

◇技术与方法◇

# ASIC1 基因敲除小鼠的繁殖及基因鉴定

周仁鹏, 吴小山, 王志森, 葛金芳, 陈飞虎

**摘要** 饲养并繁殖酸敏感离子通道 1 (ASIC1) 基因敲除杂合子小鼠, 提取小鼠尾部组织 DNA, 采用聚合酶链反应 (PCR) 方法鉴定子代小鼠基因型。ASIC1 基因敲除小鼠的繁育和鉴定均获得成功, 子代小鼠基因型分别为杂合子 (ASIC1 + / -)、纯合子 (ASIC1 - / -) 和野生型 (ASIC1 + / +)。

**关键词** ASIC1; 基因敲除小鼠; PCR

**中图分类号** R-332

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2015)09-1341-03

酸敏感离子通道 (acid sensing ion channels, ASICs) 是一类胞外 H<sup>+</sup> 激活的阳离子通道, 属于阿米洛利敏感的上皮钠通道/退变素 (epithelial Na<sup>+</sup> channels/degenerin, ENaC/DEG) 超家族<sup>[1]</sup>。ASIC1 被发现其对 Na<sup>+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 有通透性, 广泛分布在中枢和外周神经系统以及非神经组织中, 并且有重要的生理和病理意义<sup>[2]</sup>。鉴于在 ASIC1 基因缺失细胞中进行体外实验的不足, 而转基因小鼠能够做到从整体动物水平上模拟相关靶基因的功能, 因此在积累了一定前期研究基础后, 该实验通过繁育和鉴定 ASIC1 基因敲除小鼠, 获得一定数量的敲除小鼠, 这也为深入探究 ASIC1 在类风湿关节炎发生发展中的作用及其分子机制提供了一个动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** ASIC1 基因敲除小鼠购自上海吉凯基因化学技术有限公司, 利用 CRISPR (clusters of regularly interspaced short palindromic repeats) / Cas9 技术获得, 许可证号: SCXK(沪) 2011-0031, 无特定病原体 (SPF 级)。小鼠的品系是 C57BL/6J, 雄性 1 只、雌性 2 只, 基因型为杂合子 (ASIC1 + / -)。

**1.1.2 主要器材与试剂** 器材: 梯度 PCR 仪、Centrifuge 5424R 冷冻离心机 (德国 eppendorf 公司); 琼脂糖水平电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司); ZHJH-C1209B 超净工作台 (上海智城分析仪器制造有限公司)。试剂: 细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (上海捷瑞生物工程有限公司); 6 × Loading Buffer、DL2000 DNA Marker (日本 TaKaRa 公司); PCR 引物 (上海生工生物工程技术有限公司); PCR Master Mix (2 ×) (美国 Thermo Scientific 公司)。

**1.2 ASIC1 基因敲除小鼠的饲养及繁殖** 小鼠在安徽医科大学实验动物中心进行饲养与繁殖。实验动物遵照国家实验动物饲养和使用指南, 饲养于 SPF 级环境中, 动物房内湿度控制在 50% ~ 70%, 温度 20 ~ 26 °C, 12 h 明/12 h 暗交替光照, 小鼠笼具、饲料、垫料、饮用水均经高温高压灭菌处理。饲养过程中, 每天穿无菌隔离服、口罩、手套, 进入动物房 1 次, 观察并拍照记录小鼠生长繁殖情况。垫料每 3 ~ 4 d 更换 1 次, 同时补充饲料和饮用水。采用将性成熟的小鼠 (6 ~ 9 周龄) 以雄雌比例 1 : 2 同笼合养进行小鼠的繁殖; 用于交配繁殖的小鼠每周给予灭菌鸡蛋和瓜子以补充营养。雌雄小鼠的妊娠期为 19 ~ 21 d, 仔鼠出生 23 ~ 30 d (10 ~ 12 g) 后进行断奶、分笼; 对于健康状况欠佳的小鼠给予适量无菌奶粉增强体质。

