

慢病毒载体介导 IkB 激酶- α (IKK α) 基因 RNA干扰转基因小鼠的制备*

杨志峰¹⁾ 王 龙²⁾ 杨生生¹⁾ 匡 颖²⁾ 陈 欢¹⁾

徐国江²⁾ 蔡在龙¹⁾ 王铸钢²⁾ 毛积芳^{1,2)**}

(¹⁾第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433; ²⁾上海市南方模式生物研究中心, 上海 201203)

摘要 IkB 激酶- α (IKK α) 的功能与淋巴形成和乳腺发育相关, 在乳腺肿瘤中观察到 IKK α 蛋白的过量表达. 应用小鼠受精卵卵周隙注射慢病毒载体的方式, 建立 IKK α 基因 RNAi 转基因小鼠模型, 为在体内研究 IKK α 基因的生物学功能及其与肿瘤发生的关系创造条件. 实验构建了针对 IKK α 基因 RNAi (剔除) 的慢病毒载体, 并将载体导入小鼠受精卵卵周隙, 获得携带该载体的转基因小鼠模型, 经 PCR 鉴定首建鼠阳性率为 15%. 转基因小鼠外周血细胞 IKK α mRNA 表达量明显降低. 初步表型观察分析, IKK α 基因 RNAi 小鼠发育正常, 进一步的分析工作正在进行中.

关键词 IKK α 基因, 慢病毒载体, RNA 干扰, 转基因小鼠
学科分类号 Q78

NF- κ B 蛋白表达异常与肿瘤的关系非常密切, 其抗凋亡、促细胞增殖和免疫激活等功能是导致细胞恶变的潜在因素^[1]. IkB 激酶- α (IKK α) 蛋白是与淋巴形成和乳腺发育相关的激酶, 并参与了对下游 NF- κ B 蛋白的调控. 在黑色素瘤、乳癌、胰腺癌等恶性肿瘤中, 都观察到 IKK α 蛋白表达水平的升高. 近年来发现了与肿瘤发生发展密切相关的 RANKL-IKK α -NF- κ B 通路^[2]: 上游信号引起 NF- κ B 受体激活蛋白的配体(tumour necrosis factor family member receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) 与其受体 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANK) 结合, 引起 IKK α 蛋白激活, 诱导 IkB 激酶降解, 释放 NF- κ B 蛋白入核, 调节下游基因的表达. 该通路的异常表达是导致肿瘤形成的早期事件之一. 因此探讨 IKK α 与肿瘤发生发展的关系成为 NF- κ B 信号转导通路研究的新热点.

RNA 干扰技术相对于传统的基因敲除具有投入少、周期短、操作简单等优点. 已经广泛应用于基因功能、信号转导和基因治疗等方面的研究中. 2001 年发现, 长度在 30 个核苷酸以下的短双链小分子干扰 RNA 比以往使用的长双链 RNA 干扰具有更高的专一性, 以及更小的不良反应^[3], Douglas

等构建慢病毒载体, 就是以上述的理论为基础构建的一类表达 shRNA 片段的 RNAi 载体, 可以在体内外特异性高效抑制相关基因. 相对于其他的基因导入方式, 慢病毒载体介导的外源 RNA 干扰序列进入宿主细胞具有很多优势: a. 相对于质粒载体介导的 RNA 干扰, 其产生的剔除作用持续而稳定; b. 可感染分裂期或非分裂期细胞; c. 可感染啮齿类动物的受精卵细胞并将其基因组整合到宿主染色体中, 从而获得特异性的剔除相关基因的转基因动物模型^[4].

本研究应用 RNA 干扰技术, 成功构建针对 IKK α 基因 RNAi 的慢病毒载体, 并应用卵周隙注射方法, 感染小鼠受精卵, 获得 IKK α 基因表达降低的转基因小鼠模型. 该技术为今后低成本、高效能研究 IKK α 基因在分化、发育以及肿瘤发生发展中的作用打下良好基础, 同时也提供了一个新型的制备转基因小鼠模型的技术平台.

*上海市科委重大攻关项目(03DZ14019)和国家自然科学基金资助项目(30471948, 30471676).

