

小鼠染色体工程的研究进展

王友亮 杨 晓*

(军事医学科学院生物工程研究所发育和疾病遗传学实验室,北京 100071)

摘 要 以染色体大片段的删除和重排为主要特征的小鼠染色体工程逐渐成为一种大规模研究小鼠基因功能的重要手段。这里重点介绍了小鼠染色体工程的最新研究进展。

关键词 染色体工程, 删除, 重排, Cre-loxP

中图分类号 Q813.4 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)03-0272-04

随着人类基因组计划的完成,其焦点就集中在高通量研究基因功能的技术发展上。基因打靶是在生物体整体水平上研究基因功能的一种非常有效的手段。工程化的基因片段通过基因重组,可以在哺乳动物的胚胎干细胞(ES 细胞)中造成基因中断、基因缺失或产生突变的蛋白质。修饰过的 ES 细胞经囊胚注射可产生带有突变的杂合子小鼠,如果被修饰的基因不是机体发育所必须的,就可以通过传代培养出突变的纯合子小鼠。通常的基因打靶程序,只能修饰 20kb 左右的片段^[1],但这远远小于真核生物整个基因组。有时,修饰的基因经常会产生部分缺失或带有突变的蛋白质,这些蛋白具有部分功能或其他新的功能^[2,3],达不到灭活靶基因的目的。简单的基因打靶研究过程复杂,一次只能分析一个基因,不能满足大规模基因功能研究的需要。以染色体大片段的删除和重排为主要内容的染色体工程解决了这一难题,成为分析复杂基因组的有利工具。通过染色体大片段的删除和重排产生携带特定染色体区大片缺失突变的小鼠,有助于在特定的染色体区实现系统的基因定位和功能分析。

1 放射线诱导的缺失突变

利用放射线诱导产生突变小鼠已有 60 多年的历史,通过放射线的诱导,可以产生染色体的缺失、易位、倒位、复制及基因内的点突变。利用放射线在特定的染色体上产生一系列的突变,早已成为系统研究基因组功能的一个重要手段。Russell 等在 1951 年就利用放射性射线在小鼠的 7 个非常显著的遗传标记位点产生突变,进行基因功能的研究^[4]。Yamada 等发现 γ 射线和 α 粒子在人成纤维细胞引起的突变与剂量有关,引起的突变主要是缺失突变,在 *Hprt* 位点上,最长的突变可达 2.7Mb^[5]。胚胎干细胞的成功建系和基因

打靶技术的成熟,使研究者看到了利用放射线诱导突变系统地进行基因功能研究的曙光。在 ES 细胞水平诱导产生突变,将带有突变的 ES 细胞植入小鼠的囊胚,从而产生带有突变的个体,进一步进行功能的研究,已成为功能基因组学研究的热点。为了便于筛选突变的细胞,最初,仅集中于小鼠中的几个多形态的遗传标记位点进行研究。随着研究水平的提高,现在已经能在染色体的任何一个位点进行诱导突变研究。

在小鼠基因组的任何一个位点诱导缺失突变的基本策略包括以下 3 个步骤:

1) 在靶位点上通过同源重组引入一个选择标记基因,如 *Hprt*、*HSV-tk* 等。

2) 放射处理中靶细胞,选择剂量的标准是致死剂量的 80% 如用 α 射线,剂量在 300 ~ 600rad 之间^[5,6],筛选选择标记基因丢失的细胞。

3) 分析 ES 细胞中染色体片段的缺失情况,可借助于染色体上微卫星标记或单核苷酸多态性(SNP)标记的缺失情况,推测出缺失片段的大小。

合适的 ES 细胞可直接用于囊胚注射产生嵌合体小鼠,进而分析基因的功能。Thomas J M 等用此方法在小鼠的 9 号染色体的 *Ncam* 位点,产生了一系列的缺失突变,缺失的大小大都在 3cM 以下,有的可达 35 cM,缺失图谱几乎包括了 9 号染色体的一半,为研究 9 号染色体的功能提供了很好的材料^[7]。大片段的丢失可能会对动物产生致死性,突变杂合子就有可能是致死的。通过大量不同类型的缺失突变体的比较,利用基因重叠的方法可找到某一杂合子致死的特定区域,在这样的特定区域内可能含有与动物的早期发育密切相关的基因。

