

研究论文

前列腺素受体HA标签小鼠的鉴定

陶西西[#], 王北[#], 左胜楷^{*}, 余鹰^{*}

天津医科大学基础医学院药理学系, 天津 300070

摘要: 前列腺素是一类有重要生理活性的不饱和脂肪酸衍生物, 其通过结合特异性的受体发挥生理功能。前列腺素受体缺乏特异性的抗体, 这极大制约着前列腺素信号直接的深入解析。本文旨在鉴定及验证“人造精子”和CRISPR-Cas9联合应用构建的氨基端(-NH₂, -N)带HA标签的9种前列腺素受体小鼠。通过将向导RNA表达质粒和带标签的打靶载体质粒转入“人造精子细胞”, 筛选出含HA标签的“人造精子细胞”。进一步将标签细胞注射到小鼠卵母细胞中并移植入假孕母鼠体内, 获得标签小鼠。提取前列腺素受体HA标签小鼠的基因组DNA, 利用PCR技术检测小鼠的基因型。分离小鼠腹腔巨噬细胞, 通过Western blot方法验证带HA标签的前列腺素受体的蛋白表达情况。结果显示, 前列腺素受体HA标签小鼠能扩增出特异性的DNA条带, 并且巨噬细胞蛋白中可检测出特定HA蛋白条带的表达, 野生型小鼠则没有相应条带。综上可知, 我们成功制备了9种前列腺素受体-N-HA标签小鼠, 为进一步研究前列腺素信号在体内及体外的病理生理功能提供强有力的工具。

关键词: 前列腺素受体; HA标签; 转基因小鼠

中图分类号: Q493.9; Q78; R339.6

Identification of mouse lines with HA-tagged prostaglandin receptors

TAO Xi-Xi[#], WANG Bei[#], ZUO Sheng-Kai^{*}, YU Ying^{*}

Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Prostaglandins are a class of poly-unsaturated fatty acids-derived bioactive lipids with important physiological function by binding to specific receptors. Prostaglandin receptors lack specific antibodies, which greatly impedes the research on our understanding of the signaling of prostaglandins. The aim of this study was to identify nine mouse lines with amino terminal (-NH₂, -N) HA-tagged prostaglandin receptors by using the combination of artificial sperm and CRISPR-Cas9 technology. The guide RNA expression plasmid and labeled targeting vector plasmids were transferred into “artificial sperm cells”. The “artificial sperm cells” containing labeled proteins were selected and injected into mouse oocytes, and implanted into pseudopregnant mice to obtain labeled mice. The genomic DNA of the prostaglandin receptor tagged mice was extracted, and the genotypes of mice were detected by PCR method. We also isolated mouse peritoneal macrophages to verify the protein expression of HA-labeled prostaglandin receptor by Western blot. Specific DNA bands were amplified in prostaglandin receptor labeled mice, and specific HA protein bands were detected in macrophage proteins, which was not detected in wild type mice. In summary, we successfully constructed 9 mouse lines with HA-tagged prostaglandin receptors, providing a powerful tool for further study of the pathophysiological functions of prostaglandin signaling both *in vivo* and *in vitro*.

Key words: prostaglandin receptor; HA tag; transgenic mice

前列腺素 (prostaglandins, PGs) 是由二十碳不饱和脂肪酸花生四烯酸经过一系列酶促代谢产生的一

类具有生理活性的不饱和脂肪酸, 在炎症相关疾病的发生和发展过程以及维持心血管稳态中发挥着重

Received 2021-02-16 Accepted 2021-03-29

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81790623, 31800995).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding authors. YU Ying, Tel: +86-22-83336627; E-mail: yuying@tmu.edu.cn; ZUO Sheng-Kai, Tel: +86-22-83336627; E-mail: zuoshengkai@126.com

要的作用^[1,2]。在多种生理和病理刺激下, 细胞膜磷脂经磷脂酶 A₂ (phospholipase A₂, PLA₂) 催化释放出花生四烯酸, 花生四烯酸在前列腺素 H 合成酶 [因为具有环氧酶活性而被称作环氧化酶 (cyclooxygenase, COX), 包括 COX-1 和 COX-2] 的环氧化活性和过氧化活性的作用下, 依次生成前列腺素不稳定的中间代谢产物 PGG₂ 和 PGH₂, 之后经过不同的前列腺素合成酶的作用代谢生成各种有生物活性的前列腺素, 包括 PGI₂、PGE₂、PGF_{2α}、PGD₂ 以及血栓素 A₂ (thromboxane A₂, TxA₂)^[3]。前列腺素由于半衰期很短, 在合成后迅速释放到细胞外, 以自分泌或旁分泌的方式与它们产生部位邻近的膜受体结合而发挥作用^[4]。细胞释放的前列腺素主要是由一类叫做前列腺素转运蛋白的有机阴离子转运多肽家族进行转运。每种前列腺素都有特定的一种或几种受体, 这些受体属于跨膜 G 蛋白耦联受体家族^[5]。目前, 人和小鼠中至少已知有 9 种前列腺素受体, 除此之外还有许多 C 末端不同剪接的变异体。PGE₂ 有 4 种受体——EP1、EP2、EP3 和 EP4, 分别由 *Ptger1*、*Ptger2*、*Ptger3* 和 *Ptger4* 基因编码; PGD₂ 有 2 种受体——DP1 和 DP2, 分别由 *Ptgdr* 和 *Ptgdr2* 基因编码; PGF_{2α}、PGI₂ 和 TxA₂ 各有一种受体, 分别是 FP、IP 和 TP, 由 *Ptgifr*、*Ptgir* 和 *Tbxa2r* 基因编码。这些受体都具有七次跨膜区、一个胞外氨基端和胞内羧基端, 属于视紫红质样的 G 蛋白耦联受体。前列腺素受体同源性不高, 但结构有一定的保守区域, 根据同源性和介导的信号通路, 可以分为三大类: 舒张型的受体包括 IP、DP1、EP2 和 EP4, 这类受体通过耦联的 G_s 蛋白激活腺苷酸环化酶, 上调细胞内的 cAMP 水平; 收缩型的受体包括 EP1、FP 和 TP, 这类受体通过耦联 G_q 蛋白上调细胞内的钙离子水平; DP2 和 EP3 受体则属于抑制型的受体, 通过耦联 G_i 蛋白下调细胞内的 cAMP 水平; 由于 DP2 在有些细胞, 比如心肌细胞上, 还可以耦联 G_q 蛋白, 参与细胞内的钙离子水平调节。越来越多的研究显示, 前列腺素在细胞增殖、分化、凋亡等多种细胞活动及生殖、炎症、癌症、心血管疾病等生理和病理过程中发挥重要功能, 前列腺素受体是研发相关疾病特异性药物的重要靶标, 但由于前列腺素受体属于跨膜 G 蛋白耦联受体, 至今还没有特异性抗体, 这极大地制约着这一领域的研究^[6-8]。

