

文章编号 1006-8147(2020)01-0001-07

论 著

TauT 转基因大鼠的构建及鉴定

齐浩铭¹, 仝慧慧¹, 范维佳², 王 辰², 莫丽冬², 徐立霞², 么秀华², 黄慧玲²

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.南开大学附属环湖医院, 天津市神经外科研究所, 天津市脑血管与神经变性重点实验室, 天津 300350)

摘要 目的: 为研究牛磺酸转运体(TauT)在神经系统疾病中的作用, 构建并繁育脑特异性表达 TauT 转基因模型大鼠(TauT⁺大鼠)。方法: 将 TAUT cDNA 插入脑特异性 PDGF 启动子下游, 构建转基因表达载体, 显微注射法建立 TAUT 转基因大鼠。Genotype 鉴定转基因大鼠的基因型。经过配种繁殖和鉴定后, 绘制 2~8 月龄生长曲线、测定各脏器质量、脏体系数和脏脑系数; RT-PCR 技术检测 TauT⁺大鼠大脑组织中 *Slc6a6* mRNA 基因表达水平; Western blot 检测 TauT⁺大鼠在大脑、心、肝组织的 TauT 蛋白表达, 并对 TauT⁺大鼠大脑组织进行免疫组化染色和 HE 染色, IPP 软件对免疫组化图像进行处理。结果: 成功构建 PDGF-*Slc6a6* 表达质粒, 得到 3 只 TauT⁺大鼠 F0 代。经过繁殖和鉴定, 与同窝阴性大鼠(TauT⁻大鼠)比较, TauT⁺大鼠大脑组织 *Slc6a6* mRNA 基因表达水平显著升高, 大脑、心、肝组织 TauT 蛋白表达水平没有显著性差异, HE 染色和免疫组化结果显示 TauT⁺大鼠脑组织海马区和皮层区未见异常, TauT 蛋白表达没有显著性差异。结论: 成功构建 TauT 转基因大鼠品系, 为后续研究 TauT 在大脑中的作用提供一种较好的动物模型。

关键词 牛磺酸转运体; 大鼠; 转基因

中图分类号 R332

文献标志码 A

Establishment and identification of TauT transgenic rats

QI Hao-ming¹, TONG Hui-hui¹, FAN Wei-jia², WANG Chen², MO Li-dong², XU Li-xia², YAO Xiu-hua², HUANG Hui-ling²

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin Neurosurgical Institute, Tianjin Key Laboratory of Cerebrovascular and Neurodegenerative Diseases, Tianjin 300350, China)

Abstract **Objective:** To establish brain-specific expression taurine transporter transgenic rats(TauT⁺-rats), which can be used for the study of the effects of taurine transporter (TauT) on neurological diseases. **Methods:** The transgene expression vector was constructed by inserting the TauT cDNA into the downstream of PDGF promoter specifically expressed in brain tissue. The transgenic rats was established by micro injection and detected the genotype by PCR. The weight curves of 2-8 months TauT⁺-rats were measured, the weight of each organ, the visceral coefficient and the visceral brain coefficient were measured. The expression of *Slc6a6* mRNA in the brain tissue of TauT⁺ rats was detected by RT-PCR. Western Blotting was used to detect TauT protein expression in brain, heart and liver tissues. Immunohistochemical staining and HE staining were performed on TauT⁺ rat brain cortex and hippocampus, and IPP processing Immunohistochemical images. **Results:** TauT cDNA transgenic vector was successfully constructed and three TauT transgenic rats were established. The expression level of *Slc6a6* mRNA in brain tissue of TauT⁺ rat was significantly increased, but the expression levels of TauT protein in brain, heart and liver tissues were not. HE staining and immunohistochemistry showed no abnormalities and significant difference in brain cortex and hippocampus. **Conclusion:** The brain-specific expression TauT transgenic rat was successfully established and identified. The transgenic rat could be a useful model to research the function of taurine transporter in brain.

Key words taurine transporter; rat; knock in

牛磺酸(Taurine, Tau), 又称 2-氨基乙烷磺酸, 是体内丰富存在的 β -氨基酸, 占人体总质量的约 0.1%, 在体内以自由状态存在, 是一种调节机体正常生理活动的非蛋白氨基酸, 具有维持细胞渗透压^[1]、调节细胞内 Ca^{2+} 浓度^[2]、增强细胞膜抗氧化能力、调节脂类消化与吸收、维持机体正常发育^[3]等广

泛的生物学作用。Tau 在大脑、骨骼肌、心脏、肝脏和视网膜有非常高的含量, 通常高达 20~43 mmol/L^[4]。人体所需的牛磺酸有两条主要来源, 一是在体内由肝脏中的甲硫氨酸和半胱氨酸生物合成, 二是由体外食物摄取, 食物摄取为补充牛磺酸的主要方式, 要维持细胞内的高浓度 Tau, 主要是通过牛磺酸转运体的转运得以实现。

牛磺酸转运体(Taurine transporter, TauT)是由 *SLC6A6* 基因编码的一种 Na^+ 、 Cl^- 依赖性膜转运蛋白, 具有 12 个疏水跨膜结构域^[5]。TauT 在神经系统

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81571216); 天津市应用基础及前沿技术重点项目(16JCZDJC35500)

作者简介 齐浩铭(1994-), 男, 硕士在读, 研究方向: 生物化学与分子生物学; 通信作者: 黄慧玲, E-mail: huanghailing@126.com。

