

光（化）遗传技术基础 与转基因小鼠的应用

徐敬杨

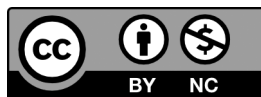
重庆市西南大学，重庆

摘要 | 光遗传学和化学遗传学均为人工调节神经元活性的相关技术，分别兴起于 21 世纪初和 20 世纪 90 年代。这两项技术的主要路线相似，通过遗传学手段使目标脑区的神经元表达出光敏离子通道蛋白或者人工受体蛋白，再利用外加刺激影响重组通道蛋白的活性，从而改变神经元动作电位的产生与抑制，最后观察动物行为的变化，讨论动物行为的变化和脑区神经元活性的关系，换言之，技术目的为分析心理或行为的脑内机制。该类技术的使用往往还需要依靠其他生物学工具，如使脑内神经元表达出外源光敏离子通道蛋白或者人工受体蛋白所需的重组腺相关病毒，以及 Cre 鼠相关的转基因技术等。此外，光遗传学和化学遗传学在行为神经科学中备受青睐，但应用范围不仅仅局限于此，它们还可以应用于胞内信号转到、疾病研究或者药物设计学等多个领域。虽然该技术仍存在些许不足，但总体瑕不掩瑜，未来在行为神经科学研究和神经及精神领域疾病的治疗中具有可观的潜力。

关键词 | 光遗传学；化学遗传学；重组腺相关病毒；转基因小鼠；基本原理；技术路线

Copyright © 2022 by author (s) and SciScan Publishing Limited

This article is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



1 光遗传与化学遗传概述

1.1 光遗传学的发明和基本原理

光遗传学的概念于2006年首次被斯坦福大学的卡尔·迪赛罗斯(Karl Deisseroth)提出,他与麻省理工学院的爱德华·博伊登于2004年8月获得了该技术实验的成功,自此两人共同开创了光遗传学的时代^[1]。

光遗传学是以DNA重组为代表的遗传学与光学相结合的一种细胞生物学研究技术方法,通常利用转基因技术或者病毒侵染使受体细胞在细胞膜上表达出光敏通道蛋白,如视紫红质通道蛋白2(channel rhodopsin-2, ChR2)和嗜盐菌视紫红质(halorhodopsin, HR)等视蛋白。如图1所示,这些特殊的通道蛋白活性可以被特定波长的光调节,进而定向激活神经元膜电位的去极化或者超极化,如前述的ChR2和NpHR光敏通道蛋白可分别由蓝色或者黄色的光进行调节,不同通道蛋白不仅需要特定波长的光,在接受光刺激后也会存在不同离子向不同方向的流动,例如HR接受黄光刺激后会出现氯离子内流从而产生膜电位超极化的结果,而ChR接受蓝光刺激后会出现钠离子、钾离子和氢离子的内流从而产生膜电位去极化的结果^[2]。这一技术的优越性在于优秀的特异性,可以特异性地针对某一类细胞,即带有特定光敏离子通道的神经元^[3]。该技术被*Nature Method*评为2010年的“年度技术”,它行为神经科学研究和神经及精神领域疾病的治疗提供了更多的可能^[4]。

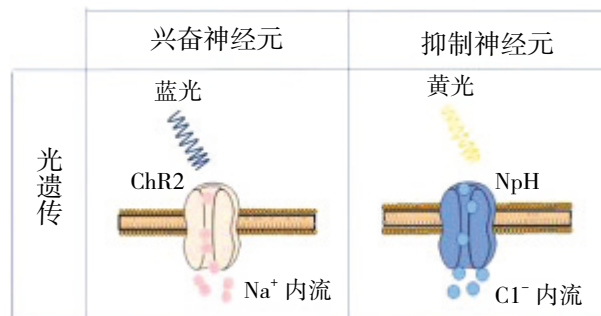


图1 光遗传学技术原理^[5]

