

钙蛋白酶抑制蛋白转基因小鼠的构建和鉴定

叶廷巧, 马双陶, 李丹, 郑曦, 王强, 苏立男, 张彦, 杨芸, 杨永健

(成都军区总医院心血管内科, 成都 610083)

【摘要】 目的 将人的钙蛋白酶抑制蛋白(calpastatin, CAST)外源基因整合到C57BL/6J小鼠中,构建高表达CAST的转基因小鼠模型。**方法** 利用Gateway技术构建pRP-EX3d-EF1A-CAST-IRES-eGFP载体,回收片段后通过显微注射法将目的基因片段注入到C57BL/6J小鼠受精卵中,将其胚胎移植至同期发情的假孕受体母鼠输卵管内获得子代小鼠。采用PCR方法鉴定出阳性的转基因小鼠,确定首建鼠,通过与C57BL/6J小鼠回交后互交数代建系。利用RT-PCR和Western blotting方法检测CAST基因和蛋白在各组织中的表达情况。**结果** 将90枚注射受精卵移植到3只假孕鼠中,3只均怀孕,移植成功率100%,产下23只子鼠,经PCR鉴定得到2只转基因阳性首建鼠,阳性率为9%。子代小鼠进行RT-PCR检查显示,CAST基因在转基因小鼠的心、肝、脾、肺、肾、脑和骨骼肌中均有表达;Western blotting检查显示,CAST蛋白表达在转基因小鼠中显著高于同窝阴性小鼠。**结论** 通过显微注射法成功构建CAST高表达的转基因小鼠,为进一步研究CAST奠定了良好的模型基础。

【关键词】 钙蛋白酶抑制蛋白;转基因;小鼠;模型;显微操作法

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 04-0047-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.04.011

Establishment and identification of calpastatin transgenic mouse models

YE Ting-qiao, MA Shuang-tao, LI Dan, ZHENG Xi, WANG Qiang, SU Li-nan,
ZHANG Yan, YANG Yun, YANG Yong-jian

(Department of Cardiology, General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu 610083, China)

【Abstract】 Objective To establish an animal model of calpastatin (CAST) transgenic mice by inserting the full human CAST into the genome of C57BL/6J mice. **Methods** Recombinant transgenic vector pRP-EX3d-EF1A-CAST-IRES-eGFP was constructed by Gateway technology. It was injected into the fertilized eggs from C57BL/6J mice. The injected eggs were transplanted into the oviduct of pseudopregnant mice. Tail DNA PCR screening was performed to identify the positive founder mice. The expressions of CAST mRNA and protein in tissues of the transgenic mice were detected by RT-PCR and Western blotting. **Results** Ninety eggs were transplanted into the oviducts of 3 recipients. The transplantation success rate was 100%. 23 viable offsprings were born from the recipients. Tail DNA PCR screening showed that two of the offsprings were positive transgenic mice. The positive rate of transgenic mice was 9%. RT-PCR assay revealed that CAST mRNA expressions were present in the heart, liver, kidney, lung, spleen, brain and skeletal muscle of the transgenic mice. Additionally, the CAST protein expression was significantly increased in the transgenic mice. **Conclusion** CAST transgenic mice have been successfully established and provide a good animal model support for further studies on the CAST function.

【Key words】 Calpastatin; Transgenic; Mice, models; Microinjection

钙蛋白酶抑制蛋白(calpastatin, CAST)是一种内源性钙蛋白酶(calpain)抑制剂,广泛存在于哺乳动物细胞内,分子量大小约 130×10^3 ,与钙蛋白酶

共同组成钙蛋白酶系统,二者相互协调。CAST抑制钙蛋白酶的催化活性,以保证钙蛋白酶只对底部局部的特定定位点进行水解,防止细胞发生自溶^[1]。

【基金项目】 成都军区总医院科研项目(2011YG-A11);2013全军医学科技青年培育项目(13QNP058)。

【作者简介】 叶廷巧(1989-),男,硕士研究生,研究方向:心力衰竭、心肌重构。Email: yetingqiao1989@163.com

【通讯作者】 杨永健(1965-),男,主任医师,博士生导师,研究方向:心肌重构的发病机制。Email: y.yongjian@yahoo.com

在各种心血管疾病发生过程中,钙蛋白酶系统被认为发挥着重要作用。此外,钙蛋白酶系统还参与信号转导,细胞增殖、分化、凋亡和膜融合等生理过程。国外有报道通过注射外源性钙蛋白酶抑制剂可以抑制小鼠心肌梗死后心肌重构的发生^[2]。但是,内源性 CAST 的作用国内外报道甚少。因此,本研究拟构建 CAST 过表达的转基因小鼠,这将为钙蛋白酶系统的研究提供有用的工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠,购自成都达硕实验动物有限公司【SCXK(川)2013-24】,共 300 只,8~10 周龄,体重 22~25 g,雌雄各半。

