

转基因动物乳腺生物反应器相关技术及研究进展

梁振鑫¹ 尹富强¹ 刘庆友² 李力^{1*}

(1 广西医科大学 南宁 530021 2 广西大学 南宁 530004)

摘要 转基因动物乳腺生产人类重组蛋白人血清白蛋白(hSA)、人纤维蛋白原(hFIB)、人蛋白 C(hPC)、人凝血因子(hF-VIII)和(hF-IX)等具有较高市场潜力,使其在医学领域获得广泛应用。对转基因动物乳腺生物反应器的优势、目的基因选择、载体构建、基因工程技术、重组蛋白在肿瘤治疗上的应用、当前困境和未来前景等方面进行较为全面的综述,以期能有助于转基因动物生物反应器的研究。此外较详细地探讨了利用 CRISPR-Cas 基因打靶技术生产高表达量的人类重组蛋白的可能性。

关键词 动物乳腺生物反应器 载体构建 转基因技术 生物制药

中图分类号 Q819

转基因动物乳腺生物反应器是应用 DNA 重组和转基因技术,而获得能在动物乳腺组织中特异表达外源基因,从而高效生产活性功能蛋白的转基因动物个体。自 1987 年 Gordon 等^[1]首次构建转基因小鼠乳腺生物反应器成功表达并提取出组织型纤溶酶原激活剂(tPA)后,转基因动物乳腺生物反应器在各国逐渐成为了研究热点,并相继建立了一批以转基因生物反应器为核心技术的生物制药公司,其中荷兰 Genpharm 公司用转基因牛生产乳铁蛋白,每年从乳汁中提炼出的营养奶粉的销售额是 50 亿美元^[2]。而美国 GTC 公司用山羊乳腺生物反应器生产出重组人抗凝血酶 III(ATryn),并成为首个在欧洲药监局和美国 FDA 相继获准上市的生物工程药物。经过将近 30 年的发展,转基因动物乳腺生物反应器表达的产品由最初的抗凝血酶 III(ATryn)、抗胰蛋白酶(hAA T)、蛋白 C(hPC)、纤维蛋白原(hFIB)、血清白蛋白(hSA)、凝血因子 VIII(hF-VIII)和 IX(hF-IX)等扩展到市场潜力巨大、其它系统难以生产而在乳腺中表达有明显优势的組織型纤溶酶原激活剂(tPA)、乳铁蛋白(hLF)、葡萄糖苷酶(hGlu)、抗体、超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶、蜘蛛牵丝蛋白和白介素 II 等,其中近 30 种进入临床开发,部分已经获得批准上市,这将促进人类医药事业发展并给众多患

者带来福音^[3]。本文对转基因动物乳腺生物反应器的优势、目的基因选择、载体构建、基因工程技术、重组蛋白在肿瘤治疗上的应用、当前困境和未来前景等方面进行了全面综述。

1 转基因动物乳腺生物反应器的优势

与利用微生物或细胞发酵生产药用重组蛋白的传统技术相比,转基因动物乳腺生物反应器具有不可比拟的优势。(1)乳腺生产药用重组蛋白产量高、成本低。哺乳动物的乳腺是高度分化的腺体,具有超强的蛋白质合成能力,尤其是经过改良的动物品系,其乳腺的蛋白质合成能力更强,而且乳汁中蛋白质种类相对较少,主要是酪蛋白、乳球蛋白、白蛋白和从血液中扩散出来的少量血清蛋白及免疫球蛋白,因此易于药用重组蛋白分离纯化,且生产工艺简单^[4]。(2)转基因动物乳腺生物反应器技术对动物自身的伤害小。哺乳动物的乳腺是个相对封闭的分泌系统,其特异性表达的重组蛋白很少进入血液循环因而对转基因动物造成的伤害很小。(3)无环境污染。乳腺生物反应器在产品的生产和纯化过程中没有毒性物质或有害物质释放。(4)易规模化。由于转基因可以遗传,从而使得扩大种群和进行规模化生产较为容易。(5)缩短新药上市周期。据估算如果利用动物乳腺生物反应器生产新药,其周期缩短为 5 年左右,而传统技术则需要 10~15 年。

