

利用四倍体胚胎补偿法制备 ES 小鼠的技术方法

TECHNIQUE OF PRODUCING MICE DERIVED FROM EMBRYONIC STEM CELLS BY TETRAPLOID EMBRYO COMPLEMENTATION

李相运^{*5} 周荣艳

(河北农业大学动物科技学院,保定 071001)5

[摘要] 目的 介绍四倍体胚胎补偿法制备 ES 小鼠技术的操作环节,加快该技术的推广应用。方法 综合分析近几年来国内外在小鼠四倍体胚胎与 ES 细胞嵌合的研究成果,并结合我们自己的实验结果,分析影响 ES 小鼠制备的各种因素。结果 四倍体胚胎不能正常发育至妊娠期末,通过四倍体胚胎与胚胎干(ES)细胞的嵌合可以得到完全由 ES 细胞发育而来的小鼠,即 ES 小鼠。同核移植小鼠相比,ES 小鼠具有正常的形态、生理和神经特征。ES 细胞和四倍体胚胎的遗传背景、ES 细胞的生长状态、嵌合方法、培养基种类、体外培养环境、移植方法、继母母性等是影响 ES 小鼠生活力的重要因素。结论 利用四倍体胚胎补偿法可以简便而快速地从遗传修饰的 ES 细胞获得突变体小鼠,为研究基因功能和构建人类疾病动物模型提供了一条有效途径。

[关键词] 胚胎干细胞;四倍体胚胎;电融合;聚合;小鼠

[中图分类号] Q1321.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 052921356(2006)067245

小鼠是最为常用的实验动物,也是主要的人类疾病模型动物,而且,小鼠胚胎干细胞(ES)的分离建系方法最为成熟。胚胎干细胞是一种高度未分化的多能性细胞,具有长期自我增殖、自我更新和多向分化的潜能,能够再生出各种功能细胞和组织器官,已成为现代生命科学领域中最前沿、最热门的研究课题。通过小鼠 ES 细胞与四倍体胚胎聚合技术可以简便而快速地从经过遗传修饰的小鼠 ES 细胞中获得完全由 ES 细胞发育而来的个体,即 ES 小鼠,为研究人类基因功能和构建疾病动物模型提供了一条有效途径。虽然制备 ES 小鼠的技术早在 1990 年就已经出现^[1],但至今为止,该技术还没有在国内和国外实验室得到普及和推广,很可能是因为这一技术涉及的操作环节较多,且每一环节的成败都直接影响着 ES 小鼠的获得。本文简要介绍四倍体胚胎补偿技术及其基本操作步骤、ES 小鼠组织嵌合度分析方法以及 ES 小鼠的应用前景,重点综述影响 ES 小鼠制备的诸多因素,如 ES 细

中,四倍体胚胎只参与胚外组织的生成^[2-3]。四倍体细胞与二倍体细胞在嵌合体小鼠组织中的严重偏离分布现象已被生物学家应用于许多实验,以挽救胚外组织的发育缺陷、划分遗传不相似组织、快速获得基因突变小鼠以及分析突变基因的表型。如果将 ES 细胞与四倍体胚胎嵌合,使二者的发育潜能互相补偿,就有可能得到完全由 ES 细胞发育而来的个体,其胚外组织则由四倍体胚胎生成,这种技术被称为四倍体胚胎补偿技术(tetraploid embryo complementation)^[4,5],所得到的小鼠称为 ES 小鼠。Nagy 等^[6]在 1993 年首次利用该技术得到了完全由 ES 细胞发育而来的 ES 小鼠。随后,Feggan 等^[5,7,8]利用杂交遗传背景的 ES 细胞高效获得有生殖能力的成年 ES 小鼠,并发现小鼠 ES 细胞遗传背景的杂合程度影响 ES 小鼠生活力的关键因素。国内,我们研究小组在 2004 年 3 月利用四倍体胚胎补偿技术也获得了 ES 小鼠^[9]。鼠中,这种技术比克隆技术效率高且更有优势,在出生重、胎

细胞的遗传背景、ES 细胞的传代次数和冷冻、ES 细胞的生长状态、四倍体胚的制作方法、四倍体胚的遗传背景、四倍体胚与 ES 细胞的嵌合方式、假孕母鼠的母性和分娩方式、聚合胚移植方式、聚合培养基等,目的在于使该技术尽快在我国得到实际应用。

