研究报告

利用 TALE-TFs 在小鼠成纤维细胞中激活 β-酪蛋白基因启动子表达载体

皮文辉[1],梁龙[2],唐红[1],张译元[1],郭延华[1],王立民[1],向春和[3],周平[1],刘守仁[1]

(1. 新疆生产建设兵团绵羊繁育生物技术重点实验室,新疆 石河子 832000;
2. 新疆埃乐欣药业有限公司,乌鲁木齐 830013;3. 石河子大学动物科技学院,新疆 石河子 832003)

【**摘要**】 **目的** 利用 TALE-TFs,在小鼠成纤维细胞中激活 β-酪蛋白基因启动子,为检测 β-酪蛋白基因启动子—目的基因表达框的表达结果,提供一种检测途径。**方法** 将构建的 TALE-TFs 和 β-酪蛋白基因启动子—Red 报告基因质粒电转染进入小鼠成纤维细胞,通过荧光显微镜直接观察报告基因表达情况。**结果与结论** 利用 TALE 人工转录因子,在小鼠成纤维细胞中能够激活 β-酪蛋白基因启动子表达框,为替代乳腺上皮细胞表达验证系统提供了新的途径。

【**关键词**】 TALE-TFs;小鼠成纤维细胞;β-酪蛋白基因启动子;表达调控
【**中图分类号**】Q95-33 【**文献标识码**】A 【**文章编号**】1005-4847(2014) 05-0013-04
Doi:10. 3969/j. issn. 1005-4847. 2014. 05. 003

Direct activation of expression vector with β-casein gene promoter using engineered TALE transcription factors in mouse fibroblasts

PI Wen-hui[1], LIANG Long[2], TANG Hong[1], ZHANG Yi-yuan[1], GUO Yan-hua[1], WANG Li-min[1], XIANG Chun-he[3], ZHOU Ping[1], LIU Shou-ren[1]

(1. Key Laboratory of Sheep Breeding and Development Technology of Xinjiang Production and Construction Crops, Shihezi, Xinjiang 832000, China; 2. Ailexin Pharmaceutical Co., Ltd. of Xinjiang, Urumqi 830013; 3. College of Animal Science & Technology, Shihezi University, Shihezi Xinjiang, 832003)

【**Abstract**】 **Objective** TALE-TFs were adopted to provide a new way in detection of the expression result of β-casein gene promoter-interesting gene expression cassettes in mouse fibroblasts. **Methods** TALE-TFs of eukaryotic expression plasmid and expression cassette with β-casein gene promoter and red fluorescent protein reporter gene were co-nucleofected into mouse fibroblasts by Amaxa nucleofector. **Results** and **Conclusion** β-casein gene promoter was activated by artificial TALE-TFs in the mouse fibroblasts. The way is a new expression verification system instead of mammary epithelial cells with fibroblasts.

【**Key words**】 Transcription activator-like effector-transcription factors (TALE-TFs); Mouse fibroblasts; β-casein gene promoter; Gene expression modulation

1987 年 Gordon 等[1]采用原核显微注射转基因技术,获得乳腺生物反应器小鼠模型。随着转基因技术体系的发展,乳腺生物反应器的研究也取得了相应发展。酪蛋白是哺乳动物乳中主要的蛋白组份,根据结构划分为 4 类:α_{s1}、α_{s2}、β 和 κ[2]。哺乳动物 β-酪蛋白基因在乳腺中高表达[2,3],皮肤[4]和有毒 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocytes)[5]中也表达。敲除 β-酪蛋白基因小鼠能够正常生长、繁殖和哺育后代[6]。β-酪蛋白基因启动子是构建乳腺生物反应器表达框的候选启动子。

[**基金项目**] 国家自然基金项目资助(31360276);兵团国际合作项目资助(2013BC004);新疆兵团绵羊繁育生物技术重点实验室项目资助(2013KLS01);兵团博士资金项目资助(2009JC05);兵团青年科学基金(2013CB021)。

[**作者简介**]皮文辉(1972 -),男,研究员,博士,从事动物遗传育种方面的工作。Tel:(0993)6683837; Email: wzjpwh@163.com

