

在小鼠进行基因打靶的研究进展

杨 晓 黄培堂 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所, 100071. Email: yangx@nic. bmi.ac.cn)

摘要 基因打靶是在生物活体研究基因功能的有效手段. 通过基因打靶可以对小鼠染色体组进行特异性的遗传修饰, 包括简单的基因剔除、点突变的引入、染色体组大片的删除和重排以及外源基因的定位整合等. 近年来的研究表明, 对基因打靶进行时间和空间上的调控已成为可能.

关键词 基因打靶 基因剔除 基因敲入 染色体组工程

自 20 世纪 80 年代早期胚胎干细胞技术建立^[1, 2]及 13 年前第 1 例基因剔除小鼠诞生以来, 在小鼠进行基因打靶的研究进展迅速, 给现代生物学研究带来了革命性的变化. 基因打靶是在胚胎干细胞技术和同源重组技术基础上发展起来的可以改变生物活体遗传信息的技术手段. 胚胎干细胞是从早期胚胎中分离出来的多潜能细胞, 经过体外的培养和遗传修饰, 仍然具有分化的全能性. 它们经显微注射可被引入着床前的胚胎中, 并发育成包括生殖系在内的各种组织^[3](图 1). Smithies 最早于 1985 年在哺乳动物细胞中实现了同源重组. 他和 Capecchi 的研究小组两年后在胚胎干细胞中分别实现了基因的定位剔除^[4, 5]. 目前, 在胚胎干细胞进行同源重组已经成为一种对小鼠染色体组上任意位点进行遗传修饰的常规技术. 通过基因打靶获得的突变小鼠已近千种(相关数据库参见文献[6]), 并正以每年数百种的速度增加. 通过对这些突变小鼠的表型分析, 许多与人类疾病相关的新基因的功能已得到阐明, 并直接导致了现代生物学研究各个领域许多突破性的进展. 因此前任美国国立卫生研究院(NIH) 院长 Varmus 在第 11 届国际小鼠基因组会议上指出, NIH 敏锐地意识到小鼠遗传学通过一种动物整体的研究策略正在全面地改变科学的面貌. 目前人类全基因组序列分析已基本完成, 功能基因组学研究正在大规模地启动, 基因打靶已成为后基因组时代研究基因功能最直接和最有效的方法之一. 现在, 研究者不仅可以通过简单的基因剔除改变活体的遗传信息, 也可以精确地小鼠染色体组中引入点突变, 甚至可以删除大至几个分摩的染色体组片段或制造特

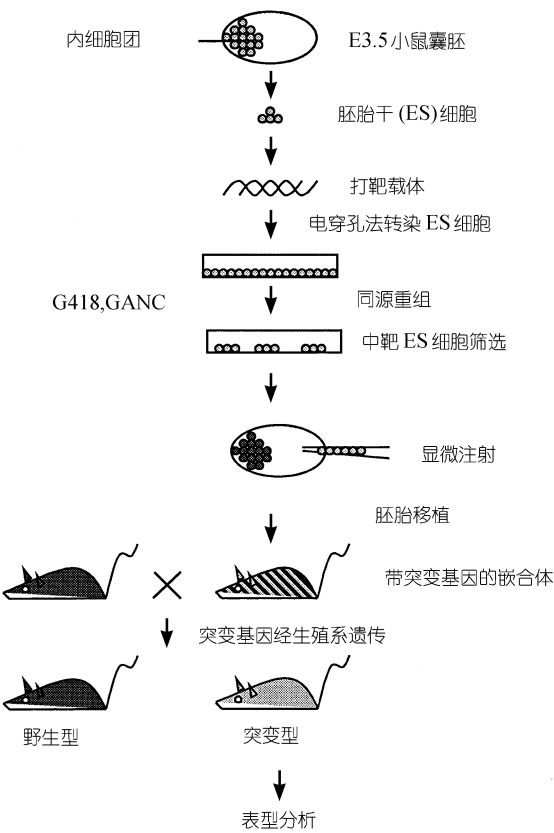


图 1 基因打靶的主要技术步骤

异的染色体易位. 对基因打靶进行时空上的调控也变成可能, 并成为在脊椎动物成体中研究基因功能的重要手段.

