

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00539

## 动物转基因新技术研究进展

孙振红<sup>1,2</sup>, 苗向阳<sup>1</sup>, 朱瑞良<sup>2</sup>

1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193;
2. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018

**摘要:** 动物转基因技术是 21 世纪发展最为迅速的生物高新技术之一, 它是指通过基因工程技术将外源基因整合到受体动物基因组中, 从而使其得以表达和遗传的生物技术。动物转基因的关键限制因素是转基因效率和基因表达的精确调控。目前有多种转基因技术, 每一种技术各有其优缺点, 仍然需要进一步研究。随着研究的深入, 转基因技术必将在探讨基因功能、动物遗传改良、生物反应器、动物疾病模型、器官移植等领域有广阔的应用前景。文章综述了近年发展的提高转基因效率的生殖干细胞法、提高转基因精确性的基因打靶法、RNA 干扰(RNAi)介导的基因沉默技术和诱导多能干细胞(iPS)转基因技术。新的转基因技术为转基因动物的研究提供了更好的平台, 可以加快促进人类医药卫生、畜牧生产等领域的发展。

**关键词:** 转基因技术; 基因打靶; RNA 干扰; iPS 细胞

## New advances in animal transgenic technology

SUN Zhen-Hong<sup>1,2</sup>, MIAO Xiang-Yang<sup>1</sup>, ZHU Rui-Liang<sup>2</sup>

1. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;
2. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

**Abstract:** Animal transgenic technology is one of the fastest growing biotechnology in the 21st century. It is used to integrate foreign genes into the animal genome by genetic engineering technology so that foreign genes can be expressed and inherited to the offspring. The transgenic efficiency and precise control of gene expression are the key limiting factors on preparation of transgenic animals. A variety of transgenic techniques are available, each of which has its own advantages and disadvantages and still needs further study because of unresolved technical and safety issues. With the in-depth research, the transgenic technology will have broad application prospects in the fields of exploration of gene function, animal genetic improvement, bioreactor, animal disease models, organ transplantation and so on. This article reviews the recently developed animal gene transfer techniques, including germline stem cell mediated method to improve the efficiency, gene targeting to improve the accuracy, RNA interference (RNAi)-mediated gene silencing technology, and the induced pluripotent stem cells (iPS) transgenic technology. The new transgenic techniques can provide a better platform for the study of transgenic animals and promote the development of medical sciences, livestock production, and other fields.

**Keywords:** transgenic techniques; gene targeting; RNA interference; induced pluripotent stem cells

收稿日期: 2009-09-29; 修回日期: 2009-11-16

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(编号: 2008AA10Z140), 转基因生物新品种培育科技重大专项(编号: 2009ZX08008-004B, 2008ZX08008-003), 国家自然科学基金项目(编号: 30571339)和中国农业科学院创新基金项目(编号: 2004-院-1)资助

作者简介: 孙振红(1986-), 女, 硕士, 专业方向: 微生物与免疫及转基因动物。E-mail: xhm.3333@163.com

通讯作者: 苗向阳(1968-), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 基因工程与功能基因组学及转基因动物。Tel: 010-62895663;  
E-mail: mxy32@sohu.com

动物转基因技术是在经典遗传学、分子遗传学、结构遗传学和DNA重组技术的基础上,运用基因工程等实验技术手段,将分离得到的外源目的基因或重组基因导入动物受精卵或早期胚胎细胞中,使之整合到宿主细胞基因组内,随细胞的分裂而增殖,并稳定地遗传给下一代的一种生物技术。转基因技术开始于20世纪80年代,Jaenisch等<sup>[1]</sup>首次应用反转录病毒感染胚胎,制备了转基因动物。随着新技术新方法的出现,动物转基因技术也在不断的完善之中。利用传统的转基因方法,如显微注射法、精子载体法、电穿孔法、脂质体介导法等,已经制备了转基因小鼠、大鼠、猪、牛、羊、鸡等多种转基因动物。经过20多年的发展,动物转基因技术在其多样性和实用性方面均取得了显著的进步,尤其是近几年发展的几项新技术,使转基因动物的研究产生了历史性的飞跃。通过生殖干细胞介导的转基因技术、对胚胎干细胞以及体细胞等进行基因打靶的定点整合转基因技术、RNA干扰介导的基因沉默技术以及诱导多能干细胞(iPS)技术,提高了转基因动物制备效率,使基因表达的精确调控成为现实。更多更新颖的动物转基因技术的出现,使得转基因动物具有更加广阔的应用前景,如制备动物生物反应器、提高畜禽生产能力及肉奶品质、培育抗病动物、生产人类用动物器官、建立人类疾病模型等,将给人类带来巨大的经济效益。

## 1 生殖干细胞法

### 1.1 精原干细胞法

精原干细胞(Spermatogonial stem cells, SSCs)是在哺乳动物的睾丸内一群像胚胎干细胞(Embryo stem cells, ES cells)一样具有高度自我更新能力和分化潜能的细胞。精原干细胞位于雄性哺乳动物体内曲细精管生精上皮基膜内,不仅能够自我更新生成新的干细胞,而且可以源源不断的增殖分化形成各阶段的生殖细胞直至精子,从而向下一代传递遗传信息。精原干细胞移植技术是近年发展起来的一项新的动物繁殖技术,该技术是将体外培养的适龄雄性供体动物的精原干细胞注入适龄受体动物的生精小管中,进而产生精子。此项技术为研究精子的发生以及转基因动物的制作提供了一个极佳的思路,

