

復旦大學

本科毕业论文



论文题目： 调控迁移体形成的受体蛋白基因筛选

姓 名： 赵睿康 学 号： 20307110060

院 系： 生命科学学院

专 业： 生物技术

指导教师： 俞立 职 称： 教授

单 位： 清华大学生命科学学院

完成日期： 2024 年 5 月 20 日

调控迁移体形成的受体蛋白 基因筛选

完成人

赵睿康

指导小组成员

俞立 教授

杜万清 老师

目 录

摘要	I
Abstract	II
一、前言	1
1.1 研究背景.....	1
1.1.1 新细胞器迁移体的发现.....	1
1.1.2 迁移体的生物学功能.....	2
1.1.3 迁移体的生成机制.....	4
1.2 研究目的与意义.....	5
1.3 主要研究内容.....	5
二、材料与方法	6
2.1 材料.....	6
2.1.1 细胞系与细胞培养剂.....	6
2.1.2 质粒与引物.....	6
2.1.3 实验所用到的仪器.....	7
2.1.4 实验所用到的软件.....	7
2.2 试剂.....	7
2.2.1 培养基.....	7
2.3 实验方法.....	8
2.3.1 贴壁细胞的培养与传代.....	8
2.3.2 稳定敲低细胞系的构建.....	9
2.3.3 迁移体表型的高内涵分析.....	11

2.3.4 实时荧光定量 PCR	11
三、研究结果	14
3.1 对迁移体形成没有显著影响的部分基因	14
3.2 对迁移体形成具有显著影响的部分基因	15
四、讨论	21
4.1 论文总结	21
4.2 论文展望	23
参考文献	24
致谢	25

摘要

细胞在迁移的过程中会在尾部留下一种称为收缩丝的丝状结构，收缩丝上会长出一些直径为 1-2 微米左右的泡状结构，我们将它们称之为“迁移体”。细胞可以通过“迁移性胞吐”排出内容物维持自身稳态，也可以通过迁移体介导物质运输与信号传导。迁移体的形成是一个受到细胞主动调控的过程，SMS2 聚集灶能决定迁移体的产生，Rab35 可以通过招募整合素蛋白决定迁移体的形成位点，收缩丝上富集胆固醇与 TSPAN4 蛋白的微结构膜可以在细胞迁移产生的拉力下聚集形成宏结构膜，并随后膨胀形成迁移体。虽然迁移体形成的生物物理学机制已经得到了较为充分的理解，但是迁移体形成的生物学调控机制仍然存在许多的未知。本研究结合基因敲低及高内涵成像筛选到了一系列显著影响迁移体形成的受体蛋白，为探索新的迁移体形成调控机制提供了潜在的思路，也为发现迁移体新的生物学功能提供了线索。

关键词：迁移体，收缩丝，遗传筛选

Abstract

When cells migrate, long fibrillar structures called ‘retraction fiber’ are left behind. Small vesicle-like structures called ‘migrasome’ will simultaneously grow up on retraction fibers. The diameter of migrasomes is about 1-2 μ m. By generating migrasomes, cells can shed their content material to maintain homeostasis through a process called ‘migracytosis’. Also, cells can transfer specific biomolecules to other cells where the target cells take up migrasomes and uptake the internal material. Migrasomes can also mediate cell-cell interaction by releasing chemokines and attractants in certain contexts. The formation of migrasomes is a regulated process. SMS foci can determine the early fate of migrasomes. Integrin can be recruited by Rab35, which later become the formation site of migrasomes. On the retraction fibers, microdomains, which is highly enriched in cholesterol and tetraspanins, will assemble into macrodomains under the force generated by migration. These macrodomains will automatically swell to form migrasomes. Although the biophysical law governing the formation of migrasomes is largely understood, mechanisms regulating the formation of migrasomes remain unknown. Here, using knockdown genetic screening combined with high content imaging, we identify a series of genes that can significantly affect migrasome formation. These genes may potentially play a role in regulating migrasome formation. Our results can provide new insights into identifying novel mechanisms regulating migrasome formation as well as new biological functions of migrasomes.

Key words: migrasome, retraction fiber, genetic screen

一、前言

1.1 研究背景

1.1.1 新细胞器迁移体的发现

迁移体 (migrasome) 是 2014 年由俞立教授团队发现的新细胞器。迁移体的发现是从细胞外的“石榴体”开始的。细胞在迁移的过程中会在尾部留下丝状结构，我们称之为“收缩丝”。早期的研究通过透射电子显微镜发现在收缩丝的交叉处与末端有许多直径 $1\mu\text{m}$ 左右的囊泡状的结构，它们具有独特的结构，由单层细胞膜包被，内含数量不等的小囊泡，形状像一颗剖开的石榴，因此被研究人员称为“石榴体”。研究人员通过密度梯度离心的方法分离纯化了“石榴体”，并通过质谱找到了“石榴体”的标记蛋白，四次跨膜蛋白 (Tetraspanin4, TSPAN4)。然后，研究者构建了稳定表达带有荧光标签的 TSPAN4 的细胞系，通过活细胞成像发现 TSPAN4 蛋白可以同时标记收缩丝与“石榴体”，并且“石榴体”会先在收缩丝上逐渐变大，然后收缩丝断裂脱落后，“石榴体”也随之破裂。同时，研究人员发现“石榴体”的形成与细胞迁移高度相关，用肌动蛋白与肌球蛋白的抑制剂处理细胞破坏细胞的迁移能力后，“石榴体”的生成受到了严重的抑制；而在培养皿中预先孵育纤连蛋白促进细胞的迁移能力后，“石榴体”数量显著增加。由于“石榴体”的形成高度依赖于细胞迁移，因此“石榴体”被正式命名为“迁移体” (migrasome)。前人研究表明，细胞质成分能被运输到迁移体中，并通过迁移体排出细胞，该过程被称为“迁移性胞吐” (migracytosis)；同时，迁移体也能够被细胞吞噬^[1]。这些证据表明，迁移体可能参与了细胞自身稳态的维持以及细胞间的通讯，具有重要的生物学功能。

为了更好地研究迁移体，研究人员需要一个独立于过表达荧光标签偶联蛋白的非侵入式成像手段。前人研究发现麦胚凝集素 (Wheat germ agglutinin, WGA) 可以在固定的细胞与活细胞中很好地标记迁移体^[2]，从而可以作为一个良好的用于迁移体成像的标签，避免过表达荧光标签偶联蛋白对于细胞本身性质的影响。

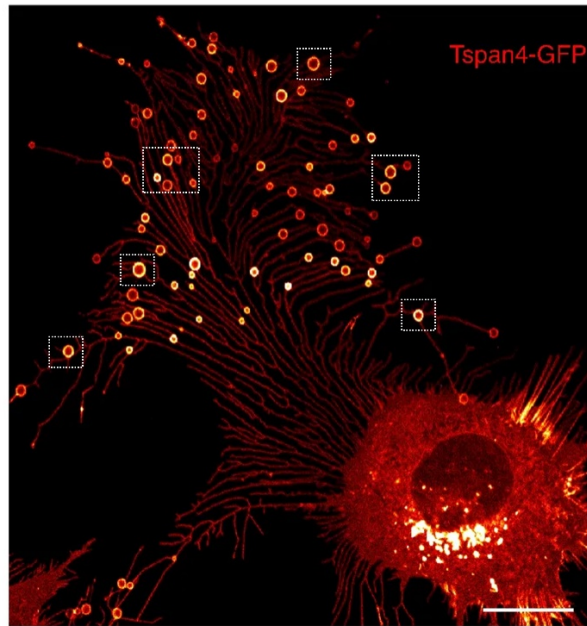


图 1 L929 细胞系产生的迁移体

图中的 L929 细胞系为稳定表达带有 GFP 标签 Tspan4 的细胞系，丝状结构为 L929 细胞迁移产生的收缩丝，位于收缩丝上的泡状结构为迁移体，图中使用白色方框标记部分迁移体

1.1.2 迁移体的生物学功能

1.1.2.1 迁移体可以调控细胞稳态

迁移体可以通过迁移性胞吐将细胞质物质排出细胞，从而维持细胞自身的稳态。研究人员发现 L929 细胞在线粒体氧化磷酸化解偶联剂 CCCP 的处理下，可以将受损的线粒体通过迁移体排出细胞。研究人员将这一现象命名为“线粒体胞吐”(mitocytosis)。研究表明，在暴露于轻度的线粒体压力时，膜电位异常以及富集活性氧的受损线粒体可以与驱动蛋白 KIF5B 结合，沿着微管被运输至细胞膜处，并通过肌球蛋白 Myo19 与质膜上的皮质肌动蛋白结合，最终经过 Drp1 的分裂作用后被转运至迁移体中。线粒体胞吐在活体中也发挥重要的生理学功能。研究人员发现野生型小鼠血液内的中性粒细胞能够快速迁移，且它们能够产生大量的迁移体，这些迁移体中含有受损的线粒体。将影响迁移体形成的 TSPAN9 基因敲除后，小鼠体内的中性粒细胞生成迁移体的能力受到了抑制，并且其线粒体膜电位与野生型小鼠细胞的线粒体相比显著性地降低了。受损的线粒体会在细胞内聚集，导致细胞活性的下降以及细胞死亡^[3]，这些结果说明迁移体很可能在体内参与调控细胞的线粒体质量控制与自身稳态。