为证实 β-酪蛋白基因启动子驱动的表达框是否有效,Kolb 等[7](1999)采用乳腺上皮细胞。国内乳腺生物反应器研究方面,也采用乳腺上皮细胞验证乳腺特异性表达框的有效性[8]。如果能够在成纤维细胞中激活 β-酪蛋白基因启动子,检测重组表达框的表达结果,将为 β-酪蛋白基因启动子表达载体检测,提供另外一种简便的检测途径。

快速发展的转录激活样效应子(transcription activator-like effector, TALE)技术,已经成为基因组编辑(genome editing)和基因转录调控(transcriptional modulation)的有效工具[9,10]。TALE 来源于黄单胞杆菌(*Xanthomonas* sp.),TALE-DNA 结合结构域由串联重复单元组成,大部分单元含 34(33 ~ 35)个氨基酸,单元的第 12 和 13 位氨基酸高度可变,称为重复可变区(repeat-variable diresidues, RVDs)[11]。TALE 的 RVDs 识别 DNA 序列的 4 个碱基具有高度的专一性,TALE 重复单元的第 13 位氨基酸直接与 DNA 的碱基特异结合[12,13]。研究者几乎能够针对任何 DNA 靶序列,构建特异性 TALE-DNA 结合域,在靶向改变基因序列和调控基因表达方面具有广泛的用途。

TALE-DNA 结合域串联 VP64 转录激活因子,构成 TALE 转录因子(TALE transcription factors, TALE-TFs)。TALE 特异结合 DNA,VP64 同真核细胞内转录因子作用,招募 RNA 聚合酶和其它因子,稳定转录前起始复合体(transcription preinitiation complex),间接调控特定基因转录[14,15]。TALE-TFs 即能提高表达基因的转录水平,还能激活在特定细胞中不表达的基因[15-17]。本研究利用 TALE-TFs,在小鼠成纤维细胞中,成功激活 β-酪蛋白基因启动子,为检测 β-酪蛋白基因启动子—外源基因表达框表达结果,提供了一种检测方法。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物

SPF 级 KM 鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】。雌雄各 2 只,10 周龄,雄鼠体重 36g,雌鼠体重 30g,饲养在新疆农垦科学院实验动物房,自然交配后,取妊娠 18d 的 KM 孕鼠,留待实验。

1.1.2 试剂

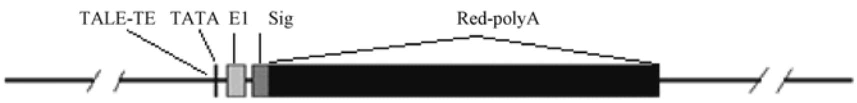
TALE Toolbox 试剂盒(Addgene, 1000000019)。Herculase II fusion polymerase 购自 Agilent Technologies;Esp3I(BsmBI)、AfeI 购自 Fermentas;BsaI-HF 购自 New England Biolabs;T7 DNA ligase 购自 Enzymatics;PlasmidSafe ATP-dependent DNase 购自 Epicentre;琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒等试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司;1 kb DNA ladder 购自北京全式金生物技术有限公司;Marker VII、DH5a 大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司;核酸染料 GELVIEW 购自北京百泰克生物技术有限公司。

1.2 小鼠 β-酪蛋白基因启动子—Red 报告基因表达载体构建

本实验室应用“Golden Gate”克隆法构建 β-酪蛋白基因启动子——红色荧光蛋白(Red)报告基因表达载体 pEGFP-N1-mE1-HR[18]。该载体表达框由小鼠 β-酪蛋白基因启动子调控序列和 TATA box、第 1 外显子、信号肽序列、Red 基因和 poly A 片段组成,形成一个完整的表达框,包含 TALE-TFs 结合位点(图 1)。

