

人肾素转基因小鼠的建立*

陈兰英** 姜立群 刘嘉莉 苏雪峰 方福德¹⁾ 陈永福²⁾

(中国医学科学院 心血管病研究所 阜外心血管病医院, 北京 100037)
(中国协和医科大学)

摘要 为研究人肾素基因在体内的功能和建立其药物干预实验的动物模型, 采用显微注射法, 将纯化的人肾素基因导入小鼠受精卵, 再培育成转基因小鼠. 通过 DIG DNA 印迹和 PCR 分析, 进行转基因整合检测. 在出生的 13 只子代鼠中, 得到一只转基因阳性鼠. 整合率为 7.7%, 有效率 0.3%, 转基因已稳定传代. RT-PCR 显示转基因阳性鼠的肾、心和肺组织中有肾素基因表达, 而在肝脏与骨骼肌中则未检测到. 阳性鼠血浆肾素活性较对照鼠明显升高, 而肾与心脏组织的肾素活性则无明显变化. 人肾素转基因小鼠可用于研究循环或组织的 RAS 中肾素基因的功能及有关其药物抑制实验.

关键词 人肾素, 转基因小鼠, 逆转录-聚合酶链反应, 地高辛, DNA 印迹, 显微注射

学科分类号 Q503

高血压在我国的患病率很高, 其发病机制至今尚未清楚. 肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 基因在血压调节中有重要作用. 尽管对肾素基因已有较多了解, 但其详细作用机制还有待深入研究^[1]. 为进一步了解人的肾素基因在体内的功能及其组织特异性分布, 本文报道了用显微注射法建立人肾素转基因小鼠及转基因的组织特异性表达, 以期建立研究人肾素基因和其药物干预实验的动物模型, 并对转基因动物技术在高血压研究中的应用作一尝试.

1 材料与方法

1.1 实验动物与器材

由 6~10 周龄昆明白雌鼠与 C57BL/6 雄鼠交配得到的杂交一代小鼠为供体鼠, 8~10 周龄昆明白雄鼠 (用作种公鼠及制作结扎公鼠) 和雌鼠 (与结扎公鼠交配后产生受体母鼠), 均为 II 级动物, 购自中国医学科学院实验动物研究所繁育场. 转基因动物技术所需仪器有显微操作仪 (德国 Leit 2), 倒置相差显微镜 (日本尼康公司), 拉针仪 (日本 Narishige PD-5 型) 和光学显微镜 (东方光学仪器厂).

1.2 试剂

所用试剂盒主要有 Sephaglass BandPrep Kit (Pharmacia 公司), 随机引物标记试剂盒 (Promega 公司, USA) 以及 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit III (Boehringer-Mannheim 公司). 限制性内切酶, 蛋白酶 K, 酚试剂及异硫

氰酸胍购自北京华美生物工程公司 (Sino-American Biotechnology Company, SABC). 胚胎培养专用乳酸钠 (26.10 g/L), 丙酮酸钠, 氯化钙, 透明质酸酶及三溴乙醇购自美国 Sigma 公司. PCR 引物合成, Taq DNA 聚合酶, dNTPs, RNasin, DTT, Oligo (dT) 15, Moloney-murine leukemia virus (M-MLV) 购自上海生工公司. 孕马血清, 促性腺激素 (PMSG), 人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 购自天津实验动物研究所, α -³²P-dCTP 购自北京福瑞公司, 血管紧张素 I (Ang I), ¹²⁵I 放免试剂盒购自北京北方生物技术研究所, 其余均为国产分析纯.

1.3 人肾素基因纯化和鉴定

克隆有人肾素基因的 pUC19 质粒——phRNTM15 由日本 Fukamizu 教授惠赠. 该质粒上人肾素基因克隆位点为 *Bgl* II 和 *Cla* I. 质粒经 *Bgl* II 和 *Cla* I 大量酶切, 回收 15 kb 人肾素基因片段, 用玻璃粉试剂盒纯化经酶切鉴定为人肾素基因. 用作转基因的人肾素基因含 10 个外显子, 9 个内含子以及 3.0 kb 和 1.2 kb 的 5' 和 3' 侧序列.