CRISPR/Cas9 是细菌用来对抗入侵的病毒及外源 DNA 的一种适应性免疫防御系统, 是细菌和病

毒进行斗争产生的免疫武器^[9]。简单地讲, CRISPR/Cas9 系统通过在向导 RNA (single-guide RNA, sgRNA) 的引导下, 通过 Cas9 内切酶在双链 DNA 特定位点进行切割。近年来, 人们利用外源提供的 DNA (打靶载体), 对 CRISPR/Cas9 定点切割的基因组 DNA 进行同源重组修复, 能够高效、特异、快速地编辑基因组。通过将来源于单倍体胚胎的雄性单倍体胚胎干细胞 (androgenetic haploid embryonic stem cells, AG-haESCs) 删除 H19-DMR (differentially DNA methylated region, DMR, 在受精卵中发挥作用的甲基化修饰) 和 IG-DMR 可人为制造出 DKO (double knockout, 双敲除)-AG-haESCs, 也可称为“人造精子”, 将这个“人造精子”通过胞浆内注射技术 (intracytoplasmic AG-haESC injection, ICAHCI) 注入卵母细胞可产生可育的后代^[10,11]。近年来, 基于 CRISPR-Cas9 基因编辑技术和“人造精子”, 李劲松等科研人员实现体外编辑“人造精子”的遗传操作, 高效率地产生具有预期遗传性状的小鼠, 并启动了基因组标签计划项目 (genome tagging project, GTP), 以期实现对小鼠的每个蛋白都加上特定标签^[12]。GTP 项目的技术路线是首先利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术将特定的“标签”序列插入“人造精子细胞 (孤雄单倍体胚胎干细胞)”目标基因序列位置, 从而获得在目标基因位置带有标签的“人造精子细胞”; 然后, 通过显微操作技术把这个“人造精子细胞”注入卵母细胞中, 将这个重构的二细胞移到假孕母鼠体内, 进而获得携带标签基因的杂合子小鼠; 最后, 将杂合子小鼠交配获得带有标签的纯合子小鼠, 这样带有特定标签的特定基因便可在小鼠生长发育等生命过程中转录和翻译成带有特定标签的蛋白质。由于设计的标签具有特异性的抗体以及成熟的研究手段, 这样就能通过跟踪标签的方式来研究目标蛋白在体、实时、动态的变化。HA 标签是一段来源于人流感病毒血凝素蛋白、由 9 个氨基酸残基 (YPYDVPDYA) 组成的短序列, 分子量很小, 仅为 1.1 kDa, 对目标蛋白的空间结构影响小, 且有很好的抗体便于目标蛋白的检测、分离和纯化, 是理想的蛋白标签。因此, 我们选择将 HA 标签融合在前列腺素受体蛋白氨基端 (-NH₂, -N) 构建小鼠。

本研究通过 CRISPR/Cas9 技术对小鼠的前列腺素受体基因进行定点敲入 HA 标签, 并从基因组和蛋白水平对带有 HA 标签的前列腺素受体小鼠进行

鉴定和验证, 为后续前列腺素更直接、更深入的研究提供有力工具。

1 材料与方法

1.1 实验动物 野生型 (wild type, WT) C57BL/B6J 小鼠由天津医科大学提供。本研究实验方案遵循动物福利和伦理原则, 经过天津医科大学动物实验伦理会审查, 符合伦理规范要求。

1.2 前列腺素受体标签小鼠的构建 本研究所涉及的 9 种前列腺素受体标签小鼠都是利用 CRISPR/Cas9 技术构建, 由基因组标签计划项目 (GTP) (<http://www.sibcb.ac.cn/gtp/index.jsp>) 研发中心完成。标签小鼠在 GTP 数据库的编号如下: Ptger1-N 带 HA 标签 (Ptger1-N-HA) 小鼠 (GTP CODE: 19000508), Ptger2-N-HA 小鼠 (GTP CODE: 19000509), Ptger3-N-HA 小鼠 (GTP CODE: 19000510), Ptger4-N-HA 小鼠 (GTP CODE: 19000511), Ptgdr-N-HA 小鼠 (GTP CODE: 19000512), Ptgdr2-N-HA 小鼠 (GTP CODE: 19000513), Ptgir-N-HA 小鼠 (GTP CODE: 19000516), Ptgfr-N-HA 小鼠 (GTP CODE: 19000515), Tbx2r-N-HA 小鼠 (GTP CODE: 19000514)。

1.3 主要试剂 鼠尾裂解液成分包括: 1.0 mol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L EDTA, 10% SDS, 5.0 mol/L

NaCl; 2 × Hieff PCR Master Mix (货号: H3901030) 和琼脂糖 (货号: A7002870) 购买自翌圣生物科技 (上海) 有限公司; 6 × Protein Loading buffer (货号: N21010) 和 DNA Marker (货号: O10927) 购买自北京全式金生物技术有限公司; Super GelRed 核酸染料 (货号: IS0429) 购买自苏州宇恒生物科技有限公司; 巯基乙酸盐淀粉肉汤购买自美国 BD 公司 (货号: 211716)。

1.4 小鼠基因组 DNA 的提取 新生小鼠 10~14 天时, 剪取小鼠鼠尾, 置于 1.5 mL EP 管中, 加 500 μL 鼠尾裂解液和 3 μL 蛋白酶 K, 置于 55 °C 烘箱, 消化过夜; 之后酚-氯仿抽提获得基因组 DNA。

1.5 小鼠基因型鉴定 PCR 反应体系均为 20 μL: 2 × Taq Master Mix 10 μL, 上下游引物各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, ddH₂O 7 μL。标签小鼠的鉴定引物序列见表 1。

Ptger1、*Ptger2*、*Ptger4* 和 *Ptgfr* 基因的扩增条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s (退火温度每个循环 + 0.1 °C), 72 °C 延伸 1 min, 共 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。

Ptger3 基因的扩增条件为: 94 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 50 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。

表1. 标签小鼠的鉴定引物序列

Table 1. Tagged mice genotyping PCR primers

| Genes | Forward (5'→3') | Reverse (5'→3') | Product size (bp) |
|-------------|------------------------------|-------------------------|-------------------|
| Ptger1-N-HA | TCCGTATGATGTGCCGGATT | GTAACCTCGTAGCGACCCACG | 572 |
| Ptger1-WT | CCACTGATATGAGCCCCTGC | GTAACCTCGTAGCGACCCACG | 558 |
| Ptger2-N-HA | TCCGTATGATGTGCCGGATT | CCGATGGAGAGGTAGCGTTC | 441 |
| Ptger2-WT | ACCCTCCACCATGGACAATTTTC | CCGATGGAGAGGTAGCGTTC | 429 |
| Ptger3-N-HA | TCCGTATGATGTGCCGGATT | GCAGGGTCTGTCTCGTTGC | 618 |
| Ptger3-WT | GCCCCGCCACTATGGCTA | ACACTGTCATGGTTAGCCCG | 360 |
| Ptger4-N-HA | ACCCACCCCTACAGGTAAGT | AATCCGGCACATCATAACGGA | 500 |
| Ptger4-WT | CCATCATGTCCATCCCCGGA | ACCAGAGAGGTGGCGATGAGTAA | 853 |
| Ptgdr-N-HA | TCCGTATGATGTGCCGGATT | GAGCAGCGGTGAGGATAGTG | 738 |
| Ptgdr-WT | GGACAAGGGCTATGAACGAGTCC | GAGGTTGTACATGGCACCCA | 683 |
| Ptgdr2-N-HA | TCCGTATGATGTGCCGGATT | ACGTGGCTCGAGGCAATTAT | 699 |
| Ptgdr2-WT | TTGCCATGGCCAACGTCAC | CGTGGCTCGAGGCAATTATG | 681 |
| Ptgir-N-HA | TCCGTATGATGTGCCGGATT | CAACTACTGCTGATGCTCGCC | 600 |
| Ptgir-WT | GGGGCACGTATGAAAAACAGAAA | CGCTGGCCATCATCTTCATAGG | 582 |
| Ptgfr-N-HA | TCCGTATGATGTGCCGGATT | AAGAGTGTGACTCCCGTGAC | 705 |
| Ptgfr-WT | TTACCTCCACAACAATGTCTATGAACAG | ACGCAGGAGACGCACATTAT | 793 |
| Tbx2r-N-HA | TCCGTATGATGTGCCGGATT | GAGTGCGAATATGAGCCCGA | 622 |
| Tbx2r-WT | GGAGCCATGTGGCCCAATG | GAGCCCGAAGACCACGTCAC | 594 |

Ptgdh 和 *Ptgdh2* 基因的扩增条件为：94 °C 预变性 3 min；94 °C 变性 30 s，59 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，共 40 个循环；最后 72 °C 延伸 5 min。

Ptgir 基因的扩增条件为：94 °C 预变性 3 min；94 °C 变性 30 s，59 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，共 30 个循环；最后 72 °C 延伸 5 min。

