

863

生物高技术丛书

# 转基因动物

陈永福 主编



科学出版社

“863”生物高技术丛书

# 转 基 因 动 物

陈永福 主编

科 学 出 版 社

2 0 0 2

## 内 容 简 介

本书共分十章,系统地介绍了转基因动物的发展历史、转基因方法、基因的整合和表达机制等传统的转基因动物研究的内容。为了反映 21 世纪转基因动物的发展趋势,书中辟出一定篇幅阐述动物体细胞克隆、基因定位整合的原理和方法,并对它们的发展前景进行了预测。书中还单独用一章来讨论动物乳腺生物反应器的研究成果、发展前景和必备条件,以便使读者对这项重大技术有一个全面的认识。动物繁殖学是研究转基因动物的必备理论,鸡是发展转基因动物产业的重要对象,对这两方面的内容,书中也有所涉及。

本书可以作为相关专业的本科生和研究生的教材,也可供研究人员和管理人员参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

转基因动物/陈永福主编. —北京:科学出版社,2002.3

(“863”生物高技术丛书)

ISBN 7-03-009721-1

I. 转… II. 陈… III. 转基因-动物-遗传工程 IV. Q953

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 065029 号

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>

源海印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2002 年 3 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2002 年 3 月第一次印刷 印张:12

印数:1—3 000 字数:259 000

定价:25.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈北燕〉)

## “863”生物高技术丛书编辑委员会

丛书主编：

侯云德 强伯勤 沈倍奋

丛书编委会（按汉语拼音排序）：

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 陈永福 | 陈 竺 | 陈章良 | 丁 勇 | 顾健人 | 侯云德 |
| 黄大昉 | 贾士荣 | 李育阳 | 刘 谦 | 卢兴桂 | 马大龙 |
| 强伯勤 | 沈倍奋 | 唐纪良 | 许智宏 | 杨胜利 | 赵国屏 |

## 《转基因动物》编辑委员会

**主编：**陈永福

**编委**（按汉语拼音排序）：

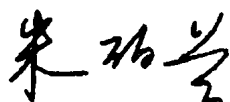
安道昌 陈永福 李 青 夏国良 朱大海

## 丛书序 I

生物技术是 20 世纪末期,在现代分子生物学等生命科学的基础上发展起来的一个新兴独立的技术领域,已被广泛应用于医疗保健、农业生产、食品生产、生物加工、资源开发利用、环境保护,对农牧业、制药业及其相关产业的发展有着深刻的影响,成为全球发展最快的高技术之一。在近 20 余年的时间里,各种生物新技术不断涌现。20 世纪 70 年代创建了重组 DNA 技术和杂交瘤技术之后,动植物转基因技术、细胞大规模培养技术,以及近几年的基因组学、蛋白质组学、生物信息学、组合化学、生物芯片技术和自动化药物筛选技术等相继发展起来。可以说,生物技术的范围在不断地扩展,进入了蓬勃发展的新阶段。

我国的生物技术在“国家高技术研究与发展(863)计划”的支持下,经过 15 年全国生物技术科技人员的努力拼搏,在农业生物技术和医药生物技术的研究和开发方面都取得了很大的进展。一方面,我们在研究上取得了一批具有国际影响的创新成果,并获得一批拥有了自己知识产权的专利;另一方面,在开发上已有一批生物技术产品进入市场,还有相当一批产品正在研究开发中;海洋生物技术和环境生物技术也已起步。目前,生物技术研究产业化已引起了全社会的关注,并将成为我国 21 世纪的一个新兴支柱产业。

在辞别 20 世纪,迈入 21 世纪之际,“863”计划生物领域专家委员会回顾我国生物技术的发展历程,展望生物技术发展前景,编写了“‘863’生物高技术丛书”。借此机会,我希望所有从事生物技术研究 and 开发的科研人员,要进一步团结拼搏,增强创新意识,注重成果转化,为我国生物技术不断发展壮大做出新的贡献!



