



〔12〕发明专利申请公开说明书

〔21〕 申请号 89109830.5

〔51〕 Int.Cl⁵

C12N 15/02

〔43〕 公开日 1990年11月14日

〔22〕申请日 89.12.21

〔30〕优先权

〔32〕88.12.21 〔33〕US 〔31〕07/287,713

〔32〕89.6.23 〔33〕US 〔31〕07/370,557

〔71〕申请人 宾夕法尼亚大学理事会

地址 美国宾夕法尼亚州

〔72〕发明人 罗·凯塞拉

简·理杰

〔74〕专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利

代理部

代理人 辛敏忠

说明书页数: 56

附图页数: 1

〔54〕发明名称 转基因生物和细胞及其制备方法

〔57〕摘要

本发明公开了转基因或转染色体生物和细胞及其生产方法。分离供体生物的染色体或染色体片段,将大部分回收的染色体或染色体片段插入受体生物的遗传物质中。本发明还公开了回收、操作方法,将大的染色体片段注入并随后插入遗传物质或受体细胞的方法。

1 一种转基因非人生物的生产方法，其中所说的生物是动物或微生物，在其遗传物质中至少含有导入的一种外源染色体或至少一种外源染色体片段，该外源染色体和染色体片段均至少含有约 1 0 0 K b 核酸。

2 权利要求 1 的方法，其特征为该外源染色体或染色体片段至少含有约 2 5 0 K b 核酸。

3 权利要求 1 的方法，其特征为该外源染色体或染色体片段至少含有约 1 m b 核酸。

4 权利要求 1 的方法，其特征为该外源染色体或染色体片段至少含有约 1 0 —3 0 m b 核酸。

5 权利要求 1 的方法，其特征为所述生物是一种动物。

6 权利要求 1 的方法，其特征为所述生物是一种哺乳动物。

7 权利要求 1 的方法，其特征为所述生物是一种微生物。

8 权利要求 5 的方法，其特征为所述外源染色体和所述外源染色体片段是动物来源的。

9 权利要求 5 的方法，其特征为所述外源染色体和所述外源染色体片段是植物来源的。

10 权利要求 5 的方法，其特征为所述外源染色体和所述外源染色体片段是微生物来源的。

11 权利要求 7 的方法，其特征为所述外源染色体和所述外源染色体片段是动物来源的。

12 权利要求 7 的方法，其特征为所述外源染色体和所述外源

染色体片段是植物来源的。

1 3 权利要求 7 的方法，其特征为所述外源染色体和所述外源染色体片段是微生物来源的。

1 4 一种转基因动物细胞，在其遗传物质中至少含有一种外源染色体或至少含有一种外源染色体片段，所述外源染色体和所述外源染色体片段至少含有约 1 0 0 k b 核酸。

1 5 权利要求 1 4 的转基因动物细胞，其特征为该细胞是一种多性胚干细胞。

1 6 一种转基因生物，其中所述生物是一种植物，在其遗传物质中至少含有一种选择的外源染色体或至少含有一种选择的外源染色体片段，该外源染色体和外源染色体片段均至少含有约 1 0 0 k b 核酸，并且是来源于植物的。

1 7 一种转基因生物，其中所述生物是一种植物，在其遗传物质中至少含有一种外源染色体或至少含有一种外源染色体片段，该外源染色体和外源染色体片段均至少含有约 1 0 0 k b 核酸，并且是来源于动物或微生物的。

1 8 权利要求 1 7 的转基因生物，其特征为该外源染色体和外源染色体片段是来源于动物的。

1 9 权利要求 1 7 的转基因生物，其特征为该外源染色体和外源染色体片段是来源于微生物的。

2 0 将至少一种染色体或染色体片段从供体生物转移至受体生物的方法，该方法包括：（a）分离供体生物的选择的染色体或选择的染色体片段，和

（b）将至少一部分供体生物的选择的染色体或选择的染色体片

段插入受体生物的遗传物质中。

2 1 权利要求 2 0 的方法，其特征为该插入步骤 (b) 包括将染色体或染色体片段插入受体生物的细胞中，以将其并入受体生物的遗传物质中。

2 2 权利要求 2 1 的方法，其特征为将由供体生物分离得到的染色体或染色体片段插入受体生物细胞的细胞质中。

2 3 权利要求 2 1 的方法，其特征为将由供体生物分离得到的染色体或染色体片段插入受体生物细胞的前核中。

2 4 权利要求 2 1 的方法，其特征为将由供体生物分离得到的染色体或染色体片段插入受体生物的细胞核中。

2 5 权利要求 2 0 的方法，其特征为该受体生物是一种原核细胞。

2 6 权利要求 2 0 的方法，其特征为该受体生物是一种真核细胞。

2 7 权利要求 2 6 的方法，其特征为该真核细胞是一种动物细胞。

2 8 权利要求 2 7 的方法，其特征为该动物细胞是一种哺乳动物的细胞。

2 9 权利要求 2 8 的方法，其特征为该哺乳动物细胞是一种啮齿动物细胞。

3 0 权利要求 2 8 的方法，其特征为该哺乳动物细胞是一种卵母细胞。

3 1 权利要求 2 6 的方法，其特征为该真核细胞是一种植物细胞。

3 2 权利要求 2 0 的方法，其特征为分离步骤 (a) 包括：

(a') 制备该供体生物的一个或多个染色体以用于所述染色体或所述染色体片段的回收；

(b') 选择待回收的染色体或染色体片段；

(c') 回收该染色体或染色体片段；和

(d') 操作该回收的染色体或染色体片段使之进入吸管、微电极或注射器中，或将该染色体或染色体片段送入囊泡中 或将该染色体或染色体片段装在微弹发射器上。

3 3 权利要求 3 2 的方法，其特征为制备步骤 (a') 包括将供体生物的一个或多个染色体涂布在表面上。

3 4 权利要求 3 3 的方法，其特征为将一个或多个染色体涂在固定剂溶液中，然后除去该固定剂溶液。

3 5 权利要求 3 2 的方法，其特征为选择步骤 (b') 包括用染色体形态学鉴别该染色体或染色体片段。

3 6 权利要求 3 2 的方法，其特征为选择步骤 (b') 包括用染色体染色法鉴别该染色体或染色体片段。

3 7 权利要求 3 2 的方法，其特征为选择步骤 (b') 包括用染色体谱带分析法鉴别该染色体或染色体片段。

3 8 权利要求 3 2 的方法，其特征为选择步骤 (b') 包括通过原位杂交分析法鉴别该染色体或染色体片段。

3 9 权利要求 3 2 的方法，其特征为选择步骤 (b') 包括通过抗体结合法鉴别该染色体或染色体片段。

4 0 权利要求 3 2 的方法，其特征为选择步骤 (b') 包括用离心法分离该染色体或染色体片段。

4 1 权利要求3 2的方法,其特征为选择步骤(b')包括用光活化分选法分离该染色体或染色体片段。

4 2 权利要求3 2的方法,其特征为选择步骤(b')包括通过电泳分离该染色体或染色体片段。

4 3 权利要求3 2的方法,其特征为回收步骤(c')包括从供体生物的染色体中切割染色体片段,并将该染色体片段从表面上的供体生物的剩余染色体处移开。

4 4 权利要求4 3的方法,其特征为用吸管进行切割。

4 5 权利要求4 3的方法,其特征为用针进行切割。

4 6 权利要求4 3的方法,其特征为用激光进行切割。

4 7 权利要求4 3的方法,其特征为用一种酶进行切割。

4 8 权利要求3 2的方法,其特征为回收步骤(c')包括将该染色体或染色体片段从表面上的供体生物剩余染色体处移开。

4 9 权利要求3 2的方法,其特征为操作步骤(d')包括使回收的染色体或染色体片段与活化溶液接触,并将回收的染色体或染色体片段和活化溶液吸入吸管或注射器或微电极中。

5 0 权利要求4 9的方法,其特征为该活化溶液含有蛋白酶、乙二醇四乙酸、聚乙烯吡咯烷酮和染料,该染料对受体细胞基本上是无毒的。

5 1 权利要求5 0的方法,其特征为该蛋白酶是胰蛋白酶。

5 2 权利要求5 0的方法,其特征为该染料是碱性品红。

5 3 权利要求4 9的方法,还包括用一种生理上可接受的液体稀释吸管、微电极或注射器中的活化溶液。

5 4 权利要求5 3的方法,其特征为该生理上可接受的液体含

有蛋白质溶液。

5 5 权利要求 5 3 的方法，其特征为该生理上可接受的液体含有氯化钾。

5 6 权利要求 5 3 的方法，其特征为该生理上可接受的液体含有蛋白酶抑制剂。

5 7 权利要求 5 6 的方法，其特征为该蛋白酶抑制剂是 ϵ -氨基己酸。

5 8 权利要求 5 6 的方法，其特征为该蛋白酶抑制剂是苯甲脒-HCl。

5 9 权利要求 3 2 的方法，其特征为该操作步骤 (d') 包括将回收的染色体或染色体片段与一种生理上可接受的溶液接触，并将回收的染色体或染色体片段以及生理上可接受的溶液吸入吸管或注射器或微电极中。

6 0 权利要求 5 9 的方法，其特征为该生理上可接受溶液含有蛋白质溶液。

6 1 权利要求 5 9 的方法，其特征为该生理上可接受溶液含有氯化钾。

6 2 权利要求 3 2 的方法，在制备步骤 (a') 和回收步骤 (c') 之前还包括观测扩展后的供体生物的一个或多个染色体。

6 3 权利要求 6 2 的方法，其特征为该观测步骤包括用实质上对受体生物无毒的染料使供体生物的一个或多个染色体染色。

6 4 权利要求 6 3 的方法，其特征为该染料含有碱性品红。

6 5 权利要求 6 3 的方法，其特征为该染料含有吉姆萨氏染料。

6 6 权利要求 6 3 的方法，其特征为该染料含有赖特氏染料。

6 2 权利要求 6 2 的方法,其特征为该观测步骤包括采用光学观测技术。

6 8 权利要求 6 7 的方法,其特征为该观测步骤包括采用相差显微镜法。

6 9 权利要求 6 7 的方法,其特征为该观测步骤包括采用差分干扰对照透镜。

7 0 权利要求 6 7 的方法,其特征为该观测步骤包括采用 Nomarsky 透镜。

7 1 权利要求 6 7 的方法,其特征为该观测步骤包括采用霍夫曼调变透镜。

7 2 权利要求 3 3 的方法,其特征为所述表面实质上不会与染色体粘结。

7 3 权利要求 7 2 的方法,其特征为该表面是塑料或硅化玻璃。

7 4 权利要求 2 0 的方法,其特征为插入受体生物遗传物质中的染色体或染色体片段含有编码人免疫球蛋白复合物或其部分的遗传物质。

7 5 权利要求 2 0 的方法,其特征为插入受体生物遗传物质中的染色体或染色体片段含有编码人组织相容性复合物或其部分的遗传物质。

7 6 权利要求 7 4 的方法,其特征为该受体生物是一种动物。

7 7 权利要求 7 6 的方法,其特征为该动物是一种哺乳动物。

7 8 权利要求 7 7 的方法,其特征为该哺乳动物是一种啮齿动物。

7 9 权利要求 2 0 的方法,其特征为插入受体生物遗传物质中

的染色体或染色体片段含有编码激素、生长因子、凝血因子或酶的遗传物质。

8 0 权利要求 7 9 的方法，其特征为该受体生物是一种非人哺乳动物。

8 1 权利要求 2 0 的方法，其特征为插入受体生物遗传物质中的染色体或染色体片段是人染色体或染色体片段。

8 2 权利要求 2 0 的方法，其特征为插入受体生物遗传物质中的染色体或染色体片段含有与人体疾病有关的遗传物质。

8 3 权利要求 8 2 的方法，其特征为所说的人体疾病为下列之一：亨廷顿氏病、老年痴呆症、成人多囊肾病、唐氏先天愚症、综合肢梢节自身免疫、心血管和代谢疾病。

8 4 权利要求 2 0 的方法，其特征为插入受体生物遗传物质中的染色体或染色体片段含有与增加皮肤恶性黑素瘤或其他癌生成有关的人体遗传物质。

8 5 一种转基因细胞，它至少含有一种外源染色体或外源染色体片段，采用将染色体或染色体片段从供体生物移至受体细胞的方法，将其导入该转基因细胞或该转基因细胞的异常增殖细胞中，该方法包括：

(a) 分离供体生物的染色体或染色体片段；和 (b) 将该供体生物的部分染色体或染色体片段（含有约大于 1 0 0 k b 核酸）插入受体细胞（b 1）的遗传物质中，从而得到该转基因细胞（b 2），或由该受体细胞得到转基因动物，然后由该转基因动物得到该转基因细胞。

8 6 权利要求 8 5 的转基因细胞，其特征为该转基因细胞是一

种真核细胞。

8 7 权利要求 8 5 的转基因细胞，其特征为该转基因细胞是一种原核细胞。

8 8 权利要求 8 6 的转基因细胞，其特征为该真核细胞是一种动物细胞。

8 9 权利要求 8 6 的转基因细胞，其特征为该真核细胞是一种植物细胞。

9 0 一种生产针对抗原的人单克隆抗体的方法，包括：

从融合生成的杂交瘤细胞系中收获抗体，该融合细胞是由骨髓瘤细胞、能产生针对抗原的人抗体的 B 淋巴细胞形成，所说的 B 淋巴细胞是从转基因动物中得到的；

这里所说的转基因动物是一种动物，该动物中至少某些细胞中至少含有一种外源染色体或外源染色体片段，它们均含有约大于 1 0 0 k b 的核酸。

9 1 一种生产针对抗原的人单克隆抗体的方法，包括：

(a'') 免疫一种转基因动物，该动物中的至少某些细胞含有至少一种外源染色体或外源染色体片段，它们均含有约大于 1 0 0 k b 的核酸；

(b'') 从免疫的转基因动物的淋巴结、脾脏或外周血液中收获能产生针对抗原的抗体的 B 淋巴细胞；和

(c'') 使收获的 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞系融合以生成杂交瘤细胞系，该细胞系能产生针对抗原的抗体。

