

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.03.0231

论著

# 靶向 SUPT6 小鼠胚胎干细胞 dTAG 细胞系的建立及功能验证

于艺曦, 胡德庆

(天津医科大学基础医学院细胞生物学系, 天津 300070)

**摘要** 目的: 利用降解 TAG 系统(dTAG)建立靶向 SPT6 同系物、组蛋白伴侣和转录延伸因子(SUPT6)的 dTAG 细胞系, 诱导内源性 SUPT6 的急性降解。方法: 设计靶向小鼠 *Supt6* 的向导 RNA 并构建 PX459-PITCh-*Supt6* sgRNA 和 *Supt6*-dTAG 供体质粒; 将载体转入小鼠胚胎干细胞 V6.5 细胞系中并进行药物筛选, 对筛选后的单克隆进行基因型鉴定及测序分析; CCK-8 法及碱性磷酸酶染色检测阳性克隆的增殖与分化; 使用 dTAG-13 诱导阳性克隆 SUPT6 蛋白的降解并进行免疫印迹实验验证; 碱性磷酸酶染色评估阳性克隆中 SUPT6 降解对干细胞多能性的影响。结果: 成功设计并构建靶向 *Supt6* 向导 RNA 和 dTAG 供体载体; 筛选获得插入 dTAG 标签的阳性克隆; 插入 dTAG 标签不影响细胞的增殖与分化功能( $F=0.014\ 19, P>0.05$ ); dTAG-13 成功诱导 Flag 标签标记的内源性 SUPT6 降解( $F=617.5, 372.4$ , 均  $P<0.001$ ), 且撤药后 Flag 标签标记的 SUPT6 水平逐渐恢复( $F=410.9, 226.8$ , 均  $P<0.001$ ); 阳性克隆中 SUPT6 降解导致干细胞多能性下降。结论: 构建的 SUPT6-dTAG 细胞系能够实现内源性 SUPT6 的急性可逆降解。

**关键词** SUPT6; CRISPR/Cas9; dTAG; 胚胎干细胞

中图分类号 Q2

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)03-0231-07

## Establishment and functional verification of mouse embryonic stem cell dTAG cell line targeting SUPT6

YU Yixi, HU Deqing

(Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** A dTAG cell line targeting SPT6 homologous, histone chaperone and transcription extension factor (SUPT6) was established using the degradation TAG (dTAG) system to induce acute degradation of endogenous SUPT6. **Methods:** The small guide RNA targeting mouse *Supt6* was designed, and PX459-PITCh-*Supt6* sgRNA and *Supt6*-dTAG donor plasmids were constructed. These plasmids were co-transfected into the mouse embryonic stem cell line V6.5 followed by drug selection. The selected monoclonal cells were genotypically identified and sequenced. The proliferation and differentiation of positive clones were detected by CCK-8 assay and alkaline phosphatase staining. The degradation of SUPT6 in positive clones was induced by dTAG-13 and confirmed by Western blotting. Alkaline phosphatase staining was used to evaluate the effect of SUPT6 degradation on stem cell pluripotency in positive clones. **Results:** Targeted *Supt6* guide RNA and dTAG donor vectors were successfully designed and constructed. Positive clones with the dTAG tag inserted were obtained. The insertion of the dTAG tag did not affect cell proliferation and differentiation ( $F=0.014\ 19, P>0.05$ ). dTAG-13 effectively induced degradation of endogenous Flag-tagged SUPT6 ( $F=617.5, 372.4$ , both  $P<0.001$ ). Upon drug withdrawal, the levels of Flag-tagged SUPT6 gradually recovered ( $F=410.9, 226.8$ , both  $P<0.001$ ). SUPT6 degradation in positive clones led to a reduction in stem cell pluripotency. **Conclusion:** The constructed SUPT6-dTAG cell line is capable of achieving acute and reversible degradation of endogenous SUPT6.

**Key words** SUPT6; CRISPR/Cas9; dTAG; embryonic stem cells

降解 TAG 系统 (degradation tag system, dTAG) 是一种创新的靶向目标蛋白诱导降解的方法, 由 Nabet 等共同开发并被广泛应用<sup>[1-2]</sup>。该系统通过 CRISPR/Cas9 技术在目的基因 N 端精确敲入胞质脯氨酰异构酶工程变体 FKBP12<sup>F36V</sup>, 并由高选择性 FKBP12<sup>F36V</sup> 配体 AP1867 和 E3 连接酶配体连接组

成的 dTAG-13 识别并结合。dTAG-13 可作为靶蛋白和 CereblonE3 泛素连接酶复合物的桥梁, 形成靶蛋白-FKBP12<sup>F36V</sup>-(dTAG-13)-CereblonE3 泛素连接酶复合物的复合物, 引起靶蛋白多聚泛素化和降解<sup>[3-4]</sup>。dTAG 利用小分子处理的时间可控优势和遗传学的精确性, 从而实现对目标蛋白功能的精确调控。

SPT6 同系物、组蛋白伴侣和转录延伸因子 (SPT6 homolog, histone chaperone and transcription e-

基金项目 国家自然科学基金面上项目(32270650)

