

网络出版时间:2015-06-30 13:47

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2015.08.008

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150630.1347.008.html>

高效 PiggyBac 转座酶的构建与筛选

张 龙^a, 梁明福^b, 张智英^a

(西北农林科技大学 a 动物科技学院, b 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】**构建能够定点转座的高效 PiggyBac 转座酶系统。**【方法】**以野生型 PiggyBac 转座酶为模板, 通过易错 PCR 方法随机突变转座酶基因, 构建转座酶突变库, 并将其与能够靶向识别并结合 DNA 序列的锌指蛋白(ZFP)融合表达, 构建 ZFP-PiggyBac 转座酶突变库系统。将转座酶载体突变库、转座子载体和报告载体共转到酿酒酵母 JMY1 中, 通过 Ura-5FOA 酵母筛选系统筛选高效定点作用的转座酶。**【结果】**成功构建 ZFP-PiggyBac 转座酶突变库系统, 经过 3 轮系统筛选获得 5 个高效作用的突变转座酶。**【结论】**新构建的 ZFP-PiggyBac 转座酶突变库系统具有在锌指蛋白 ZFP 靶向识别域 Rosa26BS 位点处进行高效转座的能力。

【关键词】 5FOA; 转座酶; 锌指蛋白

【中图分类号】 Q78

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)08-0001-09

Construction and screening of hyperactive PiggyBac transposases

ZHANG Long^a, LIANG Ming-fu^b, ZHANG Zhi-ying^a

(a College of Animal Science and Technology, b College of Life Sciences,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** This study aimed to construct highly efficient and site-directed PiggyBac transposase system. **【Method】** Wild-type PiggyBac transposase was used as template to construct mutant transposase library with random mutation transposase gene by error-prone PCR. Fusion expression with the ZFP protein that can recognize and bind the target DNA sequence was conducted to get ZFP-PiggyBac mutant transposase library system. Then the mutant transposase library, transposon and report vector were co-transformed into *Saccharomyces cerevisiae* JMY1. Highly efficient and site-specific transposases were screened by Ura-5FOA yeast screening system. **【Result】** Highly efficient ZFP-PiggyBac mutant transposase library was successfully constructed. After three times of screening, five hyperactively mutant transposases were obtained. **【Conclusion】** Newly constructed ZFP-PiggyBac mutant transposase library had the site-specific and efficient transposable ability at the ZFP protein recognition domain Rosa 26BS.

Key words: 5FOA; transposase; zinc finger protein

PiggyBac 转座子最初由 Fraser 等^[1]从甘蓝蚜度尺蛾基因组中获得, 为 II 型转座子, 现在已经在转基因小鼠生产^[2]、小鼠胚胎干细胞遗传学操作^[3-5]、基因诱变等基因操作^[6]、多能干细胞诱导^[7-8]等领域

得到应用。PiggyBac 转座子转座时特异性地插入 TTAA 位点^[9], 由于其来源于高等生物昆虫, 因而较其他转座子具有更高的活性^[10], 没有潜在的病毒遗传毒性, 并且可改造性较强; PiggyBac 转座子携

【收稿日期】 2014-01-21

【基金项目】 农业部“948”计划项目“高效 PiggyBac 转座酶引进及改造”(2013-Z17)

【作者简介】 张 龙(1988—), 男, 安徽淮北人, 硕士, 主要从事转基因操作研究。E-mail: zhlong990@hotmail.com

【通信作者】 张智英(1958—), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物基因组学及转基因动物生产研究。E-mail: zhangzhy@nwsuaf.edu.cn

带的外源基因片段较长,最长可以携带 150 kb 的目的片段^[11];借助转座酶,PiggyBac 转座子可以将目的基因从宿主精确切割敲除,且不会使宿主染色体发生重排。这些优势使得 PiggyBac 转座子在转基因操作中获得了广泛的应用。但是,由于 PiggyBac 转座子在转座时不易控制,易产生随机整合且转座效率较低,从而限制了 PiggyBac 转座子的进一步应用。

锌指蛋白(ZFP)存在于多种真核生物中,用于识别靶位点的 DNA 结合域,其能够以序列特异性的方式与 DNA 结合^[12-13],通过其 α 螺旋特异性地插入到 DNA 双螺旋大沟并与 DNA 结合^[14],对基因调控起重要作用。由于 PiggyBac 转座子本身不会自发转座,其作用机制是由 PiggyBac 转座酶的切割作用而完成转座^[15],因此通过提高转座酶活性可以提高转座效率^[16-17],解决其转座效率低及不易受控的缺点。本研究通过对野生型 PiggyBac 转座酶进行随机突变,同时在转座酶 N 端融合表达能够特异性识别 DNA 序列的 ZFP,以期获得能够特异性识别靶位点的高效转座酶,为进一步提高外源基因在转基因操作中的位点特异性和安全性提供可能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒 载体构建所需质粒 JMB84-Ura、JMB405、JMB440、pst1374-trans、pst1374-ZFP、JMB440-ZFP-WTtrans、JMB1022-3TR-5TR 及大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、酿酒酵母菌株 JMY1,均由西北农林科技大学动物科技学院基因组学实验室保存。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶,购自 NEB 公司;pfu 高保真酶、easy Taq DNA 聚合酶、dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP,购自北京全式金生物技术有限公司;胶回收试剂盒,购自威格拉斯生物技术(北京)有限公司;质粒提取试剂盒、酵母提取试剂盒,购自 Omega 公司;核酸共沉剂,购自大连宝生物工程有限公司;5FOA,由宝鑫生物有限公司代购;其他试剂均为国产分析纯或更高级别试剂。引物由上海博尚生物技术公司合成。序列测定由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

1.2 转座子载体 JMB405-3TR-5TR 的构建

根据载体 JMB1022-3TR-5TR 上转座子序列,利用 primer 5.0 软件设计引物,上游引物 3TR-F 为:5'-GCGAGATCTTTAACCCTAGAAAGATA-ATCA-3',下游引物 5TR-R 为:5'-GCGCTCGAG-

