

四倍体补偿技术的建立及其应用*

匡颖^{1)**} 孙霞¹⁾ 邓涛²⁾ 卢希彬¹⁾ 孙瑞林²⁾ 王铸钢^{1,3)} 费俭^{1,4)}

¹⁾上海南方模式生物研究中心, 上海 201203; ²⁾中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031;

³⁾上海交通大学医学院医学遗传学教研室, 上海 200025; ⁴⁾同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

摘要 常规基因剔除小鼠的获得主要是利用 ES 细胞的全能性先获得嵌合体小鼠, 再利用 ES 细胞的生殖系传递能力, 通过嵌合体与野生型小鼠的交配获得杂合子小鼠。而四倍体补偿技术则可绕过嵌合体小鼠阶段, 直接获得基因修饰杂合子小鼠。利用电融合技术和 Piezoelectric microinjection 显微注射技术建立了四倍体补偿技术, 小鼠四倍体胚胎的获得率(电融合率)为 $(93.01 \pm 1.37)\%$, 经体外培养囊胚形成率为 $(82.49 \pm 2.08)\%$ 。通过显微注射方法将 2 种 129 品系小鼠来源的 ES 细胞(CJ7 和 SCR012)注射到四倍体囊胚腔中, 获得了完全 ES 细胞来源的小鼠, ES 鼠的获得率分别为 2.7% 和 8.3%。经微卫星 DNA 检测, 成体小鼠的 10 个被检测组织均为 129 小鼠来源的。同时, 也利用基因修饰的 ES 细胞进行了研究, 获得了 2 种基因修饰的完全 ES 细胞来源的杂合子小鼠, 部分小鼠具有繁殖能力, 经繁育已获得了纯合子, 其中凝血因子 VIII 基因敲除小鼠获得了预期的血友病小鼠表型。上述结果说明四倍体补偿技术可应用于基因修饰小鼠的制备。

关键词 四倍体补偿技术, ES 鼠, 基因修饰, 近交系 ES 细胞

学科分类号 Q78, Q334

小鼠二倍体胚胎经理化诱导可产生四倍体胚胎, 这些胚胎与孤雌、孤雄生殖一样往往不能发育到期^[1,2]。Graham 等发现, 当正常受精的二倍体(2N)胚胎或小鼠胚胎干细胞(ES 细胞)与四倍体胚胎(4N)聚合形成嵌合胚后则有可能对其发育加以拯救, 获得存活个体, 此即为四倍体补偿技术(tetraploid complementation experiment)^[3-5], 又称为 2N-4N 嵌合胚技术。研究发现, 4N 胚胎细胞具有明显的胚外组织限制性分布(发育)特性, 4N 胚胎细胞最终只分布至胎盘滋养层及卵黄囊内胚层等胚外组织^[2,3], 而基本不参与胎儿及胚外中胚层组织的发育, 故通过该技术获得的小鼠为完全 2N 胚胎或 ES 细胞来源的(简称 ES 鼠)^[4,5]。四倍体补偿技术是近年来兴起的胚胎操作技术, 可高效、快捷地获得完全 ES 细胞来源的基因修饰小鼠模型。

国际上常规的小鼠基因剔除技术是将经过基因修饰的小鼠 ES 细胞注射到小鼠正常囊胚中, 获得嵌合体小鼠, 利用 ES 细胞发育全能性, 在嵌合体小鼠中获得来源于 ES 细胞的生殖细胞, 并繁育后代, 得到带有该基因修饰的杂合子小鼠。由于受到小鼠性成熟周期的制约, 这一方法获得基因剔除小鼠需要很长的研究周期, 在一定程度上限制了这一

技术在当今日益激烈的基因功能研究竞争中的应用。与此相比, 四倍体补偿技术绕过了嵌合体小鼠阶段, 可以直接获得基因修饰小鼠, 大大地节约了成本、缩短了研究周期。同时该技术较易获得不同胚胎发育期的基因修饰胎儿, 在胚胎致死基因功能研究, 尤其是在杂合状态下即呈现致死效应的, 此为唯一有效的研究该基因功能的方法。利用其可拯救胚外突变表型的特点, 该技术也可用于控制胚胎着床和胚外组织发育的基因功能研究, 这是常规的基因修饰技术无法实现的。然而, 由于这一技术需要操作环节较多, 如 ES 细胞的培养、传代与冷冻、四倍体胚胎的获得方法、胚胎的体外培养、ES 细胞与四倍体胚胎的嵌合方式等, 每一步的成败都将影响到 ES 鼠的获得, 目前在国际上尚未普及, 国内实验室也未见利用该技术获得近交系的野生型和基因修饰 ES 鼠的报道。

* 国家自然科学基金面上项目(30570971), 上海市科委重大项目(04DZ14006, 03DZ14088, 06DZ05907)和科技部十一五重大科技支撑计划(2006BAI23B02)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 021-58961006, E-mail: kuangying01@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-07-11, 接受日期: 2007-08-08

