

转基因克隆动物技术及其应用

张德福 王建荣

(上海市农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106)

(上海市农业遗传育种重点实验室动物遗传工程研究室, 上海 201106)

摘要 克隆动物是目前生物技术领域研究的热点之一,其科学意义和应用价值重大。根据现有理论和技术发展趋势,本文提出了转基因克隆动物的概念,即将转基因动物技术与克隆动物技术有机地结合,认为转基因克隆动物制作技术有望成为21世纪创建遗传工程动物的主导性技术。

关键词 克隆动物 胚胎细胞 体细胞 转基因克隆动物

1 转基因动物研究在农业和医学领域应用前景广阔,但研究进展步履维艰,技术障碍是主要的制约因素

转基因动物研究可应用于家畜遗传改良培育高产低耗优质抗逆新品种(系);把转基因动物作为时空四维考察体系,可以研究基因功能和发育调控等基础生物学问题;也可藉此用作人兽疾病的实验模型,研究医学和兽医学问题;把转基因动物改造成为医用器官移植的供体,可取代人体器官的直接移植;把转基因动物开发成为活体发酵罐,可使动物象工厂一样根据工程设计的要求,生产预期的蛋白药物等高附加值的物质。

自1980年Gurdon^[1]首获转基因小鼠,1982年Palmiter^[2]首获表型发生改变的超级小鼠至今已有近20年。除单一基因修饰的转基因小鼠医学模型较早得到应用外,转基因动物乳腺生物反应器生产药物蛋白经10多年的研究,全世界范围内目前仅有2个药品刚进入3期临床,5-6个药品刚进入2期临床,至今没有诞生在农艺性状上发生改良、可资畜牧生产应用的转基因家畜品系。转基因动物制作所涉及的原理主要是DNA同源重组和Cis-Trans调控机制^[3],尽管对转基因整合、调控的规律有了基本的了解,但转基因动物制作效率低、定点整合困难所导致的转基因动物制作成本高和调控失灵,是制约当今转基因动物实用化进程的主要原因。

2 克隆技术的发展为转基因动物的研究应用带来了契机,转基因技术与克隆技术结合,创建转基因克隆动物,有望成为下一世纪培育遗传工程动物的主导性技术途径

以核移植为技术核心的动物克隆研究已历经半个多世纪,至1997年,以英国Roslin研究所Wilmot

实验室“多莉羊”的诞生为标志,确认了哺乳动物体细胞在一定的条件下能展示其遗传全能性,获得了发育生物学上的理论突破和生物工程领域的技术突破^[4]。

体细胞动物克隆技术虽不能进行种质创新,但为种质创新效果的迅速放大提供了技术可能。两个技术的恰当结合将是振奋人心的。根据目前的生命科学和生物技术的发展现状和趋势,两者的结合既有迫切性又有必然性。而且,这种结合不仅仅是简单的技术叠加,而是技术的重组、综合和优化,从而可望实现技术结合效应的膨胀。如,体细胞动物克隆技术的建立,可以突破转基因动物制作的传统,大大降低转基因动物制作的技术难度和投入成本。因此,我们认为当今动物克隆技术最重要的应用方向之一是高附加值转基因克隆动物的研究开发。

转基因克隆动物技术是转基因动物技术与克隆动物技术的有机结合,它是以动物体细胞(包括动物成体体细胞、胎儿成纤维细胞等)为受体,将目的基因以DNA转染的方式导入能进行传代培养的动物体细胞,再以这些体细胞为核供体,进行动物克隆。而转基因动物的克隆是指在获得转基因动物的基础上进行的动物克隆,因此只能实现两个技术效应的简单叠加,而不能实现技术结合效应的膨胀。

尽管以成年动物高度分化的体细胞为核供体制作克隆动物的技术体系尚需总结完善,但以胎儿体细胞为核供体的克隆技术已趋于成熟,在最近二年内体细胞克隆绵羊、奶牛、山羊相继获得了成功。上述理论和技术的突破提示:直接以胎儿体细胞为转基因受体细胞,继而以转基因体细胞为核供体制作转基因克隆动物的技术路线是可行的。采用简便的体细胞转染技术实施目标基因的转移,可以避免家

