

斑马鱼卵黄脂磷蛋白在早期胚胎中促进L1-ORF2 诱导的EGFP报告基因表达

王文霞 王晓蝶 武崇光 Luqman ALI 耿琦 张国忠 冯旭 杨悦成 王秀芳* 吕占军*
(河北医科大学, 河北省实验动物学重点实验室, 遗传研究室, 石家庄 050017)

摘要 为了探讨长散布核元件-1(long interspersed nuclear element-1, L1)在胚胎早期高表达的分子机制, 将人L1的第二个开放阅读框(open reading frame 2, ORF2)(L1-ORF2, 该文中简称ORF2), 插入到pEGFP-C1质粒(C1)的EGFP基因下游, 生成C1-ORF2表达载体, 插入的ORF2可以影响EGFP报告基因的表达。将C1-ORF2等表达载体注射到斑马鱼(*Danio rerio*)早期胚胎中, 结果表明, 在所使用的表达载体中, 只有插入ORF2的表达载体诱导EGFP报告基因高表达。C1-ORF2表达载体诱导的EGFP荧光强度随着胚胎的发育而显著降低。EGFP荧光报告蛋白在C1-ORF2中的表达受到组蛋白的抑制, 0 h胚胎溶卵液(简称胚胎溶卵液)能减弱组蛋白对EGFP表达的抑制作用, 从胚胎溶卵液中纯化的卵黄脂磷蛋白(lipovitellin, Lv)的作用强于胚胎溶卵液。凝胶阻滞实验表明, ORF2 DNA能与胚胎溶卵液蛋白、组蛋白和Lv结合。改变组蛋白、Lv和ORF2片段三者的添加顺序, 结果证明Lv可以结合ORF2片段和组蛋白, 从而干扰组蛋白与ORF2的结合。进一步研究发现, Lv增加了C1-ORF2 DNA对DNase I消化的敏感性。该研究获得以下结论: Lv可以与所有检测的DNA片段结合, 但与ORF2的结合比其他DNA片段的结合亲和力更高。Lv通过提高ORF2 DNA染色质的易接近性, 激活ORF2诱导的斑马鱼早期胚胎EGFP基因的表达。

关键词 长散布核元件-1; 斑马鱼(*Danio rerio*)早期胚胎; 卵黄脂磷蛋白; 凝胶阻滞实验; 染色质重组; 体外转录

Zebrafish (*Danio rerio*) Lipovitellin Promotes the Expression of EGFP Reporter Gene Induced by L1-ORF2 in Early Embryos

WANG Wenxia, WANG Xiaodie, WU Chongguang, Luqman ALI, GENG Qi, ZHANG Guozhong,
FENG Xu, YANG Yuecheng, WANG Xiufang*, LÜ Zhanjun*

(Department of Genetics, Hebei Key Lab of Laboratory Animal Science, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract To explore the molecular mechanisms of high expression of L1 (long interspersed nuclear element-1) in early embryo, in this study, C1-ORF2 expression vector (in which human L1-ORF2 was inserted into pEGFP-C1 vector) was generated and the inserted ORF2 could affect the expression of EGFP reporter gene. The C1-ORF2 and other vectors were injected into zebrafish (*Danio rerio*) early embryos. The results showed that only C1-ORF2 induced high expression of EGFP reporter gene. The EGFP fluorescence intensity induced by C1-ORF2 vector significantly decreased with embryonic development. The expression of EGFP reporter in C1-ORF2 was in-

收稿日期: 2023-12-13

接受日期: 2024-03-04

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81771499)和河北省自然科学基金面上项目(批准号: H2018206099、H2021206460)资助的课题

*通信作者。Tel: 15076110502, E-mail: wangxf1966@hebm.edu.cn; Tel: 13785198996, E-mail: lslab@hebm.edu.cn

Received: December 13, 2023

Accepted: March 4, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81771499), and the Natural Science Foundation of Hebei Province, China (Grant No.H2018206099, H2021206460)

*Corresponding authors. Tel: +86-15076110502, E-mail: wangxf1966@hebm.edu.cn; Tel: +86-13785198996, E-mail: lslab@hebm.edu.cn

hibited by histone, but embryo lysate attenuated the histone-induced suppression of EGFP reporter, and Lv (lipovitellin) purified from embryo lysate had a stronger effect than did unmodified embryo lysate. Gel retardation assays showed that ORF2 bound to embryo lysate protein, histone and Lv. Changing the order of histone, Lv and ORF2 fragment addition proved that Lv could bind with ORF2 fragment and histone to interfere the binding of histone to ORF2. This study further found that Lv increased the accessibility of C1-ORF2 DNA to DNase I. It has been concluded that there are a variety of DNA binding proteins in 0 h zebrafish embryos, among which Lv is the most abundant one. Lv can bind to all DNA fragments detected, but binds to ORF2 with a greater affinity than with other DNA fragments. Lv activates *EGFP* gene expression induced by ORF2 in zebrafish early embryo by enhancing the accessibility of ORF2 DNA.

Keywords long interspersed nuclear element-1; zebrafish (*Danio rerio*) early embryo; lipovitellin; gel retardation assay; chromatin reconstitution; *in vitro* transcription

长散布核元件-1(long interspersed nuclear element-1, LINE-1, 简称L1)是脊椎动物,包括哺乳动物、蜥蜴、青蛙和斑马鱼,基因组中的一个转座元件^[1-3],人类L1和斑马鱼L1具有70%的同源性,并且人类L1和斑马鱼L1都包含两个开放阅读框ORF1和ORF2^[2-4]。ORF2编码的蛋白在斑马鱼和人类之间具有进化保守性,含有核酸内切酶和逆转录酶活性,但ORF1编码的蛋白不含保守结构域^[5-7]。L1通常被认为在分化的细胞类型中是沉默的,以避免细胞发生突变。但是L1在人类、啮齿动物和鱼类的早期胚胎中高度表达^[8-9]。L1元件在人类胚胎的8细胞期表达量增加,囊胚期开始减少,主要表达于人类早期胚胎多能干细胞中;小鼠L1在2细胞期表达,其水平在2~8细胞期之间开始下降,16细胞期进一步下降^[10]。L1在蝾螈的胚胎干细胞和早期的多能干细胞中表达;蝾螈断肢再生实验表明,L1在断肢后新生的芽基中表达,是去分化细胞的标志^[11]。斑马鱼胚胎基因组活化晚于哺乳动物,斑马鱼胚胎基因组活化发生在胚胎发育到1 000细胞(受精后3 h)之后,其L1在穹顶期(受精后4.3 h)开始表达,在受精后8 h表达量达到峰值,而后表达量减少。L1表达发生在胚胎干细胞、多能干细胞、去分化细胞以及某些肿瘤细胞中^[12]。

在胚胎早期发育过程中,由L1元件转录而来的L1 RNA作为核支架来促进必要的基因表达,抑制L1转录会干扰胚胎的正常发育^[8,13]。虽然一些文献报道了L1在胚胎早期发育过程中的激活过程,但调控L1转录的分子机制尚不完全清楚^[14]。研究促进L1表达的反式调节因子对于揭示胚胎早期发育、干细胞形成和细胞去分化的机理有重要生物学意义。

本研究试图用斑马鱼胚胎阐明影响L1在早期胚胎中表达的分子机理。斑马鱼胚胎较哺乳动物胚胎容易获得,为生物学研究提供了强有力的工具^[15]。TAN等^[16]将人*MLL-AF9* mRNA显微注射到斑马鱼胚胎中,建立了高效的体内模型,用于研究*MLL-AF9*基因的功能。卵黄脂磷蛋白(lipovitellin, Lv)是斑马鱼早期胚胎(early zebrafish embryo, EZE)中丰富的DNA结合蛋白。Lv是卵黄原蛋白的主要成分,是卵黄原蛋白相关产物中分子量最大的蛋白。对不同物种Lv和卵黄原蛋白组成的分析表明,Lv是一种富含碳水化合物和脂质的糖脂蛋白,类似于卵黄原蛋白^[17]。Lv传统上被认为是胚胎发育的能量储备,并被证明参与鱼类胚胎发育的免疫防御^[18-19]。然而,Lv是否调控L1的表达尚未见报道。为了探索人L1在早期胚胎中高表达的分子机制,本研究将构建的人L1-ORF2(简称ORF2)表达载体显微注射到EZE中。结果发现C1-ORF2注射入0 h斑马鱼胚胎,孵育24 h后可观察到Lv能够激活*EGFP*报告基因的表达。本研究为寻找与Lv在人胚胎细胞中发挥类似作用的物质提供了线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 本研究使用的斑马鱼为TU品系,由南京尧顺禹生物科技有限公司提供。实验按照河北医科大学动物保护与使用委员会批准的方案进行。将16周龄的成年斑马鱼饲养在流动系统中,每次实验的前一晚,将4对成年斑马鱼放置在同一个水箱不同的网中,实验当天上午8点,将雄鱼和雌鱼放在同一个水箱中进行交配和产卵。快速收集处于不同发育

阶段的受精卵,在立体显微镜下向其中注入不同表达载体。45 min内收集的受精胚胎(即处于1细胞期的胚胎)被称为是0 h斑马鱼胚胎;2 h内收集的受精胚胎被称为2 h斑马鱼胚胎;4 h内收集的受精胚胎被称为4 h斑马鱼胚胎,以此类推。将表达载体显微注射入斑马鱼胚胎后,再将胚胎置于加热至28.5 °C的曝气自来水中饲养。

1.1.2 试剂药品及仪器 三卡因购自美国Mreda公司;二甲苯氰醇FF、低熔点琼脂糖购自北京索莱宝科技有限公司;琼脂糖购自西班牙Biowest公司;Xho/Pst I、Hind III/Nhe I、Apa I/Xho或Xho/Pst I限制性内切酶购自日本TaKaRa公司;牛组蛋白、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自上海源叶生物科技有限公司;Lv由本实验室从0 h斑马鱼胚胎溶卵液中纯化获得;硫酸铵购自石家庄市化学试剂厂;DNase I、细胞核提取试剂盒、RNA酶抑制剂、蛋白酶K购自美国ThermoFisher Scientific公司;其他试剂为国产分析纯;荧光倒置显微镜购自德国Leica公司;超声波破碎仪(VCX105PB)购自美国Sonics公司;气动皮升注射系统购自美国WPI公司;5333型PCR仪购自美国Eppendorf公司;实时PCR系统购自美国Applied Biosystems公司;拉针仪购自美国Sart公司;28 °C斑马鱼培养箱购自上海森信实验仪器有限公司。毛细管玻璃针购自美国World Precision Instruments公司;透析袋购自美国Seva公司;Alpha Innotech凝胶成像分析仪购自上海普诺森生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 表达载体构建 本课题组在以往发表的论文中,已经构建了C1-ORF2、C1-Alu×14和C1-LacZ表达载体^[20-21]。简要地,从人X染色体的L1PA3区扩增了人L1-ORF2序列(简称ORF2, 3 825 bp)。将ORF2插入pEGFP-C1(C1)质粒的EGFP基因下游,构建C1-ORF2表达载体;将14个串联的Alu序列(人短散布核元件,总长度为3 962 bp)插入C1的EGFP基因下游,构建C1-Alu×14表达载体;将大肠杆菌LacZ基因片段(3 825 bp)插入C1质粒EGFP基因下游,构建C1-LacZ表达载体。

