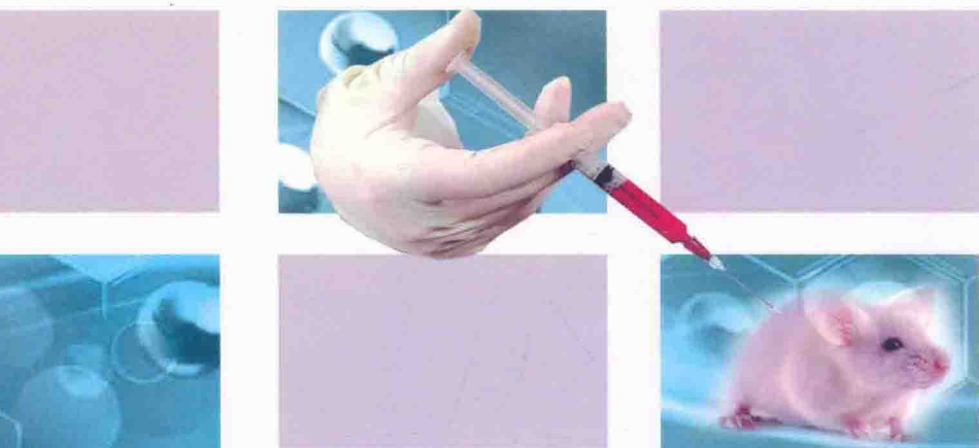


基因修饰小鼠 制备常用技术

Jiyin Xiushi Xiaoshu Zhibei Changyong Jishu

王超 主编



中國農業大學出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS

基因修饰小鼠制备 常用技术

王 超 主编

中国农业大学出版社
· 北京 ·

内 容 简 介

基因修饰小鼠是目前生物医学研究中最重要实验动物模型之一。30多年来,对基因修饰小鼠的开发和利用极大地促进了我们对哺乳动物基因功能和发育程式的研究以及对人类疾病发病机制的认识,也保障了新药的开发进程。本书系统地介绍了小鼠转基因和基因敲除的常规技术以及最新研究进展,以期使更多生物医学领域的学生和科研人员能学习和使用这些技术,并充分利用日益丰富的基因修饰小鼠资源,促进科学研究的发展。本书可供从事生物学、医学、药学和农学等学科教学、研究以及生物技术管理人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

基因修饰小鼠制备常用技术/王超主编. —北京:中国农业大学出版社,2013.12
ISBN 978-7-5655-0846-2

I. ①基… II. ①王… III. ①转基因动物-实验动物-小鼠-研究 IV. ①Q789
②Q959.837

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 262848 号

书 名 基因修饰小鼠制备常用技术

作 者 王 超 主编

策划编辑 潘晓丽

封面设计 郑 川

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路 2 号

电 话 发行部 010-62818525,8625

编辑部 010-62732617,2618

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

经 销 新华书店

印 刷 北京时代华都印刷有限公司

版 次 2013 年 12 月第 1 版 2013 年 12 月第 1 次印刷

规 格 787×980 16 开本 15.5 印张 279 千字 插页 1

定 价 30.00 元

责任编辑 冯雪梅

责任校对 王晓凤 陈 莹

邮政编码 100193

读者服务部 010-62732336

出 版 部 010-62733440

e-mail: cbsszs @ cau.edu.cn

图书如有质量问题本社发行部负责调换

编审人员

主 编 王 超

副 主 编 郭 萌 陈振文 王凤超 杜小燕

编写人员 陈振文 池亚菲 杜小燕 郭 萌 彭博雅
王 超 王凤超

主 审 张连峰

序

现代生物医学和药学研究离不开使用各种实验动物,而作为最常用的啮齿类实验动物,小鼠已被研究了 100 多年。现阶段,通过传统育种方式培育的小鼠疾病模型已远不能满足生命科学研究和药物研发的需要。随着基因组测序技术的深入发掘和一系列现代生物技术日新月异的发展,同时,为了更有效地研究单基因和(或)多基因生物学功能及其在人类疾病发生发展中所起的作用,科研人员基于基因工程和胚胎工程等手段,开发出了各种基因修饰小鼠。这些基因修饰小鼠不仅是研究人类发育生物学、遗传学、医学和药物开发不可或缺的动物模型,也为拓展基因修饰动物的物种范围做出了重要贡献,从而有力地推动了预防和治疗人类疾病的研究进程。

