

Brevican 基因敲除小鼠的制备

韩 晞¹, 董 艳^{2*}

1. 复旦大学附属华山医院神经外科, 上海 200040
2. 第二军医大学长征医院神经外科, 上海 200003

[摘要] **目的** 制备 brevicin 基因敲除小鼠。**方法** 采用 ET 克隆方法, 构建 brevicin 打靶载体。线性化打靶载体, 电转化胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES), 将正确同源重组的 ES 细胞注射入囊胚腔, 生育嵌合体, 再交配繁育杂合子及纯合子。PCR 法鉴定小鼠的基因型。**结果** 将 PGK 启动子指导的 NEO 表达框敲进 Bcan 第 3 外显子, 敲除第 3~8 外显子序列, 得到打靶载体, 上游臂为 2.4 kb, 下游臂为 4.8 kb。基因打靶后, 得到双臂均发生正确同源重组的克隆数 14 个。利用阳性 ES 细胞克隆注射入囊胚, 得到 3 只嵌合率大于 50% 的雄鼠, 繁育得到 6 只 Brevican^{-/-} 纯合子小鼠。**结论** 利用同源重组方法, 成功敲除干细胞靶基因, 建立 Brevican^{-/-} 建系小鼠。

[关键词] brevicin; 基因敲除小鼠; 胚胎干细胞; 同源重组

[中图分类号] R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)08-0818-04

Generation of brevicin knockout mice

HAN Xi¹, DONG Yan^{2*}

1. Department of Neurosurgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China
2. Department of Neurosurgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To generate brevicin knockout mutant mice. **Methods** The targeting construct to inactivate the brevicin gene was made by using the ET cloning technology. The construct was linearized and electroporated into embryonic stem (ES) cells. Homologous recombinants were identified by PCR after selecting the stable transfectants. The positive clones were then injected into C57BL/6 blastocysts, and the injected blastocysts were transferred into pseudopregnant foster mothers. Heterozygote and homozygote were multiplied by procreation mosaic. Progeny gene type was assayed by PCR. **Results** A neomycin resistance expression cassette under the control of the phosphoglycerate kinase (PGK) promoter was flanked by a 2.4-kb 5-arm fragment and a 4.8-kb 3-arm fragment, thus introducing the NEO gene into exon 3 and deleting the encoding region from exon 3 to exon 8 after homologous recombination. Fourteen clones of gene-targeted ES cells were identified and three male chimeras with a higher than 50% chimeric ratio were produced. Six brevicin-null mice were generated after outbred and inbred. **Conclusion** Genetically modified ES cells have been successfully generated by homologous recombination, and brevicin-deficient mouse strain has been successfully generated.

[Key words] brevicin; knockout mice; embryonic stem cells; homologous recombination

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(8): 818-821]

Brevican 是一种硫酸软骨素蛋白聚糖, 属于 lectican 家族, 由一段髓芯蛋白及与其相连的糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)链构成。Brevican 是一种中枢神经系统富含的细胞外基质, 参与胶质细胞和神经元的发育调节, 在胶质瘤的发生中具有重要作用^[1-3]。以往的实验结果认为, brevicin 只在中枢神经系统组织表达。我们的研究首次发现, brevicin mRNA 在非神经组织的垂体前叶中有特异性表达^[4]。作为一种垂体前叶组织中的细胞外基质,

brevican 在垂体前叶发育中的作用尚不明确。本研究采用 ET 克隆方法, 构建 brevicin 打靶载体, 通过同源重组方法, 进行该基因的胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)基因敲除和模式动物的建立, 为进一步研究 brevicin 的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂 基因敲除打靶载体由上海南方模式生物研究中心提供, 各种限制性内切酶、T₄

[收稿日期] 2011-05-13 **[接受日期]** 2011-06-15

[基金项目] 国家自然科学基金(30571912)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30571912)。

[作者简介] 韩 晞, 博士。E-mail: hanxi@sina.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81885690, E-mail: dr.dongyan@yahoo.com.cn