收稿日期:2014-12-03 修回日期:2014-12-24

* 通讯作者,电子邮箱:lili@gxmu.edu.cn

(6) 乳腺生物反应器的产业具有巨大市场潜力和巨额利润。GTC 公司上市的 A Tryn 预计每年市值 7 亿美元,另据美国红十字会分析,人血清白蛋白(hSA)、人纤维蛋白原(hFIB)、人蛋白 C(hPC)、人凝血因子(hF-VIII)和(hF-IX)的市场潜力年估值均在几亿和十几亿美元之间^[5]。

2 目的基因选择

纵观转基因动物生物反应器表达的产物从最初的抗凝血酶 III(A Tryn)、抗胰蛋白酶(hAA T)、蛋白 C(hPC)、纤维蛋白原(hFIB)、血清白蛋白(hSA)、凝血因子 VIII(hF-VIII)和 IX(hF-IX)到组织型纤溶酶原激活剂(tPA)、乳铁蛋白(hLF)、葡萄糖苷酶(hGlu)、抗体、超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶、蜘蛛牵丝蛋白和白介素 II。可见制备转基因动物乳腺生物反应器的目的基因一般选择医用价值价高的酶、抗体等蛋白相对应的基因序列。

3 制备转基因动物乳腺生物反应器的载体选择

3.1 乳腺特异表达载体 pBC1

绝大部分构建转基因动物乳腺生物反应器的研究中,选用 pBC1 乳腺表达系统作为乳腺表达载体。pBC1 乳腺表达载体是美国 Invitrogen 公司生产的一种乳腺特异表达载体,大小为 21628bp。pBC1 乳腺表达载体用山羊 β -酪蛋白启动子来启动重组蛋白的高效表达。山羊 β -酪蛋白启动子是一个组织特异表达的强启动子,主要在乳腺上皮细胞内表达。乳蛋白的合成是在乳腺上皮细胞内完成的,这些细胞负责所有翻译后的修饰,包括糖基化和磷酸化。糖基化和磷酸化对重组蛋白进行正确修饰是其具有生物活性的必要条件。除了强启动子外,乳腺表达载体 pBC1 还包含外显子(1、2、7、8 和 9)的非编码区、内含子(1、7 和 8)、 β -酪蛋白 3'终止子区和双拷贝的 β -globin 隔离子,其中内含子能增强基因的转录, β -酪蛋白 3'终止子区则是外源基因正常转录的必要条件,而双拷贝的 β -globin 隔离子可以减少顺式调控元件对外源基因表达的影响。由于 pBC1 载体具有乳腺特异性表达的结构,常被用于构建转基因动物乳腺生物反应器并大量表达重组蛋白或抗体。据资料显示,由 pBC1 载体构建的转基因小鼠乳腺生物反应器表达的重组蛋白含量可达 35g/L(Youngetal, 1997),转基因山羊乳腺生物反应器表达的重组蛋白含

量可达到 20g/L(Zeomek,1998)。由于 pBC1 载体只有唯一的克隆位点 *XhoI*,故在基因链接克隆前需用碱性磷酸酶 CIP 或 CIAP 去磷酸化,防止载体自连从而提高获得重组质粒的概率。在连接时,载体与目的基因的比例一般为 1:10,常用的连接酶为 T4 或 T7,获得重组质粒后需鉴定目的基因序列的正反方向^[6]。

