

APP^{swe}/PS1^{dE9}/TAU 三转基因阿尔兹海默病 大鼠模型的建立

张丽, 陈炜, 张旭, 孙彩显, 张连峰

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 大鼠的大脑比小鼠更大, 是研究神经系统的重要模型。建立 APP^{swe}/PS1^{dE9}/TAU 三转基因大鼠, 发展能更全面表现人类阿尔兹海默病表型的动物模型。**方法** 构建人 PrP-hAPP695 K595N/M596L、PrP-hPS1^{dE9} 和 PDGF-TAU 转基因表达载体, 显微注射法制备转基因大鼠。PCR 法鉴定转基因首建鼠及其子代基因型。Western blot 检测转基因大鼠脑组织中 APP、PS1 和 TAU 蛋白的表达。Morris 水迷宫检测 6 月龄三转基因大鼠学习记忆能力改变。APP、PHF-TAU 免疫组织化学染色观察三转基因大鼠脑组织 APP 及 TAU 的表达。**结果** 得到 1 个同时高表达 APP、PS1 和 TAU 三个基因的转基因大鼠品系。转基因大鼠 6 月龄已经出现显著的行为学改变: 学习记忆能力下降, 病理学改变表现为过度磷酸化 TAU 增多和神经元胞浆内 A β 表达异常增加。**结论** 成功建立了 APP^{swe}/PS1^{dE9}/TAU 三转 AD 大鼠, 可作为新一代工具动物模型用于基础医学和 AD 转化医学研究。

【关键词】 转基因; 微管相关蛋白 Tau; 阿尔兹海默病; 神经纤维缠结; 大鼠

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 03-0061-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 003. 013

Establishment of APP^{swe}/PS1^{dE9}/TAU triple transgenic rat model of alzheimer disease

ZHANG Li, CHEN Wei, ZHANG Xu, SUN Cai-xian, ZHANG Lian-feng

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Centre, Peking Union Medical CoHege (PUMC), Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To develop a model that could roundly show the phenotypes of human alzheimer disease (AD), the triple-transgenic rat model harboring APP(Swe), PS1^{dE9}, and TAU transgenes was established in view of the advantage of rat as an important animal model on the research of nerve system. **Methods** APP^{swe}/PS1^{dE9}/TAU triple transgenic rat AD rats were generated on a SD background by co-injecting rat pronuclei with two human genes driven by the mouse prion promoter: 'Swedish' mutant human APP (APP^{sw}) and exon 9 mutant human presenilin-1 (PS1^{dE9}) and human microtubule-associated protein tau gene under the control of PDGF promoter. Transgene integration was confirmed by genotyping and expression levels were evaluated by western blot (WB) of brain homogenates. The pathological changes were detected by human A β , TAU and Phospho-PHF-TAU immunohistochemistry staining (IHC). The behavioral and cognitive changes were evaluated by Morris water maze. **Results** One transgenic rat lines with high human APP (Swe),

[基金项目] 国家科技支撑计划课题“神经和代谢疾病基因工程模型的建立”(2012BAI39B02)。

[作者简介] 张丽, 女, 助理研究员, 博士, E-mail: zhangl@cnilas.org。

[通讯作者] 张连峰, E-mail: Zhanglf@cnilas.org。

PS1dE9, and TAU transgenic expression was selected from three transgenic founders. Compared with the wild type rat, the transgenic rat showed significant learning and memory impairments in the Morris water maze at 6 months of age. The triple transgenic rat manifested hyperphosphorylated tau and obvious aggregation of amyloid- β ($A\beta$) in the brain cortex and hippocampus. **Conclusion** APP^{swe}/PS1dE9/TAU triple transgenic rat AD model was established. The triple transgenic AD rat fills a critical need for a next-generation animal model to enable basic and translational AD research.

