神奇的基因开关——四环素调控系统

南模生物深耕基因编辑领域，在四环素诱导小鼠模型构建上有着成熟的技术和丰富的经验，为您的基因功能研究之路保驾护航。

目的基因过表达，是研究基因功能的主要方法之一。其中，如何确保目的基因准确无误的表达是非常关键的一步。因为目的基因表达过量或者在不恰当的时间表达都会影响到细胞状态或者机体的生长发育，进而影响实验结果。四环素(Tetracycline, Tet)调控基因表达系统便可以做到对基因表达的精准调控，今天小编便来介绍这一神奇的基因开关。

四环素调控基因表达系统

四环素调控基因表达系统是以大肠杆菌Tn10转座子上Tet抗性操纵子为基础而建立的。在细菌系统中，正常情况下，tetR将与tetO结合，抑制下游抗性基因的转录。当存在四环素或者四环素类似物如强力霉素时，tetR将与四环素结合，不再和tetO结合，造成下游抗性基因表达，细菌从而获得耐药性[1]。

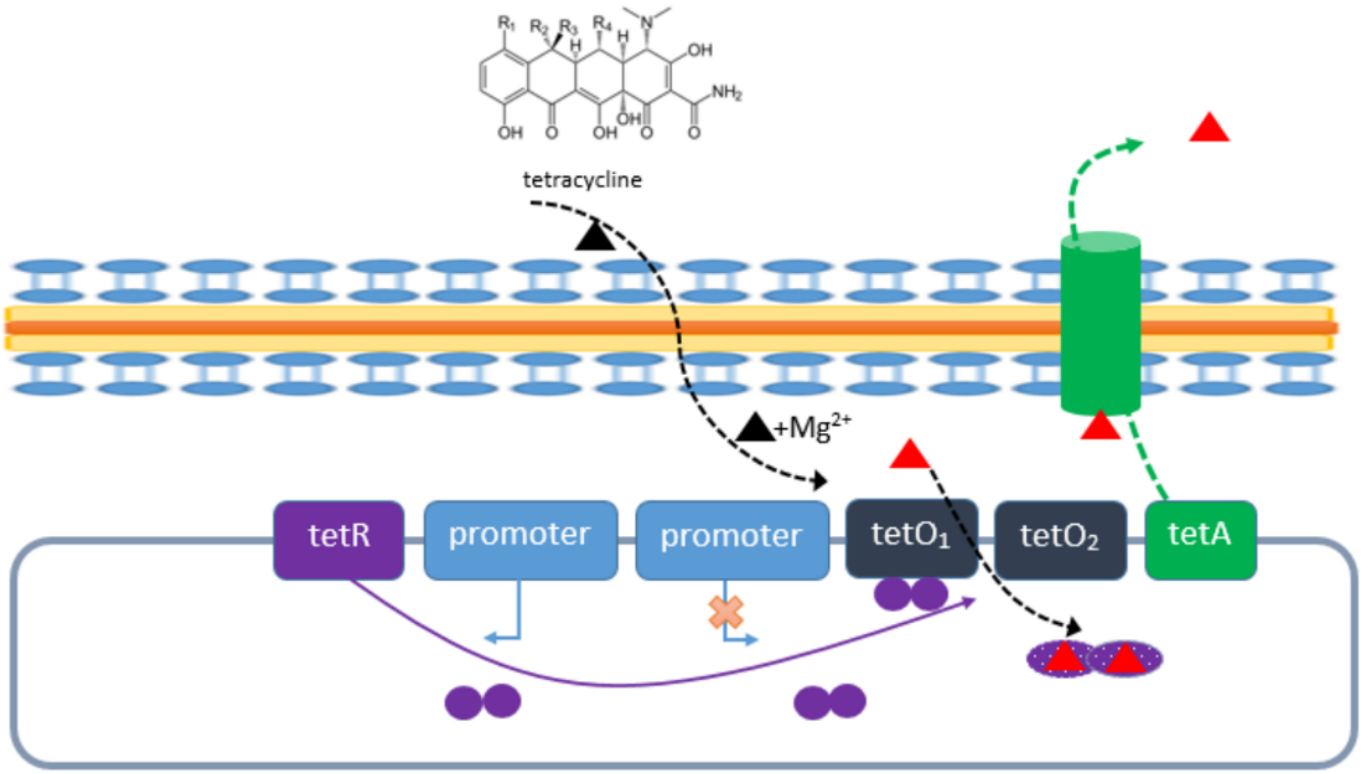

图1 TetR和tetO在四环素耐药菌中的作用原理[1]

