

陈志锋, 彭 莱, 吴 强. 单细胞水平原钙黏蛋白基因簇的转录分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(2): 38–43.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.02.010

单细胞水平原钙黏蛋白基因簇的转录分析

陈志锋¹, 彭 莱², 吴 强^{1,2}

(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240;

2. 上海交通大学系统生物医学研究院比较生物医学中心/系统生物医学教育部重点实验室, 上海 200240)

摘要:原钙黏蛋白 (protocadherin, *Pcdh*) 基因簇由紧密相连的 3 个基因簇 (*Pcdh α* , *Pcdh β* 和 *Pcdh γ*) 组成, 其中 α 、 β 基因簇包含可变区外显子 (C 型和非 C 型) 和恒定区外显子。这种独特的基因排列方式使 *Pcdh* 基因簇具有产生单细胞分子多样性的潜能。目前, 在单细胞水平有关 *Pcdh* 基因簇转录表达的研究较少。为了探索单细胞 *Pcdh* 基因簇的转录表达模式, 利用显微操作系统并结合 RT-PCR 方法, 在单细胞水平分析了小鼠大脑皮层和人类神经母细胞瘤细胞系 SK-N-SH 的 *Pcdh α* 和 *Pcdh β* 基因簇表达模式。研究发现 *Pcdh α* 和 *Pcdh γ* 的 C 型和非 C 型亚型均是随机表达, 每个单细胞表达不同组合的若干个 *Pcdh* 基因簇亚型。研究表明, 在小鼠大脑皮层及人类神经母细胞瘤的单个细胞中, *Pcdh* 基因簇的转录表达都能够产生单细胞表面分子多样性。这为进一步揭示神经元中 *Pcdh* 基因簇表达调控的分子机理及其在大脑神经回路中的功能奠定理论基础。

关键词:原钙黏蛋白基因簇; 表达模式; 单细胞; RT-PCR; 单细胞表面分子多样性

中图分类号:Q786

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2017)02-0038-06

哺乳动物的神经系统中含有上亿个神经元, 这些神经元通过突触结构形成复杂而有序的信号通讯网络, 不同神经元之间是如何有效地相互识别, 进而相互连接, 形成复杂的神经环路, 这一直都是神经科学领域亟待解决的重要基础性课题。有研究提出每个神经元都含有其特异性的身份识别标签^[1-2], 这些标签具有分子多样性, 可以用来区别于其他神经元, 指导不同神经元之间特异性识别, 保证神经环路的正确形成。在哺乳动物系统中, 何种蛋白能够产生单细胞的分子多样性呢? 近年来, 在脊椎动物中所独有的、进化过程中高度保守的原钙黏蛋白基因簇引起了人们的关注。原钙黏蛋白基因

簇由 3 个串联排列的基因簇 *Pcdh* (α 、 β 和 γ) 组成, 其中 *Pcdh α* 和 *Pcdh γ* 基因簇包含 C 型和非 C 型可变外显子组成的可变区以及 3 个恒定区外显子组成的恒定区^[3-4] (图 1)。小鼠 *Pcdh α* 基因簇可变区包含 12 个非 C 型可变外显子 ($\alpha 1 \sim \alpha 12$) 和 2 个 C 型可变外显子 ($\alpha c 1 \sim \alpha c 2$), 小鼠 *Pcdh γ* 基因簇可变区包含 19 个非 C 型可变外显子 ($\gamma a 1 \sim \gamma a 12$, $\gamma b 1 \sim \gamma b 8$, 但没有 $\gamma b 3$) 和 3 个 C 型可变外显子 ($\gamma c 3 \sim \gamma c 5$) (图 1-A); 人的 *Pcdh α* 基因簇可变区包含 13 个非 C 型可变外显子 ($\alpha 1 \sim \alpha 13$) 和 2 个 C 型可变外显子 ($\alpha c 1 \sim \alpha c 2$), 人的 *Pcdh γ* 基因簇可变区包含 19 个非 C 型可变外显子 ($\gamma a 1 \sim \gamma a 12$, $\gamma b 1 \sim \gamma b 7$) 和 3 个 C 型可变外显子 ($\gamma c 3 \sim \gamma c 5$) (图 1-B)。在转录时, 通过启动子选择和顺式可变剪接作用, 使可变区外显子与 3 个恒定区外显子相连, 最终形成由可变区外显子编码的胞外结构域 (含有 6 个胞外结构域, 即 EC1 ~ EC6)、跨膜结构域和恒定区外显子编码的胞内结构域组成的原钙黏蛋白分子^[5-6] (图 1)。因此, 不同可变外显子形成不同原钙黏蛋白的组合具有产生单细胞多样性的潜能。

Yagi 等对 P21 小鼠蒲肯野细胞 *Pcdh* 基因簇的表达模式进行了研究, 认为 *Pcdh α* 和 *Pcdh γ* 基因簇 C 型亚型组成型表

收稿日期: 2016-01-26

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 91519302, 812111583); 中国博士后科学基金 (编号: 2015M571558); 上海市科学技术委员会科研计划 (编号: 14JC1403601)。

作者简介: 陈志锋 (1989—), 男, 江西赣州人, 硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: chenzt2013@qq.com。

通信作者: 吴 强, 教授, 博士生导师, 主要从事分子细胞生物学和神经发育生物学研究。Tel: (021) 34204300; E-mail: qiangwu@sjtu.edu.cn。

[5] Khlestkina E K, Pestsova E G, Röder M S, et al. Molecular mapping, phenotypic expression and geographical distribution of genes determining anthocyanin pigmentation of coleoptiles in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104(4): 632–637.