9 2 权利要求 9 0 的方法，其中所述杂交瘤细胞系是在体外细胞培养中繁殖的。

9 3 权利要求 9 1 的方法，其中所述杂交瘤细胞系是在体外细胞培养中繁殖的。

9 4 权利要求 9 0 或 9 1 的方法，其中所述杂交瘤细胞系是作为体内腹水瘤在亲和寄主中繁殖的。

9 5 权利要求 9 0 或 9 1 的方法，其中所述的转基因动物是一种小鼠，所说的骨髓瘤细胞是鼠的骨髓瘤细胞。

9 6 权利要求 9 0 或 9 1 的方法，其中所说的转基因动物是一种大鼠，所说的骨髓瘤细胞是小鼠或大鼠的骨髓瘤细胞。

9 7 权利要求 9 0 或 9 1 的方法，其中所说的抗原选自下列至少一种：细菌、真菌、病毒、支原体、寄生物、组织相容性抗原、肿瘤和分化抗原。

9 8 由下列方法生产的单克隆抗体：从融合生成的杂交瘤细胞系中收获抗体，该融合细胞是由骨髓瘤细胞、能产生针对抗原的抗体的 B 淋巴细胞形成，其中所说的 B 淋巴细胞是从转基因动物中得到的，该转基因动物中的至少某些细胞含有外源染色体或外源染色体片段，它们均含有约大于 1 0 0 k b 的核酸。

9 9 由下列方法生产的人单克隆抗体：

(a'") 用一种抗原免疫转基因动物，该转基因动物中的至少某些细胞至少含有一种外源染色体或外源染色体片段，它们均含有大于 1 0 0 k b 的核酸，该转基因动物还含有编码人免疫球蛋白复合物或其一部分的遗传物质；

(b'") 从免疫的转基因动物的淋巴结、脾脏或外周血液中收获能产生针对抗原的抗体的 B 淋巴细胞；和

(c'") 使收获的 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞系融合以生成杂交

瘤细胞系，该细胞系能产生针对抗原的抗体。

100 一种制备转基因动物的方法，该转基因动物中大多数细胞至少含有一种外源染色体或外源染色体片段，该方法包括：

(a'") 将至少一种选择的外源染色体或至少一种选择的外源染色体片段导入胚性动物受体细胞的遗传物质中；

(b'") 将含有外源染色体或外源染色体片段的胚性动物受体细胞移植到雌性动物的输卵管或子宫中；和

(c'") 培养该胚性动物受体细胞以得到转基因动物。

101 一种转基因植物细胞，在其遗传物质中至少含有一种选择的外源染色体或至少含有一种选择的外源染色体片段，其特征为该外源染色体和外源染色体片段均至少含有约 100 kb 的核酸，而且是来源于植物的。

102 一种转基因植物细胞，在其遗传物质中至少含有一种选择的外源染色体或至少含有一种选择的外源染色体片段，其特征为该外源染色体和外源染色体片段均至少含有约 100 kb 的核酸，而且是来源于动物或微生物的。

103 权利要求 5 的转基因非人生物，其特征为外源染色体或外源染色体片段含有这样的遗传物质，该遗传物质使该生物具有可用于模拟由感染因子或环境因子产生的病理条件的性能。

104 权利要求 103 的转基因非人生物，其特征为该感染因子是一种艾滋病毒或肝炎病毒。

105 一种制备转基因动物的方法，该转基因动物中大多数细胞至少含有一种外源染色体或外源染色体片段，该方法包括：

(a) 将至少一种外源染色体或外源染色体片段（它们均至少含

有约 100 kb 的核酸) 导入胚性动物受体细胞的遗传物质中;

(b) 从该胚性动物受体细胞中产生多性胚胎干细胞系;

(c) 将该多性胚胎干细胞系移植到培养的胚胎中以产生一种嵌合胚胎; 和

(d) 培养该嵌合胚胎。

106 一种制备转基因动物的方法, 该转基因动物中大多数细胞至少含有一种外源染色体或外源染色体片段, 该方法包括:

(a) 将至少一种外源染色体或外源染色体片段(它们均至少含有约 100 kb 的核酸) 导入多性胚胎干细胞的遗传物质中;

(b) 将该多性胚胎干细胞系移植到培育的胚胎中以生成一种嵌合胚胎; 和

(c) 培养该嵌合胚胎。

107 一种从转基因多细胞动物中得到的转基因动物细胞, 该多细胞动物中大多数细胞至少含有一种外源染色体或至少一种外源染色体片段, 它们均至少含有约 100 kb 的核酸。

108 权利要求 107 的转基因动物细胞, 其特征为该外源染色体或外源染色体片段含有这样的遗传物质, 该遗传物质编码 (I) 人免疫球蛋白复合物或其一部分, 或 (II) 人组织相容性复合物或其一部分, 或 (III) 激素、生长因子、凝血因子或酶, 或 (IV) 人体中可遗传的疾病, 或 (V) 一种传染性疾病。

转基因生物和细胞及其制备方法

本申请是1989年6月23日提交的07/730,557号申请的后续部分,而后者又是1988年12月21日提交的07/287,713号申请的后续部分。

本发明涉及单细胞和多细胞的转基因生物(动物、植物和微生物)和生产这些生物的方法。

遗传物质由一个细胞向另一细胞的转移可用来产生表达外源遗传特性的转基因动物,因此最近引起了广泛注意。Scangos等人对基因转移曾进行过综述,见Adv. Gen. 24: 285, 1987; Houseman和Nelson也进行过综述,“利用中期染色体转移测定哺乳动物基因图”,见Kucherlapati编《基因转移》PP95—115, Plenum Press, 纽约, 1986。

Leder和Stewart的4,736,866号美国专利公开了转基因哺乳动物,为了检测化学药品对哺乳动物的致癌作用,这些动物的基因组中掺入有与外来致癌基因相关的DNA。用于制备这些转基因哺乳动物的部分方法在Wagner和Hoppe的4,873,191号美国专利和Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 5016, 1981中已经公开。

外源基因向其他物种的转移还可用于向易得病物种转移疾病抗性因子,和通过植物、动物和微生物以及培养植物、动物和微生物细胞生产商业上有用的化合物。虽然有几种方法可用来将DNA从一个细胞转移到另一个细胞,但这些方法缺乏可预见的和/或有效的外源

DNA 向受体基因组的掺入，并且所要转移的 DNA 大小受到严格限制。这些都是现有技术的缺陷，例如见 4, 873, 191 号美国专利。

直接向受精卵的前核内显微注射 DNA 是一种广为使用的将 DNA 从一个细胞向另一个细胞转移的方法。这种技术是，用一个非常小的移液管，将外源 DNA 片段注射到受精卵母细胞的前核中，如小鼠卵母细胞。所注射的 DNA 一般是一种结合在质粒克隆载体中的重组 DNA。

在注射之前，通常要用限制性核酸内切酶切割含有外源 DNA 的质粒，以使它们线性化或切下一个重组插段。然后，可将 DNA 和载体 DNA 一起注射，或者将含有该 DNA 片段的插段分离后再注射。常常是向每个前核内注射 1 到几百个外源 DNA 拷贝。注射 DNA 之后，将胚胎转移到一个假孕雌性动物中并发育到足孕。

典型地是，外源 DNA 的整合发生于受体细胞基因组内某一位点，但某些转基因生物（如转基因小鼠）可含有多个整合位点。对于 DNA 整合机理仍没有真正研究清楚。可以对这种转基因动物中的外源 DNA 进行表达，而且常常可以将这种外源 DNA 通过该种系传递给后代。

4, 736, 866 号和 4, 873, 191 号美国专利公开了通过这种方法制备的转基因非人类哺乳动物。在 4, 736, 866 号美国专利中，将含有小鼠 *myc* 基因或 S 1.07 浆细胞瘤 *myc* 基因的质粒注射到受精单细胞小鼠卵的雄性前核中。已知可以使这种 *myc* 基因活化以增加动物体内肿瘤，尤其是恶性肿瘤的发生。

每个前核要注射大约 500 个线性化的质粒拷贝。然后将已注射

的卵转移到假孕雌性动物中发育至足孕。含有 $m y c$ 致癌基因的小鼠可用于测定一种怀疑致癌的物质，方法是把这些动物暴露于可疑致癌物，并且测定赘生物的生长作为致癌性的标志。

虽然这种向受精卵的前核内注射重组 DNA 的方法是有效的，但这种方法只能有效地转移较少的 DNA 片段，通常小于 100 千碱基 (kb) 的连续 DNA。这种大小限制可能是因为在受体细胞中存在有内源核酸酶，可引起注射的 DNA 降解。另外，机械剪切引起的 DNA 断裂也限制使 DNA 大分子通过小吸管头部孔的可行性。

同样，通过磷酸钙或多阳离子沉淀的 DNA 而将 DNA 转移到细胞中，也只可转移较少的 DNA 连续片段，其大小一般少于 100 kb。运用这种不同的方法，还有可能会因为内源核酸酶引起的 DNA 降解而限制此方法中可插入 DNA 分子的大小。

如果想要转移由很大的基因编码的遗传特性，如杜兴肌营养不良综合症的营养障碍基因，或视网膜神经胶质瘤的 Rb 基因，或者转移那些由多基因复合体编码的遗传特性，如人免疫球蛋白复合体和组织相容性座位时，前面的 DNA 显微注射和磷酸钙/多阳离子 DNA 沉淀法都表现出非常显著的障碍。人免疫球蛋白复合体含有那些来自自由非连续 DNA 片段组成的基因组，这些非连续片段的遗传座位相距很远。

因此，为了将表达完整人免疫球蛋白基因组的能力转移给受体细胞或生物，则必须转移编码整个基因组的成千上万个千碱基的 DNA。到目前为止，由于现有的 DNA 转移法受到分子大小的限制，这种转移大分子基因的方法尚未成为可能。

另外，运用 DNA 注射法时，必须首先将所需基因克隆后才能用

来制备转基因生物。当需要转移那些尚没有重组克隆或不知分子结构的遗传特性时，对克隆DNA的需要便是这种显微注射技术的严重障碍。

虽然目前已知许多特征具有其遗传因素，但尚未鉴别出编码这些特征的基因。不能够转移这些特征会减慢对这些特性的研究和认识。

例如，在西红柿这样的植物中，已鉴别出控制植物高度、疾病抗性和产量的遗传特性，而且已知控制这些特性的某些基因的染色体定位。但是，由于尚未得到其分子结构的详细情况，不能获得控制这些特性的基因重组克隆。缺乏这种重组克隆，则不能运用现有的基因转移法转移这些遗传特性。

虽然通过以磷酸钙或多阳离子沉淀的染色体为媒介进行转染可得到较大的DNA插段，但此方法的转化效率很低，通常在 10^5 — 10^7 个受体中可得到1个转化体，而DNA显微注射后从100个受体中可得到5—30个转化体。因此，通过染色体的转染将外源DNA转移到胚胎或细胞中的方法不具有实用性，尤其只能得到少量胚胎或细胞时更是如此。

即使可得到大量的细胞或胚胎，但如果在外源DNA插段的性质是随机的，并且转化效率很低的情况下，那么在感兴趣的染色体区域必须有可选择的标记，以只使那些已掺入合适外源染色体或染色体片段的细胞选择性地存活和生长。对于与这种可选择标记一起定位的需要是非常不实际的，此需要把这种方法的运用限制于少量侧面带有可选择标记的染色体区域，如含有HGPRT座位的X染色体的一部分。

虽然最近公开了一种将从*Petunia alpicola*的悬浮培养细胞中大量提取的总植物染色体非选择性地注射到碧冬茄(*Petunia*

hybrida) 原生质体中的方法 (Griesbach, Plant Science 50: 69—77, 1987), 但这种技术并未克服外源 DNA 掺入性质的随机性和专一性问题。它不能选择性分离某一特殊的染色体或选择性注射某一特殊的染色体。实际上, 这种方法的实际结果, 与运用磷酸钙或其他多阳离子沉淀法向组织培养细胞中转移染色体没有太大差别。

染色体转染或注射法带来的一个严重缺陷就是外源遗传信息的掺入是一个随机过程。因此, 例如将 *Petunia alpicola* 染色体注射到碧冬茄中, 或者通过磷酸钙沉淀的染色体向组织培养细胞进行转染时, 所有的染色体具有被掺入或插入受体细胞的均等可能性。不管怎样, 考虑到任何给定生物的基因组的复杂性, 在不存在一个选择结构的情况下, 将所需要的特性或基因转移到受体细胞中是非常不可能的。

还应当注意到, 虽然已公开的有关碧冬茄的研究声称, 有关类黄酮生物合成途径的多种酶可从 *Petunia alpicola* 转移到碧冬茄中, 但是 (1) 尚没有资料直接证明能够成功地将 DNA 从供体转移到受体, 和 (2) 此结果是很不可能的, 因为这些酶可能是通过多基因座位编码的, 因此需要同时掺入来自几个不同染色体的 DNA, 在已知外源 DNA 掺入率很低的情况下, 这是一件非常不可能的事情。

总之, 尽管 DNA 显微注射可以有效地将外源 DNA 从一个细胞转移到另一个细胞, 但这种方法在转移大大超过约 100 kb 的 DNA 片段时用处不大, 因而具有其局限性。而且这种方法对于转移那些尚没有重组体克隆或尚不知道分子遗传结构情况的遗传特性时, 也存在缺陷。

运用磷酸钙或多阳离子染色体沉淀法，有可能转移较大的DNA片段和未克隆的基因组DNA。不过，运用后面这种方法掺入转染DNA的效率是非常低的，而且外源遗传信息的插入是随机的。因此，将这种磷酸钙沉淀法用于受体细胞数目有限和所转移的染色体区域不含有选择标记的情况是不实际的。

注射未选择的总染色体混合物会带来显著的缺陷，因为不能选择所要整合的感兴趣的染色体或染色体区域。后面这种方法需要有一个选择标记以识别合适的转化体。这样就严格限制了这种方法的运用。

因此，需要寻找一种能够进行选择回收的方法，并能将特定染色体的特定区域从一种生物（细胞）转移到另一种生物（细胞）中，从而保证所制备的转化体以比较理想的概率含有所需遗传信息。

