

· 综 述 ·

基因敲入小鼠模型鉴定及表型分析的研究进展

雍曾花, 姚合斌

[摘要] 通过胚胎干细胞技术和 DNA 同源重组技术获得的基因敲入小鼠模型是国际上研究人类突变基因和类似疾病的趋势, 可将整体动物实验与细胞水平研究结合, 探索基因突变的发病机制和病理生理变化。而对该类模型的成功鉴定可为进一步的实验研究提供坚实的基础。本文就各种基因敲入小鼠模型的鉴定及表型分析工作进行综述。

[关键词] 基因敲入; 小鼠; 模型; 鉴定; 表型分析

[中图分类号] Q784

[文献标志码] A

[文章编号] 2095-3097(2013)05-0306-04

doi: 10.3969/j.issn.2095-3097.2013.05.016

许多人类疾病是由于基因发生各种类型的突变, 如碱基替换、丢失、插入等引起的。由于人体作为研究对象的局限性, 发展相应的人类疾病模型, 对于研究人类基因的功能、人类疾病的分子机制及研制相应的诊断、治疗药物具有非常重要的意义。因此许多国内外研究者通过基因敲入 (gene knock-in) 技术^[1] 即应用胚胎干细胞技术和 DNA 同源重组技术, 用某一基因替换另一基因, 或将一个设计好的基因片段插入到基因组的特定位点, 并利用该基因位点全套的表达调控元件以实现特异性的表达。构建各种基因敲入小鼠模型首先要在体外构建携带突变基因的打靶载体, 用显微注射、电穿孔等技术将打靶载体转染小鼠胚胎干细胞, 并经过筛选获得按预期设计发生同源重组的中靶胚胎干细胞, 在通过囊胚显微注射等方法获得嵌合体小鼠, 在经过饲养、繁殖获得纯合子基因敲入小鼠, 从而在整体动物水平研究与人类疾病相关的基因的功能。

为了确定构建的基因敲入小鼠是否能作为理想的模型, 确保进一步实验研究的顺利进行, 对基因敲入小鼠进行全面的鉴定是必不可少的。在此主要从基因型的鉴定及目的突变的确定、目的突变的转录、目的基因翻译水平的检测、基因敲入小鼠的初步表型分析 4 个方面概述近几年来国内外对各种基因敲入小鼠鉴定的内容和方法。

1 小鼠基因型的鉴定及目的突变的确定

通过基因敲入技术构建的嵌合型小鼠与野生型小鼠交配得到的杂合子小鼠, 杂合子间交配繁殖获得野生型、杂合子和纯合子 3 种基因型小鼠。

1.1 聚合酶链反应鉴定小鼠的基因型 基因敲入小鼠构建过程中, 同源臂的插入和酶切位点的变化可导致基因片断长度的改变。常对 3 种小鼠的基因组

DNA 进行聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增, 再对 PCR 产物进行凝胶电泳分离, 判断有无预期大小的扩增产物, 从而鉴定小鼠的基因型。Xi 等^[2] 建立了 α A-晶状体球蛋白 R49C 突变敲入小鼠模型, 对获得小鼠的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 再对扩增产物进行电泳分离, 野生型小鼠只检测出 500 bp 条带, 而杂合子显示出 500 bp 和 550 bp 条带, 纯合子只有 550 bp 条带。Nishio 等^[3] 在对心脏钾离子通道基因 KCNQ1 的 V207M 突变敲入小鼠模型进行鉴定时, 通过上述方法发现野生型小鼠只出现 96 bp 条带, 纯合子小鼠只显示出 281 bp 条带, 而杂合子小鼠中 2 种条带都有。Ferone 等^[4] 也是用同样方法来鉴定小鼠基因型的。PCR 技术已被广泛用于敲入小鼠基因型的鉴定, 但此法可因引物的特异性不够而易出现假阳性结果, 需要用其他方法进一步验证。

1.2 Southern 印迹杂交和 DNA 序列测定进一步确认目的突变的存在 Southern 印迹杂交是指将电泳分离、原位变性的单链 DNA 片段转移到硝酸纤维素膜或尼龙膜上, 然后与核酸探针杂交检测 DNA 的一种方法。Yang 等^[5] 对水通道蛋白 2 (aquaporin 2, AQP2) 基因 T126M 敲入小鼠模型, 应用 Southern 印迹技术将基因组 DNA 进行酶切消化, 再电泳分离并转移到尼龙膜上, 用特定基因组片段作为探针与膜上的 DNA 印迹杂交确定目的 DNA 的存在。Fingerle-Rowson 等^[6] 对巨噬细胞移动抑制因子 (macrophage migration inhibition factor, MIF) 基因 P1G 突变敲入小鼠鉴定时, 取纯合子小鼠的肝脏基因组 DNA 直接进行序列测定, 确认存在 CCT→GGC 的突变。Poiteilon 等^[7] 建立了 Lmna 基因 (编码 A 型核纤层蛋白) R298C 突变敲入小鼠模型, 对鼠尾基因组 DNA 进行序列测定确定突变存在。而 Jun 等^[8] 对 Fuchs 角膜内皮营养不良疾病模型即 Col8a2 基因 (编码 α 2-胶原蛋白 VIII) Q455K 敲入小鼠, 先用 Southern 印迹对

