

## 动物乳腺生物反应器的现状和趋势

苟克勉<sup>1</sup>\* 安晓荣<sup>1</sup> 田见晖<sup>2</sup> 陈永福<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室; <sup>2</sup> 动物科技学院, 北京 100094)

**摘 要** 利用转基因家畜的乳腺生产人类重组蛋白,可以高效获得安全、足量的药用蛋白。本文针对乳腺生物反应器的成功研制,从目的基因的选择、载体构建、转基因技术等方面探讨了动物乳腺生物反应器的研究现状。分析了提高转基因效率和外源蛋白表达水平的技术途径,提出了降低总体成本的战略措施。特别探讨了利用 Cre-loxP 系统发展“体细胞打靶-体细胞核移植技术体系”,高效生产乳腺生物反应器动物的可能性。

**关键词** 转基因动物, 乳腺, 生物反应器, 核移植

中图分类号 Q789 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)02-0144-05

动物乳腺生物反应器属于转基因动物的范畴,其核心内容是通过各种转基因技术,将乳腺组织特异性启动子驱动的外源基因,在动物乳腺组织高效表达,在乳汁中生产目的产品。1987年,科学家首先从转基因小鼠的乳汁中获得了人类 tPA 蛋白(组织型纤溶酶原激活剂)<sup>[1]</sup>。此后十多年的科学实践证明,动物乳腺有广泛表达外源基因的能力,可以生产各种蛋白质和多肽,从小分子肽到大分子蛋白质,从分泌型蛋白到内膜蛋白、多聚蛋白、二价抗体<sup>[2]</sup>等。显示动物乳腺是一种很好的生物反应器,在生产高附加值蛋白质方面有广泛用途。

根据国际上的研究结果总结,用动物乳腺生产重组蛋白质产品有以下四大优势:(1)产品活性高。动物乳腺可以对表达的蛋白质进行糖基化、脂化、磷酸化、羧化和形成多聚体等一系列后加工,产品最接近天然提取物,活性好,不易产生抗药性。(2)产量高。从表 1 中可以看出,动物乳腺可以将外源基因表达达到每升几克到几十克,对于抗凝血酶 AT-III、凝血因子 F-IX、抗血友病因子 F-VIII 等许多产品来讲,数头动物的产量就可以满足全世界的市场需求。(3)产品易于纯

化。乳品生产和加工早已实现机械化,有成熟的技术和设施,通过传统的制酪技术去除奶中酪蛋白之后,目的产品留在乳清中,用常规的层析技术可以将产品纯化到 99% 以上。(4)生产成本低。动物乳腺表达外源基因是一种可遗传性状,奶的生产是一种高效技术,一旦研制出生产某种产品的动物,维持生产的成本很低,产品成本主要是纯化的成本。

### 1 乳腺反应器的研究现状

十多年来,已有数百种产品在小鼠乳腺获得高效表达,其中数种重要医用产品已在大动物乳汁中生产出来,即将投放市场。具体数据如表 1 所示。但是,动物乳腺表达的产品及其产业化的成绩,并未像最初预期那样快,反映出整体技术尚存在重大瓶颈。下文将概括描述动物乳腺生物反应器在几个核心环节上的技术现状,分析它们对动物乳腺生物反应器发展的影响。

#### 1.1 目的基因

国际上首批用动物乳腺表达的产品是 AT-III、AAT、F-VIII、F-IX、蛋白 C、血纤蛋白原和血清白蛋白等血源产品。这

表 1 动物乳腺生产医用蛋白实例

Table 1 Examples of biopharmaceutical protein in the milk of transgenic animals

基因名称	受体动物	表达水平(g/L)	开发现状	参考文献
抗凝血酶 III(AT-III)	山羊	6	III 期临床	[3]
抗胰蛋白酶(AAT)	绵羊	35	III 期临床	[4]
葡萄糖苷酶	家兔	10	III 期临床	[5]
蛋白 C	猪	1	III 期临床	[6]
tPA(组织型纤溶酶原激活剂)	山羊	6	II 期临床	[7]
乳转铁蛋白	奶牛	3.5	II 期临床	[8]
第八因子(F-VIII)	猪	3	?	[9]

