

# 利用基因诱捕技术进行小鼠基因剔除的初步研究\*

谭晓红<sup>1)</sup> 程 萱<sup>1)</sup> 毛春明<sup>1)</sup> 陈光慧<sup>2)</sup> 杨 晓<sup>1)</sup>\*\*

(<sup>1)</sup>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, 北京 100071; <sup>2)</sup>北京大学心血管研究所, 北京 100083)

**摘要** 对利用基因诱捕技术进行小鼠基因剔除做了初步的探索, 为进一步应用该技术进行小鼠基因功能研究奠定了基础. 利用基因诱捕载体转染小鼠 ES 细胞, 获得了 36 株 *neo* 基因单拷贝整合的诱捕 ES 细胞, 其中 14 株细胞表达有活性的  $\beta$  半乳糖苷酶. 将 3 株诱捕 ES 细胞分别经显微注射引入到受体囊胚中, 再植入假孕母鼠的子宫中使其发育成小鼠. 两株细胞得到了程度不同的嵌合体小鼠, 其中一株诱捕 ES 细胞整合至生殖系. 利用质粒拯救实验获得了诱捕载体整合位点附近的基因组序列, 通过序列比对发现被诱捕的基因可能是一个新基因. X-gal 染色结果显示, 该基因的表达局限于小鼠腹部及肢芽的部位.

**关键词** 基因诱捕, 小鼠, 基因剔除

**学科分类号** Q73

基因诱捕是通过物理、化学、生物等方法将一个带有外源基因如抗药基因或报告基因的 DNA 载体导入到 ES 细胞中. 外源基因通过捕获到的内源基因表达调控元件获得表达的同时, 使内源的基因功能丧失. 利用 cDNA 末端快速扩增法 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 或者质粒拯救法可以获知外源基因整合位点旁侧的序列. 通过显微注射或 ES 细胞融合技术可以获得特定基因缺失的动物用于功能研究<sup>[1]</sup>. 基因诱捕是功能基因组研究的有力工具之一. 基因诱捕可大规模、经济有效地在整个基因组产生突变的 ES 细胞克隆, 这样可加速对基因组的注释和构建人类疾病的动物模型. Hansen 等<sup>[2]</sup>用 4 个不同的基因诱捕载体, 从 11 000 个 ES 细胞克隆中获得了 5 142 个基因诱捕位点附近的序列. 他们报道了 59% 的基因诱捕 ES 细胞可产生有表型的转基因小鼠, 其概率与传统的基因打靶近似<sup>[3]</sup>. 美国建立了基因诱捕的资源库 (<http://baygenomics.ucsf.edu>), 为研究人员提供数千个带有已知基因或新基因插入突变的 ES 细胞系<sup>[4]</sup>. 基因诱捕可用来发现新基因和鉴定重要基因的功能, Kluppel 等<sup>[5]</sup>运用高通量诱导的基因诱捕方法鉴定了 BMP 信号通路新的靶基因. 目前国内尚无相关报道.

本研究中, 我们利用一个改构后的载体进行了初步的基因诱捕研究. 该基因诱捕载体含有 En-2 剪接受体 (splicing acceptor, SA) 序列、内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES) 序列、编码 lacZ 和 *neo* 融合蛋白的  $\beta$ geo 基因和带有氨苄青霉素抗性基因 (*amp<sup>r</sup>*) 的质粒骨架序列<sup>[6]</sup>.

通过电穿孔方法将该载体导入小鼠 ES 细胞. 利用 DNA 印迹对 G418 抗性的 ES 细胞克隆进行筛选, 获得了 36 株 *neo* 基因单位点整合的 ES 细胞. 通过显微注射将其中 3 株 ES 细胞引入小鼠囊胚, 有两株细胞获得整合程度不同的嵌合体小鼠, 其中一个品系的嵌合体小鼠可经生殖系遗传. 质粒拯救试验结果显示, 该小鼠可能是一个新的基因剔除小鼠.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 基因诱捕载体:** 由北京大学陈光慧教授惠赠.

