DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.013
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
32 2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)01-0032-04

检测Cre位点特异重组酶活性的双报告转基因小鼠建立

朱焕章[1],陈建泉[2],成国祥[2],薛京伦[3] ([1]第三军医大学西南医院病理科,重庆 400038;[2]上海转基因动物研究中心,上海 201203;[3]复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室,上海 200433)

提 要:目的 建立用于检测Cre位点特异重组酶活性的双报告转基因小鼠。方法 采用显微注射方法,将携带*lacZ*和人碱性磷酸酶(human alkaline phosphatase, hAP)报告基因的ZAP载体导入近交C57BL/6小鼠554枚受精卵;利用PCR, Southern blotting技术对其仔鼠进行基因整合鉴定;应用X-gal染色方法,对转基因小鼠胚胎进行转基因表达检测。结果 存活的398枚受精卵被移入21只假孕受体小鼠输卵管;13只受体怀孕产下68只后代。合子存活率和出生率分别为71%(398/554)和17%(68/398)。在68只小鼠中,5只雄性和4只雌性小鼠整合有双报告基因。转基因整合率和有效率分别为13%(9/68)和1.6%(9/554)。9只首建鼠与正常C57BL/6小鼠杂交产生F1代小鼠。F1代小鼠转基因的传递符合孟德尔规律,X-gal染色仅在3只首建鼠的13.5 d龄胚胎中观察到。结论 检测Cre位点特异重组酶活性的双报告转基因小鼠已建立。

关键词:转基因小鼠;*lacZ*;碱性磷酸酶;Cre重组酶
中图法分类号:R-332; R394.8 文献标识码:A

Establishment of double reporter transgenic mice for monitoring Cre recombinase activity

ZHU Huan-zhang[1], CHEN Jian-quan[2], CHENG Guo-xiang[2], XUE Jing-lun[3] ([1]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Shanghai Transgenic Animal Research Center, Shanghai 201203; [3]State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To establish a double reporter transgenic mice for monitoring Cre recombinase activity. **Methods** ZAP DNA fragment with *lacZ* and human alkaline phosphatase (hAP) gene was microinjected into the male pronucleus of 554 fertilized eggs from C57BL/6 mice. The founder mice and their progeny were screened for integration of transgene into the mouse genome by PCR and Southern blotting. The expression of *lacZ* transgene at early embryos from F1 generation mice was analyzed by X-gal staining. **Results** A total of 398 survival ZAP DNA injected fertilized eggs were transfered to the oviducts of 21 pseudopregnant recipient mice. Of the 21 recipient mice, 13 became pregnancy and gave birth to 68 offspring mice. The zygote survival rate and birth rate were 71% (398/554) and 17% (68/398), respectively. Of the 68 offspring mice, 9 mice (5 males and 4 females) were identified by PCR and Southern blot analysis. Total integration rate and efficiency of transgene was 13% (9/68) and 1.6% (9/554), respectively. Nine mice as the founders were back-crossed to set up F1 generation with other inbred C57BL/6 mice. Out of 9 transgenic mice, transmission of reporter gene in F1 offspring mice followed Mendelian rules, but the expression of *lacZ* protein was detected at the early embryonic stage (13.5 days postcoitum) in only 3 mice. **Conclusion** A double reporter transgenic mice for monitoring Cre recombinase activity is established.

Key words: transgenic mice; *lacZ*; alkaline phosphatase gene; Cre recombinase

以Cre/loxP系统与基因打靶技术相结合的条件性基因打靶,可允许靶基因的缺失/突变仅发生在小鼠发育的某一阶段或和特定的组织器官,因而已成为研究基因功能及建立人类疾病动物模型的重要工具[1~3]。要实现条件性基因基因打靶,一方面须建立靶基因被loxP修饰的打靶小鼠品系,另一重要方面须建立诱导性或组织特异性Cre转基因小鼠品系。目前,国外已建立了众多Cre转基因小鼠[4~6]。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070380, 30170145)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070380, 30170145)

作者简介:朱焕章(1964—),男,河南省洛阳市人,博士,副教授,主要从事转基因动物及基因治疗方面的研究,现在复旦大学遗传学研究所。电话:(021)65643627; E-mail: hzzhu@fudan.edu.cn

收稿日期:2003-07-01;修回日期:2003-10-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

复旦大学遗传学研究所遗传工程实验室已建立了肝细胞特异表达嵌合性 Cre 重组酶的转基因小鼠品系[7],但该鼠的重组特征须与其报告小鼠杂交才能确立。为此,本研究利用显微操作技术,将双报告基因 ZAP 载体(CMV-loxP-*lacZ*-loxP-hAP)导入近交 C57BL/6 小鼠的受精卵,制备 ZAP 转基因小鼠,为检测 Cre 转基因小鼠的重组特征奠定基础。

