

靶向家蚕丝素重链基因的 锌指蛋白结构域的人工构建*

刘婷婷, 梁梓强, 梁安文, 郭技星, 李广宏, 王方海

(中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室//昆虫学研究所, 广东 广州 510275)

摘要: 将多个可特异识别并结合 DNA 的锌指单体串联在一起即可构成锌指蛋白结构域, 若将其与不同的功能域因子融合, 则会构建出有很多用途的人工蛋白分子, 从而实现了对基因组的各种定点修饰或调控。以家蚕丝素重链基因为研究对象, 首先利用 Zinc Finger Tools 软件筛选到了一个合适的靶标位点, 再采用模块组装技术, 通过酶切、片段回收、连接、转化等步骤成功将多个锌指单体串联在一起, 构建出一对靶向家蚕丝素重链基因特定位点的由 4 个锌指单体组成的锌指蛋白结构域, 这为将来定点修饰或改造家蚕丝素基因, 进一步提高蚕丝质量和产量, 以及大幅度提升家蚕生物反应器对外源蛋白的表达能力打下了良好的基础。

关键词: 家蚕; 丝素重链基因; 锌指蛋白

中图分类号: Q965 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2017) 02-0001-04

Artificial construction of zinc finger protein domain targeting *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene

LIU Tingting, LIANG Ziqiang, LIANG Anwen, GUO Jixing, LI Guanghong, WANG Fanghai
(State Key Laboratory for Biocontrol and Institute of Entomology, Sun Yat-sen University,
Guangzhou 510275, China)

Abstract: Many zinc finger units, which can specifically recognize and bind to DNA, are strung together to form zinc finger protein domain. There are many uses to artificially construct the protein molecules, such as various site modification or regulation of the genome, by its integration with the different functional domains of active factors. This study focused on fibroin heavy chain gene of silkworm. Firstly, a suitable target site was found using Zinc Finger Tools software, and then we used module assembled technology to construct a pair of four zinc finger domain targeting the specific site of fibroin heavy chain gene, through restriction enzyme digesting, fragment recycling, linking, transforming, and other steps. The results would provide a good foundation for the fixed-point modification or reconstruction of fibroin genes to improve silk quality and production, or to greatly enhance the expression of exogenous protein in the bio-reactor of *Bombyx mori*.

Key words: silkworm; fibroin heavy chain gene; zinc finger protein

锌指是构成锌指蛋白 (ZFP) 结构域的基本单元, 为广泛存在于多种蛋白质中的蛋白基序, 可特

异介导蛋白质与核酸或其它蛋白质的相互作用。将多个可特异识别并结合 DNA 的锌指单元串联在一

* 收稿日期: 2016-08-10

基金项目: 广东省科技计划项目 (2014A010107009)

作者简介: 刘婷婷 (1991 年生), 女; 研究方向: 生物工程; E-mail: 377085590@qq.com

通信作者: 王方海 (1965 年生), 男; 研究方向: 生物化学与分子生物学; E-mail: lsswf@mail.sysu.edu.cn

起后即构成 ZFP。若将 ZFP 与锌指激活因子 (Zinc finger activator)、锌指抑制因子 (Zinc finger repressor)、锌指核酸甲基化酶 (Zinc finger methylase)、锌指核酸酶等不同的功能结构域融合, 可构建出有很多用途的人工蛋白分子, 从而实现对基因组的各种定点修饰或调控^[1]。其中锌指核酸酶的研究报道较多, 由于其可通过锌指蛋白和特定 DNA 位点结合, 从而将核酸酶带入该部位, 对附近的 DNA 链进行酶解切割, 从而可达到诱导 DNA 特定位点的双链断裂, 大大提高同源重组的发生概率等。该技术因其具有高效和特异性的特点而受到广泛关注和研究, 已经在多种物种 (如果蝇、线虫、斑马鱼、大鼠等) 中得到应用, 近年来已经有多篇研究成果在 Nature, Science, Nature Biotechnology 等杂志上发表^[2-4]。

ZFP 结构域通常由 3~6 个 C2H2 类型的锌指重复单元串联而成, 其基本骨架大多来自人或小鼠的天然锌指蛋白 ZIF268。通常每个锌指可直接特异识别和结合 DNA 双螺旋中某一条单链上的 3 个连续核苷酸 (一个三联子), 而由多个锌指串联形成的 ZFP 结构域则可识别更长的靶标序列, 同时也大大增加了 DNA 靶向修饰的特异性^[1]。

