

Tbx18-Cre 基因敲入小鼠的繁殖、鉴定及其应用

张进 刘亚杰 翁敏杰 余强*

重庆医科大学附属第二医院心血管内科 重庆 400010

摘要:为了探讨 *Tbx18-Cre* 基因敲入小鼠(*Tbx18:Cre* knock-in *Mus musculus*)的繁殖、鉴定及 *Tbx18* 基因敲除小鼠和遗传示踪小鼠模型的应用,将 *Tbx18-Cre* 基因敲入杂合子小鼠进行繁殖,应用 PCR 法鉴定其子代基因型。将子代雌雄杂合子小鼠互交,应用 H. E 染色观察 *Tbx18* 基因敲除胚鼠心的形态学变化。将杂合子小鼠与 *Rosa^{EYFP}* 报告小鼠交配,应用心冰冻切片技术观察 *Tbx18:Cre/Rosa26R^{EYFP}* 双转基因遗传示踪胚鼠心内 *Tbx18* 阳性心外膜祖细胞发育命运。结果表明,用于繁殖、基因敲除研究及基因遗传示踪的子代基因型均符合孟德尔遗传规律。同时心 H. E 染色和心冰冻切片发现,*Tbx18* 敲除小鼠心窦房结发育存在缺陷,而 *Tbx18* 阳性心外膜祖细胞是心发育重要的祖细胞来源。研究结果揭示,*Tbx18-Cre* 基因敲除小鼠是研究先天性心脏病发病机制的理想模式动物,*Tbx18* 阳性心外膜祖细胞可能是心脏病患者心脏修复和再生潜在的种子细胞。

关键词:转录因子 *Tbx18*;基因敲入;*Cre* 重组酶基因;聚合酶链式反应(PCR);心发育

中图分类号:Q813 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2012)03-28-07

The Breeding, Genotyping and Application of *Tbx18-Cre* Knock-in Mice

ZHANG Jin LIU Ya-Jie WENG Min-Jie SHE Qiang*

Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

Abstract: To investigate the breeding and genotyping for *Tbx18* knock-out mice (*Tbx18:Cre* knock-in *Mus musculus*) and the application of *Tbx18* knock-out and genetic tracing mice, we introduced into *Tbx18:Cre* knock-in heterozygote mice and breed offspring. The genotyping of the offspring were performed by PCR using genomic DNA. We observed the morphology of knock-out (KO) hearts from male and female heterozygote mice inter-crossed by Hematoxylin and eosin-staining (H. E) analysis. We also observed the fate of *Tbx18*-expressing epicardial cells within *Tbx18:Cre/Rosa26R^{EYFP}* embryos by cryostat sections. The results indicated that the genotyping of heterozygote offspring, *Tbx18* knock-out and *Tbx18:Cre/Rosa26R^{EYFP}* embryos were consistent with Mendel's law of segregation. We also found that there was malformation of the SAN head in *Tbx18* knock-out heart compared with the wild-type. The *Tbx18*-expressing epicardial cells were important cardiac progenitor resource in mouse heart development. These results suggest that *Tbx18* knock-out mice is an ideal model for studying the mechanisms of congenital heart diseases. The *Tbx18*-expressing epicardial cells are candidate cardiac progenitor for cardiac repair and regeneration in heart disease.

Key words: T-box transcription factor *Tbx18*; Gene knock-in; *Cre* recombination enzyme gene; Polymerase chain reaction (PCR); Heart development

基金项目 国家自然科学基金面上项目(No. 30971213),重庆市卫生局重点项目(No. 2009-1-13),2010 重庆医科大学校级重点项目(No. 201010);

* 通讯作者,E-mail: qshe98@ hotmaill. com;