1　材料和方法

1.1　材料

工具酶如 *Eco*RV, *Hin*dⅢ, *Sfi*Ⅰ, *Stu*Ⅰ, 和 dNTP, *Taq* DNA 聚合酶, 以及其它分子生物学主要试剂分别为 Promega, Sangon 和 Sigma 公司产品。α-^{32}P dCTP 购自北京亚辉生物公司,探针标记试剂盒购自 Amersham Pharmacia Biotech Inc. X-gal 的染色液购自华美生物公司。C57BL/6、ICR(清洁级)小鼠购自上海实验动物中心。

1.2　方法

1.2.1　转基因载体构件　　含有双报告基因的 ZAP 载体由加拿大多伦多大学 Nagy 教授惠赠,结构见图 1。第一报告基因是 β*geo*(*LacZ*/*neo*)融合基因,其后紧接着三个重复 SV40 多腺苷酸(pA)信号,同向 loxP 序列位于其两端,由此构成 floxed-βgeo 框;该融合基因受控于 CMV 增强子和鸡 β 肌动蛋白基因启动子(pCCAG)。第二报告基因是 hAP,由于三个重复 SV40 多腺苷酸(pA)信号的存在,正常情况下 hAP 不表达,只有经 Cre 重组酶介导 floxed-βgeo 框切除后才表达。重组体的鉴定由限制酶切分析及 DAN 序列分析方法证实。



The pCCAG promoter, comprising the CMV enhancer and chicken β-actin promoter, drived expression of the reporter genes. The first reporter, βgeo, followed by three copies of the SV40 polyadenylation signal was flanked by loxP sites and was removed by Cre excision. The second reporter, expressed only after 4-OHT-induced Cre recombinase mediated excision, was hAP gene, followed by the rabbit β-globin polyadenylation sequence

图 1　ZAP 表达载体的结构

Fig 1　Structure of the ZAP expression vector

1.2.2　转基因小鼠的制备　　按标准方法制备转基因小鼠[8]。转基因构件经 *Sfi*Ⅰ-*Stu*Ⅰ酶切成线性,用凝胶钝化 QIAGEN 试剂盒回收目的片段。DNA 溶解在显微注射缓冲液,其终浓度为 1 μg/ml。64 只 C57BL/6 小鼠作为供体,21 只 ICR 小鼠作为受体。转基因被注射入 C57BL/6 雄性原核,然后,移植入假孕母鼠输卵管。受体鼠怀孕产出仔小鼠。

1.2.3　转基因整合检测　　DNA 准备:用干净眼科剪,断取 4 周龄的转基因小鼠尾(长 1~1.5 mm)组织,用蒸馏水洗净后,放入含 500 μl STE 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl)内,按 Sambrook[8] 方法进行 DNA 抽提。

1.2.3.1　PCR 检测　　据 *lacZ* 基因序列进行引物设计,引物由赛百胜公司合成。引物序列如下:上游引物, 5′-TTC ACT GGC CGT CGT TTT ACA ACG TCG TGA-3′;下游引物, 5′-ATG TGA GCG AGT AAC AAC CCG TCG GAT TCT-3′. PCR 反应体系包含 2 μl 10× PCR buffer, 0.4 μl 25 mmol/L Mg^{2+}, 1 μl 15 mmol/L dNTP, 各 1 μl 10 pmol 上、下游引物, 2 U Taq DNA 聚合酶, 1 μg DNA 样品,加入无菌水至总体积 20 μl。PCR 的反应程序:首先 95 ℃变性 5 min,然后 30 个循环,包括 94 ℃变性 30 s, 58 ℃退火 40 s 和 72 ℃延伸 10 min。10 μl PCR 产物在 1.8% 琼脂糖凝胶上点样, 80 伏电泳 40 min,观察电泳结果,记录拍照。阳性转基因小鼠与正常 C57BL/6 杂交产生杂合 F1 代小鼠,同样用 PCR 进行整合检测。