[6] Khlestkina E K, Pshenichnikova T A, Röder M S, et al. Clustering anthocyanin pigmentation genes in wheat group 7 chromosomes [J]. Cereal Res Commun, 2009, 37(3): 391–398.

[7] Khlestkina E K, Röder M S, Pshenichnikova T A, et al. Functional diversity at the *Rc* (red coleoptile) gene in bread wheat [J]. Mol Breed, 2010, 25(1): 125–132.

[8] Gulyaeva Z B. Localization of the genes for pubescence of the glumes

and coloration of the auricles in the leaf sheath in winter wheat variety UT'Yanovka [J]. Bull Appl Bot Genet Plant Breed, 1984, 85: 95–96.

[9] Melz G, Thiele V. Chromosome locations of genes controlling 'purple leaf base' in rye and wheat [J]. Euphytica, 1990, 49(2): 155–159.

[10] Arbuzova V S, Badaeva E D, Efremova T T, et al. A cytogenetic study of the blue-grain line of the common wheat cultivar Saratovskaya 29 [J]. Russ J Genet, 2012, 48(8): 785–791.

[11] Shen Y, Shen J, Dawadondup, et al. Physical localization of a novel blue-grained gene derived from *Thinopyrum bessarabicum* [J]. Mol Breed, 2013, 31(1): 195–204.

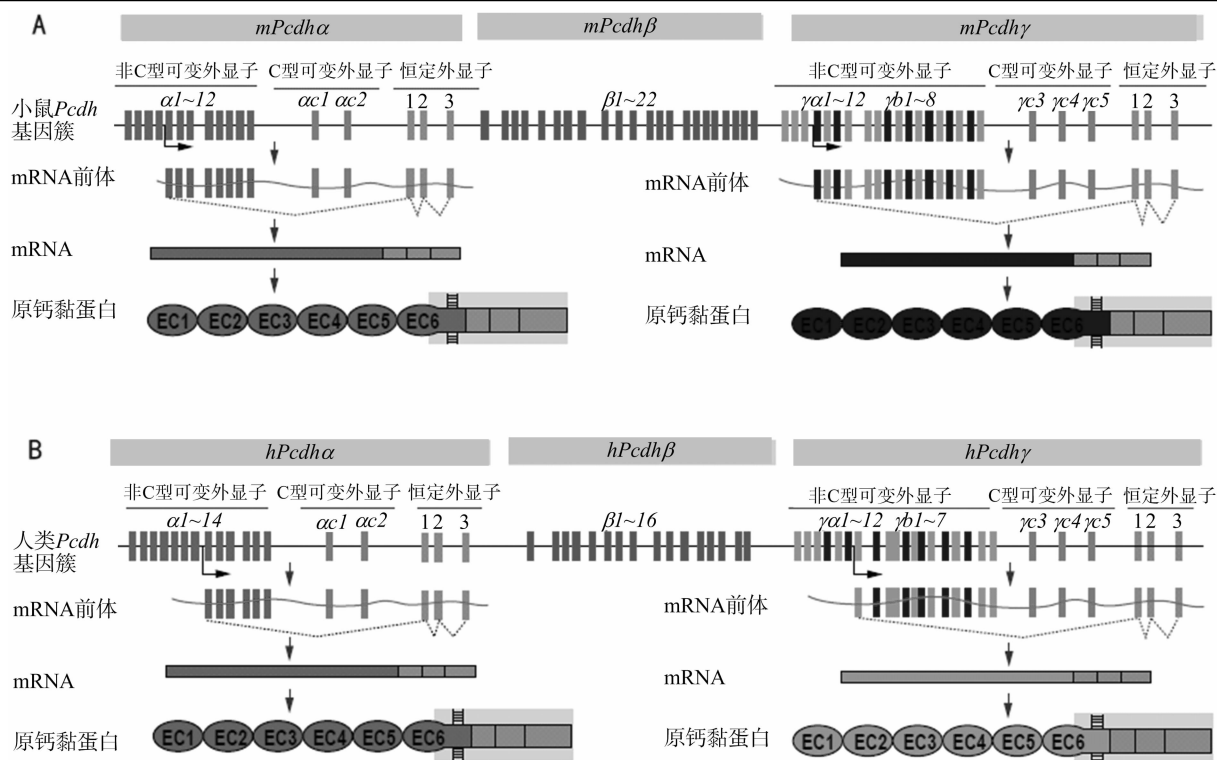


图1 小鼠(A)与人类(B)原钙黏蛋白基因簇结构及其转录表达机制

达,即每个单细胞都表达 C 型亚型,而非 C 型亚型随机表达^[7-9]。这为单细胞 *Pcdh* 基因簇表达的分子多样性提供了初步的证据,但这种表达模式的发现只是基于小鼠一个发育时期和一种细胞类型的研究,其普遍性有待验证。在小鼠大脑皮层细胞中 *Pcdh* 基因簇以怎样的模式表达,是否具有多样性,目前还不清楚。另外,有研究表明,在人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-SH 中 *Pcdhα* 和 *Pcdhγ* 基因簇表达特定亚型的组合^[10],那么在单细胞水平,每个 SK-N-SH 细胞是否都表达这些特定亚型的组合,单细胞 *Pcdhα* 和 *Pcdhγ* 基因簇的转录表达是否具有多样性,尚不清楚。

