

# 原发性开角型青光眼致病基因小鼠 MYOC Pro356Leu 突变型质粒构建及鉴定

## Construction and identification of primary open angle glaucoma disease MYOC Pro356Leu mutant plasmid in mouse

李春梅 卓业鸿 陈梦飞 孙雪荣 祁影 葛坚\*

中山大学中山眼科中心, 眼科学国家重点实验室, 广州 510060

Chunmei Li, Yehong Zhuo, Mengfei Chen, Xuerong Sun, Ying Qi, Jian Ge

State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

**目的:** 构建小鼠 MYOC Pro356Leu 突变型质粒及鉴定。

**方法:** 1. 将含有红重组酶基因的质粒 pKD46 电击入 RP23-180F15 BAC 克隆。2. 利用 PCR 扩增 pStart-K 载体, 将 PCR 产物电穿孔入 RP23-180F15 BAC 红色重组细菌的 MYOC 基因组片段。3. PCR 扩增 mMyoc Afe I 片段, 亚克隆 mMyoc Afe I 片段进入 pBluescript 载体。4. 设计两条寡核苷酸将 Pro356Leu (C to T at codon 356) 导入 pBS\_mMyoc Afe I 克隆。5. 通过酶切及连接酶反应将 pBS\_mMyoc Afe I mut clone 导入 pStart-K\_mMyoc 构建成 pStart-K\_mMyoc mut 克隆。

**结果:** 成功构建小鼠 MYOC Pro356Leu 突变型质粒 pStart-K\_mMyoc mut 克隆, 并经酶切及测序证实。

**结论:** 应用红重组技术及 pStart-K 载体克隆大片段 DNA 是有效的 DNA 克隆方法, 我们所构建的 MYOC Pro356Leu 突变型质粒将为研究 MYOC 基因在原发性开角型青光眼发病中的功能和作用提供实验依据。《眼科学报》2010;25:54-58。

**关键词:** 原发性开角型青光眼; MYOC Pro356Leu 突变; 质粒构建

**Purpose:** To construct and identify the plasmid of mutant MYOC Pro356Leu in mouse.

**Methods:** 1. Red recombinantase-expressing plasmid pKD46 was transferred to RP23-180F15 BAC clone by electroporation. 2. The pStart-K vector was amplified by PCR and the PCR product was electroporated into the bacteria containing the mMYOC. 3. PCR amplification of the mMyoc Afe I fragment and subcloning and then subcloned it into pBluescript vector. 4. Two oligonucleotides was designed and introducing the Pro356Leu (C to T at codon 356) into the pBS\_mMyoc Afe I clone. 5. pBS\_mMyoc Afe I mut clone was introduced to pStart-K\_mMyoc by digestion and ligation reaction.

**Results:** pStart-K\_mMyoc mut clone, the mouse MYOC Pro356Leu mutant plasmid was constructed and identified well by restriction enzyme digest and sequencing.

基金项目: 中国自然科学基金项目资助 (30600695/C030309)

通讯作者: 葛坚, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 青光眼。E-mail: gejian@mail.sysu.edu.cn

**Conclusion:** It is a good method to construct a long DNA fragment clone by red re-combinase and pStart-K vector. The constructed Mouse MYOC Pro356Leu plasmid will be very helpful for the studies on the function and biologic effects of MYOC gene in primary open angle glaucoma. *Eye Science* 2010; 25: 54-58.

**Key words:** Primary open angle glaucoma; MYOC Pro356Leu mutant; Plasmid construction

**青** 光眼是世界范围内主要的不可逆转性的致盲眼病之一,以进行性视神经萎缩为特点<sup>[1]</sup>。目前普遍认为眼内压增高是青光眼发生的主要风险因素<sup>[2]</sup>。眼内压主要取决于房水流出的阻力,而小梁网的阻力增加是原发性开角型青光眼(Primary open angle glaucoma, POAG)的主要因素<sup>[3]</sup>。最近研究认为,小梁网可诱导糖皮质激素反应蛋白(Trabecular meshwork-inducible glucocorticoid response/myocilin, TIGR/MYOC)在 POAG 的发生中起着重要的作用。英国的一项研究表明,在散发的 POAG 和正常眼压性青光眼中,MYOC 突变率为 2.2%<sup>[4]</sup>,在世界范围 POAG 患者中,MYOC 突变发生率为 3%~4%<sup>[5]</sup>。流行病学研究发现,约 30%~56%的 POAG 和高眼压患者有明显的家族史,一级亲属的发病率是普通人群的 7~10 倍<sup>[6]</sup>。

