

DOI: 10.13376/j.cblls/2015085

文章编号: 1004-0374(2015)05-0631-09

· 技术与应用 ·

黑腹果蝇二元表达系统原理及应用

陈轮号¹, 刘恽君^{2*}

(1 浙江大学医学院临床医学系, 杭州 310058; 2 浙江大学医学院神经生物学系, 杭州 310058)

摘要: 二元表达系统是简单、高效的遗传操作工具, 提高了特定基因的重组效率, 实现了基因精确时空表达。目前应用于黑腹果蝇的二元表达系统主要有 GAL4/UAS、FLP/FRT、LexA/lexAop、Q 系统以及 Cre/loxP、CRISPR/Cas9 系统, 其中 GAL4/UAS 和 FLP/FRT 系统应用最为广泛。二元表达系统的联合成功应用于嵌合体的构建, 为细胞谱系分析、细胞间相互作用等研究提供了强有力的工具。综述了果蝇二元表达系统的原理、应用及各系统之间的联合应用, 为研究者选择遗传操作工具提供了参考。

关键词: 黑腹果蝇; 基因表达; 遗传技术

中图分类号: Q-31; Q786; S436.631.29

文献标志码: A

The principle and applications of binary expression systems in *Drosophila melanogaster*

CHEN Lun-Hao¹, LIU Yi-Jun^{2*}

(1 Department of Clinical, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2 Department of Neurobiology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Binary expression systems are simple and ideal genetic techniques, which have increased efficiency of gene recombination and allowed the precise manipulation of gene expression in a temporal and spatial fashion. Binary expression systems widely used in *Drosophila melanogaster* at present include GAL4/UAS, FLP/FRT, LexA/lexAop, Q system, Cre/loxP, and CRISPR/Cas9 system, and among them, GAL4/UAS system and FLP/FRT system are most widely used. The combination of these systems has succeeded in establishing mosaic, providing powerful techniques for studies in cell lineage analysis, interaction among cells and so on. This review summarizes the principle and applications of binary expression systems in *Drosophila melanogaster* and further introduces the co-applications among these systems. Our intention is to provide guidance and suggestions regarding which genetic tools are most suitable for researchers.

Key words: *Drosophila melanogaster*; gene expression; genetic techniques

黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*), 因伴性遗传为人们所熟知, 又因二元表达系统的应用而成为科研界的宠儿。实验研究中, 研究者可以通过精确的遗传操作标记组织或细胞, 提高实验的特异性, 达到在组织或细胞中精确调控某一基因等目的。目前, 实现精确遗传操作的重要工具之一是二元表达系统。二元表达系统通常由调控基因表达的两个部件构成: (1) 组织特异性的转录激活因子; (2) 受上游激活序列控制的目的基因。当组织特异性转录激活因子与上游激活序列结合后, 目的基因出现表达。

应用于果蝇的二元表达系统主要有 GAL4/UAS、FLP/FRT^[1]、LexA/lexAop^[2]、CRISPR/Cas9 系统^[3-4]、Q 系统^[5-6]及 Cre/loxP^[7]系统, 其中 GAL4/UAS、FLP/FRT 系统应用最为广泛, 也是多重二元表达系统联合应用的基石。二元表达系统的单独及联合应用大

收稿日期: 2015-01-23; 修回日期: 2015-02-17

基金项目: 浙江省科技计划项目(2013C37001)

*通信作者: E-mail: yjliu@zju.edu.cn; Tel: 0571-88206271

大提高了基因表达的时空特异性、遗传操作的效率以及实验的可重复性,使得果蝇这一模式动物更加广泛地应用于科学研究的各个领域。

1 果蝇二元表达系统简介

1.1 GAL4/UAS系统

半乳糖调节上游启动子元件 (galactose-regulated upstream promoter element, GAL4) 是在酵母中发现的转录激活因子,可以与 DNA 序列中的特殊位点半乳糖上游激活序列 (galactose upstream activating sequence, UAS_G 或 UAS) 结合,诱导 UAS 下游基因的转录与翻译。利用分别带有 $GAL4$ 和 UAS 的转基因果蝇品系进行杂交,产生的后代可以条件性表达 UAS 序列所连接的目的基因 (图 1A)。

值得注意的是,利用不同特性的 $GAL4$ 可以实现基因在不同的时间和空间特异性表达。为了精确控制果蝇中 $GAL4/UAS$ 系统表达,目前有 3 种常用方法: (1) 利用 $GAL4$ 的抑制因子 $GAL80$ 去调节 $GAL4$ 的活性^[8]; (2) 利用物理的方法,如将热休克蛋白启动子与 $GAL4$ 基因相连后通过热激诱导 $GAL4$ 蛋白表达^[9]; (3) 利用化学方法,如四环素应答系统,调控 $GAL4/UAS$ 系统的表达^[10]。

1.2 FLP/FRT系统

FLP/FRT 系统首先于酵母体内发现,是一种位点特异性重组系统。 FLP 重组酶 (flippase recombination enzyme) 具有位点特异性, FRT 是 FLP 重组酶的特异性结合位点。 FLP 重组酶可根据两段 FRT 序列的方向及位置差异而产生不同的基因重组结果 (图 1B): (1) 当两段 FRT 序列方向一致并在同一条 DNA 上, FLP 可以介导删除 FRT 序列之间的 DNA 片段和一个 FRT 序列,并使被删除的序列成环而丧失转录活性; (2) 若 FRT 序列位于同一条 DNA 上但方向相反,则 FLP 会介导 FRT 序列之间的倒位; (3) 若 FRT 序列位于两条 DNA 序列上,则 FLP 介导侧翼序列 (flanking sequence) 之间的易位。 FLP/FRT 系统常应用于基因的定点敲除及嵌合体的构建 (图 1C)。

