【小鼠大学问】条件性基因敲除小鼠，高分paper必杀器

全身性基因敲除 or 条件性基因敲除

全身性基因敲除

也就是我们常说的 **KO**（Knockout），也叫完全基因敲除，是指在小鼠所有组织细胞中，将靶基因的某些重要外显子或功能结构域、甚至所有外显子敲除掉，导致靶基因的表达缺失。

应用：

- 研究目的基因对全身生理或病理的功能

优势：

- 小鼠模型构建周期短
- 交配流程简单

劣势：

- 大约有1/3的基因纯合敲除后会导致小鼠胚胎期死亡或出生期死亡
- 引发其它基因的代偿，导致基因敲除后没有明显表型改变

条件性基因敲除

CKO（Conditional Knockout），将某个基因的修饰限制于小鼠某些特定类型的细胞或发育的某一特定阶段，实现对小鼠基因组的时空特异性修饰。

应用：

- 胚胎致死性基因的研究
- 研究靶基因在特定组织或细胞中的功能
- 研究靶基因在特定时期或阶段发挥的作用

优势：

- 多功能的基因敲除模型，可与不同工具鼠灵活搭配使用，客观而系统地研究目的基因在不同组织器官发生、发育或疾病发生、治疗过程中的作用与机制
- 克服了重要基因完全敲除后的胚胎致死或过早死亡

劣势：

- 交配流程较为复杂
- 小鼠模型构建周期相对较长

CKO之于高分Paper

为什么说拥有条件性基因敲除小鼠模型以后更容易发高分文章呢?

一篇好文章，意味着我们需要一个好故事。时间、地点、人物，这故事的三大基本要素自然是缺一不可!

简单的来说，故事的主人公就是我们所研究的基因。而 CKO 除了可以明确目的基因的缺失在特定组织或细胞类型之中发生，还可以限制发生的特定时间。

与普通的 KO 相比，CKO 无疑提供了更精准确凿的不在场证明。这样的故事当然也就更有说服力，再也不怕 reviewer 质疑啦!

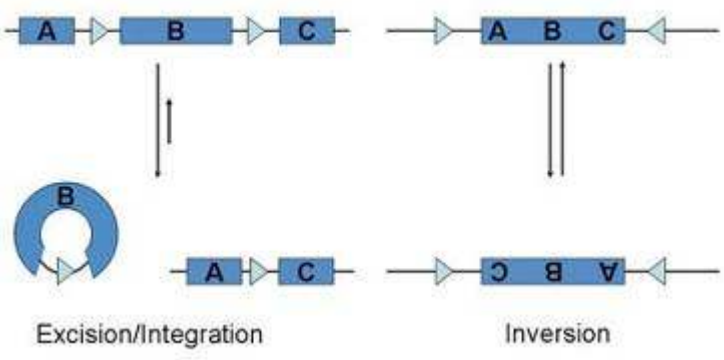
关于CKO你一定要知道的"4W"

HOW CKO 是如何实现的?

条件性基因敲除的基本原理是重组酶系统（如：Cre-loxP）介导的位点特异性重组技术。

Cre-loxP 系统，是目前最常用的重组酶系统之一，它是来自于大肠杆菌噬菌体 P1 的重组酶系统。Cre 是重组酶（38kDa），可识别 34bp 长的 DNA 序列 loxP。loxP 两侧各 13bp 构成回文结构，中间 8bp 为非回文结构，因此 loxP 具有方向性。

- 当 DNA 分子上存在两个同向 loxP 序列时，Cre 可将两个 loxP 序列之间的DNA 片段切出并环化，同时将 loxP 两侧的序列进行连接。
- 当 DNA 分子上存在两个方向相反的 loxP 序列时，Cre 可导致 loxP 之间的序列发生反转。



图片来自《Transgenesis Techniques Principles and Protocols 》Third Edition

WHAT CKO 敲除的是什么?

条件性基因敲除的靶基因中必须带有可以被 Cre 重组酶识别的 loxP 序列，这种基因称为 floxed gene。

带有 floxed 靶基因的小鼠称为 flox 小鼠。在这种小鼠中，通常采用 DNA 同源重组方法，在拟敲除基因片段的两侧分别放置一个同向的 loxP 位点。

loxP 位点的存在应不影响该基因的功能。

WHERE & WHEN CKO 何时何地发生？

除了 flox 小鼠以外，重组酶系统介导的条件性基因敲除还需要另一类重要的基因工程小鼠的参与——Cre 工具鼠。

Cre 工具鼠中，将 Cre 重组酶的编码序列置于特定的基因启动子下，Cre 的表达特性决定了靶基因何时何地发生敲除。

Cre 在哪一种组织细胞中表达，靶基因的敲除就发生在哪种组织细胞；Cre 的表达水平将影响靶基因在此种组织细胞中进行修饰的效率；使用诱导型Cre 重组酶可以通过给予诱导剂，决定在特定的发育时期或疾病发生阶段，定时地进行基因敲除。

影响 Cre 表达 pattern 的的因素包括：

- Cre 上游的特异性启动子

  广泛型或组织特异性

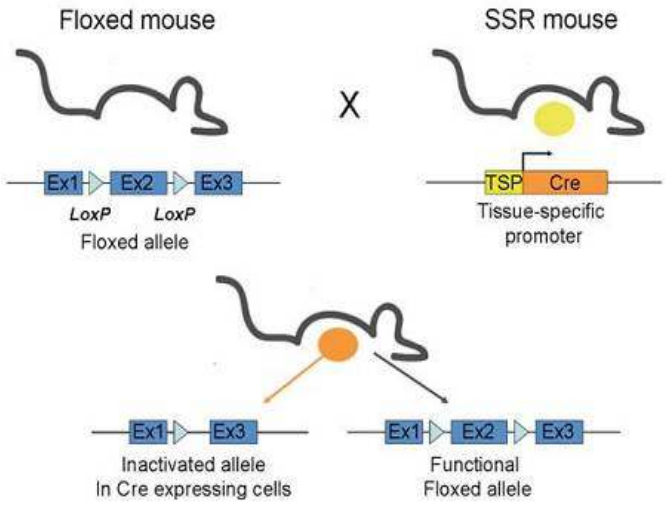
- Cre 工具鼠的构建方式

  随机整合或定点敲入

- Cre 的类型

  组成型或诱导型

实验时，将 flox 小鼠和 Cre 工具鼠进行交配，最后获得 flox 纯合且 Cre 杂合的小鼠。在这类小鼠中，凡是表达 Cre 的细胞，两个 loxP 之间的序列被切除，从而实现组织特异性基因敲除。



图片来自《Transgenesis Techniques Principles and Protocols 》Third Edition