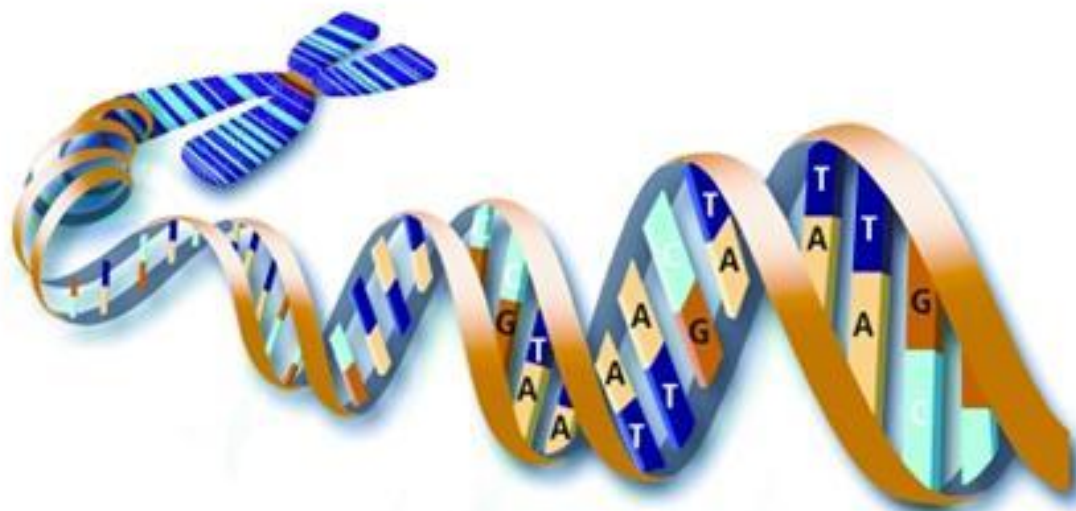


第七章

实验动物遗传工程技术



遗传工程技术

在生物整体、组织、细胞和分子水平各个层次上全面系统的研究基因功能的技术。

核心技术：

- 转基因
- 染色体大片段删除
- 基因敲入
- 点突变
- 基因敲除

实验动物遗传工程

——功能基因组时代的研究平台

研究基因功能，阐明疾病发生机理，寻找药物治疗靶点的重要技术工具。具有不可替代的应用价值。

功能基因组时代，生命科学需要实验动物科学的支撑，实验动物遗传工程技术的发展和完善，为推动生命科学的飞跃发展提供了有力的工具。



小鼠基因组测序的完成

- 继人类第二个完成全基因组学的哺乳动物。
- 全基因组框架图可免费获取（NCBI）
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/mouse>

Mus musculus (house mouse)

Reference genome: [Mus musculus \(assembly GRCm38.p6\)](#)

Download sequences in FASTA format for [genome](#), [transcript](#), [protein](#)

Download genome annotation in [GFF](#), [GenBank](#) or [tabular](#) format

BLAST against Mus musculus [genome](#)

All 22 genomes for species:

Browse the [list](#)

Download sequence and annotation from [RefSeq](#) or [GenBank](#)

Display Settings: ▾ Overview

Send to: ▾

Organism Overview ; [Genome Assembly and Annotation report \[22\]](#) ; [Organelle Annotation Report \[20\]](#)

ID: 52



Mus musculus (house mouse)

The laboratory mouse is a major model organism for basic mammalian biology, human disease, and genome evolution, and its genome has been sequenced

Lineage: [Eukaryota\[2519\]](#); [Metazoa\[835\]](#); [Chordata\[358\]](#); [Craniata\[350\]](#); [Vertebrata\[350\]](#); [Euteleostomi\[344\]](#); [Mammalia\[148\]](#); [Eutheria\[143\]](#); [Euarchontoglires\[65\]](#); [Glires\[34\]](#); [Rodentia\[32\]](#); [Myomorpha\[21\]](#); [Muroidea\[20\]](#); [Muridae\[9\]](#); [Murinae\[7\]](#); [Mus\[4\]](#); [Mus\[3\]](#); [Mus musculus\[1\]](#)

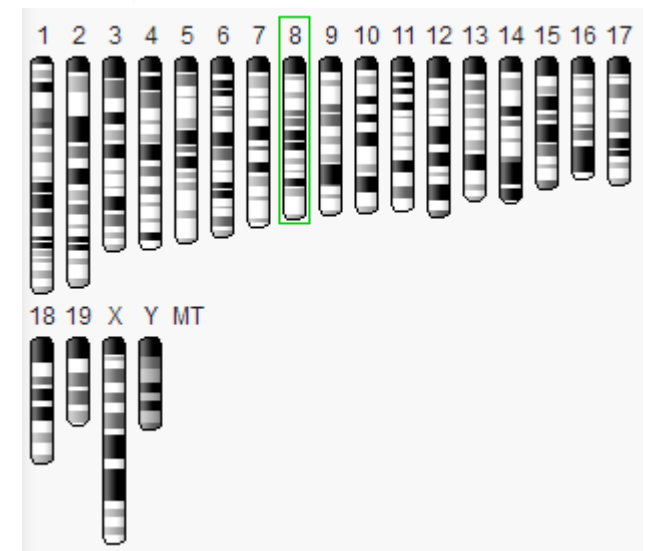
The mouse is one of the major organisms for modeling human disease and comparative genome analysis. There are over 450 inbred strains of mice, providing a wealth of different genotypes and phenotypes for genetic and other studies. In addition, thousands of spontaneous, radiation- or chemically-induced, and transgenic mutants provide potential models [More...](#)

Summary

Sequence data: genome assemblies: 22; sequence reads: 106 (See [Genome Assembly and Annotation report](#))
Statistics: median total length (Mb): 2671.82
median protein count: 61939
median GC%: 42.4891

NCBI Annotation Release: 106

以C57BL/6J 近交系的雄性个体的基因组为蓝本，通过全基因组鸟枪法和散弹鸟枪法相结合的策略完成。



小鼠与人类基因组的比较

- 小鼠的**基因总数与人类接近**，约30000个编码基因，其中80%的基因是人类的定向进化同源基因，在人类基因组中无同源基因的小鼠种属特异性基因所占比例不到1%。
- 小鼠基因组大小2.5Gb，人类基因组大小2.9Gb
- 小鼠基因组90%以上的区域分布在于人类基因组相对应的同线性区域内

- 在核酸水平，小鼠基因组与人类基因组有约40%的同源性
- 小鼠基因组中中性替代突变率是人类基因组的2倍，转座元件比人类更活跃
- 在对应的基因组区域中分布着与人类同类型的重复序列
- 在小鼠基因组中，在自然选择压力下呈高度保守的区段占整个基因组的5%。

- 小鼠基因组测序可更明确的研究小鼠基因组与人类基因组的异同，为进一步以小鼠为模式生物研究人类基因组功能奠定坚实的基础
- 可更为有效的通过遗传遗传工程技术手段对小鼠基因组进行改造和修饰奠定基础
- 推动小鼠遗传工程的研究发展及在生物医学研究中的应用。

转基因小鼠的几个里程碑工作

- 1974 Jaenisch and Mintz: 将SV40病毒DNA注射小鼠囊胚, 得到整合有SV40病毒的小鼠 (Proc Natl Acad Sci U S A. 1974 Apr;71(4):1250-4.)
- 1976 Jaenisch: 将逆转录病毒用于小鼠囊胚感染获得转基因小鼠, 并能传代 (Proc Natl Acad Sci U S A 1976 Apr;73(4):1260-4)
- 1980-81 Gordon et al., Brinster et al., Costantini et al.: DNA小鼠受精卵原核注射建立了转基因小鼠的方法 (Science. 1981 Dec 11; 214(4526): 1244-6. Cell. 1981 Nov;27(1 Pt 2):223-31. Nature. 1981 Nov 5;294(5836):92-4.)
- 1982 Palmiter et al., 在小鼠中过度表达人生长激素基因, 获得超级小鼠 (Nature. 1982 Dec 6;300(5893):611-5.)

超级小鼠：人生长激素转基因小鼠



第一节 转基因技术



一、转基因动物

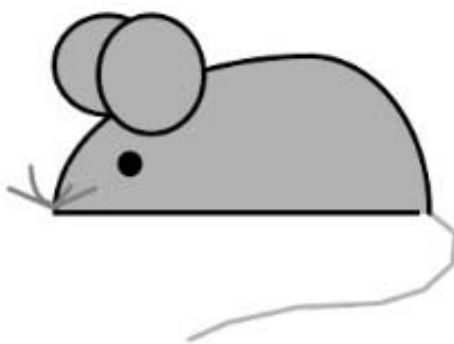
- 通过插入目的基因用于过表达基因研究
- 通过插入目的基因的shRNA来降低目的基因的本底表达
- 通过同源重组的方法获得基因Knock-in 和 Knock-out

优秀的转基因动物代表：小鼠



小鼠遗传操作技术原理

目的基因

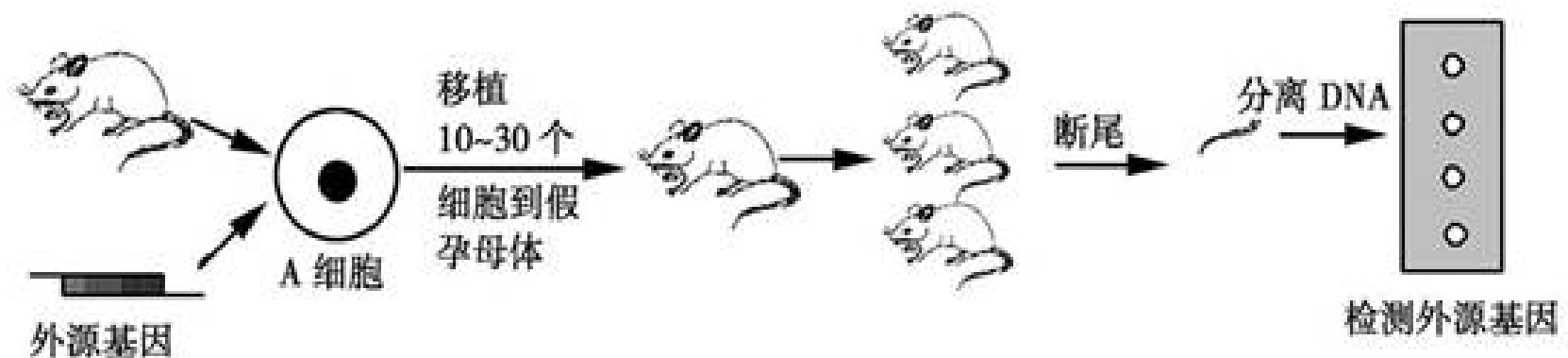


功能获得

功能缺失

三、转基因小鼠技术

将外源基因转导入小鼠的组织细胞内，使小鼠的不同组织细胞表达该外源基因，并可通过配子传给子代。



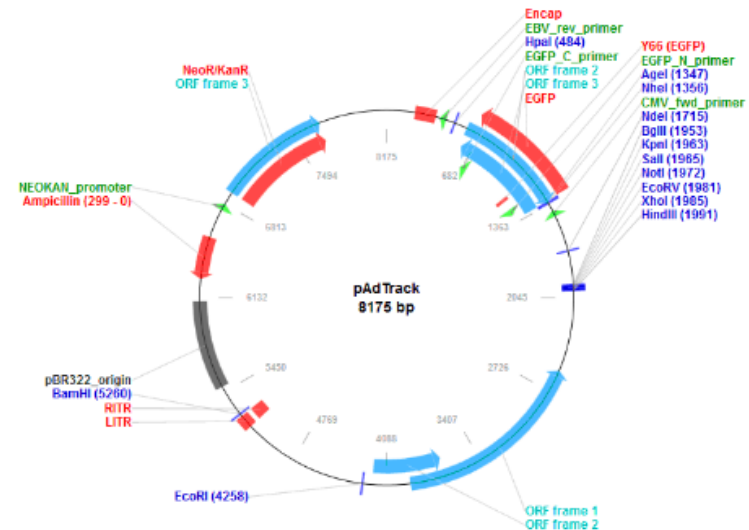
转基因小鼠的制备过程



I. 构建转基因表达载体

常规转基因载体的基本结构包括：

- ① **启动子**，用于驱动转基因的转录和后期表达；
- ② 拟插入的靶基因 **cDNA序列**，包含有要表达肽段的编码序列；
- ③ **cDNA非翻译区**(untranslated region, UTR)和3'端加多聚腺苷酸尾巴(polyadenylation, **polyA**)；
- ④ 质粒复制所需的 **DNA骨架序列**



