

核定位信号肽和转运肽对斑马鱼转基因效率的影响

钟继汉^{1,2},沈丹²,陈才²,高波^{1,2*},宋成义^{1,2}

(1. 扬州大学 农业与农产品安全国际合作联合实验室,江苏 扬州 225009;

2. 扬州大学 动物科学与技术学院,江苏 扬州 225009)

摘要:为了探讨核定位信号肽 S413 - PV 和转运肽 Tp10 这 2 种融合肽对转基因效率的影响,将 S413 - PV 和 Tp10 与线性化质粒分别以质量比 50:1、100:1、200:1 混合制成转染液,注射斑马鱼单细胞期胚胎,分别检测转染 24 h、120 h 后胚胎的阳性率和成活率。结果表明:与对照组相比,转染 24 h 后,S413 - PV 组胚胎阳性率极显著上升,胚胎成活率均下降,但差异不显著;Tp10 组阳性率均呈上升趋势,200:1 组差异极显著,其他组差异不显著,胚胎成活率均显著下降;转染 120 h 后,S413 - PV 组胚胎阳性率均极显著上升,胚胎成活率均呈下降趋势,100:1、200:1 组差异极显著;Tp10 组胚胎阳性率上升,200:1 组差异显著,胚胎成活率均极显著下降。以上结果表明,S413 - PV 可显著提高斑马鱼转基因效率,对胚胎毒性较小;Tp10 对转基因效率影响不显著,且对胚胎毒性较强。

关键词:核定位信号肽;转运肽;基因转移;斑马鱼

中图分类号: Q78;S813.3 文献标志码: A 文章编号: 1004 - 3268(2017)06 - 0142 - 05

Effect of Nuclear Localization Signal Peptides and Transit Peptides on Gene Transfer Efficiency in Zebrafish

ZHONG Jihan^{1,2}, SHEN Dan², CHEN Cai², GAO Bo^{1,2*}, SONG Chengyi^{1,2}

(1. Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-product Safety, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: In order to study effect of nuclear localization signal S413-PV and transport peptides Tp10 on gene transfer efficiency, the synthetic NLS peptide S413-PV or transport peptide Tp10 was mixed with linearized plasmid harbouring green fluorescent protein (GFP) expressing cassette at the mass ratio of 50:1, 100:1, and 200:1, respectively. Then the mixture was injected into 1-cell stage fertilized eggs of zebrafish. GFP positive efficiency and the survival rate of embryos were detected at 24 hours post fertilization (hpf) and 120 hpf stages. The results showed that the GFP positive rate of embryos in S413-PV groups were significantly higher than that in the control group both at 24 and 120 hpf stages. There were significant differences between the different ratio. The GFP positive rate of embryos was highest at the ratio of 200:1. The GFP positive rates of embryos in Tp10 groups were also higher than that in the control at 24 and 120 hpf. And the GFP positive rate of embryos at the ratio of 200:1 was significantly higher than that in other groups at 24 hpf. The survival rate of embryos either in S413-PV or Tp10 was lower than control. The rate decreased with the peptides ratio increased. The survival rate of embryos in S413-PV groups at the ratio of 100:1 and 200:1 were significantly lower than that in other groups at 120 hpf. The survival rate of embryos in Tp10 groups were significantly lower than that in control group both at 24 and 120 hpf stages. These data

收稿日期:2016 - 12 - 22

基金项目:国家自然科学基金项目(31671313,31572364)

作者简介:钟继汉(1990 -),男,山东枣庄人,在读硕士研究生,研究方向:分子标记与遗传育种。E-mail:978096325@qq.com

* 通讯作者:高波(1975 -),女,江苏连云港人,副教授,博士,主要从事分子生物学方向教学及科研工作。

E-mail: bgao@yzu.edu.cn

ta suggested that S413-PV could significantly improve the transgenic efficiency in zebrafish and had a little effect on the survival rate of embryos. While Tp10 had no significant effect on transgenic efficiency, and had higher toxicity to embryos.