1.2.2 显微注射表达载体 斑马鱼产卵后快速收集不同发育阶段的胚胎,在体视显微镜下注射不同表达载体。注射前制备表达载体液,浓度为0.1 µg/µL,介质为:0.05%酚红、0.1 mol/L KCl。用微毛细血管针将表

达载体溶液注入斑马鱼胚胎卵黄囊中。每个胚胎注射1.7 nL表达载体溶液。显微注射后,将胚胎于28.5 °C孵育。

1.2.3 观察EGFP报告基因mRNA及蛋白的表达情况 将注射表达载体后的斑马鱼胚胎置于6孔板中,用0.01%的三卡因麻醉。将1.2%低熔点琼脂糖溶液置于恒温板上保持溶解。从6孔板中取出三卡因液,加入1 mL包埋液(配方为:0.01%三卡因、1.2%低熔点琼脂糖)。将6孔板置于冰上冷却,待包埋液凝固后,加入0.01%的三卡因覆盖在三卡因-琼脂糖包埋液上。利用荧光倒置显微镜(490 nm激发波长)观察斑马鱼胚胎中EGFP荧光蛋白的表达情况。利用ImageJ软件测量每个斑马鱼胚胎的荧光强度。将C1、C1-ORF2、C1-Alu×14和C1-LacZ表达载体注射到0 h斑马鱼胚胎中,24 h后提取总RNA,RT-qPCR检测EGFP mRNA水平,检测EGFP mRNA引物对为:上游引物5'-GCA CCA TCT TCT TCA AGG AC-3',下游引物5'-TTG TCG GCC ATG ATA TAG AC-3',扩增片段的长度为181 bp。

1.2.4 0 h斑马鱼胚胎溶卵液(斑马鱼溶卵液)的制备 收集斑马鱼0 h胚胎(产卵后45 min内的胚胎),吸净上清,将斑马鱼胚胎溶于终体积为1 mL的1×胚胎缓冲液中,缓冲液配方为:0.1 mol/L NaCl、0.5 mmol/L苯甲基磺酰氟(phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF)、2 mmol/L二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、0.5 mmol/L乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)、10 mmol/L Tris-HCl(pH7.4)中。在0 °C条件下使用超声波破碎仪破碎胚胎,将粉碎的溶卵液于室温、12 000 r/min条件下离心5 min,收集的上清液为100%溶卵液。使用考马斯亮蓝染色法,用牛血清白蛋白制作标准曲线,于595 nm波长下测定斑马鱼溶卵液(zebrafish embryo lysate, ZEL)的吸光度(D)值,然后将其代入标准曲线中,计算出蛋白质的含量。使用1×胚胎缓冲液对上清液进行稀释,得到不同浓度的溶卵液。

1.2.5 从斑马鱼溶卵液中纯化Lv 根据参考文献[22]中的方法,用分子筛加离子交换层析从胚胎溶卵液中分离Lv,并用质谱分析技术对纯化出的Lv纯度进行鉴定。

1.2.6 体外染色质重组 使用孵育重组的方法进行染色质体外重组^[23]。为防止后续实验中重组混合物中辅助因子的干扰,本研究仅使用组蛋白八

聚体、载体DNA和Lv进行孵育重组。据报道,在没有辅助因子的情况下,重组染色质也可以在适当的条件下形成^[24]。简而言之,将C1-ORF2(或C1-Alu×14)表达载体(终浓度为0.1 μg/μL)与指定浓度的组蛋白八聚体^[25]和Lv(或BSA)混合后,置于由0.1 mol/L NaCl和10 mmol/L Tris-HCl配制成的缓冲液中,室温孵育30 min。每个0 h斑马鱼胚胎注射1.7 nL上述混合物。培养24 h后,于倒置荧光显微镜(490 nm)下观察。利用ImageJ软件测定胚胎EGFP的荧光强度。

1.2.7 凝胶阻滞实验 凝胶阻滞实验是根据文献[26]描述的方法。简而言之,将C1-ORF2、C1-Alu×14、C1-LacZ和C1表达载体分别使用*Xho*/*Pst* I、*Hind* III/*Nhe* I、*Apa* I/*Xho*和*Xho*/*Pst* I限制性内切酶进行酶切。将消化后的混合物添加到等体积的10%苯酚[含有1%十二烷基硫酸钠(SDS)]中,在60 °C下作用30 min以使限制性内切酶失活。然后,在-20 °C下将1/10体积的3 mol/L NaAc和3倍体积的无水乙醇添加到混合物中过夜以沉淀DNA。于室温、12 000 r/min条件下离心10 min后获得酶消化的DNA片段。沉淀用75%乙醇洗涤2次,并在双蒸水(double distilled water, DDW)中溶解。

将得到的纯C1-ORF2、C1-Alu×14和C1-LacZ片段分别与等量的溶卵液、组蛋白和Lv混合,在由0.1 mol/L NaCl和10 mmol/L Tris-HCl配制成的缓冲液(pH7.2)中于室温下孵育15 min,其中DNA片段的终浓度为20 ng/μL,胚胎溶卵液、组蛋白或Lv的终浓度为指定值。将纯化后的ORF2、Alu×14、C1片段与不同浓度的Lv在室温下孵育15 min, DNA片段的终浓度为10 ng/μL,缓冲液配方为0.1 mol/L NaCl、10 mmol/L Tris-HCl。改变2.5 μL组蛋白(指示浓度)、2.5 μL Lv(指示浓度)和5 μL ORF2片段(40 ng/μL)的孵育顺序。将任意两种组分的混合物在室温下孵育15 min,加入第三种组分后在室温下再孵育15 min。将10 μL培养液与2 μL二甲苯酚FF混合后,将5 μL混合液装入6孔板中,在4~8 °C下进行1.5%琼脂糖电泳(电泳缓冲液为0.5×TBE, EB染色)。使用Alpha Innotech凝胶成像分析仪采集图像。

1.2.8 DNase I消化 首先通过孵育重建方法获得C1-ORF2+组蛋白+Lv和C1-Alu×14+组蛋白+Lv重组体。用0.045 U/μL DNase I在室温下分别消化0 s、30 s、2 min或4 min。加入10 μL终止液(配方为: 0.1%

SDS、10 mmol/L EDTA),用无水乙醇沉淀。沉淀物用75%乙醇洗涤2次,干燥,用50 μL 2.5%的SDS溶解,加入1/10体积的二甲苯青上样缓冲液。每份样品各取10 μL点样,进行1.5%琼脂糖凝胶电泳。

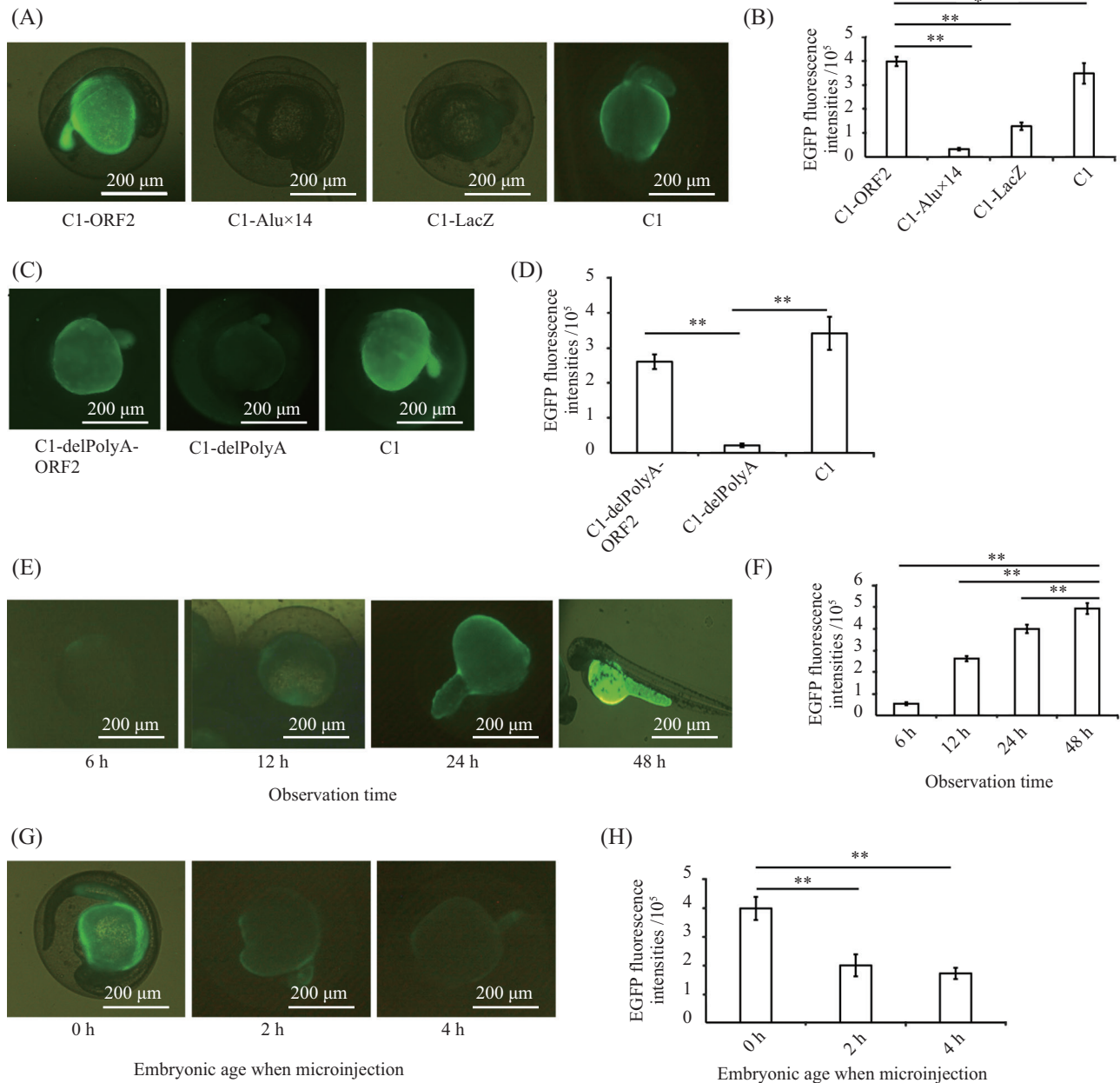
1.2.9 统计分析 所有数据均采用SPSS 17.0软件进行统计处理。组间比较采用单因素方差分析。结果以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 L1-ORF2(ORF2)注射入0 h斑马鱼胚胎24 h后观察EGFP荧光蛋白表达情况

