

转基因动物研究中存在问题*

田小利 陈兰英

(中国医学科学院心血管病研究所, 北京 100037)

摘要

15 年来已建了许多用作研究人类疾病的转基因动物模型。转基因动物已作为研究代谢调节、分化、发育中有关基因功能的工具, 它已作为一种分子农场可生产基因产品等。但要看到, 转基因还有许多问题要解决。首先是转基因的阳性率低, 这是受了许多因素如 DNA 样品质量, 分子大小和结构, 动物种属, 原核的可见性, 注射针的调节和微注射技术等影响。通常转基因首建的阳性率在 10—20%, 有时甚至低于 1%。在基因操作后, 外源基因整合到宿主基因组, 可引起包括插入突变在内的宿主细胞基因突变, 缺失突变, 宿主基因扩增和位移。转基因的表达不能预测, 可能因转基因的改变, 质粒序列的影响, 整合部位和拷贝数不确实, 缺乏顺式作用元件或反式作用因子。这使得转基因功能分析紊乱。此外, 转基因动物模型可能和预期不符, 转基因过度表达可使动物表型异常。一些社会问题也将在本文中讨论。

关键词: 转基因存在问题 转基因阳性率 整合 基因突变 基因表达

一、转基因动物的效率

目前, 制备转基因动物最常用的方法仍是显微注射法, 从已积累的资料^(1,2,3)看, 在转基因的长度为几至 250kb 范围内(最近我们在试图导入 650kb 的 YAC), 此法转基因动物的阳性率(阳性子代动物/出生子代动物总数)为 10

~25%, 转基因的总效率(阳性子代动物/注射受精卵的总数)为 1~10%。但许多实验室远不能达到此效率⁽⁴⁾, 且阳性率结果重复性差, 甚至根本无法重复, 而有的实验室则长时间得不到转基因动物。Hochi 等⁽⁵⁾以鼠为例研究了显微注射法的转基因效率, 如下表所示:

批号	注射卵数	存活卵数	移植卵数	子代数	检测数	阳性鼠数
1	53	31	22	8	7	0
2	135	54	52	18	18	1
3	108	34	34	4	4	1
4	104	33	32	1	1	0
5	138	61	61	14	14	1
6	129	63	63	0	0	0
7	117	31	31	4	4	0
总数	784	307	295	49	48	3

其中转基因动物的阳性率(3/48)为 6.3%, 总效率(3/784)为 0.38%。另一组实验数

据则略高于此表(未显示), 但统计结果基本相同。我们对大鼠的统计结果与此接近: 阳性率为

* 本文发表得到国家“八五”科技攻关项目(编号 85-915-03-11)的资助

3.3%,总效率为1.0%。说明转基因动物的效率仍然很低。因此,我们认为提高转基因技术水平或改进转基因技术方法,增加转基因动物的阳性率,仍是目前所要解决的重要问题。

二、转基因的整合造成宿主细胞基因的突变

1. 插入突变

转基因整合于宿主动物的基因组时,可能会引起宿主染色体的插入突变,突变的发生率约为5~7%⁽⁶⁾。这种突变一方面为人们认识和发现新的基因提供了实验材料,但另一方面也干扰了人们正在进行的转基因研究,因为人们最初的转基因研究可能并不是为了研究突变。插入突变可以是中性突变或有义突变,有义突变可以引起动物表型的改变甚至造成动物的不育或死亡。如Overbreck等⁽⁷⁾在研究中发现,鲁斯氏肉瘤病毒的启动子和氯霉素乙酰转移酶基因拼成的融合基因引起的插入突变可造成鼠足连脚等,说明这种插入突变为有义突变。

2. 缺失突变

Woychik等⁽⁸⁾报道转基因引起小鼠四肢表型异常。进一步研究发现,当转基因插入2号染色体时,造成插入位点周围约1kb基因组片段的缺失,这种缺失突变可能是造成四肢畸型的原因。

3. 宿主基因的扩增和移位(translocation)

Palmiter等⁽⁶⁾曾观察到,转基因插入宿主动物基因组时,引起插入位点周围序列(约5kb)的倍增。Overbreck等⁽⁷⁾发现转基因插入后引起基因的移位等。

由于转基因介入动物的基因组可导致基因的突变,因此,如果转基因动物出现新表型时,应仔细区分此表型的产生是转基因表达的结果还是基因组突变的结果。

三、转基因的表达

1. 表达混乱

表达混乱包括:不在预期的组织中表达;子代中的表达情况不同;同一启动子在不同的个体或不同的动物中表达行为不同⁽⁶⁾。如 β -珠蛋白的转基因研究中,10个实验室所得到的表达情况不同(均使用天然启动子),其表达率(表