Key words: NLS peptide; transit peptide; gene transfer; zebrafish

细胞穿膜肽 (cell penetrating peptides, CPPs) 是一系列通过耗能或非耗能形式跨过多层细胞膜的小分子多肽 (其长度一般不超过 30 个氨基酸)^[1]。研究发现, CPPs 能够有效地将小分子药物、蛋白质、肽类、核酸片段以及纳米载体 (如脂质体、聚合物胶束、无机纳米粒等) 转运穿过细胞膜。CPPs 种类较多, 主要包括转运肽 (transit peptides)^[2]、核定位信号肽 (nuclear localization signal, NLS)^[3] 等。NLS 是一段富含精氨酸、赖氨酸的氨基酸序列, 存在于真核细胞核蛋白和病毒蛋白中, 具有引导定位核区的功能, 利用含核定位信号肽的非病毒载体为基因转移提供了新的途径。NLS 能够提高基因入核效率已经在细胞上得以证实, James 等^[4]研究表明, 大分子 DNA 的入核效率较小分子、单链 DNA 分子低, 而利用 NLS 可以提高大分子 DNA 入核效率, 其原理是 NLS 能够引导其所携带的 DNA 分子特异地趋向核区, 识别核孔, 然后进入细胞核。这一发现具有重要的学术价值和医学应用前景, 引起了学术界的广泛关注, 在基因治疗领域陆续研发出了多种融合肽, 并对其序列构成进行了修饰改进, 其中 S413 - PV、Tat 等融合肽具有很好的基因转移效果^[5]。S413 - PV 为由 21 个氨基酸残基组成的融合肽, 包含穿膜肽和核定位信号肽序列^[6]。此外, 功能类似的转运肽在细胞转染和基因治疗上也取得很好的应用效果, 如 Transportan 10 (Tp10)^[7]。S413 - PV 和 Tp10 均能够有效介导蛋白质、DNA 和 RNA 等多种分子高效入核^[8], 在细胞转染和基因治疗领域应用较为广泛, 但在制备转基因动物中应用较少。斑马鱼作为模式生物具有产卵量大、发育快、生长周期短等优点^[9-10], 对制备转基因动物的研究具有重要意义。

如何将外源基因有效导入细胞核并整合至基因组是制备转基因动物的关键环节, 为了提高基因组整合效率, 转座子、CRISPR/Cas9 和 TALEN 等基因修饰技术已在各种动物上应用广泛^[11-15], 并取得较为满意的遗传修饰效果。鉴于此, 为提高转基因效率, 利用核定位信号肽 S413 - PV 和转运肽 Tp10, 以模式生物斑马鱼为研究对象, 探讨融合肽在动物体内的转基因效果, 以期为转基因动物的制备提供一

种简便有效的方法。

1 材料和方法

1.1 供试模式生物

斑马鱼由国家斑马鱼资源中心提供。斑马鱼饲养在循环水箱中, 温度 28.5 ℃, 每天光照 14 h。

1.2 载体及试剂

多转座子重组载体 pT3 - FAG - GFP 由扬州大学表观遗传学与表观基因组学研究所构建保存。商品化核定位信号肽 Tp10 (SP - 15 - 0033 - 01) 和 S413 - PV (SP - 15 - 0034 - 01) 购自英国 CAMBRIDGE 公司; 去内毒素 DNA 提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司; E3 培养液、氨苄青霉素 (Ampicillin)、T4 DNA 连接酶、DNA Marker λ - Hind III、DNA Marker DL15000、DNA 提取试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒、高保真酶及其他分析纯级生化试剂均购自宝生物工程有限公司。

1.3 转染注射液制备

将 pT3 - FAG - GFP 质粒用 *Sma* I 酶切进行线性化处理, S413 - PV、Tp10 分别与线性化处理的质粒按质量比 50:1、100:1、200:1 混合, DNA 的注射质量浓度为 20 ng/μL。

