

用“增强子陷阱”技术构造并筛选果蝇 UAS/GAL4 系统中 GAL4 新品系及 脑基因表达图谱数据库的开发

刘晓隽* 袁小京* 孙侃* 帅祎春* 宋庆轩* 王磊*
邵丽莎* 赵昕宇* 吕义晟* 吕玉兵* 王连章* 钟毅**

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要 “增强子陷阱”技术是建立果蝇脑全基因组表达图谱及其数据库的重要方法。筛选获得新特异表达的 GAL4 品系, 可为进一步研究果蝇脑神经在学习记忆功能提供强有力的基因工具。通过“增强子陷阱”技术来获得果蝇突变体, 并与报告转基因果蝇(UAS-EGFP)杂交, 用荧光显微镜观察成年果蝇脑内荧光分布, 从而获得该突变体的脑基因表达图谱, 在此基础上利用 JavaScript 来建立果蝇脑全基因组表达数据库。目前获得基因突变体果蝇 2 677 种, 大部分在果蝇脑中有表达, 其中在果蝇嗅觉学习记忆相关脑区蘑菇体表达的基因有 368 个, 且有部分基因特异地表达在某些传导通路上。这些果蝇基因突变体库及其表达图谱为进一步研究各基因的功能及作为遗传工具来研究各脑区结构和功能提供极大方便。

关键词 增强子陷阱, 突变体文库, 报告转基因果蝇, 蘑菇体, 表达图谱

学科分类号 Q189

果蝇作为一种经典的模式生物, 其神经系统结构相对简单。同时由于其基因在进化上的保守性及遗传和分子生物学操作的优势, 已被广泛用于神经系统生理和病理研究^[1,2]。目前许多研究表明, 与哺乳动物类似, 果蝇神经系统通过不同的特化区域分别行使不同生理功能。例如蘑菇体和中心体分别对果蝇嗅觉和视觉相关的学习记忆有重要作用^[3~5]。因此筛选在这些特异部位表达的 Gal4 品系对进一步研究这些部位神经功能具有重要意义。

我们利用果蝇自身的一种转座子——P 因子携带 Gal4 基因在果蝇的基因组中自由跳转^[6], 产生了 2 677 种不同的果蝇 P 因子插入突变品系。如果该品系的 P 因子位于某未知基因的增强子附近, 则 P 因子携带的 Gal4 基因表达被增强子激活^[7,8]。其产物结合到上游激活序列(UAS), 使下游的报告基因——增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 表达, 从而标记出某未知 Gal4 品系突变基因的表达部位^[8~10](图 1)。

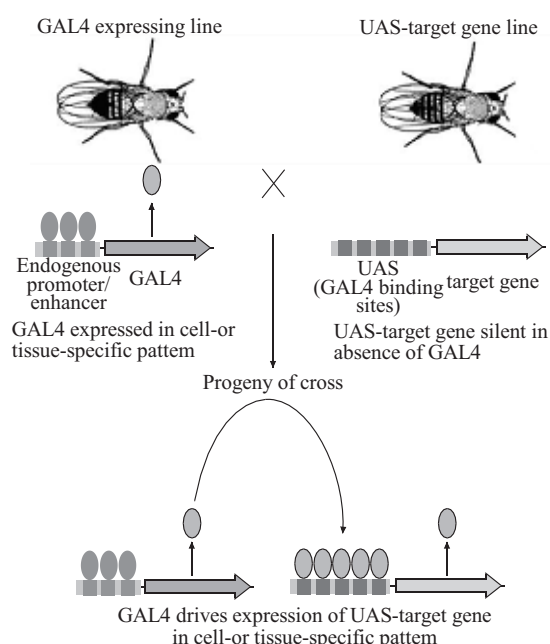


Fig. 1 Gal4-UAS system^[9]