将C1-ORF2、C1-Alu×14、C1-LacZ和pEGFP-C1(C1)表达载体分别显微注射入0 h斑马鱼胚胎,培养24 h后,观察EGFP荧光蛋白表达情况。图1A和图1B显示,C1-ORF2诱导了较强的EGFP荧光表达,C1-Alu×14诱导了显著较低的EGFP荧光表达,C1-LacZ诱导了较弱的EGFP荧光蛋白表达(C1-ORF2组 vs C1-Alu×14组荧光表达强度, t 值为80.32, $P<0.01$; C1-ORF2组 vs C1-LacZ组荧光表达强度, t 值为47.89, $P<0.01$)。C1质粒虽然也诱导了EGFP荧光表达,但是C1-ORF2诱导的EGFP荧光蛋白强度仍然显著高于C1质粒($P<0.05$, t 值为4.75)。

C1质粒诱导高的EGFP荧光蛋白表达的原因之一是该质粒含有PolyA增强子^[27],在C1质粒的EGFP基因下游插入Alu×14、LacZ或ORF2序列,分别转染HeLa细胞后,它们均在HeLa细胞中显示了较强的EGFP荧光蛋白表达的抑制作用^[21]。本研究中,C1-Alu×14和C1-LacZ质粒与C1质粒比较,均显示出了对EGFP表达的抑制作用,该结果与HeLa细胞中的结果一致,但是C1-ORF2注射入0 h斑马鱼胚胎,孵育24 h后观察到的结果与在HeLa细胞中的结果不一致。为了确切证实ORF2在注射的0 h斑马鱼胚胎中对EGFP的活化作用,本文将C1质粒中的PolyA序列去除,构建了不含PolyA的C1表达载体,即C1-delPolyA表达载体。图1C显示C1-delPolyA与C1表达载体相比,注射入0 h斑马鱼胚胎并孵育24 h后,C1-delPolyA表达载体几乎完全失去了诱导EGFP荧光蛋白表达的能力(t 值为30.26, $P<0.01$)。将ORF2插入C1-delPolyA表达载体,构建了C1-delPolyA-ORF2表达载体。图1C显示C1-delPolyA-ORF2表达载体引起了较强的EGFP表达,与C1-delPolyA表达载体



A: C1-ORF2、C1-Alu×14、C1-LacZ或pEGFP-C1(C1)表达载体注射入0 h斑马鱼胚胎24 h后, EGFP荧光蛋白表达的代表图。B: 由C1-ORF2、C1-Alu×14、C1-LacZ及C1表达载体诱导的EGFP荧光强度, 数据来自图1A, 为3次独立实验的均值±标准差。C: C1-delPolyA-ORF2、C1-delPolyA、C1表达载体注射入0 h斑马鱼胚胎24 h后, EGFP荧光蛋白表达的代表图。D: C1-delPolyA-ORF2、C1-delPolyA、C1表达载体诱导的EGFP荧光强度, 数据来自图1C, 为3次独立实验的均值±标准差。E: 将C1-ORF2注射入斑马鱼0 h胚胎, 观察EGFP荧光蛋白在不同时间表达的代表图。F: C1-ORF2在不同时间诱导的EGFP荧光强度, 数据来自图1E, 为3次独立实验的均值±标准差。G: 将C1-ORF2注射入不同发育阶段的胚胎, 在注射后24 h观察EGFP荧光表达的代表图。H: 从图1G测量的C1-ORF2诱导的EGFP荧光强度, 为3次独立实验的均值±标准差。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: representative images of EGFP expression at 24 h after injection of the C1-ORF2, C1-Alu×14, C1-LacZ, or C1 (pEGFP-C1) expression vectors into 0 h zebrafish embryos. B: EGFP fluorescence intensity induced by the C1-ORF2, C1-Alu×14, C1-LacZ, or C1 expression vectors, calculated from the images in Fig.1A ($\bar{x} \pm s$ of three independent experiments). C: representative images of EGFP expression at 24 h after injection of the C1-delPolyA-ORF2, C1-delPolyA, C1 expression vectors into 0 h zebrafish embryos. D: EGFP fluorescence intensity induced by the C1-delPolyA-ORF2, C1-delPolyA, C1 expression vectors, calculated from the images in Fig.1C ($\bar{x} \pm s$ of three independent experiments). E: representative images of EGFP expression at different times after C1-ORF2 injection into 0 h zebrafish embryos. F: EGFP fluorescence intensity induced by C1-ORF2, calculated from the images in Fig.1E ($\bar{x} \pm s$ of three independent experiments). G: representative images of EGFP expression induced by C1-ORF2 injection into embryos at different developmental stages, observed at 24 h after microinjection. H: EGFP fluorescence intensity induced by C1-ORF2, calculated from the images in Fig.1G ($\bar{x} \pm s$ of three independent experiments). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图1 ORF2在0 h斑马鱼胚胎中激活EGFP荧光蛋白的表达

Fig.1 ORF2 activates EGFP fluorescent protein expression in 0 h zebrafish embryos

之间有显著统计学差异($P<0.01$, t 值为49.41)。图1D显示的是用ImageJ软件测量的图1C中各组斑马鱼的荧光强度值。

图1E和图1F显示C1-ORF2诱导的EGFP荧光强度随着观察时间的延后逐渐增加,在48 h时达到峰值。48 h测得的荧光强度值显著高于24 h、12 h和6 h(t 值分别为66.39、74.48和74.83, $P<0.01$)。将C1-ORF2表达载体注射到不同发育阶段的斑马鱼胚胎(0 h、2 h或4 h斑马鱼胚胎)中,在注射后24 h观察EGFP荧光蛋白表达情况,图1G和图1H显示在注射入0 h斑马鱼胚胎,孵育24 h后产生的EGFP荧光强度最高,随着所注射胚胎发育时间的延后,荧光强度明显下降(注射的0 h斑马鱼胚胎与2 h、4 h斑马鱼胚胎比较, t 值分别为22.65和15.98, $P<0.01$)。

以上这些结果表明, C1-ORF2注射入0 h斑马鱼胚胎,孵育24 h后引起了EGFP荧光蛋白的高表达。

2.2 ORF2在转录水平激活EGFP基因表达

使用RT-qPCR检测EGFP mRNA水平,图2显示与C1-Alu×14或C1-LacZ相比, C1-ORF2诱导了较高的EGFP mRNA的表达($P<0.05$)。这些结果表明ORF2在转录水平激活了EGFP基因的表达。

2.3 0 h斑马鱼胚胎溶卵液(斑马鱼溶卵液)对EGFP蛋白表达的影响

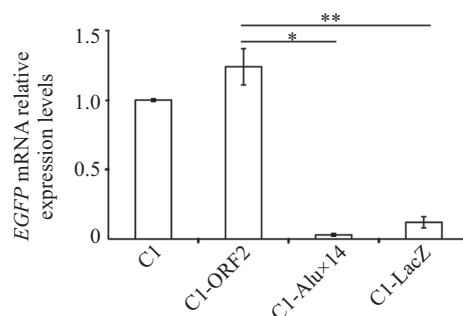
ORF2在0 h斑马鱼胚胎中引起了EGFP高表达,推测在ZEL中可能存在某种物质促进这种作用。因此将不同浓度的溶卵液与C1-ORF2孵育后,注射入0 h斑马鱼胚胎,24 h后观察EGFP蛋白的表达情

况。结果证明EGFP蛋白的表达不受任何浓度ZEL的影响。据文献报道,斑马鱼胚胎溶卵液含有抑制和促进基因表达的蛋白质^[28-29]。由于抑制蛋白主要是组蛋白,因此推测ZEL可能含有减弱组蛋白抑制作用的成分。将C1-ORF2与不同浓度的组蛋白(0、0.02、0.04、0.08和0.16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)孵育后,注射入0 h斑马鱼胚胎,24 h后检测EGFP荧光蛋白的表达。图3A和图3B显示组蛋白浓度为0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, C1-ORF2的EGFP荧光强度降低至50.18%,接近基线的一半(0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组蛋白组与0和0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组蛋白组比较, t 值分别为22.76和23.57, $P<0.01$)。高浓度组蛋白(0.08和0.16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)几乎完全抑制了EGFP蛋白的表达。

在确定导致50% EGFP荧光抑制的组蛋白浓度后,进一步检测了ZEL是否可以减弱组蛋白的抑制作用,结果显示,较高浓度的ZEL(1.900 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、3.800 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、7.600 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)减弱了组蛋白对EGFP荧光表达的抑制作用(图3C),3.800 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ZEL将组蛋白介导的EGFP荧光抑制作用降低了80.49%。这些结果表明, ZEL中含有减弱组蛋白抑制作用的成分。然而,结果也显示3.800 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ZEL不能解除0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组蛋白对EGFP荧光表达的抑制作用。综上所述, ZEL虽然没有激活ORF2诱导的EGFP表达的作用,但可以减弱组蛋白对ORF2所诱导的EGFP蛋白表达的抑制作用。

2.4 纯化的Lv减弱组蛋白对EGFP表达抑制的作用高于ZEL

根据本实验室的前期研究, Lv可能在促进ORF2

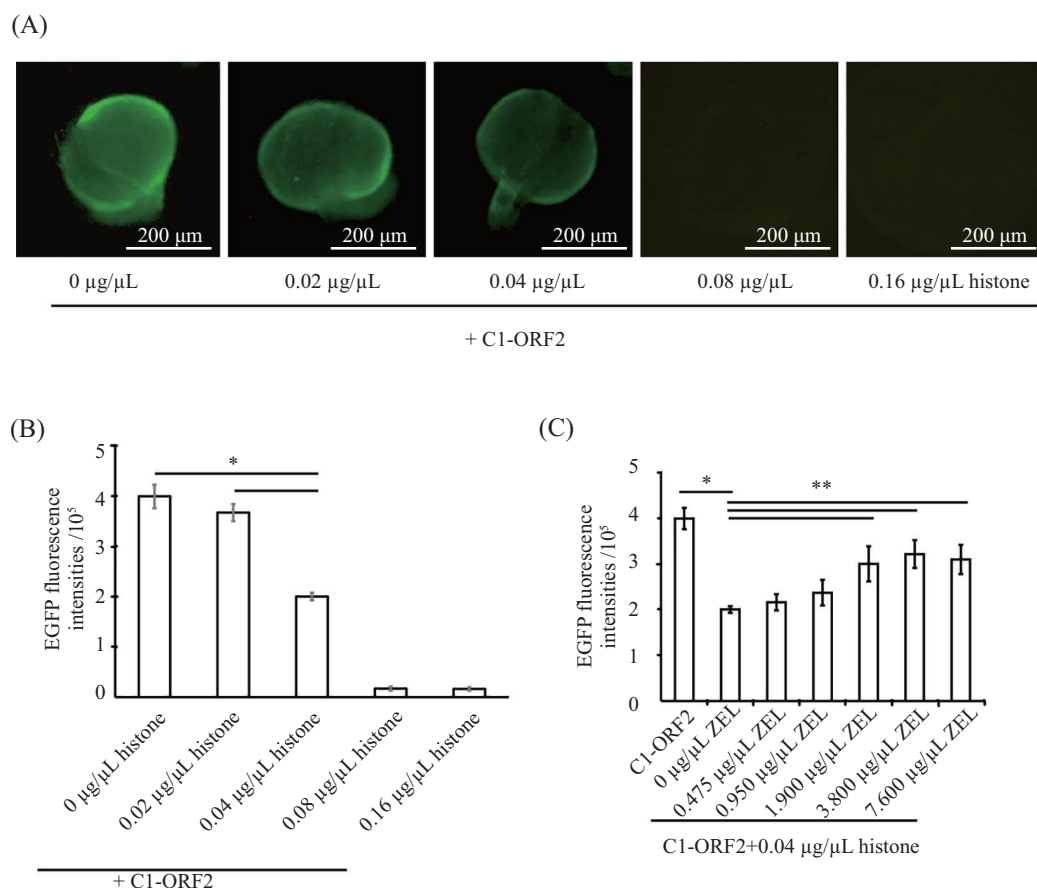


将C1、C1-ORF2、C1-Alu×14和C1-LacZ表达载体注射到0 h斑马鱼胚胎中,24 h后提取总RNA, RT-qPCR检测EGFP mRNA水平。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

