

Hrd1 转基因小鼠的构建与验证

杨硕 刘磊 万幸 王文丰 王娟 贺恒 雷蕾 李斌

【摘要】 背景 内质网应激在糖尿病视网膜病变(DR)中发挥着重要作用。羧甲基戊二酰辅酶 A 还原酶降解蛋白 1(Hrd1,又名 Syvn1)作为一种内质网相关蛋白降解(ERAD)途径中的核心蛋白,能够减少内质网应激。目的 构建 Hrd1 高表达小鼠,为今后研究 Hrd1 在 DR 中的作用提供动物模型。方法 构建 Hrd1 系统表达重组质粒,酶切、测序后显微注射 3 pl 到 685 枚 C57BL/6 小鼠受精卵中,移植到代孕母鼠,得到 Hrd1 转基因小鼠。利用鼠尾 PCR 检测法鉴定 F0 代小鼠的基因型。得到 Hrd1 基因检测阳性鼠后,使其分别与野生型鼠杂交,得到 F1 代 Hrd1 转基因小鼠,取鼠尾组织,用 PCR 检测法再次鉴定 F1 代小鼠基因型。结果 成功构建了 Hrd1 重组载体,重组质粒 pRP. ExBi-EF1a-Syvn1-IRES-eGFP 的全序列测定结果显示,cDNA 序列均正确。接受了 Hrd1-pcDNA 显微注射的 685 枚受精卵中成活 598 枚。将存活的受精卵移植到代孕母鼠后共产子鼠 41 只,获 F0 代子鼠 8 只,生理活动均良好。PCR 电泳显示 339 bp 处阳性条带,该基因型可以传递到子代 F1。结论 成功构建了 Hrd1 转基因小鼠。

【关键词】 羧甲基戊二酰辅酶 A 还原酶降解蛋白 1; 小鼠/转基因; 内质网应激; 糖尿病视网膜病变

Construction and validation of Hrd1 transgenic mice Yang Shuo, Liu Lei, Wan Xing, Wang Wenfeng, Wang Juan, He Heng, Lei Lei, Li Bin. Refractive Treatment Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: Li Bin, Email: libin-12@163.com

[Abstract] Background Endoplasmic reticulum stress plays an important role in diabetic retinopathy (DR). Hydroxymethyl glutaric acyl coenzyme A reductase degradation protein 1 (Hrd1) is a key protein in endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD), and can reduce the excess endoplasmic reticulum stress.

Objective This study was to generate Hrd1 transgenic mice and offer the animal model with Hrd1-high-expression for further pathogenesis research of DR.

Methods The construct was generated by inserting the murine Hrd1 cDNA into a vector of systemic expression. The Hrd1 recombinant plasmids were then linearized, purified and microinjected 3 pl into 685 fertilized C57BL/6 mouse eggs, and the eggs were then transplanted into the pseudopregnant C57BL/6 mice to produce Hrd1 transgenic mice. Born transgenic founders were genotyped by PCR.

The positive mice were mated with wild-type mice and reproduced generation was confirmed by PCR. **Results** The recombinant Hrd1 vector was constructed successfully, and the pRP. ExBi-EF1a-Syvn1-IRES-eGFP plasmid sequencing results showed that the cDNA sequence was correct. There were 598 survival-fertilized eggs that accepted Hrd1-pcDNA microinjection. Then the ova were implanted into the pseudopregnant C57BL/6 mice and got 41 mice pups. After PCR detection, eight F0 generations Hrd1 mice were obtained, and the physiological states of the F0 mice were normal. PCR result showed positive bands of 339 bp, and the gene type can be passed on to offspring F1.

Conclusions This study demonstrates the successful generation of Hrd1 transgenic mice.

[Key words] Hydroxymethyl glutaric acyl coenzyme A reductase degradation protein 1; Mouse/Transgenic; Endoplasmic reticulum stress; Diabetic retinopathy

遗传因素在糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy,

DR)中扮演的重要角色已得到公认和关注^[1-5]。我们先前的研究对糖尿病病史长达 20 年但未并发 DR 的患者和 5 年内并发 DR 的糖尿病患者进行了基因对比分析,结合部分相关文献,发现这些因子在 DR 的发生和发展过程中有不同的表达,认为多个内质网应激因子与糖尿病患者并发 DR 有一定关联^[6-10],但内质网