### 1.3 小鼠的基因型鉴定

**1.3.1 小鼠组织 DNA 的提取** 小鼠出生 3 ~ 4 周后, 使用耳标钳对小鼠进行打耳钉标记, 剪取小鼠尾尖长约 0.3 ~ 0.5 cm, 置于与耳钉编号一致的 1.5 ml 无菌离心管中, 在液氮中将尾尖组织研磨成粉末, 并转移到新的 1.5 ml 的离心管中; 使用试剂盒 (离心柱型) 提取小鼠基因组 DNA, 步骤: ① 加入 400 μl ACL Solution 和 10 μl 的 Proteinase K 震荡混匀 1 min; ② 置于 55 °C 水浴 1 ~ 3 h, 在此期间可以适当摇晃, 以促进裂解; ③ 取出样品依次加入 300 μl Ext Solution 和 300 μl AB Solution 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 溶液分为上层蓝色抽提层和下层透明水相层, DNA 在下层水相中; ④ 将下层溶液吸到 GenClean Column 中, 8 000 r/min 离心 1 min, 弃去离

2015-03-31 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81271949)

作者单位: 安徽医科大学药学院, 合肥 230032

作者简介: 周仁鹏, 男, 硕士研究生;

陈飞虎, 男, 博士生导师, 责任作者, E-mail: cfhchina@sohu.com

心管中废液;⑤将 GenClean Column 放回收集管,加入 500  $\mu\text{l}$  Wash Solution, 8 000 r/min, 室温离心 1 min, 重复 1 次;⑥再次 12 000 r/min 室温离心 1 min, 将柱放入新的洁净 1.5 ml 离心管中,在柱中央加入 50 ~ 100  $\mu\text{l}$  Elution Buffer 室温放置 2 min;⑦然后 12 000 r/min 离心 1 min, 离心管中收集的液体则为 DNA。对提取 DNA 测量光密度(optical density, OD) 值后,加 ddH<sub>2</sub>O 保存于 -20  $^{\circ}\text{C}$ 。

**1.3.2 PCR 扩增反应** 设计 ASIC1 基因扩增引物序列,上游引物: 5'-TTCCATCTCTGCCTATCTAT-3'; 下游引物: 5'-ATAGTCTATACCACGACCTT-3'。PCR 扩增体系: 根据 PCR Master Mix(2 $\times$ ) 使用说明,按 25  $\mu\text{l}$  反应体系进行扩增。分别加入如下反应物: 前段引物(100  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{l}$ 、后段引物(100  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{l}$ 、2 $\times$  Taq PCR Master Mix (0.05 U/ $\mu\text{l}$ ) 12.5  $\mu\text{l}$ 、DNA 模板 1.0  $\mu\text{l}$  加 ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu\text{l}$ 。采用 PCR 仪进行循环扩增,扩增条件设置如下: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s、62  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s、72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 循环 40 次; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min 终止反应。

**1.3.3 琼脂糖凝胶电泳及基因型判定方法** 配制 1.2% 琼脂糖凝胶: 0.3 g 琼脂糖粉, 20 ml 1 $\times$  TAE 电泳缓冲液; 上样: 5  $\mu\text{l}$  PCR 产物和 1  $\mu\text{l}$  Loading Buffer; 之后进行电泳分析, 电泳电压 80 V, 时间 30 min。

小鼠基因型鉴定结果的判定方法: 由电泳结果显示, 条带位于 360 bp 处为基因纯合子小鼠; 而电泳条带位于 548 bp 处则为野生型小鼠; 两条带(360、548 bp) 均存在的为基因杂合子小鼠。

## 2 结果

**2.1 小鼠繁殖及生长情况** 两只配种的 ASIC1 基因敲除杂合子雌鼠 4 个月内共产下子代仔鼠 31 只, 仔鼠由母鼠母乳喂养, 新生小鼠为粉红色, 无毛发(图 1A); 哺乳期约 25 d, 仔鼠成活 30 只, 其中雄性小鼠 14 只, 雌性小鼠 16 只(图 1B)。

