

DOI: 10.1360/yc-007-1291

# 基因打靶技术：开启遗传学新纪元

滕艳, 杨晓

军事医学科学院生物工程研究所发育和疾病遗传学研究室, 北京 100071

**摘要:** 基因打靶技术作为最有效的定向修饰小鼠基因的技术手段在揭示基因的生理功能、研究人类疾病的遗传机制以及寻找新的药物靶标的过程中发挥着重要的作用。近年来, 随着条件基因打靶技术的发展使基因失活可以限制在特定时段特定组织或细胞内。文章将主要介绍基因打靶技术的发展简史、近期进展以及在其他模式动物中的应用。

**关键词:** 基因打靶; 小鼠; 条件基因打靶; 基因敲除

## Gene targeting: the beginning of a new era in genetics

TENG Yan, YANG Xiao

Genetic Laboratory of Development and Diseases, Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

**Abstract:** Gene targeting, which allows the efficient modification of specific murine genes, plays important roles in elucidating physiological function of genes *in vivo*, dissecting the genetic mechanisms of human disease and identifying potential targets for drug development. In recent years, the development of conditional gene targeting has provided novel opportunities for gene inactivation in specific cells or organs, and at specific time points, both during development and in the adult animals. In this review, we introduce the history of gene targeting and recent progress of gene targeting technology and its applications in other model organisms.

**Keywords:** gene targeting; mouse; conditional gene targeting; gene knockout

在历经近 20 年的推广和应用后, 基因打靶技术终于获得诺贝尔奖评审委员会的关注和肯定。2007 年 10 月 8 日, 美国科学家 Mario R. Capecchi 和 Oliver Smithies<sup>[1]</sup>、英国科学家 Martin J. Evans 因为在利用胚胎干细胞对小鼠基因进行定向修饰原理方面的系列发现分享了 2007 年诺贝尔生理学或医学奖。他们的这些发现直接催生了基因打靶技术, 使得对哺乳动物基因组进行修饰和改造并使之通过生殖系遗传成为可能。基因打靶技术的发明和应

用革命性地改变了现代生物医学研究的面貌, 并导致了生物医学研究各个领域中的许多突破性进展。

### 1 基因打靶技术的发展简史

基因打靶技术是一种定向改变细胞或者生物个体遗传信息的实验手段<sup>[2]</sup>。通过基因打靶技术可以对生物体基因组进行基因灭活、点突变引入、缺失突变、外源基因定位引入、染色体组大片段删除等

收稿日期: 2007-10-16; 修回日期: 2007-10-19

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: 2005CB522506; 2006CB943501)、国家自然科学基金重点项目(编号: 30430350)、国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2006AA02Z168)、国家支撑计划(编号: 2006BAI23B01-3)和北京市平台计划(编号: Z0006303041231)[Supported by National Basic Research Program of China(973 Program) (No.2005CB522506; 2006CB943501), Chinese National Natural Science Foundation (No.30430350), Hi-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No.2006AA02Z168), National Science Supporting Program (No.2006BAI23B01-3) and Beijing Science Projects (No.Z0006303041231)]

作者简介: 滕艳(1976-), 女, 吉林人, 博士, 研究方向: 发育和分子遗传学。E-mail: tengyan0919@tom.com

通讯作者: 杨晓(1967-), 女, 四川都江堰人, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 发育和分子遗传学。E-mail: yangx@nic.bmi.ac.cn

修饰和改造,并使修饰后的遗传信息通过生殖系遗传,使遗传修饰生物个体表达突变的性状。通过对遗传修饰生物体的表型分析和机理研究,帮助人类理解生命现象的本质、揭示疾病发生的机理、探寻疾病预防和诊疗的有效方法。

基因打靶技术是在胚胎干细胞(ES)技术和同源重组技术成就的基础之上产生和发展的。同源重组是指发生在减数分裂或者有丝分裂过程中相同或者相似DNA序列间的重组。它通常通过一对同源分子非姊妹染色体间的断裂而产生新的重组片段。同源重组在进化过程中高度保守,Joshua Lederberg由于50多年前在细菌中首先证实同源基因间重组的原理而获得了1958年的诺贝尔奖。Capecchi和Smithies都首先预见到新的遗传物质可以通过同源重组引入哺乳动物细胞的基因组,并对基因进行特异性修饰和改造。同源重组技术的概念是20世纪70年代初在酵母研究中发展起来的。与酵母系统完全不同的是,哺乳动物细胞中同源重组的概率非常低。1980年,Capecchi<sup>[3]</sup>报道用玻璃针将DNA直接注射入细胞核可以显著提高基因转移的效率。该方法迅速地被改进并用于将新基因引入小鼠受精卵研制转基因小鼠。他随后证明同源重组可以发生在外源DNA和哺乳动物细胞染色体的同源序列间。他构建了一种携带有缺陷的新霉素抗性基因的细胞系,并证明这种有缺陷的抗性基因可以通过与外源DNA间的同源重组得到修复<sup>[4]</sup>。在Capecchi这些先驱性的工作进行同时期,Smithies等<sup>[5]</sup>提出了同源重组可能用于修复突变基因的概念,并在1985年一篇里程碑论文中报道了在红白血病细胞中实现了人工打靶载体和细胞染色体上 $\beta$ -球蛋白基因间的同源重组。

Capecchi和Smithies的工作均证实了利用同源重组对生物体的遗传信息进行定向改造的可能性,然而这些工作都是在体外培养的细胞中进行的。要通过同源重组获得遗传修饰的动物,还需要另外一种重要的载体:ES细胞。