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.02.004

基金项目:国家自然科学基金项目(30872823、81271015)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院眼屈光治疗中心(杨硕、刘磊、王娟),眼科(万幸、王文丰、贺恒、雷蕾、李斌)

通信作者:李斌,Email:libin-12@163.com

应激因子的作用通路尚不明确。我们先前的研究对内质网相关蛋白降解 (endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD) 途径中的核心蛋白羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶降解蛋白 1 (hydroxymethyl glutaric acyl coenzyme A reductase degradation protein 1, Hrd1) 进行研究, 发现 6 月龄糖尿病大鼠视网膜组织中的 Hrd1 表达较野生型鼠明显下调^[10]。为进一步研究 Hrd1 在糖尿病内质网应激中的作用及其对 DR 的保护作用, 本研究对转基因小鼠的 Hrd1 表达进行检测。

1 材料与方法

1.1 材料

选用 SPF 级 C57BL/6 小鼠, 饲养于华中科技大学动物实验中心 [实验动物生产许可证号: SCXK (鄂) 2010-0009], 饲养环境为清洁级。阳性首建鼠分别与野生型杂交, 进行繁殖建系。

1.2 方法

利用 Trizol 法提取小鼠视网膜组织细胞中的 RNA, 利用 cDNA 第一链合成试剂盒 (立陶宛 Fermentas 公司), 通过高保真 Taq 酶 (日本 Takara 公司) 进行 PCR 扩增, 获得 Hrd1 cDNA。Hrd1 上游引物为: 5'-TTCGTCAGCCACGCTTATCA-3', 下游引物为: 5'-CTTGTGTCCCAGGGTTCT-3'。酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 回收纯化目的片段后, 整合连接到 pRP. Des3d 载体 (本实验室保存)。按 Qiagen 质粒抽提试剂盒 (德国 Qiagen 公司) 操作步骤, 制备 Hrd1-pcDNA (图 1)。对重组质粒 pRP. ExBi-EF1 α -Syvn1-IRES-eGFP 进行全序列测定。采用 Qiagen 琼脂糖凝胶回收试剂盒 (德国 Qiagen 公司) 纯化 Hrd1-pcDNA 片段, 暂保存于 4℃ 条件下。使用分光光度计测量 Hrd1-pcDNA 质量浓度, 在琼脂糖凝胶上检验定量 Hrd1-pcDNA 用于显微注射。

纯化后的 Hrd1-pcDNA 溶解于质粒显微注射缓冲液中, 准确调整 Hrd1-pcDNA 质量浓度至 5 ng/ μ l, 用显微注射器注射 3 μ l 到小鼠受精卵的雄原核中, 并将受精卵移植到受体鼠的输卵管中。待小鼠出生后, 取 2 周龄小鼠尾尖组织, 采用碱裂解法提取 DNA, 同时设置阳性对照组和阴性对照组, 采用双引物法行 PCR 检测, 鉴定 *Hrd1* 基因。经鉴定为阳性的小鼠分别与野生型小鼠杂交后得到 F1 代小鼠, 采用相同方法鉴定基因型。目的基因 *Hrd1* 上游引物: 5'-CTCAAGCCTCAGACAGTGGTT-3', 下游引物: 5'-AACAGCGTACCAGGACCGTTC-3'; 内源基因有机阳离子转运蛋白 2 (organic cation transporters 2, Oct2) 上游引物: 5'-TCTTAGCTCTGCTCTCCGGT-3', 下游引物: 5'-CACTGGCTGAGGAAGGAGAC-3'。PCR 反应体系为 20 μ l (日本 Takara 公司), 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min, 然后 94℃ 变性 40 s, 59℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环, 最后 72℃ 再延伸 10 min。目的片段长度为 339 bp, 内源基因片段长度为 196 bp。

2 结果

重组质粒 pRP. ExBi-EF1 α -Syvn1-IRES-eGFP 的全序列测定结果显示, cDNA 序列均正确, 未有碱基突变。

共 685 枚受精卵接受了酶切纯化后的 Hrd1-pcDNA 显微注射, 其中成活 598 枚。将存活的受精卵移植到代孕母鼠, 共产子鼠 41 只, 获 F0 代子鼠 8 只, 生命特征、活力等均未受影响 (图 2)。F0 代小鼠 PCR 鉴定结果, 阳性小鼠在 339 bp 处可见 Hrd1 阳性条带 (图 3)。对 F0 代中鉴定出的阳性鼠分别与野生型小鼠杂交, 得到 F1 代子鼠。F1 代 PCR 鼠尾鉴定电泳结果, 阳性小鼠在 339 bp 处可见 Hrd1 阳性条带 (图 4)。

