

动物隐花色素研究进展

吕垣澄, 吴晓晖

复旦大学生命科学学院, 遗传工程国家重点实验室及发育与疾病国际联合研究中心, 遗传与发育协同创新中心, 上海 200433

摘要: 动物隐花色素(Cryptochrome)分为 I 型和 II 型, 对生物钟的调控作用广为人知。I 型隐花色素可以感受光信号而介导转录抑制物降解, II 型隐花色素不需感受光而直接充当转录抑制物。近期研究发现, 动物隐花色素还参与免疫应答和糖代谢, 并为果蝇等动物光信号诱导的化学磁感知所必需。对动物隐花色素的进一步研究将增加对动物感知磁场过程的了解, 也将帮助开发针对糖尿病等疾病的干预方法。文章重点综述了动物隐花色素的克隆与表达、结构特征、生理功能及作用机制, 为这一领域的研究提供参考。

关键词: 动物; 隐花色素; 生物钟; 化学磁感知

Research progresses in animal cryptochromes

Yuancheng Lu, Xiaohui Wu

State Key Laboratory of Genetic Engineering and National Center for International Research of Development and Disease, Collaborative Innovation Center for Genetics and Development, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: Animal cryptochromes are widely known to regulate circadian clock and can be divided into two types. Type I cryptochromes receive light to initiate the degradation of transcriptional inhibitors, whereas type II cryptochromes directly act as light-irresponsive transcriptional inhibitors. Recent studies reveal that animal cryptochromes also have functions in immune response and carbohydrate metabolism, and are required in light-induced chemical magnetoreception in animals like *Drosophila*. The further researches on animal cryptochromes will improve our understanding of magnetoreception and aid development of therapeutic treatment of diseases such as diabetes. In this review, we summarize the research progresses of animal cryptochromes, with an emphasis on its cloning, expression, and structural and functional studies.

Keywords: animal; cryptochrome; circadian clock; chemical magnetoreception

隐花色素(Cryptochromes)是一类在高等真核生物中广泛存在的、对蓝光和近紫外光敏感的黄素类蛋白, 也称紫外光-A/蓝光受体(UV-A/blue-light receptor)。隐花色素因其有助于孢子繁殖的隐花植物吸收蓝光而得名, 植物隐花色素主要在植物光形态建成、开

花调控、生物钟调控及气孔开放和感知磁场中发挥作用^[1]。1993 年拟南芥隐花色素基因 *cry1*(又名 *hy4*) 首先被克隆^[2], 1996 年起, 黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、小鼠(*Mus musculus*)和人(*Homo sapiens*)等动物的隐花色素基因也陆续被克隆。与植物

收稿日期: 2014-05-23; 修回日期: 2014-06-16

基金项目: 秦惠若与李政道中国大学生见习进修基金, 国家基金委人才培养基金和国家拔尖人才培养计划资助

作者简介: 吕垣澄, 本科生, 专业方向: 发育遗传学。E-mail: yuanchenglu26@gmail.com

通讯作者: 吴晓晖, 教授, 博士生导师, 研究方向: 发育遗传学。E-mail: xiaohui_wu@fudan.edu.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2014.0864

网络出版时间: 2014-8-22 8:24:17

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20140822.0824.001.html>

隐花色素不同, 动物的隐花色素主要在动物生物钟调控、免疫应答、糖类代谢以及感知磁场等过程中发挥作用。本文将对动物隐花色素的克隆与表达、结构特征、生理功能和作用机制进行综述。

1 动物隐花色素的克隆与表达

隐花色素在多种动物中广泛存在。无脊椎动物中, 果蝇的隐花色素基因 *dCry* 克隆于 1996 年^[3]。2005 年, 帝王斑蝶(*Danaus plexippus*)的隐花色素基因 *dpCry1* 和 *dpCry2* 也被发现^[4]。目前发现, 果蝇之外的绝大部分昆虫都有不止一个隐花色素基因^[5]。哺乳动物一般具有两个隐花色素基因, 其中人的隐花色素基因 *hCry1* 和 *hCry2* 克隆于 1996 年^[3,6]。两年后, 小鼠隐花色素基因 *mCry1* 和 *mCry2* 也被克隆^[7]。此后, 非哺乳类脊椎动物的隐花色素基因也被陆续克隆, 目前已知非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)具有 *XtCry1*、*XtCry2* 和 *XtCry4* 3 个隐花色素基因^[8], 鸡(*Gallus gallus domesticus*)具有 *cCry1*、*cCry2* 和 *cCry4* 3 个隐花色素基因^[9]。斑马鱼(*Danio rerio*)则具有 *zCry1a*、*zCry1b*、*zCry2a*、*zCry2b*、*zCry3* 和 *zCry4* 6 个隐花色素基因^[10]。

动物隐花色素常高表达于神经组织。果蝇 dCRY 高表达在腹侧神经元^[11](Ventral lateral neurons, LNvs)及复眼感光细胞^[12], 主要定位于细胞质。小鼠 mCRY1 高表达于视交叉上核(Suprachiasmatic nucleus, SCN), 定位于线粒体; mCRY2 高表达于视网膜, 定位于细胞核^[7]。人 hCRY2 高表达于视网膜神经节细胞层(Ganglion cell layer, GCL), 定位于细胞核和细胞质^[13]。

2 动物隐花色素的结构特征

动物隐花色素蛋白包含 N 端的光修复酶同源区(Photolyase homology region, PHR)以及序列和长度不保守的 C 端调控尾区(C-terminal regulatory tail region)。前者缺乏光修复酶的 DNA 损伤修复功能, 后者与蛋白细胞内定位有关^[3]。2011 年, Zoltowski 等^[14,15]解析了果蝇隐花色素蛋白 dCRY 的结构。PHR 区的三维结构包含 N 端的 α/β 结构域和 C 端的螺旋结构域, 两个结构域间是一个长的联结。螺旋结构域的两个凸角形成一个腔, 可以非共价结合黄素腺嘌呤二核苷酸(Flavin adenine dinucleotide, FAD)。

PHR 区凹槽处的催化中心不结合 DNA 底物, 而是结合 C 端调控尾上第 536 位上保守的色氨酸(Trp536)突出, 从而模拟光修复酶对 DNA 光化产物的识别。dCRY 上的 Trp 342、Trp 397 和 Trp 420 3 个氨基酸组成的光活化电子传递链接受光能后, 能将结合的氧化态 FAD(FADox)转变为双电子还原态 FAD(FAD^{•-})。这一光致还原过程会引发 dCRY 构象改变, 导致 C 端调控尾离开 PHR 区的凹槽。2013 年, Czarna 等^[16]又解析了小鼠隐花色素蛋白 mCRY1 的结构, mCRY1 与 dCRY 在个别氨基酸上的差异赋予 mCRY1 一些不同的特性。如 mCRY1 的 Ser71、Ser280 是腺苷酸活化蛋白激酶 AMPK 的磷酸化位点, 可以响应细胞的代谢状态而调控 mCRY1 的稳定性; Ser247 是丝裂原活化蛋白激酶 MAPK 的磷酸化位点, 影响 mCRY1 作为转录抑制物的活性。

3 动物隐花色素调控生物钟的功能与作用机制

生物钟是生物体行为、生理和代谢活动广泛存在的昼夜节律。动物生物钟的形成和维持依靠转录/翻译负反馈环路中的转录激活物和抑制物, 它们使体内生物钟蛋白以及钟控蛋白的含量昼夜变化。隐花色素参与了生物钟的形成。根据隐花色素在调控生物钟中的作用, 它们被分为两类(图 1)。I 型隐花色素(如果蝇 dCRY)是无转录抑制作用, 作为光受体对光响应的隐花色素。II 型隐花色素(如小鼠和人的 CRY)作为转录抑制物, 对光无依赖。有意思的是, 帝王斑蝶既具有类似 dCRY 的 I 型光依赖但无抑制作用的隐花色素 dpCRY1, 也具有类似 mCRY1/2 的 II 型有抑制作用但无光依赖的隐花色素 dpCRY2^[4]。斑马鱼中, zCRY3 和 zCRY4 是类似 dCRY 的 I 型隐花色素, zCRY1a、zCRY1b、zCRY2a 和 zCRY2b 是类似 mCRY1/2 的 II 型隐花色素^[10]。

dCRY 是果蝇生物钟转录/翻译负反馈环路的一部分, 参与对光响应和生物钟调控。在黑暗状态下, dCRY 的 C 端尾嵌入 PHR 区的凹槽, 阻止其与 Timless 蛋白及 E3 泛素连接酶 JETLAG (JET) 相结合^[14,17]。此时, 转录因子 CLOCK 和 CYCLE 激活携带 E-box 启动子元件的基因 *period (per)*、*timless (tim)* 以及 *cry* 表达^[18]。PER 蛋白与 TIM 蛋白相结合形成复合物, 磷酸化后进入核内抑制 CLOCK 和 CYCLE

的功能,从而保持 PER 与 TIM 的含量稳定在较低水平。在光照下, dCRY 蛋白 PHR 区结合的 FAD 被光致还原引发 dCRY 构象改变,暴露出的 PHR 区与 TIM 及 JET 结合。JET 的泛素化作用导致 dCRY 和 TIM 降解,从而解除 PER 与 TIM 对 CLOCK 和 CYCLE 的抑制,促进 *per* 和 *tim* 表达。野生型果蝇在夜间被光刺激后,会表现出时相位移。而具有 FAD 结合位点突变的 *cry^b* 果蝇即使给予正常明暗周期,其 PER 和 TIM 蛋白的表达也发生紊乱^[19]。

小鼠等哺乳动物的 CRY1 和 CRY2 属于充当转录抑制物的 II 型隐花色素。小鼠视交叉上核 CRY1 的表达呈现昼夜节律,在连续黑暗中也能保持。野生型小鼠在连续黑暗中能保持与在正常光暗周期下相同的约 24 h 的自主活动周期,不受光照影响。*mCry1* 或 *mCry2* 敲除小鼠在正常光暗周期下能维持约 24 h 的自主活动周期,但在连续黑暗中分别展现加速和减缓的周期性自主活动^[20]。小鼠自主的节律性活动不仅依靠 mCRY1 和 mCRY2,也受到光受体(视黑素)传递的光信号调节^[21]。*mCry1* 和 *mCry2* 双敲除的小鼠,在连续黑暗下完全丢失自主活动节律,但在正常光暗周期下仍能维持约 24 h 的自主活动周期^[20]。在夜里给予双敲除小鼠光诱导,能使 *Per* 表达上调形成类似于生物钟的相移^[22]。

