# Pygo2 转基因小鼠模型的建立及表型的初步分析

袁圆阳, 骆启聪, 李 超, 李博安*
(厦门大学 生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 主要通过建立 Pygo2 转基因小鼠的模型对其表型进行初步分析. 首先构建 K14-2× flag-Pygo 的转基因构件, 经酶切、纯化后构建 Pygo2 转基因小鼠. 出生后的仔鼠用 PCR 和 Western 方法检测基因型, 并通过进一步的免疫组化验证 Pygo2 基因的表达. PCR 检测获得 7 只转基因阳性鼠, 6 只 Western 检测为阳性. 对转基因小鼠子代的胚胎和成体进行免疫组化证明, Pygo2 基因在皮肤和乳腺组织中有过量表达. 转基因小鼠的皮肤、乳腺以及鼠尾椎骨等组织出现了异常的表型. 乳腺中有肿瘤组织的形成, 且 Pygo2 在肿瘤中有大量表达. 该模型的成功建立为进一步研究 Pygo2 的功能奠定了基础.

关键词: Pygo2; 转基因小鼠; 表型
中图分类号: Q 356.1 文献标识码: A 文章编号: 0438-0479(2010)02-0266-06

Pygopus(Pygo) 基因是 Wnt 信号经典通路的一个重要成分, 2002 年, 在研究果蝇的发育机制时被发现[1]. Pygo 是一个核蛋白, C 端为含有锌指结构的 PHD 结构域, 可以与 Bcl9/Legless 相连, 进而与 Arm/β-catenin 相连, 参与 Wnt 信号经典通路对下游基因的调控. N 端为 NHD 结构域, 目前认为主要是具有转录激活功能. 根据 C 端序列的不同, 小鼠基因中的 Pygo 基因分别被命名为 mPygo1 和 mPygo2[2-4].

在小鼠成体中, Pygo1 主要在小鼠心脏中表达, 而 Pygo2 基因则在心、肝、脑、肺、肾、肠、皮肤等组织中均有表达, 对小鼠胚胎发育的研究也表明, Pygo2 的表达范围大于 Pygo1 的表达. 目前认为 Pygo2 对于小鼠的发育具有更重要的作用. Pygo2 基因敲除的小鼠, 在胚胎发育过程中会产生多种缺陷表型, 并发生死亡, 无法通过敲除来详细研究该基因的功能[5-6]. 由于 Pygo2 参与的信号通路 Wnt 信号经典通路是发育过程中重要的信号调控通路, 建立 Pygo2 过表达的转基因小鼠模型对研究该基因的功能具有重要意义.

本研究建立了在 K14 启动子下特异性表达外源 Pygo2 基因的小鼠模型, 并对其表型进行了初步分析, 为研究 Pygo2 的功能提供了很好的实验平台.

## 1 材料与方法

### 1.1 Pygo2 基因克隆及转基因载体构建制备

以购买的 IMAGE CLONE 为模板, SP1: 5′-CCCAAGCTTGCCGCCTCGGCG-3′ 和 SP2: 5′-CCGGAATTCTCACCCATCGTTAGCAGCG-3′ 为引物(下划线分别示引入的酶切位点 *Hind* III 和 *Eco*R iv), 利用高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, PCR 产物纯化后连接到 pMD18-T 载体上, 将连接产物转化感受态 *E. coli* DH5α 后进行质粒扩增并测序.

测序结果正确的质粒, 用 *Hind* ㈣和 *Eco*R iv酶切, 回收目的片段, 并连接到 pCDNA3.1-2Xflag 载体中, 转化后质粒扩增, 筛选并测序鉴定, 得到含有 2× flag-Pygo2 的 pCDNA3.1的质粒(图 1 上图).

用 *Xho* iv和 *Eco*R iv酶切后再用 *klenow* 补平, 回收的目的片段与用 *Bam*H I 酶切并补平的 K14 载体连接(图 1 下图). 经转化、筛选、测序鉴定阳性克隆. 在 MCF10A 细胞中进行表达验证.

