

miR-100 基因敲除小鼠模型的构建及基因型鉴定

乔思源, 江文刚, 汪思应

摘要 目的 探讨 miR-100 基因敲除小鼠模型的构建及基因鉴定。方法 将引进的 miR-100^{flox/flox} 小鼠与 EIIa-Cre 小鼠进行交配繁育出 F1 代小鼠, 将 F1 代小鼠中基因型为 miR-100^{flox/-} 的雌雄小鼠继续进行交配, 获得 F2 代小鼠, 待小鼠 1 周龄时剪尾部组织提取 DNA, PCR 法扩增目的基因片段, 琼脂糖凝胶电泳进行基因型结果判定。结果 结果显示有所需要的 miR-100 基因敲除纯合子小鼠, 将获得的敲除纯合子小鼠再交配, 就可获得更多的基因敲除纯合子小鼠。F1 代杂合子小鼠交配获得的 F2 代小鼠中出现 3 种基因型: miR-100^{flox/flox}、miR-100^{flox/-}、miR-100^{-/-}, 使用 PCR 法成功鉴定出了子代小鼠的基因型。同时剪取 miR-100 敲除纯合子小鼠、miR-100^{flox/flox} 小鼠及 miR-100 敲除杂合子小鼠的耳朵提取 RNA, 然后进行 qRT-PCR 验证 miR-100 的表达情况。qRT-PCR 结果显示, miR-100 基因全身敲除纯合子小鼠的耳朵中 miR-100 的表达几乎为零。结论 该实验成功配繁出 miR-100 基因全身敲除的小鼠模型, 为后续实验提供基础。

关键词 miR-100; 基因敲除; 基因型鉴定; 繁育

中图分类号 R 332; Q 78

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)04-0510-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.002

miR-100 是定位于人类染色体 11q24.1 上大小约为 22 个核苷酸的微小 RNA。微小 RNA 是一类非编码的单链小分子 RNA, 广泛存在于真核生物中, 其通过与靶基因的 3'UTR 结合而转录后抑制基因表达, 以诱导基因或者蛋白质降解。目前对 miRNA 的研究^[1]表明, miRNA 几乎在每个细胞过程的调控中都起着至关重要的作用, 包括增殖、凋亡、分化和血管生成等。miR-100 在多种恶性肿瘤中发挥重要的调控作用, 成为了近年来的研究热点。miR-100 基因敲除模型的建立可以更好地研究 miR-100 在各种肿瘤等疾病中发挥作用的机制, 从整体水平研究其功能。

miR-100^{flox/flox} 小鼠是在 C57BL/6 小鼠的 miR-100 基因两端分别插入一个 loxP 的位点, 所以外观上和 C57 BL/6 小鼠基本没有差异。而 EIIa-Cre 小鼠是表达 Cre 重组酶的工具鼠, 可以特异性识别 loxP 位点从而将 loxP 位点间的基因敲除。该研究根据以上原理, 通过将 EIIa-Cre 小鼠与 miR-100^{flox/flox} 小鼠进行配繁, 得到 miR-100 敲除杂合子小鼠后再进行配繁, 从而得到 miR-100 敲除纯合子小鼠。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 miR-100^{flox/flox} 小鼠雌雄各 3 只和 SPF 级 EIIa-Cre 小鼠雌雄各 3 只, 体质量均在 20 g 左右, 购自南京大学模型动物研究中心, 所有小鼠饲养在安徽医科大学实验动物中心的 SPF 环境中。经安徽医科大学实验动物中心审批, 并严格遵循实验动物使用的原则。

1.2 主要试剂与仪器 琼脂糖粉末(广州赛国生物科技有限公司); TAE(50X) 电泳缓冲液(上海碧云天科技有限公司); PCR 试剂盒(广州赛国生物科技有限公司); DNA 引物(中国赛默飞世尔科技有限公司); qPCR 试剂盒(上海吉玛制药技术有限公司); PCR 扩增仪(普通)(德国耶拿分析仪器股份公司); 化学发光凝胶成像仪(北京汇佳科技有限公司); 荧光定量 PCR 仪(上海伯乐生命医学产品有限公司)。

1.3 小鼠的饲养与繁殖 小鼠在安徽医科大学基础医学院实验动物中心饲养和繁殖。温度控制在 25 °C 左右, 湿度保持 70% 左右, 明暗循环 12 h/d, 自由饮食和饮水。小鼠笼盒、垫料、饲料、饮用水均经过高温高压消毒灭菌处理。饲养过程中, 每 2 d 进入动物房观察和记录小鼠的生长情况。每周更换 1 次小鼠垫料, 每天补充饲料和饮用水。