1.1.2.2 迁移体可以介导信号传递与物质运输

迁移体在细胞间信号传递与物质运输中也扮演着重要的角色，并具有重要的生物学意义。研究人员在体外模型中证明了 L929 细胞产生的迁移体中富含 PTEN mRNA 和 PTEN 蛋白，且它们能被受体细胞吸收并在受体细胞中促进下游蛋白 Akt 的去磷酸化，从而直接揭示了迁移体能够介导细胞间生物大分子的运输^[4]。此外，研究人员也在斑马鱼以及鸡胚等体内模型中揭示了迁移体介导细胞间信号转导的生物学功能。在斑马鱼模型中，敲除已知的影响迁移体生成的基因会导致斑马鱼胚胎发育出现严重的器官发育缺陷，注射野生型斑马鱼胚胎迁移体则可以回补这一表型。研究人员进一步通过质谱分析发现斑马鱼胚胎迁移体内部富集信号分子，趋化因子，生长因子与形态发生素。在原肠运动期，迁移体高度富集在胚盾腔中，其内含的 CXCL12 等信号分子可以作为化学趋化因子诱导背侧前体细胞在正确的地方聚集，从而调控胚胎发育中的器官生成^[5]。在鸡胚胎中，研究人员发现鸡胚绒毛尿囊膜中的单核细胞具有很强的迁移能力并能产生大量的迁移体，并且迁移体中富含 VEGFA, CXCL12 等血管生成因子，这些迁移体能够充当“先锋”，规划血管新生路线，并招募更多的单核细胞，构建促进血管生长的微环境，调控血管生成^[6]。

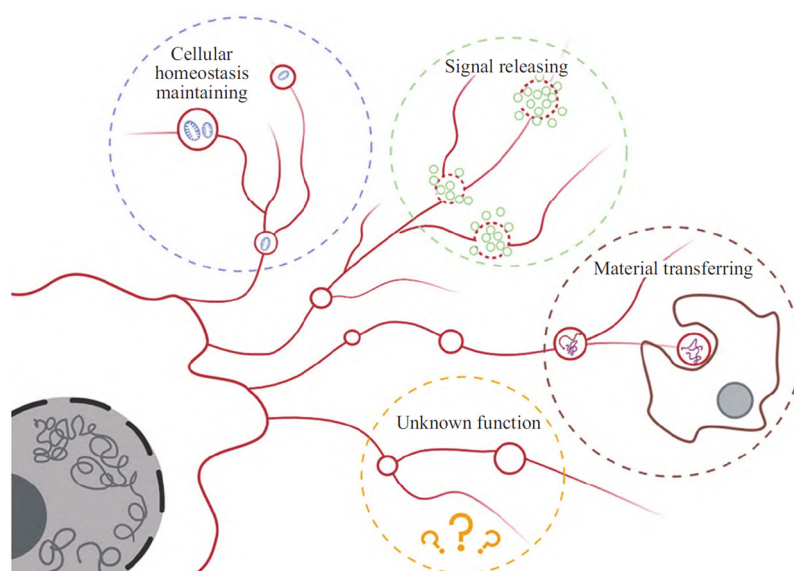


图 2 迁移体的生物学功能^[7]

已有的研究证实了迁移体的三个主要的功能，一是通过排出细胞内的物质调控维持细胞自身稳态；二是通过释放信号分子介导细胞间的信号转导；三是通过传递生物分子介导细胞间的物质运输；目前迁移体的生物学功能研究还停留在较为初步的阶段，有更多未知的功能有待研究与探索

1.1.3 迁移体的形成机制

为了更好地研究迁移体的生物学功能，我们需要对迁移体的形成机制以及相关的调控机制有更深入地理解。SMS2 是一种鞘磷脂合酶，负责将神经酰胺转化为鞘磷脂。细胞在迁移的过程中，SMS2 会在细胞迁移的前沿基底膜上形成聚集灶，且该聚集灶会锚定在同一位置，细胞迁移离开后，锚定的 SMS2 聚集灶保留在收缩丝上成为迁移体生成的位点，随后，SMS2 通过将神经酰胺转化为鞘磷脂来促进迁移体的生长。SMS2 聚集灶的形成是目前可观测到的迁移体形成最上游的事件，决定了迁移体的产生^[8]。前人研究发现磷脂酰肌醇磷酸激酶 PIP5K1A 以及其催化产物 PIP2 在迁移体中富集，且抑制 PIP5K1A 的酶活性会显著抑制迁移体的形成，说明 PIP5K1A 介导的 PIP2 生成能够调控迁移体的形成，研究人员通过筛选迁移体内的 PIP2 结合蛋白发现 Rab35 定位于迁移体的形成位点。早期研究发现迁移体的形成依赖于整合素与细胞外基质蛋白的相互作用^[9]，在收缩丝上 Rab35 与整合素蛋白共定位，而敲除 Rab35 会导致整合素蛋白在收缩丝上均匀分布，这表明 Rab35 能够招募整合素蛋白，介导迁移体与胞外基质的粘附。PIP2-Rab35 轴在 SMS2 聚集灶形成的基础上进一步决定了迁移体的形成位点^[10]。以上研究表明迁移体的形成是受到细胞主动调控的过程。

为了更准确地研究迁移体形成的生物物理原理，研究人员构建了基于巨大单层囊泡 (giant unilamellar vesicles, GUV) 的体外模型用以模拟迁移体的形成。研究人员使用纯化的 TSPAN4，胆固醇和其他脂质在体外重构生成 GUV，通过将带有生物素的 GUV 与偶联链霉亲和素流动室底部相互作用来模拟细胞与胞外基质的相互作用，通过定向液流产生机械力或者玻璃针牵拉的方式来模拟细胞的迁移。研究人员用构建的体外模型成功地从镶嵌了 TSPAN4-GFP 的单层囊泡中拉出类似收缩丝的管状结构，在拉管过程中微区结构域聚集形成宏结构域并在膜管上自发膨胀形成类似于迁移体的结构。通过体外模型的研究，研究人员总结出了迁移体生成的生物物理模型，即收缩丝上会存在富集 TSPAN4 以及胆固醇的微结构域，这些微结构域会组成微米量级的宏结构膜；由于宏结构膜富含胆固醇，因此其弯曲刚性显著高于收缩丝的其余部位，在细胞迁移所带来的牵拉下，收缩丝上的宏结构膜会自发地膨胀形成迁移体^[11]。

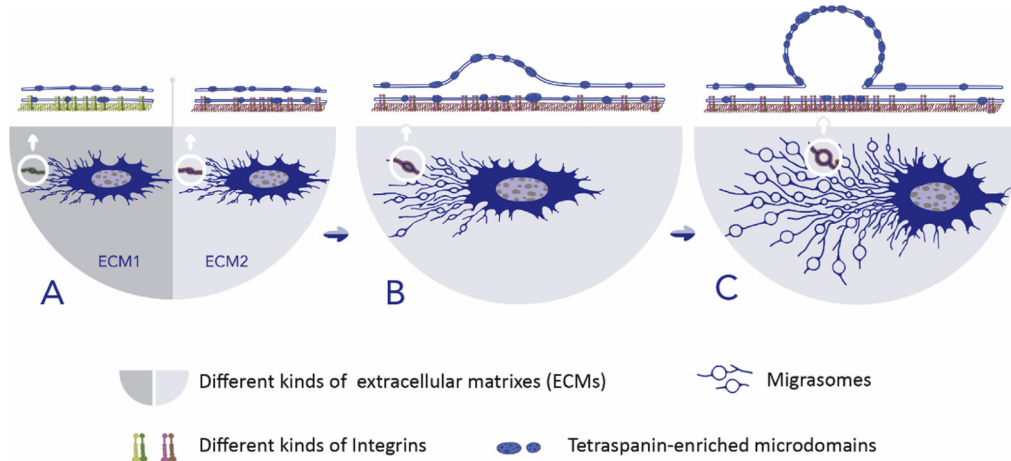


图 3 迁移体生成的生物物理模型^[12]

(A) 在细胞迁移的过程中，整合素蛋白与细胞质基质蛋白的结合锚定位点决定了迁移体的生成位点；(B) 在这些生成位点处，收缩丝上 Tspan 家族蛋白与胆固醇富集形成微结构膜，并使得膜逐渐凸出；(C) 富集 Tspan 蛋白与胆固醇的微结构膜组装形成宏结构膜，通过改变收缩丝膜的局部弯曲刚性使得宏结构膜自发膨胀形成迁移体

1.2 研究目的与意义

迁移体是细胞在迁移的过程中产生的具有特定的形态与功能的细胞器。目前，迁移体的生物学功能已经得到了初步的研究，迁移体的形成的上游事件以及迁移体形成的生物物理学原理已经得到了较为充分的理解，但是，迁移体形成的调控机制还存在许多未知。本研究旨在通过遗传筛选的手段，鉴定得到调控迁移体形成的基因，为迁移体形成的调控机制提供线索。该研究的意义在于筛选得到调控迁移体形成的基因不仅将有助于理解迁移体形成的调控机制，而且将有利于研究者更好地利用遗传学手段研究迁移体对特定生物学过程的影响，并将有助于迁移体体内模型的建立，为迁移体生理学功能研究打下坚实的基础。

1.3 主要研究内容

本研究的目的是通过遗传筛选的手段鉴定得到调控迁移体生成的基因。在筛选策略上，本研究采用点阵式筛选的手段，利用慢病毒转染 shRNA 的方法实现特定靶基因的敲低，再通过高内涵成像手段对不同靶基因敲低的细胞进行成像获得靶基因敲低后迁移体的表型，最后通过定性表型分析与定量统计分析的手段筛选得到特异性调控迁移体生成的基因。

