文章编号:2095 - 1116(2012)06 - 0613 - 03 ·技术与方法·

Nrf2 基因敲除小鼠的饲养繁殖及基因型鉴定

胡春萍,蔡雪婷,杨 洋,卢悟广,杨 杰,叶 娟,曹 鹏
(江苏省中医药研究院细胞与分子生物学实验室,江苏 南京 210028)

摘 要: **目的** 繁殖和鉴定 Nrf2 基因敲除小鼠。 **方法** 将引进的杂合子小鼠进行饲养并繁殖,繁殖成功的子代有 3 种基因型小鼠,即野生型、杂合子以及纯合子小鼠,从繁殖成功的小鼠尾巴中提取基因组 DNA,用 PCR 法鉴定小鼠的基因型。 **结果** Nrf2 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 Nrf2 基因敲除纯合子小鼠的有效途径。

关键词: Nrf2; 基因敲除; 小鼠; 聚合酶链反应
中图分类号: Q78 **文献标识码:** A

Breeding, Reproducing, and Identifying Nrf2 Knockout Mice

HU Chunping, CAI Xueting, YANG Yang, et al
(*Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Jiangsu Province Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu* 210028, *China*)

Abstract: **Objective** To breed and identify Nrf2 knockout mice. **Methods** Nrf2 knockout mice were bred and reproduced according to Mendel law. Genomic DNA was extracted from the mice tails and subjected to PCR for genotype identification. **Results** The experimental model for Nrf2 knockout mice was successfully established and more Nrf2 knockout mice were reproduced. **Conclusion** The polymerase chain reaction experiment can succeed in distinguishing different genetic Nrf2 gene of phenotype. Furthermore, it can lay out a solid foundation to further study of Nrf2 knockout mice related model.

Key words: Nrf2; knockout; mice; polymerase chain reaction

Nrf2 可保护肺脏、肝脏、消化道、神经系统和心血管系统等多种器官或组织,如肺纤维化和急性肺损伤、肺气肿、哮喘、阿尔茨海默病、帕金森病、脑缺血、老化和心血管疾病、炎症、狼疮样自身免疫性肾炎和黄斑变性等[1]。Nrf2 的这种广谱特性使 Nrf2 对于多器官疾病具有巨大的治疗潜力。随着 Nrf2 研究的进一步加深,多器官保护剂 Nrf2 的应用模式也不断进步,从而使器官损伤的预防研究成为热门,所以该小鼠的应用近年来世界各国呈逐年增加的趋势,本文对 Nrf2 基因敲除小鼠的饲养、繁殖及鉴定方法进行了探讨。

收稿日期: 2012 - 09 - 05
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274150、81201967、30873410),江苏省中医药领军人才项目(RC1006).
通讯作者: 曹鹏,电话:025 - 85608666,E-mail:pcao79@yahoo.com.
13951685111njhcp66@126.com.

1 材料与方法

1.1 实验动物

Nrf2 基因敲除小鼠从 Johns Hopkins University 引进,在江苏省中医药研究院动物中心繁殖扩群。

1.2 小鼠的饲养和繁殖

实验小鼠均饲养在动物中心的屏障环境中,室内温度为 20 ℃ ~ 26 ℃,相对湿度 50% ~ 70%,噪声小于 60 dB,氨浓度小于 14 mg/L,光照明暗交替 12 h/天。环境许可证号为 SCXK(苏)2007-0004。小鼠所食饲料为江苏省协同医药生物工程有限责任公司所提供 60Co 辐射饲料,营养成份为:粗蛋白 23.0%、粗脂肪 10%、粗灰份 6.1%、粗纤维 2.1%、水份 10.1%、钙 1.28%、磷 0.91%、赖氨酸 1.42%、蛋氨酸 + 胱氨酸 0.67%、精氨酸 1.68%、组氨酸 0.73%、丙氨酸 + 络氨酸 1.96%、苏氨酸 0.92%、亮氨酸 1.98%、异亮氨酸 0.88%、缬氨酸 1.18%。生