【Key words】 Transgenic; Microtubule-associated protein tau; Alzheimer's disease; Neurofibrillary tangles; Rat

阿尔茨海默症(alzheimer disease, AD)是一种常见的中枢神经系统退行性变性疾病,其临床表现以退行性大脑认知,识别功能障碍为特征,有明显记忆力降低并伴随个性和行为的改变。AD 约占全部痴呆病人的 70%,位于心脏病、癌症和中风之后的第四位死亡性疾病,目前已成为发达国家主要社会问题之一。AD 主要神经病理特征包括细胞外大量由 β 淀粉样蛋白($A\beta$)组成的老年斑(senile plaques, SP)、神经细胞内神经原纤维丝缠结(neurofibrillary tangles, NFT)、神经细胞丢失,皮质动脉和小动脉的血管淀粉样变性,及大脑皮质萎缩^[1-2]。

由于 $A\beta$ 构成的老年斑是所有 AD 患者脑内最为突出的神经病理特征以及寡聚 $A\beta$ 呈现显著的神经毒性作用,所以一直以来 AD 的病理发生机制依然是基于 $A\beta$ 的淀粉样级联假说。然而,新近的研究对这个假说提出了强烈质疑。首先,临床-病理研究发现部分脑内广泛分布老年斑的患者并无痴呆的表现^[3];其次,与老年斑相比,脑细胞内神经原纤维丝缠结程度与患者临床痴呆程度有更好的相关性^[4];此外,迄今为止几乎所有基于 $A\beta$ 假设的治疗方案均被临床研究否决^[5]。

现有的动物模型过表达 β APP 可以很好的模拟老年斑沉积的表型,但是不能看到神经纤维缠结。为了让这两种病理特征同时出现,需要引入多种基因,因此,国际上已经制备了 APP^{swe}, PS1M146V 和 tauP301L 三转小鼠^[6-8]。相对小鼠而言,大鼠的神经系统与人类更相似,大脑更发达,脑容量、表面积均比小鼠大。大鼠智力更高,对新环境易适应,有探索性,易训练,具备对惩罚和暗示敏感的特性,更加有利于并更广泛地用于行为学研究和高级神经活动的研究,同时,大鼠模型生理数据采集及血样、尿样采集等简便,更适合药物研究,但是迄今为止还没有建立相应的三转基因大鼠。

本研究建立的 APP^{swe}/PS1dE9/TAU 三转基因大鼠,6 月龄出现明显的行为学改变和神经原纤维缠结病理改变,为 AD 发病机制研究和药物评价提

供了更好的工具动物。

1 材料和方法

1.1 APP^{swe}/PS1dE9/TAU 转基因大鼠的制备

PrP-hAPP695^{K595N/M596L}、PrP-hPS1^{dE9} 和 PDGF-TAU 转基因载体由本实验室构建,用显微注射法将线性化的转基因载体注射到 SD 大鼠的受精卵中^[9],用 SD 大鼠(购自军事医学科学院实验动物中心,SCXK(军)2007-004;SYXK(军)2009-003)作假孕受体,制备转基因大鼠(TE2000U 显微注射仪)。实验中涉及动物的操作程序已经得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会的批准(ILAS-GC-2010-044)。

1.2 APP^{swe}/PS1dE9/TAU 转基因大鼠的基因型鉴定

转基因大鼠在出生 7 d 用剪趾法标记,收集剪下的组织,用碱裂解法提取基因组 DNA^[10],用 PCR 法对转基因小鼠进行基因型检测。APP、PS1、TAU 的 PCR 引物序列见表 1(Invitrogen 公司合成)。反应条件为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共 35 个循环。琼脂糖电泳分析 PCR 产物,目的产物长度分别为 350 bp、500 bp 和 500 bp。

表 1 APP^{swe}/PS1dE9/TAU 转基因大鼠的基因型鉴定引物

引物名称 Primes	序列 Sequences
APP-F60	GACTGACCACTCGACCAGGTTCTG
APP-R60	CTTGTAAGTTGGATTCTCATATCCG
PS1-F60	GAACGGCAGGAGCACAAAC
PS1-R60	ACAGTAATGTAGTCCACAGCAACG
Tau-F58	CTGAGCAAAGGAGATGAAA
Tau-R58	TTGAGCCCACTTGGACTG

1.3 western blot 检测转基因大鼠脑组织中 APP、PS1 和 TAU 的表达

提取 F1 代阳性转基因鼠及同窝阴性对照大鼠脑组织总蛋白,BCA 法测定浓度,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,将蛋白条带转移到 0.45 μ m 硝酸纤维素膜上,置于 5% 的脱脂奶粉封闭液中,室温 1 h,加入

TBST 稀释的小鼠抗人 Beta Amyloid (A β)6E10 单克隆抗体(1:200, Covance), 兔抗人 PS1 多克隆抗体(1:1000, ab65293, Abcam), 小鼠抗人 Tau (D-8) 单克隆抗体(1:100, sc-166060), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 用 TBST 洗膜三次, 每次 10 min。然后加入 1:15000 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG, 室温杂交 1 h。采用 HRP-GAPDH(康成生物, 中国)作为内参, 将膜置于化学发光剂中, 用 X 光胶片曝光、显影及定影。