TTAACCCTAGAAAGATAGTCT-3',3TR-F 和 5TR-R 中下划线部分分别为 Bgl II 和 Xho I 酶切位点。以 JMB1022-3TR-5TR 质粒为模板,采用降落式 PCR 扩增转座子序列,反应体系为:模板 2.0 μ L,引物 3TR-F 和 5TR-R 各 0.5 μ L,dNTPs 4.0 μ L,10 $\times$ Buffer 5.0 μ L,easy Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L,ddH₂O 37.5 μ L。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 反应 30 s,68 $^{\circ}$ C 反应 30 s,72 $^{\circ}$ C 反应 30 s,16 个循环,每个循环退火温度减低 1 $^{\circ}$ C;94 $^{\circ}$ C 反应 30 s,52 $^{\circ}$ C 反应 30 s,72 $^{\circ}$ C 反应 30 s,25 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 PCR 产物和 JMB405 载体分别经 BamH I 和 Xho I 双酶切并纯化回收后,用 T4 DNA 连接酶将其骨架与两端带有 Bgl II 和 Xho I 酶切位点的双链 DNA 片段于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜后,转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布于含 100 mg/L 氨苄青霉素(Amp)的 LB 固体培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,挑取单克隆,接种于 2 mL 含 100 mg/L Amp 的 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 10 h,提取质粒,经 Xho I 和 Sma I 双酶切鉴定,酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,将构建正确的转座子载体命名为 JMB405-3TR-5TR。

1.3 报告载体 JMB84-Rosa26BS-Ura 的构建

Rosa26BS 为锌指蛋白(ZFP)特异性识别位点,其碱基序列为:5'-GCAACTCCAGTCTTTCTTGGGCGGGAGTC-3',根据该序列利用 primer 5.0 软件分别设计包含 Rosa26BS 锌指蛋白特异性识别位点的上游引物 JMB84-F1、JMB84-F2 和下游引物 JMB84-R、JMB84-F1 序列为:5'-GCAACTCCAGTCTTTCTTGGGCGGGAGTCATGTCGAAAGCTACATATAAG-3',JMB84-F2 序列为:5'-AAC CTGCAG GAAACGAAGATAAATCATGTGCAAC-TCCAGTCTTTCTTGG-3',JMB84-R 序列为:5'-AGTGGATCCGAATTCGATATCAAGCTTATC-3',JMB84-F2 和 JMB84-R 序列中的下划线部分分别为 Pst I 和 BamH I 酶切位点。通过 2 步 PCR 扩增 Rosa26BS 位点,以 JMB84-Ura 为模板,JMB84-F1、JMB84-R 为引物进行第 1 步 PCR 扩增,PCR 反应体系为:模板 2.0 μ L,引物各 0.5 μ L,dNTPs 4.0 μ L,10 $\times$ Buffer 5.0 μ L,easy Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L,ddH₂O 37.5 μ L。PCR 程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 反应 30 s,68 $^{\circ}$ C 反应 30 s,72 $^{\circ}$ C 反应 2 min,16 个循环,每个循环退火温度减低 1 $^{\circ}$ C;94 $^{\circ}$ C 反应 30 s,52 $^{\circ}$ C 反应 30 s,72 $^{\circ}$ C 反应 2 min,25 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。再以第 1 步 PCR 产物为模

板,JMB84-F2、JMB84-R 为引物进行第 2 步 PCR 扩增,反应体系和程序同第 1 步 PCR。分别将第 2 步 PCR 产物和 JMB84-Ura 载体用 *Pst* I 和 *Bam*H I 进行酶切并连接、转化得到 JMB84-Rosa26BS-Ura 报告载体,使用 *Pst* I 和 *Bam*H I 双酶切 JMB84-Rosa26BS-Ura 报告载体对其进行鉴定,酶切产物用 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.4 JMB440-ZFP-trans 转座酶载体突变库的构建

1.4.1 JMB440-ZFP 载体的构建 于 37 ℃下用 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切 Pst1374-ZFP 和 JMB440 载体,酶切时间 3 h,将得到的 ZFP 序列连接到骨架载体 JMB440 中,获得 JMB440-ZFP 载体,使用 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切 JMB440-ZFP 载体进行鉴定,酶切产物用 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测。

表 1 易错 PCR 反应体系的组成

Table 1 Composition of error-prone PCR reaction system														μL
反应物 Reactant	体系 Volume													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
10×Buffer	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
10 pmol/ μL Primer F/R	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
200 ng/ μL pst1374-trans	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
easy <i>Taq</i>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
1 pmol/ μL MgCl_2	1.50	2.75	3.80	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
1 pmol/ μL MnCl_2	0	0	0	0	0.20	0.30	0.50	0.75	1.00	0	0	0	0	0
dNTPs	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	A	B	C	D	4.00
ddH ₂ O	35.35	32.85	30.75	28.35	28.25	28.20	28.10	28.00	27.85	22.35	22.35	22.35	22.35	26.35

注:A、B、C 和 D 4 组中 dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP 的体积分别为 4,1,2,3;3,4,1,2;2,3,4,1;1,2,3,4 μL。
Note: The volumes of dATP, dTTP, dGTP and dCTP in A, B, C and D respectively are 4, 1, 2, 3; 3, 4, 1, 2; 2, 3, 4, 1; 1, 2, 3, 4 μL, respectively.

