

I型干扰素受体(*Ifnar*)基因敲除小鼠的繁育及基因型鉴定

陈亚坤¹ 孙婧¹ 蒋亚君¹ 王昕昉¹ 刘晓宇¹ 戴连攀² 卢选成¹ 李晓燕¹

(1. 中国疾病预防控制中心, 北京 102206) (2. 中科院北京生命科学研究院, 北京 100101)

摘要:目的 对 *Ifnar* 基因敲除小鼠繁育及鉴定方法进行分析, 为多种病毒研究提供理想的动物模型。方法 将引进的纯合 *Ifnar* 基因敲除小鼠, 以 1 雄 2 雌的合笼方式进行饲养繁殖, 从仔鼠中提取鼠尾基因组 DNA, PCR 法扩增目的基因片段, 琼脂糖凝胶电泳进行基因型结果判定。结果 *Ifnar* 基因敲除小鼠繁育成功, 获得了一批基因敲除鼠, 使用 PCR 方法成功鉴定出 *Ifnar* 基因敲除纯合子小鼠。

关键词: I 型干扰素受体; 基因敲除; 小鼠; 繁育; 基因型鉴定

中图分类号: Q-33 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)04-0035-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.009

干扰素(Interferon, IFN)是能够干扰病毒在宿主细胞内增殖的一种蛋白, 1957年由 Isaacs 与 Lindenmann 共同发现。干扰素分为 I 型干扰素和 II 型干扰素两大类^[1]。I 型干扰素包括 IFN- α 和 IFN- β , II 型干扰素也称为 IFN- γ ^[2]。干扰素生物效应发挥的前提是, 必须要与细胞表面相应的信号受体结合^[2-3], 如果干扰素受体缺乏, 会导致干扰素无法与之结合, 进而无法发挥干扰素的生物学效应。干扰素受体(IFNR)分为 I 型干扰素受体(结合 I 型干扰素)和 II 型干扰素受体(结合 II 型干扰素), 干扰素受体基因敲除小鼠属于免疫缺陷动物模型, 是多种病毒研究的敏感动物模型, 可用于病毒的致病机制研究以及抗病毒疫苗、药物研发。中国疾病预防控制中心实验动物中心通过引进 I 型干扰素受体(*Ifnar*)基因敲除小鼠, 并在负压屏障设施内以 1 雄 2 雌的合笼方式进行了饲养、保种繁育, 并对繁育的仔鼠基因型进行了鉴定, 结果获得了稳定的 *ifnar*^{-/-} 基因型小鼠。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Ifnar 基因敲除小鼠纯合子自重庆医科大学引进, 品系名: B6.129S2-*Ifnar*^{tm1Agt}/Mmjax, 遗传背景:

C57BL/6, 基因型: *ifnar*^{-/-}。

1.2 仪器和试剂

PCR 扩增仪(杭州博日科技有限公司, 型号: TC-XP-D), 化学发光凝胶成像系统(北京科创锐新生物科技有限公司, 型号: K8360), 核酸水平电泳仪(北京六一生物科技有限公司, 型号: DYCP-31DN), 台式高速冷冻离心机(艾本德中国, MiniSpin), 恒温水浴锅(上海习仁, 型号: HH-12), 实验动物饮水机(北京木牛流马精华工程技术有限公司, MN-LM200 J); 动物饮水专用灭菌器(凌云博际北京科技有限公司, III 型)。

基因组 DNA 提取试剂盒(北京全式金生物技术有限公司, 货号: EE101), 2 × EasyTaq PCR SuperMix(北京全式金生物技术有限公司, 货号: AS111), 2 K DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司, 货号: BM101), Biotium Gelred 核酸染料(10000×)(莱博斯特(北京)科技有限公司, 货号: 41003)。

