

支架蛋白 JLP 基因敲除小鼠的构建及其肾脏表型的初步观察

阳 诚 宋 远 袁小涵 王惠明

摘 要 目的 繁殖和鉴定支架蛋白 JLP 基因敲除小鼠,对其肾脏表型进行初步观察。方法 将 JLP 基因敲除杂合小鼠进行配种繁殖,提取子代小鼠的组织 DNA,用 PCR 技术检测小鼠的基因型,并用 Western blot 法验证基因敲除效果。通过 PAS 病理染色等观察肾脏微观结构。结果 成功繁殖并获得子代小鼠,子代小鼠有 3 种基因型,包括纯合子(JLP +/+、JLP -/-)和杂合子(JLP +/-)。PCR 检测基因型的方法方便且结果准确。结论 笔者成功建立了 JLP 基因敲除小鼠模型,能够进一步探究发现 JLP 基因对生物体的作用及机制。

关键词 JLP JNK MAPK 基因敲除小鼠模型

中图分类号 R5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.09.006

Construction of a Mouse Model for Scaffold Protein JLP Knockout and Preliminary Observation of the Renal Phenotype. Yang Cheng, Song Yuan, Yuan Xiaohan, et al. Department of Nephrology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To breed the scaffolding protein JLP knockout mice and observe the renal phenotype. **Methods** Breeding the JLP heterozygous mice will get the homozygous mice offspring. PCR reaction was used to detect the gene genotype after extracting the mice tissue DNA and the microstructure of the kidney was observed by PAS pathological staining. **Results** The homozygous mice offspring were obtained and 3 genotypes including JLP +/+, JLP +/- and JLP -/- were tested. **Conclusion** JLP knockout mice provides an effective animal model for further research on the function of JLP protein.

Key words JLP; JNK; MAPK; Knockout mice

JLP 蛋白(c-Jun NH2-terminal kinase-associated leucine zipper protein, JLP)是一种参与调节 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、p38 蛋白(p38 mitogen-activated protein kinases, p38 MAPK)相关信号通路分子和转录因子的支架蛋白,对细胞的生长、发育、分化、凋亡、炎症反应等均有重要的影响^[1,2]。JLP 蛋白广泛表达于小鼠多器官组织中,在小鼠脑、肺、脾脏、睾丸、卵巢等器官中表达量较大,于心脏、肝脏、子宫中的表达量相对较少^[3]。尽管目前对 JLP 蛋白的功能研究众多,但发现 JLP 蛋白对机体新的作用及意义非常重要。

此次试验通过对 JLP 基因敲除杂合小鼠的繁殖及基因型鉴定,成功获得 JLP 基因敲除纯合小鼠,现对小鼠的繁殖、基因型鉴定、JLP 基因的表达进行探究并对其肾脏表型进行初步观察。

材料与方法

1. 实验材料:2 × Taq PCR Master Mix (KT201) 和 DNA marker 均购自天根(北京)生化科技公司,PCR 引物由巴菲尔(武汉)生物公司合成,小鼠麻醉药由戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司)配制而成。组织 DNA 提取试剂盒购买于美国 Omega 公司。琼脂糖、50 × TAE 溶液、BSA 测浓度试剂盒、蛋白配胶试剂盒、蛋白 marker 均购自碧云天公司。兔抗 GAPDH 抗体购自杭州至贤生物公司,兔抗 JLP 抗体购自英国 Abcam 公司,兔抗 TGF-β1 抗体购自北京博奥森生物技术公司。

2. 仪器与设备:PCR 仪(德国耶拿分析仪器公司);凝胶成像仪(美国 bioSpectrum 公司);电泳仪(伯乐生物有限公司);Odyssey CLx 近红外双色荧光成像(美国 LI-COR 公司)。

3. 实验动物:JLP 基因敲除小鼠由日本金泽大学 Yoshioka 教授馈赠,雌雄各 1 只,品系背景为 C57/BL6,基因型为杂合子(JLP +/-)。小鼠饲养并繁殖于武汉大学人民医院动物实验中心,实验所用小鼠均为 SPF 级别,实验中心定期消毒并更换鼠笼、垫料。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81370800)

