

# 【小鼠大学问】转基因小鼠的“三段进阶”

小鼠转基因的“三段进阶”。

这里我们说的转基因小鼠是指：将一段外源基因随机插入到小鼠基因组中，获得过量表达目的基因的小鼠模型。

## 转基因1.0 显微注射法构建完全随机插入转基因小鼠

用显微注射针将线性化的外源DNA片段直接注入小鼠受精卵的原核中，使外源基因整合到小鼠基因组中，从而获得转基因小鼠。

优点：

- 过程较简单
- 周期短（3个月左右获得founder小鼠）
- 可进行大片段插入，如BAC转基因

缺点：

- 随机整合
- 整合位点随机造成基因组的重排、易位缺失
- 整合位点、多拷贝串联整合都会导致外源基因表达率低甚至不表达
- 外源基因插入可能破坏小鼠内源基因
- 获得founder小鼠（基因型鉴定为阳性）后需要建系来筛选外源基因高表达的line，并且至少需要2个表达的line，相互印证表型才可以

也就是说：

外源DNA是怎么整合到小鼠基因组里的，你不知道。

外源DNA整合在哪里，你也不知道。

外源DNA到底有几个拷贝整合进去了，你还是不知道。

外源DNA整合进去以后能不能被表达出来，你就更不知道了。

说白了，全靠RP。

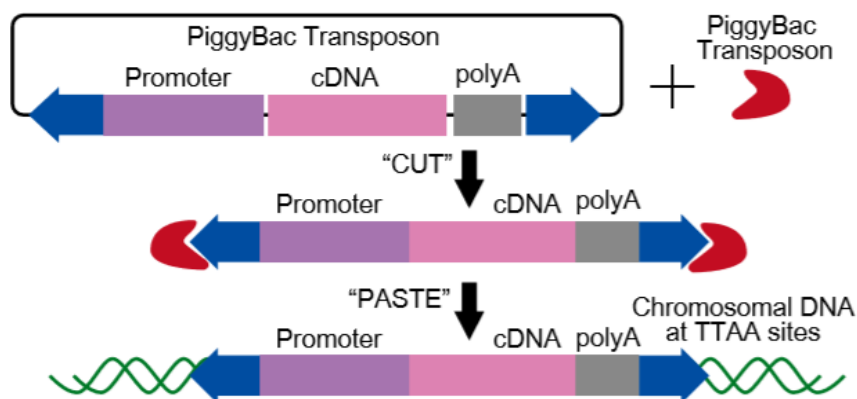
不过有一点你可以知道，那就是获得的founder小鼠越多，筛选到高表达line的可能性就越高。

## 转基因2.0 利用DNA转座子系统提高转基因的表达阳性率

DNA转座子的转座遵循“切离-粘贴 (cut and paste)”机制，在转座酶 (transposase)的催化下，DNA转座子及中间的DNA片段被从原始位置切离并插入到新的基因组位置。

用到转基因小鼠制备的过程中，就是将外源待表达的DNA片段构建到转座子质粒中去，并和转座酶mRNA一起显微注射到小鼠受精卵中，转座酶将外源DNA片段从质粒中切离下来，插入到小鼠基因组中去。

常用于哺乳动物转基因的转座子有：piggyBac、SleepingBeauty (SBll) 和Tol2。其中，piggyBac转座子在转座酶的辅助下特异性识别基因组中5'-TTAA-3'位点，精确地剪切和插入不留下印迹；并且在随机插入基因组的过程中，更倾向于插入有活跃转录的位置；而且转座效率比其他两个高。



## 转基因1.0 vs 2.0的性能对比

	转基因 1.0 传统转基因	转基因 2.0 Piggybac 转座酶系统介导的转基因
制备方式	注射线性化 DNA 片段	注射环状质粒和转座酶 mRNA
整合到基因组上的结构	注射进去的整个 DNA 片段	仅转座酶识别的两个 ITR 间的序列整合到基因组上
插入位点数量	单位点插入和多位点插入均有可能，多为单位点插入	单位点插入和多位点插入均有可能，多为多位点插入
插入位点拷贝数	多拷贝串联	单拷贝
插入位点选择性	随机插入，插入位点无规律	倾向于插入到转录活跃的区域，插入位点为：TTAA
基因型鉴定阳性率	通常可获得基因型鉴定阳性的小鼠，数量依赖于注射量，阳性率与插入片段大小呈负相关	可获得基因型鉴定阳性的小鼠，数量依赖于注射量，阳性率与插入片段大小的敏感性较传统转基因低
目的基因表达	依赖于插入位点，目的基因表达阳性率低	倾向于插入到转录活跃的区域，目的基因表达阳性率较传统转基因大幅提高
后续小鼠繁育需注意的问题	1) 需建系，筛选 founder 2) founder 间不能互交	1) 需建系，因可能有多位点插入，意味着有更多 founder 需要建系，需要维持更多的小鼠数量 2) 由于可能有多位点插入，传代过程中，随着位点分离，F1 代小鼠中目的基因的表达量显著低于 F0 代小鼠，降低幅度依赖于插入位点数量和插入位点位置

从这张表格中，你不难发现 2.0进阶版虽然仍旧不能确定整合位点与外源DNA的插入数量，但在相同的制备周期里，2.0进阶版提高了外源基因表达的效率，很大程度上能够避免转基因1.0“竹篮打水一场空”的遗憾，不失为性价比更高的一种方式。

当然，如果你和小编一样，对不确定的事情特别没有安全感，又对自己的RP没什么自信的话，一定马上就要发出这样的怒吼了：难道就没有一种既能明确而准确地插入外源基因又能保证表达的方法吗？

