



# GFP 在绿色荧光裸鼠不同组织中的表达及分析

尤金炜,董敏,刘彪,梁磊,田迎,胡文娟,田小芸,方天,  
周森妹,赵志刚,恽时锋

(南京军区南京总医院比较医学科,全军实验动物科普与伦理教育基地,  
全国科普教育基地,南京 210002)

**【摘要】** 目的 研究外源绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,简称 GFP)基因在 BALB/c 绿色荧光裸鼠主要器官组织中的表达及其差异。方法 小动物成像系统和 RT-PCR 方法检测 GFP 的组织分布以及荧光表达水平情况。结果 经活体荧光影像系统观察及 PCR 方法检测发现 GFP 可以在裸鼠多个器官组织中表达,其中在胰腺、心脏、全脑、皮肤、睾丸中表达量较高。结论 外源绿色荧光蛋白可以在模型动物体内成功表达且稳定遗传,其中在胰腺组织中高表达。

**【关键词】** 绿色荧光蛋白;裸鼠;组织分布

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 05-0067-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.05.015

## Distribution of green fluorescent protein (GFP) expression in green fluorescent nude mice

YOU Jin-wei, DONG Min, LIU Biao, LIANG Lei, TIAN Ying, HU Wen-juan, TIAN Xiao-yun,  
FANG Tian, ZHOU Sen-mei, ZHAO Zhi-gang, YUN Shi-feng

(Department of Comparative Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Army Education Base of Science and Ethics of Experimental Animals, National Science Education Base, Nanjing 210002, China)

**【Abstract】 Objective** To study whether the green fluorescent protein (GFP) gene can be successfully expressed in green fluorescent nude mice and the tissue distribution characteristics. **Methods** Small animal imaging system and RT-PCR assay were used to detect the GFP tissue distribution and fluorescence expression level. **Results** The GFP can be expressed in multiple tissues in green fluorescent nude mice. A higher expression was observed in the pancreas, heart, brain, and skin. **Conclusion** Exogenous GFP can be stably expressed and inherited in green fluorescent nude mice, with the highest expression in the pancreas.

**【Key words】** Green fluorescent protein (GFP); Nude mice; Tissue distribution

近年来,无胸腺裸鼠作为新的动物模型,活跃于免疫学、肿瘤学、毒理学等各领域的研究工作中,尤其在免疫生物学、免疫病理学、移植免疫、肿瘤免疫、病毒和细菌免疫等领域,在短短的几年中,就展开了一系列富有成效的新的研究,推动了各方面的工作,为实验免疫学、实验肿瘤学提供了新的工具<sup>[1-3]</sup>。而来源于水母(Aequorea victoria)的绿色荧光蛋白,

它无需作用底物或共作用物,在荧光激发下可以直接发光,性质稳定,现已成为细胞生物学和分子生物学中应用最广泛的分子标记之一<sup>[4-5]</sup>。

1980年,Gordon等<sup>[6]</sup>用显微注射转基因方法获得了2只转基因小鼠。1995年,Ikawa等<sup>[7]</sup>采用绿色荧光蛋白报告基因,成功建立了绿色荧光蛋白转基因小鼠。2007年,冯娟等<sup>[8]</sup>建立了红色荧光和绿

**【基金项目】** 南京军区南京总医院课题(2012052)。

**【作者简介】** 尤金炜(1983-),男,硕士,南京军区南京总医院比较医学科技师。

**【通讯作者】** 恽时锋(1965-),男,主任技师,教授,博士生导师,从事医学实验动物学工作。

色荧光转基因小鼠模型。2013 年,王贵利等<sup>[9]</sup>建立绿色荧光转基因大鼠,2013 年,本科室张立波等<sup>[10]</sup>建立了绿色荧光转基因裸鼠。

本实验针对这种动物模型,观察外源绿色荧光蛋白基因能否在裸鼠体内成功表达,并探讨荧光蛋白在该模型组织中的分布特点。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

选取 49 及 70 日龄 GFP 转基因雄裸鼠各 6 只,由本单位选育【SCXK(军)2012-0014】,在本实验室无特定病原体(specific-pathogen free, SPF)的饲养间饲养【SYXK(军)2012-0047】。

### 1.2 仪器与试剂

主要仪器:IVIS Lumina XR 型小动物成像系统(美国)、荧光定量 PCR 仪、Allegra 21R 台式高速冷冻离心机、AR5120 电子天平、MultiTemp III 恒温水浴锅、Hofer MV-25 紫外透射仪、雪花状制冰机、移液器、超净工作台。

主要试剂与耗材:TRIzol reagent、RNase inhibitor、Dnase I、RT mix、qPCR master mix、DEPC、SDS、agarose、毛细管、离心管、枪头、PCR 反应管、三溴乙醇。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 荧光裸鼠 GFP 表达情况

