

B2 晶体蛋白基因敲除小鼠模型的建立

张 军¹, 黄才国², 李闻捷^{1*}, Wei Weng³, 汪佳祺¹

(1. 第二军医大学长海医院中心实验室, 上海 200433; 2. 第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433; 3. 美国 inGenious Targeting Laboratory, Inc., 纽约 11790-3350)

[摘要] 目的: 建立 B2 晶体蛋白基因敲除小鼠模型。方法: 采用美国 iGTL 实验室的技术构建打靶载体, 建立基因敲除小鼠模型。采用 PCR 对小鼠基因型进行鉴定, Western 印迹法对晶体蛋白的表达进行鉴定。结果: PCR 成功检测出 3 种基因型; 纯合子基因敲除的小鼠未检测到 B2 晶体蛋白的表达。结论: 成功构建了 B2 晶体蛋白基因敲除的小鼠模型。

[关键词] 晶体蛋白; 小鼠, 基因敲除

[中图分类号] R 776 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)11-1246-03

Establishment of a B2 crystallin gene knockout mice model

ZHANG Jun¹, HUANG Cai-guo², LI Wen-jie^{1*}, Wei WENG³, WANG Jia-qi¹ (1. Central Laboratory, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. inGenious Targeting Laboratory, Inc., New York 11790-3350, USA)

[ABSTRACT] Objective: To establish a B2 crystallin gene knockout mice model. Methods: The gene-targeting vector was established by the technique of American inGenious Targeting Laboratory. PCR technique was used to identify the genotype of the model mice and expression of B2 crystallin protein was detected by Western blot. Results: Three genotypes were successfully identified and expression of B2 crystallin protein was not detected in gene knockout mice. Conclusion: The B2 crystallin gene knockout mice model has been successfully established.

[KEY WORDS] beta-crystallin; mice, gene knockout

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11): 1246-1248]

晶体蛋白是哺乳动物晶状体细胞质中主要的结构蛋白。根据其在电场中的迁移能力, 晶体蛋白主要分为 α、β、γ 三大类。目前对于 β 晶体蛋白的基因敲除工作已有较多研究^[1-3], 这些模型的建立成为研究相应晶体蛋白功能的重要生物模型。

在 α 类晶体蛋白中, β2 亚组分的含量占绝对优势, 而且其水溶性成分的含量随年龄增长呈反常增高趋势^[4,5], 提示该蛋白对于晶状体的发育、成熟、乃至老年性白内障的发生、发展有重要影响。为深入研究 β2 基因及相应晶体蛋白的功能, 建立基因敲除模型是一有效手段。目前国内外尚未见 β2 晶体蛋白基因敲除动物模型报道。第二军医大学长海医院中心实验室和美国 iGTL (inGenious Targeting Laboratory) 实验室的 Wei Weng 博士 (iGTL 公司的 CEO) 合作, 建立了 β2 晶体蛋白基因敲除的小鼠模型, 并已成功在国内进行繁殖。

1 材料和方法

1.1 基因敲除小鼠的建立 该部分工作是由 Wei Weng 博士应第二军医大学长海医院中心实验室的

有关要求设计, 并在美国纽约 iGTL 实验室完成, 最终以合作方式惠赠小鼠模型供本实验室专用。

简述其基因敲除过程如下: 从 C57BL/6 小鼠 BAC 文库中克隆 10.5 kb 长度的基因组片段。该片段包含 β2 晶体蛋白基因的第 1~4 号外显子。将小鼠 β2 基因组序列 [gi:6681034] 中, 自 49 602~52 543 碱基, 共 2 941 bp 长度的核酸片段用外源性载体序列替换, 该敲除片段 (2 941 bp) 完全包含了 β2 基因的第 1 和第 2 外显子。将所获得的新的质粒片段克隆入打靶载体 pGTL-1。上述打靶载体用 *Not*I 酶切线性化后, 采用电穿孔法转入 C1 (C57BL/6) 胚胎干细胞。经 G418 筛选, 得到阳性克隆。后用 BBCA1 及 Neo1 引物 (序列附后) 进行鉴定, 阳性克隆能够得到一个 2.5 kb 的鉴定性片段。将筛选成功的克隆细胞植入假孕的小鼠子宫内, 发育得到 β2 基因敲除的小鼠。敲除片段示意

