

优化整体原位杂交方法检测基因在幼鼠大脑中的表达

刘安军 麻献华 杨 瑞 章卫平 谢志芳

摘要 **目的** 优化整体原位杂交方法,用于检测基因在幼鼠大脑中的时空表达分布。**方法** 通过摸索最佳蛋白酶 K 的消化时间,改良杂交缓冲液成分,并延长杂交时间和漂洗时间,对整体原位杂交方法进行优化,并用优化的方法检测了 Cdh6、Bhlhb5 和 Lmo4 mRNA 在出生后 7 天的小鼠大脑中的整体表达分布。**结果** 采用优化的整体原位杂交方法成功地检测了 3 种 mRNA 在幼鼠全脑的区域性表达特征,特异性杂交信号强,非特异性背景低。**结论** 成功优化了幼鼠全脑原位杂交方法,为开展后续的研究打下基础。

关键词 整体原位杂交 小鼠 大脑 基因表达

中图分类号 R34

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.05.012

Detection of mRNA Expression on Postnatal Mouse Brains by Optimized Whole Mount in situ Hybridization. Liu Anjun, Ma Xianhua, Yang Rui, et al. College of Basic Medical Sciences, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To optimize whole mount in situ hybridization protocol for detecting mRNA expression on postnatal mouse brains. **Methods** Critical steps of whole mount in situ hybridization were optimized including proteinase K digestion time, composition of hybridization buffer as well as durations of incubation and washing steps. The mRNA expression of Cdh6, Bhlhb5 and Lmo4 was detected on brains from postnatal 7 days mice using the modified whole mount in situ hybridization protocol. **Results** By using the optimized whole mount in situ hybridization protocol, mRNA expression patterns of Cdh6, Bhlhb5 and Lmo4 were successfully detected on mouse brains, with great specificity and low background signal. **Conclusion** The optimized whole mount in situ hybridization protocol can be used for large-size organs such as postnatal mouse brains.

Key words Whole mount in situ hybridization; Mouse; Brain; Gene expression

整体原位杂交(whole mount in situ hybridization)是运用 cRNA 或寡核苷酸等探针检测完整组织中 mRNA 表达的一种技术。该技术方法的最大优势是在保留器官甚至整个个体结构基本完整的基础上,从整体上观察 mRNA 表达的时空分布特征^[1]。而在组织切片上进行的原位杂交虽然具有更高的敏感度,但只能观察某个特定切面上的分子表达,因此具有一定的局限性^[2]。整体原位杂交特别适用于研究小动物胚胎发育早期的整体分子表达特征,这是由于胚胎发育早期组织结构相对松散,而且个体和器官体积较小,有利于探针和抗体的渗透^[3, 4]。但对于胚胎发育晚期的较大胚胎及出生后的小动物器官,由于组织结构致密度增加,而且体积较大,影响了探针和抗体的渗透以及杂交后的洗脱过程,因此不容易成功。

哺乳动物的大脑皮质在水平方向上可以分为几个功能不同的区,如躯体运动区,躯体感觉区,视觉皮质区和听觉皮质区等。每个机能区的神经元表达一些区特异性分子^[5, 6]。如 Cdh6 (cadherin - 6)、Bhlhb5 (class B basic - helix - loop - helix transcription factor 5)表达于出生后小鼠的躯体感觉区域、视觉皮质区和听觉皮质区,而不表达于躯体运动区域^[7, 8]。而 Lmo4 (lim domain only 4)的表达特征则正好相反,即强表达于 P7 (出生后 7 天)小鼠大脑的躯体运动区,但不表达于躯体感觉区,视觉皮质区有微弱表达^[9]。大脑皮质的水平分区发育虽然从胚胎早期就已经开始,但一直到出生后的一段时间内会受到多种因素的调节,最后才会形成成熟的分区特征。因此为了研究皮质分区发育的分子机制,有必要建立出生后幼鼠大脑整体原位杂交方法。为了克服出生后小鼠大脑体积较大,探针和抗体不易渗透的困难,本研究通过摸索蛋白酶 K 最佳消化时间、调整杂交缓冲液成分;并适当延长杂交和漂洗时间,成功优化了幼鼠大脑整体原位杂交方法,为后续的研究打下基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31470759, 31270814)