11 四倍体胚胎补偿技术

在小鼠 ES 细胞与二倍体胚胎的嵌合体中,ES 细胞能参与胚体所有组织的生成;而在四倍体胚胎与二倍体胚胎的嵌合体

中,四倍体胚胎只参与胚外组织的生成^[2-3]。四倍体细胞与二倍体细胞在嵌合体小鼠组织中的严重偏离分布现象已被生物学家应用于许多实验,以挽救胚外组织的发育缺陷、划分遗传不相似组织、快速获得基因突变小鼠以及分析突变基因的表型。如果将 ES 细胞与四倍体胚胎嵌合,使二者的发育潜能互相补偿,就有可能得到完全由 ES 细胞发育而来的个体,其胚外组织则由四倍体胚胎生成,这种技术被称为四倍体胚胎补偿技术(tetraploid embryo complementation)^[4,5],所得到的小鼠称为 ES 小鼠。Nagy 等^[6]在 1993 年首次利用该技术得到了完全由 ES 细胞发育而来的 ES 小鼠。随后,Feggan 等^[5,7,8]利用杂交遗传背景的 ES 细胞高效获得有生殖能力的成年 ES 小鼠,并发现小鼠 ES 细胞遗传背景的杂合程度影响 ES 小鼠生活力的关键因素。国内,我们研究小组在 2004 年 3 月利用四倍体胚胎补偿技术也获得了 ES 小鼠^[9]。鼠中,这种技术比克隆技术效率高且更有优势,在出生重、胎

21 聚合法制备 ES 小鼠的基本步骤

21.1 2 细胞胚收集及四倍体胚的制备:雌鼠于下午 14:00 腹腔注射 PMSG 10UI(6:00~ 18:00 光照);48 h 后,腹腔注射 hCG 10 UI。以 1B1 的比例与雄鼠合笼。次日清晨检查阴道栓。见栓后第 2 d 上午 12:00,断颈处死母鼠,打开腹腔,子宫,将卵巢和输卵管一并剪下,置无菌培养皿中。从输卵管器从输卵管全部插入输卵管,冲洗输卵管并收集 2 细胞胚。在实体显微镜下剔除未受精的卵母细胞和变性胚,挑选

[收稿日期] 20050823 **[修回日期]** 20060211

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30571336)5

[作者简介] 李相运(1968),男(汉族),陕西省西安市人,博士,教授。

* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

E-mail: Lxym@hebau.edu.cn Tel: (0312)75284595

的2细胞胚置M2液中。将2细胞胚用融合液(0.3 moPL 甘露醇+ 0.1% BSA+ 0.1 moPL CaCl₂+ 0.11 mmoPL MgCl₂)洗涤3次后移入电融合槽两电极间。先用交流电场(7Vpmm, 20s)作用于胚胎,待两个分裂球的接触面与电场方向垂直时,开始电融合。融合电压100 Vpmm,脉冲时程50 Ls,脉冲次数2次,处理后的胚用M2液洗涤2次后移入KSOM液中培养,30 min后观察,弃去未融合的胚,融合胚过夜培养至4细胞阶段^[12]。

2.1.2 ES细胞团块的准备:聚合前2h更换ES细胞培养基。聚合时,挑选生长状态良好的ES细胞集落,经消化液(0.25%胰蛋白酶+0.04%EDTA)作用2~3min,DMEM(Dulbecc's Modified Eagle's Medium, Gibco)中和,然后用微管吹打成20个细胞左右的团块。

2.1.3 ES细胞团块与四倍体胚的聚合:首先将四倍体4细胞胚移入0.5%链霉蛋白酶中,37℃培养5~7min,去掉透明带。随后,在31.5 cm(NUNC)培养皿底部做6个30 L1的KSOM微滴,并用缝衣针在每个微滴底部做10个凹陷(直径0.1 mm),石蜡油覆盖,将去掉透明带的四倍体4细胞胚用M2液洗涤3次后,置1枚或2枚于培养皿底部的凹陷内。之后,再