**1.1.2 细胞系:** TC1 ES 细胞由美国国立卫生研究院邓初夏研究员惠赠.

**1.1.3 菌株和试剂:** 特级胎牛血清、DMEM 高糖培养基、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、青-链霉素 (Hyclone 公司), DH10 $\beta$  菌株 (Invitrogen 公司), 蛋白酶 K (Merck 公司),  $\beta$ -巯基乙醇 (Gibco 公司), 小鼠胎儿成纤维细胞饲养层分泌分化抑制因子 LIF (Chemicon 公司), 100 mm, 150 mm 组织培养皿 (Nunc 公司).

**1.1.4 实验动物:** 清洁级昆明小鼠和 C57 小鼠购自军事医学科学院动物中心, 饲养于清洁级实验动物房.

\* 国家高技术“863”计划资助项目 (2001AA216081) 和国家自然科学基金资助项目 (30025028).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-66948882; Fax: 010-63895937

E-mail: yangx@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2004-02-05, 接受日期: 2004-03-30

## 1.2 方法

**1.2.1 基因诱捕载体的改建:** 将原来的基因诱捕载体用限制性内切酶 *Sal* I 切下, 连入已插入了 *Xho* I 位点的 pGEM-3Zf 载体中。

**1.2.2 滋养层细胞的制备:** 解冻的小鼠原代成纤维细胞, 于滋养层细胞培养液 (DMEM, 15% FBS, 0.1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇, 0.1 mmol/L 非必需氨基酸, 0.1 mmol/L 青-链霉素, 0.1 mmol/L L-谷氨酰胺) 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养 3 天后移入 3 个 100 mm 组织培养皿。3 天后, 再用胰蛋白酶处理并转移到 150 mm 组织培养皿中。3 天后, 再转移到 40 个 150 mm 组织培养皿中培养 3~4 天, 直至细胞铺满皿底。用终浓度为 10 mg/L 的丝裂霉素 C 处理成纤维细胞, 37℃ 培养 2~3 h。将含丝裂霉素 C 处理过的、已经失去有丝分裂活性的成纤维细胞冻存, 制备为滋养层细胞<sup>[7]</sup>。

**1.2.3 电击转染 ES 细胞:** 36  $\mu$ g 用 *Xho* I 线性化的载体经电击转染  $2 \times 10^7$  个 ES 细胞 (600 V, 25  $\mu$ F)。被转染的细胞与 7 ml ES 细胞培养基混匀后, 铺于 4 个已长满滋养层细胞的 100 mm 培养皿中。

**1.2.4 被诱捕 ES 细胞克隆的挑选:** 转染后 24 h 将 ES 细胞培养基换成含有 G418 (175 mg/L) 的筛选培养基, 每天更换新鲜的筛选培养基。转染后第 7 天挑取阳性克隆。

**1.2.5 X-gal 染色:** 细胞用含有 0.25% 戊二醛的 PBS 溶液固定 5 min 后, 用含有 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 的 PBS 溶液漂洗 3 次, 每次 1 min。然后加入 PBS 配制的含有 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.01% 脱氧胆酸钠, 0.02% NP-40 的漂洗缓冲液漂洗 3 次, 每次 1 min。在漂洗缓冲液中加入 5 mmol/L K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>、5 mmol/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 和 1 g/L X-gal 配制染色工作液, 于 37℃ 染色 3~24 h。E10.5d 的胚胎室温固定 22 min, 然后用漂洗缓冲液漂洗 3 次, 每次 20 min。在染色工作液中于 37℃ 染色 6~24 h<sup>[8]</sup>。

**1.2.6 ES 细胞经显微注射至小鼠的囊胚:** 将被诱捕的 ES 细胞用显微注射仪注射至 3.5 天的鼠囊胚腔中, 短暂培养后移植入假孕鼠的子宫中<sup>[9]</sup>。

**1.2.7 PCR 法筛选嵌合体小鼠:** 在基因诱捕载体的 *neo* 基因序列上选取 2 条引物, 上游引物序列为 GTTGTCCTACTGAAGCGGGAAGGG, 下游引物序列为 GCGATACCGTAAAGCAGGAGAA, 扩增条带大小为 494 bp。PCR 反应条件为 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 30 s, 33 个循环; 72℃