1.4 Morris 水迷宫检测转基因大鼠的行为学变化

选用 6 月龄转基因大鼠 12 只及同窝阴性对照大鼠 8 只, 利用 Morris 水迷宫进行大鼠行为学分析(Ethovision XT 监测分析软件, Noldus 公司, 荷兰)。水迷宫宫体(购自中国医学科学院药物研究所)直径 200 cm, 高 50 cm, 平台直径 10 cm, 高 30 cm。水迷宫实验过程分为连续 5 d 的隐藏平台获得实验和第 6 天的空间探索实验两部分。每天训练 2 次, 每次使小鼠在不同区域下水, 水迷宫按东南西北分为 1、2、3、4 区域, 平台即第五区域, 位于第 4 区域内。每次游泳时间为 60 s, 每次训练间隔 1 h 左右。小鼠没有找到平台的按 60 s 计算潜伏期, 平台隐藏获得实验检测大鼠学习获得能力, 空间探索实验检测大鼠空间记忆能力。

1.5 病理学观察

选用 6 月龄行为学实验进行后大鼠, 麻醉法牺牲大鼠, 取出脑组织, 10 μ m 冰冻切片。丙酮固定 15 min, PBS 洗三遍, 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min, 0.5% Triton X-100 处理 5 min。正常山羊血清工作液, 室温封闭 60 min。小鼠抗人 Beta Amyloid (A β)6E10 单克隆抗体(1:200, Covance), 小鼠抗人单克隆抗体(TAU-5)(1:500, Millipore), 小鼠抗人 Phospho-PHF-tau pSer202/Thr205 单克隆抗体(AT8)(1:50, Thermo Scientific), 4 $^{\circ}$ C 过夜。山羊抗小鼠 IgG-HRP 多聚体(中杉金桥), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。DAB 显色, 苏木精复染, 光镜下观察。

1.6 统计学方法

利用 SPSS16.0 软件统计分析, 平台隐藏获得实验中的逃避潜伏期采用多重测量的方差分析学试验。空间探索实验中的各象限的游泳时间和穿越目标次数采用单因素方差分析。数据采用均数 \pm 标准差, 差异显著水平设为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 APPsw/PS1dE9/TAU 转基因大鼠的建立

PrP-hAPP695^{K595N/M596L}、PrP-hPS1^{dE9} 和 PDGF-TAU 转基因载体由本实验室构建, 利用点突变方法使人 APP695 第 595 和 596 位点的氨基酸同时发生了由赖氨酸突变为天门冬酰胺与蛋氨酸突变为亮氨酸的突变, 称为瑞士突变。把 APP、PS1 突变基因分别克隆到小鼠肌蛋白启动子(PrP)的下游构建 APP695、PS1dE9 转基因表达载体。将人 TAU 基因最长转录本 cDNA 克隆到 PDGF 启动子下游构建 PDGF-TAU 转基因载体(图 1A)。

用显微注射法将线性化的转基因表达载体注射到 SD 大鼠的受精卵中, 转入受体假孕 Wistar 大鼠中, 大鼠出生 7 d 提取基因组 DNA, 用 PCR 扩增鉴定转基因大鼠的基因型(图 1B), 共得到 3 只首建鼠, 且均可传代。分别提取首建鼠的 F₁ 代阳性转基因大鼠和同龄对照大鼠脑组织总蛋白, western blot 分析, 结果显示 33、34 号首建鼠脑组织内 APP、PS1 及 TAU 蛋白表达量明显高于同龄阴性对照大鼠, 留种繁育用于行为学和病理学分析(图 1C)。

2.2 6 月龄 APPsw/PS1dE9/TAU 转基因大鼠学习记忆能力下降

经过检验前 5 d 学习有效, 所有大鼠都能较快的找到平台。随后第 6 天撤出平台, 进行空间探索实验。Ethovision XT 监测分析软件记录大鼠在目标区域即第 4 区(zone4)和平台区(platform)的穿梭次数和停留时间。Morris 水迷宫试验发现 6 月龄 APPsw/PS1dE9/TAU 转基因大鼠空间探索实验结果与同龄野生型小鼠相比有显著差异, 较同窝阴性对照大鼠学习及记忆能力降低($P < 0.05$)(图 2)。

