

综述

基因捕获技术的现状及应用*

王明科^{1,2,3} 孙慧勤² 栗永萍² 邹仲敏^{4**}

(1 中国人民解放军海军医学研究所 上海 200433)

(2 第三军医大学军事预防医学院全军复合伤研究所 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室 重庆 400038)

(3 解放军 441 医院 福鼎 355200 4 第三军医大学军事预防医学院毒理学研究所 重庆 400038)

摘要 随着越来越多生物基因组测序的完成,生物医学研究已进入后基因组时代。基因捕获技术由于其克隆、发现新基因及揭示基因功能方面具有独特的优点,已成为功能基因组时代研究的有力工具,在生物医学研究各个领域的应用日趋广泛。主要对基因捕获技术的原理、分类、一般操作流程、优缺点及基因捕获在发育生物学、新基因鉴定、干细胞分化、肿瘤和生殖医学研究方面的应用作一综述,为相关研究者提供借鉴。

关键词 基因捕获 发育生物学 新基因鉴定 干细胞分化 肿瘤 生殖医学

中图分类号 Q789

后基因组时代阐明基因的功能及不同基因之间的相互作用已成为生物医学研究的迫切任务。目前,70%以上的基因功能未知,而基因捕获(gene trapping)技术在揭示基因功能方面有独特的优点,在功能基因组时代可发挥重要作用^[1]。此外,国际基因捕获协会(International Gene Trap Consortium, IGTC)在其网站提供了大量的基因捕获胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs),截至2014年10月6日已包括125029个可免费使用的基因捕获细胞系,为阐述基因功能提供了重要研究平台^[2]。本文主要对基因捕获的原理、分类、一般操作流程、优缺点及在生物医学研究中的应用作一介绍。

1 基因捕获原理及分类

1.1 基因捕获的基本原理

利用一含报告基因(包括LacZ或EGFP等)的DNA载体通过电转化或者病毒转染的方式随机插入宿

主细胞基因组,形成内源基因和报告基因的融合转录本,产生内源基因失活突变,通过报告基因的表达提示插入突变的存在及突变内源基因的时空表达特点。

1.2 基因捕获的基本分类

基因捕获载体包括3种基本类型^[3-4]:增强子捕获(enhancer trap)载体、启动子捕获(promoter trap)载体和基因捕获载体。增强子捕获载体插入位置常邻近编码序列^[4]。启动子捕获载体只能用于单个细胞产生突变体,而不能使生物体发生突变,并具有DNA插入偏向性,且只能捕获有转录活性的基因^[5]。但启动子捕获载体减少了非功能DNA片段被捕获进入ESCs而造成假像的机率^[6],也可鉴定冗余基因和在多个发育阶段行使功能的基因。基因捕获载体常用来研究小鼠体内插入导致的突变,也可发现和确定机体发生发展过程中的调控基因,以及外源刺激物调控的基因^[7]。由于基因捕获载体插入在内含子,捕获的效率较启动子捕获可提高10~100倍^[8]。但选择性剪接会导致低水平的野生型转录本产生,从而形成减效等位基因(hypomorphic alleles)突变^[4]。

1.3 新型捕获载体

1.3.1 polyA 捕获载体 筛选基因自带启动子且含剪

收稿日期:2014-10-08

* 国家自然科学基金(31201035)、国家“973”计划(2005CB522605)、全军医学科技“十二五”重大项目(AWS11C004)资助项目

**通讯作者,电子邮箱:zouzhmin@yahoo.com

接供体位点,使得不管捕获到的基因表达与否均可通过筛选基因获得捕获克隆,但 polyA 捕获载体有插入偏向性(大部分在基因 3'端),有时会激活 mRNA 的无义介导降解(nonsense mediated decay, NMD)^[9]。

