哺乳动物单倍体胚胎干细胞的建立与应用

丁一夫¹, 李劲松^{1*}, 周琪^{2*}

1. 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(生物化学与细胞生物学研究所), 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031;

2. 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

* 联系人, E-mail: jsli@sibcb.ac.cn; zhouqi@ion.ac.cn

收稿日期: 2019-08-12; 接受日期: 2019-10-01; 网络版发表日期: 2019-12-20

国家自然科学基金(批准号: 31530048, 81672117, 31730062)资助

摘要 哺乳动物胚胎干细胞通常为二倍体, 限制了其在后基因组时代功能基因研究上的应用. 近年来, 随着不同物种单倍体胚胎干细胞的建立, 科学家获得了一种可用于高通量正反向遗传筛选的细胞工具. 单倍体胚胎干细胞具有类似于二倍体胚胎干细胞的无限增殖能力、基因表达模式、分化潜能等特点, 可以在细胞水平开展遗传筛选研究; 通过不同物种单倍体干细胞的融合形成异源二倍体细胞可以用于研究基因的演化. 另外, 小鼠单倍体胚胎干细胞可代替配子用于产生动物, 这为研究基因印记在胚胎发育过程中的作用、快速构建携带复杂基因修饰的模式动物、进行个体水平遗传筛选等提供了一个新的遗传学工具. 最近, 单倍体胚胎干细胞的基因组标签计划的提出, 以构建所有编码蛋白质基因的标签小鼠资源平台为目的, 将促进蛋白质研究的标准化, 并为揭开胚胎发育复杂而有序的蛋白质调控网络提供工具.

关键词 单倍体胚胎干细胞, 遗传筛选, 异源二倍体胚胎干细胞, “人造精子细胞”, 基因组标签计划

单倍体细胞只具有一套染色体, 显著降低了基因组的复杂程度, 因而在遗传分析、基因功能与性状研究中具有重要的应用价值. 单倍体细胞一般存在于低等生物中, 如酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)^[1]. 高等动物往往是以二倍体的形式存在, 在其生命周期中, 仅有配子细胞是单倍体. 然而, 卵子和精子是结构和功能均已特化的细胞, 且不能在体外进行培养传代, 因此不能用于遗传编辑和修饰^[2].

如何在体外建立高等动物能稳定传代的单倍体细胞系是生命科学研究领域的一个重要问题, 一种可行的策略是从单倍体胚胎中建立细胞系. 1970年, Freed

和Mezger-Freed^[3]在美洲豹蛙(*Rana pipiens*)孤雄胚胎中建立了两株单倍体细胞系, 其中一株可以传代200次以上. 1975年, Philippe和Landureau^[4]从蟑螂(*Periplaneta*)早期胚胎中建立了单倍体细胞系. 1978年, Debec^[5]首次从基因突变造成的单倍体果蝇(*Drosophila*)胚胎中建立了果蝇的单倍体细胞系. 2009年, Yi等人^[6]从青鳉鱼(*Oryzias latipes*)孤雌胚胎中建立了单倍体多能干细胞系, 并发现这些细胞可以通过注入未受精卵子中获得后代. 单倍体斑马鱼(*Brachydanio rerio*)胚胎可以存活3天, 利用这一特性可以开展与斑马鱼早期胚胎发育相关基因的遗传筛选研究^[7,8], 同时也为进一步

引用格式: 丁一夫, 李劲松, 周琪. 哺乳动物单倍体胚胎干细胞的建立与应用. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 1635–1651

Ding Y F, Li J S, Zhou Q. Generation and applications of mammalian haploid embryonic stem cells (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2019, 49: 1635–1651, doi: 10.1360/SSV-2019-0170

建立斑马鱼单倍体细胞系提供了原始材料。另外, 1999年, Kotecki等人^[9]从白血病患者中分离得到了近单倍体细胞系, 该细胞系除了8号染色体和性染色体外, 其余染色体都只含有一条。这个细胞系能在体外长期培养扩增, 并被应用于高通量遗传筛选发现了重要的病毒受体基因, 显示了哺乳动物单倍体细胞系在遗传分析和疾病研究中的潜在价值^[10~12]。然而, 白血病近单倍体细胞系长期培养传代过程中会出现遗传物质不稳定和部分染色体丢失, 大大限制了其在遗传筛选中的应用。

如何建立正常的哺乳动物单倍体细胞系, 一直是科学家们努力的方向。早在40余年前, 科学家构建了小鼠(*Mus musculus*)单倍体胚胎用于研究染色体倍性对胚胎发育的影响^[13~20]。单倍体胚胎可以依据遗传物质来源分为孤雌和孤雄两类: 孤雌单倍体胚胎只携带一套卵子的遗传物质, 而孤雄单倍体胚胎携带一套精子遗传物质。孤雌单倍体胚胎是通过孤雌激活卵子, 使其排出第二极体后产生的携带一套染色体的胚胎; 另外, 孤雌单倍体胚胎也可以通过去除受精卵雄原核的方法获得。孤雄单倍体胚胎可以通过类似于核移植的方法获得, 即先将卵子的遗传物质通过显微操作的方法去除, 然后注入一个精子的头部; 或者可以通过去除受精卵雌原核的方法, 获得含有一套来自父本染色体的胚胎。孤雌和孤雄单倍体胚胎可以在体外发育成囊胚^[21~23], 然而, 单倍体胚胎移植到小鼠体内会在着床后不久发育停滞^[24]。对这些胚胎细胞进行核型分析发现, 大部分单倍体细胞在体内转变为二倍体细胞^[25]。有意思的是, 将单倍体胚胎与正常二倍体胚胎嵌合后产生的小鼠能正常发育到成年, 然而所有单倍体胚胎细胞来源的成体细胞均为二倍体^[26]。这些结果证明, 单倍体胚胎细胞在发育和分化过程中会发生自发二倍体化, 因此, 维持单倍体胚胎细胞的干性可能是建立小鼠单倍体细胞的关键。

1981年, Evans和Kaufman^[27]从小鼠囊胚内细胞团中分离建立了人类历史上第一株胚胎干细胞。胚胎干细胞在体外能长期稳定传代, 并具有无限的自我更新能力、多向分化潜能和基因组的高度稳定性。这一研究成果为从单倍体胚胎中获得单倍体细胞提供了一条新途径。Kaufman等人^[28]第一时间尝试从孤雌单倍体胚胎中建立单倍体胚胎干细胞系。然而, 最终建立的4个细胞系均为二倍体。这一结果显示, 单倍体干细胞在

体外建立和培养过程中也会发生自发的二倍体化, 形成稳定的二倍体细胞。因此, 如何维持细胞的单倍体性成为建立单倍体细胞系的关键。这一难题直到2011年才由英国科学家Leeb和Wutz^[29]和奥地利科学家Elling等人^[30]解决。通过引入流式细胞分选技术, 他们在建系早期及时将单倍体胚胎干细胞分选出来进行培养, 并在传代过程中定期地进行单倍体细胞流式分选富集, 成功从孤雌发育的单倍体胚胎中建立了孤雌单倍体胚胎干细胞系。利用这一策略, 2012年, 上海和北京两个研究团队分别独立建立了小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞系^[31,32]。有意思的是, 孤雄单倍体胚胎干细胞在注射到卵胞质后, 能够支持胚胎发育并获得健康可育的“半克隆小鼠”。另外, 孤雄单倍体胚胎干细胞可以在体外进行基因打靶等遗传修饰, 进而通过卵胞质注射一步获得携带遗传修饰小鼠。这些研究产生了一种集单倍体性、自我更新、多能性和“受精”能力为一体的新型干细胞。单倍体干细胞的建立不仅带来了新的科学问题, 如单倍体细胞为何发生二倍体化、“受精”能力如何获得等, 而且为生命科学多个领域的研究带来了新工具, 尤其是在基因功能研究方面。

在过去8年间, 单倍体干细胞研究取得了突飞猛进的进展, 多种哺乳动物的单倍体细胞被建立, 基于单倍体干细胞的应用全面展开^[33~35](图1)。本综述总结了单倍体胚胎干细胞的发展历程以及在生命科学研究中的应用, 并对该领域进一步的发展提出了展望。

1 不同物种单倍体胚胎干细胞的建立

由于哺乳动物的单倍体细胞目前只能从单倍体囊胚中建立, 过去几年中, 科学家尝试从已成功建立胚胎干细胞的物种中建立单倍体干细胞^[36~40], 目前已成功地获得了小鼠^[29~32]、大鼠^[41,42]、非人灵长类^[43,44]和人^[45,46]的单倍体胚胎干细胞(图1和图2)。

