文章编号:1000-5404(2005)05-0373-03

论著

SRC-3基因敲除小鼠的饲养繁殖及鉴定

杜智勇,粟永萍 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教学室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 繁殖和鉴定SRC-3基因敲除小鼠。**方法** 将所引进的杂合子小鼠进行饲养并繁殖,繁殖成功后其子代中将会出现野生型、杂合子以及纯合子3种基因型,提取每只小鼠尾部基因组DNA,用PCR法进行鉴定,一旦获得雄性纯合子,就将其与雌性杂合子交配,依照孟德尔遗传定律就有可能获得较多的基因敲除纯合子小鼠。**结果** SRC-3杂合子小鼠的饲养和繁殖均获得成功,亦获得了较多的基因敲除纯合子小鼠。**结论** 正确的饲养繁殖以及鉴定方法是从杂合子中获得SRC-3基因敲除纯合子小鼠的有效途径。

关键词:类固醇受体辅调节蛋白-3;基因敲除;小鼠
中图法分类号:R-332; S865.13 **文献标识码**:A

Breeding, reproducing, and identifying SRC-3 knock-out mice

DU Zhi-yong, SU Yong-ping (Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To breed and identify steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) knock-out mice. **Methods** Heterozygote mice were bred and reproduced. Wild genotype, heterozygote genotype, and homozygote genotype would appear in offsprings of parents. Genome DNA extracted from the murine tails was subjected to PCR for genotype identification. Male homozygote mice were selected to mate with the female heterozygote mice for acquiring homozygote baby mice according to Mendel law. **Results** Breeding and reproducing were successful and more heterozygote genotype mice were reproduced. **Conclusion** Appropriate methods for breeding, reproducing, and identifying are the effective way for acquiring SRC-3 knock-out mice from heterozygote mice.

Key words: steroid receptor coactivator-3; gene knock out; mice

我们于2004年5月从美国贝勒医学院徐建明教授所在的分子生物学实验室成功引进了类固醇受体辅调节蛋白-3(SRC-3)基因敲除杂合子小鼠,其中雄鼠1只,雌鼠4只。引进此批小鼠的目的是为了获得SRC-3基因敲除纯合子小鼠,为海外合作基金项目提供实验动物。现将此批小鼠的饲养、繁殖及鉴定过程报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

小鼠由美国引进,1雄4雌,共5只,品系为C57/129,基因背景为SRC-3基因敲除杂合子(SRC-3+/-)。

1.2 小鼠的饲养和繁殖

将小鼠置于洁净的层流动物房内,室内温度控制在18~22 ℃,湿度50%~60%,小鼠笼盒、垫料以及食物经钴源照射处理,饮水经高温高压灭菌处理。饲养过程中,每天进入层流动物房1次,观察小鼠生长情况,入室人员必须穿无菌隔离衣、戴帽子、手套。垫料每周1换,食水每日补充。小鼠的性成熟期为60 d左右,母鼠妊娠期为19 d左右,繁殖采用1只雄鼠分别与两只雌鼠同居的方式进行。

1.3 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(SRC-3+/+)、杂合子(SRC-3+/-)以及纯合子(SRC-3-/-)3种表型,故需对子代进行基因型鉴定。

1.3.1 小鼠尾部基因组DNA的提取 参照Omega公司组织基因组DNA提取试剂盒进行:剪去小鼠尾尖0.2~0.5 cm放入1.5 ml EP管中,加入180 μl Buffer TL后再加入25 μl Protease K (20 mg/ml),55 ℃水浴震摇1~4 h; 10 000×g离心5 min,将上清转于另一1.5 ml EP管中,加入15 μl RNase A (25 mg/ml)以去除RNA;加入410 μl预混的Buffer BL (200 μl BL+210 μl乙醇)和等体积的异丙醇,剧烈震荡;将全部反应液转移到HiBind@ DNA柱上,8 000×g离心1 min以结合DNA;用750 μl Wash Buffer 8 000×g离心1 min洗柱两遍后以最大离心力(12 000×g)离心2 min;将柱子置于1个新的1.5 ml EP管中,加入200 μl预热(70 ℃)的DNA Elution Buffer, 8 000×g离心1 min以抽提DNA。

1.3.2 PCR反应及琼脂糖电泳进行基因型鉴定

1.3.2.1 引物设计 引物设计由美国贝勒医学院分子生物

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054200);海外青年学者合作研究基金资助项目(30328025)
Supported by the National Key Basic Development and Plan of China ("973" Projects, G1999054200) and Cooperative Research Foundation for Oversea Scholars (30328025)

作者简介:杜智勇(1971-),男,河南省开封市人,博士研究生,主治医师,主要从事创伤应激方面的研究,现在新桥医院麻醉科工作。电话:(023)68774682
通讯作者:粟永萍,电话:(023)68752009

