

利用 P 因子不精确剪切获得 *Tis11* 基因敲除果蝇

谢昌传,汪雪坤,李立胜,田丽丽,吴秀榕,洪丽欣,周化民*

(厦门大学生命科学学院,细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,福建 厦门 361005)

摘要: *Tis11* 是哺乳动物基因 TTP 在果蝇中的同源物,其基因位于果蝇 X 染色体 11B9 区.它含有两个保守的顺式 Cys-X₈-Cys-X₅-Cys-X₃-His (CCCH) 锌指结构.它与 mRNA 的稳定性有关.为了进一步从动物水平研究 *Tis11* 的生物学功能,作者利用 P 因子不精确剪切的特性来获得 *Tis11* 基因敲除果蝇.以 P 因子插入果蝇 19949 为起始材料,经过一系列杂交后,挑取了 700 株 P 因子被切除的果蝇.通过 PCR 筛选和鉴定,从这 700 株果蝇中获得一株果蝇 279,它的 *Tis11* 基因的第 2 个外显子中包括翻译起始位点的区域被删除.

关键词: 果蝇;P 因子;不精确剪切;*Tis11*

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2007)06-0857-06

黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 是遗传学中最普遍使用的研究材料,是奠定经典遗传学基础的重要模式生物之一.基于清晰的遗传背景和便捷的遗传操作,果蝇在发育生物学、生物化学、分子生物学等领域占据了不可替代的位置.

在果蝇的基因组内含有许多可转座的元件家族,如: *hoho*、*mariner*、*Hermes*、*Minos*、*piggyBac* 等^[1-3]. 其中一类与细菌的转座子很类似,称为 P 因子.这类元件两端有短的反向重复序列,当它插入到基因组中时,会在插入位点产生靶位点 DNA 的正向重复序列;与细菌转座子一样,这些元件在基因组外就失去了它的功能.所有 P 因子末端都具有 31 bp 的反向重复序列和 11 bp 亚末端反向重复序列^[4]. 这些顺式重复序列是 P 因子有效转座所必需的,但只有这些重复序列并不能使 P 因子产生有效的转座^[5]. 在果蝇体内野生型的 P 因子最长约 2.9 kb,有 4 个开放阅读框,短的 P 因子也经常出现,都是由野生型 P 因子内部缺失所形成的.

P 因子的激活具有组织特异性:它仅发生在生殖细胞中^[6]. P 因子在体细胞和生殖细胞中都被转录.因为转录终止位点的泄漏使其在体细胞和生殖细胞中的转录产物分别为 2.5 kb 和 3.0 kb.在体细胞中,P 因子仅前 2 个内含子被剪接,产生了由阅读框 0-阅读框 1-阅读框 2 构成的 mRNA.这个 mRNA 编码一个分子量为 66 ku 的蛋白,该蛋白是转座酶的阻遏物.而在生

殖细胞中,3 个内含子均被剪切,4 个阅读框拼接在一起形成 mRNA,它编码一个 87 ku 的具有转座酶活性的蛋白. P 因子转座时,它结合在 P 因子两端的亚末端区域并且抑制转录^[7-8]. 在体外转座时,GTP 是转座所必需的^[9]. P 因子通过一种 Tn10 式的非复制型“切割和粘帖”机制发生转座.

自 P 因子被发现以来,它已经成为绘制果蝇基因组图谱的强有力的分子生物学工具.以 P 因子为基础的一系列的转基因载体被成功开发,并用于果蝇基因功能的分析.现在 P 因子主要被用于基因突变^[10]、转基因、增强子捕捉、位点特异性基因重组、基因替换和基因敲除等几个方面.

