

## 研究报告

## 原位杂交检测大鼠前庭代偿中 GAP-43 mRNA 水平

余瑞元 牟晓东 王燕峰 孙久荣 徐长法

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

**摘要** 用 DIG 标记的 GAP-43 cDNA 为探针, 以大鼠海马切片作阳性对照, 使用原位杂交方法检测了大鼠迷路损毁 5、12、20 和 30 d 后前庭核区 GAP-43 mRNA 水平的变化。结果表明, 迷路损毁后前庭核区 mRNA 水平升高。原位杂交的应用, 为前庭代偿中轴突发芽, 突触重组的神经可塑性研究打下了方法学基础。

**关键词** 原位杂交, GAP-43cDNA, 地高辛 (DIG), 海马切片, 前庭代偿

**学科分类号** Q522

原位杂交 (*in situ* hybridization, ISH) 的方法, 是利用核酸分子间互补结合的性质, 通过标记探针与生物组织内某些特定的核酸在切片上进行杂交, 从而将储存或传递遗传信息的 DNA 或 mRNA 变为可视化的一种手段<sup>[1]</sup>。目前, 在国际上的神经科学研究领域中, ISH 方法已逐步得到广泛应用, 在我国, 对此方法虽有文献介绍, 但是, 以此研究脑损伤后的修复和中枢神经系统可塑性的报道实属罕见。本文采用对神经再生和突触重组起重要作用的生长相关蛋白 GAP-43 (growth associated protein 43) 的 cDNA 作探针, 用 DIG (digoxigenin) 为标记物, 应用原位杂交方法, 检测了正常大鼠脑组织海马切片及大鼠迷路损毁 5、12、20 和 30 d 后的前庭核区 GAP-43 mRNA 水平的变化, 为前庭代偿中轴突发芽和突触重组的神经可塑性研究打下了方法学基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及分组

雄性 Wistar 大鼠, 体重约 200 g。做海马切片大鼠 8 只, 4 只为阴性对照组, 4 只为实验组; 做迷路损毁术大鼠 36 只, 分正常组, 假手术组, 单侧迷路损毁 5、12、20 和 30 d GAP-43 mRNA 水平测试组, 每组 6 只。

### 1.2 主要试剂和仪器

携带 GAP-43 cDNA (1.15 kb) 的质粒载体 pGB<sup>0</sup>, 由 Joost Verhaagen 惠赠; DIG DNA 标记及检测试剂盒, 德国 Boehringer 公司产品; 限制性内切酶 *EcoR* I、溶菌酶、无 DNA 的 RNase A、蛋白酶 K 和大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段

(简称 Klenow 酶), 分别为美国 Promega、Sigma、Merck 公司和国内华美生物工程公司产品; 鲑精 DNA、牛血清清蛋白、显色底物 (NBT 和 BCIP)、焦碳酸二乙酯 (DEPC)、葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、马来酸和去离子甲酰胺等试剂均为 Sigma 公司产品。

Bright 冰冻切片机 (英国) 和 Univar 光密度扫描仪 (葡萄牙)。

### 1.3 迷路损毁术

腹腔注射戊巴比妥钠麻醉动物, 剪除左侧耳根部鼠毛, 碘酒和酒精消毒后在耳根部切开皮肤 2~3 cm, 钝性分离暴露听泡, 骨钳去除听泡的腹后侧壁, 暴露内耳, 注入 0.6 ml 无水乙醇, 明胶海绵止血后, 缝合肌肉和皮肤。术后注射青霉素  $4 \times 10^4$  U。假手术组在去掉听泡腹后侧壁后即缝合。

### 1.4 脑切片制作

参照文献 [2] 的方法进行。

### 1.5 原位杂交

方法参照文献 [3, 4]。

#### 1.5.1 探针标记

GAP-43 cDNA 片段的获得: 用 *EcoR* I 酶切 pGB<sup>0</sup>, 通过琼脂糖凝胶电泳方法获取 1.15 kb 的 cDNA 片段作探针。

