

果蝇Golgin-84在发育中的表达和功能研究

侯国丽¹ 林鑫华² 吴一卉^{2*} 刁爱坡^{1*}

(¹天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; ²中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 高尔基体形态和结构的维持与真核细胞内的物质运输和细胞正常功能密切相关, 高尔基体蛋白Golgin-84对维持高尔基体形态发挥了重要作用, 但其在发育中的功能尚不清楚。为了研究Golgin-84在果蝇发育中的作用, 成功制备并纯化了抗果蝇Golgin-84的多克隆抗体并成功构建了*UAS-golgin-84-V5*过表达和*golgin-84 RNAi*转基因果蝇, 并对*golgin-84*在果蝇发育中的作用作了初步分析。蛋白免疫印迹和免疫荧光染色实验表明: 制备的Golgin-84抗体能特异性识别重组和内源Golgin-84蛋白; Golgin-84与高尔基体蛋白GM130共定位; Golgin-84在果蝇不同发育阶段的各组织中广泛表达, 在睾丸中表达较高。另外发现, 选择性地抑制果蝇翅膀中Golgin-84表达使得翅脉发育异常; 过表达Golgin-84导致果蝇翅膀生长图式出现缺陷。该实验成功制备了果蝇Golgin-84抗体, 获得了*golgin-84*转基因果蝇, 并对*golgin-84*的功能作了初步的分析, 为进一步阐明Golgin-84的作用机制奠定了基础。

关键词 Golgin-84; 黑腹果蝇; 抗体制备; 过表达

Studies of *Drosophila* Golgin-84 Expression and Functions in Development

Hou Guoli¹, Lin Xinhua², Wu Yihui^{2*}, Diao Aipo^{1*}

(¹School of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; ²State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The structure of Golgi apparatus is closely related to membrane transport and normal cellular function. It is already known that the cis-Golgi localized Golgin-84 plays an essential role in the maintenance of Golgi structure in mammalian cells. However, the function of Golgin-84 in development remains unclear. To examine the roles of Golgin-84 in development, we generated and purified the polyclonal antibody against *Drosophila* Golgin-84, and the *UAS-golgin-84-V5* over-expression and *golgin-84 RNAi* transgenic *Drosophila* lines were generated. We preliminarily analyzed the function of *golgin-84* in *Drosophila melanogaster* during wing development. Western blot and immunofluorescence staining showed that the purified antibody can recognize recombinant and endogenous Golgin-84 protein, and the antibody stained Golgin-84 co-localized with Golgi marker protein GM130 in S2 cells. Golgin-84 was ubiquitously expressed during development in *Drosophila melanogaster* and abundant in testis. Furthermore, inhibition of Golgin-84 expression resulted in wing defects, and wing growth and patterning defects were observed in the Golgin-84 over-expressed *Drosophila*. In conclusion, we successfully generated the Golgin-84 antibody and transgenic lines in *Drosophila*, and examined the function of Golgin-84 in wing development. Our results laid the foundation to further study the physiological function and molecular mechanism of *golgin-84*.

Key words Golgin-84; *Drosophila melanogaster*; antibody preparation; over-expression

收稿日期: 2012-12-13 接受日期: 2013-01-29

国家自然科学基金(批准号: 31071181、31071284)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-64807731, E-mail: yihuiwu@ioz.ac.cn; Tel: 022-60602948, E-mail: diaoaiipo@tust.edu.cn

Received: December 13, 2012 Accepted: January 29, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31071181, 31071284)

*Corresponding authors. Tel: +86-10-64807731, E-mail: yihuiwu@ioz.ac.cn; Tel: +86-22-60602948, E-mail: diaoaiipo@tust.edu.cn

网络出版时间: 2013-04-11 16:51

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130411.1651.001.html>

高尔基体(Golgi apparatus)是存在于大多数真核生物细胞内的一种细胞器,由意大利神经病理学家高尔基于1898年用光学显微镜观察银染神经细胞时首次发现^[1]。高尔基体由一系列平行排列的扁平膜囊(cisternae)及管网状膜结构(Golgi network)组成。扁平膜囊平行排列类似扁盘堆叠结构,称为高尔基堆(Golgi stack)。高尔基体位于细胞内膜系统分泌途径的中心,主要功能是将内质网合成的蛋白质、脂类等大分子进行加工修饰,然后再分类、包装、运输到细胞内特定的部位(如细胞膜、胞内体、溶酶体等)或分泌到细胞外,以行使其各自的功能^[2-7]。

Golgin家族蛋白是定位在高尔基体上并带有较长coiled-coil结构域的一类蛋白, Golgin往往通过其C-端的跨膜区或小GTPase锚定到高尔基体膜上,对维持高尔基体膜结构和囊泡运输发挥重要作用。Golgin-84是Golgin家族成员之一^[8-10], 隶属II型跨膜蛋白,其C-端含有一个跨膜区域,起镶嵌到高尔基体膜上的作用,中间为较长的coiled-coil结构域,可连接两个蛋白分子形成二聚体,其N-端的功能还不清楚。Golgin-84在个体的不同组织中均有表达,在睾丸中表达量较高,推测其可能在生殖细胞的分泌和精子的顶体形成中起着重要的作用^[8]。已有研究表明,在哺乳动物细胞中Golgin-84定位于高尔基体的顺面,免疫沉淀证明Golgin-84同CASP(CUTL1 alternatively spliced product, Golgin家族成员)相互作用,并调节高尔基体内部COPI膜泡(COPI vesicles)的反向运输^[11-13],过表达或抑制该基因表达将导致高尔基体的裂解和膜泡运输效率下降^[14-15]。Golgin-84在果蝇和哺乳动物细胞中有高度的保守性^[16],目前对Golgin-84在果蝇中的功能研究还未见相关报道。