Figure 1 The technical principles of optogenetics

1.2 化学遗传学的背景和基本原理

相比之下，化学遗传学的研究要早于光遗传学，它在 20 世纪 90 年代中期就已经兴起，是一种小分子化合物和基因编辑融合的新兴技术，利用遗传学方法改造的内源性受体蛋白使其能够被特定小分子药物调节 [6]，因此受体蛋白的活性变得可以人为控制，换言之，这也意味着受体蛋白所在的神经细胞的活性也可以控制。

在该技术中，只由特定药物激活的受体 (designer receptor sexclusively activated by designer drugs, DREADDs) 是使用最为广泛的一种，这是一类只由氯氮平 -N- 氧化物 (Clozapine-N-oxide, CNO) 激活的受体，其中，Gq-DREADD 和 Gi-DREADD 是使用最多的两种人工受体。Gq-DREADD 又称为 hM3Dq，这是一种从人毒蕈碱乙酰胆碱受体 M3 (hM3D) 改造的仅对 CNO 有反应的人工受体，当 CNO 和 hM3D 结合后，可打开神经元的外向钾离子通道，使该神经元去极化，从而形成动作电位；Gi-DREADD 又称为 hM4Di，这是一种从人毒蕈碱乙酰胆碱受体 M4 (hM4D) 改造的仅对 CNO 有反应的人工受体，当 CNO 和 hM4D 结合后，可打开神经元的内向钾离子通道，使该神经元超极化从而抑制动作电位的产生 [5, 7, 8]，如图 2 所示。

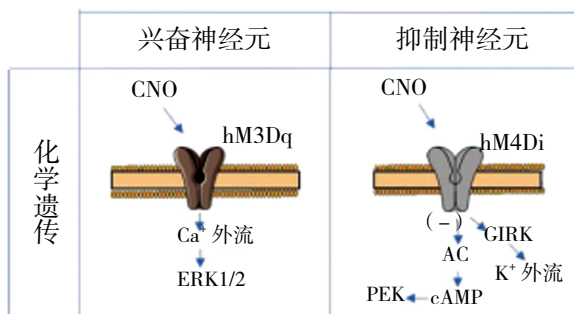


图 2 化学遗传学技术原理 [5]

Figure 2 Technical principles of chemical genetics

此外，化学遗传学也为药物筛选与开发奠定了基础，调节用小分子药物或能称为治疗疾病靶点的潜在药物 [9]。化学遗传学和光遗传学类似，人工改造后

的受体蛋白在神经元中的表达可通过 rAAV 转染细胞实现。这项技术的一个优越性在于调节是可逆的,通过目标脑区给药、腹腔注射或者口服特定药物实现即可受体蛋白的人工调节^[5],待药物被全部代谢后,对受体蛋白的调节作用则会消失。

2 腺相关病毒在光遗传学和化学遗传学中的应用

腺相关病毒(AAV)是一种无被膜且无法自主复制的二十面体微小病毒,遗传物质为单链线性DNA。重组腺相关病毒载体(rAAV)常用于基因编辑中,它的优势在于广泛的宿主细胞、免疫原性低、体内表达时间长等。在光遗传学和化学遗传学中,利用脑立体定位注射的方法将rAAV注射入目标脑区,rAAV可通过膜受体介导的内吞作用进入并侵染神经元,病毒经核孔再进入细胞核后在核内裂解,裸露的重组单链DNA逆转录形成双链DNA,最终在胞内表达出重组蛋白,即光敏离子通道蛋白或目标人工受体^[10],如图3所示。事实上,rAAV中往往不止整合入了光敏离子通道蛋白的编码基因,还有上游的特异启动子和下游的荧光标签蛋白的编码基因,如红色荧光蛋白(RFP)或绿色荧光蛋白(GFP)等。启动子因rAAV侵染组织或下游功能基因的不同而不同,下游荧光蛋白的意义在于证明光敏离子通道蛋白的存在,光遗传学相关实验结束后可通过脑切片中有无荧光信号来证实。