** 通讯联系人.

Tel: 021-25070306-8018, E-mail: jifang@hotmail.com

收稿日期: 2006-07-20, 接受日期: 2006-08-22

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 小鼠材料. 供体、受体鼠皆为杂交一代(CBA ♂ × C57BL/6J ♀), 由上海南方模式生物研究中心繁殖.

1.1.2 IKK α 基因剔除慢病毒载体由本研究室构建.

1.1.3 各类限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、蛋白酶 K、DNA 聚合酶、Random primer labeling kit、Catrimox-14 RNA isolation kit、RT-PCR 检测试剂盒和实时定量 PCR 检测试剂盒分别购自 Promega、TAKARA、NEB、ABI 和 Invitrogen 公司, 质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司.

1.1.4 细胞培养相关试剂: DMEM 液体培养基、非必需氨基酸、谷氨酰胺、PBS、青链霉素、稻瘟菌素、胰蛋白酶等分别购自 Gibco 和 Invitrogen 公司.

1.1.5 参照文献报道的针对 IKK α mRNA 的特异性 siRNA^[5], 设计寡核苷酸序列, 并合成 2 条寡聚核苷酸链: 5' CACCGCAGGCTCTTTCAGGGACACGAATGTCCCTGAAAGAGCCTGC 3'; 5' AAAAGCAGGCTCTTTCAGGGACATTCGTGTCCCTGAAAGAGCCTGC 3'. 经去磷酸化和退火后, 产物命名为 IKK α ds Oligo, 结构见图 1.

1.1.6 引物. U6 引物: 5' GGACTATCATATGCTTACCG 3', V5 引物: 5' ACCGAGGAGAGGG-

TTAGGGAT 3'. RT-PCR IKK α 引物: 5' GTCAGGAGAAGTTCGGTTTA 3', 5' ATTCCAGTTTCACGCTCA 3'. RT-PCR MRPL19 引物: 5' GGGATTTGCAATTCAGAGATCAG 3', 5' GGAAGGGCATCTCGTAAG 3'. Realtime IKK α 引物: 5' CTAAGACACAGACCTCCTGATCAC 3', 5' TGCACGATGATCTTCACCATCT 3'. Realtime MRPL 19 引物: 5' CCACAGCCGACCCCTATG 3', 5' TGATGCAAATCCCCAGGAA 3'. 由上海生工生物技术公司合成.

1.2 方法

1.2.1 慢病毒载体的构建. IKK α ds Oligo 产物与 2 μ l pENT/U6 vector (0.5 mg/L)连接、转化 TOP10 感受态菌, 质粒抽提收获 pENT/U6-IKK α vector, 测序正确后与 2 μ l pLenti6/BLOCK-iT-DEST vector (150 mg/L)重组转化 stbl3 感受态菌获得重组克隆, 测序正确后抽取其质粒 DNA, 采用 QIAGEN-tip 100 (Midi) plasmid purification 质粒抽提试剂盒大量制备. 取 3 μ g pU6-IKK α -knockdown 表达载体与 9 μ l Vira power Package Mix 混合后, 加入 36 μ l lipofectimine 2000 阳离子脂质体, T-75 细胞培养瓶中共转染 293FT 细胞, 包装产生慢病毒载体, 至 72 h 收集上清, 并通过 0.45 μ m 滤器过滤, 4 $^{\circ}$ C, 70 000 $g \times 2$ h 超速离心后弃上清, 沉淀即为 IKK α 基因剔除慢病毒载体, 分装后冻存于 -80 $^{\circ}$ C 待用, 载体中产生 RNAi 效应的片段见图 1.

