

生产转基因动物的技术现状

成国祥* 左嘉客

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

用实验手段, 可将特定外源基因导入早期胚胎的细胞, 由此整合到染色体上, 还可通过被整合动物的生殖细胞系传给子代。这类整合外源基因的“新动物”被统称为转基因动物 (Transgenic Animals)。

按人为意愿设计生产转基因动物, 能达到如下若干目的: 1) 将理想的遗传物质导入动物染色体, 以扩大种内遗传变异, 回避有性繁殖所固有的局限性, 使基因能在种系关系遥远的机体间流动; 2) 通过转基因动物的表达, 提供一些具有经济价值的新型蛋白; 3) 能有效地回避不利基因, 使有利性状转移到高产性能的种系中, 以减少回交所需的劳力、财力和时间; 4) 通过转基因, 设计并生产出特定的实验动物模型。

近10年, 世界上已有许许多多实验室开展转基因动物方面的研究工作, 取得了不少有价值的成果。

生产转基因动物技术的关键主要涉及: 对外源基因组构、载体、受体(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宿主动物等等的选择是否恰当, 以及一些有关转基因是否整合和表达的鉴定技术。

本文的重点就转基因动物生产的关键技术——基因导入法的研究现状, 应用以及各方法的优缺点, 作一简单介绍。

一、基因显微注射法

在显微镜下借助于显微操作仪, 将毛细玻璃管针直接插入受精卵的原核中, 注入特定外源基因。一般采用的显微玻针直径为 $0.5-1\ \mu\text{m}$, 注射量约为 $2\ \text{p}1$, 并以原核膨胀作为外源基

因被正确注入原核的形态依据。注射后的受精卵经体外培养 $0.5-1$ 小时, 即可移植同步发情的受体动物输卵管中, 或经体外培养, 待发育至囊胚后再移植到受体动物的子宫内, 以保证转基因胚胎继续正常发育, 直至分娩产出。实验动物如兔、小鼠, 用结扎输精管的雄性动物与可育的雌性动物交配假孕而获得受体, 大家畜牛、羊、猪等受体动物用前列腺素处理同步发情而获得。

本法虽为最早发展的技术, 但仍属有效的。在大家畜上运用此技术, 要比早期在小鼠上施行转基因的难度高, 因为大家畜所能提供的受精卵数较少; 又较难把握住大家畜早期胚胎的发育时序, 以正确无误地取得足量的原核期受精卵; 更甚者, 在大家畜受精卵的细胞质中, 含有不少脂肪和色素等透光度低的颗粒, 降低了原核的可见度。尽管如此, 本法仍被成功地应用于猪、绵羊和牛。目前所选用的受精卵太多为超数排卵后的受精卵。在微分干涉相差显微镜下, 不经处理就能直接观察到绵羊受精卵的原核, 而猪和牛的受精卵, 事先必须经离心处理, 才能使原核显露。研究表明, 适当离心处理并不影响受精卵的进一步发育。

在小鼠, 转基因整合率(基因整合的幼仔数/移植的胚胎总数)可达 6% , 而家畜较低。Hammer 等将金属硫因——人生长激素融合基因注入猪和绵羊受精卵, 转基因整合率分别为 0.98% 和 0.1% ^[1]。这一结果提示, 在注射后的整合过程中, 可导致不少胚胎死亡。由转基因胚胎发育至胎儿并顺利分娩产出的百分比, 约

* 现在江苏农学院任教。

为5%—20%胎儿死亡可发生在怀孕各阶段。其原因一则是由于显微手术对胚胎损伤所致,另则可能是外源基因整入胚胎的基因组后,引起插入突变,有些插入突变是致死的。目前尚无法预测转基因胚胎的质量。倘若在注射基因后,在体外与单层体细胞共培养,或在异种或同种动物输卵管中寄养一定时间后,冲洗收集胚胎。选择能继续发育的胚胎移植,这样可大大提高转基因整合率。

聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, 简写 PCR)能检测少量胚胎细胞内 DNA 中存在的单拷贝基因,甚至能检测出单个精子或二倍体细胞基因组中的单拷贝基因^[2]。可是 PCR 检测法尚存在某些弊端,首先它需要有特定的引物,其次用的 ³²P 标记探针的半衰期短,反应显示所需时间长,使得杂交反应不能随时进行,胚胎较难保存。最近用非同位素异羟基洋地黄毒甙(Digoxigenin)标记探针,不仅具备 ³²P 标记探针的灵敏度,且稳定,12小时之内可完成 PCR 检测。这样,可通过 PCR 快速检测出植入前胚胎是否整合外源 DNA。取阳性胚胎,再利用核移植技术,可克隆出更多的整合外源基因的动物。

二、染色体片段显微注入法

从人或动物染色体上割取特定的染色体片段,然后注入动物早期胚胎中,以获得携带外源 DNA 的动物。用这种方法设计而获得的动物,严格地讲应称作转染色体动物(Transomics)。Brunt 介绍 Lo 及其同事成功地从分裂中期的成纤维细胞染色体中显微切割下着丝粒,该染色体片段长约 1—1.5 Kb。注入胚胎并移植受体动物后,能发育成为小鼠个体。进一步检测证实染色体片段已整合在小鼠细胞基因组中^[3]。由于片段不是注射到原核期受精卵中,因而被整合的动物都是嵌合体,成为不足之处。

