

敲除 *L-periaxin* 基因的大鼠 RSC96 细胞系的建立

梁敏, 彭婷婷, 石亚伟

山西大学生物技术研究所 教育部化学生物学与分子工程重点实验室, 山西 太原 030006

梁敏, 彭婷婷, 石亚伟. 敲除 *L-periaxin* 基因的大鼠 RSC96 细胞系的建立. 生物工程学报, 2016, 32(12): 1735–1744.
Liang M, Peng TT, Shi YW. Establishment of *L-periaxin* gene knock-out RSC96 cell line. Chin J Biotech, 2016, 32(12): 1735–1744.

摘 要: 轴周蛋白 (Periaxin) 是外周神经系统非致密性髓鞘中特异表达的蛋白, 编码 Periaxin 的基因经由选择性剪接产生两种蛋白异构体 L-periaxin 和 S-periaxin, 对髓鞘形成的初始化有重要作用。至今在 *Periaxin* 基因上已发现有 18 种不同的位点突变导致外周脱髓鞘神经疾病腓骨肌萎缩症 4F 亚型 (CMT4F) 的发生。利用转录激活因子样效应物核酸酶 (TALENs) 靶向基因敲除技术对大鼠 RSC96 细胞的 *periaxin* 基因进行敲除, 根据 TALENs 设计原则, 确定 *L-periaxin* 基因的敲除靶点在其编码 NLS 结构域部分, 设计相应的 TALEN 左臂与右臂的识别序列, 构建含上述识别序列的 *L-periaxin* 基因敲除载体 TALEN-L 和 TALEN-R, 并将其转入 RSC96 细胞, 经嘌呤霉素药物筛选, 获得 *L-periaxin* 基因敲除细胞株, 经测序确认大鼠 RSC96 细胞中的基因组中 *L-periaxin* 基因区段已被敲除, 成功构建了 *L-periaxin* 基因敲除细胞模型。计算 *L-periaxin* 基因敲除载体的突变率为 21.6%。Western blotting 实验证明, 在 RSC96 细胞中只能检测到 S-periaxin 蛋白的表达。通过流式细胞术及 MTT 实验检测基因敲除细胞的细胞周期和生长速度, 发现敲除 *L-periaxin* 基因的细胞生长速度缓慢, G1 期细胞增多, S 期细胞减少。

关键词: periaxin, 基因敲除, RSC96 细胞, TALEN 技术

Establishment of *L-periaxin* gene knock-out RSC96 cell line

Min Liang, Tingting Peng, and Yawei Shi

Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi, China

Abstract: Periaxin, a protein of noncompact myelin, is specifically expressed in the peripheral nervous system (PNS).

Received: April 25, 2016; **Accepted:** September 6, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31170748), the Graduate Education and Innovation Program of Shanxi Province (No. 2016BY025).

Corresponding author: Yawei Shi. Tel: +86-13803451349; E-mail: yaweishi@sxu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31170748), 山西省研究生教育创新项目 (No. 2016BY025) 资助。

网络出版时间: 2016-09-23

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160923.1417.003.html>

There are two protein isoform L-periaxin and S-Periaxin by alternative splicing of *periaxin* gene, playing an important role in the initiation of myelin formation. So far, 18 different mutation sites in *L-periaxin* gene have been found to induce the peripheral demyelinating neurological charcot-marie-tooth diseases subtype 4F (CMT4F). The technique of activation of transcription activator-like effector nucleases (TALENs) was used to knock out the *L-periaxin* gene in RSC 96 cell line of Rattus. According to the design principle, the knock-out site of *L-periaxin* was assured to NLS domain of L-periaxin, which is target sequence of left and right arms of TALEN. The knock-out vectors of TALEN-L and TALEN-R were established and transfected into RSC96 cell. After puromycin screening, *L-periaxin* was knocked out successfully in RSC96 cell, which is confirmed by DNA sequence. The mutation efficiency is 21.6%. S-periaxin, not L-periaxin can be detected by Western blotting in *L-periaxin* gene knock-out RSC96 cell. The cell growth rate was decreased and the number of cells in G1 increased and decreased in S phase in *L-periaxin* gene knock-out RSC96 cell by flow cytometry and MTT assay.

Keywords: periaxin, gene knock-out, RSC96 cell, TALENs

Periaxin 是施万细胞中特异表达的支架蛋白之一^[1],参与髓鞘成熟及稳定^[2-3]。Periaxin 蛋白在周围神经纤维发育早期即可表达,在髓鞘中的定位是逐渐变化的,在髓鞘形成过程中,其表达在近轴突膜上(靠近轴突),但髓鞘成熟后,它定位在远轴突膜上(靠近基底膜)^[4]。Periaxin 敲除的小鼠髓鞘纤维可正常发育^[5],但是细胞质带(Cajal 带)被破坏,并且施万细胞在神经发育过程中的伸长程度受损^[6],导致节间距离减小,使神经传导速度降低,影响运动功能。Periaxin 的突变也会导致多种神经疾病,包括先天性肌营养不良、神经纤维瘤病和麻风病^[7]。至今在 Periaxin 基因上已发现有 18 种不同的位点突变可能导致外周脱髓鞘神经疾病 CMT4F 亚型的发生^[8]。Periaxin 根据 mRNA 剪接方式的不同可以编码 L-periaxin 和 S-periaxin 两种蛋白亚型,分别含有 1 461 个氨基酸和 147 个氨基酸^[9-10]。