作者单位:430060 武汉大学人民医院肾内科

通讯作者:王惠明,电子信箱:wanghuimingwhm@yahoo.com

4. 小鼠建系:所有小鼠均由 Yoshika 教授赠送的一对小鼠(F0 代)繁殖而来,此对小鼠繁殖产生的 F1 代小鼠包括纯合子(JLP +/+、JLP -/-)和杂合子(JLP +/-),F1 代杂合子(JLP +/-)之间自交产生 F2 代,从而建立一个稳定的品系。

5. 小鼠基因型鉴定:1) 小鼠组织 DNA 的提取:小鼠麻醉后(3% 戊巴比妥钠)剪去 1~2 个脚趾(放于 EP 管内),脚趾剪碎后溶于 200 μ l TL 溶液中,加入 20 μ l 蛋白酶溶液后于 55℃ 水浴 2h,每 30min 震荡 EP 管 1 次,直至组织溶解。然后按照 Omega DNA 提取试剂盒(cat No. D3396)提供的实验步骤提取组织 DNA,得到上清即为 DNA 提取液。2) PCR 反应:(1) PCR 引物共有 3 种,其中引物 1 和引物 2 加入 PCR 反应体系能够扩增出正常野生 JLP 序列的片段,引物 2 和引物 3 加入 PCR 反应体系中能够扩增出突变型的 JLP 序列片段。所用引物序列为:Primer 1:5' - TGTCAGTTCGCTGGCTTCGGTA - 3'; Primer 2:5' - CTCAGCCTGCAGGCTAAAATCCTG - 3'; Primer 3:5' - TAAAGCGCATGCTCCAGACTGCCTT - 3'。(2) PCR 体系:PCR mix 10 μ l, ddH₂O 6 μ l, 引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ l。(3) PCR 反应条件:预变性:94℃, 2min;变性 94℃, 20s,退火 58.5℃, 30s,延伸 72℃, 1min, 30 个循环,最后延伸 4℃, 5min。4℃ 保存。3) 凝胶电泳分析:取 1.5% 琼脂糖凝胶导入三角瓶中,于微波炉中加热溶化,室温自然冷却至 60~70℃ 后加 Goldview,倒入封好的凝胶槽,厚度约 3~5mm,在距底板 0.5~1.0mm 的位置放置样品梳,检查梳子齿间有无气泡,待冷却成型后取出梳子及隔板,放入水平电泳槽,再在电泳槽中加入 1 * TAE 缓冲液淹没过胶 1~2mm 为止。将 10 μ l PCR 产物与 DNA marker 加入到凝胶孔中,进行电泳,电压为 110V,时间为 35min。取出凝胶块,置于紫外透射反射分析仪上观察,即可见 DNA 条带,拍照保留数据。

6. Western blot 免疫印迹法:收集并提取组织蛋白,BSA 法测蛋白浓度,配制 10% 分离胶,5% 浓缩胶进行电泳,取 10 μ l 制备好的蛋白样品和 marker 加入上样孔。加样后先恒压 80V 电泳至分离胶与浓缩胶交界处,改为恒压 120V,待 marker 指示剂到凝胶底部时关闭电泳仪。转膜条件为 GAPDH 200mA, 90min; JLP 200mA, 120min。TGF- β 1 200mA, 90min。转膜后 5% 脱脂牛奶封闭 1h, TBS 洗膜 1 次, 5min, 接着一抗孵育, 4℃ 过夜。配置一抗所用抗体浓度分别为兔抗 GAPDH 抗体(1:1000), 兔抗 JLP 抗体(1:1000),

兔抗 TGF- β 1 抗体(1:200)。第 2 天 TBST(TBS + 0.1% 的吐温)洗膜 3 次,每次 5min,随后二抗(LI-COR, 羊抗兔, 1:10000)避光孵育 1h, TBST 洗膜 3 次,每次 5min。最后,在 Odyssey CLx 近红外双色荧光成像系统进行曝光并保存图像。