10 min。

**1.2.8 DNA 印迹分析:** 在基因诱捕载体上有 1 个限制性内切酶 *Bgl* II 位点, 3 个 *Sac* I 位点。分别用 *Bgl* II 和 *Sac* I 限制性内切酶消化基因组 DNA, 以 1 kb 的 *neo* 基因序列为探针做 DNA 印迹 (图 1)。

**1.2.9 质粒拯救实验获得基因组整合位点的序列:** 在基因诱捕载体上含有氨苄抗性的基因序列, 用相应的限制性内切酶消化 ES 细胞的基因组 DNA, 然后用高效率的 DNA 连接酶进行连接, 并将连接产物经电击转染至 DH10 $\beta$  菌株中, 能够在带有氨苄青霉素的平板上生长的菌落, 必带有氨苄抗性的基因序列和被诱捕到的一段基因组序列, 原理见图 1。通过测序和与 GenBank 的序列进行比对可获知被诱捕基因的信息。

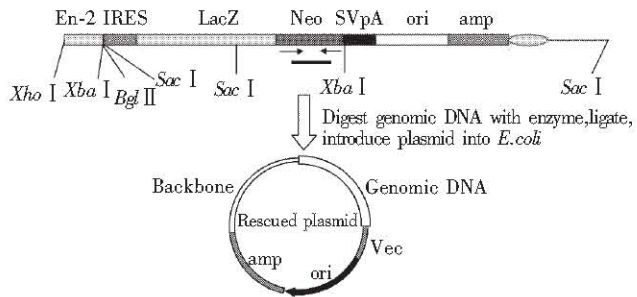


Fig. 1 Structure of the genetrap vector and theory of plasmid rescue

—: probe of Southern blot; →: primer and direction.

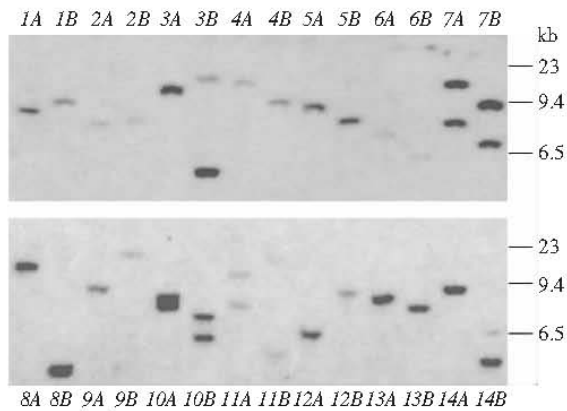
## 2 结 果

### 2.1 基因诱捕 ES 克隆的筛选和鉴定

通过分子克隆的方法, 在 *En-2* 基因的序列前添加一个 *Xho* I 位点, 用该 *Xho* I 限制性内切酶将基因诱捕载体线性化, 用于转染 ES 细胞。基因诱捕载体构件包括一段约 1.8 kb 的小鼠 *En-2* 基因, 594 bp 的内部核糖体进入位点 (IRES), 约 3.9 kb *LacZ* 和 *neo* 基因的融合基因 ( $\beta$ geo), 约 200 bp 的 SV40 polyA 序列, 还有约 3 kb 的载体骨架序列 (图 1)。

36  $\mu$ g 线性化的基因诱捕载体经电击转染  $2 \times 10^7$  个 ES 细胞, 24 h 后加入含 G418 的筛选培养基, 获得 46 株阳性克隆。分别用 *Bgl* II (图 2-A) 和 *Sac* I (图 2-B) 消化阳性克隆的基因组 DNA, 以 1 kb 的 *neo* 基因序列作探针进行 DNA 印迹。以 *Sac* I 消化基因组 DNA, *neo* 基因单位点整合 ES 克