1.1 小鼠单倍体胚胎干细胞的建立

小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞的成功建立主要得益于两个技术的应用, 一是采用了一种更利于干性维持的胚胎干细胞培养系统, 即添加2i(CHIR99021和PD0325901, 分别抑制GSK3和MEK信号通路)的培养体系^[29,30,47], 2i有利于胚胎干细胞的自我更新, 可以用来从传统培养条件下无法建系的小鼠品系中建立胚胎

图 1 单倍体胚胎干细胞研究的里程碑成果

Figure 1 Landmarks in the field of haploid embryonic stem cells

图 2 哺乳动物孤雌和孤雄单倍体胚胎干细胞的建立. A: 建立孤雌单倍体胚胎干细胞的策略; B: 建立孤雄单倍体胚胎干细胞的策略

Figure 2 Strategies for generation of mammalian PG-haESCs (parthenogenetic haploid embryonic stem cells) and AG-haESCs (androgenetic haploid embryonic stem cells). A: Strategies for generation of PG-haESC; B: strategies for generation of AG-haESCs

干细胞^[48]. 二是利用流式分选方法在胚胎干细胞建系早期进行单倍体细胞的富集. 与体内观察和早期建系研究的结果一致, 单倍体胚胎干细胞会发生自发二倍体化, 需要通过核酸染料Hoechst33342标记DNA来分选富集单倍体细胞^[49,50], 从而建立单倍体细胞系, 并需要通过定期分选富集的方法在体外长期维持单倍体

的特性. 利用相似的方法, 小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞也顺利建成^[31,32].

但是, 单倍体干细胞的建系效率非常低, 第一例孤雌单倍体胚胎干细胞的建系效率为2.7%(25/937)^[29]. 随后建成的孤雄单倍体胚胎干细胞系的效率则更低^[31,32], 可能存在的原因是: (i) 孤雄单倍体胚胎的建

立需要通过显微操作, 而孤雌单倍体胚胎的获得只需体外化学激活卵子, 这种机械操作导致了胚胎发育率的降低; (ii) 通过向去核卵子中注入单个精子获得孤雄单倍体胚胎有两种, 一种是携带X染色体的单倍体胚胎, 另外一种携带Y染色体的单倍体胚胎, 而后者一种胚胎在体外不能发育到囊胚阶段^[23], 这降低了1/2的孤雄单倍体胚胎体外发育率, 因而也降低了单倍体干细胞的建系效率^[31]. 是否能通过优化显微操作过程的相关环节, 减少显微操作过程对胚胎发育的影响, 提高单倍体胚胎的囊胚发育率; 是否能通过分选X精子提高孤雄单倍体胚胎的发育率^[51]; 是否能通过优化单倍体胚胎的培养体系促进单倍体胚胎的体外发育, 这些问题的回答将促进单倍体干细胞建系体系的完善和发展.

1.2 大鼠单倍体胚胎干细胞的建立

小鼠的胚胎干细胞早在1981年建成, 但是, 同为啮齿动物并被广泛用作模式动物的大鼠的胚胎干细胞却一直未被建成. 2008年, 利用2i培养系统, Li等人^[52]及Buehr等人^[40]分别从大鼠正常受精来源的囊胚中成功建立了胚胎干细胞系. 利用相似的培养系统, 2014年, Li等人^[41]从大鼠孤雄单倍体胚胎中建立了孤雄单倍体胚胎干细胞. 与小鼠孤雄单倍体胚胎构建相似, 可以通过去除受精卵雌原核的方法获得大鼠的孤雄单倍体胚胎; 不同于小鼠单倍体胚胎可以体外培养至囊胚, 大鼠孤雄单倍体胚胎需要移植到受体输卵管内培养至囊胚后再次取出建系^[41,42]. 另外, 通过孤雌激活的方式, 科学家也获得了大鼠孤雌单倍体胚胎干细胞^[42].

1.3 非人灵长类单倍体胚胎干细胞的建立

非人灵长类胚胎干细胞已成功地从食蟹猴(*Macaca fascicularis*)、恒河猴(*Macaca mulatta*)和狨猴(*Calithrix jacchus*)中建立^[37-39,53]. 不同于小鼠胚胎干细胞可以通过单细胞的方式进行扩增传代, 灵长类胚胎干细胞从建立之日起, 一直是以细胞克隆通过机械方法分成小克隆的方式来传代^[54]. 然而, 单倍体胚胎干细胞的建立和维持需要借助流式分选技术分离富集携带单套染色体的单个细胞, 因此, 灵长类胚胎干细胞传统的传代方式可能不适用于单倍体细胞的建立. 2013年, Yang等人^[43]利用改良的灵长类胚胎干细胞单细胞传代方式^[55-57], 成功地从食蟹猴孤雌单倍体囊胚中建立

了两株单倍体胚胎干细胞系. 利用相似的方法, Wang等人^[44]建立了恒河猴的孤雌单倍体胚胎干细胞. 但是截至目前, 尚无非人灵长类孤雄单倍体胚胎干细胞成功建立的报道.

1.4 人单倍体胚胎干细胞的建立

人二倍体胚胎干细胞于1998年成功建立^[36], 2016年, Sagi等人^[46]和Zhong等人^[45]分别报道了从自愿捐献的人类卵子中建立人孤雌单倍体胚胎干细胞的工作. 有意思的是, 从孤雌激活卵子来源的单倍体囊胚中建立细胞系, 首次流式分选均难以获得足够多的单倍体细胞. Sagi等人^[46]通过多次分选富集的方式最终成功建立了单倍体细胞系; 而Zhong等人^[45]却未获得任何单倍体细胞. 后者进一步研究发现, 通过去除受精卵雄原核的方法建立孤雌单倍体胚胎, 能够顺利地从中建立单倍体胚胎干细胞系^[45], 可能的原因是精子介导激活的卵子相较化学激活的卵子更利于孤雌单倍体胚胎的发育. 由于用于研究的人卵子依赖于辅助生殖患者自愿捐献, 同时孤雄胚胎发育效率较低, 截至目前尚无人孤雄单倍体胚胎干细胞的成功报道.

2 单倍体胚胎干细胞的特性

单倍体胚胎干细胞是一类集单倍体性、自我更新、多能性和“受精”能力为一体的新型干细胞类型.

2.1 单倍体胚胎干细胞的自发二倍体化

单倍体胚胎干细胞均会发生自发二倍体化, 需要通过定期流式分选富集单倍体细胞的方法维持单倍体特性. 重要的是, 不同于白血病来源的近单倍体细胞系的遗传不稳定性^[9,58], 单倍体胚胎干细胞的基因组能长期保持稳定. 同时, 单倍体细胞自发二倍体化过程本身又是非常有意思的生物学现象, 对其机制的解析一方面可能产生新的细胞分裂可塑性调控机制, 另一方面有望产生促进单倍体特性稳定的新方案. 早期的观察排除了单倍体细胞自发二倍体化是因为细胞融合产生的^[59], 暗示细胞周期调控异常可能是二倍体化的原因. 随后的研究发现, 单倍体细胞M期延长, G2/M期过渡不能正常发生, 导致细胞重新进入G1/S期, 从而产生二倍体细胞^[60,61]. 进一步通过培养系统中加入可以促进G2/M期过渡的小分子化合物, 可使单倍体细胞的

单倍体特性得到显著的稳定维持^[60,62,63]。值得一提的是,小鼠和人的单倍体细胞自发二倍体化的速度不同:小鼠单倍体胚胎干细胞很容易发生二倍体化,平均每传代4~6次(2~3周)就必须进行单倍体的富集^[31];而人单倍体细胞的单倍体性则较稳定,连续培养传代两个月,单倍体细胞比例仍可达到20%以上^[45,46]。这种差异的产生可能的原因有物种差异、细胞类型差异(人胚胎干细胞更类似于小鼠外胚层细胞的状态)^[64]和培养条件差异等。单倍体细胞自发二倍体化的具体机制仍然不清楚,通过比较单倍体细胞和二倍体细胞细胞分裂的些微差异可能会为揭示二倍体化的机制提供线索^[63,65]。

截至目前,单倍体干细胞仍然需要通过定期富集的方法来维持单倍体特性。较常用的是富集手段为流式细胞分选技术,其原理是根据单倍体和二倍体细胞的染色体数量不同,通过Hoechst33342对DNA进行嵌合标记后在流式分选仪紫外光激发下进行分析,信号和遗传物质的多少呈正相关。单倍体胚胎干细胞系在流式细胞仪上会出现3个主峰,根据DNA的信号由强至弱分别对应了G2/M期的二倍体细胞(4N)、G2/M期的单倍体或G0/G1期二倍体细胞(2N)以及G0/G1期单倍体细胞(1N)^[66]。流式分选的方法虽然精确,但是该方法需要昂贵且操作复杂的仪器,同时细胞需要承受DNA染色、高能激光照射以及液流带来的物理压力,存在对细胞造成不可预知损伤的风险。为了解决这些问题,最近两个研究组利用单倍体胚胎干细胞平均直径(约8 μm)小于二倍体化胚胎干细胞平均直径(约10 μm)的特点,用过滤的方式实现了单倍体细胞的富集^[67,68]。单倍体细胞自发二倍体化使得单倍体细胞技术的推广使用受到了一定的限制,进一步研究解析相关机制,维持单倍体胚胎干细胞的倍性是下一步的努力方向。