标记反应: 将上述取得的探针溶于 pH 8.0 的 TE 中, 浓度约为 0.1 mg/L。取 15  $\mu$ l 未标记探针溶液, 沸水浴煮 5 min 后, 以冰浴冷却 5 min。依次加入 2  $\mu$ l 六聚寡核苷酸的随机引物, 2  $\mu$ l DIG 标记的 dNTP 底物和 1  $\mu$ l (10 U/ $\mu$ l) Klenow 酶溶液,

混匀, 37℃温育 24 h. 最后加 2 μl 0.2 mol/L pH 8.0 的 EDTA 终止反应.

探针回收: 向标记反应液加入 2.5 μl 4 mol/L LiCl, 混匀, 再加入 75 μl - 20℃无水乙醇, 混匀, - 70℃放置 30 min 以上, 4℃下 12 000 r/min 离心 15 min, 去上清. 用 4℃70% 乙醇洗涤沉淀, 真空干燥后溶于 100 μl DEPC 处理过的重蒸水中, - 20℃保存.

**1.5.2 标记探针含量的检测:** 取少许 DIG 标记的标准品和标记探针, 用重蒸水依次进行 1/20、1/40、1/80、1/160、1/320 和 1/640 稀释, 取以上不同稀释度的标准品与探针各 1 μl, 分别在硝酸纤维素膜上点样, 80℃烘烤 30 min 至 2 h. 缓冲液 1 (0.1 mol/L 马来酸, 0.15 mol/L NaCl, 用 NaOH 调至 pH 7.5) 浸泡 1 min, 缓冲液 2 (Boehringer 公司的封阻试剂按 1% 浓度溶解于缓冲液 1, 小份分装, 灭菌后 4℃保存) 封闭 15 min. 以 1:5 000 稀释后的 DIG-AP 复合物室温下温育硝酸纤维素膜 1 h, 不时轻摇. 缓冲液 1 洗涤 15 min, 如是两次, 缓冲液 3 (0.1 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 用 NaOH 调至 pH 9.5) 平衡 5 min, 加入 1/2 倍体积的显色液, 避光静置反应, 30 min 后可见显色斑点. 显色适度时去除显色液, 重蒸水洗膜两次后于 pH 8.0 TE 中浸泡 10 min 以上. 肉眼比较标准品和探针显色点的颜色后, 再依据稀释倍数折算出标记探针的含量 (DIG 标记标准品的含量是已知的).

**1.5.3 杂交:** 将制作好的脑切片按下列程序处理. TBS 浸泡 5 min, 0.2 mol/L HCl 浸泡 10 min, 再 TBS 浸泡 3 min. 乙酸酐溶液浸泡 20 min, TBS 浸泡 3 min. 于蛋白酶 K 溶液中 37℃温育消化 30 min, TBS 洗 5 min, 如是两次, 2×SSC 平衡 5 min. 以 0.5 mg/L 的比例向缓冲杂交液加入新变性的探针, 脑切片在含探针溶液中 37℃温育过夜. 2×SSC 洗片 15 min, 如是两次. 缓冲液 1 平衡 5 min, 缓冲液 2 室温下封闭 30 min, 不时轻摇. 缓冲液 1 洗涤 15 min, 如是两次. 缓冲液 3 平衡 5 min. 加显色液, 避光静置反应 6~10 h. 显色适宜时去除显色液. 用重蒸水洗片两次, 再 TE 浸泡 10 min 以上. 晾干, 树胶封片.

## 2 结 果

### 2.1 标记探针含量的检测

检测标记探针含量的结果如图 1 所示, A、B

两行是标准品, 其含量为 5.2 mg/L, C、D 两行是标记探针. 由肉眼观察比较, B 行 1 和 D 行 3 的点显色深浅程度一致, 由此经过折算知, 标记探针含量是标准品含量的 4 倍, 约 20 mg/L.