在本研究中我们利用电融合技术获得了四倍体胚胎, 并利用两株已商品化的来源于 129 品系小鼠的 ES 细胞 CJ7、SCR012, 以及基因敲除 ES 细胞阳性克隆 18 KO 和 F8 KO(凝血因子Ⅷ knock-out ES 细胞)等进行了研究, 高效获得了完全 ES 细胞来源的野生型和基因修饰小鼠。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 ES 细胞. CJ7 和 SCR012 ES 细胞系分别来源于 129 S1/Sv 和 129 S6/SvEv, 由上海南方模式生物研究中心保存。18 MG (mouse ensemble gene ID ENSMUSG00000032530) knock-out ES 细胞(简称 18 KO)和 F8 KO 分别是 CJ7 和 SCR012 经过打靶后所获得的阳性克隆, 由上海南方模式生物研究中心制备并保存。

1.1.2 小鼠. ICR 小鼠购自中国科学院上海实验动物中心, CBA×C57BL/6J、129S1/Sv 和实验所获得的 ES 鼠均由上海南方模式生物研究中心繁育。ICR 小鼠用作四倍体囊胚的供体, CBA×C57BL/6J 用来制备假孕母鼠。

1.1.3 细胞培养相关试剂. ES 细胞培养所需的 DMEM 培养基(高糖, ES 细胞级)、胎牛血清(ES 细胞级)、G418、Gancyclovir、LIF、青链霉素、胰蛋白酶等分别购自 Gibco BRL 公司、Sigma 公司、Chemicon 公司。

1.1.4 引物由上海生工生物工程技术公司和上海英俊生物技术有限公司合成。D2Mit102: 5' TAT TTC CC TGT CAC TCC TCC C 3' 和 5' TGT CTT TAT GCT CAG ACA TAC ACA 3'; D5Mit138: 5' AGA CAG TTA CCT TCT TCC CAA GG 3' 和 5' TGT TTC TCC CTT CTG CCA TC 3'; 18KO: 5'ATTG-GCTGCTGGAGGGAGGGAAGAG 3' 和 5' CGGA-ACACGGCGGCATCAGAG 3'; F8 KO:1- 5' CAC-TTGTAAGAGTTTGGGGATG 3', 2- 5' TTCGCAG-CGCATCGCCTTCTAT 3' 和 3- 5' GTAATCTGGA-AATCACGGATGC3'; Sry: 5' GAGAGCATGGAGG-GCCAT 3' 和 5' CCACTCCTCTGTGACACT 3'。

1.2 方 法

1.2.1 四倍体囊胚的获得. 3~4 周龄的 ICR 小鼠经超排后与性成熟的 ICR 小鼠进行交配, 2 细胞期胚胎取自见栓 1.5 天雌鼠的输卵管, 并置于 KSOM-AA^[6]培养液中, 37℃, 5%CO₂ 条件下培养

备用。

采用电融合的方法获得四倍体胚胎^[7], 电融合仪 CF-150B 为匈牙利 BLS Ltd. 产品, 电融合槽为 GSS250 型, 融合液为 0.3 mol/L 甘露醇溶液(含 0.3% BSA), 在 30 V, 40 mm 的条件下进行融合, 融合后的胚胎培养于 KSOM-AA 中。1 h 后挑出融合的胚胎, 悬滴培养于 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中。

1.2.2 ES 细胞培养. 按常规的方法培养, ES 细胞完全培养基为 DMEM, 内含 10⁻⁶ mol/L β- 巯基乙醇, 100 U/ml 青霉素, 50 mg/L 链霉素, 15%胎牛血清, 1 000 U/ml LIF。ES 细胞培养在丝裂霉素 C (终浓度 10 mg/L)处理过的滋养层细胞上, 每天换液。用于囊胚腔注射的 ES 细胞经 0.1%胰蛋白酶-EDTA 消化后, 重悬于 DMEM(无 LIF)中冰上放置备用。

1.2.3 ES 细胞的四倍体囊胚注射及胚胎移植(ES 鼠的获得). 注射时采用的是无 LIF、含 20mmol/L HEPES 的 DMEM 完全培养基, Piezoelectric microinjection (Primetech, Ibaraki, Japan)显微注射系统, 每枚囊胚注射 15 个左右的 ES 细胞, 注射后囊胚培养于无 LIF 的 DMEM 完全培养基中, 37℃, 5% CO₂ 培养 1 h 左右, 将注射后胚胎移植到 2.5 天假孕母鼠子宫中, 每侧移植 6~8 枚。假孕母鼠饲养在上海南方模式生物研究中心动物房, 自然分娩。

1.2.4 ES 鼠组织来源的检测. 首先通过 ES 鼠的毛色来判断其组织来源; 其次 ES 鼠性成熟后再与野生型 ICR 雄鼠进行交配, 通过子代的毛色来判断其组织来源; 最后取 ES 鼠的心、脑、肝、肺、肾、脾、睾丸、胃、肠、附睾等组织 DNA, 进行微卫星 DNA 的 PCR 检测, 采用 2 个染色体微卫星 DNA 标记 D2Mit102 和 D5Mit138 来区分 129 和 ICR 成分, D2Mit102 和 D5Mit138 的引物序列来自 National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)网站, 反应条件: 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 2 min, 35 个循环, PCR 产物 3%凝胶电泳分离^[8]。