C1, C1-ORF2, C1-Alu×14 and C1-LacZ expression vectors were injected into 0 h zebrafish embryos. After 24 h, the total RNA was extracted, and RT-qPCR was used to measure EGFP mRNA levels. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图2 ORF2在转录水平激活EGFP基因的表达

Fig.2 ORF2 activates EGFP gene expression at the transcriptional level



A: 与不同浓度组蛋白孵育后C1-ORF2诱导EGFP荧光表达的代表图。B: 测量图3A中各组EGFP荧光强度。 $n=20$ 。C: 0.04 µg/µL组蛋白和不同浓度ZEL孵育后, C1-ORF2诱导的EGFP荧光强度, ZEL: 斑马鱼胚胎溶卵液。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: representative images of EGFP fluorescence induced by C1-ORF2 after incubation with different concentrations of histone. B: EGFP fluorescence intensities measured from the images in Fig.3A. $n=20$. C: EGFP fluorescence intensities induced by C1-ORF2 after incubation with 0.04 µg/µL histone and different concentrations of embryo lysate. ZEL: zebrafish embryo lysate. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图3 ZEL减弱组蛋白对C1-ORF2质粒的EGFP荧光表达的抑制作用

Fig.3 ZEL attenuates histone-dependent suppression of C1-ORF2 plasmid EGFP fluorescence

引起EGFP高表达中起重要作用, 本研究用分子筛离子交换层析从胚胎溶卵液中分离了Lv, 将纯化出的蛋白质样本进行质谱分析证实了Lv的纯度高达99.22%, 参见本实验室已经发表的论文^[22]。

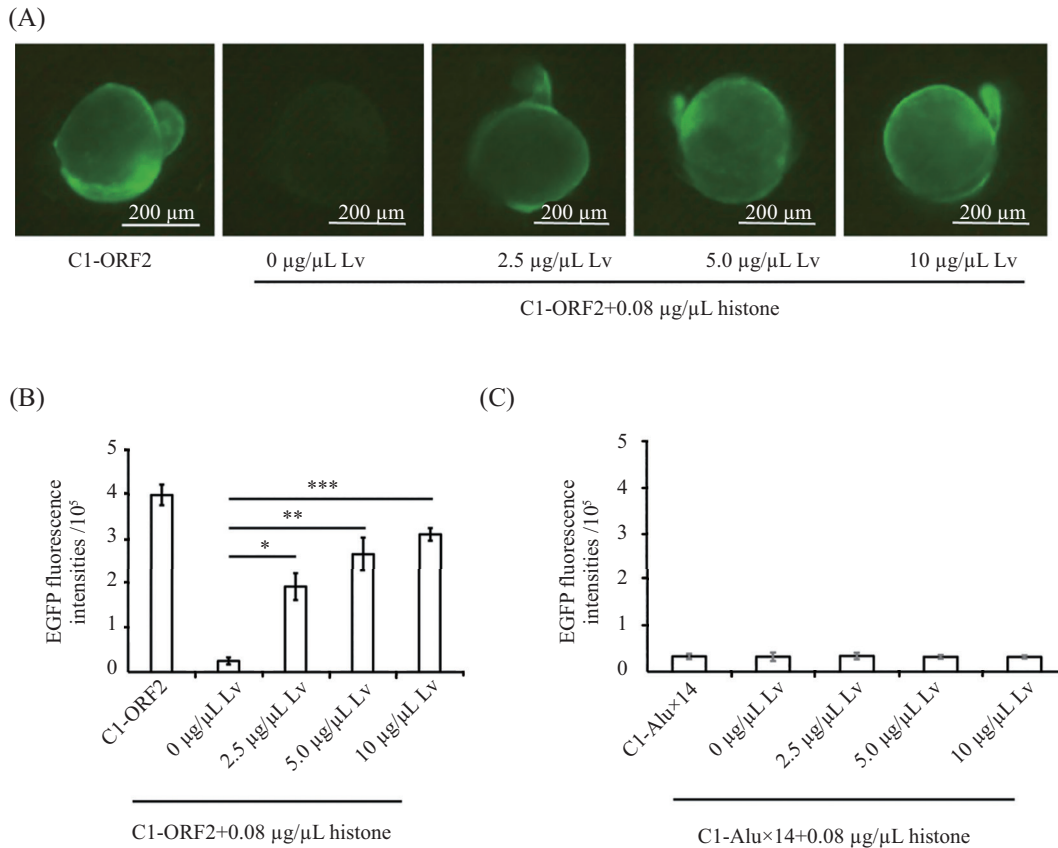
将0.08 µg/µL组蛋白与不同浓度Lv及C1-ORF2共同孵育(“孵育重组”法), 图4A显示, 2.5、5.0、10 µg/µL Lv可明显减弱0.08 µg/µL组蛋白对EGFP表达的抑制作用。另外, Lv解除组蛋白抑制的作用强于ZEL, 即Lv减弱了0.08 µg/µL组蛋白诱导的抑制作用, 而ZEL仅减弱了0.04 µg/µL组蛋白诱导的抑制作用。图4B显示, 2.5、5.0、10 µg/µL Lv诱导的EGFP荧光强度明显高于0 µg/µL Lv($P<0.05$)。0.08 µg/µL组蛋白诱导的EGFP蛋白抑制率为93.8%, 10 µg/µL Lv诱导的EGFP蛋白抑制率为22.21%, 因此10 µg/µL Lv使EGFP蛋白表达的抑制率降低了71.59%。图4C显示注射入C1-Alu×14后,

EGFP几乎不表达, 而加入组蛋白或Lv对EGFP表达无影响。

2.5 C1-ORF2与ZEL、组蛋白和Lv具有较高的亲和力

C1-ORF2注射入0 h斑马鱼胚胎后, 引起EGFP报告基因表达, C1-Alu×14和C1-LacZ注射入0 h斑马鱼胚胎后, 几乎没有引起EGFP表达(图1); 组蛋白抑制了C1-ORF2质粒中EGFP蛋白的表达, 而Lv具有减弱组蛋白对C1-ORF2质粒EGFP表达抑制的作用。推测Lv发挥该种作用的分子机理是Lv与C1-ORF2质粒中的ORF2结合进而导致EGFP报告基因的活化。因为Lv占ZEL蛋白质的95%以上, 下面我们用凝胶阻滞实验探讨了ORF2、Alu×14和LacZ片段分别与ZEL、组蛋白和Lv的结合能力。

用限制性核酸内切酶消化C1-ORF2、C1-



Lv、组蛋白和C1-ORF2(各2 μL)混合后注射入0 h斑马鱼胚胎。A: C1-ORF2质粒和0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组蛋白混合后与不同浓度Lv(0、2.5、5.0、10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)共同孵育, 诱导的EGFP荧光表达的代表图。B: 各组EGFP荧光强度, 数据来自图4A, 以3次独立实验的均值 $\pm$ 标准差表示。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。C: C1-Alu $\times$ 14质粒和0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组蛋白混合后与不同浓度Lv(0、2.5、5.0、10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)共同孵育, 诱导的EGFP荧光表达的代表图。

Lv, histone and C1-ORF2 (2 μL each) were mixed and injected into 0 h zebrafish embryos. A: representative images of EGFP fluorescence induced by C1-ORF2 incubated with 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ histone and different concentrations of Lv (0, 2.5, 5.0 or 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). B: the EGFP fluorescence intensities measured from the images in Fig.4A. Data are presented as the $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. C: EGFP fluorescence intensities induced by C1-Alu $\times$ 14 incubated with 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ histone and different concentrations of Lv (0, 2.5, 5.0 or 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

图4 Lv可减弱组蛋白诱导的EGFP表达抑制

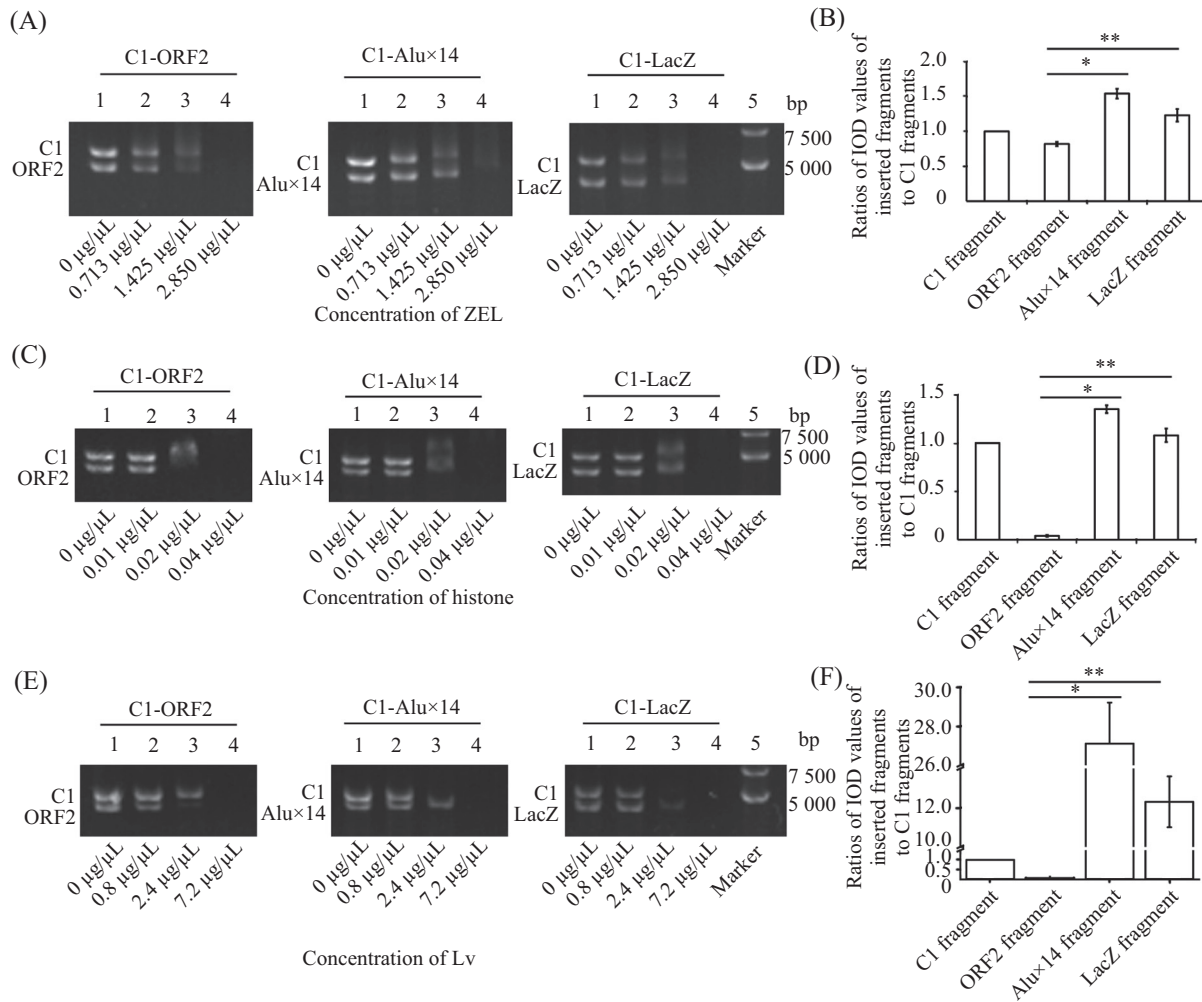
Fig.4 Lv ameliorates the histone-induced inhibition of EGFP fluorescence