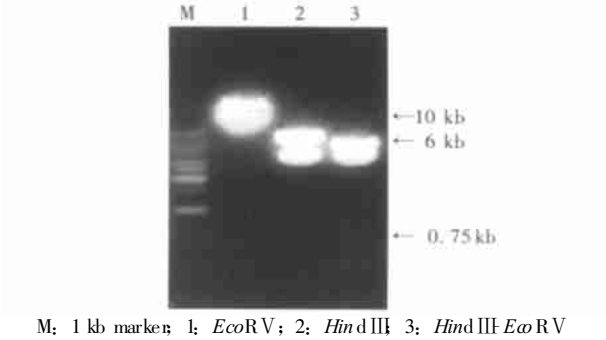
1.2.3.2　Southern blot 检测　　Southern blot 按常规方法进行[9]。尾组织 10 μg DNA 用 *Hin*dⅢ酶切消化,经 0.6% 的凝胶电泳,转移到尼龙膜上。在尼龙膜杂交 5 h 42 ℃后,用 α-^{32}P dCTP 标记 0.7 kb 的探针杂交过夜,−70 ℃放射自显影。

1.2.4　F1 代小鼠胚胎的 X-gal 染色　　将 F1 代转基小鼠的 13.5 胎龄的胚胎在 PBS 配制的固定液(2% 多聚甲醛, 0.25% 戊二醛, 0.01% NP40)中固定 30 min。弃固定液,用 PBS 洗 1 次。加入 10 ml 含有 2 mmol/L $MgCl_2$, 0.02%NP40, 0.01% 脱氧胆酸钠的 PBS 缓冲液,室温振荡 2 h。含有 1 mg/ml X-gal 的染色液 10 ml, 30 ℃染色 24 h。正常小鼠的胚胎作为阴性对照。

2　结果

2.1　构件鉴定

ZAP 载体经 *Eco*RV + *Hin*dⅢ酶切产生 3 个片段,显示实际结果与理论值相一致(图 2)。DAN 序列分析方法更进一步证实该载体正确。



M: 1 kb marker; 1: *Eco*RV; 2: *Hin*dⅢ; 3: *Hin*dⅢ-*Eco*RV

图 2　ZAP 载体的酶切鉴定

Fig 2　Identification of ZAP vector

2.2　转基因小鼠的建立

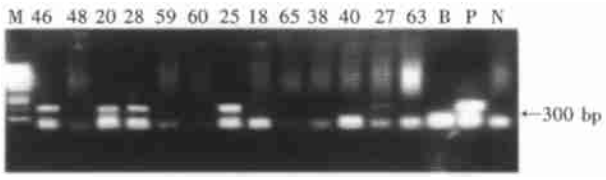
将 ZAP 载体 DNA 片段微注射于 554 枚 C57BL/6 小鼠受精卵,其中存活的 398 枚被移入 21 只假孕受体小鼠输卵管;13 只受体怀孕产下 68 只后代(图 3)。合子存活率为 71%(398/554),出生率 17%(68/398)。PCR 和 Southern blot 整合分析见图 4。图 5 显示在 68 只仔鼠中,有 9 只小鼠(5 只雄性, 4 只雌性)携带有 ZAP 基因,并作为首建鼠。转基因整合率和有效率分别为 13%(9/68)和

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

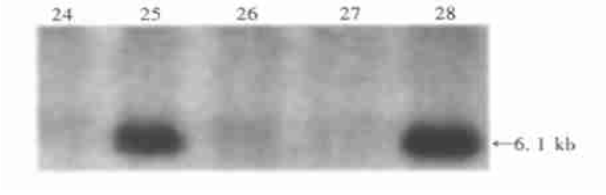
1.6%(9/554)。将9只首建鼠与正常C57 BL/6小鼠或同窝非转基因小鼠杂交,产生F1代小鼠结果见表1。转基因皆能遗传到后代。



图3 ICR受体鼠产下部分转基因小鼠
Fig 3 Transgenic mice borne by ICR recipient mice



M: 1 kb marker; 20, 25, 28, 46, and 27 transgenic founder mice (positive bands 300 bp); 18, 38, 40, 48, 59, 60, 63, and 65 non-transgenic mice; N: Negative control; B: Blank control (H_2O); P: Positive control
图4 利用PCR鉴定ZAP转基因小鼠
Fig 4 Identification of ZAP transgenic mice by PCR



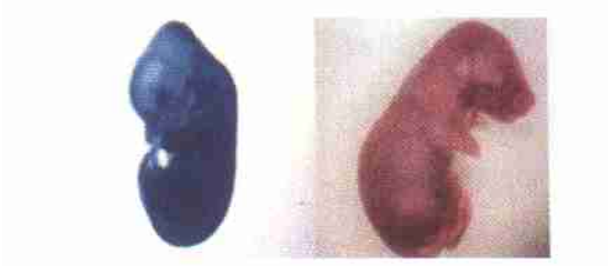
25, 28 mice: Positive (6.1 kb); 24, 26, 27: Negative mice
图5 转基因小鼠的Southern blotting鉴定
Fig 5 Identification of transgenic mice by Southern blot analysis