Tis11 是哺乳动物基因 TTP 在果蝇中的同源物,它的 N-端含有两个保守的顺式 Cys-X₈-Cys-X₅-Cys-X₃-His (CCCH) 锌指结构,其通过结合 mRNA 3 端 ARE(AU rich element) 元件来调节 mRNA 的稳定性,它还参与了体内 siRNA 的加工过程^[11]. TTP 基因敲除的小鼠会发生由于 TNF 积累引起的炎症反应和关节炎.据报道,在果蝇胚胎发育过程中,*Tis11* 基因存在两种长度不同的转录产物分别为 6 kb 和 3 kb^[12]. 虽然有报道认为 *Tis11* 参与调节 mRNA 的稳定性和 siRNA 的加工,但是其具体的生物学功能并不清楚.为了研究 *Tis11* 的功能,我们利用 P 因子被不精确地切除来获得 *Tis11* 基因敲除果蝇.为从整体动物水平去分析该基因的功能奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

主要试剂: Tris-HCl、EDTA、氯化钠、十二烷基磺

收稿日期:2006-12-20

基金项目:国家自然科学基金(30670442)资助

*通讯作者: huaminzhou@xmu.edu.cn

酸钠(SDS)、醋酸钾、氯化锂购于上海生工生物工程有
限公司, *Sau3A* I、*Hha* I、*Taq* DNA 聚合酶, dNTP,
T4 DNA 连接酶购于大连宝生物公司。

果蝇饲养:饲养温度 25℃, 相对湿度 80%, 光照周
期 12 h。果蝇食物配方如下:每升果蝇食物含玉米粉
67 g, 琼脂粉 5.3 g, 麦芽提取物 42.4 g, 大豆粉 9.2 g,
酵母提取物 15.9 g, 蔗糖 40 g, 丙酸 4.5 mL, 水 920
mL。

果蝇基因型: *yw* (Bloomington stock 6599), *w[67c23] P*
{w[+ mC] = lacW} Tis11 [G0124] / FM7c (Bloomington stock
11915), *y[1]w[67c23] P{w[+ mC] y[+ mDint2] = EPgy2}*
Tis11 [EY09107] (Bloomington stock 19949), *FM6, y[1] dm*
[+] w[1] / Dp(1; Y) y[+] / (Bloomington stock 4327), *yw; ry*
[506] Sb[1] P{ry[+] = delt2-3} 99B / TM6 (Bloomington
stock 3664)。

PCR 引物:

*Tis11*F: 5'-CAGGTGGCACCTCTACCA GTCGA GTTTG-
CAC-3';

*Tis11*R: 5'-GA GAA GGTGCACA GCGTAA GGA GCG-
GATC-3';

*Tis11*F3: 5'-GTCGGCTTCTCCGTTTTCA GGCTGA-3';

*Tis11*R3: 5'-CTACA GGAA TTGCA GAA GGCTTTCT-
TCG3';

*Tis11*F1: 5'-ATGTCTGCTGATA TTCTGCA GAAATC-
3';

*Tis11*F2: 5'-CA GTCTGGTGACCA TCACCGA GAAC-3';

*Tis11*R1: 5'-GTCCGA TCCTGTGCTCATGCTCA G-3';

Plac1: 5'-CACCCAA GGCTCTGCTCCCAAA T-3';

Pry2: 5'-CTTGCCGACGGGACCACCTTA TGTTATT-3'。

1.2 实验方法

(1) 果蝇基因组 DNA 的提取

取 10 只麻醉的果蝇装入 eppendorf 管, 每管加入
200 μ L 缓冲液 A (100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 100
mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 0.5% SDS), 用研
磨棒研碎果蝇直至剩下表皮, 置于 65℃ 水浴 30 min,
加入 400 μ L 的 LiCl / KAc 溶液 (1.4 mol/L KAc, 4.3
mol/L LiCl), 混匀, 置于冰上 10 min 以上, 室温下最
大速度离心 15 min, 转移 500 μ L 上清至另一新管中,
加入等量异丙醇, 混匀, 室温下最大速度离心 15 min,
去上清, 70% 乙醇洗涤一次, 室温下晾干 5~10 min,
沉淀溶解于 50 μ L TE (10 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0, 1
mmol/L EDTA) 中。

(2) 反向 PCR (Inverse PCR)