[基金项目] 国家自然科学基金(81170800)

[作者单位] 100048 北京, 海军总医院内分泌科 (雍曾花, 姚合斌)

小鼠进行初筛,然后用DNA序列测定对初筛阳性的小鼠进一步确认。

2 目的基因转录水平的测定

目的基因在表达过程中经过转录形成 mRNA,所以可以通过对 mRNA 的鉴定来确认目的基因的真实存在。

2.1 Northern 印迹杂交分析目的基因转录水平的变化 Northern 印迹杂交的基本程序与 Southern 印迹杂交相似,只是被检测的对象是 RNA,可以定性或相对定量分析特定 RNA 的表达水平,可以确定特定基因的组织分布情况以及基因的表达时相。任维华等^[9]建立的 Adiponectin 基因(编码一种脂肪细胞特异分泌的活性蛋白质)剔除 LacZ 基因(编码 β -半乳糖苷酶)敲入小鼠模型,取杂合子(Adi+/LacZ+)小鼠白色脂肪、褐色脂肪、脑、肝、肌肉、睾丸等 11 种组织,提取总 RNA,以 Northern 印迹检测结果显示在杂合子小鼠的脂肪组织中可检测到 Adiponectin 和 LacZ 基因的表达。还有一些研究者^[5-6]也应用了 Northern 印迹分析,在小鼠特定组织中检测到目的基因表达的 mRNA。

2.2 逆转录-聚合酶链式反应分析目的基因转录水平的变化 逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)是将 RNA 的逆转录和聚合酶链式扩增相结合,以 mRNA 为模板反转录合成 cDNA,再以 cDNA 为模板进行特定基因转录产物的 PCR 扩增的技术。Wu 等^[10]构建了 SCN4A 基因(编码电压门控钠离子通道 NaV1.4) R669H 突变敲入小鼠模型作为低钾型周期性麻痹的模型,用 RT-PCR 方法检测到野生型(R669H^{+/+})小鼠中只表达正常基因 SCN4A,在纯合子(R669H^{mv/m})小鼠只有 R669H 突变的 SCN4A 基因表达的 mRNA,而杂合子小鼠中 2 种基因均有表达。Mangerich 等^[11]用人聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1(human poly ADP-ribose-polymerase-1, hPARP-1)替换鼠 PARP-1(mPARP-1)而得到 hPARP-1 敲入小鼠,通过 RT-PCR 技术发现杂合子和纯合子 hPARP-1 敲入小鼠中都存在 hPARP-1 基因的转录,且纯合子小鼠中的 hPARP-1 转录水平较杂合子小鼠高。还有一些研究者^[9,12-13]也是用 RT-PCR 技术在杂合子和纯合子敲入小鼠中检测到目的基因的转录,而在野生型小鼠中没有。

3 目的基因翻译水平的测定

基因表达的最终产物是蛋白质,在机体内真正发挥生物学作用的也是蛋白质,所以可以对蛋白质进行定性、定量、定位分析来确定目的基因的翻译功能。

3.1 Western blotting 方法测定目的基因编码的蛋白质或多肽 在蛋白质水平上检测目的基因的表达,最常用的方法就是采用 Western blotting 方法对目的基因编码的蛋白质或多肽进行定性和半定量分析。Badadani 等^[14]为研究伴包涵体肌病、Paget's 骨病及额颞叶痴呆(inclusion body myopathy with Paget's disease of the bone and frontotemporal dementia, IBMPFD)建立了含缬酪蛋白(valosin-containing protein, VCP)基因 R155H 突变敲入小鼠,对野生型和 VCP^{R155H/+}杂合子小鼠的股四头肌、脑、心和肝脏组织 Western blotting 方法分析,结果显示 VCP 表达的蛋白质水平相似。Sancho-Pelluz 等^[15]构建了一个常染色体显性色素性视网膜炎疾病模型即编码视紫红质基因的 D190N 敲入小鼠,对野生型小鼠和 D190N/+杂合子小鼠的视网膜提取物进行 Western blotting 方法分析,发现野生型和杂合子小鼠中视紫质的水平也相似。以上突变并没有影响到靶基因的翻译功能,而是通过改变蛋白质的结构或功能来影响机体功能的。