注：在没有四环素的情况下，TetR（紫色实心圆）以高亲和力与两个四环素操纵子tetO1和tetO2 结合。这导致四环素外排转运蛋白 TetA 的抑制。如果存在四环素时（黑色三角形），四环素与 Mg2+形成复合物（红色三角形）。该复合物与 TetR 结合，这导致TetR 与tetO分离，TetA得以表达。

由此可见，四环素诱导基因表达系统的关键元件是四环素反应元件（TRE）和四环素阻遏蛋白（TetR）。经过多年发展，这一系统也经过了多次优化，现在常用的TRE是由7个长度为19个氨基酸的四环素抗性操纵子(TetO)组成，TRE及下游CMV启动子共同组成了四环素依赖性启动子（Ptet）。而对TetR的改造，使得多

种Tet调控系统逐渐发展起来，应用最为广泛的便是抑制型系统Tet-off和激活型系统Tet-on。

Tet-off系统

Gossen 和Bujard最初构建的系统便是Tet-off系统，即在四环素存在的情况，目的基因表达水平降低或者不表达。为了达到这一目的，人们对大肠杆菌TetR进行了改造，将疱疹病毒的 VP16 蛋白的转录激活区域融合到TetR上，从而合成了反式激活蛋白tTA，改变了TetR阻遏蛋白的属性。在缺乏四环素时，tTA 将和TRE结合，VP16会使Ptet活化从而使基因表达促进目的基因表达，而在四环素存在时，tTA则与四环素结合，抑制目的基因表达[2]。

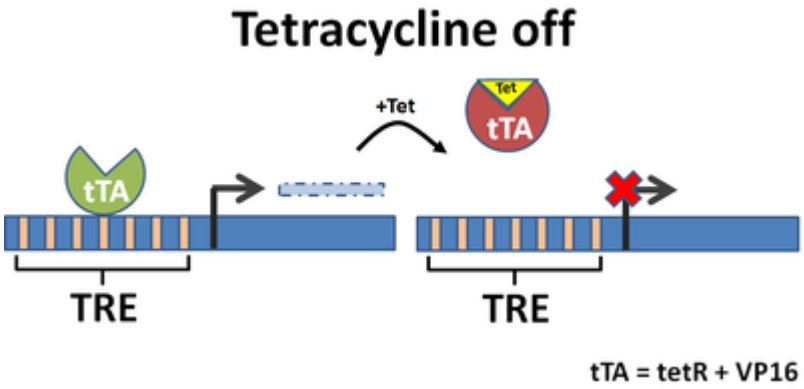

图2 Tet-off系统原理

Tet-on系统

1995年，Gossen等发现了tetR参与四环素诱导的抑制反应的关键的4个氨基酸残基，这些氨基酸残基突变后可发生反向的反应，即在四环素存在的条件下，目的基因能够表达蛋白，而缺失四环素时，目的基因无法表达。新的反式激活蛋白被称为rtTA，由rTetR与VP16融合而成[2]。