1 完全基因剔除(complete knockout)的策略

在 ES 细胞中进行基因打靶最常用的策略依然是使用正-负双选择(positive-negative selection, PNS)载体^[7]. 阳性选择标记基因通常被插入靶基因功能最关键的外显子中^[8, 9], 或通过同源重组删除靶基因最重要的功能域^[10]. 在许多研究中, 将 β -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)以正确的读框插入靶基因的外显子中, 除了剔除靶基因外, 通过分析 β -半乳糖苷酶的活性可以研究靶基因表达的时空顺序. *lacZ* 基因 5' 端若携带内源核糖体插入位点(internal ribosomal entry sites, IRES), 则 *lacZ* 基因的插入会不受时相的控制而得到正确的翻译^[11](图 2(a)).

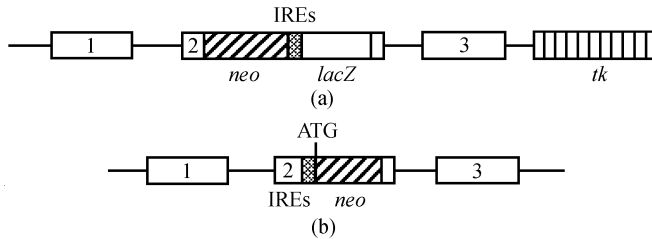


图2 完全基因敲除载体

(a) 带 *lacZ* 基因的 PNS 载体, (b) 无启动子载体. 数字表示靶基因的外显子顺序

使用 PNS 载体依然得到较多随机整合的 ES 克隆, 因为阴性选择基因(多为 *tk* 基因)可能在转染及整合过程中失活, 从而导致打靶载体随机整合的 ES 克隆得以生长. 启动子缺失的打靶载体可以进一步提高打靶载体的效率^[12]. 载体中阳性选择标记基因 *neo* 是不带启动子的, 只有发生正确的同源重组, *neo* 基因被精确地插入靶基因启动子后, 抗性基因才会表达, 并使 ES 克隆在选择性药物培养基中存活下来. 若在 *neo* 基因 5' 端连接上 IRES 位点, 则可以在任意外显子中插入而起相同的作用(图 2(b)).

研究者对基因剔除后是否导致无义突变(null mutation)持越来越谨慎的态度. 尽管通常设计的打靶策略会摧毁靶基因最重要的功能域, 但只要染色体组中残留有任何编码序列, 就可能以末端删除或缺失突变的方式表现出来, 有时甚至会产生所谓的渗漏突变(leaky mutation). 这主要由于 RNA 的异常拼接、替代或隐微启动子的应用, 以及下游 AUGs 翻译位点的启用等等. 所以在获得基因剔除小鼠后, 应在转录水平和翻译水平检测靶基因的活性. 若有残余蛋白质表达, 则应检测靶基因蛋白质的相关功能, 以便于对表型分析的结果得出正确的结论. 通过对渗漏突变进行严谨的分析可能得到无义突变研究无法获得的信息. 如 *fgfr2* 基因的无义突变导致小鼠胚胎在胚胎移植到子宫中数小时后(E3.5)死亡, 表明胚胎移植和卵柱形成需要 FGFR2 介导的信号^[13]. 而另一例渗漏突变的 *fgfr2* 基因剔除小鼠在胚胎期 E10-11 d 死亡, 突变小鼠没有四肢^[14]. 一系列的研究证实 FGF/FGFR2 信号是肢芽(limb bud)发生所必需的. 我们用基因剔除技术成功地研制了数种 *Smads* 基因剔除小鼠^[8~10], 其中 *Smad3* 基因剔除小鼠中有突变 *Smad3* mRNA 的表达. 尽管其假想的翻译产物不具有生物活性所必需的受体结合功能域和磷酸化位点, 我们还是进行了多方面的功能实验以证实该基因剔除导致一个可能的无义突变^[10].

2 大规模随机基因剔除——基因捕获(gene trapping)

用常规方法进行基因打靶研究需耗费大量的时间和人力. 研究者必须针对靶位点在染色体文库中筛选相关的染色体组克隆, 绘制相应的物理图谱, 构建特异性的打靶载体以及筛选中靶 ES 细胞等. 通常一个基因剔除纯合子小鼠的获得需要一年或更长的时间. 面对人类基因组计划产生出来的巨大的功能未知的遗传信息, 传统的基因剔除方法显得有些力不从心, 因此, 基因捕获法应运而生. 利用基因捕获可以建立一个携带随机插入突变的 ES 细胞库, 节省大量筛选染色体组文库以及构建特异打靶载体的工作及费用, 更有效和更迅速地进行小鼠染色体组的功能分析^[15]. 基因捕获的策略如图 3 所示. 典型的基因捕获载体包括一个无启动子的报道基因, 通常是 *neo* 基因. *neo* 基因插入到 ES 细胞染色体组中, 并利用捕获基因的转录调控元件实现表达的 ES 克隆可以很容易地在含 G418 的选择培养基中筛选出来. 从理论上讲, 在选择培养基中存活的克隆应该 100% 地含有中靶基因. 中靶基因的信息可以通过筛选标记基因侧翼 cDNA 或染色体组序列分析来获得.

