

# 揭示基因组功能的强大工具: 基因打靶技术

## ——2007 年度诺贝尔生理学或医学奖成果简介

秦川

中国医学科学院实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021

[摘要] 基因打靶技术是 20 世纪 80 年代发展起来的新技术, 是一种利用 DNA 同源重组原理和胚胎干细胞(ES 细胞)技术按定向组合的方式改变生物活体遗传信息的实验手段, 具有定位性强、打靶后新的基因有随染色体 DNA 稳定遗传的特点, 其方法包括基因敲除、基因敲入、点突变、缺失突变、染色体组大片段删除等, 相关的基因工程技术包括转基因、基因沉默和基因捕获技术等, 为生命科学、基因组学和疾病治疗等领域的研究提供了强大的工具。美国科学家 Mario R. Capecchi, Oliver Smithies 和英国科学家 Martin J. Evans 因基因打靶技术的开创性研究而获得了 2007 年度诺贝尔生理学或医学奖。

[关键词] 诺贝尔生理学或医学奖; 基因打靶; 基因工程; 功能基因组学

[中图分类号] Q784

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)24-0030-06

## Gene Targeting Techniques as a Powerful Tool to Explore the Secret of Gene Function

### —Introduction to Achievement of the 2007 Nobel Prize in Physiology or Medicine

QIN Chuan

Institute of Laboratory Animal Science of Chinese Academy of Medical Sciences, Comparative Medicine Center of Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Abstract: Gene targeting is a new technique emerged from the 1980s, as an experimental method based on DNA homogenous recombination theory and Embryonic Stem cell (ES cell) system to modify specific genes and make them express in an organism. This technique is characterized by precise targeting and the targeted genes to be stabilized and inherited with ES cells and then developed into a gene modified organism. Except the most classical method of gene knock-out and knock-in, the methods of gene targeting included spot mutation, delete mutation, genome large segment deletion, etc. This technique supplies a promising tool for researches in biomedicine, genome, disease therapy and others. With gene targeting it is now possible to produce almost any type of DNA modification in a mouse genome, allowing scientists to establish the roles of individual genes in health and disease. It is now being applied to virtually all areas of biomedicine—from basic research to the development of new therapies. Due to the importance of gene targeting technique, two American scientists (Mario R. Capecchi and Oliver Smithies) and an English scientist (Martin J. Evans) were awarded the 2007 Nobel Prize in Physiology or Medicine for their contribution in the discovery and development of the gene targeting technique.

Key Words: the Nobel Prize in Physiology or Medicine; gene targeting; gene engineering; functional genomics

CLC Number: Q784

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)24-0030-06

收稿日期: 2007-11-19

作者简介: 秦川, 中国医学科学院实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 教授, 研究方向为实验病理学;

E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn

## 0 前言

瑞典皇家卡罗琳外科医学研究院诺贝尔生理学或医学奖评审委员会 2007 年 10 月 8 日宣布, 美国科学家卡佩基(Mario R. Capecchi)、史密斯(Oliver Smithies)和英国科学家埃文斯(Martin J. Evans)(图 1)因在“涉及使用胚胎干细胞进行小鼠特定基因修饰方面的一系列突

破性发现”而获得 2007 年度诺贝尔生理学或医学奖<sup>[1]</sup>。这三位科学家的研究作为“基因打靶”(gene targeting)技术奠定了基础。利用“基因打靶”技术,通过胚胎干细胞可改造活体动物特定基因,使实验鼠体内的特定基因失去作用,从而发现这些基因的功能,扩大了对“胚胎发育、人类生理学、老化与疾病的相关基因”的认识。



图 1 2007 年度诺贝尔生理学或医学奖获得者

Fig. 1 Three laurels of the 2007 Nobel Prize in Physiology or Medicine

马里奥·卡佩基(Mario R. Capecchi) 1937 年出生于意大利,后加入美国国籍。1967 年获哈佛大学生物物理学博士学位,长期担任美国犹他大学人类遗传学和生物学教授,同时在霍华德·休斯医学研究所(Howard Hughes Medical Institute)工作。卡佩基在基因打靶技术的研究中做出了开创性工作,标志性贡献是于 1987 年发表在《细胞》杂志上的论文“Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells”<sup>[2]</sup>。