2.2 单倍体胚胎干细胞均携带X染色体

从卵子来源的孤雌胚胎中建立的单倍体干细胞均携带X染色体^[29,30,42,43,45,46]。有意思的是,从孤雄胚胎中建立的单倍体胚胎干细胞也只携带X染色体^[31,32,41],这说明携带Y染色体的精子不能支持重构的单倍体胚胎着床前的发育^[23,69],自然也就无法获得携带Y染色体的囊胚和胚胎干细胞。相对应地,利用孤雄单倍体胚胎干细胞作为精子的替代物注入卵子中产生的半克隆

小鼠都是雌性的^[31,32]。是否能建立携带Y染色体的单倍体细胞,是否能通过卵子注射产生雄性半克隆小鼠,这些问题的解答有助于发展和完善单倍体干细胞技术。

2.3 单倍体胚胎干细胞的多能性和自我更新能力

由于单倍体胚胎干细胞来自囊胚的内细胞团,本质是胚胎干细胞,因此具有正常二倍体胚胎干细胞的所有特点,包括长期的自我更新能力、基因组稳定性、干性标志物的表达、相似的基因表达模式、在体内和体外形成具有三胚层细胞的胚体和畸胎瘤的能力^[33]。重要的是,小鼠和大鼠的单倍体胚胎干细胞通过二倍体囊胚注射能产生嵌合个体,甚至发生生殖系的嵌合^[41,59]。有意思的是,小鼠单倍体干细胞的分化伴随着自发二倍体化的加剧^[29-32,59],而人的单倍体干细胞在分化过程中则表现出相对稳定的单倍体特性,甚至能非常稳定地分化成包括心肌和神经细胞等在内的终末分化细胞^[45,46]。这些结果提示细胞的倍性与细胞的分化状态有关,同时也提出一个重要的科学问题:是否能建立不同分化状态的稳定的单倍体细胞^[2,33,70,71]?

从着床前囊胚中可以建立3类干细胞:胚胎干细胞、外胚层干细胞和滋养层干细胞,单倍体胚胎干细胞的建立提示有可能从中建立其他两种干细胞(图3)。最近,Cui等人^[72]从孤雌单倍体囊胚中成功建立了稳定的单倍体滋养层干细胞。而Peng等人^[73]通过在小鼠单倍体胚胎干细胞中过表达滋养层干细胞的标志基因*Cdx2*的方式获得了单倍体滋养层干细胞,这些单倍体滋养层干细胞可用于筛选与胚外组织,包括胎盘发育相关的基因。利用体外培养建系的方法,He和Kidder^[74]从小鼠孤雌囊胚中建立了单倍体外胚层干细胞。而Shuai等人^[75]通过体外分化单倍体胚胎干细胞的方法建立了单倍体外胚层干细胞。

那么,是否能进一步建立单倍体的成体干细胞,甚至单倍体的体细胞呢? Gao等人^[76]通过建立*Pax6-GFP*敲入的小鼠单倍体胚胎干细胞(*Pax6*是神经干细胞特异的标志基因),在分化过程中富集表达绿色荧光蛋白的细胞并转入神经干细胞培养基中,建立了稳定的单倍体神经干细胞系。Wang等人^[44]通过体外分化的方法建立了稳定的猕猴单倍体神经干细胞系。Xu等人^[77]在体外将小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞定向分化为神经细

图3 不同干性和分化状态单倍体细胞的建立

Figure 3 Generation of haploid cells with different stem and differentiate state

胞时发现, 分化过程中单倍体细胞会迅速二倍体化, 但有一小部分神经细胞保持单倍体特性。另外, He等人^[63]通过在培养基中加入小分子化合物抑制单倍体细胞二倍体化, 结合piggBac转座子介导的插入突变和体外分化, 产生了不同分化状态的单倍体体细胞以及大规模携带遗传突变的单倍体神经细胞库。这些研究显示, 通过优化培养条件, 可以产生来自不同胚层的单倍体体细胞, 为功能基因的体外筛选研究提供了新的单倍体细胞来源。

2.4 单倍体细胞作为配子替代物的能力

印记基因的表达调控是决定哺乳动物两性生殖的关键^[78]。20世纪80年代, 科学家通过构建小鼠单亲二倍体胚胎的方式证明父源DNA拷贝和母源DNA拷贝在遗传上的不等价性^[79,80]。这种不等价性产生的重要原因是不同来源的DNA拷贝携带着不同的甲基化修饰, 有甲基化修饰的区域使其周围基因发生沉默, 即发生基因的印记^[81]。印记基因区域的甲基化是在配子形成过程中建立的, 这种差异甲基化状态在建立后将一直维持, 即便在受精后剧烈的全基因组甲基化擦除过程中仍保持稳定^[78]。那么, 通过受精过程、早期胚胎

发育和胚胎干细胞建系过程形成的携带配子遗传物质的单倍体胚胎干细胞的印记基因甲基化和表达状态如何呢?

研究显示, 来源于精子的孤雄单倍体胚胎干细胞大体上保持精子的雄性印记状态, 尤其是在细胞系建立的早期^[31]。因此, 将这些细胞注射到卵子中, 可以支持胚胎的全程发育并产生健康小鼠^[31,32]。这些小鼠中一半的遗传物质来源于培养的单倍体细胞, 相对于克隆动物中全部遗传物质来源于供体细胞, 人们将其称为半克隆小鼠^[31]。然而, 半克隆小鼠的出生效率低(4.5%左右), 而且约1/2的半克隆小鼠出现发育迟缓的现象。分析原因发现, 原本在精子中不表达的雄性印记基因 $H19$ 在单倍体细胞和发育迟缓的半克隆小鼠中出现高表达的现象^[31]。这暗示印记基因的异常表达可能是导致半克隆小鼠胚胎发育异常的关键原因, 而通过调控印记基因的表达则有可能提高半克隆小鼠的出生效率。随后, 实验者从注射 $H19$ -DMR敲除的小鼠精子产生的单倍体胚胎中建立了孤雄单倍体胚胎干细胞系($H19$ -DMR敲除后, $H19$ 的表达下降)或者在孤雄单倍体胚胎干细胞系中敲除 $H19$, 将这些细胞注入卵子后能显著提高半克隆小鼠的出生效率^[82,83]。然而, 仍

然有1/3的半克隆小鼠出现发育迟缓的现象. 进一步分析原因发现, 在*H19*-DMR敲除的细胞和发育迟缓的半克隆小鼠中存在另外一个雄性印记基因*Gtl2*的异常高表达. 进一步在*H19*-DMR敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞中敲除了调控*Gtl2*表达的*IG*-DMR(*IG*-DMR敲除后, *Gtl2*表达下降), 发现*H19*-DMR和*IG*-DMR双敲除的细胞能高效产生半克隆小鼠, 达到20%左右的出生效率, 并且几乎不会产生发育迟缓的半克隆小鼠^[83]. 有意思的是, 在原本已经失去产生半克隆小鼠能力的孤雄单倍体胚胎干细胞中敲除*H19*-DMR和*IG*-DMR后, 细胞又恢复了“受精”的能力, 并且能达到17%的出生效率^[83]. 这些结果证明, 单倍体胚胎干细胞长期培养并不会对其遗传物质稳定性造成显著影响使其失去支持胚胎发育的能力; *H19*-DMR和*IG*-DMR是单倍体胚胎干细胞获得“受精”能力的两大障碍, 将这两个障碍去除后, 能够产生高效支持半克隆胚胎发育的单倍体干细胞. 然而, *H19*-DMR和*IG*-DMR敲除并没有改变单倍体干细胞的整体转录组, 说明这两个区域是在半克隆胚胎发育的过程中起到了重要作用^[34]. 最近的一项研究系统分析了*H19*-DMR和*IG*-DMR在胚胎早期发育过程中的作用, 发现*H19*-DMR主要调控半克隆胚胎着床后到12.5天前的胚胎发育, 而*IG*-DMR主要参与调控12.5天后的胚胎发育^[84].

