

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00555

NLRP3 基因敲除小鼠的繁殖与基因型鉴定

冯世杰, 宗英, 张子腾, 杜秀明, 袁伯俊, 陆国才*

第二军医大学热带医学与公共卫生学系卫生毒理学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 繁殖及鉴定 *NLRP3* 基因敲除(*NLRP3*^{-/-})小鼠。**方法** 将引进的 *NLRP3* 基因敲除杂合子小鼠, 单独进行饲养及配种繁殖, 繁殖后其子代出现 3 种基因型: 野生型、杂合子型及纯合子型, 提取每只小鼠的基因组 DNA, 用 PCR 和 T7E1 酶切方法进行鉴定, 将获得的纯合子小鼠与异性杂合子交配, 以获得更多的基因敲除纯合子小鼠。**结果** *NLRP3* 杂合子小鼠的饲养及繁殖均获得成功, 获得了 *NLRP3* 基因敲除纯合子和杂合子小鼠。**结论** 正确的饲养、繁殖及鉴定方法是从 *NLRP3* 基因敲除杂合子小鼠中获得纯合子小鼠的有效途径。

[关键词] 基因敲除小鼠; *NLRP3*; 炎症小体; 纯合子; 杂合子

[中图分类号] R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)05-0555-05

Breeding and genotype identification of *NLRP3* gene knock-out mice

FENG Shi-jie, ZONG Ying, ZHANG Zi-teng, DU Xiu-ming, YUAN Bo-jun, LU Guo-cai*

Department of Health Toxicology, College of Tropical Medicine and Public Health, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To breed and identify *NLRP3* gene knock-out mice. **Methods** The *NLRP3* gene knock-out heterozygote mice were bred alone and copulated. The offsprings were to have three genotypes: wild genotype, heterozygote genotype and homozygote genotype. Genomic DNA was obtained from each pups and were subjected to PCR and T7 endonuclease 1 to identify the genotype. The homozygote mice were mated with the opposite sex heterozygote mice to obtain more homozygote pups. **Results** Breeding and reproducing were both successful, and we obtained heterozygote genotype and homozygote genotype mice with *NLRP3* gene knock-out. **Conclusion** Correct methods of breeding, reproducing and identifying can effectively obtain *NLRP3* gene knock-out mice from heterozygote mice.

[Key words] knockout mice; *NLRP3*; inflammasome; mice; homozygote; heterozygote

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(5): 555-559]

炎症小体(inflammasome)是一类存在于细胞质中的多蛋白复合物, 2002年 Martinon 等^[1]首次对其进行描述。作为固有免疫系统的感受器, 炎症小体能被多种类型的病原体或危险信号所激活, 通过多个信号通路诱导细胞因子及炎症介质的释放, 引发炎症反应^[2]。炎症小体也在多种疾病如肿瘤、糖尿病、老年痴呆等^[2-3]的形成过程中起重要作用。目前研究最多的 *NLRP3* 炎症小体是由 Nod 样受体家族蛋白 3(Nod-like receptor family, pyrin domain-con-

taining 3, *NLRP3*)和凋亡凝集样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC)及 caspase-1 前体(pro-caspase-1)组成的蛋白复合物^[4]。炎症小体活化后可使 pro-caspase-1 转化为有活性的 caspase-1, 后者裂解白介素 1 β 前体(pro-IL-1 β)及白介素 18 前体(pro-IL-18), 形成并分泌有活性的 IL-1 β 和 IL-18^[5], IL-1 β 和 IL-18 在适应性免疫应答方面发挥重要作用^[6-7]。

尽管目前国内部分单位也开展了炎症小体的相

[收稿日期] 2014-03-10 **[接受日期]** 2014-04-13

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技专项(2014ZX09J14106); 上海市公共卫生重点学科建设计划项目(12GWZX0501); 上海市自然科学基金(13ZR1449400). Supported by Major Science and Technology Project of “Significant New Drug” of China (2014ZX09J14106), Key Public Health Discipline Construction Program of Shanghai (12GWZX0501), and Natural Science Foundation of Shanghai (13ZR1449400).

