

应用小鼠整体原位杂交技术检测 *MDM2* 在鼠胚发育不同阶段的表达

周文^{1,2}, 冯湘玲¹, 李虹¹, 王磊¹, 任彩萍¹, 姚开泰¹

(1. 中南大学 湘雅医学院 肿瘤研究所, 中国湖南 长沙 410078 ;
2. 湖南大学 化学生物传感与计量学国家重点实验室, 中国湖南 长沙 410082)

摘要: 整体原位杂交(whole-mount *in situ* hybridization, WMH)已经成为基因表达定位和表达分布模式研究的一种重要手段. 该技术能在整体水平上精确地研究胚胎发育过程中基因表达的三维信息, 而且为大规模筛选区域及组织特异性候选克隆提供了有利的技术手段. 采用体外转录地高辛标记的 RNA 探针, 检测已知基因 *MDM2* 在鼠胚胎发育不同阶段的表达模式.

关键词: 整体原位杂交; RNA 探针; 小鼠; *MDM2*

中图分类号: Q132.7

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2006)02-0099-04

Using Whole-mount *in Situ* Hybridization Technique to Detect the Gene *MDM2* in Different Stages of Mouse Embryos

ZHOU Wen^{1,2}, FENG Xiang-ling¹, LI Hong¹, WANG Lei¹, REN Cai-ping¹, YAO Kai-tai¹

(1. Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, Hunan, China; 2. State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, Hunan University, Changsha 410082, Hunan, China)

Abstract: Whole-mount *in situ* hybridization has become a very important tool for studying localization and distribution pattern of gene expression. Also, it has greatly facilitated the precise three-dimensional localization of transcripts from genes whose expression is important during development and the ease and speed with which patterns of gene expression can be visualized makes it an attractive technique for screening large numbers of candidate clones for region- or tissue-specific expression. Here we take the *MDM2* RNA probe labeled by DIG-11-UTP to detect the expression pattern in different stages of mouse embryos.

Key words: whole-mount *in situ* hybridization; RNA probe; mouse; *MDM2*

(*Life Science Research*, 2006, 10(2): 099 ~ 102)

整体原位杂交作为检测胚胎发育过程中基因表达整体效果的快速、有效手段, 已在基因表达的时空顺序和表达谱的建立等多方面得到了广泛的

应用^[1, 2]. 整体原位杂交技术一方面为大规模的筛选区域及组织特异性候选克隆提供了有利的技术手段. 随着鼠胚胎早期发育阶段 cDNA 文库的

收稿日期: 2006-02-23; 修回日期: 2006-03-23

基金项目: 湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室开放基金资助项目(200412)

作者简介: 周文(1974-), 女, 湖南岳阳人, 中南大学湘雅医学院博士研究生, 从事鼻咽癌癌变原理研究, Tel: 0731-4805451, E-mail: zw20042@126.com; 任彩萍(1972-), 女, 湖南浏阳人, 中南大学副教授, 博士, 硕士生导师, 通讯作者, 主要从事鼻咽癌变分子机制研究及干细胞研究, Tel: 0731-2355066, E-mail: rencaiping@xysm.net; 姚开泰(1931-), 男, 江苏昆山人, 中国科学院院士, 中南大学湘雅医学院教授, 通讯作者, 从事鼻咽癌癌变原理研究, E-mail: klcaremh@public.cs.hn.cn.

完善, 该技术可大规模的分离胚胎发育中重要的调节子, 从而为胚胎形成模式提供了一个重要的新的分子遗传标志库^[3-5]。另一方面为检测某些细胞群在体内的原位转录本, 并阐明分化过程中的分子遗传事件提供了帮助。如, 鼠胚胎干细胞(ES 细胞)为多能干细胞, 其分化有助于了解胚胎的正常发育过程, 而整体原位杂交技术能检测到其中某些少量的亚类细胞群在基因表达中的重要变化, 而这些轻微的异质性是不能用总 RNA 的方法所能检测到的^[6, 7]。此外, 两个或多个基因在同一细胞内的共表达或两个基因在相邻细胞中的有序表达, 为了解分子信号传导通路提供了一个可靠的切入点。