小鼠的孤雌单倍体胚胎干细胞也具有替代卵子遗传物质的潜力. 实验证明, 早期代数的小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞通过核移植方法替换卵子遗传物质后, 能够支持“受精”后胚胎的发育. 然而, 胚胎发育为个体的能力非常低, 仅两只小鼠发育到期, 一只活至成年^[85]. 对于这一现象, 孤雄单倍体胚胎干细胞“受精”能力的研究启发了研究人员: 孤雌单倍体胚胎干细胞中胚胎发育密切相关的雌性印记基因的正常表达可能是其被用作卵子遗传物质替代物的关键. 今后的研究需要发现这些重要的印记基因, 并在孤雌单倍体胚胎干细胞中通过遗传或者表观修饰使其恢复成卵子的印记状态, 或可使其高效地用作卵子遗传物质的替代物.

3 单倍体胚胎干细胞的应用

单倍体胚胎干细胞只携带一套遗传物质, 极大地方便了哺乳动物细胞水平的遗传筛选(图4); 同时, 由于孤雄单倍体细胞能够替代精子高效产生半克隆小

鼠, 又为快速制备遗传编辑小鼠以及开展动物水平的遗传筛选提供了新方法(图5).

3.1 单倍体胚胎干细胞在细胞水平的应用

(1) 基于单倍体胚胎干细胞的大规模遗传筛选. 单倍体胚胎干细胞最显著的应用是利用其单倍体性开展大规模的遗传筛选, 因为基因单拷贝的缺失即会出现与其功能所对应的表型. 这一特性适用于所有单倍体胚胎干细胞, 包括孤雌和孤雄单倍体胚胎干细胞. 利用小鼠的孤雌单倍体胚胎干细胞, 开展了基于pigg-Bac转座子系统的正向遗传筛选, 发现了参与细胞DNA修复、细胞毒性、胚胎干细胞干性退出以及X染色体沉默相关的关键基因^[29,30,86-89]. 相似的正向遗传筛选同样适用于大鼠、猴和人的单倍体胚胎干细胞^[41,43,90]. 另外, 在小鼠单倍体胚胎干细胞中也成功地开展了反向遗传筛选^[30]. 这一系列研究显示出单倍体干细胞在遗传筛选上的强大优势. 由于单倍体胚胎干细胞具有在体内外分化为三胚层细胞的能力, 结合简单高效的新型基因编辑技术CRISPR-Cas9^[91-93](clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9), 将有助于在体外高效筛选参与胚胎干细胞分化为功能体细胞的重要因子. 另外, 处于不同干性或分化状态的单倍体细胞, 包括小鼠单倍体滋养层细胞^[72,73]、猴单倍体神经干细胞^[44]以及小鼠单倍体神经细胞^[63]等, 也被用于基于piggBac转座子系统的正向筛选研究, 并且有关键的调控因子被发现.

(2) 基因突变细胞文库的构建. 单倍体干细胞中一个基因的突变会造成该基因功能的完全缺失, 即便细胞发生二倍体化, 产生的二倍体细胞仍然是一个纯合突变的细胞, 有助于基因功能的研究. 利用这一特点, Elling等人^[94]构建了突变细胞文库, 称为Haplobank, 包含超过1百万个单倍体细胞系: 这些细胞携带16970个基因中的任何一个基因的遗传修饰, 并携带遗传条形码. 重要的是, 这些遗传修饰可以实现基因的条件性敲除和可逆转的敲除, 为正反向遗传筛选提供了有效的、可验证的细胞文库. Yamanishi等人^[95]设计了药物筛选系统用以获得二倍体化的突变细胞, 加速了纯合突变细胞库的构建. 另外, He等人^[63]通过添加小分子抑制单倍体细胞二倍体化, 结合体外分化和piggBac转座子随机插入技术, 构建了基因组范围的突变神经细

图4 单倍体胚胎干细胞在细胞水平的应用. A: 细胞水平的遗传筛选; B: 杂合二倍体细胞的建立和应用

Figure 4 Applications of haploid embryonic stem cells at the cellular level. A: Genetic screening at cellular level; B: generation and application of Mouse-Rat allodiploid embryonic stem cells

胞文库. 这些突变的细胞库为进一步研究基因调控提供了理想的细胞资源.

(3) 异源二倍体细胞的构建和应用. 物种间杂交动物同时具有两个亲本的遗传背景, 为研究物种的产生、基因的进化、X染色体失活等提供了一种独特的模型. 但自然界中广泛存在生殖隔离, 只有极少数的动物可以产生跨物种杂交动物. 为了解决这一问题, 不少实验室曾尝试利用不同物种二倍体细胞相互融合的方式获得异源四倍体细胞. 然而, 异源四倍体细胞基因组不稳定, 很容易发生染色体丢失. 最近的一项研究发现, 小鼠和大鼠单倍体胚胎干细胞融合产生的异源二倍体胚胎干细胞具有稳定的基因组、完整的三胚层分化能力以及早期生殖系嵌合的能力. 有意思的是, 这种小鼠/大鼠异源二倍体胚胎干细胞的X染色体不同于常见的二倍体细胞随机失活模式, 固定地以小鼠X染色体发生失活的方式存在, 有助于鉴定X染色体失活逃逸基因. 通过比较异源二倍体胚胎干细胞与二倍体胚胎干细胞在RNA、蛋白质表达上的差异, 可开展物种间性状差异的分子调控机制研究^[96]. 是否可以利用其他种属单倍体干细胞创造出新的异源二倍体胚胎干细

胞, 或许是下一个研究的热点.

3.2 单倍体干细胞作为配子替代物用于制备小鼠

(1) 胚胎发育的印记基因调控研究. 自20世纪80年代发现父母源染色体存在发育必需的印记基因以来, 印记基因如何调控胚胎的早期发育过程一直是研究重点^[79,80,97]. 20世纪末, Kono等人^[98]建立了连续核移植的技术体系用于探讨发育的印记基因调控. 他们首先从新生雌性小鼠的卵巢中获得非生长的卵子(nongrowing卵子, ng卵子), 这些卵子的DNA甲基化已被擦除, 而新的印记区域DNA甲基化还没有建立^[99]; 将ng卵子与去除生发泡的(含遗传物质)的正常卵子(full-grown卵子, fg卵子)进行融合形成重构卵子; 重构卵子进一步在体外成熟形成成熟的处于第二次减数分裂中期的卵子(ng MII卵子), 将其遗传物质(二倍体)转入另一个正常的成熟卵子(fg MII卵子)中产生ng/fg重构卵子; ng/fg重构卵子进而在体外通过孤雌激活排出两个极体后形成孤雌来源的二倍体胚胎; 移植到体内后, 这些孤雌胚胎能够发育至13.5天^[98]. 利用这一技术, 他们发现, 以携带H19-Igf2雄性印记基因簇的调控区域(H19-

图 5 单倍体胚胎干细胞在个体水平的应用。A: 孤雌单倍体胚胎干细胞用于遗传筛选、模拟疾病和基因组标签小鼠的制备; B: 单倍体胚胎干细胞用于印记基因的发育调控研究

Figure 5 Applications of haploid embryonic stem cells at the organismal level. A: Generation of mouse models carrying complex gene modifications to mimic human diseases or screen for critical genes; B: application of haploid embryonic stem cells in imprinting research and development

DMR)敲除的ng MII卵子作为供体,一小部分孤雌胚胎能够发育到期并存活到成年^[100],而以携带*H19-DMR*和*Dlk1-Dio3*雄性印记基因簇的调控区域(*IG-DMR*)双敲除的ng MII卵子作为供体,可实现高效的孤雌发育^[101]。这些研究显示,这两个雄性印记调控区域是限制孤雌胚胎发育的关键。然而,这一连续核移植策略技术复杂,难以作为一个常规的实验手段用于发育的印记基因调控研究。

体外培养的小鼠卵子来源的孤雌单倍体胚胎干细胞会随着细胞的培养传代逐渐发生基因组范围的甲基化丢失,包括印记调控区域DNA的甲基化^[102],形成类似于ng卵子的低甲基化状态。另外,来源于精子的小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞在敲除*H19-DMR*和*IG-DMR*后,能替代精子通过卵子注射高效支持胚胎的发育^[83]。

这些研究提示,在孤雌单倍体胚胎干细胞中敲除*H19-DMR*和*IG-DMR*,也有可能实现高效的孤雌胚胎发育。2016年,Zhong等人^[102]和Li等人^[103]的研究证实了这一可能性,在体外培养的孤雌单倍体胚胎干细胞中敲除*H19-Igf2*和*Dlk1-Dio3*的调控区域后,实现了小鼠孤雌胚胎的高效发育。利用相似的策略,Li等人^[104]尝试通过调控印记基因实现小鼠的孤雌发育。他们在孤雌单倍体胚胎干细胞中敲除了7个雌性印记调控区域,包括*Nespas*, *Peg3*, *Snrpn*, *Kcnq1*, *Grb10*, *Igf2r*和*Gnas*,然后注入去核的卵子中,进一步注射精子获得孤雌胚胎;这些胚胎发育至囊胚后,从中建立孤雌二倍体胚胎干细胞系;将这些细胞注入四倍体囊胚中,产生了两只孤雌小鼠。然而,这两只小鼠均在出生后两天内死亡^[104],说明仍有其他雌性印记区域对胚胎出生前后

的发育有着重要的作用. 这些研究证明, 单倍体胚胎干细胞为研究胚胎发育印记调控提供了新工具. 下一步的研究需要进一步揭示这些调控区域, 并应用到单倍体细胞的印记调控区域的敲除组合中, 以期实现孤雄胚胎的高效发育.

