

# BALB/c-HSF1 基因剔除小鼠的引种、 保种与繁殖特性的观察

丁志刚<sup>①</sup> 陈广文<sup>②</sup> 俞远京<sup>①</sup> 肖献忠<sup>②</sup>

(①中南大学湘雅医学院实验动物学部 长沙 410078; ②中南大学湘雅医学院病理生理学教研室 长沙 410078)

**摘要:**对引入的 BALB/c-HSF1 基因剔除小鼠近一年的繁殖、生长发育情况进行了系统观察,并就三种繁殖方式的繁殖鼠交配率、受胎率、分娩率、胎间隔及哺乳期仔鼠成活率进行了比较。结果表明,与野生型(HSF1<sup>+/+</sup>)动物比较,HSF1 的缺乏对动物的繁殖有一定影响;胎间隔与动物的胎次无明显的相关性,而生长曲线与 BALB/c 的生长曲线类似,这种现象可能与 HSF1 基因剔除小鼠有 BALB/c 的血缘有关。

**关键词:** BALB/c-HSF1; 基因剔除; 引种; 保种; 繁殖特性

**中图分类号:** Q95-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)02-34-04

## Observations on Introduced Species Maintenance and Reproduction Characteristic of BALB/c-HSF1 Knock-out Mice

DING Zhi-Gang CHEN Guang-Wen YU Yuan-Jing XIAO Xian-Zhong

(Xianya Medical College, Central South University Changsha 410078, China)

**Abstract:** The reproduction and development condition of BALB/c-HSF1 knock-out mice of introduced has been surveyed systematically about a year. The rates of mating, pregnancy and parturition have been compared about the three gene types of breeding ways [HSF1<sup>+/-</sup> (♀) × HSF1<sup>-/-</sup> (♂), HSF1<sup>+/-</sup> (♀) × HSF1<sup>+/-</sup> (♂), HSF1<sup>+/+</sup> (♀) × HSF1<sup>-/-</sup> (♂)], embryo space as well as survive rate. The results have indicated that there was some effects on reproduction of BALB/c-HSF1 knock-out mice because of the lack of HSF1 gene. However there was no significant correlation about embryo space with the number of embryo to this animal. Its growth curve was similar to BALB/c's and it is original from BALB/c.

**Key words:** BALB/c-HSF1; Knock-out; Introduction of the species; Species maintenance; Reproduction characteristic

1962 年 Rifossa 等发现果蝇唾液腺多线染色体,在环境温度升高时,某些特定部位在 1 分钟内就出现“蓬松”现象,并且这些部位的基因具有转录活性。1974 年 Tiissieres 发现热诱导基因蓬松的活化产物是一组热休克蛋白(HSP),这一现象被称为热休克应答,进一步研究发现它普遍存在于从细菌到高等真核生物的

整个生物界。热休克基因家族被认为是迄今为止的最为保守的遗传系统<sup>[1]</sup>。热休克蛋白基因是靠热休克因子(HSF)进行调控的<sup>[2]</sup>。许多学

第一作者介绍 丁志刚,男,27岁,技师;研究方向:实验动物学。

收稿日期:2000-12-30,修回日期:2001-06-30

者观察到在高等真核生物细胞中有多种 HSF 的存在,各种 HSF 不仅在理化性质上有较大的差别,在细胞中也有不同的功能。

基因剔除是一种经过人为干预达到抑制或灭活目的基因表达的分子生物学技术。通过分析缺失基因动物体内单基因缺陷所产生的表型异常(一些表型消失和一些表型出现)来研究基因调控和功能,建立疾病的动物模型等。本文通过对 HSF1 基因剔除小鼠的引种、保种,并对其繁殖特性进行了观察,现报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 动物** 美国得克萨斯州大学西南医学中心 Ivor J. Benjamin 和肖献忠教授等用 129 小鼠 ES 细胞,按常规的基因剔除技术,将 HSF1 基因剔除掉,将阳性克隆细胞采用显微注射法,注入到 BALB/c 小鼠囊胚内,再移入合适的假孕小鼠体内,产生嵌合体子鼠。经几代观察,证实了其基因剔除特性已稳定地导入到动物生殖细胞内,后代能按孟德尔遗传规律进行遗传,建成了 BALB/c-HSF1 基因剔除小鼠,简称为 HSF1 基因剔除小鼠<sup>[2]</sup>。