[作者简介] 冯世杰, 硕士. E-mail: fxiaojie1120@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871032, E-mail: newdrug@smmu.edu.cn

关研究,但并未见在 *NLRP3* 基因敲除小鼠动物模型上的实验研究报道。本课题组为了开展 *NLRP3* 炎症小体相关的药理学与毒理学研究,于2013年10月引进了 *NLRP3* 基因敲除杂合子小鼠。现将从 *NLRP3* 基因敲除杂合子小鼠获得 *NLRP3* 基因敲除纯合子小鼠的繁殖及鉴定过程作一报告。

1 材料和方法

1.1 实验动物 *NLRP3* 基因敲除杂合子 (*NLRP3*^{+/-}) 小鼠从北京唯德生物科技有限公司引进,利用 TALEN (transcription activator-like effector nucleases) 技术获得,品系为 C57BL/6, SPF 级,共 3 只 (2 雄 1 雌)。野生型 (wide type, WT) C57BL/6 小鼠由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,生产许可证号: SCXK (沪) 2008-0016,合格证号: 2008001631246,使用许可证号: SYKX (沪) 2012-0003,SPF 级条件饲养。

1.2 主要试剂及仪器 鼠尾裂解液 (北京康为世纪生物科技有限公司); EDTA、异丙醇均为分析纯 (上海医药集团上海化学试剂公司); 蛋白酶 K (protease K)、2× *Taq* PCR Master Mix、AL2000 DNA Marker、5× TBE、1 mol/L Tris-HCl、10% SDS (北京艾德莱生物科技有限公司); T7 核酸内切酶 1 (T7 endonuclease 1, T7E1, 北京唯德生物科技有限公司); 琼脂糖 (美国 Amresco 公司); 6× Loading buffer (日本 TaKaRa BIO 株式会社)、溴化乙啶 (EB) 溶液 (上海莱枫生物科技有限公司)。DK-8D 型三孔电热恒温水槽 (上海一恒科技有限公司); UNO-II 型 PCR 仪 (美国 Biometra 公司); Eppendorf 5804R 低温离心机 (德国 Eppendorf AG); FR-250 电泳仪、FR-980A 生物电泳图像分析系统 (上海复日科技有限公司)。

1.3 基因敲除小鼠的饲养和繁殖 *NLRP3* 基因敲除杂合子小鼠引进后,置于第二军医大学药物安全性评价中心 SPF 级动物房内饲养和繁殖。饲养温度 18~22℃,相对湿度 40%~70%,明暗循环 12 h/d,自由饮食和饮水。小鼠笼盒、玉米芯垫料及饲料、饮用水均经过高温高压消毒灭菌处理。饲养过程中,每天进入 SPF 动物房观察和记录小鼠的生长情况。每周更换 3 次小鼠垫料,每天补充饲料和饮用水。

繁殖初期 1 只雄鼠与 1 只雌鼠进行合笼,小鼠的性成熟期为 8 周左右,母鼠妊娠期为 21 d 左右,繁殖出 F2 代子鼠后,1 只雄鼠与 2 只雌鼠进行合笼。配种小鼠定期给予灭菌葵花籽以补充营养。

1.4 小鼠的基因型鉴定 由于引进的 *NLRP3* 基因敲除小鼠均为杂合子,其子代可能出现野生型 (*NLRP3*^{+/+})、杂合子 (*NLRP3*^{+/-}) 和纯合子 (*NLRP3*^{-/-}) 3 种表型,故需对子代进行基因型鉴定。

1.4.1 小鼠基因组 DNA 提取 剪取绿豆大小的小鼠耳朵放入 1.5 mL EP 管中,加入 500 μL 裂解液,55℃ 水浴过夜。隔天 12 000×g 离心 5 min,转移上清至另一新的 1.5 mL EP 管中,加入同等体积异丙醇,轻轻混匀,室温静置 10 min,12 000×g 离心 10 min。弃上清,将沉淀溶解于适量 TE 缓冲液中,即得 DNA。

