

# 动物转基因技术研究现状与应用前景

张瑞杰 苗向阳\*

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

**摘要** 动物转基因技术是 20 世纪 70~80 年代兴起的一种生物技术, 它从诞生之日起, 就显示了广阔的应用前景。转基因技术经过多年的发展, 已经形成了显微注射法、逆转录病毒载体法、精子载体法和体细胞核移植法等比较成熟的方法。近年来, 又出现了性腺注射法、RNA 干扰法、基因打靶结合克隆法等新技术。本文在前人研究的基础上重点总结了各种转基因方法的基本原理和国内外最新研究动态, 对各种转基因技术的优缺点进行了详细的探讨。最后本文还对转基因技术在畜牧生产中的应用进行了阐述, 并对转基因技术总体存在的问题进行了分析。

**关键词** 转基因技术; RNAi; 基因打靶; 动物克隆; 生物反应器

动物转基因技术是指将分离得到的外源目的基因或重组基因, 运用基因工程等实验技术手段, 导入动物受精卵(或早期胚胎细胞)中, 使之整合到宿主细胞基因组内, 随细胞的分裂而增殖, 并稳定地遗传给下一代动物的一种生物技术。动物转基因技术形成于 20 世纪 70~80 年代。1970 年, Berg 和 Eckardt<sup>[1]</sup>创立了 DNA 重组技术, 为转基因技术的产生奠定了基础。1974 年, 美国科学家 Jaenisch 等<sup>[2]</sup>把猿猴病毒 40 (Simian virus 40, SV40) 注入小鼠囊胚中, 得到部分体组织含有 SV40 DNA 的嵌合体小鼠。1980 年, Gordon 等<sup>[3]</sup>尝试用显微注射的方法制备转基因小鼠。1982 年, Palmiter<sup>[4]</sup>将 5' 端调控区缺失后的大鼠生长激素基因与小鼠金属硫蛋白 I 基因启动子相连接, 然后将融合基因注入受精小鼠雄原核, 成功研制出了著名的“超级小鼠”(super mouse)。从此以后, 转基因技术不断发展并且日趋成熟。随着转基因技术研究的继续深入, 生物学家发明了越来越多用于制备转基因动物的新技术、新方法。其中, 显微注射法、逆转录病毒载体法、胚胎干细胞介导法、精子载体法、体细胞核移植法是几种比较成熟的方法; 性腺注射转基因法、RNA 干扰法、基因打靶结合克隆法等是最近兴起的方法, 本文就以上几种方法的研究进展结合前人的研究工作综合叙述。

## 1 动物转基因技术

### 1.1 显微注射法

又称 DNA 显微注射法, 是指用显微操作仪将外源基因直接注入受体动物的受精卵中, 使外源基因整合到受精卵的基因组内, 最终发育成转基因动物的技

术。显微注射转基因法最早由美国人 Gordon<sup>[3]</sup>发明, 他在 1980 年首次利用原核注射的方法开展动物转基因研究。受 Gordon 的启发, 1982 年, Palmiter<sup>[4]</sup>将 5' 端调控区缺失后的大鼠生长激素基因与小鼠金属硫蛋白 I 基因启动子相连接, 然后将融合基因注入受精小鼠雄原核, 成功研制出了著名的“超级小鼠”。1985 年, Hammer 等<sup>[5]</sup>利用显微注射法成功制成了转基因猪和转基因绵羊。此外, 转基因兔、转基因牛及转基因山羊也相继问世。近年来, 显微注射法制作转基因动物也时有报道。Lee 等<sup>[6]</sup>通过向猪单细胞受精卵显微注射的方法建立了一个包含重组人血管假性血友病因子(rhVWF) cDNA 的转基因猪系。使转基因猪的乳腺中表达 rhVWF, 并在猪的乳汁中分离得到了 rhVWF。Liu 等<sup>[7]</sup>为了建立 PEG10 (paternal express gene 10) 转基因小鼠模型并研究 PEG10 基因在转基因小鼠中对肿瘤生长和转移的作用, 将包含小鼠白蛋白启动子的 pALB-PEG10 的线性表达元件、PEG10 的结构基因、和多腺苷酸化信号序列显微注射到小鼠受精卵中, 并将处理后的胚胎移植到假孕母鼠的输卵管内, 获得了转基因鼠。

显微注射法是目前转基因动物生产中应用最广泛、最有效的方法之一。显微注射法转基因效率高; 适用范围广, 任何 DNA 均可直接注射; 没有其它

收稿日期: 2009-11-23 接受日期: 2010-8-31

转基因生物新品种培育科技重大专项(No.2009ZX08008-004B, No.2008ZX08008-003), 国家高技术研究发展计划(863 计划)(No.2008AA10Z140), 国家自然科学基金(No.30571339)和中国农业科学院创新基金(No.2004-院-1)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 010-62895663, E-mail: mxy32@sohu.com