家蚕是一种重要的经济昆虫, 其可吐丝结茧, 为丝绸原料的重要来源, 同时家蚕也是世界上研究较多的一种高效的生物反应器^[5], 如能对其丝素基因进行修饰或改造, 我们就有可能进一步提高蚕丝质量和产量, 也就有可能对家蚕生物反应器进行更好的改造升级。因此本研究主要报道我们课题组以家蚕丝素重链基因为研究对象, 采用模块组装技术成功构建出靶向家蚕丝素重链基因特定位点的一对由 4 个锌指单元组成的 ZFP。

1 材料和方法

1.1 质粒和酶

用于组装锌指蛋白 (ZFP) 结构域的所有质粒均源自美国 Addgene 公司的 Modular Assembly Kit v1.0 试剂盒, 本实验中所使用的酶都是购自 TaKaRa 公司。

1.2 构建方法

主要采用模块组装方法, 具体参考文献 [6], 本实验以家蚕丝素重链基因为研究对象, 首先利用网上 Zinc Finger Tools 软件 (<http://www.scripps.edu/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php>) 确定靶基因上合适的位点, 获得的位点为 6 个核苷酸的间隔序列, 在其左右各含

有 4 个三联子组, 再分别从现有的试剂盒中寻找含有能够与各三联子结合的锌指质粒, 通过酶切、连接等步骤组装成可特异结合上述连续 4 个三联子组序列的 ZFP。

1.3 活性检测

通过细菌双杂交 (B2H) 系统, 在携带有靶位点 DNA 序列的报告基因表达体系中检测报告基因表达的强弱来判定 ZFP 的活性。

2 结果与分析

2.1 靶标位点的确定

我们选取了家蚕丝素重链基因为研究对象, 该基因的详细结构可参阅 Zhou 等^[7] 文献, 利用网上 Zinc Finger Tools 软件筛选到了一个合适的靶标位点, 在丝素重链基因 AF226688 中, 这个靶标位点位于 65 461 到 65 520 之间。具体为间隔序列 6 个核苷酸, 左右各由 4 个三联子组组成, 每个三联子对应于一个可以与之结合的锌指单体, 这样可以构建一对由 4 个锌指单体组成的锌指蛋白结构域, 可与该段序列特异结合, 如果在末端加上 *FokI*, 则可构成锌指核酸酶, 能够特意切断该靶标序列, 为了便于后面的表述, 我们将准备构建的能够与这对由 4 个三联子组组成的序列特异结合的锌指蛋白结构域分别命名为 F1aF2aF3aF4a 和 F1bF2bF3bF4b, 其中每一个 F 代表一个锌指单体, 如图 1 所示。

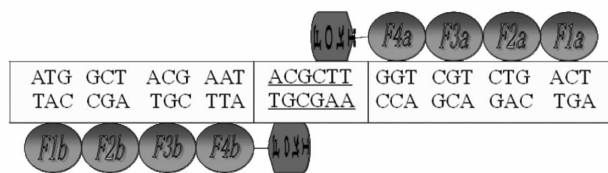


图 1 筛选到的靶标位点序列和拟构建的一对与
之可特定结合的由 4 个锌指单体组成的锌指蛋白结构域

Fig. 1 The sequence of target sites and the zinc finger protein domain formed by 4 zinc finger units

2.2 锌指蛋白结构域的人工构建

首先分别选取对应于 F1a、F2a、F1b、F2b 的质粒进行酶切, 用 *Age I* 和 *BamH I* 酶切对应于 F1a 和 F1b 的质粒, 获得相应的线形质粒框架, 用 *Xma I* 和 *BamH I* 酶切对应于 F2a 和 F2b 的质粒, 获得相应的相对分子质量在 100 左右的锌指单体, 分别纯化线形质粒框架和锌指单体, 再经过连接转化、挑选阳性克隆检测等步骤, 即可获得含有 F1aF2a 和 F1bF2b 两个锌指单体的质粒, 图 2 为具

体酶切的电泳图。用同样的方法可获得含有 F1aF2aF3a 和 F1bF2bF3b 3 个锌指单体的质粒，图 3 为分别选取 4 个克隆细胞进行酶切鉴定的电泳图，均含有一个 300 bp 左右的条带，说明 3 个锌指单体连接成功。接着再用同样的方法可获得含有 F1aF2aF3aF4a 和 F1bF2bF3bF4b 4 个锌指单体的质粒，图 4 为分别选取 4 个克隆细胞进行酶切鉴定的电泳图，其中共有 6 个样品均含有一个 400 bp 左右的条带，说明 4 个锌指单体连接成功。

