

灵长类巨细胞病毒慢性潜伏再激活诱导免疫衰老的研究进展

王宇虹^{1,2}, 曲光瑾^{1,2}, 肖冲³, 邓巍^{3*}

(1. 哈尔滨医科大学附属第一医院干部病房, 哈尔滨 150001; 2. 解放军总医院国家老年疾病临床医学研究中心, 北京 100039; 3. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

【摘要】 巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)免疫潜伏再激活可以诱导 T 细胞进而发生免疫衰老已成为衰老的公认机制之一。在免疫活性宿主体内, CMV 一旦感染可在骨髓中静默潜伏, 通过分化依赖性活化刺激进入循环传播, 保持终生持续感染的能力。本文针对人类和非人灵长类 CMV 感染后免疫状况、免疫逃避机制以及与免疫衰老相关性等方面进行比较和综述, 以期为今后免疫衰老模型构筑、疫苗研制和药物开发提供基础。

【关键词】 巨细胞病毒; 免疫衰老; 比较医学; 灵长类

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 07-0124-05

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2018. 07. 022

Research progress on chronic latent reactivation of primate cytomegalovirus-induced immune senescence

WANG Yuhong^{1,2}, QU Guangjin^{1,2}, XIAO Chong³, DENG Wei^{3*}

(1. Department of Geriatric, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China.

2. National Clinical Research Center for Geriatric Disease, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039.

3. Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021)

【Abstract】 Reactivation of cytomegalovirus (CMV) can induce T cells to undergo immune senescence, a mechanism of aging. After CMV infection of immunocompetent hosts, it persists in bone marrow. CMV is stimulated and propagates into circulation via differentiation-dependent reactivation throughout life. This article compares and reviews the immune status of human and nonhuman primates after CMV infection, the immune escape mechanisms, and the relationship with immune senescence. Such information may provide a basis for establishing models of immune senescence and the development of drugs and vaccines.

【Key words】 cytomegalovirus, CMV; immune senescence; comparative medicine; primates

巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)是一种分布广泛的古哺乳动物病毒, 遗传证据表明目前进化的 CMV 与宿主在哺乳动物物种具有共同的祖先^[1]。人类巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)在

人群中广泛感染, 其全球感染率高达 60% ~ 100%^[2]。在免疫活性宿主体内, HCMV 保持终生持续感染的能力, 无论原发性还是复发性 HCMV 感染通常都是亚临床的^[3]。因此, 对于免疫功能正常

【作者简介】 王宇虹(1974—), 女, 博士后, 专业: 老年病, 免疫衰老机制及模型。E-mail: Dr. yuhongwang@gmail.com

【通信作者】 邓巍(1975—), 男, 助理研究员, 研究方向: 实验病理。E-mail: dengwei717@163.com

的 HCMV 携带者, HCMV 逃避宿主高水平的抗病毒免疫反应, 与宿主终身稳定共存, 其免疫逃避机制一直是免疫研究的重要挑战。而对于免疫功能障碍的感染者, HCMV 可导致严重的疾病, 甚至致死, 这对 HCMV 的疫苗开发和药物治疗提出了重要的挑战^[4]。对于免疫衰老的 HCMV 携带者, 病毒的免疫逃避机制, 与免疫适应性集中体现的免疫衰老之间的相互作用, 则更加微妙复杂^[5]。

由于 β -疱疹病毒类具有种属特异性, 导致 HCMV 病毒不能在任何动物模型直接研究^[6]。每个物种的 CMV 高度适应其各自的宿主物种, 这种高度种属特异的 CMV 基因组特点, 反映了其与宿主密切的进化关联性。鼠类由于不具有 CD28 丢失性, 无法针对其进行 CMV 感染后免疫衰老机制的研究^[7], 因此首选非人灵长类动物进行 CMV 慢性潜伏再激活诱导免疫衰老的动物模型构建。HCMV 最接近的种属是黑猩猩, 由于价格、饲养和伦理等问题, 并不是一个具有良好可行性的 CMV 动物模型, 所以猕猴 CMV (rhesus cytomegalovirus, RhCMV) 感染模型是目前研究 HCMV 感染的最优选非人灵长类动物模型。从宿主角度, 感染 RhCMV 的圈养和野生猴子无处不在; 而且 RhCMV 的感染宿主内也存在和人类一样的慢性潜伏再激活的反复免疫诱导机制^[8]。从病毒角度, RhCMV 和 HCMV 基因组的大小、结构和基因组织相似。RhCMV 的基因组突变与 HCMV 基因组的突变具有共线性, 近 60% 潜在致病蛋白与 HCMV 蛋白具有同源性, 这些同源蛋白主要集中在病毒的结构和免疫调节蛋白, G 蛋白偶联受体和蛋白参与核酸代谢、DNA 复制和转录调控蛋白^[9]。故本文从宿主三个免疫状况角度, 分别阐述人类巨细胞病毒 HCMV 和猕猴巨细胞病毒 RhCMV 的感染免疫研究现状。