* 共同第一作者。

** 通讯联系人. Tel: 010-62772273, E-mail: zhongyi@cshl.edu

收稿日期: 2008-04-18, 接受日期: 2008-05-15

1 材料和方法

1.1 P 因子插入突变体的构建

P 因子转座需要转座酶，通过杂交方法引入转

座酶基因后，P 因子在基因组中发生一次随机跳转，再通过杂交去除转座酶基因，则 P 因子不再跳转，从而产生稳定的 P 因子插入突变体(图 2)。

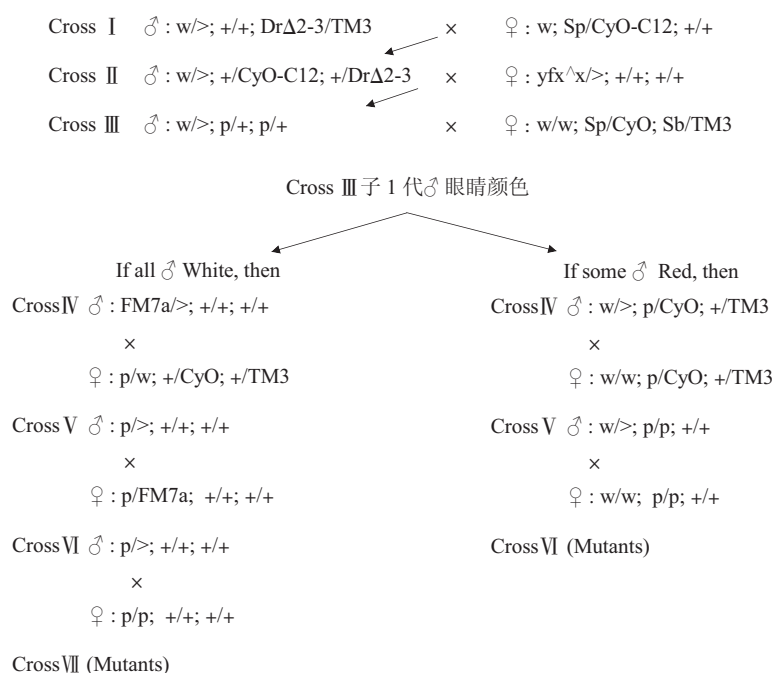


Fig. 2 Genetic scheme of generation of P-element insertion mutants

w indicates white eye; TM3 and FM7a are balancers; DrΔ2-3 contains the transposase; CyO-C12 contains the source for P[Gal4] transposable element.

1.2 未知 GAL4 品系突变基因表达部位的鉴定

将突变体和 UAS-EGFP 基因纯合体果蝇杂交。如果突变体中的 P 因子插入到未知基因的增强子附近，受这些增强子影响，P 因子中含有的 Gal4 基因表达会在特异的组织或细胞中被激活，使 EGFP 基因表达。用荧光显微镜可以观察到发出绿色荧光的部位。具体步骤如下：取羽化 5 天的果蝇，将果蝇用二氧化碳(CO₂)麻醉并放入无水酒精中进一步麻醉，用镊子夹住翅膀放入磷酸盐缓冲液(PBS)中清洗掉无水酒精，放入琼脂板上并用解剖针固定胸部，并在果蝇上滴加 1~2 滴 PBS，用解剖镊逐步将整个果蝇头皮和脑部黏附在表面的白色气管去除，并避免伤及脑部，保持脑结构完整。将剖好的果蝇成虫脑部置于滴有 PBS 的载玻片上，在荧光显微镜下(OLYMPUS IX70)观察并拍照。设

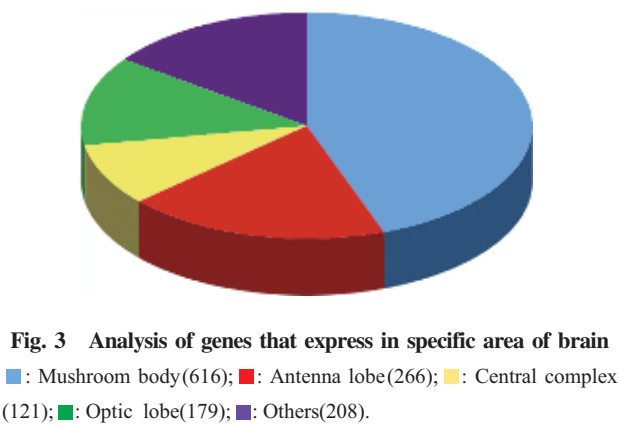
计“Flies”网络查询系统对这些照片进行管理。

对表达特异的品系在共聚焦显微镜下进行拍照。步骤如下：将剖好的果蝇成虫脑部至于冰上含有 4%多聚甲醛的 PBS 中固定，抽气以去除气管中多余气体。将抽气后的成虫脑至于载玻片上，加入透明剂封片，置于共聚焦显微镜(OLYMPUS FV500)观察并拍照。

2 结 果

2.1 突变体绿色荧光蛋白表达部位统计

目前已经鉴定表达部位的突变体共 2 677 种。其中 692 种突变体的神经系统不表达 EGFP，1 113 种突变体在神经系统中广泛表达，专一性地在某些部位表达 EGFP 的突变体表达情况如图 3。



2.2 特殊神经传导通路的荧光蛋白表达
发现特异表达于特定脑区以及特定传导通路的 Gal4 品系，如在蘑菇体、中心体等特异表达 (图 4a, b). 发现特异表达于与某些功能相关的未知神经元的 Gal4 品系(图 4c~f).