果蝇golgin-84的同源基因为CG17785,位于3号染色体右臂,编码一个含516个氨基酸的蛋白。鉴于Golgin-84在哺乳动物细胞中起调控膜泡运输的作用^[14-15,17],推测其可能在果蝇的生长发育中也起着调控作用。本研究成功制备了果蝇Golgin-84抗体并进行了纯化,用纯化的抗体检测到Golgin-84在果蝇体内广泛表达。另外,成功构建了golgin-84转基因果蝇,观察到抑制Golgin-84表达和Golgin-84过表达后对果蝇发育产生了一定的表型,并对其表型作了初步分析。本课题为进一步研究Golgin-84的功能,进而研究高尔基体在个体发育中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 *pGEX-4T-1*、*PET-30a*、大肠杆菌MM294、BL21、*Valium20*、*pUAST-V5*由本实验室保存。所用到的工具蝇基因型分别为 w^{1118} 、*en-Gal4*、*ap-Gal4/BCG*、*MS1096-Gal4*、*tub-Gal4*,由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 T4 DNA连接酶、限制性内切酶EcoR I、Xho I购自NEB公司;蛋白marker购自广州康润生物制品开发有限公司;DNA marker、fastPfu DNA聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司;DNA纯化回收试剂盒、胶回收试剂盒、dNTP均购自康为世纪生物科技有限公司;IPTG购自AMRESCO公司;Western blot转膜仪、凝胶图像分析仪购自Bio-Rad公司;Odyssey购自LI-COR公司;激光共聚焦显微镜(LSM780)购自Carl Zeiss;镍离子金属螯合柱、谷胱甘肽琼脂糖凝胶层析柱均购自Sigma公司;一抗mouse anti-V5、荧光偶联二抗均购自Invitrogen公司;一抗rabbit anti-GM130购自Abcam公司;引物合成、序列测定由华大基因生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 *pGEX-4T-1-golgin-84-ag*表达载体的构建 上游引物的序列为: 5'-GGA ATT CAT GTC ATC CTG GAT CAC AG-3'; 下游引物的序列为: 5'-CCG CTC GAG TTA CAT GTT TTG CTG TAG CTG C-3', 划线部分为EcoR I、Xho I酶切位点。以果蝇基因组为模板,对Golgin-84从N-端的第1-423个氨基酸(Golgin-84-ag)进行PCR扩增。PCR产物纯化后用EcoR I和Xho I进行双酶切,连接至原核表达载体*pGEX-4T-1*。连接产物转化大肠杆菌MM294感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素(终浓度为100 mg/L)的固体培养基上。提取阳性转化子进行PCR和酶切鉴定后,由华大基因公司测序鉴定。

1.2.2 GST-Golgin-84-ag重组蛋白的原核表达及纯化 将测序正确的重组质粒*pGEX-4T-1-golgin-84-ag*转化大肠杆菌BL21,用终浓度为1 mmol/L的IPTG在25 °C条件下诱导6 h。菌体经超声破碎后,分离上清,用谷胱甘肽琼脂糖凝胶层析柱纯化GST-Golgin-84-ag重组蛋白。获得的蛋白用SDS-PAGE分离并用考马斯亮蓝染色鉴定。

1.2.3 多克隆抗体的制备及纯化 纯化的GST-Golgin-84-ag重组蛋白免疫健康豚鼠,免疫过程由北京

康为试剂有限公司完成, 静脉取血分离血清。表达纯化His-Golgin-84-ag重组蛋白用于抗体的纯化。将纯化的His-Golgin-84-ag蛋白进行SDS-PAGE电泳分离, 用湿转法转到PVDF膜上。用PBST(0.1% Triton X-100)稀释(1:1)的血清与含有His-Golgin-84-ag目的蛋白的PVDF膜在4 °C条件下孵育过夜。用0.1 mol/L的甘氨酸(pH2.5)洗脱, 收集洗脱组分, 4 °C储存。

1.2.4 过表达重组质粒的构建 以 w^{1118} 野生型果蝇cDNA为模板, 利用PCR的方法扩增出golgin-84 cDNA全长片段, 纯化后用Not I和Xho I进行双酶切, 连接至pUAST-V5载体, 筛选获得UAST-golgin-84-V5重组质粒。所得质粒用于果蝇胚胎显微注射。

1.2.5 golgin-84 RNAi转基因果蝇的构建 在网站DSIR(<http://biodev.cea.fr/DSIR/DSIR.html>)上分析设计用于golgin-84 RNAi的寡核苷酸序列。以RNAi1: GGA AGA TCT TAA TAA CGA AAC; RNAi2: GCG AGG AAA CAC TAG CAA AGG为靶序列, 退火后与EcoR I和Nhe I双酶切的Valium20载体连接, 筛选获得重组质粒, 所得质粒用于果蝇胚胎显微注射。Tub-Gal4诱导golgin-84 RNAi表达, 取10只成虫提取mRNA反转录成cDNA, RT-qPCR检测RNAi处理果蝇中golgin-84 mRNA水平的表达情况。

1.2.6 抗体特异性的Western blot分析 取野生型 w^{1118} 、en-Gal4诱导的golgin-84 RNAi和UAS-golgin-84-V5过表达果蝇三龄幼虫匀浆后制备蛋白样品, 经SDS-PAGE电泳、转膜后, 一抗用本实验制备的guinea pig anti-Golgin-84(1:1 000)和mouse anti-V5(1:300), 二抗为700 DX-donkey anti-guinea pig(1:15 000)和700 DX-donkey anti mouse(1:15 000)。Western blot检测重组蛋白和果蝇幼虫内源Golgin-84蛋白的表达情况。