因为在体外培养精原干细胞的过程中可以探索最佳的DNA转染条件,还能够对转染外源基因的阳性精原干细胞进行筛选,从而大大提高了转基因效率。利用精原干细胞进行转基因已成为目前转基因动物研究领域的热点之一。

1994年,Brinster等<sup>[2]</sup>首先建立了该技术,并实现了供体小鼠的精原干细胞在受体中进行精子发生和单倍体的生殖遗传。在应用该技术过程中的异种移植法更是富有挑战性的创新。Nagano等<sup>[3]</sup>在体外用反转录病毒对小鼠精原干细胞进行转染,转染效率为2%~20%。将转染后的精原干细胞移植入受体小鼠睾丸中,结果在子代中发现4.5%的子代小鼠为稳定的转基因小鼠,并表达外源基因,提示外源基因已被稳定整合入干细胞基因组。Kanatsu-Shinohara等<sup>[4]</sup>尝试将携带有增强型绿色荧光蛋白基因(EGFP)的慢病毒载体与体外培养的大鼠精原干细胞混合,然后将其移植到免疫缺陷的小鼠睾丸中,观察发现大鼠精原干细胞在小鼠睾丸内产生了表达EGFP的生精细胞,并生成精子,最终生产出转基因大鼠。Honaramooz等<sup>[5]</sup>通过腺相关病毒(Adeno-associated virus, AAV)携带GFP报告基因转染体外培养的山羊精原干细胞,然后将其移植到射线照射处理过的受体山羊睾丸内,转染后的精原干细胞能够定植并生成精子。采精后进行体外受精,转基因胚胎阳性率可达10%。这是第一个成功通过精原干细胞移植的方法进行大家畜转基因研究的报道,为建立转基因大动物模型带来了希望。随着培养体系的不断完善,筛选、移植方法的不断改进,一定可以获得更高的移植成功率,提高生产转基因动物的效率等。

### 1.2 原始生殖细胞法

原始生殖细胞(Primordial germ cells, PGCs)是指能够发育成为精子或卵子的祖先细胞,来源于胚胎生殖嵴,与来源于囊胚内细胞团(Inner cell mass)的胚胎干细胞同属全胚层多能干细胞(Pluripotent stem cells)。原始生殖细胞可以定居在受体性腺,并能够在受体胚胎性腺迁移、增殖。又由于各个时期的原始生殖细胞都可以作为转基因的受体细胞<sup>[6]</sup>,故以其作为载体进行转基因研究较为简便、高效,并逐渐引起关注。

Natio等<sup>[7]</sup>从早期鸡胚血液分离得到了PGCs,利

用脂质体法导入LacZ基因,然后注入受体胚,53只鸡胚发育到第3d且在生殖嵴表达了LacZ基因。2006年, Van de Lavoie等<sup>[8]</sup>将携带有绿色荧光蛋白基因的PGC注入孵化3d的鸡胚内,将孵化出的公鸡与未转入基因的母鸡交配,成功获得生殖腺转入外源基因并带有绿色荧光的雏鸡。而对于哺乳动物, Brinster等<sup>[9]</sup>则证明了可以通过雄性个体之间的精原细胞转移来制备转基因动物,他们向C57BL6×STL杂交一代小鼠的曲精细管内注入ZFlacZ系小鼠的PGC,结果证明植入的PGC成功发育为精子细胞,并能够受精产生后代。另外, Mueller等<sup>[10]</sup>的报道中指出从转基因猪分离出的PGC具有一定的嵌合能力,从而证实了利用PGC进行猪或其它大动物转基因的可行性。

利用原始生殖细胞进行转基因来制备转基因动物有很大的优势,其可操作性强,可以大量制备<sup>[11,12]</sup>,是近几年发展起来的一项新的转基因技术。该方法同基因打靶技术相结合,可以同时提高转基因效率和精确度,在转基因动物研究中将会得到广泛的应用。但如何优化其操作以提高转基因效率以更好的应用于转基因家畜等问题还有待进一步的探索。

## 2 基因打靶技术

基因打靶技术(Gene targeting technology)是指通过同源重组将外源基因定点整合入靶细胞基因组上某一确定的位点,以达到定点修饰改造染色体上某一基因为目的的一项技术。它克服了随机整合的盲目性和危险性,是一种理想的修饰、改造生物遗传物质的方法。

### 2.1 胚胎干细胞(ES细胞)基因打靶

该方法利用ES细胞能在体外培养并保留发育的全能性,将改造后的外源基因导入ES细胞后,再把ES细胞注入动物囊胚,ES细胞能够参与宿主细胞的胚胎构成,形成嵌合体直至达到种系嵌合,从而将带有外源基因的ES细胞传给后代,产生转基因动物。Bradly等<sup>[13]</sup>首次成功地用显微注射法将ES细胞移入囊胚腔,并移植回假孕母鼠,获得生殖系嵌合体,经过适当的交配,获得了源于ES细胞系的纯系小鼠。1987年, Thomas等<sup>[14]</sup>选择小鼠ES细胞为靶细胞进行基因打靶,建立了次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(hprt)基因敲除(Gene knock-out)的动物模型。通过基

