

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/87

C12N 5/10 A01K 67/027

C07K 16/28



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01810496.7

[43] 公开日 2003 年 7 月 23 日

[11] 公开号 CN 1432067A

[22] 申请日 2001.3.5 [21] 申请号 01810496.7

[30] 优先权

[32] 2000. 3. 28 [33] US [31] 09/537,861

[86] 国际申请 PCT/US01/07018 2001.3.5

[87] 国际公布 WO01/73094 英 2001.10.4

[85] 进入国家阶段日期 2002.11.28

[71] 申请人 百圭生物科技公司

地址 美国加州工业市

[72] 发明人 王康圣

[74] 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

代理人 戴建波

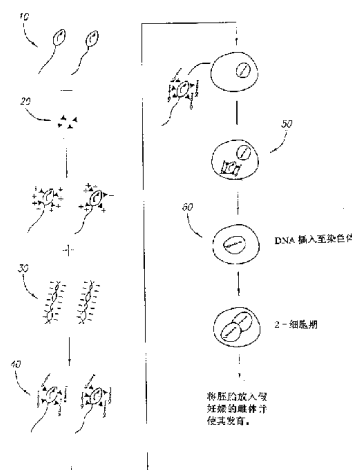
权利要求书 10 页 说明书 19 页 附图 16 页

[54] 发明名称 用于基因修饰非人类动物的新载体

[57] 摘要

本发明涉及一种载体及其用于生产基因修饰的动物和细胞的用途。一方面,本发明涉及一种载体,其含有一个精细胞及一个或多个通过一个或多个非脂质体基底的连接子结合于精细胞上的聚核苷酸分子。精细胞可以是任何动物的细胞,优选为非人类动物的。在本发明的一个优选具体实施方案中,所述的一个或多个聚核苷酸分子可以为一种基因产物进行编码,其可赋予细胞或动物所需的特征。在本发明的另一优选实施方案中,所述的连接子为一种蛋白质或多肽,优选具有精子专一性,例如可与精细胞的外表面结合的抗体。连接子优选为借助离子作用力与一个或多个聚核苷酸分子发生相互作用。此类相互作用的进行亦可借助其它的分子相互作用,包括使用另一连接子或第二连接子。精子、连接子及一个或多个聚核苷酸的相连亦可发生在生物体外或生物体内。另一方面,在本发明中,可由具有上述载体的动物卵细胞受精而衍生出基因上修饰的细胞或动物。受精可发生在生物体外或生物体内。在一优选的具体实施例中,基因修饰的发

生是因聚核苷酸分子全部或部分地插入至细胞或动物之基因组中。在本发明的又一方面中,其包括细胞,例如衍生自此类基因上修饰的动物或其后代的精细胞或卵细胞及其细胞系。再一方面,在本发明中,通过利用具有某些所需特征的上述精子载体,可以得到基因上修饰的动物。此类所需的特征的实施例包括较快的生长速率、抗疾病能力或抗病原体能力、在乳汁中的某些蛋白质的高率以及在动物至人类的外源性移性移植中移植器官的适应性等。



知识产权出版社出版

ISSN 1008-4274

- 1、一种用于基因上修饰非人类之动物或细胞的载体，其包括：
一种非人类的精细胞以及至少一种结合于该非人类的精细胞之上的聚核苷酸分子，该结合至少通过一种非脂质体基底的连接子。
- 2、根据权利要求 1 所述的载体，其中，所述的非脂质体基底的连接子是结合于所述的非人类精细胞的外表面。
- 3、根据权利要求 1 所述的载体，其中，所述的非脂质体基底的连接子还含有至少一种多肽。
- 4、根据权利要求 3 所述的载体，其中，所述的多肽是一种蛋白质。
- 5、根据权利要求 1 所述的载体，其中，所述的非脂质体基底的连接子是一种精子专一性连接子。
- 6、根据权利要求 1 所述的载体，其中，所述的非脂质体基底的连接子优先结合在非人类精细胞的外表面上。
- 7、根据权利要求 1 所述的载体，其中，所述的非脂质体基底的

连接子是一种免疫球蛋白。

8、根据权利要求 1 所述的载体，其中，所述的非脂质体基底的连接子是一种抗体。

9、根据权利要求 1 所述的载体，其中，所述的至少一种聚核苷酸分子是为一种 DNA 分子。

10、根据权利要求 9 所述的载体，其中，所述的 DNA 分子能为基因产物进行编码。

11、根据权利要求 10 所述的载体，其中，所述的基因产物是一种 RNA 分子。

12、根据权利要求 10 所述的载体，其中，所述的基因产物是一种蛋白质。

13、根据权利要求 1 所述的载体，其中，所述的非脂质体基底的连接子与所述的至少一种聚核苷酸分子通过分子间的相互作用而发生相互作用，该分子间的相互作用包括离子相互作用、共价相互作用、范德瓦相互作用以及配体-受体间的相互作用。

14、根据权利要求 1 所述的载体，其中，所述的非脂质体基底的连接子，通过至少一种第二非脂质体基底的连接子，与所述的至少一种聚核苷酸分子发生相互作用。

15、根据权利要求 2 所述的载体，其中，所述的至少一种聚核苷酸分子，在生物体内通过非脂质体基底的连接子而结合到非人类精细胞的外表面。

16、一种用于将至少一种聚核苷酸分子连接至非人类精细胞外表面的非脂质体基底的连接子，其含有至少一种多肽。

17、根据权利要求 16 所述的非脂质体基底的连接子，其中，所述的多肽是一种蛋白质。

18、根据权利要求 16 所述的非脂质体基底的连接子，其中，所述的多肽是一种免疫球蛋白。

19、根据权利要求 16 所述的非脂质体基底的连接子，其中，所述的多肽是一种抗体。

20、根据权利要求 16 所述的非脂质体基底的连接子，其中，所述的至少一种多肽是结合于非人类精细胞的外表面。

21、一种细胞，其衍生自具有一种载体的、有效受精的非人类卵细胞，其中，所述的载体包括：

一种非人类的精细胞和至少一种通过一种非脂质体基底的连接子而结合于该非人类的精细胞的聚核苷酸分子。

22、根据权利要求 21 所述的细胞，其中，所述的受精发生在生物体外或生物体内。

23、根据权利要求 21 所述的细胞，其中，所述的至少一种聚核苷酸分子是全部地或部分地插入至该细胞的基因组中。

24、一种基因修饰的非人类动物，其来自于用如下的载体使非人类的卵细胞受精，所述的载体含有：非人类的精细胞以及至少一种通过一种非脂质体基底的连接子而结合于该非人类的精细胞的聚核苷酸分子。

25、根据权利要求 24 所述的基因修饰的非人类动物，其中，所述的非人类的动物是一种哺乳动物。

26、根据权利要求 24 所述的基因修饰的非人类动物，其中，所述的非人类的动物是一种鸟类。

27、根据权利要求 24 所述的基因修饰的非人类动物，其中，所述的非人类的动物是猪类。

28、根据权利要求 24 所述的基因修饰的非人类动物，其中，所述的至少一种聚核苷酸分子是全部地或部分地插入至该非人类动物的基因组中。

29、根据权利要求 24 所述的基因修饰的非人类动物，其中，所述的受精是在生物体外或生物体内进行的。

30、根据权利要求 24 所述的基因修饰的非人类动物，其中，所述的至少一种聚核苷酸分子是在生物体外或生物体内通过非脂质体基底的连接子而结合至非人类精细胞的外表面。

31、一种非人类的动物，其是如权利要求 24 所述的基因修饰的非人类动物的后代。

32、一种细胞，其衍生自根据权利要求 25 所述的基因修饰的动物或衍生自根据权利要求 24 所述的基因修饰的动物后代。

33、根据权利要求 32 所述的细胞，其中，所述的细胞是一种生殖细胞。

34、一种细胞系，其衍生自根据权利要求 24 所述的基因修饰的动物或衍生自根据权利要求 24 所述的基因修饰的动物后代。

35、一种基因修饰非人类动物的方法，其包括下列步骤：

通过至少一种非脂质体基底的连接子将至少一种聚核苷酸分子连接至非人类的精细胞；

用通过所述的非脂质体基底的连接子与所述的至少一种聚核苷酸分子连接的非人类的精细胞，使非人类的卵细胞在生物体外或生物体内有效地受精。

36、根据权利要求 35 所述的方法，其中，所述的连接发生在生物体外或生物体内。

37、根据权利要求 35 所述的方法，其中，所述的非脂质体基底的连接子还含有一种多肽。

38、根据权利要求 37 所述的方法，其中，所述的多肽是一种蛋白质。

39、根据权利要求 37 所述的方法，其中，所述的非脂质体基底的连接子是连接于非人类精细胞的外表面。

40、根据权利要求 35 所述的方法，其中，所述的非脂质体基底
的连接子是一种精子专一性的连接子。

41、根据权利要求 35 所述的方法，其中，所述的非脂质体基底
的连接子是一种免疫球蛋白。

42、根据权利要求 35 所述的方法，其中，所述的非脂质体基底
的连接子是一种抗体。

43、根据权利要求 35 所述的方法，其中，所述的至少一种聚核
苷酸分子是一种 DNA 分子。

44、根据权利要求 43 所述的方法，其中，所述的 DNA 分子能
为基因产物进行编码。

45、根据权利要求 44 所述的方法，其中，所述的基因产物是一
种 RNA 分子。

46、根据权利要求 44 所述的方法，其中，所述的基因产物是一
种蛋白质。

47、根据权利要求 35 所述的方法，其中，所述的非脂质体基底

的连接子与所述的至少一种聚核苷酸分子通过分子间的相互作用而发生相互作用，该分子间的相互作用包括离子相互作用、共价相互作用、范德瓦相互作用以及配体-受体间的相互作用。