酶解: 取 20 μ L 果蝇基因组 DNA 用 *Sau3A* I 或
者 *Hha* I 酶解 3 h, 65℃ 灭活 20 min, 取 5 μ L 酶切产
物进行 0.8% 的琼脂糖胶电泳, 检测酶切效果。

连接: 取一半酶切产物用 200 μ L 连接体系连接 3
h, 加两倍体积 100% 乙醇, 0.1 体积 3 mol/L NaAc
(pH 5.2), 冰上沉淀 10 min, 室温下最大速度离心 5
min, 去上清, 70% 乙醇洗涤一次, 晾干, 沉淀溶解于
100 μ L TE 中。

PCR: 取 10 μ L 连接产物为模板, 在 50 μ L 反应体
系中进行 PCR, 反应条件为: 95℃ 5 min 预变性, 94℃
30 s, 56℃ 1 min, 72℃ 2 min 扩增 35 个循环, 72℃ 延
伸 10 min。反向 PCR 原理如(图 1) 所示。

(3) 果蝇 RNA 提取

将果蝇麻醉, 快速置于液氮中, 用液氮在研钵中
将其磨碎, 加入 1 mL 的 Trizol, 室温放置 5 min, 每毫升
的 Trizol 加 0.2 mL 氯仿, 大力摇 15 s, 室温静置 2~3
min, 然后 12 000 g 4℃ 下离心 15 min, 将水相转移至
干净的管中, 加入等体积的 *V* (氯仿) : *V* (异戊醇) =
24 : 1, 剧烈振荡, 11 000 g 4℃ 下离心 5 min, 取上清,
每毫升 Trizol 加 0.5 mL 异丙醇, 振荡混匀, 室温静置
15 min, 11 000 g 4℃ 下离心 10 min, 在管底可见白色
RNA 沉淀, 去上清, 用 75% 乙醇洗, 让 RNA 于室温晾
干 5~10 min, 用无 RNA 酶的水溶解 RNA。

2 结果与分析

2.1 P 因子插入果蝇株的选择与验证

为获得 *Tis11* 基因敲除果蝇, 需要寻找 P 因子位
于基因 *Tis11* 附近的果蝇株。首先, 在网页 <http://www.flybase.org/> 中搜索 *Tis11* 的相关信息, 可以得
知有 12 个 P 因子插在基因 *Tis11* 的附近。再根据这些
P 因子的名字从网页 <http://flypush.imgen.bcm.tmc.edu/pscreen/> 中搜索它们的相关信息, 特别是 P

