



第六章 转基因动物

湖南师范大学生命科学学院

袁 嫫 洲



本章目录

6.1 动物转基因技术

6.2 转基因动物的筛选与检测

6.3 转基因动物的现状与应用

转基因动物的概念

借助基因工程技术把**外源目的基因**导入动物的**生殖细胞、胚胎干细胞或早期胚胎**，使之在受体染色体上稳定整合，并能把外源目的基因传给子代的个体，叫转基因动物（transgenic animals）



1982年制备成功的巨鼠



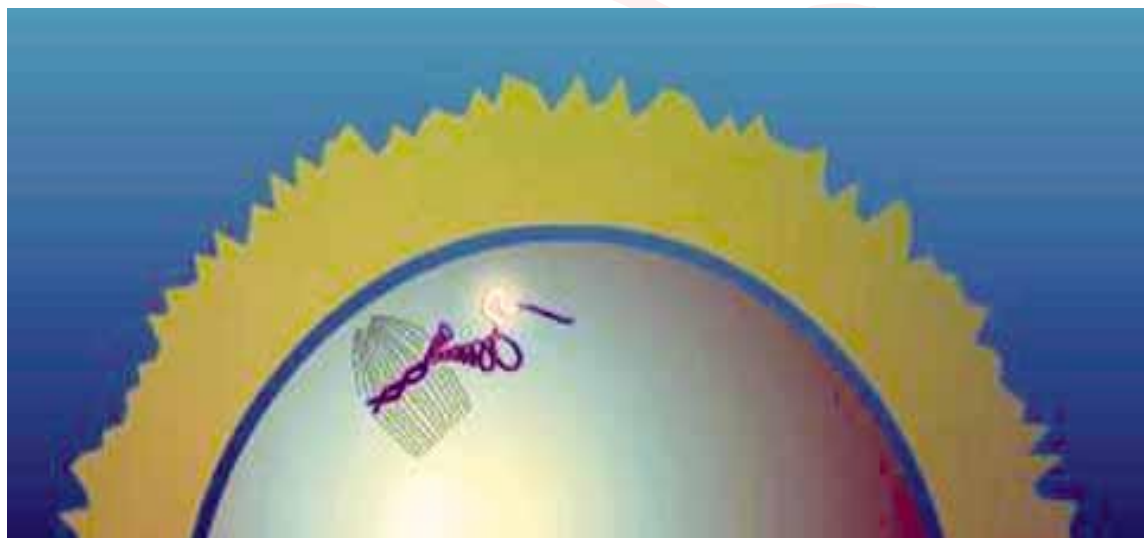
克隆羊多莉

转基因羊波莉





首只转基因猴
安迪和制备它
的卵母细胞（
2000）



第一只克隆狗和转基因狗 (2009)

第一只克隆狗（英国）

Lancelot Encore

的原型Lancelot



韩国首尔国立大学李炳春 (Byeong-Chun Lee) 成功克隆培育出荧光猎兔犬，它们也是世界上第一批转基因实验狗。被命名“鲁比-珀皮” (Ruby Puppy) 在内的5只猎兔犬在紫外光线都呈现出红色荧光。



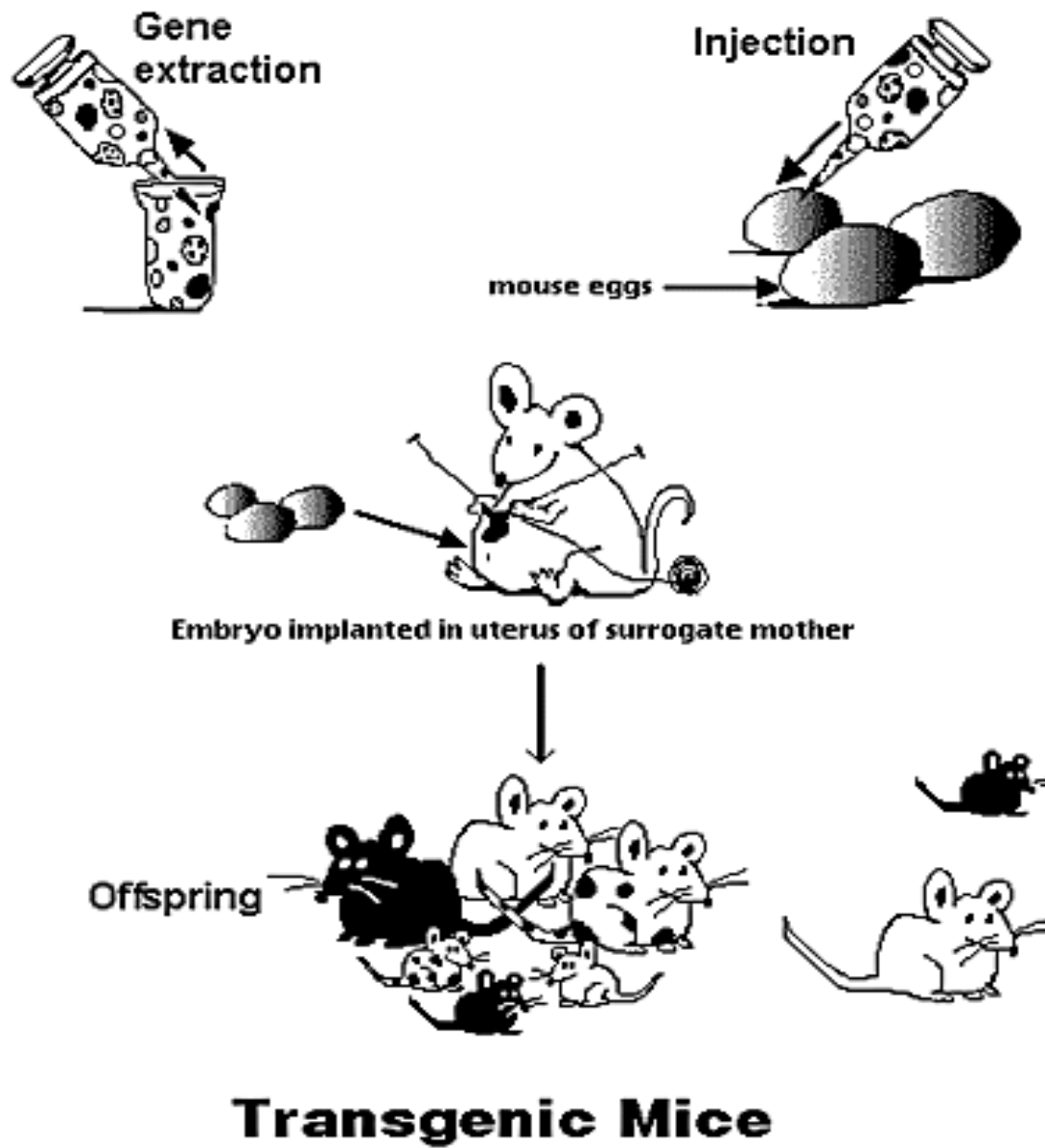
第一节 动物转基因技术

- 1 显微注射法
- 2 逆转录病毒法
- 3 胚胎干细胞法
- 4 体细胞核移植法

一. 显微注射法

在显微镜下将体外构建的外源目的基因，用注射针注射到动物受精卵中，使之与动物基因组整合，从而得到转基因动物的方法。





1、目的DNA的准备

- **构建目的基因的表达载体：** 目的基因应包含完整的ORF, 顺式调控序列, 加尾信号。
- **线性DNA分子的准备**（调控序列两端或整个载体打开）



图 2-1 转基因载体的构建

DNA浓度：1-3 $\mu\text{g/ml}$.



2、小鼠的准备和要求

- **超排受精卵的准备：**
 - 选择4—6周龄的小鼠，用孕马血清促性腺激素素（PMSG）和人绒毛促性腺激素（hCG）先后进行腹腔注射，做超数排卵处理；
- 注射后10—13小时超排卵，每个母鼠与一个公鼠交配。