1.4.2 PCR 扩增反应及琼脂糖凝胶电泳进行基因型鉴定 引物由北京唯德生物科技有限公司设计,*NLRP3* 基因引物分别是正向: 5'-GTT TTC ATT CCT GCA CTG CCA GTG-3'; 反向: 5'-CAA AAA CCC TTC TGT TTA CTC ACT C-3'。PCR 扩增: 根据 2× *Taq* PCR Master Mix 使用说明,按 25 μL 反应体系进行扩增。分别加入如下反应物: DNA 模板 3 μL、前段引物 (20 μmol/L) 1 μL、后段引物 (20 μmol/L) 1 μL、2× *Taq* PCR Master Mix (0.1 U/μL) 12.5 μL,加 ddH₂O 补足至 25 μL。其中, DNA 模板中有一组为对照组,即野生型小鼠 DNA,其余为实验组,即 F1 代杂合子交配繁殖的 F2 代子鼠 DNA。PCR 反应循环设置如下: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1~2 kb/min, 循环 40 次; 72℃ 5 min 终止反应。将上步反应得到的实验组和对照组 PCR 扩增产物按照如下反应体系进行退火处理。1 号管加实验组 PCR 产物 5 μL; 2 号管加实验组 PCR 产物 2.5 μL, 对照组 PCR 产物 2.5 μL; 3 号管加对照组 PCR 产物 5 μL; 4 号管加对照组 PCR 产物 5 μL; 再分别向 1、2、3、4 号管中各加入 1.1 μL T7E1 1×buffer, 4.4 μL ddH₂O。放入 95℃ 水浴锅 5 min, 自然冷却至室温; 再向 1、2、3 管中分别加入 0.5 μL T7E1 酶, 37℃ 反应 30 min。取 T7E1 酶切后各管产物 8 μL 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。根据以下 3 种情况判断小鼠为野生型、杂合子亦或是纯合子: (1) 纯合子小鼠: 样品小鼠的 PCR 产物自我杂交,

经 T7E1 酶切,只有一种带型(和野生型带差不多);而样品小鼠的 PCR 产物与野生型鼠的 PCR 产物杂交,出现两种带型(突变体带和野生型带)。(2)杂合子小鼠:样品小鼠自我杂交,经 T7E1 酶切,出现两种带型(突变体带和野生型带);而样品小鼠的 PCR 产物与野生型鼠的 PCR 产物杂交,也出现两种带型(突变体带和野生型带)。(3)野生型小鼠:样品小鼠自我杂交,经 T7E1 酶切,只有一条带;而样品小鼠的 PCR 产物与野生型鼠 PCR 产物杂交也出现一条带。

2 结果

2.1 小鼠的繁殖和生长情况 杂合子母鼠共生育 8 只 F2 代小鼠,生长发育见图 1,与野生型 C57BL/6

小鼠相比未见明显异常。



图 1 F2 代 1 周龄小鼠(A)和 5 周龄小鼠(B)