[基金项目] 国家自然科学基金 (30470681)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30470681)。

[作者简介] 张 军, 博士, 讲师。

* Corresponding author. E-mail: wenjieli@eastday.com

见图 1。引物序列如下:

Neo1 :5 -TGC GAG GCC AGA GGC CAC TTG TGT AGC-3 ; BBCA1 :5 -GCA GTG CTA CAG GAT GCA ACT CAG-3 。

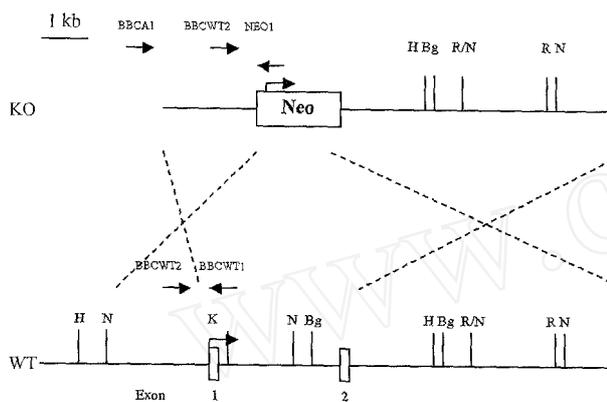


图 1 B2 基因敲除片段示意图

Fig 1 Targeting construction of mouse B2 gene

H: *Hind* ; Bg: *Bgl* ; Sm: *Sma* ; N: *Not* ; K: *Kpn*

1.2 实验动物的繁殖 从美国 iGTL 实验室引进 10 只杂合子小鼠(雌雄各半),养于第二军医大学实验动物中心,并在清洁级的层流动物房内进行饲养繁殖,小鼠笼、水、食物、垫料等用前均经消毒处理。采用 1 只公鼠和 1 只母鼠交配繁殖后代。母鼠的孕期大约是 20 d,生育小鼠发育良好。

1.3 小鼠基因型的鉴定 由于引进的小鼠均是杂合子,其子代可以是杂合子、纯合子和野生型 3 种基因型。因此,首先采用 PCR 的方法对其基因型进行鉴定。

1.3.1 小鼠尾部基因组的抽提 子代小鼠生长到 20~30 d,剪取 0.2~0.5 cm 长的小鼠尾巴末端,置冰上,研钵磨碎后,采用 TaKaRa 公司的 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver. 3.0 基因组抽提试剂盒抽提小鼠基因组 DNA。抽提的基因组经电泳进行鉴定,并用分光光度法定量。

1.3.2 鉴定用扩增引物 采用 3 对引物(序列附后)进行鉴定。第 1 和第 3 对引物都含有插入的 neo 基因的序列,因而可以鉴定插入的载体片段;第 2 对引物的扩增片段位于被载体替换的 2 941 bp 序列内。因此,杂合子小鼠应该是 3 对引物都可以扩增出;纯合子应是第 1 和第 3 对引物可以扩增出;而野生型则是第 2 对引物可以扩增。引物序列如下。

第 1 对引物:产物片段约 760 bp,上游 5 -TGC GAG GCC AGA GGC CAC TTG TGT AGC-3,下游 5 -CTG AAT GCT GTG ATT TCA GCG TCA

C-3 ;第 2 对引物:产物片段约 760 bp,上游 5 -GGT CAC CAG AAG GAG GAA-3,下游 5 -GGA GAA ACT TGT GGG CTA A-3 ;第 3 对引物:产物片段约 760 bp,上游 5 -TGC GAG GCC AGA GGC CAC TTG TGT AGC-3,下游 5 -GGA GAA ACT TGT GGG CTA A-3 。