(2) 单倍体胚胎干细胞用于高效制备复杂遗传修饰小鼠. 携带*H19-DMR*和*IG-DMR*双敲除的孤雄单倍体胚胎干细胞可以作为精子替代物用于高效产生半克隆小鼠. 同时, 这些细胞可以在体外进行多轮的基因编辑, 进而通过卵子注射一步将单倍体细胞携带的基因修饰传递给小鼠, 为快速制备遗传修饰小鼠提供了新方法^[35,66,105]. 通过这种方法, 已经实现了高效制备携带人类点突变的小鼠模型^[106]、携带蛋白质标签小鼠模型^[107,108]、同时携带多基因敲除以及多基因敲入小鼠模型^[83]. 在“人造精子细胞”中敲除多个基因, 通过卵子注射一步获取多基因杂合敲除小鼠可以用于模拟多基因剂量下降造成的人类复杂疾病. 最近, 研究人员将与人类强直性肌营养不良征1型(myotonic dystrophy type 1, DM1)相关的4个基因(*Dmpk*, *Six2*, *Dmwd*和*Mbnl1*)在孤雄单倍体胚胎干细胞中进行敲除, 进而通过卵子注射获得了四基因敲除的杂合小鼠, 模拟了DM1患者绝大多数的病症, 为进一步研究该疾病的发生发展以及治疗策略提供了新的模型^[109]. Wang等人^[110]从人苗勒管畸形患者(Müllerian anomalies, MA, 其病变导致严重的女性生殖道发育障碍)病例中, 通过全基因组杂交芯片发现9例携带有罕见的基因组拷贝数变异(copy number variants, CNVs). 然后, 家系的遗传分析发现, 部分患者的母亲携带相应的CNV, 提示单一的遗传变异不足以导致苗勒管发育不良. 因此, 研究人员进一步利用全外显子测序技术对上述9例CNV携带者进行了全外显子测序, 发现其中1例*GEN1*/2p24.2缺失患者还携带有*WNT9B*基因突变、1例*TBX6*/16p11.2缺失患者还携带有*GATA3*基因突变. 由此推测“*GEN1*+*WNT9B*”“*TBX6*+*GATA3*”这两个突变组合可能是导致人类MA的致病原因. 将这两个突变组合分别导入“人造精子细胞”中, 最终发现*Gen1*^{+/-}*Wnt9b*^{+/-}杂合突变能够导致小鼠严重的苗勒氏管畸形, 为进一步阐述疾病致病机制提供了一个新的假说. 这些结果显示, “人造精子细胞”介导半克隆技术是验证人类复杂疾病的遗传缺陷基础的有效工具.

(3) 单倍体胚胎干细胞介导的小鼠个体水平遗传

筛选. CRISPR-Cas9技术介导的突变筛选在小鼠和人细胞中已被广泛应用, 结合孤雄单倍体胚胎干细胞介导的半克隆技术则有望实现小鼠个体水平的遗传筛选. 为达到这一目的, 研究人员首先构建出稳定表达Cas9的孤雄单倍体胚胎干细胞, 然后将针对多个基因的sgRNA(single-guide RNA)文库转染到该细胞中, 通过调整慢病毒的滴度, 使得大部分单倍体细胞只携带一个sgRNA, 建立了稳定表达Cas9和sgRNA的细胞系. 由于Cas9和sgRNA会在细胞中对相应的基因进行突变, 因此该细胞系实为携带不同突变基因的单倍体细胞库. 将其注射到卵子中, 稳定表达的Cas9和sgRNA又可以突变卵子中对应的基因, 进而获得双链同时突变的, 从而实现个体水平基于突变的遗传筛选^[83]. 通过半克隆技术, 细胞水平的遗传筛选上升到小鼠个体水平的遗传筛选, 丰富了基因功能研究的手段. 然而, 小鼠个体水平遗传筛选的效率受限于很多因素, 如半克隆胚胎发育效率、CRISPR-Cas9基因编辑效率等. 因此, 该策略难以用于基因组范围的筛选, 更适用于小规模候选基因的靶向筛选. 最近, Bai等人^[111]利用此系统针对72个候选基因(来源于体外骨分化过程的高通量测序数据, 推测可能参与骨骼发育)开展了骨发育相关基因的筛选研究. 研究人员首先建立了一个稳定表达Cas9同时携带216个sgRNA的“人造精子细胞”文库(大部分的单倍体干细胞携带一个sgRNA), 并通过半克隆技术获得了426只携带不同突变基因的半克隆小鼠, 并通过骨骼整体染色分析确定存在骨干发育缺陷的小鼠; 进一步确定异常小鼠携带的sgRNA及其靶向基因是否发生突变. 通过这一筛选策略, 研究人员从72个候选基因中筛选出4个参与骨发育调控的关键基因. 利用相似的策略, 结合最新的CRISPR-Cas9介导的单碱基编辑器, Li等人^[112]建立了蛋白质关键氨基酸的体内遗传筛选系统, 并对影响小鼠原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)发育的重要基因*Dnd1*开展个体水平氨基酸功能位点筛选, 发现4个决定DND1在PGC发育中功能的关键氨基酸, 为蛋白质结构和功能的研究开辟了一个新的体系. 该体系的一个潜在应用是在小鼠中筛选与发育疾病相关基因的功能位点, 并与已有的SNVs数据库进行比对, 预测疾病相关基因的致病位点^[113].

(4) 单倍体胚胎干细胞介导的基因组标签计划. 2004年, 人类基因组计划顺利完成, 描绘了人类基因

的30亿碱基序列,同时揭示存在超过22000个编码蛋白质的基因^[114]。然而,后基因组时代的蛋白质组功能研究进展却没有想象得那么顺利,其中一个原因是缺乏一个简单高效的研究系统。蛋白质表达具有时空特异性,在体、实时、动态分析蛋白质是研究生命活动规律的关键。为解决这一问题,科学家已经在低等的真核生物酵母中构建了全基因组编码蛋白质基因的原位敲入同一标签的文库,进而开展了基于同一标签抗体的蛋白质功能网络研究^[115~117]。相似的标签文库在线虫和果蝇中也已构建,但与酵母不同的是,在这两个模式动物中使用的是BAC TransgeneOmics的系统,而非原位插入^[118,119]。利用BAC TransgeneOmics,科学家也成功地在哺乳动物(人和小鼠)细胞中构建了标签细胞库^[120]。然而,该系统转入小鼠胚胎干细胞中,却难以通过传统胚胎干细胞介导转基因小鼠制备策略大规模获得标签小鼠文库。

启动基因组标签计划(genome tagging project, GTP)的目的是在基因组范围获得携带蛋白质标签的小鼠模型,类似于给所有蛋白质带上一个条形码。GTP的启动得益于两个新发展的生物技术,一是CRISPR-Cas9基因编辑技术,该技术高效、精准,使得基因原位插入外源序列变得非常简单^[121];二是基于孤雄单倍体胚胎干细胞(“人造精子细胞”)的半克隆技术^[31,32,83]。通过这两项技术的结合,可以在体外编辑“人造精子细胞”,精准获得携带标签的细胞系,进一步构建“人造精子细胞”库。重要的是,通过“人工授精”(卵胞质内单细胞注射技术),即可一步大规模获得携带标签蛋白质的小鼠库^[122]。“人造精子细胞”介导半克隆技术用于开展GTP有以下优势:(i)由于“人造精子细胞”是单倍体,基因编辑比常规的二倍体细胞效率更高且速度更快;(ii)可以对携带标签序列的细胞进行基因型分析,选择携带正确插入且不携带脱靶编辑的细胞用于下一步研究;(iii)由于不少蛋白质在胚胎干细胞中均有表达,因此可预先在培养的“人造精子细胞”中对插入标签序列是否影响蛋白质功能进行分析,确保产生的标签小鼠蛋白质功能不受到影响;(iv)只需2个月就能获得特定基因标签的小鼠,制备时间短、效率高,从而节约了大量时间和饲养小鼠的成本;(v)“人造精子细胞”以细胞的形式冷冻保存,在需要时解冻复苏,再通过卵子注射即可获得小鼠,显著缩减了通过动物保种的成本。为了推动GTP,中国科学院生物化学与细胞生