收稿日期 2001-10-11,修回日期 2002-01-31。

基金项目 北京市科技项目(No. 954020600)、国家自然科学基金(No. 30070837)、国家杰出青年科学基金(No. 30025028)和军事医学科学院创新启动基金资助。

* 通讯作者。Tel: 86-10-63895937; Fax: 86-10-63833521; E-mail: yangx@nic.bmi.ac.cn

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

2 Cre-loxP 介导的染色体重组

有时,单个基因剔除突变动物的表型不易观察。可以同时删除多个基因,得到可观察的表型后,反过来研究该片段内基因的功能,这样有利于找到一些新的基因或发现一些基因的新功能。此外,染色体的重排如染色体的易位、杂合性丢失(Loss of heterozygosity, LOH),是导致胚胎发育异常及人类遗传性疾病的主要原因之一,同时,这种染色体重排也是肿瘤发生过程中重要的遗传改变。限制性的基因组删除(删除基因组的某一个大的片段或某一整个的基因簇),可以作为一个非常重要的遗传工具,建立动物疾病模型,筛选和研究特定染色体区域内具有隐性性状的突变。要实现多个基因的同时删除,传统的基因打靶无法实现,Cre-loxP 系统的应用则将其变为可能。Cre 重组酶是在噬菌体 P1 中发现的一个 38kD 的蛋白质,它能识别 34bp 的特异序列(loxP),介导两个 loxP 之间的序列发生重组,从而将两个 loxP 位点之间的序列删除,此过程不需要任何其它辅助因子的帮助^[8]。loxP 的位置和方向不同,Cre 重组酶介导重组形成的产物亦不相同,可以导致染色体的倒位、删除和易位(见图 1)。所有的过程都是可逆的,由于动力学的原因,分子内的重组频率比分子间的重组频率高。此系统最大的优点是可以实现染色体的定点操作,克服了用放射线诱导产生突变的缺点。

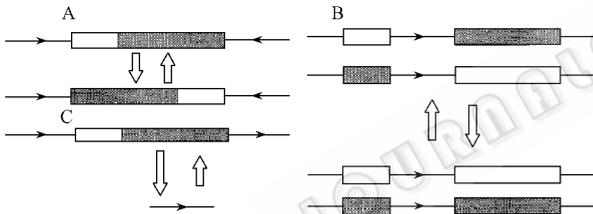


图 1 Cre-loxP 介导的位点特异性重组

Fig.1 Cre-loxP mediated site-specific recombination

A. Recombination between two loxP sites inserted into the same DNA molecule in opposite orientation leads to inversion of the intervening DNA segment. B. The two loxP sites located on separate DNA molecules, translocation can be achieved. C. Recombination between directly repeat loxP sites results in excision of the flanked DNA region

2.1 Cre-LoxP 介导的染色体内大片的删除和重排

位点特异的重组可以介导长距离的重组,这种重组已被应用于果蝇^[9]和植物^[10,11],在哺乳动物中也已取得成功^[12,13]。Li 等在 1996 年用此方法成功地将淀粉样前体蛋白基因(*APP*) 200 kb 的片段去除。他们采用两步打靶的方法,分别将两个 loxP 位点引入靶位点的上游和下游,在第一次打靶的过程中同时将 2 个选择标记基因 *neo*、*tk* 及 3' 端缺失的 *hprt* 基因和 loxP 序列引入到靶位点的上游,通过筛选得到 *neo* 抗性的阳性克隆。筛到的克隆用于进行第二次打靶,在靶位点的下游引入另一个 loxP 序列和 5' 端缺失的 *hprt* 基因(两个部分缺失的 *hprt* 基因单独没有功能,组合在一起时才具有功能),同时引入 2 个选择标记基因 *puro* 和 *tk* 基因。在两次打靶过程中 *tk* 基因可只用一次,但两次打靶的正选择