二、材料与方法

2.1 材料

2.1.1 细胞系与细胞培养试剂

L929 细胞系、293FT 细胞系为实验室现有细胞系；Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培养基、GlutaMAX™ 均购自 ThermoFisher Scientific 公司；青霉素/链霉素、0.25%胰蛋白酶购自浙江森瑞生物科技有限公司；胎牛血清购自以色列 Biological Industries 公司；纤连蛋白购自默克生物技术有限公司；10mg/ml 嘌呤霉素购自碧云天生物技术有限公司；Vigofect 细胞转染试剂购自威格拉斯生物技术（北京）有限公司；96 孔玻璃底高内涵筛选微孔板购自 PerkinElmer 有限公司

2.1.2 质粒与引物

shRNA 质粒克隆购自清华大学生物医学测试中心 shRNA 文库平台。病毒包装质粒（psPAX2 质粒、pMD2.G 质粒）均为实验室现存质粒；实时荧光定量 PCR（qPCR）引物主要参考自 PrimerBank 数据库。

表 1 本研究所使用的主要的 qPCR 引物

引物名称	引物序列（5' —3'）
Mouse-Pear1-qPCR-F	GCACTGTTTCATTGGCTACCG
Mouse-Pear1-qPCR-R	AGAGACATCTGGCATGACGTA
Mouse-Gprasp1-qPCR-F	CCCAGGCAAAGGCTGAAAATA
Mouse-Gprasp1-qPCR-R	GATTTGTGTCCTAACCTTGGGTC
Mouse-Il17ra-qPCR-F	AGTGTTTCCTCTACCCAGCAC
Mouse-Il17ra-qPCR-R	GAAAACCGCCACCGCTTAC
Mouse-Tyk2-qPCR-F	AGCCATCTTGGAAGACAGCAA
Mouse-Tyk2-qPCR-R	GACTTTGTGTGCGATGTGGAT
Mouse-Crlf2-qPCR-F	ACCACAGCGCCAACTTGAG
Mouse-Crlf2-qPCR-R	CGCCGGACAGGAAATATCG
Mouse-Cmklr1-qPCR-F	ATGGAGTACGACGCTTACAACG
Mouse-Cmklr1-qPCR-R	GGTGGCGATGACAATCACCA
Mouse-Gria2-qPCR-F	TTCTCCTGTTTTATGGGGACTGA
Mouse-Gria2-qPCR-R	CTACCCGAAATGCACTGTATTCT
Mouse-ErbB2-qPCR-F	CTACCCGAAATGCACTGTATTCT

2.1.3 实验所用到的仪器

手动移液器（GILSON 公司）
电动移液器（Eppendorf 公司）
二氧化碳细胞培养箱（SANYOU 公司）
高内涵细胞成像分析系统（PerkinElmer 公司）
低温高速小型离心机（Eppendorf 公司）
低温高速大型离心机（Eppendorf 公司）
Nanodrop 微量分光光度计（ThermoScientific 公司）
ChemiDoc 成像系统（Bio-Rad 公司）
普通 PCR 仪（杭州博日科技有限公司）
荧光定量 PCR 仪（罗氏公司）
高压蒸汽灭菌仪（SANYOU 公司）
二氧化碳恒温摇床（SANYOU 公司）
超净工作台（北京长风公司）
加热制冷型金属浴（卡尤迪生物技术公司）
水浴锅（上海森信有限公司）
电泳仪电源（北京六一仪器厂）

2.1.4 实验所用到的软件

Harmony 用于设置高内涵分析参数；Excel 用于处理 qPCR 相关数据；ImageJ 用于处理细胞图像；GraphPad Prism 用于绘制统计分析结果图。

2.2 试剂

2.2.1 培养基

2.2.1.1 LB 培养基

表 1 LB 液体培养基和固体培养基

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	5 g	10 g
Agar	—	15 g
加水定容至	1000 mL	1000 mL

灭菌条件：121℃，高压湿热，20 min。

2.2.1.2 细胞培养相关溶液

表 2 细胞培养专用 1×PBS

组成	1×PBS (1 L)
NaCl	7.89 g
KCl	0.35 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3.58 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.31g
加水定容至	1000 mL

2.3 实验方法

2.3.1 贴壁细胞的培养与传代

本研究中所用到的 293FT 细胞系、L929 细胞系均为贴壁生长细胞，生长速度较快，易于培养与转染。下面以 10cm 培养皿培养 L929 细胞为例进行说明。

1) 从培养箱中取出细胞，在显微镜下观察细胞的状态与细胞密度，待细胞生长至贴壁密度为 80%-90%左右，且细胞状态良好的时候进行传代。

2) 提前 30 分钟对细胞超净工作台进行紫外灭菌。

2) 在 37 度水浴锅中预热培养基，胰酶溶液与 PBS 缓冲液。

3) 将待传代的细胞，预热后的培养基，胰酶与 PBS 缓冲液经 75%酒精消毒后放入超净工作台中。

4) 用真空泵或移液器弃去细胞培养皿中的培养基，然后加入 2mL PBS 缓冲液，轻轻晃动培养皿，使得 PBS 缓冲液与整个培养皿底充分接触，充分润洗。

5) 用真空泵或移液器弃去 PBS 缓冲液，然后加入 2mL 0.25%胰蛋白酶（含 0.002% EDTA）缓冲液，轻轻晃动培养皿，使得胰蛋白酶缓冲液与整个培养皿底充分接触，室温静置 1 分钟左右，在显微镜下观察细胞形态，若细胞呈

现圆形，且细胞间开始出现明显的间隙，则表示消化完全；也可轻轻拍打培养皿，若有少量细胞被拍打的力震落皿底，则表示消化完全。

6) 用真空泵或移液器弃去胰蛋白酶缓冲液，加入 3mL 培养基，用移液器边吸边将仍处于贴壁状态的细胞温和地吹打至细胞皿底，使细胞分散为独立个体。反复多次吹打直至贴壁状态的细胞全部从培养皿底脱落并成单个。

7) 将 2mL 细胞悬液弃去，留下 1mL 细胞悬液，再补加 9mL 新鲜培养基，“8 字形”晃动培养皿，使得细胞在培养皿中均匀分布。

8) 放入 37 度培养皿中培养过夜，次日观察细胞密度与细胞形态。

2.3.2 稳定敲低细胞系的构建

2.3.2.1 shRNA 干扰载体的提取

本研究所使用的表达 shRNA 干扰载体的大肠杆菌克隆直接购自清华大学基因文库平台，下面以 Axygen 质粒 DNA 小量提取试剂盒为例进行说明。

1) 将 shRNA 干扰载体的大肠杆菌克隆接种至 4-8mL 氨苄抗性的 LB 培养基中，在摇床中 37 度 220 rpm 培养 12-16 小时。

2) 将菌液 3000rpm 离心 10min，弃去上清液留下菌体沉淀。

3) 向菌体沉淀加入 250 μ L Buffer S1，用移液器吹打或涡旋振荡使得菌体充分重悬。

4) 加入 250 μ L Buffer S2，轻柔地上下颠倒多次混匀至溶液清亮透彻。

5) 加入 350 μ L Buffer S3，轻柔地上下颠倒多次混匀，此时出现白色沉淀，静置 2-3min。

6) 12000rpm 离心 10min，收集上清液。

7) 将 DNA 制备管插在负压装置的接口上，开启调节负压，将上清液转移到制备中，缓慢吸走液体。

8) 加入 500 μ L Buffer W1，缓慢吸走液体。

9) 加入 700 μ L Buffer W2，缓慢吸走液体。

10) 重复上一步操作。将制备管置于 2mL 离心管中，12000rpm 离心 2min，弃去离心下来的液体。

11) 将制备管置于 1.5mL 离心管中, 开盖使得乙醇充分挥发, 加入 60-80 μ L 提前预热的 ddH₂O, 静置 3min, 12000rpm 离心 1min。

12) 使用微量分光光度计测定提取质粒的浓度与纯度后, 将 shRNA 干扰载体置于-20 度冰箱中保存, 用于后续实验。

2.3.2.2 慢病毒的包装与收集

慢病毒的包装采用三质粒包装法, 通过转染的方法在细胞中表达病毒包装质粒, 包膜制粒与目的基因质粒, 包装生产带有目的基因 shRNA 载体的慢病毒。下面以用 Vigofect 转染 293FT 细胞包装慢病毒为例。

1) 在显微镜下观察待转染细胞的状态, 保证细胞处于良好的状态, 在转染前一天将细胞铺至 24 孔板中, 保证第二天的细胞密度可以达到 80%-90%左右。

2) 转染前 1 小时, 给待转染细胞更换新鲜的完全培养基, 放回 37 度培养箱培养。

3) 将 0.6 μ g 包装质粒 psPAX2、0.4 μ g 包膜质粒 pMD2.G 与 0.4 μ g 目的基因载体加入 PBS 缓冲液中至总体积 25 μ L, 轻轻混匀, 室温放置。

4) 将 0.5 μ L Vigofect 转染试剂加入 PBS 缓冲液中至总体积 25 μ L, 轻轻混匀, 室温放置。

5) 将稀释的 Vigofect 逐滴加入稀释的 DNA 溶液中, 轻轻混匀, 所得的转染工作液在室温放置 15 分钟。

6) 将转染工作液轻轻混匀, 逐滴加入待转染细胞中, 轻轻地上下左右摇晃混匀, 放入 37 度培养箱中培养。

7) 转染后大约 12 小时, 更换原有培养基为新鲜的完全培养基。

8) 转染后大约 48 小时, 收集含有慢病毒的上清液至干净的 ep 管内, 3000 rpm 离心 5 分钟, 收集上清液至干净的 ep 管内。注意所有与病毒接触过的枪头与培养皿需要经过 50% 84 消毒液消毒 24 小时后才可丢弃。