通过转录分析手段如逆转录 PCR (RT-PCR)^[11]的方法可以得到细胞中基因表达的信息,常规的 RT-PCR 方法至少需要上万个细胞。这种群体细胞转录分析方法得到的是一群细胞基因表达的综合信息,但是无法知道单细胞内基因表达的情况以及单细胞间基因表达的差异。只有将单细胞技术(单细胞显微操作技术等)与转录分析技术结合,将 RT-PCR 等转录分析方法直接应用于单个细胞的研究,才能揭示单个细胞中基因表达的真实情况,才能比较不同细胞间基因表达的差异^[12]。

本研究利用根据 Smart-Seq2^[13]的部分步骤改进而来的单细胞 RT-PCR 的方法探索了 P0 小鼠大脑皮层细胞和 SK-N-SH 细胞系原钙黏蛋白基因簇 *Pcdhα* 和 *Pcdhγ* 的表达模式,发现所有亚型的转录表达都是随机的,不同单细胞随机表达不同亚型的组合,从而赋予单个细胞原钙黏蛋白基因簇表达的分子多样性,为原钙黏蛋白作为神经元特异性身份识别标签参与神经回路的形成提供了新的证据,为进一步揭示单个神经元中原钙黏蛋白基因簇表达的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 小鼠与细胞系 小鼠为 B6 野生型小鼠,购于南京大学模式动物研究所;SK-N-SH 细胞系为人神经母细胞瘤细胞系,购于上海细胞库。

1.1.2 试验试剂 1×TrypLE Express enzyme, no phenol red (12604-021) 购于 Gibco 公司;Triton X-100 (T9284) 购于 Sigma-Aldrich 公司;dNTP Mix (R0192) 购于 Fermentas 公司;5×First-strand buffer (18064-014) 购于 Invitrogen 公司;DTT (18064-014) 购于 Invitrogen 公司;Superscript II 逆转录酶 (18064-014) 购于 Invitrogen 公司;重组核酸酶抑制剂 (2313A) 购于 Clontech 公司;Betaine (61962) 购于 Sigma-Aldrich 公司;MgCl₂ (M8266) 购于 Sigma-Aldrich 公司;KOD-Plus-Neo (KOD-401) 购于 TOYOBO 公司;Taq PCR Master Mix (BS9298) 购于 BBI 公司;FBS (10099-141) 购于 Gibco 公司;DMEM/High Glucose (SH30243.01B) 购于 Thermo 公司;Papain (P4752-50MG)、DNase I (DN25-10MG) 购于 Sigma 公司。

1.1.3 实验仪器 Laser based micropipette puller 系统(美国 Sutter Instrument 公司);Xenoworks™ Micromanipulator (美国 Sutter Instrument 公司);Mini Vortexer (82019-170) 美国 VWR 公司;Leica Microsystems(德国 Leica 公司);5810R 离心机(德国 Eppendorf 公司);PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Forma 902 超低温冰箱(美国 Thermo 公司);Forma series II 细胞培养箱(美国 Thermo 公司)。

1.1.4 引物 本研究所用引物(表 1)均由生工生物工程(上

表 1 本研究所用引物

引物名称	引物序列(5′-3′)
<i>mPcdhα</i> 特异性逆转录引物(mART)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGAGCTGAAGTTACACACCCCTTC
<i>mPcdhγ</i> 特异性逆转录引物(mGRT)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACAGAAATGGCACCTGGTAAGG
<i>hPcdhα</i> 特异性逆转录引物(hART)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGAGGAGAAAGGAAACTTGGGTC
<i>hPcdhγ</i> 特异性逆转录引物(hGRT)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACCTGACTGGGCACCTTGTCTCTG
模板转换引物(Template-switching oligo) ^[13]	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATrGrG + G
PCR 预扩增引物(ISPCR oligo) ^[13] :	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG
人和小鼠 <i>Pcdhα</i> 、 <i>γ</i> 亚型特异性引物	见参考文献[5,10]

海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞系的单细胞悬浮液制备 于长满有 SK-N-SH 细胞系的 60 mm 培养皿中,弃培养基;加入 2 mL 37 ℃ PBS 溶液,然后去除 PBS;加入 1 mL 37 ℃ 胰蛋白酶消化 3 min;加入 1 mL 37 ℃ 培养基终止消化,用移液枪轻轻吹打细胞;取 200 μL 细胞液于 15 mL 离心管中,再加入 1 mL 培养基和 1 mL 胰蛋白酶溶液进行稀释,置于冰上待用。

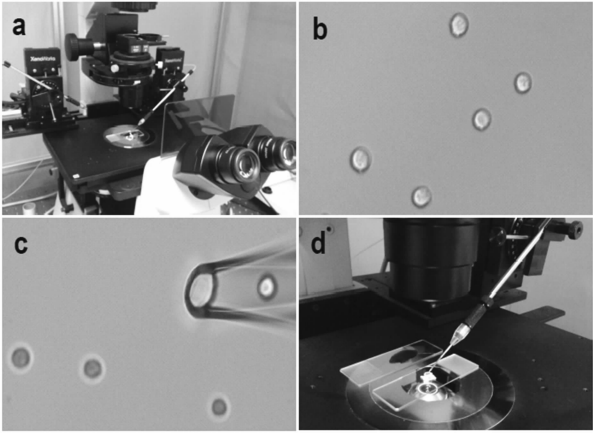
1.2.2 小鼠大脑皮层的酶消化分离溶液的制备 称量 1 mg 木瓜蛋白酶于 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL DMEM-High Glucose 培养基和 1 μL 1 mg/mL DNase I 并混匀,置于 37 ℃ 水浴锅中待用。