鉴于本法导入的遗传信息片段长,在 1000 Kb 以上,所以能生产出具备某些特殊疾病的

实验动物模型。

三、重组的逆转录病毒感染着床前胚胎

把重组的逆转录病毒载体 DNA 包装成高滴度病毒颗粒,去感染着床前胚胎,于是携带外源基因的逆转录病毒 DNA 可在感染过程中整合到该宿主的染色体内。此法操作较简便,可通过注射将病毒转移到囊胚腔内,或将去透明带的胚胎与分泌病毒颗粒的细胞共培养,以达到外源基因转移到胚胎中的目的。感染后的整合率较高,整合的多是单拷贝,单一位点,且在染色体的整合位点附近未发生明显的重排。然而本法有欠缺之处,由于选用的转移宿主不是原核期受精卵,而是卵裂之后的胚胎,致使外源基因在动物各种组织中的分布不均,不易整合到生殖细胞中。病毒的 DNA 序列有时会影响外源基因在宿主中的表达。此外,病毒衣壳大小有限,所能包裹的外源基因的大小有限,最大限度为 8 Kb。用病毒作为载体导入动物,就其安全性问题一直引人深思。

人们成功地以鼠莫氏白血病病毒作为载体,携带外源基因导入鼠胚胎。最近用猫白血病病毒作为载体,也成功地将外源基因导入去透明带的羊胚胎中^[4]。

实际上,本法非常适用于禽类,因为很难观察到禽类受精卵的原核。Salter 等(1987)首先用反转录病毒作载体生产出转基因鸡^[5]。由于所用的载体为禽白血病病毒,然而一般的鸡,包括 SPF 鸡,都带有内源性白血病病毒,并整合在染色体上,所以选用供转基因的鸡胚必须是不含内源性白血病病毒的 Q 系鸡。载体病毒被注射到未孵化的受精鸡蛋卵黄卵中,由此感染早期的鸡胚。结果在 37 只 Go 代公鸡中,有 9 只是嵌合体,前病毒传给子代的频率为 1%—11%不等。按孟德尔式进行遗传,由此表明反转录病毒基因已插入鸡的生殖细胞系中。

Bosselman 等(1989)用复制有缺陷的病毒作为载体,这样就避开了载体复制完整病毒的严重后果^[6]。他们用网状内皮组织增生病毒

(REV)作为载体,因此被感染的鸡胚无需源自不含内源性白血病病毒的O系鸡。具体地讲,所用的载体为REV ME III,它携带REV LTR启动子驱动的Tn 5新霉素抗性基因和I型简单疱疹病毒结构基因,必须用含辅助病毒的C3辅助细胞复制,效价可达 10^4 TK转导单位。Bosselman等用ME III载体感染2599只鸡胚,孵出的760只仔鸡中,173只含载体序列。在82只全血检测阳性的公鸡中,33只的精液中含有载体序列。将血清和精液检测阳性的Go代公鸡与对照组鸡交配,传递给G₁后代的频率为2%—8%。Bosselman用携带生长激素基因的同样载体,获得了转基因鸡。综上所述,用反转录病毒作载体,把外源基因插入生殖细胞系基因组,是目前生产转基因家禽最有效的途径。

四、胚胎干细胞介导法

囊胚的内细胞团(Inner Cell Mass, ICM)中含有尚未分化的胚胎干细胞。体外建株的ICM细胞称EK(Embryonic karyotype cells)或ES(Embryonic stem cells)细胞。如果将EK细胞植入正常发育的囊胚腔中,它们能很快地与受体的ICM聚集在一起,参与正常胚泡的发育。

用电穿孔和磷酸钙沉淀法,将外源DNA转染到ES细胞中,其转染频率可分别达到万分之十和千分之一。用反转录病毒作载体感染ES细胞,感染率可达100%。筛选出整合的ES细胞,植入受体囊胚腔,由此发育而成的个体就可能携带着特定的外源基因。

Evans等从着床前小鼠胚胎分离出能在体外传代的正常全能干细胞,即EK细胞^[7]。同年, Martin等以不同方法培养出小鼠胚胎干细胞^[8]。小鼠全能干细胞株的建立无疑方便了转基因动物的生产。Alan等(1987)曾试图建立绵羊ES细胞株,但未获成功^[9]。次年, Doetschman建立了仓鼠胚胎干细胞株^[10], Evans等建立了猪的EK细胞株^[11]。