7. 肾脏 PAS 染色:小鼠麻醉后处死取右侧 1/2 肾脏置于 4% 多聚甲醛中固定 24h,石蜡包埋,固定肾脏组织,切成 3 μ m 的切片,石蜡切片脱蜡后用蒸馏水洗 1min。爱先蓝染液(pH 值为 2.5)染色 15min,稍水洗后高碘酸溶液氧化 10min,蒸馏水洗 2min,雪夫试剂染色 15min,流动自来水洗 5min, Mayer 苏木素染核 1~2min,流水冲洗 5min,最后用 95% 乙醇、无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。显微镜下观察拍片。

8. 小鼠血肌酐测定:小鼠麻醉后通过心脏采血得到大约 500 μ l 血液(10 周小鼠),室温静置 20min, 3000 $\times$ g 离心 30min,取上清,于武汉大学人民医院检验中心检测小鼠血肌酐(serum creatinine, Scr)及尿素氮(blood urea nitroge, BUN)值。

9. 统计学方法:应用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。小鼠体重、JLP 和 TGF- β 1 在小鼠肾脏组织中的表达水平以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据间比较采用两个独立样本的 *t* 检验,多组间均数比较采用方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠基因型鉴定:亲本 JLP 基因敲除小鼠(F0 代)均为杂合子, F1 代及 F2 小鼠均有纯合子(JLP +/+、JLP -/-)和杂合子(JLP +/-) 3 种基因型(图 1), JLP +/+ 的小鼠只能检测出野生型 JLP 基因, JLP -/-

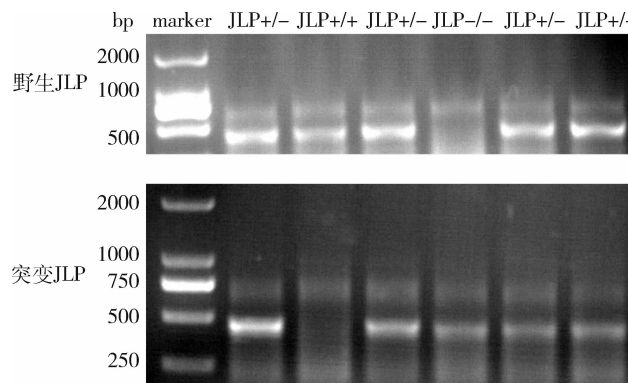


图 1 小鼠基因型 PCR 鉴定结果

加入引物 1 和引物 2 的 PCR 反应体系可检测出野生型 JLP 基因,加入引物 2 和引物 3 的 PCR 反应体系可检测出突变型 JLP 基因;JLP -/- 小鼠能检测出突变型 JLP 基因, JLP +/+ 小鼠可检测出野生型 JLP, JLP +/- 小鼠可检测出两种类型的 JLP 基因

小鼠只能检测出突变型 JLP 基因,而杂合子小鼠可以检测出两种基因。

2. 小鼠 JLP 基因表达检测:为了进一步验证基因型检测的准确性以及 JLP 基因敲除的效果,选取经 PCR 鉴定出来的 JLP +/+ 和 JLP -/- 小鼠,应用 Western blot 法检测 JLP 蛋白在两种小鼠肾脏组织中的表达。结果如图 2 所示, JLP +/+ 小鼠可检测到 JLP 蛋白的表达,而 JLP -/- 小鼠肾脏组织无 JLP 蛋白的表达。

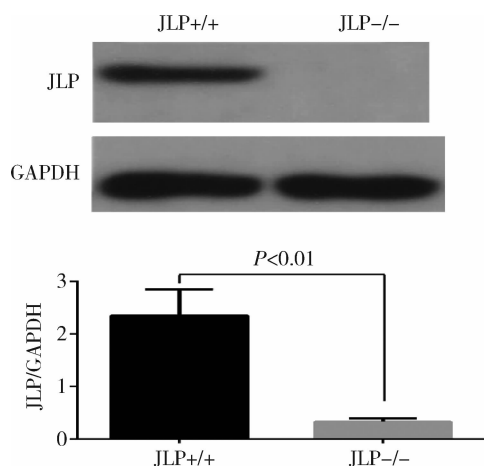


图2 选取经 PCR 鉴定出 JLP +/+ 和 JLP -/- 的小鼠,提取小鼠肾脏的蛋白,用 Western blot 法检测 JLP 蛋白的表达
JLP -/- 小鼠肾脏内无 JLP 蛋白的表达

