动物转基因技术的新进展*

李劲松 庄大中 孙青原 陈大元[1)]

(中国科学院动物研究所, 生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 到目前为止, 原核注射是最可靠, 也是使用最广泛的动物转基因方法. 但该方法存在整合效率太低及不能定点整合的问题. 在过去的20年里, 出现了一些新的转基因方法, 包括精子介导、反转录病毒介导、携带外源基因体细胞的核移植、ES细胞基因打靶技术等. 但这些方法都未能根本地解决存在的问题. 最近的一些文献中报道转基因技术在原有方法的基础上做出了改进后, 取得了突破性进展.

关键词 转基因技术, 显微注射, 动物

学科分类号 Q81, Q78

1976年, Jaenisch利用反转录病毒感染胚胎的方法进行转基因, 这是最早的动物转基因方法. 1980年, Gordon首次利用原核注射的方法开展动物转基因研究; 1982年, Palmiter将大鼠的生长激素基因注射到小鼠的原核中获得了体型明显大于正常小鼠的"超级鼠", 这一成果轰动了全世界. 之后, 原核注射作为最主要的一种转基因手段在生物医学的各个领域发挥重要作用, 研究人员利用该技术建立人类疾病的动物模型、制造生物反应器、改善畜产品的营养结构、进行疾病治疗等等. 但是, 原核注射法存在两方面的不足, 一是整合效率低, 自问世以来, 所获得的转基因动物不超过注射卵的1%. 二是不能定点整合, 外源基因被注入原核后, 其插入染色体是完全随机的, 这就大大影响了外源基因的表达及外源基因的遗传稳定性. 因此, 研究人员尝试利用其他一些手段, 如利用复制缺陷型的反转录病毒作为载体、利用精子作为载体、利用整合外源基因的体细胞进行核移植[1], 利用小鼠胚胎干细胞 (ES cell) 进行基因打靶等. 这些技术的运用在一定程度上能弥补原核注射的不足, 但并未根本地解决这些问题. 近一年来, 研究人员在原有转基因方法基础上加以改进, 在提高整合率, 加强外源基因的定点整合方面取得了一些突破性的进展.

1 复制缺陷型反转录病毒作为载体的方法

用携带外源基因的反转录病毒感染胚胎是最早使用的动物转基因方法, 其基本原理是当反转录病毒的RNA进入细胞后, 反转录成DNA (DNA前病毒), 依靠反转录病毒的整合酶及其末端特异的核苷酸序列, DNA前病毒可以整合到染色体上, 从而将其所携带的外源基因插入到染色体. 大部分的反转录病毒只能感染分裂的细胞, 而核膜崩解发生在有丝分裂的M期, 细胞分裂结束后又重新形成, 因此反转录病毒的整合只能发生在M期. 用反转录病毒来感染早期胚胎, 由于整合发生在发育的晚期, 故产生的是嵌合体, 只有部分细胞或组织获得外源基因. 另外, 整合往往在多位点发生, 故其后代会出现遗传差异. 处于MⅡ期的卵子核膜崩解, 而且卵子停滞在MⅡ期的时间比体细胞M期长得多, 因此Chan等[2]设想用复制缺陷型反转录病毒携带外源基因感染MⅡ期卵子, 将大大提高整合率, 且因为外源基因在卵子受精前就已整合, 就避免了嵌合体的产生. 他们用经过重组的携带外源基因的复制缺陷型病毒注入到牛MⅡ期卵子的透明带下, 然后进行体外受精 (图1), 有316枚受精卵发育至桑椹胚, 其中整合阳性的为178枚, 占56%, 而注射到受精卵透明带下则整合率为22%, 原核注射只有17%. 随机选择囊胚进行胚胎移植, 成熟卵子组共10枚移植给5头受体牛, 最终产下4头小牛, 均为转基因个体. 而受精卵组共12枚移植6头受体牛, 共获得4头小牛, 其中只有1头为转基因个体.

* 国家自然科学基金资助项目 (39770098).