作者单位:200433 上海,中国人民解放军第二军医大学基础部(刘安军、麻献华、杨瑞、章卫平、谢志芳);250031 中国人民解放军济南军区总医院麻醉科(刘安军)

通讯作者:谢志芳,电子邮箱: xiezf@smmu.edu.cn

材料与方法

1. cRNA 探针的制备:根据 *Cdh6* 基因的 cDNA 序列分别设计 PCR 引物(上下游引物分别为 5' - acaccccggttccccagagta - 3', 5' - accgccaccttctgtgtgtaa - 3')。以幼鼠大脑 cDNA 为模板对目的片段进行 PCR 扩增。将得到的目的片段与 T 载体进行连接后转化,挑取重组克隆进行酶切鉴定。将鉴定正确的重组质粒送上海杰李公司测序。*Bhlhb5* 和 *Lmo4* 的重组质粒由同济大学丁玉强教授实验室提供。用 PCR 方法将测序正确的目的片段扩增,采用地高辛标记系统体外转录出 cRNA,经乙醇沉淀纯化后获得 cRNA - 地高辛探针。

2. 全脑标本的获取:取 P7 的 FVB 品系小鼠 5 ~ 8 只,4% 多聚甲醛(pH 9.0)灌注后分离完整的大脑标本,继续 4℃ 固定过夜。次日用 PBS(磷酸盐缓冲液)漂洗 3 遍后,用梯度甲醇(25%、50%、75%、100%)脱水,每次 20min,最后保存在 - 20℃ 的 100% 甲醇中。

3. 水化及漂白:将上述全脑标本从高浓度甲醇中逐步水化至 PBST(含 0.1% Tween - 20 的 PBS),每次 20min,用尖镊或针头在大脑腹侧刺 3 个小孔,在 6% H_2O_2 /PBST 中室温孵育 1h,注意保持大脑腹侧面向上,以便漂白过程中产生的气泡可以经小孔中溢出。

4. 蛋白酶 K 消化时间的优化:在 37℃ 下用 20μg/ml 蛋白酶 K(PBST 配制)消化,设置了 3 种不同的消化时间,分别为 30、45 和 60min,注意使标本静置勿摇动以保持结构的完整性。消化后的大脑用 4% 多聚甲醛/0.2% 戊二醛在 4℃ 固定 20min。

5. 预杂交和杂交:对杂交缓冲液配方进行改进,在通用配方的基础上添加了 5% 葡聚糖硫酸酯钠盐(Dextran Sulfate sodium, Sigma D8906)。改良后的杂交缓冲液含 50% 甲酰胺、5% 葡聚糖硫酸酯钠盐、1.3 × SSC(pH 7.5)、5mmol/L EDTA、2% Tween - 20、0.5% CHAPS、50μg/ml 变性鲑鱼精 DNA、100mg/ml 肝素钠。将大脑在 70℃ 的杂交缓冲液中预孵育 1h(在杂交炉内进行,缓慢旋转),然后加入相应的 cRNA - 地高辛探针(终浓度为 200ng/ml),70℃ 孵育 48h。

6. 杂交后的洗脱:大脑先用 70℃ 的杂交缓冲液漂洗 30min × 2 次,再分别用杂交缓冲液/TST(1:1)和 TST 缓冲液(含 0.5mol/L NaCl,0.01mol/L Tris HCl pH 7.5,0.1% Tween - 20)室温漂洗 10min × 2

次。接着用 100μg/ml RNase A(TST 配制)37℃ 孵育 1h。经 TST 漂洗 10min 后,再用 65℃ 杂交缓冲液漂洗 1h × 2 次。用杂交缓冲液/MABT(1:1)和 MABT(含 100mmol/L 马来酸,150mmol/L NaCl,0.1% Tween - 20,pH 7.5)在室温下各漂洗 10min,而后继续在 MABT 中漂洗 1h。

7. 抗体孵育:将大脑在室温下用 10% 羊血清(MABT 配制)封闭 1h 后,移入含碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体(1:4000 稀释,Roche)的 MABT 中 4℃ 孵育过夜。次日用 MABT 漂洗 1h × 5 次,并在 4℃ 下继续漂洗 3 天,漂洗时样品一直处于缓慢摇动中。