1.2.7 抗体荧光染色 取golgin-84 RNAi的雄蝇UAS-golgin-84与en-Gal4雌蝇杂交, 待出现F1代三龄幼虫后将其解剖, 参考Belenkaya等^[18]的方法进行固定和免疫荧光染色。一抗为本实验制备的guinea pig anti-Golgin-84(1:1 000)和rabbit anti GM130(1:500), 二抗为Cy3-goat anti guinea pig(1:400)和488-goat anti rabbit(1:400)。收集S2细胞, 3.7%甲醛室温固定10 min, 用含5%马血清的0.02% PBST(0.02% Triton X-100)透膜20 min后进行免疫荧光^[19]。制片, 在激光共聚焦显微镜下观察染色情况。

1.2.8 荧光染色检测Golgin-84在果蝇不同组织中的

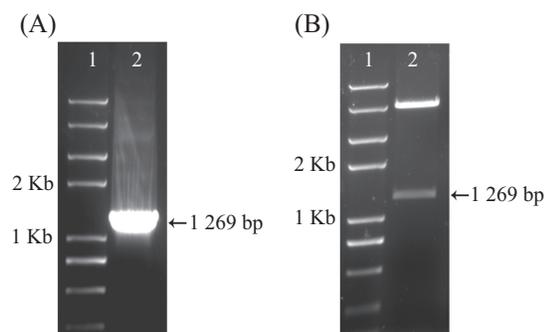
表达 取野生型果蝇的三龄幼虫、成虫将其解剖, 按照Belenkaya等^[18]的方法固定和免疫荧光染色。收集24 h的果蝇胚胎(<http://cshprotocols.cshlp.org>), 将胚胎用50%次氯酸钠脱膜后用0.03% Triton X-100、0.7% NaCl清洗, 染色过程中用含有0.2% BSA和0.1% Tween-20的PBS清洗未结合的一抗。制片后, 在激光共聚焦显微镜下观察Golgin-84在不同组织中的表达情况。

1.2.9 基因功能分析 取UAS-golgin-84雄蝇分别与ap-Gal4、MS1096-Gal4雌蝇杂交; 另外取UAS-golgin-84-V5雄蝇分别与tub-Gal4、en-Gal4、ap-Gal4、MS1096-Gal4雌蝇杂交, 放在25 °C的恒温培养箱中培养。在F1代果蝇羽化前移除培养管中的亲代果蝇, F1代果蝇羽化后观察其表型。

2 结果

2.1 重组载体的构建与鉴定

以果蝇基因组为模板, 对golgin-84进行PCR扩增, 得到1 269 bp目的片段, 如图1A所示。PCR回收产物和原核表达载体pGEX-4T-1连接过夜, 连接产物转化大肠杆菌MM294感受态细胞。提取阳性重组质粒, 用EcoR I和Xho I双酶切鉴定后得到1 269 bp的基因片段, 如图1B所示, 与预期DNA片段大小相符, 表明已成功构建了pGEX-4T-1-golgin-84-ag重组载



A: golgin-84的PCR产物电泳分析; 1: DNA分子量标准; 2: PCR产物; B: 重组载体的酶切鉴定; 1: DNA分子量标准; 2: pGEX-4T-1-golgin-84-ag的酶切鉴定。

A: analysis of PCR product by agarose gel electrophoresis; 1: DNA marker; 2: PCR product of golgin-84; B: agarose gel electrophoresis of digestion product of recombinant plasmid; 1: DNA marker; 2: pGEX-4T-1-golgin-84-ag digested by endonuclease.

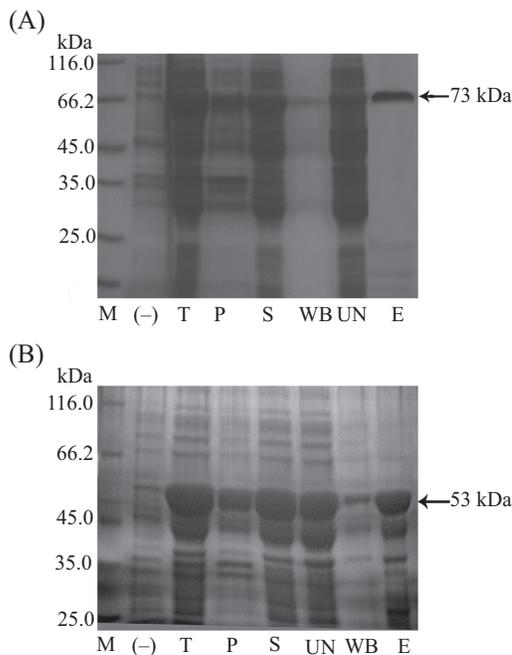
图1 Golgin-84 PCR产物琼脂糖凝胶电泳分析和重组载体的酶切鉴定

Fig.1 Analysis of golgin-84 PCR product by agarose gel electrophoresis and identification of digested product of recombinant plasmid

体。经测序鉴定表明, 阅读框架未变, 无缺失或突变, 可以用于融合蛋白的表达。

2.2 GST-Golgin-84-ag融合蛋白的表达与鉴定

收集表达的菌体, 超声破碎后取上清(可溶蛋白)和沉淀, 经SDS-PAGE分离后考马斯亮蓝染色鉴定。实验结果表明: 表达的目的蛋白主要位于上清中。用谷胱甘肽琼脂糖凝胶层析柱对重组蛋白进行纯化, 用终浓度为20 mmol/L的还原型谷胱甘肽进行洗脱, 经SDS-PAGE鉴定得到73 kDa大小的重组蛋白



