

动物转基因研究及其应用

刘 燊 李 宁*

(中国农业大学 农业生物技术国家重点实验室,北京 100193)

摘要:回顾了动物转基因研究的发展历程,综述了现有的转基因方法,并简要介绍了该技术给农业、生物医药、环境保护、生物材料、生物反恐等领域带来的新变化,同时,展望了转基因动物的发展前景。

关键词:转基因技术;转基因动物;生物育种;生物医药;人类疾病的动物模型

中图分类号:S813.1 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2010)05-0847-08

The Recent Progress in Transgenic Animal Research and Its Applications

LIU Shen ,LI Ning*

(State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: This paper reviews the recent advances and applications of transgenesis in livestock and their derivative products. Firstly, the developments in transgenic techniques are presented. Secondly, its emerging applications in the field of agriculture, pharmaceuticals, environmental protection, biological materials and anti-terrorism are analyzed. Finally, the prospects of transgenic animals are discussed.

Key words: transgenic technology; transgenic animals; transgenic breeding; pharmaceuticals; animal models for human disease

动物转基因技术起始于20世纪80年代初期,是指将特定的外源基因导入动物受精卵或胚胎,使之稳定整合于动物的染色体基因组并稳定遗传给后代的一种技术手段。虽然最早的转基因动物——莫氏白血病病毒转基因小鼠,在1976年由Jaenisch^[1]利用逆转录病毒感染小鼠胚胎得到,然而,真正打开了转基因动物制备阀门的人则属于美国科学家^[2],1980年,他发明了显微注射法,并将SV40启动子与疱疹病毒的胸苷激酶(TK)基因插入pBR322质粒中,然后将其注入小鼠受精卵的原核中,再把胚胎植

收稿日期:2010-09-24

基金项目:转基因重大专项高效转基因技术及其育种应用(2009ZX08010-014B)和863计划多位点基因安全转移技术(2009AA10Z110)资助

作者简介:刘燊(1984—),男,博士生,主要从事动物转基因克隆研究, E-mail: liushen163@163.com。

* 通讯作者:李宁(1962—),男,江西南昌市人,博士,教授,博士生导师,中国工程院院士。“国家杰出青年基金”获得者,“长江学者奖励计划”特聘教授,科技部“973”项目首席科学家,自然科学基金委“创新研究群体”学术带头人和欧盟第5框架PigBioDivII计划负责人。1978年9月—1982年7月在江西农业大学兽医学专业学习,获学士学位;1985年9月—1991年7月在北京农业大学动物遗传育种专业学习,先后获硕士学位、博士学位;期间于1989年1月—1990年7月在爱尔兰都柏林大学分子生物技术专业学习,获博士学位。获国家级奖励3项、省部级奖励6项;还获“长江学者成就奖一等奖”、“光华工程科技奖青年奖”、“全国五一劳动奖章”、“国务院政府特殊津贴”、国际“WCGALP青年科学家奖”等个人奖励;发表学术论文260余篇,其中SCI论文100余篇,包括在《Nature》、《PNAS》、《Journal of Virology》、《Genetics》、《Genomics》、《BMC Genomics》、《BMC Molecular Biology》、《Molecular Phylogenetics and Evolution》等国际著名期刊上发表的论文;主编面向21世纪课程教材《动物遗传学》和国际英文专著《Genomics and Biotechnology in Livestock Breeding》;获中国和美国发明专利11项,23项专利处在公示期。E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn。

