模式生物

1 模式生物

【定义】生物体由低等向高等、由简单向复杂的进化过程中，很多生物学过程在不同生物物种中是非常保守的。因此，可以通过选择合适的物种，对其开展研究，获得对生命基本规律或者人类健康的认识，这样的物种就称为模式生物。

【要求/满足条件/选择】有利于回答和解决研究者关注的问题；繁殖容易，周期短，研究成本低；遗传背景清楚，有遗传操作的手段；表型分析容易。

2 常用模式生物及其特点

（1）大肠杆菌（E. coli）：适合实验室培养（可以液体培养和固体培养） ，安全，培养条件简单，生长迅速，克隆方便，基因操作简便，已完成测序。是分子生物学，遗传学和生物化学研究中的重要模式生物，也用于人类感染性疾病和其他微生物研究。

（2）酿酒酵母（Saccahromyces cerevisiae）：单细胞的真核生物，适合实验室培养（可以液体培养和固体培养），安全，克隆方便，基因操作简单。可有丝分裂，也可以出芽繁殖，可通过改变物理或化学环境完全控制其生长，而且其在单倍体和二倍体的状态下均能生长，并可在实验条件下较方便地控制单倍体和二倍体之间的相互转换，这点对其基因功能的研究十分有利。如在单倍体状态下，只需一次基因替换，就能得到某个特定基因缺失的酵母株；而对于一些缺失后致死的基因，人们可以在二倍体菌株中进行基因替换，然后通过孢子筛选，获得带有基因缺失的单倍体菌株。是分子生物学，遗传学，生物化学，真核细胞周期调控，信号转导等研究的重要模式生物，16条染色体，12M，约6000个蛋白编码基因，基因结构紧凑。此外，有将近31％编码蛋白质的酵母基因或者开放阅读框与哺乳动物编码蛋白质的基因具有高度的同源性。是分子生物学，遗传学，生物化学，真核细胞周期调控，信号转导等研究的重要模式生物。目前已发展了一些非常有效的技术使得酵母基因组中6000个基因中的任何一个基因均能被突变的等位基因取代，甚至从基因组中完全缺失，具有很高的效率和准确性。还可利用异源基因与酵母基因的功能互补以确证基因的功能，是一种研究人类基因功能的捷径。

（3）线虫（ Caenorhabditis elegans ）：构造简单，成虫大小约1mm。它通身透明，生命周期短（3天半），可大量养殖，易于产生突变。保种方便，还可被冻在冰箱里储存，复苏之后继续研究。大部分为雌雄同体（雄虫占0.05%），实验室饲养简单（以细菌为食），目前实验室常用的野生型品种是N2。作为经典模式生物其有特殊的形态特点。它是唯一一个身体中的所有细胞能被逐个盘点并各归其类的生物。细胞数目以及细胞命运图谱几乎固定。其幼虫含有556个体细胞和2个原始生殖细胞，成虫则根据性别不同具有不同的细胞数。最常见的雌雄同体成虫成熟后含有959个体细胞和2000个生殖细胞，而较少见的雄性成虫则只有1031个体细胞和1000个生殖细胞。其基因组有5对常染色体，1对性染色体，97M，约20000个基因。线虫的遗传操作手段成熟（如转基因和RNAi），是研究发育（细胞命运决定），神经系统的重要模式生物。

（4）果蝇（Drosophila melanogaster）：个体小，适合实验室饲养，生命周期短，繁殖力强，具有成熟的遗传操作的方法，具备众多的突变品系，有特殊的染色体结构，有比较复杂的行为能力。是遗传学，发育生物学理想的模式生物。

（5）斑马鱼（zebrafish；Brachydanio rerio）： 个体小（约4-6cm），雌雄辨别较容易。饲养在淡水中，对水质要求不严，水温22-26度为宜，产卵频繁且量多（每次三百至上千粒），繁殖迅速，周期短（约3个月），适合在实验室养殖。它是脊椎动物，胚胎发育周期短，胚胎通体透明，遗传操作方法成熟，其个体发育是在全透明状态下完成的，是进行胚胎发育机理和基因组研究的好材料。最初主要用于遗传和发育学研究，目前其在免疫学中的应用也日益为人们所重视。

（6）小鼠：当今世界上研究最详尽且最小的哺乳动物之一，体重约25-40克（近交系17-35g，封闭群30-55g），繁殖快，世代周期短，饲养管理费用低，故在生物医学研究中广泛使用。其在生物进化上与人类接近(60 - 75 百万年)，胎盘形成和早期胚胎发育与人类相近，组织器官结构和细胞功能也与人类相似，并有有高级神经活动。目前小鼠基因组测序计划已完成，发现人类99%的基因存在于小鼠，基因同源性高达78.5%，基因组93%的区域基因排列顺序与人类相同相同。小鼠的基因组改造的技术手段成熟，经长期人工饲养选择培育，已育成多达千余个独立的远交群和近交系。利用小鼠可以进行基因体内功能的研究（如基因产物、基因调控），开可进行基因组功能的研究（系统生物学研究），以及建立人类疾病动物模型（如研究疾病的发生和进程，和疾病相关的生物体生命过程的改变，疾病的治疗方法等）。