1.2.3 小鼠大脑皮层的单细胞悬浮液制备 使用高压灭菌后的外科手术器械取下 P0 时期的小鼠大脑,置于冰浴 DMEM-High Glucose 培养基中;用尖细的镊子取少量大脑皮层放入酶消化分离溶液中,37 ℃ 消化 15 min;除去上层液体,加入 1 mL DMEM-High Glucose 和 FBS 的混合液(9:1)清洗,用移液枪吹散细胞;并使用 100 μm 孔隙滤膜过滤;400 r/min 离心 5 min 除去上层液体,加入 1 mL DMEM-High Glucose 和 FBS 的混合液,重悬细胞,置于冰上待用。

1.2.4 单细胞的挑取与裂解 准备工作:(1)单细胞裂解缓冲液的配制:将 0.2% 体积分数的 Triton X-100 溶液、RNA 酶抑制剂和 DTT(100 μmol/L)按 95:5:1 的比例混合,并充分混匀。(2)10 μmol/L 特异性逆转录引物(表 1)溶液的配制:将 10 μL 100 μmol/L 的特异性逆转录引物溶液和 90 μL 无核酸酶超纯水充分混匀。(3)单细胞裂解混合液的配制:将单细胞裂解缓冲液、特异性逆转录引物溶液和 10 mmol/L dNTP mix 溶液按 2:1:1 的比例充分混合均匀。

操作步骤:将单细胞悬液与台盼蓝按 9:1 比例混合,并充分混匀;取 100 μL 上述混合液涂在载玻片上,置显微镜下,静置 1 min;在显微镜下用毛细玻璃移液管吸取单个细胞(图 2-c);将吸入的单细胞吹出(伴随有 0.3 μL 液体)至含有 4 μL 的单细胞裂解混合液 PCR 管的盖子中(图 2-d);将含有单细胞的盖子盖回 PCR 管,立即涡旋并放置于冰上;17 000 r/min 离心 15 s;将样品放置在 72 ℃ 水浴锅中恒温加热 3 min 后,瞬时离心并立即置于冰上。

1.2.5 单细胞样品逆转录反应 解冻逆转录反应各试剂,并混匀;混合以下组分:0.25 μL 重组 RNA 酶抑制剂(40 U/μL),2.00 μL Superscript II first-strand buffer(5×),0.5 μL DTT(100 mmol/L),2.00 μL Betaine(5 mol/L),0.06 μL MgCl₂(1 mol/L),0.10 μL TSO(100 μmol/L),0.29 μL Nuclease-free water,0.50 μL SuperScript II 逆转录酶



a—显微操作系统;b—单细胞显微照片;c—用显微玻璃移液管吸取单细胞;d—将挑到的单细胞放入PCR管盖中
图2 单细胞的挑取

(200 U/μL);将混合组分加入到单细胞样品中,并混匀;离心 700 r/min 10 s 并立即放置冰上;设置以下反应参数进行逆转录:42 ℃ 90 min;50 ℃ 2 min,42 ℃ 2 min,10 个循环;70 ℃ 15 min。

1.2.6 单细胞样品 PCR 预扩增反应 依次向 PCR 试管中加入以下组分并充分混匀,2.5 μL KOD-Plus-Neo 聚合酶 10×PCR 缓冲液,2.5 μL 2 mmol/L dNTP,0.25 μL ISPCR primers(10 mol/L),9.25 μL 无核酸酶的超纯水,0.5 μL KOD-Plus-Neo 聚合酶;加 15 μL PCR 预扩增反应的混合液于单细胞样品中,使最终反应体系为 25 μL,充分混匀,以 700 r/min 离心 10 s 并置于冰上;PCR 反应参数:98 ℃ 3 min;98 ℃ 20 s,67 ℃ 15 s,72 ℃ 4 min,30 个循环;72 ℃ 5 min。

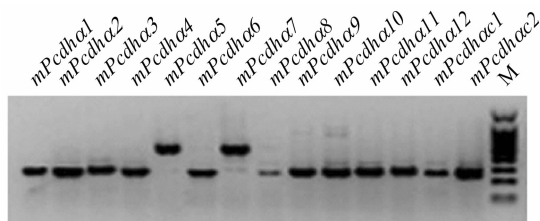
1.2.7 单细胞 *Pcdh* 基因簇亚型特异性 PCR 于 PCR 管中加入 1 μL 稀释了 2 倍的 PCR 预扩增反应产物,并向 PCR 管中依次加入以下组分:5 μL Taq PCR Master Mix,0.4 μL Primer F(10 μmol/L),0.4 μL Primer R(10 μmol/L),3.2 μL 去离子水;PCR 反应参数:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,35 个循环;72 ℃ 7 min;琼脂糖凝胶电泳,根据 *Pcdhα* 和 *Pcdhγ* 各亚型对应条带的有无来判断亚型是否表达。

2 结果与分析

2.1 小鼠大脑皮层单细胞 *Pcdhα* 基因簇的转录分析

首先,取 P0 时期小鼠大脑皮层,通过普通 RT-PCR 和琼脂糖凝胶电泳分析大脑皮层群体细胞中 *Pcdhα* 各个亚型的表达情况。由图 3 可知,在群体细胞水平上,大脑皮层细胞表达所有的 *Pcdhα* 亚型。

