

【小鼠大学问】你找到Safe Harbor了吗？

除了Rosa26以外，还有哪些位点可以安全地进行外源基因插入并高效表达呢？已经有多个可用于哺乳动物外源基因插入的基因组「SafeHarbor」被发现并应用到人、小鼠、大鼠、兔子、猪的可调控或可逆基因过表达，例如：AAVS1、CCR5、HPRT、H11、Col1a1、TIGRE等等。

什么是Safe Harbor？

20世纪90年代末 Philippe Soriano 及其同事发现，一个被命名为 ROSAβgeo26 的随机转基因小鼠品系在所有组织中都能检测到高水平的β半乳糖苷酶表达。他们对这种转基因小鼠进行了基因插入的定位，确定了在第6号染色体的基因整合，也就是我们现在常说的Rosa26位点。虽然带有外源插入片段的纯合子小鼠的出生率略低于杂合子幼崽，但纯合子小鼠也能正常发育和繁殖，对小鼠和细胞无害。自此，Rosa26位点被用于**基因安全敲入**并能保证转入基因的正常稳定表达。「Safe Harbor」安全港位点的概念由此被普及。

除了Rosa26以外，还有哪些位点可以安全地进行外源基因插入并高效表达呢？

已经有多个可用于哺乳动物外源基因插入的基因组「SafeHarbor」被发现并应用到人、小鼠、大鼠、兔子、猪的可调控或可逆基因过表达，例如：AAVS1、CCR5、HPRT、H11、Col1a1、TIGRE等等。

H11位点

H11位点（也叫Hipp11）位于小鼠第11号染色体，是 Eif4enif1与Drg1 这两个基因之间的一个位点，由 Simon Hippenmeyer于2010年发现并命名。由于H11位点位于两个基因之间，故外源基因插入后影响内源基因表达的风险很小。同时H11位点所在的Eif4enif1与Drg1这两个基因的侧翼序列区域具有广泛的空间和时间EST（expression sequence tag）表达模式，能够使整合在此的外源基因受指定启动子的驱动而稳定表达。该位点的纯合敲入小鼠可正常发育和繁殖。因此成为可与Rosa26位点相媲美的新「Safe Harbor」。

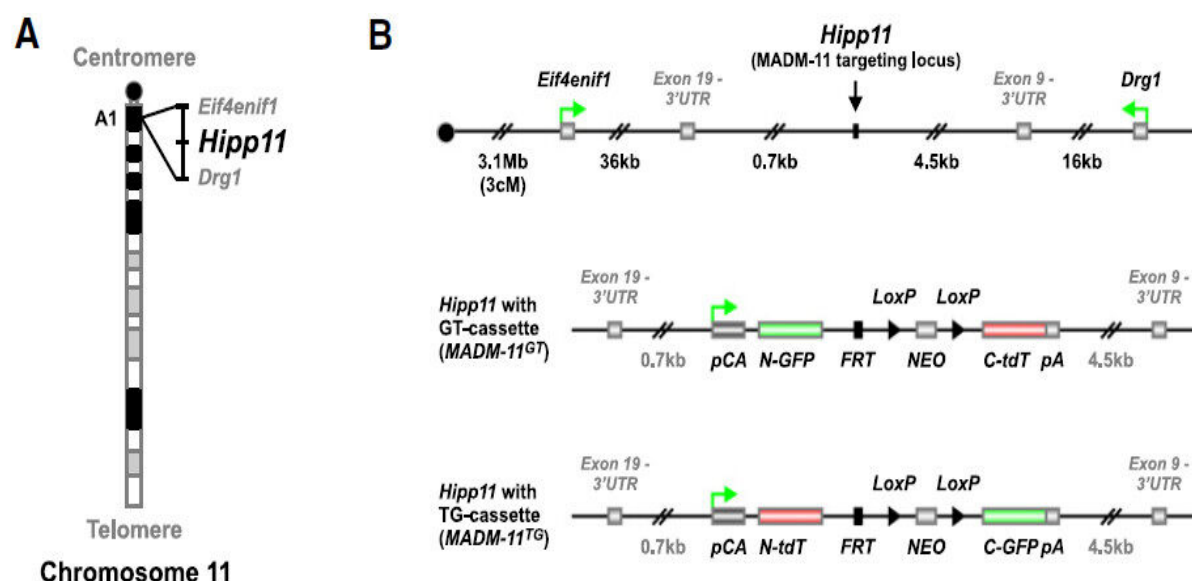


图1. The H11 genomic locus in cytoband A1 (~3 cM) between Eif4enif1 and Drg1 genes.