1) 通讯联系人: 中国科学院动物研究所48号信箱, 北京 100080.
Tel: (010) 62562793, E-mail: chendy@panda.ioz.ac.cn

收稿日期: 1999-10-16, 修回日期: 2000-01-31

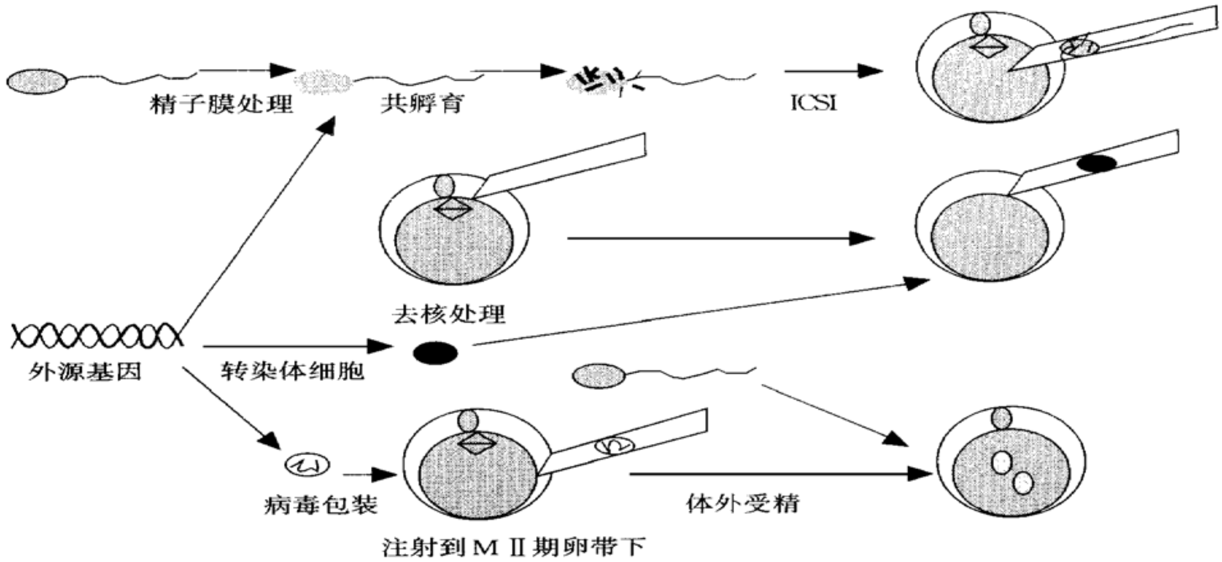

图 1　三种转基因方法图解

该方法能大大提高整合率，且技术难度不高，实验成本也较低，但仍存在三方面不足，一是携带外源基因的大小受到反转录病毒颗粒大小的限制，一般小于 10 kb；二是会产生多位点整合导致后代遗传差异，三是反转录病毒介导的转基因会影响外源基因表达．表 1 比较了四种转基因方法的特点．

表 1　几种不同转基因方法比较

	原核注射	反转录病毒感染	精子携带	体细胞核移植
基因准备	易	难	易	中等
转移基因大小	中等	小	无限制	无限制
定点整合	有可能	不可能	不可能	有可能
技术要求	高	低	低	高
胚胎存活	中等	高	中等	低
胎儿存活	中等	高	中等	低
转基因胎儿比例	1%～10%	约 100%	约 20%	100%
嵌合体的比例	中等	低	低	无
外源基因的拷贝数	高	低	低	可选择
多位点整合	低	中等到高	中等	低

2　精子作为载体的方法

1989 年，Lavitrano 等首次报道用活精子作为载体进行转基因获得了转基因小鼠，随后不少实验室利用相似的方法进行研究，但一直没能重复出这一结果．因此作为一种存在争议的方法，它的应用也受到了限制．10 年后，Perry 等[3]改进了这一方法，他们根据精子头、死精子（膜破损）经胞质内精子注射（ICSI）后能够发育成个体的事实，先通过去垢剂、冻融或冻干来破坏小鼠精子的膜，这就促使外源基因在与精子共孵育时能结合在精子表面甚至接触到高密度的精子 DNA，然后将精子通过 ICSI 的方法注入 M Ⅱ 期小鼠卵子中（图 1），从而可以避免外源基因在胞质内被降解[4]，获得了 64%～94% 的表达外源基因的胚胎，将桑椹胚或囊胚移至假孕母鼠体子宫内，产生的个体中有 17%～21% 的携带外源基因．

该方法与其他方法比存在不少优势．反转录病毒感染法既需要重组反转录病毒，又需要利用显微操作技术；原核注射方法所用的注射针很细（约 0.78 μm），故不能操作携带大片段外源基因的重组体（如酵母或哺乳类的人工染色体），而用于 ICSI 的注射针的直径是其 100 倍（约 78 μm）．另外，有些动物的合子含有丰富的脂肪，不易观察，操作起来很不方便，而 ICSI 就不存在这一问题．因此，Perry 等认为这一技术将有很广泛的应用前景．

