

低钾型周期性麻痹相关的 Cchl1a3 基因 R528H 敲入小鼠模型的构建

雍曾花¹, 徐宏燕¹, 王大鹏², 王晓英³, 姚合斌^{1,3}

(1. 安徽医科大学海军临床学院, 北京 100048; 2. 解放军海军总医院基础医学研究中心, 北京 100048;
3. 解放军海军总医院内分泌科, 北京 100048)

【摘要】 目的 构建低钾型周期性麻痹相关的 Cchl1a3 基因 R528H 敲入小鼠模型。**方法** 将 Cchl1a3-knock-in 打靶载体电转染 ES 细胞, 经过 G418 和 Ganciclovir 筛选阳性 ES 细胞克隆并用 PCR 和 DNA 测序法鉴定。将阳性 ES 克隆注射到小鼠囊胚, 获得嵌合体小鼠。通过杂交获得的杂合子小鼠与 FLP 小鼠交配繁育获得去 *neo* 杂合子小鼠, 并用 PCR 和 DNA 测序进行鉴定。将去 *neo* 杂合子小鼠交配得到纯合子后代, 进行生长发育等方面的观察。**结果** 打靶载体成功转染 ES 细胞, PCR 和 DNA 测序法证实 9 个 ES 细胞克隆发生正确的同源重组。通过显微注射获得 7 只嵌合体小鼠。将嵌合体小鼠交配繁育的杂合子小鼠和 FLP 小鼠交配获得 9 只去 *neo* 杂合子小鼠, 最终得到 15 只去 *neo* 纯合子小鼠。该小鼠在发育至性成熟阶段, 精神、饮食及活动状态良好, 但是在 4 个月龄时逐渐出现脱毛, 皮肤破溃甚至死亡。**结论** 成功构建 Cchl1a3 基因 R528H 突变的纯合子小鼠, 为研究人类 CACNA1S 基因功能和阐明低钾型周期性麻痹发生的分子机制奠定了基础。

【关键词】 低钾型周期性麻痹; Cchl1a3; 基因敲入; 小鼠; 模型

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 07-0007-07

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 007. 002

Construction of Cchl1a3 gene R528H knock-in mouse model related to hypokalemic periodic paralysis

YONG Zeng-hua¹, XU Hong-yan¹, WANG Da-peng², WANG Xiao-yin³, YAO He-bin^{1,3}

(1. Naval Clinical College of Anhui Medical University, Beijing 100048, China; 2. Center of Basic Medical Sciences, Navy General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100048, China; 3. Department of Endocrinology, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100048, China;)

【Abstract】 Objective To construct Cchl1a3 gene R528H knock-in mouse model related to hypokalemic periodic paralysis. **Methods** ES cells were transfected with Cchl1a3-Konckin targeting vector linearized by Not I digestion, selected in the medium containing both G418 and ganciclovir. Resistant clones were screened by PCR and further confirmed by DNA sequencing for correct homologous recombinants. Chimera mice were obtained by routing microinjection of homologous recombined ES cells into blastocysts. Heterozygous mice were obtained by mating. Through heterozygous mice with FLP mice mating, removal of *neo* gene heterozygous mice were established and identified with the PCR and DNA sequencing. After mating, homozygous offspring were constructed and observed. **Results** ES cells were successfully transfected with

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30671006;81170800)。

[作者简介] 雍曾花(1986 -), 女, 硕士生, 主要从事模型动物研究。

[通讯作者] 姚合斌, 男, 博士, 硕士生导师, E-mail: yhb196321@163.com。

targeting vector. It was confirmed that 9 resistant clones happened right homologous recombination by PCR and DNA sequencing. 7 chimera mice were obtained by microinjection. After breeding the chimeric mice, heterozygous mice were mated FLP mice to obtain 9 heterozygous mice removal of *neo* gene, the finally obtained 15 homozygous mice with Flp-deleted *neo* gene. In the developmental stage of sexual maturity, the spirit of the mice, restaurants and activities in good condition, but the gradual emergence of hair removal at 4 months of age, skin ulceration and even death. **Conclusions** We successfully constructed Cchl1a3 gene R528H mutation homozygous mice. And it laid a foundation for the study of human CACNA1S gene function and to clarify the molecular mechanism of hypokalemic periodic paralysis.

