

水通道蛋白 5 基因敲除纯合子小鼠的获取

To obtain aquaporin 5 knock-out homozygous mice

王桂芳,董春玲,肖奎,孙加源,陈智鸿,白春学*

(复旦大学中山医院呼吸内科暨呼吸病研究所,上海 200032)

[关键词] 水通道蛋白 5;小鼠,基因敲除;繁殖

[中图分类号] R-332

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2007)11-1275-02

水通道蛋白(aquaporins, AQPs)是表达于动植物细胞膜表面的一类蛋白质,主要调控渗透压介导的水分子运动,也部分调控其他小分子如甘油、尿素等物质的跨膜运动。目前发现人类有 12 种 AQPs 的表达,主要表达于泌尿系统、消化系统、呼吸系统等部位液体流动量较大的细胞膜上。呼吸系统中主要表达 AQP1、3、4、5 四种分子,其中 AQP1、AQP5 在急性肺损伤的发病中具有重要作用^[1-2],但二者的确切作用机制尚不很清楚,对其确切机制的探讨是目前研究的热点。

研究某基因的明确功能目前常采用 RNA 干扰技术,但这种技术并不能完全缺失该基因功能,更不能永久性缺失,而基因敲除法可以克服这一缺点,达到永久性完全缺失某基因的目的。由于技术条件的限制,国内鲜有实验室可进行目的基因的精确敲除,目前一般采用引进国外基因敲除动物模型的方法来获得基因敲除动物。Ma(麻彤辉)等^[3]于 1999 年成功建立 AQP5 基因敲除小鼠模型,对于研究 AQP5 基因的体内功能具有重要意义。

我们前期对 AQP5 在呼吸系统的作用已进行了初步研究,为进一步探讨 AQP5 基因在呼吸系统中的作用,中山医院呼吸病研究所于 2005 年 7 月引进 1 对 AQP5 基因敲除杂合型小鼠,进行繁殖、筛选,以期获得足够数量的 AQP5 基因敲除纯合子小鼠进行后续实验。

1 材料和方法

1.1 实验动物 2 只 CD-1 鼠系的 AQP5 基因敲除小鼠,1 雄 1 雌,6 周龄,体质量分别为 20 g 和 21 g,引自加利福尼亚大学心血管研究所(University of California, San Francisco 分校),基因背景为 AQP5 基因敲除杂合型(AQP5^{+/-})。

1.2 小鼠的饲养和繁殖 小鼠饲养于复旦大学上海医学院实验动物中心 SPF 环境中。将小鼠置于洁净层流架内,室内温度 18~22℃,湿度 50%~60%,小鼠笼盒、垫料以及食物均经⁶⁰Co 照射消毒,饮水经高温高压灭菌处理。饲养过程中,每天观察小鼠生长情况,补充饲料及饮用水。小鼠采用 12 h 光照周期。小鼠达 8 周龄时,2 鼠合笼,母鼠的妊娠期 19 d 左右。

1.3 子一代小鼠的基因型鉴定 由于所引进小鼠均为杂合子,其子代可能出现野生型(AQP5^{+/+})、杂合子(AQP5^{+/-})

及纯合子(AQP5^{-/-}) 3 种基因型,故需对子一代进行基因型鉴定。

1.3.1 DNA 的提取 将鼠尾用剪刀剪碎,移入离心管。按华舜生物工程公司组织基因组 DNA 提取试剂盒操作说明进行。电泳鉴定、限制性酶切鉴定、分光光度仪测定纯度,最后将所制备的基因组 DNA 置于-20℃保存。

1.3.2 基因型鉴定 引物序列由该小鼠的建立者^[3]、现任职于东北师范大学膜通道实验室的麻彤辉教授提供,由 3 条寡核苷酸链组成。引物 W:5'-TCC TTG AAG ACC AGA ACC TTA CTT G-3'位于 AQP5 基因的上游区域,作为通用引物;引物 K:5'-GTT TGT GCC AGC ACT ACT CAC CC-3'位于 AQP5 基因敲除区域;引物 N:5'-CAC CGC TGA ATA TGC ATA AGGCAG-3'。

反应体系(30 μl):引物 W(0.2 μg/μl) 0.45 μl,引物 K(0.2 μg/μl) 0.3 μl,引物 N(0.2 μg/μl) 0.3 μl, MgCl₂(50 mmol/L) 1.2 μl, 10×Buffer 3.0 μl, dNTP(10 mmol/L) 0.5 μl, Taq DNA 聚合酶(5 U/μl) 0.5 μl, 尾部 DNA 模板 1 μl, 加 H₂O 补足 30 μl。PCR 反应条件:94℃ 5 min, 1 个循环;94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环;72℃ 10 min, 1 个循环。

PCR 结束后,取 PCR 产物 10 μl 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析结果:由引物 W 和 K 检测出的约 450 bp 条带为纯合子型小鼠,由引物 W 和 N 检测出的约 270 bp 条带为野生型小鼠,两带均出现为杂合子小鼠。

1.4 子二代纯合子小鼠的筛选及鉴定 子一代小鼠中鉴定后选择雌性杂合子与雄性纯合子进行交配,获得子二代小鼠。按孟德尔遗传规律,子二代小鼠可能会出现杂合子(AQP5^{+/-})及纯合子(AQP5^{-/-}) 2 种基因型,再次采用 1.3 项下的方法进行鉴定筛选纯合子。按上述方法直至获得足够数量的纯合子小鼠。

[基金项目] 国家自然科学基金(30370611)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30370611)。