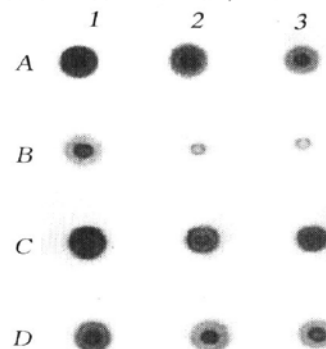


图 1 标记探针含量的检测

A、B: 标准品; C、D: 标记探针. A、C (1~3): 1/20、1/40、1/80 稀释; B、D (1~3): 1/160、1/320、1/640 稀释.

### 2.2 正常大鼠海马区切片杂交显色结果

以海马区切片作为 ISH 方法建立的参照, 结果表明, 阳性实验海马区着色明显, 见图 2a, 说明该脑区相应部位细胞中 GAP-43 mRNA 水平较高, 与文献报道的结果相一致<sup>[5~7]</sup>. 在阴性对照实验中: a. 脑切片经 RNA 酶 A 处理的对照中, 海

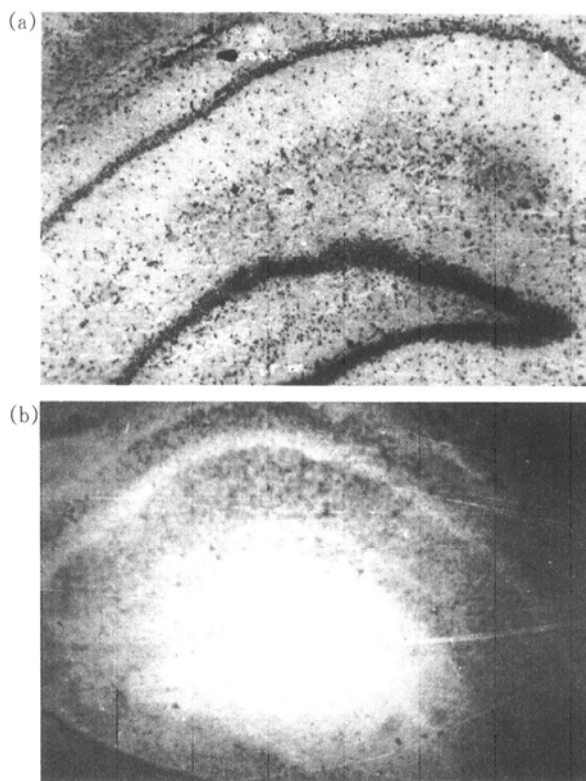


图 2 正常大鼠海马切片原位杂交显色结果

(a) 阳性实验结果; (b) RNaseA 处理后的阴性实验结果.

马区仅有微弱显色, 见图 2b, 这说明经酶消化后, GAP-43 mRNA 水平明显降低, 证明阳性实验片中的显色, 确实是由于探针与 GAP-43 mRNA 特异结合所致; b. 无探针的对照中, 海马区几乎没有任何显色, 证明 DIG-AP 复合物对组织切片的非特异性结合极弱; c. 无抗 DIG-AP 复合物的对照中, 海马区也几乎没有任何显色, 证明内源性碱性磷酸酶的影响极小, 可忽略不计. b. 和 c. 的阴性对照实验结果均未示出照片.

### 2.3 ISH 方法检测大鼠前庭代偿中核区 GAP-43 mRNA 水平的变化

前庭代偿中前庭核区切片原位杂交显色差异和相对光密度扫描定量结果见图 3 和表 1, 图 3 和表

1 中 L 和 R 分别代表前庭核区的左侧和右侧, 图 3 只给出左侧显色照片. 由图 3 和表 1 可见, 正常组 (Nor) 前庭核区内 GAP-43 mRNA 水平很低, 假手术组 (Sham) GAP-43 mRNA 水平比正常组的高, 与假手术组相比, 术后 5 d 组 GAP-43 mRNA 水平有明显升高, 约为假手术组的 2 倍, 术后 12 d 组的水平达到最高值, 约为假手术组的 3 倍, 术后 20 d 组的水平仍高于假手术组, 30 d 后 GAP-43 mRNA 水平与正常组趋平.

