

文章编号:1004-0374(2005)01-0076-06

· 技术与应用 ·

乳腺生物反应器的研究现状和产业化前景

王庆忠, 李国荣, 尹 昆, 张会亮, 李云龙*

(山东师范大学生命科学学院, 济南 250014)

摘要: 转基因动物乳腺生物反应器是伴随转基因动物技术而发展起来的一项高新生物技术。利用这项技术, 我们可以从动物乳汁中源源不断地获取用于医疗或保健目的的有生物活性的基因产物。这是一种全新的蛋白质生产模式, 它将成为许多国家的重要支柱产业之一。本文介绍了乳腺生物反应器的基本概念和基本原理; 概述了制备过程中的目的基因选择、载体构建、转基因等技术环节的研究现状; 分析了乳腺生物反应器的优势及存在的问题, 并就其产业化前景进行了展望。

关键词: 转基因动物; 乳腺生物反应器; 表达载体; 转基因技术

中图分类号: Q95-33; Q789 文献标识码: A

The study actuality and industrial prospects of mammary gland bioreactor

WANG Qing-Zhong, LI Guo-Rong, YIN Kun, ZHANG Hui-Liang, LI Yun-Long*

(School of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: Transgenic animal's mammary gland bioreactor that was developed from animal transgenic technology is a new high-biotechnology. Using this technology, we can obtain the active gene products from milk constantly for the purpose of medical treatment and health care. This is a new-type protein-producing mode and will become one of the major industrial fields in many countries. In this paper, the basic concept and basic principle of mammary gland bioreactor was introduced; the selection of exogenous gene, the construction of expression vector, transgenic methods and so on in the course of making mammary bioreactor were summarized; the advantages and the problems of it at present were also reviewed; the industrial prospects in the future were discussed.

Key words: transgenic animal; mammary gland bioreactor; expression vector; transgenic technology

基因工程制药始于20世纪70年代。它的发展经历了细菌基因工程、细胞基因工程和转基因动物三个阶段。细菌基因工程制药是用含有目的基因的质粒载体转染大肠杆菌等原核生物, 使之表达目标蛋白。因细菌缺乏翻译后加工机制, 表达的重组蛋白需经人为修饰才具有活性, 这提高了生产成本和工艺复杂性, 限制了细菌基因工程制药的发展。于

是人们开始用真核细胞表达系统来生产药用蛋白, 由此诞生了细胞基因工程。哺乳动物细胞具有转录后加工修饰能力, 能产生有活性的蛋白产物; 但哺乳动物细胞培养条件苛刻, 难以实现像细菌那样的大批量培养。随着转基因动物的问世, 通过转基因动物进行蛋白药物生产成为现实。外源基因在转基因动物体内最理想的表达场所就是乳腺。乳腺生物

收稿日期: 2004-04-26; 修回日期: 2004-06-28

基金项目: 山东省优秀中青年科学家奖励基金资助项目

作者简介: 王庆忠(1961—), 男, 副教授, 博士生; 李国荣(1964—), 女, 教授, 博士后, 硕士生导师; 尹昆(1980—), 女, 硕士生; 张会亮(1980—), 男, 硕士生; 李云龙(1940—), 男, 教授, 博士生导师, * 通讯作者。

反应器便是一种利用转基因技术获得药物蛋白的动物个体表达系统,它利用乳腺特异性调控元件指导外源基因在乳腺中特异地表达,以转基因动物的乳腺组织生产药用重组蛋白。这种外源基因在乳腺中表达的转基因动物称为乳腺生物反应器。

1 乳腺生物反应器研究简史

转基因动物的研究始于20世纪80年代初。1980年,Gordon等^[1]将重组DNA用显微注射法导入小鼠受精卵原核,首次获得了整合有外源基因的小鼠。1982年Palmiter等^[2]将大鼠生长激素基因显微注射到小鼠受精卵中,首次获得了体重为正常小鼠2倍以上的“超级小鼠”并提出了从转基因动物中提取药物蛋白的设想。此后几年的许多研究奠定了转基因动物技术体系的基础,但真正的乳腺生物反应器研究则始于1987年Gordon等^[3]的工作,他们将组织型纤溶酶原激活剂(tPA)与小鼠乳清酸蛋白(WAP)基因的启动子构成重组基因,成功地培育出了37只在乳汁中能表达tPA的转基因小鼠,同年,世界上第一只能从乳汁中分泌 α_1 -抗胰蛋白酶(AAT)的转基因绵羊在英国罗斯林研究所诞生。从此,开始了乳腺生物反应器的实用性研究。

