

实验方法

一种优化的成年斑马鱼视网膜吗啡啉电转染方法

侯海涛^{1,**}, 吕金阳^{2,**}, 张志强¹, 陆颖³, 周翠萍³, 周天球³, 张书强^{1,*}, 徐绘^{1,*}

南通大学¹教育部和江苏省神经再生重点实验室, 神经再生协同创新中心; ²医学院; ³附属医院眼科, 南通 226001

摘要: 通过吗啡啉(morpholino, MO)电转染敲降斑马鱼视网膜内目标基因表达是研究基因功能的有效手段, 但现有方法存在局限性。本文旨在发展一种优化的成年斑马鱼视网膜MO电转染方法。优化要点是在电极内侧涂抹超声凝胶, 并使用方形电极而不是圆形电极。结果显示, 使用超声凝胶可有效减少电转染所致视网膜损伤并简化实验步骤, 采用方形电极显著提高了MO电转染效率。用本方法敲降视网膜再生相关基因*Ascl1a*显著抑制了视网膜祖细胞的生成。本方法是对现有MO电转染方法的优化。

关键词: 斑马鱼; 视网膜; 电转染; 吗啡啉

中图分类号: R339.14

An improved method for *in vivo* electroporation of morpholinos into the adult zebrafish retina

HOU Hai-Tao^{1,**}, LV Jin-Yang^{2,**}, ZHANG Zhi-Qiang¹, LU Ying³, ZHOU Cui-Ping³, ZHOU Tian-Qiu³, ZHANG Shu-Qiang^{1,*}, XU Hui^{1,*}

¹Co-innovation Center of Neuroregeneration, Ministry of Education and Jiangsu Key Laboratory of Neuroregeneration; ²Medical School; ³Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital, Nantong University, Nantong 226001, China

Abstract: *In vivo* electroporation of morpholinos (MOs) into the retina of adult zebrafish is an efficient method to study gene function related to retinal disease and regeneration. However, the currently reported methods are complicated with low MO transfer efficiency and high probability to cause collateral damage. The present study was aimed to optimize the existing MO electroporation methods. Two major changes were made to MO electroporation procedure in zebrafish retina. One was to coat the inner side of the electrode with ultrasonic gel. The other was to replace the commonly used round electrode with novel rectangular one. The results showed that the use of ultrasonic gel reduced collateral damage caused by retinal electroporation and simplified the experimental procedure. The rectangular electrode significantly increased transfection efficiency of MO electroporation. In particular, knocking down the expression of *Ascl1a* in the retina by using our method significantly inhibited the generation of retinal progenitor cells. These results suggest our method is the optimization of the current MO electroporation methods and may be a better alternative for relevant researchers.

Key words: zebrafish; retina; electroporation; morpholino

Received 2017-05-25 Accepted 2017-07-03

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 31401234), the Jiangsu Student's Platform for Innovation and Entrepreneurship Training Program (No. 201610304031Z), Nantong University Graduate Student Scientific Innovation Program (No. YKC16040) and Natural Science Foundation of Education Department of Jiangsu Province, China (No. 16KJB180025).

**These authors contributed equally to this work.

*Co-corresponding author. ZHANG Shu-Qiang: Tel: +86-513-85051597; E-mail: sqzhang0328@ntu.edu.cn; XU Hui: Tel: +86-513-85051593; E-mail: huixu82@126.com

