

在小鼠胚胎干细胞进行基因打靶的策略

杨 晓 张兆山 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 基因打靶技术是一种通过同源重组按预期方式改变生物活体的遗传信息的实验手段, 与小鼠胚胎干细胞培养系统相结合, 使得人们可以方便地将各种突变引入小鼠体内, 得以从生物整体水平上研究高等真核生物基因的表达、调控及其生理功能。扼要介绍了近年来在小鼠胚胎干细胞进行基因打靶的研究进展。

关键词 基因打靶, 小鼠胚胎干细胞, 同源重组, 打靶载体

基因打靶技术是一种通过同源重组按预期方式改变生物活体的遗传信息的实验手段。它产生于 70 年代末和 80 年代初, 最初应用于酵母系统, 80 年代中期应用于培养的哺乳动物细胞^[1]。但直到 1988 年, 此技术渐趋成熟, 可用作普通的遗传实验手段^[2]。小鼠胚胎干细胞 (ES 细胞) 取自小鼠早期胚胎的内细胞团, 它能在体外培养并保留发育的全能性。在体外进行遗传操作后, 将它重新植回小鼠胚胎, 它可发育成胚胎的各种组织, 从而形成嵌合体小鼠。如果这些携带突变基因的 ES 细胞能发育成小鼠的生殖细胞, 通过杂交就能获得突变基因的纯合小鼠。基因打靶技术结合这种 ES 细胞系统, 使得人们可以方便地将各种突变引入小鼠体内, 以传统实验手段无法比拟的速度获得各种突变体小鼠, 用作进行遗传分析的材料, 由此而产生了一个异常活跃的研究领域, 极大地促进了分子生物学的发展。迄今为止, 用这种方法已经产生了数百种突变体小鼠系, 使得研究者得以从生物整体上研究高等真核生物基因的表达、调控及其生理功能, 并用来研究人类疾病的分子机制和用作人类疾病的动物模型。

能在 ES 细胞表达的筛选标志基因的应用, 是基因打靶技术得以实现的基础之一。最早应用的两种标记基因是新霉素磷酸转移酶基因 (neo) 和病毒的胸腺嘧啶激酶基因 (HSV-

tk)^[2]。表达 neo 基因的细胞可通过在含 G418 (一种新霉素相关的氨基糖苷) 的培养基上生长而筛选。一种毒性核苷酸类似物 (gancyclovir 或 FIAU) 可用来筛选 HSV-TK⁻ 的细胞。含 HSV-tk 基因的细胞可利用它作为该酶的底物而导致细胞死亡。仅含细胞内源 tk 基因的细胞不能利用这种物质而存活下来。另一种标记基因次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (HPRT) 基因^[3]因为具有双重的筛选方法也得到越来越广泛的应用。表达 HPRT 的细胞能在含次黄嘌呤/氨甲喋呤/胸腺嘧啶 (HAT) 的培养基上生长, 而 hprt⁻ 细胞会产生 6-硫代鸟嘌呤 (6-TG) 抗性, 因而可用含 6-TG 的培养基筛选。

打靶载体的构建直接影响基因打靶策略和效率。基因打靶的载体通常可分为两种类型, 一种是插入型载体, 又称 O 型载体; 一种是置换型载体, 又称 Ω 型载体。插入型载体需在同源区制造一个线性化缺口, 同源重组的发生将导致整个载体插入染色体同源区。置换型载体其同源区和整个质粒骨架均保持线性化, 同源重组后, 载体上仅同源区插入染色体并将靶基因的同源序列置换下来。近 10 年来, 基因打靶的研究进展迅速, 研究者在这两种载体的基础上发展了一些巧妙的策略, 不仅能简单地使基因失活, 而且能将更精细的突变引入