Simons等^[4-5]将带MT启动子的 β -乳球蛋白-凝血因子IX(BLG-FIX)、BLG-AAT等重组DNA片段注射到绵羊受精卵中,获得了在乳汁中有外源基因表达的转基因后代。Wilmut等^[6]将羊乳球蛋白基因片段与F-IX和AAT cDNA融合质粒注入小鼠及绵羊受精卵中,获得乳汁中含F-IX和AAT的转基因小鼠及绵羊。Wright等^[7]将绵羊BLG基因调控区与人AAT基因相连,获得了4只转基因绵羊。Velander等^[8]利用WAP基因启动子与人蛋白质C(hPC)cDNA重组基因获得的转基因猪,重组hPC的表达量(1g/L)比人血中hPC浓度还高200倍。Ebert等^[9]用 β -CA基因的启动子引导tPA在山羊乳汁中得到表达(1~3 g/L)。Wilmut等^[10]首创体细胞克隆技术并成功构建了表达人F-IX的转基因克隆绵羊。2000年,英国PPL公司将人类AAT基因定点整合到胎儿成纤维细胞的前胶原基因座,用转基因细胞生产的转基因打靶绵羊,每升乳中AAT蛋白的含量达到了650 mg,远远高于显微注射法构建的转基因绵羊18 mg的水平^[11]。2001年,他们又利用基因打靶技术生产出了AAT、3-GT和朊病毒双剔除的克隆绵羊^[12]。上述研究可以看出,乳腺生物反应器研究从模式动物——小鼠的转基因开始,逐步建立起

了大动物乳腺生物反应器制备的技术平台。

我国的施履吉院士在20世纪80年代初就提出了乳腺生物反应器的构想并获得了表达乙肝病毒表面抗原的转基因兔。1996年10月,复旦大学遗传所和上海医学遗传所合作成功地获得了表达有活性的F-IX蛋白的转基因小鼠和5只转基因绵羊,真正开始了我国的乳腺反应器构建工作。1998年,上海医学遗传研究所构建以牛酪蛋白基因启动子驱动F-IX基因表达的表达载体,显微注射到山羊受精卵的雄原核,成功制备了5头转基因羊。上海医学遗传研究所于1999年2月,得到一头带有人血清白蛋白基因的转基因牛。2000年,中国农大和北京兴源生物科技中心合作,将改造的人AAT基因显微注射到山羊受精卵原核中,获得了3只带有人AAT的转基因山羊。近年来的成功报道仍限于显微注射等常规方法,离国外尚有一定差距。

2 乳腺生物反应器的产业化进展

20世纪80年代末90年代初,相继出现了以乳腺生物反应器技术为核心的三大技术公司,即美国的GTC(Genzyme Transgenics)、英国的PPL(PPL Therapeutics)和荷兰的PBV(Pharming B V)。目前全世界从事该项商业开发的公司已有30多家,表达水平达到可以进行商业生产的药物蛋白达40余种,其中已在临床试验的蛋白有10余种,如AAT、hPC、tPA、F-IX、F-VIII、乳铁蛋白、人血清白蛋白、抗凝血酶III、胶原、血纤蛋白原等,有些已进入三期临床阶段。

