

·学科进展·

转基因动物研究的现状与展望

戴旭明 李 坚 傅继梁

(第二军医大学医学遗传教研室,医学分子遗传学开放实验室,上海 200433)

[摘要] 简要评述了国内外转基因动物研究的现状,归纳了目前常用的几种转基因动物遗传修饰的策略,比较分析了几种转基因动物建立途径的特点以及存在的问题。在此基础上介绍了国家自然科学基金重点项目“医学转基因动物模型研究”的研究内容,并对转基因动物研究的未来发展作了展望。

[关键词] 转基因动物

转基因动物(transgenic animal)技术是通过遗传工程的手段对动物基因组的结构或组成进行人为的修饰或改造,并通过相应的动物育种技术使得这些经修饰改造后的基因组在世代间得以传递和表现^[1]。利用这一技术,人们可以在动物基因组的特定定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,在动物发生、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农场;可以将所引入的DNA片段作为环境诱变剂作用的靶DNA,通过对它回收后的结构分析,研究诱变剂造成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中的应用越来越广,技术本身的发展也越来越快,朝着修饰和精确性与可调性日益逼近。本文着重介绍对动物基因组进行修饰改造的策略和转基因动物建立技术这2个方面的发展情况。

1 转基因动物技术体系的组成

70年代中期至今,伴随着遗传学、细胞学、胚胎学和基因工程等学科及其相关技术的发展,转基因动物技术已经经历了近20年的发展,从原理、技术和在生命科学研究领域中的应用来看,可以将转基因动物研究的整个系统归纳为以下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,并进一步地开发利用符合设计要求的遗传工程动物。

其中“上游部分”是基础,根据相关的基础研究为后续转基因动物研究提出需解决的问题;“中游部分”是技术的关键,也是整个技术体系的核心;而“下游部分”则是目的。近年来以“基因组计划”为代表的遗传学研究在认识基因组的结构组成方面正在大步地向前迈进,为通过转基因动物技术对动物基因组进行修饰提供了坚实、丰富的基础。可以预见,对大量基因相关的基础问题的研究在各个学科深入发展的同时,希望应用转基因动物技术在整体动物背景上观察特定基因或基因组合的结构与功能的关系的需求也日益迫切。因此,发展和完善转基因动物技术必然成为整个生命科学研究发展进程中的关键之一。

2 转基因动物遗传修饰的策略及其发展

从理论上讲,遗传工程的发展,已有可能运用多

本文于1999年7月5日收到。

种策略在体外培育的哺乳动物细胞中对任何一个或几个已知基因组结构和 DNA 序列的位点进行各种类型的遗传修饰。

2.1 导致产生新功能的基因组修饰 (gain of function, GOF)

(1) 普通转基因: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。

(2) 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。

2.2 导致功能丢失的基因组修饰 (loss of function, LOF)

(1) 插入突变:外源 DNA 片段在基因组中发生整合后,势必造成插入位点的基因组结构发生变化,如果该位点是某基因的所在位点,造成相应基因的结构破坏而导致的 LOF,可以是在进行 GOF 的转基因时发生的,也可以是利用插入型载体进行的基因打靶。

(2) 大片段缺失突变:利用置换型的基因打靶载体,将内源基因的功能片段用某些选择基因片段替换而造成 LOF 的基因打靶方式。

(3) 引入点突变:通过基因打靶,可以对基因组中的特定的位点引入单个碱基置换或几个碱基的定向改变。

(4) 条件性基因缺失突变:利用位点特异性重组系统,如 Cre-loxP, FLP/FRT 系统,通过对造成体内基因打靶的重组酶表达的调控,在特定的组织或不同的发育阶段特异性地、或诱导性地实现所要求的遗传修饰事件,借以克服某些重要的基因在纯合缺失或杂合缺失状态下的致死效应和生存能力下降的问题。

2.3 导致基因替换的基因组修饰 (LOF/GOF)