还需要有一种方法，能将大分子DNA（如染色体或其片段）从一个供体生物转移给一个受体生物，而且尤其需要一种不具有上述现有技术中所存在的那些缺陷的方法。

本发明的目的包括提供一种可向一种受体细胞转移至少染色体或染色体片段的方法，以及用于生产单细胞和多细胞转基因生物的方法，和由此方法生产的转基因生物和单细胞。

总的来说，发明者发现，这些发明目的以及由下面的说明书明显可见的其他目的，可由下列新方法满足其要求，即将一个染色体或染色体片段从供体生物转移到受体生物中。这种方法包括：

（a） 从一种供体生物中分离一种染色体或染色体片段。

（b） 将供体生物的染色体或染色体片段的大部分插到一种受体生物的遗传物质中。

从另一方面说，本发明还提供了含有至少一种外源染色体或至少

一种外源染色体片段的转基因细胞。这些染色体或染色体片段是通过本发明方法掺入到该细胞或细胞前代中的。这些转基因细胞可以是原核或真核细胞。这些转基因细胞可以是单细胞生物或多细胞生物中的单细胞。

还有一方面是，本发明还提供了转基因生物，包括动物和植物，它们的生殖细胞和体细胞含有至少一种外源染色体或染色体片段。通过本发明的方法，可从某种动物或植物中得到外源染色体或染色体片段，并将它们掺入动物或植物的胚胎或掺入动物或植物的祖先中。本发明提供的转基因生物包括单细胞和多细胞生物。

根据本发明的方法，可由受体细胞内插入的染色体或染色体片段的数目，可以从1到大约与天然受体细胞中存在的染色体数目相等的数。

图1代表了一种Southern印迹杂交分析。通过琼脂凝胶电泳分离从小鼠尾组织提取的DNA (2、5 μ g)；并吸印在硝化纤维素上面，与来自PBLUR 8 (一种含有人分散性Alu重复DNA的质粒)的缺口翻译的DNA进行杂交。分子量以千碱基计算。泳道1，是一种由显微注射非着丝粒人染色体片段的卵母细胞发育成的小鼠 (这里是“E鼠”)的Mbo I消化的DNA；泳道2，代表来自E鼠的未消化的DNA；泳道3，代表由一种正常的未注射卵母细胞发育成的小鼠的Mbo I消化的DNA。通过观察杂交谱带发现，谱带1和2中的DNA都有人DNA存在。相比而言，来自任何未注射过的正常小鼠的DNA则表现出与PBLUR 8探针没有杂交。

在本说明书发明方法的(a)步中使用了术语“分离”，是用来将本方法与动植物的自然生殖区别开来。该术语表明，在本发明方法

的分离步骤中，来自供体生物的染色体或染色体片段是从一种细胞或供体生物中得到的。

为了更清楚地与现有技术方法可得到的转基因细胞和生物相区别，在本发明中，已经向其中转移了至少一个染色体或染色体片段的转基因细胞和生物也称为“转染色体”细胞或生物。正如本文所述，术语“转染色体”生物或细胞是指包括一种根据本发明方法已向所述生物和细胞（或其祖先）转移了染色体或染色体片段的转基因生物或细胞。

这里所用术语“生物”包括单细胞和多细胞生物。

本发明用于转移染色体或染色体片段的方法比现有技术的DNA显微注射法更为优越，因为这些现有技术的方法不适于转移大于约100 kb的DNA顺序，例如4, 736, 866和4, 873, 191号美国专利的方法。相对而言，本发明的方法尤其适于转移具有至少约10—30百万碱基的DNA顺序。这便可以转移那些由非常大的基因或基因组编码的遗传特性。本文所用术语“碱基”如千碱基或百万碱基是指核酸中的碱基。

再者，不同于现有技术的磷酸钙和多阳离子介导的染色体沉淀法的是，该方法只能得到较低的外源DNA掺入率，而本发明方法可以高效率掺入转移的外源DNA。因此，这种方法可用于受体细胞数目有限的情况。

而且，不象前面所述的向植物原生质体内的染色体注射，本发明方法能高明地进行回收和转移选择的含有已知基因的染色体和染色体片段，以及选择的含有已知特性但其遗传因素尚不清楚的遗传物质。与运用鸟枪法转移基因的现有技术相比，本发明可以高度地选择遗传信息并将它们转移到受体生物中。本说明书所用术语“选择的”是指

本发明所赋予的这种高明的回收和转移。

本发明还与美国专利4, 873, 191中在制备转基因哺乳动物中所用的遗传物质转移法显著不同。一个非常重要的差别就是, 在美国专利4, 873, 191中用于制备转基因哺乳动物时向受精卵母细胞(合子)注射的遗传物质包括裸露的重组DNA分子; 就是说是一种简单的、相对短的多聚脱氧核糖核酸分子。相对而言, 本发明所用的(转移的)相应于染色体的遗传物质, 是由蛋白质包裹的以致密状态存在的DNA大分子。

本发明所用的染色体和染色体片段的特征在于, 与存在于天然染色体中的蛋白质或至少与该蛋白质大致等同的合成蛋白质结合在一起。应当认识到, 有可能对某些结合蛋白质进行少量修饰, 例如有些蛋白质可以分离或用酶学方法进行修饰(如由于操作步骤造成的或合成修饰等)。但应当保留足够量的这种蛋白质以得到下述优越性。

这种蛋白质的结合对于促进外源遗传物质的整合起着几个重要作用。首先, 染色体中大DNA分子的致密包裹可将非常大的DNA片段掺入受体细胞中而不会因机械剪切导致断裂。第二, 所结合的蛋白质可以保护DNA不会被内源核酸酶降解, 并还可以促进DNA大的连续片段的掺入而没有核酸酶引起的断裂。

这种防止机械剪切或核酸酶引起的断裂的作用, 可以将大于10—30百万碱基(Mb)的DNA分子用上述的染色体注射法掺入受体细胞基因组中。相对而言, 美国专利4, 873, 191中所描述的裸露DNA显微注射法所能掺入的连续DNA片段的大小通常不大于50—100Kb。

通过染色体或染色体片段掺入外源遗传物质的本发明方法的第三

个显著优点是，所能达到的转化率很高。这种高转化率可能是由于防止了外源DNA的降解。还有可能是染色体中的蛋白质对DNA的包裹进一步促进了其他方式的DNA插入，如促进外源DNA与介导DNA重组和修复的酶之间的相互作用。染色体中DNA的包裹还可通过增强和稳定外源DNA和内源DNA之间的碱基配对来促进DNA的插入。

因此，运用本技术，发明人发现通过显微注射单个人染色体片段可成功地掺入人DNA。而注射裸露的DNA需要掺入成百上千的外源DNA分子拷贝才能成功地掺入外源DNA。

本发明与美国专利4,873,191公开内容的另一个重要区别是，本发明可提供一些方法用于选择和回收来自于天然染色体的用于插入某种受体细胞以进行DNA转化的并大于数百万碱基的特定DNA片段。同样，本发明也与Griesbach发表的（见上）研究中将未选择的总染色体提取物不加选择地注射到植物细胞中的方法明显不同。

本发明与美国专利4,873,191公开的内容相比的另一个显著差别是，本发明可提供一些方法，用来通过将外源遗传物质插入受体细胞的前核、核和胞浆中进行DNA转化。相比而言，在美国专利4,873,191中，必须将外源DNA掺入某种哺乳动物合子（受精卵母细胞）的原核中。能够运用本方法将外源遗传物质掺入细胞浆中以达到DNA的转化，其直接原因在于染色体蛋白质可保护外源DNA不受细胞浆中核酸酶的影响。

而且，在本发明中，发现运用怀孕的雌性动物比使用假孕雌性动物携带已注射的胚胎进行发育到足月要好。在美国专利4,873,

191中，只能运用假孕雌性动物来携带胚胎发育到足月。本发明之所以主张运用怀孕的雌性动物，是因为它能显著提高发育的成熟率。

本发明还提供了一些转染色体细胞或生物，在这些细胞和生物中，将从供体细胞或生物中分离的大部分染色体或染色体片段插入受体细胞或生物的遗传物质中。供体细胞可以是独立于受体细胞或生物的一种微生物、植物或动物，或者是来源于微生物、植物或动物的细胞。受体细胞或生物也可以是独立于供体细胞或生物的一种微生物、植物或动物，或来自一种微生物、植物或动物的细胞。

因此，本发明提供了一些转染色体细胞和生物，其中，不管受体细胞或生物是一种微生物、植物或动物，都已向其中（或其祖先中）转移了可以是来自独立的微生物、植物或动物的供体细胞或生物的染色体或染色体片段。

在本发明的一种方案中，供体细胞或生物以及受体细胞或生物是两种不同的单个细胞或生物。他们相互独立，可以是同种或异种，同属或异属等。进一步说，供体细胞或生物可以是独立于受体细胞或生物的一种微生物、植物细胞或动物细胞。同样，受体细胞可以是独立于供体细胞或生物的一种微生物、一种植物细胞或动物细胞。

在另一个方案中，供体细胞和受体细胞同属于一种多细胞生物。在这种情况下，可从该生物的相同或不同组织中获得属于同一生物的两个细胞，其中一个作为供体，另一个作为受体。

本发明方法尤其适用于产生转染色体细胞或生物，这些细胞或生物具有许多不同的用途，包括如下，但不局限于此：

（1）转染色体细胞和生物（微生物、植物、动物）可以制备具有商业和/或医疗价值的产品，如免疫球蛋白或抗体或它们的片段、

激素、生长因子、凝血因子、象纤维蛋白溶酶原活化因子类的酶等。

(2) 转染色体生物(微生物、植物、动物)的改良株可含有所要求的特性,如干旱/害虫抗性、除莠剂抗性、抗病性、快速生长和/或繁殖率等。

(3) 转染色体动物和细胞可用来作为动物模型系统,包括人疾病和其他病理条件的模型。这些模型有利于药物治疗、诊断试剂和/或方法以及其他病人治疗法的发展。例如,在亨廷顿舞蹈病、成年多囊肾病、老年痴呆症、唐氏先天愚症、癌症、自身免疫病、心血管疾病、传染病如艾滋病、肝炎或其他已知和未知病因等病理状态中使用。

(4) 转染色体细胞和生物可作为染色体文库,以促进基因连锁图的测定和整个基因组的顺序测定。本发明的技术在这方面的运用包括,构造用于人基因组顺序测定的人染色体库,和构造植物和动物染色体库,用于基因连锁图的测定,以促进培育商业上和/或农业上的重要植物和动物中有价值的特性;和

(5) 在转染色体细胞和生物中,掺入注射的外源染色体片段或用注射的外源染色体或染色体片段取代染色体的特定片段,可以缓和或纠正病理状态,或者对一种或多种选择的特性按要求进行修正。

本发明还提供了一些含有多个相同或不同外源染色体或染色体片段的转染色体细胞或生物及其制备方法。这包括带有任何外源染色体和染色体片段结合物的转染色体细胞或生物。这些染色体或染色体片段可来自一种和几种生物,而且如果是来自一种生物,这些染色体片段可以是来自同一或不同个体的相同或不同细胞。

本发明的转染色体细胞可以是原核生物或真核生物细胞,象微生

物和动物或植物细胞。本发明还提供了一些转染色体动物和植物，它们的生殖细胞和体细胞含有一种外源染色体或一种外源染色体片段。这些染色体或染色体片段是通过本发明方法掺入一种受精或未受精的卵母细胞、精子、生殖细胞、该动物或植物的体细胞、该动物或植物的胚胎系细胞或该动物或植物的祖先中去的。本发明中的一种情况是，这种转基因动物最好是一种非人哺乳动物，更好是小鼠。

本发明用于将染色体或染色体片段从供体细胞或生物转移到受体细胞或生物的方法包括，分离一种供体细胞或生物的染色体或染色体片段，然后向受体细胞或生物的遗传物质中插入供体细胞或生物的染色体或染色体片段中的大部分核酸，其数目大于核酸碱基原始数目的20%。本发明方法使一种或多种已识别基因的转移以及含有一种或多种未定性基因的遗传物质的转移成为可能。

本发明的分离步骤还可包括下列步骤：（1）制备可回收的供体细胞或生物的一个或多个染色体；（2）选择感兴趣的染色体或染色体片段；（3）回收该染色体或染色体片段；和（4）将回收的染色体或染色体片段装入一个移液管或其他合适的装置中（见下文）。

制备步骤包括任何产生适于随后的回收步骤的染色体的结合步骤。选择步骤包括任何识别待回收的染色体或染色体片段的结合步骤。可以通过染色体的形态学检查来鉴别染色体，即通过染色体核型分析中常用的染色体谱带法或其他方法如原位杂交分析，或染色体特定抗原与选择性抗体的染色反应来识别染色体。

如果所转移的是一个染色体片段，那么回收步骤包括从供体生物的染色体上切下一个染色体片段，并将它从供体生物的剩余染色体处移开。如果转移一个完整的染色体，那么回收步骤包括将整个染色体

与该供体生物的其他染色体分开。

操作步骤还包括，将回收的染色体或染色体片段与一种活化溶液接触，并将该回收染色体或染色体片段和活化溶液吸进移液管或其他合适的设备中（见下文）。

可用于这种操作步骤的其他方法还有，可以使用一种含有类脂成分的活化溶液，它可以将该回收染色体或染色体片段包裹在脂质泡中。还有一种方法，可将回收染色体或染色体片段吸到一个微粒上，通过微型射弹枪插入细胞中（Klein等，*Nature* 327: 70—71, 1987）。

可以将染色体或染色体片段吸到注射器、微电极或其他具有正向移动能力的合适装置中，以代替移液管。

该操作步骤还可以包括，用一种生理上可接受的液体在移液管内或其他合适装置内稀释活化溶液。这种步骤最好是当活化溶液中含有对受体生物有害的成分时进行。

也可不使用活化溶液，将回收染色体或染色体片段置于生理上可接受的溶液中。然后将染色体或染色体片段和生理上可接受的溶液一起吸到移液管或其他合适的装置中，或者还可以运用上述列举的另外的操作方法对染色体或染色体片段进行处理。