用 1%琼脂糖凝胶电泳对 14 个 PCR 反应产物进行检测,回收能够扩增出目的条带的 PCR 产物,用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Bam*H I 对胶回收后的 PCR 产物和 JMB440-ZFP 载体进行双酶切。根据 PCR 产物(trans)和 JMB440-ZFP 的浓度,设计不同

1.4.2 易错 PCR 方法对突变转座酶的扩增 为增加转座酶突变库的多样性,通过改变 PCR 反应体系中 Mg²⁺、Mn²⁺ 和 dNTPs 的浓度,使用易错 PCR 方法随机突变野生型 PiggyBac 转座酶基因序列,以期获得有活性的高效转座酶。根据野生型 PiggyBac 转座酶基因序列,利用 primer 5.0 软件设计引物 PB-transF 和 PB-transR, PB-transF 序列为: 5'-GGTGGATCCATGGGTAGTTCTTTAG-3', PB-transR 序列为: 5'-GCGCTCGAGGTCAGAAA-CAACTTTGGCAC-3',引物 PB-transF 和 PB-transR 下划线部分分别为 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。易错 PCR 反应体系如表 1 所示,PCR 反应程序同 1.2。用 1%琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测。

的连接体系(表 2),通过化学转化方法寻找最佳连接体系后(转化后对照组培养板中没有单克隆菌落或较少,而试验组培养板中单克隆菌落较多的连接体系为最佳连接体系),依据最佳连接体系进行大量连接。

表 2 基于化学转化方法寻找最佳连接体系的组成

Table 2 Best ligation system composition by chemical transformation					μL
反应物 Reactant	连接体系 1 Ligation 1	连接体系 2 Ligation 2	连接体系 3 Ligation 3	对照 Control	
40 ng/μL trans	1.0	1.0	1.0	0	
100 ng/μL JMB440-ZFP	3.0	2.0	1.0	1.0	
Buffer	1.0	1.0	1.0	1.0	
T4 DNA 连接酶 T4 DNA ligase	0.5	0.5	0.5	0.5	
ddH ₂ O	4.5	5.5	6.5	7.5	

1.4.3 连接产物的纯化 采用核酸共沉淀法纯化连接产物,去除盐离子,纯化方法如下:取 200 μL 连接产物,于 65 ℃下灭活 20 min;向连接体系中加 4 μL DNAmate、1/10 体积(20 μL)的 CH₃COONa 和 2.5 倍体积的预冷无水乙醇;4 ℃、12 000 r/min 离

心 15 min;加 500 μL 预冷的体积分数 70%乙醇漂洗 2 遍,12 000 r/min 离心 5 min;干燥,加入 30 μL 去离子水溶解。
1.4.4 纯化连接产物的电转化及突变库的获得 将纯化的连接产物电转入大肠杆菌 DH5α 感受态细

胞中(电转化参数为 2 500 V,200 Ω,25 μF(Bio-Rad Gene Pulser)),将电转化菌液涂布于含 Amp (100 mg/L)的 LB 平板上,于次日将平板上长出的全部单克隆用含 Amp (100 mg/L)的 LB 培养液冲洗干净,150 r/min、37 ℃ 摇菌 4 h,提取质粒,得到 JMB440-ZFP-trans 转座酶突变库,使用 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定转座酶突变库,酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.5 酵母转化与高效转座酶的筛选

1.5.1 酵母转化 根据 Gietz 等^[18]报道的 LiAc 酵母转化方法,将 JMB440-ZFP-trans 转座酶突变库(带 Leu 标签)、JMB405-3TR-5TR(带 Trp 标签)和 JMB84-Rosa26BS-Ura(带 Ura 标签)以不同组合方式转化到酿酒酵母 JMY1 中,利用 Ura-5FOA 酵母筛选系统^[19-20]进行转座酶筛选。

1.5.2 高效转座酶的筛选 由于 Rosa26BS 序列位于 *Ura* 基因上游,ZFP 蛋白可以特异性地识别并

结合在此位置,当 ZFP 与 Rosa26BS 序列结合后,与 ZFP 融合表达的 PiggyBac 转座酶的切割范围被限定于 Rosa26BS 位点附近的 TTAA 位点处。当 PiggyBac 转座子插入并阻断 *Ura* 基因的表达,*Ura* 基因不表达时不会产生酶促反应,在含有 0.5 mg/mL 5FOA 培养基中不会发生毒性反应,酵母可以生长。当 PiggyBac 转座子未特异性地插入 *Ura* 基因序列中的 TTAA 位点时,*Ura* 基因不会被阻断而表达,则会发生酶促反应,在含有 0.5 mg/mL 5FOA 培养基中会发生毒性反应,导致酵母死亡。

(1)第 1 次筛选。将 JMB84-Rosa26BS-Ura 载体作为阳性对照组,JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR 作为阴性对照组,JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans 作为试验组,分别在含不同质量浓度(0,0.2,0.5,0.7 mg/mL) 5FOA 培养基中进行筛选。筛选体系如表 3 所示。

表 3 高效 PiggyBac 转座酶的第 1 次筛选体系
Table 3 First round screening of hyperactive PiggyBac transposases

试验序号 Test number	载体 Vector	5FOA/ (mg · mL ⁻¹)	培养基中氨基酸种类 Amino acid in medium
1-1	JMB84-Rosa26BS-Ura	0	Leu+His+Trp
1-2	JMB84-Rosa26BS-Ura	0.2	Leu+His+Trp
1-3	JMB84-Rosa26BS-Ura	0.5	Leu+His+Trp
1-4	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR	0	<i>Ura</i> +His+Leu
1-5	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR	0.2	<i>Ura</i> +His+Leu
1-6	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR	0.5	<i>Ura</i> +His+Leu
1-7	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR	0.7	<i>Ura</i> +His+Leu
1-8	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans	0	<i>Ura</i> +His
1-9	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans	0.2	<i>Ura</i> +His
1-10	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans	0.5	<i>Ura</i> +His
1-11	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans	0.7	<i>Ura</i> +His