1.3 LexA/lexAop系统

Lai 和 Lee^[2] 建立了独立于 $GAL4/UAS$ 系统之外的 $LexA/lexAop$ 系统。该系统的原理与 $GAL4/UAS$ 系统类似,能够诱导基因的时空表达,但是这两个系统之间互不干扰,因而有潜力成为另一广泛应用的二元表达系统。 $lexA$ operator, 简称 $lexAop$, 是受 $LexA$ 蛋白调控的操纵基因,当 $LexA$ 与 $lexAop$

结合后,可以激活 $lexAop$ 下游基因的转录。 $VP16$ 是疱疹病毒的一个转录激活因子, $LexA$ 和 $VP16$ 分别与 $lexAop$ 和目的基因活化序列结合后,激活目的基因的转录。由于该过程不能被 $GAL80$ 所抑制,因此又叫作非 $GAL80$ 抑制的 $LexA/lexAop$ 系统 (图 1D 左)。相类似的, $LexA$ 和 $GAL4$ 激活结构域 ($GAL4$ activation domain, GAD) 与 $lexAop$ 及后续序列结合,同样可以激活目的基因转录。但是当该系统内引入 $GAL80$ 后,由于 $GAL80$ 结合 GAD 可以抑制 $lexAop$ 下游基因的转录,因此又叫作 $GAL80$ 抑制的 $LexA/lexAop$ 系统 (图 1D 右)。

1.4 Q系统

Potter 等^[5-6] 利用脉孢菌 (*Neurospora*) 的 qa 基因簇设计了一种新的二元表达系统—— Q 系统。 Q 系统与 $LexA/lexAop$ 系统的原理类似,与 $GAL4/UAS$ 系统互不干扰。该系统由 3 大原件组成: 转录激活因子 $qa-1f$ (QF)、效应元件 $QUAS$ 以及 QF 的抑制子 $qa-1s$ (QS)。在 Q 系统中, $QUAS$ 为一段 5 个拷贝 (每个拷贝长度 16 bp) 的序列,与下游的目的基因相连。 QF 为转录激活因子,当其表达后与 $QUAS$ 结合,激活目的基因的表达; QS 为 QF 的抑制子,当 QS 表达时,抑制 QF 与 $QUAS$ 结合 (图 1E); 奎尼酸 (quinic acid) 可以解除 QS 的抑制作用,该抑制作用具有剂量依赖性。

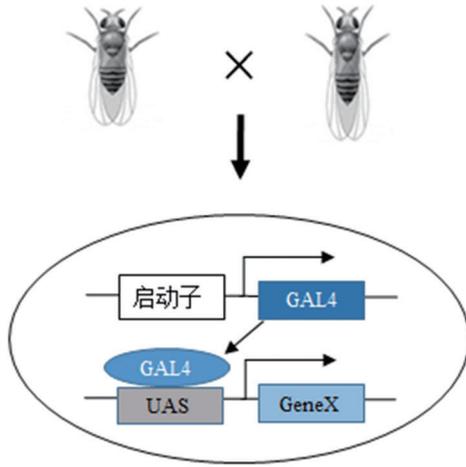
Q 系统与 $GAL4/UAS$ 系统相比,能够更加精确地标记一个或一小群细胞^[5]; 但是, Q 系统的限制是特异性表达的 QF 品系少,且构建果蝇品系需要转入的基因多,操作复杂,因而该系统的应用范围相较 $GAL4/UAS$ 系统更为有限,目前主要应用于以线虫和果蝇为模式动物的研究。

1.5 Cre/loxP系统

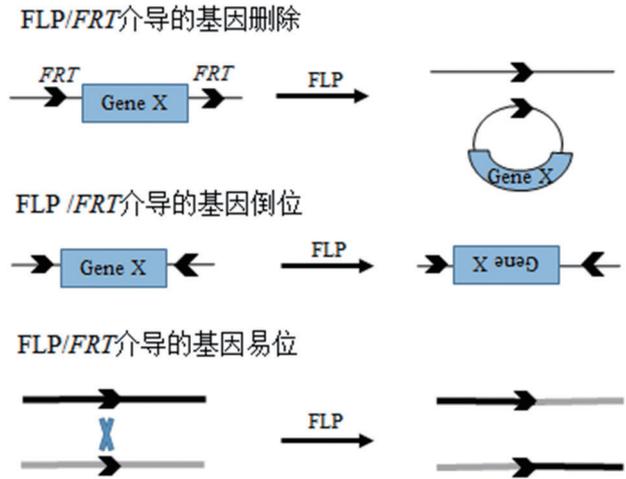
$Cre/loxP$ 系统首先发现于 $P1$ 噬菌体中^[11-13], 被广泛应用于哺乳动物的基因操作。该二元表达系统中, Cre 重组酶 (causes recombination enzyme) 相对分子质量为 3.8×10^4 , 可以特异性识别 34 bp 的 $loxP$ (locus of X -over $P1$) 序列,直接介导 $loxP$ 位点之间的基因重组。 Cre 介导的 $loxP$ 位点之间的基因重组具有方向性。当两个 $loxP$ 位点位于一条 DNA 链上,且方向相同, Cre 能有效切除两个 $loxP$ 位点间的序列; 两个 $loxP$ 位点方向相反, Cre 则导致两个 $loxP$ 位点之间的序列倒位。当两个 $loxP$ 位点分别位于两条不同的 DNA 链上, Cre 介导两链之间的基因交换。

