

小鼠肝脏特异性表达载体 ALB-ATP7B 的构建

徐琳¹, 梁秀龄¹, 徐评议¹, 王尚武², 朱雅南², 丰岩清¹, 谢秋幼¹
(1. 中山大学附属第一医院神经科; 2. 广州凯诺生物科技有限公司, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】构建人肝豆状核变性病 ATP7B 基因野生型及常见突变型的小鼠肝脏特异性表达载体 ALB-ATP7B, 为制备转基因小鼠及相关基因治疗作准备。【方法】定点突变法获取人群中常见的 Arg778Leu 及 His1069Gln 两种 ATP7B 基因突变体, 定向克隆将小鼠白蛋白启动子 ALB 序列及野生和突变的 ATP7B 基因亚克隆至真核表达载体 kbpala 上, 得到可在小鼠肝脏特异性表达的人 ATP7B 基因正常及突变型真核表达载体 ALB-ATP7B。【结果】经测序及酶切鉴定证实, 真核表达载体 ALB-ATP7B 构建成功。【结论】人类正常及突变 ATP7B 基因真核表达载体 ALB-ATP7B 的构建初步奠定了转基因小鼠制备的基础。

关键词:白蛋白; 启动子; 肝豆状核变性; 载体, 遗传学

中图分类号: R742.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554 (2004)01-0034-05

Construction of Mouse Liver-specific Expression Vector ALB-ATP7

XU Lin¹, LIANG Xiu-ling¹, XU Ping-yi¹, WANG Shang-wu², ZHU Ya-nan², FENG Yan-qing¹, XIE Qiu-you¹

(1. Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, 2. Guangzhou KaiNuo Biotechnology Limited Company, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To construct wild-type and mutant of human ATP7B gene by mouse liver-specific expression vector kbpala-albumin, which is for the preparation of transgenic mouse and further gene therapy. 【Methods】Two ALB-ATP7B mutants containing the Arg778Leu and His1069Gln mutations were constructed using site-directed mutagenesis system plus site-subcloning technique. The vectors which could express wild-type and mutant of human ATP7B gene in mouse liver cells were obtained. 【Results】enzyme analysis and sequencing analysis confirmed that the target genes were in right position of kbpala/albumin. 【Conclusion】The construction of kbpala-alb-ATP7B gene will serve as a suitable tool for transgenic mouse in the future.

Key words: albumin; promoter; hepatolenticular degeneration; vector, genetics

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(1): 34-38]

肝豆状核变性病, 也称 Wilson 病 (WD), 是一种我国较常见的常染色体隐性遗传的铜代谢障碍疾病。其病变基础在肝脏。已发现致病基因 ATP7B 的突变超过 200 种, 其中较为确定的东方人群的突变热点主要是 Arg778Leu^[1], 而西方人群的突变热点为 His1069Gln^[2]。目前国际上广泛应用的动物模型如 LEC 大鼠及 tx 小鼠均不能正确模拟人类肝豆

状核变性病的病理生理过程。因此, 制备 Arg778Leu、His1069Gln 转基因动物模型在当前对研究其发病机制和临床治疗具有很大的指导意义。转基因动物模型的制备需特定的表达载体, 故寻找和构建 ATP7B 肝脏特异性表达载体是制备转基因动物模型的基础, 以往的研究证明, 白蛋白启动子可有效引导下游基因的肝脏特异性表达^[3]。本

收稿日期: 2003-07-24

基金项目: “211”工程重点学科建设课题资助项目(98138); 广东省自然科学基金(2001130); 卫生部临床学科重大项目(2001321)

作者简介: 徐琳(1977-), 女, 山东莱阳人, 在读博士生; 梁秀龄, 博士生导师, 项目负责人。E-mail: gracia_xulin@hatmail.com

文报道小鼠肝细胞白蛋白启动子 ALB-ATP7B 表达载体的成功构建。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

