

基于膜片钳载体光遗传调控装置的研制

汪艳

(中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要: 在现有膜片钳系统基础上搭建光遗传调控装置, 以斑马鱼为光遗传技术模型的完成斑马鱼幼虫细胞中靶向插入光敏开关研究神经元以及它们的回路特性, 并精确传输不同颜色、高时空分辨率的光, 来刺激/抑制所选择的神经元, 同时单独或同时控制不同位置的神经元活动。

关键词: 光遗传学; 斑马鱼; 膜片钳

1 专业技术成果介绍

光遗传通常是指结合光学与遗传学手段, 精确控制特定神经元活动的技术。斯坦福大学 Diesseroth 实验室 2007 年发表在《自然》(Nature)上关于光控制神经回路的文章^[3,4], 被麻省理工学院技术综述评为该年度十大最有影响的技术之一。2010 年该技术入选 Nature Methods 年年度方法”, Science 杂志“十年突破。其主要原理是采用基因操作技术将光感基因(如 ChR2, eBR, NaHR3.0, Arch 或 OptoXR 等)转入到神经系统中特定类型的细胞中进行特殊离子通道或 GPCR 的表达, 光感离子通道在不同波长的光照刺激下会分别对阳离子或者阴离子的通过产生选择性, 从而造成细胞膜两边的膜电位发生变化, 达到对细胞选择性地兴奋或者抑制的目的。光遗传技术具有独特的高时空分辨率和细胞类型特异性两大特点, 克服了传统手段控制细胞或有机体活动的许多缺点, 能对神经元进行非侵入式的精准定位刺激操作而彻底改变了神经科学领域的研究状况, 为神经科学提供了革命性的研究手段。

2015 年修购专项购进一台美国 MD 公司的膜片钳系统配置钙离子成像系统、显微操作仪、给药系统, 缺乏相关的光遗传学的配套硬件与软件, 无法实现利用光遗传技术在斑马鱼靶向光敏开关技术扩展的应用。在现有膜片钳系统基础上搭建光遗传调控装置, 以斑马鱼为光遗传技术模型的完成斑马鱼幼虫细胞中靶向插入光敏开关研究神经元以及它们的回路特性, 并精确传输不同颜色、高时空分辨率的光, 来刺激/抑制所选择的神经元, 同时单独或同时控制不同位置的神经元活动。其功能开发成果运用本所鱼类基因工程学科组, 对斑马鱼嗅觉神经回路以及神经元靶向激活开启或关闭嗅觉部分神经元机制研究提供技术支撑。为鱼类遗传育种学, 淡水生态学, 水环境工程学和保护生物学等方面解决了一系列前沿科学问题,

满足了国家在水生生物学方面的重大需求，具备良好的经济效益和社会应用前景。

其项目创新点，在膜片钳配置的正置/倒置显微镜后侧端口进行链接，通过光空间调制器、高功率 LED、来保持衍射极限图像性能的前提下达到最大的光强度，以微秒级的精度来传递照明图案。内置光源的波长快速切换的外部 LED 控制器，单独或同时控制不同位置的神经元活动。光遗传调控装置用光遗传控制软件 ployScan2 在精确的空间、时间和光谱控制方面的协调传输保持一致，经多波段高功率 LED 光源和光空间调制器改变光敏感蛋白表达于可兴奋的靶细胞或靶器官精准调控。

1.1 光遗传调控装置的设计

光遗传学刺激之后，通过电生理系统记录斑马鱼样品特定部位被光遗传学刺激，需要在时间上保证光刺激同时开始电信号记录，如图 1A 所示通过膜片钳软件触发给予光源刺激。LED 光源开始按照预设的刺激区域、形状、光强和频率，通过膜片钳 clampex 软件触发光遗传装置，通过光遗传实现定点控制和照明。如图 1B 所示。