虽然已经确定 MYOC 基因突变与 POAG 疾病的发生有着密切的关系,但确切的作用机制我们却知道的很少。已有多项研究报导,MYOC 基因 Pro370Leu 位点(相当于小鼠 Pro356Leu)杂合子错义突变与疾病共分离<sup>[7,11-12]</sup>,此突变导致的临床表型为严重的开角型青光眼,而且以中国和亚洲国家居多。为了进一步研究 POAG 的发病机制,我们构建了小鼠 Pro356Leu 突变型 MYOC 质粒,为以后进行细胞转染,转基因鼠等基因功能研究奠定基础。

## 材料及方法

### 一、Red 重组 mMYOC 菌株制

将含有 RP23-180F15 BAC clone (BACPAC Resource Center) 的细菌植入含 20 mg/ml 氯霉素 (Sigma, cat. no. C0378) 的培养基过夜生长后,4℃, 2 000 转/min,离心 5 min。去上清液,加 10%冰甘油 1 ml,离心,重复一次。去上清液,加 50 ml 冰甘油。加入红重组酶表达质粒 pKD46 50 ng (GenBank accession number AY048746) 制备 electrocompetent

细胞。电击条件:0.1 cm cuvette, 1.8 kV, 25 mF 电容 (BIO-RAD, Gene Pulser Xcell)。电击后马上加 300 ml SOC 介质。取 50 ml 倒入含有 100 mg/ml 氨苄青霉素 (American Pharmaceutical Partners, Inc.) 和 20 mg/ml 氯霉素 (Sigma, cat. no. C0378) 的 LB 培养基上。30~32℃孵化 24~30 h。从培养盘中挑出一个单克隆接种到 15 ml 含 5 ml LB 培养基 (含有 100 mg/ml 氨苄青霉素;20 mg/ml 氯霉素) 的培养瓶中,30~32℃摇床 250 r.p.m 培养。当 OD600 为 4 时,接种 250 μl 入 50 ml LB 培养基 (100 mg/ml 氨苄青霉素;20 mg/ml 氯霉素) 使达到 OD600: 0.1~0.2。加入 L-阿拉伯糖,使终浓度为 0.1%~0.2%,摇晃 (250 r.p.m.) 培养 30~32℃,倍增时间 1.5~2 h。当 OD600 为 0.4~0.8 时,转移培养物入 50 ml 锥形瓶,冰上放置 10 min,偶尔轻轻摇晃。2 000 转,4℃离心 15 min。弃上清液,轻柔悬浮细胞于 50 ml,10%的冰甘油中,2 000 转,4℃离心 15 min。改 25 ml 冰甘油,重复以上操作 2 次。最后,弃上清液,加 100 ml,10%冰甘油,悬浮颗粒。

### 二、亚克隆 mMYOC 基因组片段进入 pStart-K 载体

设计一对寡核苷酸,利用 PCR 扩增 pStart-K (GenBank accession number EU530620, Addgene plasmid 20346)<sup>[8]</sup> 载体 pStartK-mMyc\_Asc1F: GCC AACCCATCTAGCTTCCTTGTGAACCTTCAAATATG CCACGGATGCCTGGCGCGCctaccggatccagtcgactgaatt gg, pStartK-mMycoc\_Aat2R: GAAGGGCTGTAAATAG AAGTAATTACTACAGGACTACTACATTTTTAAAAG ACGTCactcgagatctagaccagcttcttg, 大写的序列与 BAC 片段的两个连接点处的 50 个碱基相匹配。小写的寡核苷酸序列与 pStart-K 的序列相匹配。Asc I 和 Aat II 限制性酶切位点为红色大写寡核苷酸序列,两侧为想要的 BAC 片段,由 5' 到 3'。应用这两个寡核苷酸,通过 PCR,以 pStart-K 质粒为模板,应用 Phusion 高保真 DNA 聚合酶 (Finnzymes,