目前, 整体原位杂交在海胆、两栖类等动物胚胎上已有初步尝试^[8, 9]。本研究采用体外转录 DIG 标记的 RNA 探针, 检测已知基因 *MDM2* 在鼠胚胎发育不同阶段的表达模式。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动 物

小鼠胚胎来自怀孕的 8~9 d (E8~E9) 的昆明小白鼠。

1.1.2 质 粒

Pmdm2 质粒 DNA 由法国 Piette J 提供。质粒 DNA 含有 T7 和 T3 两种启动子, 质粒全长为 4 495 bp, 包含 1 500 bp *Mdm2* 基因片段。

1.1.3 仪 器 设 备

Orbital Mixer 购自英国 Denley 公司; 4 °C 低温冰柜购自美国法玛西亚公司; 电热恒温水浴锅购自中国北京长安科学仪器厂; 体视显微镜以及照相接口购自厦门 Motic 公司; 照相机购自上海海鸥照相机厂。

1.1.4 试 剂

体外转录试剂盒 MEGAScript™ 购自 Ambion 公司; 地高辛标记与检测试剂盒, BBR (Boehringer Blocking Reagent) 购自德国宝灵曼公司 (Boehringer Mannheim 公司); Formamide、CHAPS 购自美国 Sigma 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 *Pbmdm2* 质粒线性化

进行体外转录时要求线性化的模板 DNA 无核酸酶污染, 因此在体外转录之前需对模板 DNA 进行酶切和纯化。具体方法如下:

1) 大量酶切反应

消毒超纯水	70 μL
10 × buffer D	10 μL
乙酰化 BSA	10 μL
质粒 DNA (~1.5 g/L)	6 μL
<i>Hind</i> III (26 U/μL)	4 μL
	100 μL

37 °C 水浴, 酶切 6~7 h, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切情况, 酶切完全后终止反应。

2) 酶切产物纯化回收

在酶切产物内加入 7.5 μL 2 g/L 的蛋白酶 K (终浓度为 100 mg/L) 和 7.5 μL 10% 的 SDS (终浓度为 0.5%), 同时补充适量的超纯水至体系到达 150 μL。充分混合, 50 °C 水浴处理 30 min。此后, 加入 75 μL 苯酚/75 μL 氯仿, 充分混合后, 室温放置 5 min, 13 000 r/min 于室温离心 5 min。取上清于一新的 0.1% DEPC 处理过的 1.5 mL 离心管中, 加入 1/10 体积的 5 mol/L NH_4OAc (无 *RNase* 污染的) 以及 2 倍体积无水乙醇 (无 *RNase* 污染的), -20 °C 放置 1 h, 13 000 r/min, 4 °C 离心 15 min 沉淀 DNA 样品。75% 酒精 (无 *RNase* 污染的) 洗一次, 13 000 r/min, 4 °C 离心 10 min。将 DNA 样品溶解于 20 μL 0.1% DEPC 处理的超纯水中。经 1% 琼脂糖凝胶电泳以及分光光度计测定 DNA 浓度, -20 °C 保存备用。

1.2.2 探 针 制 备

采用转录试剂盒进行, 具体操作如下:

首先, 制备纯化的无 *RNase* 污染的 DNA 模板, 采用 QIAGEN Plasmid Mini purification Kit 抽提质粒 DNA, 用相应的酶线性化模板 DNA, 蛋白酶 K 和 SDS 处理后, 苯酚氯仿抽提纯化线性化模板 DNA。

体外转录反应体系:

无核酸酶污染的超纯水	2.5 μL
10 × Reaction Buffer	2 μL
ATP (75 mmol/L)	2 μL
CTP (75 mmol/L)	2 μL
UTP (75 mmol/L)	2 μL
GTP (15 mmol/L)	2 μL
DIG-11-UTP (10 mmol/L)	4 μL
Linear template DNA	1.5 μL
T3 Enzyme Mix	2 μL
	20 μL

37 °C 水浴孵育 6 h; 加入 1 μL 无 *RNase* 污染的 *DNase I*, 37 °C 水浴孵育 15 min; 加入 115 μL 无核酸的超纯水和 15 μL NH_4OAc 终止液, 加入等体积酚/氯仿饱和液抽提一次, 11 000 r/min, 4

