

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00890

• 研究快报 •

Rtn4-A/B 基因敲除小鼠模型的制备

朱莹¹, 胥武剑¹, 宁允叶¹, 吴琳², 卢建³, 李强^{1*}

1. 第二军医大学长海医院呼吸内科, 上海 200433

2. 南京军区总医院消化内科, 南京 200001

3. 第二军医大学基础部病理生理学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 通过制备 *Rtn4-A/B* 基因敲除小鼠, 探索 *Rtn4-B* 基因的生物学功能。**方法** 用细菌人工染色体(BAC)载体构建 *Rtn4-A/B* 基因打靶载体并使其线性化, 通过电转化法将其转入 129SvEv 品系雌性小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)。将正确同源重组的 ES 细胞注射入 C57BL/6J 小鼠囊胚腔, 繁育出嵌合体小鼠后, 进一步繁殖以获得杂合子小鼠。抽提小鼠尾尖组织 DNA, 采用 PCR 法鉴定小鼠的基因型。**结果** 基因打靶后, 得到 14 个发生双臂正确同源重组 ES 细胞克隆。利用阳性 ES 细胞克隆进行囊胚内显微注射, 得到 5 只嵌合率大于 50% 的雄鼠, 最终繁育得到 4 只 *Rtn4-A*^{+/-}*B*^{+/-} 杂合子小鼠。**结论** 利用 ES 细胞基因打靶、同源重组等方法, 成功获得 *Rtn4-A/B* 基因敲除杂合子小鼠。

[关键词] *Rtn4*; 基因打靶; 基因敲除小鼠; 胚胎干细胞; 同源重组**[中图分类号]** R394-33**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2013)08-0890-04

Construction of *Rtn4-A/B* knockout mouse model

ZHU Ying¹, XU Wu-jian¹, NING Yun-ye¹, WU Lin², LU Jian³, LI Qiang^{1*}

1. Department of Respiratory Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Gastroenterology, General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Nanjing 200001, Jiangsu, China

3. Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To generate *Rtn4-A/B* knockout mouse model and to explore the biological function of the *Rtn4-B* gene. **Methods** The targeting construct for inactivating *Rtn4-A/B* gene was prepared by bacterial artificial chromosome (BAC). The vector was linearized and electroporated into 129SvEv mouse embryonic stem cells (ES cells). Then the *Rtn4-A/B* knockout ES cells were microinjected into blastula of C57BL/6J mice after superovulation. F1 hybrid mice were bred to obtain mouse aggregation chimeras, and were identified by PCR amplification of tail genomic DNA. **Results** Fourteen clones of gene-targeted ES cells were identified after gene knockout and five male chimeras with a higher than 50 chimeric ratio were produced after microinjection into the blastula. Finally four *Rtn4-A/B* hybrid mice were obtained. **Conclusion** A *Rtn4-A/B* deficient mouse strain has been successfully generated by homologous recombination using genetically modified ES cells.

[Key words] *Rtn4*; gene targeting; knockout mice; embryonic stem cells; homologous recombination

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(8):890-893]

Reticulon(Rtn) 基因是定位于内质网膜上的一个基因家族, 现已发现 *Rtn1*、*Rtn2*、*Rtn3*、*Rtn4* 等多个家族成员。*Rtn4* 基因又称 *Nogo* 基因, 能表达 *Rtn4-A*、*B*、*C* 三种蛋白^[1]。其中, *Rtn4-A* 和 *Rtn4-B* 为 *Rtn4* 基因经同一启动子以不同方式选择性剪接后所得, 两者具有相同的羧基端序列(含 188 个氨

基酸残基)。*Rtn4-A* 蛋白主要分布于中枢神经系统, 外周组织中, 仅在睾丸和心脏组织有少量表达^[2], 而 *Rtn4-B* 蛋白广泛表达于外周器官及组织, 因此, 对 *Rtn4-B* 基因在外周组织中功能的研究并不会因为 *Rtn4-A* 基因的同时敲除而受影响^[3]。目前认为, *Rtn4-B* 蛋白主要参与机体炎症反应过程中的调控