1.3.2 分泌蛋白捕获载体 Shirasawa 等^[10]利用分泌蛋白原理及 β -gal 在内质网被灭活的特点设计了一种专门捕获编码分泌蛋白基因的载体。孙强等^[11]在此基础上构建了一种新型报告基因—peo,且证明其改造的基因捕获载体可用于分泌蛋白基因的筛选,还能减少假阳性。

1.3.3 含 Cre/LoxP 系统捕获载体 特点是筛选基因(如 neo)后含 polyA 可阻止报告基因 LacZ 的表达。当被捕获基因表达时,Cre 重组酶能切除 neo 两边方向相同的 LoxP 位点,使 LacZ 直接处于 PGK 启动子后,LacZ 表达而 neo 抗性消失,从而检测短暂表达的基因^[12]。利用 Cre 和 FLP 重组酶构建的新型基因捕获载体还可使基因敲除过程可逆并达到组织及时间特异性打断捕获基因的效果^[13-14]。

1.3.4 含 IRES 捕获载体 在载体报告基因与剪接受体之间加入内核糖体进入序列(internal ribosome entry site, IRES),即使报告基因与捕获基因融合读码框不一致时或插入在非编码区也可产生报告基因的翻译产物,在载体筛选基因 neo 终止密码子下游及剪接供体(splicing donor, SD)前加入 IRES 可阻止 NMD 激活及捕获转录沉默基因而减少插入偏向性^[15]。

2 基因捕获的一般操作流程及优缺点

2.1 基因捕获的一般流程

基因捕获的一般流程^[16]包括:(1)获取被捕获基因的 ESCs;(2)确定捕获载体在基因内的精确插入位点;(3)RT-PCR 证实捕获载体的插入及表达;(4)利用 X-gal 染色或其它报告基因证实捕获载体的插入及表达;(5)提取野生型和基因捕获小鼠尾巴或耳朵基因组 DNA,利用基因组 DNA PCR 进行基因分型;(6)通过 X-gal 染色或其它报告基因研究被捕获基因内源性启动子活性获得被捕获基因在胚胎、器官、组织中的表达谱。

2.2 基因捕获技术的优点

可在一个实验中产生大量随机插入突变体,也可达到“基因敲除”的效果,比常规基因突变更快得到突变小鼠^[17]。被捕获基因可用基于 PCR 的 cDNA 末端快速扩增法(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技

术分离,而不管其在体内的表达水平,适于检测短暂表达或表达水平较低的基因^[18]、多效基因^[19],还可能发现新基因^[20],可克服其它寻找差异表达基因的方法如差异显示、抑制消减杂交、DNA 微阵列等的缺点:以 mRNA 为研究起始材料,在检测低丰度及少量细胞表达的基因时存在一定局限性;寻找出的差异表达序列可能是基因的部分片段^[21]。通过报告基因可随时跟踪被捕获基因在体内的表达,对发育生物学家来说是最有吸引力的研究基因功能的方法^[22]。目前广泛被鉴定的基因捕获 ESCs 克隆可从国际基因捕获协会获得。

2.3 基因捕获技术的缺点

具有偏向性^[15],可能重复捕获,不同捕获策略可捕获同一基因^[23];制作的变异鼠可能没有任何表现型^[24];可出现异位报告基因表达、剪接错乱和干扰融合转录本克隆^[3];载体导入包括逆转录病毒感染法和电转化法,前者包装容量有限,也可能产生基因沉默和报告基因异常表达,后者常导致多拷贝插入^[4];捕获载体在内含子中的整合可能引起 microRNA 及增强子失活而不能正确解释被捕获基因的功能^[25]。