奥利弗·史密斯(Oliver Smithies) 1925 年出生于英国,后加入美国国籍。1951 年获牛津大学生物化学博士学位,现在美国北卡罗来纳大学教会山分校工作。他几乎在与卡佩基同一时期对“基因打靶”技术做出了奠基性贡献<sup>[3-4]</sup>,使得科学家们能够培育出拥有特定变异基因的小鼠。

马丁·埃文斯(Martin J. Evans) 1941 年出生于英国,1963 年从剑桥大学毕业后进入伦敦学院解剖与胚胎系攻读博士学位。现在英国加的夫大学担任哺乳动物遗传学教授。1981 年,他从小鼠胚胎中成功地分离出未分化的胚胎干细胞<sup>[5]</sup>,为“基因打靶”技术奠定了基本条件。

评定诺贝尔奖的标准是选取某个领域内非常重要的发现,并且这种发现能为未来的研究打开更广阔的空间。“基因打靶”技术就是因为其“开创了全新的研究领

域”,对攻克人类疾病起到了重大作用而获奖。2007 年获奖的这三位科学家研发的“基因打靶”技术,一经公布就得到广泛应用,目前已被用于基因研究、生物制药等方面。

## 1 基因打靶技术的发现和应用

### 1.1 基因打靶技术

基因打靶(gene targeting)是利用细胞染色体 DNA 可与外源性 DNA 同源序列发生同源重组的性质,以定向修饰改造染色体上某一基因的技术。它是 20 世纪 80 年代后半期发展起来的一种按预期方式准确改造生物遗传信息的实验手段,包括基因敲除和基因敲入两种方法。基因敲除(gene knock-out)是通过同源重组使特定靶基因失活,以研究该基因的功能,是基因打靶最常用的一种策略。基因敲入(gene knock-in)是通过同源重组,用一种基因替换另一种基因,以便在体内测定它们是否具有相同的功能,或将正常基因引入基因组中置换突变基因以达到靶向基因治疗的目的。

根据所用靶细胞的不同,基因打靶分为胚胎干细胞打靶(Embryonic Stem cell, ES)和体细胞(somatic cell)打靶两类。ES 细胞取自小鼠早期胚胎(囊胚期)的内细胞团,它可在体外长期培养并保留发育成各类细胞的全

能性,即只分裂但不分化。在体外进行遗传操作后,将它重新植入胚胎,可发育成胚胎的各种组织,从而形成嵌合体小鼠。如果这些携带突变基因的ES细胞能发育成小鼠的生殖细胞,通过小鼠之间的杂交就能获得基因纯合缺失的小鼠。相对而言,用体细胞进行基因打靶的优点是技术操作简单,可以直接对人的体细胞系进行打靶,研究人类特定基因功能。

### 1.2 基因打靶技术的发现和发展

20世纪80年代初,基因分子生物学技术已经建立,但是如何研究一个特定基因的功能是当时一个重大的难题。1981年,英国科学家埃文斯和同事从小鼠胚胎中第一次成功分离出未分化的胚胎干细胞,并且在体外培养成功,为基因打靶技术提供了前提条件。科学家利用这种技术,可以将胚胎干细胞培育为活体动物,从而最终得到基因敲除的小鼠。