收稿日期 2001-07-31,修回日期 2001-12-18。

基金项目 北京市自然科学基金(No. 5012007)及国家 863 高科技研究发展计划项目(No. Z21-01-01 和 2001AA213021)资助。

\* 通讯作者。 Tel/Fax: 86-10-62893463; E-mail: goukm@mail.cau.edu.cn © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

些产品的编码基因一般都比较大,用其它表达系统难以生产。后来,由于乳腺组织显示出比其它表达系统更大的优势,目标产品逐步扩大到 tPA、干扰素(IFN)、胰岛素、乳铁传递蛋白、乳糖酶、溶菌酶、抗体、疫苗、蜘蛛牵丝蛋白等各种蛋白质<sup>[2]</sup>。理论上讲,动物乳腺可以生产绝大多数蛋白质,但随着细胞大规模培养技术的日趋完善和基因治疗技术的发展,临床上用量较小的细胞因子将不会再用动物乳腺生产,而那些用量很大的产品,如治疗性抗体、血清白蛋白、营养蛋白和工业蛋白将成为动物乳腺生产的主要产品。特别是抗体生产,数年后将占到生物制品的 30%~40%,是一项很大的产业。

## 1.2 表达载体

动物乳腺生物反应器使用的表达载体,其核心生物元件无一例外地是某一种乳蛋白的基因调控序列。目前已克隆并已用作构建载体的乳蛋白基因,有 $\alpha$ S1 酪蛋白基因、 $\beta$ 酪蛋白基因、 $\beta$ 乳球蛋白基因(BLG)、乳白蛋白基因和乳清酸性蛋白基因(WAP)等。实验结果表明,以乳蛋白基因调控序列为核心元件的各种表达载体,在驱动外源基因表达时有如下特点。第一、启动子在物种间存在相容性,在物种之间可以交叉使用;一般地,反刍动物一般采用同一物种的启动子,家兔和猪则用啮齿类 WAP。乳蛋白基因调控元件可以混合使用,例如 $\alpha$ S1 酪蛋白基因 5'调控序列和 $\beta$ 酪蛋白 3'端调控元件可以构建成有效的表达载体。第二、包含类固醇应答元件(Steroid responsive elements)、TATA 盒、核糖体结合位点<sup>[10]</sup>、转录终止信号和 poly A 信号等元件的表达载体,是基础性乳腺组织特异性表达载体,可以使外源基因在动物乳腺组织中特异表达,有时甚至可以高表达。第三、增加 5'端调控序列的长度,以便将增强子包括在表达载体上,常常会增加高表达的机会。有时增加 3'端调控序列的长度或使用乳蛋白基因的内含子,也会提高表达水平。第四、即使使用所有已知功能的生物元件来构建乳腺组织特异性表达载体,仍然不能克服基因表达的“位置效应”。有人曾经在表达载体上增加鸡溶菌酶基因的基质结合区序列(MAR 序列),以便阻断邻近基因对转基因表达的干扰<sup>[11]</sup>。在某些实验中显示一定功效,但并不普遍适用。近期还发现 MAR 序列可以提高外源基因的整合效率<sup>[12]</sup>。

上述乳腺组织特异性表达载体,可以称作是基础表达载体或最低限度表达载体。因为这类载体可以保证目的基因在乳腺组织特异表达,但表达水平通常比乳蛋白基因本身差很多,个别情况下,比乳蛋白基因本身还高<sup>[4]</sup>。这说明,目前的表达载体尚缺少重要的表达元件,而这些元件需要依靠外源基因整合之处的内源基因来提供。最近,有人报道使用一条包含人乳白蛋白基因 210kb 序列的 YAC 载体在乳腺中高效表达了人的生长激素(8.9 g/L),作者宣称其载体能克服“位置效应”<sup>[13]</sup>。但是不同转基因大鼠的表达水平相差很大。所以,什么是真正的乳腺组织特异性高效表达载体,仍然是一个可以讨论的理论问题和实践中的瓶颈。另外,还应当注意一些问题。首先,动物种类对启动子有选择性。如 WAP/