中广泛分布,具有保障细胞的正常体积,维持细胞稳态^[6];促进大脑生长发育等作用。有研究显示^[7],TauT 在小鼠胚胎的神经前体细胞中表达活跃,其活性的上调增强了牛磺酸 Na^+/Cl^- 依赖的转运途径,使牛磺酸可以有效地在细胞内大量积累,促进神经前体细胞的增殖。

哺乳动物体内的 TauT 具有高度同源性^[8]。为了更好地研究 TauT 和 Tau 在某一疾病中的作用机制,以往的研究方法主要是通过实验动物的体外给与 Tau 或阻断 TauT 活性的给药方式,稳定性较差。本研究采用神经系统特异性启动子 PDGF 启动子,利用转基因技术构建了在中枢神经系统特异性表达 TauT 的转基因 SD 大鼠(TauT⁺大鼠)并进行鉴定和繁殖,为后续研究 Tau 及 TauT 在神经系统疾病中的作用和机制提供理想的模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物 TauT⁺大鼠委托中国医学科学院北京实验动物研究所进行构建 [SCXK 京 2013-0002],转基因大鼠及野生型大鼠饲养和繁殖于中国医学科学院放射医学研究所屏障环境 [SYXK 津 2014-0002],所有大鼠于温度(22~27℃)和湿度(50%~60%)的环境中饲养,12 h 的光/暗循环并给予足量饲料及水源。所有程序操作均符合实验动物伦理学要求,动物实验伦理审查证明编号:DWLL-20180916、DWLL-20180917。

1.2 实验材料 EasyPure Genomic DNA kit(北京全式金生物技术有限公司,EE101-12),Genstar2×Taq PCR StarMix with Loading Dye(深圳辉诺生物技术有限公司,A112-10),RNA simple Total RNA kit、反转录试剂盒、SYBR 法荧光定量 PCR 试剂盒(北京天根生物科技有限公司,DP419、KR118、FP205)、高效 RIPA 裂解液(索莱宝,R0010)、pmsf 蛋白酶抑制剂(美国 Thermo,36978)、TauT 一抗(美国 Santa Cruz,sc-166640)、 β -actin 一抗(博奥森生物,bs-10966R)、辣根酶标记山羊抗鼠二抗、辣根酶标记山羊抗兔二抗(中杉金桥,ZB-2305、ZB-2301);Fusion x7 凝胶成像系统(Syngene,美国)、高速冷冻离心机(Beckman,美国)、实时荧光定量 PCR 仪(Roche LightCycler 480,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 TauT⁺大鼠的构建 于 NCBI 网站找到 TauT 基因(*Slc6a6* solute carrier family 6, Gene ID: 29464),将其 CDs 扩增后插入至 pPDGF4(+)质粒的 NheI 和 XbaI 之间,构建含有神经特异性启动子 PDGF-B 驱动大鼠 *Slc6a6* 基因表达的真核表达载体 pDGF4(+)

-*Slc6a6*。转基因载体用 PvuI 酶切线性化后(线性化位点 CGAT/CG 1:5129)调整浓度至 5 ng/ μL ,用显微注射法将上述线性化片段注射入 SD 大鼠受精卵内,经短暂体外培养后筛选存活胚胎移植入假孕受体大鼠输卵管,待其自然产下新生大鼠 F0 代。

1.3.2 PCR 鉴定 TauT⁺大鼠基因型 转基因大鼠出生 10~12 d 用剪趾法编号,收集剪下的脚趾组织,使用全式金(Transgen)公司基因组 DNA 提取试剂盒提取大鼠基因组 DNA,经 Genstar 试剂盒 PCR 扩增后,用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测转基因大鼠基因型。PCR 反应体系 20 μL ,反应条件:95℃预变性 15 min,95℃变性 30 s,61℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,30 个循环。引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成:上游引物 5'-GGTGCATTCCTCATAC-CGTATTTTA-3';下游引物 5'-GGCGGCTGATGT-TAGGGTAC-3'。阳性杂合子(TauT⁺大鼠)的 PCR 扩增产物为 625bp 的 DNA 片段;阴性大鼠(TauT⁻大鼠)无此带。

1.3.3 TauT⁺大鼠的繁育 将 F0 代 TauT⁺大鼠与野生型大鼠 1:1 合笼交配,繁殖得到 F1 代大鼠,DNA 鉴定筛选 TauT⁺大鼠,幼鼠三周离乳后雌雄分笼饲养。待 F1 代大鼠长至 2 月龄左右,将同一父本母本的 F1 代大鼠 TauT⁺大鼠雄性与雌性 1:1 合笼,以期产生更多阳性 F2 代大鼠。

1.3.4 一般情况的观察 每周更换 2 次垫料,观察大鼠精神状态、毛色、运动、进食等多个方面情况并拍照。记录大鼠 2~8 月龄时的体质量并绘制成生长曲线。记录大鼠合笼后的死亡率及阳性率。

1.3.5 TauT⁺大鼠脏器质量和脏器系数的测定 取 5 月龄 TauT⁺大鼠和 TauT⁻大鼠,禁食 12 h,麻醉大鼠后断颈处死,取大鼠大脑、小脑、心、肺、肝、肾、脾、胰腺、骨骼肌等器官,剔除表面残余脂肪与筋膜,生理盐水充分洗净并吸干水分后进行称重,按照公式计算脏器系数(脏器系数=脏器质量/体质量×100%)和脏脑系数(脏脑系数=脏器质量/脑质量×100%)。