1 免疫活性正常的 HCMV 感染和 RhCMV 感染的免疫状况

HCMV 在大多数健康人的早年原发感染, 随即启动终身潜伏感染。在潜伏期间, 病毒发生频繁的再激活, 反复感染, 病毒反复的复制表达, 诱导人免疫系统产生 HCMV 特异性抗病毒免疫清除和炎症反应, 使病毒始终处于亚临床状况^[3]。宿主的免疫系统能有效的控制病毒传播, 但是与绝大多数抗病毒免疫反应可以有效保护宿主免受病毒入侵和再次感染不同, HCMV 仍可广泛原发感染, 持续终生并且定期继发机会性感染。其自身的免疫适应性和

选择性压力使其自身拥有数百万年的免疫逃避优势; 另一方面, 宿主始终无法清除潜伏在骨髓干细胞的病毒储存池, 由此产生了不同病毒株的超级感染^[10]。RhCMV 广泛存在于种群中, 在性成熟的年龄 (2.5 ~ 3 岁), 血清阳性率达到 100% 左右, 这导致原发性 RhCMV 研究的成本激增。通过对隔离的幼年恒河猴进行原发感染, 证实 RhCMV 的感染形式与人类很接近。RhCMV 在首次感染后建立了终生潜伏感染, 病毒的宿主内播散发生在唾液、泪液、尿液、排泄物、精液、母乳和宫腔中^[11]。自然暴露实验接种 RhCMV 感染的健康免疫猕猴临床症状轻微, 病理、组化和尸检显示 RhCMV 在多种组织和器官内多种细胞内有宿主内播散, 且与 HCMV-DNA 阳性细胞分布高度相近^[12]。

CMV 的免疫逃避机制是 CMV 持续终生感染的重要机制, 包括非常复杂的分子调控网络。由 HCMV 编码的众多具有免疫调节功能的蛋白, 可以干扰宿主细胞的信号转导, 活化细胞内和跨细胞运输以及细胞的凋亡^[13]。大多数编码 RhCMV 免疫调节蛋白与 HCMV 的同源性低, 但体外研究显示相似的功能, HCMV 细胞凋亡抑制机制也存在于 RhCMV。RhCMV 中的 UL36 (caspase-8 介导凋亡, 病毒抑制剂) 和 UL37 (线粒体凋亡抑制, vMIA) 同源基因的突变能够阻止 Fas 介导的在 HeLa 细胞中的细胞凋亡^[14]。

HCMV 的 UL111A 开放阅读框架与人 IL-10 呈现高度同源, HCMV 表达病毒源性 IL-10 是其免疫逃避的重要机制之一^[15]。RhCMV 中也发现了 IL-10 表达, 呈现出针对宿主体液免疫的抑制性^[16]。与 HCMV IL-10 类似, RhCMV 能在猕猴体内表达病毒源性 IL-10 (cIL-10), 它与猕猴宿主表达的 IL-10 有 25% ~ 27% 的同源性, 因此, 自然感染 RhCMV 的猕猴中可检测到抗病毒 IL-10 的抗体^[17]。HCMV 的 MHC-I 表达下调机制, 是其另一个重要的免疫逃避机制, RhCMV 的 US2、US3、US6、US11 基因组里有相似的基因家族^[18], 而啮齿类动物 US2 ~ US11 基因家族则无类似的免疫逃避机制。RhCMV-US28.5 编码一个包含五个同源基因的突变病毒趋化因子受体, 与人类 HCMV-US28 同源, 而啮齿类无此基因。灵长类动物特有的七跨膜结构域基因家族, 可进一步显示 HCMV 和 RhCMV 的同源性^[19]。

