针直接插入受精卵的原核中,注入目的基因。这是一种比较有效的方法,目前使用较广。其特点是外源基因的导入整合效率较高,不需载体,直接转移目的基因,目的基因的长度可达100Kb(千对碱基对)。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。

1.2 胚胎干细胞移植法 动物囊胚的内细胞层含有未分化的胚胎干细胞(ES),它们具有分化为体内各组织细胞的潜能。通过某种实验手段(显微注射法、逆转录病毒感染法、电穿孔法或磷酸钙沉淀法)把外源基因导入ES细胞,再用适当的筛选法[PCR法(聚合酶链反应法)、PNS法(正负选择法)、药物法等等]筛选出基因转化的ES细胞,再将其注射入宿主的囊胚,它们可整合到宿主胚胎,参与胚胎发育,最后嵌合到宿主动物体内的各组织器官中,形成转基因嵌合动物。如果基因转化的ES细胞参与了生殖腺形成,产生有功能的配子,那么,通过适当的交配可得转基因后代。

本法外源基因整合率高,植入囊胚前筛选合适的转化的ES细胞,克服了以前只能在子代选择的缺点,并能充分利用分子生物学发展起来的各种先进方法,是很有前途的技术。但是不易建立ES细胞系。由于通过嵌合体途

收稿日期:1995-06-23,修回日期:1995-09-15

径,所以实验周期长。

1.3 逆病毒感染法 用整合有外源基因的逆转录病毒感染着床前胚胎(4—8细胞),逆转录病毒DNA在感染过程中整合到宿主动物基因组。由于感染发生在受精卵数次卵裂后,因此先得到嵌合体,再通过嵌合体筛选途径获纯系。该法整合率较高,目的基因不易破坏,多是单拷贝、单位点整合,适合于难以观察到原核的禽类受精卵。由于病毒衣壳大小的限制,目的基因不宜超过10Kb,否则影响活性和稳定。此外,病毒DNA可能影响外源基因在宿主动物的表达。因通过嵌合体途径,故周期长。

1.4 精子载体导入法 利用精子作为基因载体,借助受精作用把外源基因导入受精卵,整合到受精卵的基因组中,是构建转基因动物的一种新的尝试。该法较简单、方便,依靠生理受精过程,免去了对原核的损伤。首次报道立刻引起了同行们的广泛注意,纷纷效仿,但不易成功。

2 转基因动物的应用

2.1 生命现象的基础理论研究

2.1.1 研究基因的结构和功能 利用自然突变或人为修饰的基因作为外源基因,构建转基因动物,研究导入的异常基因的表型效应,可以了解基因结构和功能的关系。Jacob^[3],Kollais^[4]等用两种不同的基因的局部片段组合成融合基因,做转基因工作,观察了这些异常的外源基因在宿主动物中的表达情况,并进行了有意义的探讨。

2.1.2 研究组织表达特异性 利用具有不同长度或不同遗传背景的侧翼顺序的外源目的基因构建成转基因动物,研究目的基因在宿主动物表达的组织特异性,可以了解调控顺序(如增强子、启动子)在组织特异性表达中的作用。Fukamizu等^[5]用含有转录起点上游3Kb、下游1.2Kb的人肾素基因构建转基因小鼠。该基因在小鼠中表现为组织表达特异性,提示与组织表达特异性有关的调控“元件”可能存在于该基因的5'端侧翼顺序中。

2.1.3 研究发育进程的特异性表达 将不同的外源基因转入宿主动物受精卵或早期胚胎干细胞,可观察研究目的基因在胚胎不同发育阶段的特异表达、闭关及调控机理。珠蛋白基因簇由多个不同的基因成员组成,它们紧密排列在一段DNA链上(如 β 珠蛋白基因簇5'- ϵ -G γ -A γ - ψ β - δ - β -3')。在发育早期,5'端的基因先表达,后期是3'端的 β 基因特异表达。Kollais等^[4]把含有不同片段的珠蛋白基因导入小鼠,对它们在小鼠发育中的特异表达进行了研究。

2.2 医学研究

2.2.1 研究致病基因 将致病基因或病毒基因导入动物,可研究这些外源基因在宿主动物引起的病理变化,从而探讨发病机理。Kim等^[6]曾把HBX基因转入小鼠,结果转基因小鼠的肝脏发生癌变。把癌基因与特定的增强子、启动子融合构建转基因动物,癌基因可在特定的相关组织中表达而引起癌变,为探讨癌基因致癌机理提供了新的线索。Hanahan^[7]用胰岛素基因增强子与ST₄₀Tag基因融合,转入小鼠,ST₄₀Tag在胰腺中表达,引发胰腺癌。

2.2.2 建立医学动物模型 转基因动物的构建可以用于建立疾病模型。如果导入的外源基因是功能缺陷的基因,那么可以得到遗传病的转基因动物模型;如果外源基因是传染病毒基因,得到的将是传染病的转基因模型。贺涛等^[8]报道构建成了Lesch-Nyhan综合症(HPRT基因缺陷)、家族性淀粉样神经病(TTR基因缺陷)、镰刀型红细胞贫血、胶原病等遗传病的小鼠动物模型。Ren^[9]则建成脊髓灰质炎的转基因小鼠模型。另外,在药理学研究方面,Mickisch^[10]构建多抗药性转基因小鼠作为药理研究的新工具。

