

生命科学前沿丛书

基 因 打 靶 技 术

杨 晓 黄培堂 黄翠芬 主编

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

基因打靶技术是一种定向改变生物活体遗传信息的实验手段。它的产生和发展建立在胚胎干细胞技术和同源重组技术成就的基础之上,并促进了相关技术的进一步发展。自20世纪80年代早期胚胎干细胞技术建立及15年前第一例基因剔除小鼠诞生以来,基因打靶的研究进展迅速,给现代生物学和医学研究带来了革命性的变化,并直接引发了现代生物学和医学研究各个领域许多突破性的进展,成为后基因组时代研究基因功能最直接和最有效的方法之一。作者参阅了大量国内外近期文献资料,并结合近年来的工作实践,比较全面地介绍了基因打靶技术的发展及常用的研究策略,力求反映本研究领域最新的研究进展。书中附有基因打靶研究中常用的实验方法和常用数据库,可供从事现代生物学和医学领域的研究和技术人员、教师和研究生参阅。

图书在版编目(CIP)数据

基因打靶技术/杨晓,黄培堂,黄翠芬主编. —北京:科学出版社,2002.8

(生命科学前沿丛书)

ISBN 7-03-010435-8

I. 基… II. ①杨… ②黄… ③黄… III. 基因-定向变异-遗传工程-实验方法 IV. Q78-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2002)第033577号

责任编辑:马学海 杨兆弘 / 责任校对:宋玲玲

责任印制:刘士平 / 封面设计:马学海 槐寿明

出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2003年1月第一版 开本:B5(720×1000)

2003年1月第一次印刷 印张:17 插页:1

印数:1—3 000 字数:316 000

定价:39.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

《生命科学前沿丛书》专家委员会

主任委员：吴 旻

委 员：（按汉语拼音排序）

陈永福	陈 竺	范云六	贺福初
黄大盪	李家洋	李衍达	马大龙
强伯勤	沈倍奋	王琳芳	

《基因打靶技术》编辑委员会

主 编：杨 晓 黄培堂 黄翠芬

编 委：（按汉语拼音排序）

陈红星 程 莹 崔 芳 郝振明

黄翠芬 黄培堂 林福玉 刘 兵

毛春明 孙岩松 孙彦洵 谭焕然

谭晓红 王友亮 杨 晓 张雅丽

周 江

总 序

近年来，生命科学的发展进入了黄金时期，由人类基因组计划衍生出一批新兴技术——“e-cell”、“克隆技术”、“转基因技术”、“生物信息学”等等，如雨后春笋般呈现在人们面前。

在现代生命科学发展的近 20 余年中，跨学科、跨领域融合以及新思想、新方法的不断涌现，使生命科学的各个分支领域的前沿以惊人的速度不断取得突破性进展。现代生命科学所展现的美好未来，也诱使人们以前所未有的热情关注着生命科学的最新发展。

近年来，我国生命科学研究力求与世界先进水平同步，密切注视着生命科学前沿研究的最新动态，从事生命科学前沿研究队伍的核心力量越来越年轻化，青年生命科学家的最新科研成果更新率及知识刷新率越来越快。为此，《生命科学前沿丛书》将优秀青年科学家的最新研究进展展示给大家，对生命科学领域近年来的新技术、新成果、新问题作了精辟的介绍。

愿我国的生命科学能更上一层楼！

北京生物工程学会理事长

The image shows a handwritten signature in black ink, which appears to be '吴旻' (Wu Yan), the name of the President of the Beijing Society of Bioengineering.

2002 年 9 月

序

生命科学是本世纪的热门研究领域之一。人们长期以来就不断探索生命的奥秘，关于生命活体运转机制的研究已成为多种学科研究的焦点。从科学发展的规律看，科学家除了要有理论的思维和明确的探索目标外，还须有良好的实践手段以验证其理论的正确性；理性认识的不断深入，又促使更新颖的技术建立，如此反复循环，科学探索得以逐步地向纵深发展。

20 世纪中叶，DNA 双螺旋学说的建立奠定了基因是生物遗传物质的基础，其结构是可以认识的。经过 DNA 重组技术的操作，人们发现基因重组、缺失、突变、插入等与生物的进化有着密切的关系，从而大大促进了生命科学研究的发展。由于生物高技术的迅速发展，它已成为生物学特别是医学生物学前进的依托。2001 年人类基因组密码框架的破译，是人类认识生命的一个里程碑。目前正在进入后基因组时代，特别是基因功能的研究正成为科学家当前奋斗的方向。生物机体的生、老、病、死的规律，已在基因水平、细胞水平、组织水平上全面展开，整体水平的研究是重要的一环。我们看到基因打靶技术是研究定向改变生物遗传信息的手段，是了解生物体正常发育及疾病发展机制的十分有用的研究工具。国际上分子生物学的研究已普遍采用该技术，而我国正在起步。为了尽快推广此项新技术，军事医学科学院生物工程研究所发育和疾病遗传学研究室经过两年实践，已取得一定经验，因此组织了全室科技人员，整理近年国内外发表的文献资料，结合实践体会，撰写本书，以供国内同行开展本项工作参考。由于生物高技术发展迅速，更简便、更有效的技术将不断涌现，本书只能起到抛砖引玉的作用，不当之处还请读者多多指正。

黄翠芬

2001 年 11 月 22 日

前 言

人类基因组工作框架图的正式发表，标志着人类真正进入了功能基因组学研究的新时代。生物学的研究模式也随之发生了巨大的变化，系统化、整体化和综合化的趋势越来越明显。功能基因组学研究的主要技术手段包括生物信息学、生物芯片、蛋白质组学等。此外，功能基因组学的研究还将会在极大程度上依赖于对模式生物的研究。通过基因打靶对模式生物的遗传物质进行修饰并研究其相关的表型，可以提供基因异常导致疾病的直接证据，快速解析相关的分子途径和机制。与酵母、果蝇、线虫、大鼠等模式生物相比，小鼠作为研究用脊椎动物，尤其是哺乳动物的模式生物具有其特有的优势。首先，小鼠是具有较短世代周期的哺乳动物，组织细胞的生理结构、功能特征和生化途径与人类相似；且繁育能力强，易于在实验室条件下维持。其次，小鼠基因组规模 (3×10^9 bp) 与人类基因组近似，许多染色体区域中同样的基因以同样的次序排列。利用小鼠拥有的众多近交系，可在相对均一的遗传背景下展开分析。最重要的是，转基因技术和基因打靶技术的发展已使得对小鼠遗传物质按预期方式进行活体修饰成为可能。

自 20 世纪 80 年代早期胚胎干细胞技术建立及 15 年前第一例基因剔除小鼠诞生以来，在小鼠进行基因打靶的研究进展迅速，给现代生物学研究带来了革命性的变化。Oliver Smithies 最早于 1985 年在哺乳动物细胞中实现了同源重组。他和 Mario Capecchi 的研究小组两年后在胚胎干细胞中分别实现了基因的定位剔除。目前，在胚胎干细胞进行同源重组已经成为一种对小鼠染色体组上任意位点进行遗传修饰的常规技术。通过对这些突变小鼠的表型分析，许多与人类疾病相关的新基因的功能已得到阐明，并直接导致了现代生物学研究各个领域许多突破性的进展。因此，美国国立卫生研究院 (NIH) 前任院长 Harold Varmus 在第 11 届国际小鼠基因组会议上指出，NIH 敏锐地意识到小鼠遗传学通过一种动物整体的研究策略正在全面地改变科学的面貌。目前，研究者不仅可以通过简单的基因剔除改变活体的遗传信息，也可以精确地在小鼠染色体组中引入点突变，甚至可以删除大至几个分摩的染色体组片段或制造特异的染色体易位。对基因打靶进行时空上的调控也变为现实，并成为在脊椎动物成体中研究基因功能的重要手段。可以预测，与日俱增的突变小鼠品系及其研究结果将提供越来越多的基因在脊椎动物发育和各种生理病理过程中功能的立体图卷，最终将促进人类对生命现象本质的理解。

