

APP/PS1 双转基因阿尔海默病小鼠的繁殖及基因型鉴定*

毛敬洁^{1#} 李钻芳¹ 林如辉¹ 卓沛元² 张颖铮²

(1 福建中医药大学中西医结合研究院 福州 350122; 2 福建中医药大学康复医学院 福州 350122)

摘要:目的:繁殖和基因鉴定 APP/PS1 双转基因阿尔海默病(AD)小鼠。方法:将雄性纯合子 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠与阴性纯合子(野生型)雌鼠进行交配。PCR 鉴定 APP/PS1 双转基因 AD 传代小鼠的基因表型。结果:50 只 APP/PS1 双转基因 AD 传代小鼠基因组 DNA 中 31 只小鼠基因组 DNA 扩增出 300 bp 的 APP 条带和 600 bp 的 PS1 条带。APP/PS1 双转基因 AD 小鼠的饲养和繁殖获得成功,获得了较多的成功转入 APP/PS1 基因的纯合子小鼠。结论:正确饲养繁殖及利用 PCR 对 AD 模型鼠的繁殖小鼠进行基因鉴定,是有效获得 APP/PS1 双转基因纯合子小鼠的有效途径,为临床更好的研究认知障碍提供有效的 AD 动物模型。

关键词:阿尔海默病;APP/PS1 双转基因;基因型

Reproduction and Genotype Identification of APP/PS1 Double Transgenic Alzheimer's Disease Mouse Model

MAO Jing-jie[#], LI Zuan-fang¹, LIN Ru-hui¹, ZHUO Pei-yuan², ZHANG Ying-zheng²

(1Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou350122;

2College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou350122)

Abstract: Objective: To breed and identify the genotype of APP/PS1 double transgenic Alzheimer's disease (AD) mouse model. Methods: The male homozygous APP/PS1 double transgenic AD mice mated with negative homozygous (wild type) female mice and the genetic phenotypes were identified by PCR in APP/PS1 double transgenic AD passaged mice. Results: There were 31 mice were identified APP/PS1 double transgenic AD mouse by PCR in 50, and it was about 300 bp size APP genome DNA detected, and 600 bp size PS1 genome DNA detected. The methods of feeding and breeding were successful and more homozygote baby mice with APP/PS1 double transgenic mouse were attained. Conclusion: The appropriate methods of feeding and breeding and the identification of PCR are the effective ways to acquire homozygote baby mice with APP/PS1 transgenic mouse. It provides the effective AD animal models for clinical research.

Key words: Alzheimer's disease; APP/PS1 double transgenic; Genotype

中图分类号:R749.16

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2015.10.002

阿尔海默病(Alzheimer Disease, AD)是老年期最常见的中枢神经系统退行性疾病。临床表现为进行性认知障碍和神经精神异常,以大脑皮质广泛性萎缩出现大量的 β 淀粉样蛋白(β -amyloid Protein, A β)沉积形成的老年斑(Senile Plaque, SP)和异常过度磷酸化 tau 蛋白形成的神经原纤维缠结(Neurofibrillary Tangle, NFT)为典型的病理变化。发病机制涵盖遗传、环境危险因子、多种基因及致病蛋白的改变。目前认为中枢神经递质代谢障碍、APP 基因突变、A β 多肽沉积、tau 蛋白过度磷酸化、炎症、氧化应激、异常的细胞周期/凋亡等是 AD 的主要发病机制^[1-2]。APP/PS1 转基因小鼠被认为是可模拟 AD 自然病理生理过程的理想动物模型^[3-4]。众所周知,转基因鼠价格较高,为本课题研究认知障碍提供足够的动物模型,从南京大学生物医药研究院动物实验模式中心购入了 APP/PS1 双转基因小鼠纯合子雄性 2 只和野生型雌鼠 2 只进行繁殖。根据遗传规律所获后代有 1/4 的机率为阴性纯合子,所以在使用前必须进行基因型检测。现将这批小鼠的饲养、繁殖及鉴定过程报道如下:

1 材料和仪器

1.1 实验动物 由南京大学生物医药研究院动物实验模式中心提供 B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9}) 85Dbo/J 品系。双转基因小鼠纯合体雄性种鼠 2 只及同窝阴性雌性鼠 2 只,繁殖所产生后代 50 只,1~4 月龄,分笼喂养于福建中医药大学实验动物中心,SPF 级。