1.3 小鼠 β-酪蛋白基因 TALE-TFs 靶点设计

由于 TALEs 的可编辑属性,在目标基因序列上几乎可任意选择靶序列结合位点。对于 TALE-TFs 构建,可在启动子近端区域内选择一段 DNA 序列作为靶序列,进行 TALE 识别模块构建。为有效地防止脱靶效应,构建 TALE 的靶序列不应过短,一般建议 16 – 30 bp。本实验选择长度 19 bp,遵循 5‘端以 T 碱基起始原则(图 2)。TF1 对应的 RVDs 排列是 HD-NG-NG-NN-NN-NI-NI-NG-NG-NN-NI-NI-NN-NN-NN-NI-HD-NG;TF2 对应的 RVDs 排列是 NN-NI-NI-NN-NN-NN-NI-HD-NG-NG-NG-NG-NG-NN-NI-NN-NG-NI-NG;TF3 对应的 RVDs 排列是 NG-NN-NI-NN-NG-NI-



TALE—TF 代表 TALE-TFs 靶向位点;TATA 代表 TATA box;E1 代表 β-酪蛋白基因第一外显子;Red-polyA 代表红色荧光蛋白基因和 Sv40 polyA 序列

图 1 小鼠 β-酪蛋白基因启动子—Red 报告基因载体结构示意图

Note. TALE-TF means targeting sites of TALE-TFs; TATA for TATA box; E1 means the first exon of mouse β-casein gene; Red-polyA for red fluorescent protein gene and Sv40 polyA DNA sequence

Fig. 1 Schematic diagram of the expression vector of mouse β-casein gene promoter-Red reporter gene

NG-HD-NG-NG-NI-HD-NI-NI-NI-HD-HD-NI-HD。

TF1 tcttggaattgaagggact

TF2 tgaagggactttttgagtat

TF3 ttgagtatcttacaaaccac

tcttggaattgaagggactttttgagtatcttacaaaccacaaaattagcatgtcattaagtgcag tatatata cggt

图 2　小鼠 β-酪蛋白基因启动子的 TALE-TFs 靶点序列(方框是 TATA box 序列)

Fig. 2　Target site sequence of TALE-TFs for mouse β-casein gene promoter. Box is a TATA box sequence

1.4　TALE-TFs 构建程序

实验采用 Zhang 等的 TALE 构建程序[9,19]。经两轮 PCR 扩增和"Golden Gate"克隆反应构建 TALE-TFs 真核表达质粒。用 AfeI 酶切鉴定 TALE-TFs 构建结果。

1.5　小鼠原代成纤维细胞分离和培养

选妊娠 18 d 的 KM 孕鼠,安乐死,取出胎鼠,采用组织块培养法,培养液是 DMEM,添加 15% 胎牛血清、100 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素, 37℃、5% CO_2 饱和湿度环境培养,获得小鼠原代成纤维细胞。每隔 2 d 换培养液 1 次,5 d 传代 1 次。当成纤维细胞覆盖培养皿底部 80% ~90% 时,进行传代。用 PBS 溶液洗细胞 2 次,2% 胰蛋白酶溶液消化细胞 1 ~ 3 min。当细胞形态变圆时,加入含血清 15% 的 DMEM 培养液终止细胞消化。用移液器轻轻吹吸,至培养皿底部的细胞完全漂浮起来。将细胞悬液转移至离心管中,400 g 离心 10 min。保留细胞沉淀,弃去上清。加入 1 mL 培养液充分悬浮细胞,将该悬浮细胞转入细胞培养皿中,添加适量培养液,混匀细胞,于 37℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。

