

小鼠大用处之荧光示踪小鼠

基因修饰小鼠是目前研究人类基因功能最重要的模式生物，通过基因敲入的方式，将外源的荧光蛋白表达元件（示踪基因）敲入到小鼠内源基因中，即可以对目的基因进行标记和示踪。

这几天科学界最大的新闻非诺贝尔奖莫属了。诺贝尔奖是对科研工作者学术成就的最大认可。2008年的诺贝尔化学奖授予了在绿色荧光蛋白(GFP)研究和应用方面做出突出贡献的科学家。自从GFP蛋白从水母中分离到后，就已经广泛用于特定蛋白的标记和示踪。近年来随着分子生物学、有机化学以及材料科学等学科的进展，科学家们又获得了多种新型的荧光蛋白（表1），使用这些荧光蛋白标志物，我们可以在细胞水平或动物体内研究目的基因表达，蛋白质运输以及各种细胞内动态的生物化学信号通路等。

表1. 常用荧光蛋白的物理属性.

蛋白	光谱颜色	激发峰 (nm)	发射峰 (nm)	亮度	光稳定性	聚集状态
EBFP2	蓝色	383	448	18	55	弱二聚体
ECFP	蓝绿色	433/445	475/503	13	64	弱二聚体
mEGFP	绿色	488	507	34	174	单体
EYFP	黄色	514	527	51	60	弱二聚体
mVenus	黄色	515	528	53	15	单体
tdTomato	红色	554	581	95	98	T二聚体
TagRFP	橙色	555	584	48	37	单体
mRFP1	红色	584	607	12.5	8.7	单体
mCherry	红色	587	610	17	96	单体

数据来源于 *Journal of Cell Science*.

基因修饰小鼠是目前研究人类基因功能最重要的模式生物，通过基因敲入的方式，将外源的荧光蛋白表达元件（示踪基因）敲入到小鼠内源基因中，即可以对目的基因进行标记和示踪。根据不同的研究目的，可分为以下三种情况：

一、用于蛋白的亚细胞定位研究

将示踪基因敲入到小鼠内源基因的或5'端或3'端，且与内源基因融合表达，可以确定内源蛋白的亚细胞定位（如图1所示）。荧光标签插入位置的决定因素：1. 已有文献的报道，首先考虑已有的参考模型；2. N端或C端有无蛋白修饰，避免插入的位置进行蛋白翻译后的修饰；3. 离主要功能域远的N端或C端，确保蛋白正常功能的行使。总之，荧光标签插入的位置应尽量避免影响蛋白的正常功能。