TALEN (Transcription activator-like effector nucleases) 转录激活因子样效应因子核酸酶,是继归巢核酸内切酶(Homing endonucleases)、锌指核酸酶(Zinc finger nucleases, ZFNs) 技术之后^[11],发展起来的又一种对靶向基因进行修饰的新技术。转录激活因子样效应因子(Transcription

activator-like effectors, TALEs) 最初发现于植物病原黄单胞菌中,可以特异性地识别并结合一定的 DNA 序列^[12];Fork I 是一种 II_s 型限制酶,在二聚体的状态下存在切割活性^[13]。TALE 核酸酶(TALENs) 即是由 TALEs 构成 DNA 结合结构域与内切核酸酶 Fork I 构成的切割结构域构成。

TALE 蛋白的 DNA 结合结构域是由数量可变且高度保守的重复单元组成,一般情况下,34 个氨基酸组成一个重复单元,每个重复单元序列中第 12、13 位的氨基酸特异识别 DNA 链中的 A、T、G、C 碱基^[14]。这样一个能够识别单一碱基的 TALE 蛋白可作为一个单独的基本单元模块,多个这样的模块按照一定的顺序串连组合,可识别特定的 DNA 序列。所以 DNA 序列中的每一个碱基的识别都需要一个对应的基本单元模块,即编码 34 个氨基酸的 TALE 重复序列。

2009 年,各个重复单元特异识别的 DNA 碱基被破译。12、13 位氨基酸与碱基之间的对应分子密码为:NI 对应 A,HD 对应 C,NG 对应 T,NN 对应 G/A^[11]。根据 TALE-DNA 分子密码,将识别目的序列上各个碱基的 TALE 单元依次连接,构成可识别完整碱基序列的 TALEs;并与 Fork I 酶相连接即形成 DNA 酶 TALEN^[15]。

两个 TALEN 单体的结合位点间的距离要适当, 并且反向相对, 使得 Fork I 的两个单体能在一处聚集并形成具有切割活性的二聚体, 从而定点剪切 DNA^[16]。

RSC96 细胞株是原代大鼠施万细胞经长时间培养后自发转化而成的^[17-18], 为了进一步研究 *L-periaxin* 基因在髓鞘形成过程中的作用, 我们利用 TALEN 技术构建了一对针对 *L-periaxin* 基因的 TALENs 载体, 获得了敲除 *L-periaxin* 基因的 RSC96 细胞株, 为后续研究其在髓鞘形成过程中的作用及腓骨肌萎缩症的防治提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

克隆菌株 *E. coli* X10 由本实验室保存; 大鼠施万细胞 RSC96 购自武汉博士德生物公司, 用含 10% 无支原体胚胎牛血清的 DMEM (含葡萄糖 4.5 g/L, 含丙酮酸钠 0.11 g/L) 培养液在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养。

本实验中载体构建使用上海斯丹赛生物技术有限公司 TALEN 试剂盒中: A、T、G、C 四种 TALE 基本单元模块 (即多个能够识别 A、T、G、C 四个碱基的 TALE 蛋白), L15: cmv-sp6-NLS-TAL-T-IRES-puro-pA, R11: cmv-sp6-NLS-TAL-T-pA 作为左右臂载体。

兔抗 *L-periaxin* 及 *S-periaxin* 多抗购自上海艾比玛特生物医药有限公司, 山羊抗兔抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 TALEN 质粒的构建与鉴定

按照 TALENs 设计原则在 TALEN 序列设计软件中 (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/>) 确定 *L-periaxin* 基因敲除靶位点, 选用位于 NLS2 结构域的一段基因作为靶点, 并在其上下游分别设计相应的 TALEN 左臂识别序列、TALEN 右臂识别序列 (表 1)。

按照 TALEN 试剂盒构建方法, 通过反复的酶切-连接反应构建可特异识别 *periaxin* 基因左、右臂的 TALEN 重复序列, 并将 TALEN 左、右臂识别序列分别与 cmv-sp6-NLS-TAL-T-IRES-puro-pA、cmv-sp6-NLS-TAL-T-pA (质粒图谱见图 1, 由上海斯丹赛生物技术有限公司提供) 载体重组, 分别命名为 TALEN-L 与 TALEN-R。

1.3 细胞培养、转染及药筛

将 DMEM (含葡萄糖 4.5 g/L, 含丙酮酸钠 0.11 g/L) 培养基中加入 10% 胎牛血清, 向培养 RSC96 细胞的培养瓶中加入 4–5 mL 培养基后, 置于 37 °C、含 5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养。细胞 6 h 后可贴壁, 1–2 d 后可更换细胞培养液, 2–3 d 后可传代。取生长状态良好的 RSC96 细胞, 于转染前一天接种于培养皿中, 当细胞密度达到 70%–80% 时, 将 TALEN-L、TALEN-R 与 pEGFP-N1 共转染进入细胞。取 2 μg TALEN-L、2 μg TALEN-R、0.5 μg pEGFP-N1 与 6 μL 脂质体混匀后室温孵育 20 min, 加入细胞中。将转染后的 RSC96 细胞置于 Delta Vision 下观察, 确定转染效率达到 70% 后, 加入 16 μg/mL 嘌呤霉素进行药