编 者

2002 年 3 月

• v •

目 录

1 基因打靶技术的发展简史及其应用前景	(1)
1.1 基因打靶技术的概念	(1)
1.2 胚胎干细胞技术的发展	(2)
1.3 同源重组技术的发展	(3)
1.4 基因打靶技术在生物医学研究中的应用前景	(4)
1.4.1 基因打靶技术在基因功能研究中的应用	(4)
1.4.2 应用基因打靶技术研制人类疾病动物模型	(5)
1.4.3 应用基因打靶技术改良动物品系和研制动物反应器	(6)
2 基因打靶的策略及载体设计	(10)
2.1 完全基因剔除	(10)
2.1.1 构建载体的一般原则	(11)
2.1.2 置换型载体	(13)
2.1.3 插入型载体	(16)
2.1.4 影响中靶效率的因素	(18)
2.1.5 体细胞打靶	(21)
2.2 基于 Cre-LoxP 重组酶系统的条件基因打靶	(25)
2.2.1 Cre-LoxP 重组酶系统	(25)
2.2.2 构建基因打靶载体要考虑的问题和 LoxP 的合理运用	(27)
2.2.3 条件基因打靶	(30)
2.2.4 表达 Cre 重组酶的转基因小鼠	(34)
2.3 用基因打靶技术引入精细突变	(44)
2.3.1 “Hit and Run”法	(44)
2.3.2 双置换法	(46)
2.3.3 “标记和置换”法	(47)
2.3.4 利用 Cre-LoxP 系统引入点突变	(48)
2.4 大片段染色体的重排和删除	(50)
2.4.1 放射线诱导的缺失突变	(50)
2.4.2 Cre-LoxP 介导的染色体重组	(51)
2.5 随机基因剔除——基因诱捕	(57)
2.5.1 诱捕载体的设计	(58)
2.5.2 基因诱捕载体导入 ES 细胞的方法	(62)

2.5.3	诱捕 ES 细胞的筛选和鉴定	(63)
2.5.4	基因诱捕研究的应用及其前景	(65)
2.6	ENU 诱导点突变与大规模基因突变和功能研究	(69)
2.6.1	ENU 诱变的机制	(70)
2.6.2	ENU 诱导的突变类型和诱变效率	(71)
2.6.3	ENU 剂量对不同小鼠品系的影响	(71)
2.6.4	ENU 诱导突变的策略	(72)
2.6.5	ENU 诱导突变表型的筛选	(77)
2.6.6	ENU 诱导点突变的鉴定	(78)
2.6.7	ENU 诱变研究的应用前景	(79)
2.7	利用基因敲入技术制备转基因动物	(81)
2.7.1	利用基因敲入技术制备转基因动物的策略	(82)
2.7.2	基因敲入法制备转基因动物的应用	(85)
2.7.3	结语	(90)
3	中靶胚胎干细胞的筛选	(94)
3.1	胚胎干细胞的分离和培养	(95)
3.1.1	ES 细胞的培养基	(95)
3.1.2	成纤维细胞用作 ES 细胞的饲养层细胞	(96)
3.1.3	小鼠 ES 细胞的分离	(98)
3.1.4	ES 细胞的鉴定	(101)
3.2	打靶载体转染 ES 细胞	(103)
3.2.1	电穿孔法转染 ES 细胞的条件	(104)
3.2.2	选择合适的抗性培养基	(104)
3.3	对发生同源重组的单克隆的筛选	(105)
3.3.1	阳性 ES 克隆的挑取	(106)
3.3.2	阳性 ES 克隆的冻存	(107)
3.3.3	ES 克隆基因组 DNA 的制备	(107)
3.3.4	PCR 法筛选中靶 ES 细胞	(107)
3.3.5	Southern 杂交法筛选中靶 ES 细胞	(108)
3.4	ES 细胞的体外诱导分化研究	(109)
3.4.1	ES 细胞体外诱导分化为肌细胞的研究	(111)
3.4.2	ES 细胞体外定向分化为神经元和神经胶质细胞	(112)
3.4.3	胚胎干细胞定向造血细胞分化的研究	(115)
4	由中靶细胞获得突变体动物的方法	(126)
4.1	通过囊胚显微注射法获得嵌合体小鼠	(126)
4.1.1	小鼠的饲养和管理	(126)

4.1.2	供体囊胚的制备	(128)
4.1.3	囊胚的显微注射	(130)
4.1.4	胚胎移植	(132)
4.1.5	嵌合体的鉴定和传代	(134)
4.1.6	基因打靶突变小鼠的维持	(136)
4.2	通过胚胎聚合法获得完全 ES 细胞来源的胚胎或嵌合体小鼠	(138)
4.2.1	用于胚胎聚合的 ES 细胞的准备	(139)
4.2.2	聚合用胚胎的准备	(139)
4.2.3	ES 细胞与胚胎的聚合	(144)
4.2.4	聚合体胚胎的培养和转移	(147)
4.2.5	剖腹产	(147)
4.2.6	二倍体或四倍体嵌合体胚胎的鉴定	(147)
4.2.7	完全 ES 细胞来源胚胎及嵌合体胚胎的应用和前景	(148)
5	基因打靶在现代生物学研究中的应用实例	(153)
5.1	应用基因剔除技术研究 <i>Smads</i> 基因的功能	(153)
5.1.1	SMADs 的结构及分类	(154)
5.1.2	SMADs 介导的信号转导	(156)
5.1.3	用基因剔除技术研究 <i>Smads</i> 基因在脊椎动物体内的功能	(158)
5.1.4	小结	(162)
5.2	葡萄糖激酶基因剔除及成年型糖尿病模型	(165)
5.2.1	MODY 的研究概况	(165)
5.2.2	葡萄糖激酶基因	(166)
5.2.3	MODY 的动物模型及葡萄糖激酶基因剔除	(168)
5.3	人类疾病的基因打靶小鼠模型	(172)
5.3.1	小鼠基因组学研究进展	(172)
5.3.2	小鼠模型的发展及特性	(174)
5.3.3	基因打靶小鼠作为人类疾病动物模型的研究	(175)
5.3.4	基因打靶小鼠作为人类疾病模型的问题与展望	(182)
5.4	核移植法研制突变体动物	(184)
5.4.1	生产突变体动物的传统方法	(185)
5.4.2	核移植方法的发展过程	(186)
5.4.3	影响核移植效率的因素及存在的问题	(187)
5.4.4	近期核移植的进展	(188)
5.4.5	基因打靶与核移植技术相结合的优势	(190)
5.4.6	基因打靶与核移植技术相结合的应用前景	(191)

6 基因打靶技术存在的问题及对策	(195)
6.1 打靶载体设计引起的问题	(195)
6.1.1 不完全剔除	(195)
6.1.2 其他基因编码区或者调控元件的删除	(196)
6.1.3 筛选标记基因对表型的影响	(197)
6.2 表型解释中存在的问题	(198)
6.2.1 基因冗余和代偿机制	(198)
6.2.2 遗传背景对小鼠表型的影响	(200)
6.2.3 修饰基因对表型的影响及应用	(202)
6.2.4 亚效等位基因	(204)
6.3 关于解决基因打靶研究中存在问题的建议	(205)
6.4 总结	(206)
7 附录 1 常用实验方法	(210)
7.1 靶基因 cDNA 探针的克隆	(210)
7.2 靶基因基因组 DNA 片段的筛选和克隆	(211)
7.2.1 从小鼠基因组细菌人工染色体(BAC)文库中筛选基因组 DNA 片段	(211)
7.2.2 从小鼠基因组噬菌体文库中筛选基因组 DNA 片段	(216)
7.3 Northern 杂交分析	(220)
7.3.1 组织和细胞总 RNA 的提取	(220)
7.3.2 在含甲醛的凝胶上进行 RNA 电泳	(220)
7.3.3 将 RNA 转移至硝酸纤维素膜并进行杂交	(221)
7.3.4 采用 mRNA 膜进行 Northern 杂交	(222)
7.4 小鼠的基因型分析	(222)
7.4.1 从鼠尾提取基因组 DNA	(222)
7.4.2 采用 PCR 法鉴定小鼠的基因型	(223)
7.4.3 小鼠早期胚胎的基因型鉴定	(224)
7.5 常规组织学分析:苏木素-伊红染色	(225)
7.5.1 石蜡标本的包埋	(225)
7.5.2 石蜡切片	(225)
7.5.3 苏木素和伊红染色液的配制	(225)
7.5.4 常规石蜡切片苏木素-伊红(HE)染色程序	(226)
7.6 免疫组化分析	(226)
7.7 普通原位杂交	(227)
7.7.1 ³⁵ S 标记的单链 RNA 探针的制备和纯化	(227)
7.7.2 组织切片的处理及原位杂交	(228)

