

四环素诱导肝脏特异表达绿色荧光蛋白 转基因斑马鱼模型建立

张力¹, 刘超¹, 周昕², 谢英¹, 刘树锋¹, 徐增年^{1*}

(1. 河北医科大学实验动物学部, 河北省实验动物实验室, 石家庄 050017;
2. 华中科技大学同济医学院遗传学系, 武汉 430032)

【摘要】 目的 探索 tet-on 四环素诱导表达系统在斑马鱼体内应用策略与技术路线, 构建四环素诱导肝脏特异表达绿色荧光蛋白的转基因斑马鱼, 为条件型功能基因研究及组织特异转基因斑马鱼疾病模型的建立奠定基础。方法 构建肝脏特异启动子 fabp10 启动 rtTA 蛋白表达的重组质粒 pfabp10-rtTA, 联合 pTRE-Tight-BI-AcGFP1 质粒转染 HeLa 细胞后给予 doxycycline 诱导, Western blot 法验证; pfabp10-rtTA 联合 pTRE-Tight-BI-AcGFP1 质粒注射斑马鱼 1-细胞期受精卵后, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline 诱导, 荧光筛选稳定整合个体。结果 共转染 pfabp10-rtTA 与 pTRE-Tight-BI-AcGFP1 的 HeLa 细胞经 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度 doxycycline 诱导培养液诱导, GFP 表达量显著高于不加 doxycycline 培养液对照组; 筛选获得的稳定整合斑马鱼幼鱼, 在浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline 条件下, 肝脏明显有绿色荧光表达, 对照组幼鱼肝脏位置未有明显绿色荧光。结论 Tet-On 四环素诱导表达系统可用于建立四环素调控斑马鱼肝脏特异表达外源基因; 利用该技术可建立诱导肝脏表达 GFP 建立转基因斑马鱼品系, 为建立条件型转基因斑马鱼疾病模型、探索肝脏器官发生发育等研究提供良好的模式动物工具。

【关键词】 斑马鱼; 四环素诱导系统; 肝脏; 绿色荧光蛋白

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 01-0081-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.01.015

Establishment of a transgenic zebrafish model with tetracycline-induced GFP expression in the liver

ZHANG Li¹, LIU Chao¹, ZHOU Xin², XIE Ying¹, LIU Shu-feng¹, XU Zeng-nian¹

(1. Hebei Key Lab of Laboratory Animal Science, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;
2. Department of Medical Genetics, Tongji Medical College; Huazhong University of Science and Technology; Wuhan 430032)

【Abstract】 **Objective** To explore the tetracycline-inducible expression system in zebrafish application strategy and build a transgenic zebrafish with tetracycline-inducible and liver-specific expression of green fluorescent protein. It is a fundamental work to construct conditional gene function studies and tissue-specific transgenic zebrafish disease models. **Methods** In this experiment pfabp10-rtTA was constructed with rtTA under the liver-specific promoter fabp10. pTRE-Tight-BI-AcGFP1 and pfabp10-rtTA were co-transfected into HeLa cells to confirm the doxycycline induction, and after that two plasmids were injected into zebrafish 1-cell stage embryos. After 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline incubation, the integrated individuals stably expressing GFP in the liver were selected. **Results** HeLa cells were transfected with pfabp10-rtTA and pTRE-Tight-BI-AcGFP1 plasmids and cultured with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline, and take 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration of doxycycline as control. Western blot results showed that GFP expression was significantly higher in the experimental group than in the control group. The selected stable integrated zebrafish were cultured at a concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline conditions, with

[基金项目] 河北省科技条件建设项目(12965519D)。

[作者简介] 张力(1984-), 博士, 讲师, 研究方向: 基因修饰疾病模型及相关机制研究。

[通讯作者] 徐增年, 副主任技师, 研究方向: 实验动物与疾病模型的标准化, Email: xzn8219@126.com

obvious GFP expression in the liver, while in the control group without doxycycline conditions, no obvious GFP expression was seen in the liver. **Conclusions** Our findings indicate that the use of the tetracycline-inducible expression system in liver of transgenic zebrafish lines could provide a good animal model tool for establishing conditional transgenic zebrafish disease models, and serve the research such as liver organogenesis and development of liver diseases.