作者简介 于艺曦(1998-), 女, 硕士在读, 研究方向: 医学细胞生物学; 通信作者: 胡德庆, E-mail: hudq@tmu.edu.cn。

longation factor gene, SUPT6)是一种在基因转录的过程中介导核小体重组的转录耦联的组蛋白伴侣蛋白。研究报道 SUPT6 与胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESCs)中发育调节因子的表达相关,可以调控干细胞的分化发育, SUPT6 敲低可以诱导 ESCs 的细胞形态学和生化变化<sup>[5-6]</sup>。本研究利用 dTAG 系统在小鼠 ESCs 细胞系中构建了 SUPT6 快速降解细胞系,并验证了其快速降解的能力,为深入研究 SUPT6 蛋白功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

CRISPR/Cas9 载体 PX459-PITCh、BSD-P2A-3×Flag-FKBP12<sup>F36V</sup> 供体载体由本实验室构建保存,小鼠胚胎干细胞 V6.5 细胞系购自 ATCC 细胞库,低糖 DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基、胎牛血清、胰酶、青霉素链霉素双抗、L-丙氨酸-L-谷氨酰胺 (glutamax) 购自 Gibco 公司,非必需氨基酸 (non-essential amino acids, NEAA)、β 巯基乙醇、CHIR 99021、PD 0325901、小鼠白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF)、明胶、抗 Flag 鼠抗、嘌呤霉素 (puromycin)、杀稻瘟菌素 (Blasticidin, Bsd)、dTAG-13 购自 sigma 公司, Lipofectamine 3000、基因组 DNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司, Bbs I、EcoR I、BamH I 购自 Thermo Fisher Scientific 公司, T4 连接酶、质粒提取试剂盒、2×Rapid Taq Master mix 购自诺维赞公司, BCIP/INT 碱性磷酸酶底物显色试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司, CCK-8 (cell counting Kit-8) 试剂盒购自碧云天公司, 抗 SUPT6 兔抗、抗 Tubulin 兔抗购自 Proteintech 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 Supt6 sgRNA 设计、质粒构建及测序鉴定

在 UCSC 数据库中检索鼠源 *Supt6* 基因的基因组信息,根据数据库提供的参数选择转录起始位置的 sgRNA, 序列为 GTCTGATTTTGTGGAAAGTG。取 sgRNA 上下游引物在 PCR 仪中进行退火反应形成双链结构,退火程序为 94℃ 缓慢降温至室温。PX459-PITCh 载体采用 Bbs I 酶在 37℃ 水浴中酶切 1 h, 酶切产物进行核酸电泳并胶回收。将回收的酶切载体和 sgRNA 双链采用 T4 连接酶连接, 室温静置 4 h 后将连接产物转化至感受态细胞 stb13 中。挑取单个克隆进行测序, 测序结果与 *Supt6* sgRNA 序列进行比对。确认正确后扩增提取质粒用于后续实验。

#### 1.2.2 Supt6-dTAG 供体质粒构建及菌落 PCR 鉴定

根据 sgRNA 切割位点分别选取长度 20 bp 的 5' 同源臂和 3' 同源臂并设计 PCR 引物, 引物序列见表 1, 以 BSD-P2A-3×Flag-FKBP12<sup>F36V</sup> 为模板进行 PCR 反应。PCR 条件为 98℃ 预变性 1 min, 以 98℃

30 s、52℃ 20 s、72℃ 30 s 循环 32 次, 72℃ 10 min, 16℃ 终止反应。PCR 产物为 1 025 bp, 将 PCR 产物进行核酸电泳验证并将相应位置条带切割下来进行胶回收, 回收产物使用 EcoR I 和 BamH I 进行双酶切, 酶切产物纯化后与同样使用 EcoR I 和 BamH I 酶切的 BSD-P2A-3×Flag-FKBP12<sup>F36V</sup> 的载体进行 T4 连接反应。将连接产物转化至感受态细胞 stb13 中, 并挑取单个克隆摇菌扩增。取菌液进行菌落 PCR 鉴定, PCR 引物为上述引物, PCR 条件为 94℃ 预变性 10 min, 以 94℃ 1 min、52℃ 20 s、72℃ 30 s 循环 30 次, 72℃ 10 min, 16℃ 终止反应。PCR 产物进行核酸电泳以鉴定阳性克隆, 阴性对照为 H<sub>2</sub>O, 阳性对照为 BSD-P2A-3×Flag-FKBP12<sup>F36V</sup> 模板。将阳性克隆进一步测序验证, 测序结果与 BSD-P2A-3×Flag-FKBP12<sup>F36V</sup> 模板序列进行比对, 选择测序正确的克隆提取质粒待用。

表 1 目的片段 PCR 扩增引物

Tab.1 PCR amplification primers of target fragment

基因名称	引物序列(5'→3')	产物(bp)
<i>Supt6</i> -dTAG	F:GGAATTCGCATCGTACGCCGTACGTGTTT-	1 025
	GGAATGCTGTATTTTGTGGAAAGTATGGC-	
	CAAGCCTTTGTCTCA	
	R:CGGGATCCGCATCGTACGCCGTACGTGTT-	
	TGGTTCTGACTCTTCGGCCTCACTCTCGA -	
	C-GAAGTCGGACATAGATCCGCCGCCACC-	
	CGACC	

