

斑马鱼 *uba6* 和 *uba7* 突变体的构建与鉴定

丁慧美, 阮 华, 黄红辉

(淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 三峡库区生态环境与生物资源省部共建
国家重点实验室培育基地, 西南大学生命科学学院, 重庆 400715)

【摘要】 目的 构建斑马鱼 *uba6* 和 *uba7* 突变体。方法 运用 TALEN 技术在斑马鱼 *uba6* 和 *uba7* 基因编码区引进突变, 并测序鉴定突变类型。结果 成功获得了两种突变类型的 *uba6* 和三种突变类型的 *uba7* 斑马鱼突变体。结论 成功构建了斑马鱼 *uba6* 和 *uba7* 突变体, 为进一步研究斑马鱼 *uba6* 和 *uba7* 基因的功能提供了材料。

【关键词】 斑马鱼; *uba6* 基因; *uba7* 基因; TALEN

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0007-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.010.002

Construction and identification of zebrafish *uba6* and *uba7* mutants by TALEN

DING Hui-mei, RUAN Hua, HUANG Hong-hui

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, State Key Laboratory Breeding Base of Eco-Environments and Bio-Resources of the Three Gorges Reservoir Region, School of Life Sciences, Southwest University, Beibei, Chongqing 400715, China)

【Abstract】 **Objective** To construct zebrafish *uba6* and *uba7* mutants. **Method** In-dels were introduced into coding regions of zebrafish *uba6* and *uba7* gene by TALEN technology, and mutation types were identified by sequencing. **Results** We obtained two *uba6* and three *uba7* mutants with different small fragment deletions resulting in reading frame shifts. **Conclusion** These *uba6* and *uba7* mutants provided starting materials for the study of zebrafish *uba6* and *uba7* gene functions.

【Key words】 Zebrafish; *uba6*; *uba7*; TALEN

泛素化以及类泛素化修饰是真核生物中调控蛋白功能的重要机制,参与多种细胞进程,如细胞分裂,免疫反应,胚胎发育等。泛素化是一个 E1-E2-E3 的多级酶促反应,使泛素共价结合至靶蛋白上。首先,泛素激活酶 UBE1 (E1)消耗 ATP 结合一个泛素分子,随后 E1 酶将泛素分子转移至泛素结合酶(E2),最后 E2 在泛素连接酶(E3)的帮助下将泛素分子转移至靶蛋白上,哺乳动物中执行泛素化

通路的 E1 有两个,即 UBE1 和 UBA6, E2 则有几十种,而决定底物特异性的 E3 达上千种^[1-3]。UBE1 和 UBA6 具有 42% 的相似性,两者激活泛素的活力相似,但是对应的 E2 则不完全相同,UBA6 能将活化的泛素转移至大部分 UBE1 的 E2 上,但是也有其特异的 E2, USE1^[2-3]。UBA6 基因敲除小鼠会在胚胎期 E10.5 死亡^[4]。ISG15 是类泛素分子,UBA7 (又称 Ube11)是激活 ISG15 的 E1 酶,类似于泛素化

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(31071286);西南大学中央高校基本科研业务费(XDJK2014A013;2362014xk02)。

【作者简介】丁慧美(1990-),女,硕士,研究方向:发育生物学 E-mail:15895840307@163.com。

【通讯作者】黄红辉(1974-),男,博士,教授,研究方向:发育生物学 E-mail:honghui@126.com;阮华(1974-),女,博士,教授,研究方向:发育生物学,E-mail:ruanhua23@126.com。

通路的 E1-E2-E3 多级酶促反应可以使蛋白发生 ISG15 修饰。小鼠 *Ube1l* 基因的敲除会导致 ISG15 蛋白修饰缺失,但游离形式的 ISG15 并不受影响,基因敲除小鼠的纯合子可存活至成年并可育^[5-6]。

TALEN (transcription activator-like (TAL) effector nucleases) 是一种新型的靶向基因编辑技术,现已应用于细胞、酵母、植物、斑马鱼及大、小鼠等各类研究对象。其原理是利用植物细菌 *Xanthomonas sp.* TALE 蛋白核酸结合域的氨基酸序列可对应识别结合位点的核酸,组装 *Xanthomonas sp.* TALE 的氨基酸序列模块识别特定 DNA 序列,并与核酸酶重组融合,这一人工构建的核酸酶可在特定位点识别(通过 TALE 氨基酸序列模块执行)并剪切(通过核酸酶执行)目的基因 DNA 序列,断裂的 DNA 在修复过程中会引进小片段插入或缺失,导致基因突变^[7-8]。

