doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.11.001

・基础研究・

小鼠大脑抑制性神经元特异性多聚核糖体结合型 mRNA 的提取

陈访访1 贾怡昌2

(1清华大学生命科学学院 北京 100084;2清华大学医学院 北京 100084)

摘要目的:建立能够高效、快速地从小鼠大脑提取抑制性神经元特异性多聚核糖体结合的 mRNA 的方法,为进行小鼠大脑抑制性神经元特异性翻译表达谱分析提供材料。方法:依据 Cre-loxp 系统,将 RiboHA 标签小鼠与抑制性神经元特异性 VGAT-Cre/PV-Cre 小鼠杂交,启动抑制性神经元中核糖体上 HA 标签的表达。后代小鼠进行基因型鉴定,获得同时表达 Cre 和 HA 的小鼠。利用免疫荧光染色检测 HA 的表达。通过免疫共沉淀从目标细胞群体中获得 HA 标记的多聚核糖体。提取多聚核糖 体结合的 mRNA。荧光定量 PCR 法检测所得 mRNA 的细胞类型特异性。利用琼脂糖凝胶电泳及 bioanalyzer 2100 检测所得 mRNA 及 cDNA 的质量。结果:HA 标记的多聚核糖体在目标细胞群体中能够被高效启动表达。抑制性神经元特异性多聚核糖体结合的 mRNA 龙 cDNA 的质量。结果:HA 标记的多聚核糖体在目标细胞群体中能够被高效启动表达。抑制性神经元特异性多聚核糖体 结合的 mRNA 能够被特异性地富集提取。所获细胞类型特异性的多聚核糖体结合的 mRNA 及 cDNA 的质量足以用来进行高通量测序及翻译表达谱的分析。结论:利用 Cre-loxp 遗传系统标记,结合蛋白免疫共沉淀实验,建立了从小鼠大脑抑制性神经元中高效特异地获得多聚核糖体结合的 mRNA 的方法,为进一步进行小鼠大脑抑制性神经元特异性翻译表达谱的分析奠定了基础。 关键词:小鼠;大脑;抑制性神经元特异性;多聚核糖体结合型;mRNA

中图分类号:R-33;Q593.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)11-2001-06

Isolation of Inhibitory Neuron-specific Polyribosome-associated mRNA from Mouse Brain

CHEN Fang-fang¹, JIA Yi-chang²

(1 School of Life Science, Tsinghua University Beijing 100084, China;

2 School of Medicine, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

ABSTRACT Objective: To establish a rapid and efficient method in extracting the Inhibitory Neuron-specific Polyribosome-associated mRNA from Mouse Brain, provide materials for the analysising of inhibitory Neuron-specific expression spectrum from the mouse brain. **Methods:** Based on the cre-loxp system, we crossed the RiboHA mouse to VGAT/PV-Cre mouse, to activate the expression of HA-tagged ribosomes. The genotype of the offspring was analyzed to obtain the Cre and HA co-expressed mouse. The expression of HA was detected by immunofluorescent staining. The HA-tagged polyribosomes were purified from the target cell population via immuno-precipitation. The mRNAs was isolated from the immunoprecipitated polyribosomes. The cell-type specificity of mRNAs was analyzed using quantitative RT-PCR (qRT-PCR). The quality of mRNAs and cDNAs was checked by using agarose gel electrophoresis and bioanalyzer 2100. **Results:** The expression of HA-tagged polyribosomes was efficiently activated in the target cell populations. The polyribosome-associated mRNAs were enriched and isolated from the inhibitory neurons specifically. The quality of cell-type-specific polyribosome-associated mRNAs and cDNAs was high enough for the high-throughput sequencing and translating profiling analysis. **Conclusions:** Through the Cre-loxp genetic labeling system combined with the immunoprecipitation, inhibitory neuron-specific polyribosome-associated mRNA transcripts have been isolated rapidly and efficiently from the mouse brain. The results lay the foundation for further analysis of the specific expres- sion of the inhibitory neurons in the brain of mice.

