

# 文昌鱼胚胎整装荧光原位杂交技术的建立

喻丹<sup>1,2</sup>, 张培军

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

**摘要:**文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*) 是进化发育生物学研究的重要模式生物, 文昌鱼胚胎整装荧光原位杂交 (WFISH, whole-mounted fluorescent *in situ* hybridization) 技术将有助于鉴定文昌鱼胚胎发育过程中具有重要调控作用的功能基因。报告了文昌鱼胚胎整装荧光原位杂交技术, 用以快速灵敏分析特定基因在文昌鱼胚胎发育过程中的时空表达图式。用体外转录合成的地高辛标记文昌鱼 *FGFR* 基因的反义 RNA 探针, 检测到 *FGFR* 在文昌鱼原肠胚中表达于发生内陷的中内胚层细胞中, 而预定发育为外胚层的细胞不表达 *FGFR*。

**关键词:**文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*); 整装荧光原位杂交; *FGFR*; 胚胎; 地高辛  
**中图分类号:** Q75; Q11   **文献标识码:** A   **文章编号:** 1000-3096(2005)06-0001-03

头索动物文昌鱼是脊椎动物与无脊椎动物在进化上的过渡类型, 是现存脊椎动物的最亲近的无脊椎动物祖先<sup>[1,2]</sup>。通过研究和比较发育过程中文昌鱼和脊椎动物基因的表达和调控, 有助于了解进化过程中基因调控过程的变化怎样影响了身体图式 (body plan) 的进化。中国在文昌鱼的研究中拥有良好的实验条件和优良的研究传统, 山东青岛和福建厦门附近海域是世界上文昌鱼最重要的栖息地之一, 拥有一定规模的群体分布, 早在 20 世纪 60 年代, 老一辈胚胎发育学家童第周、叶毓芬、吴尚勤等就在世界上率先开展了青岛文昌鱼实验胚胎学研究, 并建立了一整套文昌鱼室内暂养和繁殖技术<sup>[3]</sup>。但是, 作为进化发育生物学的模式生物, 文昌鱼的分子发育生物学方面的工作还相对滞后, 相关基本的实验手段和技术尚需要完善, 比如尚没有建立起快速简便的原位杂交实验方法, 使文昌鱼基因调控的研究工作难以深入进行。本文采用文昌鱼成纤维细胞生长因子 (*FGFR*) 基因的片断合成反义 RNA 探针进行了文昌鱼胚胎整装荧光原位杂交实验, 检测了 *FGFR* 基因在文昌鱼原肠胚中的表达图式。本实验的目的是建立一套灵敏高效的文昌鱼胚胎整装荧光原位杂交技术方法, 为进一步开展文昌鱼功能基因组和比较基因组学的研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 文昌鱼胚胎的采集

本实验采用青岛文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*) 胚胎作为实验材料, 于 2003 年 6 月中旬至 7 月中旬文昌鱼产卵季节, 从青岛近海采集性腺成熟的文昌鱼在实验室内培养。控制合适的光照, 营养和水温等条件, 可使文昌鱼在养殖水缸中正常产卵<sup>[3]</sup>。收集受精卵, 培养于 23℃ 的无菌过滤海水中, 根据 Hirakow 的分期<sup>[4]</sup>, 在不同的发育时期取样, 将胚胎在含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L MOPS pH7.4, 0.5 mol/L NaCl 溶液中, 于 4℃ 固定 12 h 后, 用 PBST 液 (20 mmol/L NaPO<sub>4</sub> buffer, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20) 冲洗, 用镊子剥除卵膜。

### 1.2 RNA 探针的制备

根据已知的文昌鱼 *FGFR* 序列 (NCBI 序列号: AB025537), 设计引物, 通过高保真 PCR 从文昌鱼原肠

收稿日期: 2004-12-20; 修回日期: 2005-03-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270692, 30213202)

作者简介: 喻丹 (1973-), 女, 山东青岛人, 博士研究生, 研究方向: 分子和进化发育生物学, E-mail: kathy@qingdaonews.com; 张培军, 通讯作者, E-mail: pjzhang@ms.qdio.ac.cn