1.4 转基因小鼠产生与传代

从与种公鼠交配后的供体鼠获取超排卵, 用显

* 国家“八五”攻关资助项目 (85-915-03-11) 和国家重点基础研究发展规划部分资助项目 (973) (G2000 056904).

** 通讯联系人.

¹⁾ 中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005.

²⁾ 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094.

Tel: 010-68314466-8068, E-mail: lanyingchen@hotmail.com

收稿日期: 2001-09-13, 接受日期: 2001-10-21

微注射法将人肾素基因导入小鼠受精卵雄原核。选完好无损的受精卵移植到受体鼠输卵管。通常于移植后 21~23 d 生仔。经整合检测鉴定的阳性鼠 (F₀₅, 雄性) 与昆明种白小鼠 (雌性) 交配, 得到的 F₁ 代阳性鼠再进行同胞交配和传代筛选^[2]。

1.5 子代鼠基因组 DNA 提取

剪取 2 月龄子代鼠尾尖 (约 1 cm), 参照文献 [3] 方法用蛋白酶 K 法提取基因组 DNA, 用作转基因整合检测的样品。

1.6 DIG DNA 印迹

用 DIG 试剂盒方法对鼠尾 DNA 样品进行 DNA 印迹的整合检测^[3]。以 *Bam*H I 酶切 *phRNTM15* 质粒, 回收其中的 2 kb 片段用作探针标记的模板, 用 1 μ g 模板进行 dUTP-Dig 标记, 临用前进行变性处理。200 μ l 酶切反应体系中加入 10~15 μ g 鼠尾 DNA, 以 *Kpn*I (200 U), 37 $^{\circ}$ C 酶解 4 h。产物依次进行凝胶电泳、变性液处理凝胶 3 次和转膜。尼龙膜先在预杂交液中预杂交 6~8 h 后, 再加入变性探针进行杂交 (44 $^{\circ}$ C) 20 h; 以三种梯度缓冲液依次洗膜各两次 (室温 2 次, 44 $^{\circ}$ C 4 次)^[4]。在室温摇床中, 主要按地高辛试剂盒方法进行封闭、抗体结合反应等。

1.7 PCR 检测

检测转基因阳性鼠的 PCR 方法如下: 50 μ l 反应体积分含 0.5~1 μ g 鼠尾 DNA 模板, 0.5 mmol/L 引物 (引物设计: 5' 引物, 5'-ACTCACGCTCCGCTATATTC-3'; 3' 引物, 5'-CCCTCCCGTAACTCTGAT-3', 产物 556 bp 为人肾素基因第 4 外显子至第 5 内含子之间的序列), 0.2 mmol/L dNTP, 0.5 U Taq DNA 聚合酶和 1 $\times$ Taq DNA 聚合酶缓冲液; 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min, 30 个循环 (94 $^{\circ}$ C, 1 min; 56 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min), 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 20 min; 反应产物用琼脂糖凝胶电泳分析。

1.8 RT-PCR

小鼠经引颈处死。迅速取出心、肝、肺、肾及骨骼肌组织。按照组织与变性液之间 1:12 (g/ml) 比例, 将组织在异硫氰酸胍变性液中用 polytron 打碎, 以酚氯仿提取总 RNA。RT 反应如下: 在 20 μ l 反应体积分含有 1 μ g 组织总 RNA, 200 U 逆转录酶 MMLV, 1 $\times$ MMLV 缓冲液, 0.5 μ l 随机引物, 0.5 mmol/L dNTP, 40 U RNasin 和 0.5 mmol/L DTT, 37 $^{\circ}$ C 逆转录 60 min, 94 $^{\circ}$ C 失活 10 min。PCR 反应如下: 50 μ l 反应体积分除 5 μ l

逆转录产物模板和 PCR 引物 (引物设计: 5' 引物为 5'-ACTCACGCTCCGCTATTC-3'; 3' 引物为 5'-TCTGTCCTCCCAGCGAT-3', 扩增片段长 300 bp, 为人肾素基因第 4~6 外显子序列) 外, 其余与上述 PCR 检测的方法完全相同。