8. 显色:将样品在显色缓冲液(含 100mmol/L Tris HCl pH 9.5,50mmol/L $MgCl_2$,100mmol/L NaCl,0.1% Tween - 20)中室温漂洗 20min × 2 次,用 NBT - BCIP 显色液(1:100 稀释,Roche)室温显色 30min ~ 2h。待显色足够深后以 PBST 漂洗 10min × 3 次终止反应。

9. 组织透明:室温下依次以 PBST/甲醇(1:1)、甲醇/甲醇/BABB(1:1)和 BABB(含 33% 苯甲醇,66% 苯甲酸苄酯)漂洗 1h,继续在 BABB 中漂洗直到非特异显色区域变得透亮。然后再依次用甲醇/BABB(1:1)、甲醇/PBST/甲醇(1:1)、PBST 漂洗各 10min × 3 次,用 4% 多聚甲醛 4℃ 固定过夜,储存在 80% 甘油(用 PBS 配制)中。最后在解剖显微镜下观察结果。

结 果

1. cRNA 探针的制备:以测序正确的重组质粒为模板,对含有目的基因片段及两端的 SP6 和 T7 启动子接头进行 PCR 扩增,电泳结果显示,得到的 PCR 产物与 *Cdh6*、*Bhlhb5* 和 *Lmo4* 的目的片段大小相符(图 1)。将得到的 PCR 产物纯化后进行体外转录出相应的地高辛标记的 cRNA 探针,可得到约 15μg 的 cRNA。

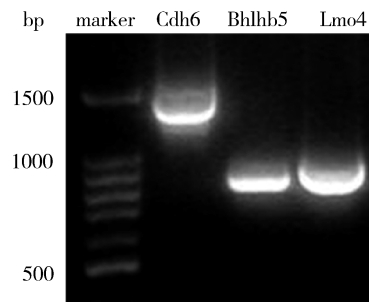


图 1 重组质粒目标片段 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

2. 蛋白酶 K 消化时间对整体原位杂交信号及大脑结构完整性的影响: 笔者先用 *Cdh6* 的 cRNA 探针, 结果发现消化 30min 的幼鼠大脑结构完整, 但未见明显的特异性显色, 延长显色时间后导致整个组织呈现蓝色背景显色 (图 2A)。而蛋白酶 K 消化 45min 的大脑表面可见 *Cad6* mRNA 特异性地表达于大脑躯体感觉区, 视觉

皮质区和听觉皮质区, 而躯体运动区未见明显显色, 这种表达特征与文献报道一致^[7], 同时大脑组织结构完整性好 (图 2B)。蛋白酶 K 消化 60min 的大脑也呈现出类似的特异性显色, 但大脑表面出现许多空白斑块, 提示消化过度引起组织结构破坏, 导致局部 mRNA 丢失 (图 2C)。上述结果显示 P7 小鼠大脑的最佳消化时间为 45min。