48、一种生产较天然的非人类动物生长快速的非人类动物的方法，其包括下列步骤：

通过至少一种非脂质体基底的连接子，将至少一种聚核苷酸分子结合至非人类的精细胞，其中，所述的至少一种聚核苷酸分子能为促生长素进行编码；

用通过所述的至少一种非脂质体基底的连接子与所述的至少一种聚核苷酸分子连接的非人类精细胞，在生物体外或生物体内使非人类的卵细胞有效地受精，以形成一胚胎；以及

使该胚胎发育成一种动物。

49、一种生产抗疾病或抗病原体的非人类动物的方法，其包括下列步骤：

通过至少一种非脂质体基底的连接子将至少一种聚核苷酸分子结合至非人类的精细胞，其中，所述的至少一种聚核苷酸分子能为基因产物进行编码，该基因产物赋予疾病抗性或病原体抗性；

用通过所述的至少一种非脂质体基底的连接子与所述的至少一种聚核苷酸分子连接的非人类精细胞，在生物体外或生物体内使非人类的卵细胞有效地受精，以形成一胚胎；以及

使该胚胎发育成一种动物。

50、一种生产蛋白质的方法，其包括下列步骤：

通过一种非脂质体基底的连接子将至少一种聚核苷酸分子结合至非人类的精细胞，其中，所述的至少一种聚核苷酸分子能为一种蛋白质进行编码，该蛋白质可专一性地生产于非人类动物的乳汁中；

用通过所述的至少一种非脂质体基底的连接子与所述的至少一种聚核苷酸分子连接的非人类精细胞，在生物体外或生物体内使非人类的卵细胞有效地受精，以形成一胚胎；

使该胚胎发育成一种动物；以及

收集由成熟的该非人类动物所生产的乳汁。

51、动物-人类外源性的移植方法，其包括下列步骤：

通过至少一种非脂质体基底的连接子将至少一种聚核苷酸分子结合至非人类的精细胞，其中，所述的至少一种聚核苷酸分子能为一种基因产物进行编码；

用通过所述的至少一种非脂质体基底的连接子与所述的至少一种聚核苷酸分子连接的非人类精细胞，在生物体外或生物体内使非人类的卵细胞有效地受精，以形成一胚胎；

使该胚胎发育成一种动物；以及

通过手术由该非人类动物移出一器官，以移植至人类，其中，被所述的至少一种聚核苷酸分子所编码的基因产物，赋予人体移植后的

耐受性。

用于基因修饰非人类动物的新载体

技术领域

本发明涉及非人类动物的基因修饰领域。

背景技术

在过去的二十年间，对动物进行有效的基因修饰，特别是对较高等的哺乳动物进行基因修饰，已成为生物科技领域研究者的主要目标。动物的基因修饰，不仅可增进人类对多细胞生物之基因及基因功能的了解，也可应用于生物农业之中。这类应用的实施例包括生产具有所需特征的家畜，例如较快的生长速率、在乳汁中生产治疗性蛋白质，或甚至由动物生产用于动物至人类的、可用于外源性移植（xenotransplantation）的、更“人类化”的器官。

现有修饰基因组的技术包括将外来 DNA 显微注射至受精卵的前核（pronuclei），经由脂质基底的试剂、电穿孔或病毒感染，将外来 DNA 在生物体外传送至胚胎干细胞，或在生物体内传送至叶细胞（blastomere）中。然而除老鼠之外，目前所发表的报告在较高等或较大动物上的成功仍属有限，例如曾有报告指出显微注射技术的要求非常苛刻，要求使用高灵敏度及昂贵的设备；也曾报道显微注射的胚胎存活率极低（Wall R.J.等人（1992），Making Transgenic Livestock,

Genetic Engineering on a Large Scale, *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol.49, pp.133-120)。这使得该领域的研究者去寻找替代的、较容易将基因传送入细胞的方法。

1989 年, Lavitrano, M.等人报道将外来 DNA 在老鼠精细胞中进行简单地培养, 并在体外有效受精, 可生产出基因上修饰的老鼠 (Lavitrano, M.等 (1989), *Sperm Cells as Vectors for Introducing Foreign DNA into Eggs-Genetic Transformation of Mice, Cell*, Vol.57, pp.717-723)。其特征相当于生物技术中之“冷融合”, 该报告在此领域中产生相当大的鼓舞 (Birnstiel, M.等 (1989), *Dangerous Liaisons: Spermatozoa as Natural Vectors for Foreign DNA, Cell*, Vol.57, pp.701-702)。然而, 据报道, 本领域的熟练人员至今仍对 Lavitrano 的报告有所质疑, 因为许多该领域的研究者报道无法重复该实验 (Brinster, R.等 (1989), *No Simple Solution for Making Transgenic Mice, Cell*, Vol.59, pp.239-241; Smith, K.(1999), *Sperm Cell Mediated Transgenesis: A Review, Animal Biotechnology*, Vol.10(1&2), pp.1-13)。

过去十年间, 对于使用精子细胞作为将基因转移至动物媒介载体的探索仍持续进行。研究者已阐明精子细胞具有将外来 DNA 内化 (internalize) 的固有能力 (Francolini, M.等(1993), *Evidence for Nuclear Internalization of Exogenous DNA into Mammalian Sperm Cells, Mol. Reprod. Devel.*, Vol.34, pp.133-139)。但存在于精液中的某些抑制因子可抑制这种接收 DNA 的能力 (Lavitrano, M., 等 (1992), *The Interaction Between Exogenous DNA and Sperm Cells, Mol. Reprod.*

Devel., Vol.131, pp.161-169)。此外，导入精细胞的外来 DNA 也可能经历大规模的 DNA 重排，因为在成熟的精细胞中，外来 DNA 的内化可活化这些细胞内某些内源性核酸酶（Maione, B.等（1997），Activation of Endogenous Nucleases in Mature Sperm Cells upon Interaction with Exogenous DNA, *DNA and Cell Biology*, Vol.16, pp.1087-1097）。这种重排可使利用此技术的基因上修饰的动物变为无用。

其它以精细胞作为载体的工作集中在使用脂质基底的试剂或电穿孔法将外来 DNA 传送入精细胞中（Smith, 同前；Rottamn R. 等（1996），Liposome-mediated Gene Transfer via Sperm Cells. High Transfer Efficiency and Persistence of Transgenes by Use of Liposomes and Sperm Cells and a Murine Amplification Element, *Journal of Animal Breeding and Genetics*, Vol.113, pp.401-411；PCT Publications WO 99/42569、WO 99/40213 及 WO 97/11597）。这种方法可能也会遭遇 DNA 内化以及暴露在可引起所导入的外来 DNA 重排的核酸酶中的问题。此外，脂质基底的试剂通常具有毒性，且电穿孔需要大量的试验以免精细胞的死亡或丧失活动力。其它技术集中于利用重组病毒的感染，如 PCT Publication WO 99/38991 中所述，或利用具有微载体（micro-carrier）的“基因枪”，如 PCT Publication WO93/24626 中所述，以将外来的 DNA 导入精细胞中。这类技术可能在技术本身上具有挑战性，而且也可能影响精细胞的存活力及活动力；其同样也可能遭遇 DNA 内化以及暴露在可引起所导入的外来 DNA 重排的核酸

酶中的问题。

自 1989 年以来，研究者发表报告，论述在不同动物中使用精细胞作为载体，这些动物包括昆虫、海洋动物、两栖动物、鸟类及哺乳类（Smith, 同前）。然而，很少有人报导此类基因修饰是在活的成熟幼体中观测到的（Smith, 同前）。更有问题的事实是一些报告仅使用 PCR 分析来确认细胞中外来 DNA 的存在。这些报告整理于 Gandolfi, F. 的表一中（（1998），Spermatozoa, DNA Binding and Transgenic Animals, *Transgenic Research*, Vol.7, pp.147-155）。因为 PCR 不能区分外来基因的传送是通过附加体（episome）还是通过染色体 DNA，Gandolfi 质疑这些报告的价值，声称其“展开了一场关于合理评价某些报告所描述的结果的重要辩论”（Gandolfi, 同前）。附加体的传送不如染色体传送受欢迎，因附加体可能于随后的细胞分裂中丧失，且所需要的基因修饰的效果可能无法在成年动物中得以表达。

由于基因修饰动物特别是高等哺乳动物的简易、无毒及有效的方式，可大幅度改善该领域，因而需要一种使用精细胞传送基因至动物的新方式。

发明的概述

本发明是关于一种载体及其在生产基因上修饰的动物及细胞的用途。一方面，本发明涉及一种载体，其含有一个精细胞及一个或多个通过一个或多个非脂质体基底的连接子结合于精细胞的聚核苷酸分子。精细胞可以是任何动物的精细胞，优选非人类动物的精细胞。

在本发明的一优选实施方案中，该一个或多个聚核苷酸分子可以对能将预期特征赋予细胞或动物的基因产物进行编码（encode）。在本发明的另一优选实施方案中，所述的连接子是一种蛋白质或多肽，优选为具有精子专一性、如可与精细胞之外表面结合的抗体。连接子优选借助离子作用力与一个或多个聚核苷酸分子发生相互作用。此类相互作用亦可借助不同的分子间相互作用来进行，包括使用另一或第二连接子。精子、连接子和一个或多个聚核苷酸的结合（association）亦可发生在生物体外或生物体内。

另一方面，在本发明中，可以由具有上述载体的动物卵细胞受精而衍生出基因上修饰的细胞或动物。受精可发生在生物体外或生物体内。在一优选的具体实施方案中，基因修饰的发生是因聚核苷酸分子全部或部分地整合（integrating）至细胞或动物的基因组中。本发明的又一方面涉及衍生（derive）自此类基因上修饰的动物或其后代的细胞如精细胞或卵细胞以及细胞系。

再一方面，在本发明中，通过利用上述精子载体得到的基因上修饰的动物拥有某些所需特征。这些特征实施例包括较快的生长速率、抗疾病或抗病原体能力、在乳汁中某些蛋白质的高产率以及适合动物至人类外源性移植的器官。