斑马鱼是研究脊椎动物发育的理想模式动物,其基因组与人类高度同源。小鼠中 *UBA6* 和 *UBA7* 基因功能已有一定的研究^[4,6],但在斑马鱼中这两个基因的功能尚不可知,运用反向遗传学手段在斑马鱼中建立突变体有助于研究其功能。本文应用 TALEN 技术对斑马鱼中 *uba6* 和 *uba7* 基因进行编辑,通过筛选获得可遗传的突变体,为后续进一步探究斑马鱼中 *uba6* 和 *uba7* 基因的功能提供了重要材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

野生型斑马鱼品系 AB Tübingen 品系。

1.1.2 质粒

TALEN 载体为 pCS2-FokI,靶向 *uba6* 基因外显子 5 和 *uba7* 基因外显子 2 的 TALEN 质粒由北京唯尚立德生物科技有限公司合成。*uba6* 靶位点: CTGGGCACCAACTTCT tcatcagagaggagg ATGTGAATA ATCAGA, 其中左臂 TALE 识别序列 CTGGGCCAACTTCT 16 bp, 右臂 TALE 识别序列 TCTGATT ATTCACAT 15 bp, 间隔 15 bp, 突变体检测酶 BseRI 识别序列 GAGGAG。*uba7* 靶位点: TGCCAAAAA CGTGATcctggctggagttagaACAGTTACAATTCAGG, 其中左臂 TALE 识别序列 TGCCAAAAA CGTGAT 15 bp, 右臂 TALE 识别序列 CCTGAATTGTA ACTGT 16 bp, 间隔 16 bp, 突变体检测酶 BpmI 识别序列 CTGGAG。

1.1.3 引物

uba6 基因外显子 5 扩增引物: TTGCTGATATAG GTGACTTGGAG (正向), CACATTAACCTTTTCAC CGGAAG (反向); *uba7* 基因外显子 2 扩增引物: GGTAATTATTTTGGCACCAACAGC (正向), GGACT TACAAATGCCTATGTGCC (反向)。

1.1.4 主要试剂

本文实验所用引物由上海生工生物技术公司以及上海 Invitrogen 公司合成。限制性内切酶购自 NEB 公司; AxyPrep™ plasmid Miniprep Kit 和 AxyPrep™ PCR Cleanup Kit 购自 Axygen 公司; T4 DNA 连接酶购自 Roche 公司; 体外转录试剂购自 Ambion 公司。

1.2 方法

1.2.1 胚胎收集

在成年斑马鱼交配前一天将斑马鱼置于有适量养殖系统水的交配盒中,用挡板将雌雄斑马鱼分开。次日早晨,将挡板拔出,斑马鱼产卵,30 min 后可收集,放置于 28℃ 恒温培养,在胚胎 12 hpf (hour post-fertilization) 时加入 0.03% PTU 抑制色素形成。

1.2.2 全胚胎原位杂交

探针合成与全胚胎原位杂交实验依据已有报导进行^[9]。本实验中所用 *uba6* 和 *uba7* RNA 反义探针浓度为 1 ug/mL。

1.2.3 斑马鱼 *uba6* 和 *uba7* 突变体的构建

将体外转录的编码识别 TALE 左右臂序列蛋白和核酸酶融合蛋白的 mRNA 等量混合显微注射入一细胞期斑马鱼胚胎,注射浓度为 500 pg/nL。在 1.5 dpf (day post-fertilization) 收集胚胎至 EP 管中,每管 8 个胚胎,加入 80 uL 50 mmol/L NaOH 溶液,95℃ 加热裂解 10 min,冷却后加入 8 uL 1mol/L Tris8.0 混合均匀,即为提取的基因组 DNA。以此基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应,扩增产物用特定的酶进行酶切检测。如果对照组胚胎的 PCR 产物能够全部被切开,而注射过 mRNA 的实验组胚胎的 PCR 产物中有未切开的 PCR 条带,则说明靶点发生了突变,TALEN 质粒有效。将注射后的斑马鱼胚胎饲养至成鱼,为 F0 代。F0 代与野生型交配产卵,收集胚胎,重复上述步骤提取基因组 DNA、PCR 扩增及酶切检测,确定此 F0 是否在生殖细胞水平携带突变,如携带突变,将 F0 与野生型生产的胚胎饲养至成鱼,为 F1 代。拔取 F1 成鱼鳞片,将鱼鳞片放入 PCR 管中,加入 10 uL 50 mmol/L NaOH 溶液,