A: 表达、纯化GST-Golgin-84-ag融合蛋白的SDS-PAGE分析; M: 蛋白分子量标准; (-): 未诱导的pGEX-4T-1-Golgin-84-ag; T: 诱导后的超声破碎总蛋白量; P: 超声破碎菌沉淀; S: 破菌上清; WB: 清洗液中的蛋白量; UN: 未结合到层析柱的蛋白; E: 洗脱组分; B: 表达、纯化His-Golgin-84-ag融合蛋白的SDS-PAGE分析; M: 蛋白分子量标准; (-): 未诱导的PET-30a-Golgin-84-ag; T: 诱导后的超声破碎总蛋白量; P: 超声破碎菌沉淀; S: 破菌上清; UN: 未结合到层析柱的蛋白; WB: 清洗液中的蛋白量; E: 洗脱组分。

A: analysis of expression and purification of GST-Golgin-84-ag fusion protein by SDS-PAGE; M: protein marker; (-): pGEX-4T-1-Golgin-84-ag uninduced; T: pGEX-4T-1-Golgin-84-ag induced; P: lysate pellet; S: lysate supernatant; WB: protein in washing buffer; UN: protein unbound to Glutathione Sepharose 4B; E: GST-Golgin-84-ag; B: analysis of expression and purification of His-Golgin-84-ag fusion protein by SDS-PAGE; M: protein marker; (-): PET-30a-Golgin-84-ag uninduced; T: PET-30a-Golgin-84-ag induced; P: lysate pellet; S: lysate supernatant; UN: protein unbound to Ni-NTA; WB: protein in washing buffer; E: His-Golgin-84-ag.

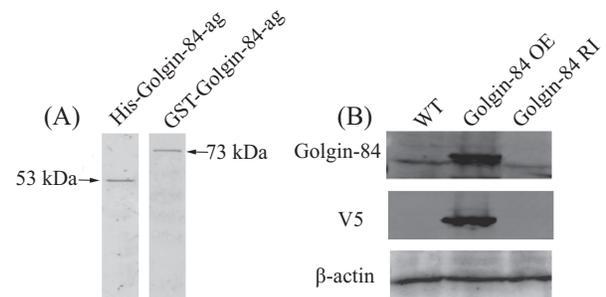
图2 表达、纯化GST-Golgin-84-ag和His-Golgin-84-ag融合蛋白的SDS-PAGE分析

Fig.2 Analysis of expression and purification of GST-Golgin-84-ag and His-Golgin-84-ag fusion protein by SDS-PAGE

GST-Golgin-84-ag(图2A), 与预期蛋白分子量相符。

2.3 Golgin-84抗体的Western blot检测

用纯化后的GST-Golgin-84-ag重组蛋白免疫豚鼠, 获得抗豚鼠血清, 用纯化的His-Golgin-84-ag重组蛋白(分子量为53 kDa, 图2B)纯化血清得到高纯度的抗体。对制备的蛋白样品进行Western blot检测。由图3可见, 抗体在1:1 000稀释的情况下, 能成功识别重组蛋白GST-Golgin-84-ag、His-Golgin-84-ag(图3A)和内源Golgin-84蛋白(图3B), 另外用V5抗体进行免疫印记, 与制备的Golgin-84抗体在同一位置出现目的条带(图3B)。实验结果表明, 制备的抗体特异性较高。



A: 抗体识别重组蛋白; B: 抗体检测内源Golgin-84蛋白表达; WT: 野生型; Golgin-84 OE: *golgin-84*过表达; Golgin-84 RI: *golgin-84* RNAi。A: antibodies that recognize the recombinant protein; B: antibody detection the expression of endogenous Golgin-84 protein; WT: wild type; Golgin-84 OE: *golgin-84* over-expression; Golgin-84 RI: *golgin-84* RNAi.

图3 Golgin-84抗体的Western blot检测

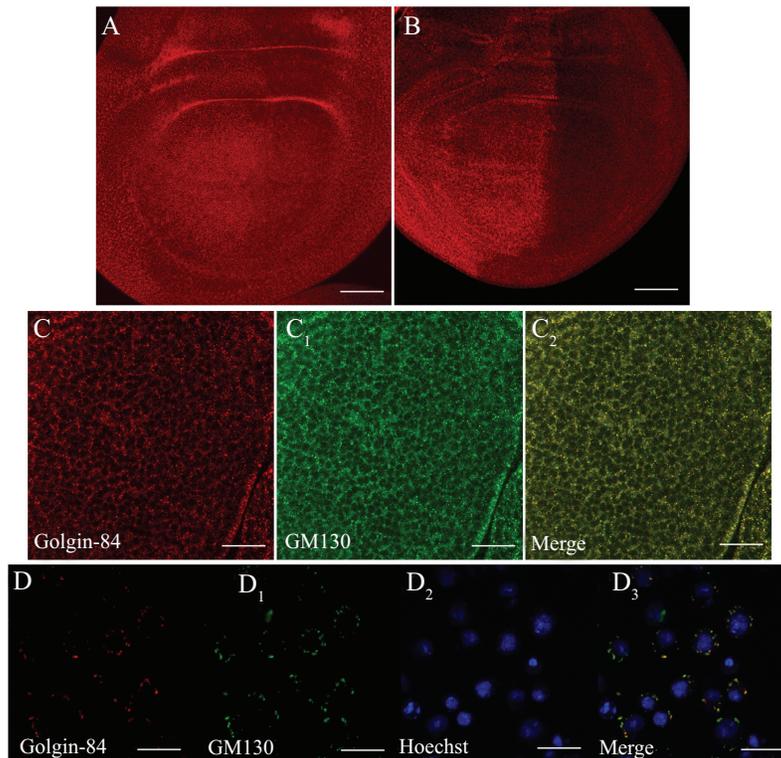
Fig.3 The test of Golgin-84 antibody by Western blot

