

转基因克隆动物

理论与实践

(第一版)

郑月茂 等 编著



科学出版社

转基因克隆动物 理论与实践

郑月茂等 编著

科学出版社

北京

内 容 简 介

转基因克隆技术是目前生物技术领域的前沿高新技术,它是在体细胞克隆的基础上,集成基因工程等多项技术发展起来的一项多学科交叉的高新技术。本书介绍了基因与基因工程、动物克隆技术和理论、动物转基因技术、目的基因的分离、转基因细胞的制备、卵母细胞体外成熟、胚胎体外培养和冷冻保存、转基因克隆胚胎移植与附植、转基因动物的检测和安全评价等方面的内容。

本书可作为本科及研究生教学和科研参考用书,亦可供高等院校生命科学、生物工程、生物制药、生物化工等专业的师生及科研人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

转基因克隆动物理论与实践 / 郑月茂等编著. — 北京:
科学出版社, 2012. 4
ISBN 978-7-03-033970-6

I. ①转… II. ①郑… III. ①转基因动物—克隆—研究 IV. ①Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 060726 号

责任编辑: 杨 岭 韩 铭 封面设计: 陈思思

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号
邮政编码: 100717
<http://www.sciencep.com>

四川煤田地质制图印刷厂印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年4月第一版 开本: 720×1000 B5

2012年4月第一次印刷 印张: 19.25

字数: 320 000

定价: 76.00 元

编著委员会

主 编：郑月茂

副主编：赵晓娥

编著人员：刘 军

邱 爽

赛务加甫

张雅蓉

徐永平

贺小英

茹 坤

安志兴

孔叶子

何小宁

张翊华

权富生

李 珍

殷松娜

党永辉

王永胜

前 言

21 世纪是生命科学的世纪，转基因克隆技术是目前生物技术领域的前沿高新技术，它是在体细胞克隆的基础上，集基因工程等多项技术发展起来的一项多学科交叉的新技术。转基因动物是借助基因工程技术将外源基因导入受体动物基因组中，使外源基因在体内表达，并能够稳定地遗传给后代的动物。转基因动物的科研价值、社会效益和经济效益逐渐显现，并已经在养殖业、医学、环境保护等领域显示了广阔的应用前景。

为了传播转基因克隆动物的知识和技术，促进转基因克隆动物的研究和应用，我们编写了这本书。本书分绪论和正文两部分，绪论介绍了转基因动物的原理、转基因动物研究进展和转基因克隆动物的研究意义；正文介绍了基因与基因工程、动物克隆技术和理论、动物转基因技术、目的基因的分离、转基因细胞的制备、卵母细胞体外成熟、胚胎体外培养和冷冻保存、转基因克隆胚胎移植与附植、转基因动物的检测和安全性评价。在本书编写过程中，我们查阅参考了他人的著作或论文，在此对原作者表示衷心的感谢和深深的敬意！

本书主编负责构思、整体编排、统稿及最后审核和定稿，并负责出版事宜，同时负责大部分章节的编写；其他各位编委分别参编了部分内容。具体分工如下：郑月茂——绪论和第 3 章；郑月茂、徐永平、张翊华、党永辉、赛务加甫、安志兴、权富生、王永胜、张雅蓉、殷松娜、邱爽、茹坤、孔叶子和李珍——第 1 章；郑月茂、赵晓娥和贺小英——第 2 章；郑月茂和贺小英——第 4 章；郑月茂、何小宁和贺小英——第 5 章；赵晓娥和郑月茂——第 6 至第 8 章；贺小英和刘军——第 9 章。

本书可作为本科及研究生教学和科研参考用书，可供高等院校生命科学、生物工程、生物制药、生物化工等专业的师生及科研人员使用。期望本书对热爱生命科学，对克隆与转基因有兴趣的广大科教人员和学生有所启发和帮助。如果书中有疏漏、不妥甚至错误之处，诚请各位批评指正。

