

# 一种在紫外敏感型视锥细胞中特异表达 tdTomato 的转基因斑马鱼系的构建

陈哲, 宋著, 王雅冬, 赵呈天\*

(中国海洋大学海洋生物多样性与进化研究所, 山东 青岛 266003)

**【摘要】** 目的 鉴于目前对斑马鱼视锥细胞视蛋白运输机制并不明确,且缺乏相应的抗体,本实验拟构建一种可以在视锥细胞中特异表达荧光的转基因斑马鱼。方法 利用编码紫外敏感型视蛋白基因(*sus1*)的启动子,构建了一种在紫外敏感型视锥细胞中特异表达红色荧光蛋白 tdTomato 的转基因斑马鱼。同时,将 tdTomato 荧光蛋白与非洲爪蟾 rhodopsin 蛋白末端 44 个氨基酸相融合,将该融合蛋白定位于紫外敏感型视锥细胞的外节段,进而可模拟内源性视蛋白的定位。结果 共筛选出三种不同品系的转基因斑马鱼,经过免疫组化分析,确定其中一种转基因品系是正确的目标品系。结论 该转基因斑马鱼的构建将会为进一步研究视锥细胞中视蛋白的运输机制提供帮助。

**【关键词】** 斑马鱼;视锥细胞;紫外敏感型; SWS1; UV opsin; 转基因

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0453-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.05.003

## Establishment of a transgenic zebrafish line with tdTomato expression in the ultraviolet-sensitive cone photoreceptors

CHEN Zhe, SONG Zhu, WANG Ya-dong, ZHAO Cheng-tian

(Institute of Evolution & Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

**【Abstract】 Objective** To better understand the mechanisms of cone opsin transport, we set to generate a transgenic zebrafish line with red fluorescence proteins expressing in the cone photoreceptors. **Methods** We used *sus1* promoter to drive the expression of a chimerical protein, in which the last 44 amino acids of rhodopsin of *Xenopus laevis* were fused to the C-terminus of tdTomato to restrict its localization to the outer segment of photoreceptors. **Results** We successfully isolated such a transgenic zebrafish line and confirmed the localization of tdTomato by immunostaining analysis. **Conclusions** This transgenic zebrafish line will help us to better understand the transport mechanisms of cone opsins, especially the transport in live photoreceptors.

**【Key words】** Zebrafish; Cone photoreceptor; Ultraviolet-sensitive; *sus1*; UV opsin; Transgene

感光细胞是接收光信号并将其传递至大脑形成视觉的第一场所,是视网膜中最重要神经元细胞之一。感光细胞由外节段(outer segment)、内节段(inner segment)、细胞核区及突触区等部分组成,其中外节段与内节段由连接纤毛(connecting cilium)相连,是外节段蛋白运输的主要通道(图 1A)。根

据外节段的形状差异,感光细胞可分为视杆细胞(圆柱形)和视锥细胞(圆锥形)两种,其中视杆细胞可感受弱光形成暗视觉,视锥细胞可感受强光形成明视觉,并具有颜色识别性<sup>[1]</sup>。感光细胞接收光信号主要是通过一种 G 蛋白偶联的跨膜受体蛋白——视蛋白(opsin)来完成。视蛋白产生于感光

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31372274,81301718)。

[作者简介] 陈哲(1995 -),男,生物化学与分子生物学专业,本科,研究方向:斑马鱼眼睛发育。E-mail: craz2012@126.com

[通讯作者] 赵呈天,教授,研究方向:胚胎发育。E-mail: chengtian\_zhao@ouc.edu.cn

细胞内节段,通过连接纤毛运输到外节段,富集于外节段内的膜盘(membrane disk)上行使功能。依据对光线敏感程度的差异,视锥细胞视蛋白可分为长波敏感型(long-wavelength sensitive, LWS)(红光敏感)、中波敏感型(middle-wavelength sensitive, MWS)(绿光敏感)和短波敏感型(short-wavelength sensitive, SWS)(蓝光敏感)三种。相应的,视锥细胞也分为 L 型、M 型以及 S 型等三种不同类型。在部分脊椎动物(如斑马鱼)中,除了上述几种感光色素之外,还存在一种对紫外敏感的短波敏感型视蛋白,即 SWS1(short-wavelength sensitive type 1)视蛋白或 UV 视蛋白<sup>[2,3]</sup>。