Key words: Mouse; Brain; Inhibitory neuron-specific; Polyribosome-associated; mRNA Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q593.2 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2017)11-2001-06

前言

大脑是人体最精密的器官,其功能机制一直是生物学领域 研究的热点。经验依赖的神经元可塑性是大脑发育早期形成功

作者简介:陈访访(1990-),女,博士研究生,主要研究方向:生物 学,E-mail: cfangfang2014@163.com (收稿日期:2016-10-08 接受日期:2016-10-30) 能性神经环路,以及成熟后进行长时程信息加工存储的细胞基础^[1,2]。过去几十年的研究发现,兴奋性神经元及抑制性神经元 的突触可塑性对于神经系统响应不同强度的外界刺激至关重 要。虽然兴奋性神经元通过突触可塑性实现神经元活动调控的 分子机制已有研究报道,但是抑制性神经元如何通过突触可塑 性适应不断变化的神经元活动仍然不清楚。神经元的抑制活动 对于神经系统实现经验依赖的可塑性发展不可或缺,当神经元 的抑制活动发生异常时将会引发一系列认知功能障碍和神经 系统疾病³³,因此探索抑制性神经元中特异的分子调控机制,对 于我们理解神经系统功能及致病机制尤为重要。

随着高通量测序与分析技术的发展,利用分子表达谱分析 寻找细胞类型特异的分子调控机制成为可能。然而想要得到体 内状态下抑制性神经元特异的分子表达谱,传统的细胞分离方 法并不适用。哺乳动物大脑中的兴奋性神经元、抑制性神经元 及胶质细胞均具有较为特殊的形态,且兴奋性神经元与抑制性 神经元相互连接形成复杂的网络,如果根据传统的标签信号法 进行机械分离及酶消化,结合流式细胞分选技术(FACS)或者 激光捕获技术(LCM)强行分离获得细胞¹⁴⁶,将在一定程度上破 坏神经元的形态和完整性,引起分子水平的变化^[7],改变神经元 原本的生理状态。

为了避开了上述技术存在的弊端,高效获取抑制性神经元 特异性多聚核糖体结合的 mRNA,为进一步分析抑制性神经元 特异的翻译表达谱做准备,我们选用 Cre-loxp 遗传学系统进行 体内抑制性神经元特异性多聚核糖体的标记。利用生物化学的 方法从新鲜组织中快速纯化获得抑制性神经元特异性的多聚 核糖体结合型 mRNA,然后进行细胞类型特异性鉴定。建立从 小鼠大脑特定类型细胞中分离正在翻译的 mRNA 的体系的同 时,也为分析抑制性神经元特异的翻译表达谱分析提供材料, 为探索抑制性神经元特异的分子调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 **实验动物** 实验所用小鼠均为 SPF 级别,从 JAX 购买, 由清华大学实验动物平台饲养。C57/B6 为遗传学背景。所用小 鼠 JAX 全称及编号如下:

RiboHA: 全称 B6N.129-Rpl22tm1.1Psam/J, 编号 011029; EMX1-Cre: 全称 B6.129S2-Emx1tm1 (cre)Krj/J, 编号 005628; CaMK-Cre: 全称 B6.Cg-Tg (Camk2a-cre)T29-1Stl/J, 编号 005359; VGAT-Cre: 全称 B6.FVB-Tg (Slc32a1-cre)2.1 Hzo/FrkJ, 编号 017535; PV-Cre: 全称 B6; 129P2-Pvalbtm1 (cre) Arbr/J, 编号 008069。

1.1.2 主要试剂和仪器 2× PCR Super Mix (Vigorous), Avertin(Sigma),多聚甲醛(Sigma),振动切片机(Lica),阳离子 防脱载玻片(Lica),HA 鼠抗(Invitrogen),Parvalbumin 鼠抗(Invitrogen),荧光二抗(Invitrogen),DAPI 染料(Invitrogen),激光 共聚焦显微镜(Zeiss),Anti-HA Magnetic Beads(Thermo Fisher),cycloheximide (Sigma),RNase Inhibitor (Thermo)。Trizol (Invitrogen),RNA 酶 (Sigma),DNA 去除试剂盒(Invitrogen), SuperScript[™]III Reverse Transcriptase(Invitrogen),2× qPCR Super Mix(Transgene)。