作为脊椎动物模式生物, 斑马鱼是研究组织器官发育和遗传性疾病非常好的模型^[1, 2], 这得益于在斑马鱼胚胎上可进行方便的遗传操作, 例如通过受精卵显微注射吗啡啉 (morpholino, MO) 或 mRNA 进行目的基因敲降和过表达^[3]。由于斑马鱼有强大的器官再生能力, 斑马鱼成鱼也被广泛用于组织器官再生的研究, 如视网膜和脊髓再生等^[4–6]。利用斑马鱼成鱼进行视网膜疾病或再生研究时, 一项重要的实验技术是通过电转染将 MO 转移到视网膜细胞内敲降目的基因的表达^[7, 8]。该技术在国外多个实验室被广泛的使用, 也有相关实验流程的介绍^[8, 9]。现在常用的视网膜 MO 电转染方法主要有两种: 一种是 Hyde 实验室报道的方法, 需在水中电转^[9]; 另一种是 Goldman 实验室所用方法, 为直接电转染^[8]。在研究实践中, 我们观察到前一种方法操作步骤较为繁琐、且转染区域仅限于背侧和中央视网膜; 后一种方法操作简单, 但常导致视网膜损伤, 影响实验结果。本文在前人的研究基础上, 结合大量实验之所得经验, 对现有视网膜 MO 电转染方法进行优化, 主要优化要点是使用超声凝胶涂抹电极内侧, 同时使用方形而非圆形电极, 以期利用斑马鱼成鱼进行视网膜疾病的研究提供更好的实验方法。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 BTX ECM830 电穿孔仪及铂金圆形镊子电极 (直径 3 mm) 购自美国 BTX 公司 (BTX Technologies Inc.), 不锈钢方形镊子电极 (长 12 mm、宽 6 mm、厚 1 mm) 为自制。SMZ-168 体视显微镜购自 Motic 公司; 101 AB-2 电热恒温鼓风干燥箱购自上海恒昌仪器厂; Leica CM3050S 冰冻切片机购自德国莱卡公司 (Leica Biosystems); ZEISS Imager M2 型荧光显微镜购自德国蔡司公司 (Carl Zeiss AG); 切片用正电荷粘附载玻片购自世泰公司; 10 μ L 微量注射器购自瑞士 Hamilton 公司; O.C.T. 冷冻切片包埋剂购自美国樱花公司 (Sakura Americas); 丽丝胺 (Lissamine) 标记的标准对照 MO 和 *Ascl1a* MO 购自美国 Gene Tools 公司, 标准对照 MO 序列为 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3', *Ascl1a* MO 序列为 5'-ATCTTGGCGGTGATGTCACATTCGC-3'; 其余常用试剂购自国药集团。

1.2 实验动物 鱼龄 9~12 个月的野生型 (AB) 和转基因斑马鱼 *Tg (1016tuba1a:GFP)*^[10] 由南通大学实验动物中心提供。实验用野生型斑马鱼 (AB) 种

鱼从国家斑马鱼资源中心引进。斑马鱼自动化养殖系统购自北京爱生科技集团公司。斑马鱼饲养和交配条件参照文献描述进行^[11]。具体条件为室温 26~28 $^{\circ}$ C, 昼夜节律为 14 h 黑夜 / 10 h 白昼, SPF 系统水环境, 斑马鱼每日自由进食标准鱼食。每条实验用斑马鱼仅用于一次实验, 且给予正常进食及光照。

1.3 成年斑马鱼玻璃体内注射 MO 野生型斑马鱼用 0.03% 三卡因 (Tricaine, MS222, Sigma) 麻醉剂麻醉后, 在体式解剖镜下将斑马鱼包裹在润湿的纸巾内, 纸巾覆盖至腮处。本文采取的视网膜损伤方式为针刺损伤, 使用 30G 注射用针头从右眼球背部 4 个象限进针戳穿眼球壁造成视网膜损伤, 这 4 个进针位置连线呈 X 形状。进针深度以刚好看不到针尖斜面为准, 损伤时注意不要伤及对侧视网膜。在针刺损伤右眼的同时使用微量注射器从每个损伤处向玻璃体内注射 0.4 μ L MO (0.5 mmol/L)。每个眼球共计 4 个伤口, 注射总量为 1.6 μ L MO。左眼为未损伤对照, 不做损伤处理。

1.4 电转染 注射 MO 前 1 min 在电极内侧抹上一层薄而均匀的水溶性超声凝胶。注射 MO 后, 立即将电极负极置于斑马鱼右眼角膜之垂直上方, 正极置于左眼垂直下方。目视确认电极紧密接触角膜, 但要避免电极覆盖斑马鱼的脑区。电转染条件为电压 70 V, 5 次 50 ms 脉冲, 脉冲之间间隔 1 s。电转染结束后迅速将尚处于麻醉状态的斑马鱼放回养殖系统的水中恢复。

