

13-13

# 转基因动物的基础与应用研究

曾邦哲

(北京中关村 中科院微生物研究所基因工程中心 100080)

Q785

**摘要** 转基因动物研究的基础:1. 经典遗传学:揭示了遗传基因的染色体几何位点与生物表型性状的形式对应关系。生物个体体现为物种内全套基因不同等位基因的组合。2. 分子遗传学:阐明了基因到性状是核酸到蛋白质的信息流调控过程,即操纵子结构模型和中心法则的研究范畴。3. 结构遗传学:基因组结构(遗传语法)、功能(发育调控)与演变(物种进化)过程构成物种进化与发育自组织的结构遗传学基础。进化是基因组的信息化增长结构化分层、分歧是基因组同层结构的重构,而发育是细胞基因组的复制和基因程序化表达。

转基因动物研究包括:1. 制造产品:器官移植、生物反应器。2. 改良生命:动物育种、基因(核酸药物)治疗。3. 研究手段:疾病模型、发育调控。转基因动物的基本方法和原理是相同的,都是建立于基因片段交换重组(质粒重组)、基因特异性表达及染色体外基因转移(病毒转位)基础上的。转基因动物表达系统由目的基因、转移载体、受体细胞构成。

**关键词** 结构遗传学 转基因动物 基因自组织 特异性表达

## 一、转基因动物的研究基础

### (一)经典遗传学

#### 1. 等位基因模型与连锁分析、体细胞遗传技术

1890年第一届国际遗传学大会,1899年在伦敦进行了杂交育种讨论,1906年第三届国际遗传会上 Willian Bateson 建议采用“遗传学”(Genetics)术语。1909年,约翰森提出“基因(Gene)和基因型、表现型术语。1932年第六届国际遗传学大会(Ithaca, NY)上提出“遗传工程”一词,并定义为将遗传学原理在动、植物繁殖方面的应用。1913年 Sturtevant 证明了遗传图是线性的和三点测验连锁分析。1932年摩尔根《基因论》发表,1936年斯特恩发现果蝇体细胞有丝分裂染色体交换,60年代巴斯基发现体外培养小鼠细胞融合。以后日本冈田善雄发现灭活仙台病毒促进细胞融合。1959年伯内特提出抗体形成的克隆选择学说和免疫抗体的DNA重排,1975年米尔斯腾使致敏淋巴细胞与骨髓细胞融合,获单克隆抗体细胞株。

#### 2. 染色体交换与同源重组的发现

遗传交叉(Crossover)发生在减数分裂的染色体联合时,同源染色体交换从而产生同源重组,相同或几乎相同的两个DNA节段发生在相应区域的同源片段之间的不对称交叉导致重复和缺失。借助于重组可构建新的遗传变种,如酵母基因克隆到细菌质粒并转化另株酵母,可发生质粒插入酵母细胞染色体中。 $\lambda$ 噬菌体DNA能通过重组作用整合进 *E. coli* 染色体的特异位点成为前病毒(provirus)的位点特异重组,不依赖于DNA顺序同源性(有很短同源序列),而依赖于能与某些酶相结合的DNA序列的存在。

### (二)分子遗传学

#### 1. 操纵子模型与分子克隆、转基因技术

Avery、Macloood 及 McCarthy 在沙门氏菌、噬菌体、动物细胞染色体中发现病毒转化细胞

的能力。1953年华生、克利克发现DNA分子结构标志着分子遗传学的诞生。1957年克利克提出中心法则,1970年泰明和博尔蒂莫发现逆转录现象。1961年Jacob和Monod发表大肠杆菌乳糖操纵子学说揭示了基因表达的调节原理和操纵子结构。1972年Stanford大学的PaulBerg首次将两种不同物种DNA片段连接成重组DNA,1973年科恩与博耶将DNA片段连接到质粒上,并转移到大肠杆菌内创立了DNA重组技术。1977年11月美加州希望城医学中心Boyer、板仓等四人和加州大学合作,首次用大肠杆菌生产出生长激素抑制因子。

