

·学科进展·

# 时空基因打靶

王忠华

(第二军医大学细胞生物学教研室,上海 200433)

**[摘要]** 综述了基因打靶在对基因功能研究方法学上的进展,阐明目前已能达到在任意时刻、任意组织内剔除任意一个基因。

**[关键词]** 转基因, 基因剔除, 时空基因打靶

在机体体内,基因的表达具有时空特性,在正确的时间不同基因或被打开或被关闭表达的结果导致机体能正常的发育和生长。由于分子生物学的发展,目前已证明人类几乎任何疾病的发生、发展都与基因突变或异表达存在直接或间接的关系。基因表达“空间特异性”指同一个基因在不同的组织或器官内有不同的表达水平,有些基因只能在特定的组织中才能表达,如白蛋白只在肝细胞中表达,此也被称为基因表达的组织特异性;“时间特异性”指基因表达具有动态性,即在不同的发育阶段或不同的生理状况下同一基因有不同的表达模式,如甲胎蛋白基因只在胎儿阶段才得到表达<sup>[1]</sup>。基于基因在时间及空间上的这些表达特性,在细胞生物学水平的研究往往无法正确认识体内基因的真正功能及作用角色,所以一直以来研究者们试图努力寻找一种方法使在动物整体水平来研究和观察基因的功能。

1980年 Gordon 通过显微注射方法第一次成功得到使外源基因在动物水平产生表型的转基因小鼠。1982年 Palmiter 等将大鼠生长激素(rGH)结构基因和人生长激素(hGH)基因融合后导入小鼠受精卵原核内,获得体积大于原种系两倍的“超级小鼠(Super mice)”<sup>[2]</sup>。这些工作被认为在基因功能研究史上具有里程碑式的意义。到目前为止,一系列与多种疾病相关的动物模型得到建立。转基因动物为阐明基因功能提供了一个有力的分析系统,为以分子、细胞到个体多层次、多方位地研究分析复杂生理现象中基因的表达、调控提供了新的方法和思路。

但转基因方法同样存在对基因功能认识上一定

的局限性,具体体现在:(1)DNA的随机插入性,可造成基因组中整合位点不能清楚;(2)在宿主基因组中插入的外源目的基因的拷贝数不能明确,一系列的研究证明插入基因的拷贝数与基因表达的强弱并不存在明确的正相关关系;(3)随机插入很可能造成基因组内被插入位点基因的破坏,从而使表型分析具有一定的盲目性;(4)不同的插入位点因为所处的上下环境不同而造成目的基因在表达水平上不一致,在很多情况下插入的外源基因有可能并不被表达<sup>[3]</sup>。此外最大的一个缺陷是常规的转基因手段只能用于功能获得性研究(Gain of Function),对基因组内已有的基因则无法进行功能分析。基于DNA同源重组原理建立的基因打靶技术克服了这些障碍和缺陷,它可使染色体内的目的基因被定点敲除和定点修饰。在此基础上分子生物学前沿学科——发育生物学和神经生物学得到全面的发展。

## 1 基因 Knock-Out 技术

小鼠胚胎干细胞(Embryonic Stem Cell, ES Cell)是在1980年由 Evans 和 Kaufmann 首先分离,为从早期胚胎内细胞团中分离出来的一种多潜能细胞,可在体外培养扩增及进行遗传修饰,且仍具有分化的全能性,在重新引入着床前的胚胎内可发育成包括生殖系在内的各种组织<sup>[4]</sup>。在ES细胞水平首先获得阳性细胞克隆可大范围的减少筛选工作量。在DNA水平同源重组可造成靶基因位点三种情况的发生,分别为插入、置换或缺失,因此建立一套能有效筛选目的基因被正确敲除的选择系统显得极为重