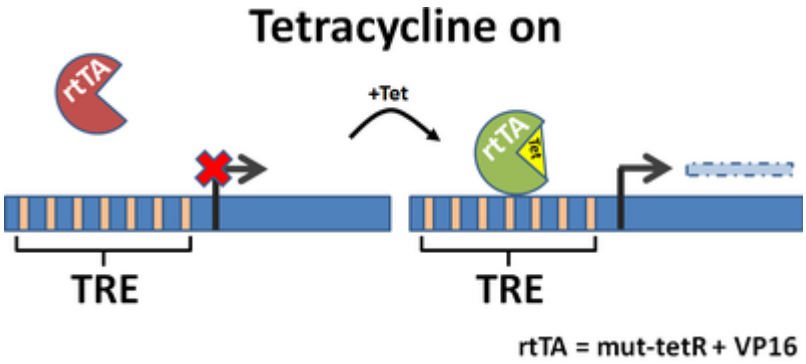

图3 Tet-on系统原理

经过多年的发展，人们对Tet-on系统的启动子和活化因子进行了持续的优化，使目的基因在没有四环素的情况下表现出更高的稳定性和更低的背景活性，在有四环素诱导情况下有更高的表达水平。其中，TRE3G和rtTA2 S -M2 变体表现出对四环素的高敏感性，成为目前广泛应用的四环素诱导系统的元件[3][4]。

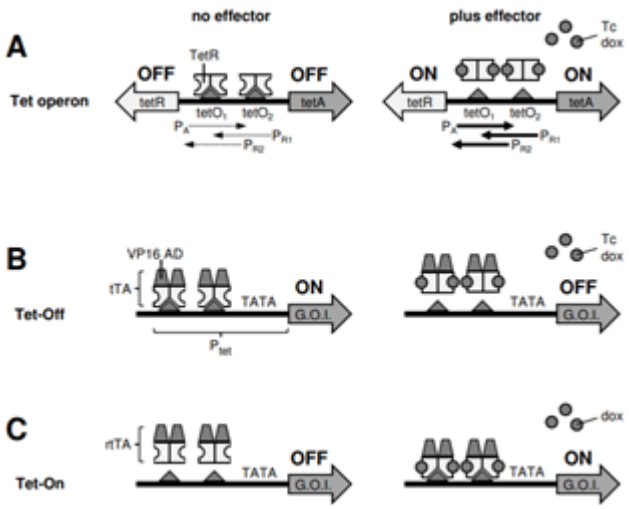

图4 Tet抗性操纵子、Tet-Off和Tet-On系统原理[3]

四环素调控基因表达系统小鼠模型

四环素诱导系统主要通过pTRE和tTA/rtTA两部分相互配合完成基因表达调控的功能。因此，利用四环素诱导系统在小鼠体内实现对目的基因表达的调控，原则上需要建立两种小鼠。

首先，建立pTRE小鼠，需将目的基因插入到四环素依赖性启动子下游，使目的基因的表达受四环素的控制。其次，需要建立tTA或者rtTA小鼠，该小鼠中的tTA/rtTA激活因子由特定启动子驱动，可在特定细胞或者组织或者全身表达tTA或者rtTA。

这两种小鼠繁育后，可获得子代小鼠中既带有pTRE及目的基因又带有tTA/rtTA的小鼠，即可实现通过四环素的有无来调控基因的表达。

Tet-off小鼠模型

Tet-off小鼠模型是通过tTA小鼠同pTRE小鼠交配获得。主要可应用于调控目的基因过表达的水平。例如，Giles等通过构建α-MHC-tTA; pTRE-cMyBP-C小鼠，进行了回复实验（Rescueexperiments），即将α-MHC-tTA鼠、pTRE-cMyBP-C鼠同cMyBP-C 敲除鼠交配，利用四环素基因调控系统在cMyBP-C 敲除小鼠中恢复cMyBP-C的表达，进而验证了cMyBP-C缺陷造成的心肌肥大的表型是可逆的。在这一系统中，通过注射四环素，还可以瞬时降低cMyBP-C的表达。可见，Tet-Off实现可以对基因的功能的全面的研究[5]。