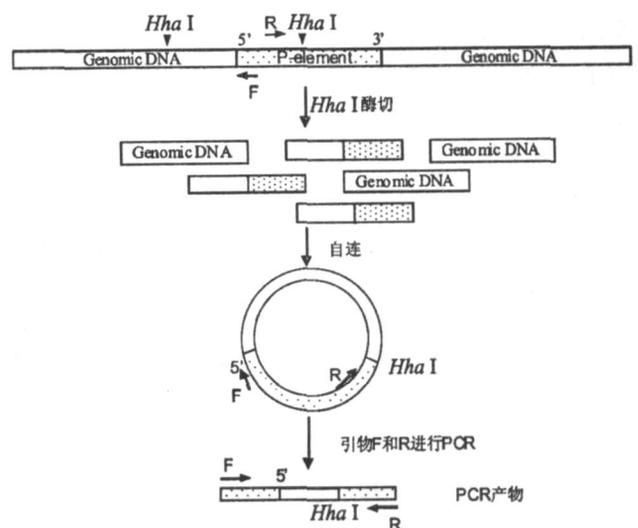


图 1 反向 PCR 原理图

Fig. 1 The principle of inverse PCR

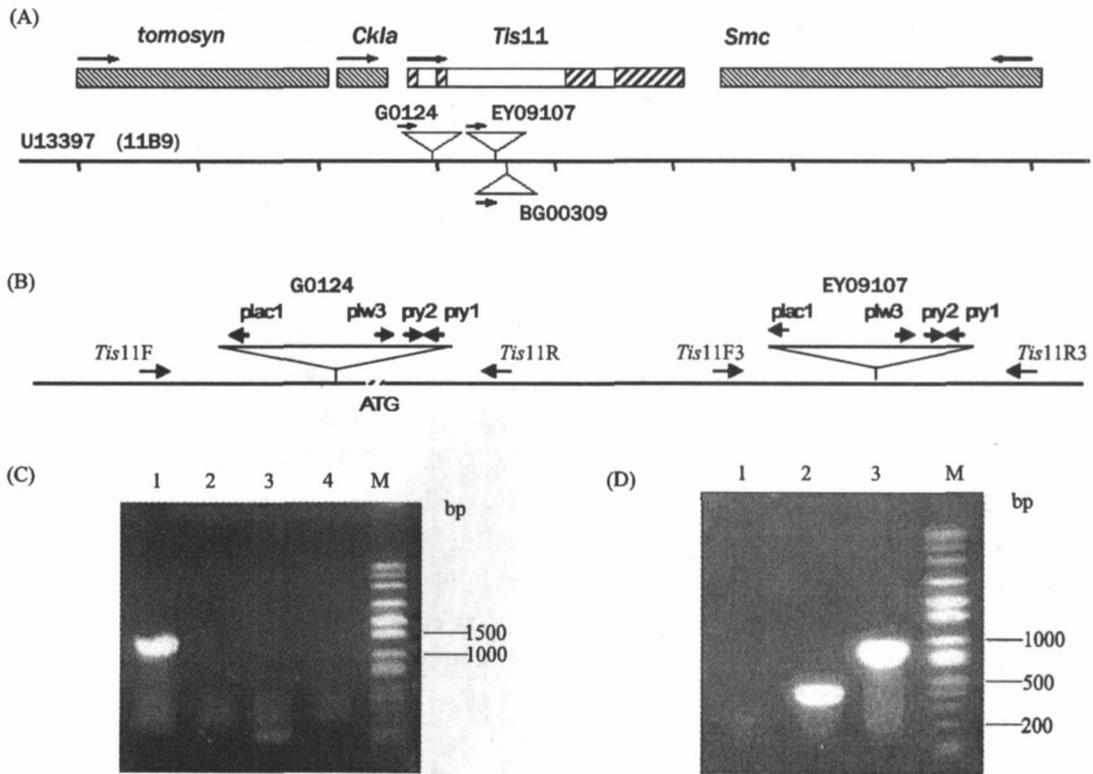


图 2 P 因子位置和方向的验证
 (A) P 因子在基因组中的插入位置和方向简图; (B) 用于鉴定 G0124 和 EY09107 的 PCR 引物示意图; (C) PCR 鉴定 G0124; (D) PCR 鉴定 EY09107

Fig. 2 Identification of P-element inserted site and direction

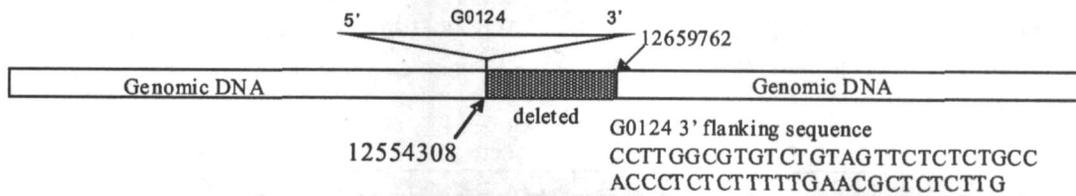


图 3 P 因子 G0124 3 端相邻序列示意图
 12554308 和 12659762 是基因组上的位置
 Fig. 3 3' flanking sequences of P-element G0124

因子 5 和 3 两侧的序列和 P 因子载体的名字. 最后, 通过 flybase 进行 Blast, 找到这些 P 因子在基因组中的确切位置. 根据它们所在的位置, 我们挑选了 3 个 P 因子插入果蝇株做为起始果蝇株, 它们分别是 G0124、EY09107 和 BG00309. G0124 位于基因 *Tis11* 的 0 号和 1 号外显子之间, EY09107 插在第 2 个内含子里, 距离 1 号外显子 3 端约 3 kb, BG00309 位于 EY09107 后 500 bp (图 2A). 它们在 Bloomington 储藏中心所对应的编号分别为 11915、19949 和 12482.