所得到的阳性克隆, 用 *Eco*R iv和 *Sph* iv酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 纯化回收目的片段.

### 1.2 转基因小鼠的建立

得到的含有 K14 启动子和 2× flag-Pygo2 片段的 DNA 溶液, 送至南京模式动物研究所, 构建转基因小鼠.

### 1.3 转基因小鼠 PCR 的检测

剪取出生后 3 周的小鼠尾尖 0.5~1 cm, 提取鼠尾中的DNA. 引物序列为: K14-1: 5′-CACGATACACCTGACTAGCTGGGTG-3′, K14-2: 5′-CATCACGCACAGGCTAGCGCCAACT-3′, 扩增片段长513 bp,

收稿日期: 2009-08-20
基金项目: 国家自然科学基金(30671173); 福建省自然科学基金重点项目(2008J0007)
* 通讯作者 liboan87@gmail.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

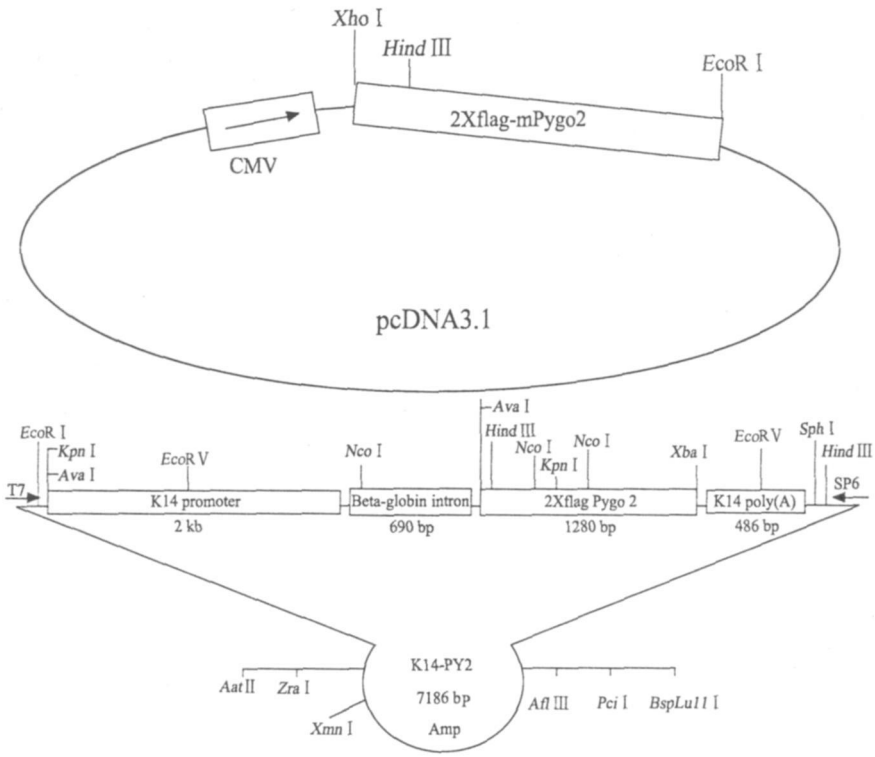


图 1　中间载体 pCDNA3.1-2Xflag-mPygo2(上图)和 K14-2Xflag-mPygo2(下图)的物理图谱

Fig. 1　Restriction maps of pCDNA3.1-2Xflag-mPygo2 and K14-2Xflag-mPygo2

PCR 反应条件为 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s→58 ℃ 30 s→72 ℃ 40 s, 35 个循环, 72 ℃延伸 10 min. 用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物.

### 1.4　转基因小鼠 Western 方法的检测

剪取转基因小鼠尾尖 1 cm 左右, 剪碎后加入蛋白裂解液进行组织匀浆, 4 ℃最大转速离心 10 min, 取上清, 用 Broadford 试剂盒(生工)测蛋白浓度后, 上样, 在 10% 的 SDS 胶中进行电泳, 300 mA 转膜 90 min, 一抗(鼠抗的 flag 抗体 1∶8 000 稀释) 4 ℃孵育过夜, 二抗(山羊抗鼠抗体 1∶5 000 稀释) 室温孵育 1 h. Millipore Immobilon Western 化学发光试剂盒显影曝光, 观察条带位置及强度.

