



Genome-TALER™ TALEN 及 TALE-TF 产品和服务

用户手册

广州高新技术产业开发区
广州科学城掬泉路3号
广州国际企业孵化器F区8楼
510663

电话: 4006-020-200; 020-32068595
传真: 020-32052877

网址: www.igenebio.com

用户手册

Genome-TALER™ TALEN 及 TALE-TF 产品和服务

- I. TAL 效应子技术简介
- II. 相关服务
- III. 实验示例
- IV. TALEN及TALE-TF 基因组编辑流程概览
- V. 关键步骤
- VI. 参考文献
- VII. 附录
- VIII. 有限使用许可及质保声明

I. TAL 效应子技术简介

转录激活因子样效应子(TAL effectors)是由植物病原菌黄单胞菌(*Xanthomonas*)在感染植物时分泌的蛋白质。TALEs识别宿主植物靶基因的启动子区，调控相应基因的表达。TALE蛋白中间含有一个重复区域，该区域由33-35个氨基酸的重复单元组成。每个重复单元的氨基酸序列高度保守，除了第12位和13位的两个氨基酸可变，即重复单元可变的双氨基酸残基（RVD）。TALE单体通过RVD识别DNA靶点上的碱基，有如下——对应关系：NI = A, HD = C, NG = T, NN = G 或 A。近期的研究工作证实了NH RVD对碱基G的识别特异性及亲和性都高于NN。因此NH已经替换了NN用于碱基G的识别。GeneCopeia也提供N* RVD用于5'甲基化胞嘧啶的识别。（图1）

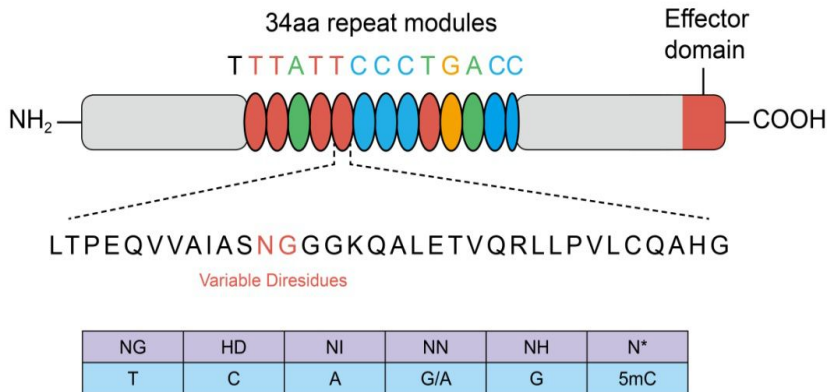


图1. 上图：TAL效应子示意图。下图：常用RVD识别密码。

TAL效应子已广泛应用于靶向基因组编辑工具的制备：通过融合表达核酸酶、转录因子或其他功能的结构域构建位点特异的内切酶（TALEN）、靶基因转录调控因子（TALE-TFs）或者其他基因组修饰蛋白（图2）。TALE融合蛋白通过TALE特异性识别结合染色体上靶序列进行靶向基因组编辑，比如基因敲除、基因敲入（结合使用重组供体质粒）、基因组修饰、基因转录激活或抑制等。不同于识别3联体碱基的锌指蛋白，TALE单体通过——对应的关系精确识别单个碱基（A, T, C, G），因此可以针对基因组上任意目标序列设计组建TALE模块。