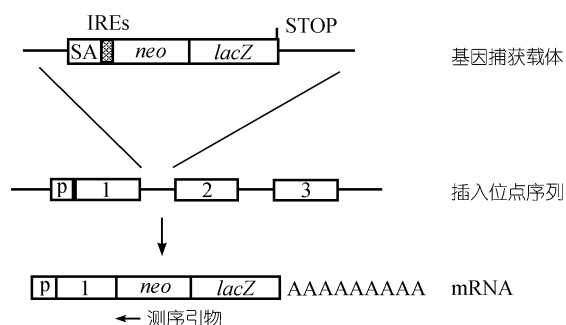


图 3 基因捕获的常用策略

用基因捕获法在单次实验中可以获得数以百计的带有单基因剔除的 ES 克隆. 这些克隆可以在 96 孔培养板中生长、复制并用于基因型分析. 大规模地保存和分析中靶 ES 细胞在小型的实验室中也是可行的. 此方法的缺点是只能剔除在 ES 细胞中表达的基因. 单种的细胞类型中表达的基因数目约为 10^4 , 现在的基因捕获载体从理论上讲应能剔除所有在 ES 细胞表达的基因, 因此, 在 ES 细胞中进行基因捕获还是大有可为的. 1997 年后, 克隆技术接连取得重要突破, 用哺乳动物体细胞可以克隆出新个体^[16, 17]. 可以设想, 在体细胞中应用基因捕获可以剔除更多在发育晚期才表达的基因, 其后通过核移植技术获得带有突变基因的动物个体, 这不失为一种可以弥补以上缺陷的办法. 用基因捕获法进行基因剔除的另一个缺点是无法对基因进行精细的遗传修饰.

3 精细突变的引入

基因打靶研究最重要的应用之一是研制人类疾病动物模型. 人类的疾病许多是由于基因功能丧失所引起的, 也有许多是由于基因过表达或功能获得(gain of function)所引起的. 后者的情况就无法用基因剔除的方法获得相应的疾病模型. 研究者发明了各种方法可以将精细突变引入小鼠染色体组中, 最早应用的策略首推“hit and run”以及“tag and exchange”^[18~20](图 4). 这两种方法均需分别经过两次筛选或两次打靶. 首先用选择标记基因以及突变基因将野生型基因置换, 再将选择标记基因剔除. 这样长时间的体外操作有时会影响 ES 细胞发育成生殖细胞的能力. Cre-LoxP 系统的应用使得研究者有更多的选择. 来自 P1 噬菌体的 Cre 重组酶可以识别 34 bp 部分回文的 LoxP 序列, 并通过分子间重组将两个相同方向的 LoxP 序列间的核苷酸序列有效切除. Chen 等人^[21]经一次打靶将 *fgr3* 突变引入小鼠染色体组中, 获得突变小鼠后再与 E II-Cre 转基因小鼠杂交, 利用在生殖细胞中表达的 Cre 重组酶活性删除 *fgr3* 突变小鼠