郑月茂

2011 年 10 月 2 日

• i •

目 录

前言

绪论	(1)
第 1 章 基因与基因工程	(13)
1.1 基因	(13)
1.1.1 基因的基本结构特征	(14)
1.1.2 基因表达调控	(17)
1.1.3 基因打靶与基因沉默	(33)
1.2 基因工程	(35)
1.2.1 基因工程定义	(36)
1.2.2 基因工程工具酶	(36)
1.2.3 基因克隆载体	(38)
1.2.4 基因工程基本操作步骤	(52)
1.2.5 基因工程历史	(54)
1.2.6 基因工程应用	(55)
第 2 章 动物克隆技术和理论	(63)
2.1 动物克隆技术发展简介	(63)
2.1.1 动物胚胎分割技术	(63)
2.1.2 动物细胞核移植技术	(64)
2.2 动物克隆技术的基本原理	(66)
2.2.1 胚胎分割的基本原理	(66)
2.2.2 细胞核移植的基本原理	(67)
2.3 动物克隆技术	(67)
2.3.1 显微操作器械	(67)
2.3.2 胚胎分割	(68)
2.3.3 细胞核移植	(69)
2.4 动物克隆理论	(75)
2.4.1 受体胞质对供体核的重编程	(76)

2.4.2	核质互作	(81)
2.4.3	核移植的线粒体问题	(81)
2.4.4	哺乳动物的表观遗传学调控	(82)
2.4.5	DNA 甲基化与动物克隆	(87)
2.4.6	基因组印记与动物克隆	(91)
2.5	小结	(97)
第3章	动物转基因技术	(98)
3.1	动物转基因技术和克隆技术的区别	(98)
3.2	动物转基因技术	(98)
3.2.1	原核期胚胎的显微注射技术	(99)
3.2.2	逆转录病毒载体侵染技术	(99)
3.2.3	慢病毒载体技术	(100)
3.2.4	精子载体技术	(101)
3.2.5	体细胞核移植技术	(102)
3.2.6	ES 细胞介导技术	(105)
3.2.7	胞内单精注射技术	(106)
3.2.8	受体介导的基因转移	(106)
3.3	动物转基因新技术研究进展	(107)
3.3.1	PGCs 技术	(107)
3.3.2	精原干细胞法	(108)
3.3.3	基因打靶技术	(108)
3.3.4	RNA 干扰 (RNAi) 介导的基因沉默技术	(113)
3.3.5	诱导多能干细胞转基因技术	(114)
3.3.6	人工染色体法	(116)
3.3.7	双顺反子条件表达转基因系统法	(119)
3.3.8	问题与展望	(119)
3.4	外源重组基因导入动物细胞的其他方式	(121)
3.4.1	电穿孔法	(121)
3.4.2	基因枪法	(121)
3.4.3	超声波法	(122)
3.4.4	磷酸钙或 DEAE-葡聚糖转染法	(122)
3.4.5	脂质体介导转化法	(122)
3.4.6	动物病毒介导转导法	(122)

3.5	提高转基因效率的策略	(123)
3.5.1	外源基因的整合机制	(123)
3.5.2	转基因表达载体的构建	(126)
3.6	转基因技术存在的问题	(130)
3.6.1	成本高、整合效率总体比较低	(130)
3.6.2	转基因表达水平低	(130)
3.6.3	难以控制转基因在宿主基因组中的行为	(131)
3.6.4	目的基因与动物生产性状的多基因矛盾突出	(131)
3.6.5	转基因动物及其产品的安全性问题	(131)
第4章	目的基因的分离	(133)
4.1	核酸的制备	(134)
4.1.1	DNA 的制备	(134)
4.1.2	RNA 的制备	(135)
4.1.3	人工合成核酸片段	(135)
4.1.4	核酸样品的分析与检测	(136)
4.2	基因文库的构建	(139)
4.2.1	原核生物基因组文库的构建	(140)
4.2.2	真核生物基因组文库的构建	(142)
4.2.3	cDNA 基因文库的构建	(146)
4.3	目的基因的分离	(153)
4.3.1	从基因文库中筛选分离目的基因	(153)
4.3.2	利用聚合酶链反应技术扩增目的基因	(158)
4.3.3	利用差示分析法分离目的基因克隆	(163)
4.3.4	应用基因定位克隆技术分离筛选目的基因	(164)
4.3.5	标签测序法分离目的基因	(165)
4.3.6	基因的酶法合成	(168)
第5章	转基因细胞的制备	(170)
5.1	受体细胞的类型	(171)
5.1.1	原核受体细胞	(171)
5.1.2	丝状真菌受体细胞	(171)
5.1.3	酵母受体细胞	(172)
5.1.4	动物受体细胞	(172)
5.2	重组基因导入原核受体细胞的主要途径	(174)