1.1.2 试剂

Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen 公司), Gateway® LR Clonase™ II Plus Enzyme Mix (Invitrogen 公司), QIAquick Gel Extraction Kit

(Qiagen 公司), 质粒小提试剂盒 (Tiangen 公司), Taq DNA polymerase (美国 Fermentas 公司), dNTP Mix (美国 Fermentas 公司), PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase (Takara 公司), GeneRuler™ 1kb DNA ladder (Fermentas 公司), LA Taq (Takara 公司), PMD18-T Simple Vector (Takara 公司), 引物 (Sangon Biotech 公司), 鼠尾基因组 DNA 提取试剂盒 (成都福际生物技术有限公司), Premix Taq (Takara 公司), RT-PCR 试剂盒 (Takara 公司), calpastatin 羊抗鼠的一抗 (sc-7561, Santa 公司)。

1.2 方法

1.2.1 载体 pRP. EX3d-EF1A-CAST-IRES-eGFP 的构建及线性化 DNA 片段的制备

含有 attB 重组位点的目的片段与含有 attP 重组位点的供体载体之间通过 BP 反应获得含有“attL1-目的基因-attL2”的入门载体;含有“attL1-目的基因-attL2”的入门载体再与含有 attR 重组位点的目的载体之间通过 LR 反应获得“attB1-目的基因-attB2”的表达载体(图 1)。