Alu $\times$ 14和C1-LacZ, 使其消化为C1质粒片段和插入片段, 分别命名为C1/ORF2、C1/Alu、C1/LacZ片段。将三种片段分别与不同浓度的ZEL、组蛋白或Lv孵育, 之后进行1.5%琼脂糖凝胶电泳和EB染色, 观察ORF2片段结合蛋白的情况。结果显示ORF2、Alu $\times$ 14、LacZ和C1片段的亮度随着ZEL(图5A)、组蛋白(图5C)和Lv(图5E)浓度的增加而降低, 这表明这4种DNA片段由于与蛋白质结合而发生凝胶阻滞, 且ORF2和Alu $\times$ 14片段的凝胶阻滞程度差异较大。

图5A为C1、ORF2、Alu $\times$ 14、LacZ片段与ZEL孵育后的凝胶阻滞代表图。由于测得的积分光密度(integrated optical density, IOD)值代表未与蛋白结合的DNA片段, 因此插入片段的IOD值与C1质粒片段的IOD值之比 >1 , 说明插入片段的结合能力低

于C1片段; 比值 <1 说明插入片段的结合能力高于C1片段。用ImageJ软件测定图5A中第三泳道(ZEL浓度为1.425 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)条带IOD值, 图5B显示ORF2片段与C1片段的IOD比值为0.82, 说明ORF2片段与ZEL的结合能力高于C1片段; Alu $\times$ 14插入片段与C1片段的IOD比值为1.54, 这表明Alu $\times$ 14插入片段与ZEL的结合能力低于C1片段。因此, ORF2与ZEL蛋白的结合能力高于Alu $\times$ 14; ORF2片段与Alu $\times$ 14片段IOD比值为0.53(0.82/1.54)。LacZ片段与C1片段的IOD比值为1.23, 位于ORF2片段与Alu $\times$ 14片段之间, 表明LacZ与ZEL的结合能力高于Alu $\times$ 14, 但低于ORF2。

图5C为C1、ORF2、Alu $\times$ 14、LacZ片段与组蛋白孵育后的凝胶阻滞代表图。用ImageJ软件测定图5C中第三泳道(组蛋白浓度0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)条带的



将C1/ORF2、C1/Alu×14和C1/LacZ片段分别与ZEL、组蛋白或Lv孵育后,用1.5%琼脂糖凝胶电泳进行EB染色。A:与ZEL蛋白孵育后,C1、ORF2、Alu×14、LacZ片段的凝胶阻滞代表图。ZEL:斑马鱼胚胎溶解液。B:当ZEL浓度为1.425 μg/μL时(第三泳道),插入片段IOD值与C1片段IOD值的比值,数据来自图5A,为3次独立实验的均值±标准差。C: C1、ORF2、Alu×14、LacZ片段与组蛋白孵育后的凝胶阻滞代表图。D:当组蛋白浓度为0.02 μg/μL时(第三泳道),插入片段与C1片段IOD值的比值,数据来自图5C,为3次独立实验的均值±标准差。E:与Lv孵育后,C1、ORF2、Alu×14、LacZ片段的凝胶阻滞代表图。F: Lv浓度为1.67 μg/μL时(第三泳道),插入片段与C1片段IOD值的比值,数据来自图5E,为3次独立实验的均值±标准差。* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

C1/ORF2, C1/Alu×14 and C1/LacZ fragments were incubated with embryo lysate, histone or Lv and then subjected to 1.5% agarose-gel electrophoresis with EB staining. A: representative gel retardation assays of C1, ORF2, Alu×14, LacZ fragments after incubation with ZEL protein. ZEL: zebrafish embryo lysate. B: the ratios of IOD values measured from Fig.5A of the inserted fragments to that of the C1 fragment when the concentration of the embryo lysate was 1.425 μg/μL (lane 3). The data are presented as the $\bar{x}\pm s$ of three independent experiments. C: representative images of gel retardation assays of C1, ORF2, Alu×14, LacZ fragments after incubation with histone. D: the ratios of IOD values measured from Fig.5C of the inserted fragment to that of the C1 fragment when the concentration of histone was 0.02 μg/μL (lane 3). The data are presented as the $\bar{x}\pm s$ of three independent experiments. E: representative gel retardation assays of C1, ORF2, Alu×14, LacZ fragments after incubation with Lv. F: the ratios of IOD values measured from Fig.5E of the inserted fragment to that of the C1 fragment when the concentration of Lv was 1.67 μg/μL (lane 3). The data are presented as the $\bar{x}\pm s$ of three independent experiments. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图5 C1-ORF2与ZEL、组蛋白和Lv具有较高的结合能力

Fig.5 C1-ORF2 has high binding abilities with ZEL, histone and Lv

IOD值。图5D显示ORF2片段与C1片段的IOD比值为0.04,表明ORF2与组蛋白的结合能力高于C1片段。Alu×14与C1片段的IOD比值为1.35,表明Alu×14与组蛋白的结合能力低于C1片段。ORF2片段与C1的IOD比值是Alu×14片段与C1比值的0.029 6倍(0.04/1.35),

说明ORF2与组蛋白的结合能力高于Alu×14。LacZ与C1片段的IOD比值为1.08,位于ORF2和Alu×14片段之间。这些结果表明ORF2与组蛋白的结合能力高于Alu×14。

图5E为C1、ORF2、Alu×14、LacZ片段与Lv孵

育后的凝胶阻滞代表图。用ImageJ软件测定图5E中第三泳道(Lv浓度 $1.67 \mu\text{g}/\mu\text{L}$)条带的IOD值。由图5F可知, ORF2片段与C1片段的IOD比值为0.07, 说明ORF2与Lv的结合能力高于C1片段; Alu $\times 14$ 与C1片段的IOD比值为27.1, 表明Alu $\times 14$ 与Lv的结合能力低于C1片段。ORF2片段与C1的IOD比值是Alu $\times 14$ 片段与C1片段IOD比值的0.002 6倍(0.07/27.1), 表明ORF2与Lv的结合能力显著高于Alu $\times 14$ 。

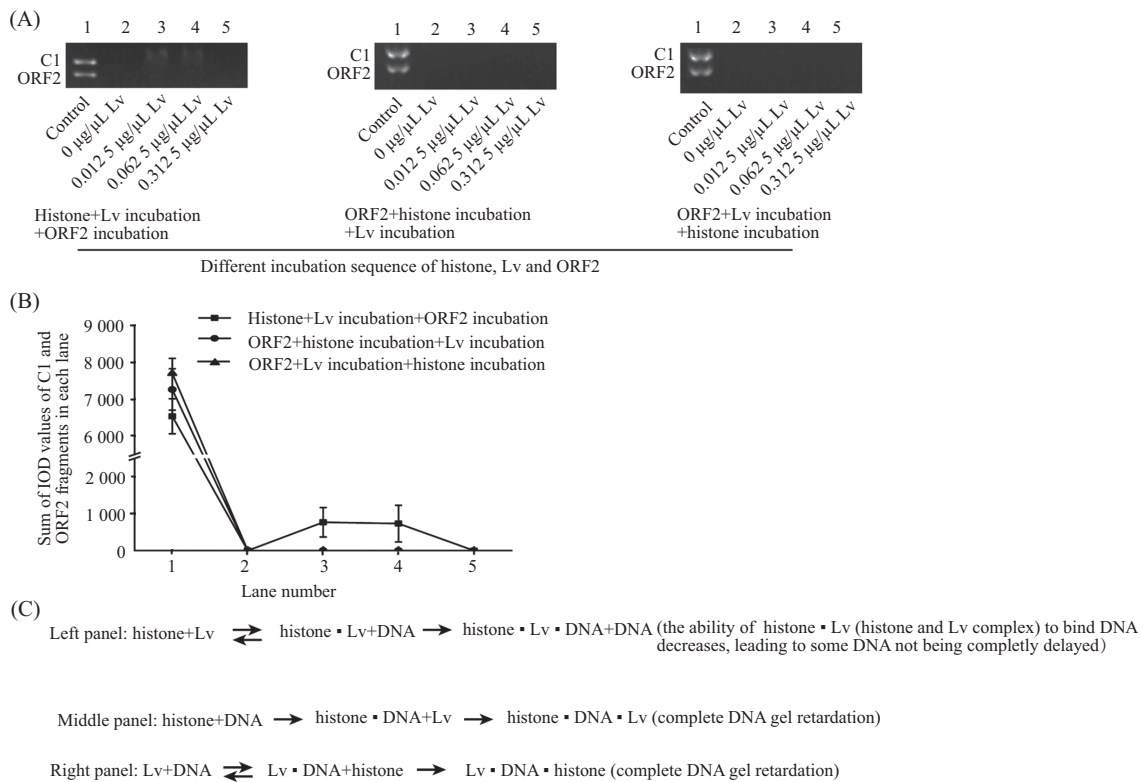
以C1片段为参照, 在相同的实验系统中, 证实ORF2与Lv结合时IOD比值为Alu $\times 14$ IOD比值的0.002 6倍, 与组蛋白结合时为Alu $\times 14$ 比值的0.029 6倍, 与ZEL蛋白结合时为Alu $\times 14$ 比值的0.53倍。这些结果表明, ORF2与Lv的结合能力远高于

Alu $\times 14$ 。

2.6 Lv干扰组蛋白与ORF2 DNA的结合

Lv可解除由C1-ORF2诱导的组蛋白对EGFP荧光蛋白表达的抑制(图4)。解释这一现象的一个潜在机制是Lv可能通过以下两种方式阻碍组蛋白与C1-ORF2 DNA的包装: (1) Lv与ORF2 DNA的结合通过空间位阻阻止组蛋白与ORF2 DNA的结合; (2) Lv与组蛋白的结合阻止组蛋白与ORF2 DNA的结合。本研究将不同浓度的Lv与 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组蛋白以及 $0.04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的C1/ORF2片段按不同顺序混合, 通过凝胶阻滞实验, 验证三者的结合方式。