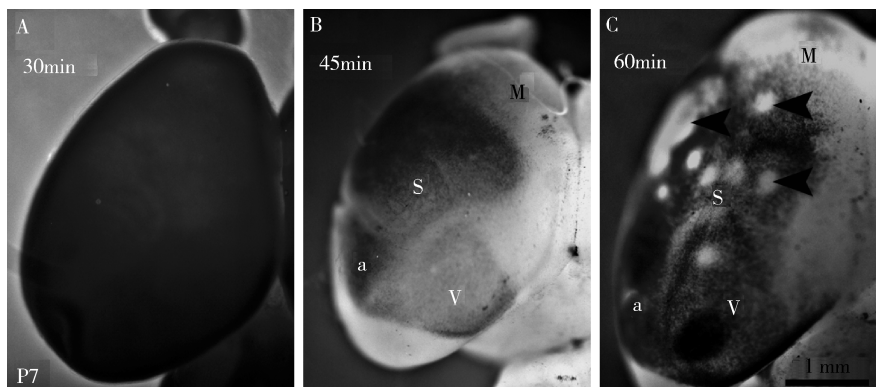


图2 蛋白酶 K 消化时间对整体原位杂交信号及小鼠大脑组织结构的影响

A. 消化 30min; B. 消化 45min; C. 消化 60min; 黑色箭头指示组织和信号斑块状缺损。a. 听觉皮质; M. 运动皮质; V. 视觉皮质; S. 躯体感觉区

3. 整体原位杂交检测 *Bhlhb5* 和 *Lmo4* 在 P7 小鼠大脑中的表达。为了进一步验证经优化的整体原位杂交的可靠性, 笔者又检测了另外两种分子在大脑皮质的表达。结果表明 *Bhlhb5* mRNA 高表达于大脑躯体感觉区, 视觉皮质区和听觉皮质区, 而躯体运动区未见阳性显色 (图 3), 其表达特征与文献报道一致^[7]。 *Lmo4* mRNA 高表达于 P7 小鼠大脑的运动区和听觉皮质区, 但不表达于躯体感觉区, 视觉皮质区有极微弱的表达, 其表达特征也与文献报道一致^[9]。整体显色阳性信号强, 背景低 (图 3)。

调整杂交缓冲液成分, 成功优化了幼鼠大脑整体原位杂交方法。实验成功的关键主要与以下几个因素相关。

首先, 适当的蛋白酶 K 消化时间至关重要。由于出生后 7 天的鼠脑体积较大, 而且组织结构变得致密, 影响探针及抗体的渗透, 因此就必须用蛋白酶 K 进行适当消化, 去除部分细胞间和细胞内的蛋白成分, 以利于试剂的有效渗透。但同时又必须保持组织结构和 mRNA 的完整性, 不能消化过度。蛋白酶 K 消化的效果除与酶浓度密切相关外, 还与温度和分子的运动相关。笔者选择在酶的最佳工作温度 37℃ 条件下进行消化, 这样既可以提高酶的工作效率又能使得实验条件更稳定。同时, 在消化过程中让组织始终保持静置状态, 使得消化由浅入深逐渐进行。消化后的组织会变得非常柔软和脆弱, 震荡或轻微的外力作用会导致组织的完整性遭到破坏。因此在消化结束后组织再次固定前避免震荡或摇晃组织。

其次, 笔者对杂交缓冲液的配方进行了改进, 在整体原位杂交的常规杂交缓冲液中加入 5% 葡聚糖硫酸酯钠盐。葡聚糖硫酸酯是一种高分子物质, 在核酸杂交过程中常被当作促进剂, 可以提高有效的探针浓度, 从而缩短探针退火所需的时间。人们常在针对组织切片的原位杂交缓冲液体系中应用该分子, 常

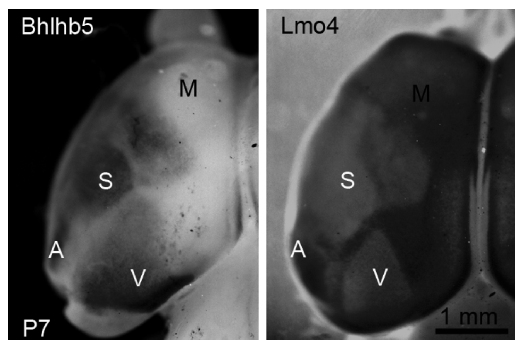


图3 优化的整体原位杂交检测 *Bhlhb5* 和 *Lmo4* mRNA 在 P7 小鼠大脑中的表达

A. 听觉皮质; M. 运动皮质; V. 视觉皮质; S. 躯体感觉区

讨 论

本研究主要通过摸索最佳蛋白酶 K 消化时间、

规使用浓度为 10% ,以提高杂交速率^[10]。而整体原位杂交中很少有人应用葡聚糖硫酸酯,因为该分子容易造成不同程度的背景染色^[11]。笔者在预实验中发现,加入低浓度的葡聚糖硫酸酯钠盐并不会增加背景,但可以大大提高特异性的杂交信号强度。

最后,考虑到样品体积大,笔者延长了杂交时间和漂洗时间,有效提高了阳性信号同时降低了非特异性背景染色,取得了较好的实验效果。

致谢:感谢法国 Institute of Biology of Valrose Studer 实验室的 Christian Alfano 博士为本实验提供了详细的整体原位杂交方法,本实验是在她提供的方法基础上进一步优化而建立的。感谢同济大学丁玉强教授和张磊博士为本实验提供部分质粒。