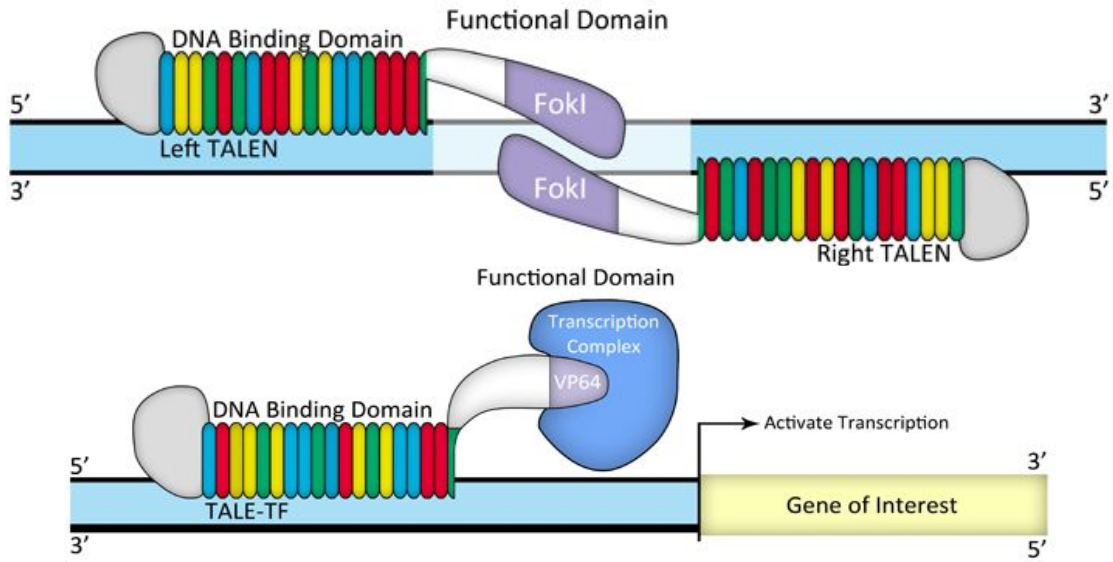


图2. 上图： TALEN设计示意图。 下图： TALE-TF设计示意图。

Advantages

靶向任意基因，无细胞类型限制

高序列特异性基因组编辑

可应用于基因敲除、基因敲入、基因修饰、基因激活或抑制等等

灵活的结合域和功能域设计，可选择TALEN， TALE-TF或其他TAL效应子

II. 相关服务

服务		描述	应用范围
验证服务	错配酶切验证	染色体水平功能验证。通过检测TALEN介导的非同源末端连接（NHEJ）在染色体靶点上生成的插入缺失突变验证其功能。	TALEN
	qPCR检测	染色体水平功能验证。通过测量靶基因表达水平的变化，验证TALE-TF的功能。	TALE-TF
供体克隆服务 (详见附录)	供体克隆设计与构建	我们会依据您的实验需求，提供供体克隆客户定制服务。供体克隆能将您感兴趣的基因、筛选标记或遗传因子通过TALEN介导的同源重组整合到宿主细胞的基因组内。我们提供一系列含有不同筛选标记及遗传因子的供体载体设计以满足您的实验需求。	TALEN
稳转细胞系服务 (详见附录)	单克隆细胞系	含有TALEN介导的基因组修饰的单克隆细胞系。	TALEN
	细胞库	为含有TALEN介导的基因组修饰的单克隆细胞系建库。	TALEN
转基因小鼠服务	转基因小鼠	构建TALEN介导的基因组修饰的转基因小鼠。	TALEN

III. 实验示例

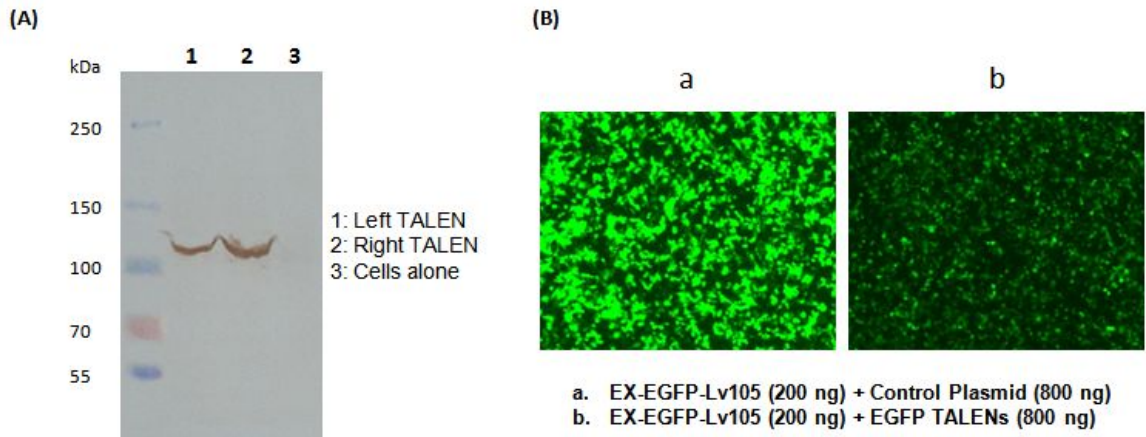


图3. EGFP TALENs 下调靶基因eGFP的表达. (A) eGFP TALENs 表达检测: 转染eGFP TALEN质粒到HEK293T细胞中 (6孔板, 转染0.8 μg 质粒每孔)。48小时后收集细胞, 通过western blot检测EGFP-TALENs的表达 (Flag标签抗体, SDS-PAGE分离胶浓度为8%, EGFP-TALEN分子量约110kDa)。(B) EGFP TALENs 下调靶基因eGFP的表达: 共转染EGFP TALENs质粒和EX-EGFP-Lv105 (eGFP表达克隆)到6孔板中的HEK293T细胞中。48小时后在显微镜下观察EGFP的表达水平。(Nikon Eclipse Ti, 曝光时间: 600ms)。

