

# DRD<sub>3</sub> 基因敲除鼠饲养繁殖及基因型鉴定

张宝, 魏曙光, 张洪波, 余兵, 冯祖飞, 官方霖, 徐月红, 高春燕, 李生斌\*

(西安交通大学医学院卫生部法医学重点实验室, 环境与疾病相关基因教育部重点实验室, 陕西西安 710061)

**摘要** [目的] 对于 DRD<sub>3</sub> 基因敲除小鼠的饲养繁殖以及鉴定方法进行分析, 为进一步研究多巴胺及其受体的功能提供动物模型。[方法] 引进的 DRD<sub>3</sub> 基因敲除小鼠均为杂合子基因型, 1 雌 1 雄同窝进行饲养繁殖, 从仔鼠中提取基因组 DNA, 进行 PCR 鉴定。[结果] 成功获得的子代小鼠有敲除杂合子、野生型及敲除纯合子 3 种基因型。DRD<sub>3</sub> 敲除杂合子基因型小鼠的饲养繁殖获得成功, 亦获得较多敲除纯合子基因型小鼠。[结论] 正确的饲养繁殖管理及基因型鉴定方法可从 DRD<sub>3</sub> 基因杂合子小鼠成功获得纯合子小鼠。

**关键词** DRD<sub>3</sub> 基因; 基因敲除; 鉴定

**中图分类号** S813 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)26-10657-02

## Breeding Reproduction of DRD<sub>3</sub> Gene Knockout Mice and Its Genotype Identification

ZHANG Bao et al (Key Laboratory of Forensic Science of Ministry of Health, Key Laboratory of Environment and Disease Relevant Genes of Ministry of Education, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061)

**Abstract** [Objective] To discuss the breeding and identification methods of DRD<sub>3</sub> gene knockout mice and lay the foundation for further study on the function of dopamine and its receptors. [Method] Heterozygote mice were bred and reproduced. Genome DNA extracted from the mice's tails were amplified by using PCR method for genotype identification. There were three genotypes (heterozygote, wild-type and homozygote) in the offspring. [Result] The experimental model for DRD<sub>3</sub> gene knockout mice was successfully established and more DRD<sub>3</sub> knock-out mice were reproduced. [Conclusion] Appropriate methods of breeding, reproducing, and identifying are effective ways to gain DRD<sub>3</sub> gene knock-out mice from heterozygote mice.

**Key words** DRD<sub>3</sub>; Gene knockout; Identification

多巴胺是下丘脑和脑垂体腺中关键的一种神经递质, 其紊乱可以导致多种神经精神系统相关疾病, 如帕金森症、精神分裂症、抑郁症、多动症和药物成瘾等疾病<sup>[1]</sup>。多巴胺通过与受体相互作用而发挥生物学功能。多个受体中, D<sub>3</sub> 受体常表达于突触后神经元, 对于学习记忆过程及运动行为发挥重要的作用。近年来, 多巴胺 D<sub>3</sub> 受体(DRD<sub>3</sub>)功能的研究成为热点问题之一, 对于该突变小鼠的应用也日益增长。笔者对 DRD<sub>3</sub> 基因敲除小鼠的繁殖鉴定进行了探讨。

## 1 材料与与方法

**1.1 实验动物** DRD<sub>3</sub> 基因敲除杂合子小鼠由美国芝加哥大学徐明教授实验室惠赠, 在西安交通大学动物实验中心 SPF 层流房中繁殖扩群。

**1.2 小鼠的饲养与繁殖** 小鼠均在西安交通大学动物实验中心的 SPF 层流动物房中饲养, 屏障环境内温度 18~22℃, 相对湿度约 50%~60%, 光照明暗交替 12 h/d。小鼠饲养过程中饲料、垫料、鼠盒均进行 131℃、5 min 高压预真空灭菌。饮水经超滤净化水机处理达到纯净无菌水要求, 实行自由采食和饮水, 鼠盒的垫料每 2~3 d 更换 1 次。按照 SPF 级动物饲养标准进行。最初引进的小鼠 1 雌 1 雄饲养, 母鼠妊娠期为 20 d 左右, 哺乳期为 28~30 d, 在幼鼠 7~10 日龄左右时剪脚趾标记。小鼠的性成熟期为 60 d 左右, 大量繁殖时采用 1 只雄鼠与 2 只雌鼠同居的方式进行。