F-Ⅷ基因构件能被猪整合<sup>[9]</sup>,不能被绵羊整合<sup>[5]</sup>。其次,物种对基因表达有影响,如 F-Ⅷ基因构件在猪乳腺中的表达(2.7 mg/L)<sup>[9]</sup>优于绵羊( $\leq 4 \sim 6 \mu\text{g/L}$ )<sup>[14]</sup>。再次,基因对动物可能有消极影响。EPO 基因容易出现异位表达,导致动物死亡;GH、TGF、WAP 等与乳腺发育有关的重组蛋白/肽类激素,可能影响动物乳腺发育和分泌能力<sup>[15]</sup>。即使与乳腺无关的蛋白 C,当其浓度达到 1 g/L 左右(0.96~1.2 g/L)时,猪乳内源性 IgG、IgM、IgA 的浓度相应升高了 2~3 倍,转铁蛋白甚至升高了 4~5 倍<sup>[15]</sup>。最后是转基因动物个体间表达能力的差异,同一转基因个体的 F1 后代,它们的表达水平有很大的差异。

## 1.3 转基因技术

### 1.3.1 显微注射技术

1980 年由 Gordon 等人<sup>[16]</sup>建立的经典方法。即将目的基因直接注射到受精卵原核内部。转基因效率分别为小鼠 20%~30%、家兔和猪 5%~15%、山羊 2%、绵羊 1%~5%、牛不超过 0.5%。转基因个体的嵌合率高,为 65%,容易剪断大片段 DNA。双原核注射时,整合目的基因的小鼠能够达到 50%<sup>[17]</sup>。我们课题组曾生产了表达多种基因的小鼠(IFN、GH、EPO、IBDV、CD59、GFP 等基因;10%~15%)、猪(MT/GH;3%)和绵羊(IBDV 基因;3%)<sup>[2]</sup>等。与之不同,下面几种方法将外源 DNA 直接导入配子细胞中(精子/卵母细胞),试图在受精前/时完成目的基因的整合,来降低嵌合体的比例。

### 1.3.2 精子载体技术

是一项未得到多数科学家认可的技术。精子质膜能结合 DNA,但 DNA 的吸收受到质疑。1989 年, Lavitran 等人详尽报道了精子结合、吸收 DNA、生产转基因小鼠的研究<sup>[18]</sup>。质疑者认为,精子吸收 DNA 如此简单的话,物种的稳定性无法维持。赞成者的解释是,精子表面存在 DNA 结合蛋白,正常情况下被精清的 IF-I 因子封闭,洗去 IF-I 后,暴露的 DNA 结合蛋白就可能将 DNA 转运到胞质中<sup>[18]</sup>。提高精子质膜通透性、甚至破坏质膜的方法,如电激、脂质体介导、冷冻、去污剂处理等技术可以协助目的基因进入精子胞质,最终获得转基因动物。我们课题组用脂质体介导的精子载体技术,得到了表达 GFP 基因的家兔<sup>[2]</sup>。

### 1.3.3 胞内精子注射技术(ICSI)

1999 年由 Perry 等人建立<sup>[19]</sup>。即将目的基因与去污剂、冻融或冻干方法处理的精子共注射到 M II 期卵母细胞质的方法。81% 桑椹/囊胚能表达报告基因,纯合比例达 75%。阳性移植胚胎生产转基因小鼠的比例是 26%<sup>[19]</sup>,与显微注射相近,纯合后代多,适合大片段 DNA 的注射,只在小鼠中获得了成功。我们课题组用绵羊进行了尝试,发现 ICSI 胚胎能表达 GFP 基因(10%),显示 ICSI 技术生产转基因家畜(绵羊)具有可行性。

### 1.3.4 逆转录病毒侵染技术

这项技术用目的基因替换病毒基因组的反式元件,通过顺式元件的调控序列和感染成分侵染卵母细胞,实现转基因过程。1998 年和 2001 年, Bremel<sup>[20]</sup>和 Schatten<sup>[21]</sup>研究小组分别获得 4 头转基因奶牛和 1 只转基因猴 ANDi。后者分析了 ANDi 的 13 种组织 mRNA 和 DNA,确认是一只纯合个体。优点是目的基因的整合有序而稳定,拷贝数和插入位点相对固定,转基因(牛)效率高