1.2 主要试剂 小鼠组织基因组 DNA 提取试剂盒购自 Biospin 公司;引物由上海生工生物有限公司设计合成。100 bp marker (杭州博日科技有限公司);PCR Master Mix (2X) [加拿大(中国)Fermentas 公司];琼脂糖(美国 Bio-west 公司);Gold View 染料(上海赛百盛基因技术有限公司);6 X Loading Buffer、5 X TBE(上海捷瑞生物工程有限公司)。无水乙醇(广州化学试剂厂分析纯)。

1.3 主要仪器 G-STORMGSI 梯度 PCR 仪(英国 GRI 公司),Gel DOC 2000 型凝胶成像分析系统、APC 电泳仪、水平式电泳槽(美国 Bio-Rad 公司),DU-650 型蛋白核酸分析仪(美国 Beckman 公司),5417R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

* 基金项目:福建省自然科学基金资助项目(编号:2013J01378)

通讯作者:毛敬洁, E-mail: maojingjie1988@yeah.net

2 方法

2.1 饲养与繁殖法 实验动物遵照国家实验动物饲养和使用指南, 温度: $(22 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 湿度: 50%, 12 h/12 h 明暗循环, 自由饮食和饮水。小鼠的可配期为 3~10 个月, 母鼠的妊娠期为 20 d 左右, 繁殖采用一只雄鼠与一只雌鼠同居的方式进行。新生鼠出生后前 5 d 不换垫料, 第 19~20 天后子鼠雌雄分笼饲养。

2.2 基因鉴定方法

2.2.1 剪鼠尾 当新生的小鼠年龄达到 2~3 周(耳朵已经长开)时剪鼠尾较好, 鼠尾剪去长度不得超过 0.5 cm。此时剪尾一方面避免了在幼崽出生后一周打扰带乳母鼠, 防治母鼠的吃仔现象; 另外这时的小鼠容易抓取, 体毛尚未生长, 小鼠的出血较少恢复力比较强, 提取 DNA 的质量较好。剪鼠尾后即对小鼠标记, 一般情况下一笼小鼠不会超过 10 只, 采用左右耳朵打洞的方法来标记, 依次标记为左 1、右 1、左 2、右 2、左 1 右 1、左 2 右 1、左 1 右 2、左 2 右 2、左 3, 最后一只不打洞。

2.2.2 DNA 提取和定量 剪取小鼠尾巴 0.5 cm 放入编号的 EP 管中, 投入液氮冷却后研磨, 取 50 mg 粉末放入 1.5 ml 离心管。用 Biospin 组织基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。在 50 mg 组织中加入 600 μl 的 RL Buffer 用 1 ml 的 Tip 头轻轻吹打混合均匀后, 于 6 000 r/min 离心 1 min, 弃上清; 加 10 μl PK Solution 和 200 μl LT Buffer 混合均匀; 于 56°C 环境中温浴 90 min, 移出加 400 μl GA Buffer 混匀; 12 000 r/min 离心 2 min, 将上清液转移到 1 个新的 1.5 ml 离心管; 加 300 μl 的 G Binding Buffer 和 50 μl 无水乙醇混合均匀; 将混合液体分 2 次转移至 Spin column, 6 000 r/min 离心 30 s, 弃去接液管内液体; 向 Spin column 中加入 500 μl 的 G Binding Buffer, 10 000 r/min 离心 30 s, 弃去接液管内液体; 向 Spin column 中加入 600 μl 的 Wash Buffer, 10 000 r/min 离心 30 s, 弃去接液管内液体; 重复 1 次; 再次将 Spin column 10 000 r/min 离心 1 min, 将 Spin column 转移到 1 个新的 1.5 ml 离心管; 向 Spin column 中加 100 μl 至 200 μl Elution Buffer, 室温温育 1 min; 12 000 r/min 离心 1 min, 并弃 Spin column; 1.5 ml 离心管中液体含有 DNA。

2.2.3 引物合成设计 引物序列设计如下: APP 正义链: $5' - \text{GAC TGA CCA CTC GAC CAG GTT CTG} - 3'$, 反义链: $5' - \text{CTT GTA AGT TGG ATT CTC ATA TCC} - 3'$; APP 产物大小为 344 bp。PS1 正义链: $5' - \text{AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA}$