1.3.3 PCR 扩增 采用 TaKaRa 公司的 Ex Taq^R Hot Start Version 试剂盒进行 PCR 扩增。经过多次优化条件,最终 3 对引物的扩增条件按照如下体系进行: *Taq* 酶(5 U/ μ l)0.25 μ l,10 \times buffer 5 μ l,两条引物(25 μ mol/L)各 0.5 μ l(终浓度),基因组 DNA 1 μ l,补充水体积至 50 μ l。反应条件按照如下进行:94 2 min;40 个循环的条件是 94 35 s,58 35 s,72 45 s;72 5 min。PCR 产物采用 1%琼脂糖凝胶电泳进行分析,所用核酸 marker 购自上海博光生物科技有限公司。

1.4 小鼠晶体蛋白的 Western 印迹鉴定 取 30 d 龄左右的小鼠处死,取眼晶体。加入 1 ml 0.04 mol/L、pH 6.8 的磷酸盐缓冲液(含 0.1 mol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,3 mmol/L β -巯基乙醇)匀浆化,4 $^{\circ}$ C,10 000 \times g 离心 20 min,取上清;将沉淀物重复上述步骤共 2~3 次,合并上清,测定蛋白浓度(Bradford 法试剂盒)。按常规方法进行 Western 印迹鉴定。B2 晶体蛋白的多克隆抗体(山羊抗鼠)购自 Santa cruz 公司,预染的蛋白 marker 和 Bradford 法蛋白浓度定量试剂盒购自碧云天生物技术研究,二抗(辣根过氧化物酶标记的驴抗山羊多克隆抗体)和 DAB 显色底物购自华美生物工程公司。电泳和转膜分别采用 Bio-Rad 公司的 Mini-PROTEAN^R 3 电泳系统和 Trans-Blot^R cell 转印系统。

1.5 小鼠晶状体裂隙灯观察 采用 1%阿托品滴眼液和 5%新福林滴眼液联合散瞳,在裂隙灯下观察小鼠晶状体。

2 结果

2.1 小鼠的繁殖和生长 杂合子小鼠成功地繁殖出后代,所生小鼠大多数短期内(目前为止最长观察了 5 个月)生长状况良好,目前已经成功地繁殖了 5 代。将部分小鼠在普通级的动物饲养条件下进行饲养繁殖,目前生长状况亦良好,也可以成功的进行生长和繁殖(已繁殖了 2 代),并未引起明显习性改变。

2.2 小鼠基因型鉴定 图 2 所示是 3 种不同的基因型小鼠的电泳结果:纯合子小鼠成功的扩增出 2 条片段;杂合子扩增出 3 条片段;野生型仅扩增出 1 条片段。

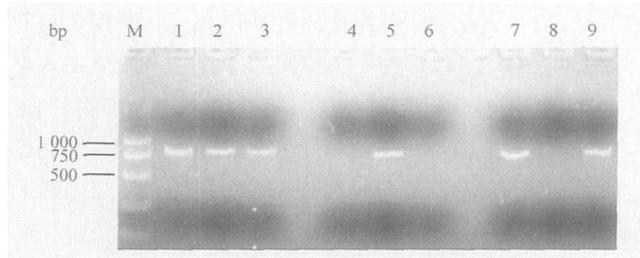


图2 小鼠基因型 PCR 检测结果

Fig 2 Genotype of mice examined by PCR

M:Marker; 1-3: PCR results of heterozygote; 4-6: PCR results of wild type; 7-9: PCR results of gene knockout; 1,4,7: PCR results of first pair of primers; 2,5,8: PCR results of second pair of primers; 3,6,9: PCR results of third pair of primers