和Rosa26位点的过表达模型一样，在H11位点我们也可以采用CRISPR/Cas9技术构建条件性基因过表达小鼠模型，即广泛型强启动子pCAG与外源目的基因cDNA之间用loxP-STOP-loxP结构隔开，只有与组织特异性Cre工具鼠交配后，才会在特异细胞或组织中表达目的基因。

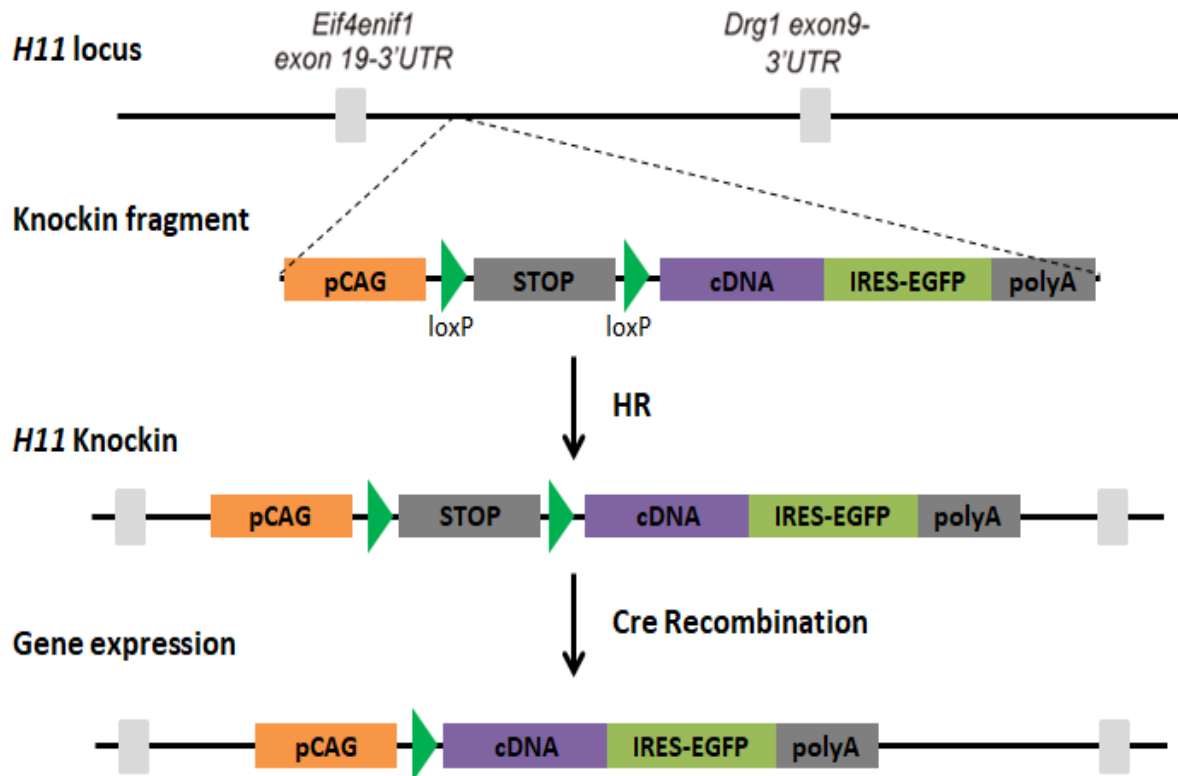


图2. H11位点定点过表达示意图。

Col1a1位点

Col1a1位点是2006年由Caroline Beard首先使用作为四环素诱导调控外源基因表达的整合位点。Col1a1位点实际上位于第11号染色体的Col1a1基因3'UTR下游约500bp左右。在四环素调控模型中，在TetO启动子之前往往加上SA-polyA来阻隔上游启动子的影响，防止不依赖于四环素的转录调控。