2000 年 7 月 15 日

## 丛书序 II

生物技术是 20 世纪末人类科技史中最令人瞩目的高新技术,为人类解决疾病防治、人口膨胀、食物短缺、能源匮乏、环境污染等一系列问题带来了希望。国际上科学家和企业家公认,信息技术和生物技术是 21 世纪关系到国家命运的关键技术,是创新产业的发展增长点。

生物技术是指有机体的操作技术。它从史前时代起就一直为人类所开发利用,造福于人类。在我国的悠久历史中,传统的生物技术在经济的发展中一直起重要作用,特别是农业。据传,在石器时代的早期,神农氏曾传授人民如何种植谷物,并实行轮作制度;在石器时代的后期,我国就善于酒精发酵;在公元前 221 年的周代后期,我国就能做豆腐并酿制酱油和醋,其所用的基本技术沿用至今。公元前 200 年,在我国最早的诗集——《诗经》中就提到过采用厌氧菌进行亚麻浸渍处理。早在 16 世纪,我国的医生就知道,被疯狗咬可以传播狂犬病。公元 10 世纪,就有了预防天花的活疫苗,到了明朝(1368~1644),这种疫苗就广泛用于大量人群接种,此后,这种疫苗接种技术通过有名的丝绸之路传入欧洲国家。

1953 年 Watson 和 Crick 提出了脱氧核糖核酸(DNA)的双螺旋结构模型,阐明它是遗传信息的携带者,从而开辟了现代分子生物学的新纪元。DNA 分子是所有生命机体发育和繁殖的蓝本。众所周知,一切生命活动主要是蛋白质的功能,而蛋白质是由基因编码的。60 年代初就破译了“遗传密码”。生命现象千姿百态,但生命体的本质却有高度的一致性。它们的蛋白质都是由 20 种氨基酸以肽键连接而成,核酸都由 4 种核苷酸以磷酸二酯键构成,其遗传密码在整个生物界也基本一致。于 70 年代,科学家们发展了一种新技术,也就是众所周知的 DNA 重组技术。它向人们提供了一种手段,人们可以在试管内,根据人们的意愿来操作基因、改造基因,新的基因信息可以转入一种简单的生命体中,如大肠杆菌,或转入另一种机体,借以提供一种手段来改造谷物和家畜品种,或生产有效药物,制作疫苗和一系列自然蛋白质,或进行基因治疗。显然,新生物技术是一场革命,是生产力的一次解放,被认为是 20 世纪人类的一项最伟大贡献,它必将深刻地促进世界经济的发展。

广义的新生物技术包括基因工程、细胞工程、发酵工程和酶工程,但新技术的核心是基因工程技术,它能带动其他生物技术的发展,最具有革命性。

近 20 年来,国际上生物技术飞跃发展,特别是基因操作技术、生物治疗技术、转基因动植物技术、人类和其他生命体基因组工程、基因治疗技术、蛋白质工程技术、生物信息技术、生物芯片技术等。生物技术的创新正在带动着生物技术巨大产业的发展,它包括基因药物、重组疫苗、生物芯片、生物反应器、基因工程抗体、基因治疗与细胞治疗、组织工程、转基因农作物、兽用生物制品、生物技术饲料、胚胎移植工程、基因工程微生物农药、环保、海洋生物技术,以及现代生物技术对发酵、制药、轻工业食品等传统产业的改造等领域。

目前,生物技术产业与信息产业相比较还处于发展初期,至 1998 年全世界共有生物

技术公司 3600 余家,主要集中在美国和欧洲,其中年产值超过 10 亿美元的有约 20 家。生物技术产业在 20 年中市场总值增加了 50 多倍;涨幅最快是在近 10 年,例如美国在 1980 年生物技术产品的销售额还处于零增长,1991 年达到 59 亿美元,1996 年为 101 亿美元,1998 年增至 147 亿美元;目前,生物技术仍保持 25% 左右的增长速度,20% 左右的融资率和 12.5% 就业增长率以及 8.76% 平均股市涨幅。另一方面,也要看到,美国的 1300 余家生物技术公司中上市公司为 300 家,而赢利的公司约为 20 家,这是由于生物技术产品的研究和开发周期比较长,因此从整体看生物技术产业还处在投入阶段。从另一方面来看,尽管美国公司的赢利公司不多,但赢利公司的数量却在稳步上升。

1999 年全球生物技术产品的总销售额约为 500 亿美元,而产生的间接经济效益超过 3000 亿美元,全球有一半以上的人直接享用过生物技术产品。其主要产品为医药产品、农产品和食品。