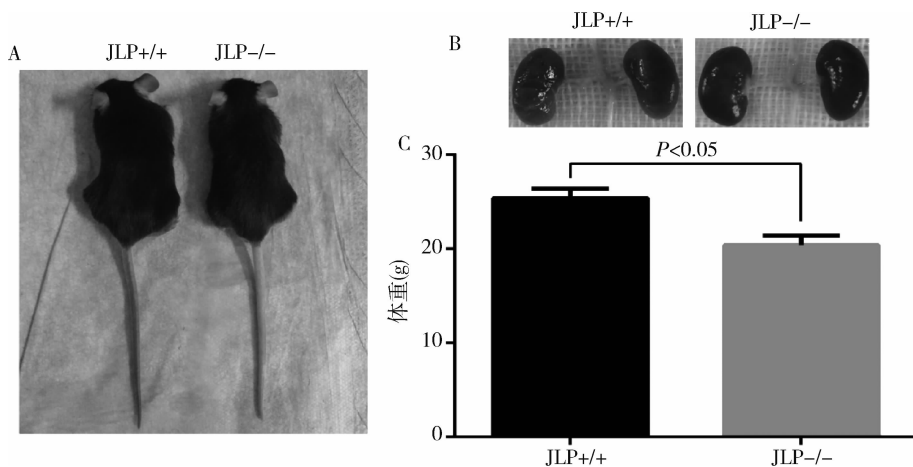


图3 JLP 基因敲除对小鼠生长发育的影响

A. 10 周大小鼠的宏观形态; B. 10 周大小鼠肾脏的宏观形态; C. 10 周大小鼠的平均体重

7. JLP 基因突变对肾功能的影响:检测两种基因型小鼠的肌酐及尿素氮值,评估 JLP 基因敲除对小鼠肾功能的影响。JLP +/+ 组小鼠肌酐值为 $10.9 \pm 0.2 \text{ mg/dl}$, JLP -/- 组小鼠的肌酐值为 $11.0 \pm 0.2 \text{ mg/dl}$,两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$);

3. 小鼠基因型分布比例:从一对 F0 代小鼠交配产生的 F1 代小鼠中挑选出 4 对 JLP 杂合小鼠进行自交繁殖,得到 48 只 F2 代小鼠中,其中有 9 只 JLP +/+ 小鼠(约占总数的 18.8%),5 只 JLP -/- 小鼠(占 10.4%),剩下全部为 JLP 杂合子小鼠,占总数的 70.8%。

4. 两种基因型小鼠的外观特点:经 PCR 检测出的 JLP +/+ 和 JLP -/- 小鼠在外形上有一定的差异,野生型(JLP +/+)小鼠的躯干、尾巴为正常的深灰色,而 JLP 基因敲除(JLP -/-)小鼠躯干部毛发的颜色为浅灰色,尤其尾巴近似白色(图 3A)。

5. 两种基因型小鼠的生长情况:两种小鼠在精神、饮食、大小便等方面未见明显差异。在 F1 代小鼠出生后 2 ~ 20 周内,每周称量 1 次体重,小鼠在第 4 周开始, JLP -/- 小鼠较其他两种基因型小鼠的体重要轻。如图 3C,选取 10 周龄同笼同性别的小鼠称量体重可发现,野生型小鼠的体重较 JLP -/- 小鼠的体重稍重,两组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。野生型小鼠及杂合子小鼠可正常生育,而 JLP -/- 小鼠生育能力减退。

6. 两种基因型小鼠肾脏表型的初步观察:从外形上来看,两种基因型小鼠的肾脏差异不明显(图 3B)。运用 PAS 染色观察肾脏病理变化,结果显示,两种基因型小鼠的肾脏微观结构差异亦不明显(图 4)。

JLP +/+ 组小鼠尿素氮为 $9.9 \pm 0.1 \text{ mmol/L}$, JLP -/- 组小鼠的尿素氮为 $10.1 \pm 0.1 \text{ mmol/L}$,两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),详见图 5。

