

Caveolin-1 基因敲除小鼠子代基因型的鉴定及繁育方法

周胜强¹, 罗东¹, 黄素芬¹, 易健², 刘柏炎^{1*}

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

【摘要】 目的 探讨小凹蛋白-1 (caveolin-1) 基因敲除小鼠的鉴定方法与最优繁育方式, 为深入研究 caveolin-1 在脑缺血损伤修复中的作用提供理想的动物模型。**方法** 将引进的 caveolin-1 基因敲除小鼠饲养于 SPF 级实验室, 煮沸裂解法提取鼠尾组织基因组 DNA, 根据美国杰克逊实验室 (Jackson Laboratory) 提供的引物序列进行 PCR 反应检测其基因型, 采用 caveolin-1^{+/+} 杂合子互交、杂合子与 caveolin-1^{-/-} 纯合子杂交 (正交及反交)、纯合子互交 4 种不同的交配方式, 观察亲代小鼠的受孕率、子代小鼠的外形特征及纯合率。**结果** 琼脂糖凝胶电泳显示 PCR 产物分子量大小约 200 bp 和 661 bp, 与预期的目的基因片段分子量大小一致, 成功鉴定了 caveolin-1 基因敲除小鼠的不同基因型; 不同交配方式的繁殖结果基本符合孟德尔遗传规律, 且雌性、雄性 caveolin-1^{-/-} 纯合鼠具有一定的繁殖能力, 三种不同基因型小鼠的外形特征无明显差异。**结论** 煮沸裂解法提取基因组 DNA, PCR 法能够快速可靠鉴定 caveolin-1 基因敲除小鼠的基因型; caveolin-1 杂合子小鼠互交与纯合子互相结合繁育方法可能是短期内获得足量纯合子子鼠与同源野生子鼠的较好方式。

【关键词】 小凹蛋白-1; 基因敲除; 小鼠; 鉴定; 繁育方法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0228-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.002

Genotype identification and breeding method of caveolin-1 gene knockout mice

ZHOU Sheng-qiang¹, LUO Dong¹, HUANG Su-feng¹, YI Jian², LIU Bai-yan^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007)

【Abstract】 Objective To investigate the identification and optimal breeding method of caveolin-1 knockout mice, and provide an ideal animal model for further study of the role of caveolin-1 in cerebral ischemic injury and repair. **Methods** The introduced caveolin-1 gene knockout mice were reared in the SPF laboratory and genomic DNA was extracted from mouse tail tissue by the method of boiling lysis. According to the primer sequences provided by the Jackson Laboratory of America for polymerase chain reaction (PCR) to detect the genotypes, with the four different ways of mating: caveolin-1^{+/+} heterozygote intercrossing, heterozygous and homozygous caveolin-1^{-/-} hybrid (orthogonal and pay) as well as homozygous intercrossing. The pregnancy rate, shape characteristics of the filial generation mice and homozygous rate of the parental mice were observed. **Results** Agarose gel electrophoresis results indicated that the size of molecular weight of the PCR products was about 200 bp and 661 bp, which were consistent with the expected target gene fragment, and identified caveolin-1 gene knockout mice of different genotypes successfully. The results of different mating patterns are basically in agreement with Mendel rule, and the female and male caveolin-1^{-/-} homozygous mice had a certain ability to reproduce, three different genotypes of mice had no significant differences between the shape features. **Conclusions** PCR can fast and reliably identify the genotypes of caveolin-1 knockout mice using genomic DNA through the method of boiling lysis. Combi-

【基金项目】 国家自然科学基金 (NO. 81273989); 湖南省教育厅创新平台项目 (NO. 12K089)。

【作者简介】 周胜强 (1988 -), 男, 博士研究生, 从事中医药防治脑血管疾病及神经干细胞研究。Email: 549160941@qq.com

【通讯作者】 刘柏炎 (1970 -), 男, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合防治脑血管疾病及神经干细胞研究。Email: liubaiyan@126.com

ning the breeding methods of intercrossing of caveolin-1 heterozygous mice and intercrossing of caveolin-1 homozygous mice may be a good way to obtain enough homozygous mice and homologous wild type mice in a short period.

