

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00449

## 转基因动物新技术研究进展

罗庆苗, 苗向阳, 张瑞杰

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

**摘要:** 转基因技术经过数十年的发展日渐成熟, 并推动转基因技术研究进入一个新的发展阶段。文章综述了体细胞核移植技术、慢病毒载体法、转座子介导的基因转移法、RNA 干扰介导的基因敲除法和锌指核酸酶-基因打靶技术等近年发展起来的方法。而近来诱导多能干细胞(iPS 细胞)的成功为尚未获得 ES 细胞的大动物建立多能干细胞系提供了一种新的方案, 为转基因动物研究开创一片更广阔的天地。文章在前人研究的基础上重点总结了以上各种转基因技术的最新研究动态并对各种转基因技术的特点进行了探讨。

**关键词:** 转基因技术; RNAi; 基因打靶; 锌指核酸酶; iPS; 动物克隆

## An update on the development of transgenic animal technology

LUO Qing-Miao, MIAO Xiang-Yang, ZHANG Rui-Jie

*Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China*

**Abstract:** The animal transgenic technology has increasingly turned mature over several decades and promoted the research of transgenic technology to a new developmental phase. In this review, various kinds of transgenic technologies, including somatic cell nuclear transfer, gene transfer mediated by transposon, gene knockout mediated by RNA interference, and zinc-finger nucleases-gene targeting technology, are summarized. Recently, the success of induced pluripotent stem cells (iPS cells), which has provided an alternative way to derive pluripotent stem cells of large animals, will extend the field of transgenic animal studies. Here, we summarized the latest trends on the basis of previous studies. In addition, the characteristics of different kinds of transgenic methods in detail are discussed.

**Keywords:** transgenic technology; RNA interference; gene targeting; zinc-finger nuclease; iPS; animal cloning

动物转基因技术是指运用基因工程等实验技术手段, 对动物基因组进行有目的的遗传修饰, 并通过动物育种技术使修饰改造的基因稳定遗传给后代动物的一种生物技术。Gordon 等<sup>[1]</sup>率先尝试用显微注射的方法制备转基因小鼠, 证实了外源基因可以通过显微注射的方法整合到宿主基因组中。Palmiter 等<sup>[2]</sup>将 5' 端调控区缺失后的大鼠生长激素基因与小鼠金属硫蛋白 I 基因启动子相连接, 然后将融合基

因注入小鼠受精卵雄原核, 获得 7 只转基因阳性鼠, 成功研制出了著名的“超级小鼠”。Hammer 等<sup>[3]</sup>利用该方法成功地制作了转基因兔、绵羊和猪。上述 3 项研究开创了动物转基因研究历程上的里程碑。此后, 转基因技术不断向前发展。1997 年, Willmut 等<sup>[4]</sup>通过体细胞核移植技术制备出了世界上第一头哺乳动物转基因克隆绵羊, 开创了哺乳动物体细胞核移植的先例。这项技术为转基因动物的制备开辟了

收稿日期: 2010-11-18; 修回日期: 2011-03-16

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(编号: 2009ZX08008-004B, 2008ZX08008-003), 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(编号: 2008AA10Z140), 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: 罗庆苗, 硕士, 专业方向: 基因工程及转基因动物。E-mail: luoqingmiao870219@163.com

通讯作者: 苗向阳, 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。E-mail: mxy32@sohu.com

崭新的天地, 转基因技术研究进入了新的发展历程。

近年来, 随着转基因技术研究的继续深入, 出现了许多动物转基因新技术、新方法。包括慢病毒载体法、转座子介导的基因转移法、RNA 干扰介导的基因敲除法、锌指核酸酶-基因打靶技术。这些技术方法不仅提高了转基因动物的制备效率, 同时使转基因动物的基因表达调控更加精确。而近来诱导多能干细胞(iPS 细胞)技术在在小鼠、恒河猴、人、大鼠和猪这些物种上的成功对那些还未建立 ES 细胞的物种建立多能干细胞系提供了一种新的方案, 也将给这些物种的胚胎干细胞的建立、基因修饰动物的产生带来新的希望<sup>[5]</sup>, 显示了 iPS 细胞技术在转基因动物研究领域的巨大前景。

## 1 体细胞核移植技术

1997 年, Wilmut 等<sup>[4]</sup>利用成年绵羊乳腺上皮细胞作为核供体, 然后将其移植到去核的卵母细胞中, 重构胚胎经过激活和培养后, 移植到代孕动物中, 成功获得了体细胞克隆绵羊多莉(Dolly), 具体图解见图 1。此项成果拉开了动物体细胞克隆技术的序幕。随后, Schnieke 等<sup>[6]</sup>通过体细胞核移植, 率先在

世界上培育了表达人凝血因子的转基因克隆绵羊。

Cibelli 等<sup>[7]</sup>获得了转基因牛, Macháty 等<sup>[8]</sup>得到了转基因猪。在国内, 此研究领域也得到了快速地发展并达到了国际领先水平。龚国春等<sup>[9]</sup>成功地获得了我国首例转基因体细胞克隆牛。张运海等<sup>[10]</sup>获得我国第一头体细胞克隆猪。杨鹏华等<sup>[11]</sup>首次成功培育出第一批乳铁蛋白转基因奶牛。Yang 等<sup>[12]</sup>构建亨廷顿蛋白转基因载体, 运用体细胞核移植技术, 成功获得 6 头亨廷顿舞蹈症转基因猪。该研究成果表明运用转基因技术建立人类遗传性疾病的转基因大动物模型的重要性。

体细胞核移植技术的突出优点是可以在细胞水平上早期验证修饰事件, 简化了转基因动物生产的许多环节, 从而减少受体动物的数目, 不需要用受体母畜来承担那些非转基因的胚胎, 表现了强大的生命力。且产生的转基因后代遗传背景及遗传稳定性一致, 不需选配即可建立转基因群体, 具有很大的优越性。但由于体细胞核移植技术涉及核质互作, 核重编程等复杂过程, 产生的转基因后代部分个体表现出生理或免疫缺陷。且传统核移植操作程序复杂, 对设备和技术要求较高。

