

基因靶向改造技术的发展及其意义 ——解读 2007 年诺贝尔生理学或医学奖

高翔*

(南京大学模式动物研究所, 南京 210061)

瑞典皇家科学院诺贝尔奖委员会于 2007 年 10 月 8 日宣布将 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 (Mario R. Capecchi) 和奥利弗·史密斯 (Oliver Smithies)、英国科学家马丁·埃文斯 (Martin J. Evans), 以表彰他们在建立利用胚胎干细胞进行小鼠基因靶向改造的技术方面所作的贡献。目前基因靶向改造技术已经广泛应用于生物医学的各个领域, 今后这一技术仍将对深入开展基因功能研究产生极大的促进作用, 同时随着在疾病动物模型建立、基因治疗等领域的应用, 它也将为医学的发展和人类健康带来好处。

2007 年诺贝尔生理学或医学奖颁给了在小鼠基因组建立基因靶向改造技术的三位科学家, 美国科学家马里奥·卡佩奇 (Mario R. Capecchi) 和奥利弗·史密斯 (Oliver Smithies)、英国科学家马丁·埃文斯 (Martin J. Evans)^[1]。这几乎是一项毫无争议的奖励, 这不仅是由于三位科学家对这项技术的开创性贡献为世人公认, 更是因为这项技术的发明建立了基因功能验证的金标准, 因而该技术也成为了功能基因组研究的核心方法。就像 PCR 技术的发明促使分子生物学研究进入世界上最普通的实验室, 基因靶向改造技术使这些普通的实验室可以利用基因剔除小鼠在整体动物水平开展深入的基因或特定基因组序列的功能研究。同时, 这项技术的产生, 为疾病动物模型建立、动物克隆、基因治疗和干细胞等多个领域的研究提供了全新的视角和开辟了广阔的空间。

基因靶向改造技术的实质是对特定的基因序列进行定点的分子生物学改造。这些改造包括“基因剔除 (gene knockout)”——破坏某个基因或特定的基因组序列, 及“基因替换 (gene knockin)”——用一段设计好的序列整合到或替换动物基因组的特定位点。基因靶向改造技术主要分为两个步骤 (图 1): a. 在具有分化全能性的胚胎干细胞 (ES 细胞) 中通过同源重组的方法实现基因靶向的基因组定点改造; b. 将改造的 ES 细胞通过显微注射或聚合等方法整合到野生型小鼠胚胎, 形成嵌合的动物

个体, 由于部分 ES 细胞可能分化为配子细胞, 该个体与野生型小鼠的进一步交配将可以得到所有细胞均携带有定点改造的基因组的动物个体。

从理论到实际操作, 这项技术使科学家可以在基因组水平按设计实现所有类型的 DNA 序列改造: 从单碱基突变到几十万个碱基的颠换和剔除。因此, 这项技术不仅仅可以用来分析基因功能, 还可以分析任何我们感兴趣的基因组结构的功能, 包括小 RNA 编码区及保守的非转录区域 (如增强子序列) 等。

然而, 这项技术的核心价值, 主要不是基于其复杂的操作过程, 更是基于其独特的操作材料, 这个材料就是试验用小鼠。小鼠作为目前最重要的模型动物, 其生理生化指标和人类非常相近, 其基因组和人类基因组也高度同源, 所以是构造人类疾病模型的最佳实验动物对象。因此, 在小鼠体内实现基因组改造的意义和应用价值, 远远大于在大肠杆菌和酵母实现该技术的意义。在我看来, 这其实是三位科学家获奖的关键原因。