2.4 抗体的荧光染色分析

将构建的*golgin-84* RNAi转基因雄蝇*UAS-golgin-84*与*en-Gal4*雌蝇杂交, 解剖三龄幼虫, 固定和免疫荧光染色。染色结果显示: 果蝇翅成虫盘后侧Golgin-84蛋白水平有明显的降低, 表明我们制备的抗体能特异性识别Golgin-84蛋白, 并且纯化后抗体的效价更高(图4A和图4B)。RT-qPCR检测也表明RNAi处理的果蝇与对照相比*golgin-84* mRNA水平降低了60%。野生型果蝇翅成虫盘和S2细胞双染Golgin-84和GM130, 实验结果表明: Golgin-84与GM130有共定位(图4C-图4C₂、图4D-图4D₃), 并且位于细胞核附近。这与在哺乳动物细胞中的报道一致^[8,14]。

2.5 抗体检测Golgin-84蛋白在果蝇不同组织中的表达

取野生型果蝇*w¹¹¹⁸*胚胎、三龄幼虫及成虫解剖,

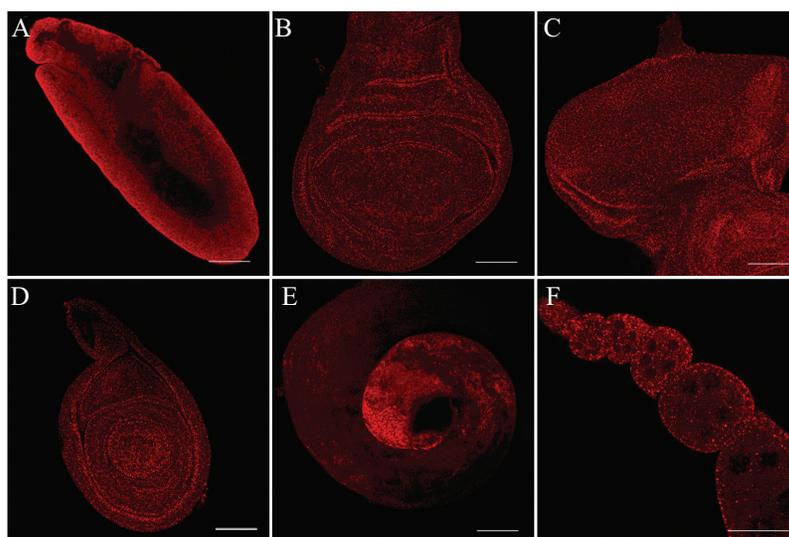


A,B: *golgin-84* RNAi转基因果蝇翅膀的成虫盘背侧向上、前侧向左; A: 未纯化抗体; B: 纯化抗体(标尺=50 μm); C-C₂: 野生型果蝇翅膀成虫盘; C: Golgin-84的翅膀成虫盘染色; C₁: GM130的翅膀成虫盘染色; C₂: C和C₁的叠加图(标尺=50 μm); D: Golgin-84在S2细胞中表达; D₁: GM130在S2细胞中表达; D₂: S2细胞细胞核; D₃: D、D₁和D₂叠加图, Golgin-84与GM130共定位(标尺=10 μm)。

A,B: wing disc is oriented dorsal up, anterior left; A: unpurified antibody; B: purified antibody(scale bar=50 μm); C-C₂: wild type wing disc of *Drosophila*; C: Golgin-84 staining in wild type wing disc; C₁: GM130 staining in wild type wing disc; C₂: the merge of C and C₁(scale bar=50 μm); D: Golgin-84 expression in S2 cells; D₁: GM130 expression in S2 cells; D₂: the nuclei of S2 cells; D₃: the merge of D, D₁ and D₂. Golgin-84 colocalized with Golgi marker GM130(scale bar=10 μm).

图4 抗体Golgin-84的荧光染色

Fig.4 The immunofluorescence using Golgin-84 antibody

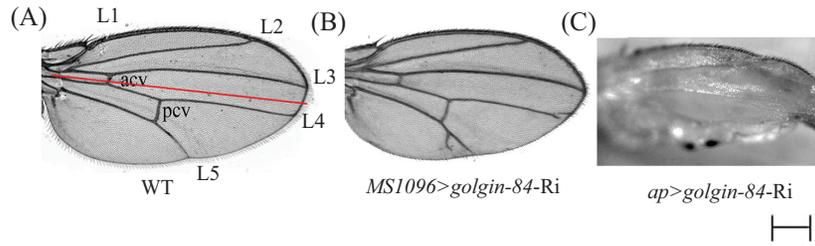


A: 胚胎; B: 翅膀的成虫盘; C: 眼睛的成虫盘; D: 腿的成虫盘; E: 睾丸; F: 卵巢。标尺=50 μm 。

A: embryo; B: wing disc; C: eye disc; D: leg disc; E: testis; F: ovary. Scale bar=50 μm .