收稿日期: 1996-04-09, 修回日期: 1996-09-23

ES 细胞染色体中。

1 基因敲除

基因敲除 (gene knock out) 通过同源重组而使特定的靶基因失活, 是基因打靶最常用的一种策略。虽然上述两种载体都可应用, 但对于单纯的基因敲除, 置换型载体更常用一些 (图 1)。此载体上含有一段与欲灭活的靶基因具有高度同源性的外源基因, 在外源基因中插入带有启动子的选择标记基因 (通常是 neo 基因) 作为阳性选择标记。为了增加阳性克隆中同源重组的概率, 在载体上同源序列的一侧或两侧设计了一个带有启动子的阴性选择基因, 通常是 HSV-tk 基因。此载体导入 ES 细胞后, 如果发生了随机的非同源重组, HSV-tk 基因会随之整合到染色体上, 表达 HSV-tk 基因的细胞会被培养基中毒性核苷酸类似物的代谢产物杀死。而如果在 ES 细胞中发生的是同源重组, HSV-tk 基因会因为同源序列的外侧而被删除, 细胞也因为不表达此基因产物而在毒性培养基上存活下来。这就是所谓的正负选择法 (positive-negative selection)^[2]。用这种方法可使重组效率提高 2~2 000 倍不等。

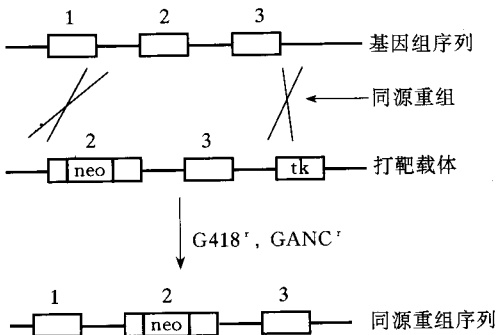


图 1 基因敲除

通过这种策略进行基因打靶, 将得到的基因失活的 ES 细胞再植回小鼠胚胎, 已经产生了数百种不同的突变体小鼠。大多数基因敲除都会产生一个无义基因, 如抑癌基因 P₅₃ 敲除的纯合小鼠体内测不到任何完整的或部分的基因产物^[4]。由于打靶设计细节的不同, 一些

基因敲除的小鼠也会产生无功能的基因产物、部分的基因产物或交替拼接的基因产物^[5]。基因敲除对小鼠表型的影响也有很大差异。有些基因敲除导致小鼠在胚胎发育早期或出生后死亡, 而且某些基因敲除产生的死亡表型与所用 ES 细胞的遗传背景相关。如表皮生长因子 (EGF) 基因敲除的 ES 细胞, 如源于 CF-1 小鼠, 会因内细胞团的退化导致植入期死亡。如果 ES 细胞来自 129/SV, 纯合体会因为胎盘缺陷而死于孕中期。而用 CD-1 的 ES 细胞产生的突变体小鼠可在出生后存活三周^[6]。令人惊异的是, 一些功能十分重要的基因敲掉后, 其表型却表现正常, 如已经证明视黄酸对人类的胚胎发育至关重要, 视黄酸受体 $\alpha 1$ (RAR $\alpha 1$) 是大多数组织中最丰富的一种类型, 其高度保守的氨基酸序列也暗示它具有重要的功能。然而带有 RAR $\alpha 1$ 无义突变的小鼠却观察不到任何异常的表型^[7]。这些实验结果提示, 基因产物间更复杂的相互关系决定了一种蛋白的功能。

基因敲除技术的应用极大地促进了人们对基因的认识, 但它也存在一些不足之处。传统基因敲除技术在进行基因打靶时直接灭活靶基因, 常常导致小鼠在胚胎早期死亡, 使得人们无法深入研究此基因的作用。位点特异的重组酶的应用使得研究者发明了在一定组织定位进行基因敲除的技术, 从而避免动物的死亡, 并可以在特定组织细胞中研究基因的功能^[8]。此外, 传统基因敲除技术在灭活靶基因的同时, 将异源的选择标记基因导入基因组内并保留下来。为了防止基因打靶过程中引进外源的遗传因素干扰分析, 研究者发展了另外一些策略以便将更加精细的突变引入非选择性的基因。

