

网络出版时间: 2021-7-28 11:28 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1016.031.html>

## LSS 基因敲除小鼠的饲养、繁殖及基因型鉴定

李名聪 孙晓梅 李昱昊 周宏 罗欣 张胜权

**摘要** 探讨羊毛固醇合成酶(LSS)基因敲除鼠的繁育和基因型分析。将引进杂合子小鼠进行饲养并繁育,提取其基因组DNA,利用PCR反应扩增目的基因片段,鉴定出小鼠的基因型;Western blot分析并比较LSS基因敲除杂合子小鼠和野生型小鼠的肝脏、皮肤组织中LSS蛋白的表达情况。成功的繁育出LSS基因敲除小鼠,使用PCR鉴定其子代小鼠包括野生型(LSS<sup>+/+</sup>,Wt)、杂合子(LSS<sup>+/-</sup>),未出现纯合敲除小鼠;Western blot结果表明:相较于野生型小鼠,LSS基因敲除杂合子小鼠在肝组织和皮肤组织中表达LSS蛋白量少;杂合子敲除鼠的生存能力比野生型小鼠弱。获得LSS基因敲除小鼠,PCR鉴定小鼠基因型具有简单、稳定的优点。

**关键词** LSS;基因敲除小鼠;基因型鉴定;聚合酶链式反应体系;繁育

中图分类号 R 332

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)08-1335-04  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.034

甲羟戊酸代谢途径是生物体内重要的代谢途径之一,该途径在各种酶的作用下利用乙酰辅酶A产生一系列产物包括甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)、羊毛固醇(lanosterol, LAN)等<sup>[1-4]</sup>。LSS编码羊毛甾醇合酶,这是上述途径中的关键酶,能够将氧鲨烯环化形成羊毛固醇。LSS双等位基因突变会

引起脱发伴智力低下(alopecia with mental retardation, APMR)综合征、广泛的先天性白内障<sup>[5-8]</sup>。近期研究<sup>[9]</sup>表明,LSS双等位基因突变导致的组织羊毛固醇合成酶缺乏会引起稀毛症和白内障。开发LSS缺陷状态的动物模型可以从整体水平研究LSS蛋白的功能。由于LSS null小鼠胚胎致死性,尚未有白内障或稀毛症小鼠模型<sup>[10]</sup>。该研究针对LSS基因敲除小鼠的繁育饲养和基因型鉴定,对其方法进行探讨和优化,为相关机制研究提供更好的LSS基因敲除动物模型。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 2017年12月从南京大学南京生物医药研究所引进3只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级C57BL/6品系小鼠,8周龄,(20±2)g,2只雌鼠基因型是LSS基因敲除型杂合子(LSS<sup>+/-</sup>),1只雄鼠基因型是野生型(wide type, Wt),实验动物许可证号:SCXK(苏)2015-0001。所有实验动物的饲养与操作均符合国标及安徽省实验动物中心管理饲养条例。

**1.2 主要试剂** 鼠尾基因型鉴定试剂盒(上海碧云天生物公司);DL2000 bp DNA marker和Premix Taq (TaKaRa Taq Version 2.0 Plus dye)(大连宝生物工程有限公司);琼脂糖粉、引物和溴化乙锭(Ethidium bromide, EB)(上海生工生物工程股份有限公司);抗β-actin抗体、抗LSS抗体(美国Santa Cruz公司);辣根酶标记山羊抗兔IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

**1.3 仪器** DYY-6C电泳仪(北京市六一仪器厂),

2020-10-17 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271748);安徽省高等学校自然科学基金项目(编号:KJ2017A195)

作者单位:安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

作者简介:李名聪,女,硕士研究生;

张胜权,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: sqz36@yahoo.com

veneer repair. The occlusal surfaces of 7 mandibular premolars were ground evenly for 1.5 mm, simulating the morphology of occlusal surface of severe wear tooth, and the occlusal surface was prepared with IPS e-max Press. After the adhesive was cemented, static loading test was performed on each specimen until cracked, and the fracture load value and fracture mode were recorded. The fracture load of the specimens was much higher than the normal masticatory force, which could meet the clinical repair needs. The fracture mode was mostly limited to the fragmentation of the restoration or the damage of the tooth in a small range, which was conducive to the secondary repair. IPS e-max Press occlusal veneer is a minimally invasive and ideal method for the restoration of severe tooth wear in premolar.