我国自 1986 年实施“863”计划以来的 15 年中,现代生物技术的开发研究与产业化进入飞速发展阶段;两系法杂交稻的开发与推广对我国的粮食增产起了重要作用,2000 年已推广 5000 万亩以上。1993 年我国第一例转基因作物抗病毒烟草进入了大田试验,1997 年第一例转基因耐贮存番茄获准进行商品化生产,至 1999 年 5 月共有 6 种转基因作物及其产品投放市场。2000 年我国转基因抗虫棉花种植面积超过 550 万亩。1990 年我国研制了第一例转基因家畜,1991 年山羊克隆获得成功,生物技术饲料添加剂已经实现了规模化生产。我国自 1989 年第一种基因药物——重组  $\alpha 1b$  干扰素获准投放市场以来,至 1999 年我国已有 18 种基因药物和疫苗获准进行商业化生产,另有 26 种基因药物处于临床前或临床 I、II 期试验,我国生物技术医药产业已初具规模。我国已列为人类基因组计划国际大协作的成员国,承担完成 1% 的任务,美、英、日、法、德、中科学家于 2000 年 6 月 26 日宣布人类基因组全部 DNA 序列的工作框架图已经完成。我国在国际上首先发现神经性耳聋的基因,基因治疗已有 4 个项目进入临床试验阶段,生物芯片技术的开发研究与产业化正在与国际上同步发展。15 年来我国在生物技术领域中取得的成就是举世瞩目的,同时还培养了一大批中青年科技人才,为下世纪初“S-863”计划的实施和生物高技术产业化奠定了扎实的基础,也将为下世纪初我国的经济建设做出应有的贡献。

本丛书是在科学技术部中国生物工程开发中心、“863”计划生物技术领域专家委员会的领导下,由在第一线从事“863”生物高技术研究开发的科技人员撰写的系列丛书。本丛书包括了农、医生物技术的各个方面,不仅基本上概括了近 10 年来国际上的研究进展和发展趋势,而且还全面反映了我国“863”计划实施 15 年来在生物技术领域取得的进展和成果。本丛书的出版无疑将进一步推动我国生物技术开发研究和产业化的进程,促进我国经济的持续发展。同时,本丛书也是培养新一代青年生物技术科学家的重要教科书。



2000 年 1 月 16 日

## 前 言

在首期“863”计划即将圆满完成之际,生物领域专家委员会决定出版一套生物高技术丛书,反映我国在这一重要研究领域的成就和进展,并指定我主编《转基因动物》分册。

转基因动物的技术是在 20 世纪 80 年代成熟起来的,其成功的标志是使用直接向动物胚胎注射纯化的 DNA 分子的方法,生产出各种转基因动物。这种方法一直沿用到 20 世纪末,没有任何实质性的改进。显微注射 DNA 生产转基因是一种很可靠的方法,但也是一种效率比较低的方法。这种方法的固有缺点是生产转基因动物的概率太低,若以注射 DNA 并实施胚胎移植的胚胎为基数来计算,在各种动物中的成功率在 1%~5% 的范围内。此外,即使得到了转基因动物,外源基因也不一定表达或正确表达。因此,受技术体系本身所形成的制约,使得生产转基因动物成为一种周期很长,需要经费很多的高风险技术产业。直到今天,真正有商业化前景的转基因动物数量很少,在这一点上与转基因植物形成鲜明的对照。

在 20 世纪将要结束之时,动物体细胞克隆技术获得成功,使得动物生物技术界以巨大的惊喜进入 21 世纪。体细胞克隆技术是动物细胞操作和整体操作之间的桥梁,其科学意义是十分重大的。有了体细胞克隆技术,转基因操作的研究将主要在离体培养的细胞上进行,获得了与生产转基因植物大致等同的技术优势。由于动物与人体更为接近,人们对动物生理生化知识的了解远比对植物的了解深入,21 世纪生物技术的重大成果将主要来自对动物的研究,这是一种合理的预测,信不信由你。

由于上述原因,在安排本书的内容时,适当地压缩了描述用显微注射法生产转基因动物的相关内容,增加了动物体细胞克隆、基因定向整合和动物乳腺生物反应器等新内容。如果问本书与已出版的有关转基因动物的其他书籍有何不同,也许可以说本书的重点是描述和讨论未来的动物转基因技术及应用前景。

本书的一半章节是我本人编写的,限于自己的理论知识和技术素养,书中的错误和缺点在所难免。特别是有关动物体细胞克隆等新内容,国内外尚无写进教科书的结论可供参考,完全是根据近年来发表的科学论文提炼而成的,有些观点很可能引起争论。好在编写本书的惟一目的是总结“863”计划 15 年来转基因动物研究方面的概况,向读者提供一本方便的资料,不妥之处请多加批评和指正。在编写本书的过程中,得到安晓荣、苟克勉、林爱星、侯健、李瑞国、柏家林和崔秀宏等同志大力协助,在此一并致谢。