斑马鱼具有与人类似的视网膜组成,其感光细胞的结构及功能与人类似,且发育时间较短,是理想的研究感光细胞的发育及视觉形成机制的模式动物。斑马鱼有五种感光细胞,包括一种视杆细胞和四种视锥细胞<sup>[4]</sup>。其中红光敏感型和绿光敏感型视锥细胞可相互结合,形成双锥细胞,紫外敏感型和蓝光敏感型视锥细胞均为单锥细胞,且紫外敏感型视锥细胞长度要短于蓝光敏感型视锥细胞。斑马鱼感光细胞首次出现在胚胎发育至 43~48 hpf(hour post fertilization)之间,在胚胎发育至 72 hpf 后,形成较为成熟的感光细胞层。对不同视蛋白基因的原位杂交结果表明,红光敏感的视锥细胞首先出现,然后是绿光敏感型和蓝光敏感型,紫外敏感型的视锥细胞最晚形成<sup>[5,6]</sup>。在成熟的斑马鱼视网膜中,感光细胞具有非常精细的马赛克排列方式,这种排列与细胞极性蛋白 Crumbs 的存在密切相关<sup>[7]</sup>。

感光细胞凋亡与多种人类疾病密切相关,包括视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP), Leber's 先天性黑朦症(Leber's congenital amaurosis, LCA)等,是导致人类失明的重要原因,研究表明视蛋白的功能及运输缺陷是导致感光细胞凋亡的重要诱因<sup>[8,9]</sup>。由于外节段缺乏相应的蛋白合成系统,所有蛋白均是在内节段合成,经连接纤毛运输至外节段(图 1A),该运输环节出现问题可导致感光细胞的凋亡,因此研究视蛋白的运输机制显得尤为重要。

对斑马鱼视蛋白运输机理研究的一个重要手段是通过抗体免疫染色,分析视蛋白的定位,而目前仅视杆细胞的视蛋白有较好的抗体,对视锥细胞视蛋白的抗体使用较少。同时,由于不同视锥细胞视蛋白在结构上存在非常大的相似性,其抗体使用也存在着交叉结合的风险。为了更好的研究斑马鱼视

蛋白运输的分子机制,我们利用 *sus1* 视蛋白基因的启动子构建了一种在紫外敏感型感光细胞中特异表达荧光蛋白 *tdTomato* 的转基因斑马鱼。我们将 *tdTomato* 基因与编码非洲爪蟾 rhodopsin 末端 44 个氨基酸的基因片段相连接,后者可帮助 *tdTomato* 定位至视锥细胞的外节段,并模拟视蛋白的运输及定位<sup>[10,11]</sup>。我们已成功获得了相应的转基因斑马鱼,并验证了其表达的特异性,该转基因斑马鱼将为进一步研究视锥细胞视蛋白的运输机制提供便利。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验所用野生型斑马鱼为 Tübingen 品系,由中国海洋大学药学院分子医学生物学研究室获得。同时,为减少荧光观测时黑色素的干扰,我们将所获得的转基因品系与斑马鱼白化突变体 albino 进行了交配。

### 1.2 载体构建

首先,将 5.5 kb *sus1* 基因启动子(从 Dr Kawamura 处获得)克隆至 Gateway 载体 p5E-MCS 上;后通过 PCR 扩增含有 HA 标签序列的 *tdTomato* 基因,并通过 BP 反应将该片段连接到 pDONR221 载体中(所用扩增引物为:HA-TOM-P5: ATGTACCATACGATGTTCC-AGATTACGCTGTGAGCAAGGGCGAGGAG, HA-TOM-P3: GGGGACCACTTTGTACAAG-AAAGCTGGGTACTTGTACAGCTCGTCCATGC),编码爪蟾 opsin 羧基端 44 氨基酸的片段克隆至 p2rp3 载体<sup>[11]</sup>,最后将上述三个载体与目标载体 pDEST-Tol2pA2 通过 Multisite Gateway 的方式进行连接,具体载体信息见参考文献<sup>[12]</sup>。

### 1.3 显微注射及转基因品系筛选

将表达载体与编码转座酶(transposase)的 mRNA 共同注射至单细胞时期的斑马鱼胚胎中,注射终浓度分别为 30 ng/ $\mu$ L 和 100 ng/ $\mu$ L。5 d 后,在荧光显微镜下挑选眼睛有红色荧光的胚胎进行养殖,至成鱼后进行随机交配,筛选 F1 代眼睛有红色荧光的 F0 品系。

