文章编号:1000-5404(2007)14-1361-03

论著

HIF-1α条件性基因敲除嵌合体小鼠的获得

赵 玲,杜晓兰,苏 楠,宋瑞华,何启芬,李福兵,戚华兵,陈 林 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军创伤中心,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 应用Cre/loxP系统建立HIF-1α条件性基因敲除小鼠模型。**方法** 电击法将构建好的HIF-1α条件性基因敲除载体转染入小鼠ES细胞,用G418与Ganciclovir对转染的ES细胞进行正负筛选,经Southern杂交鉴定得到阳性ES细胞克隆后,将已发生正确重组的ES细胞显微注射入小鼠囊胚腔,对子代鼠进行基因型鉴定。**结果** 经G418与Ganciclovir筛选培养得到490个阳性克隆,用5′端探针进行Southern杂交鉴定获得1株发生同源重组的ES细胞克隆,经显微注射,得到5只由基因敲除ES细胞和供体囊胚细胞共同发育而来的嵌合体小鼠。**结论** 成功得到基于Cre/loxP系统的HIF-1α条件性基因敲除嵌合体小鼠模型。

关键词: 低氧诱导因子-1α;条件性基因敲除;同源重组;胚胎干细胞;Cre/loxP系统
中图法分类号: R-332;R394-33;R394.2 **文献标识码:** A

Generation of chimeras for HIF-1α conditional knockout mice

ZHAO Ling, DU Xiao-lan, SU Nan, SONG Rui-hua, HE Qi-feng, LI Fu-bing, QI Hua-bing, CHEN Lin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To generate chimeras for hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) conditional knockout mice using Cre/loxP system. **Methods** The mouse ES cells were electroporated with conditional knockout vector of HIF-1α, selected by G418-positive and Ganciclovir-negative culture. Target ES cells, following positive and negative selection, was identified by Southern blotting. Chimera mice were born by pseudopregenant mice which were transplanted with blastocysts microinjected with target ES cells. **Results** A total of 490 ES clones were collected after screening by both G418-positive and Ganciclovir-negative selection, and one clone with correct homologous recombinant event was obtained by Southern blotting screening. Five chimeras were produced following blastocysts microinjection and transplantation. **Conclusion** Chimera mice with HIF-1α conditional knockout allele were obtained, which will help to finally obtain HIF-1α conditional knockout mice, subsequently provide the possibility to study HIF-1α function *in vivo*.

Key words: hypoxia inducible factor-1α; conditional knockout; homologous recombination; embryonic stem cell; Cre/loxP system

低氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是介导哺乳动物低氧反应的主要因子之一[1]。HIF-1包括α和β两个亚基,HIF-1α对氧气浓度敏感,是HIF-1的氧气敏感成分[2]。为研究HIF-1α在体内的功能及相应生物学机制,有研究者建立了HIF-1α基因敲除小鼠模型[3],但遗憾的是在全身敲除HIF-1α基因的小鼠在胚胎期即死亡,难以进一步研究HIF-1α基因的功能。因此,如能建立HIF-1α的条件性基因敲除小鼠模型,则可望获得能存活的并在特定组织细胞中HIF-1α表达降低的小鼠模型。为此,我们构建了剔除小鼠HIF-1α基因第5号外显子的条件性基因敲除载体,经ES细胞电转筛选,获得了1株发生正确同源重组的阳性克隆,经囊胚注射得到5只由基因敲除ES细胞和供体囊胚细胞共同发育而来的雄性嵌合体小鼠,为最终获得HIF-1α条件性基因敲除小鼠模型,进而在小鼠整体水平研究HIF-1α功能奠定基础。

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054203, 2005CB522604);国家自然科学基金面上项目(30370318)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054203, 2005CB522604) and the General Program of the National Natural Science Foundation of China (30370318)

作者简介: 赵 玲(1979-),女,山东省济南市人,助理实验师,主要从事基因敲除及转基因方面的研究。电话:(023)68757572, E-mail:zhaoling63@sohu.com
通讯作者: 陈 林,电话:(023)68757572, E-mail:linchen70@163.com