2 “hit and run” 法

由于大多数哺乳动物基因组的基因并不具备可供直接筛选突变体的表型, 因此将精细的突变引入靶基因而不改变基因组的其他结构是一项十分困难的任务。研究者陆续发明了一些

方法, 如将不含选择基因的打靶载体注入 ES 细胞, 然后用 PCR 分析鉴定同源重组克隆^[9]; 或者用无选择基因的打靶载体与仅含标记基因的载体共转染 ES 细胞^[10]. 但效率较高、应用广泛的方法应首推“hit and run”法^[11]. 用这种方法可将位点特异的突变通过两步同源重组引入无选择表型的靶基因. 其打靶载体含有靶基因的同源序列, 包括所设计的突变. 载体上也含有 neo 基因和 HSV-tk 基因分别作为两步同源重组的筛选标记 (图 2). 第一步, 发生单位点交互同源重组, 打靶载体整个插入基因组的靶基因中. 基因组中同时串联有两个同源区, 中间隔以质粒序列和选择标记基因; 第二步, 发生单位点的染色体体内同源重组, 将 neo 基因、HSV-tk 基因、质粒序列以及一个拷贝的同源序列切除, 这一回复的同源重组可通过 tk 基因的活性丧失进行筛选. 1991 年, Hastly 等首次应用此方法在 Hox-2.6 同源盒基因中引入一个终止密码子, 突变体的翻译产物比正常蛋白少 43 个氨基酸. 这种方法使得研究者有可能在生物活体中研究某一突变体蛋白的功能而不受任何筛选标记基因整合的影响.

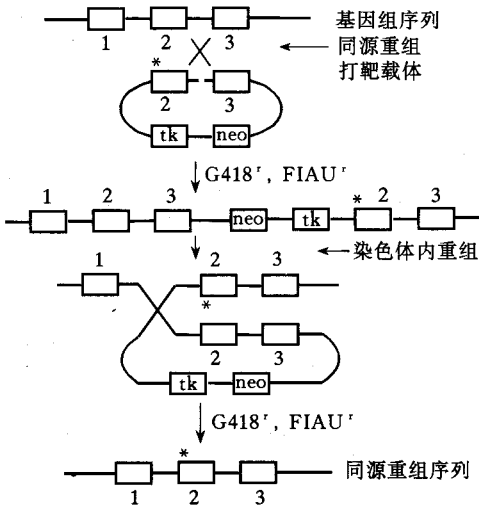


图 2 “hit and run” 法

“hit and run” 法最明显的优点就是只在宿主基因组中引入了突变的基因. 它的不足之

处在于, 其一, 此过程中第二步染色体内的同源重组无法精确的控制, 可能会导致失去携带突变的同源序列, 而留在基因组中的仍是未修饰的内源片段. 其二, 整个过程需要采用两种培养基分别进行先后两次筛选, 长时间的体外培养可能会削弱 ES 细胞进入生殖系的能力. 此外, 如果需要将不止一个位点的突变分别引入靶基因, 每引进一个突变, 必须重复两个步骤的整个过程. 另一类采用置换型载体进行基因打靶、将突变经过两次同源重组引入靶基因的策略部分地弥补了这些缺陷.

3 双置换法

最早提出这一设想的研究者称其为“*In-Out*”法^[3]. 第一步, 用含有 HPRT 基因的打靶载体转染 hpert-ES 细胞, HPRT 基因两侧是靶基因的同源序列. 通过在 HAT 培养基上生长并用 PCR 进行基因组分析, 筛选发生同源重组、HPRT 基因整合到染色体中的阳性克隆. 第二步, 再用只携带含突变的同源序列的打靶载体转染第一步获得的 hpert⁺ ES 细胞. 同源重组发生后, 突变序列整合入染色体, hpert 被置换出来. hpert⁻ 细胞可在 6-TG 培养基上筛选并用 PCR 进行分析. 这种方法的优点在于, 第一步获得的 hpert⁺ ES 细胞, 除了可用于产生普通的基因敲除小鼠, 更可用作将不同突变引入靶基因的基础. 对于任何一个靶基因, 只要通过第一步获得 HPRT 基因插入的 ES 细胞, 此后每次将不同的突变引入, 只需经过一次基因打靶、进行一次筛选即可. 这将大大减少工作量, 提高获得不同突变体的效率. 1995 年, Moore 等将这种方法稍加改进, 称其为“双置换法” (double replacement) (图 3). 他们用这种方法将五种突变分别引入 Prion 蛋白基因, 期望研究人类 Prion 相关疾病及其基因治疗的可能性. 他们构建的打靶载体缺失了同源序列外显子的一段序列, 可保证第一步基因打靶获得的 ES 细胞获得靶基因完全无义的表型. 用它产生的基因敲除小鼠, 不会因插入基因的回复突变而部分恢复靶基因的活