℃离心 10 min; 取上清, 加入等体积氯仿再抽提一次, 11 000 r/min, 4 ℃离心 10 min; 取上清于一个新的 0.1% DEPC 处理的 1.5 mL 离心管, 加入 3 倍体积的无水乙醇和 5 mol/L NH_4OAc , -20 ℃冰箱放置 1 h, 11 000 r/min, 4 ℃离心 15 min 沉淀 RNA, 干燥后用无核酸酶的水溶解 RNA. 用 1% 琼脂糖凝胶电泳以及分光光度仪测定探针浓度, -70 ℃保存备用.

1.2.3 小鼠胚胎的获取、固定和脱水处理

选用 6~8 周的昆明小鼠雌雄合笼, 次日上午检查雌鼠是否有阴栓 (plug), 将阴栓阳性雌鼠放于另一笼中喂养. 在雌鼠怀孕后 8~9 d, 经断颈术处死孕鼠, 取出小鼠胚胎, 在解剖显微镜下去除所有滋养外胚层、体壁层等外膜结构后, 将胚胎置于 15 mL 预冷的 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 中, 4 ℃固定 2 h. 以 PBT (含 0.1% 吐温 20 的 PBS) 4 ℃洗 3 次, 之后以 100% 甲醇洗 3 次, 置 -20 ℃备用.

1.2.4 小鼠胚胎预处理和探针杂交

将固定和脱水处理后的胚胎以 30% 过氧化氢: 甲醇按 1: 5 的比例漂白, 室温 2 h, 甲醇漂洗 3 次, 每次 5 min; 然后依次通过 75%、50% 和 25% 的甲醇/PBT 溶液各洗涤 20 min, PBT 洗 3 次, 每次 20 min; 为使胚胎得到有效的漂洗, 每 5 mL 实验管胚胎数目为: E8~9 = 7~10 个、E10 = 2 个. 胚胎漂白后, 再以 10 mg/L 蛋白酶 K/PBT 37 ℃处理, 处理时间为 7~10 min; PBS-Tween 水平摇洗 2 次, 每次 5 min, 将胚胎在 0.1% 戊二醛/4% PFA/PBT 室温下再固定 20 min; 在固定结束后, 以 PBT 漂洗 2~3 次, 每次 5 min (室温); 加 1 mL 预杂交液 (含 50% 甲酰胺、1.3 × SSC (pH 4.5)、50 mg/L 酵母 RNA、10% Tween 20、10% CHAPS、100 mg/L Heparin) 60 ℃水浴 3 次, 每次 1 h; 换含约 1 mg/L *MDM2* RNA 探针的杂交液 (成份同预杂交液) 1 mL; 65 ℃杂交过夜.

1.2.5 终止杂交, 抗体孵育和显色

用预热的杂交液 65 ℃漂洗 30 min; 预热的溶液 1 (50% formamide/1XSSC/0.1% Tween 20 新鲜配制) 漂洗 2 次, 每次 1 h; 溶液 1/MABT 按 1: 1 的比例 (含 100 mmol/L maleic acid, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20) 室温漂洗 30 min; MABT 漂洗 4 次, 每次 30 min; MABT/2% BBR 室温漂洗 1 h; 2 mL 新鲜 MABT/2% BBR/20% 封闭用绵羊血清, 室温孵育 1 h; MABT/2% BBR/20% 封

闭用绵羊血清/抗地高辛抗体, 4 ℃孵育过夜, E7~9 的抗体滴度为 1/2 000, E10 为 1/5 000.

