

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00469

# 条件基因打靶研究存在的主要问题及对策

林福玉, 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, 蛋白质组学国家重点实验室, 北京 100071

**摘要:** 基于 Cre-loxP 等位点特异性重组系统的条件基因打靶技术在解析基因功能和制备疾病小鼠模型方面发挥着极其重要的作用。但包括 Cre 重组酶转基因的表达模式不理想、重组效率存在差异、Cre 重组酶的毒性等在内的 Cre-loxP 重组系统相关的缺陷以及条件基因打靶技术本身存在的问题, 如遗传背景、育种策略、实验对照、基因代偿等方面的影响往往被忽略, 严重影响基因功能和小鼠表型解析的准确性。针对这些问题, 精细调控实现 Cre 重组酶的理想时空特异性表达、详尽地分析 Cre 重组酶的重组效率、降低 Cre 重组酶的毒性、遗传背景单一化、优化育种策略、设立严格实验对照、多基因联合条件基因打靶等诸多解决方案应予以采纳。

**关键词:** 条件基因打靶; Cre-loxP; 位点特异性重组; 遗传背景

## Issues and solutions of conditional gene targeting

LIN Fu-Yu, YANG Xiao

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

**Abstract:** Conditional gene targeting, based on the site-specific recombination system such as Cre-loxP, plays a vital role in the study of gene functions and the generation of disease mouse models. It was always under consideration that there were problems in the Cre-loxP recombination system, such as illegal expression pattern of Cre transgene, variation of Cre recombination efficiency and toxicity of Cre recombinase, as well as the potential influences of genetic background, breeding strategy, experimental control and gene compensation. Oversights of these issues may have a profound influence on the accuracy of gene functional dissection and conditional gene targeting mice phenotypic interpretation. Accordingly, solutions should be adopted including delicate regulative control of temporal-spatial specific Cre expression, detailed detection of Cre recombination efficiency, reduction of Cre toxicity, simplification of mouse genetic background, optimization of breeding, setting up of proper control and combined conditional gene targeting.

**Keywords:** conditional gene targeting; Cre-LoxP; site-specific recombination; genetic background

条件基因打靶是基于位点特异性重组酶 Cre/FLP 重组酶切除或者颠倒 loxP/FRT 锚定的 DNA 片段, 在小鼠体内以一种组织/细胞特异性或者可诱导等“有条件性的”方式引入突变, 从而研究基因

功能的强有力的技术。来源于细菌噬菌体的 Cre 重组酶及其特异识别序列 loxP 位点构成条件基因打靶常用的系统<sup>[1-3]</sup>。Cre-loxP 系统包含两类小鼠, 一类基因锚定 *floxed* 小鼠是在各种目的基因的两侧通过同

收稿日期: 2010-10-28; 修回日期: 2011-03-15

基金项目: 蛋白质组学国家重点实验室深入研究课题(编号: SKLP-K200902), 国家科技重大专项新药创制(编号: 2009ZX09501-027)资助

作者简介: 林福玉, 博士, 副研究员, 研究方向: 转基因动物。Tel: 010-66948849; E-mail: linfuyu2000@yahoo.com.cn

通讯作者: 杨晓, 博士, 研究员, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: yangx@nic.bmi.ac.cn

源重组引入 34 个碱基对的 loxP 位点的小鼠, 另一类 Cre 重组酶转基因小鼠是各种组织/细胞特异性或者可诱导的方式调控下表达 Cre 重组酶的小鼠。通过上述两类不同小鼠组合交配, 特异条件调控表达的 Cre 重组酶将介导 loxP 位点间基因片段的重组, 获得多种条件基因打靶小鼠。常规完全敲除那些小鼠胚胎发育必需的重要基因时, 往往导致小鼠胚胎期死亡而难以分析基因在成体中功能。条件基因打靶可以克服完全基因打靶这一缺点, 能够用于更加精细地解析基因在特定组织、特定发育阶段的功能。条件基因打靶除用于基因功能基础研究之外, 发明 10 多年以来在生物医学研究领域已日渐广泛, 还成功用于构建“第二代”人类疾病小鼠模型, 可以更好地模拟人类疾病相关体细胞突变。正是由于条件基因打靶的广泛应用, 此实验技术体系内在固有的一些问题, 如 Cre 重组酶转基因的表达模式、靶基因重组效率的差异、Cre 重组酶的毒性、遗传背景、育种策略、实验对照、基因冗余等诸多方面越来越引起人们的强烈关注<sup>[4, 5]</sup>, 如果忽略这些问题, 很容易导致错误的实验结论。

## 1 Cre 重组酶表达的保真性和重组效率的不同

### 1.1 Cre 重组酶表达的保真性

利用条件基因打靶技术可以在特定的细胞类型或者组织器官(空间特异性)实现对小鼠基因组的遗传改造, 也可以在小鼠生命周期的特定发育阶段(时间特异性)在特定的细胞或者组织中进行遗传修饰。这种调控的基础是 Cre 重组酶转基因表达的保真性。这里的“保真性”是指 Cre 重组酶在小鼠中的表达模式(包括 Cre 重组酶表达的程度、空间分布和发育阶段等)与研究人员所预期的表达模式一致。实现 Cre 重组酶特异性时空调控表达的策略多种多样: 可以将特异的启动子和增强子与 Cre 基因相连形成经典的 Cre 转基因载体, 通过显微注射引入小鼠基因组; 可以将 Cre 的 cDNA 基因通过“基因敲入”整合到小鼠基因组合适的基因调控序列附近; 也可以整合上述两种方法, 将包含细胞/组织特异性表达或者特定发育阶段表达的基因组序列的细菌人工染色体改造成表达 Cre 的转基因表达载体。

虽然研究人员尽力将组织/时间特异的基因表达调控序列与 Cre 编码区组合并将这种表达框架引入基因组中, 但还不能完全保证 Cre 重组酶转基因按照预期表达。通过小鼠受精卵显微注射获得的 Cre 重组酶转基因小鼠, 由于转基因随机整合位点染色体结构的不同形成的“位点效应”, 导致不同的转基因品系之间 Cre 重组酶的表达模式可能不同。Cre 重组酶基因敲入小鼠 Cre 重组酶的表达受整合位点内源性的转录调控, 其表达模式理论上应该与整合位点内源基因的表达模式一致, 但如果内源基因位点表达水平不高, 重组酶的表达水平能否实现体内重组完成打靶过程就需要谨慎的检测评价。

### 1.2 Cre 重组酶重组活性及作用原理

即使利用相同的 Cre 重组酶转基因小鼠, 不同靶基因的重组效率也千差万别, 因为不同 loxP 锚定的靶基因对 Cre 重组酶介导重组反应的敏感性差异明显<sup>[6]</sup>。有些染色体区的基因似乎对 Cre 重组反应具有抵抗性。极端情况下, 同一种 Cre 重组酶转基因小鼠能够成功剔除一种锚定基因, 而对另外一种锚定基因却完全没有作用。B 细胞特异的 CD19-Cre 转基因实验<sup>[7]</sup>提供了很好的例证: CD19-Cre 能够有效介导成熟 B 细胞中大多数 loxP 锚定基因的剔除, 非成熟 B 细胞和前 B 细胞中部分基因的剔除, 而几乎不能介导 B 祖细胞中基因的剔除。其内在的机理目前尚不清楚, 原因可能是不同锚定基因的 loxP 位点由于处于不同的染色质结构差异造成与 Cre 重组酶的结合能力不同。

位点特异性重组的机制是两个重组靶位点/loxP 位点之间的随机碰撞。对于 M 期包埋在染色体内的基因而言, 随机碰撞的几率受两个因素的影响: 第一个因素是两个位点在染色体上的距离。两个位点相距越远, 相互碰撞的概率越小, 导致重组发生的几率越低。这是可以确定的; 第二个因素是未知的, 即 loxP 在基因中放置的位置不同造就的“位置效应”, 导致条件基因打靶过程中的不可控性。锚定靶基因时一般将两个 loxP 放置在一个基因的关键区段的外显子或者重组后将导致移码突变的外显子的两侧。当然最好将整个靶基因全部锚定, 但锚定片段太长往往影响打靶效率。因此在设计条件基因打靶时, 仔细研究基因的结构、寻求锚定区域的长短与基因的外显子之间的平衡对于打靶效率有重要影响。

1.3 条件基因打靶系统 Cre 活性分析与检测

常规组织特异性启动子调控的 Cre 转基因小鼠的 Cre 表达依赖于转基因整合位点。通常的应对做法是构建几个表达 Cre 的转基因小鼠系，然后评估 Cre 的表达部位和水平，鉴定出最有效的鼠系用于和基因锚定小鼠交配实现条件基因打靶。目前多应用报告小鼠来分析 Cre 重组酶表达的保真性。这类报告小鼠的等位基因通常是标记基因，如绿色荧光

蛋白(GFP)或者β-半乳糖苷酶(β-Gal)基因，标记基因的前面有loxP锚定的“停止(STOP)”序列，Cre重组酶介导的重组发生前标记基因表达被阻止，只有在特异调控下的Cre表达后，介导锚定的STOP表达框在特定的组织/器官、发育阶段重组切除后，标记基因才能表达。报告小鼠成为检测活体内Cre重组酶活性和作用的重要遗传学工具小鼠。至今已经有很多Cre和Flp报告小鼠(表 1)<sup>[2]</sup>。