1.2.5 基因修饰 ES 鼠的基因型鉴定. 基因修饰小鼠的基因型鉴定采用 PCR 方法, 18 KO 和 F8 KO 基因修饰 ES 细胞的打靶策略见 2.4, 18KO ES 鼠的基因型鉴定采用引物对 P3 和 P4, 反应条件: 94℃ 45 s, 64℃ 45 s, 72℃ 2 min, 30 个循环, 产物大小为 500 bp; F8 ES 鼠的基因型鉴定采用 3 条

引物: P1 在 neo 上, P2 在臂上, P3 在敲除区域, 反应条件: 94℃ 45 s, 58℃ 45 s, 72℃ 2 min, 30 个循环, 野生型条带为 715 bp, 敲除条带为 500 bp. 同时我们也对 7 只 18KO ES 鼠基因组中的雄性性别决定基因 (sex- determining region on the Y chromosome, Sry)采用 PCR 的方法进行检测, 反应条件: 94℃ 45 s, 60℃ 45 s, 72℃ 30 s, 35 个循环, 产物大小为 265 bp.

2 结 果

2.1 四倍体囊胚的获得

如图 1 和表 1 所示, 在 4 次融合实验中, 融合 1 h 后 90%以上的 2 细胞期胚胎的 2 个卵裂球发生了融合, 融合后体外培养 48 h, 四倍体胚胎的囊胚形成率可达 80%左右. 有趣的是尽管胚胎发生了融合, 但它的发育时序并没有发生改变, 融合胚在 4 细胞期即发生致密化(compact), 囊胚形成时间也与 2 细胞期胚胎体外培养的发育时间相一致.

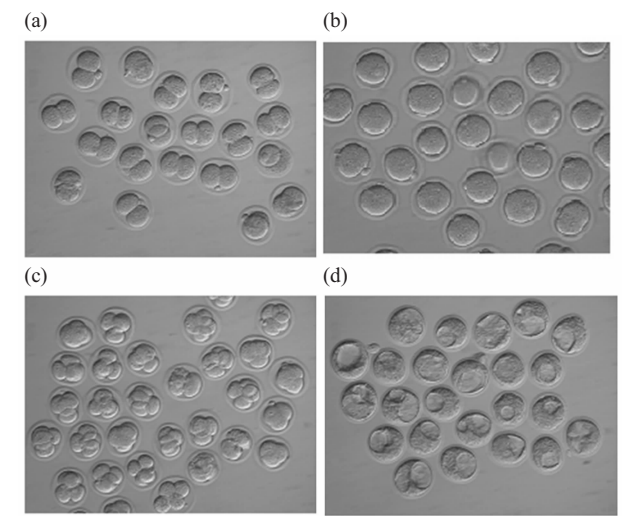


Fig. 1 Development of tetraploid embryos *in vitro*
(a) 10 min after fusion. (b) 1 h after fusion. (c) 24 h after fusion. (d) 48 h after fusion.

Table 1 Development of tetraploid embryos <i>in vitro</i>			
	2-cell embryos	Fused embryos (% embryos)	Tetraploid blastocysts (% fused)
1	120	115(95.83%)	95(83.60%)
2	38	36(94.73%)	28(82.35%)
3	144	130(90.00%)	100(77.00%)
4	82	75(91.46%)	65(87.00%)

2.2 野生型 ES 鼠的获得

CJ7 和 SCR012 ES 细胞系分别来源于 129 S1/Sv 和 129 S6/SvEv, 均为雄性. 129 S1/Sv 和 129 S6/SvEv 均为灰毛、黑眼睛小鼠, 而 ICR 小鼠为白毛、红眼睛, ES 鼠为完全 ES 细胞来源的, 故理论上这 2 株 ES 细胞来源的 ES 鼠均应为灰鼠, 而当这 2 株 ES 细胞注射到两倍体囊胚的囊胚腔时将获得灰白相间的嵌合体小鼠(图 2). 本研究所获得的 20 只 ES 鼠均为灰毛黑眼睛小鼠, 其中来自于 CJ7 的有 3 只(表 2), 为雄性, 2 只发育到成年并有正常的生殖能力, 与野生型 ICR 小鼠交配后, 其后代毛色均为灰色, 来自 SCR012 的有 5 只, 均为雄性, 4 只发育到成年, 3 只有正常的生殖能力, 其后代也均为灰鼠.