图示的简要说明

图 1 是本发明一具体实施方案的基本步骤的图形表示。

图 2 所示为本发明一具体实施方案中，将精子专一性的（sperm-

specific) 抗体结合至老鼠精细胞的流动细胞计结果。

图 3 所示为本发明一具体实施方案中, 将精子专一性的抗体结合至猪的精细胞的流动细胞计结果。

图 4 所示为本发明一具体实施方案中, 将精子专一性的抗体结合至牛的精细胞的流动细胞计结果。

图 5 所示为本发明一具体实施方案中, 将精子专一性的抗体结合至鸡的精细胞的流动细胞计结果。

图 6 所示为本发明一具体实施方案中, 将精子专一性的抗体结合至山羊的精细胞的流动细胞计结果。

图 7 所示为本发明一具体实施方案中, 将精子专一性的抗体结合至绵羊的精细胞的流动细胞计结果。

图 8 所示为 pCMV- β 的质粒图谱。

图 9 所示为结合至 pCMV- β 质粒的、精子专一性抗体的琼脂糖胶体分析。

图 10 所示为用于检测根据本发明一具体实施方案进行基因修饰的老鼠胚胎所分离出的基因组 DNA 中 pCMV- β 序列的 PCR 分析结果。

图 11 所示为用于检测在老鼠尾巴基因组 DNA 中的 B 型肝炎表面抗原基因序列并根据本发明一具体实施方案将此基因序列整合入老鼠染色体的 DNA 印迹法 (southern-blot) 分析结果。

图 12 所示为 pSEAP-2 对照组的质粒图谱。

图 13 所示为用于检测由根据本发明一具体实施方案的基因上修饰的猪的尾巴组织所分离的基因组 DNA 中的 pSEAP-2 对照组质粒序

列的 DNA 印迹分析结果。

图 14 所示为由四只基因上修饰的猪、根据图 13 色带的密度测定强度所得的 pSEAP2 对照组质粒的复制数。

图 15 及 16 所示为根据本发明一具体实施方案的基因上修饰的猪的血清中所分泌的碱性磷酸酶的酶分析结果。

发明的一般性说明

一般而言，图 1 是显示涉及利用本发明一具体实施方案，使用一种精子载体对细胞或动物进行基因上修饰的基本步骤。简言之，以本领域已知的方法收集动物精子细胞 10，或由商业来源例如于 Ohio, West Manchester 的 Birchwood Genetics 购得动物精子细胞 10，并与连接子 20 结合在一起。此类连接子优选为抗体或 IgG、IgA 或 IgM 型的免疫球蛋白，但其亦可为其它化合物，例如肽类、糖蛋白、碳水化合物或其它化合物连接子。此类连接子通过不同的分子相互作用结合或连接至精细胞的外表面，这些分子间相互作用可以是离子相互作用、共价键、范德瓦力或配体-受体相互作用等。之后，环形或线形 DNA 分子 30 也是通过不同的分子相互作用结合或连接到精子-连接子复合物的连接子上，如通过离子相互作用、共价键、范德瓦力或配体-受体相互作用等。这些 DNA 分子可能能为某些基因产物进行编码，但其亦可能为断裂的基因，其与内源性 (endogenous) 基因同源，可再结合至染色体而淘汰一种基因。所生成的精子-连接子-DNA 复合物 40 可再用于进行生物体外或生物体内的受精。随着受精，该 DNA

可导入受精卵 50 及胚胎 60 中并可整合插入染色体内,成为动物或细胞的基因物质的一部份。

或者,该精子-连接子-DNA 复合物的结合、偶合、连结、连接或相连亦可在生物体内完成。首先,可在生物体外将连接子与 DNA 偶合或结合在一起。之后,将此连接子-DNA 复合物直接或间接注入雄性动物的睾丸中。PCT Publications WO 99/40213 及 WO 97/11597 公开了将 DNA 注入睾丸的步骤,此处将之列为本发明的参考文献。

连接子-DNA 复合物的一个实例是连接于 DNA 分子的抗体,该抗体可专一性地辨识精细胞表面上某些抗原决定部位 (epitope)。因为裸 DNA 的酸性特征,故其可与具有碱性或带正电性的抗体进行离子连接、结合或偶合。然而,DNA-连接子的相互作用不限于离子作用力。该复合物亦可借助本领域中熟知的方法,用 UV 光进行交联而形成共价键。DNA 及连接子亦可借助本领域中熟知的方法加以修饰。例如,所述的 DNA 可借助于 PCR 反应中添加生物素化的去氧核苷酸而予以生物素化;所述的抗体可经修饰或购买与链霉抗生物素蛋白相连者,其与 DNA 上的生物素紧密结合;或经链霉抗生物素蛋白修饰且可辨识第一个抗体的第二抗体,亦可作为经修饰的 DNA 与第一连接子之间的第二连接子。

若将 DNA-连接子复合物注入动物的睾丸中,则此复合物可寻得精子细胞并与之结合。接着可经由雄性或雌性的自然交配或借助收集到的精细胞对雌体进行人工受精而在生物体内发生受精。收集到的精细胞也可使用生物体外的受精技术,其本领域中已经熟知。另一方面,

若在生物体外将精子-连接子-DNA 复合物结合成一体,则可借助生物体外的受精技术完成受精。受精卵及所产生的胚胎可再移植至代理动物孕母使之发育。或者,以已熟知的人工授精法或将精子-连接子-DNA 复合物直接注入雌性动物的输卵管中,亦可在生物体内完成受精。

一般而言,经修饰的动物可提供许多用途。家畜、家禽或鱼类可嵌入可编码成长激素的基因,以使之较正常者生长更快;或其亦可嵌入促生长素基因,以增加肌肉生长并减少脂肪组织(Pursel, V.G.等人(1089) Genetic Engineering of Livestock, *Science*, Vol.224, pp.1281-1288; Etherton, T.D. 等(1993) Mechanism by which Somatotropin Decreases Adipose Tissue Growth, *American Journal of Clinical Nutrition*, VOL. 58 (Supp.), pp.287S-295S)。插入的基因如可促进免疫系统的干扰素,或其它基因如可对病毒、朊病毒(prion)或细菌性蛋白质进行编码的基因,亦可使此类家畜、家禽或鱼类具有疾病抗性 or 病原体抗性。感染性病原体的实例包括沙门氏菌、流行性感冒病毒、疯牛病的朊病毒蛋白等。或者,导入可对反义 RNA 分子进行编码的 DNA,而这些反义 RNA 分子可互补于此类病毒、朊病毒或细菌的 RNAs,从而亦可抑制来自这些 RNA 的蛋白质翻译和生产,由此可限制感染性病原体的生长和散播。

此外,在生产制衣原料如毛及丝的动物中,包括昆虫例如蚕,若插入能产生限制速率的氨基酸的生化酶的基因,则可增加此类原料的产率。例如,对于绵羊,半胱氨酸会限制羊毛的产率。插入可为丝氨

酸转乙酰酶及 O-乙酰丝氨酸硫基酶进行编码的细菌性基因，可增加丝氨酸及乙酰-CoA 转换成半胱氨酸的转换率，从而增加羊毛的产量（Ward, K. (1991), The Application of Transgenic Techniques for the Improvement of Domestic Animal Productivity, *Current Opinion in Biotechnology*, Vol.2, pp.834-839）。

而且，此类基因修饰的动物亦可在其乳汁中生产治疗性蛋白质，例如胰岛素、生长激素、干扰素、红血球生成素、菌落刺激因子（GM-CSF）、t-PA 或因子 VIII，其通过将此类蛋白质的基因，与来自乳腺专一性基因的启动子如绵羊的 β -乳球蛋白、老鼠的乳清酸蛋白或牛的 α -S1 酪蛋白质相连接而实现（同上）。另一方面，动物的乳汁亦可以通过添加人类化的蛋白质而得以强化，例如人类乳铁素，其可增强婴儿的肠内铁质吸收（Lonnerdal, B.(1996), Recombinant Human Milk Proteins-An Opportunity and a Challenge, *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol.63, pp. 622-626）。在动物至人类的外源性移植中，通过利用如人类蜕变加速因子，基因修饰的猪可成为更“人类化”的器官的来源（Cozzi, E.等（1994），Expression of Human Decay Accelerating Factor in Transgenic Pigs, *Transplantation Proceedings*, Vol.26, pp. 1402-1403）。

上述引用的文件均作为本发明的参考文献。

下列实施例表明本发明者已利用上述的精子载体生产许多基因上修饰的动物。所使用的分子遗传、流动细胞计、抗体生产、杂交瘤技术、生物体外受精、胚胎操作及人工授精的方法，虽未在本公开明

确说明，但已在科技文献中有充分的报道。此类方法是本领域者人员所熟知的。

实施例 1

本实施例是说明对精细胞具有专一性的抗体的制备。

将收集自雄鼠的精细胞注射回老鼠作为抗原，以免疫并产生对精子表面抗原有反应的抗体。利用流动细胞计来筛选采用普通杂交瘤技术发展出的单株抗体，以鉴别可结合至一系列不同动物（老鼠，猪，牛，绵羊，山羊及鸡）的候选抗体。简言之，将精细胞与不同的初级单株抗体一起培养、洗涤，并进一步与可专一性辨识老鼠免疫球蛋白的次级抗体一起培养。此类次级抗体为商业上可得并于本领域中被熟知，其具有荧光分子，例如荧光素或若丹明结合于其上。一旦此次级抗体经结合并洗涤，则流动细胞计仪器或 FACS 分类机可于裸精细胞中，计算出与初级及次级抗体结合的荧光精细胞数目。

图 2-7 显示出此类分别结合至老鼠、猪、牛、鸡、山羊及绵羊的 mAbc 的流动细胞计分析结果。Y-轴相当于所检测的精细胞数，而 X-轴为结合至细胞的相对荧光强度。斜线的波峰代表对照反应，其中精细胞仅与荧光性抗-老鼠免疫球蛋白抗体一起培养。另一方面，阴影的波峰代表的反应是将 mAbc 抗体与次级抗体分别与相应的老鼠、猪、牛、鸡、山羊及绵羊的精细胞一起培养。波峰往右移动代表 mAbc 抗体的正结合。

如图 2 中所示，与仅与荧光性次级抗体一起培养的小区相比，与

mAbc 抗体及荧光性次级抗体一起培养的老鼠精细胞可测得较大的荧光信号。类似地，在图 3 及 4 中，较大的荧光信号可分别由与 mAbc 抗体及荧光性次级抗体一起培养的猪和牛精细胞测得，其可由右侧的阴影波峰证明。