收稿日期:2004-11-15;修回日期:2005-01-18

学实验室廖兰提供，由3条寡核苷酸链组成。引物1(5′-GATGAGTGGACTAGGCGAAAGCTCT)位于SRC-3基因的上游区域，作为通用引物；引物2(5′-GCTGAGATTTGCAGAGATGAGCTC)位于SRC-3基因敲除区域，用于检测野生型；引物3(5′-GGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAG)位于 *LacZ* indicator 用于检测突变型。

1.3.2.2 PCR过程 在25 μl反应体系中加入如下反应物：引物1(0.1 μg/μl)3 μl，引物2(0.1 μg/μl)1.5 μl，引物3(0.1 μg/μl)1.5 μl，$MgCl_2$(25 mmol/L) 2 μl，10×Buffer 2.5 μl，dNTP(2.5 mmol/L) 3 μl，*Taq* DNA polymerase (5 U/μl) 0.3 μl，尾部DNA模板2 μl，加H_2O补足25 μl。PCR反应过程：94 ℃ 2 min 30 s，59 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min循环1次；94 ℃ 1 min，59 ℃ 50 s，72 ℃ 1 min循环34次；94 ℃ 1 min，59 ℃ 50 s，72 ℃ 5 min，循环1次。

1.3.2.3 电泳鉴定 取PCR产物10 μl点于1.5%琼脂糖凝胶上电泳分析结果：由引物1和2检测出的约450 bp条带为野生型小鼠；由引物1和3检测出的约230 bp条带为基因敲除纯合子小鼠；两带均出现为杂合子小鼠。

2 结果

2.1 小鼠的繁殖情况

SRC-3杂合子母鼠成功繁殖出子代幼鼠(图1)。



图1 SRC-3杂合子小鼠所产幼鼠

Fig 1 Offsprings of heterozygote mice

2.2 小鼠生长情况

SRC-3杂合子母鼠及2周龄幼鼠(图2)。

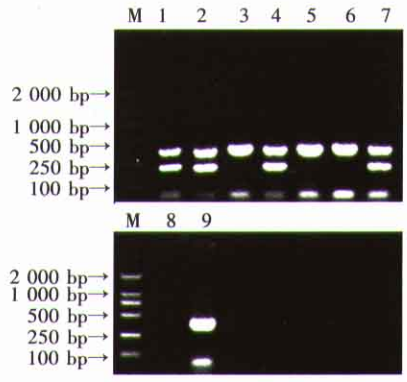


图2 SRC-3杂合子母鼠及2周龄幼鼠

Fig 2 The SRC-3 female heterozygote mouse and 2-week-old babies

2.3 小鼠基因型鉴定结果

2.3.1 子一代鉴定结果 图3中3、5、6号小鼠出现450 bp条带为野生型；1、2、4、7号小鼠出现230 bp和450 bp条带为杂合子。

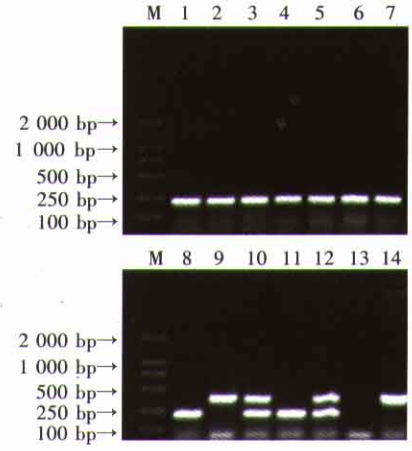


M: Marker DL2000; 1 – 7: Number of mouse; 8: Negative control; 9: Positive control

图3 子一代PCR鉴定结果

Fig 3 Results of first gerneration by PCR

2.3.2 子二代小鼠基因型鉴定结果 图4中1～8及11号小鼠出现230 bp条带为基因敲除纯合子；9号小鼠出现450 bp条带为野生型；10、12号小鼠出现230 bp和450 bp条带为杂合子。



M: Marker DL2000; 1 – 12: Number of mouse; 13: Negative control; 14: Positive control

图4 子二代PCR鉴定结果

Fig 4 Results of second gerneration by PCR

3 讨论

转基因小鼠是目前国内外研究热点，国外已成功建立了多种转基因小鼠的模型，并且已经证明转基因动物在研究基因的结构和功能以及与之相关的疾病方面较以往其它任何研究手段都更加直观和有效。国内

由于技术条件的限制，目前只有少数研究单位获得转基因小鼠模型，但尚没有成功获得基因敲除小鼠模型的报道，多数需从国外引进。我所由于承担海外合作基金研究项目，成功地从美国休斯敦贝勒医学院分子生物学实验室徐建明教授处引进了类固醇受体辅调节蛋白(SRC)基因敲除小鼠模型，放于我所层流动物房进行繁殖。

