

精子特异性 *Sleeping Beauty* 转座酶转基因小鼠模型的建立

路迎冬, 张 旭, 马 婧, 张连峰, 马元武

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立精子特异性表达 *Sleeping Beauty* (SB) 转座酶转基因小鼠模型, 为研究 SB 转座子在小鼠中的应用提供工具。**方法** 克隆精子特异性启动子用以驱动 SB 转座酶基因的表达, 建立精子特异性表达 SB 转座酶的载体, 利用显微注射方法建立以 C57BL/6J 为背景的精子特异性表达 SB 转座酶的转基因小鼠。PCR 鉴定首建鼠的基因型, western blot (WB) 和免疫组织化学 (IHC) 检测 SB 转座酶基因在小鼠生殖腺睾丸中的表达情况, 筛选睾丸中高表达 SB 转座酶的转基因小鼠。**结果** 显微注射方式获得了 5 只首建小鼠, 其中 3 只能稳定传代, 利用 WB 和 IHC 成功的筛选出一株在精子中高表达 SB 转座酶的转基因小鼠。**结论** 成功建立了精子特异性高表达 SB 转座酶转基因小鼠模型, 为将 SB 转座子作为一种基因工程工具应用于小鼠基因修饰模型的建立提供非常重要的工具资源。

【关键词】 DNA 转座子; *Sleeping Beauty*; 转座酶

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 03-0034-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 003. 008

Establishment of sperm specific *Sleeping Beauty* transposase-expressing transgenic mouse

LU Ying-dong, ZHANG Xu, MA Jing, ZHANG Lian-feng, MA Yuan-wu

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Laboratory Animal Science;
Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish the sperm specific *Sleeping Beauty* (SB) transposase-expression transgenic mouse for the study of the genetic modification mediated by transposon system in mouse. **Methods** Pm1 promoter was cloned from mouse genomic DNA to drive the expression of SB transposase. The transgenic mice were generated by microinjection. The gene type of transgenic line was identified by PCR. The expressing level in testis was determined by western blot and immunohistochemistry (IHC) staining. **Results** Five lines of transposase transgenic mice were obtained by microinjection and three can be germline. One mouse line with higher expression level of transposase in the testis was obtained. **Conclusion** One transgenic mouse model with *Sleeping Beauty* transposase - expression was successfully established. This model will greatly contribute to the research of genetic modification mediated by transposon in mouse

【Key words】 DNA transposon; *Sleeping Beauty*; Transposase

[基金项目] 协和青年基金(2012J25); 国家重大科技项目(2012BA139B02)。

[作者简介] 路迎冬(1988-), 女, 硕士生, 研究方向: 比较医学。E-mail: luyd@cnilas.org。

[通讯作者] 马元武。E-mail: mayuanwu@gmail.com。

自 1950 年转座子发现以来,转座子作为一种重要的基因工程功能分析工具,在黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)^[1]、线虫 (*Caenorhabditis elegans*)^[2]、家蚕 (*Silkworm*)^[3] 等低等生物中发挥着重要的作用。随着多个物种基因组序列图谱的完成,在脊椎动物中发现了大量转座子相关序列,其中人类基因组中 40% 的序列与转座子序列相关,可见转座子在人类进化过程中发挥着非常重要的作用^[4]。1997 年,Zoltan Ivics 等^[5] 对鲑鱼来源的 Tc1 样转座子序列类比分析,并利用分子生物学手段进行重构,建立了一种能够在哺乳动物细胞中转座的 DNA 转座子,命名为“睡美人”(Sleeping Beauty, SB)。SB 转座子属于 Tc1/mariner 家族成员^[6],作为一种 DNA 转座子,采用“剪切-黏贴”(cut and paste)的转座模式。转座反应的发生需要转座序列(能够被转座酶所识别的一段反向末端重复序列(IR))和转座酶同时存在^[7]。随后的研究发现该转座系统在斑马鱼、大小鼠等体内也都表现出较高的转座活性^[6,9]。转座子序列在转座酶存在情况下,能够发生转座,去除转座酶时,转座子序列稳定存在^[8],利用这一特性,将转座酶和转座子序列分离,建立包含转座子载体和转座酶表达载体的二元转座系统^[10],二者分离提高了转座系统的安全性,利用转座子序列可以携带一段外源 DNA 序列进入宿主基因组,应用于转基因、基因突变和基因治疗等方面^[12-15]。为将 SB 转座系统应用于小鼠体内筛选突变基因,建立基因修饰小鼠模型,并使得突变基因能够在种系中稳定遗传,本研究通过克隆小鼠精子特异性的 Prrm1 启动子,构建能够在精子中特异性表达 SB 转座酶的转座载体,利用显微注射的方式建立精子特异性表达 SB 转座酶的转基因小鼠。该研究将为 SB 转座系统应用于小鼠的基因工程功能分析提供重要的工具小鼠资源。