染色体/染色体片段分离步骤中所采用的所有步骤可在任何适宜的温度下进行。在染色体的制备中，如果通过标准方法制备染色体，最好该过程是在所建议的温度条件下进行（见例如 “MacGregor 和 Varley” 动物染色体研究”，John Wiley 和 Sons, 1983）。在选择、回收和操作步骤中，有一个较宽的适宜温度范围。这个宽的温度范围优选为 0—25℃ 之间，最好是在大约室温下

进行。

在染色体制备步骤中，高湿度是有害的，一般该制备步骤最好在低或最低的湿度（即 $\leq 50\%$ 相对湿度）下进行。但选择、回收和操作步骤都可在一个较宽的室内湿度范围内进行。

在回收步骤之前，可以观察供体生物的一个或多个染色体。该观察步骤最好包括用一种对受体生物基本上无毒的染料将供体生物的一个或多个染色体染色。另外，还可以通过几种光学方法使供体生物的一个或多个染色体显象，例如相差照相、霍夫曼调变透镜、

Nomarsky 透镜或差分干扰对照透镜等。

其中一个优选方案是，将观察步骤运用于选择步骤中以有助于染色体的识别。可以通过某些染色体的整个外形和相对臂长来确定其特性。在由于相似形态的多个染色体存在而引起混淆不清的情况下，可采用本领域已知的各种方法加强对染色体的识别，包括染色体谱带分析、原位杂交分析或染色体特异抗原的抗体反应等。

本发明方法的插入步骤还包括运用一个移液管，或任何具有上述转移能力的其他装置，装入染色体或染色体片段，在允许将染色体或染色体片段掺入受体细胞和生物遗传物质的条件下，将染色体或染色体片段注射到受体细胞或生物中。

在插入步骤中，除了通过移液管进行注射外，还可采用其他插入方法。其他合适的方法包括用脂质小泡调节膜的融合以将外源遗传物质插到受体细胞中，或者用一种微型射弹枪将吸附有染色体或染色体片段的颗粒插到受体细胞中。

插入步骤中可插入多个染色体或染色体片段。这可以包括从一个种的相同或不同细胞，或者从不同种的相同或不同细胞中得到的染色

体或染色体片段，还可以包括人工染色体（下面讨论）或染色体、染色体片段或人工染色体的任意结合。

插入步骤中的插入方式是，将外源遗传物质掺入受体细胞的核或前核中。另外，无核的有丝分裂或减数分裂细胞也可作为插入受体。在后面的情况下，当有丝分裂或减数分裂的末期核膜重新形成时，就可以将外源遗传物质掺入受体细胞核中。

外源遗传物质的掺入受到一般存在于受体细胞中的内源重组和 DNA 修复酶的调节。本发明方法能将全部染色体或染色体片段的大部分掺入受体细胞的遗传物质中。这种掺入率足以在制备的转染色体生物中观察到所需特性。因此一般来说，这种掺入水平在有利情况下可包括至少大于大约 20% 已转化的外源遗传物质。

不过，在掺入受体细胞基因组之前，有些染色体物质已丢失。这可能是因为，如果（例如）与染色体或染色体片段连在一起的一定量的蛋白发生丢失，则会引起裸露的 DNA 结构域发生一些有限的核酸降解。这种连接蛋白质的部分丢失可以有几种原因，象蛋白分解或机械干燥等引起的降解。

然而，将人工或自然的外源染色体或染色体片段掺入细胞中时，可以引起外源 DNA 整合至细胞的内源染色体中。不过，外源遗传物质也可能作为附着成分存在于受体生物的基因组中；也就是说并未插入受体细胞或生物的染色体中。

在这种情况下，外源染色体物质能通过下一个细胞分裂周期进行分离，仍然可保持为一个分离的染色体。当外源遗传物质中（不管是自然还是人工合成的）含有几种 DNA 成分如着丝粒、端粒和复制原点顺序时，这种情况最容易发生。尽管这样，也有可能通过从存在于

受体细胞基因组的遗传信息中获得这些成分，而将这些顺序掺入外源遗传物质中。

在插入过程中，当掺入多个染色体片段或染色体时，则会将一种或多种与 DNA 分子结合在一起的蛋白质掺入受体细胞的基因组中，并且这种掺入受到与掺入单个染色体或染色体片段相似的介导机理。应当注意到，存在多个外源染色体或染色体片段时，存在于受体细胞中的这些独立大分子的物理结合，会在内源 DNA 重组和修复酶的作用下发生共价连接。在这种情况下，多个外源染色体和染色体片段会共整合至受体细胞的基因组中。

本发明所用染色体或染色体片段的来源可以是动物、植物或微生物。本发明所用染色体或染色体片段也可以是对自然的染色体或染色体片段的合成修饰，或者是通过合成制备的全新的具有上述蛋白保护套的 DNA 大分子。

这种合成修饰的自然染色体或全新合成的带有蛋白质的 DNA 分子，在本文中称为人工染色体以示区别。

这种人工染色体可通过不同方式产生。例如，在插入之前，可将多个自然染色体或染色体片段连在一起。这包括染色体或染色体片段的共价连接或非共价连接。也可通过顺序缺失、插入、或替代或其他外遗传修饰法（如 DNA 甲基化或脱甲基）对自然染色体或染色体片段进行修饰。

另外，可将自然产生或通过重组法体外制备的线性、环形或其他拓扑构型的 DNA 大分子，通过与可使 DNA 包裹成致密状态的特定蛋白质结合在一起，转化到人工染色体中。具有这种特性的蛋白质包括象亚精胺这样的聚胺类或其他蛋白质中的组蛋白。也可通过将自然

染色体或染色体片段与体外制备的带有蛋白质的DNA结合在一起，来构造人工染色体。

当需要同时向一种受体细胞或生物中掺入未连锁的特性时，插入人工染色体具有特别的优越性。另外，对存在于自然染色体或染色体片段中，或存在于构成人工染色体的DNA分子中的特定核苷酸进行修饰，可以调节表达水平或由插入的外源遗传信息表达的表型。

本发明所述的用于回收选择的染色体物质作为DNA转化来源的方法，是本发明的一个重要而且新颖的内容。正是由于本发明这方面的内容，直接或间接地将本发明DNA转化方法与所有其他曾经描述过的DNA转化方法，包括美国专利4,873,191的方法区别开来。

首先，使用染色体或染色体片段转移遗传信息，能够掺入非常大的DNA连续片段。将DNA在染色体中与蛋白部分紧密结合在一起，可保护外源DNA不受内源核酸酶的降解，而且，还可使大DNA分子保持高度致密状态，从而保护DNA不会因插入过程中的机械剪切发生断裂。因此，运用本发明所述的染色体转移法，可以产生含有至少10百万碱基或更大DNA片段的转染色体细胞和生物。而美国专利4,873,191所述的通过注射裸露DNA掺入的DNA片段的大小通常不大于50—100千碱基。

第二，用染色体或染色体片段转移遗传信息与注射裸露DNA的方法相比，可以得到更高的转化率。因此，发明者发现，只插入人染色体片段的一个拷贝，即可将人DNA掺入小鼠合子中。而如美国专利4,873,191所述的向受精小鼠卵母细胞中注射裸露DNA时，通常需要导入成百上千的外源DNA拷贝。

如果不受到理论上的限制，这种较高的外源染色体和染色体片段的转化率，可能是由于结合在染色体 D N A 上的蛋白质防止了核酸降解。而裸露的 D N A 易于受到降解影响，许多情况下，在有机会插入受体细胞基因组之前就很快降解。

第三，染色体或染色体片段的使用，不仅能象美国专利 4, 873, 191 所述将外源遗传物质插入受精卵母细胞的前核中，还可以插入任何受体细胞核中和任何有丝分裂和减数分裂细胞的胞浆中。尽管掺入某种分裂细胞胞浆中的裸露 D N A 可能会被内源核酸降解，但是，掺入某种分裂细胞中的外源染色体或染色体片段，和存在于有丝分裂细胞胞浆中的内源染色体一样，很少或不会受到不利因素的影响。

转移染色体物质与转移裸露 D N A 相比，其第四个显著优点是，能够产生含有外源导入的遗传特性的转基因细胞和生物，而且这些遗传特性未经生化定性或分子克隆。尤其是在这种遗传特性是由大于 200 K b 的基因或基因组编码的情况下，这种方法尤为重要，因为这些遗传特性用现有的 D N A 重组法不易于克隆。加之，注射这种大块裸露 D N A 时，由于机械剪切和核酸降解，也不可能不发生断裂。因此，制备转基因细胞和生物的本发明与上述美国专利 4, 873, 191 的显著差别在于，只有本发明公开了可表达尚没有重组 D N A 克隆的特性的转基因细胞和生物的制备方法。

本发明在几个重要方面与 Griesbach 所述的染色体注射研究相比也具有明显的差别。首先，在本发明方法中，要回收选择的染色体，然后再插入受体细胞中，而在 Griesbach 的研究中，所注射的染色体是从供体细胞分离出的总染色体中随机选择的。如果没有选择步骤对要插入受体细胞中的特定染色体进行识别，就必须产生大量的

转化体，然后通过筛选寻找那些可能含有某个或几个感兴趣的特定染色体的转化体。

如果需要向受体细胞中插入多个染色体或染色体片段，在这种情况下，上述后者的方法则完全无能为力了。因此，如果随机注射染色体，那么向任何受体细胞中掺入合适的染色体或染色体片段的结合体，并同时将这些染色体或染色体片段掺入其基因组中的可能性是非常小的。

与Griesbach的研究相比，本发明方法的第二个重要优点是本文所述的回收方法，此方法除了可以回收选择的完整染色体外，还可回收特定的染色体片段以供插入使用。如果是随机地整合，即使可能的话，想整合任何所给染色体的某一准确片段也是很不容易的。此方法与本发明的选择步骤结合在一起，可以避免注射大量染色体时所出现的染色体掺入的随机性，并可选择性插入靶遗传物质。

因此，运用本发明，不仅可以大大提高产生含有特定染色体插段的转化体的效率，而且，当需要只插入共同存在于同一染色体上的遗传特性集合体中的一个亚单位时，或当需要插入位于几个不同染色体上的遗传特性时，本发明方法是必不可少的。

本发明染色体转化法的一系列新颖特征可有很多用途，这些用途是其他用于制备转基因细胞和生物的外源DNA插入法所不能达到的。

例如，由于本方法能够转移10—30百万碱基长的DNA片段，因此，在转移那些由非常大的基因（如分子营养不良的营养不良基因）所编码的遗传特性，和那些由基因复合体（如人免疫球蛋白复合体）所编码的遗传特性时，本发明的方法是一种理想的方法。

例如，众所周知，对于每种类型的免疫球蛋白链来说，包括κ轻

链、 λ 轻链和重链，都有一个DNA片段的独立库，从该库中可以最终合成一个编码一条多肽单链的基因。每个DNA顺序库都带有一个位置不同的V区片段，该片段位于染色体的一个或多个C区顺序以上成千上万个碱基对处。实际上，DNA顺序库在某种程度上更为复杂，因为多肽链的每个V区是由两个或三个独特V片段编码而成，而对于轻链来说是由一个或多个J片段编码而成，而对于重链来说则是由一个或多个D片段编码而成。

其他DNA转移法不能够转移编码这些多肽链的大DNA片段。从另一方面讲，本发明方法尤其适用于转移编码一种功能性免疫球蛋白或其部分所必需的大DNA片段。因此，运用本发明方法中的一个方案，能够将含有完整免疫球蛋白基因的染色体或染色体片段从一种生物或细胞转移到另一种生物或细胞。

例如，运用本发明的这种方法，可以将含有完整的V、J和C片段的染色体或染色体片段，从一个人细胞转移到一个其他动物如小鼠的受体细胞中，以产生一种具有表达人免疫球蛋白或其部分的淋巴细胞的转基因生物。从这种动物中可得到完整的人免疫球蛋白，并且这种动物可以作为如制备人单克隆抗体的B淋巴细胞的来源。

本发明的方法尤其可用于将人染色体14、2和22的染色体或染色体片段从一个人细胞转移到一个其他哺乳动物的受体细胞中，以产生一种具有表达人免疫球蛋白或其部分的淋巴细胞的转基因细胞或生物。这种人染色体14、2和22各自可编码含有人V、J、D和C完整片段的人免疫球蛋白的重链、 κ 轻链和 λ 轻链。

从这种意义上讲，由于几种原因，使用一种啮齿动物如小鼠作为受体生物是本发明方法的一个尤为优越的方面。首先，由于完整的人

免疫球蛋白是在一种“非人类”遗传背景中表达的，因此转染色体生物可表达针对人体内不具有遗传多态性抗原的人类抗体。再者，如果在免疫球蛋白中去除等位基因，则可保证B细胞能够产生只有一种免疫特性的抗体。第二，转染色体小鼠会容易地被各种可能的有毒免疫原所免疫，并产生“人类”抗体，而不存在对人体进行免疫时所遇到的道义障碍。第三，运用啮齿动物（尤其是小鼠）作为转染色体宿主生物，可使用精心设计的细胞融合系统从转染色体小鼠的B淋巴细胞中制备人单克隆抗体。制备杂交瘤细胞系和小鼠骨髓瘤细胞系的方法是广为人知和容易得到的。例如见，Goding, 1986, 单克隆抗体：理论与实践，第2版，Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, P P. 33—42; 59—77。另外，由于可以使用啮齿类骨髓瘤细胞，任何可能存在的外来因素如病毒都可以是来自非人类的。这与使用转化的EB病毒人细胞系的系统相比具有重要的优越性。因为这种系统经常会受到来自人体的外来因素的污染，包括特殊的致癌病毒因素。最后，使用本发明方法还具有一些其他优越性，将小鼠用于本发明既容易又方便，而且鼠类繁殖快，其怀孕时间大约21天，第一次交配在4到8周之间。

因此，运用本发明的方法，可方便地制备转染色体小鼠，用来作为表达整个人免疫球蛋白复合物的B淋巴细胞的来源。因此，这些转染色体小鼠可以用来简单便易地大量制备针对任何所述抗原的均一的人单克隆抗体。因此，运用本发明方法可方便地制备一些在本发明之前不能得到的人单克隆抗体。