[收稿日期] 2013-01-06 **[接受日期]** 2013-04-19**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81170060/H011), 国家自然科学基金青年项目(81200030/H0108). Supported by National Natural Science Foundation of China (81170060/H011) and National Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars (81200030/H0108).**[作者简介]** 朱莹, 博士生. E-mail: zying0306@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161311, E-mail: liqressh@hotmail.com

以及组织损伤后的修复,此外还涉及肿瘤细胞凋亡、神经元退行性变等病理生理过程^[4-5],但具体作用机制尚不明确。本研究拟通过经典的同源重组及囊胚注射等方法构建 *Rtn4-A/B* 基因敲除模型小鼠,为进一步研究 *Rtn4-B* 的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂 基因打靶细菌人工染色体载体 BAC:pBR322 由上海南方模式生物研究中心提供,限制性内切酶 *Bam*H I 酶、*Not* I 内切酶以及 PCR 试剂盒等购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa 试剂盒,货号 Cat. No:DRR002B)。DNA 标记物购自晶美生物工程有限公司。质粒抽提试剂盒及凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 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南方模式生物研究中心完成。胚胎干细胞

(embryonic stem cell, ES 细胞) SCR012 购自 Chemicon 公司(来源于 129SvEv 品系雄性小鼠),C57BL/6J 小鼠由上海南方模式生物研究中心提供。

1.2 重组质粒制备 参照文献[6]的方法进行重组质粒的制备。使用 BAC:pBR322 打靶 *Rtn4-A/B* 基因(EnsemblGene ID:ENSMUSG00000020458)。将与 *Rtn4-A/B* 基因同源的 5'和 3'臂、标记有 *NEO* 抗性基因的表达框敲入 BAC 打靶载体以替换欲敲除的 *Rtn4-A/B* 基因区域。其中,*NEO* 两端 FRT 序列可被 FLP 重组酶识别从而将 *NEO* 基因剔除。5'臂 2 888 bp,3'臂 4 398 bp(图 1)。将 100 μ g *Rtn4-A/B*-KO 质粒 DNA 用 *Not* I (酶用量:150 U)线性化,酶切体系为 150 μ L、37 $^{\circ}$ C 消化过夜,等体积酚氯仿、氯仿处理后,无水乙醇沉淀,并用 100 μ L 无菌 PBS 将线性化后的质粒 DNA 重悬以备用。