1.2.6 终止显色, 固定照相

依次以 MABT (含 100 mmol/L maleic acid, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20) 漂洗 10 次, 前 4 次 15 min, 后 4 次 30 min, 最后二次 1 h, 碱性磷酸酶溶液 (100 mmol/L Tris pH 9.5, 50 mmol/L MgCl_2 , 100 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20, 5 mmol/L 左旋咪唑) 漂洗 3 次 (室温), 每次 10 min; 碱性磷酸酶溶液 (100 mmol/L Tris pH 9.5, 50 mmol/L MgCl_2 , 100 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20) 室温洗 2 次, 每分钟 5 次; 碱性磷酸酶液中 (含 4.5 mL/L NBT, 3.5 mL/L BCIP) 避光反应, 待显色反应至满意强度 (室温孵育 30 min~3 d), 换 PBT 液 (PBT: 0.1% (v/v) Tween 20/1 × PBS pH 7.8) 室温洗 6 次, 每分钟 10 次; 体视镜下照相^[10].

2 结果

有研究表明, *MDM2* 可在 7.5 d 鼠胚胎内含有神经脊始祖细胞的神经褶顶部和 8 d 鼠胚胎内含有迁徙前神经脊细胞的神经褶背部检测到该基因表达. 在此发育阶段, 具有多潜能神经脊细胞开始离开后脑神经褶区域, 在腮弓处克隆生长, 并形成多种类型的细胞或者组织, 例如感觉神经元, 神经胶质, 黑素细胞, 骨/软骨^[11-13]. 本研究采用了 DIG 标记的 *MDM2* RNA 片段作探针, 体外转录标记长度为 1.5 kb 的反义链 RNA, 检测 *MDM2* 在鼠早期胚胎 (E8-E9) 中的表达情况 (图 1 A、B、C). 杂交后经 NBT/BCIP 显色发现, 在 8~9 d 的小鼠胚胎中, 在胚胎前脑 (B、C) 中脑 (A)、后脑部位 (A、B) 以及背侧脊索处均可检测到紫红色阳性信号 (如箭头所示), 这与所报道的表达情况一致, 说明该方法用于检测 *MDM2* 的表达分布是可行的.

3 讨论

随着功能基因组时代的到来, 有必要了解这些新基因的功能及在发育过程中的表达模式. 而整体原位杂交技术正好为了解胚胎发育过程中的基因表达提供了帮助. 与传统的切片原位杂交技术相比, 整体原位杂交有以下优点: 1) 能够直观地观察基因在整体中的时空表达分布, 能很精确地反映基因表达的三维信息^[3]. 2) 可以同时分析多个组织块、胚胎或不同发育阶段的胚胎.

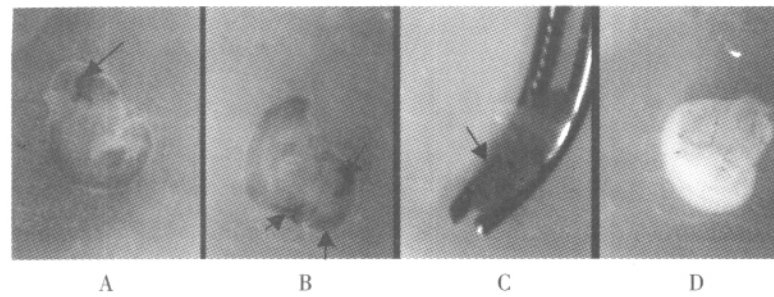


图1 MDM2 探针对 E8~9 小鼠胚胎的原位杂交结果

Fig. 1 Results of *in situ* hybridization of MDM2 anti-sense RNA probes on E8~9 mouse whole mount embryos

A: lateral view of an 9 day postcoitum(dpc) embryo; B: lateral view of an 8~8.5 dpc embryo; C: ventral view of an 8~8.5dpc embryo on the tip of a hemostat; D: Blank control embryo, treated without RNA probes.

整体原位杂交技术最易出现的问题是高背景,低信号。为避免这一现象,在实验过程中我们需要注意以下几个方面:

3.1 蛋白酶 K 的处理时间

这一步是杂交成功与否的关键因素,蛋白酶 K 处理的目的是为了提高胚胎组织对探针的通透性,以便探针能够有效地进入组织细胞内与 mRNA 靶分子进行杂交。如果处理不足,则会导致探针不能有效地渗透至组织内,不能显示杂交信号。整体原位杂交时,蛋白酶 K 处理的时间一般需要 7~10 min。其处理时间可根据胚胎的大小不同而定: E8~9=8 min、E10=10 min; 在本实验中,我们主要通过眼睛检测蛋白酶 K 消化是否适度,当看见卵黄囊的碎片从胚胎体有脱落时,即可终止反应。延长蛋白酶 K 消化时间是为了更有利于探针的渗透,但是过之,则会导致低信号的发生,组织中的 mRNA 会因此弥散,被漂洗掉。可见,蛋白酶 K 消化处理是非常重要的一个步骤。