DNA 连接酶、*Taq* 酶及 PCR 试剂等购自 TaKaRa 及 NEB 公司, DNA marker(1 kb ladder) 购自晶美生物工程公司, 质粒抽提试剂盒及凝胶回收试剂盒购自 Qia-gen 公司。细胞培养所需试剂为 Invitrogen 公司产品。引物合成和测序由上海英骏生物技术有限公司完成。胚胎干细胞 SCR012(来源于 129Sv/Ev 品系雄性小鼠) 及 C57BL/6J 小鼠由南方生物模式研究中心提供。

1.2 制备同源重组载体 使用细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 载体打靶

brevicin 基因 (EnsemblGene ID : ENSMUSG00000004892, <http://www.ensembl.org/index.html>)。将 PGK 启动子指导的 NEO 表达框敲进 Bcan 第 3 外显子, 敲除第 3~8 外显子(图 1)。上游臂为 2.4 kb, 下游臂为 4.8 kb, 上游臂侧翼接 PGK 启动子指导的 TK 表达框(图 2)。将 100 μ g KO Vector 质粒 DNA 用 *Not* I (酶用量: 300 U) 酶切线性化, 酶切体积 300 μ l, 37 $^{\circ}$ C 消化 4 h。凝胶电泳, 分离纯化线性化质粒 DNA。

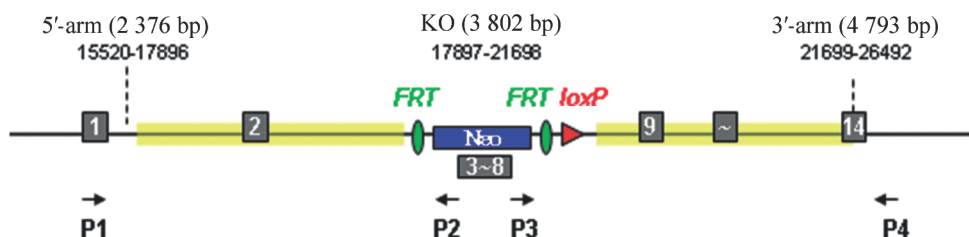


图 1 Brevicin 基因敲除小鼠打靶载体构建策略

Fig 1 Targeting strategy for generation of brevicin-null mice

1.3 ES 细胞打靶及鉴定 基因打靶所用细胞 SCR012 为来源于 129/S6/SvEv 品系雄性小鼠的胚胎干细胞。使用同源重组载体 DNA 约 30 μ g。电转仪型号: Gene Pulser (Bio-Rad, 美国); 电穿孔条件: 电压 240 V, 电容 500 μ F; 实际通电时间 9.6 ms, 实际电压 256 V。打靶后克隆用 300 μ g/ml G418 和 2 μ mol/L GanC 筛选 8 d。抽提抗性克隆的基因组 DNA, 进行跨 5' 或 3' 臂和插入片段的长链 PCR 鉴定(图 3, 表 1)。5' 臂 PCR 引物为 P1 和 P2, 目的片段为 3.2 kb, PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 4 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 68 $^{\circ}$ C 180 s, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 34 个循环。3' 臂 PCR 引物为 P3 和 P4, 目的片段为 5.2 kb, PCR 反

应条件为: 95 $^{\circ}$ C 4 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 68 $^{\circ}$ C 300 s, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 34 个循环。