虽然 $Cre/loxP$ 系统的原理与 FLP/FRT 系统类

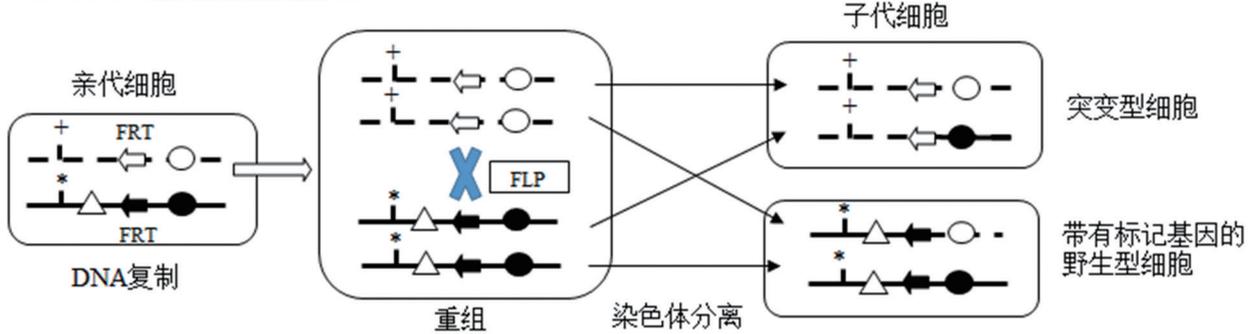
A. GAL4/UAS系统



B. FLP/FRT系统

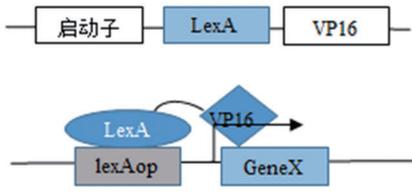


C. FLP/FRT系统构建嵌合体

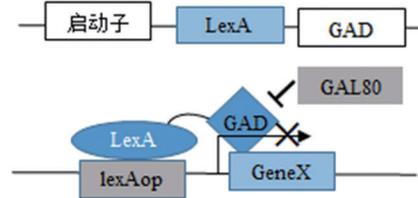


D. LexA/lexAop系统

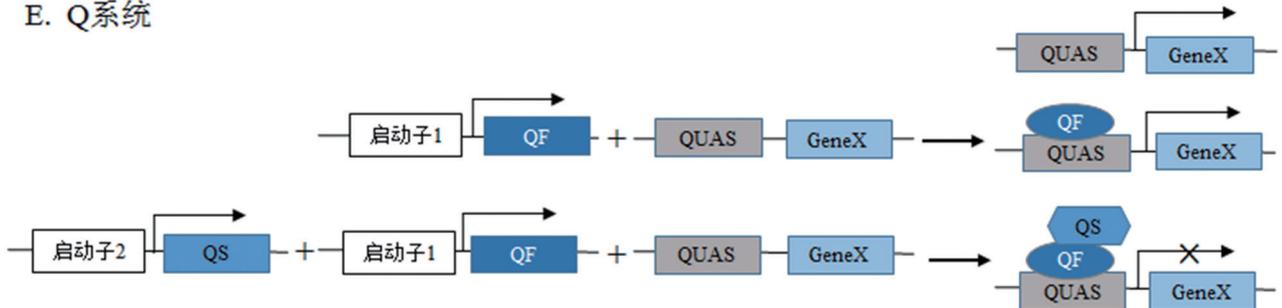
非GAL80 抑制的LexA/lexAop系统



GAL80 抑制的LexA/lexAop系统



E. Q系统



A: GAL4/UAS系统。GAL4基因在启动子的存在下出现表达, 表达产物与UAS基因结合从而诱导UAS下游的基因X的表达。
 B: FLP/FRT系统。FLP介导同一DNA链上方向一致的FRT序列之间的基因删除, 方向相反的FRT序列之间的基因倒位, 同源染色体FRT位点之间的基因交换。
 C: FLP/FRT系统构建嵌合体。FLP介导了同源染色体FRT(箭头)位点之间的有丝分裂重

组, 形成野生型(*)和突变型(Δ)两种子代细胞。D: LexA/*lexAop*系统。LexA和VP16分别与*lexAop*和基因X前的一段活化序列结合诱导基因X的转录翻译, 该过程不能被GAL80所抑制(左); LexA和GAD分别与*lexAop*和基因X前的一段活化序列结合诱导基因X的转录翻译, 该过程可通过GAL80抑制GAD而阻止基因X的转录(右)。E: Q系统。*QUAS*与下游的基因X相连, 因缺乏转录激活因子QF而不出现表达; 当QF存在时, 基因X出现表达, 该过程可被QF的抑制子QS抑制。

图1 黑腹果蝇二元表达系统原理示意图

似, 但两者的应用存在许多差异: FLP 受热更易分解, 30 °C为其最适温度, 当温度超过 39 °C时则基本检测不到活性, 而 Cre 的最适温度为 37 °C或更高。因此, Cre/*loxP* 系统更适用于哺乳动物, 而 FLP/*FRT* 系统则适用于培养细胞以及果蝇等变温动物的基因改造^[11]。尽管早在 1996 年, Siegal 和 Hartl^[7] 已将 Cre/*loxP* 系统应用于果蝇, 并成功删除了白眼基因, 但是该系统在以果蝇为模式动物的研究中应用非常有限。

2 不同二元表达系统的优缺点对比

虽然上述 5 种二元表达系统为细胞增殖、分化及个体发育过程提供了有利的研究工具, 但是每种二元表达系统均具有一定的局限性, 如组织表达不够特异、热激改变生理特性等。表 1 总结了上述 5 种方法的优缺点, 以便于研究者根据实际情况进行选择。