因打靶,不仅可以敲除特定的外源基因,还可以将外源基因转入动物基因组,获得基因敲入的转基因动物。美国犹他大学Eccles人类遗传学研究所科学家Mario R. Capecchi、美国北卡罗来纳州大学教会山分校医学院教授Oliver Smithies与英国科学家卡迪夫大学卡迪夫生命科学学院Martin J. Evans因为在利用胚胎干细胞对小鼠进行基因打靶的系列发现分享了2007年诺贝尔生理学或医学奖。

该方法中,ES细胞提供了一个研究处理整体细胞群的实验体系,利用ES细胞作为载体,体外定向改造ES细胞,可使得基因的整合数目、位点、表达程度和插入基因的稳定性及筛选工作等都在细胞水平上进行。目前,在ES细胞中进行同源重组已成为一种对小鼠染色体组任意位点进行遗传修饰的常规技术,该技术可以应用在研究基因功能和疾病模型方面。但是,至今尚未获得家畜的ES细胞用于基因打靶,从而也限制了基因打靶在制备乳腺生物反应器等实际生产中的应用。

### 2.2 体细胞基因打靶

在体细胞克隆技术成功之后,科学家们不再将基因打靶技术局限于ES细胞,而将基因打靶与体细胞核移植技术结合起来作为制备转基因动物的一种新的选择。首先设计合成一个将要导入体细胞的打靶载体,将此载体导入受体细胞,之后可以在体外培养条件下对整合外源基因的体细胞进行大量增殖和筛选,同时可以进行外源基因的表达分析,然后将整合并能高效表达外源基因的体细胞作为核供体,与核受体(一般是成熟卵母细胞)进行体外融合重构以形成克隆胚胎,再将克隆胚进行胚胎移植给代孕的母畜,从而诞生出某一基因发生定向改变的后代。

PPL公司的McCrearh等<sup>[15]</sup>在Nature上报道了COL1A1(原胶原)基因在胎儿成纤维细胞内进行基因打靶,在COL1A1基因内插入了IRES和无启动子的neo和 $\alpha$ 1-antitrypsin(AAT)基因,生产出转基因克隆绵羊,该羊乳中AAT蛋白含量高达650 mg/L。这是第一例通过核移植生产的体细胞基因打靶绵羊。在克隆动物制备过程中,提供体细胞核的供体动物如果与提供细胞质的受体动物不同,很可能会由于基因印记而导致核质的不协调,从而大大降低转基因克隆动物的制备效率<sup>[16]</sup>。为解决这一问题, Yang等<sup>[17]</sup>

选择将体细胞核移植到同一母牛的去核卵子细胞内,此克隆的同体重组胚中基因重排明显优于异体重组胚,其囊胚发育率也明显高于异体胚。另外,2004 年 Kuroiwa 等<sup>[18]</sup>应用该技术制备出无疯牛病的牛,2005 年 Wall 等<sup>[19]</sup>制备了不发生乳房炎的奶牛,2006 年 Lai 等<sup>[20]</sup>制备出能够合成多不饱和脂肪酸的猪。2008 年 Baldassarre 等<sup>[21]</sup>报道,重组人丁酰胆碱酯酶(rBChE)在哺乳期山羊乳中的表达量可达到 1~5 g/L。

该技术绕过了需要 ES 细胞打靶的障碍,直接在体细胞中进行基因同源重组,体外筛选中靶细胞,通过核移植制备转基因动物。ES 细胞经过打靶修饰、筛选、扩增后仍保持进入生殖系的能力,但体细胞不同,用于克隆家畜的体细胞体外存活时间是有限的,尽管有些细胞在经过基因打靶进入核移植时仍具有全能性,但衰老的细胞打靶效率会降低,这也成为体细胞基因打靶的主要限制因素。相信随着新技术的不断出现,靶受体细胞的培养传代、打靶以及核移植等相关技术会被攻破,从而提高体细胞基因打靶效率。由于该方法建立的转基因动物可高效表达体细胞中转入的外源基因,可以加快制备商业化生产水平的生物反应器及生产基因工程药物等的发展。

### 2.3 条件性基因打靶

外源基因整合到动物基因组中带有随机性,表现为整合位点的随机性和拷贝数量的随机性,这使得转入目的基因的表达有很强的不可控性。然而,在实际运用中往往需要使目的基因在特定组织或细胞类型中进行表达,或者使其在动物发育的某个阶段进行表达,因此,外源基因的时空可控表达成为人们迫切需要解决的问题。而条件性基因打靶则是一个绝佳的策略,具有很大的应用价值。它主要是基于 Cre/LoxP 系统从而使打靶产生的变异在时间、空间或时空上都具有特异性,Gu 等<sup>[22]</sup>利用这种策略首先实现了 DNA 聚合酶 $\beta$ 基因在 T 细胞的灭活。