1.4 小鼠尾部组织基因组 DNA 的提取 待子鼠 1 周龄时, 将小鼠尾部组织剪取长约 0.5 cm 的小段于 1.5 ml EP 管中, 在 EP 管中加入 100 μl Buffer MP, 4 μl Foregene Protease Plus, 轻微涡旋混匀。65 °C 孵育 25 min, 然后 95 °C 处理 5 min, 12 000 r/min 离心

2020-10-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81572749)

作者单位: 安徽医科大学病理生理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 乔思源, 女, 硕士研究生;

汪思应, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: sywang@

ahmu.edu.cn

5 min。转移上清液至新的 EP 管中,4 ℃ 或 -20 ℃ 放置备用或直接用于 PCR 扩增。

1.5 PCR 扩增反应及琼脂糖凝胶电泳进行基因型鉴定 小鼠基因型鉴定引物序列: EIIa-Cre Cre-up: 5'-GCCTGCATTACCGGTCGATGC-3'; EIIa-Cre Cre-low: 5'-CAGGGTGTATAAGCAATCCC-3'; miR-100 loxpF1: 5'-TCTGGGCTCTCAGCAAGTAAATGTC-3'; miR-100 loxpR1: 5'-ACTGAAGGGGATAAGGTTGCC-TCTC-3'; miR-100 loxpF2: 5'-GGATGCCTTTTACAG-TGGTAGACAC-3'; miR-100 loxpR2: 5'-CTGTCAGC-CAAGTCTTCACTTTCTG-3'; miR-100 loxpF1: 5'-TCTGGGCTCTCAGCAAGTAAATGTC-3'; miR-100 loxpR2: 5'-CTGTCAGCCAAGTCTTCACTTTCTG-3'。PCR 反应体系: 2x PCR mix 10 μl, 前引物 0.5 μl, 后引物 0.5 μl, 超纯水 5 μl, DNA 模板 4 μl, 总体积 20 μl。PCR 反应程序: EIIa-Cre 程序为 ① 95 ℃、5 min; ② 95 ℃、30 s; ③ 63 ℃、35 s; ④ 72 ℃、45 s; ⑤ 72 ℃、3 min; ⑥ 16 ℃ hold。②到④为循环反应,循环数为 35。miR-100^{loxP}程序: ① 95 ℃、5 min; ② 95 ℃、30 s; ③ 62 ℃、30 s; ④ 72 ℃、30 s; ⑤ 72 ℃、5 min; ⑥ 4 ℃ hold。②到④为循环反应,循环数为 35。miR-100^{null}程序: ① 95 ℃、5 min; ② 95 ℃、30 s; ③ 62 ℃、60 s; ④ 72 ℃、30 s; ⑤ 72 ℃、5 min; ⑥ 4 ℃ hold。②到④为循环反应,循环数为 35。琼脂糖凝胶电泳: 琼脂糖 1.5 g, 5X TAE 2 ml, 双蒸水 98 ml, 溴化乙啶(EB) 5 μl, DNA 样本 10 μl, 电泳电压 90 V, 时间 40 min, 凝胶成像仪成像。

1.6 基因型结果判定 EIIa-Cre 的引物扩增条带在 481 bp 左右,为 EIIa-Cre 小鼠。miR-100-loxpF1 和 miR-100-loxpR1 的引物扩增条带 flox 在 423 bp, wildtype 在 358 bp。miR-100-loxpF2 和 miR-100-loxpR2 的引物扩增条带 flox 在 379 bp, wildtype 在 312 bp。miR-100-loxpF1 和 miR-100-loxpR2 的引物扩增条带 flox 在 1 585 bp, wildtype 在 1 453 bp, 而 null 在 467 bp。

1.7 qPCR 检测 miR-100 的表达 剪取 F2 代小鼠的鼠耳提取 RNA, 进行逆转录, 得到的 cDNA 再进行定量 PCR。用吉玛公司的 microRNA&U6 snRNA Hairpin-it™ Normalization Quantitation RT-PCR 试剂盒检测 miR-100 的表达。