哺乳动物生物钟也依赖于内在的转录/翻译负反馈环路(图 1)。在生物钟周期的起始,转录因子 CLOCK-BMAL1 异源二聚体激活启动子区含 E 盒增强子的基因 *Cry1*、*Cry2*、*Per1*、*Per2*、*Per3*、*Rev-erba* 和 *Rev-erbb* 等表达。产生的各种 CRY 与 PER 蛋白在细胞质中结合并入核。一段时间后,随着上述蛋白在细胞核内浓度的增加,CRY 蛋白发挥转录抑制功能,阻遏 CLOCK 和 BMAL1 介导的转录。另一方面,表达出的 REV 蛋白入核并与促进 *Bmal1* 基因转录的 ROR 蛋白竞争性结合 *Bmal1* 启动子中的 RORE 响应元件,从而阻遏 *Bmal1* 的转录^[23]。这些事件导致 CLOCK-BMAL1 异源二聚体浓度降低,转录激活水平进一步下降。随后,新一轮生物钟周期又随着核内 CRY、PER 和 REV 等蛋白表达下降和降解, CLOCK-BMAL1 异源二聚体所受阻遏的解除而逐渐启动^[24]。

除了转录/翻译负反馈环路,磷酸化、泛素化、乙酰化、Sumo 化等翻译后修饰对于调控生物钟蛋白

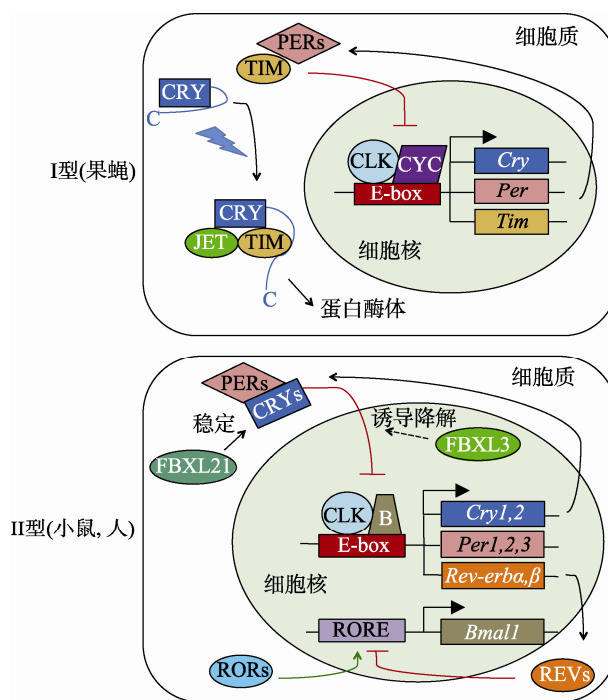


图 1 两种类型隐花色素的转录/翻译反馈循环的示意图
蓝线代表 CRY 的 C 端调控尾区,红线代表入核并抑制,绿线代表入核并激活,黑曲线代表出核或结合,加粗黑折线代表转录翻译过程。CRY, cryptochrome; PER, period; TIM, timeless; CLK, clock; B, Bmal1; CYC, cycle; JET, E3-ligase Jetlag; FBXL21, F-box and leucine-rich repeat protein 21; FBXL3, F-box and leucine-rich repeat protein 3; REVs, reverse-Erb receptors; RORs, retinoid-related orphan receptors; RORE, retinoic acid receptor response element.

的稳定性及细胞亚定位也起着重要作用。以 CRY 蛋白为例,属于 F 盒型 E3 泛素连接酶家族的 FBXL3 在核内结合 CRY 并诱导其泛素化降解^[25,26]。同家族的 FBXL21 则主要在细胞质中结合 CRY 保持其稳定^[27]。另外,CRY1 的 Ser 247 和 CRY2 的 Ser 265 位点一样都可被激酶 MAPK 磷酸化,增强自身对 CLOCK-BMAL1 异源二聚体的阻遏活性,但 CRY2 的 C 端比 CRY1 多一个可被激酶 DYRK1A 磷酸化的 Ser 557 位点^[28]。该位点磷酸化伴随着糖原合成酶激酶 GSK-3 β 介导的 Ser 553 位点磷酸化,最终诱导 CRY2 自身被蛋白酶体降解^[29],这使 CRY2 对 CLOCK-BMAL1 异源二聚体的阻遏效果弱于 CRY1。这样,在 CRY1 和 CRY2 核内蛋白总量相对恒定时,其比例将可以双向调控生物钟周期^[30]。这与 *Cry1* 和 *Cry2* 基因敲除小鼠分别展现加速和减缓的周期性自主活动相吻合^[20]。

隐花色素也是生物钟与糖类代谢和免疫应答联系的中心分子。小鼠 CRY1 和 CRY2 作用于糖皮质

激素受体(Glucocorticoid receptor)后, 抑制糖皮质激素受体参与的转录^[31]。CRY1 和 CRY2 结合小分子 KL001 后, 避免自身被泛素化降解, CRY1 量增多, CRY2 量则维持稳定, 在减缓生物钟的同时抑制胰高血糖素诱导的糖异生作用^[30]。而缺少了CRY1和CRY2, 细胞 NF- κ B 和 PKA 信号通路会被激活, 前炎症细胞因子的水平提升^[32]。

4 动物隐花色素在磁场感知中的作用和可能机制

磁场感知(Magnetoreception)是指生物利用地磁场为归航、筑巢及长距离迁徙等行动提供方位信息的能力。昆虫、鱼类、鸟类和哺乳动物的许多物种都有磁场感知能力。例如, Canton-S 品系果蝇未受训练时在测试装置中趋向于无磁场的一侧; 通过训练建立起食物与磁场间的条件反射后则可趋向有磁场的一侧^[33](图2)。红鲑鱼(*Oncorhynchus nerka*)洄游的方向不受光照影响, 但当磁场方向逆时针偏转 90 度后其游动方向也相应逆时针偏转近 90 度^[34]。鸽(*Columba livia*)可以在没有太阳指向的阴天正确归航, 但颈背部粘上磁铁后会在阴天迷失方向^[35]。C57BL/6J 品系小鼠经过训练后可将窝搭在特定的磁场方向上^[36], 野牛(*Bos primigenius*)、马鹿(*Cervus elaphus*)、西方狍(*Capreolus capreolus*)吃草和休息时的体轴指向也依地磁场方向调整^[37]。

研究发现隐花色素和近紫外光的存在是果蝇感知磁场能力的必要条件^[33]。缺乏 400~420 nm 波长近紫外光时, Canton-S 果蝇无法鉴别磁场。*cry* 基因缺陷(*cry^b*)或缺失(*cry⁰*)的 Canton-S 果蝇无论是否接受训练也都不能在测试装置中展现磁场趋向性。但体内表达帝王斑蝶的 *dpCry1* 或 *dpCry2* 基因后, *cry^b* 突变果蝇可在波长 420 nm 以下光照射时感知磁场^[38]。表达人 *hCry2* 转基因后, *cry^b* 突变果蝇也可在 400~500 nm 近紫外光和蓝光照射下恢复磁场感知^[39]。有意思的是, 上述波长正处于相应隐花色素的敏感波段, 提示光照可能是通过隐花色素发挥作用^[40,41]。

迁徙鸟类的磁场感知也可能与隐花色素相联系^[42]。处于强度较低的短波长单色光(370 nm 紫外光, 424 nm 蓝光, 502 nm 蓝绿光或 565 nm 绿光)中时, 知更鸟(*Erithacus rubecula*)的春季迁徙方向保持正常。处于其隐花色素不敏感的长波长黄光或红光中时, 知更

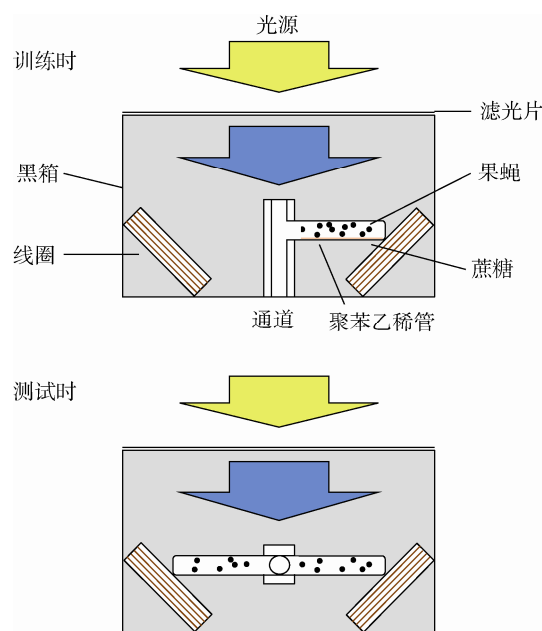


图2 果蝇感知磁场的行为检测原理图

两侧的线圈一侧通平行电流, 产生与地磁场相当的磁场强度(5G), 另一侧通反向电流, 无磁场强度。进入黑箱的光线波长通过更换上方的滤光片控制。训练时(上图), 右侧线圈内通平行电流产生磁场, 果蝇通过升降机通道被送至右侧含有蔗糖的聚苯乙烯管内进食 2 min。测试时(下图), 升降机通道水平放置以消除训练时的位置记忆, 未受训练或受过训练的果蝇从通道进入两侧空管内。2 min 后, 统计有磁场侧和无磁场侧管内的果蝇数^[33]。

鸟会迷失方向^[43]。花园莺(*Sylvia borin*)感受磁场变化后其神经节细胞活跃, 而其视网膜和神经节细胞中均有丰富的 CRY1 蛋白分布, 与此相反, 非迁徙鸟类的神经节细胞在感受磁场变化后不活跃, 细胞中 CRY1 含量也很低^[44,45]。