1.3.6 TauT⁺大鼠大脑组织 *Slc6a6* 基因的 RT-PCR 检测 取 F1 代 5 月龄 TauT⁺大鼠和 TauT⁻大鼠大脑组织,匀浆后取 100 mg,使用 RNA simple Total RNA kit 试剂盒提取大脑组织的总 RNA,反转录成 cDNA,SYBR 法荧光定量 PCR 检测 *Slc6a6* 基因的 mRNA 表达水平。PCR 反应条件:95℃预变性 5 min,94℃变性 15 s,60℃退火 15 s,72℃延伸 15 s,40 个循环,最后 72℃延伸 5 min。样本目的基因的相对表达量计算公式为:相对表达量=2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} (ΔCt =

Ct₁-Ct₂;Ct₁:样品目的基因的临界循环数;Ct₂:样品管家基因的临界循环数。 $\Delta\Delta Ct$ =实验组 ΔCt -对照组 ΔCt 的平均值)。引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成,上游引物 5'-GAGGTCATCATAG-GCCAGTAC-3';下游引物 5'-GTACACATTCAGGAGGGACAC-3',扩增产物长度为 120 bp, GAPDH 为内参,上游引物 5'-AACTCCCATTCTTC-CACC-3';下游引物 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAG-3',扩增产物长度为 100 bp。

1.3.7 Western blot 检测 TauT^{+/+}大鼠大脑、心脏、肝脏组织的 TauT 蛋白表达 取 5 月龄 TauT^{+/+}大鼠及 TauT^{-/-}大鼠的大脑、心脏、肝脏组织,匀浆后分别取 100 mg,加入含 5%PMSF 的 RIPA 蛋白裂解液并进行蛋白定量后,取 100 μ g 蛋白于 10%SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离蛋白,将蛋白转移到 0.45 μ m 的 PVDF 膜上,置于 5%脱脂奶粉中封闭 2 h 后加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TauT 蛋白一抗(稀释浓度 1:200),内参 β -actin 一抗(稀释浓度 1:10 000)。次日加入二抗(TauT 与 β -actin 二抗的稀释浓度均为 1:10 000)孵育后,使用凝胶成像仪对 PVDF 印迹膜进行显影扫描蛋白条带的灰度值,并对结果图像进行定量分析,TauT 蛋白的表达水平为 TauT 与 β -actin 的比值(TauT/Actin),各组样本的 TauT 蛋白数据归一化后进行比较分析。

1.3.8 免疫组化检测 TauT^{+/+}大鼠大脑组织 TauT 蛋白的表达 取 5 月龄 TauT^{+/+}大鼠及 TauT^{-/-}大鼠,左心室灌注后,取脑组织放入 10%中性福尔马林溶液,固定,脱水,包埋制成 4 μ m 厚石蜡切片,将石蜡切片脱蜡后经苏木精-伊红染色后制成 HE 染色树脂片;或脱蜡后加入 TauT 蛋白一抗(稀释浓度 1:200)后 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,PBS 冲洗后加入二抗(辣根酶标记山羊抗鼠,稀释浓度 1:10 000),最后经 DAB 显色,苏木精复染,脱水,制成免疫组化染色树脂片,利用 Leica BOND-III 全自动免疫组化仪进行常规染色,光学显微镜下观察并进行结果分析。每张切片随机选取 3 个 200 倍视野,使用 Image pro plus(IPP)图像分析软件进行半定量分析并计算目的蛋白平均光密度(OD/Area)。

1.4 统计学方法 利用 SPSS17.0 软件和 GraphPad Prism 6 对数据进行处理,数据结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间数据采用独立样本 t 检验进行分析,当 $P<0.05$ 时有显著性差异。

2 结果

2.1 TauT^{+/+}大鼠的构建 将 *Slc6a6* cDNA 重组到 PDGF4(+)的 NheI 和 XbaI 之间构建 PDGF-*Slc6a6*

表达质粒(图 1),用 PvuI 酶切线性化载体。用显微注射法将上述线性化片段注射入 SD 大鼠受精卵内,制备转基因大鼠,共获得 3 只 TauT^{+/+}大鼠首建鼠(F0 代:4[#]、9[#]、11[#])。

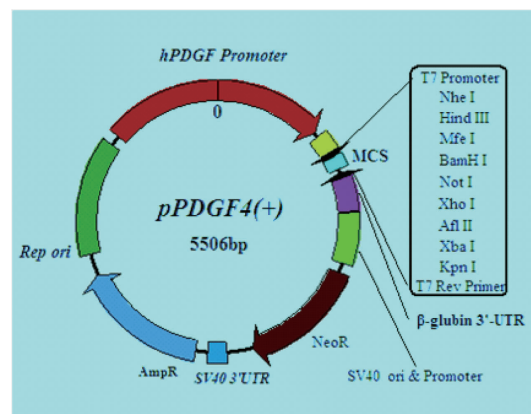
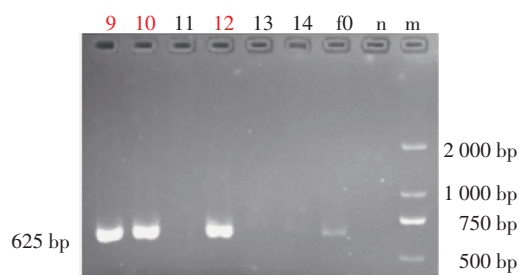