7.7.3	漂洗和曝光	(229)
7.7.4	乳胶曝光和显影	(230)
7.8	整体原位杂交	(230)
7.8.1	地高辛(DIG)标记的 RNA 探针的制备	(230)
7.8.2	胚胎的固定	(231)
7.8.3	胚胎的预处理和杂交	(231)
7.8.4	漂洗和抗体标记	(232)
7.8.5	显色反应	(232)
7.9	小鼠的全骨架制备	(233)
7.10	利用藏红 O 染色检测小鼠骨切片中蛋白多糖的含量	(234)
7.11	小鼠组织的 lac Z 染色	(234)
7.11.1	组织切片的 lac Z 染色	(234)
7.11.2	整体胚胎的 lac Z 染色	(235)
8	附录 2 常用溶液和缓冲液的配制	(236)
8.1	常用试剂的配制	(236)
8.2	杂交试验中用于降低背景的封闭液	(241)
8.3	蛋白水解酶类	(242)
8.4	M ₂ 和 M ₁₆ 溶液的配制	(243)
8.4.1	贮存液成分	(243)
8.4.2	M ₂ 溶液的配制	(243)
8.4.3	M ₁₆ 溶液的配制	(244)
9	附录 3 常用参考书和数据库	(243)
9.1	常用参考书	(248)
9.2	常用基因打靶和转基因小鼠资源网站	(245)
9.2.1	主要数据库精选	(245)
9.2.2	遗传工程突变体小鼠	(246)
9.2.3	特定小鼠品系	(248)
9.2.4	ENU 诱变数据库	(249)
9.2.5	基因打靶操作手册	(249)
9.2.6	乳腺转基因数据库	(250)
9.2.7	商业和其他供应者	(250)
	后记	(251)

1 基因打靶技术的发展简史 及其应用前景

1.1 基因打靶技术的概念

基因打靶技术是一种定向改变生物活体遗传信息的实验手段^[1,2]。通过对生物活体遗传信息的定向修饰（包括基因灭活、点突变引入、缺失突变、外源基因定位引入、染色体组大片段删除等），并使修饰后的遗传信息在生物活体内遗传，表达突变的性状，从而研究基因功能等生命科学的重大问题，以及提供相关的疾病治疗、新药筛选评价模型等。基因打靶技术的发展已使得对特定细胞、组织或者动物个体的遗传物质进行修饰成为可能。它的产生和发展建立在胚胎干细胞（embryonic stem cell, ES 细胞）技术和同源重组技术成就的基础之上，并促进了相关技术的进一步发展。它的原理和操作流程如图 1.1.1 所示。具体方法：首先

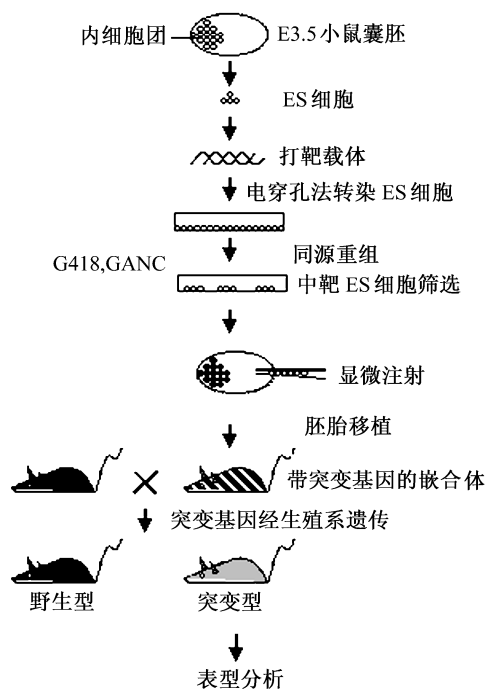


图 1.1.1 基因打靶的主要技术步骤

要获得 ES 细胞系,利用同源重组技术获得带有研究者预先设计突变的中靶 ES 细胞。通过显微注射或者胚胎融合的方法将经过遗传修饰的 ES 细胞引入受体胚胎内。经过遗传修饰的 ES 细胞仍然保持分化的全能性,可以发育为嵌合体动物的生殖细胞,使得经过修饰的遗传信息经生殖系统遗传。最终获得的带有特定修饰的突变动物为研究者提供一个特殊的研究体系,可以在生物活体中研究特定基因的功能。目前,在 ES 细胞进行同源重组已经成为一种对小鼠染色体组上任意位点进行遗传修饰的常规技术。通过基因打靶获得的突变小鼠已经超过千种(相关数据库参见文献 [3]),并正以每年数百种的速度增加。通过对这些突变小鼠的表型分析,许多与人类疾病相关的新基因的功能已得到阐明,并直接导致了现代生物学研究各个领域许多突破性的进展。

1.2 胚胎干细胞技术的发展

干细胞是指一类具有无限分裂能力的细胞,它们能通过一次不对称分裂在复制自己的同时产生不同类型的细胞^[4]。ES 细胞是从着床前的哺乳类胚胎中分离的全能干细胞,具有在体外不分化的增殖能力,经过长期体外培养后仍然具有分化成所有 3 种胚层的发育潜能^[5]。

对 ES 细胞的研究可以追溯到 20 世纪 50 年代对小鼠胚胎进行体外培养的实验。Whitten^[6]于 1956 年成功地应用补充了牛血清白蛋白的培养基培养受精卵,使单细胞的受精卵在体外发育到囊胚阶段。其后,Brinster^[7]于 1965 年建立了微滴培养技术,用于着床前小鼠胚胎的培养。McLaren 等^[8,9]对输卵管移植和子宫移植条件进行了优化,并最终使得通过胚胎移植从体外培养的胚胎产生活的小鼠成为一种常规的技术。10 年后,Gardner^[10]建立了将分离的细胞注射入宿主囊胚获得嵌合体小鼠的方法。这一方法的成功建立使得研究者有可能系统地检测经过体外操作的胚胎细胞的分化全能性。

1970 年,Stevens^[11,12]作为先驱者成功分离了小鼠胚胎瘤细胞(embryonal carcinoma, EC)并将其作为模式体系研究胚胎细胞的全能性。几年后,Brinster^[13], Mintz 和 Illmensee^[14], 以及 Papaioannou^[15]等证实胚胎瘤干细胞可以整合入宿主囊胚并分化成多种正常成年组织,但没有胚胎瘤细胞整合入生殖系的报道。1981 年,Evans 和 Martin 分别独立地从正常的小鼠囊胚中分离了 ES 细胞^[16,17]。与大多数 EC 细胞不同,ES 细胞具有完全正常的核型。尤其重要的是,Bradley^[18]随后证实通过显微注射引入囊胚的 ES 细胞可以分化为成体的各种组织并整合入生殖系。小鼠 ES 细胞的分离和应用是 ES 细胞技术发展过程中的里程碑,它与同源重组技术的结合使得在生物整体水平上定向改变和修饰哺乳类动物的遗传物质成为可能。在此基础上发展起来的基因打靶技术革命性地改变了生命科学的面貌,成为研究基因功能的有力手段。

此后,陆续有从啮齿类动物之外物种的着床前胚胎中分离多潜能细胞的报道,但这些细胞的发育潜能没有得到进一步的研究和证实。1995 年, Thomson 等^[19]报道从恒河猴中分离了猴的胚胎干细胞。这些细胞可以在体外培养 1 年以上并维持未分化的状态。这些细胞具有正常的核型,并保持分化成滋养层细胞、内胚层、中胚层和外胚层组织细胞的能力。猴 ES 细胞从细胞形态、细胞表面分子标记物、所需生长因子均不同于小鼠 ES 细胞,而与人类 EC 细胞类似。1996 年, Thomson 等^[20]又报道了绒猴 ES 细胞的分离。1998 年, Thomson 等^[21]报道从人的囊胚中分离了 ES 细胞。这些人类 ES 细胞具有正常的核型,表达高水平的端粒酶活性。在体外不分化地增殖 4~5 个月后,这些细胞仍然保持分化成滋养层细胞和所有 3 种胚层的发育全能。Shamblott 等^[22]在同年报道从流产胎儿的胚胎生殖细胞中成功分离了多能的胚胎干细胞。其实,早在 1994 年, Bongso 等从人的囊胚中分离并培养了内细胞团来源的细胞,由于没有滋养层细胞的支持,这些细胞最终分化或者死亡。2000 年,他们报道了人 ES 细胞的建立,证实了 Thomson 等人的研究并进一步对人 ES 细胞的表型及分化能力进行了鉴定^[23]。人源 ES 细胞的建立是一个激动人心的进展,对人 ES 细胞的研究将促进对人体早期发育、人类疾病的发生机制、新基因的发现、新药筛选和药效评价等基础和临床应用的研究。人源 ES 细胞的成功分离和培养以及体内和体外的定向分化研究,使得采用体外定向分化的组织细胞取代体内受损或衰竭组织细胞成为可能。随着这一领域的迅速发展,ES 细胞培养及定向分化技术正成为新的细胞替代疗法的基础。