3 基因捕获在生物医学中的应用

3.1 在发育生物学中的应用

3.1.1 动物发育生物学 基因捕获最初就是用于 ESCs 制作基因突变小鼠研究胚胎发育相关基因^[26]。Kohoutek 等^[27]用含 β -galactosidase-neomycin (β -geo) 元件的捕获载体灭活小鼠 ESCs 的细胞周期蛋白 T2 (C-type cyclin T2, CycT2),并获得了 CycT2 突变小鼠。CycT2 杂合子小鼠的 LacZ 染色揭示了 CycT2 在胚胎发育过程中的表达特点,提示 CycT2 在整个胚胎发育过程均发挥了作用;纯合子小鼠在胚胎早期就已死亡,提示 CycT2 突变减少了胚胎发育关键基因的表达。此外,基因捕获还广泛应用于其它模式生物如斑马鱼、果蝇、片脚类甲壳动物等。

3.1.2 植物发育生物学 基因捕获已被证明特别适合于研究那些成年期不能得到其突变表型的早期胚胎致死基因,在植物生长和发育生物学研究中得到广泛使用^[28]。Springer 等^[29]用基因捕获在拟南芥分离到一个基因 PROLIFERA (PRL),基因突变体研究显示 PRL 对于大配子体和胚胎发育是必须的,并通过报告基因证明 PRL 在分裂中的细胞表达。Yu 等^[30]在水稻中应用基因捕获鉴定了一个侧根组织特异性表达基因 peroxidase 1,联合芯片技术证明植物激素 ABA 可增强

peroxidase 1 启动子的活性。此外,基因捕获也可用于胡萝卜、番茄、小立碗藓等模式生物的研究。

3.2 发现新基因并研究其功能

过程是通过基因捕获得到具有突变表型的小鼠品系或差异表达克隆,利用 RACE 等技术分离新基因,根据表型改变发现新基因的功能或已知基因的新功能^[20]。Tang 等^[31]用 PU8 捕获载体从小鼠 ESCs 捕获到一个新基因(Ayu17-449 基因),LacZ 染色证明 Ayu17-449 蛋白主要在脑神经细胞和肾脏近曲小管细胞表达,通过功能基因分析提示 Ayu17-49 基因可能与激素分泌有关。Forbes 等^[32]用基因捕获打断 Ndufs6 基因,引起肾脏皮质缺陷,造成了肾脏损伤,包括引起蛋白尿、肾脏纤维化、细胞线粒体 ATP 及过氧化物酶减少等,揭示了已知基因的新功能。

3.3 在干细胞分化研究中的应用

基因捕获还可方便筛选分化前后的差异表达克隆,再用 RACE 分离得到干细胞分化相关基因,已被用于揭示干细胞多种分化的分子机制。Hirashima 等^[33]用 polyA 捕获载体转染 ESCs 后诱导内皮分化,LacZ 筛选获得 7 个差异表达克隆,RACE 分离 3 个可能的内皮分化正相关基因 endoglin、ASPP1 和 Hes1,并以 LacZ 染色证明 endoglin 和 ASPP1 在早期胚胎发育中呈内皮细胞特异性表达。本课题组用基因捕获载体 ROSAFARY 建立了 10T1/2 细胞基因捕获阳性克隆库^[34],并分离获得 TGF- β 1 诱导平滑肌分化前后 3 个差异表达基因: *Mtgs6* 和两个新基因(*mgt-6* 和 *mgt-16*),其中新基因 *mgt-6* 和 *mgt-16* 可能与平滑肌分化有关^[35-37]。

3.4 在肿瘤研究中的应用

主要用于筛选、发现肿瘤相关基因,而收集基因捕获克隆中恶性转化后基因表达受抑制的克隆还有利于筛选获得抗肿瘤药物的分子靶标。Ishiguro 等^[38]用四环素可诱导基因捕获系统转染结肠癌细胞系 PKO,证实 CLCN4 是一个新的与结肠癌迁移、侵袭及转移正相关的基因。Yamamura 等^[39]认为传统癌症研究为假说驱动的研究,而基因捕获为未知驱动的研究,基因捕获可找到癌症研究中很少被注意但确实与癌症相关的基因,并列举 3 个实例加以证明。