cat. no. F-530S)扩增 pStart-K。2 ml PCR 产物加于 1% 琼脂糖凝胶电泳。应用 QIAprep spin column (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, cat. no. 27106) 纯化 PCR 产物。用 DpnI 消化纯化后的 DNA, 37°C, 1~2 h, 再次纯化产物。将纯化后的 PCR 产物电穿孔入 BAC 的红色重组细菌, 参数同前。电穿孔后, 立即加入 1 ml SOC 介质, 转移细胞至 1.7 ml 管, 37°C, 摇晃孵化 (250 r.p.m.), 1 h 后, 将细胞植入 LB 培养皿 (50 mg/ml 卡那霉素)。挑出 8 个小克隆, 种植入 5 ml LB 培养基, 37°C 过夜。应用 QIAprep spin columns 准备 DNA minipreps, 用 XhoI 酶切, 确定是否 Myoc 基因组片段被顺利捕获入 pStart-K。对两个 pStart-K-mMyoc clones 进行测序, 进一步确认捕获片段的连接区域。即: attL1 和 attL2 位点和基因组片段的开始和最后的 50 个碱基。测序引物序列: pStartK\_seq1: TAACTGCCAG GCATCAAATAAGC, pStartK\_seq2: AGTCAGCCCC ATACGATATAAGTTG。

三、亚克隆 mMyoc Afe I 片段进入 pBluescript 载体

设计 2 个寡核苷酸, 利用 PCR 扩增 mMyoc Afe I 片段 pBS-mMyoc Afe1\_Not1F: AGATAAGAA TGCGGCCGCagcgcctagctctggtaggagagc 和 pBS-mMyoc Afe1\_EcoR1R: CGGAATTCagcgcctagctctgctctgtg, 小写的序列与 mMyoc Afe I 片段的两个连接点相匹配, 红色小写代表 Afe I 位点, Not I and EcoR I sites 由红色大写字母代表。应用以上引物, 用 Phusion 高保真 DNA 聚合酶, 从 plasmid template pStart-K\_mMyoc 扩增 4.5 kb Afe I 片段, 1% 琼脂糖检测。QIAquick PCR purification column (Qiagen, cat. no. 28104) 纯化产物。Not I 和 EcoR I 消化 37°C, 过夜, 消化纯化 DNA 和 5 mg 的 pBluescript vector (Stratagene, cat. no. 212208), 1% 琼脂糖电泳分离消化产物, 切下有意义的 DNA 条带, 纯化。用 T4 DNA 连接酶, 进行标准的连接反应, 室温下 2 h, 20  $\mu$ l 体积中, 预切的 mMyoc Afe I 片段和 pBluescript vector 的摩尔比为 3:1。取 2  $\mu$ l 以上连接反应的混合物, 转化 20  $\mu$ l 化学主管 DH5a cells。热休克, 42.1°C, 1 min。加 300  $\mu$ l SOC 介质, 孵化 37°C 摇晃培养 (250 r.p.m.) 1 h。种植 150 ml LB 培养基 (100 mg/ml 氨苄青霉素)。挑取 5 个克隆培养, 准备 DNA minipreps。用 Not I 和 EcoR I 酶切, 确定正确克隆。选 2 个 pBS\_mMyoc Afe I