- **假孕母鼠的准备：**
- 通过注射PMSG和hCG诱导产生，再与结扎的公鼠交配。

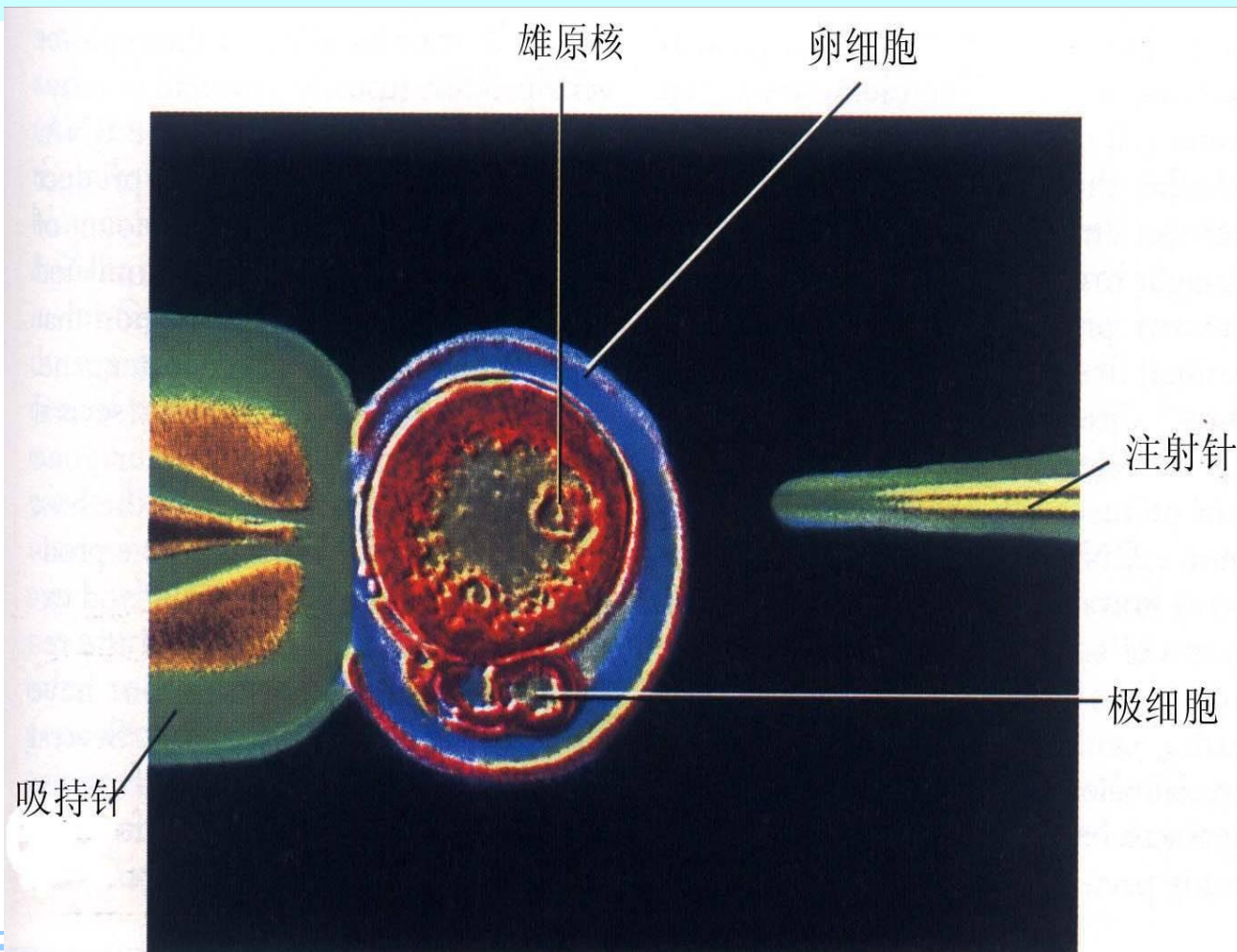


3、受精卵的分离

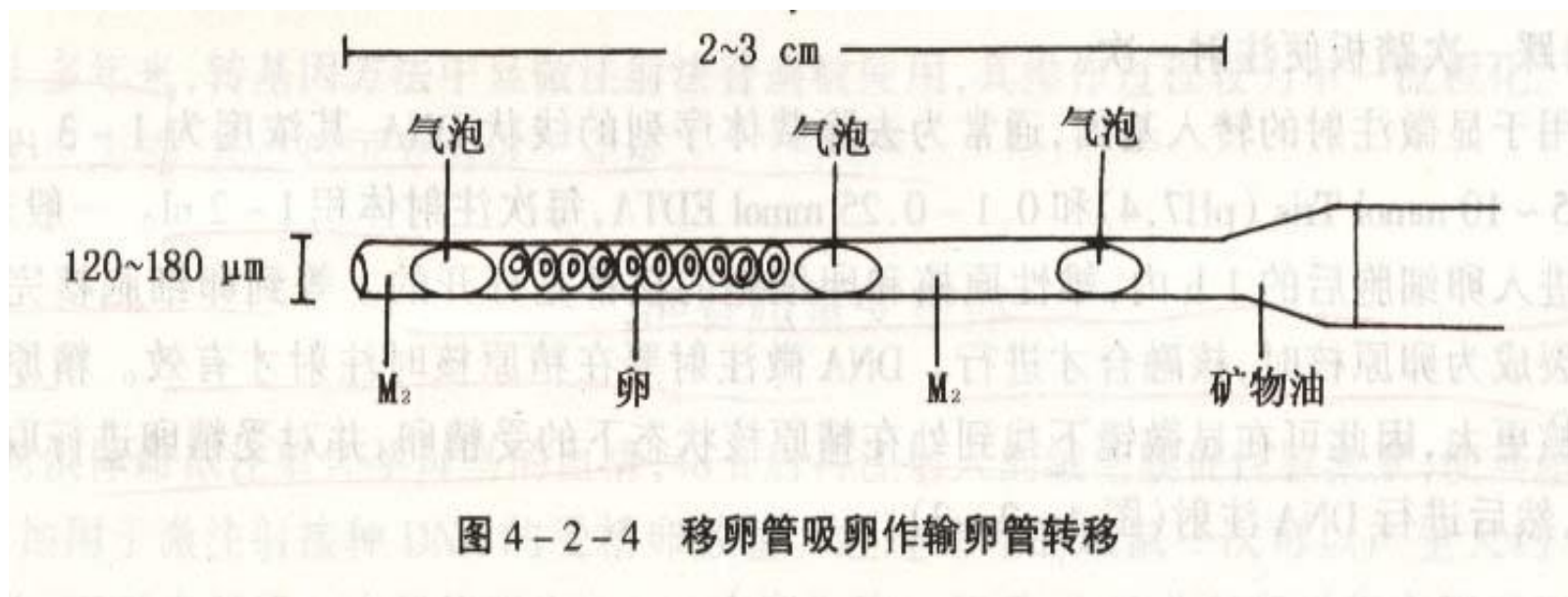
- 处死经超排处理的小鼠，从输卵管膨大部位取出**受精卵**
- 解散卵丘细胞,**清洗受精卵**
- 在显微镜下**确认和选择受精卵**。

4、显微注射

将受精卵置于**培养皿或玻片的液滴**内，用吸持针吸住受精卵；将外源基因注入**受精卵的雄原核**内。



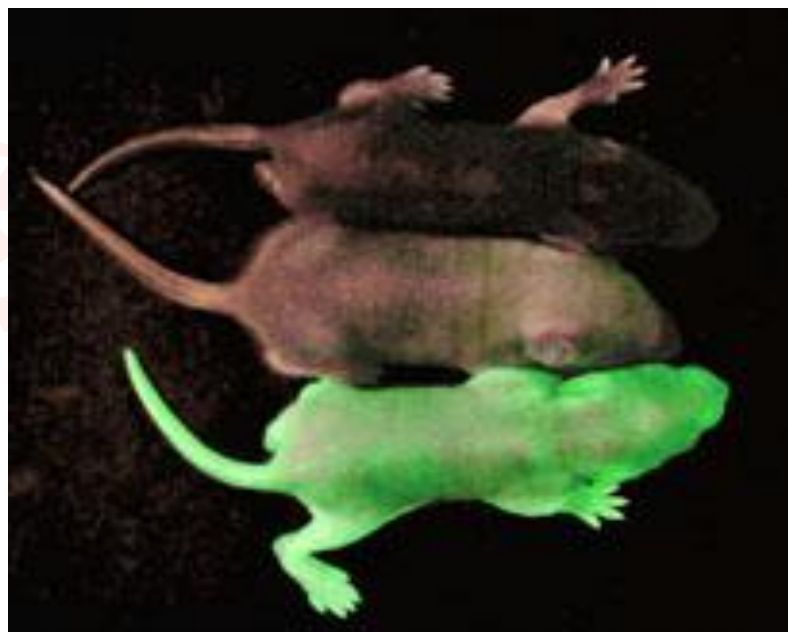
5、受精卵的移植



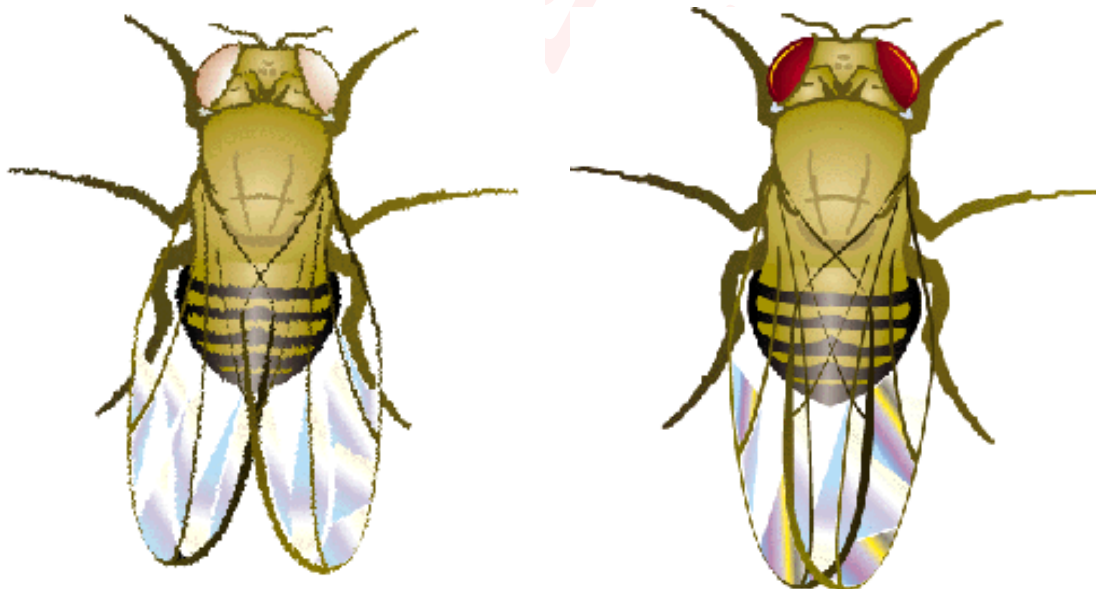
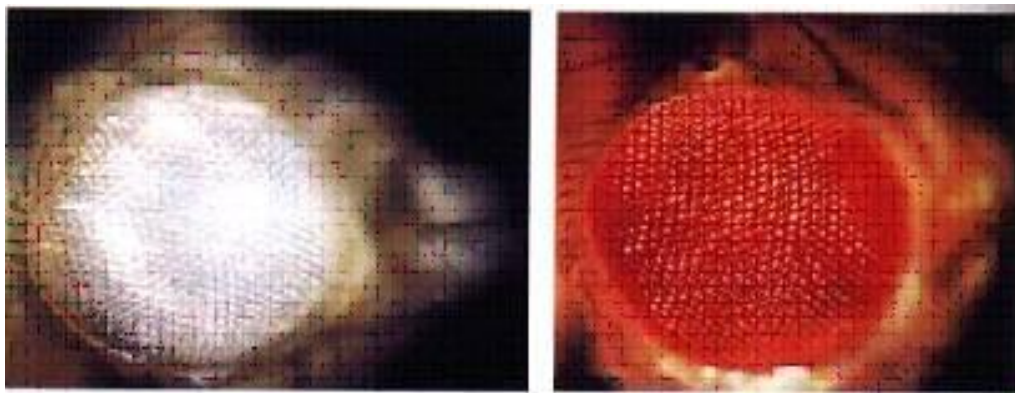
- 将假孕小鼠麻醉，在腹部下方与最后一根肋骨平行的地方开一个小口，在**输卵管壶口处用微吸管将注射过的受精卵移入**，缝合伤口。按常规饲养，20天前后，后代幼鼠将产出。