3 二元表达系统之间的联合应用

3.1 GAL4/*UAS*和FLP/*FRT*系统的联合应用

Duffy 等^[14] 研究发现, FLP/*FRT* 具有特定位点重组的优点。过去的研究者运用热休克蛋白、紫外线(UV)等方法激活 FLP/*FRT* 系统, 但是这些物理方法缺点是致死率高, 无法控制表达特异性, 并且

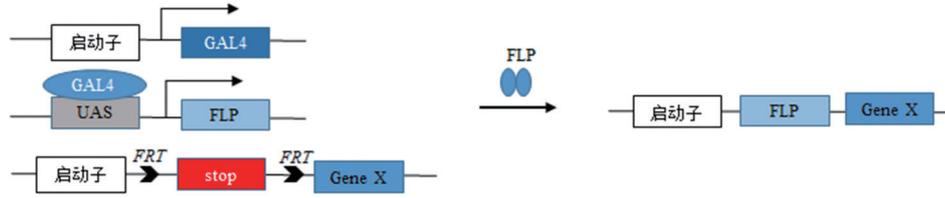
成功率低^[14]。后来, Duffy 等^[14] 利用 GAL4/*UAS* 系统调控特异性表达, 与 FLP/*FRT* 系统联合应用, 发展了“定向嵌合体(directed mosaic)”技术(图 2A), 克服了非特异性表达, 并避免了传统物理方法对果蝇生理的影响, 提高了实验成功率和重复性。“定向嵌合体”技术成功继承了过去 FLP/*FRT* 系统的优点, 可以用于 DNA 链内部及不同 DNA 链间的特定位点重组。

在这两个系统的基础上, 又有研究者引入了 GAL4 的抑制基因 *GAL80*, 构建了 FINGR (ET-FLP-induced intersectional GAL80/*GAL4* repression) 系统^[15-16] (图 2B)。FINGR 系统由 3 个部分组成: (1) GAL4/*UAS* 系统; (2) FLP/*FRT* 系统介导的 *GAL80* 转化工具; (3) ET-FLP2 (enhancer-trap FLP2)。这 3 个部分之间起到了相互制约的作用: *GAL80* 可以抑制 GAL4 的活性^[2], 而 FLP/*FRT* 系统可以调控 *GAL80* 的表达。FINGR 系统由两个相互补充的策略组成: *tubP>GAL80>* (“Flp-out”, “>”表示 *FRT*, 下同) 和 *tubP>stop>GAL80* (“Flp-in”)。“Flp-out”的原理是: FLP 介导的特定位点重组发生后, *GAL80* 基因被删除, 解除了 *GAL80* 蛋白对 GAL4 的抑制, *UAS* 下游的基因出现表达。“Flp-in”的原理与“Flp-out”相反, FLP 介导的特定位点重组后, 抑制 *GAL80* 表达的基因被删除, *GAL80* 在特定组织中

表1 目前应用于果蝇的二元表达系统的优缺点对比

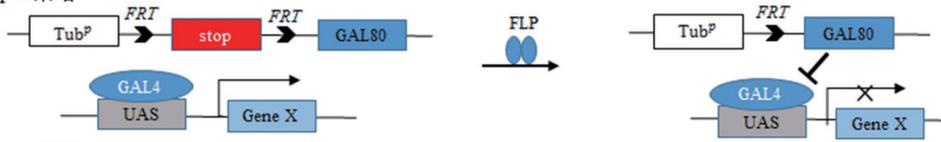
二元表达系统	优势	不足
GAL4/ <i>UAS</i>	(1)供研究者选择的GAL4和 <i>UAS</i> 品系丰富; (2)可通过GAL80或热激等简单调控GAL4的表达。	(1)目前用于标记单个细胞或者一小群细胞; (2)特定细胞的GAL4品系有限。
FLP/ <i>FRT</i>	定点操作基因, 实现基因的删除、易位或倒位。	(1)时空特异性较差; (2)通过热激等理化方法调控基因表达可能引起致死等效应。
LexA/ <i>lexAop</i>	与GAL4/ <i>UAS</i> 系统相互独立, 互不影响, 不受GAL80抑制。	(1)效率较GAL4/ <i>UAS</i> 、Q系统低; (2)LexA不存在时, <i>lexAop</i> 的转录水平高。
Q系统	(1)与GAL4/ <i>UAS</i> 系统相互独立, 互不影响; (2)标记和操纵单个细胞或一小群细胞; (3)QF不存在时, <i>QUAS</i> 转录水平低。	(1)特异性的QF品系果蝇少; (2)构建果蝇需要引入8个基因, 操作复杂。
Cre/ <i>loxP</i>	Cre重组酶较FLP重组酶更耐高温。	Cre重组酶的最适温度显著高于果蝇的标准生活温度。