**Key words** occlusal veneer; IPS e-max Press; severe wear; fracture resistance

普通 PCR 仪(美国赛默飞公司),全自动数码凝胶图像分析仪(上海勤翔科学仪器有限公司)

**1.4 小鼠的饲养和信息记录** LSS 基因敲除小鼠于安徽医科大学实验动物中心 SPF 级动物房内饲养与繁殖。饲养温度 18 ~ 22 °C,相对湿度 40% ~ 70%,明暗循环 12 h/d,自由饮食和饮水。小鼠笼盒、垫料、饲料和饮用水都经过高温高压消毒灭菌处理。每周换 2 次垫料,添加水和饲料,并且给予人道关怀。在繁殖笼标签上,记录鼠号、基因型、出生日期、合笼日期、父母本的鼠号、产仔日期和数量。在离乳笼标签上,记录笼号、基因型、数量、出生日期、离乳日期、死亡日期、父母本基因型。

**1.5 小鼠组织基因组 DNA 提取** 实验前将 DNA Extraction Solution 和 Enzyme Mix 按照比例(48 : 2)充分混匀配制好消化液。用 70% 乙醇冲洗剪刀和镊子,剪取 0.2 ~ 1 cm 的小鼠尾尖放入 250 μl 的 PCR 管中,加入 50 μl 消化液,需确保小鼠尾巴完全浸没。将样品置于 PCR 仪中,55 °C 孵育 15 min,95 °C 孵育 5 min。往上述样品中加入 50 μl Stop Solution 涡旋混匀,提取小鼠基因组 DNA。

**1.6 PCR 扩增反应** 引物是由南京大学南京生物医药研究所设计,并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,LSS 基因引物分别是 Primer F: ACCTGGGCGGAGTCTAAGGAAG; Primer R: AAGGCTCTC-CACTGTTTCAGAGCT。PCR 扩增反应体系根据小鼠基因型鉴定试剂盒使用说明,按照 25 μl 反应体系进行扩增反应。分别加入: Premix Taq ( TaKaRa Taq Version 2.0 Plus dye) 12.5 μl、F 引物(10 μmol/L) 1 μl、R 引物(10 μmol/L) 1 μl 孔 DNA 模板 1 μl、加入双蒸水补足至 25 μl。PCR 反应循环体系设定为:① 预变性:94 °C、3 min;② 94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 40 s [40 s/(kb · min)] 循环 35 次;③ 72 °C、10 min 终止反应。

**1.7 1.6% 琼脂糖凝胶电泳和基因型结果判断** 0.4g 琼脂糖加入 25 ml 1 × 琼脂糖电泳缓冲液(TAE)中,加热至完全溶解,稍冷却至不烫手,加入 2 μl 溴化乙啶(EB);上样 DNA 样本 5 μl 电泳电压 90 V,时间 90 min。于化学发光凝胶成像系统中拍照观察。扩增产物长度为 328 bp 左右条带,为 Wt;扩增产物有 282 bp 和 328 bp 两条电泳条带则为杂合敲除小鼠(LSS<sup>+/-</sup>)。

**1.8 Western blot 检测** 各组肝脏和皮肤组织中 LSS 蛋白的表达 取适量小鼠肝脏或皮肤组织置于冰冷的裂解液中提取总蛋白。用 BCA 蛋白浓度测

定试剂盒进行蛋白定量,蛋白样品与上样缓冲液在沸水中煮沸 10 min。采用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳并转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温下封闭 2 h,用 TBST 洗膜 3 次,与 LSS 一抗(1 : 1 000) 4 °C 过夜,次日用 TBST 洗膜 3 次,加入对应的山羊抗小鼠 IgG(1 : 20 000) 室温 2 h, TBST 洗膜 3 次,内参使用 β-actin。ECL 化学发光试剂进行显影,Image J 软件测定吸光度值以计算蛋白表达水平。

**1.9 小鼠生殖与繁育** 当小鼠 8 周达到性成熟,采用杂合子与野生型小鼠以雄鼠和雌鼠 1:2 进行合笼扩繁。幼鼠经哺乳期 21 d 后进行分开饲养,出生 8 周左右进行下一步实验。利用 5 只杂合子雄鼠和 5 只杂合子雌鼠进行扩繁,以野生小鼠(5 雄/5 雌)作为对照组进行扩繁获得 3 个月内子代数。总产子数除以母鼠生产次数得到每窝平均产子数,将存活 3 周子代数除以总产子数计算 3 周存活率。