图 4 为单细胞 RT-PCR 分析 P0 小鼠大脑皮层 *Pcdhα* 亚



M—DNA marker; *mPcdha1-α12*,
α1-α2—小鼠*Pcdha*各亚型

图3 RT-PCR分析小鼠(P0)大脑皮层群体细胞中*Pcdha*各个亚型的表达

型表达的结果。由图4可知,所有细胞都表达 *Pcdhα*,但并不是每个细胞都表达 C 型亚型,如有 6 个细胞表达 $\alpha c2$,有 1 个细胞表达 $\alpha c1$ 。在非 C 型亚型中,有的非 C 型亚型没有被检测到表达,如 $\alpha 1$ 、 $\alpha 6$,有的非 C 型亚型在 3 个细胞中被检测到表达,如 $\alpha 7$ 、 $\alpha 11$ 等,因此,表达不同亚型的细胞个数不同。由图4纵向看,每个细胞表达不同的 *Pcdhα* 亚型组合,如 2# 表达 $\alpha 4$ 和 $\alpha 8$ 的组合,14#表达 $\alpha 2$ 、 $\alpha 5$ 和 $\alpha c2$ 的组合。

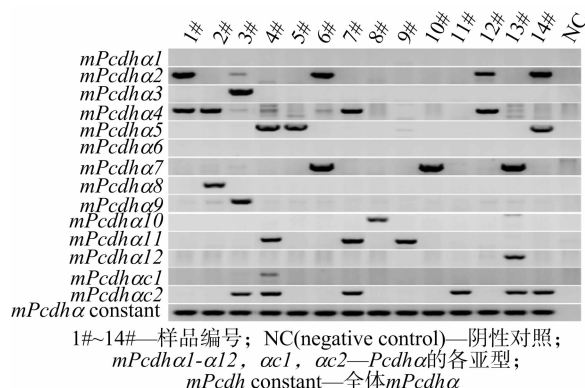
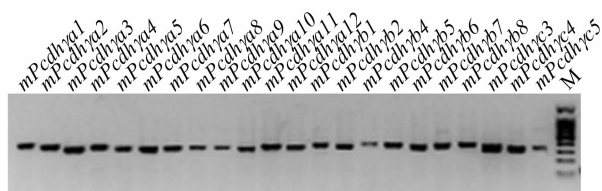


图4 小鼠(P0)大脑皮层细胞中*Pcdhα*亚型的单细胞RT-PCR分析

以上结果表明,在 P0 小鼠的大脑皮层单细胞中,*Pcdhα* C 型亚型($\alpha c1$ 和 $\alpha c2$) 和非 C 型亚型的表达是随机的,单细胞随机选择表达这些亚型的组合,单细胞间 *Pcdhα* 的表达具有多样性。

2.2 小鼠大脑皮层单细胞 *Pcdh γ* 基因簇的转录分析

由图 5 可知,群体细胞水平上,P0 小鼠大脑皮层细胞表达所有 *Pcdhy* 亚型的组合。



M—DNA marker; *mPcdhy*1-12, *yb1-yb8*(无b3),
yc3-yc5—小鼠*Pcdhy*各亚型

图6为14个(1#~14#)小鼠(P0)大脑皮层单细胞 *Pcdhy* 各个亚型表达的情况。每个细胞都表达 *Pcdhy*, 71% (10/14) 的细胞表达 C 型亚型 $\gamma c3$, 只有 21% (3/14) 的细胞表达 $\gamma c4$, 这批细胞中没有检测到表达 $\gamma c5$ 的细胞, *Pcdhy* C 型亚型 ($\gamma c3$, $\gamma c4$ 和 $\gamma c5$) 是随机表达的。另外, 表达不同非 C 型亚型

的细胞个数差异很大,有的非C型亚型不表达,如 $\gamma a8$ 、 $\gamma b5$ 等等,而有的非C型亚型在多个细胞中被检测到表达,如有6个细胞表达 $\gamma a11$ 。不同单细胞间表达 γ 亚型的种类数也相差很大,有的细胞表达1~2种*Pcdhy*亚型,如12#只表达 $\gamma b4$,6#只表达 $\gamma b2$ 和 $\gamma c3$,而有的细胞表达5种*Pcdhy*亚型组合,如3#表达 $\gamma a3$ 、 $\gamma a4$ 、 $\gamma a6$ 、 $\gamma a11$ 和 $\gamma c3$ 的组合,4#表达 $\gamma a4$ 、 $\gamma b2$ 、 $\gamma a7$ 、 $\gamma a12$ 和 $\gamma c3$ 的组合。

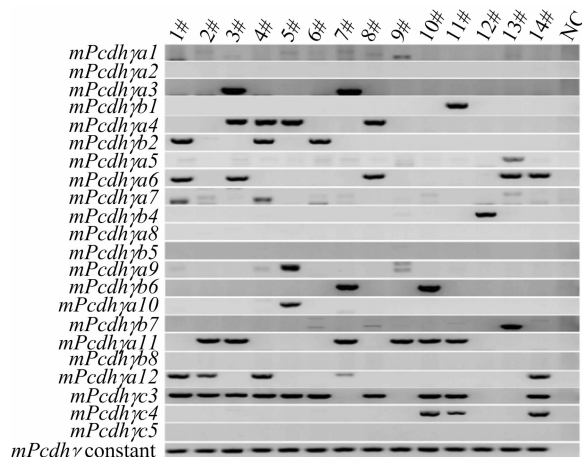


图6 小鼠(P0)大脑皮层细胞中*Pcdhγ*亚型的单细胞RT-PCR分析

综合以上结果分析,小鼠(P0)的大脑皮层单细胞 *Pcdhy* 亚型的表达是随机的,每个细胞随机选择表达不同的 *Pcdhy* 亚型组合,单细胞 *Pcdhy* 的表达具有多样性。