野生型人 ATP7B 基因克隆 pRC/CMV-ATP7B 由日本 Sugiyama 教授赠送。小鼠白蛋白启动子 Bluescript/Albumin、真核表达载体 kbpala 由中山大学附属第一医院神经科徐评议教授惠赠。定点突变试剂 QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit 购自 MERCK 公司。T4 DNA ligase 购自 Promega 公司。Subcloning Efficiency™ DH5α™ Chemically Competent *E. coli* 购自 Invitrogen 公司。DNA Extraction Kit 购自 Fermentas 公司。小量质粒快速抽提纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。限制性内切酶购自 New England Biolab 公司。操作按试剂盒说明书进行,除非特别说明,所使用的离心机均为台式低温高速离心机(1.5 mL, Megafuge 1.0 R, Heraeus),其他试剂为市售分析纯,所有溶剂使用前需经高压蒸汽灭菌。文中所有电泳图均为 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,Marker 均为 MBI Fermentas 的 1 kb DNA ladder,片段的分子量由大到小分别是:10 kb、8 kb、6 kb、5 kb、4 kb、3.5 kb、3 kb、2.5 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp、250 bp,其中 3 kb 的片段浓度最高。

1.2 人 ATP7B 基因 Arg778Leu 及 His1069Gln 两种突变体的制备

1.2.1 质粒抽提 首先提取 pRC/CMV-ATP7B 质粒 DNA 作为模板:将 3~5 mL 过夜培养的菌液以 800 r/min($r=4$ cm)离心 5 min 收集至 1.5 mL 离心管,彻底去除上清,加入 250 μ L P1(细菌悬浮液),震荡至彻底悬浮;加入 250 μ L P2(碱裂解液),立即温和颠倒离心管 5~10 次以混匀,室温静置 4 min;加入 350 μ L P3(中和液),立即温和颠倒离心管 5~10 次以混匀;12 000 r/min 离心 12 min,将上清液小心移入吸附柱,离心 15 s,倒掉收集管中的液体;在吸附柱中加入 500 μ L B1(清洗液),离心 15 s,倒掉收集管中的液体;在吸附柱中加入 500 μ L W1(洗涤液),离心 15 s,倒掉收集管中的液体,重复两次后,离心 1 min,彻底去除吸附柱中的液体,将吸附柱放入一个新的离心管中,在吸附柱膜中央加入 50 μ L T1(洗脱液),55 $^{\circ}$ C 水浴 5 min,离

心 1 min,将所得液体于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 定点突变 按 QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit 要求设计含有预期突变的引物。Arg778Leu 突变体的引物:正向引物,5'-TTCATTGC CCTGGGCTGTGGCTGGAA-3';反向引物,5'-GTTC CAGCCACAGGCCAGGGCAATGAA-3'。His1069 Gln 突变体的引物:正向引物,5'-CAGCA GT-GAACAGCCCTTGGGCGTGGCA-3';反向引物,5'-CT GCCACGCCCAAGGGCTGTTCCTGC TG-3'。

1.2.3 PCR 扩增 反应体系为 50 μ L: pRC/CMV-ATP7B 模板 5~50 ng,两个引物各 125 ng,1 μ L dNTPmix,1 μ L *Pfu* Turbo DNA polymerase。反应条件为 96 $^{\circ}$ C 4 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 1 min,68 $^{\circ}$ C 20 min 24s,共循环 18 次。然后将反应产物置于冰上,加入 1 μ L *Dpn* 限制性内切酶,混匀后 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 消化模板 DNA。将 2 μ L 反应产物加入 50 μ L XL-Blue 感受态细胞,混匀后冰浴 30 min,42 $^{\circ}$ C 热休克 20 s,将反应产物迅速置于冰上 2 min,加入预热至 42 $^{\circ}$ C 的 0.5 mL NZY + 培养基,37 $^{\circ}$ C 温和震荡(200 r/min)孵育 1 h,各取 150 μ L 菌液涂至含氨苄西林的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,次日每个突变体挑取 3 个单菌落培养、质粒提取后进行模板测序鉴定。测序引物分别为:Arg778Leu,5'-GACTGTCCATTCTAAATCTC-3';His1069Gln,5'-CTGGAGATGGCGCACAAG-3'。