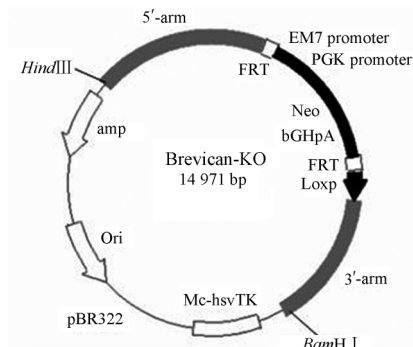


图 2 Brevicin 基因敲除小鼠打靶载体质粒图谱

Fig 2 Construction of brevicin targeting vector

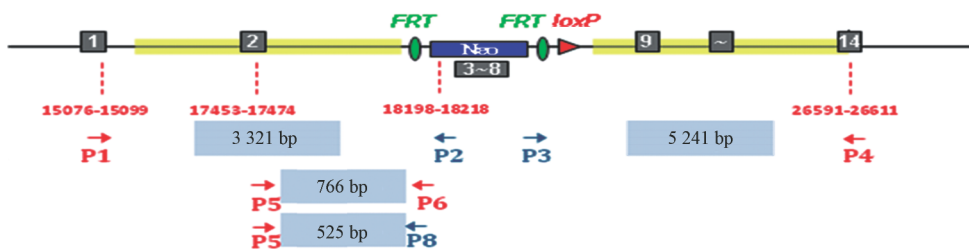


图 3 Brevicin 基因敲除小鼠基因型 PCR 鉴定策略

Fig 3 Strategy to identify brevicin-null mice by PCR

1.4 制备 brevicin 基因敲除纯合子小鼠 C57BL/6J 小鼠超数排卵。自然受孕后采集囊胚显微注射。分娩嵌合雄鼠用于繁育。将嵌合率大于 50% 的成

熟小鼠与野生型 C57BL/6J 雌性小鼠进行交配, 后代灰色小鼠经提取尾基因组 DNA 进行 PCR 鉴定, 得到杂合子小鼠。杂合子小鼠体成熟后, 可进一步

传代,后代小鼠经 PCR 鉴定基因型。PCR 鉴定引物如图 3 所示,其中 P1、P4、P5 和 P6 序列为 brevican 基因组序列,P2、P3 和 P8 为 Neo 基因序列。

表 1 PCR 鉴定引物序列
Tab 1 sequences of PCR primers

Primer	Sequence (5'-3')
P1	AGT CTC GGC TGC GGC TGC GGG ACG
P2	GGC CTA CCC GCT TCC ATT GCT C
P3	CCG TGC CTT CCT TGA CCC TGG
P4	GGC TCT TCT GGG TAG CTT TGC
P5	GCC CTC GCT GAT GAC CTG AAA G
P6	GCT GTC GTC GAT ACC GTG CTG
P8	CCT CTT CAG ACC TGA AGT TCC TAT AC

2 结果

2.1 同源重组载体构建和鉴定 构建的同源打靶 BAC 质粒用 *Not I* 酶切后电泳如图 4 所示。

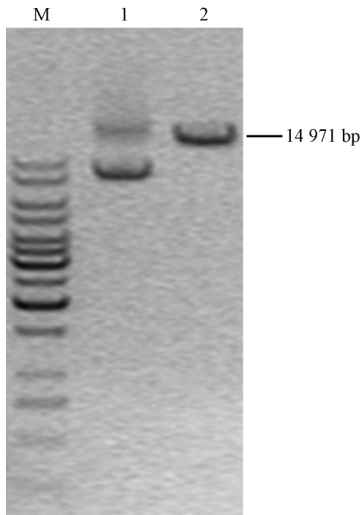


图 4 ES 细胞基因打靶前 brevican 线性化质粒 DNA 电泳图谱

Fig 4 Verification of brevican targeting vector by *Not I* before injection into the ES cells

M: MBI 1 kb DNA ladder; 1: Brevican plasmid; 2: Brevican plasmid digested by *Not I*

2.2 胚胎干细胞转基因敲除 brevican 基因 基因打靶后,进行 ES 克隆鉴定。挑取抗性克隆共 203 个,提供 DNA 样本 203 份。共鉴定药物抗性克隆 203 个,其中双臂均发生正确同源重组的克隆数 14 个。5'臂 PCR 阳性条带为 3 221 bp,3'臂 PCR 阳性条带为 5 241 bp(图 5)。

2.3 Brevican 基因敲除小鼠的建立 ES 细胞共进行两轮囊胚腔注射,利用阳性克隆注射了 143 枚囊胚,移植了 10 只受体,共出生 17 只嵌合体小鼠,其

中有 3 只嵌合率大于 50% 的雄鼠。3 只嵌合率大于 50% 的雄鼠与 C57 母鼠交配,得到灰褐色的小鼠,抽提基因组 DNA,PCR 检测结果表明 5 只灰褐色小鼠的 Brevican 基因被敲除,为 F1 代 Brevican^{+/-} 杂合子小鼠(图 6),杂合子小鼠交配,得到子代小鼠,于 2~3 周龄剪尾抽提基因组 DNA,经 4 对引物(P1+P2, P3+P4, P5+P6, P5+P8) PCR,筛选出 6 只 Brevican^{-/-} 纯合子小鼠(76,78,79,84,85,87),6 只 Brevican^{+/-} 杂合子小鼠(73,74,77,82, 88,91)(图 7)。

