

Otg1 突变导致激素分泌异常的细胞生物学机理研究

完成人
杨影

指导小组成员

吴晓晖 教授

目 录

摘 要.....	1
Abstract	2
一、前 言	3
二、材料与amp;方法	10
2.1 实验材料.....	10
2.2 实验试剂.....	11
2.3 实验仪器.....	12
2.4 实验软件.....	12
2.5 实验方法.....	12
三、研究结果.....	15
3.1 <i>Otg1</i> 影响细胞内囊泡运输	15
3.2 <i>Otg1</i> 、F-actin 与囊泡运输	19
四、讨 论.....	21
参考文献.....	22
致谢.....	23

摘 要

激素分泌对维持生物体的血糖稳态和生长发育至关重要。我们通过 PB 诱变获得了 *Otg1* (oocyte testis gene 1) 基因的突变体小鼠。该小鼠表现出激素分泌导致的生长迟缓、出生后死亡等性状。OTG1 作为一种鲜有报道的高尔基体蛋白，可能与多肽类激素的囊泡运输有关。本文通过使用目前研究囊泡运输应用广泛的 VSVG 蛋白为标记，发现在垂体瘤细胞 GH3 细胞内当 *Otg1* 表达被抑制时，囊泡运输受到显著阻碍。另外，我们试图进一步从细胞生物学角度通过研究 *Otg1* 与不同糖浓度刺激下胰岛癌细胞中 F-actin 聚合的关系，来确认 *Otg1* 影响囊泡运输的作用机制。我们对 *Otg1* 基因在细胞生物学方面的研究为 *Otg1* 基因突变大致激素分泌异常提供了原因支持，这不仅加深了我们对囊泡运输机制的了解，而且有助于我们增加对人类相关疾病（如新生儿死亡、代谢异常）机理的认识。

关键词：

Otg1 基因，囊泡运输，激素分泌

Abstract

Hormone secretion is essential for glucose homeostasis and growth. We identified an *Otg1* (oocyte testis gene 1) mutant, which carries a *piggyBac* transposon (*PB*) insertion, in a screen for mice bearing metabolic defects. The mice exhibit growth retardation, postnatal lethality. These phenotypes might be caused by decreased hormone secretion. OTG1 is rarely reported before. As a Golgi-associated protein, OTG1 may be involved in vesicle transport related to hormone secretion. By using the widely-used model, VSVG protein, as a marker for studying vesicle transport, we found that in the pituitary GH3 cells, when *Otg1* is knocked down, vesicle transport is significantly blocked. In addition, we sought to further study the intracellular mechanism how OTG1 works by monitoring F-actin of insulinoma beta-TC-6 cells. Using different glucose concentrations to stimulate beta-TC-6 cells, F-actin shows different conditions (polymerization/depolymerization). Our cellular research on *Otg1* gene greatly supports the conclusion that abnormal hormone secretion is the main reason of phenotypes of *Otg1* mutant mice. Besides, our study not only deepens our understanding of the mechanism of vesicle transport, but also will contribute to our knowledge of signaling pathways of related human diseases (such as human perinatal mortality and metabolic abnormalities).

Keywords,

Otg1 gene, vesicle transport, hormone secretion

一、前言

1.1 目前多肽类激素等蛋白分泌的分子细胞生物学机理研究

1.1.1 囊泡运输机制的研究

胞吐作用是神经递质或激素经储存他们的分泌囊泡与质膜融合释放的过程。该过程动态、快速，并涉及多个步骤，包括囊泡运输、栓连、对接，启动和融合(1)。

以胰岛 β 细胞为例，核心致密囊泡(dense-core vesicles)在反式高尔基体上产生并成熟。在胰岛素浓度升高的条件下，核心致密囊泡都会通过 Ca^{2+} 信号通路的调节而运送到微管末端，这个过程依赖于驱动蛋白kinesin-1(2)。随后通过肌动蛋白皮层(actin cortex)及肌球蛋白V (myosin V)和纤维型肌动蛋白(F-actin)等马达蛋白的配合，囊泡被运输到质膜附近的分泌位置。另外，还有多种蛋白会参与囊泡的栓连和对接过程，例如小G蛋白Rab家族和它们的互作蛋白。栓系在质膜上之后，部分囊泡会与质膜对接，即可释放囊泡池(readily-releasable pool) (3)，在受到刺激后，该池中囊泡与质膜融合，这个过程主要通过SNARE蛋白复合物介导(4) (图1.1.1)。然而，葡萄糖浓度升高导致核心致密囊泡运动的机制目前仍不明确，另外，这些运输到质膜的囊泡被选中的原因也尚未探明。

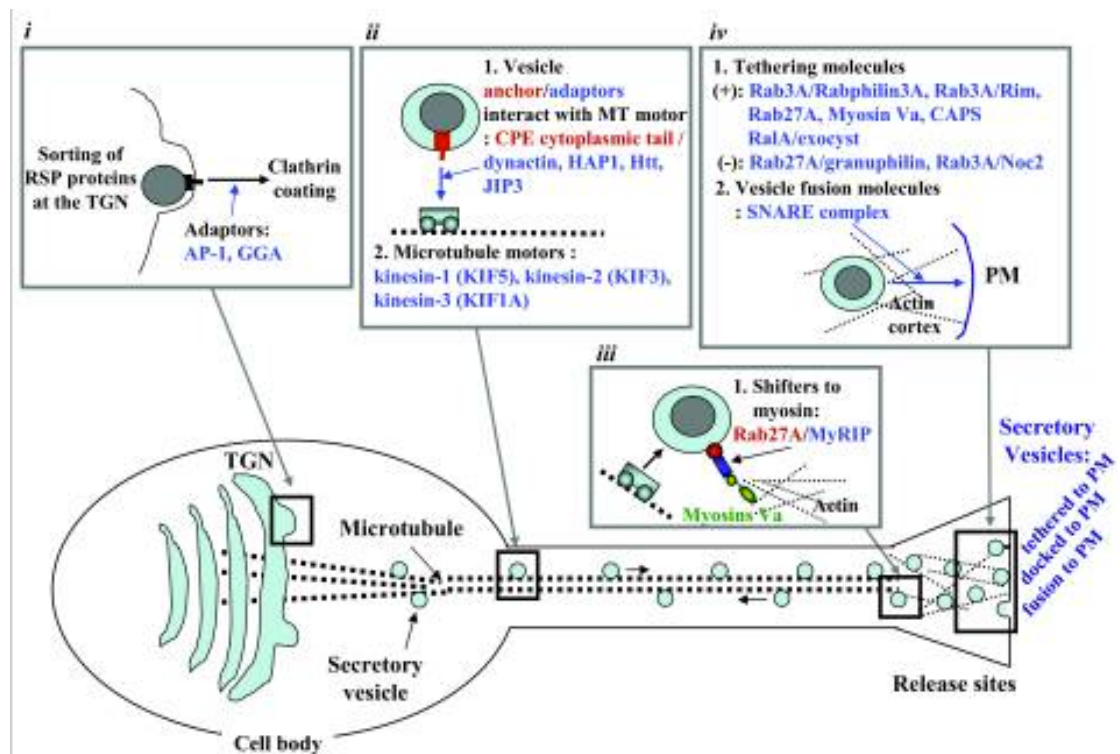


图 1.1.1 蛋白类激素囊泡运输机制 [取自(3)]