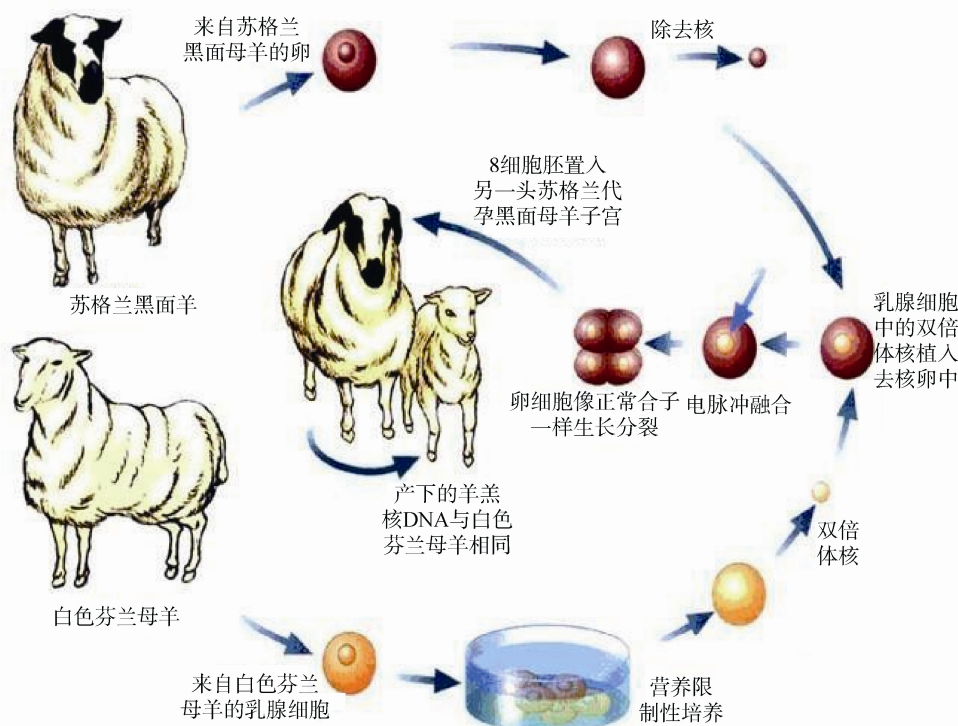


图 1 体细胞核移植技术生产克隆羊(图片来源: <http://4a.njau.edu.cn:8020/bio/6/5-1-1.htm>)

## 2 慢病毒载体法

慢病毒属于逆转录病毒科。慢病毒感染宿主细胞后, 病毒 RNA 反转录为 DNA 后可以整合到宿主细胞的染色体上并长期稳定表达。慢病毒能感染分裂细胞和静止细胞, 不易诱发宿主免疫反应, 因此成为有效的基因转移载体。近年来, 慢病毒载体法制备转基因动物被广泛应用。Pfeifer 等<sup>[13]</sup>用重组绿色荧光蛋白(GFP)慢病毒感染小鼠 ES 细胞和桑椹胚, 发现早期胚胎和出生后仔鼠稳定表达 GFP, 具体图解见图 2。同年, Lois 等<sup>[14]</sup>利用慢病毒载体法成功制备转基因小鼠和大鼠。他们在 GFP 基因下游连接早发肝肝炎病毒转录后调控元件(WRE), 以提高 GFP 基因的转录水平。将病毒液进行受精卵卵周隙注射, 注射后胚胎移植到假孕母鼠体内, 所产仔鼠 86% 携带 1 个以上 GFP 转基因拷贝。Hofmann 等<sup>[15]</sup>利用慢病毒载体法首次成功制备绿色荧光蛋白转基因猪, McGrew 等<sup>[16]</sup>报道利用该方法高效制备了转基因鸡, 效率比以往任何方法高出 100 倍。Sasaki 等<sup>[17]</sup>通过自我失活的慢病毒液进行受精卵卵周隙注射, 首次培育出了带有增强的绿色荧光蛋白(EGFP)转基因的非人类转基因灵长类动物—普通猕猴, 在国际上引起了巨大轰动。张敬之等<sup>[18]</sup>也利用慢病毒载体法成

功制备 GFP 转基因小鼠。Niu 等<sup>[19]</sup>利用基于猿猴免疫缺损病毒的慢病毒载体成功获得转基因猕猴。

慢病毒载体法的优点是外源基因的整合率较高; 外源基因多属单拷贝整合; 宿主范围广。但是慢病毒载体容量有限, 外源基因片段长度通常小于 10 kb, 因而转入的基因很容易缺少其邻近的调控序列, 同时慢病毒 DNA 序列可能会干扰外源基因的表达, 以致整合后的表达率低。且外源基因难以植入生殖系统, 所得转基因家畜大多为嵌合体, 需要广泛的杂交, 以建立转基因系。携带外源基因的病毒载体在导入受体细胞基因组过程中有可能激活基因组 DNA 序列上的原癌基因或其他有害基因, 安全性令人担忧。

## 3 转座子介导的基因转移法

利用转座子可以在基因组内插入和切离并改变自身位置的特性, 使之能携带外源基因整合到动物基因组内, 从而制作转基因动物。1951 年, McClintock 在玉米中首先发现转座子, 直到 50 年之后, McClintock 的工作才得到科学界的肯定, 荣获 1983 年的诺贝尔生理学医学奖。此后, 转座子及其相关技术得到迅速地发展, 成为生物基因功能分析的有效工具之一。Fadool 等<sup>[20]</sup>将 mariner 元件成功地转入了斑马鱼中, 并实现了种系传递。Sang 等<sup>[21]</sup>将 mariner