ES细胞是从着床前的哺乳类胚胎中分离的全能干细胞,具有较强的增殖能力,经过长期体外培养后仍然具有分化成所有3种胚层的发育潜能<sup>[6]</sup>。对ES细胞的研究可以追溯到20世纪50年代对小鼠胚胎进行体外培养的实验。Whitten<sup>[7]</sup>于1956年成功地使单细胞的受精卵在体外发育到囊胚阶段。其后,Brinster<sup>[8]</sup>于1965年建立了微滴培养技术,用于着床前小鼠胚胎的培养。McLaren等<sup>[9,10]</sup>对输卵管移植和

子宫移植条件进行了优化,并最终使得通过胚胎移植从体外培养的胚胎产生活的小鼠成为一种常规的技术。十年后,Gardner<sup>[11]</sup>建立了将分离的细胞注射入宿主囊胚获得嵌合体小鼠的方法。这一方法的成功建立使得研究者有可能系统地检测经过体外操作的胚胎细胞的分化全能性。

1970年,Stevens<sup>[12,13]</sup>作为先驱者成功分离了小鼠畸胎瘤细胞(embryonal carcinoma, EC)并将其作为模式体系研究胚胎细胞的全能性。几年后,Brinster<sup>[14]</sup>,Mintz和Illmensee<sup>[15]</sup>,以及Papaioannou等<sup>[16]</sup>证实胚胎瘤干细胞可以整合入宿主囊胚并分化成多种正常成年组织,但没有胚胎瘤细胞整合入生殖系的报道。1981年,Evans等<sup>[17]</sup>和Marin<sup>[18]</sup>分别报道从正常的小鼠囊胚中分离了ES细胞。与大多数EC细胞不同,ES细胞具有完全正常的核型。尤其重要的是,Evans等<sup>[19]</sup>研究小组在1984年证实通过显微注射引入囊胚的ES细胞可以分化为成体的各种组织并整合入生殖系。小鼠ES细胞的分离和应用是ES细胞技术发展过程中的里程碑,它与同源重组技术的结合使得在生物整体水平上定向改变和修饰哺乳类动物的遗传物质成为可能。

1987年,Evans等<sup>[20]</sup>和Monk等<sup>[21]</sup>的研究小组在小鼠胚胎干细胞中分别对次黄嘌呤磷酸转移酶基因(*Hprt*)的进行改造,并获得了经生殖系遗传的突变小鼠。Capecchi等<sup>[22]</sup>发展了一种称为“正负筛选”的策略,使中靶胚胎干细胞克隆数增加3~10倍,真正使得同源重组技术可以作为修饰哺乳动物基因组遗传信息的常规手段。1989年,真正通过同源重组获得的基因敲除小鼠相继诞生<sup>[23-25]</sup>,开启了遗传学新纪元的大门。

## 2 基因打靶小鼠研制的新进展

### 2.1 利用位点特异性重组酶系统实现时空上可调节的基因敲除

自从1994年第一例应用Cre-LoxP系统研制的组织特异性基因敲除小鼠问世以来<sup>[26]</sup>,条件基因敲除技术迅速取代了传统的完全基因敲除成为主流<sup>[27]</sup>。条件基因敲除技术利用Cre-LoxP和FLP-FRT位点特异性重组酶系统使得时空特异性基因敲除变为现实。在特定阶段特定组织或细胞中表达Cre或FLP重组酶的转基因小鼠通过与在基因组中引入LoxP或FRT序列的小鼠交配,可导致子代鼠中特定组织或细胞中的靶基因被删除。基于Cre-LoxP系统的第二代小鼠模

型可以克服重要功能基因敲除所导致的早期致死表型, 模拟人类疾病相关的体细胞突变, 并对突变进行时空上的调控, 提供了激动人心的新机会研究已知或者未知基因的在疾病的起始、发生和治疗过程中的作用及其机制。

近几年来, 利用细菌人工染色体(bacterial artificial chromosomes, BACs)构建的*Cre*转基因载体通过受精卵注射得到了许多与内源性基因表达谱相似的*Cre*转基因小鼠<sup>[28~30]</sup>。2007年Xu等<sup>[31]</sup>将两种不同细胞特异性的*Cre*基因部分缺失的转基因小鼠交配得到了恢复*Cre*重组酶活性的子代小鼠, 从而对*Cre*在特定细胞中的表达达到了“双重”限制。在构建转基因载体时, 如果同时将*Cre*基因置于配体或药物可诱导的启动子控制下, 就可同时实现在时间和空间水平上对*Cre*表达的精确调控。近几年来研究者利用各种诱导系统结合细胞特异性启动子构建了多种在时空水平上可调控的*Cre*转基因小鼠, 为揭示靶基因在特定阶段特定细胞中的功能提供了强为有力的工具<sup>[32~34]</sup>。除了利用*Cre*转基因小鼠, 还可通过感染具有自我剪切功能的表达重组酶的逆转录病毒和慢病毒以及直接注射可透膜的*Cre*重组酶蛋白而实现重组, 同时可以减少*Cre*重组酶的细胞毒性<sup>[35~38]</sup>。