1.5 眼球收取、冰冻切片及免疫荧光染色 电转染后 4 d, 麻醉并收取斑马鱼的眼球, 取眼球前 3 h 腹腔注射 5- 溴脱氧尿嘧啶核苷 (5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU) 以标记增殖细胞。收取的眼球在 4% 多聚甲醛 / 1 \times PBS 中室温固定 2 h, 20% 蔗糖 / 1 \times PBS 处理 6 h 以上, 之后转移至 O.C.T 中包埋、冰冻切片, 切片厚度 12 μ m。切片制备好后可在荧光显微镜下观察丽丝胺标记的吗啡啉 (红色荧光) 在视网膜中的分布并拍照记录, 随后用抗 GFP (1: 1 000, Life Technologies) 或抗 BrdU 抗体 (1: 500, Abcam) 进行免疫荧光染色, 具体方法参考之前的文献^[10, 11]。最后使用荧光显微镜拍照成像。视网膜电转染后, 以损伤位置为中心选取长度 500 μ m 的视网膜区域, 利用图像分析软件 ImageJ 进行视网膜中 MO 荧光强度分析。

1.6 统计方法 文中所有实验结果均重复 3 次以

上。实验数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。使用统计软件 SPSS 11.0 进行统计学分析, 两组间差异用 t 检验 (双尾) 进行, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 超声凝胶可有效减少电转染所致视网膜损伤

电转染引起的视网膜损伤可使转基因鱼系 *Tg (1016tuba1a:GFP)* 中的 Müller 细胞激活并表达 GFP。我们首先比较了在未损伤组用或不用超声凝胶对视网膜损伤的影响。未损伤的眼球在 0 d 接受一次电转染, 4 d 后收取眼球检测 GFP 表达情况。结果显示, 在未用超声凝胶组, 视网膜中有大量 GFP⁺ 的 Müller 细胞 (图 1A), 提示有广泛视网膜损伤; 相反在使用超声凝胶组, 仅可见极少数 GFP⁺ 细胞 (图 1B)。我们接下来进一步在针刺损伤的眼球上比较超声凝胶对电转染损伤的影响。在未用凝胶组, 电转染后 4 d 视网膜中出现广泛的 GFP⁺ Müller 细胞 (图 1C); 而在使用超声凝胶组, GFP⁺ 细胞范围局限在针刺伤口附近区域 (图 1D), 与之前报道的视网膜损伤后 GFP⁺ 细胞的正常范围相符合^[12]。这些结果表明使用超声凝胶能明显减少因电转染所致的视网膜损伤。

2.2 方形电极显著提高了 MO 电转染效率

我们接着比较了圆形和方形两种电极对电转染效率的影响。针刺损伤眼球的同时注射对照 MO, 然后分别使用带有超声凝胶的圆形和方形电极进行电转染。电转染 4 d 后制备眼球冰冻切片, 检测丽丝胺标记的 MO 在视网膜中的分布和数量。实验结果显示方形电极组转染效率大幅优于圆形电极组 (图 2)。圆形电极转染后 MO 主要分布在损伤位置中央较小范围内且大多呈细小颗粒状, 在其他区域含量很少, 总体效率较低 (图 2A, C); 而方形电极组视网膜内 MO 分布较广, 多呈连片状, 在整个视网膜内含量均较高, 总体效率明显好于前者 (图 2B, C)。这些结果证实使用方形电极能显著提高 MO 电转染效率。

2.3 电转染 *Ascl1a* MO 显著抑制了视网膜祖细胞的生成

为了解优化后电转染方法的有效性, 我们选择了敲降一个重要的视网膜再生相关基因 *Ascl1a*^[13] 来验证电转染效率。在对照和 *Ascl1a* MO 电转染组, 损伤后 4 d 视网膜内均可见大量 MO (图 3A), 提示电转染成功。在对照 MO 组, 损伤位置附近内核层 (inner nuclear layer, INL) 内可见大量再生的 BrdU⁺

