



雄性生殖细胞特异性表达绿色荧光蛋白小鼠的繁殖及其表型鉴定

王志茹^{1,2}, 李 军², 刘晓梅¹, 吴红联², 朱德生²

(1. 吉林大学公共卫生学院, 长春 130021; 2. 北京大学实验动物中心, 北京 100871)

【摘要】 目的 繁殖雄性生殖细胞特异性表达绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 小鼠, 为进行小鼠生殖系统毒性研究提供有效的工具。方法 将 Ddx4 - cre 转基因雄鼠与 Rosa26mT/mG 转基因雌鼠交配, 产生子代动物, 利用分子生物学、组织病理学及活体成像等技术, 分别从分子、细胞和组织水平对子代及其亲代小鼠进行表型鉴定。结果 PCR 结果表明在子代小鼠的睾丸组织中发生了 Cre 酶介导的特异性基因重组; 活体成像可以看到在 F1 代小鼠的睾丸组织中具有 GFP 的表达; 睾丸冰冻切片及精子荧光观察显示 GFP 主要表达于次级精母细胞、精子细胞和精子中。结论 雄性生殖细胞特异性表达 GFP 小鼠繁殖成功。

【关键词】 睾丸; 特异性; 基因重组; 绿色荧光蛋白

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0029-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.007

Production and phenotype identification of specific expressed green fluorescent protein in male mice germ cells

WANG Zhi-ru^{1,2}, LI Jun², LIU Xiao-mei¹, WU Hong-lian², ZHU De-sheng²

(1. School of public health, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Peking University Laboratory animal centre, Beijing 100871, China)

【Abstract】 **Objective** The aim of this study is production of organ specific animal model for studying reproductive toxicity in mice. **Methods** F1 generation was gotten by mating the Ddx4 - cre transgenic male mice with the Rosa26mT/mG transgenic female mice. F1 offspring and its parents phenotype was screened by molecular biological, histopathological and in vivo imaging technology. **Results** At molecular level, specific DNA fragment was only found in testis of F1 offspring; At the organ level, the expression of green fluorescent protein could only be observed in testis of F1 offspring; Testicular frozen sections and sperm fluorescence observation showed that green fluorescent protein were mainly expressed in the germ cell lineage such as secondary spermatocyte and spermatocyte and spermatozoon. **Conclusions** The production of the mice with specific germ cell expressed green fluorescent protein by Cre/loxP recombination system were built successfully.

【Key words】 Testis; Specificity; Gene recombination; Green fluorescent protein

生殖系统的改变是造成不孕不育的重要原因, 如何简易快速的检测生殖系统的损伤是目前研究的一个热点。在绝大多数物种中, Ddx4 基因特异性表达于生殖细胞中^[1], 常被用作分子标记研究配子

发生和原始生殖细胞的起源、迁移、分化等方面。雄性生殖细胞的 DDX4 蛋白表达, 从 12.5dpc 生殖嵴一直持续到减数分裂后的精子细胞^[2]。本研究利用生殖系统特异性启动子 Ddx4 启动的 Cre 酶, 通

[作者简介] 王志茹(1988 -), 女, 硕士生, 研究方向: 纳米毒理学, Email: 843872569@qq.com。

[通讯作者] 朱德生(1960 -), 男, 高级工程师, 研究方向: 转基因动物, Email: deshengz@pku.edu.cn。

过 Cre/loxP 位点特异性重组系统^[3]产生雄性生殖细胞特异性表达 GFP 小鼠模型,为后续进行雄性小鼠生殖系统发育和毒性研究提供理想的动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 B6. FVB-Tg(Ddx4 - cre)1Dcas/JnjuDdx4 - cre 小鼠(以下简称为 Ddx4 - cre 小鼠)4 只,雌雄各半,雄性为杂合子(T/W),雌性为纯合子(T/T); SPF 级 B6.129 (Cg) - Gt (ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato, - GFP)Luo} 小鼠(以下简称 Rosa26mT/mG 小鼠)4 只,雌雄各半,均为纯合子(mut/mut)。小鼠周龄 4~8 周,均购自南京大学南京生物医药研究院【SCXK(苏)2010-0001】。饲养于北京大学实验动物中心【SYXK(京)2011-0003】。饲养条件符合 SPF 级实验动物的饲养标准。