在图 5 中，将荧光性抗体单独与鸡精细胞一起培养，并不在此类精细胞中产生任何可测得的荧光性。反之，右边波峰代表已连接 mAbc 抗体的鸡精细胞内的荧光度。图 5 亦显示鸡精细胞的一些族群无法表现出可被 mAbc 辨识的抗原，其可由左边的阴影波峰证明。

在图 6 中，可由与 mAbc 抗体及荧光性次级抗体一起培养的山羊精细胞测得荧光度，其可由右边两个阴影波峰证明。左边的阴影波峰可代表山羊精细胞的族群，其比右边波峰的族群表现较低量的可被 mAbc 辨识的抗原。对比在图 5 中的仅与荧光性次级抗体一起培养的鸡精细胞，抗-老鼠免疫球蛋白荧光性抗体似乎亦结合于山羊精细胞，但比作为连接子的 mAbc 之量低许多。

类似地，在图 7 中，可由与 mAbc 抗体及荧光性次级抗体一起培养的绵羊精细胞测得荧光度，其可由右边的阴影波峰证明。波峰的分布再次代表不同的精细胞具有不同量的、可由 mAbc 辨识的抗原。

如图 2、3、4、6 及 7 中所示，哺乳类精细胞可以较低的浓度结合于荧光次级抗体上。因为次级抗体是针对不存在于鸡精细胞的老鼠免疫球蛋白，其亦可对位于精细胞表面的其它哺乳类蛋白质具有交叉作用性（图 5）。然而，因 mAbc 的添加而造成荧光波峰的移动，明白地证实 mAbc 抗体对不同动物的精细胞有较高的亲和力。

实施例 II

本案例是说明单株抗体 mAbc 通过离子作用力结合至 DNA 分子的能力。

将浓度为 0.5 毫克/毫升的纯化 mAbc 溶液以不同体积加至含有 300 毫微克之经 *Sal I* 切割的 pCMV- β 质粒的 DNA 溶液中（图 8，Clontech Laboratories, Inc., Cat.#6177-1）。将该混合物于室温下培养 40 分钟后，将该混合物加载到常规的百分之一的琼脂糖胶体上，并于 20 毫安培下分离 1 小时。随后，将 DNA 以 Ethidium Bromide 染色并于 UV 灯下观察。

在图 9 中，第 1、2 及 8 道为对照组，其中，第 1 道为经 *Sal I* 切割的纯 pCMV- β 质粒，第 2 及 8 道为在经修饰的 Tyrode' s 培养基中经 *Sal I* 切割的 pCMV- β 质粒。第 3、4、5、6 及 7 道分别为将经 *Sal I* 切割的 pCMV- β 与相应的浓度为 0.5 毫安/毫升的 mAbc 溶液 0.2 微升、1 微升、2.5 微升、6 微升及 10 微升一起培养的实验性反应。在第 5、6 及 7 道中，保留在胶体的孔槽中的 DNA 量增加，显示带正电荷的抗体与带负电荷的质粒 DNA 相结合，使其净电荷为零，使得该复合物不再对胶体内的电场有所反应。

实施例 III

本实施例说明 DNA 通过连接子或抗体结合或偶合至精子上。

利用标准末端标示技术，将 DNA 分子以 T4 DNA 聚合酶标示 P^{32} ，将其与老鼠、猪、鸡、绵羊、山羊及牛精细胞，与 mAbc、mAbD 或

对照的对果蝇（*Drosophila*）蛋白具有专一性的抗体一起培养。借助闪烁计数器测量 DNA 结合量。精细胞与抗体的比例如下：

老鼠----400,000 个精细胞对 600 毫微克的经标示的 DNA；

猪-----600,000 个精细胞对 800 毫微克的经标示的 DNA；

鸡-----300,000 个精细胞对 500 毫微克的经标示的 DNA；

绵羊----1,000,000 个精细胞对 500 毫微克的经标示的 DNA；

山羊----1,000,000 个精细胞对 500 毫微克的经标示的 DNA；

牛-----1,000,000 个精细胞对 500 毫微克的经标示的 DNA。

表 1 显示出在 mAbc 和 mAbD 的存在下，与无抗体或加入对果蝇（*Drosophila*）蛋白具有专一性的抗体者相比，精细胞对经标示的 DNA 的结合显著地较多。反应 1 及 2 仅含精细胞及经标示的 DNA，而反应 3 及 4 含有对果蝇（*Drosophila*）蛋白具有专一性的抗体及精细胞及经标示的 DNA。反应 5 含 mAbD，而反应 6 及 7 含 mAbC 与精细胞及经标示的 DNA。

表 1

反应		老鼠 (cpm)	猪 (cpm)	鸡 (cpm)	绵羊 (cpm)	山羊 (cpm)	牛 (cpm)
1	无抗体	12471	12971	5830	15367	17749	12766
2	无抗体	15814	13713	6383	13259	16574	14398
3	对照抗体	11541	10531	N/D	14018	155347	15351
4	对照抗体	13653	14038	N/D	12834	15997	13918
5	mAbD	18900	16220	10314	N/D	N/D	N/D
6	mAbC	18139	16269	7294	19368	20385	20417
7	mAbC	19314	17343	9865	18437	19543	18643

N/D=未测出

实施例 IV

本实施例说明生产基因上修饰的老鼠的过程。

从 9 至 20 周大小的 FVB 雄鼠的切开副睾中采集精细胞。将此类副睾组织切成小片，在 300 微升的 pH 7-8 的经修饰的 Tyrode's 培养基中培养 1 小时，以使精子进入培养基中。一旦在 300 微升培养基中收集到精子后，随即于 37C 下对 100 万个精细胞加入 5 毫克的连接子抗体 1 小时。用 300 微升经修饰的 Tyrode's 培养基洗涤 3 次上述精子-连接子复合物，利用标准微量离心法于 3000 rpm 下离心一分半钟。最后将精子-连接子复合物再悬浮于 300 微升培养基中，加入 1 毫

克的直线化 pCMV- β 质粒或可转译出 B 型肝炎表面抗原 (HbsAg) 的质粒, 并培养 1 小时。

为了采集排出的卵, 使每只 9 至 20 周大小的 FVB 雄鼠在采集日四天前注射 5 I.U. 的怀孕母马血清 (PMS), 并于采集日两天前注射 5 I.U. 的人类绒毛膜促性腺激素 (hCG)。将由堆积细胞围绕的切开排出之卵于室温下置于含一滴经修饰的 Tyrode's 培养基的 35-毫米培养皿中。随后, 直接在排出之卵加入 300 微升上述制备的精子-连接子-DNA 复合物。将全部混合物于 37°C 下以 CO₂ 平衡并于顶部加入矿物油防止蒸发。于 37°C 下在生物体外受精 4 小时后, 以毛细管采集受精卵并以 CZB 培养基洗涤三次。在转移至假性妊娠雌鼠的输卵管前, 将胚胎进一步于 300 微升 CZB 培养基中培养 20-22 小时。

为了确认 pCMV- β 质粒的存在, 在移植入假性妊娠雌鼠十天后, 由胚胎分离出的 DNA 进行 PCR 分析, 其利用可检测对应于 pCMV- β 质粒 CMV 启动子区的 480 bp 片段的引物 (图 8)。在图 10 中, 第 6、7、8、9、10、12、13、14、15、17、18、19、24、33 及 40 道明显地显示出此 480 bp PCR 片段。第 1 及 21 道为分子大小标示剂。

为确认 HBsAg 质粒插入老鼠基因组中, 进行 DNA 印迹分析。将老鼠尾巴分离出的基因组 DNA 水解, 在胶体上分离, 根据本领域中已知方法转印至尼龙膜上。图 11 显示使用与 HBsAg 互补的探针序列的 DNA 印迹杂化结果。第 1-13 道含有来自接受以上精子-连接子-DNA 复合物受精胚胎之假性妊娠鼠所生的老鼠的基因组 DNA; 第

C1-C7 道含有来自未经处理或非转基因老鼠的基因组 DNA。第 4、5 及 8 道显示出 HBsAg 序列插入至老鼠基因组的阳性横带，因此，证实 13 只老鼠中有三只只是基因上修饰过的。

实施例 V

本实施例说明生产基因上修饰的猪的步骤。

利用动物饲养技术中已知的一般方法收集猪所射出的精细胞。将其悬浮于 1 毫升的猪增量培养基（购自德国 Merck, Ref.N.R. 13151/0001-用于公猪的稀释混合物 M3），将一千五百万个精细胞与 5 毫克连接子抗体于室温下培养 40 分钟，其间加以间歇性振荡。用猪增量培养基（extender medium）将精子-连接子混合物洗涤一次，并将该混合物再悬浮于 1.5 毫升相同的培养基后，加入 5 毫克 pSEAP2-对照质粒（图 12, Clontech Laboratories, Inc., Cat. #6052-1），于室温下与该混合物培养四十分钟。直接将所生成的精子-连接子-DNA 复合物 200 微升注入被麻醉的雌猪输卵管中，使其体内受精。

在猪出生并长至 70 天后，分析其 pSEAP2-对照质粒的存在。图 13 显示由此类猪的尾部组织所分离出的基因组 DNA 的 DNA 印迹分析。简言之，将自此类猪分离出的基因组 DNA 水解，在胶体上分离，按本领域中已知方法转印至尼龙膜上。再用图 12 中所示的、pSEAP2-对照质粒的 Not I 至 BamH I 区域的、经标示的序列来探测该 DNA 印迹。在图 13 中，M 代表标示物，且 1-43 代表所分析的猪的号码。于

第 5、17、19、25、26、27、28、30、36、38、39 及 40 道中的杂化 (hybridization) 信号表明 pSEAP2-对照质粒已插入相应猪的基因组中。在图的右下半边, 八条道具有增加的 pSEAP2-对照质粒分子复制数者 (1、2、2、4、4、8、16 及 32) 亦与来自实验猪只的 DNA 一起载入胶体上。此八条道用以根据横带的密度测定强度来估算插入的猪只的 pSEAP2-对照质粒复制数 (图 14)。如图 14 中所示, S5 具有最高强度, 其对应于图 13 的第 5 道。