6、转基因小鼠的鉴定

- PCR
- Southern blot
- Northern blot
- Western blot
- 标记性状



标记性状鉴定转基因果蝇

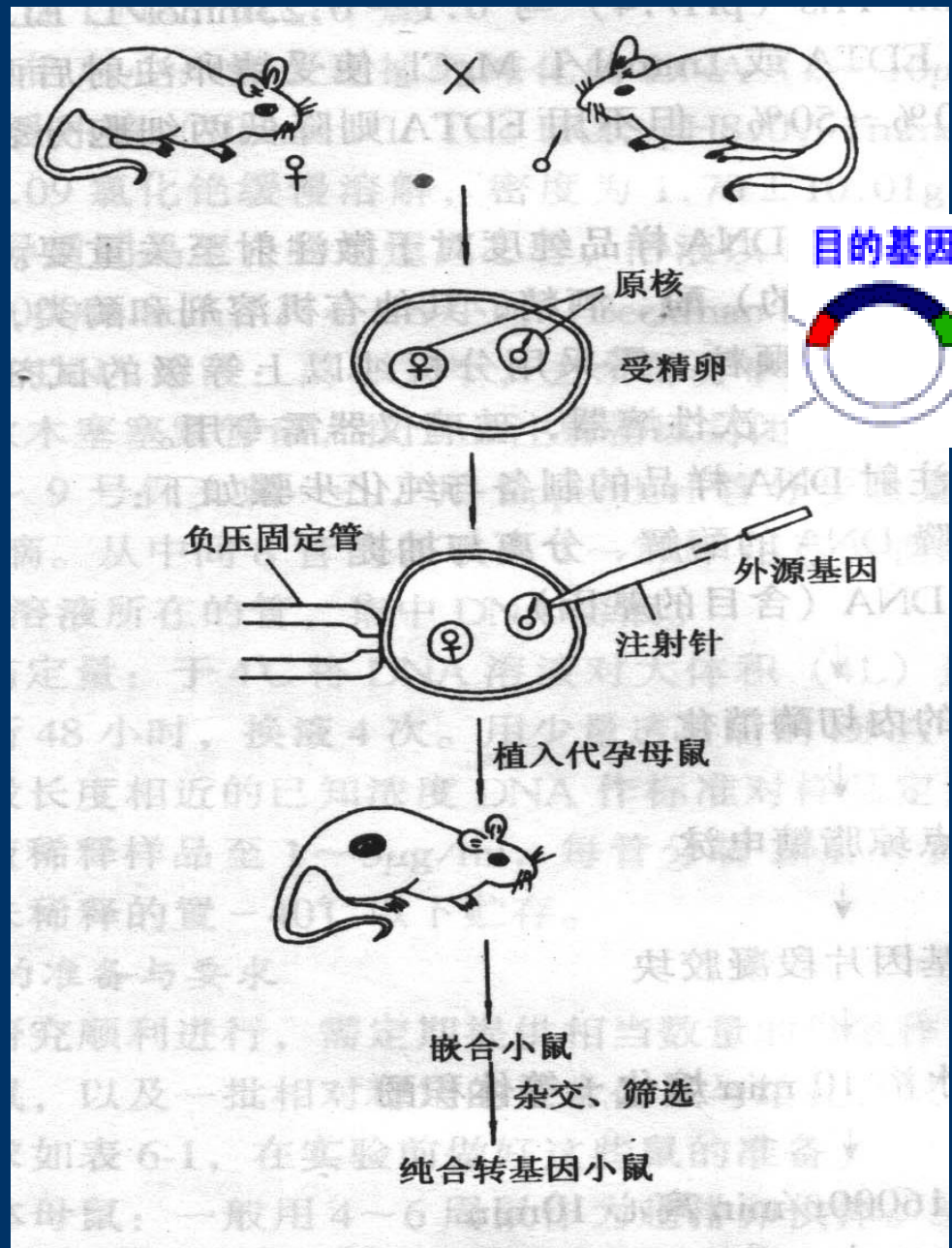




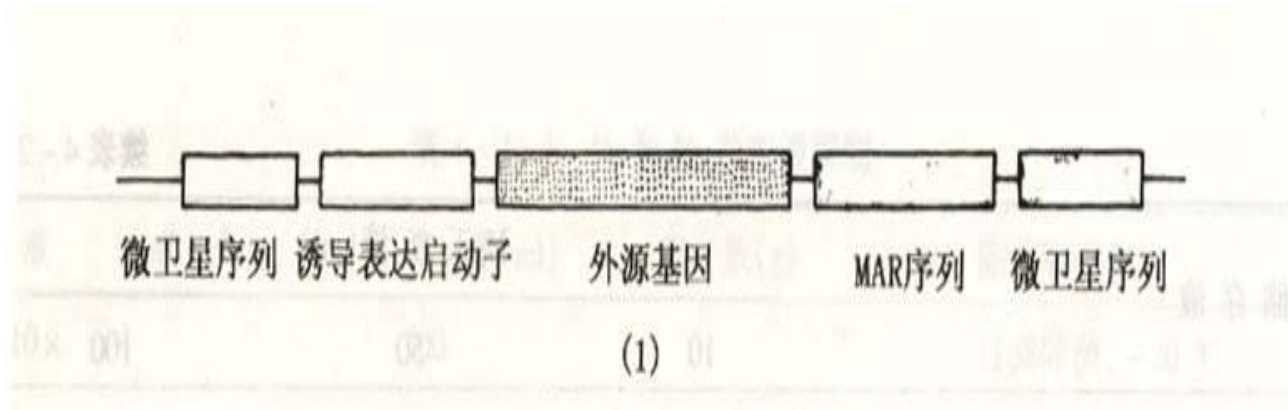
显微注射法的效率

- 每天可注射几百个卵，但大约只有66%能存活；移入子宫后，大约25%的受精卵能发育成幼鼠；其中又有大约25%左右的幼鼠是转基因鼠。
- 理想情况下， 30—50/1000
- 一般情况下， 1/1000