A. 定向嵌合体技术

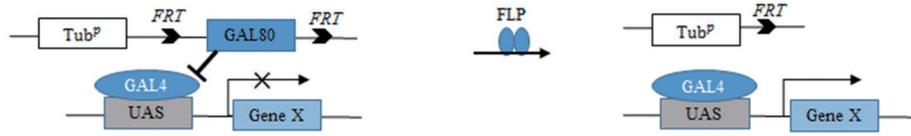


B. FINGR系统

Ffp-in策略

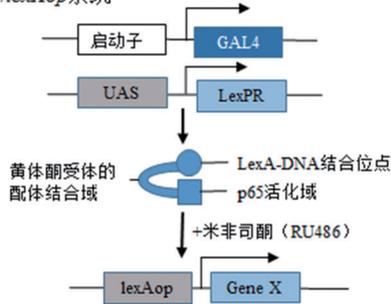


Ffp-out策略

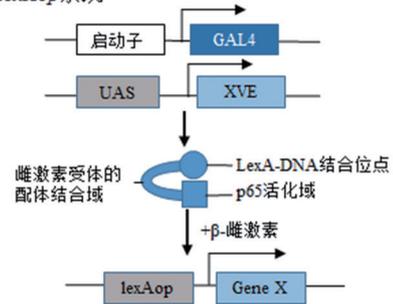


C. 受药物和GAL4/UAS系统调控的LexA/lexAop系统

LexRP/lexAop系统

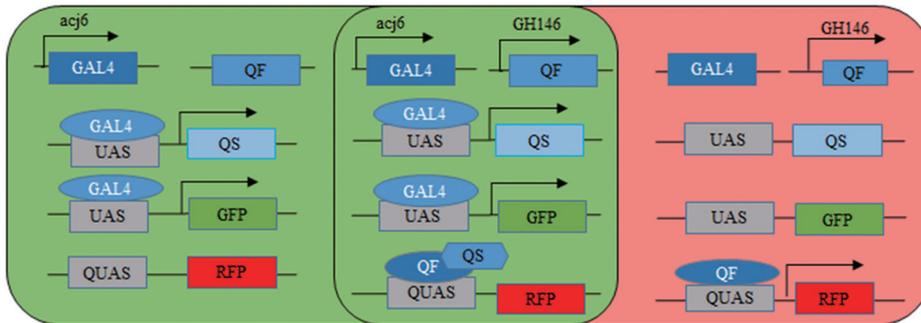


XVE/lexAop系统

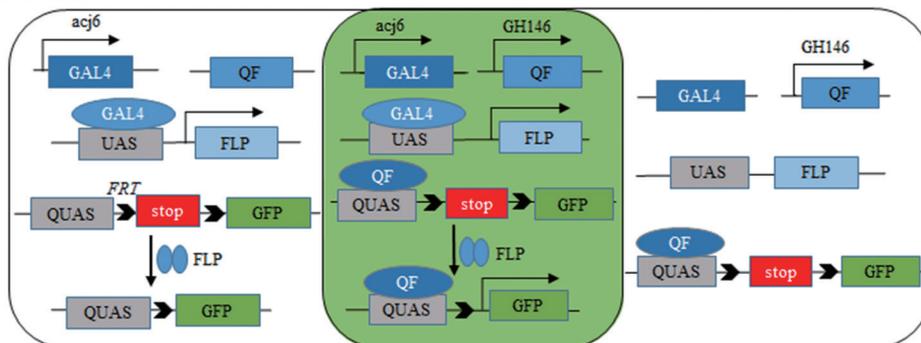


D. Q系统与GAL4/UAS、FLP/FRT系统的联合应用

QF NOT GAL4



QF AND GAL4



A: 定向嵌合体技术。将*UAS*与*FLP*相连, 当具有时空特异性的*GAL4*基因表达时, *GAL4*蛋白与*UAS*序列结合而使*FLP*基因表达, 继而引起了*FRT*位点之间的染色体(或DNA)重组, 删除*stop*基因, 基因*X*出现表达。B: FINGR系统。FINGR系统包括“Flp-in”和“Flp-out”两种策略: 在*FLP*表达的细胞中, *stop*基因被删除, 继而启动子*Tub^P*启动*GAL80*表达, 抑制了任何*GAL4*启动的*UAS-GeneX*的表达(Flp-in); 在*FLP*表达的细胞中, *GAL80*被删除, 解除了*GAL80*对*GAL4*的抑制作用, 因此*UAS*下游的基因发生表达(Flp-out)。C: 受药物和*GAL4/UAS*系统调控的LexA/*lexAop*系统。RU486可与LBD结合而活化LexRP蛋白, 活化的LexRP蛋白可引起*lexAop-GeneX*的表达。若缺乏RU486, 则不会引起*lexAop-GeneX*的表达(LexRP/*lexAop*系统), 而 β -雌激素可以与XVE上的雌激素受体的配体结合域结合而活化XVE蛋白, 活化的XVE蛋白可引起*lexAop-GeneX*的表达; 但是若缺乏 β -雌激素, 则不会引起*lexAop-GeneX*的表达(XVE/*lexAop*系统)。D: Q系统与*GAL4/UAS*、*FLP/FRT*系统的联合应用。在两个矩形的重叠区域中, *GAL4*通过诱导*UAS-QS*的表达进而抑制细胞内QF的活性。该细胞中, QF激活的基因转录因此被阻断, 称之为“QF NOT GAL4”; *GAL4*通过诱导*FLP*的表达从而删除了*QUAS*下游的*stop*基因(左侧), 但是只有当QF表达的时候*QUAS*下游的报告基因(右侧)才能表达, 且只有在重叠区域的细胞才能表达报告基因, 该方法称之为“QF AND GAL4”。LexRP: LexA-黄体酮受体嵌合体; XVE: LexA-雌激素受体嵌合体; LBD: 配体结合域; RU486: 米非司酮。