载体或化学试剂对细胞造成毒性; 不经嵌合体途径便有可能直接获得纯系, 实验周期短。但该方法中外源基因多拷贝串联式随机整合入宿主基因组中, 整合位点和拷贝数难以精确控制, 还有可能造成严重的插入突变, 发生表达调节障碍, 甚至导致受体基因组发生严重突变, 使受体细胞死亡。此外, 整合位点也不易分析, 整合率低, 虽然可以通过加大外源 DNA 的注入浓度来提高整合率, 但同时转基因细胞的成活率将显著下降。

## 1.2 逆转录病毒载体法

利用逆转录病毒的长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)区域具有转录启动子活性的特点, 将外源基因连接到LTR下游进行基因重组后, 制成高滴度的病毒颗粒, 人为感染着床前或着床后的胚胎, 也可以让胚胎与能释放逆转录病毒的单层培养细胞共孵育以达到感染的目的。逆转录病毒 RNA 进入宿主细胞后, 被反转录为 DNA, 并在整合酶和其末端特殊核酸序列作用下, 整合到宿主细胞的基因组, 进行表达和遗传, 得到转基因动物。1974 年, Jaenisch 等<sup>[2]</sup>将 SV40 DNA 注入小鼠胚胎中, 发现获得的小鼠体内有 SV40 DNA 整合。1987 年, Salter 等<sup>[8]</sup>用鸡白血病毒作为载体生产转基因鸡, 得到嵌合体鸡。1989 年 Bosselman 等<sup>[9]</sup>用网状内皮组织增生病毒作载体将 GH 基因导入鸡胚胎, 结果得到了体内含有 GH 基因的嵌合体鸡。直到 1998 年, Bremel 等<sup>[10]</sup>将逆转录病毒直接注入卵母细胞才生产出纯系转基因牛。近年来, 慢病毒载体法制备转基因动物得到广泛应用。Moreno 等<sup>[11]</sup>在家兔怀孕 22 天时, 通过向胎儿肝内、羊膜内或腹腔内注射包含增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)转基因的 HIV 重组慢病毒颗粒, 在所产生幼兔的许多组织中检测到了 EGFP。Kvell 等<sup>[12]</sup>使用以浓缩的 HIV-1 为基础的慢病毒载体, 显微注射卵周隙制备稳定的转基因 BALB/c 系小鼠。在载体中, 人的 EF1 $\alpha$  启动子启动 EGFP 的表达。EGFP 的表达结果显示, 基因表达产物均匀分布, 没有镶嵌现象。然而, 却观察到 EGFP 的表达有组织依赖性差异。到第六代只有一个新生儿未表达 EGFP。

逆转录病毒感染转基因法操作简单, 宿主范围广, 不受胚胎发育阶段的影响, 无导入基因的连环化现象, 可引入单拷贝的基因, 且单一位点单拷贝整合、整合效率高。该方法的不足之处是需要生产带有外源基因的逆转录病毒; 插入外源基因的长度有一定限

制, 一般不能超过 10Kb, 整合后的表达率低; 将基因导入受体细胞过程中, 有可能激活细胞的原癌基因或其它有害基因; 所得转基因家畜大多为嵌合体, 需要广泛的杂交, 以建立转基因系; 转基因的表达问题尚未解决<sup>[13]</sup>。虽然逆转录病毒载体法在研究和应用过程中尚存在许多未曾解决的难题, 但其操作简单、整合效率高, 在未来仍将具有很高的研究和应用价值。

## 1.3 精子载体法

精子载体法是指将外源基因与精子共培养, 或通过电穿孔、脂质体介导等方法将外源基因导入成熟的精子, 使精子携带外源 DNA 进入卵细胞受精, 得到整合有外源 DNA 的受精卵, 然后经胚胎移植将转基因受精卵转移到同期发情的动物子宫内, 经胚胎发育产生转基因动物。1989 年, Lavitrano 等<sup>[14]</sup>首次报道把 PSV2 CAT 质粒与小鼠的附睾精子共孵育后进行体外受精, 移植后获得了转基因阳性鼠。1993 年, Squires 等<sup>[15]</sup>把外源 DNA 用脂质体包装后, 与鸡精子共孵育, 然后进行人工授精, 获得成功。2002 年, Lavitrano 等<sup>[16]</sup>成功建立了抗衰老 hDAF 的转基因猪。目前精子载体法已在多种动物中获得了基因后代, 其中包括牛、猪、兔、小鼠, 这表明精子载体法是一种有用的转基因方法。近年来精子载体法也得到了广泛的应用。Shen 等<sup>[17]</sup>将外源 DNA 与二甲基亚砜(DMSO)的混合物转染精子来制备转基因兔, 并将这种方法与脂质体介导法进行比较, 结果显示 DMSO-精子介导的基因转移方法(SMGT)得到的转基因阳性比率(56.3%)高于脂质体法的转基因阳性率(39.6%~47.8%)。Li 等<sup>[18]</sup>为了评价动物乳腺组织的表达功能, 构建了能表达人乳铁蛋白的基因转移载体, 并用二甲基亚砜精子介导的基因转移(DMSO-SMGT)方法, 得到了 89 个幼兔, 其中 46 个为转基因兔。21 个作为乳腺生物反应器的转基因母兔中有 17 个母兔的乳腺中可以表达人的乳铁蛋白。结果表明 DMSO-SMGT 法制备的转基因兔能在正确的目标组织中表达人的乳铁蛋白。2007 年, 本实验室苗向阳等<sup>[19]</sup>以 LacZ 基因为报告基因, 构建质粒载体 p-OV- $\beta$ -Gal, 用脂质体介导法、精子介导法以及电激法相结合, 将该质粒载体转移到鸡早期胚胎内, 进行转基因鸡研究, 结果发现其外源基因整合阳性率为 13.2% (7/53), 表达阳性率为 20.7% (11/53)。