期 cDNA 文库 (由日本熊本大学 Yasui 教授惠赠) 扩增出 450 bp 长的序列, 克隆入 pGEM-T 载体 (Promega), 经测序验证后, 分别用 Sall 和 EcoRI 进行质粒线性化, 凝胶回收后作为体外转录模板。在 Dig-rUTP (Rhoche) 存在下分别用 SP6 和 T7 进行体外转录合成正义 RNA (作为原位杂交对照实验) 和反义 RNA 探针。文昌鱼 *FGFR1* 片段扩增所用的正义引物为 5'ATGCTCACTCTCTCAGCCAATG 3', 反义引物为 5'GCCCTTACCCTATGCTTCCTTA 3', PCR 扩增条件为: 94°C 5 min, 随后进行 30 个循环的 94°C 1 min, 57°C 30 s, 72°C 30 s。

### 1.3 文昌鱼胚胎整装原位杂交

本实验所用的 1.5 mL 和 500  $\mu$ L Eppendorf 管均预先进行硅烷化处理和去 Rnase 处理, 方法见分子克隆手册<sup>[5]</sup>。文昌鱼胚胎较小而且脆弱, 其平均直径仅有 130  $\mu$ m, 为方便实验操作和处理, 我们制备了特制的容器, 具体的制作方法是: 将 500  $\mu$ L Eppendorf 管切除管底, 将 400 目筛绢用热封仪封在去掉底部的 Eppendorf 管的管底, 制成一个小篮, 用刀片修整小篮边缘, 使其恰好能够套在 1.5 mL Eppendorf 管内, 将去除卵膜的固定后的文昌鱼胚胎样品移进入胚胎内部的中内胚层细胞, 而在外胚层细胞没有检测到表达。

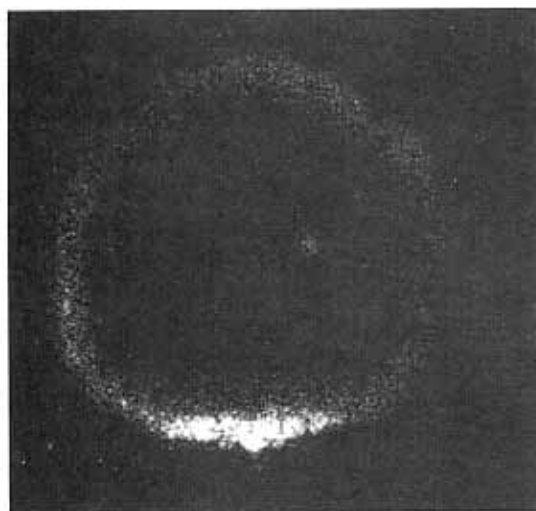


图 1 整装原位杂交的文昌鱼初期原肠期胚胎  
Fig. 1 *In situ* hybridization of amphioxus initial gastrula

文昌鱼初期原肠胚, 侧面观, 动物极向上。FGFR 转录产物分布在植物极附近的细胞中, 图中的比例尺为 50  $\mu$ m。

Amphioxus initial gastrula, lateral view, animal pole was up. FGFR was transcribed in the cells near the vegetal pole. Scale bar: 50  $\mu$ m.

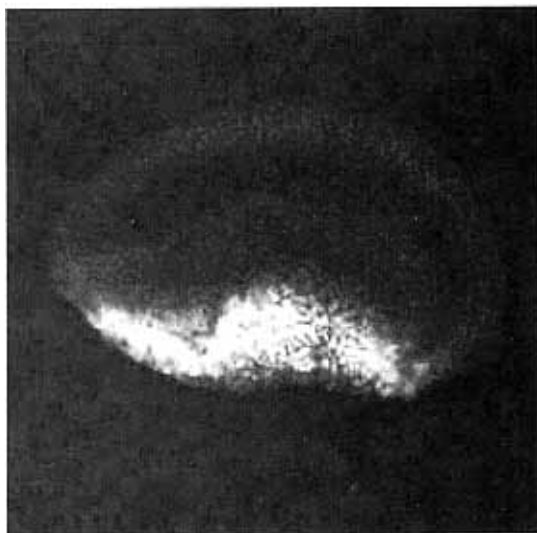


图 2 整装原位杂交的文昌鱼原肠期胚胎

Fig. 2 *In situ* hybridization of amphioxus middle gastrula

文昌鱼中期原肠胚, 侧面观, 动物极向上。FGFR 的染色出现在已经内陷的植物半球细胞中, 与周围的细胞相比这些细胞体积较大。在外胚层细胞中没有检测到 FGFR 的表达, 图中的比例尺为 50  $\mu$ m。

Amphioxus middle gastrula, lateral view, animal pole was up. FGFR transcripts was located in the mesoderm cells undertaking involution. No signal was detected in the ectoderm cells. Scale bar: 50  $\mu$ m.