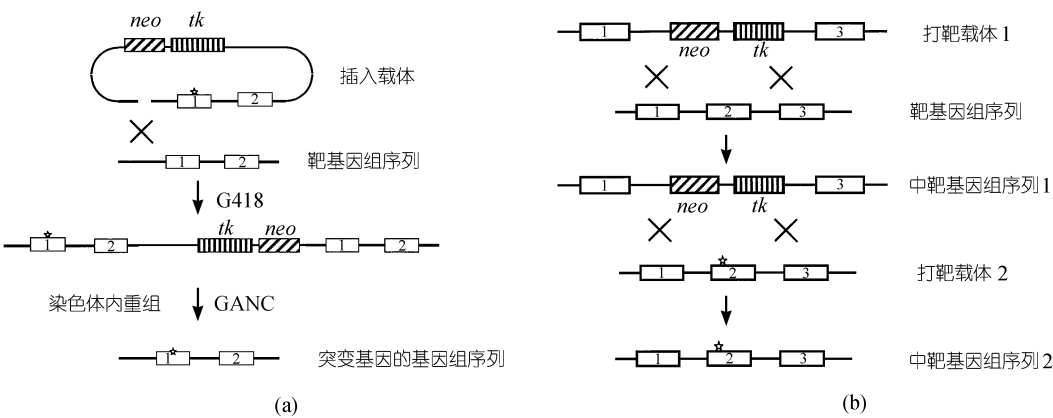


图 4 引入精细突变的策略
(a) “hit and run”法, (b) “tag and exchange”法

染色体组中的两侧带 LoxP 序列的选择标记基因, 获得了精确模仿人类侏儒症的模型小鼠. 可以预见, 随着功能基因组学的研究进展, 更多人类疾病相关基因会被发现. 各种精确模仿人类疾病的动物模型会在研究人类疾病的分子机制、研制预防、诊断和治疗药物等方面发挥越来越大的作用.

4 时空上可调节的基因打靶

完全基因剔除将靶基因自产生时刻起在所有的组织器官中终生灭活. 许多在成体器官发育中具有重要功能的基因, 如肿瘤抑制基因 *Brca1*, *Brca2*, *Dpc4/Smad4* 等, 由于在胚胎早期表达, 基因剔除后往往导致小鼠胚胎早期死亡, 使得研究者无法深入探索这些基因在成体中的重要作用. Cre-LoxP 和 FLP-frt 系统^[22, 23]的应用使得组织特异性基因剔除变为现实. 研究者利用 Cre-LoxP 和来自酵母的 FLP-frt 系统可以研究特定组织器官或特定细胞中靶基因灭活所导致的表型. 第 1 例应用 Cre-LoxP 系统研制成功的组织特异性基因剔除小鼠是由 Gu 等人^[24]在 1994 年报道的. 构建条件剔除 (conditional knockout) 小鼠的打靶载体 (图 5), 常将阳性选择标记基因置于靶基因的内含子中, 并在靶基因重要功能域两侧的内含子中插入方向相同的 LoxP 序列. 最好将标记基因的两侧也放上相同方向的 LoxP 序列, 因为许多时候选择标记基因即便被放置在内含子中, 也会阻断靶基因的转录^[25]. 如果出现这种情况, 可以用 Cre 重组酶表达质粒转染中靶 ES 细胞, 在细胞水平通过 LoxP 位点将 *neo* 抗性基因除去. 另一种更可行的方法是将条件剔除杂合子小鼠与 E II-Cre 转基因小鼠杂交^[25].

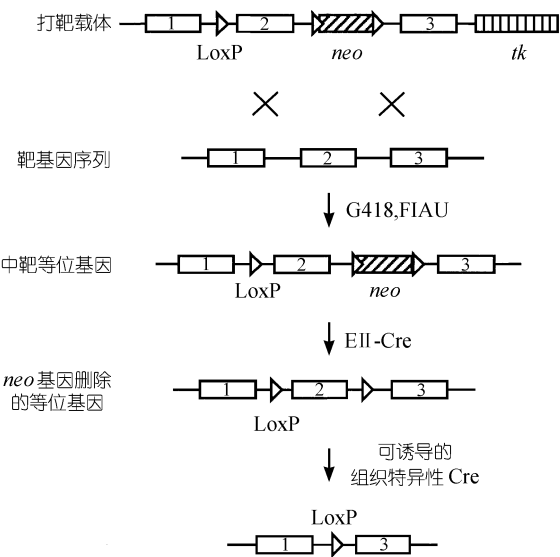


图 5 研制条件敲除小鼠的策略

由于 E II-Cre 在单细胞期即表达, 通过筛选它们的子代小鼠, 可获得只删除 *neo* 基因的条件敲除小鼠(图 5). Meyer 等人^[26]同时应用 Cre-LoxP 和 FLP-*frt* 系统研制了系列 *fgf8* 等位基因突变小鼠. *fgf8* 染色体组上的不同区域分别放置了成对的 LoxP 序列和 *frt* 序列, 通过与 Cre 或 FLP 转基因小鼠杂交可以分别获得完全敲除小鼠和条件敲除小鼠.