本书的编者中,不仅有长期从事动物生殖生物学和实验动物学科科研及教学的一线人员,也有长期从事基因修饰动物制备的技术骨干。文稿的编写着眼于方便初步学习和使用基因修饰小鼠的生物和医学本科生、研究生及相关科研人员,因此对国际上最新开发和利用的基因修饰方法和技术进行了兼收并蓄,并广泛结合了编者们的科研及教学实践经验。在内容安排上,作者充分考虑了读者的需求,重视基础知识的阐述,强调从发展的视角看待新技术用于制备基因修饰小鼠的必然性。本书在编写中力图做到语言简练,层次清楚。

编者中有多人是我的学生,看到他们将所学到的理论知识充分应用到具体的科研和教学实践中,为促进教学改革和培养合格人才努力工作,我感到很欣慰。

夏国良

2013 年 9 月

前 言

长久以来,为了揭示人类发育、疾病及衰老的奥秘,人们付出了艰辛的努力。人类基因组测序的完成为我们了解基因表达模式和基因功能打开了一扇窗,但要研究浩瀚的基因组信息,需要借助一系列的模型,尤其是实验动物模型。基因修饰动物技术是在动物整体水平上研究目的基因或基因组功能的生物技术。自 20 世纪 80 年代以来,以直接向动物胚胎转入纯化的 DNA 分子方法建立为标志,人们已通过各种途径,生产出基因修饰动物并广泛应用于生物学基础研究、药物研发、动物育种、基因产品制备及营养成分改进等领域。通过基因修饰技术制备人类疾病动物模型,不仅为研究基因功能和疾病发病机理及治疗提供了理想材料,也为现代生物医药研发创造了条件。

本书主要介绍了小鼠的基因修饰技术。在实验动物的培育和研发中,经过 100 多年的研究与积淀,虽然人们已经开发出了多种适合开展基因组改造研究的模型动物,包括线虫、斑马鱼、爪蟾以及小鼠等,但小鼠是目前公认的制备人类疾病模型及研究基因组功能最有效的疾病模型动物。首先,因为小鼠是遗传学和生物学特性研究得最清楚的哺乳类动物;其次,小鼠个体小,繁殖能力强,有利于节约研究成本;再次,小鼠基因组与人类基因组相比,不仅同源性高,基因组排列和结构相似,而且其胚胎发育过程、解剖结构、生理学、行为学和疾病发生机理等也都与人类近似;最后,小鼠是目前最常用于基因敲除和基因捕获研究的实验动物。

本书共 7 章。在介绍了基因修饰动物技术理论及最新进展的基础上,分 5 章分别阐述了制备转基因、基因敲除、条件性基因敲除、基因捕获及基因修饰动物育种新技术等内容,最后对基因修饰小鼠的育种和保种做了阐述。在编写过程中,我们参考了大量近几年来出版发行的国外优秀出版物和最新科研成果,也兼顾了国内实验室的工作经验和特点,突出了系统性、实用性和可操作性。本书可作为生物医学及相关专业科研人员基于动物模型研究基因功能的参考书。