以精子为载体, 通过体外授精获得转基因动物的最大优点是方法相对简单、易行, 不需昂贵的显微操作设施及复杂的操作技巧, 动物育种不经过嵌合体,

实验周期短,利用精子的自然属性克服人为机械操作给胚胎造成的损伤,整合率高。其主要缺点是实验结果不稳定,可重复性差。虽然精子载体法还存在一些问题,但它简单、易行、快速、经济,已成为一种重要的转基因动物生产方法。近年来,越来越多的研究者使用该方法得到了转基因动物,表明该方法具有广阔的应用前景。除此之外,精子载体法也为转基因动物产业化提供了一条可能的途径。

#### 1.4 体细胞核移植法

体细胞核移植法首先要将目标基因转移到体外培育的动物体细胞中,筛选出阳性转基因细胞并进行繁殖,制备出供移植用的细胞核供体。然后将转基因细胞核供体移植到去核的卵母细胞中,重构胚胎经过激活和培养后,移植到代孕动物中,从而产生转基因动物。1997年,英国 Roslin 研究所的 Wilmut 等<sup>[20]</sup>利用成年绵羊乳腺上皮细胞作为核供体,成功获得了体细胞克隆绵羊多莉(Dolly),拉开了动物体细胞克隆技术的序幕。随后, Wilmut 研究小组<sup>[21]</sup>通过体细胞核移植,率先在世界上培育了表达人凝血因子 IX 的转基因克隆绵羊,以后 Cibelli<sup>[22]</sup>在 1998 年又获得了转基因牛, Bondioli<sup>[23]</sup>于 2001 年得到了转基因猪。Umeyama 等<sup>[24]</sup>用胞浆内精子注射与体细胞核移植相结合的方法发展了一种具有明显糖尿病症状的遗传修饰猪。虽然 22 个克隆后代中的大部分死于断奶前,存活达 20~196 天的四只转基因猪被诊断为具有非致命血糖水平的糖尿病患者,血糖水平高于 200mg/dl。对其中一个克隆猪做口服葡萄糖耐量试验表明糖负荷后血糖水平显著增加。

该技术的突出优点是可以减少受体动物的数目,不需要用受体母畜来承担那些非转基因的胚胎,表现了强大的生命力。另外,该方法事先在细胞中进行基因转移和对阳性细胞进行筛选,简化了转基因动物生产的许多环节,节约了人力,产生转基因后代遗传背景及遗传稳定性一致,不需选配就可建立转基因群体,具有很大的优越性。体细胞核移植法的不足之处在于,费用高、效率低,生出的部分个体表现出生理或免疫缺陷。而且传统核移植操作程序复杂,对设备和技术要求较高。体细胞核移植技术发展时间较长,其相应操作方法已比较成熟。

#### 1.5 性腺转基因方法

性腺转基因方法是应用各种手段,将外源基因转染原始生殖细胞后,或将外源基因或其载体直接注入生殖细胞内,使其整合入生殖细胞基因组中,再通过

有性生殖产生转基因动物。Kim 等<sup>[25]</sup>把外源基因用脂质体转染精原细胞,再将被转染的精原细胞微注射到精原细胞被破坏的雄性动物的睾丸的曲精细管内,发现小鼠康复后可以产生携带外源基因的精子,利用这种雄鼠与雌鼠交配可能产生转基因小鼠。沈新明等<sup>[26]</sup>直接用人巨细胞病毒启动子调控的增强型绿色荧光蛋白表达载体注射到小鼠的曲精细管内,再通过与雌鼠交配,成功获得了表达绿色荧光蛋白的转基因仔鼠。Yuan 等<sup>[27]</sup>直接向曲精细管内注入外源 DNA,然后对曲精细管电击或电穿孔处理,获得的转基因小鼠阳性率达 25%。Yang 等<sup>[28]</sup>直接向卵巢注射绿色荧光蛋白的基因,让处理后的雌鼠与雄鼠交配后也得到了转基因小鼠。Li 等<sup>[29]</sup>对在活体内和活体外用精原干细胞法生产转基因鸡的效率进行了研究,表明睾丸介导的基因转移(testis-mediated gene transfer, TMGT)与转染的精原干细胞移植基因转移法(transplanting transfected spermatogonial stem cells, TTSSCs)是生产转基因鸡的可行方法。本实验室曲朝杰等以 pIRES2-EGFP 载体为基础,在其多克隆位点区插入抗菌肽 Thanatin 基因序列,构建高效表达载体。将线性化的载体 DNA 多点注射到白来航公鸡的睾丸内,与白来航母鸡交配后收集到 268 枚受精蛋,孵化 257 枚受精蛋。通过 PCR 和 southern blot 分析证明 160 枚为阳性转基因鸡胚,转基因阳性率为 59.70%。