1 材料和方法

1.1 Prrm1 启动子的克隆

利用引物: Prrm1-S: 5'-TACGCGTGTGA GGTCCCACTCC-3' 和 Prrm1-AS: 5'-TGCTAGCT

GGCTTGCCCGGAG-3' (上海英俊生物技术有限公司合成,中国),以小鼠基因组 DNA 为模板,扩增片段大小为 801 bp 的精子特异性启动子,将 PCR 产物进行 TA 克隆,测序正确后,用 *Mlu* I (Takara 公司) 和 *Nhe* I (Takara 公司) 酶切目的片

段,并连接到经这两个酶切的 pCDNA3.1(+)的载体上完成对 CMV 启动子的替换,即完成 Prrm1-expression 载体构建。

1.2 SB 转座酶表达质粒的构建以及转基因小鼠制作

利用 *Nhe* I 和 *Xho* I 从质粒 pCDNA3.1(+)-SBase^[10] 中回收 SB 转座酶基因片段(1022 bp),将目的基因连入含有 Prrm1 启动子的载体(Prrm1-expression)中完成 Prrm1-SBase 表达载体的构建。利用 *Mlu* I/*Nhe* I, *Mlu* I/*Xho* I 分别对构建的 Prrm1-SBase 质粒进行双酶切验证。然后将酶切验证正确的 Prrm1-SBase 载体经 *Pvu* I (Takara 公司) 线性化, Sephadex G50 柱纯化,调整浓度至 5 ng/ μ L,用于显微注射。将纯化好的 DNA 片段注射到 SPF 级 C57BL/6J 小鼠的受精卵中(小鼠购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-001】),用 ICR 小鼠作为假孕受体小鼠(购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-001】),制备转基因小鼠(TE2000U 纤维注射仪)。实验在本研究所卫生部人类疾病比较医学重点实验室完成【SYXK(京)2013-002】。实验中涉及动物操作程序已经得到中国医学科学院医学实验动物研究所动物使用与管理委员会批准,批准号为 ILAS-GC-2012-001。

1.3 SB 转座酶转基因小鼠的基因型鉴定

首建鼠在出生 7~14 d 时,用剪脚趾标记法标记,收集剪下的组织,碱裂解法提取基因组 DNA^[11],PCR 法对首建鼠进行筛选。PCR 上游引物为 SB-S1: 5'-TCCCAGAACAACAGCAAAG-3',下游引物为 SB-AS1: 5'-CATCAGACCAGAGGAC ATTTC-3' (上海英俊生物技术有限公司合成,中国)。PCR 反应体系 20 μ L (PCR 反应相关试剂购自宝生物工程(中国)有限公司,中国)。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; (95 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保温。扩增片段大小为 224 bp。

1.4 western blot 检测转座酶在小鼠睾丸中的表达

颈椎脱臼法牺牲小鼠,提取阳性转基因小鼠的 F1 代和非转基因(non-transgenic, NTG) 对照小鼠睾丸的总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,取 20 μ g 蛋白经高温变性后,进行 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳,将蛋白转移至 NC 膜上(Millipore, 美国),用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST (20 mmol/L Tris, 0.05% Tween, pH 7.6) 封闭 NC 膜,选择一抗为抗 SBase 的单克隆抗体(1:1000 稀释, MAB2798, R&D, 美国),

二抗为 HRP-偶联的羊抗鼠抗体(1:10000 稀释,ZB-2305,康成生物,中国);内参选用 HRP-偶联的 β -actin 单克隆抗体(1:10000 稀释,KC-5A08,中杉金桥,中国),通过 HRP 在暗室进行显色。用 Image J 分析软件分析 western blot 条带灰度,确定蛋白的表达量。

1.5 转座酶在睾丸中的组织染色观察

取 2 月龄的转基因小鼠和同窝阴性小鼠的睾丸,固定液中固定 23 h 后,经过脱水、石蜡包埋、组织切片。其中一组用于 HE 染色^[12]。另一组进行免疫组织化学染色,经过异丙醇以及梯度乙醇脱水,枸橼酸钠抗原热修复,冷却至室温后用 3% H_2O_2 去除内源性过氧化物酶,山羊血清封闭,滴加一抗(1:100 稀释,MAB2798,R&D,美国),湿盒内 4℃ 过夜;PBS 洗 3 次,每次 5 min,加入羊抗鼠二抗(具体用法详见二步法免疫组化试剂盒,PV-9002),PBS 洗 3 次,每次 5 min,然后进行 DAB 显色,终止反应,梯度乙醇脱水、异丙醇透明、封片,扫描病理切片。