5.2.1	转化	(174)
5.2.2	转导	(174)
5.2.3	转染	(175)
5.2.4	电穿孔	(175)
5.2.5	三亲本杂交	(176)
5.3	重组基因导入动物受体细胞	(176)
5.4	重组子筛选	(177)
5.4.1	遗传表型直接筛选	(177)
5.4.2	依赖于重组子结构特征分析筛选	(181)
5.4.3	核酸分子杂交分析	(182)
5.4.4	免疫化学分析检测	(191)
5.4.5	PCR 筛选法	(194)
5.5	转基因细胞的检测	(195)
5.5.1	目的基因的整合检测	(195)
5.5.2	目的基因的表达检测	(197)
5.5.3	其他检测	(201)
5.5.4	转基因细胞的核型分析	(202)
第 6 章	卵母细胞体外成熟	(204)
6.1	卵母细胞发育生物学特性	(204)
6.1.1	卵泡发育和排卵	(205)
6.1.2	卵母细胞卵膜的发生发育	(207)
6.1.3	卵泡细胞在卵母细胞发育中的作用	(207)
6.1.4	卵母细胞发育及成熟过程中超微结构的变化	(207)
6.2	卵母细胞体外成熟	(210)
6.2.1	卵母细胞体外成熟培养概况	(211)
6.2.2	卵母细胞成熟的机理	(211)
6.2.3	卵母细胞成熟培养	(214)
6.2.4	影响卵母细胞体外成熟的因素	(219)
第 7 章	胚胎体外培养和冷冻保存	(225)
7.1	胚胎体外培养	(225)
7.1.1	简单化学限定培养液	(225)
7.1.2	共同培养系统	(226)
7.1.3	添加肽类生长因子的培养系统	(227)

7.1.4	早期胚胎体外发育的影响因素	(228)
7.2	胚胎冷冻保存	(230)
7.2.1	胚胎冷冻保存的发展简史	(230)
7.2.2	胚胎冷冻保存的意义	(232)
7.2.3	胚胎冷冻的基本原理	(232)
7.2.4	胚胎冷冻及解冻的基本方法	(238)
7.2.5	胚胎冷冻效果的鉴定	(245)
第8章	转基因克隆胚胎移植与附植	(247)
8.1	胚胎移植	(247)
8.1.1	胚胎移植概述	(247)
8.1.2	转基因克隆胚胎移植的准备	(251)
8.1.3	受体的同期发情	(253)
8.1.4	转基因克隆胚胎移植	(257)
8.2	附植	(262)
8.2.1	胚泡迁移、定位和植入	(262)
8.2.2	附植中的妊娠识别及其机理	(263)
第9章	转基因动物的检测和安全性评价	(266)
9.1	转基因动物的检测	(266)
9.1.1	外源基因存在的检测	(266)
9.1.2	外源基因拷贝数的检测	(266)
9.1.3	外源基因整合位点数的检测	(268)
9.1.4	外源基因整合位点基因组序列的检测	(268)
9.1.5	转基因表达的检测	(269)
9.1.6	转基因动物检测中存在的问题和展望	(270)
9.2	转基因动物的安全性评价	(271)
9.2.1	转基因动物安全性检测的内容和方式	(271)
9.2.2	转基因动物研究及其产品的安全性评价	(273)
9.2.3	转基因动物食品的安全性评价	(278)
参考文献		(286)