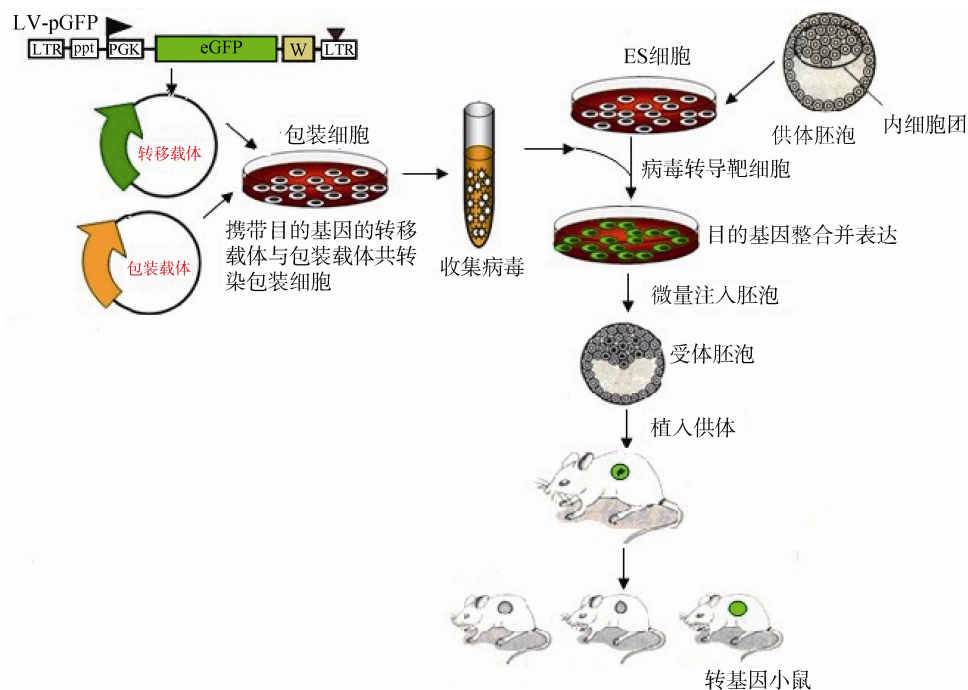


图 2 慢病毒载体法制备转基因动物

元件成功地对鸡进行了种系转化。Mariner 元件对斑马鱼和禽类种系转化的成功为转基因动物制备提供了新的有效基因导入方法。Ivics 等<sup>[22]</sup>根据积累的系统发生数据,将鲑鱼基因组中一个已经失活的转座系统进行分子重建,获得了睡美人(sleeping beauty)转座子。Dupuy 等<sup>[23]</sup>将带有 *GFP* 基因的 SB 转座子线性化后,与体外转录的编码 SB10 转座酶的 mRNA 一同注射入小鼠的单细胞胚胎,转入的外源基因通过生殖细胞传递给后代。PiggyBac 转座子首次在杆状病毒浸染粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* TN-368 细胞株系中发现。利用 PiggyBac 转座子构成的载体-辅助质粒系统已成功地获得了转基因地中海果蝇、黑腹果蝇和家蚕。丁昇等<sup>[24]</sup>首次报道 PiggyBac 转座子系统能在哺乳动物细胞和小鼠中高效转座,并成功培育出带有荧光的转基因小鼠,从而在世界上首次建立一种高效的哺乳动物转座系统,具体图解见图 3。PiggyBac 转座子属于 DNA 转座子。PiggyBac 转座子在转座酶作用下,切出和插入发生在特征性 (TTAA)核苷酸序列目标位点,使其在动物体内能进行准确转座,目前是哺乳动物中转座活性最强的 DNA 转座子。近年来,利用转座子技术进行转基因动物功能研究得到了迅速的发展。Wu 等<sup>[25]</sup>利用 PiggyBac 与 Cre-loxP 系统相结合培育出大量基因突变老鼠并进行了广泛的功能基因研究。Woltjen 等<sup>[26]</sup>开展利用 PiggyBac 转座子对细胞进行重编程的研究,研究人员利用来自病毒的 2A 肽序列生成一种结合

重编程因子的“多顺反子载体”，该载体被 piggyBac 转座子载体送入细胞中，从而在人和小鼠成纤维细胞中都生成了稳定的 iPS 细胞。然后，又从已经生成的 iPS 细胞系中除去与 2A 结合的重编程因子。此项研究开发了一种更安全的 iPS 细胞制备方法。

较之传统的基因剔除和化学诱变等方法,转座子介导的基因转移法整合效率高,承载容量大,可同时携带多个基因,且转基因以单拷贝形式整合,易于模拟内源基因的表达,同时易于确定整合位点。但在基因组中转座子的移动(转座)可诱导剪切和插入位点的突变,以可移动 DNA 片段作为载体尚存在转移基因结果的不稳定性和与内源跳跃基因相互作用的可能性。而 Klattenhoff 等<sup>[27]</sup>认为,生殖细胞对转座子特别敏感,为了给遗传物质向下一代的传递提供更多的忠实性,某些多细胞真核生物进化产生了基于 RNA 的令生殖细胞转座子沉默的途径。这使得基于转座子介导的基因转移法又困难重重。

#### 4 RNAi 介导的基因敲除法

RNA 干涉(RNAi)是一种普遍存在于绝大多数生物体内序列特异性的转录后基因沉默机制(PTGS),它通过一段双链 siRNA 或单链 miRNA 导致同源靶 mRNA 降解,从而阻断目的基因的表达。Fire 等<sup>[28]</sup>首次阐明此现象为转录后沉默机制,通过注射与秀丽新小杆线虫机体同源基因(靶基因)的双链 RNA 阻断了靶基因的表达,并将其命名为 RNA 干扰