### 1.5　转基因小鼠免疫组化方法的检测

取转基因阳性小鼠和同窝野生型小鼠的皮肤组织, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 制备石蜡切片. 石蜡切片进行 HE 染色或者使用免疫组化 SAPC 试剂盒(武汉博士德公司), 进行特异性抗体的检测. 一抗为本实验室制备的 Pygo2 兔抗, 4 ℃孵育过夜, 二抗为生物素化的山羊抗兔抗体, 室温孵育 1 h. AEC 显色, 苏木素复染, 甘油明胶封片, 显微镜下观察. 胚胎小鼠乳腺采取同样的方法检测. 成体小鼠乳腺, 直接取下后包埋于 OCT 中, 制备冰冻切片. 免疫荧光实验进行检测, 一抗为本实验室制备的 Pygo2 兔抗, 二抗为博士德公司购买的 FITC 标记的羊抗兔二抗, DAPI 复染, 甘油封片, 显微镜下观察.

### 1.6　茜素红染色

取小鼠尾巴, 去皮, 在 0.1% 的茜素红溶液中染色, 1% 氢氧化钾溶液中浸泡过夜至骨骼呈玫瑰色, 其余部分透明, 依次浸入甘油比例逐渐增高的甘油与氢氧化钾溶液的混合溶液中, 最终保存于甘油溶液.

### 1.7　传　代

转基因阳性原代小鼠与 C57BL/6 小鼠交配繁殖, 产生的子代通过 PCR 检测鉴定, 建立转基因阳性小鼠系.

## 2　结　果

### 2.1　Pygo2 转基因载体的构建及转基因小鼠的获得

我们构建的 K14-Pygo2 转基因载体, 包括 K14 的启动子, β珠蛋白(β-globin)的部分内含子, 以及 1 280 bp 的含有 flag 标签的 Pygo2 基因的全部序列. 载体构建成功后, 在 MCF10A 细胞中先进行初步表达检测, 然后送至南京模式动物研究所, 用于转基因小鼠的构建.

### 2.2　出生小鼠 PCR 的检测

共出生子代小鼠 71 只, PCR 检测阳性的仔鼠为 7

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

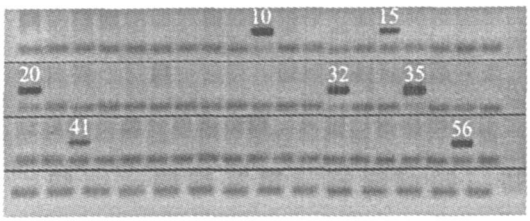


图 2 部分鼠尾 DNA PCR 检测结果
编号为小鼠编号, 编号下的条带为 PCR 阳性条带

Fig. 2 Electrophoresis results of PCR products of the transgenic mice

只, 出生阳性率为 9.86%(7/71). PCR 结果见图 2.

## 2.3 Pygo2 转基因小鼠 Western 的检测结果

进一步对转基因小鼠进行 Western 检测, 结果显示, 在转基因小鼠的仔鼠中, 除了 41# 小鼠品系中没有测出 flag 的表达外, 其余均有 flag 的表达, 分别是 10# 、15# 、20# 、32# 、35# 以及 56# (图 3).