而有些突变对细胞的影响是通过改变蛋白质的含量来调节的。Kudryashova 等^[16]构建了 TRIM32 基因(编码 tripartite motif containing 32, TRIM32 蛋白质,一种泛素连接酶 E3) D489N 敲入小鼠模型,对野生型和 D489N 敲入小鼠的大脑组织进行 Western blotting 方法分析,发现突变小鼠中 TRIM32 蛋白质的量较野生型小鼠明显下降。Poitelon 等^[7]通过 Western blotting 方法对野生型和纯合子小鼠进行半定量分析,在脊髓中均检测到 Lmna 基因编码的 A 型核纤层蛋白,而纯合子小鼠中蛋白质的表达量比野生型小鼠中的有所减少。

3.2 免疫组化实验对目的突变表达的蛋白质进行原位检测 Sancho-Pelluz 等^[15]同时还应用免疫组织化学的方法对视网膜上的视紫质进行原位检测,发现 D190N/+杂合子小鼠的视紫质在视网膜外段正确表达。Woodman 等^[17]建立了亨廷顿舞蹈病基因(Huntington's disease gene, Hdh) Q150 敲入小鼠作为亨廷顿舞蹈病模型,通过免疫组织化学的方法对来自 2、4、6、8、10 个月大的纯合子小鼠的脑组织切片进行免疫染色,结果显示在 6 个月龄小鼠的纹状体和海马体中可检测到特异性聚合物,在 10 个月龄小鼠的大部分大脑组织中可见明显的聚合物。

4 基因敲入小鼠的初步表型分析

基因通过表达产物参与细胞内特定的生化途径、信号转导或相互作用,产生特定的表型。基因突变可对野生型表型产生不同程度的影响,引起各种形态突变、临床生化突变和行为突变等。基因研究

的核心是阐明基因的功能,弄清楚造成表型的机制。对基因敲入小鼠模型进行初步表型分析有利于基因功能的解释,还可对进一步研究人类基因病提供成功的疾病模型。

4.1 敲入小鼠的物理指标的检测 研究者可通过体质量、毛色、行为学改变及机体功能的物理检测等指标分析小鼠的表型。Durieux 等^[18]建立了 Dnm2 基因(编码发动蛋白-2) R465W 敲入小鼠模型来研究人类常染色体显性中央核肌病的病理生理机制,观察到在 3 种基因型小鼠出生时外观形态相似,但是纯合子小鼠与杂合子及野生型小鼠比较,其总体质量较明显的减轻,而其肝脏有明显的肿大,杂合子小鼠的肝脏质量也比野生型小鼠的重,这与患者的相一致。Nguyen 等^[19]建立的线粒体肌病模型即 Acta1 基因(编码 α -骨骼肌肌动蛋白)基因 H40Y 敲入小鼠较正常小鼠有严重的肌无力表现,自发性运动明显减少,由于眼部和面部的肌力下降导致眼睑开放度变小,眼睑下垂和面部的异常表现。这些表现与线状体肌病患者相似。Lu 等^[20]建立了与人类遗传性听力损害有关的 SLC26A4 基因 c. 919-2A>G 突变的敲入小鼠模型,对纯合子小鼠进行听力学测试、前庭功能的评估,与正常小鼠对照,其表现出严重的听力障碍、平衡能力的下降也与患者表现相似。

4.2 敲入小鼠的生理生化指标的检测 小鼠的生理生化指标包括生命体征、代谢产物、电解质等的测定。Nomura 等^[21]建立 Bsnd 基因(编码 Barttin 蛋白) R8L 敲入小鼠作为巴特综合征模型。巴特综合征是以顽固性低钾低氯性碱中毒,同时伴有低钠血症,多尿、多饮、生长发育落后,血清肾素、血管紧张素 I/II 及醛固酮水平明显高于正常,而血压正常等为特点的常染色体隐性遗传病。Bsnd 基因 R8L 敲入小鼠与正常小鼠比较,在正常饮食状态下血和尿的化验结果及血压均没有明显的异常;然而给予 10~14 d 的低盐饮食后,敲入小鼠表现出多尿、低钠血症、低钾血症、代谢性碱中毒。这些表现都符合巴特综合征的特点,从一定程度上说明了作为研究巴特综合征发病机制的动物模型,这个敲入小鼠的建立是成功的。