本文于2000年12月13日收到。

要。目前在 ES 细胞水平已有多种策略来筛选靶基因被正确定点敲除的策略。

首先有人设法在构建打靶载体时把一阳性选择标记基因(通常为 neo)插入靶基因功能最关键的外显子中(插入型载体),此可破坏目的基因功能,达到靶基因被敲除的目的。重组发生可通过阳性选择标记基因来筛选,在许多研究中,也有人通常将  $\beta$ -半乳糖苷酶基因(Lac Z)以正确的读框顺序插入靶基因的外显子中,除剔除基因外通过分析  $\beta$ -半乳糖苷酶的活性可研究靶基因表达的时空顺序。但此方法的缺陷是仍不能直接区别和筛选出外源 DNA 被定点重组的细胞克隆和随机插入的细胞克隆,此外留下的选择标记、启动子或增强子等元件也可能影响临近基因的表达,并且产生的串联重复序列不稳定,有发生二次重组的可能。1988年, Mansour 等通过建立一套正负双选择标记系统来筛选基因组内同源重组正确发生的 ES 细胞克隆,该载体上除含有外源的正选择基因 neo(neomycin)外,同时也含有负选择基因元件 HSV-tk(herpes simplex virus-tk)<sup>[5]</sup>(图 1)。

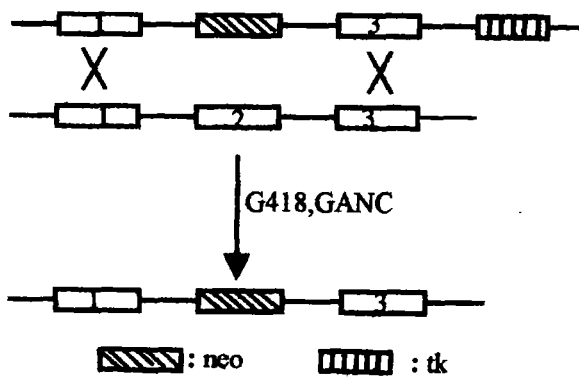


图 1 正负双选择系统

在同源重组发生时,由于 neo 基因对 G-418 具有抗性,因此可筛选出含 neo 的阳性克隆,故 neo 基因称为正选择基因;而 HSV-tk 基因由于表达的胸苷激酶可使丙氧鸟苷(ganciclovir, GCV)转变为毒性氨基酸,此使含有该基因的转染细胞死亡,因此 HSV-TK 基因称为负选择基因。同源重组发生后,因 HSV-tk 基因位于构建的打靶载体目的基因同源序列之外,所以可用 ganciclovir 来筛除载体随机整合的细胞阳性克隆。因此经过正/负双选择系统的筛选可得到同源重组已正确发生的阳性克隆<sup>[6]</sup>。但一系列的基因打靶研究显示,使用正负双选择标记载体依然会得到较多随机整合的 ES 克隆,原因可能为负选择基因可能在转染及整合过程中失活,从而导致

打靶载体随机整合的 ES 克隆得以生长,对此启动子缺失的打靶载体可进一步提高打靶载体的效率。载体中阳性选择标记基因 neo 是不带启动子的,只有发生正确的同源重组,neo 基因被精确插入靶基因启动子后,抗性基因才会表达,从而使 ES 细胞克隆在选择性药物培养基中活下来。研究者对基因剔除后是否导致无义突变(null mutation)持越加谨慎的态度,尽管通常设计的打靶策略能摧毁靶基因最重要的功能域,但只要染色体中残留任何编码序列,就可以末端删除或缺失突变的方式表现出来,有时会产生所谓的渗漏突变(leaky mutation),原因主要是由于 RNA 的异常拼接、替代或隐微启动子的应用,以及下游 AUGs 翻译位点的启动等,所以在获得基因剔除小鼠后,应在转录水平和翻译水平检测靶基因的活性,若有残余蛋白表达,则应检测靶基因蛋白的相关功能,以便对表型分析得出正确的结论,通过对渗漏突变进行严谨的分析可能得到无义突变研究所无法获得的信息<sup>[7-10]</sup>。