3.5 在生殖医学中的应用

近年来基因捕获在生殖医学研究中逐步受到重视。Tarnasky 等^[40]用含 β -geo 元件的基因捕获载体的 ESCs 制作了外致密纤维蛋白 2(outer dense fiber protein 2, Odf2)突变小鼠,发现 Odf2 突变雄性小鼠由于精子

尾巴不正常使精子活动能力缺陷导致其不育。此外,基因捕获也可用于精原干细胞制作基因突变小鼠^[41],为生殖医学研究提供了另一条途径。

4 展望

自从基因捕获出现后,捕获载体的改进一直都受到研究者的青睐。用基因捕获建立的 ESCs 突变细胞库也将成为以小鼠为模式生物研究人类疾病发生发展机制及生物制药方面重要的遗传资源。高通量及其它新兴技术如芯片相结合也是基因捕获发展的趋势。我们相信,随着更多更完善捕获载体的出现,基因捕获技术在动植物胚胎发育、新基因鉴定、细胞分化、癌症、生殖医学及药物靶点^[42]等方面的研究均将作出更大的贡献。

参考文献

- [1] Gentile A, D' Alessandro L, Medico E. Gene trapping: a multi-purpose tool for functional genomics. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2003, 20: 77-100.
- [2] Skarnes W C, von Melchner H, Wurst W, et al. A public gene trap resource for mouse functional genomics. *Nat Genet*, 2004, 36 (6): 543-544.
- [3] Stanford W L, Cohn J B, Cordes S P. Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet*, 2001, 2 (10): 756-768.
- [4] 党素英, 王铸钢. 基因捕获技术. *国际遗传学杂志*, 2006, 29 (1): 20-25.
Dang S Y, Wang Z G. Gene-trapping technique. *International Journal of Genetics*, 2006, 29 (1): 20-25.
- [5] 魏小慧, 郑肖兰, 郑服丛. 启动子捕获技术及其研究进展. *江西农业学报*, 2009, 21 (4): 66-68.
Wei X H, Zheng X L, Zheng F C. Promoter capturing technique and its research progress. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2009, 21 (4): 66-68.
- [6] 万海英, 汤华. 基因敲除技术现状及应用. *医学分子生物学杂志*, 2007, 4 (1): 86-90.
Wan H Y, Tang H. Status quo and application of gene knockout. *Journal of Medical Molecular Biology*, 2007, 4 (1): 86-90.
- [7] 龚强, 胡维新. 基因诱捕技术及基因诱捕数据库. *生命的化学*, 2007, 27 (1): 84-86.
Gong Q, Hu W X. Gene trap and gene trap database. *Chemistry of Life*, 2007, 27 (1): 84-86.
- [8] Skarnes W C, Auerbach B A, Joyner A L. A gene trap approach in mouse embryonic stem cells: the lacZ reported is activated by splicing, reflects endogenous gene expression, and is mutagenic in mice. *Genes Dev*, 1992, 6 (6): 903-918.