在实际运用中，本发明中的一种方法包括下列步骤：

(a) 用某种抗原免疫一种转染色体动物，该动物的细胞（生

殖细胞和体细胞)含有一种带有编码人免疫球蛋白复合物或其部分的遗传物质的人染色体或染色体片段。用包括下列步骤的方法将人染色体或染色体片段移入该动物或其祖先的胚胎中:(I)从人体细胞中分离染色体或染色体片段;和(II)通过将染色体或染色体片段注射到该动物或其祖先细胞中的方法,将人细胞染色体或染色体片段的大部分插入到该动物或其祖先的遗传物质中。

(b) 收集B淋巴细胞,该细胞能够制备与来自淋巴结、脾或免疫的转染色体动物的外周血液的抗原发生反应的抗体;和

(c) 将收集的B淋巴细胞与一种骨髓瘤细胞系融合,制备一种可产生抗该抗原抗体的杂交瘤细胞系。

根据本发明的一个优选方案,该转染色体动物是一种啮齿动物,尤其是小鼠,而该骨髓瘤细胞系是一种啮齿动物细胞系,尤其是一种鼠骨髓瘤细胞系。这种杂交瘤细胞系可以通过体外细胞培养,或在体内作为一种相容宿主动物的腹水瘤或皮下固体瘤繁殖生成。

本说明书中所用的抗原应当包括能够诱导抗体应答的任何部分,包括但不限于,细菌、真菌、病毒、支原体、寄生虫、组织相容性、肿瘤和分化抗原等。

运用本发明的另一种方法,可以产生一些能够生产具有商业和或医药价值产品的转染色体细胞和生物,包括微生物、植物和动物。例如,可以制备一些生物和细胞作为某些产品的有效而经济的来源,这些产品包括但不限于:激素、生长因子、凝血因子、酶、抗体等。

本发明的转染色体植物和动物还包括具有农业价值的植物和动物。例如,可以通过本发明的方法提供一些具有农业价值的转染色体动物,包括鸡、肉牛、水牛、产奶动物、猪、火鸡、羊等。通过本发明所提

供的具有农业价值的转染色体植物包括谷类、小麦、甜菜、大豆、水果树、胡萝卜、菠菜、石刁柏、土豆等。

因此，运用本发明的另一种方法可以产生一些具有所需特性的生物和细胞包括微生物、植物和动物。例如，可以产生一些具有所需特性的植物和植物细胞，这些特性包括但不限于：增强的抗旱能力、抗虫害能力、抗除莠剂能力、酸、碱性增强或减弱的耐受性、生长率和/或生产能力的增加、高度的增加或减少等。

另一种情况是，可以制备一些具有所需特性的动物，这些特性包括但不限于：疾病和害虫抗性的增加、生长和生产速度的加快、肉类质量提高、肉或奶产量增加等。作为其他用途，本发明还可制备能够降解废物和/或有害物质的转染色体微生物，并且将它们用于环境控制和废物处理系统中。

运用本发明的一个方案，可以产生一些动物或细胞作为人和动物疾病及其他病理状态的模型系统，以有益于药物治疗、诊断技术和试剂及其他病人治疗法的发展。这些疾病或病理状态可由遗传编码的特性产生，或由传染因素或环境因素产生，或者在某种情况下病因是未知的。当这些疾病或病理状态是一些基因编码的且已知染色体位置的显性特性时，可用本发明方法来制备该疾病和病理状态的动物模型。下面是解释此实施方案的一些实例，但它们不能以任何方式限制本发明方案的范围。

例如老年痴呆症是一种与痴呆有关的退化性神经疾患，在美国发病人数有2.5百万。在有疾病史的家族中，发生此疾病的可能性在90岁时增加50%。遗传资料表明，老年痴呆症出现的家族早期发作危险性与染色体21上受影响基因的单拷贝的显性遗传有关。由于

在发达国家象美国、加拿大和西欧国家中，整个人口老龄化加快，因此，寻求一种有效的治疗措施来控制和治疗这种退化性疾病是迫切需要的。另外，还非常需要更好的方法和试剂帮助准确的诊断这种老年痴呆症。但由于缺乏一种合适的动物模型系统而阻碍了这方面的发展。

运用本发明的方法，可以产生一些象小鼠这样的含有一个来自老年痴呆症病人的染色体 21 合适片段的动物。这些动物可作为老年痴呆症的模型。它们对于测定有效地治疗这种严重疾病的药理学因素意义之大是难以估计的。而且，有了这种动物模型，就能探索这种疾病的生理和生化基础，而且可以设计更合理的有效治疗方案和诊断试剂与方法。

另一个例子是，唐氏先天愚症通常是由于染色体 21 的三拷贝遗传（三染色体 21）造成的。这种遗传疾病有几种表现，包括智力发育迟缓、白血病发病危险性增加、免疫紊乱、早老症和早期出现与老年痴呆症有关的病理改变。唐氏先天愚症是出现智力发育迟缓的最普遍原因。发现其发病率为出生婴儿的 0.1% 和所有未出生婴儿的 0.5%。

这种遗传病的发病率随母亲年龄增大而大大提高，而且目前在美国、大部分西半球和西欧有两个孩子的家庭倾向于晚育，因此这种发病率的数目可能会增加。目前对于这种疾病尚无治疗措施，而且其病因学也不清楚。而且，也没有好的动物模型以用来寻求减缓这种退化性疾病痛苦的有效疗法。

遗传资料表明，人染色体 21 的某个特定片段的遗传会导致唐氏先天愚症的发生。因此，运用本发明的染色体转移技术，能够产生可作为这种疾病模型的转染色体小鼠。有了这种动物，便可以寻求用于

控制和减缓与这种遗传病相关的病理反变的药物和疗法。另外，有了这种动物和老年痴呆症动物模型，便可以弄清两种疾病中导致痴呆的共同缺陷所在。这一资料有助于制定一系列方案，来识别治疗其中一种疾病的疗法，而且这种疗法比治疗另一种疾病更为有效。

另一个例子是，亨廷顿氏病是一种不可治愈的具有后期发作表现的退化性神经疾病，它引起人生早期劳动力的丧失。这种疾病与显性表达的染色体4上的一个缺失基因有关。因此，运用本发明的转染色体方法，掺入一个来自该病人染色体4的合适片段，可制备带有这种亨廷顿氏缺陷的转染色体小鼠。这种动物可以作为研究这种退化疾病的基础和寻求这种致死性疾病的有效疗法的动物模型。

另一个例子是，成人多囊肾病是一种常染色体显性遗传病，它与多个重要器官包括肝、肾、胰和脾中出现囊有关。这种疾病通常到三十或四十岁时才可诊断出来，并且有肾功能的进行性退化。如果不进行肾透析和肾移植疗法，这种疾病会导致在50岁之前死亡。成人多囊肾病是一种最普通的显性遗传病，其发病率大约是1/1000。这种疾病在美国和欧洲是导致功能性丧失的第三最普遍的因素。有9%的所有肾透析病人患有这种疾病。

虽然这种疾病出现流行，但目前尚没有有关这种退化疾病的基础数据，控制或治疗这种肾功能进行性丧失的治疗措施也是未知的。不过，最近得到的遗传资料清楚表明，此疾病是由于染色体16的某个显性缺陷基因的遗传直接引起的。

因此，运用本发明的染色体转移技术，可将这种病人的合适染色体片段掺入象小鼠这样的动物中，来制备一种成人多囊肾病的动物模型。有了这种动物模型系统，对于寻求控制和治疗这种流行疾病的方法

恶性骨髓瘤是一种人口发病率增长最快的癌症。由于染色体 1 中的某个显性特性的遗传，这种受害者中大约有 8—12% 易于发生这种肿瘤。目前，有关此疾病的分子或生化基础一无所知。已经识别出导致这种癌症危险性增加的基因。因而，运用本发明的染色体转移技术，可将这种突变体特性掺入到象小鼠这样的动物中，从而产生一种可用于研究这种疾病的模型。这种动物模型可用于筛选和制备药物，以及制定其他有用的病人治疗和处理方案。

其他的说明性例子有，本发明的方法可用于那些与单突变基因或染色体变异和代谢疾病有关的遗传变异，这些变异已被定位于指定的常染色体上（如上述），对此的描述分别见表 3 7—1 和 3 4—3，James B. Wyngaarden 和 Lloyd H. Smith 编，Cecil Textbook of Medicine Vol. 1, 18th ed., W.B. Saunders Company, P. 169, 156 (1988)，本发明参考其公开内容。

运用本发明方法的另一个方案，还可以产生一些动物和细胞，以有助于对自身免疫病、心血管疾病、传染病如艾滋病或肝炎引起的病理状态或其他已知或未知病因的病理状态寻求药物治疗、诊断方法和/或试剂及其他病人治疗方案。运用本发明的方法，还可以制备一些含有某种可带来各种病理状态特征的染色体或染色体片段的转染色体细胞或动物。例如，可以将人遗传物质掺入细胞或动物中。该动物可以感染与艾滋病有关的 HIV 病毒，并且繁殖一种转染色体非人细胞或动物。这种细胞或动物可作为一种非常有意义的模型系统，以寻求治疗或诊断艾滋病的药物或试剂。

采用本发明的另一种实施方案，可产生可作为人染色体库的转染色体生物和细胞，包括微生物、植物和动物。例如，通过产生转染色体小鼠或小鼠细胞集合体（均含有人染色体物质的不同片段），有可能形成动物或细胞系的“库”，该“库”将累积包含人基因组的所有染色体。

动物或细胞系的这种集合体不仅对研究工作极为重要，而且对生物技术／制药工业也很实用。这将大大促进人基因组图谱的测定工作，因为它可方便地提供目前只能用繁琐方法得到的遗传连锁资料。也许最感兴趣的是用此文库获取连锁资料，以加速限制片段长度多态性（RFLP）分析，从而测定与特异的人疾病有关基因的染色体位点。此外，某些动物或细胞系还可作为人的其他疾病或病理状态的模型，包括由于基因剂量效应产生的那些疾病。

除制造人染色体库以外，本发明的方法还能用于由任何细胞或生物产生类似的染色体库，该染色体库可由转染色体细胞系的集合体或转染色体生物组成。因此，该染色体库可来源于植物、动物或微生物，受体转染色体细胞或生物还能由植物、动物或微生物产生或由它们组成。除其他用途外，农业或其他工业上有用的植物和动物的染色体库能用于帮助测定所需特性的图谱并予以选育或测定不需要特性的图谱并予以删除。

在本发明方法的另一个实施方案中，能够产生转染色体动物、植物、细胞和微生物，其中，一个或多个内源染色体区域由一个或多个外源染色体片段代替，从而消除或减轻由被替代的染色体区中的遗传缺陷引起的疾病或病理状态。此外，这种染色体替代法可用于导入所需特性以代替不想要的由内源染色体区域编码的特性。

对单倍体生物来说，受体生物中内源遗传物质的替代结果能消除或减轻遗传缺陷，包括消除某种疾病或病理状态，或代之以所需特性。对二倍体生物来说，若缺陷或不需特性是隐性的，而且受影响个体对该缺陷或不需特性是纯合子的话，则在两个同源染色体中取代一个编码该缺陷或不需特性的染色体片段将减轻、消除或适当修饰该生物。若二倍体生物的缺陷或不需特性是显性的，且呈纯合状态的话，则必须用双取代法去消除受影响生物的缺陷，或在单取代后进行育种、交配或体细胞重组能产生消除了缺陷的后代。若二倍体生物的缺陷或不需特性是显性的，而受影响的个体是杂合子的，则取代一个含有该缺陷或不需特性的染色体即能消除、减轻或适当改善遗传缺陷或不需特性。该方法可推广到三倍体和更高倍体生物，特别是以不同状态染色体存在的各种植物。

若外源染色体片段的插入是由内源和外源染色体之间的某些同源顺序介导的，则可用外源染色体片段代替宿主生物中的内源染色体片段。通过注射染色体片段导入大块遗传物质时，更易发生这种同源性促进的重组过程，但注射DNA只能导入少量的遗传物质（其量至少相差1000倍，百万碱基对千碱基）。

如上所述，同源顺序的量直接影响进入宿主基因组的外源顺序进行同源重组的速率，同源顺序增加2倍，则测到的同源重组增加20倍（参见Capecchi, Trends in Genetics 1989, 5:）。因此，若导入的染色体含有扩展的同源区，则更易于用外源染色体片段代替内源染色体区，决定内源染色体取代效率的是外源片段中的同源度，而不是外源染色体插在内源非同源染色体中的位置。而且，发明人自己的资料（将含有人随体DNA顺序的着丝粒片段注入小鼠胚

胎中)说明,在受体细胞中更容易进行同源重组。发明人已测到导入小鼠着丝粒中的外源人着丝粒染色体片段含有相关小鼠的随体DNA顺序。

本文所用的术语染色体包括生物的遗传物质。与本发明有关的染色体包括含或不含RNA的原核和真核生物的遗传物质,包括DNA遗传物质,如RNA病毒。正如上述,与本发明有关的染色体至少包括与上述遗传物质有关的蛋白质、糖类和其他物质。

本领域的普通技术人员应该明白,上述核酸和其他组合物可包含在染色体中,这在一定程度上取决于该染色体物质的来源和性质。染色体片段是指比整个染色体少的部分染色体。染色体片段含有部分基因、一个基因或多个基因,或多个和多部分基因的结合。生物的遗传物质是指通过有性或无性繁殖能生成该生物后代的遗传物质。

本发明的染色体不包括亚微质粒和包含在这种质粒中的重组核酸。尽管有上述定义,但通过核酸与蛋白质结合而构成的人造染色体(含有少量亚微质粒和与蛋白质结合的重组核酸)仍包括在本发明染色体定义的范围內。

此外,遗传物质中含有由人造遗传物质繁殖的核酸(如质粒和其他重组核酸)的生物均能提供本发明所定义的染色体或染色体片段。

本文所用的术语生物包括单细胞生物如细菌和原生动物、病毒、真菌;多细胞生物如植物和动物以及单细胞和多细胞生物的组织和组织培养物。

本发明方法中所用的染色体可由任何原核和真核生物得到。来自哺乳动物、鸟类、植物和微生物的染色体是本发明所用遗传物质的合适来源。重组DNA或插入染色体内的重组DNA也是遗传物质的合