影响转基因动物成功的关键制约因素是什么？



提高目的DNA的整合率与表达率

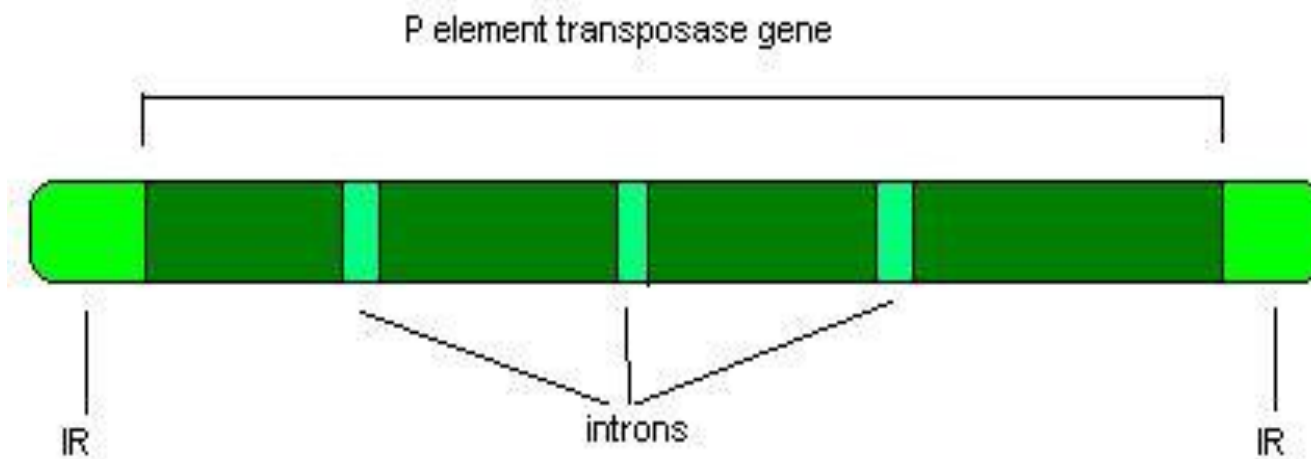


顺式调
控序列

MAR序
列

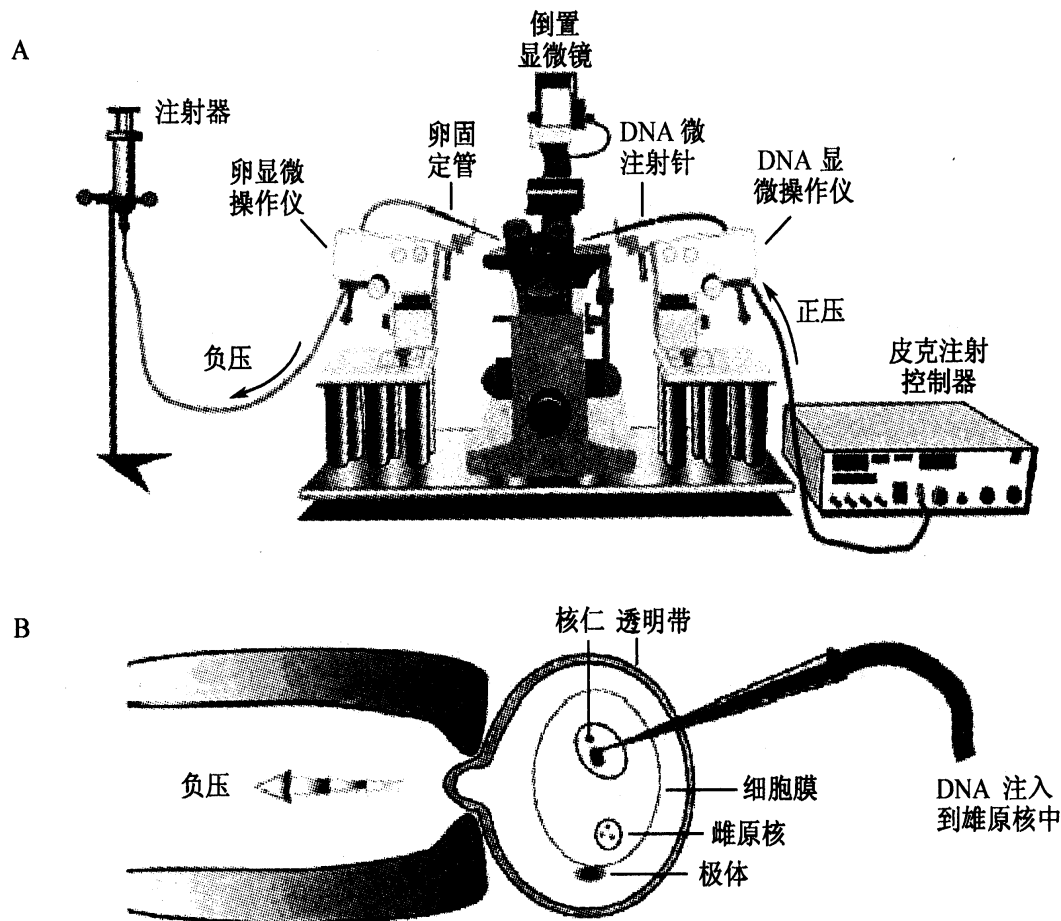
同源重
组

转座子



7、显微注射法的不足

- 外源基因整合效率低；
- 随机整合或随机插入，存在插入突变的风险
- 方法复杂，技术性强，设备昂贵等。



二、逆转录病毒法

1、逆转录病毒的结构

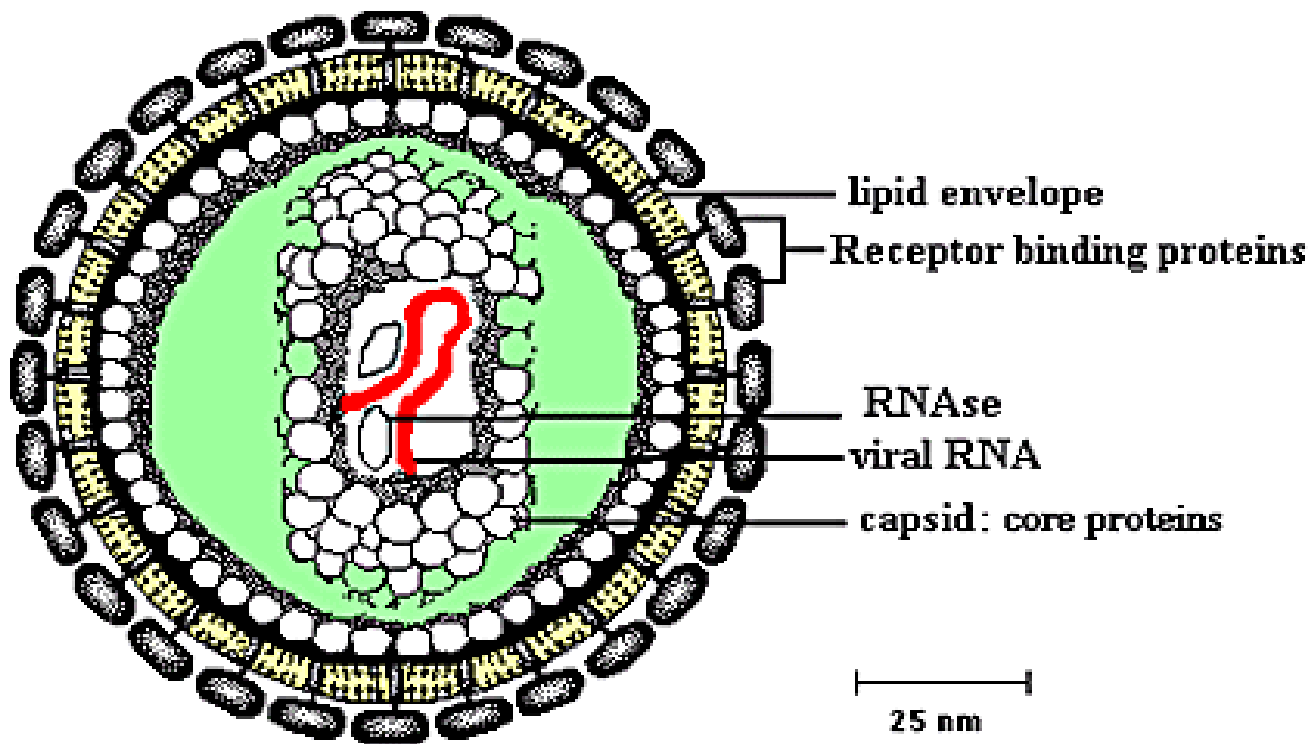


Diagram of a Retrovirus

2、逆转录病毒的基因组

- 基因组长9kb， LTR细分为5'-u3-R-u5-3'。其中u3区包含病毒的增强子和启动子序列， R区包含一个Cap区。u5区包含聚腺苷酸加尾信号。5'LTR的3'边界区是引物结合位点（PBS）。U5的下游还有 ψ 序列， 包装识别信号。



小鼠白血病病毒(Mo-MLV)

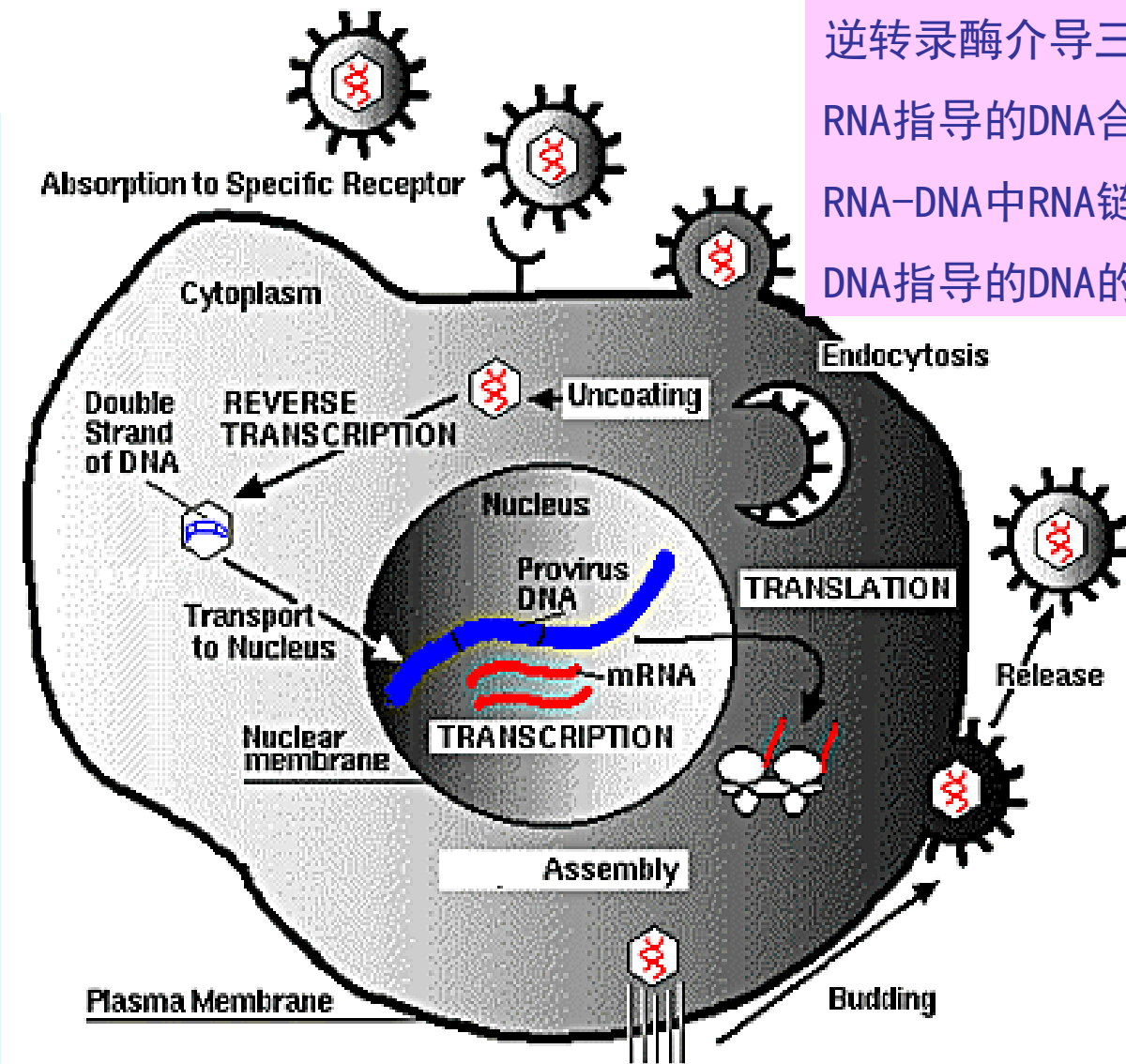
Pol: 逆转录酶, 病毒蛋白酶, 整合酶



3、 逆转录病毒的生活周期

- 病毒侵入细胞；
- 病毒的RNA基因组在细胞质中反转录成双链的前病毒DNA (复制形式DNA) ；
- 前病毒DNA被传送至细胞核，并最终整合到宿主染色体上；
- 整合后的前病毒DNA进而使用宿主细胞的RNA聚合酶转录自己；
- 最后，部分转录的信息被翻译成病毒蛋白质，组装成新的病毒。