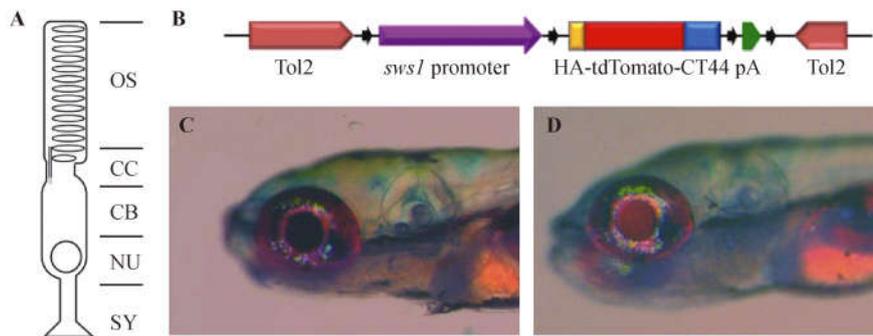
### 1.4 冰冻切片及免疫组化

首先将胚胎或成鱼眼睛用 4% 多聚甲醛 4℃ 固定过夜,1 × PBST 洗两次,每次 5 min,然后加入含 30% 蔗糖的 PBST 脱水;4℃ 过夜后,将胚胎放入冰冻包埋剂中,调整到合适位置,置于 -20℃,包埋剂凝固后进行冰冻切片机切片,厚度约 12  $\mu$ m。收集

的切片置于室温干燥 4 h 或者 4℃ 过夜, 然后 PBST 水化, 用封闭液 (10% 山羊血清, 90% PBST, 0.5% Triton X-100) 封闭 45 min; 加入一抗, 4℃ 过夜; 之后 1 × PBST 洗 3 次, 加入二抗, 室温反应 4 h, 1 × PBST 洗 2 次, 然后进行共聚焦显微镜 (Leica Sp8) 观测。本实验所用抗体比例为: zpr-1 小鼠单克隆抗体 (ZIRC, 1:250), zpr-3 小鼠单克隆抗体 (ZIRC, 1:250) 以及 HA 单克隆抗体 (Santa Cruz, 1:250)

## 2 结果

### 2.1 载体构建



注: A: 视杆细胞的结构示意图; B: Tol2 转基因表达载体示意图; C, D: 注射表达载体 5 d 后幼鱼眼睛荧光照片, 注射幼鱼 (D) 在眼睛晶体中有明显红色荧光, 而未注射幼鱼 (C) 眼睛仅有自发荧光现象。A 中缩写词: OS (outer segment): 外节段; CC (connecting cilium): 连接纤毛; CB (cell body): 细胞体; NU (nucleus): 细胞核; SY (synapse): 突触。

图 1 表达载体构建及显微注射

Note. A: Diagram of a rod photoreceptor cell; B: Diagram of the Tol2 construct for making transgenic line; C, D: Images of 5 dpf zebrafish larvae showing red fluorescence in the lens of injected embryo (D), while only auto-fluorescence exists in the control larvae (C).

Fig. 1 Diagram of microinjection and Tol2 construct

### 2.2 显微注射及转基因筛选

将该表达载体和编码转座酶的 mRNA 共同注射到单细胞时期的斑马鱼胚胎中, 在胚胎发育至 5 d 时, 在眼睛晶体处有明显的荧光表达 (图 1D)。后我们进行了大量注射培养, 共获得约 50 条 F0 成鱼。之后, 对 F0 进行随机交配, 筛选 F1 代具有荧光特异表达的品系。在筛选的过程中, 由于眼睛存在自发荧光现象 (图 1C, D), 我们通过冰冻切片进行了进一步的验证。