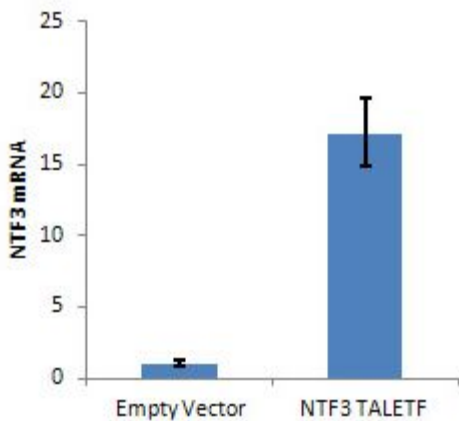
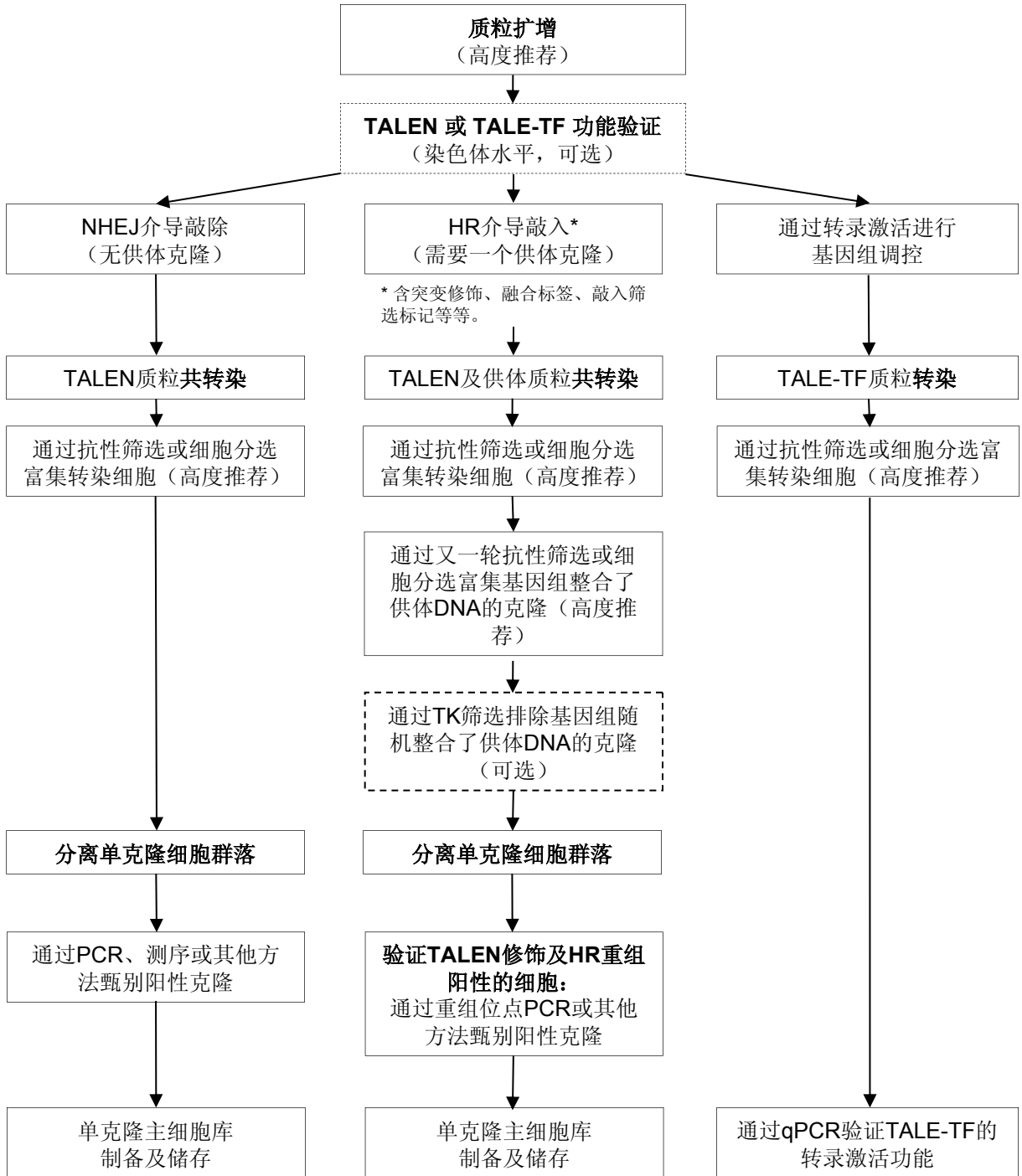


图4. NTF3 TALE-TF 上调内源性NTF3的转录。

转染 NTF3 TALE-TF到HEK293T细胞中 (6孔板, 每孔转染1 μg 质粒)。实时荧光定量PCR检测表明TALE-TF将HEK293T细胞内NTF3的表达水平提高了17倍左右 (以空载体做对照)。

