

pCAG-3×flag-PP2A C α 转基因小鼠构建及高表达系的筛选

周建丽, 赖娅娜, 李树珍, 曾文滔*

南京医科大学医药实验动物中心, 医药模式动物重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 构建过表达pCAG-3×flag-PP2A C α 转基因小鼠, 筛选高表达稳定遗传系, 建立PP2A C α 基因相关功能研究模型动物。方法: 将Flag蛋白标签序列与鼠源PP2A C α cDNA转录本设计成融合基因, 插入CAG启动子下游, 构建过表达载体pCAG-3×flag-PP2A C α 。通过原核显微注射技术, 将线性化pCAG-3×flag-PP2A C α 质粒注射入受精卵雄原核, 构建pCAG-3×flag-PP2A C α 过表达模型小鼠, PCR筛选阳性过表达小鼠。提取阳性过表达小鼠组织总蛋白, 在蛋白质水平分析转基因小鼠3×flag-PP2A C α 的表达。结果: PCR鉴定及测序结果证实, pCAG-3×flag-PP2A C α 转基因载体及过表达pCAG-3×flag-PP2A C α 转基因小鼠模型构建成功。Western blot筛选转基因高表达系小鼠。结论: 筛选得到pCAG-3×flag-PP2A C α 高表达稳定遗传系小鼠。

[关键词] pCAG-3×flag-PP2A C α ; 转基因小鼠; 过表达

[中图分类号] Q785

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)03-283-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20180301

Constructing of pCAG - 3 × flag - PP2A C α transgenic mice and screening of high level expression system

Zhou Jianli, Lai Yana, Li Shuzhen, Zeng Wentao*

Animal Core Facility, Key Laboratory of Model Animal Research, NMU, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To construct over-expressing pCAG-3×flag-PP2A C α transgenic mice, screen the stable system of high level expression, and therefore to provide a transgenic animal model for the study of the biological function of PP2A C α . **Methods:** The pCAG-3×flag-PP2A C α transgenic vectors were constructed by inserting mice PP2A C α cDNA and Flag protein sequence tag to the downstream of pCAG promoter. The linear pCAG-3×flag-PP2A C α plasmid was injected into the zygote nucleus by microinjection technique to get the over-expressing pCAG-3×flag-PP2A C α mice. The positive over-expression mice were identified by PCR. The positive expression of total protein in mice was extracted and the expression of transgenic mice was analyzed at the protein level. **Results:** The pCAG-3×flag-PP2A C α transgenic vector and transgenic mice was successfully constructed by PCR and was verified by plasmid sequence analysis. The system of high level expression transgenic mice was screened by Western blot assay. **Conclusion:** The pCAG-3×flag-PP2A C α transgenic mice with stable system of high level expression were screened and obtained.

[Key words] pCAG-3×flag-PP2A C α ; transgenic mice; over-expression

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(03):283-287]

通过激酶和磷酸酶作用的蛋白可逆磷酸化构成了所有生命体中信号转导和调节基本机制的主要形式^[1]。蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 作为丝/苏氨酸磷酸酶的一大家族, 是体内含量最高的酶之一。PP2A 调控多种生物进程, 包括细胞增殖、分化、迁移及凋亡, 细胞周期, DNA 损伤应

答甚至肿瘤的发生等^[2-5]。PP2A 全酶包含 A、B、C 3 个亚单位, 其中作为支架亚单位的 A 和作为催化亚单位的 C 构成了 PP2A 的核心酶, A 亚单位和 C 亚单位分别包括 α 和 β 两种亚型。核心酶 PP2A C 催化亚单位的缺失, 即可导致 PP2A 失活。

Gu 等^[6]建立了 PP2A C α 和 PP2A C β 全身性敲除的小鼠模型, 发现 PP2A C α 敲除鼠在胚胎期约 6.5 d 即发生死亡, 而表达量相对很低的 β 亚基全身性敲除小鼠无任何可观察到的表型, 这表明 PP2A C α 是

[基金项目] 国家自然科学基金(31171443)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wentaozeng@njmu.edu.cn