表 1 大鼠 *L-periaxin* 基因的靶点信息

Table 1 The target information of *Rattus L-periaxin* gene

Left target (5'–3')	Cleavage site	Right target (5'–3')
CCCAAGTTCTCCCGAT	TGCGTCGGGGCCTTA	AAGCCGATGCTGTCAAGGGA
GGGTTCAAGAGGGCTA	ACGCAGCCCCGGAAT	TTCGGCTACGACAGTTCCCT

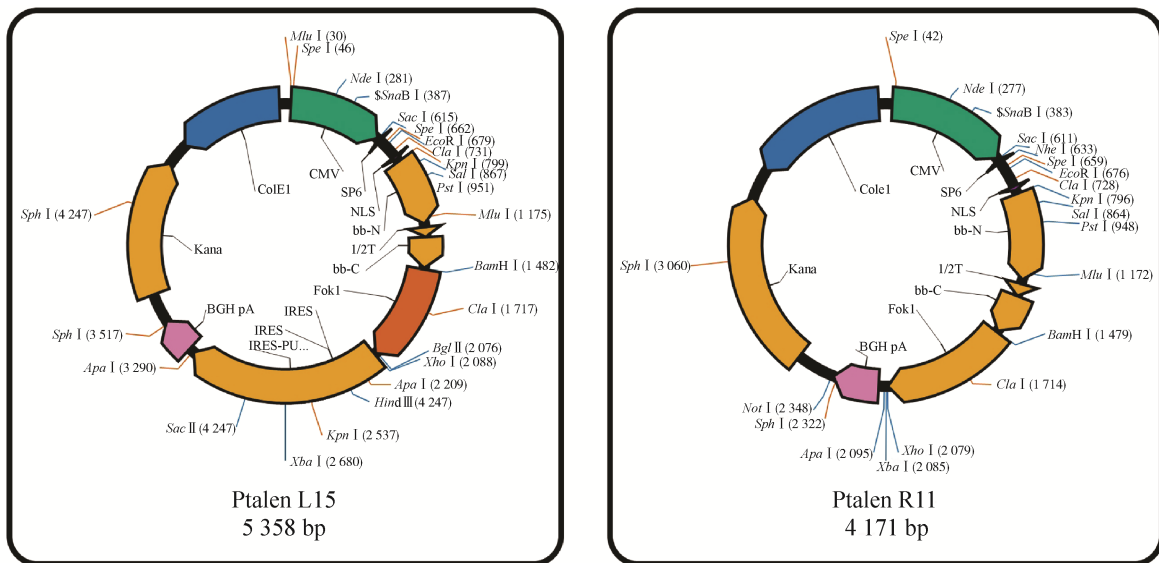


图1 TALEN质粒图谱 (左图为连接可识别TALEN左臂,即靶位点上游序列的TALEN重复序列的载体;右图为连接可识别TALEN右臂,即靶位点下游序列的TALEN重复序列的载体)

Fig. 1 The plasmid profile of TALEN. Left: connecting-vector of TALEN-L; Right: connecting-vector of TALEN-R.

筛。药筛3 d后,得到成功转入TALEN-L和TALEN-R的细胞,用无抗性的培养基再培养数日。

1.4 TALEN表达载体的活性检测及突变率检测

根据 *periaxin* 基因序列在位于编码NLS结构域的打靶位点上下游各300 bp处设计引物 Sense (5'-CCCCTGTCCACTCACTGTGAGATT C-3') 和 Antisense (5'-GGCTCCTAGCCCAAGG GTTGCCAGG-3') 以药筛后的RSC96细胞全基因组DNA为模板,PCR扩增目的片段。将扩增产物测序。再将PCR产物连接到pMD18-T载体,进行单克隆测序,以单克隆测序结果中含有基因突变的序列数占所有测序序列数比例,确定质粒的突变率。

1.5 单克隆筛选

消化经过药筛的细胞接种96孔板,挑选单个细胞继续培养,并将细胞克隆编号。待细胞

长至一定数量,将不同编号的细胞分别收取少量细胞进行鉴定,其余细胞继续培养、冻存,用于后续研究。收取的少量细胞分别提取基因组DNA,以上述Sense和Antisense为引物,PCR扩增TALENs作用靶位点处上下游共约650 bp片段,经T7E1酶酶切后,通过琼脂糖凝胶检测,如果出现杂带,则证明该单克隆细胞株为突变型。之后将鉴定为突变的细胞克隆的PCR产物分别与pMD18-T克隆载体连接,每个克隆挑取至少10个单菌落测序。采用同源分析软件(DNAMAN)进行序列比对,分析确定突变类型。

1.6 Western blotting检测细胞中Periaxin蛋白表达情况

收集 *L-periaxin* 基因敲除成功的RSC96细胞及对照组RSC96细胞,提取细胞总蛋白,BCA法测蛋白浓度。将待测样品置于聚丙烯酰胺凝胶上,电泳后转移到硝酸纤维素膜(上海生物工程股份有限公司)上。经过封闭后,用兔抗

L-periaxin 及 *S-periaxin* 多抗 (上海艾比玛特生物医药有限公司) 4 °C 过夜孵育, 加入 1 : 1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司), 室温振荡 2 h 后洗涤, 显色。