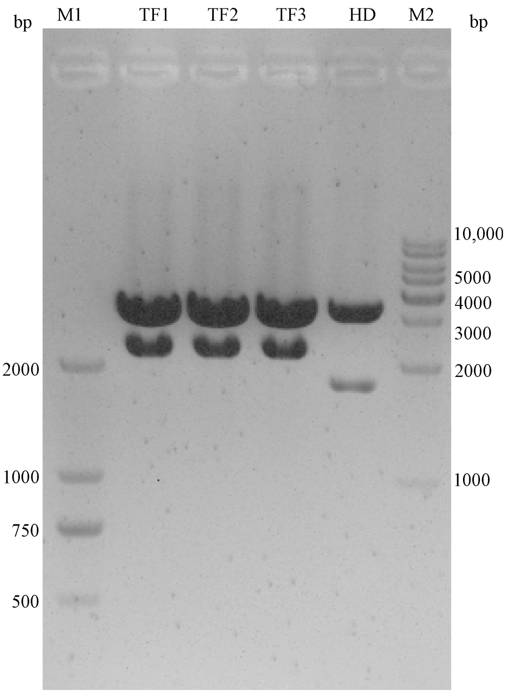
1.6　质粒电转染程序

除内毒素的 TALE-TF 和 pEGFP-N1-mE1-HR Red 报告基因表达质粒按 1∶1 质量比混合,采用 Amaxa 电转仪将质粒导入小鼠成纤维细胞。培养成纤维细胞至 90% 密度,胰酶消化。1∶50 倍混合 Nucleofection S1 和 S2 电转液,100 μL 电转液混悬 3 × 10^6 细胞,分别加入 2 μg 的 TALE-TF 和 pEGFP-N1-mE1-HR 质粒,转入电击杯中,采用 CZ-165 程序实施电转染。电转染后静止 10 min,补加 800 μL 培养液悬浮电击杯中细胞,将细胞转入培养皿中培养。电转细胞 6 h 换液 1 次,36 h 观察细胞荧光蛋白基因表达效果。

2　结果

2.1　TALE-TFs 构建酶切检测结果

AfeI 酶切鉴定构建的 TALE-TFs 真核表达质粒。正确组装的 TALE-TFs 质粒,酶切产生 DNA 条带大小是 167、2118、3435 和 3544 bp,其中 2118 bp 的 DNA 片段,是 18 个 RVD 的串联重复体(图 3)。



注:M1:Marker VII; M2:1 kb DNA ladder; TF1、TF2 和 TF3 是 AfeI 酶切的人工转录因子;HD 是 AfeI 酶切的 pTALETF_v2 (HD) 骨架载体

图 3　AfeI 酶切 TALE-TF 质粒电泳图

Note. M1:Marker VII; M2:1 kb DNA ladder; TF1, TF2 and TF3 are restriction maps of engineered TALE-TF plasmids digested with AfeI enzyme; HD is a restriction map of pTALETF_V2(HD) plasmid digested with AfeI enzyme.

Fig. 3　The elctrophoretic map of TALE-TF expression plasmids digested with restriction enzyme AfeI

AfeI 酶切构建的 TALE-TF 质粒,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。电泳运行 8 min 时,165 bp 片段清晰可见。经长时间电泳,各酶切片段分开后,很难看清 165 bp 片段。3435 bp 和 3544 bp 条带,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳很难分开,故 TALE-TFs 质粒酶切长时间电泳可见 2 条 DNA 带。

2.2　TALE-TFs 激活 pEGFP-N1-mE1-HR 红色荧光蛋白报告基因表达质粒

细胞电转染后培养 72 h,用 Laica 倒置荧光显微镜观察。分别在自然光、绿色荧光和红色荧光光源下观察细胞发光效果,确定报告基因表达结果。图 4 是 TF2 人工转录因子观察结果,显示出红色荧光蛋白报告基因表达结果。TF3 处理细胞组,有很弱的红色荧光显现,图像未列出。TF1 人工转录因子处理细胞组,未见到红色荧光蛋白表达细胞。

比较分析同一视野下 3 种不同光源成像的图片(图 4,彩插 3)。由于构建的 TALE-TFs 表达质粒中含有串联表达绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)基因,当表达 TALE-TFs 蛋白时,GFP 也表达。图片 b 和 c 比较可以看到,1,2,3 和其他标注细胞呈对应关系,这些细胞即发绿色荧光也发红光荧光;而且部分发绿色荧光的细胞未发红色荧光。只转染 TALE-TFs 对照试验,在红色荧光下观察细胞,未显现荧光,是黑暗视野;只转染 β-酪蛋白基因启动子驱动的 Red 基因质粒,在红色荧光下观察细胞,未显现红色荧光,是黑暗视野(图片未列出)。说明在成纤维细胞中,TALE-TFs 能够激活质粒中 β-酪蛋白基因启动子。

