

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.11.012

Presenilin-1/Presenilin-2 双基因敲除小鼠的繁育及基因型鉴定*

张元 郭庆喜 刘勇 唐红 蒲霞 阮思蓓 罗霞 唐明希[△]

(泸州医学院附属医院病理科 四川 泸州 646000)

摘要 目的:繁育及鉴定 Presenilins 双基因敲除小鼠,为进一步研究阿尔茨海默症(AD)奠定基础。**方法:**将引进的野生型及 PS1/PS2 双基因敲除小鼠进行饲养并繁殖,繁殖成功的子代小鼠基因型有野生型、杂合子和纯合子 3 种。提取子代小鼠鼠尾基因组 DNA,用 PCR 法和琼脂糖凝胶电泳鉴定基因类型。**结果:**PS1/PS2 双基因敲除小鼠的饲养和繁殖均获得成功,繁殖结果符合孟德尔遗传规律,同时获得更多基因型小鼠和 Presenilins 双基因敲除小鼠。**结论:**正确的饲养繁殖以及鉴定方法是获得 PS1/PS2 双基因敲除小鼠的有效途径。

关键词:presenilins 基因;基因敲除;小鼠;聚合酶链反应;琼脂糖凝胶电泳

中图分类号:Q95-3,R74 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)11-2052-03

Breeding and Identifying Presenilin-1 and Presenilin-2 Conditional Double Knockout Mice*

ZHANG Yuan, GUO Qing-xi, LIU Yong, TANG Hong, PU Xia, RUAN Si-bei, LUO Xia, TANG Ming-xi[△]

(Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Taiping Road 25, Luzhou, sichuan, 646000, China)

ABSTRACT Objective: To breed and identify presenilin-1 (PS1) and presenilin-2 (PS2) conditional double knockout mice (dKO), in order to further study the molecular and neuronal mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). **Methods:** Based on the genotypes of the initial breeders that were transported into China from our collaborator at USA, four mating pairs were set up. The plug was confirmed at about 3-5 days after breeding, and plugged female mice were carefully maintained in the animal facility at the College. After delivery, pups were weaned at postnatal day 20 (P20), and a small fragment of tail was clipped from each pup. The genomic DNA was extracted, and PCR with three sets of primers that respectively recognize and distinguish the Cre transgene, PS1 floxed/wild-type alleles, and PS2 knockout/wild-type alleles was performed. The amplified DNA fragments were separated by agarose gel electrophoresis, and visualized by UV. **Results:** PCR products from all three PCR amplifications showed the correct size for each allele as it was expected. Based on the distributions of genotypes among the pups, the penetration of each genotype was accordant with the Mendelian inheritance law. At this stage, we have obtained PS1/PS2 homozygous dKO mice. **Conclusion:** The introduced dko mice from USA have been successfully bred in our animal facility, and the colonies are under expanding currently.

Key words: PS1, PS2; Conditional knockout; Mice; Cre, genotyping, breeding, colony

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R74 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)11-2052-03

前言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD),即所谓的老年痴呆症,占有痴呆类型的 60%~80%,是一种中枢神经系统的退行性疾病。目前我国的正常老龄人口中,每年约有 7%~12%的人转为轻度认知障碍。这些患者的早期病症并不明显,如不能及时发现和治疗,其中的 40%将最终发展为中重度老年痴呆症患者,给个人、家庭和整个社会都会带来沉重精神、医疗和经济负担^[1]。临床早期表现主要为患者记忆力的减退和生活自理能力的下降,最终导致发生进行性的认知功能障碍和缺失、神经行为异常,出现精神状况及生活自理能力的完全丧失

^[2-3]。大脑皮层和海马细胞外 A β (β -amyloid) 样淀粉沉积和老年斑的形成以及神经原纤维缠绕和神经元细胞数目减少、神经胶质细胞的改变等是其典型的病理改变^[4-7]。随着我国及世界性老龄化人口的不断增多,检测技术的不断发展,AD 的检出率也在不断攀升。AD 在 65 岁以上人群的发病率为 10%,而 85 岁以上老年人中有近半数人口患有 AD,是一种全世界致死率高和负担最重的疾病之一^[8]。双基因敲除小鼠 (PS1/PS2 double knockout mice, dKO mic)模型,具有与年龄依赖性神经退行性疾病(ADND)相似的年龄依赖性神经元进行性变性、坏死和后期的痴呆行为^[9]。这种模型也已被其它 4 个非附属实验室所证实^[9-12]。本研究通过 dKO mic 的 PS1/PS2 双基因敲除小鼠的不

* 基金项目:四川省科技厅科技支撑计划(2012SZ0172)

作者简介:张元(1988-),女,临床学士,硕士研究生,E-mail: 805365966@qq.com

[△]通讯作者:唐明希,男,博士,硕士生导师,副教授,E-mail: mxxtang69@163.com

(收稿日期:2013-11-17 接受日期:2013-12-10)