95℃加热裂解 10 min, 冷却后加入 8 uL 1mol/L Tris8.0 混合均匀, 获得基因组 DNA。以此基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应, 扩增产物纯化后送样测序, 通过读取套峰获得斑马鱼 F1 突变类型。

2 结果

2.1 斑马鱼 *uba6* 基因的时空表达模式

检测基因时空表达模式有助于研究基因的功能。我们运用全胚胎原位杂交的方法检测了斑马鱼中 *uba6* 基因早期的表达模式。结果显示 *uba6* 呈现全身性表达, 在 1~3 dpf 时于肠中有一定程度的富集, 此富集随发育的进行趋于明显(彩插 3 图 1)。

2.2 斑马鱼 *uba7* 基因的时空表达模式

类似于 *uba6* 基因, 我们也检测了 *uba7* 基因的时空表达模式。结果显示, *uba7* 基因在 1~3 dpf 的斑马鱼胚胎中表达, 表达模式为全身性, 在肠中稍有富集(彩插 3 图 2)。

2.3 斑马鱼中 *uba6* 和 *uba7* 突变体建立

2.3.1 TALEN 质粒活性检测

为检测 TALEN 靶点设计是否工作, 必须检测质粒的活性。将以质粒为模板体外转录的 mRNA 注射至一细胞期的斑马鱼胚胎中, 提取注射后胚胎的基因组 DNA, PCR 扩增包含靶点的 DNA 片段, 酶切检测此片段能否被切开。结果如图 3 所示, 对照组野生型胚胎的 PCR 产物能够完全被切开; 而实验组即注射了 mRNA 的斑马鱼胚胎中部分 PCR 产物被切开, 部分 PCR 产物未被切开, 说明该靶点发生了突变, 且效率较高。

2.3.2 F0 突变体筛选

将上述实验中注射 mRNA 的斑马鱼饲养至成

鱼, 为 F0 代。F0 是野生型和突变型细胞的嵌合体, 为检测突变是否产生在生殖细胞水平, 将 F0 代与野生型交配产生 F1 子代, 提取 F1 胚胎的基因组 DNA, 采取 2.3.1 中相同的策略, 即 PCR 扩增含靶位点的基因组 DNA 并酶切检测。结果如图 3 所示, 对照组野生型的 PCR 产物能够完全被切开; 而实验组 PCR 产物未能被全部切开, 这说明部分 F1 子代含有靶位点突变, F0 代含有可遗传的突变, 将 F1 代斑马鱼胚胎饲养至成鱼。

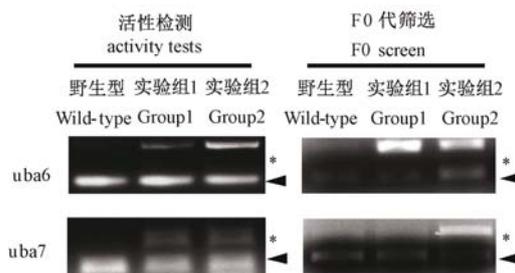


图 3 TALEN 质粒活性检测及 F0 筛选

Note: asterisk, PCR product; arrowhead, enzyme digest products.