(2)第 2 次筛选。根据第 1 次筛选结果,从筛选平板 1-10、1-11 中分别挑取 10 个克隆,分别标记为 10-1~10-10 和 11-1~11-10,在 SD(-Leu-Trp-Ura)酵母培养基中扩大培养至 OD₆₀₀=1,使用 Omega 公司酵母提取试剂盒提取酵母质粒。将提取的酵母质粒转化大肠杆菌感受态细胞 DH5α,在含 Amp (100 mg/L)抗性的 LB 固体平板上筛选。每个平板挑取 10 个阳性克隆,提取质粒,用 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切筛选 JMB440-ZFP-trans 载体,获得 19 个阳性

质粒(10-3-5、11-8-6、10-1-8、10-2-7、10-4-3、10-5-6、10-6-5、10-7-7、10-8-2、10-9-2、10-10-8、11-1-8、11-2-1、11-3-5、11-10-4、11-5-1、11-6-4、11-7-8、11-9-2)。

分别将第 1 轮筛选出的 19 个 JMB440-ZFP-trans 转座酶载体与 JMB405-3TR-5TR 和 JMB84-Rosa26BS-Ura 共同转化到酿酒酵母 JMY1 中,在含 0.5 mg/mL 5FOA 的培养基中筛选,转化组合如表 4 所示。

表 4 高效 PiggyBac 转座酶的第 2 次筛选体系
Table 4 Second round screening of hyperactive PiggyBac transposases

试验序号 Test number	转化载体 Vector	5FOA/ (mg · mL ⁻¹)	培养基中氨基酸种类 Amino acid in medium
2-1	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (10-3-5)	0.5	<i>Ura</i> +His
2-2	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (11-8-6)	0.5	<i>Ura</i> +His

续表 4 Continued table 4

试验序号 Test number	转化载体 Vector	5FOA/ (mg · mL ⁻¹)	培养基中氨基酸种类 Amino acid in medium
2-3	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (10-1-8)	0.5	Ura + His
2-4	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (10-2-7)	0.5	Ura + His
2-5	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (10-4-3)	0.5	Ura + His
2-6	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (10-5-6)	0.5	Ura + His
2-7	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (10-6-5)	0.5	Ura + His
2-8	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (10-7-7)	0.5	Ura + His
2-9	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (10-8-2)	0.5	Ura + His
2-10	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (10-9-2)	0.5	Ura + His
2-11	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (10-10-8)	0.5	Ura + His
2-12	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (11-1-8)	0.5	Ura + His
2-13	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (11-2-1)	0.5	Ura + His
2-14	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (11-3-5)	0.5	Ura + His
2-15	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (11-10-4)	0.5	Ura + His
2-16	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (11-5-1)	0.5	Ura + His
2-17	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (11-6-4)	0.5	Ura + His
2-18	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (11-7-8)	0.5	Ura + His
2-19	JMB84-Rosa26BS-Ura/JMB405-3TR-5TR/JMB440-ZFP-trans (11-9-2)	0.5	Ura + His

(3)第 3 次筛选。根据第 2 次筛选结果,将筛选出最高效的 11 个 JMB440-ZFP-trans 转座酶载体(10-3-5、11-8-6、10-1-8、10-9-2、11-1-8、11-2-1、11-3-5、11-10-4、11-6-4、11-7-8 和 11-9-2)和 JMB440-ZFP-WTtrans 野生型转座酶载体进行第 3 次筛选,试验条件同第 2 次筛选。试验同时将 JMB440-ZFP-WTtrans 野生型转座酶载体作为对照。

2 结果与分析

2.1 转座子载体 JMB405-3TR-5TR 的鉴定

将构建的 JMB405-3TR-5TR 载体用 *Xho* I 和

Sma I (该酶切位点位于 JMB405 载体上的 *Bam*H I 酶切位点之后)进行双酶切,结果获得了 578 bp 的条带(图 1),与预期结果一致,表明 JMB405-3TR-5TR 载体构建成功。

2.2 报告载体 JMB84-Rosa26BS-Ura 的鉴定

用 *Pst* I 和 *Bam*H I 双酶切报告载体 JMB84-Rosa26BS-Ura,结果如图 2 所示。由图 2 可以看出,获得长度为 1 850 bp 的条带,与预期的结果一致,表明报告载体 JMB84-Rosa26BS-Ura 构建成功。

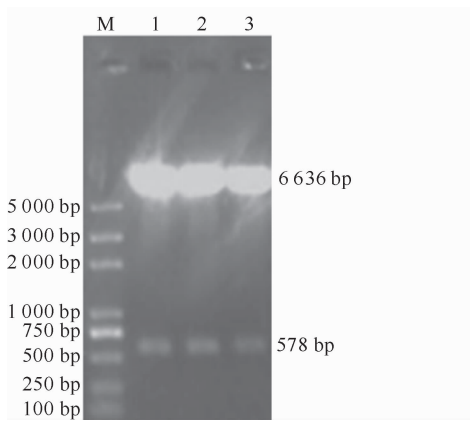


图 1 转座子载体 JMB405-3TR-5TR 的 *Xho* I 和 *Sma* I 双酶切鉴定

M. 2 000 Plus DNA Marker;1~3. 酶切产物

Fig. 1 Double digestion of the recombinant vector JMB405-3TR-5TR with *Xho* I and *Sma* I

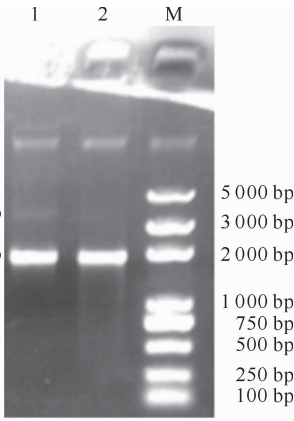


图 2 报告载体 JMB84-Rosa26BS-Ura 的 *Pst* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定

M. 2 000 Plus DNA Marker;1,2. 双酶切产物

Fig. 2 Double digestion of the recombinant report vector JMB84-Rosa26BS-Ura with *Pst* I and *Bam*H I