2.3 SK-N-SH 细胞系中单细胞 *Pcdhα* 基因簇的转录分析

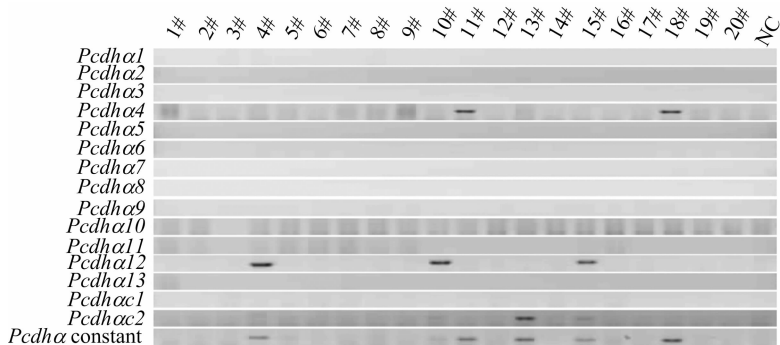
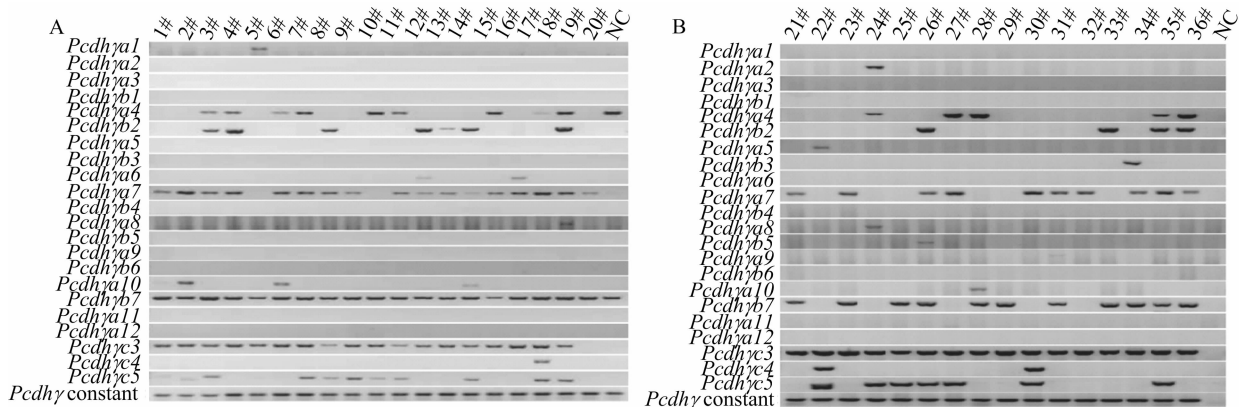
SK-N-SH 是人神经母细胞瘤细胞系,以往研究表明,在群体细胞水平,该细胞系 *Pcdhα* 基因簇表达 $\alpha 4$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 12$ 、 $\alpha c1$ 和 $\alpha c2$ 等 5 种亚型^[10]。

如图 7 所示,这批细胞中只有 $\alpha 4$ 、 $\alpha 12$ 和 $\alpha c2$ 被检测到表达,只有 6 个细胞被检测到表达 *Pcdh α* ,由图 7 可知,4#、10#和 15#都只表达 $\alpha 12$,11#和 18#都只表达 *Pcdh $\alpha 4$* ,13#只表达 *Pcdh $\alpha c2$* 。结果表明,并不是每个 SK-N-SH 细胞都表达一样的 *Pcdh α* 特定亚型组合,单细胞 *Pcdh α* 的表达具有多样性。

2.4 SK-N-SH 细胞系中单细胞 *Pcdhy* 基因簇的转录分析

前期研究表明,在群体细胞水平上,SK-N-SH 细胞系 *Pcdhy* 基因簇表达 $\gamma b1$ 、 $\gamma a4$ 、 $\gamma b2$ 、 $\gamma b3$ 、 $\gamma a7$ 、 $\gamma b5$ 、 $\gamma a9$ 、 $\gamma a10$ 、 $\gamma b7$ 、 $\gamma c3$ 、 $\gamma c4$ 和 $\gamma c5$ 等 12 种亚型^[10]。由于 *Pcdhy* 基因簇结构的独特性^[3],笔者推测,每个 SK-N-SH 细胞随机表达 *Pcdh* 基因簇的亚型,每个细胞表达不一样的 *Pcdhy* 亚型组合。由于细胞群体的 *Pcdh* 基因簇表达是所有单细胞 *Pcdh* 基因簇综合表达的结果,群体细胞稳定表达特定亚型的组合。

如图 8 所示,用单细胞 RT-PCR 的方法全面分析了 36 个 SK-N-SH 单细胞(图 8A,1#~20#;图 8B,21#~36#)所有 *Pcdhy* 亚型表达的情况,每个 SK-N-SH 细胞都会表达 *Pcdhy*,94% (34/36) 的细胞表达 C 型亚型 *Pcdhy*γ3,表达 *Pcdhy*γ4 和 *Pcdhy*γ5 的细胞分别占细胞总数的 8% (3/36) 和 44% (16/36)。在非 C 型亚型中,有的非 C 型亚型没有被检测到表达,如 γa3 等;有的非 C 型亚型在大部分细胞中被检测到表达,如 γb7。从纵向看图 8,并不是所有细胞都表达相同的特定某些 *Pcdhy* 亚型组合,有的细胞表达亚型的种类多,