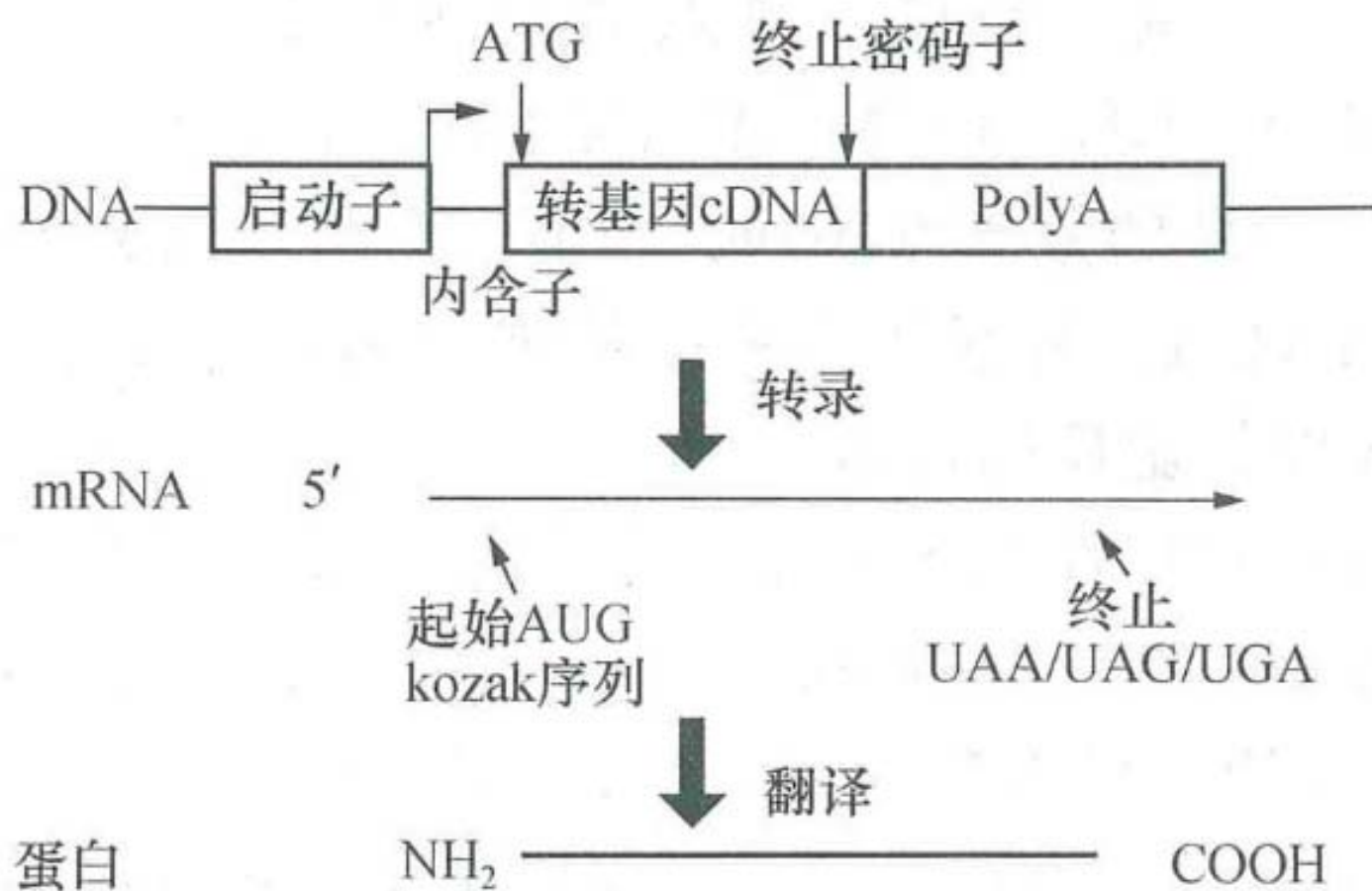


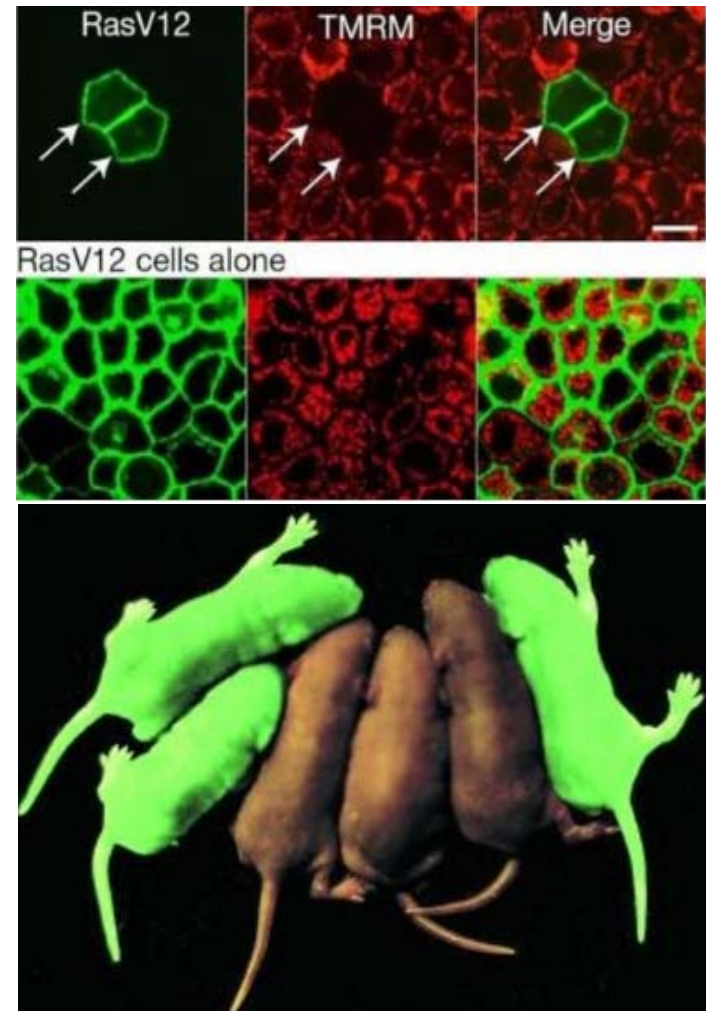
图 2-1 转基因载体结构及表达示意图

为了能精确控制外源基因编码序列的高表达，除了要在转基因载体中保留上述组件外，在载体设计中还可引入各种**附加DNA序列**，

- 内含子(intron)
- 基质附着区(MARs)
- 绝缘子(insulator)
- 内部核糖体进入位点序列
(internal ribosome entry site, IRES)
- E2A框
- Kozak序列

为了能提高转基因小鼠的筛选效率，或者示踪，还使用了各种报告基因。

- 氯霉素乙酰转移酶基因 (cat)
- 荧光酶基因(luc)
- 绿色荧光蛋白GFP
- β -半乳糖苷酶基因(Lac Z)
- 碱性磷酸酶基因
- 生物传感器（如钙或cAMP传感器）
- 用于细胞系敲除的基因（如白喉毒素及甲型流感病毒的M2蛋白的突变体）等。



转基因载体的线性化

DNA的纯度和浓度对后续转基因动物制备的成功率影响较大。

质粒线性化
(单酶切)



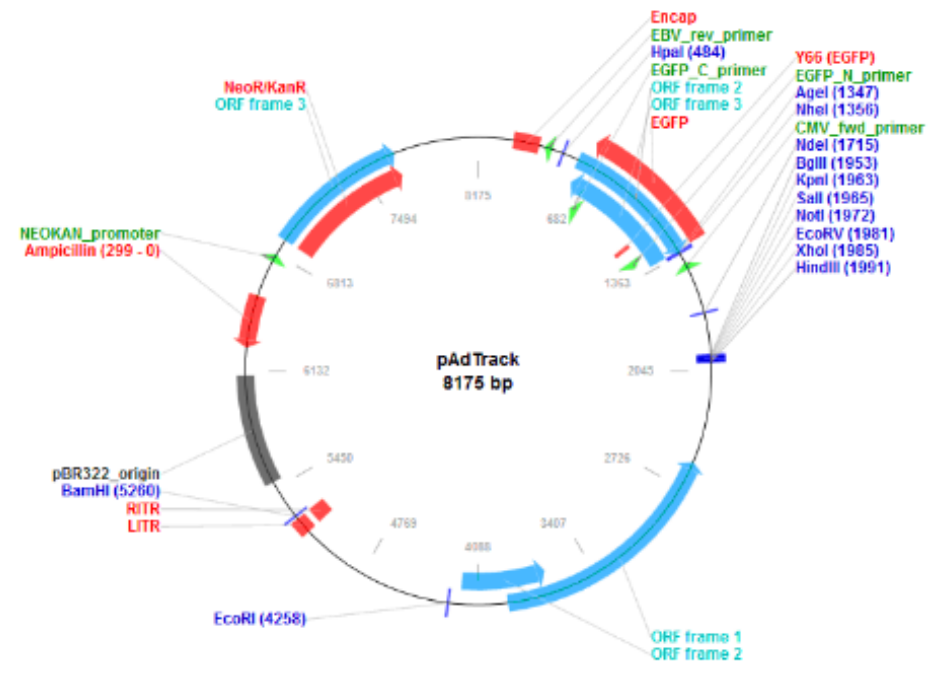
电泳



凝胶回收



工作浓度
1-5ng/ul



2.转基因小鼠的建立

线性化载体导入小鼠胚胎细胞中。

两种方法

DNA原核显微注射法

胚胎干细胞囊胚显微注射法

(1) DNA原核显微注射法

通过显微操作仪将外源基因直接注入**受精卵**，使外源基因整合到DNA中，发育成转基因动物。

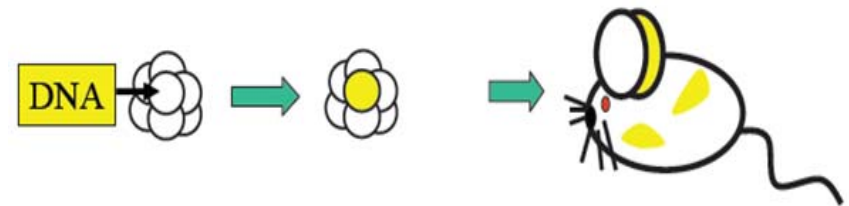
- 最经典
- 最广泛
- 多拷贝首尾相连的形式
- 整合机制目前不清楚



(2) 胚胎干细胞囊胚显微注射法

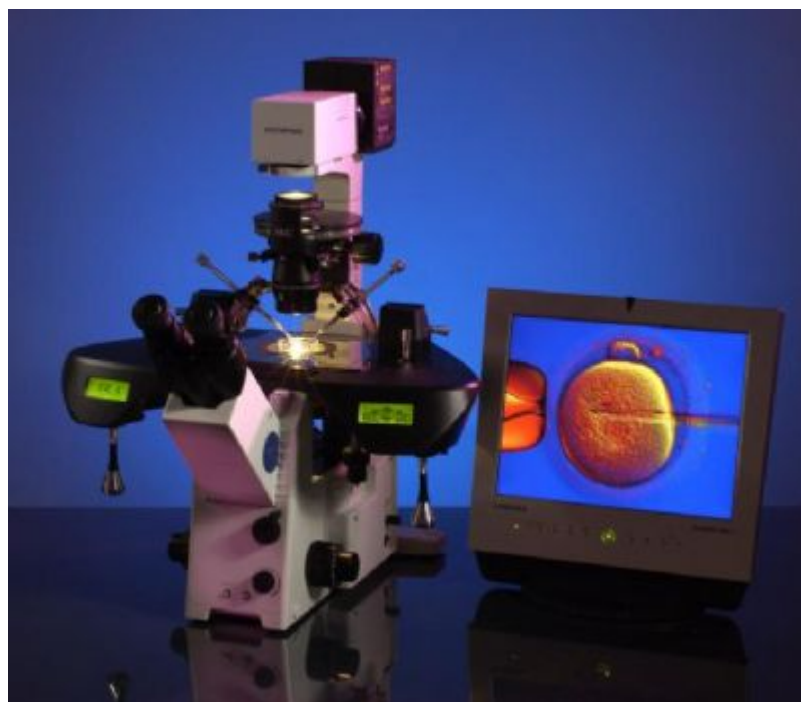
在体外将外源基因导入**胚胎干细胞**；然后将转基因的胚胎干细胞通过显微操作仪注入**动物囊胚**，此胚胎干细胞可参与宿主的胚胎构成，形成**嵌合体**。（小鼠应用成熟）

胚胎干细胞体外培养时保持未分化状态，当被注入囊胚腔后，可以参与包括生殖腺在内的各种组织嵌合体的形成。出生的动物其**生殖系统就可能整合上外源基因**，通过杂交繁育可得到具有纯合目的基因的个体。

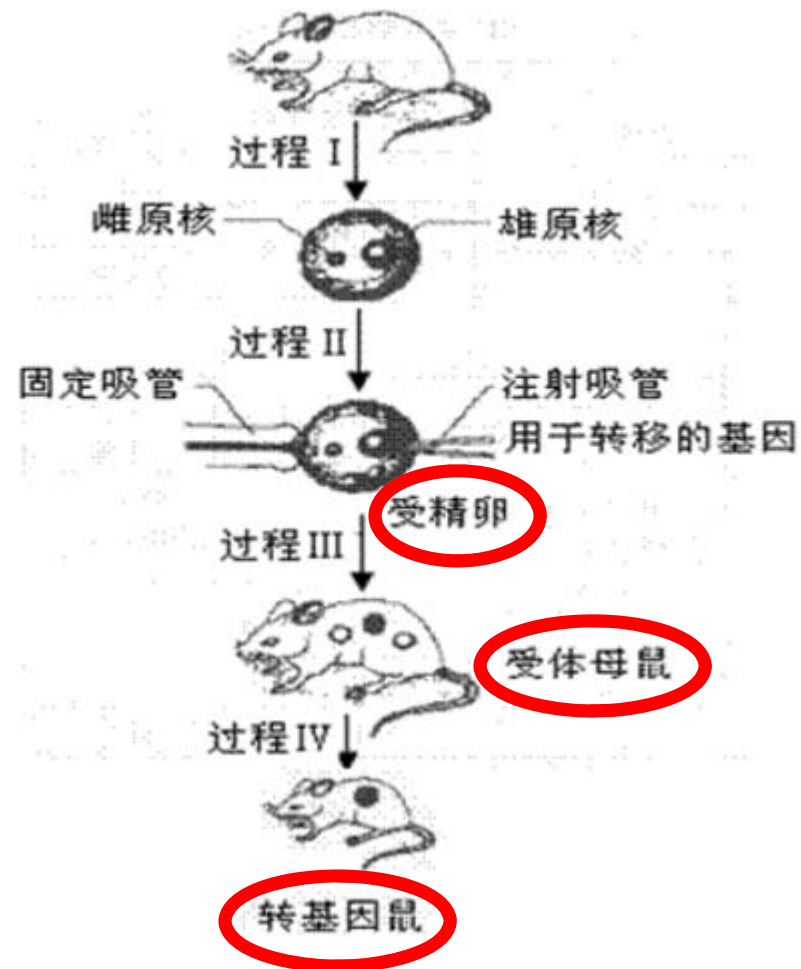


(重点介绍)

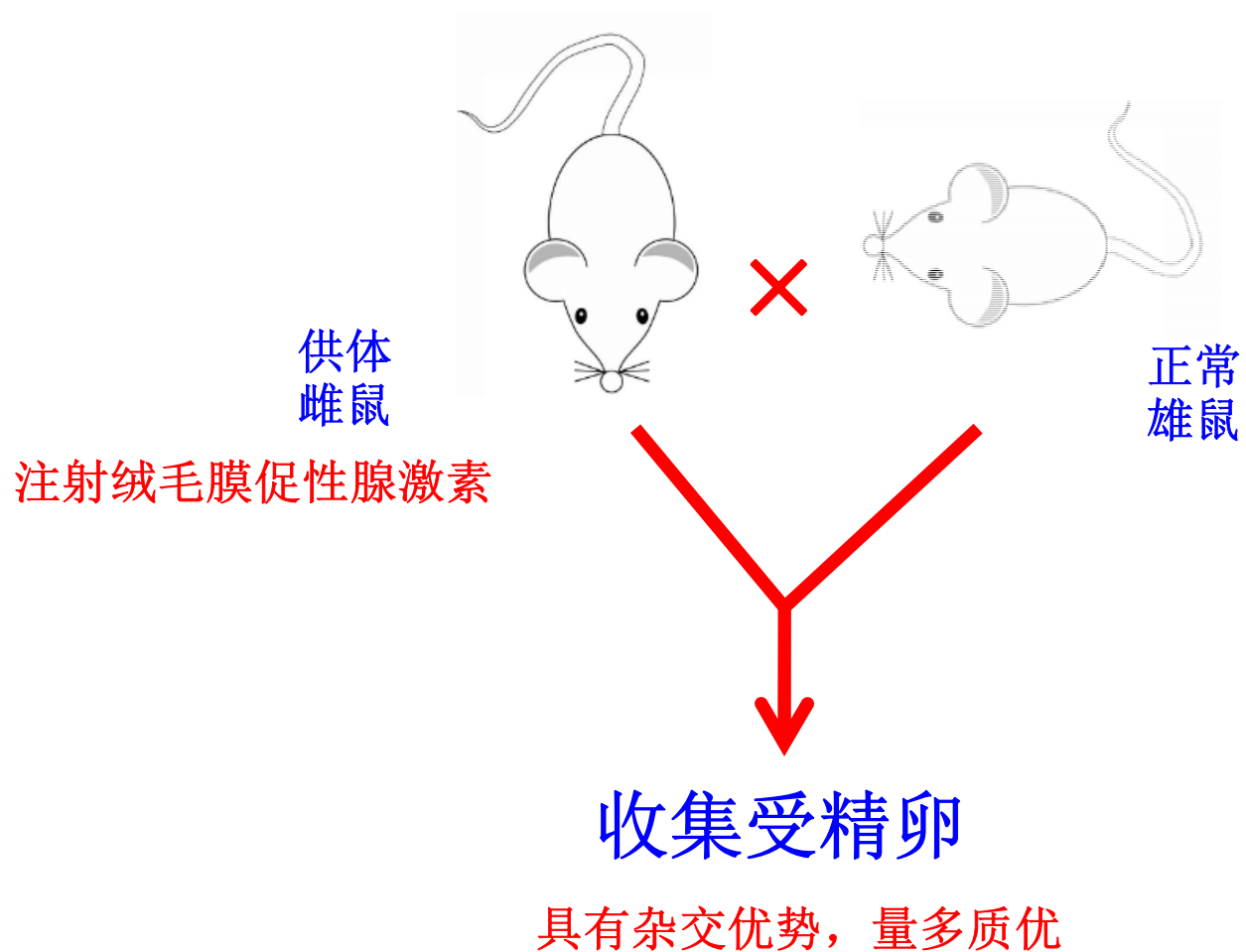
原核显微注射法步骤



显微注射流程



1.小鼠受精卵的获得



受精卵采集

日期	处 理
0 天下午 3:00~5:00	注射 PMSG 8~10 单位
2 天下午 5:00~7:00	注射 hCG 8~10 单位，母鼠与输精管结扎公鼠配对，同笼过夜
3 天上午 7:00~8:00	观察记录配种 ♀ 鼠阴栓情况
4 天下午	输卵管采集 2~4 细胞胚
5 天晚上	输卵管、子宫角采集 8 细胞~桑椹胚
6 天晚上	子宫角采集囊胚、孵化囊胚或孵出胚泡