[Key words] Caveolin-1; Gene knockout; Mice; Identification; Breeding methods

Corresponding author: LIU Bai-yan. E-mail: liubaiyan@126.com

基因敲除小鼠是建立在胚胎干细胞技术与基因同源重组或 TALEN、CRISPR/cas9 等技术上的一种定向改变生物活体遗传信息的转基因动物,是研究疾病的发病机制、分子基础及寻找合适药物靶标的重要工具^[1-2]。目前,通过对基因敲除小鼠的研究,许多与人类疾病相关新基因的功能得到了阐明,且与以往腺病毒或脂质体转染基因过表达系统和 SiRNA 干扰等基因沉默研究手段相比具有显著的优越性^[3]。

小凹蛋白-1(caveolin-1)是细胞质膜微囊(caveolae)的标志性蛋白^[4]。近年 caveolin-1 的研究主要集中在胆固醇转运、肿瘤发生与侵袭转移方面^[5-6],在神经生物学研究中尚处于起始阶段。研究发现,caveolin-1 在哺乳动物脑内多个部位均有表达,参与了脑的正常发育成熟及海马可塑性的调控^[7-8],能影响成年小鼠脑内室管膜下区(subventricular zone, SVZ)及海马齿状回颗粒下层(subgranular zone, SGZ)神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的增殖与分化^[9-10]。国外研究报道 caveolin-1 基因敲除加重了脑缺血损伤^[11],课题组前期研究发现缺血性脑损伤能上调大鼠脑内 caveolin-1 蛋白的表达^[12],但其机制尚不完全清楚。

由于转基因小鼠具有能够从动物整体水平上模拟相关基因在体内的功能等诸多优势,为了更好地研究 caveolin-1 蛋白在脑缺血损伤修复中的作用及机制,我们 2011 年从美国杰克逊实验室(Jackson Laboratory)成功引进了 SPF 级 caveolin-1 基因敲除杂合子小鼠,在湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心动物房内饲养,并成功进行了鉴定与不同繁育方法比较。现将该小鼠的基因型鉴定、繁育过程报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

Caveolin-1 基因敲除小鼠亲代购自美国 Jackson Laboratory (Maine, USA),批号:2909619,SPF 级,库存号:007083,品系名:B6. Cg-Cav1^{tm1Mls}/J,遗传背景:C57BL/6,基因型:杂合子 caveolin-1^{+/-}。小鼠

的月龄 2~3 月,体重(25±5)g。

1.1.2 主要仪器及试剂

PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:T100 thermal cycler),化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司,型号:XRS + Imager),台式高速冷冻离心机(德国 Hermle 公司,型号:Z32HK),核酸水平电泳仪(北京百晶生物技术有限公司,型号:BG-SUHWI-DI),超纯水机(上海摩勒科学仪器有限公司,型号:摩尔超纯水机动物型 5009-11-582);基因组 DNA 提取溶液(A 液:25 mM NaOH + 2 mM EDTA;B 液:40 mM Tris-HCl),DreamTaq Green PCR Master Mix (2×)(美国 Thermo Scientific 公司,批号:00220411),100 bp DNA ladder(北京 Solarbio 科技有限公司,批号:20141103),Biowest Regular Agarose G-10(广州翔博生物科技有限公司,批号:111910)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠饲养

Caveolin-1 基因敲除小鼠饲养在湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心独立通气笼盒(individually ventilated cages, IVC)系统中,环境温度控制在(24±0.5)℃,相对湿度 50%~60%,自由饮食进水,昼夜光照节律。采用斯莱康大小鼠繁殖饲料及灭菌垫料,二者均为 SPF 级,垫料每周更换 2 次,饮水为超纯水,每日补充饲料及饮水。饲养笼具及饮水瓶每次更换清洗后均使用 84 消毒液浸泡,自来水冲洗后高压灭菌处理。