3.2 杂合基因座载体

利用外源目标蛋白的基因组序列(从起始密码子到终止密码子)完全置换某种乳蛋白基因座中该乳蛋白的基因组序列,从而成功构建杂合基因座载体。目前常用的乳蛋白基因座主要有:乳清酸蛋白(whey acid protein, WAP)基因座、p-乳球蛋白(P-Lactoglobulin, BLG)基因座、牛 α -SI 酪蛋白(Bovine α -SI casein)基因座和乳清白蛋白(lactalbumin, LA)基因座等。2012 年,Shao 等^[7]利用连续三步缺口修复技术成功构建小鼠乳清酸蛋白-人溶菌酶杂合基因座。2013 年,Zheng 等^[8]利用连续三步缺口修复技术成功构建牛 α -SI 酪蛋白-人溶菌酶杂合基因座,该杂合基因座在转基因小鼠乳汁中有效地表达人溶菌酶,浓度可高达 6.06g/L。

3.3 人工染色体载体

人工染色体载体是指利用染色体的复制元件来驱动外源 DNA 片段复制的载体,其装载外源 DNA 的容量远大于普通质粒,甚至可以跟染色体的大小接近。常用的人工染色体有酵母人工染色体(YAC)和细菌人工染色体(BAC)等。1997 年 Fujiwara 等^[9]使用 YAC 装载 210 kb 的人 α -乳白蛋白基因成功制备转基因大鼠,获得 3 个可遗传的转基因鼠系,鼠奶中人 α -乳白蛋白的表达量达到 2.0~4.3 mg/ml。2008 年,Yang 等^[10]使用 BAC 装载人乳铁蛋白(hLF)成功制备转基因牛,牛奶中人乳铁蛋白的浓度达 2.5~3.4g/L。

4 制备转基因动物生物反应器模型的基因工程技术

4.1 基因组编辑技术

4.1.1 锌指核酶(Zinc finger nucleases, ZFN)技术
ZFN 技术是一种对基因组 DNA 实现靶向修饰的新技术,其通过锌指核酶作用于基因组 DNA 上特异的靶点产生 DNA 双链切口,然后经过非同源末端连接或同源重组途径实现对基因组 DNA 的靶向敲除或者替换。锌指核酶是一类人工合成的限制性内切酶,由锌指 DNA 结合域与具有限制性内切酶活性的 DNA 切割域融合而成。ZFN 技术一般采用 FokI-ZFN 二聚体形式

来保证其切割效率,但使用过程中可能因同源二聚体效应而导致脱靶,影响切割特异性^[11]。2013年,Wang等^[12]利用ZFN技术成功制备表达溶葡萄球菌素的转基因牛。

4.1.2 TALEN 技术 转录激活子因子样效应核酸酶(transcription activator like effector nucleases,TALEN)技术是一种对基因组DNA实现靶向修饰的新技术,其通过TALEN蛋白作用于基因组DNA上特异的靶位点产生DNA双链切口,然后经过非同源末端连接或同源重组途径实现对基因组DNA的靶向敲除或者替换,其中TALEN蛋白分子由DNA结合域和FokI核酸酶组成。当两个TALEN分子共转入细胞后,分别结合到靶点两侧,而FokI则形成二聚体并发挥切割作用,生成双链断端,细胞内的非同源性末端接合修复机制启动,断口被修复同时随机地删除和插入一定数量的碱基,而达到对基因组进行编辑的目的^[13]。2014年,Shaida等^[14]利用TALEN技术成功制备表达人血清蛋白(hSA)的转基因牛。

4.1.3 CRISPR-Cas 系统基因修饰技术 CRISPR-Cas系统基因修饰技术是最近发展的一种基因编辑技术,由CRISPR序列元件和Cas基因家族两部分组成。其中CRISPR由一系列高度保守的重复序列(repeats)组成,重复序列的长度通常21~48bp,重复序列之间被同样高度保守的26~72bp间隔序列(spacers)隔开。Cas(CRISPR-associated sequences,CASs)基因家族是存在于CRISPR附近区域的一组由4~10bp高度保守基因组成的序列,这些基因编码的蛋白具有核酸内切酶、核酸外切酶和螺旋酶等功能域,Cas蛋白在向导RNA分子的引导下对特定位置的DNA进行切割,形成双链DNA缺口,然后细胞会借助同源重组机制或者非同源末端连接机制对断裂的DNA进行修复,从而达到对基因组进行编辑的目的^[15]。2013年,Yoshimi等^[16]利用CRISPR-Cas技术成功构建了转基因大鼠模型。