【Key words】 Zebrafish; tet on; Liver; Green fluorescence protein, GFP; Tetracycline-inducible expression system

肝脏为人体新陈代谢、解毒与维持机体动态平衡发挥重要作用^[1]。乙肝、肝硬化、肝癌等在有关肝脏的疾病都困扰着人类的健康和社会发展^[2,3]。因此,分析肝脏的发生、发育机制不仅可以掌握肝脏疾病发生的早期动向、针对疾病进行治疗与干预,还可对肝脏细胞的体外培养、肝脏移植和药物治疗提供指导研究方案^[4]。

斑马鱼作为新兴的模式动物被广泛应用于胚胎发生与器官形成的分子、细胞调控等各项机制研究。利用四环素诱导斑马鱼肝脏表达绿色荧光蛋白,可为器官发生、疾病发生、器官移植等分子机制研究提供良好的实验动物基础。斑马鱼具有便于研究基因功能、易于制作人类疾病模型和高通量药物筛选的优点,因此针对斑马鱼在特定时间、特定种类细胞内进行基因调控表达的特定系统成为了新的研究方向。有关时空调控基因表达的不同研究策略与方法已有报道。一种系统利用了热激或雌激素受体调控 Cre(CreER)表达^[5]。但在斑马鱼中重组只发生于特定温度范围,且条件型调控基因的表达在温度作用下易造成基因丢失。另一种表达系统是利用蜕皮激素受体-Gal4 融合蛋白调控 Gal4 活性^[6]。尽管 Gal4/UAS 系统功能强大且大量由 Gal4 启动的转基因斑马鱼品系已被建立,但是本身系统易被基因沉默且易形成 Gal4 转基因的嵌合表达。另外,细菌 LexA 转录因子与人前列腺素受体的配体结合区域所形成的融合蛋白也可应用于斑马鱼条件型基因调控系统的建立,但是和 Gal4/UAS 系统一样观察到了基因嵌合表达的现象^[7]。最后一种系统则是四环素诱导表达系统,是由 tetracycline (Tet) 或四环素衍生物 doxycycline (Dox) 调控的外源基因可调控表达。此诱导系统已广泛应用于小鼠基因功能研究或模型构建当中,在斑马鱼当中则首先被应用于心脏特异表达外源基因,可通过是否加入四环素类诱导药物可逆的调控基因的开启与否。

1992 年, Gossen 和 Bugard 在大肠杆菌中发现了四环素操纵子(TetO)的负调控原理,将表达阻遏蛋白(TetR)氮端的 207 个氨基酸序列与表达激活结构域的 VP16 蛋白序列相融合,构建合成可表达

四环素诱导的转录激活蛋白(tTA)的调节质粒;将克隆自巨细胞病毒的迷你启动子(PminCMV)与多串联重复四环素操纵子序列(TetO)融合构成四环素反应元件(TRE),构建而成的质粒为表达质粒,所建系统称为 Tet-off 基因诱导表达系统^[8]。之后,通过突变 TetR 序列中的 4 个氨基酸,将 tTA 突变为 rtTA,rtTA 在四环素存在条件下可与 TRE 特异性结合,可开启下游目的基因的表达;相反,在缺乏四环素条件下,rtTA 蛋白构象改变失去与 TRE 结合能力,抑制下游目的基因表达,即 Tet-on 基因诱导表达系统。

该实验将转录激活子 rtTA 构建于斑马鱼肝脏特异启动子 fabp10a 下游,GFP 蛋白表达于 PminCMV 启动子下游,将所构建的二元表达载体用于 HeLa 细胞瞬时转染并对其进行 Western blot 检测,将双质粒用于斑马鱼 1-细胞受精卵注射并进行四环素药物诱导表达,筛选 GFP 表达阳性的转基因斑马鱼个体。结果表明,该 Tet-On 四环素诱导表达系统可成功应用于四环素调控斑马鱼肝脏特异表达外源基因的转基因研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物