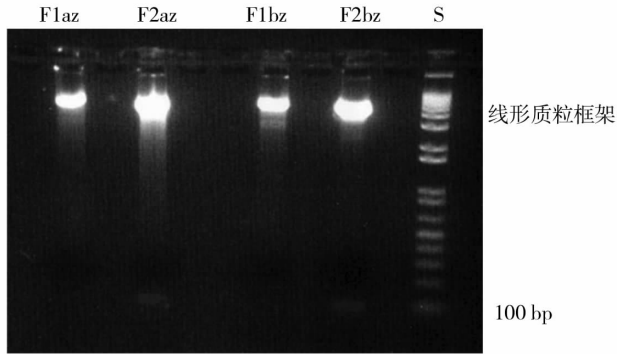


图 2 带有相应锌指单体质粒的酶切电泳图

Fig. 2 The enzyme electrophoresis of plasmid with corresponding zinc finger units

F1az、F2az、F1bz、F2bz 代表相应的质粒；S 为 DNA Marker；用 *Age* I 和 *Bam*H I 酶切 F1az 和 F1bz，可见到特别明亮的线形质粒框架条带，用 *Xma* I 和 *Bam*H I 酶切 F2az 和 F2bz，可见到 100 bp 左右的锌指单体条带

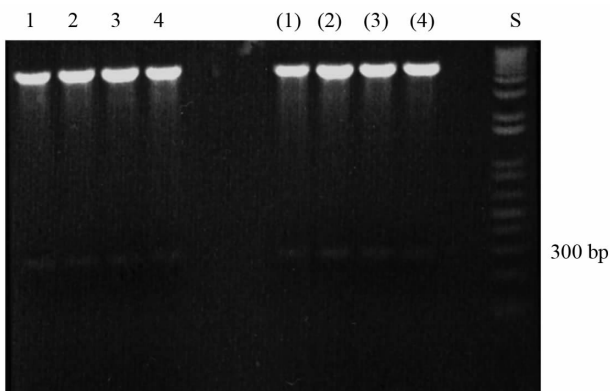


图 3 构建含有 F1aF2aF3a 和 F1bF2bF3b 3 个锌指单体的阳性克隆电泳鉴定图

Fig. 3 Identification of cell clones containing three zinc finger F1aF2aF3a or F1bF2bF3b by electrophoresis

S 为 DNA Marker；1、2、3、4 和 (1)、(2)、(3)、(4) 分别代表挑选的 4 个克隆，用 *Xma* I 和 *Bam*H I 酶切，均可获得 300 bp 左右的条带，表明 F1aF2aF3a 和 F1bF2bF3b 3 个锌指单体均连接成功

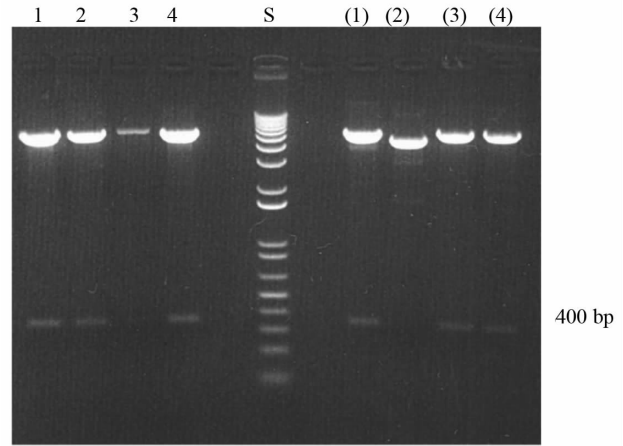


图 4 构建含有 F1aF2aF3aF4a 和 F1bF2bF3bF4b 4 个锌指单体的阳性克隆电泳鉴定图

Fig. 4 Identification of cell clones containing four zinc finger F1aF2aF3aF4a or F1bF2bF3bF4b by electrophoresis S 为 DNA Marker；1、2、3、4 和 (1)、(2)、(3)、(4) 分别代表挑选的 4 个克隆，用 *Xma* I 和 *Bam*H I 酶切，各有 3 个克隆获得 400 bp 左右的条带，表明 F1aF2aF3aF4a 和 F1bF2bF3bF4b 4 个锌指单体连接成功

2.3 活性检测

构建好的 2 个锌指蛋白结构域 F1aF2aF3aF4a 和 F1bF2bF3bF4b，与靶位点的结合能力，主要是通过细菌双杂交系统来检测的^[8]，首先分别构建好相应的质粒，然后共同转进细菌细胞内，进行共表达，最后观测计算出待测样品的半乳糖苷酶的活性强度，从而确定构建好的锌指蛋白结构域与靶位点的结合能力。由表 1 可知，锌指蛋白结构域 F1aF2aF3aF4a 的半乳糖苷酶的活性单位为 10.527，与对照的比值为 1.484，活性相对较高；而锌指蛋白结构域 F1bF2bF3bF4b 的半乳糖苷酶的活性单位为 8.726，与对照的比值为 1.16，活性相对较低。