该系统包括 Cre 重组酶和 loxP 位点两部分<sup>[23,24]</sup>,其中 LoxP 由两个 13 bp 的反向重复序列和 8 bp 的间隔区域构成,Cre 重组酶可识别 LoxP 位点,切除或置换两个 LoxP 位点间的 DNA 片段。因此可以通过给 Cre 重组酶 1 基因选择适当的组织特异性启动子,控制 Cre 重组酶基因在特定组织细胞中表达,保证基因表

达的空间特异性。而 Cre/LoxP 系统通过两种方式保证了目的基因表达的时间可控性:一种是在 Cre 重组酶基因的上游置入诱导剂依赖性的启动子,如四环素调控蛋白启动子、干扰素诱导性启动子等,根据需要在不同的时间给予诱导剂,启动转录使 Cre 重组酶表达,从而调控基因表达;另一种是将 Cre 重组酶基因与类固醇受体的配体结合域(Ligand binding domain, LBD)基因结合,表达出的融合蛋白的重组酶活性需要在激素类诱导剂作用下才能被激活<sup>[25]</sup>。

利用 Cre/LoxP 系统可以实现条件性基因敲除,即构建打靶载体时,在目的基因的两侧加上相同方向排列的 LoxP 序列,然后进行基因打靶制备转基因小鼠系。与此同时,再制备一种转入 Cre 重组酶基因的转基因小鼠,这两种小鼠交配后即可产生同时含有以上两套基因的转基因小鼠。将 Cre 重组酶基因与诱导型启动子或类固醇激素受体的 LBD 融合,并为其选择适当的组织特异性启动子,则可以在动物个体出生后根据时间需要激活 Cre 重组酶,切除基因组中两个 loxP 位点之间的基因,实现目的基因在某个特定组织器官的局部敲除<sup>[26]</sup>。这一策略特别适用于研究一些胚胎期必需基因的功能和广泛表达的基因在某一特定组织中的功能。相反,利用 Cre/LoxP 系统还可以实现条件性基因修复,如将两个 loxP 位点插入到某个功能基因中,即可根据时间需要通过药物诱导激活 Cre 重组酶,切除两个 loxP 位点之间的片段使目的基因重新恢复功能<sup>[27]</sup>。

Rendahl 等<sup>[28]</sup>首先将 Cre/LoxP 系统与胚胎干细胞的研究结合了起来。将 Pgk-LoxP-Neo 盒引入胚胎干细胞的目的基因座,Cre 酶表达 pgk 启动子被除去,同时 ES 细胞对 G418 的敏感性增加。这项研究有效地将单拷贝基因引入确定的基因座,加强了内源性调控元件控制转入基因的表达。由于细胞对 Cre 酶的吸收有限,从而限制了 Cre/LoxP 系统的应用,改进细胞对其的吸收效率也是 Cre/LoxP 系统研究的一项重要内容。Chenuaud 等<sup>[29]</sup>研究了由 Kaposi 成纤维细胞生长因子改进的疏水肽,以及 HIV-TAT 的基本肽对细胞吸收 Cre 酶效率的影响。结果表明当核定位信号与 Cre 的融合物与 TAT 肽融合后使成纤维细胞、鼠胚胎干细胞对 Cre 的吸收增加到 95%。

总之,该系统利用组织专一性启动子对转基因表达保证了空间专一性,同时利用药物诱导系统对



转基因表达保证了时间可控性,实现了定时、定位地对外源目的基因进行精确调控,达到了人为控制其表达的目的。可以利用此技术建立时空表达可控的转基因模型调控体系,对基因功能的研究具有十分重要的价值。

### 3 RNA 干扰(RNAi)介导的基因沉默技术

RNA干扰(RNAi)是双链RNA介导的特异性基因表达沉默现象,自从20世纪末被发现之后,其基础研究和应用迅速成为21世纪初生命科学中的热点领域之一。利用该方法,可以部分地抑制特定内源基因的表达,或通过mRNA的降解使目的基因表达下调沉默<sup>[30-31]</sup>,从而实现基因表达调控的时空性和可逆性。

双链小分子RNA(siRNA)可通过互补序列特异地结合目标mRNA,被结合的mRNA将不再翻译而使动物表现出特定的性状改变。例如,2005年Acosta等<sup>[32]</sup>设计了斑马鱼*myostatin*基因的干扰片段并注入其受精卵,这段干扰片段即双链小分子RNA干扰了*myostatin*的表达并降低其mRNA水平,从而解除*myostatin*基因对肌肉组织生长和发育的抑制作用,产生肌肉发达的斑马鱼。2006年,Pfeifer等<sup>[33]</sup>将能使*PrP*基因沉默的siRNA序列转入原核小鼠细胞核内,这些胚胎发育成小鼠后,再把感染性“瘙痒病”朊病毒注射到小鼠的大脑中;脑细胞含有siRNA的小鼠的存活时间比普通小鼠大大延长。该技术有望用于抗羊瘙痒病的转基因羊新品种的培育。

近几年已经开发出时空RNA干扰技术,通过控制干扰基因的转录,实现对RNA干扰的控制。2007年,Dickins等<sup>[34]</sup>将启动子四环素反应元件(Tetracycline response element, TRE)与RNA干扰基因结合后转入小鼠中,成功转入的小鼠再与转有转录因子(tTA)的小鼠杂交,制备出同时含有TRE、RNA干扰基因以及tTA的转基因小鼠。利用给予这些小鼠四环素药物,来激活tTA系统并使之与启动子结合,进而激活TRE,从而启动RNA干扰。