入假孕母鼠的输卵管,得到了 78 只小鼠,其中两只为阳性鼠。1982 年,Palmiter^[3]将小鼠金属硫蛋白-I 基因启动子控制下的大鼠生长激素显微注射到小鼠受精卵中,得到对照组成年体重近 2 倍的“硕鼠”,“硕鼠”的出现,使人们很快意识到了转基因技术的巨大潜力,也使动物转基因研究迅速成为生命科学中的热门领域之一。之后,显微注射法被普遍采用,转基因兔、羊和猪等动物也相继诞生^[4]。但是,其他动物实验很快发现,显微注射法存在着严重的缺陷,突出的一点是外源基因整合效率十分低下,如兔为 1%~2%,猪为 1%~5%,而且,其表达水平强烈地受“位置效应”的影响,因此,制备的转基因动物成功率很不稳定。1997 年,英国 Wilmut 等^[5]通过体细胞核移植技术率先制作出世界上第一头转基因克隆羊 Dolly,开创了哺乳动物体细胞核移植的先河,同时也给转基因低下的效率问题提供了解决方案。体细胞核移植法的优点在于,可先在体外筛选出整合外源基因的阳性细胞,再将阳性体细胞进行核移植,理论上应为 100% 的阳性率,这大大减少了受体母畜的数量,节约了实验成本,为大量制备转基因动物铺平了道路。同年,通过该技术获得了乳腺特异表达人凝血因子Ⅸ的转基因克隆羊 Polly^[6]。2000 年,McGreath 等^[7]首次在羊的 $\alpha 1$ 原骨胶原(COL1A1)基因位点定点插入由 β -乳球蛋白基因启动子调控的人 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶(AAT)基因,成功得到了基因打靶的克隆羊,其中 AAT 的表达量为 650 $\mu\text{g}/\text{mL}$,远高于之前报道的 AAT 随机整合的转基因羊的表达量 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。基因打靶的克隆动物有 100% 的转基因效率,同时也能避开转录不活跃基因座,保证较高的表达量,是转基因动物的理想模型。但是,体细胞基因打靶技术却是一项非常艰难的工作,只是偶尔才能获得成功,原因在于体细胞能够传的代数非常有限,而且经药物筛选之后,细胞活力差,用这样的细胞来进行核移植实验,胚胎发育率低。另外,中靶细胞不能得以有效扩繁,鉴定工作难以在细胞水平上开展。因此,在基因功能研究、人类疾病模型建立等方面做出了巨大贡献的基因打靶技术,自 1985 年成功以来^[8],基本都是在小鼠 ES 细胞中进行。至今为止,能真正建立 ES 细胞系的动物只有小鼠和大鼠,且大鼠的基因打靶工作在其 ES 细胞系建立 2 年后便成功完成^[9]。因此,如果能得到大动物的 ES 细胞系,基因打靶工作可能就变得相对容易。为解决 ES 细胞难题,日本科学家开辟了新途径,2006 年,Yamanaka^[10]通过给体细胞转染有限的因子,使小鼠的体细胞重编程为诱导多能性干细胞(iPS),3 年之后,便有多数实验室报道了猪 iPS 细胞系的建立。虽然替代 ES 细胞还有许多工作需要突破,但 iPS 细胞无疑给大动物的基因打靶提供了新的发展思路。外源基因的随机整合给动物转基因带来了许多问题,而解决这一系列问题的必要途径是:将外源基因的随机整合改变为定点打靶,这还需要很长一段路要走。

1 发展中的(新型)转基因技术

1.1 精子载体法

精子载体法继显微注射之后,最简单易行的方法,可对大量的精子细胞进行处理,且不损伤卵母细胞,在短时间内便能生产出转基因胚胎,但是该方法存在一个假设的前提,认为大多数物种的精子都有一定的摄取外源 DNA 的能力,可以通过受精过程把外源基因导入到受精卵中。1989 年,意大利的 Lavitrano 等^[11]报道了通过精子介导,成功获得转氯霉素乙酰转移酶基因(CAT)的转基因小鼠。但随后很多实验室无法重复出 Lavitrano 报道的结果。有研究还显示,外源 DNA 并未整合到宿主的基因组中,而是以附加体的形式存在于染色体之外,由于在正常的细胞有丝分裂中,附加体丢失的机率很高,因此,很多研究者认为精子载体法并不是一种行之有效的转基因方法。精子载体法还需进一步的研究和改进,以提出更能让人信服的理论支持和实验证据。

1.2 慢病毒载体技术

慢病毒载体的研究起始于细胞转染和基因治疗。2002 年,Lois 构建了转移质粒 pFUGW,将其与包膜蛋白质粒 P Δ 8.9、包装质粒 pVSV-G 共转染 293T 细胞,获得重组病毒液,再将其注入受精卵周隙中,成功制备了转基因小鼠和大鼠,其中 86% 为阳性,阳性中 90% 能高效表达绿色荧光蛋白^[12]。慢病毒载体的优点是效率非常高,是其他方法的上百倍,缺点是插入外源基因的容量有限(小于 8.5 kb),另外,安全性也是公众经常讨论的话题。目前,转基因鸡的制备主要采用慢病毒载体技术。

1.3 转座子介导的基因转移

转座子的突出代表是 Sleeping Beauty(SB)和 PiggyBac(PB)。SB 是一个“沉睡”了 1000 万年的鲑鱼

转座系统,1997年,Ivics^[13]利用生物信息学方法恢复了其转座活性,因此成为第一个被证明在哺乳动物细胞中有转座活性的DNA转座子。PiggyBac则来源于鳞翅目昆虫,2005年,丁晟等^[14]首次报道该转座子能在哺乳动物细胞和小鼠中高效转座,并成功培育出带有荧光的转基因小鼠。转座子的优势主要在于整合效率高、承载容量相对较大、易于确定整合位点等。