#### 1.2.3 细胞转染、药物筛选及单克隆细胞基因组鉴定

取 15 μL Lipofectamine 3000 加入 200 μL Opti-MEM 培养基混匀后室温静置 5 min, 取 PX459-PITCh-*Supt6* sgRNA 和 BSD-P2A-3×Flag-FKBP12<sup>F36V</sup>-*Supt6* 质粒各 3 μg 与 12 μL P3000 在另 200 μL Opti-MEM 培养基中混匀, 将二者混匀室温静置 20 min。使用 200 μL Opti-MEM 培养基重悬 2×10<sup>6</sup> 个 V6.5 细胞, 将细胞悬液与 DNA 悬液混匀, 置于 37℃ 细胞培养箱中 30 min。使用 0.1% 明胶包被 60 mm 细胞培养皿, 同样置于 37℃ 细胞培养箱中 30 min。将包被的细胞培养皿中的液体吸净晾干, 加入 5 mL V6.5 细胞培养基, 将细胞悬液加入培养皿中摇匀, 放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。24 h 后更换含有 1.5 μg/mL 嘌呤霉素的细胞培养基继续培养, 再过 24 h 后更换含有 2.5 μg/mL 杀稻瘟菌素的细胞培养基培养 7 d。抗性筛选后在光学显微镜低倍镜视野下挑取单个细胞克隆并置于包被过的 24 孔板中培养。收取单克隆细胞加入 50 μL 细胞裂解液和 1 μL 蛋白酶 K, 混匀后置于 55℃ 金属浴中过夜, 以提取基因组 DNA。在 *Supt6* sgRNA 切割位点两侧基因组上设计 P1/P2 一对外部引物, 在插入序列上设计 P3/P4 一对内部引物, 鉴定引物序列见表 2, 阴性

对照为H<sub>2</sub>O和WT细胞基因组DNA。使用2×Rapid Taq Master mix进行基因型鉴定PCR,反应体系为2×Rapid Taq Master mix 10 μL、基因组DNA 2 μL(约350 ng)、上下游引物(10 μmol/L)各0.4 μL、去离子水7.2 μL。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测以鉴定阳性克隆。将阳性克隆用外部引物P1/P2的扩增产物进行测序,并将测序结果与供体片段序列比对。

表2 PCR鉴定dTAG插入序列引物

Tab.2 PCR identification of dTAG insertion sequence primers

引物名称	引物序列(5'→3')	产物(bp)
P1	AGCTGTGCTATATAGCTACAAGGA	364(WT)
P2	CTCTAGGTACCACCTCGCCT	1 267 (SUPT6-dTAG)
P3	AGCAACGGCTACAATCAACA	338
P4	AACCAGAGGGCAGCAATTCA	

1.2.4 CCK-8实验和碱性磷酸酶染色检测阳性克隆的增殖和分化 选取2、4号阳性克隆作为生物学二重复进行实验。CCK-8实验需在96孔板每孔铺入500个细胞,在培养24、48、72、96 h后每孔加入100 μL培养基和10 μL CCK-8溶液的混合液,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中避光孵育1 h,在450 nm检测吸光度以比较WT细胞和阳性克隆的增殖程度。碱性磷酸酶染色需在24孔板每孔铺入2×10<sup>4</sup>个细胞,放入37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养48 h后,1×PBS缓冲液冲洗细胞两次,4%多聚甲醛室温固定细胞5 min,再次使用1×PBS缓冲液冲洗细胞两次,加入BCIP/INT碱性磷酸酶底物显色试剂,放入37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中避光孵育30 min后置于光学显微镜下观察拍照,以观察WT细胞和阳性克隆的分化程度,293T细胞为阴性对照。

1.2.5 蛋白免疫印迹法鉴定阳性克隆 12孔板每孔铺入8×10<sup>4</sup>个细胞,培养48 h后利用MRIPA溶液分别裂解WT细胞和阳性克隆细胞以获取全细胞蛋白,加入蛋白裂解液后置于95℃金属浴煮沸

10 min,离心获取上清。配置浓缩胶浓度4%、分离胶浓度6%的胶,每孔上样约2×10<sup>5</sup>个细胞的等量蛋白以进行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,电泳结束后300 mA恒流冰上湿转2 h。用1×TBST配置5%脱脂牛奶封闭液,室温封闭1 h。1×TBST配置一抗(SUPT6 1:2 000;Flag 1:5 000;Tubulin 1:5 000),4℃摇床孵育一抗过夜。1×TBST重复洗膜3次,每次5 min。1×TBST配置二抗(1:20 000),室温摇床孵育1 h,再次洗膜后使用ECL化学发光液曝光。观察抗Flag抗体信号的有无以及抗SUPT6抗体信号的蛋白条带位移的变化。