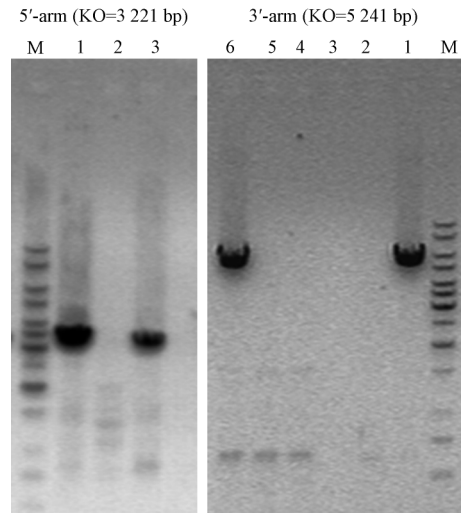


图 5 ES 细胞阳性克隆 PCR 鉴定

Fig 5 Identification of positive ES cells by PCR

M: MBI 1 kb DNA ladder; 1-6: Different ES cells

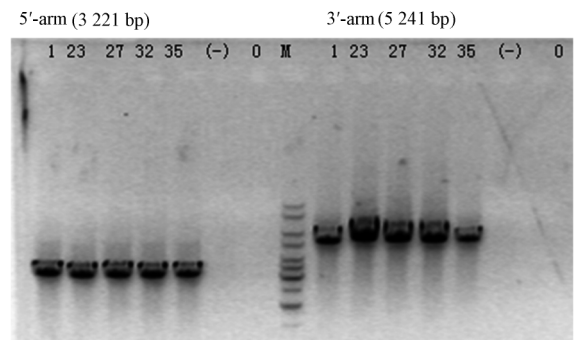


图 6 Brevican 基因敲除小鼠 F1 代繁育与检测

Fig 6 Identification of brevican-null mice in F1 generation by PCR

M: MBI 1 kb DNA ladder; 0: Control for PCR; (-): Wild type mice

3 讨论

利用基因工程小鼠研究基因功能是一种常用的实验策略。Brakebusch 等^[5] 制备 brevican 基因敲除小鼠时,将 PGK 启动子指导的 Laz-NEO 表达框敲进 brevican 第 2 外显子,敲除几乎全部的外显子

及部分 3' 端非翻译区。我们的基因敲除策略是将 PGK 启动子指导的 NEO 表达框敲进 brevican 第 3 外显子, 敲除第 3~8 外显子。Brevican 基因的基因组区域 G/C 含量偏高, 达 56.32%, 并且在一定区域 G、C 经常重复连续出现, 致使 ES 细胞 PCR 鉴定很难进行; 我们以不改变其基因敲除部位为原则作了一些改动, 即在原打靶载体上把 PGK-NEO 置换成 PGK-NEO-bGHpA, 希望能提高 ES 细胞打靶阳性克隆数, 结果 ES 细胞打靶阳性克隆数未见提高。我们改用 ET 克隆方法获得打靶载体双侧臂^[6-7], 最终成功筛选出敲除 brevican 的 ES 细胞, 繁育出 Bcan^{-/-} 小鼠。阳性 ES 细胞克隆的验证一般常采用 PCR 或 Southern blot, 本实验中采用了 PCR 途径进行验证, 其中 P1 和 P4 引物分别位于 5'、3' 端同源重组臂外。因此, PCR 扩增条带的模板一定是发生同源重组的目的染色体, 可以排除随机整合的干扰。

