

筛选控制果蝇心脏发育的基因

戴琦, 李冬玲, 袁婺洲, 吴秀山, 李敏

(湖南师范大学生命科学学院, 湖南省长沙市 410081)

[关键词] 果蝇; 心脏发育; 致死系; 免疫化学; 候选基因; 遗传学位点

[摘要] 果蝇的早期心脏发育模式与脊椎动物的早期心脏发育模式具有惊人的相似性, 研究果蝇心脏发育基因有助于揭示人体心脏发育机理和先天性心脏病发生机制。为了克隆和鉴定控制心脏发育的新基因, 在化学诱变建立果蝇平衡致死系的基础上, 用果蝇心脏组织特异抗体 Mab No. 3, 对 310 个平衡致死系进行免疫化学方法筛选, 观察到有 63 个致死系表现出心脏突变表型。分别将这些有心脏表型突变的品系与果蝇第 2 和第 3 染色体缺失系杂交, 测定了 14 个品系的遗传学位点, 其中 7 个品系在遗传学位点上有别于已报道的心脏发育控制基因。并查寻和讨论了各突变品系的可能候选基因。

[中图分类号] Q344

[文献标识码] A

Screen on the Genes Involved in Heart Development of *Drosophila*

DAI Qi, LI Dong- Ling, YUAN Wu- Zhou, WU Xiu- Shan, and LI Min

(The Life Science College of Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

MeSH *Drosophila*; Heart Development; Lethal Lines; Immunochimistry; Candidate Genes; Cytological Positions

ABSTRACT **Aim** The developmental pattern of early heart in *drosophila* is remarkably similarity that in vertebrate. This reseach aims at approaching genes controlling human congenital heart disease. **Methods** In order to clone and identify new genes that are involved in *drosophila* heart development, after establishing the balanced lethal lines, 310 lethal lines were screened with Mab No. 3 antibody expressed in heart cells of *drosophila*. **Results** 63 of them showed mutant phenotypes. **Conclussions** After examined with *drosophila* deficient stocks of chromosome 2 and 3, the cytological positions of 14 lethal lines have been determined. Candidate genes located in these cytological positions are searched and discussed.

大多数控制果蝇早期心脏发育的基因与人的同源基因在序列上有高度保守性, 并具有相同的基因功能。自九十年代初开始, Bodmer 等^[1,2]报道第一个与果蝇心脏发育相关的基因 *tinman*, 与人的基因 *NKX2- 5* 有 65% 的同源序列, *NKX2- 5* 基因的突变能导致人先天性心脏病房间隔缺损^[3]。迄今为止, 已鉴定出与心脏发育相关的基因十六个, 如 *tin*、*wg* 和 *hh*^[1~ 16] 等。通过对果蝇心脏发育基因的筛选, 为鉴定人类心脏发育基因, 防治先天性心脏病提供新的有效途径。

但是, 心脏发育是一个十分复杂的过程, 有许多未知基因有待进一步的发现。为获得更多的控制果蝇心脏发育的基因, 本实验室率先在国内运用 P 转位子诱变的方法, 获得了一些果蝇平衡致死系^[4,5]。

由于 P 转位子诱变最多只能使 50% 的基因产生突变, 为克服这一不足, 本文采用化学诱变剂甲磺酸乙酯(EMS) 对野生型雄果蝇进行化学诱变, 建立大量的平衡致死系。用小鼠单克隆抗体 Mab No. 3 和 Goat anti- Mouse IgM- HRP 进行免疫组化反应染色, 筛选到 63 个心脏表型突变的品系, 并确定了 14 个果蝇品系的细胞遗传学位点, 其中有 7 个品系的突变表型是至今未报道的, 表明至少有 7 个控制果蝇心脏发育的新候选基因。

1 材料与方法

1.1 果蝇品系

野生型、2 号品系及缺失系均由瑞典 Karolinska Institute 吴秀山教授赠送(见表 1, Table 1)。

1.2 双平衡系的建立

2 号品系的处女蝇(橙眼、弯翅、短身)与 4 号品系的雄果蝇(白眼、弯翅、短刚毛)多对交配, 选择白眼、弯翅、短身、短刚毛 F1 代的果蝇单对相互交配,

[基金项目] 国家自然科学基金(39770382)

[作者简介] 戴琦, 女, 1976 年出生, 湖南汉寿县, 硕士研究生。吴秀山, 男, 1952 年出生, 湖南衡阳人, 分子生物学特聘教授。李敏, 女, 1955 年出生, 重庆人, 分子生物学教授, 课题负责人。