Tbxa2r 基因的扩增条件为：94 °C 预变性 3 min；94 °C 变性 30 s，58 °C 退火 30 s，72 °C 延伸

1 min，共 37 个循环；最后 72 °C 延伸 5 min。

PCR 结束后，取 PCR 扩增产物 8 μ L，在 2% 琼脂糖凝胶中 150 V 恒压电泳约 30 min，使用 Tanon 化学发光成像仪拍照观察。

1.6 巨噬细胞分离 为了获取较多巨噬细胞，在实验前三天每只小鼠腹腔注射 2 mL 4% 巯基淀粉肉汤。在麻醉状态下，引颈处死小鼠后，腹腔注入 10 mL PBS，轻揉腹部 5 min，吸出腹腔内细胞悬液

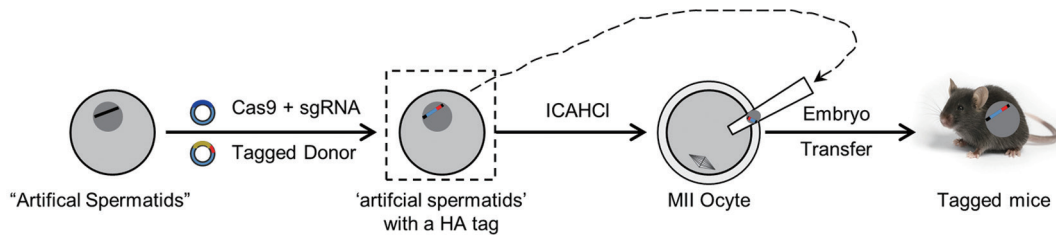


图 1. 标签小鼠的构建流程

Fig. 1. Schematic diagram of tagged mice construction. Colored bars represent specific protein-coding genes. Red bar represents the HA tag. ICAHCI, intracytoplasmic AG-haESC injection; AG-haESCs: androgenetic haploid embryonic stem cells.

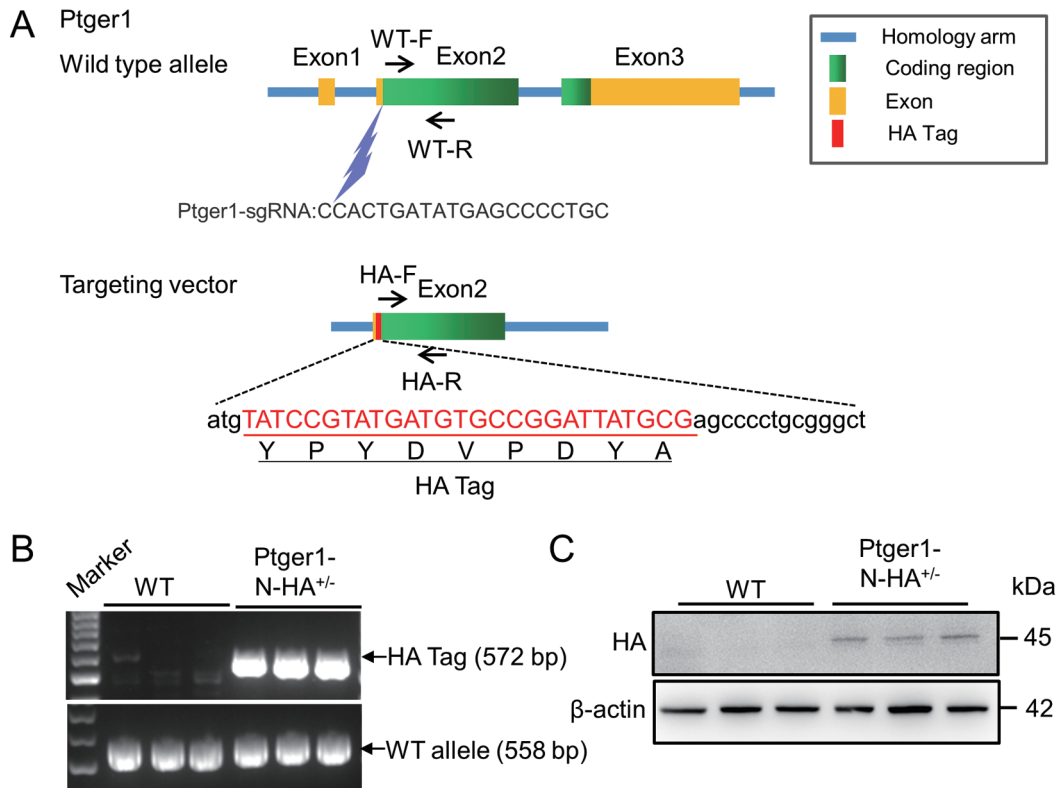


图 2. *Ptger1-N-HA* 小鼠构建及鉴定

Fig. 2. Construction and identification of *Ptger1-N-HA* mice. *A*: The schematic diagram for sgRNA targeting for the *Ptger1* gene and the construction of *Ptger1-N-HA* mice targeting vector. WT-F and WT-R, HA-F and HA-R primers were used in PCR for the genotyping. *B*: Genotyping of WT and *Ptger1-N-HA*^{+/-} mice using tail specimen DNA. *C*: HA protein detected in peritoneal macrophages of WT and *Ptger1-N-HA*^{+/-} mice by Western blot.

离心, 之后用含 10% FBS 的 DMEM 重悬沉淀, 放入细胞培养箱中贴壁 3 h, 贴壁细胞即为巨噬细胞。

1.7 Western blot 向收集到的巨噬细胞 (10^6 细胞) 中加入 100 μ L 预冷的 RIPA 裂解液 (碧云天公司), 吹散重悬后置于冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}$ C 离心后吸取上清液于新的 EP 管中。BCA 法 (Thermo Fisher 公司) 测定蛋白浓度, 将蛋白定量后加入对应体积的上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 变性 10 min。之后经 10% SDS-PAGE 电泳, 将凝胶上蛋白电转到 0.4 μ m PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶 (溶于 TBST 中) 室温封闭 2 h, 加入 anti-HA 和 anti- β -actin 一抗 (Abclonal) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 每次 7 min。HRP 耦联的兔二抗室温孵育 2 h 后, 使用 Tanon 化学发光凝胶成像仪曝光, 检测蛋白表达情况。

2 结果

2.1 标签小鼠构建流程图

标签小鼠构建流程如图 1 所示, 首先用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术将包含 HA 标签序列的打靶载体在 sgRNA 的指引下插入“人造精子细胞”目标基因序列位置, 从而获得在目标基因特定位置带有 HA 标签的“人造精子细胞”; 然后, 通过显微操作技术把这个带有 HA 标签的“人造精子细胞”注入卵母细胞中; 最后, 将这个重构的二细胞移到假孕母鼠体内, 进而获得携带标签基因的杂合子小鼠。

2.2 Ptger1-N-HA 小鼠基因型鉴定及 HA 标签检测

小鼠 *Ptger1* 基因位于 8 号常染色体上, 包含 3 个外显子 (1~2 080), 编码区 CDS (291~1 508) 在外显子 2 至外显子 3 之间, 编码 EP1 受体。根据 sgRNA 靶基因的设计原则, 选择 *Ptger1* 基因转录起始密码子附近第 2 个外显子作为 sgRNA 靶点, HA 标签插入在打靶载体的第二个外显子的起始密码子之前 (图 2A)。

首先我们用 PCR 方法鉴定了 *Ptger1*-N-HA 杂合子小鼠的基因型, 琼脂糖凝胶电泳显示, *Ptger1*-N-HA 杂合子小鼠 (*Ptger1*-N-HA^{+/-}) 有一条 572 bp 的 HA 条带和一条 558 bp 的 WT 条带, WT 小鼠只有一条 558 bp 的 WT 条带 (图 2B)。我们进一步通过 Western blot 方法检测 *Ptger1*-N-HA^{+/-} 和 WT 小鼠腹腔巨噬细胞中 HA 的表达, 结果如图 2C 所示, 在 *Ptger1*-N-HA^{+/-} 小鼠中有 HA 蛋白条带, 而 WT 小鼠中未检测到 HA 表达。以上结果说明 *Ptger1*-N-HA 标签小鼠构建成功。