收稿日期: 2006-12-15;**修回日期:** 2007-01-10

1 材料与方法

1.1 材料

HIF-1α 条件性基因敲除载体由本实验室构建[4]，R1 ES 细胞株购于加拿大多伦多 Nagy 实验室；G418 抗性的小鼠胚胎成纤维细胞由本实验室建立。工具酶为 TaKaRa 公司产品；电穿孔仪及电穿孔杯为 Bio-Rad Gene Pulser Ⅱ System（Bio-Rad 公司）。DMEM 高糖培养基、白血病抑制因子（leukemia inhibitory factor，LIF）、胎牛血清（ES 细胞专用）、丝裂霉素 C、PBS 缓冲液（pH 7.2）、0.25% EDTA-胰蛋白酶、G418、明胶、三溴乙醇（avertin）、Brinster's 培养液（BMOC-3）等试剂分别购自 Gibco BRL、Sigma、Hyclone 公司。孕马血清促性腺激素（pregnant mare serum gonadotropin，PMSG）、人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin，HCG）购自天津华孚高新生物技术公司，C57BL/6J、昆明白小鼠均为 SPF 级，购自国家啮齿类实验动物种子中心上海分中心，饲养于本院实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 滋养层细胞的制备和 ES 细胞的培养 按文献[5]制备 G418 抗性的小鼠胚胎成纤维细胞，扩增后用 10 μg/ml 丝裂霉素 C 处理 2～3 h，即成滋养层细胞，冻存于液氮备用。复苏 ES 细胞前 1 d 用滋养层细胞铺好已用 0.1% 明胶处理过的培养皿，ES 细胞培养液含 20% 胎牛血清及 1 000 U/ml LIF，置于 CO_2 孵箱培养。

1.2.2 电击转染 ES 细胞 转染前将载体用 *Not* Ⅰ 酶切线性化。ES 细胞用胰酶消化后重悬于 PBS 中，浓度为 2×10^7/ml。取 43.2 μg 载体 DNA 与 1 ml 细胞混匀，加入电穿孔槽中电击，电击参数为 600 V、25 μF、200 Ω，电击时间为 78 ms。将电击后的细胞分入 4 个已铺好滋养层细胞的培养皿中，置于 CO_2 孵箱培养，24 h 后换成 ES 细胞筛选培养液（含 280 μg/ml 的 G418 及 2 μmol/L 的更昔洛韦）。

1.2.3 ES 细胞阳性克隆的筛选和鉴定 每天更换 ES 细胞筛选培养液，第 8 天挑取 ES 细胞克隆。将挑取的单个未分化 ES 克隆置于 96 孔板中，充分消化后将每个克隆一分为二，1 份冻存，另 1 份培养后转移至 24 孔培养板上扩增并提取基因组 DNA，用 *Eco*R Ⅴ 酶切消化过夜，缓慢电泳 36 h，用敲除载体 5′端外侧的探针进行 Southern 杂交。

1.2.4 显微注射制备嵌合体小鼠

1.2.4.1 小鼠囊胚的准备 选取 4 周龄左右，体质量 12.5～14.5 g 的 C57BL/6J 的不动情雌鼠，中午腹腔注射 5 IU 的 PMSG，46 h 后再腹腔注射 10 IU 的 HCG，将雌鼠与种雄鼠合笼，次晨检查阴栓（记为 0.5 d），第 3 天上午引颈处死有阴栓的雌鼠，取出子宫用 BMOC-3 冲洗出囊胚，并将囊胚收集在覆盖有矿物油的 BMOC-3 液滴中置于 CO_2 孵箱培养，待其囊胚腔明显膨大后即可用于注射。

1.2.4.2 囊胚显微注射 按文献[5]制备注射用 ES 细胞以及显微注射用的持卵针和注射针。挑选小而圆，表面光亮的 ES 细胞进行注射，每个囊胚腔注射 12～15 个 ES 细胞。注射后的囊胚继续置孵箱内培养 2 h。挑选形态正常，透明带完整的囊胚进行移植。

1.2.4.3 囊胚的子宫移植 选 8～10 周龄动情昆明白雌鼠与输精管结扎雄鼠合笼，次晨检查阴栓（记为 0.5 d），2 d 后可用于囊胚的子宫移植。用 2.5% 三溴乙醇麻醉假孕雌鼠，行背部手术将 6～8 个囊胚移植入单侧子宫。如果移植成功，仔鼠在 17 d 后出生，数天后可由毛色初步判断是否嵌合体小鼠。