第一作者介绍 张进,男,博士生;研究方向:心脏发育生物学;E-mail: zhangjinxy@ sina. com。

收稿日期:2011-11-25,修回日期:2012-02-29

心的发育过程是一个受到多种基因和信号分子精细调控的复杂过程。*Tbx18* 是近年来发现的较为重要的心发育调控基因^[1],但其具体功能不清楚,要想在整体水平了解 *Tbx18* 基因在心发育中的功能,*Tbx18-Cre* 基因敲入小鼠 (*Tbx18;Cre* knock-in *Mus musculus*) 是最直接最有效的模式动物和研究手段之一。因此,我们从加州大学 Evans 实验室引进 *Tbx18-Cre* 基因敲入杂合子小鼠,繁殖并利用 PCR 法鉴定其子代。在此基础上用其子代和 *Rosa26^{EYFP}* 报告小鼠建立了 *Tbx18* 基因敲除模型及 *Tbx18;Cre/Rosa26R^{EYFP}* 双转基因遗传示踪模型。为今后探索研究先天性心脏病发病机制及未来心脏病患者心脏修复和再生治疗奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 由美国加州大学圣地亚哥分校 Evans 实验室引进 2 只雄性 *Tbx18-Cre* 基因敲入杂合子小鼠^[2],由美国 Jackson 实验室引进 2 只雄性 *Rosa^{EYFP}* 报告小鼠。将 *Tbx18-Cre* 基因敲入小鼠雌雄互交得到 *Tbx18* 基因敲除胚鼠,将 *Tbx18-Cre* 基因敲入小鼠和 *Rosa^{EYFP}* 报告小鼠交配得到 *Tbx18-Cre/Rosa26R^{EYFP}* 双转基因遗传示踪胚鼠。

1.2 小鼠的饲养和繁殖 *Tbx18-Cre* 基因敲入小鼠在重庆医科大学实验动物中心 SPF 级(无特殊病原体)动物房内进行繁殖。室内温度控制在 18~22℃,湿度为 50%~60%,光照/黑暗为 12 h/12 h。小鼠垫料及食物经高温灭菌处理。小鼠达到性成熟后(60 d 左右),采用 1 只雄鼠与 3 只雌鼠合笼的方式进行繁殖。计算胎龄时,当晚 20:00 时将 1 只雄鼠与 3 只雌鼠合笼,次晨 8:00 时检查雌鼠阴栓,有阴栓者记为胚胎 0.5 d。

1.3 小鼠的基因型鉴定

1.3.1 鼠尾基因组 DNA 的提取 剪趾及剪尾操作最好在小鼠出生后 8~12 d 之内完成,一方面出于动物伦理管理规范,另一方面,小鼠的出血较少,提取的基因组 DNA 质量较好。剪取 0.2~0.5 cm 鼠尾(同样适用于脚趾、胚胎组织、卵黄膜等),放入 1.5 ml Eppendorf 管中,加

入 500 μl 组织裂解液(5 mmol/L EDTA pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Tris pH 8.0, 0.2% SDS, 蛋白酶 K 0.4 mg/ml), 55℃ 水浴过夜。基因组 DNA 的提取方案采用高翔教授推荐的酚/氯仿提取法^[3]。

1.3.2 PCR 扩增基因组 DNA

(1) PCR 反应: ①所用引物序列:用 primer primer 5 引物设计软件设计。针对 *Tbx18* 基因靶位点设计引物(上游引物:5'-GGG AGT CAA TAA GTG CAT CAT T-3', 下游引物:5'-TCT TTT GAA GCT GAT GCT GCT-3'),产物大小为 371 bp,用于检测野生型。针对敲入的外源基因 *Cre* 重组酶基因设计引物(上游引物:5'-GCC AGC TAA ATA TGC TTC ATC-3', 下游引物:5'-ATT GCC CCT GTT TAA CTA TCC-3'),产物大小 727 bp,用于检测突变型。鉴定 *Tbx18;Cre/Rosa26R^{EYFP}* 双转基因胚鼠时,用两对引物即 *Cre* 重组酶基因引物(同前面)和 *EYFP* 基因引物(上游引物:5'-GCA CGA CTT CTT CAA GTC CGC CAT GCC-3', 下游引物:5'-GCG GAT CTT GAA GTT CAC CTT GAT GCC-3'),*EYFP* 基因引物扩增产物大小为 315 bp。②PCR 扩增条件:94℃ 3 min; 94℃ 30 s;60℃ 退火 30 s(*Tbx18* 基因引物退火温度为 60℃, *Cre* 重组酶基因引物 62℃, *EYFP* 基因引物 58℃);72℃ 30 s;35 个循环;72℃ 3 min;4℃ 10 min。(2)琼脂糖凝胶电泳鉴定基因型:琼脂糖凝胶上出现 371 bp 单一条带提示该小鼠为野生型,727 bp 单一条带提示该小鼠为 *Cre* 重组酶基因纯合子,371 bp 及 727 bp 条带均出现提示为 *Tbx18* 基因和 *Cre* 重组酶基因的杂合子。315 bp 及 727 bp 条带均出现提示为 *Tbx18;Cre/Rosa26R^{EYFP}* 双转基因小鼠(转 *Cre* 重组酶基因和 *EYFP* 基因)。