**2.2 PCR 鉴定子代小鼠基因型结果** 根据孟德尔遗传定律, 其子代小鼠可能出现的 3 个基因表型为杂合子(ASIC1 + / -)、纯合子(ASIC1 - / -) 及野生型(ASIC1 + / +)。图 2 中编号 1、2 小鼠的电泳条带位于 548 bp 和 360 bp 处为基因杂合子; 编号 4、5 小鼠的电泳条带位于 360 bp 处为基因敲除纯合子; 条带处于 548 bp 位置的 3、6 号小鼠为野生型。经鉴定, ASIC1 + / - 小鼠 17 只; ASIC1 - / - 小鼠 5 只; ASIC1 + / + 小鼠 8 只。

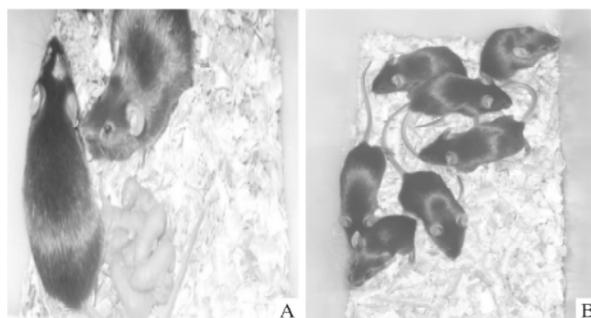


图 1 ASIC1 基因敲除杂合子小鼠所产幼鼠  
A: 3 日龄; B: 4 周龄

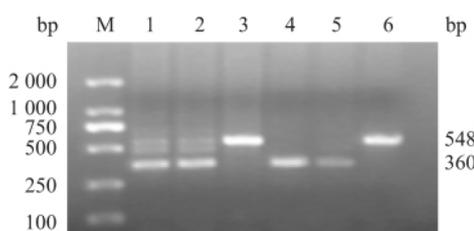


图 2 部分子代 ASIC1 小鼠 PCR 鉴定结果

M: Marker; 1 ~ 6: 小鼠 DNA 扩增结果, 其中 ASIC1 - / - 有一条带为 360 bp, ASIC1 + / - 有两条带为 548 bp 和 360 bp, WT 有一条带为 548 bp。

## 3 讨论

酸碱平衡是维持正常生理活动的重要条件之一, 几乎各种疾病如缺血、炎症、低氧、癌症等的过程都会引起不同程度的 pH 值变化, 而 ASICs 作为酸重要的感受器, 其影响着组织病理生理的改变。ASIC1a 因其可以参与 Ca<sup>2+</sup> 内流的调控并具有广泛的生物学功能和重要的病理生理学价值成为研究的热点<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明在脑缺血病灶的脑室内敲除 ASIC1a 基因或注射 ASIC1a 阻滞剂都可以对缺血性脑损伤起到保护作用。而在含有 Ca<sup>2+</sup> 的 pH = 6.0 培养基内培养软骨细胞时就会增加细胞内钙浓度, ASIC1a 阻滞剂能够很明显降低细胞内 Ca<sup>2+</sup> 增加并抑制酸诱导的关节软骨损伤<sup>[5-6]</sup>。组织酸化可以迅速活化 ASICs 开放, 从而导致 Ca<sup>2+</sup> 超载并诱导产生细胞损伤。因此深入探究 ASIC1 蛋白在机体内部的作用机制, 将有助于明确各种疾病的发生机制, 也有助于疾病的治疗。近些年来, 已有采用 ASIC1 敲除小鼠研究 ASIC1 蛋白在机体中的生理和病理作用<sup>[7-8]</sup>。但目前国内一般使用 ASIC1 基因表达沉默的细胞系进行体外实验, 由于机体内整体环境相当复杂, 因此仅从细胞水平研究 ASIC1 蛋白的功能还是远远不够的。

