

TNNT3^(R69H) 突变转基因小鼠模型的建立

李兆阳, 吕相川, 汪 瑛, 杨 葳, 于 洋, 周生来, 王 惟, 张梅英, 郑志红

(中国医科大学实验动物部, 辽宁省转基因动物重点实验室, 辽宁沈阳 110001)

【摘要】 目的 建立 TNNT3^(R69H) 突变转基因小鼠模型。**方法** 构建 pEGFP-TNNT3^(R69H) 转基因构件, 通过原核显微注射方法将线性化、纯化后的外源质粒 pEGFP-TNNT3^(R69H) 注入 BDF1 小鼠受精卵中, 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。用 PCR 和 Southern blot 方法检测子代鼠尾基因组 DNA, 通过 RT-PCR 及 Western blot 的方法检测 TNNT3 基因表达。**结果** 8 只假孕小鼠共移植注射后的胚胎 82 枚, 出生 40 只子代鼠, 经 PCR 和 Southern 方法检测得到 5 只转基因阳性小鼠。对其子代小鼠进行 RT-PCR、Western blot 检测结果显示, TNNT3 在转基因小鼠心脏和骨骼肌中表达量明显增多。**结论** 通过显微注射法使外源基因 pEGFP-TNNT3^(R69H) 在小鼠基因组中整合, 成功建立了 TNNT3^(R69H) 突变转基因小鼠模型。

【关键词】 转基因小鼠; TNNT3 突变; 显微注射

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)02-0009-05

doi:10.3969/j.issn.1671.7856.2012.02.003

Establishment of TNNT3^(R69H) Mutation Transgenic Mice

LI Zhao-Yang, LV Xiang-chuan, WANG-Ying, YANG-Wei, YU Yang, ZHOU Sheng-lai, WANG-Wei,
ZHANG Mei-ying, ZHENG Zhi-hong

(The Key Lab of Laboratory Transgenic Animal of Liaoning Province, Department of Laboratory Animal Science,
China Medical University, Shenyang 110001, China)

【Abstract】 Objective To establish an animal model of TNNT3^(R69H) mutation transgenic mice. **Methods** Transgenic component pEGFP-TNNT3^(R69H) was constructed, linearized and purified, then microinjected into fertilized mouse eggs. These eggs were transplanted into pseudopregnant mice. The genotype of transgenic founders were identified by PCR and Southern blot. The expression of TNNT3^(R69H) transcript in the tissues of the transgenic mice was detected by RT-PCR and Western blot. **Results** Transgenic BDF1 mice were obtained by microinjection. PCR and Southern blot results showed 5 of 40 mice were integrated. **Conclusions** TNNT3^(R69H) mutation transgenic mouse models are successfully established by pronuclear microinjection.

【Key words】 TNNT3 mutation, Microinjection; Transgenic mice

远端关节弯曲 (distal arthrogryposis, DAs) 是一种先天性多发性关节挛缩畸形遗传病, 主要表现为 2 个或 2 个以上关节的挛缩畸形, 且不包括由神经和骨骼肌病变所导致的关节畸形^[1], 当前对于 DAs

的遗传学研究主要集中在与骨骼肌和肌腱形成相关的基因上, 快速反应骨骼肌肌钙蛋白 T3 基因 (fast skeletal muscle troponin T3, TNNT3) 就是相关基因之一。有研究在 1 个 DAs 家系中发现了 G→A 的错

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项 2010ZX09401-304; 辽宁省科技厅攻关项目 2009408001-1。

[作者简介] 李兆阳 (1982 -), 男, 研究生在读, 讲师。

[通讯作者] 郑志红, 教授, E-mail: zhihongzheng@163.com。

义突变。此突变位于 *TNNT3* 基因第 11 号外显子上,并且引起了第 69 位的氨基酸发生了改变,精氨酸被组氨酸所代替(R69H)^[2]。本研究通过显微注射法,建立了 *TNNT3*^(R69H) 突变的转基因小鼠模型,为研究远端关节弯曲疾病提供动物模型。