1.1.3 引物序列 小鼠基因型鉴定所用引物序列: VGAT-Cre-F:GCATTTCTGGGGATTGCTTA; VGAT-Cre-R: GTCATCCTTAGCGCCGTAAA;PV-Cre-F:GCGGTCTGGCA-GTAAAAACTATC;PV-Cre-R:GTGAAACAGCATTGCTGTC-ACTT;RiboHA-F:GGGAGGCTTGCTGGATATG;RiboHA-R: TTTCCAGACACAGGCTAAGTACAC。

qRT-PCR 所用引物序列:兴奋性神经元 Marker:Vglut1-F: AGCATCTTGATGGGCATTTC;Vglut1-R:CAGGGAGGCTA- TGAGGAACA;抑制性神经元 Marker;GAD1-F:GCGACGA-GAAAAGCTACACA;GAD1-R:GAGATGACCATCCGGAAA-A; 星型胶质细胞 Marker :GFAP-F:AAGCCTCAAGGAGGA-GATGG;GFAP-R :GGATCTGGAGGTTGGAGAAA。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠基因型鉴定 将出生后一个月的小鼠按照性别分 笼并编号。剪取1 cm 左右的鼠尾放入 1.5 mL 的离心管中,加 入 120 μL 50 mM 的 NaOH 溶液,95 ℃金属浴煮 10 min,冷却 后加入 30 mL pH8.0 的 Tris-EDTA 中和混匀,以1 μL 为模版, 分别用 Cre 引物及 RiboHA 引物做 PCR 反应,反应之后的样品 用琼脂糖凝胶电泳检测分析结果。

1.2.2 灌流固定及振动切片 取 12 周龄的小鼠,按照 1:10 (w/v)注射浓度为 1.25%(w/v)的 Avertin 进行麻醉。麻醉之后 将小鼠腹部朝上四肢固定在手术盘中,剪开胸腔及隔膜,先用 pH7.4 的 PBS 溶液进行缓慢灌流,血液全部冲出后改用 4 %的 多聚甲醛溶液灌流,待小鼠全身僵直后停止灌流。将小鼠后颈 及头盖骨部位切开,小心取出完整的大脑,放入 5 倍体积的 4 %多聚甲醛溶液中,固定 24 h 至 48 h。

将固定好的小鼠大脑取出,用吸水纸吸干残留溶液,用手 术刀片进行冠状修片,修整后用2%的琼脂进行包埋。将封装 在琼脂里的大脑取出利用振动切片机切片,设置切片厚45 μM,选取含有海马部位的脑片贴于载玻片上,室温晾干,浸于 PBS 溶液中4℃保存。

1.2.3 脑片免疫荧光染色检测 HA 的表达 取出脑片,放入洗 片盒中,倒入 0.3 % pH6.0 的柠檬酸钠溶液,于微波炉中煮沸 3-5 min,取出室温放置缓慢冷却,即抗原修复完毕。将载玻片于 室温晾干,用防水笔围绕脑片画出一定范围以方便染色。用含 有 10 %标准山羊血清及 0.3 %TritonX-100 的 PBS 封闭液室温 封闭 1 h。吸掉封闭液,用封闭液稀释的 HA 抗体(1:200)4 ℃染 色过夜。PBST(0.3 % TritonX-100)洗片三次,每次 10 min。用 PBST 稀释好的荧光二抗(1:5000)及 DAPI (1:10000)进行室温 避光染色 1 h。PBST 洗片三次,每次 15 min。封片后于激光共聚 焦显微镜下观察。

1.2.4 免疫共沉淀获得 HA 标记的多聚核糖体 小鼠断颈处 死后,迅速取出大脑。分出海马组织进行称重,按照 1:10(w/v) 加入冰上预冷过的裂解缓冲液,利用匀浆器迅速研磨成匀浆, 在冰上孵育 30 min 以彻底裂解细胞。于 4 ℃ 20,000×g 离心 10 min,取上清置于冰上进行下一步免疫共沉淀实验,并留出 一部分作为 Input 提取 RNA。