长期以来, 解释动物磁场感知机理的主要有磁晶体感知(Magnetite-based magnetoreception)和化学磁感知(Chemical magnetoreception)两种假说^[46]。磁晶体感知假说认为在外部磁场作用下, 细胞中的磁晶体颗粒簇阵列将发生形变, 影响细胞膜上离子通道的开放, 产生相应的细胞膜电位, 帮助动物感知磁场。鸽、知更鸟等上喙部都有磁晶体存在, 产生的信号可能通过三叉神经传递至脑^[47]。鲑鱼的嗅瓣也被发现具有磁晶体^[46]。然而, 很多有磁感知能力的动物体内未发现磁晶体或与磁晶体相联系的神经通路。知更鸟暴露于地磁场强度 1% 的微弱高频振荡磁场中也会失去对春季迁徙方向的偏好^[48]。这些都暗示存在磁晶体感知外的其他磁感知机制。

化学磁感知假说认为, 动物细胞内某些磁感受

器具有对磁场敏感的自由基对(Radical pair), 可以接受能量发生电子跃迁。若电子在跃迁过程中自旋方向不变化, 自由基对处于单重态。一旦磁场造成电子自旋方向的变化, 产生自旋不配对的电子, 自由基对便会处于三重态。不同的磁场方向和强度改变自由基对处于单重态和三重态的比率和转换的频率, 产生不同的磁场信号传输到神经系统, 参与动物对磁场的感知。由于电子自旋状态的共振效应, 自由基对对于磁场的响应会比磁晶体更敏感, 这可能是微弱人工磁场能干扰动物磁感知能力的原因^[48]。同时, 电子跃迁所需能量可由光引发的电子传递来提供。因此, 隐花色素等细胞内的光受体视为可能的磁受体^[46]。果蝇 dCRY 在光刺激下能与一个参与视觉信号通路的蛋白复合物 Signalplex 结合^[49], 这种结合靠 dCRY 的 C 端尾与脚手架蛋白 INAD (Inactivation No-After potential D) 的相互作用介导。这可能是 dCRY 调节腹侧神经元细胞膜兴奋性及发放频率的基础^[50]。考虑到隐花色素存在于绝大部分无脊椎动物和脊椎动物, 化学磁感知可能是动物中更普遍的磁感知机制。

解释化学磁感知分子机制最常用的是 $[FADH^+ + Trp^{\cdot-}]$ 假说。这一观点认为, 隐花色素蛋白结合的 FAD 辅基受到光子撞击后会接受一个质子并从最邻近的色氨酸残基(Trp)上夺得一个电子, 形成 $[FADH^+ + Trp^{\cdot-}]$ 自由基对充当磁敏自由基对^[51]。但是这一假说近年来受到果蝇实验结果的挑战。虽然帝王斑蝶 *dpCry2* 上 FAD 相邻 345 位色氨酸突变成苯丙氨酸后不能再帮助 *cry^b* 果蝇感知磁场^[38], 但在 *cry^b* 果蝇中表达 FAD 相邻 342 位色氨酸突变成苯丙氨酸的果蝇 *dCry* 基因, 或 FAD 相邻 328 位色氨酸突变成苯丙氨酸的帝王斑蝶 *dpCry1* 基因都能使其恢复磁场感知。在体外实验中, 上述突变能阻碍 $[FADH^+ + Trp^{\cdot-}]$ 自由基对形成所需的光致还原过程^[38]。对此, 也有人提出隐花色素可能通过 $[FADH^+ + O_2^{\cdot-}]$ 自由基对充当磁敏自由基对^[52]。这一观点的主要实验证据是拟南芥隐花色素 AtCRY1 在 FADH⁺回到氧化态的过程需要超氧化物的参与, 因此可能形成 $[FADH^+ + O_2^{\cdot-}]$ 自由基对^[53]。考虑到人视网膜富含隐花色素而超氧化物缺乏, 这一假说也可用于解释人为何不能感知磁场^[52]。但总体而言, $[FADH^+ + O_2^{\cdot-}]$ 假说还需要动物体内的直接实验证据支持。

目前没有证据表明隐花色素在磁场感知和生物钟调节过程中使用了相似的分子机理。dCRY 感知磁场不受 PER、TIM 和 CYCLE 等生物钟蛋白缺陷的影响, *tim* 或 *cycle* 基因敲除的果蝇具有正常感知磁场能力^[38]。通过连续光照造成果蝇生物钟紊乱时, dCRY 处于低水平, 其他生物钟蛋白无法积累, 但磁感知能力不受影响^[33]。

5 结语与展望

隐花色素在动物中广泛存在, 对其基本结构及分子作用机制等已经有了较多的研究, 但对其生理作用机制和在疾病中的影响仍有待进一步探索。在生理作用机制方面, 隐花色素是目前动物中已知的唯一直接参与磁场感知的蛋白, 但如何参与仍不明确。例如, II 型隐花色素作为转录抑制物调控生物钟时不依赖光, 为何却在果蝇中参与感知磁场时接受光诱导? 人的隐花色素在果蝇具有感知磁场功能, 但人却不能像果蝇一样感知磁场。进化是否抹去了隐花色素感知磁场的必要条件, 这些条件究竟是什么? 了解隐花色素磁敏自由基对组成和磁场信号传递的神经通路有望对此做出回答。在疾病影响方面, 隐花色素参与生物钟维持机体生命活动的基本节律。生物钟紊乱不仅可以影响思维和免疫, 而且与肥胖、糖尿病等代谢疾病和心血管疾病密切相关。哺乳动物隐花色素 CRY1 和 CRY2 可双向调控生物钟周期, 通过调控 CRY1 和 CRY2 的比例可能有望用于纠正生物钟紊乱和各种相关疾病。目前, 已有研究人员根据这一思路寻找调控隐花色素蛋白活性的小分子化合物^[30]。总之, 隐花色素研究具有重要的理论意义和应用价值。综合利用神经生物学、模式动物遗传学、分子细胞生物学等手段开展工作, 解析隐花色素相关信号和生理通路, 将有望揭开动物隐花色素的神秘面纱。

参考文献

- [1] Chaves I, Pokorny R, Byrdin M, Hoang N, Ritz T, Brettel K, Essen LO, van der Horst GT, Batschauer A, Ahmad M. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu Rev Plant Biol*, 2011, 62: 335–364.
- [2] Ahmad M, Cashmore AR. HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 1993, 366(6451): 162–166.

- [3] Todo T, Ryo H, Yamamoto K, Toh H, Inui T, Ayaki H, Nomura T, Ikenaga M. Similarity among the *Drosophila*(6–4) photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science*, 1996, 272(5258): 109–112.
- [4] Zhu H, Yuan Q, Briscoe AD, Froy O, Casselman A, Reppert SM. The two CRYs of the butterfly. *Curr Biol*, 2005, 15(23): R953–R954.
- [5] Yuan Q, Metterville D, Briscoe AD, Reppert SM. Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(4): 948–955.
- [6] Hsu DS, Zhao X, Zhao S, Kazantsev A, Wang RP, Todo T, Wei YF, Sancar A. Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *Biochemistry*, 1996, 35(44): 13871–13877.
- [7] Kobayashi K, Kanno SI, Smit B, van der Horst GTJ, Takao M, Yasui A. Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(22): 5086–5092.
- [8] Takeuchi T, Kubo Y, Okano K, Okano T. Identification and characterization of cryptochrome4 in the ovary of western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Zoolog Sci*, 2014, 31(3): 152–159.
- [9] Watari R, Yamaguchi C, Zemba W, Kubo Y, Okano K, Okano T. Light-dependent structural change of chicken retinal Cryptochrome4. *J Biol Chem*, 2012, 287(51): 42634–42641.
- [10] Kobayashi Y, Ishikawa T, Hirayama J, Daiyasu H, Kanai S, Toh H, Fukuda I, Tsujimura T, Terada N, Kamei Y, Yuba S, Iwai S, Todo T. Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes Cells*, 2000, 5(9): 725–738.
- [11] Emery P, Stanewsky R, Helfrich-Förster C, Emery-Le M, Hall JC, Rosbash M. *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron*, 2000, 26(2): 493–504.
- [12] Yoshii T, Todo T, Wülbeck C, Stanewsky R, Helfrich-Förster C. Cryptochrome is present in the compound eyes and a subset of *Drosophila*'s clock neurons. *J Comp Neurol*, 2008, 508(6): 952–966.
- [13] Thompson CL, Bowes Rickman C, Shaw SJ, Ebright JN, Kelly U, Sancar A, Rickman DW. Expression of the blue-light receptor cryptochrome in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(10): 4515–4521.
- [14] Zoltowski BD, Vaidya AT, Top D, Widom J, Young MW, Crane BR. Structure of full-length *Drosophila* cryptochrome. *Nature*, 2011, 480(7377): 396–399.
- [15] Levy C, Zoltowski BD, Jones AR, Vaidya AT, Top D, Widom J, Young MW, Scrutton NS, Crane BR, Leys D. Updated structure of *Drosophila* cryptochrome. *Nature*, 2013, 495(7441): E3–E4.
- [16] Czarna A, Berndt A, Singh HR, Grudziecki A, Ladurner AG, Timinszky G, Kramer A, Wolf E. Structures of *Drosophila* cryptochrome and mouse cryptochrome1 provide insight into circadian function. *Cell*, 2013, 153(6): 1394–1405.
- [17] Ozturk N, Selby CP, Zhong D, Sancar A. Mechanism of photosignaling by *Drosophila* cryptochrome: role of the redox status of the flavin chromophore. *J Biol Chem*, 2014, 289(8): 4634–4642.
- [18] Stanewsky R. Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell Tissue Res*, 2002, 309(1): 11–26.
- [19] Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M, Hall JC. The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, 1998, 95(5): 681–692.
- [20] van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 1999, 398(6728): 627–630.
- [21] Lucas RJ, Hattar S, Takao M, Berson DM, Foster RG, Yau KW. Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science*, 2003, 299(5604): 245–247.
- [22] Okamura H, Miyake S, Sumi Y, Yamaguchi S, Yasui A, Muijtjens M, Hoeijmakers JHJ, van der Horst GTJ. Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock. *Science*, 1999, 286(5449): 2531–2534.
- [23] Solt LA, Burris TP. Action of RORs and their ligands in(patho)physiology. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23(12): 619–627.
- [24] Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, van der Horst GT, Hastings MH, Reppert SM. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 2000, 288(5468): 1013–1019.
- [25] St John PC, Hirota T, Kay SA, Doyle FJ 3rd. Spatiotemporal separation of PER and CRY posttranslational regulation in the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(5): 2040–2045.
- [26] Yumimoto K, Muneoka T, Tsuboi T, Nakayama KI. Substrate binding promotes formation of the Skp1-Cul1-Fbx13 (SCF^{Fbx13}) protein complex. *J Biol Chem*, 2013, 288(45): 32766–32776.
- [27] Hirano A, Yumimoto K, Tsunematsu R, Matsumoto M, Oyama M, Kozuka-Hata H, Nakagawa T, Lanjakornsiripan D, Nakayama KI, Fukada Y. FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell*, 2013, 152(5): 1106–1118.