表1 ZAP转基因仔鼠的传递结果
Tab 1 Transmission rate of the ZAP transgene to offspring

Founder line	Sex	No. of littermate	No. of offspring	No. of transgenic mice	Ratio (%)
1	M	2	10	5	50.0
2	F	3	11	6	54.5
3	M	2	9	5	55.5
4	F	2	8	3	37.5
5	M	2	9	4	44.4
6	M	2	10	4	40.4
7	M	2	8	3	37.5
8	F	3	11	4	36.3
9	F	3	13	4	30.7

2.3 F1代小鼠胚胎*LacZ*表达的检测

为了检测*LacZ*基因表达,将9只F1代转基小鼠的13.5 dpc胚胎进行*LacZ*染色,结果其中的3个首建鼠的F1代转基小鼠胚胎显示*LacZ*阳性染色,见图6。



Left: *lacZ* positive staining embryo of transgenic mouse; Right: Negative control
图6 F1代小鼠胚胎的X-gal染色
Fig 6 X-gal staining for F1 mouse embryo

3 讨论

目前,国外有数个实验室建立了Cre报告转基因小鼠[10~14]。由于报告基因和转基因途径的不同,因此Cre报告转基因小鼠各具特色。如LacZ报告品系,易于检测Cre介导切除后的组织定位,而GFP报告品系,则易于在活体组织检测Cre介导切除。理想的检测Cre重组特征的转基因构件应具备以下几个特征:①报告转基因的表达应具有广泛性;②一个报告转基因的表达仅在Cre介导切除前检测到;③另一报告转基因的表达仅在Cre介导切除后检测到,即第二个报告转基因的表达仅在Cre介导第一个报告转基因被切除后才允许表达。在本研究的ZAP载体中,pCAGG启动子具有持续性和广泛性,因而被选择作为调控元件;作为第一报告基因的βgeo是LacZ/neo的融合基因,不仅提供了可视的报告而且便于在ES细胞上选择;而在βgeo后的3个重复SV40多腺苷酸(pA)信号存在能确保转录信号停止。hAP作为第二报告基因,正常情况下不表达,只有经Cre重组酶介导floxed-βgeo框切除后才表达。我们曾用ZAP载体转染BRL(大鼠肝细胞)和BRK(大鼠肾细胞)细胞株,经G418选择后,建立了携带有双报告基因ZAP细胞株[15]。诱导性Cre重组酶表达载体转染ZAP细胞株,用1 μmol/L 4-羟基三苯氧胺(4-hydroxytamoxifen, 4-OHT)处理后,经碱性磷酸酶染色,ZAP细胞株显示阳性碱性磷酸酶染色;用PCR方法证实Cre重组酶介导了floxed-βgeo框架的切除;从而在细胞水平上证实ZAP载体的有效性,同时建立了体外检测Cre转基因小鼠表达的CRE重组酶活性的方法。为了建立一个在整体水平上检测Cre重组酶活性的体系,本研究利用显微操作技术,将双报告基因ZAP载体导入近交C57BL/6小鼠的受精卵,建立了9个ZAP转基因首建小鼠,最后获得了3只稳定有效表达*lacZ*的首建鼠。

由转基因随机整合入受精卵途径获得的转基因动物,其目的基因的表达受整合位点、目的基因的拷贝数、个体的遗传背景、转基因的调控

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

区等因素影响。在本研究, 从 9 只首建小鼠的后代中, 仅有 3 只首建鼠后代有 *lacZ* 表达, 与 Imai 等[16] 报道在 20 只首建小鼠的后代中仅有 3 只首建鼠在肝特异表达 Cre-ERt mRNA 一致。这些结果说明了并非每一个转基因首建小鼠皆能表达 Cre 重组酶, 染色体整合位点可能影响转基因表达。

目前, 除了复旦大学遗传学研究所遗传工程实验室已建立了肝细胞特异表达嵌合性 Cre 重组酶的转基因小鼠品系[7], 国内军事医学科学院生物工程研究所发育和疾病遗传学研究室, 在 Cre 重组酶转基因小鼠的研制及应用方面做了许多工作, 如相继构建了软骨组织特异性 Cre 重组酶转基因小鼠和胰腺特异表达 Cre 重组酶转基因小鼠[17,18]。因而, ZAP 双报告转基因小鼠建立将为检测 Cre 转基因小鼠的重组特征奠定基础。

参考文献:

[1] Le Y, Sauer B. Conditional gene knockout using Cre recombinase [J]. Mol Biotechnol, 2001, 17(3): 269—275.

[2] Lewandoski M. Conditional control of gene expression in the mouse [J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(10): 748—755.

