

水通道蛋白 3 基因敲除小鼠的饲养繁殖及鉴定

董春玲^{1,2}, 王桂芳¹, 肖奎¹, 李波³, 马忠森², 白春学¹

[摘要]目的: 繁殖和鉴定水通道蛋白 3(AQP3)基因敲除小鼠。方法: 将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, 提取每种基因型小鼠尾部基因组 DNA, 用 PCR 法进行鉴定, 将其雄性纯合子与雌性杂合子交配, 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: AQP3 杂合子小鼠的繁殖和饲养均获得成功, 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 AQP3 基因敲除纯合子小鼠的有效途径。

[关键词] 模型; 生物学; 水通道蛋白 3 基因敲除; 小鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 318 [文献标识码] A

Breeding reproducing and identifying for aquaporin 3 gene knock out mice

DONG Chun ling^{1,2}, WANG Gui fang¹, XIAO Ku¹, LI Bo³, MA Zhong sen², BAI Chun xue¹

(1. Institute of Respiratory Department Zhongshan Hospital Fudan University, Shanghai 200032

2. Institute of Respiratory Department The Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041

3. Department of Human Anatomy, Basic College of Medicine, Jilin University, Changchun 130021 China)

[Abstract] **Objective** To breed and identify aquaporin 3(AQP3) gene knock out mice. **Methods** Heterozygote mice were bred and reproduced. Wild genotype, heterozygote genotype and homozygote genotype would appear in the 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 to acquire homozygote baby mice according to Mendel law. **Results** The breeding and reproducing were successful and more heterozygote genotype mice were reproduced. **Conclusions** Appropriate methods of breeding, reproducing and identifying are effective ways for acquiring AQP3 gene knock out mice from heterozygote mice.

[Key words] model; biological; aquaporin 3 gene knock out mice

2005年 7月, 我们从美国加州大学旧金山分校 Venkman 教授所在的心血管研究所引进水通道蛋白 3(Aquaporin 3, AQP-3)基因敲除杂合型小鼠, 该小鼠是由麻彤辉教授(现在东北师范大学膜通道实验室)于 1999 年建立。引进此批小鼠的目的是为了获得 AQP-3 基因敲除纯合子小鼠, 为研究 AQP-3 在呼吸系统的病理生理学功能提供实验动物。现将此批小鼠的饲养、繁殖及鉴定作一报道。

1 材料与方法

1.1 实验动物 小鼠由美国引进, 雌、雄鼠各 2 只, 品系为昆明鼠, 基因背景为 AQP-3 基因敲除杂合子(AQP-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 °C, 湿度为 50% ~ 60%, 小鼠笼盒、垫料及食物经 ⁶⁰Co 照射处理, 饮水经高温高压灭菌处理。饲养过程中, 研究人员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。每周换垫料 3 ~ 5 次, 食水每日补充。小鼠的性成熟期为 60 天左右, 母鼠妊娠期为 19 天左右, 繁殖采用 1 只雄鼠与 1 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(AQP-3 + / +)、杂合子(AQP-3 + / -)以及纯合子(AQP-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 剪取小鼠尾尖 0.2 ~ 0.5 cm 放入 1.5 ml EP 管中, 参照华舜生物工程公司组织基因组 DNA 提取试剂盒操作说明进行抽提 DNA。电泳鉴定、限制性酶切鉴定、分光光度仪测定纯度、浓度, 最后将所制备的基因组 DNA 置于 -20 °C 保存。

1.3.2 PCR 反应及琼脂糖凝胶电泳进行基因型鉴定 (1)引物设计: 由麻彤辉教授所在的东北师范大学膜通道实验室提供, 由 3 条寡核苷酸链组成。引物 1: 5'-AGA CAA CGC CAC CAC CAT GTT CTG-

[收稿日期] 2006-12-26

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30370611)

[作者单位] 1 上海复旦大学附属中山医院 呼吸内科, 上海 200032

2 吉林大学第二医院 呼吸内科, 吉林 长春 130041;