1.3 小鼠白蛋白启动子的定向亚克隆

Bluescript/Alb 在白蛋白启动子序列的两端分别含有 *NotI* 和 *BamHI* 两个单酶切位点,与 kbpala 的相应多克隆位点相匹配,故可通过双粘端定向连接将白蛋白启动子亚克隆至 kbpala 上。反应如下:在 40 μ L 的酶切反应体系中,加入约 2 μ g 质粒、*NotI* 和 *BamHI* 两种酶各 1 μ L,4 μ L 10X 酶切缓冲液,0.4 μ L 10 \times BSA,余体积用 ddH₂O 补足,混匀后,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离目的片段。用手术刀切下含有所需 DNA 的凝胶块放入 1.5 mL 离心管,每 1 倍体积凝胶加入 3 倍体积结合液(binding solution),至 55 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 使之完全溶解;加入混匀的重悬液(resuspended silica)5 μ L,颠倒混匀后至 55 $^{\circ}$ C 水浴 5~10 min,12 000 r/min($r=4$ cm)离心 5 s 后,彻底除去上清,加入 500 μ L 预冷的洗涤液(wash buffer),震荡重悬后离心 5 s 倒掉上清,反复重复 3 次,彻底除去上清,加入 10~20 μ L ddH₂O 于 55 $^{\circ}$ C

水浴中溶解洗脱DNA, 进行连接反应: 10 μL 反应体系中含有插入片段约 0.2 μg, 载体约 0.1 μg, T4 DNA 连接酶 1 μL, 10 × ligation buffer 1 μL, 余体积用 ddH₂O 补足, 混匀后 18 °C 孵育 2 h, 于 65 °C 5 min 灭活后取 5 μL 连接产物转化感受态细菌。37 °C 过夜培养后挑选单克隆菌落, 提质粒后 *Not* I 和 *Bam* H I 双酶切鉴定。

1.4 小鼠白蛋白启动子 Alb-ATP7B 基因表达载体的构建

pRC/CMV -ATP7B 质粒中的 ATP7B 基因是通过前后两个 linker 连接至 pRC/CMV 载体上的, 其 5' 及 3' 端分别含有 *Bam*H I 及 *Xba* I 的酶切位点, 而 kbpala-alb 上具有 *Bam*H I 及 *Avr* II 的酶切位点, *Xba* I 与 *Avr* II 酶切所得的粘末端相匹配, 故可通过双酶切定向连接将 ATP7B 正常及突变基因亚克隆至 kbpala-alb 载体上。在整个 kbpala-alb 序列上, *Bam*H I 及 *Avr* II 均为单酶切位点, 酶切后可得到 5.6 kb 及 670 bp 两个片段, 5.6 kb 为目的的载体片段; 而在整个 pRC/CMV -ATP7B 序列上, 共有 2 个 *Xba* I 及 4 个 *Bam*H I 酶切位点, 酶切后可得到 6 个片段, 分别为 4.6 kb、3.2 kb、2 kb、300 bp、76 bp、6 bp, 4.6 kb 的片段为目的的插入片段。将目的片段与载体片段以 3 ~ 10: 1 的物质的量比进行连接后转化感受态细菌, 次日挑选单克隆提质粒 *Bam*H I / *Avr* II 双酶切鉴定。

2 结果

2.1 Arg778Leu 及 His1069Gln 定点突变

定点突变反应后将 PCR 产物进行电泳, 在凝胶上显示分子量为 10.19 kb 的电泳带(图 1)。电泳片段大小与克隆的目的基因长度相同, DNA 测序也证实 Arg778Leu 及 His1069Gln 突变体构建成功

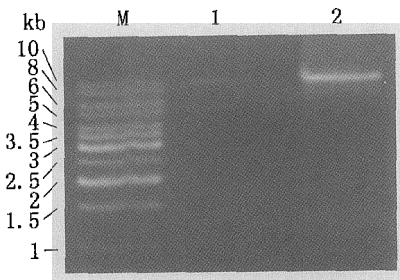


图 1 定点突变的 PCR 结果

Fig. 1 PCR product of site-directed mutation
M: 1kb ladder; lane 1: Arg778Leu; Lane 2: His1069Gln

