

• iGEM 专栏 •

## 哺乳动物抑制型转录因子及启动子对的全新设计与构建

杨子杰, 潘祎杰, 蔡毅鸣, 傅彤, 冯骜, 刘燕, 王一恒, 熊心旋, 蔡亮

复旦大学 生命科学学院, 上海 200438

杨子杰, 潘祎杰, 蔡毅鸣, 等. 哺乳动物抑制型转录因子及启动子对的全新设计与构建. 生物工程学报, 2018, 34(12): 1886-1894.

Yang ZJ, Pan YJ, Cai YM, et al. *De novo* construction of mammalian synthetic inhibitory transcription factor and promoter pairs. Chin J Biotech, 2018, 34(12): 1886-1894.

**摘要:** 转录因子及启动子是基因回路的基础。相较于原核启动子, 真核启动子作用机制复杂, 增加了全新设计与改造的难度。目前有限数量的真核转录因子及启动子成为在哺乳动物细胞中设计并实现复杂基因回路以满足各类临床或工业应用需求的瓶颈。文中介绍了基于能够结合特定 DNA 序列的 DNA 结合结构域, 通过柔性连接肽连接到转录抑制模块 KRAB, 构建抑制型转录因子以及通过在 SV40 启动子下游插入结合序列构建对应启动子的方法。而后, 在哺乳动物细胞系中通过流式细胞术对其抑制转录的强度、不同转录因子及启动子对之间的正交性进行了测定。文中提供了一套标准化的、可调节的转录因子及启动子的全新设计与构建方案。基于该方案所构建的 5 对抑制型转录因子及启动子对能够在哺乳动物细胞中起到不同程度的抑制效果且相互正交。文中构建的哺乳动物转录因子及启动子对扩充了哺乳动物生物元件库, 为构建复杂真核基因回路打下了基础; 运用该设计方法能够根据需求构建更多正交的人工转录因子及启动子对。

**关键词:** 真核转录调控, 人工转录因子, 人工启动子, 合成生物学, 生物元件

## *De novo* construction of mammalian synthetic inhibitory transcription factor and promoter pairs

Zijie Yang, Yijie Pan, Yiming Cai, Tong Fu, Ao Feng, Yan Liu, Yiheng Wang, Xinxuan Xiong, and Liang Cai

School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

**Abstract:** Transcriptional regulation is crucial for regulated gene expression. Due to the complexity, it has been difficult to engineer eukaryotic transcription factor (TF) and promoter pairs. The few availabilities of eukaryotic TF and promoter pairs limit their practical use for clinical or industrial applications. Here, we report a *de novo* construction of synthetic inhibitory

**Received:** July 11, 2018; **Accepted:** September 13, 2018

**Supported by:** National Top Talent Undergraduate Training Program of Ministry of Education of China (Nos. 20180202, 20160804), Fudan's Undergraduate Research Opportunities Program.

**Corresponding author:** Liang Cai. Tel: +86-21-31246727; E-mail: cail@fudan.edu.cn

\*These authors contributed equally to the study.

教育部“基础学科拔尖学生培养计划”研究课题经费 (Nos. 20180202, 20160804), 复旦大学本科生物学学术资助计划 (FDUROP) 资助。

网络出版时间: 2018-10-18

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20181016.1353.001.html>

transcription factor and promoter pairs for mammalian transcriptional regulation. The design of synthetic TF was based on the fusion of DNA binding domain and Kruppel associated box transcription regulating domain (KRAB). The synthetic promoter was constructed by inserting the corresponding TF response element after SV40 promoter. We constructed and tested five synthetic inhibitory transcription factor and promoter pairs in cultured mammalian cells. The inhibition capability and orthogonality were verified by flow cytometry. In summary, we demonstrate the feasibility of constructing mammalian inhibitory TF and promoter pairs, which could be standardized for advanced gene-circuit design and various applications in the mammalian synthetic biology.

**Keywords:** eukaryotic transcription regulation, synthetic transcription factor, synthetic promoter, synthetic biology, Bio-Brick

真核转录因子及启动子是真核生物基因表达调控的基础元件之一；在各层次的调控中，转录水平的调控十分重要<sup>[1]</sup>。大部分真核启动子受结合其特定 DNA 序列的蛋白质调控<sup>[2]</sup>。启动子作为转录网络信息节点，不仅对基因的表达起到了开关的作用，同时也影响着转录的动力学<sup>[3]</sup>。

