



# 利用TALEN技术高效制备TXNIP基因敲除小鼠模型

张欢欢<sup>1</sup>, 刘楚新<sup>2</sup>, 马月<sup>1</sup>, 肖丽萍<sup>2</sup>, 李飞达<sup>2</sup>, 应华忠<sup>1</sup>, 刘欢<sup>2</sup>

(1. 浙江省医学科学院浙江省实验动物中心, 杭州 310013; 2. 深圳华大基因研究院, 深圳 518083)

**【摘要】** 目的 利用显微注射技术注射敲除 *Txnip* 基因的 TALEN mRNA 获得 TXNIP 敲除小鼠。方法 在线设计 *Txnip* 敲除位点, 构建 TALEN 载体并在细胞水平验证剪切活性, 体外转录 TALENs 成 mRNA 并通过显微注射技术注射到 C57BL/6J 小鼠受精卵, 对 F0 代小鼠进行 DNA 水平鉴定获得 TXNIP 敲除小鼠。结果 在 *Txnip* 第一外显子上设计了 TALEN 识别剪切位点, 并在细胞水平验证具有剪切活性, 注射 mRNA 到受精卵获得了 4 只敲除小鼠, 其中 2 只 *Txnip* 发生移码突变, 成功制备了 TXNIP 敲除小鼠。结论 通过注射 TALENs mRNA 可以高效制备 TXNIP 敲除小鼠。

**【关键词】** TALEN; 显微注射; TXNIP; 基因敲除; 模型, 小鼠

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0009-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.002

## Efficient preparation of a TXNIP knockout mouse model by transcription activator-like effector nucleases (TALEN)

ZHANG Huan-huan<sup>1</sup>, LIU Chu-xin<sup>2</sup>, MA Yue<sup>1</sup>, XIAO Li-ping<sup>2</sup>, LI Fei-da<sup>2</sup>, YING Hua-zhong<sup>1</sup>, LIU Huan<sup>2</sup>

(1. Zhejiang Laboratory Animal Center, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China;

2. BGI-Shenzhen, Shenzhen 518083)

**【Abstract】 Objective** To knockout the murine *Txnip* gene using microinjection of transcription activator-like effector nuclease (TALEN) mRNAs. **Methods** TALEN knockout site recognizing *Txnip* was designed by tools on line, then constructed the vectors and assayed its cleavage activity at cellular level. TALEN mRNA was transcribed *in vitro* and microinjected into C57BL/6J mouse zygotes. F0 mice were verified at DNA level with *Bam*HI and TXNIP-knockout mice were obtained. **Results** We designed and constructed TALENs which recognized and cut the first exon of *Txnip*, and got four TXNIP knockout mice, among which two were frameshift mutation, demonstrating that the TXNIP-knockout mice were generated by TALEN technique. **Conclusions** Microinjection of *in vitro* transcribed TALEN mRNAs into murine zygotes is a highly effective and convenient way to develop TXNIP-knockout mouse model.

**【Key words】** TALEN; Microinjection; TXNIP; Gene knockout; Model, mouse

基因敲除小鼠模型是研究基因功能的重要工具之一,最早科学家利用同源重组技术制备基因敲除小鼠 ES 细胞系,然后通过囊胚注射制备基因敲

除小鼠<sup>[1,2]</sup>,近年来兴起的基因组编辑工具,例如锌指核酸酶 ZFN<sup>[3]</sup>,转录激活因子样效应物核酸酶 TALEN<sup>[4]</sup>,规律成簇间隔短回文重复序列 CRISPR 以及 CRISPR 相关蛋白系统 CRISPR/Cas 系统<sup>[5]</sup>,都