从 Bloomington 储藏中心获取所需果蝇株后, 提取各株果蝇的基因组 DNA 进行 PCR 鉴定, 以检测 P 因子插入的位置, 从而确定 P 因子插入的方向. 如图 2C 所示, 泳道 1 用引物 *Tis11F* 和 *Plac1* 进行 PCR 所

得产物大小与预计的理论大小一样, 泳道 2 所用引物是 *pry2* 和 *Tis11R*, 未能得到预期的 PCR 产物, 说明 P 因子 G0124 5 端的序列与理论相符, 3 端的序列不确定, P 因子正向插入 (图 2A). 图 2D 泳道 1 所用引物为 *Tis11F3* 和 *Tis11R3*, 没有得到理论大小的带, 与预期相符, 因为 P 因子自身的大小有 10 kb, 用基因组 DNA 作为模板进行 PCR 很难得到大于 4 kb 的产物. 泳道 2 所用引物为 *Tis11F3* 和 *Plac1*, 泳道 3 所用引物为 *pry2* 和 *Tis11R3*, 这两个泳道 DNA 带的大小与理论大小一致, 说明 P 因子 EY09107 5 和 3 端的序列与理论相符, 其正向插入基因组.

2.2 P 因子 G0124 3 端序列的鉴定

P 因子 G0124 位于基因 *Tis11* 的第 1 个内含子里

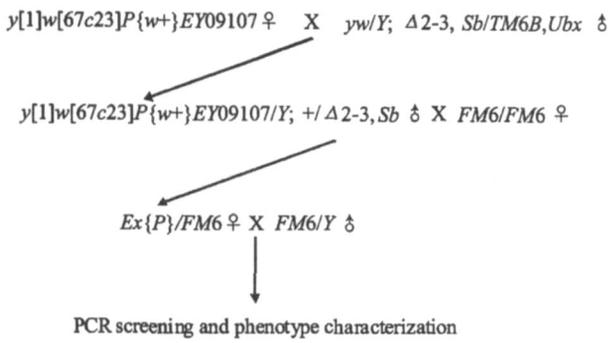


图 4 杂交流程图

Fig. 4 Crossing schemes

面,而第 1 个内含子只有 1 000 bp,所以以 G0124 为起始果蝇获得 *Tis11* 敲除果蝇的几率比用 EY09107 大. 基于上述原因必需获取 G0124 3 端的序列信息. 采用反向 PCR 的方法取得其 3 端的产物,通过测序得到序列. 对所得序列进行比对发现在 G0124 的 3 端已经有约 105 kb 的基因组缺失,结果如图 3 所示. 在这段缺失的基因组里共包含了 6 个基因,因此含有 P 因子 G0124 的果蝇株本身就是一个多基因敲除的突变株.

2.3 杂交策略与基因敲除果蝇的鉴定

检验了各 P 因子的确切信息后,为了获得 *Tis11* 基因敲除果蝇,选择 19949 作为起始果蝇株. 图 4 为获得 *Tis11* 敲除果蝇所进行的杂交流程. 首先,用 19949 的雌果蝇与含有转座酶基因 2-3 的 3664 雄果蝇杂交,选取同时含有 P 因子 EY09107 和转座酶 2-3 的 F1 代雄果蝇与含有平衡染色体 FM6 的 4327 雌果蝇