图1 PDGF-*Slc6a6* 重组质粒构建

Fig 1 Establish of the transgene expression vector of PDGF-*Slc6a6*

2.2 PCR 鉴定 TauT^{+/+}大鼠结果 电泳结果见图 2, F0 及 F1 代 TauT^{+/+}大鼠扩增产物为 625 bp 的 DNA 片段,与预期片段位置相符,转基因大鼠 DNA 遗传稳定,TauT^{+/+}大鼠和 WT 大鼠没有条带。



m: 分子量标记 DL2000; n: 阴性对照; f0: 11[#] F0 代 TauT^{+/+}大鼠; 9、10、12: F1 代 TauT^{+/+}大鼠; 11、13、14: F1 代 TauT^{+/+}大鼠

图2 TauT^{+/+}大鼠 DNA PCR 鉴定

Fig 2 Results of genotype identification TauT^{+/+} rat by PCR

2.3 TauT^{+/+}大鼠繁殖情况 繁殖情况见表 1, F0 代(4[#]、9[#]、11[#]) 共繁育 6 次: 4[#] 未生育, 9[#] 繁育 2 次, 后代均为阴性; 11[#] 繁育 4 次, F1 代的阳性率为 44.07%, 基本符合孟德尔遗传定律, 故选择 11[#] F0 代及其后代进行繁育。F0 代和 F1 代共繁育出 174 只大鼠, 死亡 22 只, 其中 TauT^{+/+}大鼠 63 只, TauT^{-/-}大鼠 111 只, 阳性率 36.21%, 死亡率 3.7%。

2.4 TauT^{+/+}大鼠一般情况的观察 如图 3、4 所示, TauT^{+/+}大鼠与 TauT^{-/-}大鼠毛色光滑, 精神健康, 并未出现饮食上的异常, 无脱毛萎靡情况, 在体型上无明显差别, 体质量也无明显差异。

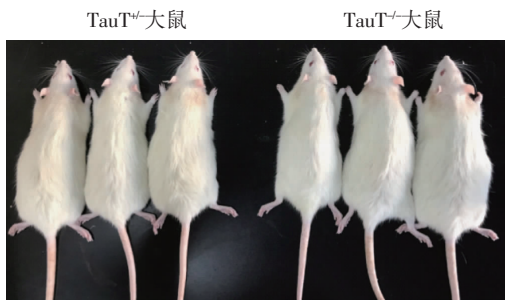
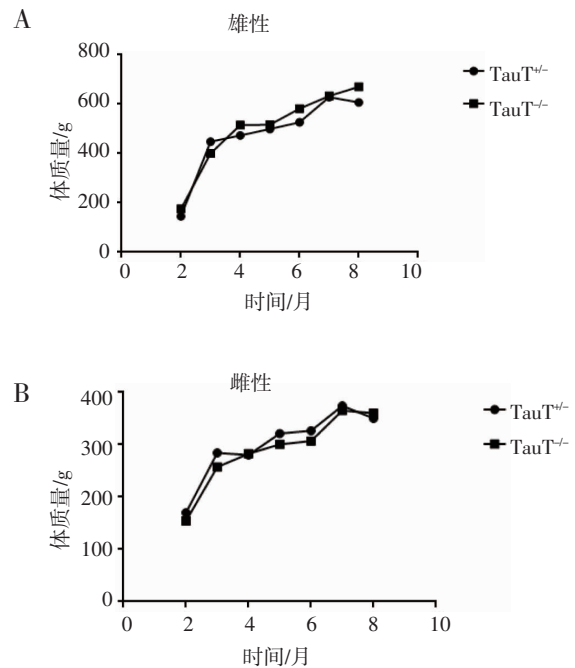
2.5 TauT^{+/+}大鼠脏器质量和脏器系数的测定 脏器质量和脏器系数的测定结果见表 2, 与 TauT^{-/-}

表 1 $TauT^{+/-}$ 大鼠繁育结果Tab 1 Reproduction of F0-F1 generation of the $TauT^{+/-}$ and $TauT^{-/-}$ rats

代数	配种方式 (♀×♂)	子代大鼠基因型/只		合计/只	阳性率/%
		-/-	+/-		
F0 代	4 [#] F0(+/-)×WT(-/-)	0	0	0	0
	9 [#] F0(+/-)×WT(-/-)	22	0	22	0
	11 [#] F0(+/-)×WT(-/-)	33	26	59	44.07
F1 代	1 [#] F1(+/-)×5 [#] F1(+/-)	14	6	20	30.00
	20 [#] F1(+/-)×21 [#] F1(+/-)	9	2	11	18.19
	3 [#] F1(+/-)×6 [#] F1(+/-)	20	12	32	37.50
	79 [#] F1(+/-)×81 [#] F1(+/-)	1	7	8	87.50
	80 [#] F1(+/-)×82 [#] F1(+/-)	3	7	10	70.00
	80 [#] F1(+/-)×87 [#] F1(+/-)	9	3	12	25.00
合计		111	63	174	36.21