为了研制组织特异性 Cre 转基因小鼠, 多将 Cre 基因与组织特异性基因的启动子连接构建转基因载体, 再通过传统的转基因技术或基因敲入法获得相应的转基因小鼠. 已经发表和正在研究的 Cre 转基因小鼠已近百种, 相关的信息在数据库¹⁾中可以查到. 条件剔除小鼠获得后, 除了与 Cre 或 FLP 转基因小鼠杂交获得组织特异性基因剔除小鼠外, 还可通过感染表达重组酶的腺病毒或逆转录病毒而实现组织特异性的重组. 研究者用表达 Cre 重组酶的腺病毒感染 *apc* 基因条件剔除小鼠的直肠, 四周后小鼠在感染区发生肿瘤. 肿瘤组织中 *apc* 的第 14 个外显子被删除, 表明腺病毒感染导致 Cre-loxP 介导的重组并使得 *apc* 基因的功能因此而丧失^[27].

为了达到在时空上调节基因打靶的目的, 研究者将 *cre* 基因置于配体或药物可诱导的启动子控制下. Kühn 等人^[28]在 1995 年报道了 Mx1-Cre 转基因鼠的研究. Mx1 是一种与抗病毒感染相关的基因, 它在健康的小鼠中是不表达的, 但可被重组干扰素或干扰素诱导剂 pI-PC 诱导. 携带 Mx1-Cre 的条件剔除小鼠只有在干扰素或 pI-PC 存在的条件下才会发生 Cre-LoxP 介导的重组. 另一个常用的系统是四环素调节系统^[29]. St-Onge 等人^[30]证实应用经典的 tet 系统可实现 Cre 介导重组的诱导控制, 但存在较高的背景 Cre 重组酶活性. 这些研究都是试图在转录水平上来控制 Cre 重组酶的表达从而达到在特定时段将靶基因剔除的目的. 另一类研究则采用在转录后水平调节重组酶活性的策略. Feil 等人^[31]将 *cre* 基因与人雌激素受体突变的配体结合功能域融合, 产生的 Cre-ER^T 具有 tamoxifen 依赖的重组酶活性. 他们将融合蛋白置于巨细胞病毒(CMV)的启动子下研制成功了转基因小鼠, 配体依赖的 Cre 重组酶介导的基因重组效率在皮肤中达 50%, 脑中仅 10%. 不同组织的效率与组织中 Cre 的表达水平有关. 第 1 例对 Cre 重组酶活性真正实现时空上调节的研究是 1998 年由 Schwenk 等人^[32]报道的. 他们应用 B 细胞特异的启动子将 Cre-ER 融合蛋白的表达限制在 B 淋巴细胞中. B 淋巴细胞中 Cre 介导的重组效率高达 80%.

Cre-LoxP 系统的应用标志着基因打靶的研究进入了一个崭新的时代, 因为研究者终于可以如愿以偿地在不同的时相、不同的空间按预期的设计进行基因剔除. 从理论上讲, 应该可以在任意细胞、任意时刻剔除任意一个靶基因. 然而, 现阶段可利用的组织特异性表达 Cre 重组酶的转基因小鼠还十分有限. 对 Cre 转基因表达的精确控制还依赖于更多组织特异性标志基因的发现以及人工调控基因表达系统的进一步研究.

5 染色体组大片段的删除和重排

染色体重排, 包括缺失、倒位和易位是导致人类遗传性疾病的主要原因, 同时也是肿瘤发生过程中重要的遗传改变. 背景清楚的染色体组缺失还是鉴定隐性突变的有力工具. Ramirez-Solis 等人^[33]应用位点特异的重组酶系统首次在小鼠 ES 细胞中实现了最长 3~4 cM 染色体组片段的缺失和倒位. 他们通过先后两次基因打靶在同一条染色体上的靶片段两端分别引入 LoxP 序列、阳性筛选标记基因以及部分缺失的 *hprt* 基因. Cre 介导的重组将删除 LoxP

1) <http://www.mshri.on.ca/nagy/cre.htm>

间的靶片段,并使两端部分缺失的 *hprt* 基因在染色体组上重新组成功能性的 *hprt* 基因,使该克隆能在含 HAT 的培养基中存活^[33](图 6). LoxP 序列如果被置于不同的染色体上,将导致不同染色体间的易位. Deursen 等人^[34]将 LoxP 序列通过同源重组引入不同的染色体上,利用 Cre 重组酶在小鼠 ES 细胞实现了非同源染色体间的重组. Justice 等人^[35]用 Cre-LoxP 系统研制了携带毛色基因标记的染色体组大片段缺失的突变小鼠,用突变剂处理,通过表型筛选可以分析单倍体区域的隐性突变. 用此策略可以获得小鼠染色体组任意靶位点功能性的信息. 此后, Zheng 等人^[36]报道应用 Cre-LoxP 系统研制了带 24 cM 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或缺失将成为对小鼠染色体组进行功能分析的重要手段.