杂交. 接着,选取不含 P 因子 EY09107,而含有平衡染色体 FM6 的 F2 代雌果蝇与含有平衡染色体 FM6 的 4327 雄果蝇进行单杂交,即用 1 只选取的 F2 代雌果蝇与 3 只含有平衡染色体 FM6 的 4327 雄果蝇进行杂交,每 1 管单杂交就是 1 个果蝇株,一共挑取了 700 株果蝇. 然后,提取 F3 代雄果蝇的基因组并进行 PCR 筛选. 在 700 株果蝇中,只有 279 和 306 两株出现了比野生型小的带. 把 PCR 产物测序后,发现它们缺失的序列相同(图 5),因此 279 和 306 可能是由同 1 个精母细胞发育成熟的精子杂交后的后代. 获得 *Tis11* 敲除果蝇后,提取果蝇 279、*yw* 和 19949 的 RNA 进行 RT-PCR,进一步验证其真实性(图 6). 图 6 显示,用 *Tis11*F1 和 *Tis11*R1 进行 PCR 时,279 没有带,而 *yw* 和 19949 有带,用 *Tis11*F2 和 *Tis11*R1 进行 PCR 时,3 株果蝇都有带,这说明了在果蝇 279 的基因组中 *Tis11* 的第 2 个外显子缺失,但是体内还会转录出由其他几个外显子构成的 mRNA. 这可能是由于 *Tis11* 基因在体内有不同的转录形式造成的.

3 讨论

果蝇作为生物学的模式生物之一,具有生长周期短、容易培养的优点,已经被广泛运用于遗传学和发育生物学研究. 在果蝇中发现的可转座的元件也成为各个生物学领域研究的强有力的分子生物学工具. 其中 P 因子已被运用于转基因,基因突变,基因重组等方面. 2005 年 Xu 等人成功地运用 *piggyBAC* 进行哺乳