最近, 研究者利用组织特异性基因敲除技术揭示了某些基因在组织器官发育、生理过程以及疾病发生中的重要功能。在小鼠脑组织中特异性敲除胰岛素受体底物 2(Irs-2)可导致小鼠寿命的延长<sup>[39]</sup>。转录调节因子Sox7 在维持小鼠胚胎和新生期的造血干细胞的过程中发挥重要的作用<sup>[40]</sup>。在小鼠卵巢上皮中同时敲除*PTEN*和*Apc*两个抑癌基因导致小鼠 100%发生卵巢子宫内膜腺癌, 其肿瘤的发生、发展以及转移过程均与人类疾病相似<sup>[41]</sup>。近年来, 我们研究室在国内自主研制成功了 10 余种组织特异性*Cre*重组酶转基因小鼠以及系列组织特异性条件基因敲除小鼠, 通过对突变小鼠的表型分析, 系统地揭示了*Smad4* 基因在组织器官发育和稳态维持以及相关疾病发生过程中的作用和机制<sup>[42~47]</sup>。

## 2.2 大规模随机基因敲除技术

大规模随机基因敲除技术主要包括基因诱捕、乙烷亚硝基脲(ENU)诱变以及近几年快速发展起来的转座子介导的基因突变。研究者利用位点特异性重组酶系统对传统的基因诱捕策略进行了改进使条件性的基因诱捕成为可能<sup>[48]</sup>。在小鼠ES细胞中进行

ENU诱变可以在ES细胞中直接进行突变基因的筛选, 使ENU诱变技术同样适合于基因驱动的研究。而通过在cDNA样品库中检测特定基因的剪接突变, 使在ES细胞水平上进行基因突变的筛选更加方便、有效<sup>[49]</sup>。近几年来, 研究者成功地将不同的转座子系统应用到小鼠中, 为大规模地研制基因突变小鼠以及构建新的疾病模型提供了崭新的途径<sup>[50, 51]</sup>。在转座子系统基础上, 同时结合不同的诱导系统可以对基因突变实现时空水平上的调控<sup>[52, 53]</sup>。最近, 利用位点特异性重组酶系统和转座子系统的一种新的基因诱捕策略为在小鼠基因组范围内大规模地进行基因突变提供了一种更方便、快捷的方法<sup>[54]</sup>。

## 2.3 miRNA 敲除小鼠证实 miRNA 在哺乳动物中的生理功能

最近引起极大关注的基因打靶小鼠首推 2007 年诞生的miRNA敲除小鼠。采用与传统基因打靶相似的策略, 数个研究小组成功地删除了基因中编码miRNA的部分, 这些突变小鼠表现出各种不同的缺陷表型。靶向删除*miR-1-2* 导致 50%突变小鼠在分娩前死亡, 研究结果揭示了该miRNA在调节心脏形态发生、电传导和细胞周期控制方面的生理功能<sup>[55]</sup>。*miR-208* 是 $\alpha$ -肌球蛋白重链基因一个内含子中编码的、在心脏特异性表达的miRNA。*miR-208* 敲除小鼠表型相对正常, 但研究结果显示*miR-208* 是心肌肥厚和纤维化所必需的, 证明 $\alpha$ -肌球蛋白重链基因除了编码一种主要的心肌收缩蛋白, 还通过*miR-208* 调节应激和激素信号条件下心脏生长和基因表达<sup>[56]</sup>。另两个小组同时报道了*miR-155* 敲除小鼠的研制和表型分析<sup>[57, 58]</sup>。他们的结果显示*miR-155* 敲除导致突变小鼠由于T细胞、B细胞和树突状细胞功能失常而导致免疫缺陷。所有这些研究为在新的层面上理解基因调控正常发育和抑制疾病的机制提供了新的线索。

## 2.4 重组工程系统用于构建基因打靶载体

利用常规方法构建打靶载体费时费力, 而且如果基因组和克隆载体上缺少合适的限制性内切酶位点, 就会使打靶区域受到限制。而近些年来发展起来的基于噬菌体的大肠杆菌同源重组系统(也称为重组工程, recombineering)可以在线性化DNA片段和大肠杆菌染色体、BAC和PAC克隆等之间实现同源重组, 该技术所需的同源序列短(40~60 bp), 不需使用限制性内切酶和连接酶, 为构建打靶载体提供了



一个高效、精确、灵活的平台<sup>[59,60]</sup>。大肠杆菌内重组蛋白的表达通常可以通过转染表达重组蛋白的质粒<sup>[61]</sup>或复制缺陷型的 $\lambda$ 噬菌体<sup>[62]</sup>,或者使缺陷型的前噬菌体基因整合进大肠杆菌基因组来完成<sup>[63]</sup>。2002年,Zhang等<sup>[64]</sup>通过重组工程系统从噬菌体的基因组文库中筛选到靶基因,同时也完成了基因打靶载体的构建。2003年,Cotta-de-Almeida等<sup>[61]</sup>和Liu等<sup>[63]</sup>利用该技术截取了小鼠BAC载体上的靶基因序列构建了条件基因打靶载体,而Valenzuela等<sup>[65]</sup>和Yang等<sup>[66]</sup>将修饰过的小鼠BAC载体直接进行ES细胞转染。2007年Chan等<sup>[62]</sup>通过改进重组工程系统的技术细节,在96孔板上可进行全部的操作,同时完成96个条件基因打靶载体的构建只需要两周,使大规模构建基因打靶载体成为可能。同样,应用重组工程系统也使构建Cre基因敲入载体和BAC载体更加方便、快捷。