适来源。

待移植的特定染色体或染色体片段将取决于待移植的遗传信息。可用现有技术中对染色体基因或DNA定位的公知方法鉴别并选择本发明的染色体或染色体片段。

可通过形状或大小的鉴别、核型分析、原位杂交分析及染色体染色和显带的其他一般方法鉴别染色体。另一方面，可用分部分离染色体的生化方法如电泳、离心和光活化的分选法纯化本发明的染色体。对人造染色体来说，染色体可由编码所需基因或基因组的上述已鉴别的DNA分子组成。

用于实施本发明的染色体和染色体片段一般大于100 Kb，大于250 Kb更好；大于500 Kb更好；大于1 Mb最好。用本发明的方法可方便地移植0.3—1.0 μm的染色体片段（相当于10—30 Mb）。但是应该明白，小于100 Kb或大于30 Mb的染色体或染色体片段也适用于本发明的方法。

受体生物包括多种真核和原核生物，在产生转染色体细胞的本发明实施方案中，适用的细胞为哺乳动物、鸟类、植物和微生物的细胞。来自植物、哺乳动物或其他来源的组织培养细胞也同样适用。

在产生转染色体动物的本发明实施方案中，单细胞如受精和未受精的卵母细胞，最好是非人卵母细胞，精子和生殖细胞，也最好是非人的，以及胚胎中的其他胚细胞，包括多性胚干（ES）细胞（见下文）均适用于本发明。在本发明的优选方案中，受体细胞是非人胚细胞；最好是非人的哺乳动物胚细胞，如小鼠胚细胞。

将染色体或染色体片段注入受体细胞之前，先制备供体生物的染色体或染色体片段，从而选择并回收感兴趣的染色体或染色体片段。

最好将供体生物的染色体或染色体片段涂布在不明显非可逆地粘附染色体的表面上(本文称其为“非粘性的”),如处理过的玻璃或塑料。该表面本身可为任何形状,如凹形或管形或其他形状的玻璃或塑料。合适的非粘性表面是硅化玻璃。

本发明方法中所用的玻璃表面的硅化方法是將玻璃片浸入用水稀释(1:100)的Prosil-28 (Thomas Scientific)中,然后用水冲玻璃片,使其自然干燥。其他使玻璃表面不粘附的处理方法也是适用的。

可用普通方法将染色体涂布在表面上,适用的方法是使低渗休克细胞(即染色体源)涂布在硅化玻璃上。

涂布在表面上以前,还可使低渗休克细胞与一种固定剂混合,然后在固定剂中涂布在硅化玻片上,然后蒸发除去固定剂。各种固定剂都能用于该步骤,例如甲醇、乙醇、甲醇:乙酸或乙醇:乙酸的混合物(配比范围为20:1 V/V—2:1 V/V)。固定剂最好是一种含有甲醇:乙酸为2:1 V/V混合物的溶液。涂布结果是染色体被固定在表面,以便进行后面的选择和/或回收步骤。

若用真核细胞作染色体源,最好在有丝分裂阶段进行染色体分离。在细胞循环的这个阶段比其他阶段更易进行染色体鉴别和操作,因为有丝分裂的染色体其组织通常更为致密。为富集有丝分裂细胞,用普通方法如用乙酰甲基秋水仙碱或秋水仙碱处理,在有丝分裂时阻断供体。另一种方法是在细胞循环的有丝分裂阶段由同步化的细胞制得有丝分裂的染色体。用各种标准方法,例如胸苷阻断、羟基脲处理、细胞淘洗或光活化细胞分选法由细胞循环其他阶段的细胞纯化有丝分裂细胞,从而达到细胞循环的同步化。

在本发明的某些实施方案中，将染色体涂布在表面以前，先以大块混合物收获该染色体，然后再用电泳、离心或光活化分选仪或其他能富集或纯化用于插入的待回收的选择染色体的方法进一步分离。然后将适当纯化的染色体涂布在表面上以使用本发明方法进行进一步分离和回收。

若需要的话，将染色体涂布在表面后进行观测，以选择和/或回收所需的染色体或染色体片段。本发明方法的观测步骤包括用基本上对受体细胞无毒的染料使染色体染色。本文所用的术语无毒染料是指不会使DNA降解或不会明显降低受体细胞存活率的染料。这些染料包括碱性品红、用普通方法制备的吉姆萨氏或赖特氏染料。另一种染色法是用一般光学显微镜技术如霍夫曼调变透镜、差分干扰对照透镜、Nomarsky透镜及相差透镜。

在本发明的某些实施方案中，在涂布以前先进行选择步骤，用电泳、离心、光活化分选仪或其他富集或纯化染色体（用于插入的待回收染色体）的分离法分离染色体。将适当纯化的染色体涂布在表面（如玻片或试管）上，再用本发明方法进行分离和回收。

各种染色体鉴别方法均能用于选择步骤，这些方法包括一般的染色体染色法，例如用吉姆萨氏或赖特氏染料显带。假定显带的各种生物核型是独特的，则在选择步骤中用特征染色体显带图可准确鉴别染色体。但也能用未染色染色体的光学检测法鉴别染色体，因为在某些生物中，有些染色体具有与特征臂长比有关的独特形状。检测未染色染色体的合适的光学方法包括差分干扰对照透镜、Nomarsky透镜、霍夫曼调变透镜和相差透镜等等。

在选择步骤中所用的另一种合适的染色体鉴别法是原位杂交法，

与对已知存在于感兴趣的染色体或染色体区中的顺序特异的核酸探针进行原位杂交。另外，用对已知只存在于感兴趣的染色体或染色体区中的抗原特异的抗体进行染色体染色也能用于选择步骤中。该抗原包括核酸、蛋白质、糖类或其他化学物质。

选择步骤后，回收染色体或染色体片段。最好用玻璃吸管切割含有所要染色体区的染色体，并将切下的染色体片段从切下它的染色体处移开而回收染色体片段。切割核酸的其他方法，例如激光或酶介导的方法也适用于本发明。

在本发明的实施方案中，将整个染色体移入受体细胞，此时不必切割片段，而回收将包括使染色体定位，以便使其通过操作进入吸管中。该方法包括（例如）从表面上的其他染色体中取出该染色体。在本发明的实施方案中，由制备供体生物染色体可得到染色体片段，不必切割也能回收感兴趣的片段。

然后使切下的染色体片段或整个染色体进入吸管中。最好先使染色体或染色体片段与活化溶液接触，然后将染色体或染色体片段吸入吸管中。因此，用活化溶液有助于将片段吸入注射吸管或上述文献所述的其他合适装置中。

在本发明的优选方案中，将涂布步骤得到的染色体或染色体片段固定在表面上，本发明的活化溶液最好含有蛋白酶，还含有其他活化剂例如乙二胺四乙酸（EDTA）、聚乙烯吡咯烷酮和无毒染料。蛋白酶最好是胰蛋白酶。其他蛋白酶也适于作为活化溶液。无毒染料最好是碱性品红。其他适用的染料包括吉姆萨氏或赖特氏染料。活化溶液中各成分浓度可以改变，一般胰蛋白酶约为0.01% w/v—0.06% w/v；EDTA约为0.1 mM—1.0 mM；最好胰蛋

白酶为0.025%wt, EDTA为0.1mM。

然后将活化溶液中的活化染色体或染色体片段吸入注射吸管或上述文献所述的其他合适装置中。再在注射吸管顶端吸入生理上可接受液体以稀释活化溶液,同时使该染色体或染色体片段保持在吸管中。

该动作重复多次,以使用生理上可接受的液体使活化溶液充分稀释。

在本发明的其他一些实施方案中,将活化染色体或染色体片段装入存在生理上可接受液体的微电极或脂质泡中(参见列入本文参考文献的Paphadjopoulos等, *In Vitro* 16: 49—54, 1980)而不是装入注射吸管中。另一种方法是将染色体或染色体片段装在微型发射器上,如上面所讨论的。

生理上可接受的液体可是对受体细胞无害的任何液体。如果活化溶液中包括蛋白酶,则生理上可接受的液体中最好至少含有一种蛋白酶抑制剂。蛋白酶抑制剂最好是 ϵ -氨基己酸和苯甲脒-HCl。适用的液体为盐溶液和蛋白质溶液。

为了将染色体或染色体片段插入哺乳动物细胞中,优选的生理上可接受的液体是氯化钾溶液,浓度约为50mM的氯化钾溶液更好。更优选的生理上可接受液体是约10mM Tris溶液、约0.1mM的EDTA、约0.1%含有约50mM ϵ -氨基己酸聚乙烯吡咯烷酮和约5mM苯甲脒-HCl。含牛血清清蛋白的蛋白质溶液也适用于本发明方法及某些优选情况。可改变并调制所用的特定的生理上可接受溶液以适于受体细胞。

在本发明的某些实施方案中,活化溶液可为生理上可接受的液体。在这些实施方案中,不必用生理上可接受液体稀释活化溶液,该步骤可省去。

若受体细胞是动物胚细胞，则该胚细胞最好是一种细胞的受精卵母细胞。受精卵母细胞是已活化而且开始胚胎发育的卵。将精子与卵融合能实现活化，但也可用其他活化方法如用机械刺穿卵膜或电刺激方法。

在受精的卵母细胞期引入外源遗传物质将大大提高外源物质导入生殖细胞和转染色体动物体细胞中的可能性。这种已注入的卵母细胞还能用于产生胚干细胞系（由此而得到动物），从而提供含有外源染色体片段的转染色体株的生殖系传导。

在转染色体缔造动物的生殖细胞中存在外源遗传物质的意思是指，至少某些、或所有缔造动物的后代在其所有的生殖细胞和体细胞中均携带外源遗传物质。在胚胎后期导入外源遗传物质常常会导致缔造动物的一些体细胞或生殖细胞缺少外源遗传物质，而遗传外源染色体或染色体组的该动物后代在其所有的生殖细胞和体细胞中都携有外源遗传物质。

可用普通的显微注射装置实施本发明的方法，这些装置如下列文献所述：Gordon, J. W. 和 Ruddle, F. H., “基因至小鼠胚胎的转移：通过前核注射产生转基因小鼠”，Methods in Enzymology, Vol. 101, PP. 15, 411—433, Academic Press, 1983；Hogan 等，小鼠胚胎操作：实验室手册，冷泉港实验室，冷泉港，New York, 1986。本发明方法中所用的吸管按现有技术中公知的方法制备，例如按 Gordon 和 Ruddle 的上述文献或 Hogan 等人的上述文献中的方法稍加改进（如本文所述）。

通常在放大400倍的情况下，将染色体或染色体片段注入受体

细胞。注入细胞若不能附着在底层，则需要先固定受体细胞，如用移液吸管吸住。然后使受体细胞与装有染色体或染色体片段的注射吸管接通，将染色体或染色体片段注入细胞中，或注入细胞核中或受精卵母细胞的前核中，或注入有丝分裂或减数分裂细胞的细胞质或卵母细胞中。

染色体或染色体片段注入受体细胞后，在合适的细胞培养液中用普通方法培养细胞。在小鼠胚胎（即受精的卵母细胞和发育后期）情况下，可将受体细胞直接移入假孕雌性小鼠（母亲）或最好是怀孕雌性小鼠（母亲）的输卵管或子宫内，或先培养一天或多天，再植入假孕雌性小鼠，最好是怀孕雌性小鼠的输卵管或子宫内生长发育至出生。对1个细胞至4—8个细胞期的胚胎可进行输卵管移植，而对8个细胞期至胚泡期的胚胎可进行子宫移植。

另一种方法是培养转染色体胚胎以分离转染色体多性胚干细胞系（EVANS等，*Nature* 292: 154—156, 1981; Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7634—7638, 1981）。将这种转染色体干细胞注入胚泡期小鼠的胚胎中，接着移植到假孕雌性小鼠子宫内生长发育直至出生。由该方法得到的动物能提供由转染色体胚干细胞产生的生殖细胞，从而得到转染色体后代，该后代的所有体细胞和生殖细胞都是转染色体的。

在另一种实施方案中，本发明提供了多性胚干细胞。以本万法制得的转染色体胚胎作起始物，用一般方法（EVANS等的上述文献；Martin的上述文献）能制造多性胚干细胞。例如，使胚胎在体外生长至胚泡期，由透明带孵化后，附着在培养皿底层上，从胚胎（其

中滋养细胞已涂布在培养皿上)中分离暴露的内细胞团(ICM)。

然后使分离的内细胞团进行简单的胰酶消化,用小吸管用力切断该细胞团使其变成较小的细胞集合体,然后将该细胞集合体涂在丝裂霉素C处理的 γ 辐照的成纤维细胞饲养层中,该饲养层含有初级小鼠胚成纤维细胞或小鼠成纤维细胞的STO细胞。2天后显现出胚干细胞集落,其特征为核/胞质比很大,而细胞总体积小,在集落中的细胞没有明显的细胞边缘。

该胚干(ES)细胞系能长期保留在培养物中,移入小鼠胚胎的胚泡后将参与正常发育,在宫内移植后将形成嵌合的缔造小鼠,在某些情况下,该小鼠的所有3个生殖层中均含有由外源胚干细胞产生的细胞,包括在生殖系中的细胞。这样,该小鼠的后代提供了建立小鼠品系的工具,该小鼠品系含有ES细胞系的遗传物质。

因此,用注入染色体片段的小鼠卵开始分离ES细胞,生成的转染色体的ES细胞系含有可遗传的导入的选择的外源染色体或染色体片段,由注入这种ES细胞的胚泡生成的杂种小鼠培养后长成的小鼠,将含有由杂种缔造小鼠中转染色体ES细胞组成的生殖系的外源染色体或染色体片段。

上述ES干系的生成使含有所需外源染色体的动物繁殖成本大大降低并节省时间。因此,通过在培养物中先鉴别含有感兴趣染色体插段的ES细胞系,能用一般的嵌合胚胎法产生合适的转基因小鼠系而不必生成和筛选许多不同的转染色体小鼠系。采用ES干细胞系的方法能推广到小鼠以外的其他动物中,并能方便地用于所有哺乳动物胚胎。特别是用于将遗传特性导入大动物如饲养动物中,因为生产转基因饲养动物要比生产转基因小鼠麻烦得多,成本也要高得多。