1.4 *Tbx18* 基因敲除小鼠大体形态观察及心

H.E 染色 *Tbx18-Cre* 基因敲入小鼠雌雄互交得到 3 种基因型胚鼠:*Tbx18* 基因敲除型、野生型和杂合子。观察同窝基因敲除型胚鼠和野生型胚鼠的大体形态差异,并将这 2 种胚鼠用 4% 多聚甲醛固定,标本石蜡包埋、切片,H.E 染色观察 *Tbx18* 基因敲除对心的形态学影响。

1.5 *Tbx18:Cre/Rosa26R^{EYFP}* 双转基因遗传示踪小鼠冰冻切片 将 *Tbx18:Cre/Rosa26R^{EYFP}* 双转基因遗传示踪胚鼠用 4% 多聚甲醛固定过夜, 弃 4% 多聚甲醛, 用冰 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 15% 蔗糖溶液和 30% 蔗糖溶液脱水各 4 h, 胚鼠沉底后用冰冻切片包埋剂 OCT (optimum cutting temperature compound) 包埋。标本 -80℃ 冰箱保存。胚鼠心行横位冰冻切片, 厚度为 10 μm。

2 结果

2.1 *Tbx18-Cre* 基因敲入杂合子小鼠的繁殖情况 引进的 2 只雄性 *Tbx18-Cre* 基因敲入杂合子小鼠与背景为 C57BL/6J 的野生型雌鼠交配, 杂合子雄鼠成功繁殖出子代幼鼠。用 *Cre* 重组

酶基因引物(图 1A)和 *Tbx18* 基因打靶突变位点设计的引物(图 1B)鉴定杂合子。结果是:266 只子代幼鼠中, 128 只为 *Tbx18-Cre* 基因敲入杂合子小鼠, 138 只为野生型小鼠, 分别占 48.1% 和 51.9%, 子代基因型基本符合孟德尔遗传规律。

2.2 *Tbx18-Cre* 基因敲入杂合子小鼠雌雄互交后基因敲除型胚鼠的鉴定 根据 *Cre* 重组酶基因(图 1A)和 *Tbx18* 基因打靶突变位点(图 1B)设计的引物可鉴别出 *Tbx18* 基因敲除型、野生型和杂合子胚鼠(图 1)。118 只子代胚鼠中, 基因敲除型 29 只, 野生型 30 只, 杂合子 60 只, 分别占 24.6%、25.4% 和 50%, 子代基因型基本符合孟德尔遗传规律。*Tbx18* 基因敲除型和野生型用于平行对照实验。

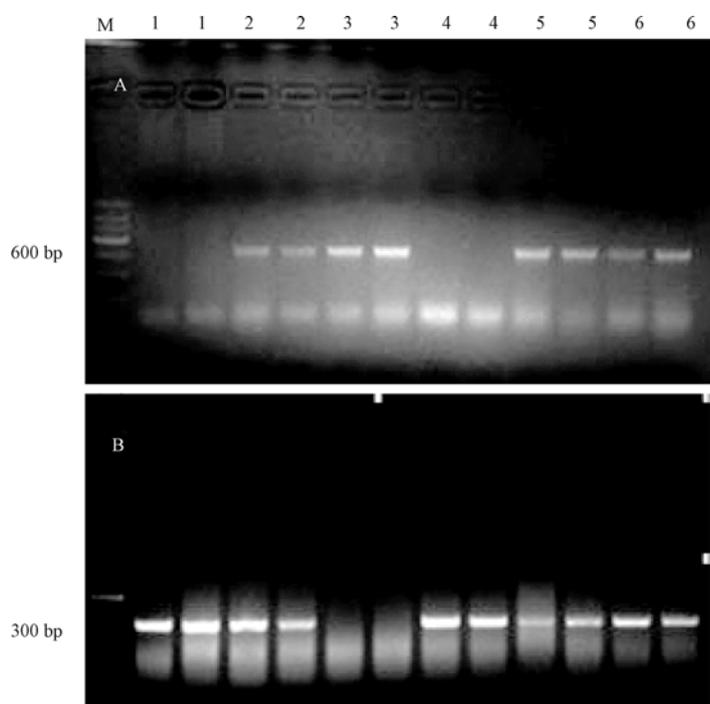


图 1 PCR 法鉴定 *Tbx18* 基因敲除型、野生型及杂合子小鼠(或胚鼠)