1 材料和方法

1.1 材料

动物:SPF 级成年 C57BL/6J 小鼠,来自中国医科大学实验动物部[SCXK(辽)2003-0009]。试剂:总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent (Cibcobl 公司), cDNA 双链合成试剂盒 (Promega 公司),引物合成和 DNA 测序 (上海英骏生物技术有限公司),PCR 产物纯化试剂盒及胶回收纯化试剂盒 (Takara 公司),T4 DNA 连接酶 (Promega 公司),大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞为本实验室保存,质粒筛选试剂 IPTG X-gal (Takara 公司),DNA 聚合酶和限制性内切酶 (Takara 公司),质粒 DNA 快速抽提纯化试剂盒、琼脂糖 (Takara 公司),LB 培养基、胰蛋白胨和酵母提取物 (Sigma 公司)、pTZ57R/T 载体 (Takara 公司),Quick change kit II 试剂盒 (Strata Gene 公司)。

1.2 方法

1.2.1 *TNNT3* 基因的克隆:采用 Trizol 试剂提取正常 B6 小鼠骨骼肌组织总 RNA,反转录得到 cDNA,根据 GenBank 提供的小鼠 *TNNT3* 基因 cDNA 序列,用 Primer5 软件设计合成扩增引物,高保真酶扩增 *TNNT3* 基因 cDNA 全长。上游引物:ACTACAGATACAACCCACCG,下游引物:GTCCTGAGTTCCCAAAGAT,预期扩增片段 888 bp。扩增参数如下:95 $^{\circ}$ C,5 min,95 $^{\circ}$ C,1 min,58 $^{\circ}$ C,1 min,72 $^{\circ}$ C,1 min,26 个循环,72 $^{\circ}$ C,10 min,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳确认,应用胶回收试剂盒回收、纯化目的片段,与 pTZ57R/T 载体连接,转化,扩增,SacI 酶切鉴定,测序,阳性克隆命名为 pTZ57R/T-*TNNT3*。

1.2.2 *TNNT3* 基因突变:设计合成突变引物使第 69 位的精氨酸被组氨酸所代替,上游为:GACATCCAGAAGAAGCATCAGAACAAAGACC (A 为突变碱基)下游为:GTCTTTGTTCTGATGCTTCTTCTGGATGTC,根据 Quick change kit II 试剂盒说明书进行操作,转化,扩增并测序,阳性克隆命名为 pTZ57R/T-*TNNT3*^(R69H)。

1.2.3 重组表达载体的构建:Kpn I 和 Hind III 共

同酶切 pTZ57R/T-*TNNT3*^(R69H),1% 琼脂糖凝胶电泳,胶回收目的片段,将目的片段插入到 pEGFP-C2 载体相应的多克隆位点,转化,大肠杆菌扩增,酶切鉴定后测序,阳性克隆命名为 pEGFP-*TNNT3*^(R69H)。所得阳性克隆质粒经 Apal I 酶切后用 1% 琼脂糖凝胶电泳回收目的片段,用 QIAquick Gel Extraction Kit 试剂盒纯化回收约 5 200 bp 长的目的片段,纯化后 DNA 溶于 Microinjection buffer (pH:7.4)中,注射浓度 4 ng/ μ L。

1.3 显微注射及 F0 代鼠的产生

将纯化后的 pEGFP-*TNNT3*^(R69H) 片段通过显微注射法注入 BDF1 小鼠受精卵中,将注射后状态良好的受精卵移植到 ICR 假孕母鼠的输卵管内,待 F0 代鼠产生。实验用小鼠均在屏障动物房中饲养和繁殖,温度控制在 22 $^{\circ}$ C,自动光控(12 h 明 12 h 暗)。

1.4 转基因鼠的检测

1.4.1 鼠尾基因组 DNA 的 PCR 检测:(1)按《分子克隆》提供方法进行鼠尾基因组 DNA 的提取;(2)进行 PCR 检测:pEGFP-*TNNT3*^(R69H) 上游引物:GGAGAAACCAAGACCCAA;pEGFP-*TNNT3*^(R69H) 下游引物:CACCCATAGAGGACAGAGC,产物长度为 347 bp,PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C,45 s;58 $^{\circ}$ C,45 s;72 $^{\circ}$ C,45 s,30 个循环,72 $^{\circ}$ C,10 min,1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。pEGFP-*TNNT3*^(R69H) 作为阳性对照,野生型 BDF1 鼠尾 DNA 作为阴性对照。