用ES细胞能产生商品化的转染色体动物，但不能使外源遗传物质通过生殖系传导，或者其中的体细胞和/或生殖细胞是嵌合性的，而不是每个细胞都含有外源染色体或染色体片段。同样，由于其他原因，没用ES细胞生成的转染色体动物也可能是嵌合性的，但这些动物可适用于对前面的转染色体动物所述的多种用途。除了用ES细胞生成转染色体动物而产生嵌合现象外，嵌合现象还能通过聚集一个或多个小鼠胚胎分裂球而生成转染色体动物而产生，该小鼠胚胎含有插入的外源染色体或染色体片段，并具有一个或多个未注入小鼠胚胎的分裂球。如果外源染色体或染色体片段不是在注射时而是在一次或多次细胞分裂后整合的，则也可能产生嵌合现象。产生嵌合现象的再一个原因是，外源染色体或染色体片段导入受体基因组后将从某些细胞中消除。这些原因和其他原因能直接或间接导致所生成的转染色体动物产生嵌合现象。在生殖系和/或体细胞组织中可观察到嵌合现象，在极端情况下，很可能导致外源染色体或染色体片段的体细胞或生殖细胞的缺乏。

但值得注意的是，这种嵌合的转染色体动物可用于上述的若干商业用途。例如，即使小鼠中不是每个B淋巴细胞都含有编码人免疫球蛋白基因的外源染色体片段，但这种小鼠仍可用于生产人抗体（如上所述）。同样，嵌合的转染色体动物可用作疾病的模型。事实上，在某些情况下，嵌合的转染色体动物实际上是有益的，例如若动物的每个细胞都存在外源遗传物质的话，则对动物健康和生存会有不利影响。还应注意，即使嵌合会导致不能由生殖系传导，但是，由于可得到含有插入的合适外源染色体或染色体片段的ES细胞，因此可方便地制造更多的转染色体动物。

关于小鼠胚胎的应用可参考下列文献：Gordon, J. W 和 Ruddle, F. H. “基因至小鼠胚胎的转移：通过前核注射产生转基因小鼠” *Methods in Enzymology*, Vol. 101, P P 411—433, Academic Press, 1983; Hogan 等, 小鼠胚胎的操作：实验室手册，冷泉港实验室，冷泉港，New York, 1986. 上述方法经修改后均适用于本发明。

对于其他种的胚细胞来说，注入染色体或染色体片段以后，将胚胎移入假孕雌性或最好是怀孕雌性动物中，或培养后植入假孕雌性或最好是怀孕雌性动物中，或按需要用现有技术的公知方法进行处理。

在本发明的优选方案中，用一般方法将已注射染色体或染色体片段的受体细胞植入怀孕雌性的输卵管或子宫中，以便生长发育直至出生。如上述文献的实例3所示，本发明人发现怀孕雌性的胚胎产率明显高于假孕雌性。在实例3中测到的怀孕雌性的胚胎产率比假孕雌性增加100%以上。

因此，本发明的最佳实施方案中采用怀孕雌性以利于胚胎的发育。这些怀孕雌性动物是与正常雄性交配的雌性，因此怀有它们自己的仔，而不是象通常用DNA注射法生产转基因动物那样由雌性与切除了输精管的雄性交配而产生的假孕雌性。这种差别对提高注入有染色体片段胚胎的出生率极为重要。

怀孕雌性中内生仔的存在有利于受孕，这可能是由于提供了合适的激素平衡，从而使子宫上皮更易接收植入物并有助于胚胎进一步发育。怀孕雌性可与正常的雄性关在一起，通常在检测到阴道塞入精子的那天下午，或在受孕的最初5天内任何时候进行使用。可根据外源胚胎的发育期选定移植胚胎的精确时间。

在大多数情况下，雌性动物含有它们自己的受精卵产生的胚胎，其数目为0—16，这取决于雌性的年龄及所用品系。用8—12周龄的CD1雌性，通常在交配的雌性中发现有12—16个胚胎。

可用遗传标记（例如皮毛颜色和眼睛色素的差别）来区分由注射外源导入染色体片段的卵母细胞产生的胎儿或小鼠和由内源未注射胚胎产生的胎儿。例如，代用的CD1（白化体）与B6D2F1雄性（黑色皮毛）交配将生成深色眼睛和皮毛的胎儿和动物。若外源导入胚胎是由SWR/J（白化体）雌性与SJL/J（白化体）雄性交配产生的，结果得到的胎儿和动物将长有红眼睛和指示它们白化体状态的白色皮毛。该方法很容易区分由注射染色体片段卵产生的白化体小鼠及由内源胚胎产生的着色小鼠。也能用其他遗传标记，例如同功酶标记、组织相容性抗原等，或其他明显的形态特征例如弯曲特性等，或行为的改变或能直接或间接检测或测定的任何其他可辨别的特性。

本发明还能用于由本发明方法生成的转染色体动物或植物产生细胞系。用一般的细胞分离法可生成该细胞系，并在一般培养条件下繁殖。该细胞系有各种用途，包括模拟疾病或病理状态、生产生物化合物、遗传连锁的分析等。

本发明方法还可直接将染色体或染色体片段注入组织培养细胞中，从而生成转染色体细胞系。组织培养细胞包括动物或植物的。用组织培养细胞作受体对植物来说特别重要，因为在限定的条件下，完整植株能容易地由组织培养细胞再生（参见上述文献）。同样，将染色体或染色体片段直接注入多性动物胚干细胞也能由生成的转染色体动物产生转染色体干细胞。

下列细胞是适于作本发明受体细胞的植物细胞：例如分生细胞、

生殖细胞、愈伤组织、小孢子、花粉，及体细胞胚或合子胚。由于存在纤维素或其他结构分子，某些植物细胞的壁很厚或很硬。当这些细胞是受体细胞时，必须用普通方法，如酶消化，在插入外源染色体或染色体片段前去除结构分子以使它们转成原生质体。

对于未去除细胞壁的细胞来说，可用较硬的吸管（或上述文献中的其他合适装置）穿透细胞壁。为便于插入染色体，还能用激光介导和其他方法，例如用微型发射器刺穿细胞壁。也能用细胞壁的局部酶消化以帮助插入或注入过程。还必须控制固定注入细胞所用的仪器或其他条件，或该方法的其他步骤。用本发明方法生成的转染色体植物细胞产生转染色体植物也包括在本发明范围内。

由体细胞组织或含转染色体细胞的愈伤组织再生植株能得到本发明提供的植物来源的转染色体生物。由体细胞组织再生正常植株是众所周知的，参见列入本文的参考文献，Horsch等，*Science* 227: 1229—1231, 1985。例如，许多植物能容易地再生，只要将由一个叶片长出的小片细胞组织放在潮湿的营养介质中即可。也可由愈伤组织（最初从成熟植物上切割下的紊乱的未分化的细胞团，然后在组织培养中无限生长）再生整个植株。用合适的植物激素处理，诱导愈伤组织分化为根和茎。最后能再生含有可育花的整个植物。

本发明的方法可用于制备体细胞组织和含转染色体细胞的愈伤组织。然后用这些组织产生整个转基因植物。

使用遗传工程构建的T₁质粒改良作物的主要问题是，许多主要农作物或单子叶植物能抵抗土壤杆菌的感染。虽然有些人认为土壤杆菌能感染某些单子叶植物，如百合和天门冬属，但主要农作物如玉米

和小麦还没能成功地用土壤杆菌感染。

本发明方法的优点在于不依赖于用土壤杆菌或其他载体感染目的细胞，因此能产生主要农作物的转基因植物，并提供一种简便方法以经济地感染重要的单子叶植物。

虽然Griesbach的上述研究已利用显微注入大块分离的染色体以产生转基因植物，但本发明方法与Griesbach的方法（参见上述讨论）有许多明显差别。主要差别之一是本发明方法选择和回收确定的染色体区域以用于插入，而Griesbach研究的方法中是注入由矮牵牛（*Petunia*）分离得到的整个染色体混合物的随机集合体。

精确测定待移植遗传物质的能力对于得到所需特性的转基因植物的可能性和效率来说是极为重要的，没有这种能力染色体注入法就不能经济地用于商业用途，甚至也不能用于研究目的。然而，Griesbach的研究结果似乎证明了将染色体显微注入植物原生质体的可能性，这些细胞能再生成具有强再生功能的完整植物。因此，用本发明方法能生成具有特定遗传特性的植物，而且对商业上具有所需特性的园艺和农业植物来说是极为重要的。

在另一个实施方案中，本发明提供了能生产相当于微生物、植物或动物基因源的基因产物的转基因植物。现有技术已表明转基因植物能产生动物抗体（参见 Hiatt 等，*Nature* 342: 76—78, 1989）。Hiatt 等人用含各种质粒的土壤杆菌转化烟草植物。并发现所得到的转基因烟草植物能产生特异抗体。本发明与 Hiatt 的区别至少在于本发明方法能将染色体或染色体片段从供体生物插入受体植物，因此是将一个大得多的 DNA 分子加入受体植物（如上述文献所述）。因此，本发明方法能使移植的遗传信息编码全

部抗体基因，而不只是编码单个抗体基因。

将RNA移至受体细胞也包括在本发明范围内。例如，在基因进行活性转录时有许多相应的RNA拷贝与该染色体或染色体片段结合在一起，在此时转移染色体可将它们一起转移。另一种方法是，单独移植用作遗传信息源的RNA。

下列实例是为了说明，而不是为了加以限制。参照某些优选方案和实例，本文已对本发明作了详细叙述，但对本领域的专业技术人员来说显然可作各种变更，不能认为本发明只限于具体的举例说明的实施方案。

实例1 染色体的制备

用来自人成纤维细胞系的缩合染色体，MRC—5作染色体和染色体片段源。MRC—5是具有正常染色体核型的成纤维细胞系产生的二倍体胎儿肺脏。在细胞分裂中期用乙酰甲基秋水仙碱($10\mu\text{g}/\text{ml}$)阻断该细胞2小时，然后按如下方法处理以制备中期扩展物。用胰蛋白酶/EDTA($0.05\%/0.5\text{mM}$)作简单的处理(使培养皿上的细胞脱下)以收获该细胞，在台式临床离心机中快速离心而沉降，然后悬浮在 37°C 的 0.075M KCl中15—20分钟。在此低渗休克后，再离心细胞，并悬浮在冰冷的甲醇/乙酸(3:1)中。置于在冰上的固定剂中5分钟，离心细胞，然后再悬浮在新鲜的冰冷固定剂中。

在冰上再保温30分钟以后，将该细胞再悬浮在少量新鲜的冷固定剂中，并涂布在玻片上。这包括将该细胞悬浮液的小等分试样滴在硅化玻片上(用巴斯德吸管)，紧接着将该玻片放在沸水浴的缓和蒸汽流上，通过加热玻片以使固定剂蒸发。对于MRC—5细胞系来说，

很可能涂布早期得到的涂布物最适于剖切和注入。缺点是该细胞在硅玻片上固定时间大于45分钟至1小时常常不会断开，而断开的细胞也似乎不适于剖切/注入（在剖切过程中会膨胀，难以从玻片上除去，这是由于它与玻片的粘性增加了）。而且，周围环境的湿度高会大大降低制得的染色体的形成效率。采用高效脱湿器能基本解决上述问题。

剖切、注射和固定吸管的制备

顶端为1—2 μm 的剖切吸管是由Fwikfil玻璃毛细管（外径1.0 mm，内径0.58 mm，W. P. 仪器公司）制成的，在立式Narishige控制器中进行控制。为制备注入吸管，先用铬酸清洗玻璃毛细管（外径1.0 mm，内径0.8 mm，V. W. P. 科学公司），然后在160℃的烘箱中烘烤10分钟。冷至室温后，用Nonidet P—40处理该毛细管，彻底冲洗并自然晾干。在卧式控制器（Industrial Science Associates, Inc.）中控制这些毛细管以使其顶端约为0.1 μm 。在注射前，在移液吸管上轻轻敲击使吸管顶端扩大，最后使其顶端达到0.5—1.0 μm 。为制备移液吸管（外径80—100 μm ），在微焰灯上用手控制玻璃毛细管，放在DeFonbrune一型微型锻熔炉上，在玻璃砧座上截断并磨光。

染色体片段的剖切

从由正常人成纤维细胞系MRC—5得到的染色的中期染色体涂布物（0.1%碱性品红）中剖切染色体片段。用0.1%的碱性品红使该涂布物染色1小时，用水冲洗，然后在空气中干燥。用安装在Leitz显微操纵仪上的剖切吸管与玻片成45°角度将脱水的0.3—1.0 μm 大小（相当于10—30 mb）的片段切下。降低剖切

吸管位置使其与玻片上待切的染色体区域接触以便切割该片段。剖切吸管与玻片接触后，由于玻璃吸管顶端的可弯性使其向下移动擦过染色体，从而得到从剩余的染色体上取下的片段。

染色体片段的挑取和注入

用一小滴胰蛋白酶覆盖剖切的片段，该胰蛋白酶含有0.05%胰蛋白酶/0.5mM EDTA/0.1%的聚乙烯吡咯烷酮/0.005%碱性品红的溶液。此时，用固定吸管代替剖切吸管，将预先装有硅油的注入吸管装在第二个显微操纵仪上。将注入和固定吸管的顶端浸入胰蛋白酶液滴中，将注入吸管的顶端用固定吸管扩口，使注入吸管的最终大小为0.5—1.0 μ m。然后从注入吸管中喷出空气和油，并将少量的胰蛋白酶溶液吸入吸管顶端。接着，操作该注入吸管以取下剖切的片段。这包括用注入吸管轻触并推动剖切的片段，使其与玻片分开并浮起。然后将该片段吸入吸管中，从顶端装入少量1%牛血清清蛋白(BSA)以清洗该片段。

为了注入，将预先装有染色体片段和BSA清洗液的吸管一次插入用固定吸管固定的小鼠卵前核中，该小鼠卵前核固定在装有Hepes缓冲的Witten氏培养液(参见Witten, W.K. Adv. Biosci 6: 129, 1971)的凹形玻片中。然后注入含有该染色体片段的液体，然后一次性抽出吸管。注入液体的体积约为3 μ l(即前核大小增加约30—40%)。然后收集在显微操作中存活的注射卵，在Witten培养液中培养，并监测它们的发育情况。

