

动物转基因技术在转基因牛中的研究进展及其应用

张兆顺

(咸阳职业技术学院生物科技系, 陕西 咸阳 712046)

摘要: 动物转基因技术的应用, 改变了传统的通过杂交改良的牛育种方式, 大大加快了牛品种改良和高附加值牛新品种培育步伐。本文就目前转基因牛育种方面的研究进展进行总结, 并就转基因牛在生物制药、抗病育种以及品种改良等方面的应用进行了综述。

关键词: 动物转基因技术; 转基因牛; 生物制药; 新品种培育

中图分类号: S813.3

文献标志码: A

文章编号: 94047-(2012)03-0018-04

转基因技术兴起于60年代, 经历了半个世纪的发展, 目前已经在基因功能研究、动物新品种培育、功能性重组蛋白生产等方面发挥重要的作用。1980年, Gordon等通过显微注射的方法得到了世界首例转疱疹病毒胸苷激酶的转基因小鼠, 而随后“超级小鼠”的出现, 引起了人们极大的关注, 也充分认识到了通过动物转基因技术在动物品种改良方面的巨大的潜在价值。1990年, Pharming公司成功培育了世界上首例转人乳铁蛋白转基因牛, 为转基因牛的研究开创了先河。随着体细胞克隆等技术的出现对转基因技术的改进, 转基因牛研究在生物制药、抗病育种、品种改良等方面也得到了飞速的发展, 极大的加速了转基因牛新品种培育步伐。本文就目前国内外转基因牛研究进展和应用前景进行综述。

1 动物转基因技术概况

1.1 显微注射法

利用显微注射操作方法将外源基因直接注入实验牛的受精卵中, 然后, 把这种受精卵通过胚胎移植技术移植到母牛子宫内, 让其发育成为转基因克隆牛。它的优点是基因效率比较稳定, 容易制备。缺点是操作难度大, 效率较低, 成本昂贵。目前获得成功的转基因动物有兔、猪、牛、羊等。

1.2 体细胞克隆法

将牛生殖器官或其它部位(如耳背部)的体细胞, 在新鲜状态或经过短暂时间培养后, 加入外源基因整合, 选出阳性的转基因集群作为获得转基因的阳性细胞群作为核供体, 通过体细胞核移植技术来生产转基因胚胎, 将此胚胎移入受体母牛子宫内即可获得转基因克隆牛。这种方法优点是明显降低了成本, 生产效率较高。缺点是该技术很多关键技术还有待于进一步的完善和提高。

1.3 病毒载体法

主要利用逆转录病毒DNA的LTR片段转录启动子活性强这一特性, 在LTR下部连接外源基因先形成高滴度病毒颗粒, 使受精卵或胚胎受到感染, 再整合到宿主细胞的基因组中得到较好表达, 并遗传给转基因牛。优点是操作简单, 整合效率高, 效果稳定。缺点是由于是非同源整合, 结合不稳定, 调控区内可能会发生相互作用, 有潜在的致病性和致癌性。

1.4 基因打靶法

此法是一种指通过外源载体遗传物质(DNA)与动物基因组遗传物质(DNA)之间进行同源重组对基因组得到定点修饰的高端技术。过去转基因技术多数采用随机整合, 目的基因必须随机整合到基因组转录活跃区才可能得到高度表达。而基因打靶技术, 可以实现目的基因的定点整合,

收稿日期: 2012-06-23

基金项目: 国家“863”计划(2010AA10Z101, 2008AA101010)

作者简介: 张兆顺(1964—), 男, 陕西咸阳人, 副教授。主要从事畜牧兽医专业教学与科研工作。

目的基因在细胞水平状况下就可以明确的得到表达。此外还可以达到定点剔除有害基因的目的。

1.5 锌指核酸酶介导法

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。ZFN 可识别并与特定的 DNA 序列结合, 并通过切割这一序列的特定位置点使 DNA 的双链断裂。之后, 可以对基因组的特定位置点进行多种遗传操作。它是近几年才发展起来