1.9 血浆和组织肾素活性分析

鼠眼底动脉血加 EDTA (抗凝), 1 000 g 离心 5 min 分离血浆。小鼠组织按 0.2:1 (g/ml) 加入 9 g/L NaCl 匀浆, 1 000 g 离心 5 min 后取上清为样品。肾素活性测定: 除反应体系中加入 50 μ l 抗凝的人血浆, 用以提供人肾素作用的底物即血管紧张素原外 (这是因为转基因小鼠中导入的人肾素基因因其种属特异性而不能催化小鼠自身含有的血管紧张素原底物), 其余按放免试剂盒方法进行。依照反应温度的不同每个样品分成两组, 每组取双份样品, 再计算平均值。A 组 (对照组) 4 $^{\circ}$ C 保温 3 h; B 组 (实验组) 37 $^{\circ}$ C 保温 3 h。B 组减去 A 组数值则为每个样品的测定结果。肾素活性以 37 $^{\circ}$ C 条件下, 每小时每毫升样品中产生的 Ang I 含量的 pg 数表示。

1.10 分组与统计

文中阳性对照采用克隆有 15 kb 人肾素基因组 DNA 的质粒 *phRNTM15*。RT-PCR 及肾素活性分析中均以年龄匹配的转基因阴性鼠为对照鼠 (又称阴性对照)。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 按 *t* 检验进行统计分析。

2 结 果

2.1 外源基因的鉴定

纯化的人肾素基因在显微镜下观察无颗粒物质出现, 堵针现象较少发生, 毒性小, 注射了 DNA 的卵母细胞分裂率达到 50%, 说明外源基因的纯度达到显微注射要求, 可作转基因用。纯化的人肾素基因质粒经 *Bgl* II 和 *Cla* I (或 *Kpn* I) 酶切得到 15 kb 和 2.7 kb (或 11 kb 和 6.5 kb) 的人肾素基因特征片段, 这与质粒 *phRNTM15* 的酶切图谱和文献 [5] 报道相符。

2.2 人肾素转基因小鼠产生

2.2.1 显微注射: 以 2.5 mg/L 浓度将人肾素基因注射到 459 枚小鼠受精卵原核, 挑取形态完好存活的 348 枚卵 [存活率=75.8% (348/459)] 移植到 14 只假孕母鼠, 其中 3 只受孕 (受孕率 21.4%) 得子代鼠 13 只, 1 只为阳性鼠。转基因整合率 7.7% (1/13), 总效率为 0.3% (1/348)。

2.2.2 转基因整合检测:

a. DIG DNA 印迹: 用 *Kpn* I 酶切从 F_0 代鼠尾提取的 DNA, DIG 标记 DNA 印迹显示, F_0 在 11 kb 处出现了人肾素基因酶切后的特征条带, 与人肾素基因组 DNA (阳性对照) 结果相符 (图 1). 此外, 在 8 kb 处尚有一条增加的条带.

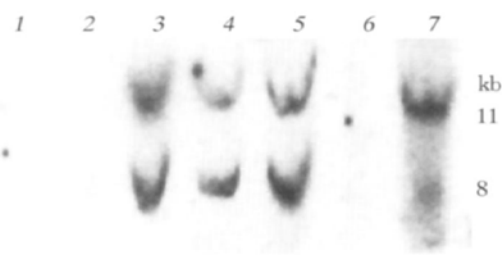


Fig. 1 Identification of transgenic mice by DIG DNA blot

1, 2: transgenic negative mice; 3, 4, 5: transgenic positive mice; 6: non-transgenic mouse; 7: human genomic DNA as positive control.

b. PCR 检测: 以克隆有 15 kb 人肾素基因组 DNA 的质粒作阳性对照, 用非转基因鼠的鼠尾 DNA 为阴性对照, 经 PCR 鉴定的阳性鼠 (图 2-2) 在 515~697 bp 分子质量标准之间有一条约为 560 bp 的条带, 此为人肾素基因的特征片段, 并与阳性对照 (图 2-4) 出现条带的位置相同, 其余对照均未见任何扩增条带.

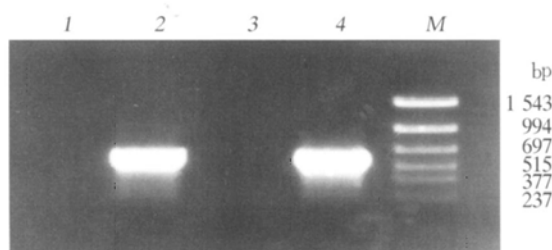


Fig. 2 Identification of transgenic mice by PCR

1: transgenic negative mouse; 2: transgenic positive mouse; 3: non-transgenic mouse; 4: phRNTM15 as positive control; M: molecular mass marker.