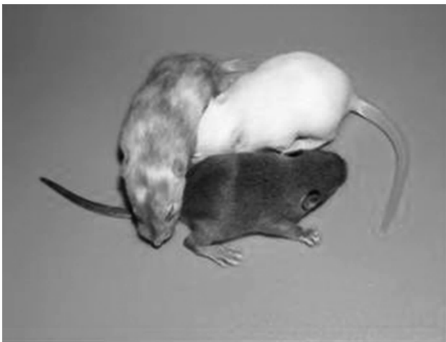
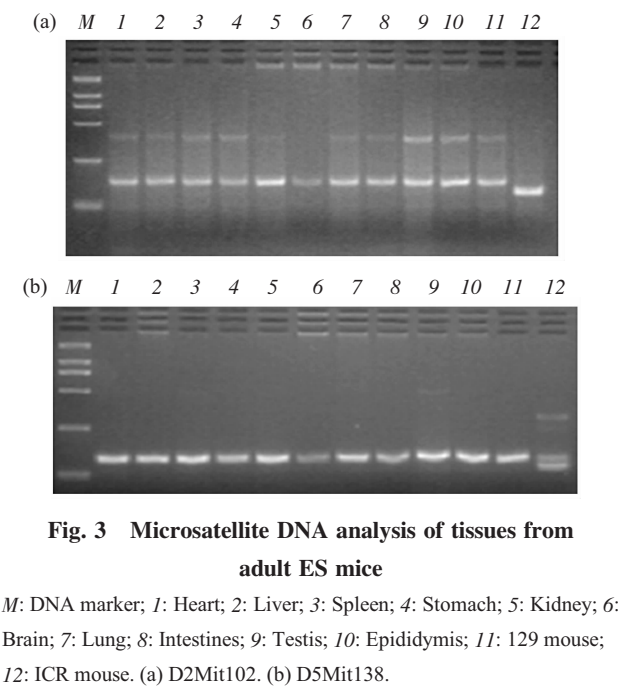


Fig. 2 Comparison of ES mouse, wild type ICR mouse and ES-2N chimera mouse

Table 2 Production of completely ES cell derived mice			
ES cell lines	No.of injected tetraploid blastocysts	No.of live offspring (% transferred)	No.of adult mice (Female/Male)
CJ7	111	3 (2.7%)	2(0/2)
SCR012	60	5 (8.3%)	4(0/4)
18 KO	86	7 (8.1%)	6(3/3)
F8 KO	168	8 (4.8%)	8(1/7)

2.3 ES 鼠组织来源的微卫星 DNA 检测

ES 鼠完成交配实验后处死, 提取 ES 鼠 10 个组织的组织 DNA, 进行微卫星 DNA 标记 D2Mit102 和 D5Mit138 的 PCR 检测. 如图 3 所示, 所检测的 10 个组织均为 129 小鼠品系来源, 未发现 ICR 成分.



2.4 基因修饰 ES 鼠的获得

18 KO 和 F8 KO ES 细胞均是通过同源重组技术所获得的基因敲除阳性克隆，打靶策略见图 4a 和图 5a，经过了基因打靶和两轮药物筛选后，细胞代数均在 24 代以上。18 MG 是一个未知功能基因，生物信息学分析显示，它编码的是一个分泌蛋白，18 KO 打靶载体是通过常规分子克隆技术构建的；凝血因子Ⅷ是功能已知的蛋白质，它的基因缺陷会导致人类甲型血友病，F8 KO 打靶载体是通过 Red/ET 同源重组技术(ET 克隆技术)构建的。

如表 2 所示，18KO ES 细胞经注射后获得了 7 只 ES 鼠，均为灰鼠，经 PCR 检测均带有敲除载体片段(图 4b)，其中 6 只发育至性成熟，3 雌 3 雄，3 只雄鼠中 2 只具有繁殖能力，并通过其繁殖出了纯合子小鼠(图 4c)；F8 KO 经注射后，获得了 8 只 ES 鼠，7 雄 1 雌，均发育至性成熟，在 7 只雄鼠中有 6 只具有繁殖能力，因凝血因子Ⅷ基因位于 X 染色体上，根据文献报道，凝血因子Ⅷ敲除的雄鼠会发生出血不止并导致死亡，故我们在 F1 代小鼠

