

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.21.003

高表达人源 SP15 对小鼠生长和生殖的影响 *

陈霞 全欣 潘筱云 许译丹 李建民[△]

(南京医科大学基础医学院 江苏 南京 210029)

摘要 目的:探究高表达人源 SP15 对小鼠生长和生殖的影响,为研究 NYD-SP15 在生物体中的功能提供动物模型。**方法:**将人源 NYD-SP15 cDNA 以及 Cre 序列插入 PCAG 启动子下游,构建 NYD-SP15 转基因表达载体,并通过原核注射,构建全身性表达 NYD-SP15 的转基因小鼠;将获得的 NYD-SP15 转基因小鼠与 C57/BL6 小鼠交配,PCR 鉴定转基因小鼠是否有 Cre 插入,筛选出人源 NYD-SP15 表达的小鼠,统计转基因小鼠体重变化和后代阳性情况。**结果:**通过 PCR 鉴定及测序验证,我们成功构建了 NYD-SP15 转基因过表达载体。并通过 PCR 鉴定小鼠基因型,筛选出可以表达人 NYD-SP15 的转基因小鼠。比较转基因小鼠与同窝野生型小鼠体重,发现转基因小鼠体重与同窝野生型小鼠相比无明显区别,说明在体内过表达 NYD-SP15 对小鼠体重无明显影响。通过对后代阳性小鼠出生情况统计发现 F₂ 代阳性小鼠出生率较 F₁ 代明显降低。**结论:**人源 NYD-SP15 在小鼠体内能正常表达,对其生长无明显影响,但其后代阳性出生率呈逐代下降趋势,推测该原因可能与 NYD-SP15 在睾丸中表达有关。

关键词:胞苷脱氨酶;NYD-SP15;转基因小鼠;生长;生殖

中图分类号:Q75;Q78;Q812 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)21-4009-05

The Effects of Overexpressing Homo SP15 on Growth and Reproduction of Mice*

CHEN Xia, TONG Xin, PAN Xiao-yun, XU Yi-dan, LI Jian-min[△]

(School of Basic Medical Science, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To observe the growth and reproduction in mice overexpressing homo SP15 gene and provide a transgenic animal model for the study of the biological function of SP15. **Methods:** NYD-SP15 transgenic vectors were constructed by inserting homo NYD-SP15 cDNA and the Cre fragment to the downstream of PCAG promoter. Microinjection was applied to get the mice expressing NYD-SP15 protein systemically. The positive offspring, which could stably express protein SP15, were obtained by mating NYD-SP15 transgenic mice with C57/BL6 mice and identified by PCR. Then the weights of positive transgenic mice were compared with their wildtype controls and the birth number of positive offspring was counted. **Results:** The NYD-SP15 transgenic overexpression vector was successfully constructed by PCR and plasmid sequence analysis. The NYD-SP15 transgenic mice were identified by PCR. It was indicated that overexpression of homo NYD-SP15 could not affect the body weight of mouse, since there was no significant difference between the weights of transgenic mice and littermate wild-type mice. What's more, the birth rate of positive F₂ offspring was significantly lower than that of F₁ in transgenic mice. **Conclusion:** Transgenic mice could express Homo NYD-SP15 normally and play biological function successfully. Since NYD-SP15 could be expressed in the testis, it was suggested that NYD-SP15 might influence the reproductive system and caused the lower birth rate of positive F₂ offspring than F₁.

Key words: Cytidine deaminase; NYD-SP15; Transgenic mice; Growth; Reproduction

Chinese Library Classification(CLC): Q75; Q78; Q812 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)21-4009-05

前言

胞苷脱氨酶(Cytidine Deaminase, CD)是一种参与核酸代谢的含锌金属蛋白酶,在人体多种组织中大量存在。它可以通过特异性催化胞苷产生脱氨反应,进而参与体内核酸代谢过程。该家族成员至少含有一个具有锌结合催化区(H/C)X-E-X(23-30)-PCXXC(X为任意氨基酸)核心的 CMP_cyt_deam 结构域。根据进化树可以将胞苷脱氨酶分为胞苷脱氨酶(Cytidine

deaminase, CDA)、脱氧胞苷脱氨酶(Deoxycytidine deaminase, dCMP)和激活诱导的胞苷脱氨酶(Activation-induced cytidine deaminase, AID)/载脂蛋白 B 蛋白家族(Apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide, APOBEC)三大类^[12]。有文章报道 APOBEC(载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽,apo)能够将载脂蛋白 B 信使 RNA 脱氨基化而产生一个未成熟终止子,表达截短了的载脂蛋白 B,影响机体内脂类的代谢^[34]。其中载脂蛋白 B 家族又可以分为 APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A-G,