2.3 突变体绿色荧光蛋白表达部位统计
JavaScript 技术生成的动态 HTML 设计网络查询系统，可以把所有 Gal4 特异性表达的照片按照不同品系的编号归类，从而进行浏览、搜索、统计，并且修改删除也很方便(图 5). 这项技术有助于对大规模结果筛选的分析和整理.

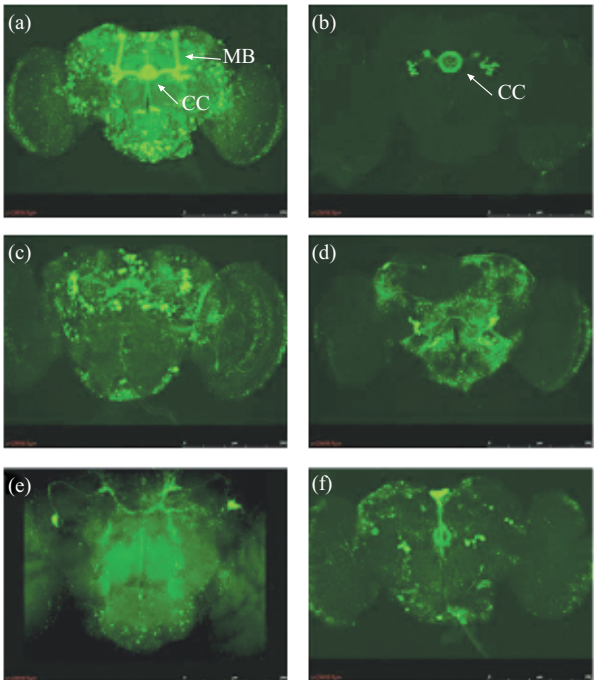


Fig. 4 Gal4 lines that specifically express in some neural circuitry
(a) A line specifically express in mushroom body (MB) and central complex(CC). (b) A line specifically express in ellipsoid body of central complex. (c)~(f) Specific expression in some unidentified neurons.