绪 论

转基因动物 (transgenic animal) 是借助基因工程技术将外源基因导入受体动物基因组中, 使外源基因在体内表达, 并能够稳定地遗传给后代的动物。转基因动物研究的基本特征是人类有目的、有计划地改变动物遗传组成, 从而赋予转基因动物新的表型特征。

体细胞克隆的成功为转基因动物生产掀起一场新的革命, 动物体细胞克隆技术为迅速放大转基因动物所产生的种质创新效果提供了技术可能。随着基因重组技术的发展, 人们不仅能够分离单一的基因序列, 而且可以体外合成需要的外源基因, 并将其转移到其他动物基因组中。采用简便的体细胞转染技术实施目标基因的转移, 可以避免家畜生殖细胞来源困难和低效率的缺陷。同时, 采用转基因体细胞系, 可以在实验室条件下进行转基因整合预检和性别预选。在核移植前, 先把目的外源基因和标记基因 (如 *lacZ* 基因和新霉素抗性基因) 的融合基因导入培养的体细胞中, 再通过标记基因的表现来筛选转基因阳性细胞及其克隆, 然后把此阳性细胞的核移植到去核卵母细胞中, 最后生产出的动物在理论上应是 100% 的阳性转基因克隆动物。

转基因克隆动物研究是动物生物工程领域中最诱人和最有发展前景的课题之一, 转基因克隆动物可作为医用器官移植供体和生物反应器, 还可用于家畜遗传改良和创建疾病实验模型等。

1. 转基因动物的原理

转基因动物指通过基因工程技术将目的基因导入生殖细胞、干细胞或体细胞 (利用克隆技术由转基因体细胞制作转基因动物), 并整合到受体细胞的基因组中, 它们经过各种发育途径形成所有细胞都包含目的基因的个体。导入的基因称为转基因 (transgene), 而整个技术则称为转基因技术 (transgenic technology)。利用转基因技术, 人们可以在动物基因组特定的位点引入所设计的基因突变, 模拟造成人类遗传性疾病的基因结构或数量异常; 可以通过对基因结构进行修饰, 在动物生长、发育的全过程研究体内基因的功能及其结构功能的关系; 可以在动物基因组引入病毒基因组以模拟病毒性疾病的发病过程; 可以通过引入具有重要药用价值蛋白的编码基因, 使动物成为该药物蛋白的生

产场所；可以将所引入的 DNA 片段作为环境诱变剂作用的靶向 DNA，通过对它回收后的结构分析，研究诱变剂造成的 DNA 损伤和诱发基因突变的规律。转基因动物技术不仅在生命科学研究中的应用越来越广，而且技术本身发展也越来越快，逐步逼近修饰的精确性与可调性。

从原理、技术及在生命科学研究领域中的应用来看，可将转基因动物研究大致分为以下 3 个部分：①上游部分，克隆目的基因，分析基因的结构并在体外或其他系统中进行功能研究；②中游部分，设计遗传修饰策略（包括载体系统的构建等），选择适当的靶细胞进行基因转移和鉴定，在此基础上将遗传修饰由细胞向整体动物过渡，实现对整体动物基因组进行人为修饰的目的；③下游部分，按育种程序进行工程动物的选育和建系，在整体动物的背景上对目的基因的功能进行详细的研究，并进一步开发利用符合设计要求的遗传工程动物。

转基因动物的遗传修饰策略包括：①导致产生新功能（gain of function, GOF）的基因组修饰，主要有普通转基因及基因重复。普通转基因指在基因组中转入一个能有效表达的基因，该基因可以是原基因组所没有的，也可以是有相应的内源基因的，还可以是结构发生了变化的内源基因等。基因重复指利用造成基因重复的基因打靶技术，在内源基因的邻近部位引入一个与内源基因含有相同调控序列的基因拷贝，而且原则上不破坏原基因邻近位点上的基因的结构。②导致功能丢失（loss of function, LOF）的基因组修饰，主要有插入突变、大片段缺失突变、点突变及条件性基因缺失突变。③导致基因替换的基因组修饰，主要利用基因打靶技术使替换位点上的内源基因被另一个基因取代，使得内源基因丢失的同时获得另外一个基因的功能，这种策略通常比较精确，不影响邻近位点基因结构。④染色体畸变。