## 2 条件性基因打靶

常规的转基因及基因打靶技术对调控基因的表达显得束手无策,因为它们在胚胎期就已造成染色体中被修饰目的基因不可逆的变化,如失活、异表达或过表达等,因此很难将异常的表型归纳为哪一类细胞或组织,同时很难排除在成熟动物上由于发育缺陷所引起的异常表型;此外突变的机体也可能对缺失基因进行功能上的互补,此使被研究的目的基因的功能表型得不到全部体现;另外机体对产生的突变可能产生一更复杂的二级表型。基因敲除技术存在最大一个缺陷是:如果这个基因的缺失可造成胚胎致死,那么此基因在发育后期的功能将无法分析,而这些基因往往很有可能是与机体发育或各种疾病的发生极为相关,因此如能发展一套对目的基因在体内的表达进行调控的方法将显得极有价值。

以 Cre/LoxP 系统与基因打靶技术相结合的条件性基因打靶可克服上述局限性。此系统主要是应用了 Cre 酶的重组特性,它能特异性的识别和重组 DNA 上的 LoxP 序列位点。Cre 是一种来源于 P1 噬菌体系统的 DNA 酶,可特异性地重组基因组中 34bp 长的 LoxP 序列(ATAAC TTCGT ATAGC ATACA TTA-TA CGAAG TTAT)。策略第一步是构建目的基因置于两 LoxP 位点间的打靶载体,经在 ES 细胞水平的筛选,将携带该载体的小鼠与受控于组织特异性启动子或诱导性启动子的 Cre 转基因小鼠交配,经 Cre

介导的重组发生后,即可获得目的基因在某一组织器官或发育时期缺失的基因打靶小鼠。Chen 等人经一次打靶将 *fgfr3* 突变引入小鼠染色体,获得突变小鼠后再与 EII-Cre 转基因小鼠杂交,利用在生殖系细胞中表达的 Cre 重组酶活性删除 *fgfr3* 突变小鼠染色体中的两侧带 LoxP 序列的选择标记基因,获得精确模仿人侏儒症的模型小鼠。

(1)第一例应用 Cre/LoxP 重组系统成功获得组织特异性基因剔除小鼠由 Gu 等人于 1994 年首先报道<sup>[9]</sup>,构建条件剔除小鼠打靶载体时常将阳性选择标记基因置于靶基因的内含子中,并在靶基因重要功能域两侧的内含子中插入方向相同的 LoxP 序列,此外最好将标记基因的两侧也同时放上同方向的 LoxP 序列,因许多时候选择标记基因即使被放置在内含子中,也会阻断靶基因的转录,如出现这种情况,可以用表达 Cre 重组酶的质粒转染中靶 ES 细胞,在细胞水平通过 LoxP 位点间的重组将 *neo* 抗性基因删除,然后通过筛选子代小鼠即可获得只删除 *neo* 基因的条件敲除小鼠(图 2)。

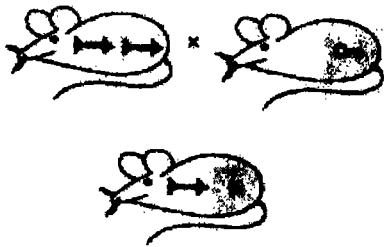


图 2 组织特异性基因打靶

为了研制组织特异性 Cre 转基因小鼠,研究人员也常将 Cre 基因与组织特异性启动子连接构建载体,再通过传统的转基因技术或基因敲入法获得相应的转基因小鼠。但许多时候,某一基因的调控元件在染色体上相距甚远,或存在于内含子中,所以应用以 ES 细胞培养技术或用同源重组为基础的基因敲入法,可将外源基因整合到特定的靶位点,利用靶位点全套的调控元件来实现靶基因的特异性表达。

Richerd 等人于 1997 年将 Cre 基因定位整合到 CD19 位点,得到 Cre 基因只在 B 淋巴细胞中表达的转基因小鼠。Cre 介导的在脑、乳腺、肠等组织器官中的组织特异性基因打靶已相继产生。已经发表和正在研究的 Cre 转基因小鼠已近百种,相关的信息可在数据库中得以查到<sup>[10]</sup>。

