

# 原位杂交检测 *lin-4* mRNA 在 *Caenorhabditis elegans* 中的表达

高雅君 杨玉荣\*

(厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

**摘要** *lin-4* 是控制 *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) 幼虫发育的异时性基因, 也是一种小 RNA 分子(microRNA)。通过整体原位杂交检测小 RNA *lin-4* 在野生型和 *lin-14*、*lin-28* 突变体中的区域性表达, 探讨 *lin-4* 在 *C.elegans* 发育时空控制中的作用。结果表明: *lin-4* mRNA 在胚胎发育的早期和中期表达, 胚胎后期至 L1 期末没有表达, 之后又持续表达, 成虫中也可以检测到 *lin-4* mRNA 的存在。在 *lin-14* 和 *lin-28* 突变体中, *lin-4* 的表达基本与野生型一致, 不受 *lin-14*、*lin-28* 基因突变的影响, 说明 *lin-14* 和 *lin-28* 是 *lin-4* 的下游基因。

**关键词** *Caenorhabditis elegans*; *lin-4*; *lin-28*; *lin-14*; 原位杂交

多细胞生物的发育需要细胞分裂、细胞死亡和细胞分化的时空一致性, 各种器官的准确定位和适时发育反映了基因活性的时间和空间性。一般说来, 在胚胎发育过程中, 基因时空性表达的控制是由一些起关键性调控作用分子的时空性造成的。

在 *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) 中, 通过分析幼虫各个阶段的突变体发现了一系列在虫体发育的不同阶段进行表达的基因, 这些基因又称为异时性基因, 这类基因突变会引起非正常的组织产生和形态的改变, 使发育的时间顺序被破坏。目前发现的异时性基因有 *lin-4*、*lin-14*、*lin-42*、*daf-12*、*lin-28*、*let-7* 等, 它们形成了一个遗传调控网络, 控制了 *C.elegans* 细胞谱系发育的时序性, 在虫体发育的空间和时序表达上起着重要的调控作用, 控制着发育的时序性<sup>[1]</sup>。

在这些异时性基因中, 由 *lin-4*、*lin-14* 和 *lin-28* 这 3 个异时性基因组成的调控网络在控制幼虫前面 3 个发育阶段中起着重要的作用<sup>[2]</sup>。LIN-14 的活性决定了 L1 期细胞的命运, 在 *lin-14* 的突变型中, L1 期的发育事件消失了, 而发生了 L2 期的早熟事件。L2 期的特异性发育过程要求 *lin-14* 和 *lin-28* 同时有活性。它们的功能由于 *lin-4* 的表达而受到抑制, 决定了后来细胞的发育命运<sup>[1]</sup>。*lin-4* 作为一种 microRNA (miRNA, 即微小 RNA), 编码一段 22 nt 的小分子非编码 RNA, 它抑制了 *lin-14* 和 *lin-28* 的翻译<sup>[3]</sup>。虽然抑制过程的详细机制还不清楚, 但 *lin-14* 和 *lin-28* mRNA 的 3' 非编码区和 *lin-4* 的序列互补, 这提示 *lin-4*

RNA 通过和它们的 mRNA 结合成反式的抑制复合体而起作用<sup>[4-7]</sup>。在序列缺失的 *lin-4* 的突变体或者 *lin-14* 获得功能突变体中, L1 期幼虫发育过程出现反复。同样, 如果将 *lin-28* 中的 *lin-4* 结合序列除去, 出现 L2 期的发育迟缓现象。

目前还发现在脊椎动物中也存在着异时性基因的同源分子<sup>[8,9]</sup>, 特别是其中的一个小 RNA 分子 *let-7* 在人和小鼠中都找到了类似物。*lin-28* 类似基因也在小鼠的胚胎发育中起重要的作用<sup>[10]</sup>。异时性基因功能、表达和分布以及作用机制的研究, 对其他多细胞生物发育模式的研究具有重大意义<sup>[3]</sup>。由于 *lin-4* 对 *C.elegans* 的幼虫发育阶段过程中的更替极为重要, *lin-4* mRNA 在 *C.elegans* 的区域性表达尚未见报道, *lin-4* RNA 的存在和丰度直接影响着其他基因的表达。本文报告原位杂交法检测 *lin-4* 在 *C.elegans* 发育中的分布情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验所用虫株由 *Caenorhabditis Genetics Center* 提供。主要虫株有 N2: 野生型; DR441: *lin-14*(n179) X; MT1524: *lin-28*(n719)I。

反应中所用的 dNTP、PCR 缓冲液、Taq 酶、

收稿日期: 2006-09-27 接收日期: 2006-12-06

国家自然科学基金资助项目(No.30470881)

\* 通讯作者。Tel: 0592-2181792, Fax: 0592-2182066, E-mail:

yryang@jingxian.xmu.edu.cn.