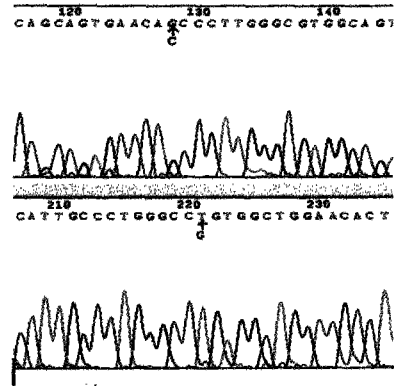


图 2 His1069Gln 及 Arg778Leu 突变体测序图谱

Fig. 2 Sequence of His1069Gln and Arg778Leu mutant allele

The upper is His1069Gln and the lower is Arg778Leu

(图 2)。

2.2 Bluescript/Albumin 及 kbpala 质粒酶切及连接后重组质粒的酶切鉴定

Not I / *Bam*H I 双酶消化 kbpala 电泳后可见两条大小为 3.9 kb 及 20 bp 片段, 其中目的载体片段为 3.9 kb; Bluescript/Albumin 双酶消化后可见 2.3 kb 及约 3 kb 两个片段, 目的插入片段为 2.3 kb(图 3)。将 kbpala 酶切所得 3.9 kb 载体片段与 Bluescript/Albumin 酶切片段 2.3 kb 连接后转化单克隆菌落, 质粒提取后分别用 *Bam*H I / *Not* II 双酶切鉴定。电泳后可见载体及插入片段分别为 3.9 kb

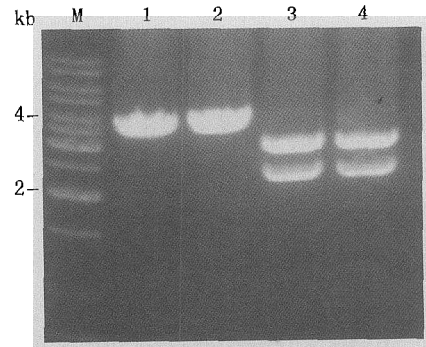


图 3 Bluescript/Albumin 和 kbpala 载体 *Bam*H I、*Not* I 酶切电泳分析

Fig. 3 Fragment of bluescript-alb and kbpala by *Bam*H I、*Not* I digestion

M: 1kb ladder; lane 1, 2: digestion product of kbpala (3.9kb); lane 3, 4: digestion of Bluescript/Albumin vector

及 2.3 kb(图 4)。

2.3 pRC/CMV-ATP7B 及 kbpala/alb 的酶切、

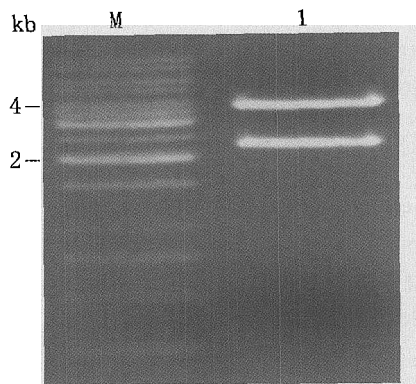


图4 重组质粒 kbpala/alb 的 *Bam*H I、*Not* I 酶切分析

Fig. 1 Identification of recombinant kbpala/alb

M: 1kb ladder; lane 1: digested kbpala/alb

连接及重组质粒的鉴定

将 pRC/CMV-ATP7B 野生型及 Arg778Leu、His1069Gln 突变型分别用 *Bam*H I/*Xba* I 双酶切, 可获目的片段 4.6 kb 电泳带; kbpala/alb 用 *Bam*H I/*Avr* II 双酶切后得到的载体片段则为 5.6 kb(图 5)。将上述目的基因酶切片段 4.6 kb 与 kbpala/alb 载体片段 5.6 kb 连接后转染细胞, 提取