1.4 RNA 干扰及锌指核酸酶介导的基因敲除技术

RNA 干扰(RNAi)技术是利用一些19~23 nt的小双链RNA来高效、特异地阻断体内特定基因的表达,并促使mRNA降解,使其无法翻译出目的蛋白,从而使细胞或个体表现出特定基因缺失的表型。用人工合成的siRNA转染细胞或早期胚胎,可产生高达90%的瞬时基因敲除效果,如果要获得持久稳定的基因敲除效果,则可将siRNA设计成shRNA形式,并使其整合到宿主基因组中^[15]。目前,利用慢病毒载体携带的shRNA成功敲除了猪的PERV基因,也实现了在牛胚胎中敲除朊蛋白基因。与常规敲除技术相比,RNAi介导的基因敲除省去了费时的细胞筛选工作和冗长的动物培育过程,有效地提高了制作基因敲除动物的效率,在动物新品种培育中显示出强大的实力。

锌指核酸酶(ZFN)是由一个DNA识别域和一个非特异性核酸内切酶组成。此酶N末端为锌指蛋白DNA结合域,由一系列Cys2-His2锌指蛋白串联组成,每个锌指蛋白识别并结合一个特异的三联体碱基。C末端为非特异性核酸酶FokI结构域,FokI只在二聚体状态时才有酶切活性。锌指核酸酶能在DNA的特定位置发生双链断裂,从而启动了天然的DNA修复机制,致使目标DNA序列发生缺失、移码等突变,介导了基因敲除的发生^[16]。锌指核酸酶技术大大提高了打靶效率(由原来的 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ 提高到 $10^{-1} \sim 10^{-2}$)。不过,该技术一直被Sigma公司所垄断,而从该公司订购一套设计好的锌指核酸酶,价格极其昂贵。

2 转基因技术在农业领域的应用

转基因是将非自身外源基因导入受体之内,并使其正确表达的技术。转基因动物技术有可能成为未来提高和改良家畜经济性状的高效育种手段,然而这一技术目前尚存在诸多问题需要解决,主要是外源目的基因整合率低、表达率低、传代丢失和引起转基因动物畸形等。目前人们对转基因动物应用于家畜育种的希望主要有4个方面:1)通过转生长发育调控基因,提高家畜的生长发育潜力,如转生长激素基因动物以获得不同程度的生长力提高;2)通过转基因提高家畜抗性——抗病力和适应性;3)通过转外源基因给家畜引入新的代谢途径,提高或改善家畜利用某种物质或营养成分的能力;4)利用转基因技术改善畜产品品质,修饰乳蛋白结构、增加乳中的营养物质组分、提高牛乳营养价值。

2.1 提高动物生长速率

生长激素(GH)基因是动物转基因研究中适用最早,也是迄今使用最为频繁的基因。转生长激素基因猪、羊、鱼问世及其对经济性状提高给人们以极大的鼓舞。1985年,Harmmer等^[4]将人的生长激素基因显微注入猪的受精卵中,获得了转基因猪,其与同窝非转基因猪比较,生长速度显著提高,饲料利用率提高17%,胴体脂肪明显减少。Pursel等^[17]将牛的生长激素基因转入猪,生产出2个猪的家系,其生长速度提高11%~14%,饲料转化率提高16%~18%。值得一提的是,Du等^[18]将用抗冻蛋白基因启动子来调控鱼生长激素,获得了的转基因大西洋鲑鱼,生长周期缩短了一半,体重增加了2~6倍,该鱼已由美国AquaBounty公司培育成功,并通过了部分检测机构的认证,将有可能成为第一个被端上餐桌的转基因动物食品。

肌肉生长抑制素(Myostatin)是影响畜禽瘦肉率、改善肉质性状的另一重要基因。敲除了小鼠的该基因C端生物活性区,纯合突变体小鼠比杂合体或野生型小鼠重约30%,骨骼肌比野生型小鼠多2~3倍,骨骼肌肌纤维数目比野生型高86%,可见肌肉的增重既有肌细胞的增生,也有肌纤维的肥大^[19]。Myostatin抑制肌肉生长发育的功能也在选育品种“比利时蓝”和“皮尔蒙特”牛中得到验证。“比利时蓝”具有十分强壮的骨骼肌,其骨骼肌数量是其他品种的4倍,研究表明,“比利时蓝”牛的Myostatin基因外显子Ⅲ缺失11 bp,造成移码突变,使缺失突变后面的第14位密码子变为终止密码,合成无功能的Myostatin蛋白。而“皮尔蒙特”牛中检测到2个点突变,导致Myostatin功能全部丧失,这些研究表明,肉牛的“双肌”现象是由于在骨骼肌细胞中缺少Myostatin蛋白抑制作用的缘故。该基因的突变应用到