由于并不是所有的siRNA都能起到抑制效果,因此RNAi应用的重要问题是如何设计有效的RNAi序列,并使其在细胞内长时间稳定的表达。虽然RNAi现象的机制目前还没有完全弄清楚,涉及到很多不明功能的酶和蛋白质,但该技术有望被广泛

用于基因功能分析和疾病治疗的研究中,推动分子生物学、医学等的进展。如利用RNAi可以降低或抑制某些基因的表达,建立相应的动物模型用于病毒性疾病治疗和预防,将会是一个具有广阔发展前景的领域。也可以将RNAi技术与其他转基因方法如体细胞克隆法相结合,定向地生产转基因动物用于研究与生产。

### 4 诱导多能干细胞转基因技术

诱导多能干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPS cells)是将几种转录因子转入已经分化的体细胞中,使其重编程为类似胚胎干细胞的一种细胞类型。iPS细胞同样具有自我更新和分化的全能性,其功能与胚胎干细胞类似,无需制造胚胎,从任何组织的细胞都可以制造出具有干细胞功能的细胞,避免了转基因面临的伦理问题,更重要的是简化了制备转基因动物的过程。iPS产生机理与相关技术的深入研究,将会给治疗人类疑难疾病、组织修复与再生以及生物制药等诸多生物医学领域带来新的发展机遇。

2006年日本京都大学Takahashi等<sup>[35]</sup>将携带有Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc 4种限定因子基因的逆转录病毒载体导入小鼠成纤维细胞,结果显示转入限定因子的成纤维细胞被诱导重编程为胚胎干细胞样的多能性细胞,该细胞被称为“诱导多功能干细胞”(iPS细胞)。一年后,研究人员又成功的将人的皮肤成纤维细胞诱导为iPS细胞<sup>[36]</sup>。2009年7月,美国《细胞·干细胞》杂志和英国《自然》杂志分别报道了我国科学家利用iPS细胞培育出哺乳动物的消息,北京生命科学研究所高绍荣博士和中国科学院动物研究所周琪博士领导的研究小组分别利用iPS细胞,通过四倍体囊胚注射得到了存活并具有繁殖能力的小鼠,证明了iPS细胞的全能性<sup>[37,38]</sup>。这期间许多实验室针对这一领域展开研究,产生了一系列新的研究成果。例如由于c-Myc为癌基因,它的重新激活会导致iPS细胞的高致瘤性,针对这一问题,Nakagawa等<sup>[39]</sup>将c-Myc因子从Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4 4个限定因子中去除,结果有效地分离到iPS细胞,只是iPS细胞产生的效率明显降低。但是该实验获得的iPS细胞特异性高、质量好,并且其多能性标记基因的表达水平更接近于ES细胞,产生的后代小鼠的致

瘤性也大大降低。研究发现如果体细胞内某种限定因子的表达量合适,在重编程过程中可以去掉该因子而不影响结果。如在小鼠神经干细胞内,Sox2 和 c-Myc 的表达水平比 ES 细胞高,因此 Kim 等<sup>[40]</sup>分别将 Oct4 和 Klf4、Oct4 和 c-Myc 两组限定因子导入神经干细胞,也成功地将其诱导为 iPS 细胞。

另外,研究证明某些小分子化合物可以促进重编程,甚至可以替代限定因子。如在转入 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 4 种因子诱导小鼠成纤维细胞时,若加入维甲酸(Valproic acid, VA)可以明显提高其重编程效率,即使在去掉癌基因 c-Myc 时也能保持效率不下降,从而有效避免了诱导细胞癌变的可能<sup>[41]</sup>。在对限定因子进行研究的同时,科研人员也展开了对其载体的探索,如利用来自病毒的 2A 肽序列生成一种结合限定因子的“多顺反子载体”(Multicistronic vector),该载体被 piggyBac 转位子载体送入细胞中,进而在人和小鼠成纤维细胞中都生成了稳定的 iPS 细胞<sup>[42]</sup>。综合近两年的实验成果,可以推测小鼠的任何体细胞都有可能通过病毒载体转染限定因子的方法诱导成为 iPS 细胞<sup>[43]</sup>。在 iPS 细胞报道后短短两年多的时间内,iPS 细胞的研究就受到了人们广泛的关注,体细胞重编程、去分化和多潜能干细胞来源等一系列热点问题再次成为干细胞研究的热点和焦点,同时也为转基因动物的研究提供了全新的思路。

iPS 细胞的功能同 ES 细胞非常相似,具有多向分化的潜能。同普通细胞一样,iPS 细胞能够作为转基因的靶细胞,可以通过一定的转基因技术将外源基因转入 iPS 细胞,也可以针对 iPS 细胞进行基因打靶或基因敲除等遗传修饰,从而根据人的意愿实现 iPS 细胞内基因改造,然后将其注入囊胚腔来获得嵌合体后代,高效、定向的生产转基因动物。另外,将 iPS 细胞应用到体细胞核移植技术是一个非常不错的选择,利用 iPS 细胞作为核供体细胞,同适当的受体细胞融合后便可以直接获得转基因动物。因此,在转基因动物研究中,将 iPS 细胞诱导技术同动物转基因技术相结合是一种创新,应用该方法不仅可以避免种间繁殖障碍,克服亲缘关系的制约,而且可获得用传统的交配方法无法得到的动物新性状。

