

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

皮文辉<sup>1</sup>, 梁龙<sup>2</sup>, 唐红<sup>1</sup>, 张译元<sup>1</sup>, 郭延华<sup>1</sup>, 王立民<sup>1</sup>, 向春和<sup>3</sup>, 周平<sup>1</sup>, 刘守仁<sup>1</sup>

(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  $\beta$ -酪蛋白基因启动子, 为检测  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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;  $\beta$ -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 $\beta$ -casein gene promoter using engineered TALE transcription factors in mouse fibroblasts

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

(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  $\beta$ -casein gene promoter-interesting gene expression cassettes in mouse fibroblasts. **Methods** TALE-TFs of eukaryotic expression plasmid and expression cassette with  $\beta$ -casein gene promoter and red fluorescent protein reporter gene were co-nucleofected into mouse fibroblasts by Amaxa nucleofector. **Results** and **Conclusion**  $\beta$ -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;  $\beta$ -casein gene promoter; Gene expression modulation

1987年 Gordon 等<sup>[1]</sup>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:  $\alpha_{s1}$ 、 $\alpha_{s2}$ 、 $\beta$  和  $\kappa$ <sup>[2]</sup>。哺乳

动物  $\beta$ -酪蛋白基因在乳腺中高表达<sup>[2,3]</sup>, 皮肤<sup>[4]</sup>和有毒 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocytes)<sup>[5]</sup>中也表达。敲除  $\beta$ -酪蛋白基因小鼠能够正常生长、繁殖和哺育后代<sup>[6]</sup>。 $\beta$ -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】** 国家自然科学基金项目资助(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  $\beta$ -酪蛋白基因启动子驱动的表达框是否有效, Kolb 等<sup>[7]</sup> (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<sup>[8]</sup>。如果能够在成纤维细胞中激活  $\beta$ -酪蛋白基因启动子, 检测重组表达框的表达结果, 将为  $\beta$ -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<sup>[9,10]</sup>。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)<sup>[11]</sup>。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<sup>[12,13]</sup>。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物 (transcription preinitiation complex), 间接调控特定基因转录<sup>[14,15]</sup>。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<sup>[15-17]</sup>。本研究利用 TALE-TFs, 在小鼠成纤维细胞中, 成功激活  $\beta$ -酪蛋白基因启动子, 为检测  $\beta$ -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

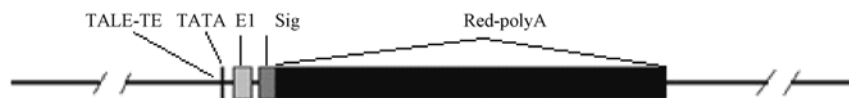
TALE Toolbox 试剂盒 (Addgene, 1000000019)。Herculase II fusion polymerase 购自 Agilent Technologies; Esp3I (BsmBI)、AfeI 购自 Fermentas; BsaI-HF 购自 New England Biolabs; T7 DNA ligase 购自 Enzymatics; PlasmidSafe ATP-dependent DNase 购自 Epicentre; 琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒等试剂购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 1 kb DNA ladder 购自北京全式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 $\beta$ -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  $\beta$ -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<sup>[18]</sup>。该载体表达框由小鼠  $\beta$ -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 $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -casein gene; Red-polyA for red fluorescent protein gene and Sv40 polyA DNA sequence

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



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色荧光; 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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<sup>[19]</sup>。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  $\beta$ -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  $\beta$ -酪蛋白基因启动子, 为在成纤维细胞中进行检测  $\beta$ -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]. *Biochem 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 PthXol 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, Schomack 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, Brunker 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