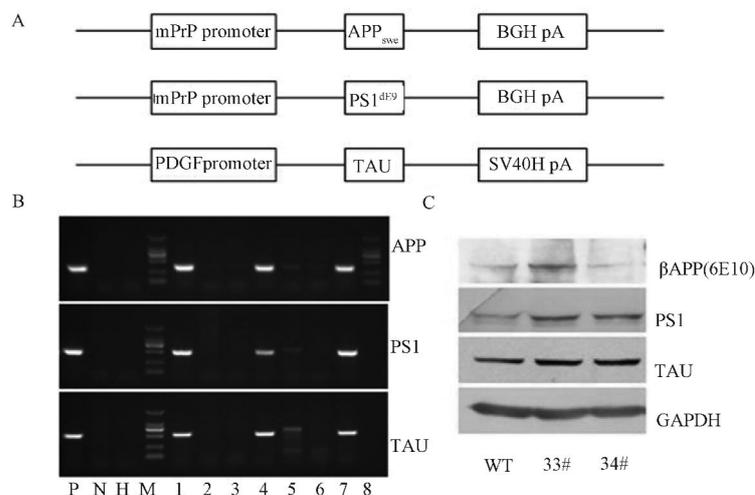
2.3 6 月龄 APPsw/PS1dE9/TAU 转基因大鼠脑组织中 A β 的表达

APP 免疫组织化学结果显示, 和野生对照相比, 6 月龄转基因大鼠脑组织中皮层和海马神经元中 A β 表达均显著增加, 但未有明显老年斑出现(彩插 8 图 3)。

2.4 6 月龄 APPsw/PS1dE9/TAU 转基因大鼠脑皮层出现神经原纤维缠结

TAU5 免疫组织化学结果显示, 和野生对照相比, 6 月龄转基因大鼠脑组织中皮层总 TAU 蛋白的表达略有增加。PHF-TAU5 免疫组织化学结果显示, 野生对照皮层神经元内无磷酸化 PHF-TAU 免疫阳性, 而转基因大鼠皮层神经元有大量磷酸化 PHF-TAU 免疫阳性着色, 结构类似神经原纤维缠

结(彩插 8 图 4)。

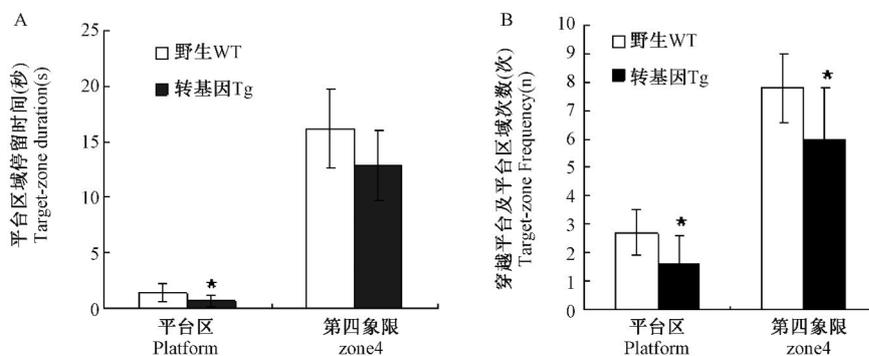


注:A: APP_{swe}、PS1_{dE9}、TAU 转基因表达载体;B:转基因大鼠的 PCR 鉴定,P,阳性对照;N,阴性对照;H, H₂O;M, DL2000 DNA marker;泳道 1-8 为转基因大鼠鼠尾 DNA,1、4、7 为阳性首建鼠。C:western blot 检测人 APP_{swe}、PS1_{dE9}、TAU 蛋白在转基因大鼠脑组织中的表达。WT,同窝阴性对照鼠;33#、34#为阳性首建鼠。GAPDH 为加样一致性对照。

图 1 APP_{swe}/PS1_{dE9}/TAU 转基因大鼠的建立

Note:A: APP_{swe}、PS1_{dE9}、TAU transgenic expression construct; B: PCR genotyping of APP_{swe}/PS1_{dE9}/TAU transgenic rats;P, positive control;N,negative control;H, H₂O₂; M, DL2000 DNA marker; Lanes 1-8 were transgenic rat DNA samples, 1,4 and 7 were three founders. C, The expression of human APP, PS1 and TAU in the brain tissues of transgenic rats were determined by western blot. WT,wild type control rat;33# and 34# were two founders. GAPDH were used as loading control.