达的动物/总阳性动物)分别为0、18.7%、22%、40%、?、?、70%、75%和100%。转基因在细胞和动物水平的表达情况也可能不一样,如TK⁽⁹⁾和SV40⁽¹⁰⁾启动子在细胞水平均为强的启动子,但在某些转基因动物中的表达活性则较弱甚至不表达。因此,细胞水平的表达并不能完全作为判断外源基因是否在转基因动物中表达的标准,这也为转基因研究带来了困难。又如主要在颌下腺表达的小鼠Ren-2基因,在其转基因大鼠中则在肾上腺表达⁽¹¹⁾,不在预期组织中表达的原因是多方面的,可能是调节基因表达的顺式调控元件和反式作用因子之间的不协调造成的。外源基因被转入动物后,动物组织细胞并不是外源基因的“故乡”。因此,宿主动物在和原动物相同的组织细胞中可能缺乏相应的反式作用因子,而造成转基因不在预期组织中表达或表达混乱的结果。除此,宿主细胞基因和转基因之间的相互作用或转基因的整合位点不适,也可能是表达混乱的原因。子代表达行为不同包括:亲子表达行为不同,子代之间表达行为不同以及转基因在子代中表达消失。这也是转基因研究中难以解释和解决的问题。

2. 转基因的修饰与表达

Araki等⁽¹²⁾在乙型肝炎病毒的转基因研究中发现,有些阳性鼠在随雌性传代时,肝炎病毒基因的表达则受抑制,经研究发现,这些肝炎病毒基因在雌性动物的细胞中已被甲基化,因此,转基因表达的抑制可能和其甲基化有关。Pourcel等⁽¹³⁾在转基因研究中也发现,甲基化可以抑制转基因的表达。这些研究说明宿主动物细胞可以通过修饰-限制系统影响转基因的表达。

3. 载体序列影响转基因的表达

Chada和Townes等^(14,15)在 β -珠蛋白的转基因研究中发现:当将携带有质粒载体的 β -珠蛋白转入小鼠时,珠蛋白基因不表达或表达极低;删去载体序列时, β -珠蛋白的表达可提高100~1000倍。尽管并非所有的转基因表达都受载体序列的抑制,但在转基因工作中,当转基因携带有载体序列而又不表达时,考虑载体序列对转基因表达的影响是必要的。

4. 作为转基因的 cDNA 可能不表达

真核细胞基因被内含子分割,这些内含子中可能存在着基因表达的调控元件,在缺失内含子的 cDNA 中,这些元件也不存在,因此用 cDNA 作转基因时,转基因在宿主动物细胞中的表达将会受到影响甚至不表达。如 Lozano 等⁽¹⁶⁾曾用小鼠 P53 的 cDNA 和 SV40 的调控元件拼接成融合基因建立转基因动物,转基因阳性鼠中并不表达 p53。但若引入内含子 2~9,则 p53 的表达水平接近正常且具有组织特异性。说明对 p53 基因而言,内含子是其表达必需的调控元件。除此,Choi⁽¹⁷⁾和 Palmiter 等^(17,18)也研究了内含子对转基因表达的影响,均发现内含子(包括异源内含子)可以加强基因的表达。

5. 转基因部分整合时不表达

受精卵细胞在接受外源 DNA 时,可能只整合了外源基因的一部分,从而造成外源基因的残缺和不表达。Wagner 等将人 β -珠蛋白基因和 TK 基因转入小鼠时发现,得到的两只转基因鼠中,其中一只仅整合有人 β -珠蛋白基因的一部分,尽管该部分能传给子代,但并未表达。说明整合的基因未必都完整,而这种不完整的基因是不能表达的。

6. 转基因拷贝数可能影响其功能的实现

一般认为,转基因整合的拷贝数并不影响转基因的表达水平,但 Costatini 等⁽¹⁹⁾发现,将人 β -珠蛋白基因转入 β -地贫小鼠时,如果转基因的拷贝数大于 50,则地贫可被校正,而拷贝数为 1 时则无效。说明转基因整合的拷贝数也有可能影响转基因的表达和功能的发挥。除此,有人观察到转基因在染色体的整合位点对其表达也有影响,此不赘述。