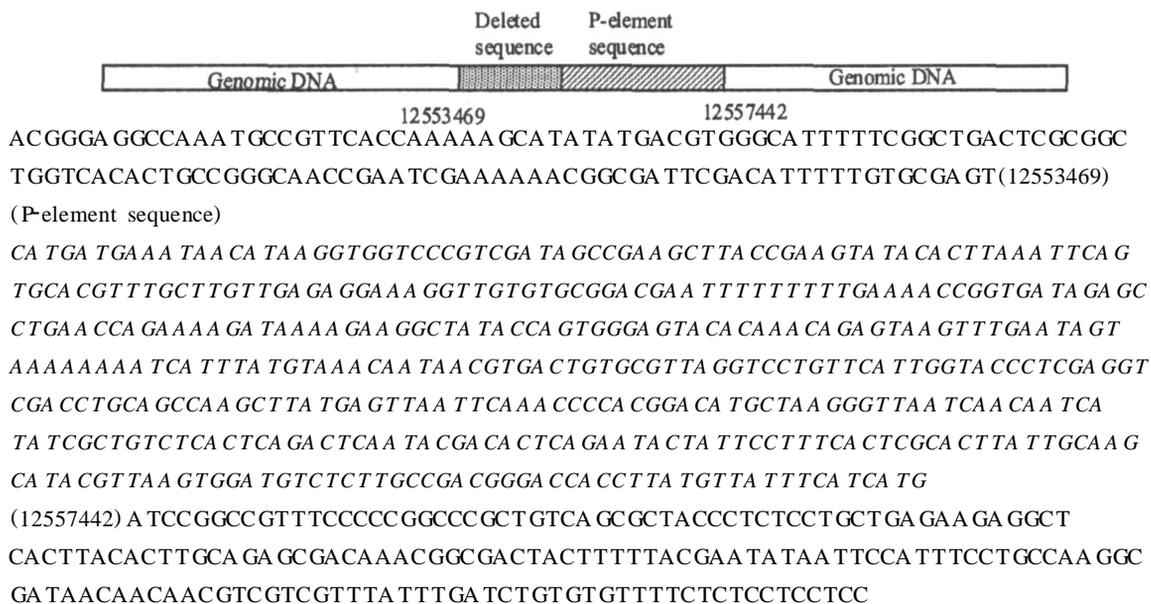


图 5 果蝇 279 和 306 基因组缺失示意图

12553469 和 12557442 分别表示被切除序列在基因组中的起始和终止位置,斜体部分表示残留的 P 因子序列

Fig. 5 Schematics of deletion in the genome of *Drosophila* 279 and 306

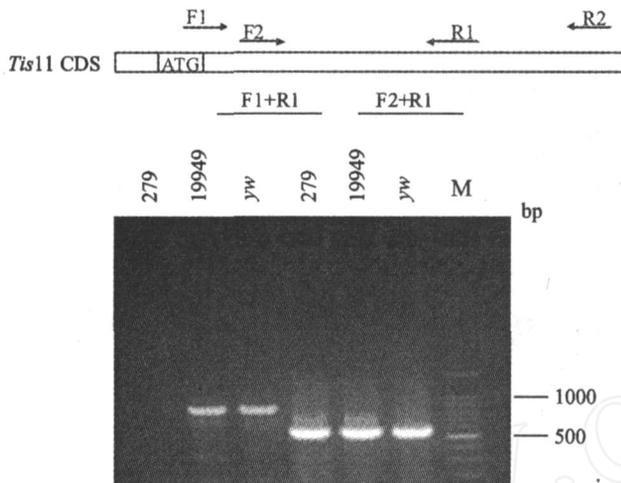


图 6 RT-PCR 鉴定 *Tis11* 基因敲除果蝇

Fig. 6 RT-PCR identification of *Tis11* knockout

动物细胞基因组的操作^[13]. 2004 年 Bellen 等人利用 P 因子随机插入,覆盖了果蝇 40% 基因^[10]. 随着生命科学的发展,运用基因敲除动物来研究基因功能已经成为必然. 而 P 因子提供了获取基因敲除果蝇的有力工具和便捷的方法.

本文作者利用 P 因子不精确剪切结合现有的各种平衡染色体及相关标记,设计了一套可行的杂交线路,通过 PCR 筛选最终得到 *Tis11* 基因敲除果蝇. 在杂交过程中,因为 P 因子上带有红眼睛基因 (white), 转座酶 2-3 上连锁着短毛基因 (stubble), X 染色体的平衡染色体 FM6 上有棒眼 (Bar) 标记,所以可以根据所带有的标记选择需要的子代. 19949 的雌果蝇与含有转座酶基因 2-3 的 3664 雄果蝇杂交得到的 F1 代,为了把 P 因子从基因组中切除,我们选择同时含有 P 因子和转座酶的 F1 代果蝇与果蝇 4327 杂交. 因为 P 因子的切除过程是一个不精确的过程,所以 P 因子被切除后的每一个体其基因组的序列都可能不一样. 另外, P 因子不精确切除有可能导致 *Tis11* 基因敲除, *Tis11* 敲除的纯合子可能会致死. 故此,我们用 X 染色体的平衡染色体果蝇株 4327 与选取的 F1 代果蝇进行单杂交.

本实验一共进行 700 个单杂交只获得一株基因敲除果蝇,获得基因敲除果蝇的频率似乎很低. 其主要原因是:一方面,被切除序列与 P 因子的距离是影响得率的主要原因,距离 P 因子越远的序列在发生不精确切除时被切除的几率就越小. P 因子 EY09107 距离第 2 个外显子的距离较远,有 3 kb;另一方面,在进行 PCR 筛选时,只筛选 P 因子 5 端旁侧序列缺失突变子,而舍弃了 3 端旁侧序列缺失突变子. 这就有可能丢失第 3 个外显子被敲除的果蝇. 因此在选择 P 因子

插入株时,要选择距离目的序列近的 P 因子插入株作为起始,有利于提高得率.

果蝇 279 的基因组中 *Tis11* 的第 2 个外显子缺失,但是体内还会转录出由其他几个外显子构成的 mRNA. 这可能是因为 *Tis11* 基因在体内有不同的转录形式造成的;也可能是因为第 2 个外显子被敲除但是启动子区域没有被破坏,所以转录出不含第 2 个外显子的转录产物. 这个转录产物是否具有 *Tis11* 的部分功能我们不清楚. 由于没有商业化的抗体可以在蛋白质水平检测内源 *Tis11* 的表达情况,所以我们还未能确定这种转录产物是否能够表达 *Tis11*. 在 DNA 水平上,我们已经把 *Tis11* 的翻译起始位点开始的 84 个碱基敲除. 因此,我们已经得到 1 个 *Tis11* 突变子. 但在这个突变子中, *Tis11* 基因的功能是否完全缺失我们并不清楚,这是我们接下来要研究的问题.