Fig. 1 PCR for identification of *Tbx18* knock-out, wild-type and heterozygote mice (embryos)

A 图示 *Cre* 重组酶基因扩增情况; B 图示 *Tbx18* 基因扩增情况。1 和 4 号仅在 371 bp 处有条带, 表示子代为野生型; 3 号仅在 727 bp 处有条带, 表示子代为基因敲除型; 2、5、6 号在 371 bp 和 727 bp 两处均有条带, 表示子代为杂合子。A、B 图中 M 表示 DNA marker。Figure A and B represent the amplification of *Cre* recombination enzyme gene and *Tbx18* gene respective. Only 371 bp fragment could be amplified in lane 1 and 4 that represent wild-type mice (embryos). Only 727 bp fragment could be amplified in lane 3 that represents knock-out mice (embryos). Both 371 bp and 727 bp fragment could be amplified in lane 2, 5, 6 that represent heterozygote mice (embryos). The alphabet M in figure A and figure B represent DNA marker.

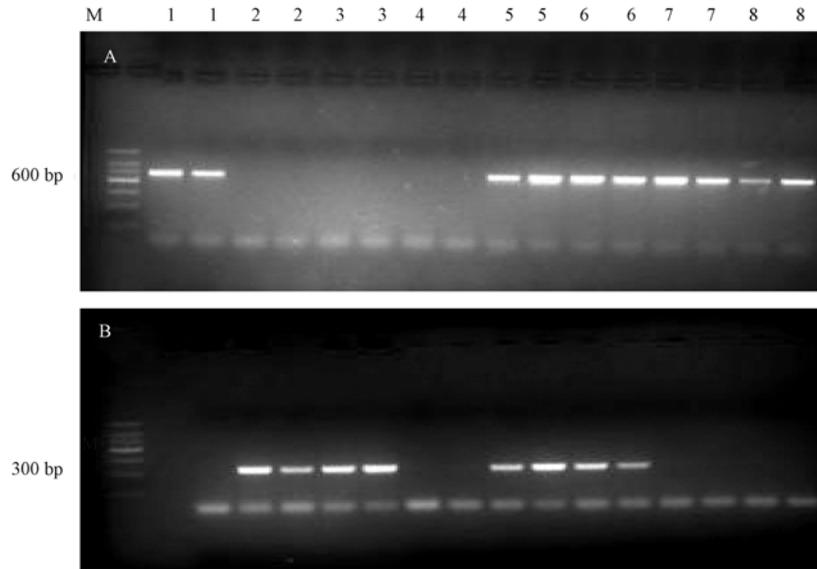


图 2 PCR 法鉴定 *Tbx18;Cre/Rosa26R^{EYFP}* 双转基因示踪胚鼠

Fig. 2 PCR for identification of *Tbx18;Cre/Rosa26R^{EYFP}* double embryos

A 图示 *Cre* 重组酶基因扩增情况; B 图示 *EYFP* 基因扩增情况。1,5~8 号胚鼠有 *Cre* 重组酶基因,2,3,5,6 号胚鼠有 *EYFP* 基因,因而 5,6 号为 *Tbx18;Cre/Rosa26R^{EYFP}* 双转基因胚鼠。A、B 图中 M 表示 DNA marker。

Figure A and B represent the amplification of *Cre* recombination enzyme gene and *EYFP* gene respective. Lane 1, 5-8 represent *Cre* recombination enzyme gene. Lane 2, 3, 5, 6 represent *EYFP* gene. So, Lane 5, 6 represent *Tbx18;Cre/Rosa26R^{EYFP}* double embryos. The alphabet M in figure A and figure B represent DNA marker.