2.3 转基因组织特异性表达

转基因阳性鼠的肺、肾、心 (图 3-2, 4, 6) 样品在 237 与 377 之间均出现约 300 bp 的人肾素基因的特征片段, 在肝和骨骼肌 (图 4-2, 4) 则无. 初步可见转基因以肾脏中转录较强, 肺脏较弱. 对照鼠在相应位置也无任何条带.

2.4 转基因小鼠肾素活性与表型分析

转基因阳性鼠心重比 4.883 ± 0.735 ($n = 7$), 较对照鼠 3.554 ± 0.725 ($n = 8$) 显著增加 ($P <$

0.05). 阳性鼠血浆肾素活性 1.231 ± 0.485 ($n = 8$) 也明显高于转基因阴性鼠 0.732 ± 0.523 ($n = 6$) ($P < 0.05$), 阳性鼠增加的血浆肾素活性是来源于人肾素的转基因表达; 但阳性鼠心、肾组织肾素活性 (分别为 0.623 ± 0.365 , $n = 7$; 1.020 ± 0.709 , $n = 7$) 与对照鼠结果 (分别为 0.682 ± 0.439 , $n = 8$; 1.306 ± 0.507 , $n = 8$) 相近, 二者无统计学差异.

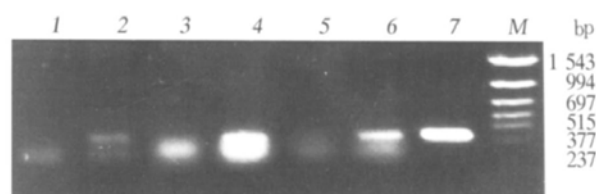


Fig. 3 The expression analysis of human renin gene in the lung, kidney, and heart of transgenic mice

1, 2: lung; 3, 4: kidney; 5, 6: heart (1, 3, 5: transgenic negative mice; 2, 4, 6: transgenic positive mice respectively); 7: recombinant pSKCMV-RNM plasmid (containing human full length renin cDNA fragment) as positive control; M: molecular mass markers.

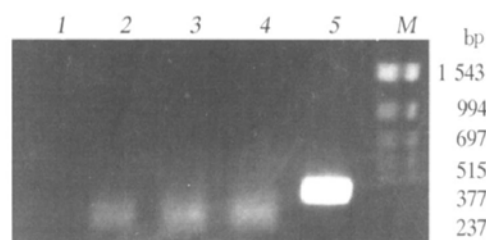


Fig. 4 The expression analysis of human renin gene in the liver and skeletal muscle of transgenic mice

1, 2: liver; 3, 4: skeletal muscle (1, 3: control mice; 2, 4: transgenic mice respectively); 5: positive control (recombinant pSKCMV-RNM plasmid); M: molecular mass markers.

3 讨 论

显微注射法对外源基因的纯度要求较高, 和氯化铯超速离心制备法相比, 本文用玻璃粉试剂盒纯化的显微注射用的人肾素基因不仅纯度高, 且操作简单, 不需特殊设备. 本文中受精卵经注射后, 卵的存活率约为 75.8%. 提高注射卵的存活率要注意注射针口径要合适, 太细易堵针, 太粗则卵的存活率太低. 尽可能缩短操作时间, 注入 DNA 量不宜太多, 以原核扩大为注射前的 2 倍为宜. 转基因的效率是转基因工作者主要关心的问题. 近年来转基因效率有明显提高, 但许多实验室仍很低, 还存在重复性差等困难^[6]. 本文同时用两种方法进行整合检测, 证明已成功地建立了转人肾素基因小鼠并稳定传代, 现已转交保种, 提供科研服务. 转基

因整合率 7.7% , 有效率 0.3% , 还有待提高. 此外, 在 DIG DNA 印迹整合检测中, 转基因出现了额外增加的杂交信号 (8 kb), 有可能转基因在完全整合时, 还同时伴有部分整合 (缺失整合), 该现象虽与前文报道的 MLC₂ 糜酶转基因小鼠中证实的缺失整合现象相似^[7], 但它不影响转基因的转录表达, 其详细机制有待进一步研究.