**1.2 检疫** 1999 年 8 月,由肖献忠教授从美国随飞机带回 HSF1 小鼠三对。按照国家动物检疫的有关法律和实验动物检疫的具体要求,对其进行了有效的隔离、检疫。其产地的检疫证明符合我国 SPF 小鼠的微生物控制级别。

**1.3 饲养条件** 饲养所用层流架、饲养笼具(配有过滤帽)均由苏州吴县实验动物器材厂制造。室内温度控制在 20~25℃,相对湿度 60%左右,照明 12 h 明亮,12 h 黑暗,换气次数 18 次/h。所用饮水、垫料均经高压灭菌,饲料为自行配制加工的全价颗粒饲料并经<sup>60</sup>Co 照射灭菌,营养成分为:粗蛋白 22.24%,粗纤维 3.35%,粗脂肪 3.83%,钙 0.96%,磷 0.63%。

**1.4 繁殖方式** 由于 HSF1<sup>-/-</sup> 雌鼠妊娠期间,其胚胎在发育过程中易死亡<sup>[2]</sup>,所以只能选取 HSF1<sup>+/-</sup> 或 HSF1<sup>+/+</sup> 雌鼠用于生产,而用于实验的理想动物基因型为 HSF1<sup>-/-</sup>,同时需一定数量的 HSF1<sup>+/+</sup> 动物用于对照。为此目的,主要

采取两种方式进行繁殖:HSF1<sup>+/-</sup> (♀) × HSF1<sup>-/-</sup> (♂)、HSF1<sup>+/-</sup> (♀) × HSF1<sup>+/+</sup> (♂)。少量地采取 HSF1<sup>+/+</sup> (♀) × HSF1<sup>+/-</sup> (♂) 方式进行繁殖。

**1.5 动物观察** 每天上午 8:30 时、下午 4:00 时进入饲养间观察动物进食、进水情况。配种根据脱落的阴道细胞以及阴道栓的存在确认交配成功,并把交配成功日作为妊娠起始日。将妊娠起始日至第一胎出生日的时间记为第一胎胎间隔,第一胎出生日至第二胎出生日的时间记为第二胎胎间隔,依此类推。按常规方法记录并计算出交配率、受胎率、分娩率、仔鼠成活率。

**1.6 动物称重** 分娩当日作为哺乳零日,每天上午 9:30 时称重并计算出 1 周的平均体重值,从哺乳零日测至 4 周龄,记录动物的生长发育情况。

**1.7 基因检测** 每只 HSF1 基因剔除小鼠剪取一个脚趾,先用蛋白酶于 55℃ 恒温下振荡消化过夜,再于 95℃ 下 15 min 灭活蛋白酶后备作 PCR 用。取上清液在含有野生型和基因突变型两对引物的反应体系中作 PCR。首先在 95℃ 变性 3 min,加入 DNA 聚合酶,进入扩展循环:95℃ 1 min、60℃ 1 min、72℃ 1 min,35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳,E. B 染色后在紫外透射仪下观察结果,并用凝胶照相系统拍照。

## 2 结果与讨论

**2.1 基因检测结果** 仅在 300 bp 处出现一条条带的为纯合子(HSF1<sup>-/-</sup>),仅在 500 bp 处出现一条条带的为野生型(HSF1<sup>+/+</sup>),同时在 300 bp、500 bp 处各出现一条条带的为杂合子(HSF1<sup>+/-</sup>)(图 1)。