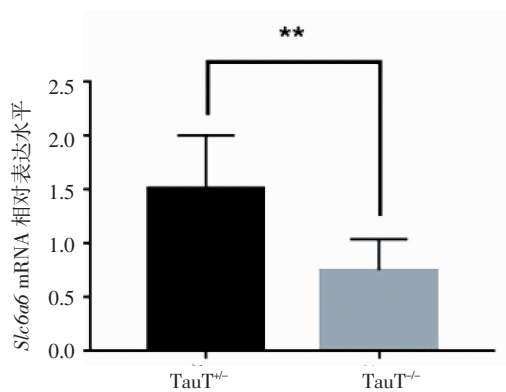
大鼠比较, $TauT^{+/-}$ 大鼠的肝体、肾体系数显著下降($P<0.05$),但脏脑系数均无显著性差异,总趋势是:与 $TauT^{-/-}$ 大鼠比较, $TauT^{+/-}$ 大鼠各项脏器指标均无显著性差异。

2.6 $TauT^{+/-}$ 大鼠大脑组织 *Slc6a6* 基因的 RT-PCR 检测 如图 5~7,RT-PCR 结果表明 $TauT^{+/-}$ 大鼠在大脑组织中的 *Slc6a6* 基因 mRNA 表达水平较 $TauT^{-/-}$ 大鼠显著升高($P<0.05$),融解曲线显示只有内参基因 GAPDH 和 *Slc6a6* 基因的融解峰,扩增产物分别在 81 ℃和 85 ℃时出现单一峰,扩增特异性较好。

图 3 $TauT^{+/-}$ 大鼠外观一般观察Fig 3 The general status of $TauT^{+/-}$ rats图 4 2~8 月 $TauT^{+/-}$ 大鼠体质量生长曲线Fig 4 The body weight curves of 2~8 months $TauT^{+/-}$ rats表 2 $TauT^{+/-}$ 大鼠和 $TauT^{-/-}$ 大鼠脏器质量、脏器系数、脏脑系数的比较Tab 2 Results of organ weight,organ coefficient and organ/brain ratio of the $TauT^{+/-}$ and $TauT^{-/-}$ rat

指标	$TauT^{+/-}(n=12)$			$TauT^{-/-}(n=21)$		
	脏器质量/g	脏器系数/%	脏脑系数/%	脏器质量/g	脏器系数/%	脏脑系数/%
大脑	2.05±0.21	0.42±0.11	1.00	2.01±0.12	0.52±0.15	1.00
心脏	1.53±0.32	0.30±0.06	0.74±0.11	1.43±0.35	0.34±0.06	0.71±0.15
肺	1.98±0.52	0.39±0.08	0.96±0.21	1.71±0.39	0.43±0.14	0.85±0.18
肝脏	11.87±3.26	2.30±0.28*	5.74±1.19	11.48±3.35	2.75±0.48	5.68±1.53
左肾	1.55±0.45	0.30±0.02*	0.75±0.17	1.37±0.42	0.32±0.03	0.67±0.18
脾脏	0.71±0.14	0.14±0.04	0.35±0.06	0.63±0.12	0.16±0.04	0.31±0.05
胰腺	1.47±0.67	0.29±0.13	0.71±0.29	1.24±0.40	0.32±0.14	0.62±0.25
骨骼肌	0.93±0.59	0.18±0.08	0.45±0.25	0.71±0.28	0.17±0.07	0.35±0.13

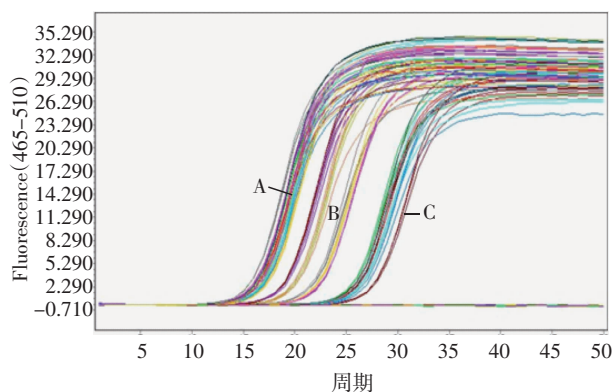
* $P<0.05$



** $P < 0.05$

图 5 TauT^{+/+}大鼠大脑组织 *Slc6a6* mRNA 表达水平情况

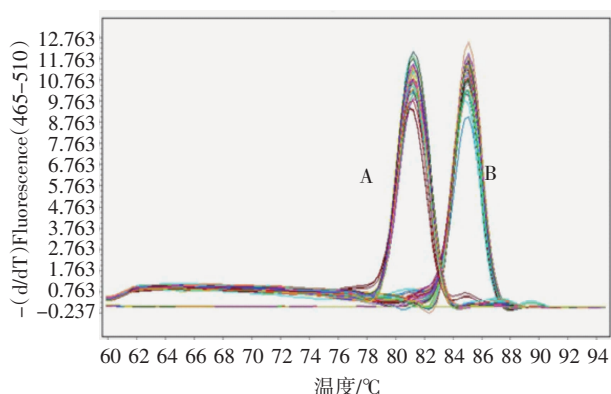
Fig 5 Expression of *Slc6a6* mRNA in the brain of the TauT^{+/+} and TauT^{-/-} rat



A.GAPDH 扩增曲线;B.*Slc6a6* 基因扩增曲线;C.阴性对照

图 6 RT-PCR 扩增曲线

Fig 6 Amplification curve of RT-PCR



A.GAPDH 融解曲线;B.*Slc6a6* 基因融解曲线

图 7 RT-PCR 融解曲线

Fig 7 Melting curve of RT-PCR

2.7 Western blot 检测 TauT^{+/+}大鼠大脑、心、肝组织 TauT 蛋白的表达 结果如图 8~9 所示,与 TauT^{+/+}大鼠比较,TauT^{+/+}大鼠在大脑、心、肝中 TauT 蛋白表达均无显著性差异($P > 0.05$)。

