

专题介绍

小鼠基因功能研究及疾病模型系列专题(一)

高翔*

(南京大学模式动物研究所, 南京 210061)

小鼠是验证基因的在体功能的重要实验动物,也是建立疾病模型的重要试验对象,而基因组改造及表型分析则是这一实验系统中最核心的技术。本系列专题的目的,就是要帮助刚刚开始利用小鼠做为实验对象的科学家或研究生掌握最基本的小鼠研究相关知识,特别是基因组改造等基本技术的常识。这些专题将主要考虑到实用的原则,因此可能牺牲了相关知识的完备性,同时对文献的引用也不完整。如读者希望更深入的了解相关技术及文献,可以查阅 Lee Siver 编写的 *Mouse Genetics* 及 Virginia Papaioannou 和 Richard Behringer 编写的 *Mouse Phenotypes: A Handbook of Mutation Analysis*。

1 不同的小鼠品系及遗传背景

做为一个不同层次的研究系统,小鼠可以类比为分子生物学实验中的质粒和细胞生物学实验中的细胞系。小鼠亦有许多不同的品系,不同性质的实验可能必须在合适的小鼠品系上进行才能得到最佳结果。小鼠品系可以基本分为两大类。一类是近交系,也就是所谓“纯系”,理论上同一个近交系内的小鼠有完全相同的基因组序列,所以没有个体遗传背景的差别;另一类是远交群,相同远交群品系的小鼠个体之前存在着一定程度的遗传多样性,而这种遗传多样性的维持是通过大种群及特殊的配对交配系统实现的。因此,个体实验室在利用远交群小鼠做实验时,应该购买商业化公司或国家中心的小鼠,而不可以用自己繁殖的小鼠。常用的远交群小鼠品系有 CD-1 (又称 ICR) 和昆明种小鼠等。

近交系小鼠的遗传一致性保证了实验结果的个体误差较小,因此绝大多数基因功能研究的实验选用近交系小鼠。主要的近交系小鼠品系有 C57BL/6J、C3H、Balb/c、129 和 FVB 等。由于特定的疾病模型有时必须在特定的近交系背景上才能表现出来,因此选用不同的近交系必须参照文献严格执行,如换用了其他近交系,很可能得不到预期的效果。例如,db/db 小鼠携带有 *Leptin* 基因的突变,从而表现出 II 型糖尿病的症状,通常用的 db/db 小鼠有两种遗传背景选择。一种是 C57BL/6J (简称 B6),一种是 C57BLKS/J。两种背景的小鼠虽然都在 4 周开始出现高血糖和高胰岛素,但 B6 背景的突变小鼠会随后产生胰岛 β 细

胞的代偿性增生,提高了胰岛素水平,从而导致 3~4 个月龄后小鼠血糖恢复正常。而在 C57BLKS/J 背景下,小鼠的高血糖表型不能恢复,所以在检测降血糖药物时,使用 C57BLKS/J 背景的 db/db 更为合适。

在我们建立转基因小鼠和基因剔除小鼠时,最初的遗传背景常常和我们最终使用的遗传背景不一致,或者最初的遗传背景不是近交系的背景,而是杂合的背景,这时我们有时必须通过回交的办法来建立相对纯合的遗传背景。例如,最早建立的小鼠胚胎干细胞是 129 背景的,因此利用这些 ES 细胞建立的基因剔除小鼠也是在 129SV 的背景上。由于 129 小鼠的繁殖非常困难,所以在大多数实验室我们用 B6 品系小鼠来繁育这些基因剔除小鼠,导致了得到的小鼠同时有来自 129 和 B6 两种不同的染色体片段,这种被称做为杂合背景。由于不同遗传背景的表型本身存在差异,因此杂合背景给特定研究带来很大的个体差异。这种差异对于行为学检测尤其明显。以疼痛为例,B6 小鼠对热的敏感性和 129 相比要超过两倍,而对咖啡因的敏感性则比 129 要差近 3 倍。因此,如果科学家研究特定基因对痛觉的敏感性的作用,那么最好要将基因剔除小鼠的遗传背景固定到特定品系上才能获得精确的数据。