- 受体
- 吞噬
- 脱外壳
- 逆转录
- 核蛋白复合体
- 有丝分裂
- 复合体进入核



逆转录酶介导三种反应：
RNA指导的DNA合成
RNA-DNA中RNA链的降解
DNA指导的DNA的合成

Retrovirus replication

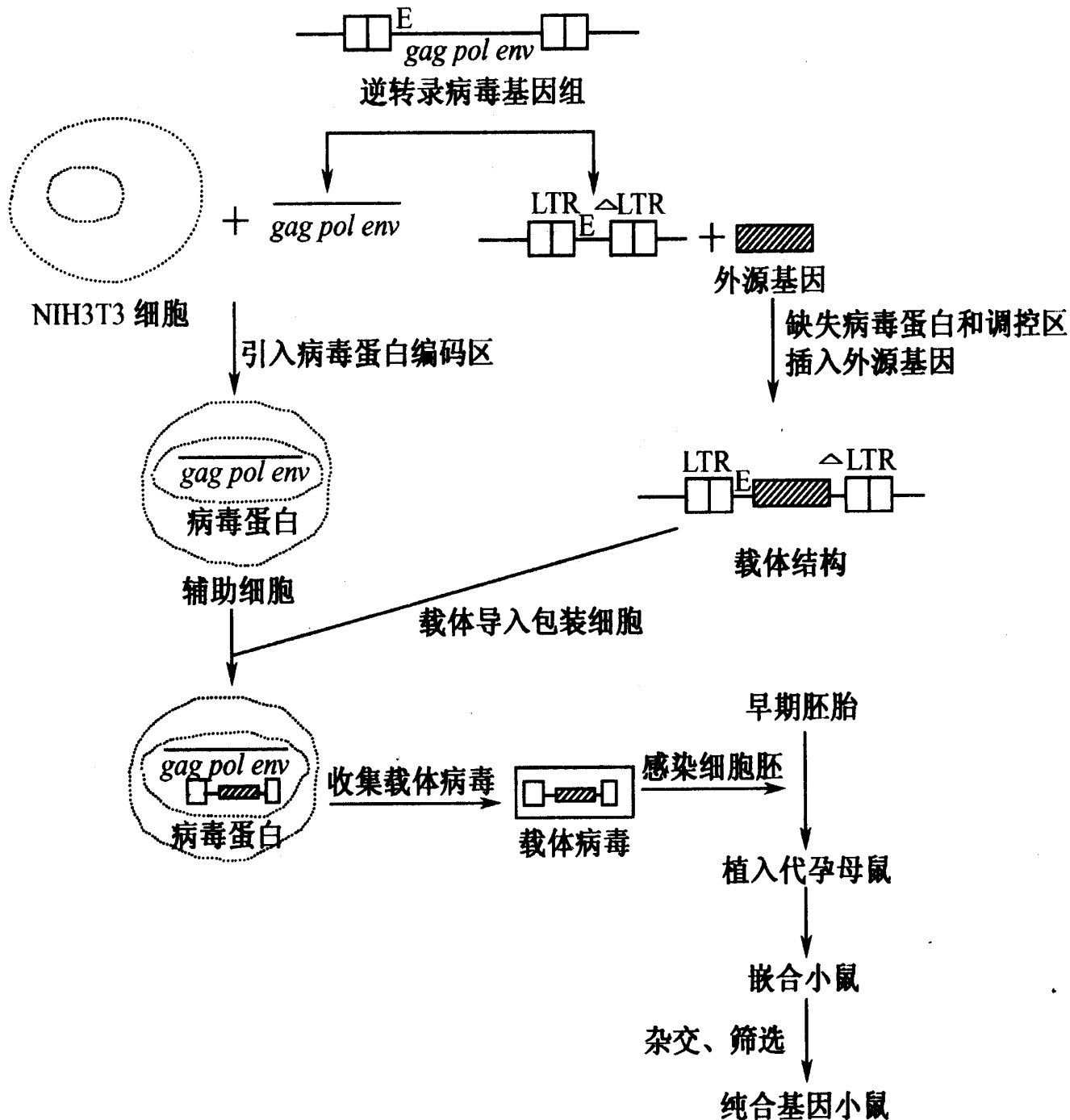
4、 逆转录病毒载体的构建

- 为了保证逆转录病毒载体的感染功能，建立**包装细胞**，在包装细胞里**表达三个逆转录病毒的结构基因**。所以首先让携带有外源目的基因的逆转录病毒载体感染包装细胞，在包装细胞中被包装成新的子代病毒颗粒，再去感染动物宿主细胞。



小鼠白血病病毒(Mo-MLV)

逆转录病毒载体制作转基因动物的过程



5、逆转录病毒介导转基因的优势

- 逆转录病毒载体可同时感染大量胚胎，也可感染稍晚阶段的不同发育时期的胚胎；
 - 高效率感染并能在宿主细胞DNA上高度整合，可以大大提高基因的转移效率。
-
- 但这一高的感染率绝对依赖于细胞的两个特性：一是细胞要具有逆转录病毒的受体，二是目标细胞需要进行细胞分裂。二者缺一不可。

6、逆转录病毒的安全性问题

- 虽然逆转录病毒载体可同时感染大量胚胎，感染效率高，并能在宿主细胞DNA上高度整合，但只可以转移小片断的小于10kb的DNA。而且存在安全隐患。如逆转录病毒在靶细胞染色体上的整合可能造成：

- 1) 破坏细胞正常生长的必须基因/抑癌基因
- 2) LTR激活原癌基因
- 3) 染色体重排激活原癌基因



三. 胚胎干细胞法

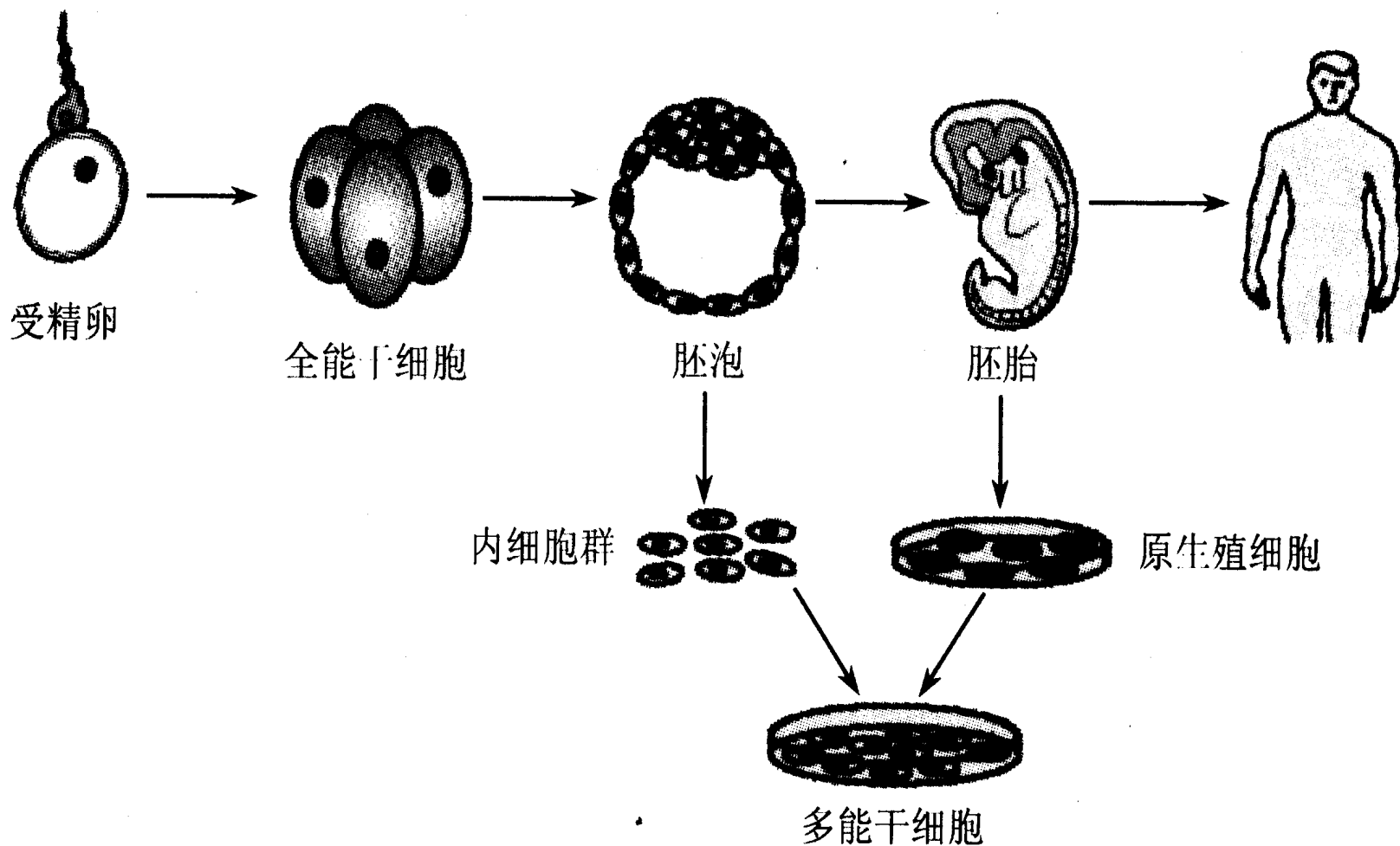
- **胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES细胞)** 是指从哺乳动物囊胚期内的细胞团中分离出来的尚未分化的胚胎细胞，这种细胞具有发育的潜能性，能够分化出各种组织。