2. 转基因动物研究进展

转基因动物研究一般认为是从 1971 年 Brackett 等利用精子将外源 DNA 转入兔卵母细胞开始的。1980 年 Gordon 用显微注射法将外源胸苷激酶基因转入小鼠基因组，首开转基因小鼠之先河。1982 年，Palmiter 等因成功地获得了转人生长激素基因的“硕鼠”而轰动了整个生命科学领域。1985 年，Lovell-Badge 首次提出用转基因动物乳腺生产重组蛋白的思路。自 1987 年 Gordon 将人组织纤维溶酶原激活剂（tPA）cDNA 与小鼠乳清酸蛋白（WAP）基因启动区构建融合表达结构首建乳腺生物反应器小鼠模型，至今 20 多年的时间，人 α -抗胰蛋白酶、人尿激酶等诸多重要蛋白质已得到有效表达。1996 年，克隆羊“多莉”（Dolly）的诞生，开创了哺乳动物细胞核移植的里程碑。随后，通过该

技术获得的可表达人凝血因子 VI 的转基因绵羊“波莉” (Polly) 诞生。2006 年 8 月全球第一个通过乳腺生物反应器生产的药物 ATryn 获准上市, 标志着转基因技术在动物农业和生物医药产业的发展进入到一个新的黄金时期。以转基因动物技术为核心的现代生物技术产业逐步形成, 并成为当今世界发展速度最快、最活跃的高新技术产业领域之一。

我国较大规模地进行转基因动物的研究与产业化开发始于 20 世纪 80 年代中后期, 由“863”计划资助, 同时也是“863”计划最早实施的高技术项目之一。现在我国已设立转基因重大专项。经过多年的努力, 取得了十分显著的成绩, 先后获得了生长速度快、瘦肉率高、对某些病毒有一定抗性的转基因猪, 在乳腺组织中能表达人药用蛋白凝血因子、人生长素、人红细胞生成素等的转基因羊, 有一定药用价值的牛等。

2002 年 10 月 13 日, 中国首例转基因克隆牛在深圳诞生, 但因喂奶不慎, 在降生 1 小时 20 分钟后因呛奶而不幸夭折。中国农业大学陈永福教授课题组用巨细胞病毒 (CMV) 启动的 *neo* 和 *gfp* 基因构件分别转染羊 (和牛) 的颗粒细胞后, 筛选得到阳性细胞后直接进行克隆, 体外发育的克隆囊胚均表达 *gfp* 基因。阳性胚胎移植到受体, 2000 年 2 只转基因克隆绵羊出生了。上海生物所用显微注射法将乙型肝炎表面抗原基因转移至兔胚胎, 获得转基因兔。中国科学院遗传与发育生物学研究所与扬州大学合作, 将促红细胞生成素基因和人乙型肝炎表面抗原基因导入山羊, 获得了两种乳腺特异性表达的转基因山羊。我国台湾畜产试验所联合台湾大学畜产系、中兴大学生命科学系和屏東科技大学兽医系与畜产系的研究也使克隆羊成功自然繁殖, 并且外源基因可传给下一代, 2002 年 7 月 5 日取自一头高泌乳量母羊的体细胞成功克隆了两头羊, 分别命名为“宝吉”和“宝祥”。在另一个试验中, 对来自和“宝祥”同一个先驱者母羊的体细胞, 外加了供治疗人类 A 型血友病用的第八凝血因子的外源基因, 在 2004 年 3 月 10 日也成功复制出台湾第一个确定带有外源基因的克隆羊, 取名“宝钰”。“宝钰”于 2004 年 11 月 26 日配种怀孕, 2005 年 4 月 25 日分娩, 产下一只小公羊, 而这只小公羊体内已检测出确定含有人类第八凝血因子的外源基因, 成功证明转基因的克隆动物也可以顺利成长、交配、怀孕和分娩。2003 年 10 月 17 日降生 4 天的世界上第一头转有人岩藻糖转移酶基因的体细胞克隆牛“岩娃”在其出生地山东省梁山县通过专家鉴定。“岩娃”开创了在同一头牛中转入 3 种不同外源基因 (人岩藻糖转移酶基因、绿色荧光蛋白基因和新霉素抗性基因) 的世界先例。2004 年, 利用精子载体法制备乳腺生物反应器的转基因兔模型获得成功。