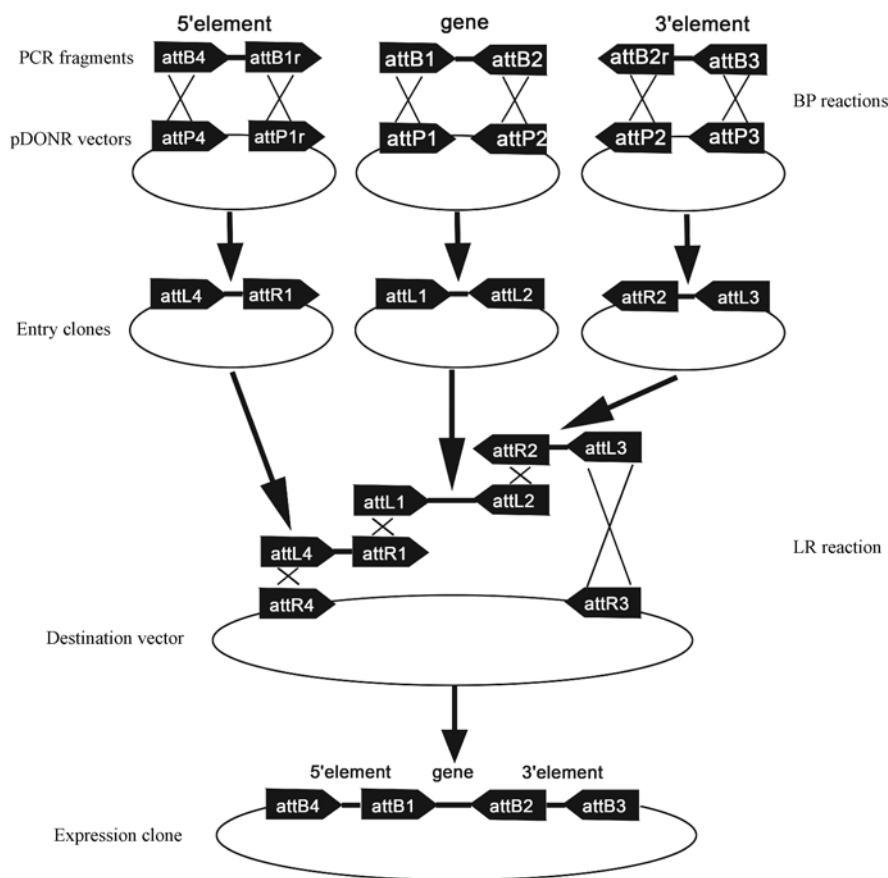


图 1 载体构建模式图

Fig. 1 Pattern diagram of the construction of recombinant vectors

针对 CAST 基因的 CDS 序列设计相应的引物(引物 attB1-Kozak-CAST-F: 5'-GGGGACAAGTTTG TACAAAAAGCAGGCTGCCACCATGTCCCAGCCCC GCCAGA-3'; 引物 attB2-CAST-R: 5'-GGGGACCA CTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAGTCATCTTTTGG CTTGGAAGTTTCC-3'),以正常人基因组 DNA 为模板,由重叠 PCR 扩增、合成含有 attB1-Kozak-CAST -attB2 目的基因的片段。利用 Gateway clone 技术,经 BP 反应将 CAST 基因插入到载体 pDown 上,合成 pDown-CAST 目的基因的入门克隆;再与 pUp-EF1A, pDown-CAST, pTail-IRES-eGFP 和 PRP. Des3d 经过 LR 反应形成 pRP. EX3d-EF1A-CAST-IRES-eGFP 表达载体。产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,用 QIAquick Gel Extraction Kit 试剂盒纯化、回收目的片段,并溶于显微注射缓冲液(microinjection buffer, pH 7.4)中,至终浓度为 3 ng/ μ L。

1.2.2 显微注射及子代小鼠 F₀ 的产生

将纯化后的线性 pRP. EX3d-EF1A-CAST-IRES-eGFP 片段通过显微注射法注入 C57BL/6J 小鼠的受精卵雄原核中,挑选注射后状态良好的受精卵,移植到假孕母鼠的输卵管内,待 F₀ 代小鼠出生^[3]。所有实验用小鼠均在 SPF 级动物房中饲养和繁殖,温度控制在 21℃,相对湿度 55%,自动光控(12 h 明/12 h 暗)。

1.2.3 转基因小鼠的基因型鉴定

小鼠在出生 14 d 后用剪趾法标记,并剪取 0.5 ~ 1 cm 尾巴,采用鼠尾基因组 DNA 提取试剂盒提取小鼠 DNA,利用特异性的引物进行 PCR 扩增,筛选出目的片段阳性的小鼠^[4]。针对插入目的基因片段的上游引物为:5'-ACGTAAACGGCCACAAGTTC-3',下游引物为:5'-GATCTTGAAGTTCACCTTGATGC-3',产物的长度:440 bp。在 50 μ L PCR 体系中分别加入:Premix Taq 25 μ L,引物各 1 μ L,模板 DNA 8 μ L,灭菌蒸馏水 15 μ L。反应条件:94℃ 变性 5 min,进入循环(94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 27 s),共 30 个循环,最后一个循环在 72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。取 5 μ L PCR 产物进行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳,经凝胶图像分析系统观察结果。pRP. EX3d-EF1A-CAST-IRES-eGFP 作为阳性对照,野生型 C57BL/6J 小鼠鼠尾 DNA 作为阴性对照,并设立空白对照。

1.2.4 转基因小鼠繁殖

首建鼠分别与野生型的 C57BL/6J 交配,所产的子代通过 PCR 法鉴定筛选出阳性小鼠,分别建

系。种鼠与 C57BL/6J 回交 2 代以上(最好 7 代),使遗传背景趋于稳定,同窝的阳性小鼠相互交配建立稳定的转基因小鼠系。

1.2.5 转基因小鼠组织中 CSAT mRNA 表达的检测

选取转基因阳性小鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、脑和骨骼肌组织,采用 Trizol 试剂提取组织总 RNA。对提取的 RNA 在反转录前进行 DNaseI 处理,并用酚、氯仿抽提以去除残留的基因组 DNA。采用 RT-PCR 试剂盒进行反转录得到 cDNA 及 PCR 扩增,经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析结果^[5]。

1.2.6 转基因小鼠心脏组织中 CAST 蛋白表达水平的检测

采用免疫印迹法(Western blotting)检测小鼠心脏中 CAST 蛋白的表达。按照蛋白提取试剂盒提取转基因阳性小鼠和同窝阴性小鼠的心脏总蛋白,经 SDS-PAGE 凝胶电泳后转移至 PVDF 膜上,以 CAST 抗体为一抗,4℃ 孵育过夜,加入二抗后在 37℃ 摇床中孵育 1 h,将化学发光剂滴至 PCDF 膜上,暗室曝光。用 UVP 成像系统对结果进行半定量分析,以 GAPDH 作为内参。