1.7 RSC96 细胞、*L-periaxin* 缺失的 RSC96 细胞和体外转染 *L-periaxin* 的 RSC96 细胞的生长曲线的绘制

分别取对数生长期的 RSC96 细胞、*L-periaxin* 缺失的 RSC96 细胞和体外转染 *L-periaxin* 的 RSC96 细胞接种于 96 孔板, 每孔 3 000 个细胞, 每组 9 个复孔, 分别于接种后的第 12、24、36、48、60、72 h 加 MTT (5 mg/mL), 20 μ L/孔, 37 °C、5% CO₂ 温箱中继续孵育 4 h, 弃上清后加 DMSO 150 μ L/孔, 37 °C 振荡 10 min, 使结晶充分溶解, 于 490 nm 波长处在酶联仪上测定各孔吸光度值, 以时间为横轴、吸光度值为纵轴, 绘制 3 组细胞生长情况柱状图。

1.8 流式细胞术检测细胞周期

分别将 1×10^6 个 RSC96 细胞、*L-periaxin* 缺失的 RSC96 细胞和体外转染 *L-periaxin* 的 RSC96 细胞种植于 35 mm 培养皿, 培养过夜之后换无血清培养液培养 24 h 后收集细胞。用 70% 冰冷的乙醇 4 °C 固定 2 h, 3 000 \times g 离心 5 min, 细胞经 PBS 清洗后重悬于含 50 μ g/mL 的 PI (Propidium iodide, 碘化丙啶) 和 100 μ g/mL DNase-free RNase 的 PBS 溶液中。样品在 37 °C 避光放置 15 min 后用流式细胞仪测定 DNA 含量。

2 结果与分析

2.1 TALEN 表达载体鉴定

构建 TALEN 表达载体的设计中 TALEN 左臂识别序列长度为 15 bp, 其中每一个碱基的识

别需要一个对应的基本单元模块, 即编码 34 个氨基酸的 TALEN 重复序列 (102 bp), 所以识别 15 bp 需要的 TALEN 重复序列为 1 530 bp (102 \times 15 bp), 另外 L15 空载体 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点之间有 803 bp, 所以一旦构建成功的 TALEN-L 双酶切后得到的片段大小应为 2 333 bp (1 530+803 bp); 同理, TALEN 右臂识别序列为 18 bp, 双酶切后得到的片段大小为 2 639 bp。将构建的重组质粒 TALEN-L 与 TALEN-R 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行双酶切鉴定, 0.7 % 琼脂糖凝胶电泳显示 (图 2), TALEN-L 得到了约 2 333 bp 的目的片段和约 4 570 bp 的载体片段; TALEN-R 得到了约 2 639 bp 的目的片段和约 3 386 bp 的载体片段, 酶切结果揭示 TALEN 表达载体构建成功。

2.2 TALEN 表达载体活性检测及突变率计算

将 TALEN-L、TALEN-R 质粒与 pEGFP-N1 共转染 RSC96 细胞 48 h 后, 利用 Delta Vision 拍照, 观察转染效率。结果显示, 其转染效率达到 70% (图 3)。

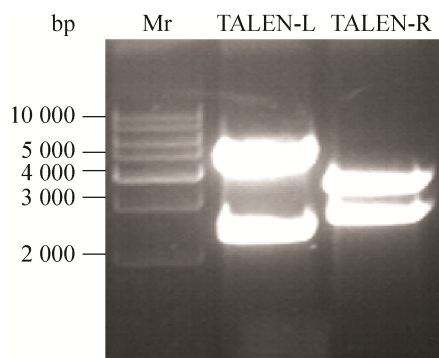


图2 TALEN 质粒经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切后的电泳结果

Fig. 2 Enzymatic digestion of TALEN-L and TALEN-R with *Bam*H I and *Eco*R I.

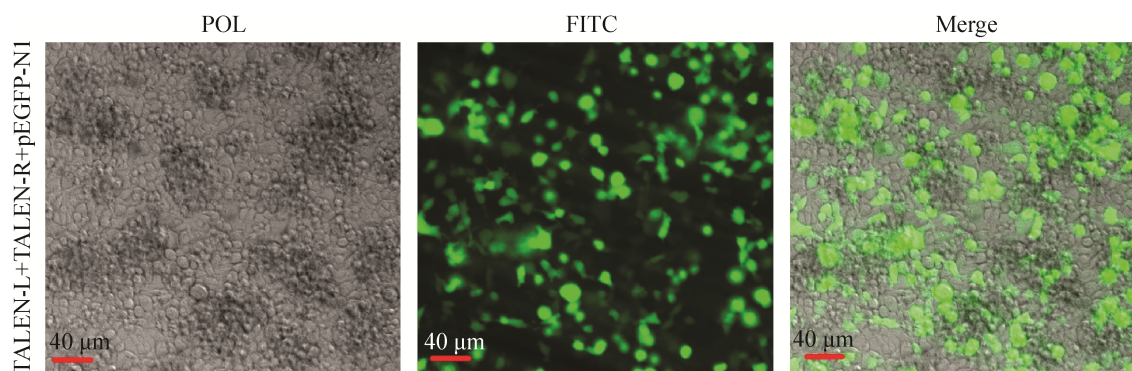


图3 TALEN 质粒转染 RSC96 细胞 48 h 后转染效果

Fig. 3 Effect of transfection RSC96 cell with TALEN-L and TALEN-R after 48 h.