**1.10 统计学处理** 采用 SPSS Statistics 统计软件对数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用 *t* 检验,检验水准  $\alpha = 0.05$  为显著性检验水准,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 小鼠基因型鉴定结果** F2 代基因型鉴定部分结果如图 1A,其中 1、2、4、5、6、9、10 号出现 1 条 328 bp 的条带,为野生型小鼠;3、7、8 号分别产生 328 bp 和 282 bp 两条条带,为杂合子小鼠。将杂合子小鼠与异性杂合子小鼠进行合笼,得到子代小鼠基因型如图 1B,其中 1、2、3、4 号出现 1 条 328 bp 的条带,

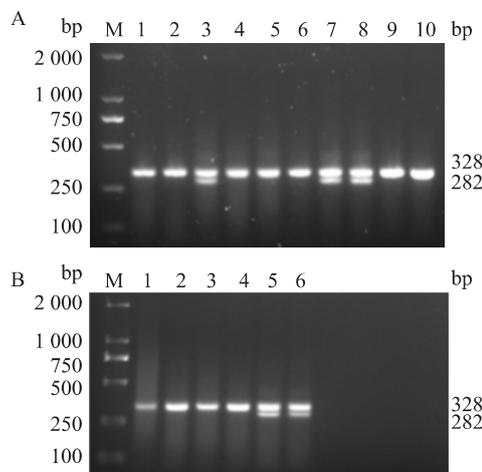


图 1 小鼠基因型的 PCR 鉴定

A: F2 代小鼠基因型; B: 杂合子配繁子代小鼠基因型; M: DL2000 DNA marker; 1 ~ 9: 子代小鼠

为野生型小鼠;5、6号分别产生328 bp和282 bp两条条带,为杂合子小鼠。

**2.2 基因敲除小鼠 LSS 蛋白表达情况** 为了进一步确认 PCR 结果的准确性,选取 PCR 鉴定的野生型、杂合子小鼠,Western blot 检测 LSS 蛋白在肝脏、皮肤组织中的表达量。结果如图 2 所示,野生型和杂合子小鼠肝脏、皮肤中可见 LSS 蛋白表达,杂合子小鼠表达量低于野生型小鼠( $t = 8.266, P < 0.01; t = 5.539, P = 0.0005$ )。

**2.3 小鼠的繁殖情况** F1 代母鼠产下子代小鼠(F2) F2 代杂合基因敲除小鼠与野生型小鼠交配,成功的繁殖出 F3 代。LSS<sup>+/-</sup> 鼠与 Wt 鼠在体型方面相差不异,见图 3。LSS<sup>+/-</sup> 鼠配繁每窝平均产子数和子代 3 周存活率均低于 Wt 鼠,差异有统计学意义( $t = 4.049, P < 0.05; t = 2.795, P = 0.0081$ ),见表 1。

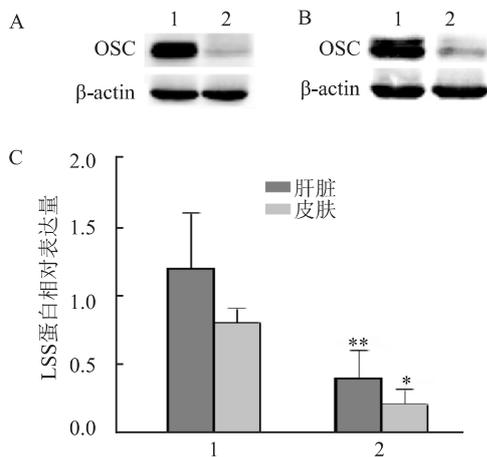


图 2 Western blot 法检测 LSS 蛋白在野生型和杂合子小鼠肝脏和皮肤中表达水平

A: 肝脏组织中 LSS 蛋白表达条带; B: 皮肤组织中 LSS 蛋白表达条带; C: LSS 蛋白与内参比值; 1: 野生型小鼠对照组; 2: 杂合子小鼠组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$