于每个凹陷内放置一个ES细胞团块,于培养箱过夜培养至囊胚阶段。将聚合囊胚移植假孕21.5 d的小鼠两侧子官角,16 d后剖腹产或17 d后等待自然分娩。

3.1 影响制备ES小鼠的因素

3.1.1 ES细胞的遗传背景:ES细胞的遗传背景决定着获得ES小鼠的效率,杂合ES细胞比近交系来源的ES细胞更容易获得ES小鼠^[5,7]。所有来源于近交系ES细胞的ES小鼠在围产期都因呼吸衰竭而死亡,但大多数(80%~85%)来源于杂交ES细胞的ES小鼠则能健康地存活至成年,虽然也有一小部分死于呼吸衰竭。Nagy等^[6]在1993年获得了源于R1 ES细胞的ES小鼠,但效率很低,这可能是因为R1 ES细胞是来源于两个129亚系小鼠之间的杂交,其ES细胞遗传背景的杂合程度不是很大。一定水平的杂交遗传背景是维持ES小鼠出生后健康发育的重要因素。我们从未从CJ7和J1两个ES细胞系得到ES小鼠,可能就是因为它们的近交遗传背景所致。相反,从B6129SF1ES细胞却能高效获得ES小鼠,18.1%的嵌合胚胎移植后都可正常发育为ES小鼠^[9]。我们还不清楚,是什么机制导致了杂交ES细胞来源的ES小鼠比近交系ES细胞来源的ES小鼠更具生命力,虽然普遍认为可能是杂交优势在起作用,那么,这种差异的出现是需要大范围的染色体杂合态还是仅要求几个位点保持杂合态呢?要弄清楚这个问题,就必须从F1小鼠与亲本回交的囊胚中分离ES细胞,并利用同样的方法鉴定ES细胞的发育潜力。

3.1.2 ES细胞的传代次数和冷冻:ES细胞的传代次数和冷冻对ES细胞的多能性是否有影响,目前还无定论。在我们的研究中发现,ES细胞传代次数的增多以及冷冻都会显著影响获得ES小鼠的效率,ES细胞的传代次数最好控制在10代以内^[9]。因此,为了高效获得ES小鼠,每个实验室必须经常建立不同杂合遗传背景的ES细胞系,依靠购买或友人赠送ES细胞的方法是不明智的选择。再者,不同实验室培养ES细胞的环境条件不同,不同ES细胞系丧失多能性的速度也有所不同,这些因素都促使我们要自己建立大量的ES细胞系。深入研究影响ES细胞发育能力的各种因素有助于

提高获得ES小鼠的效率。

3.1.3 ES细胞的生长状态:选择优良的未分化ES细胞是制备ES小鼠的前提条件。我们挑选ES细胞团块的方法与传统方法有所不同,传统方法是先将31.5 cm培养皿的ES细胞轻度消化,然后再培养40 min,待成纤维细胞贴壁后再选择大小合适的ES细胞团块,这种方法不能有效保证所选的ES细胞团块均处于较好的未分化状态,且需要ES细胞的数量较多^[10]。而我们的改进方法是:首先在实体显微镜下挑选20个左右生长状态良好且没有任何分化迹象的ES细胞集落(边缘清楚、表面光滑、结构致密、折光性强、立体感明显),用PBS洗涤1次,消化液作用2~3min后用DMEM中和,再用微管(内径50 Lm)吹打成小团块即可。这种方法只需要少量的ES细胞,而且也不必提前准备ES细胞,还能对ES细胞进行选择。聚合法不易精确掌握ES细胞团块的大小,如果采用1枚胚与ES细胞聚合,一般要求ES细胞团块包含10~15个细胞;如果采用2枚胚与ES细胞聚合,ES细胞团块可以包含10~30个细胞,采用2枚胚聚合比采用1枚胚聚合放宽了对ES细胞数量的限定,也可以有效提高获得ES小鼠的效率,但过多的ES细胞不利于嵌合胚胎的正常发育^[6]。