虽然对 HCMV 感染的保护性免疫应答的性质尚不完全确定, HCMV 诱导的病毒特异性免疫必须

被视为宿主保护机制。通过对病毒自然感染史的研究,证实 HCMV 反复机会性感染诱导的中和抗体和细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 反应,能有效抑制 HCMV 感染升级和 CMV 相关疾病发生^[20]。RhCMV 诱导猴宿主的免疫保护性反应与人类一致。磷酸化蛋白 65 (pp65) 是 HCMV 免疫反应的主要目标之一,RhCMV-pp65-2 定位于细胞核,也是猕猴体液免疫和细胞免疫的目标^[21]。在健康猕猴中,RhCMV 特异性 CTL 反应也具有 MHC-I 限制性,其靶蛋白 Rh-IE1 和 Rh-IE2,与 HCMV 靶蛋白同源^[22]。此外,RhCMV 的特异性中和抗体的时间变化曲线和人 HCMV 也高度相似,且中和抗体的靶蛋白也均为病毒壳表面的糖蛋白 (GB)。体外处理克隆的 RhCMV GB 和 HCMV GB 其水解产物相近,且存在抗体交叉反应^[23]。存在于免疫系统的靶向 IE1/IE2,GB 和 pp65 使 RhCMV 成为研究 CMV 疫苗的可行模式。

2 免疫功能低下患者的 HCMV 感染和 RhCMV 感染的免疫状况

HCMV 感染在健康人身上通常无症状,但此病毒是免疫功能不成熟或低下患者的发病和死亡的重要病因之一,也是艾滋病和移植受体机会性感染常见的危及生命的并发症^[24]。免疫功能低下时免疫系统已经不能控制 HCMV 的原发感染或潜伏期的再激活。HCMV 先天感染是美国出生缺陷传染病原因的重要原因,仅在美国,与巨细胞病毒病有关的卫生保健费用就超过每年 44 亿美元^[25]。免疫系统功能低下的猕猴也能观察到严重的 RhCMV 病。实验接种病毒的猕猴胎儿,中枢神经系统发生异常的风险与胎盘的母体 IgG 转移到胎儿的 RhCMV 免疫反应呈负相关^[21]。监测类似于人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染过程的 RhCMV 的反应,在携带 RhCMV 的猕猴上构建猴免疫缺陷病毒 (simian immunodeficiency virus, SIV) 感染模型,随之进行免疫抑制能够产生特征性 RhCMV 播散病变,与人类移植受体和 HIV 患者的 HCMV 播散方式高度雷同^[25]。总之,无论是人类还是猕猴,宿主免疫功能和 CMV 之间的博弈结果,决定了 CMV 感染的临床结局。在针对宿主抗移植物的研究中,研究者拟应用抗 CD40 和 CD28 抗体延长移植肾的存活时间,有趣的是,在猕猴上应用 CD40/CD28 抗体后,RhCMV 再感染被显著激活,出现播散性 CMV 病^[26-27],这与下文讲到的“CMV-免疫衰老”悖论相关。

3 免疫衰老的“健康”个体的 HCMV 感染和免疫衰老的相关性探究

免疫衰老的“健康”老年人,本身即存在一个逻辑悖论。因为衰老的退行性变是一个基因调控的不可逆过程,免疫系统也不能独善其身。在一个健康的老年个体中,免疫功能无异常和年轻免疫活性的免疫系统仍存在很多差异,而健康衰老的定义,目前仍是一个极大的挑战。一方面,持续终生的 HCMV 反复再感染诱导的免疫反应,可能是老年个体免疫衰老的重要责任病原体。老人宿主外周血中,一半以上的效应记忆 T 细胞 (effector memory CD8⁺ T cells, EM CD8⁺ T cells) 均为 HCMV 特异性的 T 细胞。这种 HCMV 特异性 T 细胞的高度克隆化的累积效应,“压缩”了外周血初始 T 细胞的数量,使老年个体针对新抗原的识别能力和 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 多样性降低。另一方面,来自相对健康的高龄老人人群的流行病学数据显示, HCMV 的反复再激活与预期寿命呈现显著正相关,而不是预测的负相关,因此还有研究者推测 HCMV 在老年个体免疫衰老的漫长进程中,可能发挥一个“低水平疫苗样炎性刺激”作用,进而避免了老年个体遭受高致病性新病原体感染后的“免疫休克时间窗”,从而降低了衰老个体的死亡率^[28]。