物学研究所于2017年11月成立了GTP研发中心,组建了管理团队和技术团队。GTP中心制定了一系列标准操作流程。截至2019年7月1日,中心已经构建了614个标签“人造精子细胞”系和135个标签小鼠。GTP中心将建成为具有特色、开放共享的标签小鼠资源平台,服务于国内外科学家;中心网站也已于7月正式对外开放(<http://www.sibcb.ac.cn/gtp/pro/index.jsp>),科研人员可以搜索感兴趣的标签细胞和小鼠,并定制需要的标签产品。

基于GTP的细胞和小鼠平台,可以利用一个针对标签的抗体开展所有蛋白质表达时空、动态图谱和相互作用网络研究,将极大推动蛋白质功能研究,并促进蛋白质研究的标准化^[122]。同时,基于这一特色的平台有望开展大科学研究计划,如精准描绘发育的蛋白质图谱(Protein Atlas)等^[122,123]。

4 单倍体胚胎干细胞研究的展望

单倍体胚胎干细胞结合最新的基因编辑技术在疾病模拟、遗传筛选和功能基因研究上有着独特的优势。在细胞水平,结合体外细胞分化系统,有望开展分化发育相关重要基因的遗传筛选;特别是利用人和猴的单倍体胚胎干细胞,可以筛选并研究灵长类动物发育相关的重要调控基因。另外,不同物种单倍体细胞的融合构建稳定跨物种的杂合细胞系,为进一步研究物种进化提供了新的细胞模型。在个体水平上,“人造精子细胞”介导的半克隆技术为在小鼠中快速模拟人类疾病相关突变基因、位点、基因组合和位点组合提供了强大的工具,为人类遗传学研究提供了新手段。最近,科学家利用CRISPR-Cas9技术将酵母16条染色体融合为一条^[124],进一步又对一条染色体进行了环化^[124],发现这些改变并没有显著影响酵母的基本生命活动规律。这一系列研究带来了新的科学问题:是否高等真核生物的染色体结构和数目可以改变?单倍体胚胎干细胞结合CRISPR-Cas9技术为开展哺乳动物染色体改造研究提供了方法。一方面,单倍体胚胎干细胞有利于染色体的改造,可以探讨染色体结构、数量改变是否会对细胞功能产生影响;另一方面,如果经过改造的小鼠单倍体干细胞可正常存在,则进一步可以通过卵子注射产生胚胎用于研究改造后的染色体对胚胎发育的影响,甚至建立染色体异常小鼠模型用于模拟

人类染色体异常的相关疾病^[125-127]。

单倍体胚胎干细胞在细胞和个体水平的遗传研究上展现出不可取代的优势, 为了进一步促进单倍体细胞的应用, 今后需要重点关注以下6个方面问题: (i) 单倍体细胞的自发二倍体化仍然是限制其应用的一个重要瓶颈, 解析二倍体化的分子机制不仅有助于人们了解细胞倍性调控的核心机制, 还将为稳定单倍体细胞的倍性提供线索。 (ii) 虽然“人造精子细胞”能够高效产生半克隆小鼠, 但是相比精子注射产生小鼠的效率仍有一定的差距, 进一步寻找其中原因, 不仅有助于发现胚胎发育调控的关键因素, 也为提高半克隆小鼠出生效率奠定了理论基础。 (iii) “人造精子细胞”携带的*H19*-DMR和*IG*-DMR敲除可能会为利用该技术获得多基因修饰小鼠模型模拟人类疾病带来更多

的变量, 是否能通过其他非基因编辑方式, 如优化培养条件等方法来改变印记调控区域的甲基化状态, 从而免去对*H19*-DMR和*IG*-DMR的敲除, 是解决这一问题的关键。 (iv) 目前建立的孤雄单倍体胚胎干细胞系都是由携带X染色体的单倍体囊胚而来, 分析携带Y染色体的单倍体囊胚发生发育阻滞的原因, 或可为建立携带Y染色体的孤雄单倍体胚胎干细胞系提供方向。 (v) 建立体外分化系统稳定高效产生不同功能成体干细胞或体细胞状态的单倍体细胞, 将极大促进功能基因遗传筛选研究。 (vi) 建立非人灵长类孤雄单倍体胚胎干细胞介导的半克隆技术, 将促进非人灵长类基因修饰模型的制备, 加速神经系统的发育与疾病研究^[128]。综上所述, 相信单倍体胚胎干细胞结合基因编辑技术将促进后基因组时代的功能基因研究。

参考文献

- 1 Zhang N, Bilsland E. Contributions of *Saccharomyces cerevisiae* to understanding mammalian gene function and therapy. In: Castrillo J, Oliver S, eds. *Yeast Systems Biology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. New York: Humana Press, 2011. 501–523
- 2 Shi L, Yang H, Li J. Haploid embryonic stem cells: An ideal tool for mammalian genetic analyses. *Protein Cell*, 2012, 3: 806–810
- 3 Freed J J, Mezger-Freed L. Stable haploid cultured cell lines from frog embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1970, 65: 337–344
- 4 Philippe C, Landureau J C. Culture of cockroach embryonic cells and hemocytes of parthenogenic origin. Maintenance *in vitro* of haploid and aneuploid forms. *Exp Cell Res*, 1975, 96: 287–296
- 5 Debec A. Haploid cell cultures of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 1978, 274: 255–256
- 6 Yi M, Hong N, Hong Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science*, 2009, 326: 430–433
- 7 Wiellette E, Grinblat Y, Austen M, et al. Combined haploid and insertional mutation screen in the zebrafish. *Genesis*, 2004, 40: 231–240
- 8 Patton E E, Zon L I. The art and design of genetic screens: Zebrafish. *Nat Rev Genet*, 2001, 2: 956–966
- 9 Kotecki M, Reddy P S, Cochran B H. Isolation and characterization of a near-haploid human cell line. *Exp Cell Res*, 1999, 252: 273–280
- 10 Carette J E, Guimaraes C P, Varadarajan M, et al. Haploid genetic screens in human cells identify host factors used by pathogens. *Science*, 2009, 326: 1231–1235
- 11 Carette J E, Guimaraes C P, Wuethrich I, et al. Global gene disruption in human cells to assign genes to phenotypes by deep sequencing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 542–546
- 12 Carette J E, Raaben M, Wong A C, et al. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature*, 2011, 477: 340–343
- 13 Kaufman M H. The chromosome complement of single-pronuclear haploid mouse embryos following activation by ethanol treatment. *J Embryol Exp Morphol*, 1982, 71: 139–154
- 14 Modlinski J A. Haploid mouse embryos obtained by microsurgical removal of one pronucleus. *J Embryol Exp Morphol*, 1975, 33: 897–905
- 15 Modlinski J A. Preimplantation development of microsurgically obtained haploid and homozygous diploid mouse embryos and effects of pretreatment with Cytochalasin B on enucleated eggs. *J Embryol Exp Morphol*, 1980, 60: 153–161
- 16 Graham C F. The production of parthenogenetic mammalian embryos and their use in biological research. *Biol Rev*, 1974, 49: 399–422
- 17 Tarkowski A K. Induced parthenogenesis in the mouse. In: *The Society for Developmental Biology*. New York. 1975. 107–129
- 18 Kaufman M H. Parthenogenesis in the mouse. *Nature*, 1973, 242: 475–476
- 19 Kaufman M H, Gardner R L. Diploid and haploid mouse parthenogenetic development following *in vitro* activation and embryo transfer. *J Embryol Exp Morphol*, 1974, 31: 635–642
- 20 Kaufman M H. Timing of the first cleavage division of haploid mouse eggs, and the duration of its component stages. *J Cell Sci*, 1973, 13: 553–