畜生殖细胞来源困难和低效率。同时,采用转基因体细胞系,可以在实验室条件进行转基因整合预检和性别预选。

3 两者联合的必要性和必然性,联合后可能的趋势和影响

Wilmur 研究小组在取得克隆绵羊“多莉”后,于 1997 年 6 月报道用胚胎细胞为核供体,获得了表达治疗人血友病的凝血因子 IX 转基因克隆绵羊“波利”(Polly),1997 年 12 月又在美国 Science 杂志上发表了用转染的胚胎成纤维细胞获得 6 头转基因克隆绵羊,目前转基因克隆绵羊能高水平地表达人凝血因子 IX,开创了转基因克隆动物技术研究的先河,为转基因克隆动物的制作展示了技术的可能性^[5,6]。PPL 公司最近宣布,该公司已与最新培育出连续三代克隆鼠^[7]的有关研究机构达成商业合作协议,计划联手培育可用于人体器官移植的转基因克隆猪;Cibelli 等(1998)用相似的方法获得了携带有 α -半乳糖苷酶基因的转基因牛^[8]。

转基因克隆动物技术的采用,使基因转移效率大为提高,转基因动物后代数迅速扩增;所需动物数大幅度减少,比显微注射法所需动物数减少 2.5 倍(绵羊);对于与性别有关的性状(如蛋白的生产,必须在雌性个体完成),它可以预先选择雄性或雌性性别克隆,从而预定胚胎和后代的性别。转基因克隆动物技术优于传统的显微注射法的另一表现是它能实现显微注射法所不能实现的大片段基因转移,更重要的是,在胚胎移植之前,它就筛选阳性细胞作为核供体,这样核移植产生的胚胎为阳性,最终产生的后代也是 100% 的阳性。转基因克隆动物技术在畜牧业上的应用前景也相当诱人,即通过转染的方法先将目标基因导入家畜体细胞,再利用克隆技术使携带目标基因的家畜迅速扩群。

目前我们实验室开始了转基因克隆猪的研究,以猪胎儿成纤维细胞为受体,通过转染的方式进行

目的基因(增瘦肉基因、人溶菌酶基因)的转移,再以整合有目标基因的猪胎儿成纤维细胞为核供体进行克隆研究,旨在建立培育转基因克隆猪的关键技术,获得转基因克隆猪。

4 我国开展转基因克隆动物技术的迫切性和意义

我国转基因动物技术和克隆动物技术的开展,相对发达国家起步较晚,而转基因克隆动物技术则是空白。在利用转基因动物作为生物反应器生产生物活性物质(如人凝血因子等)方面,虽然取得了一些进展,但转基因效率较低,所需动物较多;活性物质表达浓度较低。影响了其应用开发价值。而利用转基因克隆动物技术则是解决这些问题的有效途径。克隆动物技术主要在胚胎分割、胚胎核移植等方面取得了较大的进展。在国际上克隆出的动物中,除个别外,我国均已克隆成功。但这与体细胞克隆动物的成功尚存在着质的差别。

我们认为当今动物克隆技术最重要的应用方向是高附加值转基因动物的克隆。预计转基因克隆动物的研究将成为 21 世纪国际范围内的生物工程领域的竞争热点。

参考文献

- [1] Gordon J W, Scangos G A, Plotkin D J, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1980, 77: 7380 - 7384.
- [2] Palmiter R D, Brinster R E, Hammer M E, et al. Nature. 1982, 300: 611 - 615.
- [3] Isola L M and Gordon L W. Transgenic animal: A new era in developmental biology and medicine. In: First N L. ed. Transgenic Animals. USA: Reed Publishing Inc. 3 - 20, 1988.
- [4] Wilmut et al. Nature, 1997, 385: 810 - 813.
- [5] Schnieke A K et al. Science, 1997, 278(19): 2130 - 2333.
- [6] Wilmut and Schnieke A K. Nuclear transfer in the production of transgenic farm animals. In: J. D. Murray. ed. Transgenic Animals in Agriculture. New York: CABI Publishing. 1999, 67 - 78.
- [7] Wakayama, T. et al. Nature, 1998, 394: 369 - 374.
- [8] Cibelli JB et al. Science, 1998, 280: 1256 - 1258.