1.2.2 繁育方法

先将 caveolin-1 基因敲除杂合子雄性与雌性小鼠按 1:1 搭配,繁殖多代子鼠后,再将不同基因型性成熟(8 周龄左右)雌雄小鼠按以下四种方式 1:1 合笼配种:caveolin-1^{+/-} ♂ 与 caveolin-1^{+/-} ♀,caveolin-1^{+/-} ♂ 与 caveolin-1^{-/-} ♀,caveolin-1^{-/-} ♂ 与 caveolin-1^{+/-} ♀,caveolin-1^{-/-} ♂ 与 caveolin-1^{-/-} ♀,每组配对 8 对,均交配两个月。

1.3 基因型鉴定

(1)鼠尾基因组 DNA 的提取:采用煮沸裂解法^[13]提取鼠尾组织基因组 DNA:剪取小鼠尾尖 0.3~0.5 cm,置于 0.2 mL PCR 管中,置冰上剪碎,加入 A 液 100 μL 浸没组织,PCR 仪 95℃加热

2 h,冷却后加入 B 液 100 μ L,吹打混匀,12 000 r/min,4℃ 离心 5 min,取上清基因组 DNA,4℃ 冰箱备用。

(2)PCR 扩增:引物序列由 Jackson Laboratory 提供, Wild type forward: 5'-GCACACCAAGGAGATT-GACC-3', Common: 5'-CTTGGCTGTCACCACACAC-3', Mutant reverse: 5'-CTCCAGACTGCCTTGGGAAAA-3',由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,为干粉状,稀释 100 倍后等体积混合后备用。PCR 反应体系为 20 μ L:2 $\times$ DreamTaq Green PCR Master Mix 10 μ L,模板 DNA 2 μ L,引物混合物 1 μ L,ddH₂O 7 μ L。采用 PCR 仪进行扩增,反应条件为预变性 95℃ 3 min,变性 95℃ 30 s,退火 60℃ 30 s,延伸 72℃ 45 s,循环 40 次,72℃ 5 min 终止反应。

(3)琼脂糖凝胶电泳:取 PCR 扩增产物 6 μ L,在 2% 琼脂糖凝胶中以 150 V 由负极向正极电泳 30 min,于化学发光凝胶成像系统中拍照观察。

(4)基因型结果判定:Common 和 mutant reverse 引物扩增产物长度为 200 bp 左右,为 KO 小鼠;wild type forward 和 common 引物扩增产物长度为 661 bp,为 WT 小鼠;两条电泳条带均存在的为 HET 小鼠。

1.4 不同繁殖方式繁育结果观察

交配后密切观察小鼠的受孕情况,计算其受孕率;从娩出后第 1~28 天每周定期观察其外形特征,离乳后剪尾检测其基因型,计算纯合率。

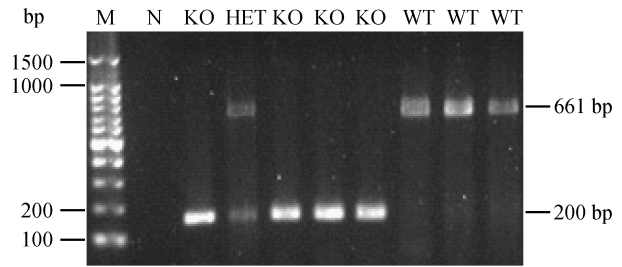
1.5 统计学方法

计量资料数据用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较,用单因素方差分析(One-way ANOVA)。计数资料组间比较,用 χ^2 检验。所有数据均用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 部分小鼠基因型鉴定结果

部分小鼠鼠尾基因组 DNA 扩增产物凝胶电泳结果(图 1):N 为阴性对照未见电泳条带,仅 200 bp 左右位置可见条带为 caveolin-1 基因敲除纯合子,仅 661 bp 位置可见条带为野生型,200 bp 左右和 661 bp 位置两条条带均可见为 caveolin-1 基因敲除杂合子。



注:M:Marker(100 bp DNA ladder);
N:阴性对照;KO:纯合子;HET:杂合子;WT:野生型。

图 1 部分小鼠基因型 PCR 鉴定结果
Note: M: Marker(100 bp DNA ladder) N: Negative control
KO: Homozygote. HET: Heterozygote. WT: Wild type.