性成熟 Tuebingen 品系斑马鱼引自清华大学生命科学学院,饲养条件参照本实验室斑马鱼饲养方法^[9]。

1.1.2 试剂

DM5000 marker(北京康为世纪公司);凝胶回收试剂盒(Omega 公司)、限制性内切酶(TaKaRa 公司),Phusion Polymerase 与 T4 DNA Ligase(Fermentas 公司)、质粒大小提试剂盒(北京天根生化公司)。lipofectamin 2000(Invitrogen 公司),DAB 试剂盒(武汉博士德公司),鼠抗 GFP 单克隆一抗、 β -actin 一抗、辣根过氧化物酶标记二抗均购自碧云天公司;测序均送于北京 Invitrogen 公司完成。

1.2 pfabp10-rtTA 载体的构建

pfabp-C1 质粒由新加坡国立大学龚志远教授馈

赠, pTRE-Tight-BI-AcGFP 质粒购自 Clontech 公司。克隆 rtTA 引物如下(加粗部分为酶切位点序列):

rtTAS: 5'-GC ACCGGT ATGTCTAGACTGGA-CAAGAGCA-3';

rtTAAS: 5'-GC TCCGGA TTACCCGGGGAGCAT-GTC-3'。

PCR 程序为: 98℃ 30 s, 98℃ 10 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 72℃ 终延伸 5 min, 35 循环。将扩增片段 rtTA 与 pfabp10-C1 分别经 Age I、BspE I 双酶切, 分别回收 747 bp rtTA 片段与 6908 bp 的 pfabp10-C1 载体骨架片段, 两片段 16℃ 连接过夜后转化感受态细胞。转化获得的克隆菌落经质粒提取、酶切鉴定后送测序公司测序, 将测序结果正确的质粒大量提取后用于斑马鱼 1-细胞胚胎注射。

1.3 细胞转染

消化后 HeLa 细胞以 1×10^4 密度接种于 12 孔板, 次日进行脂质体转染。转染参照 lipofectamin 2000 说明操作。转染后 24 h 分别加入终浓度为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline, 48 h 后于倒置荧光显微镜下观察 GFP 表达。

1.4 蛋白的提取与 Western blot

提取 doxycycline 诱导 48 h 后的瞬时转染有 pTRE-Tight-BI-AcGFP1 与 pfabp10-rtTA 混合质粒的 HeLa 细胞总蛋白, 并参照免疫印迹检测方法检测 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline 处理组 GFP 蛋白表达情况^[9]。

1.5 斑马鱼胚胎注射

显微注射具体操作参照斑马鱼 1-细胞胚胎注射方法^[9]。注射质粒浓度分别为 pfabp10-rtTA 0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 与 pTRE-Tight-BI-AcGFP₁ 0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 注射体积 2 nL。注射后受精卵于 (28 \pm 0.5)℃ 系统水中恢复培养, 并在 1~11 d 后倒置荧光显微镜下观察并筛选肝脏位置可特异表达 GFP 的阳性胚胎。

2 实验结果

2.1 pfabp10-rtTA 载体构建

pfabp10-rtTA 构建流程如图 1, 将扩增片段 rtTA 与 pfabp10-C1 分别经 Age I、BspE I 双酶切, 分别回收 6902 bp 的 pfabp10-C1 载体骨架片段(图 2A) 与 759 bp rtTA 片段(图 2B)。pfabp10-rtTA 重构质粒经 Age I、BspE I 双酶切鉴定, 鉴定结果如图 2C。