Fig. 1 The generation of APP_{swe}/PS1_{dE9}/TAU transgenic rats



注:A:6 月龄野生型大鼠与转基因模型大鼠平台区域停留时间;B:6 月龄野生型大鼠与转基因模型大鼠穿越平台区域次数。*, $P < 0.05$ 。

图 2 Morris 水迷宫第六天空间探索实验结果比较

Note:A, Comparison of target zone duration between 6 month old transgenic and control rats; B, Comparison of target zone frequency between 6 month old transgenic and control rats. *, $P < 0.05$.

Fig. 2 Result of 6th day's probe trial testing of morris water maze trials

表 2 6 月龄 APP_{swe}/PS1_{dE9}/TAU 转基因大鼠与野生大鼠在隐藏平台实验中搜索平台潜伏期
Tab. 2 Escape latencies of 6 month old APP_{swe}/PS1_{dE9}/TAU transgenic rats and wildtype rats in hidden platform acquisition training

分组 Groups	第一天 Day1	第二天 Day2	第三天 Day3	第四天 Day4	第五天 Day5
野生型 WT(n=8)	45.24 ± 20.40	41.09 ± 22.76	27.89 ± 19.74	19.11 ± 18.36	8.20 ± 4.66
转基因 TG(n=12)	57.27 ± 7.83*	55.46 ± 10.80*	42.41 ± 18.48*	26.14 ± 18.56*	21.92 ± 19.52*

注:*, $P < 0.05$ 。Note:*, $P < 0.05$ 。

3 讨论

相对小鼠而言,大鼠在生理、行为等方面与人类更接近^[11]。神经行为研究的初期,大鼠是最常用的模式生物。大鼠在许多标准的神经药理学任务中表现良好。大鼠行为表现多样,情绪敏感,适应新环境快,探索性强,可人为唤起或控制其感觉(动觉、视觉、触觉、嗅觉),具有行为情绪的变化特征。广泛应用于行为学及行为异常、高级神经活动的研究。此外,大鼠给药容易,采样量合适方便,行为多样化,常用于药物毒理、药效评价、新药筛选等研究。因此,建立 APP^{swe}/PS1^{dE9}/TAU 三转基因大鼠,将为 AD 发病机制研究和药物评价提供了更好的工具动物。

阿尔茨海默病(alzheimer disease, AD)可分为家族性(FAD)和散发性或迟发性(SAD/LOAD)。FAD 为常染色体显性遗传病,仅占全部 AD 的 15% 以下,而 LOAD 没有明显的遗传背景,发病较晚,认为与遗传和环境因素有关。迄今为止,AD 的发病机制尚未完全明确,主要有几种假说:β 淀粉样蛋白学说、Tau 蛋白学说、基因突变学说、能量代谢障碍学说等等,其中 Aβ、Tau、PS1 和 ApoE 等作为主要的易感基因均在 AD 的发病过程中起到重要作用。其中 Tau 蛋白在 AD 患者脑中总量多于正常人;正常 Tau 蛋白减少而异常过度磷酸化 Tau 蛋白大量增加。Tau 过度磷酸化后与微管蛋白的结合力下降 90%,导致 AD 患者脑中受累神经元微管结构广泛破坏,正常轴突转运受损,引起突触丢失神经元功能损伤,发生脑神经退行性病变。由于近年来基于 Aβ 假设的治疗方案均被临床研究否决^[5],且与老年斑相比,脑细胞内神经原纤维丝缠结程度与患者临床痴呆程度相关性更好^[4],使得 Tau 基因的相关研究已经成为目前 AD 研究的焦点。

Cohen RM 等^[12]建立了背景为 F344 的 APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转大鼠,6 月龄时 Aβ 表达显著增多,无老年斑出现,行为学改变不显著,而直到 16 月龄和 26 月龄时才出现老年斑和神经纤维缠结,行为学上表现为学习记忆能力明显下降。本研究建立的 APP^{swe}/PS1^{dE9}/TAU 三转基因大鼠,三转基因大鼠由于引入了第三个基因,表达人最长转录本 TAU 基因,更加有利于从更多层面对 AD 展开研究。而且,初步的表型研究已经显示出其优势:6 月龄时已经出现了较为明显的行为学改变,虽然无老年

斑,但是皮层和海马神经元胞浆内 Aβ 显著增多,磷酸化的 PHF-TAU 表达显著增加,结构类似神经原纤维缠结。此后,还将就 6 月龄之后三转基因大鼠的行为学改变及病理改变进行深入和长期的研究,为该模型的使用提供更为详尽的数据。