由于转基因的表达受多种因素影响,给转基因表达调控的研究带来了不便,在工作中只有全面了解转基因在宿主动物细胞中的行为,才能正确认识转基因的表达调控的机制。

四、动物模型可能和预期不符

在镰刀状贫血动物模型的研究中,人们试图将突变的血红蛋白基因转入小鼠以获得镰刀

状贫血动物,但结果使研究者大失所望;所有的转基因动物都只表现出镰刀状红细胞的病变而并未表现贫血⁽²⁰⁾。除此,在高血压转基因动物模型的建立中,多数结果和预期不符⁽²¹⁾。造成这些结果的原因可能是:1)因物种之间的差异,可能同一种疾病在不同的物种(如人和动物)中发病机制不同。2)生物体内有极其复杂的调节和平衡机制,在内源基因功能正常时,单一的外源基因对动物整体的作用可能是有限的。3)转基因的整合、表达和调节尚不能真正达到人为控制等。这些给转基因动物模型的建立带来了一定的困难。

五、病毒转基因研究中存在的问题

病毒基因可能从整合位点脱下恢复病毒特性,而造成细胞功能紊乱或死亡。Lacey 等⁽²²⁾将牛 papilloma 病毒的基因组 DNA 转入小鼠后,其 DNA 可能整入小鼠的基因组中,但有时可以从染色体上脱离下来,成为染色体外独立复制的成份,这时,小鼠将患皮肤癌。

六、看家基因与转基因研究

看家基因是维持细胞生存所必需的基因。显而易见,如果转基因使看家基因产生有义突变或作为看家基因的转基因不适表达时,细胞的正常生理功能将受到严重影响甚至导致细胞死亡。其结果可能使转基因受精卵不能发育、纯合子动物死亡和不育。这也给以定点整合为目的的胚胎干细胞法的研究带来了困难。

七、转基因产品制备中的问题

用转基因动物生产基因产品时,人们总是希望能提高转基因的表达水平,但动物机体能否承受转基因高表达带来的不适或紊乱,应该是一个值得探讨的问题。Gordon 等在二氢叶酸还原酶基因的转基因研究中发现,如果该基因在体内过多表达,将引起骨骼肌缺损、侏儒甚至不育。除此,动物具有杂种优势,不宜建立纯系,这样转基因在动物传代中表达的维持也将是一个尚需解决的问题。

八、一些社会问题

用人基因制备的转基因产品中,在食用时可能会存在不适心理。如将人的生长素基因转

人鱼的受精卵,可得到转基因鱼,但由于这种转基因鱼中表达人的蛋白——生长激素,则人们在食用这些鱼时可能心理上有所顾虑,尽管这个问题可通过转鱼生长激素基因得到解决,但面对这种工程食品,人们的顾虑可能一时难以消除,当然,食品中高表达的基因产物是否对人类有害,也难以预测。另一方面,在病毒等致病基因的转基因研究中,不可避免地会产生一些有害的转基因动物,虽然至今未见有转基因动物向社会扩散的报道,但人们总存在着担心等。

转基因动物的建立是一个艰辛、复杂的系统工程,从第一例转基因动物的建立至今已有十余年的历史,毋庸置疑,十多年来,其已在生物学、医学、农牧和食品等方面取得了卓著的成绩。现在回过头来剖析和探讨转基因研究中存在的问题和困难,不仅可以为我们更好的利用转基因动物这个工具为人类服务,也有助于转基因技术的改进和提高。转基因研究的重复性差和多样性也反应了客观世界的复杂和多样性,从此意义上看,转基因研究中的“副产品”(如突变体,表达多样性等)为人类更多地提供了展示自然规律的窗口。相信将来转基因技术做为认识和改造生命的手段将为人类做出更多的贡献。