Ddx4 - cre 小鼠在 Ddx4 启动子调控下在生殖系统中特异性表达 Cre 酶的转基因小鼠^[4]。

Rosa26mT/mG 小鼠是全身组织器官表达红色荧光蛋白的转基因小鼠,当其与 Cre 转基因小鼠交配产生的后代将发生 Cre 酶介导的特异性基因重组,将敲除 mT 基因,从而激活 mG 基因的表达,产生绿色荧光蛋白(彩插 10 图 1)^[5]。

1.2 动物交配

Ddx4 - cre 小鼠 4 只,雌雄各半,雄性为杂合子,雌性为纯合子,1:1 交配,扩大种群。

Rosa26 小鼠 4 只,雌雄各半,均为纯合子,1:1 交配,扩大种群。

Ddx4 - cre 小鼠 6 只,雄性,杂合子(T/W);与 Rosa26 小鼠 6 只,雌性,纯合子(mut/mut);1:1 交配,获得 F1 代雄性小鼠,其基因型可分为两种 Ddx4 - cre(T/W);Rosa26mT/mG(mut/wt)与 Ddx4 - cre(W/W);Rosa26mT/mG(mut/wt)。而在表达 Cre 酶的组织,会产生 Cre 酶诱导的基因重组,切除 mT 基因。通过交配产生子代可能的基因型和表型(图 2)。

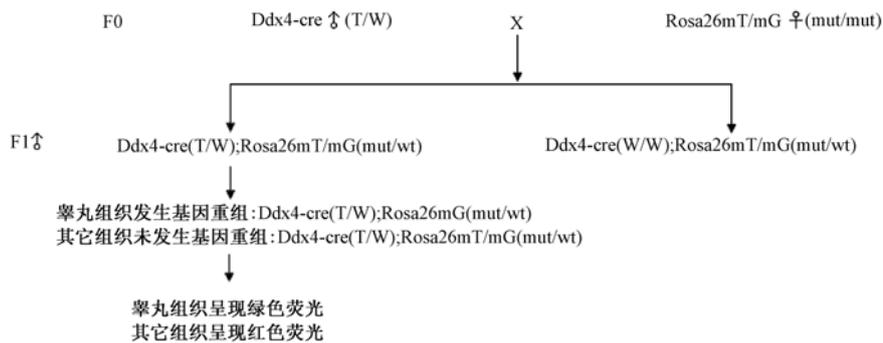


图 2 Ddx4-cre ♂ 小鼠与 Rosa26mT/mG ♀ 小鼠交配可能产生的子代的基因型和表型

Fig. 2 Genotype and phenotype of offspring by mating the Ddx4-cre male mice with the Rosa26mT/mG female mice

1.3 双阳性 F1 代雄性小鼠的筛查

利用 PCR 的方法,对母代和子代雄性小鼠进行基因型鉴定。提取鼠尾 DNA,PCR 扩增检测 Ddx4 - cre 基因和 Rosa26mT/mG 基因,确定小鼠基因型,筛选基因型为 Ddx4 - cre (T/W); Rosa26mT/mG

(mut /wt) 的子代小鼠,为双阳性 F1 代雄性小鼠。Ddx4 - cre 基因扩增条件为 94℃ 30 s,62℃ 35 s,72℃ 45 s,35 个循环;Rosa26mT/mG 基因扩增条件为 94℃ 30 s,61℃ 1 min,72℃ 1 min,35 个循环。所使用的引物及其意义(表 1)。