Fig.1 Results of genotype
identification of some mice by PCR

2.2 不同繁殖方法繁育结果

Caveolin-1 基因敲除杂合子互交、杂合子与纯合子正交、反交以及纯合子互交,四种不同配种繁殖方式所产子代小鼠的基因型分布基本符合孟德尔遗传定律(表 1),其纯合率分别为 23.52%、47.36%、52.54%、100.00%。杂合子互交雌鼠受孕率为 100.00%,杂合子与纯合子正交、反交雌鼠受孕率均为 87.50%,纯合子互交雌鼠受孕率为 75.00%,杂合子互交种群与其余三种繁殖方式的雌鼠受孕率比较,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

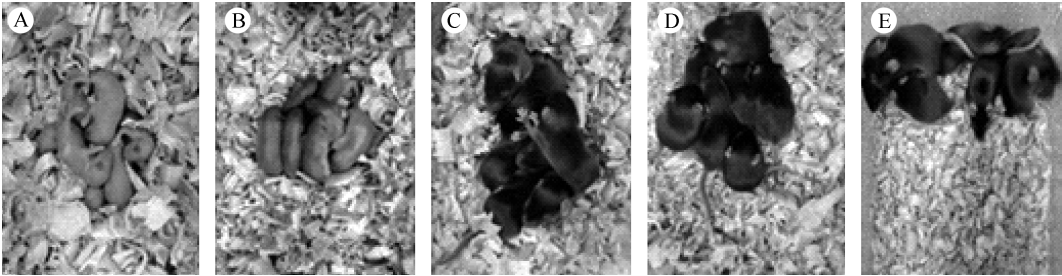
表 1 Caveolin-1 基因敲除小鼠不同繁殖方法繁育结果($n = 8$)						
Tab.1 Breeding results of different propagation method in the caveolin-1 gene knockout mice						
种群编号 Number	配种方式 Method $\delta \times \varphi$	子鼠基因型/只 Genotype/ n			合计/只 Total/ n	受孕率/% Pregnancy rate/%
		+/+	+/-	-/-		
1	+/- $\times$ +/-	19	33	16	68	100.00
2	+/- $\times$ -/-	0	30	27	57	87.50*
3	-/- $\times$ +/-	0	28	31	59	87.50*
4	-/- $\times$ -/-	0	0	30	70	75.00*

注:与种群编号 1 比较,* $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the population No. 1, * $P < 0.05$.

2.3 三种不同基因型小鼠外形特征

Caveolin-1 基因敲除杂合子小鼠互交所生子代新生幼鼠呈肉红色, 赤裸无毛, 两眼紧闭, 两耳粘贴在皮肤上, 尾短, 四肢不发达, 活动能力有限(图 2A)。7

日龄、14 日龄、21 日龄及 28 日龄不同基因型小鼠(经基因型鉴定存在 caveolin-1^{+/-} 杂合子、caveolin-1^{-/-} 纯合子、caveolin-1^{+/+} 野生型三种不同基因型)在外观形态上未见明显差异(图 2B、C、D、E)。



注: A:1 日龄子鼠; B:7 日龄子鼠;
C:14 日龄子鼠; D:21 日龄子鼠; E:28 日龄子鼠。

图 2 三种不同基因型不同日龄子鼠外形特征

Note: A: 1-day-old mouse. B:7-day-old mouse. C:14-day-old mouse. D:21-day-old mouse. E: 28-day-old mouse.

Fig. 2 Appearance of three different genotypes of mice at different ages

3 讨论

Caveolae 是 20 世纪 50 年代由日本科学家 Yamada 发现并命名的细胞膜上烧瓶状凹陷, 大小约 50 ~ 100 nm, 在血管内皮细胞、脂肪细胞、平滑肌细胞等细胞上表达丰富, 在细胞的囊泡转运、胆固醇体内平衡以及细胞信号转导等生物学过程调控发挥着重要作用^[4, 14-15]。Caveolin-1 是 caveolae 的关键结构与功能蛋白, 肽链中间由疏水性的氨基酸形成一个发夹样结构将其锚定在细胞膜上, 而亲水性的 C 端和 N 端均朝向胞质, 在其 N 端包含了由 20 个氨基酸残基组成的脚手架区域(caveolin-1 scaffolding domain, CSD), caveolin-1 通过其 CSD 能够寡聚细胞内各种信号分子的催化亚基(如 Src 家族激酶、丝/苏氨酸激酶、G 蛋白、蛋白激酶 A、蛋白激酶 C、生长因子受体以及一氧化氮合成酶等), 对其活性状态起直接调节作用, 从而参与了细胞增殖分化、炎症反应等多种病理、生理过程^[16]。