3.2 探针及抗体浓度

探针和抗体浓度的高低对于杂交信号的强弱以及背景的高低都有很大的影响。探针及抗体浓度大,则可以得到较强的杂交信号,但背景色有可能较深,影响信号的观察。反之,在实验中,可通过降低探针和抗体浓度来减少高背景。降低探针浓度可减少非特异性的杂交,而降低抗体浓度可避免非特异的显色,避免高背景的现象。综合我们研究的经验,我们认为,在对交配后 7~9 d 的小鼠胚胎进行整体原位杂交时,使用 1~2 mg/L 的探针浓度和 1:2 000 的抗体浓度是比较适度的。

3.3 漂洗

无论是探针杂交后的漂洗还是抗体孵育后的漂洗,都可以有效的降低显色背景。因此,在探针杂交后和抗体孵育后都需要充分的漂洗。另外,可

通过延长 1 h 溶液 1 的漂洗以降低背景,同时在抗体漂洗后,将胚胎置于 MABT 4 °C 过夜,然后在显色前漂洗 1 h, 2 次,此步尤其适合 E10 的胚胎。另外,杂交后使用 RNase A 充分降解未杂交的 RNA 探针也是降低背景信号的有效方法之一。

参考文献 (References):

- [1] BUTLER K, ZORN A M, GURDON J B, *et al.* Nonradioactive *in situ* hybridization to *Xenopus* tissue sections[J]. *Methods*, 2001, 23(4): 303-312.
- [2] BARRY R, BEDDINGTON R. Whole-mount *in situ* hybridization to mouse embryos: gene expression in three dimensions[J]. *TIG*, 1993, 9(5): 162-167.
- [3] NEIDHARDT L, GASCA S, HERRMANN B G, *et al.* Large-scale screen for genes controlling mammalian embryogenesis, using high-throughput gene expression analysis in mouse embryos[J]. *Mech Dev*, 2000, 98(1-2): 77-94.
- [4] LIU Yu-ru, BRIGID L, HOGAN M, *et al.* Differential gene expression in the distal tip endoderm of the embryonic mouse lung[J]. *Gene Expression Patterns*, 2002, 2: 229-233.
- [5] REBECCA Q, BEATE W. Large-scale expression screening by automated whole-mount *in situ* hybridization[J]. *Mech Dev*, 2004, 121: 971-976.
- [6] BRADLEY R E. *A Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development*[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1986, 475-508.
- [7] SHEN M M. Identification of differentially expressed genes in mouse development using differential display and *in situ* hybridization[J]. *Methods*, 2001, 24: 15-27.
- [8] NICOLAS P H. *In situ* analysis of gene expression in *Xenopus* embryos[J]. *C R Biologies*, 2003, 326: 1011-1017.
- [9] ANDREA S, STERN C D. Combined whole-mount *in situ* hybridization and immunohistochemistry in avian embryos[J]. *Methods*, 2001, 23: 339-344.
- [10] CORREIA K M, CONLON R A. Whole-mount *in situ* hybridization to mouse embryos[J]. *Methods*, 2001, 23(4): 335-338.
- [11] BRONNER F M. Neural crest cell formation and migration in the developing embryo[J]. *Fed Am Soc Exp Bio*, 1994, (8): 699-706.
- [12] OSUMI-YAMASHITA N, NINOMIYA Y, DOI H, *et al.* The contribution of both forebrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos[J]. *Dev Biol*, 1994, 164: 409-419.
- [13] SERBEDZIJA G N, BRONNER-FRASER M. Vital dye analysis of cranial neural crest cell migration of the hindbrain neural crest does not arise from its segmental generation[J]. *Development*, 1992, 116: 297-307.