

基因打靶技术的研究进展

张丽娜 刘国安 杨红

(西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070)

摘要: 基因打靶技术是 20 世纪 80 年代发展起来的新技术, 是一种利用 DNA 同源重组原理和胚胎干细胞 (ES 细胞) 技术按定向组合的方式改变生物活体遗传信息的试验手段, 具有广阔的应用前景。对基因打靶技术原理、步骤、条件性基因打靶以及应用进行综述。

关键词: 基因打靶 DNA 同源重组 胚胎干细胞

The Research Progress of Gene Targeting

Zhang Lina Liu Guoan Yang Hong

(College of Life Science Northwest Normal University Lanzhou 730070)

Abstract Gene targeting is a new technique emerged from the 1980s as an experimental method based on DNA homogenous recombination theory and embryonic stem cell (ES cell) system to modify specific genes and make them express in an organism. It has been applied in some aspects and will be used widely in the future. In this paper the theory, step, application of gene targeting and conditional gene targeting were reviewed.

Key words: Gene targeting DNA homogenous recombination Embryonic stem cell

基因打靶 (gene targeting) 技术是 20 世纪 80 年代发展起来的一项重要的分子生物学技术, 是利用基因转移方法, 将外源 DNA 序列导入靶细胞后, 通过外源 DNA 序列与靶细胞内染色体上的同源 DNA 序列间的重组, 将外源 DNA 定点整合入靶细胞基因组上某一确定的位点, 或对某一预先确定的靶位点进行定点突变, 从而改变细胞遗传特性的方法^[1]。该技术具有定位性强、打靶后目的片段与染色体 DNA 共同稳定遗传的特点, 为生命科学、基因组学和疾病治疗等领域的研究提供了强有力的工具。美国科学家马里奥·卡佩基 (Mario R. Capecchi)、奥利弗·史密斯 (Oliver Smithies) 和英国科学家马丁·埃文斯 (Martin J. Evans) 因基因打靶技术的开创性研究而获得了 2007 年度诺贝尔生理或医学奖。

1 基因打靶技术的原理

基因打靶技术是在胚胎干细胞 (ES) 技术和同

源重组理论的基础之上产生和发展的。同源重组是指发生在非姐妹染色单体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。Capecchi 和 Smithies 都首先预见到新的遗传物质可以通过同源重组引入哺乳动物细胞的基因组, 并对基因进行特异性修饰和改造。Capecchi 证明同源重组可以发生在外源 DNA 和哺乳动物细胞染色体的同源序列间。他构建了一种携带有缺陷的新霉素抗性基因的细胞系, 并证明这种有缺陷的抗性基因可以通过与外源 DNA 间的同源重组得到修复^[2]。在 Capecchi 这些先驱性的工作进行同时期, Smithies 等^[3]提出了同源重组可能用于修复突变基因的概念, 并在 1985 年报道了在红白血病细胞中实现了人工打靶载体和细胞染色体上 β 球蛋白基因间的同源重组。然而这些工作都是在体外培养的细胞中进行的。要通过同源重组获得遗传修饰的动物, 还需

要另外一种重要的载体-ES细胞^[4]。

胚胎干细胞 (embryonic stem cells ES)是指当受精卵分裂发育成囊胚时内细胞团的细胞,具有向各种组织细胞分化的潜能,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,它能发育成胚胎的各种组织。1981年,Evans等^[5]和 Marin^[6]分别报道从正常的小鼠囊胚中分离了ES细胞。与大多数EC细胞不同,ES细胞具有完全正常的核型。尤其重要的是,Evans等^[7]研究小组在1984年证实通过显微注射引入囊胚的ES细胞可以分化为成体的各种组织并整合入生殖系。胚胎干细胞的分离和体外培养的成功奠定了基因打靶技术的基础。

2 基因打靶技术的基本环节

基因打靶的技术要点如下:① 基因打靶载体的构建:把目的基因和调控序列等与内源靶序列同源的序列都重组到带标记基因的载体上;② 打靶载体的导入:用电穿孔和显微注射等方法将打靶载体导入受体细胞内;③ 同源重组子的筛选:用选择性培养基筛选打靶击中的重组阳性细胞;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。