GTC公司以生产重组药物蛋白和单克隆抗体为主导产品。目前已经在不同转基因动物的乳腺中表达了65种蛋白,其中45种蛋白(14种在转基因山羊中表达)的表达水平达到了1g/L以上,而在山羊的乳腺中表达的AT-^[13]已进入二期临床。GTC率先以乳腺反应器生产单克隆抗体,并获得了美国的单抗生产专利保护,已在山羊乳汁中生产了8余种单克隆抗体。PPL公司于1994年开始构建乳腺生物反应器,1997年克隆了绵羊“多利”,1999年进行体细胞基因打靶研究并于次年培育出体细胞基因打靶绵羊。PPL重点开发AAT、人胆盐刺激脂酶和纤维蛋白原三个药物蛋白,其中在绵羊乳汁中表达的AAT达到了40g/L,已进入二期临床。PBV公司致力于建立转基因兔和牛的技术平台,已拥有36项专利,重点研究和开发 C_1 -抑制因子、纤维蛋白原、胶原蛋白和乳铁蛋白等。其转基因兔乳腺反

反应器生产的 C_1 -抑制因子已进入二期临床,转基因牛乳汁中表达的人乳铁蛋白即将进入二期临床。除三大公司外,还有大小不等的多家公司,如日本的Somitomo Metals公司、加拿大Nexia生物技术公司等。Abgenix和Medarex两家公司用小鼠乳腺反应器来生产治疗性单克隆抗体,已有产品进入临床期^[14]。

1996年,我国“863”计划将动物乳腺反应器列入重大项目。目前已表达了10余种外源基因,但还没有产品进入临床阶段。国内乳腺生物反应器构建主要集中在北京、上海、深圳、秦皇岛等地。深圳绿鹏公司和中国农大陈永福等于1997年创立的“转基因动物工程技术研究开发中心”已成功培育出国内首例转基因牛、7只含有人生长素基因的转基因兔等。北京兴绿源生物科技中心在中国农大李宁等的指导下已于2000年6月培育出4只含人AAT基因的转基因山羊^[15]。上海转基因研究中心和上海杰隆生物工程股份有限公司合作,于2001年用体细胞克隆技术克隆出3只转基因羊,现已申请专利12项,成为目前国内最大的乳腺生物反应器基地。2003年,河北省博太生物技术有限公司与加拿大Neuman生物技术公司合作投资8000万人民币,拟利用乳腺生物反应器生产hTPA、人血白蛋白(Has)和单抗等药用蛋白产品。

3 乳腺生物反应器生产重组蛋白的优势

动物乳腺生物反应器的核心是通过乳腺组织特异性启动子驱动的外源基因在动物乳腺组织中高效特异地表达,从乳汁中获取目的产物。与其他制药方式相比,它具有多方面的优势:(1)重组蛋白活性高。动物乳腺可对表达的蛋白质进行糖基化、脂化、磷酸化、羧化等一系列后加工,产品接近天然提取物。(2)药物蛋白产量高。乳腺可将外源基因表达达到每升几克到几十克。(3)生产成本低。一头转基因动物相当于一个制药车间,况且转基因动物可无限繁殖,易于扩大生产规模,饲养成本低,费用主要用于产品提纯。(4)生产条件简单。(5)无环境污染。乳腺生物反应器产业基本上是一个畜牧业过程;产品纯化过程中没有毒性物质或有害物质释放。(6)对动物影响小。乳腺是一种外分泌腺,外源蛋白质很少进入循环系统,这可避免大量表达的外源性蛋白对动物健康造成的危害。(7)缩短新药上市周期。利用乳腺反应器来生产蛋白新药,开发周期将缩短10年左右。(8)经济回报丰厚。用传统的细

胞培养来生产1克基因药物,平均成本为100~1000美元,而利用转基因动物乳腺反应器来生产,则只需10~25美元^[16]。

4 乳汁蛋白基因的表达调控

哺乳动物乳汁中主要含有6种蛋白质:4种酪蛋白(α_{s1} 、 α_{s2} 、 β 和K)、2种乳清蛋白(α -乳白蛋白和 β -乳球蛋白)。在啮齿动物中,乳清酸蛋白(WAP)是主要的乳汁蛋白。乳汁蛋白基因的表达是在类固醇、多肽激素、生长因子等的调节下进行的。在泌乳期,乳蛋白的大量表达恰好与循环血液中黄体酮的明显降低、生乳激素(主要为糖皮质激素和催乳激素)的升高相一致。黄体酮抑制乳汁分泌^[17],而催乳激素通过与位于乳蛋白基因5'末端启动子区的激素应答元件(HRE)相互作用促进乳蛋白基因的表达。 α 、 β 酪蛋白基因的HRE序列高度保守,在转基因时可以在不同动物中通用。