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31171443)

作者简介:陈霞(1988-),女,硕士,主要研究方向:转基因小鼠构建, E-mail:stick_up@163.com

△ 通讯作者:李建民,电话:025-86862102, E-mail: jianminlilab@163.com

(收稿日期:2014-02-19 接受日期:2014-03-15)

以及活化诱导的胞苷脱氨酶(AID)。它们能够将靶基因序列上的胞嘧啶脱氨基成为尿嘧啶,从而调节体内不同的生物学功能^[5,6]。已有文献报道载脂蛋白B家族蛋白基因的异常表达,可诱导肿瘤相关基因的表达而引起癌症。而在过表达该家族基因的转基因动物模型研究中也发现这种小鼠的肝脏发育出现异常,最终形成肿瘤^[7,9]。

通过对临床病例的筛选和转基因动物模型的表型分析,研究结果表明过表达部分胞苷脱氨酶家族基因会增加癌症发生的可能性^[10-15]。在NYD-SP15的研究中,通过基因芯片和定量PCR等技术已经发现NYD-SP15是与精子发生相关的胞苷脱氨酶基因家族一员,它在多种组织中(如睾丸、肾脏、胰、脑等)都可以表达^[16]。这为研究NYD-SP15的过表达是否会影响小鼠精子的发生以及基因的传递提供了依据。另外,NYD-SP15所编码的蛋白质含有两个不同的dCMP_cyt_deam结构域,是目前为止发现的胞苷脱氨酶家族中唯一具有双脱氨酶结构域的蛋白^[17]。因此,NYD-SP15可能是一个潜在的原癌基因,这为我们的深入研究提供了思路。本研究通过构建高表达NYD-SP15的转基因小鼠模型,比较转基因小鼠与对照鼠的体重差异,并统计其后代阳性小鼠数量,研究NYD-SP15对小鼠生长繁殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 T4连接酶,TagDNA聚合酶,限制性内切酶NotI SpeI AclI,切胶回收试剂盒以及PrimeSTRA高保真PCR反应体系均为宝生物公司产品。质粒抽提试剂盒购于天根生化科技公司;琼脂糖购自南京大治生物科技有限公司;由上海Invitrogen公司完成引物合成以及质粒测序。

1.1.2 菌株和质粒 质粒pCAG-3flag-sp15和p-Insulator-CAG-3flag-PP2ACa(V5)均为本实验室构建^[18]。大肠杆菌DH5 α 感受态细胞为本实验室自行制备。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计 从NCBI网站的Genebank中获得小鼠NYD-SP15的mRNA序列(NM_030911.3),设计一对特异性引物特异性扩增SP15(约1.9 kb),引物由Invitrogen公司合成,序列如下:

SP15-F: 5'-AATAATGGATCCATGAAAGAAGCTGGGCAG-3'
SP15-R: 5'-AATAATGCGGCCGCTCGACTTAGTGGATTCCGAGGCG-3'

1.2.2 NYD-SP15基因及cre片段的获取 用NotI/SpeI酶切实验室之前构建的pCAG-3flag-sp15-cre质粒,酶切反应体系(20 μ L)为:质粒1.5 μ L;10*H 2 μ L;BSA 2 μ L;SpeI 1 μ L;NotI 1 μ L;ddH₂O 12.5 μ L。酶切反应条件为:37 $^{\circ}$ C,2 h。用TaKaRa片段纯化试剂盒纯化酶切产物。由于上一步酶切得到的两个片段大小相近不易区分,因而用AclI酶切产物,将后续实验用不到的片段酶切成两个小片段,酶切体系(20 μ L)为:纯化产物17 μ L;AclI 1 μ L;10*K 2 μ L。酶切反应条件为:37 $^{\circ}$ C,2 h。