和人类基因组一样, 小鼠基因组也编码约 30 000 个基因, 据分析, 约 99% 的人类基因可以在小鼠基因组找到同源基因, 而这些基因的序列的

* 通讯联系人。

Tel: 025-58641598, E-mail: gaox@nicemice.cn

收稿日期: 2007-10-16, 接受日期: 2007-10-17

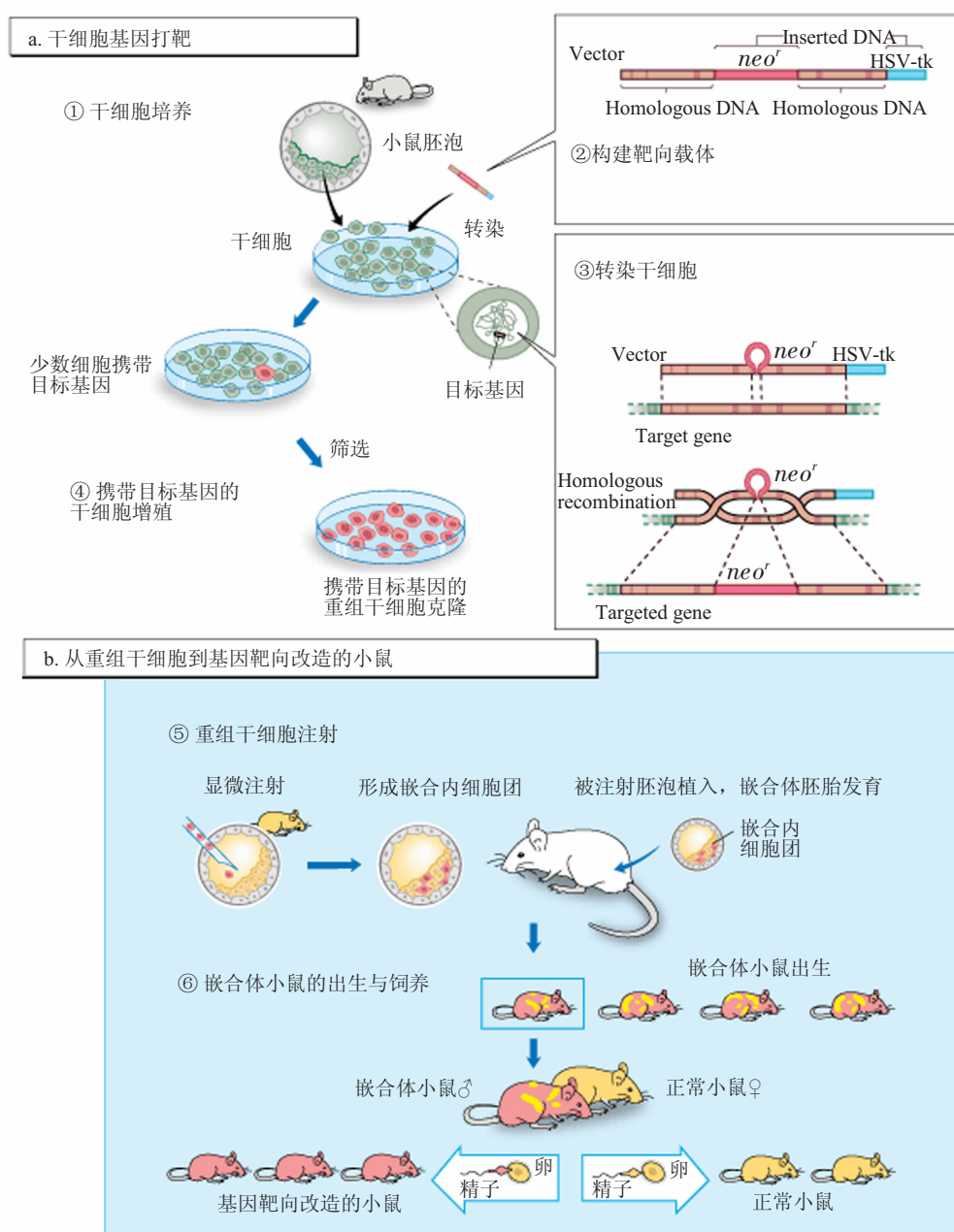


Fig. 1 General strategy for gene targeting in mice

图 1 基因靶向改造技术的基本步骤

(http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/press.html,

Copyright: The Nobel Committee for Physiology or Medicine)

整体同源性也在 90% 以上. 由于实验用小鼠主要来自于小家鼠的两个亚种, 在和人类共同生活的几十万年的历史中, 相似的生活环境致使两者在免疫调控和应激等生理过程 方面有很多相通之处.