1.7.1 逆转录体系 5 × MMLV RT Buffer 4 μl, dNTP 0.75 μl, miRNA&U6 snRNA RT primer mix 1.2 μl, RNasin 0.25 μl, MMLV Reverse Transcriptase 0.2 μl, RNA 样本根据各样本浓度及质量 2 μg 计算其所

需体积,最后加入 DEPC 水补足体积到 20 μl。采用 PCR 仪进行扩增,反应条件为: 25 ℃、30 min; 42 ℃、30 min; 85 ℃、5 min; 4 ℃ 保存。

1.7.2 qPCR 体系 2 × Real-time PCR Master Mix (SYBR) 10 μl, miRNA/U6 snRNA specific Primerset 0.4 μmol/L, ROX reference dye 2 μl, Taq DNA polymerase 0.2 μl, cDNA 样本加入 2 μl, 最后 DEPC 水补足 20 μl。定量 PCR 仪进行扩增,反应条件为: 95 ℃、3 min; 95 ℃、12 s; 62 ℃、40 s, 40 个循环; 4 ℃ 保存。

1.8 统计学处理 所有数据采用 GraphPad Prism 6.0 进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠的配繁 母代的 miR-100^{flox/flox} 小鼠与 EIIa-Cre 小鼠相互配繁成功得到 F1 代杂合子幼鼠,将获得的 F1 代小鼠雌雄相互交配得到 F2 代小鼠,其中就有 miR-100 全身敲除的纯合子,成功配繁出 miR-100^{-/-} 基因型小鼠。每只母鼠妊娠期为 19 ~ 21 d, 每胎产 3 ~ 8 只幼鼠。

2.2 小鼠基因型鉴定结果 ① 当 5'端条带在 423 bp 和 3'端条带在 379 bp, null 条带在 1 585 bp 时,为 miR-100^{flox/flox} 纯合子小鼠。② 只有当 5'端和 3'端不表达条带,同时 null 条带在 467 bp 时为 miR-100^{-/-} 纯合子小鼠。③ 当不满足以上两种条带时都为敲除杂合子小鼠。F1 代部分小鼠基因型鉴定结果见图 1, 其中 1 号和 2 号条带满足 ①, 所以为 miR-100^{flox/flox} 纯合子。而 3、4、5、6、7 号小鼠的条带 ①、② 都不满足, 所以为 miR-100^{flox/-} 杂合子小鼠。将 F1 代 miR-100^{flox/-} 杂合子小鼠雌雄合笼配繁, 产生 F2 代小鼠进行基因型鉴定, 结果如图 2, 其中只有 1、2、3、8 号小鼠的条带符合 ②, 所以为 miR-100^{-/-} 纯合子小鼠。

2.3 敲除小鼠其 miR-100 表达情况 为了进一步确认 PCR 结果的可靠性, 选取经 PCR 鉴定获得的 miR-100^{flox/flox} 纯合子、miR-100^{flox/-} 杂合子、miR-100^{-/-} 纯合子小鼠, 用定量 PCR 的方法检测其 miR-100 的表达情况, 结果如图 3 所示, 相较于 miR-100^{flox/flox} 纯合子表达 (0.987 138 ± 0.012 340), miR-100^{flox/-} 杂合子的 miR-100 表达 (0.746 125 ± 0.011 959) 降低, 而 miR-100^{-/-} 纯合子小鼠其 miR-100 的表达 (0.000 157 ± 0.000 009) 几乎为零, 差异

有统计学意义 ($F = 10\ 560.296, P < 0.001$)。结果与 PCR 方法鉴定所得的结果一致,验证了 miR-100 的敲除效果,证实了 miR-100 全身敲除小鼠模型。