猪、羊中的效应还有待进一步研究。

2.2 提高动物抗病能力

流感病毒可感染多数禽类及哺乳动物,而小鼠可以有选择性地抗流感病毒的侵染,研究表明这种抗性与其 Mx1 基因的表达有关。Garber 等^[20]克隆了小鼠 Mx1 基因的有义链和反义链,并转染鸡胚胎成纤维细胞,结果表明,转染了有义链的鸡胚胎成纤维细胞对人流感、禽流感病毒具有抵抗作用。1992 年, Berm 获得了转小鼠抗流感基因的猪,从而增强其对流感病毒的抵抗能力。

绵羊髓鞘脱落病毒(Visna)是绵羊慢病毒属的典型代表,后者可导致绵羊脑炎、肺炎、关节炎等。Visna 病毒产生的衣壳蛋白对于病毒与宿主细胞的粘着以及之后发生的融合具有重要作用。1994 年, Clements 等^[21]将 Visna 病毒的衣壳蛋白基因导入绵羊基因组中,并在血液中检测出 Eve 糖蛋白的免疫抗体,使转基因羊的抗病能力得到了明显的提高。

2000 年, Kerr 等^[22]将溶葡萄球菌酶基因转入小鼠乳腺中,用来防治由金黄色葡萄球菌引起的乳腺炎,结果表明,表达量高的小鼠乳腺具有明显的抗性,这对于防治奶牛乳腺发炎具有潜在的应用前景。2005 年, Donovan 等获得乳腺中表达溶葡萄球菌酶的转基因牛,经检测转基因牛被葡萄球菌感染的概率仅为 14%,而非转基因牛而非转基因牛对照的感染率达 71%。

2006 年,美国科学家 Maga 等^[23]培育出在乳腺中特异表达人溶菌酶的转基因山羊,表达水平达 270 mg/L,奶样饲喂仔猪试验表明,含重组人溶菌酶的奶样能显著减少仔猪胃肠道的大肠杆菌等细菌数,从而证明转基因山羊奶可用于预防仔猪腹泻等疾病。

动物传染性海绵状脑病(TSE)是危害畜牧业及人类健康的重大疫情之一,该病在牛中称为“疯牛病”,在羊中称为“瘙痒病”,其病因均为 PRNP 基因编码的朊蛋白的错误折叠。研究表明,PRNP 基因敲除小鼠发育正常且不会感染疯牛病^[24],因此,如果将牛和羊的 PRNP 基因敲除,将对畜牧业生产和人类健康起着积极的作用。2001 年, Denning 等^[25]首次获得了 4 只 PRNP 基因敲除的羔羊,2004 年, Kuroiwa^[26]获得了 PRNP 敲除牛,2007 年, Richt^[27]获得了 PRNP 基因双位点敲除牛,同年, Golding 等^[28]首次获得了 RNA 干扰介导的 PRNP 基因敲除羊。这种转基因牛、羊将不携带传染性的朊蛋白,给无“疯牛病”及“羊瘙痒病”种群提供了优秀的种质资源。

2.3 提高动物肉类风味

2004 年日本 Saeki K 等^[29]将菠菜 $\Delta 12$ 去饱和酶基因转入猪体内,成功培育 6 头转基因猪,其体内的不饱和脂肪酸要比一般猪高大约 20%。2004 年, Kang 等^[30]将线虫的 fat-1 基因转入小鼠中,2006 年, 赖良学等^[31]获得了转线虫 fat-1 基因的体细胞克隆猪, fat-1 基因的表达可将 $\omega-6$ 转化成 $\omega-3$ 多不饱和脂肪酸,这大大提升了猪肉的营养价值,对治疗人类心率失常、癌症以及提高免疫力有着积极的作用。

2.4 提高羊毛产量和品质

1996 年,新西兰科学家 Damak 等^[32]培育出 IGF-1 转基因绵羊,其转基因子代净毛平均产量比其非转基因半同胞提高了 6.2%。1998 年, Bawden 等^[33]将毛角蛋白 II 型中间细丝基因导入绵羊基因组,并使其在皮质中特异表达,结果转基因羊毛光泽亮丽,羊毛脂的含量得到明显的提高。2005 年,澳大利亚科学家 Amdas 等^[34]将生长激素基因转入绵羊基因组中,发现转基因羊的生长速度和羊毛质量均较对照组显著提高。