## 2. 基因转移与染色体外DNA的发现

1951年B. McClintok在玉米遗传研究中,发现能在基因组内不同区域转移的控制成分,即目前称为转座子(transposons)。某些噬菌体DNA就是转座子,而且有些致癌的RNA病毒也有类似细菌转座子的结构。1980年Temin注意到逆转录病毒前病毒DNA两端具LTR,整合部位两侧产生靶序列的正向重复(DR),结构类似于细菌的转座子,因而提出逆转录病毒可能由细胞的转座子演化而来。逆转录病毒RNA基因组中pol基因编码逆转录酶、整合酶和蛋白酶。RNA在进化过程中获得的信息可通过逆转座作用而固定到基因组中。逆转座子可引起基因突变、重排和作为可移动的同源序列促进同源重组。

### (三)结构遗传学

#### 1. 基因组分析技术与遗传学语法

人类基因组计划始自1986年(美)达尔贝提出的人类基因组全序列的测定,对人体24条染色体的遗传、物理图谱构建及顺序分析和基因识别及功能的研究。1987年Olson等首先提出酵母人工染色体(YAC)克隆,极大地推动了探讨遗传序列及信息的研究,近年又发展了P1噬菌体及细胞人体染色体(BAC)等克隆技术。采用大尺度物理图谱分析、Alu和Line指纹图分析、顺序标签位点(Sequence Tagged Site, STS)图谱分析、Alu-PCR指纹图谱、染色体步移、染色体特异的YAC克隆库、YAC在染色体上的直接定位等综合构建YAC重叠群方法,1993年12月完成第一代的人基因物理图谱。

#### 2. 基因调控与特异性表达

真核细胞中有启动子、增强子顺式调控元件和基因编码的可溶性蛋白或RNA反式作用因子两类调控元件控制基因的时空特异性表达,一般包括单一基因调节系统(SGR)和复式基因调节系统(MGR)。同源异形盒基因(Homeobox gene)是胚胎发育、细胞分化调节基因,控制体节、中枢神经系统、前后分化关系。1984年McGinnis及Scolt和Weiner在研究果蝇(*Drosophila*)发育中首先发现,Hox基因产物都为转录因子,能与顺式元件结合。Hox基因间距大约4.5kb。基因转录调节的一些重要区可分散在整个基因内或作为距离增强子定位于基因一侧。根据其沿A-P轴作用而分为A-P型和非A-P型。A-P型Homeobox基因成簇排在一条或多条染色体上。从1983~1989年在果蝇及其它动物发现近90种基因,包括Hox和En、Pax等基因。

#### 3. 物种进化和基因(家)族、群模型

从细胞基本代谢图到多细胞进化、发育框架(模式生物)的维管束、三胚层和四种组织、器官系统的自更新、自复制、自协调系统的染色体和基因组的组织层次、结构进化、发育时空格局的基因调控,是结构遗传学所要解决的问题<sup>[1]</sup>。基因群(genes group)是构成某个性状发育的系列相关基因;基因家族(gene family)是同类基因在发育不同时期表达或是不同进化水平的基因。基因处于基因组的一定基因位点(gene site),是否表达或激活取决于基因环境基因场

(genes field)的信号物质,即基因相互作用和细胞通讯、细胞互作。生物进化也就是基因组结构的分层次进化;个体发育构成基因组的程序表达功能过程。植物进化到维管束的出现、动物进化到出现循环系统后更高级层次的神经、免疫、内分泌系统<sup>[2]</sup>基因族结构与功能是动物发育的很重要内容。

#### (四)人工与天然基因重组

高科技产业化是经济腾飞的关键,产品的高技术含量和生产规模化是生物工业发展的重要指标。改造生命(遗传工程)和仿造生命(仿生工程)是人工进化、生物工业的两大主题,包括分子元件(生物分子芯片)、生化反应器(固定化核糖体、酶、细胞器技术)、仿生机器(人工神经网络)等,将构成生物物理联盟工业模式<sup>[3]</sup>的基础。

生物工程包括三个层次的内容:(1)、微生物发酵、动植物细胞培养及细胞融合杂交的代谢工程、蛋白质工程和基因工程,都是通过基因重组改变单细胞的生化过程而获得所需产品的生物技术;(2)、细胞器及核蛋白体、酶的固定化技术包括传感器和反应器的应用,实际上已属于仿生工程范畴;(3)、转基因动物、植物和动植物杂交育种,动物 ES 细胞和植物全能细胞应用提供了动、植物遗传工程的有利手段。