M. 2 000 Plus DNA Marker;1,2. Double digestion products

2.3 JMB440-ZFP-trans 转座酶载体突变库的构建

2.3.1 JMB440-ZFP 载体的鉴定 将构建的 JMB440-ZFP 用 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切,结果获得了 548 bp 的条带(图 3),与预期结果一致,表明 JMB440-ZFP 载体构建成功。

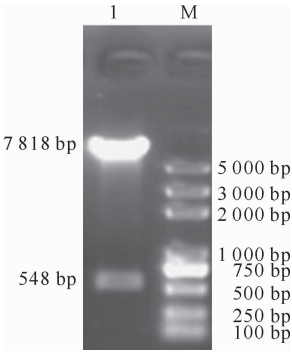


图 3 载体 JMB440-ZFP 的 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定
M. 2 000 Plus DNA Marker;1. 双酶切产物
Fig. 3 Double digestion of JMB440-ZFP with *Xba* I and *Bam*H I

2.3.2 易错 PCR 反应产物的电泳检测 由图 4 可知,在体系 1~6 和 10~14 中获得了 1 700 bp 的片段,结果与预期结果一致;而体系 7~9 中无 PCR 产物,其原因是体系中 Mn^{2+} 浓度太高,导致 PCR 反应

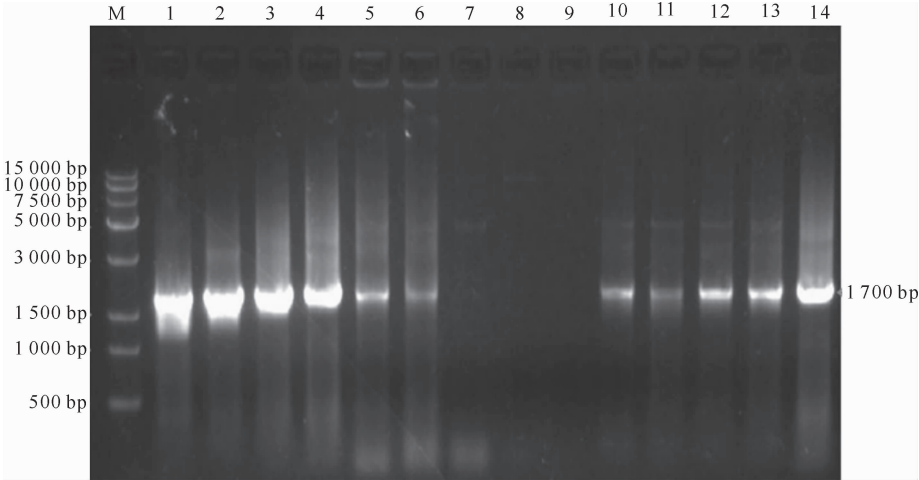


图 4 易错 PCR 反应产物的检测
M. 15 000 DNA Marker;1~14 分别为表 1 中 1~14 号体系的易错 PCR 反应产物
Fig. 4 Detection of error-prone PCR product

2.4.2 第 2 次筛选 由图 7-A 可知,2-1、2-2、2-3、2-10、2-12、2-13、2-14、2-15、2-17、2-18 和 2-19 号试验培养板中酵母菌落长势较好,表明这 11 组对应的转座酶载体(10-3-5、11-8-6、10-1-8、10-9-2、11-1-8、

无法进行。
2.3.3 JMB440-ZFP-trans 转座酶载体突变库的鉴定 根据 1.4.2 中寻找的最佳连接体系 2 进行大量连接,构建得到的 JMB440-ZFP-trans 转座酶载体突变库,用 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切,结果获得了 1 792 bp 的条带(图 5),与预期结果一致,表明 JMB440-ZFP-trans 转座酶载体突变库构建成功。

2.4 高效 PiggyBac 转座酶的筛选

2.4.1 第 1 次筛选 由图 6 可知,阳性对照组中 1-1 号培养板上有单克隆菌落生长;而 1-2 和 1-3 号培养板上没有单克隆菌落生长,表明当 5FOA 质量浓度为 0.2~0.5 mg/mL 时,*Ura* 基因的表达杀死了酵母。阴性对照中 1-4 号培养板上有单克隆菌落存活,而 1-5~1-7 号培养板上无单克隆菌落存活,表明在仅含有转座子载体时无法完成转座,则转座子不能阻断 *Ura* 基因的表达,从而在 5FOA 质量浓度仅为 0.2 mg/mL 的培养板上 *Ura* 基因表达时即可杀死酵母。试验组培养板上均有单克隆菌落生长,表明在含有转座酶载体存在时,转座子成功阻断了 *Ura* 基因的表达,导致 5FOA 质量浓度为 0.2~0.7 mg/mL 时酵母仍可生长。酵母存活数量越多,表明转座酶将转座子成功转座到 *Ura* 基因序列的效率越高。

11-2-1、11-3-5、11-10-4、11-6-4、11-7-8 和 11-9-2) 成功地将转座子转座到 *Ura* 基因中,并阻断了 *Ura* 基因的表达;2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-11 和 2-16 号培养板中酵母长势较差,表明其对应试验中的报告

载体(10-2-7、10-4-3、10-5-6、10-6-5、10-7-7、10-8-2、10-10-8 和 11-5-1)没有或者仅有少量的 *Ura* 基因被阻断表达,转座酶活性较弱。

2.4.3 第 3 次筛选 由图 7-B 可知,10-9-2、11-1-8、11-10-4、11-7-8 和 11-9-2 号培养板对应的单克隆菌落长势较好,表明其对应的转座酶具有较高的转座活性,阻断了 *Ura* 基因的表达。野生型对照组(WT)没有单克隆菌落生长,表明野生型转座酶在 5FOA 质量浓度为 0.5 mg/mL 时没有阻断 *Ura* 基因的表达。10-3-5、11-8-6、10-1-8、11-2-1、11-3-5 和 11-6-4 号培养板中的酵母菌落长势较差,表明其对应的转座酶在转座过程中阻断 *Ura* 基因表达的效率较野生型转座酶(WT)效率高,但较 10-9-2、11-1-8、11-10-4、11-7-8 和 11-9-2 号培养板中的转座酶转座效率低。因此,经过 3 次 0.5 mg/mL 5FOA 筛选得到的 10-9-2、11-1-8、11-10-4、11-7-8 和 11-9-2 号培养板中 5 个转座酶即为高效转座酶。