1982年,美国科学家卡佩基基于哺乳动物细胞中含有催化DNA分子间进行同源重组的酶系,这种酶能催化细胞内不同DNA之间的交换和外源DNA和内源DNA之间的重组,设想在体外构建体内正常基因的缺陷形式,然后和小鼠体内一个结构已知而功能未知的正常基因发生同源重组,从而使小鼠体内产生缺陷基因,通过观察“嵌合鼠”表型异常来确定正常基因的功能。这一想法在原则上并没有太大障碍,但实际操作起来却困难重重。卡佩基使外源基因和内源基因重组成为可能,并解决了重组细胞的鉴定问题。卡佩基研究组获得了携带缺陷抗药基因(neo)的细胞,这种细胞不具有抗药性,然后将携带可以弥补基因缺陷的DNA注射到该细胞中。如果内源和外源的DNA发生了同源重组,则细胞就具有了抗药性,而未发生重组的细胞则被药物杀死,通过抗药性筛选获得了重组细胞。虽然抗药性筛选可以获得重组细胞,但得到的细胞数量却非常少,无法满足实验的需要。卡佩基用小鼠的胚胎干细胞进行同源重组,然后用筛选得到的重组干细胞移植到胚胎中,最后得到了含有基因缺陷的小鼠,同时也就获得了大量的重组细胞而实现了细胞的扩增。这种方法为生命科学研究提供了理想的实验动物模型<sup>[6-7]</sup>。1987年,卡佩基在美国《细胞》杂志发表了基因打靶技术的论文,当时在学术界引起轰动。卡佩基在研究过程中改进了起初的基因敲除方法,发展了一种“正-负”双选择法(positive-negative selection)。这种方法的优点是既增加发生同源重组的细胞数量,又避免细胞内发生随机重组的弊端,实现了定向基因敲除的目标。卡佩基的新方法理论上可以做到“替换”体内的任何靶基因,同时不影响靶基因以外的其他任何基因的表达,使基因打靶技术具有了更大的可操作性。在同一时期,美国北卡罗来纳大学教会山分校的史密斯也为基因打靶做出了重大贡献。史密斯于1985年在哺乳动物细胞中实现了

同源重组,他和卡佩基的研究小组两年后在胚胎干细胞中分别实现了基因的定向敲除。他的技术路线与卡佩基不同之处在于,卡佩基采用的方式是人为地让某个基因缺失,失去功能,即基因敲除;而史密斯则致力修饰已经发生突变的基因(或致病基因),使其恢复原来的功能(基因治疗),即基因敲入。

卡佩基和史密斯分别在1987年《细胞》和《自然》杂志发表的两篇文章标志着基因打靶技术的建立。1989年,卡佩基实验室取得了更大的进展,他们将小鼠体内的真正基因进行了敲除,并且获得了具有目的基因缺陷的小鼠,这次成功从根本上实现了特定基因敲除的目标,所获得的基因缺陷小鼠也开始广泛地应用于生命科学的各个领域。

### 1.3 基因打靶技术的策略

基因打靶技术的巧妙之处在于,把胚胎干细胞技术和DNA同源重组技术的最新成就成功地“结合”起来。首先,从小鼠囊胚分离出未分化的胚胎干细胞,然后用正-载体对胚胎干细胞中特定基因实施“打靶”,即除掉该基因的一部分(通常是中间外显子),然后将“中靶”的胚胎干细胞移植回小鼠囊胚(受精卵分裂至8个细胞左右即为囊胚,此时受精卵只分裂不分化),移植进去的中靶胚胎干细胞钻入囊胚胚层,与囊胚一起分化发育成相应的心脏、大脑、血管、肌肉等器官和组织,最后诞生出具有基因功能缺陷的“嵌合鼠”。小鼠基因打靶常用策略<sup>[1]</sup>见图2。由于中靶的胚胎干细胞保持分化的全能性,因此它可以发育成为嵌合鼠的生殖细胞,使得经过定向改造的遗传信息可以代代相传。研究者最终将获得带有特定基因突变的“纯合鼠”,从而实现在生物活体内研究特定基因功能的科学梦想。