【Key words】 Hypokalemic periodic paralysis; Cchl1a3; Gene knock-in; Mouse; Model

低钾型周期性麻痹 (hypokalemic periodic paralysis, HypoPP) 是一组以反复短暂发作性肌无力伴随血清钾降低为特征的常染色体显性遗传性离子通道疾病。其中, 家族性低钾型周期性麻痹 (familial hypokalemic periodic paralysis, FHypoPP) 为最常见的形式, 主要涉及的离子通道基因有 CACNA1S、SCN4A 和 KCNE3 (分别编码骨骼肌电压门控 L-型钙通道 $\alpha 1$ 亚单位 CaV1.1、钠通道 α 亚单位 NaV1.4 和钾通道辅助亚单位 MiRP2)。HypoPP 患者具有基因异质性, 有研究报道 HypoPP 患者中 CACNA1S 基因突变最常见^[1]。目前, HypoPP 的发病机制尚不十分清楚。因受人体试验的伦理学限制, 构建动物模型用于研究人类疾病已成为国际趋势。而 99% 的小鼠基因与人类基因组同源^[2], 目前已成为研究哺乳动物尤其是人类基因功能的最常用且能够实现定点突变的模式生物^[3]。因此, 我们选择代表性好、发病症状重的 CaV1.1 Arg528His (R528H) 突变, 运用同源重组和胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES 细胞) 技术构建了 Cchl1a3 基因 (与人类 CACNA1S 基因对应) R528H 突变的 HypoPP 敲入小鼠模型, 为在整体动物水平研究发病机制和病理生理提高良好的平台。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 打靶载体及实验动物

Cchl1a3-knock-in 打靶载体上海南方模式生物研究中心保存; SPF 级 C57BL/6J 雌鼠, 体重 18 ~ 19 g, 来自上海南方模式生物研究中心【SCXK (沪) 2009-0023】。实验在上海南方模式生物研究中心屏障动物实验设施进行【SYXK (沪) 2008-0035】。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 细胞及培养基

来源于 129S6/SV 品系小鼠的 ES 细胞由上海南方模式生物研究中心保存。DMEM 培养基、胎牛

血清、G418、Ganciclovir (均为 Gibco BRL 公司产品, 美国)、LIF (Chemicon 公司, 美国)、青链霉素、胰蛋白酶 (均为 Sigma 公司产品, 美国)。

1.1.3 酶及试剂

Wizard Genomic DNA 纯化试剂盒 (Promega 公司, 美国); Taq DNA 聚合酶, dNTP 及限制性内切酶 (TaKaRa 公司, 日本); PCR 引物 (上海英俊生物技术有限公司和上海生工生物工程有限公司合成); 琼脂糖粉 (Oxoid 公司, 英国); DNA Marker (深圳晶美生物技术有限公司)。

1.1.4 主要仪器

电转仪 (Bio-Rad 公司, 美国); 显微注射平台 (Olympus 公司, 日本); PCR 仪 (Eppendorf AG22331 Hamburg, 德国); DNA 测序仪 (ABI 公司 Prism 377, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 Cchl1a3-knock-in 打靶载体的构建

以 Cchl1a3 基因为模板设计引物, 扩增套取同源臂并定向插入到 pBR322 质粒, 并利用 Red/ET 介导的同源重组从含有 Cchl1a3 基因的细菌人工染色体中套取包含目的基因的片段。PCR 扩增含有目的突变的同源臂并将其插入 PL451 质粒的 Frt-*neo*-Frt 片段两侧, 再与携带 Cchl1a3 基因的 pBR322-Cchl1a3 质粒经同源重组后, 在 Cchl1a3 基因片段内实现目的定点突变 G→A, 并插入 *neo* 筛选基因和 Flp 重组酶特异性识别位点 Frt, 从而获得 Cchl1a3-knock-in 打靶载体。该载体构建已在课题组的前期工作中完成^[4]。