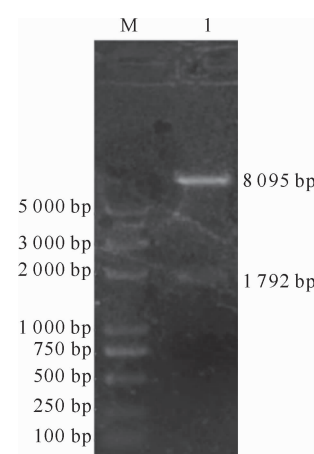


图 5 JMB440-ZFP-trans 转座酶突变库的 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定
M. 2 000 Plus DNA Marker;
1. 转座酶突变库的双切酶切产物

Fig. 5 Double digestion of JMB440-ZFP-trans library with *Xho* I and *Bam*H I

M. 2 000 Plus DNA Marker; 1. Double digestion products

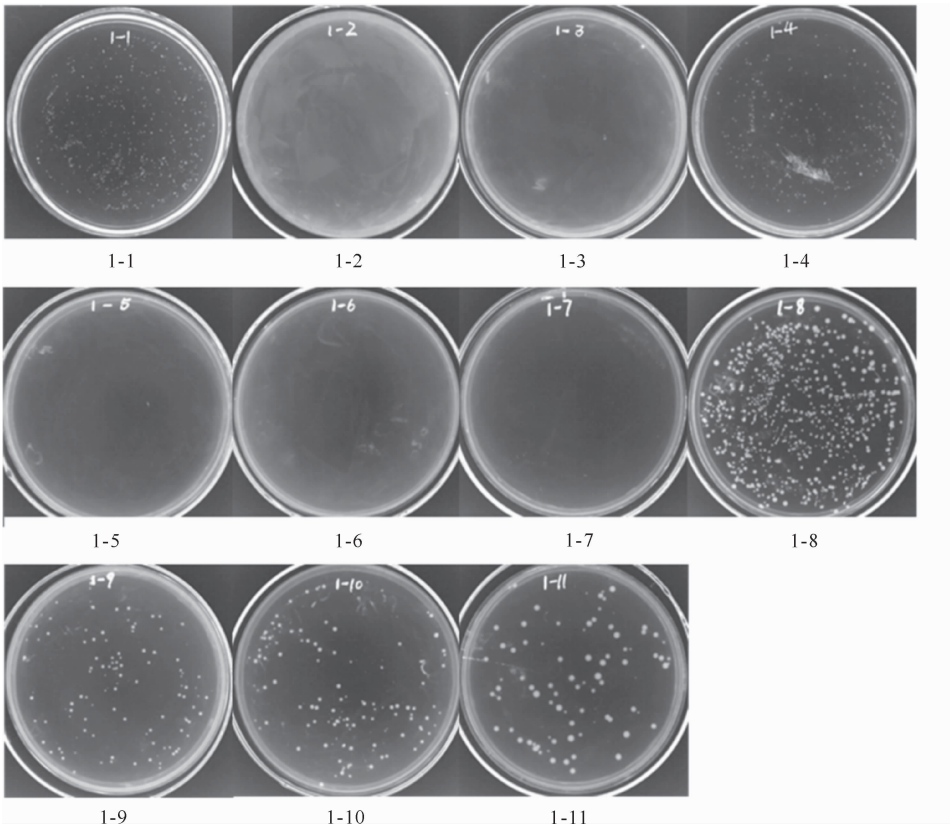


图 6 高效 PiggyBac 转座酶的第 1 次筛选

1-1~1-11 与表 3 中的试验序号一致;1-1~1-3 为阳性对照组;1-4~1-7 为阴性对照组;1-8~1-11 为试验组

Fig. 6 First round screening of hyperactive PiggyBac transposases

1-1~1-11 are consistent with Table 3; 1-1~1-3 are positive controls; 1-4~1-7 are negative controls; 1-8~1-11 are experimental groups