2.2 F2 代小鼠基因型鉴定结果 F2 代 8 只小鼠中 1、3、4、6、7、8 号为雄鼠,2、5 号为雌鼠。其各自基因型鉴定结果见图 2。

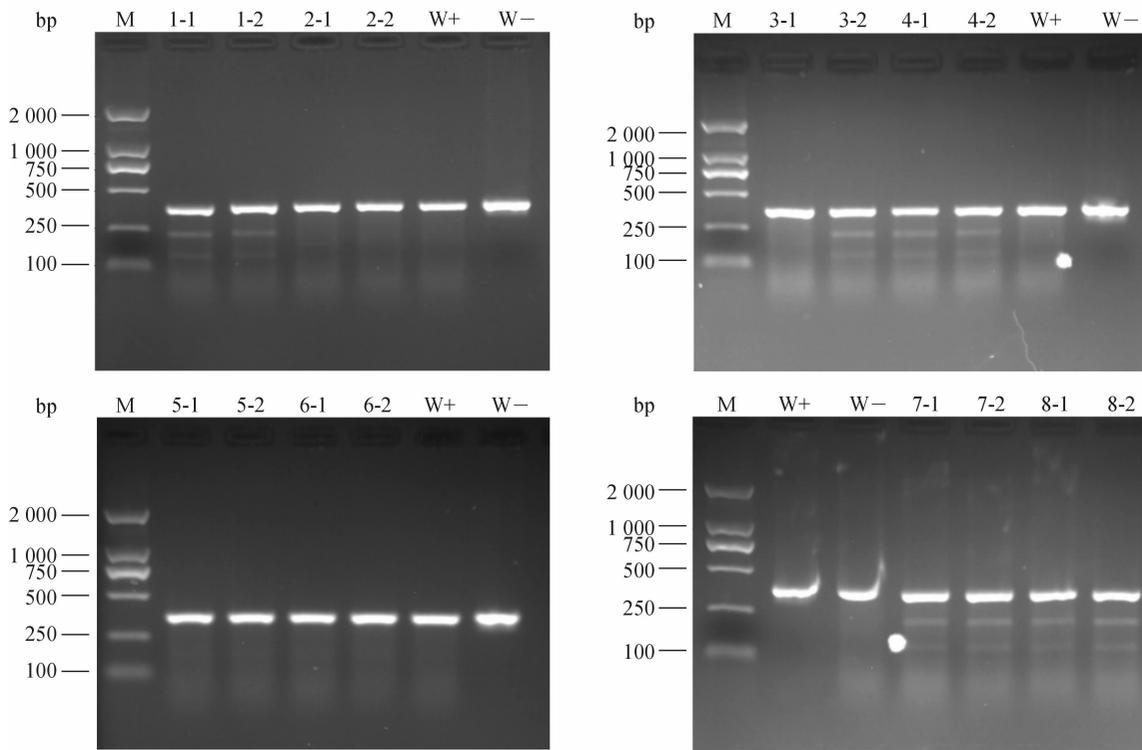


图 2 F2 代小鼠基因型鉴定结果

M:AL-2000 DNA 标记物; 1-1, 2-1, 3-1, 4-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1:F2 代 N 号小鼠 DNA 自我杂交组(N:动物编号); 1-2, 2-2, 3-2, 4-2, 5-2, 6-2, 7-2, 8-2:F2 代 N 号小鼠和野生型小鼠 DNA 杂交组(N:动物编号); W+:野生型小鼠 DNA 自我杂交组(加 T7E1 酶); W-:野生型小鼠 DNA 自我杂交组(不加 T7E1 酶)

根据 *NLRP3* PCR 引物和发生突变的位置,经 T7E1 酶切后会出现不同的 DNA 带型:野生型条带为 366 bp,突变体条带为 2 条,分别为 226 bp 和 140 bp。经 T7E1 酶切后,根据前文所述基因型判断方法可知:3 号小鼠自我 DNA 杂交后出现一条带,与野生型小鼠 DNA 杂交后出现两条带,故为纯

合子小鼠;1、4、7、8 号小鼠无论是自我 DNA 杂交组还是与野生型小鼠 DNA 杂交组,都出现两条带,故为杂合子小鼠;2、5、6 号小鼠无论自我 DNA 杂交组还是与野生型小鼠 DNA 杂交组,都出现一条带,故为野生型小鼠。

3 讨论

天然免疫是机体防御病原体的第一道防线,主要通过模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)来识别病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs),第一时间产生免疫应答、快速清除病原体^[8]。其中 Nod 样受体(Nod-like receptors, NLRs)是模式识别受体中非常重要的一类^[9]。迄今为止已发现人体内含有 23 种 NLR 家族蛋白分子,而小鼠体内则已发现 35 种^[10]。目前已经发现多种内源性刺激因素如病毒、真菌和细菌等多种病原体及其 PAMPs 均能刺激 NLRP3 炎性小体的组装、活化,细菌成孔毒素也能诱导 NLRP3 炎性小体的组装;而胞外危险信号如 ATP、单钠尿酸、 β -淀粉样蛋白和多种环境损伤同样能引起 NLRP3 的活化。有研究发现激活的 NLRP3 炎症小体能够通过引起肝细胞炎症而发挥保护作用,从而促进肝脏恢复稳态;而慢性肝炎时炎症小体长期激活,能够诱导肝脏细胞死亡,代偿性地引起肝细胞增殖和肝脏再生^[11]。在肠炎模型中也发现 NLRP3 炎症小体的激活对于肠炎具有保护作用;同时发现 NLRP3 炎症小体还能抑制肠炎相关性肿瘤的发生^[12]。因此,NLRP3 炎症小体是机体的保护屏障之一,具有重要的研究意义。

2009 年科学家揭示了植物病原菌-黄单胞杆菌(*Xanthomonas* spp.)中 TALE 蛋白的氨基酸序列与靶位点 DNA 序列间逐一对应且能特异性识别并结合的重大发现^[13],并在此基础上开发了 TALENs 技术。作为一种崭新的分子生物学技术手段,TALENs 技术克服了早前许多基因修饰技术如锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)等不能靶向所有序列、脱靶切割、设计繁复等缺点,能特异性实现对任意靶目标 DNA 的敲除、敲入或点突变^[14]。其主要原理是利用 TALE 和 *Fork I* 限制性核酸内切酶的催化区域融合为 TALEN,保留 TALE 的 DNA 靶序列特异识别功能及 *Fork I* 的 DNA 酶活性^[15],目前已成功在斑马鱼、线虫、大鼠小鼠、果蝇和细胞等物种实现了基因组定点突变^[16]。本教研室引进的 NLRP3 基因敲除小鼠,系通过 TALEN 技术剪切目标基因外显子 DNA,使 DNA 发生修复后形成移码突变,从而使控制 NLRP3 蛋白表达的基因失活,