2.3 Ptger2-N-HA 小鼠基因型鉴定及 HA 标签检测

小鼠 *Ptger2* 基因位于 14 号常染色体上, 包含 2 个外显子 (1~3 768), 编码区 CDS (855~1 943) 在外显子 1 至外显子 2 之间, 编码 EP2 受体。根据 sgRNA 靶基因的设计原则, 选择 *Ptger2* 基因转录起始密码子附近第 1 个外显子作为 sgRNA 靶点, HA 标签插入在打靶载体的第一个外显子的起始密码子之前 (图 3A)。

首先我们用 PCR 方法鉴定了 *Ptger2*-N-HA 杂合子小鼠的基因型, 琼脂糖凝胶电泳显示, *Ptger2*-N-HA 杂合子小鼠 (*Ptger2*-N-HA^{+/-}) 有一条 441 bp 的 HA 条带和一条 429 bp 的 WT 条带, WT 小鼠只有一条 429 bp 的 WT 条带 (图 3B)。我们进一步通过 Western blot 方法检测 *Ptger2*-N-HA^{+/-} 和 WT 小鼠腹腔巨噬细胞中 HA 的表达, 结果如图 3C 所示, 在 *Ptger2*-N-HA^{+/-} 小鼠中有 HA 蛋白条带, 而 WT 小鼠中未检测到 HA 表达。以上结果说明 *Ptger2*-N-HA 标签小鼠构建成功。

2.4 Ptger3-N-HA 小鼠基因型鉴定及 HA 标签检测

小鼠 *Ptger3* 基因位于 3 号常染色体上, 包含 4 个外显子 (1~2 120), 编码区 CDS (143~1 243) 在外显子 1 至外显子 4 之间, 编码 EP3 受体。根据 sgRNA 靶基因的设计原则, 选择 *Ptger3* 基因转录起始密码子附近第 1 个外显子作为 sgRNA 靶点, HA 标签插入在打靶载体的第一个外显子的起始密码子之前 (图 4A)。

首先我们用 PCR 方法鉴定了 *Ptger3*-N-HA 纯合子小鼠的基因型, 琼脂糖凝胶电泳显示, *Ptger3*-N-HA 纯合子小鼠 (*Ptger3*-N-HA^{+/+}) 仅有一条 618 bp 的 HA 条带, 而 WT 小鼠只有一条 360 bp 的 WT 条带 (图 4B)。我们进一步通过 Western blot 方法检测 *Ptger3*-N-HA^{+/+} 和 WT 小鼠腹腔巨噬细胞中 HA 的表达, 结果如图 4C 所示, 在 *Ptger3*-N-HA^{+/+} 小鼠中有 HA 蛋白, 而 WT 小鼠中未检测到 HA 蛋白表达。以上结果说明 *Ptger3*-N-HA 标签小鼠构建成功。

2.5 Ptger4-N-HA 小鼠基因型鉴定及 HA 标签检测

小鼠 *Ptger4* 基因位于 15 号常染色体上, 包含 3 个外显子 (1~3 327), 编码区 CDS (628~2 094) 在外显子 2 至外显子 3 之间, 编码 EP4 受体。根据 sgRNA 靶基因的设计原则, 选择 *Ptger4* 基因转录起始密码子附近第 2 个外显子作为 sgRNA 靶点, HA 标签插入在打靶载体的第二个外显子的起始密码子之前 (图 5A)。

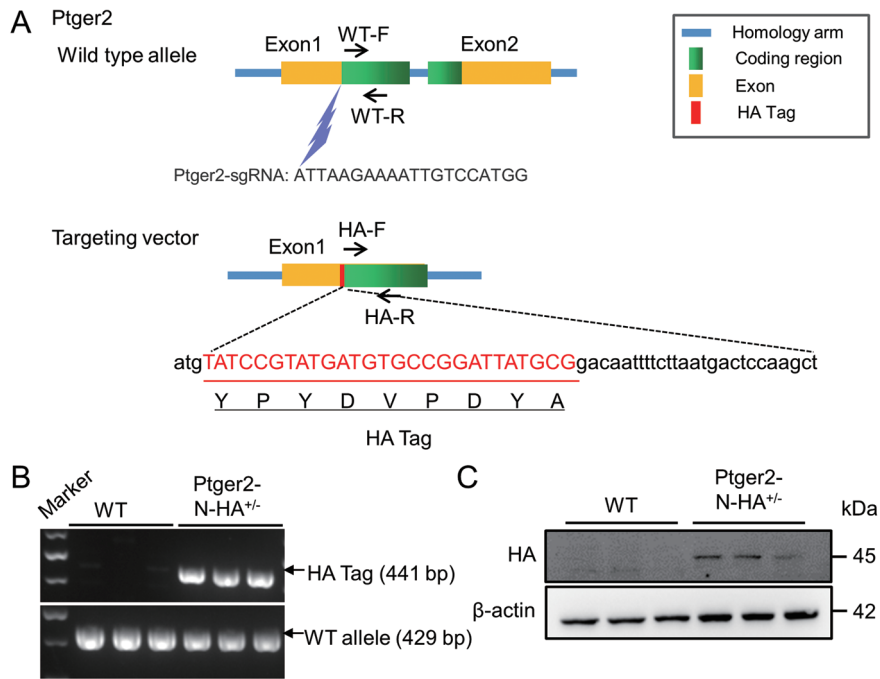


图 3. Ptger2-N-HA小鼠构建及鉴定

Fig. 3. Construction and identification of Ptger2-N-HA mice. *A*: The schematic diagram for sgRNA targeting for the *Ptger2* gene and the construction of Ptger2-N-HA mice targeting vector. WT-F and WT-R, HA-F and HA-R primers were used in PCR for the genotyping. *B*: Genotyping of WT and Ptger2-N-HA mice using tail specimen DNA. *C*: HA protein detected in peritoneal macrophages of WT and Ptger2-N-HA mice by Western blot.

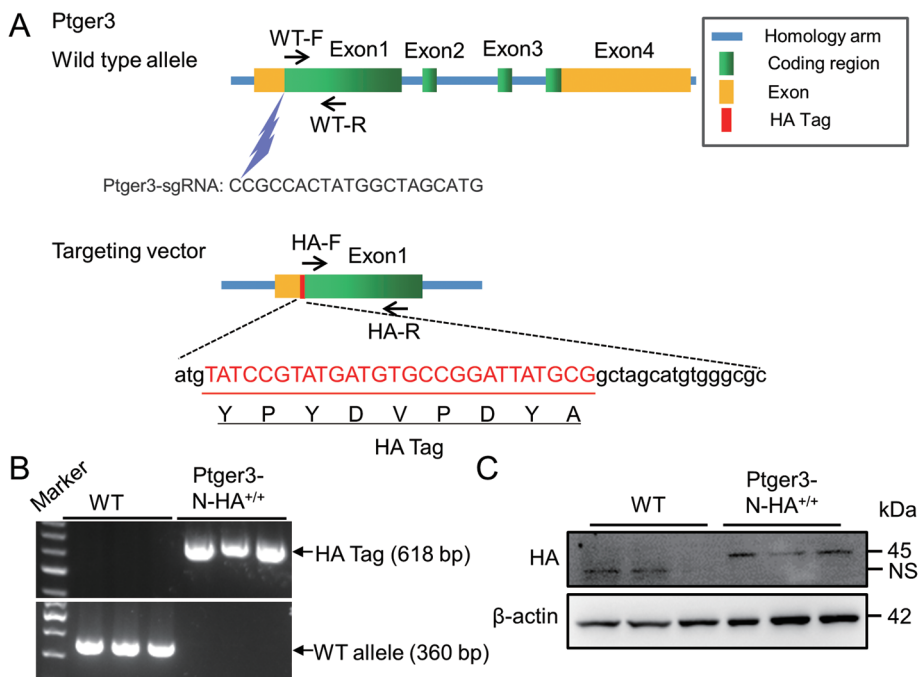


图 4. Ptger3-N-HA小鼠构建及鉴定

Fig. 4. Construction and identification of Ptger3-N-HA mice. *A*: The schematic diagram for sgRNA targeting for the *Ptger3* gene and the construction of Ptger3-N-HA mice targeting vector. WT-F and WT-R, HA-F and HA-R primers were used in PCR for the genotyping. *B*: Genotyping of WT and Ptger3-N-HA mice using tail specimen DNA. *C*: HA protein detected in peritoneal macrophages of WT and Ptger3-N-HA mice by Western blot. NS: non-specific.