1.2.2 ES 细胞的电转化及药物筛选

取处于对数生长期的 ES 细胞经 0.125% 胰蛋白酶-EDTA 消化并计数, 加适量的 PBS 使细胞密度达到约 $1.5 \times 10^7/\text{mL}$ 。取 0.8 mL 上述 ES 细胞悬液, 加入约 35 μg 经 Not I 线性化的 Cchl1a3-knock-in 质粒 DNA, 混匀后以电压为 240 V、电容为 500 μF 的电参数进行电穿孔, 电转后的细胞重新悬浮后平

均分配到 3 个已铺好滋养层细胞 10 cm 盘培养皿中培养。电穿孔 24 h 后换含有选择药物 G418 (300 mg/L) 和 Ganciclovir (2 μ mol/L) 的培养液进行选择培养, 每天更换培养液, 8 ~ 10 d 后可发现肉眼可见的抗性 ES 细胞克隆并进行挑取。

1.2.3 PCR 法和 DNA 测序法鉴定同源重组 ES 细胞克隆

挑取的 ES 细胞克隆经消化、吹打后转移至 96 孔培养板中培养, 部分冻存, 部分用于提取基因组 DNA。根据 *Cchla3* 基因敲入载体构建策略 (图 1) 设计特异性的 PCR 引物, 进行 PCR 扩增筛选获得的 ES 细胞克隆是否发生双臂同源重组。其中, 5' 短臂上游引物 P1 为 5'-TCACGCCACCCCTTCC ATGAACACA-3' (gene site: 39729-39753), 位于 5' 短臂外; 下游引物 P2 为 5'-CCTCCCCCGTGCCT TCCTTGAC-3', 位于 *neo* 重组区域, 应扩增出 2340 bp 的片段。3' 长臂上游引物 P3 为 5'-CTGA GCCCAGAAAGCGAAGGA-3', 位于 *neo* 重组区域; 下游引物 P4 为 5'-CCCGTCCCCTTTTGGTGCAT AGTGC-3' (gene site: 48770-48746), 位于 3' 长臂外, 应扩增出 7511 bp 的片段。反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。进一步对 PCR 产物进行 DNA 测序, 明确有无突变。

1.2.4 ES 细胞的囊胚注射及胚胎移植获得 *Cchla3* 基因 R528H 敲入嵌合小鼠并鉴定

囊胚来源于自然受孕并发育至囊胚阶段的 C57BL/6J 小鼠, 将阳性 ES 细胞克隆显微注射到小

鼠囊胚中, 每枚囊胚中注射 15 个左右 ES 细胞。将注射后囊胚培养于无 LIF 的 DMEM 完全培养基中, 37℃, 5% CO₂ 条件下培养 1 h 左右, 再移植到 2.5 d 假孕母鼠子宫中, 每侧移植 8 ~ 10 枚, 自然分娩, 产下的后代若毛色与 ES 细胞来源小鼠 (129S6/SVEV 灰褐色) 相同, 说明该鼠是有 ES 细胞整合的嵌合体小鼠。对该灰色小鼠经提取尾基因组 DNA 进行 PCR 鉴定 (鉴定策略同上), 是否携带打靶后的突变基因。

1.2.5 *Cchla3* 基因 R528H 敲入去 *neo* 小鼠的获得及鉴定

再将嵌合体小鼠与 C57BL/6J 小鼠交配, 获得杂合子小鼠并与携带 Flp 重组酶的 FLP 小鼠交配繁育, 获得的子代小鼠可被位点特异性重组切除 *neo* 基因和 1 个 Frt 位点, 为杂合的 *Cchla3* 基因 R528H 敲入去 *neo* 小鼠。用 PCR 法鉴定子代小鼠是否发生去 *neo* 反应。根据 *Cchla3* 基因敲入去 *neo* 小鼠基因组鉴定策略 (图 2) 设计特异性的 PCR 引物。其中, 5' 短臂上游引物 P1 同上, 下游引物 P5 为 5'-TAAGCTTGATATCGAATTCCGAAGTTCC-3', 位于重组区域, 产物大小为 2116 bp; 3' 长臂上游引物 P6 为 5'-CCGGATCCACCTAATAACTTCGTAT-3', 位于重组区域, 下游引物 P4 同上, 产物大小为 7165 bp。反应条件: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 15 s, 62℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。再对 PCR 产物行 DNA 序列测定进一步证实, 其 *Cchla3* 基因突变 (G→A) 和敲入的基因片段的重组位点是否正确。