2.1 打靶载体的构建

基因打靶载体包括载体骨架、靶基因同源序列和突变序列及选择性标记基因等非同源序列。其中同源序列是同源重组效率的关键因素。试验表明,在哺乳动物细胞内,当同源序列长度在295 bp—1.8 kb之间时,重组率与同源序列长度呈正比,当同源序列长度在200 bp以下时,重组效率明显降低^[8,9]。

基因打靶载体有基因插入型载体 (gene insertion vector)和基因置换型载体 (gene replacement vector)。插入型载体中与靶基因同源的区段中含有特异的酶切位点,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酶切位点在引导序列和筛选基因外侧,线性化后,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。

近些年发展起来的基于噬菌体的大肠杆菌同源重组系统,也称为重组工程 (recombineering),可以

在线性化DNA片段和大肠杆菌染色体、BAC和PAC克隆等之间实现同源重组,该技术所需的同源序列短(40—60 bp),不需使用限制性内切酶和连接酶,为构建打靶载体提供了一个高效、精确、灵活的平台^[10,11]。例如,2007年Chan等^[12]通过改进重组工程系统的技术,在96孔板上可进行全部的操作,同时完成96个条件基因打靶载体的构建只需要2周,使大规模构建基因打靶载体成为可能。

2.2 转化受体细胞

外源DNA导入的方式主要有显微注射法、电穿孔法、精子载体法和逆转录病毒法等。目前应用最广的是显微注射法。逆转录病毒载体法利用某些病毒与组织细胞有特异的亲合力,可用于时空特异性基因打靶,在人类疾病的基因治疗方面具有较大的发展潜力^[13]。

通常情况下,遗传修饰的中靶ES细胞通过显微注射被引入受体囊胚的内细胞团中。这些ES细胞必须整合入生殖系,才能使修饰过的遗传信息传递到子代小鼠。为了快速获得基因打靶小鼠,一些研究小组采用四倍体囊胚补偿技术,通过电融合获得只能发育为胎盘组织的小鼠四倍体囊胚用于中靶ES细胞的显微注射,ES细胞在这样的环境中能利用其全能性发育为一个完整的个体,从而直接获得基因突变的杂合子小鼠^[14—16]。2007年,Poueym irou等^[17]报道了将中靶的ES细胞通过激光辅助注射到8细胞期的小鼠胚胎中,此时受体胚胎的内细胞团还没有形成,使得中靶ES细胞更具竞争力。通过这种方法获得的F₀代小鼠几乎完全由中靶ES细胞发育而来,并100%能经过生殖系将突变基因遗传到F₁代小鼠。这种改良的显微注射方法不受ES细胞品系的限制,显著提高了中靶ES细胞的整合效率,大大缩短了基因打靶小鼠研制的周期^[4]。

2.3 筛选受体细胞

由于外源基因与靶细胞DNA可发生同源重组或非同源重组,而且同源重组的发生频率较低,故必须从中筛选出被转化的靶细胞,并从中去除随机插入的细胞。这就需要在打靶载体上加入正负选择系统 (positive and negative selective system)。其原理是首先在体外构建打靶载体,然后在靶基因的同源序列之间插入新霉素抗性基因 (neo)作为正筛选的标

记,在同源序列的3'端插有不合启动子的单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV-tk)作为负选择,疱疹病毒胸苷激酶基因由邻近的新霉素抗性基因启动子调节。将打靶载体导入细胞后,因为随机整合使新霉素抗性基因与胸苷激酶基因同时整合至基因组中,胸苷激酶基因的表达产物能将致死核苷类似物9-(1,3-二羟-2-丙氧甲基)鸟嘌呤代谢成致死核苷,从而杀死随机整合细胞。而同源重组细胞由于仅有位于同源序列之间的新霉素抗性基因而整合,在药物G418和丙氧鸟苷的双重筛选下仍能存活。该系统主要是通过杀死随机整合细胞而浓缩同源重组子克隆,达到从大量随机整合的细胞中筛选到同源重组子克隆的目的^[18]。