2.5 改善牛奶成分:“人源化”牛奶

牛乳及其各种加工品是改善人类健康水平,提高生活质量的重要营养来源。牛乳的与人乳具有较大的差异,不能完全适合人类的营养需求。大约有 70% 的人不能很好地消化牛奶中的乳糖,导致乳糖不耐受症;牛乳中 β -乳球蛋白是婴儿牛乳过敏症的主要致敏原,消除致敏原是婴儿配方奶粉亟待解决的问题;在营养与保健方面,具有重要生理功能的 α -乳清蛋白、乳铁蛋白和溶菌酶等成份,其在牛乳中的含量显著低于人乳。改善牛乳品质,使之更接近于人乳,即“人源化”牛奶,必将极大的提高人类生活质量。2003 年, Brophy 等^[35]培育出 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白的转基因牛,使两种酪蛋白的含量分别提高了 20% 和 100%,两者均为是酪和酸奶制品的主要成分,将有利于促进乳品加工产业的发展。2002 年之后,中国农业大学陆续成功获得转人乳铁蛋白^[36]、人 α -乳清蛋白、人岩藻糖转移酶、人溶菌酶的

转基因奶牛,其中人乳铁蛋白表达量达到 $2 \sim 3.43$ g/L,人 α -乳清蛋白的表达量达到 1.55 g/L, β -乳球蛋白敲除牛也在试验当中,这些将为我国的“人源化牛奶”产业化奠定了重要的基础。

3 转基因技术在生物医药的应用

3.1 作为生物反应器生产药物

2006年8月全球第一个通过乳腺生物反应器生产的药物——重组人抗凝血酶Ⅲ(商品名:ATryn)批准上市,标志着转基因技术在生物医药产业的发展进入到一个新的黄金时期,据美国Amy Brock咨询公司预测,到2013年全球重组蛋白药物销售额将达1600亿美元,其中重组抗体药物销售额将达370亿美元。

生物反应器制药是转基因动物的一个非常重要的用途,具有广阔的前景。虽然动物生物反应器类型很多,如血液、尿液、精液、蚕茧、蛋清、乳腺等,且均有成功表达活性蛋白的报道^[37],但乳腺是最为有效,也是目前国际上唯一证明可以达到商业化的生物反应器。因为乳腺具备理想生物反应器的诸多优点:1)表达产物生物活性高,且能够对重组蛋白质进行多种翻译后加工(包括 β -羟基化、糖基化、 γ -羧化酶等),生产的蛋白质生物活性高,非常接近天然产品;2)表达量大、成本低:产奶量高的动物多为食草动物,饲养成本低。乳房又是一种高效合成蛋白的器官,一头奶牛每年产奶 $8000 \sim 10000$ L。若奶中某种目的蛋白含量达 $1 \sim 10$ g/L,如胰岛素、干扰素、白细胞介素、促红细胞生成素等,则十几头牛的产量就可满足人类的需要。而饲养者只需为奶牛提供草料和适宜条件即可;3)产品易提纯、质量高:乳腺生物反应器的产品属纯生物制品,避免了其他生产方式的化学及生物毒素的污染,安全可靠;4)易产业化,可通过繁殖扩群,进行规模化生产。

与乳腺反应器相比,鸡蛋反应器开发相对较晚,技术相对滞后和单一,但由于鸡个体小、繁殖快,从鸡蛋中提取药物蛋白相对简单,因此,鸡蛋反应器也逐步成为开发药用和营养蛋白的一种有效途径。2002年,Harvey等^[38]获得了 β -内酰胺酶转基因鸡,2007年,罗斯林研究所取得突破,培育出两种蛋清特异表达的转基因鸡品系,一种可从蛋清中提取人体干扰素(IFN- β -1a),另一种可提取可治疗皮肤癌的单克隆抗体(miR24)^[39]。鸡蛋反应器的限制因素在于转基因鸡是嵌合体,表达量受到限制,如果这一问题得到解决,市场上将很快出现具有防心血管病、抗癌等效用的“营养蛋”、“保健蛋”。

3.2 建立诊断、治疗和新药筛选的人类疾病动物模型

转基因动物疾病模型即通过精确的引入或者失活与人类疾病及病原体相关基因的表达,使转基因动物产生与人类相似的疾病,在发病机理、药物筛选和基因治疗等方面的研究中发挥着巨大用途。2008年,Roger等^[40]人通过基因敲除技术构建了囊性纤维化双等位基因敲除的疾病模型猪(CFTR-/-),这是首个除小鼠以外的人类遗传性疾病基因打靶的哺乳动物模型。通过临床诊断、电生理学及病理学检测方法分析新生CFTR-/-幼猪,发现其能很好模拟人类新生儿囊性纤维化症状,为囊性纤维化等疾病防控的研究带来了曙光。2009年,Kragh等^[41]利用徒手克隆技术建立了7头人类老年痴呆症小型猪的疾病模型。目前,已建立的疾病模型有癌症、动脉粥样硬化、镰状细胞性贫血和免疫缺陷等,主要用于人类遗传性疾病的研究,这些模型的建立对人类认识、预防和治疗疾病有着不可替代的作用。

