

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-072

哺乳动物染色体工程研究进展

朱骊宇^{1,2}, 赵玉龙^{1,2}, 李伟^{1,3,4}, 王立宾^{1,3,4}

(¹ 中国科学院动物研究所, 干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101; ² 中国科学院大学, 北京 100049;
³ 中国科学院干细胞与再生医学创新研究院, 北京 100101; ⁴ 北京干细胞与再生医学研究院, 北京 100101)

摘要: 哺乳动物染色体工程是指通过多种实验手段对哺乳动物的染色体进行编辑, 从而可以构建疾病动物模型、制备人源化药物工厂、解析物种进化机制甚至于合成全新生命。近些年, 天然染色体改造技术、染色体设计与合成技术及染色体大片段转移技术等哺乳动物染色体工程的核心技术迅速发展, 并相互交叉融合。同时, 胚胎干细胞被发展为一种新型的哺乳动物合成生物学的底盘细胞, 极大地推动了哺乳动物染色体工程的发展, 催生了一大批用于医药和进化研究的动物模型, 包括模拟唐氏综合征的小鼠模型、产生人类单克隆抗体的工具小鼠以及用于研究染色体重组生物学效应的染色体连接小鼠等, 也极大推动了基础研究和生物医药领域的发展。但是, 因为缺乏对哺乳动物染色体和发育的全面认知, 所以对哺乳动物染色体的操纵仍面临诸多挑战, 不仅包括技术手段, 也包括生物伦理及安全性等。本文将对以上三种哺乳动物染色体工程主要的技术方法及其在多方面的应用进展进行简要综述, 同时对哺乳动物染色体工程的进一步应用与挑战进行展望。

关键词: 染色体工程; 染色体改造; 染色体合成; 染色体转移; 合成生物学; 染色体疾病; 胚胎干细胞

中图分类号: Q81 文献标志码: A

Progress in mammalian chromosome engineering

ZHU Liyu^{1,2}, ZHAO Yulong^{1,2}, LI Wei^{1,3,4}, WANG Libin^{1,3,4}

(¹State Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³Institute for Stem Cell and Regeneration, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ⁴Beijing Institute for Stem Cell and Regenerative Medicine, Beijing 100101, China)

Abstract: Mammalian chromosome engineering refers to its editing through various methods to create animal models for chromosome diseases, pharmaceutical factories of human proteins, dissection of mechanism underlying evolution, and even synthetic life. In recent years, some milestone technologies of mammalian chromosome engineering, such as natural chromosome modifications, chromosome design and synthesis, and chromosome large fragment transfer, have been developed and integrated with each other. At the same time, embryonic stem cells have also been developed as a new chassis for mammalian synthetic biology. Applications of embryonic stem cells to synthetic biology greatly

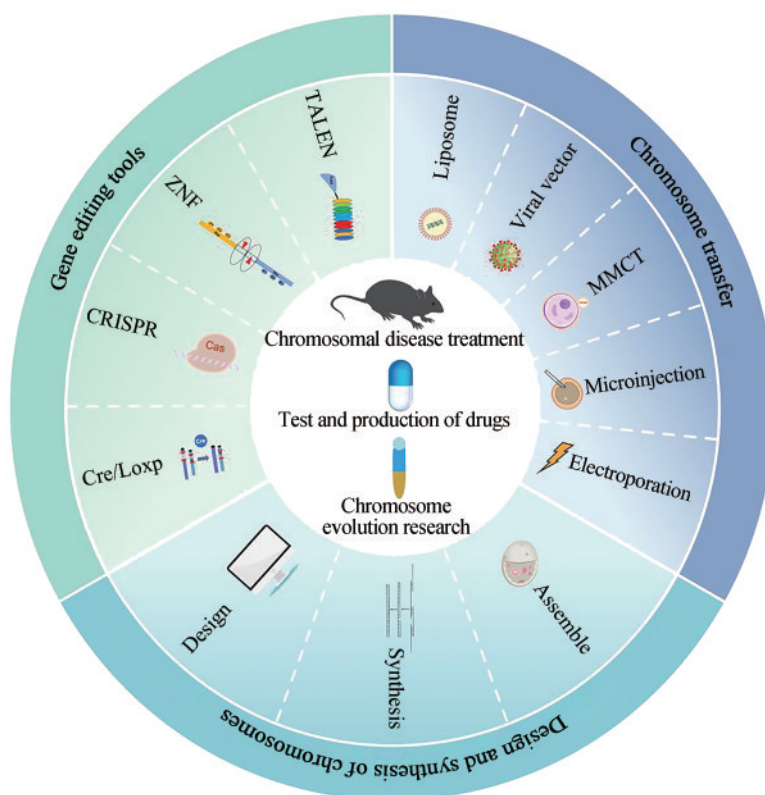
收稿日期: 2022-12-11 修回日期: 2023-02-27

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0903800)

引用本文: 朱骊宇, 赵玉龙, 李伟, 王立宾. 哺乳动物染色体工程研究进展[J]. 合成生物学, 2023, 4(2): 394-406

Citation: ZHU Liyu, ZHAO Yulong, LI Wei, WANG Libin. Progress in mammalian chromosome engineering[J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(2): 394-406

promote the development of mammalian chromosome engineering, giving birth to a large number of animal models for studies on diseases and evolution, including mouse models for Down syndrome, mice producing human monoclonal antibodies, and chromosome-ligation mice to study the biological effects of chromosome recombination. However, the manipulations of mammalian chromosomes are still challenging due to the lack of comprehensive understanding on chromosome composition and mammalian development. In addition to technological challenges, there are issues with bioethics and bio-safety. In this review, we review main technologies and current applications of mammalian chromosome engineering, and we also highlight future applications and challenges of mammalian chromosome engineering.



Keywords: chromosome engineering; chromosome modification; chromosome synthesis; chromosome transfer; synthetic biology; chromosome disease; embryonic stem cells

1 染色体工程的定义

染色体是遗传物质 DNA 的主要载体，染色体的稳定包括染色体数目和结构的稳定，对于个体生存和物种延续来说染色体的稳定性是必需的，染色体的变异往往会导致个体产生疾病。然而，并非所有的染色体变异都是有害的，某

些染色体的变异可能会成为物种进化的重要驱动力，而且物种的进化往往伴随着染色体的变异。因此通过实验技术对物种的染色体进行改造，一方面可以研究染色体变异导致疾病发生的机制，有利于开发染色体异常疾病的诊断及治疗方式；另一方面也可以用于研究染色体变异如何影响物种进化，有利于在分子水平上阐

明物种进化的机制。经过数十年的发展,对于物种染色体的改造技术不断进步,从对简单生物的改造向对复杂生物的改造拓展,从染色体片段向完整染色体拓展,从随机改造向定向改造拓展,逐渐发展为一门完整的学科,称为染色体工程(chromosome engineering)。

染色体工程这一术语最早由Rick和Khush于1966年首次提出^[1]。科学家最早将染色体工程作为一种用于改良农作物遗传性状的育种新技术^[2-4]。随着生物学技术的发展,尤其是合成生物学和基因编辑技术的兴起和发展,人类对于染色体的改造能力大大提升,不仅能够人为增加或者削减染色体数量,改变染色体结构,甚至可以实现完整染色体的合成,创造全新的生命^[5]。现在染色体工程技术除了应用于植物育种,还在真菌和哺乳动物细胞的染色体改造中得到了应用。目前,染色体工程的主要研究内容是不断开发染色体改造的新技术,使染色体的编辑更加简单、更加精确,同时将染色体改造技术应用于药物生产、疾病诊断与治疗、疾病发病机制研究以及物种进化研究,并最终实现生命的改造及创造。