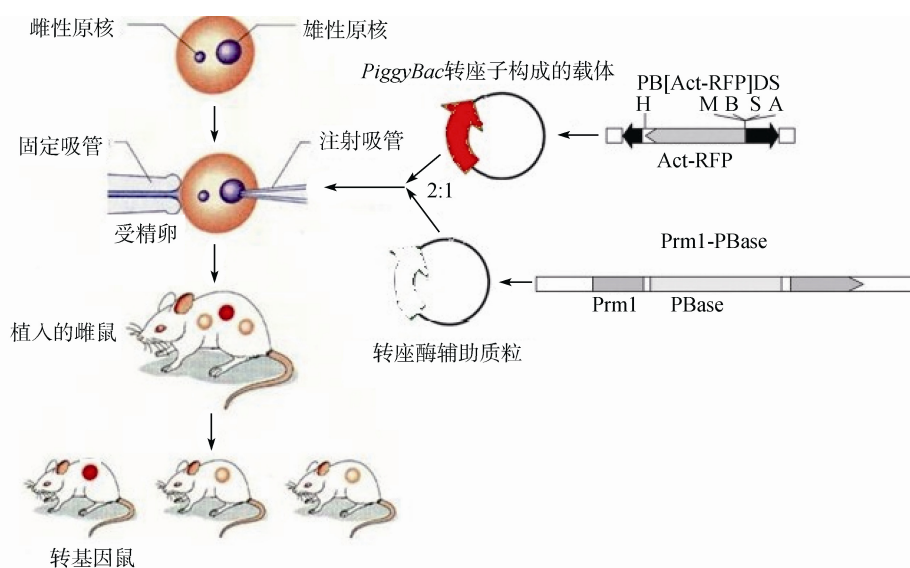


图3 PiggyBac 转座子系统介导制备转基因动物



(RNA interference, RNAi)。Elbashir 等<sup>[29]</sup>首次报道哺乳动物培养细胞中通过 siRNA 成功诱导了特异性靶基因表达沉默, RNAi 技术成功地从植物研究发展到哺乳动物的相关研究上。Hasuwa 等<sup>[30]</sup>首次报道成功建立了 RNAi 转基因小鼠, 其利用 *RFP* 作为 RNAi 载体导入的报告基因, 向表达 GFP 小鼠中导入表达 siRNA<sub>EGFP</sub> 的 shRNA 质粒, 获得没有 GFP 表达而有 RFP 表达的转基因小鼠, 具体图解见图 4。Jagdece 等<sup>[31]</sup>利用核移植克隆法与 RNAi 技术相结合, 成功获得体内不繁殖猪内源性逆转录病毒(PERV)的转基因猪。杨志峰等<sup>[32]</sup>构建了针对 *IKK $\alpha$*  基因 RNAi (敲低)的慢病毒载体, 并将载体导入小鼠受精卵卵周隙, 获得携带该载体的转基因小鼠模型, 转基因小鼠外周血细胞 *IKK $\alpha$*  mRNA 表达量明显降低。Li 等<sup>[33]</sup>报道了 siRNA 制备的新方法, 通过构建质粒 pAd-hTR(human telomerase RNA, hTR), 将 pAd-hTR 转染哺乳动物细胞系 HEK-293, 获得了携带有 hTR 靶向的 siRNA(Ad-hTR-siRNA)腺病毒, 证明了 hTR siRNA 在 HeLa 细胞系中能有效地进行端粒酶的敲除, 从而指出了这种 siRNA 表达重组腺病毒系统在癌症基因治疗方面的前景。

与传统的基因敲除方法相比, RNAi 的方法具有明显优点——高效、周期短、特异性强和操作简单, 因此 RNAi 可以作为一种简单有效的代替基因敲除

的工具。通过制备针对靶基因 mRNA 不同区段的 siRNA 转基因动物, 有可能获得对靶基因不同程度的缄默效果, 从而可以模拟动物数量遗传性状。但 RNA 干扰载体导入率不高, 很多设计的 dsRNA 不能产生抑制靶基因转录后沉默的效果, 且不能产生稳定地干涉作用。在 RNAi 的研究中, 研究人员一般利用逆转录病毒传递编码 shRNA 的基因。有研究表明, 大量的 shRNA 会阻断细胞 miRNA 路径, 影响内源性正常 miRNA 的水平和活性。

## 5 基因打靶技术

基因打靶技术是基于同源重组原理, 使外源 DNA 定点整合到靶细胞的特定基因座上, 对动物基因组进行精细地修饰和改造的技术, 其具有位点专一性强和打靶后目的片段可以和染色体 DNA 共同稳定遗传的特点。Thomas 等<sup>[34]</sup>首先对小鼠胚胎干细胞(ES 细胞)进行了基因打靶, 然后将此打靶的 ES 细胞移植进入小鼠囊胚, 将此重组胚移植进入代孕母鼠, 最后产出嵌合体仔鼠, 通过相互交配获得基因敲除的纯合小鼠。在大家畜体内至今还没有成功获得胚胎干细胞系, 因此在大家畜上主要结合克隆技术与体细胞基因打靶技术来产生转基因动物。McCreath 等<sup>[35]</sup>首先在成纤维细胞中进行基因靶位操作, 用体细胞核移植生产出了基因打靶绵羊。Lai