2009年11月,由中国著名动物胚胎工程专家、西北农林科技大学张涌教授历时十年主持培育的世界第一例转人防御素基因克隆奶牛,于25日中午在陕西杨凌通过剖腹产降生;第二例转人防御素基因克隆奶牛于26日中午降生。它们均体质健壮,毛色光亮。

2010年12月19日,世界首例转基因克隆水牛在广西大学的科研基地金光乳业水牛场诞生,研发目的就是改良和培育新的水牛品种,提高水牛繁殖率、产奶量和抗病力。

内蒙古大学生命科学学院实验动物研究中心近年来在家畜体细胞克隆和转基因技术的研究方面也取得了突破,并于2005年成功培育出了2头体细胞克隆牛和1头转基因克隆牛。2009年长江学者李光鹏教授成功克隆出一批国际优质品种肉牛,并在肉羊、绒山羊、转基因绵羊、转基因牛等方面成功获得克隆个体。内蒙古大学生命科学学院实验动物研究中心刘东军研究员的研究团队于2010年2~3月共获得绒山羊羔羊17只,其中转基因克隆羔羊14只,体细胞克隆羔羊3只。

2011年5月10日石河子大学动物科技学院在转基因克隆绵羊领域取得重大突破,成功获得肌肉生长抑制素基因干扰的转基因克隆绵羊,取名“多多”。

到目前为止,获得的转基因动物有转基因猪、鸡、大鼠、猴、兔、绵羊、山羊及牛等。

3. 转基因克隆动物的研究意义

21世纪是以生命科学和信息科学为主导的世纪,生命科学将跃居自然科学的前沿。新世纪转基因生物、克隆技术的研究将日趋成熟,转基因生物和克隆动物在生产实践中的应用将会大大改善人类的生活条件和质量。体细胞动物克隆技术上取得的突破,不仅给人们的观念带来了很大的改变,而且也蕴藏着巨大商业价值和社会价值。动物克隆技术将首先应用于医药领域,用以生产各种医用人体蛋白,其次用于患者本人细胞培育出的新组织来治疗各种疾病,进行器官移植,可以避免产生免疫排斥,提高手术成功率。动物克隆技术还有助于加速动物育种的进程。利用优良动物品种的体细胞作为核供体克隆动物,可以避免自然条件下选种所受的动物实验周期和效率的限制,从而大大缩短育种年限,提高育种效率,同时,也可以考虑用动物克隆技术拯救濒危动物。在基础生物学研究中,转基因动物可用于研究真核细胞的基因转录和表达调控以及个体发育的分子调控规律,建立诊断和治疗人类疾病的动物模型。在生产中,转入生长激素基因或关键代谢酶基因,可以提高动物产品的生产效率和质量;在动物抗病育种中,可以提高动物对疾病的抵抗力;用动物血液或泌乳系统作为

生物反应器,生产药用蛋白或珍贵蛋白,目前已有多种具有生物活性的人类蛋白质可以从转基因动物的乳汁中获得,这些动物包括小鼠、大鼠、家兔、猪、羊等。此外,人类也期待通过转基因动物生产可用于人体器官移植的动物器官。