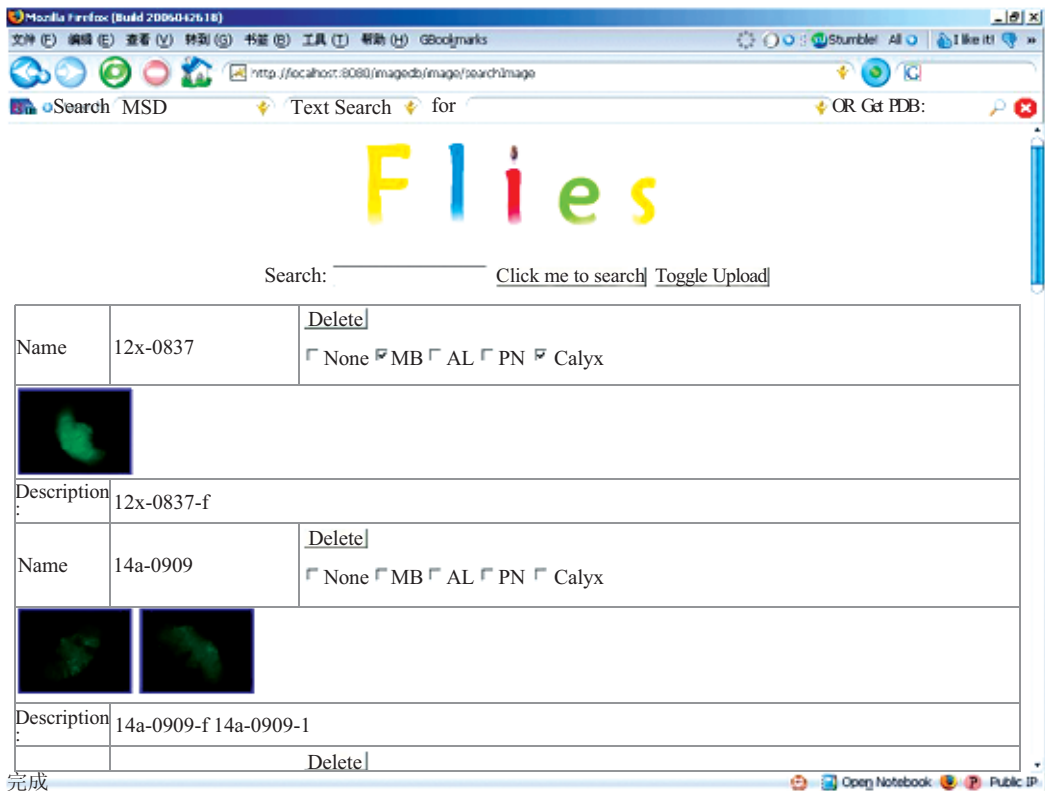


Fig. 5 HTML online search system

3 讨 论

3.1 全基因组饱和突变

基因表达的时间空间调控对基因在不同发育阶段及不同组织和器官中行使其功能至关重要. 因此本实验室构建了多种携带报告基因的 P 因子插入突变体, 研究各基因表达的空间表达特点. 我们构建的 P 因子插入突变体覆盖了果蝇 X 染色体和 2 号、3 号染色体, 因此几乎包含整个果蝇基因组(果蝇 4 号染色体和 Y 染色体含有很少量基因). 果蝇基因组约有 13 000~14 000 个基因^[1], 而且虽然 P 因子插入位点有一定倾向性, 但是如果能够构建大约 3×10^5 万个 P 因子插入突变体, 则可以认为达到饱和和突变. 由于果蝇全基因组序列和 P 因子序列均已知, 因此很容易确定插入位点, 从而确定未知基因. 观察各基因的表达特点, 对研究果蝇的蛋白质组有重要意义. 本研究目前已经构建了大约 3 000 个 P 因子插入突变体, 预计两年左右即可完成全部基因组的饱和和突变.

3.2 EGFP 表达分析

由于 Gal4 基因的启动子和未知基因的启动子不完全相同, 并且和增强子的相对位置等也不相同, 因此用报告基因的方法可能不能完全准确地反映未知基因的表达图谱, 需要用原位杂交等其他方法来进一步研究.

我们已检测的所有突变体中, 约 1/4 不表达 EGFP, 原因可能是由于 P 因子插入位置距离增强子较远造成. 对于在专一部位表达报告基因 EGFP 的突变体, 其携带的 P 因子插入位点附近的增强子使 Gal4 基因在特定位点表达. 这种突变体可以作为工具果蝇, 使其他 UAS 调控的基因在特定部位表达, 从而有助于研究基因在相关部位的功能以及相关部位神经元的功能^[9, 10]. 例如在特定部位表达与囊泡再循环有关的 *Shibire* 基因突变型, 可以在高温时竞争性抑制特定部位神经元的囊泡释放, 从而使该神经通路阻断^[12].

另外 99 种 Gal4 品系的报告基因在所有神经系统中均表达. 这些基因可能是神经细胞的“管家基因”, 参与维持神经细胞基本功能. 还有大约 1/5 的突变体, 报告基因表达在多个部位. 例如有些基因同时在蘑菇体和嗅球表达, 而在其他部位不表达, 这些基因对于研究神经系统不同部位发育和进化上的相关性有一定价值.

从实验结果可以看出, 蘑菇体中表达的基因最

多, 说明蘑菇体的功能最为复杂. 蘑菇体由 α/α' 、 β/β' 和 γ 小叶组成, 研究表明蘑菇体是将各种外界信号进行整合的主要区域^[13~17]. 为此我们对疑似特异在各小叶表达的 Gal4 品系拟进一步用共聚焦成像等方法, 从而为进一步深入研究果蝇神经系统的工作机理提供果蝇工具.

3.3 展望

利用增强子陷阱构建果蝇基因表达文库并进行 Gal4 特异表达品系的筛选弥补了我国大规模筛选的空白. 特别是在特异神经元表达的 Gal4 品系更是为今后对果蝇神经系统及其功能的研究提供了强有力的工具. 此外, JavaScript 技术生成的动态 HTML 设计网络查询系统这项有助于对大规模结果筛选的分析和整理, 值得推广.