断繁育,为进一步研究 AD 提供良好的动物模型和科研平台。

1 材料与方法

1.1 实验动物

PS1/PS2 双基因敲除亲代雌、雄小鼠各 4 只,基因型分别为 (Cre+/-,PS1 F/F,PS2-/-) 和 (Cre-/-,PS1 F/F,PS2-/-),由美国 Ya-Ping Tang 教授 (Louisiana State University, USA) 惠赠,遗传背景为 B6CBAF1。

1.2 主要的仪器和试剂

PCR 仪型号 Bio-Rad PTC-200,电泳仪型号 TY-200-C。蛋白酶 K 和 Taq 酶购自天根生化科技有限公司。引物设计如下: PS1 (ENSMUSG00000019969) F: 5'-CAGACATTAGCACTGTCTGTAAGGAGTC-3', R: 5'-GTTCTTAAACCTCTAAAC-TTCCATGAGC-3'; Cre F: 5'-AGATGTTTCGCGATTATC-3', R: 5'-AGCTACACCAGAGACGG-3'; PS2 (ENSMUSG00000024032) 5'-AAGTATCGATGCTACAAGGTGAGG-3', PS2 Re: 5'-CCCA-CATGATAAAAGGAGAGC-3', 及 PGK-Neo, 5'-GCCTGAA-CAACGAGATCAGCA-3'。

实验小鼠饲养于泸州医学院附属医院肿瘤科 SPF 动物房,室温控制在 18-22℃,湿度 40-60%,12 h/12 h 光照周期。鼠盒经严格清洗,紫外线消毒,垫料、饲料和饮水经过高温高压灭菌处理。饲养过程中保持充足的饲料和饮水,垫料每周更换两次。小鼠的性成熟期为 60 天左右,母鼠妊娠期 21 天左右,繁殖及继代尽量采用远亲的 1 只雄鼠与 1 只雌鼠同居的方式进行。

1.3 子代小鼠基因型鉴定

1.3.1 小鼠鼠尾 DNA 的提取 (1) 麻醉小鼠,剪取尾尖 0.3-0.5 cm,放入 1.5 mL EP 管中,存放在 -70℃ 的冰柜中备用。(2) 消化:将每只盛有鼠尾的 EP 管中加入 500 μL 消化液,于 55℃ 恒温箱中,摇摆消化过夜。(3) DNA 的提取:翻转 EP 管 3-5 次,13000 rpm 离心 20 min;转移上清液入对应编号的新 EP 管中;每个 EP 管中加入 500 μL 异丙醇,翻转 3-5 次混匀,室温下静置 5 min;13000 rpm 离心 20 min,弃上清,加入 500 μL 70%乙醇;13000 rpm 离心 5 min,弃上清,干燥;每管加入 50 μL TE 缓冲液,于 60℃ 恒温箱中过夜;加入 0-200 μL TE 缓冲液,保存于 4℃ 备用。(4) PCR 鉴定:PCR 扩增总反应体积 25 μL。

1.3.2 PCR 反应体系 Cre 及 PS1 反应体系总量为 25 μL,组成如下: dd H₂O, 16.1 μL; 25 mM MgCl₂, 1.5 μL; 10× PCR Buffer (without MgCl₂), 2.5 μL; dNTP (10 mM; 2.5 mM each), 2.0 μL; Primer 1 (50 mM), 0.3 μL; Primer 2 (50 mM), 0.3 μL; TAQ DNA polymerase (5 U/ml), 0.3 μL; DNA (in 200-250 ml H₂O), 2.0 μL。PS2 反应体系如 Cre 及 PS1,但需加 0.3 μL pgk-Neo 引物,相应双蒸水用量减为 15.8 μL。

1.3.3 PCR 反应条件 (1) Cre 及 PS1 反应条件如下:a. 95℃ 预变性 1 min; b. 94℃ 变性 15 sec, 55℃ 退火 20 sec, 72℃ 延伸 3 min,并重复 30 个循环; c. 4℃ 保持。(2) PS2 反应条件如下:a. 94℃ 预变性 5 min; b. 94℃ 变性 1 min, 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min,并重复 34 个循环; c. 4℃ 保持。分别取 PCR 反应产物及 DNA Marker 进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳 (140 V, 20 min) 后观察结果。

2 结果

2.1 小鼠的繁殖情况

初代目的小鼠是将前脑 PS1 条件性敲除的杂合子与全身性 PS2 完全敲除的杂合子杂交,再以得到的后代中基因型为 (Cre+/-,PS1 F/F,PS2-/-) 的杂合子分别交配,最终得到基因型为 (Cre+/-,PS1 F/F,PS2-/-) 的目的小鼠 (图 1)。母鼠平均每胎产约 7-8 只幼鼠,成活率 100%。幼鼠由母鼠喂养 21 天后分离喂养,6 周龄时剪尾行基因类型鉴定,8 周龄可交配继代。

