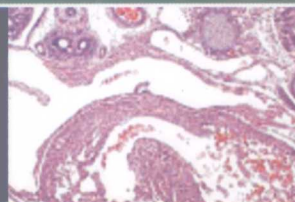
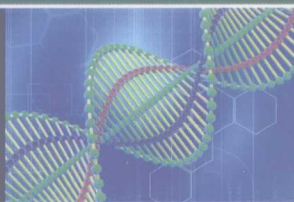




生命科学前沿丛书

转基因动物技术



张 健 主编



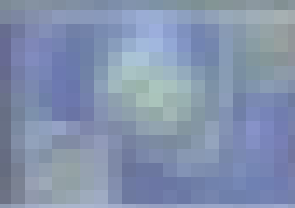
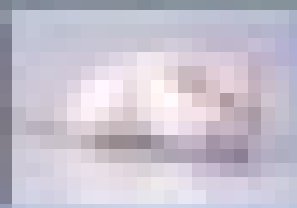
科学出版社

www.sciencep.com



中国畜牧学杂志
CHINA JOURNAL OF ANIMAL HUSBANDRY

转基因动物技术



第 1 卷 第 1 期



中国畜牧学杂志
CHINA JOURNAL OF ANIMAL HUSBANDRY

生命科学前沿丛书

转基因动物技术

张 健 主编

科 学 出 版 社

北 京

版权所有,侵权必究

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303

内 容 简 介

本书由教育部“长江学者奖励计划”特聘教授张健率领多年在转基因动物技术领域从事科研与教学的资深教授、博士和中青年骨干教师编写而成。全书由概述、实验动物的饲养与培育、基因表达的调控、转基因的制备及导入宿主动物、基因的定位打靶及条件打靶、转基因及其表达的检测、转基因动物技术在生物及医学研究中的应用、转基因动物技术在生物制药中的应用、异种器官移植、转基因技术的安全与伦理问题等共10章组成。作者在参阅大量国内外近期文献资料的基础上,结合自己近年的工作经验,比较系统地介绍了转基因动物技术的发展和常用的研究策略,并较好地反映了该研究领域的最新研究进展,具有较强的科学性和实用性。

本书可作为高等院校生物、医学、动物学、实验动物学、兽医学等专业的高年级本科生及研究生学习用书,也可供上述专业的科研、教学和实验技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

转基因动物技术/张健主编. —北京:科学出版社,2009.

(生命科学前沿丛书)

ISBN 978-7-03-024947-0

I. 转… II. ①张… III. 动物-外源-遗传工程-生物技术 IV. Q953

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 112736 号

责任编辑:杨瑰玉/责任校对:王望容

责任印制:彭 超/封面设计:苏 波

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>

武汉市科利德印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009年7月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2009年7月第一次印刷 印张:14 1/2 插页 1

印数:1—1500

字数:350 000

定价:39.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《转基因动物技术》编辑委员会

主 编 张 健

副主编 卢芳国 何迎春

编 委 (按姓氏笔画排序)

王 燕	甘 露	卢芳国	刘如石
任凯群	李 玲	何迎春	肖湘文
张 健	张 波	周 畅	庞 瑜
胡 翔	胡兴旺	贺爱兰	彭海宁

前 言

自 1982 年,Palmiter 等将大鼠生长激素基因转入小鼠受精卵中,获得了生长快、体型大的超级巨鼠以来,世界各国科学家对转基因技术应用于动物生产的研究产生了极大的兴趣。在 1991 年第一次国际基因定位会议上,转基因动物技术被公认是继遗传学中连锁分析、体细胞遗传和基因克隆(DNA 重组)之后的第四代技术,被列为生物学发展史 126 年中 14 个转折点之一。近年来,转基因动物技术已经是生命科学中最受关注、发展最快的技术之一,其应用已广泛渗透于分子生物学、发育生物学、免疫学、制药及畜牧育种等各个研究领域中,并且该技术正在对动物生产产生一场新的革命,在提高生长速度、生产性能,改善产品品质、抗病育种、基因治疗等方面取得了可喜的进展,显示出诱人的应用前景。基于这样的学术形势,我们编写了本书,目的是更好地和同行交流经验,促进转基因动物技术的发展和應用。