9) 置于 4 度冰箱短期存放或-80 度冰箱长期存放。

2.3.2.3 慢病毒的感染

下面以使用慢病毒侵染 L929 细胞为例进行说明。

1) 转染后 48 小时开始准备病毒感染, 配制含有 16 μ g/mL 聚凝胺的新鲜完全培养基。

2) 用含有聚凝胺的新鲜完全培养基重悬状态良好的 L929 细胞, 将细胞传代至 24 孔板中, 使得 24 孔板每孔中细胞悬液为 200 μ L 且细胞密度为 60-70%。

3) 取病毒液, 每孔取 200 μ L 病毒液与细胞悬液 1:1 混合, 将病毒液逐滴加入细胞中, 轻轻地上下左右摇匀使得病毒液与细胞悬液充分混合。

4) 感染后 24 小时, 将含有病毒液的培养基弃去, 换为含有 6 μ g/mL 嘌呤霉素的新鲜完全培养基。

5) 嘌呤霉素药物筛选 48 小时后, 所有成功被病毒感染的细胞生长状态良好, 未经病毒感染的对照组细胞以及病毒感染失败的细胞全部死亡。

6) 将含有嘌呤霉素的培养基换为新鲜完全培养基, 扩增通过药物筛选的阳性细胞, 用于后续实验。

2.3.3 迁移体表型的高内涵成像

下面以 PerkinElmer 公司高内涵细胞成像分析系统为例进行说明。

1) 用 PBS 缓冲液以 1:100 的稀释比稀释纤连蛋白, 高内涵分析专用 96 孔培养皿中每孔加入 40 μ L 的纤连蛋白稀释液, 充分摇匀后放入 37 度培养箱中孵育 1 小时。

2) 取出高内涵分析专用培养皿, 弃去 PBS, 每孔加入 L929 细胞与新鲜完全培养基, 确保细胞密度不高于 20%, 放入 37 度培养箱培养 12 小时。

3) 用 4%多聚甲醛稀释 WGA 染料至稀释比为 1:1000^[13], 在每孔中加入 WGA 稀释液, 室温固定染色 30min。

4) 弃去固定液, 用 PBS 缓冲液洗三遍。将高内涵分析 96 孔培养皿置于高内涵细胞分析仪中, 设置荧光通道、焦面、荧光强度等拍摄参数, 拍摄获得迁移体的表型。

2.3.4 实时荧光定量 PCR

2.3.4.1 细胞 mRNA 的提取

本研究采用 Trizol 法提取细胞 mRNA，所有的枪头与 EP 管必须经过 DEPC 处理，实验者需佩戴口罩，避免 RNA 的降解与污染。下面以提取 6 孔板中细胞的 mRNA 为例进行说明。

- 1) 将细胞消化后用完全培养基重悬，用 PBS 重悬洗涤三次。
- 2) 加入 300 μ L Trizol 溶液吹打细胞，使得细胞与 Trizol 充分混匀，室温静置两分钟。
- 3) 加入 60 μ L 氯仿，立即剧烈涡旋振荡至溶液充分混匀，静置 2-3 分钟，使溶液分层
- 4) 4 度，12000g 离心 15 分钟后，溶液分为三层。
- 5) 取透明的最上层转移入新的 EP 管中，加入 300 μ L 异丙醇，充分混匀后-20 度静置 20 分钟。
- 6) 4 度，12000g 离心 15 分钟，EP 管底部出现白色沉淀。小心弃去上清液，加入 1mL 75%乙醇重悬洗涤沉淀。
- 7) 4 度，7500g 离心 5 分钟，小心弃去上清液。将沉淀置于超净台中风干 5-10 分钟。
- 8) 将干燥的 RNA 溶解于 20 μ L DEPC 水，微量分光光度计测定浓度后，保存于-80 度冰箱中。

2.3.4.2 细胞 mRNA 反转录为 cDNA

下面以 Takara 公司反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit 为例进行说明。

- 1) 在经过 DEPC 处理的 PCR 管中加入：

5× PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 μ L
PrimeScript RT Enzyme Mix	0.5 μ L
Oligo dT Primer	0.5 μ L
Random 6 mers	0.5 μ L
RNA	500ng
RNase Free dH ₂ O	定容至 10 μ L

- 2) 设置反转录的程序：

37°C	15min
85°C	5s
4°C	--

3) 程序结束后，加水补至 100μL，放入-20 度冰箱长期保存。

2.3.4.3 荧光定量 PCR 的体系配制

下面以擎科公司 TSINGKE® Master qPCR Mix 为例进行说明。

1) 配制荧光定量 PCR 反应体系：

2×TSINGKE® Master qPCR Mix	10μL
Primer F	0.8μL
Primer R	0.8μL
cDNA	1.4μg
ddH ₂ O	定容至 20μL

2) 将配好的溶液加入 qPCR 专用 96 孔板中，避免气泡。在 96 孔板上盖上专用的透明膜，离心后放入荧光定量 PCR 仪中进行反应。

3) 程序结束后得到数据，进行数据分析。

三、研究结果

前期实验发现，迁移体内含高磷酸化水平的受体蛋白，本研究选取了 20 个富集程度最高的高磷酸化蛋白进行筛选，每个基因使用两条靶向不同位点的 shRNA，通过慢病毒转染法实现靶基因的敲低，后续使用高内涵成像的方法对不同实验组的细胞进行成像，分析不同基因对迁移体形成的影响。

3.1 筛选系统有效性的验证

建立一个有效的筛选系统是筛选结果可靠性的前提条件。在本研究中，成功实现靶基因的敲低是筛选系统有效性的关键，一方面，在慢病毒侵染 L929 细胞后，我们会使用 6 μ g/mL 的嘌呤霉素处理细胞，筛选掉那些未被侵染的 L929 细胞，留下那些侵染成功的阳性细胞进行后续实验；另一方面，我们使用实时荧光定量 PCR 验证了靶基因的敲低（图 3.1）。为了提高筛选的效率，我们只验证了会显著影响迁移体形成的部分基因的敲低效率。

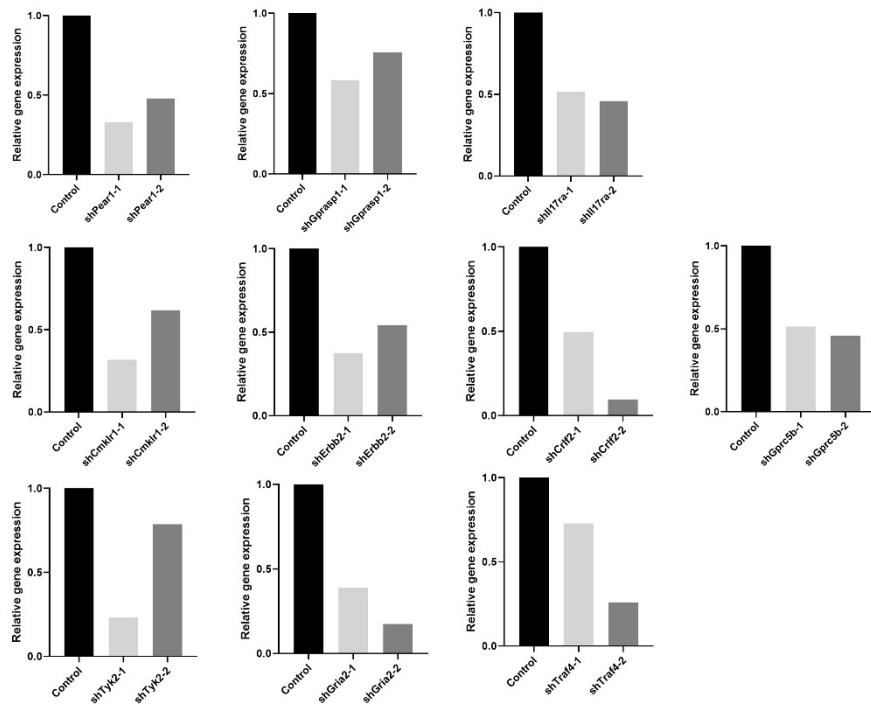


图 3.1 敲低效率验证结果

将慢病毒转染后经过嘌呤霉素筛选的阳性细胞培养于 6 孔板中，培养 12 小时后用 Trizol 法提取 RNA，再反转录为 cDNA，最后进行荧光实时定量 PCR 反应，反应后的数据以 GAPDH 作为内参归一化，目标基因表达量再以转染了 scrambled RNA 的对照组细胞的目标基因表达量进行二次归一化，纵坐标表示经过内参归一化后目标基因相比于对照组细胞的相对表达量。

3.2 筛选所得不同基因的表型

3.2.1 筛选表型的分类

根据高内涵分析的表型，我们可以将不同基因的表型分为四类，分别是迁移距离显著变短且迁移体数量显著减少；迁移距离变短且迁移体数量显著减少；迁移距离与迁移体数量无显著变化以及迁移距离无显著变化且迁移体数量显著增加（图 3.2.1，表 3.2.1）。另外，部分基因的两条 shRNA 表型不一致，且部分基因两次生物学重复的表型不稳定，这些基因的表型暂时无法归入以上四类，需要进一步的验证（表 3.2.1）。