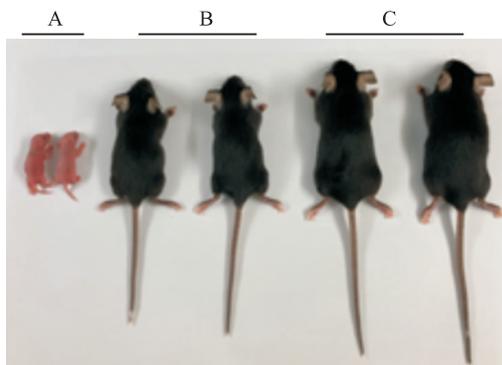


图 3 不同年龄的子代小鼠外观

A: 出生 3 d 小鼠; B: 出生 3 周小鼠; C: 8 周龄野生型和杂合子小鼠

表 1 LSS 缺失对小鼠繁殖的影响

基因型	平均产子数(每窝)	3 周存活率(%)
Wt	4.171 ± 0.3331	98.85 ± 1.150
LSS <sup>+/-</sup>	2.543 ± 0.2254*	90.03 ± 2.940*
LSS <sup>-/-</sup>	0	0

Wt: 野生型小鼠; LSS<sup>+/-</sup>: 杂合子小鼠; LSS<sup>-/-</sup>: 纯合子小鼠; 与 Wt 比较: \*  $P < 0.05$

### 3 讨论

胆固醇对于哺乳动物细胞生长发育和分裂具有重要作用。在啮齿动物妊娠期,母体胆固醇可以穿过胎盘影响胎儿的生长发育。依据孟德尔遗传定律,敲除杂合子基因型小鼠交配,其子代可能出现野生型、敲除杂合子和敲除纯合子 3 种基因型。Mori et al<sup>[7]</sup> 研究发现 LSS 纯合敲除小鼠胚胎显示异常间充质细胞,这些间充质细胞呈椭圆形,胞质小,细胞核大,处于未成熟状态。纯合敲除胚胎致死,该胚胎主要病理变化是器官发生缺陷、皮肤和神经组织以及主要内脏器官难以辨认。通过对 LSS 基因敲除小鼠生长繁殖性能的观察结果显示未得到 LSS 纯合敲除小鼠,杂合子小鼠少于野生型小鼠,存活率也低于野生型小鼠,LSS 缺失可能会影响该小鼠的生长或繁殖能力,有待后续进一步实验。

皮肤病变、白内障和先天性异常通常与胆固醇合成途径的酶遗传缺陷有关。羊毛固醇合成酶在该途径中将(S)-2,3-环氧角鲨烯转化为羊毛固醇<sup>[11-12]</sup>。近年来研究<sup>[9]</sup>表明 LSS 表皮特异性基因敲除小鼠因皮肤屏障功能低下,导致皮下发育不全而严重脱水致死。此外 LSS 还与一种罕见的常染色体隐性遗传病神经外皮综合征有关,其特征是发育不良和智力障碍或发育迟缓,通常伴有早发性癫痫相关<sup>[13]</sup>。Zhao et al<sup>[14]</sup> 研究表明 LSS 是富于晶状体的两性性分子,在体外实验使用羊毛固醇处理可以显著降低预先形成的蛋白聚体,有效降低白内障的严重程度。

因此引进了 LSS 基因敲除小鼠,按照 SPF 级标准进行饲养繁殖。采用较为简单快捷、重复性较好的 PCR 方法,进行基因型鉴定。通过 Western blot 检测得到杂合子小鼠 LSS 表达量在肝脏和皮肤中低于野生型小鼠,其结果与 PCR 方法鉴定的结果一致,说明应用 PCR 方法鉴定小鼠基因型结果可靠、可信。在饲养过程中,未得到 LSS 基因敲除纯合子小鼠且获得的杂合子小鼠比例低,所以在饲养和繁殖的过程中要格外注意。本次实验,课题组采用杂