1.4.2 鼠尾基因组 DNA 的 Southern blot 检测:参考《分子克隆》中的 Southern blot 检测方法,PCR 检测阳性小鼠和正常 BDF1 小鼠(阴性对照)基因组 DNA (约 25 μ g)用 BamH I 酶切后 1% 琼脂糖凝胶电泳,质粒 PCR 产物 347 bp 片段作为阳性对照,毛吸印迹法使 DNA 转移到尼龙膜上,紫外交联固定 DNA,PCR 扩增的 *TNNT3* 片段纯化后³²P 标记并进行杂交,洗膜,放射自显影。

1.4.3 转基因小鼠不同组织 RT-PCR 检测:选取转基因子代小鼠及野生型小鼠的心肌、骨骼肌组织,使用 Trizol 试剂提取组织总 RNA。对提取的 RNA 在反转录实验前进行 DNaseI 处理并用酚、氯仿抽提以去除残留基因组 DNA。采用 RT-PCR 试剂盒进行反转录得到 cDNA,PCR 扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳分析结果。

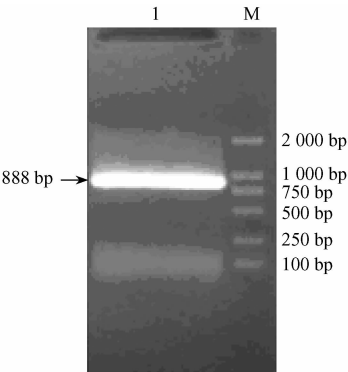
1.4.4 转基因小鼠不同组织 Western blot 检测:提取转基因鼠心肌、骨骼肌组织蛋白,进行 SDS-PAGE

电泳,水浴转印法将蛋白质转印到硝酸纤维素膜上,通过特异抗体与蛋白质的结合,对表达产物进行分析。

2 结果

2.1 TNNT3 基因克隆

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测为单一条带,片段长度约 900 bp,和预期基本相符(图 1),胶回收纯化后(图 2)连接到 pTZ57R/T 载体上,酶切鉴定后的电泳结果与预期相符(图 3),挑取酶切鉴定后阳性克隆,测序验证正确(如图 4)。