1) 转基因动物用于基因功能的基础生物学研究

通过转基因动物技术可以获得多种疾病的动物模型。疾病的动物模型为药物筛选、发病机理和临床医学研究提供了理想的实验动物体系,并能为诊断和开展治疗类似的疾病积累宝贵的资料。现已建立起的疾病动物模型有:癌症、肝炎、动脉硬化、淋巴系统病、镰刀状细胞贫血、红细胞增多症、心肌顿抑和老年痴呆症等。另外,转基因动物技术可用于基因调控机制和发育生物学的研究,如特异靶向沉默或插入某个基因,可以研究该基因的功能。另外该技术还可以应用于以下研究:①基因功能和调控机制的研究;②与癌症发生相关的基因活动的研究;③免疫系统的调控机制及其与细胞相互作用的研究;④作为人类遗传疾病的动物模型;⑤生长的控制及调控机制的研究;⑥动物发育的研究;⑦生物学和遗传学的基础机制的研究。转基因动物模型可按照人们的愿望进行设计和培育,其建立过程的本身就可进行疾病机理的研究。对于人们认识、预防和治疗疾病有着不可替代的作用,具有广泛的推广和应用前景。在未来的时间内,转基因动物的研究不会局限于生产某一种对农业或医学有重大经济价值的动物品系或品种,越来越多的研究将针对生物学本身。

2) 转基因动物在农业生产上的应用

(1) 培育生产性能高的动物新品种

利用转基因技术能在较短时间内培育出常规方法不能或需长期培育才能育成的品种或种群并提高动物的繁育速度。通过转基因技术,改变生长因子、生长因子受体和生长调节因子的表达,可以改变动物的生长速度。研究表明,增加生长激素的表达可以提高猪的生长速度和饲料利用率。利用调控序列控制人胰岛素样生长因子在猪骨骼肌内表达,发现雌性的脂肪量和厚度显著降低,然而雄性没有影响。生长因子肌肉抑制素是肌肉生长的负调节基因,在哺乳动物中非常保守,研究表明敲除小鼠肌肉抑制素基因,小鼠的体重显著增加。对于牛,该基因发生突变会产生双肌现象,因此适当抑制大动物肌肉抑制素基因的表达可以提高瘦肉产量。这些研究表明,通过转基因技术调节生长相关基因的表达,可以提高家畜的生长速度,增加单个动物的产品数量。通过转基因技术,改变动物消化道内酶的组成,提高动物饲料利用率,对畜牧生产极为有利。如含有植酸酶的转基因猪,可以显著提高日粮中植酸磷的吸收,饲养过程

中无需补加无机磷,同时粪便中磷的含量显著降低,降低了畜牧生产对环境的影响。澳大利亚将生长激素基因转入绵羊基因组中,获得的转基因羊生长速度比一般的绵羊快 1/3,体型大 50%。中国科学院水生生物研究所在世界上率先开展鱼类基因转移和育种工作,成功地将人生长激素基因导入鲤鱼的基因组中,所获得的转基因鱼能够有效表达人生长激素基因,并表现快速生长效应,有的转基因鱼在生长 9 个月后比对照鱼重 1.5 kg,后来又获得了转生长激素基因泥鳅、银鲫和镜鲤等。目前已将外源生长激素基因转移到多种经济动物中,获得了转基因牛、转基因兔和转基因马等。研究发现 ESR 和 *FecB* 基因与动物繁殖性能有关,Rothschild 等(1996)报道 ESR 基因与猪的产子数有关,在几种品系的猪中,该基因的突变可提高产子数。对绵羊的研究表明,*FecB* 基因是与生殖力相关的一个重要基因,可以提高排卵效率,每增加一个拷贝数,排卵效率提高 1.5 倍。含有适合拷贝数的 *FecB* 的转基因羊,其繁殖能力显著提高。通过转基因技术提高动物繁殖性能刚刚起步,随着与生殖力相关的基因被发现,培育高产的转基因动物对畜牧业生产有重要意义。

(2) 提高产品质量

为了生产更健康的转基因产品,研究人员利用去饱和酶提高动物肉中不饱和脂肪酸的含量,对减少人类冠心病和中风有潜在价值。而且来源于其他动物,对人类健康有利的脂肪酸,也可以用来生产转基因家畜品种,提高肉的风味。理论上,我们可以通过 DNA 重组技术,增加或减少奶中的各种成分。为了动物和人类健康,通过修饰奶的成分,可以生产出泌乳量更大、对人类更健康的转基因动物。奶的主要营养成分包括蛋白质、脂肪和乳糖。奶中的蛋白质种类很多,其中酪蛋白是最重要的营养成分,提高酪蛋白的含量可以改善奶的品质。通过转基因技术,成功提高牛乳中酪蛋白的含量,提高了牛乳的经济价值。乳球蛋白对人体不易吸收,通过敲除 β -乳球蛋白(β -Lactoglobulin)基因可以生产不含乳球蛋白的牛乳。研究发现,部分婴儿对乳糖有不良反应,因此可以通过敲除 α -Lactalbumin 基因,从而抑制乳糖的合成,生产不含乳糖的乳品。