## 转基因3.0 定点转基因 —— “一清二白”的过表达神器

一清：

整合位点清楚

二白：

1) 整合拷贝数明白

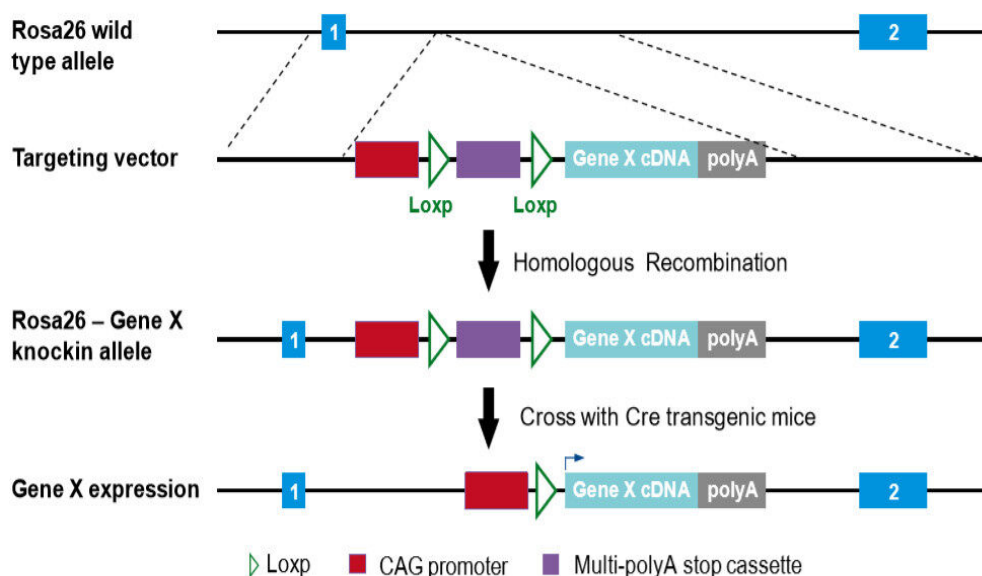
## 2) 不需要建系，后代小鼠基因型明白

更重要的是：外源基因表达有保证！

Rosa26位点是目前最为常用的定点整合位点之一。它位于小鼠6号染色体，是一个非编码基因，已被证明在大部分组织和细胞中都有表达。表达比较活跃的基因区域因为需要转录因子的进入基因组结构不会被异染色质化，因此在这个区域定点插入外源基因，在各组织中表达的可能性都非常高。所以，Rosa26被广泛用来作为外源基因表达的安全位点。当然，还有一些其它的安全位点，我们下期再详细介绍哈~

外源DNA片段怎么整合到Rosa26位点里呢？依靠同源重组。

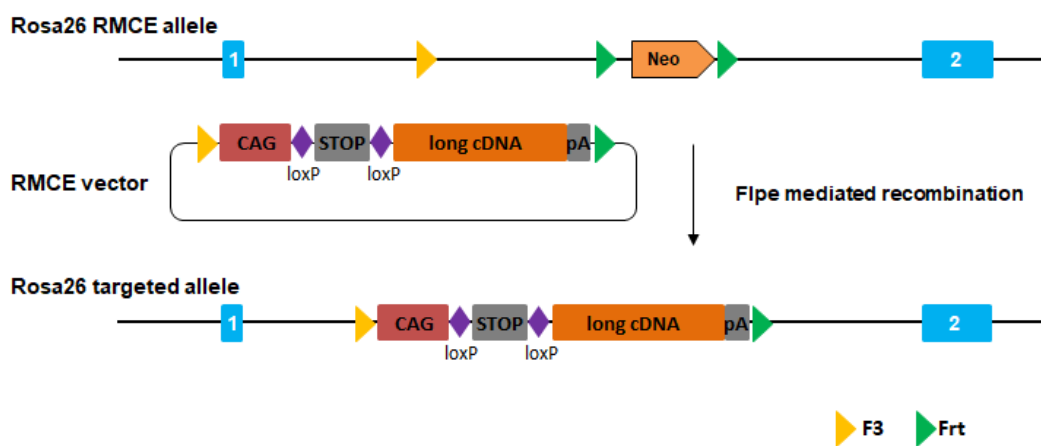
无论是ES细胞打靶还是CRISPR途径，都需要构建一个同源重组载体，在Rosa26基因两段同源臂之间放上外源基因片段。一般情况下，为了实现外源基因的高表达，可以选择类似CAG启动子这样的广泛型强启动子。在组成型表达的基础上，我们还可以更灵活地实现条件性——组织特异性或时间特异性——过表达，方法很简单，就是在启动子和外源cDNA之间加上一段两侧带有loxP位点的multi-polyA转录终止（STOP）信号，像这样：



构建一个定点转基因小鼠花费的时间会长一些，即使采用CRISPR技术也要6个月左右。不过话说回来，如果算上随机插入转基因小鼠的建系时间，小编觉得定点转基因还是更有优势哒~

你也许还会问，靠同源重组能插入几十kb那么大的片段吗？

不用怕，我们可以用RMCE（重组酶介导的盒式交换）来解决超大片段的定点过表达难题哦！RMCE技术基于利用Rosa26位点中带有侧翼为特定重组酶识别位点（例如：loxP、lox511位点或F3、Frt位点）的工具ES细胞系。构建带有外源片段的第二个转基因（侧翼也带有特异性重组酶识别位点）交换质粒，在表达重组酶（例如Cre或Flpe）的帮助下在ES细胞中催化盒式交换，从而完成超大片段（20-30kb）的定点整合。就像这样：



转基因的方法很多，不同方法有它各自的优缺点，综合考量，选择最适合方法~