## 2.5 显微注射技术的改良

通常情况下,遗传修饰的中靶ES细胞通过显微注射被引入受体囊胚的内细胞团中。这些ES细胞必须整合入生殖系,才能使修饰过的遗传信息传递到子代小鼠。为了快速获得基因打靶小鼠,一些研究小组采用四倍体囊胚补偿技术,通过电融合获得只能发育为胎盘组织的小鼠四倍体囊胚用于中靶ES细胞的显微注射,ES细胞在这样的环境中能利用其全能性发育为一个完整的个体,从而直接获得基因突变的杂合子小鼠<sup>[67-69]</sup>。但采用四倍体囊胚补偿技术必须使用较早代数杂交ES细胞才有可能获得出生存活的小鼠。2007年,Poueymirou等<sup>[70]</sup>报道了将中靶的ES细胞通过激光辅助注射到8细胞期的小鼠胚胎中,此时受体胚胎的内细胞团还没有形成,使得中靶ES细胞更具竞争力。通过这种方法获得的F<sub>0</sub>代小鼠几乎完全由中靶ES细胞发育而来,并100%能经过生殖系将突变基因遗传到F<sub>1</sub>代小鼠。这种改良的显微注射方法不受ES细胞品系的限制,显著提高了中靶ES细胞的整合效率,大大缩短了基因打靶小鼠研制的周期。

## 3 小鼠以外模式生物中基因打靶技术的研究进展

### 3.1 利用转基因和同源重组技术研制基因敲除果蝇

果蝇是遗传学研究中经典的模式生物之一。利用P转座子构建的果蝇插入突变体文库,为研究果蝇功能基因组学提供了丰富的遗传材料。但研究者始终无法对基因敲除的过程进行精细的调控,利用

此方法获得的突变体常常不是无义突变。由于P转座子的插入位点不是完全随机的,因此也无法利用此方法灭活所有的基因。2000年,Rong等<sup>[71]</sup>报道了一种可以在果蝇体内进行定位修饰的方法。在其他模式生物中的研究结果表明,带有缺口的环状DNA或者线性DNA比完整的环状DNA更容易重组。利用这一特性,Rong等构建了带内切核酸酶-Sce消化位点的突变基因。将该突变基因和筛选标记基因置于两个FRT序列之间,并利用P转座子获得转基因果蝇。另外构建表达识别FRT位点的FLP重组酶转基因果蝇,以及识别突变基因所携带消化位点的-Sce

内切核酸酶转基因果蝇。在携带3种转基因的果蝇中,FLP将FRT序列间的突变基因切下形成一个环状DNA,-Sce内切核酸酶作用于消化位点,使突变基因线性化,从而驱动同源重组的发生。突变基因插入内源基因中,从而使特定内源基因活性丧失。他们用该方法先后研制了数种内源基因敲除的果蝇,结果显示利用该方法可以有效地获得携带插入突变和等位基因置换的果蝇突变体,不临近端粒的果蝇基因均可以被有效地敲除。随后,利用该技术研制的基因敲除果蝇已经出现了几十种。在果蝇中敲除转录因子Hand揭示了其在果蝇的心脏发生以及造血发生中的作用<sup>[72]</sup>。研究者为了研究Dscam基因编码多种蛋白质的生物学意义,研制了多种Dscam基因的不同区域敲除的突变果蝇和基因敲入果蝇,揭示了Dscam蛋白多样性在神经系统中的重要作用<sup>[73-76]</sup>。

### 3.2 利用核移植技术研制基因敲除大动物

自从首例通过核移植技术利用培养的分化细胞成功获得活的哺乳动物的研究<sup>[77]</sup>报道以来,利用体细胞作为供体进行核移植在绵羊、牛、小鼠、山羊和猪中相继取得了成功。核移植技术的迅速发展使得对大动物的基因组进行定位修饰成为可能。2000年,McCreath等<sup>[78]</sup>对绵羊胎儿成纤维细胞进行基因打靶,将抗胰蛋白酶(AAT)转基因定位整合到绵羊

1 原胶原(COL1A1)基因位点,并通过核移植培育成功一只活的绵羊。2002年,Lai等<sup>[79]</sup>成功研制了首例基因敲除猪。他们首先通过同源重组技术获得了 $\alpha$ -1,3-半乳糖基转移酶基因敲除中靶猪胚胎成纤维细胞,而后通过核移植技术将中靶细胞的核引入去核的卵母细胞中,最终获得了一个 $\alpha$ -1,3-半乳糖基转移酶等位基因敲除的克隆猪。理论上可以采取同样的策略获得其它种类大动物的基因敲除突变体,用于深入

研究基因的功能或者研制更理想的人类疾病模型。

### 3.3 利用 ENU 诱变技术研制基因敲除大鼠

大鼠是一个在生物医学研究中广泛使用的模式生物, 在许多生理学和病理学研究领域中是研究者首选的啮齿类实验动物。2004 年大鼠的全基因组序列测定已经顺利完成, 研制基因敲除大鼠对于许多疾病相关基因功能的深入研究具有重要的意义。以前的研究显示 ENU 可以有效地诱导小鼠的种系突变, 是小鼠功能基因组研究的有力工具<sup>[80]</sup>。2003 年, Zan 等<sup>[81]</sup>利用乙烷亚硝基脲(ENU)诱导大鼠种系突变体, 对子代大鼠 *Brca1* 和 *Brac2* 基因上的功能突变进行筛选, 最终获得了这两种肿瘤抑制基因的基因敲除大鼠。2007 年 Homberg 等<sup>[82]</sup>在 ENU 诱导的大鼠种系突变体中筛选到一种 5-羟色胺转运蛋白的基因敲除大鼠, 揭示了 5-羟色胺转运蛋白在维持 5-羟色胺稳态中的作用。可以预期在不久的将来, 结合核移植技术和 ENU 体细胞诱变或者体细胞打靶应能产生更多的基因敲除大鼠, 对促进相关领域的研究产生积极的影响。最近, 转座子系统介导的基因突变为大规模地构建基因敲除大鼠提供一种新的方法<sup>[83, 84]</sup>。