真核转录因子及启动子对基因表达的调控主要分为两种方式：1) 转录因子招募 RNA 聚合酶并起始转录<sup>[4]</sup>的激活型转录调控；2) 阻碍 RNA 聚合酶与 DNA 结合以阻碍转录发生<sup>[5]</sup>的抑制型调控。相较于激活型转录调控，抑制型转录调控在实现细胞内复杂的基因回路中具有更加重要意义。近些年，合成生物学研究的进展，实现了利用抑制型转录调控元件构建负反馈信号通路从而加速信号达到稳态的时间<sup>[6]</sup>、双稳态开关<sup>[7]</sup>、振荡器<sup>[8]</sup>、基于三节点非协调前馈环的带通信息传递<sup>[9]</sup>、布尔逻辑运算<sup>[10]</sup>等，然而上述的进展多集中在原核细胞中，真核细胞尤其是在哺乳动物细胞中能够被使用的抑制型转录调控元件十分有限。

在构建人工基因回路时，需要考虑宿主的内源信号对构建的基因回路的干扰；通过使用跨物种启动子或者使用人工合成的启动子，使得设计的基因回路信号与宿主基因回路信号正交，是维持系统鲁棒性的关键<sup>[11]</sup>。在设计转录因子及启动子时，需要关注不同转录因子及启动子间的正交性，以确保网络间的节点不会相互干扰。

通过结合特异 DNA 序列的蛋白，比如锌指蛋白 (Zinc finger, ZF)<sup>[12]</sup>，或者转录激活因子样效应

物 (Transcription activator-like effector, TALE)<sup>[13]</sup> 以及规律成簇间隔短回文重复 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)<sup>[14]</sup> 技术都能够构建特异识别某个 DNA 位点并实现转录激活或者抑制的元件，即实现人工设计的转录因子及启动子对。因为转入到哺乳动物细胞中的外源基因大小是有限的，小尺寸的 ZF 有望在有限长度的回路中实现更复杂的调控网络，成为本研究的首选。本研究中使用的三重重复的 ZF 在理论上最多能够识别 4<sup>9</sup> 个不同序列的 DNA 结合结构域 (DNA binding domain, DBD)，提供了极大的可能性来满足系统的正交性。

本研究基于人工合成的 ZF 并融合了转录抑制模块 KRAB，配合在 SV40 启动子后插入能够被人工合成的 ZF 所特异性结合的 DNA 序列，构建了能够在哺乳动物细胞中应用的抑制型人工转录因子及启动子对。文中总结了人工转录因子启动子对的设计范式，并检验了其在哺乳动物细胞系中应用的抑制能力以及正交性。这样的人工转录因子及启动子对的构建为实现复杂的真核转录网络提供了崭新的机遇。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、细胞系与载体

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞购自天根生物公司；HeLa 及 293T 细胞由实验室保存；pSB1C3 载体取自 2017 iGEM distribution kit (plate 4 4B, BBa\_J04450)；pML2-EGFP-P2A 和 pML2-mCherry-N1 载体由实验室保存。

## 1.2 试剂及耗材

DNA 限制性内切酶 *EcoR* I、*Spe* I、*Xba* I、*Pst* I、*Mfe* I、*Hind* III、*Age* I 和 T4 DNA 连接酶、DNA marker 购自 NEB 公司；Phanta 高保真 PCR 酶购自 Vazyme 公司；细胞转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Thermo 公司；质粒小提试剂盒和胶回收试剂盒购自 Axygen 公司；高糖 DMEM 培养基购自 Gibco 公司；NaCl 购自 BBI 公司；蛋白胨和酵母膏购自 OXOID 公司。

## 1.3 抑制型启动子 (SynPro) 构建

人工合成抑制型启动子 (SynPro) 由 SV40 启动子与不同重复数量的转录因子结合位点 (REs) 组成, 其序列如表 1 所示。在启动子及 REs 前端加上前缀序列 (GAATTCGCGGCCGCTTCTAG), 包含保护碱基以及 *EcoR* I、*Xba* I 酶切位点; 在后端加上后缀序列 (TACTAGTAGCGCCGCTGCAG), 包含保护碱基以及 *Spe* I、*Pst* I 酶切位点。将 REs 分成两份: 一份使用 *EcoR* I、*Spe* I 内切酶 37 °C 酶切 1 h 并胶回收得到前置片段; 一份使用 *Xba* I、*Pst* I 内切酶 37 °C 酶切 1 h 并胶回收得到后置片段; 将 pSC1C3 载体利用 *EcoR* I、*Pst* I 内切酶 37 °C 酶切 1 h 并胶回收得到线性化载体; 将前置片段与后置片段以及线性化 pSC1C3 载体利用 T4 DNA 连接酶在 16 °C 连接 10 h 以上。

由于 *Spe* I 与 *Xba* I 是同尾酶, 所以能够将前置序列与后置序列连接在载体上形成两次重复的

转录因子结合位点 (2×Es), 并且 2×REs 的前后缀都被保留。利用前缀引物与后缀引物进行 PCR 得到 2×REs 序列, 重复上述过程并替换前后置序列得到 N 次重复转录因子结合序列 (N×REs)。将前置序列替换为 SV40 启动子, 后置序列为 N×REs, 能够得到抑制型启动子 pSV40-N×REs。在本研究中, 利用上述方法构建了 2×REs、4×REs、8×REs 片段。