图5 Golgin-84在果蝇不同组织中的表达

Fig.5 The expression of Golgin-84 in different tissues of *Drosophila*

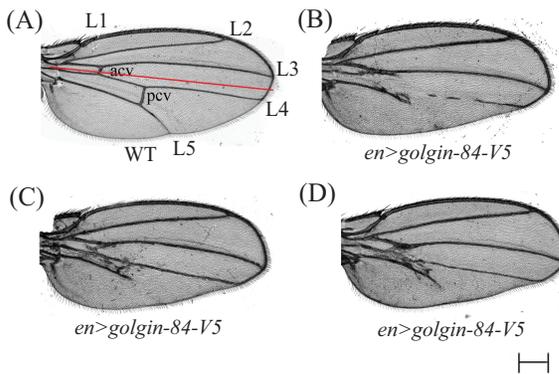


A: 野生型果蝇翅膀, 红线标注的为前后部分界线; B: *MS1096-Gal4*诱导*golgin-84*沉默, 导致L4、L5翅脉发育不正常, 外显率为38.2%($n=327$); C: *ap-Gal4*诱导*golgin-84*沉默, 翅膀出现水泡, 外显率为59.1%($n=215$)。标尺=100 μm 。

A: the wing of wild type *Drosophila*, anterior and posterior boundary was marked by red line; B: expression of *golgin-84* was silenced by *MS1096-Gal4*, the vein of L4, L5 were abnormal, the penetrance was 38.2%($n=327$); C: blisters were found when *golgin-84* expression was silenced by *ap-Gal4*, the penetrance was 59.1%($n=215$). Scale bar=100 μm .

图6 RNAi抑制Golgin-84表达引发翅膀发育缺陷

Fig.6 Inhibition of Golgin-84 expression resulted in wing defects



A: 野生型果蝇翅膀, 红线标注的为前后部分界线; B: *en-Gal4*特异性在翅膀后部表达, 因此*en-Gal4*诱导Golgin-84在翅膀后部过表达, 成虫翅膀后部出现L4、L5、acv、pcv翅脉缺失, 外显率为95.5%($n=335$); C: *ap-Gal4*诱导Golgin-84过表达, 翅膀出现水泡, 外显率为89.9%($n=178$); D: *MS1096-Gal4*诱导的Golgin-84过表达, 使得整个翅膀皱缩, 外显率为93.5%($n=278$)。标尺=100 μm 。

A: the wing of wild type *Drosophila*, anterior and posterior boundary was marked by red line; B: *en-Gal4* expressed on the posterior of the wing. L4, L5, acv, pcv veins missing on the posterior of adult wing were found, the penetrance was 95.5%($n=335$); C: blisters were found when Golgin-84 over-expression was induced by *ap-Gal4*, the penetrance was 89.9%($n=178$); D: expression of Golgin-84 was induced by *MS1096-Gal4*, wings were crumple, the penetrance was 93.5%($n=278$). Scale bar=100 μm .

图7 Golgin-84过表达引发果蝇翅膀发育缺陷

Fig.7 Wing defects due to over-expression of Golgin-84 in *Drosophila*

一抗为本研究制备的Golgin-84抗体(1:1 000), 制片后, 在激光共聚焦显微镜下观察到Golgin-84蛋白在胚胎、翅膀、眼睛、腿成虫盘、睾丸和卵巢等不同组织均有表达(图5), 且分布在胚胎各个部位, 可见Golgin-84是一个广泛表达的蛋白, 可能对果蝇的发育起着调节作用。

2.6 Golgin-84的功能分析

为研究果蝇中*golgin-84*基因的功能, 我们将 ϕ C31位点特异性重组的转基因载体定点注射到果蝇的胚胎中, 通过一系列杂交成功获得了*golgin-84* RNAi转基因果蝇, 并观察降低Golgin-84蛋白表达对果蝇发育产生的影响(图6)。发现用*MS1096-Gal4*、*ap-Gal4*选择性地翅膀中抑制Golgin-84蛋白表达, 翅膀出现翅脉分叉(图6B)和水泡(图6C)生长表型。我们针对*golgin-84*基因两个不同的序列进行了*golgin-84* RNAi转基因果蝇研究, 两种RNAi处理均降低了Golgin-84蛋白的表达, 转基因果蝇产生的表型也相似。

为了进一步研究Golgin-84蛋白的作用功能, 我们过表达Golgin-84, 观察其对果蝇发育产生的影响(图7)。用*tub-Gal4*在所有组织中过表达Golgin-84, 发现果蝇不能存活, 进一步观察发现这些果蝇在三龄至蛹期初期死亡。而用*en-Gal4*、*ap-Gal4*、*MS1096-Gal4*在翅膀中选择性过表达Golgin-84时个体能够发育成熟, 但翅膀出现翅脉缺失(图7B)、水泡(图7C)、翅膀皱缩(图7D)等严重缺陷。

3 讨论

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)由于其生长周期短、繁殖快、染色体少、遗传背景简单且易于操作等优点, 已经被广泛运用于遗传学和发育生物学研究。*GAL4/UAS*系统是一种转基因技术体系。其原理是利用组织特异性的启动子或增强子与*GAL4*基因相连接, *UAS*与靶基因连接。在其杂交后代中, 组织特异性表达的*GAL4*以同样方式调控