(2)在机体内基因的表达不仅具有组织特异性(空间特性),同时也具有时间上的动态特性,如在不

同的发育阶段或不同的生理状况下,基因的表达可有不同的程度或方式,在某一发育阶段,核内绝大多数基因是关闭表达的。为了研究在时间方式上调节基因表达的目的,研究者将 Cre 基因置于配体或药物可诱导的启动子控制下达到这种目的。该策略的关键是对 Cre 的表达进行可逆的诱导调控。Kuhn 等人在 1995 年报道了 Mx1-Cre 转基因鼠的研究<sup>[11]</sup>, Mx1 是一种与抗病毒感染相关的基因,它在健康的小鼠中不会表达,但可被重组干扰素或干扰素诱导剂 PI-PC 诱导。所以携带 MX1-Cre 的条件剔除小鼠只有在干扰素或 PI-PC 存在的条件下才导致 Cre/LoxP 介导的重组发生。此外基于四环素(tetracycline, Tet)的 Tet-off/Tet-On 系统也是新近发展起来的高效、无毒的基因诱导表达调控系统。目前除上述诱导系统外,基于蜕皮激素(ecdysone), RU486 和化学性诱导二聚体(chemical inducer of dimerization, CIDS)等新的诱导基因表达系统已显示出更加诱人的应用前景<sup>[12]</sup>,它们的推出势必拓宽对诱导调控系统的选择范围。

### 3 时空基因打靶

为了达到在时空上调节基因打靶的目的,研究者将组织特异性调控和诱导性基因打靶相结合,从而实现以时空方式对靶基因进行功能研究的目的。此策略除了应用组织特异性启动子外,对 Cre 表达达到可逆性的诱导调控也是极为关键的(图 3)。

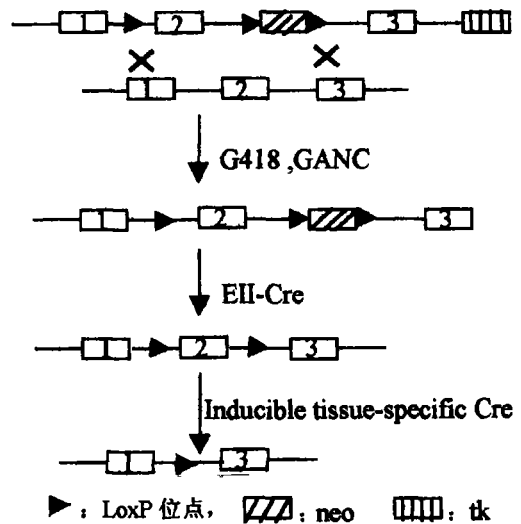


图 3 时空基因打靶

Stonge 等人将四环素阻遏蛋白(tetracycline repressor, Tet R)基因与单纯疱疹病毒(HSV)编码蛋白

P16C 端 130 个氨基酸的基因片段相融合, 构建成置于组织特异性启动子控制下并表达四环素转录激活因子 (tetracycline transcriptional activator, tTA) 的质粒<sup>[13]</sup>; 而含有四环素抗性操纵子 (tetracycline resistance Operator, Tet O) 和巨细胞病毒 CMV 启动子的四环素反应因子 (tetracycline response element, TRE) 则与被调控的目的基因 Cre 融合构建成第二个质粒。将上述构件通过转基因方法即可获得在某一特定组织器官表达 tTA 和 Cre 的转基因鼠; 然后将该鼠与携带靶载体的 LoxP 修饰小鼠交配, 所产后代若服用 Tet, 由于 Tet 与 TetR 具有高亲合性, 使 tTA 蛋白构型发生改变, 导致不能结合 TetO, 从而引起 TRE 下游 Cre 基因的转录阻断; 如在发育某一阶段停止服用 Tet, 则 tTA 可激活 TRE 表达, 引起 TRE 下游 Cre 基因在某一特异组织器官得到表达, 表达的 Cre 酶介导位点特异重组的发生, 从而达到以时空的方式实现对靶基因的表达调控。