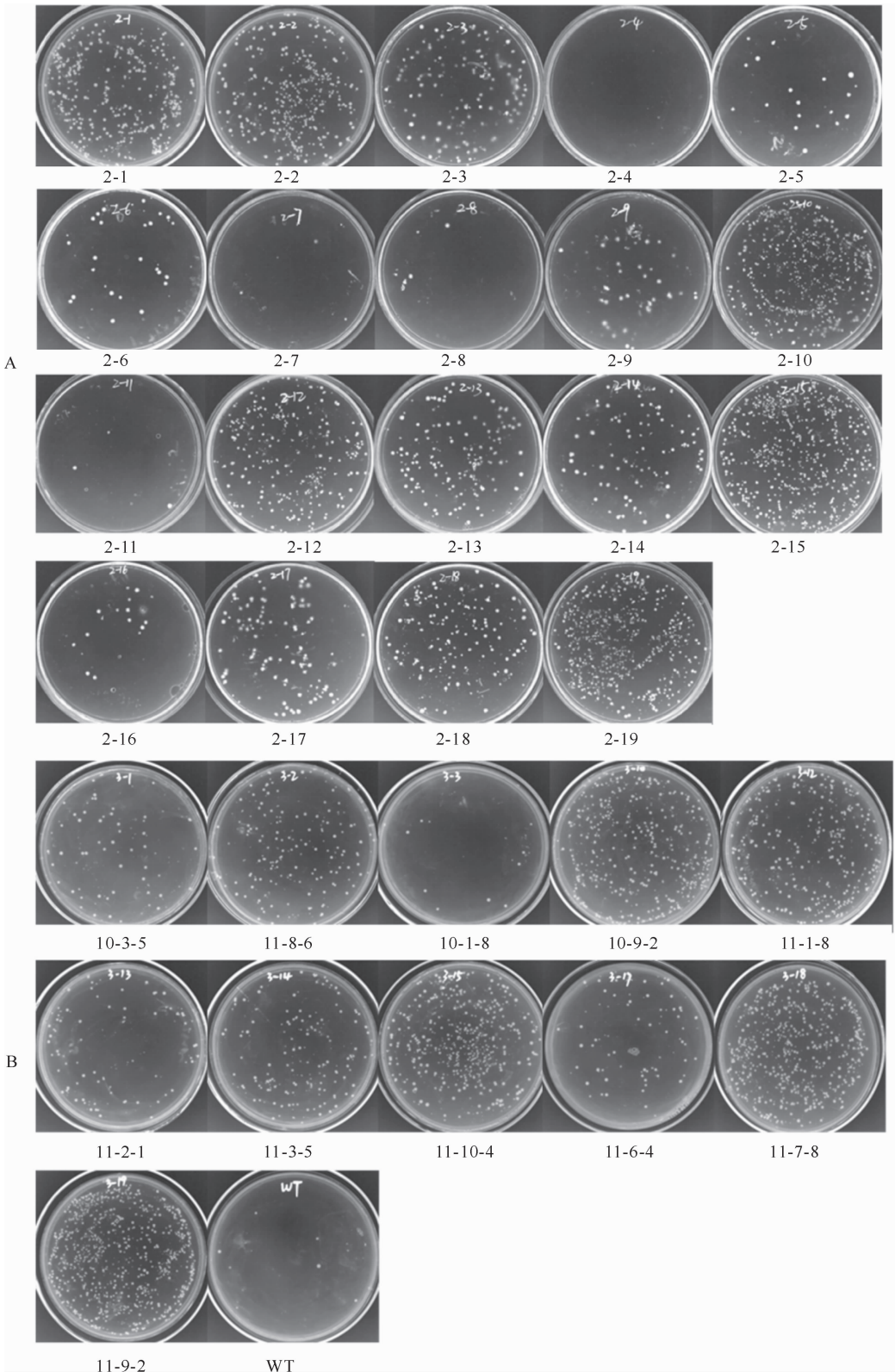


图 7 高效 PiggyBac 转座酶的第 2 次(A)和第 3 次(B)筛选

2-1~2-19 与表 4 中的试验序号一致;10-3-5、11-8-6、10-1-8、10-9-2、11-1-8、11-2-1、11-3-5、11-10-4、11-6-4、11-7-8 和 11-9-2 为载体编号;WT 为 JMB440-ZFP-WTtrans 野生型转座酶载体

Fig.7 Second round (A) and the third round (B) screening of hyperactive PiggyBac transposases

2-1~2-19 are consistent with Table 4;10-3-5,11-8-6,10-1-8,10-9-2,11-1-8,11-2-1,11-3-5,11-10-4,11-6-4,11-7-8 and 11-9-2 are the numbers of vectors;WT represents JMB440-ZFP-WTtrans wild type transposases vector

3 讨 论

PiggyBac 转座子属于离解型转座子,该转座子本身不能编码自己的转座酶,PiggyBac 转座系统包括转座酶载体和转座子供体载体。转座子供体载体在转座酶载体协助下可携带外源基因在基因组中进行插入和转座,其转座效率依赖于转座酶的切割效率。因此,通过对 PiggyBac 转座系统中转座酶切割效率的优化,可以作为提高该系统转座效率的突破点。本研究通过易错 PCR 方法随机突变转座酶基因,构建转座酶突变库,获得高效的突变转座酶。为了提高转座子的定点识别能力,有效地克服其随机转座不易控制的缺点,本试验将突变的高效转座酶与 ZFP 具有靶向特异性识别的位点 Rosa26BS 融合表达,构建 JMB440-ZFP-trans 转座酶载体突变库。

本研究将 JMB405-3TR-5TR 转座子载体、JMB84-Rosa26BS-Ura 报告载体、JMB440-ZFP-trans 转座酶载体突变库共转化到酿酒酵母 JMY1 中,通过 Ura-5FOA 系统进行转座酶筛选。将 ZFP 与具有特异性转座能力的 PiggyBac 转座酶进行融合表达,具有位点特异性识别功能的 ZFP 靶向结合于 Ura 基因上游的 Rosa26BS 位点处,从而有效地控制了 PiggyBac 转座酶的切割范围。基于融合表达蛋白 ZFP 的限制,PiggyBac 转座酶只切割 ZFP 识别位点 Rosa26BS 序列附近的 TTAA 位点,并阻断 Ura 基因的表达。Ura 基因不表达,酿酒酵母 JMY1 可以在含有 5FOA 筛选培养基中生长。经过 3 轮有效筛选,笔者发现经过突变后的转座酶较野生型转座酶表现出更高的转座效率,并最终获得 5 个高效的能够定点转座的 ZFP-PiggyBac 转座酶。

高效 ZFP-PiggyBac 转座酶的建立可以实现对靶基因位点附近基因的定点敲除或者目的基因的定点引入。将筛选出的高效 PiggyBac 转座酶系统与根据特殊目的设计的转座子载体配合,形成高效的 PiggyBac 转座子系统,进一步提高外源基因在转基因过程中的整合效率,且能实现基因的可控切离,提高了转基因技术在转基因动物生产中的安全性。将高效 PiggyBac 转座酶与特异性识别 DNA 序列的锌指蛋白(ZFP)融合,构建 ZFP-PiggyBac 转座酶系统,在 ZFP 识别位点附近的 TTAA 处实现定点插入目的基因。通过与不同的 ZFP 进行融合,可以根据科研工作者的不同需求获得多种 ZFP-PiggyBac 转座酶系统,使得在动物基因组中感兴趣的位点插入目的基因成为可能。