(20%)<sup>[20]</sup>。缺点是插入片段小,存在生物安全性问题<sup>[2]</sup>。

**1.3.5 动物体细胞核移植技术**:1997年,体细胞核移植技术成功<sup>[22]</sup>。同年底,英国 Roslin 研究所和 PPL 公司通过克隆转基因的体细胞,获得了6只整合 neo 和/或 F-I $\chi$  基因绵羊<sup>[23]</sup>。随后,其它实验室生产的转基因克隆牛<sup>[24, 25]</sup>和表达 GFP 的克隆山羊相继出生<sup>[26]</sup>。2001年,我们课题组获得了2只表达 neo 基因的克隆绵羊<sup>[27]</sup>。

上述技术中,目的基因随机整合到动物的染色体中,容易损伤管家基因,或者容易出现异位表达及表达失控情况。而且目的基因的表达难以克服拷贝数和插入位点周围染色体微环境的影响。解决问题的根本出路是实现目的基因在动物中的定点整合。2000年,英国 PPL 公司的科学家将人类 AAT 基因定点整合到胎儿成纤维细胞的 procollagen 基因座位,用转基因细胞生产的克隆绵羊,每升乳中 AAT 蛋白的含量达到了650毫克,远远高于显微注射绵羊18毫克的水平<sup>[28]</sup>。这是世界上第一例基因打靶家畜。2001年,又出生了 $\alpha$ -1,3-GT 和朊病毒双剔除的克隆绵羊<sup>[29]</sup>。

目前动物乳腺生物反应器研究的现状,可以用难度大、效率低、时间长和费用高四个词来形容。根本原因在于生产转基因动物效率低和基因表达受“位置效应”影响这两大技术瓶颈。假如没有新技术体系的建立,基本情况不会有很大改变。

## 2 体细胞核移植方法生产乳腺反应器动物是发展的必然趋势

克隆技术可以将离体培养的、基因定点修饰后的动物体细胞转变成动物个体,可以很好地解决动物转基因效率低和基因表达方面的问题。因此,采用以体细胞克隆技术为核心的各种技术平台,是未来生产动物乳腺反应器动物的希望和必然趋势。如果将目的基因定点整合到家畜体细胞的乳蛋白(或其它合适的)基因座后,由转基因体细胞通过核移植技术生产的乳腺反应器动物,能够充分利用天然乳蛋白基因固有的高效表达的调控机制。理论上消除了随机整合的位置效应,目的基因只在乳腺高效表达,是生产乳腺反应器动物的理想模式。虽然 PPL 公司生产打靶绵羊的原胶原座位并不是乳腺特异的基因座,但是他们的成功经验还是揭示了这项技术生产乳腺反应器动物的广阔前景。

### 2.1 技术体系的优越性

**2.1.1 动物转基因效率大幅提高**:虽然体细胞克隆技术出现的历史很短,在方法上还有许多可以改进的地方,特别是在移植成活率上需要大力改进。即使如此,从国际国内已取得的结果来衡量,使用体细胞克隆技术生产转基因动物的成功率已超过显微注射等常规技术(表2)。此外,采用体细胞克隆技术之后,奶牛成了最容易生产的转基因动物,而奶牛的产奶量是绵羊和山羊的20~30倍,是最理想的制作乳腺生物反应器的动物。

**2.1.2 克隆技术有利于使用定点表达基因的技术**:显微注射等已建立的转基因技术,其核心是操作受精卵和配子,有时间上的限制,不可能使用定点整合和表达基因的技术。而

表2 不同方法生产转基因动物的效率

Table 2 Transgenic efficiency of microinjection and nuclear transfer methods

方法	移植 100 枚胚胎	使用的受体数	产生转基因动物数	参考文献
显微注射	牛	50	0.1~0.2	[2]
	绵羊	25	1.0	[2]
	山羊	25	1.1	[2]
克隆法	牛	50	10	[24, 25]
	绵羊	25	6~8	[23, 27]
	山羊	25	3~4	[26]