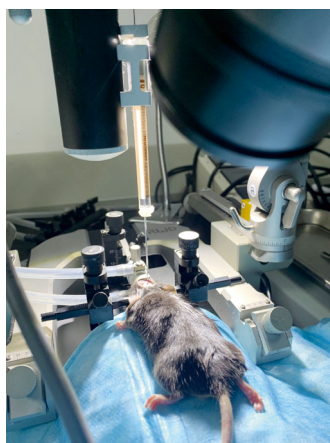


图3 脑立体定位注射法向目标脑区注射病毒

Figure 3 Stereotaxic injections inject the virus into the target brain region

rAAV 根据可感染组织的不同被分为很多种，可被神经系统中的细胞膜受体识别的 rAAV 有 rAAV2/1、rAAV2/2、rAAV2/4、rAAV2/5 等多种重组腺病毒，其中 rAAV2/1 在高滴度时可凭借囊泡顺向跨突触。还有其他亲和肝脏、胰脏或肌肉等组织的 rAAV^[10]，如图 4 所示。

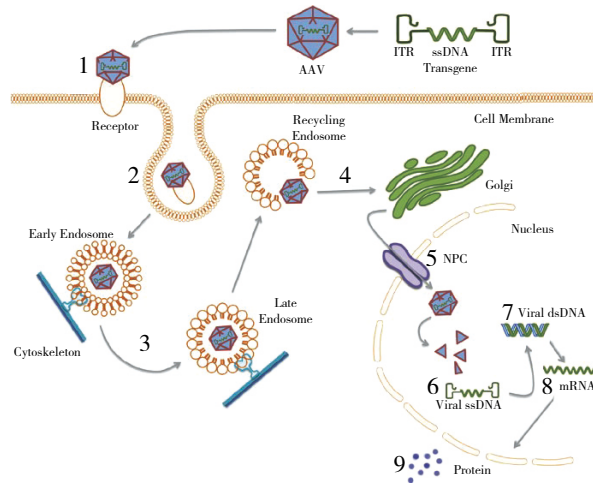


图 4 腺相关病毒作用机制

Figure 4 Mechanism of action of adeno-associated virus

3 光遗传学的技术路线

如图 5 所示，该技术从重组腺病毒的获得到数据分析的全程技术操作可分成三大板块，即光感基因病毒载体技术、光 / 神经界面技术以及光电极阵列技术（若选用转基因小鼠则可进行第二板块的操作）。

3.1 光感基因病毒载体技术

按第一部分所述的光遗传学原理，激光只能调节成功表达出光敏离子通道蛋白的神经元，因此，使神经元带上光敏离子通道蛋白是光遗传学的基本。rAAV 转染法中，重组病毒的构建采用的是将重组 DNA 链直接导入病毒蛋白衣壳的方法，这一步可以自行操作，重组腺病毒直接购买比较容易，实验室中需要做的是将重组腺病毒注射入目标脑区，常采用的是脑立体定位注射技术，一段时间后病毒表达完成，此时方可继续开展后续的实验步骤。这一板块除了为光遗传学技术的开展奠定必要基础之外，还能够实现光遗传学中优秀的特异

性,即神经细胞的选择性。

3.2 光 / 神经界面技术

完成光敏离子通道蛋白特异性表达后可以向目标脑区中埋入光纤,并用特定颜色的激光刺激目标脑区中的神经元,如蓝光可使 ChR 打开,钠离子向神经元内流动,最终产生了去极化的结果。这一板块可实现信息的写入。

3.3 光电极阵列技术

光遗传学直接的实验结果为一系列的神经元膜电位和被试动物行为的变化,在生理心理学中,光遗传学用于分析心理或行为的脑内机制,常用的模式即为探究目标脑区神经元的激活或抑制和特定行为的联系,例如利用蓝光激活右侧次级运动皮层(M2)中表达了 ChR 的神经元后,小鼠会产生持续转圈的行为特征,当激光关闭时小鼠自发活动方向恢复正常。这一板块实现了光遗传学结果的信息读取^[11],如图5所示。