产许可证号为苏饲审(2008)01008,饮水为消毒酸化水,使用的垫料、盒子等一切用具均进行131 ℃、5 min高压预真空灭菌。小鼠的性成熟期为60天左右,母鼠妊娠期为21天左右,繁殖采用1只雄鼠与2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Nrf2基因敲除小鼠,所以采用1只雄鼠与2只雌鼠同居的方式进行繁殖,其子代可能出现基因野生型($Nrf2^{+/+}$)、杂合子($Nrf2^{+/-}$)以及纯合子($Nrf2^{-/-}$)胚胎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0.5~1.0 cm,放入2 mL离心管中,存放于液氮中。参照Axygen Biosciences公司组织基因组DNA提取试剂盒操作说明进行抽提DNA,双蒸水(ddH_2O)溶解。测OD值,4 ℃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(参照Johns Hopkins University)[2]:引物1:5′-TGG ACG GGA CTA TTG AAG GCT G-3′(sense for both genotypes);引物2:5′-CGC CTT TTC AGT AGA TGG AGG-3′(antisense for wild type);引物3:5′-GCG GAT TGA CCG TAA TGG GAT AGG-3′(antisense for LacZ),由上海Invitrogen公司合成,3种引物按1∶1∶1混合至10 μmol/L。目的基因片断长度分别为750 bp和400 bp。(2)PCR过程:反应体系(下列反应物构成25 μL的反应体系):2×EasyTaq PCR SuperMix 12.5 μL,10 μmol/L混合引物2.5 μL,模板DNA 2.5 μL,加ddH_2O 7.5 μL补足25 μL。采用PCR扩增仪进行循环扩增:预变性,96 ℃ 2 min;变性,94 ℃ 1 min;退火,58 ℃ 1 min;延伸,72 ℃ 1 min,共30个循环,最后再延伸15 min。(3)电泳鉴定:取PCR反应终产物20 μL 1%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(ethidium bromide,EB)作为分子量标记物。小鼠尾部组织琼脂糖凝胶电泳基因型片断为:野生型750 bp;纯合子400 bp;杂合子750 bp和400 bp,按此基因条带可以鉴别出各个基因型小鼠。

2 结 果

2.1 小鼠的繁殖情况

Nrf2基因敲除小鼠纯合子($Nrf2^{-/-}$)全雄小鼠成功繁殖出子代幼鼠(见图1)。每只母鼠妊娠期为19~21天,每胎平均约产10~17只幼鼠,成活率>92%。

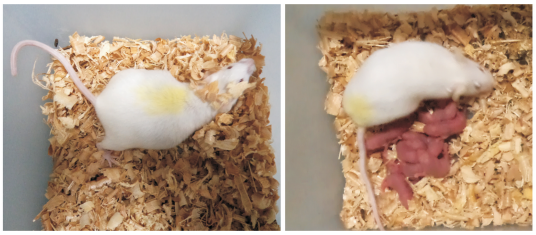


图1 Nrf2基因敲除小鼠的繁殖 A:妊娠期母鼠;B:一日龄小鼠

Fig. 1 The reproduction of Nrf2 knockout mice

2.2 小鼠基因型鉴定结果

子一代鉴定部分结果见图2,其中1、5、6号小鼠出现一条400 bp左右条带,为纯合子;2、3、7号小鼠出现750 bp和400 bp条带,为杂合子;4号小鼠出现一条750 bp左右条带,为野生型。

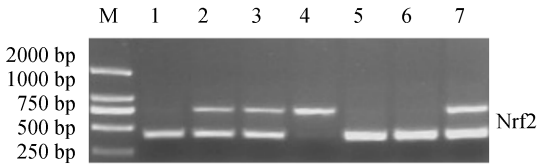


图2 Nrf2基因敲除小鼠基因型的鉴定 1、5、6:纯合子;2、3、7:杂合子;4:野生型

Fig. 2 The identification of Nrf2 knockout mice genotype

3 讨 论

细胞微环境的稳定是保持细胞正常增殖、分化、代谢和功能活动的重要条件,微环境成分的异常变化可使细胞发生病变。与维持细胞微环境酸碱平衡的酸碱缓冲对相似,细胞内存在一系列氧化还原缓冲对来维持细胞氧化还原稳态。对于正常细胞而言,细胞氧化水平的增高会导致胞内ROS水平,从而对细胞蛋白合成和DNA结构造成损伤,进而诱发细胞凋亡,而对于恶性增殖的肿瘤细胞,同样需要应对高密度生长带来的氧化压力,近来研究发现,Nrf2在还原稳态的维持中起关键作用[1]。