PP2A的主要催化作用单位。在雄性小鼠睾丸组织中特异性敲除PP2A C α 可以引起雄性小鼠不育、精子异常、睾丸结构异常^[7]。在小鼠皮肤组织中敲除PP2A C α 可以引起小鼠毛发稀疏、脚掌角质化、黑色素沉积和尾部严重的过度角质化等现象^[8]。本研究拟构建全身表达pCAG-3 \times flag-PP2A C α 的转基因小鼠及筛选高表达稳定遗传系,以期对PP2A C α 基因的相关功能研究提供模型动物。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所需的C57BL/6J小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2012-0002。质粒pcDNA3.1 3 \times FLAG Rhe B、pCAG-hsp5a和大肠杆菌DH5 α 感受态细胞均由本实验室自行制备。

主要试剂:PrimerScript RT反转录试剂盒、PrimeSTRA高保真酶、DL2000 Marker、BamH I限制性内切酶、Not I限制性内切酶(TaKaRa公司,日本);Taq聚合酶、T4连接酶(Promega公司,美国);小牛肠碱性磷酸酶(calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP, TaKaRa公司,日本),氨苄青霉素(上海生光公司),Flag(一抗抗兔, Cell Signaling公司,美国), GAP-DH(一抗抗兔, Sigma公司,美国);Protein Inhibitor Cocktail、培养液M16、阿佛丁(1.25%)(Sigma公司,美国)。引物合成与质粒测序均由金斯瑞公司完成。

1.2 方法

1.2.1 pCAG-3 \times flag-PP2A C α 载体构建

小鼠总cDNA获取:通过提取C57BL/6J小鼠总RNA,并利用反转录试剂盒对RNA进行逆转录,合成单链cDNA。

PP2A C α cDNA片段的获取:根据Genebank中小鼠mRNA序列设计扩增PP2A C α cDNA(NC_000077.6)的特异性引物, MusPP2ACaF/MusPP2ACaR, cDNA片段全长927 bp。分析cDNA与pcDNA3.1 3 \times FLAG Rhe B载体序列,在引物5'端分别加入BamH I/Not I内切酶位点。引物合成由金斯瑞公司完成,序列如下: MusPP2ACaF: 5'-AATAATGGATCCATGGACGAGAAGTTGTTCCACC-3', MusPP2ACaR: 5'-AATAATGCGGCCGCTTACAGGAAGTAGTCTGGGGTA-3'。以小鼠总cDNA为模板,以MusPP2ACaF/MusPP2ACaR为引物扩增小鼠PP2A C α cDNA片段。扩增反应条件为95 $^{\circ}$ C 5 min预变性;98 $^{\circ}$ C变性,55 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min。片段纯化试剂盒纯化PP2A C α cDNA片段。

pcDNA3.1 3 \times FLAG PP2A C α 质粒构建:用BamH I/Not I对pcDNA3.1 3 \times FLAG Rhe B载体和PCR获得的PP2A C α 片段分别酶切,37 $^{\circ}$ C双酶切2 h, pcDNA3.1 3 \times FLAG Rhe B需另加入CIAP 37 $^{\circ}$ C处理1 h去磷酸化。切胶纯化获取pcDNA3.1 3 \times FLAG元件片段5 344 bp和PP2A C α 片段933 bp。将上述载体与片段酶切纯化产物用T4连接酶于37 $^{\circ}$ C连接2 h,连接产物转化入DH5 α 感受态,37 $^{\circ}$ C孵育1 h后涂布于氨苄抗性固体培养板中培养。次日挑取单克隆摇菌扩大培养并PCR鉴定pcDNA3.1 3 \times FLAG PP2A C α 阳性菌液。PCR阳性菌液质粒抽提后送公司测序。鉴定引物序列如下:T7:5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', MusPP2ACaR:5'-AATAATGCGGCCGCTTACAGGAAGTAGTCTGGGGTA-3'。