首先我们用 PCR 方法鉴定了 *Ptger4*-N-HA 纯合子小鼠的基因型, 琼脂糖凝胶电泳显示, *Ptger4*-N-HA 纯合子小鼠 (*Ptger4*-N-HA^{+/+}) 仅有一条 500 bp 的 HA 条带, 而 WT 小鼠只有一条 853 bp 的 WT 条带 (图 5B)。我们进一步通过 Western blot 方法检测 *Ptger4*-N-HA^{+/+} 和 WT 小鼠腹腔巨噬细胞中 HA 的表达, 结果如图 5C 所示, 在 *Ptger4*-N-HA^{+/+} 小鼠中有 HA 蛋白, 而 WT 小鼠中未检测到 HA 蛋白表达。以上结果说明 *Ptger4*-N-HA 标签小鼠构建成功。

2.6 *Ptgdr*-N-HA 小鼠基因型鉴定及 HA 标签检测

小鼠 *Ptgdr* 基因位于 14 号常染色体上, 包含 2 个外显子 (1~3 187), 编码区 CDS (123~1 196) 在外显子 1 至外显子 2 之间, 编码 DP1 受体。根据 sgRNA 靶基因的设计原则, 选择 *Ptgdr* 基因转录起始密码子附近第 1 个外显子作为 sgRNA 靶点, HA 标签插入在打靶载体的第一个外显子的起始密码子之前 (图 6A)。

首先我们用 PCR 方法鉴定了 *Ptgdr*-N-HA 杂合子小鼠的基因型, 琼脂糖凝胶电泳显示, *Ptgdr*-N-HA 杂合子小鼠 (*Ptgdr*-N-HA^{+/-}) 有一条 738 bp 的 HA 条带和一条 683 bp 的 WT 条带, WT 小鼠只有一条 683 bp 的 WT 条带 (图 6B)。我们进一步通过 Western blot 方法检测 *Ptgdr*-N-HA^{+/-} 和 WT 小鼠腹腔巨噬细胞中 HA 的表达, 结果如图 6C 所示, 在 *Ptgdr*-N-HA^{+/-} 小鼠中有 HA 条带, 而 WT 小鼠中未检测到 HA 表达。同时, 在靶蛋白下方出现了非特异性信号, 可能与组织细胞蛋白制备或者抗体重复使用相关。上述结果说明 *Ptgdr*-N-HA 标签小鼠构建成功。

2.7 *Ptgdr2*-N-HA 小鼠基因型鉴定及 HA 标签检测

小鼠 *Ptgdr2* 基因位于 19 号常染色体上, 包含 3 个外显子 (1~2 644), 编码区 CDS (254~1 402) 只在外显子 3 之上, 编码 DP2 受体。根据 sgRNA 靶基因的设计原则, 选择 *Ptgdr2* 基因转录起始密码子附近第 3 个外显子作为 sgRNA 靶点, HA 标签插入在打靶载体的第三个外显子的起始密码子之前 (图 7A)。

首先我们用 PCR 方法鉴定了 *Ptgdr2*-N-HA 杂合子小鼠的基因型, 琼脂糖凝胶电泳显示, *Ptgdr2*-N-HA 杂合子小鼠 (*Ptgdr2*-N-HA^{+/-}) 有一条 699 bp 的 HA 条带和一条 681 bp 的 WT 条带, WT 小鼠只有一条 681 bp 的 WT 条带 (图 7B)。我们进一步通过 Western blot 方法检测 *Ptgdr2*-N-HA^{+/-} 和 WT 小鼠腹

腔巨噬细胞中 HA 的表达, 结果如图 7C 所示, 在 *Ptgdr2*-N-HA^{+/-} 小鼠中有 HA 条带, 而 WT 小鼠中未检测到 HA 表达。以上结果说明 *Ptgdr2*-N-HA 标签小鼠构建成功。

2.8 *Ptgir*-N-HA 小鼠基因型鉴定及 HA 标签检测

小鼠 *Ptgir* 基因位于 7 号常染色体上, 包含 2 个外显子 (1~3 334), 编码区 CDS (296~1 543) 在外显子 1 至外显子 2 之间, 编码 IP 受体。根据 sgRNA 靶基因的设计原则, 选择 *Ptgir* 基因转录起始密码子附近第 1 个外显子作为 sgRNA 靶点, HA 标签插入在打靶载体的第一个外显子的起始密码子之前 (图 8A)。

首先我们用 PCR 方法鉴定了 *Ptgir*-N-HA 纯合子小鼠的基因型, 琼脂糖凝胶电泳显示, *Ptgir*-N-HA 纯合子小鼠 (*Ptgir*-N-HA^{+/+}) 仅有一条 600 bp 的 HA 条带, 而 WT 小鼠只有一条 582 bp 的 WT 条带 (图 8B)。进一步的, 我们通过 Western blot 方法检测 *Ptgir*-N-HA^{+/+} 和 WT 小鼠腹腔巨噬细胞中 HA 的表达, 结果如图 8C 所示, 在 *Ptgir*-N-HA^{+/+} 小鼠中有 HA 蛋白条带, 而 WT 小鼠中未检测到 HA 蛋白表达。以上结果说明 *Ptgir*-N-HA 标签小鼠构建成功。

2.9 *Ptgfr*-N-HA 小鼠基因型鉴定及 HA 标签检测

小鼠 *Ptgfr* 基因位于 3 号常染色体上, 包含 3 个外显子 (1~4 414), 编码区 CDS (300~1 400) 在外显子 2 和外显子 3 之间, 编码 FP 受体。根据 sgRNA 靶基因的设计原则, 选择 *Ptgfr* 基因转录起始密码子附近第 2 个外显子作为 sgRNA 靶点, HA 标签插入在打靶载体的第二个外显子的起始密码子之前 (图 9A)。

首先我们用 PCR 方法鉴定了 *Ptgfr*-N-HA 杂合子小鼠的基因型, 琼脂糖凝胶电泳显示, *Ptgfr*-N-HA 杂合子小鼠 (*Ptgfr*-N-HA^{+/-}) 有一条 705 bp 的 HA 条带和一条 793 bp 的 WT 条带, WT 小鼠只有一条 793 bp 的 WT 条带 (图 9B)。我们进一步通过 Western blot 方法检测 *Ptgfr*-N-HA^{+/-} 和 WT 小鼠腹腔巨噬细胞中 HA 的表达, 结果如图 9C 所示, 在 *Ptgfr*-N-HA^{+/-} 小鼠中有 HA 条带, 而 WT 小鼠中未检测到 HA 表达。以上结果说明 *Ptgfr*-N-HA 标签小鼠构建成功。

2.10 *Tbxa2r*-N-HA 小鼠基因型鉴定及 HA 标签检测

小鼠 *Tbxa2r* 基因位于 10 号常染色体上, 包含 4 个外显子 (1~1 949), 编码区 CDS (457~1 482) 在外显子 3 和外显子 4 上, 编码 TP 受体。根据 sgRNA