达到实现 NLRP3 基因敲除的目的。该基因敲除动物模型的构建在国内尚属首次。同时为了更全面地研究 NLRP3 炎症小体激活对相关疾病病理生理的影响,我们还引进了 NLRP3 炎症小体相关的其他基因敲除小鼠(*ASC*^{-/-}小鼠、*Caspase-1*^{-/-}小鼠),用同样的方法进行饲养、繁殖和基因型鉴定,为科研工作提供了有力保障。

引进的基因敲除小鼠严格遵循 SPF 级动物标准管理,饲养和繁殖方法参照文献^[17]进行。由于本次引进的 NLRP3 基因敲除小鼠均是杂合子,所以其子代可能出现 NLRP3^{+/+}、NLRP3^{+/-}、NLRP3^{-/-} 3 种表型,我们采用 PCR 扩增小鼠基因组 DNA、再用 T7E1 酶切的方法成功进行了基因型鉴定。为了确保 T7E1 酶质量安全可靠,每块琼脂糖凝胶电泳时,相应增加了一孔不含 T7E1 酶的对照组,即只加入野生型小鼠 DNA 扩增产物 5 μ L,95 $^{\circ}$ C 5 min 冷却到室温后,不加 T7E1 酶切,直接 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min。从上述鉴定结果来看,对照组野生型小鼠 DNA 加入和不加入 T7E1 酶均为一条带,即 366 bp。说明 T7E1 酶作用显著有效,可以用来鉴定小鼠基因型。杂合子小鼠交配后,可得到部分纯合子(NLRP3^{-/-})的子代,用于科研工作,而杂合子(NLRP3^{+/-})子代可以保种用。实验过程中,为不影响小鼠正常生长、保证存活率,我们选择出生 3 周左右即离乳后小鼠,剪取耳部组织进行基因鉴定。目前通过一段时间的饲养、繁殖和鉴定,我们已经获得了较多的 NLRP3^{-/-}小鼠,同时也获得了部分 *ASC*^{-/-}小鼠、*Caspase-1*^{-/-}小鼠。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro-IL-beta [J]. *Mol Cell*, 2002, 10: 417-426.
- [2] Menu P, Vince J E. The NLRP3 inflammasome in health and disease; the good, the bad and the ugly [J]. *Clin Exp Immunol*, 2011, 166: 1-15.
- [3] De Nardo D, Latz E. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease [J]. *Trends Immunol*,

- 2011,32:373-379.
- [4] Lamkanfi M, Dixit V M. Inflammasomes and their roles in health and disease[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012,28:137-161.
- [5] Carneiro L A, Magalhaes J G, Tattoli I, Philpott D J, Travassos L H. Nod-like proteins in inflammation and disease[J]. *J Pathol*, 2008,214:136-148.
- [6] Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y T, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors [J]. *Nat Med*, 2009, 15:1170-1178.
- [7] Wen H, Miao E A, Ting J P. Mechanisms of NOD-like receptor-associated inflammasome activation [J]. *Immunity*, 2013,39:432-441.
- [8] Fukata M, Vamadevant A S, Abreu M T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders [J]. *Semin Immunol*, 2009, 21: 242-253.
- [9] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. [J]. *Cell*, 2010,140:805-820.
- [10] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes [J]. *Cell*, 2010,140:821-832.
- [11] Wei Q, Mu K, Li T, Zhang Y, Yang Z, Jia X. Deregulation of the NLRP3 inflammasome in hepatic parenchymal cells during liver cancer progression [J]. *Lab Invest*, 2014,94:52-62.
- [12] Zaki M H, Boyd K L, Vogel P, Kastan M B, Lamkanfi M, Kanneganti T D. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis [M]. *Immunity*, 2010, 32: 379-391.
- [13] Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors [J]. *Science*, 2009, 326: 1509-1512.
- [14] Li T, Huang S, Jiang W Z, Wright D, Spalding M H, Weeks D P, et al. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and *Fok I* DNA-cleavage domain [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011,39:359-372.
- [15] Moscou M J, Bogdanove A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors [J]. *Science*, 2009, 326:1501-1503.
- [16] 沈延,肖安,黄鹏,王唯晔,朱作言,张博. 类转录激活因子效应物核酸酶 (TALEN) 介导的基因组定点修饰技术[J]. *遗传*, 2013,35:395-409.
- [17] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京:人民军医出版社, 2000:71-82.

[本文编辑] 张建芬,尹茶