本书共 10 章,约 35 万字,全面、系统地阐述了转基因动物技术领域中的相关理论知识,科研、实验技术和重要的应用领域。具体内容包括概述、实验动物的饲养与培育、基因表达的调控、转基因的制备及导入宿主动物、基因的定位打靶及条件打靶、转基因及其表达的检测、转基因动物技术在生物及医学研究中的应用、转基因动物技术在生物制药中的应用、转基因动物技术在异种器官移植中的应用、转基因技术的安全与伦理问题。本书内容丰富,图文并茂,不仅系统地介绍了传统的转基因动物技术的内容如实验动物的饲养与培育、转基因方法等,同时也反映了 21 世纪转基因动物技术的发展趋势如基因的定位打靶及条件打靶、转基因的制备及导入宿主动物等,还介绍了转基因动物技术的应用情况。本书的编写者均是在转基因动物技术领域长期从事教学、科研的工作者,编写中力求理论联系实践,其内容有较强的科学性和实用性。本书可作为高等院校生物、医学、动物学、实验动物学、兽医学等专业的高年级本科生及研究生学习用书,也可供上述专业的科研、教学和实验技术人员参考。

由于时间仓促,本书中的疏漏和不足之处恐在所难免,敬请读者提出宝贵意见,以便完善。

张 健

2009 年 1 月 10 日于长沙

目 录

第一章 概述	1
第一节 转基因动物技术的基本原理	1
一、转基因的细胞学原理	1
二、转基因的胚胎学原理	1
三、转基因的分子生物学原理	2
第二节 转基因动物技术要点	2
一、转基因方法	2
二、转基因的类型与在个体中的作用	5
三、转基因动物制备方法	5
四、转基因的表达特征及提高转基因表达的策略	6
第三节 转基因动物技术的应用	7
一、应用	7
二、问题及对策	9
参考文献	10
第二章 实验动物的饲养与培育	11
第一节 实验动物的分类	11
一、在动物学上的分类	11
二、按遗传学控制原理分类	12
三、按微生物学控制原理分类	13
第二节 实验动物的饲养条件与环境控制	14
一、影响实验动物环境的因素及其控制	14
二、实验动物的房舍设施	15
三、实验动物饲养的辅助设施和设备	20
四、实验动物环境监测和设施的维护	20
第三节 实验动物的营养与饲料	21
一、动物营养需要	21
二、各种实验动物的营养需要	22
三、饲养标准与饲料标准	23
四、饲料的营养成分及其作用	23
第四节 实验动物的育种	25
一、近交系的培育	25
二、封闭群的培育	27
三、杂交群的培育	29

四、特殊性状动物的培育	30
五、野生动物的实验动物化	30
参考文献	31
第三章 基因表达的调控	32
第一节 染色体的结构	32
一、原核生物染色体的基本结构	32
二、真核生物染色质的基本结构	32
三、真核生物染色体的结构模型	33
第二节 原核生物基因表达的调控	34
一、原核生物 DNA 水平的调控	35
二、原核生物的操纵子调控	36
三、原核生物翻译水平的调控	39
四、原核生物基因表达的时序调控	41
五、环境条件对原核生物基因表达的调控	42
第三节 真核生物基因表达的调控	42
一、真核生物 DNA 水平的基因表达调控	43
二、真核生物转录水平的基因表达调控	46
三、真核生物转录后水平的基因表达调控	52
四、真核生物翻译水平的基因表达调控	54
五、真核生物翻译后水平的基因表达调控	56
参考文献	57
第四章 转基因的制备及导入宿主动物	58
第一节 目的基因的获取	58
一、目的基因的来源	58
二、目的基因的分离	61
第二节 常用载体	64
一、质粒(plasmid)	64
二、噬菌体载体(bacteriophage vector)	66
三、柯斯质粒(cosmid)	68
四、人工染色体	69
五、动物病毒载体	71
六、染色体定位整合载体	78
七、几种特殊的表达载体	79
第三节 DNA 重组	79
一、工具酶	79
二、目的基因 DNA 片段与载体的连接方法	82
三、重组 DNA 导入受体细胞	84
四、重组体的选择和筛选	84
第四节 外源基因导入宿主动物细胞的方法	86