1、利用ES细胞制备转基因小鼠

- 从受精后3.5天的雌鼠子宫中取出胚胎，在胚胎培养基中培养直至囊胚期，脱去透明带。
- 鼠胚贴壁生长4—6天后，ICM增殖为一团圆柱形的细胞，即内细胞团ICM。
- 在体视镜下离散ICM，分别培养在培养板中，筛选ES细胞克隆，特征是细胞小，核大，胞质少，核内有一个或多个凸出的深色核仁结构，细胞紧靠，很难辨认单个细胞。

人体胚胎肝细胞的来源

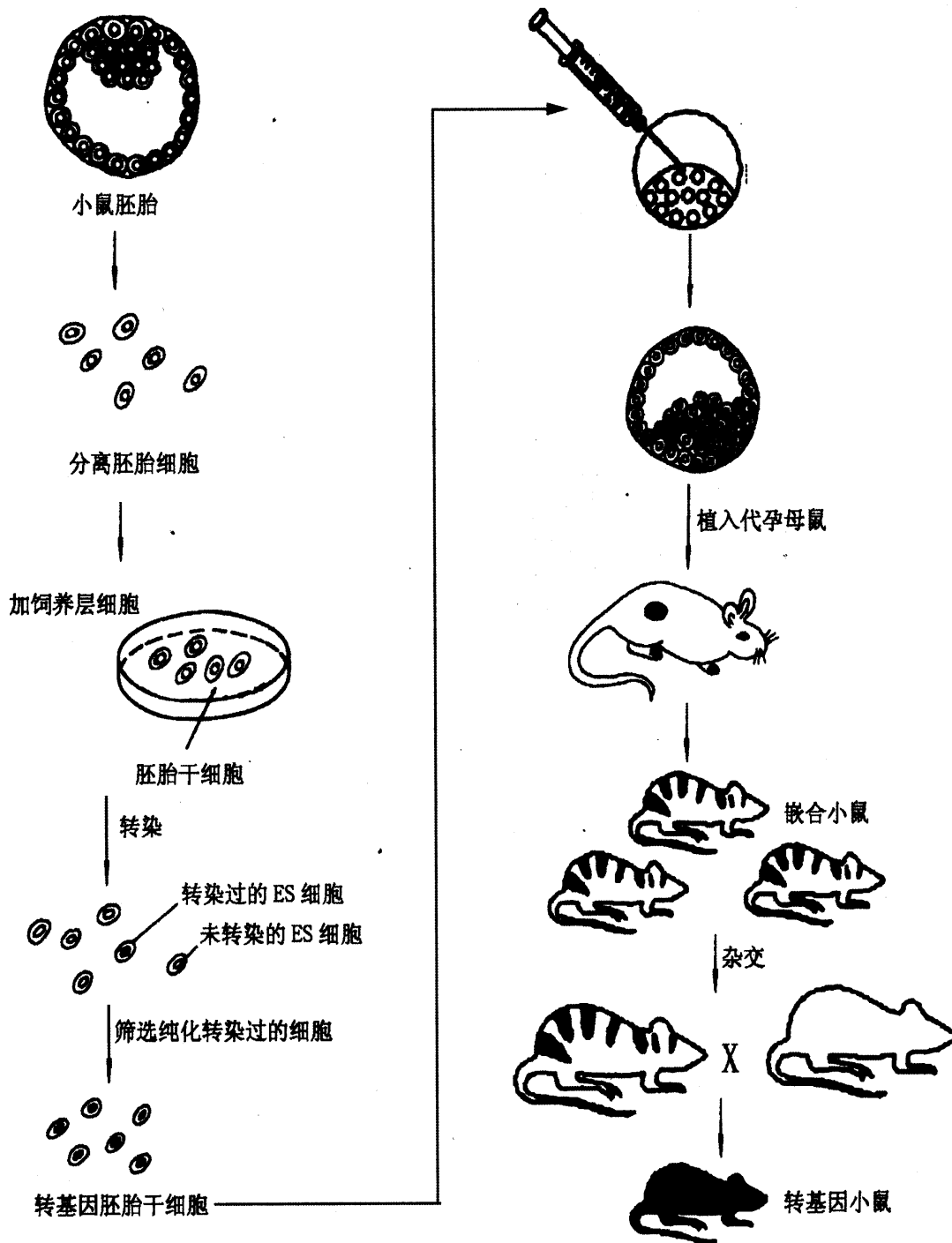




胚胎干细胞介导转基因动物的产生

- 体外直接将外源基因导入ES细胞
- 体外培养筛选
- 再注入到受体囊胚腔中，与其中的囊胚细胞聚集在一起，成为受体胚胎的一部分，参与其分化
- 成为嵌合体
- 再通过杂交成为纯合体

利用ES细胞制备转基因小鼠的过程





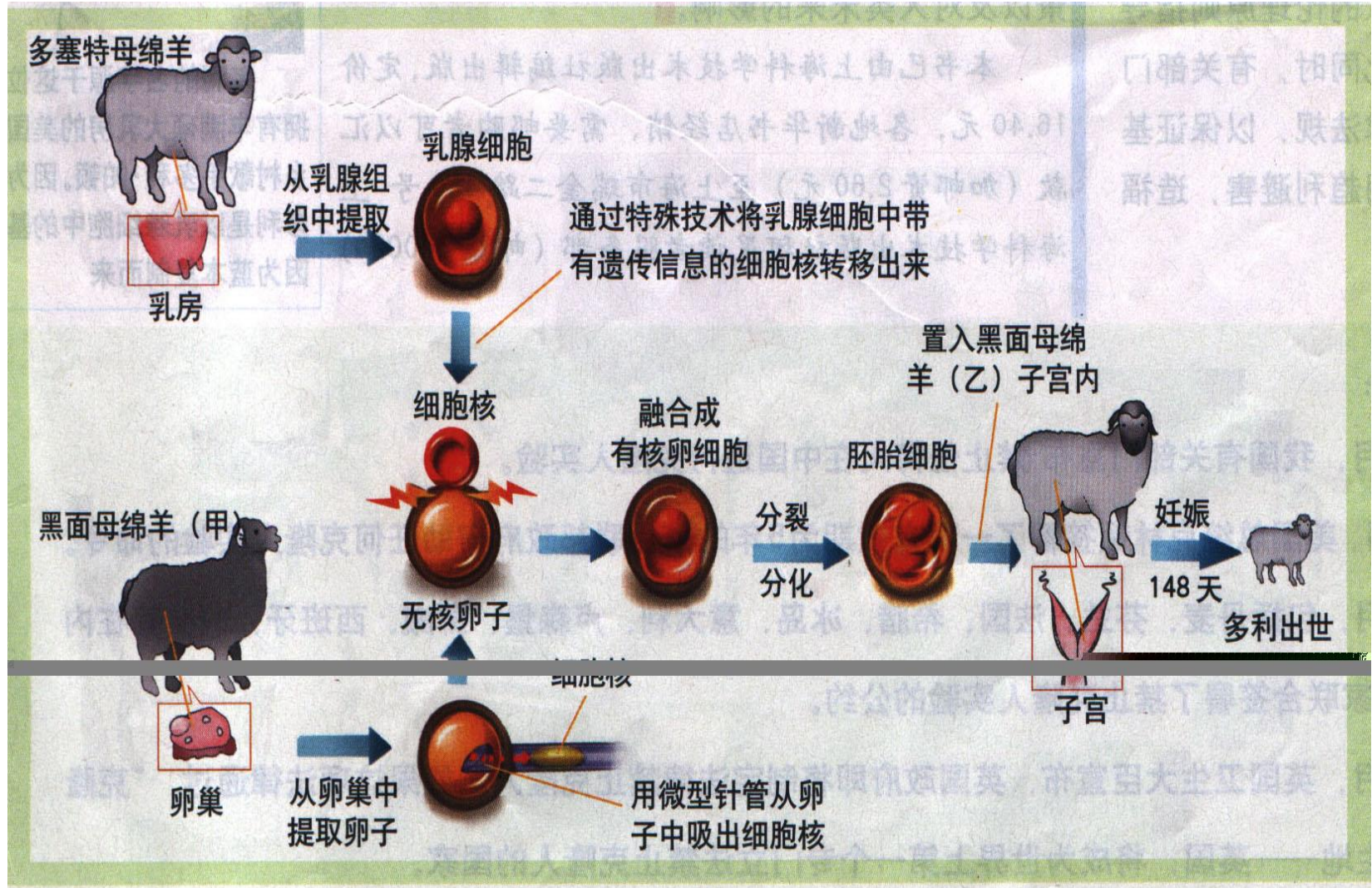
三. 体细胞核移植法

- 体细胞核移植 (somatic cell nuclear transplantation, NT) 是指将动物早期胚胎卵裂球或动物体细胞的细胞核移植到去核的受精卵或成熟的卵母细胞胞质中，从而获得重构卵，并使其恢复细胞分裂，继续发育成与供体细胞基因型完全相同的后代的技术。