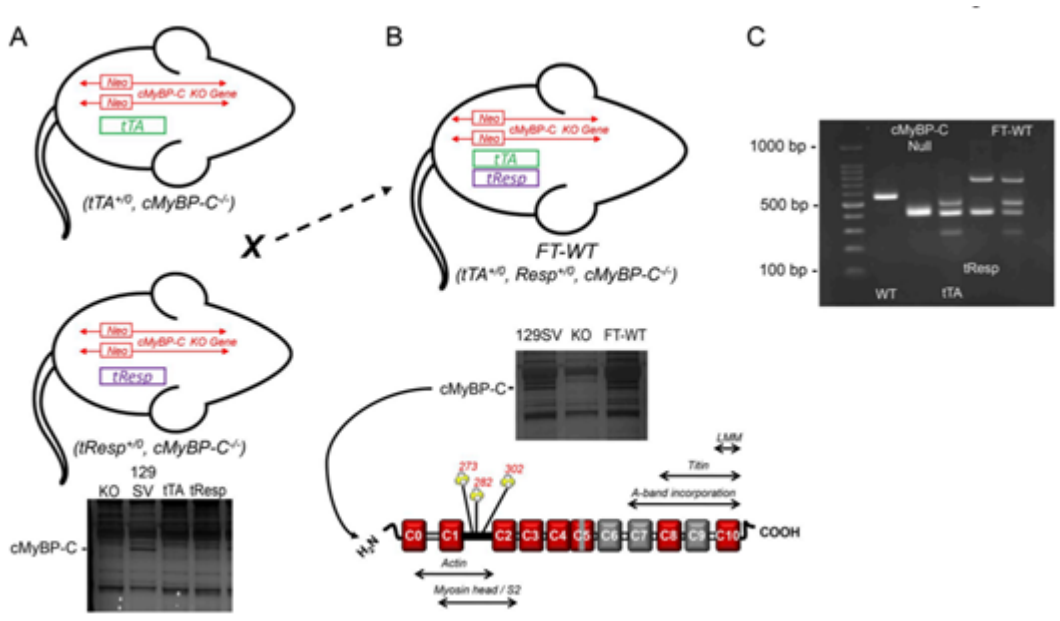

图5 Tet-off小鼠模型

Tet-on小鼠模型

Tet-On小鼠模型是通过rtTA小鼠同pTRE小鼠交配获得。主要应用于诱导目的基因过表达。例如，Song等通过构建Alb-rtTA小鼠，再注射pTRE-uPA腺病毒，制备肝脏损伤模型。Alb是肝脏特异表达的基因，uPA则是肝毒性物质，在注射四环素后，rtTA在Alb启动子的作用下，将在肝脏中同pTRE结合，进而过表达下游基因uPA，造成肝脏损伤[6]。

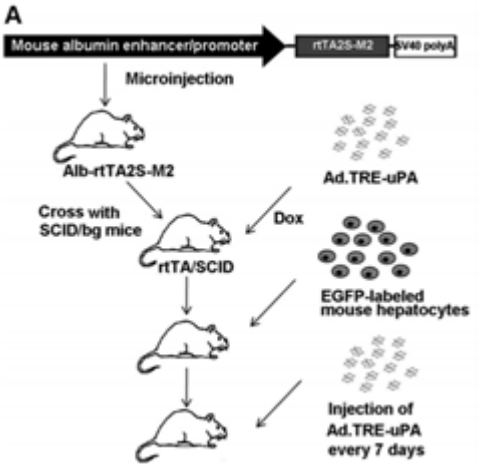

图6 Tet-on小鼠模型

四环素调控系统的优势

目前，除四环素诱导系统以外，科学家们还开发了多种条件性基因调控系统，如Cre-loxp系统、Flp-frt系统、Dre-rox系统等，而四环素诱导基因表达系统仍具有自己的独特优势。

首先Tet-On系统在没有诱导时目的基因的表达水平比较低，诱导时表达水平增高，最高诱导倍数可达10000倍。

其次原核来源的TetR与TetO的结合特异性高，哺乳动物细胞中没有类似的DNA靶向序列，所以Tet系统调控特异性高，并且宿主基因不受到影响，适合于体内外的各种基因表达的调控。

同时，Tet系统的诱导药物为Tet或Dox，Tet作为一种抗生素已被人们应用了很长时间，是对人体较为安全的一种药物，并且在Tet系统中低剂量的Tet就可调节基因的表达，所以不会对动物或细胞产生强毒性。