4 灵长类动物模型在 HCMV 诱导免疫衰老机制中的重要性

CMV 的进化变异与物种相关性具有平行关系,灵长类动物的 CMV 基因组与啮齿类动物病毒基因组相比,其相互关联性显著增高。最广泛使用的鼠 CMV (MCMV) 解决生物学和免疫学的很多基本问题,但是和 HCMV 基因组有很多不同,MCMV 存在许多“非必需基因”^[29]。此外,免疫衰老作为一个衰老个体发生的增龄性退行性改变,也是进化压力产生的调适性改变。HCMV 诱导的免疫衰老最重要的表型之一是 CD28 的丢失, HCMV 特异性 CD28^{null} CD8⁺ T 细胞的增高,是人类免疫衰老风险表型群的独立风险因素之一^[30],鼠的 T 细胞表面的 CD28 从不丢失,这降低了鼠模型在免疫衰老中的研究价值^[7]。HCMV 潜伏于骨髓中无法清除,是 HCMV 终生反复感染的最重要机制,目前的研究重点已经从 HCMV 的反复再激活,前推到 HCMV 在骨髓干细胞的潜伏阶段。既往应用原代细胞和体外细胞系的实验感染,已经证实了分子水平上 HCMV 基因表达

复杂调控的断面网络,这些研究主要集中在 MIE 基因即时表达调控^[31-32]。因为干细胞的 HCMV 再激活表型的关键在于 MIE 基因的表达从静止变为触发,细胞转录抑制因子通过组蛋白翻译后的修饰,构建一个染色质结构依赖的转录抑制机制,相关问题还有很多,例如:HCMV 长期在髓系细胞中携带,这个潜在的基因组如何维持呢?它们生命的某个阶段,是否发生增殖?HCMV 潜在的复制起点是什么?HCMV 基因组运输和重新激活高度被限制是如何实现的?最近的研究表明 UL84 可维持病毒序列,一批具有强大的长期抗凋亡功能的细胞蛋白在潜伏感染的 CD34⁺ 细胞中上调,提示 HCMV 拥有一个与众不同的抗凋亡体系^[33]。伴随基因表达技术的高速发展,越来越多的证据提示 HCMV 潜伏其实是一个高度活跃的过程,其中涉及延迟特定基因产物以及定时编排,这些编排时间相关性变化帮助病毒维持潜伏感染,调节 HCMV 潜伏的骨髓内干细胞的内环境以利于病毒的潜伏。HCMV 携带细胞骨髓干细胞的获取,在临床上缺乏实践性。通过在猕猴干细胞获取染色质表型,以及多种组学的同步研究,对明确 HCMV 的潜伏再激活机制,从潜伏期抑制病毒再激活,从而阻断免疫衰老的核心途径,都是非常具有前景的假说^[34]。

综上,研发 RhCMV 作为人类巨细胞病毒的动物模型的时代已经到来。恒河猴动物和细胞模型已应用了许多关于基因组细菌编辑、细胞标记和人工染色体突变的先进技术,由于成本和近亲繁殖淘汰率高的原因,灵长类不会取代小鼠在巨细胞病毒生物学和免疫学的应用,但对于许多重要的科学问题,如疫苗研制、药物开发、潜伏的 CMV 感染与免疫衰老,非人灵长类正迅速成为首选动物模型。

参考文献:

- [1] Kerschner H, Bauer C, Schlag P, et al. Clinical evaluation of a fully automated CMV PCR assay [J]. J Clin Virol, 2011, 50 (4): 281 – 286.
- [2] Pawelec G, Akbar A, Caruso C, et al. Human immunosenescence: is it infectious? [J]. Immunol Rev, 2005, 205: 257 – 268.
- [3] Kondo K, Kaneshima H, Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(25): 11879 – 11883.
- [4] Krause PR, Bialek SR, Boppana SB, et al. Priorities for CMV vaccine development [J]. Vaccine, 2013, 32(1): 4 – 10.
- [5] Tu W, Rao S. Mechanisms underlying T cell immunosenescence;

aging and cytomegalovirus infection [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 2111.