其中, SV40 启动子由 PCR 扩增自 pQM6.2 质粒 (本实验室保存), 4×UAS 由 PCR 扩增自 LR041 质粒 (iGEM 2017 Tsinghua-A 队伍提供), 其余 REs 片段由 IDT 公司以 gBlock 形式合成。连接产物转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中并涂布于含氯霉素抗性的固体 LB 培养基上, 37 °C 下培养 14 h。重组克隆都通过 Sanger 测序验证正确。

## 1.4 人工合成抑制型转录因子 (Syn-TFs) 构建

在 KRAB 序列前添加核定位信号 (PKKKRKV) 与柔性连接肽 G<sub>4</sub>S (GGGGs), 构成 (G<sub>4</sub>S)-NLS-KRAB 片段。转录因子 DNA 结合结构域 (DNA binding domain, DBD) 的 DNA 序列如表 1 所示, 通过 PCR 将 DBD 与 (G<sub>4</sub>S)-NLS-KRAB 片段融合, 构成抑制型转录因子编码序列 DBD-(G<sub>4</sub>S)-NLS-KRAB。其中, KRAB (RTLVT FKDV FDFTR EEWKL LDTAQ QIVYR NVMLE NYKNL VSLGY QLTKP DVILR LEKGE EPWLV) 片段由 PCR 扩增自 LR041 (iGEM 2017 Tsinghua-A 队伍提供), DBD 片段由 IDT 公司以 gBlock 形式合成。

表 1 DBD 序列以及对应转录因子结合位点 (RE) 序列

Table 1 DBDs and their corresponding REs

DBD	GI/PMID	RE	RE sequence (5'-3')
Gal4	1145799716	UAS	GGAGCACTGTCCTCCGAACG
PIP	11062442	PIR	GAAATAGCGCTGTACAGCGTATGGGAATCTCTTGTACG GTGTACGAGTATCTTCCCGTACACCGTAC
ZFHD1	1063691901	ZFHD1RE	TAATGATGGGCG
ZF21-16	22323524	ZF21-16RE	ATTAGAAGTGA
ZF42-10	22323524	ZF42-10RE	AGACGCTGCTC
ZF43-8	22323524	ZF43-8RE	AGAGTGAGGAC
ZF54-8	22323524	ZF54-8RE	ATGGGTGGCAT

## 1.5 表达载体构建

通过 PCR 在抑制型启动子 pSV40-N×REs 5' 端加上 Age I 酶切位点以及保护碱基;利用 EcoR I、Age I 内切酶 37 °C 酶切 1 h 并胶回收合成启动子片段;用 EcoR I、Age I 内切酶 37 °C 酶切 1 h 并胶回收得到 pML2-mCherry-N1 线性化的载体;用 T4 DNA 连接酶在 16 °C 连接 10 h 以上,得到由抑制型启动子驱动 mCherry 表达的 pML2-pSV40-N×REs 真核表达载体 (质粒 B; 图 2A)。

通过 PCR 在抑制型转录因子 DBD-(G<sub>4</sub>S)-NLS-KRAB 3'端加上 Mfe I 酶切位点及保护碱基,在 5' 端加上 Hind III 酶切位点以及保护碱基;用 Mfe I、Hind III 内切酶 37 °C 酶切 1 h 并胶回收合成转录因子片段;用 Mfe I、Hind III 内切酶 37 °C 酶切 1 h 并胶回收得线性化载体 pML2-EGFP-P2A;用 T4 DNA 连接酶在 16 °C 连接 10 h 以上,得到 EGFP-P2A 与 DBD-(G<sub>4</sub>S)-NLS-KRAB 编码序列融合的真核表达载体 pML2-EGFP-P2A-DBD-(G<sub>4</sub>S)-NLS-KRAB (质粒 A; 图 2A)。

## 1.6 细胞培养

293T 细胞和 HeLa 细胞都是在含有 10% FBS 的 DMEM (Gibco) 中培养,培养基中还添加有终浓度为每毫升 100 单位青霉素、100 μg 链霉素和 2 mmol/L 谷氨酸。培养条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>。