1.2.3 原核表达载体的构建 将上一步经酶切后得到的sp15-cre片段与实验室之前构建的p-Insulator-CAG-3flag-

PP2ACa载体经(NotI/SpeI)酶切后,通过T4连接酶连接,连接反应条件为16 $^{\circ}$ C,2 h。然后将连接产物转化到DH5 α 感受态细胞中,在含有Amp的LB固体培养基铺板37 $^{\circ}$ C培养过夜。次日挑取单克隆菌落扩大培养并提取质粒进行PCR扩增,鉴定引物分别为:SP15-F/R和cre-f/ β -globin-PA-R。由Invitrogen公司合成的鉴定引物序列如下:cre-f: 5'-GCAACGTGCTGGT-TATTGTG-3'; β -globin-PA-R: 5'-TTTTGGCAGAGGGAAAAA-GA-3';

质粒PCR鉴定,跑胶验证正确后,将质粒送Invitrogen公司测序。若序列比对正确,表明成功获得了正确的重组过表达质粒。

1.2.4 受精卵以及假孕母鼠的准备 给可育雌鼠C57BL/6注射孕马血清与绒毛膜促性腺激素(HCG)促使其超排卵,处理后与可育雄鼠(FVB)交配,次日从输卵管内收集受精卵备用。将可育雌鼠(ICR)与输卵管结扎绝育的雄鼠交配,刺激雌鼠发生妊娠变化而得到假孕母鼠。

1.2.5 获得转基因过表达F0代小鼠 重组原核表达质粒pInsulator-CAG-3xFlag-Cre-SP15用I-CeuI酶切,经切胶纯化回收后得到6813 bp大小的片段,然后采用原核注射的方法将目的片段注射到预先准备的C57BL/6小鼠受精卵中,再将受精卵移植到假孕FVB母鼠的输卵管中,最终获得F₀代NYD-SP15过表达转基因鼠。

1.2.6 小鼠鼠尾DNA的抽提及基因型鉴定 用苯酚/氯仿裂解法抽提出生10天左右小鼠尾尖(或脚趾)基因组DNA,并通过特异性的PCR引物鉴定小鼠基因型。NYD-SP15转基因小鼠鉴定时使用引物序列如下:

Cre-F: 5'-TTGCCTGCATTACCGGTCGATGC-3',

Cre-R: 5'-TTGCACGTTACCGGCATCAACG-3'.

20 μ L PCR反应体系,反应条件为:95 $^{\circ}$ C变性5 min;95 $^{\circ}$ C,30 s;55 $^{\circ}$ C,30 s;72 $^{\circ}$ C,30 s;二至四步反应30个循环后,72 $^{\circ}$ C充分延伸10 min,4 $^{\circ}$ C降温并保存。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

1.2.7 F0代小鼠体重统计学分析 出生后每隔一周记录阳性F0代小鼠及其同窝对照小鼠(每组n>3)体重,并统计绘制成折线图。

1.2.8 转基因小鼠阳性后代统计 将鉴定得到的F₀代小鼠对应的阳性后代统计成表,并计算阳性小鼠出生率。

2 结果

2.1 NYD-SP15基因及cre片段的获取

通过用NotI/SpeI以及AclI酶切原始的pCAG-3flag-sp15-cre质粒以获得含有NYD-SP15基因及cre的目的片段(图1),PCR鉴定结果正确,紫外条件下切胶并回收目的片段。

2.2 鉴定重组质粒

将上一步得到的两个片段连接得到的重组质粒pInsulator-sp15-3*flag-cre通过PCR鉴定(图2),重组质粒扩增得到了正确约1.9 kb的SP15片段以及800 bp的Cre与 β -globin的融合序列。再将重组质粒送上海Invitrogen公司测序,经序列比对软件验证重组质粒目的序列正确。