1.3 *Ifnar* 基因敲除小鼠的饲养繁育

Ifnar 基因敲除小鼠饲养在中国疾病预防控制中心实验动物中心负压屏障设施内^[4], 在独立通风笼盒(individually ventilated cages, IVC)内饲养和繁殖, 饲养温度控制在 20 ~ 24 °C, 相对湿度 40% ~ 70%, 自由饮食进水, 昼夜光照节律。按照 SPF 级动

收稿日期: 2019-02-21

作者简介: 陈亚坤(1982—), 女, 硕士, 研究方向: 基因工程修饰动物模型。E-mail: yakunchen@163.com

通信作者: 李晓燕(1977—), 女, 副研究员, 研究方向: 实验动物管理与动物模型。E-mail: lixy997606@163.com

物饲养标准进行饲养,垫料、鼠盒均经过 131 ℃、15 min 高压蒸汽灭菌后使用。饲料采用华阜康公司生产的 SPF 级小鼠饲料,小鼠饮水采用超滤净化水机生产后再高压灭菌处理。垫料每周更换 1 次,每日补充充足饲料及饮水。采用 1 雄 2 雌合笼方式进行繁殖。

对 14 笼合笼的纯合 *Ifnar* 基因敲除小鼠(5~10 个月月龄)的生产情况进行 4 个月的跟踪,对生产的仔鼠数量进行统计计算。

1.4 小鼠的基因型鉴定

1.4.1 鼠尾基因组 DNA 提取:剪取小鼠尾尖长 0.2~0.3 cm 的组织,放入容量 1.5 mL 离心管中,快速放入-20 ℃ 保存。用 DNA 提取试剂盒提取小鼠基因组 DNA 后,放于 4 ℃ 备用。

1.4.2 PCR 扩增反应:鉴定引物序列由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,Common: CGAGGCGAAGTGTTAAAAG, Wild type Reverse: ACGGATCAACCTCATTCCAC, Mutant Reverse: AATTCGCCAATGACAAGACG。以上 3 种引物按照 1:1:1 比例混合至 10 μmol/L,进行 PCR 反应。PCR 反应体系(20 μL):2×PCR Mix 10 μL,引物混合物 1 μL,模板 DNA 2 μL,灭菌 ddH₂O 7 μL。采用 PCR 扩增仪进行 Touchdown 循环扩增,反应条件:预变性 94 ℃ 2min;变性 94 ℃ 20 s,复性 65 ℃ 15 s,复性温度每个循环下降 0.5 ℃,延伸 68 ℃ 10 s,循环 10 次;变性 94 ℃ 15 s;复性 60 ℃ 15 s,延伸 72 ℃ 10 s,循环 28 次;最后延伸 72 ℃ 2 min;10 ℃ 停留。

最后样品取出,4 ℃ 保存备用。

1.4.3 琼脂糖凝胶电泳:取 PCR 扩增产物 1 μL,在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳分析,以 120v 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。

1.4.4 基因型结果判定:按条带不同鉴别出各个基因型小鼠。鼠尾基因组 DNA 经 PCR 扩增后,琼脂糖凝胶电泳基因型片段为:Common 和 mutant reverse 引物扩增产物长度为 250 bp 左右,为突变型(KO)小鼠;Common 和 Wild type reverse 引物扩增产物长度为 155 bp 左右,为野生型(WT)小鼠;250 bp 和 155 bp 两条电泳条带均存在的为杂合(HET)小鼠。

1.5 统计方法

统计数据用($\bar{x} \pm s$)表示,样本平均数和理论值每胎 8~15 只^[5]最小值间比较,用单样本 *t* 检验统计学方法分析。所有数据用 excel 进行统计录入,用 SPSS 22.0 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 小鼠外形特征

C57BL/6(=B6)遗传背景的 *Ifnar* 基因敲除小鼠成年鼠的被毛为黑色,与野生型 B6 小鼠相同。*Ifnar* 基因敲除小鼠交配后产生的子代新生幼鼠,两眼紧闭,四肢蜷缩,皮肤无毛,呈肉红色,与野生型幼鼠外观形态上无明显差异。