基因型鉴定是进行基因敲除小鼠繁育保种的重要环节之一, 其方法主要包括传统的 Southern bolt 法和 PCR 法^[17]。本研究采用煮沸裂解法提取鼠尾组织基因组 DNA, 参照 Jackson Laboratory 提供的引物序列, 通过普通 PCR 扩增凝胶电泳成功鉴定出 caveolin-1 敲除鼠的基因型, 与用 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA、Southern bolt 法鉴定比较, 整个过程耗时较短、费用较低, 说明该方法可以作为检测 caveolin-1 敲除小鼠基因型的一种快速可靠方法。

基因敲除小鼠由于被敲除的基因功能各不相

同, 使得敲除小鼠的某些功能丧失, 可能造成生长发育或生殖功能障碍, 故在饲养繁殖及保种方面与普通实验小鼠相比有不同的要求^[18]。研究结果表明三种不同基因型小鼠在外观形态上未见明显差异, 与国外学者 Trushina 等^[6]报道的结果一致; Caveolin-1 基因敲除杂合子小鼠的繁殖能力未受影响, 根据孟德尔遗传定律, 采用杂合子互交, 子代小鼠可能出现纯合子(caveolin-1^{-/-})、杂合子(caveolin-1^{+/-})和野生型(caveolin-1^{+/+})三种基因型, 其比例接近 1:2:1, 获得的 caveolin-1^{-/-} 纯合子小鼠可用于实验研究, caveolin-1^{+/+} 野生型小鼠可用作阴性对照, caveolin-1^{+/-} 杂合子小鼠可用来保种, 因此, 该繁育方法能同时兼顾了实验与保种需求, 但纯合子获得率仅 50% 左右, 若短期内需要使用大量纯合子用于实验则无法提供; 纯合子的繁殖能力虽有所下降, 但尚未完全丧失, 具有一定的繁殖能力, 而纯合子互交所产子代纯合率为 100%, 无杂合子与野生型子鼠, 故短期内若需提高纯合子数量以及使用同源野生鼠用作实验, 采用杂合子互交与纯合子互相结合的繁育方法可能是一种较好的选择。通过一段时间的饲养鉴定、繁殖, 目前已获得了一定数量的 caveolin-1 基因敲除小鼠, 这为深入研究 caveolin-1 在脑缺血损伤修复中的作用及药物靶标的筛选提供了前期基础。

参 考 文 献

[1] Guan C, Ye C, Yang X, et al. A review of current large-scale mouse knockout efforts [J]. Genesis, 2010, 48(2): 73-85.
[2] 白敏, 李崎, 邵艳姣, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建定点