一、磷酸钙转染技术	87
二、二乙氨基乙基葡聚糖转染技术	88
三、聚阳离子-DMSO 转染技术	88
四、显微注射技术	88
五、电穿孔法	91
六、脂质体载体法	91
七、反转录病毒载体法	92
八、胚胎干细胞法	94
九、精子载体法	94
参考文献	98
第五章 基因的定位打靶及条件打靶	101
第一节 基因打靶的载体和策略	101
一、基因打靶的载体	101
二、基因打靶的策略	105
第二节 基因的定位打靶	111
一、定位打靶载体的构建	111
二、胚胎干细胞的培养和电转	111
三、阳性 ES 细胞克隆的筛选	112
四、阳性 ES 细胞转入胚胎	113
五、嵌合体小鼠的鉴定和维持	118
六、影响中靶效率的因素	118
第三节 基因的条件打靶	120
一、条件性基因打靶的概念和原理	120
二、表达各种可控的重组酶转基因鼠是发生条件打靶的关键	121
三、条件基因打靶技术基本策略	123
第四节 基因打靶技术的改进和应用前景	125
一、重组工程系统使得构建基因打靶载体更方便、快捷	125
二、位点特异性重组酶系统实现时空特异性基因敲除	125
三、大规模随机基因敲除技术	126
四、miRNA 敲除小鼠证实 miRNA 在哺乳动物中的生理功能	126
五、显微注射技术的改良	126
六、基因打靶的应用前景	127
参考文献	128
第六章 转基因及其表达的检测	130
第一节 外源基因整合的检测	130
一、聚合酶链式反应	130
二、Southern 印迹杂交法	131
三、DNA 斑点杂交	134
四、染色体原位杂交	135

五、原位聚合酶链式反应(in situ PCR)	137
第二节 外源基因在转录水平的检测	139
一、反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)	139
二、Northern 印迹杂交法	139
三、RNA 斑点杂交	142
四、RNA 原位杂交	142
五、原位反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)	143
六、RNase 保护分析	144
七、反转录差异显示技术	145
第三节 外源基因在翻译水平的鉴定	146
一、酶联免疫吸附剂测定	146
二、Western 印迹法	148
三、免疫组织化学染色法	150
四、报告基因	151
五、双向电泳	151
参考文献	153
第七章 转基因动物技术在生物及医学研究中的应用	154
第一节 转基因动物技术在研究哺乳动物发育中的应用	154
一、转录因子与发育紊乱	154
二、转录因子与心脏发育	154
第二节 转基因动物技术在基因表达调控研究中的应用	155
一、利用转基因动物可研究基因在发育中的时空调控	155
二、转基因动物技术可探讨目的基因突变所致的异常表型以研究基因功能	157
第三节 转基因动物技术在医学研究中的应用	158
一、在肿瘤学研究中应用	158
二、在免疫学研究中的应用	158
三、在遗传性疾病研究中的应用	159
四、在病毒性疾病研究中的应用	159
五、在改良和培育动物新品种的应用	160
六、在生物活性物质研制生产中的应用	160
第四节 人类疾病的转基因动物模型	161
一、神经系统疾病的转基因动物模型	161
二、听觉和视觉疾病的转基因小鼠模型	163
三、心血管疾病的转基因动物模型	164
四、骨、软骨疾病的转基因小鼠模型	166
五、癌症的转基因小鼠模型	167
六、代谢和激素疾病的转基因小鼠模型	169
七、病毒性疾病转基因小鼠模型	170
八、其他疾病的转基因动物模型	171