图 1 基因敲除小鼠的成年鼠和仔鼠外形特征

注:A.成年小鼠 B.1 日龄仔鼠

Fig.1 Appearance of adult and neonatal knockout mice

Note:A. adult mouse B. neonatal mice

2.2 小鼠的繁育情况

Ifnar 基因敲除母鼠妊娠期为 20 d 左右,哺乳期为 21 d 左右,小鼠的性成熟期为 45~60 d,以上小鼠生理特性和野生型无明显差异。但在产仔数量上,大多在每胎 10 只以下,较野生型每胎 8~15 只低。对 14 笼 5~10 个月月龄小鼠的生产情况进行 4 个月的跟踪,对生产的仔鼠数量进行统计计算。在 4 个月期间 14 笼小鼠共计生产 41 胎,产仔数量总数为 225 只,平均每胎为 (5.6 ± 2.7) 只,和野生型理论

值每胎 8~15 只相比较,差异极显著 ($P < 0.01$),具有统计学意义。

2.3 小鼠基因型鉴定结果

部分小鼠鼠尾基因组 DNA 扩增产物鉴定结果如下图:N 为阴性水对照,未见条带。1 号样品条带在 155 bp 位置左右,为野生型,2~8 号样品条带在 250 bp 位置左右,为 I 型干扰素受体 (*ifnar*) 基因敲除小鼠。

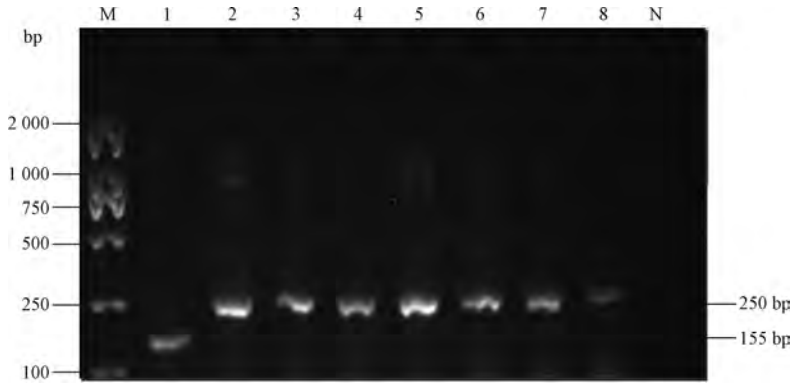


图 2 部分小鼠 PCR 基因型鉴定结果

注:M:Marker(2 kb DNA marker) 1:野生型样品 2~8:不同样品 N:阴性对照

Fig.2 Results of genotype identification of some mice by PCR

Note: M:Marker(2 kb DNA marker) 1:wild type 2~8: Different samples N: Negative control

3 讨论

在敲除小鼠的饲养过程中,其外观形态、性成熟时间、妊娠时间,哺乳时间等,与野生型小鼠相比未见明显差异。但在产仔数量上,敲除小鼠 (5.6 ± 2.7) 只明显较野生型每胎产仔数量少,和理论值每胎 8~15 个存在极显著差异。当然,不排除饲养条件,环境因素等对小鼠的生殖能力造成影响,但经观察,同等条件下本中心其他小鼠具有和理论值相当的生殖能力。并且本研究中产仔数量的差异与王晓东等^[6]的实验结果相一致,他们对三种品系的基因敲除小鼠产仔数量进行研究,结果表明,三种基因敲除小鼠平均每胎产仔数量与其背景小鼠相比均低,其中 II 型干扰素受体基因敲除小鼠平均每胎产仔数为 (5.25 ± 0.82) 只。因此综合以上结果推测,某些基因的敲除可能会影响敲除小鼠的繁殖能力。本研究中 *Ifnar* 敲除小鼠产仔能力较低,可能是由于 I 型干扰素受体基因的敲除影响了某些基因的调控表达,使敲除小鼠的某些功能丧失,造成生殖功能障