的一种可用于在分子水平进行基因组定点改造的一种有效方法, 其特点是修饰效率高, 且特异性极高。

总之, 在转基因牛的研究进展中以上五种方法应用居多, 并取得成果也较为突出。

2 转基因牛的研究进展

2.1 国内外转基因牛的研究现状

近二十年来, 在众多科学家和畜牧兽医科技工作者的共同努力下, 转基因牛研究进展很快, 成果辉煌。主要成果见表 1、表 2。

表 1 国外转基因牛研究进展

时 间	内 容	方 法
1990 年	荷兰 Pharming 公司的科学家用酪蛋白启动因子与人乳铁蛋白 (HLF) 的 cDNA 构建了转基因载体, 获得了世界上第一头名为“Herman”的转基因公牛。该公牛与非转基因母牛生产的转基因后代母牛牛奶中的人乳铁蛋白得到较好表达	显微注射法
1998 年	日本的科学家 Cibelli 等 ^[1] 利用母牛子宫内膜和输卵管上的细胞作为核供体, 获得了体细胞转基因克隆牛。同年, 他们用胎儿成纤维细胞为核供体, 也获得了携带外源基因的克隆牛。	体细胞克隆法
1999 年 6 月	美籍华裔科学家杨向中等利用 1 头成年奶牛的体细胞也获得了名为“艾米”转基因牛, 由于该体细胞不是繁殖系统的体细胞, 故“艾米”的诞生意义重大	体细胞克隆法
2002 年	Berkel 等 ^[2] 利用牛的酪蛋白启动子与人乳铁蛋白基因组的 6.2kb 片段构成转基因载体, 获得转基因牛。	显微注射法
2003 年	日本科学家 Yutaka 等 ^[3] 采取基因敲除法产出了 α -1,3 半乳糖苷转基因酶基因单等位基因灭活的转基因克隆牛, 第一次在牛转基因技术中实现了基因打靶	基因打靶法
2005 年	Donovan 等 ^[4] 将编码溶葡萄球菌酶的基因结合到奶牛基因组中获得转基因克隆奶牛, 转基因奶牛葡萄球菌感染率仅为 14%, 而非转基因牛的感染率达 71%	体细胞克隆法
2007 年	Richt 等通过基因打靶技术使得牛的 PRNP 基因双位点得到灭活, 该转基因牛存活了近 3 年	基因打靶法
2009 年	Hockenmeyer 等 ^[5] 采取 ZFN 对人的 ES 细胞设计 4 对锌指核酸酶对 OCT4 基因位点在打靶时观察到其中 2 对锌指核酸酶诱导的同源重组效率在 36%--94% 之间	锌指核酸酶介导法

2.2 转基因牛的应用

2.2.1 乳腺生物反应器 利用转基因技术, 使外源基因转入牛的基因组中并定位表达于牛乳腺, 利用牛乳腺这一天然的、高效合成并分泌蛋白的能力, 在牛奶中生产价值较高产品的转基因牛的总称。这需要通过转基因牛的乳腺来实现。牛乳腺是最理想的生产基因药物的表达场所, 优点是它

不影响牛本身的生理代谢, 且易提纯, 产量高, 生物活性稳定。

日本科学家 Kuroiwa 等^[8]将体细胞克隆技术与微细胞介导的染色体转移技术 (MMCT) 相结合, 把含有整个人类免疫球蛋白重链基因 IgH 和轻链 Ig λ 的染色体片段转入牛的原代胎儿成纤维细胞内, 获得了转基因牛 4 头, 它们的血液中表达了人

表2 国内转基因牛研究进展

时 间	内 容	方 法
1999 年	上海医学遗传研究所曾益涑院士等采取向体外受精牛的早期胚胎内注射外源基因法得到一头带有人血清白蛋白基因的转基因牛	显微注射法
2002 年	中国科学院动物研究所陈大元等得到了1头名为“委委”的体细胞克隆牛，这是我国自主完成的第1头转基因牛，但出生不久就死亡了，到2月13日，另外11头代孕母牛产下14头转基因犊牛，目前仅活了5头 ^[6]	体细胞克隆法
2002--2006 年	中国农业大学李宁教授等研究人员获得了49头转基因克隆奶牛，目前有29头存活，人乳铁蛋白、人 α 乳清蛋白和人溶菌酶在转基因牛奶中表达量的平均值达到了世界上最高水平	体细胞克隆法
2006 年	中国工程院旭日干院士等研究人员完成的体细胞转基因牛及其相关技术研究，并顺利通过鉴定	体细胞克隆法
2010 年	内蒙古大学动物研究中心和科维尔有限公司共同协作成功培育出了不含肌肉生长抑制素基因的转基因肉牛。该肉牛产肉量大，肉质优良，深受人们青睐 ^[7]	体细胞克隆法

类多克隆抗体，该转基因牛培育成功，为今后利用转基因牛生产人源化的单克隆抗体，应用于医学治疗疾病提供了可能，具有广阔的市场前景。

2.2.2 生物制药 牛乳腺因其产奶量高，蛋白易于纯化等优点，利用转基因牛乳腺生产大量安全、高效、低成本的人药用蛋白是目前研究的重点和热点。目前已有十多种人体蛋白在牛乳腺中表达，这些蛋白在防治疾病和保健等方面具有重要的价值。

荷兰Pharming公司的科学家们用酪蛋白启动因子与人乳铁蛋白（HLF）的cDNA构建了转基因载体，获得了世界上第1头名字为“Herman”的转基因公牛。该公牛与非转基因母牛繁殖的转基因后代中有25%后代牛奶中人乳铁蛋白得到了表达。

广西大学动物科学技术学院的石德顺教授等研究人员目前正在研究含有血小板生成素的转基因牛，有望在牛奶中含有足够量的血小板生成素，这一研究如果成功就可治疗相应的血液疾病^[9]。

2009年，美国FDA批准了世界上首例乳腺生物反应器生产的抗凝血酶药物上市，该药物的上市，将极大的加快转基因牛乳腺生物反应器的研究步伐。

2.2.3 抗病育种 研究证明，牛的许多感染性疾病都是由遗传控制的，牛的遗传性状决定了对某些感染性疾病的发病率的高低。利用分子生物学技术手段，来寻找抗病基因，且培育抗病品种，可以从根本上改变牛的遗传物质结构，从而达到降低