4.2 常用的转基因动物制备技术

4.2.1 显微注射技术 显微注射法是一种经典的物理转基因技术,它是借助显微操作仪通过显微注射固定针($0.5\mu\text{m} < \text{针口直径} < 1.5\mu\text{m}$)把外源基因注入受体动物受精卵的原核中,由于受体细胞的基因组序列可能发生重组、缺失、复制或易位等现象从而将外源基因整合到其染色体上,并使受体细胞成活、增殖而发育成转基因动物的技术。该技术是目前应用得最广、最

可靠的方法,主要应用于转基因小鼠的制备,而外源基因的整合效率为10%~40%。2011年,Chen等^[17]利用显微注射法成功制备表达嵌合抗体的转基因小鼠。

4.2.2 体细胞核移植法 体细胞核移植法是指把动物的体细胞核移植入另一个体的去核卵细胞中,然后将转核胚移植入同期发情的代孕母体子宫,最终获得一个与供体细胞个体遗传性状一致的动物个体的技术。2013年,Yu等^[18]利用体细胞核移植技术成功制备表达人溶菌酶(hLZ)的转基因山羊,羊奶中人溶菌酶含量为2.3~3.6g/L。目前,该方法是建立兔、猪、羊、牛乳腺生物反应器的最主要技术。

4.3 其他转基因动物制备技术

4.3.1 病毒感染法 病毒感染法是通过病毒感染的方式将外源基因导入动物细胞中并发生整合,最终获得转基因动物个体的技术。该技术是一种常用的转基因技术,常用的病毒载体包括DNA病毒载体、反转录病毒载体等。2010年,Krisztián等^[19]利用慢病毒载体法成功制备绿色荧光蛋白转基因BALB/c小鼠。

4.3.2 胚胎干细胞介导法 胚胎干细胞(embryonic stem cells,ES介导法)是以胚胎干细胞作为载体将外源基因导入动物细胞中并发生整合,最终获得转基因动物个体的技术。其获得转基因动物制备的基本步骤可以是外源DNA转化ES细胞后再通过核移植产生转基因个体,也可以通过注射法产生嵌合体,经过嵌合体的繁殖获得转基因个体^[20]。

4.3.3 精子导入法 精子载体导入法就是利用精子作为外源基因载体,将精子直接与外源基因混合培养后,外源基因则可以直接进入精子头部,借助生理受精作用导入受精卵,从而整合到受精卵的基因组中,并进行胚胎移植,使外源基因得到表达的方法^[21]。

4.3.4 转座子介导法 转座子介导法是指利用转座子在转座过程中发生染色体DNA缺失或倒置,使得外源基因插入染色体中从而制备转基因动物的技术。应用于脊椎动物中的转座子为“睡美女”(sleeping beauty,SB)转座子,该转座子遵循经典的“剪切-粘贴”作用机制。通常“睡美女”转座子能特异性地整合到基因组中的TA双核苷酸位点。2013年,Lu等^[22]利用“睡美女”转座子介导技术成功制备转基因小鼠模型。

综上所述,经不同的研究者不断的努力,基因工程技术取得较大的发展,但它们各有优劣(详见表1和表2)。

表1 转基因动物乳腺生物反应器相关基因组编辑技术的优缺点

Table1 The advantages and disadvantages of genome editing technology of transgenic animal mammary gland bioreactor

技术类型	优点	缺点	参考文献
ZFN 技术	技术成熟,效率高于被动同源重组。	设计依赖上下游序列,易脱靶其细胞毒性高。	[11-12]
TALEN 技术	识别切割效率更高,几乎可以靶向任何序列,不受上下游序列影响。	具有一定细胞毒性,模块组装过程繁琐。	[13-14]
CRISPR-Cas 技术	靶向精确,脱靶率低,细胞毒性低等特点。	仍存在脱靶现象,具有一定细胞毒性。	[15-16]