**2.2 交配率、受胎率、分娩率(表 1)** 共交配处理 22 只雌鼠,有 20 只交配成功,一次交配成功率达 90%;在交配成功的雌鼠中实际妊娠的有 19 只,受胎率为 95%;在受胎的 19 只雌鼠中有 1 只在妊娠过程中流产,其余 18 只都顺利产仔,分娩率达 94.7%。

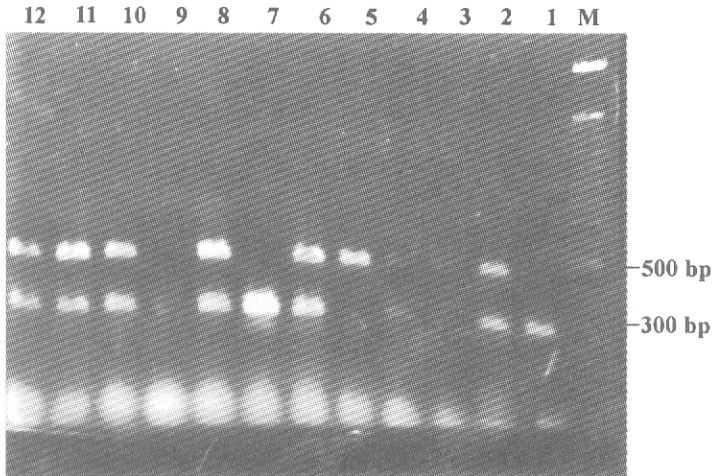


图 1 12 个样品的扩增结果

1、7. 仅在 300 bp 处出现一条条带, 为纯合子(HSF1<sup>-/-</sup>); 2、6、8、10、11、12. 在 300 bp、500 bp 处各出现一条条带, 为杂合子(HSF1<sup>+/-</sup>); 3、4、9. 因样品含量太少, 条带不清; 5. 仅在 500 bp 处出现一条条带, 为野生型(HSF1<sup>+/+</sup>); M. PCR marker

表 1 3 种繁殖方式 HSF1 knockout mice 交配率、受胎率、分娩率比较

繁殖方式	交配率(%)	受胎率(%)	分娩率(%)
HSF1 <sup>+/-</sup> (♀) × HSF1 <sup>-/-</sup> (♂)	83.3(10/12)	90.0(9/10)	88.9(8/9)
HSF1 <sup>+/-</sup> (♀) × HSF1 <sup>+/-</sup> (♂)	100(9/9)	100(9/9)	100(9/9)
HSF1 <sup>+/+</sup> (♀) × HSF1 <sup>+/-</sup> (♂)	100(1/1)	100(1/1)	100(1/1)

### 2.3 胎间隔(表 2)

表 2 8 对 HSF1 knockout mice 繁殖鼠 1~4 胎胎间隔比较

动物号	繁殖方式 ♀ × ♂	胎间隔 (d)				平均值
		第一胎	第二胎	第三胎	第四胎	
01	HSF1 <sup>+/-</sup> × HSF1 <sup>+/-</sup>	42	24	28	63	39 ± 17.61
02	HSF1 <sup>+/-</sup> × HSF1 <sup>+/-</sup>	31	29	24	38	31 ± 5.80
03	HSF1 <sup>+/-</sup> × HSF1 <sup>+/-</sup>	25	64	38	16	36 ± 20.88
04	HSF1 <sup>+/-</sup> × HSF1 <sup>+/-</sup>	26	64	42	25	39 ± 18.24
05	HSF1 <sup>+/-</sup> × HSF1 <sup>-/-</sup>	38	28	37	45	37 ± 6.97
06	HSF1 <sup>+/-</sup> × HSF1 <sup>-/-</sup>	37	40	32	25	34 ± 6.55
07	HSF1 <sup>+/-</sup> × HSF1 <sup>-/-</sup>	42	20	22	44	32 ± 12.75
08	HSF1 <sup>+/-</sup> × HSF1 <sup>-/-</sup>	42	43	47	23	39 ± 10.71
	平均值	35 ± 7.13	39 ± 17.21	34 ± 8.79	35 ± 15.48	35 ± 3.22