1.4 试验分组及胚胎注射

试验设 S413 - PV 处理组、Tp10 处理组、对照组, S413 - PV 处理组、Tp10 处理组注射 1.3 中制备的转染液, 对照组仅注射质粒无融合肽。每组 3 个重复, 每组注射胚胎数均在 150 枚以上。注射前一天晚上, 取 4 尾母鱼、2 尾公鱼于繁殖盒中, 隔板隔开培养, 第 2 天将隔板拿开, 公鱼追逐母鱼即开始交配产卵, 自产卵开始计时 10 ~ 15 min 后收集受精卵, 水温控制在 28.5 ℃, 将收集的受精卵置于体视显微镜下进行胚胎显微注射。将上述注射液注射至斑马鱼单细胞期胚胎, 将注射后的胚胎置于含有 E3 培养液的平皿中培养, 每 24 h 换液一次, 注射后 24 h 和 120 h 应用体视正置荧光显微镜观察报告基因绿色荧光蛋白表达情况, 统计阳性胚胎数和成活胚胎数, 计算胚胎阳性率和胚胎成活率。

胚胎阳性率 = GFP 阳性胚胎数 / 被检测活胚胎数 × 100% ;

胚胎成活率 = 被检测活胚数 / 注射胚胎总数 × 100% 。

1.5 数据统计及分析

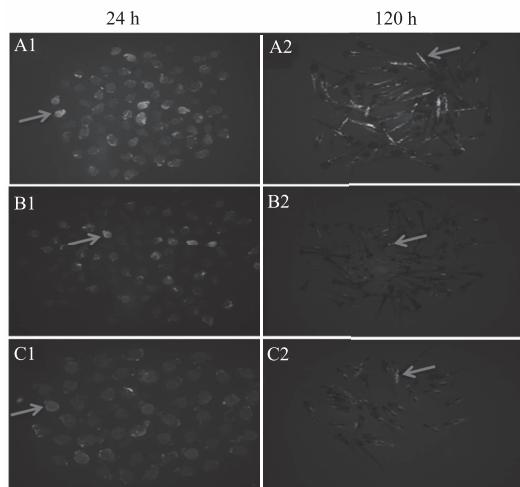
试验数据进行单因素方差分析,应用 LSD 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 2 种融合肽对斑马鱼基因转移效率的影响

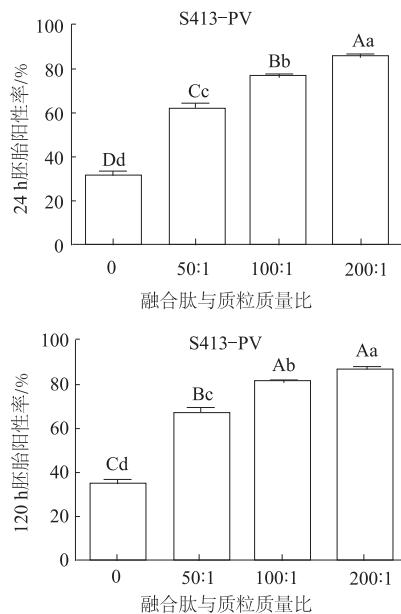
将显微注射的斑马鱼受精卵培养至 120 h,检测荧光表达情况,对照组、S413 - PV、Tp10 处理组均能观察到荧光表达,但不同组间 GFP 阳性胚胎数量存在差异(图 1)。分别测定培养 24 h、120 h 后阳性胚胎数及 2 种融合肽的转基因效率,结果显示,转染 24 h 后,融合肽与线性化质粒在质量比为 50:1、100:1、200:1 时,S413 - PV 组胚胎阳性率分别为 62.37%、76.60%、85.78%,Tp10 组的胚胎阳性率分别为 33.18%、35.78%、40.00%,对照组胚胎阳性率为 32.32%;转染 120 h 后,S413 - PV 组的胚胎阳性率分别为 66.92%、81.70%、86.94%,Tp10 组胚胎阳性率分别为 36.13%、38.70%、45.00%,对照组胚胎阳性率为 35.01%。统计结果表明,与对照组相比,转染 24 h 后,S413 - PV 组胚胎阳性率均极显著