利用 ISH 方法, 检测了迷路损毁不同天数后前庭核区 GAP-43 mRNA 水平的变化趋势, 为研究前庭代偿中, GAP-43 mRNA 水平与轴突发芽、突触重组的神经可塑性关系提供了极为有用的资料.

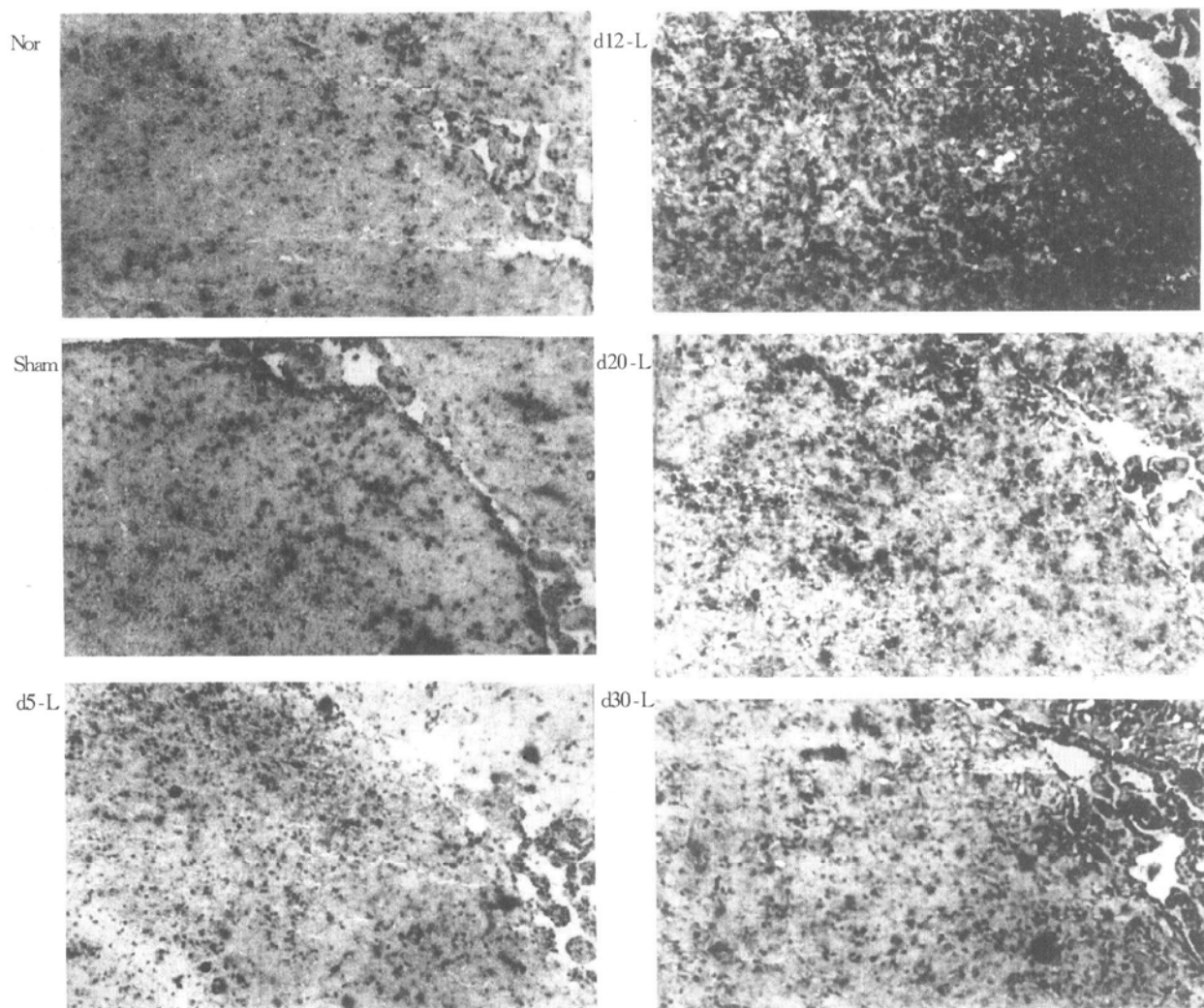


图 3 大鼠前庭代偿中前庭核区 GAP-43 mRNA 的水平变化

表 1 前庭代偿中大鼠前庭核区 GAP-43 mRNA 杂交着色后的相对光密度值

| 大鼠组别 | 正常动物 | 假手术动物 | d5-L | d5-R | d12-L | d12-R | d20-L | d20-R | d30-L | d30-R |
|------|------|-------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1    | 2.31 | 3.36  | 8.66 | 7.66 | 10.09 | 9.61  | 4.92  | 4.15  | 3.53  | 4.12  |
| 2    | 3.24 | 3.25  | 8.51 | 6.86 | 8.70  | 10.03 | 4.58  | 6.57  | 3.32  | 3.92  |
| 3    | 2.91 | 3.84  | 5.23 | 6.84 | 12.99 | 10.08 | 4.59  | 4.26  | 3.15  | 3.37  |
| 4    | 2.81 | 3.46  | 5.72 | 6.57 | 9.05  | 8.77  | 4.27  | 4.57  | 3.86  | 3.50  |
| 5    | 3.05 | 4.03  | 4.85 | 5.01 | 10.98 | 9.67  | 3.70  | 4.06  | 4.05  | 3.78  |
| 6    | 2.69 | 3.98  | 7.60 | 7.34 | 8.96  | 8.55  | 5.03  | 4.38  | 3.52  | 3.74  |
| 7    |      |       | 6.10 | 5.96 | 7.65  | 7.24  | 3.95  | 3.71  | 3.61  | 2.93  |