### 2.4 哺乳期仔鼠成活率(表 3)

表 3 3 种繁殖方式 HSF1 knockout mice 哺乳期仔鼠成活率比较

繁殖方式	3 日龄成活率(%)	21 日龄成活率(%)
HSF1 <sup>+/-</sup> (♀) × HSF1 <sup>-/-</sup> (♂)	96.0(120/125)	97.5(117/120)
HSF1 <sup>+/-</sup> (♀) × HSF1 <sup>+/-</sup> (♂)	93.5(100/107)	95.0(95/100)
HSF1 <sup>+/+</sup> (♀) × HSF1 <sup>+/-</sup> (♂)	100(11/11)	100(11/11)

## 2.5 生长发育情况(图 2)

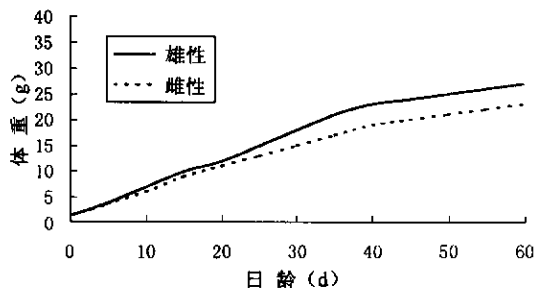


图 2 生长曲线

**2.6 讨论** HSF 在正常生理条件下都有基础水平的表达。热诱导能使 HSF 发生一系列的变化,并最终获得转录的诱导活性。近年来人们陆续在鸡、番茄、小鼠和人等高等真核生物细胞中发现了多种 HSF 的存在。同种细胞中不同的 HSF 不仅在理化性质上有较大的差别,在功能上也不同<sup>[1-3]</sup>。有关研究表明 HSF 基因的缺乏会抑制酵母的正常生长,在哺乳动物细胞的发育和分化过程中,一些与发育有关的基因上也发现了有活性的 HSF。对 HSF1 基因剔除小鼠的繁殖特性初步观察中,发现该种动物的交配率、受胎率和分娩率与 HSF1 基因缺乏的多少似乎有一定的关系。例如:在 HSF1<sup>+/-</sup> (♀) × HSF1<sup>-/-</sup> (♂) 繁殖系统中的交配率、受胎率和分娩率比 HSF1<sup>+/-</sup> (♀) × HSF1<sup>+/-</sup> (♂) 等繁殖系统要低一些,此外,哺乳期仔鼠成活率

也揭示 HSF1 基因数量的减少,或多或少地影响了仔鼠的成活率。这在动物整体水平上提示,HSF1 基因的减少,影响了 HSF1 基因剔除小鼠的繁殖能力,这与在分子水平阐述的 HSF 影响哺乳动物发育、分化的功能是一致的。

HSF1 基因剔除小鼠的胎间隔在 35 d 左右,胎间隔与动物的胎次无明显的相关性,但比文献报道<sup>[4]</sup>的其它品系动物如 C<sub>3</sub>HeB/Felax (28 d)、C<sub>57</sub>BL/6jax (27.7 d) 要长,只比 BALB/cHe 的 33 d 左右略长,而且生长曲线与 BALB/c 的生长曲线类似,这种现象可能与 HSF1 基因剔除小鼠有 BALB/c 的血缘有关。同时,由于这种动物引入的时间较短,许多繁殖特性尚需要积累,这也是今后需进一步观察的。

## 参 考 文 献

- [1] 沈翔珩,方福德主编.真核基因表达调控.北京:高等教育出版社,施普林格出版社,1997. 270~289.
- [2] Xian Z X. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *The EMBO Journal*, 1999, **18**(21): 5 943 ~ 5 952.
- [3] Randy McMillan D, Xian Z X. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes hermotolerance protection against heat-inducible apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273** (13): 7 523 ~ 7 528.
- [4] 田崎嘉雄等著.实验动物的生物学特性资料. TOKYO: SOFT SCIENCE, INC, 1989. 228.