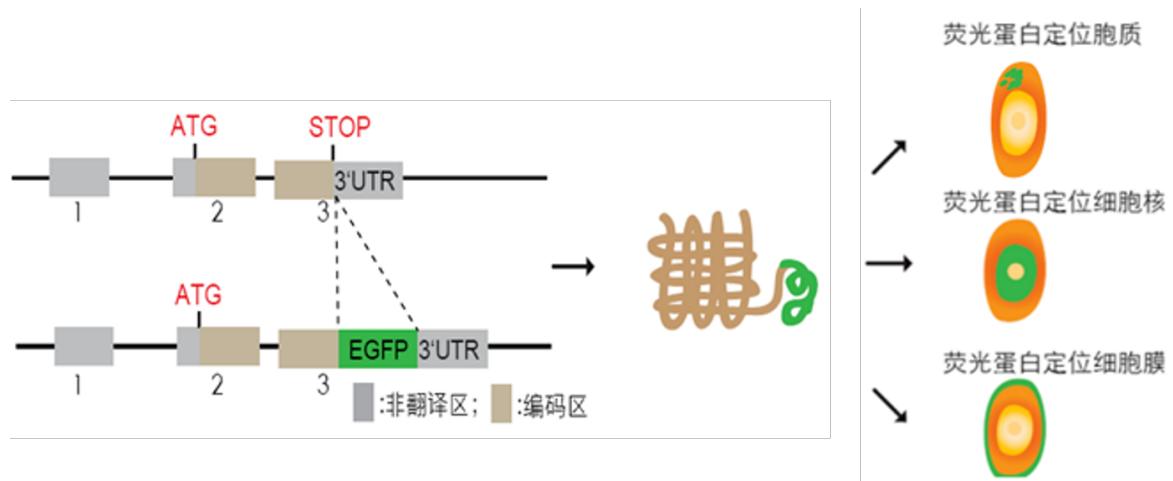


图1. 用于蛋白亚细胞定位研究的小鼠模型构建示意图。

应用举例：

2019年2月份，国际学术期刊 *PLoS Genetics* 在线发表了中国科学院生物化学与细胞生物学研究所张雷和周斌研究组的最新合作研究成果 “*VGLL4 plays a critical role in heart valve development and homeostasis*” [1]。此研究揭示了Vgll4基因在心脏瓣膜发育中以及出生后稳态维持过程中具有重要的功能。南模生物为该研究构建了**Vgll4-EGFP**小鼠模型。

研究人员首先通过构建Vgll4基因全身敲除小鼠发现Vgll4基因敲除后小鼠大部分会出生前死亡，而部分存活的小鼠体型偏小、有严重的心肌肥大，还伴有心脏血液回流以及心脏瓣膜异常增厚等症状。随后作者通过构建Vgll4-EGFP荧光示踪小鼠观察Vgll4基因的表达时间及亚细胞定位（如图2所示），发现Vgll4基因从胚胎期的13.5天开始表达在小鼠主动脉瓣、肺动脉瓣间充质细胞的细胞核中，并持续表达在成体心脏动脉瓣膜的间充质细胞中，这些结果表明VGLL4可能在心脏瓣膜发育和出生后稳态维持过程中具有重要的生理功能。该研究首次阐明了作为Hippo信号通路拮抗剂的VGLL4在心脏瓣膜发育以及稳态调节过程中的重要功能，为心脏瓣膜疾病的预防和治疗提供新靶点。