IV. TALEN及TALE-TF 基因组编辑流程概览



V. 关键步骤

A. 质粒扩增

我们推荐您在进行靶向基因实验前先扩增所提供的质粒。质粒可以使用任何适合RecA- 及EndA-E.coli 感受态细胞的条件下进行转化。

在转化TALE产品质粒时，我们建议铺50-200 μ l 转化后的细胞到新鲜的LB-氨苄青霉素抗性平板上（50 μ g/ml）。将平板在37°C下孵育过夜，所得菌落接种到约200ml的含50 μ g/ml氨苄青霉素的LB培养基，在37°C下摇菌过夜。过夜培养后，使用去内毒素质粒DNA大量提取试剂盒提取质粒DNA。

我们推荐您使用酶切分析或直接测序确认扩增质粒的完整性。

B. TALE-TF 或 TALEN 修饰细胞鉴定

(A) qRT-PCR法测定 TALE-TF 转录激活活性

qRT-PCR能定量测量TALE-TF诱发的转录上调。Genecopoeia为人类基因组上的大多数基因提供经过验证的qPCR引物。Genecopoeia也提供完整的验证服务，包括RNA提取、逆转录、qPCR及数据分析。

网络上有大量qRT-PCR标准流程可供选择。我们在此提供一个简要的概述：

1. 转染24或48小时候，收集细胞提取总RNA。
2. 用紫外分光光度计测量RNA浓度。
3. 逆转录获得cDNA。
4. 进行qPCR（定量PCR）
5. 分析数据，用 $\Delta \Delta Ct$ 方法计算基因转录水平。

(B) 错配酶切法测量 TALEN 剪切效率

TALEN介导的NHEJ常会在靶点序列引入插入缺失突变。我们推荐使用Surveyor突变检测试剂盒及标准凝胶电泳（Transgenomic, cat. no. 706025）对这类突变进行检测。替代选择包括Cel1、T7、绿豆及S1核酸酶。

Surveyor酶切实验应依照厂商提供的标准流程进行操作。该实验步骤在厂商提供的用户手册中有更详细的叙述。我们在此提供一个简要的概述。

1. 转染24或48小时候，收集细胞提取基因组DNA。
2. PCR扩增TALEN靶点附近的序列。

3. 用5 μl PCR产物跑2%凝胶电泳进行检测。对任意模板，都应确保至少有一条产物带对应引物的预期扩增产物，且条带大小符合基因组上引物结合位点之间的距离。

关键步骤：如果PCR出现多个扩增子条带，应重设引物并优化PCR条件，避免脱靶扩增。如碰上特殊情况无法获得单一条带，可先胶回收长度正确的条带，再进行杂合双链重退火及Surveyor核酸酶消化。

4. DNA杂合双链形成。此时，PCR产物中包括含有TALEN介导修饰的和不含修饰的基因组DNA。取300ng产物，在热循环仪试管中进行杂交。

5. Surveyor核酸酶 S 消化。用Surveyor核酸酶 S 消化杂交后的同源或杂合DNA双链，验证TALEN的酶切效率。

C. TALE-TF或TALEN转染靶细胞

如使用TALE-TF进行转录调控，请选用方法A；如使用TALEN，需要测试其核酸酶活性，请选择方法B。

1. 按照目的细胞类型的推荐实验条件，在六孔细胞培养板每孔接种约100,000到300,000个待转染细胞。视需要调整培养体积。转染前一日，用胰蛋白酶进行消化并计算细胞数目。决定每孔接种的细胞数，以使它们在转染时达到70-80%的融合率。

2. 次日，根据厂商提供的说明书，使用适合的转染试剂制备TALENs或TALE-TF转染混合物。让转染混合物在细胞上反应超过6小时。

A) 2.0μg TALE-TF质粒

B) 1.0μg左侧TALEN质粒 + 1.0μg右侧TALEN质粒

注：请依据您的实验需要设立合适的对照组。

技术说明：

1) 因为不同细胞系的转染效率有所不同，我们建议客户优化质粒与转染试剂用量直至取得最佳效果。

2) 为取得最优的转染效果，我们建议将质粒DNA与转染试剂、无抗性培养基及完全培养基内生长的细胞预混合。

3) 对于难转染细胞（如原代细胞、干细胞或造血干细胞），利用非被动的转染方法，如NucleoFection（Lonza）或Neon system（Life Technologies）也许更为明智。请按照该细胞类型的厂商提供的实验准则操作。

3. 转染24小时后，弃去转染培养基，加入含抗生素的完全生长培养基，取1/10或1/20细胞接种6孔板，保留1组板用作重组位点PCR检测鉴定样品（见后文）。让细胞回复24小时。

4. 转染48小时后开始进行药筛。我们推荐对抗生素浓度进行优化，以获得最佳结果。

技术说明：

用未转染细胞确立致死曲线可以确定抗生素对靶细胞系的有效浓度。药筛48小时能杀死超过90%细胞的抗生素浓度（一般有效范围为0.5µg-5µg/ml）即为该靶细胞系筛选的正确剂量。