Tet-off/Tet-On 系统是通过转录水平来试图控制 Cre 重组酶的表达, 从而实现在特定的时间段将靶基因剔除, 另一个实现时空基因打靶的策略是采用转录后水平来调节重组酶的活性。通过将 Cre 与雌激素受体 (ER) 的配体结合域的融合来控制 Cre 的功能。Feil 等人将 ER 的配体结合域与 Cre 重组酶融合产生一嵌合重组酶 (Cre-ER), 在细胞水平首先论证该酶活性依赖雌激素或 Tamoxifen 的存在, 但由于机体内源性激素的存在, 因此他们将 Cre 与突变 LBD 融合构建成嵌合体 Cre-ERt 蛋白, 该蛋白仅能与外源配体结合, 与内源激素不发生结合, 而外源配体也仅与突变的 ERt 结合, 从而使这一策略在小鼠中能够实施。Brocard 等人随后的研究结果显示在 CMV 启动子控制下表达 Cre-ERt 的转基因小鼠服用 Tamoxifen 后, 可导致 Cre 介导的重组在预定时间内的多数组织上发生, 重组效率在皮肤中达到 50%、脑中为 10%<sup>[14]</sup>。Schwenk 等通过构建置于 B 细胞特异性启动子 En/PSV40 控制下表达 Cre-ERt 蛋白的基因构件, 得到仅在 B 细胞特异性表达 Cre-ERt 蛋白的转基因小鼠, 在服用 Tamoxifen 后, 激活的 Cre 重组酶导致在预定时间和特定组织内的重组发生<sup>[15]</sup>, 这是目前第一例真正实现时空基因打靶的例子。

分子生物学最为核心的一个内容是研究基因的表达机制和调控功能, 它也使我们生命现象的认

识首次深入到揭示生命本质的深度。Cre/LoxP 系统的应用标志着基因打靶进入崭新的时代, 因为研究者终于可以如愿以偿地在不同的时相、不同的空间按预期的设计进行基因剔除, 从理论上讲, 可以在任意组织器官、任意时刻剔除任意一个靶基因。目前人类基因组计划 (Human Genomic Project, HGP) 测序工作已基本完成, 研究人员随之将面对的是周期更长、耗资更巨大的基因组后计划——功能基因组计划。此计划的中心任务是研究已知序列上一个个未知基因的功能。基因打靶作为对基因功能研究具有最直接和最有效的方法和手段, 必将在这场后基因组时代 “Gene Gold Rush” 中发挥巨大的贡献。

### 参 考 文 献

- [1] 王忠华, 胡以平. 真核生物中基因的合表达现象. 科学, 2000, 9:49.
- [2] Palmiter R D, Brinster R L. Germ line transformation of mice. *Ann Rev Genetic*, 1986, 20:465.
- [3] 王忠华, 发育分子生物学. 上海: 第二军医大学出版社, 2000, 184.
- [4] Sonano P. Gene targeting in ES cells. *Annu. Rev. Neurosci*, 1995, 18: 1.
- [5] Mansour S L, Capecchi M R. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selelable genes. *Nature*, 1988, 336:348.
- [6] 施家琦, 夏家辉. 真核生物中基因打靶的策略. 生命科学研究, 1999, 3(2):96.
- [7] 杨晓, 黄翠芬. 在小鼠中进行基因打靶的研究进展. 科学通报, 2000, 45(15):1 584.
- [8] Hasty P, Krumlauf R. Introduction of a subtle mutation into the Hox-2-6 locus in embryonic stem cells. *Nature*, 1991, 350:243.
- [9] Gu H, Orban P C. Deletion a DNA polymerase  $\beta$  gene segment in T cells using cell type-specific targeting. *Science*, 1994, 265:103.
- [10] Sikorski R et al. Transgenic on the Internet. *Nature Biotechnology*, 1997, 15:289.
- [11] Kuhn R et al. Inducible gene targeting in mice. *Science*, 1995, 269: 1 427.
- [12] Gingrich J R, Roder J. Inducible gene expression in the nervous system of transgenic mice. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1998, 21:37
- [13] Stonge et al. Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Nucleic. Acid Res.*, 1996, 24:3 875.
- [14] Brocard J et al. Spatio-temporally controlled site - specific somatic mutagenesis in the mouse. *PNAS*, 1997, 94(26):14 559.
- [15] Schwenk F et al. Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic. Acid Res.*, 1998, 26(6):1 427.