- [9] Tsakiridis A, Tzouanacou E, Rahman A, et al. Expression-independent gene trap vectors for random and targeted mutagenesis in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37 (19): 1-14.
- [10] Shirasawa S, Yoshimi M, Kamochi H, et al. Gene trap screening for cell surface and extracellular matrix molecules produced by chondrocytes. *J Biochem*, 2005, 137 (1): 79-85.
- [11] 孙强, 韩骅. 分泌蛋白特异性基因陷阱的设计与验证. *生物化学与生物物理进展*, 2004, 31 (4): 328-333.
Sun Q, Han H. Design and efficacy of a gene trap system for secretory proteins. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2004, 31 (4): 328-333.
- [12] Chen Y T, Liu P, Bradley A. Inducible gene trapping with drug-selectable markers and Cre/loxP to identify developmentally regulated genes. *Mol Cell Biol*, 2004, 24 (22): 9930-9941.
- [13] Chaiyachati B H, Kaundal R K, Zhao J, et al. LoxP-FRT Trap (LOFT): a simple and flexible system for conventional and reversible gene targeting. *BMC Biol*, 2013, 10: 96.
- [14] Ni T T, Lu J, Zhu M, et al. Conditional control of gene function by an invertible gene trap in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109 (38): 15389-15394.
- [15] Song G, Li Q, Long Y, et al. Effective expression-independent gene trapping and mutagenesis mediated by Sleeping Beauty transposon. *J Genet Genomics*, 2012, 39 (9): 503-520.
- [16] Ullrich M, Schuh K. Gene trap: knockout on the fast lane. *Methods Mol Biol*, 2009, 561: 145-159.
- [17] Schnutgen F, Ehrmann F, Ruiz-Noppinger P, et al. High throughput gene trapping and postinsertional modifications of gene trap alleles. *Methods*, 2011, 53 (4): 347-355.
- [18] Springer P S. Gene traps: tools for plant development and genomics. *Plant Cell*, 2000, 12 (7): 1007-1020.
- [19] 黄小乐. 面向后基因组研究的基因陷阱技术. *中山大学研究生学刊: 自然科学与医学版*, 2003, 24 (3): 6-15.
Huang X L. Gene trap strategies for postgenome era. *Journal of the Graduates Sun Yat-Sen University (Natural Sciences, Medicine)*, 2003, 24 (3): 6-15.
- [20] Cecconi F, Meyer B I. Gene trap: a way to identify novel genes and unravel their biological function. *FEBS Lett*, 2000, 480 (1): 63-71.
- [21] Akiyama N, Matsuo Y, Sai H, et al. Identification of a series of transforming growth factor beta-responsive genes by retrovirus-mediated gene trap screening. *Mol Cell Biol*, 2000, 20 (9): 3266-3273.
- [22] Lako M, Hole N. Searching the unknown with gene trapping. *Expert Rev Mol Med*, 2000, 2 (5): 1-11.
- [23] Evans M J, Carlton M B, Russ A P. Gene trapping and functional genomics. *Trends Genet*, 1997, 13 (9): 370-374.
- [24] 汤华, 唐任宽. 利用捕获载体解析小鼠基因在生物发育过程中的功能. *生命的化学*, 2005, 25 (1): 49-51.
Tang H, Tang R K. Unraveling gene function in mouse development by trapping vector. *Chemistry of Life*, 2005, 25 (1): 49-51.
- [25] Osokine I, Hsu R, Loeb G B, et al. Unintentional miRNA ablation is a risk factor in gene knockout studies: a short report. *PLoS Genet*, 2008, 4 (2): e34.
- [26] Gossler A, Joyner A L, Rossant J, et al. Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. *Science*, 1989, 244 (4903): 463-465.
- [27] Kohoutek J, Li Q T, Blazek D, et al. Cyclin T2 Is Essential for mouse embryogenesis. *Mol Cell Biol*, 2009, 29 (12): 3280-3285.
- [28] Brukhin V B, Jaciubek M, Bolanos Carpio A, et al. Female gametophytic mutants of *Arabidopsis thaliana* identified in a gene trap insertional mutagenesis screen. *Int J Dev Biol*, 2011, 55 (1): 73-84.
- [29] Springer P S, Holding D R, Groover A, et al. The essential Mcm7 protein PROLIFERA is localized to the nucleus of dividing cells during the G(1) phase and is required maternally for early *Arabidopsis* development. *Development*, 2000, 127 (9): 1815-1822.
- [30] Yu S M, Ko S S, Hong C Y, et al. Global functional analyses of rice promoters by genomics approaches. *Plant Mol Biol*, 2007, 65 (4): 417-425.
- [31] Tang H, Araki K, Yamamura K. Cloning and expression analysis of a murine novel gene, Ayu17-449. *Yi Chuan Xue Bao*, 2006, 33 (5): 413-419.
- [32] Forbes J M, Ke B X, Nguyen T V, et al. Deficiency in mitochondrial complex I activity due to ndufs6 gene trap insertion induces renal disease. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19 (4): 331-343.
- [33] Hirashima M, Bernstein A, Stanford W L, et al. Gene-trap expression screening to identify endothelial-specific genes. *Blood*, 2004, 104 (3): 711-718.
- [34] 王明科, 邹仲敏, 罗成基, 等. 多用途基因捕获 C3H/10T1/2 细胞阳性克隆库的构建及鉴定. *第四军医大学学报*, 2008, 29 (6): 508-512.
Wang M K, Zou Z M, Luo C J, et al. Establishment and identification of gene trap clones from C3H/10T1/2 cells transfected with rosafary vector. *Journal of Fourth Military Medical University*, 2008, 29 (6): 508-512.
- [35] Wang M, Sun H, Jiang F, et al. Cloning and characterization of a novel gene with alternative splicing in murine mesenchymal stem cell line C3H/10T1/2 by gene trap screening. *BMB Rep*, 2010, 43 (12): 789-794.