运用小鼠建立疾病模型, 是基因靶向技术在现代生物医学研究中的主要应用之一. 人类疾病几乎都可以找到其遗传基础, 除了直接的致病基因之外, 易感突变分析也在临床治疗中发挥越来越重

要的作用, 成为了近几年医学遗传研究的主要内容之一. SNP 检测技术的发展与人类单倍体多态性图谱的完成, 从某种意义上使从临床标本中直接分析筛查致病基因和易感突变成为可能. 但是, 要验证这些关联分析发现的候选致病基因和易感突变的功能, 小鼠基因靶向改造技术的运用必不可少. 换言之, 根据新发现的人类基因组突变或变异, 利用基因靶向改造技术在小鼠等模式动物中在基因组水平

进行模拟(替换模式动物中相应基因组序列), 然后再分析该模式动物的生理生化是否发生和人类临床病理相似的改变, 这已成为确证致病基因及易感突变的功能、分析疾病的分子和细胞机制的核心技术方法. 例如, 在人类肿瘤中, 我们发现 p53 等基因被频繁突变, 因此我们怀疑这些基因可能是肿瘤抑制基因. 要确认某一基因为肿瘤抑制基因, 我们可以在小鼠体内利用该基因靶向改造技术, 特异性地小鼠基因组中剔除该基因, 或将在人类肿瘤标本中找到突变引入小鼠基因组, 观察这些小鼠是否会产生肿瘤. 这类工作, 一方面有可能建立新的模拟临床表型的肿瘤动物模型, 另一方面为深入探讨肿瘤抑制基因的上游信号通路和下游靶向基因提供了最佳实验材料, 同时, 为寻找和筛选调控肿瘤抑制基因的药物提供实验动物模型.

由于此类疾病模型的重要性, 从 2006 年开始, 美国、欧盟、加拿大以及我国都启动了大规模的基因剔除小鼠计划. 目前, 国际上已有大约 4 000~5 000 种基因剔除小鼠. 国际计划是在 5~10 年中将所有近 3 万个基因全部一一剔除. 从而为系统性地寻找基因功能和建立人类疾病模型提供基本材料. 我国的基因剔除技术平台相对国际发达国家建立较晚, 一直到 21 世纪初我国仅有极少数实验室可以开展这方面研究. 2001 年底, 国家科技部通过科技攻关项目建立了国家遗传工程小鼠资源库. 该资源库在短短三年中建立了完善的基因剔除小鼠平台并开始为我国的生物医学工作者提供有关基因组改造和建立疾病模型的技术服务. 该平台目前已保种和繁育了四百多个品系的遗传工程小鼠, 其中近一半以上为基因剔除小鼠模型. 这些模型中, 包括许多人类重大复杂疾病的常用遗传模型, 比如, 糖尿病模型、心血管模型、神经退行性疾病模型、自身免疫性疾病模型和肿瘤模型等.

值得一提的是, 基因靶向技术从 20 年前三位

科学家奠定了基本技术以来, 已经有了很大的发展, 经典的基因剔除技术已经发展为可控制基因剔除技术. 由于人类和小鼠的基因数有限, 一个基因常常承担着多个不同的功能. 以此类推, 控制人类细胞活动的主要信号传导途径也屈指可数. 所以, 由于许多基因的表达对早期胚胎发育至关重要, 按照经典基因剔除技术方法在动物体的所有细胞都失活该基因, 会导致所谓“胚胎致死”表型, 从而我们不可能进一步分析该基因对成体器官组织的功能. 1994 年, 科学家发明了条件型基因剔除技术, 该技术结合了转基因和 DNA 重组酶技术, 可以在特定组织、器官或细胞类型失活一个特定基因, 这样我们就可以分析该基因在这些组织、器官和细胞类型中所起的生理生化作用. 目前, 国际基因剔除计划中采取的技术就是这种条件性基因剔除技术.

基因剔除技术发现的另一个启示是干细胞的全能问题. 马丁·埃文斯第一次得到具有全分化潜能的胚胎干细胞就预示着动物克隆的可能性. 所以, 多利羊的诞生也可以看作是胚胎干细胞理论的一个副产品. 而由于在胚胎干细胞实现了基因组改造, 使从根本上修正人类遗传性疾病变成了一个可以预言的未来.

最后, 2007 年的诺贝尔生理医学奖还可能为生命科学的研究者带来一点新的启示, 奥利弗·史密西斯教授建立基因剔除技术时已近 60 岁. 在北卡大学的很多教授都知道, 在下午奥利弗·史密西斯教授一般不会客和接电话, 他会带着他的随身听, 在美妙的音乐中, 在自己熟悉的试验台上忙着克隆新基因和构建新载体. 说到底, 生物学还是一门实验科学.

参 考 文 献

- 1 The Nobel Assembly at Karolinska Institutet. Press Release. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/press.html, 2007-10-08