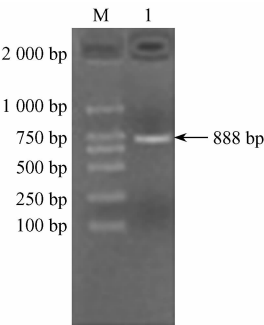


注:1:PCR 产物,M:DL 2000

图 1 PCR 电泳结果

Note: 1: Products of PCR, M: DL 2000

Fig. 1 Electrophoresis results of PCR products

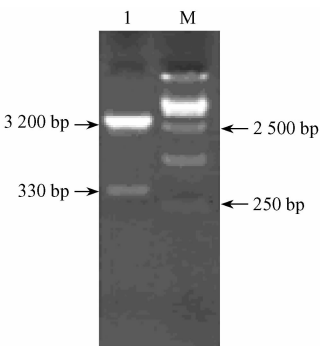


注:1:纯化后 PCR 产物,M:DL 2000

图 2 纯化后电泳结果

Note: 1: Purified PCR fragments, M: DL 2000

Fig. 2 Electrophoresis results of purified PCR fragments



注:1:sacI 酶切产物 2:DL 15000

图 3 质粒酶切结果

Note: 1: Product of sacI linearized; 2: DL 15000

Fig. 3 Result of enzyme digestion of the plasmids

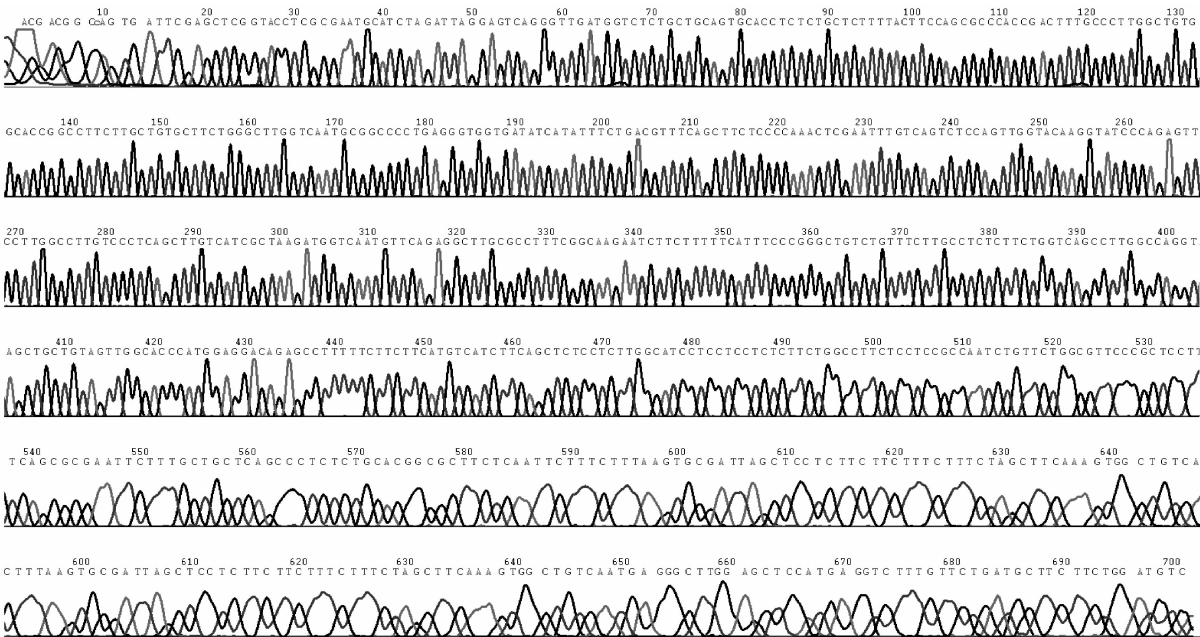


图 4 测序结果

Fig. 4 Results of sequencing

2.2 TNNT3 基因突变

pEGFP-TNNT3^(R69H) 突变后测序结果见图 5

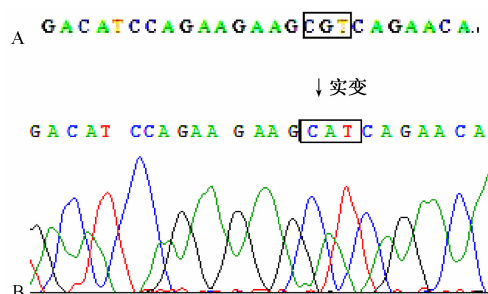
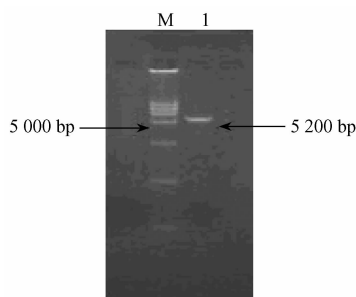


图 5 测序结果 A 野生型; B 突变型

Fig. 5 Results of sequencing. A. Wild type; B. Mutant

2.2 重组表达载体的构建

构建所得阳性克隆质粒经 *Apa*L I 酶切后用 1% 琼脂糖凝胶电泳回收目的片段, 结果见图 6。



注: M: DL 15000 1: 酶切、回收后的阳性质粒

图 6 酶切、胶回收电泳结果

Note: M: DL 15000; 1: Results of enzyme digestion and gel extraction products

Fig. 6 Electrophoresis results of enzyme digestion and gel extraction products

2.3 F0 代小鼠的产生

共注 130 枚受精卵, 存活 82 枚, 分别移入 8 只 ICR 小鼠输卵管, 共产出 40 只 F0 代转基因小鼠。

2.4 F0 代转基因小鼠检测

2.4.1 鼠尾基因组 PCR 检测结果: 鼠尾基因组 DNA 经 PCR 扩增后, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳, 阴性、阳性和空白对照成立, 阳性小鼠在 347 bp 处可见扩增条带, 部分结果见图 7。

2.4.2 鼠尾基因组 Southern blot 检测结果: 5 只 PCR 检测阳性的 TNNT3 转基因小鼠 Southern 检测均有特异目的条带 (图 8)。1、2、3、9、11 号 Southern blot 检测阳性, 可见特异整合条带, 野生型小鼠基因组 DNA 未见特异条带。