检查 F2 代是否出现正常体、直翅或长刚毛性状,若未出现,则为所需要的双平衡系。

表 1 果蝇品系

Table 1 *Drosophila lines*

品系名	基因型	性状	作用与特点
野生型	+ ; + ; +	红眼 直翅 正常体	雄蝇用于诱变
双平衡系	w; Df (2R) WMGS, + /SM6a - TM6Tb	白眼 弯翅 短刚毛 短体	平衡第 2、3 三染色体
2 号品系	w; M95, + /SM6 - TM6Tb	橙眼 弯翅 短刚毛	平衡第 2 染色体
缺失系	共 105 个第 2、 第 3 染色体的 缺失系		

1.3 化学诱变建立平衡致死系

按照 Grigliatti 等^[17]所述方法,用 2.6%的 EMS 诱变成批的野生型雄果蝇,诱变后的雄果蝇与 3~ 5 只双平衡系处女蝇杂交,选择白眼、弯翅、短体、长刚毛的 F1 代雄果蝇再与双平衡系处女蝇杂交,白眼、弯翅、短体 F2 代的果蝇相互交配,若 F3 代无性状分离,则为所需的平衡系。

1.4 胚胎抗体染色

胚胎抗体染色按吴等^[6,7]方法,25℃发育 12~ 16 h 的胚胎经 4.5% 次氯酸钠溶解绒毛膜,甲醛固

定液固定 30 min,甲醇中剧烈振动去卵黄膜,经小牛血清白蛋白预吸附 1 h 后,加 1:20 抗体 1 Mab No. 3 反应过夜,次日用缓冲液 PBT(磷酸缓冲液 0.1 mol/L,脱氧胆酸盐 0.3%)洗 3 次(30 min/次),加 1:200 抗体 2Goat anti- mouse IgM- HRT 反应 1.5 h。缓冲液 PBT 和 0.1 mol/L Tris·Cl 洗数次(30 min/次),经标准的二氨基联苯胺(DAB)显色反应后制片,置显微镜下观察,若某一品系有 20%~ 50% 的心脏表型突变的胚胎个体,可判断为心脏发育基因突变品系。

1.5 遗传学位点的测定

有心脏表型突变的处女蝇分别与 45 个第 2 染色体缺失系及 60 个第 3 染色体缺失系杂交,根据 F1 代性状是否分离,从而确定隐性致死突变基因的细胞遗传学位点。

1.6 候选基因的计算机检索

利用果蝇数据库 (<http://Flybase.bio.indiana.edu>) 查找隐性基因,再从各基因的网页中查寻其功能及表达部位,从而推测与心脏发育相关的候选基因。

2 结果

2.1 突变品系的鉴定

抗体筛选 310 个平衡致死系,其中 63 个品系具有心脏突变类型,另有 20 个可能有心脏突变表型。具体类型见表 2(Table 2)。

表 2 突变品系的表型

Table 2 The phenotype of mutant lines

Abnormality region	Mutant lines										Percentage(%)
Increase of heart cells											
The 4th to 7th ventral segment	2050	21131	2045	22101	2104	21271	2129	2261	2252		38.1
	21621	22262	2274	2185	20371	2032	21373	2194	21252		
	2239	20101	21141	2163	2093	21021					
The whole heart	20303	2064	2250	2112	2233	21161					9.5
Decrease of the 3th thoracic to 3th ventral segment and increase of the 3th to 7th ventral segment	2007	2047	22551	22553	2271	20562	20563				11.8
Decrease or deletion The 2th to 5th ventral segment	20983	186	2149	21149	21332	21352	21831	20972			12.7
The 3th to 4th or 3th to 5th ventral segment	66	104	20941	20521	2068	20973	22154	21301			14.3
Deletion of both lines of antero- lateral heart cells	21972	2039	20691	22022							6.3
Deletion of one line of antero- lateral heart cells	20974	2131	2042								4.8
Aberation of heart Looping pattern of heart	2209	20281									3.2

2.2 突变体的细胞遗传学图谱及相关区域内的候选基因

将表现心脏突变表型的品系与果蝇第 2 或第 3 染色体缺失系杂交, 确定了 14 个隐性致死基因的遗

传学位点, 其中 7 个位点的缺失系的突变表型是未报道的。通过计算机检索, 查找到一批相应该 7 个缺失区域的相关候选基因。见图 1(Figure 1) 和表 3 (Table 3)。