- 突变小鼠品系 [J]. 遗传, 2015, 37(10): 1029–1035.
- [3] 周仁鹏, 吴小山, 王志森, 等. ASIC1 基因敲除小鼠的繁殖及基因鉴定 [J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(9): 1341–1343.
- [4] Parat MO. The biology of caveolae: achievements and perspectives [J]. Int Rev Cell Mol Biol. 2009, 273:117–162.
- [5] Wang F, Gu H, Zhang D. Caveolin-1 and ATP binding cassette transporter A1 and G1-mediated cholesterol efflux [J]. Cardio Haematol Disorders-Drug Targets, 2014, 14(2): 142–148.
- [6] Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, et al. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly [J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(4): 715–735.
- [7] Trushina E, Du Charmé J, Parisi J, et al. Neurological abnormalities in caveolin-1 knock out mice [J]. Behav Brain Res, 2006, 172(1): 24–32.
- [8] Gaudreault S B, Blain J F, Gratton J P, et al. A role for caveolin-1 in post-injury reactive neuronal plasticity [J]. J Neurochem, 2005, 92(4): 831–839.
- [9] Jasmin JF, Yang M, Iacovitti L, et al. Genetic ablation of caveolin-1 increases neural stem cell proliferation in the subventricular zone (SVZ) of the adult mouse brain [J]. Cell Cycle, 2009, 8(23): 3978–3983.
- [10] Li Y, Luo J, Lau W M, et al. Caveolin-1 plays a crucial role in inhibiting neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells via VEGF signaling-dependent pathway [J]. PloS One, 2011, 6(8): e22901.
- [11] Jasmin JF, Malhotra S, Singh Dhallu M, et al. Caveolin-1 deficiency increases cerebral ischemic injury [J]. Circ Res, 2007, 100(5): 721–729.
- [12] 刘柏炎, 沈剑刚, 蔡光先, 等. 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠脑内 caveolin-1、2 的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28(1): 22–24.
- [13] 于东明, 王思谦, 范媛媛, 等. 煮沸裂解法快速提取 Tg2576 小鼠 DNA [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2011, 14(24): 48–50.
- [14] Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae [J]. Nature Rev Mol Cell Biol. 2007, 8(3): 185–194.
- [15] Fang K, Fu W, Beardsley AR, et al. Overexpression of caveolin-1 inhibits endothelial cell proliferation by arresting the cell cycle at G0/G1 phase [J]. Cell Cycle, 2007, 6(2): 199–204.
- [16] Bucci M, Gratton J P, Rudic R D, et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation [J]. Nature Med, 2000, 6(12): 1362–1367.
- [17] Lee GS, Lee KY, Choi KC, et al. Phenotype of a calbindin-D9k gene knockout is compensated for by the induction of other calcium transporter genes in a mouse model [J]. J Bone Mineral Res, 2007, 22(12): 1968–1978.
- [18] 陈锡文, 管敏强, 陈通克, 等. ALK3 基因敲除小鼠的繁育及基因鉴定 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009, 6(11): 78–79.

[收稿日期] 2015-12-11

信息

北京积水潭医院投入使用欧标模式大动物笼舍

随着实验动物科学的快速发展,“好的实验动物福利 = 好的科学研究结果”已经是国际科学界的共识。通过“中英实验动物福利国际论坛”学习诺和诺德中国区北京大动物实验室先进的饲养管理经验,北京市创伤骨科研究所对大动物饲养间按照欧洲标准进行了改建。现已通过验收,并于 2016 年 5 月迎来第一批比格实验用犬入住。

改建后新式笼舍设计科学,每个笼舍的面积为 1.98 平方米,动物生活在可以自由走动的围栏里,活动空间加大,安全,平时群居生活改善了实验动物的生存环境。①笼舍质量:采用 304 不锈钢表面喷砂工艺、自动引水系统、金刚砂耐磨防滑地面。②一舍多用,提高利用率:可按照不同的需求灵活拆卸,分别饲养犬、小型猪、羊三种动物。③符合 3R 原则:将原有的 31 个犬笼位减少成 16 只犬(或 16 只小型猪,或 8 只羊)的笼舍。④充分体现对实验动物的人文关怀:横向栏杆,以便于动物手术后借助栏杆的力量逐渐站立;犬的防滑高台跑道,以增加生活的趣味性;每两个笼舍之间都有 2 个活动门,以增加动物的活动空间;猪用开窗,以便于分栏饲养的猪有头脸部的亲密接触。此外,原有得天独厚的庭院条件,可以使动物白天在院子里自由活动。

经改建后,北京积水潭医院的大型实验动物(狗、小型猪、羊)将生活在国内、外实验动物界和骨科界先进的饲养环境中,对于提高骨科动物实验的科学研究结果在国际上的认可度、进一步提高北京积水潭医院的骨科动物实验的研究水平起到积极作用。

北京市创伤骨科研究所动物实验室 赵丹慧 阎国强 供稿