新开发的药品用于人体之前首先要进行动物试验,但许多疾病都没有合适的动物模型来进行药物评价。利用转基因动物则可建立敏感动物品系及与人类相同疾病的动物模型,用于新药的筛选。如Mehtali等建立了表达HIV-1-Tat基因的转基因小鼠模型,用于体内筛选抗艾滋病病毒药物,Okuma等构建了表达白介素-4的转基因小鼠模型,用于筛选对抗HIV-1的免疫治疗制剂。目前,人们已获得的动物疾病模型约有400种,其中制备的基因敲除转基因动物疾病模型约有310种,基因过量表达的动物模型约有40种,具有极大的推广和应用前景。

3.3 生产可用于人体器官移植的动物器官

异种器官移植是解决世界范围内器官短缺的有效途径。目前,科学家认为猪器官是最理想的异种供体器官,主要原因是猪的器官大小与人的相似,解剖结构和生理指标相近,且不存在伦理学方面的问题。然而器官移植时出现的超急性排斥反应极大地阻碍了这一进程,利用转基因技术改造异种来源器官的遗传性状,使之能适用于人体器官或组织的移植,是解决移植短缺的最有效途径。Rosengard等将

人的补体抑制因子、衰退加速因子(hDAF)转移至猪基因组中,有 27 头转基因猪在其内皮细胞、血管平滑肌和鳞状上皮细胞等不同程度地表达了 hDAF^[42],这可以解决器官移植中的超敏排斥反应,为异种器官移植展示了良好的前景。赖良学和 Dai 等结合基因打靶和体细胞核移植技术,以敲除 $\alpha-1,3$ 半乳糖转移酶基因的体细胞作为核供体,成功地获得了 $\alpha-1,3$ 半乳糖转移酶基因敲除的克隆猪^[43-44]。 $\alpha-1,3$ 半乳糖能被人体免疫细胞所识别,引发排斥反应,将该基因敲除后,可直接阻止猪细胞表面 $\alpha-1,3$ 半乳糖的存在,从而消除了猪作为人类器官供体的一个主要障碍,推动了器官移植的发展与应用。

4 利用转基因动物生产生物材料

用动物乳腺生产工业蛋白质(如蛛丝蛋白)是转基因动物应用的一个新领域。蜘蛛丝是最为坚韧且有弹性的天然动物纤维,具有优异的机械特性,能耐腐蚀、耐低温、抗酶解等特性。2003 年,加拿大 NEXIA 公司的研究人员将蜘蛛体内的牵丝蛋白基因转入山羊基因组中,培育出乳腺特异表达牵丝蛋白的转基因山羊,该人造蜘蛛丝比钢还强 4~5 倍,被称作“生物钢”^[45]。这种人造蜘蛛丝既有蚕丝的质感和光泽,且弹性极强,可以用来制造手术缝线,耐磨服装,还能制成柔软的防弹衣。该重组蛋白将在医疗、军事、建材、航天、航海等工业市场发挥着广阔的应用前景。

5 转基因动物在环保方面的应用

动物粪便产生的磷污染在农业和环境保护上一直是个棘手的问题。加拿大科学家将大肠杆菌植酸酶基因与小鼠唾液腺特异表达的启动子结合,培育出一种“环保猪”,该猪唾液能分泌植酸酶,可有效地消化饲料中的植酸磷,使其粪便含磷量减少了 75%,这对环保大有裨益^[46]。

6 转基因动物在生物反恐中的应用

生化武器是指以细菌、病毒、毒素等使人、动物、植物致病或死亡的物质材料制成的武器。它包括生物武器(如炭疽热、天花、Q 热)和化学武器(如光气、氯气、芥子气、路易氏毒气)。作为一种大规模杀伤性武器,当其被恐怖分子利用时,对社会构成了巨大的威胁。神经毒剂是有机磷毒剂的一种,后者还包括沙林、梭曼、塔崩毒气等,它们经由皮肤吸收进入血液循环,再到大脑和肌肉,造成肌肉严重抽搐而死亡。重组人丁酰胆碱酯酶(商品名:PROTEXIA[®])是人体血液中的一种天然蛋白,其像海绵一样吸附有机磷毒剂,并将其降解,解除神经损伤。2007 年,Huang 等^[47]制备了乳腺特异表达重组人丁酰胆碱酯酶的转基因山羊,表达量为 0.1~5 g/L,为其商品化奠定了基础。