8. JLP 基因突变对肾脏 TGF- β 1 表达的影响:使用 Western blot 法检测两种小鼠肾脏组织中 TGF- β 1

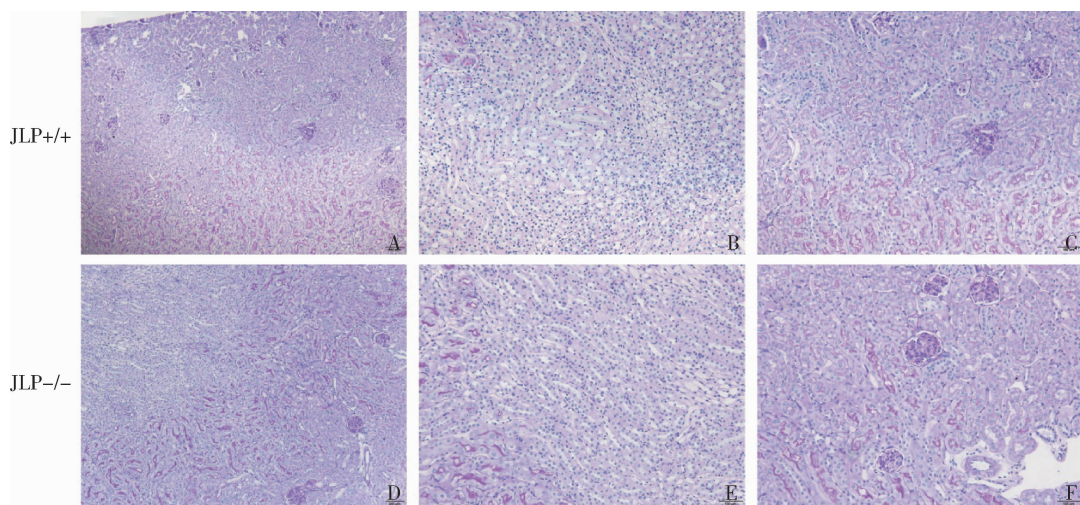


图 4 两种基因型小鼠肾脏表型的初步观察

图片均为 PAS 染色,其中 A、D 为 $\times 40$, B、C、E 和 F 为 $\times 100$ 。JLP $-/-$ 小鼠与 JLP $+/+$ 小鼠的肾脏微观结构差异不明显

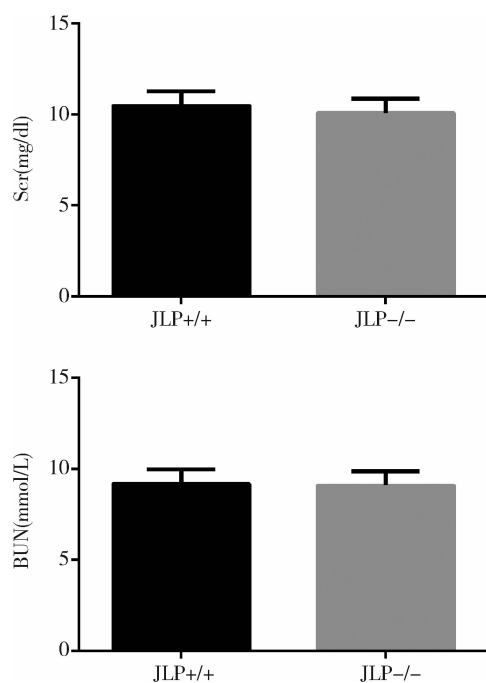


图 5 JLP 基因突变对小鼠肾功能的影响

A. 两种基因型小鼠的血肌酐 (Scr) 值测定结果;
B. 两种基因型小鼠的尿素氮 (BUN) 测定结果

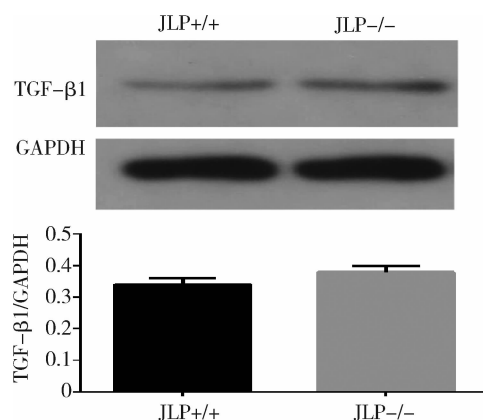


图 6 选取经 PCR 鉴定出 JLP $+/+$ 和 JLP $-/-$ 基因型的小鼠,提取小鼠肾脏的蛋白,用 Western blot 法检测 TGF- $\beta 1$ 的表达