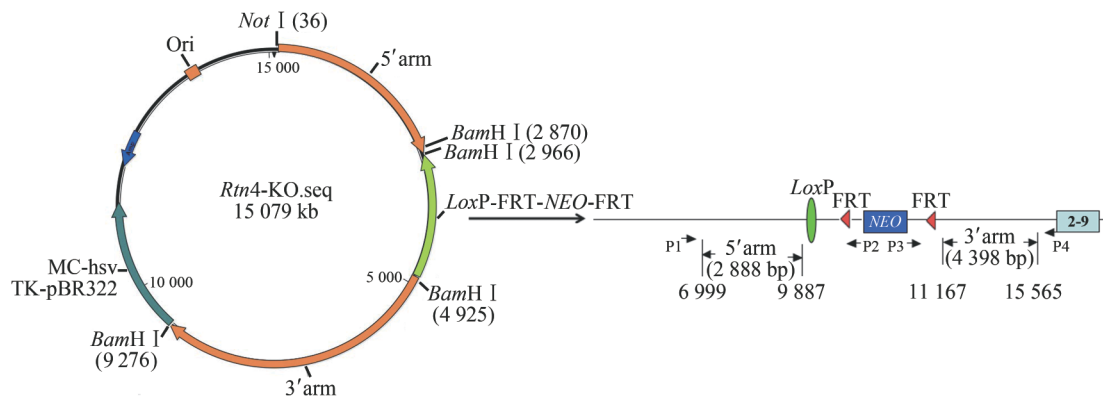


图 1 *Rtn4-A/B* 基因敲除打靶载体质粒图谱

Fig 1 Construction of *Rtn4-A/B* targeting vector

P1, P2, P3 and P4 represented four primers

1.3 ES 细胞打靶、鉴定及筛选 参照文献[7]的方法进行 ES 细胞打靶与鉴定。使用线性化后的 *Rtn4-A/B*-KO 质粒 DNA 进行细胞转染,用量为 40 μ g。电穿孔条件:电压 240 V,电容 500 μ F,实际通电时间 10.9 ms,实际电压 258 V(电转仪型号为 Bio-Rad Gene Pulser, Cat. No. 165-2105)。克隆筛选条件: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'臂或 3'臂和插入片段的长链 PCR 鉴定。共设计 4 条引物进行 PCR 鉴定,P1:5'-TGA GCT TCA TTG ATG TTC CTG GTT ATT-3';P2:5'-CCT CCC CCG TGC CTT CCT TGA C-3';P3:5'-CTG AGC CCA GAA AGC GAA GGA-3';P4:5'-ATG ATA TAA GCT CAA GTG ATC CTG CAG-3'。5'臂引物为

P1、P2,其中 P2 引物位于 *NEO* 重组区域),目的片段长度为 3.4 kb,PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 3 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,63 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 3 min 30 s,共 35 个循环。3'臂引物为 P3、P4,其中 P3 引物位于 *NEO* 重组区域),目的片段长度为 5.1 kb,PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 3 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,63 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 5 min,共 35 个循环。

1.4 *Rtn4-A/B* 基因敲除杂合子小鼠的制备 参照文献[8]的方法进行 *Rtn4-A/B* 基因敲除杂合子小鼠的制备。C57BL/6J 小鼠超数排卵,自然受孕后,待受精卵体内发育至囊胚阶段进行显微注射以分娩出嵌合鼠。将嵌合率大于 50%成熟雄性小鼠与野生型 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(鉴定策略同上),得到杂合子小鼠。

2 结果

2.1 同源重组载体的构建及鉴定 构建的同源打靶质粒用 *Bam*H I 酶切后电泳如图 2 所示。在 3 个独立的质粒中,分别用 *Bam*H I 酶进行酶切,得到结果一致的 3 个条带,长度分别为 8 673、4 351、1 959 bp,与打靶质粒载体构建图谱对应。

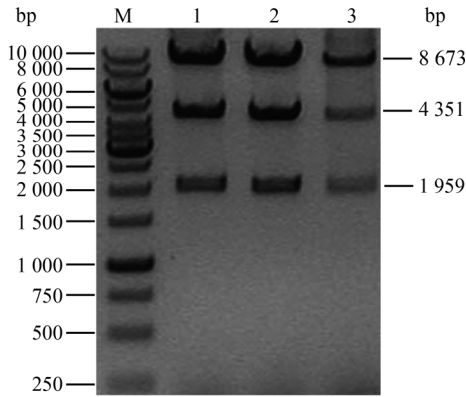


图 2 *Rtn4-A/B-KO* 质粒 DNA 经 *Bam*H I 酶切后的电泳图

Fig 2 Agarose gel analysis of *Rtn4-A/B-KO* plasmid DNA digested by *Bam*H I

M: 1 kb DNA ladder; 1-3: *Rtn4-A/B-KO* plasmid DNA

2.2 ES 细胞打靶及筛选 采用 *Not* I 酶将 *Rtn4-A/B-KO* 质粒线性化后,通过电转方法将其转入 ES 细胞。基因打靶后,进行 ES 细胞克隆鉴定。挑取抗性克隆和提供 DNA 样本共 180 份。PCR 鉴定药物抗性 ES 细胞克隆 180 个,其中 14 个 ES 细胞克隆发生双臂同源重组(在 16 个 ES 细胞中,由于 A1 号和 G5 号 ES 细胞 3'臂未发生同源重组而被淘汰)。见图 3。

2.3 *Rtn4-A/B* 基因敲除杂合子小鼠的初步制备 挑选发生双臂同源重组的 ES 细胞,注射 74 枚胚胎,制作 5 只受体,共得到 11 只小鼠,其中 5 只雄性小鼠嵌合率大于 50%。将这 5 只雄鼠与野生型 C57BL/6J 雌性小鼠进行交配,得到 F1 代灰色小鼠,经提取尾基因组 DNA 并进行 PCR 鉴定得到 F1 代 *Rtn4-A*^{+/-}*B*^{+/-} 杂合子小鼠 4 只(编号分别为 21、22、23、26),其中雄鼠 1 只、雌鼠 4 只。见图 4、图 5。