3.1.4 四倍体胚的制作方法:在哺乳动物中,诱导四倍体的形成有3种基本方法,第1种方法是通过显微操作技术将1个二倍体细胞核直接注入受精卵中,效率很低,只有9%~15%的被操作胚可以存活^[2]。第2种方法是利用化学试剂抑制细胞质的分裂,但同时不影响细胞核基因组的复制。细胞松弛素B(CB)就是一种常用的细胞分裂抑制剂,将2细胞胚暴露于含CB的培养基中,就可通过抑制胚的第2次卵裂来得到四倍体胚^[13],但经CB处理后的胚不全是四倍体,其中约20%的胚是四倍体与二倍体的嵌合胚,还有很小一部分(0.1%~4%)根本没受到抑制,仍象正常胚一样分裂^[2]。此外,还有利用秋水仙素、乙醇、热休克等方法制备四倍体胚。第3种方法是将两个二倍体胚分裂球进行融合而产生四倍体胚,最初是用仙台病毒作为融合剂,后来改用聚乙二醇,但这两种方法的速度慢、效率低、重复性差、融合剂毒性大,到最后只能得到极少的四倍体胚。目前,最常用的方法是电融合法,该法已在小鼠、大鼠、兔子、牛和猪获得成功。在电融合过程中,瞬间的电脉冲在细胞膜上形成电压差,使两个紧密接触的细胞膜之间出现许多微小通道,细胞质就通过这些通道互相融合。除要求无菌和无尘环境外,影响电融合最重要的因素是胚在电场中的排列方式,只有当2细胞胚中两

个分裂球的接触面与电场方向垂直时才能获得最好的融合效果,通过施加短暂而微弱的交流电压(7Vpmm, 20s)就可快速使2细胞胚在电场中得到这种排列方式。理论上,利用单次0.3~11.5 kV/cm的直流电脉冲就可完成胚胎的电融合^[14],但我们在实验中常常利用2次短时(100 Vpmm, 50 Ls)电脉冲,融合率可达95%~100%,融合胚在KSOM中可很容易发育到囊胚阶段^[9]。在这种融合胚中是否会包含有四倍体与二倍体的嵌合胚(4nB2n)呢?据报道,物种不同,这种融合胚中包含4nB2n嵌合胚的可能性也不同,在小鼠、大鼠以及猪的电融合胚中没有发现4nB2n嵌合胚^[2],我们在大量的电融合胚移植实验中也从未得到过妊娠期末的正常鼠胎^[9],但在兔和牛中却发现少量的4nB2n嵌合胚存在^[2],造成这种物种差异的原因目前还不清楚。

315 四倍体胚的遗传背景:四倍体胚良好的体外发育能力是影响制备 ES 小鼠的关键因素,如果嵌合胚中的四倍体细胞的分裂能力很有限。那么,嵌合胚的发育能力必定会受到严重影响。不同遗传背景的四倍体胚的体外发育能力有显著差异,据说 C57BL@CBA@Rb(113)Bnr 或 C57BL@CBA@Q 杂交四倍体胚的发育能力最好;在含有 (CBA@C57BIP6)F1 遗传背景的四倍体胚中,有 11.7%~41.2% 的胚胎可以发育到妊娠的第 14~15 d^[2],而大多数近交系四倍体胚最多发育到妊娠的第 9 d^[15]。但到目前为止,除一些未公布的实验数据外,还没有相关的文献报道,若要充分估计四倍体胚的补偿作用,这方面的研究是不能忽略的,因遗传背景不同而引起的四倍体细胞发育能力的不同也是一个有意义的学术研究领域。我们可以从中了解是哪哪一个因素在调控这个发育过程。我们发现,在 KSOM 培养基中, B6D2F2 四倍体胚比 CD1 四倍体胚的发育速度快,相应地获得 ES 小鼠的效率也高^[9]。遗传背景杂合程度的大小是影响四倍体胚体外发育能力的主要因素。