4.3 敲入小鼠的组织病理学分析 Nakai 等^[22]为研究多发胃肠道间质性肿瘤(gastrointestinal stromal tumour, GIST)建立了生殖细胞系的原癌基因 c-KIT 的 D818Y 突变(KIT-D818Y)敲入小鼠。肉眼观察到杂合子和纯合子敲入小鼠在盲肠处均出现明显的肿物,而纯合子小鼠的肿物几乎涉及整个盲肠并伴有胃的明显肿胀。进一步在显微镜下观察到杂合子小鼠盲肠的肿物是由 KIT 阳性的梭状细胞组成,这

点与人 GIST 相一致。纯合子小鼠的大肿物也显示出与人 GIST 相似的 KIT 阳性的梭状细胞增生,且比杂合子小鼠更加突出。Lu 等^[20]对敲入小鼠的内耳做组织形态学研究,发现耳蜗和前庭毛细胞退化、血管纹的萎缩等特征,符合该病的表现。

诸多研究表明,基因敲入小鼠的鉴定主要是从以上 4 个方面进行的,每个方面还应用了许多不同的检测技术和方法。其中,前一步是后一步的基础和保证,小鼠的表型改变才是基因敲入小鼠模型是否成功的关键和终极目标。基因敲入小鼠模型是国际上研究人类突变基因和类似疾病的趋势,不仅可以解决研究材料稀缺、代表性差的问题,还可以将整体动物实验与细胞水平研究结合,探索基因突变的发病机制和病理生理变化。但对基因敲入小鼠的表型分析是个涉及学科面很广的研究,往往精心设计和构建的小鼠不一定会成为理想的疾病模型,表型研究已经成为功能基因组学和疾病基因组学发展的瓶颈^[23]。但随着相关知识的不断完善和生物技术的不断进步,对基因敲入小鼠的鉴定内容会更加的全面,鉴定方法会更加的先进。

【参考文献】

- [1] 贾弘提,冯作化.生物化学与分子生物学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2010:523.
- [2] Xi JH, Bai F, Gross J, et al. Mechanism of small heat shock protein function in vivo: a knock-in mouse model demonstrates that the R49C mutation in alpha A-crystallin enhances protein insolubility and cell death[J]. J Biol Chem, 2008, 283(9):5801-5814.
- [3] Nishio H, Kuwahara M, Tsubone H, et al. Identification of an ethnic-specific variant (V207M) of the KCNQ1 cardiac potassium channel gene in sudden unexplained death and implications from a knock-in mouse model[J]. Int J Legal Med, 2009, 123(3):253-257.
- [4] Ferone G, Thomason HA, Antonini D, et al. Mutant p63 causes defective expansion of ectodermal progenitor cells and impaired FGF signalling in AEC syndrome[J]. EMBO Mol Med, 2012, 4(3):192-205.
- [5] Yang B, Zhao D, Verkman AS. Hsp90 inhibitor partially corrects nephrogenic diabetes insipidus in a conditional knock-in mouse model of aquaporin-2 mutation [J]. FASEB J, 2009, 23(2):503-512.
- [6] Fingerle-Rowson G, Kaleswarapu DR, Schlander C, et al. A tautomerase-null macrophage migration-inhibitory factor (MIF) gene knock-in mouse model reveals that protein interactions and not enzymatic activity mediate MIF-dependent growth regulation[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(7):1922-1932.
- [7] Poitelon Y, Kozlov S, Devaux J, et al. Behavioral and molecular exploration of the AR-CMT2A mouse model Lmna (R298C/R298C)[J]. Neuromolecular Med, 2012, 14(1):40-52.