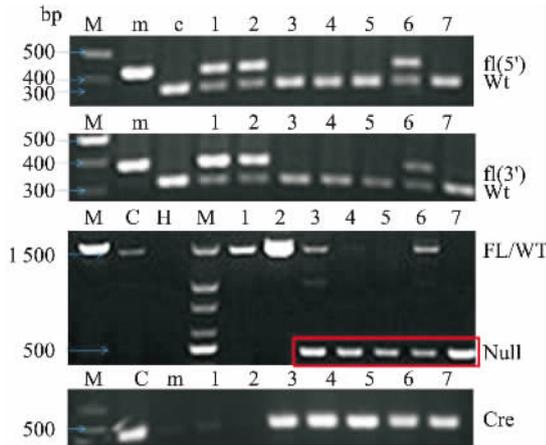


图1 F1代小鼠的基因型鉴定结果

1、2: 均为小鼠 miR-100 纯合子小鼠; 3、4、5、6、7: 均为小鼠 miR-100 敲除杂合子小鼠

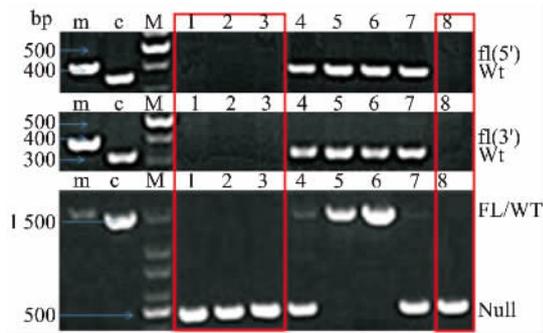


图2 F2代小鼠的基因型鉴定结果

1、2、3、8: 均为所需的 miR-100 敲除纯合子小鼠; 4、5、6、7: 均为 miR-100 杂合子小鼠

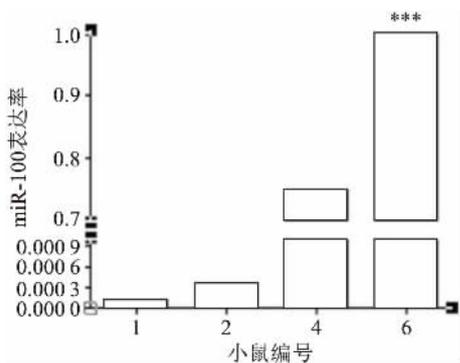


图3 F2代小鼠的 miR-100 表达情况

1、2: miR-100 敲除纯合子小鼠; 4: miR-100 敲除杂合子小鼠; 6: miR-100^{flox/flox} 纯合子小鼠; 与 1 组比较: *** $P < 0.001$

3 讨论

作为研究最多的非编码 RNA, miRNA 是短的 (约 22 个核苷酸) 内源性非编码 RNA, 通过与靶标的 3'-UTR 结合促进 mRNA 降解并抑制转译在转录后水平调节基因表达^[2-3]。研究^[4]表明, 超过 50% 的 miRNA 位于染色体上的所谓的脆性区域中, 这些染色体经常被删除, 扩增或重排与癌症相关。有研究^[5-6]表明, miRNA 表达的异常表达模式和功能异常已被确定与包括癌症在内的多种人类疾病相关。研究^[7]表明, miR-100 是 miR-99 家族的一员, 其起源可以追溯到两侧对称动物的祖先。miR-100 在肿瘤进展中的表达模式和作用尚未完全阐明, 近期的研究^[8-9]显示了有争议的结果。在人类癌症中, miR-100 被报道^[10]既可以作为致癌 miRNA, 也可以作为抑癌 miRNA, 这取决于肿瘤类型和微环境。已经有报道^[11]称 miR-100 的失调参与了肿瘤的发生、发展和耐药。miR-100 的下调在多种人类肿瘤中被报道, 如非小细胞肺癌 (NSCLC)^[12]、胃癌 (GC)、肝细胞癌 (HCC)^[13]。该课题组前期建立的 miR-100 肝特异性敲除小鼠模型, 在成年小鼠中, miR-100 基因敲除对肝功能和形态没有影响。在老年小鼠中, HE 染色显示 miR-100 敲除可引起炎症细胞浸润和肝细胞核扩展, 而且 miR-100 基因敲除的老年小鼠血清 AST 和 ALT 水平升高, 表明其肝功能受损^[14]。

Cre/loxP 系统是一种广泛应用于小鼠位点特异性基因操作的技术。该系统允许删除特定细胞、组织和整个生物体中感兴趣的基因, 从而产生多种条件敲除小鼠品系。Cre/loxP 系统是一种位点特异性的遗传调节技术, 广泛应用于小鼠特定 DNA 位点的基因缺失、插入、逆转录和易位^[15]。该系统包含两个主要成分: Cre 重组酶和 loxP 位点。Cre 重组酶可以特异性识别具有方向性的 34 碱基对不对称 DNA 序列的 loxP 位点。根据两个 loxP 位点的定位, Cre 重组酶可以切除或逆转插入两个 loxP 位点之间的转基因序列。基于此, 本课题组选择了 miR-100^{flox/flox} 小鼠, 此类小鼠的 miR-100 基因两端分别被插入了一个 loxP 位点, 然后将其和表达 Cre 重组酶的 EIIa-Cre 小鼠交配, 从而能够获得 miR-100 被敲除的杂合子且表达 Cre 的小鼠, 再将其进行交配就可获得 miR-100 被敲除的纯合子小鼠, 成功建立 miR-100 基因敲除小鼠模型, 并按照 SPF 级标准进行饲养繁育。采用较为简便易行、重复性、适用性较好的琼脂糖凝胶电泳的方法进行基因型鉴定。虽然