clones 进行测序, 进一步证实 primers M13F 和 pStartK\_seq2。

四、将 Pro356Leu 突变导入 mMyoc 基因

设计两条寡核苷酸将 Pro356Leu (C to T at codon 356) 导入 pBS\_mMyoc Afe I 克隆。mMyoc Afe1\_mutF: CTACCACGGACACTTCCiGTACGCGTGGGG, mMyoc Afe1\_mutR: TAGCCACCCCACGCGTACaGGAAGTG TCCG, 在每条寡核苷酸链中大写的序列与 mMyoc Afe I 片段突变点两端的序列吻合, 有 23 个核苷酸重叠, 小写字母代表突变点 (C to T)。应用 QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, cat. no. 200521) 进行定点突变 (根据操作手册), 产生 pBS\_mMyoc Afe I mut clone。测序两个所得 pBS\_mMyoc Afe I mut 克隆, 证实突变 primers M13F 和 pStartK\_seq2 两侧的序列。用 Afe I 消化 10  $\mu$ g pBS\_mMyoc Afe I mut clone 和 pStart-K\_mMyoc, 37°C 过夜。1% 琼脂糖凝胶电泳分离消化后的产物, 切下有意义的 DNA 条带并纯化。用 T4 DNA 连接酶 (Fermentas, cat. no. EL0011) 进行连接反应, 在 20  $\mu$ l 总体积中, pBS\_mMyoc Afe I mut clone 和 the pre-cut pStart-K\_mMyoc 的摩尔比为 3:1, 4°C 过夜。热休克 42.1°C 1 min, 3  $\mu$ l 产物转化 50  $\mu$ l 化学主管 DH10B cells。加 300  $\mu$ l 的 SOC 介质, 37°C 摇晃培养 (250 r.p.m.) 1 h。取 150 ml 倒入 LB 培养基 (50 mg/ml 卡那霉素)。挑取 5 个克隆培养, 准备 DNA minipreps。Xho I 消化确定正确的克隆, 用 pBS-mMyoc Afe1\_Not1F, 将 pStart-K\_mMyoc mut clone 进行测序, 进一步证实。Aat II 内切酶消化, 准备进行小鼠胚胎细胞显微注射。

## 结 果

小鼠 MYOC Pro356Leu 突变型质粒 pStartK-Myoc mut 结构图 (图 1): 小鼠 MYOC Pro356Leu 突变型质粒 pStartK-Myoc mut 具有大多数限制酶切位点, 抗卡那霉素基因, 35 858 bp。图中桔红色所代表的是 MYOC 基因, 启动子及终止子已标记出, C/T 为 Pro356Leu 突变点, 由 C 突变为 T, 绿色代表 RP23-180F15 片段。

pStartK-Myoc mut 经 Aat II 内切酶消化后电泳图 (图 2): pStartK-Myoc mut 经限制性内切酶 Aat II 消化后, 为 33 577 bp, 经过纯化后, 为进行胚胎干细胞显微注射做好准备。我们采用线性化的 DNA