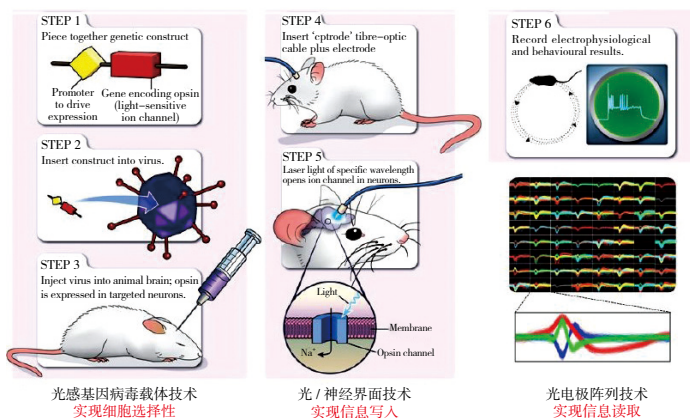


图5 光遗传学技术路线

Figure 5 The technical route of optogenetics

4 化学遗传学的技术路线

化学遗传学的技术路线和光遗传学相似,从病毒转染到记录实验结果大致也分为三个板块,即人工受体蛋白表达、给予 CNO 和结果记录。

4.1 人工受体蛋白表达

鉴于 DREADDs 的种类繁多, 根据实验目的选取合适的人工受体十分重要, 和光遗传学相同, 可采用重组腺相关病毒注射的方法或直接使用转基因小鼠模型使神经元表达出人工受体蛋白。当采用病毒注射的方法时, 所用 rAAV 中同样带有特异的启动子、人工受体蛋白编码基因以及荧光蛋白编码基因等, 若重组载体需为 Cre 依赖的 DIO 系统, 人工受体蛋白编码基因与启动子方向相反且两端还需要带有 loxp 位点。设计好的 rAAV 通过脑立体定位注射的方式进入目标脑区, 侵染细胞, 以前述方式使目标脑区的神经细胞表达出特定的人工受体蛋白。

4.2 给予 CNO

在特定时间通过腹腔注射、目标脑区直接给药或者口服给予小鼠小分子药物 CNO, 激活或抑制目标脑区中表达的人工受体蛋白, 从而达成调节目标脑区中神经元活性的目的。

4.3 记录膜电位及行为变化^[11]

同样的, 化学遗传学也被用于分析心理或行为的脑内机制, 在小分子药物药效时间内, 观察并记录目标脑区中神经元的膜电位以及动物特定行为的变化, 即可证明该脑区中神经细胞活性的变化和动物行为的联系, 如图 6 所示。实验结束后取脑切片, 观察目标脑区中是否存在荧光信号, 可进一步证明实验结论。

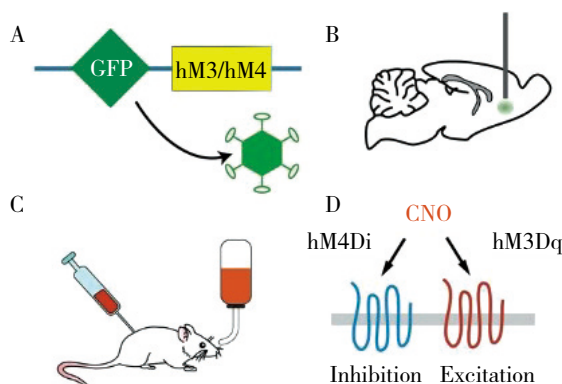


图 6 化学遗传学技术路线

Figure 6 The technical route of chemical genetics

5 转基因小鼠的应用

5.1 Cre-LoxP 系统的基本原理

Cre-LoxP 是一种常用于基因工程的技术,如图 7 所示,其中的 Cre 指环化重组酶,它是一种具有核酸内切酶活性的蛋白质,能够特异性识别 LoxP 位点并且在位点处切断 DNA 链,最终使 DNA 链发生重组,可能造成 DNA 片段缺失、插入、易位、翻转等结果。Cre 酶的编码基因可由任何一种启动子调控,使用不同的启动子可以实现 Cre 酶在特定器官、组织或细胞中表达,这一点也是该系统在应用过程很重要的特点。LoxP 指一段特殊的 DNA 序列,每一个 LoxP 位点由两个 13bp 反向重复序列和中间间隔的 8bp 序列组成,应用于基因编辑的 LoxP 位点在目标基因的 5 和 3 两端各存在一个。其中 8bp 的中间间隔序列决定了 LoxP 位点的方向性,13bp 的反向重复序列是 Cre 酶的结合位点^[12, 13]。