随着生物技术的迅猛发展,基因修饰技术历久弥新,同时限于编者的理论和技术水平,因此书中出现各种纰漏和错误在所难免,恳请读者批评指正。

编 者

2013 年 7 月

目 录

第 1 章 基因修饰动物概述	1
1.1 基因修饰动物的概念	1
1.1.1 转基因动物	2
1.1.2 基因敲除	2
1.1.3 基因捕获	5
1.1.4 其他理化因素引起的基因组修饰与基因修饰的区别	5
1.2 转基因动物的命名	6
1.2.1 转基因动物	6
1.2.2 基因敲除/敲入动物	8
1.2.3 条件性敲除小鼠的命名原则	9
1.2.4 基因捕获突变动物的命名原则	9
1.2.5 对携带遗传操作实体的品系和原种的命名规则	9
1.3 基因修饰动物技术的价值	10
1.3.1 使用小鼠做基因修饰研究的原因	10
1.3.2 基因修饰动物模型与细胞模型的区别	12
1.4 基因修饰的伦理学	13
1.4.1 基因修饰对动物的危害	13
1.4.2 环境和社会安全问题	14
1.4.3 基因修饰动物涉及的伦理学问题	15
1.5 基因修饰动物制备原理	15
1.5.1 生殖生物学原理	16
1.5.2 胚胎工程技术原理	19
1.5.3 基因修饰技术原理与进展	23
1.6 基因修饰技术发展趋势	47
第 2 章 原核注射法制备转基因小鼠	50
2.1 转基因载体的构建	50
2.1.1 目的基因序列优化设计与克隆	51

2.1.2	侧翼非翻译序列(UTR)和 PolyA 信号	53
2.1.3	选择合适的启动子	54
2.1.4	目的基因的连接	58
2.1.5	质粒载体的选择	58
2.1.6	注射前质粒的酶切与纯化	59
2.2	动物的准备	60
2.2.1	动物选择	60
2.2.2	超数排卵与卵的收集	62
2.3	原核注射	64
2.3.1	显微注射工作站	64
2.3.2	显微注射前的准备	66
2.3.3	显微注射	68
2.4	胚胎移植	69
2.4.1	输卵管移植	69
2.4.2	子宫角移植	73
2.5	阳性转基因小鼠检测	74
2.5.1	染色体水平的检测	74
2.5.2	转录水平的检测	76
2.5.3	翻译水平的检测	77
2.5.4	转基因小鼠整体表型观察	78
2.5.5	常规方法简介	78
2.6	讨论	82
2.6.1	转基因的总体效率	82
2.6.2	转基因在小鼠体内的整合及表达效率分析	83
第3章	基因敲除小鼠制备	91
3.1	载体构建	91
3.1.1	载体设计原则	91
3.1.2	筛选阳性细胞克隆的策略	93
3.1.3	载体的克隆	94
3.2	胚胎干细胞	96
3.2.1	ESC 体外培养	96
3.2.2	同源重组 ESC 的鉴别	102

3.3 囊胚注射与胚胎移植	105
3.3.1 囊胚注射	105
3.3.2 胚胎移植	107
3.3.3 利用性别和毛色鉴别基因敲除鼠	108
3.4 注意事项	109
3.4.1 基因插入	109
3.4.2 基因敲除	110
3.4.3 大片段敲除	110
3.4.4 筛选基因的干扰	111
3.4.5 异常表型	111
3.4.6 遗传背景和修饰位点	111
3.4.7 基因冗余和代偿机制	112
3.4.8 补救方式	112
3.4.9 重组效率	112
3.4.10 基因敲除策略的灵活运用	112
第4章 条件性基因敲除	114
4.1 位点专一性重组酶	114
4.1.1 Cre/LoxP 系统	116
4.1.2 Flp/FRT 系统	123
4.1.3 其他重组酶	124
4.2 小鼠条件性基因敲除	125
4.2.1 条件性敲除载体的设计	125
4.2.2 条件性同源重组敲除	126
4.2.3 RNA 干扰	134
4.3 基因修饰小鼠可诱导表达系统	134
4.3.1 基于四环素依赖的调控系统	135
4.3.2 基于配体诱导重组酶系统的基因敲除	142
4.3.3 注意事项	146
第5章 基因捕获	150
5.1 基因捕获的类型及特点	150
5.1.1 基因捕获	152
5.1.2 启动子捕获	152