**1.3 小鼠的基因型鉴定** 引进小鼠均为 DRD<sub>3</sub> 基因敲除杂合子小鼠, 配对繁殖后依据孟德尔遗传定律其子代会出现野生型、杂合子以及纯合子 3 种基因型, 需要对子代进行基因型鉴定。

**1.3.1 鼠尾 DNA 提取。** 剪取小鼠尾尖长 0.3 cm 的组织, 放入容量 1.5 ml 离心管中, 快速带回实验室低温保存。然后, 利用 Chelex-100 与蛋白酶 K 相结合提取基因组 DNA, 测定 OD 值, 于 4℃ 条件下保存备用。

**1.3.2 PCR 反应及琼脂糖凝胶电泳。**

(1) PCR 反应。鉴定引物序列参考文献[2], 由上海生工合成。野生型鉴定引物: 5'-CATCTGCACGCT-TCAAAGCG-3'; 5'-TTTCTCGGCAGGAGCAAGGTG-3'。敲除鼠鉴定引物: 5'-GCTCACCCTAGGTAGTTG-3'; 5'-ACCTCTGAGCCAGATAAGC-3'; 将以上 4 种引物按照 1:1:2:2 的比例混合至 10 μmol/L, 进行 PCR 反应。

PCR 反应体系(20 μl): 2×Taq PCR Mix 10 μl, 上述混合引物 4 μl, 模板 DNA 2 μl, 灭菌 ddH<sub>2</sub>O 4 μl 补足至 20 μl。使用 PCR 扩增仪进行 Touchdown 循环扩增: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 65~50℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 35 s, 复性温度每个循环下降 1℃, 15 个循环; 94℃ 变性 30 s; 50℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 35 s, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 保存备用。

(2) 琼脂糖凝胶电泳: 将 PCR 反应终产物 5 μl 于 2% 的琼脂糖凝胶中进行电泳分析。然后, 依据琼脂糖凝胶基因型 205 bp 和 300 bp 片段大小分辨出各类基因型小鼠。

## 2 结果与分析

**2.1 小鼠的繁殖情况** 从图 1 可以看出, DRD<sub>3</sub> 基因敲除纯合子(DRD<sub>3</sub><sup>-/-</sup>)小鼠较正常小鼠配对受孕时间略长, 雌雄配

**基金项目** 国家自然科学基金项目(31301949); 中国博士后科学基金资助项目(2013M532056); 陕西省博士后科学基金资助项目。

**作者简介** 张宝(1983-), 女, 陕西西安人, 讲师, 博士, 从事动物遗传学研究, E-mail: zhangbao\_814@mail.xjtu.edu.cn。\* 通讯作者, 博士, 博士生导师, 从事基因多态性与疾病研究, E-mail: shbinlee@mail.xjtu.edu.cn。

**收稿日期** 2013-08-06

对后繁殖出仔鼠。 $DRD_3$  敲除母鼠妊娠期为 20 d 左右。

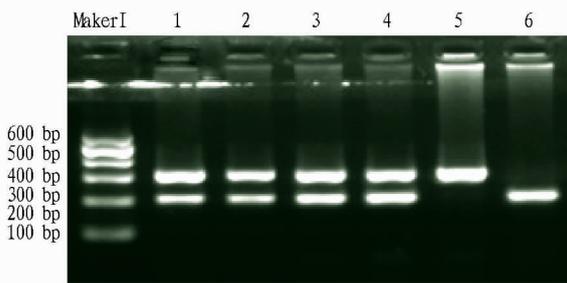
**2.2 小鼠基因型鉴定结果** 从图 2 可以看出,5 号小鼠呈现 1 条 300 bp 条带,为敲除纯合型;1、2、3、4 号小鼠均出现大小

为 300 和 205 bp 2 个条带,为杂合型;6 号小鼠仅出现 1 条 205 bp 大小的条带,为野生型。



注:A. 妊娠期母鼠;B. 1 日龄小鼠。

图 1  $DRD_3$  基因敲除小鼠的繁殖



注:5. 敲除纯合子;1、2、3、4. 杂合子;6. 野生型。

图 2  $DRD_3$  基因敲除小鼠基因型的鉴定

### 3 讨论

多巴胺由脑内分泌,能够影响动物情绪的神经传导物质,参与了情感、运动、认知、神经内分泌等多个生理过程的调节,与精神分裂症、帕金森综合症和药物成瘾等密切相关<sup>[3]</sup>。多巴胺通过其多个受体发挥生物学效应。 $DRD_3$  基因编码多巴胺  $D_3$  受体,分布于 Calleja 岛、伏隔核、丘脑、下丘脑以及小脑中的部分区域和中脑边缘系统的核心部位<sup>[4]</sup>,在情感、运动和认知感觉的信息加工过程中发挥着重要作用。目前, $DRD3$  已经成为多个受体中的研究热点之一。