在另一研究中, 也在 70 天大小的基因修饰猪中, 检测由 pSEAP2-对照质粒所表达的分泌性碱性磷酸酶 (SEAP)。收集此类猪只的血清并利用 Clontech's Great EscAPE™ SEAP 化学荧光检测套组 (Cat. #K2041-1) 及其方法分析 SEAP 活性, 在此, 其作为本发明的参考文献。由 Clontech's pSEAP-2 载体所表达的 SEAP 酶具有热稳定性。因此, 为测定与猪的内源性碱性磷酸酶活性相反的 SEAP 活性量, 该分析在添加化学荧光基质前, 需先将样品于 65℃ 下加热三十分钟, 以将内源性碱性磷酸酶去活化。作为对照, 图 15 显示未进行热去活化步骤的分析结果。基因上修饰猪及非-转基因对照猪之间的总碱性磷酸酶活性无显著差异。反之, 图 16 显示了进行此热去活化步骤的结果。在没有内源性碱性磷酸酶的活性下, 基因上修饰猪的 SEAP 活性显著高于非转基因对照猪的活性。因此, pSEAP2-对照质粒确实已插入猪的基因组并可表达 SEAP 酶。

前述实施例证实本发明利用上述的精子载体可以生产许多基因上

修饰的动物。但这些数据仅作为实施例，并非将本发明限制为这些实施例。可以理解，下述对实施例的改进并未脱离本发明的精神。

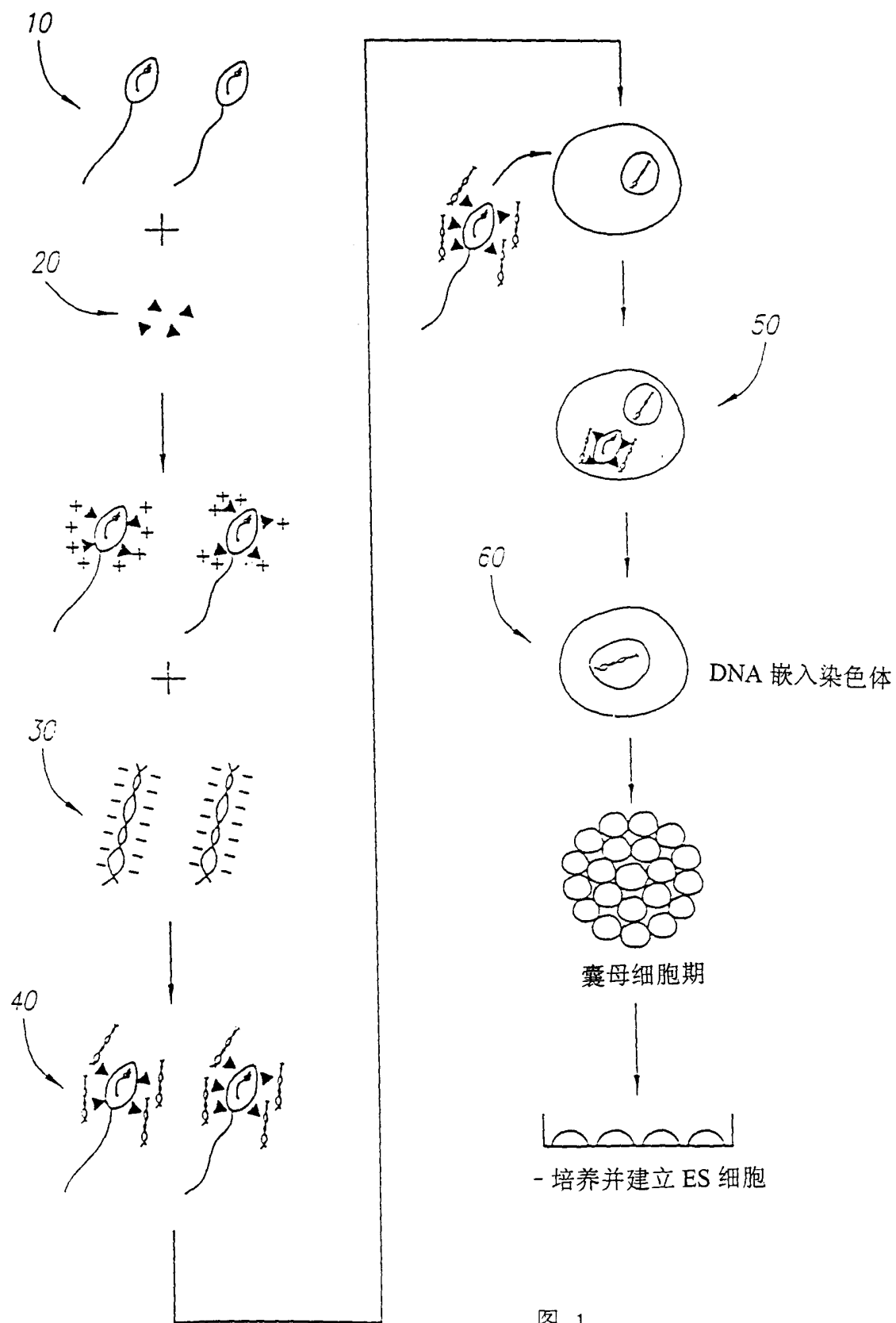


图 1

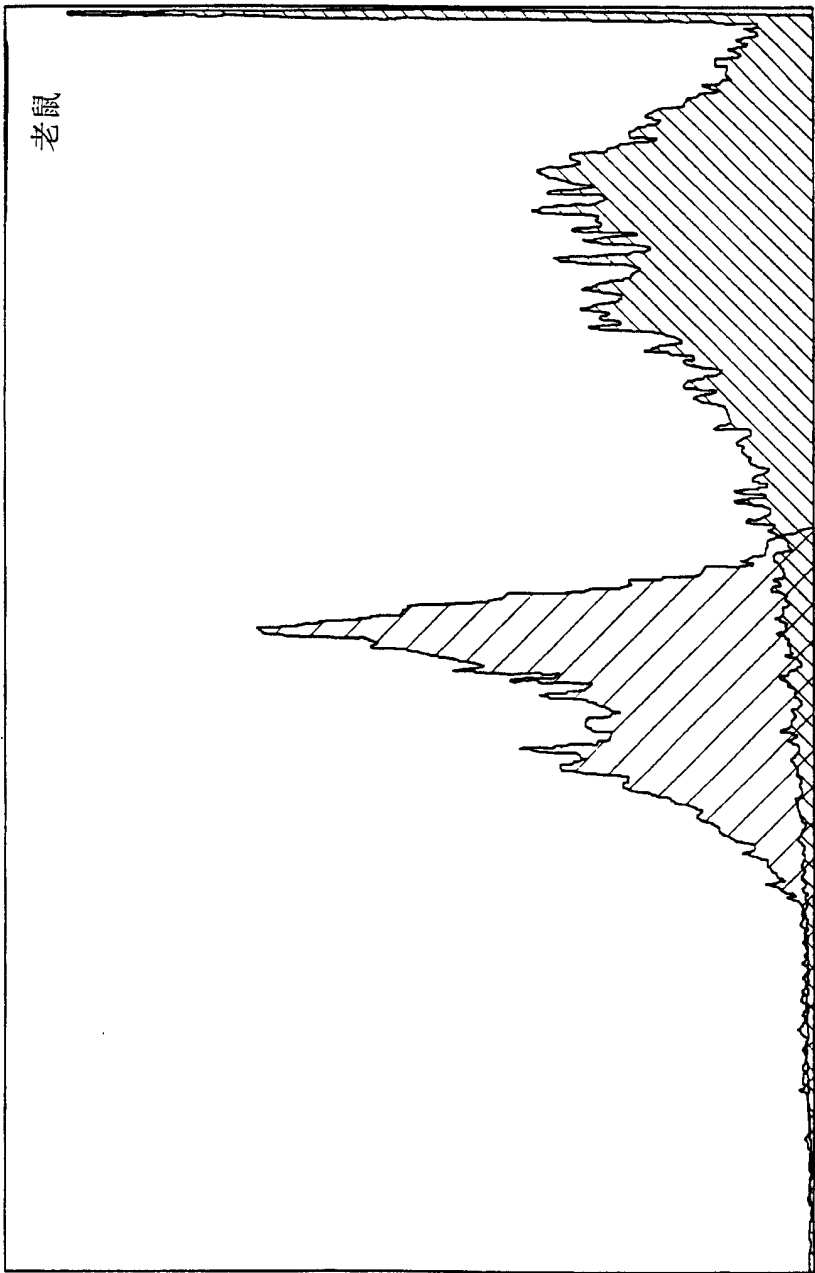


图 2

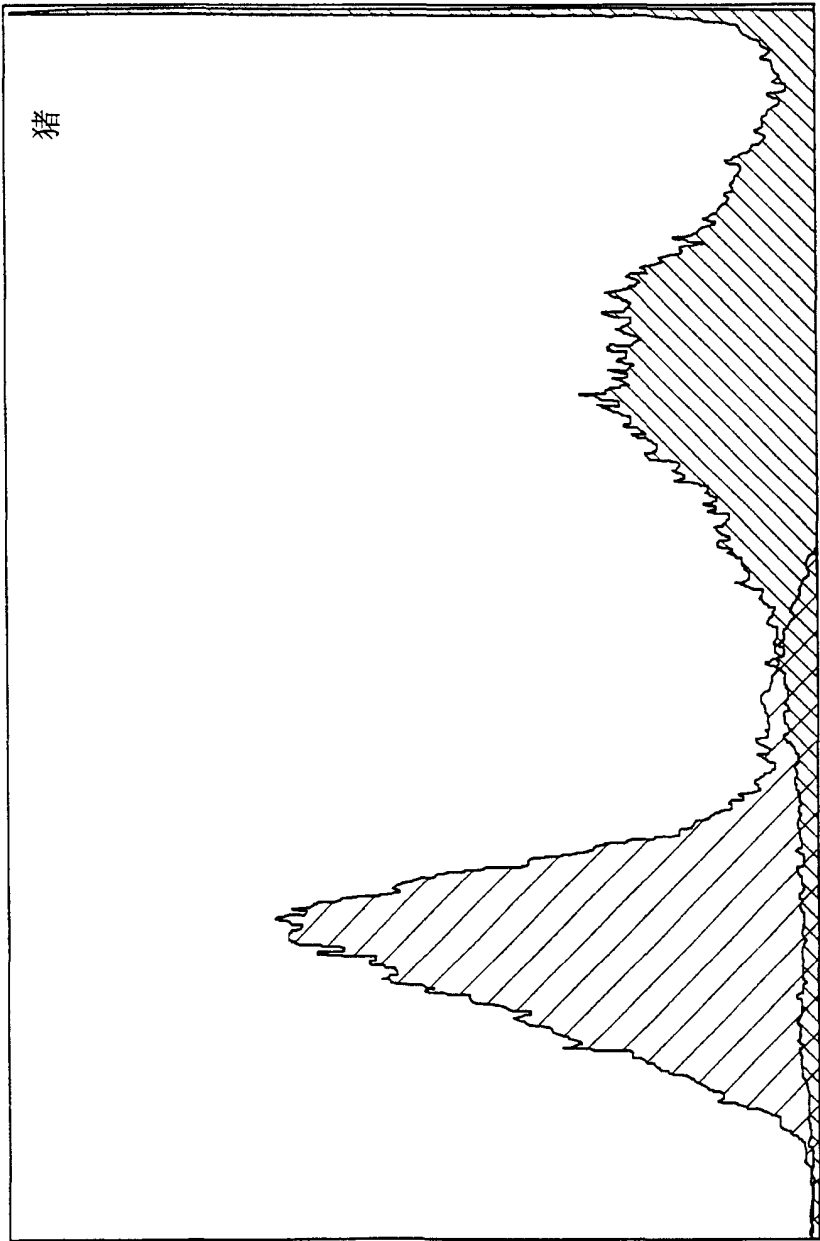


图 3

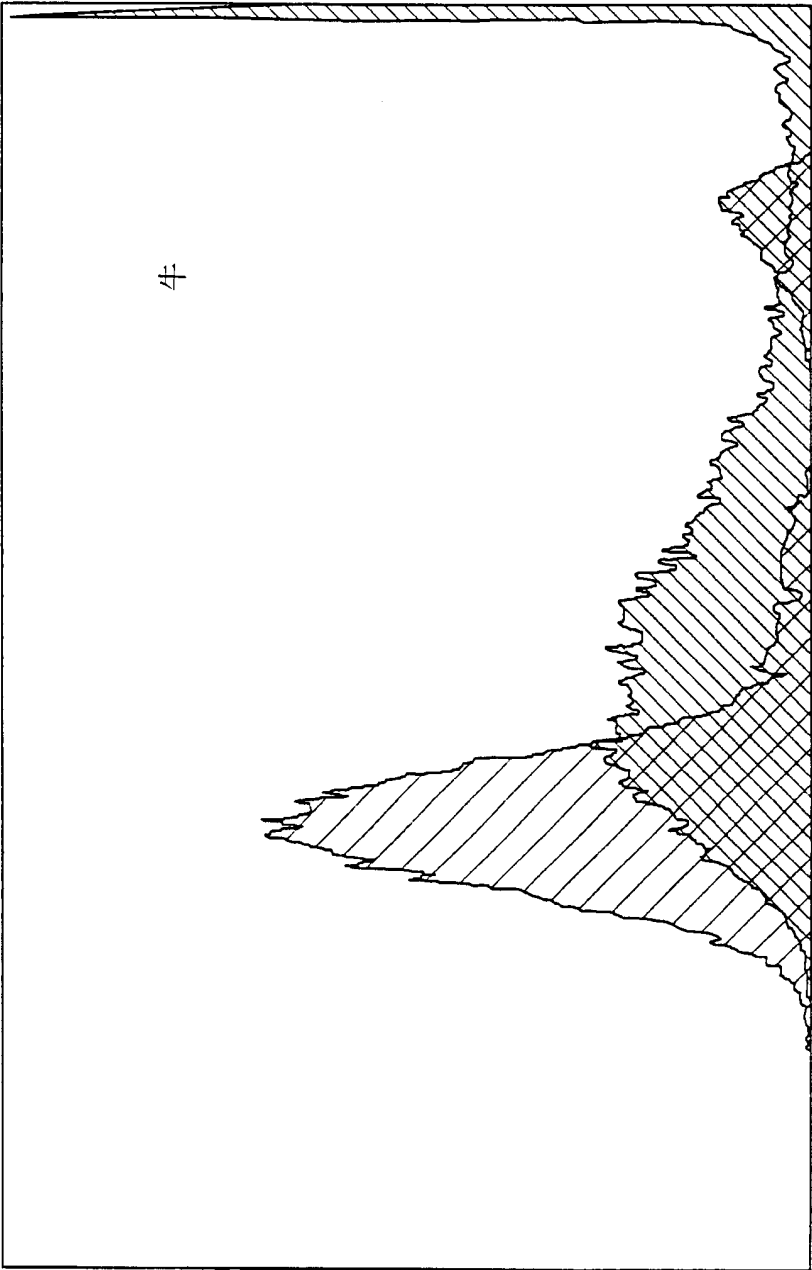


图 4

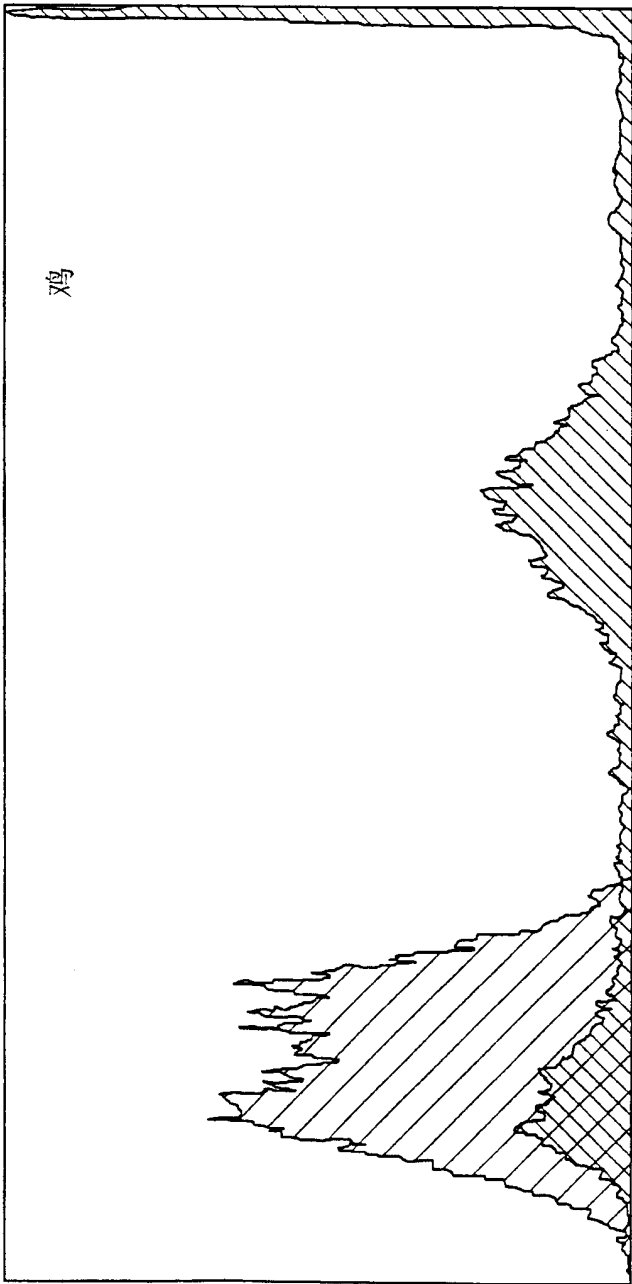


图 5

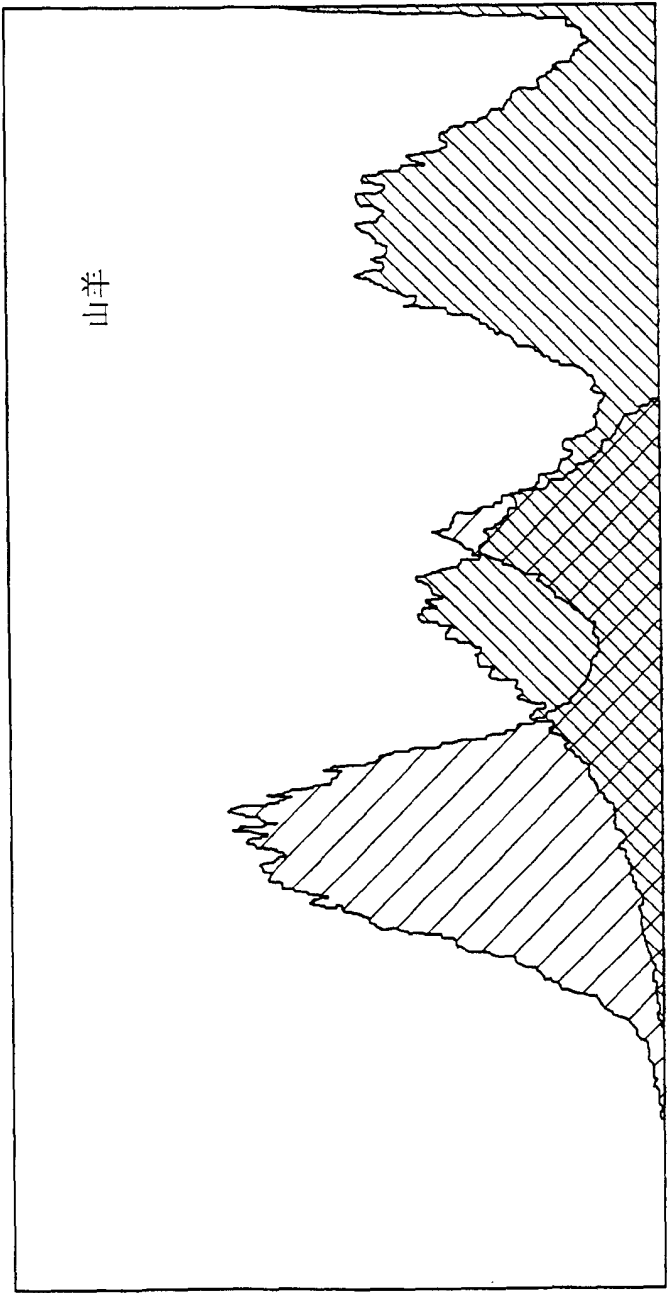


图 6

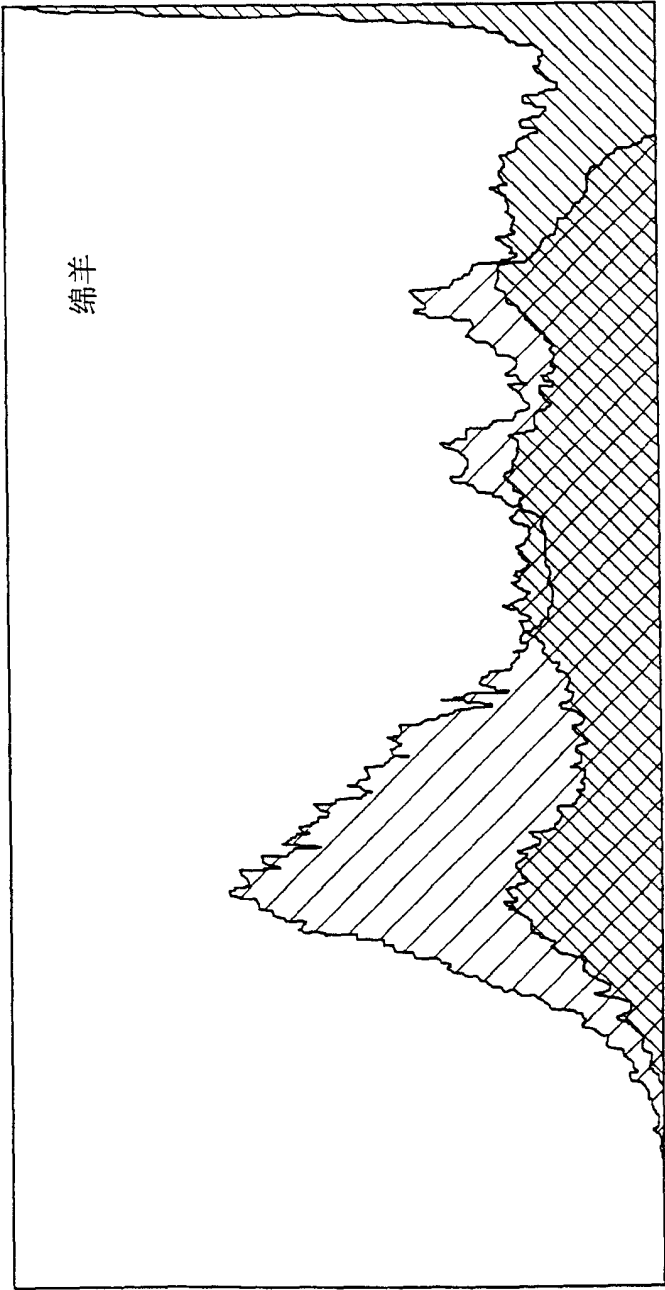