体细胞克隆技术许可将基因整合和生产胚胎分开操作,有利于使用在小鼠胚胎干细胞中发展起来的基因打靶技术<sup>[30]</sup>。通过基因打靶技术,可以将目的基因定向地送到一个乳蛋白基因座或一个已知可以在乳腺组织高效表达外源基因的座位上,以达到高效表达的目的。如果能有基因打靶技术相配合,则体细胞克隆技术可以使生产乳腺生物反应器动物的成本下降90%,将会大大促进这项技术的产业化。

**2.1.3 克隆技术可以缩短产品生产周期**:乳腺生物反应器研究的另外一个不利因素是产品开发周期太长。在体细胞克隆技术出现之前,这是一个不可能克服的困难,因为每种动物的怀孕期和性成熟年龄是物种所特有的,不可能改变。例如,牛的怀孕期约9个半月,可以配种的年龄是14~18个月,从操作转基因胚胎开始到转基因牛自身产奶需要经历两个怀孕期和一个性成熟期,总共32~36个月<sup>[25]</sup>。从一头转基因动物扩展成一个生产群体,依赖自然繁殖过程又需数年时间。有了体细胞克隆技术,可以把已证明是高效表达的动物个体直接变成一个群体,不依赖这头动物的生理年龄。若是在细胞阶段能证明目的基因已整合到高效表达基因座上,甚至可以像工厂生产某种产品一样,按照需求成批生产合格的动物。据估算,相同条件下,生产100kg重组蛋白,显微注射法生产的转基因奶牛,至少需要56个月,如果是转基因公牛,则需要65个月,核移植方法生产的转基因奶牛只需要41个月,而且在第15个月时,有望获得至少200g的重组蛋白进行鉴定和临床实验<sup>[25]</sup>。

**2.1.4 克隆技术可以预先决定性别**:动物乳腺生物反应器的生产畜群由雌性动物组成,在生产出一头公的转基因动物时,只能检测其基因整合状况,只有到这头动物生产出女儿且其女儿分娩之后,才知道基因表达情况<sup>[25]</sup>。这种漫长的等待,对投资方和研究人员都是很痛苦的。克隆技术可以有选择性地克隆来自雌性的细胞,显然是很大的优点<sup>[31]</sup>。

### 2.2 面临的技术问题及对策

目前克隆技术尚有许多不完善处,采用克隆技术同时克服转基因效率和基因表达的“位置效应”尚需时日。但是,采用“体细胞打靶—体细胞克隆技术体系”可以实行由低级到高级,逐步完善的方式来实现。

**2.2.1 提高克隆技术的效率**:现阶段,奶牛克隆胚胎发育到囊胚阶段的比例已经超过30%,与体外受精胚胎相近,此阶段没有太大问题,主要问题是克隆胎儿怀孕率低,易流

产。这是世界范围内的难题。科学家已经发现供体细胞类型对克隆效率有影响。颗粒细胞和胎儿成纤维细胞的克隆效率相对高于肌肉细胞、乳腺细胞等其他类型的体细胞。采用“体细胞打靶-体细胞核移植技术体系”生产乳腺反应器动物时,首先应当选择雌性体细胞,而且是已经有克隆后代诞生的体细胞。要求这种细胞应该易培养,倍增时间短。

**2.2.2 克服基因随机整合带来的基因表达“位置效应”问题:**虽然通过体细胞克隆生产出来的动物百分之百是整合了目的基因的动物。但在转染细胞时基因整合位点仍然是随机的,实现同源重组,把目的基因整合到乳蛋白基因座上的机会微乎其微。解决这个问题的根本办法是在细胞中进行基因打靶,通过靶向整合把目的基因送到乳蛋白基因座上。实现打靶的条件是要具备适宜的打靶载体和可用以体细胞克隆的乳腺细胞系。目前,尚未见有人报道获得了既可用于打靶又可作克隆核供体的牛、羊乳腺细胞系。即使分离到这样的乳腺细胞系,短时间在培养的乳腺细胞上实现目的基因在乳蛋白基因座上靶向整合,仍然存在很大的疑问<sup>[32,33]</sup>。基因打靶技术是在小鼠胚胎干细胞上建立起来的,在小鼠胚胎干细胞上实施打靶时实现同源重组的机会在 $10^{-5}$ 至 $10^{-7}$ 之间。有报道说,在培养的体细胞上实现同源重组的机率比在小鼠胚胎干细胞低3000倍<sup>[32]</sup>。如果这份报道所说的事实具有普遍性,那么事情就不太乐观了,即使把目前现有的所有能提高基因打靶效率的策略,如增加同源臂长度<sup>[34]</sup>、RNA/DNA寡聚复合物转染细胞<sup>[32]</sup>、载体双酶切混合物共转染<sup>[35]</sup>、无启动子筛选<sup>[33,36]</sup>等都使用上,在乳腺细胞上实现基因打靶仍将是很难的,虽然乳腺上皮克隆牛<sup>[37]</sup>和羊<sup>[22]</sup>是成功的。