## 1.7 流式细胞分析

HeLa 细胞或 293T 细胞在密度达 70%左右的时候对其进行 pML2-pSV40-N×REs 与 pML2-EGFP-P2A-DBD-(G<sub>4</sub>S)-NLS-KRAB 质粒的两两配对共转染。在转染 24 h 后报告基因 mCherry 的表达量由流式细胞仪 (FASCJazz, BD) 对红色荧光强度测量 (每种实验条件至少记录 20 000 个双色细胞的荧光强度)。流式数据使用 FlowJo 10 软件进行分析。以共转染了 CMV-EGFP 和 pSV40-mCherry 的细胞群体的 EGFP 平均荧光强度 (MFI, Mean fluorescence intensity) 作为内参,按照如下公式

对各组的 mCherry MFI 进行校正处理:

$$MFI_{mCherry, Normalized} = MFI_{mCherry} \frac{\overline{MFI}_{EGFP, pSV40}}{MFI_{EGFP}}$$

## 2 结果与分析

### 2.1 SynTF-SynPro 对的设计

本研究提出了一种定制哺乳动物人工转录因子 (Synthetic transcription factor, SynTF) 及人工启动子 (Synthetic promoter, SynPro) 的方法。SynTF 具有标准化的结构,从其 N 端到 C 端,3 个核心结构域依次是:DNA 结合结构域 (DNA binding domain, DBD)、核定位序列 (Nuclear location sequence, NLS) 和转录调节结构域。DBD 能够识别并结合特定 DNA 序列,即响应元件 (Response element, RE)。为了增加核心元件间的灵活性,G<sub>4</sub>S 柔性接头序列 (Linker)<sup>[15]</sup>被插入到 DBD 和 SV40 NLS<sup>[16]</sup>之间。通过选择转录调节结构域的类型,能够设计抑制型或激活型的 SynTF (Silencing-form SynTF, SynTF(S); Activating-form SynTF, SynTF(A); 图 1A)。通过使用 KRAB<sup>[5]</sup>作为抑制型转录调节结构域,能够构建抑制型 SynTF。与抑制型 SynTF 配对的是抑制型人工启动子 SynPro (Silencing-form SynPro, 缩写为 SynPro(S); 图 1A)。相对于将 RE 插入到组成型启动子上游<sup>[17]</sup>,将重复数量的 RE 插入到启动子 pSV40 的下游构建所得的 SynPro(S) 具有如下功能:1) KRAB 招募转录抑制物能够抑制启动子表达<sup>[18]</sup>;2) 由于 RE 位于组成型启动子下游,当 SynTF(S) 结合到 RE 上时,能够导致空间位阻,通过抑制 RNA 聚合酶的正向运动而增强转录抑制的能力。该设计使得 SynPro(S) 在对应的 SynTF(S) 不存在的情况下表达;而在 SynTF(S) 存在的情况下,启动子下游的基因表达被抑制 (图 1A)。