基因替换:利用基因打靶技术进行的基因替换,使得替换位点上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的结构。

2.4 染色体畸变^[2]

利用位点特异性重组系统介导的 DNA 重组原理,通过对重组酶识别的位点在染色体上位置的控制以及重组酶表达的控制,可以造成各种类型的染色体畸变,如重复、倒位、相互易位等等。

由此可见,就遗传修饰的后果来看,可以造成基因结构和功能的丢失 (LOF),也可以造成基因结构和功能的获得 (GOF);可以对基因组造成较大范围的缺失突变,也可以在基因组的特定部位引入单个碱基的改变;可以对 DNA 片段进行操作,也可以造成染色体结构的人为变化;可以造成基因的缺失突变,也可以在内源基因的位点附近引入相同的基因重复;可以造成“永久的”(相对于“条件性”的而言)基因组结构改变,也可以造成“条件性”的遗传修饰,使得遗传修饰变得受人为了的精确调控。所以说,对于一个细胞中的某一特定的基因组结构,目前已经能够进行各种类型的遗传修饰,而将这些遗传修饰过渡到转基因动物,则取决于育种技术的进步。

3 建立转基因动物途径及其发展

能否将在细胞中进行的遗传修饰过渡到整体以及实现向后代的传递,主要取决于所进行修饰的细胞类型和与其相应的育种技术。至今为止,能够被有效地用来进行转基因动物研究的途径主要有以下几条:

(1) 受精卵原核显微注射和育种:以单细胞期受精卵为靶细胞,利用显微注射技术将构建好的载体 DNA 直接注入受精卵的原核,并将受注射的受精卵移入假孕母体输卵管继续发育,获得转基因动物个体。该途径获得 GOF 模型的效率高,操作简便,实验周期短;其转基因的长度没有严格限制;适用的动物物种广泛。但由于转基因的整合是随机的,因此整合的位点、拷贝等均难以精确控制。同时随机整合也可造成较严重的插入突变,影响基因组的其他结构和功能,无法满足精确修饰的要求。此外遗传修饰的方式无法在细胞阶段得到确证,必须在得到转基因动物后才能验证。目前在普通的 GOF 转基因动物研究中,受精卵原核显微注射已作为常规方法推广应用。

(2) 胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ES) 介导的基因转移和育种^[3]:体外培养 ES 细胞,利用电穿孔等基因转移技术将载体 DNA 转入 ES 细胞后,在体外经过适当的筛选和鉴定,首选得到符合设计要求的基因组修饰,再将所获得的 ES 细胞经过囊胚腔注射等与受体囊胚细胞混合,并移植入假孕母体子宫继续发育产生嵌合体,通过利用生殖系嵌合子代设计适当的交配育种,获得纯系。该系统能将所有上述的遗传修饰在细胞中得以实现,并可以由此引入到转基因动物整体,遗传修饰能力强且十分精确。

基因转移操作方便,体外培养细胞阶段即可经分子鉴定来保证只有发生预设遗传修饰 ES 细胞用于囊胚腔注射,提高了效率。但目前可用于该系统的 ES 细胞系只来源于小鼠,适用物种少。此外动物育种需经过嵌合体途径,受 ES 细胞的生殖系嵌合能力以及交配几率的影响,实验周期较长。