性。此外，他们在打靶载体的 5' 端加上一个 HSV-tk 基因，起到富集同源重组体的作用。第一步基因打靶的重组子筛选在含 HAT 和 GANC 的培养基上进行^[12]。

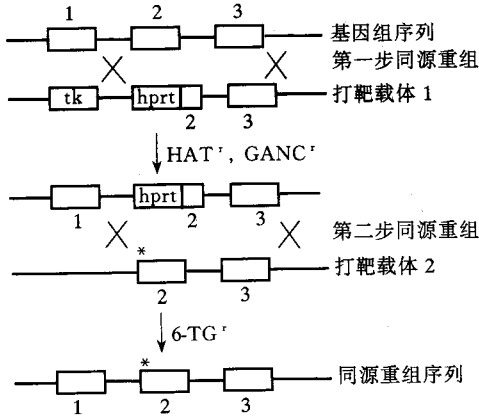


图 3 双置换法

一种叫作“标记和交换”（“tag and exchange”）的策略与上述方法有异曲同工之妙。Askow 等^[13]通过第一步基因打靶将 neo 和 HSV-tk 基因同时插入靶基因中进行“标记”，筛选 neo^r 的阳性克隆。在第二步基因打靶过程中，用只带有突变设计的同源序列载体转染第一步得到的 ES 细胞，载体上的序列将置换下被“标记”的靶基因，两个选择标记基因也同时被除去。同源重组子可由 HSV-tk 基因活性丧失而得到筛选。研究者用这种方法成功地将 ES 细胞内源的 Na⁺, K⁺-ATP 酶改变了两个氨基酸，使其既能维持转膜运输的离子泵功能，又能抵抗强心类糖苷的抑制作用。另有一种类似于“选择与标记”的双置换法^[14]，其唯一不同之处在于，第一步所用打靶载体不是单纯的将 neo 和 HSV-tk 基因插入靶基因同源序列中，而是在标记基因插入的同时缺失了一段同源序列。与前一种方法相比，后者更有利于在靶基因中较大范围内引入多位点突变。Wu 等用这种方法将点突变导入内源的胶原蛋白基因 Colla-1，使得能在体内测试这一突变体能否抵抗胶原酶的酶解作用。

4 基因敲入

传统基因敲除技术已成为一种研究基因功能的强有力的手段。但对于许多基因，简单的失活常常导致让人费解的无改变的表型。一种最常见的解释认为某些其他基因取代了靶基因的功能，要在普通基因敲除小鼠中证明这一点十分困难。最近，Hanks 等发明了一种新的策略，通过基因打靶用一种基因替换另一种基因，以便在体内测定它们是否具有相同的功能，故称为基因敲入（gene knock in）。Engrailed-1 和 2（En1 和 En2）是两种结构相关的发育控制基因，两者均含有保守的同源盒 DNA 序列。两种基因均在大脑发育的早期开始表达，En1 比 En2 早表达 8~10 h。En1 敲除的小鼠会产生严重的异常表型，如中脑和小脑缺陷，并在出生后不久死亡。而 En2 基因敲除的小鼠却产生几近正常的表型。这些实验结果暗示 En1 具有 En2 类似的生理活性，足以替代 En2 的功能。为了证实两者具有相同的功能，研究者通过基因打靶将 En2 基因插入 En1 基因使其失活，同时将其自身置于 En1 的调控序列下，并以 En1 的模式表达，结果产生了表型正常的小鼠。这个结果证明通过置换基因的调控序列，可使基因获得新的功能^[15]。

基因敲入的方法设计十分简单，是一个类似普遍基因敲除方法的一步同源重组过程。其不同之处在于，设计打靶载体时，要将靶基因第一外显子的 N 端序列缺失，并将新的替换基因置于靶基因的调控序列之下，使其能精确地按照靶基因的调控模式表达（图 4）。采用