在饲养过程中,还没有发现 miR-100 的敲除和未敲除的小鼠有明显差别,但是为后续对 miR-100 基因的相关机制深入探究提供了较好的模型。

参考文献

- [1] Li C, Gao Y P, Zhang K, et al. Multiple roles of microRNA-100 in human cancer and its therapeutic potential [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(6): 2143–59.
- [2] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116: 281–97.
- [3] Song J L, Nigam P, Tektas S S, et al. MicroRNA regulation of wnt signaling pathways in development and disease [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(7): 1380–91.
- [4] Landau D A, Slack F J. MicroRNAs in mutagenesis, genomic instability, and DNA repair [J]. *Semin Oncol*, 2011, 38(6): 743–51.
- [5] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215–33.
- [6] Lu J, Getz G, Miska E A, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834–8.
- [7] Hertel J, Bartschat S, Wintsche A, et al. Evolution of the let-7 microRNA family [J]. *RNA Biol*, 2012, 9(3): 231–41.
- [8] Yang G, Gong Y, Wang Q, et al. The role of miR-100-mediated notch pathway in apoptosis of gastric tumor cells [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(6): 1087–101.
- [9] 石端博, 邢爱艳, 高超, 等. 胃癌中 microRNA-100 的表达 [J]. *中华病理学杂志*, 2013, 42(1): 15–9.
- [10] Wang H, Wang L, Wu Z, et al. Three dysregulated microRNAs in serum as novel biomarkers for gastric cancer screening [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(12): 298.
- [11] Medina P P, Slack F J. MicroRNAs and cancer: an overview [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(16): 2485–92.
- [12] Liu J, Lu K H, Liu Z L, et al. MicroRNA-100 is a potential molecular marker of non-small cell lung cancer and functions as a tumor suppressor by targeting polo-like kinase 1 [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 519.
- [13] Chen P, Zhao X, Ma L. Downregulation of microRNA-100 correlates with tumor progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 383(1–2): 49–58.
- [14] Yang D, Tang S, Yang Y, et al. Generation and validation of miR-100 hepatocyte-specific knock-out mice [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 535.
- [15] Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring [J]. *Genesis*, 2000, 26(2): 99–109.

Construction and genotyping of miR-100 knockout mouse model

Qiao Siyuan, Jiang Wengang, Wang Siying

(Dept of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the construction and identification of miR-100 gene knockout mouse model. **Methods** The introduced miR-100^{fllox/fllox} mice were mated with EIIa-Cre mice to produce F1 heterozygous mice. The male and female mice with miR-100^{fllox/-} genotype were further mated to obtain F2 generation mice. When the mice were 1 week old, the tail tissues were cut to extract DNA, the target gene fragment was amplified by PCR, and the genotype was determined by agarose gel electrophoresis. **Results** Among them, there were miR-100 knockout homozygous mice. If the obtained knockout homozygous mice were mated, more knockout homozygous mice could be obtained. By cutting the mouse ears to extract the RNA, the mouse RNA could be extracted without affecting the life of the mouse. Therefore, the ears of miR-100 knockout homozygous mice, miR-100^{fllox/fllox} mice, and miR-100 knockout heterozygous mice were cut to extract RNA, and then qPCR was performed to verify the expression of miR-100. The breeding and identification of miR-100 gene knockout mice were successful, and stable genetic knockout mice were obtained. Three genotypes were found in F2 generation mice mated with F1 heterozygous mice: miR-100^{fllox/fllox}, miR-100^{fllox/-}, and miR-100^{-/-}. The genotypes of the offspring mice were successfully identified by PCR. qPCR results showed that the expression of miR-100 in the ears of the whole-body knockout homozygous mice was almost zero. **Conclusion** In this study, a mouse model of whole-body deletion of miR-100 gene is successfully cloned, providing a basis for subsequent experiments.

Key words miR-100; gene knockout; genotype identification; breeding