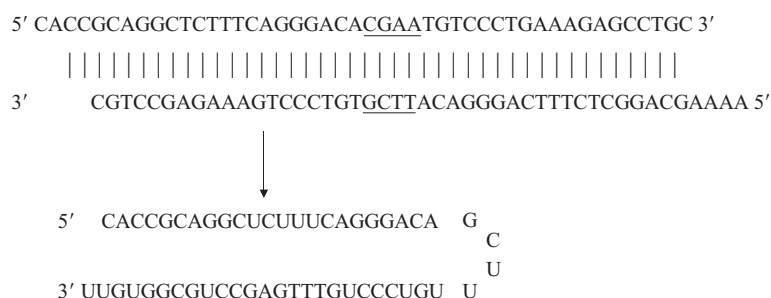


Fig. 1 The structure of ds oligo and shRNA of IKK α

1.2.2 慢病毒滴度测定. 胰酶消化并调整 MCF-7 细胞至 2×10^5 /ml, 转入 6 孔板中培养过夜, 每孔 1 ml, 生长至 30%~50%密度待用. 10 μ l 慢病毒载体从 -80 $^{\circ}$ C 中取出, 原液按 10 倍稀释法用普通 DMEM 培养基稀释后 (1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷), 分别加到 6 孔板中的 5 个孔中, 剩余 1 孔, 不加病毒, 作为阴性对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育过

夜. 次日更换含 6 mg/L polybrene 的 DMEM 培养基, 过夜培养后, 在含有 10 mg/L 稻瘟菌素的 DMEM 培养基孵育, 每隔 3 天更换培养基, 持续 12 天结束. 弃上清, PBS 清洗细胞 2 次, 1%结晶紫室温染色 10 min, 计数蓝染颗粒, 该数值乘以稀释倍数即为病毒的滴度值, 用 Transducing Units (TU)/ml 表示.

1.2.3 假孕母鼠培养. 正常公鼠 (6~8 周龄) 麻醉、腹部剖开, 将两侧的输精管各剪去 1 cm, 缝合, 休息 2 周以上备用. 在供体鼠合笼的同一天将正常母鼠与结扎公鼠合笼 (3:1), 第 2 天见栓的母鼠为假孕鼠.

1.2.4 受精卵细胞取材. 处死见栓的供体母鼠, 撕开腹部皮肤和肌肉, 暴露腹腔, 剪下输卵管置于 100 μ l 的 M2 液滴中. 体视显微镜下撕开输卵管壶腹部, 让包裹颗粒细胞的卵块流出并移入含透明质酸酶 (80 U/ml) 的 M2 液滴中, 待颗粒细胞脱落后, 吸取已消化下来的受精卵, 在 M2 液滴中洗涤 4~5 遍, 移入 M16 培养液中, 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 条件下培养.

1.2.5 慢病毒(IKK α -knockdown-lentivirus)感染小鼠受精卵细胞及胚胎移植.

方法 1: 用玻璃微量注射针注射 10 μ l 病毒溶液到受精卵卵周隙.

方法 2: 用 PIEZO 仪 (注: 一种仪器, 利用压电陶瓷的工作原理, 可以用高频震动在透明带上开一个小口), 注射 50 μ l 病毒溶液到受精卵卵周隙.

方法 3: 用玻璃微量注射针注射 10 μ l 病毒溶液到受精卵卵周隙后, 再将注射后受精卵浸泡于含慢病毒溶液中过夜培养.

取假孕母鼠, 麻醉、背部剪开, 拉出卵巢和输卵管. 将输卵管与卵巢间的膜撕开一小缺口, 移卵针吸取 25 枚注射后存活的受精卵, 穿过膜上的缺口吹到输卵管伞口内, 将卵巢和输卵管送回假孕母鼠体内, 缝合伤口.

1.2.6 转基因小鼠首建鼠(founder mouse)的 PCR 鉴定.

出生小鼠 186 只, 出生 3 周后, 剪 1cm 仔鼠尾, 置于螺旋管中, 每管加 500 μ l 裂解液和 50 μ l 蛋白酶 K, 放入杂交管中, 56 $^{\circ}$ C 条件下, 杂交炉中转动过夜, 次日抽提基因组 DNA 并溶于双蒸水中待用.

按照慢病毒基因组序列设计一对引物(U6、V5), 以 1 μ g 小鼠基因组 DNA 为模板, PCR 反应鉴定. 95 $^{\circ}$ C, 5 min 变性; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 进行 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 10 min 延伸. 反应结束后, 取 5 μ l 样本在 2% 琼脂糖凝胶中电泳并观察结果.