输卵管胚胎采集 子宫角胚胎回收

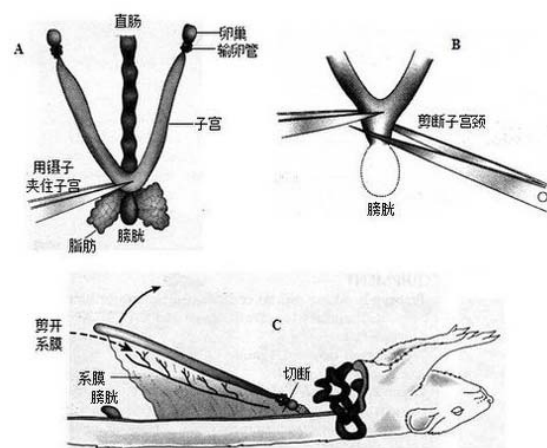


图 4-5 小鼠小鼠输卵管分离方法(引自 A.纳吉等, 2003)

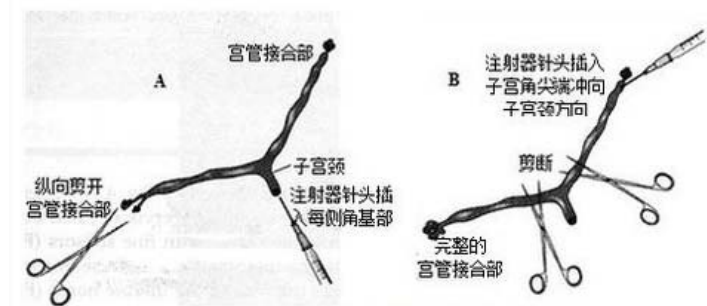
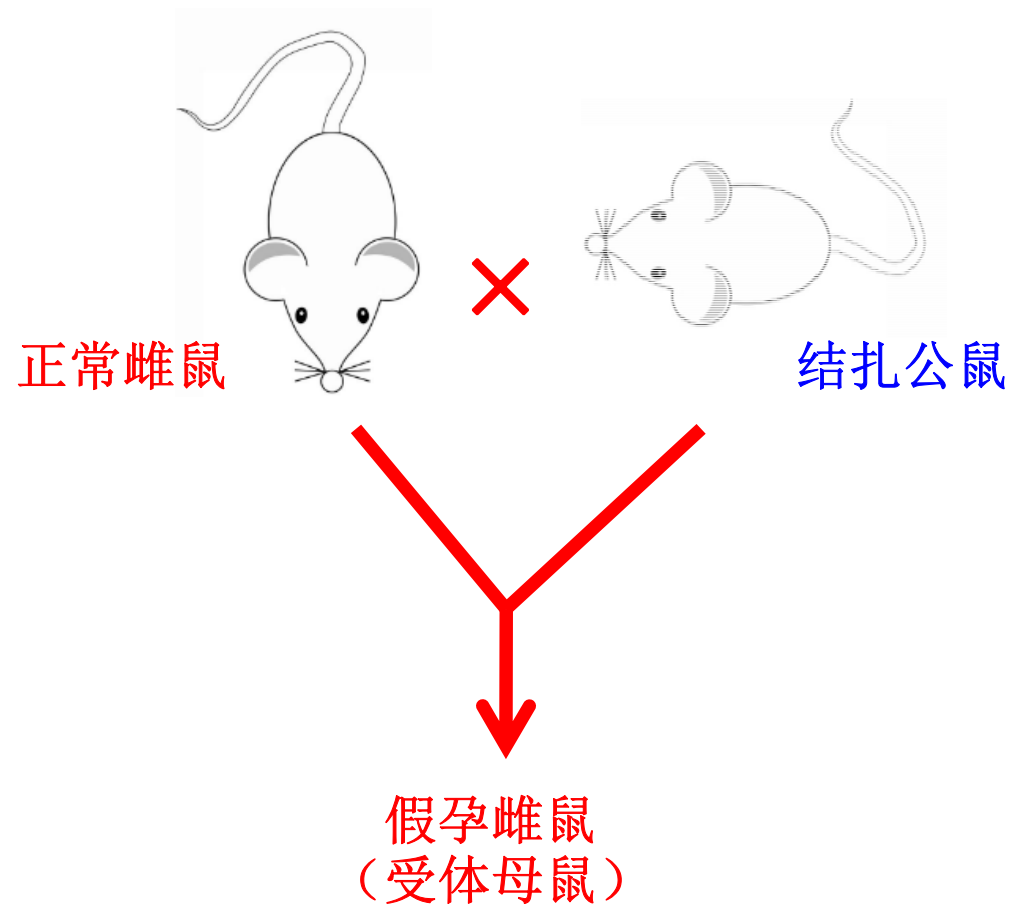


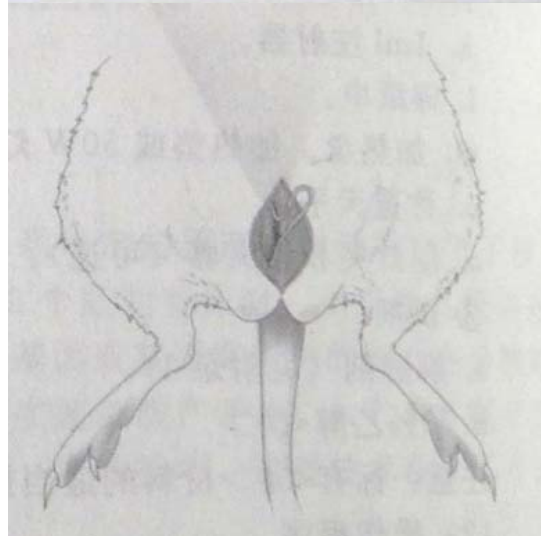
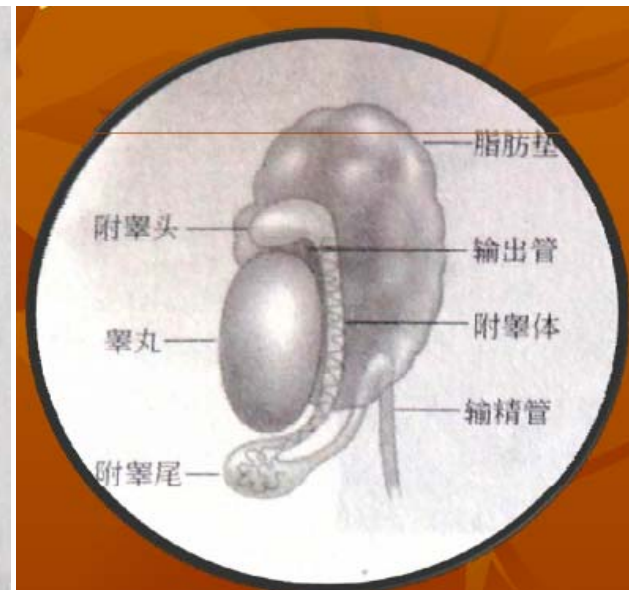
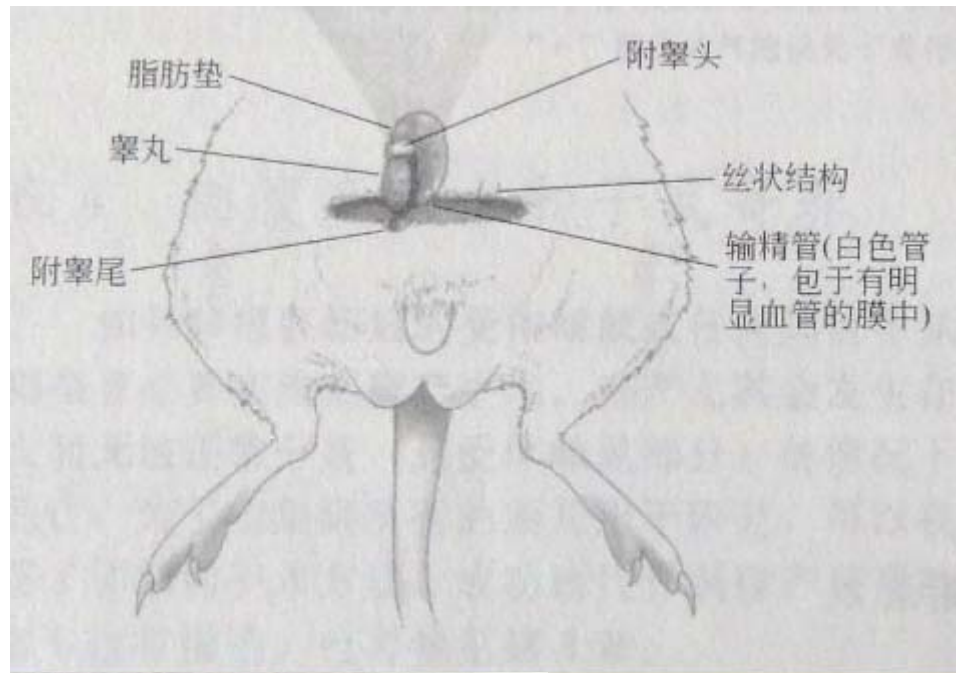
图 4-6 小鼠离体子宫胚胎冲洗(引自 A.纳吉等, 2003)

2.受体母鼠的获得

受体母鼠用于孕育注射后存活的受精卵



公鼠输精管结扎



3. 受精卵原核DNA显微注射

- 将纯化的外源基因注射进受精卵的原核内。工作液中受精卵可能成团状，显微注射用的受精卵必须是单个细胞，而且无细胞碎片。如不符合该标准，需用透明质酸酶进行消化，随后漂洗干净。

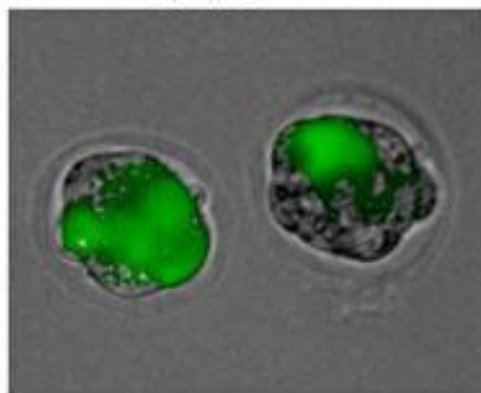
原核注射法获取 F0 转基因小鼠



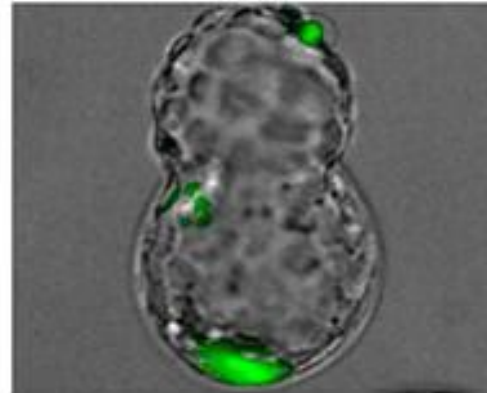
卵子



桑椹胚



囊胚



4. 受精卵体外培养

商品化的小鼠培养液M16、CZB、KSOM，有效的克服2-4细胞的阻滞现象。

采用四孔培养皿



培养条件：每孔500ul培养液，其上覆盖石蜡油，培养箱中预平衡3-4小时，每孔放入20-30枚受精卵。培养条件：37度，5%CO₂.饱和湿度，连续培养120h，不换液，统计24,48,72,120h，受精卵的体外发育情况。

小鼠胚胎发育阻滞的原因？

- ◆ 葡萄糖和磷酸盐是导致阻滞的主要原因。
- ◆ 文献认为小鼠胚胎发育阻滞是由于胚胎吸收大量葡萄糖所致，并且认为磷酸盐在此过程中起协同作用。

不同商品化小鼠受精卵体外培养液的组成成分

表 1 小鼠精原核形成期受精卵体外培养液的组成成分 (mMol/L)

组分	培 养 液				
	M16	mM16	KSOM	mKsom	CZB
氯化钠	81.62	81.62	95	95	81.62
氯化钾	4.78	4.78	2.5	2.5	4.83
二水氯化钙	1.71	1.71	1.7	1.7	1.7
磷酸二氢钾	1.19	1.19	0.35	0.35	1.18
硫酸镁	1.19	1.19	0.2	0.2	1.18
碳酸氢钠	25.0	25.0	25.0	25.0	25.12
葡萄糖	5.56	5.56	0.2	0.2	
丙酮酸钠	0.33	0.33	0.2	0.2	0.27
乳酸钠	23.28	23.28	10	10	31.30
乙二铵四乙酸二钠	-	0.1	0.01	0.1	0.11
牛磺酸	-	5.0	-	5.0	
合氨酰胺	-	-	1.0	1.0	2.0
必需氨基酸 AA(50X)	-	-	2% (v/v)	-	2% (v/v)
非必需氨基酸 AA(100X)	-	-	1% (v/v)	-	1% (v/v)
牛血清白蛋白 (mg/ml)	4	4	1	4	5
青霉素 (mg/100ml)	60	60	60	60	60
链霉素 (mg/100ml)	50	50	50	50	50

表2 小鼠受精卵在不同培养液中的体外发育情况比较

培养液	受精卵数	胚胎体外发育			可移植囊胚数(%)
		2-细胞数(%)	4-细胞数(%)	桑椹胚/囊胚数(%)	
M16	196	179(91.3) ^a	121(61.7) ^b	67(34.2) ^c	39(58.2) ^a
mM16	96	95(98.9) ^a	91(94.7) ^a	75(78.1) ^a	61(80.1) ^b
KSOM	152	131(86.2) ^b	34(22.3) ^c	2(1.3) ^c	0(0) ^c
mKSOM	86	78(90.6) ^b	78(90.6) ^a	58(67.4) ^a	43(74.1) ^b
CZB	77	57(74) ^a	12(15.5) ^c	0(0) ^c	0(0) ^c

注:同一竖栏相同字母标注者差异不显著($p>0.05$);a;b, $p<0.05$;a;c,b;c, $p<0.01$

表3 血清对小鼠受精卵体外发育情况的影响

培养液	受精卵数	胚胎体外发育			可移植囊胚数(%)
		2-细胞数(%)	4-细胞数(%)	桑椹胚/囊胚数(%)	
M16	74	64(86.5) ^a	43(58.1) ^a	30(40.5) ^a	20(66.7) ^a
M16 + 10% FBS	45	43(95.5) ^b	0(0) ^c	0(0) ^c	0(0) ^c
mM16 + 10% FBS	41	35(85.4) ^a	29(70.7) ^b	12(4.8) ^b	5(41.6) ^c

注:同一竖栏相同字母标注者差异不显著($p>0.05$);a;b, $p<0.05$;a;c,b;c, $p<0.01$

PVA聚乙烯醇，不能明显支持小鼠的胚胎发育

表 4 PVA 对小鼠受精卵体外发育的影响

培养液	受精卵数	胚胎体外发育			可移植囊胚数(%)
		2-细胞数(%)	4-细胞数(%)	桑椹胚/囊胚数(%)	
M16	90	86 (95.5) ^a	50(55.5) ^a	27(30) ^a	16(59.2) ^a
mM16	90	78(86.6) ^b	17(18.8) ^c	0(0) ^c	0(0) ^c
mKSOM	58	25(43.1) ^c	8(13.7) ^c	0(0) ^c	0 (0) ^c