合子小鼠杂交方式繁育 筛选所需基因型 野生型和杂合子小鼠可以进行对照造模 进行表型分析; 剩余的杂合子小鼠可以用作保种再繁育以解决后续繁殖问题。

### 参考文献

- [1] Goldstein J L , Brown M S. Regulation of the mevalonate pathway [J]. *Nature* , 1990 , 343( 6257) : 425 – 30.
- [2] Freed-Pastor W A , Mizuno H , Zhao X , et al. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture *via* the mevalonate pathway [J]. *Cell* , 2012 , 148( 1-2) : 244 – 58.
- [3] 金 锐 , 王 芳 , 栾 康 , 等. 甲羟戊酸激酶基因真核及 shRNA 表达载体构建及其对 BxPC-3 细胞周期蛋白表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报* , 2016 , 51( 1) : 22 – 6.
- [4] 顾亚男 , 周 宏 , 朱婷婷 , 等. 胺丁羟磷酸盐抑制皮肤角质形成细胞的增殖作用 [J]. *安徽医科大学学报* , 2019 , 54( 8) : 1169 – 73.
- [5] Hejtmancik J F. Ophthalmology: Cataracts dissolved [J]. *Nature* , 2015 , 523( 7562) : 540 – 1.
- [6] Chen X , Liu L. Congenital cataract with LSS gene mutations: a new case report [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab* , 2017 , 30( 11) : 1231 – 5.
- [7] Mori M , Li G , Abe I , et al. Lanosterol synthase mutations cause cholesterol deficiency-associated cataracts in the Shumiya cataract rat [J]. *J Clin Invest* , 2006 , 116( 2) : 395 – 404.
- [8] Besnard T , Sloboda N , Goldenberg A , et al. Biallelic pathogenic variants in the lanosterol synthase gene LSS involved in the cholesterol biosynthesis cause alopecia with intellectual disability , a rare recessive neuroectodermal syndrome [J]. *Genet Med* , 2019 , 21( 9) : 2025 – 35.
- [9] Wada Y , Kikuchi A , Kaga A , et al. Metabolic and pathologic profiles of human LSS deficiency recapitulated in mice [J]. *PLoS Genet* , 2020 , 16( 2) : e1008628.
- [10] Dickinson M E , Flenniken A M , Ji X , et al. High-throughput discovery of novel developmental phenotypes [J]. *Nature* , 2016 , 537( 7621) : 508 – 14.
- [11] Mullen P J , Yu R , Longo J , et al. The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer [J]. *Nat Rev Cancer* , 2016 , 16( 11) : 718 – 31.
- [12] Romano M-T , Tafazzoli A , Mattern M , et al. Bi-allelic mutations in LSS , encoding lanosterol synthase , cause autosomal-recessive hypotrichosis simplex [J]. *Am J Hum Genet* , 2018 , 103( 5) : 777 – 85.
- [13] Chen X J , Hu L D , Yao K , et al. Lanosterol and 25-hydroxycholesterol dissociate crystallin aggregates isolated from cataractous human lens via different mechanisms [J]. *Biochem Biophys Res Commun* , 2018 , 506( 4) : 868 – 73.
- [14] Zhao L , Chen X J , Zhu J , et al. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts [J]. *Nature* , 2015 , 523( 7562) : 607 – 11.

## Breeding , reproduction and genotype identification of LSS knockout mice

Li Mingcong , Sun Xiaomei , Li Yuhao , et al

( Dept of Biochemistry and Molecular , Anhui Medical University , Hefei 230032)

**Abstract** To explore the breeding and genotype analysis of Lanosterol synthase ( LSS) gene knockout mice. The introduced heterozygous knockout mice were reared and bred , the tails of progeny mice around 2 weeks old were cut , their genomic DNA was extracted , the target gene fragments were amplified by PCR reaction and identified by agarose gel electrophoresis Genotype of mice; Western blot analysis was used to analyze and compare LSS protein expression in livers and skin tissues of heterozygous and wild-type mice. A batch of LSS knockout mice were successfully bred , and their progeny mice were identified by PCR with two genotypes: wild type ( LSS<sup>+/+</sup> , Wt) and heterozygous ( LSS<sup>+/-</sup> ) , which did not appear Homozygous knockout mice; Western blot results showed that compared with wild-type mice , LSS gene knockout heterozygous mice expressed less LSS protein in liver and skin tissues; the viability of heterozygous knockout mice was weaker than that of wild – type mice. Successfully obtaining LSS gene knockout mice , PCR identification of mouse genotypes has the advantages of fast , simple and stable , which lays the foundation for further study of the biological function of LSS.

**Key words** LSS; genotype knockout; genotype identification; polymerase chain reaction system; breeding