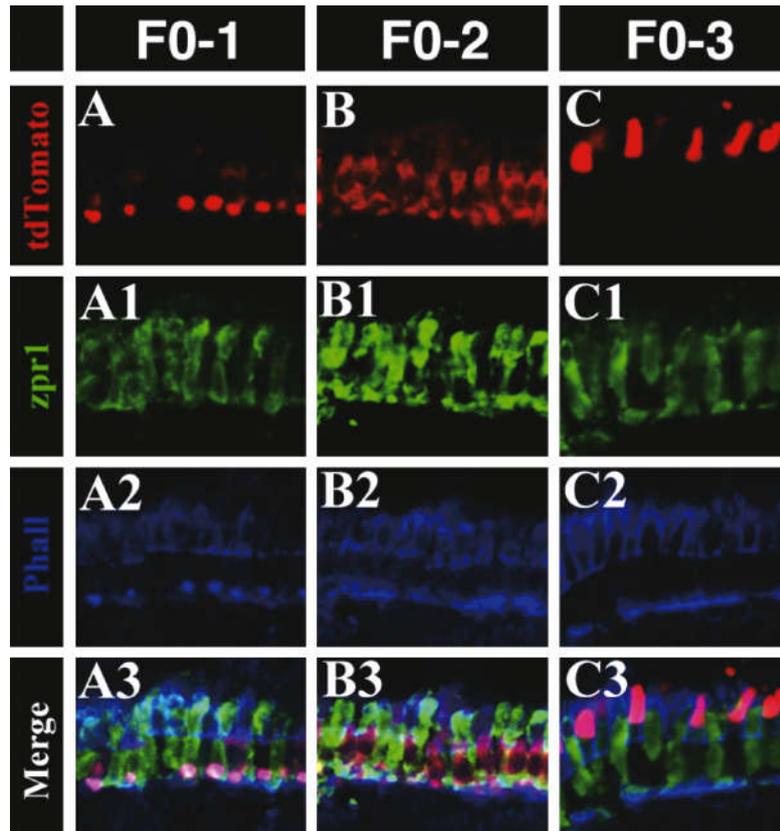
### 2.3 稳定表达转基因品系的建立

我们共获得三种 F0 转基因品系, 免疫染色结果表明三种品系荧光蛋白的表达有明显差异: F0-1 转基因胚胎中红色荧光的表达主要成点状, 存在于视锥细胞的突触部位 (图 2A)。进一步 DAPI 染色显示该表达部位并非细胞核 (图未出示); F0-2 转基因胚胎中红色荧光主要存在于感光细胞细胞体 (cell body) 中, 同时也存在类似于 F0-1 的点状分布

为更好地研究脊椎动物视锥细胞视蛋白的运输机理, 我们设计了一种编码红色荧光蛋白的嵌合基因 *tdTomato-CT44*, 其中红色荧光蛋白编码基因 *tdTomato* 与编码非洲爪蟾 Opsin 末端 44 个氨基酸的序列相互融合。在表达的嵌合蛋白中, 末端的 44 个氨基酸可将融合蛋白定位于感光细胞外节段。进一步利用 Multisite Gateway 技术, 将该嵌合基因连接到 *sws1* 基因的 5.5 kb 启动子后, 从而保证该融合蛋白在紫外敏感型的视锥细胞中特异表达<sup>[13]</sup>。同时, 为了提高转基因筛选的效率, 将整个表达片段克隆到了具有 Tol2 转座子的目标载体上 (图 1B)。

(图 2B); F0-3 转基因胚胎中红色荧光的表达完全存在于外节段, 而且可看到明显的圆锥状, 说明其为目标品系 (图 2C)。

我们对 F0-3 的转基因品系进行了传代, 对 F2 代胚胎的免疫组化分析表明其具有与 F1 代完全相同的亚细胞定位, 表明转基因品系构建成功。同时, 分别收集 3、5 d 和 7 d 的 F2 代胚胎, 进行冰冻切片及免疫染色, 结果表明红色荧光蛋白在发育至 3 d 左右开始表达, 并主要定位于视锥细胞的外节段。随着胚胎的发育, 可观察到外节段逐渐延伸, 呈明显圆锥状 (图 3A-C)。同时, HA 抗体染色的结果表明其染色部位与 *tdTomato* 荧光蛋白表达部位完全重叠, 排除了胚胎自发荧光的干扰 (图 3D)。最后, 我们利用视杆细胞视蛋白抗体 *zpr3* 进行了免疫染色 (图 3E), 结果表明 *tdTomato* 的存在部位与 *zpr3* 的染色部位并不重合, 且均位于 *zpr3* 染色基底部位下方。



注: A, B, C: 红色荧光蛋白的表达位置; A1, B1, C1: zpr1 免疫荧光染色, 显示双锥细胞的位置; A2, B2, C2: 鬼笔环肽 (phalloidin) 染色, 显示肌动蛋白的位置; A3, B3, C3: 为三种的叠加。

图 2 三种不同转基因斑马鱼视网膜切片免疫染色图

Note. Confocal images of the retinal cells stained with zpr-1 antibodies (A1, B1, C1). Sections were also counterstained with phalloidin to label the actin filaments (A2, B2, C2).