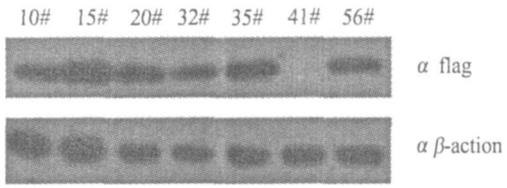


图 3 转基因小鼠 Western 检测结果

Fig. 3 Western results of the transgenic mice

## 2.4 转基因小鼠的传代情况

将在 PCR 检测得到的 7 只转基因阳性原代鼠, 按照首建雄鼠与 B6 雌鼠 1∶2 合笼, 首建雌鼠与 B6 雄鼠 1∶1 合笼的原则, 进行繁殖, 得到的子一代定义为 F1 代, 子一代与野生型 B6 小鼠的后代为 F2 代, 以此类推. 再次 PCR 检测 F1 和 F2, 41# 品系的 F2 代鼠内未发现阳性鼠, 因此此次建立的转基因小鼠中, 阳性率为 8.54%(6/71). 10# 、15# 、20# 、32# 、35# 、56# 所生的 F1 和 F2 代仔鼠中, 均有测出较高比例的阳性鼠, 稳定传代建立品系(表 1).

表 1 Pygo2 转基因小鼠品系的建立

Tab. 1 Construction of Pygo2 transgenic mice line

| 鼠系 | 性别 | 仔代 F1 代/只 | 阳性率/% | F2 代/只 | 阳性率/% |
|---|---|---|---|---|---|
| 10 | ♀ | 1 | 33.33 | 13 | 59.09 |
| 15 | ♂ | 14 | 58.33 | 17 | 62.96 |
| 20 | ♂ | 2 | 10.53 | 7 | 19.44 |
| 32 | ♂ | 2 | 40 | 5 | 55.56 |
| 35 | ♂ | 6 | 35.29 | 3 | 100 |
| 41 | ♂ | 2 | 25 | 0 | 0.00 |
| 56 | ♂ | 3 | 5.40 | 4 | 80 |

## 2.5 Pygo2 转基因小鼠免疫组化的结果分析

选取建立品系的转基因小鼠仔代小鼠, 进行免疫组化, 结果显示, 在转基因小鼠皮肤的表皮及毛囊组织以及乳腺组织中, 均有 Pygo2 基因的表达, 且与同窝的野生型小鼠相比, Pygo2 的表达量明显上升(图 4).

## 2.6 转基因小鼠的表型分析

### 2.6.1 皮肤组织的异常情况

转基因阳性小鼠中, 肉眼可以观察到部分成体的皮肤组织出现囊肿、溃烂, 取这部分皮肤进行石蜡切片, 用 HE 染色观察基本形态结构, 发现转基因的小鼠

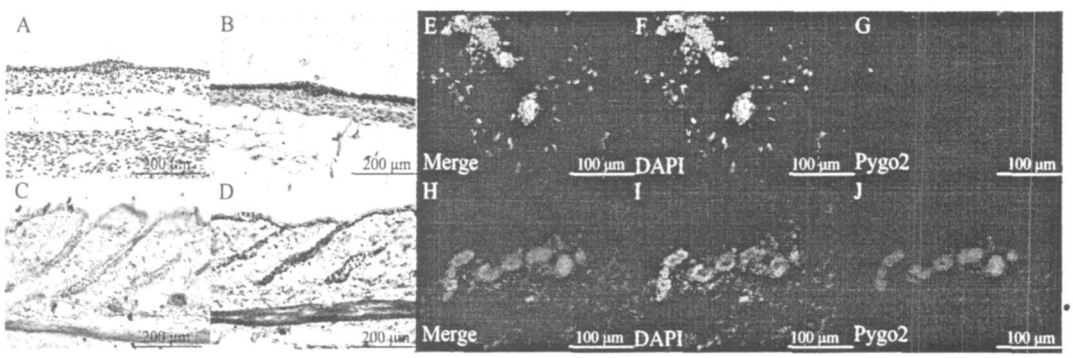


图 4 Pygo2 在转基因小鼠和野生型小鼠的皮肤和乳腺组织中的表达情况

A. 野生型小鼠 E14.5 的皮肤和乳腺组织; B. 转基因小鼠 E14.5 的皮肤和乳腺组织; C. 野生型小鼠成体 3 周的皮肤组织; D. 转基因小鼠成体 3 周的皮肤组织; E. F 和 G 图的叠加; F. 野生型小鼠成体 12 周乳腺组织 DAPI 的免疫荧光; G. 野生型小鼠成体 12 周乳腺组织 Pygo2 的免疫荧光; H. I 和 J 图的叠加; I. 转基因小鼠成体 12 周乳腺组织 DAPI 的免疫荧光; J. 转基因小鼠成体 12 周乳腺组织 Pygo2 的免疫荧光