研究表明,乳蛋白基因表达的调控元件有3类^[18]:(1)5'末端调控元件:包括启动子、增强子和激素应答元件。(2)使染色体变构和开放功能的元件:位于5'端的位点控制区(LCR),具有增强子和绝缘子的双重功能;核基质粘附区(MAR),多数位于基因的两侧。(3)与转录翻译有关的元件:5'端和3'端非翻译区,它们能增强mRNA稳定性和翻译效率,如 β -酪蛋白基因的5'端非翻译区能增强报告基因的表达;PolyA,决定mRNA转录稳定性。

5 表达载体构建

5.1 常用的5'端调控序列 在乳腺反应器表达载体中常用的5'端调控序列有 α_{s1} -酪蛋白(α_{s1} -CA)基因、 β -酪蛋白(β -CA)基因、 β -乳球蛋白(BLG)基因和乳清酸蛋白(WAP)基因等的启动子序列,它们的来源多为牛、羊、兔、大鼠和小鼠。研究最多和效果较佳的是绵羊的BLG、牛的 α_{s1} -CA、山羊的 β -CA、小鼠的WAP等基因的启动子。小鼠WAP 5'端调控序列常用来指导人tPA基因的cDNA在小鼠、猪等乳腺中表达;现已克隆了牛、山羊、绵羊的BLG 5'端调控序列,并已指导人F-IX基因cDNA、AAT基因、人胰岛素基因、人促红细胞生成素(EPO)基因等在小鼠、山羊、绵羊等乳腺中表达;酪蛋白基因5'端调控序列中,常用的是 α_{s1} -CA、 β -CA基因启动序列,牛 α_{s1} -CA基因启动序列已用于指导人尿激酶基因在小鼠乳汁中、人乳铁蛋白基因在牛乳汁中表达;大鼠 β -CA基因启动子指导氯霉素乙酰转移酶基因(CAT)在转基因小鼠乳腺中表达,

兔 β -CA基因启动子序列指导人IL-2基因在转基因兔乳腺中特异地表达。

5.2 目的基因选择 目的基因多是 mRNA 反转录得到的 cDNA。首批用乳腺反应器生产的产品是 AT-III、AAT、F-VIII、F-IX、hPC、血纤蛋白原和血清白蛋白等血源产品。这些产品的编码基因都比较大,用其他表达系统难以生产。之后逐步扩大到 tPA、干扰素、胰岛素、乳转铁蛋白、乳糖酶、溶菌酶、抗体、疫苗、蜘蛛牵丝蛋白等各种蛋白质^[19]。从理论上讲,动物乳腺可以生产绝大部分的蛋白质,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,临床上用量较少的细胞因子将不再用乳腺生产,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,数年后将占生物制品的30%~40%。

5.3 表达载体构建 乳腺生物反应器构建所用的表达载体有质粒载体、人工染色体载体和基因打靶载体。质粒载体携带大片段DNA时不稳定,而YAC(酵母人工染色体)可携带大至12Mb的片段,能包容整个调控区域;但YAC插入的片段亦不稳定,有时会发生基因重组。BAC(细菌人工染色体)、PAC(P1衍生人工染色体)可用于携带300kb,甚至更大的片段,较稳定。打靶载体含有两段与打靶位点两端同源的区域,中间一段为不同源的目的基因并带有某种筛选标记^[20]。打靶载体分两种:插入型载体和置换型载体。前者断裂位点在同源序列内,选择基因紧邻目的基因的序列,载体DNA同源序列与染色体靶位点发生一次同源重组,整个载体整合到染色体靶位点上;后者断裂位点位于同源序列的外侧或两侧,选择基因位于同源目的序列内部或外侧,载体的目的序列与染色体靶位点发生两次同源重组并取代染色体靶位序列。目前多采用置换型载体进行基因打靶。