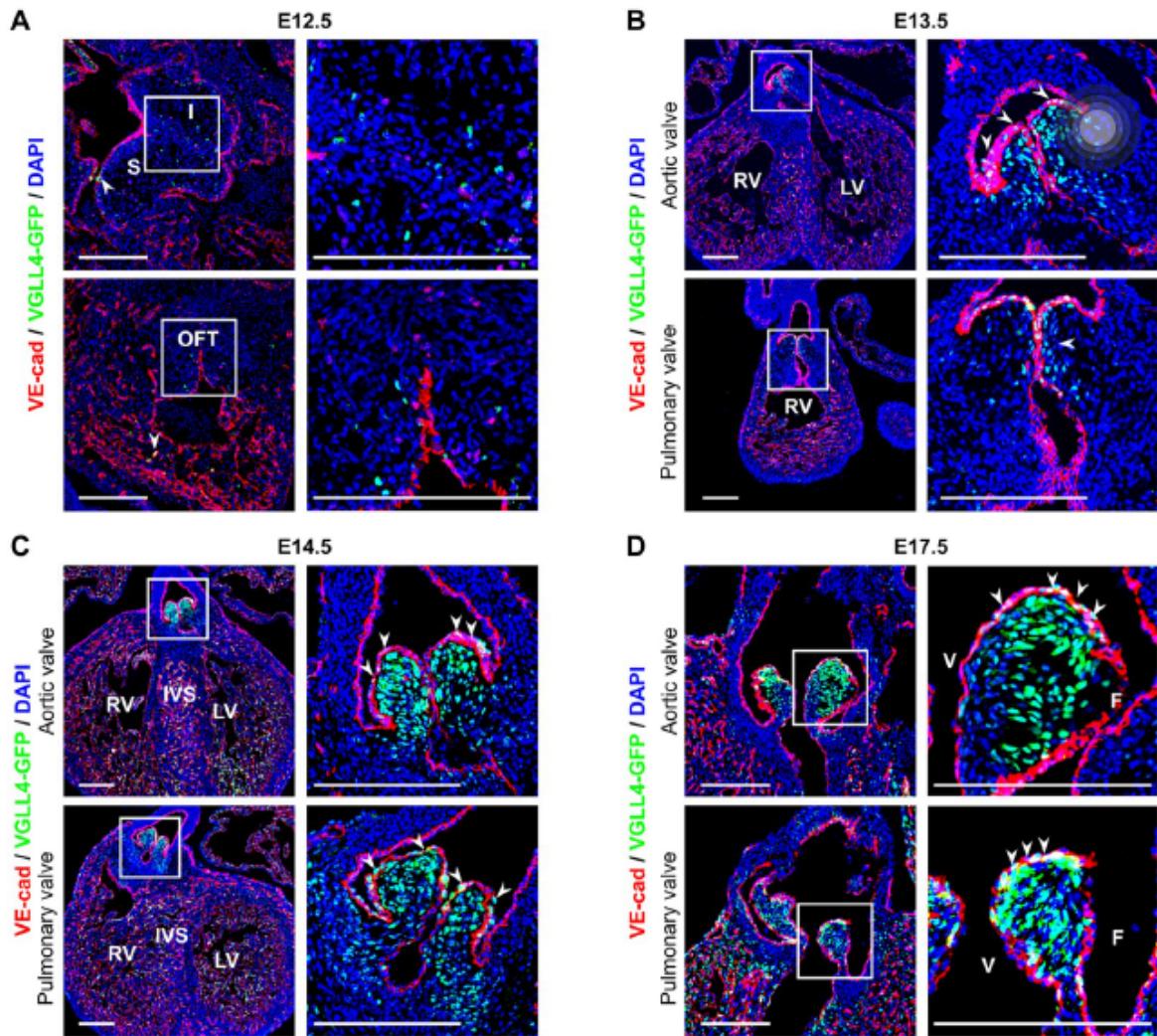


图2. *Vgll4*-GFP融合蛋白的亚细胞定位检测。胚胎期13.5天，*Vgll4*基因开始大量表达于小鼠主动脉瓣、肺动脉瓣间充质细胞的细胞核中，此后一直表达在成体心脏动脉瓣膜的间充质细胞中。

二、用于蛋白的表达谱研究

常见的有两种方式。第一种方式是，将荧光示踪基因通过2A（自剪切多肽）或IRES（内部核糖体进入位点序列）敲入到小鼠内源基因的3'端，对内源基因表达进行示踪（如图3所示）；第二种方式是，将荧光基因敲入到小鼠内源基因的5'端，通过终止序列polyA与内源基因连接，可以实现内源基因的替代表达，通过观察荧光示踪基因的表达了解内源性蛋白的表达情况，例如：是否表达、表达量、表达组织分布等等。