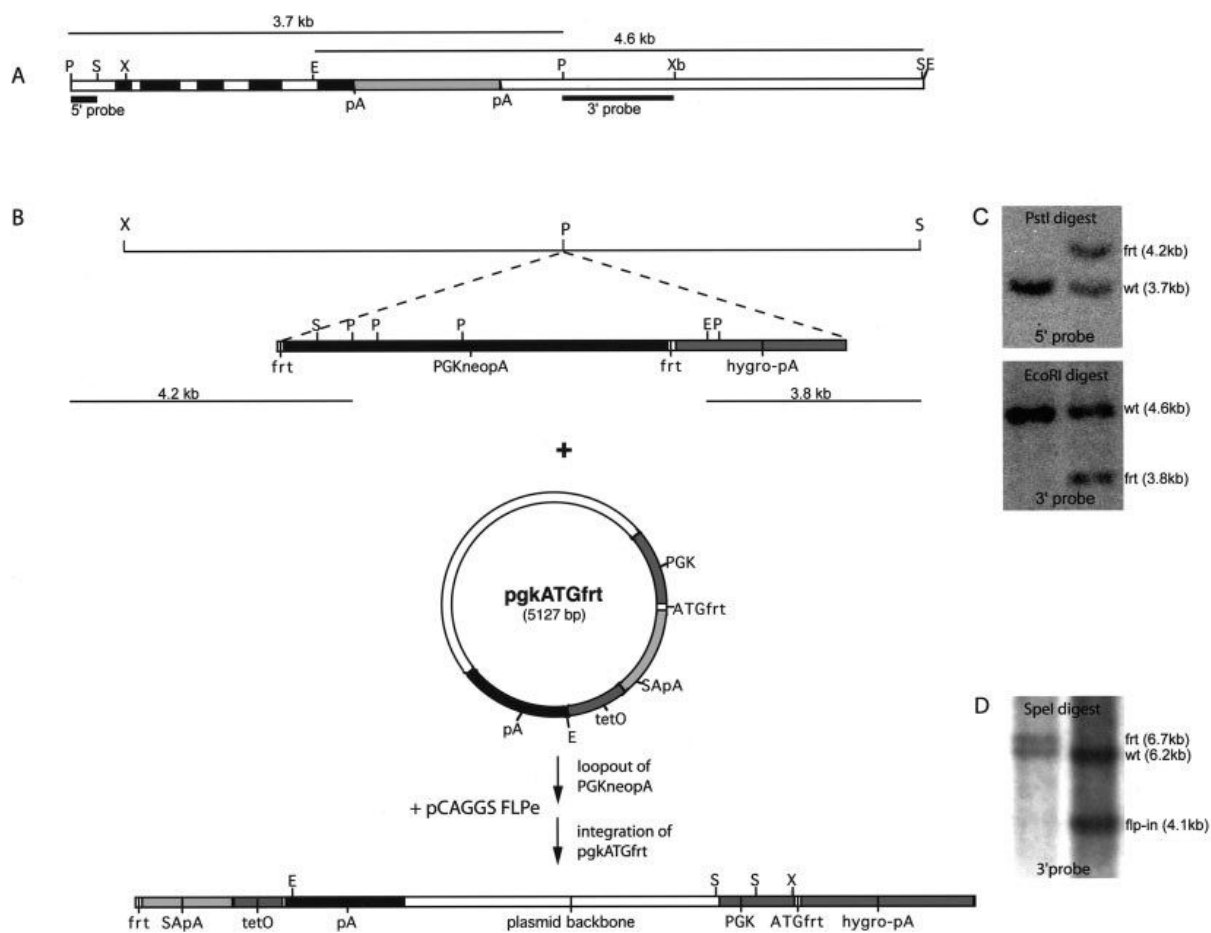


图3. Col1a1定点插入位点示意图。

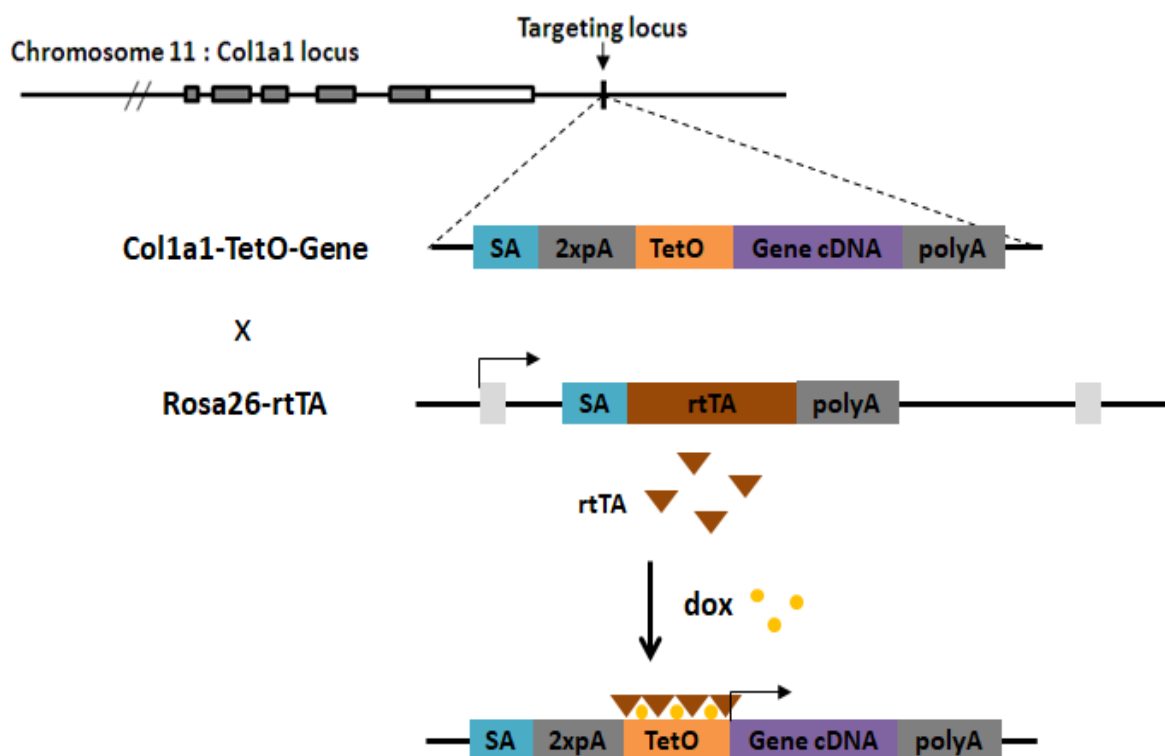


图4. Col1a1位点四环素调控可逆过表达模式图。

例如，Col1a1-tetO-EGFP与Rosa26启动子驱动的rtTA工具鼠交配后，通过dox诱导，在小鼠体内可高效诱导EGFP的表达，且EGFP的表达谱与Rosa26启动子表达谱相一致。不过值得注意的是，在骨骼肌、脑组织和睾丸组织中没有EGFP的表达，后两者可能是由于血脑屏障和血睾屏障的关系。