Fig. 4 Expression of Pygo2 in transgenic mice and wild mice

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

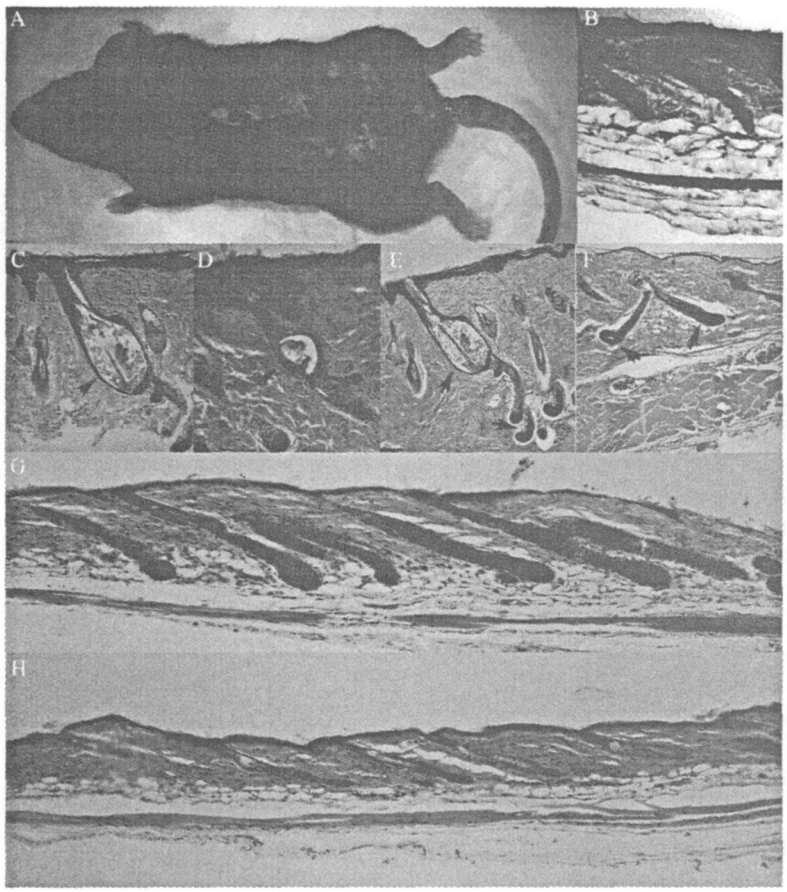


图 5　Pygo2 转基因小鼠皮肤的异常表型

A. 28 周转基因小鼠表皮多处溃烂; B. 28 周野生型小鼠毛囊结构; C、D、E 和 F. 同时期转基因小鼠不同个体中的异常毛囊结构(箭头标明囊肿、增生和毛囊生长方向异常); G. 31 天野生型小鼠的毛囊结构; H. 同时期同窝转基因型小鼠的毛囊结构

Fig. 5　Abnormal phenotype of skin in transgenic mouse

毛囊发育异常, 出现毛囊增生, 毛囊囊肿, 以及毛囊生长方向的异常. 具体分析毛囊的发育时, 发现同一年龄的转基因小鼠和野生型小鼠毛囊发育处于不同的时期. 当成体 31 d 时, 野生型小鼠的毛囊处于 anagen 时期, 而同时期转基因型的小鼠毛囊发育已经进入 telogen 或 catagen 时期. 结果如图 5 所示.