表 1 PCR 引物、扩增片段及目的

Tab. 1 PCR primer fragment size and purpose

基因 Genes	F(5' - 3')	R(5' - 3')	扩增片段 Fragment size	目的 Purpose
Ddx4 - cre	CACGTGCAGCCGTTT AAGCCGCGT	TTCCCATTTCTAAACA ACACCCTGAA	240bp(T/W)	确定 F1 雄性小鼠是否携带了其父代的 Ddx4 - cre 基因
Rosa26 mT/mG	TTCCCATTTCTAAAC AACACCCTGAA	①CGAGGCGGATCAC AAGCAATA ②TCAATGGGCGGGGTCGTT	250bp(mut/mut); 300bp(wt/wt)	确定 F1 雄性小鼠是否携带了其母代的 Rosa26mT/mG 基因
mT	AGCTGGACATCACCT CCCACAACG	CGTCGCCGTCCA GCTCGACCAG	1262bp	验证实验鼠的睾丸组织是否发生了 cre 酶介导的基因重组

1.4 动物分组

为了研究通过交配产生的动物的基因型和表型,我们选取三组动物。Ddx4 - cre 小鼠 4 只,雄性,周龄 4 ~ 5 周,为阴性对照鼠;Rosa26mT/mG 小鼠 4 只,雄性,周龄 4 ~ 5 周,为红色荧光蛋白对照鼠;双阳性 F1 代小鼠 4 只,雄性,周龄 4 ~ 5 周为实验鼠。

1.5 DNA 提取

利用浓盐法提取组织 DNA^[6],加入 500 μ L (含 5 μ L 蛋白酶 K) 的组织裂解液放到 52 $^{\circ}$ C 恒温水浴箱中消化过夜,加入 5 mol/L NaCl 250 μ L,混匀,冰浴 10 min。12000 r/min,离心 10 min,吸上清 400 μ L 加入 1 mL 预冷的无水乙醇,12000 r/min 离心 10 min 后去上清,干燥沉淀后加入 60 μ L 去离子水 55 $^{\circ}$ C 溶解 DNA。

1.6 PCR 扩增体系

PCR 反应体系为 20 μ L,包括:10 \times Buffer 2 μ L, 2.5 mmol/LdNTP 1.6 μ L,10 μ m 引物各 0.4 μ L,5U rTaq 酶 0.4 μ L,模板 DNA 1 μ L,去离子水 14.2 μ L。PCR 反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.7 组织 mT 基因扩增

利用 3 组动物的睾丸组织(去除被膜组织)及实验鼠的脑、心、肝、脾、肺、肾、肠,提取 DNA,PCR 扩增检测 mT 基因。引物与目的片段(表 1)。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s,61 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环。

1.8 组织荧光观察

颈椎脱臼法处死小鼠,取出脑、心、肝、脾、肺、肾、肠、睾丸,利用小动物成像仪进行离体组织的荧光观察,红色荧光(激发光 536/40 nm;发射光 590/20 nm);绿色荧光(激发光 425/26 nm;发射光 520/35 nm),曝光时间均为 1 s。

1.9 组织冰冻切片的荧光观察

将固定于 4% 甲醛溶液中的组织,转入 6 ~ 10 mL 30% 蔗糖溶液中沉糖过夜,用 OCT 胶包埋,储存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中,备用。利用冰冻切片机进行组织切片(10 μ m),无水乙醇固定,DAPI 染色,封片,观察。

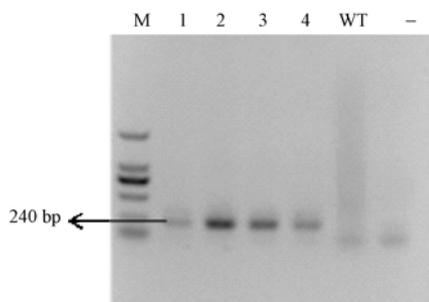
1.10 精子荧光观察

分离附睾置于 1 mL 生理盐水,将附睾横切为若干段,用眼科镊子轻轻挤压附睾组织块,去掉附睾。静止 5 min,荧光显微镜观察精子荧光。

2 结果

2.1 双阳性 F1 代雄性小鼠的筛查

通过 F1 代雄鼠鼠尾 DNA PCR 检测,结果(图 3、图 4)证明 1 - 4 号 F1 代雄性小鼠携带了父代的 Ddx4 - cre 基因和母代的 Rosa26mT/mG 基因。