2.8 TauT^{+/+}大鼠大脑组织海马与皮层 HE 染色和免

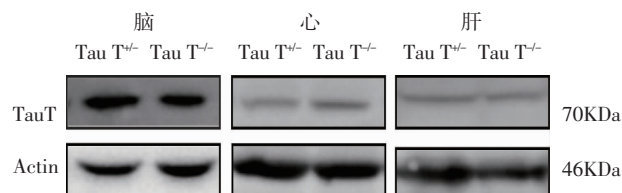


图 8 免疫印迹检测 TauT^{+/+}大鼠大脑、心脏、肝脏 TauT 蛋白表达水平

Fig 8 The protein expression level assay of TauT protein in the brain, heart and liver of the TauT^{+/+} and TauT^{-/-} rat by Western blot

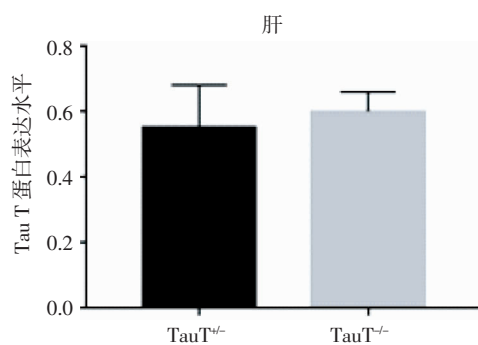
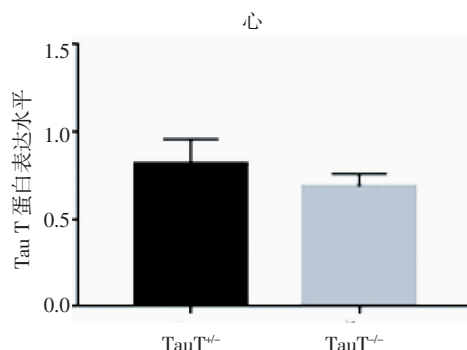
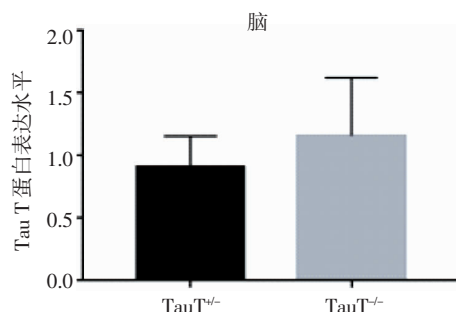
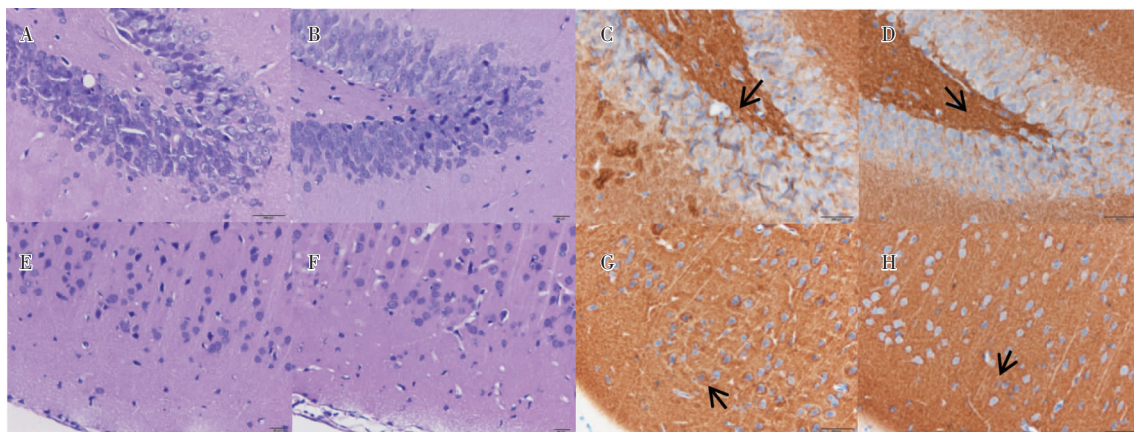


图 9 TauT^{+/+}大鼠大脑、心脏、肝脏 TauT 蛋白表达水平柱状图分析

Fig 9 The protein expression level assay of TauT protein in the brain, heart and liver of the TauT^{+/+} and TauT^{-/-} rat by histogram analysis

疫组化结果 HE 染色免疫组化结果如图 10、11 所示,TauT^{+/+}大鼠与 TauT^{-/-}大鼠海马区与皮层处的细胞排列紧密且规则,细胞形态正常,未见肿胀。IPP 软件光密度分析及 t 检验显示 TauT^{+/+}大鼠与 TauT^{-/-}大鼠在大脑皮层和海马区 TauT 的表达情况无显著差异($P > 0.05$)。



A、B.TauT^{+/-}与 TauT^{-/-}大鼠海马区 HE 染色;C、D.TauT^{+/-}与 TauT^{-/-}大鼠海马区免疫组化染色;E、F.TauT^{+/-}与 TauT^{-/-}大鼠大脑皮层 HE 染色;G、H. TauT^{+/-}与 TauT^{-/-}大鼠大脑皮层免疫组化染色