表2 转基因动物乳腺生物反应器相关转基因动物制备技术的优缺点

Table 2 The advantages and disadvantages of transgenic technology of transgenic animal mammary gland bioreactor

技术类型	优点	缺点	参考文献
显微注射技术	外源基因不限长度,转移率高,实验周期相对较短。	显微操作昂贵,技术操作要求高。	[17]
体细胞核移植技术	动物转基因效率高,基因整合和生产胚胎分开有利于使用基因打靶技术。	克隆个体怀孕率低,发育异常,存活率低。	[18]
病毒感染法	稳定性好,实验重复性佳,导入效率高。	目的基因不宜超过 10kb,存在安全隐患。	[19]
胚胎干细胞介导法	有利于将外源基因整合到细胞的染色体中。	ES 建株困难。	[20]
精子导入法	简单、方便,依靠生理受精过程,避免对原核的损伤。	目的基因整合率低,效果不稳定,相关理论及其过程不甚清楚。	[21]
转座子介导法	安全性相对较高,无免疫原性,对携带序列无特殊要求,结构简单,对源基因的影响较小等。	转座效率不高,携带外源 DNA 的能力不强,多拷贝的 SB 座子转座时容易发生染色体缺失和致死性的背景突变。	[22]

5 转基因动物品种的选择

功制备小鼠、兔、山羊和奶牛等多种转基因动物乳腺生物反应器,但它们各有优劣(详见表3)。

近三十多年来,经不同的研究者不断的努力,已成

表3 转基因动物乳腺生物反应器受体品种实例

Table 3 The example of transgenic animal mammary gland bioreactor

动物品种	优点	缺点	目的基因	参考文献
小鼠	生长快,成熟早,繁殖力强,全年多发情,成功率高。	泌乳量少,表达量低。	抗体基因	[17,23]
兔	生长发育较快,繁殖力较强,哺乳期长,寿命长。	成功率低,技术难度大。	hGH 基因 hFVIIa 基因	[24-25]
猪	繁殖周期短、生产力高,全年多发情、平均寿命较长。	成功率低,技术难度大。	hFIX 基因	[26-27]
山羊	乳房发达、哺乳期时间长,平均寿命长。	成功率低,技术难度大。	hLZ 基因 HBD3 基因	[18,28]
绵羊	乳房发达、哺乳期时间长,平均寿命长。	成功率低,技术难度大。	AAT 基因 hFIX 基因	[29-30]
奶牛	乳房庞大、泌乳期较长,产奶量大,平均寿命长。	成功率低,技术难度大。	hSA 基因 hLF 基因	[10,14]

注:hGH:人生长激素;hFVIIa:人凝血因子VIIa;hFIX:人凝血因子IX;hLZ:人溶菌酶;HBD3:人 β 防御素3;AAT:抗胰蛋白酶;hSA:人血清蛋白;hLF:人乳铁蛋白。

6 转基因动物乳腺生物反应器表达的重组蛋白在肿瘤治疗中的应用

6.1 在宫颈癌治疗中应用

2008年,Yang等^[10]成功制备能表达人乳铁蛋白

(hLF)的转基因牛乳腺生物反应器,其制备人乳铁蛋白的生物特性经生化分析证实与天然人乳铁蛋白性质一致。人乳铁蛋白是一种隶属于铁结合蛋白家族的糖基化蛋白。它具有如抑菌、抗病毒感染、调节体内铁的平衡、促进铁的传递和吸收、调节机体免疫功能和增强机

体抗病能力等多种生理作用。据支旭勃(2008年)研究,人乳铁蛋白具有诱导宫颈癌Hela细胞凋亡的作用,并检测到突变型p53基因及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)在经rhLF处理的Hela细胞中被显著抑制。