Lv首先与组蛋白孵育, 在Lv浓度为 $0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, C1和ORF2片段均完全阻滞(图6A, 左图, 泳道2)。随着

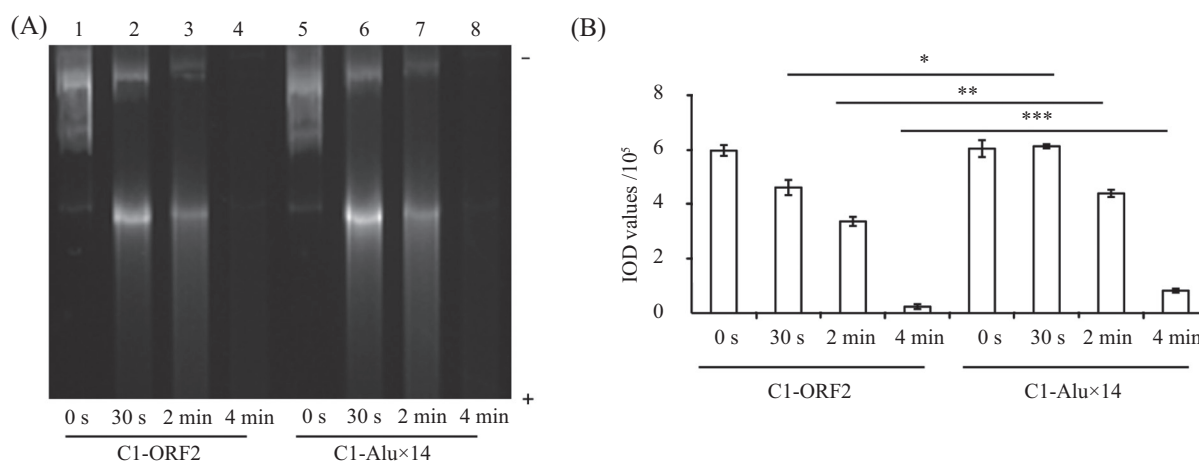


A: 凝胶阻滞代表图显示不同浓度的Lv以不同的顺序与组蛋白和C1/ORF2片段孵育。组蛋白先与Lv孵育, 再与C1/ORF2片段孵育。Lv浓度为0时, C1/ORF2片段完全阻滞; Lv浓度为 0.0125 或 $0.0625 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, C1/ORF2片段部分阻滞(左图)。组蛋白与C1/ORF2片段孵育, 然后与Lv孵育。无论Lv浓度如何, C1/ORF2片段均完全阻滞(中图)。Lv先与C1/ORF2片段孵育, 再与组蛋白孵育。无论Lv浓度如何, C1/ORF2片段均完全阻滞(右图)。B: 显示图6A中每个泳道的C1和ORF2片段的IOD值的总和, 数据为3次独立实验的均值 $\pm$ 标准差。C: 组蛋白、Lv和C1/ORF2片段按不同顺序孵育的凝胶阻滞结果示意图。

A: representative gel retardation assays showing different concentrations of Lv incubated with histone and C1-ORF2 expression vector in different order. Histone was incubated with Lv, and then incubated with ORF2 fragment. ORF2 fragment is completely retarded when the Lv concentration is 0 and partially shifted when the Lv concentration is 0.0125 or $0.0625 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (left panel). Histone was incubated with ORF2 fragments and then with Lv. ORF2 fragments are completely retarded regardless of Lv concentration (middle panel). Lv was incubated with ORF2 fragments and then with histone. ORF2 fragments were completely retarded regardless of Lv concentration (right panel). B: the sum of the IOD values of the C1 and ORF2 fragments in each lane from the images shown in Fig.6A. The data are presented as the $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments. C: schematic diagram of gel retardation results caused by incubating histone, Lv and C1/ORF2 fragments in a different order.

图6 Lv干扰组蛋白与C1和ORF2序列的结合

Fig.6 Lv interferes with histone binding to the C1 vector and ORF2 sequence



A: DNase I digestion of C1-ORF2+histone+Lv(C1-ORF2) or C1-Alu×14+histone+Lv(C1-Alu×14) recombinants. C1-ORF2 (C1-Alu×14) (final concentration 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), histone (final concentration 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and Lv (final concentration 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) were recombined using the incubation reconstitution method. The recombinants were digested with DNase I (0.045 U/ μL) for 0 s, 30 s, 2 min and 4 min, respectively. B: IOD values of each lane calculated from the image of Fig. 7A. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

A: representative image showing DNase I digestion of C1-ORF2+histone+Lv (C1-ORF2) or C1-Alu14+histone+Lv (C1-Alu×14) recombinants. C1-ORF2 (C1-Alu×14) (final concentration 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), histone (final concentration 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and Lv (final concentration 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) were recombined using the incubation reconstitution method. The recombinants were digested with DNase I (0.045 U/ μL) for 0 s, 30 s, 2 min and 4 min, respectively. B: IOD values of each lane calculated from the image of Fig. 7A. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图7 Lv增加C1-ORF2 DNA的DNase I消化敏感性

Fig. 7 Lv increases the DNase I digestion sensitivity of C1-ORF2 DNA

Lv浓度的增加(0.012 5和0.062 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), C1和ORF2均发生部分凝胶阻滞(图6A左图, 泳道3和4, 部分DNA可以进入凝胶); 但当Lv浓度非常高(0.312 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)时, C1和ORF2片段发生了完全阻滞(图6A左图, 泳道5, DNA不能出孔)。当C1/ORF2片段先与组蛋白孵育, 然后再与Lv孵育时, 所有浓度的Lv均导致C1和ORF2片段完全阻滞(图6A, 中图, DNA不能出孔)。同样, 当C1/ORF2片段先与Lv孵育, 再加入组蛋白孵育时, 所有浓度的Lv均导致C1和ORF2片段完全阻滞(图6A, 右图)。图6B显示图6A中每个泳道的C1和ORF2片段的IOD值的总和(结果为3次独立实验的均值 $\pm$ 标准差)。发生这一现象的可能解释见图6C, 即组蛋白与Lv结合后, 形成组蛋白与Lv的复合物(组蛋白-Lv), 从而抑制组蛋白与DNA之间的结合。电泳可见DNA条带呈凝胶阻滞, 表明Lv可以干扰组蛋白与DNA的结合。

2.7 Lv可提高C1-ORF2表达载体的DNase I消化敏感性

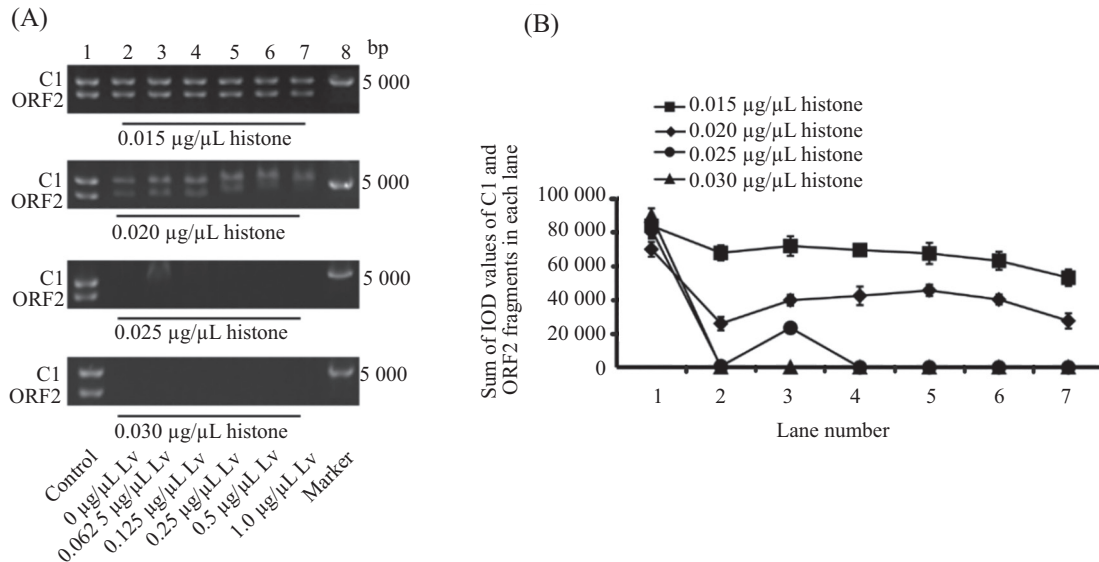
将Lv、组蛋白和表达载体(C1-ORF2或C1-Alu×14)在室温下孵育, 然后用DNase I消化不同时间(0 s、30 s、2 min或4 min), 1.5%琼脂糖电泳观察结果, 验证Lv是否干扰组蛋白与C1-ORF2的包装。随着DNase I消化时间的增加, 表达载体DNA条带亮度逐渐减弱(图7A, 泳道1~8), 但C1-ORF2 DNA片段

的亮度显著低于C1-Alu×14。图7B显示的是根据图7A, 用ImageJ软件计算出的每个泳道的IOD值。这些结果表明, 当重组系统中包含组蛋白、Lv和质粒DNA时, C1-ORF2 DNA比C1-Alu×14 DNA更容易被DNase I消化。

2.8 Lv可干扰组蛋白与ORF2 DNA的结合

进一步研究组蛋白浓度对凝胶阻滞的影响, 在添加C1-ORF2之前, 首先将组蛋白与Lv孵育。组蛋白浓度为0.015 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, 对DNA凝胶阻滞无明显影响(图8A)。当组蛋白浓度为0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Lv浓度为0时, C1/ORF2条带亮度为C1/ORF2对照的37.06%(即阻滞率为62.94%)。Lv浓度为0.062 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, C1/ORF2条带亮度分别降低至对照组的56.83%、60.53%、65.2%、57.46%、39.3%。因此, Lv与组蛋白的结合减弱了组蛋白引起的C1/ORF2 DNA的凝胶阻滞。

当组蛋白浓度为0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Lv浓度为0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, C1/ORF2条带亮度为对照的0.7%(即阻滞率为99.3%)。当Lv浓度为0.062 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, C1/ORF2条带亮度为对照的28.63%。Lv浓度为0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, C1/ORF2完全阻滞。这些结果表明, 低Lv浓度减弱了组蛋白诱导的C1/ORF2片段凝胶阻滞。当组蛋白浓度为0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, 无论



A: 不同浓度组蛋白与不同浓度Lv孵育, 然后再与C1/ORF2孵育, 观察组蛋白和Lv浓度对凝胶阻滞的影响。组蛋白浓度为0.02 μg/μL时, 0.062 5和0.012 5 μg/μL Lv减弱组蛋白引起的C1/ORF2片段凝胶阻滞; 组蛋白浓度为0.025 μg/μL时, 0.062 5 μg/μL Lv可减弱组蛋白引起的C1/ORF2片段凝胶阻滞。B: 图8A中各泳道C1和ORF2片段的IOD值的总和。

A: effects of histone and Lv concentrations on gel retardation when different concentrations of histones were incubated with different concentrations of Lv and then with C1/ORF2. When histone concentrations is 0.02 μg/μL, 0.062 5 and 0.012 5 μg/μL Lv attenuated the gel retardation of C1/ORF2 fragment caused by histone; when histone concentrations is 0.025 μg/μL, 0.062 5 μg/μL Lv attenuated the gel retardation of C1/ORF2 fragment caused by histone. B: the sum of IOD values of C1 and ORF2 fragments in each lane from the images of Fig.8A.