注:同一竖栏相同字母标注者差异不显著($p>0.05$);a;b, $p<0.05$;a;c, $p<0.01$

重组人白血病抑制因子，能够促进胚胎体外发育，提高胚胎发育到囊胚的比率

表 5 rhLIF 对小鼠受精卵体外发育的影响

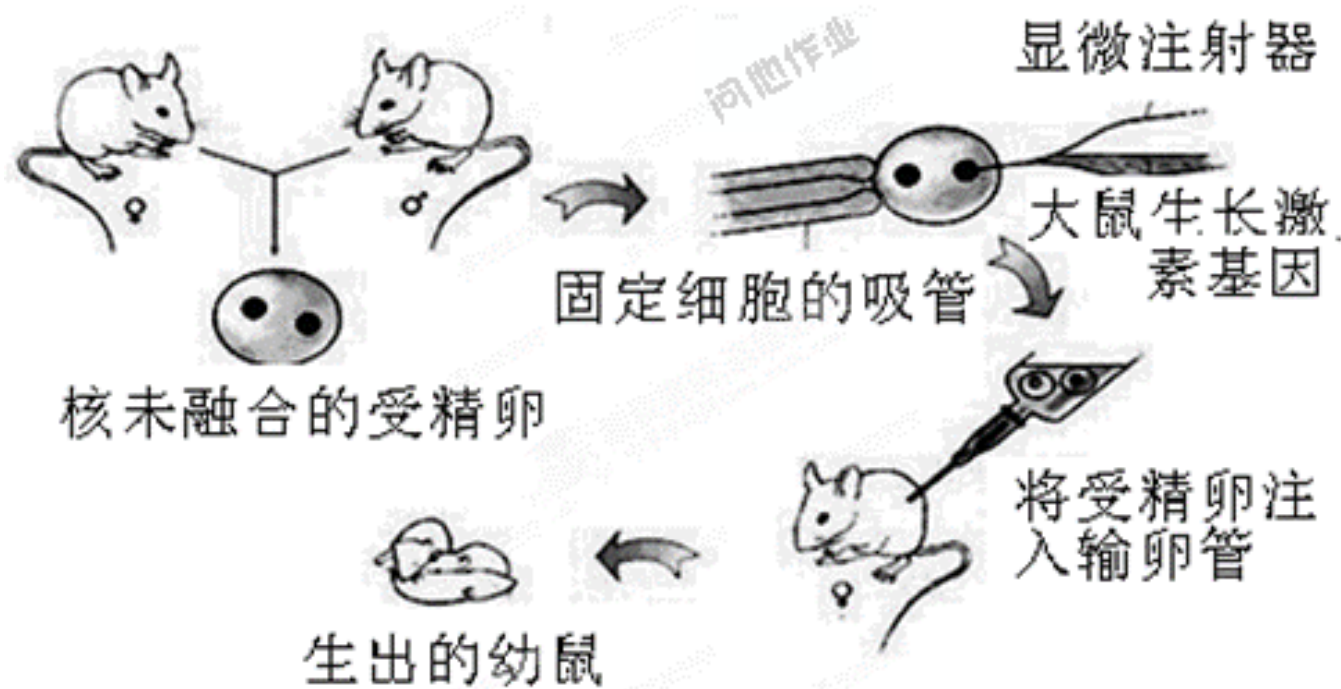
培养液	受精卵数	胚胎体外发育			桑椹胚/囊胚数(%)
		2-细胞数(%)	4-细胞数(%)	桑椹胚/囊胚数(%)	
mM16	41	39(95.1) ^a	36(87.8) ^a	26(63.4) ^a	0(0) ^a
mM16rhLIF	56	55(98.2) ^a	51(92.8) ^a	47(84) ^b	22(39.2) ^c
mKSOM	88	78 (88.6) ^b	78(88.6) ^a	59(67) ^a	2(2.2) ^a
mKSOMrhLIF	85	81 (95.3) ^a	73(85.8) ^a	69 (81.1) ^b	32(37.6) ^c

注:同一竖栏相同字母标注者差异不显著($p>0.05$);a;b, $p<0.05$;a;c, $p<0.01$

5.代孕小鼠输卵管移植

将存活受精卵或存活胚胎移植到同步交配的假孕母鼠的输卵管(或子宫)内，饲养后鉴定是否受孕以及个体发育状况

- 移植时选择只能容纳1个胚胎直径的移植管，约120~180um，吸入胚胎的次序为石蜡油、空气泡1、培养液、空气泡2、胚胎（多个胚胎紧密排列，带入的培养液要尽量少）、空气泡3、培养液。撕开壶腹部，用小镊子夹住输卵管伞口附近边缘，移植管插入壶腹部开口处，吹入胚胎，气泡3和气泡2都进入壶腹部即可。子宫和输卵管归位，缝合。



6.子代鼠外源基因整合和表达的检测

- 产出的鼠仔中，属转基因小鼠者，约占全部小鼠的20%-30%。因此，对转基因小鼠必须进行鉴定筛选。
- 较常用的鉴定基因是否整合的方法有PCR法及Southern杂交法。而Northern杂交，RT-PCR检测，Western杂交，免疫组织化学法则被用来检测转入基因的蛋白表达状况。

提取鼠尾组织DNA，通过PCR或者southern 检测转基因的靶基因是否插入到小鼠基因组中。

首建鼠F0：靶基因插入的小鼠称为首建鼠，不同首建鼠DNA拷贝数不同，呈杂合状态。**(不能自行交配)**

F1代：首建鼠与野生型小鼠交配后，转基因阳性的小鼠随机分配，外源DNA随机插入，基因表达水平差异较大。可能诱发突变影响转基因小鼠的表型。

如何解决随机插入诱发的突变？

- 采用多种方法多种手段检测几个品系子代不同组织、不同器官mRNA及蛋白质的表达水平，如果两个以上的品系小鼠的表型或者细胞学变化具有一致性，才可以选择其中一个品系进一步展开功能学研究。



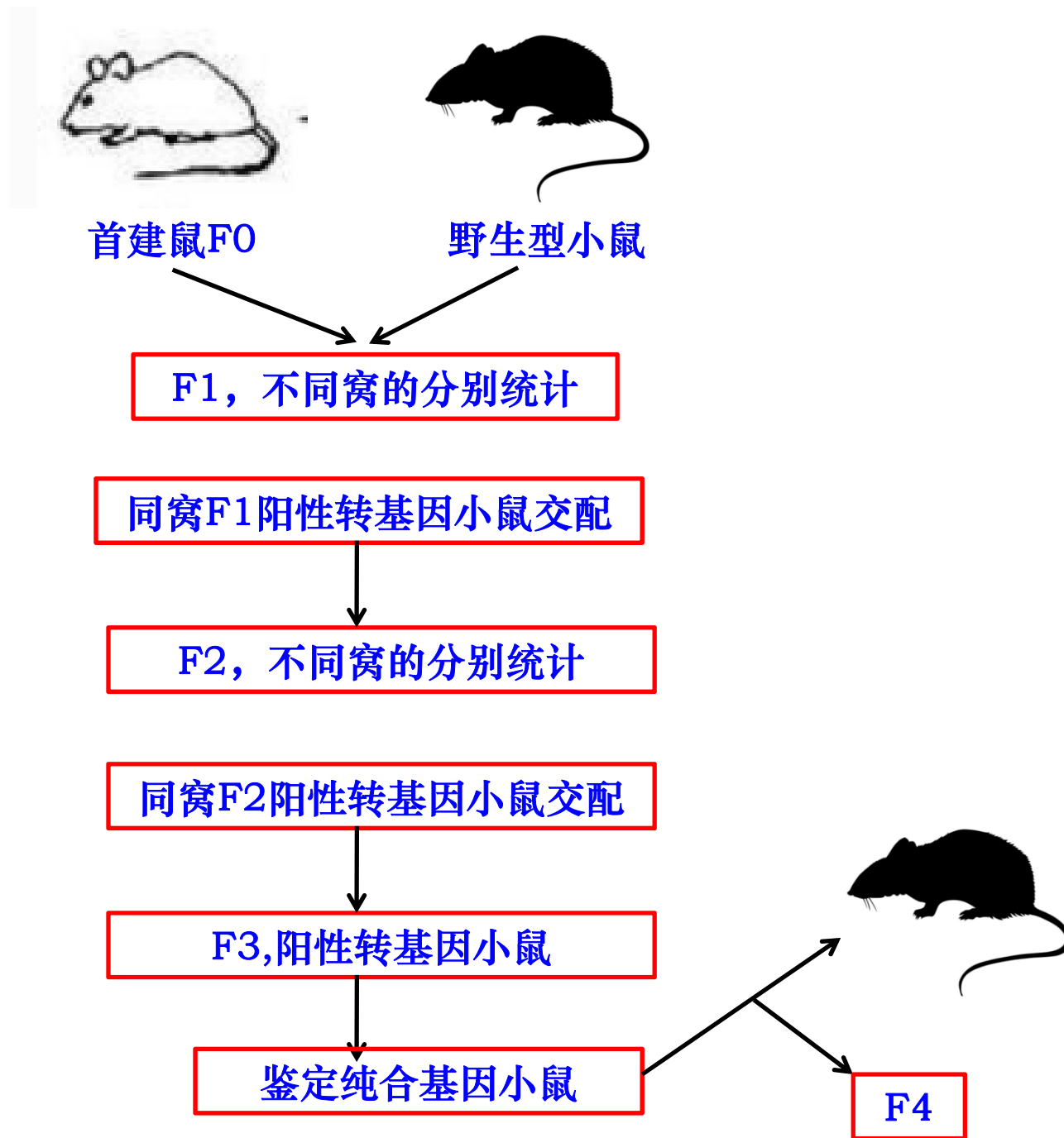
7.转基因小鼠的建系与保存

- DNA原核显微注射方法制作转基因小鼠：半合子，后代只有一部分个体带有整合的基因,有的没有目的基因。
- 所以，转基因小鼠需要一个相当长的筛选和纯化过程，以期获得纯合子的转基因小鼠。

(1) 如何杂交获得纯合子小鼠?

- 制作同一批转基因小鼠后，将其中的一部分与正常的野生型小鼠杂交，检测后代的整合几率。
- 通过同一窝的阳性雌雄小鼠交配，在基因的同源重组作用下，最终得到纯合子小鼠。

采用的经典育种与 PCR-southern 结合的方法筛选



(2) 转基因小鼠的保种

- 筛选鉴定的纯合子的转基因小鼠保存育种。
- 半合子小鼠代替

目的基因有毒性、致畸或胚胎致死性，则有可能无法得到首代转基因小鼠；或者由于纯合后基因的毒性增加，导致后代健康状况差，丧失生育能力或存活期短等问题。每次繁殖都需要经过烦杂的筛选。

(3) 转基因小鼠的饲养环境要求

- 用于建系和种系保存的转基因小鼠一般饲养于SPF级环境中。

8.原核显微注射的优缺点

[优点]

- (1) 外源基因在宿主染色体上的整合率相对较高;
- (2) 转基因小鼠得率在60%-80%;
- (3) 导入的外源基因可长达50kb。

[不足之处]

- (1) 外源基因随机整合;
- (2) 个别原核不清晰, 需进行特殊处理;
- (3) 需大型精密仪器, 费用昂贵;
- (4) 操作周期相对较长

9.转基因小鼠的应用

- 基因表达调控、基因功能及发育调控作用的研究
- 基因工程定向育种
- 转基因动物生物反应器研制
- 人类疾病小鼠模型与基因治疗
- 药理学研究
- 器官移植
- 环境科学研究

(1) 基因表达调控、基因功能及发育调控作用的研究

- Hox gene (同源异形盒基因)
- 疾病基因
- 学习与记忆基因
- 生理周期基因

基因表达有时空与组织的特异性；
外源基因的表达受特异性有关顺式作用序列的调控；

(2) 基因工程定向育种

- 向动物体转移外源基因并使之在动物体内表达，能够克服物种间固有的生殖隔离，实现动物育种之间遗传物质的交换。
- 实质是将基因转移与传统育种方法结合，各取其精华，快速创造新的目的变异和固定扩展变异，从而快速培育出高产优质和抗逆动物品种。

转基因羊、猪、鸡、鱼、鼠等

(3) 转基因动物生物反应器

转基因动物生物反应器概念：

将具某种重要应用价值的生物活性蛋白基因导入动物受精卵或早期胚胎，培育转基因动物，使外源基因在动物的特定组织内高效表达，再从这些组织的分泌液、浸出液或血清中分离提取目的基因产物。

➤ 乳腺——理想器官

肾脏和膀胱

➤ 多肽药物、蛋白质疫苗、酶类

乳腺生物反应器具有以下特点：

(1)乳腺是自我封闭系统，乳腺表达的蛋白质不回流到血液循环系统，避免外源基因表达的蛋白质对动物本身的影响；

(2)乳腺组织是一种有效的蛋白质合成器；

一头奶牛一年可生产乳蛋白250—300Kg，一只绵羊或山羊一年可生产乳蛋白25—30Kg。如果有百分之一的乳蛋白代换成医用蛋白，产量十分可观。

(3)乳腺分泌的基因产物不但产量高，而且易提纯。表达的蛋白经过充分的修饰加工，具有稳定的生物活性。生物活性接近天然产品；

(4)在动物乳腺表达的外源基因可以遗传，可用常规技术繁殖生产群体。

乳腺组织特异表的基因：具milk box保守序列

——乳清蛋白基因

—— β 乳球蛋白基因

——酪蛋白基因

已开发的产物：

——血栓治疗药物（组织型纤溶酶原激活因子）

——出血性疾病（凝血因子VIII，IX）

——免疫治疗药物（IFN，IL，TNF）

——营养制剂（人乳铁蛋白）

4. 人类疾病小鼠模型与基因治疗

- 癌症——肺癌——p53功能缺陷
- 遗传病——地中海贫血（临床失败——细胞表达？）
- AD
 - 对AD患者死亡后脑部解剖发现脑部存积了一种 β 淀粉状蛋白
 - 将人类 β 淀粉状蛋白的基因转到大鼠体内使其发病，再清除 β 淀粉状蛋白，发现能够减慢甚至停止病情

5.药理学研究

- 胰岛 β 细胞B7-1转基因小鼠对STZ敏感
- 阿霉素抗癌，但心脏毒性等副作用大
 - 金属硫蛋白MT具保护作用
- P糖蛋白---肿瘤多药耐药
 - knockout mice证实其影响药物的分布与清除