某些疾病的发病率。如Donovan等（2005）将编码溶葡萄球菌酶的基因结合到奶牛基因组中获得转基因克隆牛，转基因牛葡萄球菌感染率仅为14%，而非转基因牛感染率达71%^[10]。

1985年4月，英国发现世界上首例疯牛病，消息一经公布，举世震惊，引起全球对英国牛肉的极大恐慌，各国纷纷禁止进口和销售英国牛肉及其制品。为此，英国将疯牛病疫区的1100多万头牛屠宰处理，造成了约300亿美元的经济损失。目前已经给许多国家造成了巨大的经济损失，严重威胁着人类的健康，引起世人极大的关注。Pfeife等（2006）在牛胚胎的研究结果证明利用RNA技术能够下调朊病毒基因的表达，这为以后培育抗抗疯牛病转基因牛提供了依据^[11]。

2.2.4 品种改良 转基因技术可用于改造牛本身的基因组，从而克隆出生长速度快、瘦肉率高，肉质好的改良牛种，并且还有培育时间短，扩群迅速的优点。

2003年，Brophy等科学家提取了1头奶牛的胚胎干细胞，将2种额外的基因（ β -酪蛋白和k-酪蛋白）加入基因组中，由此培育的转基因牛牛奶中 β -酪蛋白的含量提高了320%，k-酪蛋白的含量也增加了100%^[12]。

3 问题与展望

我国转基因家畜的研究始于1986年。目前，

转基因牛的研究应用还不广泛,它主要应用于转基因奶牛和转基因肉牛中。转基因技术还存在许多不足,主要是转基因的效率偏低、成本较高,建立优质转基因牛品系需要的时间太长^[1]。今后,研究应用重点应该是在不断提高现有转基因技术水平的基础上,建立更加简捷、实用的转基因技术,生产出更有生产应用价值,且外源基因稳定遗传的健康牛群。

随着科学技术的不断发展,动物转基因技术将是21世纪生物工程技术领域内具有实际应用价值的高端技术之一。转基因牛在生物制药、抗病育种、品种改良等方面的开发利用前景会更加美好。

参 考 文 献

- [1] Cibelli J B, Stice SL, Golueke P J, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent Fetal fibroblasts[J]. Science, 1998, 280: 1256~1258.
- [2] Berkel H C, Welling M W, Geerts M, et al. Large scale Production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows[J]. Nature Biotechnology, 2002, 20: 484~487.
- [3] Yutaka S, Tokihiko S, Wanami U, et al. Heterozygous Disruption of the alpha 1,3-galactosyltransferase Gene in cattle[J]. Transplantation, 2003, 76(6): 900~902.
- [4] Donovan D M, Kerr D E, Wall R J. Engineering disease Resistant cattle[J]. Transgenic Res, 2005, 14(5): 563~567.
- [5] Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, et al. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases[J]. Nat Biotechnol, 2009(27): 851~857.
- [6] 崔文涛. 转基因牛研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(7): 48~50.
- [7] 黄永震, 贺花, 陈宏. 动物转基因技术研究新进展及其在牛育种上的应用[J]. 中国牛业科学, 2011, 37(4): 35~40.
- [8] Kuroiwa Y, Kasinathan PJ, Choi Y, et al. Cloned Transchromosomal calves producing human Immunoglobulin[J]. Nat Biotechnol, 2002(20): 889~894.
- [9] Kuroiwa Y, Kasinathan PJ, Choi Y, et al. Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin[J]. Nat Biotechnol, 2002(20): 889~894.
- [10] 马洪才, 马巍, 等. 转基因技术研究进展及在动物生产中的应用[J]. 中国奶牛, 2008(5): 29~32.
- [11] 陈青, 曹文广. 动物转基因新技术研究进展[J]. 中国农业科学, 2011, 44(10): 2168~2175.
- [12] 周丹, 安玲, 马艳娇, 等. 转基因技术研究进展及在动物生产中的应用[J]. 现代畜牧兽医, 2010(7): 75~80.
- [13] 邓守龙, 吕自力, 陆东林, 等. 转基因克隆牛研究进展[J]. 新疆畜牧业, 2008(2): 14~18.

[责任编辑、校对: 阮班录]

Research on Application of Animal Transgenic Technology to Transgenic Cattle

ZHANG Zhao-shun

(Department of Biology Science & Technology, Xianyang Vocational Technical College, Xianyang, Shaanxi 712046)

Abstract: The application of animal transgenic technology has changed traditional cattle breeding featured by hybridization, has accelerated the pace of improving cattle variety and of fostering new cattle breed with higher added value. This article reviews current researching progress of transgenic cattle breeding, and summarizes the application of transgenic cattle technology in bio-pharmaceutical engineering, disease-resistance breeding, breed improvements and the like.

Key words: animal transgenic technology; transgenic cattle; bio-pharmaceutical engineering; new breed fostering