- [6] Staczek J. Animal cytomegaloviruses [J]. Microbiol Rev, 1990, 54(3): 247 – 265.
- [7] Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence [J]. Immunol Rev, 2005, 205: 158 – 169.
- [8] Yue Y, Barry PA. Rhesus cytomegalovirus a nonhuman primate model for the study of human cytomegalovirus [J]. Adv Virus Res, 2008, 72: 207 – 226.
- [9] Bowman JJ, Lacayo JC, Burbelo P, et al. Rhesus and human cytomegalovirus glycoprotein L are required for infection and cell-to-cell spread of virus but cannot complement each other [J]. J Virol, 2011, 85(5): 2089 – 2099.
- [10] Gabanti E, Bruno F, Fornara C, et al. Polyfunctional analysis of human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD4⁺ and CD8⁺ memory T-cells in HCMV-seropositive healthy subjects following different stimuli [J]. J Clin Immunol, 2014, 34(8): 999 – 1008.
- [11] Huff JL, Eberle R, Capitanio J, et al. Differential detection of B virus and rhesus cytomegalovirus in rhesus macaques [J]. J Gen Virol, 2003, 84(1): 83 – 92.
- [12] Lockridge KM, Sequar G, Zhou SS, et al. Pathogenesis of experimental rhesus cytomegalovirus infection [J]. J Virol, 1999, 73(11): 9576 – 9583.
- [13] Jackson SE, Mason GM, Wills MR. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion [J]. Virus Res, 2011, 157(2): 151 – 160.
- [14] Smith JA, Pari GS. Expression of human cytomegalovirus UL36 and UL37 genes is required for viral DNA replication [J]. J Virol, 1995, 69(3): 1925 – 1931.
- [15] Lockridge KM, Zhou SS, Kravitz RH, et al. Primate cytomegaloviruses encode and express an IL-10-like protein [J]. Virology, 2000, 268(2): 272 – 280.
- [16] Eberhardt MK, Deshpande A, Fike J, et al. Exploitation of interleukin-10 (IL-10) signaling pathways: alternate roles of viral and cellular IL-10 in rhesus cytomegalovirus infection [J]. J Virol, 2016, 14(21): 9920 – 9930.
- [17] Logsdon NJ, Eberhardt MK, Allen CE, et al. Design and analysis of rhesus cytomegalovirus IL-10 mutants as a model for novel vaccines against human cytomegalovirus [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e28127.
- [18] Powers CJ, Früh K. Signal peptide-dependent inhibition of MHC class I heavy chain translation by rhesus cytomegalovirus [J]. PLoS Pathog, 2008, 4(10): e1000150.
- [19] Rivailler P, Kaur A, Johnson RP, et al. Genomic sequence of rhesus cytomegalovirus 180.92: insights into the coding potential of rhesus cytomegalovirus [J]. J Virol, 2006, 80(8): 4179 – 4182.
- [20] Kapp M, Tan SM, Einsele H, et al. Adoptive immunotherapy of HCMV infection [J]. Cytotherapy, 2007, 9(8): 699 – 711.
- [21] Yue Y, Kaur A, Zhou SS, et al. Characterization and