7.器官移植

超急性排斥反应

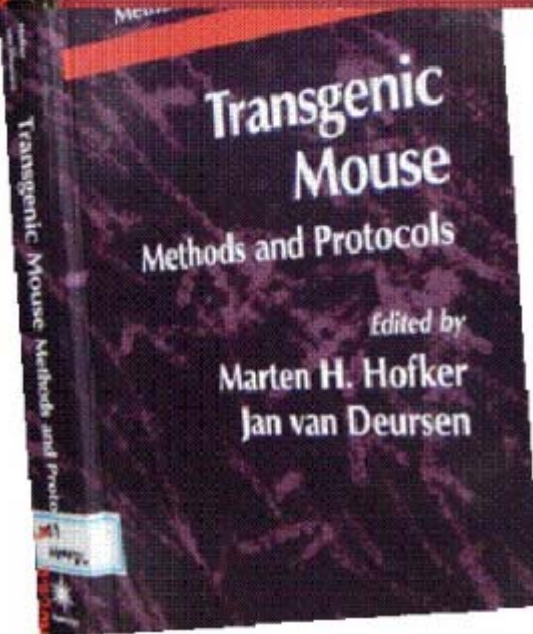
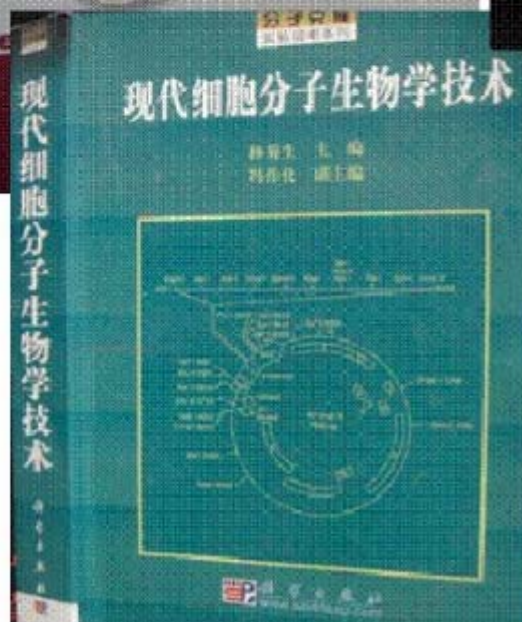
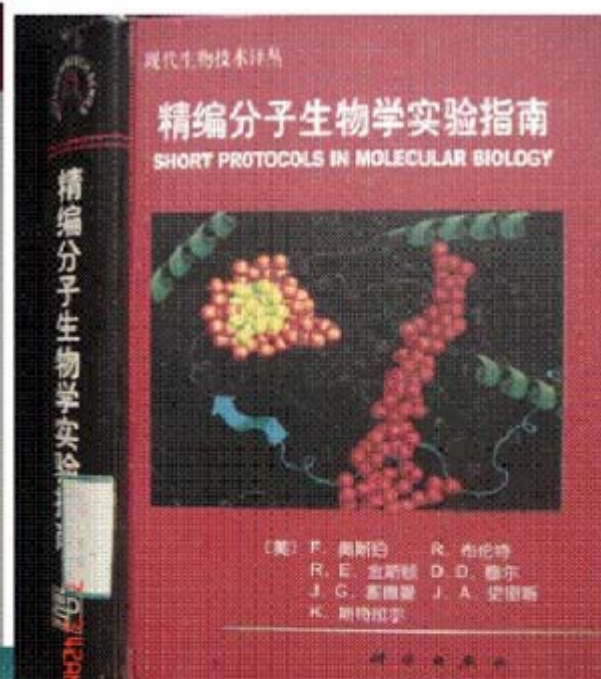
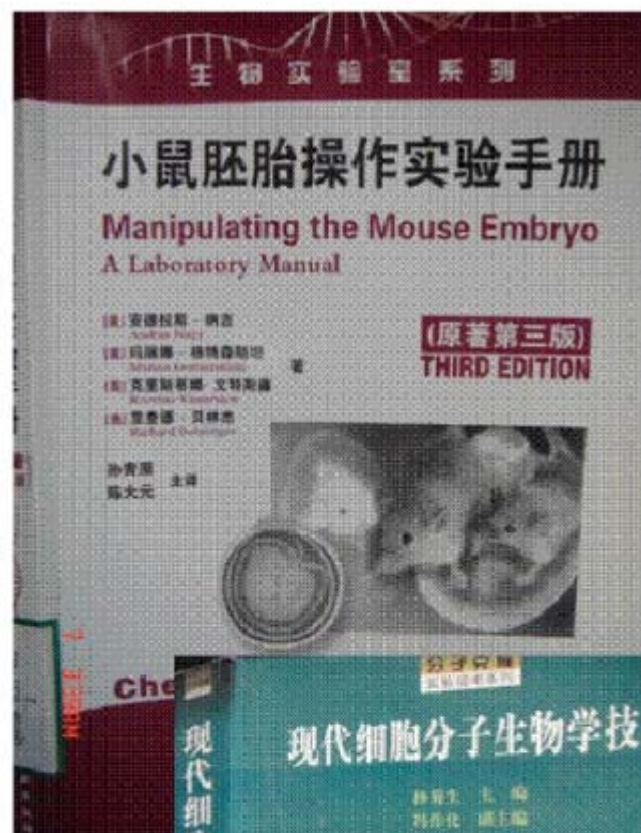
补体激活的阻断——免疫抑制剂危险

补体活性调节因子的负调控

——膜辅助因子MCP

——衰退促进因子hDAP/hCD59

1999——猪心——猕猴（器官大小）



第二节 基因打靶技术

- 研究基因功能及基因表型
- 人类的很多疾病都与特定的基因有关。
 - 某个疾病有哪些基因有关？
 - 这些基因怎么样影响人类健康？
 - 机理如何？

大多数基因的生物学功能还不清楚，通过了解一个生命体缺失或者获得某个特定基因时它的表型如何，可以研究基因功能。

基因打靶技术

- 结合基因重组和胚胎干细胞培养技术建立
发展了基因打靶技术
- 应用基因打靶技术建立的小鼠
 - 基因剔除 (knock out, KO)
 - 基因敲入 (knock in, KI)

基因敲除 (knock out) 和基因敲入 (knock in)

KO过程也称基因打靶 (gene targeting)，利用DNA同源重组，在基因组中的某一特定部位进行定点的基因置换，用**无功能基因替换目的基因**或Delete目的基因。

根据需要（如验证A与B在功能上有某种关联），在敲除基因A时，将有功能的基因B放在A基因的位置，即A是KO，B是Knock in。

基因打靶的优势

- 适应的细胞系既可以是原核细胞，也可以是真核细胞；
- 能够把外源基因引入染色体DNA的特片段上；
- 可对宿主细胞的染色体进行精细的改造；
- Knock out 或者knock in 的基因随着染色体DNA的复制而稳定复制；

二、基因打靶的意义

- 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)，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

心血管疾病，神经病变，糖尿病和癌症

实例：人类囊肿性纤维化疾病属于单基因遗传性疾病，将致病基因移植到小鼠身上，培育出患囊肿性纤维化疾病的小鼠，为针对这一疾病的治疗提供了动物模型，有望在药物或治疗方法上取得突破。

小鼠基因剔除技术的里程碑工作

- 1981 Evans and Kaufman: (Nature. 1981 Jul 9; 292(5819):154-6, Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Dec; 78(12):7634-8) 建立了ES细胞
- 1986 – 1987 Robertson et al , Hooper et al, Kuehn et al, : 对ES细胞进行遗传操作, 并获得ES细胞来源的小鼠个体 (Nature. 1986 Oct 2-8; 323(6087):445-8. Nature 1987 Mar 19-25; 326(6110):292-5, Nature. 1987 Mar 19-25; 326(6110):295-8.)
- 1988 Thomas et al., Doetschman T. et al. 在ES细胞中建立基于同源重组的基因打靶技术 (Cell. 1987 Nov 6; 51(3):503-12.; Nature. 1987 Dec 10-16; 330(6148):576-8.)
- 1989 Jaenisch et al: 建立b2-microglobulin-deficient基因剔除小鼠 (Nature. 1989 Nov 23; 342(6248):435-8.)
- 1994 Gu et al, 将Cre-LoxP系统用于ES细胞的打靶, 建立条件性基因剔除技术 (Science. 1994 . 265:103.)

瑞典皇家科学院诺贝尔奖委员会宣布将2007年度诺贝尔生理学或医学奖授予美国科学家马里奥-卡佩奇和奥利弗-史密西斯、英国科学家马丁-埃文斯，以表彰他们在胚胎干细胞和基因打靶研究方面所作的贡献。





The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007

"for their discoveries of principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells"



Photo: Tim Roberts/PR Newswire, © HHMI

Mario R. Capecchi

1/3 of the prize

USA

University of Utah; Howard Hughes
Medical Institute
Salt Lake City, UT, USA

b. 1937
(in Italy)



Photo: The Press Association Limited

Sir Martin J. Evans

1/3 of the prize

United Kingdom

Cardiff University
Cardiff, United Kingdom

b. 1941



Photo: Scanpix/Dan Sears

Oliver Smithies

1/3 of the prize

USA

University of North Carolina at
Chapel Hill
Chapel Hill, NC, USA

b. 1925
(in United Kingdom)

一、基因打靶技术的理论基础

➤ ES细胞全能性

➤ 同源重组技术

首先获得ES细胞系，利用同源重组技术获得带有基因突变的ES细胞。通过囊胚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。由于经过遗传修饰的ES细胞利用全能性，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

(一) 细胞的全能性?

- 指细胞经分裂和分化后仍具有形成完整有机体的潜能或特性。
- 在多细胞生物中每个个体细胞的细胞核具有个体发育的全部基因。
- 在一定条件下，都可以发展成多功能细胞。
- 只要条件许可，每个个体细胞的细胞核都可发育成完整的个体。

证明实验

(1) 经典爪蟾核移植实验:

将爪蟾蝌蚪小肠上皮细胞的细胞核移植到去除了核的卵细胞中并刺激其分裂，结果发现这样的卵细胞仍然可以发育成蝌蚪甚至成体，也证明了细胞核具有全能性

(2) 克隆羊多利：体细胞核移植

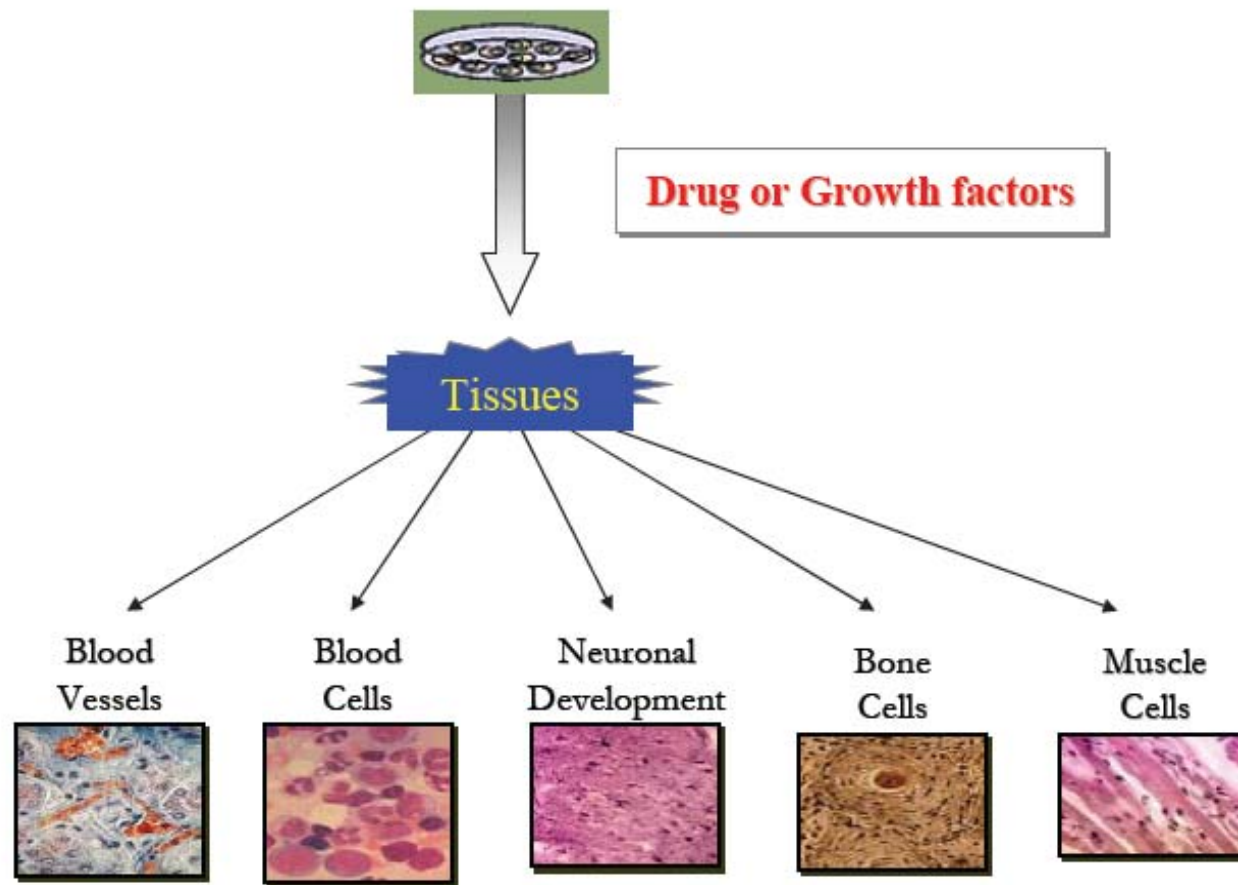
- 在生物体的所有细胞中，受精卵的全能性是最高的。
- 其次生殖细胞：尤其是卵细胞

(二) 胚胎干细胞

1. 概念：(embryonic stem cell, ESCs, 简称ES、EK或ESC细胞)

- ◆早期胚胎(原肠胚期之前)或原始性腺中分离出来的一类细胞，它具有体外培养无限增殖、自我更新和多向分化的特性。
- ◆无论在体外还是体内环境，ES细胞都能被诱导分化为机体几乎所有的细胞类型。

ES Cells Differentiation



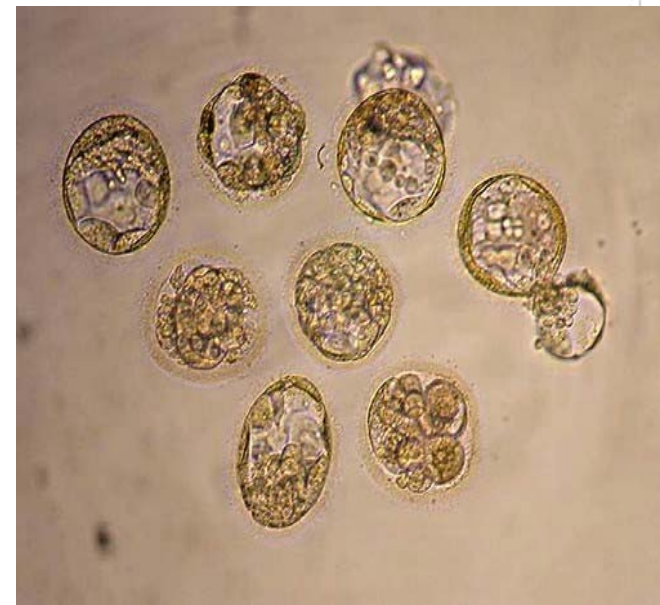
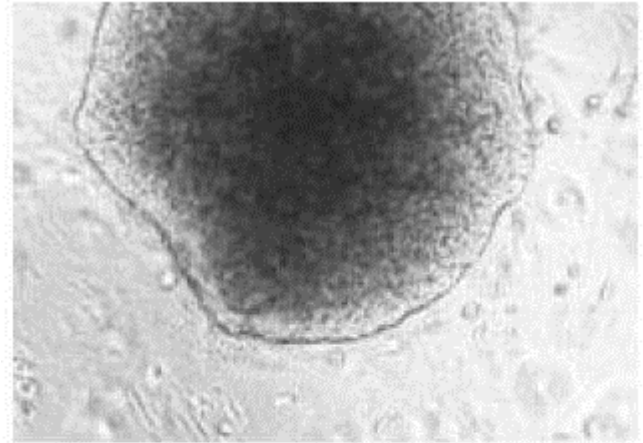
◆目前中国外研究人员已在仓鼠、大鼠、兔、猪、牛、绵羊、山羊、水貂、恒河猴、美洲长尾猴以及人类都分离获得了ES细胞

◆已经证明小鼠ES细胞可以分化为心肌细胞、造血细胞、卵黄囊细胞、骨髓细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、内皮细胞、黑色素细胞、神经细胞、神经胶质细胞、少突胶质细胞、淋巴细胞、胰岛细胞、滋养层细胞等。