3 动物品系分类（按遗传特性）

（1）近交系：经连续20代（或以上）的全同胞兄妹交配（或者亲代与子代交配）培育而成，近交系数应大于99%，品系内所有个体都可追溯到起源于第20代或以后代数的一对共同祖先。特点：遗传背景均一，实验结果比较准确，可以避免遗传组成不同或个体差异太大等所引起的误差；近交衰退，生活力弱，对生产环境要求高、产仔少、营养要求高。

（2）远交系（封闭群）：在一定群体内，以非近亲交配方式育成的动物品系，连续15代不从外部引入新的动物种群。特点：遗传背景具有群体均一性，但个体各异，实验能够反映特定群体遗传背景下的情况；繁殖能力强、环境适应能力高。

（3）杂交一代：两个不同近交系杂交所生的第一代动物称为杂交一代动物或F1代。特点：个体间遗传均一 ，个体间遗传变异与近交系一样很小，其基因位点均为杂合型（近交系为纯合型），因此能取得一致的实验结果。表现双亲的显性性状 ，具有杂种优势，如体质健壮、生长快、易于饲养管理、发育均匀、手术后恢复快等优点。

4 动物品系分类（按微生物）

（1）普通级：没有被疾病控制的动物，排除烈性传染病、人畜共患病，饲养于普通环境下

（2）清洁级：仅对于我国国情而定，微生物控制高于普通普通动物，种子来源于SPF动物（剖腹产），饲养于清洁级环境下，排除规定的寄生虫、微生物（排除对动物危害大和对科学研究干扰大的病原体）

（3）SPF（Specific pathogen-free）级：无特定病原体动物，没有特定的微生物、寄生虫。但

未必没有特定以外的微生物和寄生虫。屏障条件下进行饲养

（4）无菌动物（Germ free）：没有能被检查出微生物、寄生虫的动物。妊娠末期，通过剖腹产、

子宫切除手术，将无菌取胎的仔鼠放在隔离器内无菌条件下进行饲养的动物

（5）知菌动物（Gnotobiote）/悉生动物：，具有已知微生物的动物。隔离器内无菌条件下进

行饲养。

5 常用小鼠品系

（1）C57BL/6小鼠，近交系，黑色。

自发肿瘤较少，对放射物质耐受力强；补体活性高，较易诱发免疫耐受性；干扰素产量高，对百

日咳易感因子（Pertussis HSF）敏感。是肿瘤学、生理学、遗传学研究的常用品系。

（2）BALB/cA小鼠，近交系，白色。

6月龄后出现免疫球蛋白增多症，主要是IgG和IgA量增加；干扰素产量低，对百日咳易感因子敏

感，补体活性高；对矿物油诱导浆细胞瘤敏感。。广泛应用于肿瘤学、生理学、免疫学、核医学

和单克隆抗体等研究中。

（3）DBA/2小鼠，近交系，淡棕色。

在生理学上，血细胞多，血压低，维生素K缺乏引起死亡率高，对百日咳易感因子敏感，在35日

龄左右，听源性癫痫发作率可达100％ 。常用于肿瘤学、遗传学、免疫学的研究。

昆明小鼠（KM），远交系，白色。

（4）前身是Swiss小鼠，1946年自印度引进中国。昆明小鼠是我国特有的封闭群小鼠，广

泛应用于药理学、毒理学等方面的实验。该鼠适应性强、繁殖能力高，常用于药物毒

性、药物筛选、生物效应测定和药效比较的实验。

（5）ICR小鼠，远交系，白色。

起源于美国Fox Chase Cancer Center的Swiss小鼠。该鼠适应能力强，繁殖力强，生

长速度快，实验重复性较好；是国际通用的封闭群小鼠，常用于免疫药物筛选、药理、

毒理、肿瘤、放射学、食品、生物制品等科研、生产和教学。外周血象和骨髓细胞具

有良好的稳定性，是较理想的血液学实验模型。

6 转基因小鼠技术流程

（1） 受精卵单细胞原核注射

【特点】随机插入；单位点和多位点插入并存；多拷贝串连；插入位点及整合方式对转入基因表达的影响；插入位点影响；插入序列引发的de novo甲基化；同源性依赖的基因沉默；使用大片段的DNA，如BAC等；使用隔离子（Insulator如小鼠H19基因）来减少插入位点对转基因表达的影响；