整装荧光原位杂交技术 (WFISH) 可以快速分析基因在胚胎发育过程中的时空表达图谱, 而特异性的组织表达往往提示目的基因在该组织的发育分化过程中具有某种重要功能, 入小篮, 整个原位杂交实验在这一特制容器中进行, 每次更换新的反应溶液时, 将小篮移入一个新的 1.5 mL 管, 从上部缓慢滴加溶液。文昌鱼胚胎整装原位杂交实验过程为: 胚胎在含 5 mg/L 蛋白酶 K 的 PBST 中 37°C 处理 20 min, 用 PBST 冲洗后, 在 4% 多聚甲醛中固定 45 min, 用 PBST 冲洗后在 68°C 进行预杂交 5 h, 预杂交液组成为 50% 甲酰胺, 5 $\times$  SSC, 0.1% Tween 20, 10 mmol/L 柠檬酸 pH6.0, 0.5 mg/mL Heparin, 1mg/mL 酵母 tRNA。随后, 加入反义 RNA 探针 (终浓度为  $\mu$ g/L) 在 68°C 下杂交过夜。洗脱后在含有 1% BSA 和 1% 正常山羊血清的 PBST 中孵育 45 min, 以 1: 1 000 的比例加入交联 Rhodamine 的山羊抗地高辛抗体 Ig G Fab 段 (Rhoche), 4°C 孵育过夜, 用 PBST 冲洗, 样品在甘油中透明, 装片, 用 Bio-Rad MRC 1 024 激光共聚焦显微镜观察, Adobe Photoshop 6.0 进行图像处理。分别用不加探针和加入正义 RNA 的杂交液作对照实验。

## 2 结果和讨论

整装荧光原位杂交 (WFISH) 包括两个实验过程: 首先是探针的制备, 其次是杂交系统的建立。最近, 非放射性地高辛 (Digoxigenin, Dig) 标记的探针已经在许多物种的原位杂交实验中得到了广泛的应用, 比较放射性探针, Dig 标记探针更为安全, 使用方便, 而且 Dig 标记的 RNA 探针的灵敏度要高于 Dig 标记的 DNA 探针; 而抗 Dig 荧光抗体的使用, 又进一步大大提高了检测的灵敏度。文昌鱼是进化发育生物学研究的重要模式生物, 但是其胚胎较小, 结构脆弱, 为实验操作带来了许多不便, 很难得到背景清晰、结构完整的胚胎原位杂交实验结果, 本实验中特制的小篮的使用, 简化了实验步骤, 有助于保持胚胎的形态完整性; 实验中我们还采用 Dig 标记的 RNA 探针, 提高反应的特异性, 建立了一套快速高效灵敏的文昌鱼胚胎整装荧光原位杂交的方法。

在脊椎动物中 FGFR 是原肠化过程所必需的, 在爪蟾和小鼠中 FGFR 的抑制导致中胚层发育缺陷, 不能进行原肠化<sup>[6,7]</sup>。但是在头脊椎动物文昌鱼中, FGFR 对原肠化作用的贡献尚没有相关报道。本实验结果表明, 在文昌鱼早期原肠胚中, FGFR 的表达最初出现在植物极附近的细胞中 (图 1), 位于已经扁平化但尚未出现明显凹陷的植物极附近区域, 在随后的原肠作用过程中, 从胚胎侧面观察, 染色的区域逐渐向两侧扩展, 到原肠中期, 整个发生内陷的区域均被染色 (图 2), 这些细胞大而圆, 相互之间结合较为松散。Hirakow 等<sup>[4]</sup>在用电镜观察同一时期的胚胎时, 也见到了这样的一些独特的细胞, 他们根据其形态上的特征推测它们可能是最早发生内陷的那部分细胞。而位于胚胎最外侧的外胚层细胞始终没有观察到染色的出现。这些结果表明在文昌鱼胚胎原肠作用过程中, FGFR 的转录产物分布在为进一步研究基因的功能提供必要的依据; WFISH 追踪特异基因的表达的时空分布, 在文昌鱼中还拥有特别的意义, 通过检测进化中保守的文昌鱼基因的表达图式, 可以指示进化过程中的特异组织器官的原基。文昌鱼基因组计划在 2001