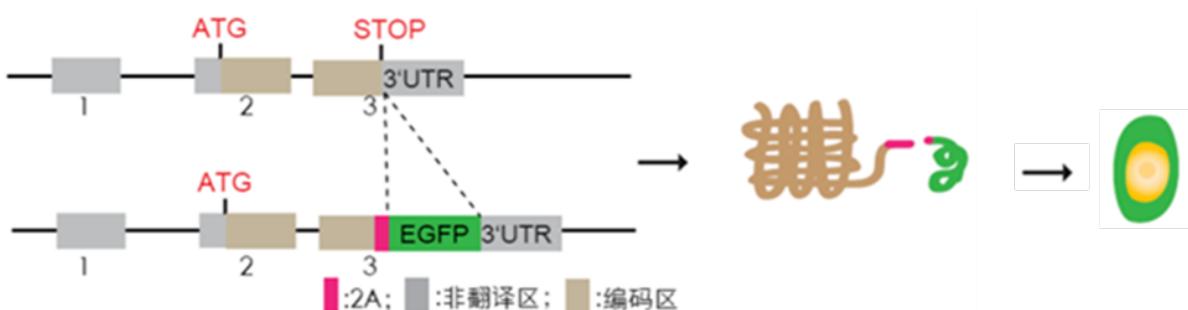


图3. 用于蛋白表达谱研究的小鼠模型构建示意图。

应用举例：

2018年10月份, *EBioMedicine*在线发表了中国科学院上海生命科学研究院营养与健康院所丁秋蓉研究组和上海中医药大学劳远至研究组的合作研究成果 “*Screening of FDA-approved drugs identifies sunitinib as a modulator of UCP1 expression in brown adipose tissue*” [2]。该研究通过大规模化合物体内筛选发现sunitinib可作为褐色脂肪组织 (Brown Adipose Tissue, BAT) 的激活剂, 是治疗肥胖及脂肪肝等相关代谢型疾病的潜在药物。南模生物为该研究提供了Ucp1-2A-GFP小鼠模型。

为寻找激活褐色脂肪细胞的小分子物质, 研究人员在褐色脂肪成熟标志物解偶联蛋白(UCP1)终止密码子前定点敲入绿色荧光蛋白(GFP)表达框, 建立了成熟褐色脂肪组织细胞荧光示踪的小鼠模型 (如图4所示)。随后作者喂食荧光示踪小鼠1000余种临床用药通过观察荧光强度来检测体内Ucp1基因的表达水平, 结果发现sunitinib能显著促进褐色脂肪细胞中UCP1的表达。本研究结合荧光标记的基因示踪小鼠模型和大规模化合物筛选, 建立了一个筛选调控褐色脂肪组织细胞激活剂的高效实验体系, 也为肥胖及相关代谢型疾病研究提供了新的思路。