九、RNAi 技术与转基因动物模型	172
参考文献	174
第八章 转基因动物技术在生物制药中的应用	176
第一节 转基因动物制药的诞生	176
一、细菌基因工程药物阶段	176
二、细胞基因工程药物阶段	176
三、转基因动物制药阶段	177
第二节 乳腺生物反应器	177
一、乳腺反应器研究简史	177
二、乳腺生物反应器的分类	179
三、乳腺生物反应器生产重组蛋白的优势	180
四、乳腺生物反应器目标产品的选择	181
五、乳腺生物反应器的产业化进展	182
第三节 转基因动物技术在人源化治疗性单克隆抗体研发中的应用	183
一、转基因动物生产人源化治疗性抗体	184
二、人源化治疗性单克隆抗体临床应用	186
参考文献	187
第九章 转基因动物技术在异种器官移植中的应用	188
第一节 异种器官移植发展简史	188
一、萌芽阶段	188
二、早期阶段	188
三、发展阶段	189
第二节 异种器官移植排斥反应的类型	189
一、超急性异种排斥反应	190
二、急性异种间体液免疫排斥反应	191
三、急性异种间细胞免疫排斥反应	193
四、慢性异种间排斥反应	195
第三节 异种器官移植排斥反应的防治	196
一、正确合理的配型,选择理想供者	196
二、移植植物或受者的预处理	197
三、免疫抑制药物的应用	198
四、诱导免疫耐受	199
五、免疫学监测	199
第四节 异种器官移植的临床尝试	200
一、临床肾脏异种移植	200
二、临床心脏异种移植	200
三、临床肝脏异种移植	201
四、临床胰岛异种移植	201
第五节 转基因动物技术克服异种移植后排斥反应的策略	202

一、转人补体调节蛋白基因	202
二、消除(或减少)异种移植物抗原基因	203
三、多策略克服免疫排斥	204
四、克服急性血管排斥和诱导耐受	204
五、问题与展望	204
参考文献	205
第十章 转基因技术的安全与伦理问题	207
第一节 转基因技术生物安全问题的提出	207
一、生物安全问题的提出	207
二、《卡塔赫纳议定书》的主要内容及其地位	208
第二节 转基因技术的生物安全与伦理问题	209
一、环境安全问题	209
二、食品安全问题	211
三、伦理道德问题	212
第三节 转基因技术的生物安全管理	213
一、生物安全性评价	213
二、转基因技术应用中应遵循的生态伦理原则	214
三、实现转基因技术生态安全的途径	216
参考文献	218

第一章 概 述

转基因动物技术是指借助基因工程技术将体外重组的结构基因导入受精卵或早期胚胎,培育出转移基因个体的技术。整合到个体基因组上的外源结构基因称为转基因。转基因技术被公认是遗传学研究中继 20 世纪初的连锁分析、60 年代的体细胞遗传和 70 年代的基因克隆之后的第四代技术。转基因动物(transgenic animal)是指在动物基因组内稳定地整合以实验方法导入的外源基因,并且外源基因可以稳定地遗传给后代的遗传工程动物。转基因动物技术(transgenic animal technique)是实验动物学与分子生物学紧密结合的成果,是在胚胎和重组 DNA 技术发展的基础上产生的,能在活体中接近真实地再现某一特定基因的表达和所导致的后果,把复杂系统简化进行研究,是目前层次最高的实验技术体系。建立特定的转基因动物模型,研究外源基因在整体动物中的表达调控规律,具有系统的整体性和独立性,能够从四维时空观察基因调控的整体效应。1980 年,Gordon 等人首先育成带有人生长激素基因的转基因小鼠,其生长速度快 2~4 倍,体形大一倍,被称为转基因“硕鼠”。由此,转基因动物技术轰动了整个生命科学界。

第一节 转基因动物技术的基本原理

转基因动物技术是一种分子水平、细胞水平和活体动物水平的综合研究技术体系,它是遗传学、分子生物学、细胞生物学、生殖生物学、发育生物学、实验动物学等学科的理论和技术的应用。应用这个技术系统,能从分子水平入手,实现对动物基因的定向改变(突变),然后在活体动物机体的不同层次(分子、细胞、组织、器官和系统)观察基因活动情况和表型效应。