表 1 Cre 和 Flp 报告小鼠

报告小鼠	重组酶	启动子/增强子	转基因 T/敲入 KI	报告基因	报告基因条件表达方式	参考文献
R26R	Cre	<i>ROSA26</i>	KI	<i>β-Gal</i>	ELC	[8]
cAct-XstopXlacZ	Cre	鸡β-肌动蛋白	T	核内β-Gal	ELC	[9]
floxLacZ	Cre	鸡β-肌动蛋白	T	<i>β-Gal</i>	ELC	[10]
cβ-STOP-lacZ	Cre	鸡β-肌动蛋白	T	核内β-Gal	ELC	[11]
<i>ROSA26</i> <sup>flox</sup>	Cre	<i>ROSA26</i> 原病毒	KI	<i>β-Gal</i>	ELC	[12]
Z/AP	Cre	<i>CAG</i>	T	<i>β-Gal</i> <i>PLAP</i>	— ELC	[13]
UCR	Cre	<i>G3BP(BT5)</i>	KI	<i>β-Gal</i>	ELC	[14]
Z/EG	Cre	<i>CAG</i>	T	<i>β-Gal</i> <i>eGFP</i>	— ELC	[15]
CAG-CAT-EGFP	Cre	<i>CAG</i>	T	<i>eGFP</i>	ELC	[16]
<i>ROSA26</i> -EGFP <sup>f</sup>	Cre	<i>ROSA26</i>	KI	<i>eGFP</i>	ELC	[17]
LSLMAP2GFP	Cre	鸡β-肌动蛋白	T	<i>MAP2-GFP</i>	ELC	[18]
ZW (CAG-lacZ-WGA)	Cre	<i>CAG</i>	T	<i>β-Gal</i> <i>WGA</i>	— ELC	[19]
Z/RED (CAG-Bgeo,-DsRed*MST)	Cre	<i>CAG</i>	T	<i>β-Gal</i> <i>RFP</i>	— ELC	[20]
CAG-tdTomato	Cre	<i>CAG</i>	KI	<i>RFP variant</i>	ELC	[21]
piGAP	Cre	<i>CAG</i>	T	<i>eGFP(F)</i> <i>hPLAP</i>	— ELC	[22]
R26R-TRPV1-ECFP	Cre	<i>ROSA26</i>	KI	<i>TrpV1</i> <i>ECFP</i>	— ELC	[23]
ZW (CAG-lacZ-WGA)	Cre	<i>CAG</i>	T	<i>β-Gal</i> <i>WGA</i> <i>EGFP</i>	— ELC	[24]
luc-gal(Tg)	Cre	<i>CAG</i>	T	<i>Luc/β-Gal</i>	— ELC	[25]
Hmgcr::FRTZ	FLP	<i>Hmgcr</i> 序列	T	核内β-Gal	EFC	[26]
R26::FRAP	FLP	<i>ROSA26</i>	KI	<i>hPLAP</i>	EFC	[27]
R26FR	FLP	<i>ROSA26</i>	KI	<i>β-Gal</i>	EFC	[28]
R26::FLAP	FLP+Cre	<i>ROSA26</i>	KI	<i>eGFP(F)</i> <i>hPLAP</i>	EFC EFC+ELC	[29]
R26: NZG	Cre FLP	<i>CAG</i>	KI	<i>β-Gal</i> <i>EGFP</i> <i>RFP</i>	— ELC	[30]
Thy1-Brainbow1.0/1.1/2.1	Cre (FLP)	<i>Thy1</i>	T	<i>CFP/EYFP/(GFP</i> <i>in 2.1)</i>	ELC	[31]
R26R-EYFP	Cre	<i>ROSA26</i>	KI	<i>eYFP</i>	ELC	[32]
R26R-ECFP	Cre	<i>ROSA26</i>	KI	<i>eCFP</i>	ELC	[32]

CAG: 鸡β-肌动蛋白启动子偶联巨细胞病毒增强子; Hmgcr 羧甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; β-gal: β-半乳糖苷酶; ELC: LoxP 锚定的 STOP 表达框的切除; hPLAP 人胎盘碱性磷酸酶; UCR, 通用型条件 lacZ 报告小鼠; EYFP, 增强型黄色荧光蛋白; ECFP, 增强型蓝绿色荧光蛋白; EFC: FRT 锚定的 STOP 表达框的切除; eGFP(F): 增强型绿色荧光蛋白-法尼氏酰化(farnistylated); 虚线表示重组前报告蛋白持续表达; WGA: 小麦胚凝集素(植物凝集素); Thy1: 胸腺细胞抗原 1; Trpv1: 瞬时受体电位阳离子通道 V 亚家族成员 1; Luc: 荧光素酶。

目前应用最为广泛的报告小鼠是R26R小鼠<sup>[8]</sup>。随着研究的不断需要和深入,这类报告小鼠的种类还在不断增加。最近一种称为“脑虹”的报告基因小鼠<sup>[31]</sup>的复杂和精细显示了研究人员的巨大智慧,他们用几种LoxP位点锚定2到3种荧光蛋白,使小鼠的脑组织在Cre重组酶的作用下呈现彩虹样结构,可检测到神经细胞会表达多达166种可分辨的不同荧光,为神经系统的研究提供了有利的工具。

应用报告小鼠的前提是它们能够真实的反映靶基因的剔除状态,但不同基因对Cre重组酶介导的重组反应敏感性的不同<sup>[6]</sup>会限制这种分析。尽管标记基因这种方法可以在单细胞水平上检测Cre重组酶的特异活性,但“真正的”条件基因打靶实验中这种特异的活性并不一定完全相同。一种表达黄色荧光蛋白的报告小鼠<sup>[32]</sup>经Cre重组酶重组表明c-Kit<sup>+</sup>原B细胞中重组率为5%,前B细胞中为40%<sup>[33]</sup>。然而,转录因子*Mcl-1*<sup>[34]</sup>和*c-Myb*<sup>[35]</sup>条件打靶小鼠B细胞发育严重阻滞在原B细胞向前B细胞转换阶段,PCR分析表明,两种实验中在这一阶段的绝大部分细胞中两种基因都发生了重组<sup>[34,35]</sup>。因此,报告小鼠得到的结果只能作为一种参考,这依赖于报告小鼠中loxP锚定的“停止”表达框的基因位点对Cre重组酶的敏感性和真正实验中loxP锚定的靶基因对Cre重组酶的敏感性是否完全一致。同时机体所有细胞中报告基因的表达原则上都能被检测到。在某种特定类型的细胞中报告基因不表达,并不能证明Cre重组酶没有表达或在其他的基因位点没有重组活性。为鉴定Cre转基因小鼠介导重组的效率及特异性,可以用多种不同的报告小鼠来检测,同时检测结果可以反映出Cre重组酶针对不同基因的打靶效率可能会有所不同。

为确保条件打靶实验中的特异性,最好对小鼠的不同组织Cre重组酶的表达模式和loxP锚定的靶基因进行全面分析,同时必须检测Cre重组酶介导重组前后基因组发生的变化。检测Cre重组酶小鼠在不同组织中介导的重组的最直接的方法是应用Southern杂交来区分野生型等位基因、loxP锚定等位基因和重组后的等位基因,但这种方法灵敏度有限,而且需要大量的细胞。细胞数量较少时可以选择PCR方法检测。

在靶基因条件打靶后,从细胞水平上追踪以及

区分突变型和野生型细胞的另一种方法就是利用原位杂交或免疫组化染色来检测野生型细胞中的mRNA和蛋白,但这种检测在很大程度上依赖于探针和抗体的灵敏性及特异性。事实上,如果靶基因只有一小部分编码区被剔除,那么能够检测mRNA的表达被剔除的原位杂交探针可选择的长度不大,其特异性可能较差,不能有效区分突变型和野生型细胞。因此,条件打靶时剔除基因的一大段编码区有利于寻找良好的原位杂交探针。在没有靶基因编码蛋白的抗体无法进行免疫组化实验时这显得更为重要。

另外一种更直接的检测方法是在条件打靶的靶基因后插入一个报告基因(如*lacZ*、碱性磷酸酶、*eGFP*等),报告基因(通常在5'端有一个剪接受体SA)一般放置在最3'端的重组酶识别位点的后面,包含报告基因的中靶等位基因在重组酶介导的切除后,靶基因以一种组织特异性方式被剔除,同时报告基因被激活并对发生重组的细胞进行标记<sup>[36,37]</sup>,这样可以直接观测到感兴趣的组织或细胞中靶基因的剔除效率,有助于解析打靶小鼠表型。这种方法的前提条件是靶基因的启动子足够强,报告基因能够在特定细胞或者所有细胞中被激活表达并能被检测到。从此意义上来说,这种检测虽可以提高灵敏度,但不像Southern杂交那么直接。

#### 1.4 Cre重组酶不“保真”造成的额外优点

值得欣慰的是,Cre转基因小鼠的不保真性可能会拓展小鼠的应用空间。B细胞从不成熟的过渡细胞分化成存活较长的卵泡和边缘区B细胞时,CD21被诱导表达,因此CD21-Cre3A转基因小鼠最初被设计用于成熟B细胞特异的基因功能的遗传学分析。应用CD21-Cre3A细菌人工染色体转基因小鼠介导loxP锚定的转录因子*yy1*等位基因的条件基因打靶CD21-Cre3A; *yy1*<sup>flox/flox</sup>小鼠实验<sup>[38]</sup>就呈现出Cre表达的不保真性:CD21-Cre3A的确能介导脾脏成熟B细胞内loxP锚定基因的重组<sup>[38]</sup>,也能介导同样表达CD21的卵泡枝状细胞内锚定基因的重组<sup>[39]</sup>,但其他不同的组织中也会发生重组剔除,最明显的是前脑。实际上,CD21-Cre3A, *yy1*<sup>flox/flox</sup>条件基因打靶纯合子小鼠很早死亡,表现出众多发育异常,其中前脑几乎完全缺失<sup>[4]</sup>。此结果暗示即使Cre敲入在



成熟B细胞和卵泡枝状细胞中表达 $CD21$ 位点<sup>[40]</sup>也不一定能保证 $Cre$ 转基因表达的保真性,但 $CD21-Cre3A$ 小鼠出人意料地成为一种还可用于前脑条件基因打靶的工具小鼠。这种由于基因的表达调控和表达模式尚不清楚就应用其调控序列制备的 $Cre$ 转基因小鼠出现异位表达的例子很多,拓宽了不保真 $Cre$ 转基因小鼠的条件打靶应用范围。

## 2 条件基因打靶中的嵌合体

在条件基因打靶中稳定表达 $Cre$ 重组酶的转基因小鼠品系至关重要。但大部分组织或细胞特异性 $Cre$ 转基因小鼠并不是100%有效的,当这种 $Cre$ 转基因小鼠与 $floxed$ 小鼠交配时,特定组织只有部分细胞由于基因剔除失去功能,这样就产生嵌合体(个体中特定组织内的细胞的基因型不完全相同)。残余存在的野生型细胞可能会掩盖打靶小鼠应有的表型,也有可能产生完全不同的表型,会加大小鼠表型分析的难度。当靶基因以非细胞自主性方式起作用,特别是当靶基因编码分泌型信号分子时,仅有的一小部分野生型细胞表达基因产物可能会完全挽救突变的表型。相反,受体或细胞内信号转导分子等细胞自主性蛋白基因的条件打靶,并不总是需要达到100%的重组效率就可以产生表型,尽管可能与完全基因打靶不完全相同。