## 4 基因打靶技术对生命科学和医学研究的深远影响

自诞生之日起, 基因打靶技术应用到生命科学和医学几乎所有的研究领域, 对生命科学和医学的研究模式和总体面貌产生了深刻的影响。基因打靶技术的应用导致生命科学和医学研究领域的突破性进展层出不穷, 使得许多古老的学科如发育生物学和胚胎学焕发出新的异彩, 并直接催生了许多新的学科如遗传生理学(Genetic Physiology)。

在基因打靶技术诞生之前, 人类对高等模式生物中基因功能的认识主要来自于对人类患者和实验动物中随机突变的连锁分析和相关性研究、少量的过表达转基因动物研究, 以及大量的体外细胞培养实验。体外细胞培养系统很难帮助科学家揭示基因在复杂的多种细胞参与的生物学过程以及相关疾病发生中的功能和机制。基因打靶技术的发明使得科学家第一次能对关于特定基因生理功能的假设进行实验验证。基因打靶技术的应用使得研究者可以在生理状态下深入研究基因在哺乳动物胚胎发育、神经系统、心血管系统和免疫系统等复杂生物学过程和组织器官中的功能。

人类基因组及模式生物基因组的序列测定结果

显示, 人类和小鼠的基因组均编码大约 22 400 个基因。人类在 21 世纪面临的主要挑战是要解读这些基因的功能并研究基因调控的分子机制。目前, 在不同模式生物中利用基因打靶技术已对上万种基因的功能进行了研究, 研制成功的基因打靶小鼠也有数千种。通过对这些突变小鼠的表型分析, 许多与人类疾病相关的基因功能已得到阐明。

事实上, 只有通过基因打靶研究才能真正建立基因和疾病间的因果关系。通过基因打靶技术研制的人类疾病小鼠模型已超过 500 种。这些模型的建立极大地丰富了人类对这些疾病相关基因功能的了解。每年都有利用基因打靶技术新建立的人类癌症、心血管疾病、骨质疏松、神经退行性病变、免疫缺陷等疾病小鼠模型, 为疾病机理研究、新药研发和治疗方案评价提供了宝贵的遗传资源。即便是对复杂性疾病相关的基因功能研究, 利用基因打靶技术可以在生理状态下每次只研究一种因素的影响, 并通过杂交得到的多基因突变小鼠证实基因与复杂性疾病发生间的因果关系。

国际小鼠基因敲除联盟将在不久的将来完成小鼠全基因组的基因敲除<sup>[85, 86]</sup>。国内也启动了十一五支撑计划系统研制条件基因打靶小鼠。下一轮 miRNA 敲除小鼠研制的热潮将会进一步帮助人类加深对生命本质的了解。可以想象基因打靶技术对生命科学和医学研究的深远影响才刚刚揭开序幕。

### 参考文献(References):

- [1] GUO Xiao-Qiang, Oliver Smithies. *Hereditas(Beijing)*, 2007, 29(6):649–650.  
郭晓强, 奥利弗·史密斯. 遗传, 2007, 29(6):649–650.
- [2] Müller U. Ten year of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev*, 1999, (82): 3–21.
- [3] Capecchi MR. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, 1980, (2 Pt 2): 479–488.
- [4] Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, 1986, 44(3): 419–428. [\[DOI\]](#)
- [5] Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, 1985, 317: 230–234. [\[DOI\]](#)
- [6] Fuchs E, Segre JA. Stem cells: A new lease on life. *Cell*, 2000, 100: 143–155. [\[DOI\]](#)
- [7] Whitten WK. Culture of tubal mouse ova. *Nature*, 1956, 177: 96. [\[DOI\]](#)