**2. 6. 2**　乳腺组织的异常情况

成体发育过程中, 转基因阳性小鼠的乳腺组织明显比野生型小鼠早熟, 以 9 周时为例, 野生型的小鼠乳腺导管上出现乳芽组织, 同时期的转基因小鼠乳腺组织中, 导管分支更为复杂, 乳芽结构也更为明显(图 6 中 A、B、C、D). 另外, 当小鼠生长至一定时间时, 部分转基因小鼠的乳腺形成乳腺肿瘤, 并且大量表达 Pygo2 蛋白, 而同窝野生型小鼠无肿瘤发生. 在我们的研究过程中, 形成的肿瘤组织均发生于乳腺部位, 且第 2、3、5 对乳腺发生的几率较大. HE 染色结果显示转基因小鼠的肿瘤主要为腺癌(Adenocarcinoma), 也存在一部分腺棘癌(Adenoacanthoma). 进一步进行免疫组化实验, 发现肿瘤组织内 Pygo2 大量表达(图 6E、F).

**2. 6. 3**　尾椎骨的异常情况

转基因小鼠的尾椎与野生型小鼠相比也有一定异常. 10 周龄时, 转基因小鼠的尾椎可以观察到空泡的出现, 以及一定形状的扭曲(图 7).

## 3　讨　论

由于小鼠的许多生化特征与人类相似, 且饲养周期相对较短, 饲养过程可控, 成本相对较低, 因此常作为基本的动物研究模型[7]. 特别是目前转基因小鼠的构建体系相对比较成熟, 转基因小鼠的构建成为研究基因体内具体功能的重要途径.

本研究通过构建 K14 启动子下的带有 flag 标签的 Pygo2质粒, 构建了 Pygo2过表达的小鼠品系, 获得7只阳性转基因小鼠, 其中 6 只稳定传代. K14 启动子可以在肝、肾、脑、舌头、皮肤及其附属器官等组织中进行广泛表达[8], 由于得到转基因小鼠后, 发现其乳腺和皮肤的表型比较明显, 因此我们首先重点观察了小鼠的

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

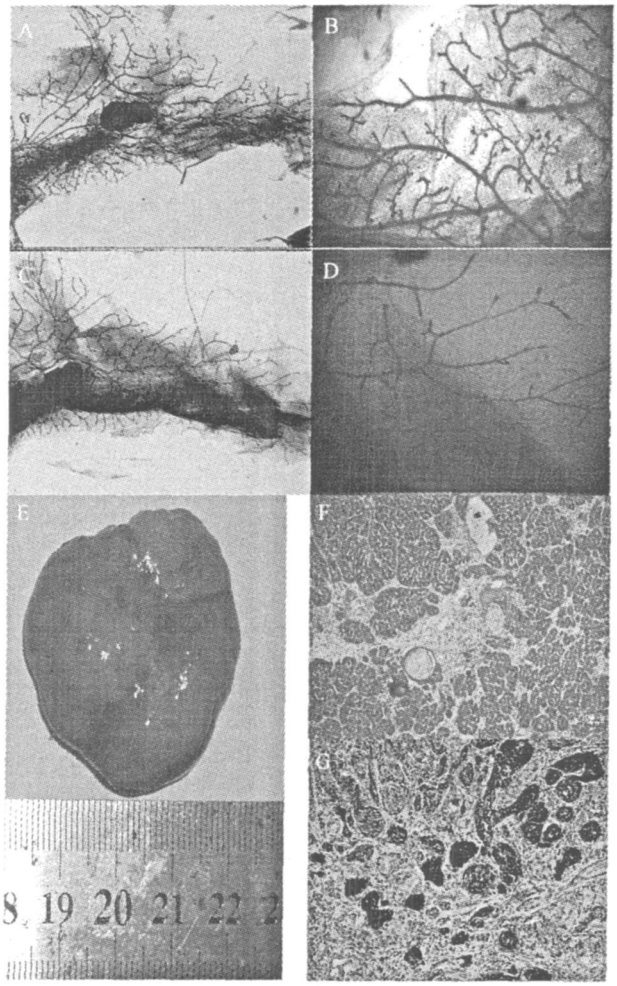


图 6 Pygo2 转基因小鼠乳腺的异常表型

A 和 B. 转基因小鼠 9 周时第 4 对乳腺组织结构; C 和 D. 同窝野生型小鼠 9 周时第 4 对乳腺组织结构; E. 转基因小鼠 65 周时第 5 对乳腺形成的肿瘤组织; F 和 G. 肿瘤组织的 HE 染色结果(F)和 Pygo2 免疫组化结果(G)