2.4 中靶细胞的鉴定

采用特异PCR和Southern杂交等技术对所筛选克隆的基因组进行鉴定。进行PCR鉴定时,先设计一对引物,其一端以打靶细胞染色体基因组DNA的特定基因座为模板,另一端以载体上导入的外源基因为模板,对筛选细胞的染色体DNA进行特异PCR扩增,这样可保证扩增后的片段为同源重组产生的特殊片段。然后对经PCR鉴定的克隆用Southern杂交产生特殊带谱的方法来进一步确定同源重组克隆,即中靶细胞。

3 条件性基因打靶技术

条件性基因打靶(conditional gene targeting)可定义为将某个基因的修饰限制于某些特定类型的细胞或小鼠发育的某一特定阶段的一种特殊的基因打靶方法。它实际上是在常规的基因打靶的基础上,利用重组酶介导的位点特异性重组技术,在对小鼠基因修饰的时空范围上设置一个可调控的“按钮”,从而使小鼠基因组的修饰范围和时间处于一种可控状态。条件性基因打靶的基本原理是利用一种位点特异性的重组酶Cre。Cre是一种主要存在于低等生物体中,但在哺乳动物细胞中能有效的发挥作用的重组酶^[19]。这个酶的特点是可特异性识别具有34个碱基的不对称的核酸序列loxP,使得两个位于loxP之间的序列发生重组。Cre/loxP系统首先是使目的基因位于两个同向的loxP位点之间,然后在ES细胞内发生同源重组,选择性标记筛选后,将其注入胚囊中,最后再注入假孕小鼠子宫内以繁殖转

基因小鼠。这与传统的敲除技术一样,但是产生的小鼠却与正常小鼠表型一致,仅在基因组上目的基因的两端含有loxP位点。当Cre出现时,loxP位点间的目的基因被敲除。因此这个系统不但需要目的基因位于loxP位点间的转基因小鼠,还需要Cre转基因小鼠。将Cre序列的前端插入组织特异性的启动子,就使得Cre在特定的组织或细胞中表达,导致这些组织或细胞中的靶基因被敲除,而其它组织或细胞中Cre不表达,靶基因不会被改变,也就形成不同组织特异性的Cre转基因小鼠^[20,21]。因此,当目的基因位于loxP位点间的转基因小鼠与组织特异性的Cre转基因小鼠交配后,则目的基因就可在特异的组织中敲除,达到了敲除组织类型上的控制^[22]。军事医学科学院生物工程研究所的研究者在国内自主研制成功了10余种组织特异性Cre重组酶转基因小鼠以及系列组织特异性条件基因敲除小鼠,通过对突变小鼠的表型分析,系统地揭示了Smad4基因在组织器官发育和稳态维持以及相关疾病发生过程中的作用机制^[4]。

4 基因打靶技术的应用

4.1 基因功能的研究

后基因组时代的主要任务就是分析大量新基因的功能。研究者利用基因打靶技术揭示了某些基因在组织器官发育、生理过程以及疾病发生中的重要功能。例如,Lolin等^[23]敲除试验鼠体内负责编码产生S6蛋白激酶1的基因,可以起到“热量限制”的效果,试验鼠患与衰老有关疾病的情况可大大减少,其中雌性试验鼠的寿命可延长约五分之一。这一研究为开发抑制人类衰老的药物提供了思路。最近日本研究者发现,小鼠内的转录抑制因子Bmi1基因被敲除后,造血干细胞失去了多能性,只能分化成淋巴细胞。由此认为该基因是造血干细胞生成血细胞过程中的一个关键分化基因^[24]。Wu等^[25]通过同时敲除小鼠卵巢上皮中的两个抑癌基因PTEN和Apo,结果表明小鼠100%发生卵巢子宫内膜腺癌,其肿瘤的发生、发展以及转移过程均与人类疾病相似。Zhao等^[26]将mR-1-2基因靶向敲除后,可导致50%突变小鼠在分窝前死亡,研究结果揭示了该mRNA在调节心脏形态发生、电传导和细胞周期控制方面的生理功能。