[作者简介] 王桂芳,博士,主治医师。现为复旦大学临床医学博士后流动站博士后。E-mail:panpan-8848@126.com

* Corresponding author. E-mail:cxbai@zshospital.com

2 结果

2.1 小鼠的繁殖、生长情况 成功繁殖出10只子一代幼鼠,4雌6雄。2周龄内,10只小鼠体质量相差不大,在0.5g以内;2~3周龄后,体质量出现明显差异,其中4、7、8号小鼠体质量最轻,与其余7只相差约3g左右。

2.2 子一代小鼠基因型鉴定结果 PCR鉴定结果表明(图1):4、7、8号小鼠出现450bp条带为纯合型,1、2、5、6号小鼠出现270bp和450bp条带为杂合子,3号小鼠仅有一条短的270bp片段,为野生型。其中4、7、8号纯合型小鼠为体重最轻的3只小鼠。因为本研究室的电泳仪一次电泳所能加样的最多标本数为8例,另外2只小鼠另次电泳鉴定,其中第9号为野生型,第10号为杂合子。

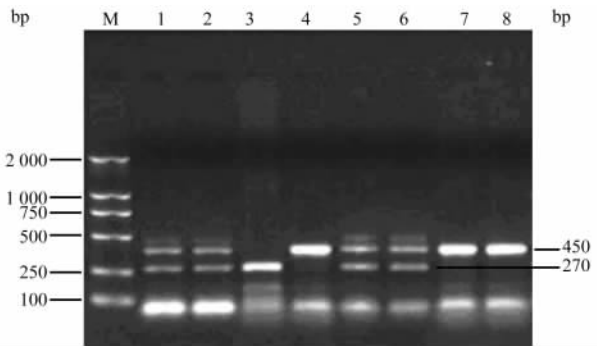


图1 子一代小鼠基因型PCR鉴定结果

M: Marker DL2000;1-8: Number of mouse

2.3 子二代小鼠繁育及筛选 将子一代雌性杂合子与雄性纯合子进行交配,母鼠每胎生仔鼠为10~13只左右,经鉴定筛选,其中约50%为纯合子小鼠。而采用子一代雌雄纯合子小鼠进行繁殖,每胎生育仅4~5只,极少超过5只,要得到足够数量的实验用小鼠需耗时较长。故本研究采用雌性杂合子与雄性纯合子交配后筛选鉴定的方法获得AQP5基因敲除纯合子小鼠。

3 讨论

AQPs是一大类表达于细胞膜表面,介导渗透压驱动的水的跨膜转运的蛋白,首次发现该类蛋白质的Agre教授获得了2003年的诺贝尔化学奖^[4]。目前已鉴定出的AQPs有12种,其中AQP5主要表达于人I型肺泡上皮细胞、唾液腺、腮腺、汗腺上皮细胞上,对于这些组织和器官水的平衡起重要作用。Ma等^[3]于1999年应用基因重组技术成功建立AQP5基因敲除小鼠,并发现AQP5^{-/-}小鼠胸膜、唾液腺、腮腺的分泌明显下降^[5]。

本研究中的1对AQP5杂合子小鼠成功引进后,参照国

内外相关规范及文献^[3,6-7],按照SPF级动物饲养标准进行饲养和繁殖,成功繁殖出10只子一代幼鼠。子一代幼鼠发育成熟后不同小鼠间体质量相差明显,其中3只小鼠体质量最轻,最后经基因型鉴定证实这3只小鼠是AQP5基因敲除纯合子小鼠。这可能由于AQP5^{-/-}小鼠消化液分泌不足引起^[3]。本次引进的AQP5小鼠均为杂合子,其子一代可能出现3种基因型,即AQP5^{+/+}(野生型)、AQP5^{+/-}(杂合子)、AQP5^{-/-}(纯合子),其中纯合子自然作为实验小鼠,野生型用作对照小鼠,杂合子用作种小鼠。

我们在预实验中发现,雌性纯合子的生育力较杂合子及野生型小鼠下降,因此如想得到足够数量的纯合子小鼠,最好以雌性杂合子与雄性纯合子交配。本研究中采用此种方式交配,母鼠每胎生仔鼠为10~13只,子二代可获得50%的纯合子小鼠;而如果采用纯系敲除鼠进行繁殖,则每胎仅生育4~5只,极少超过5只,要得到足够数量的AQP5基因敲除纯合子小鼠需耗时较长。虽然以雌性杂合子与雄性纯合子交配后代小鼠需要筛选鉴定,但能保证小鼠足够数量,而且可以通过体质量对纯合子及杂合子进行初筛,大大降低了工作量。因此,本研究中,我们一直采用雌性杂合子与雄性纯合子交配的方法获取足够数量的AQP5^{-/-}(纯合子)小鼠。

通过一段时间的繁殖和鉴定,目前本实验室已获得了较多的各种AQP5基因型小鼠,为进一步研究AQP5的信号转导通路及其在呼吸系统疾病中的发病机制提供了充足的实验材料。

[参考文献]

- [1] Su X, Song Y, Jiang J, et al. The role of aquaporin-1 (AQP1) expression in a murine model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2004, 142: 1-11.
- [2] Chen Z, Wang X, Gao L, et al. Regulation of MUC5AC mucin secretion by depletion of AQP5 in SPC-A1 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342: 775-781.
- [3] Ma T, Song Y, Gillespie A, et al. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 20071-20074.
- [4] 白春学,宋元林. 水通道研究者获诺贝尔奖给我们的启发[J]. *中华结核呼吸杂志*, 2004, 27: 483-484.
- [5] Ma T, Fukuda N, Song Y, et al. Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice[J]. *J Clin Invest*, 2000, 105: 93-100.
- [6] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京:人民军医出版社, 2000: 71-82.
- [7] 魏泓. 医学实验动物学[M]. 成都:四川科学技术出版社, 1998: 57-64.

[收稿日期] 2007-04-20

[修回日期] 2007-11-01

[本文编辑] 贾泽军