1.1.2 研究方法进展

日新月异的荧光技术和显微镜技术使活细胞观测囊泡运动成为可能，其中激光扫描共聚焦显微镜（confocal laser scanning microscope, CLSM）和全内角反射荧光显微镜（total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM）因具有优秀的三维成像技术而可以提供较为精准的高质量画面(图 1.1.2)。

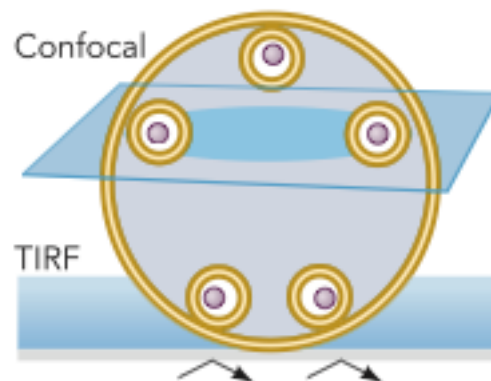


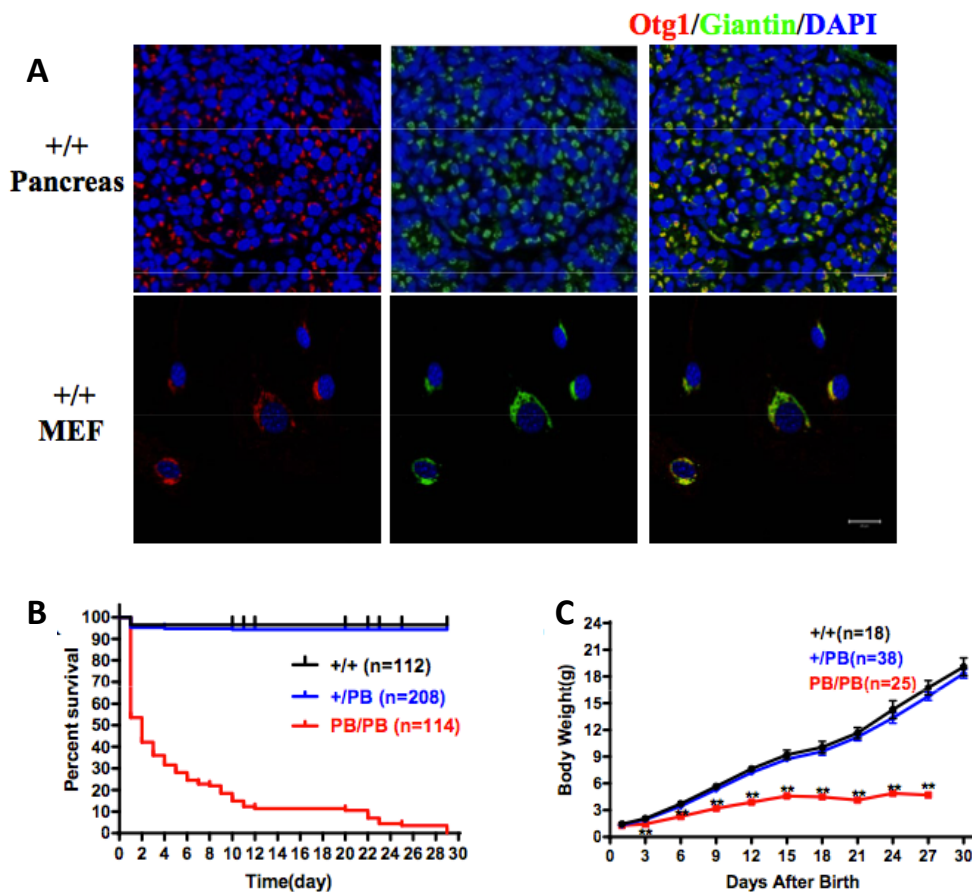
图 1.1.2 共聚焦显微镜与全内角反射荧光显微镜成像截面 [改自(5)]

使用激光扫描共聚焦显微镜和全内角反射荧光显微镜可以观察单一囊泡的运动方式，具体可观察截面如图所示。

1.2 OTG1 蛋白的前期研究

1.2.1 小鼠 *Otg1* 基因的前期研究进展

我们通过小鼠 PB 插入诱变筛选获得了一个代谢异常的突变致死品系——*Otg1* 突变小鼠。我们发现在突变小鼠中 PB 转座子插入 *Otg1* 基因的第八个外显子中，这导致该基因无法表达。该基因编码的蛋白 OTG1 被定位在高尔基体上。*Otg1* 突变小鼠出现围产期死亡、发育迟缓（通常在达到 5g 之前死亡）等表型，这可能是突变体低血糖、低胰岛素、低生长激素等代谢异常导致(6)。我们在分离 *Otg1* 突变小鼠的胰岛后检测其胰岛素分泌量，发现相对于野生型小鼠高糖刺激胰岛后胰岛素分泌相对减少，另外鼠垂体瘤细胞 GH3 细胞通过小发卡 RNA（small hairpin RNA, shRNA）抑制 *Otg1* 的表达后，生长激素分泌也相对减少(7)（图 1.2.1）。这些结果都提示我们 *Otg1* 突变可能导致囊泡运输异常，从而使得突变小鼠表现出上述异常表型。



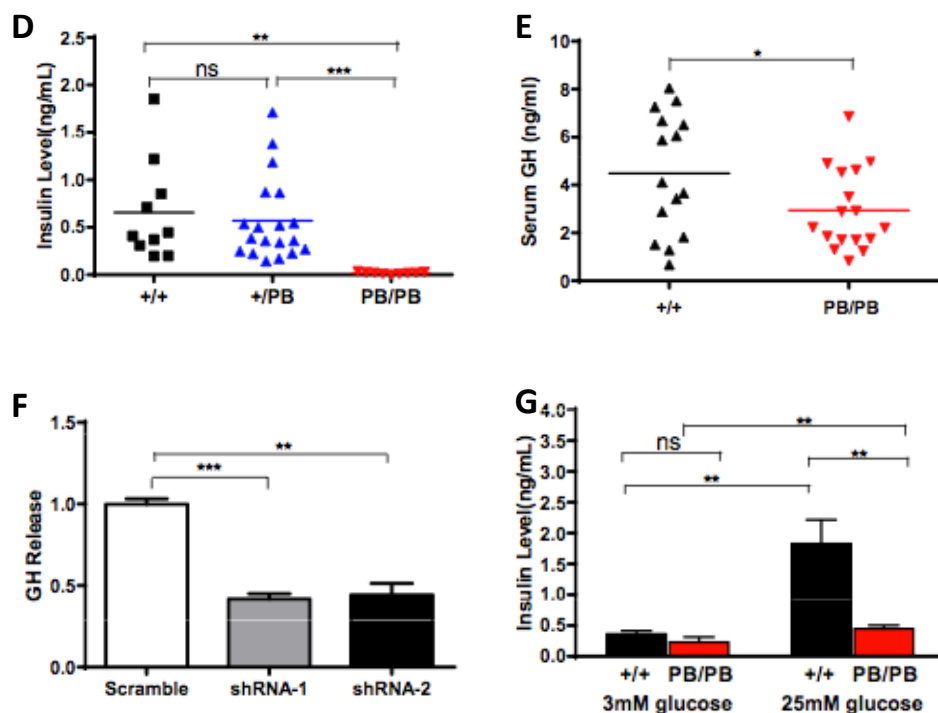


图 1.2.1 *Otg1* 前期研究进展 [A、B、C、D、E 来自(6); F、G 来自(7)]