- [28] Harada Y, Sakai M, Kurabayashi N, Hirota T, Fukada Y. Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem*, 2005, 280(36): 31714–31721.
- [29] Kurabayashi N, Hirota T, Sakai M, Sanada K, Fukada Y. DYRK1A and glycogen synthase kinase 3 β , a dual-kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(7): 1757–1768.
- [30] Hirota T, Lee JW, St John PC, Sawa M, Iwaisako K, Noguchi T, Pongsawakul PY, Sonntag T, Welsh DK, Brenner DA, Doyle FJ 3rd, Schultz PG, Kay SA. Identification of small molecule activators of cryptochrome. *Science*, 2012, 337(6098): 1094–1097.
- [31] Lamia KA, Papp SJ, Yu RT, Barish GD, Uhlenhaut NH, Jonker JW, Downes M, Evans RM. Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. *Nature*, 2011, 480(7378): 552–556.
- [32] Narasimamurthy R, Hatori M, Nayak SK, Liu F, Panda S, Verma IM. Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(31): 12662–12667.
- [33] Gegear RJ, Casselman A, Waddell S, Reppert SM. Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila*. *Nature*, 2008, 454(7207): 1014–1018.
- [34] Quinn TP. Evidence for celestial and magnetic compass orientation in Lake Migrating Sockeye Salmon Fry. *J Comp Physiol*, 1980, 137(3): 243–248.
- [35] Keeton WT. Magnets Interfere with Pigeon Homing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, 68(1): 102–106.
- [36] Muheim R, Edgar NM, Sloan KA, Phillips JB. Magnetic compass orientation in C57BL/6J mice. *Learn Behav*, 2006, 34(4): 366–373.
- [37] Begall S, Červený J, Neef J, Vojtěch O, Burda H. Magnetic alignment in grazing and resting cattle and deer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(36): 13451–13455.
- [38] Gegear RJ, Foley LE, Casselman A, Reppert SM. Animal cryptochromes mediate magnetoreception by an unconventional photochemical mechanism. *Nature*, 2010, 463(7282): 804–807.
- [39] Foley LE, Gegear RJ, Reppert SM. Human cryptochrome exhibits light-dependent magnetosensitivity. *Nat Commun*, 2011, 2: 356.
- [40] Song SH, Ozturk N, Denaro TR, Arat NO, Kao YT, Zhu H, Zhong D, Reppert SM, Sancar A. Formation and function of flavin anion radical in cryptochrome 1 blue-light photoreceptor of monarch butterfly. *J Biol Chem*, 2007, 282(24): 17608–17612.
- [41] Özgür S, Sancar A. Analysis of autophosphorylating kinase activities of Arabidopsis and human cryptochromes. *Biochemistry*, 2006, 45(44): 13369–13374.
- [42] Dodson CA, Hore PJ, Wallace MI. A radical sense of direction: signalling and mechanism in cryptochrome magnetoreception. *Trends Biochem Sci*, 2013, 38(9): 435–446.
- [43] Wiltschko R, Stapput K, Bischof HJ, Wiltschko W. Light-dependent magnetoreception in birds: increasing intensity of monochromatic light changes the nature of the response. *Front Zool*, 2007, 4: 5.
- [44] Mouritsen H, Janssen-Bienhold U, Liedvogel M, Feenders G, Stalleicken J, Dirks P, Weiler R. Cryptochromes and neuronal-activity markers colocalize in the retina of migratory birds during magnetic orientation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(39): 14294–14299.
- [45] Niessner C, Denzau S, Stapput K, Ahmad M, Peichl L, Wiltschko W, Wiltschko R. Magnetoreception: activated cryptochrome 1a concurs with magnetic orientation in birds. *J R Soc Interface*, 2013, 10(88): 20130638.
- [46] Johnsen S, Lohmann KJ. The physics and neurobiology of magnetoreception. *Nat Rev Neurosci*, 2005, 6(9): 703–712.
- [47] 刘小峰, 史远. 鸟类磁感受的生物物理机制研究进展. 生物物理学报, 2009, 25(4): 247–254.
- [48] Thalau P, Ritz T, Stapput K, Wiltschko R, Wiltschko W. Magnetic compass orientation of migratory birds in the presence of a 1.315 MHz oscillating field. *Naturwissenschaften*, 2005, 92(2): 86–90.
- [49] Mazzotta G, Rossi A, Leonardi E, Mason M, Bertolucci C, Caccin L, Spolaore B, Martin AJM, Schlichting M, Grebler R, Helfrich-Forster C, Mammi S, Costa R, Tosatto SCE. Fly cryptochrome and the visual system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(15): 6163–6168.
- [50] Fogle KJ, Parson KG, Dahm NA, Holmes TC. CRYPTOCHROME is a blue-light sensor that regulates neuronal firing rate. *Science*, 2011, 331(6023): 1409–1413.
- [51] Rodgers CT, Hore PJ. Chemical magnetoreception in birds: the radical pair mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(2): 353–360.
- [52] Solov'yov IA, Schulten K. Magnetoreception through cryptochrome may involve superoxide. *Biophys J*, 2009, 96(12): 4804–4813.
- [53] Muller P, Ahmad M. Light-activated cryptochrome reacts with molecular oxygen to form a flavin-superoxide radical pair consistent with magnetoreception. *J Biol Chem*, 2011, 286(24): 21033–21040.

(责任编辑: 吴 强)

小鼠荧光素酶检测系统构建

姓名

吕垣澄

指导小组成员

吴晓晖 教授

许田 教授

目 录

摘要	1
Abstract	2
前言	3
材料与方法	6
结果	10
讨论	16
参考文献	17
致谢	18

摘 要

组织器官的尺寸调控是一个被研究不多的领域，已知的基因多与胰岛素信号转导和肿瘤相关。为能利用基因突变小鼠大规模筛选组织器官尺寸调控基因，我们正在培育组织特异的分泌性荧光素酶转基因小鼠。该系统计划利用改造的 Firefly、Gaussia 和 Cypridina 三种分泌型荧光素酶分别标记心肌、脂肪和胰岛等三种组织，尝试通过血液中三种荧光素酶含量的高低对三个组织器官的尺寸进行无损化检测。论文构建了 aMHC-FLuc、aP2-GLuc 和 RIP-CLuc 等三个转基因，能够分别表达于 H9C2、3T3-L1 和 β TC-6 等三个细胞系，表达的荧光素酶都只催化自身底物反应发光，彼此间无交叉反应。转基因共注射三个转基因载体片段至小鼠受精卵，获得的 24 只首建鼠中鉴定出 3 只单阳性雄性转基因小鼠。我们计划用这些小鼠检测胰岛，心肌等组织器官的尺寸。该分泌性荧光素酶报告系统为大规模筛选特定基因表达异常和特定组织器官尺寸异常的突变体提供了新的方法，并且利用该系统对单个转基因小鼠个体进行给药前至给药后的活体动态观测，可以改进药物筛选。

关键词：

尺寸调控，组织器官，分泌性荧光素酶，转基因小鼠，无损化检测

Abstract

Size control of tissue-organ is an under-study field, known relative genes usually involve in insulin signal transduction and cancer. In order to do a large-scale screening of size-control genes, we are developing transgenic mice that can secrete luciferase into blood from specific tissue. This system uses three secreted luciferase to label three organ-tissues respectively. The modified Firefly luciferase labels cardio muscle, Cypridina luciferase labels pancreatic islets and Gaussia luciferase labels adipocyte. According to the level of luciferase in blood, this non-invasive measurement could reports the size of organ-tissue. This thesis built three transgenic constructs aMHC-spC-FLuc, aP2-GLuc and cHS4-RIP-CLuc, they can respectively express in H9C2, 3T3-L1 and β TC-6 cell lines. The three luciferases only catalyze their own substrate without cross-reactions. After doing the transgenic co-injection of these three constructs into the mouse zygotes, we obtain three single-positive founders from the 24 founders. We plan to use these positive founders to measure the size of cardio muscle and pancreatic islets. This blood luciferase system offers a new method for large-scale screening of specific gene expression mutation and specific organ-tissue size mutation. With the help of this system, we can also monitor the change of gene expression and tissue size during drug treatment in live mice, thus the drug screening could be improved.