最后一点是，四环素系统具有可逆性，在去除诱导剂后可使系统关闭，也可反复加入诱导剂，多次启动诱导反应。

南模生物深耕基因编辑领域，在四环素诱导小鼠模型构建上有着成熟的技术和丰富的经验，为您的基因功能研究之路保驾护航。已有和部分在研的四环素诱导动物模型信息见下表：

分类	货号	品系简称	应用领域	状态
rtTA 工具鼠	NM-KI-200245	Tff1-2A-rtTA	Tff1 阳性细胞 rtTA 工具鼠	活体
	NM-KI-204999	Rho-2A-rtTA	Rho 阳性细胞 rtTA 工具鼠	活体
	NM-KI-200077	Pax8-rtTA	Pax8 阳性细胞 rtTA 工具鼠	活体
	NM-KI-18025	R26-SA-rtTA	全身性 rtTA 工具鼠	胚胎冻存
	NM-KI-18043	Sftpc-IRES-rtTA	Sftpc 阳性细胞 rtTA 工具鼠	胚胎冻存
	NM-KI-190064	H11-CAG-LSL-rtTA-IRES-tdtomato	条件性 rtTA 工具鼠；荧光标记小鼠	精子冻存
	NM-KI-190118	Crabp1-2A-rtTA	Crabp1 阳性细胞 rtTA 工具鼠	胚胎冻存
	NM-KI-200258	Tigre-TetO-hEGFR*del19-IRES-GFP-2A-Cre	荧光标记小鼠；Cre 工具鼠	活体
	NM-KI-200205	Cdh5-rtTA	Cdh5 阳性细胞 rtTA 工具鼠	研发中
TRE 鼠	NM-KI-205000	Tigre-TetO-hVEGFA165-IRES-EGFP	荧光标记小鼠	活体
	NM-KI-200311	Tigre-TetO-1190007I07Rik	1190007I07Rik 过表达小鼠	研发中
	NM-KI-200261	Slc6a1-TRE	Slc6a1 表达调控小鼠	胚胎冻存
	NM-KI-00008	Mycn-TRE-EGFP	荧光标记小鼠	胚胎冻存
	NM-Tg-215000	pTRE-Mir125b-Tg	Mir125b 过表达小鼠	研发中
	NM-Tg-200006	pTRE-Nrg1-Tg	Nrg1 过表达小鼠	研发中
	NM-KI-200260	Tigre-TetO-hERBB2*ex20ins-IRES-GFP-2A-Cre	荧光标记小鼠；Cre 工具鼠	活体
	NM-KI-190020	R26-TetO-Dre-IRES-mtagBFP2	Dre 工具鼠；荧光标记小鼠	胚胎冻存
	NM-KI-200259	Tigre-TetO-hEGFR*T790M/del19-IRES-GFP-2A-Cre	荧光标记小鼠；Cre 工具鼠	活体
	NR-KI-200005	Tigre-TetO-Cre-IRES-EGFP(SD)	Cre 工具鼠；荧光标记大鼠	研发中
基因编辑工具鼠	NM-KI-200256	Tigre-TetO-Cas9-IRES-tdTomato	Cas9 工具鼠；荧光小鼠	活体
	NM-KI-00123	Col1a1-TRE3G-dCas9-VPR-EGFP	荧光标记小鼠；dCas9 工具鼠	胚胎冻存
	NM-KI-200276	Tigre-TetO-dCas9-SPH	dCas9 工具鼠	研发中

Reference:

[1]2013.igem.org/Team:Bielefeld-Germany/Biosafety/Biosafety_System_M

[2]www.addgene.org/collections/tetracycline

[3] Das AT, Tenenbaum L, Berkhout B. Tet-OnSystems For Doxycycline-inducible Gene Expression. Curr Gene Ther.2016;16(3):156-67.

[4] Loew R,Heinz N, Hampf M, Bujard H, Gossen M. Improved Tet-responsive promoters withminimized background expression. BMC Biotechnol. 2010 Nov 24;10:81.

[5] Giles J,Patel JR, Miller A, Iverson E, Fitzsimons D, Moss RL. Recovery of leftventricular function following in vivo reexpression of cardiac myosin bindingprotein C. J Gen Physiol. 2019 Jan 7;151(1):77-89.

[6] Song X, GuoY, Duo S, Che J, Wu C, Ochiya T, Ding M, Deng H. A mouse model of inducibleliver injury caused by tet-on regulated urokinase for studies of hepatocytetransplantation. Am J Pathol. 2009 Nov;175(5):1975-83.