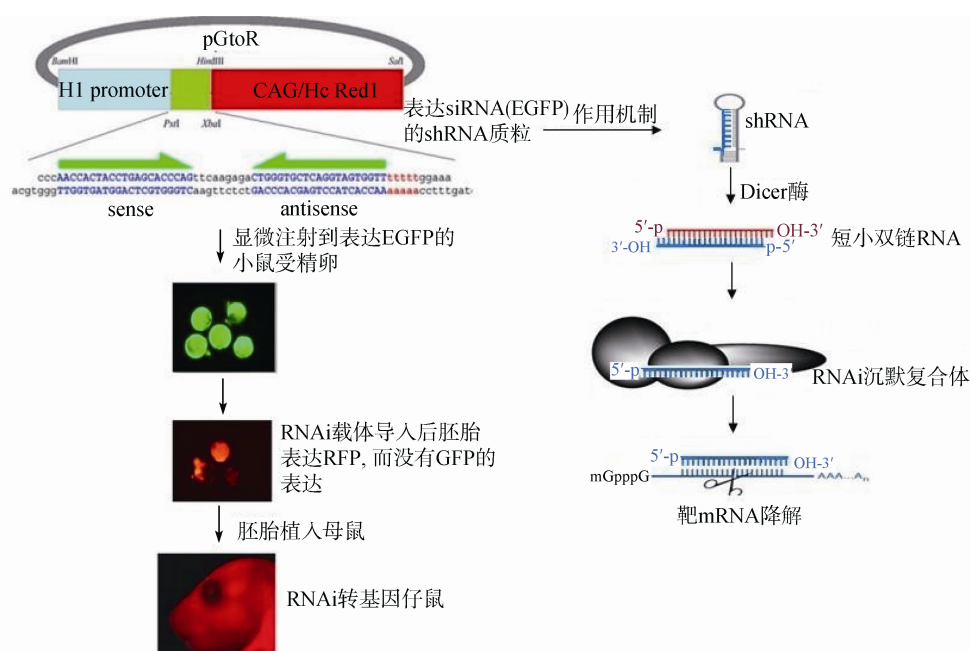


图4 RNAi法制备转基因动物

等<sup>[36]</sup>运用基因打靶结合克隆的方法制作出了敲除 $\alpha$ -1, 3-糖苷转移酶的转基因猪。Kuroiwa 等<sup>[37]</sup>通过敲除牛朊蛋白( PRNP) 基因制作了无疯牛病的牛。在家禽上, van de Lavoie 等<sup>[38]</sup>对原始生殖细胞(PGC)进行基因打靶, 获得携带能表达绿色荧光蛋白基因的打靶载体, 将其注入孵化 3 d 发育至 13~15 d 的鸡胚内, 获得 8 只公雏, 成长后与母鸡交配产生 7 只生殖腺有转入外源基因和带有绿色荧光的转基因雏鸡。Tong 等<sup>[39]</sup>利用大鼠胚胎干细胞首次成功建立了 p53 抑癌基因敲除大鼠模型。这一突破解开了 20 多年来“无法用基因敲除的方法来构建大鼠疾病动物模型”的难题, 使得这种“与人类更接近”的动物能更好地为人类疾病研究效力。

基因打靶技术克服了随机整合的盲目性和偶然性, 整合位点精确、表达水平高, 是一种理想的修饰、改造生物遗传物质的方法。但这一方法在技术上仍有一些问题, 主要是基因打靶的效率太低, 产生的串联重复序列不稳定, 能自发进行二次同源重组, 对此尚须进一步的研究。

### 5.1 锌指核酸酶-基因打靶技术

近来, 锌指核酸酶技术的出现使基因打靶技术发生了质的飞跃。锌指核糖核酸酶(ZFN)由一个 DNA 识别域和一个非特异性核酸内切酶构成。DNA 识别域是由一系列 Cys2-His2 锌指蛋白(zinc-fingers)串联组成(一般 3~4 个), 每个锌指蛋白识别并结合一个特异的三联体碱基。多个锌指蛋白可以串联起来形成一个锌指蛋白组识别一段特异的碱基序列, 具有很强的特异性和可塑性。与锌指蛋白组相连的非特异性核酸内切酶是来自 *FokI* 的 C 端的 96 个氨基酸残基组成的 DNA 剪切域。*FokI* 是来自海床黄杆菌的一种限制性内切酶, 只在二聚体状态时才有酶切活性, 每个 *FokI* 单体与一个锌指蛋白组相连构成一个 ZFN, 识别特定的位点, 当两个识别位点相距恰当的距离时(6~8 bp), 两个单体 ZFN 相互作用产生酶切功能。从而达到 DNA 定点剪切的目的。锌指核酸酶定点识别并剪切 DNA, 在特定位置产生 DNA 双链断裂, 通过诱导细胞自身天然的 DNA 修复过程“同源定向修复”或“非同源末端连接”来引入外源 DNA, 从而修改细胞内源基因。该技术突破了基因打靶限制性的因素-打靶效率, 将基因打靶的效

率由原来的  $10^{-6}$ ~ $10^{-7}$  提高至  $10^{-1}$ ~ $10^{-2}$ , 应用范围也更加广泛。在果蝇和斑马鱼研究中, 直接利用胚胎注射 ZFN 的 mRNA 用于产生可遗传的特殊位点的敲除突变。Meng 等<sup>[40]</sup>设计出识别斑马鱼与血管内皮生长因子受体同源基因的锌指核酸酶, 直接将锌指核酸酶 mRNA 注射到斑马鱼一细胞期胚胎, 经检测发现约 10% 的目的基因产生突变。在锌指核酸酶技术研究中, 设计出高特异性的锌指组合是锌指核酸酶技术的瓶颈。Maeder 等<sup>[41]</sup>采用开源方式(Oligomerized pool engineering, OPEN) 应用制备有效的锌指核酸酶, 其创建 66 个锌指库, 每一个里面都有一种独特的锌指结构数据资料, 每一个锌指结构可与一个特异的 DNA 位点结合。锌指核酸酶与特异的 DNA 位点结合, 可特异地剪接一种植物细胞基因和 3 种人类细胞基因, 剪接后达到预先改造基因的效率高达 50%。Geurtst 等<sup>[42]</sup>利用构建的锌指核酸酶 DNA 或锌指核酸酶 mRNA 显微注射到大鼠的一细胞胚胎中, 获得了两个内源基因 *Immunoglobulin M (IgM)* 和 *Rab38* 定点敲除的大鼠, 敲除效率高达 25%~100%, 这是首次运用该技术制备出基因定点敲除哺乳动物, 具体图解见图 5。Mashimo 等<sup>[43]</sup>利用 ZFN 技术在大鼠体内定点敲除了白细胞介素 2 受体 基因(*Il2rg*), 由于在人与小鼠体内与此基因同源的基因突变会导致综合免疫缺损(X-linked severe combined immune deficiency, X-SCID), 该研究成功建立了敲除 *Il2rg* 基因的 *X-SCID* 基因的疾病模型。Carbery 等<sup>[44]</sup>利用锌指核酸酶技术对小鼠进行基因组靶向修饰研究, 运用此技术制备靶向修饰动物不到 4 个月, 极大地缩短了时间, 提高了效率。