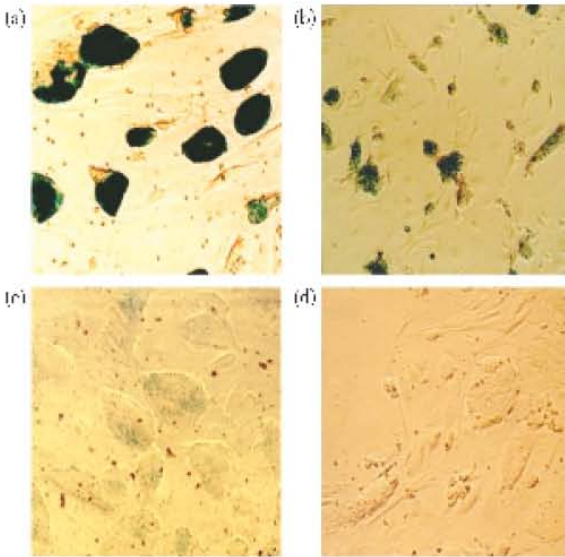
隆应当出现一条约 5 kb 的条带. 当载体末端的 *Sac* I 位点在载体整合进基因组时被破坏或被删除, 单拷贝整合会出现一条大于 5 kb 的条带. 多拷贝整合时, DNA 印迹结果会出现多于一条的阳性条带. 因为载体上只有一个 *Bgl* II 位点, 因此用该酶消化基因组 DNA 做 DNA 印迹, 则可鉴定是否为单拷贝整合, 当只有一条大于或约等于 7.5 kb 的条带时, 很可能是单拷贝整合. 当出现一条 15 kb 的条带时, 则可能是载体以头尾相接的方式整合进基因组. 若出现两条以上的条带, 则是多拷贝整合. 通过 DNA 印迹鉴定 *neo* 基因单拷贝整合的细胞株有 36 株, 图 2 是部分检测结果. 在图 2 被检测的 14 株 ES 克隆中, 10 株 ES 克隆为 *neo* 基因单位点整合 ES 克隆 (图 2-1, 2, 4~6, 8, 9, 12~14); 4 株 ES 克隆疑为 *neo* 基因多位点整合 ES 克隆 (图 2-3, 7, 10, 11).



**Fig. 2 Southern blot analysis of genomic DNA to identify ES clone trapped**  
A: The genomic DNA was digested with *Bgl*II; B: The genomic DNA was digested with *Sac*I. 1.0 kb *neo* gene was used as probe.

2.2 表达 LacZ 的 ES 克隆鉴定

对阳性 ES 细胞进行 X-gal 染色发现, 有 14 株细胞表达有活性的  $\beta$  半乳糖苷酶. 说明基因诱捕载体成功地捕获到内源基因表达调控元件并获得表达. 每株阳性 ES 细胞的 X-gal 染色强度是不同的, 有的 ES 细胞 (第 2 8 号克隆) 对 X-gal 染色呈强阳性反应 (图 3a), 有的染色较弱 (图 3b), 还有的 ES 克隆仅部分区域染色阳性 (图 3c), 图 3d 是 X-gal 染色完全阴性的 ES 克隆.



**Fig. 3 LacZ staining of trapped ES cells**  
 $\beta$ -gal staining patterns of trapped cell lines were classified into four different groups as follows: (a) strong and ubiquitous, (b) moderate level of  $\beta$ -gal staining, (c) restricted (20% ~ 50% of the cells were positive), (d) no lacZ expression was detected.

2.3 基因诱捕小鼠的研制和鉴定

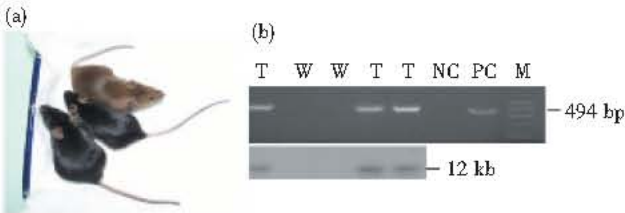
将 3 株诱捕 ES 细胞分别注射到小鼠的囊胚, 有两株细胞得到了程度不同的嵌合体小鼠, 其中一株诱捕 ES 细胞可整合至生殖系 (表 1).