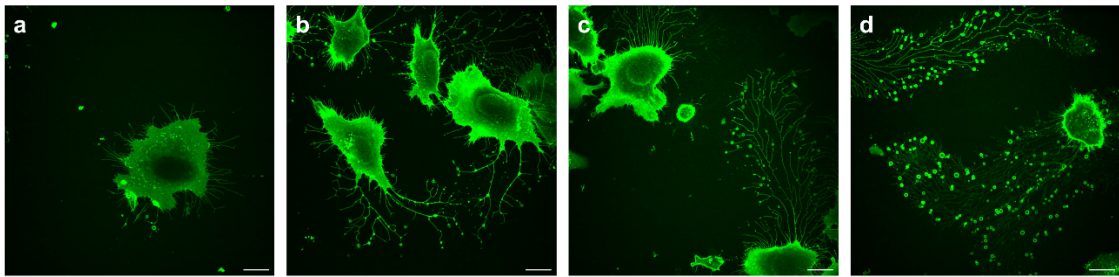


图 3.2.1 四类表型的代表性图像

a 代表迁移距离显著变短且迁移体数量显著减少；b 代表迁移距离变短且迁移体数量显著减少；c 代表迁移距离与迁移体数量无显著变化；d 代表迁移距离无显著变化且迁移体数量显著增加

表 3.2.1 不同基因表型的分类

基因名称	迁移距离	迁移体形成数量
Crlf2, Cmklr1, Gprasp1 Erb2, Pear1, Il17ra	--	--
Tyk2, Gria2, Traf4, Gprc5b	-	--
Ptp ra , Igflr	=	=
Ddr2	=	++
Ephb4, Gria4, Gpr35, Grk5	两条shRNA表型不一致	
Scarb1, Tbx2r	表型不稳定	

根据高内涵分析的结果根据迁移距离与迁移体数量对不同基因的表型进行分类；
--表示显著减少；-表示非显著地减少；=表示无显著变化；++表示显著增加。

3.2.2 对迁移体形成没有显著影响的部分基因

经过一次实验的初步筛选，我们首先筛选到了一些对迁移体形成没有显著影响的部分基因，分别是 *Igfl1r* 与 *Ptpra*（图 3.1a）。与转染不靶向任何基因的乱码序列 scrambled shRNA 的对照组相比，*Igfl1r*, *Ptpra* 的敲低没有造成平均每个细胞产生迁移体数量的显著变化（图 3.1b）。由于这些基因在初筛后被认定为对迁移体无显著影响的基因，因此只做了一次生物学重复。

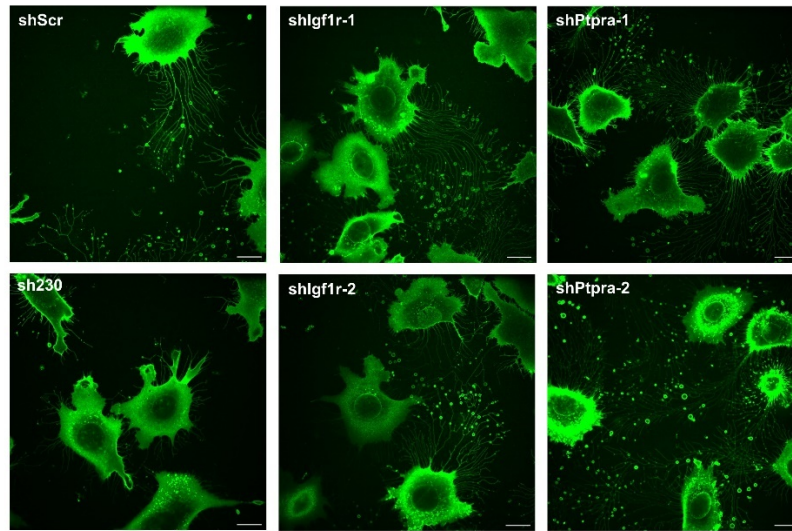


图 3.1a 不同基因敲低表型

将不同的 shRNA 载体通过慢病毒转染 L929 细胞，嘌呤霉素筛选得到阳性细胞后将细胞培养于纤连蛋白包被过的 96 孔板中，培养 12 小时，固定染色后进行拍摄；图中-1 或-2 分别表示靶向同一基因的两条不同的 shRNA，sh230 为抑制迁移体形成的阳性对照，shScr 为不靶向任何基因的阴性对照，标尺为 20 μ m

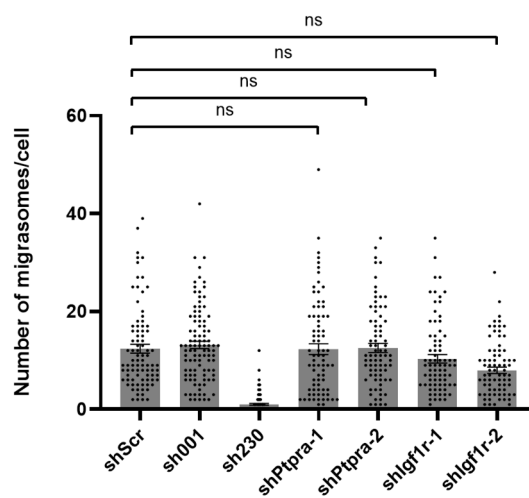


图 3.1b 敲低不同的基因对单个细胞产生迁移体的影响

将高内涵分析仪拍摄的图像收集后，对每个细胞产生的迁移体数量进行统计，每组统计 50 个细胞，利用 GraphPad Prism 8 进行非配对 t 检验（双侧检验），**** $P < 0.0001$

3.2.2 显著促进迁移体形成的部分基因

在初步筛选的过程中，我们也筛选到了一个可能促进迁移体形成的基因 Ddr2，与转染 scrambled shRNA 的对照组相比，Ddr2 敲低使得每个细胞产生迁移体的数量显著性增加了（图 3.2.2b），并且细胞产生的收缩丝密度更高，形成的迁移体尺寸也相对更大，结构也更加饱满完整（图 3.2.2a）。由于在初次筛选中，该基因被认定为对迁移体形成无抑制作用的阴性基因，因此没有进行二次实验的验证，后续还需要进行更多次的重复验证该表型。

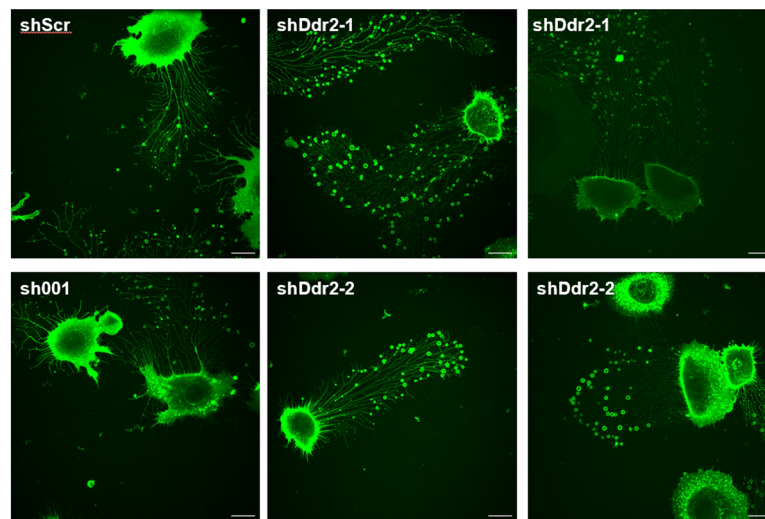


图 3.2.2a Ddr2 基因敲低表型

将不同的 shRNA 载体通过慢病毒转染 L929 细胞，嘌呤霉素筛选得到阳性细胞后将细胞培养于纤连蛋白包被过的 96 孔板中，培养 12 小时，固定染色后进行拍摄。图中-1 或-2 分别表示靶向同一基因的两条不同的 shRNA，sh001 为促进迁移体形成的阴性对照，shScr 为不靶向任何基因的阴性对照，标尺为 20 μ m

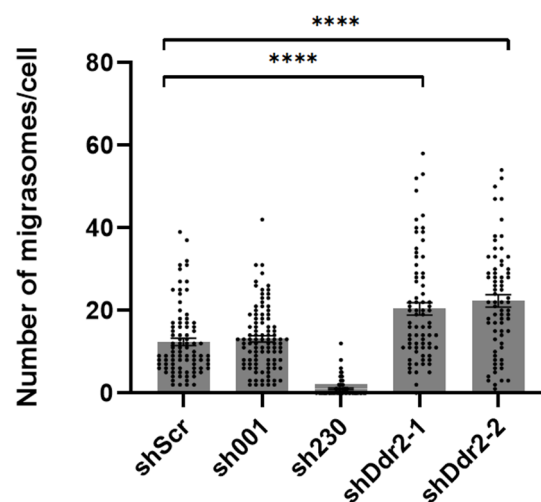


图 3.2.2b 敲低不同的基因对单个细胞产生迁移体的影响

将高内涵分析仪拍摄的图像收集后，对每个细胞产生的迁移体数量进行统计，每组统计 100 个细胞，利用 GraphPad Prism 8 进行非配对 t 检验（双侧检验），****P<0.0001

3.2.3 显著抑制迁移与迁移体形成的部分基因

经过两次生物学重复的验证，我们也筛选到了一些对迁移体形成具有显著影响的一部分基因，与转染 scrambled shRNA 的对照组相比，这些基因的敲低导致平均每个细胞产生的迁移体数量显著性地降低了（图 3.2.3c）。与野生型细胞相比，Gprasp1, Il17ra 以及 Pear1 敲低导致大部分细胞失去了迁移能力，而对于少数能够迁移的细胞，它们产生的收缩丝与迁移体的形态也不同于正常的细胞（图 3.2.3a），说明这些基因很可能是通过影响细胞自身的迁移能力来影响迁移体的形成。我们也用荧光定量 PCR 的方法验证了这些基因的敲低效率，Il17ra 与 Pear1 基因的敲低效率都大于 50%，Gprasp1 基因的敲低略高于 50%（图 3.1），但表型显著，提示细胞迁移能力与产生迁移体的能力对 Gprasp1 的表达量较为敏感。

