

体细胞基因打靶制备动物乳腺生物反应器的策略与应用

沈 伟^{1,2} 杨正田¹ 邓继先^{1*}

(¹军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071; ²西北农林科技大学 杨凌 712100)

摘 要 在转基因动物研究中,由于基因表达调控元件的人工拼接和外源基因在动物基因组中随机整合所带来的“位置效应”,致使转基因动物外源基因的表达水平不高并且差异较大。为此,利用定位整合优势,对以基因同源重组为基础的基因打靶技术进行了大量研究。介绍了就利用体细胞基因打靶和核移植技术制备动物乳腺生物反应器的策略和应用情况做一综述,并对提高基因打靶效率的各种策略、打靶细胞的选择、转基因细胞核移植的低融合事件以及基因打靶制备乳腺生物反应器的优越性进行分析。

关键词 基因打靶 核移植 转基因动物 乳腺生物反应器

中图分类号 Q813 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2003)06-0767-04

在制备转基因动物过程中,由于基因表达调控本身的复杂性以及外源基因在动物基因组中整合的随机性,使得外源基因在宿主动物体内的表达大多停留在一个较低水平,且个体间表达水平差异很大。这主要归因于外源基因在基因组中随机整合而带来的“位置效应”。为此,国内外学者对影响外源基因在体内表达的各种调控成分进行了大量的研究。虽然大多研究证实了这些人工拼接的调控成分对外源基因的表达效率有一定的正效应,但却无法使得生物自身内源性调控元件原有功能正常体现。而外源基因在基因组中定位整合却能全面克服这一难题,于是许多学者开始利用基因打靶技术进行转基因的定位整合研究^[1-6]。随着体细胞核移植技术的逐步完善,人们已开始进行转基因克隆动物领域的技术探索。本文将对该研究领域的新进展作一综述。

1 体细胞基因打靶制备动物乳腺生物反应器的技术关键

1.1 体细胞基因打靶的技术优越性

在基因组进行外源基因多拷贝随机整合的转基因动物,其表达水平一般比内源基因低,这可能是由于染色体结构的影响和插入位点的多拷贝整合。于是人们通过研究插入位点的独立性等来解决此问题,如插入位点控制区、基质结合区和基因的共注射等,但效果并不显著。1987年,Thomas等首次报道利用基因打靶技术在ES细胞上对小鼠基因组进行遗传修饰而产生转基因小鼠以来,基因打靶技术为单拷贝基因定位整合提供了新思路^[6]。

基因打靶能对基因整合位点与整合的拷贝数进行有效的控制,在利用内源基因5'和3'侧翼序列的情况下,使单拷贝外源基因接近内源基因的表达水平,并且外源基因在不同动物体内或细胞克隆中的表达水平一致。利用ES细胞基因

打靶技术,Strah等制备了在不同位点有不同启动子调控的单拷贝转基因小鼠,发现同一启动子的转基因小鼠表达水平一致,不同启动子的小鼠表达有差异,而随机整合产生的小鼠转基因表达水平差异大^[7]。利用Cre-LoxP系统介导的位点特异性重组,Fukushige等把人 β -actin启动子调控的lacZ基因打靶到CHO细胞基因组中,结果LacZ基因被高水平表达,克隆间的差异小于10%。另外,有研究表明基因打靶允许插入的外源基因片段在1.6~5.8kb间^[8]。

由此可见,将外源基因定位整合到家畜体细胞的乳蛋白基因座制备乳腺生物反应器,能够充分利用内源乳蛋白基因固有的高效表达调控机制。这是当今乳腺生物反应器动物生产的理想模式,它在一定程度上能避开乳用家畜胚胎干细胞建系这一难题。如果能提高乳腺细胞的核移植效率,直接利用乳腺细胞进行乳蛋白基因座的基因打靶或者建立乳蛋白基因座插入LoxP位点的通用靶细胞,那么基因打靶在制备乳腺生物反应器方面将更具实际应用价值。

1.2 体细胞核移植的技术平台

哺乳动物体细胞核移植技术的快速发展为转基因动物的研究注入了新活力。利用该技术可在体外培养条件下对整合外源基因的体细胞进行大量增殖和筛选,并可以进行外源基因的表达分析,然后将整合外源基因并能高效表达的体细胞核移植,得到具有相似遗传特征的转基因动物群系。