年已经启动, 预计 2005 年完成, 届时解读大量基因的功能及其表达调控规律将是一个重大问题和技术挑战, 利用整装原位杂交进行的基因表达图式分析将是文昌鱼胚胎发育和进化生物学研究中所必需的, 本实验中对文昌鱼 FGFR 基因的整装荧光原位杂交实验结果表明我们已经建立起一套灵敏而行之有效的研究文昌鱼基因表达时空图式的技术方法, 今后我们将进一步开展文昌鱼发育相关的功能基因的研究, 并以表达图式的比较为切入点, 借助其他脊椎动物模型, 对发育机制的进化进行深入研究。

### 参考文献:

- [1] Holland ND, Chen J. Origin and early evolution of the vertebrates: new insights from advances in molecular biology, anatomy, and palaeontology[J]. *BioEssays*, 2001, 23: 142-151.
- [2] Wada H, Satoh N. Details of the evolutionary history from invertebrates to vertebrates, as deduced from the sequence of 18S rDNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 1801-1804.
- [3] Tung TC, Wu SC, Tung YFY. The development of isolated blastomeres of *Amphioxus*[J]. *Scientia Sinica*, 1958, VII(12): 57-90.
- [4] Hirakow R, Kajita N. Electron Microscopic study of the development of amphioxus, *Branchiostoma belcheri tsingtauense*: the gastrula[J]. *J Morph*, 1991, 207: 37-52.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南 (第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 954, 343.
- [6] Amaya E, Musci TJ, Kirschner MW. Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm induction in *Xenopus* embryos[J]. *Cell*, 1991, 66: 257-270.
- [7] Yamaguchi TP, Harpal K, Henkemeyer M, et al. Fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation[J]. *Genes Dev*, 1994, 8: 3032-3044.

(下转第 12 页)

ation wind wave model[J]. *Journal of Physical Oceanography*, 1996, 26: 2 497 – 2 518.

[4] 钱志春. 海浪及其预报 [M]. 北京: 气象出版社, 1991. 1 – 189.

## Simulating wind – wave field of the East China Seas with QuikSCAT/NCEP blended wind and WAVEWATCH

Li Ming – kui<sup>1,2</sup>, Hou Yi – jun<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. The Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Jan., 20, 2005

Key Words: WAVEWATCH; numerical simulation; wind – wave

**Abstract:** Applying the wave model WAVEWATCH – III to the East China Sea, this paper simulates the wind – wave field from Jan. 23, 2000 to Jan. 31, 2000 with the QuikSCAT and NCEP blended wind. The comparison between the model result and the observation from buoy indicates that this paper obtains a simulative wave result with high precision and resolution.

(本文编辑: 刘珊珊)

---

(上接第 3 页)

## Whole – mounted fluorescent *in situ* hybridization of amphioxus embryos

YU Dan<sup>1,2</sup>, ZHANG Pei – jun<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Dec, 20, 2004

Key Words: amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*); whole – mounted fluorescent *in situ* hybridization; *FGFR* and digoxigenin

**Abstract:** Cephalochordate amphioxus (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*) has emerged as an important animal model in evolutionary developmental biology research in recent years. The whole – mounted fluorescent *in situ* hybridization (WFISH) of amphioxus embryos contributes to the identification of critical genes functioning in amphioxus embryogenesis. In present study, we report the development of WFISH to analyze rapidly and sensitively the spatial and temporal expression pattern of a specific gene during the development of amphioxus embryos. Digoxigenin – labelled antisense RNA probes against *FGFR* was synthesized through *in vitro* transcription in the present of Digoxigenin (Dig) – UIP and it was detected that during amphioxus gastrulation, *FGFR* expression was restrict to the invaginating mesendoderm cells but no positive signals was detected in ectoderm cells.

(本文编辑: 刘珊珊)