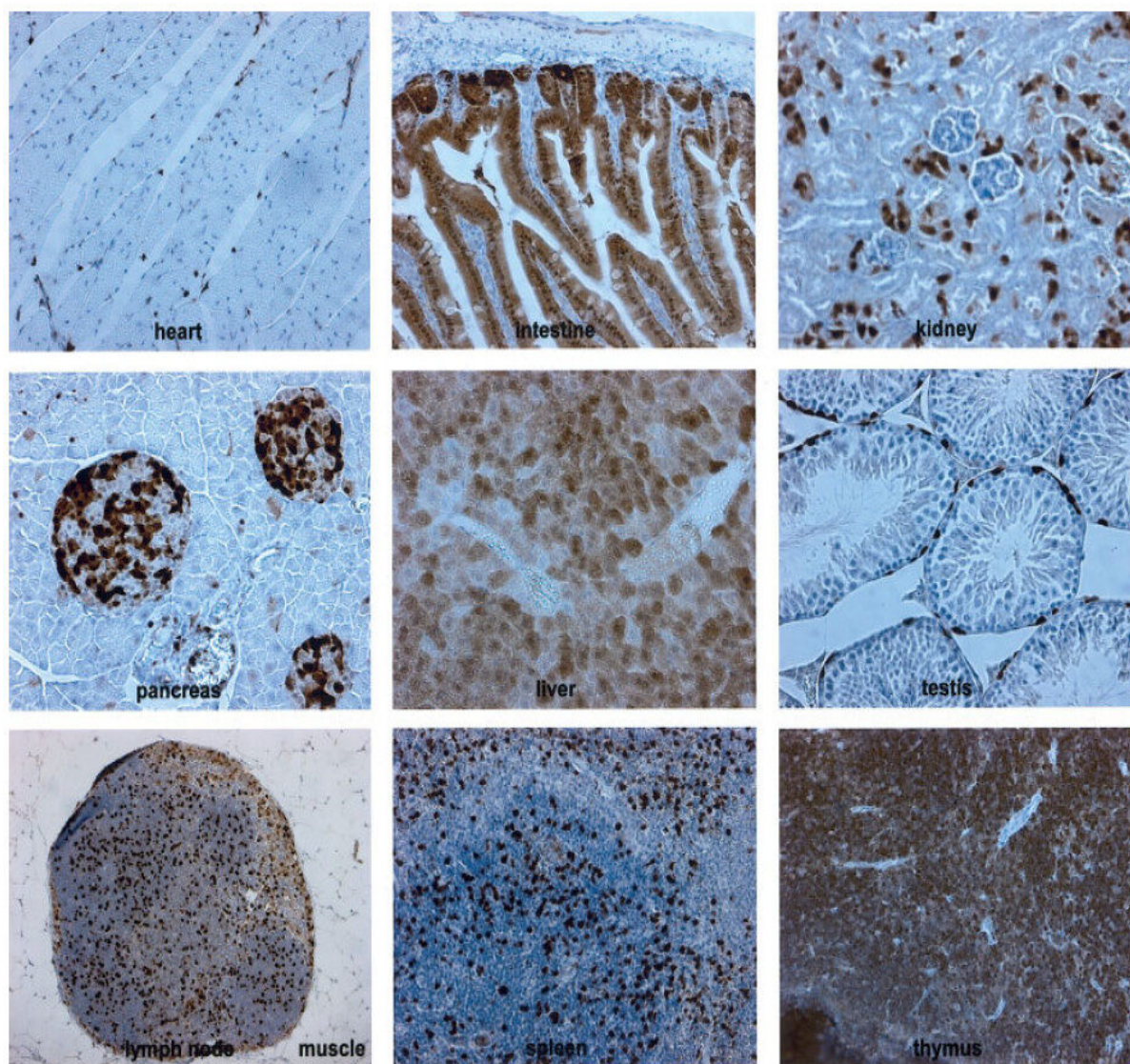


图5. Col1a1位点dox诱导EGFP表达情况。

Table 1
In Vivo Expression of Inducible EGFP

Tissue	Cell type: EGFP Expression
Spleen	B-cells: ++ T-cells: ++
Thymus	All cells: +++
Lymph node	B-cells: +++ T-cells: +++
Liver	Hepatocytes: +++ Endothelial cells: + Bile ducts: -
Kidney	Tubular cells (cortex): + Collecting ducts (medulla): + Interstitial cells (medulla): -
Heart	Myocytes: - Interstitial fibroblasts: + Endothelial cells: + Pericardial cells: +
Intestine	Crypt cells: +++ Villi: +++ Mesenchymal cells: -
Pancreas	Islet cells: +++ Acinar cells: +
Brain	No expression
Testis	Peritubular cells: + All other cells: -
Lung	Bronchial epithelial cells: + Alveolar cells: + Interstitial fibroblasts: + Endothelial cells: -
Skin	Epithelial (epidermis): +++ Fibroblast (dermis): ++ Adipocytes: +
Skeletal muscle	No expression