2 染色体工程的技术方法

研究染色体结构与数量上的变异,合成新的染色体甚至新的生命,这些都离不开先进的生物技术。这些技术包括基因编辑技术、染色体片段甚至完整染色体的设计与合成技术、DNA及染色体的转移技术等。下面对染色体工程发展中所涉及的实验技术进行简要的介绍。

2.1 天然染色体改造技术

为了研究染色体的数目和结构对于物种进化以及疾病发生的影响,需要对细胞自身的染色体进行改造,如染色体重排、增加或删减等,这也是染色体工程的核心技术和难点。染色体改造,需要科学家在染色体水平上,对大片段基因甚至是整个染色体进行操作,这就需要利用到基因编辑技术,包括Cre/LoxP、锌指核糖核酸酶(ZFN)、转录激活剂样效应核酸酶(TALEN)和以成簇规

律间隔的短回文重复序列(CRISPR/Cas)等。

2.1.1 条件性基因敲除系统

条件性基因敲除是将对某个基因的修饰限制在某个发育阶段或某一类细胞中,实现时空特异性修饰。目前的条件性敲除系统主要包括来自于噬菌体的Cre/LoxP、Gin/Gix系统以及来自酵母的Flp/FRT和R/RS系统,其中应用最多的就是Cre/LoxP系统。

Cre/LoxP重组酶技术是1981年Sternberg和Hamilton^[6]开发的一种条件性基因敲除技术。Cre重组酶可以特异性识别LoxP序列,介导两个LoxP位点之间的序列删除或重组,通过改变两个LoxP序列的位置和方向,实现对大片段染色体的改造。而此技术应用于哺乳动物染色体操纵始于20世纪90年代,Allan Bradley等^[7-9]利用Cre/LoxP系统对小鼠染色体进行了缺失、倒位和重复等一系列操作。

2.1.2 锌指核酸内切酶技术(ZFNs)

锌指核糖核酸酶是一种人工改造的核酸内切酶,由两部分组成:DNA识别结构域和源于FokI限制性内切酶的核酸酶结构域^[10]。其工作原理就是通过人工设计合成8~10个锌指结构域用于识别靶序列,将这些锌指结构域与核酸内切酶结合,就可以将特异序列的基因切开,为了形成DBS,一般需要两个ZFN分别识别DNA两条链。这也导致其设计复杂,不易筛选,脱靶率高,耗时耗力^[11-12]。Kazuki等^[13]通过ZFN与微细胞介导的染色体转移法相结合,建立了携带21三体(Ts21)和GATA结合蛋白1短亚型(GATA1s)的人多能干细胞系。

2.1.3 转录激活因子样效应蛋白核酸酶(TALEN)技术

TALEN的结构与ZFN很相似,与ZFN一样,TALEN也具有FokI核酸酶结构域,其DNA识别结构域是TALEN蛋白,TALEN由33~35个氨基酸重复序列串联阵列组成,每个重复序列可以识别一个碱基对^[14]。与ZFN相比,TALEN设计更为简单,构建更为方便,特异性更好,对细胞毒性和脱靶率都比ZFN低,因此TALEN技术受到大家青睐。Jaenisch实验室^[15]利用TALEN技术在iPSC和人的ES细胞中实现了基因敲入;夏庆友团队^[16]

利用两对TALEN在家蚕中实现了800 bp染色体片段的敲除。

2.1.4 规律成簇间隔短回文重复序列(CRISPR)技术

CRISPR/Cas系统是一种天然的细菌防御系统,用于抵御噬菌体的侵染。该系统通过将外来短核苷酸序列整合到CRISPR位点,然后通过转录加工成crRNA和tracrRNA,用于识别特异的DNA序列,其可以与核酸酶Cas相融合,实现对靶序列的切割^[17]。Doudna等^[18]通过将crRNA和tracrRNA融合形成单链引导的RNA(sgRNA),并且可以改变sgRNA上一小段序列,来靶向不同的DNA序列。与ZFN和TALEN相比,CRISPR/Cas技术操作简单、效率高、特异性好,因此在染色体工程领域被广泛应用。2017年杨辉团队^[19]利用CRISPR/Cas技术在小鼠ESCs中实现了整条染色体敲除;2018年,覃重军团队与其合作者^[20]利用CRISPR/Cas9将酿酒酵母单倍体细胞中16条染色体融合为一条,创造只含有一条染色体的酵母。2022年作者所在团队^[21]利用CRISPR/Cas技术首次在哺乳动物小鼠中实现了完整染色体的重排,成功将小鼠1号与2号、4号与5号染色体进行连接,创造了具有全新核型的小鼠。随后,李劲松团队和周金秋团队^[22-23]也分别通过CRISPR/Cas技术实现了小鼠染色体的连接。

另外,还有一些其他的基因编辑工具,例如巨核酸酶,还有基于CRISPR/Cas系统开发的BE和PE系统等,尤其是PE系统,在大片段染色体操作方面有很大的发展前景^[24-25]。综合来看,目前用于染色体水平上的编辑工具和方法还有很大的局限性,已有的方法在编辑效率上仍存在较大的问题。但随着基因编辑技术的发展,未来一定会有更多、更高效的染色体编辑工具被应用到哺乳动物染色体改造中。

2.2 染色体设计与合成技术

合成基因组学不仅是合成生物学领域前沿热点,也是染色体工程的关键技术。合成基因组学专注于从零开始构建基因组片段甚至是整个基因组^[26],通过对天然的遗传物质进行设计和改造,

甚至是对其进行从头合成,获得重构的或者非天然的生命体,实现“人造生命体”^[27]。

2.2.1 合成染色体的设计

合成染色体的设计主要包括三个原则:简化,扩展和重构^[28]。基因组简化原则是探索在不同条件下支持生命活动最少的基因集合以及其功能,主要包括了基因水平的简化和非基因区间的简化^[29]。基因组扩展原则就是在天然基因组的基础上,增加新的基因,赋予生物新的功能与表型^[30]。基因组的重构设计原则根据对天然基因组的设计再造维度从小到大,包括:密码子替换,基因表达元件模块化,基因簇重新排列和染色体结构重排等^[31-32]。除此之外,对于重构基因组的表观遗传改造也是必须考虑的因素。

早期的染色体合成不会对天然染色体进行大规模改造。1970年,科学家合成了77 bp的酵母丙氨酸tRNA基因^[33],这是人类第一次实现基因的人工合成。2002年,7.5 kb的脊髓灰质炎病毒cDNA被合成出来,并且产生了具有传染性的活病毒,这是人类合成的第一个病毒基因组^[34]。2005年,科学家对T7噬菌体基因组中约12 kb片段进行重新设计、合成,并将其转移到T7噬菌体中,获得了人工改造的T7.1噬菌体^[35]。随后,越来越多的病毒基因组相继被合成出来^[36-38],而科学家对于基因组的合成追求并未止步于病毒基因组,他们开始向拥有更加复杂基因组的细菌挑战。2008年,J. Craig Venter团队^[39]利用全化学合成的寡核苷酸,首次对整个支原体基因组进行了合成组装,但并没有获得活细胞。随后,他们对1.08 Mb的蕈状支原体基因组进行全合成,并将其成功转移到山羊支原体中,这是第一个完全由人类制造并能够自我复制的生物,他们将其命名为JCVI-syn1.0^[40]。之后,合成基因组学开始了设计-合成阶段,2016年,Venter团队^[29]通过计算机辅助设计的方式对JCVI-syn1.0进行合理删减,将其基因组缩减至531 kb,获得了迄今为止能够自我复制的最小细菌生物——JCVI-syn3.0。