1.2.5 嵌合体小鼠基因型鉴定 剪取出生 10 d 仔鼠尾尖，提取基因组 DNA，用 *neo* 基因上的引物 RINA（5′-CCAGACTGCCTTGGGAAAAGC-3′）和 hif 基因上的引物 A1F1（5′-TACCATGTGTTTACAGAGGC-3′）进行 PCR 鉴定。

2 结果

2.1 中靶 ES 细胞的筛选与鉴定

基因敲除载体电击转染的 ES 细胞在含 G418 和更昔洛韦的选择培养基中筛选培养，第 8 天后挑取 ES 克隆 490 个，扩增后共提取 360 个 ES 细胞 DNA，*Eco*R Ⅴ 酶切消化后用敲除载体 5′端外侧的探针进行 Southern 杂交（图 1），野生型只出现 1 条 13.1 kb 的条带，HIF-1α 中靶等位基因由于插入的 *neo* 基因序列中携带了 1 个 *Eco*R Ⅴ 位点，使得与该探针杂交后还出现 1 个 9.6 kb 的条带（图 2）。经过 Southern 杂交，得到 1 株阳性 ES 细胞克隆。

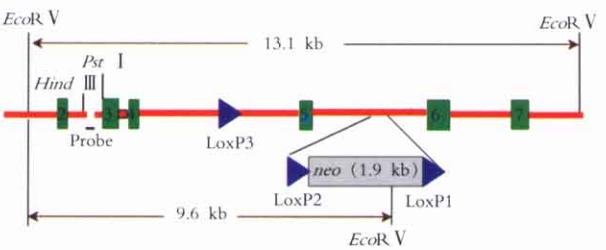
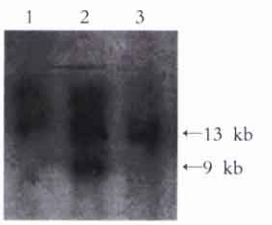


图 1 Southern blot 探针位置示意图



1，3：未中靶 ES 细胞；2：中靶 ES 细胞

图 2 HIF-1α 敲除 ES 细胞的 Southern 杂交鉴定

2.2 中靶 ES 细胞显微注射制备嵌合体小鼠

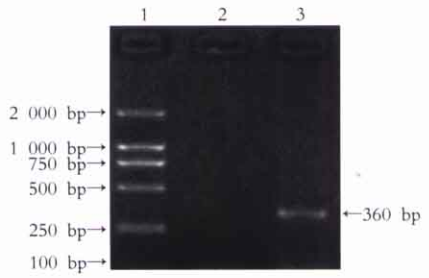
将筛选出的中靶 ES 细胞进行 C57BL/6J 的囊胚腔注射，并将注射后形态正常的囊胚移植入假孕雌鼠的子宫。我们共注射了 50 个囊胚，移植 6 只小鼠，有 4 只移植成功，共出生 10 只小鼠，其中 8 只为嵌合体小鼠，从毛色判断有 2 只为 100% 嵌合体小鼠，4 只为 40%～80% 嵌合体小鼠，2 只嵌合度在 40% 以下（图 3）。

2.3 嵌合体小鼠的基因型鉴定

HIF-1α 条件性基因敲除载体中含有 *neo* 基因，因此用 *neo* 基因上的引物 RINA 和 *hif* 基因上的引物 A1F1 进行 PCR 可扩增出约 360 bp 的条带（图 4）。经 PCR 鉴定，8 只嵌合体小鼠中嵌合率在 40% 以上的 6 只小鼠的尾尖基因组中整合了 HIF-1α 条件性敲除载体。



图 3　HIF-1α 条件性基因敲除嵌合体小鼠



1：DNA 标准（DL 2000）；2：野生型小鼠；3：HIF-1α 条件性基因敲除嵌合体小鼠

图 4　HIF-1α 条件性基因敲除嵌合体小鼠基因型鉴定

3　讨论

HIF-1α 是细胞在缺氧等条件下稳定表达的具有转录活性的核蛋白，它能够与靶基因相结合，通过转录及转录后的调控，使机体对缺氧、缺血产生适应性反应[6-8]。基因敲除技术可在整体动物水平研究基因功能，但是常规基因敲除 HIF-1α 小鼠在胚胎发育期即死亡[3]，不能研究 HIF-1α 在胚胎发育后期和成年后发生低氧时机体的病理生理反应中的作用。如能建立 HIF-1α 的条件性基因敲除小鼠模型，则可望获得能存活的 HIF-1α 在特定细胞表达降低的小鼠模型。国外最近已经建立主要剔除第 2 号外显子的 HIF-1α 的条件性基因敲除小鼠模型[9,10]，但我们无法引进。为此，我们希望建立旨在剔除小鼠 HIF-1α 基因第 5 号外显子的条件性基因敲除小鼠模型。