锌指核酸酶-基因打靶技术对动物基因组进行精细修饰的可操作性显著增强, 大大提高了基因定点整合的效率, 为动物模型的建立与功能基因组研究提供了强有力的动力。但该技术尚处于初级研究阶段, 也存在着不足之处。很多锌指核酸酶在进行基因修饰过程中产生脱靶现象(off-target), 引起细胞剂量依赖性毒性。Gupta 等<sup>[45]</sup>通过不同的锌指核酸酶对斑马鱼 *kdrl* 基因座进行靶向修饰研究, 利用 Illumina 测序评估了斑马鱼中 141 处潜在的脱靶位点, 发现只有少数的脱靶位点导致细胞累积损伤。为此尚需对锌指核酸酶-基因打靶技术进行深入的研究。

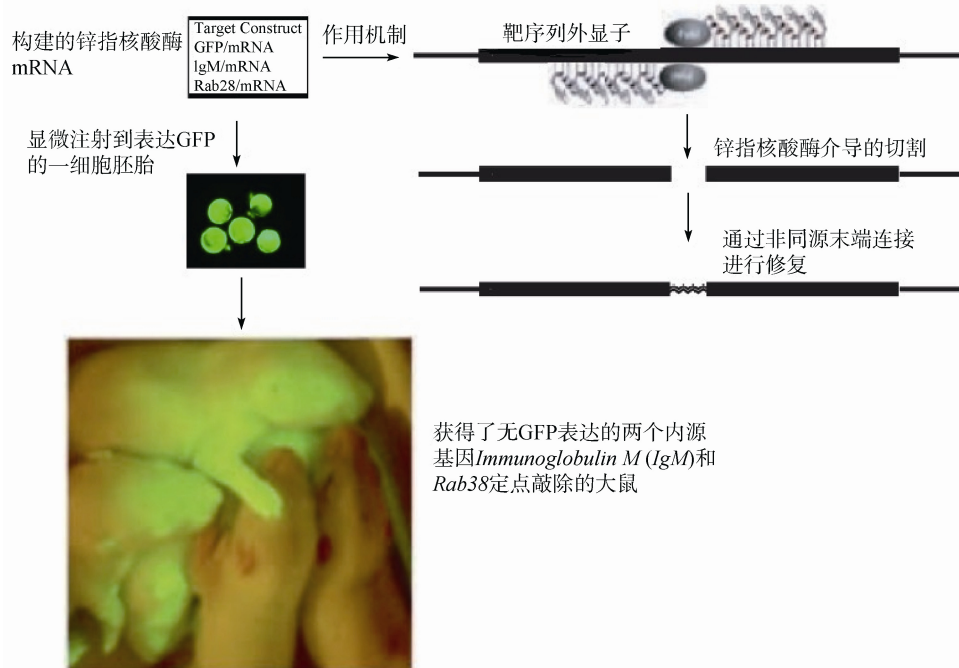


图 5 锌指核酸酶-基因打靶技术制备转基因动物

## 6 iPS 细胞在转基因动物中的应用前景

2006 年, Takahashi 等<sup>[46]</sup>首次发现外源导入特定的转录因子能够使已分化的细胞重编程回归到胚胎细胞状态, 他们通过慢病毒载体介导将 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 4 种转录因子导入小鼠皮肤成纤维细胞, 获得了具有强大的自我更新能力和分化潜能的多能性干细胞, 称为“诱导性多潜能干细胞”(Induced pluripotent stem cells, iPS 细胞)。这一研究受到了整个生命科学领域的广泛关注。Woltjen 等<sup>[26]</sup>和 Kaji 等<sup>[47]</sup>采用转座子介导的方法高效率制备了 virus-free 鼠 iPS 细胞, 随后又成功将先前导入的转录因子基因从 iPS 细胞中移除, 制备了一种更安全的获得 iPS 细胞的方法。Soldner 等<sup>[48]</sup>将移除外源基因的人 iPS 细胞成功诱导成多巴胺神经元, 发现神经元细胞的基本功能不受影响。Kim 等<sup>[49]</sup>研究发现, 成人细胞在被重新编程为诱导多功能干细胞的过程中并不会放弃其对原始组织的“记忆”, 这一新发现对目前方兴未艾的干细胞临床和科研提出了挑战。Polo 等<sup>[50]</sup>也证实了 iPS 细胞拥有这样的“记忆”能力, 保留对原初组织的记忆会影响 iPS 细胞分化为其它细胞的能力, 但通过让 iPS 细胞不断分裂的方法, 这种“记忆”是可以消除的。

我国在 iPS 细胞研究领域也取得了重大突破。Liu 等<sup>[51]</sup>首次报道建立了恒河猴 iPS 细胞系, Wu 等<sup>[52]</sup>完成了猪 iPS 细胞的建立; Esteban 等<sup>[53]</sup>也报道建立了西藏小型猪的 iPS 细胞系。Zhao 等<sup>[54]</sup>、Kang 等<sup>[55]</sup>同时报道通过四倍体补偿技术获得了完全由 iPS 细胞来源的成体小鼠, 具体图解见图 6。这是世界上第一次获得完全由 iPS 细胞制备的活体小鼠, 有力地证明了 iPS 细胞具有真正的全能性。以上研究成果为其他大动物牛、羊等 iPS 细胞建系提供了借鉴, 这些 iPS 细胞不仅有助于用传统的方法从动物胚胎中获得 ES 细胞, 而且可能直接用于产生基因敲除动物和转基因动物。在 ES 细胞尚未成功建立之时, 基于 iPS 细胞的基因打靶技术可能是目前解决转基因效率低下的最佳替代方案<sup>[56]</sup>。