$-3'$, 反义链: $5' - \text{GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT} - 3'$; PS1 产物大小为 608 bp。反应体系 20 μl , 扩增条件为: 95°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 59°C 退火 40 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环, 72°C 延伸 10 min。GAPDH 正义链: $5' - \text{AAA TGG TGA AGG TCG GTG TGAA C} - 3'$, 反义链: $5' - \text{CAA CAA TCT CCA CTT TGC CAC TG} - 3'$; 产物大小为 93 bp。反应体系 20 μl , 扩增条件为: 95°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 59°C 退火 40 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环, 72°C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后进行光密度扫描, 用凝胶成像分析系统 Quantity one 进行观察分析。

3 结果

3.1 小鼠繁殖及分辨年龄 每次生产 6~10 只, 2 周后小鼠跳笼活跃, 平均每笼只能饲养 4~5 只。小鼠整个身体粉红且腹部无奶时, 为前一晚出生或出生当天; 小鼠腹部有一小团白色物质, 为出生 2~3 d; 当小鼠背部长出皮毛时, 为出生 3~4 d; 当小鼠毛长全, 但眼睛未睁开时, 为出生 10 d 左右; 当小鼠眼睛刚开, 耳朵未开时, 此小鼠为出生 12 d 左右; 当小鼠耳朵刚开时, 为出生 14 d 左右。2~3 周是剪鼠尾基因鉴定的最佳期间。

3.2 APP/PS1 双转基因小鼠基因表型的鉴定 以基因组 DNA 为模板扩增, 可见在 9 只小鼠中均扩增出约 100 bp 大小条带阳性对照内参基因 GAPDH, 其中 3 只小鼠(1、2、3)基因组 DNA 扩增出约 350 bp 及约 600 bp 大小的条带, 与预计所扩增的 APP 及 PS1 基因大小一致。鉴定结果见图 1。

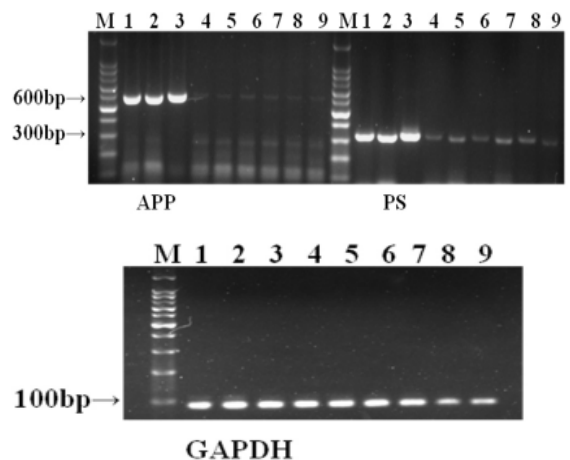


图 1 APP/PS1 双转基因小鼠基因表型的鉴定

注: M 为 Bio DL100 DNA Marker, 1、2、3 是 APP/PS1 双转基因阳性小鼠, 4、5、6 是转基因阴性小鼠, 7、8、9 是野生型阴性对照组小鼠。

4 讨论

阿尔海默病可分为家族性(FAD)和散发性或迟

发性(SAD/LOAD)。FAD 为常染色体显性遗传病,仅占全部 AD 的 15%以下,而 LOAD 没有明显的遗传背景,目前研究认为发病主要与 β 淀粉样前体蛋白(APP)基因及早老素蛋白(PS)遗传基因突变有关^[5]。中枢神经系统 PS 主要集中在海马和皮层内。PS 是一种跨膜蛋白,可在细胞中与 APP 形成复合物,参与 APP 转运及合成后加工。1995 年 Games 等首次报道成功将人突变型淀粉样蛋白前体 APP 基因转入小鼠后,AD 转基因动物模型成为 AD 研究热点^[6]。虽然 APP 转基因动物出现类似 AD 患者的大脑改变,但是 APP 突变转基因模型出现病理学及行为学改变均较晚。PS1 基因位于 14 号染色体上,参与 APP 转运及合成后的加工。在阿尔海默病中 APP 突变只占 AD 患者的 1%~3%^[7],PS 基因突变的患者则高达 40%~50%,70%~80%早发家族 AD 是由 PS1 基因突变所致,PS1 基因继 APP 之后重要的 AD 相关基因^[8]。2000 年 Wengenack 等^[9]制作了 APP/PS1 双转基因小鼠,表达人突变的 PS 基因和 APP 基因,12 周后在转基因鼠皮质和海马发现 A β 沉积,而且 A β 的量多伴有神经元改变和突触丢失及年龄有关的神经行为学功能障碍,标志着 AD 转基因动物模型研究进入了新的阶段。APP/PS1 双转基因小鼠模型因较好地模拟了 AD 的病理特征和渐进性病程,亦被世界公认为常用的 AD 疾病模型^[10]。