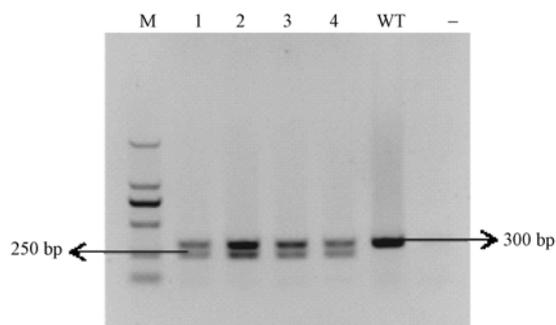


注:M:Marker DL2000;“wt”:野生型。

图 3 Ddx4 - cre 基因 PCR 电泳图

Note:M represents Marker DL2000;“wt” represents wild type.

Fig. 3 PCR electrophoresis of Ddx4-cre



注:M:Marker DL2000;“wt”:野生型。

图 4 Rosa26mT/mG 基因 PCR 电泳图

Note:M represents Marker DL2000;“wt” represents wild type.

Fig. 4 PCR electrophoresis of Rosa26mT/mG

2.2 组织 mT 基因的扩增

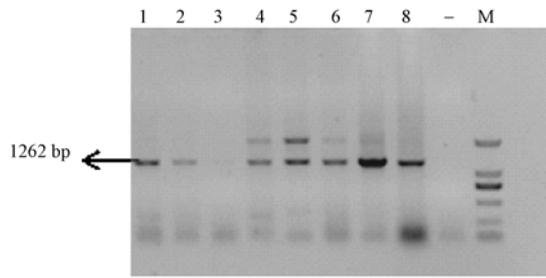
双阳性 F1 小鼠 mT 基因的扩增结果显示只有睾丸组织 DNA 不能扩增出 mT 基因(图 5)。双阳性 F1 代小鼠睾丸组织 mT 基因的扩增结果和其亲代鼠的睾丸组织 DNA 的 PCR 扩增结果见图 6, F1 代小鼠睾丸组织未能扩增出 mT 基因,而其亲代的 Rosa26mT/mG 鼠睾丸组织 DNA 可以扩增出 mT 基因。这表明双阳性 F1 小鼠睾丸组织在基因水平上确实发生了 Cre 酶介导的基因重组。

2.3 整体器官荧光观察

小鼠的离体器官的小动物成像观察,双阳性 F1 代鼠的脑、心、肝、脾、肺、肾、肠、睾丸组织呈现红色荧光,但睾丸组织可观察到绿色荧光而其他组织无绿色荧光(彩插 10 图 7)。

2.4 组织学荧光观察

双阳性 F1 代小鼠和亲代小鼠脑、心、肝、脾、

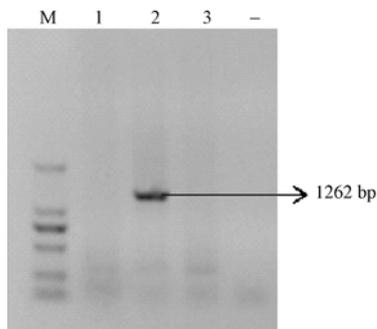


注:1:脑;2:心;3:睾丸;4:肝;5:脾;
6:肺;7:肾;8:肠;M:Marker DL2000。

图 5 F1 子鼠不同组织 mT 基因 PCR 电泳图

Note:1:brain;2:heart;3:testis;4:liver;5:spleen;
6:lung;7:kidney;8:gut;M:Marker DL2000.

Fig. 5 PCR results of mT gene in different tissue in F1 offspring



注:1:F1 睾丸组织 DNA;2:Rosa26mT/mG
鼠睾丸组织 DNA;3:Ddx4-cre 鼠睾丸组织 DNA。

图 6 亲代和子代动物睾丸组织 mT 基因 PCR 电泳图

Note:1: the testis DNA of the F1 mouse;2: the testis DNA of the Rosa26mT/mG mouse;3: the testis DNA of the Ddx4-cre mouse.