1.3 同源重组技术的发展

现代生命科学研究由分子水平的研究向整体水平回归的趋势越来越明显。尤其是基因组计划完成之后,生命科学研究呈现出系统化、整体化和综合化的趋势。同源重组技术的发展也反映了这些特点。同源重组是指发生在减数分裂或者有丝分裂过程中相同或者相似 DNA 序列间的重组。它通常通过一对同源分子非姊妹染色体间的断裂而产生新的重组片段。同源重组技术的概念是 20 世纪 70 年代初在酵母研究中发展起来的。与酵母系统完全不同的是,哺乳动物细胞中同源重组的概率非常低。直到 1985 年, Smithies 等^[24]才首次报道在肿瘤细胞中实现了人工打靶载体和内源 β -球蛋白基因间的同源重组。两年后, Smithies 和 Capecchi 的研究小组在小鼠胚胎干细胞中分别实现了次黄嘌呤磷酸转移酶基因 (*Hprt*) 的定位剔除^[25,26]。1988 年, Capecchi 实验室的 Mansour 等^[27]发展了一种称为“正负筛选”(positive-negative selection)的策略,将胸腺嘧啶激酶基因 (*tk*) 置于打靶载体的外侧,作为筛选的负性标记。与单用一种阳性筛选标记基因的策略相比,采用“正负筛选”策略时正确克隆富集的倍数要高 3~10 倍,真

正使得同源重组技术可以作为修饰哺乳动物基因组遗传信息的常规手段并应用于生命科学研究的各个领域。

利用同源重组技术按照研究者预先设计在动物整体水平上灭活特定靶基因的研究开始揭示许多未知基因的功能。由于对基因组遗传信息进行精确修饰的需要,研究者随后发展了一些策略如“Hit and Run”以及“Tag and Exchange”^[28,29]将基因的突变引入染色体组内。1994年,Gu等^[30]利用Cre-LoxP系统首次研制成功组织特异性基因剔除小鼠,使得对基因剔除进行时间和空间上的双向控制成为可能。1995年,Ramirez-Solis等^[31]应用位点特异的重组酶系统首次在小鼠ES细胞中实现了长3~4 cm染色体组片段的缺失和倒位。应用此策略可以构建染色体组任意片段的缺失突变体小鼠,用于遗传学分析,主要是用于鉴定缺失区域的隐性基因突变。近年来,世界上多个小鼠基因组中心纷纷采用大规模、系统的化学诱变进行突变小鼠的研究。2000年,de Angelis等^[32]报道了他们用乙烷亚硝基脲(*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, ENU)大规模筛选基因显性突变的研究。他们对14 000只小鼠进行了临床相关指标的检测,获得了182只具有各种表型的突变小鼠。Nolan等^[33]在同时报道的研究中,从26 000只子代小鼠中分离到500种显性突变小鼠。将ENU诱变研究与染色体组缺失突变体研究结合起来,可以快速分析染色体组特定区域内的隐性突变,提高大规模基因功能研究的效率。

1.4 基因打靶技术在生物医学研究中的应用前景

1.4.1 基因打靶技术在基因功能研究中的应用

走进21世纪,生命科学已经进入了后基因组时代,大规模的基因功能研究正成为生命科学研究的热点。宏伟的人类基因组计划的顺利实施,完成了人类基因组及多种模式生物基因组的序列测定,产生了编码30 000~40 000个基因的核苷酸序列,其中只有一小部分基因的作用是已知的。面对这样一个打开的基因宝库,人类在新世纪面临的主要挑战是要解读这些序列所编码的基因的功能并研究基因调控的分子机制,这对于深入研究人类遗传疾病、肿瘤的发生机制以及理解许多生命现象的本质均有十分重要的意义。基因打靶技术综合应用现代生物医学各个研究领域的高新技术及最新研究成果,提供一个研究系统使得研究者可以在生物整体水平、组织水平、细胞水平、分子水平各个层次上全面系统地研究基因的功能。在基因功能研究方面,它具有其他方法所难以比拟的直接性和有效性,是后基因组时代进行功能基因组学研究的重要平台技术。从第一例成功的基因剔除报道至今,仅13年的时间,在包括美国、日本和欧洲各国在内的发达国家中,基因打靶技术已成为常规性的重要生物医学研究手段。在小鼠进行的基因打靶研

究导致了生物医学研究领域许多重要进展，小鼠已成为研究脊椎动物基因功能最重要的模式生物。利用基因打靶技术得到特定靶基因功能获得或者缺失的小鼠突变体并进行相关表型的研究将最终有助于绘制人类基因在各种生理和病理过程中功能的立体图卷。对基因功能的深入研究和了解将有利于发现新的具有应用价值的基因和蛋白，因此，通过基因打靶进行的基因功能研究将成为今后医药产业的基础。

基因打靶技术的发展使得它可以满足大规模基因功能研究的需要。目前，一种叫做“基因诱捕”^[34]的策略得到了广泛的应用。利用基因诱捕可以建立一个携带随机插入突变的 ES 细胞库，节省大量筛选染色体组文库以及构建特异打靶载体的工作及费用，更有效和更迅速地进行小鼠染色体组的功能分析。此外，基因打靶研究结合随机化学物质（如 ENU）诱变的研究也正在世界上多个小鼠基因组中心进行。除了基因完全失活的小鼠模型，携带基因功能获得或者部分基因功能丧失突变的小鼠模型将会有助于对基因功能更全面和更深入的了解。

1.4.2 应用基因打靶技术研制人类疾病动物模型

随着生物医学研究的迅速发展，人们已经认识到，所有的疾病，无论是器质性的还是功能性的，均可在基因水平上去探究其原因，并以此为基础研制早期诊断试剂，设计新的治疗方案，发展新的治疗药物。许多人类遗传病及肿瘤一旦确诊后已处于不可逆转的发生阶段，而且至今仍无理想的治疗药物。由于人类作为研究对象的局限性，发展相应的人类疾病动物模型，对于研究人类疾病的分子机制以及研制相应的诊断、治疗药物均具有非常重要的意义。

通过基因打靶研制的人类疾病小鼠模型已有数百种。这些模型的建立极大地丰富了人类对这些疾病相关基因功能的了解^[35,36]。以成纤维细胞生长因子受体 3 (FGFR3) 的功能研究为例，我们可以了解小鼠模型是如何帮助研究者发现该基因在长骨发育中的作用的。最早的临床研究发现 FGFR3 上不同功能域的突变导致不同程度的侏儒症^[37~39]。而在小鼠中进行的研究显示 *Fgfr3* 基因剔除导致与侏儒症病人完全相反的表型，*Fgfr3* 缺失突变导致小鼠长骨过度生长^[40,41]。这些数据提示 FGFR3 是长骨生长的负调控因子。此后，研究者利用基因敲入 (gene knock-in) 和 Cre-LoxP 系统将 *Fgfr3* 突变引入小鼠基因组研制成功了侏儒症的模型小鼠^[42,43]，证实侏儒症确实是由 *Fgfr3* 突变导致基因功能激活所引起的。目前，这些模型小鼠正用于进一步的功能研究和 *Fgfr3* 抑制物的筛选，研究者希望通过药物筛选可以获得 *Fgfr3* 活性的抑制物以用于这种遗传疾病的治疗。

许多肿瘤病人都有家族史，家族中的人对某种特定的肿瘤表现出一种易患性。现在知道这种家族易患性与肿瘤抑制基因的突变经生殖系遗传有关。用基因

打靶技术已经研制出了数十种小鼠肿瘤模型,其中最著名的当属肿瘤抑制基因 *P53* 基因剔除小鼠^[44~46]。*P53* 基因突变导致人类 Li-Fraumeni 综合征,患者并发各种类型的肿瘤,主要是软组织肉瘤、乳腺癌、脑瘤、骨瘤、白血病等。*P53* 基因剔除小鼠精确地体现出 Li-Fraumeni 综合征患者的表型,其肿瘤表型受小鼠种系遗传背景的影响^[44]。因此,通过对这些小鼠的研究,可能发现 *P53* 基因相关的影响肿瘤发生率的修饰基因。由于肿瘤抑制基因往往在生命的基本活动中担当重要的功能,许多肿瘤抑制基因如 *Brcal*、*Dpc4/Smad4* 定位缺失导致小鼠在胚胎期死亡^[47~50],使得研究者无法研究这些基因在成体器官发育和肿瘤发生中的功能。现代基因打靶技术的发展已使得对基因打靶进行时间和空间上的控制成为可能,研究者利用条件基因剔除技术建立了多种组织特异的肿瘤模型。如乳腺癌肿瘤抑制基因 *Brcal* 基因剔除导致小鼠在中胚层发生前死亡^[47,48],研究者利用 Cre-LoxP 系统研制了乳腺组织特异性 *Brcal* 基因剔除小鼠^[51]。经过一个很长的潜伏期之后,突变小鼠长了乳腺癌,在组织病理学上与人类乳腺癌惊人的相似。对该小鼠进行表型分析的结果表明, *Brcal* 基因缺失导致基因组不稳定性增加,引起了其他基因包括肿瘤抑制基因和癌基因的突变,最终导致乳腺癌发生。这些小鼠除了可被继续用于研究相关疾病的分子机制,也可用于治疗药物的筛选,并可作为传统治疗药物和基因治疗的评价系统。