表达载体构建必须根据调控序列的功能、特点、目的基因大小和动物种类加以选择。研究表明,乳蛋白基因调控序列在驱动外源基因表达时有如下特点:(1)启动子在哺乳动物物种间可以通用和重新组合使用。如山羊 β -CA基因启动子可驱动人细胞毒性T细胞抗原4免疫球蛋白融合基因在转基因鼠乳腺中特异地表达^[21]; α_{s1} -CA基因5'端调控序列和 β -CA基因3'调控成分可构建成有效地表达载体。(2)包含类固醇应答元件、TATA盒、核糖体结合位

点^[18]、转录终止信号、polyA信号等元件的表达载体是乳腺特异性表达的基础载体。(3)增加5'调控序列的长度常会增加高表达的机会,有时增加3'端长度也会提高表达水平。(4)即使利用所有已知功能的表达元件来构建乳腺特异性表达载体,目前仍不能克服基因的“位置效应”。(5)内含子对高水平表达是一个重要条件。如上海医学遗传研究所用 β -CA基因的启动子、外显子1、外显子2和内含子2的6.7kb片段构建的人F-IX表达载体在转基因鼠乳腺中得到高水平表达(52.9mg/L)^[22]。另外,在构建载体时要注意:(1)动物种类对启动子有选择性,如WAP/FVIII基因构件能被猪整合^[23],却不能被绵羊整合^[24]。(2)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(2.7mg/L)优于绵羊(4~6ug/L)。(3)基因对动物可能有消极影响,如影响乳腺发育或分泌能力。

6 常用的转基因技术

6.1 显微注射技术 显微注射技术是将目的基因直接注射到受精卵原核内,让其随机整合到染色体上。体外培养至囊胚,然后移植到代孕子宫。该方法是由Gordon等于1980年建立的。现已用此技术生产出大鼠、小鼠、兔、绵羊、山羊、猪、牛等转基因动物;但其转基因效率较低,据统计^[25],小鼠为20%~30%,家兔和猪5%~15%,山羊2%,绵羊1%~5%,牛不超过0.5%。如果注射后对移植前胚胎进行阳性筛选,可大大提高转基因效率。

6.2 基因打靶技术 基因打靶是用打靶载体与受体细胞基因组中与目的基因序列相同或相近的基因进行同源重组,对细胞基因组进行定点修饰的一种外源DNA导入技术^[26]。基因打靶克服了显微注射法的随机整合、多拷贝、位置效应等缺陷,具有位点专一性强、定点整合、单拷贝和可遗传等特点,在近几年受到广泛关注。常用的打靶细胞是ES细胞,但至今发现只有小鼠ES细胞能再分化为生殖细胞,这限制了对大动物ES细胞的定点打靶^[27]。近年来对体细胞进行基因打靶取得了良好进展。体细胞打靶和核移植相结合是制备乳腺生物反应器的必然趋势;但基因打靶效率是极低的。一种提高效率的对策是引入Cre/LoxP重组体系。Cre重组酶能识别一段称作loxP的34bp序列,且自身能催化重组反应,具有创造大片段缺失和插入的能力。另外,可利用的重组酶是已经在小鼠中应用的来自酵母菌的FLP-frt系统^[28]。此外,细胞体外培养的代数是实施基

因打靶的主要限制。一般来说,完成一轮打靶需要体细胞传代45次以上^[29]。研究发现,传代45次以上的牛成纤维细胞,仍能作为核供体生产转基因动物^[30];但体外长期传代培养的体细胞容易发生染色体丢失。

6.3 体细胞核移植技术 体细胞克隆技术是将目的基因转移到动物胚胎或成体来源的培养细胞中,筛选出已整合有目的基因或获得相应的遗传修饰的细胞后,克隆转基因细胞系,然后将细胞核移入去核的卵细胞中,经电融合刺激卵裂,并将获得的重构胚移入代孕母体子宫,从而获得转基因动物个体。与显微注射等常规方法相比,体细胞克隆技术具有四大优势:(1)提高了转基因效率。经过基因转移、阳性细胞筛选和核移植等过程,淘汰了阴性细胞克隆,转基因动物成功率大大提高,如体细胞克隆牛的成功率为20%,绵羊为24%~32%,山羊为16%左右。(2)便于和基因打靶技术相结合,以达到定点整合和高效表达的目的。(3)缩短了生产周期。由于同时获得大量的具有相同遗传背景的转基因细胞,只要能证明目的基因已整合到高效表达的基因座上,我们就可以像工厂生产某种产品那样,成批生产合格的乳腺反应器动物,从而克服了动物自然生长和生殖周期长的限制。(4)可预先决定性别。克隆技术可以有选择性地克隆产生雌性动物,直接组成乳腺生物反应器生产群。