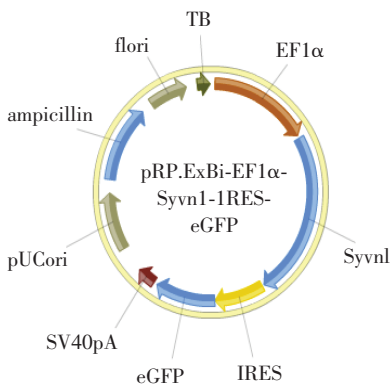


图 1 质粒构建示意图

EF1 α : 启动子; Syvn1: 滑膜细胞凋亡抑制物 1 抗体 (目的基因片段), 即 Hrd1; IRES: 内部核糖体进入位点 (连接元件); eGFP: 增强型绿色荧光蛋白; SV40pA: 终止序列; pUCori: 转录起始位点; ampicillin: 氨苄青霉素; flori: 丝状噬菌体复制起始点; TB: 转录阻断元件



图 2 Hrd1 转基因 F0 代小鼠生命体征、活力等未受影响

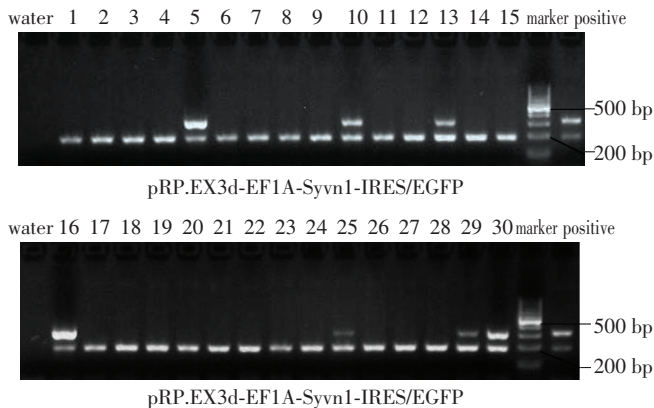


图3 F0代小鼠 PCR 鉴定结果 5、10、13、16、25、29、30:阳性 F0 小鼠 Hrd1 条带,片段大小为 339 bp; Oct2 条带,片段大小为 196 bp; Water: 阴性对照; marker: DNA 分子标志; positive: 阳性对照

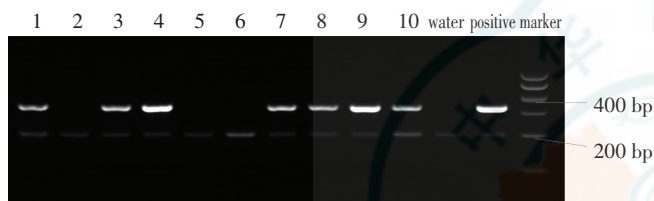


图4 F1代小鼠 PCR 鉴定结果 1、3、4、7、8、9、10: Hrd1 条带,片段大小为 339 bp; Oct2 条带,片段大小为 196 bp; water: 阴性对照; positive 阳性对照; marker: DNA 分子标志

3 讨论

多个内质网应激相关因子与 DR 的发生关系密切^[6-10]。当内质网内环境被理化因素破坏时即会产生内质网应激现象。内质网应激在一定程度上有利于维持内质网内环境稳定,但是当内质网应激超过一定限度后就会对细胞产生损害,导致细胞凋亡。内质网对部分无功能蛋白的处理途径之一是通过 ERAD 途径,通过处理这些有害蛋白来抑制内质网应激反应,维持内质网内环境的稳定^[11]。我们前期对增强子结合蛋白、Hrd1 等内质网应激相关因子的表达进行研究,发现在糖尿病进展过程中其表达下调^[8]。Hrd1 在内质网腔内错误折叠蛋白的降解能够抵抗内质网应激诱导的细胞凋亡^[12]。因此本研究选取 Hrd1 作为 DR 抵抗基因的一个研究重点。