1.2.7 统计分析

所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 20 统计软件进行统计学分析。两组间比较采用 *t* 检验,若 *P* < 0.05,认为差异具有统计学意义。

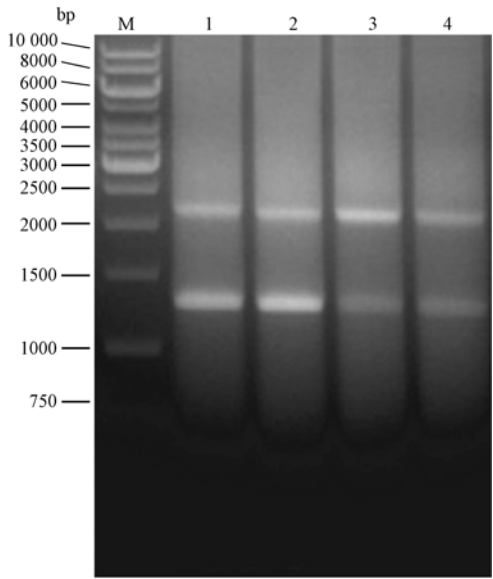
2 结果

2.1 载体 pRP. EX3d-EF1A-CAST-IRES-eGFP 的构建及鉴定

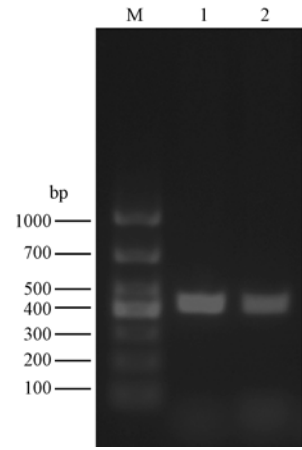
重叠 PCR 融合 attB1-Kozak-CAST -attB2 片段理论大小为 2317 bp,切胶回收电泳图条带与理论大小相符(图 2)。结果表明:PCR 扩增 attB1-Kozak-CAST -attB2 基因片段成功。载体 pRP. EX3d-EF1A-CAST-IRES-eGFP 经 PCR 鉴定理论大小为 440 bp,电泳图中与理论大小相符的克隆即为阳性克隆(图 3)。结果表明:通过 Gateway 技术成功构建载体 pRP. EX3d-EF1A-CAST-IRES-eGFP。

2.2 首建鼠的产生及基因型鉴定

共获得存活的 90 枚注射卵,分别移植到 3 只假孕母鼠的输卵管中,其中 3 只母鼠均怀孕,移植成功率 100%,产下 23 只小鼠,经 PCR 鉴定,其中 2 只小鼠为阳性,阳性率 9%。阳性小鼠再次通过剪鼠尾提取基因组 DNA,进行 PCR 检测,确认 2 只为转基因均为阳性小鼠(图 4)。



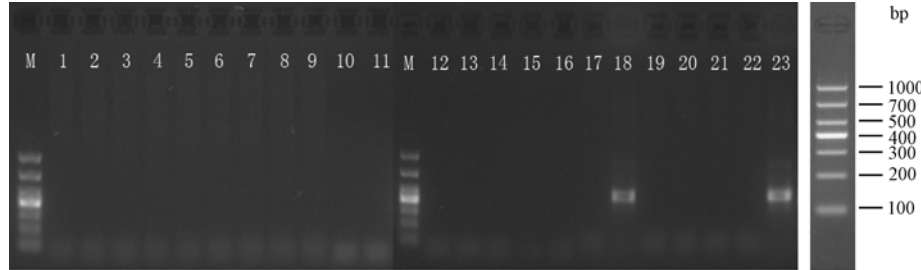
注:M;marker;1~4:目的片段 attB1-Kozak-CAST -attB2,大小约 2317 bp。
图 2 重叠 PCR 融合目的片段 attB1-Kozak-CAST -attB2 切胶回收结果
Note. M: Maker; 1~4: attB1-Kozak-CAST-attB2, about 2317 bp.
Fig. 2 PCR showing the recombinant fragments: attB1-Kozak-CAST-attB2