2.3 B2 晶体蛋白的 Western 印迹鉴定 小鼠 B2 晶体蛋白的相对分子质量是 23 400,实验结果杂合子和野生型均检测到相对分子量约为 24 000 的片段,纯合子未检出。结果见图 3。

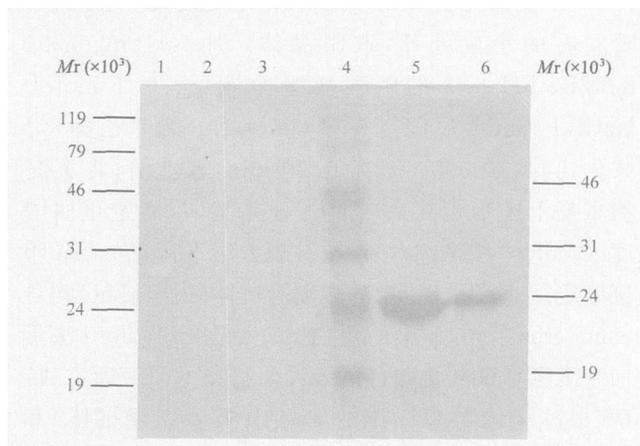


图3 小鼠晶体蛋白蛋白的 Western 印迹鉴定

Fig 3 Western blot results of B2 crystallin

1-3: Gene knockout mice; 4: Prestained marker; 5: Wild type; 6: Heterozygote

2.4 裂隙灯检查基因敲除小鼠晶状体初步结果 9 只 2.5 个月龄基因敲除小鼠(纯合子)在裂隙灯下观察眼晶状体,7 只发生轻度的斑块样混浊,位于晶状体中央;4 个月龄时,上述晶状体混浊程度明显加重。杂合子和野生型小鼠晶状体均保持透明。

3 讨论

转基因小鼠是国内外进行基因及相应蛋白功能研究的一个热点。但目前,国内有关实验室建立基因敲除小鼠模型的技术还不是非常成熟,能够快速提供商品化服务的单位更少。因此,为顺利完成本课题组申报的国家自然科学基金课题(“B2晶体蛋白功能及基因

敲除影响”)的有关内容,经过本课题组和美国 iGTL 公司的友好合作,双方共同设计、建立了 B2 晶体蛋白基因敲除的小鼠模型,并在国内成功繁殖。

B2 晶体蛋白组分在许多哺乳动物晶状体中是含量最高的重要结构蛋白成分之一。该蛋白随老化进程所呈现的表达特点极具特殊性:大鼠刚出生时 B2 晶体蛋白水平极低,是一种晚基因产物^[6];2 周后该蛋白含量急剧增长,此后持续呈现高水平;随大鼠的自然老化进程, B2 晶体蛋白会发生极为明显的量和质的时相性改变^[4,5]。提示该蛋白的功能是在后天逐渐发展起来的,研究 B2 基因敲除后的综合影响亦需要较长时间的观察研究。

本课题初步实验结果表明, B2 基因敲除的小鼠出生后 1 个半月左右,80%左右的小鼠晶状体即发生混浊,提示 B2 基因与白内障的发生具有密切关系,有关该基因及其相应蛋白功能的研究仍在进行中。

此外,本课题组在建立、繁殖 B2 晶体蛋白基因敲除后的小鼠实验过程中发现:无论是基因敲除的杂合子还是纯合子小鼠,在清洁级和普通级的动物饲养环境中,较短时间内(目前为止最长观察了 5 个月)均可以进行正常生长、繁殖。这一方面提示该基因敲除后,对小鼠的存活和生长短期内没有明显的影响;但另一方面,尚无法判断该基因敲除后对小鼠发育的远期影响。

[参考文献]

[1] Boyle DL, Takemoto L, Brady JP, et al. Morphological characterization of the Alpha A- and Alpha B-crystallin double knockout mouse lens[J]. BMC Ophthalmol, 2003, 3:3.

[2] Brady JP, Garland D, Douglas-Tabor Y, et al. Targeted disruption of the mouse alpha A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein alpha B-crystallin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 884-889.

[3] Brady JP, Garland DL, Green DE, et al. Alpha B-crystallin in lens development and muscle integrity: a gene knockout approach[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42: 2924-2934.

[4] 李闻捷, Joseph Fu SC. 晶体蛋白 B2 对眼晶体老化的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20:1905-1907.

[5] 李闻捷, Joseph Fu SC. 大鼠主要水溶性晶体蛋白在老化进程中的时相变化[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20:22-26.

[6] Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2004, 86: 407-485.

[收稿日期] 2006-08-02

[修回日期] 2006-10-09

[本文编辑] 曹 静