Table 1 Production of chimeric mice by blastocyst microinjection

| Serial number of ES cells | No. of blastocysts microinjected | No. of blastocysts transferred | No. of recipient female mice | No. of pregnant mice | No. of new born mice | No. of chimeric mice |
|---------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1                         | 54                               | 50                             | 5                            | 4                    | 13                   | 10                   |
| 2                         | 48                               | 43                             | 4                            | 3                    | 2                    | 2                    |
| 3                         | 63                               | 59                             | 6                            | 3                    | 8                    | 0                    |

对出生的嵌合体小鼠进行 PCR 检测, 发现由 28 号 (图 2-5) ES 细胞获得的 1 只棕色小鼠和由 5 号 ES 细胞获得的 8 只花色小鼠有阳性 ES 细胞的

嵌合 (图 4a). 最左侧是 ES 细胞嵌合度较低的小鼠, 中间的是 C57 小鼠, 最右侧是 ES 细胞在毛色上 100% 嵌合的小鼠.



**Fig. 4 Identification of genetrapped offsprings**  
(a) The agouti mouse is an offspring from a gene trapped germline chimera. (b) Identification of the genotypes of the gene trapped offspring. The upper shows results of genotyping by PCR. A 494 bp fragment can be amplified in offspring carrying the gene trapped allele, but not in wild-type mice. The lower shows results of Southern blot. A 12 kb band was detected in gene trapped mice. W: Wild-type mouse; T: Gene trapped mouse; NC: Genomic DNA from wild type ES cells as negative control; PC: Genomic DNA from gene trapped ES cells as positive control.

将 28 号 ES 细胞和 5 号 ES 细胞来源的嵌合体小鼠与 C57BL/6J 小鼠进行交配, 对获得的子代小鼠进行 PCR 和 DNA 印迹鉴定, 发现 28 号 ES 细胞来源的嵌合体小鼠可经生殖系稳定遗传. 阳性小鼠经 PCR 可扩增出 494 bp 的阳性条带, 野生型小鼠无此条带 (图 4b, 上). DNA 印迹鉴定基因诱捕的子代小鼠, 阳性小鼠可出现约 12 kb 的阳性条带, 而野生型则无此条带 (图 4b, 下).

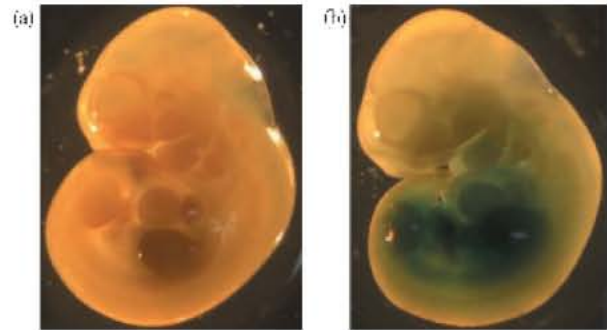
2.4 利用质粒拯救法鉴别诱捕基因

对 7 株单拷贝整合的阳性 ES 细胞基因组 DNA 进行了质粒拯救实验, 并对获得的序列进行测序, 然后与 GenBank 的序列进行比对, 发现被诱捕到的基因有 2 个是未知基因, 另有一个与 45S rRNA 同源, 还有一个与 slp1 基因同源 (表 2).

Table2 Part of sequence blast result of rescued plasmid

| Serial number of ES cells | Size of plasmid | Sequence primers | Result of Blast | Annotation of gene |
|---------------------------|-----------------|------------------|-----------------|--------------------|
| 5                         | 4.5             | f (1), Sp6       | 45S rRNA        | rDNA               |
| 14                        | 6.0             | T7, Sp6          | unknown gene    |                    |
| 23                        | 23.0            | f (1), Sp6       | Slp1            | limb development   |
| 28                        | 4.2             | T7, Sp6          | unknown gene    |                    |

将 28 号 ES 细胞来源的基因诱捕小鼠的子代小鼠进行杂交, 取 10.5 天的胚胎作 X-gal 染色. 结果显示, 被诱捕胚胎的腹部区域及肢芽 X-gal 染色阳性 (图 5b), 而同窝的对照胚胎则未见着色 (图 5a).