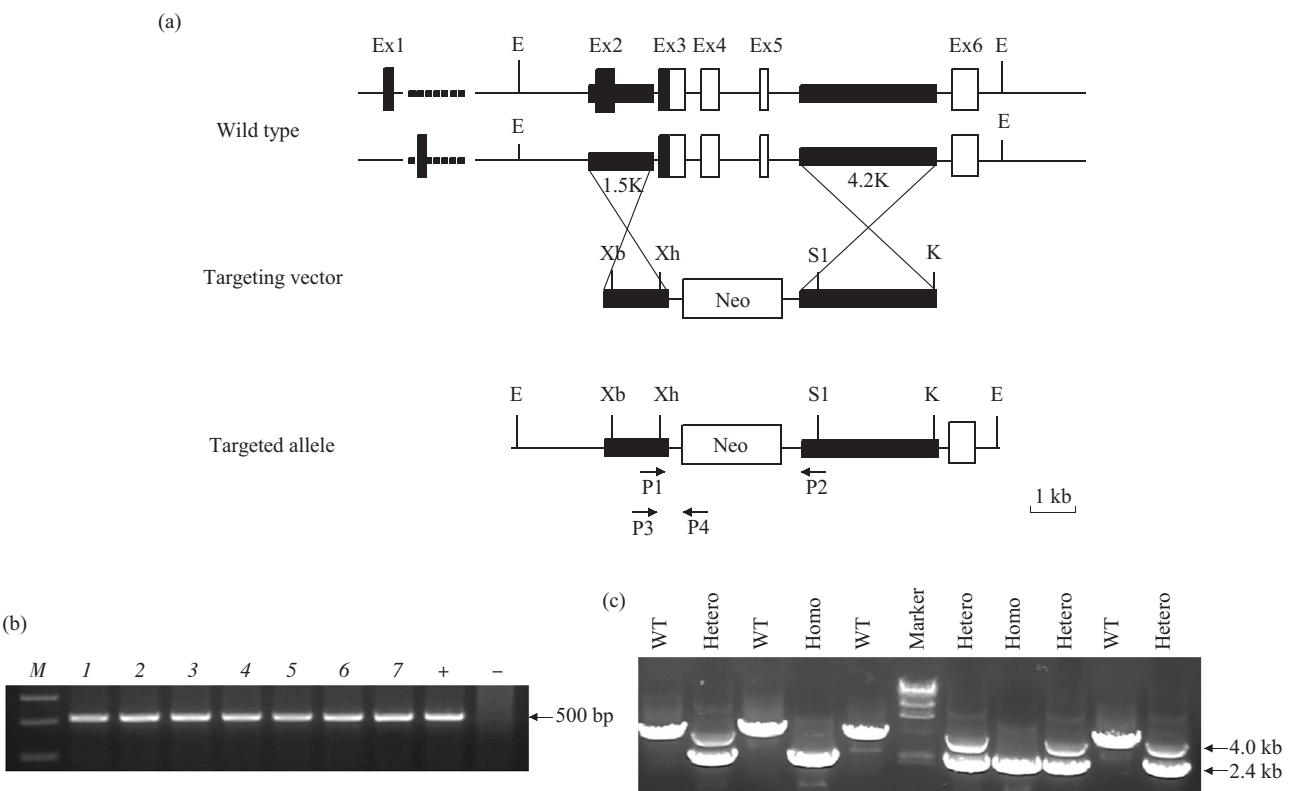


Fig. 4 Strategy for generation of 18 knock out mice

(a) Gene targeting strategy: exon3, 4, and 5 were replaced by neo cassette. E: *EcoR* V; K: *Kpn* I; Xb: *Xba* I; Xh: *Xho* I; S1: *Sal* I; Ex: Exon; : None code; : Code. (b) PCR analysis of tail DNA of mice derived completely from 18 KO ES cell using tetraploid embryo complementation. Primer P3 and P4 were used and the expected product is 500 bp. Lane1~7 were genomic DNA of mouse 1~7. The plasmid was used as positive control and an unassociated genomic DNA was used as negative control. (c) Genotyping of the 18 KO mice. The primer P1 and P2 were used. The wild type product was 4.0 kb and the targeted allele gave a 2.4 kb fragment.

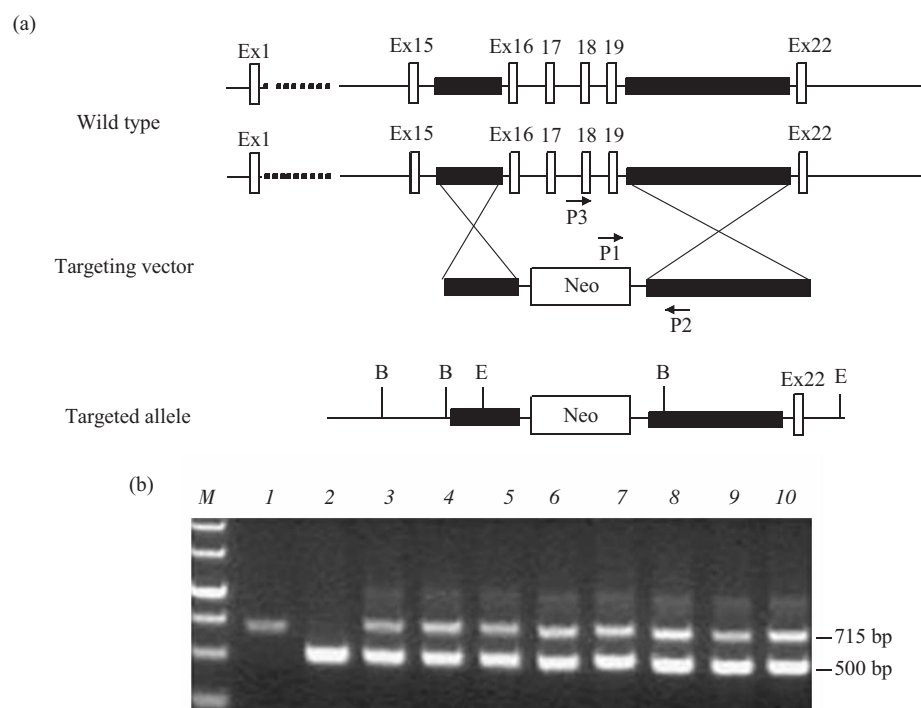


Fig. 5 Strategy for generation of F8 knock out mice

(a) Gene targeting strategy: exon16, 17, 18 and 19 were replaced by neo cassette. E: *EcoR* V; B: *Bam* H I; Ex: Exon; ■: Homologous arm; □: Code. (b) PCR analysis of tail DNA of mice derived completely from F8 KO ES cell using tetraploid embryo complementation and its female offspring. Primer P1 and P2 were used to test the targeted allele and the expected product is 500 bp; Primer P2 and P3 were used to test the wild type allele and the expected product is 715 bp. M: DNA marker; 1: 5# F8 KO ES mouse; 2: Wild type mouse; 3~10: Female offspring of 5# ES mouse.