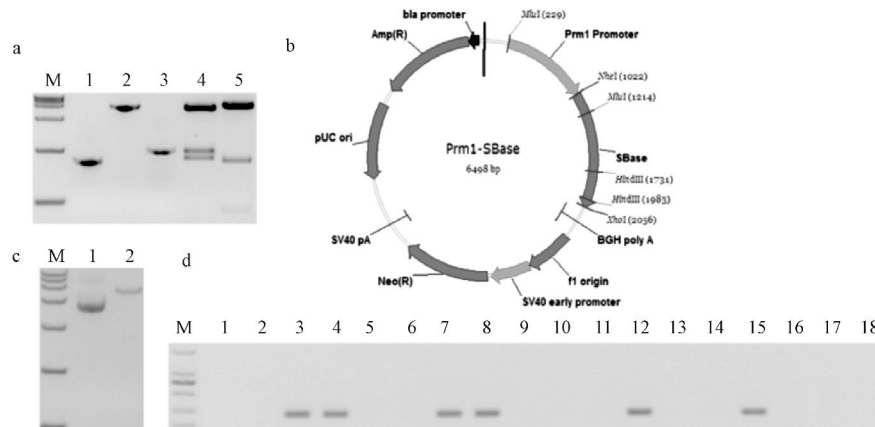
2 结果

2.1 表达 SB 转座酶转基因小鼠的制备及基因型鉴定

利用引物 Prm1-S 和 Prm1-AS 扩增的 Prm1 启动子片段大小为 801 bp,将构建完成的 Prm1-expression 与从质粒 pCDNA3.1(+)-SBase 中回收的 SBase 片段,大小为 1022 bp 连接,完成 Prm1-SBase 的载体构建,利用 *Mlu* I/*Nhe* I,*Mlu* I/*Xho* I 分别对构建的 Prm1-SBase 质粒进行双酶切验证(图 1a)。Prm1-SBase 结构示意图(图 1b)。

将线性化的 Prm1-SBase (6498 bp) 片段(图 1c),显微注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵雄性核中,提取出生小鼠的基因组 DNA,PCR 检测 SB 转座酶基因,大小为 224 bp 片段,获得含有目的基因的首建鼠,共获得 5 只阳性转基因小鼠,其中#1、#4、#9 能够稳定传代,#5、#12 不传代。基因型鉴定结果(图 1d)。

2.2 SB 转座酶在小鼠睾丸中显著高表达



注:M: Marker DL15000; a(Prm1-SBase 载体构建)。1. 从小鼠基因组 DNA 中扩增的 Prm1 启动子,片段大小为 801 bp;2. 利用 *Mlu* I 和 *Xho* I 双酶切 pCDNA3.1(+)回收得到大小为 4671 bp 骨架片段;3. 利用 *Nhe* I 和 *Xho* I 从 pCDNA3.1(+)-SBase 中酶切获得的 SBase 片段,大小为 1022 bp;4. 利用 *Mlu* I/*Xho* I 酶切验证 Prm1-SBase 载体,产生酶切片段大小分别为 4671 bp,985 bp,842 bp;5. *Mlu* I/*Nhe* I 酶切验证 Prm1-SBase 载体,产生片段大小分别为 5705 bp,793 bp,182 bp)b(Prm1-SBase 质粒示意图)c(利用 *Pvu* I 对 Prm1-SBase 表达载体线性化,片段大小为 6498 bp)d(显微注射获得首建鼠,1. 空白对照,2. 阴性对照,3. 阳性对照,4、7、8、12、15 为 F_0 代转基因阳性小鼠,分别为 F_1 、 F_4 、 F_5 、 F_9 、 F_{12} ;5、6、9、10、11、13、14、16、17、18 为 F_0 代阴性小鼠)。