在转基因动物研究和乳腺反应器构建中,还曾使用过逆转录病毒载体转染法、精子载体法等技术进行基因转移,但因各种原因已被淘汰。目前,原核显微注射法仍是主要的动物转基因方法,但基因打靶和体细胞克隆已在转基因动物乳腺生物反应器制备中开辟了一条崭新的道路,成为理想的策略和首选方案^[31]。

7 存在的问题与产业化前景

在乳腺反应器研制中尚存在下述待解决的难题:(1)转基因动物的成功率低。(2)目的蛋白的表达水平远低于乳汁中总蛋白含量。(3)目的基因的分离、改造、载体构建、体细胞克隆等技术环节还不够成熟。(4)“位置效应”与“剂量效应”目前无法克服。(5)乳汁蛋白基因表达调控机理、目的基因在宿主染色体上整合的详细机制、基因表达调控元件在不同家畜表现差异的原因、乳腺细胞对蛋白质的加工修饰机理等还未弄清。(6)产品的安全性的问题,外源基因侵入对动物和基因药物对人体正常

功能有何影响,否会造成基因污染,尚难定论。

虽有这些问题存在,但许多国家政府和大型制药企业仍竞相投入巨资资助乳腺生物反应器产品的开发和生产,使乳腺反应器研制和产业化呈现日益加速的趋势。利用乳腺反应器生产营养活性蛋白,如需求量极大的护肤品中的活性蛋白,或者改造奶质而使其具备营养和药用双重功能,或者直接生产口服生物制品,都具有极大的市场潜力。我们相信乳腺生物反应器产业不仅会成为有高额利润回报的新型行业,而且将会带动整个国民经济的发展,形成全新的产业结构模式。因此,我们应当抓住机遇,增加投资力度,大力兴办乳腺反应器产业,以在未来的生物高技术竞争中夺得主动权。

[参 考 文 献]

- [1] Gordon JW, Scangos GH, Plotkin DJ, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 7380-7384
- [2] Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with meal thione in growth hormone fusion genes. *Nature*, 1982, 300: 611-615
- [3] Gordon K, Lee E, Vitale JA, et al. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Biotechnology*, 1987, 5: 1183-1187
- [4] Simons JP, McClenaghan M, Clark AJ. Alteration of the quality of milk by expression of sheep β -lactoglobulin in transgenic mice. *Nature*, 1987, 328 (6130): 530-532
- [5] Simons JP, Land RB. Transgenic livestock. *J Reprod Fertil Suppl*, 1987, 34: 237-250
- [6] Wilmut I, Archibald AL, Harris SM, et al. Modification of milk composition. *J Reprod Fertil Suppl*, 1990, 41: 135-146
- [7] Wright G, Carver A, Cotton D, et al. High level expression of active human α -1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology*, 1991, 9 (9): 830-834
- [8] Velandier WH, Johnson JL, Page RL, 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
- [9] Ebert KM, DiTullio P, Barry CA, et al. Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats. *Biotechnology*, 1994, 12: 699-702
- [10] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810-813
- [11] McCreath KJ, Howerof J, Campbell KH, et al. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, 405: 1066-1069
- [12] Denning C, Burl S, Ainslie A, et al. Deletion of the α (1,3)-galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat Biotech*, 2001, 19: 559-562
- [13] Yeung PK. Technology evaluation: transgenic antithrombin