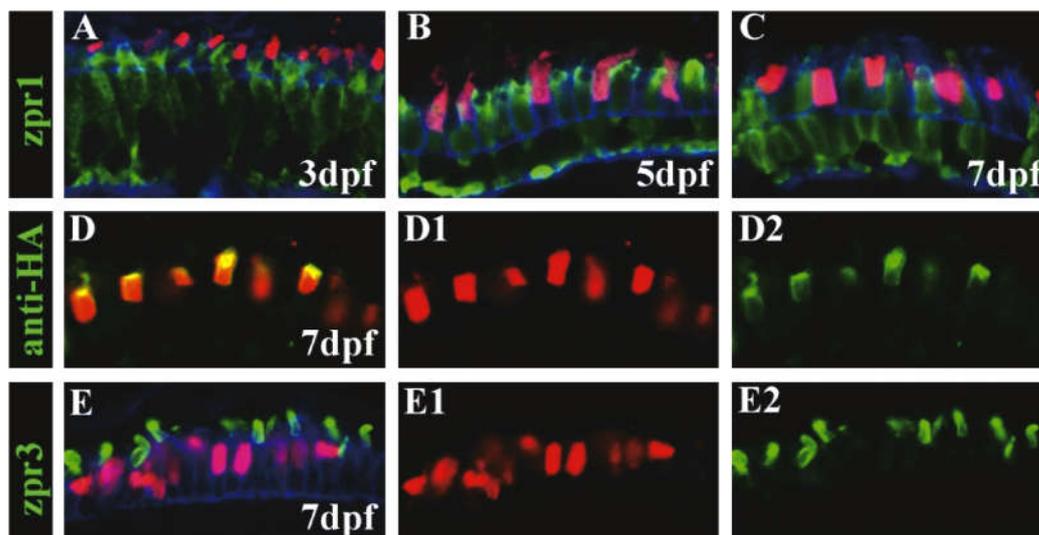
Fig. 2 Immunohistochemistry of the retinal cells in three transgenic zebrafish lines.

### 3 讨论

研究视蛋白的运输机理对认识感光细胞的凋亡及相应的视网膜疾病具有重要意义。斑马鱼感光细胞的结构与人类类似, 研究其视蛋白运输机制可对视网膜色素变性等疾病的研究提供有力支持。目前对视蛋白研究的一个瓶颈问题在于缺乏有效的检测抗体, 虽然针对斑马鱼不同视蛋白的抗体已经有报道<sup>[3]</sup>, 但是由于存在特异性的担心, 在视蛋白的研究中还没有广泛采用。目前, 仅有针对视杆细胞视蛋白的抗体 (zpr3) 得到广泛认可。

为更好的研究视锥细胞视蛋白的运输机制, 本实验建立了一种在紫外敏感型视锥细胞中特异表达红色荧光蛋白 tdTomato 的转基因鱼品系。同时, 通过将 tdTomato 与视蛋白末端 44 个氨基酸相融合, 使得该荧光蛋白特异定位于视锥细胞外节段, 并模拟内源性视蛋白的定位, 从而为视蛋白运输机制的研究提供了新型的研究工具。在视杆细胞外节段, 每

天更新约 10% 的视蛋白, 因此需要大量的视蛋白合成及运输。为适应这一需求, 感光细胞产生了一种特有的高效运输机制: 除非有特异的非外节段定位信号, 感光细胞外节段是几乎所有膜蛋白的默认运输目的地<sup>[14]</sup>。视蛋白末端 44 个氨基酸具有部分跨膜序列, 可将其融合蛋白定位至外节段。但是, 实验中发现这并不是绝对的定位方式, 我们除发现在外节段的定位之外, 也发现两种不同的定位 (F0-1, F0-2)。在这两种转基因品系中, 红色荧光蛋白存在于突触或者胞体中, 与预期结果并不一致。尤其是定位在近突触部位的转基因品系中, 我们发现其表达的融合蛋白虽成点状分布, 但与核染料 DAPI 不能共定位。我们推测造成这种定位的原因可能是与转基因片段在基因组插入位点的特殊性有关, 可能插入的位点附近有增强子的存在, 导致该蛋白的表达明显升高, 而合成的蛋白未能及时包装至运输囊泡中, 自我聚集形成类似于内涵体 (inclusion bodies) 的结构, 从而采取不同的运输机制。



注: A, B, C: 不同时期转基因胚胎 *zpr-1* 抗体染色结果(绿色); D, D1, D2: 7 d 转基因胚胎 HA 抗体染色结果(绿色); E, E1, E2: 7 d 转基因胚胎 *zpr3* 抗体染色结果(绿色), 蓝色为鬼笔环肽的染色。所有图中, 红色均表示 tdTomato 的表达。

图 3 稳定表达转基因品系感光细胞切片染色分析

Note. Confocal images of the photoreceptors in the stable transgenic zebrafish line stained with *zpr-1* antibody (A, B, C), anti-HA antibody (D, D1, D2) and *zpr-3* antibody (E, E1, E2). In all panels, red channel indicates expression of tdTomato in the transgenic zebrafish larvae.