4.2 建立人类疾病的动物模型

由于人类疾病动物模型对医学和生命科学的研究非常重要,而以自然或诱发发生的人类疾病模型既不能满足现代医学研究的需要,也具有很大的局限性。基于基因同源重组原理的基因打靶技术的出现,使转基因在体内的定点整合成为现实,因而产生了去除特定基因的动物模型。例如, Aaron等^[27]用基因打靶技术剔除了大鼠一个插入报告基因和两个内源基因 IgM 和 Rab38,成功培育出首只永久可遗传的基因突变大鼠,为后续开发人类疾病基因突变动物模型奠定基础。James等^[28]发现敲除一个对正常肌肉功能至关重要的肌动蛋白基因,小鼠肌肉仍然能够形成,但是肌肉细胞功能受损。在这个发现的基础上建立了目前了解甚少的人类肌肉疾病的新小鼠模型,该模型还给研究退化肌肉疾病的遗传学家一个研究人类中央核疾病的新靶标。Shapiro等^[29]通过基因打靶途径建立了肺慢性阻塞性疾病小鼠模型,为肺慢性阻塞性疾病的基因治疗提供了很好的动物模型。随后,利用基因打靶技术建立了人类癌症、心血管疾病、骨质疏松、神经退行性病、免疫缺陷等疾病小鼠模型,为疾病机理研究、新药研发和治疗方案提供了宝贵的遗传资源。

4.3 用于疾病的基因治疗

基因治疗是纠正疾病相关缺陷基因的一种技术,大多数试验性基因治疗是从正常基因替换异常的致病基因。因此通过基因敲入技术将正常基因引入病变细胞中。代替原来异常的基因或对缺陷基因进行精确改正。使修复后的细胞表达正常蛋白,不再表达错误产物,是一种理想的基因治疗策略。另外,可通过基因打靶技术敲除多余的、过量表达的、影响正常生理功能的基因,以达到治疗目的。

4.4 用于改造生物和培育新的生物品种

基因打靶技术不仅适用于动物。而且可以应用于植物,使转基因植物和生物反应器的制备更为精确。外源基因将被准确地插入受体的基因组中。定点改造原有的基因功能,使生物获得优良的性状,并避免由于外源基因在基因组中随机整合可能带来的不利影响。对动植物生殖细胞或早期胚胎干细胞的基因进行修饰改造,可以产生一些人类需要的新品种。如生长速度、喂食效率 (feed efficiency)等特性

的改造。Myostatin基因敲除小鼠比野生型小鼠具有明显多的骨骼肌^[30],双肌牛也是由于 Myostatin 基因外显子 3个碱基突变造成的。因而如果能在绵羊或猪上敲除该基因将可产生骨骼肌明显增大的品种,这将具有很高的经济价值^[31]。又如 Ralph等^[32]敲除了烟草中一种能够将尼古丁转化成去甲烟碱的基因,结果表明,遗传修饰的烟草植株中致癌物 NNN 的量减少了 6倍,并且与烟草致癌有关的亚硝胺物质减少了 50%。这一发现可能有助于发展出致癌物含量减少的烟草产品或无烟烟草产品。在中国,袁三平发明了一种利用基因打靶技术制备哺乳动物乳腺生物反应器的方法,通过该方法将医用蛋白基因加到基因打靶动物中,可以获得合成医用蛋白的基因打靶生物反应器。这将对人类的健康产生深远的意义。

5 展望

基因打靶技术自诞生以来,对生命科学和医学的研究领域产生了深远的影响。它使得科学家第一次能对关于特定基因生理功能的假设进行试验验证。基因打靶技术的应用使得研究者可以在生理状态下深入研究基因在哺乳动物胚胎发育、神经系统、心血管系统和免疫系统等复杂生物学过程和器官中的功能。现在的发展趋势是:(1)通过条件基因打靶技术在时间和空间上对基因剔除进行调控;(2)发展满足大规模基因功能研究需要的随机基因打靶技术;(3)通过定位引入技术在基因组上引入精细突变以研制精确模仿人类疾病的动物模型。

参考文献

- [1] Capecchi MR. Ahering the genome by homologous recombination. *Science* 1989, 244, 1288-1292.
- [2] Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* 1986, 44 (3), 419-428.
- [3] Smithies O, Gregg RG, Boggs SS et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature* 1985, 317, 230-234.
- [4] 滕艳, 杨晓. 基因打靶技术: 开创遗传学新纪元. *遗传*, 2007, 29 (11), 1291-1298.
- [5] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981, 292, 154-156.
- [6] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse em-

- bryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells
Proc Natl Acad Sci USA. 1981, 78, 7634-7638.
- [7] Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines Nature. 1984, 309, 255-256.
- [8] Fujitani Y, Yamamoto K, Kobayashi I. Dependence of frequency of homologous recombination on the homology length Genetics. 1995, 140, 797-809.
- [9] Liskay RM, Letsou A, Stachelek J. Homology requirement for efficient gene conversion between duplicated chromosomal sequences in mammalian cells Genetics. 1987, 115, 161-167.
- [10] Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. Mouse genomic technologies: recombineering, a powerful new tool for mouse functional genomics Nat Rev Genet. 2001, 2, 769-779.
- [11] Muylers JP, Zhang Y, Stewart AF. Techniques: Recombinogenic engineering—new options for cloning and manipulating DNA Trends Biochem Sci. 2001, 26(5), 325-331.
- [12] Chan W, Costantino N, Li R, et al. A recombineering based approach for high-throughput conditional knock-out targeting vector construction Nucleic Acids Res. 2007, 35(8), e64.
- [13] Evans MJ, Carlton MBL, Russ AP. Gene trapping and functional genomics Trends Genet. 1997, 13, 370-374.
- [14] Nagy A, Rossant J, Nagy R, et al. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells Proc Natl Acad Sci USA. 1993, 90, 8424-8428.
- [15] Eggan K, Akutsu H, Loring J, et al. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation Proc Natl Acad Sci USA. 2001, 98(11), 6209-6214.
- [16] Eakin GS, Hadjantonakis AK, Papaioannou VE, Behringer RR. Developmental potential and behavior of tetraploid cells in the mouse embryo Dev Biol. 2005, 288(1), 150-159.
- [17] Poueymirou WT, Auerbach W, Freundewey D, et al. F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses Nat Biotechnol. 2007, 25(1), 91-99.
- [18] 袁进, 顾为望. 基因打靶技术在人类疾病动物模型研究中的应用. 中国比较医学杂志, 2008, 18(1): 58-62.
- [19] Nagy A. Cre recombinase, the universal reagent for genome tailoring Genesis. 2000, 26, 99-109.
- [20] Lakso M, Santer B, Mosinger B, et al. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice Proc Natl Acad Sci USA. 1992, 89, 6232-6236.
- [21] Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, et al. Conditional gene targeting J Clin Invest. 1996, 98, 600-603.
- [22] 侯昭晖, 杨仕明, 杨伟炎. 条件基因敲除技术及应用现状. 国际遗传学杂志, 2007, 30(1): 19-24.
- [23] Selman C, Tullet JA, Wieser D, et al. Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span Science. 2009, 326(5949), 140-144.
- [24] Oguro H, Yuan J, Ichikawa H, et al. Poised lineage specification in multipotential hematopoietic stem and progenitor cells by the polycomb protein Bmi-1 Cell Stem Cell. 2010, 6(3), 279-286.
- [25] Wu R, Hendrix-Lucas N, Quick R, et al. Mouse model of human ovarian endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/beta-catenin and PI3K/Pten signaling pathways Cancer Cell. 2007, 11(4), 321-333.
- [26] Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2 Cell. 2007, 129(2), 303-317.
- [27] Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, et al. Knockout rats via embryonic injection of zinc-finger nuclease Science. 2009, 325(5939), 433.
- [28] Sonnemann KJ, Fitzsimons DP, Patel JR, et al. Cytoplasmic γ -Actin is not required for skeletal muscle development but its absence leads to a progressive myopathy Development Cell. 2006, 11(3), 387-397.
- [29] Shapiro SD. Transgenic and gene targeted mice as models for chronic obstructive pulmonary disease Eur Respir J. 2007, 29, 375-378.
- [30] McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass by a new TGF- β superfamily member Nature. 1997, 387, 83-90.
- [31] Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double muscled phenotype in cattle Nat Genet. 1997, 1, 71-74.
- [32] Lewis RS, Jack AM, Morris JW, et al. RNA interference (RNAi)-induced suppression of nicotine demethylase activity reduces levels of a key carcinogen in cured tobacco leaves Plant Biotechnology Journal. 2008, 6(4), 346-354.