自1997年Wilmut等^[9]获得了克隆绵羊“Dolly”以来,其它类型体细胞的克隆动物也随即产生,细胞类型有成年动物的皮肤成纤维细胞、输卵管/子宫上皮细胞、卵丘/颗粒细胞和肌肉细胞等^[10]。1997年,Schnieke等把人因子IX基因随机整合到胎儿成纤维细胞中,核移植生产了2只转基因绵羊^[11]。随后,转基因克隆牛、山羊等相继出世^[12-16]。有研究表明,虽然转基因的胎儿成纤维细胞在体外培养生存的时间有限,

但当培养至衰老时,其群体倍增的细胞数足够进行核移植。无论是利用转基因胚胎培养的体细胞系,还是用遗传改造过的成年动物的皮肤成纤维细胞等,都可以做核供体来生产转基因克隆动物,有些转基因动物所携带的外源基因还可以得到高水平表达^[17,18]。

2 体细胞基因打靶与核移植的技术难点

2.1 体细胞基因打靶现存的技术难点

一般而言,在胚胎干细胞进行基因打靶时同源重组率为 $10^{-5} \sim 10^{-7}$,而在体细胞中的打靶概率要低3个数量级,并且打靶细胞的非同源重组率又非常高,有时要比同源重组高出几个数量级^[19]。为解决这些问题,要求有很大数目的细胞克隆来筛选,这就增加了实验的难度。虽然人们可以利用正负标记选择、启动子诱捕或 Cre-LoxP 系统等方法来提高选择的准确性和效率,但这些策略在实际应用中都有一定的局限性。如:由于靶细胞和靶位点的差异导致中靶细胞富集能力差、筛选困难;在制备乳腺生物反应器时,在成纤维细胞中乳蛋白基因的打靶无法有效地使用启动子诱捕策略;以及打靶后期细胞传代困难等。

2.2 体细胞核移植现存的技术难点

由于转基因体细胞的基因组结构被进行了一定的遗传修饰并要进行多次传代,所以其核移植效率比正常体细胞要低^[20]。有研究发现,转基因后的山羊胎儿成纤维细胞体外传代10代后,重构胚融合率显著下降^[16]。Denning 等发现相当数量的中靶细胞在进行核移植前已经老化,延长培养时间与打靶后的严格筛选对细胞核移植不利^[21,22]。McCreath 等所获得体细胞基因打靶绵羊的总有效率为3.6%,Lai 等构建了338个重构胚胎仅有1只正常发育生长,总有效率为1.2%^[18]。Denning 等的研究也如此,出生的4只羊羔中生存时间最长的为12d^[21]。

转基因体细胞在体外培养时,染色体的核型可能受到外界诸多因素的影响而发生改变,但有研究认为克隆动物效率低的原因不在于基因打靶或其它形式的转基因,而主要是供核基因组的不完全重编程导致机体发育不正常。体细胞作为已经分化的细胞,它的重编程过程不仅要依次打开胚胎发育所需的相关基因,还要关闭细胞本身已经开放活化的基因。这一过程大部分要在核移植后卵裂开始前完成。由于仅用几分钟到几小时的时间完成自然受精胚大约几个月甚至更长的时间,从而造成了重编程的不完全,进而导致胚胎发育过程中基因的异常表达。一旦基因异常表达程度超过了发育中胚胎的忍受程度,胎儿就会面临死亡^[23,24]。

3 提高体细胞基因打靶效率的策略

3.1 基因打靶方式的选择

启动子诱捕法对打靶细胞的富集通常达到100~5000倍,因而无启动子载体是一种非常有效的打靶载体^[21]。但用无启动子载体打靶,靶细胞应能有效进行抗性筛选,如果利用的靶基因是乳蛋白基因,而靶细胞是成纤维细胞而非乳腺细胞,这样乳蛋白基因启动子就很难调控无启动子的标记基因表达。

通过建立在特定位点插入 LoxP 序列的通用靶细胞系,即在内部基因启动子下游先行插入一个 LoxP 位点,在二次打靶载体的外源基因两侧设计两个同向的 LoxP 位点,这样就可利用 Cre 酶将目的基因定位敲入到内部基因启动子的下游了,并且 Cre 酶介导的位点特异性重组没有插入基因长度的限制。Tuc 等证明了 Cre-LoxP 系统在小鼠 ES 细胞中参与基因敲除是有效的,并且基因组中存在的单拷贝 LoxP 位点对外源基因的表达影响不大^[25]。Andreas 等利用双置换法先把 LoxP 位点引入到 β -酪蛋白基因,然后把单拷贝的报道基因定位整合到已经存在的 LoxP 位点,从而得到位点特异性重组的 ES 细胞^[26]。由于转基因在特异类型细胞中表达需要特殊的转录调控元件,然而完整的调控元件很难获得。在这种情况下,该策略弥补了外源基因调控成分不全、排列顺序不当和位置效应等缺陷。为检测位点特异性重组所组成的内部启动子与外源基因转录表达盒构建的有效性,Klob 对打靶后的整个表达盒克隆并在细胞中进行瞬间表达,认为这种方法是有效的^[27]。