将转染 TALEN-L 和 TALEN-R 质粒的 RSC96 细胞加入 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素进行药筛 3 d, 部分细胞死亡, 仍有贴壁存活细胞, 且状态良好。加入培养基继续培养, 数天后, 收集转染成功的 RSC96 细胞提取基因组 DNA (图 4A)。PCR 扩增 TALENs 作用靶位点处上下游可见 650 bp 片段 (图 4B), PCR 产物测序结果显示, 打靶位置处的序列出现套峰, 说明打靶成功(图 4C)。将该 PCR 产物连接 pMD18-T 载体, 挑选 13 个菌落通过自身引物筛选, 目的片段大小仍为 650 bp (图 4D)。依据筛选结果, 将 1–8 和 10–11 号质粒送测序。测序结果显示 2 号质粒缺失 1 bp; 3 号质粒缺失 7 bp; 5 号质粒缺失 6 bp, 表明该质粒有活性, 质粒的突变效率为 21.6%, 可以用于后续实验 (表 2)。

2.3 *periixin* 缺失单细胞克隆的筛选

为制备 *periixin* 基因敲除细胞系, 利用脂质体转染法将 TALENs 表达载体转染 RSC96 细胞, 通过挑取单克隆法获得 30 个细胞克隆。采用 T7E1 酶切和测序的方法确定细胞克隆的突变类型。

用 T7E1 酶分别酶切每个克隆的 PCR 产物, 未转染 TALENs 的细胞作为对照。结果显

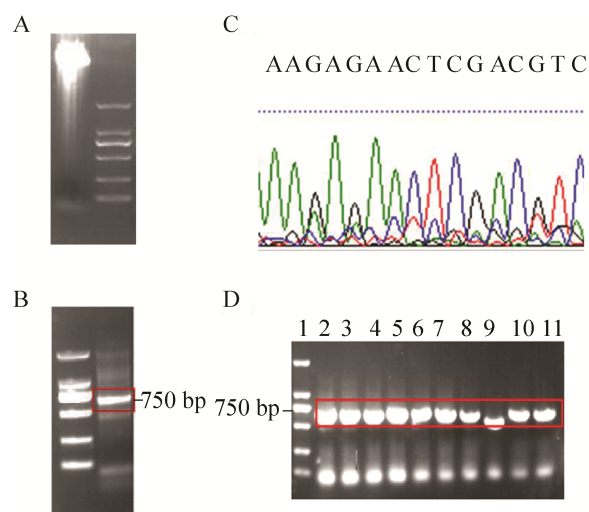


图4 TALEN 质粒活性检测结果 (A: TALEN 敲除 *L-periixin* 后的 RSC96 细胞基因组提取结果; B: 以基因组为模板对打靶位置进行 PCR 扩增结果; C: 打靶位置 PCR 产物进行测序结果; D: 打靶位置 PCR 产物连接 T 载体的筛选结果)

Fig. 4 Detection of TALEN plasmid activity. (A) Genome extraction from *L-periixin* knock-out RSC96 cell. (B) PCR results of *L-periixin* gene targeting position. (C) Sequencing results of *L-periixin* gene targeting position. (D) Screening results of PCR product connected with T-vector.

示, 编号为 G4 的细胞株的 PCR 产物经 T7E1 酶切后出现两条带 (图 5A), 该细胞株为突变体。

表 2 *L-periaxin* 基因突变细胞克隆的打靶情况Table 2 The targeting position of *L-periaxin* mutation in cell cloning

	Left target (5'-3')	Cleavage site	Right target (5'-3')
WT	CCCAAGTTCTCCCGAT	tgcgtcggggcctta	AAGCCGATGCTGTCAAGGGA
2	CCCAAGTTCTCCCGAT	tgcgtcgggg-ctta	AAGCCGATGCTGTCAAGGGA-1
3	CCCAAGTTCTCCCGAT	tgcgtcggg-----	-AGCCGATGCTGTCAAGGGA-7
5	CCCAAGTTCTCCCGAT	tgcg-----cctta	AAGCCGATGCTGTCAAGGGA-6

“-”: the lack of base number.

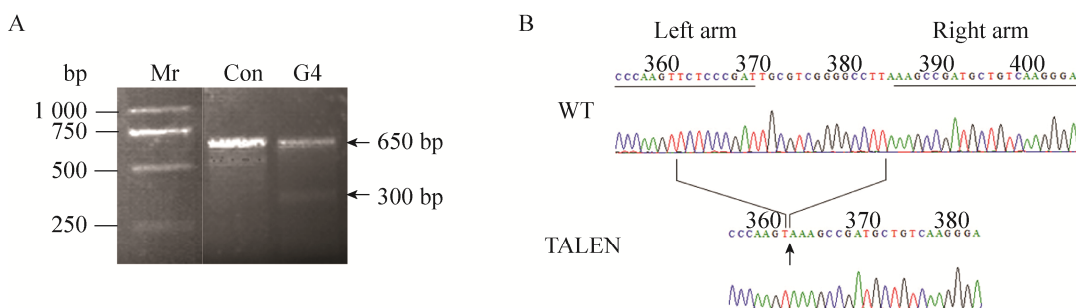


图 5 TALEN 敲除 *L-periaxin* 的 RSC96 细胞突变株的鉴定 (A: 正常 RSC96 细胞株及编号为 G4 的 TALEN 敲除细胞株靶位点处 PCR 产物的 T7E1 酶切结果对比; B: 正常 RSC96 细胞株及编号为 G4 的 TALEN 敲除细胞株靶位点处测序结果对比)