碍。但这种差异是否确实与基因敲除有关,还需要进一步研究。

基因敲除小鼠繁育保种的一个重要环节就是基因型鉴定,方法主要包括 PCR 法和传统的 Southern bolt 法^[7]。本研究采用试剂盒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 *Ifnar* 敲除鼠的基因型,与 southern bolt 鉴定法相比较,整个过程耗时较短、费用较低,该方法可以作为 *Ifnar* 基因敲除小鼠基因型检测的一种快速可靠方法。

1994 年 Müller 等首次成功制成 *Ifnar* 敲除小鼠^[8],属于基因修饰的免疫缺陷小鼠模型。小鼠由于性格温顺易饲养,便于操作,繁殖能力强,且对病毒易感等特性,广泛应用于各种病毒致病机理以及疫苗和药物评价的研究。但是免疫功能健全的小鼠对有些病毒耐受,不能建立病毒感染模型或模型不利于后续病毒各项研究,免疫缺陷小鼠模型的建立就显得尤为重要。例如,用寨卡病毒感染免疫功能健全的 C57B/6,BALB/C,CD1 小鼠,组织中未检测到病毒 RNA,小鼠也未出现疾病症状^[9-11]。但

Lazear 等^[12]用寨卡病毒接种 *Ifnar* 敲除小鼠,小鼠则高度易感,呈现后肢无力、瘫痪等典型的神经症状。因此,*ifnar*^{-/-}免疫缺陷小鼠模型的建立和应用对某些特定病毒的研究至关重要。

目前,*Ifnar* 敲除小鼠在人肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71, EV71)^[13-14]、登革热病毒 (Dengue virus, DENV)^[15] 和寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV)^[16] 等的研究中都有应用。近年来,随着 zika 病毒研究成为热点问题,对于干扰素受体敲除小鼠的应用也随之日益增加。但这些前期的研究中应用的干扰素受体敲除小鼠多为 129 背景,如 I 型干扰素受体基因敲除的 A129,II 型干扰素受体基因敲除小鼠的 G129,以及以上两种鼠杂交得到的 AG129。基因敲除小鼠常见于 129 小鼠是因为其 ES 做打靶时,中靶效率高,囊胚注射后成功率也高。最初 Zika 病毒研究中,小鼠模型也多为 129 背景,但近来 B6 背景的 *Ifnar* 敲除小鼠模型也多有建立^[12,17]。因为 B6 小鼠遗传背景和生理生化指标更清楚,当只有 129 背景品系小鼠时,可把 129 小鼠和 B6 小鼠回交,获得 B6 类似背景的小鼠,再进行试验。本实验中小鼠为 129 小鼠和 B6 小鼠回交后得到的 B6 背景 *Ifnar* 敲除小鼠。

为满足科学试验研究的需要,本中心引进 B6 背景的 *ifnar* 基因敲除小鼠,在负压屏障动物房饲养,通过一段时间的繁殖、鉴定,已获得一定数量的 *ifnar* 基因敲除小鼠,这为多种病毒的深入研究提供了一定的前期实验动物基础,并且相较于 129 品系的小鼠模型,遗传背景更清晰,生理生化指标更清楚,有助于得到重复性更好的实验结果。