1.4.3 应用基因打靶技术改良动物品系和研制动物反应器

自 1980 年第一例转基因小鼠诞生以来,通过显微注射法将外源基因片段引入受精卵的雄性原核一直是研制转基因动物最实用的方法。采用这种传统方法获得的转基因动物,其外源基因整合的位点和拷贝数是高度不确定的,对外源基因的表达以及由此而引起的表型有很大的影响。传统转基因载体上要设法带上所有的调控元件以期能使外源基因获得理想的表达。长期以来,某一基因的调控元件在染色体组上相距甚远,或存在于内含子中,使得外源基因要得到理想的表达十分困难。应用以 ES 细胞培养技术和同源重组为基础的基因敲入技术,可将外源基因整合到特定的靶位点,克服外源基因整合的位点效应,并可利用靶位点全套的表达调控元件以实现组织与时空的特异性表达。由于经济大动物的胚胎干细胞系还鲜有报道,克隆技术却有突飞猛进的发展,在体细胞中进行基因打靶并通过核移植获得转基因动物是一条可行的途径。2000 年, McCreath 等^[52]成功地利用基因打靶技术在绵羊胎儿成纤维细胞中将 α 抗胰蛋白酶 (AAT) 基因定位整合入绵羊 $\alpha 1$ 原胶原 (COL1A1) 基因位点,并通过核移植技术获得了一只活的绵羊,外源基因在乳汁中的含量达 0.65mg/ml ^[52]。显而易见,通过基因打靶技术研制动物生物反应器正在改变传统研制转基因动物的方法。此外,由于高级哺乳动物

恒河猴和人的 ES 细胞系相继建立成功, 有理由期待其他经济大动物的 ES 细胞系在近期成功建立。随着对人类基因组功能了解的逐渐加深, 人类对高等动物遗传物质的改造能力也将逐渐增强, 利用基因打靶技术定向改变这些经济大动物的经济性状是完全有可能的。

(杨 晓)

参 考 文 献

- 1 Müller U. Ten years of gene targeting; targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev*, 1999, 82 (1—2): 3~21
- 2 杨 晓, 黄培堂, 黄翠芬. 在小鼠进行基因打靶的研究进展, 科学通报, 2000, 45 (15): 1584~1592
- 3 Sikorski R, Peters R. Transgenics on the Internet. *Nat Biotechnol*, 1997, 15 (5): 289
- 4 van der Kooy D, Weiss S. Why stem cells? *Science*, 2000, 287 (5457): 1439~1441
- 5 Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell*, 2000, 100 (1): 143~155
- 6 Whitten WK. Culture of tubal mouse ova. *Nature*, 1956, 177: 96
- 7 Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos in vitro. II. The effect of energy source. *J Exp Zool*, 1965, 158: 59~68
- 8 McLaren A, Michie D. Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster-mothers. I. Factors affecting the implantation and survival of native and transferred eggs. *J Exp Biol*, 1956, 33: 394~416
- 9 McLaren A, Biggers JD. Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early embryos. *Nature*, 1958, 182: 877~878
- 10 Gardner RL. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature*, 1968, 220 (167): 596~597
- 11 Stevens LC. The biology of teratomas. *Adv Morphog*, 1967, 6: 1~31
- 12 Stevens LC. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and post-implantation mouse embryos. *Dev Biol*, 1970, 21 (3): 364~382
- 13 Brinster RL. The effect of cells transferred into mouse blastocyst on subsequent development. *J Exp Med*, 1974, 140: 1049~1056
- 14 Mintz B, Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72 (9): 3585~3589
- 15 Papaioannou VE, McBurney MW, Gardner RL *et al*. Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature*, 1975, 258 (5530): 70~73
- 16 Evans MJ, Kaufmann MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292 (5819): 154~156
- 17 Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78 (12): 7634~7638
- 18 Bradley A, Evans M, Kaufman MH *et al*. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 1984, 309 (5965): 255~256
- 19 Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, *et al*. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92 (17): 7844~7848
- 20 Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, *et al*. Pluripotent cell lines derived from common marmoset blasto-

- cysts. *Biol Reprod*, 1996, 55 (2): 254~259
- 21 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282 (5391): 1145~1147
 - 22 Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad USA*, 1998, 95 (23): 13726~13731
 - 23 Reubinoff BE, Pera MF, Fong C, *et al.* Embryonic stem cell lines from human blastocysts; somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*, 2000, 18 (4): 399~404
 - 24 Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, *et al.* Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, 1985, 317 (6034): 230~234
 - 25 Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, *et al.* Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 1987, 330 (6148): 57657~57658
 - 26 Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987, 51 (3): 503~512
 - 27 Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, 1988, 336 (6197): 348~352
 - 28 Hastly P, Ramirez-Solis R, Krumlauf R, *et al.* Introduction of a subtle mutation into the Hox-2.6 locus in embryonic stem cells. *Nature*, 1991, 350 (6315): 243~246
 - 29 Askew GR, Doetschman T, Lingrel JB. Site-directed point mutations in embryonic stem cells; a gene-targeting tag-and-exchange strategy. *Mol Cell Biol*, 1993, 13 (7): 4115~4124
 - 30 Gu H, Marth JD, Orban PC, *et al.* Deletion of a DNA polymerase β gene segment in T cells using cell type-specific targeting. *Science*, 1994, 265 (5168): 103~106
 - 31 Ramirez-Solis R, Liu P, Bradley A. Chromosome engineering in mice. *Nature*, 1995, 378 (6558): 720~724
 - 32 de Angelis MH, Flaswinkel H, Fuchs H, *et al.* Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat Genet*, 2000, 25 (4): 444~447
 - 33 Nolan PM, Peters J, Strivens M, *et al.* A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse. *Nat Genet*, 2000, 25 (4): 440~443
 - 34 Evans MJ, Carlton MBL, Russ AP. Gene trapping and functional genomics. *Trends Genet*, 1997, 13 (9): 370~374
 - 35 Bedell MA, Jenkins NA, Copeland NG. Mouse models of human disease. Part I . Techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes Dev*, 1997, 11 (1): 1~10
 - 36 Bedell MA, Jenkins NA, Copeland NG. Mouse models of human disease. Part II . Recent progress and future directions. *Genes Dev*, 1997, 11 (1): 11~43
 - 37 Bellus GA, McIntosh I, Smith EA, *et al.* A recurrent mutation in tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia. *Nature Genet*, 1995, 10 (3): 357~359
 - 38 Muenke M, Schell U. Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. *Trends Genet*, 1995, 11 (8): 308~313
 - 39 Naski MC, Wang Q, Xu J, *et al.* Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet*, 1996, 13 (2): 233~237
 - 40 Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, *et al.* Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet*, 1996, 12 (4): 390~397
 - 41 Deng C, Wynshaw-Boris, Zhou F, *et al.* Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone

- growth. *Cell*, 1996, 84 (6): 911~921
- 42 Li C, Chen L, Iwata T, *et al.* A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarfism in mice by activation of STAT3 and ink4 cell cycle inhibitors. *Hum Mol Genet*, 1999, 8 (1): 35~44
 - 43 Chen L, Monsonego EO, Yang X, *et al.* Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *J Clin Invest*, 1999, 104 (11): 1517~1525
 - 44 Hooper ML. The role of the p53 and Rb-1 genes in cancer, development, and apoptosis. *J Cell Sci*, 1994, 18 (Suppl): 13~17
 - 45 Malkin D. Germline p53 mutations and heritable cancer. *Annu Rev Genet*, 1994, 28: 443~465
 - 46 Jacks T. Lessons from the p53 mutant mouse. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996, 122 (6): 319~327
 - 47 Gowen LC, Johnson BL, Latour AM, *et al.* *Brcal* deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet*, 1996, 12 (2): 191~194
 - 48 Hakem R, de la Pompa JL, Sirard C, *et al.* The tumor suppressor gene *Brcal* is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell*, 1996, 85 (7): 1009~1023
 - 49 Sirard C *et al.* The tumor suppressor gene *Smad4/Dpc4* is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev*, 1998, 12 (1): 107~119
 - 50 Yang X, Li C, Xu X, *et al.* The tumor suppressor SMAD4/DPC4 is essential for epiblast proliferation and mesoderm induction in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 (7): 3667~3672
 - 51 Xu X, Wagner KU, Larson D, *et al.* Conditional mutation of *Brcal* in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumor formation. *Nat Genet*, 1999, 22 (1): 37~43
 - 52 McCreath KJ, Howcroft J, Campbell K, *et al.* Production of gene-targeted ship by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, 405 (6790): 1066~1069