[参考文献]

- [1] Fraser M,Smith G,Summers M. Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses; Relationship between host DNA insertions and FP mutants of autographa californica and galleria mellonella nuclear polyhedrosis viruses [J]. Journal of Virology,1983,47:287-300.
- [2] Ding S,Wu X,Li G,et al. Efficient transposition of the PiggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice [J]. Cell,2005,122:473-83.
- [3] Wang W,Lin C,Lu D,et al. Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2008,105:9290-9295.
- [4] Wang W,Bradley A,Huang Y. A PiggyBac transposon-based genome-wide library of insertionally mutated Blm-deficient murine ES cells [J]. Genome Research,2009,19:667-673.
- [5] Nakazawa Y,Huye L,Salsman V,et al. PiggyBac-mediated cancer immunotherapy using EBV-specific cytotoxic T-cells expressing HER2-specific chimeric antigen receptor [J]. Molecular Therapy,2011,19(12):2133-2143.
- [6] Katter K,Geurts A,Hoffmann O,et al. Transposon-mediated transgenesis,transgenic rescue,and tissue-specific gene expression in rodents and rabbits [J]. The FASEB Journal,2013,27:930-941.
- [7] Woltjen K,Michael I,Mohseni P,et al. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells [J]. Nature,2009,458:766-770.
- [8] Yusa K,Rad R,Takeda J,et al. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the PiggyBac transposon [J]. Nature Methods,2009,6:363-369.
- [9] Fraser M,Ciszczon T,Elick T,et al. Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons PiggyBac (IFP2) and tag-along (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of lepidoptera [J]. Insect Molecular Biology,1996,5:141-151.
- [10] Wu S,Meir Y,Coates C,et al. PiggyBac is a flexible and highly active transposon as compared to sleeping beauty,Tol2,and Mos1 in mammalian cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,2006,103:15008-15013.
- [11] Rostovskaya M,Fu J,Obst M,et al. Transposon-mediated BAC transgenesis in human ES cells [J]. Nucleic Acids Research,2012,40:e150.
- [12] Sander J,Zaback P,Joung J,et al. An affinity-based scoring scheme for predicting DNA-binding activities of modularly assembled zinc-finger proteins [J]. Nucleic Acids Research,2009,37:506-515.
- [13] Desjarlais J,Berg J. Toward rules relating zinc finger protein sequences and DNA binding site preferences [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1992,89:7345-7349.

[15] 周光宏,徐幸莲. 肉品学 [M]. 北京:中国农业科技出版社, 1999:195-210.
Zhou G H,Xu X L. Meat science [M]. Beijing:China Agricultural Science and Technology Press,1999:195-210. (in Chinese)

[16] Ker B J,McKeith F K,Easter R A. Effect on performance and carcass characteristics of nursery to finisher pigs fed reduced crude protein amino acid-supplemented diets [J]. Journal of Animal Science,1995,73(2):433-438.

[17] Wood J D,Enser M,Fisher A,et al. Fat deposition,fatty acid composition and meat quality: A review [J]. Meat Science, 2008,78(4):343-358.

[18] Nilzen V,Babol J,Dutta P C,et al. Free-range rearing of pigs with access to pasture grazing-effect on fatty acid composition and lipid oxidation products [J]. Meat Science,2001,58:267-275.

[19] 张克英,陈代文,胡祖禹. 影响猪肉品质的主要因素 [J]. 四川农业大学学报,2002,20(1):67-74.
Zhang K Y,Chen D W,Hu Z Y. Factors for influencing pork quality [J]. Journal of Sichuan Agricultural University,2002, 20(1):67-74. (in Chinese)

[20] Fujimura S,Muramoto T,Katsukawa M. Chemical analysis and sensory evolution of free amino acids and 5'-inosinic acid in meat of Hinai-dori, Japanese native chicken comparison with broilers and layer pullets [J]. Animal Science and Technology,1994,65(7):610-618.

[21] Johansen I T. Effects of reducing the starch content in oat-based diet with cellulose on jejunal flow and absorption of glucose over an isolated loop of jejunum in pigs [J]. British Journal of Nutrition,1994,72(1):717-729.

[22] 陈杰. 家畜生理学 [M]. 北京:中国农业出版社,2003.
Chen J. Animal physiology [M]. Beijing: China Agriculture Press,2003. (in Chinese)

[23] Edwards C A,Johnson I T,Read N W. Do viscous polysaccharides slow absorption by inhibiting diffusion or convection [J]. European Journal of Clinical Nutrition,1988,42(5):307-312.

(上接第 9 页)

[14] Dreier B,Beerli R,Segal D,et al. Development of zinc finger domains for recognition of the 5'-ANN-3' family of DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276:29466-29478.

[15] Mossine V V,Waters J K,Hannink M,et al. PiggyBac transposon plus insulators overcome epigenetic silencing to provide for stable signaling pathway reporter cell lines [J]. PLoS One,2013,8:e85494.

[16] Cadiñanos J,Bradley A. Generation of an inducible and optimized PiggyBac transposon system [J]. Nucleic Acids Research,2007,35:e87.

[17] Yusa K,Zhou L,Li M,et al. A hyperactive PiggyBac transposase for mammalian applications [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2011,108:1531-1536.

[18] Gietz R,Woods R. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method [J]. Methods in Molecular Biology, 2006,313:107-120.

[19] Poon B P,Mekhail K. Effects of perinuclear chromosome tethers in the telomeric URA3/5FOA system reflect changes to gene silencing and not nucleotide metabolism [J]. Frontiers in Genetics,2012,3:144.

[20] Yano T,Sanders C,Catalano J,et al. sacB-5-fluoroarotic acid-pyrE-based bidirectional selection for integration of unmarked alleles into the chromosome of rhodobacter capsulatus [J]. Applied and Environmental Microbiology,2005,71(6):3014-3024.