$Cre$ 重组酶介导的条件打靶是个动态过程,也造成所有的靶组织/细胞中同时发生重组。发生重组的细胞数目开始可能处于很低的水平,随着时间形成乙状曲线,最终才达100%饱和。 $Cre$ 重组酶的表达特性和 $LoxP$ 锚定序列的特点影响该曲线。 $Cre$ 重组酶介导的条件打靶小鼠的靶细胞中靶蛋白的缺失时间存在延迟,这种延迟具有几个层面:首先是 $Cre$ 转录开始,随后是 $Cre$ 蛋白的翻译和聚集,然后 $Cre$ 催化 $loxP$ 锚定的靶基因的重组。这个过程会剔除靶蛋白的转录模板,但重组前的靶基因转录的mRNA依然会在一定阶段内在细胞内作为模板翻译成蛋白质。翻译过程完成后,靶蛋白还需要在靶细胞内降解。RNA和蛋白质在细胞内的半衰期差异巨大,如果基因产物越稳定,也就意味着从基因剔除到出现表型的时间间隔越长;同时RNA和蛋白质能在很宽的浓度范围内保持在细胞内发挥正常的功能。这种问题的存在最初可能会掩盖基因灭活的表型。由于

$Cre$ 和靶基因表达的动力学和靶蛋白及其mRNA的稳定性,这种延迟会达几小时甚至数天,限制了条件打靶在快速发育过程中基因的功能研究。因此,在应用条件基因打靶研究基因功能之前,应该对目的基因的性质有所考虑。总体来讲,有必要分析条件基因打靶 $Cre$ 介导的重组后细胞内靶基因的RNA或蛋白质剔除的情况。

正是由于组织或细胞特异性条件基因打靶的不完全性,提供了更丰富的关于目的基因在组织器官发育过程中的功能信息。 $VHL$ (von Hippel-Lindau)综合征发生与 $VHL$ 基因突变有关。 $Vhl$ 基因完全剔除小鼠死于胚胎期。 $\beta$ -肌动蛋白启动子指导下的 $Cre$ 重组酶转基因小鼠制备的 $Vhl$ 基因条件打靶 $VHL^{fl/d}/Cre$ 小鼠多个组织的部分细胞中剔除了 $Vhl$ 基因,肝脏发生多发性血管瘤,多种组织中出现血管扩张和血管生成,很好地模拟人类疾病的临床特征。有趣的是,研究者还发现子代嵌合体雄性小鼠睾丸变小、精子数量减少并导致不育,表明 $Vhl$ 基因还在小鼠精子生成过程中发挥重要作用<sup>[41]</sup>。

$Cre$ 重组酶介导的基因在某些组织器官中的不完全剔除可以更加精确有效地模拟疾病的发生过程。部分幼儿粒单系白血病(JMML)患者中发现 $NFI$ 基因失活的现象。Le等<sup>[42]</sup>将干扰素可诱导的 $Cre$ 转基因小鼠与 $Nfl$ 条件基因打靶小鼠交配,子代 $Mx1-Cre; Nfl^{flox/flox}$ 条件打靶小鼠仅部分造血细胞中剔除了 $Nfl$ 基因。 $Nfl$ 基因的部分失活导致髓系增生障碍,这种表型相当于JMML的临床亚急性表现。此外, $Nfl$ 基因的不完全剔除还导致了髓细胞组织浸润、对粒单集落刺激因子的高敏感性、过度增殖以及抗凋亡。这种可人为调控的小鼠模型对于进行JMML临床治疗以及JMML的分子机制深入研究提供了更好的技术平台。家族性结肠腺瘤性息肉病(FAP)患者携带 $APC$ 突变基因。Shibata等<sup>[43]</sup>利用腺病毒介导 $Cre$ 重组酶在大约10%~20%的结肠上皮细胞中剔除了 $Apc$ 基因,结果83%的 $Apc$ 基因剔除纯合子 $AxCANCre; Apc^{580S}$ 小鼠在病毒感染4周后发生结肠腺瘤,平均腺瘤个数是6.7个, $Apc$ 基因剔除纯合子小鼠结肠腺瘤在1年后大约50%发生癌变,证明了这种小鼠模型可更好地模拟结肠腺瘤的发生过程。

由于 $Cre$ 转基因小鼠在胚胎干、祖细胞中表达时相存在差异,这种“嵌合体”表达的条件基因打靶

在细胞命运和发育谱系的研究应用广泛,主要是通过Cre转基因小鼠与报告小鼠(表 1)检测发育不同时期报告基因的表达来研究。但这种应用需要注意以下几点:第一,Cre转基因在胚胎发育整个过程中特定组织的表达图谱必须明确。时空表达模式图的检测方法主要是原位杂交和免疫组化,也可以通过表达GFP-Cre融合蛋白<sup>[44]</sup>用GFP判定Cre表达的简化方法;第二,Cre报告小鼠的时空表达特性需要明确。通过与Cre报告小鼠表达比较,可以确定细胞谱系关系;第三,在某时间点检测到的Cre报告基因的表达应该是所有表达Cre和报告基因的前体细胞的后代。这些前体细胞可能是同一细胞谱系的不同发育阶段,也可能是不同的谱系,仅仅检测发育后期一个阶段可能会得到错误的细胞命运图。这种缺陷可通过应用可诱导的条件基因打靶得以解决。一些在分化细胞中表达的基因,也可能在胚胎发育的早期有表达,用这种基因的启动子制备的Cre转基因小鼠可能由于胚胎期就开始表达Cre而成为“deleter”小鼠,丧失其组织/器官的特异性。因此,选择Cre转基因小鼠进行条件基因打靶实验时,Cre开始重组剔除基因的发育阶段很重要。出生前神经元特异性剔除NMDA受体<sup>[45]</sup>和TrkB受体<sup>[46]</sup>基因的小鼠都胚胎致死,只有通过选择出生后神经元才表达Cre的小鼠来对成年小鼠的长期记忆形成过程和疾病发生中两种受体的功能进行解析。

### 3 生殖系 Cre 介导的重组造就表观遗传学对条件基因打靶的影响

表观遗传学是指单细胞或者多细胞生物将不是核苷酸编码的信息遗传给后代的现。现在越来越多的证据表明,转基因动物的卵子或精子中的RNA或蛋白质可以遗传给非转基因的后代引起表观遗传学改变。Matthaei等<sup>[47]</sup>在将Tnap启动子调控的Cre小鼠和FloxStop(基因结构为loxP-β-gal-Stop-loxP-EGFP)小鼠交配时最直观地发现了这一问题。FloxStop小鼠表达β-Gal,由于STOP序列的存在而不表达GFP。和Cre小鼠交配后的双转基因条件表达小鼠(delLoxP)因为β-Gal的剔除,不再表达β-Gal,同时预期通过这种交配Cre会剔除β-gal-Stop使小鼠开始表达GFP而变绿。实际上,Cre转基因是父本时,确实看到了Cre稳定遗传给后代并在子代中剔除了锚定

的基因(Cre/delLoxP)。雄性野生型Cre阳性小鼠和FloxStop/FloxStop雌鼠交配产生的后代全部是FloxStop阳性,一半是Cre阳性。只有Cre阳性子代小鼠因为停止序列切除(delLoxP)而变绿。然而,当Cre转基因是母本时,和FloxStop/FloxStop雄鼠交配产生的后代也全部是FloxStop阳性,一半是Cre阳性。但全部子代小鼠都表达GFP而变绿,即便是没有遗传获得Cre基因的WT/delLoxP阴性小鼠也变绿。其他科学家也发现了这种现象:角蛋白K5启动子调控的Cre转基因小鼠用于条件打靶时可以实现组织特异性基因剔除,而角蛋白K5启动子调控的Cre转基因母鼠的所有后代均发生了基因的剔除<sup>[48]</sup>,即便是没有遗传获得Cre基因的小鼠;更为重要的是Cre转基因小鼠作母本时,子代基因的剔除不再是组织特异性的条件剔除,而是所有组织的锚定基因全部被剔除,表明剔除可能发生在胚胎发育的早期阶段<sup>[48]</sup>。这些数据表明,Cre的RNA或者蛋白可能存在于Cre转基因母鼠的所有卵子中,能够遗传给非转基因的后代,引起广泛的基因剔除。而且,这种“母系遗传”现象发生于其他多种不同的启动子调控的Cre小鼠<sup>[49-51]</sup>中,暗示这种现象可能普遍存在。在这种情况下,不携带Cre转基因的floxed小鼠可能不是一个严格的对照。

在这种“母系遗传”现象逐步引起人们关注之时,是否可以应用Cre小鼠和基因锚定的母鼠进行交配避免这种现象呢?最近的一项研究<sup>[52]</sup>否定了这种设想,他们应用3.6 kb或2.3 kb大鼠Colla1启动子调控的Cre转基因小鼠(Col3.6-Cre和Col2.3-Cre)与Igf1第4外显子被锚定的小鼠交配制备成骨细胞特异性的Igf1打靶小鼠,结果发现部分没有遗传Cre基因的后代小鼠也发生了Igf1基因的重组剔除。Col2.3-Cre和Col3.6-Cre为母本的后代重组发生率分别是50%和28%。更为惊奇的是Col2.3-Cre和Col3.6-Cre为父本的后代重组发生率分别是15%和18%。这种Cre的RNA或蛋白质通过精子遗传并引起重组的“父系遗传”现象同样存在,只不过效率稍稍低于“母系遗传”现象。

最近发现了转基因RNA能够在非转基因子代中引起表型变化的直接证据。Rassoulzadegan等<sup>[53]</sup>发现,携带Krt<sup>tm1Alf</sup>转基因的公鼠的腿和尾有白色斑点。这些小鼠与野生型母鼠交配产生的后代,包括那些

*Kit<sup>tm1Alf</sup>*转基因阴性的子代小鼠, 全部具有白色斑点的腿和尾。更为有趣的是, 他们将*Kit<sup>tm1Alf</sup>*的RNA注射到单细胞的小鼠胚胎, 获得了具有白色斑点的腿和尾的小鼠。这表明, *Kit<sup>tm1Alf/+</sup>*的RNA能够通过转基因小鼠的精子遗传给非转基因的后代, 在转基因基因本身不存在的情况下诱导表型的发生。