科学家对于基因组的合成并不局限于对于已有的生物的模拟,他们尝试着创造全新的并不存在的生命甚至改变生命的规则。2016年,George Church团队^[31]创造了一种称为“rE.coli-57”的细

菌,其中7个密码子被删除,并用其同义密码子替代。2017年,Pamela Silver领导的团队^[41]对沙门氏菌菌株LT2基因组中约20万个碱基进行重编码,消除了基因组上特定的亮氨酸密码子,以防止病原微生物之间的基因转移。2009年,美国科学家Boeke^[42]提出“人工合成酵母基因组计划”(Sc2.0),旨在对真核生物酵母的基因组进行全化学合成。目前,已经完成了酿酒酵母II号、III号、V号、VI号、X号和XII号这6条染色体从头设计与化学全合成^[43-48],获得与普通酿酒酵母高度一致的人工合成型酵母。对基因组所有的设计都旨在提高遗传的灵活性和基因组的稳定性^[32, 49-50]。虽然现在可以通过从头设计和化学合成的方法对简单的真核生物的染色体进行合成,但是将合成基因组技术应用于基因组组成更为复杂的真核生物如高等植物或者动物仍然极具挑战性。

2016年,由国际科学家联合在*Science*提出“人类基因组编写计划”(Human Genome Project-Write, HGP-Write),旨在从头设计合成人类及其他物种大型基因组,这必将为解决复杂真核生物中基因组的设计合成提供可行的方案^[51]。

2.2.2 染色体合成与组装技术

1955年,Michelson等^[52]首次实现了用3',5'-磷酸二酯键将两个核苷酸连接在一起。1981年,Beaucage等^[53]实现了寡聚核苷酸的自动连接。在此基础上,形成了第一代DNA合成技术——柱式合成法,就是将DNA固定在固相载体上,实现连接。这种方法错误率低,但是通量小、成本高。1991年,固相亚磷酸胺化学合成法出现^[54],逐渐形成了芯片合成法,也就是第二代化学合成技术。与第一代相比虽然通量增加、成本降低,但存在可合成长度短、错误率高、寡核苷酸库成分复杂等问题。第三代DNA合成技术是超高通量合成技术,即半导体结合电化学法。该法通量高、成本低,但具有超高技术门槛和专利壁垒。目前最新一代DNA合成技术是酶促合成技术,主要包括微阵列法、酵母体内DNA合成法、连接介导DNA合成法,但目前技术还处于研发阶段。DNA合成技术的更新迭代对于促进染色体合成技术发展具有重大意义。

DNA组装技术种类很多,按组装位置来分主

要是体外组装和胞内组装两种方法。体外组装主要包括BioBrick、Golden Gate和Gibson方法。BioBrick和Golden Gate法都是利用II型限制性内切酶进行识别、切割和连接^[55-56]。这两种方法操作简单,但是受酶切位点的限制,可连接的片段小;Gibson法则是利用核酸外切酶产生黏性末端,再利用连接酶连接,避免了酶切位点的限制,但是成本高,该法可以实现几万到几十万碱基对的片段连接^[57]。对于更长的片段,则需要在胞内进行。胞内组装的方法主要分为位点特异性重组和同源重组两种。位点特异性重组主要包括Cre/LoxP和attB/P等,将大片段DNA整合到染色体的特定位置,与限制酶类似,这种方法受到位点限制^[58-59]。同源重组则是利用两端同源序列进行整合,在原核细胞中常用的是大肠杆菌的Red/ET系统,同源重组效率高,通常还会利用CRISPR/Cas在同源处切割,可以进一步提高成功率^[60-61]。真核生物中酿酒酵母具有强大的同源重组能力,因此在合成基因组学作为组装大片段DNA和分子构建的工具被广泛使用^[62]。

2.3 染色体大片段转移技术

基因组或者染色体合成之后,如果要使其发挥功能,我们需要将合成的基因组或者染色体引入到受体细胞中,因此如何实现超大片段DNA的转移是实现染色体工程的又一关键技术。为此科学家开发出了多种DNA转移的方法,目前已有的转移方法主要有三类:物理转移法、化学转移法和生物转移法。

2.3.1 物理转移法

物理转移法,主要包括电转染和显微注射法等^[63-65]。

电转染主要是通过电击,使得细胞膜破裂开孔,在瞬间强大的电场内,带电的DNA分子可以通过类似电泳的方式转移到细胞内,但是由于磷脂双分子层的电阻很大,电流无法进入到细胞质内,因此对细胞毒性比较小。但是一般的电转染方法无法将外源的大片段染色体转移进细胞核中,LONZA核转染技术不依赖于细胞有丝分裂,不受细胞增殖的影响,可直接将外源基因导入到细胞核中^[66]。2021年,

Boeke 团队^[63]利用 LONZA 的核转染技术将 101 kb 的基因组电转至 A17iCre 小鼠胚胎干细胞中。

显微注射法是利用显微操作仪将外源基因片段直接注射到目的细胞内。通过“破坏”细胞膜结构，将基因片段转移到目的细胞内^[67]。与电转染相比，显微注射法的通量较低。1993 年，Olson 团队^[65]利用显微注射技术，将 200~500 kb 完整的 YAC DNA 片段微量注射到哺乳动物细胞中。

2.3.2 化学转移法

化学转移法，主要包括用脂质体、阳离子聚合物等介导的 DNA 转移^[68-70]。

脂质体转移法是目前比较成熟高效的方法，主要利用了脂质体表面带正电荷的特性，其可以与带负电荷的 DNA 相互结合，形成脂质体-DNA 复合物，再与细胞膜融合或者通过内吞的方式，将 DNA 带到细胞内。但与物理转移法相比，脂质材料对于细胞有毒性。1999 年，Z. Larin 团队^[68]利用脂质体转染将多聚 L-赖氨酸(PLL)和聚乙烯亚胺(PEI)压缩的 2.3 Mb 的 YAC 转移到 HT1080 细胞中。2001 年，Jose 等^[69]利用脂质体将 404 kb 的 HAC 转移到 HPRT 缺陷型 HT1080 细胞中。

2.3.3 生物转移法

生物转移法主要是以病毒、微细胞介导的染色体转移 (MMCT) 技术和 PEG 介导的酵母原生质体和哺乳动物细胞融合技术等^[71-73]。

MMCT 是基于目标细胞和来自染色体供体细胞的微细胞的融合^[71]。首先，用秋水仙胺处理染色体供体细胞，以阻止纺锤体的形成。长时间的秋水仙胺处理可诱导大量的微核，每个微核包含一条到多条染色体。然后利用细胞松弛素 B 处理微核细胞，通过离心将微核分离出来。由于微细胞的质膜保持完整，微细胞与靶细胞的融合允许染色体进入靶细胞。最后通过药物筛选杂交细胞。1999 年，Oshimura 团队^[74]利用 MMCT 技术，将人类染色体转移到小鼠 A9 细胞系中，使得每个细胞内含有一条人类的染色体，制备了用于进行染色体转移的细胞库。2005 年，Fisher 研究组^[75]利用 MMCT 技术，将人类 21 号染色体导入到小鼠胚胎干细胞中，并通过生殖系嵌合的方式得到了唐氏综合征小鼠的模型，命名为 TC1 小鼠。