示例：使用EndoFectin™试剂及TALEN或TALE-TF质粒转染HEK293T细胞

1) 细胞接种

转染前约24小时接种HEK293T至6孔板。确定每孔接种的细胞数，以使转染时每孔细胞融合率为70-80%。

2) 制备DNA–Opti-MEM混合物。

方法 A)：混合2.0 µg TALE-TF质粒DNA与 50 µl Opti-MEM。

注：设立对照组（如报告质粒或空载体转染）监控转染效率与细胞的健康状况。

方法 B)：混合左侧及右侧TALEN质粒各1.0 µg（共2 µg）及50 µl Opti-MEM。

注：转染对照组可省略一侧或双侧TALEN质粒。设立对照组（可使用报告质粒或空载体转染）监控转染效率与细胞的健康状况。

3) 制备EndoFectin™–Opti-MEM溶液

用50 µl Opti-MEM稀释6 µl EndoFectin™-Plus，室温下混合均匀。

4) 制备DNA- EndoFectin™混合物

将稀释后的EndoFectin™滴入DNA–Opti-MEM混合物的试管并轻柔地涡旋混匀。（*注：切勿颠倒加入的顺序*）在室温下孵育10-25分钟以使DNA-EndoFectin™复合物形成。

5) 细胞转染

将DNA-EndoFectin™直接加到培养皿或培养板板孔内，轻柔摇晃混匀。

D. TALEN修饰及同源重组（HR）细胞验证

1. 通过设计引物对5端或3端重组臂的进行重组位点PCR扩增，可以确证供体DNA特异整合到基因组上的靶点。

2. 重组位点验证PCR实验步骤

1) 使用前，验证引物应被稀释10 µM。验证5端或3端重组臂已足以证明供体片段整合，但也可以选择同时验证两端重组臂作为额外的确证。

2) 重组位点验证PCR标准流程细节：

a) 用合适的基因组DNA小量提取试剂盒从阳性对照细胞或实验组细胞中分离基因组DNA。请按照试剂盒制造商提供的实验说明操作。

b) 重组位点验证PCR（反应体系如下）

试剂	实验组 (TALEN+供体克隆)	对照组 (供体克隆)
基因组DNA(60~100ng/μl)	1 μl	1 μl
10 μM 5' (or 3') AAVS1 PCR Primer Mix	1 μl	1 μl
5×UltraPFTM Buffer (Mg ²⁺ free)	5 μl	5 μl
10 mM dNTPs	0.5 μl	0.5 μl
20mM MgSO ₄	2.5 μl	2.5 μl
UltraPF(5U/μl)	0.25 μl	0.25 μl
PCR级蒸馏水	14.75 μl	14.75 μl
总体积	25 μl	25 μl

98°C, 5min

98°C, 20sec

55°C, 30sec

72°C, 1min

72°C, 7min

Hold at 4~16°C

} 35 cycles

PCR产物用1X TAE缓冲液和1% Agarose/EtBr凝胶电泳，确认重组位点验证PCR结果。

样品的5端及3端重组位点验证PCR结果因引物设计而异。

技术说明：

- 1) 3端与5端重组位点的PCR结果条带强弱可能会有所差异。原因有可能是两端重组位点的染色体结构、修饰和该区域的序列影响了PCR的扩增效率。
- 2) 一端重组位点的验证PCR结果为阳性就足以确证整合成功。
- 3) 虽然不常见，但供体克隆同时与非靶标位点发生随机整合的情况也有可能发生。负筛选可被用于检测细胞中同时存在的随机整合。

E. 分离单克隆细胞系

连续稀释法被广泛用于分离含有目的修饰的单细胞，以进行扩增培养构建新的单克隆细胞系。像大多数单克隆分离方法，该方法也不能保证所选的细胞群落源自单一细胞。建议的做法是进行第二轮分离增大筛选到单克隆系的概率。此外值得一提的是，不同细胞类型在连续稀释法中的表现也有很大区别，因此实验时应针对目的细胞类型查阅相关的文献资料。