参考文献

- 1 Puschel B, Jouneau A. Whole - mount in situ hybridization to assess advancement of development and embryo morphology [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1222: 255 - 265
- 2 Asp J, Abramsson A, Betsholtz C. Nonradioactive in situ hybridization on frozen sections and whole mounts [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 326: 89 - 102
- 3 Shimizu H, Uchibe K, Asahara H. Large - scale whole mount in situ hybridization of mouse embryos [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 577: 167 - 179
- 4 Wei Q, Manley NR, Condie BG. Whole mount in situ hybridization of

- E8.5 to E11.5 mouse embryos [J]. *J Vis Exp*, 2011, 56: 2797
- 5 Caronia - Brown G, Yoshida M, Gulden F, *et al.* The cortical hem regulates the size and patterning of neocortex [J]. *Development*, 2014, 141(14): 2855 - 2865
- 6 Bishop KM, Rubenstein JL, O'Leary DD. Distinct actions of Emx1, Emx2, and Pax6 in regulating the specification of areas in the developing neocortex [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(17): 7627 - 7638
- 7 Alfano C, Magrinelli E, Harb K, *et al.* Postmitotic control of sensory area specification during neocortical development [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 6632
- 8 Joshi PS, Molyneaux BJ, Feng L, *et al.* Bhlhb5 regulates the postmitotic acquisition of area identities in layers II - V of the developing neocortex [J]. *Neuron*, 2008, 60(2): 258 - 272
- 9 Cederquist GY, Azim E, Shnyder SJ, *et al.* Lmo4 establishes rostral motor cortex projection neuron subtype diversity [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(15): 6321 - 6332
- 10 van Gijlswijk RP, Wiegant J, Raap AK, *et al.* Improved localization of fluorescent tyramides for fluorescence in situ hybridization using dextran sulfate and polyvinyl alcohol [J]. *J Histochem Cytochem*, 1996, 44(4): 389 - 392
- 11 Lauter G, Soll I, Hauptmann G. Hauptmann, Sensitive whole - mount fluorescent in situ hybridization in zebrafish using enhanced tyramide signal amplification [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1082: 175 - 185

(收稿日期:2015 - 12 - 01)

(修回日期:2015 - 12 - 14)

CXCR4 基因沉默对黑色素瘤侵袭和转移影响的实验研究

吴包金 李文鹏 丁 伟 周兆平 周仲文 顾小叶 江 华

摘 要 **目的** 探讨 CXCR4 基因沉默对黑色素瘤侵袭及转移的影响及可能机制。**方法** 设计合成 CXCR4 特异性短发夹状 RNA(shRNA)插入 pSilencer 载体,转染人高转移性黑色素瘤细胞株 MV3、RT - PCR 和 Western blot 法检测 shRNA 对靶基因 CXCR4 表达的影响。利用 Transwell 小室模型检测细胞体外侵袭能力,MTT 法检测细胞体外增殖能力。通过裸鼠尾静脉瘤细胞注射,将转染后的细胞接种至裸鼠皮下,构建黑色素瘤转移模型,观察肿瘤生长情况。**结果** CXCR4 - shRNA 能有效下调 CXCR4 基因的表达,降低黑色素瘤细胞增殖、体外侵袭及转移能力。RT - PCR 及细胞免疫荧光显示,转染 CXCR4 - shRNA 的黑色素瘤 MV3 细胞系 MMP - 2 表达下调;免疫组化结果显示,实验组裸鼠黑色素瘤瘤体及转移灶组织 MMP - 2 的表达低于对照组。**结论** shRNA 介导的 CXCR4 基因沉默在体外实验能够显著抑制黑色素瘤细胞的生长和增殖活性,减弱体外侵袭能力,且体外产生抑瘤效应,明显降低肝、脑器官转移能力和定向肺转移能力。其机制可能与 SDF - 1/CXCR4 信号途径阻断,进而抑制 MMP - 2

基金项目:上海市卫生局科研课题(20114211)

作者单位:200040 上海,复旦大学附属华山医院整形外科(吴包金、丁伟、周兆平、江华);浙江大学医学院附属第二医院整形外科(李文鹏);复旦大学附属华山医院病理科(周仲文),中心实验室(顾小叶);第二军医大学附属长征医院整形外科(江华)

通讯作者:江华,电子信箱:jianghua_smmu@126.com;吴包金,电子信箱:wubaojin@126.com