图 10 TauT^{+/-}与 TauT^{-/-}大鼠大脑皮层和海马区免疫组化和 HE 染色结果比较(200x)

Fig 10 Comparison of immunohistochemical and HE staining results between brain cortex and hippocampus in TauT^{+/-} and TauT^{-/-} rat(200x)

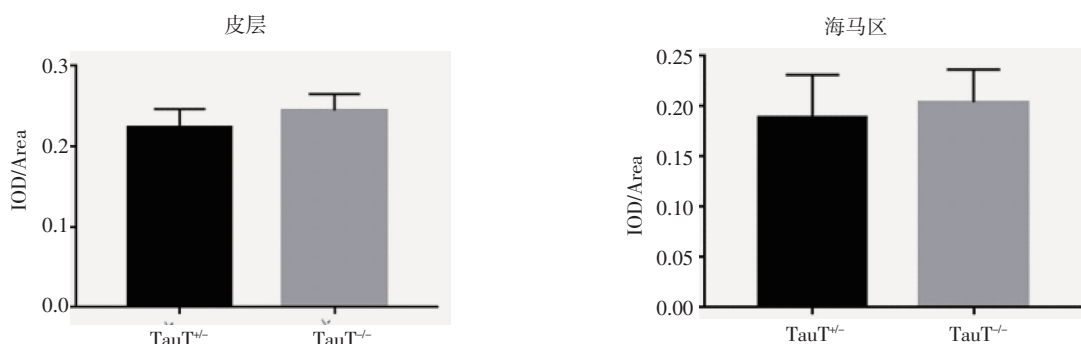


图 11 TauT^{+/-}与 TauT^{-/-}大鼠大脑皮层和海马区免疫组化光密度对比分析

Fig 11 Comparison between optical density of brain cortex and hippocampus in TauT^{+/-} and TauT^{-/-} rat

3 讨论

大鼠作为常用的实验动物,除了体型较大可易于手术操作、形态观察之外,在生理、代谢等方面也更为接近人类^[9],尤其在研究神经系统相关疾病^[10-11]和抑郁焦虑样行为^[12]中具有较大优势。笔者团队制作的 TauT^{+/-}大鼠是通过显微注射技术将 PDGF-Slc6a6 基因随机整合到基因组中的,该技术的优点是实验周期较短,整合效率较为稳定,且导入的外源基因片段大小不受限制^[13],但基因整合的拷贝数及位点未知,通常是多拷贝,且由于不同首建鼠插入的位点及拷贝数不同,而导致不同 F0 代大鼠之间目的基因表达有差异,因此需要筛选出高表达且稳定遗传的大鼠进行传代。本实验中 4[#]转基因首建鼠不育,9[#]转基因首建鼠繁育 2 窝均为阴性,11[#]转基因首建鼠繁育 4 窝,阳性率为 44.07%,基本符合孟德尔遗传定律,故选择 11[#]首建鼠及其后代进行繁育。

大鼠的体质量和生存情况是衡量大鼠表型变化的重要参数,冯颖等^[14]报道向 Wistar 大鼠喂食含有牛磺酸的饲料未影响其体质量,但喂食牛磺酸转

运体抑制剂 β-丙氨酸可以显著降低大鼠体质量。笔者在繁殖 TauT 转基因大鼠的过程中,发现 TauT^{+/-}大鼠与 TauT^{-/-}大鼠在体质量、毛发、进食、活动等方面均无明显差异,表明插入 TauT 基因未对大鼠造成外在表型的影响,这与其报道结果相似。实验动物脏器质量、脏器系数和脏脑系数的变化可反映出毒物或插入基因对实验样本及其脏器的综合效用^[15],本研究发现:相比于 TauT^{-/-}大鼠,TauT^{+/-}大鼠的肝体、肾体系数显著降低($P < 0.05$),提示插入 TauT 基因可能会对 SD 大鼠的肝脏和肾脏有影响,但因其它脏器系数无显著性差异,而且各脏器的脏器质量、脏脑系数均没有显著性差异,综合来看,TauT^{+/-}大鼠的脏器水平与 TauT^{-/-}大鼠无显著性差异。有研究显示^[16],长期补充牛磺酸会导致肾脏质量的增加并伴随着肾脏重吸收作用及肾小球滤过作用紊乱的情况,具体机制不明确。笔者也将会增加 TauT^{+/-}大鼠的数量以密切关注其肝脏和肾脏的变化情况。