**Fig. 5 Whole-mount X-gal staining of genetrapped embryo**  
(a) Lateral view of whole-mount stained E10.5 wild-type embryo as negative control. (b) Stained E10.5 genetrapped embryo.

3 讨 论

在基因诱捕中, 单位点整合是很重要的. 如果诱捕过程中出现多位点整合, 在 ES 细胞克隆中无

法区分是哪一个整合位点发生了融合转录. 换言之, 多个整合位点中, 是单位点起作用还是多个位点发生转录, 是同时转录还是次序转录, 无法判定. 这样一来, 必须对每个整合位点进行分析, 这项工作将会变得冗长而乏味. 而且, 产生的嵌合体动物将不具有代表性, 无法用作进一步的研究. 因此在获得被成功诱捕的克隆之后, 我们通过 DNA 印迹鉴定外源基因单拷贝整合的细胞株有 36 株, 并对它们进行了相应的研究.

为了尽快分析获得的大量被诱捕 ES 细胞克隆, 需要对 ES 细胞进行快速的初步筛选, 以减少不必要的后续工作, 而对感兴趣的被诱捕克隆做深入的研究. 我们首先进行了 ES 细胞的 X-gal 染色. 在理论上应用 LacZ-neo 融合载体 ( $\beta$ geo), 即产生  $\beta$ -半乳糖苷酶-新霉素磷酸转移酶融合蛋白的载体转染 ES 细胞, G418 抗性的克隆应该具有  $\beta$ -半乳糖苷酶活性, X-gal 染色强弱能够在一定程度上反映被诱捕基因的表达丰度. 在我们获得的 46 株 G418 抗性的克隆中仅有 14 株细胞表达有活性的  $\beta$  半乳糖苷酶. 有些克隆普遍表达 lacZ, 但有强弱之分; 有些只在克隆中某一亚群的细胞中表达 lacZ;

还有一部分克隆的 X-gal 染色呈阴性。这主要是因为检测这两种酶活性方法的敏感性可能会有差异,检测不到 LacZ 表达的 ES 细胞中被捕获的基因可能是低水平表达的基因<sup>[10]</sup>。我们取广泛强表达的第 28 号细胞系进行了质粒拯救实验,得知这可能是一个新基因。将 ES 细胞注射至小鼠囊胚,获得了嵌合体小鼠,并通过 DNA 印迹鉴定该突变可经生殖系遗传。通过对其胚胎进行 X-gal 染色以检测该基因的表达模式,发现尽管  $\beta$ -半乳糖苷酶在未分化的 ES 细胞中广泛强表达,而在 10.5 天的小鼠胚胎中却局限于小鼠的腹部及肢芽的部位,显示该基因在不同发育阶段具有不同的表达模式,可能在腹部和肢芽发育中具有一定的功能。Bonaldo 等<sup>[11]</sup>也曾报道过这种细胞与胚胎表达模式有差异的例子。

我们实验室曾利用同源重组技术成功地研制了 *Smad2* 条件基因打靶小鼠<sup>[7]</sup>,本研究的结果显示,利用基因诱捕技术成功地获得了一个新的基因剔除小鼠。与传统的基因打靶技术相比,基因诱捕作为一种大规模高通量的基因诱变方法,可以通过一次转染试验筛选到大量携带插入突变的 ES 克隆。在筛选出感兴趣的基因之后,通过将诱捕的 ES 细胞注射到受体囊胚中,获得突变体小鼠,分析小鼠的表型,推测被诱捕基因的功能。通过基因诱捕技术研制基因剔除小鼠可以节省基因打靶载体构建的时间,但同时也无法精细地控制基因打靶的结果。此外,基因诱捕实验的成功实施,还有赖于高通量