A: OTG1 蛋白为高尔基体蛋白, 与 Giantin 共定位。B: 各基因型小鼠的存活曲线。C: 各基因型小鼠的生长曲线。D: 各基因型小鼠的胰岛素表达量。E: 突变小鼠和野生小鼠的生长激素表达量。F: 在 GH3 细胞中抑制 *Otg1* 表达 (shRNA) 和对照组细胞 (Scramble) 的生长激素释放情况。G: 突变小鼠或野生型小鼠离体胰岛在不同浓度葡萄糖刺激下的胰岛素分泌情况。

1.2.2 *Otg1* 人类同源基因 *C10orf118*

基因 *C10orf118* (chromosome 10 open reading frame 118) 是基因 *Otg1* 在人类基因组中的同源基因, 其编码的蛋白 CTCL tumor antigen L14-2 为原发性皮肤 T 细胞淋巴瘤 CTCL (cutaneous T cell lymphoma) 中的高表达抗原之一(8)。蛋白序列比对显示, 两基因编码的蛋白同源性高达 95%, 表明这是一类在哺乳动物中非常保守的蛋白质 (表 1.2.2)。另外, 研究发现在表皮癌细胞系 A-431 中, *C10orf118* 基因呈现高表达并且被定位在高尔基体上。

表 1.2.2 OTG1 与 CCCP-1 蛋白序列比对

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1439 bits(3724)	0.0	Compositional matrix adjust.	757/899(84 %)	832/899(92 %)	1/899(0 %)
Otg1	19	MSETEHIAISSDATTEKTSSELRDDSCISVSGDESSRLTGAELLSLSDSLCQTNEHC			78
C10orf118	1	MSET+HIAS SSD KT EL++DSC SG+ESS+LE ++LLSL++D+ LCQ NEH			60
Otg1	79	SQIEVQESHIPDCGSGENSCANTDTCPEDSGQIDDFPGGDFTEQVSKTKEPEQTVTQILA			138
C10orf118	61	NRIEAQENYIPDHGGGEDSCAKTDTGSENSEQIANFPGNFAKHISKTNETEQKVQILV			120
Otg1	139	ELKSSAPAEANPKTASASLYDTCRKLISEMKTVSASDDLGEIESELLSAEFAEGHQ			198
C10orf118	121	ELRSSSTFPESANEKTYSESPYDTCCKFKISKIKSVSASEDLLEIESELLSTEFAR-HR			179
Otg1	199	VPNGLNKGEQALALFEKCVHSRYLQQLVTKQLIKENKNHQELILNICSEKDSLREELRK			258
C10orf118	180	VPNGMNKGEHALVLFKCVQDKYLQGEHIIKKLIKENKKHQELPVDICSEKDNLEELKK			239
Otg1	259	RTETEKQHMNTIKQLELRIEELNKEIKASKDQLVAQDVTAKNAIQIHKEMAQRMDQANK			318
C10orf118	240	RTETEKQHMNTIKQLESRIEELNKEIKASRDQLIAQDVTAKNAVQQLHKEMAQRMEQANK			299
Otg1	319	KCEEARQEKEAMVMKYVRGEKEALDLRKEKETLERKLRDASKELKNTNKKIKQLSQEKGR			378
C10orf118	300	KCEEARQEKEAMVMKYVRGEKESLDLRKEKETLEKLRDA+KELEKNTNKKIKQLSQEKGR			359
Otg1	379	LQQLYESKEGETTRLIREIEKLKEEMNSQVIKVKWAQNKLAEMDSHKETKDKLKETTTK			438
C10orf118	360	LQQLYESKEGETTRLIREIEKLKEEMNSQVIKVKWAQNKLAEMDSHKETKDKLKETTTK			419
Otg1	439	LTQAKEEAQIRQNCQDMIKTYQSEEEIKSNELDAKLRTKGELEKQMQEKSQDLEMHHA			498
C10orf118	420	LTQAKEEAQIRQNCQDMIKTYQSEEEIKSNELDAKLRTKGELEKQMQEKSQDLEMHHA			479
Otg1	499	KIKELEDLKRTPFEGMDLRLTLRTKAKCLEDERLRTEDLSKYREIINRQKSEIQNLDDK			558
C10orf118	480	KIKELEDLKRTPFEGMDLRLTLRTKAKCLEDERLRTEDLSKYREIINRQKSEIQNLDDK			539
Otg1	559	VKITDQLHEQLQSGKQEIHLKEEMESLNSLINDLQKDIEGSRKRESELLLFTEKLTSKN			618
C10orf118	540	VKITDQLHEQLQSGKQEIHLKEEMESLNSLINDLQKDIEGSRKRESELLLFTEKLTSKN			599
Otg1	619	AQLQSESSALQSQVDNLSCTESQLSQSQCMQGANRNLESKLLKEEELRKEEVQTLQAEI			678
C10orf118	600	AQLQSESSALQSQVDNLSCTESQLSQSQCMQGANRNLESKLLKEEELRKEEVQTLQAEI			659
Otg1	679	SAAQTEVKALSTQVEELKDELVTQRRKHASNVKDLKQLQARRKLEQTENGNDKDISS			738
C10orf118	660	ACRQTEVKALSTQVEELKDELVTQRRKHASNVKDLKQLQARRKLEQTENGNDKDISS			719
Otg1	739	MGSRSSSSGSLNARISAEDRSPENTSSSVAVDNFPVVDKAMLIERIVRLQKAHARKNEKI			798
C10orf118	720	MGSRSSSSGSLNARISAEDRSPENTSSSVAVDNFPVVDKAMLIERIVRLQKAHARKNEKI			779
Otg1	799	EFMEDHIKQLVEEIRKKTIIQSYVLREESGTLSSSEASDFNKVHLSRRGGIMASLYTSHP			858
C10orf118	780	EFMEDHIKQLVEEIRKKTIIQSYVLREESGTLSSSEASDFNKVHLSRRGGIMASLYTSHP			839
Otg1	859	ADSGLTLELSLEINRKLQAVLEDTLLKNITLKENLQTLGTEIERLIKQHELEQRTTKA			917
C10orf118	840	ADSGLTLELSLEINRKLQAVLEDTLLKNITLKENLQTLGTEIERLIKQHELEQRTTKA			898

1.2.3 Otg1 线虫同源基因 Cccp1

基因*Cccp-1* (conserved coiled-coil protein-1) 是基因Otg1在线虫基因组中的同源基因 (表1.2.3)。研究表明, 其编码的蛋白CCCP-1蛋白与小G蛋白RAB-2蛋白互作, 并且共定位在高尔基体上(9)。CCCP-1蛋白与RAB-2蛋白共同控制反式高尔基体上致密核心囊泡的成熟。致密核心囊泡的主要作用为释放多肽类神经调质。