陈永福

2001 年 3 月

# 目 录

丛书序 I

丛书序 II

前言

|                            |    |
|----------------------------|----|
| <b>第一章 转基因动物概述</b> .....   | 1  |
| 一、转基因动物研究简史 .....          | 1  |
| 二、为什么研究和应用转基因动物 .....      | 4  |
| (一) 什么是转基因动物 .....         | 4  |
| (二) 为什么要研究和应用转基因动物 .....   | 4  |
| (三) 转基因动物的命名 .....         | 5  |
| (四) 关于转基因动物所涉及的伦理学问题 ..... | 5  |
| 三、转基因动物技术的现状 .....         | 6  |
| 四、新的技术高潮即将来临 .....         | 9  |
| <b>第二章 哺乳动物生殖生理</b> .....  | 15 |
| 一、性腺和配子发育的控制 .....         | 15 |
| (一) 生殖系统的发育 .....          | 15 |
| (二) 下丘脑-垂体对生殖的控制 .....     | 16 |
| (三) 促性腺激素释放的变化 .....       | 17 |
| (四) 卵泡发育 .....             | 18 |
| 二、排卵和黄体的控制 .....           | 19 |
| (一) 排卵 .....               | 19 |
| (二) 黄体 .....               | 20 |
| (三) 卵巢周期 .....             | 22 |
| 三、生殖周期 .....               | 23 |
| (一) 生殖周期 .....             | 23 |
| (二) 初情期和生殖衰老期 .....        | 24 |
| (三) 性行为 .....              | 25 |
| (四) 影响生殖周期的外部因素 .....      | 26 |
| 四、妊娠和分娩 .....              | 29 |
| (一) 妊娠 .....               | 29 |
| (二) 分娩 .....               | 32 |
| <b>第三章 转基因方法</b> .....     | 35 |
| 一、显微注射 .....               | 35 |
| (一) 什么是显微注射 .....          | 35 |
| (二) 显微注射生产转基因小鼠 .....      | 36 |

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| (三) 显微注射生产转基因猪 .....       | 40        |
| (四) 显微注射生产转基因羊 .....       | 43        |
| (五) 显微注射生产转基因牛 .....       | 45        |
| (六) 显微注射技术的改进 .....        | 47        |
| 二、体细胞克隆生产转基因动物 .....       | 52        |
| (一) 怎样通过体细胞克隆生产转基因动物 ..... | 52        |
| (二) 体细胞克隆生产转基因绵羊 .....     | 53        |
| (三) 体细胞克隆生产转基因牛 .....      | 56        |
| 三、其他转基因方法 .....            | 56        |
| (一) 反转录病毒载体 .....          | 56        |
| (二) 精子介导 .....             | 59        |
| 四、转基因动物的传代和检测 .....        | 62        |
| (一) 转基因研究材料的传代 .....       | 62        |
| (二) 转基因动物的检测 .....         | 62        |
| <b>第四章 基因的整合和表达 .....</b>  | <b>67</b> |
| 一、基因整合 .....               | 67        |
| (一) 随机整合 .....             | 67        |
| (二) 同源重组 .....             | 70        |
| 二、动物基因表达的基础知识 .....        | 71        |
| (一) 组织特异性表达 .....          | 71        |
| (二) 染色质的结构 .....           | 72        |
| (三) 真核基因表达调控 .....         | 73        |
| 三、外源基因的表达 .....            | 79        |
| (一) 真核基因表达的调控序列 .....      | 79        |
| (二) 表达结构的构建和功能域转移 .....    | 82        |
| <b>第五章 动物乳腺生物反应器 .....</b> | <b>86</b> |
| 一、动物乳腺是优良的蛋白质合成器官 .....    | 86        |
| (一) 动物乳腺合成蛋白质的能力 .....     | 86        |
| (二) 动物乳腺是一种优良的生物反应器 .....  | 87        |
| 二、研制动物乳腺生物反应器的条件 .....     | 88        |
| (一) 动物种类的选择 .....          | 88        |
| (二) 转基因技术的选择 .....         | 90        |
| (三) 基因表达载体的选择 .....        | 93        |
| 三、目标产品的选择 .....            | 94        |
| (一) 血液蛋白质 .....            | 94        |
| (二) 第二代医用蛋白质 .....         | 95        |
| (三) 基因工程牛奶 .....           | 96        |
| (四) 其他工业蛋白质 .....          | 96        |
| (五) 兽医产品 .....             | 97        |