图2 二元表达系统之间的联合应用示意图

出现表达, 继而抑制了*GAL4/UAS*系统。

3.2 *GAL4/UAS*和Cre/*loxP*系统的联合应用

*FLP/FRT*系统是目前果蝇嵌合体分析的最有效工具之一, 但是在果蝇胚胎早期中的重组效率并不高^[17-18]。为了克服这一缺点, Buchholz等^[19]将Cre/*loxP*与*GAL4/UAS*系统联合运用于果蝇胚胎中, 提高了表达效率, 如构建*pAct5C-loxP-gypsy-loxP-GAL4*序列(*pAloxg-GAL4*), 其中gypsy可以抑制启动子*pAct5C*。当Cre存在时, 删除gypsy基因, 解除该基因对*pAct5C*的抑制作用, *pAct5C*激活了*GAL4/UAS*系统, *UAS*下游的标记基因启动表达; 但是*GAL4/UAS*与Cre/*loxP*系统的联合应用具有一定局限性, 目前仅在部分组织中得到成功应用^[18]。

3.3 受药物和*GAL4/UAS*系统调控的LexA/*lexAop*系统

在LexA/*lexAop*和*GAL4/UAS*系统的基础上, Kuo等^[20]将LexA与带有新活化位点的蛋白融合, 创建了新的二元表达系统。该系统通过外在激素调控基因时空表达, 克服了物理方法的缺点^[20-29]。LexA-黄体酮受体嵌合体(LexA-progesterone receptor chimeras, LexRP)是LexA结合域(LexA-binding domain, LexA-BD)、p65活化域(activation domain, AD)以及黄体酮受体的配体结合域(ligand-binding domain, LBD)的融合产物(图2C左), 该融合产物受到米非司酮(mifepristone, RU486)的严格调控, 与*lexAop*结合后可激活基因的表达。相似的, 雌二醇严格调控LexA-雌激素受体嵌合体(LexA-estrogen receptor chimeras, XVE)(图2C右), 激活基因的表达。这个系统的功能与*GAL4/UAS*类似, 但是优点在于可受到外在药物的调控, 可以更加精确地调控基因的时空表达^[7,20]。

3.4 *GAL4/UAS*与Q系统的联合应用及其相互调控

*GAL4/UAS*系统和Q系统是两个互不影响的系统, 运用逻辑运算的思维将这两个系统联合应用可以创造出新的表型。当这两个系统在同一组织或细胞中表达, 可以使该重叠的区域只表达其中一个系统所代表的表型, 即做表型的“减法”; 同样道理, 利用“加法”的原理, 可使该重叠区域带有标记而非重叠区域不带有标记, 这就缩小了范围, 选择性标记研究者感兴趣的单一细胞或一群细胞。前一种方法称之为“QF NOT GAL4”, 后一种称之为“QF AND GAL4”^[5]。

3.4.1 “QF NOT GAL4”——*GAL4*而非QF交叉实验(*GAL4* NOT QF intersectional experiment)

果蝇的投射神经元(projection neurons, PNs)由前背侧、外侧和腹侧的神经元母细胞系分化而来^[5,30-31]。在果蝇幼虫的PNs中, 转录因子GH146-QF主要表达在由前背侧、外侧和腹侧神经母细胞分化而来的PNs中, 而Acj6则仅在前背侧PNs中表达。在同一只果蝇体内, 同时存在GH146-QF与*acj6-GAL4*时, 由于分别驱动*QUAS-mtdT-RFP*和*UAS-mCD8-GFP*, 从而分别表达红色荧光蛋白RFP和绿色荧光蛋白GFP。在大部分前背侧PNs中, 同时表达红绿两种荧光蛋白; 而在外侧和腹侧PNs中, 仅表达红色荧光蛋白。如图2D所示, 当在前背侧PNs中引入*UAS-QS*基因后, QS在*GAL4*的驱动下表达并抑制QF活性, 阻断了由QF介导的*QUAS-mtdT-RFP*表达。利用这样的“逻辑减法”策略, 可以实现该区域仅表达绿色荧光蛋白, 而不再表达红色荧光蛋白, 有利于对单一或一小群神经元投射的研究。

简言之, 当组织或细胞表达*GAL4*时, Q系统

的表达受抑制, 于是该区域相当于做了一次“表型的减法”, 在目标区域减去了 Q 系统所代表的表型: Q 系统活化所诱导的报告基因不表达, 只表达 GAL4/UAS 系统活化所诱导的报告基因。

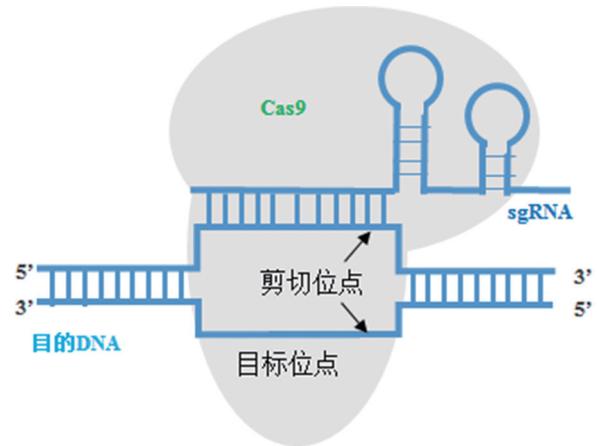
3.4.2 “QF AND GAL4”——QF和GAL4交叉实验 (QF AND GAL4 intersectional experiment)