致谢 感谢美国冷泉港实验室 Tim Tully 教授对本工作的大力支持.

参 考 文 献

- Kohler R E. *Lords of The Fly: Drosophila Genetics and The Experimental Life*. Chicago: University of Chicago Press, 1994. 15
- Rubin G M, Lewis E B. A brief history of *Drosophila's* contributions to genome research. *Science*, 2000, **287**(5461): 2216~2218
- Davis R L. Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci*, 2005, **28**(1): 275~302
- Tully T, Preat T, Boynton S C, *et al.* Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell*, 1994, **79**(1): 35~47
- Liu G, Seiler H, Wen A, *et al.* Distinct memory traces for two visual features in the *Drosophila* brain. *Nature*, 2006, **439**(7076): 551~556
- William R. Engels P Element in *Drosophila*, <http://engels.genetics.wisc.edu/Pelements/Pt.html#PElementsInDrosophila>, 2005-01-15
- Joseph B. Duffy GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife genesis. *Genesis*, 2002, **34**(1-2): 1~15
- Han P L, Ronald L. Davis the *Drosophila* brain revited by enhancer detection. *J Neurobiology*, 1996, **31**(1): 88~102
- Phelps C B, Brand A H. Ectopic Gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods*, 1998, **14**(4): 367~379
- St Johnston D. The Art and design of genetic screen: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet*, 2002, **3**(3): 176~188
- Adams M D, Celniker S E, Holt R A, *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 2000, **287**(5461), 2185~2195
- Kitamoto T. Targeted expression of temperature-sensitive dynamin to study neural mechanisms of complex behavior in *Drosophila*. *J Neurogenetics*, 2002, **16**(4): 205~228
- Wang Y L, Xia S Z, Tully T, *et al.* Blockade of neurotransmission in *Drosophila* mushroom bodies impairs odor attraction, but not repulsion. *Current Biology*, 2003, **13**(21): 1900~1904
- Xia S, Tully T. Segregation of odor identity and intensity during

- odor discrimination in *Drosophila* mushroom body. PLoS Biol, 2007, **5**(10): e264
- 15 Yu D, Akalal D B, Davis R L. *Drosophila* alpha/beta mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning. Neuron, 2006, **52** (5): 845~855
- 16 Davis R L. Mushroom bodies and *Drosophila* learning. Neuron, 1993, **11**(1): 1~14
- 17 Dubnau J, Grady L, Kitamoto T, *et al.* Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. Nature, 2001, **411**(6836): 476~480

Genomic Screen for Expression Pattern in Adult *Drosophila* Brains *In vivo* by Enhancer Trap Method and Establishment of Expression Database

LIU Xiao-Jun*, YUAN Xiao-Jing*, SUN Kan*, SHUAI Yi-Chun*, SONG Qing-Xuan*, WANG Lei*,
SHAO Li-Sha*, ZHAO Xin-Yu*, LÜ Yi-Sheng*, LÜ Yu-Bing*, WANG Lian-Zhang*, ZHONG Yi**

(Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract “Enhancer trap” is an important technique to build and explore *Drosophila* brain gene expression pattern and its database. Large genome-wide screen for specific expression pattern in adult *Drosophila* brains by enhancer trap method provides fly tools for further understanding neural basis of learning and memory. Enhancer trap method was utilized to generate *Drosophila* P[Gal4] mutant library. Each mutant in library was crossed with GFP reporter flies (*UAS-eGFP*); heads of the adult off-springs were dissected to obtain the whole brain which were examined under the epifluorescence microscope and expression pattern of each mutant were further analyzed. JavaScript was utilized to establish an expression pattern library. A total of 2 677 mutant lines of *Drosophila* were obtained by P-element induced mutagenesis and subjected to expression pattern analysis. Most of mutated genes express in adult fly. 368 mutated genes specific express in the mushroom body, which was reported to involve in *Drosophila* olfactory learning and memory, and some others specific express in other neuron circuitries. *Drosophila* mutant libraries and genome-wide expression pattern database was built by enhancer trap method, which as a tool will be utilized to understand the function of genes and particular neural circuitries in *Drosophila* in the future.

Key words enhancer trap method, mutant libraries, reporter transgenic flies, mushroom body, expression pattern

*These authors contributed equally to this paper.

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62772273, E-mail: zhongyi@cshl.edu

Received: April 18, 2008 Accepted: May 15, 2008