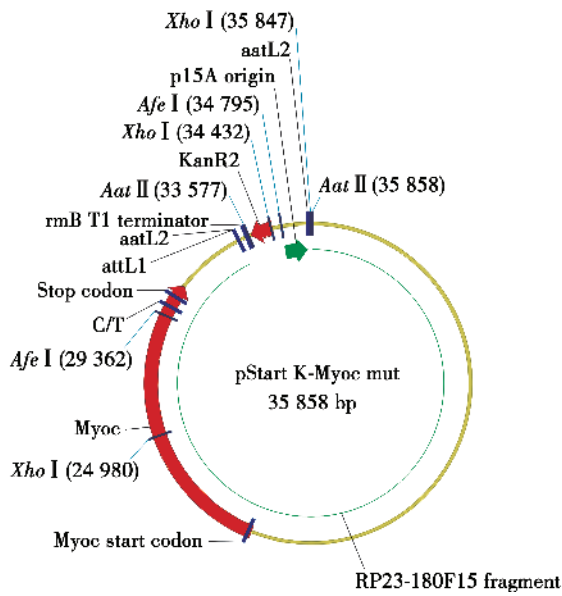


图 1 pStartK-Myoc Pro356Leu mut 结构图

片段进行注射, 因为与环状 DNA 相比, 线性 DNA 更容易插入胚胎的基因组中, 提高子代转基因鼠的阳性率。

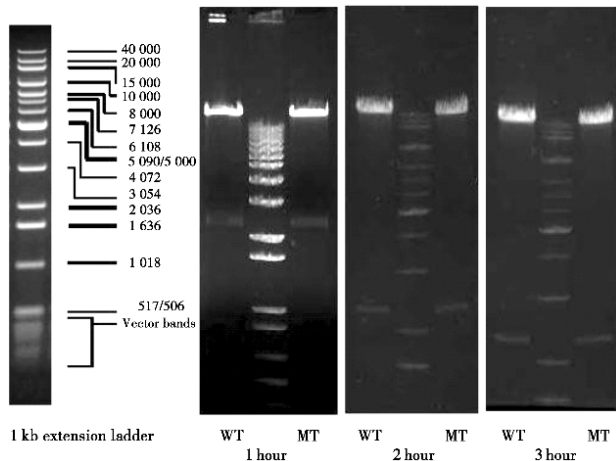


图 2 WT 为野生型, MT 为突变型, 0.5% 琼脂糖分别电泳 1、2、3 h 后成像, 目的片段约为 33 kb。

测序证实 Pro356Leu 突变: 经测序证实 Pro356 Leu (C to T at codon 356) 突变 (图 3), 测序引物序列: MYOC mut primer F: ctgagtccagaactgtggtcag

### 讨 论

利用质粒克隆进行转基因动物模型构建是目前研究基因功能的主要方法, 一般的方法是应用质粒克隆的方法, 将目的 DNA 片段克隆入载体,

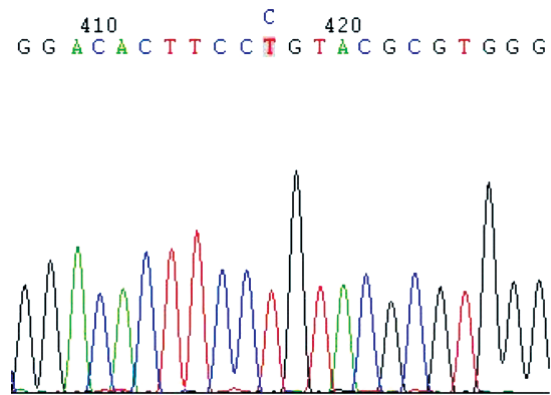


图 3 Pro356Leu 突变点 C→T

进行动物胚胎注射, 得到转基因子代。我们构建小鼠 MYOC 基因 Pro356Leu 突变型质粒, 基本策略是将 RP23-180F15 BAC clone 中的 MYOC 基因组片段, 通过红重组系统, 克隆入 pStart-K 载体。红重组酶通过 pKD46 质粒表达, 与目的基因片段 5' 或 3' 端同源的约 50 bp 的寡核苷酸, 既可以扩增 pStart-K 以得到线性 PCR 产物, 同时也可做为重组基因组 MYOC 的碱基序列。

#### 1. 小鼠 MYOC 基因组 DNA 的来源

我们选择 RP23-180F15 BAC clone 做为小鼠 MYOC 基因组 DNA 的来源, 因为 RP23-180F15 BAC clone 含有 MYOC 基因所有外显子和内含子序列和调控因子。小鼠 MYOC 基因组, 约 10 kb, 位于 chr 1: 164569300-164579824。另外, 小鼠 RP23-180F15 BAC clone 还包括 5' 端的 110 kb 序列和 3' 端的 113 kb 序列, 共 234 kb, 位点 chr 1: 164458916-164692917。

#### 2. 利用 Red 重组技术克隆大片段 DNA

我们的目的基因较大, 按常规方法很难做到, 所以我们采用了噬菌体 Red 重组系统, 该系统可以催化同源侧翼序列短的线性 DNA 片段与细菌染色体的靶基因进行同源重组。以实现外源线性 DNA 片段与细菌染色体靶基因进行同源重组, 外源线性 DNA 通常是 PCR 产物, 在它们的两翼各含有与染色体靶基因两翼同源的序列 40~60 bp。这种 Red 重组技术省去了体外 DNA 酶切、连接等步骤, 使细菌染色体靶基因的敲除与替换操作相对简单, 是新菌株构建的有力手段<sup>[9,10]</sup>。pKD46 质粒含有一个表达 red 重组酶的基因, 能够将 33 kb 的基因组 MYOC 基因从 RP23-180F15BAC clone 克隆入 pStart-K 质粒。