5.1.3	增强子捕获	154
5.1.4	PolyA 捕获	154
5.1.5	可移除式外显子捕获	156
5.1.6	定向捕获	156
5.1.7	条件性基因捕获	156
5.2	基因捕获示例	159
5.2.1	捕获策略	159
5.2.2	RT-PCR 法确认基因捕获载体的插入位点	160
5.2.3	利用 X-Gal 染色确认 ESC 中载体的插入位点	162
5.3	完成基因型鉴定	162
5.4	X-Gal 染色鉴定胚胎、组织和切片中载体表达的特征	164
5.5	讨论及注意事项	165
5.5.1	载体的导入方法	165
5.5.2	重复捕获	165
5.5.3	基因捕获表达分析	166
5.5.4	表型缺失	166
5.5.5	突变基因的克隆和序列测定	166
5.5.6	突变的适应性	167
5.5.7	注意事项	167
第 6 章	CRISPR/Cas 和 TALEN 系统敲除	169
6.1	CRISPR/Cas 技术敲除	169
6.1.1	载体设计	169
6.1.2	敲除序列连接到 pX260 或 pX330 载体	171
6.1.3	敲除序列连接到 gRNA cloning 载体(Church Lab)	173
6.1.4	体外转录嵌合 gRNA 及 Cas9 mRNA	174
6.1.5	一步法(原核注射法)实现(多)基因敲除	175
6.1.6	基因修饰检测	176
6.1.7	注意事项	177
6.2	TALEN 技术敲除	177
6.2.1	载体设计	177
6.2.2	一步法构建载体操作步骤	181
6.2.3	TALEN 的体外转录	188

6.2.4 制备基因敲除小鼠	188
6.2.5 注意事项	188
第7章 基因修饰小鼠繁育和保种	189
7.1 建立基因修饰小鼠品系	189
7.1.1 背景品系的选择	189
7.1.2 建立新品系基因修饰小鼠	190
7.2 基因修饰小鼠同类系育种策略	193
7.3 新的基因修饰品系的育种	194
7.3.1 成活率	194
7.3.2 生殖力	194
7.3.3 母性行为	194
7.3.4 寿命	194
7.3.5 基因型外显率	195
7.3.6 性连锁	195
7.4 基因修饰小鼠的表型分析	195
7.4.1 对照组选择	195
7.4.2 表型鉴定	195
7.5 福利评价	196
7.5.1 新生动物福利评价	197
7.5.2 离乳后福利评价	197
7.5.3 控制基因修饰小鼠繁殖数量的福利原则	198
7.6 影响小鼠育种的因素	200
7.6.1 垫料和产房材料	201
7.6.2 环境改善	201
7.6.3 食物供给	201
7.6.4 日常饲养	201
7.7 配子与胚胎保种	202
7.7.1 配子和胚胎冷冻	203
7.7.2 胚胎冷冻方法	205
7.7.3 精子冷冻保存方法	207
7.7.4 卵母细胞冷冻保存方法	208
7.7.5 卵巢组织冷冻保存方法	209

7.7.6	冷冻胚胎和配子的解冻	210
7.7.7	冷冻保存卵巢组织的解冻方法	212
7.8	体外受精方法	213
7.8.1	IVF 培养皿的准备	213
7.8.2	精子样品的准备	213
7.8.3	卵母细胞的收集	214
7.8.4	受精卵的洗涤和培养	214
7.8.5	讨论与注意事项	215
参考文献		217

第 1 章 基因修饰动物概述

1980 年, Gordon 等首次报道用显微注射法向小鼠胚胎注射 DNA 可以实现遗传转化, 提出了转基因动物(transgenic animal, Tg)一词, 从此开辟了基因修饰研究的先河。随后, Palmiter 等于 1982 年向小鼠转入含金属硫蛋白基因启动子与大鼠生长激素基因的 DNA 片段后, 获得了体型发生质变的“巨鼠”, 在国际上引起了轰动。基因修饰动物研究从此广受重视, 先后得到了一系列基因修饰实验动物、经济用动物和家畜等。这些动物的产生为推动科学进步和促进社会生产积累了丰富的资料。同时基因修饰动物的应用也渗透到了生物医学研究的领域, 极大地推动了生物医学的发展。

目前, 获得基因修饰动物(genetically modified animals)策略包括以下四种: ①转基因后导致产生新功能的基因组修饰(gain of function, GOF), 主要是目的基因过表达, 包括普通转基因及基因敲除策略中的基因重复; ②导致功能丢失的基因组修饰(loss of function, LOF), 主要有插入突变、大片段缺失突变、点突变及(条件性)基因缺失突变; ③导致基因替换的基因组修饰, 主要利用基因敲除技术使替换位点上的内源基因被另一个基因取代, 使得内源基因丢失的同时, 获得另外一个基因的功能, 这种策略通常比较精确, 不影响邻近基因结构; ④染色体畸变。