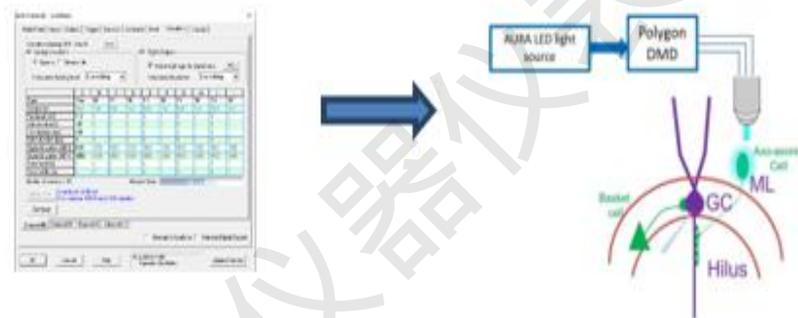


图 1 A.光遗传 LED 光源控制图

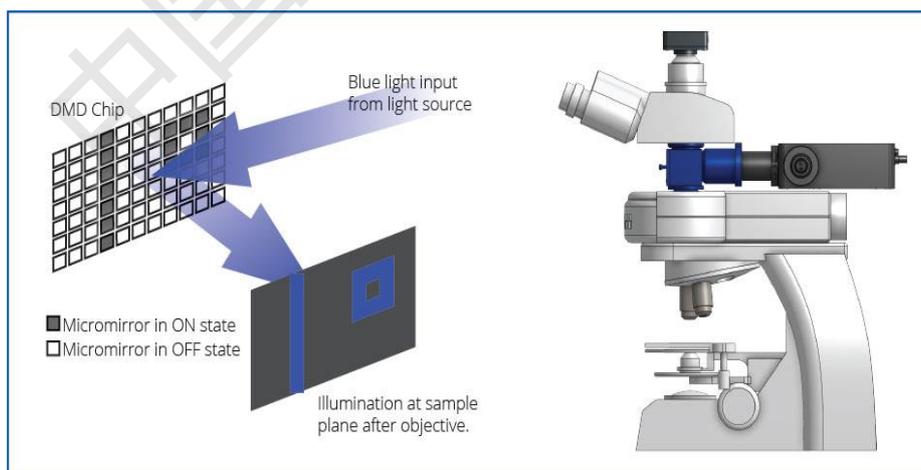


图 1 B.光遗传定点控制系统示意图

1.2 软件

光遗传控制 ployScan2 软件,控制照明图案与显微镜上的数码相机所拍摄的图进行对准;同时控制照明强度和时问;实时观察样本的电信号随光刺激强度和实验的变化,精确到单个细胞的开启与关闭,保存刺激程序和校准程序(如图2)。

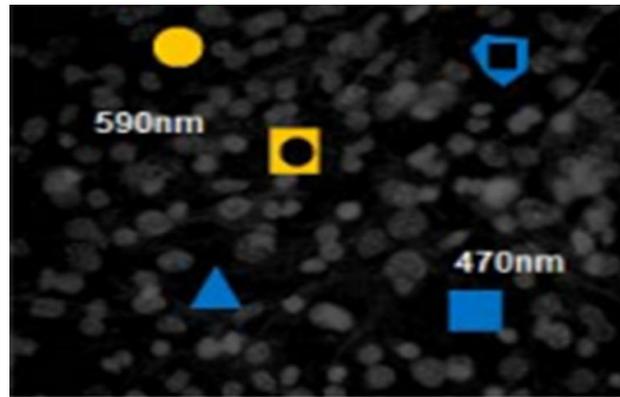


图2 polyScan2 软件定点照明选择界面

1.3 光敏感蛋白模型的构建

构建 hChR2(H134R)-CMV-GCaMP6s 慢病毒载体(如图3), hChR2(H134R)是 ChR2 最常见形式, h 指代该基因的编码序列经过适用人密码子表的优化, H134R 指第 134 位的组氨酸突变为精氨酸,这个突变抑制了 ChR2 对 H⁺的结合能力,从而增加了分子整体的电导率,进而增加了光照下激发的内向电流, CMV 为该序列的启动子, GCaMP6s 为一种钙离子指示剂,当钙离子与之结合则会产生绿色荧光,在 470nm 蓝光下可激活光敏感通道,通过 GCaMP6s 来反应钙离子流的变化。