2.2 四环素诱导 GFP 蛋白表达的鉴定

将 pfabp-C1 质粒转染 HeLa 细胞, 发现斑马鱼

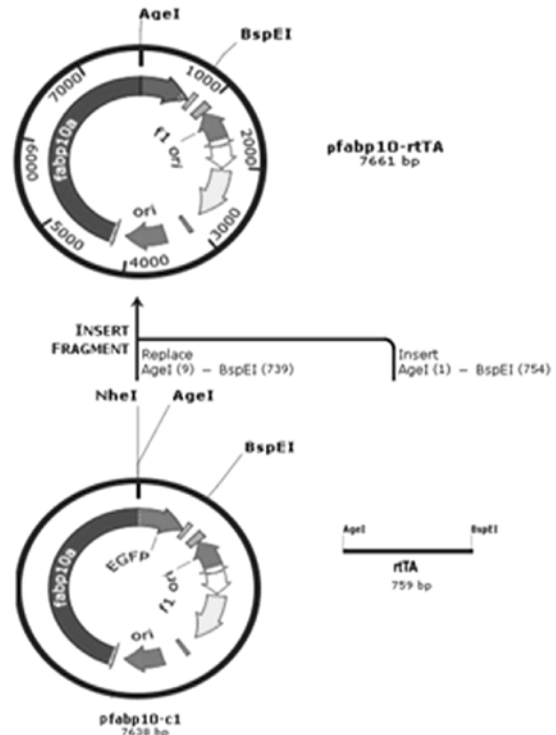
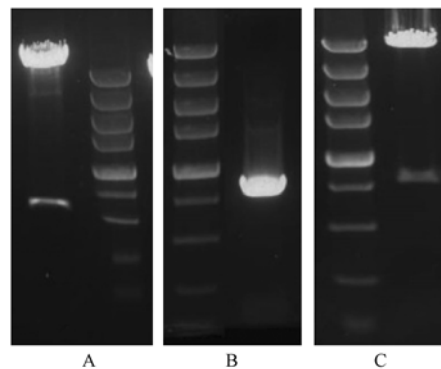


图 1 pfabp10-rtTA 载体构建

Fig. 1 The construction map of pfabp10-rtTA



注: A: pfabp10-C1 经 Age I 与 BspE I 酶切后结果; B: PCR 克隆 rtTA 片段; C: pfabp10-rtTA 经 Age I 与 BspE I 酶切鉴定结果。

图 2 载体构建电泳结果

Note. A: pfabp10-C1 plasmid cut by enzyme Age I and BspE I; B: rtTA fragment cloned by PCR; C: Identification of pfabp10-rtTA cut by Age I and BspE I.

Fig. 2 Electrophoretic results in the construction process of pfabp10-rtTA

肝脏特异启动子同样可启动 GFP 蛋白在 HeLa 细胞中表达。因此, 将 pfabp10-rtTA 与 pTRE-Tight-BI-AcGFP1 质粒混合转染 HeLa 细胞, 之后加入终浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 doxycycline 的细胞培养液, 处理 48 h 后荧光镜下 GFP 蛋白表达并提取细胞蛋白进行免

疫印迹检测。结果表明,转染并加入 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline 的 HeLa 细胞 GFP 蛋白表达量明显高于未加入 doxycycline 转染细胞表达量(见图 3)。

2.3 四环素诱导表达 GFP 转基因斑马鱼的建立

pfabp10-rtTA 与 pTRE-Tight-BI-AcGFP1 质粒纯化后显微注射到斑马鱼 1-细胞期受精卵,72 h 幼鱼孵出卵壳后加入终浓度为 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 doxycycline 胚胎孵化液体,加药后 24 h 在倒置荧光显微镜下可以观察到绿色荧光蛋白在斑马鱼早期肝脏位置成功表达,未加入 doxycycline 对照组中未发现明显绿色荧光蛋白表达(图 4)。

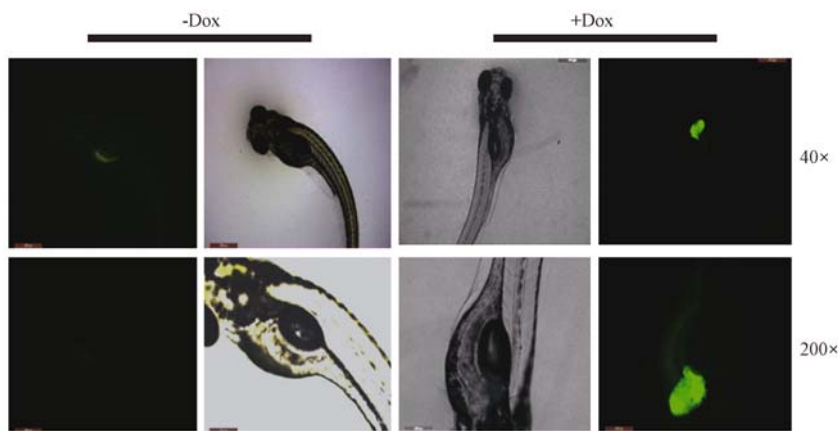


图 4 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline 诱导转基因斑马鱼肝脏中 GFP 的表达情况