表 1 锌指蛋白结构域活性分析结果
Table 1 The analysis results of zinc finger protein domain activity

测试样品	半乳糖苷酶的活性单位	与对照的比值
F1aF2aF3aF4a	10.527	1.484
阴性对照 1	7.925	
F1bF2bF3bF4b	8.726	1.16
阴性对照 2	7.524	

3 讨论

蜘蛛丝用途非常广泛，但资源紧缺，故人们一

直尝试使用生物技术的方法改造其它生物体来生产蜘蛛丝, 可惜进程缓慢^[9], 目前虽能将蜘蛛丝基因导入家蚕中生产出蜘蛛丝纤维^[10], 然而产量太低, 原因是家蚕本身要合成大量蚕丝蛋白, 占用了体内过多的氨基酸资源。如文中所描述, 我们已成功构建出一对靶向家蚕丝素重链基因特定位点的由 4 个锌指单体组成的 ZFP, 在此基础上我们拟将其与 *Fok I* 核酸酶功能域融合, 使其成为靶向家蚕丝素重链基因特定位点的锌指核酸酶^[11], 再结合基因打靶方法^[12]敲掉家蚕丝素重链基因, 从而提高转入的蜘蛛丝基因的表达产量, 一旦获得成功, 不但能解决蜘蛛丝纤维资源紧缺的问题, 且经济意义重大。

参考文献:

- [1] 肖安, 胡莹莹, 王唯晔, 等. 人工锌指核酸酶介导的基因组定点修饰技术 [J]. 遗传, 2011, 33(7): 665 - 683.
XIAO A, HU Y Y, WANG W Y, et al. Progress in zinc finger nuclease engineering for targeted genome modification [J]. Hereditas, 2011, 33(7): 665 - 683.
- [2] TOWNSEND J A, WRIGHT D A, WINFREY R J, et al. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases [J]. Nature, 2009, 459(7245): 442 - 445.
- [3] GEURTS A M, COST G J, FREYVERT Y, et al. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases [J]. Science, 2009, 325(5939): 433 - 433.
- [4] CUI X X, JI D N, FISHER D A, et al. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases [J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(1): 64 - 67.
- [5] 刘婷婷, 梁梓强, 梁士可, 等. 利用生物工程技术生产蜘蛛丝的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(5): 132 - 137.
LIU T T, LIANG Z Q, LIANG S K, et al. Research advances of producing spider silk by biotechnology [J]. China Biotechnology, 2016, 36(5): 132 - 137.
- [6] WRIGHT D A, THIBODEAU-BEGANNY S, SANDER J D, et al. Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly [J]. Nat Protoc, 2006, 1(3): 1637 - 1652.
- [7] ZHOU C Z, CONFALONIERI F, MEDINA N, et al. Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): 2413 - 2419.
- [8] JOUNG J K, RAMM E I, PABO C O. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 7382 - 7387.
- [9] 潘志娟, 李春萍, 盛家镛. 高性能蛋白纤维蜘蛛丝的研究与应用(1) [J]. 丝绸, 2004, 10: 40 - 43.
PAN Z J, LI C P, SHENG J Y. Research and application of high performance spider silk protein fiber (1) [J]. Silk, 2004, 10: 40 - 43.
- [10] 张袁松, 赵天福, 赵爱春, 等. 转基因家蚕生产含蜘蛛丝蛋白的新型复合茧丝纤维 [J]. 纺织学报, 2012, 33(5): 1 - 5.
ZHANG Y S, ZHAO T F, ZHAO A C, et al. New silk fiber composite containing spider dragline silk protein and produced by transgenic silkworm [J]. Journal of Textile Research, 2012, 33(5): 1 - 5.
- [11] 张敏杰, 孙玲, 刘真, 等. 可编辑核酸酶介导的哺乳动物基因敲入技术最新进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2016, 38(1): 72 - 80.
ZHANG M J, SUN L, LIU Z, et al. Latest progress of gene knock-in mediated by programmable nucleases in mammals [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2016, 38(1): 72 - 80.
- [12] 聂宇, 乔艳乐, 陈瑶生, 等. 供体同源臂长度对 ZFN 介导的同源重组效率的影响 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2016, 55(4): 100 - 107.
NIE Y, QIAO Y, CHEN Y S, et al. The effect of the length of donor homologous arm on the efficiency of ZFN-induced homologous recombination [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2016, 55(4): 100 - 107.