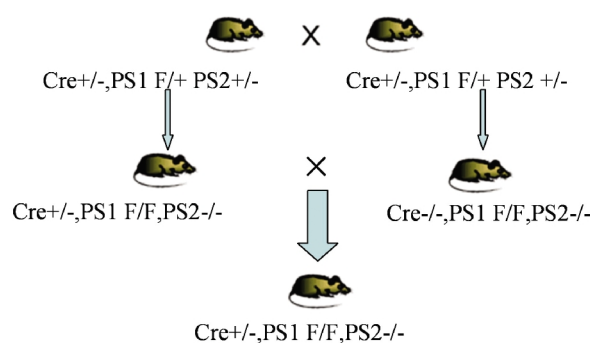


图 1 PS1/PS2 dKO 小鼠繁殖策略

Fig. 1 Breeding PS1/PS2 dKO mice

2.2 子代小鼠基因型鉴定结果

子代 dKO 小鼠的 Cre 转基因电泳结果如 (图 2, a) 所示,条带大小为 490 bp 者代表 Cre 的杂合子基因型,无条带者为野生型纯合子;条件性敲除的纯合子 PS1 电泳结果如 (图 2, b) 所示,大小为 703 bp; PS2 的基因敲除纯合子电泳结果如 (图 2, c) 所示,大小为 450 bp。

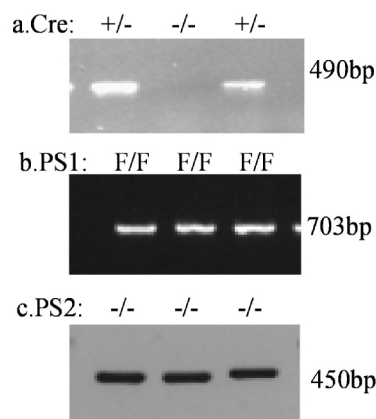


图 2 PS1/PS2 dKO 基因鉴定结果 a. Cre (+/-) 转基因, 490 bp; b. PS1 (F/F) 条件性敲除等位基因, 703 bp; c. PS2 (-/-) 敲除等位基因, 450 bp。

Fig. 2 PCR results of PS1/PS2 dKO mice a. PCR results for Cre transgene (490 bp); b. PCR results for floxed PS1 (F/F) alleles (703 bp); c. PCR results for PS2 (-/-) knockout alleles (450 bp).

3 讨论

目前认为 Presenilin 基因的变异是家族性早发 AD 的发病机制之一。PS1/PS2 基因分别定位于染色体 14q24.3 和 1q31-42, 可编码高度同源的跨膜蛋白如 γ -分泌酶等, 参与 APP

转运及合成后加工,其变异与年龄依赖性神经退行性病变密切相关^[12-15]。PS1/PS2 基因的变异加速了 A β 的产生和沉积的过程,了解该过程的具体机制有利于制定 AD 的预防及治疗方案^[16-18]。本研究所用亲代小鼠(dKO)如 Feng R 等所述^[10],利用 Cre / loxP 系统将前脑中的 PS1 条件性敲除的杂合子和利用基因打靶技术将 PS2 全身性敲除的杂合子杂交所得,即 PS1/PS2 双基因敲除小鼠 (Cre+/-,PS1 F/F,PS2-/-)。该动物模型容易存活,易饲养,主要表现类似于 AD,即 6 周龄开始出现认知功能减退,大脑皮质和海马的萎缩,侧脑室和第三脑室的扩大,以及神经元凋亡、星形胶质细胞增生和 Tau 蛋白高度磷酸化等^[19-20]。亲代基因型小鼠 (Cre-/-,PS1 F/F,PS2-/-) 与 (Cre+/-,PS1 F/F,PS2-/-)杂交,利用 PCR 及琼脂糖凝胶电泳技术可以准确的对子代小鼠进行基因鉴定:Cre+/- (487bp),PS1 F/F (703bp),PS2-/- (380bp),可获得目的基因型阿尔茨海默症(AD)小鼠。成功对基因敲除小鼠进行基因型鉴定是利用小鼠作为动物模型进行实验得以顺利进行的基本条件,PS1/PS2 双基因敲除鼠的成功繁殖和饲养为进一步研究 AD 的发生机制和病理变化,以及药物干预筛选等提供重要的实验动物基础。

参考文献(References)