### 1.4 基因打靶技术的发展和应

经过20多年的发展,基因打靶技术的基本原则未变,但是操作对象和方法都“丰富”了许多,对象除应用最多的小鼠外,还有大鼠、果蝇、细菌和猪、羊等。方法除最经典的基因敲除外,还包括基因敲入、点突变、缺失突变、染色体组大片段删除等。迄今为止,全世界科学家利用基因打靶技术已经对上万种基因的功能进行了研究,由此催生出新的药物(如癌基因靶向治疗药物)以及新的疾病治疗方法(如血友病基因治疗方法)等,并培育了500多种存在不同基因变异的人类疾病,如心血管疾病、神经退行性疾病、糖尿病和癌症等小鼠模型。“基因打靶”技术将被越来越广泛地使用,通过系统的基因打靶,人类能够了解自身和疾病与基因之间的关系、疾病发生的机理,掌握更有效的治疗手段。

基因打靶技术是一项新兴的分子生物学技术,它的产生是遗传工程领域的一次革命,为发育生物学、分子遗传学、免疫学及医学等学科,提供了一个全新的、强有力的研究手段。目前,基因打靶技术在研究基因的

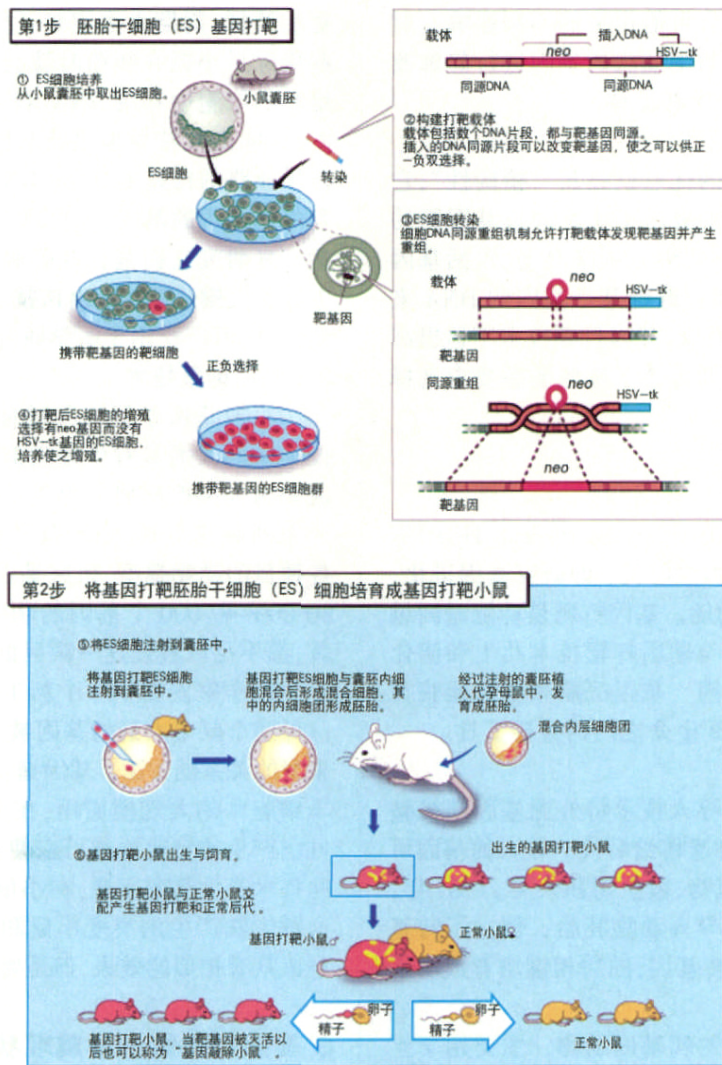


图2 小鼠基因打靶常用策略

Fig. 2 General strategy for gene targeting in mice

结构和功能、表达与调控、转基因及基因治疗等方面均取得了进展<sup>[9]</sup>, 基因打靶技术已经被广泛应用于几乎所有的生物医学领域, 使得人类对于心脏病、癌症和糖尿病等多种疾病有了更加深入的了解。预计科学家们将很快实现所有小鼠基因的敲除, 从而确定单个基因在健康和疾病中的角色。