pCAG-3 \times flag-PP2A C α 质粒构建:设计带有EcoR I酶切位点的T7+EcoR I -F上游引物与带有Not I酶切位点的PP2A C α 下游引物 MusPP2ACaR扩增获得3 \times FLAG PP2A C α 序列。以pcDNA3.1 3 \times FLAG PP2A C α 为模板获取3 \times flag-PP2A C α 片段。扩增反应条件为95 $^{\circ}$ C 5 min预变性;98 $^{\circ}$ C变性,55 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 1 min10 s,35个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min。片段纯化试剂盒纯化3 \times FLAG PP2A C α 片段。T7+EcoR I -F:5'-AATAATGAATTCTAATACGACTCATATAGG G-3'; MusPP2ACaR:5'-AATAATGCGGCCGCTTACAGGAAGTAGTCTGGGGTA-3'。用EcoR I/Not I对pCAG-hsp5a载体和3 \times FLAG PP2A C α 片段分别酶切,37 $^{\circ}$ C双酶切2 h,pCAG-hsp5a加入CIAP 37 $^{\circ}$ C处理1 h去磷酸化。分别切胶纯化获取相应片段。连接、转化及克隆鉴定方法同pcDNA3.1 3 \times FLAG PP2A C α 质粒构建。PCR阳性菌液质粒抽提后送公司测序。鉴定引物序列如下:pCAG-F:5'-GCAACGTGCTGGTTATTGTG-3'; MusPP2ACaR:5'-AATAATGCGGCCGCTTACAGGAAGTAGTCTGGGGTA-3'。

1.2.2 pCAG-3 \times flag-PP2A C α 质粒转染

以LipofectamineTM 2000为介质,按说明书操作,以pCAG-3 \times flag-PP2A C α (+)及pCAG(+)转染293T细胞,细胞培养在RPMI 1640培养基中(含1%双抗+10%胎牛血清),建立3 \times flag-PP2A C α /pCAG(+)293T细胞及pCAG(+)293T细胞的稳定表达株,质粒转染参见张家永等^[9]方法。

1.2.3 原核注射、小鼠鉴定及繁育

pCAG-3 \times flag-PP2A C α 质粒线性化并显微注射:pCAG-3 \times flag-PP2A C α 质粒Sal I内切酶酶切线

性化,切胶纯化,回收。线性化片段分装,-80℃保存备用。超数排卵和取卵参考文献[10-11]方法进行,精子采集、获能和体外受精参见Takeo等^[11]的方法。将线性化pCAG-3×flag-PP2A Cα质粒以Injection Buffer稀释至2.5 μg/mL,原核注射至受精卵雄原核中,显微镜下观察轻微膨胀即可,37℃5% CO₂培养箱培养14 h后收集发育正常的二细胞。以15~20枚/只移植入假孕的ICR雌鼠输卵管内。

Founder转基因鼠基因型鉴定并繁育:小鼠出生后7~10 d以百位法剪趾编号,并剪3~5 mm鼠尾样品待鉴定。鼠尾样品以苯酚/氯仿方法抽提基因组DNA。并通过特异性引物筛选阳性转基因小鼠。鉴定引物见下:MusPP2ACaFN:5'-ATGGACGAGAAGTTGTTACC-3',MusPP2ACaRN:5'-TTACAGGAAGTAGTCTGGGGTA-3'。扩增反应条件为95℃5 min预变性;98℃变性,55℃15 s,72℃1 min,35个循环;72℃7 min。PCR鉴定筛选阳性Founder小鼠。阳性F0转基因小鼠性成熟后,以1:1与野生型C57BL/6J合笼,以鉴定F0代小鼠的方法进行出生小仔F1代的基因型鉴定。

1.2.4 pCAG-3×flag-PP2A Cα转基因阳性小鼠检测

选取10周龄阳性F1代雄性小鼠7只,野生型C57BL/6J雄鼠作为对照;脱颈处死后打开腹腔取睾丸组织,实验方法同细胞转染Western blot鉴定。

2 结果

2.1 pCAG-3×flag-PP2A Cα载体构建

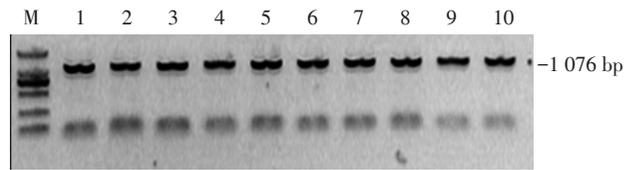
2.1.1 pcDNA3.1 3×FLAG PP2A Cα质粒构建

以小鼠总cDNA为模板,MusPP2ACaF/MusPP2ACaR为引物高保真酶扩增获得小鼠PP2A Cα cDNA片段,用BamH I/Not I对pcDNA3.1 3×FLAG Rhe B载体和PP2A Cα片段分别酶切,紫外灯下切胶回收相应片段。