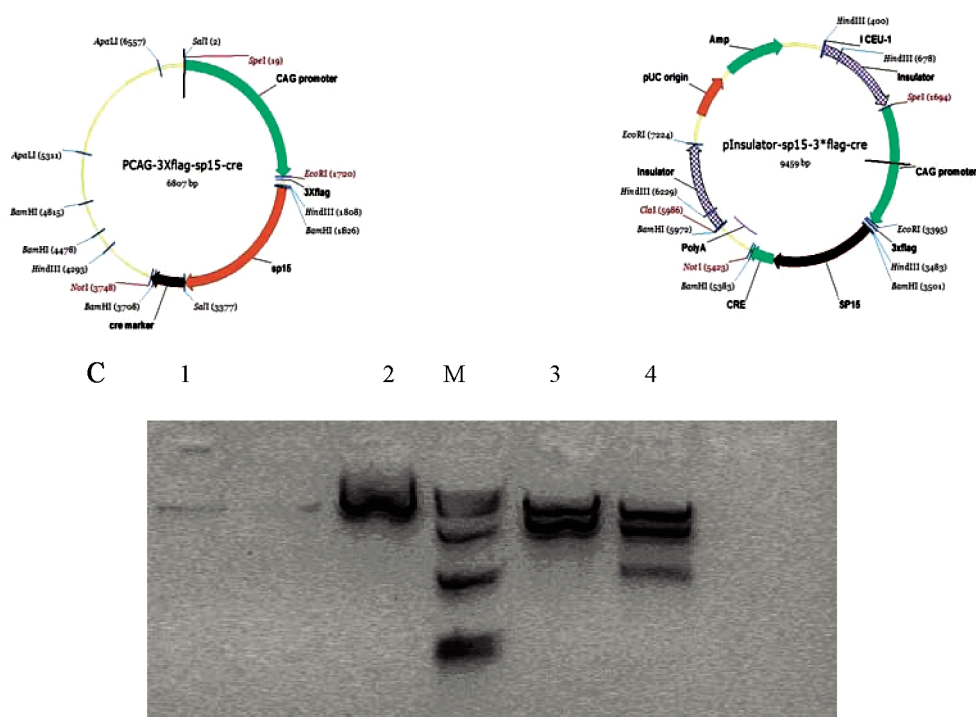


图 1 A. pCAG-3flag-sp15-cre 原始质图谱, B. 重组后的 pInsulator-CAG-3xFlag-Cre-SP15 质图谱, C. 原始质粒酶切产物凝胶电泳图, 1: sp15 原始质粒; 2: PP2ACa 载体; 3: PP2ACa 载体酶切片段(5730 bp); 4: sp15 质粒酶切片段(3729 bp); M: DNA marker DL15000。

Fig.1 A. Plasmid map of the original pCAG-3flag-sp15-cre vector, B. Map of the recombinant plasmid pInsulator-CAG-3xFlag-Cre-SP15, C. Restriction enzyme of original plasmid product-agarose gel electrophoresis, 1: original plasmid sp15; 2: plasmid PP2ACa; 3: Restriction enzyme plasmid PP2ACa (5730 bp); 4: Restriction enzyme plasmid sp15 (3729 bp); M: DNA marker DL15000.

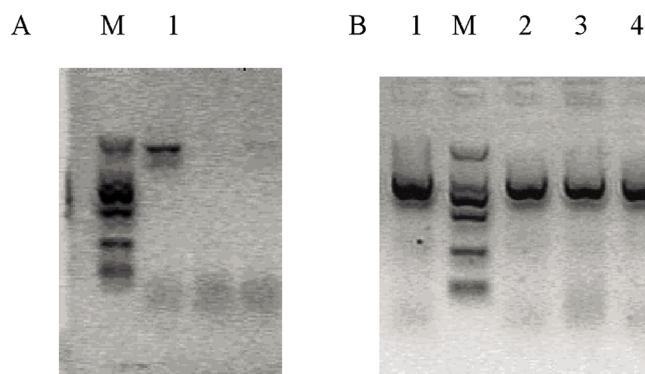


图 2 重组质粒的 PCR 产物凝胶电泳图。A. SP15 片段: 约 1.9 kb, B. 1-4: cre-f/β-globin-PA-R 鉴定结果: 800 bp, 大小正确。M: Marker。

Fig.2 PCR product of recombinant plasmid agarose gel electrophoresis. A. SP15 fragment: about 1.9 kb, B. 1-4: Identification results of cre-f/β-globin-PA-R: 800 bp, both results were the right size. DL2000 marker was used.