1. 在灭菌的96孔板每孔加入100μl培养基，留空A1孔。

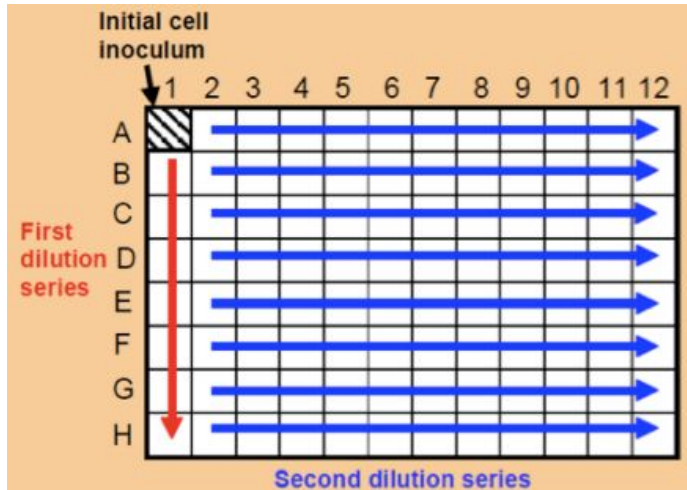


图5: 连续稀释法示意图

2. 在A1孔加入200μl细胞悬浮液，取其中100μl与B1孔中的培养基混匀，混匀过程中避免产生气泡。继续在第1列进行同样的1:2稀释至H1孔，并用培养基将第1列每孔体积定容至200μl。
3. 混匀第1列的细胞悬浮液，各取其中100μl加至第2列孔中。用移液器轻柔混匀，避免产生气泡。重复此1:2稀释至第12列，并用培养基将每孔体积定容至200μl。
4. 将培养板放在 37℃ 培养，避免扰动。
5. 培养3天后可通过显微镜观察到细胞；至5-8天左右，视细胞生长情况，可开始进行标记。在培养板盖上对含单细胞群落的孔进行标记。这些群落其后可转移至更大的容器进行扩大培养。

技术说明:

- 1) 在A1孔加入4000细胞 (2×10^4 cells/ml) 是较理想的起始浓度。对难生长的细胞系，可增加起始浓度。
- 2) 如有荧光报告基因，应观察哪些细胞群落有荧光表达。如果报告基因不是能直接观察的类型，则需等到其后的培养步骤再进行相关测量。
- 3) 每一个有单细胞群落的孔都应用独特标识号标记，并在对应的培养板和实验笔记上使用同样的标识号。

VI.参考文献

1. Boch, J. et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*. 2009 326(5959):1509-12
2. Moscou, M. et al. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*. 2009 326(5959):1501
3. Christian, M. et al. Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. DOI: 10.1534/genetics.110.120717
4. Morbitzera, R. et al. Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1013133107
5. Cermak, T. et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39, No. 12 e82 doi:10.1093/nar/gkr218
6. Li, T. et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39, No. 14 6315–6325 doi:10.1093/nar/gkr188
7. Zhang, F. et al. Programmable Sequence-Specific Transcriptional Regulation of Mammalian Genome Using Designer TAL Effectors. *Nat Biotechnol*. 2011 February ; 29(2): 149 –153. doi:10.1038/nbt.1775.

VII.附录

供体克隆设计与构建服务

GeneCopoeia提供供体克隆设计及构建服务。供体克隆装载客户定制的目的基因、筛选标记及其他遗传因子，通过位点特异性的基因组编辑工具介导的同源重组（HR）将所装载的片段整合到基因组上的靶点。GeneCopoeia提供含有不同筛选标记及遗传因子的多种供体载体供客户选择。

供体载体类型

载体	启动子	报告基因	筛选标记	LoxP 位点
pDonor-D01	EFa1	copGFP	Puromycin	N/A
pDonor-D02	CMV	copGFP	Neomycin	N/A
pDonor-D03	CMV	N/A	Neomycin	N/A
pDonor-D04	CMV	N/A	Puromycin	N/A
pDonor-D05	EFa1	N/A	Neomycin	N/A
pDonor-D07	EFa1	copGFP	Puromycin/TK	Loxp
pDonor-D08	CMV	copGFP	Neomycin/TK	Loxp
pDonor-D09	EFa1	N/A	Puromycin/TK	Loxp
pDonor-D10	CMV	N/A	Neomycin/TK	Loxp