小鼠  $DRD_3$  基因位于 16 号染色体,7 个外显子编码 446 个氨基酸构成的蛋白质。研究发现人类  $DRD_3$  基因具有多个剪切体,编码不同的蛋白,其中一些为无义介导衰变。脑区  $DRD_3$  基因 mRNA 的表达量远低于  $DRD_2$  基因,但其与多巴胺的结合力却最高<sup>[5]</sup>。同时,研究发现多巴胺  $D_3$  受体可调节多个受体间的相互作用,在特定病理环境下  $D_3$  受体显示出重要的平衡作用<sup>[6]</sup>。

大多数科学研究集中于  $DRD_3$  类药物,尤其是部分激动剂,目前成为帕金森病治疗的新方向, $DRD_3$  也成为抗精神病药的重要靶点。同时,对于  $DRD_3$  基因水平的分析也大量开展,研究发现  $DRD_3$  基因多态性与精神分裂症的病因、症状及治疗等方面都有关系<sup>[7]</sup>,由于样本量的原因、种族差异或

地域因素,结果还存在差异,需要大样本的后续研究<sup>[8-9]</sup>。

为了科学试验研究的需要,实验室引进  $DRD_3$  基因敲除杂合子小鼠,在西安交通大学动物实验中心 SPF 层流动物房进行饲养。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,故需要进行进一步鉴定,从而得到纯合基因型子代。将试验鉴定出的野生型同野生型以及纯合型同纯合型小鼠进行交配,即可获得大量野生型 ( $DRD_3^{+/+}$ ) 和纯合型 ( $DRD_3^{-/-}$ ) 小鼠,用于试验研究。通过对  $DRD_3$  基因敲除小鼠生长繁殖性能的观察结果发现  $DRD_3$  基因敲除并不影响该小鼠的繁殖能力,其具有野生型小鼠相同的繁殖性能及相同的仔鼠生命力。仔鼠出生 15 d 左右进行基因型鉴定,采用 PCR 方法进行基因型的筛选,证明 PCR 是一种快速且可靠的方法。 $DRD_3$  敲除鼠不同基因型的成功鉴定,可为建立基因敲除鼠模型及探讨疾病的发生机制和基因治疗提供基础的理论依据。

### 参考文献

- [1] 李颖,马晓璇,张莹,等.多巴胺  $D1$  受体在视神经保护中的研究进展[J].中华临床医师杂志,2012,6(23):7669-7671.
- [2] XU M, KOELTZOW T E, SANTIAGO G T, et al. Dopamine  $D3$  Receptor Mutant Mice Exhibit Increased Behavioral Sensitivity to Concurrent Stimulation of  $D1$  and  $D2$  Receptors[J]. Neuron, 1997, 19(4):837-848.
- [3] 李凡,舒斯云,包新民.多巴胺受体的结构和功能[J].中国神经科学杂志,2003,19(6):405-410.
- [4] 李伟.多巴胺及其受体的研究现状[J].中国现代神经病杂志,2011,11(1):104-106.
- [5] 张国炳,陈峻严.脑内多巴胺受体的分布和功能[J].中国校医,2013,27(1):38-40.
- [6] 和友,金国章.多巴胺  $D3$  受体 ( $D3R$ ) 的神经科学新进展[J].生命科学,2005,17(2):170-175.
- [7] 张慧杰,胡贤.多巴胺受体基因功能多态性与人格[J].医学综述,2011,17(9):1306-1308.
- [8] NUNOKAWA A, WATANABE Y, KANEKO N, et al. The dopamine  $D3$  receptor ( $DRD3$ ) gene and risk of schizophrenia: Case-control studies and an updated meta-analysis[J]. Schizophrenia Research, 1996, 16(1):61-67.
- [9] TALKOWSKI M E, KIROV G, BAMNE M, et al. A network of dopaminergic gene variations implicated as risk factors for schizophrenia[J]. Hum Mol Genet, 2008, 17(5):747-758.