用Leitz显微操纵仪，在固定的Leitz Diavert显微镜下，选择待剖切的染色体，并将剖切的染色体片段注入小鼠卵中。

按Gordon, J. W. 和 Ruddle, F. H. "基因至小鼠胚

胎的转移：通过前核注射产生转基因小鼠”。Methods in Enzymology, Vol. 101, p. 411—433, Academic Press, 1983. 以及Hogan等, 小鼠胚胎的操作：实验室手册, 1986年, 第2版, New York, 1986的方法。从超数排卵的SWR/J雌性动物在检测到阴道塞时(在与SJL/J雄性交配后)由切下的输卵管中得到受精卵。用本发明方法将供体生物的染色体片段注入该受精卵中。显微注入后, 将该卵培养5天, 以监测它们的发育情况。表1表明在小鼠胚胎中人染色体片段的整合和维持情况。33个对照胚胎(注射50mM KCl或胰蛋白酶溶液)中有21个(63%)存活, 12个(57%)发育到胚泡阶段(见表1)。而对于试验胚胎来说, 注入着丝粒片段的96个中有39个(43%)存活, 16个(41%)发育成胚泡。与此类似的是, 注入随机染色体片段(由非着丝粒区得到的片段)的32个中有17个(53%)存活, 7个(41%)发育成胚泡(见表1)。其余的胚胎(43—59%)停留在2—或4—细胞阶段。总的来说, 采用注入方法, 经注射的卵中有20%能发育成胚泡(见表2)。

表1 在小鼠胚胎中人染色体片段的整合和维持

注入的片段	试验数	胚胎数		
		存活的 ^a	发育的/存活的 ^b	探测到的片段
		注射的 ^c		
对照	2	21/33(63%)	12/21(57%)	N.A.
着丝粒	6	39/90(43%)	16/39(41%)	6/12 ^c
随机	3	17/32(53%)	7/17(41%)	0/3 ^d

N.A. 表示不适用

a 存活的表示注入2—4小时后仍存活的数目。

b 发育的表示培养4天后达到桑椹期的胚胎数目。

c 在6个阳性胚胎中, 16/82核和11/89中期涂布物呈现随体DNA定位。

d 见说明书。

将人染色体片段导入胚胎中

为确定人染色体片段是否能在发育的胚胎中存活, 在含有0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 乙酰甲基秋水仙碱的Witten培养液(Witten, W.K. Adv. Biosci. 6: 129, 1971)中培养已发育4天而达到桑椹胚期的试验和对照胚胎。经18—20小时后, 将胚胎移至1:2 Witten培养液/水的溶液中3—5分钟, 然后涂布于在冷3:1甲醇/乙酸中的玻片上(根据Garside和Hillman, Experientia 41: 1183, 1985修改)。按Lo, C. W., J. Cell Sci. 81: 143, 1986的方法及抗生蛋白链菌素碱性磷酸酶(Enzo, Inc.)或抗生蛋白链菌素过氧化物酶/银增强剂(Amersham, Corp.)检测法, 用生物素缺口转译DNA探针通过原位杂交检测人染色体片段的存在。

为了检测注射的着丝粒片段, 使用由含有人随体DNA插段的质粒pXBA-21(由Dr. James E. Sylvester, University of Pennsylvania提供, 参见Jhompson等, Nucleic Acids Res. 17: 2769—2782, 1989)组成的探针, 为了检测随机人染色体片段, 采用含人Alu I重复的质粒pBLUR8(Amersham, Corp.)。按Lo的上述方法进行原位杂交, 所不同的是除核糖核酸酶A消化外不必进行预杂交处理。用过氧化物酶/银法进行检测时, 先在二氨基联苯胺中保温30—

50秒，再在银增强混合物中保温6—8分钟。

对于注入随机片段的3个胚胎来说，未测到杂交信号。但假如Alu I重复片段不是均匀散布于人基因组中，则人染色体片段似乎已消失，这是由于很少或没有Alu I重复片段的存在及原位杂交法的检测灵敏度有限的缘故。用随体DNA探针，在核内可测到杂交信号，而且在12个胚胎的6个的单染色体中测到杂交信号。不仅在核内可测到杂交信号，而且在13个已注入的胚胎中有4个也测到该信号，这些胚胎只发育至2—细胞/4—细胞阶段（仅在一个核中测到信号）。信号定位图揭示，注入片段与各个染色体密切结合，因此可以断定，外源人着丝粒片段已导入小鼠的染色体核型中。值得注意的是着丝粒随体DNA是由与Alu I重复片段的分散性相比具有高拷贝串联重复的大集团组成的，与随机人染色体片段相比，人着丝粒片段的存在可望更易于检测。

实例2 通过共注入蛋白酶抑制剂提高卵存活率

按实例1实施本发明方法。活化溶液如实例1所述，但胰蛋白酶浓度为0.025%。生理上可接受的液体修饰为含有蛋白酶抑制剂ε—氨基己酸（50mM）和苯甲脒—HCl（5mM）。如表2所示，存活率为66%。从而发现含二种蛋白酶抑制剂的结果更易繁殖，而且在染色体注入方法中存活率更高。

虽然发育成桑椹/胚泡期的比率似乎低得多（表2为24%，而表1为41%），但通过大量试验发现，没有抑制剂会明显改变发育比率。相反，若含有抑制剂，则发育成桑椹/胚泡期的胚胎存活率始终约为24%。

表2 共注入蛋白酶抑制剂^a 后卵的存活和发育情况

	注入的卵	存活率(%)	发育 ^b (%)
实验1—6	71	51(72)	11(21)
实验7—12	68	41(60)	10(24)
实验13—18	88	57(65)	15(26)
总共	227	149(66)	36(24)

a ϵ -氨基己酸(50 mM)和苯甲脒-HCl(5 mM)

b 发育成桑椹/胚泡期

实例3 注入卵的植后发育:用假孕的雌性与怀孕的雌性相比

按实例2进行本发明方法。显微注入染色体片段后,在体外培养卵至胚泡期,然后移入子宫内再进行植后发育。

假孕雌性动物

在第一组试验中,移植的是CD 1 雌性小鼠,即与切除输精管的S J L/J 雄性小鼠交配的假孕雌性,并在怀孕的8.5天收获。这种移植导致6%的卵长成胚胎。这么低的产率可能不是由于胚胎不能正常发育,而是由于移入各个替代雌性中的胚胎数目很少(见表3),以及可能该移植卵的脆性较大的缘故。

怀孕雌性动物

在第二组试验中,为提高移植卵在体内进一步发育的效率,将注入染色体片段卵长成的胚泡转移至CD-1 雌性中,即与正常的B 6 D 2 F 1/J 雄性交配的怀孕雌性小鼠。该雌性含有受精卵,因此有它们自身发育的胚胎。这将有助于移植卵的进一步发育。

未注入的正常胚胎的存在能有助于制备植入用的子宫上皮。这种

作用是由胚胎—子宫相互作用而诱发的激素分泌物引起细胞改变的结果。此外，未注入卵的共同存在也许通过交叉喂养可提供更适于注射卵进一步发育的小环境。

根据胚胎中眼睛的色素差别或小鼠的眼睛色素和皮毛颜色的差别可区分由移植卵发育成的胚胎或小鼠及受体雌性的胚胎或小鼠。因为移植的胚胎是白化体，而替代母体的胚胎是着色的（黑眼睛／野灰色或黑色皮毛）。可在怀孕12.5天收集移植的胚胎或再使其发育至足孕。在发育至12.5天时收集移植的胚胎的实验中，40%由注入染色体卵生成的移植胚胎进一步发育成正常的12.5天胚胎（见表4A）。这些结果表明，与移植到替代的假孕雌性的胚胎（测得6%）相比，其效率明显提高。

为测定注入染色体片段胚胎的出生率，在另一组试验中，可将该胚胎移至子宫内或移至怀孕雌性的输卵管中进一步发育至足孕。

在该实例中，将注入染色体的胚胎培养成桑椹／胚胎期，然后移至怀孕的替代雌性的子宫内以进一步发育，15%的移植胚胎长成小鼠（见表4.B.2）。

为检验减少注入小鼠胚胎在体外的培养时间是否能得到更好的效果，在第二组试验中，将注入染色体的胚胎在第2天移入怀孕CD1雌性的输卵管中，而不是在发育的第5天移入子宫中。我们测得26%注射卵能出生（见表4.B.1）。这些结果表明，当胚胎在发育第2天移入怀孕雌性的输卵管时，由注入染色体片段卵产生的成活胎儿数明显增加。

总之，这些试验表明，用本发明方法注入染色体片段的卵能进行正常的植后发育，结果能生出小鼠。因此，这些方法不会阻止胚胎正

常发育至足孕。

显然，要提高注入染色体片段卵的出生率，最重要的是用怀孕雌性而不用假孕雌性。最好将胚胎移入输卵管中。

表3 移至假孕替代母体的注入卵的植后发育

试验号	移植的胚胎数	# 替代母体	回收的胚胎 ^a	效率
1	3	1	0	0 %
2	6	1	1	16 %
3	3	1	0	0 %
4	2	1	0	0 %
5	2	1	0	0 %
总共	16	5	1	6 %

^a 在怀孕8.5天时收获胚胎。

表4 用怀孕雌性（替代母体）从注入染色体的卵回收胚胎和胎儿

A 回收12.5天的胚胎

子宫移植 ^a	移植的胚胎	# 替代母体	注入胚胎的回收	CD-1 胚胎的回收 ^b	效率
未注入	13	4	5	41	38 %
假注入 ^c	11	3	5	27	45 %
注入染色体	20	11	8	73	40 %

B 成活胎儿的回收

	移植的	* 替代	由注入胚胎	由 CD1 胚胎	效率
1. 输卵管移植	胚胎	母体	出生的胎儿	出生的胎儿	
未注入	222	41	98	314	44 %
假注入 ^c	152	31	61	219	40 %
注入染色体	135	41	36	343	26 %
2. 子宫移植 ^a					
未注入	97	18	38	113	39 %
注入染色体	13	7	2	56	15 %

a 胚胎培养成桑椹—胚泡期，然后移入子宫内进一步发育。

b 根据皮毛颜色和眼睛色素区分 CD1 胎儿和由导入外源胚胎产生的胎儿，外源胚胎由白化体遗传构成，而 CD1 后代是野灰色或黑色的，这是由于与 B 6 D 2 F 1 / J 雄性交配的结果。

c 假注入相当于注入 50 mM KCl 或 50 mM ε—氨基己基和 5 mM 苯甲脒—HCl (在 10 mM Tris / 0.1 mM EDTA 中，pH 为 7.5)。

实例 4 在植后胚胎中导入注射的片段

固定 8.5 天的胚胎，埋在石蜡中，切片并按实例 1 的方法进行原位杂交处理。与生物素化的人随体 DNA 探针的原位杂交表明，在该胚胎的细胞团中存在有人着丝粒 DNA。此结果暗示，小鼠基因组中已掺入了注入的人着丝粒片段，并能复制和稳定地通过连续的细胞分裂而分离。

进行另一组试验时，将显微注入染色体片段后的卵发育成的胚泡

移至CD—1替代小鼠中，进一步监视其植后发育情况。同样转移第二组由未注入卵或注入50 mM KCl的卵发育成的胚泡作为对照。怀孕13天时，回收胚胎，固定，埋在石蜡中，然后按实例1的方法进行原位杂交。得到的结果列于表5中。

表 5 在植后小鼠胚胎中注入的人染色体片段的维持情况

		胚 胎 数			
注入的片段	试验数	存活的 / 注射的 ^a	发育的 / 存活的 ^b	回收的胚胎 ^c	测到的片段
对照	2	14/30(46%)	9/14(64%)	4(44%)	N. A.
着丝粒	10	74/135(54%)	20/74(27%)	8(40%)	4/8

N. A. 不适用

^a 存活是指注入2—4小时后仍存活的卵的数目。^b 发育是指培养4天后能达到桑椹期的胚胎数目。^c 由替代母体回收的12.5天胚胎。

如表 5 所示, 8 个注射人染色体片段的胚胎中有 4 个在原位杂交后证实存在有人随体 DNA。这 4 个阳性胚胎的 20—90 相邻切片呈现具有强杂交信号的细胞团, 这表明很多细胞都含有人随体 DNA。在每个阳性胚胎中至少测到 100—1000 个细胞中含有人随体 DNA。相反, 所有的对照胚胎中均未测到人随体 DNA, 这些对照胚胎未注入或只注入 5.0 mM KCl (即原位杂交中未测到杂交信号)。

由于每个胚胎只注入一个着丝粒片段, 因此这些原位杂交结果提示, 外源人 DNA 在转染色体动物的有丝分裂细胞中进行了多次复制。

实例 5

按实例 2 进行本发明方法, 不同的是在小鼠的卵母细胞中注入非着丝粒 (即随机的) 人染色体片段, 并使该胚胎发育至足孕。将 6 个显微注入的卵母细胞中的 3 个移入替代 CD-1 雌性小鼠中。生出一个活的小鼠。用普通的 Southern 印迹杂交法分析尾部组织的 DNA, 结果表明存在人 Alu 重复 (图 1), 这是一个散布性重复 DNA 集团。

如图 1 所示, 由显微注入卵发育成的小鼠的 Mbo I 消化 DNA 呈现 4 条与人 Alu 重复 DNA 同源的清晰带, 从而表明保留了人 DNA (图 1, 泳道 1)。相反, 正常或对照小鼠的 Mbo I 消化 DNA 都未显示这种带, 即没有人 DNA (图 1, 泳道 3)。因此, 图 1 说明按本发明方法显微注射的随机人染色体片段至少保留了一部分。总之, 试验结果清楚说明, 导入动物卵中的人染色体片段能通过多重细胞分裂繁殖, 不然则在尾部组织中测不到人 DNA。

显然, 根据上述说明可对本发明作出许多改进和变更, 因此应该明白, 在附加的权利要求范围内, 可以与本文具体叙述的不同方法实施本发明。

图 1