标记基因不能相同,便于筛选。中靶的阳性克隆在 Cre 重组酶的存在下发生重组,将 *tk* 基因去除,将对 FIAU 产生抗性。同时,两端部分缺失的 *hprt* 基因在染色体上重新组成有功能的 *hprt* 基因,使该克隆能在含 HAT 的培养基中存活^[12](见图 2)。具体的实施过程有两种策略:其一是通过两次打靶

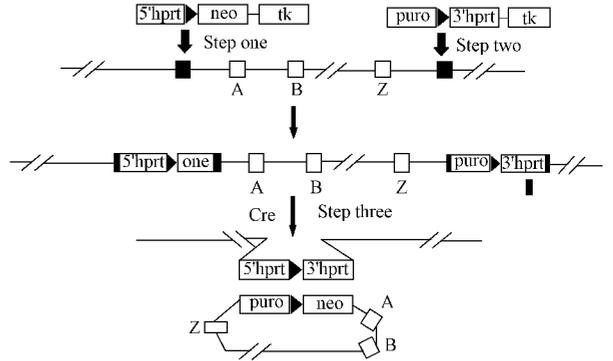


图 2 Cre-loxP 介导的染色体大片删除示意图

Fig.2 Cre-loxP associated chromosome large fragment deletions.

The black triangle represents loxP sequence, the capitalization letters represent different exons

分别将 2 个 loxP 位点引入靶位点,每次打靶都经过严格的筛选和验证,可用 PCR 和 Southern 杂交的方法进行筛选和验证。中靶的克隆转染表达 Cre 酶的质粒,去除 2 个 loxP 位点之间的序列;其二是第一次中靶的克隆直接转染第二次的打靶载体和 Cre 酶表达质粒,直接筛选最终中靶的克隆,而不用筛选和验证第二次中靶的克隆。两种方法都得到了嵌合体小鼠^[14]。Justice^[15]等用此系统研制了携带毛色基因标记的染色体大片缺失的突变小鼠。用诱变剂处理后的小鼠与特定基因组大片缺失的突变小鼠杂交,通过表型筛选可以分析单倍体区域的隐性突变,为鉴定隐性突变提供了有力工具,用此策略可以获得小鼠基因组任意靶位点的功能性信息。此后 Zheng^[16,17]等用此系统研制了带 24cM 倒位突变的小鼠,该小鼠在 11 号染色体上 *p53* 和 *Wnt3* 基因之间的倒位突变隐性致死,并带有一个显性标记 *K14 Agouti* 毛色转基因。这种倒位具有平衡染色体(Balancer chromosome)的功能,这种用毛色基因标记的倒位突变将成为对小鼠染色体组进行功能分析的重要手段。Zhu 等用 Cre-loxP 系统将位于小鼠 11 号染色体的一个长约 450kb 的片段(与人染色体 5q31 相对应)删除,因为在这个区域内无论是人还是小鼠都含有一些未知功能的基因簇。删除大片的杂合子小鼠在出生后一天就出现腹部肿胀、肝脏异常肿大的现象,进一步研究发现是甘油三酯的分泌异常所致。将其和一系列含该区片段的鼠 BAC 和人的 YAC 的转基因鼠杂交,检测转基因小鼠所表达的不同基因产物对其表型的补偿能力,发现含有 *OCTN1* 一个新发现的未知功能的基因的人 YAC 转基因鼠能补偿大片缺失后引起的异常^[18],提示该基因在维持甘油三酯正常分泌和代谢过程中具有重要的功能。