1.2.7 F1、F2 代小鼠的出生及鉴定.

取首建鼠 40, 110, 117, 150(δ)号, (经 PCR 鉴定为阳性转基因小鼠), 继续与野生型小鼠(η)

交配, 获得 F1 代小鼠, 其中 40 号产子 7 只, 110 号产子 11 只, 115 号产子 6 只, 117 号产子 25 只, 共出生 49 只仔鼠, PCR 鉴定携带慢病毒载体序列的 F1 代转基因小鼠.

从首建鼠 40 号生产的 7 只仔鼠中筛选出 2 只阳性 F1 代小鼠, 即: 18 号(δ)与 22(η)号, 交配获得 F2 代小鼠, 共产仔鼠 5 只, PCR 鉴定携带慢病毒载体序列的 F2 代转基因小鼠.

1.2.8 小鼠外周血 RT-PCR 结果鉴定. 采用 Catrimox-14 RNA isolation kit 方法, 分别从野生型、阴性和阳性转基因小鼠的首建鼠眼眶取血并抽提总 RNA, 随后应用 RevertAid First Strand cDNA synthesis kit, 将 mRNA 逆转录成 cDNA, PCR 检测 IKK α 基因在小鼠外周血细胞中的表达.

1.2.9 实时定量 PCR 法检测转基因小鼠外周血细胞 IKK α 基因的表达水平. 实时定量 PCR 技术检测 110 系中 F1 代和 F2 代 IKK α 基因在小鼠外周血细胞的表达水平, 样本包括野生型小鼠, F1 代小鼠 18 号(δ)与 22 号(η), 及其交配后产生的后代 (F2 代) 51 号, 52 号, 53 号, 54 号和 55 号小鼠. 引物序列由 ABI 实时定量 PCR 软件 Primer Express 3.0 设计. 应用荧光染料嵌入法检测. 反应体系如下: 10 μ l Syber Green Mix, 1 μ l 小鼠血液细胞逆转录模板 cDNA, 0.2 μ l 上、下游引物(20 μ mol/L), 双蒸水补足总体积至 20 μ l. 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min 重复 40 个循环. 扩增过程、荧光信号检查、数据储存和分析均由 7300 定量 PCR 仪及 SDS1.1 软件自动完成, 所获数据导入 EXCEL 进行计算和分析.

2 结 果

2.1 慢病毒载体的构建

按 Invitrogen 公司 lentiviral RNAi 表达系统 (k4944-00)提供的方法, 从培养 293FT 包装细胞的上清中收获可剔除 IKK α 基因的慢病毒共 300 ml, 为获得高滴度高感染力的慢病毒载体, 通过过滤和超速离心, 将病毒溶液浓缩至 300 μ l^[6], 随后取 10 μ l 鉴定慢病毒滴度, 剩余冻存于 -80 $^{\circ}$ C 待用.

2.2 慢病毒滴度测定

病毒原液按 10 倍稀释法用普通 DMEM 培养基稀释后 (1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷) 感染 MCF-7 细胞, 1 天后换用含 10 mg/L 稻瘟菌素的 DMEM 培养基, 每隔 3 天换液 1 次, 孵育 12 天后测定慢病毒滴度为 4 $\times$ 10⁷ TU/ml (图 2), 即

每毫升病毒原液含 4×10^7 个具有感染能力的病毒颗粒.

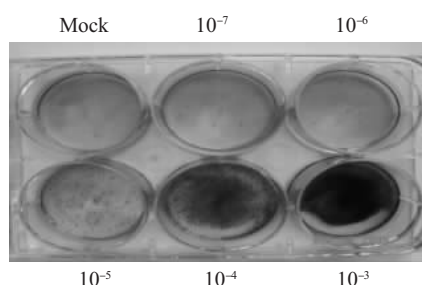


Fig. 2 Detection of IKK α knockdown lentiviral vectors

In the plate, the colony counts were: Mock, No colonies; 10^{-3} dilution, Confluent, undeterminable; 10^{-4} dilution, Confluent, undeterminable; 10^{-5} dilution, Confluent, undeterminable; 10^{-6} dilution, 38; 10^{-7} dilution, 4.