图8 Lv干扰组蛋白与C1/ORF2序列的结合

Fig.8 Lv interferes with histone binding to the C1/ORF2 fragments

Lv浓度如何, 组蛋白均可引起C1/ORF2片段完全凝胶阻滞。

3 讨论

早期胚胎中L1激活与激活因子、L1的异常甲基化和与Piwi相互作用的RNA有关^[30], 表明早期胚胎中L1的激活是一个多因素控制的过程。其中激活因子还包含多种蛋白, 如锌指蛋白Yin-Yang-1^[30]、Ten-11易位蛋白1^[31]、TFLI-A^[32]和SRY家族成员等^[33]。本文研究了0 h斑马鱼胚胎是否含有解除组蛋白抑制的激活因子。在细胞核中, DNA被紧密地包裹在高级结构中, 形成了一个高度抑制DNA转录的环境, 组蛋白可以干扰转录因子与DNA的结合, 抑制基因表达^[34]。ZHANG等^[31]报道了Ten-11易位蛋白1通过减弱组蛋白抑制激活L1表达。本研究结果显示ZEL减弱了组蛋白诱导的EGFP表达的抑制, 这表明ZEL含有减弱组蛋白抑制的成分。

将C1-ORF2、C1-Alu×14、C1-LacZ和C1质粒分别注射入0 h斑马鱼胚胎, 发现C1-ORF2引起EGFP基因高表达, C1-ORF2注射的0 h斑马鱼胚胎中EGFP荧光蛋白表达量甚至高于C1质粒, 插入与

ORF2长度相同的Alu×14序列和LacZ序列的质粒, 仅引起EGFP蛋白非常弱的表达(图1A和图1B); 去除C1质粒中PolyA序列构建的表达载体(C1-delPolyA), 在注射入0 h斑马鱼胚胎后仅能引起低的EGFP表达, 而在C1-delPolyA中插入ORF2, 引起了较强的EGFP荧光表达(图1C和图1D); 随着斑马鱼胚胎的发育, ORF2引起EGFP的表达逐渐减少(图1G和图1H)。本课题组以往的研究证明, ORF2序列插入C1质粒后转染HeLa细胞, 抑制了EGFP表达^[21]。在注射入ORF2的0 h斑马鱼胚胎中, ORF2可激活EGFP基因表达, 而ORF2在HeLa细胞中抑制EGFP表达, 这说明ORF2活化EGFP基因是早期胚胎细胞的特征, 提示在早期胚胎中存在活化ORF2的反式调节因子。

图1显示EGFP荧光信号主要出现在卵黄囊外周。文献报道受精后1天和2天的斑马鱼胚胎荧光图片中卵黄囊外周的亮度高于中心位置^[35-36]。本文中卵黄囊外周荧光强度高于中心荧光强度的结果与上述文献报道一致。关于该种现象产生的原因可能有两种解释。一种是斑马鱼卵黄属于球型立体结构, 中间厚外周薄, 荧光拍摄时紫外线穿透能力有限, 导致卵黄球外周比中心更加透明, 所以外周荧光强度

高。第二种解释是周边有更多的EGFP分子, 中心的EGFP分子少。使用荧光共聚焦显微镜可以澄清该问题, KALASEKAR等^[35]用共聚焦显微镜拍摄斑马鱼荧光图片, 结果依然显示卵黄囊周围的亮度高于中心。这些结果说明第二种解释的可能性较大。卵黄囊周边EGFP分子多的原因是注入0 h斑马鱼胚胎的pEGFP-C1质粒, 一部分进入动物极进而存在于胚体中, 其余部分存在于卵黄囊中, 在合胞体层形成后, 依赖合胞体层的转录能力产生EGFP mRNA及EGFP蛋白。CARVALHO等^[37]报道在斑马鱼早期胚胎中合胞体层细胞质包围卵黄囊, 也就是说卵黄囊周围分布着合胞体层细胞质, 而包围卵黄囊的细胞质没有细胞核。卵黄囊中的EGFP基因转录发生在合胞体层, 卵黄囊周边存在缺乏细胞核的合胞体层细胞质, 故而卵黄囊周边亮度高于中心。

0 h斑马鱼胚胎动物极与植物极之间没有细胞膜隔离, 将C1-ORF2注射入0 h斑马鱼胚胎后, C1-ORF2可以进入动物极, 所以在斑马鱼卵黄囊和体细胞里均可以观察到EGFP荧光。鱼体荧光较弱, 卵黄囊荧光较强, 分析原因是合胞体层包含几百个细胞核, 转录能力强, C1-ORF2质粒参与合胞体层细胞核转录和翻译, 产物进入卵黄囊。但是注射的质粒不能完全集中到动物极, 进入动物极的C1-ORF2会随细胞分裂呈几何级数减少。Lv是由0 h胚胎的卵黄囊提供的, 随着发育时间的延长, 多层细胞形成, 体细胞中Lv等胚胎期ORF2的反式调节因子含量不断减少, 因此待胚胎发育到48 h时观察发现鱼体仅显示非常微弱的荧光(图1E)。

文献报道, 斑马鱼和黑腹果蝇的早期胚胎中含有多种DNA结合蛋白, 这些DNA结合蛋白在合子基因组激活过程中发挥着重要作用^[38]。由于Lv在ZEL中占大多数, 因此假设Lv可能在拮抗组蛋白和激活EGFP报告基因表达中发挥关键作用。将C1-ORF2质粒和组蛋白混合后与纯化的Lv共同孵育, 注射入0 h斑马鱼胚胎, 结果证明了Lv呈浓度依赖性地减弱组蛋白的抑制, 但BSA没有抑制作用(图4和图5)。这些结果表明, Lv在斑马鱼早期胚胎中特异性激活ORF2。BSA对照结果排除了蛋白浓度和实验程序对结果的影响。

凝胶阻滞实验显示ORF2片段与ZEL、组蛋白或Lv的结合能力分别强于LacZ片段、C1片段和Alu×14片段, 而ORF2与Lv的结合能力最高(图6和

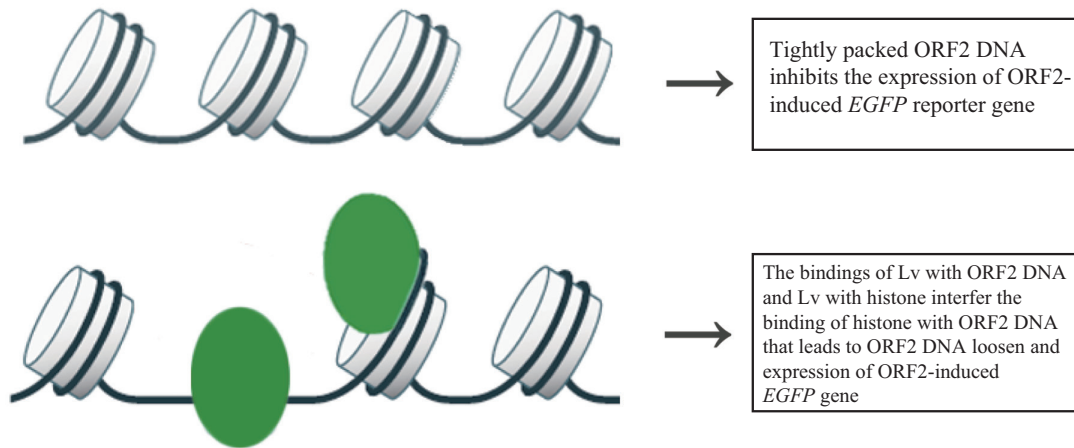
图7)。据报道, 多种DNA结合蛋白可影响基因转录, 且部分蛋白可调节L1表达。多种蛋白可以与L1的5'UTR的转录结合位点相互作用, 招募RNA聚合酶II并介导L1的转录^[30]。本文发现ORF2 DNA与Lv的亲合力远高于Alu×14。这些结果提示Lv可能是ORF2的一个新的激活因子。

组蛋白和转录因子之间的竞争结合调节了斑马鱼胚胎的转录^[34]。实验结果显示, 虽然ORF2比Alu×14更容易与组蛋白结合, 但ORF2与Lv的结合能力高于组蛋白, 并且早期胚胎中含有大量的Lv, 这可能是斑马鱼早期胚胎中ORF2被激活的原因。

本文发现Lv与组蛋白先孵育后再加入ORF2片段孵育, 可减少ORF2片段的凝胶阻滞。组蛋白(或Lv)与ORF2片段提前孵育并不能减少ORF2片段的凝胶阻滞。组蛋白是一种通用的DNA结合蛋白, 通过形成八聚体来包装DNA。组蛋白比其他DNA结合蛋白具有更高的结合稳定性, 因此转录因子仅在组蛋白与DNA结合之前激活基因表达^[39]。本文的结果表明ORF2与Lv的结合比其他DNA片段更强。理论上, 蛋白质与组蛋白结合也可延迟组蛋白包装DNA。本研究改变Lv、组蛋白和ORF2片段的孵育顺序, 研究Lv能否与组蛋白结合。结果表明, 只有Lv与组蛋白预孵育才能减少组蛋白引起的ORF2片段凝胶阻滞, 表明Lv具有与组蛋白结合的能力。ZEL中包含的组蛋白与组蛋白伴侣分子结合, 而不是独立存在^[40]。这一结果提示Lv也是一种伴侣分子。由于Lv在ZEL中占很大比例, 因此Lv在平衡组蛋白与DNA的结合中起着重要作用。

组蛋白包装的紧密程度与真核生物DNA转录直接相关。调节蛋白相关的染色质区域对DNase I消化高度敏感^[41]。本研究表明, Lv可以减弱组蛋白诱导的EGFP表达抑制。据报道, 转录因子可以作用于染色质的特定区域, 以干扰DNA的包装, 表现为转录因子对DNase I消化的敏感性增加^[41]。本文利用组蛋白和C1-ORF2(或C1-Alu×14)重组Lv。在这样的系统中, C1-ORF2 DNA的DNase I消化敏感性高于C1-Alu×14 DNA(图7), 表明重组的C1-ORF2与重组的C1-Alu×14相比, 更容易受到Lv的干扰。

组蛋白能够抑制ORF2引起的EGFP表达, Lv能减弱该抑制, 按转录原理推导, 转录的基因染色质开放, 允许RNA聚合酶及转录因子接近DNA; 凝胶阻滞实验证明Lv与组蛋白先孵育, 减少了组蛋白与



上图显示组蛋白包装DNA形成整齐的核小体抑制基因转录;下图显示Lv能与DNA和组蛋白结合,进而干扰DNA包装核小体,促进DNA转录。

The above panel shows that histone packaging DNA to form order nucleosomes inhibits gene transcription; the below panel shows that Lv can bind to DNA and histones, thereby interfering with DNA packaging nucleosomes and promoting DNA transcription.