Fig. 6 Abnormal phenotype of mammary gland in transgenic mouse

乳腺和表皮组织. 转基因小鼠中乳腺和表皮的毛囊中 Pygo2 的过量表达, 引起了乳腺发育的早熟和毛囊结构的异常, 并且乳腺组织中还出现了肿瘤, 而同窝的野生型小鼠中无肿瘤组织出现. 实验中发现, 仅 Pygo2 过表达的小鼠中, 肿瘤发生的几率不高, 为 2.8% ~ 3.7%, 但如果引入 APCmin 的品系进行杂交, 肿瘤发生的几率会明显增高, 猜测 Pygo2 对于肿瘤发生发展的作用需要 APC 基因功能上的协同, 而同背景品系的野生型老鼠没有发现肿瘤. 对于转基因小鼠的其他组织, 有无表型, 目前我们还处于初步研究当中.

Pygo2 的主要功能是参与 Wnt 经典信号通路对下游基因的调控, Wnt经典信号通路已经被证明在毛囊的发育以及乳腺组织的发育过程中具有重要作用,

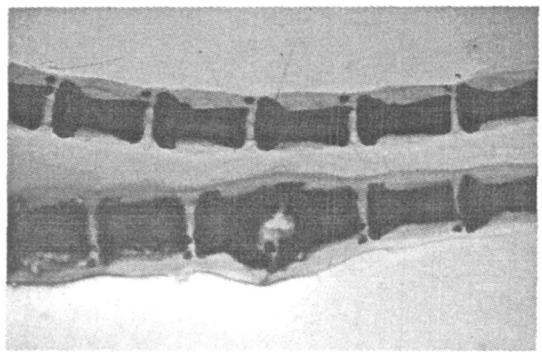

图 7 Pygo2 转基因小鼠尾椎的异常表型

图中所示为 10 周小鼠尾椎结构, 上方为野生型小鼠尾椎, 下方为转基因型小鼠尾椎

Fig. 7 Abnormal phenotype of tail bone in transgenic mouse

并且会参与肿瘤的发生和调控[9]. 因此, Pygo2 很可能在这些过程中发挥了作用, 从而产生了表型.

毛囊是皮肤重要的附属器官, 也是成体中最重要的处于不断再生状态的器官. Wnt 信号转导途径等对毛囊形态发生及生长周期具有重要的调控作用. 已经有文献报道, 如果突变 Wnt 信号通路经典途径中的β-catnin, 使其过量表达, 可以催进毛囊的生长, 甚至导致增生[10]. 在我们的研究中, 也发现了类似现象, 并且, Pygo2 的过量表达还导致了生长方向不同的毛囊的形成, 因此, 我们推测, Pygo2 基因很可能在毛囊的发生发育过程中具有重要作用.

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 已经有研究表明, Pygo2 基因敲除的小鼠胚胎中, 乳腺的发育受到抑制. Pygo2 基因特异性敲除的成体小鼠中, 乳腺的发育也受到影响, 与野生型相比, 干细胞/ 祖细胞数量有所减少, 导管分支和乳芽形成的数目上都明显减少, 虽然目前没有充分的体内的肿瘤学实验验证两者之间的联系, 但组织的发育和重建过程都已经说明了 Pygo2 和乳腺发育的关系[11]. 在我们的研究中, 过量表达 Pygo2 基因可以促进乳腺的成熟, 并产生肿瘤组织, 因此研究 Pygo2 与乳腺癌之间存在的潜在关系, 将有助于我们对乳腺癌发生和治疗的研究.