各种Cre转基因小鼠原则上都应该能够有效介导小鼠生殖系中loxP锚定序列的重组<sup>[48, 54-57]</sup>, 否则, 基因打靶突变体小鼠中部分小鼠携带理想的条件打靶突变基因, 部分小鼠大部分机体细胞乃至所有细胞的基因都可能被剔除, 呈现不均一性。这种不均一性可能完全掩盖真实的实验结果, 主要依赖于条件打靶小鼠是否能够从它的父本和母本同时遗传获得loxP锚定的等位基因和Cre转基因。因此, 涉及到Cre重组酶介导种系重组的研究, 必须事先斟酌好小鼠交配的方法, 以保证Cre等位基因和LoxP锚定的等位基因来源于不同的父本母本。

这些数据强烈地提示我们在用同窝非 Cre 转基因小鼠作为对照前, 必须记住配子(包括精子和卵子)中锚定的基因能够与来源于 Cre 转基因小鼠的配子形成合子后发生 Cre 重组酶介导的重组反应, 即便是 Cre 转基因小鼠的配子不携带 Cre 转基因也可能发生, 因此必须仔细比对与野生小鼠的差异。

## 4 Cre 重组酶的毒性

### 4.1 Cre 重组酶毒性产生原因及表现

应用Cre重组酶的条件基因打靶更为重要的一个潜在的问题是Cre重组酶本身的毒性。Capecchi研究小组发现Cre能够引起细胞基因组DNA发生重组, 表现出细胞毒性。*Prml* 启动子调控精子细胞在有丝分裂期后表达 Cre, 导致受精卵流产, 外显率为100%, 同时伴随大量的DNA损伤, 特点为雄原核染色体呈现“杂乱的DNA”<sup>[58]</sup>。以同样方式构建的没有酶活性的Cre突变载体, 和野生型Cre相近表达剂量的Cre突变体并不会造成DNA损伤, 证明DNA损伤的确是Cre重组酶的活性造成的。

另一方面, 哺乳动物基因组中存在隐含的/假的loxP的序列, 其序列可能和loxP的保守序列不完全相同, 但能够被Cre重组酶识别而发生重组<sup>[59]</sup>。生物信息学分析表明小鼠的基因组中大约每百万碱基对

中含有1.2个这样的位点<sup>[60]</sup>。Cre重组酶与这些隐含的识别序列的结合力虽然可能大大低于与保守的loxP位点的结合力<sup>[59]</sup>, 但Cre重组酶仍然可以介导两个隐含的loxP位点间的重组; 或者在单个隐含的loxP位点阻断细胞DNA损伤修复元件的功能, 从而与DNA共价连接, 成为重组反应的副产物。这些都能引起DNA的损伤。

很多研究人员已经应用逆转录病毒转染成纤维细胞的方法仔细研究了Cre重组酶的毒性, Cre重组酶的高水平稳定表达诱导细胞生长停滞<sup>[61-64]</sup>, 染色体异常<sup>[62, 64]</sup>。大部分发表的文献中Cre转基因小鼠表型正常, 与野生型小鼠基本难以区分。这种现象令人费解, 可能的原因是成纤维细胞将细胞中DNA的断裂和缺口的修复作为生命过程中内在的机制, 造就了更为精细的修复系统, 从而比其他的细胞(如淋巴细胞<sup>[63]</sup>)对Cre的毒性更为敏感。其实许多Cre转基因小鼠并非完全正常, 只是在发育过程中通过选择和适应消除了Cre的毒性。

### 4.2 减少 Cre 重组酶毒性的途径

采用病毒介导Cre基因表达制备条件基因打靶的方法<sup>[43]</sup>最大的优点是简单易行。用复制缺陷型腺病毒瞬时表达的Cre, 能够在成纤维细胞中有效介导loxP锚定的新霉素抗性表达框的切除, 但不造成明显的DNA损伤的病毒浓度范围很大<sup>[65]</sup>, 这提示通过控制重组酶的表达时间, 只要表达足够量的Cre用以介导loxP锚定的靶基因的重组, 就可以降低Cre的细胞毒性, 至少在成纤维细胞中如此。但这种方式的缺点显而易见, 那就是Cre基因的表达调控太不精确。此外, 病毒感染可能会引起并发症而干扰小鼠表型分析。

减少细胞中Cre重组酶的作用时间的第二种策略是应用自我切除型Cre表达载体<sup>[61, 62, 66]</sup>, Cre两侧用loxP锚定, 表达的Cre重组酶重组切除自身的表达框架, 从而终结自身的表达。这种策略的设计技巧在于用突变的loxP位点锚定Cre表达框, 用野生型的loxP位点锚定靶基因, 可以使Cre介导自身切除的效率低于靶基因的切除, 从而保证Cre表达后能够有时间完成“真正的”重组。

可透膜的Cre重组酶首先是Jo等<sup>[67]</sup>将FGF4 蛋白12个氨基酸残基的核定位信号序列(NLS)与Cre重组



酶构建成融合蛋白NLS-Cre-MTS, 氨基端的NLS可使Cre重组酶穿越核膜进入核内发挥作用, 在培养的细胞中成功地切除了被loxP锚定的序列。通过腹腔注射可透膜的Cre重组酶, 在小鼠的各组织内均检测到Cre重组酶的活性。这种方法的优点是简单易行, 而且在非增殖终末分化细胞中也可成功实现Cre重组酶介导的重组。此方法的缺点是Cre重组酶介导发生重组的细胞所占比例较少。来源于HIV-TAT的碱性肽段与Cre融合形成的透膜型Cre重组酶TATCre, 也可以用于剔除锚定的基因, 能够控制条件基因打靶的时间, 而且不用制备并鉴定众多的Cre转基因系。透膜的Cre重组酶蛋白直接注射到小鼠体内反映出这种方法的另一种缺陷, 即不具有良好的组织特异性。Cre通过蛋白转导方法直接导入携带loxP锚定的靶基因的细胞中<sup>[68,69]</sup>, 这种方法仅仅限于细胞培养实验。最近, Peitz 等<sup>[70]</sup>发现改进型透膜的His-TAT-NLS-Cre(简称HTNCre)转导的ES细胞能够维持正常的核型, 并能进入种系遗传。同理, Patsch 等<sup>[71]</sup>最近研制成功透膜的FLP重组酶。

可诱导的Cre表达系统, 主要包括I型干扰素系统、四环素系统、它莫西芬系统等<sup>[2]</sup>, 能够改变常规Cre介导的一次性的不可逆重组过程, 实现Cre的时空特异性调控, 减少细胞中Cre重组酶的作用时间。这种可诱导系统不仅能够实现组织特异性的条件基因打靶, 其更大的优势在于能够在特定的时间通过给予诱导剂实现条件打靶的时间控制, 避免了Cre重组造成发育早期的基因缺失造成胚胎期致死表型或者代偿机制的激活使表型解析复杂化, 彻底改变常规转基因小鼠Cre进行基因打靶不可逆的缺点。但任何诱导系统还不能达到一种理想的诱导状态——没有诱导的情况下完全没有Cre活性, 诱导后能够 100%剔除靶基因。靶细胞中部分基因剔除产生的嵌合现象依然存在。四环素系统没有被广泛应用于调控Cre介导的基因条件打靶的原因似乎就是四环素系统经常出现“渗漏”。Loonstra等<sup>[64]</sup>用成纤维细胞在内源的*Rosa26* 启动子调控Cre和雌激素受体配体结合区的融合蛋白(CreERT) 的表达。成纤维细胞在长达 9 天的、低浓度的它莫西芬诱导下能有效切除loxP锚定的靶基因, 没有发生细胞生长停滞。当然, 完全的靶基因剔除影响了成纤维细胞的扩增。作者还发现重组反应和Cre毒性与细胞增殖密切相关<sup>[64]</sup>。

有趣的是转基因果蝇中增殖和Cre诱导的发育异常正相关<sup>[72]</sup>。Raffel等<sup>[73]</sup>试图用它莫西芬诱导的CreERT2 系统分析活体内B细胞受体在c-Myc转化的B细胞淋巴瘤维持和进展中的作用, 实验最后归于失败, 其原因在于尽管实验设计时预先排除了会引起B细胞受体的剔除, 但能够有效介导靶基因重组的所需浓度的它莫西芬通过CreERT2 足以消除淋巴瘤。值得注意的是, 对肿瘤细胞的毒性不是它莫西芬自身, 而是由于CreERT2 的表达<sup>[4]</sup>。CreERT2 融合蛋白是否是因为ERT2 配体结合区招募自身进入转录复合体而加剧毒性还需进一步鉴定。最近实验发现体内表达CreERT2 直接引起血液学毒性和染色体重组<sup>[74]</sup>。这些结果清楚地表明Cre重组酶是一种浓度依赖性DNA损伤因子, 对哺乳动物细胞具有毒性作用。同时, 诱导剂本身可能引起细胞毒性。小鼠能够耐受单剂量的 4-羟基-它莫西芬, 但长期给予小鼠 4-羟基-它莫西芬会引起严重的毒性作用, 特别是对肝脏损伤最严重。因此, 条件基因打靶前系统评估 4-羟基-它莫西芬的毒副作用具有重要意义。

配体诱导二聚化技术(DiCre系统)最近研制成功<sup>[75]</sup>, 更为严谨地调控Cre重组酶的体内表达。在这种方法中, Cre与FKBP12 的FK506 结合域相融合或与FKBP12 -雷帕霉素相关蛋白FRB的结合域融合生成两种无活性的Cre融合蛋白。雷帕霉素诱导两种Cre融合蛋白形成异源二聚体而重建Cre重组酶活性。该DiCre系统已用于ES细胞Cre的活性以及小鼠胚胎和成体组织, 还可以用来建立条件性Cre的“Deleter”老鼠。此技术提供了一种组合的方式来调控Cre重组, 可以在任何特定时间点或者细胞类型通过从两个不同的启动子调节融合蛋白的表达来实现对Cre活性的严谨调控。该系统另一额外优势在于能克服在哺乳动物基因组隐藏的loxP位点可能会导致不必要的Cre介导的染色体重排引发的毒性问题。

#### 4.3 Cre 转基因可能造成“Cre 毒性”假象

除了Cre重组酶自身的毒性外, 和其他转基因一样, 随机整合的Cre转基因可能会改变整合位点及其附近的内源基因的表达(插入突变)。这些改变可能是Cre转基因的直接插入造成的内源基因的破坏和/或Cre转基因载体携带的启动子、增强子、拼接