[3] Schnutgen F, Doerflinger N, Callejia C, *et al*. A directional strategy for monitoring Cre-mediated recombination at the cellular level in the mouse[J]. Nat Biotechnol. 2003, 21(5): 562—565.

[4] 朱焕章, 史景泉. Cre/Loxp 系统在转基因小鼠上的应用策略 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(3): 235—238.

[5] Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring [J]. Genesis, 2000, 26(2): 99—109.

[6] Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse [J]. Methods, 2001, 24(1): 71—80.

[7] Zhu H Z, Chen J Q, Cheng G X, *et al*. Generation and characterization of the transgenic mice expressing a tamoxifen-inducible Cre-fusion protein specifically in the mouse liver[J]. World J Gastroenterology, 2003, 9(8): 1844—1847.

[8] Hogan B, Costantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbour, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980. 116—188.

[9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. MolecularCloning: a Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 31—61.

[10] Lobe C G, Koop K E, Kreppner W, *et al*. Z/AP, a double reporter for Cre-mediated recombination[J]. Dev Biol, 1999, 208 (2): 281—292.

[11] Mao X, Fujiwara Y, Orkin S H. Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(9): 5037—5042.

[12] Novak A, Guo C, Yang W, *et al*. Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein Upon Cre-mediated excision [J]. Genesis, 2000, 28(3-4): 147—155.

[13] Mao X, Fujiwara Y, Chapdelaine A, *et al*. Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain [J]. Blood, 2001, 97(1): 4324—326.

[14] Kawamoto S, Niwa H, Tashiro F, *et al*. A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated recombination[J]. FEBS Lett, 2000, 470(3): 263—268.

[15] Zhu H Z, Cao Y Y, Cheng G X, *et al*. Conditional gene activation in cultured hepatocytes using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase [J]. Acta Biochimica Bophysica Sinica, 2003, 23 (5): 436—440.

[16] Imai T, Chambon P, Metzger D. Inducible site-specific somatic mutagenesis in mouse hepatocytes[J]. Genesis, 2000, 26(2): 147—148.

[17] 周　江, 程　萱, 吕娅歆, 等. 胰腺组织表达 Cre 重组酶转基因小鼠的建立及鉴定[J]. 生物工程学报, 2002, 18 (3): 286—290.

[18] 郝振明, 杨　晓, 程　萱, 等. 软骨组织特异性表达 Cre 重组酶转基因小鼠的研制和鉴定[J]. 遗传学报, 2002, 29 (5): 424—429.

(编辑　栾　嘉)

(上接 28 页)

特征为皮肤和胃肠道多发性血管瘤。男女均可发病, 是一种常染色体显性遗传性疾病, 由于 9 号染色体的短臂的点突变造成血管发育异常的罕见疾病[1]。大部分病例以贫血为主要和首发症状, 主要是由于消化道慢性失血造成的缺铁性贫血; 少部分病例以其他症状就诊, 如: 癫痫、共济失调、痴呆、视力减退、泌尿系表现异常, 主要是由于血管瘤发生侵犯的部位不同所致[2~5], 因此认为 BRBNS 是一种全身性疾病。

对本病一般采取保守和对症治疗。补铁是治疗贫血、改善症状的主要治疗方法。皮肤病变一般不需要治疗, 有美容要求时可以考虑激光或手术切除治疗。消化道病变根据病变部位、范围和出血程度可采取保守治疗、内镜下激光或电凝、手术切除等治疗。

关键词: 蓝色橡皮-大疱性痣综合征; 贫血; 缺铁

中图法分类号: R732.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Gallione C J, Pasyk K A, Boon L M, *et al*. A gene for familial venous malformations maps to chromosome 9p in a second large kindred[J]. J Med Genet, 1995, 32(3): 197—199.

[2] Eiris Punal J, Picon Cotos M, Viso Lorenzo A, *et al*. Epileptic disorder as the first neurologic manifestation of blue rubber bleb nevus syndrome [J]. J Child Neurol, 2002, 17(3): 219—222

[3] Vig E K, Brodkin K I, Raugi G J, *et al*. Blue rubber bleb nevus syndrome in a patient with ataxia and dementia[J]. J Geriatr Psychiatry Neurol, 2002, 15(1): 7—11.

[4] Chang E L, Rubin P A D. Bilateral multifocal hemangiomas of the orbit in the blue rubber bleb nevus syndrome[J]. Ophthalmology, 2002, 109 (3): 537—541.

[5] Tatar G, Ozyilkan E, Telatar H. Blue rubber bleb nevus syndrome: report of a case[J]. Turk J Pediatr, 1993, 35(2): 131—134.

(编辑　刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net