2.2 Cre-loxP 介导的姐妹染色体间的重排

哺乳动物细胞中有相当数量的基因是多拷贝的,这些多

拷贝的基因在染色体上排列在一起形成基因簇。基因簇中的基因具有相同或相似的功能。用基因打靶的方法研究这些基因的功能必须使这些基因同时产生突变。如果基因簇内的各基因的遗传距离较大,可以分别在每一个拷贝上引入突变,通过子代的杂交获得每个拷贝同时带有突变的个体。但当基因簇内的各基因间的距离很小时,染色体交换的频率非常低,无法通过子代杂交获得各拷贝同时带有突变的个体。用 Cre-loxP 系统可以实现这一目的。具体的实施战略是将两个 loxP 序列通过同源重组分别引入到两个基因中去,得到两个分别带有 loxP 序列的小鼠品系。两个品系杂交,就会得到在两条姐妹染色体上同时带有 loxP 序列的小鼠,再和表达 Cre 酶的第三个小鼠品系杂交便可获得两个拷贝同时删除的子代(图3)。Matsuoka 等将编码肾素基因簇内的两个基因 ren1 和 ren2 用此方法同时灭活获得了成功^[19]。与 Cre 介导的染色体内的位点特异重组相比,Cre 介导的染色体间的重组效率大大降低。Cre 介导的染色体内的位点特异重组在受精后很快就发生,重组的频率为 100%^[20,21]。Cre 介导的染色体间的位点特异重组的频率仅为 9.6%,但这足以满足研究的需要。

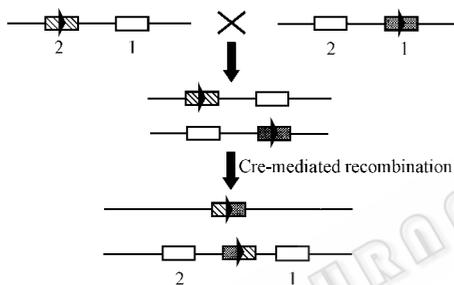


图 3 Cre 介导同源染色体间的重组

Fig.3 Cre-mediated recombination between homologous chromosomes
The black triangle represent loxP sequence, the numbers represented two genes

2.3 Cre 介导的非同源染色体间的重排

众所周知,人类的许多染色体疾病是由于染色体的易位引起的。如何建立相应的动物模型,一直是研究者努力探索的问题,Cre-loxP 系统的应用成功地解决了这一难题。将 loxP 序列分别引入到非同源染色体上,在 Cre 酶的存在下诱导非同源染色体之间的重组(图4)。van Duersen 等通过两次连续的基因打靶将两个 loxP 序列分别引入到小鼠 ES 细胞的 13 号染色体的 DEK 和 2 号染色体的 Can 基因中,两次中靶 ES 细胞转染超螺旋结构的编码 Cre 重组酶的质粒,得到了染色体易位的 ES 细胞,重组的频率为 1:1200 ~ 1:2400^[22]。非同源染色体间重组的成功,也为研究者进行动物品系的改造提供了重要的技术手段。

如果我们调节 Cre 酶表达的时空顺序,就可以获得染色体大片段在特定的组织或特定的时间删除或重排的小鼠,就可以研究基因与组织特异性疾病间的关系。

染色体大片段的删除和重排为我们通过表型分析研究基因的功能提供了一个非常有用的工具。通过小鼠染色体

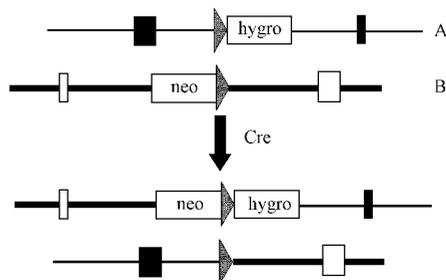


图 4 Cre 介导的非同源染色体间序列重组

Fig.4 Cre-mediated site-specific translocation between nonhomologous chromosomes

The capitalization letters represent two different nonhomologous chromosomes, the triangle represents loxP sequence

大片段的删除和重排可以产生一些人为可见的表型,建立疾病动物模型,来模拟人类的某些疾病,为肿瘤抑制基因的识别和疾病的治疗诊断找到了捷径。

REFERENCES(参考文献)

[1] Zhang H, Hasty P, Bradley A. Targeting frequency for deletion vectors in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 1994, **14** :2404 ~ 2410

[2] Li E, Bestor T H, Jaenish R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992, **69**(6): 915 ~ 926

[3] Müller U, Cristina N. Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified β -amyloid precursor protein gene. *Cell* 1994, **79**(5):755 ~ 765