将上述两个片段T4连接酶连接获得pcDNA3.1 3×FLAG PP2A Cα重组质粒,PCR鉴定出现预期1 076 bp片段的为阳性克隆(图1)。阳性克隆抽提质粒送金斯瑞公司测序,Clustal W软件比对验证重组质粒构建成功。

2.1.2 pCAG-3×flag-PP2A Cα质粒构建

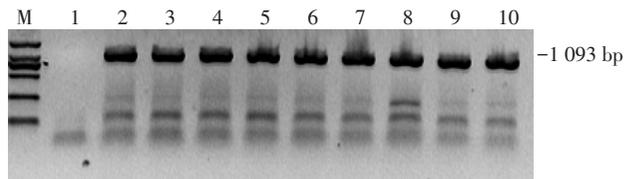
以pcDNA3.1 3×FLAG PP2A Cα为模板,T7+EcoR I -F/MusPP2ACaR为引物高保真酶扩增获得3×FLAG PP2A Cα片段,用EcoR I/Not I对pCAG-hsp5a载体和3×FLAG PP2A Cα片段分别酶切,紫外灯下切胶回收相应片段。



1~10:克隆样品;M:DL2000 marker。

图1 PCR鉴定pcDNA3.1 3×FLAG PP2A Cα重组克隆
Figure 1 PCR identification result of pcDNA3.1 3×FLAG PP2A Cα recombined clones

将上述两个片段T4连接酶连接获得pCAG-3×flag-PP2A Cα重组质粒,PCR鉴定出现预期1 093 bp片段的为阳性克隆,1号泳道未扩出阳性条带,说明该泳道对应的克隆不含有重组质粒(图2)。阳性克隆抽提质粒送金斯瑞公司测序,Clustal W软件比对验证重组质粒构建成功。



1~10:克隆样品;M:DL2000 marker。

图2 PCR鉴定pCAG-3×flag-PP2A Cα重组克隆
Figure 2 PCR identification result of pCAG-3×flag-PP2A Cα recombined clones

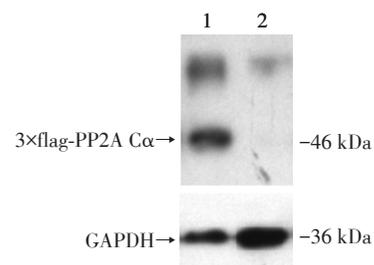
2.2 质粒转染 Western blot 鉴定

转染3×flag-PP2A Cα/pCAG(+)293T细胞上清液中,可检测到的PP2A Cα和3×flag 2种融合蛋白表达。而在转染pCAG(+)空载体组则未检出(图3),表明pCAG-3×flag-PP2A Cα转基因质粒构建成功。

2.3 pCAG-3×flag-PP2A Cα转基因小鼠基因型鉴定及繁育

2.3.1 Founder转基因鼠基因型鉴定

将重组质粒pCAG-3×flag-PP2A Cα Sal I酶切



1:转染3×flag-PP2A Cα/pCAG(+)293T细胞上清液;2:转染pCAG(+)的293T细胞上清液。

图3 Western blot检测293T细胞中pCAG-3×flag-PP2A Cα载体融合蛋白表达

Figure 3 Analysis of pCAG-3×flag-PP2A Cα fusion protein expressed in 293T cells by Western blot

线性化后回收纯化,原核注射至受精卵雄原核中。

移植后20 d小鼠出生,共计生存39只。以苯酚/氯仿法抽提鼠尾DNA, MusPP2ACaFN / MusPP2ACaRN 引物鉴定F0代小鼠,琼脂糖凝胶电泳跑胶预期条带大小为930 bp。PCR结果显示,4号、7号、11号、12号、13号、19号、26号、30号为阳性F0代小鼠(图4),12#小鼠死亡。

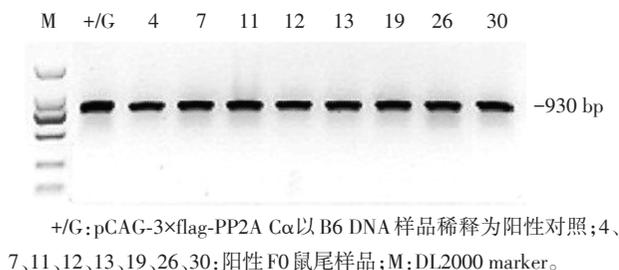


图4 PCR鉴定阳性小鼠的结果

Figure 4 PCR identification results of positive mice

2.3.2 F1代转基因鼠的繁育及筛选

阳性F0转基因小鼠性成熟后,作为种鼠,以1:1与野生型C57BL/6J合笼,作为单独的7个遗传系繁育,将转基因小鼠子代繁育2代。以PCR方法筛选阳性小鼠,方法同筛选F0阳性小鼠的方法。分别选取F1阳性后代22号、43号、96号、151号、158号、165号、168号检测蛋白水平表达量。