表 1.2.3 OTG1 与 CCCP-1 蛋白序列比对

Score	Expe ct	Method	Identities	Positives	Gaps
115 bits(287)	2e-3 0	Compositional matrix adjust.	180/736(24 %)	344/736(46 %)	106/736(14 %)
Otg1 211	ALFEKCVHSRYLQQELTVKQLIKENKNHQELILNICSEKDSLREELAKRTETETKQHMNTI				270
Cccp144	SLYSKCNNAV----QEQEERLESQNAEYREKLLRTIRERD-LNEELLKNVQN--QHKKEL				96
Otg1 271	KQLELRIEELNKEIKASKDQLVAQDVTAKNAIQIHKEMAQRMDQANKKCEEARQEKEAM				330
Cccp197	DAQVRRIRELEVQLKTTTDRGLAQEAHFNVTTKEMSQKFNALQQAATKKAEQCDKEKNEA				156
Otg1 331	VMKYVRGEKEALDLRKEKETLERKLRDASKELEKNTNKKIKQLSQEKGRLLQQLYESKEGET				390
Cccp1157	VVKYAMREGEEMKLRDEISKDSNMKVIKEELE-----AARKAQSQENLDDLEKTV				207
Otg1 391	TRLIREIEKLKEEMNSQVIKVKWAQNKLKAEMDSHKETKDKLKETTTLTQAKEEAEQIR				450
Cccp1208	QNLKVEIEKLKHERFDFENRMKIAEKRVESLSSNLSESQKQGDMLRKQLIQAKDD-----				262
Otg1 451	QNCQDMIKTYQESSEIKSNELDAKLRTKGELEKQMQEKSQDQLEMHHAKIKELEDLKRTF				510
Cccp1263	---KHIIQQYEVKLQTSTAELERRLRESEHDVERL---RTSQLEMATK-----F				305
Otg1 511	KEGMDLRLTLRTKAKCLEDERLRTEDELSKYREIINRQKSEIQNLDDKVKITDQLHEQLQ				570
Cccp1306	EEASRENTDLSKIDILQDQLSLEEDR----RKLCEEQ-----IDRLKGVESF---VE				351
Otg1 571	SGKQIEIHLKEEMESLNSLINDLQKDIEGSRKRES--ELLFTEKLTSKNAQLQ-----				622
Cccp1352	SSSHRIEETEKERETAEE--DREQAEEAAEYREQVEKMLKLTQELTERNMELQRKLKDE				409
Otg1 623	-SESSALQSQVDNLSCTESQLQSQCQMQQAN-----RNLESKLLKEEELRKEEVQTL				674
Cccp1410	BGKNTSHNSTIEKLQVELTTSLELCKSPFEETNLKISEELENLKTENQKPVLTLESLEENFY				469
Otg1 675	QAELSAAQTEVKALSTQVEELKDELVTQRRKHASNVKDLKQLQQAARKLEQTENGNDK				734
Cccp1470	RDKYDEASRKLEQTEAKLAEEKNNFSAPKKKTSATLKELKSELSCYRKNN----NGAGDS				524
Otg1 735	DISSMGSRSSSSGSLNA-----RISAEDRSPENTSSSVAVDNFPPEVD--				776
Cccp1525	G-AALGAHVLPPTSSDPSMSSRSRASSITSIDRVTTSTSEEE--VSSAAGEEAKRIENE				581
Otg1 777	-----KAMLIERIVRLQKAHARKNEKIEFMEDHIKQLVEIRKKTKIIQSYVLRREESGT				830
Cccp1582	BQKLNMQQIMIDKIVILQRKLARTKCEFLSEHVRQCLEELQKKTKIIQHFPALREASL				641
Otg1 831	LSSEASDFNKVHLSRRG---GIMASLYTSHPADSGLTLELSLEINRKLQAVLEDTLKNI				887
Cccp1642	LMPSEGSLEKVPIGRKSAAYALMGAMFTS-SGNEKKQVQIMTEVNSRLQAVLEDVVIQKNI				700
Otg1 888	TLKENLQTLGTETIERL				903
Cccp1701	LMRSSVDTLSDNTRL				716

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
21.9 bits(45)	0.16	Compositional matrix adjust.	18/64(28 %)	30/64(46 %)	12/64(18 %)
Otg1 37	TSELRDDSCISVSGDESSRLTGAEILLSLDS---DRI-----LCQTNEHCSQIEVQESH 87				
	TS R++ S +G+E+ R+E + L++ D+I L + E C E E H				
Cccp1559	TSTSREEEVSSAAGEEAKRIENEEQKLNMQQIMIDKIVILQRKLARRTEKC---EFLEEH 615				
Otg1 88	IPDC 91				
	+ C				
Cccp1616	VRQC 619				

1.3 OTG1 蛋白的细胞生物学主要研究内容

综上所述，目前我们对多肽类激素等蛋白分泌的分子细胞生物学机理了解并不透彻。协助囊泡运输的各类蛋白的种类与功能目前仍不明确。对OTG1蛋白的研究分析将有望推动这一领域的研究。本课题希望在此基础上进一步分析*Otg1*突变导致激素分泌异常细胞生物学机理，为研究代谢异常造成的人类新生儿死亡等疾病的相关机理和信号通路提供新的线索和贡献。我们主要希望通过使用VSVG蛋白为运输标记，利用共聚焦显微镜进行活细胞成像，观察OTG1蛋白是否影响细胞内运输，另外，通过观察OTG1蛋白是否会影响与激素分泌相关的F-actin等因素，围绕*Otg1*参与的代谢调控、激素分泌调节等相关机制进行深入的研究和探讨。另外，近期对于*Otg1*线虫同源基因的神经调节方面的研究给我们提供了一些新思路，我们希望能够通过在线虫模型中观察*Otg1*的表型从而获得新线索。

二、材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 动物与细胞

小鼠：

所使用小鼠背景均为 FVB/NJ，所有动物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。

线虫：

所有线虫实验均按照上海科技大学动物饲养的有关使用条例进行操作。实验操作均在上海科技大学进行。

细胞：

小鼠垂体瘤 GH3 细胞和小鼠胰腺癌 beta-TC-6 细胞，购自上海中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

2.1.2 质粒

VSVG-mEmerald 质粒在 Addgene plasmid #31947 的基础上改造而得（复旦大学生命科学学院蔡亮老师提供）。

Otg1-wVenus 质粒在 Addgene plasmid#1496 的基础上改造而得（上海科技大学朱焕平老师提供）。

2.1.3 小鼠基因型鉴定引物

引物名称	引物序列（5'-3'）
PBH66R12L	CAATACTTTCTCCAGTTTTGGC
PBH66R12R	GTTCTTAAGCGTTCATCTTCTAGAC
Bac-LB1	CAGTGACACTTACCGCATTGACAAGCACGC