[4] Russell W L. *Cold Spring Harbor Symp Quart Biol*, 1951, **16** :327 ~ 336

[5] Yamada Y, Park M S, Okinaka R T, Chen D J. Molecular analysis and comparison of radiation induced large deletions of the HPRT locus in primary Human skin fibroblasts. *Radiation Research*, 1996, **145** : 481 ~ 490

[6] You Y, Browning V L, Schimenti J C. Generation of radiation-induced deletion complexes in the mouse genome using embryonic stem cells. *Methods*, 1997, **13** :409 ~ 421

[7] Thomas J W, Lamantia C, Magnuson T. X-ray-induced mutations in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** : 1114 ~ 1119

[8] Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*, 1981, **150** : 467 ~ 486

[9] Golic K G. Site-specific recombination between homologous chromosomes in Drosophila. *Science*, 1991, **253**(5008):958 ~ 961

[10] Medberry S L, Dale E, Qin M, Ow D W. Intra-chromosomal rearrangements generated by Cre-lox site-specific recombination. *Nuclei Aci Res*, 1995, **23**(3):485 ~ 490

[11] Qin M, Bayley C, Stockton T, Ow D W. Cre recombinase-mediated site specific recombination between plant chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(5):1707 ~ 1710

[12] Ramirez-Solis R, Liu P, Bradley A. Chromosome engineering in

- [13] Lindsay E A , Vitelli F , Su H *et al.* Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* , 2001 , **410** :97-101
- [14] Li Z W , Stark G , Götz J *et al.* Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1996 , **93** :6158 ~ 6162
- [15] Justice M J , Zheng B , Woychik R P *et al.* Using targeted large deletions and high-efficiency N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis for functional analysis of the mammalian genome. *Methods* , 1997 , **13** (4) :423 ~ 436
- [16] Zheng B , Mills A A , Bradley A. A system for rapid generation of coat color-tagged knockouts and defined chromosomal rearrangements in mice. *Nucl Acids Res* , 1999 , **27** (11) :2354 ~ 2360
- [17] Zheng B , Sage M , Cai W W *et al.* Engineering a mouse balancer chromosome. *Nat Genet* , 1999 , **22** (4) :375 ~ 378
- [18] Zhu Y W , Jong M C , Frazer K A *et al.* Genomic interval engineering of mice identifies a novel modulator of triglyceride production. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2000 , **97** (3) :1137 ~ 1142
- [19] Matsusaka T , Kon V , Tayaka J *et al.* Dual renin gene targeting by Cre-mediated Interchromosomal recombination. *Genomics* , 2000 , **64** :127 ~ 131
- [20] Sakai K , Miyazaki J. A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission. *Biochem Biophys Res Commun* , 1997 , **237** :318 ~ 324
- [21] Hérault Y , Rassoulzadegan M , Cuzin F , Duboule D. Engineering chromosomes in mice through targeted meiotic recombination (TAM-RE). *Nat Genet* , 1998 , **20** :381 ~ 384
- [22] van Deursen J , Fornerod M , Van Rees B , Grosveld G. Cre-mediated site-specific translocation between nonhomologous mouse chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1995 , **92** :7376 ~ 7380.

Progresses in Mouse Chromosome Engineering

WANG You-Liang YANG Xiao*

(Genetic Laboratory of Development and Diseases , Institute of Biotechnology , Academy of Military Medical Sciences , Beijing 100071 , China)

Abstract Mouse chromosome engineering , characterized by deletion and rearrangement of large fragment of chromosome , has been an important method for studying the function of mouse genome on a large scale. The latest progress in mouse chromosome engineering was introduced.

Key words chromosome engineering , deletion , rearrangement , Cre-*loxP*

Received : 10-11-2001

This work was supported by Grants from Beijing Science Project (No. 954020600) , National High Technology Program (No. 102-08-08-02) , National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No. 30025028) and Innovation Initiation Fund of Academy of Military Medical Sciences.

* Corresponding author. Tel : 86-10-63895937 ; Fax : 86-10-63833521 ; E-mail : yangx@nic.bmi.ac.cn