遗传背景的纯化通常是通过回交 5~10 代实现的。拿到一个杂合品系的小鼠后,我们可以首先将杂合品系的雌性小鼠和近交系(以 B6 品系为例)的雄

* 通讯作者。Tel: 025-58641532, E-mail: gaoliang@nju.edu.cn

鼠交配,这样得到的F1代雄性小鼠的Y染色体是来自B6的,而其余常染色体有一半来自于B6。第二步是将F1代的雄鼠和B6雌鼠再回交,这样得到的后代雄性小鼠(N2代)所有性染色体(X和Y)均来自B6,而其余常染色体理论上B6占75%。以此类推,在N4代之后,B6成分将达到96%以上。用N4代以上的回交小鼠做实验,目前是许多实验室的共识,不少高质量的杂志也已经开始要求提交论文的相关数据必须来自于N4或N5以上的小鼠。

2 选用转基因小鼠还是基因剔除小鼠?

由于现有的小鼠近交系系大多数起源于有限的一些野生小家鼠,因而其遗传多样性有限,这大大限制了利用正向遗传学进行小鼠突变位点的精细定位。因此,在本专题中我们将主要讨论反向遗传学技术,特别是小鼠的基因剔除技术和转基因技术及其应用。

通常情况下,当我们对特定基因的细胞水平功能翻译产物的结构和生物化学组织表达谱进行了系列分析后,会考虑应用小鼠为模型对该基因的整体水平功能进行研究。首先要做的事是对其在体功能的预测。例如,如果我们观察到某一基因在肿瘤细胞中表达被抑制或产生突变,而细胞学分析表明该基因的表达明显抑制肿瘤生长,这时我们怀疑该基因可能是作为肿瘤抑制基因而发挥作用。通过表达谱分析,如果我们发现该基因只在特定组织和器官表现(如乳腺),可以猜测该基因可能只对乳腺癌可能有抑制作用。由于肿瘤生长是异常表型,不生长肿瘤为正常对照,我们推测该基因的基因剔除小鼠可能诱导乳腺癌的发生,而过表达该基因的转基因小鼠可能并不会产生明显表型。因此,针对这一基因,建立基因剔除小鼠可能更能反映基因功能。

反之,如果我们观察到特定基因在肿瘤细胞中过度表达,而在肿瘤细胞中抑制该基因表达(通过RNAi技术等)抑制肿瘤细胞的生产 and 转移。这时我们预测该基因为癌基因或原癌基因。这时我们同样要考虑组织特异性问题,因为该基因可能只影响特定组织

细胞的癌变。在这种情况下,如果我们关心的是该基因在肿瘤发生中的功能,转基因技术可能是更合适的选择。如果不出所料,在相关组织中过表达该基因可能诱导肿瘤生成中的功能。

如果我们一定要对原癌基因进行基因剔除,我们可能观察到什么现象或表型?许多原癌基因在维护正常组织功能,特别是正常的胚胎发育功能中起重要作用。如Notch、Wnt和TGF β 信号转导途径中的关键因子对肿瘤发展有重要影响,但它们的基因剔除小鼠常常表现出胚胎发育异常。在正常的胚胎发育过程中,这些因子的时空表达受到严格的调控,因此并不会直接诱发肿瘤。

必须强调的是,转基因小鼠或基因剔除小鼠并不一定出现预期的表型,整体动物的研究远比分子水平或细胞水平的研究要复杂的多。例如,肿瘤抑制基因的基因剔除小鼠可能表型并不明显,其原因也许在于体内存在功能类似的同源基因代替了原基因的功能。这样,有时必须将数个同源基因同时剔除才能看到预期的表型。另一种可能是该基因的功能只能在特殊环境下(如应激和DNA损伤等)才能表现出来。因此必须将该小鼠置于这样的环境条件下才能看到表型。当然,最糟糕的情况是,我们只是做了错误的预测:因为基因的整体功能的确不是从分子和细胞实验的结果做简单推论就能预测的。

当预测结果和实验结果不一样时,最主要的可能性是基因的多功能性能导致的胚胎期致死表型。例如,我们从体外实验中提示特定基因功能可能和学习记忆障碍相关,可没想到该基因同时影响胎盘的发育异常而导致基因剔除小鼠死于胚胎期9~10天,因此我们完全不可能利用这一体系来研究学习记忆。这时,我们要进一步考虑的是进行条件型的基因剔除,即在小鼠出生后,正常成长到成体后再破坏该基因,这样我们就可以分析该基因破坏前和破坏后学习记忆能力的改变。

在以后的专文中,将介绍条件型基因剔除小鼠的运用及注意事项。