除了 GAL4/UAS 系统和 Q 系统外, 越来越多的研究者在二元表达系统的联合应用中, 引入 FLP/FRT 系统。在 FLP/FRT 的联合应用中, 利用 Q 系统和 GAL4 系统, 可以控制 FLP 的表达时间及部位, 实现对目的基因的精确表达和调控。如图 2D 所示, FLP 在 GAL4 驱动下表达, 特异性识别并删除 2 个 FRT 位点之间的 *stop* 基因, 允许第 2 个 FRT 位点后的报告基因转录。但仅仅这样还不足以启动后转录, 同时需要存在 QF, 绿色荧光蛋白的转录才能真正起始。因此, 在同时具有 *acj6-GAL4* 和 *GHI46-QF* 的前背侧 PNs 中, 才表达相应报告基因。简言之, “QF AND GAL” 原理相当于逻辑运算中的交集, 只有在 GAL4/UAS 和 Q 系统同时表达的组织或细胞中才有目的基因表达。这一方法很大程度上精确了蛋白质表达的范围, 使得标记更具特异性。

4 以CRISPR/Cas9系统为代表的新型果蝇基因操作方法

CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats /CRISPR-associated 9) 系统为非经典的二元表达系统, 不依赖杂交, 直接对果蝇胚胎基因进行操作, 实现嵌合体的构建。以 CRISPR/Cas9 系统为代表的新型果蝇基因操作方法因简单、高效日益受到关注。

CRISPR/Cas9 系统最先发现于细菌, 是其抵抗病毒的自身防御系统。该系统中, Cas9 为一种高效的核酸内切酶, 含有两个核酸酶活化位点 (分别切割两条 DNA 链), 与 sgRNA (single-guide RNA) 构成蛋白质-RNA 功能复合体。sgRNA 由 crRNA (CRISPR RNA) 和 tracrRNA (transactivating crRNA) 两部分组成。其中, crRNA 识别目标序列, tracrRNA 参与 Cas9 的活化, 介导 Cas9 剪切 DNA 双链 (图 3)^[32]。剪切后的 DNA 双链可通过非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 或同源定向修复 (homology-directed repair, HDR) 进行修复^[32-33]。NHEJ 常引起错误修复, 结果导致小片段 DNA 的删除或插入。HDR 过程中, 细胞可以以外源的供体 (donor) 为模板, 对双链断裂 (double strand break, DSB) 处



Cas9-sgRNA 复合体通过碱基互补配对原则与目的 DNA 上的特定位点结合, 箭头所指为剪切位点。

图3 CRISPR/Cas9系统

精确修复。因此, HDR 可用于引入点突变、插入 DNA 长片段 (如报告基因或抗生素筛选基因等) 等。不同于其他的二元表达系统, CRISPR/Cas9 系统可以简单地通过显微注射实现。将 Cas9-sgRNA 或构建好的质粒注射到果蝇胚胎中, 经过筛选可以获得嵌合体, 并且突变的基因可以稳定遗传^[34]。与注射编码 Cas9 和 sgRNA 的质粒相比, 直接注射 Cas9-sgRNA 的方法突变成功率更高^[3]。在此基础上, Xue 等^[34] 将 CRISPR/Cas9 系统与 GAL4/UAS 系统结合, 成功构建了 CMCM (CRISPR/Cas9-mediated conditional mutagenesis) 系统, 实现了 GAL4/UAS 系统对 CRISPR/Cas9 系统的调控。该系统首先需要构建 UAS-Cas9/sgRNAs 的转基因果蝇品系, 然后利用组织特异性的 GAL4 品系果蝇介导 UAS-Cas9/sgRNAs 表达, 从而实现特定基因的敲除并实现相应表型的表达。CMCM 系统相较于 RNAi 技术更为高效, 为果蝇特定组织中基因功能的研究提供了新型工具。

5 果蝇二元表达系统的发展和展望

通过二元表达系统对果蝇进行遗传操作, 实现了特定组织细胞的标记, 对探究基因功能、神经网络及生物发育具有不可估量的作用。同时, 二元表达系统一定程度上克服了基因突变低特异性的缺点, 减少了理化方法引起的非选择性基因突变和对果蝇生理功能的影响, 提高了基因操作的效率和时空特异性。更为关键的是, 二元操作系统及其联合应用成功实现了嵌合体的构建, 可以达到在同一组织或个体中, 混合存在不同基因型细胞的目的, 在

探究细胞间的相互作用、细胞谱系分析、追踪复杂组织的发育过程等领域,克服了个体差异造成的误差及整体水平突变某基因造成胚胎致死的缺点,因此,可以用于某些致死突变基因的研究。

近些年,利用二元表达系统构建果蝇嵌合体取得了很大的进展,FRT介导的有丝分裂重组(FRT-mediated mitotic recombination)、FINGER系统、MARCM(mosaic analysis with a repressible cell marker)、TSG(twin spot generator)、Twin-spot MARCM和G-TRACE(Gal4 technique for real-time and clonal expression)、Coupled MARCM等均是成功应用的典范^[1,5-6,35-38]。追根溯源,这些嵌合体技术的根基均是上文中所提的二元表达系统的有机整合。

二元表达系统的应用不只局限于果蝇,同样广泛应用于线虫、小鼠、斑马鱼等模式生物。虽然不同模式生物的二元表达系统有相似之处,但也各具特点,因此,通过借鉴不同物种间的二元表达系统,可以丰富多种模式动物的基因操作手段。对于现有的二元表达系统,如何更加简便、快速、准确、有效地构建转基因品系,突破种属限制,是今后值得探索的方向。随着二元操作系统的迅速应用和发展,研究者将拥有更加有力的工具去揭开生命体的奥秘。

[参 考 文 献]

