分子细胞卓越中心构建双同源重组报告系统

作者：writer 来源：中国科学院

本文原地址：https://www.iikx.com/news/progress/7883.html

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

2019年11月26日，国际学术期刊*Journal of Biological Chemistry*在线发表了中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/生物化学与细胞生物学研究所周斌研究组的科研成果“ *Triple-cell lineage tracing by a dual reporter on a single allele* ”。该研究基于Dre-rox和Cre-loxP双同源重组系统，构建了一种新的双同源重组报告系统，可以达到在体内同时标记示踪三种细胞群。这一研究为新型双同源重组报告系统的构建提供了新的思路，进一步扩充了双同源重组报告系统库，并为发育、疾病和再生研究提供了新的技术选择。

基于基因位点特异性重组酶系统的遗传谱系示踪技术被广泛应用于器官发育、组织再生和疾病研究。目前，多种重组酶系统被普遍使用，例如Cre-loxP、Flpe-frt和Dre-rox系统。其中使用最普遍的为Cre-loxP系统。Cre重组酶受组织或细胞特异性启动子驱动，当Cre识别两个同向loxP位点之后，会诱导Cre-loxP重组，并将两个loxP位点之间的转录终止序列切除，从而使转录终止序列之后的报告基因表达。由于这种切除事件发生在基因水平上，具有永久性和不可逆性，因此表达Cre的细胞群及其子代细胞（无论是否还在表达Cre）都将永久性地被报告基因蛋白所标记。

目前，已经有多种双同源重组报告系统被构建，可多方式地对靶细胞进行标记，进行更精确的谱系示踪研究。例如*R26::FLAP*，*RC::Fela*，*R26NZG*，*RC::RLTG*，*IR1*，*NR1*，*R26-TLR*等，可在体内同时标记更精确的两种细胞群。在以往的双同源重组系统中，由于两种重组酶识别位点的排列方式是相间排列或嵌套排列，其两种报告基因的表达会彼此影响，无法各自独立表达。而且它们无法在体内同时标记更多的细胞群。在器官发育或组织再生中，一种细胞可能有多种发育起源，例如在心脏发育中，其成纤维细胞、脂肪细胞、周细胞、冠状动脉内皮细胞起源于心

+

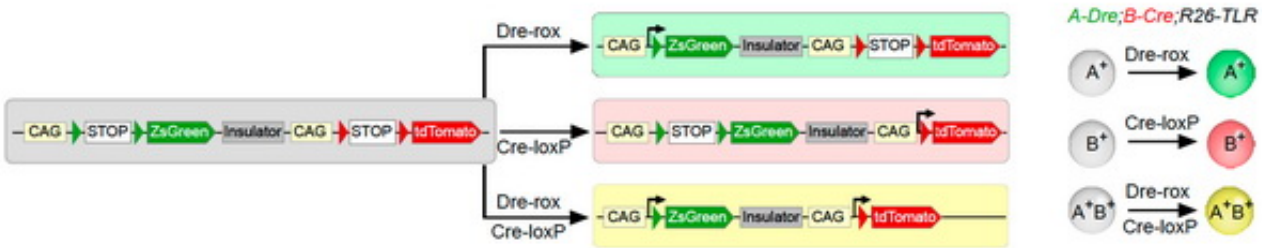
干细胞能分化为潘氏细胞、杯状细胞、肠内分泌细胞及肠上皮细胞等各种小肠特化细胞。因此，构建一种新的具有在体内同时对多种细胞群进行标记能力的双同源重组系统将对发育和再生生物学研究具有重要意义。

为了解决这一问题，研究人员基于Dre-rox和Cre-loxP同源重组酶系统，构建了一种新的双同源重组报告系统，称为*R26-TLR*（*R*osa26-*T*raffic *L* ight *R* eporter）。*R26-TLR*的具体结构为Rosa26-CAG-rox-Stop-rox-Zsgreen-insulator-CAG-loxP-Stop-loxP-tdTomato

。当发生Dre-rox重组后，ZsGreen基因会表达，而发生Cre-loxP重组后tdTomato基因会表达。ZsGreen和tdTomato的表达能够受独立的重组事件调控而不会相互影响。当一个细胞同时表达Dre和Cre重组酶时，这个细胞会同时发生Dre-rox和Cre-loxP重组而同时表达ZsGreen和tdTomato。所以这个系统可对三种细胞群进行同时
标记示踪。研究人员进一步利用*Sftpc-DreER;Scgb1a1-CreER;R26-TLR*三基因型小鼠进行体内验证。Sftpc是肺脏II型肺泡上皮细胞（AT2 cell）的分子标记，Scgb1a1是支气管棒状细胞（club
cell）的分子标记。$Sftpc^{+}Scgb1a1^{+}$
双阳性支气管肺泡干细胞（BASCs）位于支气管和肺泡交界处（BADJs），是一群新发现的多潜能肺上皮干细胞。对以上三基因型小鼠进行Tamoxifen诱导后，收取肺脏组织进行免疫荧光分析，证实了*R26-TLR*特异性地在体内同时将$Sftpc^{+}$
II型肺泡上皮细胞标记成$ZsGreen^{+}tdTomato^{-}$ 绿色荧光，将$Scgb1a1^{+}$
棒状细胞标记成$tdTomato^{+}ZsGreen^{-}$红色荧光，将$Sftpc^{+}Scgb1a1^{+}$
BASCs标记成$ZsGreen^{+}tdTomato^{+}$
黄色荧光。进一步对肺脏进行损伤，发现可同时示踪这三种细胞群的在肺损伤修复中的不同响应情况。发现在萘（
Naphthalene）诱导的支气管上皮损伤
修复过程中，$tdTomato^{+}ZsGreen^{-}$
示踪的棒状细
胞主要负责再生远离支气管
末端的棒状细胞和纤毛细胞，而$ZsGreen^{+}tdTomato^{+}$
示踪的BASCs负责再生支气管末端的棒状细胞和纤毛细胞。在博来霉素（Bleomycin）诱导的肺泡损伤后，$ZsGreen^{+}tdTomato^{-}$
示踪的II型肺泡上皮细胞
负责修复再生远离BADJ的肺泡上皮，而$ZsGreen^{+}tdTomato^{+}$
示踪的BASCs负责再生BADJ附近
区域的肺泡上皮。总结来讲，*R26-TLR*
可在体内同时标记三种细胞群，为发育、疾病和再生研究提供了新的研究工具。

该研究工作在研究员周斌的指导下，由研究生刘扩等完成，并得到了研究员季红斌的大力支持，同时得到中科院、国家基金委、国家科技部、上海市科委等的资助。

文章链接



双同源重组系统R26-TLR可同时在体内对三种细胞群进行标记示踪

研究团队单位：分子细胞科学卓越创新中心/生物化学与细胞生物学研究所

更多 科学进展 请访问 https://www.iikx.com/news/progress/

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，爱科学iikx.com转发