SRC蛋白为核受体辅调节子，目前已知的类固醇辅调节蛋白有3种，即SRC-1、SRC-2、SRC-3[1]，它们的基因在人类染色体上分别位于2p238、q21.1和20q12区域，在小鼠染色体上分别位于12A-A31、A3-A52和H2-H4区域[2]。根据现有的研究资料，SRC蛋白家族主要发挥某些类固醇受体的转录调节作用，SRC-1作为类固醇受体辅活化子介导部分类固醇受体的转录活性；SRC-2在生殖行为以及能量代谢方面发挥作用；SRC-3在生长发育、生殖以及乳腺发育发挥着重要作用[3,4]。另外还发现SRC家族与应激相关核转录因子GR、NF-kB、AP-1相互作用[5~8]，提示SRC家族在调节炎症反应和机体免疫功能方面可能也发挥着重要作用，这也是本次海外合作基金项目的主要研究内容，亦是引进SRC基因敲除小鼠的原因。

SRC-3小鼠成功引进后，饲养和繁殖参照相关文献[9,10]并结合本所条件适当调整，基本上按照SPF(无特定病原体动物)级动物饲养标准进行。由于本次引进的SRC-3小鼠均为杂合子，其子代可能出现3种表型，即SRC-3+/+、SRC-3+/-、SRC-3-/-，故必须对它们进行基因型鉴定，目前常用的基因型鉴定方法有PCR法和Southern blot法，两种方法均直观、可靠，我们采用的是前者。通过繁殖，部分子代中没有出现纯合子(图3)，部分出现了少量的纯合子(图未给出)，一旦鉴定出雄性纯合子，就将其与雌性杂合子(雌性纯合子生育能力较差)子代交配，根据孟德尔遗传学规律就可以获得较多的SRC-3-/-纯合子(图4)，纯合子就可以用作实验组，野生型可以用作对照组，杂合子可用作保种。通过一段时间的繁殖和鉴定，目前已获得了较多的各种表型的SRC-3小鼠，为海外合作基金项目的开展提供了便利条件。

参考文献：

[1] Xu J, Li Q. Review of the *in vivo* functions of the p160 steroid receptor coactivator family[J]. Mol Endocrinol, 2003, 17(9): 1681-1692.

[2] Xu J, Liao L, Ning G, *et al*. The steroid receptor coactivator SRC-3(p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1)is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(12): 6379-6384.

[3] Xu J, O'Malley B W. Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator(SRC) family in steroid receptor function[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2002, 3(3): 185-192.

[4] Weldon C B, Elliott S, Zhu Y, *et al*. Regulation of estrogen-mediated cell survival and proliferation by p160 coactivators[J]. Surgery, 2004, 136(2): 346-354.

[5] Stevens A, Garside H, Berry A, *et al*. Dissociation of steroid receptor coactivator 1 and nuclear receptor corepressor recruitment to the human glucocorticoid receptor by modification of the ligand-receptor interface: the role of tyrosine 735[J]. Mol Endocrinol, 2003, 17(5): 845-859.

[6] Wu R C, Qin J, Hashimoto Y, *et al*. Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by Ikappa kinase[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(10): 3549-3561.

[7] Lee S K, Kim H J, Na S Y, *et al*. Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits[J]. J Biol Chem, 1998, 273(27): 16651-16654.

[8] Werbajh S, Nojek I, Lanz R, *et al*. RAC-3 is a NF-kappa coactivator[J]. FEBS Lett, 485(2~3): 195-199.

[9] 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.

[10] 魏　泓. 医学实验动物学[M]. 成都：四川科学技术出版社，1998. 57-64.

(编辑　龙　亮)

《中华现代内科学杂志》征稿启示

《中华现代内科学杂志》是中华临床医药学会主办的专业学术期刊，本刊具有ISSN/CN标准刊号，现已被中华首席医学网和中文生物医学期刊文献数据库《CMCC》等收录，您可以在中华首席医学网(www.shouxi.net)免费查阅本刊各期的全部文献内容。

本刊近期投稿栏目的主题是：①心血管、呼吸、消化、肾脏、内分泌等各个系统疾病诊断及治疗的临床进展。②内科领域领先的科研成果和临床诊疗经验。③对内科临床诊疗有指导作用的基础理论研究。④流行病学研究进展的探讨。⑤反映国内外基础及临床医学重要进展的文献综述。

地　址：北京海淀区83-106信箱《中华现代内科学杂志》编辑部　　邮　编：100083

电　话：(010)62245829　　E-mail：neikexue@sohu.com