限制性内切酶、GeneRuler DNA Mixture ladder 和琼脂糖购自 MBI Fermentas 公司。胶回收试剂盒购自华舜公司。引物由上海生工合成, 引物序列分别为 *lin-4F*:5'-CCGAGTCTCCCTTACTGCAA-3'; *lin-4R*:5'-CCTAGGCCTTTTCCCCGAATACCATT-3'。pBluescript II SK(+), *E.coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞由本实验室提供。

## 1.2 方法

1.2.1 *lin-4* 基因片段的 PCR 扩增 以 *C.elegans* 野生型基因组 DNA 为模板, 以 *lin-4F* 和 *lin-4R* 为引物, 5  $\mu$ l 10 $\times$  反应缓冲液, 5  $\mu$ l 2.5 mmol/L dNTPs, 0.25  $\mu$ l 5 U/ $\mu$ l Ex Taq, 加双蒸水至反应总体积为 50  $\mu$ l。PCR 反应程序为: ① 95  $^{\circ}$ C 5 min, ② 94  $^{\circ}$ C 40 s, ③ 57.9  $^{\circ}$ C 55 s, ④ 72  $^{\circ}$ C 1.5 min, 由①到④ 37 个循环, ⑤ 72  $^{\circ}$ C 7 min, ⑥ 保持 4  $^{\circ}$ C。取 5  $\mu$ l PCR 产物电泳检查扩增结果。

1.2.2 *lin-4* 基因克隆 *lin-4* PCR 产物经 T4 激酶补平后琼脂糖凝胶电泳纯化, 试剂盒回收, 与质粒载体 pBluescript SKII(+)(经 *Sma*I 酶切、去磷酸化、琼脂糖凝胶电泳后纯化回收) 连接, 转化 *E.coli* DH5 $\alpha$ 。筛选阳性克隆, 提质粒, *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切检验并测序分析。

1.2.3 *lin-4* cDNA 探针的合成和标记 以克隆好的含有 *lin-4* 片段的质粒为模板, *lin-4F* 和 *lin-4R* 为引物, 进行 PCR 扩增, 并电泳检验。以该 PCR 产物为模板, 分别以 *lin-4F* 和 *lin-4R* 为引物, 地高辛标记的 dNTPs 为底物, 进行 PCR 扩增分别合成有义链和反义链探针。PCR 体系为: 2.5  $\mu$ l 10 $\times$ PCR 缓冲液, 1.2  $\mu$ l *lin-4R* 或 *lin-4F* 引物, 1.2  $\mu$ l Dig 标记 dNTP, 0.5  $\mu$ l 模板(第一次 PCR 产物), 0.12  $\mu$ l Taq 酶, 19.48  $\mu$ l 无菌水, 总体积 25  $\mu$ l。探针标记完成后经斑点杂交检测探针的有效性<sup>[11]</sup>, 分别取 1  $\mu$ l PCR 扩增的 F、R 探针原液, 用 5 $\times$ SSC 稀释成 100 倍、150 倍和 200 倍, 按以下步骤做点杂交: 取一硝酸纤维素膜, 在其左下方做一切角做标记, 并用铅笔均分为六小格。取上述有义链、反义链探针各稀释液 1  $\mu$ l, 100  $^{\circ}$ C 变性 5 min, 立即置于冰上。待冷却后, 从左到右依次点在膜上: 有义链 1:100、1:150、1:200; 反义链 1:100、1:150、1:200, 晾干。紫外线下照射 30 s, 使变性后的单链探针结合到膜上。1 $\times$ SSC 洗 2 次, 每次 10 min; PBT(含 0.1%BSA)洗 2 次, 每次 10 min。PBT(含 0.1%BSA)封闭 30 min。加入 1:2 500 稀释的抗地高辛抗体, 温育 30 min。PBT 洗 3 次, 每次

10 min。DETEK 洗两次, 每次 5 min。加入 30  $\mu$ l 染色液, 避光条件下染色至出现明显信号, PBT 洗 10 min 终止染色。结果显示 5 $\times$ SSC 稀释 150 时 F、R 引物效果都较好。