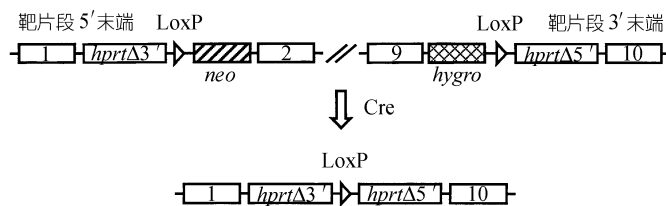


图 6 Cre 重组酶介导的染色体组大片段的删除

图中数字表示靶片段中基因的顺序(改自文献[33])

6 基因敲入(knockin)法研制转基因小鼠

自 1980 年第 1 例转基因小鼠诞生以来^[37],通过显微注射法将外源基因片段引入受精卵的雄性原核一直是研制转基因小鼠最实用的方法. 采用这种传统方法获得的转基因小鼠,其外源基因整合的位点和拷贝数是高度不确定的,对外源基因的表达以及由此而引起的表型有很大的影响. 传统转基因载体上要设法带上所有的调控元件以期能使外源基因达到理想的表达. 许多时候,某一基因的调控元件在染色体组上相距甚远,或存在于内含子中. 应用以 ES 细胞培养技术和同源重组为基础的基因敲入法,可将外源基因整合到特定的靶位点,利用靶位点全套的表达调控元件以实现特异性的表达. Rickert 等人^[38]于 1997 年将 *cre* 基因定位地整合到 CD19 的位点,使得 *cre* 基因只在 B 淋巴细胞中表达. 此外, Cre-LoxP 系统也可用于外源基因定位整合的转基因小鼠研制. 研究者预先通过同源重组在染色体组上的靶位点引入一个 LoxP 位点,再通过与携带 LoxP 序列的打靶载体进行 Cre 重组酶介导的重组,从而将外源基因引入特定的位点. 这种重组发生的效率很低,因为 Cre 重组酶可能导致进一步的重组而使插入片段删除. 研究者往往采用在打靶载体上使用无启动子的选择标记基因的策略,并将外源基因片段插入染色体组特定的启动子下游,这样只有发生位点特异重组的克隆才能表达标记基因并在选择培养基中存活. 近来,研究者使用突变 LoxP 序列可以大大地提高插入整合的效率(图 7). 他们将突变分别引入 LoxP 序列的左侧元件(LE 突变 Lox)或右侧元件(RE 突变 Lox). LE 突变 Lox 与 RE 突变 Lox 间的重组将会产生一个野生型的 LoxP 以及一个 LE+RE 突变 Lox. 由于 Cre 重组酶识别这两个位点并导致重组的概率非常低,在 ES 细胞中用这种方法定位整合的效率可达 2%~16%^[39]. Soukharev 等人^[40]将一个两端带不同序列 Lox 的选择标记基因通过同源重组引

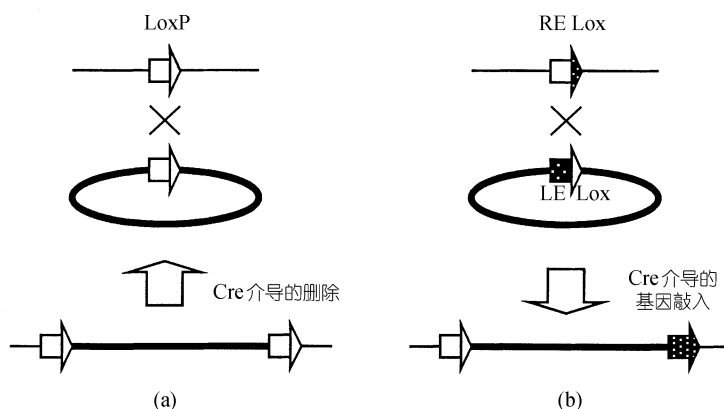


图7 Cre重组酶介导的基因敲入

图中细线表示染色体组序列, 粗线表示外源基因片段(改自文献[39])

入到 MHL-1 基因 ATG 数个核苷酸上游的位置. 这两个 Lox 序列间不能重组, 但可以与带外源基因的打靶载体上同源的 Lox 序列间发生重组, 从而可以将不同的外源基因敲入到特定的同一位点, 并可利用该基因全部的调控序列对外源基因实现时空上的控制. 这种 Cre 介导的定位整合发生的概率 3 倍于随机整合, 可以直接使用 PCR 法鉴定正确的克隆而不依赖于任何药物筛选. 这种策略可以被用于将外源基因整合到染色体上的任何位点.