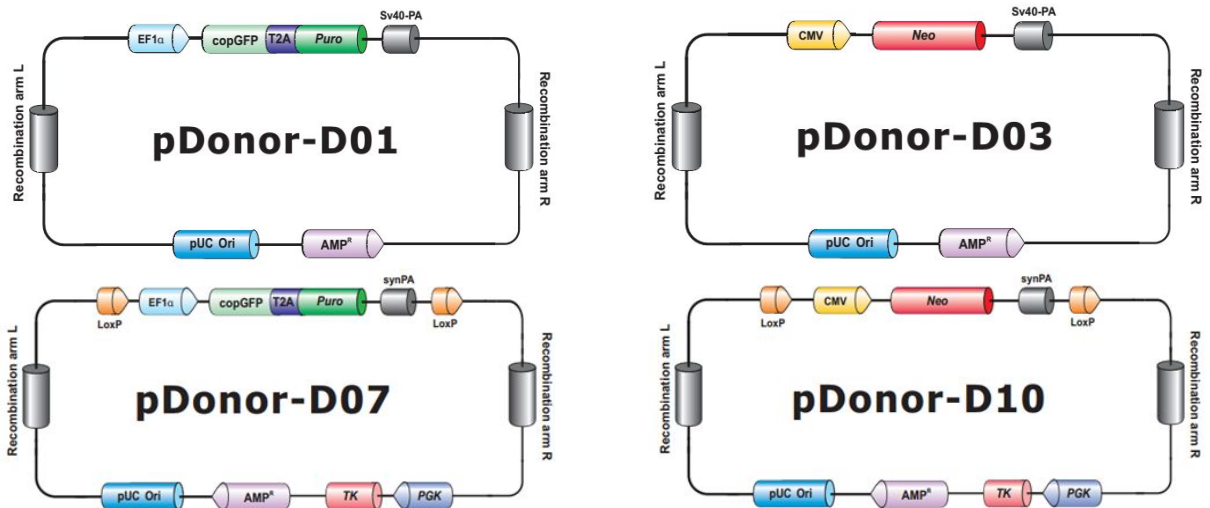
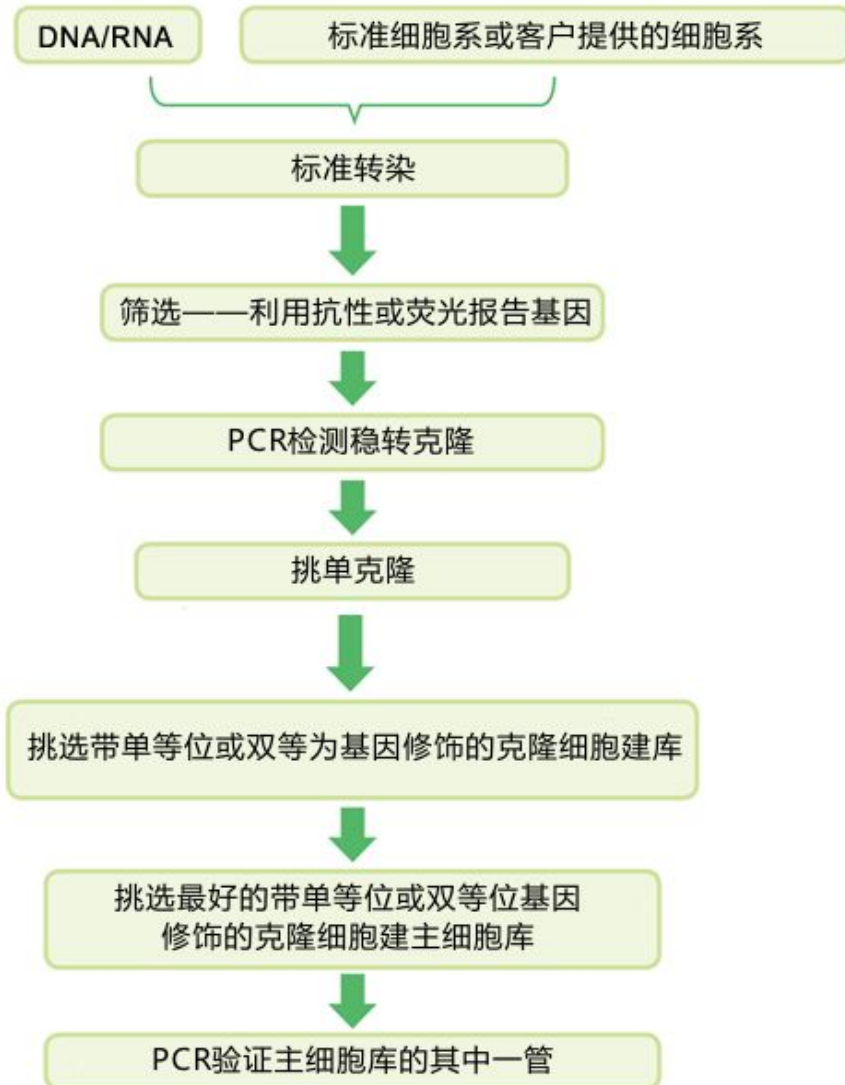