3　整合外源基因体细胞核移植的方法

随着动物克隆技术的不断发展，利用携带外源基因的培养细胞进行核移植的方法建立起来（图 1）．Schnieke 等用阳离子脂质体介导外源基因转染到培养的绵羊胎儿成纤维细胞中，然后将细胞融入去核卵母细胞中，经激活后在体外培养至囊胚移入同步受体母羊中，最后获得 6 只转基因绵羊．Cibelli 等[1]用同一方法获得了 3 只转基因牛．毫无

疑问，该方法产生个体的外源基因整合率为100%，但是核移植技术难度较大，成功率较低，且胎儿成活率不高.

4 基因打靶的方法

以上介绍的几种方法大大提高了外源基因的整合率，但是未能解决外源基因定点整合的问题. 小鼠ES细胞基因打靶技术可以获得对某一位点上基因进行改造的同合子个体. 该技术首先把含有更改好的基因或基因的一部分插入到载体，并引入到来自小鼠的ES细胞系. ES细胞能进行组织培养，并能产生任何组织的细胞，细胞增殖一段时间后，筛选出发生同源重组的少数细胞克隆并进行扩增，然后用显微毛细管将细胞注入小鼠早期胚胎中去产生嵌合体，若该嵌合体在生殖细胞携带外源基因则其后代中1/2为转基因个体，它们相互交配，后代中1/4为携带外源基因的同合子，即为可用于研究的转基因个体. 然而该技术的应用必须依赖于ES细胞，而ES细胞只在小鼠上获得，故该技术只能局限在小鼠上开展. 如何在大动物上做到外源基因的定点整合是研究人员一直努力的方向，这样一方面可以更直接地对大动物进行某些基因的功能研究，另一方面将表达人类蛋白的基因插入到宿主细胞染色体上具有相应功能的基因处，从而取代宿主基因的功能，避免了随机的低效率基因整合，且降低后期纯化外源蛋白的难度，具有广泛的商业价值.

1999年7月21日，英国PPL医疗公司宣布他们用一种新的技术获得了两只定点整合的转基因羊Cupid和Diana，他们已经将这一技术用于一些人类蛋白的开发[5].

PPL已经申请了该技术的专利，这一基因打靶技术主要包括两个步骤，首先是将外源基因插入培养的动物体细胞染色体的特定位点，然后筛选出阳性克隆的细胞进行核移植. 但具体的技术环节没有公布.

转基因技术经过十几年的发展已取得了巨大的进步，特别是近一年来在提高整合率及定点整合上都取得了突破性的进展，随着该技术被更广泛地应用，如何降低转基因技术的难度，使之更易于操作，提高转基因技术的成功率也将是研究人员需要考虑解决的问题.

参 考 文 献

1 Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, *et al*. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Science, 1998, **280** (5367): 1256~ 1258

2 Chan A W S, Homan E J, Ballon L U, *et al*. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in ooctyes. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, **95** (24): 14028~ 14033

3 Perry A C F, Wakayama T, Kishikawa H, *et al*. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. Science, 1999, **284** (5422): 1180~ 1183

4 Robel J M. New life for sperm-mediated transgenesis? Nature Biotechnol, 1999, **17** (7): 636~ 637

5 PPL develops new and improved technique to create transgenic animals. Biotechnol News, 1999.08.05 (6)

New Advances in Animal Transgenic Technology. LI Jin-Song, ZHUANG Da-Zhong, SUN Qing-Yuan, CHEN Da-Yuan (*State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080, China).

Abrstract The technique of pronuclear microinjcetion is the most reliable and popular method for transgenic livestock production to date. However, pronuclear microinjection has been proven to be inefficient in producing transgenics and in inserting a piece of DNA into a specific site in the host genome. In the past 20 years, some new approaches have been used. These include sperm-mediated DNA transfer, retroviral mediated DNA transfer into oocytes, somatic cell carrying exogenous genes nuclear transfer, the use of embryonic stem (ES) cell. But these ways can not solve existing problems thoroughly. In recent papers, the existing techniques have been improved and significant progress has been made in developing transgenic techniques.

Key words transgenic technique, microinjection, animal