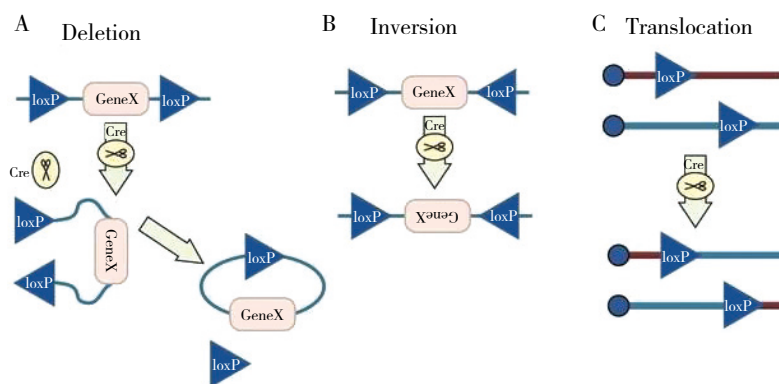


图 7 Cre-LoxP 系统导致的基因重组结果

Figure 7 The result of gene recombination caused by the CLA-LOXP system

DNA 重组结果的不同是由两端 LoxP 方向的不同所造成的,当某基因两端的 LoxP 方向相同时,会造成该基因的翻转;当某基因两端的 LoxP 方向相反时,则会造成该基因的敲除缺失;当两组 LoxP 位点分别位于两条染色体上时,会造成 DNA 序列的易位。

5.2 化学遗传学中的 Cre-LoxP

如前文所述,在神经元的遗传改造中,除了单一 rAAV 转染的方法以外也可以由转基因小鼠的参与,而在光遗传学和化学遗传中更多需要的是基因敲入或者条件性基因表达,Cre-LoxP 或者 Cre-FloxP 基因编辑系统可以较好地实现条件性表达,Cre 工具鼠在这两项技术中的应用十分广泛。

根据二元转基因系统理论,目标基因两端带有 LoxP 序列的动物和带有 Cre 重组酶编码基因的动物杂交后代会出现目标基因两端带有 LoxP 同时又能够表达 Cre 重组酶的个体^[12]。据前文所述,Cre 重组酶编码基因上游的启动子可以决定蛋白表达的组织特异性,则可在制作 Cre 工具鼠时根据实验目的所需,选取能够在脑组织中特异启动的启动子。如 4.1 中所述,目标脑区的病毒注射可以得到带有反向目标蛋白编码基因的亲本动物,当它与经基因编辑得到的 Cre 工具鼠杂交时,即可得到能够将人工受体蛋白编码基因翻转回正向的子代个体,进而该个体能够表达出目标蛋白。

6 以光遗传学或化学遗传学为研究手段的实例

6.1 光遗传学相关研究

2020 年的一项研究利用光遗传学的方法证明了中脑腹侧被盖区(VTA)中的 GABA 能神经元参与调控了小鼠的捕猎行为。作者首先监测了在小鼠捕食蟋蟀时 VTA 脑区内 GABA 能神经元活性的变化,其次利用光遗传学的方法人工激活了该神经元并观察行为变化。研究者选用了 AAV-VGAT-Cre 和 AAV-hEF1 α -DIO-ChR2-mCherry 两种重组腺相关病毒,利用脑立体定位注射将病毒打入了小鼠的 VTA 脑区中。根据前述 Cre-LoxP 系统的基本机理,在 VTA 中被两种病毒侵染的 GABA 能神经元内,Cre 酶表达进而翻转 rAAV 中 ChR2 的编码基因,进而使这一光敏离子通道蛋白能够表达并出现在细胞膜上。病毒充分表达一段时间后,开始进行小鼠捕猎相关的行为实验,即使用波长为 473nm 的蓝光刺激 VTA 脑区,观察光刺激开启和关闭时小鼠行为的变化。行为实验结束后,进行取脑、切片及 c-Fos 蛋白免疫荧光染色,观察 c-Fos 表达情况。最后用前述