3　讨论

由于 TALE-TFs 的 RVDs 序列高度重复,实验室构建的 TALE-TFs 实施测序较难。根据 TALE-DNA 结合分子密码,针对基因组靶位点设计 TALEs,不同的 TALEs 具有不同的活性,可能与上下文依赖效应或染色体状态有关[19]。为了得到具有一定活性的 TALE-TF,构建多个 TALE-TFs,转染体外培养细胞,筛选有生物学活性的 TALE-TFs,能够解决 TALEs 的难以测序问题和靶向局限性。本实验针对小鼠 β-酪蛋白基因启动子序列,设计构建了 3 条 TALE-TFs,获得了 1 条有活性的 TALE-TF 人工转录因子。在成纤维细胞中,该 TALE-TF 能够激活 β-酪蛋白基因启动子,为在成纤维细胞中进行检测 β-酪蛋白基因启动子——外源基因表达框是否能够正常表达,提供了一条代替乳腺上皮细胞检测系统的方法。

(本文图 4 见彩插 3。)

参　考　文　献

[1] Gordon K, Lee E, Vitale JA, et al. Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk [J]. Nature Biotechnol. 1987, 5:1183 - 1187.

[2] Park YW, Juarez M, Ramos M, et al. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk [J]. Small Ruminant Res. 2007, 68(1):88 - 113.

[3] Richardson BC, Creamer LK. Comparative micelle structure. 3. The isolation and chemical characterization of caprine beta 1-casein and beta 2-casein [J]. Biohem Biophys Acta. 1974, 365(1):133 - 138.

[4] Onoda M, Inano H. Distribution of casein-like proteins in various organs of rat [J]. J Histochem Cytochem. 1997, 45(5):663 - 674.

[5] Grusby MJ, Mitchell SC, Nabavi N, et al. Casein expression in cytotoxic T lymphocytes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990, 87(17):6897 - 6901.

[6] Kumar S, Clarke AR, Hooper ML, et al. Milk composition and lactation of β-casein-deficient mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994, 91(13):6138 - 6142.

[7] Kolb AF, Ansell R, McWhir J, et al. Insertion of a foreign gene into the β-casein locus by Cre-mediated site-specific recombination [J]. Gene. 1999, 227(1):21 - 31.

[8] 多曙光, 吴应积, 罗奋华, 等. 用体外培养的牛乳腺上皮细胞检测乳腺生物反应器表达载体的方法[C]. 中国生物工程学会第四次会员代表大会暨学术讨论会论文摘要集. 2005 年.

[9] Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing [J]. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013, 14:49 - 55.

[10] Carroll D. Genome engineering with targetable nucleases [J]. Annu Rev Biochem. 2014, 83(2): In press.

[11] Mak AN, Bradley P, Cernadas RA, et al. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target [J]. Science. 2012, 335(6069):716 - 719.

[12] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors [J]. Science. 2009, 326(5959):1501.

[13] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors [J]. Science. 2009, 326(5959):1509 - 1512.

[14] Zhang F, Cong L, Lodato S, et al. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription [J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(2):149 - 153.

[15] Perez-Pinera P, Ousterout DG, Brunger JM, et al. Synergistic and tunable human gene activation by combinations of synthetic transcription factors [J]. Nat Methods. 2013, 10(3):239 - 242.

[16] Maeder ML, Linder SJ, Reyon D, et al. Robust, synergistic regulation of human gene expression using TALE activators [J]. Nat Methods, 2013, 10(3):243 - 245.

[17] Hu J, Lei Y, Wong WK, et al. Direct activation of human and mouse Oct4 genes using engineered TALE and Cas9 transcription factors [J]. Nucl Acids Res, 2014, 42(7):4375 - 4390.

[18] 梁龙, 杨华, 杨永林, 等. "Golden Gate"克隆法构建靶向载体 [J]. 中国生物工程杂志. 2013, 33(3):111 - 116.

[19] Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, et al. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering [J]. Nat Protoc. 2012, 7(1):171 - 192.

[收稿日期]　2014-05-03