- [8] Brinter RL. Studies on the development of mouse embryos in vitro. II. The effect of energy source. *J Exp Zool*, 1965, 158: 59–68. [\[DOI\]](#)
- [9] McLaren A, Michie D. Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster-mothers. I. Factors affecting the implantation and survival of native and transferred eggs. *J Exp Biol*, 1956, 33: 394–416.
- [10] McLaren A, Biggers JD. Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early embryos. *Nature*, 1958, 182: 877–878. [\[DOI\]](#)
- [11] Gardner RL. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature*, 1968, 220: 596–597. [\[DOI\]](#)
- [12] Stevens LC. The biology of teratomas. *Adv Morphog*, 1967, 6: 1–31.
- [13] Stevens LC. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and post-implantation mouse embryos. *Dev Biol*, 1970, 21: 364–382. [\[DOI\]](#)
- [14] Brinster RL. The effect of cells transferred into mouse blastocyst on subsequent development. *J Exp Med*, 1974, 140: 1049–1056. [\[DOI\]](#)
- [15] Mintz B, Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72: 3585–3589. [\[DOI\]](#)
- [16] Papaioannou VE, McBurney MW, Gardner RL, Evans MJ. Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature*, 1975, 258: 70–73. [\[DOI\]](#)
- [17] Evans MJ, Kaufmann MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292: 154–156. [\[DOI\]](#)
- [18] Martin GR. 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. [\[DOI\]](#)
- [19] Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 1984, 309: 255–256. [\[DOI\]](#)
- [20] Kuehn MR, Bradley A, Robertson EJ, Evans MJ. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature*, 1987, 326(6110):295–298.
- [21] Hooper M, Hardy K, Handyside A, Hunter S, Monk M. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature*, 1987, 326(6110):292–295. [\[DOI\]](#)
- [22] Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. 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(6197): 348–352. [\[DOI\]](#)
- [23] Thompson S, Clarke AR, Pow AM, Hooper ML, Melton DW. Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell*, 1989, 56(2): 313–321. [\[DOI\]](#)
- [24] Koller BH, Hagemann LJ, Doetschman T, Hagaman JR, Huang S, Williams PJ, First NL, Maeda N, Smithies O. Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(22): 8927–8931. [\[DOI\]](#)
- [25] Zijlstra M, Li E, Sajjadi F, Subramani S, Jaenisch R. Germ-line transmission of a disrupted beta 2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*, 1989, 342(6248): 435–438. [\[DOI\]](#)
- [26] Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, 1994, 265(5168): 103–106. [\[DOI\]](#)
- [27] Schmidt-Supprian M, Rajewsky K. Vagaries of conditional gene targeting. *Nat Immunol*, 2007, 8(7): 665–668. [\[DOI\]](#)
- [28] Lee, EC, Yu D, Martinez de Velasco J, Tessarollo L, Swing DA, Court DL, Jenkins NA, Copeland NG. A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and sub-cloning of BAC DNA. *Genomics*, 2001, 73: 56–65. [\[DOI\]](#)
- [29] Sackett SD, Fulmer JT, Friedman JR, Kaestner KH. Foxl1-Cre BAC transgenic mice: a new tool for gene ablation in the gastrointestinal mesenchyme. *Genesis*, 2007, 45(8): 518–522. [\[DOI\]](#)
- [30] Sato S, Inoue T, Terada K, Matsuo I, Aizawa S, Tano Y, Fujikado T, Furukawa T. Dkk3-Cre BAC transgenic mouse line: a tool for highly efficient gene deletion in retinal progenitor cells. *Genesis*, 2007, 45(8): 502–507. [\[DOI\]](#)
- [31] Xu Y, Xu G, Liu B, Gu G. Cre reconstitution allows for DNA recombination selectively in dual-marker-expressing cells in transgenic mice. *Nucleic Acids Res*, 2007, Epub ahead of print.
- [32] Dworniczak B, Skryabin B, Tchinda J, Heuck S, Seising FJ, Metzger D, Chambon P, Horst J, Pennekamp P. Inducible Cre/loxP recombination in the mouse proximal tubule. *Nephron Exp Nephrol*, 2007, 106(1): e11–20. [\[DOI\]](#)
- [33] Bradley CK, Takano EA, Gothert JR, Gottgens B, Green AR, Begley CG, van Eekelen JA. Temporal regulation of Cre-recombinase activity in Scl-positive neurons of the central nervous system. *Genesis*, 2007, 45(3): 145–151. [\[DOI\]](#)
- [34] Sonnylal S, Denton CP, Zheng B, Keene DR, He R, Adams HP, Vanpelt CS, Geng YJ, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. Postnatal induction of transforming growth factor beta signaling in fibroblasts of mice recapitulates clinical, histologic, and biochemical features of scleroderma. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(1): 334–344. [\[DOI\]](#)
- [35] Pfeifer A, Brandon E, Kootstra N, Gage FH, Verma IM. Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: efficient gene targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 11450–11455. [\[DOI\]](#)
- [36] Silver DP, Livingston DM. Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol Cell*, 2001, 8: 233–243. [\[DOI\]](#)
- [37] Jo D, Nashabi A, Doxsee C, Lin Q, Unutmaz D, Chen J, Ruley HE. Epigenetic regulation of gene structure and