- [1] Golic KG, Lindquist S. The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell*, 1989, 59(3): 499-509
- [2] Lai SL, Lee T. Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in *Drosophila*. *Nat Neurosci*, 2006, 9(5): 703-9
- [3] Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, et al. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep*, 2013, 4(1): 220-8
- [4] Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, et al. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 2013, 194(4): 1029-35
- [5] Potter CJ, Tasic B, Russler EV, et al. The Q system: a repressible binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis. *Cell*, 2010, 141(3): 536-48
- [6] Potter CJ, Luo L. Using the Q system in *Drosophila melanogaster*. *Nat Protoc*, 2011, 6(8): 1105-20
- [7] Siegal ML, Hartl DL. Transgene coplacement and high efficiency site-specific recombination with the Cre/loxP system in *Drosophila*. *Genetics*, 1996, 144(2): 715-26
- [8] Halpern ME, Rhee J, Goll MG, et al. Gal4/UAS transgenic tools and their application to zebrafish. *Zebrafish*, 2008, 5(2): 97-110
- [9] Halfon MS, Kose H, Chiba A, et al. Targeted gene expression without a tissue-specific promoter: creating mosaic embryos using laser-induced single-cell heat shock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(12): 6255-60
- [10] Chou TB, Perrimon N. Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics*, 1992, 131(3): 643-53
- [11] Austin S, Ziese M, Sternberg N. A novel role for site-specific recombination in maintenance of bacterial replicons. *Cell*, 1981, 25(3): 729-36
- [12] Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*, 1981, 150(4): 467-86
- [13] Hochman L, Segev N, Sternberg N, et al. Site-specific recombinational circularization of bacteriophage P1 DNA. *Virology*, 1983, 131(1): 11-7
- [14] Duffy JB, Harrison DA, Perrimon N. Identifying loci required for follicular patterning using directed mosaics. *Development*, 1998, 125(12): 2263-71
- [15] Fore TR, Ojwang AA, Warner ML, et al. Mapping and application of enhancer-trap flippase expression in larval and adult *Drosophila* CNS. *J Vis Exp*, 2011, (52): 2649
- [16] Bohm RA, Welch WP, Goodnight LK, et al. A genetic mosaic approach for neural circuit mapping in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(37): 16378-83
- [17] Theodosiou NA, Xu T. Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development. *Methods*, 1998, 14(4): 355-65
- [18] Nakazawa N, Taniguchi K, Okumura T, et al. A novel Cre/loxP system for mosaic gene expression in the *Drosophila* embryo. *Dev Dyn*, 2012, 241(5): 965-74
- [19] Buchholz F, Ringrose L, Angrand PO, et al. Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(21): 4256-62
- [20] Kuo SY, Tu CH, Hsu YT, et al. A hormone receptor-based transactivator bridges different binary systems to precisely control spatial-temporal gene expression in *Drosophila*. *PLoS One*, 2012, 7(12): e50855
- [21] Bublly OA, Loeschcke V. Correlated responses to selection for stress resistance and longevity in a laboratory population of *Drosophila melanogaster*. *J Evol Biol*, 2005, 18(4): 789-803
- [22] Le Bourg E. Hormetic effects of repeated exposures to cold at young age on longevity, aging and resistance to heat or cold shocks in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*, 2007, 8(4): 431-44
- [23] Munch SB, Salinas S. Latitudinal variation in lifespan within species is explained by the metabolic theory of ecology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(33): 13860-4
- [24] Simon AF, Shih C, Mack A, et al. Steroid control of longevity in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 2003, 299(5611): 1407-10
- [25] Boothroyd CE, Wijnen H, Naef F, et al. Integration of light and temperature in the regulation of circadian gene expression in *Drosophila*. *PLoS Genet*, 2007, 3(4): e54
- [26] Busza A, Murad A, Emery P. Interactions between circadian neurons control temperature synchronization of *Drosophila* behavior. *J Neurosci*, 2007, 27(40): 10722-33
- [27] Yoshii T, Vanin S, Costa R, et al. Synergic entrainment of

- Drosophila's* circadian clock by light and temperature. *J Biol Rhythms*, 2009, 24(6): 452-64
- [28] Zhang Y, Liu Y, Bilodeau-Wentworth D, et al. Light and temperature control the contribution of specific DN1 neurons to *Drosophila* circadian behavior. *Curr Biol*, 2010, 20(7): 600-5
- [29] Ito C, Goto SG, Tomioka K, et al. Temperature entrainment of the circadian cuticle deposition rhythm in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms*, 2011, 26(1): 14-23
- [30] Gao Q, Yuan B, Chess A. Convergent projections of *Drosophila* olfactory neurons to specific glomeruli in the antennal lobe. *Nat Neurosci*, 2000, 3(8): 780-5
- [31] Jefferis GS, Marin EC, Stocker RF, et al. Target neuron prespecification in the olfactory map of *Drosophila*. *Nature*, 2001, 414(6860): 204-8
- [32] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154(6): 1380-9
- [33] Bassett AR, Liu JL. CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*. *J Genet Genomics*, 2014, 41(1): 7-19
- [34] Xue Z, Wu M, Wen K, et al. CRISPR/Cas9 mediates efficient conditional mutagenesis in *Drosophila*. *G3 (Bethesda)*, 2014, 4(11): 2167-73
- [35] Lee T, Luo L. Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron*, 1999, 22(3): 451-61
- [36] Yu HH, Chen CH, Shi L, et al. Twin-spot MARCM to reveal the developmental origin and identity of neurons. *Nat Neurosci*, 2009, 12(7): 947-53
- [37] Evans CJ, Olson JM, Ngo KT, et al. G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in *Drosophila*. *Nat Methods*, 2009, 6(8): 603-5
- [38] Griffin R, Sustar A, Bonvin M, et al. The twin spot generator for differential *Drosophila* lineage analysis. *Nat Methods*, 2009, 6(8): 600-2