(3)体细胞基因转移和克隆^[4]:以体外培养的哺乳动物体细胞为材料,通过普通的哺乳动物细胞基因转移技术,获得相应的经过遗传修饰的细胞后,直接利用核移植介导的哺乳动物体细胞克隆技术,即将该体细胞的细胞核移入去核的卵细胞中,并将所得细胞移入代孕动物,获得转基因动物克隆个体。该系统不仅具有“ES 细胞途径”的全部优点,而且物种适用面广,无需经过嵌合体育种就可直接获得纯合个体,实验周期短,效率高。但作为一个较新的技术体系,体细胞克隆技术在基础理论和实验技术上尚待进一步地完善。从目前已有的几个体细胞克隆动物的实验结果来看,普遍反映出实验的成功率较低。该体系的成熟和推广应用依赖于受精卵和核移植卵发育程序的准确启动和精细调控,而这方面的基础研究较为薄弱,目前尚难在规模水平开展。据报道世界上首例体细胞克隆动物“多利羊”出现了早衰的迹象^[5]。这反映出在体细胞重新回复到发育全能性细胞的过程中,尚有许多基因表达精细调控的未知细节。从长远的观点来看,大力发展体细胞克隆技术并推广应用到转基因动物的建立,必将大大推动转基因动物技术的发展,它可以综合所有途径的优点,又可以克服它们的缺点,应该说是理想的发展方向。同时 ES 细胞在体外能长期建系培养,又能维持正常的核型,这是其他核型正常的体细胞所不具备的,可能成为在细胞水平对基因组进行精确的遗传修饰的一个重要基础。所以,先在 ES 细胞中完成各种遗传修饰,再利用体细胞克隆技术将遗传修饰向整体动物过渡,将可能是一条非常有效的途径。

(4)精子介导的基因转移和育种^[6]:将精子细胞(通常是灭能后,即细胞膜被破坏后)与转基因载体 DNA 混合共浴后,将精子头部直接注入卵细胞,经过人工受精的受精卵移入假孕母体输卵管继续发育获得转基因动物个体。该方法涉及的基因转移方法简便,效率高;育种所用的体外受精技术已经相当成熟;动物育种不经过嵌合体,实验周期短。但从目前的研究结果来看该体系和“受精卵显微注射”途径一样具有目的基因整合的随机性和无法早期验证遗传修饰事件等缺点,成功的例子不多,还有待进一步

的研究。鉴于体外受精卵技术比较成熟,该途径也可能成为较有效的 GOF 转基因动物的建立技术,也可以作为进行生殖系细胞基因治疗的实验研究途径。

4 存在的主要问题及研究重点

综合上述情况,我们认为,在进行转基因动物研究时,提高对动物基因组进行遗传修饰后的精确性、可调控性以及可对比性,是转基因动物能否广泛地用于目的各异的生命科学研究的关键,同时,如何有效地将精确的遗传修饰在整体动物中得到表现和实现世代间的传递则是转基因动物技术的关键。理想化的作法是在一种体外培养的永生的体细胞中实现各种精确的遗传修饰,并通过核移植介导的体细胞克隆等方法有效地将经过修饰的体细胞基因组过渡到整体动物并实现世代传递。在克隆技术尚不可能推广应用的时候,针对转基因整合的随机性问题、ES 细胞育种的效率低等问题,以及在我国切实建立向动物基因组引入点突变、引入基因重复突变、引入条件性突变等几种精确修饰基因组的策略,我们拟开展的工作主要包括 4 个方面:

(1)通过提高 ES 细胞体外培养技术以及观察研究 ES 细胞体内分化规律及其影响因素,来提高 ES 细胞生殖系嵌合能力。我们试图通过建立高效表达报告基因(绿色荧光蛋白,GFP)的 ES 细胞株系和相应的示踪系统,并利用该 ES 细胞系来系统研究 ES 细胞在囊胚腔移植后的分化规律。我们构建了高效表达报告基因 GFP 的载体,以电穿孔的方式转入 ES 细胞,经筛选后得到阳性 ES 细胞移入小鼠的囊胚中,比较分析了 ES 细胞移入不同的胚胎发育期的实验结果。目前已获得了嵌合体小鼠,正在对移植 ES 细胞的分化规律进行分析。