病毒载体就是利用其传送基因组进入细胞的

机制，将目的基因包装在病毒内，对细胞进行转染。目前的病毒载体主要有逆转录病毒、腺病毒和慢病毒^[76]。但是病毒载体的容量比较小，而且操作烦琐，容易出现生物安全问题。2015 年，Monaco 团队^[77]利用 HSV-1 将一段 152 kb 大小的片段转移到人的胚胎干细胞中。

酿酒酵母具有很强的同源重组能力，是人工合成染色体组装的重要工具。利用酵母的原生质体与哺乳动物细胞融合，可以实现大片段染色体的转移。过程主要分为三步：①将要转移的片段转移到酵母细胞内进行包装；②将酵母细胞的细胞壁酶解去除；③利用 PEG 介导将酵母原生质与目的细胞融合。这种方法可以实现转移的片段大小达到 Mb 级，但实验操作烦琐、效率低，而且也存在酵母基因随机插入到动物细胞上的风险。2013 年，Li 等^[78-79]在酿酒酵母中组装了 1.4 Mb 的人 T 细胞受体基因，利用 PEG 介导融合，将其转移到了小鼠胚胎干细胞中，获得了人源化小鼠。2017 年，Brown 等^[73]利用秋水仙素等处理细胞，将细胞停留在核膜消失的 M 期，再与酵母原生质体融合，将 1.1 Mb 的 YAC 转移到 HEK293 细胞内，并将效率提高了近 300 倍。

3 哺乳动物染色体工程的应用

染色体的改变可以分为两类：一是数量上的改变，包括染色体数目的增多或减少；二是结构上的改变，缺失、易位、倒位、插入、重复和环状染色体等^[17]。染色体数目改变的原因既有有丝分裂或者减数分裂的异常导致染色体的不均等分配，也有染色体的融合或者断裂导致新的染色体形成。而染色体结构的改变主要是由于 DNA 发生断裂之后修复过程中发生了异常，从而产生了缺失、倒位和易位等改变^[80-81]。染色体的改变对于个体来说一般是有害的，会导致很多种人类疾病的发生，如 DiGeorge 综合征、猫叫综合征、急性淋巴细胞白血病、唐氏综合征、Smith-Magenis 和 Potocki-Lupski 综合征以及不孕不育等^[13, 82-86]。但是染色体的改变在物种进化过程中又扮演了重要的角色，在大量物种进化中均可以看到染色体的改变，最为大家所熟知的是，灵长类动物进化过程中，两条染色体通过罗伯逊易位融合形成了人

类的2号染色体，而这两条染色体在黑猩猩中仍然是分离的，因此人类有46条染色体，黑猩猩却有48条染色体^[87]。同时染色体作为DNA的载体可以携带大量的遗传信息，如重要的致病基因、抗体可变区片段以及可以产生特定细胞因子的基因片段等等。由此可见，研究染色体的改变对于疾病研究、进化研究以及医药产业发展都具有重要的意义。

研究哺乳动物的染色体改变需要依赖染色体工程的各项技术，随着新技术的出现，对于染色体改变的研究也不断向前推进，对于染色体改变的模拟也逐渐从小片段向大片段甚至是完整染色体推进，从对于自身染色体的改造向引入外源染色体的改造拓展（图1）。

3.1 染色体片段重组构建疾病模型

对染色体大片段的操纵首先是围绕自身的染

色体展开的，20世纪90年代，Allan Bradley等^[7-9, 82]基于Cre/LoxP系统的染色体工程技术对小鼠染色体进行了一系列操作。1995年，他们通过连续将LoxP打靶到小鼠胚胎干细胞的染色体位点，然后用Cre诱导重组，使小鼠11号染色体3~4 cM（centimorgan，遗传距离单位）染色体发生倒位、重复和缺失，首次将基因组上20 kb的基因操作拓展到了3~4 cM，同时产生了具有明确区段单倍体区域的小鼠，它们可以用于隐性基因的遗传筛选^[7]。1999年，他们开发了小鼠平衡器染色体，利用Cre/LoxP在小鼠11号染色体上的Trp53（也称为p53）基因和Wnt3基因之间产生24 cM倒置并且带有标记毛色的基因，这种倒置导致倒置纯合个体死亡，产生自我维持的杂合子种群，这种策略可以用于种群维持和染色体的大规模诱变筛选^[8]。2000年，他们在小鼠胚胎中利用重组逆转录病毒产生几千到几百万碱基的嵌套染色体缺失，同时将嵌套位点拓展到全染色体区域，小鼠

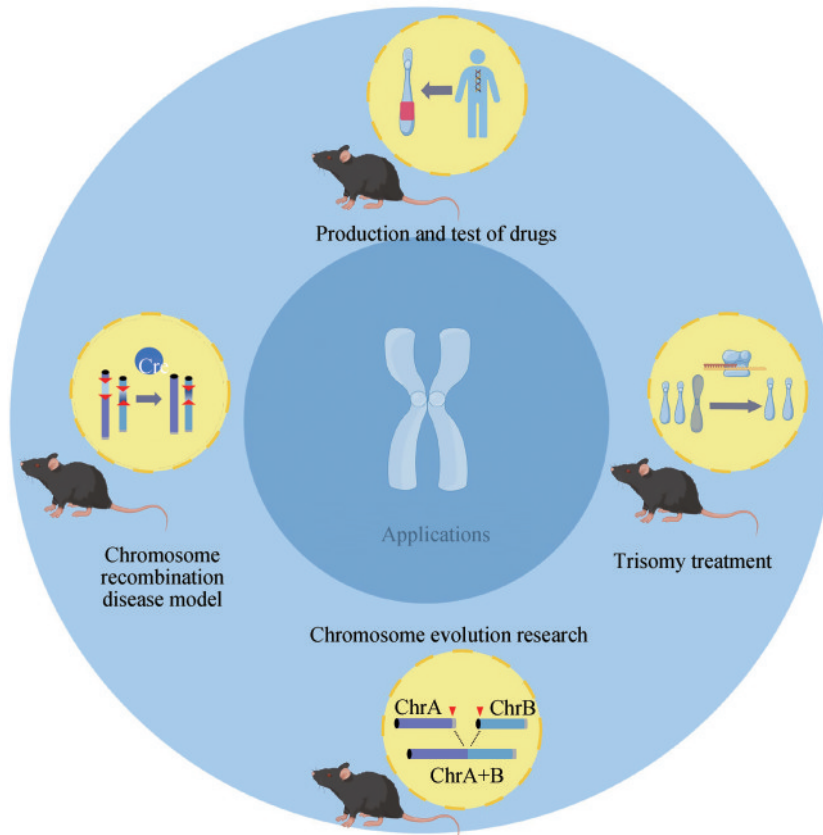


图1 哺乳动物染色体工程应用（本图利用FigDraw绘图工具绘制）

Fig. 1 Applications of mammalian chromosome engineering(This figure was drawn by FigDraw)