活性氧族和亲电子剂等可引起细胞产生急性和慢性应激损伤,从而引发一系列疾病包括:缺血和再灌注损伤、急性毒性和癌症、糖尿病、自身免疫性疾病、神经退行性疾病等。诱发应激损伤的活性氧族

和亲电子剂需要机体内抗氧化蛋白和Ⅱ相解毒酶进行代谢解毒,转录调节编码Ⅱ相解毒酶和抗氧化蛋白基因的顺式作用调节元件抗氧化反应元件(antioxidant response element,ARE)则在这一抗氧化和代谢解读过程中起重大作用。筛选结合激活 ARE 的转录因子发现,ARE 驱动的Ⅱ相解毒酶的诱导表达有一共通的上游分子——Nrf2,进一步针对 Nrf2 基因敲除的小鼠研究证实了 Nrf2 在调节Ⅱ相解毒酶和内源性抗氧化剂表达的中枢作用[2]。在 Nrf2 纯合敲除的小鼠中,正常情况和诱导情况下的Ⅱ相代谢酶水平 Nrf2 基因型野生型小鼠相比,谷胱甘肽 S 转移酶(glutathione S-tranferase,GST)、还原型辅酶Ⅰ醌类氧化还原酶、γ 谷氨酰半胱氨酸合成酶下降幅度显著高于野生型[3]。Nrf2 在 ARE 驱动的抗氧化基因和Ⅱ相解毒基因表达机制中的功能及 Nrf2 激活调控 ARE 的分子机制也逐渐被阐释。HO-1 是受 Nrf2 调控的与氧化应激密切相关的酶,HO-1 对氧化损伤的细胞有保护作用[4],有研究报道显示,Nrf2 在多种应激环境下(致癌物、亲电子物质、活性氧族、柴油机废气、炎症、钙紊乱、紫外线和香烟烟油)的多器官保护(肺脏、肝脏、肾脏、胃、小肠、中枢神经系统、脾脏细胞、巨噬细胞、红细胞和视网膜上皮)中起关键作用[5]。

肌动蛋白结合蛋白 Keap1 调控 Nrf2 的胞质内水平 Keap,其通过分别与肌动蛋白细胞骨架和 Nrf2 相结合从而将 Nrf2 限制于细胞质中,研究证实 Keap1 作为一种 E3 泛素化连接酶,它的作用不仅仅是将 Nrf2 局限于细胞质中,它在 Nrf2 的靶向泛素化和蛋白酶降解中也起积极作用[6],体内外研究均对 Nrf2-Keap1 的分离模型进行了验证[7]。当细胞暴露于氧化应激或者化学预防剂时,Nrf2 从脱离 Keap1 的限制,通过核定位信号转运至细胞核,与小分子肌腱纤维瘤蛋白 Maf 结合成异二聚体,进一步结合激活 ARE 介导的下游抗氧化基因和Ⅱ相解毒基因的表达[8]。研究发现 Keap1 介导的泛素化及降解作为控制 Nrf2 活性的主要途径,但仍存在其他的调控模式,主要包括 Nrf2 的亚细胞定位调控 Nrf2 的核质转运,转录后修饰及磷酸化磷脂酰肌醇激酶(phosphatidylinositol3 kinase,PI3K)、蛋白激酶 C(protein kinase C,PKC)、丝裂酶原激活蛋白激酶(mitogenactivatedproteinkinases,MAPKs)等针对 Nrf2 信号通路的调控,这些调控机制仍在进一步研究中[9-13]。

大量研究证实 Nrf2 能够保护不同类型的器官和细胞,单个蛋白如何能够保护多器官免受多种毒性物质的损伤? Nrf2 的细胞防御反应不仅通过调节经典的 ARE 介导的相关基因表达,而且还与不同细胞在不同环境下的防御体系中的细胞特异性的靶基因的表达有关[14],这种设想被组织芯片分析证实。Nrf2 的这种广谱特性使 Nrf2 对于多器官疾病具有巨大的治疗潜力。相信随着 Nrf2 研究的进一步加深,多器官保护剂 Nrf2 的应用模式也将不断进步,从而使器官损伤的预防成为可能。