Fig. 4 GFP expression in transgenic zebrafish induced by $30\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline

3 讨论

斑马鱼作为新兴的模式动物被广泛应用于胚胎发生与器官形成的分子、细胞调控等机制研究。斑马鱼产卵量大、胚胎透明、发育时程较短的生物特性使其易于在胚胎发育阶段进行基因功能研究。大量基因突变斑马鱼的获得使其成为了在器官发育进程、生理构造、疾病发生和行为研究方面极好的模式生物资源。目前,利用转基因技术已获得了若干人类疾病模型的转基因斑马鱼,从而为药物筛选、疾病研究等提供了新的研究工具。自 2003 年建立首个斑马鱼白血病模型后,又陆续建立了斑马鱼的黑色素瘤、横纹肌肉瘤、肝癌等模型^[10,11]。Yan 等^[12]在斑马鱼胰岛细胞、肌肉细胞和神经元中表达 MYCN 基因,表现出胰腺、神经内分泌癌的相关症状。

自从斑马鱼测序完结以来,已发现有上千的未知功能基因值得深度探索,针对可调控基因表达系统的研究对阐明未知基因功能起着非常重要的作

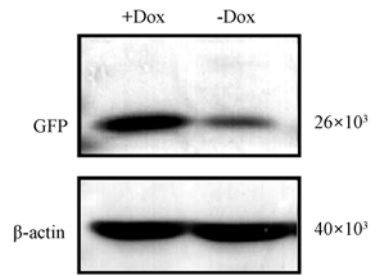


图 3 HeLa 细胞分别经 pfabp10-rtTA 与 pTRE-Tight-BI-AcGFP1 转染后免疫印迹分析

Fig. 3 The GFP expression of HeLa cells transfected with pfabp10-rtTA and pTRE-Tight-BI-AcGFP1 plasmids by Western blot

用。四环素调控系统就是一种可用于细胞水平与动物水平的解决方法。该诱导体系已成功应用于斑马鱼特异型心脏表达与大脑表达^[13,14]。Gong 等也通过将 xmrk, Kars, Myc 等基因联合 tet on 系统构建出各种四环素调控诱发的肝癌模型,且生物表型与人类肝癌发病表型类似,通过芯片与比较医学分析获取了大量有关肝癌发生、迁移等机制信息,为研究人类肝癌发病机制及药物筛选提供了良好的转基因动物模型^[10,15]。

尽管四环素诱导体系已广泛应用于动植物细胞以及从线虫到小鼠等实验模式动物,目的基因的泄露表达仍然是该体系值得考虑的问题,尤其是针对那些编码持家基因的蛋白和对发育、生长具有关键作用的转录因子^[16]。rtTA 蛋白即便在无四环素的情况下也对 TetO 序列有一定的亲和力^[17-19]。在此实验中也同样在细胞与动物实验水平发现了轻微泄露现象,少部分注射胚胎在未加入 doxycycline 条件下,肝脏同样表现出 GFP 表达。为了避免泄露,可

尝试将四环素诱导沉默子 (tTS) 引入 tet on 体系, 在无四环素诱导条件下, tTS 可与 TetO 结合进一步抑制 TRE 元件下游基因的表达。因此, 优化后的四环素诱导体系更适用于转基因斑马鱼构建。将目的基因构建于 pTRE-Tight-BI-AcGFP1 质粒中双向启动子 PminCMV 下游, 靶基因与 GFP 在共同启动子作用下同时受到四环素类药物调控表达, 在不影响靶基因功能的前提下通过 GFP 侧面反映基因表达程度与时间, 可为基因功能的研究或疾病模型构建等研究提供良好的斑马鱼模型。