3 吉林大学基础医学院 解剖学教研室, 吉林 长春 130021

[作者简介] 董春玲(1976-), 女, 博士生, 住院医师。

[通讯作者] 白春学, 博士生和博士后导师, 教授, 主要研究方向: 肺损伤和肺癌的分子发病机制和治疗。

3'位于 AQP-3 基因的上游区域, 作为通用引物; 引物 2: 5'-TAG GGG AAA GAA ACG AGT TGG GC-3' 位于 AQP-3 基因敲除区域, 用于检测野生型; 引物 3: 5'-CTC TAT GGC TTC TGA GGC GGA AAG-3' 位于替换的基因片段用于检测突变型。(2) PCR 过程: 在 30 μ l 反应体系中加入如下反应物: 引物 1 (0.2 μ g μ l) 0.45 μ l 引物 2 (0.2 μ g μ l) 0.3 μ l 引物 3 (0.2 μ g μ l) 0.3 μ l MgCl₂ (50 mmol/L) 1.2 μ l 10 \times Buffer 3.0 μ l dNTP (10 mmol/L) 0.5 μ l Taq DNA polymerase (5 u μ l) 0.5 μ l 尾部 DNA 模板 1 μ l 加水补足 30 μ l PCR 反应过程: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 循环 1 次; 94 $^{\circ}$ C 30 s 60 $^{\circ}$ C 30 s 72 $^{\circ}$ C 1 min 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min 循环 1 次。(3) 电泳鉴定: 取 PCR 产物 30 μ l 点于 1.0% 琼脂糖凝胶上, 电泳分析结果: 由引物 1、2 检测出的约 450 bp 条带为野生型小鼠; 由引物 1、3 检测出的约 350 bp 条带为基因敲除纯合型小鼠; 两带均出现为杂合型小鼠。

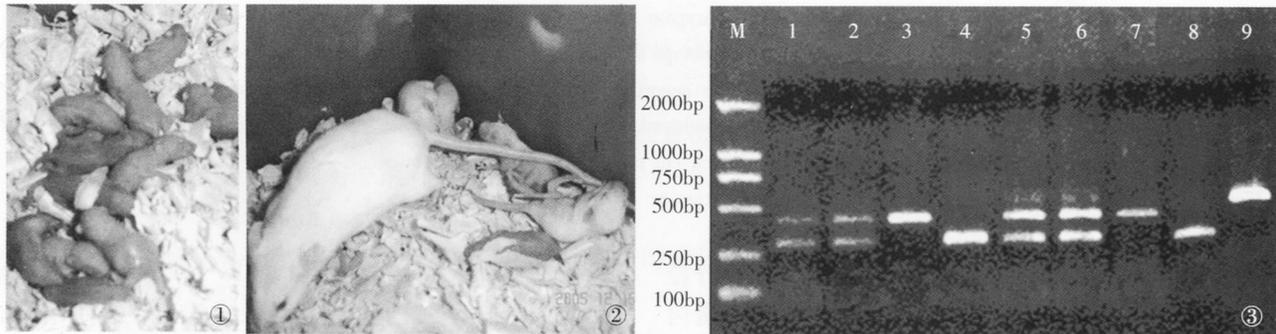


图 1 AQP-3 杂合子小鼠所产幼鼠 图 2 AQP-3 杂合子母鼠及 1 周龄幼鼠 图 3 子一代 PCR 鉴定部分结果 (M: Marker DL2000; 1~8: 小鼠编号; 9: β -actin)

3 讨论

1991 年 Agre 及其同事先后完成了对水通道蛋白 cDNA 的分子和功能鉴定, 从此水通道的生物学研究跃入了一个新的阶段^[1]。现在已经在哺乳动物中发现 13 种膜通道蛋白 AQP-0 ~ AQP-12 为同源水通道蛋白家族, 表达在哺乳动物的内皮、上皮以及其他细胞^[2]。肺水通道蛋白的发现, 在分子水平上揭示了肺泡毛细血管间水跨膜转运的机制, 目前对肺水通道的认识基本上是实验性研究。其中研究结果表明 AQP-3 不仅能转运水, 而且能转运尿素和甘油, 为相对非选择性。主要分布在肾、主气管、眼、膀胱、皮肤和胃肠道, 编码 292 个氨基酸 - 水甘油通道蛋白。有研究表明, 支气管扩张患者气管镜活检标本表达在上皮基底细胞上的 AQP-3 明显减少^[3], 在人气道上皮细胞系 A549 细胞上也有 AQP-3 的表达, 并可受地塞米松刺激表达上调^[4]。AQP-3 在肺组织水转运的机制还不明确, 但分布较广泛, 尤其发