2.4.3 RT-PCR 检测: RT-PCR 结果显示: 在转基因鼠及野生型鼠心脏及骨骼肌组织中均见 TNNT3 表

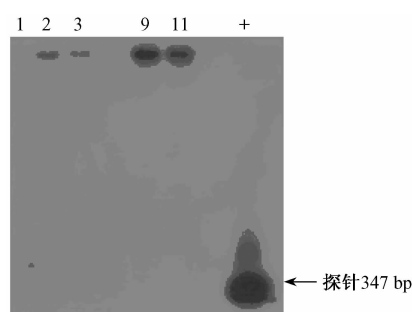


注: M: DL 2000, +: 阳性对照, -: 空白对照, 1、2、3、9、11: 转基因阳性鼠, 4、5、6、7、8、10、12、13: 转基因阴性鼠。

图 7 转基因鼠 DNA PCR 检测结果

Note: M: DL 2000, +: Positive control, -: Negative control, 1, 2, 3, 9, 11: Transgenic mice, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13: non-transgenic mice.

Fig. 7 Results of PCR products of the transgenic mice



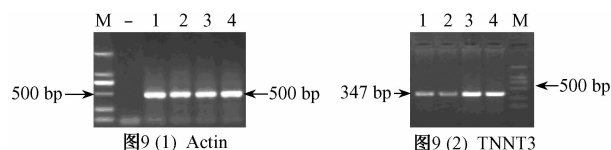
注: +: 阳性对照, PCR 扩增产物; N: 野生型小鼠; 1、2、3、9、11: PCR 检测转基因阳性鼠 DNA

图 8 鼠尾 DNA Southern blot 检测结果

Note: +: Positive control is PCR product; N: Normal mouse; 1, 2, 3, 9, 11: Positive transgenic mice tested by PCR

Fig. 8 Results of Southern blot of the transgenic mice

达, 且转基因鼠心脏及骨骼肌组织中 TNNT3 表达量都比野生型心脏及骨骼肌组织且转基因鼠中 TNNT3 表达量增多 (图 9)。



注: M: DL 2000 marker, 1: 野生型小鼠心脏; 2: 野生型小鼠骨骼肌; 3: 转基因小鼠心脏; 4: 转基因小鼠骨骼肌

图 9 转基因鼠心脏、骨骼肌组织 RT-PCR 结果

Note: M: DL 2000 marker; 1: Normal mouse heart; 2: Normal mouse muscle; 3: Transgenic mouse heart; 4: Transgenic mouse muscle

Fig. 9 Electrophoresis results of RT-PCR products of the transgenic mice

2.4.4 转基因小鼠不同组织 Western blot 检测: Western blot 结果如图 10, 结果表明转基因鼠心脏、骨骼肌中 TNNT3 蛋白表达量比野生型小鼠心脏和骨骼肌表达量多。

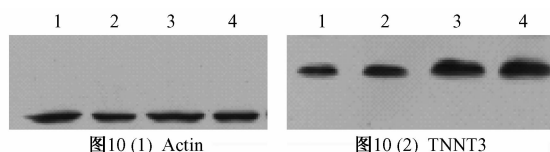


图10 (1) Actin

图10 (2) TNNT3

注:1:野生型小鼠心脏,2:野生型小鼠骨骼肌,
3:转基因小鼠心脏,4:转基因鼠骨骼肌

图 10 转基因鼠心脏、骨骼肌 Western 结果

Note:1: Transgenic mouse heart; 2: Transgenic mouse muscle; 3: Normal mouse heart; 4: Normal mouse muscle

Fig. 10 Results of Western blot of the transgenic mice

3 讨论

目前,随着对基因功能研究的深入进展,从生物整体水平进行基因功能研究已经成为科学研究发展的趋势。各种人类疾病转基因动物模型的建立,为研究疾病的发病机制及疾病治疗提供了的实验材料。利用转基因技术建立人类疾病动物模型比其他方法更有优势,它可以在动物原有遗传背景的基础上,通过改变特定基因的表达水平而实现基因组的改变。转基因小鼠模型已经在生命科学研究中发挥了重要作用,由转基因小鼠体系发展而建立的反求遗传学,就是先在体外使基因某一片段产生突变,然后将其导入基因组,从而研究基因功能与结构的关系^[3]。