2 基因打靶的策略及载体设计

2.1 完全基因剔除

完全基因剔除指通过同源重组直接将靶基因在细胞或者动物个体中的活性完全消除^[1]。进行完全基因剔除首先要在体外进行目的基因功能的缺失突变，即构建携带突变基因的打靶载体。携带突变基因的打靶载体通过各种方法导入胚胎干细胞或者体细胞中，通过同源重组将基因组中的野生型基因置换下来。

完全基因剔除过程中首要的问题是打靶载体的构建。打靶载体用来和打靶位点重组，使打靶位点产生突变。一个打靶载体至少应包括靶基因基因组的同源序列和质粒的基本骨架。由于真核细胞中同源重组发生的频率通常很低，因此要在打靶载体上添加一些选择标记基因（如正选择标记基因和负选择标记基因），来筛选打靶重组的产物（图 2.1.1）。打靶载体中正选择标记基因有两个功能：一是作为选择标记从转染细胞中分离整合了外源基因的细胞；二是作为突变原（mutagen）插入或置换靶基因的编码外显子，使靶基因产生突变。负选择标记基因用来对抗打靶过程中的非同源重组，起富集中靶克隆的作用^[2]。

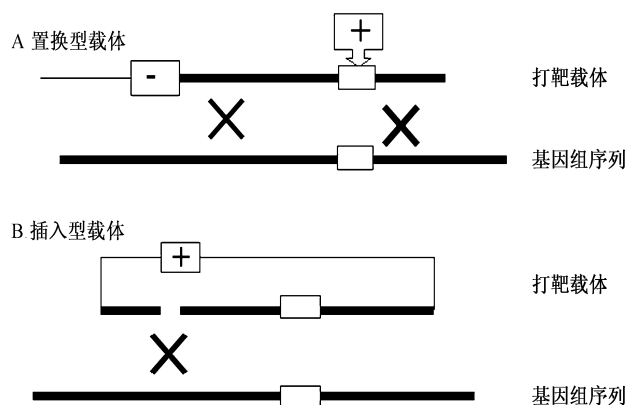


图 2.1.1 置换型载体和插入型载体的基本结构

粗线代表靶位点的同源序列，细线代表载体质粒的序列。长方形框代表靶基因的外显子，正选择标记基因用框加“+”表示，负选择标记基因用框加“-”表示。A. 置换型载体，转染之前在同源序列的外侧线性化；B. 插入型载体，转染之前在同源序列的内部线性化，产生一个双链断裂点或区

2.1.1 构建载体的一般原则

设计一个打靶载体首先要考虑以下几个问题：①用置换型载体还是用插入型载体？②打靶载体中带有长短的同源序列？③用同系的（isogenic）DNA 还是非同系的 DNA 构建打靶载体？④用筛选（screening）的方法还是用富集（enrichment）的方法获得中靶的 ES 细胞？哺乳动物细胞打靶中常用的两种载体是置换型载体（ Ω 型）和插入型载体（O 型），其基本的结构如图 2.1.1 所示。研究者可根据研究的需要选择相应的载体类型。打靶载体中同源序列的长度及 DNA 同源性的选择将在不同类型的载体设计中分别讨论。

基因剔除最早是在小鼠的一些选择性标记基因（如次黄嘌呤磷酸核糖转移酶，*Hprt*）位点上进行的^[3,4]。*Hprt* 基因编码的蛋白——次黄嘌呤磷酸核糖转移酶可以将核苷类似物代谢成对细胞有毒性的物质，基因剔除后的细胞可以在含有核苷类似物的培养基上存活。且 *Hprt* 位于 X 染色体上，故雄性来源的 ES 细胞中以单一拷贝的基因存在，因此，只需要单一拷贝的基因突变即可获得可筛选的表型。

表 2.1.1 常用的选择标记基因

1. 正选择标记基因			
选择标记基因	来 源	正选择药物	
新霉素磷酸转移酶（ <i>neo</i> ）	B	G418	
潮霉素 B 磷酸转移酶（ <i>hph</i> ）	B	潮霉素 B	
黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸转移酶（ <i>gpt</i> ） ^[8]	B	麦考酚酸+HAT+ 黄嘌呤	
次黄嘌呤磷酸核糖转移酶（ <i>Hprt</i> ）	M	HAT	
胸腺嘧啶激酶（ <i>tk</i> ）	M	HAT	
嘌呤霉素乙酰转移酶（ <i>puro</i> ）	B	嘌呤霉素	
2. 负选择标记基因			
选择标记基因	来 源	负选择药物	宿主基因型
次黄嘌呤磷酸核糖转移酶（ <i>Hprt</i> ）	M	6TG	<i>Hprt</i> ⁻
黄嘌呤/鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（ <i>gpt</i> ）	B	6TG	<i>Hprt</i> ⁻
胸腺嘧啶激酶（ <i>tk</i> ）	M	6TX	wt or <i>Hprt</i> ⁻
白喉毒素（DT）	B	不需要	wt
单纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶（ <i>HSVtk</i> ）	V	5BdU	<i>tk</i> ⁻
		GANC, FIAU	wt

B. 细菌，V. 病毒，M. 哺乳动物，HAT. 氨基嘌呤，次黄嘌呤，胸腺嘧啶，GANC. gancyclovir，FI-AU.1（1-2-deoxy-2-fluoro- β -Darabinofuransyl）-5-iodouracil，6TG. 6-巯基鸟嘌呤，6TX. 6-巯基黄嘌呤，5BdU. 5-溴脱氧尿苷，wt. 野生型，宿主基因型是指所用细胞株的基因型，便于筛选，改自文献 [9]。

要将基因剔除技术应用于其他基因位点的研究，如何建立高效、快捷的筛选中靶 ES 细胞的方法显得尤为关键。Mansour 等^[5]于 1988 年设计了一种称为正-负选择系统（positive-negative selection, PNS）的载体，即通常所说的 PNS 载体，获得了高富集的中靶细胞。此系统主要包括正选择标记基因和负选择标记基因。正选择标记基因 *neo*（目前常用的选择标记基因见表 2.1.1）通常被插入到靶基因功能最关键的外显子中^[6]，或通过同源重组删除靶基因最重要的功能域^[7]，以使靶基因彻底失活。利用筛选培养基检测是否存在选择标记基因，可以判定打靶载体是否整合到细胞的基因组中，当然这其中也包含随机整合的情况。为了最大程度地富集同源重组的克隆，研究者将从单纯疱疹病毒来源的胸腺嘧啶激酶（*HSVtk*）基因作为负选择标记基因插入到同源序列的一侧。*HSVtk* 基因产物以核苷酸类似物（FIAU, GANC）为底物，将其代谢成对细胞有毒性的物质，使细胞被杀死，而细胞 *tk* 基因编码的蛋白不能代谢 FIAU 和 GANC。当打靶载体随机整合到细胞的基因组上时，*HSVtk* 也被整合到细胞的基因组上，细胞就不能在含有 FIAU 或 GANC 的药物培养基中存活。当打靶载体通过同源重组整合到靶位点上时，*HSVtk* 基因由于在同源序列的外侧而不能与载体同时整合到细胞基因组中，细胞得以在含有正负筛选药物的培养基中存活下来。

在许多研究中，将 β -半乳糖苷酶（*lacZ*）基因以正确的读码框重组入靶基因的外显子中。通过组织学检测 *lacZ* 的表达情况，可研究靶基因表达的组织和时相特异性^[10]。*lacZ* 基因的 5' 端若携带内源核糖体插入位点（internal ribosomal entry sites, IREs）序列，则 *lacZ* 基因的插入会不受时相的控制而得到正确的翻译^[11,12]（图 2.1.2）。

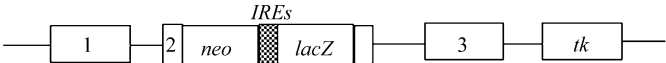


图 2.1.2 PNS 载体的基本结构
数字代表靶基因的外显子顺序

使用 PNS 载体依然得到较多的随机整合的 ES 细胞克隆，Mansour 等^[11]在 *int-2* 基因的打靶过程中发现在其一端插入一个 *HSV-tk* 基因，同源重组和非同源重组的比例最高可提高 2 000 倍，即富集因子是 2 000。如果在打靶载体的两端各插入一个 *HSV-tk* 基因，富集因子就会从 2 000 提高到 4×10^6 ，这是因为 *HSV-tk* 基因在转染和整合的过程中容易被破坏而活性丧失的缘故。当载体的两端各插入一个 *HSV-tk* 基因时，转染过程中至少有一个 *HSV-tk* 基因不被破坏的可能性大大增加，富集因子得以大幅度提高，这也被后来的实验所证实^[13]。其他的研究也表明，基因打靶载体的改进可显著提高同源重组克隆的比例^[14]。