+ <10% of the cells score GFP positive.
 ++ 10–50% of the cells score GFP positive.
 +++ >50% of the cells score GFP positive.

图6. Col1a1位点dox诱导EGFP表达概况表。

表达。

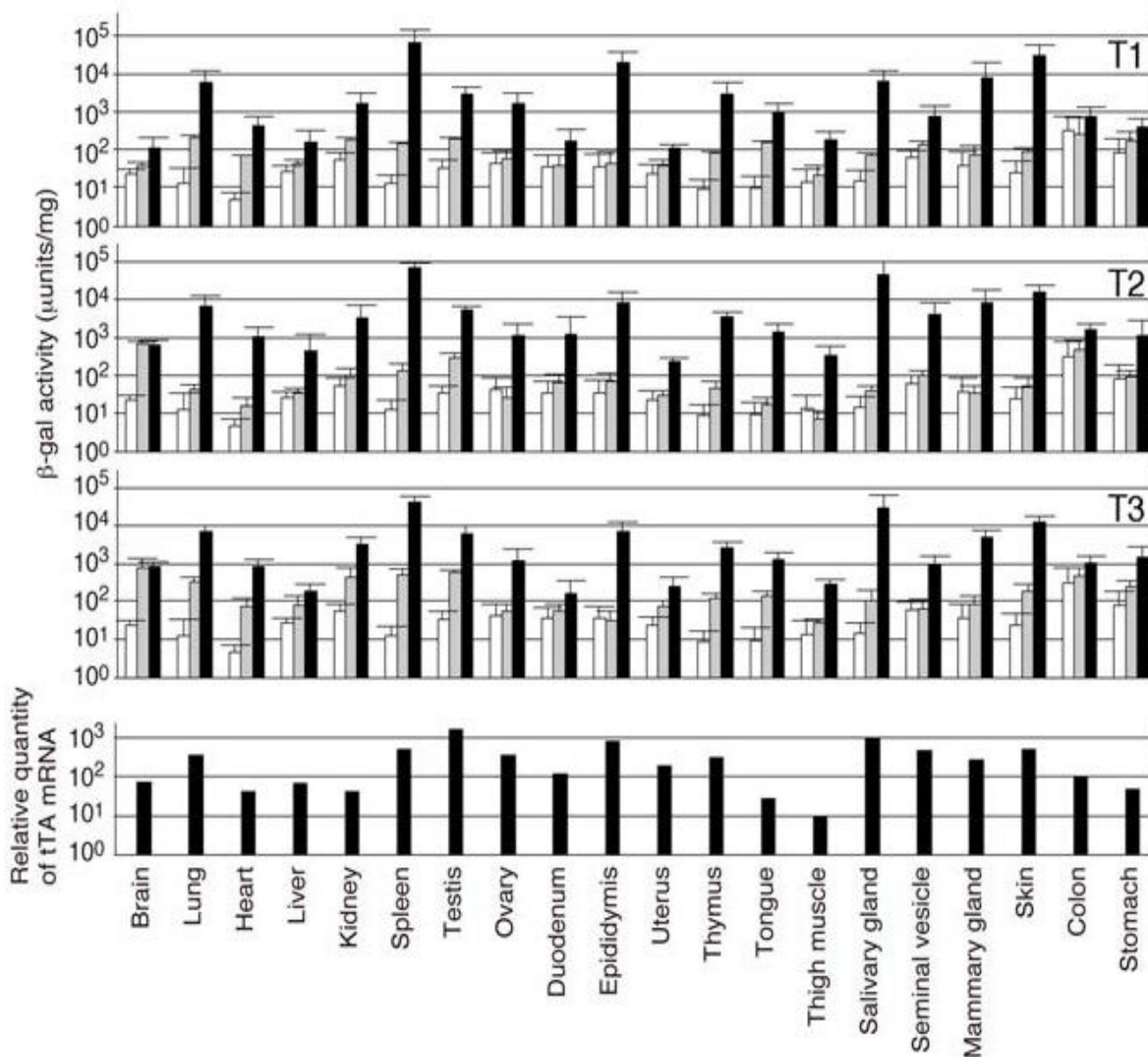


图8. Gene regulation in mice generated from tightly regulated ES clones.

和Col1a1位点类似，最好在TetO-cDNA-polyA两侧加上隔离子来减少不依赖于四环素的本底表达。

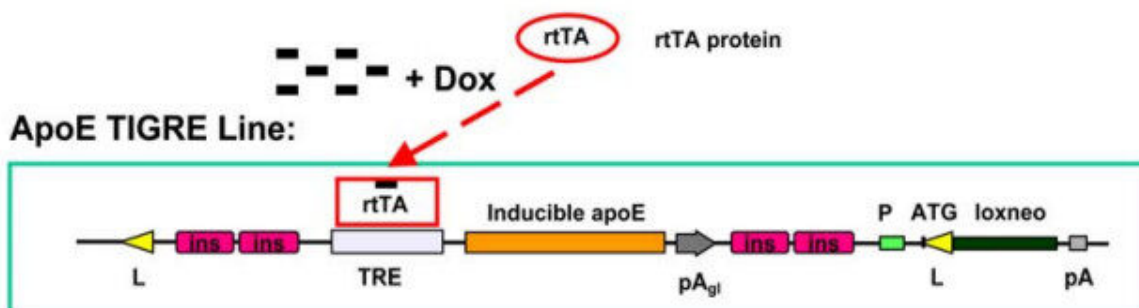


图9. The ApoE TIGRE locus contains an exogenous copy of ApoE cDNA driven by TRE and flanked by four copies of chicken b-globin insulator (ins) sequences, two on each side, and a PGK promoter (P) driven loxneo selection marker.

好的，常用的定点整合位点（Safe Harbors）先给大家普及这么多，如果想要了解更多可以在下方留言区互动，也可在公众号内回复「学问」，查看更多小鼠大学问系列干货！

References

1. Zambrowicz BP, Imamoto A, et al. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15;94(8):3789-94.
2. Hippenmeyer S, Youn YH, et al. Genetic Mosaic Dissection of Lis1 and Ndel1 in Neuronal Migration. *Neuron*. 2010 Nov 18; 68(4): 695-709.
3. Tasic B, Hippenmeyer S, et al. Site-specific integrase-mediated transgenesis in mice via pronuclear injection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 10; 108(19): 7902-7907.
4. Tasic B, Miyamichi K, et al. Extensions of MADM (Mosaic Analysis with Double Markers) in Mice. *PLoS One*. 2012; 7(3): e33332.
5. Beard C, Hochedlinger K, et al. Efficient method to generate single-copy transgenic mice by site-specific integration in embryonic stem cells. *Genesis*. 2006 Jan;44(1):23-8.
6. Hochedlinger K, Yamada Y, et al. Ectopic Expression of Oct-4 Blocks Progenitor-Cell Differentiation and Causes Dysplasia in Epithelial Tissues. *Cell*. 2005 May 6;121(3):465-77.
7. Zeng H, Horie K, et al. An inducible and reversible mouse genetic rescue system. *PLoS Genet*. 2008 May; 4(5): e1000069.
8. Linda Madisen, Aleena R. Garner, et al. Transgenic mice for intersectional targeting of neural sensors and effectors with high specificity and performance. *Neuron*. 2015 Mar 4; 85(5): 942-958.