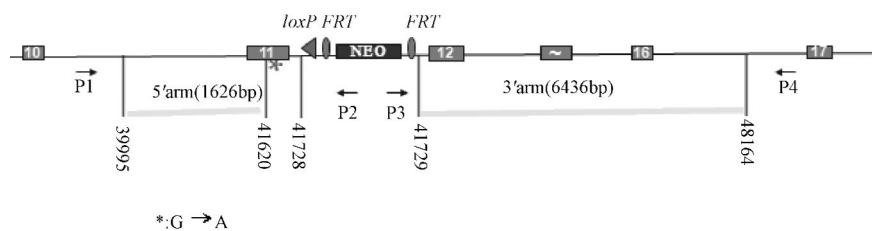


图 1 *Cchla3* 基因 R528H 敲入载体的构建策略

Fig.1 The targeting construct for homologous recombination in mouse *Cchla3* contained the R528H mutation

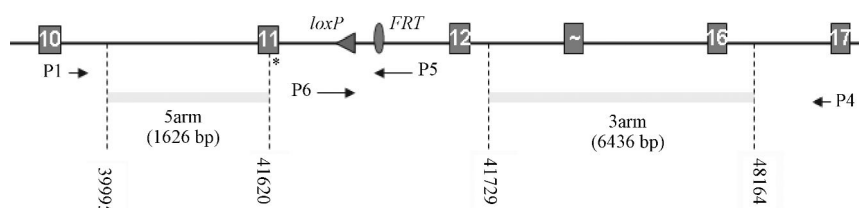


图 2 *Cchla3* 基因 R528H 敲入去 *neo* 小鼠基因组鉴定策略

Fig.2 Appraisal strategy for removal of *neo* gene mice contained *Cchla3* gene R528H mutation

1.2.6 繁殖获得 Cchl1a3 基因 R528H 敲入去 *neo* 纯合小鼠及初步表型分析

Cchl1a3 基因 R528H 敲入去 *neo* 杂合子小鼠交配得到纯合的 Cchl1a3 基因敲入去 *neo* 小鼠。然后对这些小鼠进行 PCR 及 DNA 测序进一步确定目的突变是否存在。Cchl1a3 基因敲入去 *neo* 纯合子小鼠 PCR 鉴定的上游引物 P7 为 5'-CGCTTCGACTGCTTCGTGGTGTGC-3', 下游引物 P8 为 5'-CCCGTGTTTCATGCCAAAGCTGGGC-3'。纯合子小鼠应为 870 bp 的片段, 而野生型小鼠应为 748 bp 的片段。反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。再对 PCR 产物进行 DNA 测序进一步证实目的突变是否存在, 并对该纯合子小鼠的外观、活动及生长发育等方面进行观察。

2 结果

2.1 同源重组 ES 细胞克隆的筛选及鉴定

将线性化 Cchl1a3-knock-in 载体电转染到 ES 细胞中。经过 G418 和 Ganciclovir 筛选培养 8 d 后发现并挑取 96 个药物抗性 ES 细胞克隆, 提取其基因组 DNA 样本并进行 PCR 鉴定。结果显示有 9 个 ES 细胞克隆的 5' 短臂扩增产物长 2.3 kb, 3' 长臂扩增产物长 7.5 kb, 提示双臂发生同源重组(图 3)。因突变位点靠近 5' 短臂, 进一步对这 9 个 ES 细胞克隆的 5' 短臂 PCR 产物进行 DNA 测序, 结果验证目的突变位点正确, 测序结果(图 4)。