2.1.4 Otg1-shRNA

由李荣波师兄构建，使用 pLKO.1 克隆载体（Sigma-Aldrich），使用的 shRNA 引物序列如下：

引物名称	引物序列 (5'-3')
otg1-shRNA-F1	CCGGAAGAATCATCAGGAACTTATCTTCTCGAGAAGATA AGTTCCTGATGATTCTTTTTTTTG
otg1-shRNA-B1	AATTCAAAAAAAGAATCATCAGGAACTTATCTTCTCGAG AAGATAAGTTCCTGATGATTCTT

2.2 实验试剂

2.2.1 GH3 细胞及 beta-TC-6 培养基

DMEM (High Glucose, Gibco)

10% FBS (Front)

2 mM L-Glutamine (Gibco)

100 u/ml Penicillin/streptomycin (Gibco)

2.2.2 F-actin Visualization Biochem Kit

购买自 Cytoskeleton, 包含试剂 Rhodamine Phalloidin, Wash Buffer 和 Permeabilization Buffer。

2.2.3 抗体

抗体	来源	货号	稀释比例
兔抗 Otg1	Invitrogen 产品	HPA018019	1: 1000
羊抗兔 IgG- A488	Invitrogen 产品	A11008	1: 2000

2.2.4 组织裂解液 (pH 8.0)

100 mM NaCl

100 mM Tris

25 mM EDTA

0.5% SDS

10 µg/mL 蛋白酶 K

2.2.5 10×GT buffer

166 mM (NH₄)₂SO₄

670 mM Tris (pH 6.8)

67 mM MgCl₂
50 mM β-mercaptoethanol
67 μM EDTA

2.2.6 PBST

0.4% TritonX-100 的 PBS 溶液

2.2.7 封闭液

3% Donkey Serum 对的 TBS 溶液

2.3 实验仪器

活细胞成像实验激光扫描共聚焦显微镜：旋转圆盘式共聚焦扫描头

（CSU-X/M2N, Yokogawa）与倒置显微镜（IX-81, Olympus）、EMCCD 摄像头（DU97BV, Andor）分别连接，整个显微镜系统由 Micro-Manager 软件控制。

2.4 实验软件

- Prism 6.0
- Excel 2013
- Mac vector 14.0.3
- ImageJ（NIH）（附插件 MTrackJ）

2.5 实验方法

2.5.1 细胞培养与转染

GH3 细胞和 beta-TC-6 细胞在 95%空气和 5%CO₂ 的环境下 37℃培养，使用 LipofectAMINE 2000（Invitrogen）进行 shRNA 转染或 shRNA 与质粒共转染，转染方法均为 Invitrogen 提供的标准方法。

2.5.2 beta-TC-6 细胞免疫荧光染色

6孔板放置2cmX2cm正方形盖玻片，Poly-Lysine溶液处理10min，将细胞铺于盖玻片上，进行转染、不同浓度葡萄糖刺激等操作，结束后PBS小心洗涤2遍，加入3.7%多聚甲醛（溶于PBS pH 7.4）溶液，于室温下固定5min，PBST洗3次，各10min；将盖玻片转移至载玻片上，PBST溶液洗3次，各10min。封闭液室温处理30min，弃去。加入一抗并将玻片置于湿盒内4℃过夜。PBST溶液洗3次，

各10min，加入二抗、DAPI和F-actin Visualization Biochem Kit中的phalloidin溶液，室温避光保湿放置45 min。PBST溶液洗3次，各10min，封片，荧光显微镜下观察结果。

2.5.3 活细胞成像

GH3 细胞完成质粒和 shRNA 共转染后，置于激光扫描共聚焦显微镜上 37℃预热，不同细胞按照实验要求更改温度从 33℃至 37℃，拍摄动态影像。影像拍摄 2 帧/秒，共拍摄 400 帧。图像大小为 512 x 512 pixels，voxel 为 0.0946μm /pixel。

2.5.4 胶回收与连接、转化、筛选

胶回收步骤严格按照 Qiagenjiaojiao 胶回收试剂盒说明书步骤操作。重组质粒的连接、转化与筛选按照《分子克隆实验指南》完成。

2.5.5 质粒抽提

接种待抽提质粒的菌株置于 37℃摇床中，充分的振荡培养。取菌液 1.5-5 mL 置于试管中，在室温条件下 8000 rpm 离心收集菌体。250 μL 的 Buffer P1 吹打重悬菌体。加入 250 μL 的 Buffer P2，立即温和的颠倒混匀 5-10 次，混匀后于室温条件下静置 2-4 分钟。加入 350 μL 的 Buffer P3，立即温和的颠倒混匀 5-10 次。12000rpm 离心 5-10min，收集上清至吸附柱中，9000rpm 离心 30s，弃废液。吸附柱中加入 500 μL 的去蛋白液 Buffer DW1 以降低产物中的蛋白质残留，9000 rpm 离心 30s，弃废液。向吸附柱中加入 500 μL Wash Solution，9000 rpm 离心 30s，弃废液，重复操作一次。将空的吸附柱置于收集管中放入离心机，9000rpm 离心 1 分钟。吸附柱置于新的 1.5 mL 离心管中，向吸附膜中央加入 50-100 μL 的 Elution Buffer，室温静置 1-2min，9000rpm 离心 1min，测量得到的质粒 DNA 溶液浓度并置于-20℃保存。

2.5.6 基因型鉴定（Genotyping）PCR

小鼠脚趾放入 200 μL 组织裂解液，55℃消化过夜。次日加入 400uL 的纯乙醇沉淀，13000 rpm 室温离心 10 分钟。弃上清，加入 200 μL 70%乙醇溶液洗涤一次，室温干燥。加入 200 μL TE，55℃溶解 30 分钟。取 1 μL 作为模板 PCR 分析。

PCR 反应体系：

ddH₂O 9.8 μL

10×GT buffer 1.5 μL

DMSO	1.5 μ L
25 mM dNTP	0.6 μ L
Taq polymeras	0.2 μ L
10 $\times$ BSA	0.2 μ L
20 μ M Primer 1	0.1 μ L
20 μ M Primer 2	0.1 μ L
Template	1 μ L

93 $^{\circ}$ C 90s, (93 $^{\circ}$ C 30s, 57 $^{\circ}$ C 30s, 65 $^{\circ}$ C 2~3min)₄₀, 65 $^{\circ}$ C 10min, 10 $^{\circ}$ C停留。

2.5.7 图像和统计学分析

活细胞影片 VSVG 蛋白运动路径分析使用 ImageJ 软件的 MTrackJ 插件进行蛋白路径分析, 随后获得数据进行统计学分析。数据比较分析使用 Prism6.0 采用两尾非配对 *t* 检验 (Student's *t*-test), 使用 mean $\pm$ SEM 模式作图, $p < 0.05$ 时认为有显著差异。

三、研究结果

3.1 *Otg1* 影响细胞内囊泡运输

3.1.1 GH3 细胞中 *Otg1*-shRNA 与 VSVG-mEmerald 质粒的共转染

在 *Otg1* 基因的前期研究中, *Otg1* 突变小鼠的胰岛相对野生型小鼠胰岛素分泌相对减少, 另外鼠垂体瘤细胞 GH3 细胞通过小发卡 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 抑制 *Otg1* 的表达后, 生长激素分泌也相对减少。这提示我们 *Otg1* 基因在哺乳动物的激素分泌过程中扮演了重要的角色。