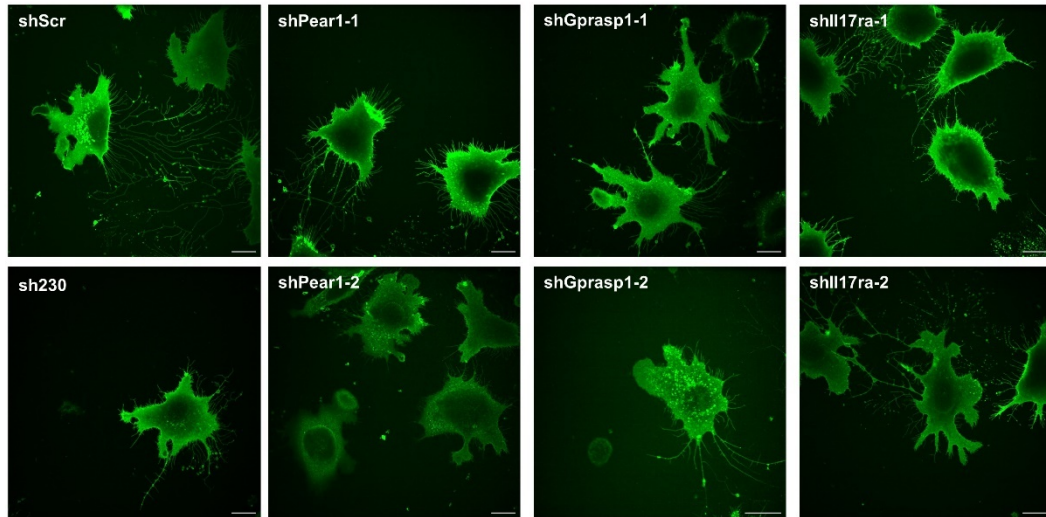


图 3.2.3a 不同基因敲低表型

将不同的 shRNA 载体通过慢病毒转染 L929 细胞，嘌呤霉素筛选得到阳性细胞后将细胞培养于纤连蛋白包被过的 96 孔板中，培养 12 小时，固定染色后进行拍摄。图中-1 或-2 分别表示靶向同一基因的两条不同的 shRNA，sh230 为抑制迁移体形成的阳性对照，sh001 为促进迁移体形成的阴性对照，shScr 为不靶向任何基因的阴性对照，标尺为 20μm

同样，Crlf2, Cmkrl1, Erbb2 的敲低也会显著性地抑制细胞迁移，并影响细胞产生的收缩丝与迁移体的形态（图 3.2.3b）以及迁移体的形成（图 3.2.3c）。荧光定量 PCR 实验也验证了这些基因的敲低效率（图 3.1）。

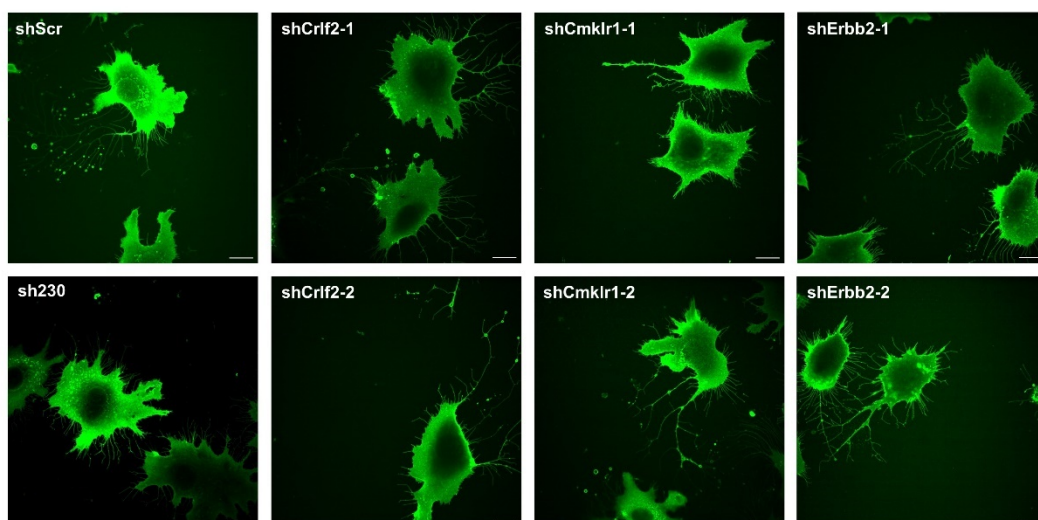


图 3.2.3b 不同基因敲低表型

将不同的 shRNA 载体通过慢病毒转染 L929 细胞，嘌呤霉素筛选得到阳性细胞后将细胞培养于纤连蛋白包被过的 96 孔板中，培养 12 小时，固定染色后进行拍摄。图中-1 或-2 分别表示靶向同一基因的两条不同的 shRNA，sh230 为抑制迁移体形成的阳性对照，sh001 为为促进迁移体形成的阴性对照，shScr 为不靶向任何基因的阴性对照，标尺为 20 μ m

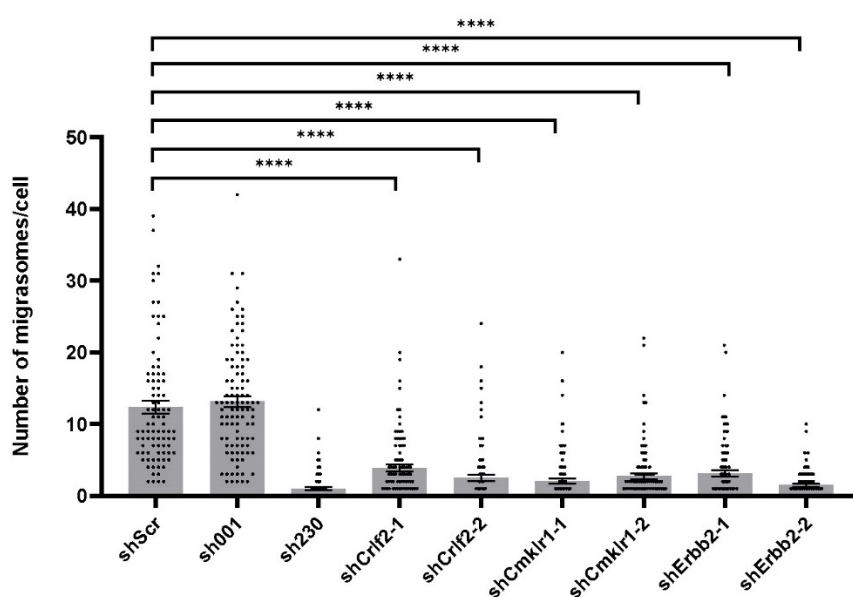


图 3.2.3c 敲低不同的基因对单个细胞产生迁移体的影响

将高内涵分析仪拍摄的图像收集后，对每个细胞产生的迁移体数量进行统计，每组统计 100 个细胞，利用 GraphPad Prism 8 进行非配对 t 检验（双侧检验），****P<0.0001

3.2.4 不影响细胞迁移但影响迁移体形成的部分基因

Tyk2, Traf4, Gria2 以及 Gprc5b 基因敲低后，细胞迁移以及产生迁移体的能力也受到了抑制（图 3.2.4a），但是相较于上述基因，细胞迁移的能力并没有完全地被抑制，因此除了平均每个细胞产生迁移体数量之外（图 3.2.4b），我们另

外统计了单位长度收缩丝上的迁移体数量以相对特异地衡量特定基因对细胞迁移体形成的影响，我们发现单位长度收缩丝上迁移体的数量较对照组显著地降低了（图 3.2.4c）。这说明 Tyk2, Traf4, Gria2 以及 Gprc5b 可能存在独立于影响细胞的迁移能力的机制来影响迁移体形成。实时荧光定量 PCR 也验证了这几个基因的敲低（图 3.1）。

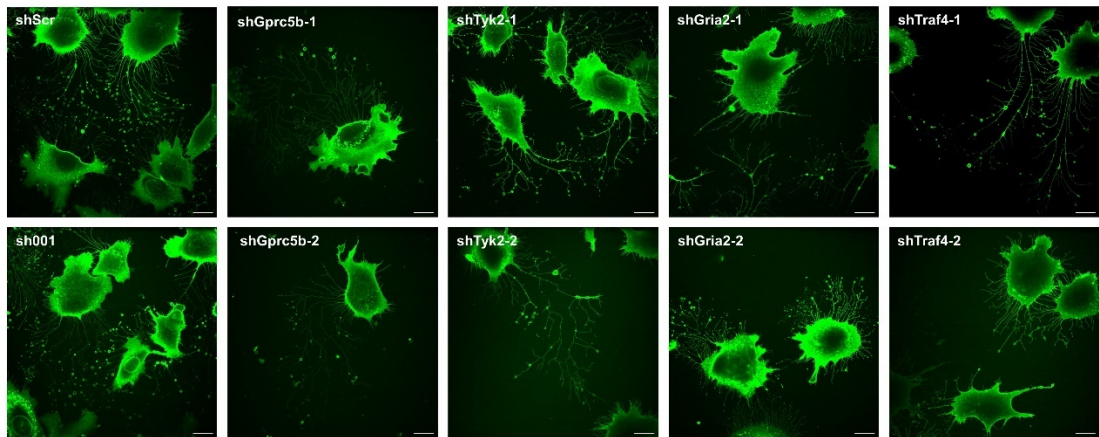


图 3.2.4a 不同基因敲低表型

将不同的 shRNA 载体通过慢病毒转染 L929 细胞，嘌呤霉素筛选得到阳性细胞后将细胞培养于纤连蛋白包被过的 96 孔板中，培养 12 小时，固定染色后进行拍摄。图中-1 或-2 分别表示靶向同一基因的两条不同的 shRNA，sh001 为促进迁移体形成的阴性对照，shScr 为不靶向任何基因的阴性对照，标尺为 20μm