在这种情形之下,一种可行的对策是引入 Cre/LoxP 重组体系。来自 *E. coli* 噬菌体 P1 的 Cre-loxP 系统,可以在小鼠 ES 细胞、小鼠活体和体外培养的人体细胞中行使有效的功能。首次成功的实例是免疫球蛋白基因时空调控打靶小鼠<sup>[38]</sup>。Cre-loxP 系统中,Cre 重组酶(Cyclization recombination)能识别一段称作 loxP (locus of X-over of P1) 的 34 bp 核苷酸序列(5-ATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTAT-3), loxP 序列由两个倒转的 13 bp 重复序列构成,中间被 8 bp 非回文序列隔开,非回文序列决定了 Cre 酶的识别方向。Cre 酶本身就能催化重组反应,不需要辅助分子的参与。Cre-loxP 系统具有创造大片段缺失和插入能力。通过 Cre-loxP 系统建立的第一例乳腺反应器动物模型,是 Utomo *et al* (1999) 采用 WAP 驱动的 rTA 因子在小鼠乳腺上皮的大量表达,表达部位与常规转基因小鼠相同<sup>[39]</sup>。表明 Cre-loxP 适用于研制乳腺反应器动物。我们首先用 Cre-loxP 系统删除染色体片段的能力,通过正反筛选机制将一个单拷贝的乳蛋白基因从启动子下游删除,并且将 lox511(突变的 loxP)序列导入该靶位点,以期提高插入整合的效率。由此得到的突变细胞作为基础材料,可以将各种各样的目的基因插入到这个突变细胞的 loxP 位点,然后继续核移植过程,最终生产乳腺反应器动物。另外一组可资利用的重组酶是已经在小鼠中应用的、来自酵母菌 FLP-*prt* 系统<sup>[40]</sup>。