光遗传学的实验方法探究 VTA 到外侧下丘脑 (LH) 之间的 GABA 神经环路与捕猎行为的联系。实验结果显示,小鼠在捕猎行为中 VTA 内 GABA 能神经元的活性确有提高,并且人为激活该神经元能够触发动物的捕猎行为,在行为实验中体现为捕猎潜伏期缩短,主动觅食和攻击的概率增加,持续啃咬饲料的时间延长等。另外 VTA 内的 c-Fos 蛋白量存在明显升高,当特异性激活 VTA 和 LH 之间的 GABA 能神经环路时,能够促使小鼠捕猎行为的发生^[14]。

6.2 化学遗传学相关研究

2019 年一项研究利用化学遗传学的方法研究了基底前脑—海马胆碱能神经环路对阿尔兹海默症早期认知功能障碍的影响。该研究首先分析了阿尔兹海默症模型小鼠在行为和代谢的异常所在,指出了基底前脑和海马内存在 A β 斑块的沉积。接下来分析了人工激活基底前脑—海马胆碱能神经环路后小鼠行为的变化,利用脑立体定位注射向基底前脑注射了 rAAV-ChAT-Cre-2a-EGFP-WPRE-pA 和 rAAV-efla-Dio-hM3Dq-mCherry-WPRE-pA 两种重组腺相关病毒,则在被两种病毒侵染的神经元内存在人工受体蛋白 hM3Dq 的表达,一段时间后通过腹腔注射给予 CNO 来激活神经环路,同时设置生理盐水注射组平行对照,而后同样开展行为和代谢情况的检验。最后通过激光共聚焦扫描成像技术再进一步明确 hM3Dq 在神经元上的表达。实验结果显示,人工激活基底前脑—海马胆碱能神经环路后小鼠体现出了学习记忆行为得到恢复,且基底前脑内的胆碱 (Cho) 和海马内 N-乙酰天门冬氨酸 (NAA) 的含量出现上升,同时也证实了神经元膜上存在人工受体蛋白 hM3Dq。总之,该研究通过化学遗传学技术成功揭示了调控基底前脑—海马胆碱能神经环路能够提升基底前脑中 Cho 和海马中 NAA 的含量,进而改善阿尔兹海默症模型小鼠的认知学习能力^[15]。

7 总结

光遗传学和化学遗传学为神经科学和生理心理学等研究提供了更多可能,这两项技术实现了神经元激活与抑制的人为控制,为探究脑区功能奠定了有力的基础。

对于光遗传学来说,该技术操作相对简单易行也颇具灵活性,除了前述神

经科学和生理心理学研究之外,它还能够应用于疾病的病理分析和治疗。一方面,对于化学遗传学来说,它的应用范围非常广泛。不仅仅局限于神经科学或生理心理学的研究,还可以参与到酶活性研究、细胞信号转导分析、基因转录、疾病研究乃至药物设计学等多个领域。另一方面,光遗传学技术虽然潜力可观,但是它仍存在一定的局限性。其一是持续激光刺激的时间不宜过长,由于光的产热效应会对实验产生干扰,所以最多不可超过十分钟;其二是可应用光遗传学的行为实验有限,由于光纤的存在,只有如旷场等无障碍地行为实验才可使用,相反,如穿梭箱一类存在障碍物的则无法开展。