注:M;maker;1,2:载体 pRP. EX3d-EF1A-CAST-IRES-eGFP,大小约 440 bp。
图 3 载体 pRP. EX3d-EF1A-CAST-IRES-eGFP 的构建结果
Note. M: Maker; 1,2: Recombinant vector pRP. EX3d-EF1A-CAST-IRES-eGFP, about, 440 bp.
Fig. 3 Enzyme digestion showing the recombinant vector pRP. EX3d-EF1A-CAST-IRES-eGFP

2.3 转基因小鼠繁殖

2 只性成熟的首建鼠分别与 C57BL/6J 小鼠回交,分别繁殖及建立相应的转基因小鼠品系,建系情况如表 1 所示。



注:M;DL1000 maker;18,23:转基因阳性小鼠;1~17,19~22:阴性小鼠。
图 4 CSAT 转基因小鼠基因型鉴定结果
Note. M: DL1000 maker; 18,23: Transgenic mice; 1~17,19~22: Non-transgenic mice.
Fig. 4 Genotyping the CAST transgenic mice with PCR

表 1 CAST 转基因小鼠谱系的建立

Tab.1 Construction of CAST transgenic mice lines

Line	Sex	F ₁ /n	F ₁ Positive rate/%	F ₂ /n	F ₂ Positive rate/%
18	雄性	21	24	36	64
23	雌性	36	28	74	70

2.4 转基因小鼠组织中 CAST mRNA 的水平

经 RT-PCR 结果显示:CAST mRNA 在转基因阳性小鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、脑和骨骼肌组织中均有表达(图 5)。

2.5 转基因小鼠心脏组织中 CAST 蛋白的表达

Western blotting 结果显示:转基因阳性小鼠中 CAST 蛋白表达水平明显高于同窝阴性小鼠(图 6)。

3 讨论

本研究通过 Gateway 技术成功构建载体 pRP. EX3d-EF1A-CAST-IRES-eGFP,与传统的克隆技术相比,该方法仅需两步(入门克隆和表达克隆)便能达到目的,大大地简化了基因克隆和亚克隆的步骤,能够快速、高效地将异源 DNA 片段克隆到不同的载体

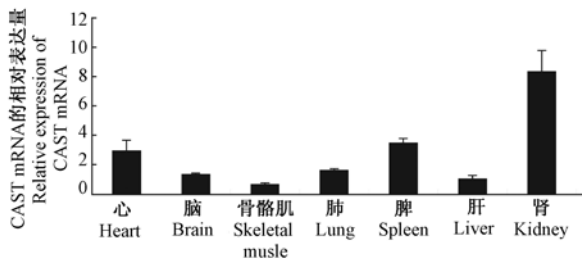
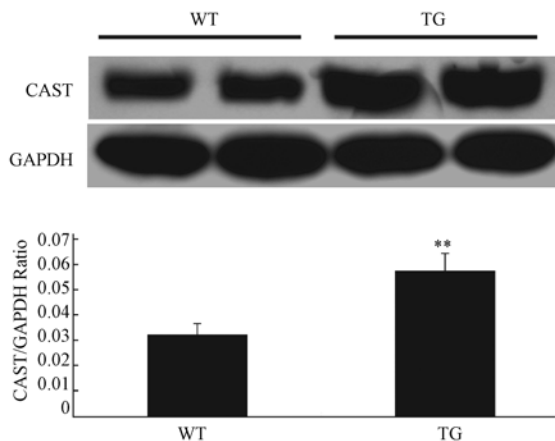


图 5 转基因阳性小鼠各组织中 CAST mRNA 表达情况

Fig. 5 Expression of CAST mRNA in organ tissues from the transgenic mice



注: WT: 同窝阴性对照鼠; TG: 转基因阳性小鼠; **: 与同窝阴性对照鼠比较, $P < 0.01$ 。

图 6 Western blotting 检测转基因小鼠及同窝阴性小鼠心脏中 CAST 蛋白的表达

Note: WT: Wild type littermates; TG: Transgenic mice; ** $P < 0.01$ vs. wild type group.