6.2 抗CD147蛋白的应用

CD147是一种跨膜糖蛋白,为免疫球蛋白超家族(IgSF)成员之一。据研究表明,CD147在乳腺癌、子宫内膜癌、骨髓癌和肺癌等众多肿瘤细胞中存在超表达的现象,同时与MMP活性增加、肿瘤的浸润和转移等相关。2011年,Chen等^[17]成功制备表达嵌合抗体chHAb18的转基因小鼠乳腺生物反应器,其中嵌合抗体chHAb18在鼠奶中的含量为1.1~7.4mg/ml。而嵌合抗体chHAb18是将抗人肝细胞肝癌表面分子HAb18G/CD147的特异性单克隆抗体HAb18 McAb进行了部分人源化改造后制备而成,其与抗原HAb18G/CD147的亲合力为HAb18 McAb的68%。

6.3 抗P185^{erbB2/neu}蛋白的应用

人的原癌基因人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)基因,又称erbB2基因,其基因组DNA定位于第17号染色体上长臂的2区1带。它的编码产物为一种分子量185kDa的受体酪氨酸激酶,故被称为P185^{erbB2/neu}蛋白。HER2基因过表达在乳腺癌和卵巢癌中比较常见,30%的乳腺癌存在HER2基因过表达,20%的卵巢癌存在HER2基因过表达。2011年,Veronika等^[23]成功制备抗HER2/neu单链IgG1抗体转基因小鼠生物反应器,其抗HER2/neu单链IgG1抗体与P185^{erbB2/neu}结合的解离系数K_{dis}为0.4±0.2nM,这和赫赛汀(Herceptin[®])与P185^{erbB2/neu}结合的解离系数基本一致。Herceptin[®]能特异结合于P185^{erbB2/neu}胞外IV区,从而阻断P185^{erbB2/neu}同源二聚体和异源二聚体的形成,并介导P185^{erbB2/neu}的内吞和在溶酶体中的降解,阻断HER2的功能,从而抑制MAPK和PI3K信号途径,抑制细胞的生长。

7 转基因动物乳腺生物反应器当前困境和未来展望

尽管通过乳腺生物反应器生产外源蛋白具有其它表达系统无法比拟的优势,但仍存在亟待解决的问题:一是制备动物乳腺生物反应器的转基因技术尚不够成熟可靠。目前除显微注射法比较成熟可靠外,其他技术有待进一步发展,以致更稳定、可靠。二是转基因动

物乳腺生物反应器“非预期效应”。转基因小鼠乳腺生物反应器虽然成功率较高,但是存在表达水平低和自身泌乳量低等因素限制,难以满足需要。而转基因羊、转基因猪和转基因牛等大型动物乳腺生物反应器虽然泌乳量较高,但是成功率较低且技术难度大。三是制备转基因动物乳腺生物反应器存在“位置效应”和“剂量效应”等问题。四是存在产品的安全性问题。外源基因侵入对动物是否会造成基因污染,以及基因药物对人体正常功能有何影响,目前尚难定论。五是乳汁蛋白基因表达调控机理、目的基因在宿主染色体上整合的详细机制、基因表达调控元件在不同家畜表现差异的原因和乳腺细胞对蛋白质的加工修饰机理等尚待弄清。综上所述,建立更成熟、可靠、高效、安全的转基因技术成为了转基因动物乳腺生物反应器能否获得进一步发展和推广的关键。

近年来,随着CRISPR-Cas系统基因修饰技术等基因打靶新技术的兴起,为转基因动物乳腺生物反应器的制备提供更多全新的思路和可能。虽然CRISPR-Cas系统基因修饰技术和TALEN技术等基因打靶技术目前主要应用于构建基因敲出转基因动物模型,且尚无应用到制备乳腺生物反应器的相关研究中,但这些技术使得通过将外源基因直接敲入天然乳蛋白位点中从而使其获得几乎完全接近天然状态下的表达情况变为可能。在这种情况下,外源基因的表达自动获得了天然乳蛋白所有的调控序列,完全排除了位点效应的影响,有助于获得稳定、高表达的目的蛋白。因此,采用以体细胞克隆技术和基因定点编辑技术为核心的各种技术平台,可能是未来生产乳腺生物反应器动物的希望和必然趋势。我们相信随着基础理论和实验技术的完善,乳腺生物反应器制备将得到更进一步的推广,并将向市场生产出更多、更好的产品,为人类的生存与健康带来更多福音和在肿瘤治疗中做出更多贡献。