大肠杆菌缺乏修饰酶类,真核生物蛋白翻译后糖基化、磷酸化、酰氨化等加工修饰,不能正确折叠,缺乏分泌作用形成无活性包含体,不能进行内含子剪切。酵母提纯工艺复杂、成本高、制品纯度达不到要求。制品免疫原性差和接种剂量大等。动物、植物细胞培养成本高、易污染、工艺上存在不少问题,培养时细胞活性、旋转产泡和透气问题。细胞培养和蛋白质加工需系列仪器设备及工艺流程复杂、工作量大,培养中产生大量次生代谢产物不利分离提纯。转基因植物表达最低、易扩散到生物环境,尤其医用蛋白基因扩散到病源生物体内从而产生抗性。转基因动物成为较先进的表达系统。美国红十字会预测,至 2005 年,全美转基因动物生物反应器生产的药物,每年可达 350 亿美元,至 2010 年,所有基因工程药物中利用转基因动物生物反应器生产的份额,将高达 95%。

## 二、转基因动物技术方法

转基因动物表达系统由目的基因、转移载体、受体细胞构成,包括基因工程上、中、下游技术,在转基因哺乳类、鸟类、鱼类和昆虫中广泛应用<sup>[4]</sup>:(1)、上游:基因改造、载体构建。外源基因含调控元件(Regulatory element)的旁侧序列(Flanking gene)和可表达的结构基因(Structural gene)序列和转录终止信号,同时为了检测方便引入报告基因(Reporter gene)或报告序列(Reporter sequence),删除目的基因的天然启动子(Promoter),将强启动子序列甚至包括增强子(Enhancer)序列和目的基因拼接成融合基因(Fusion gene)。(2)、中游:基因转移、胚胎移植与建系。转移基因的细胞导入是将已构建好的携带外源基因的基因载体系统通过物理、化学、生物方法导入细胞内,受体细胞及胚胎移植是转基因动物的重要环节,决定细胞水平筛选和外源基因的传递。外源基因通过细胞膜导入受体细胞,除天然的 DNA 转移系统(动、植物病毒、土壤农杆菌等)外,主要是物理方法在膜上形成孔道,使外源 DNA 进入细胞。(3)、下游:基因整合、表达检测与细胞筛选。转基因个体基因整合与表达检测包括染色体、基因水平、转录水平、蛋白质水平:A、DNA 水平,外源导入的 DNA 只有很少一部分能整合到宿主基因组。可采用

Southern 印迹杂交、原位杂交、Dot 杂交法或 PCR。B、RNA 水平, Northern blot 杂交如表达量过低或存在内源性的同源基因表达受限制。反转录聚合酶链反应(RT-PCR)则是高敏感、特异检测转基因表达的方法。C、蛋白水平, 可用 Western blot 分析, 但内源性同源产物会有干扰, 所以抗体的特异性功能非常重要。

### 三、转基因动物的应用

转基因动物技术最初由 Gordon 在 1980 年进行原核的显微注射而创立。1981 年 Gordon 和 Ruddle 将外源基因 TK 与 SV 早期启动子重组到质粒 PBR 中, 再用显微注射法导入小鼠, 并首次称为转基因小鼠(transgenic mice)。1982 年 Palmiter 等人用小鼠金属硫蛋白-I 基因(metallothionein)融合大鼠生长激素基因重组子显微注射小鼠受精卵, 移植假孕受体, 21 只新生小鼠, 发现其中 7 只携带上述融合基因, 6 只小鼠生长速度快, 体重 1.8 倍对照组, 激素高到 100~800 倍, 并不因插入导致生物活性改变。1981 年, Constantini 用兔的  $\beta$ -球蛋白基因对小鼠转基因, 24 只中有 9 只新生小鼠肝细胞整合  $\beta$  球蛋白基因。1985 年转基因猪、绵羊、兔问世, 至今为止, 转基因兔、鸡、牛相继成功。Simons 1987 年的工作表明小鼠能分泌外源基因表达的蛋白进入乳汁。1987 年成功实现内源基因的定点失活, 五年内定点整合导致突变的基因达数十个。1988 年 Ebert 等利用转基因猪生产活性生长激素。1989 年 Capecchi 发现哺乳动物的同源重组或基因打靶技术<sup>[5]</sup>。1990 年荷兰基因药物公司诞生了世界第一名为 Herman 的转基因公牛, 导入了乳铁蛋白基因, 经人工受精 1/4 后代母牛产乳铁蛋白。1992 年 Perasuy 将  $\beta$  羊酪蛋白基因注入小鼠乳汁含外源蛋白达 21~24mg/ml。1996 年, 中国转基因动物学会(筹)与国际科学理事会遗传实验委员会等主办的第一届国际转基因动物会议在北京召开。