- immunological analysis of the rhesus cytomegalovirus homologue (Rh112) of the human cytomegalovirus UL83 lower matrix phosphoprotein (pp65) [J]. J Gen Virol, 2006, 87(4): 777-787.
- [22] Zalcvar E, Paulus C, Tillo D, et al. Nucleosome maps of the human cytomegalovirus genome reveal a temporal switch in chromatin organization linked to a major IE protein [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(32): 13126-13131.
- [23] Lilja AE, Mason PW. The next generation recombinant human cytomegalovirus vaccine candidates—Beyond gB [J]. Vaccine, 2012, 30(49): 6980-6990.
- [24] Smith DM, Nakazawa M, Freeman ML, et al. Asymptomatic CMV replication during early human immunodeficiency virus (HIV) infection is associated with lower CD4/CD8 ratio during HIV treatment [J]. Clin Infect Dis, 2016, 63(11): 1517-1524.
- [25] Paltiel AD, Scharfstein JA, Seage GR 3rd, et al. A Monte Carlo simulation of advanced HIV disease: application to prevention of CMV infection [J]. Med Decis Making, 1998, 18(2 Suppl): S93-S105.
- [26] Lynch RM, Yamamoto T, McDermott AB. HIV vaccine research and discovery in the nonhuman primates model: a unified theory in acquisition prevention and control of SIV infection [J]. Curr Opin HIV AIDS, 2013, 8(4): 288-294.
- [27] Williams MA, Onami TM, Adams AB, et al. Cutting edge: persistent viral infection prevents tolerance induction and escapes immune control following CD28/CD40 blockade-based regimen [J]. J Immunol, 2002, 169(10): 5387-5391.
- [28] Wang YH, Zhang JY, Qiao FF, et al. Correlation between T lymphocyte subsets in peripheral blood lymphocytes and 2-year all-cause mortality in an apparently healthy elderly Chinese cohort [J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(6): 1121-1126.
- [29] Ikuta K, Ogawa H, Hashimoto H, et al. Restricted infection of murine cytomegalovirus (MCMV) in neonatal mice with MCMV-induced sensorineural hearing loss [J]. J Clin Virol, 2015, 69: 138-145.
- [30] Fasth AE, Dastmalchi M, Rahbar A, et al. T cell infiltrates in the muscles of patients with dermatomyositis and polymyositis are dominated by CD28^{null} T cells [J]. J Immunol, 2009, 183(7): 4792-4799.
- [31] Liu X, Yuan J, Wu AW, et al. Phorbol ester-induced human cytomegalovirus major immediate-early (MIE) enhancer activation through PKC-delta, CREB, and NF-κB desilences MIE gene expression in quiescently infected human pluripotent Ntera2 cells [J]. J Virol, 2010, 84(17): 8495-8508.
- [32] Martínez FP, Cruz R, Lu F, et al. CTCF binding to the first intron of the major immediate early (MIE) gene of human cytomegalovirus (HCMV) negatively regulates MIE gene expression and HCMV replication [J]. J Virol, 2014, 88(13): 7389-7401.
- [33] Russell JN, Marsh AK, Willer DO, et al. A novel strain of cynomolgus macaque cytomegalovirus: implications for host-virus co-evolution [J]. BMC Genomics, 2016, 17: 277.
- [34] Weltevrede M, Eilers R, de Melker HE, et al. Cytomegalovirus persistence and T-cell immunosenescence in people aged fifty and older: a systematic review [J]. Exp Gerontol, 2016, 77: 87-95.

[收稿日期]2018-02-02

专家问答

问:用 BAC 克隆技术构建转基因小鼠的注意要点有哪些?

答:细菌人工染色体(bacterial artificial chromosomes,BAC)是二十世纪九十年代发展起来的一种基因组文库构建技术,BAC 载体遗传稳定性好,不易发生缺失和重组,且容易制备。BAC 文库已经在人类基因组计划和基因表达调控等研究领域获得广泛的应用。BAC-DNA 含有较大的基因组片段(~200 kb)、较全面的基因调控序列,且我们可通过 Red 重组技术对 BAC-DNA 实现定点修饰。BAC-DNA 转基因小鼠一个重要特点是它可以使转入的外源基因在转基因小鼠体内不依赖整合位点高效表达。因此使用 BAC-DNA 制备的转基因小鼠在医学研究领域仍然具有一定的作用。在利用 BAC-DNA 制备转基因小鼠时需要注意以下几点:①BAC-DNA 的制备需要特殊的质粒试剂盒,推荐使用 Nucleobond column 方法提纯(NucleoBond® BAC 100 kit);②制备好的 BAC-DNA 尽可能进行脉冲场凝胶电泳,确定 BAC-DNA 的完整性;③注射缓冲液推荐加入 Spermidine 和 Spermine(注射缓冲液:5 mmol/L Tris-HCl,pH 7.4;0.2 mmol/L EDTA,100 mmol/L NaCl),以便能保存完整的 BAC-DNA;④注射时可以使用环状 BAC-DNA,也可使用线性化 BAC-DNA,但线性化 BAC-DNA 的纯化过程比较复杂,相应地增加技术难度;⑤注射时使用较粗口径的注射针和较低的注射压力。

(感谢 上海市公共卫生临床中心 周晓辉研究员、李顺博士、李峰博士 的解答)