Keywords,

Size control, tissue-organ, secreted luciferase, transgenic mice, non-invasive measurement

前言

本实验室对研究影响器官尺寸的基因感兴趣，因为改变器官尺寸是治疗一些疾病和代谢问题的潜在方法，如增加胰岛 beta 细胞组织可以帮助糖尿病人分泌更多的胰岛素；增加心肌细胞组织可以帮助替代心血管疾病患者因缺血而坏死的部分心肌；减少脂肪组织可以缓解肥胖带来的各种健康问题。但是若想在本实验室已有的 5000 个突变品系小鼠中大规模筛选器官尺寸的表型，目前的筛选方法存在缺陷：解剖筛选是最直接的方法，但这不仅会杀死小鼠，而且若想衡量小鼠体内上百个胰岛的总体积，极难定量且工作量也很大；在特定器官中表达 GFP 等荧光蛋白只适用于表层的大体积器官（如胸腺肿瘤），因为荧光蛋白发光需要外界提供激发光，小鼠毛发形成的发射光会对内部器官的发射光产生强背景噪音，荧光图像得到也只是器官的面积而非体积，另外还必须活体成像仪。所以这两种方法都不利于小鼠突变体的大规模筛选。

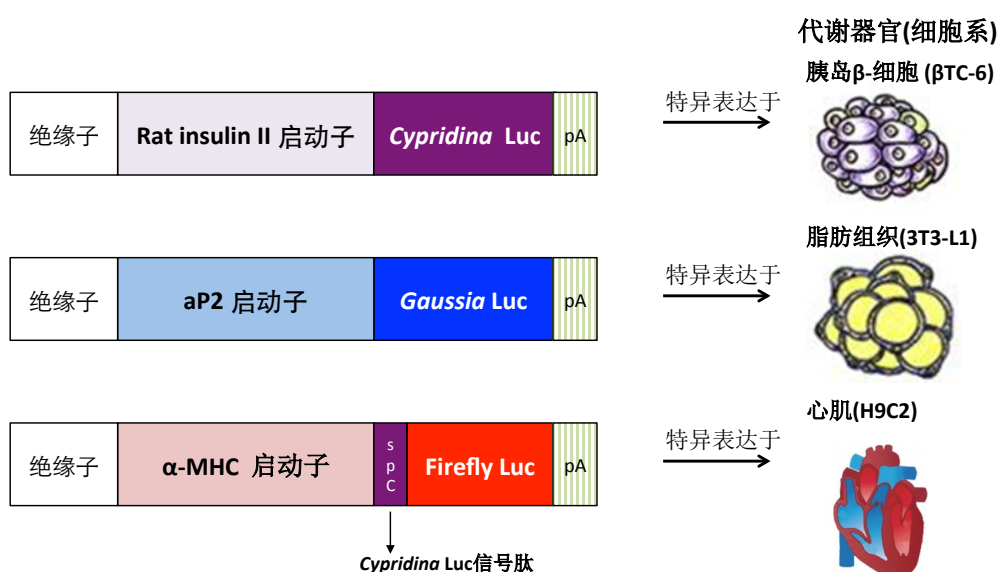


图 1 转基因载体结构示意图

荧光素酶可以催化特异底物的氧化反应而产生生物自发光，表达于活体时信噪比低，可以通过活体成像仪观测。而分泌性荧光素酶不仅可以活体成像，还能抽血检测。因此，在小鼠中建立分泌性荧光素酶报告系统可以通过构建组织特异性启动子与分泌性荧光素酶基因相连的载体，转基因注射载体到受精卵，整合于小鼠基因组，获得转基因小鼠。更大的组织可以分泌更多的荧光素酶进入血液，通过测量小鼠的血液（血浆）中分泌性荧光素酶的含量，报告特异启动子的表

达强度，间接报告特定器官的尺寸。它适用于标记小体积器官或深层的器官及在体内散布的组织（如胰岛，褐色脂肪，肿瘤等），避免了解剖和表达荧光蛋白两种筛选方法的缺陷。三个载体设计如（图一）， aMHC 启动子驱动 Firefly 荧光素酶表达于心肌组织^[1], aP2 启动子驱动 Gaussia 荧光素酶表达于脂肪组织^[2], RIP 启动子驱动 Cypridina 荧光素酶表达于胰岛 beta 细胞^[3]。

预期：1. 成功构建设计的三个载体质粒；2. 三个载体质粒成功转染对应器官的体外细胞系，成功表达荧光素酶并被检测到；3. 三种荧光素酶间无交叉反应，且 Firefly luciferase 经过改造后能成功分泌至细胞外；4.成功将三个载体质粒进行转基因注射，得到转基因阳性小鼠。

分泌性荧光素酶已被应用于报告肿瘤组织的生长和转移^[4]，在肿瘤组织中表达 Gaussia 荧光素酶后，将肿瘤组织移植到小鼠脂肪垫，任肿瘤生长。Gaussia 荧光素酶在血液，血浆和尿液中的含量随肿瘤的生长而增长，呈较好的相关性。提示分泌性荧光素酶可以被用于报告组织尺寸。

在同一只老鼠上构建三种器官的分泌性荧光素酶报告系统，不仅可以反映三种启动子的实时表达强度，还能间接反映三个相关器官尺寸之间的关系。要解决的问题是在同一只小鼠身上区别三种荧光素酶，首先要保证对彼此底物无交叉反应，其次是能区分发光光谱。

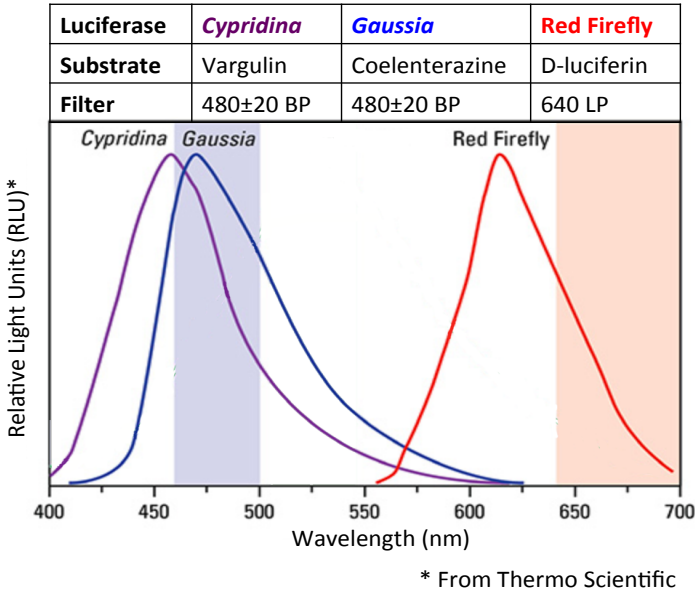


图 2 荧光素酶对应底物、发光光谱及可选用的滤光片

本研究所选用的三种荧光素酶中，它们的底物各不相同。Cypridina 荧光素酶和 Gaussia 荧光素酶是分离于海洋动物的分泌型荧光素酶。通过报告基因载体，

可用于哺乳动物细胞表达。表达后的荧光素酶为单条肽链的单体酶，分子较小且具有分泌性信号肽，因此可通过内质网分泌到细胞外。Gaussia 荧光素酶催化底物 coelenterazine 的氧化反应并且发光（最高值在 475nm）。Cypridina 荧光素酶催化底物 Vargulin 的氧化反应并且发光（最高值在 465nm）。Red Firefly 荧光素酶是一种胞内蛋白，蛋白分子量有 61KD，催化底物 D-luciferin 的氧化反应并且发光（625nm），呈红色，使其能够与 Cypridina（海萤）荧光素酶很好地区分开，从而可以组合使用。由于底物各不相同，所以三种荧光素酶不存在交叉反应。当底物充足时，发光强度与荧光素酶的浓度成正比。

从图中可以看出 Cypridina 和 Red firefly 荧光素酶反应的发射光谱几乎不重叠（见图三，重叠<1%），且底物不同。因此向小鼠血液中注射底物，可以借助活体成像仪与阴影区域所示的滤光片动态观测并区分两种荧光素酶发光强度，也可进行抽血检测。Gaussia 荧光素酶的光谱与前两者有重叠，不能与前两者同时动态观测。但它的底物为 Coelenterazine，与前两者不同。只要单独注射底物，不与前两者同时检测，或者得到两份血液样品，加不同的底物即可。

由此用三种不同启动子来驱动这三种荧光素酶基因，在同一只小鼠身上做转基因，用活体成像仪观测小鼠血液中荧光素酶的浓度，即可反映三种不同启动子的启动强度变化，间接报告三种器官的尺寸。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞与组织样品

1.1.1 细胞

大鼠心肌细胞株 H9C2、小鼠脂肪前体细胞株 3T3-L1 和小鼠胰岛 β 细胞株 β TC-6 均由本实验室保存。

1.1.2 组织

S9 系列转基因小鼠脚趾

1.2 载体与宿主菌

1.2.1 pSP72.RIP 由本实验室保存

1.2.2 pMCS-Cypridina Luc 购自 ThermoFisher 公司

1.2.3 pMCS-Gaussia Luc 购自 ThermoFisher 公司

1.2.4 UbB-DsRed-emGFP 由本实验室保存

1.2.5 pBS aP2 promoter polyA 购自 addgene

1.2.6 aMHC-eGFP-Rex-Neo 购自 addgene

1.2.7 DH5a 感受态细胞购自天根公司

1.3 小鼠品系

S9 系列转基因小鼠为本实验中转基因注射产生,小鼠品系为 FVB/NJ。所有实验用小鼠均在复旦大学发育生物学研究所的 SPF 级动物房饲养。所有的小鼠实验均按照复旦大学发育生物学研究所动物饲养及管理委员会 (IDMIACUC) 的有关实验动物福利和使用管理条例进行操作。

2 试剂

2.1 LB 培养基

组成	LB 液体培养基 (1 L)	LB 固体培养基 (1 L)
Tryptone	10 g	10 g
Yeast Extract	5 g	5 g
NaCl	10 g	10 g
Agar	—	15 g
加水定容至	1000 mL	1000 mL
加 1 mL 1M NaOH, 灭菌条件: 121℃, 高压湿热, 20 min。		

- 2.2 FuGENE HD Transfection Reagent 购自 Promega 公司
- 2.3 细胞裂解液: 1% Triton X-100, 25 mM 双甘氨酸, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, pH7.8。使用时新鲜加 DTT 至终浓度为 1 mM。
- 2.4 荧光素酶反应缓冲液: 25 mM 双甘氨酸, 15 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ 缓冲液, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 2 mM ATP, pH7.8。使用时新鲜加 DTT 至终浓度为 1 mM。
- 2.5 荧光素溶液: 25 mM 双甘氨酸, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA, 0.2 mM 荧光素, pH7.8。使用时新鲜加 DTT 至终浓度为 1 mM。
- 2.6 转基因注射缓冲液: 10 mM Tris-HCl pH7.5, 0.1 mM EDTA pH8.0, 100 mM NaCl, 0.03 mM spermine, 0.07 mM spermidine