参考文献:

- [1] Michael Ashburner, Kent G Golic, Hawley R Scott. *Drosophila a laboratory handbook* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005.
- [2] O Brochta D A, Atkinson P W. Transposable elements and gene transformation in non - drosophilid insects[J]. *Insect Biochem Molecular Biol*, 1996, 26(8/9): 739 - 753.
- [3] Lobo N, Li X, Fraser M J. Transposition of the piggyBac element in embryos of *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti*, *Trichoplusia ni* [J]. *Mol Gen Genetic*, 1999, 261(4/5): 803 - 810.
- [4] O Hare K, Rubin G M. Structure of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome [J]. *Cell*, 1983, 34(1): 25 - 35.
- [5] Mullins M C, Rio D C, Rubin G M. Cis-acting DNA sequence requirements for P element transposition [J]. *Genes and Development*, 1989, 3(5): 729 - 738.
- [6] Laski F A, Rio D C, Rubin G M. Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing [J]. *Cell*, 1986, 44(1): 7 - 19.
- [7] Kaufman P D, Rio D C. *Drosophila* P-element transposase is a transcriptional repressor in vitro [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(7): 2613 - 2617.
- [8] Kaufman P D, Doll R F, Rio D C. *Drosophila* P element transposase recognizes internal P element DNA sequences [J]. *Cell*, 1989, 59(2): 359 - 371.
- [9] Kaufman P D, Rio D C. P element transposition in vitro proceeds by a cut-and-paste mechanism and uses GTP as a cofactor [J]. *Cell*, 1992, 69(1): 27 - 39.
- [10] Bellen H J, Levis R W, Liao G, et al. The *BDGP* gene disruption project: single transposon insertions associat-

- ed with 40 % of *Drosophila* genes [J]. *Genetics*, 2004, 167(2) :761 - 781.
- [11] Jing Q, Huang S, Guth S, et al. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability [J]. *Cell*, 2005, 120(5) :623-634.
- [12] Ma Q, Wadleigh D, Chi T, et al. The *Drosophila Tis11* homologue encodes a developmentally controlled gene [J]. *Oncogene*, 1994, 9(11) :3329-3334.
- [13] Ding W X, Li G, Han M, et al. Efficient transposition of the *piggyBac* (PB) transposon in mammalian cells and mice [J]. *Cell*, 2005, 122(3) :473-483.

Using P-element Imprecise Excision to Generate *Tis11* Knockout Fly

XIE Chang-chuan, WANG Xue-kun, LI Li-sheng, TIAN Li-li,
WU Xiu-rong, HONG Li-xin, ZHOU Hua-min *

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract : *Tis11* is a mammalian TTP homologue in *Drosophila*. It locates to region 11B9 on X chromosome in *Drosophila*. It consists of two conserved tandem Cys-X₂-Cys-X₂-Cys-X₂-His(CCCH) zinc fingers. *Tis11* can be bound to target mRNA through its zinc finger domain. In mammalian, TTP destabilize the target mRNA by binding to the AU-rich element which locates on the mRNA 3' UTR. However, in fly, the physiological function of *Tis11* is largely unknown. In order to further elucidate the physiological function of *Tis11*, we generated the *Tis11* knockout fly. In this study, we generate *Tis11* knockout fly by using P-element imprecise excision. P-element is one group of elements in fly genome which are comparable to bacterial transposons. P-elements can not only be inserted into genome, but also be precisely and imprecisely excised from genome, when transposase is present in cells. Since their discovery, P-elements have become a powerful tool of molecular biology to manipulate fly genome. We generated 700 P-element excision lines from P-element insertion line 19949. After screening and identification by PCR, we only get one line 279 containing partial sequence deletion in the second exon of *Tis11* among the 700 lines. The start codon locates in the deletion part.

Key words : *Drosophila*; P-element; imprecise excision; *Tis11*