综上所述,本研究建立 APP^{swe}/PS1^{dE9}/TAU 三转基因大鼠,转基因大鼠 6 月龄即出现明显的行为学改变,同时还发生神经元胞浆内 Aβ 增多和神经原纤维缠结等病理改变,再现人类阿尔茨海默症的行为学及神经病理学特征。而且,由于大鼠寿命长,发病时程长,观察窗长,更加有利于开展干涉治疗研究,APP^{swe}/PS1^{dE9}/TAU 三转基因大鼠的建立为 AD 发病机制研究和药物评价提供了更好的工具动物。

参考文献:

- [1] Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, et al. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Science*, 2005, 307 (5713): 1282 - 1288.
- [2] Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2004, 430 (7000): 631 - 639.
- [3] Savva GM, Wharton SB, Ince PG, et al. Age, neuropathology, and dementia [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360 (22): 2302 - 2309.
- [4] Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12 (1): 38 - 55.
- [5] Holmes C, Boche D, Wilkinson D, et al. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial [J]. *Lancet*, 2008, 372 (9634): 216 - 223.
- [6] Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, et al. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A and Synaptic Dysfunction [J]. *Neuron*, 2003, 39 (3): 409 - 21.
- [7] Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, et al. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease [J]. *Neurobiology of Aging*, 2003, 24 (8): 1063 - 1070.
- [8] Stencicuk R, Antle MC, Laferla FM, Dyck RH. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 2. Behavioral and cognitive changes [J]. *Brain Res*, 2010, 1348: 149 - 155.
- [9] Gordan JW, Ruddle FH. Integration and stable germline transmission of genes injected into mouse pronuclei [J]. *Science*, 1981, 214 (4526): 1244 - 1246.
- [10] Tmeu GE, Heeger P, Mynatt RL, et al. Preparation of PCR quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT) [J]. *Biotechniques*, 2000, 29 (1): 52 - 54.

- [11] 王贵利,张连峰. 基因工程大鼠研究进展[J]. 中国比较医学杂志,2013,(23)3: 71-76. impairment, oligomeric A β and frank neuronal loss [J]. J Neurosci, 2013, 33(15): 6245-6256.
- [12] Cohen RM, Rezai-Zadeh K, Weitz TM et al. A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral [修回日期]2014-02-24

· 科 普 ·

利用 CRISPR/Cas9 技术实现快速、经济的大鼠条件基因敲除技术

在 2014 年第 1 期的 *Cell Research* 杂志上发表了一篇利用 CRISPR/Cas9 技术进行大鼠条件基因敲除技术的技术性论文(Ma, et al., Generating rats with conditional alleles using CRISPR/Cas9, *Cell Research* (2014) 24:122-125.), 这篇论文利用 CRISPR/Cas9 在靶基因的特异外显子产生 DNA 双链断裂, 同时提供一个环形质粒模板, 该质粒包含两端被 loxP 位点标记的、且与被打断外显子相同的 DNA 片段。在受精卵内同源重组修复系统(homologous recombination repair pathway)的作用下, 可实现高效率的靶基因 loxP 位点标记, 从而用于大鼠的条件性基因敲除。论文中利用该技术实现了三个甲基化酶基因(*Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*) loxP 位点标记, 效率高达 30%, 使得制备一个含 loxP 位点标记大鼠的周期仅 2~3 个月, 成为目前为止最经济、快速的大鼠条件基因敲除技术。

美国科学家在 2004 年就预测, 大鼠将“回归实验室”, 并成为生理、行为、代谢、药物等方面研究的主要动物模型。由于大鼠 ES 细胞培养条件的限制, 基于大鼠 ES 细胞的经典基因打靶技术一直没有成为常态化的技术。但是基因组编辑技术如锌指核酶(ZFNs)技术、转录激活样效应因子(Talens)技术不需要通过 ES 细胞打靶环节, 可以直接通过原核注射的方式实现目的基因的突变, 极大的缩短了建立基因敲除动物模型的时间, 拓宽了基因修饰的物种范围。相对于 ZFNs 和 Talens, 近年发展的 CRISPR/Cas9 技术在操作的简便性、实验周期、效率等方面更有优势, Ma, et al. 开发的大鼠条件基因敲除技术将为医药研究领域大鼠研究的有利工具。

(马元武 张连峰)