通过性腺转基因操作简单,技术要求低,难度小。缺点在于外源基因随机整合进入宿主基因组,难以实现定点整合,应用此方法难以获得理想的转基因动物。虽然性腺转基因法难以实现定点整合,但其以操作简单、技术要求低等优点被许多研究工作者用于生产转基因动物。

#### 1.6 RNAi 转基因法

RNAi 是一种序列特异性的转录后基因沉默机制(PTGS),它通过一段双链 siRNA 或单链 miRNA 导致同源 mRNA 降解,从而阻断目的基因的表达<sup>[30,31]</sup>。RNAi 是一种进化上保守的抵御转基因或外来病毒侵犯的防御机制<sup>[32]</sup>。1990 年, Jorgensen 等<sup>[33]</sup>首次发现这种现象,广泛引起了人们的研究兴趣。1998 年, Fire 等<sup>[30]</sup>在秀丽线虫中观察到这种现象,并阐明其为转录后沉默机制。与此同时,将 RNAi 机制用于转基因动物的研究也迅速展开。2002 年, Masaru Okabe 实验室<sup>[34]</sup>成功建立了第一种应用 RNAi 的转基因小鼠。杨志峰等<sup>[35]</sup>构建了针对 IKK $\alpha$  基因 RNAi(别降)的慢病毒载体,并将载体导入小鼠受精卵卵周隙,获得携

带该载体的转基因小鼠模型, 经 PCR 鉴定首建鼠阳性率为 15%。转基因小鼠外周血细胞 IKK $\alpha$  mRNA 表达量明显降低。Jagdece 等<sup>[36]</sup>利用核移植克隆法与 RNAi 技术相结合, 生产体内不繁殖猪内源性逆转录病毒(PERV)的转基因猪, 获得成功。

RNAi 可以作为一种有效的工具用来产生转录后沉默的效果, 从而抑制特定基因的表达, 已经在线虫、果蝇、小鼠、大鼠等模式生物中得到成功应用。但是, 由于 RNAi 的机制至今仍未解释清楚, 很多设计的 dsRNA 不能产生抑制靶基因转录后沉默的效果。而且由于 RNAi 转基因小鼠只是在转录后水平上降低基因的表达, 并不像基因敲除那样 100% 的把基因从基因组中剔除掉, 所以有时也会因背景的不干净导致产生的表型难以分析。

### 1.7 基因打靶技术

基因打靶技术是一种利用 DNA 同源重组原理和胚胎干细胞技术按定向组合的方式改变生物遗传信息的实验技术。它通过外源载体和内源靶位点相同的核苷酸序列之间的同源重组, 使外源 DNA 定点整合到靶细胞的特定的基因座上。基因打靶技术可以精细地修饰和改造基因的 DNA 片段, 具有位点专一性强和打靶后目的片段可以和染色体 DNA 共同稳定遗传的特点<sup>[37]</sup>。Thomas 等<sup>[38]</sup>首先对小鼠胚胎干细胞(ES 细胞)进行了基因打靶, 然后将此打靶的 ES 细胞移植进入小鼠囊胚, 将此重组胚移植进入代孕母鼠, 最后产出嵌合体仔鼠, 通过遗传育种获得基因敲除的纯合小鼠。McCreath 等<sup>[39]</sup>用体细胞核移植生产出了基因打靶绵羊。Lai 等<sup>[40]</sup>用基因打靶及克隆的方法制作出了敲除  $\alpha$ -1,3-糖苷转移酶的转基因猪, Kuroiwa 等<sup>[41]</sup>通过敲除牛朊蛋白(PRNP)基因制作了无疯牛病的牛。不会发生乳房炎的奶牛<sup>[42]</sup>和能够合成多不饱和脂肪酸的猪<sup>[43]</sup>也被制备出来。van de Lavoie 等<sup>[44]</sup>将基因打靶的携带能表达绿色荧光蛋白基因的原始生殖细胞(PGC)注入孵化 3d 发育至 13~15d 的鸡胚内, 获得 8 只公雏, 长大后与母鸡交配产生 7 只生殖腺有转入外源基因和带有绿色荧光的转基因雏鸡。Wu 等<sup>[45]</sup>利用基因打靶的方法, 制备了钙粘蛋白基因家族靶向断裂小鼠。

基因打靶技术克服了随机整合的盲目性和偶然性, 整合位点精确、表达水平高, 是一种理想的修饰、改造生物遗传物质的方法。它对于解决目前生物学领域的许多难题提供了新的思路和方法, 无论在基础理论研究还是在实践应用方面都有着广阔的前景。但这一方法在技术上仍有一些问题, 主要是基