**【基金项目】** 浙江省卫生高层次创新人才项目,浙江省科技厅院所专项(2014F10033)。

**【作者简介】** 张欢欢(1985-),女,研究实习员,研究方向:动物疾病模型。E-mail: zhanghuanhuan2014@126.com。

**【通讯作者】** 刘欢(1984-),男,助理研究员,研究方向:转基因动物开发。E-mail: liuhuan@genomics.cn。

大大提高了基因敲除小鼠制备效率。TALEN (transcription activator-like effector nucleases) 通过类转录激活因子效应物 (TALE) 识别 DNA 序列,并在特定位点对 DNA 进行切割,形成双链断裂 (DSB),随后在非同源末端连接 (NHEJ) 修复机制下形成随机的多个碱基的插入或删除,从而实现基因敲除<sup>[6]</sup>。

硫氧还蛋白结合蛋白 (thioredoxin-interacting protein, *Txnip*) 通过与硫氧还蛋白 (thioredoxin, Trx) 结合抑制其活性,从而发挥调节氧化还原的作用<sup>[7]</sup>。*TXNIP* 不仅通过调节 NLRP3 参与 2 型糖尿病的发生<sup>[8]</sup>,而且是肿瘤抑制相关基因,与黑色素瘤、肝细胞癌、乳腺癌、白血病等联系密切<sup>[9]</sup>。本研究采用 TALEN 技术敲除 C57BL/6J 小鼠 *Txnip* 基因,为进一步研究 *Txnip* 的生物学功能奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 TALENs 位点设计

根据 NCBI 上 *Txnip* 基因序列,利用 TALEN 在线设计工具 (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/ChoiceMenu.aspx>) 设计基因敲除位点。TALENs 敲除靶序列如下: TALEN-L 靶向 5'-TGTGAAGTTACCCGAGTC-3', TALEN-R 靶向 5'-TGGCCACGCCGCAAGCCA-3'。中间的 spacer 序列为 AAAGCCGTCAGGATCC,其中 GGATCC 为 *Bam*HI 酶切位点。

### 1.2 TALENs 载体构建

采用 Golden gate TALEN and TAL Effector kit<sup>[10]</sup> 将识别靶序列的 RVD 模块构建到 pTAL3 载体上。然后将 TALEN 片段通过 *Afl*II 和 *Xho*I 双酶切构建到 pcDNA3.1 载体上,使得 TALEN 表达由 CMV 或者 T7 启动子启动,其中 CMV 启动 TALENs 在动物细胞中表达,T7 启动 TALENs 体外转录成 mRNA。将测序正确的 TALENs 表达载体采用无内毒素质粒提取试剂盒 (OMEGA) 提取质粒备用。

### 1.3 TALENs 载体活性验证

复苏小鼠 Hepa1-2 细胞系,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基在 6 孔板上进行培养,培养条件为 5% CO<sub>2</sub>, 37℃。采用 lipofectamine (Invitrogen) 将 TALEN-F 和 TALEN-R 共转染细胞,并且以 EGFP 转染作为阴性对照,转染后继续培养。48 h 后用 0.25% 胰酶 (Life technologies) 消化收集细胞,提取 DNA。设计活性鉴定引物,引物序列如下:TXNIP-F

为 5'-TCGGCTCAATCATGGTGATGT-3', TXNIP-R 为 5'-TAGGGGGGTGAAGGCTAGTGA-3'。以细胞 DNA 为模板进行 PCR 扩增,并采用 *Bam*HI 进行酶切鉴定,其中扩增片段大小为 421 bp,酶切片段为 146 bp + 275 bp。

### 1.4 体外转录

*Afl*II 和 *Xho*I 双酶切 TALENs 无内毒素质粒,电泳回收片段,并用 cycle-purekit (OMEGA) 进行纯化。以纯化片段为模板,采用 mMESSAGE mMACHINE T7 Kit (Life Technologies) 进行体外转录合成加帽 mRNA,再用 Poly (A) Tailing Kit (Life Technologies) 对 mRNA 进行加尾。将转录的稳定 mRNA 纯化回收并用显微注射缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl/0.1 mmol/L EDTA, pH 7.4) 稀释到 100 ng/μL, -80℃ 保存备用。