2 结果

2.1 小鼠的繁殖情况 AQP-3 杂合子母鼠成功繁殖出子代幼鼠 (见图 1)。新生小鼠无毛, 呈肉红色, 眼睛未开, 四肢不发达, 有极短的尾巴, 只能摇摆地移动。每只母鼠妊娠期为 19 ~ 21 天, 每胎约产 10 ~ 14 只幼鼠, 成活率 > 95%。

2.2 小鼠生长情况 AQP-3 杂合子母鼠及 1 周龄幼鼠 (见图 2)。幼鼠由母鼠母乳喂养, 哺乳期 21 天, 故产后 3 周可离乳。

2.3 小鼠基因型鉴定结果 子一代鉴定部分结果见图 3 凝胶最左侧为 DL2000 Marker 后面依次为小鼠编号, 其中 3、7 号小鼠出现一条 450 bp 左右条带为野生型; 1、2、5、6 号小鼠出现 350 bp 和 450 bp 左右两条带为杂合型; 4、8 号小鼠出现一条 350 bp 左右条带为纯合型; 9 号为内参 β -actin。

现在 II 型肺泡上皮细胞有表达, 推测其与肺水转运及肺损伤保护机制密切相关, 仍需进一步研究^[5]。

基因敲除是自 20 世纪 80 年代末发展起来的一种新型分子生物学技术, 多是通过应用 DNA 同源重组原理使机体特定的基因失活或缺失的技术。至此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。由于水通道蛋白抑制剂 HgCl₂ 有毒性, 不宜活体实验, 故水通道基因敲除小鼠为进一步研究水通道蛋白的生理功能提供了一个良好的平台。1999 年, 麻彤辉教授在美国成功的建立了 AQP-3 基因敲除小鼠模型^[6], 但是此模型程序繁多, 成本昂贵, 这也是我们从国外引进此基因敲除鼠的重要原因。

AQP-3 基因敲除杂合型小鼠成功引进后, 饲养和繁殖参照相关文献^[7]并结合本校动物饲养条件适当调整, 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 AQP-3 小鼠均为杂合子, 其子代可能出现 3 种表型, 即 AQP-3

+ /+, AQP-3 + /-, AQP-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,因 PCR法相对简单易行,故我们采用的是前者。通过繁殖,部分子代出现了少量的纯合子(见图 3),一旦鉴定出雄性纯合子,就将其与雌性杂合子(因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 AQP-3 - /-纯合子,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。饲养过程中值得注意的是, AQP-3基因敲除鼠肾脏浓缩功能严重受损,表现出明显的多尿、烦渴,要及时补足水分及更换垫料^[8]。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 AQP-3小鼠,为在体及离体 AQP-3在肺组织水转运的机制研究提供了便利条件,具有重要价值。

(致谢:诚挚感谢东北师范大学膜通道实验室麻彤辉教授和梁兴武老师的指导和帮助。)

[参 考 文 献]

[1] Preston GM, Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral

membrane protein of 28 kilodaltons Member of an ancient channel family[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88(24): 11 110 - 11 114

- [2] Liu K, Nagase H, Huang CG, *et al* Purification and functional characterization of Aquaporin 8[J]. *Biol Cell* 2006, 98(3): 153 - 161.
- [3] Tsang KW, Leung JC, Tipoe GL, *et al* Down regulation of aquaporin 3 in bronchiectatic airways *in vivo*[J]. *Respir Med* 2003, 97(1): 59 - 64
- [4] Tanaka M, Inase N, Fushimi K, *et al* Induction of aquaporin 3 by corticosteroid in a human airway epithelial cell line[J]. *Am J Physiol* 1997, 273(5 Pt 1): L1 090 - L1 095.
- [5] Hara Chikuma M, Verkman AS. Aquaporin 3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin[J]. *Biol Cell* 2005, 97(7): 479 - 486.
- [6] Ma T, Song Y, Yang B, *et al* Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin 3 water channels[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97(8): 4 386 - 4 391.
- [7] 施新猷主编. 现代医学实验动物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 71 - 82
- [8] Kim SW, Gress V, Rojek A, *et al* Decreased expression of AQP 2 and AQP 4 water channels and Na K-ATPase in kidney collecting duct in AQP 3 null mice[J]. *Biol Cell* 2005, 97(10): 765 - 778