神经特异性启动子是一类在神经系统中特异性表达的启动子,在转基因技术中它经常与目的基

因连接后导入受精卵,用于研究神经系统疾病的相关机制^[17],神经特异性启动子的优势在于确保在所需神经细胞中发挥高表达效果的同时,避免其它细胞中相关基因表达所引起的副作用^[18-19]。血小板源性生长因子(Platelet-derived growth factor, PDGF)的启动子 PDGF 可以在整个脑和脊髓的神经元中高表达,但在神经胶质细胞中没有活性,是一种应用广泛的神经特异性启动子^[20-21]。本实验中结果显示,与 TauT^{-/-}大鼠相比, TauT^{+/+}大鼠大脑组织中 *Slc6a6* mRNA 表达水平显著升高,其它脏器(心、肝)比较无差异性(实验数据未列出),而大脑、心、肝等脏器的 TauT 蛋白表达稳定,无显著差异性,免疫组化和 HE 染色也显示 TauT^{+/+}大鼠在海马与皮层区 TauT 蛋白的表达均没有显著差异,说明转入 PDGF-*Slc6a6* 基因片段可以提高大鼠 TauT mRNA 表达水平,而未能改变大鼠大脑组织 TauT 蛋白的表达水平,从某种角度上说,即利用脑特异性启动子 PDGF 与 *Slc6a6* 基因连接后转入大鼠体内,只能在基因水平上对大鼠大脑组织有所改变,未能提高大脑组织中 TauT 蛋白表达能力,出现这种基因和蛋白表达不一致的情况,推测是转入的 PDGF-*Slc6a6* 基因片段对后期的基因翻译水平调节未能达到其蛋白表达的检测程度,具体机制尚不明确,有待后续实验进一步研究。

综上所述,本研究通过显微注射技术将 PDGF-*Slc6a6* 基因序列整合到 SD 大鼠体内构建 TauT^{+/+}大鼠,为各种神经疾病的研究提供了较好的 TauT 转基因动物模型,也为研究基因敲除 TauT 大鼠在神经系统疾病中的机制提供了对照模型。

参考文献:

- [1] Pasantes-Morales H. Taurine Homeostasis and Volume Control[J]. Adv Neurobiol, 2017,16:33
- [2] Murakami S. Role of Taurine in the Pathogenesis of Obesity[J]. Mol Nutr Food Res, 2015,59(7):1353
- [3] 刘妍妍,崔志清. 牛磺酸对小鼠肠推进及大鼠离体回肠平滑肌运动的影响[J]. 天津医科大学学报, 2008,14(4):441
- [4] Pasantes-Morales H, Hernández-Benítez R. Taurine and Brain Development: Trophic or Cytoprotective Actions[J]. Neurochem Res, 2010,35(12):1939
- [5] Gether U, Andersen P H, Larsson O M, et al. Neurotransmitter Transporters: Molecular Function of Important Drug Targets[J]. Trends Pharmacol Sci, 2006, 27(7):375
- [6] Olson J E, Martinho E Jr. Regulation of Taurine Transport in Rat Hippocampal Neurons by Hypo-Osmotic Swelling[J]. J Neurochem, 2006(96):1375
- [7] Hernández-Benítez R, Pasantes-Morales H, Pinzón-Estrada E, et al. Functional expression and subcellular localization of the taurine transporter TauT in murine neural precursors[J]. Dev Neurosci, 2010,32(4):321
- [8] 张小龙,邓欢,陈澄,等. 牛磺酸转运体的调节机制及其在动物营养研究中的意义[J]. 动物营养学报, 2013,25(10):2222
- [9] Zheng S, Geghman K, Shenoy S, et al. Retake the Center Stage--New Development of Rat Genetics[J]. J Genet Genomics, 2016,39(6):261
- [10] Flood D G, Lin Y G, Lang D M, et al. A Transgenic Rat Model of Alzheimer's Disease with Extracellular Abeta Deposition[J]. Neurobiol Aging, 2009, 30(7):1078
- [11] Zharikov A, Bai Q, De Miranda B R, et al. Long-term RNAi knockdown of α -synuclein in the adult rat substantia nigra without neurodegeneration[J]. Neurobiol Dis, 2019,125:146
- [12] Shishkina G T, Lanshakov D A, Bannova A V, et al. Doxycycline Used for Control of Transgene Expression has its Own Effects on Behaviors and Bcl-xL in the Rat Hippocampus[J]. Cell Mol Neurobiol, 2018,38(1):281
- [13] 肖红卫,华文君,张立苹,等. 转基因动物技术及其在动物育种中的应用[J]. 中国猪业, 2016,11(4):56
- [14] 冯颖,杨建成,孙长勉,等. 牛磺酸对不同月龄雄性大鼠生殖器官指数及生殖激素水平的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006(6):5
- [15] 戴丽军,叶炳飞,黄月玲. Fmr1 基因敲除小鼠脏器重量和脏器系数的比较分析[J]. 2009,19(6):59
- [16] Branco R C, Batista T M, Camargo R L, et al. Long-Term Taurine Supplementation Leads to Enhanced Hepatic Steatosis, Renal Dysfunction and Hyperglycemia in Mice Fed on a High-Fat[J]. Adv Exp Med Biol, 2015,803:339
- [17] 张丽,孙彩显,靳亚西,等. Dkk3 过表达改善阿尔茨海默症小鼠的老年斑、认知障碍和脑部糖代谢[J]. 神经药理学报, 2017,7(2):40
- [18] Sasahara M, Fries J W, Raines E W, et al. PDGF B-chain in neurons of the central nervous system, posterior pituitary, and in a transgenic model[J]. Cell, 1991,64(1): 217
- [19] Liu B H, Wang X, Ma Y X, et al. CMV enhancer/human PDGF-beta promoter for neuron-specific transgene expression[J]. Gene Ther, 2004,11(1):52
- [20] Fang F, Yang W, Florio J B, et al. Synuclein impairs trafficking and signaling of BDNF in a mouse model of Parkinson's disease[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):3868
- [21] Schregermann S R, Regensburger M, Rockenstein E, et al. The temporal expression pattern of alpha-synuclein modulates olfactory neurogenesis in transgenic mice[J]. PLoS One, 2015,10(5):e0126261

(2019-03-27 收稿)