参考文献

- [1] Gordon K, Lee E, Vitale J, et al. Production of human plasminogen activator in transgenic mice milk. *Bio Technol*, 1987, 5:1183-1187.
- [2] Yan H. *Cell Engineering*. Beijing: Chemical Industry Press, 2013. 177.
- [3] Yanli Wang, Sihai Zhao, Liang Bai, et al. Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors. *BioMed Research International*, 2013, 3(15): e580463

- [4] Liu Y M, Zhang Z Q. Animal mammary gland bioreactor and biological pharmacy. *Bulletin of Biology*, 2009, 44(10) :19-20.
- [5] Fu Y H, Zhou X M, Qian Q J. The current progress of mammary gland bioreactor for research and industry. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, 37(8) :45-51.
- [6] Invitrogen. pBC1 Milk expression vector kit. www.invitrogen.com. 2010, 8.
- [7] Shao Z L, Wu X J, Chen H X, et al. A successive three-step gap-repair method to generate the mWAP-hLYZ hybrid gene locus. *Letters in Biotechnology*, 2012, 23(5) :648-652.
- [8] Zheng Y Y, Zhou Y R, Chen H X, et al. A successive three-step gap-repair method to generate the bovine α S1-casein-hLYZ hybrid gene locus. *Letters in Biotechnology*, 2013, 24(2) :173-177.
- [9] Fujiwara Y, Miwa M, Takahashi R I, et al. Position-independent and high-level expression of human α -lactalbumin in the milk of transgenic rats carrying a 210 kb YAC DNA. *Mol Reprod Dev*, 1997, 47 :157-163.
- [10] Yang P H, Wang J W, Gong G C, et al. Cattle Mammary bioreactor generated by a novel procedure of transgenic cloning for large-scale production of functional human lactoferrin. *Plos One*, 2008, 3(10) :e3453.
- [11] Palpant N J, Dudzinski D, et al. Zinc finger nucleases: looking toward translation. *Gene Ther*, 2013, 20(2) :121-127.
- [12] Wang Y S, Xu L, Guo W J, et al. Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nature Communications*, 2013, 4 :2565.
- [13] Thomas G, Charles A G, Carlos F, et al. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(7) :397-405.
- [14] Shaida Moghaddassi, Will Eyestone, Colin E Bishop. Talen-mediated modification of the bovine genome for large-scale production of human serum albumin. *Plos One*, 2014, 9 :89631.
- [15] Hagen R, Lennart R, André P, et al. Exploiting CRISPR/Cas: interference mechanisms and applications. *International Journal of Molecular Science*, 2013, 14 :14518-14531.
- [16] Yoshimi K, Kaneko T, Voigt B, et al. Allele-specific genome editing and correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR-Cas platform. *Nature Communications*, 2014, 7 :1-9.
- [17] Chen Z N, Yang X M, Zheng M, et al. The recombinant chimeric antibody chHAb18 against hepatocellular carcinoma can be produced in milk of transgenic mice. *Transgenic Res*, 2011, 20 :321-330.
- [18] Yu H Q, Cheng J Q, Liu S G, et al. Large-scale production of functional human lysozyme in transgenic cloned goats. *Journal of Biotechnology*, 2013, 68 :676-683.
- [19] Krisztián Kvell, Tamás Czömpöly, László Hiripi, et al. Characterisation of eGFP-transgenic BALB/c mouse strain established by lentiviral transgenesis. *Transgenic Research*, 2010, 1 :105-112.
- [20] Martello G, Smith A. The nature of embryonic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30 :647-675.
- [21] Stefan Moisyadi, Joseph M Kaminski, Ryuzo Yanagimachi. Use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to generate transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2009, 32(2) :47-60.
- [22] Lu Y D, Zhang X, Jing M A, et al. Establishment of a sleeping beauty transposase expressing transgenic mouse model. *Chinese Journal of Comparative Medicine*. 2013, 23(10) :7-10.
- [23] Veronika Yuskevich, Yuriy Khodarovich, German Kagarliskiy, et al. Expression of humanized anti-Her2/neu single-chain IgG1 like antibody in mammary glands of transgenic mice. *Biochimie*, 2011, 93 :628-630.
- [24] Daniel L, Joanna Z, Marlena S, et al. Expression of human growth hormone in the milk of transgenic rabbits with transgene mapped to the telomere region of chromosome 7q. *J Appl Genetics*, 2012, 53 :435-442.
- [25] Guillaume Chevreux, Valegh Faid, Jean-Marc Scohyers, et al. N-/O-glycosylation analysis of human FVIIa produced in the milk of transgenic rabbits. *Glycobiology*, 2013, 23(12) :1531-1546.
- [26] Geun-Cheol G, William H V, Kevin E V. Analysis of the N-glycans of recombinant human factor IX purified from transgenic pig milk. *Glycobiology*, 2008, 7 :526-539.
- [27] Meng-Hwan Lee, Yin-Shen Lin, Ching-Fu Tu, et al. Recombinant human factor IX produced from transgenic porcine milk. *BioMed Research International*, 2014, 5(18) :e315375.
- [28] Jun Liu, Yan Luo, Hengtao Ge, et al. Anti-bacterial activity of recombinant human β -Defensin-3 secreted in the milk of transgenic goats produced by somatic cell nuclear transfer. *Plos One*, 2013, 8(6) :e65379.
- [29] Wright G, Carver A, Cottom D, et al. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Bio Technol*, 1991, 9 :830-834.
- [30] 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, 278 :2130-2133.