条件性基因敲除技术是利用 Cre/LoxP 系统在特定的时期或特定的细胞、组织中敲除目标基因。Cre 蛋白为源于噬菌体 P1 中的 1 种重组酶，LoxP 为 1 段 34 bp 的回文 DNA 序列。Cre 蛋白可特异地识别 LoxP 序列，使 2 个 LoxP 间发生重组，进而使其间的 DNA 序列切除。通常在目标基因的重要功能域 DNA 序列两侧各置 1 个 LoxP，得到的基因敲除小鼠目标基因的重要区域 DNA 便被 LoxP 序列所标记，一旦该小鼠和在特定组织或细胞表达 Cre 蛋白的转基因小鼠交配后，在表达 Cre 蛋白的细胞、组织中便发生 Cre 蛋白介导的对目标基因 DNA 的切除，使这些组织、细胞的目的基因被敲除，而其他组织、细胞由于没有 Cre 蛋白表达，不发生上述 DNA 被切除现象，目标基因仍正常。条件性基因敲除技术可避免在发育早期所有细胞、组织中完全敲除目的基因后可能产生的胚胎期死亡或因严重发育障碍而不能传代的情况[11]。

我们所用的 ES 细胞 R1 来源于 129 小鼠，带有褐色的毛色基因，对 C57BL/6J 的黑色基因是显性的。而且由于 ES 细胞嵌入生殖系的比率与其嵌合入毛色的比率具有正相关性，因此可由新生小鼠的毛色来判断 ES 细胞是否整合以及整合效率。在 ES 细胞介导的基因敲除中，由于目前所用的 ES 细胞都是雄性，当注入囊胚分化成生殖细胞时，出生的嵌合体仔鼠应该都是雄性的，雌性嵌合体应该弃去。本次实验经囊胚注射共获得 8 只嵌合体小鼠，经 PCR 鉴定，6 只嵌合率在 40% 以上的小鼠尾尖基因组中均整合了 HIF-1α 条件性敲除载体，其中有 5 只为雄性。目前正在把阳性嵌合体小鼠与雌性野生型 C57BL/6J 回交，观察突变是否经生殖系传递，以最终建立 HIF-1α 条件性基因敲除小鼠品系。

参考文献：

[1] Semenza G L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing[J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 13(2): 167-171.

[2] Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64(5-6): 993-998.

[3] Iyer N V, Kotch L E, Agani F, *et al*. Cellular and developmental control of O_2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha[J]. Genes Dev, 1998, 12(2): 149-162.

[4] 赵　玲，宋瑞华，孙　晶，等. 低氧诱导因子-1α 条件性敲除载体的构建[J]. 第三军医大学学报，2004，26(16)：1419-1422.

[5] Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, *et al*. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual[M]. 3th ed. New York: Spring Harbor Laboratory Press, 2003: 278-349.

[6] Pouyssegur J, Dayan F, Mazure N M. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression[J]. Nature, 2006, 441(7092): 437-443.

[7] Carmeliet P, Dor Y, Herbert J M, *et al*. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis[J]. Nature, 1998, 394(6692): 485-490.

[8] Ryan H E, Lo J, Johnson R S. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization[J]. EMBO J, 1998, 17(11): 3005-3015.

[9] Licht A H, Muller-Holtkamp F, Flamme I, *et al*. Inhibition of hypoxia-inducible factor activity in endothelial cells disrupts embryonic cardiovascular development[J]. Blood, 2006, 107(2): 584-590.

[10] Schipani E, Ryan H E, Didrickson S, *et al*. Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival[J]. Genes Dev, 2001, 15(21): 2865-2876.

[11] 陈　林，赵　玲. 转基因小鼠技术与 HIF-1α 功能的研究[J]. 国外医学：生理、病理科学与临床分册，2004，24(2)：132-135.

（编辑　张大春）