转基因动物技术是目前生物技术领域中发展较快的基因工程手段。转基因动物在研究基因的结构和相应蛋白功能以及与之相关的疾病方面,较以往腺病毒过表达系统以及小干扰 RNA 等研究手段有显著的优越性。本研究购买的 ASIC1 基因敲除小鼠均为杂合子,采用杂合子雌鼠与杂合子雄 2:1 配对,根据孟德尔遗传定律,其后代可能出现纯合子(ASIC1<sup>-/-</sup>)、杂合子(ASIC1<sup>+/-</sup>)和野生型(ASIC1<sup>+/+</sup>) 3 种基因型。PCR 因其具有快速、灵敏、费用低等特点,逐渐取代了传统的 Southern 杂交,被广泛应用于对基因敲除小鼠基因型的鉴定,但在 PCR 扩增中,如果实验条件不合适(引物设计不合理、模板 DNA 质量不高或被污染等),都容易导致不可靠或无可重复性的 PCR 扩增结果;本研究亦是采用 PCR 成功鉴定出 ASIC1 敲除鼠的基因型。在繁殖的过程中,定期全面检查繁殖雌鼠,建立完整的繁殖记录,留种的小鼠应注意补充蛋白质,特别是哺乳的母鼠要给予鸡蛋和葵花籽补充营养,避免营养不足导致的食子现象。获得的 ASIC1<sup>-/-</sup>小鼠可用于相关疾病的后续实验中,而 ASIC1<sup>+/-</sup>小鼠可用做实验的阴性对照,ASIC1<sup>+/-</sup>小鼠可用来留种;但体型较小的性成熟小鼠,应饲养一定时间后再配种或不用于配种,避免遗传对仔鼠的生长发育的影响。经过一段时间繁殖后,目前本教研室已获得了一定数量的 ASIC1 基因敲除小鼠,这为深入研究 ASIC1 在相关疾病中的作用提供了前期基础。

## 参考文献

- [1] Xiong Z G, Pignataro G, Li M, et al. Acid-sensing ion channels (ASICs) as pharmacological targets for neurodegenerative diseases [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2008, 8(1): 25-32.
- [2] Urbano F J, Lino N G, González-Inchausti C M, et al. Acid-sensing ion channels 1a (ASIC1a) inhibit neuromuscular transmission in female mice [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014, 306(4): C396-406.
- [3] Wemmie J A, Askwith C C, Lamani E, et al. Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(13): 5496-502.
- [4] Xiong Z G, Zhu X M, Chu X P, et al. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels [J]. *Cell*, 2004, 118(6): 687-98.
- [5] Yuan F L, Chen F H, Lu W G, et al. Acid-sensing ion channel 1a mediates acid-induced increases in intracellular calcium in rat articular chondrocytes [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 340(1-2): 153-9.
- [6] 袁凤来, 陈飞虎, 李霞, 等. 大鼠关节软骨酸敏感离子通道的表达 [J]. *安徽医科大学学报*, 2007, 42(5): 513-6.
- [7] Nitta C H, Osmond D A, Herbert L M, et al. Role of ASIC1 in the development of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 306(1): H41-52.
- [8] Grégoire S, Matricon J. Differential involvement of ASIC1a in the basolateral amygdala in fear memory and unconditioned fear responses [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(19): 6053-4.

## Reproduction and genotype identification of ASIC1 knockout mice

Zhou Renpeng, Wu Xiaoshan, Wang Zhisen, et al

(School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract** To breed and identify acid sensing ion channel 1 (ASIC1) gene knockout mice, so as to lay the foundation for studying ASIC1 protein. The heterozygote mice were bred and reproduced. Genome DNA extracted from the murine tail was subjected to PCR test for genotype identification. Breeding and reproducing of ASIC1 knockout mice were both successful, and the genotypes of the offspring mice were heterozygous (ASIC1<sup>+/-</sup>), homozygous (ASIC1<sup>-/-</sup>), and wild-type (ASIC1<sup>+/+</sup>). Appropriate methods of breeding, reproducing and identifying can effectively obtain ASIC1<sup>-/-</sup> mice.

**Key words** ASIC1; knockout mice; PCR