与 ES 细胞相比,iPS 细胞具有明显优势,其避免了分离 ES 细胞时对大量优质胚胎的破坏,而且 iPS

细胞容易获得,普通的体细胞即可诱导产生。另外,由于 iPS 细胞强大的可塑性,使基因的遗传修饰更加高效,转基因动物的制备也更加方便快捷。iPS 细胞的应用在转基因动物生物反应器以及人源性疾病动物模型的制作等方面具有深远的意义。但是,目前这一技术刚刚起步,还有许多问题等待解决,例如如何提高 iPS 细胞的诱导效率,如何保持 iPS 细胞多能性,如何定向可控的诱导 iPS 细胞等。随着研究的不断深入,这些问题都会得到更好的解决,进一步促进动物转基因技术的发展。

## 5 问题与展望

动物转基因技术是人类按着自己的意愿去改变动物的遗传组成,涉及生物学、畜牧学、分子遗传学和细胞遗传学等多门学科的知识,是一项富有挑战性的实验技术。动物转基因在改善畜产品质量、提高生产能力、研究人类疾病模型、生产生物医药产品等方面都显示出了广阔的应用前景。然而,转基因动物在研究过程中也存在着一些迫切需要解决的问题:

首先,目前转基因动物研究存在理论基础积累不足的问题,特别是对转基因过程中的精细理论及其过程不甚清楚;其次,转基因技术支撑体系不够完善,致使目前转基因动物的成功率和成活率极低,这是限制转基因动物发展的主要因素;第三,外源基因在目的基因中的整合率低,效果不稳定。可能对内源基因产生影响,对宿主基因组造成破坏,也可能激活动物正常情况下关闭的基因,使其表达,进而导致动物出现异常;第四,基因打靶等技术环节还有待于成熟,这就需要研究者综合转基因技术的基础理论和技术实践,不断探索,寻找更实用更完善的技术方法;第五,转基因动物还存在一些安全性问题。比如外源基因的插入可能对宿主动物自身有影响,造成基因污染,对生态平衡以及物种的多样性造成威胁;转基因动物制品可能存在有毒性或过敏等食品安全性问题;转基因移植可能加大“人畜共患病”的传播机会,危害人类健康等。因此,要认真考虑转基因动物的安全性问题,修改或制定相关的法律法规,在保证安全的前提下,使转基因动物发挥其最大的优势,造福于全人类。

自转基因动物问世以来,动物转基因技术得到

迅猛发展,为转基因动物的制备提供了更多更好的平台。通过生殖干细胞法提高了转基因的效率,通过基因打靶技术实现了外源基因的定点整合,而发展基因打靶技术,将其与RNA干扰结合在一起,使目的基因表达的时间和空间可控性成为可能,也为基因的精确调控提供了全新的途径。另外,转基因动物又能够作为microRNA功能研究、iPS细胞研究等近几年一系列热点问题的研究工具,新的技术提供了更多新的思路,从而给人类的医药卫生、家畜改良等领域带来革命性的变化,特别是作为生物反应器以及在药物生产和供人类移植所用器官的生产等方面,其经济效益和社会效益将是难以估量的。

但是现在转基因动物的应用主要集中在医药方面,在食品工业上的应用很有限,主要原因是转基因的效率太低,建立优质转基因动物品系的时间太长。今后的工作还应集中在现有的技术水平上建立更加简便、经济、有效的转基因技术,制备出外源基因稳定遗传的有生产应用价值的健康动物。随着家畜基因组计划的完成,人类将更有针对性地改良家畜基因,把外源基因插入到对动物生长影响较小的DNA片段中,从而克服随机整合和异常表达给家畜健康带来的问题,而基因打靶等新的转基因技术创造了这种可能。同时,转基因技术的发展需要更多的相关法律法规给予一定的支持。总之,转基因动物研究是一个需要不断探索和创新的过程,寻找简易、可靠、高效的转基因技术成为转基因动物的关键。纵观这20多年的发展,相信经过科学工作者的不断探讨,结合各种生物技术,不久的将来会发展出更加简便、更加新颖的动物转基因技术,更多的转基因动物及其相关的产品必将走向产业化和市场化,改善人们的生活水平,对人类的生产和发展起推动性的作用。