- [36] 王明科, 姜帆, 孙慧勤, 等. 基因捕获筛选 TGF- β 1 诱导间充质干细胞 C3H/10T1/2 平滑肌分化的差异表达基因. 第三军医大学学报, 2014, 36 (2): 92-97.
Wang M K, Jiang F, Sun H Q, et al. Identification of differentially expressed genes upon TGF- β 1 induced smooth muscle differentiation of mesenchymal stem cell lines C3H/10T1/2 cells by gene trap screening. Journal of Third Military Medical University, 2014, 36 (2): 92-97.
- [37] 王明科, 孙慧勤, 程晋, 等. 新基因 *mgt-16* 反转录病毒载体的构建及其在小鼠间充质干细胞中的表达. 第二军医大学学报, 2014, 35 (4): 447-451.
Wang M K, Sun H Q, Cheng J, et al. Construction of retroviral vector containing novel gene *mgt-16* and its expression in mouse mesenchymal stem cells. Academic Journal of Second Military Medical University, 2014, 35 (4): 447-451.
- [38] Ishiguro T, Avila H, Lin S Y, et al. Gene trapping identifies chloride channel 4 as a novel inducer of colon cancer cell migration, invasion and metastases. Brit J Cancer, 2010, 102 (4): 774-782.
- [39] Yamamura K, Araki K. Gene trap mutagenesis in mice: new perspectives and tools in cancer research. Cancer Sci, 2008, 99 (1): 1-6.
- [40] Tarnasky H, Cheng M, Ou Y, et al. Gene trap mutation of murine outer dense fiber protein-2 gene can result in sperm tail abnormalities in mice with high percentage chimaerism. BMC Dev Biol, 2010, 10: 67.
- [41] Kanatsu-Shinohara M, Ikawa M, Takehashi M, et al. Production of knockout mice by random or targeted mutagenesis in spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103 (21): 8018-8023.
- [42] Gow M, Mirembé D, Longwe Z, et al. A gene trap mutagenesis screen for genes underlying cellular response to the mood stabilizer lithium. J Cell Mol Med, 2013, 17 (5): 657-663.

Current Status and Application of Gene Trapping

WANG Ming-ke^{1,2,3} SUN Hui-qin² SU Yong-ping² ZOU Zhong-min⁴

(1 Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China)

(2 State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

(3 No. 441 Hospital of PLA, Fuding 355200, China)

(4 Institute of Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract With the completion of genome sequencing on more and more organisms, post-genomic era has begun. Gene trapping, as a powerful tool in the functional-genomic era, has been widely applied in many fields of biomedicine research because of its great merits in cloning, finding novel genes and unraveling their biological functions. The principles, classifications, manipulation procedures, advantages and disadvantages of gene trap technique and its application in developmental biology, novel gene identification, stem cells differentiation, cancer and reproductive medicine research are discussed, which will provide helpful references for relevant researchers.

Key words Gene trapping Developmental biology Novel gene identification Stem cells differentiation Cancer Reproductive medicine