本实验根据文献报道^[2]构建了 *TNNT3* 基因第 69 个氨基酸点突变 pEGFP-TNNT3^(R69H),然后采用显微注射法,把外源构件 pEGFP-TNNT3^(R69H) 注入 BDF1 小鼠受精卵制备 *TNNT3* 突变基因的转基因小鼠,并且通过 RT-PCR、Western blot 检测,该基因在转基因鼠的心脏、骨骼肌表达量增多。人的 *TNNT3* 基因,位于 11p15.5^[4],跨越 20 kb,由 16 个外显子组成,mRNA 长约 1 kb,编码 258 个氨基酸^[5]。*TNNT3* 在骨骼肌中特异性表达,其编码的快反应骨骼肌肌钙蛋白 T3 参与骨骼肌快肌收缩。有文献报道人类和小鼠的快反应骨骼肌 *TNNT3* 在氨基酸的一级结构上约有 93% 的同源性^[6]。Sung 等发现在 47 诊断为 DA2 的家系中检测出一个家系的 *TNNT3* 基因第 9 外显子 188 位点 G 变 A 错义突变,这种突变使其编码氨基酸 R63H 替换目前对此错义突变在 DA2B 形成的原因并不清楚,但是在人类、小鼠以及鸟类等模式生物中,这个第 69 位的精氨酸在 *TNNT* 家族中均表现出高度的保守性,所以此保守氨基酸的替换可能会对肌钙蛋白的结构和功能造成影响。在 1999 年,经 Varnava 等研究发现,发生

在心肌特异表达的肌钙蛋白上的 R94L 氨基酸替换与 DA2B 患者的 (R69H) 突变同源^[7]。由于 R94L 的氨基酸替换可能削弱了肌钙蛋白 N 末端的弹性,进而减弱了肌钙蛋白与原肌球蛋白 (tropomyosin, TM) 结合的能力^[8,9]。因此, (R69H) 的氨基酸改变可能也是通过这个机制影响快反应肌纤维的收缩。在患有 DA2B 的家庭中 *TNNT3* 的第 69 个氨基酸突变是导致该病的重要原因之一^[2],本研究得到 *TNNT3* (R69H) 突变转基因小鼠,为研究 DA2B 的发病机理提供了良好的实验材料,为进一步研究其发病机制奠定了一定的基础。

参考文献:

- [1] Hall JG, Reed SD, Greene G. The distal arthrogryposes: delineation of new entities—review and nosologic discussion[J]. Am J Med Genet, 1982; 11(2):185–239.
- [2] Sung SS, Brassington AM, Krakowiak PA. Mutations in *TNNT3* cause multiple congenital contractures: a second locus for distal arthrogryposis type 2B (letter) [J]. Am J Hum Genet, 2003; 73:212–214.
- [3] Chan AW, Homan EJ, Ballou JC, et al. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998, 95(24):14028–14033.
- [4] Krakowiak PA, O Quinn JR, Bohnsack JF, et al. A variant of Freeman-Sheldon syndrome maps to 11p15. 52pter [J]. Am J Hum Genet, 1997, 60(2):426–432.
- [5] Stefancsik R, Randall JD, Mao C, et al. Structure and sequence of the human fast skeletal troponin T (*TNNT3*) gene: insight into the evolution of the gene and the origin of the developmentally regulated isoforms [J]. Comp Funct Genomics, 2003, 4(6):609–625.
- [6] Wu QL, Jha PK, Raychowdhury MK, et al. Isolation and characterization of human fast skeletal beta troponin T cDNA: comparative sequence analysis of isoforms and insight into the evolution of members of a multigene family [J]. DNA Cell Biol, 1994, 13(3):217–233.
- [7] Varnava A, Baboonian C, Davison F, et al. A new mutation of the cardiac troponin T gene causing familial hypertrophic cardiomyopathy without left ventricular hypertrophy [J]. Heart. 1999, 82(5):621–624.
- [8] Palm T, Graboski S, Hitchcock DeGregori SE, et al. Disease-causing mutations in cardiac troponin: Identification of a critical tropomyosin-binding region [J]. Biophys J, 2001, 81(5):2827–2837.
- [9] Hinkle A, Tobacman LS. Folding and function of the troponin tail domain. Effects of cardiomyopathic troponin T mutations [J]. J Biol Chem, 2003, 278(1):506–513.

[修回日期]2011-09-03