※方法技术要求高，设备投入大

（2） 精子介导的转基因技术：可以用于小鼠ES细胞的转基因和胚胎（包括受精卵）的转基因，优点：比原核注射效率高，技术要求低；局限：最大插入容量 10kb，需要制备病毒

（3） 病毒介导的转基因技术（逆转录病毒、Lentivirus）

（4） 穿膜肽（核定位蛋白）介导的基因转移

（5） 转座酶介导的基因转移

7 转基因小鼠的繁育：

决定所需要的小鼠品系背景，首建者分别和选定的野生型品系进行配种繁育，首建者小鼠之间不能进行相互交配，做好出生小鼠的标牌（出生日期，亲本信息），小鼠编号（1-2周），同时采集小鼠尾部组织或者耳轮组织，提取DNA，进行基因型鉴定（gene typing），对阳性小鼠进行断奶、雌雄分笼。

8 转基因载体构建

（1）获得所需要表达蛋白的cDNA

（2）选择合适的基因表达启动子

（3）保证转录后的正确加工

9 基因调控序列的研究及报告基因

（1）启动子；增强子；负调控元件 等等

（2）常用的报告基因

E.coli b-半乳糖苷酶 (lac Z) 、底物:ONPG;MUG;X-gal、E.coli 葡糖苷酸酶 (gusA)

底物:X-gluc、荧光素酶(luc)、底物:luciferin、绿色荧光蛋白(GFP)等

10 基因剔除的定义、分类、特点、局限性

【定义】基因剔除是利用基因同源重组（homologous recombination）又称基因打靶的原理，用外源片断整合到活体细胞DNA的同源序列中，使某个基因被取代或破坏而失活。

（1）常规基因剔除 是使用一个带有正负筛选（Positive-Negative Selection，如β-geo与HSV-TK）标记的打靶载体转至ES细胞，然后将筛选成功的ES克隆导入囊胚中以进行发育。常规方法的缺陷在于：它使得实验个体的所有细胞都被改变，往往引起严重的发育缺陷和早期胚胎死亡；在培养纯系小鼠的过程中，有些基因的互补效应也增加了表型分析的复杂性；另外，由于广泛应用neo 和HSVtK作为正负选择系统，发生同源重组的细胞基因组中总留有外源的选择标记(neo)基因；该基因可能影响相邻基因的表达，不利于对突变表型的精确分析。

（2）条件基因剔除 则可以克服以上缺陷，它与常规基因剔除的不同之处就在于条件剔除对于基因的敲除是具有组织特异性的，可以在特定的发育阶段诱导敲除，因此可以避免早期胚胎的死亡，发生同源重组的细胞基因组中不含选择标记(neo)基因；条件剔除采用两个载体：其中一个载体上，打靶基因置于同向LoxP之内；另一个载体上，带有调控基因（带有组织特异性的promoter和Cre等可诱导基因）。将这两个载体分别转入不同ES中并使其发育为成熟个体，然后将两系个体杂交即可获得靶基因在特定组织特定时间的knockout动物。

通过常规基因打靶在基因组的靶位点上装上两个同向排列的loxP，并以此两侧装接上loxP 的(“loxP floxed”)ES 细胞产生“loxP floxed”小鼠,然后，通过将“loxP floxed”小鼠与Cre 转基因鼠杂交，cre基因连接到某个特定类型的细胞或发育的某一特定阶段表达的启动子的后面，产生靶基因条件性突变小鼠。在“loxP floxed”小鼠，虽然靶基因的两侧已各装上了一个loxP，但靶基因并没有发生其他的变化，故“1oxP floxed”小鼠表型仍同野生型的一样。但当它与Cre 转基因小鼠杂交时，产生的子代中将同时带有“loxP floxed”靶基因和Cre 基因。Cre 基因表达产生的Cre 重组酶就会介导靶基因两侧的1oxP 间发生切除反应，结果将一个loxP 和靶基因切除。这样，靶基因的修饰(切除)是以Cre 的表达为前提的。Cre 的表达特性决定了靶基因的修饰(切除)特性：即Cre 在哪一种组织细胞中表达，靶基因的修饰(切除)就发生在哪种组织细胞；而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。所以只要控制Cre 的表达特异性和表达水平就可实现对小鼠中靶基因修饰的特异性和程度。

（3）导性基因敲除的原理：

诱导性基因敲除也是以Cre/loxp 系统为基础，利用控制Cre 表达的启动子的活性或所表达的Cre 酶活性具有可诱导的特点，通过对诱导剂给予时间的控制，从而在loxP 动物的一定发育阶段和一定组织细胞中实现对特定基因进行遗传修饰之目的的基因敲除技术。人们可以通过对诱导剂给予时间的预先设计的方式来对动物基因突变的时空特异性进行人为控制、以避免出现死胎或动物出生后不久即死亡的现象。

11 基因打靶技术的局限性：

胚胎致死

所有细胞都改变

功能代偿

冗余

单元与系统的关系