设计高性能人工转录因子及启动子即 SynTF-SynPro 对的关键步骤是寻找特异性高、结

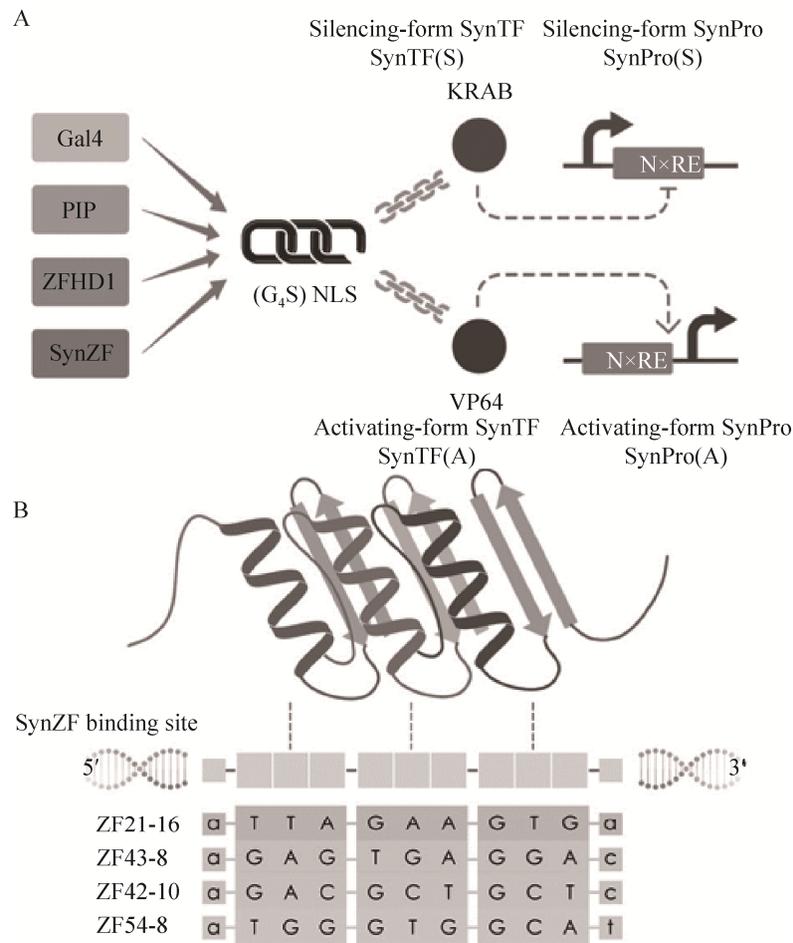


图 1 SynTF-SynPro 的设计

Fig. 1 Design SynTF-SynPro. (A) Wiring silencing- and activating-form SynTF-SynPro.  $G_4S$ , a flexible protein linker. NLS, SV40 nuclear localization signal.  $N \times RE$ , responding elements in  $N$  repeat. (B) Synthetic DBD based on synthetic ZF. Three ZF motifs were illustrated. The 4 oligo DNA sequences outlined are the RE sequences corresponding to ZF21-16, ZF43-8, ZF42-10 and ZF54-8.

合力强的 DBD。为了扩充可以供哺乳动物细胞使用的 DBD，将在其他物种中研究较为透彻的转录因子优化后应用到哺乳动物细胞中是很好的策略。通过这种方法选择出了 3 个不同来源的 DBD 序列 Gal4<sup>[19]</sup>、PIP<sup>[20]</sup>、ZFHD1<sup>[21]</sup>用于构建 SynTF。此外，已被良好表征的 DBD 数量不能满足构建多种 SynTF-SynPro 对的需求，故而利用能够对 3 个相邻碱基进行特异性识别的锌指蛋白 (Zinc finger, ZF) 的顺序连接来实现对多种特异的多位 DNA 位点进行识别<sup>[12]</sup>，构建可在哺乳动物细胞应

用的合成 ZF (Synthetic ZF)。通过将三串联 Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> ZF<sup>[22]</sup>作为锌指蛋白底盘，替换 ZF<sup>[22]</sup>上和 DNA 相互作用有关的氨基酸残基<sup>[23]</sup>，构建了多种 ZF 以便进一步的测试 (图 1B)。

## 2.2 SynTF-SynPro 的分子克隆和抑制能力测试

表 2 列出了所有完成的 SynTF-SynPro 对。为方便描述，以 pSV40- $N \times RE$  的形式命名 SynPro(S)，其中， $N$  指插入 RE 的重复数，RE 的名称用 DBD-KRAB 的名称替代。

表 2 完成的 SynTF-SynPro 对  
Table 2 Completed SynTF-SynPros

SynTF (S)	SynPro (S)
SynTF(S)-Gal4-KRAB	pSV40-4×Gal4
SynTF(S)-PIP-KRAB	pSV40-2×PIP
	pSV40-4×PIP
	pSV40-8×PIP
SynTF(S)-ZFHD1-KRAB	pSV40-4×ZFHD1
SynTF(S)-ZF21-16-KRAB	pSV40-8×ZF21-16
SynTF(S)-ZF42-10-KRAB	pSV40-8×ZF42-10
SynTF(S)-ZF43-8-KRAB	pSV40-2×ZF43-8
	pSV40-4×ZF43-8
	pSV40-8×ZF43-8
SynTF(S)-ZF54-8-KRAB	pSV40-8×ZF54-8

通过双质粒双荧光测试系统 (图 2A) 能够检测 SynTF-SynPro 对是否工作。其中, 质粒 A 搭载有强启动子 CMV 所转录的 EGFP 和 SynTF, 使得 SynTF 表达充分。P2A 将 EGFP 与 SynTF 相连, 使得 SynTF 的表达量和 EGFP 相同<sup>[24]</sup>。由此, 通过测量 EGFP 的表达量能够表征 SynTF 的表达量。质粒 B 搭载由 SynPro 所转录的 mCherry, 通过测量 mCherry 的表达量能够表征 SynPro 在不同条件下的表达强度。EGFP 和 mCherry 的荧光强度由流式细

胞仪测量; 在设备参数一致的情况下, 可以通过比较样品间的荧光强度衡量彼此间表达量的差异。

在构建的 7 个 SynTF(S)-SynPro(S) 对中, 有 6 对通过了双质粒双荧光的抑制能力测试 (图 2B)。能够工作的 SynPro(S) 在共转染对应 SynTF(S) 的情况下 (图 2B 的浅色柱状图), 相较于未转染对应的 SynTF(S) 的情况下 (图 2B 的深色柱状图) mCherry 的表达水平显著降低。说明 SynTF(S) 的存在降低了 SynPro(S) 所转录的 mCherry 的表达量, 即抑制了对应的 SynPro(S) 的转录。未被抑制的 SynPro(S) 的表达强度较被抑制的组相比要高 15–106 倍不等 (5×UAS: 106 倍; 4×PIP: 15 倍; 4×ZFHD1: 22 倍; 8×ZF21-16: 57 倍; 8×ZF42-10: 98 倍; 8×ZF43-8: 44 倍)。除了 ZF42-10, 其余 SynPro(S) 基础表达水平相对于 pSV40 都有所降低。