随着转基因技术的发展, 转基因动物育种、改良与繁殖, 转基因药物表达生物反应器, 疾病动物模型与基因治疗、器官移植, 生物发育调控、免疫及神经生物学等研究在工业、医学和农业生物科学、工程领域广泛开展起来。

#### 1. 转基因哺乳类表达系统

1987 年 Gordon 等首次利用组织纤维溶酶原激活因子(tPA)与小鼠乳清酸蛋白(WAP)启动子的重组基因, 培育出 37 只转基因小鼠, 外源性 tPA 均获表达, 其中 1 只小鼠乳清蛋白水平达 50 $\mu$ g/ml。1990 年, Meade 等利用相似的重组基因也培养出 7 只转基因小鼠, 经 ELISA 检测, 其中 1 只小鼠奶中的 tPA 含量达 100 $\mu$ g/ml。随后在 tPAcDNA 引入一个点突变, 半衰期延长, 称为 LA-tPA(Long Acting tPA, LA-tPA), 与 WAP 启动子融合, 构建重组子 WAPLA-tPA, 分别导入小鼠和山羊受精卵。转基因小鼠奶中 LA-tPA 含量达 5000 $\mu$ g/ml, 被检测的 5 只转基因山羊奶中 LA-tPA 含量为 3.0 $\mu$ g/ml。同年 Meade 等利用牛  $\alpha$ S1-酪蛋白启动子构建尿激酶(UK)和 tPA 进行了转基因小鼠研究, 在鼠奶中 UK 和 tPA 含量分别达 1~2000 $\mu$ g/ml 和 400 $\mu$ g/ml, 凝血因子 VIII、IX、干扰素(INF- $\alpha$   $\beta$   $\gamma$ )、白介素(IL2)、肿瘤坏死因子(TNF $\alpha$ )等转基因小鼠亦获成功。1991 年苏格兰爱丁堡制药公司的 Colman 等培育出 5 只奶中高水平表达  $\alpha$ -胰蛋白酶( $\alpha$ AT)的绵羊, 可达 30g/l, 德国 Pharmaceutical Protein 有限公司亦进行了类似的研究, 并获成功, 在 1 只转基因绵羊的奶中, AAT 含量高达 35g/l。美国 Genzyme 有限公司培育获得两批 tPA 转基因山羊, 奶中 tPA 含量最高的 1 只山羊达 100g/l。美国红十字会培育

出能高效表达人C蛋白的转基因猪,C蛋白在猪乳汁中可达1g/l等。

转基因哺乳类最有前景的是器官移植供体的开发,1992年11月英国剑桥大学White将人的DAF基因克隆和转移到猪基因组,在子代的血管内皮上表达了抑制人体免疫排斥反应的DAF基因,将携带了DAF基因的猪心脏移植到10只猴子,其中2只猴子的猪心脏跳动了60天。

## 2. 转基因鸟类生物反应器

1988年Salter及1990年Shuman曾提到过鸡输卵管表达的可能商业价值,但有系统、有目的的用鸟类做生物反应器的工作远未开展,1993年由英国爱丁堡的Sang博士将外源基因注入小公鸡,首次获蛋黄中含贵重的人类蛋白的母鸡。转基因输卵管表达体系包括三个配套技术方案:(1)转基因鸡产生,卵清蛋白融合基因构建、导入、整合获转基因鸡;(2)繁殖育种,转基因鸡杂交代种系统建立;(3)卵黄基因突变,卵黄代谢酶失活使鸡蛋成分单纯化。鸡白蛋白基因位于2号染色体长臂上。基因表达的调控受甾体激素诱导,即鸡输卵管细胞在接收的甾体激素信号刺激下引起细胞受体蛋白变化,产生信号并传输到卵清蛋白基因上游调控区引起卵清蛋白基因的表达。采用鸡卵清蛋白基因侧翼序列可构建筛选转基因鸡输卵管表达系统的载体<sup>[6,7]</sup>。此外,转基因昆虫蛹、转基因鱼卵都可作为很好的生物反应器。