的表达,结果显示,两组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 6)。

讨 论

众所周知,丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 是调节细胞生长和分化的重要分子,所有的真核细胞都能表达 MAPK^[4, 5]。MAPK 信号通路由 3 类激酶组成,包括 MAPK 激酶激酶 (MAP kinase kinase, MKKK)、MAPK 激酶

(MAP kinase kinase, MKK) 和 MAPK^[6, 7]。这 3 类激酶能依次激活,调节细胞的生长、分化、发育、凋亡及炎症反应等^[2]。MAPK 家族包含 3 大亚家族,包括细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK), 应激活化蛋白激酶 (JNK) 和 p38 蛋白激酶^[8-13]。支架蛋白可以调节 MAPK 信号分子间的相互作用。到目前为止,有近 20 种与 MAPK 信号通路相关的支架蛋白被发现^[14]。JNK 相互作用蛋白 (JNK-interacting protein, JIPs) 家族就是一组调节 JNK 信号通路的蛋白家族,其中包括 JIP1、JIP2、JIP3、JLP。JIP1~3 可与 JNK/MKK7/MKKs 分子相结合从而介导 JNK 信号通路,而 JLP 蛋白可通过激活 p38、JNK 分子来调节 MAPK 信号通路。

JLP 蛋白中含有 2 个 JNK 结合结构域 (JNK bind-

ing domain, JBD)、亮氨酸拉链、卷曲螺旋域等结构。JLP 蛋白可通过 JBD 与 JNK、p38 结合从而调节 MAPK 信号通路相关的生物现象^[16]。除此之外, JLP 还被发现对小鼠 B 淋巴细胞相关的凋亡、B 细胞表面 CD40 分子的内吞、CD40 分子介导的树突状细胞的活化、CD4⁺ T 淋巴细胞的活化和 T 细胞表面 CD154 分子的表达均起着关键的作用^[14-17]。支架蛋白 JLP 对于生物体的意义远非如此。基因敲除是一项使生物体内某种或几种特定基因失效的技术, 该技术为科学研究工作者提供了多种突变小鼠模型, 使得我们对每种基因于生物体行为及表型的意义理解更透彻^[18]。因此建立一种 JLP 基因敲除小鼠的动物模型至关重要。国内尚无此动物模型报道。

本实验室通过引进 JLP 基因敲除杂合小鼠并成功繁殖出纯合 JLP 基因敲除小鼠。为了确认敲除模型构建成功, 笔者检测了 JLP 基因的表达, 结果发现 JLP +/+ 小鼠肾脏组织中有 JLP 蛋白的表达, 而 JLP -/- 小鼠中无 JLP 蛋白的表达。由此表明 JLP 基因敲除小鼠模型构建成功。

根据孟德尔遗传定律, 一对等位基因在子代个体中的遗传比例应该符合 1: 1: 2 的比例, 但是本次通过 JLP +/- 杂合小鼠自交产生的 F2 代小鼠基因型并不完全符合该比例, JLP -/- 小鼠的比例只有 10.4%, 远低于 25%。这可能与 F2 代小鼠样本量不够大有关, 亦有可能因为 JLP 蛋白广泛表达于生物体内, 完全缺失该基因将会使得 JLP -/- 基因型小鼠的胚胎有一定致死率, 因此出生后小鼠基因型比例发生变化。

对 JLP 基因敲除小鼠的 F2 代进行观察, 在小鼠出生后 3 周开始, 即可通过鼠尾颜色辨别出 JLP -/- 小鼠, 但是无法区分 JLP +/+ 和 JLP +/- 小鼠(后期通过 PCR 验证基因型)。从 4 周开始 JLP -/- 小鼠体重差异出现。由此可见, JLP 基因对小鼠出生后的生长发育有影响。两种基因型小鼠的肾脏外观、微观结构、肾功能以及肾脏内 TGF- β 1 的表达无明显差异, 初步评估 JLP 基因敲除对小鼠肾脏的正常发育与肾功能影响不大, 但不能排除 JLP 基因敲除对肾脏其他功能的影响, 需进一步开展实验进行观察。