#### 1.4.1 基因功能的研究

后基因组时代的主要任务就是研究大量新基因的功能。用体细胞基因打靶技术, 通过定点改造基因组中的特定基因, 有可能在细胞水平上研究某一基因的功能及调控机制。从定点突变的干细胞获得基因突变型个体, 可在生物体整体水平上了解某些基因在体内的具体作用。

#### 1.4.2 建立人类疾病的动物模型

人类疾病动物模型对病理研究及临床治疗非常重要。建立自发或诱变病理模型需要漫长的时间, 应用转

基因技术, 外源基因在基因组中的随机整合可能带来不确定的表型。基因打靶技术在很大程度上克服了上述不足, 通过对ES细胞打靶可获得含特定突变基因的小鼠模型。

#### 1.4.3 用于疾病的基因治疗

通过基因敲入技术将正常基因引入病变细胞中, 取代原来异常的基因或对缺陷基因进行精确改正, 使修复后的细胞表达正常蛋白, 不再表达错误产物, 是一种理想的基因治疗策略。另外, 可通过基因敲除技术敲除多余的、过量表达的、影响正常生理功能的基因, 以达到治疗目的。

#### 1.4.4 用于改造生物和培育新的生物品种

基因打靶技术不仅适用于动物, 而且可以应用于植物, 使转基因动物和生物反应器的制备更为精确。外源基因将被准确地插入受体的基因组中, 定点改造原有的基因功能, 使生物获得优良的性状, 并避免由于外

源基因在基因组中随机整合可能带来的不利影响。对动植物生殖细胞或早期胚胎干细胞的基因进行修饰改造,可以产生一些人类需要的新品种。

### 1.5 基因打靶技术的优点

基因打靶技术最明显的优点就是其“精确性”,它使得科学家可以根据实验的要求来决定改造基因组的哪个基因或片断,并决定用何种方式来改变,包括基因敲除和基因敲入,还可以通过修饰某个基因的 DNA 来改造其编码蛋白的功能。所以,基因打靶技术不但提高了实验的准确性,还为人们提供了按照实验要求选择改造方式的可能性。

## 2 基因打靶相关技术

人类基因组计划(Human Genome Project, HGP)完成后,下一步就是功能基因组时代,即研究基因进化、生理、病理状态下的基因功能。基因打靶是功能基因组研究的最重要技术之一,与基因打靶技术共生和演化的基因工程技术包括转基因、基因沉默和基因捕获技术等。基因工程技术是打开生命之门的重要工具。

### 2.1 转基因技术

转基因技术通过基因导入技术将外源基因随机整合到动物的基因组内,并能遗传给后代。导入的基因可以来源于任何物种,包括植物、微生物和人类。1981年,第一次成功地将外源基因导入动物胚胎,创立了转基因动物技术。1982年获得转基因,随后相继培育成功了遗传工程大鼠等。

转基因小鼠是最常用的转基因动物,主要用于生命科学和医学研究。目前已经建立了多种疾病的转基因小鼠模型,包括心脏病、痴呆症、高血压、骨质疏松、糖尿病等小鼠模型,为这些疾病的深入研究、药物筛选等提供了工具。转基因兔主要是研究心血管病和人类脂代谢的动物模型和代谢病模型。转基因鸡是研究基因功能的动物模型,同时,利用转基因鸡蛋作为生物反应器,在蛋清中生产有药用价值的蛋白质多肽,如高密度脂蛋白、人血清白蛋白等各种细胞因子、疫苗和抗体。转基因牛和羊的乳房都是绝佳的乳房反应器系统,是生产基因药物的工厂。科学家们培育的转基因动物多种多样,包括昆虫、鱼、猪、软体动物等。为了把转基因技术应用到防治虫害领域,国外科学家选择家蝇,已经成功地培育了转基因家蝇。

### 2.2 基因沉默技术

动物体内的基因沉默技术是利用 RNA 干扰技术(获 2006 年度诺贝尔生理学或医学奖)结合转基因技术,在动物体内,由少量的双链 RNA 就能阻断基因的表达,得到和基因敲除相似的效果。近年来,越来越多的基因敲除采用了基因沉默技术这种更为简洁的方法。基因沉默的优点及应用主要为:比用同源重组法