图9 Lv作用的分子机理示意图

Fig.9 Schematic diagram of molecular mechanism of Lv action

DNA的结合,证明了Lv与ORF2有强的亲和性;DNase I消化实验证明Lv提高了L1-ORF2 DNA的易接近性。以上三点均说明Lv通过提升染色质易接近性,增加了L1-ORF2引起的*EGFP*报告基因的表达水平。但是获得最终结论还需要补充较多实验。

总结Lv作用的分子机理: Lv与DNA的结合具有序列特异性, Lv与L1-ORF2片段的亲和力高于C1、LacZ和Alu×14片段。图9示意Lv与ORF2 DNA结合,还可以与组蛋白结合,干扰组蛋白与ORF2 DNA结合形成核小体,进而促进DNA转录。由于Lv在斑马鱼早期胚胎蛋白中占很大比例,并且Lv具有DNA序列结合特异性,所以推测Lv在斑马鱼早期胚胎中作为转录因子激活L1-ORF2。

4 结论及展望

本研究证明了组蛋白能抑制L1-ORF2引起的*EGFP*表达, ZEL可解除组蛋白对*EGFP*表达的抑制。同时首次发现Lv与DNA的结合具有序列特异性, Lv与L1-ORF2片段的亲和力高于Alu×14片段。Lv还可以与组蛋白结合,干扰组蛋白与ORF2 DNA的结合。体外实验表明, Lv通过干扰含ORF2的DNA的包装来促进*EGFP*报告基因的表达。由于Lv在斑马鱼早期胚胎的蛋白中占很大比例,并且Lv具有DNA序列结合特异性,推测Lv在斑马鱼早期胚胎中作为转录因子激活L1-ORF2。L1-ORF2在斑马鱼早期胚胎中的高表达与Lv干扰DNA包装有关,参与了早期胚胎

发生。人类胚胎中没有Lv,但L1在人类胚胎中也高度表达,这意味着在人类早期胚胎中也存在与Lv功能相同的成分。寻找Lv的等效成分对人类胚胎发育过程中基因再激活的研究具有重要意义。

参考文献 (References)

- [1] MILIOTO V, PERELMAN P L, PAGLIA L, et al. Mapping retrotransposon line-1 sequences into two cebidae species and homo sapiens genomes and a short review on primates [J]. *Genes*, 2022, 13(10): 1742.
- [2] OTSU M, KAWAI G. Distinct RNA recognition mechanisms in closely related LINEs from zebrafish [J]. *Nucleos Nucleot Nucl*, 2019, 38(4): 294-304.
- [3] WANG F, CHAMANI IJ, LUO D, et al. Inhibition of LINE-1 retrotransposition represses telomere reprogramming during mouse 2-cell embryo development [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2021, 38(12): 3145-53.
- [4] TIWARI B, JONES A E, CAILLET C J, et al. p53 directly represses human LINE1 transposons [J]. *Genes Dev*, 2020, 34(21/22): 1439-51.
- [5] SWERGOLD GD. Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter [J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(12): 6718-29.
- [6] ZHAO Y, DU J, WANG Y, et al. BST2 suppresses LINE-1 retrotransposition by reducing the promoter activity of LINE-1 5' UTR [J]. *J Virol*, 2022, 96(2): e0161021.
- [7] FENG Q, MORAN J V, KAZAZIAN H H JR, et al. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition [J]. *Cell*, 1996, 87(5): 905-16.
- [8] SPADAFORA C. A LINE-1-encoded reverse transcriptase-dependent regulatory mechanism is active in embryogenesis and tumorigenesis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2015, 1341: 164-71.
- [9] FAULKNER G J, GARCIA-PEREZ J L. L1 mosaicism in mam-

- mals: extent, effects, and evolution [J]. Trends Genet, 2017, 33(11): 802-16.
- [10] KOHLRAUSCH F B, BERTELI T S, WANG F, et al. Control of LINE-1 expression maintains genome integrity in germline and early embryo development [J]. Reprod Sci, 2022, 29(2): 328-40.
- [11] ZHU W, KUO D, NATHANSON J, et al. Retrotransposon long interspersed nucleotide element-1 (LINE-1) is activated during salamander limb regeneration [J]. Dev Growth Differ, 2012, 54(7): 673-85.
- [12] CHANG N C, ROVIRA Q, WELLS J, et al. Zebrafish transposable elements show extensive diversification in age, genomic distribution, and developmental expression [J]. Genome Res, 2022, 32(7): 1408-23.
- [13] BERALDI R, PITTOGGI C, SCIAMANNA I, et al. Expression of LINE-1 retroposons is essential for murine preimplantation development [J]. Mol Reprod Dev, 2006, 73(3): 279-87.
- [14] MENG S, LIU X, ZHU S, et al. Young LINE-1 transposon 5' UTRs marked by elongation factor ELL3 function as enhancers to regulate naïve pluripotency in embryonic stem cells [J]. Nat Cell Biol, 2023, 25(9): 1319-31.
- [15] LIU J, HEMPHILL J, SAMANTA S, et al. Genetic code expansion in zebrafish embryos and its application to optical control of cell signaling [J]. J Am Chem Soc, 2017, 139(27): 9100-3.
- [16] TAN J, ZHAO L, WANG G X, et al. Human MLL-AF9 overexpression induces aberrant hematopoietic expansion in zebrafish [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 6705842.
- [17] 卢君, 刘伦伦, 张继红, 等. 鱼类卵黄蛋白的研究进展[J]. 农产品加工(学刊)(LU J, LIU L L, ZHANG J H, et al. Research progress of fish yolk protein [J]. Agricultural Products Processing, Journal), 2014(8): 57-61.
- [18] ZHANG S, DONG Y, CUI P. Vitellogenin is an immunocompetent molecule for mother and offspring in fish [J]. Fish Shellfish Immunol, 2015, 46(2): 710-5.
- [19] LIANG X, HU Y, FENG S, et al. Heavy chain (LvH) and light chain (LvL) of lipovitellin (Lv) of zebrafish can both bind to bacteria and enhance phagocytosis [J]. Dev Comp Immunol, 2016, 63: 47-55.
- [20] WANG H, SUN W, LI Z, et al. Identification and characterization of two critical sequences in SV40PolyA that activate the green fluorescent protein reporter gene [J]. Genet Mol Biol, 2011, 34(3): 396-405.
- [21] WANG XF, JIN X, WANG X, et al. Effects of L1-ORF2 fragments on green fluorescent protein gene expression [J]. Genet Mol Biol, 2009, 32(4): 688-96.
- [22] 王晓蝶, 武崇光, 王文霞, 等. 卵黄脂磷蛋白通过网格蛋白介导的内吞作用进入培养的人成纤维细胞[J]. 中国细胞生物学学报(WANG X D, WU C G, WANG W X, et al. Lipovitellin enters cultured human fibroblasts through clathrin-mediated endocytosis [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2023, 45(10): 1482-92.
- [23] LUSSER A, KADONAGA J T. Strategies for the reconstitution of chromatin [J]. Nat Methods, 2004, 1(1): 19-26.
- [24] DILWORTH S M, DINGWALL C. Chromatin assembly *in vitro* and *in vivo* [J]. Bioessays, 1988, 9(2/3): 44-9.
- [25] ANGELOV D, LENOUEVEL F, HANS F, et al. The histone octamer is invisible when NF-kappaB binds to the nucleosome [J]. J Biol Chem, 2004, 279(41): 42374-82.
- [26] AYDIN O, KANARYA D, YILMAZ U, et al. Determination of optimum ratio of cationic polymers and small interfering RNA with agarose gel retardation assay [J]. Methods Mol Biol, 2022, 2434: 117-28.
- [27] YIN K, WANG X, MA H, et al. Impact of copy number of distinct SV40PolyA segments on expression of a GFP reporter gene [J]. Sci China Life Sci, 2010, 53(5): 606-12.
- [28] AKDOGAN-OZDILEK B, DUVAL K L, GOLL M G. Chromatin dynamics at the maternal to zygotic transition: recent advances from the zebrafish model [J]. F1000Res, 2020, doi: 10.12688/f1000research.21809.1.
- [29] FACCHIN F, CANAIDER S, BIANCONI E, et al. Zebrafish embryo extract counteracts human stem cell senescence [J]. Front Biosci, 2019, 11(1): 89-104.
- [30] ATHANIKAR J N, BADGE R M, MORAN J V. A YY1-binding site is required for accurate human LINE-1 transcription initiation [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(13): 3846-55.
- [31] ZHANG P, LUDWIG A K, HASTERT F D, et al. L1 retrotransposition is activated by Ten-eleven-translocation protein 1 and repressed by methyl-CpG binding proteins [J]. Nucleus, 2017, 8(5): 548-62.
- [32] MINAKAMI R, KUROSE K, ETOH K, et al. Identification of an internal cis-element essential for the human L1 transcription and a nuclear factor(s) binding to the element [J]. Nucleic Acids Res, 1992, 20(12): 3139-45.
- [33] TCHÊNIO T, CASELLA J F, HEIDMANN T. Members of the SRY family regulate the human LINE retrotransposons [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(2): 411-5.
- [34] JOSEPH S R, PÁLFY M, HILBERT L, et al. Competition between histone and transcription factor binding regulates the onset of transcription in zebrafish embryos [J]. eLife, 2017, 6: e23326.
- [35] KALASEKAR S M, ZACHARIA E, KESSLER N, et al. Identification of environmental chemicals that induce yolk malabsorption in zebrafish using automated image segmentation [J]. Reprod Toxicol, 2015, 55: 20-9.
- [36] GUPTA P, ZHAO X F, PRAT C R, et al. Zebrafish transgenic lines co-expressing a hybrid Gal4 activator and eGFP in tissue-restricted patterns [J]. Gene Expr Patterns, 2011, 11(8): 517-24.
- [37] CARVALHO L, HEISENBERG CP. The yolk syncytial layer in early zebrafish development [J]. Trends Cell Biol, 2010, 20(10): 586-92.
- [38] VEIL M, YAMPOLSKY L Y, GRÜNING B, et al. Pou5f3, SoxB1, and Nanog remodel chromatin on high nucleosome affinity regions at zygotic genome activation [J]. Genome Res, 2019, 29(3): 383-95.
- [39] RAMOS K S, BOJANG P, BOWERS E. Role of long interspersed nuclear element-1 in the regulation of chromatin landscapes and genome dynamics [J]. Exp Biol Med, 2021, 246(19): 2082-97.
- [40] ZHU W, XU X, WANG X, et al. Reprogramming histone modification patterns to coordinate gene expression in early zebrafish embryos [J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 248.
- [41] MOYANO T C, GUTIÉRREZ R A, ALVAREZ J M. Genomic footprinting analyses from DNase-seq data to construct gene regulatory networks [J]. Methods Mol Biol, 2021, 2328: 25-46.