参 考 文 献

- [1] Isaacs A, Lindermann J. Virus interference I. The Interferon [J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957, **147**(927): 258-267.
- [2] 张玲玲,孟祥伟. 干扰素受体研究进展[J]. 吉林医学, 2003, **24**(6): 492-493.
- [3] 汤华,张灏. 干扰素的作用机制[J]. 综述与讲座, 1989, **10**: 639-640.
- [4] 刘艳,王珑,赵赤鸿. 负压屏障实验动物设施空气落下菌数静态及动态监测结果分析[J]. 实验动物科学, 2017, **34**(4): 25-31.
- [5] 孙德明,李根平,陈振文,等. 实验动物从业人员上岗培训教材[M]. 北京:中国农业出版社, 2011. 8 第一版: 137.
- [6] 王晓东,顾卫忠,邢正弘,等. 基因剔除小鼠的繁育初探[J]. 实验动物与比较医学, 2006, **26**(4): 251-252.
- [7] Lee E G S, Lee K Y, Choi K C, et al. Phenotype of 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.
- [8] Muller U, Steinhoff U, Reis L F, et al. Functional Role of Type I and Type II Interferons in Antiviral Defense [J]. Science, 1994, **6**(264): 1918-1921.
- [9] Torres J R, Martinez N, Moros Z. Microhematospermia in acute Zika virus infection[J]. Int J Infect Dis, 2016, **51**: 127.
- [10] Govero J, Esakky EScheaffer S M, Fernandez E, et al. Zika virus infection damages the testes in mice [J]. Nature, 2016, **540**(7633): 438-442.
- [11] Ma W, Li S, Ma S, et al. Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice [J]. Cell, 2016, **168**(3): 1511-1524.
- [12] Lazear H M, Govero J, Smith A M, et al. Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis [J]. Cell Host Microbe, 2016, **19**(1): 720-730.
- [13] 刘岩,陈丽琴. 肠道病毒 71 型感染所致手足口病神经系统并发症研究中采用的细胞系和小鼠模型[J]. 微生物与感染, 2013, **8**(2): 98-103.
- [14] 周舒雅,范昌发,王佑春. EV71 病毒感染动物模型研究进展. 中国比较医学杂志, 2013, **23**(10): 67-70.
- [15] 周艳萍,陈晓琦,申硕. 登革热病毒动物模型的研究进展. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, **37**(9): 712-720.
- [16] 张娜娜. 寨卡病毒感染小鼠动物模型的建立及其应用[D]. 南宁:广西医科大学, 2017.
- [17] Mysorekar I U, Diamond M S. Modeling Zika Virus Infection in Pregnancy[J]. New Engl J Med, 2016, **375**: 481-484.

(下转至第 43 页)

Study on Preparation of Catalase-2 Samples Used for Proficiency Testing and Measurement for the Stability and Uniformity

WEI Jie, WANG Hong, JIA Songhua, YUE Bingfei
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To prepare and evaluate catalase-2 sample (a type, b type) with good stability and uniformity. **Method** Extracting 4% samples randomly to finish the uniformity test. Samples were also extracted in the freeze thawing stability test for at most 4 times. As for the time-temperature uniformity, we used time(day) and temperature(℃) as the coordinate value: 1, 2, 3, 7,15, 30 days were used as time coordinate, and 4, 20, 37℃ as temperature coordinate; and 2 bottles of each type samples were observed at every fixed point. **Result** A type and b type clearly performed a and b band on their own., and all of them were able to be stable after 4-time freeze thawing. And also the time-temperature stability test showed that standard samples of a type and b type could be present stable for 30 days at 4,20℃ and 37℃. **Conclusion** Catalase-2 samples behaved well in the uniformity and stability test, which were up for the requirements of proficiency testing.

Key words:Catalase-2; sample; proficiency testing; uniformity; stability

(上接第 38 页)

Breeding and Genotype Identification of *Ifnar* Gene Knockout Mice

CHEN Yakun¹, SUN Jing¹, JIANG Yajun¹, WANG Xinfang¹, LIU Xiaoyu¹,
DAI Lianpan², LU Xuancheng¹, LI Xiaoyan¹
(1.Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206,China)
(2.Beijing Institutes of Life Science, Chinese Academy of Science, Beijing 100101,China)

Abstract: Objective To analyze the identification and breeding method of *ifnar* knockout mice, and provide an ideal animal model for virus further studying. **Method** The introduced homozygous *ifnar* gene knockout mice were bred and reproduced in one cage with one male and two female mice together. The offspring mice genomic DNA was extracted from mice tail and amplified by PCR, and PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis for genotype identification. **Result** The homozygous *ifnar* knockout mice were breeding successfully in our facility, and the genotype can be identified by our established PCR method .

Key words:*Ifnar*; knockout; mouse; breeding; genotype identification