一、转基因的细胞学原理

细胞周期可人为分成 4 个时期,正常情况下,细胞沿着 G₁-S-G₂-M 的路线运转。S 期为 DNA 合成期,M 期为有丝分裂期,M 期结束到 S 期开始之前为 G₁ 期,S 期末到有丝分裂期为 G₂ 期。MPF(M 期促进因子,maturation/mitosis/meiosis promoting factor)是真核细胞 M 期的一个基本调节物质,能引导细胞由间期向 M 期转变。M II 期的卵母细胞的 MPF 含量很高,可以诱导胞核发生一系列变化包括核膜破裂和早熟染色体凝集,处于减数分裂 M II 期的卵母细胞无核膜的时间远远长于有丝分裂 M 期的细胞。所以,此时期的卵母细胞可作为基因导入的受体。用反转录病毒载体法和精子载体法都可以利用 M II 期卵母细胞无核膜、外源基因易导入的特点。

二、转基因的胚胎学原理

从哺乳动物受精卵分裂发育的规律来看,转基因操作时较合适的部位是受精卵的雄原核,精子进入卵细胞后的 1 小时,雄原核和雌原核还未融合,在显微镜下容易看到雄原核。多数研究者在此时期把外源基因显微注射到雄原核,通过此雄原核的融合把外源基因整合入受精卵。

有的研究者认为,注射时间应选在精卵融合后的受精卵有丝分裂S期进行,外源基因可以借助受精卵自身基因组DNA复制时形成的缺口或缝隙及重组过程而整合到受精卵的基因组中。

家禽与哺乳动物相比其生殖生理特点有所不同,鸡的转基因操作,一般选择在刚产出蛋(即未孵蛋)的胎盘进行注射,注射位置是受精卵胎盘中央质膜下方30 μm 处的囊胚腔,靠近雌原核。

三、转基因的分子生物学原理

无论是显微注射法、电穿孔法等物理方法,还是反转录病毒载体法等生物学方法,目的都是把外源基因导入细胞或胚胎,然而要得到转基因动物的关键是外源基因的整合和表达效率。Brinster提出假设,诸如DNA分子游离末端和断裂点可能是整合位点,外源DNA分子游离末端和断裂点之间的相互作用能够诱导外源DNA整合入基因组。由于这种随机断裂、随机整合的位置效应,研究者很难驾驭转基因的表达效率和表达水平,而且实际应用中注射DNA线性分子比环形分子的整合效率要高。既然断裂是随机的,则转基因插入也是随机的,由此可导致内源基因的重排、缺失、移位,引起表达效果不理想。但也有一些基因构件不存在位置效应,其表达水平与该基因在宿主基因组中的拷贝数有关,某些情况下转基因在整合位点上呈现出独立性表达。

外源基因整合后,当受体基因中含有转基因的同源序列时,转基因与内源基因的表达会同时受到抑制,这种现象称为共抑制。共抑制一般发生在转基因与同源的内源基因之间或者两个相同的转基因之间。共抑制的原因可能是:①转基因与同源基因相互作用后,造成某种后成的存在性状而影响其表达;②同源基因竞争性地结合核基质等结构而出现相互抑制;③产生反义RNA,并且正义链的RNA与其结合后快速降解;④外源基因的存在,使mRNA开始时大量堆积,并激发某种未知的机制使mRNA降解。许多研究者认为,转基因整合后由于所处的位置不合适,不能建立自己的结构域从而无法独立调控,当然也无法表达。转基因表达量低也可能是因为存在翻译水平的错误剪接而影响其表达。近年来,有研究证明内含子能提高转基因动物的表达效率,据研究5'末端的内含子有利于进行mRNA的有效剪接,所以进行转基因操作,应尽量保留5'末端的内含子。

随着研究的深入,有人对转基因的低水平表达提出新的理论:转基因不表达是由于多拷贝重复序列导致了该区域异染色质化从而使转基因沉默。Doerler在研究中还发现外源基因在细胞中的甲基化是一种普遍现象。甲基化的外源基因在分裂过程中不稳定,经过多次分裂后,外源基因通过一些目前未知的机制而降解掉,从而从基因组中丢失,影响转基因的效率。