诱导多能性干细胞在转基因动物育种上有潜在的应用前景。在转基因大动物生产过程中, 它很可能代替传统的体细胞核移植, 克服大动物难以获得胚胎干细胞系的难题, 将显著提高转基因动物的生产效率, 为转基因研究开创一片更广阔的天地。

## 7 展望

转基因技术经过大约 30 年的发展日渐成熟。随着动物转基因领域新的研究方法不断涌现, 转基因

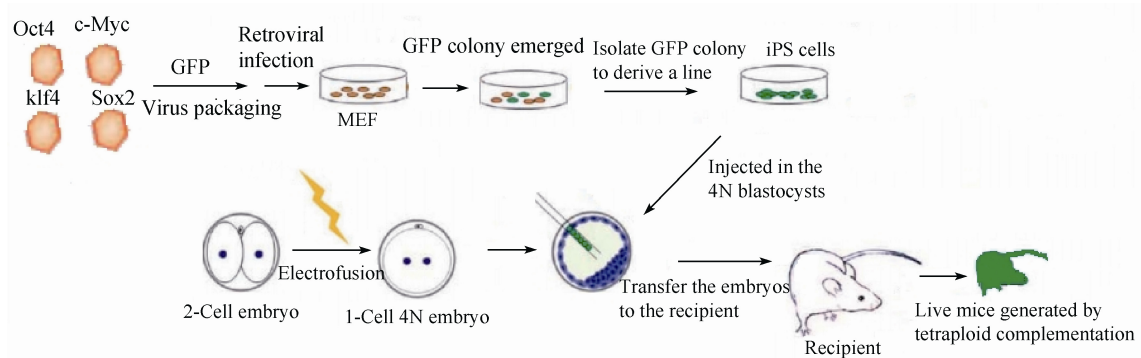


图 6 iPS 技术制备活体小鼠

技术的应用范围也不断扩展, 相继取得新进展、新突破。动物转基因技术的研究成果在改善肉奶质量, 生产生物医药产品以及人类疾病模型的建立, 特别是在治疗人类的疑难病症方面都显示出了广阔的应用前景。转基因动物已深刻影响到农业、畜牧业、医药业等许多重要领域, 同时也推动了生命科学研究的发展。因此, 充分利用转基因技术的潜在价值, 实现转基因技术实用化、商业化和转基因动物的产业化, 是科学工作者努力的目标。

#### 参考文献(References):

- [1] Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77(12): 7380–7384.
- [2] Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, 1982, 300(5893): 611–615.
- [3] Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 1985, 315(6021): 680–683.
- [4] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385(6619): 810–813.
- [5] 吴昭, 成璐, 肖磊. 新物种诱导多能干细胞的研究进展. *生命科学*, 2009, 21(5): 658–662.
- [6] Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KHS. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997, 278(5346): 2130–2133.
- [7] Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, de León FAP, Robl JM. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(7): 642–646.
- [8] Macháty Z, Bondioli KR, Ramsoondar JJ, Fodor WL. The use of nuclear transfer to produce transgenic pigs. *Cloning Stem Cells*, 2002, 4(1): 21–27.
- [9] 龚国春, 戴蕴平, 樊宝良, 朱化彬, 王莉莉, 王海平, 汤波, 刘颖, 李荣, 万荣, 黄银花, 李宁. 利用体细胞核移植技术生产转基因牛. *科学通报*, 2003, 48(24): 32–37.
- [10] 张运海, 潘登科, 孙秀柱, 孙国杰, 王晓波, 刘晓辉, 李燕, 戴蕴平, 李宁. 利用体细胞核移植技术生产表达绿色荧光蛋白的猪转基因克隆胚胎. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2005, 35(5): 439–445.
- [11] Yang PH, Wang JW, Gong GC, Sun XZ, Zhang R, Du Z, Liu Y, Ding FR, Tang B, Dai YP, Li N. 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.
- [12] Yang DS, Wang CE, Zhao BT, Li W, Ouyang Z, Liu ZM, Yang HQ, Fan P, O'Neill A, Gu WW, Yi H, Li SH, Lai LX, Li XJ. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(20): 3983–3994.
- [13] Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4): 2140–2145.
- [14] Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by Lentiviral Vectors. *Science*, 2002, 295(5556): 868–872.
- [15] Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhauve M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. Efficient transgenesis in farm animals by