外源基因定位敲入方法的应用改变了研制转基因动物的传统途径, 将把动物水平的转基因筛选提高到细胞水平. 打靶载体发展已使得在体细胞进行基因打靶成为现实. 此外, 利用体细胞核移植技术生产转基因大动物已获得成功^[41]. 因此, 利用基因打靶技术将外源基因在 ES 细胞或其他体细胞中实现定位整合和高表达, 再利用显微注射或核移植技术获得真正高表达的转基因动物是完全可行的. 这对于成本较高的转基因大动物的研制尤其具有重要的意义.

7 问题和展望

理论上可以利用基因打靶灭活所有的小鼠基因, 然而实际上实施这样的计划却是十分耗费财力的, 因为不计维持费的预算已数倍于“人类基因组计划”. 总的来说, 妨碍小鼠基因打靶研究进一步发展和应用的主要问题是其操作复杂, 实验周期长, 费用高居不下, 这与同源重组效率低密切相关. 一般实验条件下, ES 细胞中同源重组发生的频率在 $10^{-5} \sim 10^{-7}$, 体细胞中同源重组的频率更低一些. 由于一些未知的原因, 染色体组上某些基因位点存在重排(rearrangement)现象, 严重地影响打靶载体的构建和发生正确同源重组 ES 细胞的筛选. 要解决这个问题, 必须深入研究同源重组的分子机制, 掌握其规律, 发展新的打靶策略, 同时扩大研究规模, 使基因打靶研究实现系列化和产业化, 以便更加快速、特异、低廉地研制基因突变或缺失的小鼠品系, 满足功能基因组学研究的需要. 此外, 在体细胞中开展基因打靶研究可以在细胞水平上研究一些基础的细胞生物学问题, 如细胞周期调控等, 同时避免在动物整体研究中的复杂性以及高昂的维持费用. 由于伦理道德上的限制, 以剔除人类基因为目的的 ES 细胞途径的遗传操作难以为人们所接受, 因而利用人类体细胞进行基因打靶对于研究啮齿类动物不能精确重复的人类特异的疾病或生理过程具有特别重要的意义. 相信随着对同源重组机制的了解和打靶效率的进一步提高, 基因打靶研究将在各种人类体细胞系统中广泛地开展, 并将极大地促

进体细胞基因治疗的研究和应用。由于潜在的巨大利益的驱使, 在小鼠以外的物种, 尤其是在某些经济大动物的 ES 细胞中进行基因打靶研究将会改变现有动物反应器的研制模式。

无论如何, 小鼠仍将是功能基因组学研究中最主要的脊椎动物模式生物体系。除了改进基因打靶的策略, 提高基因打靶的效率, 如何实现对基因剔除进行更加简单易行的时空控制将是下一阶段努力的方向。在不久的将来, 不仅可以在特定的时间和特定的组织中实施对特定基因的剔除, 还可以通过特定的调控系统对基因灭活实现定时、定量和定位的准确控制。

与日俱增的突变小鼠品系及其研究结果将提供越来越多基因在脊椎动物发育和各种生理病理过程中功能的立体图卷, 最终将产生人类结构基因组计划所无法比拟的信息量。除了对小鼠突变品系这种宝贵的遗传资源妥善维持, 并通过生物信息学对产生的功能信息进行的收集、储存、归纳和分析, 还应促进全球化的资源和信息共享, 这将会极大地推进对基因功能、基因冗余性以及基因相互作用的研究, 促进人类对生命现象本质的理解。

致谢 本工作作为国家自然科学基金(批准号: 39970413)、国家“八六三”高新技术研究发展计划(102-08-08-02)、北京市科技项目(954020600)以及军事医学科学院创新启动基金资助项目。