1.4 记录 293T 细胞、斑马鱼胚胎光刺激的钙流的变化:

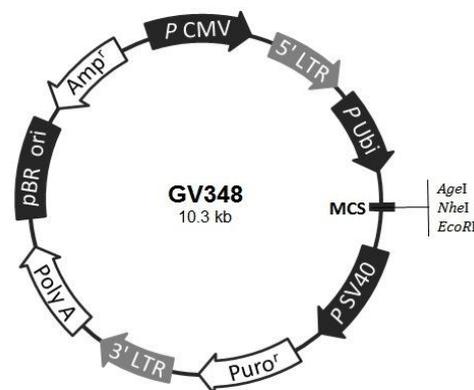


图3 构建 hChR2(H134R)-CMV-GCaMP6s 慢病毒载体

为了在细胞、斑马鱼胚胎上实现光刺激与膜片钳电生理信号联用。将构建 hChR2(H134R)-CMV-GCaMP6s 慢病毒载体，转染到 293T 细胞、斑马鱼胚胎中。细胞实验发现 72h 感染效率最佳，分别给予 470nm 的蓝光刺激，膜片钳系统记录 293T 细胞、斑马鱼胚胎中钙离子流信号的变化(如图 4A、4B)。

膜片钳经数模转换器和光遗传 PloyScan2 软件的控制，感染慢病毒 ChR2 光敏感蛋白在 470nm 光刺激时,记录到斑马鱼胚胎中钙离子电位的变化，如图 5A 所示，当给予光刺激时，相应的钙电位也出现了变化如图 5B，此外通过 CCD 成像功能记录到钙荧光的变化，如图 6C 所示，观察到钙荧光成像与光刺激同步。

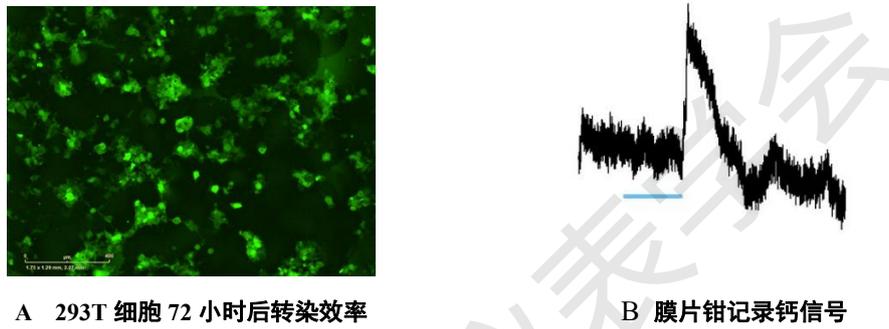


图 4 293T 细胞光遗传钙信号

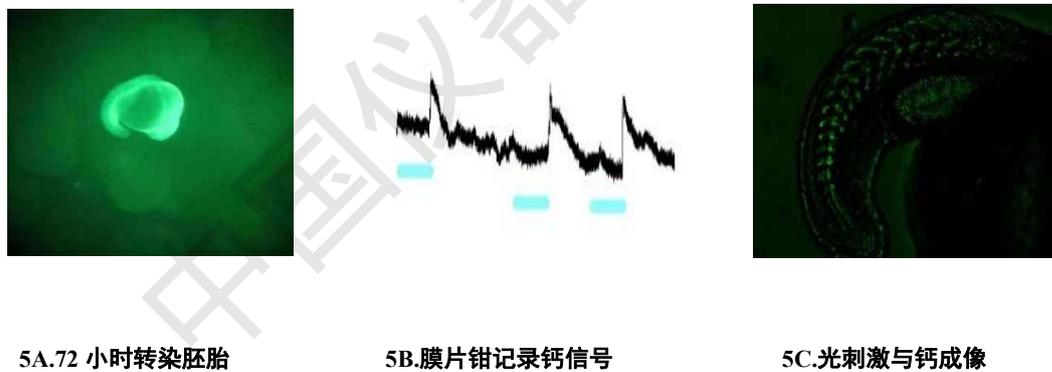


图 5 斑马鱼胚胎光遗传钙信号

1.5 利用光遗传在斑马鱼嗅觉神经回路研究

光遗传调控装置研制进行嗅觉相关基因对斑马鱼生殖的影响测试，观察并记录气味刺激敲除斑马鱼嗅觉相关基因的兴奋性电生理变化。通过光遗传技术的光敏蛋白开启记录刺激/抑制记录神经元兴奋情况，探索斑马鱼嗅觉神经回路以及神经元靶向激活开启或关闭嗅觉部分神经元机制（如图 6）。