因打靶及检测的效率较低, 能自发进行二次同源重组, 对此尚须进一步的研究。

## 2 转基因技术的应用

### 2.1 转基因技术与生物反应器

通过动物血液或乳腺生产蛋白质等生物活性物质, 即动物生物反应器。其中, 通过动物“生物反应器”生产人类药用蛋白的研究已取得了初步成功。现已经应用转基因牛、绵羊和猪作生物反应器生产出一些贵重的药用蛋白, 诸如  $\alpha$ -1,2 抗胰蛋白酶、乳铁蛋白、人血清蛋白、人凝血因子 IX、人凝血因子 VIII、抗凝血酶 III、胶原、血纤维蛋白原、蛋白质 C 和组织血纤维溶酶原激活子等。近年来许多生物技术公司竞相开展转基因动物乳腺生物反应器的研究, 并利用转基因动物大量生产人类活性蛋白质, 使转基因动物技术由实验研究向产业化发展。

### 2.2 提高畜禽的生产能力

转基因技术可以显著提高动物的生产能力, 人类在转 bGH 基因猪方面的研究表明, 转基因猪日增重增加, 饲料转化率提高 25%。Hammer 等<sup>[5]</sup>将人生长激素(PGH)基因转入猪的研究获得成功, 这种转基因猪的生长速度比对照组高出 15%, 日增重可达 1273g, 饲料利用率提高 21%, 采食量减少 20%。美国的 Pursel 等<sup>[46]</sup>曾将牛的 GH 转入猪中, 生产出 2 个猪的家系, 其生长速度比对照猪提高 11%~14%, 饲料转化率提高 16%~18%。1990 年中国农业大学培育的转基因猪, 生长速度超出对照组 40%。1998 年美国培育出 IGF1 转基因猪群, 其脂肪减少 10%, 瘦肉率增加 6%~8%<sup>[47]</sup>。我国陈永福等<sup>[48]</sup>用自己构建的融和基因 OMT/PGH 进行基因转移, 获得转基因猪生长速度提高 11.8%~14.8%, 饲料利用率提高 10%。澳大利亚学者培育的转基因猪, 日增重为 1.3kg, 17 周龄可达 90kg, 生长速度比正常对照组提高 31%, 而且转基因猪能将整合的外源基因遗传给后代, 使后代也具有该优良性状。此外澳大利亚科学家将羊毛的一种蛋白质(La- 白蛋白)的主要成分半胱氨酸导入绵羊胚胎, 繁殖出的转基因羊可使羊毛增产 5%, 估计全年收入增加 3 亿美元。转基因技术不仅可以培育出体积大、生长快的动物, 还可以培育出微型动物。研制出的微型猪, 生长快、易处理、饲料成本低, 使其更加适用于药物筛选和疾病研究。

### 2.3 改变畜产品品质

一是改变产乳性状方面, 将人乳溶菌酶基因导入小鼠, 有可能实现对乳用家畜的改良。乳汁中溶菌

酶含量提高,不仅可以减少乳房炎的发生,还能延长奶的保鲜期。此外,通过转基因技术可以制备出不同特性的牛奶以使其满足更多人的需求。二是改善产毛性能方面,新西兰Damak等<sup>[49]</sup>将小鼠超高硫角蛋白启动子与绵羊的IGF1cDNA融合基因显微注入绵羊原核期胚胎,转基因羊净毛平均产量比非转基因羊提高了6.2%。澳大利亚、新西兰、英国等主要产羊毛国家正致力于开发一种可以生产彩色羊毛的高产转基因羊。Powell等<sup>[50]</sup>将毛角蛋白II型中间细丝基因导入绵羊基因组,转基因羊毛光泽亮丽,羊毛中羊毛脂的含量得到明显的提高。Wen等<sup>[51]</sup>获得了一种转基因蚕的种系,这种蚕可以织出包含有重组蜘蛛丝的茧。

## 2.4 培育抗病动物

将抗病毒基因导入受精卵。由此发育成的个体会具有抗病能力,或者应该能减轻该种病毒侵染时为机体带来的危害。1989年,美国农业部以禽白血病病毒(ALV)为载体,获得了抗ALV的新品系鸡;1996年王敏华等<sup>[52]</sup>将猪瘟病毒核酸酶基因转移给兔,使兔的抗病力显著增强。Clements等<sup>[53]</sup>将绵羊髓鞘脱落病毒(Visna)的衣壳蛋白基因(EVE)转入绵羊,所获得转基因羊的抵抗力明显提高。Kuroiwa等<sup>[54]</sup>敲除了牛编码朊病毒(PrP)的基因,这为产生无“疯牛病”种群展示了光明的前景。Kerr等<sup>[55]</sup>让转基因鼠乳腺细胞表达溶葡萄球菌酶,结果表明赋予乳腺细胞溶葡萄球菌酶用来抗葡萄球菌 aureus 是有效的。另外,干扰素是动物机体产生的一种免疫因子,能增加机体各种病毒感染的能力。如导入B1-干扰素基因获得的转基因鼠,对狂犬病毒的抵抗力明显提高,感染病毒4d后无一死亡,数月后仍有25%的转基因鼠健在;而对照组的同窝非转基因鼠感染病毒后4d内50%死亡,6d内全部死亡。