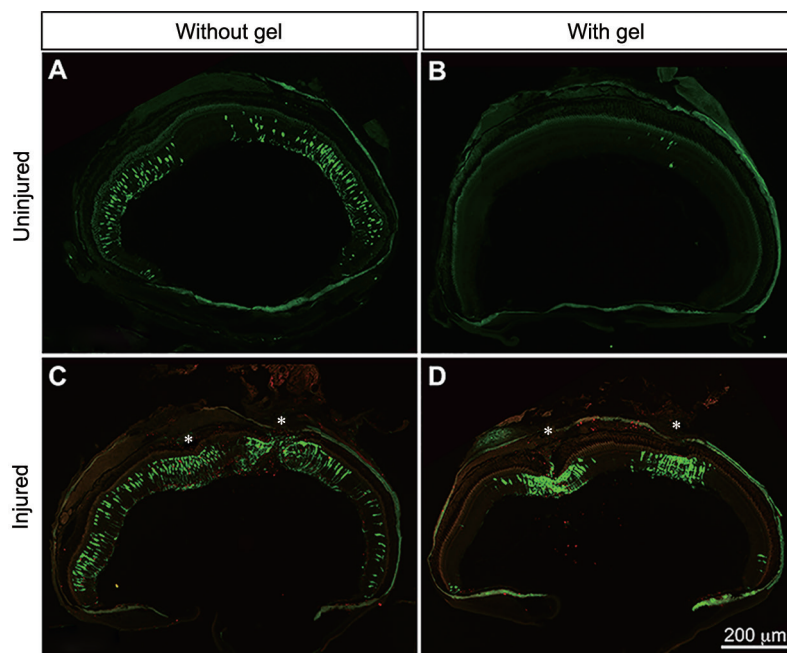


图 1. 超声凝胶对视网膜电转染损伤的作用

Fig. 1. Effects of the ultrasonic gel on collateral damage caused by retinal electroporation. Transgenic fish line *Tg (1016tuba1a:GFP)* was used for the experiment. Eyes were sectioned and immunostained for GFP 4 days after electroporation. A: Electroporation on uninjured eye without gel; B: Uninjured eye with gel; C: Electroporation on injured eye without gel; D: Injured eye with gel. Scale bar, 200 μm . *, site of poke injury.

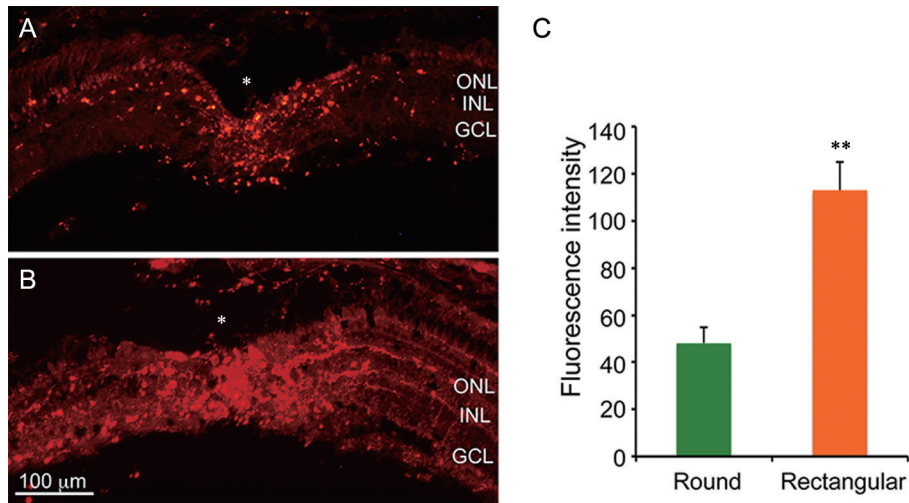


图 2. 不同形状电极对MO电转染效率的影响

Fig. 2. Effects of the electrode shape on the efficiency of MO electroporation. Wild-type zebrafish received intravitreal MO injection and were electroporated with the round (A) or rectangular (B) electrode. Four days after electroporation, eyes were sectioned and imaged under a fluorescence microscope. C: Quantification of the fluorescence intensity. Mean \pm SD, $n = 8$. ** $P < 0.01$ vs Round electrode. Scale bar, 100 μm . *, site of poke injury. ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer.