图 1 SB 转座酶转基因小鼠的制备

Note: M: DNA molecular weight marker DL15000; a, Lane 1: Prm1 promoter sequence was cloned from mouse genomic DNA using primer Prm1-S and Prm1-AS (801 bp); Lane 2: DNA fragment recovered from pCDNA 3.1(+) which digested with restriction endonuclease *Mlu* I and *Xho* I (4671 bp); Lane 3: SBase gene fragment recovered from pCDNA3.1(+)-SBase using *Nhe* I and *Xho* I (1022 bp); Lane 4: Prm1-SBase plasmid was digested using *Mlu* I and *Xho* I (4671 bp, 985 bp, 842 bp); Lane 5: Prm1-SBase plasmid was digested with *Mlu* I and *Nhe* I. b, Schematic of Prm1-SBase plasmid. c, The linearized SBase expression plasmid; Prm1-SBase plasmid was linearized using *Pvu* I and prepared for microinjection. d, Transgenic mice produced from pronuclei microinjection. Lane 4, 7, 8, 12, 15 are transgenic positive mouse representing the #1, #4, #5, #9, #12; Lane 5, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18 are negative.

Fig.1 The manufacture of SBase transgenic mouse

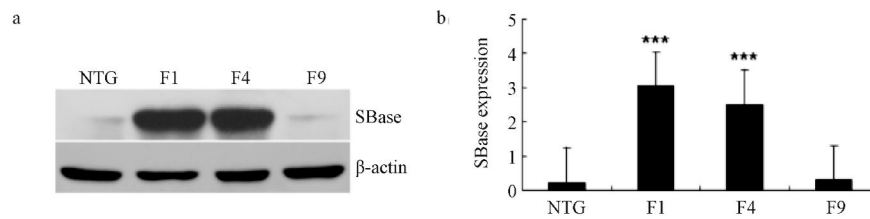


图2 SB转座酶转基因小鼠的睾丸中WB分析

Fig. 2 Western blot analysis of SB transposase expression level in testis of transgenic mice

提取传代的3个转基因小鼠的F₁代雄性睾丸总蛋白, WB分析表达量, 结果表明3个转基因小鼠品有2只小鼠有明显的高表达, 其中首建鼠#1(F₁)的SB转座酶表达量最高(图2a)。WB的灰度扫描结果(图2b)。

2.3 SB转座酶转基因小鼠睾丸组织学观察(彩插6)

基于前面的WB结果, 发现F₁和F₄转基因小鼠SBase表达量相对较高, 为进一步确定转座酶在小鼠睾丸组织中具体表达细胞类型, 对其进行组织学观察, 图3中的a, c, e为HE染色, b, d, f为免疫组织化学染色, 图3a和3b是野生对照小鼠, 图3c和3d是F₁转基因鼠, 图3e和3f是F₄转基因鼠。与对野生对照组a比较, 转基因小鼠睾丸组织中细胞在排列的层次上有所减少, 其中F₁表现最为显著, 这可能与转座酶表达有一定关系。图3d和3f显示, SB转座酶在精子形成的各个时期都有表达, 但在成熟的精子细胞内表达量最高。同时两个首建转基因小鼠比较, F₁的表达更加集中于成熟期的精子细胞, 且表达量较高。

3 讨论

用于基因修饰动物模型的制备手段, 既包括传统的转基因、基因敲除、基因敲入, 也包含近年来出现的基因修饰手段, 如辛酯核酶基因敲除、TALEN技术以及CRISPR/Cas系统^[13], 使得基因打靶可以不经过ES细胞的筛选阶段, 直接通过原核注射的方式获得基因修饰动物模型。但这些技术也存在一些缺陷, 只能针对特定的已知基因进行操作, 并且在大规模操作时只能一个一个基因单独设计, 难以实现高通量制作基因工程动物模型。而转座子是一种随机插入的方式, 能够大规模、高效率的建立基因修饰动物模型并能筛选获得一些未知基因, 进行基因功能研究。转座子技术对于基因功能研究仍然具有非常重要意义。

Zoltan Ivics等^[5]通过对鲑鱼来源的转座子家族进行系统发育分析, 发现了一种新的Tc1样转座子功能结构域, 此结构域在1~1.5千万年前活跃过(表现出转座活性), 利用分子生物学手段对SB原始转座子序列进行点突变筛选, 获得了有活性的转座子。这次的转座活性是在沉睡后的又一次苏醒, 有失而复得之意, 遂随命名为“*Sleeping Beauty* (睡美人)”, 简称SB。SB是一种Tc1/mariner样转座子, 来源于鲑鱼(salmanoid)基因组, 能够在多种哺乳动物细胞内发生转座。相对于其他转座子, SB具有明显的邻近位点转座偏好性。近年来随着对SB转座酶的不断优化, 使得SB转座系统得到不断优化, 如SB100×^[14]。此外, SB在基因组中的转座反应表现出更大的随机性, 不像PB转座子的转座活动多集中在转录单元内部和转录调节区域^[15-16]; 而且相对于PB转座子, SB转座子末端重复序列的增强子或启动子活性基本可以忽略^[17-18]; 另外, 在哺乳动物基因组内不存在SB转座子相关序列, 从而排除潜在的交叉转座现象, 这一现象在PB中明显存在^[19]。利用SB转座酶的这些优势可以获得多种基因工程小鼠, 从而达到研究目的。