6 只鼠以 0.18 mL/10 g 剂量腹腔注射三溴乙醇,麻醉后进行整体荧光成像,大体解剖后,取胰腺、心脏、皮肤、全脑等主要组织器官进行荧光成像。

#### 1.3.2 引物设计及合成

根据 GenBank 公布的 GFP mRNA 序列(L29345.1)设计引物,引物序列、扩增子长度见表 1。

#### 1.3.3 RNA 提取及反转录

6 只雄鼠解剖后,取胰腺、心脏、全脑、皮肤、睾丸、肠道、肺脏、肾脏、肝脏、脾脏等组织,TRIzol 法提取样品总 RNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反转录反应条件的设置:25℃ 10 min,42℃ 50 min,

表 1 目的基因及内参基因的引物序列

Tab.1 Primer sequences of the target and internal reference genes

基因 Genes	引物序列(5'→3') Primer sequence		扩增/bp Amplicon
	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	
GFP	ACCTGTCACACAATCTGCC	CCATGTGTAATCCCAGCAGC	97
β-actin	ATGTGGATCAGCAAGCAGGA	AAGGGTGTA AAAACGCAGCTCA	99

85℃ 5 min。

#### 1.3.4 实时荧光定量 PCR

将 cDNA 作为实时荧光定量 PCR 的反应模板,每个组织均作复孔以减少误差,以 β-actin 为内参基因作为对照。

扩增条件为,扩增曲线:94℃ 5 min;94℃ 20 s,55℃ 30 s,循环 40 次,55℃ 单点检测信号。溶解曲线:95℃ 15 s,60℃ 15 s,95℃ 15 s,连续检测信号。

#### 1.3.5 实时荧光定量 PCR 数据分析

通过实时荧光定量 PCR 的方法,采用 SYBR green 染料法,以 β-actin 为内参基因,以 49 d 裸鼠胰腺组织作为对照组, $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  法对主要脏器组织中的 GFP 相对表达量进行计算。倍数差异 =  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ,使用 SPSS 13.0 统计软件,采用 *t* 检验对数据进行差异显著性检验,统计结果以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

## 2 结果

### 2.1 绿色荧光裸鼠的荧光表达情况

绿色荧光裸鼠在自然光线下,耳廓呈黄绿色,皮肤薄呈绿色或黄绿色,大体解剖后,荧光裸鼠有先天性胸腺发育不良(图 1,彩插 11)。部分组织器官呈绿色,尤其是皮肤、胰腺更明显(图 2,见彩插 11)。

小动物成像系统观察,荧光裸鼠全身的发明显的绿色荧光(见图 2)。解剖后收集包括胰腺、心脏、皮肤、全脑、睾丸、肠道、肺脏、肾脏、脾脏、肝脏等主要器官,活体荧光成像下均发出了明显的绿色荧光(图 3,见彩插 12)。

### 2.2 SYBR 实时荧光定量 PCR 结果

GFP 在不同周龄绿色荧光裸鼠的胰腺、心脏、皮肤等主要器官中均检测到表达,其中在胰腺中相对表达量最高,其次是心脏、皮肤、全脑、睾丸,而在肠道、肺脏、肾脏、脾脏、肝脏中的相对表达量较低。49 与 70 日龄相比,仅胰腺和肺脏差异有显著性( $P < 0.05$ ),其他组间之间 GFP 的表达量差异无显著性。见表 2。

以 70 日龄绿色荧光裸鼠为例, 检验 GFP 在各组织间的表达差异, 经多重比较 Duncan 法检验结果可知, 差异不显著的有: 全脑与睾丸; 脾脏与肝脏; 肠道、肺脏、肾脏三者之间。差异显著的有肠道与脾脏、肠道与肝脏。其他组合均为差异极显著。见表 3。

表 2 GFP 在绿色荧光裸鼠的组织间的相对表达量

Tab. 2 GFP relative expression among tissues in the green fluorescent nude mice

组织 Tissues	49 d 49-day old	70 d 70-day old
胰腺 Pancreas	1	0.9299 ± 0.0297 *
心脏 Heart	0.4560 ± 0.0381	0.4100 ± 0.0237
皮肤 Skin	0.2397 ± 0.0158	0.2447 ± 0.0121
全脑 Whole brain	0.1406 ± 0.0022	0.1347 ± 0.0065
睾丸 Testis	0.1181 ± 0.0142	0.1343 ± 0.0057
肠道 Intestine	0.0553 ± 0.0110	0.0380 ± 0.0045
肺脏 Lung	0.0272 ± 0.0009	0.0176 ± 0.0043 *
肾脏 kidney	0.0269 ± 0.0071	0.0153 ± 0.0049
脾脏 spleen	0.0131 ± 0.0022	0.0134 ± 0.0045
肝脏 Liver	0.0077 ± 0.0009	0.0096 ± 0.0022

注: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  差异有显著性。

Note \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  mean significant differences.