技术的局限性并不能抹杀它们可观的潜力,我们仍期待着未来光遗传学和化学遗传学在行为神经科学研究和神经及精神领域疾病的治疗中贡献更多力量。

参考文献

- [1] 魏梦霞. 运用光遗传和神经环路示踪技术研究前庭神经核的功能 [D]. 北京: 中国科学院大学(中国科学院深圳先进技术研究院), 2021.
- [2] 蔡俊斌. 基于光遗传技术的脚桥被盖核神经调控对帕金森病大鼠模型运动行为的影响 [D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
- [3] 何肖君. 基于IH理论探讨光遗传调控CC-Parv GABA环路改善缺血性脑卒中大鼠运动功能的实验研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2021.
- [4] 刘备. 基于光遗传学方法的癫痫疾病的闭环控制研究 [D]. 天津: 天津职业技术师范大学, 2016.
- [5] 汪涛, 董钰婷, 李煜, 等. 光遗传和化学遗传在中医药脑科学研究中的应用 [J]. 世界中医药, 2020, 15(11): 1535-1539, 1545.
- [6] Urban D J, Roth B L. DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs): chemogenetic tools with therapeutic utility [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2015 (55): 399-417.
- [7] 陈洪年, 王亮. 化学遗传和光遗传癫痫发作模型研究进展 [J]. *癫痫杂志*, 2021, 7(3): 262-264.
- [8] 凌文远. 化学遗传学靶向激活运动皮层谷氨酸能神经元对脑出血小鼠运动

- 和认知功能的影响及机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2020.
- [9] 熊娟. 化学遗传学方法寻找新的抗真菌中药化合物及其作用机制研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2012.
- [10] 殷子斐. 中药单体和载体自身优化提高重组腺相关病毒的转导效率 [D]. 上海: 第二军医大学, 2015.
- [11] 王正文, 陈京. 光遗传学和化学遗传学在抑郁症研究中的应用 [J]. 济宁医学院学报, 2017, 40(5): 366-371.
- [12] 张杨, 贾林涛, 闫雨冬, 等. Cre-loxP系统及其衍生系统方法学的研究和在神经科学中的应用 [J]. 药学学报, 2020, 55(9): 2035-2042.
- [13] 孔梓宇, 柳毅, 汪晖. Cre-LoxP条件性基因敲除的实际应用策略 [EB/OL]. [2022-07-06]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?FileName=SWHZ20220421000&DbName=DKFX2022>.
- [14] 卢一平. 腹侧被盖区GABA能神经元介导小鼠捕猎行为 [D]. 福州: 福建医科大学, 2020.
- [15] 李建鸿. 基于MRS探讨化学遗传技术调控基底前脑—海马胆碱能环路改善AD模型小鼠早期认知功能的机制 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2019.

Technical Basis of Optogenetics and Chemical Genetics, and the Application of Transgenic Mice

Xu Jingyang

Southwest university, Chong Qing

Abstract: Both photogenetics and chemical genetics are the techniques for

artificially regulating the activity of neurons. They emerged at the beginning of this century and the 1990s respectively. The main routes of the two technologies are similar. It is through genetic that lead neurons in the target brain region express photosensitive ion channel proteins or artificial receptor proteins. Then the activity of recombinant channel protein was affected by external stimulation. So as to change the generation and inhibition of neuronal action potential. Finally, the changes of animal behavior were observed, and the relationship between the changes of animal behavior and the activity of neurons in the brain was discussed. In other words, the purpose of technology is to analyze the brain mechanism of psychology or behavior. The use of this kind of technology often depends on other biological tools, such as the recombinant adeno-associated virus needed to make brain neurons express exogenous photosensitive ion channel protein or artificial receptor protein, and the transgenic technology related to Cre mice. In addition, photogenetics and chemical genetics are very popular in behavioral neuroscience, but their applications are not limited to this. They can also be used in many fields such as intracellular signal transduction, disease research or drug design. Although there are still some shortcomings in this technology, there are also advantages cannot be covered up. It has considerable potential in the research of behavioral neuroscience and the treatment of neurological and mental diseases in the future.

Key words: Photogenetics; Chemical genetics; Recombinant adeno-associated virus; Transgenic mice; Basic principle; Technical route