**2.2.3 解决体细胞的长期培养问题:**细胞体外培养的代数是实现基因打靶的主要限制。研究发现,传代 45 次的牛成纤维细胞,仍然能够作为核供体生产克隆动物<sup>[41]</sup>。一般来说,完成一轮打靶,从原代培养,打靶到核移植需要体细胞传代 45 代以上<sup>[33]</sup>。绵羊 FFB 细胞的传代极限是 80~100 次<sup>[33]</sup>理论上计算,FFB 细胞能够完成两轮基因打靶过程。一般认为,体外培养的体细胞,特别是长期培养的细胞,容易发生染色体组的丢失,其比例甚至可达 50%。如果中靶细胞发生了染色体丢失,则前功尽弃,无法进行核移植。目前,还没有办法解决这个问题,只能是提高研究人员的技术水准。研究人员正在探讨延长细胞寿命的方法,包括端粒酶基因共转染细胞<sup>[42]</sup>和用 L-carnosine 等药物的处理。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Gordon K, Lee E, Vitale J *et al.* Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Biotechnology*, 1987 **5**: 1183~1187
- [2] CHEN Y F (陈永福) ed. *Transgenic Animals*. Beijing: Science Press, 2002.
- [3] Rudolph N S. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Tibtech*, 1999, **17**: 367~374
- [4] Wright G, Caryl A, Cottom D *et al.* High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology*, 1991, **9**: 830~834
- [5] Niemann H, Kues W A. Transgenic livestock: premises and promises. *Anim Reprod Sci*, 2000, **60**~**61**: 277~279
- [6] Valander W H, Johnson J L, Page R L *et al.* High-level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using a cDNA encoding human protein C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 12003~12007
- [7] Ebert K M, DiTullio P, Barry C A *et al.* Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats. *Biotechnology*, 1994, **12**: 699~702.
- [8] Krimpenfort P, Rademakers A, Eyestone W *et al.* Generation of transgenic dairy cattle using in vitro embryo production. *Biotechnology*, 1991, **9**: 844~847
- [9] Paleyanda R K, Velander W H, Lee T K *et al.* Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**: 971~975
- [10] Houdebine L M, Attal J. Internal ribosome entry sites (IRESs): reality and use. *Transgenic Res*, 1999, **8**: 157~177
- [11] Mcknight R A, Spencer M, Wall R J, Hemmighausen L *et al.* Severe position effects imposed on a 1 kb mouse whey acidic protein gene promoter are overcome by heterologous matrix attachment regions. *Mol Reprod Dev*, 1996, **44**: 179~184
- [12] Gutierrez-Adan A, Pintado B. Effect of flanking matrix attachment regions on the expression of microinjected transgenes during preimplantation development of mouse embryos. *Transgenic Res*, 2000, **9**: 81~89
- [13] Fujiwara Y, Miwa M, Takahashi R *et al.* Position-independent and high-level expression of human alpha lactalbumin in the milk of transgenic rats carrying a 210kb YAC DNA. *Mol Reprod Dev*, 1997, **47**: 157~163
- [14] Niemann H, Halter R, Camwath J W *et al.* Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic Res*, 1999, **8**: 237~247
- [15] Van Cott K E, Lubon H, Gwazdauskas F C *et al.* Recombinant human protein C expression in the milk of transgenic pigs and the effect on endogenous milk immunoglobulin and transferring levels. *Trans-*