Fig. 3 Activity tests of TALEN plasmids and F0 screen

2.3.3 F1 突变体筛选

F1 代斑马鱼中含有野生型和杂合突变体, 为鉴定出杂合突变体, 拔取少许 F1 成鱼鳞片, 提取基因组 DNA, 扩增含有靶位点的基因组 DNA 片段, 测序检测靶位点序列, 测序结果显示 F1 代含有多种突变类型, 表 1 和表 2 分别列举了 F1 代中筛选获得的移码突变类型, 其中红色标记部分是 TALEN 设计敲除的靶位点序列, 这些移码突变都可以产生早熟终止密码子。

表 1 TALEN *uba6* F1 突变类型

Tab.1 TALEN *uba6* F1 mutation type

类型 Type	序列 Sequence
野生型 Wild type	CTGGGCACCAACTTCT TCATCAGAGAGGAGG ATGTGAATAATCAGA
<i>uba6</i> Δ7in2	CTGGGCACCAACTTCT TCAT————GTGAGG ATGTGAATAATCAGA
<i>uba6</i> Δ2	CTGGGCACCAACTTCT TCATC—AGAGGAGG ATGTGAATAATCAGA

表 2 TALEN *uba7* F1 突变类型

Tab.2 TALEN *uba7* F1 mutation type

类型 Type	序列 Sequence
野生型 Wild type	TGCCAAAAACGTGATCCTGGCTGGAGTTAGAACAGTTACAATTCAGGATG
<i>uba7</i> Δ7	TGCCAAAAACGTGATCCT—GTTAGAACAGTTACAATTCAGGATG
<i>uba7</i> Δ5	TGCCAAAAACGTGATCCTGGC—TTAGAACAGTTACAATTCAGGATG
<i>uba7</i> Δ2	TGCCAAAAACGTGATCCTGGCT—AGTTAGAACAGTTACAATTCAGGATG

3 讨论

小鼠中的研究表明, *UBA6* 基因敲除会导致突变体胚胎在 E10.5 死亡^[4], 而 *UBA7* 基因的敲除虽然不影响小鼠的存活与生殖, 但是会导致 ISG15 蛋白修饰的缺失^[6]。斑马鱼中这两个基因的功能未有报道, 我们构建的 *uba6* 和 *uba7* 突变体将是在斑马鱼中研究其功能的出发材料。基因的时空表达模式结果显示, 两个基因在胚胎期都有表达, 这提示着两个基因有可能调控斑马鱼的胚胎发育。尽管我们获得的突变体中基因突变会导致移码, 但是它们有可能不会导致胚胎出现发育缺陷表型, 可能的原因有以下几种(1)斑马鱼中有其他基因(例如可能存在的复制基因、功能相似的基因等)补偿了突变基因的功能;(2)斑马鱼 *uba6* 和 *uba7* 基因有可能存在多种异构体, 突变并没有导致所以异构体移码突变;(3)两者不是斑马鱼胚胎发育必需的基因。

运用 TALEN 技术构建突变体, 可以获得多种突变类型, 通常都是小片段 DNA 的插入或缺失。我们的实验中也获得了多种突变类型, 只保留了引起移码的突变, 这些突变都导致了早熟终止密码子的出现, 从理论上分析这些突变可以导致基因功能丧失, 但是还是需要其他分子生物学方法的验证。

参考文献:

[1] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system [J]. Annu

Rev Biochem. 1998, 67:425-479.

- [2] Pelzer C, Kassner I, Matentzoglou K, *et al.* UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin [J]. J Biol Chem. 2007, 282(32):23010-23014.
- [3] Jin J, Li X, Gygi SP, *et al.* Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging [J]. Nature. 2007, 447(7148):1135-1138.
- [4] Chiu YH, Sun Q, Chen ZJ. E1-L2 activates both ubiquitin and FAT10 [J]. Mol Cell. 2007, 27(6):1014-1023.
- [5] Yuan W, Krug RM. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein [J]. EMBO J. 2001, 20(3):362-371.
- [6] Kim KI, Yan M, Malakhova O, *et al.* Ube1L and protein ISGylation are not essential for alpha/beta interferon signaling [J]. Mol Cell Biol. 2006, 26(2):472-479.
- [7] Miller JC, Tan S, Qiao G, *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. Nat Biotechnol. 2011, 29: 143-148.
- [8] Zhongwei Qiu, Meizhen Liu, Zhaohua Chen, *et al.* High-efficiency and heritable gene targeting in mouse by transcription activator-like effector nucleases [J]. Nucleic Acids Res. 2013, 41(11):e120.
- [9] Huang H, Ruan H, Aw M Y, *et al.* Mypt1-mediated spatial positioning of Bmp2-producing cells is essential for liver organogenesis [J]. Development. 2008, 135(19): 3209-3218.

[修回日期] 2015-08-18