- 德美医学小组向试验鼠体内移植了由ES细胞培养出的神经胶质细胞。通过鼠胚细胞移植技术，使瘫痪的猫恢复了部分肢体活动能力。
- ES细胞将会给人类移植医学带来一场革命。

2. ES细胞的形态结构

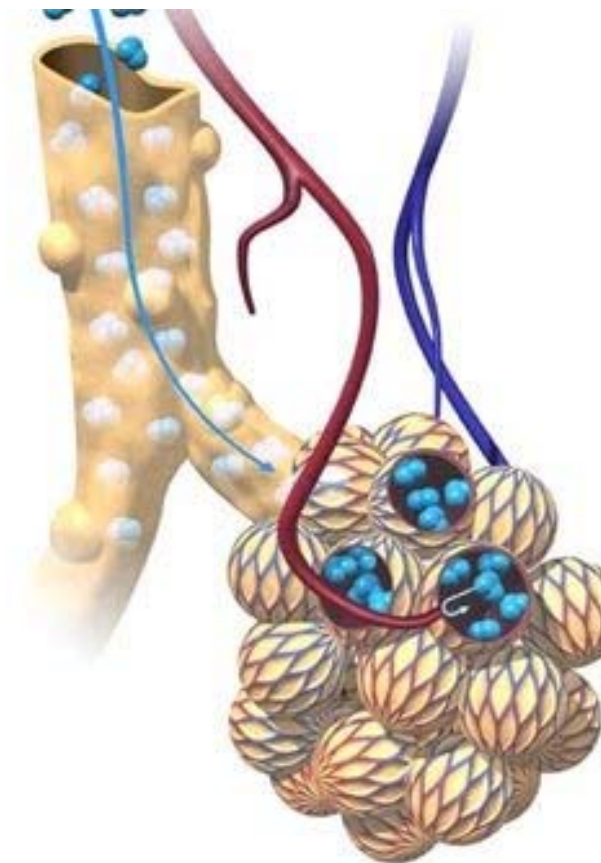
- 具有与早期胚胎细胞相似的形态结构，细胞核大，有一个或几个核仁，胞核中多为常染色质，胞质胞浆少，结构简单。
- 体外培养时，细胞排列紧密，呈集落状生长
- 细胞克隆形态多样，多数呈岛状或巢状。
- 小鼠ES细胞的直径 $7\mu\text{m}\sim 18\mu\text{m}$ ，猪、牛、羊ES细胞的颜色较深，直径 $12\mu\text{m}\sim 18\mu\text{m}$ 。



3. ES细胞的伦理问题

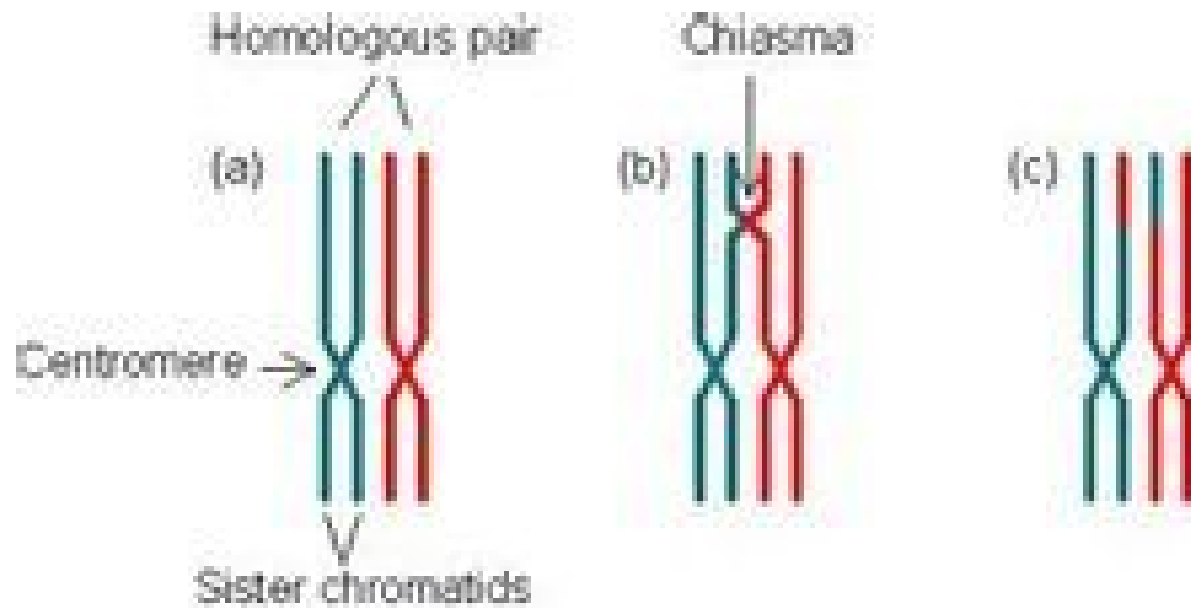
- 成功的培养出人类ES细胞，保持了ES细胞分化为各种体细胞的全能性。这样就使科学家利用人类ES细胞治疗各种疾病成为可能。
- 人类ES细胞的研究工作伦理问题

- ◆ 支持者认为这项研究有助于根治很多疑难杂症，是一种挽救生命的慈善行为，是科学进步的表现。
- ◆ 反对者则认为，进行胚胎干细胞研究就必须破坏胚胎，而胚胎是人尚未成形时在子宫的生命形式。由胚胎来源的原始(未分化)细胞，它们具有分化成为众多特异细胞类型的潜能。



(二) .同源重组 (homologous recombination)

是指发生在姐妹染色单体 (sister chromatin) 之间或同一染色体上含有同源序列的DNA分子之间或分子之内的重新组合。



- 同源重组需要一系列的蛋白质催化，如原核生物细胞内的RecA、RecBCD、RecF、RecO、RecR等;以及真核生物细胞内的Rad51、Mre11-Rad50等等
- 同源重组反应严格依赖DNA分子之间的同源性，100%重组的DNA分子之间的重组常见于非姐妹染色体之间的同源重组，称为Homologous Recombination

在基因敲除小鼠制作过程中，需要针对目的基因两端特异性片段设计带有相同片段的重组载体，将重组载体导入到胚胎干细胞后外源的重组载体与胚胎干细胞中相同的片段会发生同源重组，特异性的破坏内源性基因（基因打靶）

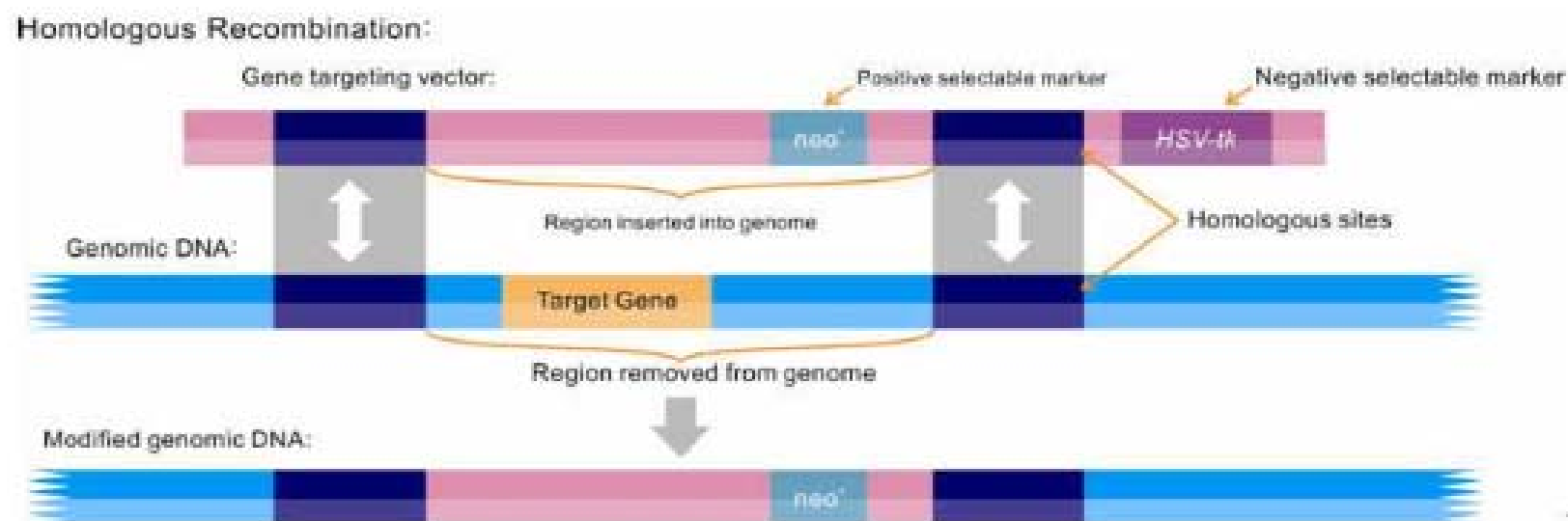


图 1. 基因敲除鼠制作同源重组原理示意图

二、基因打靶的基本环节

①基因打靶载体的构建

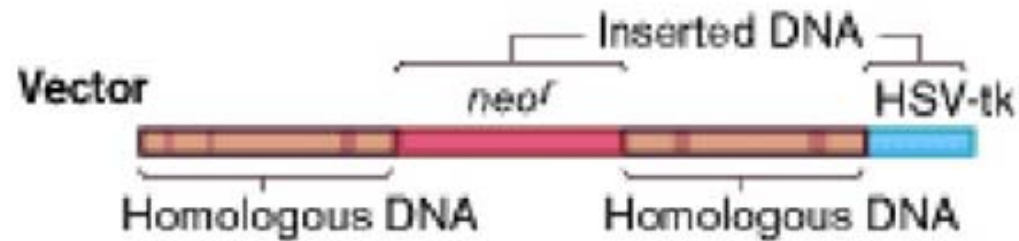
②打靶载体的导入

③筛选

④将重组阳性细胞转入动物胚胎，产生转基因动物，并进行形态观察和分子生物学检测。

三、基因敲除的基本程序

1、构建打靶载体 Targeting vector



1) 同源序列 Homologous arms

2) 打靶载体常含两种筛选标志

Neo^r
HSV-tk

positive selection

neo^r : 新霉素抗性基因，neo^r基因存在于打靶载体内，当重组（同源或随机整合）后，ES细胞能在含新霉素G418的培养液中生长

negative selection

1. HSV-tk: 单纯疱疹病毒的胸腺嘧啶激酶基因，该基因产物可分解单核苷酸类似物(ganciclovir)生成毒性产物，产生自杀效果

同源重组时: Tk-基因丢失，ES细胞存活

随机整合时: Tk-基因存在，ES细胞死亡

2. DTA (diphtheria fragment A) : 不用给药

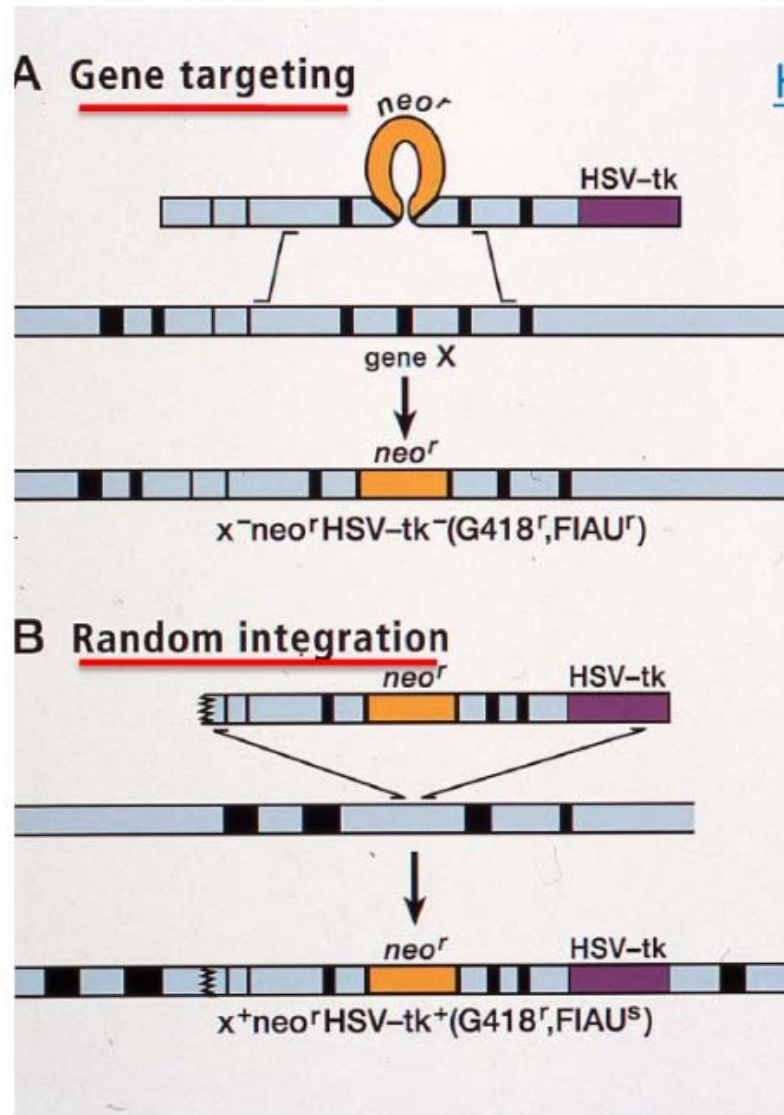
（1）打靶载体的设计

- 根据打靶基因设计不同，同源重组可以在靶基因位点造成插入置换或者确实，基因打靶载体有出入性载体和基因置换型载体两种
- 插入行载体：与靶基因同源的区段中患有特异的没切位点，线性化后，同源重组导致基因组序列的重复，从而干扰了目标基因的功能。置换型载体进行线性化的没切位点在引导序列和筛选基因外侧，显性化后，同源重组使染色体DNA序列为打靶载体序列替换。大多数基因敲除突变都采用置换型载体进行基因打靶