调控序列、多聚A尾巴等影响了内源基因的表达。最近发现基因组中存在大量功能尚不清楚的非编码区序列,它们并非“垃圾DNA”,而是具有重要调控功能的序列。如果Cre转基因插入破坏这些基因编码区外的序列,同样可能引起小鼠表型的改变。实际上,一些Cre转基因确实表现出明显的异常表型,如用于分析胰腺β细胞基因功能的RIP-Cre小鼠不能耐受葡萄糖<sup>[76]</sup>,造成的原因是高水平表达的Cre或转基因的插入效应还是两者兼而有之尚不明确。与之相反,许多Cre编码区定位打靶敲入内源基因位点制备的小鼠是杂合子基因剔除,基因的剂量效应开始显现。和野生型小鼠的B细胞相比,CD19-Cre转基因杂合子小鼠的B细胞表达一半剂量的CD19,这些小鼠B细胞发育初级过程似乎正常,但腹膜B1细胞的数量稍有下降<sup>[4]</sup>,这些结果与CD19的表达变化影响B细胞的选择和功能的结果<sup>[77]</sup>相一致。

## 5 条件基因打靶的育种策略

最基本的条件基因打靶的育种策略图见参考文献<sup>[78]</sup>。组织或细胞特异性表达Cre重组酶的转基因小鼠与floxed小鼠交配时,两代后可以得靶基因的一条等位基因被剔除,另外一条等位基因被锚定,并且在特定组织或细胞表达Cre重组酶的小鼠,基因型为Cre/+; floxed/,得到的机率是25%,其前提是被锚定的等位基因与Cre基因并不连锁。被剔除的这条等位基因可来自完全基因剔除小鼠,也可来自Cre介导的去除筛选标记的副产物-I型缺失。许多情况下,第二代的怀孕母鼠(F2)经常被处死,取F3代胚胎用于条件基因打靶研究。因此Cre/+; +/-小鼠通常是公鼠,而靶基因两条等位基因被锚定的纯合floxed/floxed锚定小鼠通常是母鼠。这样可以不用鉴定实验过程中经常处死的纯合锚定小鼠。如果没有靶基因被剔除的小鼠,也可用靶基因一条等位基因被锚定的小鼠(Cre/+; floxed/+)代替靶基因一条等位基因被剔除的小鼠(Cre/+; +/-)和纯合锚定小鼠交配。但这样做,就需要Cre重组酶有较强的活性,因为F3代小鼠两条被锚定的靶基因都需在Cre重组酶的作用下被条件剔除。最近Zhao等<sup>[79]</sup>应用这种简化策略获得的αGSU-Cre; Sfl<sup>fl</sup>小鼠具有下垂体特异的亚效等位基因表型。另外,Cre/+; +/-小鼠交配可得

到基因型为Cre/Cre; +/-的小鼠,这种小鼠与floxed/floxed小鼠交配可使得条件基因剔除F3代小鼠的机率提高到50%。但要注意的是,Cre重组酶位点纯合的小鼠表型是否为野生型的表型。通过基因敲入方法制备的Cre转基因小鼠通常不是野生型表型,因为Cre引入的同时伴有基因剔除的发生。育种计划并非完全如上所述一成不变,而要根据小鼠的遗传背景、不同基因型小鼠的生育率和存活率等来决定。

研究隐性胚胎致死突变小鼠时,通过杂合子育种途径获得纯合子条件打靶小鼠的几率仅占子代小鼠的四分之一。除了这种效率低的缺陷,每一个胚胎还需要进行基因型鉴定。当需要大量的突变体胚胎进行实验时,收集足够的样品所需的时间和财力物力将成为一大障碍。当然,可以用大量的人力和充足的空间进行大规模的小鼠交配来获得突变体,但实验动物的3R原则和资金的要求还是需要研究者做出合理的实验设计。一种生殖细胞特异性条件打靶育种策略可以提高获得条件打靶小鼠的孟德尔遗传比例。原理上讲,生殖细胞特异表达Cre并携带锚定靶基因的小鼠将只产生基因剔除的配子,这两种小鼠交配产生的后代将全部是基因剔除的小鼠。实际上,卵子特异的Zp3-Cre/+; Sox9<sup>flox/flox</sup>母鼠与精子特异的Prm1-Cre/+; Sox9<sup>flox/flox</sup>公鼠交配的后代75%为Sox9<sup>Δ/Δ</sup>条件剔除,而25%为Sox9<sup>Δ/flox</sup>。Sox9基因剔除杂合缺失导致小鼠死亡。可以想象,单倍体致死小鼠很难用于获得纯合子。这种策略实际上避免了单倍体致死,但还没有见到用于提高突变体比例的报道<sup>[80]</sup>。

## 6 条件基因打靶的实验对照

Cre重组酶的毒性问题的存在是文献中已经证明的,但在条件基因打靶这一领域多被忽略。近期一项应用RIP-Cre小鼠的综合分析<sup>[76]</sup>表明,大部分研究者没有设立只携带Cre转基因而靶基因没有被锚定的小鼠这种必要的严格对照,这种省略将导致严重的错误实验数据。Naiche等<sup>[81]</sup>仔细检测了3种曾经报道过的Cre小鼠系,发现Cre重组酶本身足以引起严重的发育缺陷,其中2种Cre转基因小鼠系造血功能丧失,许多胚胎组织细胞凋亡明显增加,表

明Cre重组酶的毒性表达会造成假象,影响表型遗传学分析的准确性。特别是应用这些小鼠的研究报道并没有设立Cre转基因小鼠作为阴性对照,因此条件基因打靶小鼠的表型全部归咎于靶基因的功能缺失。实际上,部分或者全部表型的出现是Cre重组酶毒性造成的,这提示我们需要仔细评估以前发表的条件打靶实验,谨慎细致地设计以后的条件打靶实验。

在条件基因打靶实验中即便设立 Cre 转基因的小鼠或细胞作为常规对照,这样的对照实验未必能完全解决问题的存在,因为 Cre 毒性可能只有通过打靶引入突变后才显现出来,而自身并没有毒性作用,比如 Cre 重组酶介导的抗凋亡基因或 DNA 损伤相关基因的剔除会导致中靶细胞的凋亡,因为它们不能继续抵抗 Cre 重组酶的毒性作用。当 Cre 重组酶介导引入一个致癌突变时,也无法简单地排除 DNA 损伤造成稀有细胞的转化。很明显,这时可以尝试控制 Cre 重组酶在细胞内表达的时间,或者应用挽救实验来逆转打靶突变。

## 7 条件基因打靶小鼠的遗传背景

遗传背景被定义为能够和目的基因相互作用的基因组中全部其他基因并能潜在影响表型的基因型<sup>[82]</sup>。因此,条件基因打靶实验中遗传背景也是个值得关注的问题,因为它不仅可能影响主要的病理表型,还会影响条件打靶系统本身的效率。不同小鼠品系中rtTA系统的调控也不相同为此提供了证据<sup>[83]</sup>。尽管目前还没有系统的研究,但据此类推,不同的Cre介导的基因打靶可能也是小鼠品系依赖性的。自然界存在的这种复杂性可能造成难以预料的结果或者将误导我们的研究,特别是不同的近交背景下不同的条件小鼠杂交造成遗传多重性时影响更为严重。基于此,许多实验者主张实验过程中需要尽力保持纯的小鼠遗传背景。

只是最近大鼠ES细胞来源的基因敲除才被成功报道<sup>[84]</sup>,在此之前,动物中只有小鼠的ES细胞能够种系遗传,而且是仅仅来源于几个品系的小鼠。小鼠的ES细胞最早来源于 129 系小鼠,构建floxed小鼠时由于其种系遗传性、易于遗传操作和扩增等优点应用最为广泛。但 129 系小鼠存在以下 3 方面的

问题需要引起注意:首先,129 系小鼠由于内在的遗传缺陷,繁殖能力极差,因此,实验中难以保持简单的同类系遗传背景;其次,129 系小鼠常伴有神经解剖学和行为学缺陷。与B6 小鼠相比,129 小鼠的理毛行为、空阔场地的活动和习惯、运动能力和运动学习、记忆、恐惧、抑郁样行为、焦虑、药物反应等生理参数完全不同<sup>[85]</sup>,因此应用条件打靶进行神经生物学研究时遗传背景显得更为重要;第三,129 系小鼠存在 129/J、129/Sv、129/SvEv以及 129/Ola 等亚型,不同亚型之间的遗传变异造成不同的生理和行为表现。经常会发现用同一个打靶载体,在不同的遗传背景下进行打靶,获得的小鼠表型却有很大差别。因此,在实验设计、特别是打靶小鼠表型分析时,一定要考虑到这些差异的存在。可喜的是,特定区域的单核苷酸多态性检测能够准确区分这些亚型<sup>[86]</sup>,有利于 129 系同类系的建立。

为制备基因打靶小鼠,一般在 129 系小鼠 ES 细胞中引入突变,考虑到应用毛色直接判断嵌合体小鼠的方便,中靶 ES 细胞注射到 C57BL/6(B6)囊胚,获得棕、黑杂色的嵌合体小鼠,这种可种系遗传的嵌合体小鼠产生的后代为 129:B6 杂合背景。为消除遗传背景对于小鼠表型分析造成的影响,一般重复回交至理想的遗传背景之中。回交遗传背景通常选择 B6。B6 在打靶小鼠被广泛应用的原因主要是繁殖力强,比 129 系具有更少的生理和行为异常表型。通过至少 10 代的回交,同类系可以达到 99.9%的 B6 背景,但永远不能完全恢复 100%的 B6 背景,因为在基因突变位点或转基因整合位点附近的染色体总包含至少几百个侧翼基因与突变基因或转基因连锁,侧翼基因与突变基因距离越近,染色体交换时相互分离的几率越小,连锁就越紧密,因此这些连锁基因的遗传学来源是不确定的。同时,这种回交需要的时间可能达两年之久,因此通常的做法就是开始实验时就采用遗传背景一致的小鼠。另外,显微注射法制备的 Cre 转基因小鼠的背景的选择通常是由不同遗传背景的小鼠超排能够获得的卵子的数量和质量来决定。在特定遗传背景下的 Cre 转基因小鼠与 129 或 129/B6 杂合遗传背景下锚定基因的小鼠交配进行条件打靶,这种技术本身也会造成混杂遗传背景。