2.3 *Tbx18;Cre/Rosa26R^{EYFP}* 双转基因遗传示踪胚鼠鉴定 *Tbx18-Cre* 基因敲入杂合子小鼠和 *Rosa^{EYFP}* 报告小鼠交配,57 只子代用 *Cre* 重组酶基因引物(图 2A)和 *EYFP* 基因引物(图 2B)鉴定基因型。*Tbx18-Cre* 基因敲入杂合子小鼠 14 只,*Rosa^{EYFP}* 报告小鼠 15 只,野生型 14 只,*Tbx18;Cre/Rosa26R^{EYFP}* 双转基因小鼠 14 只,分别占 24.5%、26.5%、24.5% 和 24.5%,子代基因型基本符合孟德尔遗传规律。*Tbx18;Cre/Rosa26R^{EYFP}* 双转基因示踪胚鼠用于心冰冻切片。

2.4 *Tbx18* 基因敲除小鼠大体形态观察及心 H. E 染色 胚胎发育 15.5 d 的同窝 *Tbx18* 基因敲除型胚鼠(knock-out, KO)与野生型胚鼠(wild-type, WT)比较,敲除型胚鼠表现为生长发育迟缓,体型变短变小(图 3)。将野生型和基因敲除胚鼠心切片行 H. E 染色,基因敲除胚鼠心窦房结头部严重缺失(图 4)。

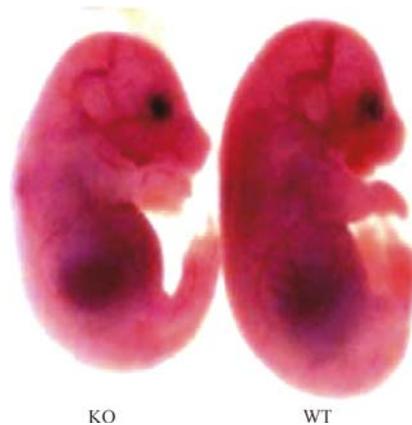


图 3 发育 15.5 d 同窝基因敲除胚鼠(KO)和野生(WT)胚鼠大体形态观察

Fig. 3 The gross morphology of knock-out(KO) and wild-type(WT) embryos at E15.5 d

敲除型胚鼠表现为生长发育迟缓,体型变短变小。The phenotype of the KO embryos was characterized by development delay and a shortened body.

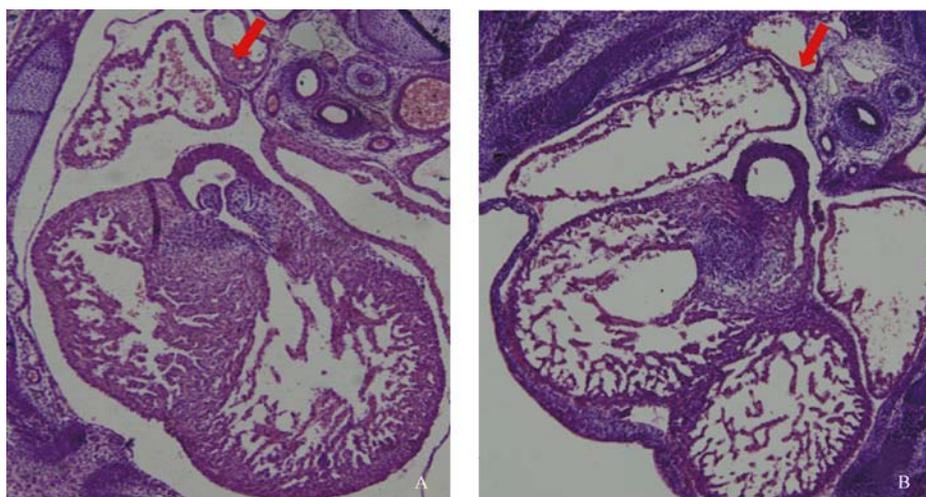


图 4 胚胎 15.5 d 同窝野生型心(A)和基因敲除心(B)H.E染色

Fig. 4 Hematoxylin and eosin-staining of wild-type (A) and knock-out (B) hearts at E15.5 d

基因敲除胚鼠心窦房结头部严重缺失(红色箭头所示)。

There was an absence of sinoatrial node head in KO embryos compared with the wild-type (red arrows).