诱导的单次染色体缺失可以模拟人类缺失综合征，如DiGeorge综合征，嵌套缺失区域的候选基因进行疾病基因的功能鉴定以及染色体区域的功能分析^[9, 82]。

3.2 染色体融合研究染色体重组的生物学效应

完整染色体融合在疾病和进化过程中是极为常见的，为了研究染色体融合如何影响染色体空间结构、细胞的基因表达、表型以及动物的表型，科学家通过基因编辑的方式对染色体进行融合，并研究其生物学效应。2022年，作者的研究团队^[21]首次利用CRISPR/Cas技术，在小鼠细胞中实现了完整染色体的可编程连接，连接的方式为头尾相连，即一条染色体的端粒与另一条染色体的着丝粒位置相连接，端粒与着丝粒的融合模拟了自然界物种进化过程中发生的串联融合现象，然后通过单倍体注射的方式首次获得了完整染色体连接的小鼠。这项研究探讨了染色体重组对于细胞倍性维持、动物表型、染色体三维结构以及物种生殖隔离建立的影响，极大地拓展了染色体工程技术的应用范围，为利用染色体工程进行进化研究提供了重要参考。之后来自中国科学院生物化学和细胞生物学研究所的李劲松团队和周金秋团队^[22-23]利用CRISPR/Cas技术，分别通过着丝粒与着丝粒融合以及着丝粒与端粒融合的方式实现了染色体的连接，采用单倍体注射的方式得到了染色体连接的小鼠，通过染色体空间结构分析联合基因表达对染色体连接的生物学效应进行了分析。完整染色体重排技术的建立为研究染色体重组的生物学效应提供了有效路径，极大地推动哺乳动物染色体工程的发展。

3.3 染色体敲除实现染色体疾病的治疗

三体综合征是常见的染色体异常，为了对染色体的数目进行纠正，科学家开发了完整染色体敲除技术，用来纠正非整倍体细胞中整条染色体的基因过量。靶向染色体消除可以通过将相反方向的LoxP位点插入靶向染色体，然后进行Cre介导的姐妹染色单体重组^[88]，或者将TKNEO转基因插入靶向染色体的一个拷贝中，然后通过自发性

染色体丢失对染色体缺失的克隆进行药物选择来实现靶向染色体消除^[89]。为了使染色体的删除更为简单，2017年中国科学院神经研究所杨辉团队^[19]利用CRISPR/Cas9技术在靶染色体上的多个位点进行切割，实现单条染色体的消除，并成功将唐氏综合征模型小鼠的ESCs中的人类21号染色体去除。这些研究提示了染色体工程技术在未来可能应用于染色体疾病的治疗。

3.4 染色体片段人源化制备药物生产测试工厂

MMCT技术的开发使得科学家可以将外源的染色体大片段甚至是完整的染色体导入到受体细胞中，同时利用干细胞技术获得携带有这些大片段的动物。Tomizuka等^[90]首次完成将人类染色体引入到小鼠胚胎干细胞以及小鼠。他们开发了一个10 Mb染色体片段，其包含2号和14号染色体上的IgK和IgH基因，使小鼠产生人类单克隆抗体^[91]。类似的技术应用于奶牛，从超免疫牛中产生人免疫球蛋白和抗原特异性人多克隆抗体^[92]。除了制备人源化抗体，科学家利用相似的手段制备了CYP3A人源化小鼠。CYP3A酶是人肝脏和小肠中含量最高的P450同工酶，具有代谢约50%的医疗药物的能力，然而，CYP3A酶因物种而异，所以小鼠和大鼠等动物模型不能反映人类CYP3A相关的药代动力学。因此，人源化CYP3A模型动物可用于预测人类新药的CYP3A相关药代动力学和毒性。完全人源化的CYP3A小鼠表现出性别、组织和发育阶段特异性CYP3A表达，与人类相似^[93]。人源化的CYP3A小鼠也具有在人类中观察到的CYP3A代谢活动。此外，人源化CYP3A小鼠胚胎的全胚胎培养物显示出沙利度胺的致畸作用，这在啮齿动物中是没有的。因此，人源化的CYP3A小鼠有望通过预测CYP3A相关的药物代谢来用于药物筛选，这是染色体工程促进人源化动物产生的结果^[94]。

2019年，Kazuki等^[95]构建了人源化药物糖基化代谢的大鼠模型，分别将UGT2（约1.5 Mb）和CYP3A（约700 kb）通过MAC成功引入大鼠，再通过这种跨染色体大鼠与内源直系同源基因缺失的大鼠结合，得到人源化大鼠模型。这种模型可

以改善对人类药代动力学和药物间相互作用的预测, 以及用于基础研究与药物发现。

此外, 科学家通过MMCT技术将人的完整的21号染色体转移到小鼠的胚胎干细胞中, 然后通过胚胎嵌合的方式得到携带人21号染色体的小鼠, 成功模拟了人类的唐氏综合征, 这些小鼠出现了人类唐氏综合征患者表征, 包括心脏异常和行为障碍等, 同时这个小鼠可以通过交配的方式将21号染色体进行有效的传递, 这一模型的建立, 为进行唐氏综合征的药物筛选测试、开发新型治疗方法, 提供了理想的模型^[75]。

4 展 望

染色体工程技术的快速发展为解决染色体异常导致的疾病提供了新的参考模型, 例如唐氏综合征小鼠模型的建立为研究唐氏综合征的病因提供了理想的模型, 大大提高了染色体疾病治疗的可能性。同时染色体工程技术的发展为染色体片段的人源化提供了可行方案, 通过HAC或者染色体片段的导入结合基因敲除技术, 可以快速地获得染色体大片段人源化的动物, 从而用于药物测试以及药物的生产。染色体工程技术的发展也为物种进化和生殖隔离提供了重要的研究方案, 完整染色体的融合可以模拟进化中的串联融合和罗伯逊易位, 而染色体片段的编辑可以模拟倒位、易位等染色体变化对于物种进化的影响。由此可见, 哺乳动物染色体工程的发展对于疾病研究、进化研究和药物的研发都具有重要的价值。

染色体工程技术之间的交叉融合, 其他生化和细胞技术的发展, 以及新型的染色体编辑技术的开发是推动染色体工程继续发展的核心推动力。在低等生物的研究中DNA合成技术与染色体的转移技术的交叉催生了第一个可自我复制的人造生命的产生。DNA合成技术与计算机辅助设计技术的融合则催生了最小基因组的诞生。而在哺乳动物染色体工程领域, 仍然面临三方面的挑战:

一是哺乳动物的基因组庞大、复杂, 尚未全面彻底地解析清楚, 除此之外染色体本身在细胞核内并非线性排列, 哺乳动物染色体具有复杂的空间构象, 人为编辑染色体是否会改变染色体本

身的空间结构, 是否会影响发育、基因的表达及细胞分化还有待研究。例如, 作者所属的研究团队在对17号染色体连接的动物进行分析时, 发现17号染色体上的基因*Capn11*可能受到远程调控的影响而沉默, 进而导致小鼠产生抑郁表型。

二是缺少对染色体进行编辑的工具与方法, 虽然现在CRISPR/Cas系统可以对染色体进行编辑, 但是染色体编辑的效率极低, 其特异性和效率都亟待提高。另外, 现在哺乳动物染色体的从头合成受限于片段组装的技术方法, 酵母细胞很难实现哺乳动物染色体级别的片段的组装, 需要开发能够实现超大哺乳动物染色体片段组装的工具细胞。