### 2.3 SynTF-SynPro 对正交性测试

在同时使用多个 SynTF-SynPro 对设计复杂回路时, 为了能够在转录水平实现回路间的互不干扰, SynTF-SynPro 对需要互相正交。使用交叉配对的双质粒双荧光测试, 即分别向 HeLa 细胞中共转染配对与非配对的 SynTF(S) 与 SynPro(S),

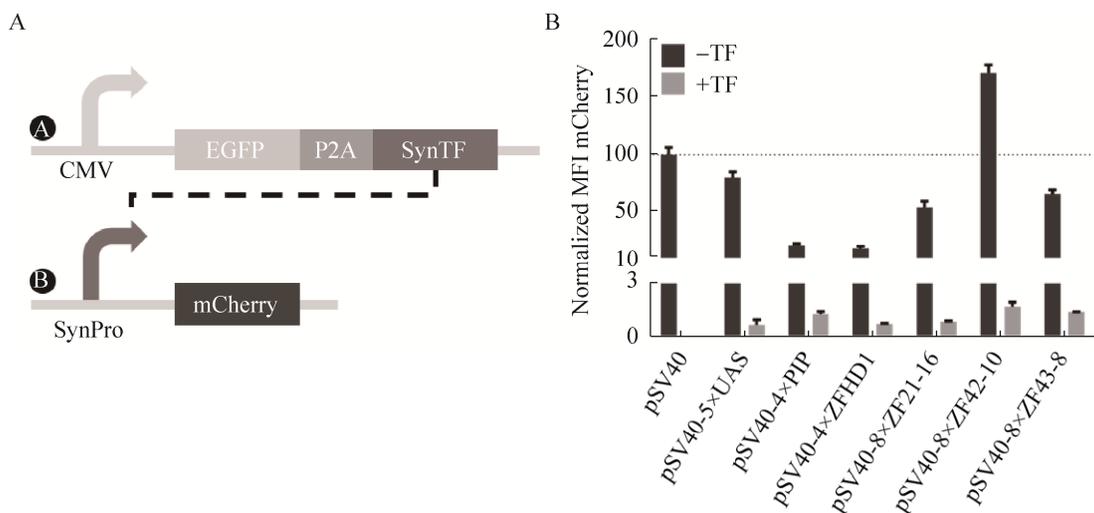


图 2 双质粒双荧光测试系统示意图以及测试结果

Fig. 2 2-plasmid 2-fluorescence test for SynTF-SynPro. (A) The 2-plasmid 2-fluorescence test for SynTF-SynPro transcriptional inhibition capability. (B) Basal and silenced expression of SynPro(S) by cognated SynTF. The mCherry fluorescent intensity was normalized ( $n=3$ , data presented are  $\bar{x} \pm s$ ).

使用流式细胞仪器测量 mCherry 的荧光强度并计算出抑制效果,对 5 对能正常工作的 SynTF-SynPro 对进行了正交性测试。在正交性热图中,每一个格子的颜色深浅和数值代表了在共同转染了 SynTF 后的归一化 SynPro 表达水平。其中,左上到右下对角线上的网格最暗,代表了只有在共转染配对 SynTF 时, SynPro 的表达水平最低,即非配对 SynTF 的抑制效果总是比配对 SynTF 的抑制效果差:因此,这 5 个 SynTF-SynPro 对都是互相正交的(图 3)。其中常用的 3 种 DBD (Gal4、PIP、ZFHD1) 正交表现良好。与依赖于 ZF 构建的 SynTF(S)-SynPro(S) 对相比,搭载了天然 DBD 对应 RE 的 SynPro(S) 的表达水平相对较低。值得注意的是,右下角的灰色框内的 pSV40-8×ZF21-16 和 pSV40-8×ZF43-8 在配对的 SynTF 存在的情况下,表达被充分抑制,但在加入非对应的 SynTF 时,仍维持较高的基本表达。图底两行右侧的格子说明基于合成 ZF 设计的几种 SynPro(S) 在非配对的 SynTF 存在的情况下有较高的表达水平,但

是在存在配对的 ZF 时维持着较低的表达水平。综上所述,基于 ZF 设计的 SynPro(S) 几乎不会与非对应 DBD 相互作用,具有较好的特异性和较大的抑制倍率。

ZF42-10 在没有共转染对应转录因子的时候,其表达水平就显著高于 pSV40 启动子的基础表达水平,无法使用(图 2B)。ZF42-10 基础表达水平高,有可能是因为细胞内源蛋白能够和 ZF42-10 相互作用,起到转录激活的效果。