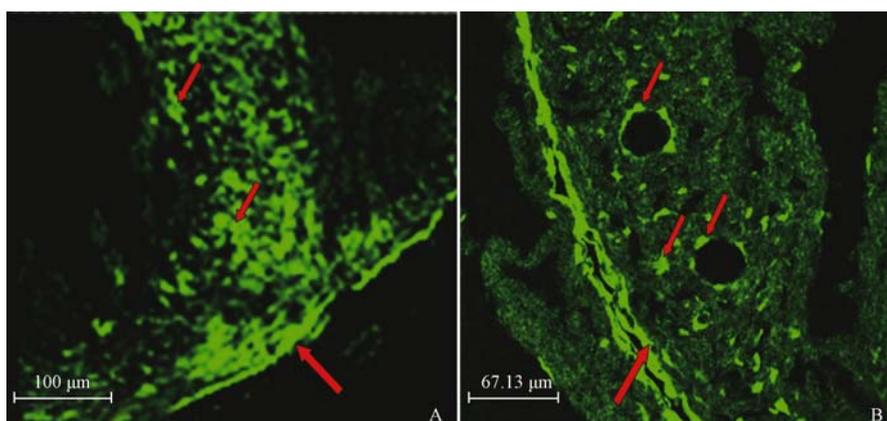


图 5 Tbx18 阳性心外膜祖细胞对心发育的贡献

Fig. 5 The contribution of Tbx18-expressing epicardial cells to heart development

A: Tbx18 阳性心外膜祖细胞(红色粗箭头)迁移分化进入心并构成了左右心室壁、室间隔(红色细箭头),标尺 = 100 μm。

B: Tbx18 阳性心外膜祖细胞(红色粗箭头)迁移分化进入心并构成了冠状动脉血管平滑肌(红色细箭头),标尺 = 67.13 μm。

Figure A indicates that Tbx18-expressing epicardial cells(broad red arrow) migrate into heart and contribution to left and right ventricular wall, ventricular septum(narrow red arrows),bar = 100 μm. Figure B indicate that Tbx18-expressing epicardial cells (broad red arrow) migrate into heart and contribute to coronary smooth muscle (narrow red arrows),bar = 67.13 μm.

2.5 Tbx18;Cre/Rosa26R^{EYFP} 双转基因小鼠心切片 心冰冻切片示 Tbx18 阳性心外膜祖细胞对心发育的贡献。在胚胎发育 16.5 d, Tbx18 阳性心外膜祖细胞不断迁移进入心,构成了心室壁、室间隔、血管平滑肌等重要结构(图 5)。

3 讨论

Tbx18 是参与心发育重要的转录调控因子^[4]。以往研究表明, Tbx18 来源的心外膜祖细胞是心发育过程中第一、第二生心区的重要

补充^[5], *Tbx18* 可调控心外膜祖细胞向窦房结起搏细胞、心室心房壁细胞、瓣膜成纤维细胞及血管平滑肌细胞分化^[2], *Tbx18* 基因敲除小鼠表现为窦房结头部严重缺失^[6-7]。由此可见, *Tbx18* 基因在调控心发育中扮演重要角色。但是 *Tbx18* 的信号调控通路目前国内外尚未见报道, 这也是我们后续的主要研究内容, 亦是引进 *Tbx18-Cre* 基因敲入杂合子小鼠的重要原因。

成功引进 *Tbx18-Cre* 基因敲入杂合子小鼠后, 饲养和繁殖在 SPF(无特定病原体动物) 级动物饲养标准下进行。由于 *Tbx18-Cre* 基因敲入小鼠只能在杂合状态下存活, 纯合状态下 *Tbx18-Cre* 基因的连锁是致死性的^[8], 故我们用 *Tbx18-Cre* 基因敲入杂合子小鼠和背景为 C57BL/6J 的野生型雌鼠交配繁殖, 出生幼鼠中只能出现杂合子和野生型。一定数量杂合子的繁殖和鉴定为我们后续实验提供了有利的条件。

我们利用成功繁殖的 *Tbx18-Cre* 基因敲入杂合子小鼠建立了 *Tbx18* 基因敲除模型和遗传示踪动物模型。初步观察到 *Tbx18* 基因敲除胚鼠存在发育迟缓。心 H. E 染色发现, 基因敲除胚鼠心的 4 个腔室及室壁厚度均未见异常, 但窦房结头部严重缺失, 与文献报道一致^[4-5]。*Tbx18* 基因敲除模型的建立为进一步研究 *Tbx18* 基因的信号调控通路及先天性心脏病发病机制奠定基础。同时, 我们利用得到的 *Tbx18; Cre/Rosa26R^{EYFP}* 双转基因小鼠示踪 *Tbx18* 基因对心外膜细胞发育命运的影响。心冰冻切片发现, 胚胎 16.5 d, 大量 *Tbx18* 阳性心外膜细胞从心外膜向心内部迁移分化并构成了心的重要组成部分, 提示 *Tbx18* 基因可能对心外膜细胞的迁移分化起重要调控作用。*Tbx18* 基因遗传示踪动物模型的建立为后续研究 *Tbx18* 阳性心外膜细胞分化命运及其深入研究其机制建立了有效、直接的工具。