### 1.5 显微注射

C57BL/6J 品系小鼠由上海市西普尔必凯实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号 SCXK (沪)2013-0016; ICR 小鼠由浙江省医学科学院提供,实验动物生产许可证号 SZXK (浙)2014-0001。实验动物使用许可证号:SYXK (浙)2014-0008。将 *Txnip* 的 TALEN-L 和 TALEN-R mRNA 混合在一起后在显微镜 (Nikon) 下利用显微操作系统 (Eppendorf) 注射到 C57BL/6J 的受精卵中,并移植到 ICR 受体雌鼠,具体实验方法参考小鼠胚胎操作实验手册<sup>[11]</sup>。

### 1.6 突变检测及基因型分析

取出生 1 周龄小鼠鼠尾提取基因组 DNA,按照活性鉴定方法对 F0 代小鼠进行鉴定。并将 *Bam*HI 酶切鉴定为阳性的小鼠的 PCR 扩增产物连接到 T 载体上,进行 Sanger 测序 (Invitrogen),进行突变基因型分析。

## 2 结果

### 2.1 TALEN 载体构建及活性鉴定

小鼠 *Txnip* 基因有两个已知转录本,为了高效敲除 TXNIP 蛋白表达,本研究选择的敲除位点为 *Txnip* 基因的第一外显子区域两个转录本重叠的部分,如图 1。TAL-effector 识别模块 HD、NG、NI、NN 分别识别碱基 C、T、A、G<sup>[12]</sup>,因此本研究中识别 *Txnip* 的模块序列分别为 5'-NN-NG-NI-NI-NN-NG-NG-NI-HD-HD-HD-NN-NI-NN-NG-HD-3' 和 5'-NN-NN-HD-HD-NI-HD-NN-HD-HD-NN-HD-NI-NI-NN-

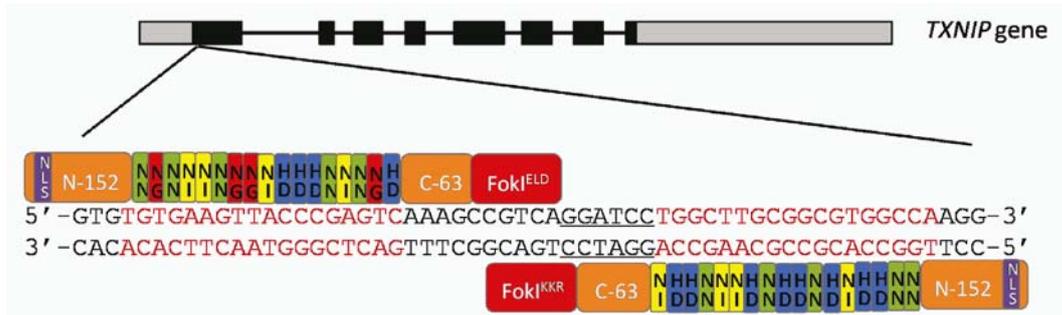


图 1 *Txnip* 基因敲除 TALENs 位点

Fig. 1 The TALENs binding site in the mouse *Txnip* gene

HD-HD-NI-3'。为了便于活性鉴定及后期小鼠阳性鉴定,本研究识别序列中间的 spacer 含有 *Bam*HI 酶切位点,如图 1 所示。

将构建的好的 TALENs 质粒转染小鼠 Hepa1-2 细胞系,进行活性鉴定。如图 2 所示,与阴性对照相比,*Bam*HI 酶切后,*Txnip* TALENs 转染的细胞 DNA 有未切开片段,说明其部分 DNA 样品 *Bam*HI 酶切位点被破坏,进而验证了本研究采用的 TALENs 有剪切活性。

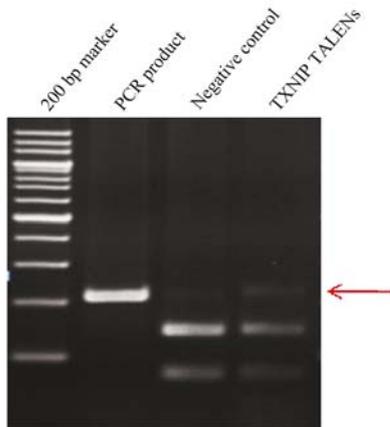


图 2 *Txnip* TALENs 剪切活性验证酶切电泳图

Fig. 2 Cleavage activity of TALENs by restriction fragment length polymorphism analysis