图7 SK-N-SH 细胞系 *Pcdha* 亚型的单细胞 RT-PCR 分析图8 SK-N-SH 细胞系 *Pcdhy* 亚型的单细胞 RT-PCR 分析

如 3# 表达 $\gamma a4$ 、 $\gamma b2$ 、 $\gamma a7$ 、 $\gamma b7$ 、 $\gamma c3$ 和 $\gamma c5$ 的组合,有的细胞表达亚型的种类少,如 19# 表达 $\gamma a7$ 和 $\gamma b7$,29# 表达 $\gamma b7$ 和 $\gamma c3$,32# 表达 $\gamma a7$ 和 $\gamma c3$ 。

以上结果分析表明,在 SK-N-SH 细胞系单细胞中,*Pcdhy* 亚型的表达是随机的,有的亚型表达几率大,有的亚型表达的几率小,不同 SK-N-SH 单细胞表达不同的 *Pcdhy* 亚型组合,单细胞 *Pcdhy* 的表达具有多样性。

3 结论与讨论

哺乳动物的神经系统由数以亿计的神经元组成,神经元之间通过多样而特异的突触连接用以交流和传递信息。原钙黏蛋白可能在复杂的神经系统中扮演重要角色,如原钙黏蛋白介导树突的自我回避^[14],决定神经元的存活^[15-16],调控树突的形成与发育^[17-18],指导突触的发育^[19-20]等等。有研究认为每个神经元的表面都有其自身特异性的身份识别标签,这些标签具有分子多样性的特征,用以指导不同神经元间特异性识别^[1-2]。而原钙黏蛋白基因簇独特的排列方式及其在中枢神经系统的特异性表达^[3-4]表明其在神经元中具有产生原钙黏蛋白分子多样性的潜能,可能作为神经元的身份识别标签参与神经回路的形成中。但哺乳动物许多神经元(如大脑皮层细胞等)中的原钙黏蛋白基因簇表达是否真的都具有分子多样性,这还不清楚。

前人对小鼠(P21)蒲肯野细胞原钙黏蛋白基因簇的表达模式进行了研究,为神经元产生原钙黏蛋白的分子多样性提供了直接的试验证据。Yagi 等基于小鼠(P21)蒲肯野细胞的研究提出了原钙黏蛋白基因簇独特的表达模式,认为原钙黏蛋白基因簇的 C 型亚型组成型表达,即每个神经元都表达 C

型亚型,而其他非 C 型亚型随机性表达^[9]。但小鼠(P21)蒲肯野细胞 *Pcdh* 基因簇的这种表达模式是否具有普遍性,并且在小鼠大脑皮层中 *Pcdh* 基因簇的转录表达是否具有多样性,目前仍不清楚。另外,有关研究表明,SK-N-SH 细胞系会稳定表达某些特定亚型的组合^[10]。但在单细胞水平,每个 SK-N-SH 细胞是否都表达这些特定亚型的组合,*Pcdh* 基因簇的转录表达是否具有多样性,这还尚未清楚。

常规的基因表达的转录分析是利用逆转录 PCR^[11] 或 RNA-Seq^[21] 的方法从群体细胞水平分析群体细胞基因表达的综合情况,但这样得到的结果是所有细胞基因表达的平均水平,没法得到单个细胞中各基因表达的情况,没法区分单细胞间基因表达的差异,因此,只有将基因转录分析方法直接运用于单个细胞,才能揭示单个细胞中基因表达的信息,才能比较单细胞间基因表达的差异。

本研究通过单细胞 RT-PCR 的方法分析了小鼠(P0)大脑皮层和 SK-N-SH 单细胞中原钙黏蛋白基因簇的表达模式,发现 C 型和非 C 型亚型的表达均是随机的,每个神经元随机选择表达不同的原钙黏蛋白基因簇亚型组合,*Pcdh* 基因簇的转录表达在单细胞中具有多样性。原钙黏蛋白基因簇转录表达的多样性为其作为神经元身份识别标签参与神经回路的形成提供了新的证据,也为进一步从单细胞水平研究原钙黏蛋白基因簇转录表达多样性的分子机理奠定了基础。有研究表明,在双相情感障碍和自闭症等多种精神类疾病中,均伴随有神经回路形成缺陷^[22-23],本研究也为系统理解精神类疾病的发病机制提供理论参考。

近年来,随着单细胞检测技术的不断发展,人们可以将转录组高通量测序(RNA-Seq)技术运用于单细胞的研究,各

种单细胞 RNA - Seq 技术相继涌现,如 scRNA - Seq^[24]、Smart - Seq^[25]、Smart - Seq2^[13,26] 等等,各种单细胞转录组高通量测序技术形式各异,但本质上都是为了更加真实全面地得到单细胞中转录组的全部信息。因此,将来可以在已有研究的基础上利用单细胞 RNA - Seq 技术,对各个发育阶段小鼠大脑皮层单细胞和神经系统其他组织的单细胞进行高通量测序,不仅可以获得各种细胞中原钙黏蛋白基因簇表达的亚型种类,还可以获得各亚型的表达水平,从而更进一步地揭示原钙黏蛋白基因簇表达的分子多样性,还可以进一步研究单细胞原钙黏蛋白基因簇组合型的表达模式是否受时空调控,为原钙黏蛋白作为神经元特异性身份识别标签参与神经回路的形成提供更多的证据。