除了 *tk* 基因,特异性免疫毒素也能作为负选择标记基因。重组免疫毒素 anti-Tac(Fv)-PE40 由抗人 IL-2 受体的 α 亚单位(Tac)抗体的可变链与部分假单胞菌外毒素融合而成,它能特异性地杀死表达 IL-2R α 的细胞。将表达 IL-2R α 的打靶载体转染 ES 细胞,得到的表达 IL-2R α 的阳性克隆用 anti-Tac(Fv)-PE40 处理。anti-Tac(Fv)-PE40 在 0.5~200 ng/ml 的范围内,对照组细胞的生长和形态完全正常,而表达 IL-2R α 的阳性克隆的平皿接种效率(plating efficiency)随 anti-Tac(Fv)-PE40 浓度的升高而明显降低, ID₅₀ 约为 1.3 ng/ml。当 anti-Tac(Fv)-PE40 达到 100 ng/ml 时,平皿接种效率降至 5×10^{-5} ,说明 anti-Tac(Fv)-PE40 能有效地杀死表达 IL-2R α 的细胞。根据这一特异性,可以将 IL-2R α 作为一个负选择标记用于基因打靶,anti-Tac(Fv)-PE40 作为一种筛选药物,可有效杀死打靶载体随机整合并表达 IL-2R α 的克隆,而对其他细胞没有毒性。Kobayashi 等^[15]用此方法进行基因打靶获得了成功。anti-Tac(Fv)-PE40 作为负筛选药物,也可应用于产生精细突变的基因打靶实验中。

2.1.2 置换型载体

置换型载体又称 Ω 型载体,其基本元件包括与靶位点两侧同源的同源序列臂、正选择标记基因、细菌质粒序列和载体上同源臂外侧的线性化位点。在许多情况下,还要在载体上加一个负选择标记基因以富集发生同源重组的中靶细胞(图 2.1.1A)。置换型载体重组的具体机制到目前为止还没有定论。重组的结果是:载体中同源序列与靶基因间发生两次染色体交换,靶基因序列被打靶载体上同源臂及同源臂间的序列所替代,而载体末端的非同源序列被切除^[16]。

2.1.2.1 设计置换型载体的原则

设计置换型载体首先考虑的是产生突变的类型,其次(也是非常重要的)是筛选富集方法的选择。一般不需要将整个的靶基因完全去除以使靶基因失去功能,而通常在靶基因外显子处插入一个正筛选标记基因,使基因产生移码突变或缺失突变。用置换型载体进行基因打靶时,影响突变类型的主要因素是打靶载体中正选择标记基因的位置。用正选择标记基因置换靶基因中的编码序列在大多数情况下会使靶基因失去功能,但在有些情况下,会产生还具有一定的功能的部分缺失的蛋白质,使研究复杂化。因此,关于靶基因在其他系统中突变体的功能研究对载体的设计有很大的帮助,有助于选择合适的突变位点。通常将正选择标记框插入到靶基因上游的外显子中,虽然正选择标记框重组到上游外显子的等位基因有时也会编码出一些小肽,但与正选择标记基因重组到下游外显子的等位基因相比,前者更容易产生无义突变。

由于外显子的长度可影响 RNA 的拼接^[17],带有标记框的大外显子常常不能

被拼接系统识别，而被当作内含子剪切掉。如果外显子恰好是编码序列，碱基数不是密码子的整数倍，就会造成靶基因的缺失突变或移码突变，产生一个没有功能的等位基因。如果被拼接掉外显子的碱基数正好是密码子的整数倍，就会形成部分缺失的蛋白质，会保留部分功能或全部功能。可见靶位点的突变是十分复杂的。

为使遗传背景清楚，大多数情况下，都采取删除部分或全部的靶基因。用正选择标记框置换全部基因或部分基因，便可达到这个目的。到目前为止，还没有确切的数据说明到底去除基因的哪一部分，打靶效率会更高。一般情况下，删除的基因片段的长度不超过 3 kb。当然，删除的基因片段超过 3kb 的，也有文献报道^[18]。值得注意的是，当删除的片段太大时，可能会影响靶基因邻近的基因，因为这些删除的片段可能正好是其他基因的调控序列。

打靶载体同源臂的长度对打靶效率影响很大^[19]。大多数载体同源臂的长度在 5~8kb 之间。同源臂和正选择标记框的相对位置决定了只有通过同源重组打靶成功的克隆才能通过药物培养基被筛选出来。为了进一步确定是否打靶成功，通常采用 PCR 的方法进行验证，用 PCR 方法扩增打靶载体和打靶位点连接处的片段。设计引物时采用的原则是：一个引物同正选择标记框退火，另一个则同打靶载体外侧相邻的基因组序列退火。PCR 扩增的效率取决于一个相对确定的引物位点（正选择标记框）与另一个引物位点之间的距离。两者之间的距离一般为 0.5~2 kb，这样有利于 PCR 检测。因此，置换型载体两侧的打靶臂是不对称的，有长臂和短臂之分。短臂为 0.5~2 kb，便于 PCR 进行检测；同时长臂要足够长，保证有足够的同源序列形成染色体交换复合体。PCR 方法检测出来的中靶克隆最后一定要用 Southern 杂交的方法进行验证。

另一种常用的筛选方法是 Southern 杂交分析。这种方法要求在设计载体时，设计好合适的限制性酶切位点，选择好正确的探针，以便把中靶的克隆和未中靶的克隆区分出来。

由于打靶载体在转染细胞之前要线性化，因此，打靶载体要在同源臂的外侧至少有一个单一的限制性酶切位点，使载体线性化。至于打靶载体上的原核序列是否去除，对打靶效率的影响不大^[16]。

综上所述，为使产生的缺失突变达到研究的目的，设计置换型载体时，应注意以下几点：

- (1) 同源臂为 5~8kb。
- (2) 正选择标记框应插在靶基因上游的外显子内。
- (3) 应避免将正选择标记框插入到靶基因外显子两个编码密码子之间。
- (4) 如果靶基因太小或 5' 端的外显子太大，应删除整个靶基因。
- (5) 如果采用 PCR 的方法进行筛选中靶的克隆，打靶载体的短臂应为 0.5~2kb。

(6) 转染细胞前，在同源臂的外侧，将载体线性化。

2.1.2.2 置换型载体产生的重组等位基因

我们期待在打靶过程中，载体的序列通过同源重组成功地置换掉野生型基因组同源区的序列。实际上，打靶过程中经常会出现非预期的结果。这主要是指载体的末端相互连接，形成链状聚合体（concatemer），或重新环化，或同时具有两种类型的异常结构。链状聚合体和环化产物重组的结果是把整个的载体（包括细菌质粒的结构及其他的非同源序列）整合到基因组中去（图 2.1.3）。加入负选择标记可以排除这些副产物。这些副产物在 PCR 筛选的过程中往往是阴性的，因为 PCR 引物的设计是和打靶载体的短臂相对应的，副产物 DNA 片段太长，往往不能通过常规 PCR 方法被扩增出来。

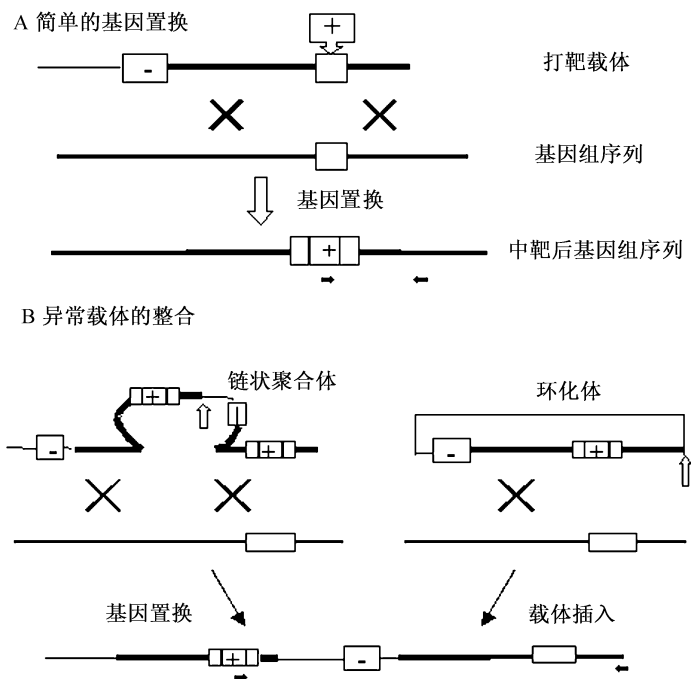


图 2.1.3 置换型载体重组模型

载体在转染前线性化，粗线代表打靶位点的同源序列，细线代表质粒骨架，深色的框代表打靶位点的一个外显子，正选择标记框和负选择标记框分别用带有+和-的框表示。深色的小箭头代表 PCR 引物。A. 简单的基因置换产物。B. 载体聚合和环化时的重组模型，浅色的箭头代表聚合或环化的连接处，PCR 引物跨越的距离太长，而不能扩增出阳性带