为了对 ERAD 的关键蛋白 Hrd1 进行更深入的研究,探索其对 DR 的抵抗作用及其机制,研究其对炎症因子、内质网应激因子、血管生成因子的作用和联系,以及完善和丰富 DR 的发病机制学说,为今后 DR 的临床治疗和预防提供一个新方向,本研究构建了 Hrd1 高表达转基因小鼠,可作为后续实验研究需要的 Hrd1 高表达动物模型。本研究采用 pRP.Des3d 真核表达载体,选择 EF1 α 为启动子,可以驱动外源基因在哺乳动物体内的强表达^[13]。在后期转基因小鼠的鉴定中,

本研究根据表达载体的全序列设计出 1 对和小鼠没有同源性的引物,从而提高了鉴定的准确性。本研究中已经获得了部分 F1 代小鼠,经鼠尾 PCR 鉴定,证实导入的 Hrd1 基因可以传代表达。但是由于前期育种的转基因小鼠数量有限,本研究中未对 Hrd1 在视网膜组织的表达进行更深入地检测,随着转基因小鼠育种工作的进行,我们会从基因和蛋白水平等进一步验证其视网膜组织表达 Hrd1 的情况,选出相对优化的品系,为后续的相关研究,包括 DR 的抵抗基因实验研究提供有用的动物模型。

参考文献

- [1] Jousseaume AM, Huang S, Poulaki V, et al. In vivo retinal gene expression in early diabetes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(12): 3047-3057.
- [2] Yau JWY, Rogers SL, Kawasaki R, et al. Meta-Analysis for Eye Disease (META-EYE) Study Group. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy [J]. Diabetes Care, 2012, 35(3): 556-564. doi: 10.2337/dc11-1909.
- [3] Simó-Servat O, Hernández C, Simó R. Genetics in diabetic retinopathy: current concepts and new insights [J]. Curr Genomics, 2013, 14(5): 289-299. doi: 10.2174/13892029113149990008.
- [4] Kuo JZ, Wong TY, Rotter JI. Challenges in elucidating the genetics of diabetic retinopathy [J]. JAMA Ophthalmol, 2014, 132(1): 96-107. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2013.5024.
- [5] Uhlmann K, Kovacs P, Boettcher Y, et al. Genetics of diabetic retinopathy [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2006, 114(6): 275-294. doi: 10.1055/s-2006-924260.
- [6] Ikesugi K, Mulhern ML, Madson CJ, et al. Induction of endoplasmic reticulum stress in retinal pericytes by glucose deprivation [J]. Curr Eye Res, 2006, 31(11): 947-953. doi: 10.1080/02713680600966785.
- [7] Li J, Wang JJ, Yu Q, et al. Endoplasmic reticulum stress is implicated in retinal inflammation and diabetic retinopathy [J]. FEBS Lett, 2009, 583(9): 1521-1527. doi: 10.1016/j.febslet.2009.04.007.
- [8] Li B, Wang HS, Li GG, et al. The role of endoplasmic reticulum stress in the early stage of diabetic retinopathy [J]. Acta Diabetol, 2011, 48(2): 103-111. doi: 10.1007/s00592-009-0170-z.
- [9] Hu WK, Liu R, Pei H, et al. Endoplasmic reticulum stress-related factors protect against diabetic retinopathy [J/OL]. Exp Diabetes Res, 2012, 2012: 507986 [2014-03-26]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3235773/. doi: 10.1155/2012/507986.
- [10] Yan S, Zheng C, Chen ZQ, et al. Expression of endoplasmic reticulum stress-related factors in the retinas of diabetic rats [J/OL]. Exp Diabetes Res, 2012, 2012: 743780 [2014-03-23]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3166715/. doi: 10.1155/2012/743780.
- [11] Kaneko M, Ishiguro M, Niinuma Y, et al. Human HRD1 protects against ER stress-induced apoptosis through ER-associated degradation [J]. FEBS Lett, 2002, 532(1-2): 147-152.
- [12] Bernasconi R, Galli C, Calanca V, et al. Stringent requirement for HRD1, SEL1L, and OS-9/XTP3-B for disposal of ERAD-LS substrates [J]. J Cell Biol, 2010, 188(2): 223-235. doi: 10.1083/jcb.200910042.
- [13] Hong S, Hwang DY, Yoon S, et al. Functional analysis of various promoters in lentiviral vectors at different stages of in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. Mol Ther, 2007, 15(9): 1630-1639. doi: 10.1038/sj.mt.6300251.

(收稿日期: 2014-06-18)

(本文编辑: 刘艳)