GAL4反应元件(*UAS*)-靶基因的表达^[20]。

高尔基体是真核生物细胞分泌途径中重要的细胞器, 研究其构建和生物遗传的分子机制对阐明高尔基体在细胞中发挥的功能具有重要意义, 另外许多疾病的发生与高尔基体结构和功能的变化有密切关系^[15,21-22]。在哺乳动物细胞中, 当细胞进入有丝分裂期时, 通过高尔基体的膜运输将停止, 带状高尔基体裂解成碎片。研究表明, 高尔基体在细胞有丝分裂期裂解是由高尔基体基质蛋白磷酸化引起的^[22-24]。Golgin-84在细胞有丝分裂期被特异磷酸化^[14], 其磷酸化可能导致带状高尔基体断裂成高尔基堆, 但其磷酸化在高尔基体裂解过程中的作用机制还有待深入研究。

疱疹性口腔炎病毒糖蛋白G(vesicular stomatitis virus G glycoprotein, VSVG)运输分析表明, 用RNAi降低*golgin-84*在HeLa细胞中的表达, 不仅可以抑制约40% VSVG从内质网经高尔基体到细胞膜的运输, 而且会使带状高尔基体断裂成单个高尔基堆。这些数据表明, Golgin-84在提高高尔基体膜运输效率和维持高尔基体结构中起着重要作用^[14,25]。当砂眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)侵染人表皮细胞在体内增殖时, Golgin-84被蛋白酶切割从而导致高尔基体裂解以满足细菌在增殖过程中蛋白质和脂肪的需要^[26]。

为了更好地研究Golgin-84的功能, 我们成功构建了重组载体*pGEX-4T-1-golgin-84-ag*。利用表达纯化的重组蛋白GST-Golgin-84-ag免疫豚鼠, 并对获得的血清进行纯化, 通过荧光染色和Western blot验证, 表明制备的抗体特异性较高。荧光染色结果显示: Golgin-84蛋白在果蝇各个组织发育中广泛表达并在睾丸中表达量较高(图5), 这一实验结果与在哺乳动物细胞中的报道相符^[8]。为了进一步研究Golgin-84在果蝇发育中的作用, 我们构建了*golgin-84* RNAi及*UAS-golgin-84-V5*转基因果蝇。Western blot实验结果显示: 用本实验制备的抗体能成功检测出野生型果蝇^{w¹¹¹⁸}、*UAS-golgin-84-V5*过表达及*golgin-84* RNAi处理的不同果蝇品系中内源Golgin-84蛋白表达的差异, 进一步表明了我们制备抗体的特异性(图4), 同时也表明我们成功构建了*golgin-84*转基因果蝇。

在Golgin-84的功能研究中, 我们主要发现了三种生长表型: 翅脉分叉、翅脉缺失和翅膀出现水

泡。*MS1096-Gal4*抑制Golgin-84表达, 导致翅膀出现翅脉分叉现象(图6B); 用*en-Gal4*诱导Golgin-84过表达, 使得翅膀出现翅脉缺失(图7B)。已有研究表明, RNA结合转录调控因子Pumilio(Pum)负调控EGFR(epidermal growth factor receptor)信号通路, 抑制Pum表达会出现额外翅脉, 然而过表达Pum则导致翅脉缺失^[28]; 另外, 过表达BMP(bone morphogenetic protein)信号的激活因子larval translucida(*ltl*)会出现翅脉缺失的现象^[28]。本研究发现, 抑制Golgin-84表达同样出现翅脉分叉, 过表达Golgin-84后也会产生翅脉缺失的现象, 与已有的研究报道相符。因此我们猜测Golgin-84的功能可能与EGFR、BMP信号通路相关, 或者影响Golgin-84蛋白的正常表达和功能, 进而导致高尔基体结构的变化从而影响了信号通路相关蛋白的运输。当用*ap-Gal4*抑制Golgin-84和诱导Golgin-84过表达时, 翅膀均能出现水泡状表型。Integrin在果蝇翅膀背部和腹部细胞连接中起着重要的作用, 当信号调节蛋白Delilah(*Dei*)表达水平下降时, 使得Integrin信号家族中PS(position-specific integrin)的表达降低, 导致果蝇翅膀背部和腹部细胞连接发生异常, 从而产生水泡状^[29-31]。我们的研究结果与已有的研究报道现象类似, 因此我们猜测Golgin-84的功能可能与Integrin信号通路相关。

另外, 根据图6和图7的结果, 过表达Golgin-84对果蝇翅膀发育的影响与*golgin-84* RNAi相比, 无论在外显率还是表型上都比较显著。RNAi处理虽然降低了Golgin-84表达(图3B, Western blot和RT-qPCR结果大约降低了60%), 少量表达的Golgin-84可能仍能发挥一定的功能。根据哺乳动物细胞中高表达Golgin-84会明显影响高尔基体结构的报道^[4], 在果蝇细胞中高表达Golgin-84可能也会影响Golgin-84的功能以及果蝇细胞中高尔基体的结构, 从而有可能影响了果蝇翅膀发育相关蛋白的运输。

总之, 本实验成功制备了果蝇Golgin-84抗体并成功构建了*golgin-84*转基因果蝇, 检测出Golgin-84在果蝇体内广泛表达, 并对影响Golgin-84蛋白功能后产生的表型进行了初步的分析。以上结果为进一步深入研究Golgin-84在果蝇发育中的调控作用机制奠定了基础。

参考文献 (References)