(3) 培育具有抗病性能的动物新品种

应用基因工程和核移植技术可以在动物体内导入抗病基因或去除致病基因,以培育出具有抗病性能的动物新品种。传统的动物育种方法比如杂交育种具有培育周期长、成本高以及培育效率低等缺点。随着分子生物学研究的飞速进展,当今的育种科学已经进入基因工程育种的新阶段。我国高度重视基因工程育种的研究,并于 2007 年投入巨资成立转基因生物新品种培育科技重大专

项,以加速我国转基因生物新品种的研究。基因工程技术是实现动物抗病育种非常重要的手段。首先获取抗病基因并克隆,再将克隆的抗病基因导入动物基因组中获得能遗传的抗病个体,然后通过常规育种技术或体细胞克隆技术扩大群体,最终育成抗病品系。当前研究较多的抗性基因有 MHC 基因、T 细胞受体基因、免疫球蛋白基因、免疫相关基因和一些病原抗性的蛋白基因。总之,转基因抗病育种对畜牧业生产有重要作用,但该研究相对落后。一个原因是可选择的抗病基因较少,抗病机理研究不清;另一个原因是转基因动物生产成本极高,转基因安全评价复杂、周期长。随着国家转基因重大专项的实施,我国转基因动物的研究进展迅速,已经制备了多个抗病物种,但这些抗病动物能否用于生产,需要长期的安全性检测。

3) 转基因动物在生物医学领域的应用

(1) 生产药用蛋白和生物制品

利用细菌和酵母等生产的人体药用蛋白虽然成本较低,但是由于这些微生物不能进行精确地转录后加工,故不能合成众多的活性人体蛋白,而且哺乳动物细胞体外生产生物活性物质的价格极高。因此,全球众多生物技术公司利用转基因动物生物反应器生产药用蛋白和生物分子。通过利用特异性启动子,可以使目的蛋白在固定组织中表达,如乳腺、血液、尿液和唾液中。其中乳腺是实现外源基因高效表达的理想组织,通过该技术多种蛋白已经在转基因动物乳腺中表达。利用转基因动物生产药用蛋白一般通过 3 种渠道。一是通过血液,DNX 公司(1988)通过将人的血红蛋白基因转移给猪,这样可以通过转基因猪来生产人血红蛋白。二是通过尿腺,利用膀胱中尿腺合成和分泌蛋白的功能来作为反应器的优点是:转基因动物都产尿,且尿中几乎不含脂肪和其他蛋白,易于纯化。Kerr 和 Wall(1996)获得能在尿液中表达人生长激素的转基因小鼠,含量高达 0.5 g/L。三是通过乳腺,泌乳是动物的一项生理活动,对动物没有什么影响,乳腺摄取、合成、分泌蛋白的能力很强,且能对重组蛋白进行多种翻译后加工,同时能将重组蛋白折叠成有功能的构象。利用家禽产蛋的特性,试图在禽蛋中表达有价值的蛋白也是国际上动物生物反应器的研究热点之一,但还没有证据表明生产外源基因能够稳定遗传的转基因家禽技术已经成功。

(2) 转基因动物生产人体器官

人类同种异体器官的移植拯救了千千万万人的生命,但供体器官来源严重不足,而且随着非正常死亡人数的不断减少和人寿命的延长,人供体器官将变得更加贫乏,每年由于可供移植的人体器官严重不足使成千上万的病人因得不到移植器官而死去。利用转基因技术改造异种来源器官的遗传性状,生产能应