2.3 转基因小鼠的 PCR 鉴定及统计学分析

应用 3 种不同方法感染小鼠受精卵获得后代,

通过慢病毒载体中的一对特异性引物进行鉴定, 扩增条带长度为 232 bp, 共繁殖、鉴定 186 只小鼠. PCR 检测表明, 慢病毒载体整合到小鼠基因组的比率分别是: 7.69%, 12.28%, 18.45%. 共获得阳性转基因首建鼠 28 只, 总体成功率为 15.05%, 经卡方分析, 用第三种方法制备的转基因小鼠的成功率最高(表 1). 部分 PCR 鉴定结果见图 3.

为获得稳定表达 IKK α 基因 RNAi 小鼠模型, 继续制备 F1 代和 F2 代, 用于建系和分析工作. 其中 F1 代小鼠共出生 49 只, 经 PCR 鉴定阳性率为 36.73%. 首建鼠 110 号的 F1 代中的 18 号(♂)与 22 (♀)号交配获得 F2 代小鼠, 共产子 5 只, 其中 4 只鉴定为阳性, 阳性率为 80%, 仅 52 号经鼠尾基因组检测为阴性小鼠.

Table 1 PCR analysis on founder mice

Group	Number of positive mice	Number of negative mice	Accounts	Efficiency
Method 1	2	24	26	7.69%*
Method 2	7	50	57	12.28%*
Method 3	19	84	103	18.45%*
Aaccounts	28	158	186	15.05%

* $P < 0.05$, compared with method 1 and method 2; method 2 and method 3; method 1 and method 3. Method 1: IKK α -knockdown lentiviral vectors were injected into the subzonal space; Method 2: IKK α -knockdown lentiviral vectors were injected into the subzonal space by piezo; Method 3: IKK α -knockdown lentiviral vectors were injected into the subzonal space and cultured overnight.

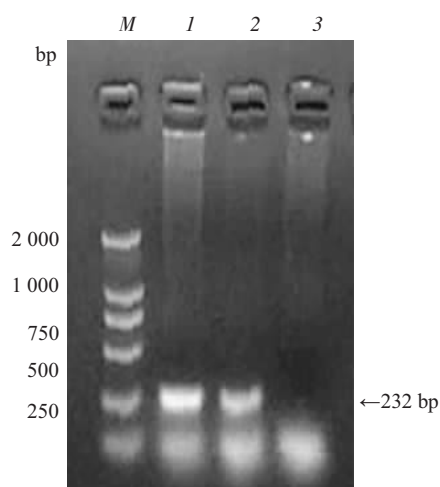


Fig. 3 Identificatoin of transgenic mice by PCR

M: DL2000 DNA marker; 1: MCF-7 cells infected by IKK α knockdown lentivirus; 2: Heterozygous IKK α knockdown mouse; 3: Wild type mouse.

2.4 IKK α 基因 RNAi 小鼠外周血细胞 RT-PCR 结果分析

通过 RT-PCR 分析检测 IKK α 基因在转基因小鼠外周血细胞中的表达, 与野生型小鼠相比, 转基因小鼠外周血细胞中 IKK α mRNA 的表达水平出现明显下降, 结果见图 4.

2.5 实时定量 PCR 检测 110 系转基因小鼠外周血细胞 IKK α 基因的表达水平

选择持家基因 MRPL19 作为校准基因, 所有样本重复 3 次, 计算 $\Delta\Delta C_t$, 并以平均相对含量 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 作图, 将野生型小鼠做为对照, 其外周血细胞 IKK α mRNA 的相对含量值定为 1, 计算转基因小鼠外周血细胞中 IKK α mRNA 的相对含量. 经 t 检验分析显示, 110 系的 F1 代及 F2 代中所有小鼠外周血细胞 IKK α mRNA 相对表达量均低于野生型小鼠. 52 号小鼠基因组 DNA 通过 PCR 分析显示,

慢病毒载体未整合至小鼠基因组, 但其 IKK α mRNA 相对表达量也低于野生型小鼠(图 5).