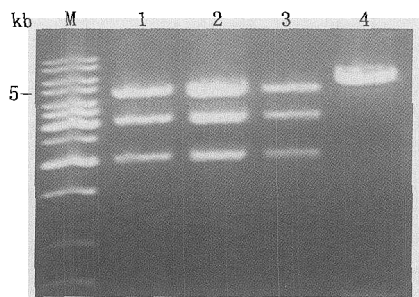


图5 pRC/CMV-ATP7B 和 kbpala/alb 的酶切电泳图
Fig. 5 Enzyme analysis of pRC/CMV-ATP7B and kbpala/alb

M: 1kb ladder; lane 1: normal ATP7B; lane 2: Arg778Leu; lane 3: His1069Gln; lane 4: kbpala/alb

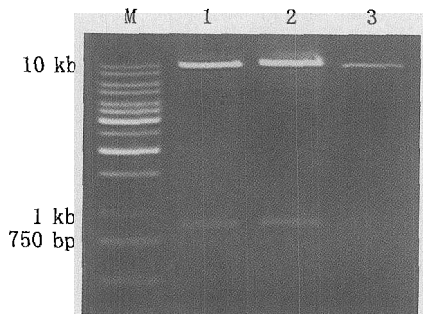


图6 kbpala-alb-ATP7B 正常及突变克隆酶切分析

Fig. 6 Enzyme analysis of normal as well as mutant kbpala/ alb-ATP7B

M: 1kb ladder; lane 1: normal ATP7B; lane 2: Arg778Leu; lane 3: His1069Gln.

质粒后进行 *Bam*H I/*Avr* II 酶切分析, 阳性克隆被切为 9.3 kb、0.88 kb 两个片段, 其中 0.88 kb 的片段来自 ATP7B(图 6)。

3 讨论

ATP7B 基因是 Wilson 病的致病基因, 主要在肝脏表达。基因突变使肝脏合成铜蓝蛋白及胆道排泄障碍, 导致金属铜在机体器官沉积。据报道, 中国人 ATP7B 突变热点主要是 Arg778Leu^[1], 而西方人群的突变热点为 His1069Gln^[2], 但基因突变后的具体发病途径并不清楚。因此, 构建这两种突变的转基因动物模型进行铜代谢观察, 对阐明本病的发病机制非常重要。目前还没有特定突变的转基因动物, 国际上常见的动物模型为: LEC 鼠 (Long-Evans cinnamon rats) 或 tx 鼠 (toxic milk mutant mice)。我课题组已从澳大利亚引进了 tx 小鼠并进行了胚肝细胞移植及细胞转基因研究, 取得了初步的成效^[4,5], 然而, 这两种模型均存在与人类 WD 患者显著不同的特征^[6]: LEC 鼠易发生肝癌且很少出现神经系统症状; tx 小鼠若吸食正常含铜乳汁则可较好的生长发育并不表现神经系统症状; 这些情况均与 WD 的临床表现很不一致。上述两种模型都具有与人类 ATP 同源基因的突变, 如 LEC 鼠 ATP7B 同源基因定位于 16 号染色体 (16 q12.2-q12.4), 其 3' 端 ATP 结合区及其下游的基因序列在内至少 900bp 的缺失^[7], tx 鼠同源基因则定位于 8 号染色体, 下游 4066 核苷酸位点错义突变, 导致第 8 个跨膜区域的氨基酸编码改变而致病^[8], 与人 ATP7B 基因突变热点不同, 不能完全反映 Wilson 病人的分子发病机制。1999 年, Buiakova 等^[9]制备了 ATP7B 基因 2 号外显子缺失的 Wilson 病小鼠动物模型, 结果发现转基因动物表现为铜在肝、肾、脑等组织的沉积, 并进一步发生肝硬化; 而突变鼠分泌的乳汁则是乏铜的, 其子代出生时肝脏明显乏铜, 若吸食母乳乳汁, 则生长迟缓, 神经系统发育异常, 多于 3 周内夭折。这些表现均与 tx 鼠极为相似, 没有取得突破。因此, 构建在肝脏等特定器官进行人 ATP7B 热点突变表达的转基因动物模型, 在基因水平上真正模拟该病, 对探讨本病基因热区突变后的分子发病机制具有重要意义。