以往的研究发现, brevican mRNA 的表达仅限于中枢神经系统(脑和脊髓)。我们研究 brevican 与脑肿瘤的关系时发现, brevican mRNA 在垂体腺瘤组织中有特异性表达, 提示正常垂体组织中可能也表达 brevican mRNA。进一步的研究表明, 不仅垂体后叶有 brevican mRNA 的表达, 而且垂体前叶也有 brevican mRNA 的表达。垂体后叶由神经外胚层演化而来, 而垂体前叶由原口外胚层演化而来, 属于内分泌组织, 是非神经组织。我们的研究首次发现, brevican 是非神经组织垂体前叶中的一种细胞外基质成分。下丘脑-垂体-靶腺轴是机体重要的神经内分泌调节系统, 已有的研究提示, brevican 在下丘脑和垂体中均有表达, 那么在各种靶腺组织中 brevican 是否也表达呢? Brevican 在神经内分泌的调节中发挥什么作用? 我们将利用 Bcan^{-/-} 小鼠探讨 brevican 在神经内分泌中的生物学功能。

(志谢 本研究与上海南方模式动物中心合作完成, 特此感谢。)

[参 考 文 献]

- [1] Theocharis A D, Skandalis S S, Tzanakakis G N, Karamanos N K. Proteoglycans in health and disease; novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting [J]. FEBS J, 2010, 277: 3904-3923.
- [2] Bekku Y, Rauch U, Ninomiya Y, Oohashi T. Brevican distinctively assembles extracellular components at the large diameter nodes of Ranvier in the CNS [J]. J Neurochem, 2009, 108: 1266-1276.
- [3] Zimmermann D R, Dours-Zimmermann M T. Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge [J]. Histochem Cell Biol, 2008, 130: 635-653.
- [4] Dong Y, Han X, Xue Y, Dong B, Guo X, Hu G, et al. Secreted brevican mRNA is expressed in the adult rat pituitary [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 314: 745-748.
- [5] Brakebusch C, Seidenbecher C I, Asztely F, Rauch U, Matthies H, Meyer H, et al. Brevican-deficient mice display impaired hippocampal CA1 long-term potentiation but show no obvious deficits in learning and memory [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22: 7417-7427.
- [6] Liu P, Jenkins N A, Copeland N G. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations [J]. Genome Res, 2003, 13: 476-484.
- [7] Chan W, Costantino N, Li R, Lee S C, Su Q, Melvin D, et al. A recombineering based approach for high-throughput conditional knockout targeting vector construction [J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35: e64.

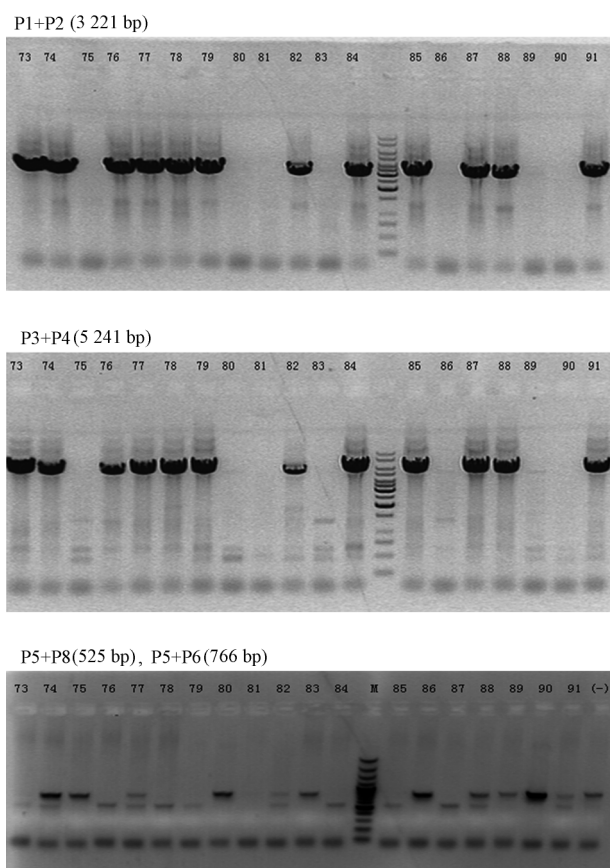


图 7 Brevican 基因敲除小鼠基因型的 PCR 鉴定结果

Fig 7 Identification of brevican-null mice by PCR

[本文编辑] 孙 岩