316 四倍体胚与 ES 细胞的嵌合方式:小鼠 ES 细胞与四倍体胚的嵌合方法有 2 种,一是注射法,即将 ES 细胞通过显微注射技术直接注入四倍体囊胚腔,二是将 ES 细胞与四倍体胚在体外聚合共培养。自从 Nagy 等^[6]首次通过四倍体胚聚合法得到 ES 小鼠以来,很少有人再利用这种方法,而是利用四倍体囊胚注射法来得到 ES 小鼠。许多报道认为,通过囊胚注射法比聚合法能更有效地获得 ES 小鼠^[16]。这可能是因为在注射法直接将 ES 细胞注入囊胚腔,有利于 ES 细胞迅速与 ICM 整合在一起参与胚胎发育。而我们发现,利用低代 ES 细胞通过聚合法也可以高效获得 ES 小鼠,从 83 枚 B6D2F2 四倍体胚与 B6129SF1ES 细胞聚合囊胚中得到了 15 只 ES 小鼠^[9],这比 Eggan 等^[5]采用注射法的效率还高,与其他报道^[16]注射法的效率相当。通过聚合法得到的 ES 小鼠似乎更容易表现发育缺陷,这些小鼠存活至成年的几率比注射法得到的 ES 小鼠为低。如在我们得到的 45 只 ES 小鼠中,只有 22 只存活至成年,其余 23 只因各种原因而死亡,包括呼吸衰竭、腹部病变、继母拒养等原因。其中呼吸衰竭是 ES 小

鼠死亡的主要原因。ES 小鼠象克隆小鼠一样同样存在鼠胎肥大、胎盘肥大和呼吸障碍等发育缺陷^[19,17~19]。此外,在 ES 小鼠中还发现了其他几种异常现象:如在嘴唇和尾部出现血管瘤样突起物、肠状异物等,但没有发现文献报道的多趾现象^[16]。

四倍体胚在体外培养 2~3 d 后才能到达囊胚阶段,长时间的体外培养和少的细胞数目使得四倍体囊胚比正常的新鲜囊胚更加脆弱,质地更黏,从而不易进行显微注射。但注射法不必去掉胚的透明带,并且还可选择状态优良的 ES 细胞来注射,而聚合法则不行。聚合法首先要去掉胚的透明带,且体外培养时间长达 24 h,这些过程无疑会对嵌合胚的生活力产生严重影响。但在实际中,聚合法比注射法更为普遍,因为聚合法不需要昂贵的仪器设备,也不需要实验人员熟练的显微操作技能,对胚胎的发育阶段也无严格限定,且制作嵌合胚胎的速度比注射法高 5~10 倍,容易普及和推广。

317 分娩方式以及继母母性:我们发现,不论采用哪种分娩方式(自然分娩和剖腹产)都不会影响 ES 小鼠的出生成活

率^[9]。在此之前的相关研究中大多都是采用剖腹产,而不让母鼠自然分娩,是考虑到鼠胎肥大和胎盘肥大可能造成的难产现象。在我们的研究中,ES 小鼠的胎盘与正常鼠胎胎盘大小相当,不会造成难产现象。在 4 只母鼠自然分娩的 13 只 ES 小鼠中发现了 4 只死亡的鼠胎,它们的体重分别为:21.16 g、21.07 g、11.93 g、11.90 g,平均 21.02 g。这说明适度肥大鼠胎照样能自然分娩,其死亡原因并非因难产窒息所致,而是因其本身可能就存在有呼吸障碍问题,之所以这样推断,是因为在通过剖腹产所得的 32 只 ES 小鼠中也发现了 8 只因呼吸衰竭而死亡的小鼠,它们的出生重也都较大,分别为 11.76 g、11.82 g、11.84 g、11.88 g、21.03 g、21.08 g、21.18 g、21.35 g,平均 11.99 g^[9]。

在有些实验中,如果要研究 ES 小鼠的胎盘发育状况,我们就必须通过剖腹产获得 ES 小鼠,这时,选择母性良好的继母对于 ES 小鼠的存活就显得非常重要。我们发现, B6D2F1 母鼠比远交系 CD1 母鼠的母性要好。以 B6D2F1 母鼠为继母,从未出现过继母咬死新生鼠的现象,但若以 CD1 母鼠为