第二节 转基因动物技术要点

转基因动物的制备有其特殊的原理和技术方法,全过程涉及:①用DNA重组技术克隆目的基因并改建;②目的基因向生殖细胞或胚胎干细胞的高效转移;③含外源基因的受精卵或早期胚胎组织在合适的环境下发育;④鉴定获得所需的稳定的转基因动物品系。

一、转基因方法

按基因导入方式来分,建立转基因动物的方法主要有显微注射法、反转录病毒载体导入

法、胚胎干细胞法、精子载体法、核移植法、人工酵母染色法、基因打靶法、脂质体介导、电转移法、受体介导的基因转移法等。

1. 显微注射法 这一方法是发展最早、目前应用最广泛和最为有效的制作转基因动物的方法,创始人是 Jaenisch 和 Mintz 等,Gorden 等和 Palmiter 等最先通过此法获得转基因动物。其基本原理是:通过显微操作仪将外源基因直接用注射器注入受精卵,利用受精卵繁殖过程中 DNA 的复制过程,将外源基因整合到 DNA 中,发育成转基因动物。其优点是:①基因的转移率高,整合效率可达 30%;②可直接用不含有原核载体 DNA 片段的外源基因进行转移;③外源基因的长度不受限制,可达 100 kb;④常能得到纯系动物;⑤实验周期相对较短。但存在一些的不足也限制了这一技术的应用:①实验设备及操作要求高;②导入外源基因拷贝数无法控制;③常导致插入位点附近宿主 DNA 大片段缺失、重组等突变,可造成动物严重的生理缺陷。

2. 反转录病毒感染法 将目的基因重组到反转录病毒载体上,制成高滴度的病毒颗粒,人为感染着床前后的胚胎,也可直接将胚胎与能释放反转录病毒的单层培养细胞共孵育以达到感染的目的,通过病毒将外源目的基因插入整合到宿主基因组 DNA 中去。Haskell 等应用该方法制作了转基因牛。此种方法有其独特的优点:①感染率高,宿主范围广;②使用方便,可直接进行囊胚腔注射,也可通过去除透明带与胚胎进行共同培养;③外源基因为单拷贝整合,应用过程较为方便。但这种方法存在以下缺点:①反转录病毒作为载体其本身具有潜在的致癌性,介导的基因也会影响外源基因的表达;②外源基因的大小受到反转录病毒的限制,而且获得子代动物嵌合体的比例较大。基于反转录病毒能够广泛感染各种非分裂细胞(如神经元、肝细胞和肌细胞等),其目的基因整合至靶细胞基因组能够长期表达,具有免疫反应小等优点,该法将成为一个有发展潜力的基因转移载体。Anthony 等报道了通过反转录病毒载体感染 M II 期的卵母细胞实现转基因,这是对反转录病毒感染法的改进,他认为反转录病毒载体介导的基因整合关键在于有丝分裂时出现核膜的分裂,因为 M II 期的卵母细胞无核膜的时间远长于处于 M 期的细胞,为反转录病毒载体介导的基因插入提供了更大的可能性。

3. 胚胎干细胞移植法 胚胎干细胞(ES 细胞)是从早期胚胎的内细胞经过体外培养建立起来的多潜能细胞系,注射于动物囊胚后可参与宿主的胚胎构成形成嵌合体,直至达到种内嵌合。因此,可将其作为一种载体,导入外源基因,获得转基因动物。近年来,ES 细胞已被公认为是转基因动物、细胞核移植、基因治疗等研究领域的一种新试验材料,具有广泛的应用前景。与传统育种方法相比,ES 细胞在生产转基因动物方面表现其独特的优势:①打破了物种的界限,突破了亲缘关系的限制,加快了动物群体遗传变异程度;②可以进行定向变异和育种,利用同源重组技术对 ES 细胞进行遗传操作,通过细胞核移植生产遗传修饰性动物,又可能创造新的物种;③利用 ES 细胞技术,可在细胞水平对胚胎进行早期选择,这样可以提高选择的准确性,缩短育种时间。但目前的研究中仍存在很多问题亟待解决:①如何控制分离 ES 细胞最佳胚胎发育时间和相应的处理方法;②如何维持与控制这种分化的进度;③如何定向诱导 ES 细胞的分化;④对于控制 ES 细胞高效分化的抑制体系的机制还未彻底研究清楚;⑤ES 细胞在生产转基因动物中的应用经济效益尚须探讨。