出生后才进行基因型鉴定，如图 5b 所示 ES 鼠为纯合子小鼠，而 F1 代小鼠中雌鼠均为杂合子小鼠。为观察表型，1 只 F8 KO 的 ES 鼠剪尾后未进行止血处理，最终 2 h 后小鼠因出血不止而死亡，而 F1 代雌鼠剪尾后却未发生此现象。

CJ7 和 SCR012 均为雄性的 ES 细胞，理论上所有的 ES 鼠都应均为雄鼠，这一点已在野生型 ES 鼠中得到证明。然而在两种基因修饰 ES 鼠的制备过程中却获得了雌鼠，这些雌鼠外观正常，从解剖学来看生殖系统形态也正常，但均不具有正常的繁殖能力。我们对 7 只 18 KO ES 鼠的 *Sry* 基因进行了检测，如图 6 所示，所有的 ES 鼠均带有 *Sry* 基因。

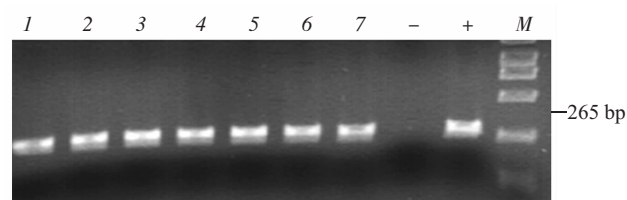


Fig. 6 *Sry* gene determination of 18 KO ES mice by PCR
1~7: 18KO ES mice; -: Wild type female mouse; +: Wild type male mouse.

3 讨 论

近年来，四倍体补偿技术因其可在短时间内获得基因修饰小鼠(研发周期缩短了近 4 个月)，能满足高通量、大规模的基因功能研究，吸引了各国学者的注意。在已有的报道中杂交系的 ES 细胞系由于基因异质性地可高效率地获得 ES 鼠(10%以上)^[9~11]，然而，在某些基因修饰小鼠的表型分析研究(如行为学和免疫学)中对小鼠的遗传背景要求较高，而且目前国际上已有大量近交系(129 来源)的基因修饰 ES 细胞出售。但是目前，近交系 ES 鼠的获得效率很低，这在一定程度上限制了它的应用，故如何利用近交系的 ES 细胞获得 ES 鼠就显得尤为重要。目前应用于四倍体补偿技术的近交系 ES 细胞系主要有 R1(种内杂交，来自 129/Sv 和 129/Sv-CP substrains)、GS1(来自 129 Sv/Ev)、J1(来自 129 terSv)、D3(来自 129 Sv)、E14.1(来自 129 Ola)、CJ7(来自 129 S1/Sv)等，其中仅有 R1 和 GS1 获得了 ES 鼠^[4,5]。

本研究中我们利用两个已商品化的近交系的

ES 细胞 CJ7 和 SCR012 成功地获得了 ES 鼠, 在以前的研究中 Li 等未获得来自 CJ7 的完全 ES 细胞来源的小鼠^[7]. 与其相比, 我们所用的 ES 细胞的代数较低(P18/P20-26), 并采用 Piezo-microinjection 显微注射系统, 而 Li 等所采用的是聚合法, 现有的研究已经证明, 显微注射法在 ES 鼠的获得效率方面明显优于聚合法, 尤其是在 ES 细胞全能性较差的情况下^[9]. 在我们的研究中完全来源于 SCR012 的 ES 鼠获得效率明显高于 CJ7, 有趣的是, 前面提到的唯一一个可获得 ES 鼠近交系的 ES 细胞 -GS1 与 SCR012 一样, 均来自 129 Sv/Ev 小鼠, 这在一定程度上说明 ES 细胞的遗传背景是影响 ES 鼠获得效率的重要因素.

从表 2 中我们可以看到, 尽管 18 KO ES 细胞经过打靶和两轮药物筛选后代数已超过 24 代, 但其 ES 鼠的获得效率(8.3%)明显高于野生型的(2.7%), 我们认为在 ES 细胞传代过程中每个细胞的全能性是不同的, 而打靶相当于一次亚克隆过程, 所挑选的克隆恰好是全能性较好的.

ET 克隆技术是近年来发展起来的打靶载体构建技术, 与常规的分子克隆技术相比, 可以获得较长的同源臂, 并且不会引入突变, 有助于获得更高的打靶效率^[12]. 研究中通过这两种方式构建的打靶载体所获得的 ES 细胞阳性克隆均获得了 ES 鼠. 18 MG 是一个未知功能基因, 18 KO 小鼠的表型尚在研究中. 凝血因子 VIII 基因缺陷是甲型血友病的主要病因, 通过四倍体补偿技术, 我们获得了凝血因子 VIII 16~19 外显子敲除的小鼠, 其中基因修饰的雄鼠获得了类似血友病的表型——出血不止而导致死亡, 而杂合子雌鼠则无此表型, 这与通过插入 *neo* 来失活凝血因子 VIII 16 或 17 外显子所获得的甲型血友病小鼠模型的表型相同^[13, 14], 详细的表型及其发病机理尚需进一步研究.