Fig. 5 Identification of TALEN knock-out *L-periaxin* RSC96 cell line. (A) Digestion of the genome of RSC96 and knock-out *L-periaxin* RSC96 cell(G4) with T7E1. (B) Comparison of the sequence between RSC96 and knock out *L-periaxin* RSC96 cell(G4) by TALENs.

又依据其 PCR 产物测序峰图判断 (图 5B), 其为单拷贝敲除的 RSC96 细胞株系。之后以同样的方法进行二次敲除, 最终得到一株 *periaxin* 敲除的 RSC96 细胞。从测序结果可以看出, 所取得的单克隆细胞系中, *periaxin* 基因的一个拷贝出现了 23 bp 的碱基缺失 (图 5B 箭头指向缺失碱基位置), 另一个拷贝出现了 1 bp 的碱基缺失, 从而导致该缺失位点以后阅读框移码的改变, 终止密码子提前出现, 后续 1 376 个氨基酸不能正常表达, 不能产生 *L-periaxin* 基因编码的蛋白。

2.4 Western blotting 检测 TALEN 敲除细胞中 *Periaxin* 蛋白表达

L-periaxin 和 *S-periaxin* 的抗体均为 C 端抗

体, 经过 Western blotting 检测可发现, 对照组的 RSC96 细胞既有 *L-periaxin* 的表达, 也有 *S-periaxin* 的表达; 而敲除 *L-periaxin* 的 RSC96 细胞中, 由于打靶位置之后的 1 376 个氨基酸均不能正常表达, *L-periaxin* C 端的抗体检测不到 *L-periaxin* 的表达, 只有 *S-periaxin* 的 C 端抗体检测到 *S-periaxin* 的表达 (图 6)。

2.5 MTT 法测细胞生长

通过 MTT 法检测对照组 (WT)、敲除组 (*periaxin*^{-/-})、体外转染 *L-periaxin* 组 (*periaxin*^{+/+}) 3 组细胞的生长状况。结果显示 (图 7), 敲除 *L-periaxin* 后细胞生长速度较正常细胞及体外转染 *L-periaxin* 基因的 RSC96 细胞均降低, 说明 *L-periaxin* 基因可能对细胞生长有一定的促进作用。

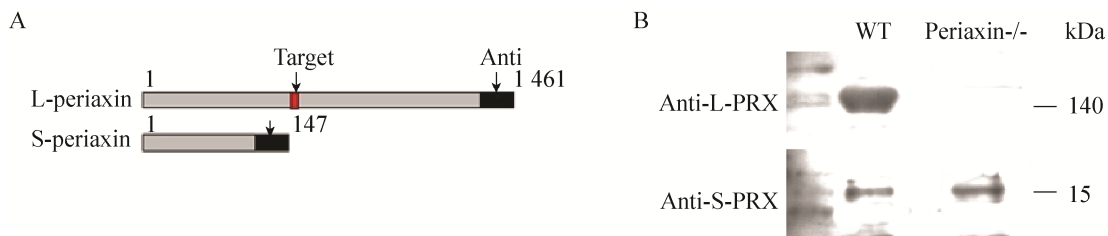


图6 Western blotting 检测细胞中 Periaxin 蛋白表达 (A: TALEN 打靶位点及 L-periaxin 和 S-periaxin 抗体对应的抗原表位区域; B: Western blotting 检测敲除 *L-periaxin* 的 RSC96 细胞的 Periaxin 蛋白表达结果)

Fig. 6 Detection the expression of Periaxin in RSC96 cell by Western blotting. (A) Knock-out target position of TALEN and antigen epitope regions corresponding to antibodies in L-periaxin or S-periaxin. (B) Detection the periaxin in TALEN knock-out *L-periaxin* RSC96 by Western blotting.

用, 敲除后影响了细胞的生长。采用 SPSS 软件处理数据, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用独立样本均数 t 检验, 率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.6 流式细胞术检测细胞周期

为了进一步验证 *L-periaxin* 基因对细胞生长的影响, 对照组、敲除组和过表达组 3 组细胞周期利用流式细胞仪进行检测, 结果显示 (图 8) 敲除组 S 期比例与对照组相比减少了 14.94%, 由此可见敲除 *L-periaxin* 通过抑制细胞的 S 期 (即 DNA 合成期), 达到抑制细胞增殖, 同时也

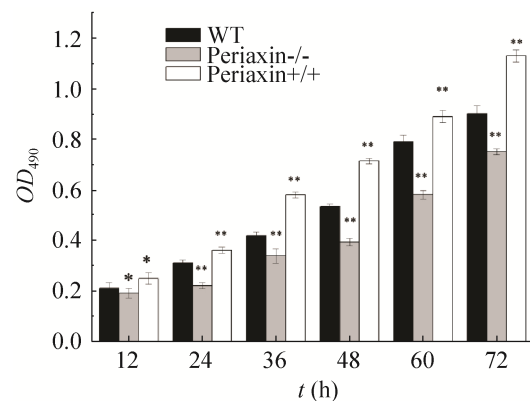


图7 MTT 法检测细胞活力

Fig. 7 Cell viability was determined by the MTT assay. Error bars represent $\bar{x} \pm s$ of triplicate experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