- [1] Chan KY, Wang W, Wu JJ, et al. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis [J]. *Lancet*, 2013,381(9882):2016-2023
- [2] 陈路明,徐斌,严家川. 脑脊液 β -淀粉样蛋白 / 磷酸化 tau 蛋白比值在鉴别诊断阿尔茨海默病与血管性痴呆中的价值[J]. *现代生物医学进展*, 2009,9(5):922-924
Chen Lu-ming, Xu Bing, Yan Jia-chuan. Value of Cerebrospinal Fluid beta-amyloid Protein/Phosphorylated Tau Protein Ratio on Differential Diagnosis of Alzheimer Disease and Vascular Dementia [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009,9(5):922-4
- [3] 毕胜, 潘尚哈. 信号转导机制与阿尔茨海默病 [J]. *现代生物医学进展*, 2009,9(10):1976-78
Bi Sheng, Pan Shang-ha. Signal Transduction Mechanisms in Alzheimer's Disease [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009,9(10): 1976-1978
- [4] 鲍娟,杨期东,罗红波. A β 1-42 注射后大鼠海马神经元凋亡及线粒体凋亡途径相关蛋白表达变化的研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2008,8(2):246-249
Bao Juan, Yang Qi-dong, Luo Hong-bo. Study on Apoptosis of Neurons in Rat Hippocampus and Expression of Related Proteins in Path of Mitochondrion after Injection of A β 1-42 [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2008,8(2):246-249
- [5] Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007,8(2):101-112
- [6] Bussière T, Giannakopoulos P, Bouras C, et al. Progressive degeneration of nonphosphorylated neurofilament protein-enriched pyramidal neurons predicts cognitive impairment in Alzheimer's disease: stereologic analysis of prefrontal cortex area 9 [J]. *J Comp Neurol*, 2003,463(3):281-302
- [7] Gomez-Isla T, Hollister R, West H, et al. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease [J]. *Ann Neurol*, 1997,41(1):17-24
- [8] Chen Q, Nakajima A, Choi SH, et al. Loss of presenilin function causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration in the mouse [J]. *J Neurosci Res*, 2008,86(7):1615-1625
- [9] Saura CA, Choi SY, Beqopoulos V, et al. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration [J]. *Neuron*, 2004,42(1):23-36
- [10] Feng R, Wang H, Wang J, et al. Forebrain degeneration and ventricle enlargement caused by double knockout of Alzheimer's presenilin-1 and presenilin-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004,101 (21): 8162-8167
- [11] Mimics K, Norstrom EM, Garbett K, et al. Molecular signatures of neurodegeneration in the cortex of PS1/PS2 double knockout mice [J]. *Mol Neurodegener*, 2008,3(14):1-11
- [12] Qian CHEN, Akira N, Se Hoon C, et al. Adult neurogenesis is functionally associated with AD-like neurodegeneration [J]. *Neurobiol Dis*, 2008,29(2):316-326
- [13] Angela HO, Jie SHEN. Presenilins in Synaptic Function and Disease [J]. *Trends Mol Med*, 2011,17(11):617-624
- [14] Mary W-S, Eva C.S, Miriam J.S., et al. Characterization of Age-Dependent and Progressive Cortical Neuronal Degeneration in Presenilin Conditional Mutant Mice [J]. *PLoS One*, 2010,5(4):e10195
- [15] 袁力勇,戴体俊. 认知功能障碍发病机制研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2007,7(1):126-130
Yuan Li-yong, Dai Ti-jun. The Progresses of Pathogenesis on Cognitive Dysfunction [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2007,7(1):126-30
- [16] 徐光,郭凌晨,石莎,等. 治疗阿尔茨海默病的新策略: 脑啡肽酶[J]. *现代生物医学进展*, 2009,9(6):1151-1153
Xu Guang, Guo Ling-chen, Shi Sha, et al. New Strategy of Alzheimer's Disease Treatment: Neprilysin [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009,9(6):1151-1153
- [17] 张莹,洪涛. 阿尔茨海默病构象转变机制研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2009,9(10):956-960
Zhang Ying, Hong Tao. Program in Dynamic A β Conformation in Pathogenesis of Alzheimer's Disease [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009,9(10):1956-960
- [18] Yu Liao, Fan Zhao. Point mutation in exon 4 of presenilin1 gene and early-onset familial Alzheimer disease [J]. *Neural Regen Res*, 2006,1 (6):493-496
- [19] Hang Waangjiang, Sang WH, DANIEL WM, et al. Interaction of Presenilins with the Filamin Family of Actin-Binding Proteins [J]. *The Journal of Neuroscience*, 1998,18(3):914-922
- [20] 张冬丽,梁立韵,嵇婷婷,等. Presenilin1 / Presenilin2 双基因敲除小鼠脑中单胺类神经递质变化的研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009,36(11):1436-1441
Zhang Dong-li, Liang Li-yun, Jiu Ting-ting, et al. Study on the change of single amine neurotransmitter in the cerebellum of Presenilin1/Presenilin2 double knockout mice (dKO) [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2009,36(11):1436-1441