替代129系的惟一选择是B6。如果能从B6背景的小鼠分离几种具有生成嵌合体和种系遗传能力的ES细胞,将取代129系ES细胞,从而使B6成为基因打靶和显微注射的主要遗传背景<sup>[87]</sup>。其实,早在1991年,第一株B6 ES细胞系就已建立<sup>[88]</sup>,但是和随后的几株都没有被成功得以推广应用,主要原因是B6 ES细胞技术方面的障碍<sup>[89]</sup>,B6系ES细胞难以培养,标准培养条件下染色体不稳定,易于产生非整倍体。表达芯片分析<sup>[90]</sup>表明培养中的B6系ES细胞比129系ES细胞更易于失去全能性。B6系ES细胞产生种系嵌合体的效率比129系弱,B6与129/S5系ES细胞的嵌合效率分别为43%和81%<sup>[91]</sup>。目前正在进行的国际基因剔除协会(IKMc),主要包括美国的剔除小鼠计划(KOMP)、欧洲的条件小鼠突变(EUCOMM)和加拿大的北美条件小鼠突变,一致同意应用相同的C57BL/6N遗传背景的ES细胞系进行<sup>[92]</sup>,主要的目的就是完全消除遗传背景对小鼠表型的影响,使基因功能的分析简单化。已经有实验室成功分离了B6小鼠的ES细胞,并构建了多种基因锚定小鼠和Cre转基因小鼠<sup>[93]</sup>,还有实验室建立了B6背景的Flp转基因小鼠<sup>[94]</sup>,从而可以在单一的B6遗传背景下进行条件基因打靶研究机体生理和病理的分子机制。C57BL/6N系ES细胞培养体系的优化以及种系嵌合体的制备技术的成熟将加速大规模基因条件打靶计划的完成<sup>[95]</sup>,必将对小鼠实验生物学研究产生深远的影响。

遗传背景的不同使小鼠的表型的解析变得复杂的同时,也为我们分析突变的研究提供了机会。条件基因打靶小鼠最初的制备和保种通常是在杂合背景下(B6和129打靶小鼠或B6和SJL的Cre转基因小鼠),进一步育种和回交可能会得到与杂合背景小鼠完全不同的表型,甚至可能从胚胎致死表型变成能存活到出生后的转变。另有原因支持选择杂合背景:回交消除杂合背景的周期较长;许多品系特异性的隐性等位基因导致一些小鼠的表型分析实验难以辨认,能通过不同品系的等位基因杂合消除这种影响,有些表型在杂合小鼠中比近交系小鼠中差异要小。

## 8 双/多基因条件基因打靶

在发育、生理和疾病的过程中,多种遗传学信

号通路连续或者平行地或交织发挥功能。常规的打靶突变体很难用于探究出它们之间的相互调节与关联。在突变遗传背景下的组合多基因条件打靶为探讨特定生物学过程中不同信号途径之间的相互作用提供了研究的平台。现在,越来越多的双/多基因条件打靶小鼠用于研究复杂的信号转导通路以及各种信号通路之间的互作来解析复杂的生理和病理机制。

Jonkers等<sup>[96]</sup>最先应用*Brac2*和*p53*双基因条件打靶小鼠研究了上皮细胞特异性条件基因剔除在肿瘤发生中的作用。他们将抑癌基因*Brca2*(锚定外显子11)和/或*p53*(锚定外显子2-10)小鼠与上皮特异性*K14-Cre*小鼠交配,*Brca2*条件剔除*K14Cre*;*Brca2*<sup>F11/F11</sup>小鼠没有肿瘤发生,而*Brac2*和*p53*双基因剔除*K14Cre*;*Brca2*<sup>F11/F11</sup>;*Trp53*<sup>F2-10/F2-10</sup>母鼠发生乳腺肿瘤和皮肤肿瘤,证明*Brac2*和*p53*两基因的剔除共同介导乳腺肿瘤的发生,二者具有协同作用。

多基因条件打靶还可以解决是否存在基因冗余。一个很著名的例子可见于加州大学的发育生物学家Martin及其同事的工作<sup>[97]</sup>。外胚层嵴尖(AER)产生信号控制肢体近端-远端轴的发育。成纤维细胞生长因子(FGF)是重要的细胞因子,但有4种FGF(FGF4、FGF8、FGF9、FGF17)在小鼠的AER表达,很难研究它们的功能。解决的办法就是得益于应用*Msx2-Cre*在小鼠肢体条件敲除不同组合的*Fgf*,从而解析出每一种FGF对整个AER-FGF信号的作用。她们发现,*Fgf4/9/17*三基因条件打靶小鼠的肢体骨骼和野生型类似,而只有*Fgf8*是正常肢体发育所必需的。其余3种*Fgf*的功能是冗余的吗?和单独的*Fgf8*条件打靶小鼠相比,一系列*Fgf8*与其他3种*Fgf*基因中一种或多种的组合条件打靶小鼠表型不同程度地加重,说明AER产生的4种FGF全部作用于肢体的图式形成同一信号通路,但作用强度不同。这种独特的遗传学研究解决了困扰多年的难题,革新了多年来人们传统的发育学理论。

需要注意的是,如果多基因条件打靶小鼠两个不同的基因携带4个loxP位点可能会导致染色体重组。减少这种重组的一种方法是其中一个基因用经典的loxP位点锚定,另一个基因用突变的loxP锚定,因为经典的loxP位点和突变的loxP位点之间的重组效率大大降低。突变的loxP可以用于锚定特定的外显子,Cre介导锚定序列的颠倒,而不是剔除外显子,



结果用突变的外显子置换了野生型外显子。为使这种颠倒不可逆转,可以在上游loxP位点(loxp1)和下游loxP位点(loxp2)引入多种点突变。重组后生成的loxP位点(loxp1、loxP2)含有两个原始loxP位点的突变,将大大降低重组效率<sup>[98]</sup>。

## 9 不用组织特异性重组酶实现组织特异性条件基因打靶

小鼠基因的表达调控逐渐明确,不仅有利于制备更多的组织/细胞特异性的Cre转基因小鼠用于条件基因打靶,也为不用组织特异性重组酶而实现组织特异性条件基因打靶提供了可能。Terauchi等<sup>[99]</sup>应用常规的基因打靶方法剔除了葡萄糖激酶基因在胰腺β细胞中特异的可变拼接外显子 1,从而在胰腺β细胞中特异剔除了葡萄糖激酶基因,而肝细胞中没有剔除,实现了条件打靶。Norris等<sup>[100]</sup>定位并靶向破坏了Nodal基因非对称表达的增强子,改变了该基因在神经节和侧板中胚层非对称性表达的模式。随着小鼠基因组测序的完成,基因表达调控的逐步深入以及转基因小鼠的制备,这种不通过和Cre转基因小鼠交配而实现条件打靶研究基因来研究不同的组织/细胞中的多种功能将成为现实。

最近发展起来的基因组靶向改造的系统应用了锌指核酶。锌指核酶最初设计用来进行基因治疗<sup>[101]</sup>,包含一个锌指DNA结合结构域和一个DNA切割结构域/限制性内切酶,不同的锌指结构域决定特异性的DNA断裂位点的特异性,因为每个锌指与特定的DNA三碱基对结合。不同的锌指组合能够识别并结合 9~12 bp的基序。锌指核酶在特定的基因位点制造出双链断裂。断裂缺口可以通过与锌指核酶共转的染色体DNA供体序列同源重组修复,这样,供体序列携带的任何突变或挽救都能够导入基因组中。断裂缺口也可以通过简单的非同源末端连接的增加或删除碱基引入突变。锌指核酶技术已经成功用于内源基因的敲除和外源基因的表达<sup>[102]</sup>。

## 10 展望

理论上,研究人员可以选择任意特定的组织或时间实现条件基因打靶,而选择重组系统时主要依赖于研究的目的和本实验室专长的实验技术,除非

是特殊需要,首选的还应该是那些已经成熟并广为应用的系统。条件打靶实验需要大量的资源和较长的时间周期,而且无法保证实验的成功。虽然很多问题有待解决,诸如嵌合体、Cre的异位或渗漏等不保真表达、Cre转基因表达模式需要精确分析(如应用可靠的报告小鼠或敲入报告基因)等,但多种条件基因打靶体系(如Cre-LoxP、Flp-FRT、可诱导系统等以及最近发明的Dre-rox系统<sup>[103]</sup>)的完善将使更加复杂的结合实验实现精细条件打靶显示出更广更深的的应用前景。大规模小鼠全基因组的条件基因打靶计划中应用同一遗传背景可以消除遗传背景对条件基因打靶小鼠表型的影响。虽然条件基因打靶技术在完全基因剔除的基础上已有长足进步,但如何对条件基因打靶在时间和空间上进行更为精细的调控仍然需要进一步研究和探索。我们相信,各种Cre重组酶工具小鼠的不断完善,越来越多的条件基因打靶小鼠的建立必将使得条件基因打靶技术在现代生物医学研究各个领域发挥越来越大的作用。

## 参考文献(References):

- [1] Glaser S, Anastassiadis K, Stewart AF. Current issues in mouse genome engineering. *Nat Genet*, 2005, 37(11): 1187–1193. DOI
- [2] Branda CS, Dymecki SM. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell*, 2004, 6(1): 7–28. DOI
- [3] Rajewsky K, Gu H, Kühn R, Betz UA, Müller W, Roes J, Schwenk F. Conditional gene targeting. *J Clin Invest*, 1996, 98(3): 600–603. DOI
- [4] Schmidt-Supprian M, Rajewsky K. Vagaries of conditional gene targeting. *Nat Immunol*, 2007, 8(7): 665–668. DOI
- [5] Matthaei KI. Genetically manipulated mice: a powerful tool with unsuspected caveats. *J Physiol*, 2007, 582(Pt 2): 481–488.
- [6] Holzenberger M, Lenzner C, Leneuve P, Zaoui R, Hamard G, Vaulont S, Bouc YL. Cre-mediated germline mosaicism: a method allowing rapid generation of several alleles of a target gene. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(21): E92. DOI
- [7] Rickert RC, Roes J, Rajewsky K. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(6): 1317–1318. DOI
- [8] Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet*, 1999, 21(1): 70–71. DOI
- [9] Tsien JZ, Chen DF, Gerber D, Tom C, Mercer EH, Ander-