2.3 获得转基因高表达 F₀ 代小鼠

用 I-CeuI 酶切重组表达质粒 pInsulator-sp15-3*flag-cre, 并将纯化得到的目的片段一定倍数稀释后注射到 C57BL/6 小鼠受精卵中, 获得 7 只假孕母鼠, 最终得到 40 只原代小鼠。

2.4 PCR 鉴定 F₀ 代小鼠基因型

通过用 Cre 引物鉴定新出生的原代小鼠鼠尾 DNA, PCR 电泳产物经琼脂糖凝胶电泳检测条带为 364 bp。因此 40 只原代小鼠中共有 8 只阳性的原代(F₀)过表达 NYD-SP15 的转基因小鼠, 编号 1-8(图 3), 其余泳道未扩出阳性条带, 说明该泳道对应的小鼠 DNA 不含有插入片段。

2.5 统计学方法分析小鼠体重变化

小鼠体重的变化可以用来直观衡量不同小鼠之间的发育

差异, 因此我们关注了转基因小鼠的体重变化。通过比较 NYD-SP15 转基因小鼠与野生型体重, 发现全身性高表达 NYD-SP15 的转基因小鼠的体重与正常小鼠无显著变化(P>0.05)(图 4), 我们推测全身性过表达 NYD-SP15 不会导致小鼠体重的异常, SP15 的高表达对小鼠体内的代谢过程无显著影响。

2.6 NYD-SP15 转基因小鼠后代出生情况

将获得的阳性 F₀ 代小鼠与 C57/BL6 小鼠交配传代, 结果 1♀ 一直无后代出生, 而 8♂ 在出生后不久死亡。F₀ 代小鼠后代出生情况如下表所示(Table 1)。结果表明 NYD-SP15 转基因小鼠 F₂ 代阳性小鼠出生率明显低于 F₁ 代, 推测 NYD-SP15 高表达对小鼠生殖系统产生影响, 最后导致 F₂ 代阳性小鼠出生数量明显下降。

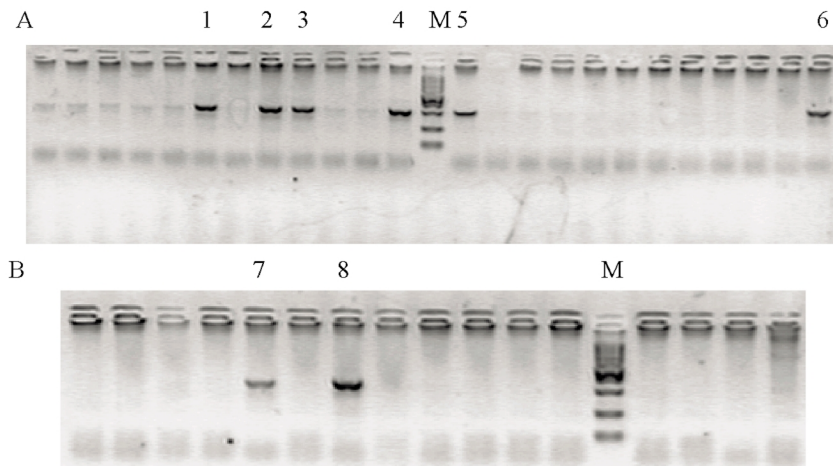


图3 鼠尾基因的PCR产物凝胶电泳图A和B. cre片段:364 bp,大小正确 M:Marker。

Fig.3 PCR product of mice tail gene agarose gel electrophoresis. A and B. cre fragment: 364 bp, both results were the right size. DL2000 marker was used.