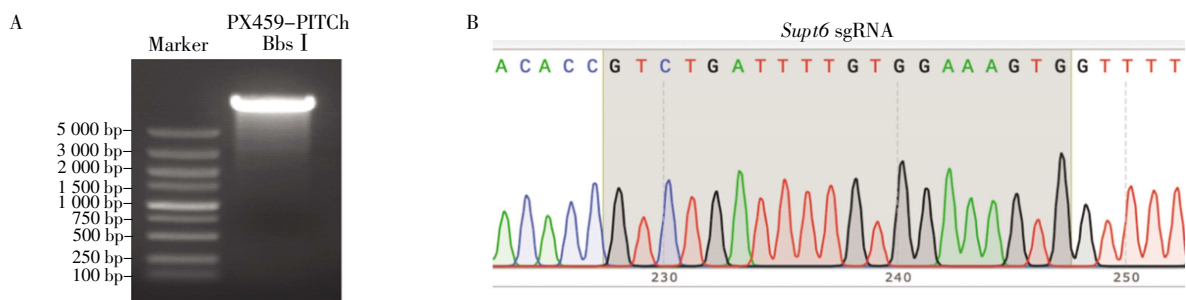
1.2.6 蛋白免疫印迹法鉴定内源性SUPT6降解及恢复 以2号阳性克隆为例进行降解实验。12孔板每孔铺入8×10<sup>4</sup>个阳性克隆细胞培养48 h,使用终浓度100 nmol/L dTAG-13分别处理阳性克隆0、0.5、1、2、4、6 h后收集细胞提取蛋白并进行蛋白免疫印迹法验证,方法同1.2.5。将阳性克隆用dTAG-13处理2 h以诱导内源性SUPT6完全降解后,撤掉dTAG-13继续培养0、0.5、1、2、4、6 h,收集蛋白进行蛋白免疫印迹法验证,方法同1.2.5。蛋白条带使用Image J分析。

1.2.7 碱性磷酸酶染色检测SUPT6降解后细胞分化状态 24孔板每孔铺入2×10<sup>4</sup>个阳性克隆细胞,培养12 h后使用终浓度100 nmol/L dTAG-13分别处理0、24、48 h,进行碱性磷酸酶染色,方法同1.2.4。

1.3 统计学处理 使用GraphPad Prism9进行分析,实验数据均重复3次。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x}+s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 PX459-PITCh-Supt6 sgRNA质粒构建及鉴定 PX459-PITCh载体酶切形成线性载体,电泳验证结果见图1A。Supt6 sgRNA与线性载体连接后通过测序比对验证,比对结果见图1B,插入序列与设计的sgRNA完全匹配。



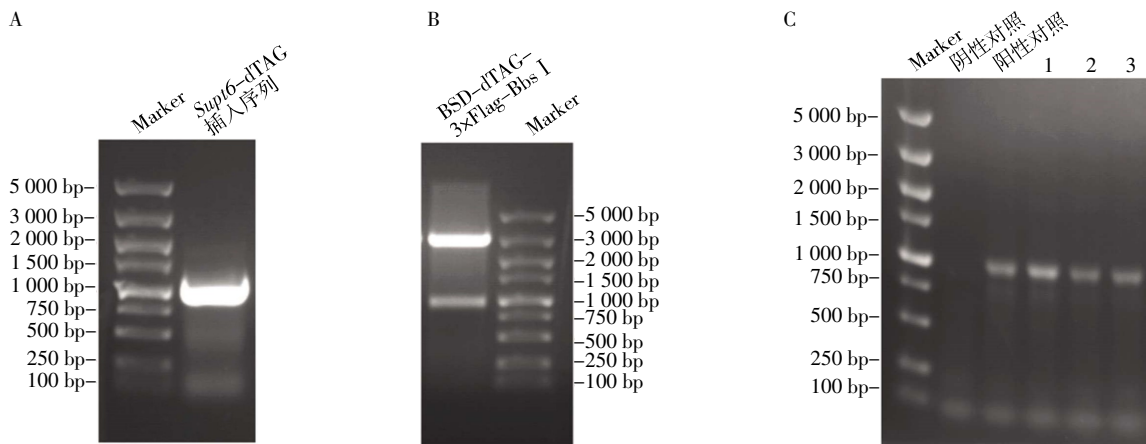
注:A:载体PX459-PITCh的酶切鉴定;B:质粒PX459-PITCh-Supt6 sgRNA的测序验证结果,灰框部分为Supt6 sgRNA序列

图1 PX459-PITCh-Supt6 sgRNA质粒构建及鉴定

Fig.1 Construction and identification of PX459-PITCh-Supt6 sgRNA plasmid

2.2 BSD-P2A-3×Flag-FKBP12<sup>F36V</sup>-Supt6 质粒构建及鉴定 PCR 扩增获得 1 025 bp 的特征条带,即目的供体片段,电泳验证结果见图 2A。BSD-P2A-3×

Flag-FKBP12<sup>F36V</sup> 载体酶切形成约 3 000 bp 的线性载体,酶切产物电泳结果见图 2B。通过菌落 PCR 鉴定连接产物,其中 1、2、3 号质粒均为阳性,见图 2C。



注:A:目的片段 *Supt6*-dTAG 插入序列 PCR 扩增电泳验证;B:载体 BSD-P2A-3×Flag-FKBP12<sup>F36V</sup> 的酶切鉴定;C:BSD-P2A-3×Flag-FKBP12<sup>F36V</sup>-*Supt6* 质粒菌落 PCR 鉴定结果,阴性对照:水;阳性对照:载体 BSD-P2A-3×Flag-FKBP12<sup>F36V</sup> 模板;1~3:1~3 号质粒

图 2 BSD-P2A-3×Flag-FKBP12<sup>F36V</sup>-*Supt6* 质粒构建及鉴定

Fig.2 Construction and identification of BSD-P2A-3×Flag-FKBP12<sup>F36V</sup>-*Supt6* plasmid