更加简便,周期大大缩短;对于哺乳动物,如对于一些敲除后小鼠在胚胎时就会死亡的基因,可以在体外培养的细胞中利用 RNAi 技术研究它的功能;由于 RNAi 能高效特异地阻断基因的表达,它成为研究信号传导通路的良好工具;RNAi 还被用来研究在发育过程中起作用的基因,如可用 RNAi 来阻断某些基因的表达,来研究它们是否在胚胎干细胞的增殖和分化过程中起着关键作用;由该技术产生的动物模型、疾病模型,同样可广泛用于医学研究、新药研制等领域。

### 2.3 基因捕获技术

小鼠是医学研究领域使用最广泛的实验动物,不仅小鼠同人类具有生理相似性,而且现有的遗传研究成果为人类疾病研究提供了巨大资源。科学家发展了一系列研究工具,如转基因动物、基因敲除等,制备了各种目的动物模型,研究基因的功能。但是要逐一研究 30 000~40 000 个基因的功能,用以上提到的研究工具,都不足以胜任这一艰巨的任务。

科学家发展了一个新工具,即基因捕获技术,这是一种使小鼠中大量的基因被灭活,以确定它们的功能与表型的关系的方法。基因捕获的真正突破是在小鼠胚胎干细胞中的大规模应用,在全能细胞中,用基因捕获的方法产生的突变往往可以使基因完全失活,并且通过胚胎技术产生突变小鼠,在小鼠体内研究基因的功能。用这种方法产生的突变小鼠和基因敲除方法产生的突变小鼠具有相似的效果,但是要方便快捷得多。

## 3 基因打靶技术发展现状

### 3.1 国际情况

以美国为例,仅美国杰克逊实验室一个机构每年向 1.5 万个实验室提供的不同小鼠,对美国的医药学研究具有巨大的推动作用。在国际上,基因工程技术和由此产生的基因工程动物资源已经成为医药研究的生长点和创新点,主要表现在:成为研究基因结构与功能的关系以及胚胎发育调控、肿瘤、神经发育等重要生命过程的平台;建立了多种人类疾病的遗传工程疾病动物模型,成为研究人类重大疾病发病机理的“人类替难者”;成为主要的药效研究、药物作用机理研究和新药筛选的“试管”;制备医用或食用蛋白的生物反应器,通过家畜乳腺分泌大量安全、高效、廉价的人体药用生物制品。

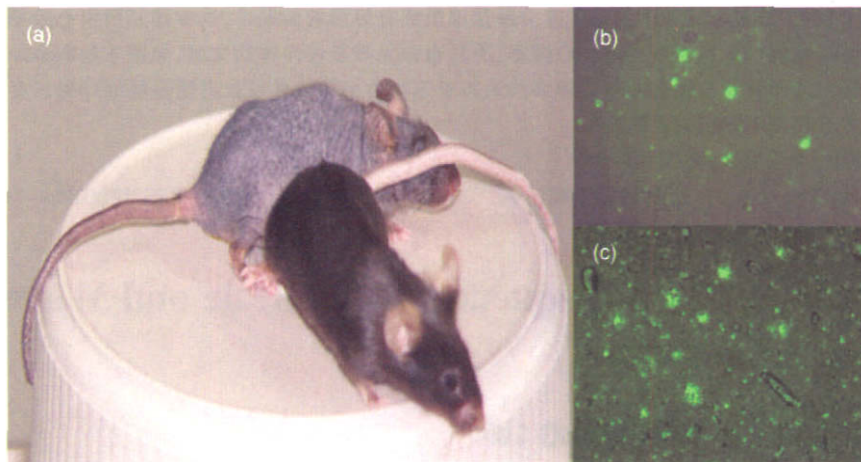
### 3.2 国内情况

基因打靶技术在中国起步并不晚,在国家 863 计划、973 计划等支持下,20 世纪 80 年代这项技术在国外出现时,国内就已经有人从事这方面的工作。现在,基因打靶技术已应用到不少物种上,如大小鼠、斑马鱼、果蝇和酵母等,从不同物种的角度建立模型研究基因功能。对中国人民健康影响最大的疾病,如心脑血管