继母,则这种现象时有发生^[9]。

318 胚移植方式:聚合胚过夜培养至囊胚阶段后,用弯头吸管(内径 0.1 mm)从培养皿底部的凹陷内吸出,吸管内要提前吸入充足的 M2 液,这样才不致将培养液滴中的培养基吸干,注意不要用尖锐玻璃针从凹陷内挑取,因为这样做很容易将嵌合胚胎刺伤。胚取出后,在 M2 液中洗涤 2 次,并用吸管将胚均匀分散,不要让它们黏连在一起。关于嵌合胚的移植,最好是采用体重 25~30 g、假孕 21.5 d 的小鼠做双侧子宫角移植,每侧移植 8~10 枚胚,单侧子宫角移植 15 枚胚也可以,单侧移植的胚不会通过迁移运动而均匀分布于两侧子宫角。而以前有许多报道称,单侧移植的胚胎可以通过迁移运动而均匀分布于两侧子宫角。双侧移植小鼠的妊娠率比单侧移植的妊娠率稍高,但双侧移植对母鼠的损伤较大。所以,在做双侧移植时,手术切口要尽可能的小,不要在母鼠两侧腹部均开口,只在腹部中线做一个开口,然后将皮肤向两侧牵引即可。如果 21.5 d 的假孕母鼠缺乏,可以将嵌合胚胎继续培养 1 d 再做移植,或者采用假孕 0.5 d 的母鼠做输卵

管移植等方法都行,只是获得 ES 小鼠的效率可能会降低。我们将嵌合囊胚移植假孕 0.5 d 的母鼠输卵管也得到了 ES 小鼠(移植 18 d 后剖腹产;若是移植假孕 21.5 d 母鼠子宫角,在移植 16 d 后剖腹产),这一点提示我们,即使没有透明带的胚也可以经过输卵管到达子宫角附植,而以前普遍认为,输卵管移植胚必须要有透明带。我们没有观察将正常去透明带囊胚移植假孕 0.5 d 母鼠输卵管的妊娠情况,如果没有妊娠出现,那可能暗示着,嵌合囊胚和正常囊胚的质地有所不同,嵌合囊胚的表面可能含有某种物质而利于其顺利通过输卵管,还有待于进一步研究。

319 培养基:体外培养环境也非常重要,特别是胚培养基,不同遗传背景的四倍体胚在同一培养基中有显著不同的发育状况。发育速度快,包含细胞数目多的四倍体胚可以显著提高获得 ES 小鼠的效率。在 M16、CZB、KSOM、MTF、SOM 等小鼠常用培养基中,我们发现,在 KSOM 培养基中, B6D2F2 四倍体胚比 CD1 四倍体胚的发育速度快^[9]。在 KSOM 中加入 10% 的 DMEM 即可作为聚合胚胎的培养基。所有类型胚在室内操作过程中应用 M2 操作液。此外,在自行配制 KSOM5

培养基时,一定要用高质量高纯度的试剂,配制好后要置于培养箱(37℃,5% CO₂)中孵育 12 h后才可用于培养胚胎。

4l ES 小鼠的组织嵌合度分析

我们必须分析 ES 小鼠的组织嵌合度以排除四倍体成分对实验结果可能造成的干扰。利用葡萄糖磷酸异构酶(GPI)生化多态位点分析发现,绝大多数 ES 小鼠是完全由 ES 细胞发育而来的,只有极少数(小于 5%)ES 小鼠在肝、心、肺、血液等组织中发现了少量四倍体成分。在现有的小鼠品系中,GPI 位点只出现了 Gpi⁴⁵、Gpi⁶⁵、Gpi⁶³ 种等位基因 \ + [7],多态性非常有限,这在很大程度上限制了 ES 细胞的来源。同时,这种分析方法比较粗糙,只有当四倍体成分在 ES 小鼠中的嵌合度大于 4%时^[5,7],才能检测到它的存在。目前,在小鼠基因组中已公布了 6 000 多个微卫星多态位点,利用丰富的微卫星标记代替 GPI 生化标记可以更加简便而精确地分析 ES 小鼠各种组织的嵌合度。我们从 B6129SFIES 细胞系共得到了 43 只 ES 小鼠^[9],其中有 22 只存活至 6 周龄以上,具有正常的生殖能力。通过微卫星 D5Mt138 标记分析发