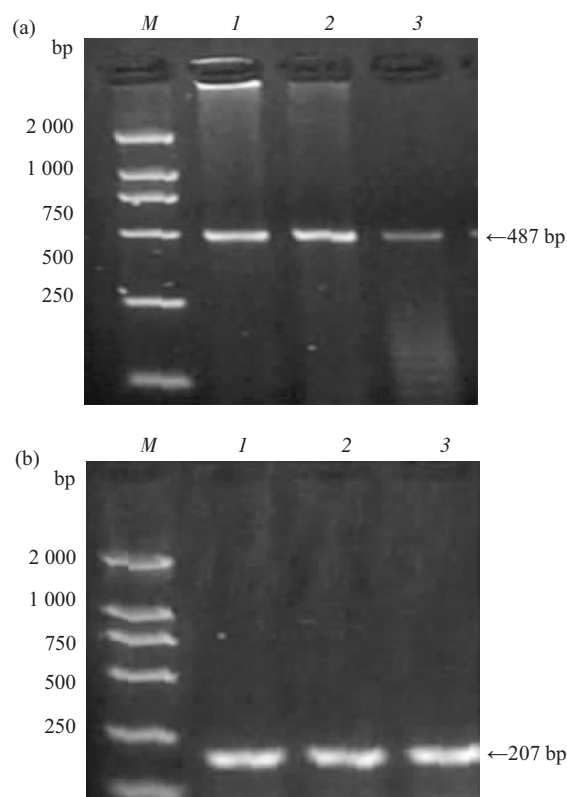


Fig. 4 Detection of RNAi effects in mice blood. A 487 bp fragment could be amplified in wild type mouse and negative mouse in found mice but low expression in heterozygous mouse

(a) Expression of IKK α gene in mice blood. M: DL2000 DNA marker; 1: Wild type mouse; 2: Negative mouse in found mice; 3: Heterozygous IKK α knockdown mouse in founder mice. (b) Expression of MRPL19 gene in mice blood. M: DL2000 DNA marker; 1: Wild type mouse; 2: Negative mouse in found mice; 3: Heterozygous IKK α knockdown mouse in founder mice.

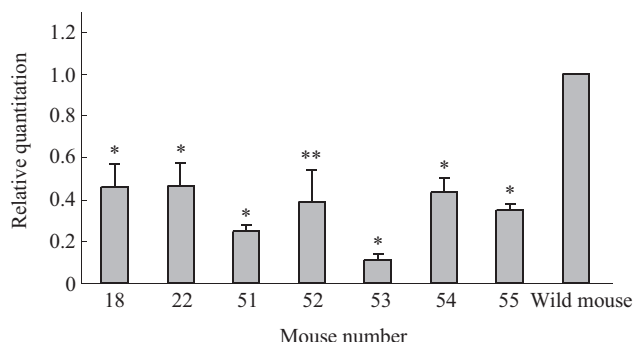


Fig. 5 Relative quantitation using the comparative C_t method to detect IKK α gene expression in transgenic mice blood

The relative amount of IKK α mRNA was described using $2^{-\Delta\Delta C_t}$. C_t refers to cycle numbers when the intensity of fluorescence reaches fluorescence threshold; $\Delta\Delta C_t = (C_{t,IKK\alpha \text{ gene}} - C_{t,MRPL19 \text{ gene}})_{\text{experiment}} - (C_{t,IKK\alpha \text{ gene}} - C_{t,MRPL19 \text{ gene}})_{\text{control}}$. * $P < 0.001$ compared with control. ** $P < 0.05$ compared with control ($n=3$, paired t -test).

2.6 IKK α 基因 RNAi 小鼠的表型观察

IKK α 基因 RNAi 小鼠的首建鼠能正常交配繁殖, 至断奶时 F1 代与野生型小鼠相比在外观和行为未见明显异常, 可能因为 IKK α 基因仅表达下调, 但在体内并未完全抑制有关. F1 代繁殖 F2 代出现很难产仔的现象, 纯合子筛选工作进展缓慢, 提示 F1 代可能存在生殖功能发育缺陷, 进一步的研究工作正在进行中.