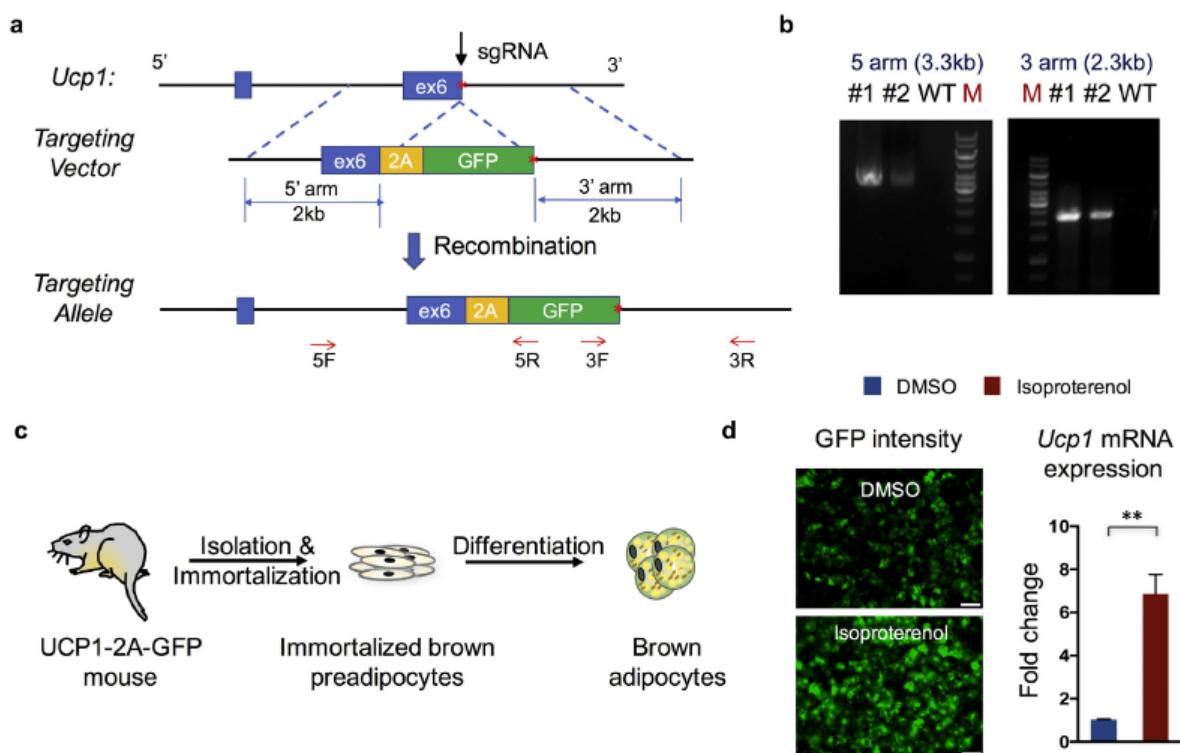


图4.Ucp1-2A-GFP荧光示踪小鼠的构建及褐色脂肪组织荧光强度的检测。在褐色脂肪成熟标志物解偶联蛋白(UCP1)终止密码子前定点敲入绿色荧光蛋白(GFP)表达框, 建立成熟褐色脂肪组织细胞荧光示踪的小鼠模型。

三、用于细胞的谱系示踪研究

利用Rosa26-LSL-reporter示踪小鼠, 与特定细胞标记基因敲入Cre的工具小鼠交配, 在子代小鼠中特定类型细胞被永久标记上报告基因荧光 (如图5所示), 通过观察这些被标记上的荧光信号可以追踪某类特定细胞及其后代所有细胞的增殖、分化以及迁移等活动, 为研究细胞命运及谱系提供有力手段。

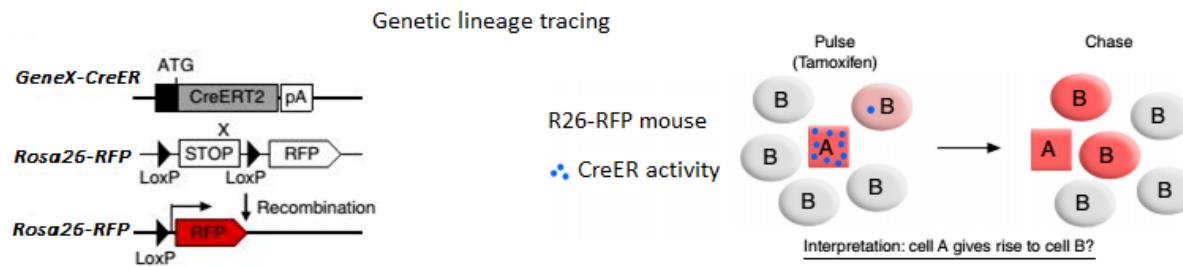


图5. 用于细胞谱系示踪研究的小鼠模型构建示意图。

应用举例：

2019年2月份，国际学术期刊 *Nature Genetics* 在线发表了中国科学院科学家团队—生物化学与细胞生物研究所周斌研究组、季红斌研究组以及中科院广州生物医药与健康研究院彭广敦研究组的合作科研成果 *“Lung regeneration by multi-potent stem cells residing at the bronchioalveolar duct junction”* [3]。该研究利用双同源重组系统 (Cre-loxP和Dre-rox) 发现位于支气管肺泡交界处的BASCs (肺支气管肺泡干细胞) 具有多种肺上皮细胞分化的潜能，并结合多种小鼠损伤模型揭示了这群干细胞在体内具有再生肺脏的能力，为肺脏的修复和再生研究提供了新的研究方向及理论基础。南模生物为该研究提供了 **R26-RSR-LSL-tdTomato** 和 **Scgb1a1-CreER (CC10-CreER)** 小鼠模型。

研究人员利用基于Cre-loxP和Dre-rox双同源重组的报告基因小鼠R26-RSR-LSL-tdTomato，并结合能特异性标记CC10+细胞的Scgb1a1-CreER小鼠和特异性标记SPC+细胞的Sftpc-DreER小鼠，通过交配获得Scgb1a1-CreER;Sftpc-DreER;R26-RSR-LSL-tdTomato (BASCs tracer) 三基因型小鼠来特异性标记CC10+SPC+BASCs。通过体内验证，此策略能特异性地标记示踪BASCs。