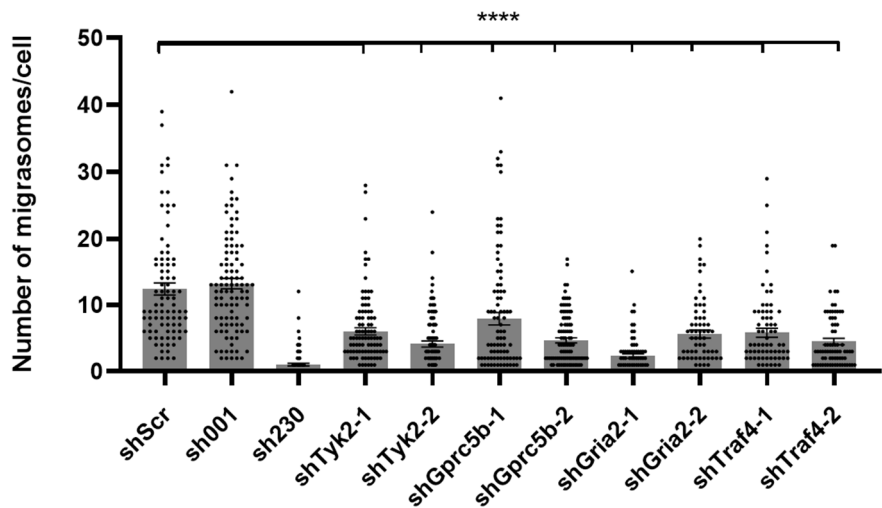


图 3.2.4b 敲低不同的基因对单个细胞产生迁移体的影响

将高内涵分析仪拍摄的图像收集后，对每个细胞产生的迁移体数量进行统计，每组统计 100 个细胞，利用 GraphPad Prism 8 进行非配对 t 检验（双侧检验），****P<0.0001

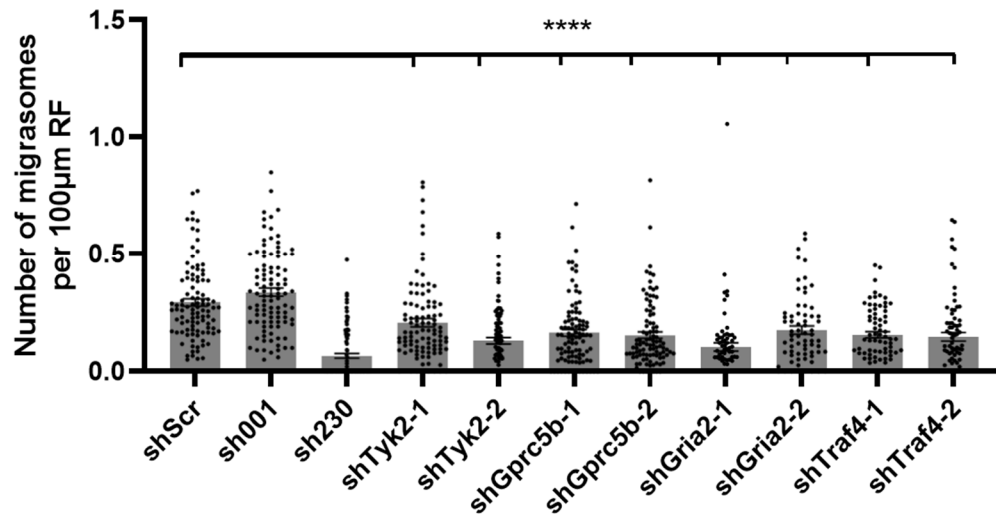


图 3.2.4c 敲低不同的基因对单位长度收缩丝上迁移体数量的影响

将高内涵分析仪拍摄的图像收集后，对每个细胞产生的迁移体数量进行统计，每组统计 100 个细胞，利用 GraphPad Prism 8 进行非配对 t 检验（双侧检验），****P<0.0001

四、讨 论

4.1 论文总结

本研究通过遗传筛选的手段筛选到了若干个对迁移体形成存在显著影响的基因，其中大部分基因对细胞迁移具有显著性地抑制作用，少部分基因对细胞迁移本身的抑制作用不大，但仍然能够显著抑制迁移体的形成。值得注意的是，本研究的初步筛选中发现 *Ddr2* 基因的敲低可以显著性地促进迁移体的形成，由于初步筛选中只选取了对迁移体形成存在抑制作用的基因做进一步的验证，*Ddr2* 对迁移体形成的促进作用需要多次生物学重复的验证，若表型稳定，探索该表型背后的机制将很有意思。另外，还有一部分基因对于迁移体形成的作用有待进一步验证，因为对于这些基因，靶向同一基因的两条 shRNA 实验组具有不一样的表型（图 4.1a, 4.1b）。造成这一现象可能的原因包括其中某一条 shRNA 存在脱靶效应造成敲低效率很低，也可能因为被敲除的基因存在 isoform，敲低一个基因的 isoform 导致了该基因其它 isoform 的回补表达。后续需要通过进一步的荧光定量 PCR 来验证两条 shRNA 的敲低效率，并且需要通过生物学重复来验证同一基因两条 shRNA 敲低产生的不同表型，再通过重新设计 shRNA 来更好地实现基因的敲低。

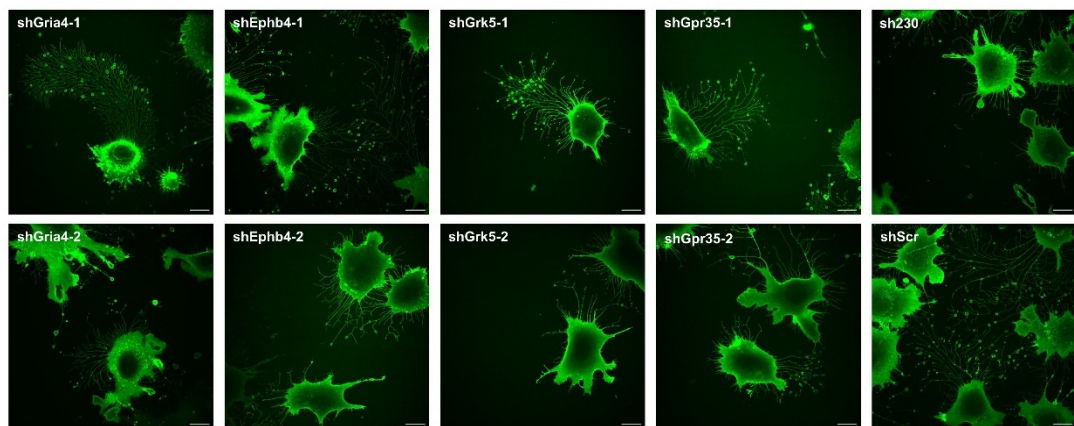


图 4.1a 不同基因敲低后细胞的典型代表图

将不同的 shRNA 载体通过慢病毒转染 L929 细胞，嘌呤霉素筛选得到阳性细胞后将细胞培养于纤连蛋白包被过的 96 孔板中，培养 12 小时，固定染色后进行拍摄。图中-1 或-2 分别表示靶向同一基因的两条不同的 shRNA，sh230 为抑制迁移体形成的阳性对照，sh001 为促进迁移体形成的阴性对照，shScr 为不靶向任何基因的阴性对照，标尺为 20 μ m

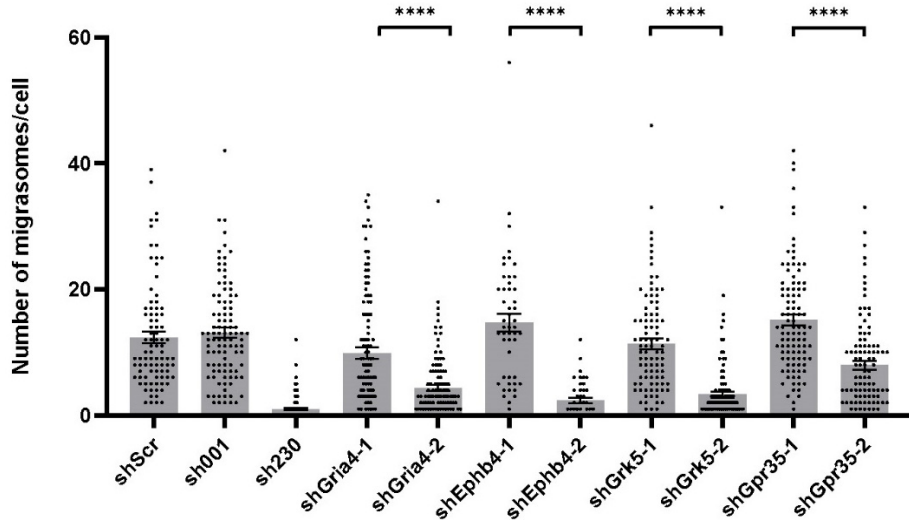


图 4.1b 敲低不同的基因对单个细胞产生迁移体的影响

将高内涵分析仪拍摄的图像收集后，对每个细胞产生的迁移体数量进行统计，每组统计 100 个细胞，利用 GraphPad Prism 8 进行非配对 t 检验（双侧检验），****P<0.0001