2.2 阳性 ES 克隆囊胚注射结果

通过显微囊胚注射共完成了 250 枚胚胎, 并移植到 2.5 d 假孕母鼠子宫中, 制作了 13 只受体。假孕母鼠饲养于上海南方模式生物研究中心 SPF 级

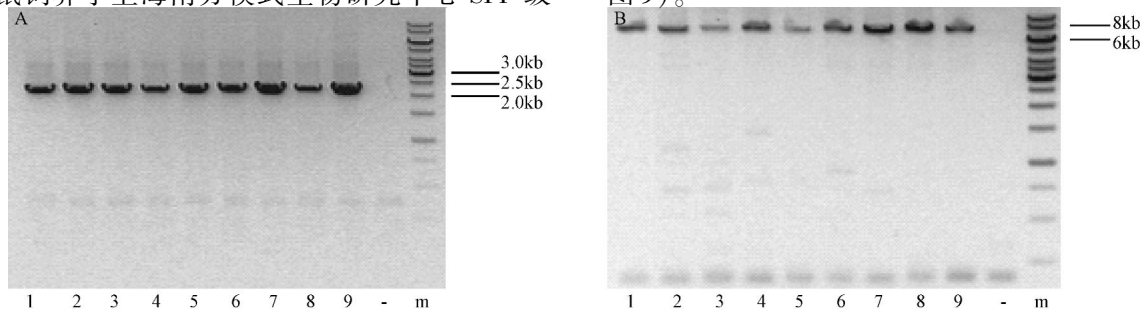
动物房, 自然分娩, 产下 15 只小鼠。其中 7 只为嵌合度 >50% 的嵌合体雄性小鼠, 它们的毛色呈灰褐色, 与 ES 细胞来源的灰褐色 129 品系小鼠相同, 也说明了外源的 ES 细胞已整合入生殖细胞, 该嵌合体小鼠是种系嵌合体小鼠(彩插 2 图 5)。

2.3 Cchl1a3 基因 R528H 敲入去 *neo* 杂合小鼠的获得及鉴定

将嵌合体小鼠与 C57BL/6J 小鼠交配获得杂合子小鼠, 再将该杂合子小鼠和 FLP 小鼠交配繁育, 获得 15 只子代并对其进行 PCR 鉴定, 结果显示其中 9 只小鼠(4 雄, 5 雌)发生了去 *neo* 反应, 即 5' 短臂扩增片段长度为目标 2.1 kb, 3' 长臂扩增片段长度为目标 7.2 kb。9 只小鼠基因组 DNA 的 PCR 电泳结果(图 6)。经 DNA 序列测定也证实了 Cchl1a3 基因突变(G→A)和敲入的基因片段的重组位点是正确的。

2.4 纯合的 Cchl1a3 基因 R528H 敲入去 *neo* 小鼠的获得及表型分析

将杂合的 Cchl1a3 基因 R528H 敲入去 *neo* 小鼠交配, 获得的子代小鼠中野生型、杂合子和纯合子的比例符合孟德尔遗传定律。对子代小鼠鼠尾基因组 DNA 进行 PCR 鉴定, 结果显示 15 只小鼠的基因组 DNA 扩增片段长度为 870 bp, 为纯合子 Cchl1a3 基因 R528H 敲入去 *neo* 小鼠, 而对照的野生型小鼠 DNA 扩增片段长度为 748 bp(图 7)。从这 15 只小鼠中随机抽取 5 只行 DNA 序列测定, 结果也证实了该小鼠为携带 Cchl1a3 基因 G→A 突变的纯合子小鼠(彩插 2 图 8)。纯合子小鼠发育至性成熟时精神、饮食及活动状态良好, 但是在 4 个月龄时从背部开始出现脱毛和皮肤破溃, 逐渐累及整个躯干, 再延伸至头部及四肢, 甚至出现死亡(彩插 3 图 9)。



注: m: DNA marker; -: 阴性对照; 1-9: 同源重组 ES 细胞克隆。

图 3 ES 细胞克隆基因组 DNA 的 5' 臂(a) 和 3' 臂(b) 的 PCR 产物凝胶电泳检测

Note: m: DNA marker; -: negative control; 1-9: homologous recombination ES clone.