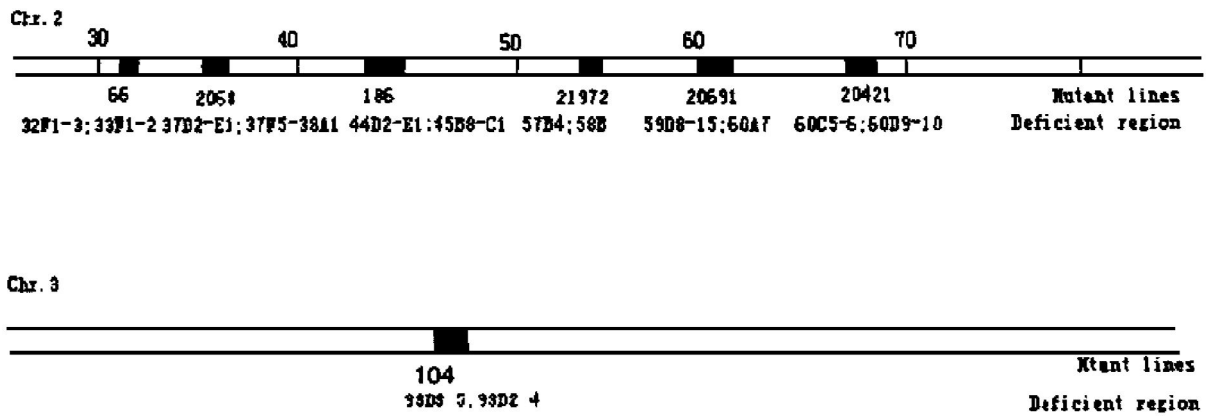


图 1 新突变体的细胞遗传学位点

Figure 1 The cytological positions of new mutants

表 3 新突变体可能的候选基因

Table 3 The possible candidate genes of new mutants

Mutant lines	Transcription factor	Translation factor	Kinase	Signal fator	Other function
66	salr salm crol prd pdm2 bun	aret sc35	nub cry	kek2	sala den esc pkd2 zuc
2068	sd		dnt	ovt	dn scw
186	unpg	zimp	sns babo	gel sns	flz yew gel itd lin ana
21972	otp		inse	sktl	len cv- 2 hy prat zab
20691	bs	dri	angel	chrw	
20421	slbo	milou pio			
104		gust111			

3 讨论

3.1 果蝇心脏的发育及基因控制

心脏发育的过程大致分为三个阶段: 早期、中期和后期。早期阶段, 从腹部中胚层顶端的细胞分化出心脏前体细胞, 呈单层从两侧向背部延伸(25℃发育 7 h)。中期阶段, 心脏细胞进一步向背部靠拢, 并衍生出副心肌细胞(7~ 12 h); 到发育后期, 副心脏细胞和心脏细胞在背部形成心管(12~ 16 h)。在心脏发育的不同阶段, 有不同的基因起作用。已报道的十多个心脏发育相关基因, 都影响心脏前体细胞的形成, 在发育早期起作用。到目前为止, 尚未见报道控制心脏发育的基因。因此, 控制心脏中后期发育的控制基因尚不清楚。

3.2 新的突变表型品系的鉴定

本实验中所使用的抗体 Mab No. 3 主要用于检测心脏发育后期的表型突变。从表 3 可知, 某些品系仅在某些胚胎体节表现出心脏突变, 这说明心脏中后期的发育受到其他基因的控制, 即在不同体节的心脏组织发育可能受不同的调控基因控制。已报道的十六个心脏发育相关基因都是控制心脏发育早期前体细胞的形成, 它们的突变往往导致心脏组织增多、严重缺失甚至完全不能形成, 根据我们的实验结果, 出现了几种新的突变表型, 如品系 21194, 其心脏缺失仅发生在第 2 至第 5 腹节, 品系 22552 的缺失发生在第 3 至第 4 腹节的一侧, 而品系 20974 则只有前部一侧的心脏组织缺失。根据这些现象, 我们推测存在某些新的基因, 它们的表达及作用主要影响心脏形成的后期, 导致局部的心脏异常。遗

传学位点的确定也进一步说明,这7个品系与已知心脏发育基因位于不同的细胞遗传学位点。因此,在这些品系中存在前人未报道的、功能与心脏发育相关的基因发生突变,这对于找出新的控制果蝇心脏发育基因提供了基础。