白蛋白是肝脏合成的血清蛋白, 基因表达在肝脏较其他组织高 1 000 倍, 其组织特异性表达的基因在于白蛋白基因存在特异性调控序列如启动子、

增强子,可与肝脏富含的转录因子如 HNF-1 (hepatocytenuclear factor-1)、C/EBP(CCAAT/enhancer binding protein)及 eH-TF 等特异性结合,刺激基因高效转录^[10]。1989 年 Izban^[11]克隆并提交了小鼠白蛋白调控序列,在白蛋白启动子引导下的转基因动物,其外源基因亦表现为肝脏特异性表达,为肝脏相关疾病的研究提供了极有价值的动物模型。近年的研究还发现,与其它启动子如 CMV、PGK 相比,白蛋白启动子引导的外源基因表达所引起的体液免疫及细胞免疫反应均较轻,基因治疗的重复性好^[12];并可克服因启动子失活而导致的转基因沉默现象,使基因治疗的有效期增加^[13],显示了极具潜力的临床应用价值。Wilson 病发病的首要靶器官是肝脏,因此,利用白蛋白基因特异性调控序列如启动子、增强子实现 ATP7B 基因的肝脏特异性表达,对模拟该病的肝脏病理生理机制具有非常重要的意义。故本研究构建的小鼠白蛋白启动子 ALB-ATP7B 表达载体对下一步制备转基因 Wilson 病小鼠模型奠定了初步基础,并具有较大的临床研究和应用价值。

参考文献:

- [1] Xu P, Jankovic J, Le WD. Identification of a high frequency of mutation at exon 8 of the ATP7B gene in a Chinese population with Wilson's disease by fluorescent PCR[J]. Arch Neurol, 2001, 58(11): 1879-82.
- [2] Thomas G R, Forbes J R, Robert E A, et al. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences[J]. Nat Genet, 1995, 9(2): 210-7.
- [3] 徐琳,徐评议,梁秀龄. 小鼠白蛋白基因的特异性调控及其在转基因动物中的应用[J]. 国外医学遗传学分册, 2003, 26(5): 287-90.
- [4] 任廷文,梁秀龄,石铸,等. Wilson 病 ATP7B 基因铜离子结合区缺失突变体构建及功能研究[J]. 中山大学学报, 2003, 24(3): 261-4.
- [5] 石铸,王莹,任廷文,等. TX 小鼠的铜代谢特点和肝脏病理学特征[J]. 中山医科大学学报, 2003, 24(3): 211-3.
- [6] 石铸,梁秀龄. Wilson 病的动物模型[J]. 中国临床神经科学, 2003, 11(1): 88-91.
- [7] Sasaki N, Hayashizaki Y, Muramatsu M, et al. The gene responsible for LEC hepatitis, located on rat chromosome 16, is the homolog to the human Wilson disease gene[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 202(1): 512-8.
- [8] La Fontaine S, Theophilos M B, Firth S D, et al. Effect of the toxic milk mutation (tx) on the function and intracellular localization of Wnd, the murine homologue of the Wilson copper ATPase[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(4): 361-70.
- [9] Buiakova O I, Xu J, Lutsenko S, et al. Null mutation of the murine ATP7B (Wilson disease) gene results in intracellular copper accumulation and late-onset hepatic nodular transformation[J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(9): 1665-71.
- [10] Liu J K, DiPersio C M, Zaret K S. Extracellular signals that regulate liver transcription factors during hepatic differentiation *in vitro*[J]. Mol Cell Biol, 1991, 11(2): 773-84.
- [11] Izban M G, Papaconstantinou J. Cell-specific expression of mouse albumin promoter. Evidence for cell-specific DNA elements within the proximal promoter region and cis-acting DNA elements upstream of -160[J]. J Biol Chem, 1989, 264(16): 9171-9.
- [12] Pastore L, Morral N, Zhou H, et al. Use of a liver-specific promoter reduces immune response to the transgene in adenoviral vectors[J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(11): 1773-81.
- [13] Herweijer H, Zhang G, Subbotin V M, et al. Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver[J]. J Gene Med, 2001, 3(3): 280-91.

(编辑 刘清海)