参 考 文 献

- 1 Evans M J, Kaufmann M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292: 154~156
- 2 Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 7634~7638
- 3 Bradley A, Evans M, Kaufman M H, et al. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 1984, 309: 255~256
- 4 Doetschman T, Gregg R G, Maeda N, et al. Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 1987, 330: 57657~57658
- 5 Thomas K R, Capecchi M R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987, 51: 503~512
- 6 Sikorski R, Peters R. Transgenics on the internet. *Nature Biotechnol*, 1997, 15: 289
- 7 Mansour S L, Thomas K R, Capecchi M R. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, 1988, 336: 348~352
- 8 Yang X, Li C, Xu X, et al. The tumor suppressor SMAD4/DPC4 is essential for epiblast proliferation and mesoderm induction in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 3667~3672
- 9 Yang X, Castilla H L, Xu X, et al. Angiogenesis defects and mesenchymal apoptosis in mice lacking SMAD5. *Development*, 1999, 126(8): 1571~1580
- 10 Yang X, Letterio J J, Chen L, et al. Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF- β . *EMBO J*, 1999, 18: 1280~1291
- 11 Mansour S L, Goddard J M, Capecchi M R. Mice homozygous for a targeted disruption of the proto-oncogene int-2 have developmental defects in the tail and the inner ear. *Development*, 1993, 117: 13~28
- 12 Hanson K D, Sedivy J M. Analysis of biological selections for high efficiency gene targeting. *Mol Cell Biol*, 1995, 15: 45~51
- 13 Arman E, Haffner-Krausz R, Chen Y, et al. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(9): 5082~5087
- 14 Xu X, Weinstein M, Li C, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development*, 1998, 125(4): 753~765
- 15 Evans M J, Carlton M B L, Russ A P. Gene trapping and functional genomics. *Trends Genet*, 1997, 13: 370~374
- 16 Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810~813

- 17 Solter D. Dolly is a clone ——and no longer alone. *Nature*, 1998, 394: 315~316
- 18 Hasty P, Ramirez-Solis R, Krumlauf R, et al. Introduction of a subtle mutation into the Hox-2.6 locus in embryonic stem cells. *Nature*, 1991, 350: 243~246
- 19 Askew G R, Doetschman T, Lingrel J B. Site-directed point mutations in embryonic stem cells: a gene-targeting tag-and-exchange strategy. *Mol Cell Biol*, 1993, 13: 4115~4124
- 20 Yang X, Zhang Z, Huang C. The strategies of gene targeting in mouse embryonic stem cells. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1997, 24: 104~108
- 21 Chen L, Monsonogo E O, Yang X, et al. Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 1999, 104: 1517~1525
- 22 Kilby N J, Snaith M R, Murray J A. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet*, 1993, 9: 413~421
- 23 Dymecki S M. FLP recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6191~6196
- 24 Gu H, Marth J D, Orban P C, et al. Deletion of a DNA polymerase β gene segment in T cells using cell type-specific targeting. *Science*, 1994, 265: 103~106
- 25 Xu X, Wagner K U, Larson D, et al. Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumor formation. *Nat Genet*, 1999, 22(1): 37~43
- 26 Meyers E N, Lewandoski M, Martin G R. An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and FLP-mediated recombination. *Nature Genet*, 1998, 18: 136~141
- 27 Shibata H, Toyama K, Shioya H, et al. Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science*, 1997, 278: 120~123
- 28 Kühn R, Schwenk F, Aguet M. Inducible gene targeting in mice. *Science*, 1995, 269: 1427~1429
- 29 Shockett P E, Schatz D G. Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 5173~5176
- 30 St-Onge L, Fyrth P A, Gruss P. Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Nucleic Acid Res*, 1996, 24: 3875~3877
- 31 Feil R, Brocard J, Mascrez B, et al. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 10887~10890
- 32 Schwenk F, Kuhn R, Angrand P O, et al. Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26: 1427~1432
- 33 Ramirez-Solis R, Liu P, Bradley A. Chromosome engineering in mice. *Nature*, 1995, 378: 720~724
- 34 van Deursen J V, Fornerod M, van Rees B, et al. Cre-mediated site-specific translocation between nonhomologous mouse chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7376~7380
- 35 Justice M J, Zheng B, Woychik R P, et al. Using targeted large deletions and high-efficiency N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis for functional analyses of the mammalian genome. *Methods*, 1997, 13(4): 423~436
- 36 Zheng B, Mills A A, Bradley A. A system for rapid generation of coat color-tagged knockouts and defined chromosomal rearrangements in mice. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(11): 2354~2360
- 37 Gordon J W, Ruddle F H. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*, 1980, 214: 1244~1246
- 38 Rickert R C, Roes J, Rajewsky K B. lymphocyte-specific, cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 1317~1378
- 39 Araki K, Araki M, Yamamura K. Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 868~872
- 40 Soukharev S, Miller J L, Sauer B. Segmental genomic replacement in embryonic stem cells by double lox targeting. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27: e21
- 41 Schnieke A E, Kind A J, Ritchie W A, et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997, 278: 2130~2133

(2000-03-30 收稿, 2000-05-25 收修改稿)