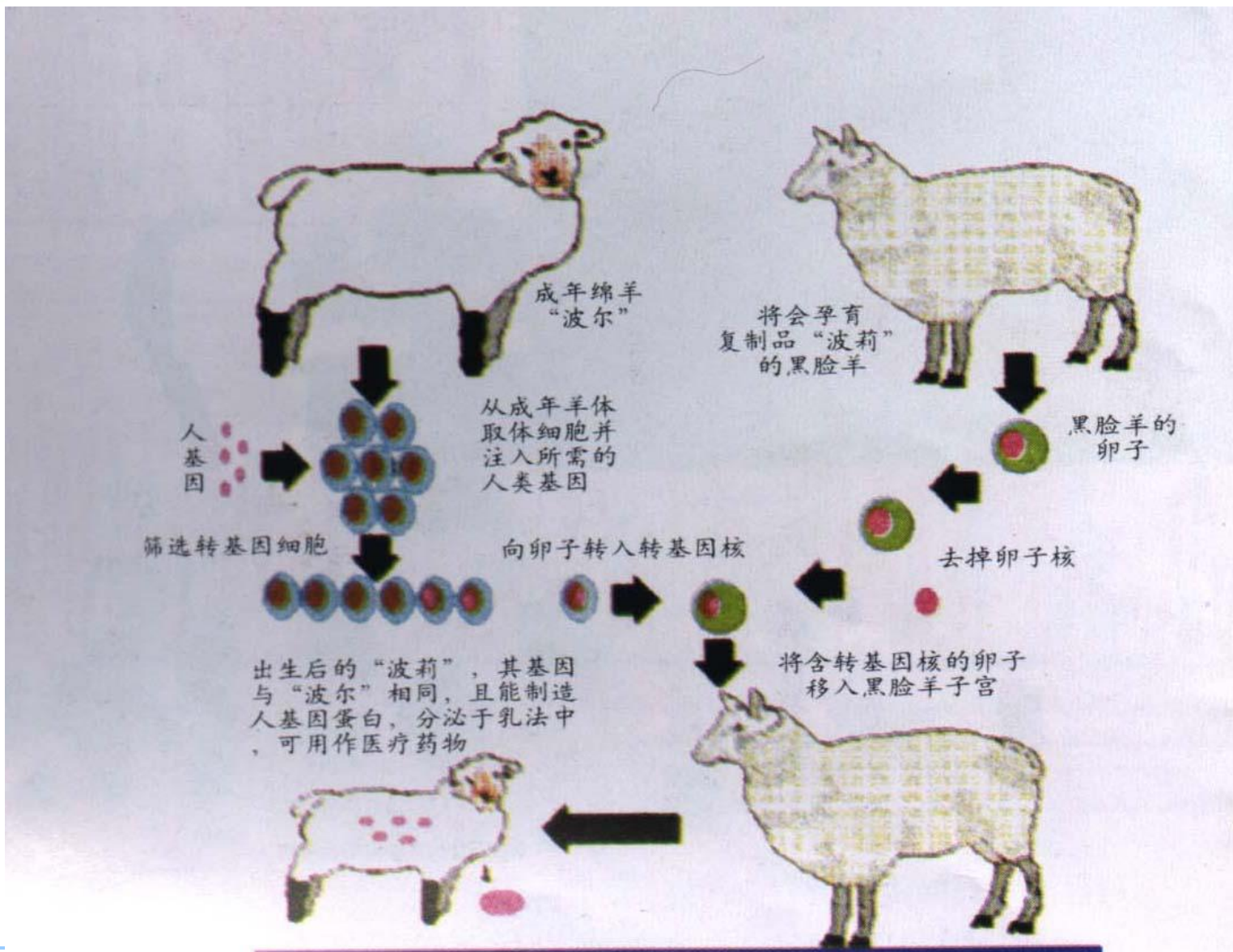


- 1997年，英国罗斯林研究所的Wilmut等通过细胞核移植先后克隆绵羊“多莉”和“波莉”成功，其中“波莉”是带有人血友病的凝血因子IX的转基因羊。
- 该技术转基因效率大为提高，转基因后代数目也迅速扩增。在胚胎移植之前，已经筛选阳性细胞作为核供体，核移植之后产生的胚胎100%为转基因个体。

多莉绵羊的产生过程



转基因波莉绵羊的产生



转基因羊波莉



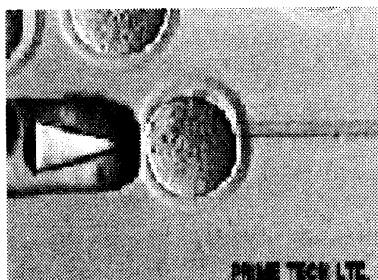


1、核供体的选择

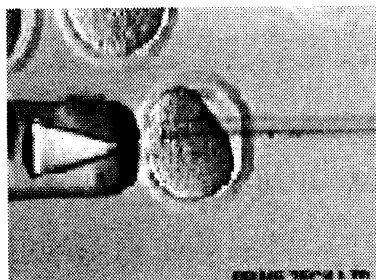
- 卵丘细胞
- 睾丸支柱细胞
- 精子细胞
- 脑细胞
- 胎儿或成体成纤维细胞
- 乳腺上皮细胞等

2、受体细胞去核的方法

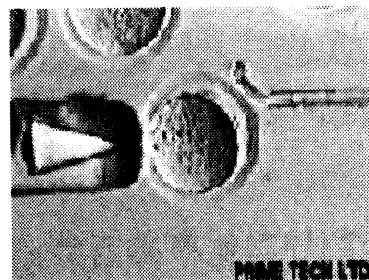
- 化学法
- 机械法



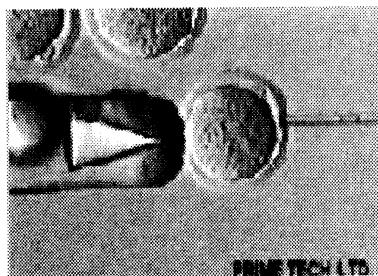
破透明带



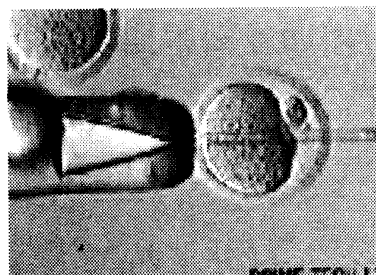
吸核 (MII 期纺锤体)



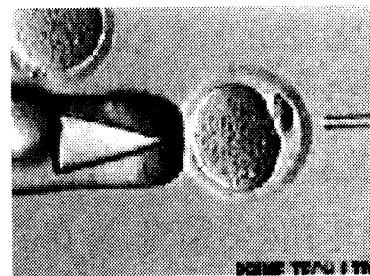
完成去核



取供体核，准备注入



移入供体核



完成移核，卵膜愈合



3、卵母细胞的激活

- 核供体细胞和受体细胞细胞周期同步化
- 对卵母细胞进行人工激活的方法：

电激活（牛、羊等）、乙醇（牛等）、离子霉素（羊）、钙离子载体A23187（牛）、氯化锶（小鼠、牛）、三磷酸酰肌醇IP3（兔）、精子提取物等



4、体细胞核移植法的优点

- 基因转移效率大为提高
- 转基因动物后代数目也迅速扩增
- 阳性细胞作为核供体，产生的后代个体100%为转基因个体
- 可以实现大片段基因的转移
- 克隆濒危的大熊猫