图6. 部分供体载体图谱

稳转细胞株服务

GeneCopoeia 为含有TALEN或CRISPR-Cas9介导的基因组修饰的细胞提供单克隆稳转细胞株构建服务及细胞建库服务。

TALEN/CRISPR稳转细胞系构建服务

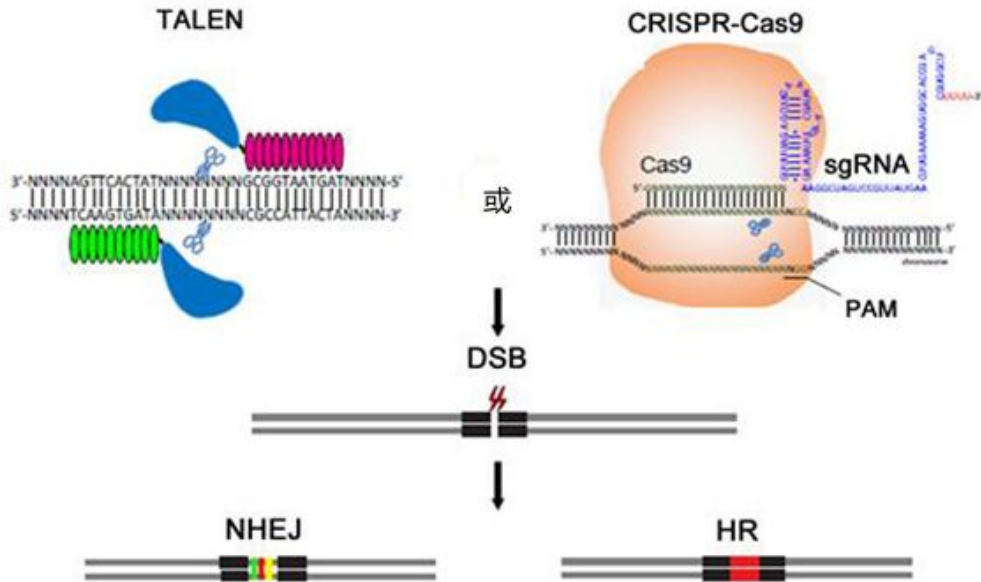


转基因小鼠服务

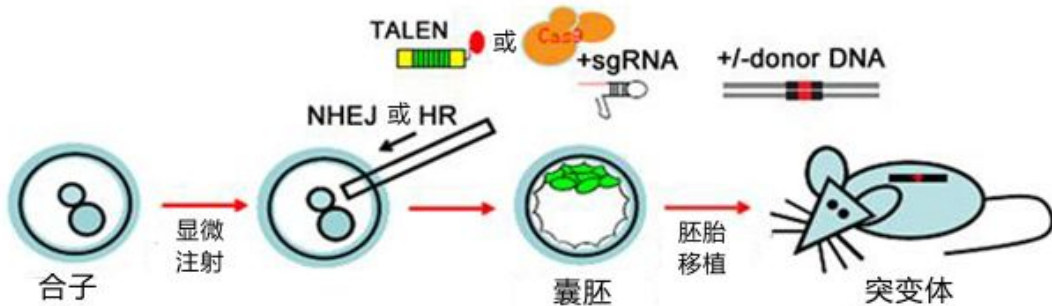
转基因小鼠模型是研究基因产物的分子机制、其相互作用以及对细胞进程影响的理想工具。GeneCopeia 能为客户定制带有TALEN 或 CRISPR-Cas9 介导的基因组修饰的转基因小鼠。

TALEN/CRISPR-Cas9介导基因组修饰

TALEN和CRISPR-Cas9基因组编辑概述



一步法构建带基因组修饰的小鼠



VIII. 有限使用许可及质量保证

有限使用许可

Following terms and conditions apply to use of the Genome-TALER™ TALEN and TALE-TF products and services (the Product). If the terms and conditions are not acceptable, the Product in its entirety must be returned to GeneCopoeia within 5 calendar days. A limited End-User license is granted to the purchaser of the Product. The Product shall be used by the purchaser for internal research purposes only. The Product is expressly not designed, intended, or warranted for use in humans or for therapeutic or diagnostic use. The Product must not be resold, repackaged or modified for resale, or used to manufacture commercial products or deliver information obtained in service without prior written consent from GeneCopoeia. This Product should be used in accordance with the NIH guidelines developed for recombinant DNA and genetic research. Use of any part of the Product constitutes acceptance of the above terms.

有限质量保证

GeneCopoeia warrants that the Product meets the specifications described in the accompanying Product Datasheet. If it is proven to the satisfaction of GeneCopoeia that the Product fails to meet these specifications, GeneCopoeia will replace the Product. In the event a replacement cannot be provided, GeneCopoeia will provide the purchaser with a refund. This limited warranty shall not extend to anyone other than the original purchaser of the Product. Notice of nonconforming products must be made to GeneCopoeia within 30 days of receipt of the Product. GeneCopoeia's liability is expressly limited to replacement of Product or a refund limited to the actual purchase price. GeneCopoeia's liability does not extend to any damages arising from use or improper use of the Product, or losses associated with the use of additional materials or reagents. This limited warranty is the sole and exclusive warranty. GeneCopoeia does not provide any other warranties of any kind, expressed or implied, including the merchantability or fitness of the Product for a particular purpose.

GeneCopoeia is committed to providing our customers with high-quality products. If you should have any questions or concerns about any GeneCopoeia products, please contact us at 301-762-0888.

© 2015 GeneCopoeia, Inc.