- lentiviral vectors. *EMBO Rep*, 2003, 4(11): 1054–1058.
- [16] McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico SG, Gihooley HJ, Kingsman AJ, Mitrophanous KA, Sang H. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep*, 2004, 5(7): 728–733.
- [17] Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Tomioka I, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito M, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, Okano H, Nomura T. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature*, 2009, 459(7246): 523–527.
- [18] 张敬之, 郭歆冰, 谢书阳, 朱怡文, 黄英, 王舒, 任兆瑞. 用慢病毒载体介导产生绿色荧光蛋白(GFP)转基因小鼠. *自然科学进展*, 2006, 16(5): 571–577.
- [19] Niu YY, Yu Y, Bernat A, Yang SH, He XC, Guo XY, Chen DL, Chen YC, Ji SH, Si W, Lv YQ, Tan T, Wei Q, Wang H, Shi L, Guan J, Zhu XM, Afanassieff M, Savatier P, Zhang K, Zhou Q, Ji WZ. Transgenic rhesus monkeys produced by gene transfer into early-cleavage-stage embryos using a simian immunodeficiency virus-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(41): 17663–17667.
- [20] Fadool JM, Hartl DL, Dowling JE. Transposition of the *mariner* element from *Drosophila mauritiana* in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(9): 5182–5186.
- [21] Sherman A, Dawson A, Mather C, Gilhooley H, Li Y, Mitchell R, Finnegan D, Sang H. Transposition of the *Drosophila* element *mariner* into the chicken germ line. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(11): 1050–1053.
- [22] Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvák Z. Molecular reconstruction of *Sleeping Beauty*, a *Tc1*-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*, 1997, 91(4): 501–510.
- [23] Dupuy AJ, Clark K, Carlson CM, Fritz S, Davidson AE, Markley KM, Finley K, Fletcher CF, Ekker SC, Hackett PB, Horn S, Largaespada DA. Mammalian germ-line transgenesis by transposition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(7): 4495–4499.
- [24] Ding S, Wu XH, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T. Efficient transposition of the *piggyBac*(PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*, 2005, 122(3): 473–483.
- [25] Wu S, Ying GX, Wu Q, Capecchi MR. Toward simpler and faster genome-wide mutagenesis in mice. *Nat Genet*, 2007, 39(7): 922–930.
- [26] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämläinen R, Cowling R, Wang W, Liu PT, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. *piggyBac* transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458(7239): 766–770.
- [27] Klattenhoff C, Xi HL, Li CJ, Lee S, Xu J, Khurana JS, Zhang F, Schultz N, Koppetsh BS, Nowosielska A, Seitz H, Zamore PD, Weng ZP, Theurkauf WE. The *Drosophila* HP1 homolog rhino is required for transposon silencing and piRNA production by dual-strand clusters. *Cell*, 2009, 138(6): 1137–1149.
- [28] Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 806–811.
- [29] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tusch T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, 411(6836): 494–498.
- [30] Hasuwa H, Kaseda K, Einarsdottir T, Okabe M. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett*, 2002, 532 (1–2): 227–230.
- [31] Ramsoondar J, Vaught T, Ball S, Mendicino M, Monahan J, Jobst P, Vance A, Duncan J, Wells K, Ayares D. Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus small interfering RNAs. *Xenotransplantation*, 2009, 16(3): 164–180.
- [32] 杨志峰, 王龙, 杨生生, 匡颖, 陈欢, 徐国江, 蔡在龙, 王铸钢, 毛积芳. 慢病毒载体介导 IkB 激酶- $\alpha$ (IKK $\alpha$ )基因 RNA 干扰转基因小鼠的制备. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(2): 215–221.
- [33] Li Y, Li H, Yao G, Li W, Wang F, Jiang Z, Li M. Inhibition of telomerase RNA (hTR) in cervical cancer by adenovirus-delivered siRNA. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14(8): 748–755.
- [34] Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987, 51(3): 503–512.
- [35] McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KHS, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, 405(6790): 1066–1069.
- [36] Lai LX, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of  $\alpha$ -1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295(5557): 1089–1092.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] Tong C, Li P, Wu NL, Yan YZ, Ying QL. Production of *p53* gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*, 2010, 467(7312): 211–213.
- [40] Meng XD, Noyes MB, Zhu LJ, Lawson ND, Wolfe SA. Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(6): 695–701.
- [41] Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiaik A, Wright DA, Anthony RM, Eichinger M, Jiang T, Foley JE, Winfrey RJ, Townsend JA, Unger-Wallace E, Sander JD, Müller-Lerch F, Fu FL, Pearlberg J, Göbel C, Dassist JP, Pruett-Miller SM, Porteus MH, Sgroi DC, Johnlafrate A, Dobbs D, McCray PB, Cathomen T, Voytas DF, Joung JK. Rapid “open-source” engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell*, 2008, 31(2): 294–301.
- [42] Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jendins SS, Wood A, Cui XX, Meng XD, Vincent A, Lam S, Michalkiewicz M, Schilling R, Foeckler J, Kalloway S, Weiler H, Ménoret S, Anegón I, Davis GD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jacob HJ, Buelow R. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, 2009, 325(5939): 433–433.
- [43] Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, Yoshimi K, Hiai H, Kuramoto T, Serikawa T. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency(X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8870.
- [44] Carbery ID, Ji D, Harrington A, Brown V, Weinstein EJ, Liaw L, Cui XX. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2010, 186(2): 451–459.
- [45] Gupta A, Meng XD, Zhu LJ, Lawson ND, Wolfe SA. Zinc finger protein-dependent and -independent contributions to the *in vivo* off-target activity of zinc finger nucleases. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(1): 381–392.
- [46] 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.
- [47] Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 2009, 458(7239): 771–775.
- [48] Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. Parkinson’s disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, 2009, 136(5): 964–977.
- [49] Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LIR, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Izarray RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2010, 467(7313): 285–290.
- [50] Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulal W, Eminli S, Tan KY, Apostolou E, Stadtfeld M, Li YS, Shioda T, Natesan S, Wagers AJ, Melnick A, Evans T, Hochdinger K. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(8): 848–855.
- [51] Liu HS, Zhu FF, Yong J, Zhang PB, Hou PP, Li HG, Jiang W, Cai J, Liu M, Cui K, Qu XX, Xiang TT, Lu DY, Chi XC, Gao G, Ji WZ, Ding MX, Deng HK. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(6): 587–590.
- [52] Wu Z, Chen JJ, Ren JT, Bao L, Liao J, Cui C, Rao LJ, Li H, Gu YJ, Dai HM, Zhu H, Teng XK, Cheng L, Xiao L. Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell Biol*, 2009, 1(1): 46–54.
- [53] Esteban MA, Xu JY, Yang JY, Peng MX, Qin DJ, Li W, Jiang ZX, Chen JK, Deng K, Zhong M, Cai JL, Lai LX, Pei DQ. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem*, 2009, 284(26): 17634–17640.
- [54] 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.
- [55] 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.
- [56] Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, DeKaveler RC, Katibah GE, Amora R, Boydston EA, Zeitler B, Meng XD, Miller JC, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(9): 851–857.