3 讨 论

实验构建的慢病毒载体来源于 HIV-1 型病毒, 改建后保留了原始病毒结构蛋白的基因组, 其原始病毒 5' 和 3' 端长末端重复序列分别由异源启动子和异源的多聚腺苷酸尾所取代, 而原有的包装信号及其他一些非必需的辅助基因, 如 vpr、vpu 等表达毒性蛋白的基因, 均在新构建的病毒载体结构中去除. 因此这些策略的使用减少插入突变所造成的威胁. 同时慢病毒载体 LTR 的 U3 位点缺失、去除病毒 LTR 的增强子、启动子活性等手段, 也避免因同源重组所产生的具有复制能力的慢病毒^[7].

我们将 IKK α 基因 RNAi 慢病毒载体, 通过病毒感染小鼠受精卵的方式获得携带该载体的转基因小鼠模型. 该技术与以往制备转基因动物模型的主要不同在于将慢病毒载体注射到小鼠受精卵卵周隙, 而不是常规的显微核注射^[8]. 与核注射相比, 慢病毒感染受精卵不会对细胞核产生物理损伤而导致受精卵死亡, 所以后代产仔率高. 收获阳性转基因小鼠的几率也提高. 常规采用的核注射方法得到的阳性小鼠在 5% 左右, 而慢病毒感染方式往往可达到 50% 甚至更高, 虽然本实验获得首建鼠的平均阳性率为 15%, 与文献报道有一定差距, 但已高于常规技术. 慢病毒载体不同于通常所用的逆转录病毒载体, 可以感染逆转录病毒载体无法感染的细胞, 如: 干细胞、神经细胞和啮齿类动物的受精卵细胞. 因此可以将所携带的目的基因整合到宿主染色体中, 并随亲本的繁殖, 将外源基因传递给子代发挥作用^[9].

在制备首建鼠的实验中, 3 种不同的方法将病毒载体整合到小鼠基因组的比率存在显著差异, 即注射病毒到受精卵卵周隙, 再将受精卵浸泡在病毒溶液中过夜培养产生的转基因小鼠比例高. 推测认为将受精卵在病毒中浸泡过夜, 受精卵进入二细胞期, 导致病毒可以在此期间继续感染, 因此提高慢病毒感染受精卵的几率, 进而提高阳性转基因小鼠

产率. 采用 PIEZO 法注入的慢病毒溶液较其他 2 组多, 理论上应产生更多转基因小鼠. 可能该方法穿孔后孔径较大导致病毒从透明带中流出, 使感染效率下降. 此外, 我们所用的慢病毒的滴度稍低也是导致产生的阳性转基因鼠比文献报道低的原因之一. 在今后实验中通过增加慢病毒的滴度和延长受精卵培养时间, 可进一步提高阳性转基因鼠的成功率.

慢病毒感染方式替代显微原核注射是一种新型的制备转基因动物模型的方法, 目前国内未见相关报道. 制备该模型目的之一是为观察慢病毒载体感染受精卵是否能获得新型转基因小鼠. 其二观察我们所制备的 IKK α 基因 RNAi 慢病毒载体是否在整体动物模型中产生 IKK α 基因 RNAi 效应. 上述实验观察结果显示, 我们已成功获得整合有慢病毒基因组序列的新型转基因小鼠. 通过实时定量 PCR 法, 检测转基因小鼠外周血细胞中 IKK α mRNA 的表达水平, 表明转基因小鼠外周血细胞 IKK α mRNA 的表达量, 均低于野生型小鼠, 其中 F2 代中的 53 号小鼠, IKK α mRNA 的相对表达量仅为野生型小鼠的 11%. 实验表明, 该模型为在整体水平观察 IKK α 基因 RNAi 提供了一个新平台. 此外, 52 号小鼠经 PCR 鉴定为阴性小鼠, 但是其外周血细胞 IKK α mRNA 表达水平也低于野生型小鼠, 具体原因仍有待进一步分析.