3 讨论

小鼠 *Rtn4(Nogo)* 基因位于 11 号染色体,长度近 50 kb,由 11 个外显子和 8 个内含子组成。根据启动子的不同,*Rtn4* 基因可编码 3 个主要的剪接变体 (*Rtn4-A, B, C*) 和至少 1 个次要的剪接变体

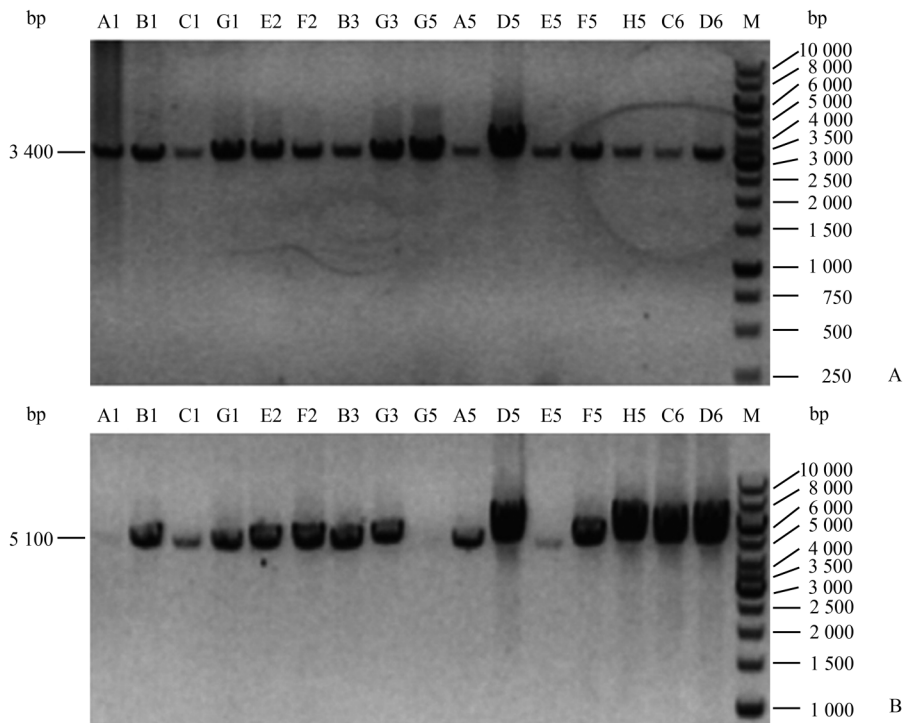


图 3 ES 细胞阳性克隆 5'臂(A)和 3'臂(B) PCR 凝胶电泳

Fig 3 Agarose gel analysis of 5'arm (A) and 3'arm (B) PCR products on clone's genomic DNA of positive embryonic stem (ES) cells

A1-D6: Different ES cell clones

(*Rtn4-B2*)以及6个睾丸特异性表达的剪接变体(*Rtn4-D,E,Aa,Ab,F,G*)^[3]。其中,第1号及第2号外显子共同参与指导*Rtn4-A,B,B2*蛋白的合成。因此*Rtn4-B*基因敲除的同时势必累及*Rtn4-A*基因。本研究中,我们构建基因打靶载体的策略是利用同源重组的方法,特异性敲除*Rtn4*基因位于10 kb左右的9 887~11 167区域,即*Rtn4-005*、*Rtn4-006*、*Rtn4-007*、*Rtn4-008*转录本的第1外显子以及*Rtn4-201*转录本的第1外显子、第1内含子及第2外显子^[3]。采用该基因敲除方法,可有效敲除*Rtn4-A,B,B2*的基因表达,而对其他*Rtn4*亚型表达无明显影响。

*Rtn4-A/B*基因敲除小鼠的成功构建为深入研究*Rtn4-B*的生物学功能奠定了基础。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

(志谢 本研究与上海南方模式生物研究中心合作完成,特此表示感谢!)