表 3 GFP 在绿色荧光裸鼠的组织间的表达差异 (70 d)

Tab. 3 GFP differential expression between the two groups (70 days)

组织 Tissues	GFP 相对表达量 Relative transcript level	$P = 0.05$	$P = 0.01$
胰腺 Pancreas	0.9299 ± 0.0297	a	A
心脏 Heart	0.4100 ± 0.0237	b	B
皮肤 Skin	0.2447 ± 0.0121	c	C
全脑 Whole brain	0.1347 ± 0.0065	d	D
睾丸 Testis	0.1343 ± 0.0057	d	D
肠道 Intestine	0.0380 ± 0.0045	e	E
肺脏 Lung	0.0176 ± 0.0043	ef	E
肾脏 Kidney	0.0153 ± 0.0049	ef	E
脾脏 Spleen	0.0134 ± 0.0045	f	E
肝脏 Liver	0.0096 ± 0.0022	f	E

注: 同列内相同字母表示在相应的水平上差异不显著。字母大写表示极显著水平, 小写表示显著水平。

Note. The same letters in the same row mean non-significant differences. Capital letters mean extremely significant differences. Small letters mean significant differences.

### 3 讨论

绿色荧光蛋白具有荧光稳定、易于检测、生物安全性好等优点, 广泛应用于生物学及基因研究等领域。本实验室培育的绿色荧光裸鼠, 可实现裸鼠全身各个组织器官表达绿色荧光蛋白, 尤其是在胰腺中表达量较高, 这与冯娟等<sup>[8]</sup>报道的绿色荧光转基

因小鼠及闫寒<sup>[11]</sup>等报道的绿色荧光裸鼠所得出的结果是一致的。

对该模型的大体解剖可见: 胸腺缺失; 胰腺、皮肤呈现肉眼可见的绿色。在活体荧光成像中, 由于没有毛发的遮掩, 清晰可见全身发出明亮的绿色。同时, 器官的荧光成像表明, 绿色荧光蛋白在该模型的全身各个主要器官如胰腺、心脏、皮肤、全脑、睾丸等均可以稳定表达。

GFP 作为荧光报告基因广泛运用于荧光标记技术中, 利用活体动物成像系统, 研究人员能够直接监控活体动物内肿瘤的生长、转移以及特定基因的表达过程等, 而带荧光标记的裸鼠能更好地模拟及观察肿瘤侵袭与转移的微环境。

实验动物的遗传背景、生理指标、生物学特性以及品系个体差异都是影响动物实验结果的重要因素<sup>[12]</sup>。本实验室对此动物模型的繁殖情况、脏器系数、生理生化等已经有了初步的研究<sup>[10, 13-14]</sup>。国内的闫寒等<sup>[11]</sup>也对此模型有比较深入的研究。但是对荧光蛋白在裸鼠组织中的分布特点均未见深入的研究报道, 为此, 本实验采用实时荧光定量 PCR 检测了荧光蛋白在主要器官组织中的变化, 为深入研究荧光裸鼠在肿瘤学等方面的研究提供一些参考。

根据统计学分析处理的结果, GFP 在不同日龄裸鼠的主要器官中均检测到表达, 其中在胰腺中相对表达量最高。49 与 70 日龄的比较, 仅胰腺和肺脏差异显著, 其他组之间 GFP 的表达量差异无显著性意义。而 GFP 在同日龄裸鼠的组织间的表达差异性较大, 以 70 d 绿色荧光裸鼠为例, 经多重比较 Duncan 法检验结果可知, 仅全脑与睾丸之间; 脾脏与肝脏之间; 肠道、肺脏、肾脏三者之间差异不显著。差异显著的有肠道与脾脏、肠道与肝脏之间。其他组合均为差异极显著。GFP 在各种组织中表达量的差异, 这也就为我们在研究中选择疾病模型及移植供体提供了依据。

本研究还发现 GFP 在不同日龄裸鼠的胰腺中均有高表达, 随日龄增长荧光表达量差异不显著, GFP 的高表达对脏器有无显著毒副作用, 本实验室方天等<sup>[15]</sup>报道了外源 GFP 基因会对脾脏形态及功能产生一定的影响。关于外源导入基因对其他脏器特别是高表达的胰腺是否有影响, 以及如何影响脏器形态及其功能的机制尚需进一步研究。

(本文图 1, 2 见彩插 11, 图 3 见彩插 12。)