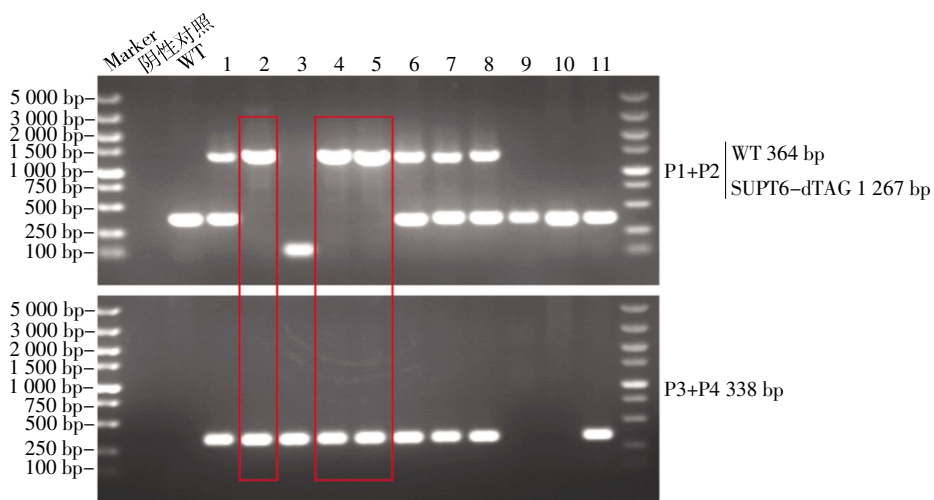
2.3 SUPT6-dTAG 敲入细胞系建立及鉴定 对敲入细胞进行基因型鉴定显示,经外部引物 P1P2 扩增后 WT 细胞产物为 364 bp,2、4、5 号克隆只存在一个 1 267 bp 的条带;经内部引物 P3P4 扩增后,WT 细胞无条带,而 2、4、5 号克隆检测出特异性的 338 bp 的条带,见图 3。最终筛选出 2、4、5 号共 3 个纯合阳性克隆。

2.4 SUPT6-dTAG 细胞系与野生型细胞在增殖和分化的比较 选取 2、4 号阳性克隆作为生物学重复用于后续实验,如图 4A 所示,两个阳性克隆与 WT 细胞的增殖曲线高度重叠( $n=3, F=0.014 19, P>0.05$ )。形态学观察进一步证实,2、4 号克隆维持了

与 WT 细胞相似的典型形态特征,见图 4B。如图 4C 所示,2、4 号克隆与 WT 细胞均存在碱性磷酸酶活性而呈现特征性棕染。

2.5 蛋白免疫印迹法验证 SUPT6-dTAG 细胞系 如图 5 所示,使用 Flag 抗体验证敲入效果时,2、4 号阳性克隆检测到插入序列中的 Flag 标签,而 WT 细胞无信号;使用内源性 SUPT6 抗体检测显示 2、4 号阳性克隆的 SUPT6 条带由于插入序列的正确整合并融合表达而较 WT 细胞有明显上移。

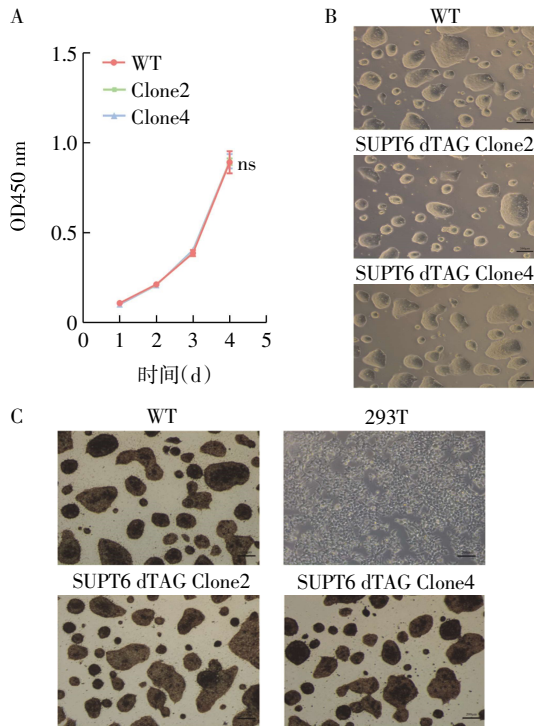
2.6 dTAG-13 诱导 SUPT6-dTAG 细胞系中内源性 SUPT6 的快速可逆降解 dTAG-13 诱导降解实验显示,处理 2h 即能实现 SUPT6 蛋白的完全降解,且与 0 h



注:阴性对照:水;WT:野生型(阳性对照)细胞基因组 DNA;1~11:1~11 号克隆基因组 DNA

图 3 SUPT6-dTAG 敲入细胞系建立及鉴定

Fig.3 Construction and identification of SUPT6-dTAG knock-in cell line



注:A:SUPT6-dTAG 阳性克隆的增殖能力;B:SUPT6-dTAG 阳性克隆镜下形态(100×);C:SUPT6-dTAG 阳性克隆的碱性磷酸酶活性(100×),阴性对照为分化细胞 293T,比例尺=200 μm

图 4 SUPT6-dTAG 细胞系与野生型细胞在增殖和分化的比较  
Fig.4 Comparison of proliferation and differentiation between SUPT6-dTAG cell line and wild-type cells