4. 精子载体法 精子是高度分化的细胞,它具有潜在的结合外源 DNA 并在受精过程中将其转入到卵内的能力。随着受精卵的发育,外源基因将随机整合到受体基因组中,部分基因能在成体中表达,部分基因不仅能表达还能遗传给后代。一旦精子能表达外源基因,那么将很

容易得到大量的转基因后代。因此,精子能携带外源基因入卵和产量丰富这两大特性使精子作为载体制备转基因动物成为一个简便的途径。精子载体法制备转基因动物无需昂贵的实验设备,亦无需专门的技术。

5. 基因剔除(gene knockout)和基因楔入(gene knockin)技术 基因剔除是基因打靶(gene targeting)的一种方法,类似于同源重组(homologous re-combination)技术,指外源DNA与受体细胞基因组中顺序相同或非常相近的基因发生同源重组而整合到受体细胞的基因组中。这是一种先进的转染技术,克服了其他转染技术所无法消除的盲目性和偶然性,具有整合位点确定、精确,转移基因频率较高等优势。该技术既可以用正常基因剔除缺陷基因,使缺陷基因不能表达以尝试疾病的基因治疗,或通过定点整合产生无效等位基因(null allele)以进行基因失活方面的研究,也可探讨缺失基因在发育和调控方面的具体作用;又可以用突变的基因剔除正常基因,以阐明该基因的基本功能及其与相关疾病发生发展的关系。基因楔入(gene knockin)技术是将外源基因定点插入的一种方法。

6. 人工酵母染色法 人工酵母染色法(YAC)是一种新型载体。其容量巨大,有克隆百万对碱基的大片段DNA的能力。此法可保证巨大基因的完整性,保证所有顺式作用因子的完整性和完整的结构基因位置的不变性,因此保证了长片段外源基因的整合率,可消除和减弱基因整合后的位置效应。Fuiiware等建立了210 kb YAC DNA转基因小鼠,在乳腺获得高水平表达人乳白蛋白,而未表现出普通转基因鼠所出现的位置效应。人工酵母染色体法具有以下优点:①保证巨大基因的完整性;②保证所有顺式因子的完整并与结构基因的位置关系不变;③保证较长的外源片段在转基因动物研究中,整合率提高;④鉴于基因的完整性,目的基因上下游的侧翼序列可以消除或减弱基因整合后的“位置效应”。

7. 受体介导的基因转移法 该方法的基本原理是在着床前胚胎中有胰岛素及胰岛素样生长因子表达,外源性胰岛素促进细胞增殖及胚胎形态发生,而且早期胚胎细胞内存在胰岛素受体,使受体介导的基因转移成为可能。该法的优点也是不需显微操作,而且使用的运载工具对胚胎无明显毒害作用,因此可为将来的基因治疗提供一条新途径。

8. 核移植法 该方法首先将外源基因导入到供体细胞中,选择其中带有外源基因的细胞进行扩增,然后将这种细胞的细胞核导入一个去了核的未受精的成熟卵母细胞中融合并激活,将重组胚直接或进行体外培养发育到桑葚胚或囊胚后植入同步化的假孕动物的输卵管。1997年世界上第一头体细胞克隆羊“多莉”(Dolly)在英国罗斯林研究所诞生,就应用了该法。安晓荣等通过体细胞核移植技术制作了转基因绵羊。体细胞核移植制备转基因动物总效率高于原核显微注射法,另外可以在核移植前选择后代的性别,产生转基因后代遗传背景及遗传稳定性一致,故不需选配,仅一代就可建立转基因群体,节约时间和费用。存在的突出问题是体细胞系难以建立,细胞的传代次数有限。