三是缺乏哺乳动物染色体工程的底盘细胞, 对现有的胚胎干细胞进行操作面临两个问题: 胚胎干细胞基因组本身的印迹丢失; 二倍体胚胎干细胞只能通过生殖系嵌合传递遗传操作, 无法一步得到遗传改造的动物。根据我们的研究结果, 印记固定的单倍体胚胎干细胞可以作为一种新型的底盘细胞, 来进行哺乳动物染色体工程研究, 实现稳定、高效、快速得到染色体编辑动物。

未来计算机辅助设计、DNA合成技术和染色体转移技术等的交叉融合可能会催生新的生命, 离真正实现人造复杂染色体、人造复杂生命, 也必定不会遥远。然而, 这必将面临一系列的生命伦理与生物安全问题。首先, 科学家们必须意识到哺乳动物染色体工程所涉及的新领域将重塑人们对于生命的理解。其次, 伦理监督机构对于涉及到合成生物学的实验及实验产物需要严格管理、严格审批, 最大程度地规避风险。最后, 合成生物学的所有从业人员需要时刻遵守2021年7月达成的《天津指南》, 严格规范自己的实验行为。

综上所述, 哺乳动物的染色体工程技术已经进入了新纪元。作为合成生物学的新兴板块, 这种复杂的操纵哺乳动物大片段染色体的工程技术, 在当前的基因组时代展示了独特的优势。使用该技术在哺乳动物基因组的功能分析、开发人类疾病的动物模型以及自然进化方面的独特优势已经得到认可, 并将在未来继续发挥作用。

符号说明

AttB/P—附着位点B/P(attachment site B/P)
 BE—碱基编辑(base editing)
 Cas—CRISPR相关蛋白(CRISPR-associated)
 cDNA—互补DNA(complementary DNA)
 Cre—环化重组酶(cyclization recombination enzyme)
 CRISPR—规则成簇间隔短回文重复(clustered regulatory interspaced short palindromic repeat)
 crRNA—CRISPR相关核糖核酸(CRISPR RNA)
 CYP—细胞色素P450蛋白(cytochrome P450 proteins)
 ESC—胚胎干细胞(embryonic stem cells)
 Flp/FRT—翻转酶/翻转酶识别靶标(flippase/flippase recognition target)
 GP-Write—基因组编写计划(Genome Project-Write)
 HAC—人类人工染色体(human artificial chromosome)
 HPRT—次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(hypoxanthine phosphoribosyltransferase)
 HSV—疱疹病毒(herpes viruses)
 Ig—免疫球蛋白(immunoglobulins)
 iPSC—诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells)
 JCVI—克雷格·文特尔研究所(J. Craig Venter Institute)
 LoxP—LoxP位点(locus of X-overP1)
 MAC—小鼠人工染色体(mouse artificial chromosome)
 MMCT—微细胞介导的染色体转移(micro-cell mediated chromosome transfer)
 PE—先导编辑(prime editing)
 PEG—聚乙二醇(polyethylene glycol)
 PEI—聚乙烯亚胺(xpolyethyleneimine)
 PLL—多聚L-赖氨酸(poly-L-lysine)
 sgRNA—向导RNA(single guide RNA)
 TALEN—转录激活因子样效应蛋白核酸酶(transcription activator-like effector nuclease)
 tracrRNA—反式激活crRNA(trans-activating crRNA)
 tRNA—转运RNA(transfer RNA)
 UGT2—UDP葡萄糖醛酸基转移酶家族2(UDP glucuronosyltransferase family 2)
 Wnt—Wnt基因(Wingless/Integrated)
 YAC—酵母人工染色体(yeast artificial chromosomes)
 ZFN—锌指核糖核酸酶(zinc-finger nuclease)

参考文献

- [1] 徐赫鸣, 谢泽雄, 刘夺, 等. 酿酒酵母染色体设计与合成研究进展[J]. 遗传, 2017, 39(10): 865-876.
 XU H M, XIE Z X, LIU D, et al. Design and synthesis of yeast chromosomes[J]. Hereditas, 2017, 39(10): 865-876.
- [2] 米福贵, 云锦凤, 逯晓萍. 植物染色体工程与育种[J]. 中国草地, 1999, 21(2): 64-67, 78.
 MI F G, YUN J F, LU X P. Chromosomal engineering and plant breeding[J]. Grassland of China, 1999, 21(2): 64-67, 78.
- [3] 李炳林, 李宏运, 安泽伟, 等. 棉花染色体工程育种[J]. 山西农业大学学报, 2001, 21(1): 1-6.
 LI B L, LI H Y, AN Z W, et al. Cotton chromosome engineering breeding[J]. Journal of Shanxi Agricultural University, 2001, 21(1): 1-6.
- [4] 纪军. 染色体工程改良小麦品质的研究[D]. 石家庄: 中国科学院石家庄农业现代化研究所, 2001.
 JI J. Study on improving wheat quality by chromosome engineering[D]. Shijiazhuang: Shijiazhuang Institute of Agricultural Modernization, Chinese Academy of Sciences, 2001.
- [5] 丁明珠, 李炳志, 王颖, 等. 合成生物学重要研究方向进展[J]. 合成生物学, 2020, 1(1): 7-28.
 DING M Z, LI B Z, WANG Y, et al. Significant research progress in synthetic biology[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(1): 7-28.
- [6] STRICKLETT P K, NELSON R D, KOHAN D E. Site-specific recombination using an epitope tagged bacteriophage P1 Cre recombinase[J]. Gene, 1998, 215(2): 415-423.
- [7] RAMIREZ-SOLIS R, LIU P T, BRADLEY A. Chromosome engineering in mice[J]. Nature, 1995, 378(6558): 720-724.
- [8] ZHENG B H, SAGE M, CAI W W, et al. Engineering a mouse balancer chromosome[J]. Nature Genetics, 1999, 22(4): 375-378.
- [9] SU H, WANG X Z, BRADLEY A. Nested chromosomal deletions induced with retroviral vectors in mice[J]. Nature Genetics, 2000, 24(1): 92-95.
- [10] BITINAITE J, WAH D A, AGGARWAL A K, et al. *FokI* dimerization is required for DNA cleavage[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(18): 10570-10575.
- [11] LAM K N, VAN BAKEL H, COTE A G, et al. Sequence specificity is obtained from the majority of modular C₂H₂ zinc-finger arrays[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(11): 4680-4690.
- [12] UL AIN Q, CHUNG J Y, KIM Y H. Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN[J]. Journal of Controlled Release, 2015, 205: 120-127.
- [13] KAZUKI Y, YAKURA Y, ABE S, et al. Down syndrome-associated haematopoiesis abnormalities created by chromosome transfer and genome editing technologies[J]. Scientific Reports, 2014, 4: 6136.
- [14] MAK A N S, BRADLEY P, CERNADAS R A, et al. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target[J]. Science, 2012, 335(6069): 716-719.
- [15] HOCKEMEYER D, WANG H Y, KIANI S, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(8): 731-734.
- [16] MA S Y, ZHANG S L, WANG F, et al. Highly efficient and specific genome editing in silkworm using custom TALENs[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45035.
- [17] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR

- provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [18] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [19] ZUO E W, HUO X N, YAO X, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted chromosome elimination[J]. *Genome Biology*, 2017, 18(1): 224.
- [20] SHAO Y Y, LU N, WU Z F, et al. Creating a functional single-chromosome yeast[J]. *Nature*, 2018, 560(7718): 331-335.
- [21] WANG L B, LI Z K, WANG L Y, et al. A sustainable mouse karyotype created by programmed chromosome fusion[J]. *Science*, 2022, 377(6609): 967-975.
- [22] ZHANG X M, YAN M, YANG Z H, et al. Creation of artificial karyotypes in mice reveals robustness of genome organization[J]. *Cell Research*, 2022, 32(11): 1026-1029.
- [23] WANG Y A, QU Z, FANG Y, et al. Chromosome territory reorganization through artificial chromosome fusion is compatible with cell fate determination and mouse development[J]. *Cell Discovery*, 2023, 9: 11.
- [24] KOMOR A C, KIM Y B, PACKER M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [25] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.
- [26] 王会, 戴俊彪, 罗周卿. 基因组的“读-改-写”技术[J]. *合成生物学*, 2020, 1(5): 503-515.
- WANG H, DAI J B, LUO Z Q. Reading, editing, and writing techniques for genome research[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2020, 1(5): 503-515.
- [27] KOLISIS N, KOLISIS F. Synthetic biology: old and new dilemmas-the case of artificial life[J]. *Biotech*, 2021, 10(3): 16.
- [28] 何博, 付宗恒, 吴毅, 等. 哺乳动物合成基因组学研究进展[J]. *合成生物学*, 2022, 3(1): 78-97.
- HE B, FU Z H, WU Y, et al. Research progress of synthetic mammalian genomics[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2022, 3(1): 78-97.
- [29] HUTCHISON C A, CHUANG R Y, NOSKOV V N, et al. Design and synthesis of a minimal bacterial genome[J]. *Science*, 2016, 351(6280): aad6253.
- [30] HOSHIKA S, LEAL N A, KIM M J, et al. Hachimoji DNA and RNA: a genetic system with eight building blocks[J]. *Science*, 2019, 363(6429): 884-887.
- [31] OSTROV N, LANDON M, GUELL M, et al. Design, synthesis, and testing toward a 57-codon genome[J]. *Science*, 2016, 353(6301): 819-822.
- [32] HOCHREIN L, MITCHELL L A, SCHULZ K, et al. L-SCRaMble as a tool for light-controlled Cre-mediated recombination in yeast[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1931.
- [33] AGARWAL K L, BÜCHI H, CARUTHERS M H, et al. Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast[J]. *Nature*, 1970, 227(5253): 27-34.
- [34] CELLO J, PAUL A V, WIMMER E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template[J]. *Science*, 2002, 297(5583): 1016-1018.
- [35] CHAN L Y, KOSURI S, ENDY D. Refactoring bacteriophage T7[J]. *Molecular Systems Biology*, 2005, 1: 2005.0018.
- [36] DORMITZER P R, SUPHAPHIPHAT P, GIBSON D G, et al. Synthetic generation of influenza vaccine viruses for rapid response to pandemics[J]. *Science Translational Medicine*, 2013, 5(185): 185ra68.
- [37] OLDFIELD L M, GRZESIK P, VOORHIES A A, et al. Genome-wide engineering of an infectious clone of herpes simplex virus type 1 using synthetic genomics assembly methods[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(42): E8885-E8894.
- [38] NOYCE R S, LEDERMAN S, EVANS D H. Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0188453.
- [39] GIBSON D G, BENDERS G A, ANDREWS-PFANNKOCHE C, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a mycoplasma genitalium genome[J]. *Science*, 2008, 319(5867): 1215-1220.
- [40] GIBSON D G, GLASS J I, LARTIGUE C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome[J]. *Science*, 2010, 329(5987): 52-56.
- [41] FREDENS J, WANG K H, DE LA TORRE D, et al. Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome[J]. *Nature*, 2019, 569(7757): 514-518.
- [42] DYMOND J S, RICHARDSON S M, COOMBES C E, et al. Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design[J]. *Nature*, 2011, 477(7365): 471-476.
- [43] MITCHELL L A, WANG A, STRACQUADANIO G, et al. Synthesis, debugging, and effects of synthetic chromosome consolidation: syn VI and beyond[J]. *Science*, 2017, 355(6329): eaaf4831.
- [44] SHEN Y, WANG Y, CHEN T, et al. Deep functional analysis of syn II, a 770-kilobase synthetic yeast chromosome[J]. *Science*, 2017, 355(6329): eaaf4791.
- [45] ANNALURU N, MULLER H, MITCHELL L A, et al. Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome[J]. *Science*, 2014, 344(6179): 55-58.
- [46] WU Y, LI B Z, ZHAO M, et al. Bug mapping and fitness testing of chemically synthesized chromosome X[J]. *Science*, 2017, 355(6329): eaaf4706.
- [47] XIE Z X, LI B Z, MITCHELL L A, et al. “Perfect” designer chromosome V and behavior of a ring derivative[J]. *Science*, 2017, 355(6329): eaaf4704.
- [48] ZHANG W M, ZHAO G H, LUO Z Q, et al. Engineering the ribosomal DNA in a megabase synthetic chromosome[J]. *Science*, 2017, 355(6329): eaaf3981.
- [49] LIU W, LUO Z Q, WANG Y, et al. Rapid pathway prototyping and engineering using *in vitro* and *in vivo* synthetic genome SCRaM-