## 3 转基因技术存在的问题

转基因动物研究主要面临两个方面的问题:一是研究过程中存在的困难;二是其安全性问题。

在转基因动物研究过程中,首先遇到的问题是整合和表达效率低。从总体上看,实验小动物转基因的阳性率高于大家畜。统计资料表明,小鼠转基因阳性率为2.6%,大鼠为4.4%,兔为1.5%,牛为0.7%,猪为0.9%,绵羊为0.9%。其次,转基因在宿主基因组中的行为难以控制。转基因在插入宿主基因组的过程中可能导致内源基因的破坏或失活,也可能激活原本处于关闭状态的基因(尤其是癌基因)。其结果

将导致转基因阳性个体出现不育、胚胎死亡、四肢畸形等异常<sup>[56]</sup>。第三,多数情况下转基因的表达率低,大部分转基因(尤其是cDNA)表达水平很低,几乎难以检测到,但个别基因表达又过高,转基因动物难以承受。第四,转基因的遗传率低,许多研究表明,转基因动物及其后代并不能够保证外源基因世代传递,外源基因整合后容易从基因组型中消失,并不能在任何情况下连续传代。只有单位点整合才能以孟德尔方式遗传。第五,基因整合的机制尚不清楚,人们对动物许多重要基因的结构和功能以及表达的调控机制尚不完全清楚,就目前转基因动物技术而言,成功的随机性很大,有待于从机制上予以突破。第六,生产成本高,由于基因整合与表达效率较低,生产一头有用的转基因动物,需用大量供体和受体动物,涉及很高的研究费用,转基因动物产业化受到很大限制。据Wall等<sup>[57]</sup>计算,生产一头祖代转基因猪需花费2.5万美元,生产一头转基因牛需要50万美元。

转基因动物在给人类带来诸多好处的同时,也有许多安全性问题。其主要包括:(1)具有某些优势性状的转基因动物可能会对生态平衡以及物种的多样性产生不良影响;(2)转基因动物器官移植可能会增加人兽共患病的传播机会;(3)用转基因动物生产的食物有可能使食用者发生过敏反应;(4)转基因动物的研究还将引发一系列社会伦理问题。为了确保转基因动物对人体的安全性,在大规模生产之前必须对转基因动物进行严格的生物安全检测。

## 4 展望

转基因技术从诞生到现在已经经过了大约40年的发展历程,在这段时间里,生物学家们不断取得新进展、新突破,这表现在转基因领域新的研究方法不断涌现,转基因技术的应用范围也越来越广。尽管现在还有一些技术关键问题亟待解决,还有一些理论问题需要阐明,现在的研究成果与当前实际需要尚存在相当距离,不过随着转基因研究的继续深入和相关生物工程技术的进步及其产业的发展,必将为解决21世纪人类生存相关的重大问题如粮食、资源、健康、环境等问题发挥巨大的作用。目前,转基因动物的应用主要在医药方面,而在食品工业中的应用尚受到较大的制约,其根本原因是转基因动物的开发投入很大,而成功率比较低,另外食品安全、社会心理也对这一领域的进展产生影响。尽管如此,转基因技术还是初步显示出了它在工业、农业及医学等行业中的巨大应用潜力和发展前景,给人类将带来巨

大的经济效益, 推动社会向前发展。而相关法规的出台, 无疑会加速和正确引导基因工程产品的研究和开发。相信在不久的将来, 转基因动物生产将会成为生产行业中的一种新兴产业。因此, 充分利用转基因技术的潜在价值, 实现转基因技术实用化、商业化以及转基因动物的产业化, 是 21 世纪生物科学工作者努力的目标。