### 3 结论与讨论

基于天然转录因子的 DBD 或人工 ZF 以及其对应的 RE,文中提供了一套标准化的人工转录因子及启动子的设计方案。利用这一套方案,成功构建了若干抑制型的人工合成的转录因子及启动子。通过双质粒双荧光测试,共有 5 对 SynTF-SynPro 对 (Gal4、PIP、ZFHD1、ZF21-16、ZF43-8) 具有较好的抑制效果并且相互正交。本研究完成的转录因子及启动子对扩充了哺乳动物细胞能够利用的合成生物学元件库。同时,这些 SynTF-SynPro

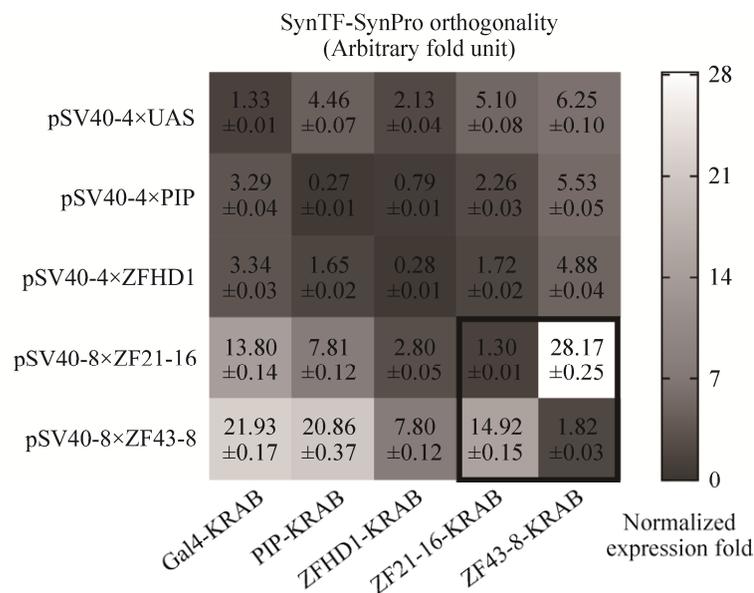


图 3 SynTF-SynPro 对的正交性测试结果

Fig. 3 SynTF-SynPro orthogonality testing. Each grids stand for the expression fold of mCherry after normalized ( $n=3$ , data are  $\bar{x} \pm s$ ). Data are recorded by FACS at 24 h after co-transfecting the corresponding SynTF and SynPro. Grids with dark grey background show a tight inhibition, while light grey grids show a high expression level and low interaction.

对具有不同的抑制强度,可利用类似的方法设计更多性质不同的 SynTD-SynPro 对,用于设计复杂的哺乳动物基因回路。

在此基础上,利用激活型的转录调节结构域,例如 VP64<sup>[4]</sup>,能够构建正交的激活型 SynTF-SynPro 对(图 1A);相较于在酵母中利用锌指蛋白构建可定制的激活型转录因子及启动子<sup>[23]</sup>,本研究拓宽了构建转录因子时 DBD 的选择范围,并将抑制型人工转录因子及启动子应用到了哺乳动物细胞中并验证了其可用性,扩大了人工转录因子及启动子的应用范围。

本研究的工作仅局限在对转录因子的抑制稳态进行测试,缺乏转录动力学性质的测试,有待后续实验进一步完善。此外,RE 的重复数量、RE 到启动子的距离对转录强度的影响是两个值得关注的问题,能否通过调节重复数量或者启动子与编码框的距离,实现对抑制型转录因子的抑制效果的调整,也是值得跟进的研究。

随着 ZF 的高通量开发技术 OPEN<sup>[25-26]</sup>和 CoDA<sup>[27]</sup>的实现以及锌指蛋白数据库(Zinc finger database)<sup>[28]</sup>的建立,今后人们能够更好地利用 ZF 高度模块化的特性,通过选择不同的 DBD 和 RE 组合,构建出数量庞大且性能优异的哺乳动物人工转录因子及启动子对,从而在哺乳动物细胞中利用合成生物学手段实现复杂的功能,如哺乳动物逻辑门的构建、细胞水平的计算等。现阶段的原核生物逻辑门的构建利用了启动子组合构建二元布尔逻辑门<sup>[10]</sup>;在真核生物中,利用特定启动子配合转录后调控也能实现多种逻辑运算<sup>[29]</sup>。利用 SynTF-SynPro 对的转录活性的正交性,本研究中构建的标准化、可调节的转录因子及启动子设计方案,有望为将来复杂回路的构建打下基础,实现真核细胞内完全的逻辑计算。