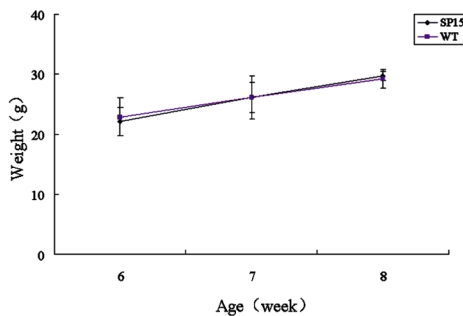


图4 NYD-SP15 转基因小鼠体重与同窝对照体重差异图。SP15: NYD-SP15 转基因小鼠, WT: 同窝对照小鼠。P>0.05 (P<0.05, *, P<0.01, **, P<0.001, ***)

Fig.4 The graph of weight between NYD-SP15 transgenic mice and littermate controls. SP15: NYD-SP15 transgenic mice, WT: littermate controls. P>0.05 (P<0.05, *, P<0.01, **, P<0.001, ***)

3 讨论

随着转基因技术的不断发展,转基因小鼠在科研中的应用也越来越广泛。目前转基因小鼠在设计过程中都会加入绝缘子以提高转基因表达效果。绝缘子(Insulator)是真核生物基因组的调控元件之一,其功能为阻遏临近调控元件,对它所界定基因的启动子起增强或阻遏作用,且它对增强子的抑制作用具有极性。绝缘子调控真核基因的表达具有时空特异性,它可以通过对染色质组蛋白的翻译后修饰作用而调节基因的表达^[19,20]。因此在设计 NYD-SP15 转基因载体时,我们在 NYD-SP15 基因两端插入了鸡 β -球蛋白隔离原件(绝缘子),使其表达不受体内其他调控元件的活化或失活效应影响,从而确保 NYD-SP15 基因在小鼠体内能够高效表达。由于在设计鉴定引物时,基因组末端和空白载体连接部位难以寻找到合适的鉴定引物,所以

表1 NYD-SP15 转基因小鼠后代阳性小鼠出生率

Table 1 Positive offspring birth rate of NYD-SP15 transgenic mice

F ₀	The number of F ₁	The number of positive F ₁	The birth rate of positive F ₁	The number of F ₂	The number of positive F ₂	The birth rate of positive F ₂
1♀	0	0	-	0	0	-
2♀	14	5	35.71%	13	1	7.69%
3♀	16	6	37.50%	16	2	12.50%
4♂	15	5	30.00%	15	1	6.67%
5♂	12	3	25.00%	7	0	-
6♂	27	6	22.22%	14	1	7.14%
7♂	20	5	25.00%	5	0	-
8♂	0	0	-	0	0	-
Average	13	4	21.93%	9	1	4.25%

我们引入了 Cre 片段,其引物序列可以方便进行小鼠的基因型鉴定。同时在 SP15 的上方插入 3*flag 作为标签蛋白,方便用 Flag 抗体在蛋白水平检测 NYD-SP15 的表达情况。本实验经过原核注射获得了稳定表达 NYD-SP15 的转基因 F₀ 代小鼠,并通过研究高表达人源 NYD-SP15 后对小鼠生长发育的影响探索其生理功能,为确定 NYD-SP15 是否也是潜在的原癌基因以及研究 NYD-SP15 对生殖系统的影响提供了动物模型。

我们发现 NYD-SP15 高表达小鼠体重无明显变化,推测 SP15 的高表达对小鼠的形态发育无显著影响。由于 NYD-SP15 已被证明与精子发生有关,但目前还未有报道指出它对雌性生殖系统生理过程存在影响。本研究中雌性鼠子代的阳性率也降低,为 NYD-SP15 高表达影响小鼠的雌性生殖系统提供了依据,但是 NYD-SP15 高表达影响小鼠生殖系统的机制还需进一步深入研究,NYD-SP15 蛋白的异常表达与临床不孕症之间有

无潜在联系也需进一步探索。NYD-SP15 作为胞苷脱氨酶家族的一员,其高表达是否会引起小鼠肿瘤,也需在后续的实验中继续关注。

4 结论

本实验通过原核注射成功构建了高表达人源 NYD-SP15 基因的小鼠,为进一步研究胞苷脱氨酶家族功能提供了良好的动物模型。并且我们发现,NYD-SP15 的高表达不会影响小鼠形态发育,但是对小鼠雌性生殖系统会有一定的影响,其机制有待深入研究。由于 NYD-SP15 是一个新发现的基因,对于它的研究时间较短,它的过表达对于其它不同组织的影响还需要进一步地探索。