Fig. 3 Immunoanalysis of photoreceptors in the stable transgenic zebrafish line.

从 F0-3 的免疫染色结果可以看到, 红色荧光间隔性存在于双锥细胞胞体之间 (*zpr1* 染色), 且位置明显要低于视杆细胞视蛋白 (*zpr3* 染色) 的定位, 这与紫外敏感型视锥细胞长度要短于双锥细胞和视杆细胞有关。同时, 对成鱼视网膜的横切染色, 可以看到精确的马赛克排列图案(未出示), 与预期的感光细胞排列方式完全一致, 表明在该品系中, 红色荧光蛋白 tdTomato 完全特异存在于紫外敏感型视锥细胞中。该转基因鱼的建立对下一步研究视锥细胞视蛋白的运输及亚细胞定位分布具有重要的帮助。

(致谢 感谢日本东京大学的 Kawamura 教授提供 UV opsin 启动子, 同时感谢中国海洋大学药学院分子医学生物学研究室提供斑马鱼品系。)

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Ahnelt PK, Kolb H. The mammalian photoreceptor mosaic-adaptive design [J]. *Progr Retinal Eye Res*, 2000, 19: 711 - 777.
- [ 2 ] Jacobs GH, Neitz J, Deegan JF. 2<sup>nd</sup>. Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light [J]. *Nature* 1991. 353: 655 - 656.
- [ 3 ] Vihtelic TS, Doro CJ, Hyde DR. Cloning and characterization of six zebrafish photoreceptor opsin cDNAs and immunolocalization of their corresponding proteins [J]. *Visual Neurosci*, 1999, 16: 571 - 585.
- [ 4 ] Nawrocki L, BreMiller R, Streisinger G, et al. Larval and adult visual pigments of the zebrafish, *Brachydanio rerio* [J]. *Vision Res*, 1985, 25: 1569 - 1576.
- [ 5 ] Larison KD, Bremiller R. Early onset of phenotype and cell patterning in the embryonic zebrafish retina [J]. *Development* 1990. 109: 567 - 576.
- [ 6 ] Raymond PA, Barthel LK, Curran GA. Developmental patterning of rod and cone photoreceptors in embryonic zebrafish [J]. *JComp Neurol*, 1995, 359: 537 - 550.
- [ 7 ] Zou J, Wang X, Wei X. Crb apical polarity proteins maintain zebrafish retinal cone mosaics via intercellular binding of their extracellular domains [J]. *Dev Cell* 2012, 22: 1261 - 1274.
- [ 8 ] Cremers FP, van den Hurk JA, den Hollander AI. Molecular genetics of Leber congenital amaurosis [J]. *Human Molec Genet*, 2002, 11, 1169 - 1176.
- [ 9 ] Humphries P, Kenna P, Farrar GJ. On the molecular genetics of retinitis pigmentosa [J]. *Science* 1992. 256: 804 - 808.
- [ 10 ] Tam BM, Moritz OL, HurdLB, et al. Identification of an outer segment targeting signal in the COOH terminus of rhodopsin using transgenic *Xenopus laevis* [J]. *J Cell Biol*, 2000, 151: 1369 - 1380.
- [ 11 ] Zhao C, Malicki J. 2011. Nephrocystins and MKS proteins interact with IFT particle and facilitate transport of selected ciliary cargos [J]. *EMBO J* 2011, 30: 2532 - 2544.
- [ 12 ] Kwan KM, Fujimoto E, Grabher C, et al. The Tol2kit: a multi-site gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs [J]. *Develop Dynamics* 2007, 236(11): 3088 - 3099.
- [ 13 ] Takechi M, Hamaoka T, Kawamura S. Fluorescence visualization of ultraviolet-sensitive cone photoreceptor development in living zebrafish [J]. *FEBS Letters*, 2003, 553: 90 - 94.
- [ 14 ] Baker SA, Haeri M, Yoo P. et al. The outer segment serves as a default destination for the trafficking of membrane proteins in photoreceptors [J]. *J Cell Biol*, 2008, 183: 485 - 498.

[ 收稿日期 ] 2015-08-07