采用本法,外源基因的整合率很高,约达50%。整合在生殖细胞中的比例也相当可观,约为30%。其缺点是不易建立EK细胞株,又生产的转基因动物都系嵌合体。

随着家畜核移植技术的不断发展,可以避免生产嵌合体型的转基因动物,即把ES细胞核移植到去核受精卵中,由此可获得克隆动物^[12]。

随着分子生物学技术的飞速发展,借助于同源重组技术(Homologous Recombination),能将已知外源基因整合到染色体的特定位点上。通过目标质粒载体和细胞基因组DNA顺序间的同源重组,能生产出携带任何基因的或突变的小鼠品系,包括生产出特定基因功能缺陷的小鼠。但同源重组技术对未知基因是无法定向导入的。而最近几年发展起来的捕获载体(Entrapment Vectors)能克隆各种未知基因,因此有助于解决上述不足之处^[13]。

五、以精子作为载体的介导法

Lavitrano等首次用精子作为载体生产转基因小鼠。将能化后的小鼠附睾精子与含一定浓度的pSV 2 CAT表达型质粒温育半小时,再行体外受精和移植。结果有30%的个体整合了外源基因,而且这些外源基因都具有表达能力^[14]。显而易见,用此生产转基因动物,不仅可免去使用复杂而昂贵的设备,且可省略不少繁杂的操作和条件准备。遗憾的是,不少实验室无法重复Lavitrano等的实验^[15]。不久, Arezzo等采取同样的方法在海星上重复了实验,并获得正结果^[16]; Gandolfi等成功地用精子载体将pSV 2 CAT基因导入猪卵,整合率达21%,被整合的外源基因全部具有表达能力^[17]。作者以精子为载体,体内受精,成功地将马立克38 Kd磷蛋白基因转移到新扬州鸡的基因组内,但整合率约为5%。

结束语

综上所述,可以看到作为转基因动物生产

关键步骤的基因导入技术正处在进一步发展和不断完善之中,其发展主要集中在两个方面,一是提高转入基因的整合表达率,二是实现基因定点转移和新基因克隆。随着诸如显微注射等原有技术的不断完善以及捕获载体法等新技术的不断涌现,基因导入技术将会日趋提高和充实,从而使转基因动物生产技术日臻成熟,并更好地造福于人类。

参 考 文 献

- [1] Hammer, R. E. et al., 1985, *Nature*, 315: 680—683.
 [2] Li, H. et al., 1988, *Nature*, 335: 414—417.
 [3] Brunt, J. V., 1990, *Biotechnology*, 8: 725—728.
 [4] Hetle, S, J. H. et al., 1979, *J. cell Biochem.*, Suppl. 13 B: 180.
 [5] Salter, D. W. et al., 1987, *Virology*, 157: 236—240.
 [6] Bosselman, R. A. et al., 1989, *Science*,

243: 533—535.

- [7] Evans, M. J. et al., 1981, *Nature*, 292: 154—156.
 [8] Martin, G. R., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 78: 7634—7638.
 [9] Alan, H. et al., 1987, *Arch. Dev. Biol.*, 196: 185—190.
 [10] Doetschman, T. et al., 1989, *Dev. Biol.*, 127: 224—227.
 [11] Evans, M. J. et al., 1990, *Theriogenology*, 33: 125—128.
 [12] Wilmut, I. et al., 1990, *Theriogenology*, 33: 113—123.
 [13] Skarnes, W. C., 1990, *Biotechnology*, 8: 889—891.
 [14] Lavitrano, M. et al., 1989, *Cell*, 57: 717—723.
 [15] Brinster, R. L. et al., 1989, *Cell*, 59: 239—241.
 [16] Arezzo, F., 1989, *Cell Biol. International Reports*, 13: 391—403.
 [17] Gandolfi, F., 1989, *J. Reprod. Fert., Abstr.*, 16.

肥大细胞的分化及其调节

汝 小 美

(北京放射医学研究所 100850)

肥大细胞(mast cell)是一种广泛存在于哺乳类动物体内的细胞,人类对它的认识可以追溯到一个多世纪前。当时,还是医学生的诺贝尔奖获得者 P. Ehrlich 首次描述了两种胞浆中有嗜碱性颗粒的细胞即循环于血液中的嗜碱性粒细胞和位于结缔组织的肥大细胞。但多年来,人们对之仍知之甚少。1950年肥大细胞在变态反应中的作用得到了证实。由于普通光学显微镜下肥大细胞的清晰易辨的形态和它在止血过程中可能具有重要而未被充分认识的作用,肥大细胞一度吸引了形态学家和比较生物学家的兴趣。近数10年,有关肥大细胞研究的一些进展引起了更多人们的注意,从而推动了这一领域的研究使之更为活跃,1985年并召

开了肥大细胞研究的专题性国际讨论会。迄今的研究已证明,肥大细胞来源于骨髓^[1],是多能造血干细胞的后裔^[2],分化过程有自身特点。本文仅就肥大细胞的分化及其调节作简要综述。

一、肥大细胞分化的特点

虽然同为造血干细胞的后裔,肥大细胞却有自己独特的分化过程。表现为(图1):

1. 红细胞、血小板及粒细胞均在分化后才离开骨髓,肥大细胞却是在前体细胞阶段便离开骨髓移向血流^[3,4],随后离开血管进入组

本文承葛忠良教授审阅,谨致谢忱。