炭疽杆菌是一种革兰氏阳性菌,当其以孢子状态存在时,生命力极强,在生化武器中常以雾化形式释放。此菌在萌发时产生 3 种毒素,炭疽保护性抗原(PA)粘附于感染者的细胞表面导致发病,致死因子(LF)和水肿因子(EF)进入细胞,致使组织及脏器发生坏死和高度水肿。治疗性的抗炭疽单克隆抗体(商品名:Valortim[®])能中和炭疽保护性抗原,保护细胞收到炭疽毒素的破坏。重组炭疽 PA 抗原疫苗(商品名:SparVax[™])则是现今炭疽疫苗的升级版,更加安全和有效。PharmAthene 公司生产的这 3 种药品将在生物反恐中起到积极的作用。

7 结 语

动物转基因技术是现代生物技术的一部分,是在分子生物学基础上建立的创建新生物类型或新生物机能的实用技术。动物转基因技术从 1980 年诞生至今,已从单一的显微注射发展成为多种方法融合的整体技术,并涉及农业、生物医药、生物材料等诸多领域,展示了广阔的应用价值与前景。但是,动物转基因技术自身还不完善,其随机整合、表达不稳定等现象有待科学的进一步突破。同时,随着转基因产品逐渐获得应用,转基因生物及其产品对生物多样性及人体自身健康的潜在风险也越来越受到人们的关注,需要科学合理的评价,才能获得广大消费者的认可。所以,今后应重点发展以下几项:(1)转基因动物新品种培育,集中支持市场前景大、技术成熟度好的转基因动物新品种研发和产业化推进,加快转基因动物新品种产业化;(2)加快推广动物分子育种,积极推动基因和分子标记在新品种培育中的应用推广,尽快将我国已经掌握的高新技术应用于生产实际,进一步支持高产抗病优质牛、羊、猪、禽、特种

动物和水产等良种选育和应用 增加畜牧业、水产养殖业的经济效益; (3) 积极拓展动物生物反应器等新型产业。动物生物反应器是最新一代生物制药和功能性保健食品生产技术, 与现代生物发酵制药技术相比, 效率可以提高上百倍, 对拓展畜牧业产业链、提高畜牧业附加值、实现我国生物制药跨越式发展具有重要意义。我们坚信, 随着对转基因动物研究的不断深入、成熟, 转基因动物及其产品必将可以投入大规模商业化生产, 转基因技术这一有力武器也将使现代生活水平提上一个新台阶。

参考文献:

- [1] Jaenisch R. Germ line integration and mendelian transmission of the exogenous moloney leukemia virus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976, 73: 1260 – 1264.
- [2] Gordon J W, Scangos G A, Plotkin D J, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980, 77: 7380 – 7384.
- [3] Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallo-thionein – growth hormone fusion genes [J]. *Nature*, 1982, 300: 611 – 615.
- [4] Hammer R E, Pursel V G, Rexroad C E, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection [J]. *Nature*, 1985, 315: 680 – 683.
- [5] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [J]. *Nature*, 1997, 385: 810 – 813.
- [6] Schnieke A E, Kind A J, Ritchie W A, et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts [J]. *Science*, 1997, 278: 2130 – 2133.
- [7] McCreath K J, Howcroft J, Campbell K H, et al. Production of gene – targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells [J]. *Nature*, 2000, 405: 1066 – 1069.
- [8] Thomas K R, Capecchi M R. Site – directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo – derived stem cells [J]. *Cell*, 1987, 51: 503 – 512.
- [9] Tong C, Li P, Wu N L, et al. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells [J]. *Nature*, 2010, 467: 211 – 213.
- [10] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126: 663 – 676.
- [11] Lavitrano M, Camaioni A, Fazio V M, et al. Sperm Cells as Vectors for Introducing Foreign DNA into Eggs – Genetic – Transformation of Mice [J]. *Cell*, 1989, 57: 717 – 723.
- [12] Lois C, Hong E J, Pease S, et al. Germline transmission and tissue – specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors [J]. *Science*, 2002, 295: 868 – 872.
- [13] Ivics Z, Hackett P B, Plasterk R H, et al. Molecular reconstruction of Sleeping beauty, a Tc1 – like transposon from fish, and its transposition in human cells [J]. *Cell*, 1997, 91: 501 – 510.
- [14] Ding S, Wu X, Li G, et al. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice [J]. *Cell*, 2005, 122: 473 – 483.
- [15] Plasterk R H A. RNA silencing: The genome's immune system [J]. *Science*, 2002, 296: 1263 – 1265.
- [16] Hockemeyer D. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc – finger nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27: 851 – 857.
- [17] Pursel V G, Pinkert C A, Miller K F, et al. Genetic engineering of livestock [J]. *Science*, 1989, 244: 1281 – 1288.
- [18] Du S J, Gong Z Y, Fletcher G L, et al. Growth Enhancement in Transgenic Atlantic Salmon by the Use of an All Fish Chimeric Growth – Hormone Gene Construct [J]. *Bio – Technology*, 1992, 10: 176 – 181.
- [19] McPherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF – beta superfamily member [J]. *Nature*, 1997, 387: 83 – 90.
- [20] Garber E A, Chute H T, Condra J H, et al. Avian cells expressing the murine Mx1 protein are resistant to influenza virus infection [J]. *Virology*, 1991, 180: 754 – 762.
- [21] Clements J E, Wall R J, Narayan O, et al. Development of Transgenic Sheep That Express the Visna Virus Envelope Gene [J]. *Virology*, 1994, 200: 370 – 380.
- [22] Kerr D E, Plaut K, Bramley A J, et al. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 66 – 70.