2.1.3 插入型载体

插入型载体又称 O 型载体，在打靶过程中，整个载体序列通过同源重组插入到基因组序列中，使靶基因产生突变。其基本的结构元件同置换型载体类似（图 2.1.1B）。其主要区别在于二者的线性化位点不同，置换型载体的线性化位点在同源序列的外侧，插入型载体的线性化位点在同源序列的内部。在载体的双链断裂点或断裂区的诱导下，插入型载体与靶序列之间经过一次染色体交换，将打靶载体插入到靶基因组序列中，从而使同源序列“复制”了一倍。对于相同的打靶序列，通常插入型载体的打靶效率比置换型载体高 5~10 倍^[16,19,20]。虽然插入型载体的打靶效率很高，由于插入型载体在打靶时有许多的拓扑构型，人们在打靶过程中更倾向于使用置换型载体。

2.1.3.1 设计插入型载体的原则

插入型载体的主要元件包括：打靶位点的同源序列（至少含有一个惟一的限制性内切酶位点，可用作线性化位点）、正选择标记框及细菌质粒的骨架，如图 2.1.1B 所示。在插入型载体的设计中非常重要的一点是考虑重组后基因的剪接和翻译的可能形式。通常，在靶基因外显子中插入打靶载体足以灭活靶基因的功能。然而，当选择标记框插入到载体中的惟一外显子内时，中靶的克隆将会含有一个正常的外显子和一个加长的人工外显子，在 RNA 的剪接过程中，就有可能跳过这个加长的外显子形成正常的剪接产物^[21]。此外，“复制”的外显子序列如果不能产生移码突变，就不能产生缺失的蛋白质。为确保在蛋白质水平上形成突变，一般要在打靶载体上引入一个终止密码子。如果移码突变发生在 C 端，产生的 N 端蛋白序列往往会具有部分或全部的功能。如果“复制”发生在靶基因的最后一个外显子处，容易形成正确的剪接产物，形成野生型的蛋白（图 2.1.4）。

另外，在载体的设计时还应考虑到重组基因的筛选。在靶位点处，基因“复制”了一份，因此，筛选中靶的克隆比置换型载体复杂。

综上所述，插入型载体的设计应遵循以下原则：

- (1) 同源序列为 5~8 kb。
- (2) 同源序列上应至少含有一个单一的限制性内切酶位点，以便形成双链断裂点。
- (3) 正选择标记框可以位于同源区内，也可以位于同源区外。
- (4) 如果载体中的同源序列仅含有一个外显子，正选择标记框不要插在外显子内。
- (5) 不要选用基因的最后一个和最后一个外显子序列作为打靶载体的插入位

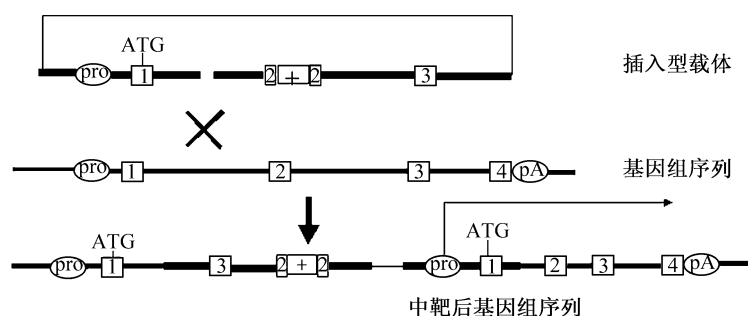


图 2.1.4 带有 5'非翻译区插入型载体的整合模型

正选择标记框带有自己的启动子。pro 和 pA 分别代表靶基因的启动子和 poly (A) 序列，ATG 代表翻译起始位点。长箭头代表靶基因的转录方向。靶基因的外显子顺序用数字表示。改自文献 [9, 22]

点。

(6) 设计载体时，尽量破坏一些限制性内切酶位点，便于 Southern 杂交分析。

2.1.3.2 重组基因的筛选

与置换型载体相比，插入型载体整合的种类更多，类型更复杂。如果载体的同源序列没有突变，整合的效率比置换型载体更高。在设计载体时有两种方法，一种是形成双链断裂点，一种是双链断裂区。采用两种方法获得的中靶克隆都可以通过 PCR 的方法检测出来，双链断裂区的可靠性更好一些。这是因为 PCR 引物的设计更合理，一条引物和双链断裂区相对应，而另一条引物则和载体上的异源序列相对应（图 2.1.5）。一旦载体插入到打靶位点，双链断裂区就以染色体序列为模板得以修复，可以通过 PCR 扩增出来。而发生随机整合时，整合后基因组中仅有载体上的一个引物位点，不能提供合适的 PCR 模板。

经 PCR 或 Southern 杂交初筛获得的阳性克隆需要传代扩增，以便进行更精细的 Southern 杂交分析，确定载体具体的整合模式，经常采用打靶序列以外的 DNA 片段作为探针。一个比较好的 Southern 杂交设计是，探针不在打靶位点的同源序列上，限制性内切酶位点又不在打靶载体上。插入一个拷贝的阳性克隆酶切片段应增大，增加的大小正好等于打靶载体的大小，同样，链状聚合体的插入也可用类似的方法来验证。由于在琼脂糖凝胶上只能分离 20kb 以内的片段，有时往往没有合适的酶切位点，就需要使用多种限制性内切酶进行消化。

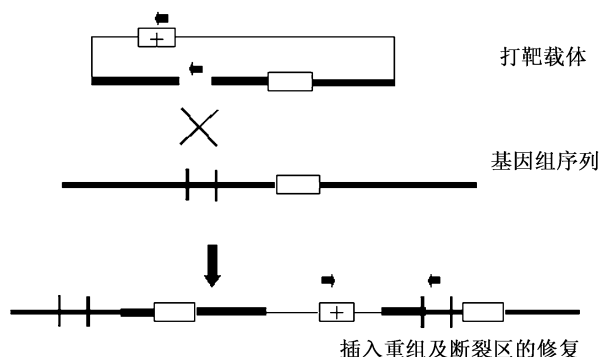


图 2.1.5 利用插入型载体获得中靶克隆的 PCR 筛选
两条竖线之间为双链断裂区，箭头表示 PCR 引物，一个位于裂区内，
另一个位于正选择标记框上。双链断裂区在重组的过程中被修复

2.1.4 影响中靶效率的因素

提高中靶效率始终是打靶载体设计过程中首要考虑的问题。影响打靶效率的因素很多，如载体的类型、同源臂的长度、打靶位点等。

2.1.4.1 双链断裂区

基因打靶过程中，打靶载体和打靶位点之间的重组是一个非常复杂的过程。在哺乳动物中，随机重组的频率远远高于同源重组的频率，为同源重组的 30~40 000 倍，可见载体和打靶位点之间的重组大部分为非同源重组。同源重组的机制，目前尚未有一个很好的定论，大家普遍认可的一个模型是双链断裂修复模型 (DSBR)。DSBR 模型最初是在解释 DNA 断裂后的修复时提出来的，后来在酵母打靶过程中发现，如果在打靶的同源区提供一个双链断裂区 (DSB)，能明显提高打靶效率^[22~25]。尽管这个模型是在酵母中提出的，实验证明在哺乳动物的基因打靶过程中，载体和染色体之间的重组也有此规律^[26]。在此模型中，同源重组发生在双链断裂区，断裂区的修复以对应的同源 DNA 作为模板，修复的断裂区实质上成为基因交换区。DNA 末端共价连接形成两个 Holiday 结构，每个结构都有两种选择，或形成交换双链，或形成非交换双链。基因的交换不需要 DNA 杂合链的形成和以后的修复过程。载体通过这种方式打靶，可产生两种产物，一种是整个载体整合到同源区形成同源区的复制，即基因插入产物；另一种产物是 DNA 的异源组合，载体中的特异序列交换到基因组中，即基因置换产物。

无论是插入型载体，还是置换型载体，载体同源区的任何一处有 DSB 都能