|                              |     |
|------------------------------|-----|
| 四、研究设施的建设 .....              | 97  |
| (一) 建设完善的研究设施的必要性 .....      | 97  |
| (二) 实验室条件 .....              | 98  |
| (三) 实验动物 .....               | 99  |
| (四) 环境条件 .....               | 100 |
| <b>第六章 我国转基因动物研究概况</b> ..... | 103 |
| 一、猪的基因工程育种 .....             | 103 |
| (一) 立项背景和研究目标 .....          | 103 |
| (二) 目的基因的分离和表达载体的构建 .....    | 103 |
| (三) 转基因技术体系的建立 .....         | 104 |
| (四) 转基因猪的生产 .....            | 106 |
| (五) 外源基因的遗传稳定性 .....         | 107 |
| (六) 转基因猪的生产性能 .....          | 108 |
| (七) 转基因猪研究的发展前景 .....        | 108 |
| 二、动物乳腺生物反应器 .....            | 109 |
| (一) 立项背景和项目的总体目标 .....       | 109 |
| (二) 目的基因研究 .....             | 109 |
| (三) 乳腺组织特异性表达载体研究 .....      | 110 |
| (四) 转基因技术 .....              | 111 |
| 三、器官移植用转基因动物 .....           | 112 |
| (一) 项目的主要目标 .....            | 112 |
| (二) 研究工作的主要进展 .....          | 113 |
| <b>第七章 动物克隆技术</b> .....      | 117 |
| 一、研究动物克隆技术的意义 .....          | 117 |
| (一) 什么是动物克隆 .....            | 117 |
| (二) 动物克隆技术发展简史 .....         | 117 |
| 二、影响核移植效率的主要因素 .....         | 120 |
| (一) 细胞核供体 .....              | 120 |
| (二) 受体细胞质 .....              | 121 |
| (三) 受体卵母细胞成熟度与激活 .....       | 122 |
| (四) 卵母细胞去核的效果 .....          | 123 |
| 三、体细胞克隆的技术环节 .....           | 123 |
| (一) 体细胞的制备 .....             | 123 |
| (二) 卵母细胞的制备 .....            | 124 |
| (三) 体细胞核移植 .....             | 125 |
| 四、体细胞克隆胚胎的移植 .....           | 126 |
| (一) 胚胎移植 .....               | 126 |
| (二) 体细胞核移植胚胎的成活率 .....       | 127 |
| (三) 体细胞克隆动物初生时的特点 .....      | 127 |

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| <b>第八章 定向基因转移技术</b> .....         | 131 |
| 一、定向基因转移的意义 .....                 | 131 |
| (一) 什么是定向基因转移 .....               | 131 |
| (二) 定向基因转移的科学意义 .....             | 131 |
| (三) 应用基因打靶技术的必要条件 .....           | 133 |
| 二、定向基因转移载体的实验设计 .....             | 134 |
| 三、定向基因转移的细胞技术 .....               | 137 |
| (一) 哺乳动物细胞在离体培养中的特性类似于微生物 .....   | 137 |
| (二) 操作哺乳动物细胞与操作微生物的重大差别 .....     | 138 |
| (三) 定向基因转移技术是依赖小鼠胚胎干细胞建立起来的 ..... | 139 |
| (四) 通过体细胞进行定向基因转移 .....           | 140 |
| 四、同源整合细胞克隆的筛选 .....               | 142 |
| (一) 非同源整合是在哺乳动物细胞中基因打靶的主要障碍 ..... | 142 |
| (二) 同源重组细胞克隆的筛选 .....             | 143 |
| 五、条件性定向基因转移 .....                 | 148 |
| (一) 什么是条件性定向基因转移 .....            | 148 |
| (二) Cre/Loxp 重组体系 .....           | 148 |
| (三) Cre/Loxp 系统在定向基因转移中的应用 .....  | 150 |
| (四) 条件性基因打靶 .....                 | 154 |
| <b>第九章 转基因动物的发展前景</b> .....       | 160 |
| 一、基因功能的研究 .....                   | 160 |
| 二、在农业上的应用 .....                   | 161 |
| 三、在医学上的应用 .....                   | 163 |
| <b>第十章 转基因家禽的方法与应用</b> .....      | 166 |
| 一、禽类的早期胚胎发育 .....                 | 166 |
| 二、生产转基因家禽的方法 .....                | 167 |
| 三、转基因家禽的应用与前景 .....               | 172 |