3.3 心脏发育中后期相关候选基因的筛选

在14个已确定遗传位点的品系中,有7个表现出心脏局部缺失表型,即66号、2068号、186号、21972号、2069号、20421号和104号,根据缺失区段,在果蝇 Database 中查找相关基因。以66号品系为例,基因 *salr*、*salm*、*crol*、*prd* 和 *pdm2* 均是作为转录因子在果蝇胚胎中有表达;*kek2* 是细胞粘连因子,*aret* 是结合 RNA 的翻译因子,它们在胚胎期也有表达,但其他基因的功能到目前为止还不清楚。

要从众多的基因中确定心脏发育控制基因,还需要进一步的验证工作。我们正在利用缺失区段部分重叠的缺失系,将特定果蝇品系的遗传学位点缩至最小,再通过突变基因品系杂交,有望得出最后结论。

参考文献

- [1] Bodmer R, Jan LY, Jan YN. A new homobox-containing gene, *mef-2* (*tinman*), is transiently expressed early during mesoderm formation in *Drosophila* [J]. *Development*, 1990, **110**: 661-669
 - [2] Bodmer R. The gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles of *Drosophila* [J]. *Development*, 1993, **118**: 719-729
 - [3] Schott JJ, Benson DW, Seidman JM, et al. Congenital heart disease caused by mutations in transcription factor NKX2-5 [J]. *Science*, 1998, **281**(5373): 108-111
 - [4] 李敏,袁葵洲,吴秀山. P转位子诱变的果蝇心脏发育基因的突变(I) [J]. 湖南师范大学自然科学学报, 1997, **20**(4): 66-69
 - [5] 袁葵洲,李敏,李冬玲,等. P转位子诱变的果蝇心脏发育基因的突变(II) [J]. 生命科学研究, 1998, **2**(2): 93-97
 - [6] Wu X, Golden K, Bodmer R. Heart development in *Drosophila* requires the segment polarity gene *wingless* [J]. *Developmental Biology*, 1995, **169**: 619-628
 - [7] Wu X, Park M, Golden K, et al. The *Wingless* signaling pathway is directly involved in *Drosophila* development [J]. *Developmental Biology*, 1996, **177**: 104-116
 - [8] Su MT, Venkatesh TV, Wu X, et al. The pioneer gene, *apontic*, is required for morphogenesis and function of the *Drosophila* heart [J]. *Mechanisms Development*, 1999, **80**: 125-132
 - [9] Frasch M. Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dn in the early *Drosophila* embryo [J]. *Nature*, 1995, **374**: 464-467
 - [10] Lilly B, Zhao B, Panganayakulu G, et al. Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila* [J]. *Science*, 1995, **267**: 688-693
 - [11] Su MT, Miki F, Tadaats G. The *Drosophila* homobox genes *zfh-1* and *even-skipped* are required for cardiac-specific differentiation of a *numb*-dependent lineage decision [J]. *Development*, 1999, **126**: 3241-251
 - [12] Krzystof J, Manfred F, Teresa J. *Ladybird*, a new component of the cardiogenic pathway in *Drosophila* required for diversification of heart precursors [J]. *Development*, 1997, **124**: 3471-479
 - [13] Park M, Yaich LE. Mesodermal cell fates during asymmetric cell division: Interaction of *Numb* and *Notch* [J]. *Neuron*, 1996, **17**: 17-24
 - [14] Park M, Yaich LE. Mesodermal cell fate decisions in *Drosophila* are under the control of the lineage genes *numb*, *Notch* and *sanpodo* [J]. *Mechanisms Development*, 1998, **75**(1-2): 117-126
 - [15] Lints TJ, parsons LM, Hartley L, et al. *Nkx-2.5*: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants [J]. *Development*, 1993, **119**(2): 419-431
 - [16] Thurbay D, Wechsler SB, Blanchard KM, et al. Molecular cloning, chromosomal mapping, and characterization of the human cardiac-specific homeobox gene *hCsx* [J]. *Molecular Medicine*, 1996, **2**(1): 86-96
 - [17] Jenkins JB. Mutagenesis at a complex locus in *Drosophila* with the monofunctional alkylating agent, ethyl methanesulfonate [J]. *Genetics*, 1967, **57**(4): 783-793
- (此文 2000-10-30 收到, 2000-12-18 修回)
(此文编辑 胡必利 朱雯霞)