3 实验方法

3.1 基因表达载体

3.1.1 构建 HS4-RIP-CLuc

pSP72.RIP 经 HindIII 和 KpnI 双酶切产生的 743bp 片段连入 HindIII 和 KpnI 双酶切处理的载体 pMCS-Cypridina Luc 得到 RIP-CLuc。以 UbB-DsRed-emGFP 质粒为模版, 用 KOD 高保真酶 PCR (引物 SpeI-cHS4-F / KpnI-cHS4-R) 扩增出 HS4 绝缘子片段。将 SpeI 和 KpnI 酶切处理的 PCR 产物连入同样酶切处理的 RIP-CLuc 载体, 即得 HS4-RIP-CLuc。

3.1.2 构建 aP2-GLuc

pBS aP2 promoter polyA 经 HindII 酶切产生的 5.4k 大片段连入 HINDIII 酶切并 CIP 脱磷处理的载体 pMCS-Gaussia Luc, 得到 aP2-GLuc。

3.1.3 构建 aMHC-spC-FLuc

F-spCFLuc-HindIII 与 R-spCFLuc-ApaI 退火产生 spC 信号肽片段, 连入 HindIII 和 ApaI 双酶切处理的载体 pGL4.20 [luc2-Puro] 即得 spC-FLuc。aMHC-eGFP-Rex-Neo 经 AgeI 酶切、Klenow 补平、XhoI 酶切产生的 5.5k 大片段连入经 HindIII 酶切、Klenow 补平、XhoI 酶切的载体 spC-FLuc 即得 aMHC-spC-FLuc。

3.2 细胞转染

24 孔板每孔铺 1×10^5 个 H9C2、3T3-L1 或 β TC-6 细胞,待细胞铺满 80%,每孔用 2ul FuGENE HD Transfection Reagent 转染 0.9 ug 荧光素酶报告质粒和 0.1ug 内参质粒 (pcX-nLacZ)。48 小时后收获细胞。每组质粒有三个重复,每次实验独立重复三次。用量为 Transfection Reagent (ul)/质粒(ug)=2:1。48 小时后收集细胞。每组质粒有三个重复,每个实验至少重复一次。

3.3 荧光素酶试验

吸取 400 ul 细胞上清留用后,用 1ml 预冷的 PBS 洗细胞三次,加 200ul 裂解液 4°C 裂解 1 小时,刮取细胞在 4°C 以 13000rpm 离心 5 分钟后吸取上清。

荧光素酶试验:在反应管中加 100ul 荧光素酶试验缓冲液和 10ul 细胞裂解物,放入冷光仪的荧光计数室,加入 30ul 荧光素溶液后测定荧光素酶活性。细胞的荧光素酶活性即为报告基因的诱导水平 / 发光强度。

3.4 转基因共注射

注射用 DNA 片段由 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up 制备,将 aMHC-spC-FLuc, aP2-GLuc 和 cHS4-RIP-CLuc 按 30:20:1 的摩尔比溶解在注射缓冲液中。按照标准操作流程,2ng/ul 的混合 DNA 被注射到 FVB/Nj 品系的受精卵中。根据引物 F-aMHC / R-Firefly、RIP-F / RIP-B 和 F-aP2 / R- Gaussia 的 GT-PCR 结果初步确定转基因阳性小鼠。

3.5 GT-PCR

剪取小鼠脚趾,加入 200 ul 含蛋白裂解酶 K(终浓度 250 ug/ml)的裂解缓冲液(100 mM NaCl, 100 mM Tris, 25 mM EDTA, 0.5%SDS, pH8.0)。 55°C 烘箱内消化过夜。加入 800 ul 无水乙醇,混匀后离心,13000 转/分 $\times$ 10 分钟。弃上清,75%乙醇溶液洗涤,室温干燥 10 分钟。200 ul $1 \times$ TE 溶解,在 55°C 烘箱中溶解 6 小时。PCR 反应如下,取 15 ul 产物电泳检测。

PCR 反应体系	PCR 反应程序
----------	----------

10×GT buffer 2 ul	93° C,90 秒;
DMSO 2 ul	93° C,30 秒;
10mM dNTP 2 ul	57° C,30 秒;
10uM primer1/2 0.2 ul	65° C,2 分钟;
Taq 0.3 ul	40 个循环;
DNA 1 ul	65° C,10 分钟;
ddH2O 12.3 ul	10° C 保温

引物列表

引物名称	引物序列(5' -3')
F-spCFLuc-HindIII	AGCTTATGAAGACCCTGATCCTGGCCGTGGCCCTGGTGT ACTGCGCCACCGTGCCTGCCAGGACATGGAAGATGCCA AAAACATTAAGAAGGGCC
R-spCFLuc-ApaI	CTTCTTAATGTTTTTGGCATCTTCCATGTCCTGGCAGTGC ACGGTGGCGCAGTACACCAGGGCCACGGCCAGGATCAG GGTCTTCATA
SpeI-cHS4-F	GGACTAGTCTCTAGAGCCCCATCCTC
KpnI-cHS4-R	GGGGTACCCTCTAGAGGGACAGCC
RIP-F	AGGACACAGCTATCAGTGG
RIP-B	ATTGAAGCCGGGCATTTC
F-aMHC	TGGCTTGTCCTGTTCCATCC
R-Firefly	TGCTTTGGAAGCCCTGGTAG
F-aP2	GAGACTGTCTCAAAAACCAAAC
R-Gaussia	TCAGAACACTGCACGTTG
F-BAC	CGGCGGGTTTTTTTATGGG
cHS4-R	TCTTGCTAAATCCAGCCCGAC

结果

1 转基因载体的构建

1.1 构建 HS4-RIP-CLuc

为了得到 RIP-CLuc, 将 pSP72.RIP 质粒经 HindIII 和 KpnI 双酶切产生的 RIP 片段与 HindIII 和 KpnI 双酶切处理的载体 pMCS-Cypridina Luc 用 T4 连接酶连接。连接产物转化 DH5a 感受态细胞, 涂布于含 Amp 的 LB 固体培养基。37 度培养箱倒置培养 12h 后挑克隆进行摇菌扩增。以所挑克隆的菌液为模板, 用引物 RIP-F / RIP-B 进行 PCR 扩增。引物 RIP-F 位于 RIP 片段上, 引物 RIP-B 位于载体上。若片段与载体成功连接, PCR 产物片段预期长 996bp。如图 1 所示, PCR 产物电泳条带长度在 1000bp 附近, 符合预期, 证明 2-6 泳道对应的克隆为阳性。以 UbB-DsRed-emGFP 质粒为模版, 用 KOD 高保真酶 PCR (引物 XhoI-cHS4-F / R) 扩增出 HS4 绝缘子片段。将 HS4 绝缘子片段与载体 RIP-CLuc 的连接产物转化 DH5a 感受态细胞, 挑选单菌落扩增。以所挑克隆的菌液为模板, 用引物 F-Bac / cHS-R 进行 PCR 扩增。引物 cHS-R 位于 cHS 片段上, 引物 F-Bac 位于载体上。若片段与载体成功连接, PCR 产物片段预期长 708bp。如图 4 所示, 2、4、5、8、10 泳道 PCR 产物电泳条带长度在 500bp 与 1000bp 之间, 且条带较亮, 符合预期。判断对应的克隆为阳性。

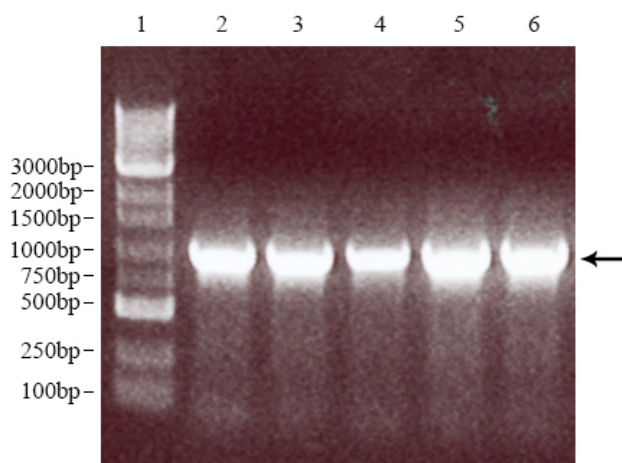


图 3. RIP-CLuc 阳性克隆筛选。泳道 1, DNA marker, 各条带分子量如图所示; 泳道 2-6, 所挑克隆菌液的 PCR 产物。

以 UbB-DsRed-emGFP 质粒为模版, 用 KOD 高保真酶 PCR (引物 XhoI-cHS4-F / R) 扩增出 HS4 绝缘子片段。将 HS4 绝缘子片段与载体 RIP-CLuc 的连接

产物转化 DH5a 感受态细胞，挑选单菌落扩增。以所挑克隆的菌液为模板，用引物 F-Bac / cHS-R 进行 PCR 扩增。引物 cHS-R 位于 cHS 片段上，引物 F-Bac 位于载体上。若片段与载体成功连接，PCR 产物片段预期长 708bp。如图 4 所示，2、4、5、8、10 泳道 PCR 产物电泳条带长度在 500bp 与 1000bp 之间，且条带较亮，符合预期。判断对应的克隆为阳性。