# 转基因动物概述

## 一、转基因动物研究简史

转基因动物的出现是重组 DNA 技术和胚胎技术发展的必然结果。重组 DNA 技术的出现,使人类首次可以分离并扩增足够数量的遗传物质 DNA。在这种情况下,人们不仅仅满足于在微生物宿主中表达基因,而是要把基因转移到植物和动物中,看一看会发生什么情况。20 世纪 70 年代初,在美国活跃着一批科学家,他们尝试各种方法,向动物体转移外源遗传物质(Papaioannou 1998)。经过数年的努力,终于找到了向动物转移外源基因的可靠方法,并证明了遗传物质的统一性,即无论是微生物来源的基因还是动植物来源的基因,它们在动物基因组中都可以有效地表达。从此,转基因动物作为生物学中的一个分支学科被确立下来,并逐步展示出越来越光明的发展前景。

早在 20 世纪 60 年代末和 70 年代初,就有人向蛙卵和小鼠胚胎注射 mRNA,研究 mRNA 能不能在动物卵细胞和早期胚胎中翻译(Gurdon et al. 1971)。当然,这还不是今天意义上的转基因动物研究,而是同转基因动物技术的出现密切相关的事件,因为后来建立了动物转基因技术的也是这一批科学家。1974 年,Jaenisch 和 Mintz 首次报道通过向移植之前的小鼠囊胚注射 SV40 的 DNA,在发育成的幼鼠体内检测到了 SV40DNA 序列的存在。当然,这还不是我们今天所讲的真正意义上的转基因小鼠,因为向囊胚注射 DNA 只能使少数细胞摄取外源 DNA,发育成的幼鼠只在其体内一部分细胞中含有被注射的 DNA,并且遗传到其下一代的机会很小。1976 年,Jaenisch 又报道了通过用反转录病毒感染小鼠的胚胎,使病毒 DNA 整合到小鼠的基因组中,并传递给后代。与此同时,Ruddle 领导的实验室和 Brinster 领导的实验室致力于发展另一种转移 DNA 的方法,即向处于原核期的小鼠胚胎直接注射纯化的 DNA。1980 年,Gordon 等人首先报道了用显微注射纯化 DNA 的方法,获得了转基因小鼠。在此后的一年时间内,有六个实验室陆续报道通过向原核期的小鼠胚胎显微注射 DNA,获得了转基因小鼠(Gordon et al. 1980; Brinster et al. 1981; Costantini & Lacy 1981; Harbers et al. 1981; Wagner et al. 1981a, b)。从此,向原核期的胚胎直接注射纯化的 DNA 作为生产转基因动物的主要方法被确立下来,并且至今仍是一种最可靠和最常使用的方法。

但是,在这些早期的实验中,使用的基因结构未曾认真地设计和构建,大多是使用容易得到的材料进行试验,实验结果仅仅表明使用 DNA 显微注射的方法可以将外源基因导入小鼠种系之中。至于被导入的基因有何生理作用,则不能够检测出来,因而在科学界

影响不是很大。例如 Gordon 等人使用的 DNA 是含有一种 cDNA 序列的质粒 DNA, 根本不可能表达; Wagner、Costantini 和 Lacy 等使用的珠蛋白基因没有表达, 而 Wagner 等人宣布他们新使用的  $\beta$ -珠蛋白基因在小鼠中获得表达, 但实验过程中为了检测基因表达把实验小鼠杀死了, 没有进行传代实验 (Palmiter 1998)。真正发生重大影响的是 Brinster 和 Palmiter 合作生产的超级小白鼠。这两位转基因动物研究的启蒙者的合作始于 1980 年。其时, Brinster 正在致力于研究转基因方法, 苦于没有一种很容易检测的基因结构; 而 Palmiter 正在研究小鼠的 MT 基因, 打算在细胞系中表达这个基因并分析基因的调控序列。当 Brinster 告知他的问题之后, Palmiter 立刻给他构建了一个由 MT 基因启动子驱动的 TK 基因, 原因是这个结构很容易构建, 利用一个 *Bgl* II 酶切位点就可以将 TK 基因的编码序列融合到 MT 的启动子下游。当用了这个融合基因生产转基因小鼠之后, 在小鼠的肝脏中表达了 TK 基因, 活性是对照小鼠的 100 倍, 这是到 1981 年底第一个在小鼠中得到了高效表达的外源基因。因此, 这两位科学家决定长期合作, 并且把用转基因的方法矫正遗传性疾病作为研究的重要目标之一。次年, Palmiter 由 William Held 处得知, 有一种微型鼠是由于体内缺少生长激素而造成, 注射生长激素后可以矫正这种遗传缺陷。其时正好听说 Ron Evans 克隆了大鼠的生长激素基因序列, Palmiter 就力邀 Evans 合作, 构建了用 MT 启动子驱动大鼠 GH 基因编码序列的基因表达结构, 供 Brinster 进行显微注射实验。他们当时手边没有微型鼠, 只好将这个融合基因注射到正常小鼠的单细胞胚胎中。实验结果证明, 含有外源 GH 基因的小鼠长得比正常小鼠几乎大一倍。当这一实验结果在 1982 年英国的《自然》杂志第 300 期上发表并在该期的封面上刊登超级小白鼠的照片之后, 引起了全世界的轰动。科学家、企业家、卡通画作者和动物保护主义者一时间都在谈论转基因动物技术, 估价它对社会和经济发展的潜在影响, 担忧它会对环境和社会伦理造成何种后果。