图 7

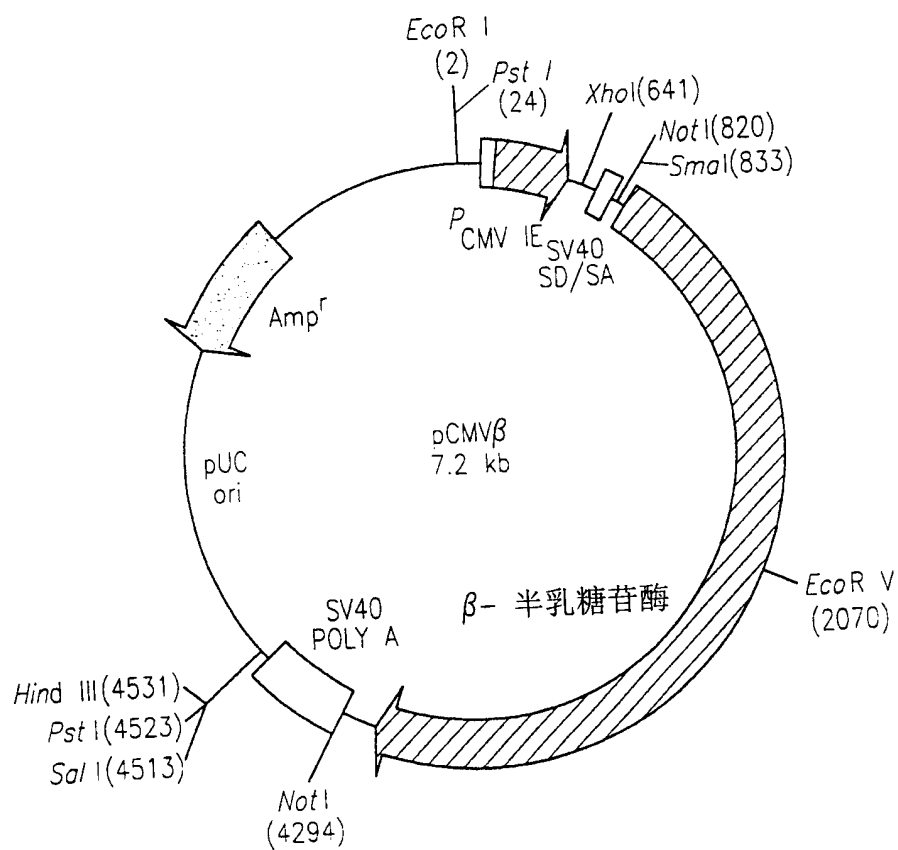
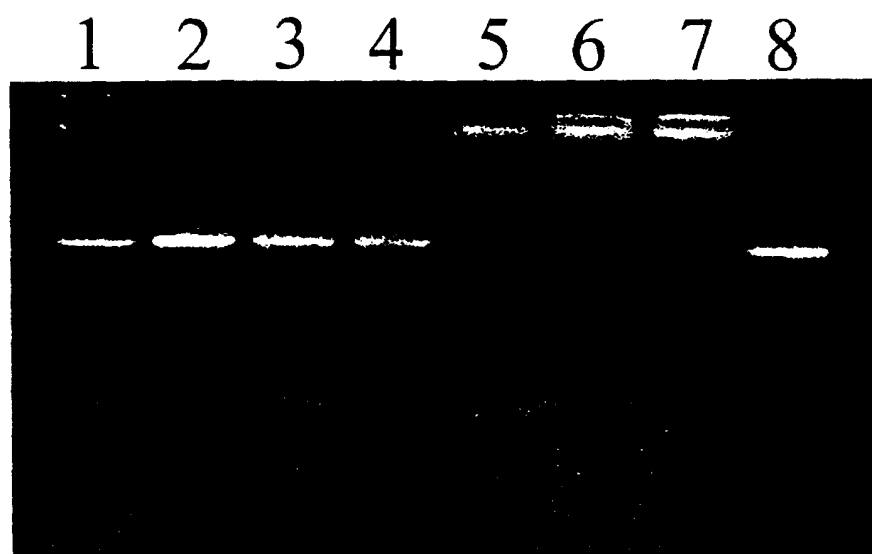


图 8



- 第1道：经 *Sal I* 切割的 pCMV- β 质粒
第2道：于经修饰的 Tyrode's 培养基中经 *Sa/I* 切割的 pCMV- β 质粒
第3道：经 *Sal I* 切割的 pSEAP-2 质粒+0.2 微升 mAb C
第4道：经 *Sal I* 切割的 pSEAP-2 质粒+0.1 微升 mAb C
第5道：经 *Sal I* 切割的 pSEAP-2 质粒+2.5 微升 mAb C
第6道：经 *Sal I* 切割的 pSEAP-2 质粒+6.0 微升 mAb C
第7道：经 *Sal I* 切割的 pSEAP-2 质粒+10.0 微升 mAb C
第8道：于经修饰的 Tyrode's 培养基中经 *Sal I* 切割的 pCMV- β 质粒。