本研究也存在许多局限性，首先是实验技术的局限性，由于现在缺少较好的自动识别图像中的迁移体并进行计数的方法，迁移体的计数是完全靠人工完成的，人工计数会存在一定的误差以及潜在的主观性，这会对迁移体数量的定量以及表型的判断造成一定的偏差；再者，由于筛选的高通量性，本研究采取的成像手段为高内涵分析仪器自动批量成像，内涵仪器自动成像存在一定的锁焦问题，它并不能保证每一个视野都能找到最佳的成像焦面，焦面的不准确可能会影响迁移体的成像形态，进而影响迁移体的人为识别与定量计数；另外，实验操作的稳定与否对细胞状态的影响不可忽视，例如病毒滴度过高或者过低都会影响细胞自身的状态，从而对基因敲低表型的判断带来影响，设置严格的对照组以及进行多次生物学重复可以在很大程度上避免这些问题。其次是研究方法的局限性，本研究采取的 shRNA 敲低的手段虽然相比于构建基因敲除细胞系具有时间周期短，操作更加简单的优势，但是对于那些只需要较少的表达量即可发挥作用的基因，基因敲低筛选可能会产生假阴性结果，同样，shRNA 的脱靶效应也有可能造成假阴性结果；另外，本研究由于时间的限制只对每个基因进行了两次生物学重复，初步筛选所得基因还需要进行进一步的验证，包括基因敲除验证以及回补实验验证，建立基因与表型之间的因果性。

总得来说，该研究筛选到了一些潜在的具有调控迁移体功能的基因，为发现新的迁移体调控机制提供了思路，探索迁移体在这些基因参与的生物学过程中发挥的具体作用也将很有意思。

4.2 论文展望

首先，本研究筛选所得基因调控迁移体形成的机制有待进一步探索。对于那些不完全抑制细胞迁移但可以显著抑制迁移体形成的基因，可以进一步探索它们特异性调控迁移体形成的机制，例如有研究报道了 *Gprc5b* 可以在脂质诱导的代谢压力下通过招募 *Fyn* 磷酸化 *SMS2* 蛋白，增加 *SMS2* 在细胞膜上的富集程度^[14]。*Gprc5b* 是否可能通过调控 *SMS2* 的磷酸化调控迁移体的形成是一个值得进一步探索的问题。后续可以通过敲除 *Gprc5b* 或者使用 *Gprc5b* 抑制剂处理细胞后观察迁移体形成的变化，也可以通过抑制 *Fyn* 的活性观察迁移体形成的变化。对于其它暂时无法提出明确的调控迁移体形成假设的基因，在经过进一步验证确定表型稳定的基础上，可以通过活细胞成像等细胞生物学手段获得蛋白的精确亚细胞定位，定位的动态变化等信息来推断基因发挥功能的机制；可以通过遗传学的手段调控基因的上下游基因，从而获知特定的信号通路在迁移体形成中扮演的作用；也可以通过免疫沉淀，质谱等生物化学手段得知蛋白发挥功能的形式以及具体的作用机制。

其次，本研究筛选所得基因调控迁移体形成的具体生物学功能有待进一步探索，例如该研究中筛选所得表型最为显著的基因 *Gprasp1* 是 G 蛋白偶联受体相关分选蛋白，它可以介导 G 蛋白偶联受体由内体向溶酶体转运并被溶酶体降解，从而下调 G 蛋白偶联受体相关信号通路。迁移体内高度富集磷酸化的 *Gprasp1* 并且 *Gprasp1* 敲低显著抑制迁移体形成的现象也提示了迁移体可能参与 G 蛋白偶联受体相关信号通路的动态调控；又比如 *Tyk2* 是 JAK 家族蛋白之一，在 JAK-STAT 通路的激活中扮演重要的作用，迁移体是否可能参与 JAK-STAT 相关通路的调控也是未知的。本研究筛选所得其它基因也参与了很多信号通路的调控，研究迁移体在信号通路调控中的作用将具有重要的意义。

最后，本文筛选所得基因虽然对迁移体形成会有影响，但是仍然不是完全独立于细胞迁移之外特异性地影响迁移体的形成，一个核心且特异性调控迁移

体的基因仍然有待发现。这一方面需要进行更高通量的筛选工作，另一方面需要建立一个更加完善的筛选系统，特别是需要一个易于分析检测的读出结果，现有的以成像为手段的读出系统仍然具有较高的不稳定性，找到一个兼具特异性与普适性的迁移体标志蛋白将有助于迁移体的机器识别的无差定量。

参考文献

- [1] MA L, LI Y, PENG J, et al. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration[J]. *Cell Research*, 2015, 25(1): 24-38.
- [2] CHEN L, MA L, YU L. WGA is a probe for migrasomes[J]. *Cell Discovery*, 2019, 5(1): 13.
- [3] JIAO H, JIANG D, HU X, et al. Mitocytosis, a migrasome-mediated mitochondrial quality-control process[J]. *Cell*, 2021, 184(11): 2896-2910.e13.
- [4] ZHU M, ZOU Q, HUANG R, et al. Lateral transfer of mRNA and protein by migrasomes modifies the recipient cells[J]. *Cell Research*, 2021, 31(2): 237-240.
- [5] JIANG D, JIANG Z, LU D, et al. Migrasomes provide regional cues for organ morphogenesis during zebrafish gastrulation[J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(8): 966-977.
- [6] ZHANG C, LI T, YIN S, et al. Monocytes deposit migrasomes to promote embryonic angiogenesis[J]. *Nature Cell Biology*, 2022, 24(12): 1726-1738.
- [7] 谢任翔, 姜东, 俞立. 迁移体的生物学功能[J]. *中国细胞生物学学报*, 2024, 46(01): 3-10.
- [8] LIANG H, MA X, ZHANG Y, et al. The formation of migrasomes is initiated by the assembly of sphingomyelin synthase 2 foci at the leading edge of migrating cells[J]. *Nature Cell Biology*, 2023, 25(8): 1173-1184.
- [9] DING T, JI J, ZHANG W, et al. The phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate-Rab35 axis regulates migrasome formation[J]. *Cell Research*, 2023, 33(8): 617-627.
- [10] WU D, XU Y, DING T, et al. Pairing of integrins with ECM proteins determines migrasome formation[J]. *Cell Research*, 2017, 27(11): 1397-1400.
- [11] HUANG Y, ZUCKER B, ZHANG S, et al. Migrasome formation is mediated by assembly of micron-scale tetraspanin macrodomains[J]. *Nature Cell Biology*, 2019, 21(8): 991-1002.
- [12] 王维丝, 黄雨薇. 迁移体生物发生的时空图谱[J]. *中国细胞生物学学报*, 2024, 46(01): 11-20.
- [13] 伍丹妮. 迁移体形成的机制研究[D]. 清华大学, 2018.
- [14] Kim YJ, Greimel P, Hirabayashi Y. GPRC5B-Mediated Sphingomyelin Synthase 2 Phosphorylation Plays a Critical Role in Insulin Resistance. *iScience*[J]. 2018 Oct 26;8:250-266.

致 谢

行文至此，落笔为终。我的四年本科生涯转瞬即逝，回首这段美好的旅程，曾经哭过，笑过，迷茫过；那些陪伴过我的人，帮助过我的人，那些美好的一个个瞬间，都如电影画面一般如此生动地在我的脑中一帧一帧地闪过。目光所及，皆是回忆，感恩生命中的每一个遇见，每一个选择。

感谢我的父母对我每一个选择的无条件支持和理解，作为我生命中最重要的人，你们是我身后最坚强的后盾，因为你们，我变得勇敢。希望我能早日成才，也成为你们身后最坚强的后盾。

感谢俞立教授给我一个在实验室完成毕业设计的机会，让我见识到了一个站在领域最前线的顶尖实验室是如何做科学的，我被俞老师对迁移体研究的专注与热情所感动；感谢李继喜教授在 Dreamlab 课题与启明星计划课题中给予我的指导，这些指导对初次踏入生物科研殿堂的我来说弥足珍贵。

感谢项雨涵师姐在我进入俞立老师实验室后给予我的所有帮助，雨涵师姐对于实验细节的把握，对于自己课题的积极推进程度以及思考的深度，与课题组其他师兄师姐交流的能力都非常值得我学习，我也非常感谢师姐在实验技能，实验设计与实验结果分析上给予我的指导，来到 yulab 遇到师姐是 serendipity，也是我的幸运。感谢钟丘实师兄，作为第一个主动加我微信的 yulab 师兄，你的风趣幽默给我带来了无数的笑容，也感谢刘思远师兄，和你们打球的日子非常快乐。感谢杜万清师兄，姜东师兄在我进入实验室前后对我的帮助。感谢郑翌师姐，你的爽朗的笑容和风趣有料的梗让我印象深刻，希望我有朝一日能在三秒内接住你的梗。感谢石林师姐，每个和你一起吃饭的中午都是实验室繁忙生活中身心最放松的时光。感谢赵文康师兄，谢任翔师兄，高明一师兄，王东锟师姐等 yulab 师兄师姐对我给予过的帮助与陪伴。

感谢我的室友们，龙哥，予衍，本科几年与你们朝夕相处的日子非常开心。感谢我的挚友 Handsome 佳骏，和你吃喝玩乐的日子还会更多；感谢 Lillian，谢谢你让我知道了爱一个人和被爱是什么感觉，希望远赴美国的你一切顺利。感谢 20sky 所有同学与姜鹤辅导员，让我的本科三年有集体归属感。

最后，感谢我自己一直以来的付出，希望自己变得更好，常开心，常健

康。

一段旅程的结束是另一段旅程的开始，我希望我能在写若干年后的博士论文致谢时还能感恩周围的人，感恩自己，不忘初心。希望我能在博士科研生涯中投入热情，享受其中，始惊，次醉，终狂。

毕业快乐!