Study on Transgenic & Cloned Animals

Zhang Defu Wang Jianrong

(Laboratory of Animal Genetic Engineering, Shanghai Municipal Key Laboratory of Agro-Genetics and Breeding

(Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, P. R. C.)

Abstract Applications of animal transgenesis has been emerging in both agriculture and medicine, ranging from disease modeling, breeding, exploring gene function and developmental regulation, xenotransplantation, to bioreactors for therapeutical proteins since early 1980s'. However, progress is obstructed by inefficiency of current

methods for production of transgenic animals. Research in animal cloning experienced no important breakthrough until the birth of "Dolly" cloned from the mammary gland cells of an adult sheep. The success of somatic cell cloning provides promising opportunity to fasten practical application of transgenesis through combination of transgenics at stage of somatic cell culture and subsequent cloning of transgenic somatic cell.

Transgenic & cloned animal (TC animal) is an entirely new concept of genetically animal, which is supposed to result from proper combination between animal transgenics and animal cloning. It becomes possible to get genetic modification of animals and propagation of engineered animals with the highest efficiency and within the shortest time. On the basis of cloned gene and constructed transgene with selectable marker, somatic cells of various tissue from adult pigs are being used to transfect with transgene DNA. The transfected somatic cells will be employed as nuclei donor for direct cloning.

Key words Animal cloning Embryonic cell Somatic cell Transgenic & cloned animal

新产品

FTA 基因保藏系统

如何长时间地保存基因样品? 如何远距离运输基因样品而无须考虑环境温度等条件对基因样品的影响? 这是在医院、军队和研究机构中经常遇到的问题。随着 FTA 基因保存系统(美国 LTI 公司 1990 年发明)的出现和商业化生产,这一问题已得到有效解决。

FTA 卡由经过专利配方的强力变性剂浸泡的滤纸制成,能够阻止细菌和其他微生物的生长,维持样品中 DNA 的完整性,使样品中 DNA 免受核酸酶、氧化剂和紫外线损坏。在 FTA 卡上,样品的细胞膜破裂,DNA 溢出细胞核,大分子 DNA 卷曲并与 FTA 基质紧密结合,无 DNA 断裂,DNA 结合率大于 90%。用 FTA 纯化试剂清洗血红素和其他抑制剂,即可纯化结合的 DNA。在纯化过程中 DNA 仍然保留在滤纸上,经纯化的 DNA 可用于 PCR 检测。

FTA 卡具有以下优越性:

使用方便:只需简单地点样和干燥,纯化 DNA 只需 1 小时

稳定性好:血样品可在室温下保存 10 年以上(稳定性实验仍在进行中)。

功能检测:FTA 卡保藏样品与直接抽提样品的 PCR 结果完全一致。

安全可靠:裂解细胞并阻止细菌和真菌的生长。

多种用途:适用血液、口腔拭子、上皮细胞、细菌、病毒和培养细胞等多种样品的保藏。

高效使用:与 FTA 卡基质结合的 DNA 能被多次扩增。

FTA 卡同时配套具备专用试剂,以去除影响 DNA 分析的污染物如血红素、PCR 抑制剂等。用 FTA 纯化试剂轻柔洗脱能够减少常规 DNA 抽提方法所引起的机械损伤,保持 DNA 大分子形式。此专用试剂经高灵敏度 PCR 分析证明不含有人类 DNA。

在国外,FTA 卡已被广泛用于医院和军队。医院里采用 FTA 卡保存新生儿的血样,以便在儿童失踪或其他意外情况下进行身份鉴定。该项目被称作 CHIP,即 Children Identification Program。同时,美国的军队系统也在使用 FTA 卡来对士兵的 DNA 进行备份,以便在战争中发生意外后快速地进行身份鉴定。

朱延文 (生命技术公司)