- [23]Maga E A , Cullor J S , Smith W , et al. Human lysozyme expressed in the mammary gland of transgenic dairy goats can inhibit the growth of bacteria that cause mastitis and the cold – spoilage of milk [J]. *Foodborne Pathog Dis* 2006 3: 384 – 392.
- [24]Bueler H , Aguzzi A , Sailer A , et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie [J]. *Cell* 1993 73: 1339 – 1347.
- [25]Denning C. Deletion of the alpha(1 3) galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep [J]. *Nat Biotechnol* 2001 19: 559 – 562.
- [26]Kuroiwa Y , Kasinathan P , Matsushita H , et al. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin – mu and prion protein in cattle [J]. *Nat Genet* 2004 36: 775 – 780.
- [27]Richt J A. Production of cattle lacking prion protein [J]. *Nature Biotechnology* 2007 25: 132 – 138.
- [28]Golding M C , Long C R , Carmell M A , et al. Suppression of prion protein in livestock by RNA interference [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 103: 5285 – 5290.
- [29]Saeki K. Functional expression of a Delta12 fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 101: 6361 – 6366.
- [30]Kang J X , Wang J , Wu L , et al. Transgenic mice: fat – 1 mice convert n – 6 to n – 3 fatty acids [J]. *Nature* 2004 427: 504.
- [31]Lai L X. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega – 3 fatty acids [J]. *Nature Biotechnology* 2006 24: 435 – 436.
- [32]Damak S , Su H Y , Jay N P , et al. Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin – like growth factor 1 [J]. *Bio – Technology* 1996 14: 185 – 188.
- [33]Bawden C S , Powell B C , Walker S K , et al. Expression of a wool intermediate filament keratin transgene in sheep fibre alters structure [J]. *Transgenic Res* 1998 7: 273 – 287.
- [34]Adams N R , Briegel J R. Multiple effects of an additional growth hormone gene in adult sheep [J]. *Journal of Animal Science* 2005 83: 1868 – 1874.
- [35]Brophy B , Smolenski G , Wheeler T , et al. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta – casein and kappa – casein [J]. *Nat Biotechnol* 2003 21: 157 – 162.
- [36]Yang P. Cattle mammary bioreactor generated by a novel procedure of transgenic cloning for large – scale production of functional human lactoferrin [J]. *PLoS One* 2008 3: e3453.
- [37]Houdebine L M. Transgenic animal bioreactors [J]. *Transgenic Res* 2000 9: 305 – 320.
- [38]Harvey A J , Speksnijder G , Baugh L R , et al. Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens [J]. *Nat Biotechnol* 2002 20: 396 – 399.
- [39]Lillico S G. Oviduct – specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2007 104: 1771 – 1776.
- [40]Rogers C S. Production of CFTR – null and CFTR – DeltaF508 heterozygous pigs by adeno – associated virus – mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer [J]. *J Clin Invest* 2008 118: 1571 – 1577.
- [41]Kragh P M. Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer’s disease – causing dominant mutation APPsw [J]. *Transgenic Res* 2009 18: 545 – 558.
- [42]Rosengard A M , Cary N R , Langford G A , et al. Tissue expression of human complement inhibitor , decay – accelerating factor , in transgenic pigs. A potential approach for preventing xenograft rejection [J]. *Transplantation* 1995 59: 1325 – 1333.
- [43]Dai Y. Targeted disruption of the alpha1 3 – galactosyltransferase gene in cloned pigs [J]. *Nat Biotechnol* 2002 20: 251 – 255.
- [44]Lai L. Production of alpha – 1 3 – galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning [J]. *Science* 2002 295: 1089 – 1092.
- [45]Lazaris A , Arcidiacono S , Huang Y , et al. Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells [J]. *Science* 2002 295: 472 – 476.
- [46]Golovan S P. Pigs expressing salivary phytase produce low – phosphorus manure [J]. *Nat Biotechnol* 2001 19: 741 – 745.
- [47]Huang Y J. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 104: 13603 – 13608.