9. 脂质体介导法 脂质体易于制备并具有高效运载DNA片段的能力,其最大特点是可与受体细胞发生特异性结合,受体细胞会将含外源基因的脂质体吞噬进来,从而实现基因转移。Rottman将外源DNA在与精子共孵育之前用脂质体包埋,脂质体与DNA相互作用形成脂质体-DNA复合物。这种复合体比较容易和精子细胞膜融合,从而进入细胞内。

10. 电转移法 也叫电脉冲刺激法或电场转移基因法。将生殖细胞或体细胞置于电场内,同时加入待转移的外源基因,在电场作用下使膜产生可变性的电穿孔,从而使得一定大小的DNA分子通过细胞膜进入细胞核,并进一步整合到宿主DNA上。这种方法操作比较简

单,效果较好,但对受体细胞需求量大,不易得到。

11. 定位整合技术 由于外源基因的随机整合带来很多问题,近年来,国内外在定位整合方面做了大量工作,设计出了多种基因打靶系统,使外源基因在受体细胞中定点整合在特异染色体及其特异位点上。该技术是利用 DNA 体内同源重组的原理,将外源基因稳定地插入特定的位点,再经适当的筛选,从而得到既定的转化细胞。这一技术不仅为基因定位整合进而为哺乳动物种系改造开拓了道路,而且在缺陷基因的修复以及生命科学的理论研究上,都将有很大的应用价值。

除上述几种转基因方法外,人们为了适应于某些特殊需要也探索了一些其他的方法,如激光导入法,但总体看来,仍不是十分理想,效率较低。

二、转基因的类型与在个体中的作用

1. 转基因的类型 用于转基因动物研究的的目的基因有以下几类:①动物体内固有的结构蛋白、功能蛋白基因,如 BMP 基因、GH 基因等;②癌基因,如 cos, fos, SV40 Tag 基因等;③病毒基因组成分, HIA 的 tat、LTR 等片段及全基因组等;④毒素基因, diphtheria toxinA 基因等;⑤转录特定基因反义 RNA 的 DNA 片段。

2. 转基因在个体中的作用 ①插入突变导致生物性状改变;②反义 RNA 抑制特定基因表达;③转基因表达出活性蛋白等方式对个体产生表型效应。转基因的表达与多种因素相关,表现为组织特异性和发育阶段特异性。

三、转基因动物制备方法

1. 基因转移受体细胞准备 制备转基因动物,首先要考虑用何种转基因途径和确定何种转基因受体细胞。全能细胞随着细胞分化、胚胎发育,可以把其中的基因组所储存的全部遗传信息扩大到生物体所有的细胞中,因此,转基因的受体细胞必须是这种全能细胞。目前,普遍采用的受体细胞有:①原生殖细胞;②精子;③受精卵;④囊胚期的内细胞团细胞。

2. 供体 DNA 的准备 待转移的外源基因,可以是预先分离的某一基因,反转录法得到的 cDNA,人工合成的 DNA 片段,含目的基因的供体细胞基因组 DNA 及其限制性内切酶消化后的 DNA 片段。

3. 实验动物的准备 ①不育雄性动物:它是产生假孕雌体的前提。②假孕雌性动物:作为获得了外源基因的胚胎的养母,它的生殖系统的生理状态应与移进胚胎的发育阶段同步,从而为移植的胚胎提供着床和继续发育的生理条件。③取受精卵的雌性动物:如果无特殊遗传背景的要求,一般采用杂交 F1 代受精卵较为理想,因为杂交 F1 代胚胎的发育能力和对外环境的耐受能力都较强,有益于提高移植胚胎的出生率。

4. 转基因动物(小鼠)制作与一般特征

(1) 基本程序:①选择小鼠品系,可以用远交系也可以用近交系。②准备不育雄鼠和假孕母鼠。③收获受精卵。④将导入外源基因的受精卵植入假孕母鼠的输卵管或子宫内使之发育。⑤首建转基因鼠(founder)中外源基因整合的检测。⑥通过繁育建立转基因小鼠品系。转基因小鼠制作的流程见图 1-1。

(2) 技术的关键:制备转基因动物(小鼠)小鼠技术的关键主要涉及对外源基因的结构、载体、供体(早期胚胎),基因导入法,供转基因胚胎发育的体外培养系统和受体动物等的选择是