Fig. 3 Agarose gel analysis of 5' PCR amplification(a) and 3' PCR amplification(b) from ES clone's genomic DNA

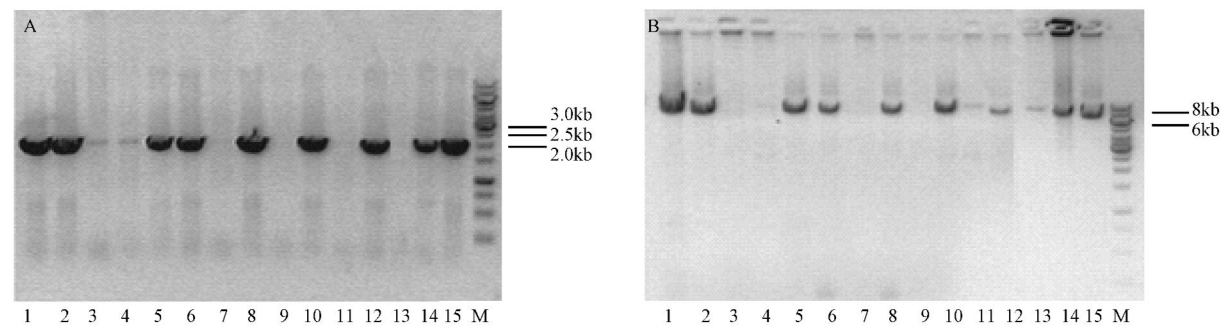


注：(a)箭头标记处为目的突变对应的反向突变位点 C→T；(b)方框标记处为目的突变对应的反向突变位点 C→T。

图 4 同源重组 ES 克隆 PCR 产物的 DNA 测序

Note: (a) Arrows marked for the corresponding reverse mutation point C→T; (b) Box marked with the corresponding reverse mutation point C→T.

Fig. 4 DNA sequencing of 5' PCR amplification from homologous recombination ES clone's genomic DNA

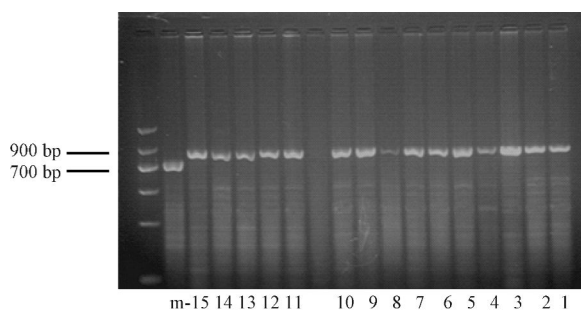


注：m:DNA marker;1,2,5,6,8,10,12,14,15:同源重组 ES 细胞克隆。

图 6 去 neo 小鼠基因组 DNA 的 5' 短臂(a)和 3' 长臂(b)PCR 产物凝胶电泳检测

Note:m: DNA marker;1,2,5,6,8,10,12,14,15: heterozygous mouse with a Flp-deleted neo gene.

Fig. 6 Agarose gel analysis of 5' PCR amplification(a) and 3' PCR amplification(b) on heterozygous mouse genomic DNA with a Flp-deleted neo gene



注:m;DNA marker; -:野生型小鼠;

1-15:去 *neo* 基因纯合子小鼠。

图7 纯合子 *Cchl1a3* 基因敲入去 *neo* 小鼠的 PCR 凝胶电泳图

Note:m; DNA marker; -:WT mouse;

1-15:homozygous mouse with a Flp-deleted *neo* gene.