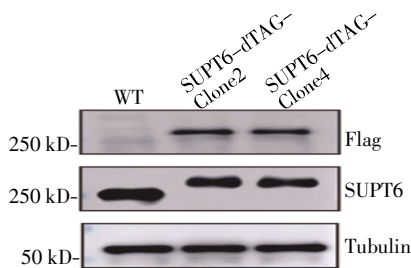
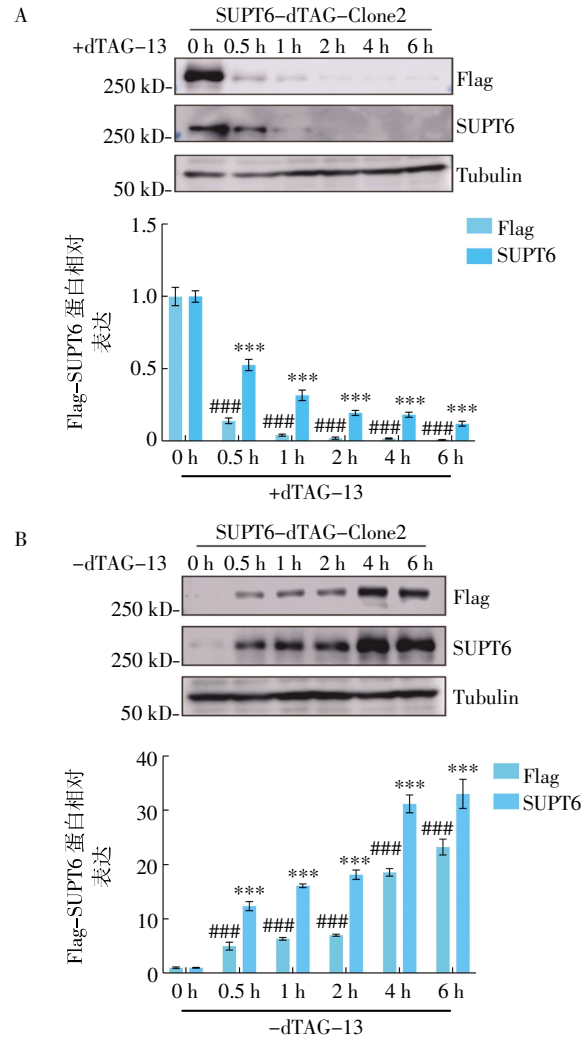


图 5 Western blotting 验证 SUPT6-dTAG 细胞系

Fig.5 Identification of SUPT6-dTAG cell line by Western blotting 相比,Flag 标签标记的 SUPT6 蛋白信号和内源 SUPT6 信号经处理后明显降低 ( $n=3, F=617.5、372.4$ , 均  $P<0.001$ ), 见图 6A。当撤掉 dTAG-13 后, 与 0 h 相比, Flag 和 SUPT6 信号则会恢复 ( $n=3, F=410.9、226.8$ , 均  $P<0.001$ ), 见图 6B。

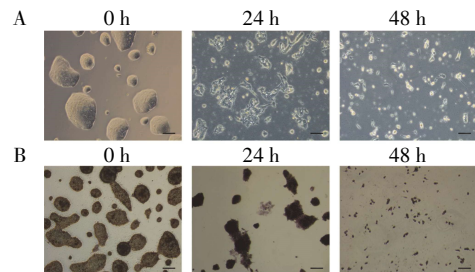
2.7 SUPT6-dTAG 细胞系中 SUPT6 降解导致的分化变化与其多能性调控功能一致 SUPT6-dTAG 细胞系功能验证显示, 随 dTAG-13 诱导 SUPT6 蛋白降解时间的延长, 细胞呈现典型多能性丧失的特征, 即增殖趋向停滞, 不再呈现圆顶状且边缘明确的克隆, 而是逐渐变得扁平、边缘不清晰, 克隆内的细胞也逐渐分散, 不再呈现聚集状态, 见图 7A。同时 SUPT6-dTAG 细胞系的碱性磷酸酶的活性也随诱导时间延长逐渐降低, 见图 7B。



注:A:dTAG-13 处理 SUPT6-dTAG-Clone2 的 SUPT6 蛋白降解水平( $n=3$ );B:撤掉 dTAG-13 处理的 SUPT6-dTAG-Clone2 的 SUPT6 蛋白恢复水平( $n=3$ );Tubulin:内参蛋白;绿色柱表示抗 Flag 抗体检测结果,  $###P<0.001$ ;蓝色柱表示抗 SUPT6 抗体检测结果,  $***P<0.001$

图 6 dTAG-13 诱导 SUPT6-dTAG 细胞系中内源性 SUPT6 的快速可逆降解

Fig.6 dTAG-13 induced rapid and reversible degradation of endogenous SUPT6 in SUPT6-dTAG cell line



注:A:SUPT6-dTAG-Clone2 经 dTAG-13 处理后镜下形态(100×);B:SUPT6-dTAG-Clone2 经 dTAG-13 处理后的碱性磷酸酶活性(100×),比例尺=200 μm

图 7 SUPT6-dTAG 细胞系中 SUPT6 导致的分化变化与其多能性调控功能一致

Fig.7 The differentiation changes induced by SUPT6 degradation in the SUPT6-dTAG cell line were consistent with its role in pluripotency regulation