### 3. 超能的 pStart-K

pStart-K 虽然是一个低拷贝的载体,但它可以稳定运载大片段的 DNA 片段,这是一般的质粒不能达到的。它含有抗卡那霉素基因,3 144 bp 大小,拥有多个常见限制性内切酶位点,可以在标准的 *E.coli* 大肠杆菌中生长,最大运载量目前还不清楚。由于我们的目的基因较大,约 33 kb,所以采用 pStart-K。实验表明,pStart-k 是一个优良的可以运载大 DNA 片段基因克隆载体。

### 4. 小鼠 MYOC Pro356Leu 突变型质粒构建意义

小鼠 MYOC Pro356Leu 突变相当于人类 MYOC Pro370Leu 突变位点。常见于中国<sup>[7]</sup>、印度<sup>[11]</sup>和日本<sup>[12]</sup>等亚洲国家。具有此突变的患者发病特点为:年龄小,眼压较高,视神经损害严重,药物治疗不敏感等特点<sup>[12]</sup>,一般都要接受复合小梁切除术控制眼压<sup>[7]</sup>。我们构建小鼠 MYOC Pro356Leu 突变质粒的目的是为进一步研究此类 POAG 的发病机制奠定基础,对于今后临床早期诊断、预防及治疗方式的选择有着重大的意义。

### 参考文献

1. Thylefors B, Négrel AD, Pararajasegaram R, et al. Global data on blindness [J]. Bull World Health Organ, 1995, 73(1):115-121.
2. Quigley HA. Open-angle glaucoma [J]. N Engl J Med, 1993, 328(15):1097-1106.
3. GRANT WM. Experimental aqueous perfusion in enucleated human eyes [J]. Arch Ophthalmol, 1963, 69:783-801.
4. Ennis S, Gibson J, Griffiths H, et al. Prevalence of myocilin gene mutations in a novel UK cohort of POAG patients [J]. Eye (Lond), 2010, 24(2):328-333.
5. Fingert JH, Stone EM, Sheffield VC, et al. Myocilin glaucoma [J]. Surv Ophthalmol, 2002, 47(6):547-561.
6. WuDunn D. Genetic basis of glaucoma [J]. Curr Opin Ophthalmol, 2002, 13(2):55-60.
7. Zhuo YH, Wei YT, Bai YJ, et al. Pro370Leu MYOC gene mutation in a large Chinese family with juvenile-onset open angle glaucoma: correlation between genotype and phenotype [J]. Mol Vis, 2008, 14:1533-1539.
8. Wu S, Ying G, Wu Q, et al. A protocol for constructing gene targeting vectors: generating knockout mice for the cadherin family and beyond [J]. Nat Protoc, 2008, 3(6):1056-1076.
9. Murphy KC. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in Escherichia coli [J]. J Bacteriol, 1998, 180(8):2063-2071.
10. Murphy KC, Campellone KG, Poteete AR. PCR-mediated gene replacement in Escherichia coli [J]. Gene, 2000, 246(1-2):321-330.
11. Bhattacharjee A, Acharya M, Mukhopadhyay A, et al. Myocilin variants in Indian patients with open-angle glaucoma [J]. Arch Ophthalmol, 2007, 125(6):823-829.
12. Taniguchi F, Suzuki Y, Shirato S, et al. Clinical phenotype of a Japanese family with primary open angle glaucoma caused by a Pro370Leu mutation in the MYOC/TIGR gene [J]. Jpn J Ophthalmol, 1999, 43(2):80-84.

(收稿日期:2010-06-06 编辑:杨江瑜)