为了观测 *Otg1* 在细胞内运输中的作用, 我们使用 VSVG-mEmerald 绿色荧光蛋白作为标记。VSVG 蛋白在 37℃ 温度条件下, 从内质网通过高尔基体转运至细胞膜(10)。在 GH3 细胞中共转染 VSVG-mEmerald 质粒与 *Otg1*-shRNA 或者 scramble-shRNA,

3.1.2 活细胞成像与 VSVG 蛋白轨迹追踪

使用激光扫描共聚焦显微镜对进行活细胞成像。实验组 (共转染 VSVG-mEmerald 质粒与 *Otg1*-shRNA) 与对照组 (共转染 VSVG-mEmerald 质粒与 scramble-shRNA) 各取 11 个细胞, 每个细胞随机挑选 10 个 VSVG 蛋白进行轨迹追踪 (图 3.1.2)。

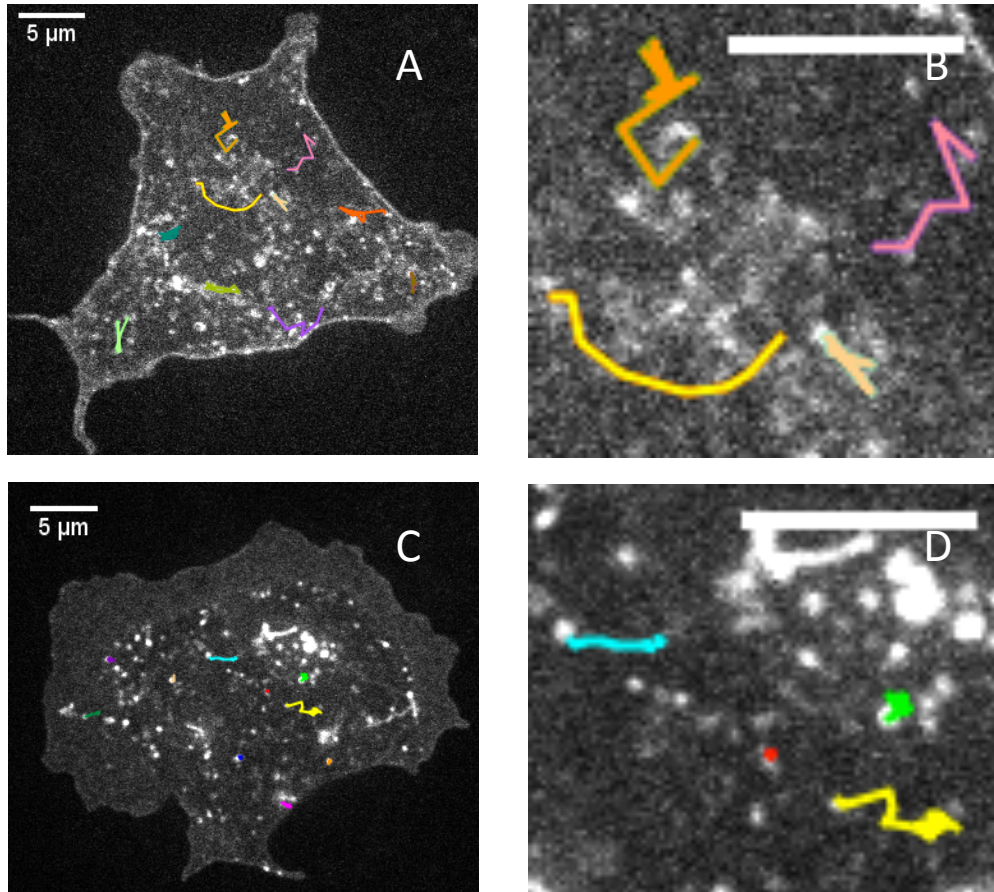


图 3.1.2 GH3 活细胞中 VSVG 蛋白的运动轨迹追踪

A: 共转染 VSVG-mEmerald 质粒与 Scramble-shRNA 的 GH3 细胞。线条为细胞中的 VSVG 蛋白运动轨迹。B: A 的局部放大图。C: 共转染 VSVG-mEmerald 质粒与 *Otg1*-shRNA 的 GH3 细胞。线条为细胞中的 VSVG 蛋白运动轨迹。D: C 的局部放大图。

直观来看，可以初步判断在 *Otg1* 表达被抑制的细胞中，VSVG 蛋白的运动受到了抑制，但仍需要对该结论进行进一步的数据验证分析。

3.1.3 VSVG 蛋白的运动分析

首先，获得各细胞 VSVG 蛋白的运动速度（图 3.1.3.1），并取平均值进行对比(图 3.1.3.2)。实验组的平均运动速度为 $0.068 \mu\text{m}/\text{sec}$ ，而对照组为 $0.186 \mu\text{m}/\text{sec}$ ，由此我们可明显看出 *Otg1* 表达被抑制后，VSVG 蛋白运动速度显著降低。

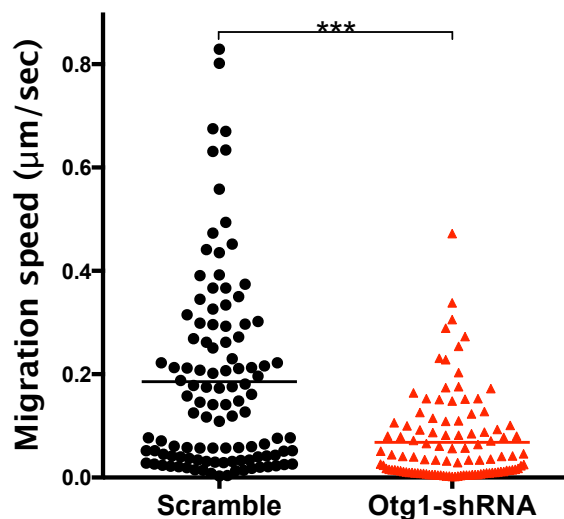


图 3.1.3.1 VSVG 蛋白的运动速度

Scramble: 共转染 VSVG-mEmerald 质粒与 Otg1-shRNA 的细胞。Otg1-shRNA: 共转染 VSVG-mEmerald 质粒与 scramble-shRNA 的细胞。Scramble 和 Otg1-shRNA 两组每组各取 11 个细胞，每个细胞随机挑选 10 个 VSVG 蛋白。

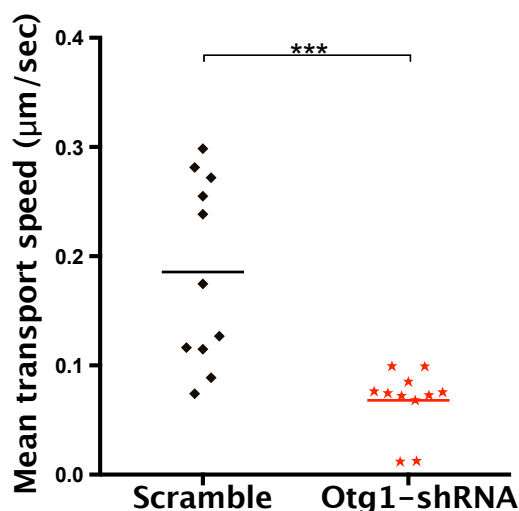


图 3.1.3.2 VSVG 蛋白的平均运动速度

Scramble: 共转染 VSVG-mEmerald 质粒与 Otg1-shRNA 的细胞。Otg1-shRNA: 共转染 VSVG-mEmerald 质粒与 scramble-shRNA 的细胞。Scramble 和 Otg1-shRNA 两组每组各取 11 个细胞，每个细胞随机挑选 10 个 VSVG 蛋白并计算其平均速度。