总之, 通过本实验笔者成功构建了 JLP 基因敲除小鼠模型, 形成了成熟稳定的基因鉴定体系, 并发现 JLP 基因对小鼠出生后的生长发育有影响, 但对肾脏的表型及肾功能的影响不大。前期研究已经发现 JLP 蛋白对 MAPK 信号通路, CD40/CD154 共刺激

子及免疫细胞的活化均有重要的影响, 沿着这些线索, 借助于 JLP 基因敲除小鼠模型, 能更好地了解支架蛋白 JLP 在生物体内的作用及作用机制。

参考文献

- Lee CM, Onésime D, Reddy EP, *et al.* JLP: A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(22): 14189 - 14194
- Zhang YL, Dong C. MAP kinases in immune responses [J]. *Cell Mol Immunol*, 2005, 2(1): 20 - 27
- Iwanaga A, Wang G, Yoshika K, *et al.* Ablation of the scaffold protein JLP causes reduced fertility in male mice [J]. *Transgenic Res*, 2008, 17(6): 1045 - 1058
- Dohlman HG. A scaffold makes the switch [J]. *Sci Signal*, 2008, 1(42): pe46
- Jimenez - Garcia L, Luque A, Hortelan S, *et al.* Critical role of p38 MAPK in IL - 4 - induced alternative activation of peritoneal macrophages [J]. *Eur J Immunol*, 2015, 45(1): 273 - 286
- Wang J, Zou T, Lu G, *et al.* Genome - wide identification of MAPK, MAPKK, and MAPKKK gene families and transcriptional profiling analysis during development and stress response in cucumber [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 386
- Wu J, Chen L, Lu G, *et al.* Genome - wide identification of MAPKK and MAPKKK gene families in tomato and transcriptional profiling analysis during development and stress response [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103032
- Sun Y, Yang N, Zhou HF, *et al.* Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600 - 604
- Li Q, Yang T, He G, *et al.* The dual role of ERK signaling in the apoptosis of neurons [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2014, 19: 1411 - 1417
- Kumar A, Gupta P, Malik A, *et al.* JNK pathway signaling: a novel and smarter therapeutic targets for various biological diseases [J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(15): 2065 - 2086
- Wong HW, Saint R, Gregory SL, *et al.* JNK signaling is needed to tolerate chromosomal instability [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(4): 622 - 631
- Wu Q, Graff JM, Saga Y, *et al.* SMAD2 and p38 signaling pathways act in concert to determine XY primordial germ cell fate in mice [J]. *Development*, 2015, 142(3): 575 - 586
- Ehyai S, Siu KW, McDermott JC, *et al.* A p38 Mitogen - activated protein kinase - regulated myocyte enhancer factor 2 - beta - catenin interaction enhances canonical Wnt signaling [J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 36(2): 330 - 346
- Enkhtuya R, Matsunaga T, Yoshioka K, *et al.* The scaffold protein JLP plays a key role in regulating ultraviolet B - induced apoptosis in mice [J]. *Genes Cells*, 2014, 19(4): 350 - 358
- Wang HM, Yan Q, Ding GH, *et al.* Scaffold protein JLP is critical for CD40 signaling in B lymphocytes [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(9): 5256 - 5266
- Wang H, Reddy EP, Kung SK, *et al.* A novel role of the scaffolding protein JLP in tuning CD40 - induced activation of dendritic cells [J]. *Immunobiology*, 2013, 218(6): 835 - 843
- Yan Q, Yang C, Wang H, *et al.* Scaffold protein JLP mediates TCR - initiated CD4⁺ T cell activation and CD154 expression [J]. *Mol Immunol*, 2017, 87: 258 - 266
- Kazdoba TM, Leach PT, Crawley JN. Behavioral phenotypes of genetic mouse models of autism [J]. *Genes Brain Behav*, 2016, 15(1): 7 - 26

(收稿日期: 2017 - 10 - 27)

(修回日期: 2017 - 11 - 28)