2.4 pCAG-3×flag-PP2A Cα转基因阳性小鼠检测

F1代小鼠取睾丸组织,Western blot方法检测野生型小鼠与7只转基因阳性小鼠3×flag-PP2A Cα融合蛋白表达量,GAPDH为内参(图5)。对Western blot结果进行灰度值分析,得到3×flag-PP2A Cα融合蛋白的相对表达量。由表1可知,pCAG-3×flag-PP2A Cα转基因阳性小鼠96号表达量最高,为野生对照小鼠表达量的36.6倍,其次为阳性小鼠43号和158号,分别为野生对照小鼠表达量的36倍和31倍。转基因阳性小鼠165号表达量最低,为野生对照小鼠表达量的2.5倍。

3 讨论

磷酸酶在机体中发挥至关重要的作用,特别是丝苏氨酸磷酸酶所作用的丝氨酸和苏氨酸位点,在这种去磷酸化作用中占据相当大的比例^[12-14]。去磷酸化和磷酸化的动态平衡保证了机体的正常功能,在阿尔兹海默病形成、肿瘤发生、机体正常发育等过程中发挥重要作用^[15]。PP2A在生殖中也具有重要调控作用:Lu等^[16]发现PP2A参与调节卵母细胞的减数分裂,对微管聚合和减数分裂纺锤体的形成

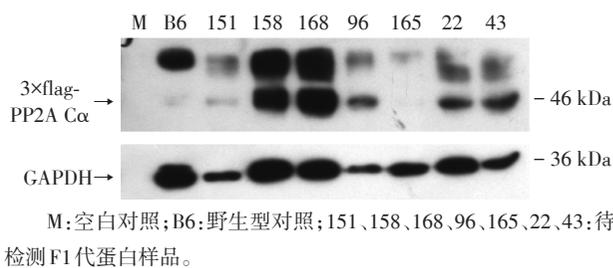


图5 转基因鼠睾丸组织 Western blot 检测

Figure 5 Analysis of spermary protein expressed in transgenic mice by Western blot

表1 转基因鼠睾丸组织 Western blot 表达量相对定量分析
Table 1 The expression analysis of spermary protein in transgenic mice by Western blot

F1 编号	FLAG	GAPDH	FLAG/GAPDH
野生型对照	281.26	4 110.3	0.068 428
151	822.48	1 573.09	0.522 844
158	10 336.16	4 839.62	2.135 738
168	7 132.09	3 678.48	1.938 869
96	2 716.45	1 082.37	2.509 724
165	370.17	2 105.82	0.175 784
22	3 160.31	2 991.06	1.056 585
43	3 736.51	1 513.36	2.469 016

是必需的。PP2A与精子的过度活化有关,当PP2A被抑制时,精子过度活化增强并激活顶体反应^[17]。Akerfelt等^[18]研究显示PP2A的连接蛋白HSF2的缺失,可导致睾丸发育减缓,精子头部异常。研究也显示Greatwall蛋白通过作用于对PP2A有抑制性的底物,控制细胞的有丝分裂过程^[19-20]。

外源基因在转基因动物中的表达取决于整合位点,由于整合位置的不同,使用相同表达载体获得的转基因动物中外源基因表达可相差较多倍^[21]。转基因小鼠中外源基因为随机插入,插入位点未知,拷贝数无法确定,这就导致后期小鼠拷贝数和表达量的差异。由于外源基因是整合于转基因动物的染色体上,对高表达的个体进行繁育就可得到大量表达水平相近的转基因动物^[21]。