在同源重组事件中,一些基因表达水平的暂时改变可能会提高打靶效率,如:Rad52p、Rad51p、Rad53p 和 Brca1p 的表达,Ubl1p、Blmp 和 P53 的表达干扰可能会提高同源重组的效率,Mre11p/Rad50p/Nbs1p 复合物的表达干扰与 DNA 依赖性蛋白激酶途径可降低随机整合的几率^[19,28]。

3.2 基因打靶细胞的选择

先前的基因转移,其受体细胞大多是受精卵或配子,而受精卵和配子在体外操作时间是有限的,因而无法直接实现基因打靶。胚胎干细胞是一种非常适宜基因打靶的细胞,但在当前,乳用家畜胚胎干细胞建系还比较困难。体细胞核移植使基因打靶技术有了更大的应用空间,通过对打靶的体细胞进行核移植来生产转基因动物已成为现今乳腺生物反应器研制的一理想策略,但这同时也对靶受体细胞的培养传代、打靶以及核移植等环节提出了更高的技术要求。一般认为,靶受体细胞应具有高的中靶效率和核移植效率,以及体外传代次数。乳腺细胞是乳腺生物反应器研究的一理想细胞模型,它可通过乳蛋白基因启动子调控标记基因的表达直接进行中靶细胞的筛选,以便利用无启动子载体,但乳腺细胞的建系和基因打靶却很难实现^[6]。成纤维细胞在这两方面比乳腺细胞、肌肉细胞等其他类型细胞有明显优势,并且易于培养传代和核移植操作。有研究表明,传代45次的牛成纤维细胞仍能作为核供体生产克隆动物。但胎儿成纤维细胞在打靶过程中容易衰老死亡,并且打靶后得到的抗性细胞克隆容易发生形态上的分化,所以进行两轮基因打靶还是有一定困难的,虽然这些细胞在体外培养120 d后仍具有分裂增殖能力(沈伟,未发表资料)。

4 提高转基因体细胞核移植效率的方法

核受体细胞的去核是核移植过程的关键环节。现今较好的方法是利用纺锤体强的双折射性,借助偏振光显微镜寻找MII期染色体的位置,然后对卵母细胞进行无创伤去核。这一方法已有效用于小鼠、仓鼠、牛和人的卵母细胞去核^[29]。在克隆胚的重建中,通常使用电融合的方法,但由于体细胞

与卵母细胞的体积相差较大,因此用电融合重建胚胎的效率较低^[30],而用细胞质内直接注入法可以大大提高重构胚的成功率,并得到了克隆猪^[31]、克隆羊^[32]等。而原核互换法可以克服卵母细胞人工激活不完全的缺陷,利用自然激活胚的胞质驱动移入核的正常发育。Polejaeva 等利用此法得到了体细胞克隆猪^[33]。人们对克隆胚胎激活的研究思路来源于卵母细胞的激活,因而电激活便成为常用的激活方法,但简单的电激活效率较低,而与化学激活的配合利用可以提高胚胎的进一步发育。Shiga 等就是利用电脉冲和放线菌酮联合激活的方法得到了成年肌肉细胞克隆牛^[10]。另外,Wakayama 等利用 Sr^{2+} 与细胞松弛素 B 联合激活方法得到了成年体细胞克隆鼠^[34]。

由于基因打靶要求体细胞在核移植前需要多次传代,因而,保持体细胞的正常分裂增殖而不过早衰老也是转基因体细胞核移植的一个关键。端粒酶可使体外培养的细胞在增殖过程中不会因细胞的连续分裂而出现端粒的过快缩短,这也就在一定程度上防止了细胞的过快衰老和死亡^[35]。有研究报道,体外培养的成年动物成纤维细胞端粒酶活性几近消失,而胎儿成纤维细胞端粒酶活性比胚胎干细胞的高数百倍,但随着细胞传代次数的增加,它们的端粒酶活性都迅速下降,可能要降至胚胎干细胞的 0.5%,甚至更低。在这种情况下,通过在细胞培养液添加端粒酶的方式可以延长体细胞在体外的培养代数,从而为核移植提供更多的核供体细胞^[36]。另外,培养液中添加白血病抑制因子(LIF)可以明显促进细胞的分裂,而未加 LIF 的对照组细胞衰老较快(沈伟,未发表资料)。