研究胚胎时期 *Tbx18* 阳性心外膜细胞分化命运及其机制对成年心损伤修复具有重要启发意义。Lepilina 等^[9] 发现, 斑马鱼 (*Danio rerio*) 心发生损伤时, 心外膜胚胎基因 *Tbx18* 可再次

激活并迁移到损伤部位, *Tbx18* 基因通过调节血管的生成完全修复了损伤的心而不遗留疤痕, 这种神奇的修复能力与胚胎基因 *Tbx18* 及 *Tbx18* 阳性心外膜细胞向心损伤部位迁移密切相关。因此, *Tbx18* 阳性心外膜细胞可能是未来心脏病患者心脏修复和再生治疗潜在的种子细胞。

值得提出的是, 在鉴定转基因动物基因型时, 经典的 Southern 技术由于实验本身步骤多、费用高、放射性等特点决定了它不适合大规模的鉴定^[10]。PCR 扩增技术具有廉价、简单、准确等得天独厚的优势, 因而, 适于大量转基因鼠的筛选。最后, 可以参考一下孟德尔遗传定律来初步判断阳性率的高低。

总之, 我们的初步研究表明, *Tbx18-Cre* 基因敲入小鼠是研究先天性心脏病发病机制的理想模式动物, *Tbx18* 阳性心外膜祖细胞是未来心脏病患者心脏修复和再生治疗潜在的种子细胞。

参 考 文 献

- [1] Kraus F, Haenig B, Kispert A. Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene *Tbx18*. *Mech Dev*, 2001, 100(1): 83-86.
- [2] Cai C L, Martin J C, Sun Y F, et al. A myocardial lineage derives from *Tbx18* epicardial cells. *Nature*, 2008, 454(7200): 104-108.
- [3] 高翔. 小鼠基因功能研究及疾病模型系列专题(二)——基因工程小鼠的品系管理及基因型鉴定. *中国细胞生物学学报*, 2010, 32(2): 193-194.
- [4] Hoogaars W M H, Barnett P, Moorman A F M, et al. T-box factors determine cardiac design. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(6): 646-660.
- [5] Chien K R, Domian I J, Parker K K. Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine. *Science*, 2008, 322(5907): 1494-1497.
- [6] Christoffels V M, Mommersteeg M T M, Trowe M O, et al. Formation of the venous pole of the heart from an *Nkx2-5*-negative precursor population requires *Tbx18*. *Circ Res*, 2006, 98(12): 1555-1563.
- [7] Wiese C, Grieskamp T, Airik R, et al. Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by *Tbx18* and

- Tbx3. *Circ Res*, 2009, 104(3): 388–397.
- [8] Bussen M, Petry M, Schuster-Gossler K, et al. The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartments. *Genes Dev*, 2004, 18(10): 1209–1221.
- [9] Lepilina A, Coon A N, Kikuchi K, et al. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell*, 2006, 127(3): 607–619.
- [10] Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003: 374–375.

欢迎订阅《动物学杂志》

《动物学杂志》是中国科学院动物研究所、中国动物学会主办的科技期刊,亦是中國自然科学核心期刊。主要报道动物学领域的最新研究成果,介绍有创见的新思想、新学说、新技术、新方法。报道范围既有宏观生态研究,又有微观实验技术。报道层次既有科学前沿性、资料性的,也有技术性、知识性的。稿件内容涉及范围广,实用性强,主要栏目有:研究报告、珍稀濒危动物、技术与方法、研究简报和快讯、科技动态等等。读者对象为动物科学领域的研究、教学、技术、管理人员及广大业余爱好者。

《动物学杂志》双月刊,16开,112页,2012年每册定价60元,全年360元,国内外公开发行。国内邮发代号:2-422;国外发行代号(Code No.):BM58。全国各地邮局均可订阅。如未能在当地邮局订到,可与编辑部直接联系。本刊对在校学生及个人订户7折优惠(直接与编辑部联系订阅)。

地址:北京市朝阳区北辰西路1号院5号中国科学院动物研究所内《动物学杂志》编辑部

邮编:100101;电话:(010)64807162。

E-mail: journal@ioz.ac.cn。网址:dwxzz.ioz.ac.cn。

欢迎投稿、欢迎订阅、欢迎刊登广告。