上清中加入 25 µL Anti-HA Magnetic Beads,于 4℃旋转孵 育过夜。第二天利用磁力架进行 Beads 富集,高盐缓冲液清洗 beads 三次,每次 5 min。洗干净的 beads 于 -80℃保存,待提取 mRNA。

裂解缓冲液成分:20 mM Tris-Cl (pH 7.4),150 mM NaCl,5 mM MgCl₂,1 mM DTT,100 µg/mL cycloheximide,1% (v/v) Triton X-100,25 U/mL RNase Inhibitor。

高盐缓冲液成分:50 mM Tris-Cl (pH 7.4),300 mM NaCl, 12 mM MgCl₂,1 mM DTT,1% (v/v)Triton X-100。

1.2.5 提取多聚核糖体结合的 mRNA 及 Input 中的总 RNA 向 beads 中加入 500 μL Trizol 试剂,4℃摇震 15 min。4 ℃, 8000×g 离心 5 min 取上清。向上清中加入 0.1 mL 氯仿,剧烈

振荡 15 秒,室温放置 3 min,4℃10000×g 离心 15 min,样品分 为三层:底层为黄色有机相,上层为无色水相和一个中间层。 RNA 主要在水相中,把水相转移到新管中,加入等体积异丙醇 进行 RNA 沉淀,室温放置 10 min。4℃10000×g 离心 10 min, 移去上清,用 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀两次。室温干燥 10 min, 加入 20 μL Nuclease-free 水溶解,-80℃保存。

Input 中的总 RNA 提取步骤同上。

1.2.6 检测 mRNA 的纯度及完整性 取 5 μL 提取得到的 mRNA,用 RNA 酶 37 ℃处理 30 min,另取 5 μL 未作处理的作 为对照,跑琼脂糖凝胶电泳。另外取 1 μL mRNA 用 bioanalyzer 2100 检测。

1.2.7 qRT-PCR 检测 Marker 基因的表达 利用 Super-Script[™]III 反转录获得 cDNA,分别以 Input 所提取的总 RNA 及免疫共沉淀后提取的细胞类型特异性 mRNA 反转得到的 cDNA 作为模板,分别用兴奋性神经元、抑制性神经元、星型胶 质细胞的 Marker 基因的引物做 qRT-PCR 反应。反应体系为:上游引物 4 μ M,下游引物 4 μ M,qPCR Mix 10 μ L,模板 10 ng,

加水补充至 20 μL。统计学方法:以 GAPDH 为内参,利用比较 Ct 值法求得计算每个样品中每个目标基因的相对表达量,然后 将免疫共沉淀样品的值与 Input 样品的值相比,获得基因表达 富集倍数。两组间比较采用 t 检验, P<0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 利用 Cre-loxp 系统标记抑制性神经元中的核糖体

为获得抑制性神经元中特异表达带有 HA 标签的多聚核 糖体的小鼠,将 RiboHA 小鼠与 VGAT-Cre 小鼠杂交,另外为 进一步获得 PV 亚型的抑制性神经元(特异表达 parvalbumin 的抑制性神经元)特异的多醣体结合 mRNA,我们也将 Ribo-HA 纯合小鼠与 PV-Cre 小鼠杂交,后代出生一个月后进行基 因型鉴定,分别获得 VGAT-Cre; RiboHA 双阳性及 PV-Cre; RiboHA 双阳性小鼠, RiboHA 小鼠信息如图 1A,后代基因型鉴 定结果如图 1C,抑制性神经元特异的 mRNA 的获得与鉴定过 程如图 1B。



图 1 利用 Cre-loxp 系统标记特定细胞类型中的核糖体

Fig.1 Label the ribosomes in target cell population via cre-loxp system

注: A RiboHA 法示意图; B 细胞类型特异性 mRNA 获取与鉴定流程图; C 基因型鉴定结果。

Note: A A cartoon outlines the RiboHA methodology; B A flow chat outlines the cell-type-specific mRNA isolation methodology; C Some genotyping

results.