- [8] Jun AS, Meng H, Ramanan N, et al. An alpha 2 collagen VIII transgenic knock-in mouse model of Fuchs endothelial corneal dystrophy shows early endothelial cell unfolded protein response and apoptosis [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(2):384-393.
- [9] 任维华, 李西华, 王芳, 等. Adiponectin 基因剔除 LacZ 基因敲入小鼠模型的建立 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(9):846-853.
- [10] Wu F, Mi W, Burns DK, et al. A sodium channel knockin mutant (Nav1.4-R669H) mouse model of hypokalemic periodic paralysis [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(10):4082-4094.
- [11] Mangerich A, Scherthan H, Diefenbach J, et al. A caveat in mouse genetic engineering: ectopic gene targeting in ES cells by bidirectional extension of the homology arms of a gene replacement vector carrying human PARP-1 [J]. *Transgenic Res*, 2009, 18(2):261-279.
- [12] Shu X, Luhmann UF, Aleman TS, et al. Characterisation of a Clqtn5 Ser163Arg knock-in mouse model of late-onset retinal macular degeneration [J]. *PLoS One*, 2011, 6(11):e27433.
- [13] Eliason SL, Stein CS, Mao Q, et al. A knock-in reporter model of Batten disease [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(37):9826-9834.
- [14] Badadani M, Nalbandian A, Watts GD, et al. VCP associated inclusion body myopathy and paget disease of bone knock-in mouse model exhibits tissue pathology typical of human disease [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10):e13183.
- [15] Sancho-Pelluz J, Tosi J, Hsu CW, et al. Mice with a D190N mutation in the gene encoding rhodopsin; a model for human autosomal-dominant retinitis pigmentosa [J]. *Mol Med*, 2012, 18:549-555.
- [16] Kudryashova E, Struyk A, Mokhonova E, et al. The common missense mutation D489N in TRIM32 causing limb girdle muscular dystrophy 2H leads to loss of the mutated protein in knock-in mice resulting in a Trim32-null phenotype [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(20):3925-3932.
- [17] Woodman B, Butler R, Landles C, et al. The Hdh (Q150/Q150) knock-in mouse model of HD and the R6/2 exon 1 model develop comparable and widespread molecular phenotypes [J]. *Brain Res Bull*, 2007, 72(2/3):83-97.
- [18] Durieux AC, Vassilopoulos S, Lainé J, et al. A centronuclear myopathy--dynamin 2 mutation impairs autophagy in mice [J]. *Traffic*, 2012, 13(6):869-879.
- [19] Nguyen MA, Joya JE, Kee AJ, et al. Hypertrophy and dietary tyrosine ameliorate the phenotypes of a mouse model of severe nemaline myopathy [J]. *Brain*, 2011, 134(Pt 12):3516-3529.
- [20] Lu YC, Wu CC, Shen WS, et al. Establishment of a knock-in mouse model with the SLC26A4 c.919-2A>G mutation and characterization of its pathology [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7):e22150.
- [21] Nomura N, Tajima M, Sugawara N, et al. Generation and analyses of R8L barttin knockin mouse [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 301(2):F297-F307.
- [22] Nakai N, Ishikawa T, Nishitani A, et al. A mouse model of a human multiple GIST family with KIT-Asp820Tyr mutation generated by a knock-in strategy [J]. *J Pathol*, 2008, 214(3):302-311.
- [23] 傅继梁. 基因工程小鼠 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006:19.

(收稿日期:2013-05-10 本文编辑:冯 博)

· 资 讯 ·

发现治疗 Parkinson's 病的新靶点

约翰霍普金斯大学医学院和美国国家癌症研究所的研究人员确定了 Parkinson's 病中一条新的通路以及一种可以缓解小鼠相关症状的潜在化合物。早期研究发现一种名为 parkin 的酶, 当出现功能障碍时, 它会编码大量因细胞回收机制损坏的相关蛋白而导致疾病。Dawson 夫妇 (Valina Dawson 与她的丈夫 Ted Dawson, 约翰斯·霍普金斯大学医学院医学细胞工程研究所) 与美国国家癌症研究所的 Debbie Swing 和 Lino Tessarollo 合作发现了一种名为 AIMP2 (aminoacyl-tRNA synthetase complex interacting multi-functional protein 2) 的 parkin 底物蛋白 (即 parkin 靶点) 被高度激活。转基因小鼠为研究人员提供了一个可以集中研究大量 AIMP2 的模型, 以避免 parkin 酶缺陷和其他蛋白过量表达的影响。

研究发现, 随着小鼠年龄增长, 逐渐出现 Parkinson's 样症状, 包括大脑内产生多巴胺神经元细

胞死亡。AIMP2 能激活一种名为 parthanatos 的自我破坏机制, AIMP2 通过与 PARP1 [poly (ADP-ribose) polymerase-1] 蛋白直接相互作用开启这一通路。PARP1 蛋白到目前为止已被确认只影响 DNA 损坏, 而不会影响其他蛋白质的信号通道。

研究人员在含大量 AIMP2 的小鼠体内检测到一种阻碍 PARP1 蛋白的化合物, 该物质能保护多巴胺神经元死亡, 避免了类似于 Parkinson's 病中可见的行为异常。虽然研究成果振奋人心, 但是还必须进行大量的动物实验。Ted Dawson 博士等正在寻找一个衡量疾病严重程度的标志物以能用于新型 Parkinson's 病药物临床试验的检测。

{摘自 Mullin E. New target to battle Parkinson's discovered [EB/OL]. (2013-08-27) [2013-09-01]. http://www.fiercebiotechresearch.com/story/new-target-battle-parkinsons-discovered/2013-08-27?utm_medium=nl&utm_source=internal. 编辑部}