为了使器官损伤的预防研究需要,本次引进的 Nrf2 小鼠均为杂合子,饲养和繁殖严格按照 SPF 级要求的动物饲养标准进行,饲养和繁殖参照相关文献[15]进行。杂合子交配其子代可能出现 3 种表型,即基因野生型($Nrf2^{+/+}$)、杂合子($Nrf2^{+/-}$)以及纯合子($Nrf2^{-/-}$)胚胎 3 种表型,故必须对它们进行基因型鉴定,通过繁殖,可以得到部分子代纯合子(见图 2)。将鉴定出的野生型同野生型,纯合子同纯合子进行交配,即可得到大量野生型($Nrf2^{+/+}$)和纯合子($Nrf2^{-/-}$)小鼠,用于实验研究。通过对 Nrf2 基因敲除小鼠生长繁殖性能的观察结果表明,Nrf2 基因敲除并不影响该小鼠的繁殖能力,其具有野生型小鼠一样的生命力。小鼠出生 10 天左右要进行基因鉴定,本研究采用聚合酶链反应(PCR)进行各种系鼠的基因型(Genotype)的筛选,聚合酶链反应可作为基因敲除小鼠不同基因表型鉴定的一种可靠快速的方法。不同基因表型 Nrf2 基因敲除鼠的成功鉴定,为建立基因敲除鼠模型及探讨疾病的发生机制和基因治疗提供理论依据。

参考文献:

[1] Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1 Nrf2 ARE pathway[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007, 4(7): 89-116.

[2] Zhu L, Liu Z, Feng Z, et al. Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells[J]. J Nutr Biochem, 2010, 21(11): 1089-1098.

[3] Ken Itoh, Tomoki Chiba, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements[J]. Biochem Bioph Res Co, 1997, 2(36): 313-322.

(下转第 623 页)

(上接第 615 页)

[4] 唐小卿,陈容前,李玉娟,等. HO-1 介导 H_2O_2 预处理对PC12 细胞氧化应激损伤的适应性细胞保护作用[J]. 中南医学科学杂志,2012,38(2):159-162.

[5] Calkins MJ, Johnson DA, Townsend JA, et al. The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(3):497-508.

[6] Zhang DD, Lo SC, Cross JV, et al. Keap1 is a redox regulated substrate adaptor protein for a Cul3 dependent ubiquitin ligase complex[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(24): 10941-10953.

[7] Furukawa M, Xiong Y. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3 Roc1 ligase[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(1): 162-171.

[8] Keum. Regulation of the Keap1/Nrf2 system by chemopreventive sulforaphane: implications of posttranslational modifications[J]. Ann N Y Acad Sci, 2011, 12(29): 184-189.

[9] Wu K, Cui JY, Kiaassen CD. Beneficial role of Nrf2 in regulating NADPH generation and consumption[J]. Toxicol Sci, 2011, 123(2): 590-600.

[10] Jeong GS, Lee DS, Li B. Protective effect of sauchinone by upregulating heme oxygenase-1 via the P38 MAPK and Nrf2/ARE pathways in HepG2 cells[J]. Planta Med, 2010, 76(1): 41-47.

[11] Yang CM, Huang SM, Liu CL, et al. Apo-8′-lycopenal induces expression of HO-1 and NQO-1 via the ERK/p38-Nrf2-ARE pathway in human HepG2 cells[J]. J Aqric Food Chem, 2012, 15(60): 1576-1585.

[12] Lee SE, Jeong SI, Tang H, et al. Fisetin induces Nrf2-mediated HO-1 expression through PKC-δ and p 38 in human umbilical vein endothelial cells[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(9): 2352-2360.

[13] Hwang YP, Kim HG, Han EH, et al. Metallothionein-III protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a PI3K and ERK/Nrf2-dependent manner[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, 231(3): 318-327.

[14] Li W, Jain MR, Chen C, et al. Nrf2 Possesses a redox insensitive nuclear export signal overlapping with the leucine zipper motif[J]. J Biol Chem, 2005, 280(31): 28430-28438.

[15] 田小芸,恽时锋,郭联庆,等. Nrf2 基因敲除小鼠的繁育及生长发育的生物学特性[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(2):50-52.