本文以分子克隆技术构建转基因载体pCAG-3×flag-PP2A Cα,细胞转染验证载体构建成功。利用显微技术获得转基因过表达Founder小鼠,Founder小鼠分别与野生型交配获得不同的遗传系以期可以获得pCAG-3×flag-PP2A Cα高表达稳定遗传系。借助于Western blot检测不同遗传系转基因阳性小鼠及野生对照小鼠中睾丸组织3×flag-PP2A Cα蛋白表达水平,结果表明pCAG-3×flag-PP2A Cα转基因

阳性小鼠43号、96号蛋白表达水平显著提高,筛选出pCAG-3×flag-PP2A Cα转基因高表达的稳定遗传系小鼠。pCAG-3×flag-PP2A Cα转基因小鼠稳定遗传系的构建,可以为进一步探索PP2A Cα基因的相关功能研究,如肿瘤发生机制、生殖相关研究等提供研究材料。

[参考文献]

[1] Shi Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure[J]. *Cell*, 2009, 139(3):468-484

[2] Seshacharyulu P, Pandey P, Datta K, et al. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer[J]. *Cancer Lett*, 2013, 335(1):9-18

[3] Basu S. PP2A in the regulation of cell motility and invasion[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2011, 12(1):3-11

[4] Chen WB, Wang ZX, Jiang CP, et al. PP2A-mediated anti-cancer therapy[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2013, 2013: 675429

[5] Janssens V, Goris J, Van Hoof C. PP2A: the expected tumor suppressor[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15(1): 34-41

[6] Gu P, Qi X, Zhou Y, et al. Generation of Ppp2Ca and Ppp2Cb conditional null alleles in mouse [J]. *Genesis*, 2012, 50(5):429-436

[7] Pan X, Chen X, Tong X, et al. Ppp2ca knockout in mice spermatogenesis [J]. *Reproduction*, 2015, 149(4): 385-391

[8] Fang C, Li L, Li JM. Conditional knockout in mice reveals the critical roles of Ppp2ca in epidermis development [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5):756

[9] 张家永,李和军,李 频,等. CD402IgG1Fc 融合蛋白真核表达载体的构建及表达[J]. *福建医科大学学报*, 2007, 41(2):105-108

[10] 董婉维,周生来. FVB 小鼠超排卵及胚胎冷冻技术的研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(11):652-654

[11] Takeo T, Tsutsumi A, Omaru T, et al. Mouse sperm cryopreservation and effective embryo production using cryopreserved C57BL/6 mouse sperm [J]. *J Mamm Ova Res*,

2010(27):70-78

[12] Mumby MC, Walter G. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth [J]. *Physiol Rev*, 1993, 73(4):673-699

[13] Garcia A, Cayla X, Guergnon J, et al. Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis[J]. *Biochimie*, 2003, 85(8):721-726

[14] Tao GZ, Toivola DM, Zhou Q, et al. Protein phosphatase-2A associates with and dephosphorylates keratin 8 after hyposmotic stress in a site- and cell-specific manner[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(7):1425-1432

[15] Whittington RA, Virag L, Marcouiller FA, et al. Propofol directly increases Tau phosphorylation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1):e16648

[16] Lu Q, Dunn RL, Angeles R, et al. Regulation of spindle formation by active mitogen-activated protein kinase and protein phosphatase 2a during mouse oocyte meiosis [J]. *Biol Reprod*, 2002, 66(1):29-37

[17] Ashizawa K, Gj W, Katayama S, et al. Regulation of acrosome reaction of fowl spermatozoa: evidence for the involvement of protein kinase C and protein phosphatase-type 1 and/or-type 2A [J]. *Reproduction*, 2006, 131(6): 1017-1024

[18] Akerfelt M, Henriksson E, Laiho A, et al. Promoter ChIP-chip analysis in mouse testis reveals Y chromosome occupancy by HSF2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(32):11224-11229

[19] Mochida S, Maslen SL, Skehel M, et al. Greatwall phosphorylates an inhibitor of protein phosphatase 2A that is essential for mitosis [J]. *Science*, 2010, 330(6011):1670-1673

[20] Gharbi-Ayachi A, Labbé JC, Burgess A, et al. The substrate of greatwall kinase, Arpp19, controls mitosis by inhibiting protein phosphatase 2A [J]. *Science*, 2010, 330(6011):1673-1677

[21] 颜景斌,肖艳萍,方彧聘,等. 转基因小鼠中外源基因遗传及表达稳定性的研究[J]. *生物工程学报*, 2002, 18(6):758-760

[收稿日期] 2017-03-30