IKK α 基因敲除小鼠表现为四肢短小, 下颚缩短及皮肤病变, 出生后不久死亡^[10]. 无法对其功能进一步研究, 通过 IKK α 基因 RNAi 小鼠的表型观察发现, 首建鼠能正常交配繁殖, 至断奶时产生的 F1 代与野生型小鼠相比在外观和行为未见明显异常, 推测与 IKK α mRNA 在体内并未被完全抑制有关. 而在 F1 代繁殖产生 F2 代时, 则出现很难产仔的现象, 仅 110 系的 18 号与 22 号产子, 导致后续纯合子筛选工作进展缓慢, 提示 F1 代可能存在生殖功能的发育缺陷. 由于 IKK α 基因敲除小鼠在出生后不久即死亡, 而通过基因 RNAi 获得的转基因

小鼠, 未出现死亡, 可开展后续研究工作. 因此, 应用慢病毒载体感染受精卵的方式, 建立 IKK α 基因 RNAi 小鼠模型, 为在整体动物水平研究 IKK α 基因的生物学功能及其与肿瘤发生的关系创造了新的条件.

致谢 感谢中国科学院生物化学与细胞生物学研究所费俭研究员对本工作的支持和帮助.

参 考 文 献

- 1 Karin M, Cao Y, Greten F R, *et al.* NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Rev*, 2002, **2** (4): 301~310
- 2 Cao Y, Bonizzi G. IKK α provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell*, 2001, **107** (6): 763~775
- 3 Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, **441** (6838): 494~498
- 4 Rubinson D A, Dillon C P, Kwiatkowski A V, *et al.* A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nature Genetics*, 2003, **33** (2): 401~406
- 5 Takaesu G, Surabhi R M, Park K J. TAK1 is critical for κ B kinase-mediated activation of NF- κ B pathway. *J Mol Biol*, 2003, **326** (1): 105~115
- 6 Yee J K, Miyanohara A, LaPorte P, *et al.* A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: Highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (20): 9564~9568
- 7 Blesch A. Lentiviral and MLV based retroviral vectors for *ex vivo* and *in vivo* gene transfer. *Methods*, 2004, **33** (2): 164~172
- 8 Fassler R. Lentiviral transgene vectors: green light for efficient production of transgenic farm animals. *EMBO reports*, 2004, **5** (1): 28~29
- 9 Lois C, Hong E J, Pease S, *et al.* Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*, 2002, 295 (5556): 868~872
- 10 Sil A, Maeda S, Sano Y, *et al.* I κ B kinase - α acts in the epidermis to control skeletal and craniofacial morphogenesis. *Nature*, 2004, **428** (6983): 660~664

Generation of IKK α Gene RNA Interfere Mouse Model by Lentiviral Vector*

YANG Zhi-Feng¹⁾, WANG Long²⁾, YANG Sheng-Sheng¹⁾, KUANG Ying²⁾, CHEN Huan¹⁾,
XU Guo-Jiang²⁾, CAI Zai-Long¹⁾, WANG Zhu-Gang²⁾, MAO Ji-Fang^{1,2)}**

¹⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

²⁾Shanghai Research Center for Biomodel Organism, Shanghai 201203, China)

Abstract I κ B kinase- α (IKK α) is required in lymphoid organogenesis and mammary gland development. It has been reported that expression of IKK α is up-regulated in human cancers. IKK α -knockdown mouse model was established in order to study of its physiological function and its role in tumorigenesis. IKK α -knockdown lentiviral vectors were injected into the subzonal space between the cytoplasmic membrane and the zona pellucida. Transgenic mice were generated with the average positive rate of 15% and the IKK α gene knockdown in this mouse model was characterized. IKK α mRNA levels were markedly lower in blood samples collected from transgenic mice as compared to wild type mice. This IKK α -knockdown transgenic mouse model proves to be a useful tool to study physiological function of IKK α gene *in vivo*. Further phenotype analysis is under the way.

Key words I κ B kinase- α (IKK α), lentiviral vector, RNAi, transgenic mouse

*This work was supported by grants from Important Project of Development for Science and Technology in Shanghai Government(03DZ14019) and The National Natural Sciences Foundation of China(30471948, 30471676).

**Corresponding author . Tel: 86-21-25070306-8018, Fax: 86-21-65334344, E-mail: jifang@hotmail.com

Received: July 20, 2006 Accepted: August 22, 2006