管、糖尿病、肿瘤、肥胖症、痴呆症和帕金森病等都是多基因慢性病。了解这些疾病的发病机理、发现有效的药物靶点、针对性地设计药物和研究治疗方法,是提高中国人民健康水平的根本。对这些疾病的深入研究需要大量的基因工程动物,作为基因相互作用、蛋白相互作用研究的工具。但是中国保有的基因工程动物不超过500种,和美、欧、日等国家的10 000多种相比,犹如杯水车薪。例如,中国现有高血压患者1亿多人,脑中风致残者600万人;冠心病患者100万人;心肌病患者200万人,是造成70%猝死的原因。但是,目前国内拥有的高血压和心脏病的疾病基因工程动物模型不超过15

种,远远不能满足研究人员的需要。

近几年来,中国政府开始认识到这个问题,并逐步增加研究资助额度。中国医学科学院实验动物研究所和南京大学等已经形成一定规模的神经性疾病、代谢病和心脑血管病基因工程模型研制和比较医学研究的重要基地,军事医学科学院和上海第二军医大学等几家单位在研究和竞争当中逐渐形成了不同侧重的基因工程动物研究实验室。中国医学科学院实验动物研究所建立的痴呆症基因工程小鼠已经成为我国新药研制和中药研究的重要模型,为20多个研究单位提供动物(图3)。



(a) 痴呆症小鼠模型; (b) 小鼠大脑组织中的老年斑; (c) 人类患者脑组织中的老年斑  
(a) Gene engineering mouse model for AD; (b) Senile plaque in mouse model brain tissue;  
(c) Senile plaque in human patient brain tissue

图3 痴呆症基因工程小鼠

Fig. 3 Alzheimer's Disease (AD) gene engineering mice

#### 4 结语

2007年度诺贝尔生理或医学奖再次表明,一项可能带来无穷应用的科学发现往往源自基础研究。随着现代分子生物学技术的发展和人类基因组图谱的完成,功能基因组学研究正大规模启动,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。通过基因打靶将外源基因在ES细胞或体细胞中进行定点整合并高效表达,利用显微注射和核移植技术生产转基因动物,具有广阔的发展前景。基于基因打靶途径建立的医学病理动物模型,在人类遗传性疾病的基因治疗中发挥着不可估量的巨大作用。基因打靶技术将对哺乳动物发育生物学、免疫学、肿瘤神经生物学和医学遗传育种等学科产生深远的影响,这必将带来21世纪人类医学史上的一次革命。

#### 参考文献(References)

[1] [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2007/press.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/press.html).

- [2] THOMAS K R, CAPECCHI M R. Site- directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo- derived stem cells [J]. *Cell*, 1987, 51(3): 503- 512.
- [3] DOETSCHMAN T, GREGG R G, MAEDA N, et al. Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells[J]. *Nature*, 1987, 330(6148): 576- 578.
- [4] GUO Xiaoqiang. Oliver Smithies [J]. *Hereditas (Beijing)*, 2007, 29(6): 649- 650.
- [5] EVANS M J, KAUFMAN M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. *Nature*, 1981, 292(5819): 154- 156.
- [6] <http://www.bioscience.utah.edu/mb/mbFaculty/capecchi/capecchi.html>.
- [7] GUO Xiaoqiang. Pioneer of gene targeting——about scientist mario renato capecchi [J]. *Chemistry of Life*, 2004, 24(5): 440- 441.
- [8] TENG Yan, YANG Xiao. Gene targeting: the beginning of a new era in genetics [J]. *Hereditas (Beijing)*, 2007, 29 (11): 1291- 1298.

(责任编辑 李慧政)