畜牧业是国民经济重要的产业之一, 家畜和家禽的生长速度是畜牧业效益的最重要经济指标。因此, 生产超级小白鼠的技术很快就被延伸到转基因家畜的研究中来。到了 1985 年, 美国人用转移 GH 基因、GRF 基因和 IGF-1 基因的方法, 生产出转基因兔、转基因羊和转基因猪。同年, 德国 Brem 生产出转基因兔和转基因猪, 使用的基因是人的 GH 基因 (Brem et al. 1985)。1987 年, 澳大利亚转移羊自身的 GH 基因, 生产出转基因羊 (Nancarrow et al. 1987)。次年, 又报道用转移猪的 GH 基因的方法生产出转基因猪 (Vize et al. 1988)。1989 年, 英国人 Polge 报道了用注射牛的 GH 基因的方法生产出转基因猪 (Polge et al. 1989)。在这一时期中, 用转基因的方法创造快速生长的家畜是研究的重点, 主要原因是受到超级小白鼠的鼓舞。然而, 外源生长激素在大家畜体内表达的生理效应与在小鼠中有很大的差别, 转基因大动物在日增重普遍提高、体内脂肪普遍减少的同时, 出现了许多病理反应。其主要表现是不同程度的繁殖机能下降, 肠胃溃疡和关节病 (Pursel et al. 1989)。事实上, 这一阶段的转基因动物研究并未培育出任何有价值的转基因动物, 同人们的期望相差甚远。这反映出人类在基因的功能、基因的表达调控和基因组中各个基因之间的相互关系上认识还相当肤浅, 利用转基因的手段改造动物之前, 还有许多基础知识需要进一步充实。

1980~1990 年的 10 年间, 是全世界对转基因动物进行研究的高潮时期, 有一系列重大技术突破。在致力于创造快速生长的家畜的同时, 对利用家畜个体作为反应器来表达

特定基因,生产高附加值产品也进行了大量研究。其中最成功的是利用动物乳腺作为生物反应器生产医用蛋白质。1987年,美国的 Gordon 等人首次报道在小鼠的乳腺组织中表达了人的 tPA 基因(Gordon et al. 1987)。在此后的4年中,陆续有数种有商业开发价值的产品在动物乳腺中生产出来。1991年,英国人报道在绵羊的乳腺中表达了人的抗胰蛋白酶基因,表达水平达到3.5~35g/L。同年,德国人 Brem 在家兔中表达了牛的凝乳酶基因,表达水平达到1~10g/L(Brem et al. 1991)。1992年,美国的 Velandar 又报道在猪的乳腺中表达了人的 C 蛋白基因,表达水平达到1g/L以上(Velandar et al. 1992)。由于乳腺表达的产品有很大商业价值,表达水平又很高,研究成果迅速被商业化。自1992年以后,文献中报道的在乳腺中高效表达外源基因的实例减少,但这并不说明再也没有人在乳腺中高效表达新基因,很可能是出于商业目的,不再公开报道。目前,已知人的抗胰蛋白酶、抗凝血酶Ⅲ和人的 C 蛋白等三种产品已进入临床实验阶段,一种以动物乳腺为主要生产手段的产业已经建立起来。除了使用乳腺作为生物反应器外,也有利用动物的血液系统生产血红蛋白的研究报道(Swanson et al. 1992)。还有利用动物的膀胱作为生物反应器,从尿液中提取产品的研究(Kerr et al. 1998)。但是,从表达水平、产品收集的简易程度和对动物的副作用等诸多因素来衡量,乳腺是比其他器官系统更为优越的基因表达靶器官。