Progress and Technology in Mammary Gland Bioreactor of Transgenic Animals

LIANG Zhen-xin¹ YIN Fu-qiang¹ LIU Qing-you² LI Li¹

(1 Guangxi Medical University, Nanning 530021, China 2 Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract Production of human serum albumin (hSA), fibrinogen (hFIB), human protein c (hPC), human blood clotting factor VIII (HF-VIII) and human blood clotting factor (hF-IX) by mammary gland bioreactor of transgenic has great market potential and is widely used in medical areas. A comprehensive review was made on the advantages, selection of target genes, construction of vector, genetic engineering technology, the application of recombinant proteins in cancer treatment, problems and prospects of mammary gland bioreactor of transgenic animals, in order to contribute to the study on transgenic animal bioreactors. Also the possibility of high level expression of human recombinant proteins by the method of CRISPR-Cas gene targeting was discussed.

Key words Mammary gland bioreactor Vector construction Transgenic technology Bio-pharmacy

马尔文仪器宣布成功收购 Affinity Biosensors 公司旗下阿基米德产品

英国马尔文仪器公司近日宣布成功收购 Affinity Biosensors 公司旗下阿基米德颗粒表征系统的收购。此次收购进一步扩展了马尔文仪器公司的产品线,为快速发展的生物制药行业提供材料和生物物理表征分析解决方案。作为马尔文生物制药行业全套分析仪器之一,阿基米德与 Zetasizer 及 NanoSight 纳米颗粒跟踪分析技术一起,为生物配方过程中量化早期聚合状况提供一系列互补解决方案。阿基米德采用共振质量测量技术检测颗粒浮力质量并同时统计其数量,即使在样品量很小时也能以高分辨率和高精度确定颗粒质量与粒度。阿基米德系统主要用于测量生物治疗配方中的蛋白质聚集,为加快研发进程、提高药物安全性和有效性提供所需关键信息。