### 参考文献(References)

- Berg H, Eckardt K. Interaction of anthracyclines and anthracyclones with DNA. *Z Naturforsch B* 1970; 25(4): 362-7.
- Jaenisch R, Mintz B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71(4): 1250-4.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryo by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77(12): 7380-4.
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, *et al.* Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 1982; 300(5893): 611-5.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, *et al.* Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 1985; 315(6021): 680-3.
- Lee HG, Lee HC, Kim SW, Lee P, Chung HJ, Lee YK, *et al.* Production of recombinant human von willebrand factor in the milk of transgenic pigs. *J Reprod Dev* 2009; 55(5): 484-90.
- Liu Y, Lin JS, Zheng XM, Tan JQ, Wang ZJ, Zhang Q, *et al.* Establishment of PEG10 transgenic mouse and effects of PEG10 on growth, metastasis of transplanted tumor in mice. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2009; 17(6):455-8.
- Salter DW, Smith EJ, Hughes SH, Wright SE, Crittenden LB. Transgenic chickens: insertion of retroviral genes into the chicken germ line. *Virology* 1987; 157(1): 236-40.
- Bosselman RA, Hsu RY, Boggs T, Hu S, Bruszewski J, Ou S, *et al.* Replication-defective vectors of reticuloendotheliosis virus transduce exogenous genes into somatic stem cells of the uncultured chicken embryo. *J Virol* 1989; 63(6): 2680-9.
- Chan AW, Homan EJ, Ballon LU, Burns JC, Bremel RD. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(24):14028-33.
- Moreno R, Rosal M, Martinez I, Vilardell F, Gonzalez JR, Petriz J, *et al.* Restricted transgene persistence after lentiviral vector-mediated fetal gene transfer in the pregnant rabbit model. *J Gene Med* 2008; 10(9): 951-64.
- Kvell K, Czömpöly T, Hiripi L, Balogh P, Kóbor J, Bodrogi L, *et al.* Characterisation of eGFP-transgenic BALB/c mouse strain established by lentiviral transgenesis. *Transgenic Res* 2009; 19(1): 105-12.
- Liu JW, Pernod G, Dunoyer-Geindre S, Fish RJ, Yang H, Bounameaux H, *et al.* Promoter dependence of transgene expression by lentivirus-transduced human blood derived endothelial progenitor cells. *Stem Cells* 2006; 24(1): 199-208.
- Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* 1989; 57(5): 717-23.
- Yee GM, Squires PM, Cejic SS, Kennedy TG. Lipid mediators of implantation and decidualization. *J Lipid Mediat* 1993; 6(1-3): 525-34.
- Lavitrano M, Bacci ML, Forni M, Lazzereschi D, Di Stefano C, Fioretti D, *et al.* Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(22):14230-5.
- Shen W, Li L, Pan Q, Min L, Dong H, Deng J. Efficient and simple production of transgenic mice and rabbits using the new DMSO-sperm mediated exogenous DNA transfer method. *Mol Reprod Dev* 2006; 73(5): 589-94.
- Li L, Shen W, Min L, Dong H, Sun Y, Pan Q. Human lactoferrin transgenic rabbits produced efficiently using dimethylsulfoxide-sperm-mediated gene transfer. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18(6): 689-95.
- 苗向阳, 丁淑燕, 郝慧芳, 杨文胜. 精子介导法制备转基因鸡的研究. *中国畜牧兽医* 2007; 34(7): 67-9.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385(6619): 810-3.
- Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, *et al.* Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997; 278(19): 2130-3.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, *et al.* Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol* 1998; 16(7): 642-6.
- Macháty Z, Bondioli KR, Ramsoondar JJ, Fodor WL. The use of nuclear transfer to produce transgenic pigs. *Cloning Stem Cells* 2002; 4(1): 21-7.
- Umeyama K, Watanabe M, Saito H, Kurome M, Tohi S, Matsunari H, *et al.* Dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1alpha induces diabetes in transgenic-cloned pigs. *Transgenic Res* 2009; 8(5): 697-706.
- Kang MJ, Kim MK, Terhune A, Park JK, Kim YH, Koh GY. Cytoplasmic localization of cyclin D3 in seminiferous tubules during testicular development. *Exp Cell Res* 1997; 234(1): 27-36.
- 沈新明, 乔贵林, 张玲, 江培洲, 黄华, 姚开泰. 用曲细精管微注射法建立绿色荧光蛋白转基因小鼠. *第一军医大学学报* 2002; 22(3): 250-3.
- Yuan J, An J, Gu WW, Huang WJ. Experimental study on generation of transgenic mice by combination of intratesticular injection with *in vivo* electroporation. *J S Med Univ* 2007; 27: 168-71.
- Yang SY, Wang JG, Cui HX, Sun SG, Li Q, Gu L, *et al.* Efficient generation of transgenic mice by direct intraovarian injection of plasmid DNA. *Biochem and Biophys Res Commun* 2007; 358(1): 266-71.
- Li B, Sun G, Sun H, Xu Q, Gao B, Zhou G, *et al.* Efficient generation of transgenic chickens using the spermatogonial