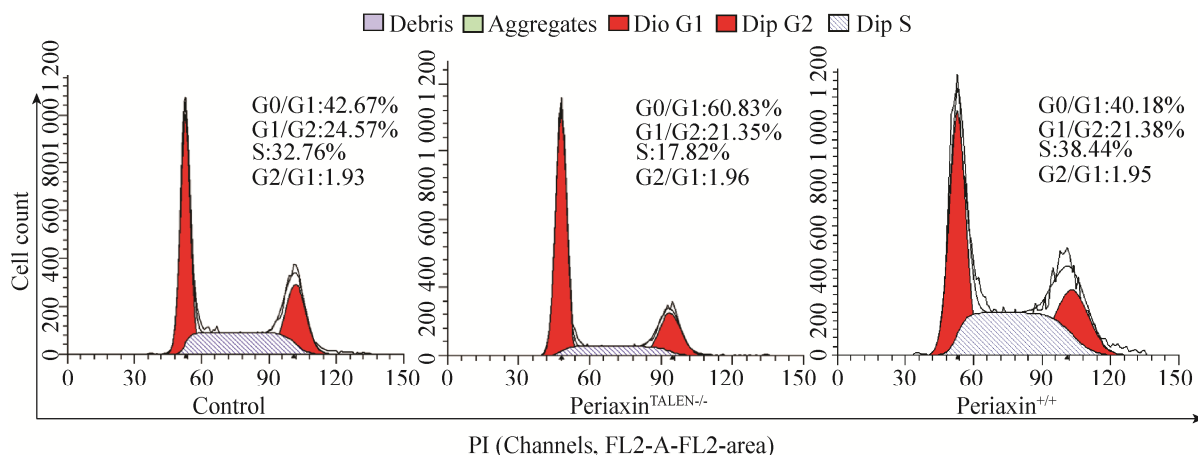


图8 通过流式细胞仪检测 periaxin 对 RSC96 细胞增殖与周期的影响

Fig. 8 Flow cytometry to evaluate the effect of periaxin on the proliferation and cell cycle progression of RSC96 cell.

证明了 TALEN 敲除 *L-periaxin* 后,影响了其在施万细胞中的生物学活性。

3 讨论

Periaxin 基因的突变与缺失可导致腓骨肌萎缩症 4F 亚型发生,该疾病是一种脱髓鞘型遗传病^[19-20]。*Periaxin* 蛋白是外周神经系统中髓鞘细胞施万细胞中特异且大量表达的蛋白,在髓鞘成熟与维护中发挥重要作用^[21]。*Periaxin* 基因突变或缺失,会导致施万细胞不能正常包裹轴突,发生脱髓鞘现象。Gillespie 等研究证明缺失了 *Periaxin* 的小鼠在 6 周后坐骨神经变厚,轴突被基底薄片及施万细胞包裹,形成洋葱头样结构^[5]。神经纤维的延展速度与节间的生长并不能完全匹配,节间距离减少,轴突直径增加。另外,*Periaxin* 的突变还将影响神经纤维的传导速度,紊乱髓鞘外郎飞氏结的节间长度和直径等^[7]。

基因敲除是 20 世纪 80 年代发展起来的一门新技术^[22]。传统的打靶技术效率低,应用大大受限^[23],所以近年来出现了许多新的基因敲除技术,如基因重组、锌指核酸酶等^[24]。锌指核酸酶技术能够对靶基因进行定点断裂,显著提高同源重组效率,是一种高效的新型基因打靶技术。已应用于多种动物基因的靶向敲除^[22]。但锌指核酸酶技术实验设计复杂,成本高,且特异性不高^[25],TALENs 可以靶向更长的基因序列^[26],并且相对更易构建,能识别任意目标基因序列,不受上下游序列影响,只需要构建特定的转录激活因子。TALENs 序列越长,对细胞产生毒副效应的可能性就越小,因为越短的 TALENs 越有可能结合和改变目标基因位点^[22]。TALEN 技术不受物种的限制,剪切效率高及脱靶效率低^[25],至今已经被成功应用于细胞、斑

马鱼、果蝇、大鼠、小鼠及植物上,并且被研究者不断地尝试应用到其他更多的物种中^[22]。

本文通过构建 TALENs 表达载体,高效获得了缺失 *L-periaxin* 基因的细胞克隆,同时初步分析了 *L-periaxin* 基因的缺失对细胞生长的影响及原因,为进一步研究 *periaxin* 在细胞生长及髓鞘形成中的作用奠定了基础,也为后续体外模拟髓鞘化过程的实验提供了必要的实验模型。