#### 参 考 文 献

[1] Hadjantonakis AK, Nagy A. The color of mice: in the light of

- GFP-variant reporters [J]. *Histochem Cell Biol*, 2001, 115(1): 49–58.
- [2] Amoh Y, Yang M, Li LN, et al. Nestin-linked green fluorescent protein transgenic nude mouse for imaging human tumor angiogenesis [J]. *Res Article*, 2005, 65(12):5352–5357.
- [3] Miretti S, Roato I, Taulli R, et al. A mouse model of pulmonary metastasis from spontaneous osteosarcoma monitored in vivo by luciferase imaging [J]. *Plos ONE*, 2008, 3(3):1–8.
- [4] Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin bioluminescent protein from the luminous hydromedusa *Aequorea* [J]. *Cell Comp Physiol*, 1962, 59:223–227.
- [5] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. *Science*, 1994, 263:802–805.
- [6] Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980, 77(12):7380–7384.
- [7] Ikawa M, Kominami K, Yoshimura Y, et al. A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP) [J]. *FEBS Lett*, 1995, 375(1–2):125–128.
- [8] 冯娟, 高蓓, 全雄志, 等. 红色荧光和绿色荧光转基因小鼠模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(4):267–270.
- [9] 王贵利, 白琳, 陈炜, 等. 绿色荧光转基因大鼠模型的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(1):5–9.
- [10] 张立波, 刘彪, 田小芸, 等. 绿色荧光裸小鼠的选育初报 [J]. *实验动物与比较医学*, 2013, 33(4):306–309.
- [11] 闫寒, 贺晓玉, 秦超, 等. 绿色荧光裸鼠的建立和验证 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(6):62–64.
- [12] 恽时锋, 朱虹. 在生命科学中影响动物实验结果的多因素分析 [J]. *医学研究生学报*, 2003, 16(5):372–375, 378.
- [13] 尤金炜, 张立波, 方天, 等. 绿色荧光裸鼠血液生理生化指标检测分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(9):23–26.
- [14] 尤金炜, 张立波, 方天, 等. 绿色荧光裸小鼠主要脏器重量及脏器系数测定与比较 [J]. *实验动物与比较医学*, 2014, 34(1):62–64.
- [15] 方天, 尤金炜, 张立波, 等. GFP 转基因裸鼠脾脏组织学观察 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(11):6–9.

[收稿日期] 2014-05-07

## (上接第 52 页)

- [3] Hunt JF, Wang C, Ford RC. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ABCC7) structure [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3(2):a009514. doi: 10.1101/cshperspect.a009514. Review.
- [4] Hwang TC, Kirk KL. The CFTR ion channel: gating, regulation, and anion permeation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3(1):a009498. doi:10.1101/cshperspect.a009498.
- [5] 巩雪芳, 卢文菊, 钟南山. 囊性纤维化跨膜传导调节体在气道炎症反应中的抗炎作用 [J]. *中华医学杂志*. 2011, 91(48):3449–3453.
- [6] Sun X, Sui H, Fisher JT, et al. Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120:3149–3160.
- [7] Meyerholz DK, Stoltz DA, Pezzulo AA, et al. Pathology of gastrointestinal organs in a porcine model of cystic fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2010, 176:1377–1389.
- [8] Zhang W, Fujii N, Naren AP. Recent advances and new perspectives in targeting CFTR for therapy of cystic fibrosis and enterotoxin-induced secretory diarrheas [J]. *Future Med Chem*. 2012; 4(3):329–345.
- [9] 张小飞, 张召军, 张广州, 等. 产肠毒素大肠杆菌快速检测方法的建立和评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(5):31–39.
- [10] 陈超, 郑成中. 致病性大肠杆菌胃肠感染小鼠模型血浆 Th1、Th2、Th17 淋巴细胞因子变化及意义 [J]. *中国医药导报*, 2013, 10(19):37–39.
- [11] 李嘉琦, 刘晓, 熊新宇, 等. 轮状病毒感染成年小鼠的研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2004, 12(4):239–243.
- [12] Thiagarajah JR, Ko EA, Tradtrantip L, et al. Discovery and development of antisecretory drugs for treating diarrheal diseases [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014, 12(2):204–209.
- [13] Thiagarajah JR, Verkman AS. CFTR inhibitors for treating diarrheal disease [J]. *Clin Pharmacol Ther*. 2012, 92(3):287–290.
- [14] Marchelletta RR, Gareau MG, McCole DF, et al. Altered expression and localization of ion transporters contribute to diarrhea in mice with *Salmonella*-induced enteritis [J]. *Gastroenterology*. 2013, 145(6):1358–1368. e1–4.
- [15] Rogers AC, Huetter L, Hoekstra N, et al. Activation of AMPK inhibits cholera toxin stimulated chloride secretion in human and murine intestine [J]. *PLoS One*. 2013, 8(7):e69050.
- [16] Sandle GI, Rajendran VM. Cyclic AMP-induced  $K^+$  secretion occurs independently of  $Cl^-$  secretion in rat distal colon [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012, 303(3):C328–333.

[收稿日期] 2014-04-09