Fig.7 Agarose gel analysis of PCR products on homozygous mouse genomic DNA with a Flp-deleted *neo* gene

3 讨论

Cchl1a3 基因编码小鼠骨骼肌 L 型电压依赖型钙通道的 α_1 亚基,与人类的 *CACNA1S* 基因编码的氨基酸序列 92% 相同。在已发现的 HypoPP 突变位点中,人类和小鼠的氨基酸也完全相同,显示了它们在功能上的高度一致性。2008 年,Hayward 等^[5]建立了表达 *SCN4A* 基因 Met1592Val 突变的小鼠,用于研究高血钾周期性麻痹(HyperKPP)的模型。Wu 等^[6]又构建了 *SCN4A* 基因 R669H 突变敲入小鼠,用于研究 HypoPP 神经肌肉电生理的变化,也取得了一定的进展。HypoPP 患者严重时可因呼吸肌麻痹或低血钾导致的恶心心律失常而危及生命。据 Jurkat-Rott^[7]报道,36 个 HypoPP 家族中有 15 人死于本病发作,中位年龄仅 22 岁。鉴于这是一种危害严重的疾病,建立与人类 HypoPP 具有相似遗传特征的点突变小鼠模型来研究该病的发病机制具有极高的价值。

在 HypoPP 患者已知突变中,*CACNA1S* 基因 R528H 突变的地域分布最广,突变频率最高,具有代表性。因此,在前期工作中我们根据 Liu^[8]等和 Chan^[9]等人的方法,运用现在常用的 Red/ET 重组技术和 Flp-FRT 重组酶系统构建了 *Cchl1a3* 基因 R528H 突变打靶载体^[4]。本研究基于 *neo* (正选择标记基因)和 HSV-tk (负选择标记基因)基因的正负筛选策略,通过 ES 细胞基因打靶获得 9 个同源重组克隆,PCR 和 DNA 序列测定均证实 *Cchl1a3* 基因内实现 R528H 定点突变并插入筛选基因和重组酶

特异性识别位点。同源重组 ES 细胞克隆显微注射、嵌合体育种获得了低钾型周期性麻痹相关的 *Cchl1a3* 基因 R528H 突变纯合子敲入小鼠模型,精确模拟 *CACNA1S* 基因第 11 号外显子上的 R528H 突变。本研究是国内首个成功构建的携带 *Cchl1a3* 基因 R528H 突变的敲入小鼠模型,不仅可以解决研究材料稀缺、代表性差的问题,还可以避免了在人体实验材料以及实验技术不可操作性的限制。

通过表型观察到去 *neo* 纯合子小鼠在性成熟前精神状态良好,饮食及活动与正常小鼠无差异,但在 4 个月龄时逐渐出现脱毛,皮肤破溃甚至死亡。经过加强环境消毒、垫料更换等处理,该纯合小鼠的皮肤状况没有明显改善,我们认为这可能与该小鼠残留有部分外源性基因有关。本研究中,杂合子小鼠与表达 Flp 重组酶的小鼠杂交后,携带的 Frt-*neo*-Frt 筛选基因片段被位点特异性重组切除 *neo* 基因和 1 个 Frt 位点,以减少对内源基因表达的影响。这是一种去除选择基因的有效方法,但仍在 *Cchl1a3* 基因 11 内含子中残留 122 bp 的外源性碱基。目前常用的基因敲入方法尚不能完全避免这种残留的重组靶点区^[10-11],但未涉及类似情况。本研究中, Frt-*neo*-Frt 片段位于 *Cchl1a3* 基因 11 内含子中,而该内含子序列及残留序列经过网上比对发现并无编码功能,但也不能完全排除残留基因对转录后剪切加工的影响。此外,小鼠皮肤溃烂多因循环障碍和神经功能障碍导致,但是因该小鼠数量的限制,尚未对其进行肌肉电生理变化,或是血液指标等检测,我们还需进一步研究解释该现象。

HypoPP 患者平时并不发病,而本研究的纯合子小鼠在没有预处理的情况下并没有出现肌肉麻痹、四肢瘫痪等 HypoPP 的典型表现,与该病患者相一致。目前,HypoPP 只在统计学上与基因突变具有相关性,但关于相关基因突变的功能学研究甚少,突变导致低血钾的分子机制仍不十分清楚。HypoPP 患者发病前常伴有明显的诱因,如剧烈活动、高碳水化合物饮食、酗酒、寒冷、劳累、上呼吸道感染、大量输入葡萄糖等。多数研究认为 HypoPP 患者的发作主要与胰岛素、甲状腺素、肾上腺素等内源性激素水平有关^[12-15]。同时,在以往对 HypoPP 小鼠模型的研究中,只观察到突变小鼠在外源的低血钾环境下具有 HypoPP 发病时的肌肉电生理特征,但并没有出现自发性的低血钾。因该疾病需要在上述条件下诱发出低血钾,本研究中并未对正常情况