为进一步确认 Otg1 表达被抑制是否会导致 VSVG 蛋白运动被阻碍并研究运动的方向是否发生改变，我们通过每个蛋白轨迹的坐标计算出方向性

(directionality)(图 3.1.3.3)和运动速度标准差(standard deviation, std)(图 3.1.3.4)。

其中方向性的计算方法:

$$directionality = \frac{d_{start-end}}{l_{start-end}}$$

$d_{start-end}$: 运动起点到终点的直线距离; $l_{start-end}$: 运动起点到终点的直线距离; 当 directionality=1 时, 代表直线运动。

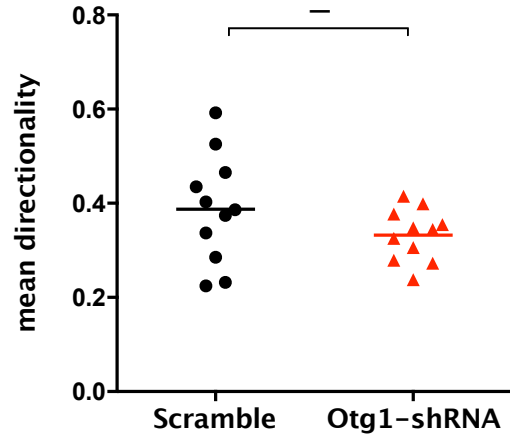


图 3.1.3.3 VSVG 蛋白的平均方向性

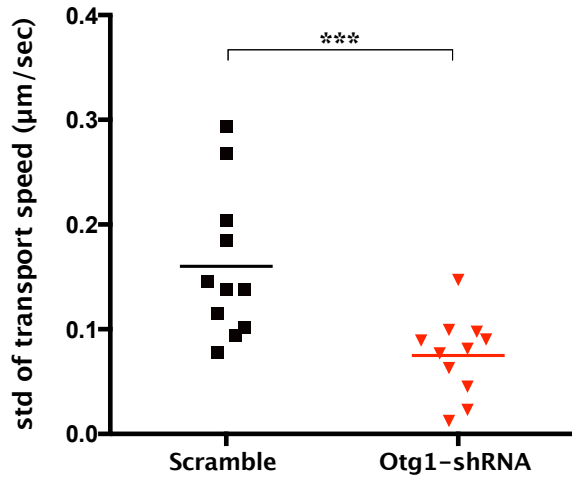


图 3.1.3.2 VSVG 蛋白的运动速度标准差

数据表明, 实验组细胞 VSVG 蛋白运动方向性与对照组并没有显著区别, 而运动速度标准差显著降低 (图 3.1.3.3), 表明抑制 Otg1 表达后, VSVG 蛋白运动表现为具有停止在原地 (运动被阻碍) 的趋势。

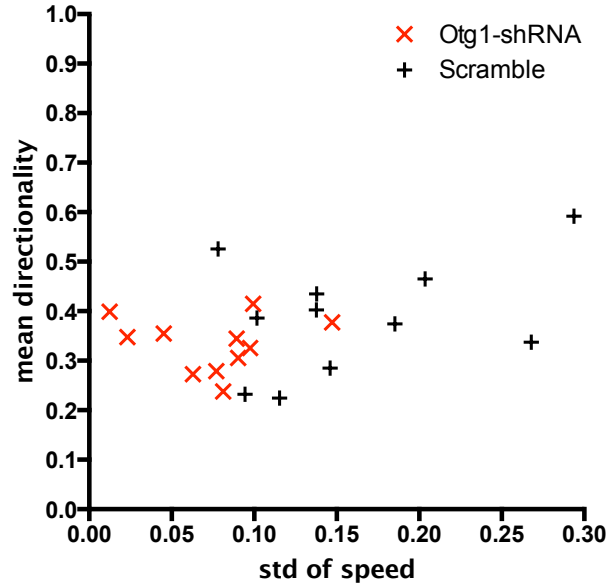


图 3.1.3.3 VSVG 蛋白的运动速度标准差与平均方向性对照图

3.2 Otg1、F-actin 与囊泡运输

3.2.1 beta-TC-6 细胞转染 shRNA

由于囊泡通过肌动蛋白皮层(actin cortex)及肌球蛋白 V (myosin V)和纤维型肌动蛋白(F-actin)等马达蛋白的配合被运输到质膜附近的分泌位置，我们猜测 OTG1 蛋白可能通过影响 F-actin 的聚合来帮助完成囊泡运输。为了确认该假设，我们首先通过转染 Otg1-shRNA 抑制 *Otg1* 在小鼠胰腺癌 beta-TC-6 细胞的表达（对照组转染 scramble-shRNA）。

3.2.2 两组细胞分别接受不同浓度葡萄糖预处理

实验组（转染 Otg1-shRNA）与对照组（转染 scramble-shRNA）的细胞分别分为两组：实验组 1、实验组 2 与对照组 1、对照组 2。四组细胞分别使用 2.8mmol/L 葡萄糖溶液饥饿处理 30min。随后，实验组 1 与对照组 1 分别用低浓度葡萄糖溶液（2.8mmol/L）处理 15min，实验组 2 与对照组 2 分别用高浓度葡萄糖溶液（25mmol/L）处理 15min。

3.2.3 免疫荧光染色观察四组细胞的 F-actin 聚合程度

使用 F-actin Visualization Biochem Kit 与 Otg1 抗体对四组细胞均进行免疫荧光染色，随后使用激光扫描共聚焦显微镜进行成像拍摄。