## 2.2 TXNIP 基因敲除小鼠构建及鉴定

体外转录分别得到 TALEN-L 和 TALEN-R 的 mRNA,如图 3。将 mRNA 分别稀释到 100 ng/ $\mu$ L 后等量混合进行胞质注射,共注射 400 枚受精卵,移植 383 枚到 14 只 ICR 受体母鼠,其中 8 只怀孕,出生 26 只 F0 代小鼠。对出生的 26 只 F0 代小鼠进行 PCR 酶切鉴定,从图 4A 可以看出,跟阴性对照(N)相比,11#,20#,22#,26#都有 *Bam*HI 未切开片段。经 Sanger 测序验证,11#小鼠属于嵌合体,有 3 种基因型,包括 WT、缺失 21 bp、缺失 4 bp,20#、22#、26#

小鼠属于基因单敲除,分别缺失 15 bp、10 bp、19 bp (图 4B)。鉴定结果显示,26 只 F0 代小鼠有 4 只敲除阳性小鼠,敲除效率为 15.4%,其中 22#和 26#小鼠 *Txnip* 发生移码突变,可作为 F0 代阳性小鼠继续繁育获得 TXNIP 双敲除模型。本研究获得了 *Txnip* 基因敲除小鼠 founder,可作为基因功能研究工具深入探讨 *Txnip* 基因的生物学活性。

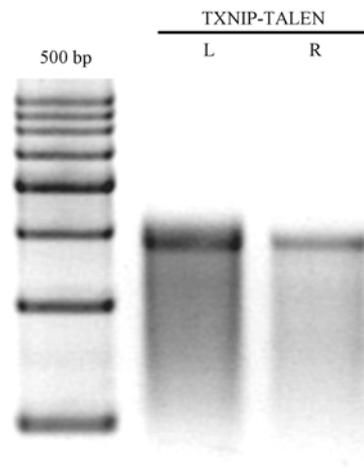


图 3 *Txnip* TALENs 体外转录 mRNA

Fig. 3 *Txnip* TALEN mRNAs transcribed *in vitro*

## 3 讨论

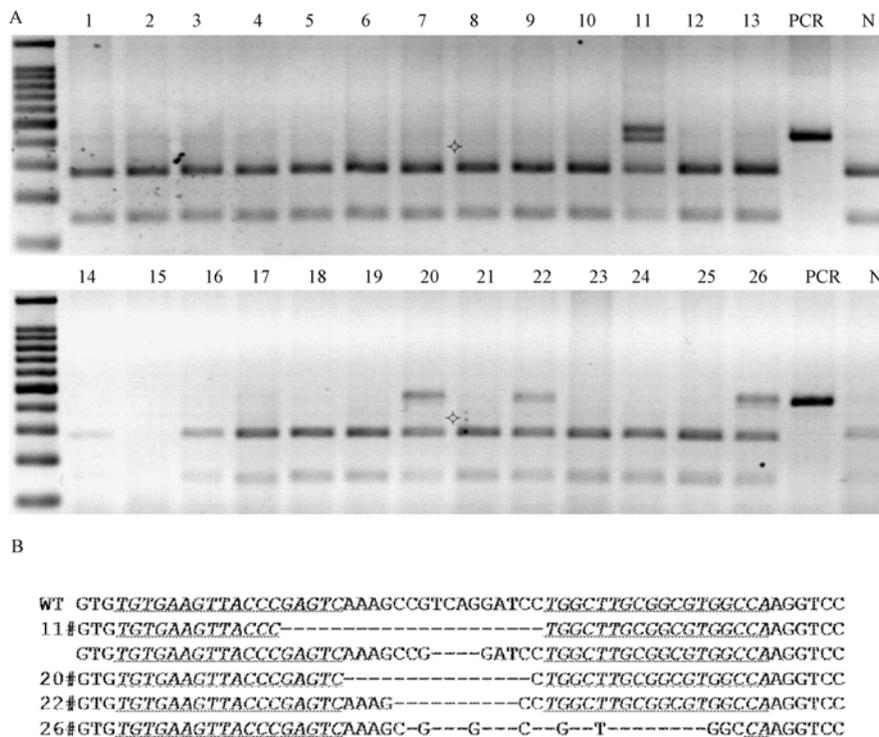
相对于传统打靶同源重组  $10^{-6}$  概率,基因组编辑工具大大提升了基因敲除的效率,因而在基因功能研究领域快速推广。TALEN 技术 2012 年被 Science 杂志评为十大科学突破之一,具有操作简单,特异性高等特点,广泛应用于动物、植物、微生物等多个物种<sup>[13]</sup>。通过截短 TALE 蛋白的 N-端和 C-端并连接异源 FokI (ELD/KKR) 实现的 TALEN 系统优化可以有效提高剪切效率并降低脱靶效率<sup>[14]</sup>, Xin 等<sup>[15]</sup> 采用该优化系统获得 89.5% 的敲除细胞系。本研究实验结果显示 *Txnip* 敲除阳性率为