参考文献:

- [1] Zipursky S L, Sanes J R. Chemoaffinity revisited: dscams, protocadherins, and neural circuit assembly[J]. *Cell*, 2010, 143 (3): 343 - 353.
- [2] Sperry, W R. Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1963, 50: 703 - 710.
- [3] Wu Q, Maniatis T. A striking organization of a large family of human neural cadherin - like cell adhesion genes[J]. *Cell*, 1999, 97 (6): 779 - 790.
- [4] Wu Q, Zhang T, Cheng J F, et al. Comparative DNA sequence analysis of mouse and human protocadherin gene clusters[J]. *Genome Research*, 2001, 11 (3): 389 - 404.
- [5] Tasic B, Nabholz C E, Baldwin K K, et al. Promoter choice determines splice site selection in protocadherin α and γ pre - mRNA splicing[J]. *Molecular Cell*, 2002, 10 (1): 21 - 33.
- [6] Wang X Z, Su H, Bradley A. Molecular mechanisms governing *Pcdhy* gene expression: evidence for a multiple promoter and cis - alternative splicing model [J]. *Genes & Development*, 2002, 16 (15): 1890 - 1905.
- [7] Esumi S, Kakazu N, Taguchi Y, et al. Monoallelic yet combinatorial expression of variable exons of the protocadherin - α gene cluster in single neurons[J]. *Nature Genetics*, 2005, 37 (2): 171 - 176.
- [8] Esumi S, Kaneko R, Kawamura Y, et al. Split single - cell RT - PCR analysis of Purkinje cells[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1 (4): 2143 - 2151.
- [9] Kaneko R, Kato H, Kawamura Y, et al. Allelic gene regulation of *Pcdh α* and *Pcdhy* clusters involving both monoallelic and biallelic expression in single Purkinje cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281 (41): 30551 - 30560.
- [10] Guo Ya, Monahan K, Wu Hai Yang, et al. CTCF/cohesin - mediated DNA looping is required for protocadherin α promoter choice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (51): 21081 - 21086.
- [11] Rio C D. Reverse transcription - polymerase chain reaction[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014 (11): 1207 - 1216.
- [12] Phillips J K, Lipski J. Single - cell RT - PCR as a tool to study gene expression in central and peripheral autonomic neurones[J]. *Autonomic Neuroscience - Basic & Clinical*, 2000, 86 (1/2): 1 - 12.
- [13] Picelli S, Faridani O R, Bjorklund A K, et al. Full - length RNA - seq from single cells using Smart - seq2[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9 (1): 171 - 181.
- [14] Lefebvre J L, Kostadinov D, Chen W V, et al. Protocadherins mediate dendritic self - avoidance in the mammalian nervous system[J]. *Nature*, 2012, 488 (7412): 517 - 521.
- [15] Chen W V, Alvarez F J, Lefebvre J L, et al. Functional significance of isoform diversification in the protocadherin γ gene cluster[J]. *Neuron*, 2012, 75 (3): 402 - 409.
- [16] Wang X, Weiner J A, Levi S, et al. Gamma protocadherins are required for survival of spinal interneurons [J]. *Neuron*, 2002, 36 (5): 843 - 854.
- [17] Garrett A M, Schreiner D, Lobas M A, et al. γ - Protocadherins control cortical dendrite arborization by regulating the activity of a FAK/ PKC/MARCKS signaling pathway[J]. *Neuron*, 2012, 74 (2): 269 - 276.
- [18] Suo L, Lu H N, Ying G X, et al. Protocadherin clusters and cell adhesion kinase regulate dendrite complexity through Rho GTPase[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2012, 4 (6): 362 - 376.
- [19] Garrett A M, Weiner J A. Control of CNS synapse development by γ - protocadherin - mediated astrocyte - neuron contact[J]. *Journal of Neuroscience*, 2009, 29 (38): 11723 - 11731.
- [20] Weiner J A, Wang Xiaozhong, Tapia J C, et al. Gamma protocadherins are required for synaptic development in the spinal cord[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (1): 8 - 14.
- [21] Mortazavi A, Williams B A, Mccue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA - Seq[J]. *Nature Methods*, 2008, 5 (7): 621 - 628.
- [22] Iossifov I, Ronemus M, Levy D, et al. De Novo gene disruptions in children on the autistic spectrum[J]. *Neuron*, 2012, 74 (2): 285 - 299.
- [23] Pedrosa E, Stefanescu R, Margolis B, et al. Analysis of protocadherin alpha gene enhancer polymorphism in bipolar disorder and schizophrenia[J]. *Schizophrenia Research*, 2008, 102 (1/2/3): 210 - 219.
- [24] Tang F C, Barbacioru C, Wang Y Z, et al. mRNA - Seq whole - transcriptome analysis of a single cell[J]. *Nature Methods*, 2009, 6 (5): 377 - 382.
- [25] Ramskold D, Luo Shu Jun, Wang Y C, et al. Full - length mRNA - Seq from single - cell levels of RNA and individual circulating tumor cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30 (8): 777 - 782.
- [26] Picelli S, Bjorklund A K, Faridani O R, et al. Smart - seq2 for sensitive full - length transcriptome profiling in single cells[J]. *Nature Methods*, 2013, 10 (11): 1096 - 1098.