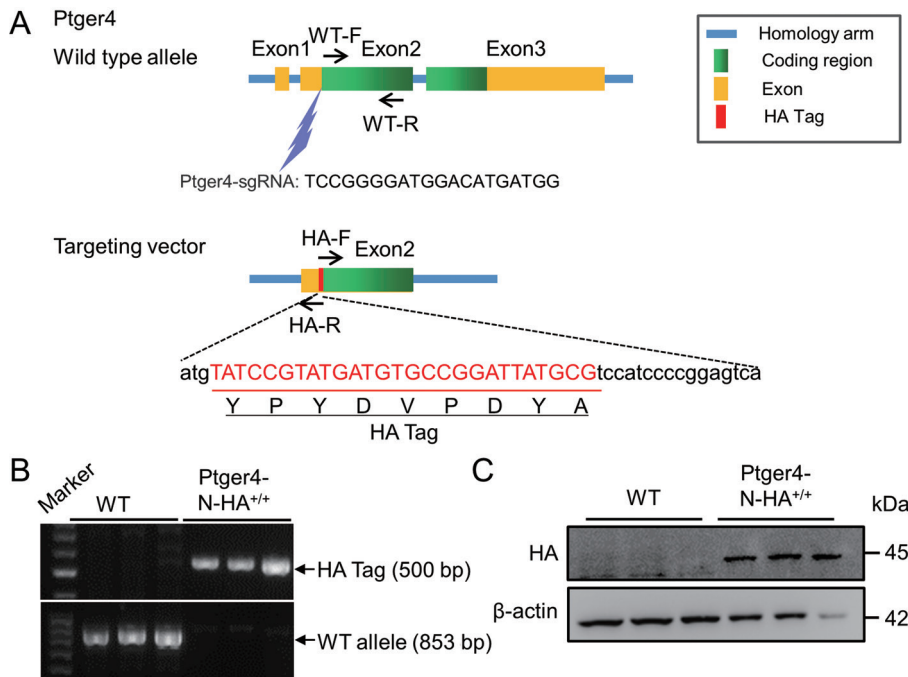


图 5. *Ptger4*-N-HA小鼠构建及鉴定

Fig. 5. Construction and identification of *Ptger4*-N-HA mice. *A*: The schematic diagram for sgRNA targeting for the *Ptger4* gene and the construction of *Ptger4*-N-HA mice targeting vector. WT-F and WT-R, HA-F and HA-R primers were used in PCR for the genotyping. *B*: Genotyping of WT and *Ptger4*-N-HA mice using tail specimen DNA. *C*: HA protein detected in peritoneal macrophages of WT and *Ptger4*-N-HA mice by Western blot.

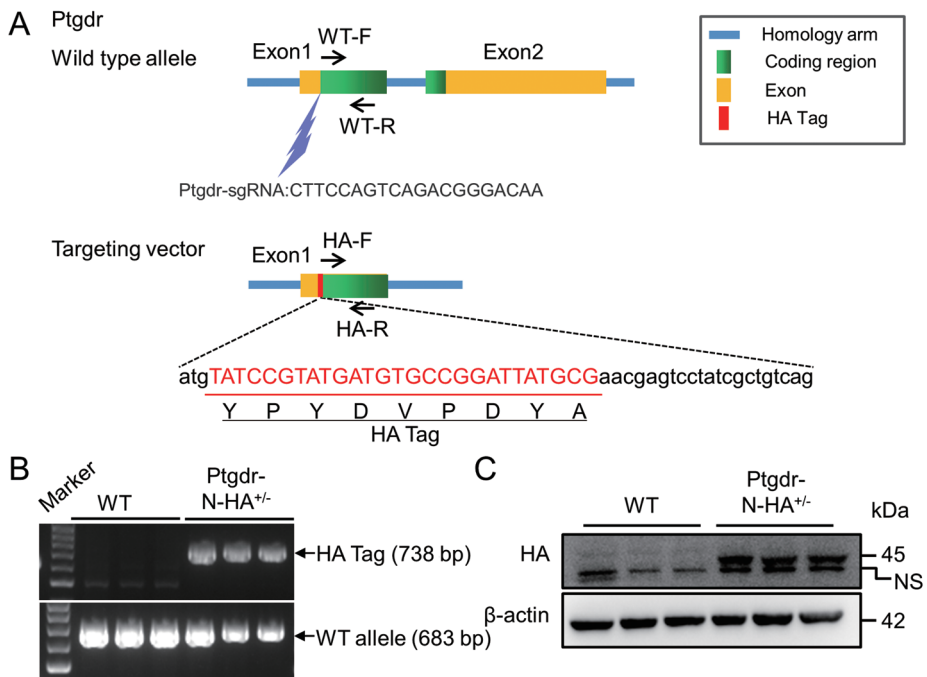


图 6. *Ptgdr*-N-HA小鼠构建及鉴定

Fig. 6. Construction and identification of *Ptgdr*-N-HA mice. *A*: The schematic diagram for sgRNA targeting for the *Ptgdr* gene and the construction of *Ptgdr*-N-HA mice targeting vector. WT-F and WT-R, HA-F and HA-R primers were used in PCR for the genotyping. *B*: Genotyping of WT and *Ptgdr*-N-HA mice using tail specimen DNA. *C*: HA protein detected in peritoneal macrophages of WT and *Ptgdr*-N-HA mice by Western blot. NS: non-specific.

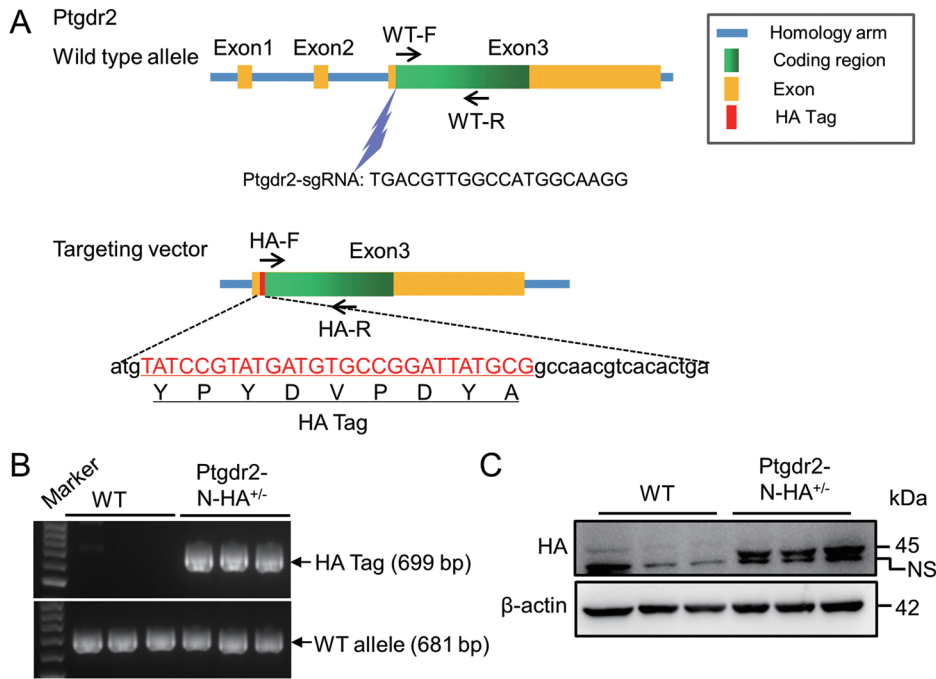


图 7. Ptgdr2-N-HA小鼠构建及鉴定

Fig. 7. Construction and identification of Ptgdr2-N-HA mice. *A*: The schematic diagram for sgRNA targeting for the *Ptgdr2* gene and the construction of Ptgdr2-N-HA mice targeting vector. WT-F and WT-R, HA-F and HA-R primers were used in PCR for the genotyping. *B*: Genotyping of WT and Ptgdr2-N-HA mice using tail specimen DNA. *C*: HA protein detected in peritoneal macrophages of WT and Ptgdr2-N-HA mice by Western blot. NS: non-specific.