15.4%, 远低于该系统在其他基因敲除动物制备的效率<sup>[16,17]</sup>, 可能原因有两种, 第一本研究构建的 TALEN 活性低于其他研究者选择的 TALEN 的活性, 因而造成显微注射获得的阳性受精卵较少; 第二 *Txnip* 基因本身参与细胞的凋亡<sup>[9]</sup>, 对细胞的生长发育有一定的影响, 造成出生小鼠阳性率较低。

通过胞质注射 TALEN mRNA 的方法制备的基因敲除动物模型, 其部分 F0 代基因型为嵌合体<sup>[18]</sup>, 这跟注射的 mRNA 量有一定的关系, 当受精卵发育到二细胞期或者四细胞期时, 仍然有表达 TALEN 的 mRNA 进行翻译并对基因组进行剪切, 因此发育的囊胚存在多种基因型<sup>[4]</sup>。本研究获得的 11# *Txnip* 敲除小鼠表现为 3 种基因型, 属于嵌合体。多数嵌合体小鼠繁育的 F1 代小鼠能够将不同的基因型分离出来, 并保持稳定遗传。因此 TALEN 技术虽然能够快速制备基因敲除动物模型, 获得纯合的敲除模型则需要更长的时间进行繁育和筛选。

TXNIP(thioredoxin-interacting protein) 具有多种

生物学功能, 尤其在氧化还原平衡中起着重要作用<sup>[19]</sup>。TXNIP 既可以通过 ASK1-Trx-TXNIP 信号通路调节细胞凋亡<sup>[20]</sup>、抑制 DNA 转录<sup>[21]</sup>, 还可以与 NLRP3 结合激活炎症反应<sup>[22]</sup>, 因而 TXNIP 可能发挥抑制肿瘤的功能, 尤其是在肝癌<sup>[23]</sup>、乳腺癌<sup>[24]</sup>、膀胱癌<sup>[25]</sup>、白血病<sup>[26]</sup>等癌症中表达量均显著下降。本研究通过注射敲除 *Txnip* 的 TALEN mRNA 构建的 TXNIP 敲除小鼠, 除了 *Txnip* 基因序列发生改变, 没有引入任何外源片段, 相对于传统方法更加“干净”。除此之外, TALEN 技术敲除基因表达的原理是识别特异序列并进行剪切形成双链断裂( (double strand break, DSB), 通过非同源末端修复引入序列改变。有报道表明, 切割位点越靠近 5' 端基因表达起始位点, 对其形成的蛋白功能影响越大, 从而基因敲除的效应越明显<sup>[27]</sup>。本研究设计的识别序列在 *Txnip* 基因的第一外显子, 而且是两个转录本重叠的部分, 因而本研究获得的 TXNIP 敲除小鼠是研究 TXNIP 功能的良好模型。



A: 出生小鼠 *Txnip* 基因 PCR 产物 *Bam*HI 酶切鉴定电泳结果; B: 酶切鉴定阳性小鼠测序结果。

**图 4** *Txnip* 小鼠鉴定结果

: Genotyping of all newborn mice by gel electrophoresis of *Bam*HI digested PCR products spanning the *Txnip* gene target site; B: Sanger sequencing of positive founder mice which were identified by *Bam*HI digestion.