5 进展与展望

随着对基因同源重组和细胞基因组重编程基础理论的深入研究,基因打靶和体细胞核移植技术正不断地发展和完善。到目前为止,国际上已经有数例基因打靶家畜的诞生。2000 年,McCreath 等把 BLG-AAT 基因连接体定位整合到绵羊胎儿成纤维细胞的 COL1A1 基因座上,并获得了 2 只成活的转基因克隆绵羊。AAT 在乳腺中的表达量达到 650 μ g/mL,而同期随机整合 AAT 的绵羊最高表达量为 18 μ g/mL^[17]。这初步显示了基因打靶制备乳腺生物反应器的优越性。Denning 等对原代培养的胎儿成纤维细胞进行了 GGTA1 和 PrP 基因的敲除,并通过核移植得到 PrP-/+ 绵羊 4 只,一只存活了 12 d^[21]。Lai 等^[18]和 Dai 等^[37]分别对猪的原代胎儿成纤维细胞进行了基因打靶,使 alpha-1,3-GT 位点的一个等位基因缺失,都得到了成活的克隆猪。他们成功的研究结果为规模化转基因克隆动物的研究提供了可借鉴方案,势必推动动物生物技术的快速发展。

REFERENCES(参考文献)

[1] Sedivy J M , Dutriaux A . Gene targeting and somatic cell genetics : a rebirth or coming of age ? *Trends genet* ,1999 ,**15** 88 - 90

[2] Milind S , Allan B . Genetics : targeting sheep . *Nature* , 2000 , **405** : 1004 - 1005

[3] Liao Y , Day K H , Damon D N *et al* . Endothelial cell-specific knockout of connexin 43 causes hypotension and bradycardia in mice .

Proc Natl Acad Sci USA , 2001 , **98** 9989 - 9994

[4] Melis E , Moons L , De M M *et al* . Targeted deletion of the cytosolic domain of tissue factor in mice does not affect development . *Biochem Biophys Res Commun* , 2001 , **289** (3) 580 - 586

[5] Zhao R , Fahs S A , Weiler H *et al* . An efficient method to successfully introduce transgenes into a given genomic locus in the mouse . *BMC Dev Biol* , 2001 , **1** (1) :10

[6] Clark A J , Burl S , Denning C *et al* . Gene targeting in livestock : a preview . *Transgenic Res* 2000 **9** 263 - 275

[7] Sirah K B , Elizabeth G P , Kimbergly D K *et al* . Single-copy transgenic mice with chosen-site integration . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1996 **93** 9067 - 9072

[8] Maria J , Marg E M , Christine R . Targeted transgenesis . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1996 **93** 8804 - 8808

[9] Wilmot B , Schnieke A E , McWhir J *et al* . Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells . *Nature* , 1997 **385** 810 - 813

[10] Shiga K , Fujita T , Hirose K *et al* . Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cell obtained from Japanese black bulls . *Theriogenology* , 1999 , **52** 527 - 535

[11] Schnieke A S . Human Factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts . *Science* , 1997 , **278** 2130 - 213

[12] Cibelli J B . Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts . *Science* , 1998 **280** 1256 - 1258

[13] Baguisi A , Behboodi E , Melican D T *et al* . Production of goats by somatic cell nuclear transfer . *Nature Biotech* , 1999 **17** 456 - 461

[14] Chen L H , Behboodi E , Reggio B C *et al* . Production of transgenic goats from a transfected fibroblast cell line . *Theriogenology* , 2001 , **55** 559

[15] Keefer C L , Keyston R , Iazaris A *et al* . Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cell . *Bio Reprod* , 2002 **66** (1) :199 - 203

[16] CHENG X (成勇) , WANG Y Q (王玉阁) , LUO J R (罗金平) *et al* . Cloned goats produced from the somatic cells of an adult transgenic goat . *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) , 2002 , **18** (1) :79 - 83

[17] McCreath K J , Howcroft J , Campbell K H S *et al* . Production of gene-targeting sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells . *Nature* , 2000 , **405** :1066 - 1069

[18] Lai L X , Kolber S D , Park K W *et al* . Production of alpha-1,3-GT knockout pigs by nuclear transfer cloning . *Science* 2002 **295** :1089 - 1092

[19] Karen M V , Kathleen M , Zsofia I *et al* . Manipulating the mammalian genome by homologous recombination . *Proc Natl Acad Sci USA* , 2001 **98** 8403 - 8410

[20] Campbell K H S , McWhir J , Ritchie W A *et al* . Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line . *Nature* 1996 **389** 64 - 66

[21] Denning C , Burl S , Ainsline A *et al* . Deletion of the α 1,3-galactosyl transferase(GGTA1) gene and the prion protein(PrP) gene in sheep . *Nature Biotech* , 2001 , **19** 559 - 562