## GENE TARGETING BY TEMPORALLY AND SPATIALLY

Wang Zhonghua

(Department of Cell Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**Abstract** In this paper, the progress on gene function researching by gene targeting is reviewed. At present, biologist can knock out one gene within every tissue and every time in vivo.

**Key words** transgenic, knock out, gene targeting by temporally and spatially

·资料·信息·

## 2000 年度国家自然科学基金委员会与香港研究资助局 联合科研资助基金项目评审结果揭晓

2000 年 11 月 17 日,由祖国内地 9 名专家和香港特别行政区 9 名专家组成的国家自然科学基金委员会与香港研究资助局联合科研资助基金第二届评审委员会在香港举行。根据协商一致和公开、公正、公平的原则,在双方两轮同行专家评审的基础上,经过与会专家的复议和无记名投票表决,有 16 个项目获得本年度联合科研资助基金的资助,总金额为 500 万元人民币和 1000 万元港币。

国家自然科学基金委员会与香港研究资助局联合科研资助基金是 1998 年 11 月在北京设立的。其目的是为了进一步促进祖国内地与香港特别行政区在科学技术领域的合作,共同资助一批立足科学前沿,体现优势互补和双方共同感兴趣并具有实质性研究内容的合作项目。项目获得者将被视为国家自然科学基金项目和香港研究资助局项目的承担者。

与去年相比,今年的申请情况和资助结果有如下的变化。首先是减少了申请的盲目性,申请项目的质量有了提高。申请项目从去年的 229 项减少到今年的 149 项,而初选获得通过的项目数却从去年的 32 项增加到今年的 52 项;其次是获得批准的项目有了增加,批准率提高。获得资助的项目从去年的 14 项增加到今年的 16 项;再次是双方不再对于每一个项目都按照二比一的比例匹配经费,而是在总经费范围之内各方根据需要对于每个项目确定资助经费,双方各自投入的经费原则上用于当地的规定仍然保持不变;最后是联合资助基金项目的受理与评审时间与国家自然科学基金面上申请项目的受

理和评审时间做到了同步进行。

此次获得资助 16 个项目仍然分布在 6 个研究领域,其中新材料领域 4 项,中医中药领域 2 项,海洋与环境科学领域 3 项,生命科学领域 2 项,信息科学领域 3 项,管理科学领域 2 项,与去年相比,资助信息科学、中医中药研究和新材料研究的项目有了增加。

此次获得联合科研基金资助的单位分布是:祖国内地方面,高等学校 8 项(清华大学 2 项,北京大学、浙江大学、厦门大学、华中科技大学、南京大学和吉林大学各 1 项),中国科学院 5 项、中国医学科学院、军队院校和中央部委研究所各 1 项;香港方面,香港科技大学 5 项,香港大学 4 项,香港中文大学 3 项,香港城市大学和香港理工大学各 2 项。

在联合科研资助基金项目评审会上,双方确定,2001 年度国家自然科学基金委员会与香港研究资助局联合科研资助项目的申请、受理和评审程序仍同于 2000 年度。在 2001 年 1 月 15 日之前,合作双方的初步申请书由港方的申请者通过所在的院校向香港研究资助局提交。

双方对于这次会议取得的成果给予了积极评价。香港研究资助局主席杨纲凯教授表示,该项联合基金加强了香港特别行政区与内地的科研联系,提供渠道让两地的研究人员就共同的研究领域进行合作。

(科学基金杂志部 汤锡芳 供稿)