2.2 HA 在抑制性神经元中特异启动表达

以 RiboHA 单阳性小鼠作为对照,VGAT-Cre;RiboHA 小 鼠、PV-Cre;RiboHA 小鼠分别为实验组,进行灌流固定与切片 染色。HA 抗体免疫荧光染色结果显示,VGAT-Cre;RiboHA 小 鼠海马区 HA 在抑制性神经元中被启动表达,如图 2B。在 PV-Cre;RiboHA 小鼠海马区,HA 亦在 PV 抑制性神经元亚型 中被特异启动表达,如图 2C。为进一步确定神经元特异性,用 parvalbumin 抗体进行染色,结果显示其表达模式与 PV-Cre 启 动的 HA 表达模式一样,如图 2D。

2.3 免疫共沉淀获得抑制性神经元特异的核糖体结合的 mRNA

取 12 周龄的 Cre; RiboHA 小鼠,取其海马,利用 HA 抗体 偶联的磁珠进行免疫共沉淀实验,从获得的带有 HA 标签的多

聚核糖体中提取 mRNA,提取的 mRNA 取出一部分用 RNA 酶 处理,另取一部分对照不做任何处理,将对照组和处理组跑琼 脂糖凝胶。为进一步确定所获 mRNA 的完整性,用 bioanalyzer 2100。另外,许多亚细胞类型的细胞在大脑特定区域的总数量 较少,如 PV 阳性的抑制性神经元,提取获得的 mRNA 量不足 以通过跑胶观察,亦可直接通过 bioanalyzer 2100 进行检测。图 3A 展示了分别从阳性对照 EMX1-Cre;RiboHA 小鼠海马、 CaMK-Cre;RiboHA 小鼠海马,阴性对照 RiboHA 小鼠,以及实 验组 VGAT-Cre;RiboHA 小鼠海马中提取的不同细胞类型中 的 mRNA,为进行后续的翻译表达谱分析,每个样品仅来源于 一只小鼠的海马。带型分析显示,获得了较高质量的 RNA,可 用于后续高通量建库测序。图 3B 展示了 mRNA 的 bioanalyzer 2100 检测结果。峰图分布及 RIN 值显示 RNA 的完整性较高。 2.4 所获 mRNA 具有抑制性神经元特异性

为方便进行后续高通量测序与分析,选用 SuperScript[™]III 进行 mRNA 反转获得 cDNA,以所得 cDNA 为模版,利用 qRT-PCR 的方法分别检测兴奋性神经元 Marker 基因 Vglut1, 抑制性神经元 Marker 基因 Gad1 及星型胶质细胞的 Marker 基 因 GFAP 的表达,并与未经过免疫共沉淀的 Input 相比较,分析 Marker 基因的富集情况。qRT-PCR 结果显示,通过免疫共沉淀 从 VGAT-Cre;RiboHA 及 PV-Cre;RiboHA 小鼠海马中提取获 得的 mRNA 中,抑制性神经元特异的 Marker 基因被显著富 集,而兴奋性神经元或星型胶质细胞特异的 Marker 基因被去 除,如图 4A-B。进一步 cDNA 的 bioanalyzer 2100 检测结果显 示,所得细胞类型特异性 cDNA 质量较高,可用于后续高通量 测序与分析,如图 4C。



图 2 VGAT/PV-Cre 在抑制性神经元中启动 HA 的表达

Fig.2 HA is activated in the inhibitory neurons by VGAT/PV-Cre

注: A VGAT-Cre; RiboHA 小鼠海马区 HA 抗体免疫荧光染色结果; B RiboHA 对照小鼠海马区 HA 抗体免疫荧光染色结果; C PV-Cre; RiboHA 小 鼠海马区 HA 抗体免疫荧光染色结果; D PV-Cre; RiboHA 小鼠海马区 Parvalbumin 抗体免疫荧光染色结果。图中标尺均为 200 μm。 Note: A Immunofluorescent staining of VGAT-Cre; RiboHA mouse hippocampus using HA antibody; B Immunofluorescent staining of RiboHA control mouse hippocampus using HA antibody; C Immunofluorescent staining of PV-Cre; RiboHA mouse hippocampus using HA antibody; D Immunofluorescent staining of PV-Cre; RiboHA mouse hippocampus using Parvalbumin antibody. Rulers are all 200 μm.