[22] WANG Y Q (王玉阁) , ZOU X G (邹贤刚) , CHENG G X (成国祥) *et al* . Cloned goats(*Capra hircus*) from fetal fibroblast celllines . *Chinese Science bulletin* (科学通报) , 1999 **44** (21) 2319 - 2323

[23] Hill J R . Clinical and pathologic feature of cloned transgenic calves

- [24] Kono T. Influence of epigenetic changes during oocyte growth on nuclear reprogramming after nuclear transfer. *Reprod Fertil Dev* ,1998 , **10** :593 – 598
- [25] Tuc S O , Priscilla A F , Peter G. Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Nucleic Acids Research* , 1996 **24** (19) 3875 – 3877
- [26] Andreas F K , Ray A , Jim M *et al.* Insertion of a foreign gene into the β -casein locus by Cre-mediated site-specific recombination. *Gene* , 1999 , **227** :21 – 23
- [27] Kolb A F , Siddell S G. Genomic targeting of a bicistronic DNA fragment by Cre-mediated site-specific recombination. *Gene* , 1997 **203** : 209 – 216
- [28] Perry M K , Chris A , Brant M W *et al.* Overexpression of human RAD51 and RAD52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* , 2001 **29** (21) 4352 – 4360
- [29] Liu L , Oldenbourg R , Trimarchi J R *et al.* Reliable , noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes. *Nature Biotechnology* 2000 **18** :223 – 225
- [30] Kubota C , Yamakuchi H , Todoroki *et al.* Six cloned calves produced from adult fibroblast cell after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2000 **97** :990 – 995
- [31] Onishi A , Iwamoto M , Akita T *et al.* Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei [J]. *Science* 2000 **289** :1188 – 1190
- [32] GUO J T (郭继彤) , AN Z X (安志兴) , LI Y (李煜) *et al.* Cloned goats (*Capra hircus*) from the ear cell lines of adult goats. *Science in China (Series C)* (中国科学) , 2002 **32** (1) :77 – 83
- [33] Polejaeva I A , Chen S H , Vaught T D *et al.* Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* , 2000 **407** :86 – 90
- [34] Wakayama T , Perry A C , Zuccotti M *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* , 1998 **394** :369 – 374
- [35] Lanza R P. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 2000 **288** :665 – 669
- [36] Wyllie F S , Jones C J , Skinner J W *et al.* Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblast. *Nat Genet* , 2000 **24** :16 – 17
- [37] Dai Y , Vaught T D , Broone J *et al.* Targeting disruption of the alpha-1,3-galactosyl-transferase gene in cloned pigs. *Nature Biotech* , 2002 **20** (3) 251 – 255

Production of Mammary Gland Bioreactor by Gene Targeting of Somatic Cells

SHEN Wei^{1 2} YANG Zheng-Tian¹ DENG Ji-Xian*

¹(Institute of Biotechnology , Academy of Military Medical Science , Beijing 100071 , China)

²(Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry , Yangling 712100 , China)

Abstract Producing mammary gland bioreactor showed great advantage over many years , but the level of transgenic expression was low in transgenic animals and the diversity was more great because of the position effect of transgene and the artificial recombination of the gene elements. Gene targeting based on the principle of gene homologous recombination had been studied and applied , because the transgene could be integrated precisely in the chromosome. This review summary the current status of producing mammary gland bioreactor by the technology of gene targeting and nuclear transfer using the somatic cell lines. These aspects were discussed , including the characteristic and difficulties of gene targeting , the strategies to improve the efficiency of gene targeting , the different features of between the strategy of promoter-trap and the Cre-LoxP system , etc ; for the others , how to select the cell lines with the different strategies of gene targeting , how to raise the times of cell lines that was cultured after the gene targeting. Somatic cell nuclear transfer offers new and exciting opportunities in the areas of the gene targeting. However , the field as a whole is still difficult and complex. In this paper , we described recent advances and novel approaches , which resulted in progress during the last year. Key problems hindering further progress are addressed , for example , how to increase the efficiency of nuclear transfer. With the technology of gene targeting and nuclear transfer , it should provide a general way to produce specific genetic changes in several mammalian species. We are clearly at the dawn of a new era in mammalian genetic technology.

Key words gene targeting , nuclear transfer , transgenic animal , mammary gland bioreactor

Received : 05-26-2003

This work was supported by a grant from the State 863 High Technology R & D project of China (No.2002AA206621).

* Corresponding author. Tel 86-010-66948841 ; E-mail : shenwei427@yahoo.com.cn , dengjx@lycos.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>