RT-PCR 显示转基因在小鼠肾、心、肺中有转录表达, 而在肝、骨骼中则未检测到, 说明我们通过用生殖系转基因技术证实了小鼠肾、心、肺中存在局部 RAS, 而在肝、骨骼肌则肾素基因含量极低或不存在, 提示肾素基因以组织特异性分布, 参与组织重塑和多种生理功能^[8,9]. 此外, 转基因在小鼠的循环 RAS 中血浆肾素活性升高, 而组织肾素活性无变化, 提示人肾素作为 RAS 的限速因子在调节体内功能时, 更多是通过循环 RAS 介导.

参 考 文 献

- Endo Mochizuki Y, Mochizuki N, Sawa H, *et al.* Expression of renin and angiotensin converting enzyme in human hearts. *Heart Vessels*, 1995, **10** (6): 285~ 293
- Hogan B, Costantini F, Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryo. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor, 1986. 80 ~ 206
- Laird P W, Zijderfeld A, Linders K, *et al.* Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**: 4293
- Sambrook J, Russell F W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 6.33~ 6.46
- Fukamizu A, Takimoto E, Sugimura K, *et al.* Dependence of angiotensin production in transgenic mice carrying either the human renin or human angiotensinogen genes on species-specific kinetics of the renin-angiotensin system. *Arzneimittelforschung*, 1993, **43**: 222~ 225
- 田小利, 陈兰英. 转基因动物研究中存在的问题. *生物工程进展*, 1995, **15** (5): 41~ 45
- Tian X L, Chen L Y. *Prog Biotech*, 1995, **15** (5): 41~ 45
- Li P, Chen L Y. Function of chymase in the heart angiotensin II formation in transgenic mice. *Chin Sci Bull*, 2001, **46** (11): 922~ 925
- Leung P S, Carlsson P O. Tissue renin-angiotensin system: its expression, localization, regulation and potential role in the pancreas. *J Mol Endocrinol*, 2001, **26** (3): 155~ 164
- Prescott G, Silversides D W, Chiu S M, *et al.* Contribution of circulating renin to local synthesis of angiotensin peptides in the heart. *Physiol Genomics*, 2000, **94** (1): 67~ 73

1 Endo Mochizuki Y, Mochizuki N, Sawa H, *et al.* Expression of

Studies on Transgenic Mice Harboring The Human Renin Gene^{*}

CHEN Lan-Ying^{**}, JIANG Li-Qun, LIU Jia-Li, SU Xue-Feng, FANG Fu-De¹⁾, CHEN Yong-Fu²⁾

(Cardiovascular Institute, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100037, China)

Abstract In order to determine the function of, *in vivo*, human rennin gene and to establish an animal model for drug inhibitory experiment of human rennin, the transgenic mice were produced via microinjection method by which the mice fertilized ova were injected with the purified human rennin gene. Assay of transgene integration was determined by DIG DNA blotting hybridization and PCR analysis. One mouse among 13 survived mice was the positive transgenic mouse. Integration efficiency was 7.7%. Overall efficiency was 0.3%. Transgene was steadily transferred from generation to generation. The human rennin transgene was found, by RT-PCR, to be expressed in the heart, kidney, and lung of transgenic mice, but not in the liver or skeletal muscle. The mean levels of rennin activity in the plasma of the transgenic mice was also found to be significantly higher than that of the control mice. However, no significant differences were seen in the mean levels of rennin activities in the kidney and heart between transgenic and control mice. These transgenic mice will provide the opportunity to investigate the rennin gene function in circulation (or tissue) rennin angiotensin system, and may, provide an experimental model for testing human rennin inhibitors as drugs.

Key words human renin, transgenic mice, RT-PCR, DIG, DNA blot, microinjection

^{*} This work was supported by grants from the National 8th Five Years Plan Special Research Programs of China (85-915-03-11) and the Special Funds for Major State Basic Research of China (973) (G2000 056904).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-68314466-8068, E-mail: lanyingchen@hotmail.com

¹⁾ Institute of Basic Medical Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China.

²⁾ National Laboratory for Agribiotechnology, China Agriculture University, Beijing 100094, China.

Received: September 13, 2001 Accepted: October 21, 2001