566

- 21 Kaufman M H, Sachs L. Complete preimplantation development in culture of parthenogenetic mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 1976, 35: 179–190
- 22 Tarkowski A K, Rossant J. Haploid mouse blastocysts developed from bisected zygotes. *Nature*, 1976, 259: 663–665
- 23 Latham K E, Akutsu H, Patel B, et al. Comparison of gene expression during preimplantation development between diploid and haploid mouse embryos. *Biol Reprod*, 2002, 67: 386–392
- 24 Iles S A, McBurney M W, Bramwell S R, et al. Development of parthenogenetic and fertilized mouse embryos in the uterus and in extra-uterine sites. *J Embryol Exp Morphol*, 1975, 34: 387–405
- 25 Kaufman M H. Chromosome analysis of early postimplantation presumptive haploid parthenogenetic mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 1978, 45: 85–91
- 26 Ito M, Kaneko-Ishino T, Ishino F, et al. Fate of haploid parthenogenetic cells in mouse chimeras during development. *J Exp Zool*, 1991, 257: 178–183
- 27 Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292: 154–156
- 28 Kaufman M H, Robertson E J, Handyside A H, et al. Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 1983, 73: 249–261
- 29 Leeb M, Wutz A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature*, 2011, 479: 131–134
- 30 Elling U, Taubenschmid J, Wirsberger G, et al. Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 563–574
- 31 Yang H, Shi L, Wang B A, et al. Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell*, 2012, 149: 605–617
- 32 Li W, Shuai L, Wan H, et al. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature*, 2012, 490: 407–411
- 33 Bai M, Wu Y, Li J. Generation and application of mammalian haploid embryonic stem cells. *J Intern Med*, 2016, 280: 236–245
- 34 Li Y, Li J, Bartolomei M S. Technical advances contribute to the study of genomic imprinting. *PLoS Genet*, 2019, 15: e1008151
- 35 Wang L, Li J. “Artificial spermatid”-mediated genome editing. *Biol Reprod*, 2019, 101: 538–548
- 36 Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282: 1145–1147
- 37 Suemori H, Tada T, Torii R, et al. Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Dev Dyn*, 2001, 222: 273–279
- 38 Thomson J A, Kalishman J, Golos T G, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7844–7848
- 39 Thomson J A, Kalishman J, Golos T G, et al. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod*, 1996, 55: 254–259
- 40 Buehr M, Meek S, Blair K, et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell*, 2008, 135: 1287–1298
- 41 Li W, Li X, Li T, et al. Genetic modification and screening in rat using haploid embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 404–414
- 42 Hirabayashi M, Hara H, Goto T, et al. Haploid embryonic stem cell lines derived from androgenetic and parthenogenetic rat blastocysts. *J Reprod Dev*, 2017, 63: 611–616
- 43 Yang H, Liu Z, Ma Y, et al. Generation of haploid embryonic stem cells from *Macaca fascicularis* monkey parthenotes. *Cell Res*, 2013, 23: 1187–1200
- 44 Wang H, Zhang W, Yu J, et al. Genetic screening and multipotency in rhesus monkey haploid neural progenitor cells. *Development*, 2018, 145: dev160531
- 45 Zhong C, Zhang M, Yin Q, et al. Generation of human haploid embryonic stem cells from parthenogenetic embryos obtained by microsurgical removal of male pronucleus. *Cell Res*, 2016, 26: 743–746
- 46 Sagi I, Chia G, Golan-Lev T, et al. Derivation and differentiation of haploid human embryonic stem cells. *Nature*, 2016, 532: 107–111
- 47 Ying Q L, Wray J, Nichols J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 2008, 453: 519–523
- 48 Nichols J, Jones K, Phillips J M, et al. Validated germline-competent embryonic stem cell lines from nonobese diabetic mice. *Nat Med*, 2009, 15: 814–818
- 49 Ellwart J W, Dörner P. Vitality measurement using spectrum shift in Hoechst 33342 stained cells. *Cytometry*, 1990, 11: 239–243
- 50 Shapiro H M. Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with Hoechst 33342 and pyronin Y. *Cytometry*, 1981,

- 2: 143–150
- 51 Garner D L, Evans K M, Seidel G E. Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. In: Carrell D, Aston K, eds. *Spermatogenesis. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Totowa: Humana Press, 2013. 279–295
- 52 Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell*, 2008, 135: 1299–1310
- 53 Wolf D P, Kuo H C, Pau K Y F, et al. Progress with nonhuman primate embryonic stem cells. *Biol Reprod*, 2004, 71: 1766–1771
- 54 Byrne J A, Mitalipov S M, Wolf D P. Current progress with primate embryonic stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2006, 1: 127–138
- 55 Brook F A. Single-cell enzymatic dissociation of hESC lines OxF1-OxF4 and culture in feeder-free conditions. In: Turksen K, ed. *Human Embryonic Stem Cells Handbook. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Totowa: Humana Press, 2012. 209–215
- 56 Chen A E, Egli D, Niakan K, et al. Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell lines. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 103–106
- 57 Bajpai R, Lesperance J, Kim M, et al. Efficient propagation of single cells accutase-dissociated human embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75: 818–827
- 58 Kessous A, Colombies P, Pris J, et al. Near haploid cell line in lymphoid blast crisis of Ph1-positive chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*, 1980, 40: 1354–1359
- 59 Leeb M, Walker R, Mansfield B, et al. Germline potential of parthenogenetic haploid mouse embryonic stem cells. *Development*, 2012, 139: 3301–3305
- 60 Takahashi S, Lee J, Kohda T, et al. Induction of the G2/M transition stabilizes haploid embryonic stem cells. *Development*, 2014, 141: 3842–3847
- 61 Guo A, Huang S, Yu J, et al. Single-cell dynamic analysis of mitosis in haploid embryonic stem cells shows the prolonged metaphase and its association with self-diploidization. *Stem Cell Rep*, 2017, 8: 1124–1134
- 62 Li H, Guo A, Xie Z, et al. Stabilization of mouse haploid embryonic stem cells with combined kinase and signal modulation. *Sci Rep*, 2017, 7: 13222
- 63 He Z Q, Xia B L, Wang Y K, et al. Generation of mouse haploid somatic cells by small molecules for genome-wide genetic screening. *Cell Rep*, 2017, 20: 2227–2237
- 64 Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 487–492
- 65 Zhao H, Yang L, Cui H. SIRT1 regulates autophagy and diploidization in parthenogenetic haploid embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464: 1163–1170
- 66 Zhong C, Li J. Efficient generation of gene-modified mice by haploid embryonic stem cell-mediated semi-cloned technology. In: Reeves A, ed. *In Vitro Mutagenesis. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press, 2017. 121–133
- 67 Qu C, Yan M, Yang S, et al. Haploid embryonic stem cells can be enriched and maintained by simple filtration. *J Biol Chem*, 2018, 293: 5230–5235
- 68 Freimann R, Wutz A. A fast and efficient size separation method for haploid embryonic stem cells. *Biomicrofluidics*, 2017, 11: 054117
- 69 Morris T. The XO and OY chromosome constitutions in the mouse. *Genet Res*, 1968, 12: 125–137
- 70 Shuai L, Zhou Q. Haploid embryonic stem cells serve as a new tool for mammalian genetic study. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5: 20
- 71 Li Y, Shuai L. A versatile genetic tool: Haploid cells. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8: 197
- 72 Cui T, Jiang L, Li T, et al. Derivation of mouse haploid trophoblast stem cells. *Cell Rep*, 2019, 26: 407–414.e5
- 73 Peng K, Li X, Wu C, et al. Derivation of haploid trophoblast stem cells via conversion *in vitro*. *iScience*, 2019, 11: 508–518
- 74 He R, Kidder B L. Culture of haploid blastocysts in FGF4 favors the derivation of epiblast stem cells with a primed epigenetic and transcriptional landscape. *Sci Rep*, 2018, 8: 10775
- 75 Shuai L, Wang Y, Dong M, et al. Durable pluripotency and haploidy in epiblast stem cells derived from haploid embryonic stem cells *in vitro*. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7: 326–337
- 76 Gao Q, Zhang W, Ma L, et al. Derivation of haploid neural stem cell lines by selection for a *Pax6-GFP* reporter. *Stem Cells Dev*, 2018, 27: 479–487
- 77 Xu H, Yue C, Zhang T, et al. Derivation of haploid neurons from mouse androgenetic haploid embryonic stem cells. *Neurosci Bull*, 2017, 33: 361–364
- 78 Barlow D P, Bartolomei M S. Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6: a018382