## REFERENCES

- [1] Thieffry D, Huerta AM, Pérez-Rueda E, et al. From specific gene regulation to genomic networks: a global analysis of transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Bioessays*, 1998, 20(5): 433–440.
- [2] Latchman DS. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29(12): 1305–1312.
- [3] Voss TC, Hager GL. Dynamic regulation of transcriptional states by chromatin and transcription factors. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(2): 69–81.
- [4] Beerli RR, Segal DJ, Dreier B, et al. Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the *erbB-2/HER-2* promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(25): 14628–14633.
- [5] Witzgall R, O’leary E, Leaf A, et al. The Krüppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(10): 4514–4518.
- [6] Mangan S, Itzkovitz S, Zaslaver A, et al. The incoherent feed-forward loop accelerates the response-time of the gal system of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 2006, 356(5): 1073–1081.
- [7] Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 2000, 403(6767): 339–342.
- [8] Elowitz MB, Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 2000, 403(6767): 335–338.
- [9] Basu S, Gerchman Y, Collins CH, et al. A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. *Nature*, 2005, 434(7037): 1130–1134.
- [10] Tamsir A, Tabor JJ, Voigt CA. Robust multicellular computing using genetically encoded NOR gates and chemical ‘wires’. *Nature*, 2011, 469(7329): 212–215.
- [11] Andrianantoandro E, Basu S, Karig DK, et al. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *Mol Syst Biol*, 2006, 2(1): 2006.0028.
- [12] Lohmueller JJ, Armel TZ, Silver PA. A tunable zinc finger-based framework for Boolean logic computation in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(11): 5180–5187.
- [13] Szulc J, Wiznerowicz M, Sauvain MO, et al. A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat Methods*, 2006, 3(2): 109–116.
- [14] Gaber R, Lebar T, Majerle A, et al. Designable DNA-binding domains enable construction of logic circuits in mammalian cells. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(3): 203–208.
- [15] Farzadfard F, Perli SD, Lu TK. Tunable and multifunctional eukaryotic transcription factors based on CRISPR/Cas. *ACS Synth Biol*, 2013, 2(10): 604–613.
- [16] Chen XY, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(10): 1357–1369.

- [17] Urrutia R. KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol*, 2003, 4(10): 231.
- [18] Morsut L, Roybal KT, Xiong X, et al. Engineering customized cell sensing and response behaviors using synthetic notch receptors. *Cell*, 2016, 164(4): 780–791.
- [19] Fussenegger M, Morris RP, Fux C, et al. Streptogramin-based gene regulation systems for mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(11): 1203–1208.
- [20] Pomerantz JL, Sharp PA, Pabo CO. Structure-based design of transcription factors. *Science*, 1995, 267(5194): 93–96.
- [21] Moore M, Klug A, Choo Y. Improved DNA binding specificity from polyzinc finger peptides by using strings of two-finger units. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(4): 1437–1441.
- [22] Klug A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Ann Rev Biochem*, 2010, 79(1): 213–231.
- [23] Khalil AS, Lu TK, Bashor CJ, et al. A synthetic biology framework for programming eukaryotic transcription functions. *Cell*, 2012, 150(3): 647–658.
- [24] Szymczak-Workman AL, Vignali KM, Vignali DA. Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors. *Cold Spring Harb Protoc*, 2012, 2012(2): 199–204.
- [25] Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Sander JD, et al. Oligomerized pool engineering (OPEN): an ‘open-source’ protocol for making customized zinc-finger arrays. *Nat Protoc*, 2009, 4(10): 1471–501.
- [26] Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiaik A, et al. Rapid “Open-Source” engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell*, 2008, 31(2): 294–301.
- [27] Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, et al. Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat Methods*, 2011, 8(1): 67–69.
- [28] Fu F, Voytas DF. Zinc Finger Database (ZiFDB) v2.0: a comprehensive database of C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc fingers and engineered zinc finger arrays. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(D): D452–D455.
- [29] Ausländer S, Ausländer D, Müller M, et al. Programmable single-cell mammalian biocomputers. *Nature*, 2012, 487(7405): 123–127.

## 团队简介:

iGEM 2017 Fudan 团队是于 2017 年代表复旦大学参加 iGEM 大赛的代表队之一。团队内学生共计 8 人, 包括队长杨子杰和 7 名队员 (潘祎杰、蔡毅鸣、傅彤、冯鹭、刘燕、王一恒、熊心旋); 主要为 2015 级复旦大学本科学生。团队指导老师蔡亮和卢大儒, 来自生命科学学院。团队于 2017 年初成立。在 2017 年 iGEM 大赛准备中, 团队成员积极合作, 相互促进, 共同进步, 最终夺得 2017 年最佳治疗项目。赛后, 团队成员继续致力于 iGEM 理念的推广, 在校内外多项活动中表现突出。



(本文责编 郝丽芳)