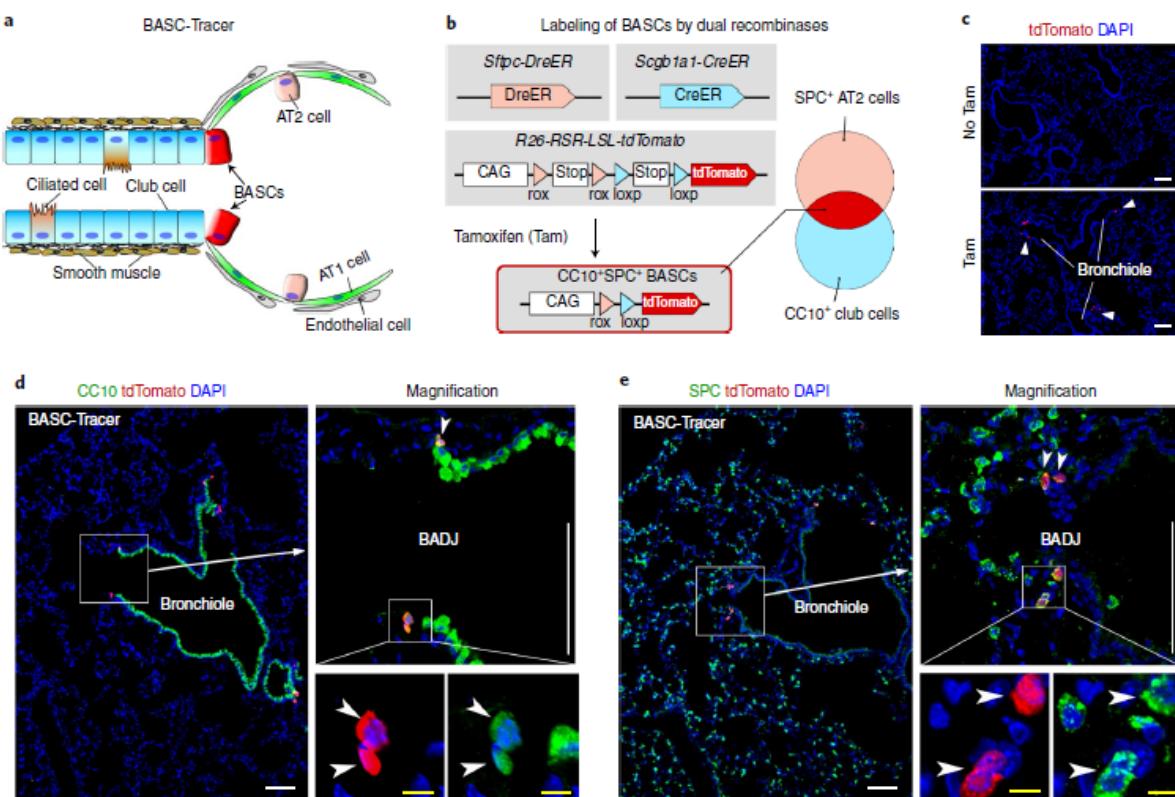


图3. 基于双同源重组系统的BASCs遗传谱系示踪。利用基于Cre-loxP和Dre-rox双同源重组的报告基因小鼠R26-RSR-LSL-tdTomato特异性标记CC10+SPC+BASCs。

综上所述，荧光示踪小鼠已广泛应用于生命医学研究的各种领域，相信在未来荧光示踪小鼠会在生命医学领域的研究中发挥更大的作用！**南模生物提供各种荧光示踪小鼠的定制服务，且已有部分荧光示踪小鼠成品（点击查看）**，如果您有这方面的需求，欢迎随时咨询！！！

参考文献：

1. Yu W, Ma X, Xu J, et al. VGLL4 plays a critical role in heart valve development and homeostasis. *PLoS Genet.* 2019 Feb 21; 15(2):e1007977.
2. Qiu Y, Sun Y, Xu D, et al. Screening of FDA-approved drugs identifies sunitinib as modulator of UCP1 expression in brown adipose tissue. *EBioMedicine.* 2018 Nov; 37:344-355.
3. Liu Q, Liu K, Cui G, et al. Lung regeneration by multipotent stem cells residing at the bronchioalveolar-duct junction. *Nat Genet.* 2019 Apr; 51(4):728-738.