| 8    |      |       | 6.51 | 6.60 | 7.09  | 8.43  | 4.45  | 4.62  | 3.08  | 3.39  |
| 平均值  | 2.84 | 3.65  | 6.65 | 6.61 | 9.44  | 9.05  | 4.44  | 4.54  | 3.52  | 3.59  |
| SD   | 0.32 | 0.34  | 1.46 | 0.82 | 1.89  | 0.98  | 0.45  | 0.87  | 0.33  | 0.37  |

### 3 讨 论

在 ISH 中, 探针标记方法的选择主要依据靶分子是染色体 DNA 还是 mRNA 及其丰度如何而定. 本工作的靶标分子是 GAP-43mRNA, 丰度较高, 所以选择随机引物法标记探针是合适的. 这种方法是以前 cDNA 为模板, 随机六聚寡核苷酸作引物, 加标记 dNTP 底物, 用 Klenow 酶延伸合成, 所得到的探针是一组长短不一的互补双链 DNA. 这种探针价廉易得, 对组织切片处理和杂交条件的要求都较宽松. 但由于它是双链探针, 在杂交时存在退火问题, 所以利用率还有待提高. 目前, 常用的探针标记物有同位素、生物素和 DIG 等<sup>[8,9]</sup>, 本研究采用后者. DIG 标记物相对于同位素而言, 它安全卫生, 还避免了曝光所需时间较长的缺点; 相对于生物素而言, 它不存在组织切片内源性信号的干扰.

在本工作中, 前庭核区显色本底略偏高, 这对获取更细微的信息是有妨碍的, 原因可能是所采用的探针存在局限性. 为了提高方法的灵敏度, 我们正在合成 3' 端被 DIG 标记、长度为 48 bp 的寡聚脱氧核苷酸探针, 使它与 mRNA 起始密码子 ATG 的 A 之后 48 bp 的序列互补. 这种探针, 由于较短而容易渗入组织切片与 GAP-43 mRNA 结合, 具有良好的特异性<sup>[10]</sup>. 此外, 未结合上组织切片的探针因其短而较容易被洗净, 可望得到信号更清晰的显色结果. 这种灵敏度和特异性都较高的方法, 在其他类型的脑损伤后修复及中枢神经可塑性研究中, 会有广泛的应用前景.