Fig.3 Polyribosome-associated mRNAs isolated from the target cells

注:A 分别从 RiboHA 对照小鼠、EMX1-Cre; RiboHA 小鼠、CaMK-Cre; RiboHA 小鼠、VGAT-Cre; RiboHA 小鼠海马中提取获得的细胞类型特异性的核糖体结合 mRNA,每个样品来源于一只小鼠,利用琼脂糖凝胶电泳检测带型,右边为 RNA 酶处理检测纯度;B Bioanalyzer 2100 检测 mRNA的质量,RIN>8.0。

Note: A Cell-type-specific polyribosome-associated mRNAs isolated from the hippocampus of RiboHA control mouse, EMX1- Cre; RiboHA mouse, CaMK-Cre; RiboHA mouse, VGAT-Cre; RiboHA mouse, each sample was from one mouse, agarose gel electrophoresis show the pattern of mRNAs, the right lanes show the RNase-treated results; B Bioanalyzer 2100 test of the mRNAs, RIN>8.0.





注:A 检测 VGAT-Cre;RiboHA 小鼠海马提取的 mRNA 中,兴奋性神经元特异性基因 Vglut1、抑制性神经元特异性基因 Gad1、星形胶质细胞特异性基因 GFAP 的富集;B 检测 PV-Cre;RiboHA 小鼠海马提取的 mRNA 中,兴奋性神经元特异性基因 Vglut1、抑制性神经元特异性基因 Gad1、星形胶质细胞特异性基因 GFAP 的富集;C Bioanalyzer 2100 检测 cDNA 质量。

*号表示显著性差异。

Note: A Evaluate the enrichment of excitatory specific marker gene Vglut1, inhibitory specific marker gene Gad1 and astrocyte specific gene GFAP of the mRNAs extracted from VGAT-Cre;RiboHA mouse; B Evaluate the enrichment of excitatory specific marker gene Vglut1, inhibitory specific marker gene Gad1 and astrocyte specific gene GFAP of the mRNAs extracted from PV-Cre;RiboHA mouse; C Bioanalyzer 2100 test of the cDNAs. The * indicates significant difference.

3 讨论

抑制性神经元通过控制动作电位的产生,协调兴奋性神经 元的活动,防止神经网络过度兴奋来参与大脑活动的调节^[89]。 不同亚型的抑制性神经元在形态、基因表达、电生理特性、连接 的下游神经元等方面存在很大差异^[10],按照基因表达的不同抑 制性神经元被分为三大亚型:SST 神经元、PV 神经元、5HT3a 神经元^[11],它们分别如何参与神经系统的调节,相互之间如何 沟通与协作仍然是未知的。利用不同亚型的抑制性神经元对应 的 Cre 特异性表达小鼠,对不同类型神经元在特定大脑活动中 表达谱的动态分析,将为理解上述问题提供有力的工具。

哺乳动物大脑的高级机能活动如学习记忆依赖于神经系 统的可塑性[12,13],而这种神经系统可塑性依赖于分子水平的更 新与调控[1416]。当人为阻断大脑中的转录或翻译时,大脑正常的 功能将被扰乱[17,18],与转录或翻译调控相关的基因发生自然突 变时亦会引起疾病的产生,如Fmrl 基因功能缺陷导致的翻译 调控紊乱引起的自闭症[19-23]。得益于高通量测序与分析技术的 发展,从全基因组水平研究细胞在生理或病理状态下的分子调 控网络已成为可能。体外研究表明同兴奋性神经元和抑制性神 经元接受相同的上游信号和刺激时,由不同的基因程序所响 应[2427],同一转录因子在兴奋性神经元和抑制性神经元中启动 的下游调控程序也是不同的[28]。胶质细胞与神经元有着完全不 同的分子表达模式,按照形态与功能也可分为很多种类,传统 观点认为它们主要起组成、支撑和免疫功能,但越来越多的证 据表明胶质细胞可参与神经元的信息传递与加工[29-33]。由此可 见,要想真正了解大脑如何行使功能,不同的细胞如何参与调 控,它们之间又有怎样的联系,都需要通过细胞类型特异性的 实验来解决。