转基因动物模型是当今研究临床疾病的热点模型,本文总结了 AD 模型 APP/PS1 基因鼠的繁殖进程和基因鉴定。基因鉴定目前提取鼠尾 DNA 的方法有很多种,以高盐提取法和酚/氯仿提取法为实验室常用 2 种方法。其中高盐提取法快捷,但提取到的 DNA 质量有时不能满足特定品系鉴定的需要,改用酚/氯仿法提取^[11]。Biospin 组织基因组提取试剂盒采用的是酚/氯仿法提取法。本研究从南京大学模式动物研究所购入了 APP/PS1 双转基因雄性小鼠 2 只进行繁殖,由于要求配对雌鼠是同窝阴性野生鼠,根据遗传规律所获后代有 1/4 的机率为阴性纯合子,所以在下一步实验前必须进行基因检测,以区分 AD 转基因型和野生型(同窝阴性)小鼠。本研究 50 只子代小鼠基因组 DNA 中 31 只小鼠基

因组 DNA 扩增出 300 bp 的 APP 条带和 600 bp 的 PS1 条带。证明 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠的饲养和繁殖获得成功,获得了较多的成功转入 APP/PS1 基因的纯合子小鼠。因此正确饲养繁殖及利用 PCR 对 AD 模型鼠的繁殖小鼠进行基因鉴定是获得 APP/PS1 双转基因纯合子小鼠的有效途径。本实验成功繁殖及鉴定了 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠的基因型,为课题组今后开展认知障碍的研究提供了理想的 AD 动物模型。

参考文献

- [1]Hillmann A,Hahn S,Schilling S,et al.No improvement after chronic ibuprofen treatment in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease[J].Neurobiol Aging,2012,33(4):833
- [2]Wolf MS.When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased Abeta42/Abeta40. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease [J].EMBO Rep,2007,8(2): 136-140
- [3]宋春未,戴雪伶,姜招峰.阿尔海默病实验动物模型研究进展[J].生物学杂志,2013,30(5):85-88
- [4]Breyhan H,Wirths O,Duan K,et al.APP/PS1KI bigenic mice develop early synaptic deficits and hippocampus atrophy [J].Acta Neuropathol,2009,117(6):677-685
- [5]Lee J,Chan SL,Mattson MP.Adverse effect of a presenilin-1 mutation in microglia results in enhanced nitric oxide and inflammatory cytokine responses to immune challenge in the brain [J].Neuromolecular Med,2002,2(1):29-45
- [6]Games D,Adams D,Alessandrini R,et al.Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein[J].Nature,1995,373(6514):523-527
- [7]Tanzi RE,Bertram L.Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective [J].Cell,2005,120 (4): 545-555
- [8]Strooper BD,Annaert W.Presenilins and the intramembrane proteolysis of proteins: facts and fiction[J].Nat Cell Biol,2001,3(10):221-225
- [9]Wengenack TM,Whelan S,Curran GL,et al.Quantitative histological analysis of amyloid deposition in Alzheimer's double transgenic mouse brain[J].Neuroscience,2000,101(4):939-944
- [10]丛琳,张楠楠,佘剑非,等.甲基化芯片检测 APP/PS1 双转基因小鼠基因组 DNA 甲基化分布 [J].中国医科大学学报,2015,44(2): 160-163
- [11]高翔.小鼠基因功能研究及疾病模型系列专题(二)—基因工程小鼠的品系管理及基因型鉴定[J].中国细胞生物学报,2010,32(2): 193-194

(收稿日期: 2015-08-04)

《实用中西医结合临床》杂志在线投稿系统指南

本刊已启用在线投稿系统,网址: <http://www.syzxyjhlc.com>,欢迎大家通过本网站投稿、浏览文章。通过本网站,可实现不限时在线投稿、审核、编

辑、校对、组版等全流程功能,作者可在线查看稿件流程情况,专家可登录网站实行在线审核,并可全文查阅本刊以往刊出文章。