- 1 Golgi C. Intorno alla struttura delle cellule nervosa. Boll Soc

- Med Chir Pavia 1898; 13: 1-14.
- 2 鲍时来. 高尔基体的结构与功能简介. 生物学通报(Bao Shilai. Bulletin of Biology) 2006; 41(9): 10-1.
- 3 Palade G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. Science 1975; 189(4200): 347-58.
- 4 Farquhar MG, Palade GE. The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. Trends Cell Biol 1998; 8(1): 2-10.
- 5 Barr FA, Warren G. Disassembly and reassembly of the Golgi apparatus. Semin Cell Dev Biol 1996; 7: 505-10.
- 6 Chandran S, Machamer CE. Acute perturbations in Golgi organization impact *de novo* sphingomyelin synthesis. Traffic 2008; 9(11): 1894-904.
- 7 Rejman Lipinski A, Heymann J, Meissner C, Karlas A, Brinkmann V, Meyer TF, *et al.* Rab6 and Rab11 regulate chlamydia trachomatis development and Golgin-84-dependent Golgi fragmentation. PLoS Pathog 2009; 5(10): e1000615.
- 8 Bascom RA, Srinivasan S, Nussbaum RL. Identification and characterization of Golgin-84, a novel Golgi integral membrane protein with a cytoplasmic coiled-coil domain. J Biol Chem 1999; 274(5): 2953-62.
- 9 Wu CC, MacCoss MJ, Mardones G, Finnigan C, Mogelsvang S, Yates JR 3rd, *et al.* Organellar proteomics reveals Golgi arginine dimethylation. Cell Biol 2004; 15(6): 2907-19.
- 10 Shorter J, Warren G. Golgi architecture and inheritance. Annu Rev Cell Dev Biol 2002; 18: 379-420.
- 11 Sohda M, Misumi Y, Yamamoto A, Nakamura N, Ogata S, Sakisaka S, *et al.* Interaction of Golgin-84 with the COG complex mediates the intra-Golgi retrograde transport. Traffic 2010; 11(12): 1552-66.
- 12 Misumi Y, Sohda M, Tashiro A, Sato H, Ikehara Y. An essential cytoplasmic domain for the Golgi localization of coiled-coil proteins with a COOH-terminal membrane anchor. J Biol Chem 2001; 276(9): 6867-73.
- 13 Malsam J, Satoh A, Pelletier L, Warren G. Golgin tethers define subpopulations of COPI vesicles. Science 2005; 307(5712): 1095-8.
- 14 Diao A, Rahman D, Pappin DJ, Lucocq J, Lowe M. The coiled-coil membrane protein golgin-84 is a novel rab effector required for Golgi ribbon formation. J Cell Biol 2003; 160(2): 201-12.
- 15 Aridor M, Hannan LA. Traffic jam: A compendium of human diseases that affect intracellular transport processes. Traffic 2000; 1(11): 836-51.
- 16 Kondylis V, Rabouille C. The Golgi apparatus: Lessons from *Drosophila*. FEBS Lett 2009; 583(23): 3827-38.
- 17 刘莹, 张红锋. 膜泡运输. 生物学教学(Liu Ying, Zhang Hong-feng. Biology Teaching) 2006; 31(11): 40.
- 18 Belenkaya TY, Han C, Standley HJ, Lin X, Houston DW, Heasman J. Pygopus encodes a nuclear protein essential for wingless/Wnt signaling. Development 2002; 129(17): 4089-101.
- 19 Rebay I, Fehon RG. Determining fusion protein antiserum quality by staining of transfected *Drosophila* S2 cultured cells. Cold Spring Harbor Protocols 2011; 2011(1): 22-5
- 20 Imamura M, Nakai J, Inoue S, Quan GX, Kanda T, Tamura T. Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*. Genetics 2003; 165(3): 1329-40.
- 21 Aridor M, Hannan LA. Traffic jams II: An update of diseases of intracellular transport. Traffic 2002; 3(11): 781-90.
- 22 Fan J, Hu Z, Zeng L, Lu W, Tang X, Zhang J, Li T. Golgi apparatus and neurodegenerative diseases. Int J Dev Neurosci 2008; 26(6): 523-34.
- 23 Lowe M, Barr FA. Inheritance and biogenesis of organelles in the secretory pathway. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8(6): 429-39.
- 24 Colanzi A, Suetterlin C, Malhotra V. Cell-cycle-specific Golgi fragmentation: How and why? Curr Opin Cell Biol 2003; 15(4): 462-7.
- 25 Satoh A, Wang Y, Malsam J, Beard MB, Warren G. Golgin-84 is a rab1 binding partner involved in Golgi structure. Traffic 2003; 4(3): 153-61.
- 26 Heuer D, Lipinski AR, Machuy N, Karlas A, Wehrens A, Siedler F, *et al.* Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction. Nature 2009; 457(7230): 731-5.
- 27 Kim SY, Kim JY, Malik S, Son W, Kwon KS, Kim C. Negative regulation of EGFR/MAPK pathway by pumilio in *Drosophila melanogaster*. PLoS One 2012; 7(4): e34016.
- 28 Szuperák M, Salah S, Meyer EJ, Nagarajan U, Ikmi A, Gibson MC. Feedback regulation of *Drosophila* BMP signaling by the novel extracellular protein larval translucida. Development 2011; 138(4): 715-24.
- 29 Brown NH, Gregory SL, Martin-Bermudo MD. Integrins as mediators of morphogenesis in *Drosophila*. Dev Biol 2000; 223(1): 1-16.
- 30 Araujo H, Negreiros E, Bier E. Integrins modulate Sog activity in the *Drosophila* wing. Development 2003; 130(16): 3851-64.
- 31 Egoz-Matia N, Nachman A, Halachmi N, Toder M, Klein Y, Salzberg A. Spatial regulation of cell adhesion in the *Drosophila* wing is mediated by Delilah, a potent activator of β PS integrin expression. Dev Biol 2011; 351(1): 99-109.