大脑作为高级机能行使单位,通过体外培养的细胞难以模 拟学习记忆等高级活动。而大脑本身细胞形态特殊,且相互之 间交错连接,形成物理和功能上的联系,要想通过传统的机械 分离与消化,结合流式细胞分选技术(FACS)或者激光捕获技 术(LCM)分离140的方法分离所需的细胞并不可行,这些传统方 法对神经元的形态、mRNA 及蛋白表达等都会产生破坏或影响⁹⁹。 而本文利用遗传学进行载体标记,进一步通过免疫共沉淀直接 从新鲜组织匀浆中获得细胞类型特异性 mRNA,相比于 FACS 或 LCM 的优势在于,第一,该方案避免了分离细胞过程中其它 类型细胞的污染及目标类型细胞的损失;第二,由于不需要分 离细胞所需的处理步骤,避免了长时间操作对于特定采样时间 点翻译水平的影响;第三,采用了 Cre-loxp 系统,该系统可以高 效地保证特异性表达[2],经典可靠;第四,将组织匀浆裂解后, 可以直接利用免疫沉淀获得特异类型细胞的核糖体 -mRNA 复 合体,简单高效;第五,RiboHA 小鼠的核糖体蛋白标签来源于 内源性等位基因的表达,相比于其它外源基因对小鼠本身的行 为影响较小。当然,此方法也依赖于是否有合适的 Cre 小鼠来 研究所感兴趣的细胞群体,但随着基因组操作技术的发展,特 异性的 Cre 小鼠的获得越来越容易,种类也越来越全面,使该 种方法适用的细胞范围更加广泛。

利用遗传系统标记结合蛋白免疫共沉淀,从小鼠大脑抑制 性神经元中高效特异地获得多聚核糖体结合的 mRNA 的方 法,结合当下发展迅速的小量测序、核糖体印记分析^[4437]等技 术,将成为强大的获取体内全基因组水品细胞类型特异性 mR-NA 翻译表达谱的工具,既可以通过分析生理状态下转录组及 翻译组的动态变化,解析不同细胞类型在高级认知功能中的功 能与联系,亦可通过分析病理条件下转录组及翻译组的调控网 络变化,帮助我们认识治病机制,也为寻找药物靶点提供依据 和选择。

参考文献(References)

- Hensch TK. Critical period plasticity in local cortical circuits [J]. Nat Rev Neurosci, 2005, 6(11): 877-888
- [2] Wiesel TN, Hubel DH. Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye [J]. J Neurophysiol, 1963, 26 (26): 1003-1017
- [3] Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia[J]. Nat Rev Neurosci, 2005, 6(4): 312-324