1.1 基因修饰动物的概念

动物基因修饰技术是基因工程(gene engineering)和胚胎工程(embryo engineering)结合的产物, 是继遗传连锁分析、体细胞遗传和 DNA 重组之后的第四代生物技术。

基因工程是 20 世纪 70 年代初诞生的生物技术, 是指采用类似工程设计的方法, 人为地在体外将核酸分子插入质粒、病毒或其他载体中, 构成遗传物质的新组合, 并将它转移到原没有这类分子的宿主细胞中扩增和表达。利用基因工程将“外源 DNA”(包括同种动物的 DNA)导入小鼠或删除小鼠内源基因, 从而产生的可遗传改变有以下几种类型: ①外源 DNA 片段至少整合或插入到一条染色体上; ②由于外源 DNA 的插入, 可能使任意某个基因结构发生改变; ③由于外源 DNA

的插入或内源基因的删除,使染色体发生重排;④有意识地导入可持久存在的遗传实体。小鼠基因组发生的这些遗传改变是区别各种基因修饰小鼠的依据。

胚胎工程是在胚胎移植(embryo transfer, ET)技术上发展起来的。胚胎移植也称受精卵移植,是指一只雌性动物(称为“供体”, donor)发情、排卵并经过配种后,在一定时间内从其生殖道(输卵管或子宫角)取出受精卵或胚胎,或者体外培养受精卵发育到囊胚期,然后把它们移植到另外一只与供体同时发情、排卵、但未经配种的雌性动物(称为“受体”, recipient)的相应部位(输卵管或子宫角)。这个来自供体的胚胎能够在受体的子宫着床,并继续生长和发育,最后产下供体的后代。即“借腹怀胎”。胚胎工程技术还包括体外受精、胚胎分割、胚胎冷冻保存、性别控制以及克隆和基因修饰技术等。

1.1.1 转基因动物

转基因动物(transgenic animal)是指通过基因工程对 DNA 进行体外操作,添加或删除一段特定(经基因工程改造或来自其他有机体)DNA 序列后导入生殖细胞、胚胎干细胞或早期胚胎中,产生遗传结构得以修饰的小鼠,这些改变的性状可以遗传给后代。其中,整合到小鼠染色体基因中的外源基因被称为转基因(transgene)。这种转移目的基因的过程称为转基因作用(transgenesis)。

转基因动物的制备综合了遗传学、分子生物学、细胞生物学、生殖生物学、发育生物学和实验动物学等学科的理论和技术。应用这个系统,可以实现对动物基因的定向改变(突变),然后在活体动物机体的不同层次(分子、细胞、组织、器官和系统)观察和研究基因表达变化和所导致的表型效应,从而对基因功能进行阐释。经过 30 多年的发展,人们对动物生殖与发育相关规律的认识逐步加深,同时对其生殖细胞以及胚胎干细胞的体外操作技术也有了质的飞跃,在基因工程和胚胎工程同步发展的推动下,促使转基因技术日趋成熟和完善。

1.1.2 基因敲除

基因敲除(gene knock-out),也称为基因打靶(gene targeting),是转染的外源 DNA 序列与细胞内的同源基因组序列间的同源重组过程。众所周知,同源重组(homologous recombination, HR)是生物界广泛存在的一种遗传信息转换方式,又称为一般性重组或非特异性重组(general recombination)。它是指发生在减数分裂或有丝分裂过程中,依赖于大范围的 DNA 同源序列间的联会,相似 DNA 序列间彼此交换遗传信息的过程,重组可以发生在联会部分的任何位置上。同源重组在进化过程中高度保守。与位点专一性重组(site-specific recombination)或转