研究中, 我们在基因修饰 ES 鼠中获得了雌性小鼠(理论上均应为雄性), 尤其是 18 KO ES 鼠中雌鼠竟高达 50%, 而在野生型 ES 鼠中却未发现此现象. 究其原因, 我们认为主要有两个方面: 在传代或打靶过程中, Y 染色体的部分丢失或雄性性别决定基因的突变, 以及雄性性别决定基因的精确表达受到抑制.

在 Li 等 2005 年的报道中曾经发现, ES 鼠的某些脏器中存在四倍体囊胚来源的成分^[9], 我们首先通过微卫星 DNA 标记对这些雌鼠卵巢的组织来源进行了检测, 结果发现其均为 129 成分, 这就排

除了四倍体囊胚污染影响性别发育的可能性. Eggan 等^[15]曾经报道, 在 ES 细胞体外传代或打靶过程会造成 Y 染色体丢失, 并通过亚克隆的方法获得了 X0 的 ES 细胞克隆, 得到了有生育能力的雌性基因修饰 ES 鼠. 在早期 ES 鼠的获得过程中也曾有研究者报道过利用雄性 ES 细胞获得了雌性的、不具有生育能力的 ES 鼠^[6], 作者认为可能是 Y 染色体的全部或部分丢失造成了这一表型. 早期的研究表明, *Sry* 基因是小鼠最重要的雄性性别决定基因, 并通过转基因小鼠证明, 只要是小鼠基因组中带有 *Sry* 基因, 哪怕是在雌鼠的一条 X 染色体上, 它都将发育为雄性^[16], 然而在我们的研究中 3 只 18 KO ES 雌鼠的 *Sry* 基因均存在, 哺乳动物的雄性性别决定与分化并不是单一基因决定的, 而是一个以 *Sry* 基因为主导的、多基因参与的有序协调表达过程, 除 *Sry* 外, 某些常染色体上的基因也参与了该过程, 如其上游的 *Wt1* (Wilms' tumor-1)、*Sf1* (steroidogenic factor-1), 其下游的 *Sox9* (*SRY*-related box)、*Fgf9* (fibroblast growth factor 9)、*Ir*, *Irr*, *Igf1r* (insulin receptor, insulin-related receptor, *Igf1* receptor)等^[17~19], 这些基因的突变都将引起 XY 小鼠的部分或全部性反转现象. 据此推测 XY 型雌鼠的获得可能是由于 Y 染色体的部分丢失或 *Sry* 等雄性性别决定基因的突变造成的.

同时, 雄性性别决定与分化也是一个基因表达量依赖的多基因相互作用过程, *Sry* 基因只有在胚胎 10.5~12.5 天表达, 小鼠生殖腺才能进入雄性性腺发育途径, 无论是 XX 基因型还是 XY 基因型的生殖腺在发育早期 *Sox9* 和 *Fgf9* 都表现出相似的基因表达模式, 一旦 *Sry* 开始表达, *Sox9* 和 *Fgf9* 才只在雄性生殖腺中表达增强, 只有 *Sry*、*Sox9* 和 *Fgf9* 均正常表达, 生殖腺才能进入雄性分化程序. 然而, ES 细胞在体外传代过程中常伴随着表观遗传异常^[20], 而且由此获得的 ES 鼠在胚胎期也仍然保留着这种异常^[21], 我们推测表观遗传异常可能影响了性别决定基因的正常表达, 进而造成了 XY 性腺的性逆转.

综上所述, 我们利用小鼠近交系的 ES 细胞建立了四倍体补偿技术, 并利用这一技术获得了完全 ES 细胞来源的基因修饰小鼠, 并证明这些小鼠可用于表型分析, 这一技术与 ET 克隆技术相结合必将进一步加快基因修饰小鼠的获得进程, 满足后基因组时代大规模、高通量的基因功能研究.