[文章编号] 1000-2200(2007)05-0507-01

· 短篇报道 ·

单羊膜囊双胎、脐带缠绕 5个真结 1例

方小红

[关键词] 双胎; 单卵; 脐带 病理学; 单羊膜囊

[中国图书资料分类法分类号] R 714.23 [文献标识码] B

孕妇 26岁, 停经 36⁺5周, 阴道流血 2 h 于 2006年 6月 14日入院。末次月经 2005年 9月 30日, 预产期 2006年 7月 7日, 孕期正常, 孕 5个月 B超提示双胎。入院产检: BP 110 / 70 mmHg 宫高 43 cm, 胎位 LOA、ROA, 胎心 136次 /分、140次 /分。肛查: 宫口 1 cm, 头先露, 高位; “0”, 胎膜破, 羊水清。B超提示: 双活胎, 均为头位。于入院下午 2时 10分宫口开全, 1.5 h后胎头拨露, 子宫收缩乏力, 予 1%缩宫素加强宫缩。下午 4时 10分在会阴左侧切保护下助娩一活女婴, 出生后 1 min Apgar评分 4分, 抢救后 Apgar评分 8分, 重 2.5 kg 转入儿科进一步治疗。见第一胎儿脐带打真结 2个。于下午 4时 22分在会阴保护下助娩另一活女婴, 羊水Ⅲ度粪染。出生后 1 min Apgar评分 1分, 抢救后 Apgar评分 4分, 重 2.35 kg 转入儿科进一步治疗。胎盘于下午 4时 30分娩出, 见一个胎盘, 共存于一个胎膜为单羊膜囊双胎。胎盘大小约为 25 cm×22 cm×3 cm, 两脐带根部相距 5 cm, 距脐带根部 15 cm处两脐带相互缠绕形成 5个真结。

讨论 由一个受精卵分裂而生长成为两个胎儿称为单

卵双胎。分裂后的胚胎除极少数外均可形成独立的胎儿, 此种双胎约占双胎总数的 30%。由于单卵双胎卵子受精后分裂成为两个胚胎的时间迟早不同而表现种类不同, 单羊膜囊单绒毛膜双胎是在受精后 8~12天分裂为双胎者, 此时两个胎儿共有—个胎盘处于—个羊膜囊内, 但无羊膜分隔, 两个胎儿由于相互运动而发生缠绕、打结, 以致—胎儿死亡。这种双胎仅占单卵双胎的 1%~2%, 但死亡率极高^[1]。一般至妊娠 7~8周 B超发现宫内两个胚囊可诊断双胎, 至妊娠 9~13周两个胎囊和两个胎儿及其胎动已明显可辨, 此时 B超应辨别双胎的类型, 若无强光带分隔于两胎之间要考虑单羊膜囊双胎, 应加强孕期监护并以剖宫产为宜^[2]。若经阴道分娩, 在第一胎儿娩出后—旦发现单羊膜囊双胎尤其合并脐带缠绕成真结应迅速人工娩出第二胎儿缩短第二产程。本例第一胎儿脐带打真结 2个, 两胎儿脐带打真结 5个实属罕见。所以, 双胎早期 B超检查时应确定是否为单羊膜囊双胎, 在处理产程时应想到单羊膜囊双胎可能及时果断处理可改变预后。

[参 考 文 献]

- [1] 顾美皎主编. 临床妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 168
- [2] 杨兰英. 单羊膜囊双胎、脐带缠绕 3个真结 1例[J]. 中国误诊学杂志, 2005, 5(18): 3596

[收稿日期] 2007-05-08

[作者单位] 安徽省池州市第二人民医院 妇产科, 247000

[作者简介] 方小红(1978-), 女, 住院医师。