座重组(trans-positional recombination)不同,它不需要特定的 DNA 序列,它可以发生在任何共有足够的特异性的两个序列间,即通过一对同源非姊妹染色体间的断裂而产生新的重组片段。这也是细胞内普遍存在同源重组的原因。而位点专一性重组依赖于少量 DNA 同源序列间的联会,但联会只限于某些序列,而且也只是在这些序列中发生重组,因此称为非同源重组。而转座重组则不依赖于同源序列,而与转座酶的作用直接相关。

细胞同时存在两种 DNA 损伤修复机制,且都能引起基因组 DNA 的靶向修饰。①经非同源末端连接(non-homologous end-joining, NHEJ)途径修复。该机制不使用同源模板进行修复,而是通过连接 DNA 双链断裂(DNA double strand break, DSB)末端,造成基因组 DNA 产生小片段的插入或者缺失,往往引起移码突变,导致基因的敲除。②当与靶位点基因组序列同源的供体 DNA 存在时,会通过同源重组途径修复(homology directed repair, HDR),使基因组 DNA 切割部位发生基因的替换。该机制依赖于 DNA 模板才能对 DSB 进行修复。即必须有同源序列的模板及位点专一性核酶的存在才能实现。HDR 能忠实地将供体 DNA 分子插入到靶位点。该修复可实现单个或者多个基因插入,以及单核苷酸取代。在实践操作中,两种修复途径各自所占的比重与细胞类型、细胞周期阶段以及造成细胞损伤的原因密切相关,可通过调节有关 DNA 修复的关键分子,从而在一定程度上使细胞偏向某个修复途径。

基因敲除的实质是通过同源重组,将外源基因定点整合入靶细胞基因组某一确定位点,以达到定点修饰改造染色体上某一基因的目的。通过基因敲除可以改变特定的基因组序列,分析基因的结构和功能,建立疾病动物模型,以研究人类疾病的分子机制以及遗传病的治疗等。总体可实现两种类型的遗传改变,即重新恢复遗传功能(GOF)或破坏/敲除原有遗传功能(LOF)。目前主要的敲除策略都是属于后一种类型。

1. 基因敲除

基因敲除技术是在胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)体外培养和同源重组技术基础之上产生和发展起来的,是一种定向改变细胞或生物个体遗传信息的手段。它是指通过同源重组原理将体外构建的基因敲除载体经体外转染导入 ESCs 中,最终获得含特定修饰基因型或造成特定基因功能缺陷(缺失、不表达或者不翻译)的嵌合体动物的基因操作技术。嵌合体动物自交后,即可从其后代中筛选出存在靶基因缺陷型的纯合子,即基因敲除小鼠。

基因敲除的基本策略依据载体的特性或重组后靶基因的特征,分为 2 种类型:①基因插入型(gene-insertion type):用于把某一外源基因导入染色体 DNA 的

某一个位点上,所设计的载体包括外源基因(目的基因)、同源基因臂及标记基因。载体与靶基因在同源区发生一次单位点交换后,将造成整个载体插入染色体同源区,从而使同源序列增加一个拷贝。该载体的缺点是敲除后基因组上将保留选择标记、启动子以及增强子等序列,这些序列可能会影响到邻近基因的表达。②基因置换型(gene-replacement type):发生同源重组时染色体 DNA 序列为敲除载体序列替换,使某一基因失去其生理功能。其骨架包括与靶位点两侧同源的同源序列臂、一个正选择标记基因框(位于两个同源序列臂间)以及一个和其中一侧同源臂相邻的负选择标记基因框,后者用于富集发生了同源重组的中靶细胞,同时在正选择标记基因框两侧设计两个可以重组的 LoxP 位点,就可将重组正确的 ESC 基因组中的正选择标记删除。

2. 基因敲入

基因敲入(gene knock-in, KI)是利用基因同源重组,将外源有功能基因(原基因组不存在或已失活的基因),转入细胞与基因组中的同源序列进行同源重组,插入到基因组中,在细胞内获得表达的技术。其制备方法类似于 KO 小鼠,区别在于载体的设计不同,即在一个内源基因编码区被删除的同时,在该位点插入另一个相关基因编码区。其结果是在同一个基因组中,两个相关基因的启动子分别控制着同一个基因的编码区。制备 KI 小鼠主要用于实现以下目的:①改变目的基因的功能。如为了验证某个位点的氨基酸对该蛋白的重要性,用另一个氨基酸序列替换原有序列;②改变转录效率;过表达或者低表达靶基因产物;③研究基因表达谱:构建一个荧光报告基因载体,通过其表达的产物以示踪靶基因在组织中的表达谱。