(2)基于 hprt(hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase,次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶)基因位点的转基因定点整合系统的建立^[7]:针对受精卵原核显微注射法中转基因随机整合的缺点,我们曾提出建立“转基因定向整合系统”。结合基于 DNA 同源重组的基因打靶原理和位点特异性重组系统介导的重组和受精卵原核显微注射途径,来实现 GOF 的转基因定向整合。我们设计构建一套通用的将外源基因定向整合于小鼠 hprt 基因位点的工具载体,拟以与 Alzheimer's 病有关的一种 cdc2 型激酶 nck5a 基因进行可行性和应用研究^[8,9],可望得到一条可以用于 GOF 型转基因小鼠模型建立的通用系统;

(3)向基因组中引入点突变的基因打靶研究:建立引入点突变基因打靶的技术体系,以精确地再现自然界的基因突变,具有重要的实用意义。我们以与血友病 B 发生有关的小鼠的凝血因子 IX (mFIX)^[10]基因突变为例进行普通 knockout 和用“in-and-out”策略在 FIX 基因组上特定的位点引入微小突变,以精确地模拟自然界的血友病 B 基因突变,在建立这一策略体系的同时,建立血友病 B 的模型;

(4)诱导性突变和引入基因重复的基因打靶策略研究:该体系对组织特异性表达的基因功能及基因的数量性状的研究有重要的意义。我们已经进行了以脑内表达的 nck5a 基因为靶基因,构建基于位点特异性同源重组的 nck5a 基因的诱导型基因打靶和引入基因重复的基因打靶,研究神经细胞中蛋白(如 tau)磷酸化与神经系统的发育、Alzheimer 病中神经纤维的缠结等病理改变的发生。

通过上述四方面的工作,我们有可能摸索建立一套高效的、完善的、能适应对基因组进行各种精确修饰需要的转基因动物研究体系。

参 考 文 献

[1] Roes J. Animal models in biomedical research: transgenesis and gene

- targeting. *Br. J. Hosp. Med.*, 1997, **57**(8):410—1.
- [2] Ramirez-Solis R, Liu P, Bradley A. Chromosome engineering in mice. *Nature*, 1995, **378**: 720—724.
- [3] Templeton N S, Robert D D, Safer B. Efficient gene targeting in mouse embryonic stem cells. *Gene. Ther.*, 1997, **4**(7):700—9.
- [4] Kato Y, Tani T, Sotomaru Y et al. Eight Calves Cloned from Somatic Cells of a Single Adult. *Science*, 1998, **282**:2 095—2 098.
- [5] Shields P G, Kind A J, Campbell K H et al. Analysis of telemeter length in cloned sheep. *Nature*, 1999, **399**: 316—317.
- [6] Perry A C F, Wakayama T, Kishikawa H et al. Mammalian Transgenesis by Intracytoplasmic Sperm Injection. *Science*, 1999, **284**: 1 180—1 183.
- [7] Wu C L, Melton D W. Production of a model for Lesch-Nyhan syndrome in hypoxanthine phosphoribosyltransferase-deficient mice. *Nature Genetics*, 1993, **3**:235—240.
- [8] Chae T, Kwon Y T, Bronson R et al. Mice lacking p35, a neuronal specific activator of cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron*, 1997, **18**:29—42.
- [9] Ohshima T, Ward J M, Huh C G et al. Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 1996, **93**: 11 173—11 178.
- [10] Schnieke A E, Kind A J, Ritchie W A et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997, **12**(19); **278**(5346):2 130—2 133.

THE CURRENT SITUATION AND PROSPECT OF TRANSGENIC ANIMAL STUDY

Dai Xuming Li Jian Fu Jiliang

(Department of Medical Genetics, Open Lab of Medical Molecular Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract This paper briefly commented the current situation of transgenic animal study in the world, summed up the genetic modification strategies commonly used and analysis the characters and problems of the pathways in the setup of transgenic animal comparatively. Meanwhile, This paper introduced the National Natural Science Fund Project “Study of Medical Transgenic Animal Models”, and look forward to the future of transgenic animal study.

Key words transgenic animal