图 9

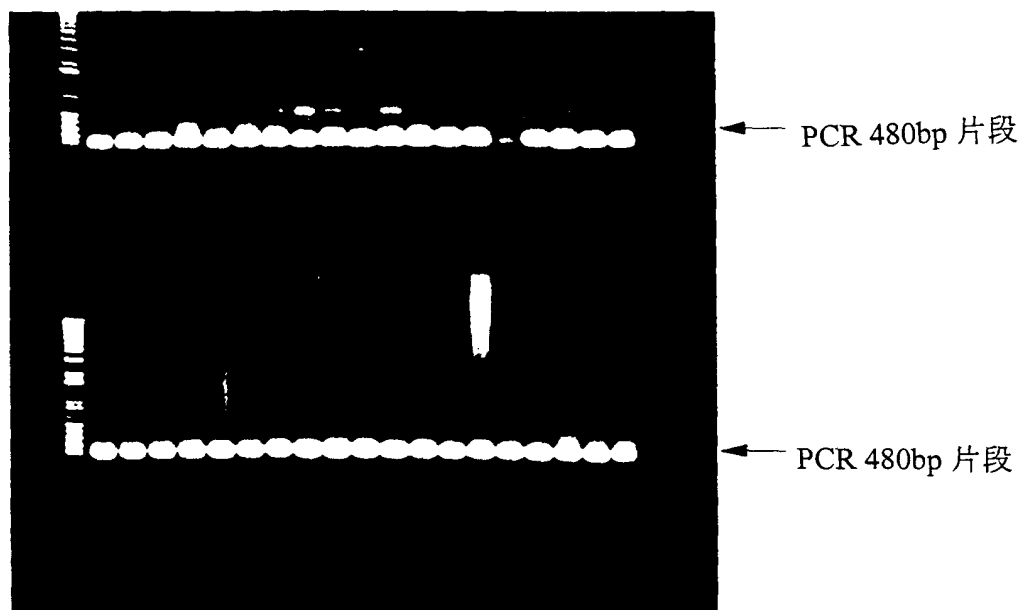


图 10

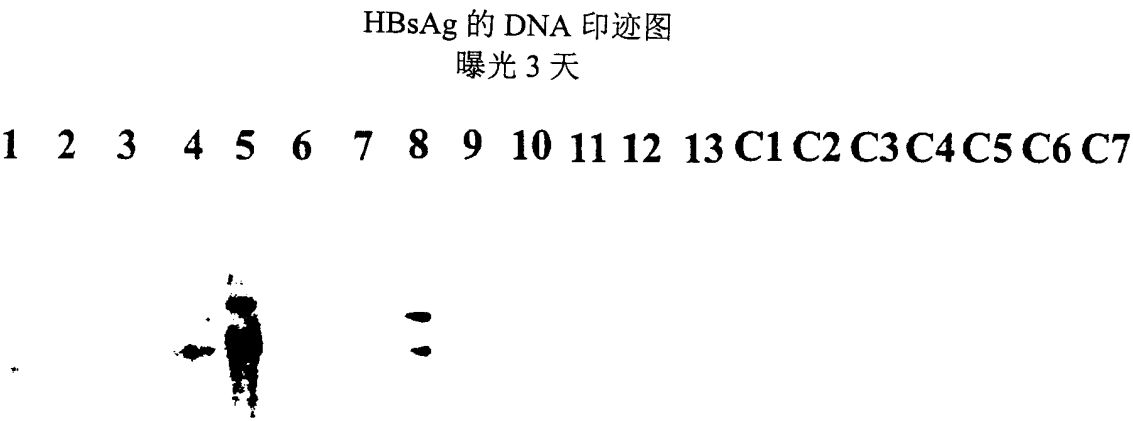


图 11

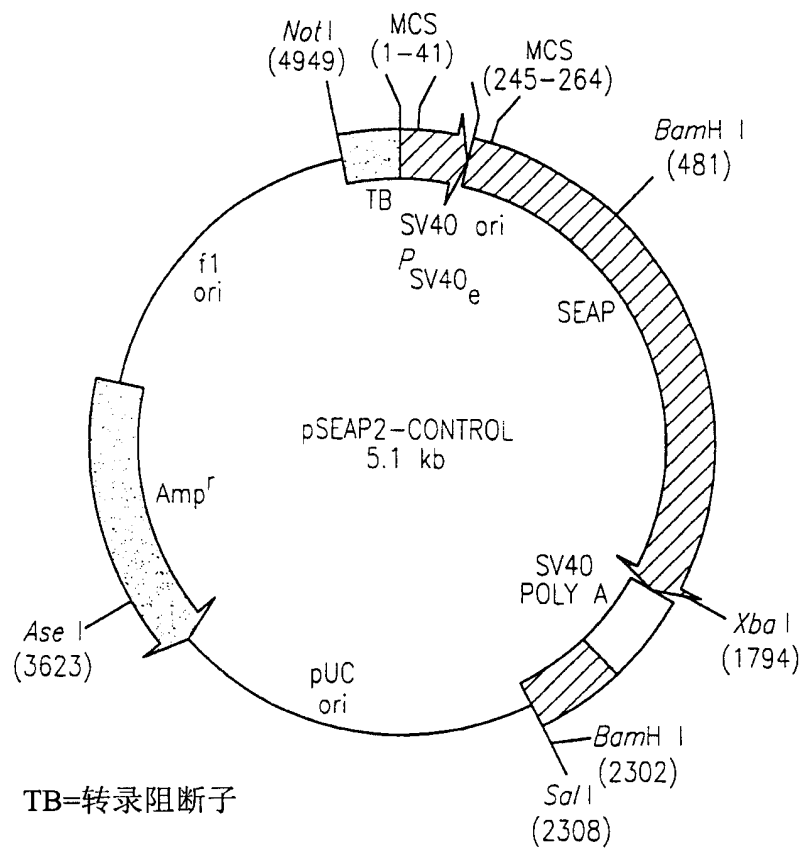


图 12

猪尾巴的 DNA 印迹图

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 M



M 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 M 1 2 2 4 4 8 16 32 M

对照质粒的复制#

图 13

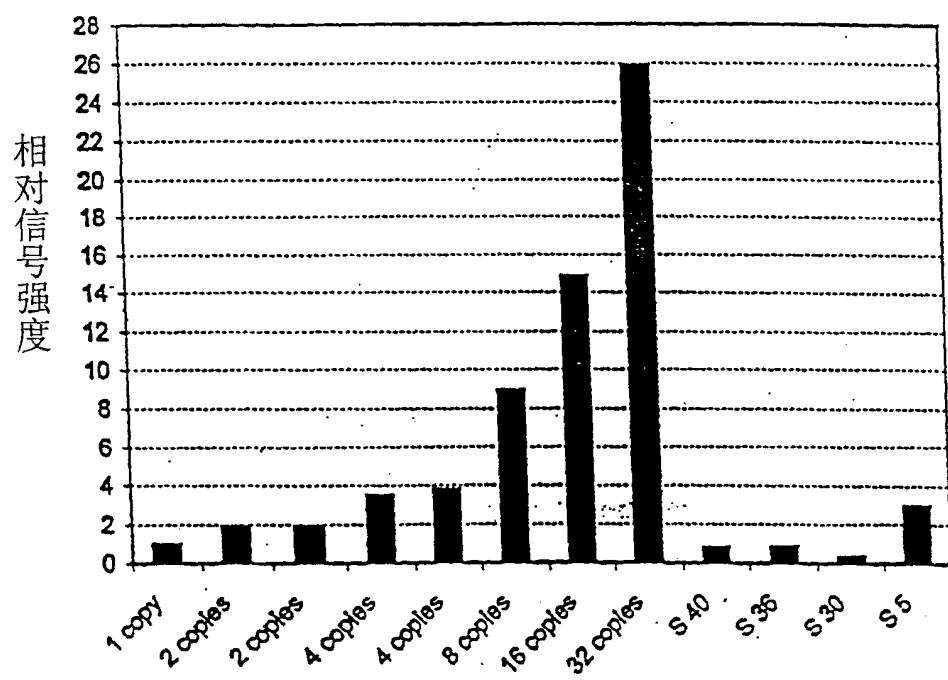
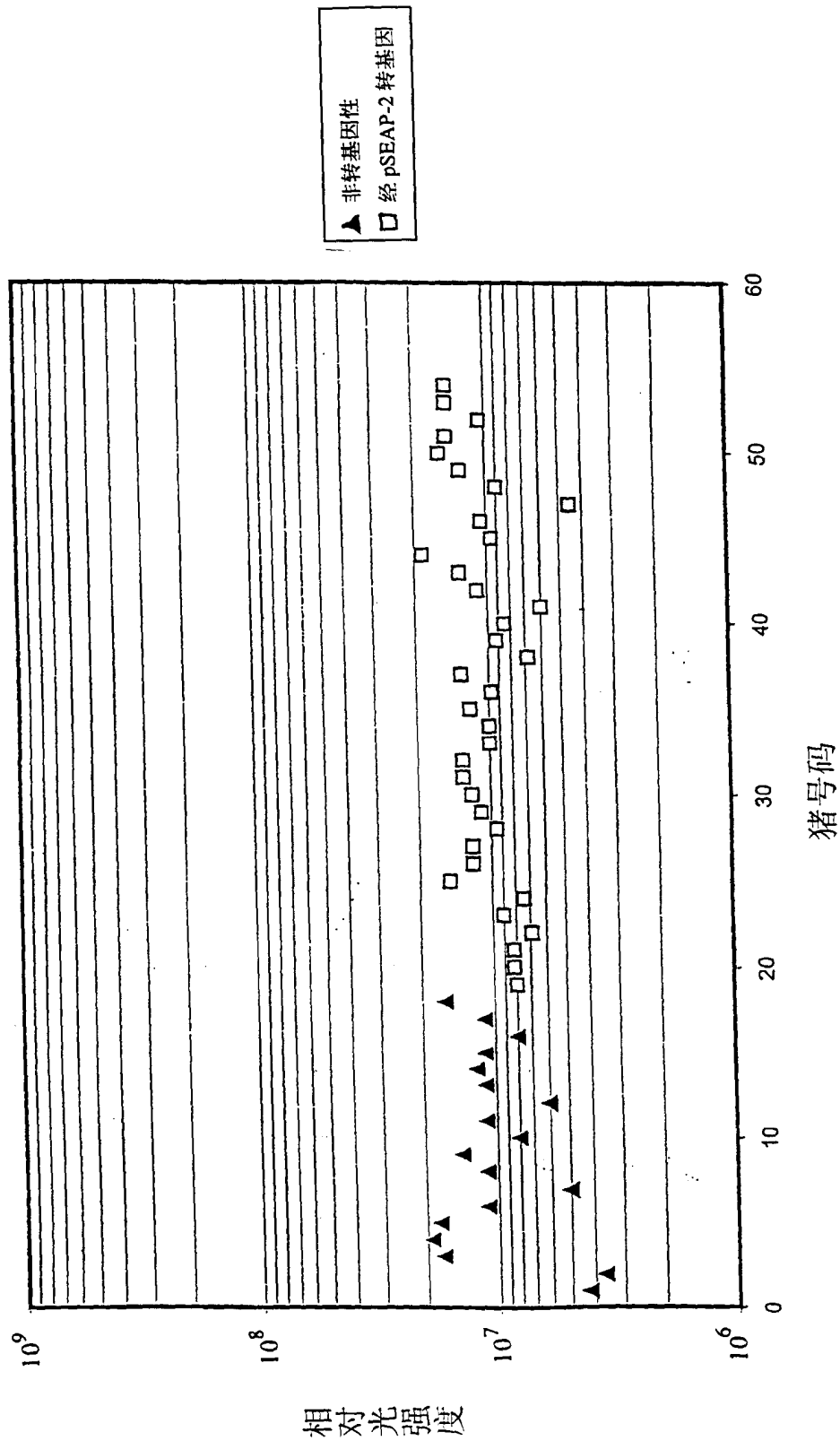


图 14

样品强度

分泌的碱性磷酸酶分析

(未经加热)



分泌的碱性磷酸酶分析
(经加热)

图 16