- stem cells *in vivo* and *ex vivo* transfection. *Sci China C Life Sci* 2008; 51(8): 734-42.
- 30 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391(6669): 806-11.
- 31 Montgomery MK, Xu S, Fire A. RNA as a target or double-stranded RNA mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (26): 15502-7.
- 32 Wilkins C, Dishongh R, Moore SC, Whitt MA, Chow M, Machaca K. RNA interference is an antiviral defence mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2005; 436 (7053):1044-7.
- 33 Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunias results in reversible cosuppression of homologous gene in trans. *Plant Cell* 1990; 2: 279-89.
- 34 Hasuwa H, Kaseda K, Einarsdottir T, Okabe M. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett* 2002; 532 (1-2): 227-30.
- 35 杨志峰, 王 龙, 杨生生, 匡 颖, 陈 欢, 徐国江, 等。慢病毒载体介导 I $\kappa$ B 激酶 - $\alpha$ (IKK $\alpha$ )基因 RNA 干扰转基因小鼠的制备。生物化学与生物物理进展 2007; 34(2): 215-21.
- 36 Ramsoondar J, Vaught T, Ball S, Mendicino M, Monahan J, Jobst P, *et al.* Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus small interfering RNAs. *Xenotransplantation* 2009; 16(3): 164-80.
- 37 Muller U. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev* 1999; 82(1-2): 3-21.
- 38 Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987; 51 (3): 503-12.
- 39 McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 2000; 405(6790): 1066-9.
- 40 Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, *et al.* Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002; 295 (5557): 1089-92.
- 41 Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H, Sathiyaselan J, Sullivan EJ, Kakitani M, *et al.* Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin- $\mu$  and prion protein in cattle. *Nat Genet* 2004; 36(7): 775-80.
- 42 Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE, Bannerman DD, Pursel VG, *et al.* Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Biotechnol* 2005; 23(4): 445-51.
- 43 Lai L, Kang JX, Li R, Wang J, Witt WT, Yong HY, *et al.* Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat Biotechnol* 2006; 24(4): 435-6.
- 44 van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Lo $\ddot{u}$ e C, Heyer BS, Bradshaw R, *et al.* Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 2006; 441 (7094): 766-9.
- 45 Wu S, Ying G, Wu Q, Capecchi MR. A protocol for constructing gene targeting vectors: generating knockout mice for the cadherin family and beyond. *Nat Protoc* 2008; 3(6): 1056-76.
- 46 Pursel VG, Pinkert CA, Miller KF, Bolt DJ, Campbell RG, *et al.* Genetic engineering of livestock. *Science* 1989; 244(4910): 1281-88.
- 47 曹果清, 周忠孝, 朱向芳. 转基因猪的研究进展. 畜牧与兽医 2002; 34(5): 40-5.
- 48 陈清轩, 曹 颀, 宋德秀, 陈永福, 魏庆信. 猪生长激素基因表达质粒的构建及其转基因动物研究. 生物化学杂志 1997; 13(5): 540-5.
- 49 Damak S, Su H, Jay NP, Bullock DW. Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor I. *Biotechnology (N Y)* 1996; 14(2): 185-8.
- 50 Powell BC, Walker SK, Bawden CS, Sivaprasad AV, Rogers GE. Transgenic sheep and wool growth: possibilities and current status. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6(5): 615-23.
- 51 Wen H, Lan X, Zhang Y, Zhao T, Wang Y, Kajiura Z, *et al.* Transgenic silkworms (*Bombyx mori*) produce recombinant spider dragline silk in cocoons. *Mol Biol Rep* 2010; 37(4): 1815-21.
- 52 王敏华, 王 斌, 江金益, 范必勤, 赵启祖, 谢庆阁, 等。转移抗猪瘟病毒核酸基因兔的研究. 畜牧兽医学报 1996; 27(4): 319-25.
- 53 Clements JE, Wall RJ, Narayan O, Hauer D, Schoborg R, Sheffer D, *et al.* Development of transgenic sheep that express the visna virus envelope gene. *Virology* 1994; 200(2): 370-80.
- 54 Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H, Sathiyaselan J, Sullivan EJ, Kakitani M, *et al.* Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin- $\mu$  and prion protein in cattle. *Nature Genet* 2004; 36(7): 775-80.
- 55 Kerr DE, Plaut K, Bramley AJ, Williamson CM, Lax AJ, Moore K, *et al.* Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 2001; 19(1): 66-70.
- 56 Wang X. Cre transgenic mouse lines. *Methods Mol Biol* 2009; 561: 265-73.
- 57 Wall RJ, Hawk HW, Nel N. Making transgenic livestock: genetic engineering on a large scale. *J Cell Biochem* 1992; 49(2): 113-20.

## Research and Application of Animal Transgenic Technology

Rui-Jie Zhang, Xiang-Yang Miao\*

(*Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China*)

**Abstract** The animal transgenic technology which originated from the 70s~80s of the 20th century was a kind of advanced biological technology. It foreshowed a broad prospect for application as its birth. After years of development, the transgenic technology had formed many mature methods, such as microinjection method, retroviral vector method, sperm vector method, somatic cell nuclear transplantation method and so on. There were also many new methods emerged in recent years. They were gonadal injection method, RNAi method, combination of gene targeting with cloning and so on. In this paper, we mainly summarized the basic principles of various kinds of transgenic technologies and their latest research trends at home and abroad on the basis of previous studies, besides, we also discussed the advantages and disadvantages of different kinds of transgenic methods in detail. At last, we described the application of transgenic technologies in livestock. Apart from this, we also analyzed the problems in transgenic technologies.

**Key words** transgenic technology; RNA interference; gene targeting; animal cloning; bio-reactor

---

Received: November 23, 2009 Accepted: August 31, 2010

This work was supported by a grant from the Major Science and Technology Project of New Variety Breeding of Genetically Modified Organisms(No.2009ZX08008-004B, No.2008ZX08008-003), the National High Technology Research Development Program of China (863 Program)(No.2008AA10Z140), the National Natural Science Foundation of China(No.30571339) and the Innovation Research Foundation of CAAS(No.2004-CAAS-1)

\*Corresponding author. Tel: 86-10-62895663, E-mail: mxy32@sohu.com