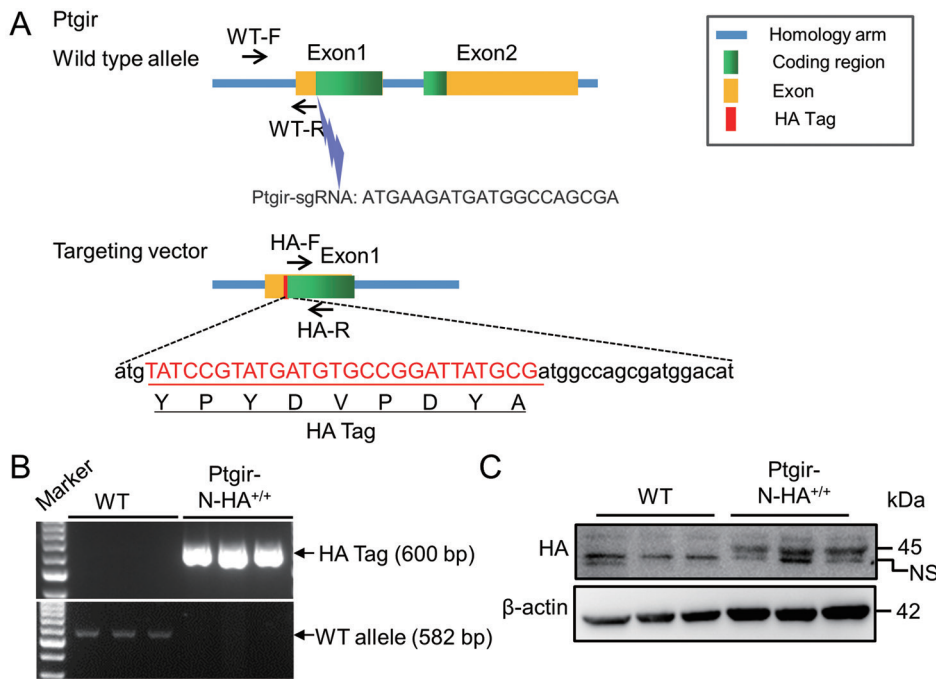


图 8. Ptgir-N-HA小鼠构建及鉴定

Fig. 8. Construction and identification of Ptgir-N-HA mice. *A*: The schematic diagram for sgRNA targeting for the *Ptgir* gene and the construction of Ptgir-N-HA mice targeting vector. WT-F and WT-R, HA-F and HA-R primers were used in PCR for the genotyping. *B*: Genotyping of WT and Ptgir-N-HA mice using tail specimen DNA. *C*: HA protein detected in peritoneal macrophages of WT and Ptgir-N-HA mice by Western blot. NS: non-specific.

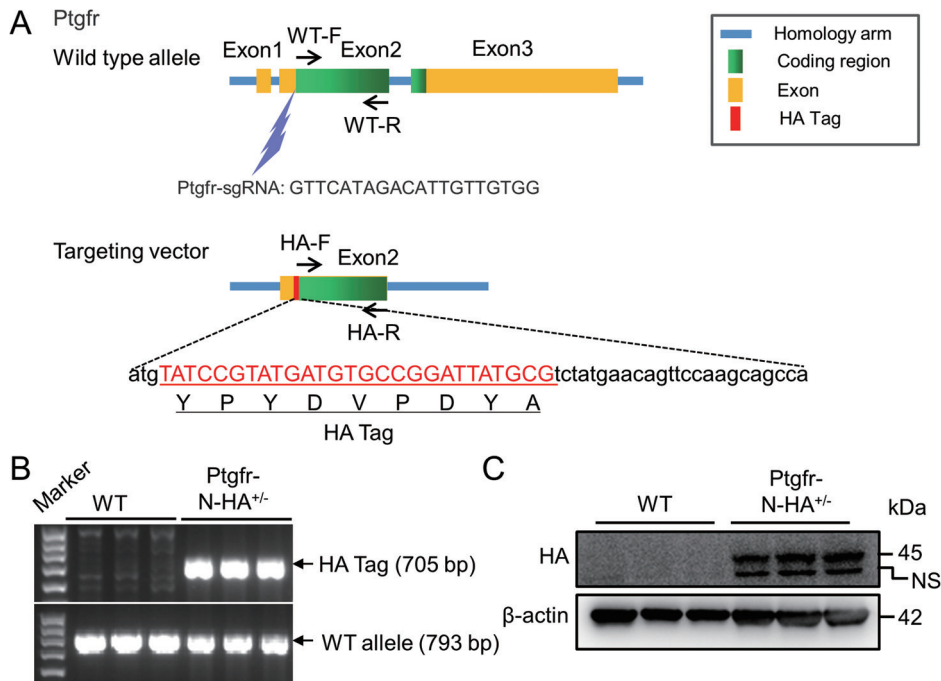


图 9. Ptgfr-N-HA小鼠构建及鉴定

Fig. 9. Construction and identification of Ptgfr-N-HA mice. *A*: The schematic diagram for sgRNA targeting for the *Ptgfr* gene and the construction of Ptgfr-N-HA mice targeting vector. WT-F and WT-R, HA-F and HA-R primers were used in PCR for the genotyping. *B*: Genotyping of WT and Ptgfr-N-HA mice using tail specimen DNA. *C*: HA protein detected in peritoneal macrophages of WT and Ptgfr-N-HA mice by Western blot. NS: non-specific.

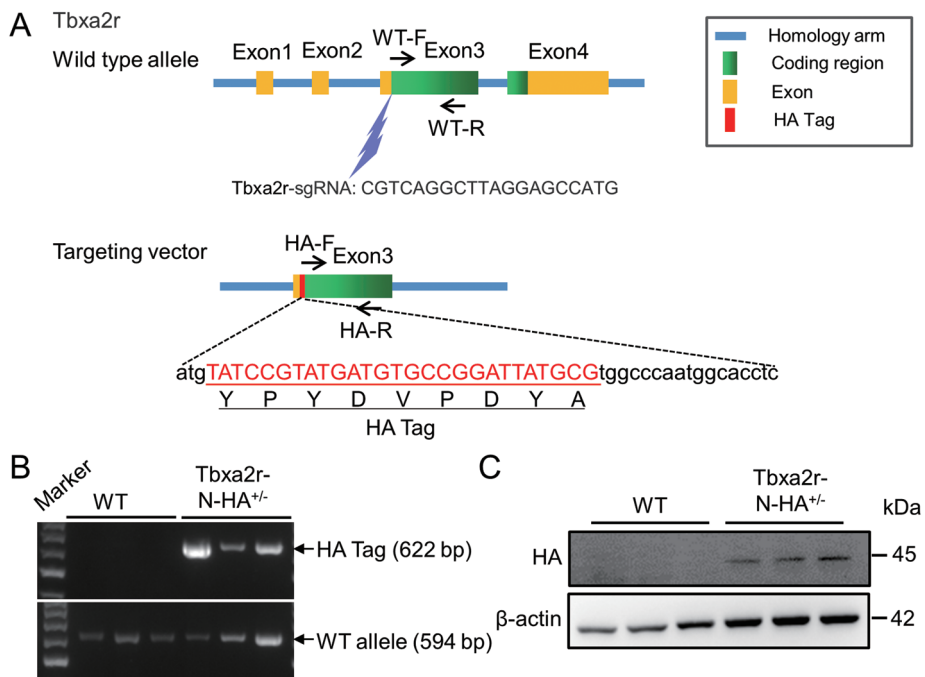


图 10. Tbx2r-N-HA小鼠构建及鉴定

Fig. 10. Construction and identification of Tbx2r-N-HA mice. *A*: The schematic diagram for sgRNA targeting for the *Tbx2r* gene and the construction of Tbx2r-N-HA mice targeting vector. WT-F and WT-R, HA-F and HA-R primers were used in PCR for the genotyping. *B*: Genotyping of WT and Tbx2r-N-HA mice using tail specimen DNA. *C*: HA protein detected in peritoneal macrophages of WT and Tbx2r-N-HA mice by Western blot.