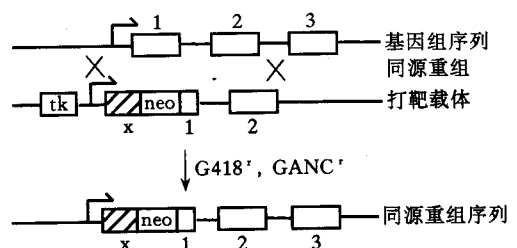


图 4 基因敲入

这种方法不仅能用一种基因置换另一种基因,而且可以系统地改变基因的结构,分析其蛋白产物各功能区的作用。

5 结 语

衡量一个基因打靶策略的基本标准包括, a. 其过程必须是定向的, 只影响所选择的位点; b. 其过程必须是特异的, 只有预先检测过的序列插入或置换靶位点; c. 其过程必须是有效的。基因打靶技术的飞速发展提供了简单或复杂的技术方法将各种类型的突变引入ES细胞, 人们可以根据自己的研究目的选择不同的策略。目前所用的基因打靶方法都仅限于在单基因中引入小的突变、小片段的缺失、或进行局部的替换。要研究多基因同时多点的突变, 以及大片段的缺失甚至染色体的易位, 还有待于基因打靶技术进一步的研究进展。

参 考 文 献

- 1 Smithies O. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature*, 1985, **317**: 230~ 234
- 2 Mansour S L. 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**: 348~ 352
- 3 Reid L H. Regulatory elements in the introns of the human HPRT gene are necessary for its expression in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 4299~ 4303
- 4 Donehower P A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature*, 1992, **356**: 215~ 221
- 5 Moens C B. Defects in heart and lung development in compound heterozygotes for two different targeted mutations at the N-myc locus. *Development*, 1993, **119**: 485~ 499
- 6 Threadgill D W. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*, 1995, **269**: 230~ 234
- 7 Li E. Normal development and growth of mice carrying a targeted disruption of the $\alpha 1$ retinoic acid receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 1590~ 1594
- 8 Gu H. Deletion of a DNA polymerase β gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, 1994, **265**: 103~ 106
- 9 Zimmer A. Production of chimaeric mice containing embryonic stem (ES) cells carrying a homobox Hox1.1 allele mutated by homologous recombination. *Nature*, 1991, **338**: 150~ 153
- 10 Reid L H. Cotransformation and gene targeting in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 1991, **11**: 2769~ 2777
- 11 Hasty P. Introduction of a subtle mutation into the Hox2.6 locus in embryonic stem cells. *Nature*, 1991, **150**: 243~ 246
- 12 Moore R C. Double replacement gene targeting for the production of a series of mouse strains with different prion protein gene alterations. *Bio/Technology*, 1995, **13**: 999~ 1004
- 13 Askew G R. Site-directed point mutations in embryonic stem cells: a gene-targeting tag-and-exchange strategy. *Mol Cell Biol*, 1993, **13**: 4115~ 4124
- 14 Wu H. Double replacement: strategy for efficient introduction of subtle mutations into the murine Coll $\alpha 1$ gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 2819~ 2823
- 15 Hanks M, Wurst W, Ansor-Cartwright L *et al.* Rescue of the Err1 mutant phenotype by replacement of Err1 with Err2. *Science*, 1995, **269**: 679~ 682

Strategies of Gene Targeting in Mouse Embryonic Stem Cell. YANG Xiao, ZHANG Zhaoshan, HUANG Cuifen (*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China*).

Abstract Gene targeting is an experimental technique which could alter the genetic message of lives following the anticipated pattern through homologous recombination. Gene targeting combined with the system of the culture of the mouse embryonic stem cell facilitate introducing various mutations into living mouse, so that the expression, regulation and physiological function of higher eukaryotic genes could be studied as a whole. Recent progress in studying on gene targeting in mouse embryonic stem cell was introduced briefly.

Key words gene targeting, mouse embryonic stem cells, homologous recombination, targeting construct