- function with a cell-permeable Cre recombinase. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 929–933. [\[DOI\]](#)
- [38] Patsch C, Edenhofer F. Conditional mutagenesis by cell-permeable proteins: potential, limitations and prospects. *Handb Exp Pharmacol*, 2007, 178: 203–232.
- [39] Taguchi A, Wartschow LM, White MF. Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science*, 2007, 317(5836): 369–372. [\[DOI\]](#)
- [40] Kim I, Saunders TL, Morrison SJ. Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell*, 2007, 130: 470–483. [\[DOI\]](#)
- [41] Wu R, Hendrix-Lucas N, Kuick R, Zhai Y, Schwartz DR, Akyol A, Hanash S, Misek DE, Katabuchi H, Williams BO, Fearon ER, Cho KR. Mouse model of human ovarian endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/beta-catenin and PI3K/Pten signaling pathways. *Cancer Cell*, 2007 11(4): 321–333. [\[DOI\]](#)
- [42] Lan Y, Liu B, Yao H, Li F, Weng T, Yang G, Li W, Cheng X, Mao N, Yang X. Essential role of endothelial smad4 in vascular remodeling and integrity. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(21): 7683–7692. [\[DOI\]](#)
- [43] Tan X, Weng T, Zhang J, Wang J, Li W, Wan H, Lan Y, Cheng X, Hou N, Liu H, Ding J, Lin F, Yang R, Gao X, Chen D, Yang X. Smad4 is required for maintaining normal murine postnatal bone homeostasis. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 13): 2162–2170. [\[DOI\]](#)
- [44] Teng Y, Sun AN, Pan XC, Yang G, Yang LL, Wang MR, Yang X. Synergistic function of Smad4 and PTEN in suppressing forestomach squamous cell carcinoma in the mouse. *Cancer Res*, 2006, 66(14): 6972–6981. [\[DOI\]](#)
- [45] Yang LL, Mao CM, Teng Y, Li WL, Zhang JS, Cheng X, Li XB, Deng HK, Yang X. Targeted disruption of Smad4 in mouse epidermis results in failure of hair follicle cycling and formation of skin tumors. *Cancer Res*, 2005, 65: 8671–8678. [\[DOI\]](#)
- [46] Wang J, Xu N, Feng X, Hou N, Zhang J, Cheng X, Chen Y, Zhang Y, Yang X. Targeted disruption of Smad4 in cardiomyocytes results in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res*, 2005, 97(8): 821–828. [\[DOI\]](#)
- [47] Zhang J, Tan X, Li W, Wang Y, Wang J, Cheng X, Yang X. Smad4 is required for the normal organization of the cartilage growth plate. *Dev Biol*, 2005, 284(2): 311–322. [\[DOI\]](#)
- [48] Xin HB, Deng KY, Shui B, Qu S, Sun Q, Lee J, Greene KS, Wilson J, Yu Y, Feldman M, Kotlikoff MI. Gene trap and gene inversion methods for conditional gene inactivation in the mouse. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(2): e14.
- [49] Greber B, Lehrach H, Himmelbauer H. Mouse splice mutant generation from ENU-treated ES cells—a gene-driven approach. *Genomics*, 2005, 85: 557–562. [\[DOI\]](#)
- [50] Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*, 2005, 122(3): 473–483. [\[DOI\]](#)
- [51] Dupuy AJ, Akagi K, Largaespada DA, Copeland NG, Jenkins NA. Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic Sleeping Beauty transposon system. *Nature*, 2005, 436(7048): 221–226. [\[DOI\]](#)
- [52] Geurts AM, Wilber A, Carlson CM, Lobitz PD, Clark KJ, Hackett PB, McIvor RS, Largaespada DA. Conditional gene expression in the mouse using a Sleeping Beauty gene-trap transposon. *BMC Biotechnol*, 2006, 6:30.
- [53] Cadinanos J, Bradley A. Generation of an inducible and optimized piggyBac transposon system. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(12): e87.
- [54] Wu S, Ying G, Wu Q, Capecchi MR. Toward simpler and faster genome-wide mutagenesis in mice. *Nat Genet*, 2007, 39(7): 922–930. [\[DOI\]](#)
- [55] Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ, Srivastava D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 2007, 129(2): 303–317. [\[DOI\]](#)
- [56] van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, 2007, 316(5824): 575–579. [\[DOI\]](#)
- [57] Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, Murphy A, Frendewey D, Valenzuela D, Kutok JL, Schmidt-Suppran M, Rajewsky N, Yancopoulos G, Rao A, Rajewsky K. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*, 2007, 316(5824): 604–608. [\[DOI\]](#)
- [58] Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, van Dongen S, Grocock RJ, Das PP, Miska EA, Vetrie D, Okkenhaug K, Enright AJ, Dougan G, Turner M, Bradley A. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*, 2007, 316(5824): 608–611. [\[DOI\]](#)
- [59] Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. Mouse genomic technologies recombineering: A powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet*, 2001, 2: 769–779. [\[DOI\]](#)
- [60] Muirers JP, Zhang Y, Stewart AF. Techniques: Recombinogenic engineering—New options for cloning and manipulating DNA. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26: 325–331. [\[DOI\]](#)
- [61] Cotta-de-Almeida V, Schonhoff S, Shibata T, Leiter A, Snapper SB. A new method for rapidly generating gene-targeting vectors by engineering BACs through homologous recombination in bacteria. *Genome Res*, 2003, 13(9): 2190–2194. [\[DOI\]](#)
- [62] Chan W, Costantino N, Li R, Lee SC, Su Q, Melvin D, Court DL, Liu P. A recombineering based approach for high-throughput conditional knockout targeting vector construction. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(8): e64.
- [63] Liu P, Jenkins NA, Copeland NG. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res*, 2003, 13: 476–484. [\[DOI\]](#)
- [64] Zhang P, Li MZ, Elledge SJ. Towards genetic genome projects: genomic library screening and gene-targeting vector construction in a single step. *Nat Genetics*, 2002, 30: 31–39. [\[DOI\]](#)
- [65] Valenzuela DM, Murphy AJ, Frendewey D, Gale NW, Economides AN, Auerbach W, Poueymirou WT, Adams