Palmiter 等人(1982)在英国的《自然》杂志上发表他们生产超级小白鼠的研究报告时,在文章的结尾部分预测:“向小鼠(从而向其他动物)导入选定的功能基因的成功,已为转基因技术在研究和实现实用目标上的应用,开辟了广阔的前景”。在文章发表后的10余年时间内,科学界的确充分讨论和积极探索了转基因动物的各种应用潜力。除上文介绍的操纵家畜的生长特性和利用动物体作为生物反应器以外,在培育抗病的家畜(Brem et al. 1991,1992)、提高家畜的利用粗饲料的能力、通过提高半胱氨酸的合成能力而提高羊毛产量(Nancarrow et al. 1991)、将猪改造成人类器官移植的器官供应者(Wilmot 1999)和改造牛奶的特性使之更适合人类消费等方面,也做了许多工作(Whitelaw 1999; Wall 2000)。

近年来,对真核基因的表达调控的研究取得了长足的进展,动物体细胞克隆技术的出现又使家畜的基因敲除和基因置换成为可能,同以往完全不同的一整套更有效和更可靠的基因转移和基因表达技术已经问世。在未来的5~10年中,转基因动物的研究和开发将会出现一个新的高潮。

我国政府和科学界对转基因动物的研究和应用十分重视。在国家“七五”技术攻关计划中首先设立了“动物个体表达系统研究”的课题,启动了转基因动物的研究。在农业部的“七五”生物技术重点项目中,又设立了“动物转基因技术研究”的课题。1987年,当首期“863”计划生物技术领域研究项目开始实施时,把“猪的基因工程育种”列为重要项目之一,一直坚持到20世纪末。在“九五”期间,“863”生物技术研究计划又把“动物乳腺生物反应器研究”增列为重大项目,给以重点支持。

由于国家的大力支持,我国转基因动物的研究取得了重大技术进步,做出了一系列成绩。1989年,利用转移羊的 MT/猪 GH 融合基因的方法,获得了快速生长的转基因猪,仅比美国晚两年,比澳大利亚晚一年。1990年,获得了快速生长的转基因兔(Chen et al. 1991)。1991年,又获得快速生长的转基因羊。我国动物生物技术基础研究力量薄弱,财

力有限,从研究条件上说根本不能与发达国家相比。但是,由于国家重视,科技人员努力拼搏,在较短的时间内掌握了转基因动物生产的各个环节,生产的转基因动物的主要技术参数均与美、英、德、澳等国相近,很好地完成了技术跟踪的任务。转基因动物,特别是转基因的大动物的生产,技术要求很高,也需要较多的费用和较好的研究条件。因此,直到 20 世纪结束时,也只有美、英、德、澳、加等少数几个国家和中国能够系统地生产出转基因的各种家畜。

## 二、为什么研究和应用转基因动物

### (一) 什么是转基因动物

目前,尚没有哪一本教科书给转基因动物下一个简单而明确的定义。为了正确理解什么是转基因动物,在这里我们只强调所有转基因动物都是由于“外源 DNA”导入(包括同一物种的 DNA)动物的基因组而产生了可以遗传的改变。这些可以遗传的改变包括:

- 外源 DNA 片段至少整合到一条染色体的一个位点上;
- 外源 DNA 的插入使基因组中任何一个基因的结构发生改变;
- 外源 DNA 的插入使染色体发生重排;
- 导入可以持久存在的遗传实体,例如,一条人工染色体或者可以自我复制并传递给子细胞的非染色体 DNA 元件。

在实际工作中,有许多别的手段也可以导致动物的基因发生改变。但是,这些改变与把外源 DNA 导入动物基因组在机制和效应上都不相同,不能列入转基因动物的范畴。这类情况包括:

- 由于化学品的诱变作用导致基因发生改变;
- 由于辐射作用导致基因发生改变;
- 由于化学品或辐射的作用使染色体发生畸变;
- 通过核移植交换遗传物质;
- 使用基因治疗技术导入 DNA 等。

### (二) 为什么要研究和应用转基因动物

生产转基因动物的程序很复杂,成本较高,时间也很长。那么,为什么要应用转基因动物来进行生物学研究和作为表达有价值的基因的受体呢?为什么不能用离体培养的动物细胞取代转基因动物呢?要回答以上问题,首先应当认识动物细胞不等同于自由生活的细菌和酵母菌,它是复杂的动物体的基本单元。因此,当动物细胞离体培养时,它们的许多特性迅速消失。原因是在动物体内细胞以有序的三维结构组成各种动物组织,由动脉输送血液来维持它们需要的营养、氧和二氧化碳浓度以及激素环境;同时它们还和周围其他类型细胞接触,接受旁分泌的刺激。在离体状况下,要维持细胞在体内相同甚至相近的环境条件,也是不可能的。这一方面的实验例证很多,最有名的是有关肝细胞的离体培养。肝细胞占肝脏体积的 90%,所以从肝脏上解聚下来的细胞培养物中主要是肝细胞。