上升,Tp10 组胚胎阳性率均呈上升趋势,质量比 200:1 组差异极显著;转染 120 h 后,S413 - PV 组胚胎阳性率均极显著上升,Tp10 组胚胎阳性率上升,质量比 200:1 组差异显著(图 2)。



A1、A2 为 S413 - PV 与质粒质量比 100:1 组;B1、B2 为 Tp10 与质粒质量比 100:1 组;C1、C2 为对照

图 1 斑马鱼胚胎注射后荧光表达情况



不同大写字母代表差异极显著($P < 0.01$),不同小写字母代表差异显著($P < 0.05$),下同

图 2 斑马鱼显微注射后 24 h 和 120 h 的胚胎阳性率

2.2 2 种融合肽对斑马鱼胚胎毒性的影响

将显微注射的斑马鱼受精卵培养 120 h,检测胚胎成活情况。融合肽与线性化质粒在质量比为 50:1、100:1、200:1 时,转染 24 h 后,S413 - PV 组胚胎成活率分别为 87.54%、83.36%、77.19%,Tp10 组胚胎成活率分别为 73.07%、66.48%、61.21%,对照组胚胎成活率为 84.85%;转染 120 h 后,S413 - PV 组胚胎成活率分别为 67.10%、64.26%、

60.00%,Tp10 组胚胎成活率分别为 59.34%、54.35%、49.99%,对照组胚胎成活率为 74.02%。统计结果表明,与对照组相比,转染 24 h 后,S413 - PV 组胚胎成活率下降,但差异不显著,Tp10 组胚胎成活率均显著下降;转染 120 h 后,S413 - PV 组胚胎成活率均呈下降趋势,质量比 100:1、200:1 组差异极显著,Tp10 组胚胎成活率均极显著下降(图 3)。可见,S413 - PV 对胚胎毒性较小。

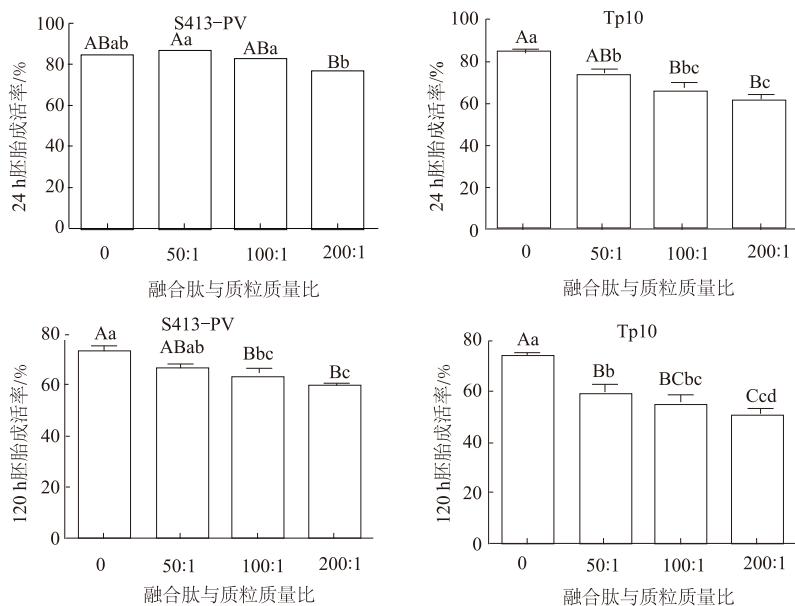


图3 斑马鱼显微注射后 24 h 和 120 h 的胚胎成活率

3 结论与讨论

本研究结果表明,核定位信号肽 S413 – PV 可以显著提高斑马鱼的基因转移效率,在制备转基因斑马鱼研究中具有应用前景;而转运肽 Tp10 对斑马鱼的基因转移效率影响不显著,且 Tp10 的毒性较 S413 – PV 高。