参考文献(References)

- [1] Silvestro G, Conticello, Cornelia J, et al. Evolution of the AID/APOBEC Family of Polynucleotide (Deoxy) cytidine Deaminases [J]. Mol Biol Evol, 2005, 22(2): 367-377
- [2] Carter J C. The nucleoside deaminases for cytidine and adenosine: Structure, transition state stabilization, mechanism, and evolution[J]. Biochimie, 1995, 77(1-2): 92-98
- [3] Teng B B, Scott O, Lawrence C. Mutational analysis of apolipoprotein B mRNA editing enzyme (APOBEC1): structure-function relationships of RNA editing and dimerization[J]. Lipid Res, 1999, 40(4): 623-635
- [4] Makoto N, Kazuhiro O, J μlia K. Alternative mRNA Splicing and Differential Promoter Utilization Determine Tissue-specific Expression of the Apolipoprotein B mRNA-editing Protein (Apobec1) Gene in Mice[J]. J Biol Chem, 1995, 270(22): 13042-13056
- [5] Ohainle M, Kerns J A, Malik H S, et al. Adaptive evolution and antiviral activity of the conserved mammalian cytidine deaminase APOBEC3H[J]. J Virol, 2006, 80(8): 3853-3862
- [6] Pham P, Bransteitter R, Goodman M F. Reward versus risk: DNA cytidine deaminases triggering immunity and disease[J]. Biochemistry, 2005, 44(8): 2703-2715
- [7] Stieler K, Fischer N. Apobec 3G efficiently reduces infectivity of the human exogenous gammaretrovirus XMRV[J]. PLoS One, 2010, 5 (7): e11738
- [8] Lada A G, Stepchenkova E I, Waisertreiger I S, et al. Genome-wide mutation avalanches induced in diploid yeast cells by a base analog or an APOBEC deaminase[J]. PLoS Genet, 2013, 9(9): e1003736
- [9] Kawai J K, Lawrence A L. APOBEC3B mutagenesis in cancer [J]. Nature Genetics, 2013, 45(9): 964-965
- [10] Moran A, Ziv G. Macrophages increase the resistance of pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine by upregulating cytidine deaminase[J]. OncolImmunology, 2013, 2(12): e27231
- [11] Yang Deng, Yan Du, Qi Zhang, et al. Human cytidine deaminases facilitate hepatitis B virus evolution and link inflammation and hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Letters, 2014, 343(2): 161-171
- [12] Yuji M, Masahiro F, Inoue H, et al. Expression of activation-induced cytidine deaminase in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma[J]. Journal of Oral Science, 2013, 55(4): 293-299
- [13] Park S R. Activation-induced Cytidine Deaminase in B Cell Immunity and Cancers[J]. Immune Network, 2012, 12(6): 230-239
- [14] Roberts, Lawrence M S, Klimczak L J, et al. An APOBEC Cytidine Deaminase Mutagenesis Pattern is Widespread in Human Cancers[J]. Nat Gene, 2013, 45(9): 970-976
- [15] Roni N, Moshe K. Repair and Cancer Promotion APOBEC3 Cytidine Deaminases in Double-Strand DNA Break [J]. Cancer Res, 2013, 73 (12): 3494-3498
- [16] Qinghuai L, Jin L, Jianmin L. NYD-SP15:A Novel Gene Potentially Involved in Regulating Testicular Development and Spermatogenesis [J]. Biochemical Genetics, 2006, 44(7-8): 405-419
- [17] 王云. NYD-SP15 基因功能的研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2009: 1-70
- [18] 李靓云. NYD-SP15 转基因小鼠的构建和表型分析及 RPAP3 和 TTC21A 蛋白中 TPR 结构域功能的研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2012: 1-68
- [19] Wendy P, David T, Hilary W, et al. Chicken β-Globin 59HS4 Insulators Function to Reduce Variability in Transgenic Founder Mice [J]. BBRC, 2000, 273(3): 1015-1018
- [20] Stefano R, John A, Callegari, et al. The cHS4 Insulator Increases the Probability of Retroviral Expression at Random Chromosomal Integration Sites[J]. JVI, 2000, 4(10): 4679-4687