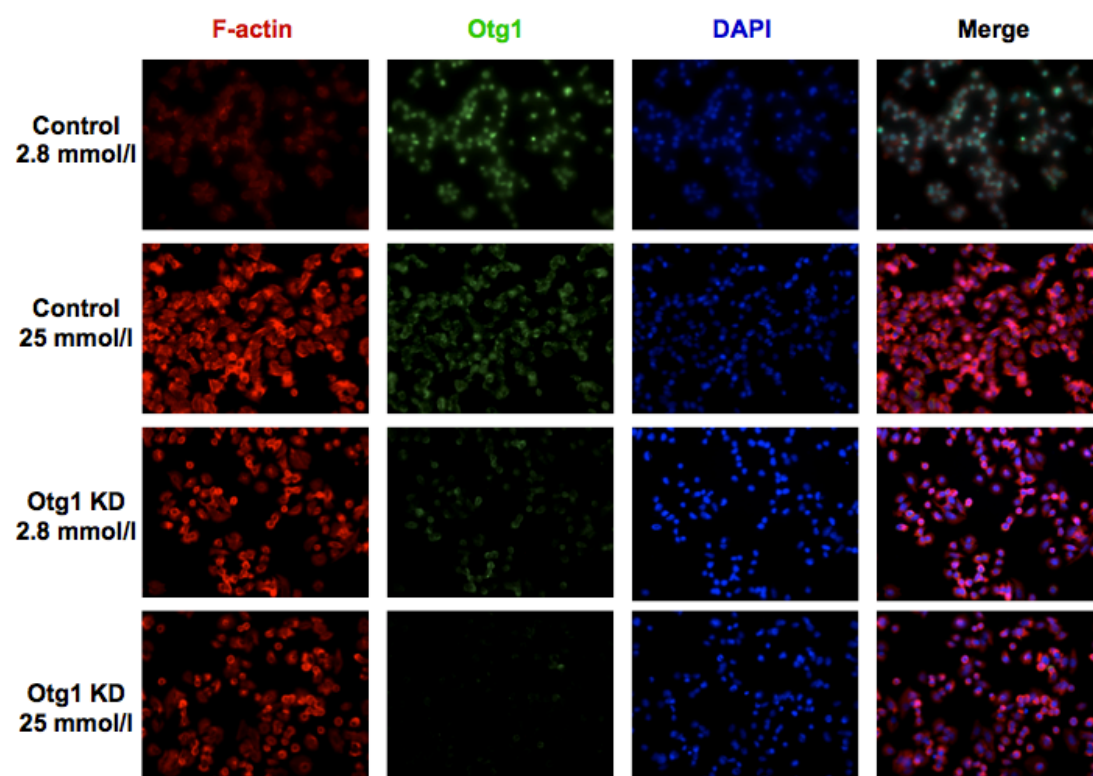


图 3.2.3 不同葡萄糖浓度刺激四组实验细胞的免疫荧光染色结果

实验结果不具有可取性，理由如下：

理论上，对照组在 2.8mmol/L 情况下 F-actin 为聚合状态，25mmol/L 情况下为解聚状态，而实验结果恰好相反。这可能是实验条件没有严格控制导致的，应该为实验者的失误。在此情况下，该实验结果无法直接说明问题。另外，对照组 1（Control 2.8mmol/L 组）的荧光强度在同样拍摄条件下明显低于其他组细胞，可能是由于该组细胞暴露在光下时间时间过长导致的，在重复实验时，需要避免此类情况。

四、讨 论

4.1 *Otg1* 基因与囊泡运输

我们的研究表明,抑制 *Otg1* 表达后,囊泡运动受到阻碍,这直接说明了 OTG1 蛋白在囊泡运输过程中具有至关重要的作用。然而, *Otg1* 基因在囊泡运输中的具体运输机制仍有待研究。

近期研究报道, *Otg1* 基因的线虫同源基因 *Cccp-1* 与 *Rab-2* 和 *Rund-1* 共同作用调节神经细胞囊泡运输过程(9)。值得注意的是,不论是 *Rab-2* 的小鼠同源基因的突变体还是 *Rund-1* 的小鼠同源基因的突变体都表现出了与 *Otg1* 突变体不同的表现型,说明 *Otg1* 基因作用的分子机制可能不保守(11)。与线虫突变体不同的是, *Otg1* 突变小鼠并没有表现出显而易见的行为学异常,并且由于前期研究表明 *Otg1* 突变小鼠具有正常的吮乳行为,这提示我们该小鼠应该具有正常的神经发育,这与线虫 *Otg1* 同源基因的突变体有较大不同。

接下来,我们希望通过直接通过构建线虫 *Otg1* 突变体,进一步观察并注意其与小鼠 *Otg1* 突变体的表型相似性,为小鼠研究提供新的思路。除此之外,由于线虫实验具有生活周期短、结构简单等优点,可以加快实验进度并为启发我们进行下一步研究。

4.2 *Otg1* 基因与人类疾病研究

由于 *Otg1* 的人类同源基因编码的蛋白是一种肿瘤抗原,这表明我们对 *Otg1* 的研究除了能对哺乳动物的囊泡运输机制提供新思路之外,也可能为相关疾病(如代谢异常或者癌症治疗)的研究作出贡献。我们将继续关注 *Otg1* 与皮肤癌的发生与发展之间的关系。

参考文献

1. Thorn P, Zorec R, Rettig J, & Keating DJ (2016) Exocytosis in non-neuronal cells. *Journal of neurochemistry*.
2. Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, & Niwa S (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10(10):682-696.
3. Park JJ & Loh YP (2008) How peptide hormone vesicles are transported to the secretion site for exocytosis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 22(12):2583-2595.
4. Vassilieva EV & Nusrat A (2008) Vesicular trafficking: molecular tools and targets. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 440:3-14.
5. MacDonald PE & Rorsman P (2007) The ins and outs of secretion from pancreatic beta-cells: control of single-vesicle exo- and endocytosis. *Physiology (Bethesda, Md.)* 22:113-121.
6. 王光学, 许田, 吴晓晖 (2011) 高尔基体蛋白 *Otg1* 缺失导致小鼠出生后死亡以及糖代谢异常的初步研究. 复旦大学博士毕业论文.
7. 李荣波, 许田, 吴晓晖 (2013) *PiggyBac* 转座子大容量转基因及 *Otg1* 突变导致代谢异常的机理研究. 复旦大学博士学位论文.
8. Hartmann TB, Thiel D, Dummer R, Schadendorf D, & Eichmuller S (2004) SEREX identification of new tumour-associated antigens in cutaneous T-cell lymphoma. *The British journal of dermatology* 150(2):252-258.
9. Ailion M, *et al.* (2014) Two Rab2 interactors regulate dense-core vesicle maturation. *Neuron* 82(1):167-180.
10. Toomre D, Keller P, White J, Olivo JC, & Simons K (1999) Dual-color visualization of trans-Golgi network to plasma membrane traffic along microtubules in living cells. *Journal of cell science* 112 (Pt 1):21-33.
11. Ayadi A, *et al.* (2012) Mouse large-scale phenotyping initiatives: overview of the European Mouse Disease Clinic (EUMODIC) and of the Wellcome Trust Sanger Institute Mouse Genetics Project. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 23(9-10):600-610.

致谢

在 3109 度过了大学时期最后一个不眠之夜，终于完成了本科毕业论文。

在这里，首先要对我的指导老师吴晓晖老师致以由衷的感谢。吴老师在本科期间给予了我耐心指导和悉心帮助。在实验期间，遇到了很多困难和挫折，吴老师循循善诱，指导我改进实验思路、自主实验、提高文章写作能力，这一切都让我获益匪浅。

其次，要特别感谢在我论文写作期间给予我巨大精神支持的谭海韵、孙鉴辉、赵咸元同学，虽然你们对生物不甚了解，但你们的支持与鼓励伴我度过了数个写论文的漫漫长夜。

接下来，要感谢我的室友彭丹菡、刘诗滢、黄斯琦和我的生科院同学们，我们互相提醒、共同努力、一起赶 **deadline**，度过了三年美好时光。

最后，请允许我对我最亲爱的父母致以最高的敬意和感谢，感谢你们在过去的二十二年里无条件的支持我、鼓励我，让我成为今天的我。

希望以后的日子，我能成为更好的我。