核定位信号肽可以有效地提高基因转移的效率,因此,核定位信号肽可以应用于转基因动物、基因治疗和细胞转染等研究中,也可以辅助制备疫苗提高免疫效果。James 等^[4]的研究证实,细胞核核孔的大小是固定的,DNA 分子进入细胞核的数量与 DNA 分子的大小密切相关,DNA 分子越大进入细胞核的量就越少,而通过 NLS 介导可以明显提高 DNA 的入核效率。如今,改进的 NLS 已经成为非常重要的非侵入性的细胞输入载体,并已作为药物载体成功地应用于体外和体内治疗。Collas 等^[16]发现,SV40 病毒中大 T 抗原的核定位信号肽在斑马鱼单细胞胚胎中能够提高 DNA 入核效率,并促进报告基因的表达。与转座子和 CRISPR/Cas9 等相比,在进行基因导入研究时,核定位信号肽介导技术具有简单快速等特点,不需要复杂的载体改造,尤其在介导大片段 DNA 时具有优势。S413 – PV 由 N 端和 C 端功能肽序列 2 部分组成,N 端 13 个氨基酸为细胞穿膜肽序列,来源于蛙的抗菌肽 DS4,C 端的 7 个氨基酸为核定位信号肽序列,来源于 SV40 病毒大 T 抗原。本研究利用核定位信号肽 S413 – PV 和转运肽 Tp10,以模式生物斑马鱼为研究对象,探讨融合肽在动物体内的转基因效果,研究结果表明,核定位

信号肽 S413 – PV 可极显著提高斑马鱼转基因效率,且对胚胎成活率影响小。

转运肽 Tp10 最先是由 Langel 等^[17]学者设计的融合肽,包括 2 部分功能肽序列,由神经肽甘丙肽的 N 端的 12 个氨基酸和通过赖氨酸残基连接的 14 个氨基酸的蜂毒肽组成,为了降低其毒性,删除 N 末端 6 个氨基酸残基形成了 Tp10。本研究结果表明,转运肽 Tp10 对斑马鱼的基因转移效率影响不显著,且 Tp10 的毒性较强。

核定位信号肽 S413 – PV 可显著提高斑马鱼转基因效率,对制备转基因动物具有非常重要的意义。转运肽 Tp10 则对斑马鱼的基因转移效率影响不显著,不建议使用。

参考文献:

- [1] Trabulo S, Mano M, Faneca H, et al. S4(13)-PV cell penetrating peptide and cationic liposomes act synergistically to mediate intracellular delivery of plasmid DNA [J]. The Journal of Gene Medicine, 2008, 10(11): 1210-1222.
- [2] Wierzbicki P M, Kogut-Wierzbicka M, Ruczynski J, et al. Protein and siRNA delivery by transportan and transportan 10 into colorectal cancer cell lines [J]. Folia Histochem et Cytobiol, 2014, 52(4): 270-280.
- [3] Ninkovic J, Bally-Cuif L. The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse [J]. Methods, 2006, 39(3): 262-274.
- [4] James J, Ludtke Z, Zhang G F. A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA [J]. Journal of Cell Science, 1999, 112(12): 2033-2041.