2.2.3 生产“天然”活性蛋白药物 从理论上讲,药用蛋白可通过传统的“基因工程”技术生产。即把目的基因借助特殊载体(质粒等),导入宿主菌,通过发酵生产。但由于真核细胞基因调控顺序与原核细胞的转录翻译系统难以匹配,所以,实际应用上存在着许多困难。通过转

染真核细胞虽能解决匹配问题,但真核细胞难以大规模培养。然而,一种导入了外源药用蛋白基因的转基因动物,可以在生理状态下表达相应的蛋白药物,安全可靠。另外,动物易饲养繁殖,一些蛋白药物还可伴随乳汁分泌,极易收集^[11]。目前已构建成人尿激酶^[12]、 γ -干扰素^[13]、人生长激素^[14]、 α_1 -抗胰蛋白酶、凝血因子 IX、抗凝血酶 III^[15]等等基因的转基因动物。这是一条生产蛋白药物的新途径,前景诱人。

2.2.4 研究基因治疗 基因治疗可分体细胞基因治疗和生殖细胞基因治疗。基本原理是应用 DNA 重组技术及其它生物学技术,针对患者细胞内有缺陷的基因,定位导入外源正常基因,替代有缺陷的基因,实施基因修正;或非定位导入外源正常基因,进行基因添加。从而使细胞的功能缺陷得到恢复,达到治疗疾病的目的。体细胞的基因治疗已有实施。但生殖细胞的基因治疗由于难度大,遗传改变可传代,涉及医学伦理学问题,目前持谨慎保守态度。因此,还没有直接对人生殖细胞进行基因治疗的先例,但在一些动物身上取得成功。Costantini^[16]应用转基因动物技术,把人 β -珠蛋白基因导入有 β -珠蛋白基因缺陷的小鼠受精卵后,使发育成的小鼠溶血性贫血症状改善,为最终实现人类生殖细胞的基因治疗进行了前期探索。

2.3 定向育种研究 用转基因技术,按人们意愿可以把一些优良基因导入宿主动物,使转基因动物具有抗病、快速增长或增产某些特种蛋白等等优良品性。丘才良^[17]把一种寒带比目鱼抗冻蛋白基因(AFP)成功地转移到大西洋鲑中,为提高某些鱼类的抗寒能力做了积极的尝试,魏彦章^[18]利用人生长激素基因构建的转基因鲤鱼,表现出快速增长的效应。

3 结 语

转基因动物体系是生理状态下的多维研究体系,它可以使人们能够综合、全面、客观地从不同的结构层面(分子 $\rightarrow$ 细胞 $\rightarrow$ 整体)以及不同的时空角度(发育进程的变化)来研究基因的表达、调控及其与发育和疾病的关系。同时,它又

是一个能扩增的人造“生命反应装置”,可应用于构建疾病动物模型、改良物种,以及生产特种基因产品等等方面。因此,它一出现就显示出充满魅力的应用前景。许多国家的学者纷纷投入到转基因动物研究,以期在各自领域取得突破。我国在转基因动物研究方面也取得了不少进展。英、美等发达国家更是奋勇争先,纷纷组建了一批转基因技术公司,构建各种转基因动物,生产特种活性蛋白,向产业规模发展。

可以预见,这项技术的不断完善和推广,必将促进人类对生命现象的理解。另外,它也可直接产生巨大的经济效益,推动社会发展。

致谢 本文承北京大学生命科学学院吴鹤龄教授审阅,特表谢意。

参 考 文 献

- 1 Jaenisch, R., B. Mintz. Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected With Viral DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71(4): 1250—1254.
- 2 Costantini, F., E. Lacy. Introduction of a rabbit β -globin gene into the mouse germ line. *Nature*, 1981, 294: 92—94.
- 3 Jacob, H. J., C.D. Sigmund, T.R. Shockley et al. Renin Promoter SV40 T-Antigen Transgenic Mouse. *Hypertension*, 1991, 17(6): 1167—1172.
- 4 Kollias, G., N. Wrighton and J. Hurst et al. Regulation Expression of Human $\alpha\gamma$ -, β -, and Hybrid $\gamma\beta$ -Globin Genes in Transgenic Mice: Manipulation of the Developmental Expression Patterns. *Cell*, 1986, 46: 89—94.
- 5 Fukamizu, A., M.S. Seo and T. Hata et al. Tissue-specific Expression of the Human Renin Gene in Transgenic Mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, 165(2): 826—832.
- 6 Kim, C. M., K. Koike and L. Saito et al. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature*, 1991, 351: 317—320.
- 7 Hanahan, D. Heritable formation of pancreatic β -cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature*, 1985, 315: 115—122.
- 8 贺涛,章扬培. 胚胎干细胞与基因靶重组研究. 国外医学遗传学分册, 1991, 14(5): 240—242.
- 9 Ren, R., F. Costantini and E.J. Gorgacz et al. Transgenic Mice Expressing a Human Poliovirus Receptor: A New

(下转第 26 页)