斑马鱼肝脏对大量化学致癌物易感, 且易产生与人类、哺乳动物相似的疾病类型。但仍有大量问题亟待解决, 如参与斑马鱼疾病形成的分子机制与人类的是否相同? 斑马鱼器官病变的分子标志与人类分子标志是否一致? 在分子水平, 斑马鱼体内的病灶组织与人体内的有多大程度的相似性? 比较基因组学发现并确定许多与癌症发生相关的基因, 如原癌基因、抑癌基因、细胞周期相关基因、血管发生相关基因和生长因子等都在斑马鱼中存在。最近, 已有文献报道, 通过比较 4 种人类肝癌组织与斑马鱼肝癌组织芯片表达谱确认了其中分子调控的保守性^[15]。建立四环素特异诱导肝脏表达系统可应用于肝脏疾病模型构建、肝脏发育调控研究、肝脏再生以及高通量药物筛选研究等多领域。因此, 此研究构建肝脏特异型诱导表达模型对研究斑马鱼肝脏的发生、发育及肝脏疾病的病变、转归具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Field HA, Ober EA, Roeser T, et al. Formation of the digestive system in zebrafish. I. Liver morphogenesis [J]. Dev Biol, 2003. 253(2): 279-290.
- [2] Dienstag JL. Hepatitis B virus infection [J]. N Engl J Med, 2008. 359(14): 1486-1500.
- [3] Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, et al. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis [J]. World J Gastroenterol, 2008. 14(27): 4300-4308.
- [4] 林春蕾, 郭传勇. 白藜芦醇抗肝癌作用研究 [J]. 中国医学导报, 2013(10): 22-24
- [5] Hans S, Kaslin J, Freudenreich D, et al. Temporally-controlled site-specific recombination in zebrafish [J]. PLoS ONE, 2009. 4(2): e4640.
- [6] Grabher C, Wittbrodt J. Efficient activation of gene expression using a heat-shock inducible Gal4/Vp16-UAS system in medaka [J]. BMC Biotechnol, 2004. 4: 26.
- [7] Gerety SS, Breau MA, Sasai N, et al. An inducible transgene expression system for zebrafish and chick [J]. Development, 2013. 140(10): 2235-2243.
- [8] Baumeister R, Helbl V, Hillen W. Contacts between Tet repressor and tet operator revealed by new recognition specificities of single amino acid replacement mutants [J]. J Mol Biol, 1992. 226(4): 1257-1270.
- [9] 张力, 谢英, 刘树锋. 过表达 BAFF 转基因斑马鱼的构建 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(11): 46-49.
- [10] Langenau DM, Traver D, Ferrando AA, et al. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish [J]. Science, 2003. 299(5608): 887-890.
- [11] Li Z, Huang X, Zhan H, et al. Inducible and repressible oncogene-addicted hepatocellular carcinoma in Tet-on xmrk transgenic zebrafish [J]. J Hepatol, 2012. 56(2): 419-425.
- [12] Yang HW, Kutok JL, Lee NH, et al. Targeted expression of human MYCN selectively causes pancreatic neuroendocrine tumors in transgenic zebrafish [J]. Cancer Res, 2004. 64(20): 7256-7262.
- [13] Huang CJ, Jou T S, Ho Y L, et al. Conditional expression of a myocardium-specific transgene in zebrafish transgenic lines [J]. Dev Dyn, 2005. 233(4): 1294-1303.
- [14] Zhu P, Narita Y, Bundschuh ST, et al. Optogenetic dissection of neuronal circuits in zebrafish using viral gene transfer and the Tet system [J]. Front Neural Circuits, 2009. 3: 21.
- [15] Li Z, Huang X, Zhan H, et al. A transgenic zebrafish liver tumor model with inducible Myc expression reveals conserved Myc signatures with mammalian liver tumors [J]. Dis Model Mech, 2013. 6(2): 414-423.
- [16] Zhu Z, Ma B, Homer RJ, et al. Use of the tetracycline-controlled transcriptional silencer (tTS) to eliminate transgene leak in inducible overexpression transgenic mice [J]. J Biol Chem, 2001. 276(27): 25222-25229.
- [17] Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, et al. doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(20): 10933-10938.
- [18] Baron U, Bujard H. Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances [J]. Methods Enzymol, 2000. 327: 401-421.
- [19] Urlinger S, Baron U, Thellmann M, et al. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(14): 7963-7968.

[收稿日期] 2014-09-19