- [5] Heitz F, Morris M C, Divita G. Twenty years of cell-penetrating peptides: From molecular mechanisms to therapeutics [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2009, 157(2): 195-206.
- [6] Hariton-Gaza E, Feder R, Mor A, et al. Targeting of non-karyophilic cell-permeable peptides into the nuclei of intact cells by covalently attached nuclear localization signals [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(29): 9208-9214.
- [7] Soomets U, Lindgren M, Gallet X, et al. Deletion analogues of transportan [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1467(1): 165-176.
- [8] Cardoso A M, Trabulo S, Cardoso A L, et al. Comparison of the efficiency of complexes based on S4(13)-PV cell-penetrating peptides in plasmid DNA and siRNA delivery [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2013, 10(7): 2653-2566.
- [9] Klee E W, Schneider H, Clark K, et al. Zebrafish: A model for the study of addiction genetics [J]. *Human Genetics*, 2012, 131(6): 977-1008.
- [10] Neelkantan N, Mikhaylova A, Stewart A M, et al. Perspectives on zebrafish models of hallucinogenic drugs and related psychotropic compounds [J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2013, 4(8): 1137-1150.
- [11] 薛松磊, 史云强, 陈才, 等. 转座子介导细胞质显微注射技术的基因转移效率比较 [J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(1): 151-156.
- [12] Clark K J, Urban M D, Skuster K J, et al. Transgenic zebrafish using transposable elements [J]. *Methods in Cell Biology*, 2011, 104(3): 137-149.
- [13] Woong Y, Wang H, Fu Y F, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 227-229.
- [14] Zu Y, Tong X J, Wang Z X, et al. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(4): 329-331.
- [15] Fang X D, Mu Y L, Huang Z Y, et al. The sequence and analysis of a Chinese pig genome [J]. *Giga Science*, 2012, 1: 16.
- [16] Collas P, Alestrom P. Nuclear localization signals enhance germline transmission of a transgene in zebrafish [J]. *Transgenic Research*, 1998, 7(4): 303-309.
- [17] Langel U, Pooga M, Kairane C, et al. Agalanin-mastoparan chimERIC peptide activates the Na^+, K^+ -ATPase and reverses its inhibition by ouabain [J]. *Regulatory Peptides*, 1996, 62(1): 47-52.

(上接第 133 页)

- [6] St-Hilaire S, Cranfill K, McGuire M A, et al. Fly prepupae as a feedstuff for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Journal of World Aquaculture Society*, 2007, 38(1): 59-67.
- [7] Furuichi Y, Takahashi T. Evaluation of acid insoluble ash as a marker in digestion studies [J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 1981, 45(10): 2219-2224.
- [8] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 2003.
- [9] Harinder P S, Tran G, Heuzé V, et al. State of the art on use of insects as animal feed [J]. *Animal Feed Science & Technology*, 2014, 197: 1-33.
- [10] Newton L, Sheppard C, Watson D W, et al. Using the black soldier fly, *Hermetia illucens*, as a value-added tool for the management of swine manure [J]. *Countryside & Small Stock Journal*, 2005, 1(6): 1-16.
- [11] Viroje W, Malin S. Effects of fly larval meal grown on pig manure as a source of protein in early weaned pig diets [J]. *Thurakit Ahan Sat*, 1989, 6: 25-31.
- [12] 周映华, 胡新旭, 卞巧, 等. 无抗发酵饲料对生长育肥猪生长性能、肠道菌群和养分表观消化率的影响 [J]. *动物营养学报*, 2015, 27(3): 870-877.
- [13] Newton G L, Booram C V, Barker R W, et al. Dried *Hermetia illucens* larvae meal as a supplement for swine [J]. *Journal of Animalence*, 1977, 44: 395-399.
- [14] Smith G S, Neumann A L, Gledhill V H, et al. Effects of "soluble silica" on growth, nutrient balance and reproductive performance of albino rats [J]. *Journal of Animal Science*, 1973, 36(2): 271-278.
- [15] 谢春艳, 黎俊, 吴信, 等. 饲粮粗蛋白质水平日变化对生长猪生长性能和血液生理生化指标的影响 [J]. *动物营养学报*, 2014, 26(7): 1753-1759.
- [16] 张董燕, 季海峰, 王晶, 等. 猪源罗伊氏乳酸杆菌对断奶仔猪生长性能和血清指标的影响 [J]. *动物营养学报*, 2011, 23(9): 1553-1559.