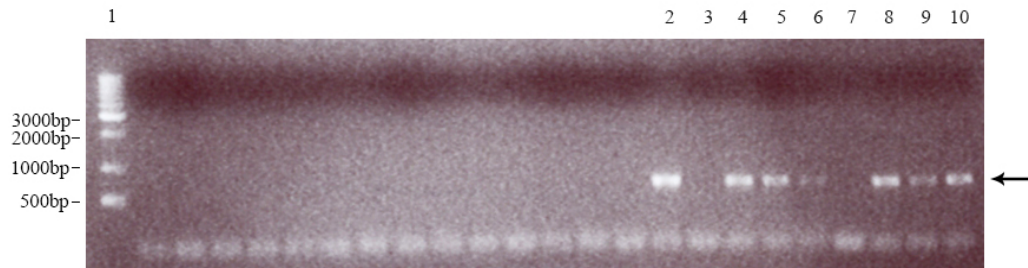


图 4. HS4-RIP-CLuc 阳性克隆筛选。泳道 1, DNA marker, 各条带分子量如图所示；泳道 2-10, 所挑克隆菌液的 PCR 产物。

1.2 构建 aMHC-spC-Fluc

spC 信号肽片段与 HindIII 和 ApaI 双酶切处理的载体 pGL4.20[luc2-Puro] 连接得到 spC-FLuc, 转化 DH5a 感受态细胞, 挑选单菌落扩增。提取质粒后, spC-FLuc 用 ApaI 酶切后出现了 1.8k 和 3.6k 两条带 (图 5), 与预期相符。

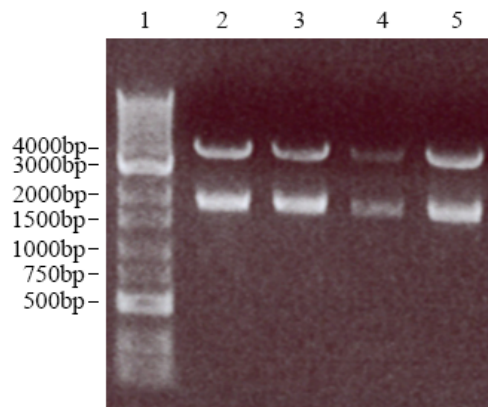


图 5. spC-FLuc 的酶切鉴定。泳道 1, DNA marker, 各条带分子量如图所示；泳道 2-5 为 spC-FLuc 被 ApaI 酶切后的产物。

aMHC 启动子与载体 spC-FLuc 连接产物转化 DH5a 感受态细胞, 挑选单菌落扩增。以所挑克隆的菌液为模板, 用引物 F-aMHC / R-Firefly 进行 PCR 扩增。引物 F-aMHC 位于 aMHC 启动子片段上, 引物 R-Firefly 位于载体上。若片段与载体成功连接, PCR 产物片段预期长 1069bp。如图 6 所示, 7 泳道 PCR 产物电泳条带长度在 1000bp 附近, 且条带较亮, 符合预期。判断对应的克隆为阳性。

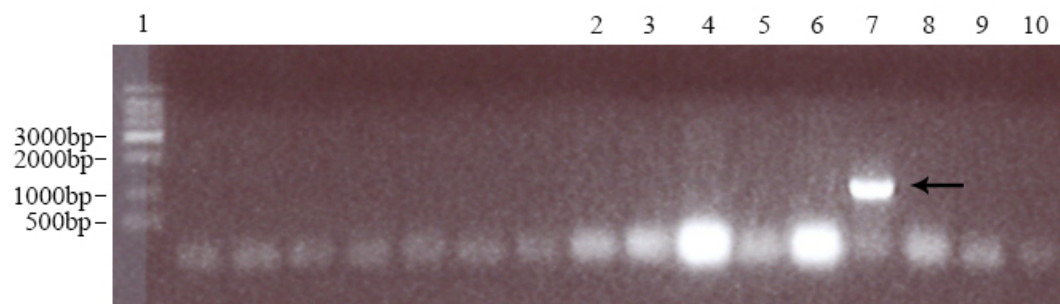


图 6. aMHC-spC-FLuc 阳性克隆筛选结果。泳道 1，DNA marker，各条带分子量如图所示；泳道 2-10，所挑克隆菌液的 PCR 产物。

1.3 构建 aP2-Gluc

aP2 promoter 与 pMCS-Gaussia Luc 载体的连接产物，转化 DH5a 感受态细胞，挑选单菌落扩增。以所挑克隆的菌液为模板，用引物 F-aP2 / R- Gaussia 进行 PCR 扩增。引物 F-aP2 位于 aP2 启动子片段上，引物 R- Gaussia 位于载体上。若片段与载体成功连接，PCR 产物片段预期长 1195bp。如图 7 所示，3 泳道 PCR 产物电泳条带长度在 1000bp 与 1500bp，且条带较亮，符合预期。判断对应的克隆为阳性。

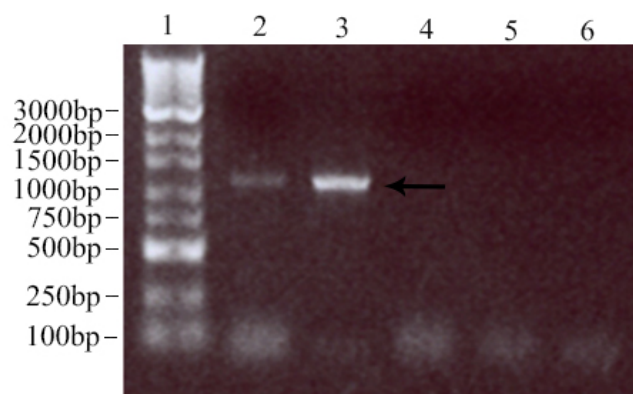


图 7. aP2-GLuc 阳性克隆筛选结果。泳道 1，DNA marker，各条带分子量如图所示；泳道 2-6，所挑克隆菌液的 PCR 产物。

2 转基因载体表达性能的细胞学测试

2.1 转基因载体的荧光素酶表达及荧光素酶的分泌效率

为了测试所构建的三个转基因载体，将载体 aMHC-spC-FLuc 转染大鼠心肌细胞株 H9C2；载体 aP2-GLuc 转染小鼠脂肪前体细胞株 3T3-L1；载体 RIP-CLuc 转染小鼠胰岛 β 细胞株 β TC-6。48h 后，收集上清（media）和细胞裂解液（lysate），与对应荧光素酶的底物反应，读取反应的发光值。如图 8 所示，三个转染组的细胞裂解液都有很高的发光值，表明三个转基因载体都成功驱动了各自荧光素酶的表达。而比较细胞裂解液和上清的发光值，可

以发现带信号肽的 Firefly 荧光素酶未能成功分泌到上清当中；Gaussia 荧光素酶的分泌效率较高，上清的发光值是细胞裂解液发光值的 4 倍左右；

Cypridina 荧光素酶的分泌效率间于前两者之间，上清的发光值与细胞裂解液发光值相当。

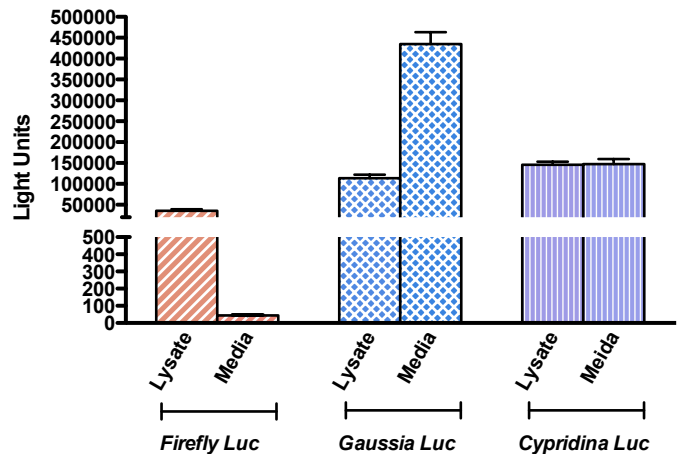


图 8. 转基因载体表达荧光素酶的分泌效率

2.2 三种荧光素酶对底物的特异性

为了测试能否在同一只小鼠中检测三种荧光素酶，将三个转染组的细胞裂解液分别与不同的荧光素酶底物反应。如图 9 所示，Firefly 荧光素酶仅与自身的底物 D-luciferin 反应；Gaussia 荧光素酶仅与自身的底物 Coelenterazine 反应；Cypridina 荧光素酶仅与自身的底物 Vargulin 反应。该实验证明了三种荧光素酶无交叉反应，因此可以将三个转基因进行转基因共注射。

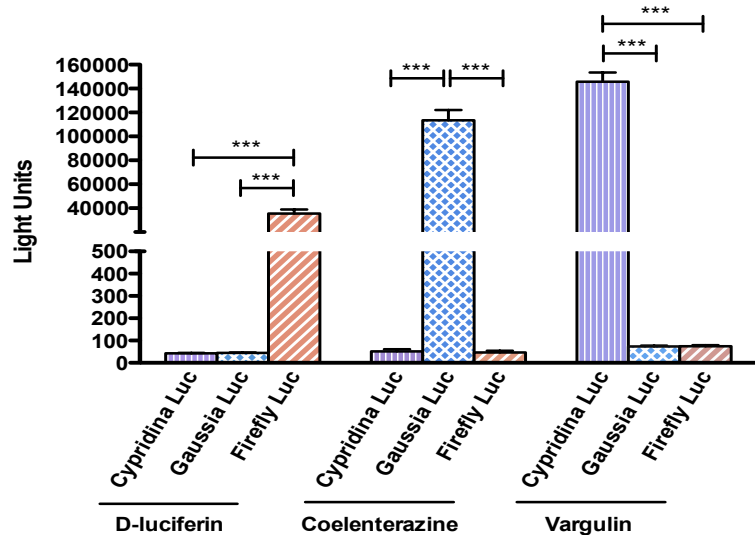


图 9. 荧光素酶对底物的特异性 ***: $p < 0.001$

3 转基因小鼠的获得

3.1 转基因注射片段的获得

将载体 aMHC-spC-FLuc 用 SpeI 和 AvrII 酶切,回收长度为 7.6k 的片段;载体 aP2-GLuc 用 XhoI 和 SphI 酶切,回收长度为 6.5k 的片段;载体 cHS4-RIP-CLuc 用 ClaI 酶切,回收长度为 4.2k 的片段。片段分别用 NucleoBond BAC 100 DNA 纯化试剂盒纯化后,得到浓度分别为 153ul/uL, 145ul/uL 和 131ul/uL 的 DNA 溶液,电泳结果如图 10 所示。将三种 DNA 片段按 30:20:1 的摩尔比溶解在注射缓冲液中,稀释至 2ng/ul 后注射到 FVB/Nj 品系的受精卵中。