## 参考文献(References):

- [1] Janeisch R, Mintz B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71(4): 1250–1254.[\[DOI\]](#)
- [2] Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(24): 11298–11302.[\[DOI\]](#)
- [3] Nagano M, Brinster CJ, Orwig KE, Ryu BY, Avarbock MR, Brinster RL. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(23): 13090–13095.[\[DOI\]](#)
- [4] Kanatsu-Shinohara M, Kato M, Takehashi M, Morimoto H, Takashima S, Chuma S, Nakatsuji N, Hirabayashi M, Shinohara T. Production of transgenic rats via lentiviral transduction and xenogeneic transplantation of spermatogonial stem cells. *Biol Reprod*, 2008, 79(6): 1121–1128.[\[DOI\]](#)
- [5] Honaramooz A, Megee S, Zeng W, Destremes MM, Overton SA, Luo J, Galantino-Homer H, Modelski M, Chen F, Blash S, Melican DT, Gavin WG, Avres S, Yang F, Wang PJ, Echelard Y, Dobrinski I. Adeno-associated virus (AAV)-mediated transduction of male germ line stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation. *FASEB*, 2008, 22(2): 374–382.[\[DOI\]](#)
- [6] Herpin A, Fischer P, Liedtke D, Kluever N, Neuner C, Raz E, Scharlt M. Sequential SDF1 $\alpha$  and b-induced mobility guides Medaka PGC migration. *Dev Biol*, 2008, 320(2): 319–327.[\[DOI\]](#)
- [7] Naito M, Matsubara Y, Harumi T, Tagami T, Sakurai M, Kuwana T. Foreign gene expression in the gonads of chimaeric chicken embryos by transfer of primordial germ cells transfected *in vitro* by lipofection for 24 hours. *Anim Sci J*, 2002, 71(3): 308–311.
- [8] Van de Lavoie MC, Diamond JH, Leighton PA, Mather-Love C, Heyer BS, Bradshaw R, Kerchner A, Hooi LT, Gessaro TM, Swanberg SE, Delany ME, Etches RJ. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*, 2006, 441(7094): 766–769.[\[DOI\]](#)
- [9] Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(24): 11303–11307.[\[DOI\]](#)
- [10] Mueller S, Prelle K, Rieger N, Petznek H, Lassnig C, Luksch U, Aigner B, Baetscher M, Wolf E, Mueller M, Brem G. Chimeric pigs following blastocyst injection of transgenic porcine primordial germ cells. *Mol Reprod Dev*, 1999, 54(3): 244–254.[\[DOI\]](#)
- [11] Leighton PA, van de Lavoie MC, Diamond JH, Xia C, Etches RJ. Genetic modification of primordial germ cells by gene trapping, gene targeting, and phiC31 integrase. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(7): 1163–1175.[\[DOI\]](#)
- [12] Suraveva NM, Baryshnikov Alu, Fisinin VI, Prokofev MI. Efficacy of various methods of a reporter gene transfer to chicken embryonic cells. *Izv Akad Nauk Ser Biol*, 2008(1): 18–23.
- [13] Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation



- of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 1984, 309(5965): 255–256. [\[DOI\]](#)
- [14] Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987, 51(3): 503–512. [\[DOI\]](#)
- [15] McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, 405(6790): 1066–1069. [\[DOI\]](#)
- [16] Marques MM, Thomson AJ, McCreath KJ, McWhir J. Conventional gene targeting protocols lead to loss of targeted cells when applied to a silent gene locus in primary fibroblasts. *J Biotechnol*, 2006, 125(2): 185–193. [\[DOI\]](#)
- [17] Yang XY, Li H, Ma QW, Yan JB, Zhao JG, Li HW, Shen HQ, Liu HF, Huang Y, Huang SZ, Zeng YT, Zeng F. Improved efficiency of bovine cloning by autologous somatic cell nuclear transfer. *Reproduction*, 2006, 132(5): 733–739. [\[DOI\]](#)
- [18] Kuroiwa Y, Kasinathan P, Matsushita H, Sathiyaselan J, Sullivan EJ, Kakitani M, Tomizuka K, Ishida I, Robl JM. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin- $\mu$  and prion protein in cattle. *Nat Genet*, 2004, 36(7): 775–780. [\[DOI\]](#)
- [19] Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE, Bannerman DD, Pursel VG, Wells KD, Talbot N, Hawk HW. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(4): 445–451. [\[DOI\]](#)
- [20] Lai L, Kang JX, Li R, Wang J, Witt WT, Yong HY, Hao Y, Wax DM, Murphy CN, Rieke A, Samuel M, Linville ML, Korte SW, Evans RW, Starzl TE, Prather RS, Dai Y. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(4): 435–436. [\[DOI\]](#)
- [21] Baldassarre H, Hockley DK, Dore M, Brochu E, Hakier B, Zhao X, Bordignon V. Lactation performance of transgenic goats expressing recombinant human butyryl-cholinesterase in the milk. *Transgenic Res*, 2008, 17(1): 73–84. [\[DOI\]](#)
- [22] Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, 1994, 265(5168): 103–106. [\[DOI\]](#)
- [23] Sakahara M, Ohkawara H, Nakao K, Yokozaki H, Aiba A. The simultaneous induction of tumorigenesis and Cre-loxP recombination in mice. *Kobe J Med Sci*, 2009, 54(6): 279–281.
- [24] Kyoungmi K, Hwain K, Daekee L. Site-specific modification of genome with cell-permeable Cre fusion protein in preimplantation mouse embryo. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388(1): 122–123. [\[DOI\]](#)
- [25] Wakita T, Taya C, Katsume A, Kato J, Yonekawa H, Kanegae Y, Saito I, Hayashi Y, Koike M, Kohara M. *J Biol Chem*, 1998, 273(15): 9001–9006. [\[DOI\]](#)
- [26] Metzger D, Chambon P. Site-and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods*, 2001, 24(1): 71–80. [\[DOI\]](#)
- [27] Yu J, McMahon AP. Reproducible and inducible knockdown of gene expression in mice. *Genesis*, 2006, 44(5): 252–261. [\[DOI\]](#)
- [28] Rendahl KG, Ouirou D, Ladner M, Covne M, Seltzer J, Manning WC, Escobedo JA. Tightly regulated long-term erythropoietin expression *in vivo* using tet-inducible recombinant adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(2): 335–342. [\[DOI\]](#)
- [29] Chenuaud P, Larcher T, Rabinowitz JE, Provost N, Joussemet B, Bujard H, Samulski RJ, Favre D, Moullier P. Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol Ther*, 2004, 9(3): 410–418. [\[DOI\]](#)
- [30] Rettig GR, Rice KG. Quantitative *in vivo* imaging of Non-viral-Mediated gene expression and RNAi-Mediated knockdown. *Methods Mol Biol*, 2009, 574: 155–171. [\[DOI\]](#)
- [31] McAnuff MA, Rettig GR, Rice KG. Potency of siRNA versus shRNA mediated knockdown *in vivo*. *J Pharm Sci*, 2007, 96(11): 2922–2930. [\[DOI\]](#)
- [32] Acosta J, Carpio Y, Borroto I, González O, Estrada MP. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J Biotechnol*, 2005, 119(4): 324–331. [\[DOI\]](#)
- [33] Pfeifer A, Eigenbrod S, Al-Khadra S, Hofmann A, Mitteregger G, Moser M, Bertsch U, Kretzschmar H. Lentivector-mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice. *J Clin Invest*, 2007, 116(12): 3204–3210. [\[DOI\]](#)
- [34] Dickins RA, McJunkin K, Hernando E, Premrsirut PK, Krizhanovsky V, Burgess DJ, Kim DY, Cordon-Cardo C, Zender L, Hannon GJ, Lowe SW. Tissue-specific and reversible RNA interference in transgenic mice. *Nat Genet*, 2007, 39(7): 914–921. [\[DOI\]](#)
- [35] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663–676. [\[DOI\]](#)
- [36] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourquet J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem



- cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318(5858): 1917–1920. [\[DOI\]](#)
- [37] Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, Hao J, Guo CL, Ma QW, Wang L, Zeng F, Zhou Q. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009, 461(7260): 86–90. [\[DOI\]](#)
- [38] Kang L, Wang JL, Zhang Y, Kou ZH, Gao SR. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(2): 135–138. [\[DOI\]](#)
- [39] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(1): 101–106. [\[DOI\]](#)
- [40] Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Arauzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Scholer HR. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 2008, 454(7204): 646–650. [\[DOI\]](#)
- [41] Huangfu D, Maehr R, Guo WJ, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, Melton DA. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 795–797. [\[DOI\]](#)
- [42] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hamalainen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Naqy A. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458(7239): 766–770. [\[DOI\]](#)
- [43] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Werniq M, Creighton MP, Steine EJ, Cassady JP, Foreman R, Lenqner CJ, Dausman JA, Jaenisch R. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 2008, 133(2): 250–264. [\[DOI\]](#)

## • 综合信息 •

### “中国科学院遗传发育所期刊工作会议”在京召开

2010年5月29–30日,“中国科学院遗传发育所期刊工作会议”在北京召开。中国科学院遗传发育所所长、中国遗传学会副理事长兼秘书长、《遗传学报》(Journal of Genetics and Genomics, JGG)、《遗传》主编薛勇彪研究员主持会议,中国遗传学会副秘书长安锡培、中国遗传学会办公室主任王长城、两刊编辑部全体编辑人员及中国遗传学会办公室相关工作人员参加了会议。

首先,编辑室主任李绍武作了“抓住机遇 结构创新 开创期刊工作新局面”的工作报告。他详细分析了两刊当前面临的机遇与挑战,提出了保持编辑队伍基本稳定、以精兵强将组建JGG编辑部,加强组稿约稿、提高期刊质量,提高期刊国际化水平的策略。在办刊的过程中培养人才,在培养人才的过程中办好刊物,使我们的编辑人员与期刊不断成长,共同进步。

随后,编辑部同志根据各自的岗位分工分别作了2010年1–5月份工作总结汇报。

会议经过讨论,明确了两刊的工作目标。为推动期刊发展,决定举办“八届一次JGG编委扩大会议暨国际学术研讨会”;更新JGG和《遗传》封面设计;关于编委及主要审稿人报酬问题和招聘医学遗传学博士等事项也做出了具体安排。

薛勇彪主编指出:编辑部的工作报告与时俱进,起点高,立意新,思考好。同时也感受到编辑部的同事们都做了大量工作,为期刊发展做出了贡献。遗传发育所将进一步重视期刊工作,加强对办刊工作的领导,将办刊工作纳入研究所知识创新工程的一部分。中国遗传学会要从长远考虑,对两刊进行明确定位;编辑部要加强与专家的联系沟通,真正使JGG和《遗传》杂志办成反映中国遗传学研究成果的平台与窗口。

此次会议的召开,进一步明确了办刊方向,为期刊发展奠定了良好基础。