3. 基因敲减

基因沉默(gene silencing)现象被发现后,基于该原理的 RNA 干扰(RNA interfere, RNAi)技术被迅速应用于基因修饰。将体外合成的小 RNA(siRNA)转染到细胞后可诱导目的基因的瞬时沉默。同理,也可实现部分或彻底干扰动物个体中靶基因的正常表达水平。RNAi 的优点包括:①比用同源重组法更加简便,周期大大缩短。②对于一些敲除后小鼠在胚胎时就会死亡的基因,可以在体外培养的细胞中利用 RNAi 技术研究它的功能。③由于 RNAi 能高效特异地阻断基因的表达,它成为研究信号传导通路的良好工具。④RNAi 还被用来研究在发育过程中起作用的基因,如可用 RNAi 来沉默某些基因的表达,来研究他们是否在胚胎干细胞的增殖和分化过程中起着关键作用。

由于少量的双链 RNA 就能阻断基因的表达,并且这种效应可以传递到子代细胞中,所以 RNAi 的反应过程也可以用于基因敲除。近年来,越来越多的基因

敲除采用了 RNAi 这种更为简单方便的方法。

4. 敲除引入精细突变

基因敲除研究最重要的应用之一就是制备人类疾病动物模型。人类疾病的发病原因各异,有些是因为 LOF,有些是由于基因过表达或者 GOF。后者无法用基因敲除的方法获得相应的疾病模型。为此,随后又发明了各种可以将精细突变引入小鼠染色体组中的策略,从而实现模拟等位基因位点发生突变,导致基因功能发生改变的情况。

5. 条件性基因敲除

在小鼠中进行的完全基因敲除解释了许多基因在个体发育和相关疾病发生过程中的功能及其机制,但由于完全的基因敲除在生殖细胞引入了基因突变,使得在分析表型时会出现很多限制。例如:①有些重要的靶基因敲除会引起胚胎早期死亡,因而无法研究该基因在胚胎发育晚期和成年期的功能;②有些基因在不同细胞类型中执行不同功能,完全基因敲除会导致突变小鼠出现复杂表型,难以确定异常表型是由一种细胞引起或多种细胞共同引起;③利用完全基因敲除小鼠,很难对靶基因在特定细胞、特定时间内的功能进行系统的研究。

条件性(conditional)敲除/敲入/敲减是指通过基因工程手段,有条件地制备的基因修饰动物的方法。目的是使靶基因被敲除、敲入或敲减于某个特定的组织或特定的发育时期,或者其表达受某种特定外源物质的诱导和控制(如某种抗生素)。研究者对 Cre-LoxP 和 Flp-FRT 系统的广泛应用使得条件性基因敲除变为现实。至此,研究者终于可以在不同的时期、空间按照预期的设计进行基因敲除。

1.1.3 基因捕获

基因捕获(gene trapping)是一种用来分离并克隆与特定功能相关基因的方法,属于大规模随机敲除。其原理是表达载体转染 ESC 后,会随机插入细胞的基因组,根据报告基因在 ESC 及嵌合体小鼠中的表达,通过筛选内源的增强子或启动子等,从而找到内源基因。该技术是第一种介于随机突变和有明确的突变标记之间的折中方案。与基因敲除相比,基因捕获因为单次转染所得的 ESC 克隆中可用的捕获基因更多,制备更快捷。根据所捕获目的元件的差异,基因捕获可以分为多种方案,如增强子捕获(enhancer trapping, Et)、启动子捕获(promotor trapping, Pt)和基因捕获(gene trapping, Gt),等等。

1.1.4 其他理化因素引起的基因组修饰与基因修饰的区别

在实际工作中,有许多其他手段也可以导致动物的基因发生改变。但是,这