**Fig. 4** Identification of TALEN-induced *Txnip* mutants in the founder mice.

## 参考文献:

- [ 1 ] Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells [J]. *Cell*, 1987, 51(3): 503 - 512.
- [ 2 ] Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes [J]. *Nature*, 1988, 6197(336): 348 - 352.
- [ 3 ] Carbery ID, Ji D, Harrington A et al. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases [J]. *Genetics*, 2010, 186(2): 451 - 459.
- [ 4 ] Sung YH, Baek IJ, Kim DH, et al. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1): 23 - 24.
- [ 5 ] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910 - 918.
- [ 6 ] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143 - 148.
- [ 7 ] Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, et al. Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(31): 21645 - 21650.
- [ 8 ] 王定坤, 陈广, 陆付耳. NLRP3 炎症小体与 2 型糖尿病的研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2014, 45(2): 111 - 114.
- [ 9 ] 李立夫, 梁莉. TXNIP 基因与肿瘤发生及转移 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28(3): 222 - 226.
- [ 10 ] Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(12): e82.
- [ 11 ] 孙青原, 陈大元. 小鼠胚胎操作实验手册(第 3 版) [M]. 化学工业出版社. 2006: 235 - 241.
- [ 12 ] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397 - 405.
- [ 13 ] 沈延, 黄鹏, 张博. TALEN 构建与斑马鱼基因组定点突变的实验方法与流程 [J]. *遗传*, 2013, 35(4): 533 - 544.
- [ 14 ] Bedell VM, Wang Y, et al. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system [J]. *Nature*, 2012, 7422(491): 114 - 118.
- [ 15 ] Xin J, Yang H, Fan N, et al. Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs [J]. *PLoS ONE*. 2013, 12(8): e84250.
- [ 16 ] 李飞达, 李勇, 刘欢, 等. 利用 TALENs 和手工克隆技术高效获得 GHR 基因敲除巴马猪 [J]. *遗传*, 2014, 36(9): 903 - 911.
- [ 17 ] Davies B, Davies G, Preece C, et al. Site specific mutation of the Zic2 locus by microinjection of TALEN mRNA in mouse CD1, C3H and C57BL/6J oocytes [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e60216.
- [ 18 ] Tesson L, Usal C, Ménoret S, et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 695 - 696.
- [ 19 ] Spindel ON, World C, Berk BC. Thioredoxin interacting protein: redox dependent and independent regulatory mechanisms [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16(6): 587 - 596.
- [ 20 ] Lu J, Holmgren A. Thioredoxin system in cell death progression [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(12): 1738 - 1747.
- [ 21 ] Minn AH, Pise-Masison CA, Radonovich M, et al. Gene expression profiling in INS-1 cells overexpressing thioredoxin-interacting protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336(3): 770 - 778.
- [ 22 ] Zhou R, Tardivel A, Thorens B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(2): 136 - 140.
- [ 23 ] Kwon HJ, Won YS, Suh HW, et al. Vitamin D3 upregulated protein 1 suppresses TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation in hepatocarcinogenesis [J]. *J Immunol*, 2010, 185(7): 3980 - 3989.
- [ 24 ] Butler LM, Zhou X, Xu WS, et al. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(18): 11700 - 11705.
- [ 25 ] Nishizawa K, Nishiyama H, Matsui Y, et al. Thioredoxin-interacting protein suppresses bladder carcinogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(10): 1459 - 1466.
- [ 26 ] Zhou J, Bi C, Cheong LL, et al. The histone methyltransferase inhibitor, DZNep, up-regulates TXNIP, increases ROS production, and targets leukemia cells in AML [J]. *Blood*, 2011, 118(10): 2830 - 2839.
- [ 27 ] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Science*, 2014, 6166(343): 80 - 84.

[ 修回日期 ] 2015-04-20