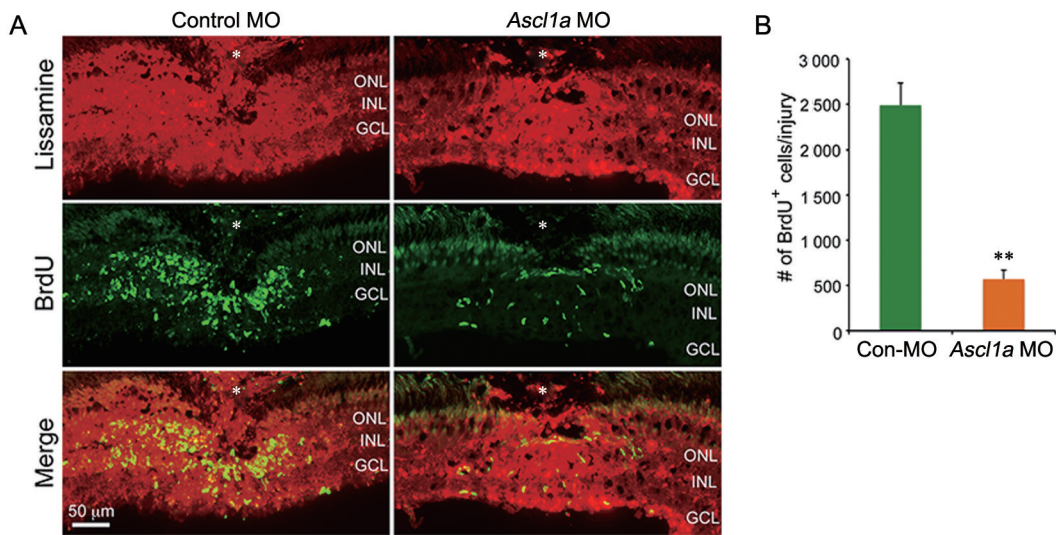


图 3. 验证本文方法对视网膜再生相关基因敲降效果

Fig. 3. Knocking down the expression of *Ascl1a* in the retina using our method. Zebrafish were treated with 0.5 mmol/L control or *Ascl1a* MO injection intravitreal and then electroporated using our optimized method. A: Representative immunofluorescence images. B: Statistical results. Mean \pm SD, $n = 10$. ** $P < 0.01$ vs Con-MO. Scale bar, 50 μm . *, site of poke injury. ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer.

的视网膜祖细胞 (图 3A), 而 *Ascl1a* MO 组 INL 内再生的祖细胞数量显著减少 (图 3A, B)。这些结果证实本文优化的 MO 电转染方法能有效抑制视网膜内再生相关基因的表达, 从而抑制视网膜再生。

3 讨论

成年斑马鱼视网膜 MO 电转染是研究视网膜疾

病和再生中基因功能的重要手段, 目前常用的两种方法^[8,9]在多个实验室被广泛使用。Hyde 实验室报道的方法^[9]需要去除外层角膜、用刀片在角膜上切割小孔、两次麻醉、以及在水中进行电转染等额外步骤, 其操作较为复杂; 另外该方法转染的视网膜区域仅限背侧和中部视网膜, 无法研究其他区域的基因功能。与该方法相比, 本方法无需上述额外步