## 参考文献

1. 曹邦哲,转基因动物与结构遗传学,转基因动物通讯,1994(12),3
2. Jie Zeng, The rhythms stability model of animal development, 94-Symposium for Young Chinese Developmental Biologists, Beijing, China, Oct. 10-15, 1995, p100.
3. Jie Zeng Strucrity. pan - evolution theory, '93Wuhan International Conference of Philosophy and Logic of Science, Wuhan, China, Oct., 1993.
4. Carl A Pinkert, Transgenic Animal Technology; a laboratory handbook, 1994 Academic Press, Inc.
5. A L Joyner, Gene Targeting, A Practical Approach, Oxford University Press, 1993
6. Bangzhe Zeng, Transgenic bird as oviduct bioreactor of pharmacy, The International Exhibition & Symposium on Biotechnology & Pharmaceutical Industries, Shanghai, China, July, 1995.
7. 曹邦哲,转基因动物表达系统:转基因蛋战略,转基因动物通讯,94(11),3

## The Fundamentals and Applications Research of Transgenic Animals

Bangzhe Zeng

(Gene Engineering Center, Institute of Microbiology, CAS, Email: Zeng@sun. im. ac. cn)

### Abstracts

#### I. STRUCTURAL GENETICS

From the views of structurity; panevolution, we can understand the organization, expression and evolution of genome; 1. structure of genome; linkage map; genes group, genes family of metabolism enzyme, receptor regulate and organelle function proteins; 2. regulation in developing; gene site, gene field and self-adaptation system for gene expression in program and induced by interacting among endocrine, immune, nervous in micro-environment. 3. species evolution; transgenic recombination; genetic crossover, transposon, mobile element and virus.

## II. TRANSGENIC ORGANISMS

Transgenic system is include recepte cell, vector and gene transfer. The applications of transgenics are: manufact products (bioreactor, organs transplantation), genetic improvement (organism breeding, gene therapy) and research methods (disease models, gene regulation); 1. recombination between genes; gene target and homologous recombination methods. 2. gene transposition of vector: sperm cell vector, microinject, gene gun, virus transfer and ES cell methods etc. . 3. gene specific expression in tissue; regulate elements in site specific expression; A. mammalian gland; a, b - SL, WAP; ALB; BLG. B. avian egg; ovalbumin; vitellogenin; Apo genes.

**Key words** structural genetics, transgenic animals, genes organization, gene expression.

## 征 订 启 事

《中国农村小康科技》是为配合党中央在 2000 年我国农村实现小康,加速农村脱贫致富、促进农村经济发展,由中国农学会和农业部情报所共同创办的。本刊宗旨是面向广大农民、农业技术推广人员和农村基层干部,宣传农业科研成果,普及农业科技知识,推广农村实用技术,介绍国内外先进技术及经验,用科学技术帮助农民脱贫致富,早日实现小康。

《中国农村小康科技》为月刊,每月底出版,国内外公开发行,全年定价 60.00 元。

联系地址:北京白石桥路 30 号中国农科院科技文献信息中心《中国农村小康科技》编辑部  
邮 编: 100081

《富英快讯》是全国动物饲养新技术产品传播网网刊。以农业部信息中心、中国农科院饲料研究所和中国农业大学等单位掌握的大量国内外农业新技术产品信息和雄厚的开发实力及一批高水平的专家学者为依托,致力推广、普及畜牧水产养殖新技术产品,沟通信息交流。

主要栏目:专家论坛;重点产品推荐;重点企业介绍;产品价目;政策法规;市场预测;网员信箱;产品供求;实用技术。

订阅方法:可按年、按季、按月随时订阅,通过邮局汇款,并注明《富英快讯》订阅款。

定 价:每册 10.00 元,全年 24 期,共 240.00 元。

单 位:北京富英信息中心

详细地址:北京市海淀区上地东路 29 号 2B 综合楼 6 层

邮 编:100085 电 话:(010)62986337 62986340 传 真:(010)62986340 62986344