- son DJ, Mayford M, Kandel ER, Tonegawa S. Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell*, 1996, 87(7): 1317–1326. [DOI](#)
- [10] Akagi K, Sandig V, Vooijs M, Van der Valk M, Giovannini M, Strauss M, Berns A. Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(9): 1766–1773. [DOI](#)
- [11] Ziyk DL, Mercer EH, Harris E, Anderson DJ, Joyner AL. Fate mapping of the mouse midbrain-hindbrain constriction using a site-specific recombination system. *Curr Biol*, 1998, 8(11): 665–668. [DOI](#)
- [12] Mao X, Fujiwara Y, Orkin SH. Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(9): 5037–5042. [DOI](#)
- [13] Lobe CG, Koop KE, Kreppner W, Lomeli H, Gertsenstein M, Nagy A. Z/AP, a double reporter for Cre-mediated recombination. *Dev Biol*, 1999, 208(2): 281–292. [DOI](#)
- [14] Michael SK, Brennan J, Robertson EJ. Efficient gene-specific expression of Cre recombinase in the mouse embryo by targeted insertion of a novel IRES-Cre cassette into endogenous loci. *Mech Dev*, 1999, 85(1–2): 35–47.
- [15] Novak A, Guo CY, Yang WY, Nagy A, Lobe CG. Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis*, 2000, 28(3–4): 147–155.
- [16] Kawamoto S, Niwa H, Tashiro F, Sano S, Kondoh G, Takeda J, Tabayashi K, Miyazaki J. A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated recombination. *FEBS Lett*, 2000, 470(3): 263–268. [DOI](#)
- [17] Mao XH, Fujiwara Y, Chapdelaine A, Yang HD, Orkin SH. Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. *Blood*, 2001, 97(1): 324–326. [DOI](#)
- [18] Huang ZJ, Yu W, Lovett C, Tonegawa S. Cre/loxP activated neuronal markers in mouse neocortex and hippocampus. *Genesis*, 2002, 32(3): 209–217. [DOI](#)
- [19] Braz JM, Rico B, Basbaum AI. Transneuronal tracing of diverse CNS circuits by Cre-mediated induction of wheat germ agglutinin in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(23): 15148–15153. [DOI](#)
- [20] Vintersten K, Monetti C, Gertsenstein M, Zhang P, Laszlo L, Biechele S, Nagy A. Mouse in red: red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals. *Genesis*, 2004, 40(4): 241–246. [DOI](#)
- [21] Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng HK. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci*, 2010, 13(1): 133–140. [DOI](#)
- [22] Badaloni A, Bonanomi D, Albieri I, Givogri I, Bongarzone E, Valtorta F, Consalez GG. Transgenic mice expressing a dual, CRE-inducible reporter for the analysis of axon guidance and synaptogenesis. *Genesis*, 2007, 45(6): 405–412. [DOI](#)
- [23] Arenkiel BR, Klein ME, Davison IG, Katz LC, Ehlers MD. Genetic control of neuronal activity in mice conditionally expressing *TRPV1*. *Nat Methods*, 2008, 5(4): 299–302.
- [24] Braz JM, Rico B, Basbaum AI. Transneuronal tracing of diverse CNS circuits by Cre-mediated induction of wheat germ agglutinin in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(23): 15148–15153. [DOI](#)
- [25] Ishikawa TO, Herschman HR. Conditional bicistronic Cre reporter line expressing both firefly luciferase and  $\beta$ -galactosidase. *Mol Imaging Biol*, 2010, 13(2): 284–292. [DOI](#)
- [26] Rodriguez CI, Dymecki SM. Origin of the precerebellar system. *Neuron*, 2000, 27(3): 475–486. [DOI](#)
- [27] Awatramani R, Soriano P, Mai JJ, Dymecki S. An FLP indicator mouse expressing alkaline phosphatase from the *ROSA26* locus. *Nat Genet*, 2001, 29(3): 257–259. [DOI](#)
- [28] Possemato R, Eggan K, Moeller BJ, Jaenisch R, Jackson-Grusby L. FLP recombinase regulated lacZ expression at the *ROSA26* locus. *Genesis*, 2002, 32(2): 184–186. [DOI](#)
- [29] Awatramani R, Soriano P, Rodriguez C, Mai JJ, Dymecki SM. Cryptic boundaries in roof plate and choroid plexus identified by intersectional gene activation. *Nat Genet*, 2003, 35(1): 70–75.
- [30] Yamamoto M, Shook NA, Kanisicak O, Yamamoto S, Wosczyzna MN, Camp JR, Goldhamer DJ. A multifunctional reporter mouse line for Cre- and FLP-dependent lineage analysis. *Genesis*, 2009, 47(2): 107–114. [DOI](#)
- [31] Livet J, Weissman TA, Kang H, Draft RW, Lu J, Bennis RA, Sanes JR, Lichtman JW. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, 2007, 450(7166): 56–62. [DOI](#)
- [32] Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, William CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F. Cre reporter strains produced by targeted insertion of *EYFP* and *ECFP* into the *ROSA26* locus. *BMC Dev Biol*, 2001, 1: 4. [DOI](#)
- [33] Schmidt-Supprian M, Wunderlich FT, Rajewsky K. Excision of the *Frt*-flanked *neoR* cassette from the *CD19cre* knock-in transgene reduces Cre-mediated recombination. *Transgenic Res*, 2007, 16(5): 657–660. [DOI](#)
- [34] Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. Development and maintenance of B and T

- lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature*, 2003, 426(6967): 671–676. [DOI](#)
- [35] Thomas MD, Kremer CS, Ravichandran KS, Rajewsky K, Bender TP. c-Myb is critical for B cell development and maintenance of follicular B cells. *Immunity*, 2005, 23(3): 275–286. [DOI](#)
- [36] Kmita M, Kondo T, Duboule D. Targeted inversion of a polar silencer within the HoxD complex re-allocates domains of enhancer sharing. *Nat Genet*, 2000, 26(4): 451–454. [DOI](#)
- [37] Moon AM, Cappechi MR. Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat Genet*, 2000, 26(4): 455–459. [DOI](#)
- [38] Kraus M, Alimzhanov MB, Rajewsky N, Rajewsky K. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igα/β heterodimer. *Cell*, 2004, 117(6): 787–800. [DOI](#)
- [39] Victoratos P, Lagnel J, Tzima S, Alimzhanov MB, Rajewsky K, Pasparakis M, Kollias G. FDC-specific functions of p55TNFR and IKK2 in the development of FDC networks and of antibody responses. *Immunity*, 2006, 24(1): 65–77. [DOI](#)
- [40] Zabel MD, Weis JH. Cell-specific regulation of the CD21 gene. *Int Immunopharmacol*, 2001, 1(3): 483–493. [DOI](#)
- [41] Ma WB, Tessarollo L, Hong SB, Baba M, Southon E, Back TC, Spence S, Lobe CG, Sharma N, Maher GW, Pack S, Vortmeyer AO, Guo CF, Zbar B, Schmidt LS. Hepatic vascular tumors, angiectasis in multiple organs, and impaired spermatogenesis in mice with conditional inactivation of the *VHL* gene. *Cancer Res*, 2003, 63(17): 5320–5328.
- [42] Le DT, Kong N, Zhu Y, Lauchle JO, Aiyigari A, Braun BS, Wang E, Kogan SC, Le Beau MM, Parada L, Shannon KM. Somatic inactivation of Nfl in hematopoietic cells results in a progressive myeloproliferative disorder. *Blood*, 2004, 103(11): 4243–4250. [DOI](#)
- [43] Shibata H, Toyama K, Shioya H, Ito M, Hirota M, Hasegawa S, Matsumoto H, Takano H, Akiyama T, Toyoshima K, Kanamaru R, Kanegae Y, Saito I, Nakamura Y, Shiba K, Noda T. Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the *Apc* gene. *Science*, 1997, 278(5335): 120–123. [DOI](#)
- [44] Heinrich AC, Pelanda R, Klingmüller U. A mouse model for visualization and conditional mutations in the erythroid lineage. *Blood*, 2004, 104(3): 659–666.
- [45] Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, 1996, 87(7): 1327–1338. [DOI](#)
- [46] Minichiello L, Korte M, Wolfer D, Kühn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R. Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron*, 1999, 24(2): 401–414. [DOI](#)
- [47] Lomeli H, Ramos-Mejía V, Gertsenstein M, Lobe CG, Nagy A. Targeted insertion of Cre recombinase into the TNAP gene: excision in primordial germ cells. *Genesis*, 2000, 26(2): 116–117. [DOI](#)
- [48] Ramirez A, Page A, Gandarillas A, Zanet J, Pibre S, Vidal M, Tusell L, Genesca A, Whitaker DA, Melton DW, Jorcano JL. A keratin K5 Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. *Genesis*, 2004, 39(1): 52–57. [DOI](#)
- [49] Hayashi S, Tenzen T, McMahon AP. Maternal inheritance of Cre activity in a Sox2Cre deleter strain. *Genesis*, 2003, 37(2): 51–53. [DOI](#)
- [50] Vincent SD, Robertson EJ. Highly efficient transgene-independent recombination directed by a maternally derived SOX2CRE transgene. *Genesis*, 2003, 37(2): 54–56. [DOI](#)
- [51] Sakai K, Miyazaki J. A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 237(2): 318–324. [DOI](#)
- [52] Cochrane RL, Clark SH, Harris A, Kream BE. Rearrangement of a conditional allele regardless of inheritance of a Cre recombinase transgene. *Genesis*, 2007, 45(1): 17–20. [DOI](#)
- [53] Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, Cuzin F. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature*, 2006, 441(7092): 469–474. [DOI](#)
- [54] Casola S, Cattoretti G, Uyttersprot N, Koralov SB, Seagal J, Hao ZY, Waisman A, Egert A, Ghitza D, Rajewsky K. Tracking germinal center B cells expressing germ-line immunoglobulin γ1 transcripts by conditional gene targeting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(19): 7396–7401. [DOI](#)
- [55] Hafner M, Wenk J, Nenci A, Pasparakis M, Scharffetter-Kochanek K, Smyth N, Peters T, Kess D, Holtkötter O, Shephard P, Kudlow JE, Smola H, Haase I, Schippers A, Krieg T, Müller W. Keratin 14 Cre transgenic mice authenticate keratin 14 as an oocyte-expressed protein. *Genesis*, 2004, 38(4): 176–181. [DOI](#)
- [56] Hobeika E, Thiemann S, Storch B, Jumaa H, Nielsen PJ, Pelanda R, Reth M. Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(37): 13789–13794. [DOI](#)
- [57] Wagner KU, McAllister K, Ward T, Davis B, Wiseman R, Hennighausen L. Spatial and temporal expression of the Cre gene under the control of the MMTV-LTR in different