### 3 讨论

ESCs 具有自我更新能力和多向分化潜能,该过程十分复杂,许多转录因子如 Oct4/Sox2/Nanog 多能调控网络以及组蛋白修饰、染色质重塑、DNA 甲基化等表观遗传相关机制都在自我更新调控中发挥重要作用<sup>[7-13]</sup>。同时 ESCs 也是作为疾病模型的组织器官培养的来源<sup>[14]</sup>。ESCs 的染色质结构较肿瘤细胞相比更为疏松。基于以上优势,本研究采用 V6.5 细胞系为研究基因功能提供了理想模型。

与其他蛋白降解手段相比,dTAG 系统利用内源性的泛素化系统降解靶蛋白,减少了引入外源泛素酶带来的干扰。且通过小分子 dTAG-13 处理诱导的快速可逆降解,能够精确控制目标蛋白的有无,从而更便捷地研究蛋白质在动态过程中的功能。该系统通过引入标签蛋白如 Flag 标签等,为靶蛋白特异性抗体质量不足的实验提供了可靠替代方案。dTAG 系统已成功应用于多种蛋白质的功能研究,尽管不同蛋白的降解效率可能略有差异,但总体上证明了其作为通用工具的有效性。

基于 dTAG 系统构建的 SUPT6 快速降解细胞系,通过使用精确整合到目标染色体系统( precise integration into target chromosome system, PITCh) 技术实现了 FKBP12<sup>F36V</sup> 标签在 *Supt6* 基因 N 端的精准整合。该系统通过目的基因 sgRNA 和 PITCh sgRNA 共同引导的微同源介导的末端连接( microhomology-mediated end-joining, MMEJ) 机制构建供体质粒<sup>[15]</sup>。MMEJ 机制利用 20 bp 微同源臂显著提高了供体质粒的构建效率。经双抗筛选获得的克隆通过基因型鉴定和蛋白免疫印迹法验证,检测到正确整合插入序列的纯合阳性克隆。阳性克隆维持与 WT 细胞相当的增殖分化状态,确保了后续功能研究的可靠性。dTAG-13 处理阳性克隆 2 h 即可完全降解 SUPT6,而撤药后蛋白水平逐渐恢复,证明该细胞降解内源 SUPT6 时具有时间可控性和可逆性的优势。在阳性克隆中诱导 SUPT6 降解,观察到细胞的形态由紧密的圆形克隆变为扁平分散状态,且碱性磷酸酶活性显著降低,表明其多能性受损,与先前的研究结果一致<sup>[5-6]</sup>。该结果验证了 SUPT6-dTAG 细胞系研究 SUPT6 的功能的可行性。本研究通过 dTAG 系统成功构建了可精准诱导 SUPT6 降解的小鼠 ESCs 系,验证了其降解过程的时间可控性与可逆性以及该细胞系的有效性和可靠性,为深入解析 SUPT6 的功能及动态调控机制提供了高效研究模型。

研究表明,SUPT6 通过 tSH2 结构域与羧基末

端结构域( carboxyl-terminal domain, CTD)磷酸化的 RNA 聚合酶 II (RNA Pol II) 直接结合,或者通过招募 PAF1 (polymerase associated factor) 复合体,去除 NELF (negative elongation factor) 复合体以调控转录延伸过程<sup>[16-19]</sup>。同时 SUPT6 通过与组蛋白 H3 和 H3K36 组蛋白甲基转移酶 SETD2 相互作用以维持组蛋白修饰<sup>[20-23]</sup>。已有研究利用人源 K562 细胞系构建了 SUPT6-dTAG 细胞系,并通过高通量测序阐述了 SUPT6 调控 RNA Pol II 的机制,验证了 SUPT6 在转录过程中的重要作用<sup>[24]</sup>。相较于在 K562 细胞系中构建的 SUPT6 快速降解细胞系,本研究构建的小鼠 ESCs SUPT6-dTAG 细胞系,在研究 SUPT6 调控转录及表观遗传修饰方面更具优势,且能够更好地探究 SUPT6 对于 ESCs 的影响。

在后续研究中将整合染色质免疫共沉淀测序( chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq)、通过精密连续测序( precision run-on sequencing, PRO-seq)、RNA 测序( RNA sequencing, RNA-seq) 等高通量测序手段,系统解析 SUPT6 急性耗竭对 RNA Pol II 的动态分布、染色质结合及转录组重塑的影响。本模型为动态研究转录延伸与表观遗传调控提供了有力工具。

#### 参考文献:

- [1] NABET B, ROBERTS J M, BUCKLEY D L, et al. The dTAG system for immediate and target-specific protein degradation[J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14(5): 431-441.
- [2] PROZZILLO Y, FATTORINI G, SANTOPIETRO M V, et al. Targeted protein degradation tools: overview and future perspectives[J]. *Biology (Basel)*, 2020, 9(12): 421.
- [3] WINTER G E, BUCKLEY D L, PAULK J, et al. DRUG DEVELOPMENT. Phthalimide conjugation as a strategy for *in vivo* target protein degradation[J]. *Science*, 2015, 348(6241): 1376-1381.
- [4] CLACKSON T, YANG W, ROZAMUS L W, et al. Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(18): 10437-10442.
- [5] WANG A H, JUAN A H, KO K D, et al. The elongation factor Spt6 maintains ESC pluripotency by controlling super-enhancers and counteracting polycomb proteins[J]. *Mol Cell*, 2017, 68(2): 398-413.
- [6] LI J, XU X, TIWARI M, et al. SPT6 promotes epidermal differentiation and blockade of an intestinal-like phenotype through control of transcriptional elongation[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 784.
- [7] SEO Y, SHIN K H, KIM H H, et al. Current advances in red blood cell generation using stem cells from diverse sources[J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 9281329.
- [8] EBRAHIMI M, FOROUZESH M, RAOUFI S, et al. Differentiation