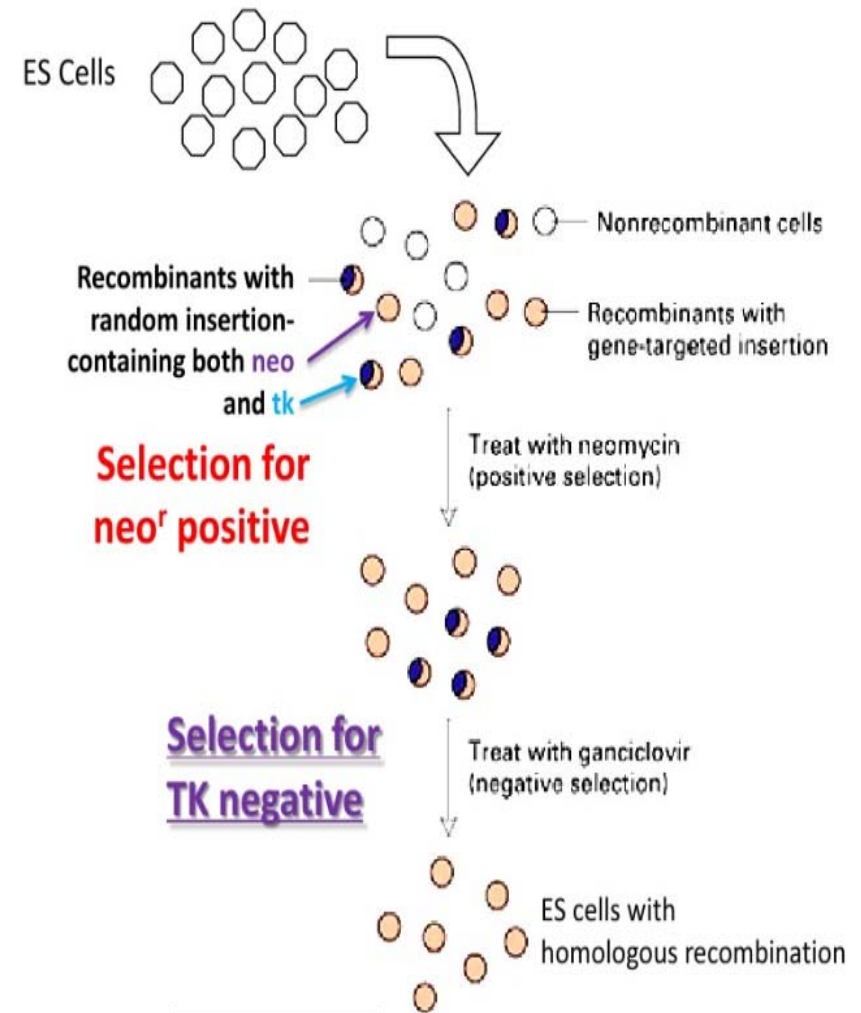
2.ES细胞打靶基因的转染

- 打靶基因载体的质粒提取（无内毒素）
- 线性化打靶载体
- 采用电转移的方法导入ES细胞，并进行抗药性ES细胞克隆筛选

3. 基因剔除阳性克隆的筛选



筛选进行了同源重组的ES细胞



- 抗药性ES细胞筛选
- 采用内切酶线性化
- 采用打靶序列以外的DNA片段作为探针，经southern印记区分打靶基因序列与内源性野生型基因序列
- PCR

基因打靶可以定向修饰

外源基因在靶细胞基因组中的整合微店一般是随机的，主要导致下面几种结果：

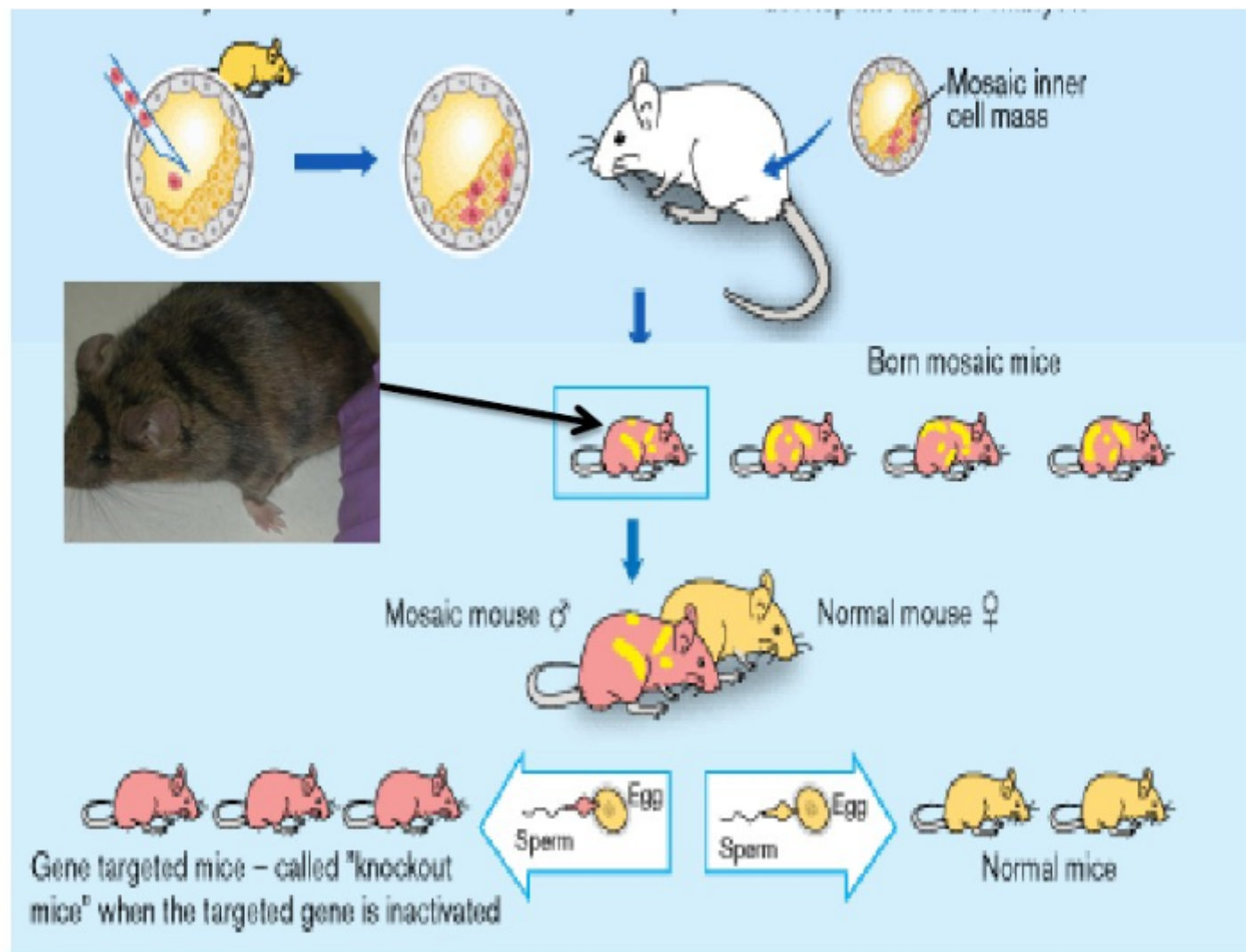
(1) 整合在正常基因的中部，导致基因表达缺失

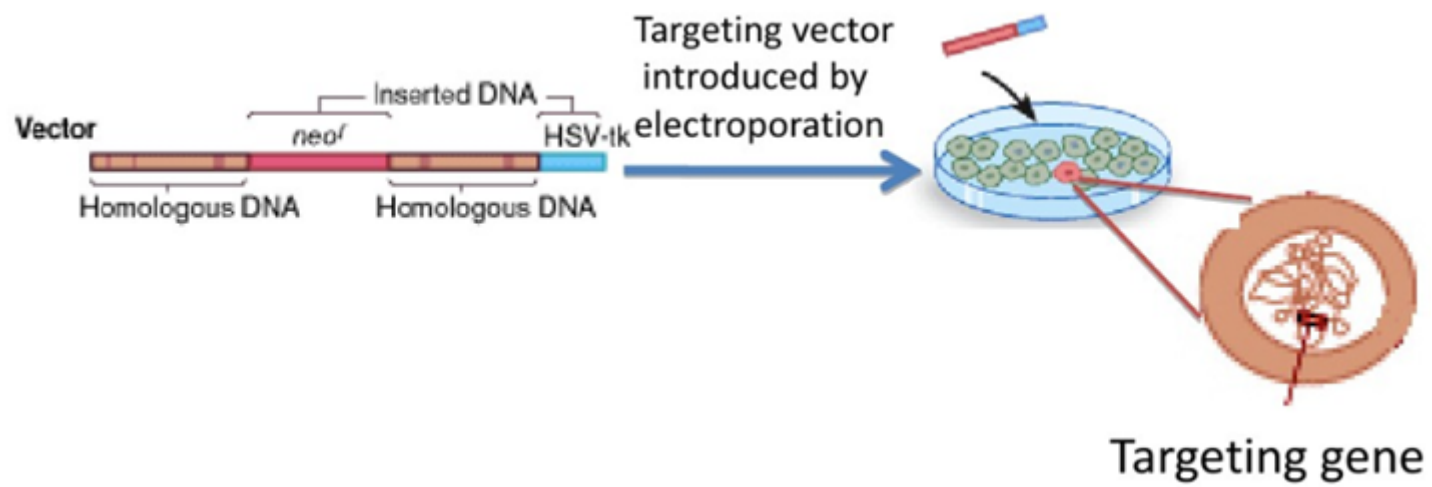
侧翼序列，影响周围正常基因活性

基因整合微店不恰当，在细胞内部表达或者表达难以控制

外源基因导入可能激活下包内的原癌基因。

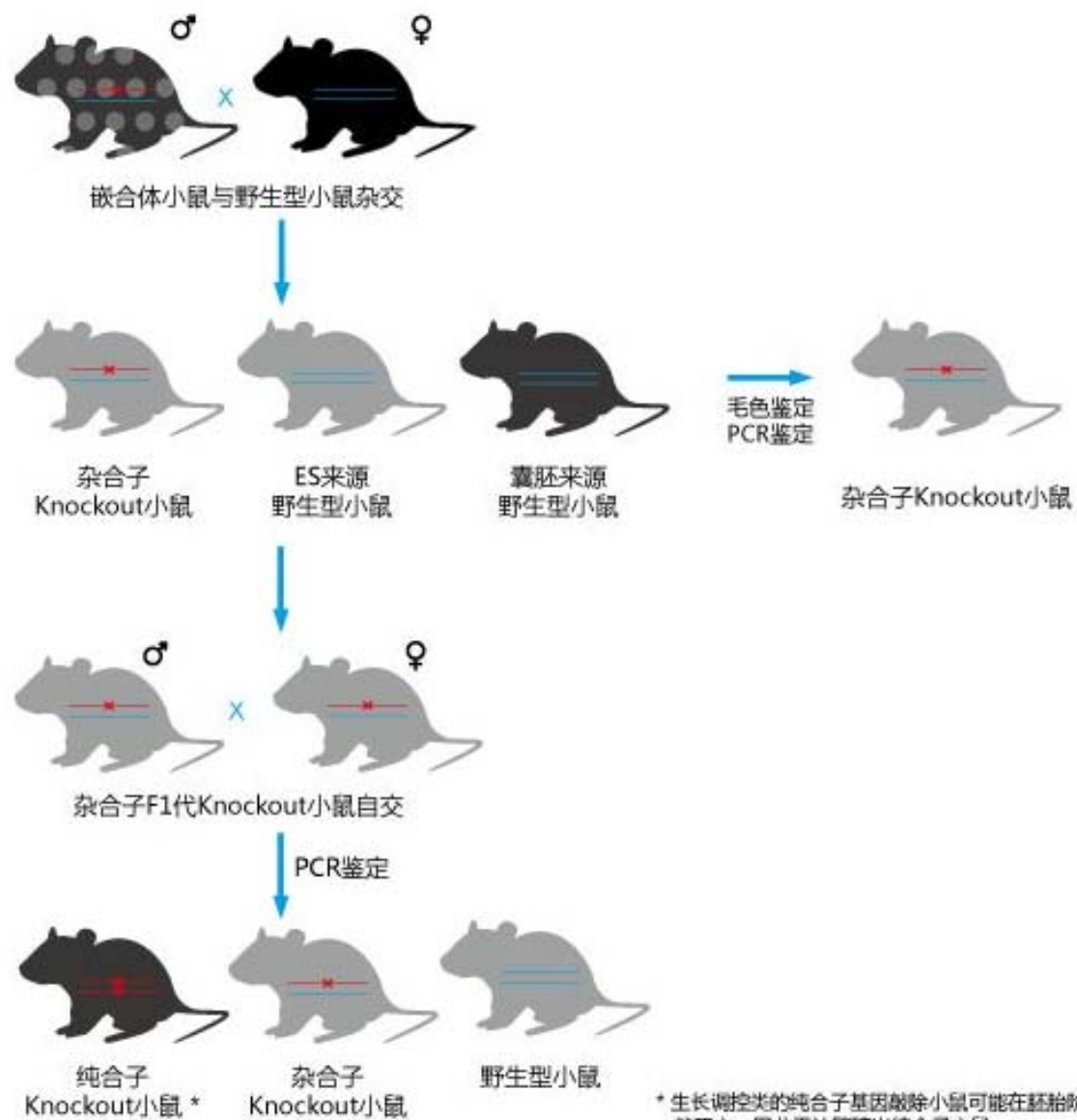
4、将基因敲除ES细胞注射入囊胚，形成嵌合胚胎，得到嵌合体小鼠，而后筛选培育阳性子代小鼠。