- [ 16 ] Gordon J , Rudle F . Integration and stable germline transmission of gene injected into mouse pronuclear. *Science* , 1980 , **214** :1244 ~ 1246
- [ 17 ] Kupriyanov S , Zeh K , Baribault H . Double pronuclei injection of DNA into zygotes increases yields of transgenic mouse lines. *Transgenic Res* , 1998 , **7** :223 ~ 226
- [ 18 ] Lavitrano M , Camaioni A , Fazio V *et al.* Sperm cells of vectors for introducing foreign DNA into eggs : genetic transformation of mice. *Cell* , 1989 , **57** :717 ~ 723
- [ 19 ] Perry A C F , Wakayama T , Kishikawa H *et al.* Mammalian transgenesis by introcytoplasmic sperm injection. *Science* , 1999 , **284** :1180 ~ 1183
- [ 20 ] Chan A W S , Homan E J , Ballou L U *et al.* Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1998 , **95** :14082 ~ 14033
- [ 21 ] Chan A W S , Chong K Y , Martinovich C *et al.* Transgenic monkey produced by retroviral gene transfer into mature oocytes. *Science* , 2001 , **291** :309 ~ 312
- [ 22 ] Wilmut I , Schnieke A E , McWhir J *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian Cells. *Nature* , 1997 , **385** :810 ~ 813
- [ 23 ] 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
- [ 24 ] Cibelli J B , Stice S T , Golueke P J *et al.* Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* , 1998 , **280** :1256 ~ 1258
- [ 25 ] Brink M F , Bishop M D , Pieper F R . Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk. *Theriogenology* , 2000 , **53** :139 ~ 148
- [ 26 ] Keefer C L , Baldassarre H , Keyston R *et al.* Generation of dwarf goat clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes. *Biol Reprod* , 2001 , **64** :849 ~ 856
- [ 27 ] AN X R (安晓荣) , GOU K M (苟克勉) , CHEN Y F (陈永福) . Production of transgenic blastocyst of sheep by somatic cell cloning. *Chinese Science Bulletin (科学通报)* , 2001 **46** (19) :1630 ~ 1634
- [ 28 ] McCreath K J , Howcroft J , Campbell K H S *et al.* Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* , 2000 , **405** :1066 ~ 1069
- [ 29 ] Denning C , Burl S , Ainslie A *et al.* Deletion of the alpha ( 1 , 3 ) galactosyl transferase ( GGTA1 ) gene and the prion protein ( PrP ) gene in sheep. *Nat Biotechnol* , 2001 , **19** :559 ~ 562
- [ 30 ] Thompson S , Clarke A R , Pow A M *et al.* Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* , 1989 , **56** :313 ~ 321
- [ 31 ] AN X R (安晓荣) , GOU K M (苟克勉) , ZHU S E (朱士恩) *et al.* Cloned calves produced by nuclear transfer from cultured cumulus cells. *Chinese Science (Series C)(中国科学 C 辑)* , 2002 , In press.
- [ 32 ] Piedrahita J A . Targeted modification of the domestic animal genome. *Theriogenology* , 2000 , **53** :105 ~ 106
- [ 33 ] Clark A J , Burl S , Denning C . Gene targeting in livestock : a preview. *Transgenic Res* , 2000 , **9** :263 ~ 275
- [ 34 ] Dickinson P , Kimber W L , Kilanowski F M *et al.* Enhancing the efficiency of introducing precise mutations into the mouse genome by hit and run gene targeting. *Transgenic Res* , 2000 , **9** :55 ~ 66
- [ 35 ] Sarig R , Mezger-Lallemand V , Leibovitz S *et al.* Increased efficiency of homologous recombination in ES cells by cleavage at both ends of homology in the targeting vector. *Transgenic Res* , 2000 , **9** :79 ~ 80
- [ 36 ] Sedivy J M , Sharp P A . Positive genetic selection for gene disruption in mammalian cells by homologous recombination. *Proc Nat Acad Sci USA* , 1989 , **86** :227 ~ 231
- [ 37 ] Zakhartchenko V , Durcova-Hills G , Stojkovic M *et al.* Effects of serum starvation and recloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J Reprod Fertil* , 1999 , **115** :325 ~ 331
- [ 38 ] Gu H , Marth J D , Orban P C *et al.* Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cell using cell type-specific gene targeting. *Science* , 1994 , **265** :103 ~ 106
- [ 39 ] Utomo A R H , Nikitin A Y , Lee W ~ H . Temporal , spatial , and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nat Biotechnol* , 1999 , **17** :1091 ~ 1096
- [ 40 ] Rodriguez C I , Buchholz F , Galloway J *et al.* High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* , 2000 , **25** :139 ~ 140
- [ 41 ] Kubota C , Yamakachi H , Yang X *et al.* Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2000 , **97** :990 ~ 995
- [ 42 ] Bordnar A G , Ouellette M , Frolkis M *et al.* Extension of life span by introduction of telomerase into normal human cell. *Science* , 1998 , **279** :349 ~ 352

## Transgenic Animals Bioreactors

GOU Ke-Mian<sup>\*1</sup> AN Xiao-Rong<sup>1</sup> TIAN Jian-Hui<sup>2</sup> CHEN Yong-Fu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> National Key Laboratories for Agrobiotechnology ,<sup>2</sup> College of Animal Science and Technology ,China Agricultural University , Beijing 100094 , China )

**Abstract** The production of human recombinant proteins in milk of transgenic farm animals offers a safe , very cost-effective source of commercially important proteins that cannot be produced as efficiently in adequate quantities by other methods. This review has summarized the current status of gene selection , vector construct , transgenic methods , economics , and obvious potential in transgenic animals bioreactors. Recently , a more powerful approach was adopted in the transgenic animals founded on the application of nuclear transfer. As we will illustrate , this strategy presents a breakthrough in the overall efficiency of generating transgenic farm animals , product consistency , and time of product development. The successful adaptation of Cre-/loxP-mediated site-specific DNA recombination systems in farm animals will offer unprecedented possibilities for generating transgenic animals.

**Key words** transgenic animals , mammary gland , bioreactors , nuclear transfer

Received : 07-31-2001

This work was supported by grants from the State 863 High Technology R&D Project of China( No. Z21-01-01 and 2001AA213021 ) and Beijing Municipal Natural Sciences Foundation( No. 5012007 ).

\* Corresponding author. Tel 86-10-62891333 ; Fax 86-10-62893463 ; E-mail : goukin@mail.cau.edu.cn