虽然SB转座子在小鼠基因功能分析研究中应用前景广阔, 但是由于目前国内缺少有效的表达SB转座酶的小鼠资源, 严重限制了SB转座子在小鼠基因功能研究中的应用。通过运用分子生物学实验技术和WB、免疫组化表型分析, 本研究成功建立了一种在睾丸组织中高表达SB转座酶的转基因小鼠模型, 由于本研究运用了精子特异性的Prm1启动子, 因此集中研究了睾丸组织中SB转座酶的表达状况, 结果为SB在小鼠中的应用提供转座酶工具小鼠资源, 为将其应用于大规模基因修饰动物模型的建立提供新方法。建立的转座酶转基因小鼠, 不仅需要在小鼠体内转座, 捕获内源基因, 更重要的是能够实现转座位点的稳定遗传, 这有待后续的继续研究。

参考文献:

- [1] Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome[J]. *Nature*, 2001. 409(6822): 860–921.
- [2] Horie K, Kuroiwa A, Ikawa M, et al. Efficient chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like transposon Sleeping Beauty in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(16): 9191–9196.
- [3] Wilber A, Linehan JL, Tian X, et al. Efficient and stable transgene expression in human embryonic stem cells using transposon-mediated gene transfer[J]. *Stem Cells*, 2007. 25(11): 2919–2927.
- [4] Ding S, Wu X, Li G, et al. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice[J]. *Cell*, 2005. 122(3): 473–483.
- [5] Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, et al. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells[J]. *Cell*, 1997. 91(4): 501–510.
- [6] Izsvak Z, Ivics Z. Sleeping beauty transposition: biology and applications for molecular therapy[J]. *Mol Ther*, 2004. 9(2): 147–156.
- [7] Hackett PB, Ekker SC, Largaespada DA, et al. Sleeping beauty transposon-mediated gene therapy for prolonged expression[J]. *Adv Genet*, 2005. 54: 189–232.
- [8] 马元武, 张连峰. 转座子 Sleeping Beauty 和 PiggyBac[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010(9): 783–787.
- [9] Geurts AM, Wilber A, Carlson CM, et al. Conditional gene expression in the mouse using a Sleeping Beauty gene-trap transposon[J]. *BMC Biotechnol*, 2006. 6: 30.
- [10] 马元武, 廉虹, 王冬梅, 等. 一种包含转座子 Sleeping Beauty 和 PiggyBac 的新型多功能载体的构建[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012. 2: 182–189.
- [11] Birnboim HC. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA[J]. *Methods Enzymol*, 1983. 100: 243–255.
- [12] Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, et al. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections[J]. *CSH Protoc*, 2008. 2008: pdb prot4986.
- [13] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2013. 31(7): 397–405.
- [14] Mátés L, Chuah MKL, Belay E, et al. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates[J]. *Nat Genet*, 2009. 41(6): 753–761.
- [15] Grabundzija I, Irgang M, Belay E, et al. Comparative analysis of transposable element vector systems in human cells[J]. *Mol Ther*, 2010. 18(6): 1200–1209.
- [16] Ammar I, Gogol-Döring, Miskey C, et al. Retargeting transposon insertions by the adeno-associated virus Rep protein[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012. 40(14): 6693–712.
- [17] Moldt B, Yant SR, Andersen PR, et al. Cis-acting gene regulatory activities in the terminal regions of sleeping beauty DNA transposon-based vectors[J]. *Hum Gene Ther*, 2007. 18(12): 1193–1204.
- [18] Walisko O, Schorn A, Rolfs F, et al. Transcriptional activities of the Sleeping Beauty transposon and shielding its genetic cargo with insulators[J]. *Mol Ther*, 2008. 16(2): 359–369.
- [19] Newman JC, Bailey AD, Fan HY, et al. An abundant evolutionarily conserved CSB-PiggyBac fusion protein expressed in Cockayne syndrome [J]. *PLoS Genet*, 2008. 4(3): e1000031.

〔修回日期〕2013-10-08