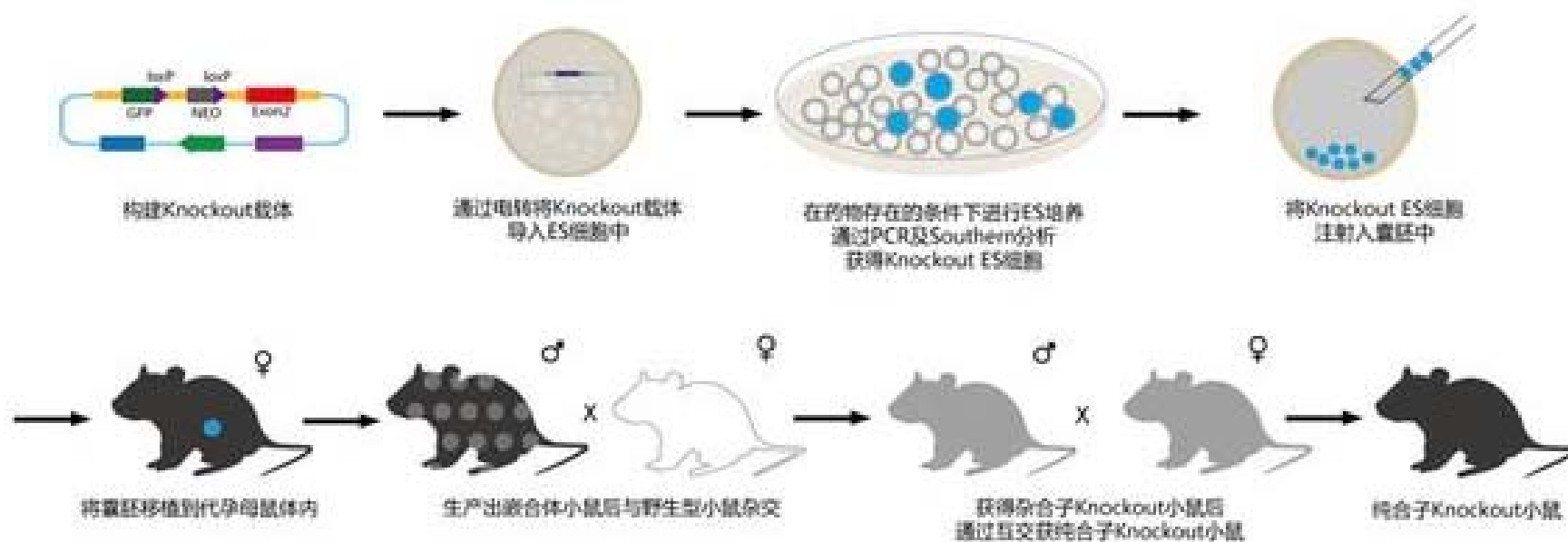


5.嵌合体阳性转基因鼠的筛选

- 嵌合体小鼠通过提取鼠尾DNA，用筛选阳性打靶ES细胞的southern印记方法来确定打靶阳性的ES细胞是否可以通过生殖细胞传给子代

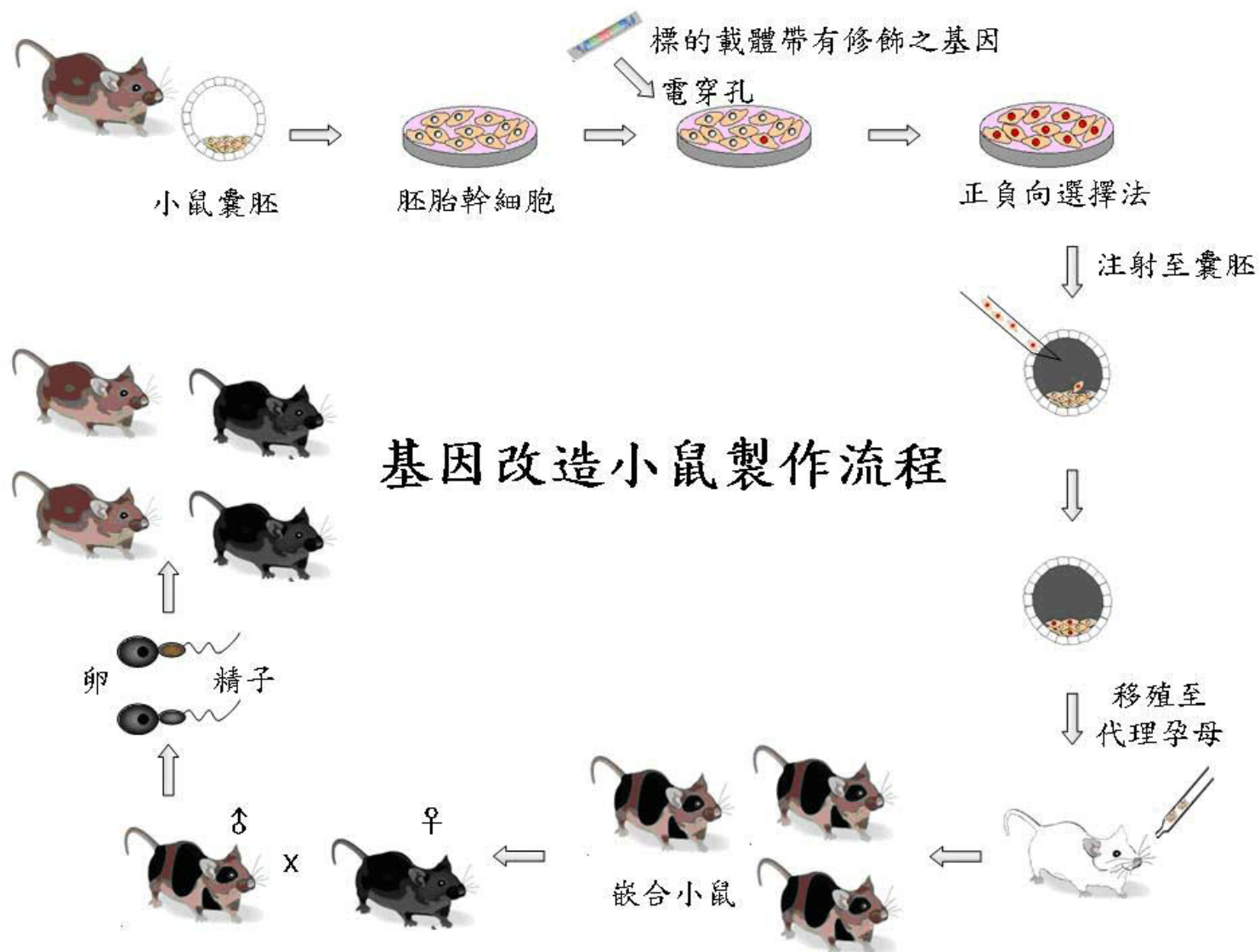


* 生长调控类的纯合子基因敲除小鼠可能在胚胎阶段就死亡，因此无法繁殖出纯合子小鼠



基因敲除小鼠

小结



三、条件性小鼠基因剔除

- 完全剔除——所有细胞产生靶基因的活性丧失，引起小鼠胚胎死亡，影响该基因在发育及成体的功能研究，阻碍对疾病病因及发病机制的认识
- 条件性剔除——研究基因在特定组织、细胞及特定时间内的功能。

三、条件性小鼠基因剔除

- Cre-LoxP系统（核心技术）
- Flp-FRT系统

- **Cre重组酶**：于1981年从P1噬菌体中发现，属于λ Int 酶超基因家族。Cre重组酶基因编码区序列全长1029bp（EMBL数据库登录号X03453），编码由343个氨基酸组成的38kDa单体蛋白。它不仅具有催化活性，而且与限制酶相似，能识别特异的DNA序列，即loxP位点，使loxP位点间的基因序列被删除或重组。Cre重组酶有70%的重组效率，不借助任何辅助因子，可作用于多种结构的DNA底物，如线形、环状甚至超螺旋 DNA。它是一种位点特异性重组酶，能介导两个LoxP位点（序列）之间的特异性重组，使LoxP位点间的基因序列被删除或重组。

- **LoxP** (**locus of X-over P1**) 序列：来源于P1噬菌体，是由两个13bp反向重复序列和中间间隔的8bp序列共同组成，8bp的间隔序列同时也确定了LoxP的方向。Cre在催化DNA链交换过程中与DNA共价结合，13bp的反向重复序列是Cre酶的结合域。其序列如下：
 - 5' - ATAACTTCGTATA - GCATACAT - TATACGAAGTTAT - 3'
 - 3' - TATTGAAGCATAT - CGTATGTA - ATATGCTTCAATA - 5'

- **Cre-LoxP系统的特性**
- 编辑
- Cre重组酶介导两个LoxP位点间的重组是一个动态、可逆的过程，可以分成三种情况：
 - 1、如果两个LoxP位点位于一条DNA链上，且方向相同，Cre重组酶能有效切除两个LoxP位点间的序列；
 - 2、如果两个LoxP位点位于一条DNA链上，但方向相反，Cre重组酶能导致两个LoxP位点间的序列倒位；
 - 3、如果两个LoxP位点分别位于两条不同的DNA链或染色体上，Cre酶能介导两条DNA链的交换或染色体易位。
- 另外，Cre不仅可以识别LoxP的2个13bp的反向重复序列和8bp的间隔区域，而且当一个13bp的反向重复序列或者8bp的间隔区发生改变时仍能识别并发生重组。利用这一特点，人们在构建载体时可以根据需要改造LoxP位点序列，以用于特定的基因突变或修复，增加了该系统的应用范围。

- **Cre/loxP重组酶系统在基因打靶中的应用策略**
- 编辑
- 基于Cre/loxP的基因打靶要分两步来进行。首先要在[胚胎干细胞](#)的基因组中引入loxP序列，这一步可以通过打靶载体的设计和对[同源重组](#)子的筛选来实现。下一步通过Cre介导的重组来实现靶基因的遗传修饰或改变。Cre/loxP系统既可以在细胞水平上用Cre重组酶[表达质粒](#)转染中靶细胞，通过识别loxP位点将抗性[标记基因](#)切除，又可以在个体水平上将重组[杂合子](#)小鼠与Cre转基因小鼠杂交，筛选[子代](#)小鼠就可得到删除外源标记基因的条件性敲除小鼠。或者将Cre[基因](#)置于可诱导的[启动子](#)控制下，通过诱导表达Cre重组酶而将loxP位点之间的基因切除（诱导性[基因敲除](#)），实现特定基因在特定时间或者组织中的失活。

四、小鼠的基因敲入 KI

- 构建人源化目的基因小鼠，研究特定基因的功能。
- 理论基础：基因同源重组

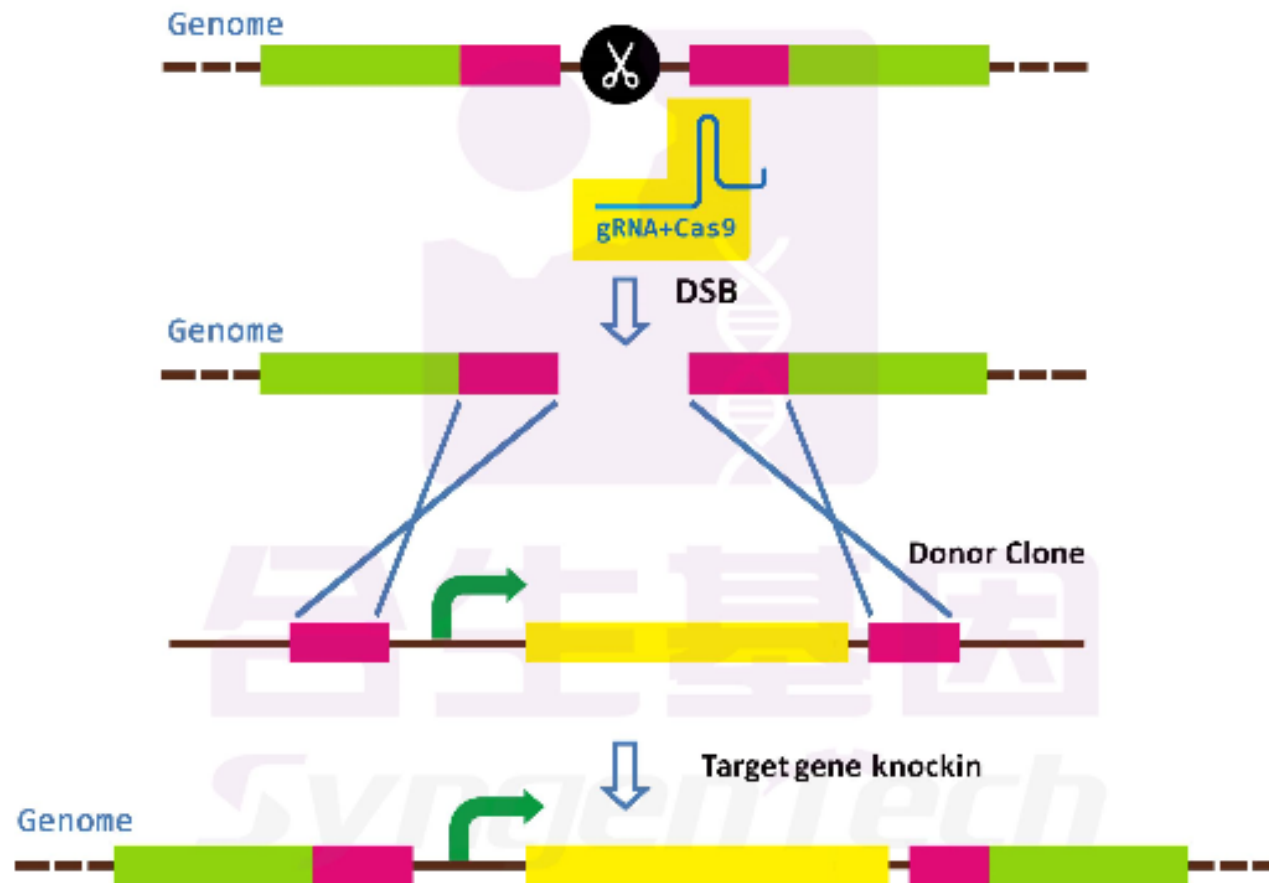
（1）构建人源化基因敲入载体

- 将人的目的基因的功能区克隆到表达载体中，构建基因敲入载体，通过同源重组的方式与小鼠ES细胞内源性的DNA在相同或者相近序列的区域内发生同源重组，使小鼠一条染色体上的目的基因被人源化的基因片段置换。

- 基因敲入有两种，一种是原位敲入,即在原基因敲除的位点插入新基因,它是基因敲除的逆过程；另一种是定点敲入,即无论敲除基因的位点在哪里,敲入的基因是在特定启动子下，以转移载体的形式转座进去,所以插入的位点是一定的。

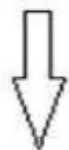
通过CRISPR/Cas9系统进行基因敲入

基因敲入原理：gRNA识别并结合在目标基因区域引导Cas9蛋白对结合位点进行切割，引起DNA双链断裂（DSB），此时若导入外源供体DNA，即可通过同源重组（HR）的方式将供体中的基因定点敲入到基因组中，实现外源基因的表达。



- （2）将线性化的敲入载体经过电转移至小鼠ES细胞内，通过同源重组将目的定点突变基因置换ES细胞内源性目的基因片段，获得Targeted ES细胞
- （3）ES细胞抗药性筛选，获得含有目的基因的ES细胞
- （4）囊胚注射
- （5）嵌合体胚系传递
- （6）靶基因敲入小鼠的分析及功能验证试验

I 载体构建 (4-8周)



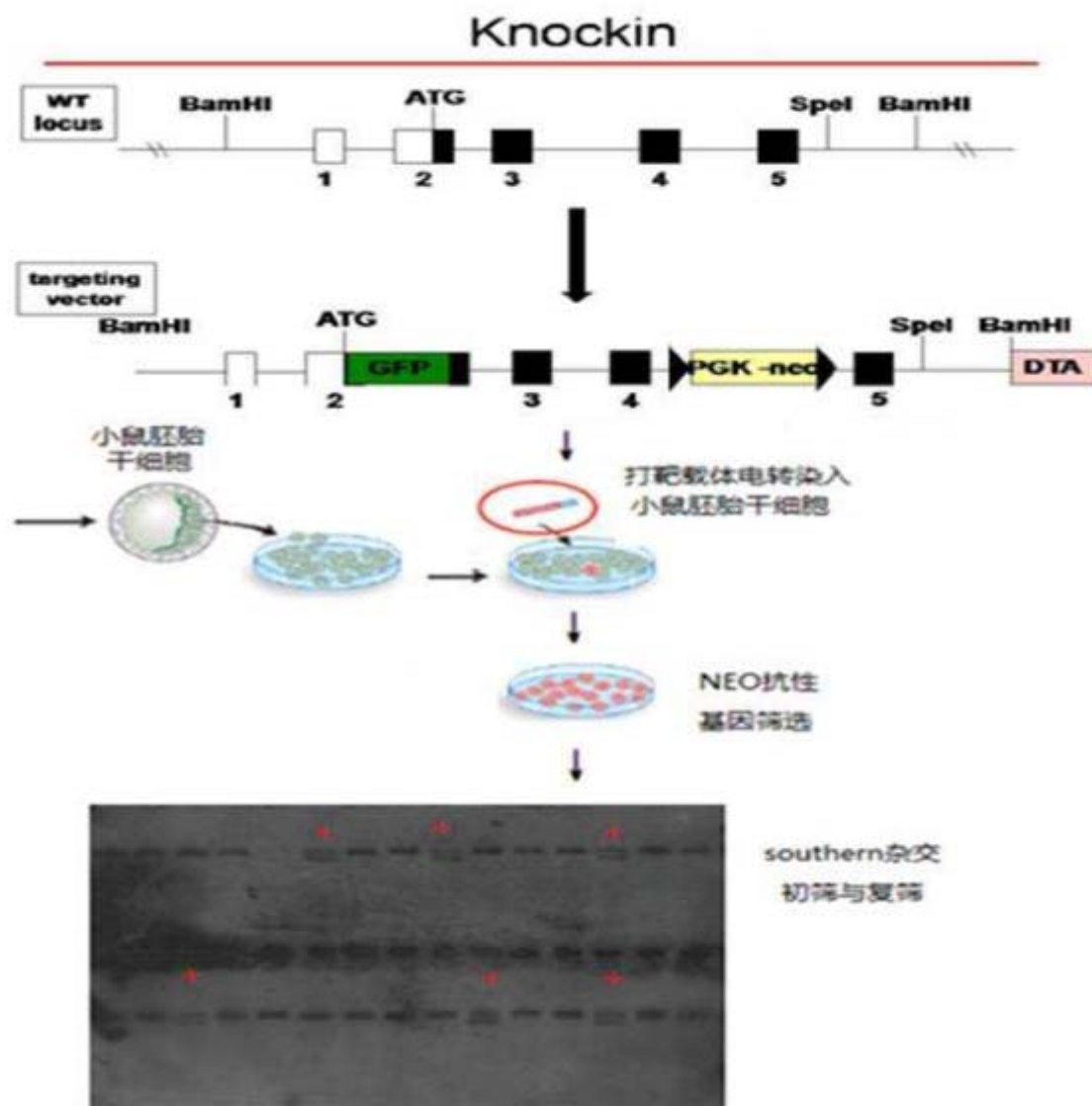
II 电转和培养
(2-3周)



III 阳性克隆筛选
(4-5周)



C57BL/6 小鼠



小结

- 利用基因打靶技术制备转基因动物的基本程序