Fig. 6 PCR results of testicular tissue mT gene in F1 offspring and its parents

肺、肾、肠、睾丸组织冰冻切片结果观察,发现只有在子代 F1 睾丸组织细胞中具有 GFP 的表达(彩插 11 图 8),GFP 主要表达于生精小管细胞中,且集中于次级精母细胞、精子细胞和精子中。

2.5 精子荧光观察

倒置荧光显微镜观察双阳性 F1 代小鼠精子和 Rosa26mT/mG 鼠精子,结果表明:F1 代子鼠精子具有 GFP 的表达,而其亲代的 Rosa26mT/mG 小鼠的精子呈微弱的红色荧光(彩插 11 图 9)。

3 讨论

荧光蛋白的发现极大地促进了生物学医药科学的研究。目前研究较广泛的荧光蛋白为红色荧光蛋白(RFP)和 GFP,其中 GFP 享有现代生物学北斗星的美誉,其具有荧光稳定、易于检测、表达调控

简单、生物安全性好等优点^[7]。本研究利用 Cre/loxP 位点特异性重组系统制作雄性生殖细胞特异性表达 GFP 小鼠模型,这为我们后续研究雄性小鼠生殖系统功能与毒性等领域提供理想的动物模型。

本实验将 Ddx4-cre 雄鼠与 Rosa26mT/mG 雌鼠交配筛选体内同时具有 Cre 基因与 Rosa26mT/mG 基因的双阳性 F1 代雄性小鼠,对其进行基因型和表型鉴定。mT 基因的扩增结果表明,仅在睾丸组织产生了 mT 基因的切除。而离体器官的荧光观察结果表明 F1 代子鼠的睾丸组织具有 GFP 的表达,组织学荧光观察结果证明 GFP 主要表达于生精小管细胞中,且集中表达于次级精母细胞、精子细胞和精子中。而大量的文献研究表明 DDX4 蛋白在小鼠精原细胞与初级精母细胞均有表达^[8],即精原细胞与初级精母细胞应均具有 Cre 酶的表达而发生特异的基因重组,但在精原细胞与初级精母细胞却未观察到绿色荧光,这可能是由于次级精母细胞、精子细胞和精子中绿色荧光强度太强,在同等条件下掩盖了精原细胞与初级精母细胞的绿色荧光。

参考文献:

- [1] Kakiuchi K, Tsuda A, Goto Y, *et al.* Cell-Surface DEAD-Box Polypeptide 4 - Immunoreactive Cells and Gonocytes Are Two Distinct Populations in Postnatal Porcine Testes [J]. Biol Reprod. 2014;90.
- [2] Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, *et al.* Isolation of a Dead-Family Protein Gene That Encodes a Murine Homolog of Drosophila-Vasa and Its Specific Expression in Germ-Cell Lineage[J]. P Natl Acad Sci USA. 1994;91:12258-62.
- [3] Kage-Nakadai E, Imae R, Suehiro Y, *et al.* A Conditional Knockout Tool kit for Caenorhabditis elegans Based on the Cre/loxP Recombination[J]. Plos One. 2014;9.
- [4] Gallardo T, Shirley L, John GB, *et al.* Generation of a germ cell-specific mouse transgenic Cre line, Vasa-Cre[J]. Genesis. 2007;45:413-7.
- [5] Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, *et al.* A global double-fluorescent cre reporter mouse [J]. Genesis. 2007; 45: 593-605.
- [6] Poh JJ, Gan SKE. Comparison of customized spin-column and salt-precipitation finger-prick blood DNA extraction [J]. Bioscience Rep. 2014;34:629-34.
- [7] 张雨丽,张桂征,苏红梅,等. 绿色荧光蛋白在转基因研究中的应用[J]. 生物技术通报,2010(9):16-19.
- [8] Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, *et al.* Embryonic stem cells can form germ cells in vitro[J]. P Natl Acad Sci USA. 2003; 100:11457-62.