Fig. 6 Expression of CAST protein in the heart of the transgenic mice and wild type littermates by Western blotting analysis

中^[6]。利用经典的显微注射法将线性化的 pRP-EX3d-EF1A-CAST-IRES-eGFP 片段导入 C57BL/6J 小鼠的受精卵中,并移植到假孕母鼠的输卵管内,成功建立了 2 只转基因小鼠,且利用双盲法对 2 只转基因小鼠再次通过剪鼠尾提取基因组 DNA,进行 PCR 检测,确保 2 只为阳性转基因小鼠。在转基因动物构建过程中,外源性蛋白是否表达以及表达的蛋白是否具有生物学活性是技术的关键。我们进一步通过 RT-PCR 检测到 CAST 基因在转基因阳性小鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、脑和骨骼肌组织中均有表达,且免疫印迹结果显示转基因小鼠较同窝野生型小鼠的心脏组织中 CAST 蛋白表达水平显著增加。综上所述,通过 Gateway 技术、显微注射的方法能成功构建 CAST 转基因小鼠,且能够稳定传代,即 CAST 转基因小鼠在转录和蛋白表达水平构建成功。

CAST 最早是在肌肉中分离、纯化 m-calpain 时发现的,并于 1979 年由 Takashi Murachi 命名^[7],作为钙蛋白酶的抑制蛋白,对 calpain 的活性调控具有重要意义,且小鼠和人的基因具有高度同源性。研究发现钙蛋白酶系统中 calpain 小部分活化后通过作用于不同的底物在细胞内发挥重要的生理作用,例如:细胞骨架的重构、细胞周期性的凋亡、细胞信号的传导^[8]。当细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,calpain 过度活化产生一系列的病理变化,例如:在心肌梗死后的心肌重构过程中,calpain 过度活化会水解心肌细胞骨架,改变心肌纤维蛋白的组成、促进心肌细胞凋亡、降低肌浆网的钙调节能力^[9]。Yang 等人对瓣膜病所致的不同程度心力衰竭病人研究中发现,随着心功能的恶化,calpain 的表达不断升高^[10],类似的在肝硬化、帕金森病、缺血性脑损伤、糖尿病、癌症等许多疾病中发现 calpain 的活性均异常增高^[11]。而 CAST 作为 calpain 的抑制蛋白,提示我们,临床上治疗这些疾病时时,通过 CAST 阻断或抑制 calpain 的活性可能是一个新的治疗突破口。本研究成功构建过表达的 CAST 转基因小鼠,为进一步探讨钙蛋白酶系统在各种疾病中作用及机制提供了有用的工具。

参 考 文 献

- [1] Momeni HR. Role of calpain in apoptosis [J]. Cell J. 2011, 13 (2): 65-72.
- [2] Mani SK, Balasubramanian S, Zavadzkas JA, et al. Calpain inhibition preserves myocardial structure and function following myocardial infarction [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009, 297(5): H1744-751.
- [3] 马双陶, 曹廷兵, 马丽群, 等. 瞬时受体电位通道家族 M8 型受体转基因小鼠模型的建立[J]. 中国医科大学学报. 2010, 39(04): 251-254.
- [4] 郑志红, 高峰, 杨葳, 等. Dicer1 转基因小鼠模型的建立[J]. 中国实验动物学报. 2008, 16(04): 258-260.
- [5] 史君, 王静, 王星, 等. 肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6 在高血压心肌梗厚大鼠实验中的意义[J]. 中国医药导报. 2012, (06): 23-25.
- [6] Liang X, Peng L, Baek CH, et al. Single step BP/LR combined Gateway reactions [J]. Biotechniques. 2013, 55(5): 265-268.
- [7] Taylor RG, Geesink GH, Thompson VF, et al. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? [J]. J Anim Sci. 1995, 73(5): 1351-1367.
- [8] Goll DE, Thompson VF, Li H, et al. The calpain system [J]. Physiol Rev. 2003, 83: 731-801.
- [9] Letavernier E, Zafrani L, Perez J, et al. The role of calpains in myocardial remodelling and heart failure [J]. Cardiovasc Res. 2012, 96(1): 38-45.
- [10] 杨永健, 周兴文, 张鑫, 等. 血管紧张素 II 受体和钙蛋白酶在心肌重构中的作用[J]. 中国应用生理学杂志. 2005, 21(3): 315-318.
- [11] Carragher NO. Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states [J]. Curr Pharm Des. 2006, 12(5): 615-638.

[收稿日期] 2014-03-03