克隆牛
1998年
日本



克隆猪
2000年
美国

克隆大鼠
2002年
中法合作



克隆马
2003年
意大利

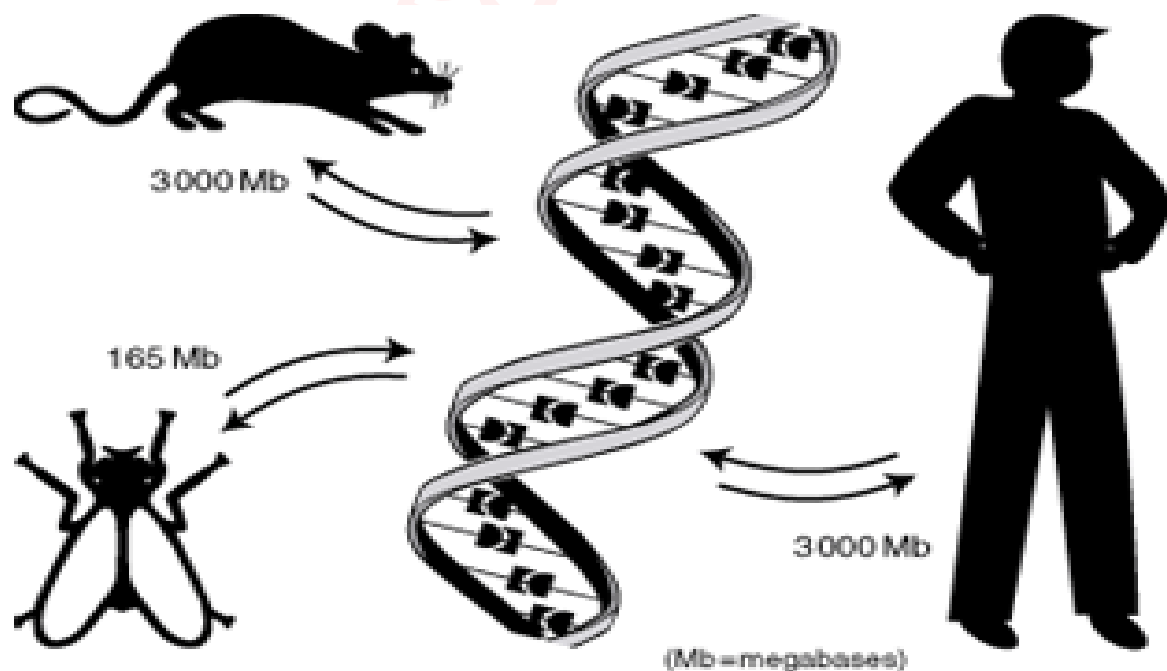
第二节 转基因动物的筛选与检测

- 报告基因
- 分子生物学检测方法



第三节 转基因动物的现状与应用

1. 采用转基因的过表达系统或基因剔除技术开展基因功能研究，基因调控机制的研究等。





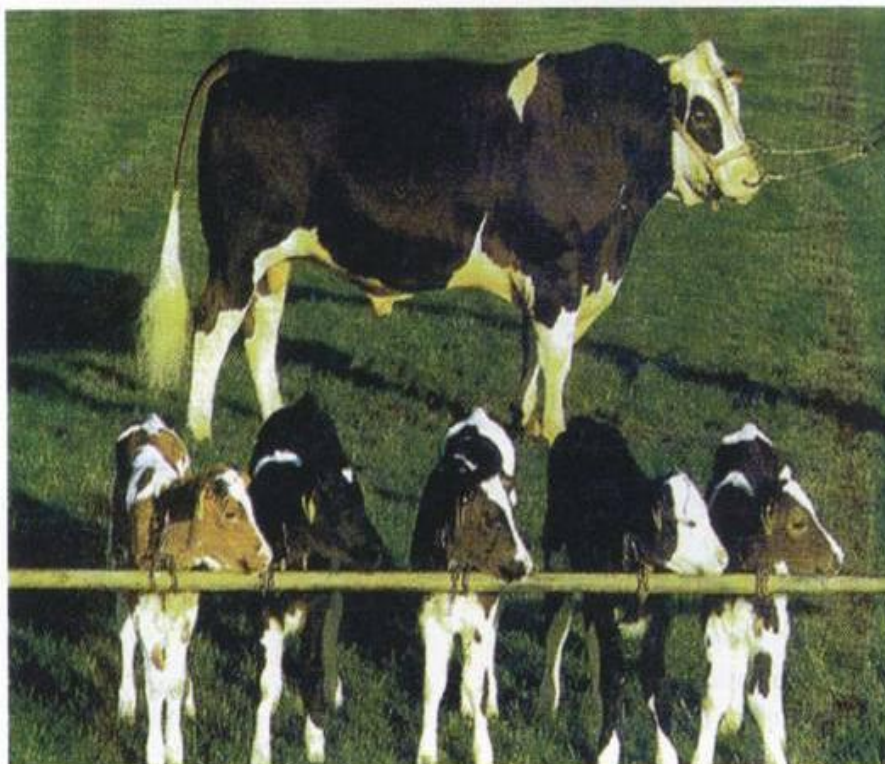
2. 转基因动物在动物育种中的应用

- **提高抗病能力：**如将流感病毒基因或衣壳蛋白基因转入动物体内，增强抗病力。
- **提高动物生长速度：**导入生长激素基因，生长激素释放因子基因，类胰岛素生长因子基因等，提高生长速度。如硕鼠。
- **提高动物产毛性能：**如将细菌的丝氨酸转移酶基因（SAT），D-乙酰丝氨硫化氢解酶基因（DAS）导入羊体内，将二硫化物转化为半胱氨酸，提高角蛋白的合成量，改善羊毛性能。
- **改善乳品品质：**如导入乳腺特异性表达启动子及大鼠肠乳糖酶基因，降低牛奶中乳糖含量。
- **提高动物生存能力：**提高鱼的耐受低溶氧性。



转基因经济动物

美国通过基因工程将人的基因植入牛的体内，由转基因公牛授精的母牛产下了5头健壮的牛犊，这些小牛犊均携带有人的基因





3. 转基因动物在医药科学研究中的应用

- 异种器官移植：猪器官移植到人身上，要克服受体对外源器官的超急性排斥反应（HAP）的障碍，克服措施有：

- 1) 降低或消除补体反应 —— 将人的补体调节蛋白因子基因 CD55, CD59 等通过转基因方法导入器官供体动物，含有 CD55 基因猪的心脏移植到猴体内后，猪心脏跳动了 10 天；
- 2) 通过基因剔除来减少或改变供体器官的表面抗原，降低免疫排斥反应；
- 3) 使供体器官表达人体免疫抑制因子，使得该种猪器官移植后在移植部位持续释放免疫抑制因子，抑制机体对移植物的免疫排斥，形成局部免疫耐受。



利用猪组织器官作为异种移植研究开发的部分项目

组织或器官	治疗疾病	开发公司
猪胰腺细胞	糖尿病	Neocrin (美国)
猪胰腺细胞	糖尿病	Vivorx (美国)
猪肝细胞	肝坏死	Circe Biomedical (美国)
猪肝脏	肝衰竭	Nextran (美国)
猪胎儿神经细胞	帕金森综合症	Diacrin (美国)
猪胎儿神经细胞	帕金森综合症	Genzyme (美国)
猪肾、心脏、肝脏	器官衰竭	Immutran (英国)
猪全部器官	器官衰竭	PPL Therapeutics (英国)

模式生物：转基因动物模型

肝癌模型

老年痴呆症模型

高血压模型

I型糖尿病转基因动物模型



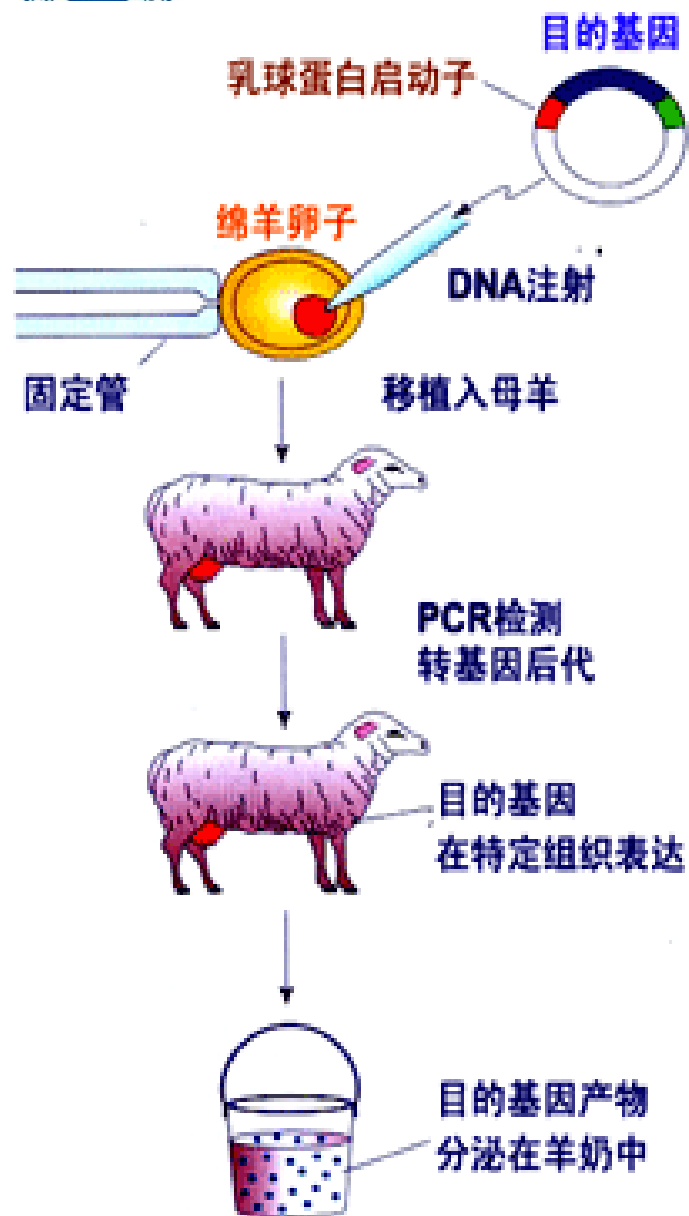


4. 动物生物反应器

- **生物反应器：从转基因动物体液或血液种收获基因产物的方式。乳腺生物反应器和血液生物反应器。**

- **优点：**

- ① 乳汁是可连续合成并分泌的集体流体，正常情况下一头奶牛每年可产上万升乳汁；
- ② 转基因动物只局限在乳腺细胞中表达，不会干扰动物整个机体的正常生理状态；
- ③ 大多数的转基因产物尤其是蛋白多肽药物本身就是人体蛋白，在动物体内表达后对人体不易产生免疫反应；
- ④ 动物乳腺是一个十分理想的蛋白质翻译后加工场所，异源重组蛋白在这里能获得天然的结构；
- ⑤ 最动物乳汁中只有为数不多的十几种蛋白组分，其性质和含量均已知，这使得转基因产物的大规模分离纯化变得十分方便。





利用哺乳动物工程细胞生产的重组蛋白

迄今为止，已有大约300种重组蛋白药物正在进行临床试验，但在哺乳动物工程细胞中大规模生产的只有少数几种：

β 干扰素

凝血因子VIII

促红细胞生成素（EPO）

白介素 2（IL-2）

单克隆抗体

组织型纤溶酶原激活剂（tPA）

γ 干扰素

凝血因子IX

生长因子（hGH）

乙型肝炎表面抗原

CD4受体