[参考文献]

- [1] Chen M S, Huber A B, van der Haar M E, Frank M, Schnell L, Spillmann A A, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1[J]. *Nature*, 2000, 403: 434-439.
- [2] Wang T, Xiong J Q, Ren X B, Sun W. The role of Nogo-A in neuroregeneration: a review[J]. *Brain Res Bull*, 2012, 87: 499-503.
- [3] Oertle T, Huber C, van der Putten H, Schwab M E. Genomic structure and functional characterisation of the promoters of human and mouse *nogo/rtn4*[J]. *J Mol Biol*, 2003, 325: 299-323.
- [4] Yu J, Fernández-Hernando C, Suarez Y, Schleicher M, Hao Z, Wright P L, et al. Reticulon 4B (Nogo-B) is necessary for macrophage infiltration and tissue repair [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 17511-17516.
- [5] Di Lorenzo A, Manes T D, Davalos A, Wright P L, Sessa W C. Endothelial reticulon-4B (Nogo-B) regulates ICAM-1-mediated leukocyte transmigration and acute inflammation[J]. *Blood*, 2011, 117: 2284-2295.
- [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] Jnyner A L. Gene targeting[M]. Oxford: Oxford University Press, 1994.
- [8] Nagy A, Gersenstein M, Vintersten K, Behringer R. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003: 198, 469, 487.
- [9] Dodd D A, Niederoest B, Bloechlinger S, Dupuis L, Loeffler J P, Schwab M E. Nogo-A, -B, and -C are found on the cell surface and interact together in many different cell types [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 12494-12502.
- [10] Xu W, Hong W, Shao Y, Ning Y, Cai Z, Li Q. Nogo-B regulates migration and contraction of airway smooth muscle cells by decreasing ARPC 2/3 and increasing MYL-9 expression[J]. *Respir Res*, 2011, 12: 14.
- [11] Wright P L, Yu J, Di Y P, Homer R J, Chupp G, Elias J A, et al. Epithelial reticulon 4B (Nogo-B) is an endogenous regulator of Th2-driven lung inflammation[J]. *J Exp Med*, 2010, 207: 2595-2607.

[本文编辑] 商素芳

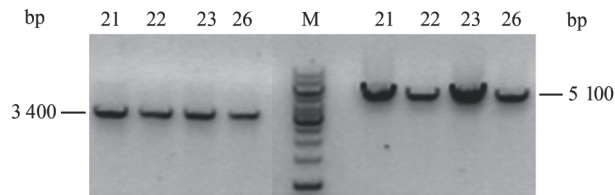


图4 鼠尾DNA双臂PCR凝胶电泳

Fig 4 Agarose gel analysis of 5' arm (left) and 3' arm (right) PCR products of mouse tail genomic DNA 21, 22, 23, and 26 represented four *Rtn4-A/B* hybrid mice, respectively

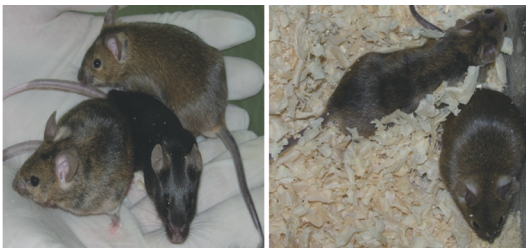


图5 F1代4只杂合子小鼠

Fig 5 Successful generation of four F1 *Rtn4-A/B* hybrid mice Two grey mice in the left were named 21 and 22, and the other two in the right were named 23 and 26

*Rtn4*基因在2000年首次从大鼠中成功克隆,由于其强大的神经轴突生长抑制作用,又被命名为Nogo^[1]。*Rtn4-A/B*在脑、脊髓、心脏、肾脏、肺脏、肝脏等外周组织中表达,主要参与机体炎症过程中的调控以及组织损伤后的修复^[2-3,9]。研究显示,使用*Rtn4-A/B*^{-/-}小鼠构建缺血性损伤模型后,损伤部位的巨噬细胞数目减少,血管再生能力下降,而移植野生型巨噬细胞后,血管再生以及创伤修复的能力明显得到改善^[3]。另外,*Rtn4-B*在哮喘的炎症及气道结构重塑中有保护作用,可降低肺部炎症及气道反应性^[10-11]。这些研究显示*Rtn4-B*在肺部炎症性疾病的发生、发展中可能扮演了重要的角色。