### 参 考 文 献

1 Harrison P J, Pearson R C A. *In situ* hybridization histochemistry and the study of gene expression in the human brain. *Progress in Neurobiology*, 1990, **34** (4): 271~ 311

2 Casoli T, Spagna C, Fattoretti P, *et al.* Neuronal plasticity in aging: a quantitative immunohistochemical study of GAP-43 distribution in discrete regions of the rat brain. *Brain Res*, 1996, **714** (1~ 2): 111~ 117

3 Vaudano E, Campbell G, Anderson P N, *et al.* The effects of a lesion or a peripheral neural graft on GAP-43 upregulation in the adult rat brain: an *in situ* hybridization and immunocytochemical study. *J Neuroscience*, 1995, **15** (5): 3594~ 3611

4 Bendotti C, Baldessari S, Pende M, *et al.* Relationship between GAP-43 expression in the dentate gyrus and synaptic reorganization of hippocampal mossy fibres in rats treated with kainic acid. *Eur J Neurosci*, 1997, **9** (1): 93~ 101

5 Benowitz L I, Apostolides P J, Perrone-Bizzozero N, *et al.* Anatomical distribution of the growth-associated protein GAP-43/B-50 in the adult rat brain. *J Neuroscience*, 1988, **8** (1): 339~ 352

6 Neve R L, Finch E A, Bird E D, *et al.* Growth-associated protein GAP-43 is expressed selectively in associative regions of the adult human brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85** (10): 3638~ 3642

7 Kruger L, Bendotti C, Rivolta R, *et al.* GAP-43 mRNA localization in the rat hippocampus CA3 field. *Mol Brain Res*, 1992, **13** (3): 267~ 272

8 Kiyama H, Emson P C, Tohyama M. Recent progress in the use of the technique of nonradioactive *in situ* hybridization histochemistry, new tool for molecular neurobiology. *Neuroscience Res*, 1990, **9** (1): 1~ 21

9 Sans N, Moniot B, Raymond J. Distribution of calretinin mRNA in the vestibular nuclei of rat and guinea pig and the effects of unilateral labyrinthectomy: a non-radioactive *in situ* hybridization study. *Molecular Brain Research*, 1995, **28** (1): 1~ 11

10 Elmer E, Kokaia M, Kokaia Z, *et al.* Delayed kindling development after rapidly recurring seizures: relation to mossy fiber sprouting and neurotrophin, GAP-43 and dynorphin gene expression. *Brain Res*, 1996, **712** (1): 19~ 34

**Checking GAP-43 mRNA Levels of the Vestibular Nucleus in the Rat Vestibular Compensation by *in situ* Hybridization Method.** YU Rui-Yuan, MU Xiao-Dong, WANG Yan-Feng, SUN Jiu-Rong, XU Chang-Fa (College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China).

**Abstract** Using DIG (digoxigenin) labeled GAP-43 cDNA as probe, the *in situ* hybridization method

(ISHM) was set up with rat hippocampus slides as positive controls. The change of GAP-43 mRNA levels in the vestibular nucleus area were investigated by ISHM in the labyrinthectomy rats at 5, 12, 20 and 30 days after the operation. The results demonstrated that labyrinthectomy increased GAP-43 mRNA levels. The application of ISHM laid a founda-

tion for the research of regenerative sprouting, synaptic remodeling and neuroplasticity in the vestibular compensation.