- III (rhAT-III), genzyme transgenics. *Curr Opin Mol Ther*, 2000, 2: 336-339
- [14] 沈子龙, 廖建民, 徐寒梅. 转基因动物技术与转基因动物制药. *中国药科大学学报*, 2002, 33(2): 81-86
- [15] Lian ZX, Zhang L, Liu ZL, et al. Production of transgenic lamb integrated with modified human anti-trypsin gene. *Acta Gene Sin*, 2001, 28(8): 716-721
- [16] Dove A. Milking the genome for profit. *Nat Biotech*, 2000, 18: 1045-1050
- [17] Streuli CH, Bailey N, Bissell MJ, et al. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *Cell Biol*, 1991, 115: 1383-1395
- [18] 高爱保, 吴登俊. 动物乳腺反应器构建技术的研究进展. *当代畜牧*, 2003, 5: 33-35
- [19] 陈永福. 转基因动物[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [20] 李惠侠, 杨公社, 曲金建. 基因打靶制备乳腺生物反应器研究进展. *动物科学与动物医学*, 2003, 20(12): 25-26
- [21] Lui VCH, Tam PKH, Leung MYK, et al. Mammary gland-specific secretion of biological active immunosuppressive agent cytotoxic-T-lymphocyte antigen 4 human immunoglobulin fusion protein (CTLA4Ig) in milk by transgenesis. *J Immunol Methods*, 2003, 277(1-2): 171-183
- [22] Huang Z, Yan JB, Huang Y, et al. High expression of human FIX(hFIX) in transgenic mice directed by goat β -casein gene promoter. *Acta Gene Sin*, 2002, 29(3): 206-211
- [23] Paleyanda RK, Velander WH, Lee TK, et al. Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nat Biotech*, 1997, 15: 971-975
- [24] Niemann H, Kues WA. Transgenic livestock: premises and promises. *Anim Reprod Sci*, 2000, 60-61: 277-293
- [25] 荀克勉, 安晓荣, 田允晖, 等. 动物乳腺生物反应器的现状和趋势. *生物工程学报*, 2002, 18(2): 144-148
- [26] Capecchi MR. Targeted gene replacement. *Sci Am*, 1994, 270(3): 52-59
- [27] Piedrahi ta JA. Gene targeting in domestic species: a new beginning. *Transgenic Res*, 2002, 9(4): 261-262
- [28] Rodriguez CI, Buchholz F, Calloway J, et al. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet*, 2000, 25: 139-140
- [29] Clark AJ, Burl S, Denning C, et al. Gene targeting in livestock: a preview. *Transgenic Res*, 2000, 9: 263-275
- [30] Kubota C, Yamakachi H, Todoroki J, et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long term culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 990-995
- [31] Fan JL, Watanabe T. Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. *Pharmacol Ther*, 2003, 99(3): 261-282

《微生物法医学：理论与技术》

随着生物恐怖主义的现实性和危害的有增无减、各类造成严重危害的传染病的不断出现, 微生物法医学应运而生, 为反生物恐怖的工作者和管理者、急性传染病预防和治疗的研究人员和临床大夫, 以及法律工作者提供如何调查取证、进行分子生物学分析、区分近源菌毒株、追踪研究病原体的理论依据和技术工具。

本书共十二章, 前三章为微生物法医学的基础, 介绍基本概念、实验室建立和各项技术支撑体系; 后九章介绍微生物研究中的各项应用技术(表型分析技术、核酸指纹分析技术、化学分析技术、生物芯片分析技术、基因组分析技术、蛋白质组分析技术、生物信息学分析技术、媒介特性分析技术、稳定同位素分析技术), 对每类技术又进行细分, 阐述技术原理、操作步骤、技术优缺点分析选择, 并结合国内外生物恐怖和造成严重危害传染病的具体实例讲述各类技术的应用。

本书既可以作为微生物科研领域的教学培训用书, 又可作为实际研究应用中的案头参考书。

ISBN 7-5025-6173-0/Q. 119 定价: 55.00元

杨瑞馥 宋亚军 主编 黄培堂 主审

2005年1月出版

全国各地新华书店和专业书店均有售, 也可以直接与化学出版社联系邮购。

邮购电话: 010-64982530, 64918013

传真: 010-64982608, 64982604

通信地址: 北京市朝阳区惠新里3号 化学工业出版社销售服务部

邮政编码: 100029