骤，大幅简化了操作；同时本方法可将 MO 转染至视网膜任意区域，便于研究基因功能。Goldman 实验室报道的方法^[8]操作步骤简单且可进行全视网膜 MO 电转染，然而我们在大量实验中发现，该方法常导致视网膜损伤，影响实验结果分析。我们在该方法的基础上通过使用超声凝胶大幅减少了视网膜损伤，同时比较了 Hyde 所用圆形电极和 Goldman 所用方形电极的电转染效率，发现后者效率显著高于前者。因此，我们优化后的方法显著简化了操作步骤、减小了损伤并大幅提高了电转染效率，可供需要相关实验技术的研究人员参考。

在使用本文所述方法进行 MO 电转染时，有一些需要注意的细节：(1) 本方法电转染使用的电压为 70 V，适合的斑马鱼为 9~12 月龄。根据我们的经验，电转染使用的电压针对不同年龄和大小的斑马鱼需要调整，一般原则是越年幼的斑马鱼需要的电压越低，反之亦然。因此不同实验室需要针对自己的情况做优化；(2) 在放置电极时，注意不要将电极覆盖到斑马鱼的脑区域，以免电转染时对脑组织造成损伤，这可能导致斑马鱼死亡；(3) 影响电转染成功的一个重要因素是 MO 的玻璃体内注射。需要确认 MO 注射后确实留在玻璃体内，这可通过在解剖镜下观察注射后瞳孔的颜色来确认：无 MO 时为黑色，有少量 MO 时为淡红色，而有较多 MO 时则呈橘红色；(4) 电转染时，需用另一只手按住斑马鱼的躯干部位，防止电击导致其跳动从而影响电极与眼睛的接触，这可能会显著降低电转染效率。

参考文献

- 1 Dooley K, Zon LI. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10(3): 252–256.
- 2 Glass AS, Dahm R. The zebrafish as a model organism for eye development. *Ophthalmic Res* 2004; 36(1): 4–24.
- 3 Fadool JM, Dowling JE. Zebrafish: a model system for the study of eye genetics. *Prog Retin Eye Res* 2008; 27(1): 89–110.
- 4 Goldman D, Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nat Rev Neurosci* 2014; 15(7): 431–442.
- 5 Lenkowski JR, Raymond PA. Müller glia: Stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. *Prog Retin Eye Res* 2014; 40: 94–123.
- 6 Mokalled MH, Patra C, Dickson AL, Endo T, Stainier DY, Poss KD. Injury-induced *ctgfa* directs glial bridging and spinal cord regeneration in zebrafish. *Science* 2016; 354(6312): 630–634.
- 7 Thummel R, Enright JM, Kassen SC, Montgomery JE, Bailey TJ, Hyde DR. Pax6a and Pax6b are required at different points in neuronal progenitor cell proliferation during zebrafish photoreceptor regeneration. *Exp Eye Res* 2010; 90(5): 572–582.
- 8 Fausett BV, Gumerson JD, Goldman D. The proneural basic helix-loop-helix gene *ascl1a* is required for retina regeneration. *J Neurosci* 2008; 28(5): 1109–1117.
- 9 Thummel R, Bailey TJ, Hyde DR. *In vivo* electroporation of morpholinos into the adult zebrafish retina. *J Vis Exp* 2011; (58): e3603.
- 10 Zhang S, Mu Z, He C, Zhou M, Liu D, Zhao XF, Goldman D, Xu H. Antiviral drug ganciclovir is a potent inhibitor of the proliferation of Müller glia-derived progenitors during zebrafish retinal regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57(4): 1991–2000.
- 11 Mu Z, Zhang S, He C, Hou H, Liu D, Hu N, Xu H. Expression of SoxC transcription factors during zebrafish retinal and optic nerve regeneration. *Neurosci Bull* 2017; 33(1): 53–61.
- 12 Wan J, Ramachandran R, Goldman D. HB-EGF is necessary and sufficient for Müller glia dedifferentiation and retina regeneration. *Dev Cell* 2012; 22(2): 334–347.
- 13 Ramachandran R, Fausett BV, Goldman D. *Ascl1a* regulates Müller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, let-7 microRNA signalling pathway. *Nat Cell Biol* 2010; 12(11): 1101–1107.