- [4] Hempel CM, Sµgino K, Nelson SB. A manual method for the purification of fluorescently labeled neurons from the mammalian brain[J]. Nat Protoc, 2007, 2(4): 2924-2929
- [5] Lobo MK, Karsten SL, Gray M, et al. FACS-array profiling of striatal projection neuron subtypes in juvenile and adµlt mouse brains[J]. Nat Neurosci, 2006, 9(3): 443-452
- [6] Rossner MJ, Hirrlinger J, Wichert SP, et al. Global transcriptome analysis of genetically identified neurons in the adµlt cortex [J]. J Neurosci, 2006, 26(39): 9956-9966
- [7] Yao F, Yu F, Gong L, et al. Microarray analysis of fluoro-gold labeled rat dopamine neurons harvested by laser capture microdissection[J]. J Neurosci Methods, 2005, 143(2): 95-106
- [8] Isaacson J, Scanziani M. How inhibition shapes cortical activity [J]. Neuron, 2011, 72(2): 231-243
- [9] Somogyi P, Klausberger T. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus [J]. J Physiol, 2005, 562(1): 9-26
- [10] Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, et al. Interneurons of the neocortical inhibitory system [J]. Nat Rev Neurosci, 2004, 5 (10): 793-807
- [11] Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons[J]. Dev Neurobiol, 2011, 71(1): 45-61
- [12] Wall JT, Xu J, Wang X. Human brain plasticity: an emerging view of the multiple substrates and mechanisms that cause cortical changes and related sensory dysfunctions after injuries of sensory inputs from the body[J]. Brain Research Reviews, 2002, 39 (2-3): 181-215
- [13] Bach-y-Rita P. Sensory Plasticity[J]. Acta Neurologica Scandinavica, 1967, 43(4): 417-426
- [14] Agranoff B. Chemistry of Mood, Motivation, and Memory (Plenum, New York), 1970
- [15] Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, et al. The long and the short of long-term memory a molecular framework [J]. Nature, 1986, 322 (6078): 419-422
- [16] Castellucci VF, Kennedy TE, Kandel ER, et al. A quantitative analysis of 2-D gels identifies proteins in which labeling is increased following long-term sensitization in Aplysia [J]. Neuron, 1989, 1 (4): 321-328
- [17] Nguyen PV, Abel T, Kandel ER. Requirement of a Critical Period of Transcription for Induction of a Late Phase of LTP [J]. Science, 1994, 265(5175): 1104-1107
- [18] Igaz LM, Vianna MR, Medina JH, et al. Two Time Periods of Hippocampal mRNA Synthesis Are Requiredfor Memory Consolidation of Fear-Motivated Learning [J]. Journal of Neuroscience, 2002, 22 (15):6781-6789
- [19] Hagerman, RJ, Hagerman, PJ. Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment and Research (Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press), 2002
- [20] Gatto, CL, Broadie K. The fragile X mental retardation protein in circadian rhythmicity and memory consolidation [J]. Mol Neurobiol, 2009, 39(39): 107-129

- [21] Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome [J]. Cell, 1991, 65(5): 905-914
- [22] Bassell GJ, Warren ST. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function[J]. Neuron, 2008, 60 (2): 201-214
- [23] Zukin RS, Richter JD, Bagni C. Signals, synapses, and synthesis: how new proteins control plasticity[J]. Front Neural Circuits, 2009, 3: 14
- [24] Bloodgood BL, Sharma N, Browne HA, et al. The activity-dependent transcription factor NPAS4 regulates domain-specific inhibition [J]. Nature, 2013, 503(7474): 121-125
- [25] Lin YX, Bloodgood BL, Hauser JL, et al. Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4 [J]. Nature, 2008, 455(7217): 1198-1204
- [26] Isaacson JS, Scanziani M. How inhibition shapes cortical activity[J]. Neuron, 2011, 72(2): 231-243
- [27] Somogyi P, Klausberger T. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus [J]. The Journal of physiology, 2005, 562(1): 9-26
- [28] Spiegel I, Mardinly A, Gabel H, et al. Npas4 regulates excitatory-inhibitory balance within neural circuits through cell-type-specific gene programs[J]. Cell, 2014, 157(5): 1216-1229
- [29] Halassa MM, Dal MM, Beltramo R, et al. Integrated brain circuits: neuron-astrocyte interaction in sleep-related rhythmogenesis [J]. The Scientific World Journal, 2010, 10(1): 1634-1645
- [30] Halassa MM, Haydon PG. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior [J]. Annual review of physiology, 2010, 72(1): 335-355
- [31] Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, et al. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes [J]. Nature, 2010, 463 (7278): 232-236
- [32] Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information [J]. Trends in neurosciences, 2009, 32(8): 421-431
- [33] Jahanshahi M, Sadeghi Y, Hosseini A, et al. The effect of spatial learning on the number of astrocytes in the CA3 subfield of the rat hippocampus[J]. Singapore medical journa, 2008, 49(5): 388-391
- [34] Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, et al. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments [J]. Nature Protocol, 2012, 7 (8): 1534-1550
- [35] Ingolia NT. Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale[J]. Nature, 2014, 15(3): 205-213
- [36] Licatalosi DD, Darnell RB. RNA processing and its regulation: global insights into biological networks [J]. Nat Rev Genet, 2010, 11 (1): 75-87
- [37] Buchstaller J, Sommer L, Bodmer M, et al. Efficient isolation and gene expression profiling of small numbers of neural crest stem cells and developing Schwann cells [J]. J Neurosci, 2004, 24 (10): 2357-2365