- 79 McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, 1984, 37: 179–183
- 80 Surani M A H, Barton S C, Norris M L. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, 1984, 308: 548–550
- 81 Ferguson-Smith A C, Sasaki H, Cattanach B M, et al. Parental-origin-specific epigenetic modification of the mouse *H19* gene. *Nature*, 1993, 362: 751–755
- 82 Zhang M, Liu Y, Liu G, et al. Rapidly generating knockout mice from H19-Igf2 engineered androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell Discov*, 2015, 1: 15031
- 83 Zhong C, Yin Q, Xie Z, et al. CRISPR-Cas9-mediated genetic screening in mice with haploid embryonic stem cells carrying a guide RNA library. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 221–232
- 84 Li Q, Li Y, Yin Q, et al. Temporal regulation of prenatal embryonic development by paternal imprinted loci. *Sci China Life Sci*, 2019, 62: 1–17
- 85 Wan H, He Z, Dong M, et al. Parthenogenetic haploid embryonic stem cells produce fertile mice. *Cell Res*, 2013, 23: 1330–1333
- 86 Elling U, Penninger J M. Genome wide functional genetics in haploid cells. *FEBS Lett*, 2014, 588: 2415–2421
- 87 Monfort A, Di Minin G, Postlmayr A, et al. Identification of *Spn* as a crucial factor for *Xist* function through forward genetic screening in haploid embryonic stem cells. *Cell Rep*, 2015, 12: 554–561
- 88 Pettitt S J, Rehman F L, Bajrami I, et al. A genetic screen using the PiggyBac transposon in haploid cells identifies Parp1 as a mediator of olaparib toxicity. *PLoS ONE*, 2013, 8: e61520
- 89 Leeb M, Dietmann S, Paramor M, et al. Genetic exploration of the exit from self-renewal using haploid embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 385–393
- 90 Yilmaz A, Peretz M, Aharoni A, et al. Defining essential genes for human pluripotent stem cells by CRISPR-Cas9 screening in haploid cells. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 610–619
- 91 Koike-Yusa H, Li Y, Tan E P, et al. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 267–273
- 92 Shalem O, Sanjana N E, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343: 84–87
- 93 Wang T, Wei J J, Sabatini D M, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343: 80–84
- 94 Elling U, Wimmer R A, Leibbrandt A, et al. A reversible haploid mouse embryonic stem cell biobank resource for functional genomics. *Nature*, 2017, 550: 114–118
- 95 Yamanishi A, Matsuba A, Kondo R, et al. Collection of homozygous mutant mouse embryonic stem cells arising from autodiploidization during haploid gene trap mutagenesis. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: e63
- 96 Li X, Cui X L, Wang J Q, et al. Generation and application of mouse-rat allodiploid embryonic stem cells. *Cell*, 2016, 164: 279–292
- 97 Barton S C, Surani M A H, Norris M L. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature*, 1984, 311: 374–376
- 98 Kono T, Obata Y, Yoshimzu T, et al. Epigenetic modifications during oocyte growth correlates with extended parthenogenetic development in the mouse. *Nat Genet*, 1996, 13: 91–94
- 99 Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 2002, 3: 662–673
- 100 Kono T, Obata Y, Wu Q, et al. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature*, 2004, 428: 860–864
- 101 Kawahara M, Wu Q, Takahashi N, et al. High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 1045–1050
- 102 Zhong C, Xie Z, Yin Q, et al. Parthenogenetic haploid embryonic stem cells efficiently support mouse generation by oocyte injection. *Cell Res*, 2016, 26: 131–134
- 103 Li Z, Wan H, Feng G, et al. Birth of fertile bimaternal offspring following intracytoplasmic injection of parthenogenetic haploid embryonic stem cells. *Cell Res*, 2016, 26: 135–138
- 104 Li Z K, Wang L Y, Wang L B, et al. Generation of bimaternal and bipaternal mice from hypomethylated haploid ESCs with imprinting region deletions. *Cell Stem Cell*, 2018, 23: 665–676.e4
- 105 Jin L F, Li J S. Generation of genetically modified mice using CRISPR/Cas9 and haploid embryonic stem cell systems. *Zool Res*, 2016, 37: 205–213
- 106 Wei L, Wang X, Yang S, et al. Efficient generation of the mouse model with a defined point mutation through haploid cell-mediated gene editing. *J Genet Genomics*, 2017, 44: 461–463

- 107 Wang X, Kang J Y, Wei L, et al. PHF7 is a novel histone H2A E3 ligase prior to histone-to-protamine exchange during spermiogenesis. [Development](#), 2019, 146: dev175547
- 108 Liu H, Huang T, Li M, et al. SCRE serves as a unique synaptonemal complex fastener and is essential for progression of meiosis prophase I in mice. [Nucleic Acids Res](#), 2019, 47: 5670–5683
- 109 Yin Q, Wang H, Xie Z, et al. Dosage effect of multiple genes accounts for multisystem disorder of myotonic dystrophy type 1. [bioRxiv](#), 2019
- 110 Wang L, Zhang Y, Fu X, et al. Joint utilization of genetic analysis and semi-cloning technology reveals a digenic etiology of Müllerian anomalies. [Cell Res](#), 2019, 364
- 111 Bai M, Han Y, Wu Y, et al. Targeted genetic screening in mice through haploid embryonic stem cells identifies critical genes in bone development. [PLoS Biol](#), 2019, 17: e3000350
- 112 Li Q, Li Y, Yang S, et al. CRISPR-Cas9-mediated base-editing screening in mice identifies DND1 amino acids that are critical for primordial germ cell development. [Nat Cell Biol](#), 2018, 20: 1315–1325
- 113 Serebrenik Y V, Shalem O. CRISPR mutagenesis screening of mice. [Nat Cell Biol](#), 2018, 20: 1235–1237
- 114 International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. [Nature](#), 2004, 431: 931–945
- 115 Gavin A C, Bösch M, Krause R, et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. [Nature](#), 2002, 415: 141–147
- 116 Huh W K, Falvo J V, Gerke L C, et al. Global analysis of protein localization in budding yeast. [Nature](#), 2003, 425: 686–691
- 117 Ghaemmaghami S, Huh W K, Bower K, et al. Global analysis of protein expression in yeast. [Nature](#), 2003, 425: 737–741
- 118 Sarov M, Barz C, Jambor H, et al. A genome-wide resource for the analysis of protein localisation in *Drosophila*. [eLife](#), 2016, 5: e12068
- 119 Sarov M, Murray J I, Schanze K, et al. A genome-scale resource for *in vivo* tag-based protein function exploration in *C. elegans*. [Cell](#), 2012, 150: 855–866
- 120 Poser I, Sarov M, Hutchins J R A, et al. BAC TransgeneOmics: A high-throughput method for exploration of protein function in mammals. [Nat Methods](#), 2008, 5: 409–415
- 121 Doudna J A, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. [Science](#), 2014, 346: 1258096
- 122 Jiang J, Yan M, Li D, et al. Genome tagging project: Tag every protein in mice through 'artificial spermatids'. [Natl Sci Rev](#), 2019, 6: 394–396
- 123 Yan M, Li J. The evolving CRISPR technology. [Protein Cell](#), 2019, 10: 783–786
- 124 Shao Y, Lu N, Wu Z, et al. Creating a functional single-chromosome yeast. [Nature](#), 2018, 560: 331–335
- 125 Eichenlaub-Ritter U. Mouse genetic models for aneuploidy induction in germ cells. [Cytogenet Genome Res](#), 2005, 111: 392–400
- 126 Sheppard O, Wiseman F K, Ruparel A, et al. Mouse models of aneuploidy. [Sci World J](#), 2012, 2012(2): 1–6
- 127 Tybulewicz V L J, Fisher E M C. New techniques to understand chromosome dosage: Mouse models of aneuploidy. [Human Mol Genets](#), 2006, 15: R103–R109
- 128 Wang L, Li J. Expansion of the mutant monkey through cloning. [Sci China Life Sci](#), 2019, 62: 865–867

Generation and applications of mammalian haploid embryonic stem cells

DING YiFu¹, LI JinSong¹ & ZHOU Qi²

1 State Key Laboratory of Cell Biology, CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

2 State Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Mammalian embryonic stem cells (ESCs) are usually diploid, which greatly limit their applications in genetic studies due to existence of two copies of each gene. Recently, the haploid embryonic stem cells (haESCs) have been established from different species, enabling large-scale forward or reverse genetic screening in mammals. The haESCs, same as diploid ESCs, sustain the abilities of self-renewal, proliferation and differentiation, greatly enhancing genetic analyses at the cellular level. Meanwhile, the allodiploid ESCs derived by fusion of haESCs from mice and rats provide a unique system to study the evolution of genes. Besides, the ability of mouse haESCs that can be used as sperm replacement for generation of animals opens new avenues for functional genetics *in vivo*, such as investigating the roles of imprinted genes during prenatal embryonic development, generation of mouse models carrying complex gene modifications to mimic human diseases and screening for critical genes or amino acids of a specific protein involved in a developmental process of interest. Genome Tagging Project (GTP) proposed based on haESCs was initiated recently with the goal to tag every protein in haESCs, followed by generation of tagged mice at genome-wide scale. GTP will provide a standard platform for the protein study, which may enable precise description of protein atlas and regulatory networks during embryonic development.

haploid embryonic stem cells, genetic screening, allodiploid embryonic stem cells, “artificial spermatids”, genome tagging project

doi: [10.1360/SSV-2019-0170](https://doi.org/10.1360/SSV-2019-0170)