靶基因的设计原则, 选择 *Tbxa2r* 基因第 3 个外显子作为 sgRNA 靶点, HA 标签插入在打靶载体的第三个外显子的起始密码子之前 (图 10A)。

首先我们用 PCR 方法鉴定了 *Tbxa2r*-N-HA 杂合子小鼠的基因型, 琼脂糖凝胶电泳显示, *Tbxa2r*-N-HA 杂合子小鼠 (*Tbxa2r*-N-HA^{+/-}) 有一条 622 bp 的 HA 条带和一条 594 bp 的 WT 条带, WT 小鼠只有一条 594 bp 的 WT 条带 (图 10B)。我们进一步通过 Western blot 方法检测 *Tbxa2r*-N-HA^{+/-} 和 WT 小鼠腹腔巨噬细胞中 HA 的表达, 结果如图 10C 所示, 在 *Tbxa2r*-N-HA^{+/-} 小鼠中有 HA 蛋白条带, 而 WT 小鼠中未检测到 HA 表达。以上结果说明 *Tbxa2r*-N-HA 标签小鼠构建成功。

3 讨论

采用“人造精子”和 CRISPR/Cas9 技术, 以 9 种前列腺素受体为靶点, 通过同源重组的方式将 HA 标签序列插入前列腺素受体基因蛋白编码序列之前, 构建前列腺素受体 HA 标签小鼠。本研究鉴定了这 9 种前列腺素受体标签小鼠的基因型, 并在相应小鼠的腹腔巨噬细胞中验证了 HA 蛋白的表达。

前列腺素作为一类重要的小分子脂类活性物质, 在机体的发热、疼痛、炎症、心血管以及肿瘤等多种病理及生理状况下发挥重要作用。传统的非甾体抗炎药 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 和 COX-2 选择性抑制剂在临床上的成功应用说明前列腺素相关信号是重要的药物靶标。但越来越多的临床数据表明, 长期服用 NSAIDs 或 COX-2 选择性抑制剂会明显增加心血管疾病的发生几率, 比如高血压、心力衰竭和中风等^[13, 14]。这些药物的心血管毒副作用暗示了前列腺素下游信号的功能多样性, 因此靶向特定的前列腺素合成酶或者受体, 减少或避免心血管毒副作用成为下一代 NSAIDs 药物的重要研究方向^[15, 16]。由于前列腺素受体属于 G 蛋白耦联受体, 结构的特殊性导致其一直没有好的特异性抗体, 这极大地制约了该领域的研究进程。9 种前列腺素受体在巨噬细胞中的表达相对较高^[1, 17-19], 加上巨噬细胞相对容易诱导分离, 所以我们选择在腹腔巨噬细胞中验证标签小鼠构建是否成功。

在这项研究中, 由于构建标签小鼠时间顺序不同, 有些标签小鼠 (*Ptger3*-N-HA、*Ptger4*-N-HA 和 *Ptgir*-N-HA) 已经得到纯合子, 而有些仅得到杂合子 (*Ptger1*-N-HA、*Ptger2*-N-HA、*PtgdR*-N-HA、*PtgdR2*-

N-HA、*Ptgfr*-N-HA 和 *Tbxa2r*-N-HA); 杂合子小鼠的前列腺素受体也会携带 HA 标记, Western blot 也能检测到 HA 蛋白的表达, 不影响实验结论。因此, 我们在基因型和巨噬细胞中的蛋白表达水平上验证了 HA 标签的前列腺素受体小鼠构建成功, 这在体内外阐明前列腺素信号变化提供了有力工具。比如, 我们可以在小鼠疾病模型进程中, 对 HA 标签通过 Western blot 等方法进行检测, 了解前列腺素受体在疾病进程中的变化, 为疾病进程的理解以及干预提供依据。此外, 我们可以收取带 HA 标签的前列腺素受体小鼠在生理或者病理情况下的组织进行切片, 通过对 HA 标记跟踪来显示前列腺素受体的表达; 还可以利用 HA 标签蛋白特异性的抗体进行前列腺素受体蛋白的免疫共沉淀以及纯化等, 寻找并分析与前列腺素相互作用的蛋白。前列腺素受体特异性抗体的缺乏造成了我们这项研究的局限性。未来若有 9 种前列腺素受体中的某个特异性的商业化抗体, 我们就可设计该受体和 HA 标签的免疫荧光染色共定位, 或者利用抗体通过免疫共沉淀拉下蛋白, Western blot 检测 HA 标签的表达情况等, 可以更充分地验证 HA 标签前列腺素受体蛋白的正确表达。

总之, 本研究鉴定并验证了 9 种带 HA 标签的前列腺素受体小鼠, 可以通过 HA 标签对前列腺素受体的表达、纯化以及定位等进行分析, 为前列腺素受体的相关研究提供了极大的便利。

参考文献

- 1 Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(5): 986-1000.
- 2 Lee K, Lee SH, Kim TH. The biology of prostaglandins and their role as a target for allergic airway disease therapy. *Int J Mol Sci* 2020;21(5): 1851.
- 3 Zhang J, Gong Y, Yu Y. PG F_{2α} receptor: a promising therapeutic target for cardiovascular disease. *Front Pharmacol* 2010; 1: 116.
- 4 Bygdeman M. Pharmacokinetics of prostaglandins. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003; 17(5): 707-716.
- 5 Narumiya S, FitzGerald GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest* 2001; 108(1): 25-30.
- 6 Ching M, Reader J, Fulton AM. Eicosanoids in cancer: prostaglandin E₂ receptor 4 in cancer therapeutics and immunotherapy. *Front Pharmacol* 2020; 11: 819.
- 7 Santus P, Radovanovic D. Prostaglandin D2 receptor antagonists

- in early development as potential therapeutic options for asthma. *Expert Opin Inv Drug* 2016; 25(9): 1083–1092.
- 8 Schaid MD, Wisinski JA, Kimple ME. The EP3 receptor/G_s signaling axis as a therapeutic target for diabetes and cardiovascular disease. *AAPS J* 2017; 19(5): 1276–1283.
 - 9 Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014; 346(6213): 1258096.
 - 10 Yang H, Shi L, Wang BA, Liang D, Zhong C, Liu W, Nie Y, Liu J, Zhao J, Gao X, Li D, Xu GL, Li J. Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell* 2012; 149(3): 605–617.
 - 11 Zhong C, Yin Q, Xie Z, Bai M, Dong R, Tang W, Xing YH, Zhang H, Yang S, Chen LL, Bartolomei MS, Ferguson-Smith A, Li D, Yang L, Wu Y, Li J. CRISPR-Cas9-mediated genetic screening in mice with haploid embryonic stem cells carrying a guide RNA library. *Cell Stem Cell* 2015; 17(2): 221–232.
 - 12 Jiang J, Yan M, Li D, Li J. Genome tagging project: tag every protein in mice through ‘artificial spermatids’. *Nat Sci Rev* 2019; 6(3): 394–396.
 - 13 Grosser T, Yu Y, Fitzgerald GA. Emotion recollected in tranquility: lessons learned from the COX-2 saga. *Annu Rev Med* 2010; 61: 17–33.
 - 14 Marsico F, Paolillo S, Filardi PP. NSAIDs and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2017; 18 Suppl 1: Special Issue on The State of the Art for the Practicing Cardiologist: The 2016 Conoscere E Curare Il Cuore (CCC) Proceedings from the CLI Foundation: e40–e43.
 - 15 Zhou S, Zhou Z, Ding K, Yuan Y, Loftin C, Zheng F, Zhan CG. DREAM-in-CDM approach and identification of a new generation of anti-inflammatory drugs targeting mPGES-1. *Sci Rep* 2020; 10(1): 10187.
 - 16 Li L, Sluter MN, Yu Y, Jiang J. Prostaglandin E receptors as targets for ischemic stroke: Novel evidence and molecular mechanisms of efficacy. *Pharmacol Res* 2021; 163: 105238.
 - 17 Tsai MK, Hsieh CC, Kuo HF, Yang SN, Kuo CH, Huang MY, Tsai YM, Lee MS, Hung CH. Effect of prostaglandin I2 analogs on macrophage inflammatory protein 1alpha in human monocytes via I prostanoid receptor and cyclic adenosine monophosphate. *J Investig Med* 2014; 62(2): 332–339.
 - 18 Kong D, Shen Y, Liu G, Zuo S, Ji Y, Lu A, Nakamura M, Lazarus M, Stratakis CA, Breyer RM, Yu Y. PKA regulatory I1alpha subunit is essential for PGD2-mediated resolution of inflammation. *J Exp Med* 2016; 213(10): 2209–2226.
 - 19 Maehara T, Fujimori K. Contribution of FP receptors in M1 macrophage polarization via IL-10-regulated nuclear translocation of NF-kappaB p65. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2020; 1865(5): 158654.