- NC, Rojas J, Yasenchak J, Chernomorsky R, Boucher M, Elsasser AL, Esau L, Zheng J, Griffiths JA, Wang X, Su H, Xue Y, Dominguez MG, Noguera I, Torres R, Macdonald LE, Stewart AF, DeChiara TM, Yancopoulos GD. High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(6): 652–659. [\[DOI\]](#)
- [66] Yang Y, Seed B. Site-specific gene targeting in mouse embryonic stem cells with intact bacterial artificial chromosomes. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(4): 447–451. [\[DOI\]](#)
- [67] Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 8424–8428. [\[DOI\]](#)
- [68] Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, Rideout WM 3rd, Yanagimachi R, Jaenisch R. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 6209–6214. [\[DOI\]](#)
- [69] Eakin GS, Hadjantonakis AK, Papaioannou VE, Behringer RR. Developmental potential and behavior of tetraploid cells in the mouse embryo. *Dev Biol*, 2005, 288(1): 150–159. [\[DOI\]](#)
- [70] Poueymirou WT, Auerbach W, Frendewey D, Hickey JF, Escaravage JM, Esau L, Dore AT, Stevens S, Adams NC, Dominguez MG, Gale NW, Yancopoulos GD, DeChiara TM, Valenzuela DM. F<sub>0</sub> generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(1): 91–99. [\[DOI\]](#)
- [71] Rong Y, Golic KG. Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science*, 2000, 288: 2013–2018. [\[DOI\]](#)
- [72] Han Z, Yi P, Li X, Olson EN. Hand, an evolutionarily conserved bHLH transcription factor required for *Drosophila* cardiogenesis and hematopoiesis. *Development*, 2006, 133: 1175–1182. [\[DOI\]](#)
- [73] Hattori D, Demir E, Kim HW, Viragh E, Zipursky SL, Dickson BJ. Dscam diversity is essential for neuronal wiring and self-recognition. *Nature*, 2007, 449(7159): 223–237. [\[DOI\]](#)
- [74] Chen BE, Kondo M, Garnier A, Watson FL, Puettmann-Holgado R, Lamar DR, Schmucker D. The molecular diversity of Dscam is functionally required for neuronal wiring specificity in *Drosophila*. *Cell*, 2006, 125: 607–620. [\[DOI\]](#)
- [75] Matthews BJ, Kim ME, Flanagan JJ, Hattori D, Clemens JC, Zipursky SL, Grueber WB. Dendrite self-avoidance is controlled by Dscam. *Cell*, 2007, 129: 593–604. [\[DOI\]](#)
- [76] Wang J, Ma X, Yang JS, Zheng X, Zugates CT, Lee CH, Lee T. Transmembrane/juxtamembrane domain-dependent Dscam distribution and function during mushroom body neuronal morphogenesis. *Neuron*, 2004, 43: 663–672. [\[DOI\]](#)
- [77] Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, 380: 64–67. [\[DOI\]](#)
- [78] McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, 405(6790): 1066–1069. [\[DOI\]](#)
- [79] Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295: 1089–1092. [\[DOI\]](#)
- [80] Kile BT, Hentges KE, Clark AT, Nakamura H, Salinger AP, Liu B, Box N, Stockton DW, Johnson RL, Behringer RR, Bradley A, Justice MJ. Functional genetic analysis of mouse chromosome 11. *Nature*, 2003, 425: 81–86. [\[DOI\]](#)
- [81] Zan Y, Haag JD, Chen KS, Shepel LA, Wigington D, Wang YR, Hu R, Lopez-Guajardo CC, Brose HL, Porter KI, Leonard RA, Hitt AA, Schommer SL, Elegbede AF, Gould MN. Production of knockout rats using ENU mutagenesis and yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(6): 645–651. [\[DOI\]](#)
- [82] Homberg JR, Olivier JD, Smits BM, Mul JD, Mudde J, Verheul M, Nieuwenhuizen OF, Cools AR, Ronken E, Cremers T, Schoffemeer AN, Ellenbroek BA, Cuppen E. Characterization of the serotonin transporter knockout rat: a selective change in the functioning of the serotonergic system. *Neuroscience*, 2007, 146(4): 1662–1676. [\[DOI\]](#)
- [83] Kitada K, Ishishita S, Tosaka K, Takahashi R, Ueda M, Keng VW, Horie K, Takeda J. Transposon-tagged mutagenesis in the rat. *Nat methods*, 2007, 4(2): 131–133. [\[DOI\]](#)
- [84] Lu B, Geurts AM, Poirier C, Petit DC, Harrison W, Overbeek PA, Bishop CE. Generation of rat mutants using a coat color-tagged Sleeping Beauty transposon system. *Mamm Genome*, 2007, 18(5): 338–346. [\[DOI\]](#)
- [85] Austin CP, Battey JF, Bradley A, Bucan M, Capecchi M, Collins FS, Dove WF, Duyk G, Dymecki S, Eppig JT, Grieder FB, Heintz N, Hicks G, Insel TR, Joyner A, Koller BH, Lloyd KC, Magnuson T, Moore MW, Nagy A, Pollock JD, Roses AD, Sands AT, Seed B, Skarnes WC, Snoddy J, Soriano P, Stewart DJ, Stewart F, Stillman B, Varmus H, Varticovski L, Verma IM, Vogt TF, von Melchner H, Witkowski J, Woychik RP, Wurst W, Yancopoulos GD, Young SG, Zambrowicz B. The knockout mouse project. *Nat Genet*, 2004, 36(9): 921–924. [\[DOI\]](#)
- [86] Auwerx J, Avner P, Baldock R, Ballabio A, Balling R, Barbacid M, Berns A, Bradley A, Brown S, Carmeliet P, Chambon P, Cox R, Davidson D, Davies K, Duboule D, Forejt J, Granucci F, Hastie N, de Angelis MH, Jackson I, Kioussis D, Kollias G, Lathrop M, Lendahl U, Malumbres M, von Melchner H, Muller W, Partanen J, Ricciardi-Castagnoli P, Rigby P, Rosen B, Rosenthal N, Skarnes B, Stewart AF, Thornton J, Tocchini-Valentini G, Wagner E, Wahli W, Wurst W. The European dimension for the mouse genome mutagenesis program. *Nat Genet*, 2004, 36(9): 925–927. [\[DOI\]](#)