参考文献

- Camper SA. Research application of transgenic mice. *Biotech*. 1987;5:638—650.
- Schedl A, Montoliu L, Kelsey G, et al. A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependent expression in transgenic mice. *Nature*. 1993;362:258—261.
- Strouboulis J, Dillon N and Grosfeld F. Developmental regulation of a complete 70kb human β -globin locus in transgenic mice. *Gene. Develop*. 1992;6:1857—1864.
- 贾士荣, 农业生物技术进展与展望, 中国科技大学出版社, 合肥, 第一版, 1993:p39.
- Hochi SI, Ninomiya T, Honma M, et al. Successful production of transgenic rats. *Anim Biotech*. 1990;1:175—184.
- Palmiter RD. Germ-line transformation of mice. *Ann Rev Genet*. 1986;20:465—499.
- Overbreck PA, Lai SP, Van Quill KR, et al. Tissue-specific expression in transgenic mice of a fused gene containing RSV terminal sequence. *Science*. 1986;231:1574—1577.
- Woychik FH, Kikutant V, Felsom LK, et al. An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in a transgenic mouse. *Nature*. 1985;318:36—40.
- Wagner EF, Steward TA and Mintz B. The human β -globin gene and a functional thymidine kinase gene in developing mice. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1981;78:5016—5020.
- Brinster RL, Chen HY, Messing A et al. Transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors. *Cell* 1984;37:367—379.
- Mullins JJ, Peters J and Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature*, 1990;344:541—544.
- Araki K, Akagi K, Miyazaki J, et al. Correlation of tissue-specific methylation with gene activity hepatitis B virus transgenic mice. *Jpn J Cancer Res*. 1990;81:1265—1271.
- Pourcel C, Tiollais P and Farza H. Transcription of S gene in transgenic mice is associated with hypomethylation at specific site and with DNase I sensitivity. *J Virol*. 1990, 64:931—935.
- Chada KJ, Magram K, Raphael G et al. Specific expression of a foreign beta-globin gene in erythroid cells of transgenic mice. *Nature*. 1985;314:377—380.
- Townes TM, Lingrel JB, Brinster RL, et al. Erythroid specific expression of human beta-globin genes in transgenic mice. *EMBO J*. 1985;4:3—9.
- Lozano G, and Levine AJ. Tissue-specific expression of p53 in transgenic mice is regulated by intron sequences. *Mol Carcinogen*. 1991;4:3—9.
- Choi T, Huang M, Gorman C, et al. A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Molecular and Cellular Biology*, 1991;11:3070—4.
- Palmiter RD, Sandgren EP, Avarbock MR, et al. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88: 478—482.
- Costantini F, Chada K and Magram J. Correction of murine β -thalassemia by gene transfer into the germline. *Science*. 1986;233:1192—1194.
- Nagel RL. Lessons from transgenic mouse lines expressing sickle hemoglobin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1994;205:274—281.
- 田小利、陈兰英, 转基因动物与高压研究, 中国循环杂志, 1993;8:434—435.
- Lacey M, Alpert S and Hanahan D. The bovine papilloma virus genome elicits skin tumor in transgenic mice, *Nature*. 1986;332:609—612.

Abstract

In the past 15 years, many transgenic lines have been established, which can be used as a human disease model, as a tool for insight into the gene function in metabolism regulation, differentiation and development, and as a molecular farm to produce the gene production and so on, but meanwhile, the problems in transgenic research are exposed. First encountered is low positive rate, it could be limited by many factors, such as the quality of DNA sample, size and the terminal structure of DNA, species of animal, visibility of pronucleus, needle's control and injection techniques. In normal case, the positive rate is round 10~20% of the founders, but sometimes it could be lower than 1%. After gene manipulation, the foreign gene will be integrated into host genome, where it may cause the host genomic mutation including insertion mutation, insertion caused deletion, and even amplification and translocation of host gene. That the expression manner of transgene is unpredicted is also a problem, as may be caused by modification of transgene, effects of vector sequence, unpredicted of both integration site and copy number, lack of either cis-acting element or trans-acting factor. These could disturb the functional analysis of transgene. In addition, the transgenic model is probably unexpected, overexpression of transgene causes the animal abnormal and some society problems are also discussed in this paper.

Key words: Problems in transgenic research Positive rate of transgene integration host genomic mutation expression of transgene

(上接第 56 页)

1996 年《微生物学杂志》征订启事

《微生物学杂志》是包括工业微生物学、医学微生物学、兽医微生物学、农业微生物学、食用菌学及生物工程学在内的综合性学术刊物。主要任务有开展学术交流,反映国内外微生物领域的进展与方向,提高广大微生物学工作者的业务水平,繁荣微生物科学事业,为实现祖国的“四化”服务。

自 1991 年起本刊由季刊改为半年刊,每期 80 页。主要栏目有“研究报告”、“研究简报”、“实验与技术”、“进展与评述”、“开发与应用”、“专题译述”、“技术讲座”、“成果与产品信息”及“会议简讯”等。读者对象为本学科的科技工作者、大中专院校师生及微生物学爱好者。

本刊创办于 1978 年,1985 年国内发行,1994 年起公开发行,由本刊编辑部征订发行,欢迎订阅,欢迎投稿。

订 阅 办 法

①《微生物学杂志》每期 2.0 元,邮费 1.0 元,全年 6.0 元。

②订阅单位或个人请由邮局汇款至辽宁省朝阳市文化路二段 22 号《微生物学杂志》编辑部。亦可银行汇款至中国工商银行朝阳双塔办事处,帐号 2032490165—69。务必注明联系人姓名。