现^[20]:22 只小鼠中有 2 只(1 只在肺、1 只在肝和血)发现有四倍体成分,而在 16 个 ES 小鼠的胎盘中却全部发现有四倍体成分。

5l ES 小鼠的应用前景

利用 ES 小鼠技术可以快速获得多基因突变体小鼠。如果按照传统做法,将打靶的 ES 细胞注入二倍体囊胚获得嵌合体,再将嵌合体与野生型小鼠交配而得到突变体小鼠。那么,要获得多基因突变体,就必须通过各个不同基因突变体之间的多次交配来实现,这必定要耗费很长时间。然而,如果我们将多个突变基因通过连续基因打靶技术组合在同一个 ES 细胞系中,就可利用 ES 小鼠技术快速得到多基因突变体小鼠。例如,利用传统方法要得到某一突变基因的纯合体,首先由打靶 ES 细胞获得嵌合体,随后让嵌合体与野生型个体交配得到突变基因的杂合体;最后再通过杂合体之间的交配而得到纯合体。这一过程至少要经过 3 个小鼠时代,约

那么,该纯合体与打靶小鼠的交配必然会导致纯合突变等位基因的分离,这又须花时间来纯合基因。相比之下,多个突变基因可以通过连续基因打靶技术组合在同一个 ES 细胞系中,每一步仅需 2~4 周,随后将该 ES 细胞与四倍体胚胎嵌合就可很快获得多基因突变体小鼠,再者,这种技术比核移植技术更容易被掌握。

随着人类基因组图谱的完成,人类迈进了功能基因组的研究时代,各种基因功能的鉴定使得模式动物和疾病模型动物的需求量大增。基因敲除技术是研究基因功能的最有效手段。基因被部分敲除的动物,其相关的功能被功能性停

止,通过表型变化可以研究这个缺失基因的功能,从而为探索人类疾病的机理提供了证据。这为疾病的治疗带来了一个前所未有的新机会,为新药的发展带来了更广阔的前景,为未知基因功能和人类疾病发病机制的研究提供了强有力的技术手段。四倍体胚补偿技术正是目前最有潜力的建立基因敲除动物模型的手段。

参 考 文 献

- [1] Nagy A, Gocza E, Diaz EM, et al. [J]. *Development*, 1990, 110(3): 813-821.5
- [2] Eakin GS, Behringer RR. [J]. *Dev Dyn*, 2003, 228(4): 752-766.
- [3] James RM, Klerkx AH, Keighren M, et al. [J]. *Dev Biol*, 1995, 167(1): 521-526.5
- [4] Misra RP, Bronson SK, Xiao Q, et al. [J]. *EMC Biotech*, 2001, 1(1): 12-21.5
- [5] Eggen K, Akutsu H, Loring J, et al. [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(1): 6209-6214.5
- [6] Nagy A, Rossant J, Nagy R, et al. [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(18): 8424-8428.5
- [7] Schwenk F, Zevnik B, Bruning J, et al. [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(11): 3982-3989.5
- [8] Eggen K, Rode A, Jentsch I, et al. [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5): 452-459.5
- [9] Li XY, Yu YS, Wei W, et al. [J]. *Mol Reprod Dev*, 2005, 71(2): 154-158.5
- [10] Hochedlinger K, Jaenisch R. [J]. *Nature*, 2002, 415(6875): 1032-1038.
- [11] Eggen K, Baldwin K, Tackett M, et al. [J]. *Nature*, 2004, 428(6978): 544-549.5
- [12] Nagy A, Gertszenstein M, Vintersten K, et al. [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003: 352-398.5
- [13] Ueda O, Jishage K, Kamada N, et al. [J]. *Exp Anim*, 1995, 44(3): 202-210.5
- [14] Kubiak JZ, Tarkowski AK. [J]. *Exp Cell Res*, 1985, 157(2): 562-566.
- [15] Kaufman MH, Webb S. [J]. *Development*, 1990, 110(4): 1122-1132.
- [16] Wang ZQ, Kiefer F, Urbanek P, et al. [J]. *Mech Dev*, 1997, 62(2): 137-144.5
- [17] Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, et al. [J]. *Nature*, 1998, 394(6691): 3692-374.5
- [18] Wakayama T, Rodriguez I, Perry AC, et al. [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(21): 14984-14989.5
- [19] Wakayama T, Yanagimachi R. [J]. *Nature Genet*, 1999, 22(2): 122-128.5
- [20] Dietrich W, Katz H, Lincoln SE, et al. [J]. *Genetics*, 1992, 131(2): 422-447.5

(编辑 郭崇洁)