下的纯合小鼠进行血钾的检测,该部分数据有待进一步补充。此外,我们将在 Cchlla3 基因 R528H 突变敲入小鼠模型的基础上,给予各种激素处理并进行表型分析,以期证实该突变小鼠能够出现自发性低血钾等表现,精确模仿人类 HypoPP 的发病。这样不仅可以发现 CACNA1S 突变致 HypoPP 的分子机制,还可以在 CACNA1S 功能的基础研究上有新的突破,为改进防治措施和药物研发提供基础。

致谢 本实验得到海军总医院中心实验室周丽君研究员的悉心指导和技术帮助,对此表示感谢。

参考文献:

- [1] Sternberg D, Maisonobe T, Jurkat-Rott K, *et al.* Hypokalaemic periodic paralysis type 2 caused by mutations at codon 672 in the muscle sodium channel gene SCN4A [J]. Brain, 2001, 124(Pt 6): 1091-1099.
- [2] Wang X, Gao G, Guo K, *et al.* Phospholemman modulates the gating of cardiac L-type calcium channels [J]. Biophys J, 2010, 98(7): 1149-1159.
- [3] 傅继梁, 主编. 基因工程小鼠[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 4-20.
- [4] 姚合斌, 高荣凯, 王晓英, 等. 应用同源重组技术构建小鼠 Cchlla3 基因 R528H 突变型打靶载体的策略[J]. 海军总医院学报, 2010, 23(2): 65-69.
- [5] Hayward LJ, Kim JS, Lee MY, *et al.* Targeted mutation of mouse skeletal muscle sodium channel produces myotonia and potassium-sensitive weakness[J]. J Clin Invest, 2008, 118(4): 1437-1449.
- [6] Wu F, Mi W, Burns DK, *et al.* A sodium channel knockin mutant (NaV1.4-R669H) mouse model of hypokalemic periodic paralysis [J]. J Clin Invest, 2011, 121(10): 4082-4094.
- [7] Jurkat-Rott K, Weber MA, Fauler M, *et al.* K⁺-dependent paradoxical membrane depolarization and Na⁺ overload, major and reversible contributors to weakness by ion channel leaks [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(10): 4036-4041.
- [8] Liu P, Jenkins NA, Copeland NG. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations [J]. Genome Res, 2003, 13(3): 476-484.
- [9] Chan W, Constantino N, Li R, *et al.* A recombineering based approach for high-throughput conditional knockout targeting vector construction [J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(8): e64.
- [10] 王芑, 段海清, 张兆山. ET 重组 Escherichia coli 中最新分子克隆方法[J]. 军事医学科学院院刊, 2002, 26(4): 289-293.
- [11] Roebroek AJ, Gordts PL, Reekmans S. Knock-in approaches [J]. Methods Mol Biol, 2011, 693: 257-275.
- [12] 诸葛宝忠. 低钾性周期性麻痹患者红细胞膜 Na⁺-K⁺-ATPase 活性变化及相关激素研究[J]. 医学检验与临床, 2006, 17(2): 23-25.
- [13] Soonthornpun S, Setasuban W, Thamprasit A. Insulin resistance in subjects with a history of thyrotoxic periodic paralysis (TPP) [J]. Clin Endocrinol (Oxf). 2009, 70(5): 794-797.
- [14] Kalita J, Goyal G, Bhoi SK, *et al.* Comparative study of thyrotoxic periodic paralysis from idiopathic hypokalemic periodic paralysis: An experience from India [J]. Ann Indian Acad Neurol. 2012, 15(3): 186-190.
- [15] Yeh FC, Chiang WF, Wang CC, *et al.* Thyrotoxic periodic paralysis triggered by beta2-adrenergic bronchodilators [J]. CJEM. 2013, 15: 1-5.

[修回日期] 2014-05-30