大规模的质粒拯救鉴定被诱捕基因的技术。

## 参 考 文 献

- 1 杨 晓,黄培堂,黄翠芬. 基因打靶技术. 北京: 科学出版社, 2003. 57 ~ 65  
Yang X, Huang P T, Huang C F. Gene Targeting. Beijing: Science Press, 2003. 57 ~ 65
- 2 Hansen J, Floss T, van Sloun P, *et al.* A large-scale, gene-driven mutagenesis approach for the functional analysis of the mouse genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (17): 9918 ~ 9922
- 3 Zambrowicz B P, Friedrich G A, Buxton E C, *et al.* Disruption and sequence identification of 2 000 genes in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 1998, **392** (6676): 608 ~ 611
- 4 Wiles M V, Vauti F, Otte J, *et al.* Establishment of a gene-trap sequence tag library to generate mutant mice from embryonic stem cells. *Nat Genet*, 2000, **24** (1): 13 ~ 14
- 5 Kluppel M, Vallis K A, Wrana J L. A high-throughput induction gene trap approach defines C4ST as a target of BMP signaling. *Mech Dev*, 2002, **118** (1 ~ 2): 77 ~ 89
- 6 Mountford P, Zevnik B, Duwel A, *et al.* Dicistronic targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (10): 4303 ~ 4307
- 7 周 江,程 莹,孙彦询,等. 基于 Cre-LoxP 系统的 *Smad2* 条件基因打靶小鼠的建立. *中国科学*, **31** (4): 335 ~ 342  
Zhou J, Cheng X, Sun Y X, *et al.* *Science in China*, **31** (4): 335 ~ 342
- 8 Takeuchi T, Yamazaki Y, Katoh-Fukui Y, *et al.* Gene trap capture of a novel mouse gene, *jumonji*, required for neural tube formation. *Genes Dev*, 1995, **9** (10): 1211 ~ 1222
- 9 程 莹,周 江,谭晓红,等. 遗传修饰小鼠胚胎干细胞种系嵌合体小鼠的研制. *生物技术通讯*, 2003, **14** (1): 1 ~ 3  
Cheng X, Zhou J, Tan X H, *et al.* *Lett Biotech*, 2003, **14** (1): 1 ~ 3
- 10 Friedrich G, Soriano P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev*, 1991, **5** (9): 1513 ~ 1523
- 11 Bonaldo P, Chowdhury K, Stoykova A, *et al.* Efficient gene trap screening for novel developmental genes using IRES $\beta$ geo vector and *in vitro* preselection. *Exp Cell Res*, 1998, **244** (1): 112 ~ 136

## Generation of a Gene Knockout Mouse by Using a Gene Trap Strategy\*

TAN Xiao-Hong<sup>1)</sup>, CHENG Xuan<sup>1)</sup>, MAO Chun-Ming<sup>1)</sup>, CHEN Guang-Hui<sup>2)</sup>, YANG Xiao<sup>1)</sup>\*\*

(<sup>1)</sup> Genetic Laboratory of Development and Diseases, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;

<sup>2)</sup> Institute of Cardiovascular Science, Peking University, Beijing 100083, China)

**Abstract** A gene trap construct was used to transfect mouse ES cells. 36 ES colonies trapped by one copy of *neo* gene were obtained. The  $\beta$ -galactosidase activity was detectable in 14 ES colonies. ES cells from 3 trapped lines were introduced into blastocysts by microinjection. Two chimeric mice lines were generated. One trapped mutation went through the germline. Genomic sequences adjacent to integration sites of the constructs were isolated by plasmid rescue. The results of sequencing suggested that the trapped gene is possibly a novel gene. The expression pattern of this gene shown by  $\beta$ -galactosidase expression was restricted in abdomen and limb bud of E10.5 mouse embryo.

**Key words** gene trap, mouse, gene knockout

\* This work was supported by grants from State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA216081) and The National Natural Sciences Foundation of China (30025028).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-10-66948882, Fax: 86-10-63895937, E-mail: yangx@nic.bmi.ac.cn

Received: February 5, 2004 Accepted: March 30, 2004