- bLE-in methods[J]. Nature Communications, 2018, 9: 1936.
- [50] JIA B, WU Y, LI B Z, et al. Precise control of SCRaMBLE in synthetic haploid and diploid yeast[J]. Nature Communications, 2018, 9: 1933.
- [51] BOEKE J D, CHURCH G, HESSEL A, et al. GENOME ENGINEERING. the genome project-write[J]. Science, 2016, 353(6295): 126-127.
- [52] MICHELSON A M, TODD A R. Nucleotides part XXXII . Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3',5'-internucleotidic linkage[J]. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1955: 2632-2638.
- [53] BEAUCAGE S L, CARUTHERS M H. Cheminform abstract: deoxynucleoside phosphoramidites. a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis[J/OL]. Chemischer Informationsdienst, 1981, 12(36)[2022-12-01]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/chin.198136353>.
- [54] FODOR S P, READ J L, PIRRUNG M C, et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis[J]. Science, 1991, 251(4995): 767-773.
- [55] SHETTY R P, ENDY D, KNIGHT T F. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts[J]. Journal of Biological Engineering, 2008, 2: 5.
- [56] ENGLER C, KANDZIA R, MARILLONNET S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability[J]. PLoS One, 2008, 3(11): e3647.
- [57] GIBSON D G, YOUNG L, CHUANG R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. Nature Methods, 2009, 6(5): 343-345.
- [58] ABREMSKI K, HOESS R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1984, 259(3): 1509-1514.
- [59] KUHSTOSS S, RAO R N. Analysis of the integration function of the streptomyces bacteriophage phi C31[J]. Journal of Molecular Biology, 1991, 222(4): 897-908.
- [60] FU J, BIAN X Y, HU S, et al. Full-length RecE enhances linear-linear homologous recombination and facilitates direct cloning for bioprospecting[J]. Nature Biotechnology, 2012, 30(5): 440-446.
- [61] COBB R E, WANG Y J, ZHAO H M. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system[J]. ACS Synthetic Biology, 2015, 4(6): 723-728.
- [62] ZHOU J T, WU R H, XUE X L, et al. CasHRA (Cas9-facilitated Homologous Recombination Assembly) method of constructing megabase-sized DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(14): e124.
- [63] MITCHELL L A, MCCULLOCH L H, PINGLAY S, et al. *De novo* assembly and delivery to mouse cells of a 101 kb functional human gene[J]. Genetics, 2021, 218(1): iyab038.
- [64] MONTOLIU L. Large-scale preparation of yeast agarose plugs to isolate yeast artificial chromosome DNA[J/OL]. Cold Spring Harbor Protocols, 2018, 2018(8) [2022-12-01]. <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2018/8/pdb.prot093955.long>.
- [65] GNIRKE A, HUXLEY C, PETERSON K, et al. Microinjection of intact 200- to 500-kb fragments of YAC DNA into mammalian cells[J]. Genomics, 1993, 15(3): 659-667.
- [66] KIM J Y, CHOI J H, KIM S H, et al. Efficacy of gene modification in placenta-derived mesenchymal stem cells based on non-viral electroporation[J]. International Journal of Stem Cells, 2021, 14(1): 112-118.
- [67] STEWART M P, LANGER R, JENSEN K F. Intracellular delivery by membrane disruption: mechanisms, strategies, and concepts[J]. Chemical Reviews, 2018, 118(16): 7409-7531.
- [68] MARSCHALL P, MALIK N, LARIN Z. Transfer of YACs up to 2.3 Mb intact into human cells with polyethylenimine[J]. Gene Therapy, 1999, 6(9): 1634-1637.
- [69] MEJÍA J E, WILLMOTT A, LEVY E, et al. Functional complementation of a genetic deficiency with human artificial chromosomes[J]. American Journal of Human Genetics, 2001, 69(2): 315-326.
- [70] LARTIGUE C, GLASS J I, ALPEROVICH N, et al. Genome transplantation in bacteria: changing one species to another[J]. Science, 2007, 317(5838): 632-638.
- [71] SUZUKI T, KAZUKI Y, HARA T, et al. Current advances in microcell-mediated chromosome transfer technology and its applications[J]. Experimental Cell Research, 2020, 390(1): 111915.
- [72] SINENKO S A, PONOMARTSEV S V, TOMILIN A N. Human artificial chromosomes for pluripotent stem cell-based tissue replacement therapy[J]. Experimental Cell Research, 2020, 389(1): 111882.
- [73] BROWN D M, CHAN Y A, DESAI P J, et al. Efficient size-independent chromosome delivery from yeast to cultured cell lines[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(7): e50.
- [74] KUGOH H, MITSUYA K, MEGURO M, et al. Mouse A9 cells containing single human chromosomes for analysis of genomic imprinting[J]. DNA Research, 1999, 6(3): 165-172.
- [75] O'DOHERTY A, RUF S, MULLIGAN C, et al. An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with Down syndrome phenotypes[J]. Science, 2005, 309(5743): 2033-2037.
- [76] WADE-MARTINS R, SMITH E R, TYMINSKI E, et al. An infectious transfer and expression system for genomic DNA loci in human and mouse cells[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(11): 1067-1070.
- [77] MORALLI D, MONACO Z L. Developing *de novo* human artificial chromosomes in embryonic stem cells using HSV-1 amplicon technology[J]. Chromosome Research, 2015, 23(1): 105-110.
- [78] LI L P, BLANKENSTEIN T. Generation of transgenic mice with megabase-sized human yeast artificial chromosomes by yeast spheroplast-embryonic stem cell fusion[J]. Nature Protocols, 2013, 8(8): 1567-1582.
- [79] LISKOVIKH M, LEE N C, LARIONOV V, et al. Moving toward a higher efficiency of microcell-mediated chromosome

- transfer[J]. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 2016, 3: 16043.
- [80] FEUK L, CARSON A R, SCHERER S W. Structural variation in the human genome[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7(2): 85-97.
- [81] HASTINGS P J, LUPSKI J R, ROSENBERG S M, et al. Mechanisms of change in gene copy number[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(8): 551-564.
- [82] MAYNARD T M, HASKELL G T, LIEBERMAN J A, et al. 22q11 DS: genomic mechanisms and gene function in Di-George/velocardiofacial syndrome[J]. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2002, 20(3/4/5): 407-419.
- [83] WU Q F, NIEBUHR E, YANG H M, et al. Determination of the 'critical region' for cat-like cry of Cri-du-chat syndrome and analysis of candidate genes by quantitative PCR[J]. *European Journal of Human Genetics*, 2005, 13(4): 475-485.
- [84] SHINOHARA T, TOMIZUKA K, MIYABARA S, et al. Mice containing a human chromosome 21 model behavioral impairment and cardiac anomalies of Down's syndrome[J]. *Human Molecular Genetics*, 2001, 10(11): 1163-1175.
- [85] RICARD G, MOLINA J, CHRAST J, et al. Phenotypic consequences of copy number variation: insights from Smith-Magenis and Potocki-Lupski syndrome mouse models[J]. *PLoS Biology*, 2010, 8(11): e1000543.
- [86] TUNÇ E, ILGAZ S. Robertsonian translocation (13;14) and its clinical manifestations: a literature review[J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2022, 45(3): 563-573.
- [87] YUNIS J J, PRAKASH O. The origin of man: a chromosomal pictorial legacy[J]. *Science*, 1982, 215(4539): 1525-1530.
- [88] MATSUMURA H, TADA M, OTSUJI T, et al. Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(1): 23-25.
- [89] LI L B, CHANG K H, WANG P R, et al. Trisomy correction in down syndrome induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(5): 615-619.
- [90] TOMIZUKA K, YOSHIDA H, UEJIMA H, et al. Functional expression and germline atransmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice[J]. *Nature Genetics*, 1997, 16(2): 133-143.
- [91] TOMIZUKA K, SHINOHARA T, YOSHIDA H, et al. Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(2): 722-727.
- [92] KUROIWA Y, KASINATHAN P, SATHIYASEELAN T, et al. Antigen-specific human polyclonal antibodies from hyperimmunized cattle[J]. *Nature Biotechnology*, 2009, 27(2): 173-181.
- [93] KAZUKI Y, KOBAYASHI K, AUEVIRIYAVIT S, et al. Trans-chromosomal mice containing a human CYP3A cluster for prediction of xenobiotic metabolism in humans[J]. *Human Molecular Genetics*, 2013, 22(3): 578-592.
- [94] KOBAYASHI K, ABE C, ENDO M, et al. Gender difference of hepatic and intestinal CYP3A4 in CYP3A humanized mice generated by a human chromosome-engineering technique[J]. *Drug Metabolism Letters*, 2017, 11(1): 60-67.
- [95] KAZUKI Y, KOBAYASHI K, HIRABAYASHI M, et al. Humanized UGT2 and CYP3A transchromosomal rats for improved prediction of human drug metabolism[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(8): 3072-3081.



通讯作者: 王立宾(1986—),男,博士后。研究方向为哺乳动物染色体工程,印记基因功能研究和复杂疾病动物模型的制备技术开发。

E-mail: wlbfbm@126.com



通讯作者: 李伟(1982—),男,研究员,博士生导师。研究方向为结合基因工程、细胞工程和合成生物学等手段建立新的基因工程技术和细胞/动物模型。

E-mail: liwei@ioz.ac.cn



第一作者: 朱骊宇(1997—),女,博士研究生。研究方向为基因治疗AAV载体筛选,合成生物学和哺乳动物染色体工程。

E-mail: zhuliyu0204@163.com