参 考 文 献

- 1 Snow M H. Embryonic development of tetraploid mice during the second half of gestation. *J Embryol Exp Morphol*, 1975, **34** (3): 707~721
- 2 Eakin G S, Hadjantonakis A K, Papaioannou V E, *et al.* Developmental potential and behavior of tetraploid cells in the mouse embryo. *Dev Biol*, 2005, **288**(1): 150~159
- 3 Graham C F. Virus assisted fusion of embryonic cells. *Acta Endocr Copenh*, 1971, **153**(Supp): 154~165
- 4 Nagy A, Rossant J, Nagy R, *et al.* Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(18): 8424~8428
- 5 Wang Z Q, Kiefer F, Urbanek P, *et al.* Generation of completely embryonic stem cell-derived mice using tetraploid blastocyst injection. *Mech Dev*, 1997, **62**(2): 137~145
- 6 Biggers J D, McGinnis L K, Raffin M. Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biol Reprod*, 2000, **63**(1): 281~293
- 7 Nagy A, Gersenstein M, Vinteraten K, *et al.* *Manipulating the Mouse Embryo: A laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003. 198, 469~487
- 8 Dietrich W, Katz H, Lincoln S E, *et al.* A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics*, 1992, **131** (2): 423~447
- 9 Li X, Yu Y, Wei W, *et al.* Simple and efficient production of mice derived from embryonic stem cells aggregated with tetraploid embryos. *Mol Reprod Dev*, 2005, **71**(2): 154~158
- 10 Eggan K, Akutsu H, Loring J, *et al.* Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(11): 6209~6214
- 11 Schwenk F, Zevnik B, Bruning J, *et al.* Hybrid embryonic stem cell-derived tetraploid mice show apparently normal morphological, physiological, and neurological characteristics. *Mol Cell Biol*, 2003, **23**(11): 3982~3989
- 12 杨建岭, 顾淑萍, 陈 臣, 等. 用 Red/ET 重组酶构建基因打靶载体. *生物工程学报*, 2006, **22**(6): 919~924
Yang J L, Gu S P, Chen C, *et al.* *China Journal Biotechnology*, 2006, **22**(6): 919~924
- 13 Bi L, Lawler A M, Antonarakis S E, *et al.* Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat Genet*, 1995, **10**(1): 119~121
- 14 Bi L, Sarkar R, Naas T, *et al.* Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies. *Blood*, 1996, **88**(9): 3446~3450
- 15 Eggan K, Rode A, Jentsch I, *et al.* Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation. *Nature Biotechnology*, 2002, **20**(5): 455~459
- 16 Koopman P, Gubbay J, Vivian N, *et al.* Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, 1991, **351** (6322): 117~121
- 17 Colvin J S, Green R P, Schmahl J, *et al.* Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell*, 2001, **104** (6): 875~889
- 18 Vidal V P, Chaboissier M C, de Rooij D G, *et al.* Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet*, 2001, **28**(3): 216~217
- 19 Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, *et al.* Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature*, 2003, **426** (6964): 291~295
- 20 Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, *et al.* Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*, 2001, **293**(5527): 95~97
- 21 Tao D, Ying K, Dan Z, *et al.* Disruption of imprinting and aberrant embryo development in completely ES cell-derived mice. *Dev Growth Differ*, 2007, **49**(7): 603~610

Production and Application of Mice Completely Derived from Inbred ES Cell Lines*

KUANG Ying^{1)**}, SUN Xia¹⁾, DENG Tao²⁾, LU Xi-Bin¹⁾, SUN Rui-Lin²⁾, WANG Zhu-Gang^{1,3)}, FEI Jian^{1,4)}

¹⁾ Shanghai Nan Fang Model Organism Research Center, Shanghai 201203, China;

²⁾ Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biologic Sciences,

The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

³⁾ Department of Medical Genetics, Shanghai Jiaotong University Medical School, Shanghai 200025, China;

⁴⁾ School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract The standard protocol for generating mutant mice from heterozygous targeted ES cells currently is time-consuming and needs two breeding steps and, in some cases, risks the failure of germline transmission. In contrast, the tetraploid embryo complementation is a time-saving single step procedure escaping from the chimera mouse. Hybrid ES cell lines always have higher generation frequency because of their genetic heterozygosities, which also limit their application. However, inbred ES cell lines often fail to generate ES mice. Judged by microsatellite DNA marker analysis, the completely ES cell derived mice (ES mice) were efficiently produced with two inbred ES cell lines (SCR012 and CJ7) by microinjecting the ES cells into tetraploid blastocysts generated by electrofusion. As a result, after electrofusion, about $(93.01 \pm 1.37)\%$ of 2-cell stage embryos fused and $(82.49 \pm 2.08)\%$ of them developed to blastocysts after 48 h *in vitro* culture. The efficiency of generating newborn ES mice of wild type SCR012 cells was higher (8.3%) than that of CJ7 (2.7%). In the meanwhile, adult and fertile mutant ES mice with two gene knock-out ES cells-18 KO (derived from CJ7) and F8 KO (derived from SCR012) were generated. Interestingly, the generation frequency of 18 KO ES mice was even higher (8.1%) than wild-type CJ7 ES mice, indicating that the development potential among ES cell clones was significantly different from each other and the decline of development potential was not equal among ES cell clones during ES cell passage *in vitro* culture. The F8 KO mice had indistinguishable bleeding phenotype, which is identical to that of mice derived from breeding of chimeric mice. These results suggested that this technique can be used as a powerful approach to produced gene targeted mice efficiently.

Key words tetraploid embryo complementation, ES mice, gene targeting, inbred ES cell

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30570971), Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (04DZ140060, 03DZ14088, 06DZ05907) and The Key Project from Ministry of Science and Technology(2006BAI23B02).

**Corresponding author .

Tel: 86-21-58961006, E-mail: kuangying01@yahoo.com.cn

Received: July 11, 2007 Accepted: August 8, 2007