REFERENCES

- [1] Gillespie CS, Sherman DL, Blair GE, et al. Periaxin, a novel protein of myelinating Schwann cells with a possible role in axonal ensheathment. *Neuron*, 1994, 12(3): 497–508.
- [2] Dytrych L, Sherman DL, Gillespie CS, et al. Two PDZ domain proteins encoded by the murine periaxin gene are the result of alternative intron retention and are differentially targeted in Schwann cells. *J Biol Chem*, 1998, 273(10): 5794–5800.
- [3] Sherman DL, Fabrizi C, Gillespie CS, et al. Specific disruption of a Schwann cell dystrophin-related protein complex in a demyelinating neuropathy. *Neuron*, 2001, 30(3): 677–687.
- [4] Scherer SS, Xu YT, Bannerman PG, et al. Periaxin expression in myelinating Schwann cells: modulation by axon-glial interactions and polarized cocatization during development. *Development*, 1995, 121(12): 4265–4273.
- [5] Gillespie CS, Sherman DL, Fleetwood-Walker SM, et al. Peripheral demyelination and neuropathic pain behavior in periaxin-deficient mice. *Neuron*, 2000, 26(2): 523–531.
- [6] Court FA, Sherman DL, Pratt T, et al. Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves. *Nature*, 2004, 431(7005): 191–195.
- [7] Feltri ML, Wrabetz L. Laminins and their receptors in Schwann cells and hereditary neuropathies. *J Peripher Nerv Syst*, 2005, 10(2): 128–143.
- [8] Yang Y, Peng TT, Shi YW. Periaxin protein and

- charcot-marie-tooth disease. Chin J Biochem Mol Biol, 2015, 31(2): 113–120 (in Chinese).
- 杨艳, 彭婷婷, 石亚伟. Periaxin 蛋白与腓骨肌萎缩症. 中国生物化学与分子生物学报, 2015, 31(2): 113–120.
- [9] Delague V, Bareil C, Tuffery S, et al. Mapping of a new locus for autosomal recessive demyelinating charcot-marie-tooth disease to 19q13. 1-13.3 in a large consanguineous lebanese family: exclusion of *MAG* as a candidate gene. Am J Hum Genet, 2000, 67(1): 236–243.
- [10] Williams AC, Brophy PJ. The function of the *periaxin* gene during nerve repair in a model of CMT4F. J Anat, 2002, 200(4): 323–330.
- [11] Lloyd A, Plaisier CL, Carroll D, et al. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(6): 2232–2237.
- [12] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. Science, 2009, 326(5959): 1509–1512.
- [13] Bitinaite J, Wah DA, Aggarwal AK, et al. *FokI* dimerization is required for DNA cleavage. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(18): 10570–10575.
- [14] Bonas U, Stall RE, Staskawicz B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol Gen Genet, 1989, 218(1): 127–136.
- [15] Li YQ, Wang CL, Zhao KJ. Molecular recognition code between pathogenic bacterial TAL-effectors and host target genes: a review. Chin J Biotech, 2011, 27(8): 1132–1141 (in Chinese).
- 李岩强, 王春连, 赵开军. 病原菌 TAL 效应子与寄主靶基因相互识别的分子密码. 生物工程学报, 2011, 27(8): 1132–1141.
- [16] Li T, Huang S, Jiang WZ, et al. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. Nucleic Acids Res, 2011, 39(1): 359–372.
- [17] Hai M, Muja N, DeVries GH, et al. Comparative analysis of Schwann cell lines as model systems for myelin gene transcription studies. J Neurosci Res, 2002, 69(4): 497–508.
- [18] Badache A, DeVries GH. Neurofibrosarcoma-derived Schwann cells overexpress platelet-derived growth factor (PDGF) receptors and are induced to proliferate by PDGF BB. J Cell Physiol, 1998, 177(2): 334–342.
- [19] Fledrich R, Stassart RM, Sereda MW. Murine therapeutic models for charcot-marie-tooth (CMT) disease. Br Med Bull, 2012, 102(1): 89–113.
- [20] Takashima H, Boerkoel CF, De Jonghe P, et al. *Periaxin* mutations cause a broad spectrum of demyelinating neuropathies. Ann Neurol, 2002, 51(6): 709–715.
- [21] Boerkoel CF, Takashima H, Stankiewicz P, et al. *Periaxin* mutations cause recessive dejerine-sottas neuropathy. Am J Hum Genet, 2001, 68(2): 325–333.
- [22] Liu XJ, Wang H, Yan F, et al. The development of gene knockout technologies in large and medium animal models. Prog Physiol Sci, 2015, 46(1): 11–16 (in Chinese).
- 刘雪静, 王欢, 严放, 等. 大中型动物基因敲除技术的研究进展. 生物科学进展, 2015, 46(1): 11–16.
- [23] Li FD, Li Y, Liu H, et al. Production of *GHR* double-allelic knockout Bama pig by TALENs and handmade cloning. Hereditas (Beijing), 2014, 36(9): 903–911 (in Chinese).
- 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. 遗传, 2014, 36(9): 903–911.
- [24] Xiao A, Hu YY, Wang WY, et al. Progress in zinc finger nuclease engineering for targeted genome modification. Hereditas (Beijing), 2011, 33(7): 665–683 (in Chinese).
- 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. 遗传, 2011, 33(7): 665–683.
- [25] Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Res, 2011, 39(12): e82.
- [26] Mussolino C, Morbitzer R, Lütge F, et al. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. Nucleic Acids Res, 2011, 39(21): 9283–9293.

(本文责编 郝丽芳)