我们的转基因阳性鼠中, 通过对 F1 代仔鼠以及进一步的 F2 代仔鼠的 PCR 检测, 排除了不稳定遗传转基因的品系, 剩下的品系仔鼠阳性率超过 50%, 表明这些外源的 Pygo2 基因已经在小鼠体内整合并可以稳定遗传. 该转基因小鼠的建立为研究 Pygo2 基因的功能提供了十分有用的实验动物模型. 对转基因小鼠表型的初步分析, 将为今后研究 Pygo2 基因提供了一定的参考方向.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献:

[1] Kramps H, Peter O, Brunner E, et al. Wnt/Wingless signaling requires BCL9/Legless-mediated recruitment of Pygopus to the nuclear β-Catenin-TCF Complex [J]. Cell, 2002, 109: 47-60.

[2] Thompson B, Townsley F, Rosin-Arbesfeld R, et al. A new nuclear component of the Wnt signalling pathway [J]. Nat Cell Biol, 2002, 4: 367-373.

[3] Belenkaya T Y, Han C, Standley H J, et al. Pygopus encodes a nuclear protein essential for Wingless/Wnt signaling [J]. Development, 2002, 129: 4089-4101.

[4] Thompson B J. A complex of Armadillo, Legless, and Pygopus coactivates dTCF to activate wingless target genes [J]. Curr Biol, 2004, 14(6): 458-466.

[5] Li B, Mackay D R, Ma J, et al. Cloning and developmental expression of mouse Pygopus 2, a putative Wnt signaling component [J]. Genomics, 2004, 84: 398-405.

[6] Li B, Rhé aume C, Teng A, et al. Developmental phenotypes and reduced Wnt signaling in mice deficient for Pygopus 2[J]. Genesis, 2007, 45: 318-325.

[7] Moore K J. Utilization of mouse models in the discovery of human disease genes[J]. Drug Discov Today, 1999, 4(3): 123-128.

[8] Vassar R, Rosenberg M, Ross S, et al. Tissue-specific and differerntiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice[J]. Proc Natl Acad Sci, 1989, 86: 1563-1567.

[9] Polakis P. Wnt signaling and cancer [J]. Gene Dev, 2000, 14(15): 1837-1851.

[10] Cristina Lo, David M, Fiona M. Transient activation of β-catenin signalling in adult mouse epidermis is sufficient to induce new hair follicles but continuous activation is required to maintain hair follicle tumours[J]. Development, 2004(131): 1787-1799.

[11] Gu B, Sun P, Yuan Y, et al. Pygo2 expands mammary progenitor cells by facilitating histone H3K4 methylation [J]. J Cell Biol, 2009, 185(5): 811-826.

# Establishment and Phenotype Analysis of a Pygo2 Transgenic Mouse Model

YUAN Yuan-yang, LUO Qi-cong, LI Chao, LI Bo-an*

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Pygopus (Pygo) is a new component of Wnt signaling with conserved PHD domain, associates with Armadillo/β-catenin through the Legless/BCL9 adaptor. The objective of this study was to construct the specific expression of vector of Pygo2 and to establish a Pygo2 transgenic mouse model and check its phenotype. K14 promoter-2× flag-Pygo2 construct was constructed, linearized, purified and then injected to produce transgenic mouse. The genotypes of transgenic founders were identified by PCR and Western. 71 offspring were born and 7 were proved to be positive founder. Protein expression of Pygo2 in tissues of transgenic mice were detected by immunohistochemistry. Pygo2 transgenic mice have been established successfully, 6 in 7 viable offsprings were positive transgenic mice, the rate of positive mouse was 8.45% (6/71). In the skin and mammary gland of transgenic mice Pygo2 was over expressed. And there is abnormal phenotype in the skin, mammary gland and tail tissues in transgenic mice. Skin shows festering and abnormal phenotype of hair follicle, mammary gland shows early maturing and some transgenic mice occurs mammary gland tumor, including adenocarcinoma and adenoacanthoma. Pygo 2 protein is highly expressed in these tumor tissues. Taken together, these data indicate that the models will be contributed to the research of Pygo2 gene function.

**Key words:** Pygo2; transgenic mouse; phenotype

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net