**Key words** *in situ* hybridization, growth-associated protein 43 (GAP-43) cDNA, digoxigenin (DIG), hippocampus slides, vestibular compensation

## 小鼠成纤维细胞凋亡与 bcl-2 结合蛋白\*

王文恭 童坦君<sup>1)</sup>

(北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

**摘要** 为检测细胞凋亡过程中 bcl-2 基因的结合蛋白, 用 PCR 技术扩增小鼠 bcl-2 基因 (mbcl-2) 调控区, 经亚克隆后的序列分析证实其准确性. 用 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 诱导小鼠成纤维细胞 (C3H 10 T1/2 Cl 8) 凋亡, 以此 PCR 产物作探针, 对上述细胞的核蛋白质粗提物进行迁移移位法 (EMSA) 与 DNA-蛋白质印迹分析. 结果表明, 细胞核内一分子质量为 53 ku 的结合蛋白与 mbcl-2 调控区的结合信号在 5-Fu 刺激 12 h 后明显增强, 而一种 100 ku 的 DNA 结合蛋白与该区的结合信号在 5-Fu 刺激 12 h 后明显减弱. 因而, p53 蛋白有可能是 bcl-2 的负转录因子, 100 ku 的 DNA 结合蛋白有可能是 bcl-2 的正转录因子.

**关键词** 细胞凋亡, bcl-2, 转录因子

**学科分类号** Q28

bcl-2 基因下调是细胞凋亡的关键环节之一. 种种迹象表明 p53 可能与 bcl-2 的下调密切相关<sup>[1,2]</sup>. 当 p53 上调时, bcl-2 表达下降, p53 缺乏时 bcl-2 呈高表达. Miyashita 等<sup>[1]</sup>认为, p53 可能作为 bcl-2 基因的负调控转录因子而下调后者的表达. 但尚无有力证据. 为探讨细胞凋亡过程中 bcl-2 与 p53 这两种凋亡关键性基因的相互关系, 我们曾用 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 诱导小鼠正常与恶性转化的成纤维细胞的凋亡<sup>[2,3]</sup>, 观察这两种基因在凋亡过程中表达变化的时序, 报道了这两种细胞在 5-Fu 作用 24 h 时细胞存活率下降, 电泳显现 DNA 梯状断裂, 流式细胞计检测出现凋亡峰<sup>[2]</sup>. 该研究的 RNA 印迹分析显示, 在 5-Fu 作用 6 h 后这两种细胞 p53 mRNA 水平已明显增高, 而 bcl-2 mRNA 水平则在作用 12 h 方明显降低<sup>[2]</sup>. p53 上调先于 bcl-2 下调, 表明在时序上 p53 具备作为 bcl-2 基因负调控因子的条件. 为考核 p53 作为 bcl-2 基因负转录因子的可能性, 我们用 PCR 扩增出小鼠 bcl-2 基因调控区长度为 652 bp 的片段, 经亚克隆后分析该 PCR 产物的序列, 证实扩增的准确性后, 用<sup>32</sup>P 标记, 以其作为探针, 对 5-Fu 刺激 12 h 的小

鼠成纤维细胞的细胞核蛋白质粗提物进行迁移移位及 DNA-蛋白质印迹分析, 结果表明一分子质量为 53 ku 的序列特异结合蛋白与该片段存在直接作用.

### 1 材料和方法

#### 1.1 细胞株

小鼠的正常成纤维细胞 (C3H 10 T1/2 Cl 8, 简称 NC3H10) 及其恶性转化的成纤维细胞 (TC3H10) 由工业卫生研究所惠赠.

#### 1.2 试剂

5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 为 Sigma 公司产品, PCR 引物由 Cybersyn 公司合成, pGEM-T 载体系统, Taq 酶, 双脱氧终止法测序试剂盒为 Promega 公司产品, 其余试剂均为国产或进口分析纯试剂.

#### 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养与凋亡的诱导:** 把 NC3H10 与 TC3H10 细胞接种于培养瓶后, 常规培养, 待细胞将铺满瓶底时, 按文献 [2, 3] 换以含 0.1% 小牛血清及 10 mmol/L 5-Fu 的 DMEM 继续培养以诱导

\* 国家自然科学基金资助项目 (39670806). <sup>1)</sup> 通讯联系人.

收稿日期: 1998-09-07, 修回日期: 1998-12-15