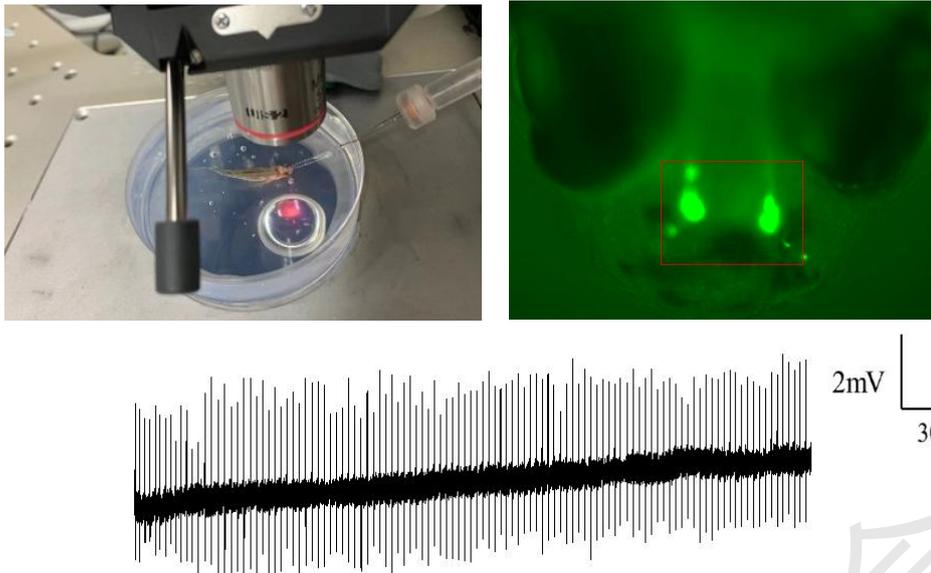


图6 斑马鱼 GnRH（促性腺激素释放激素）神经元的研究

本项目基于膜片钳技术与光遗传技术结合应用的热点和本所实际科研的需求,搭建一套斑马鱼光遗传调控装置,实现在自由活动动物的深部脑区进行光刺激,成像和在单细胞尺度上调神经细胞,以微秒级的精度来传递照明图案,并用专用软件来生成照明图案、控制照射强度和时。可广泛地将光遗传学技术应用到神经生物学的各个领域,将为我所在水生生物细胞生物学等相关研究领域的长远发展和重点突破提供强有力的支撑。

参考文献:

- [1] Yoshimura M, Doi A, Mizuno M, T. In vivo and in vitro patch-clamp recording analysis of the process of sensory transmission in the spinal cord and sensory cortex (J). J Physiol Anthropol Appl Human Sci, 2005, 24(1):93-7.
- [2] Fenno L, Ofer Y, Deisseroth K. The development and application of optogenetics [J]. Annual Review of Neuroscience, 2011, 34: 389-412.
- [3] Deisseroth K, Feng G, Majewska A K, et al. Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits [J]. The Journal of Neuroscience, 2006, 26(41):10380-10386.
- [4] McCall J G, Kim T, Shin G, et al. Fabrication and application of flexible, multimodal light-emitting devices for wireless optogenetics [J]. Nature Protocols, 2013, 8(12): 2413-2428.
- [5] Tu J, Yang F, Wan J, et al. Light-controlled astrocytes promote human mesenchymal stem

cells toward neuronal differentiation and improve the neurological deficit in stroke rats [J].

Glia, 2014, 62(1): 106-121.

[6] Zhang F, Wang LP, Brauner M, et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry

[J]. Nature, 2007, 446(7136): 633-639.

中国仪器仪表学会