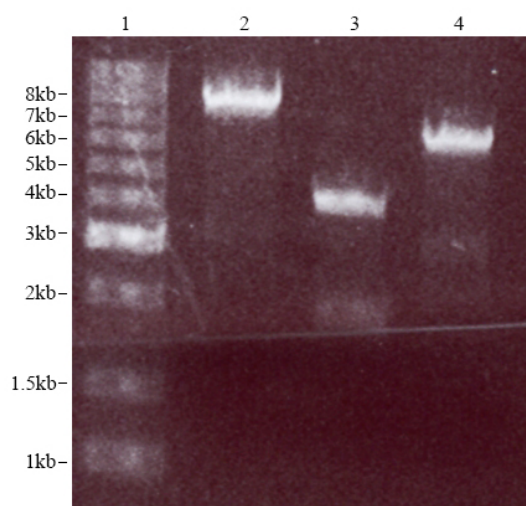


图 10. 转基因注射片段回收 泳道 1, DNA marker, 各条带分子量如图所示; 泳道 2, aMHC-spC-FLuc 载体酶切回收片段(7.6k); 泳道 3, cHS4-RIP-CLuc 载体酶切回收片段(4.2k); 泳道 4, aP2-GLuc 载体酶切回收片段(6.5k)。

3.2 阳性首建鼠的鉴定

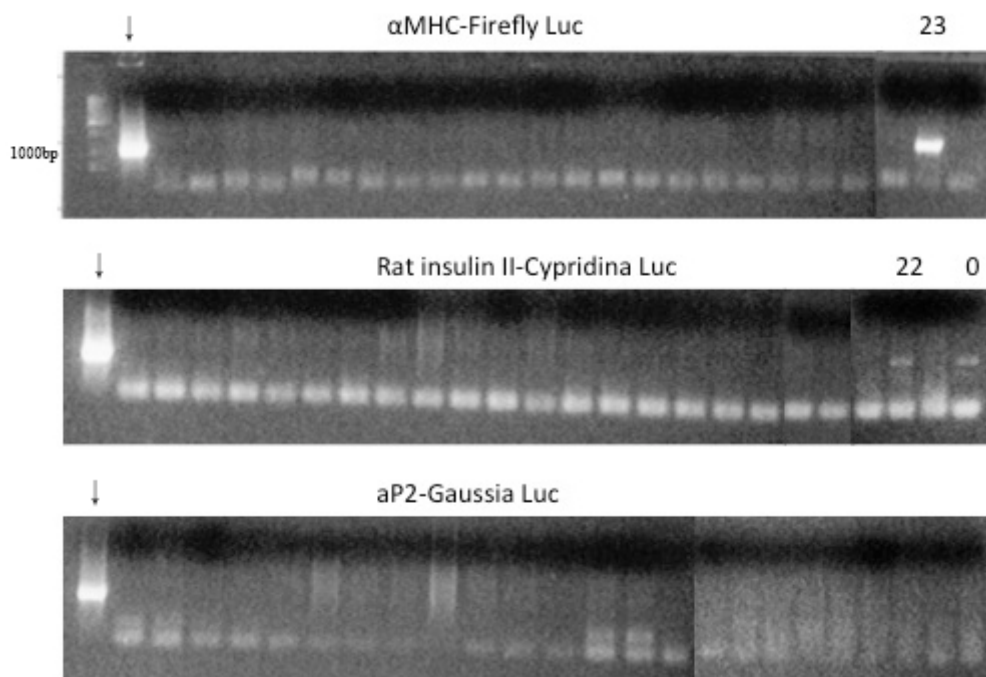


图 11. 转基因阳性首建鼠的鉴定 左侧箭头所指泳道均为阳性对照，条带在 1000bp 附近。

将被注射后的受精卵移植到假孕母鼠的体内，生出 24 只 S9 号首建鼠。通过剪脚趾对 24 只小鼠进行编号，并以脚趾基因组 DNA 为模板，用三对引物 F-αMHC / R-Firefly、RIP-F / RIP-B 和 F-aP2 / R- Gaussia 分别进行 GT-PCR 扩增。PCR 产物的电泳结果如图 11 所示，23 号首建鼠的基因组中插入了 αMHC-spC-FLuc 片段，22 号和 0 号首建鼠的基因组中插入了 cHS4-RIP-CLuc 片段。因此，共获得 3 只单阳性的小鼠，阳性率为 $3/24 \times 100\% = 12.5\%$ 。

讨论

这项研究的科学意义在于：（1）提供新的筛选方法（血液样品或活体成像仪动态观测）以大规模筛选与 **aP2** 蛋白，胰岛素以及 **MHC** 表达水平异常相关的基因，也可用于报告非分泌蛋白的表达水平；（2）间接筛选导致脂肪组织、胰岛组织，心肌组织尺寸异常的基因；增进了解三种组织间关系；（3）筛选影响分泌效率的基因；（4）用于改进再生药物筛选。利用该系统，可以进行单个个体给药前至给药后的活体动态观测，如注射可促进 β 细胞再生的 **betatrophin**^[5] 和促进心肌再生的小分子药物^[6]。因此该系统在改进药物筛选方面具有一定的应用前景。

研究中存在的问题是：（1）给 **Firefly** 荧光素酶添加信号肽后，未能使之成功分泌到细胞外，原因可能是 **Firefly** 荧光素酶带有留在细胞内的信号肽；不过通过活体成像仍可观察其在心肌细胞中催化底物产生的自发光；（2）转基因共注射时因为考虑到单个小鼠中脂肪组织的体积相对心肌和胰岛组织大很多，因此根据体积比与荧光素酶的分泌强度，将三个载体的注射摩尔比调为 30：20：1。遗憾的是摩尔量最少的 **aP2-GLuc** 载体未能成功插入小鼠基因组。（3）得到阳性首建鼠后，尚未能完成活体成像方面的实验。因为本实验室的活体成像仪损坏，需要到枫林完成该实验，而一旦小鼠运出江湾动物房，将无法再送回进行传代。因此需要将传代得到一定数量的阳性后代后，才能进行该实验。目前 23 号阳性首建鼠已传代得到一只阳性后代；22 号和 0 号阳性首建鼠暂未得到阳性后代，不排除首建鼠为嵌合体的情况。

最近报导的文献中，有研究者将本实验所使用的三种荧光素酶分别表达于三份肿瘤细胞中，然后将这三份肿瘤细胞分别移植到小鼠身体的不同部位，对小鼠进行活体观测^[7]。证实这三种荧光素酶可以在活体小鼠中同时使用并且对彼此底物无交叉反应。这从另一方面支持了本研究设计的合理性。相信本研究所构建的分泌性荧光素酶报告系统将有很好的应用前景。

参考文献

1. Agah, R., Frenkel, P. A., French, B. A., Michael, L. H., Overbeek, P. A., & Schneider, M. D.. Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo. *Journal of Clinical Investigation* (1997) 100(1), 169.
2. Barlow, C., et al. Targeted expression of Cre recombinase to adipose tissue of transgenic mice directs adipose-specific excision of loxP-flanked gene segments. *Nucleic acids research* (1997) 25(12), 2543-2545.
3. Whelan J, Poon D, Weil P A & Stein, R. Pancreatic beta-cell-type-specific expression of the rat insulin II gene is controlled by positive and negative cellular transcriptional elements. *Molecular and cellular biology* (1989) 9(8), 3253-3259.
4. Chung E, et al. Secreted Gaussia Luciferase as a Biomarker for Monitoring Tumor Progression and Treatment Response of Systemic Metastases. *PLoS ONE* (2009) 4(12), e8316.
5. Yi, P., Park, J. S., & Melton, D. A. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic β cell proliferation. *Cell* (2013) 153(4), 747-758.
6. Ni TT, et al. Discovering small molecules that promote cardiomyocyte generation by modulating Wnt signaling. *Chem Biol.* (2011) 18(12),1658-1668.
7. Maguire C A, et al. Triple bioluminescence imaging for in vivo monitoring of cellular processes. *Mol Ther Nucleic Acids* (2013) 18(2), e99.

致谢

从 12 年 6 月进入发育所到现在，发育所给我的本科科研提供了极好的平台和训练。两年的学习让我对什么是做科研，如何做科研有了直观认识。这让我更加确定自己对生命科学研究的热爱，能坚定地走在科研路上走下去。

在这里我首先要感谢我的两位导师许田教授和吴晓晖教授，能在科研生涯地初期得到两位导师地悉心指导，是我此生最大的幸运之一。无比感激他们对我这个曾经连 paper 都不会读，却心比天高的毛头小子保持耐心，从读文献做报告起用心培养我的科研基本素质，领我脚踏实地地追求真理之美。我现在仍只初涉皮毛乳臭未干，但定会谨记教诲完善自己，不辜负他们对我地推荐和期望。

因为本毕业课题由我独立完成，因此发育所的很多师兄师姐都给予过我实验上的指导和帮助。王合瑞、丁一、叶知晟以及耶鲁的潘雨堃对我实验上的指导最多，他们倾囊相授地告诉我他们多年实验获得的经验教训。尽管我的课题与他们的课题并不相关，但他们还是花了很多时间向我示范我之前没做过的实验，与我讨论我的课题设计和实验结果。没有他们帮助，我的课题连起步都会很困难。

另外，金艳、时富彪、李荣波、崔靖、严顺飞、朱晓强和陈述等师兄师姐也一直给予我关心和慷慨帮助，他们在我郁闷低潮时开导鼓励我，在我打球受伤后为我实验提供便利。在我之前或之后来过发育所的朱晓婷、董康耘、郭智豪、张昊、郭逸峰、赵亚欣、李爽等同学也都与我分享实验用品，一起讨论专业课程和实验室轶事，让我在实验室很开心。还有发育所以及江湾的技术员杨燕玲、谭贺、谈博颖和夏衍倩对我转基因小鼠的注射和饲养提供了莫大帮助。应老师，孙老师、郑老师、陶老师和韩珉老师也都对我的实验和出国申请提供了支持。感谢！

最后感谢著政（课题编号 13011）和科创计划对本课题两个子课题的资助。