- lines of transgenic mice. *Transgenic Res*, 2001, 10(6): 545–553. [DOI](#)
- [58] Schmidt EE, Taylor DS, Prigge JR, Barnett S, Capecchi MR. Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(25): 13702–13707. [DOI](#)
- [59] Thyagarajan B, Guimarães MJ, Groth AC, Calos MP. Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene*, 2000, 244(1–2): 47–54. [DOI](#)
- [60] Semprini S, Troup TJ, Kotelevtseva N, King K, Davis JRE, Mullins LJ, Chapman KE, Dunbar DR, Mullins JJ. Cryptic loxP sites in mammalian genomes: genome-wide distribution and relevance for the efficiency of BAC/PAC recombineering techniques. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(5): 1402–1410. [DOI](#)
- [61] Pfeifer A, Brandon EP, 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(20): 11450–11455. [DOI](#)
- [62] Silver DP, Livingston DM. Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol Cell*, 2001, 8(1): 233–243. [DOI](#)
- [63] de Alboran IM, O'Hagan RC, Gärtner F, Malynn B, Davidson L, Rickert R, Rajewsky K, DePinho RA, Alt FW. Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity*, 2001, 14(1): 45–55. [DOI](#)
- [64] Loonstra A, Vooijs M, Beverloo HB, Allak BA, van Drunen E, Kanaar R, Berns A, Jonkers J. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(16): 9209–9214. [DOI](#)
- [65] Baba Y, Nakano M, Yamada Y, Saito I, Kanegae Y. Practical range of effective dose for Cre recombinase-expressing recombinant adenovirus without cell toxicity in mammalian cells. *Microbiol Immunol*, 2005, 49(6): 559–570.
- [66] Mähönen AJ, Airene KJ, Lind MM, Lesch HP, Ylä-Herttua S. Optimized self-excising Cre-expression cassette for mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320(2): 366–371. [DOI](#)
- [67] 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(10): 929–933. [DOI](#)
- [68] Patsch C, Edenhofer F. Conditional mutagenesis by cell-permeable proteins: potential, limitations and prospects. *Handb Exp Pharmacol*, 2007, (178): 203–232. [DOI](#)
- [69] Peitz M, Pfannkuche K, Rajewsky K, Edenhofer F. Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(7): 4489–4494. [DOI](#)
- [70] Peitz M, Jäger R, Patsch C, Jäger A, Egert A, Schorle H, Edenhofer F. Enhanced purification of cell-permeant Cre and germline transmission after transduction into mouse embryonic stem cells. *Genesis*, 2007, 45(8): 508–517. [DOI](#)
- [71] Patsch C, Peitz M, Otte DM, Kessler D, Jungverdorben J, Wunderlich FT, Brüstle O, Zimmer A, Edenhofer F. Engineering cell-permeant FLP recombinase for tightly controlled inducible and reversible overexpression in embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2010, 28(5): 894–902. [DOI](#)
- [72] Heidmann D, Lehner CF. Reduction of Cre recombinase toxicity in proliferating *Drosophila* cells by estrogen-dependent activity regulation. *Dev Genes Evol*, 2001, 211(8–9): 458–465.
- [73] Seibler J, Zevnik B, Küter-Luks B, Andreas S, Kern H, Hennek T, Rode A, Heimann C, Faust N, Kauselmann G, Schoor M, Jaenisch R, Rajewsky K, Kühn R, Schwenk F. Rapid generation of inducible mouse mutants. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(4): E12. [DOI](#)
- [74] Higashi AY, Ikawa T, Muramatsu M, Economides AN, Niwa A, Okuda T, Murphy AJ, Rojas J, Heike T, Nakahata T, Kawamoto H, Kita T, Yanagita M. Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreERT2. *J Immunol*, 2009, 182(9): 5633–5640. [DOI](#)
- [75] Jullien N, Goddard I, Selmi-Ruby S, Fina JL, Cremer H, Herman JP. Conditional transgenesis using Dimerizable Cre (DiCre). *PLoS One*, 2007, 2(12): E1355. [DOI](#)
- [76] Lee JY, Ristow M, Lin XY, White MF, Magnuson MA, Hennighausen L. RIP-Cre revisited, evidence for impairments of pancreatic  $\beta$ -cell function. *J Biol Chem*, 2006, 281(5): 2649–2653.
- [77] Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Mol Immunol*, 2004, 41(12): 1123–1133. [DOI](#)
- [78] Kwan KM. Conditional alleles in mice: practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis*, 2002, 32(2): 49–62. [DOI](#)
- [79] Zhao L, Bakke M, Krimkevich Y, Cushman LJ, Parlow AF, Camper SA, Parker KL. Hypomorphic phenotype in mice with pituitary-specific knockout of steroidogenic factor 1. *Genesis*, 2001, 30(2): 65–69. [DOI](#)
- [80] Furuta Y, Behringer RR. Recent innovations in tissuespecific gene modifications in the mouse. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2005, 75(1): 43–57. [DOI](#)

- [81] Naiche LA, Papaioannou VE. Cre activity causes widespread apoptosis and lethal anemia during embryonic development. *Genesis*, 2007, 45(12): 768–775. [DOI](#)
- [82] Ryding AD, Sharp MG, Mullins JJ. Conditional transgenic technologies. *J Endocrinol*, 2001, 171(1): 1–14. [DOI](#)
- [83] Zhu Z, Ma B, Homer RJ, Zheng T, Elias JA. Use of the tetracycline controlled transcriptional silencer (tTS) to eliminate transgene leak in inducible overexpression transgenic mice. *J Biol Chem*, 2001, 276(27): 25222–25229. [DOI](#)
- [84] Tong C, Li P, Wu NL, Yan YZ, Ying QL. Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*, 2010, 467(7312): 211–213. [DOI](#)
- [85] Eisener-Dorman AF, Lawrence DA, Bolivar VJ. Cautionary insights on knockout mouse studies: the gene or not the gene? *Brain Behav Immun*, 2009, 23(3): 318–324.
- [86] Ridgway WM, Healy B, Smink LJ, Rainbow D, Wicker LS. New tools for defining the ‘genetic background’ of inbred mouse strains. *Nat Immunol*, 2007, 8(7): 669–673. [DOI](#)
- [87] Schuster-Gossler K, Lee AW, Lerner CP, Parker HJ, Dyer VW, Scott VE, Gossler A, Conover JC. Use of coisogenic host blastocysts for efficient establishment of germline chimeras with C57BL/6J ES cell lines. *Biotechniques*, 2001, 31(5): 1022–1024, 1026.
- [88] Ledermann B, Burki K. Establishment of a germ-line competent C57BL/6 embryonic stem cell line. *Exp Cell Res*, 1991, 197(2): 254–258. [DOI](#)
- [89] Seong E, Saunders TL, Stewart CL, Burmeister M. To knockout in 129 or in C57BL/6: that is the question. *Trends Genet*, 2004, 20(2): 59–62. [DOI](#)
- [90] Sharova LV, Sharov AA, Piao Y, Shaik N, Sullivan T, Stewart CL, Hogan BL, Ko MS. Global gene expression profiling reveals similarities and differences among mouse pluripotent stem cells of different origins and strains. *Dev Biol*, 2007, 307(2): 446–459. [DOI](#)
- [91] Hansen GM, Markesich DC, Burnett MB, Zhu Q, Dionne KM, Richter LJ, Finnell RH, Sands AT, Zambrowicz BP, Abuin A. Large-scale gene trapping in C57BL/6N mouse embryonic stem cells. *Genome Res*, 2008, 18(10): 1670–1679. [DOI](#)
- [92] 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](#)
- [93] Mishina M, Sakimura K. Conditional gene targeting on the pure C57BL/6 genetic background. *Neurosci Res*, 2007, 58(2): 105–112. [DOI](#)
- [94] Takeuchi T, Nomura T, Tsujita M, Suzuki M, Fuse T, Mori H, Mishina M. Flp recombinase transgenic mice of C57BL/6 strain for conditional gene targeting. *Biochem Biophys Res Comm*, 2002, 293(3): 953–957. [DOI](#)
- [95] Gertsenstein M, Nutter LM, Reid T, Pereira M, Stanford WL, Rossant J, Nagy A. Efficient generation of germ line transmitting chimeras from C57BL/6N ES cells by aggregation with outbred host embryos. *PLoS One*, 2010, 5(6): E11260. [DOI](#)
- [96] Jonkers J, Meuwissen R, van Der Gulden H, Peterse H, van der Valk M, Berns A. Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet*, 2001, 29(4): 418–425. [DOI](#)
- [97] Mariani FV, Ahn CP, Martin GR. Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature*, 2008, 453(7193): 401–405. [DOI](#)
- [98] Zhang Z, Lutz B. Cre recombinase-mediated inversion using lox66 and lox71: Method to introduce conditional point mutations into the CREB-binding protein. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(17): E90. [DOI](#)
- [99] Terauchi Y, Sakura H, Yasuda K, Iwamoto K, Takahashi N, Ito K, Kasai H, Suzuki H, Ueda O, Kamada N, Jishage K, Komeda K, Noda M, Kanazawa Y, Taniguchi S, Miwa I, Akanuma Y, Kodama T, Yazaki Y, Kadowaki T. Pancreatic  $\beta$ -cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. Diabetes mellitus due to defective insulin secretion to glucose. *J Biol Chem*, 1995, 270(51): 30253–30256. [DOI](#)
- [100] Norris DP, Robertson EJ. Asymmetric and node-specific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements. *Genes Dev*, 1999, 13(12): 1575–1588. [DOI](#)
- [101] Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, Holmes MC. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 2005, 435(7042): 646–651. [DOI](#)
- [102] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(9): 636–646.
- [103] Anastassiadis K, Fu J, Patsch C, Hu SB, Weidlich S, Duerschke K, Buchholz F, Edenhofer F, Stewart AF. Dre recombinase, like Cre, is a highly efficient site-specific recombinase in *E. coli*, mammalian cells and mice. *Dis Model Mech*, 2009, 2(9–10): 508–515.