- blind randomized clinical trial[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 148:1–9.
- [19] GARCIA L A, KING K K, FERRINI M G, et al. 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> stimulates myogenic differentiation by inhibiting cell proliferation and modulating the expression of promyogenic growth factors and myostatin in C2C12 skeletal muscle cells[J]. *Endocrinology*, 2011, 152(8):2976–2986.
- [20] ANDRÉS V, WALSH K. Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis[J]. *J Cell Biol*, 1996, 132(4):657–666.
- [21] ENDO I, INOUE D, MITSUI T, et al. Deletion of vitamin d receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(12):5138–5144.
- [22] LING Y, XU F, XIA X, et al. Vitamin D receptor regulates proliferation and differentiation of thyroid carcinoma via the E-cadherin-β-catenin complex[J]. *J Mol Endocrinol*, 2022, 68(3):137–151.
- [23] MURALIDHAR S, FILIA A, NSENGIMANA J, et al. Vitamin D-VDR signaling inhibits wnt/β-catenin-mediated melanoma progression and promotes antitumor immunity [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(23):5986–5998.
- [24] JHO E H, ZHANG T, DOMON C, et al. Wnt/β-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(4):1172–1183.
- [25] HURASKIN D, EIBER N, REICHEL M, et al. Wnt/β-catenin signaling via Axin2 is required for myogenesis and, together with YAP/Taz and Tead1, active in II a/ II x muscle fibers[J]. *Development*, 2016, 143(17):3128–3142.

(2024-12-02 收稿)

(上接第 236 页)

- of human induced pluripotent stem cells into erythroid cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):483.
- [9] DIVISATO G, PASSARO F, RUSSO T, et al. The key role of micro-RNAs in self-renewal and differentiation of embryonic stem cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17):6059.
- [10] VARZIDEH F, GAMBARELLA J, KANSAKAR U, et al. Molecular mechanisms underlying pluripotency and self-renewal of embryonic stem cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9):7894.
- [11] ELKENANI M, MOHAMED B A. Murine embryonic stem cell culture, self-renewal, and differentiation[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2520:265–273.
- [12] CHEN G, YIN S, ZENG H, et al. Regulation of embryonic stem cell self-renewal[J]. *Life (Basel)*, 2022, 12(8):1167.
- [13] HASSANI S N, MORADI S, TALEAHMAD S, et al. Transition of inner cell mass to embryonic stem cells: mechanisms, facts, and hypotheses[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(5):873–892.
- [14] RAUTH S, KARMAKAR S, BATRA S K, et al. Recent advances in organoid development and applications in disease modeling [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1875(2):188527.
- [15] SAKUMA T, NAKADE S, SAKANE Y, et al. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems[J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(1):118–133.
- [16] CONNELL Z, PARNELL T J, MCCULLOUGH L L, et al. The interaction between the Spt6-tSH2 domain and Rpb1 affects multiple functions of RNA polymerase II[J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(2):784–802.
- [17] AOI Y, SHAH A P, GANESAN S, et al. SPT6 functions in transcriptional pause/release via PAF1C recruitment[J]. *Mol Cell*, 2022, 82(18):3412–3423.
- [18] EHARA H, KUJIRAI T, SHIROUZU M, et al. Structural basis of nucleosome disassembly and reassembly by RNAP II elongation complex with FACT[J]. *Science*, 2022, 377(6611):eabp9466.
- [19] NARAIN A, BHANDARE P, ADHIKARI B, et al. Targeted protein degradation reveals a direct role of SPT6 in RNAP II elongation and termination[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(15):3110–3127.
- [20] WINKLER M, AUS DEM SIEPEN T, STAMMINGER T. Functional interaction between pleiotropic transactivator pUL69 of human cytomegalovirus and the human homolog of yeast chromatin regulatory protein SPT6[J]. *J Virol*, 2000, 74(17):8053–8064.
- [21] OQANI R K, LIN T, LEE J E, et al. Iws1 and Spt6 regulate trimethylation of histone H3 on lysine 36 through Akt signaling and are essential for mouse embryonic genome activation[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):3831.
- [22] YOH S M, LUCAS J S, JONES K A. The Iws1/Spt6/CTD complex controls cotranscriptional mRNA biosynthesis and HYPB/Setd2-mediated histone H3K36 methylation[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(24):3422–3434.
- [23] LI S, EDWARDS G, RADEBAUGH C A, et al. Spn1 and its dynamic interactions with Spt6, histones and nucleosomes[J]. *J Mol Biol*, 2022, 434(13):167630.
- [24] ZUMER K, MAIER K C, FARNUNG L, et al. Two distinct mechanisms of RNA polymerase II elongation stimulation *in vivo*[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(15):3096–3109.

(2024-11-11 收稿)