1.2.4 原位杂交 *C.elegans* 虫体接种于培养基, 培养 1~2 天。在解剖镜下挑取 15~20 条成熟的雌雄同体虫体制片, 原位杂交<sup>[11,12]</sup>。封片后, 用与 CCD 连接的 Nikon 显微镜拍照, 拍摄荧光照片以确定发育时期。

## 2 结果

### 2.1 *lin-4* 克隆构建

PCR 扩增获得大约 700 bp 的 DNA 片段(图 1), 克隆入 pBluescript II SK(+)载体后提质粒酶切鉴定(图 2), 同时进行 PCR 筛选(图 3)。

### 2.2 原位杂交

2.2.1 *lin-4* mRNA 在野生型中的区域性表达 *lin-4R* 探针整体原位杂交结果显示, 野生型(N2)从早期胚胎到多细胞中期胚胎都染上颜色, 染色率 90% 以上; 但当胚胎中出现幼虫形态至一期幼虫(L1)均无色; 以后又出现颜色, 并持续表达直至成虫(图 4)。

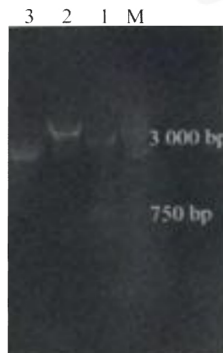
*lin-4* mRNA 主要分布在野生型的早期胚胎和中期胚胎细胞中(图 5A、图 5C、图 5E), 当胚胎发生形态形成时在体内的细胞质中已经检测不到 *lin-4* mRNA 的存在了(图 5G)。染料中加入 DAPI 染色胚胎细胞核, 以观察胚胎的对应时期(图 5B、图 5D、图 5F、图 5H)。

在一期幼虫(L1)中也没有检测到 *lin-4* mRNA 的表达(图 6A); 四期幼虫(L4)时表达量达到顶峰, 染色较深, *lin-4* mRNA 均匀分布在除咽部、食管外的肌肉中(图 6C)。而在成虫中 *lin-4* mRNA 主要分布在皮层及生殖腺(图 6E、G), 在生殖腺中表达量较高, 染色较深。荧光染料定位细胞核以确定发育时期(图 6B、图 6D、图 6E、图 6F)。

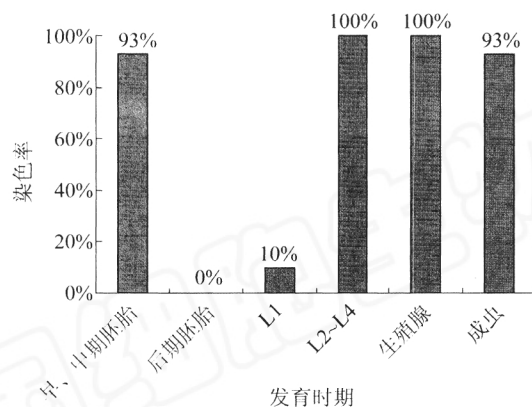
2.2.2 *lin-4* mRNA 在 *lin-14*、*lin-28* 突变体中的区域性表达 在 *lin-14* 突变体 DR441 和 *lin-28* 突变体 MT1524 中的原位杂交检测结果与野生型中大体相同, 图 7 为 MT1524 中期虫卵(图 7A)、11 幼虫(图 7C)和成虫(图 7E)的染色情况及其 DR441 成虫(图 7G)的染色情况。表明 *lin-4* mRNA 的区域性表达没有受到 *lin-14* 或者 *lin-28* 基因突变的影响, 显示 *lin-14*、*lin-28* 为 *lin-4* 的下游基因, 其表达对 *lin-4* mRNA 的表达基本无影响。

图1 *lin-4* 基因 PCR 扩增

M: Gene ruler™ DNA Ladder mixture; 1: PCR 产物。

图2 *lin-4* 质粒酶切M: 2-log DNA ladder; 1: *Bam*HI+*Xho*I 双酶切; 2: *Bam*HI 单酶切; 3: 质粒。图3 *lin-4* 质粒 PCR 筛选

M: 2-log DNA ladder; 1: PCR 筛选产物。

图4 野生型 *lin-4* mRNA 原位杂交染色统计图

### 3 讨论

*lin-4* 作为一类非编码的小 RNA (microRNA) 基因, 通过与目的 mRNA 的不完全配对调节其翻译, 在 *C. elegans* 的发育中起时序调控的重要作用。在 *C. elegans* 的研究中发现, *lin-4* 通过与 *lin-14* 和 *lin-28* 的 3' 非编码区结合形成复合物抑制其翻译而起作用<sup>[4-7]</sup>。*lin-14* 和 *lin-28* 的表达影响到线虫前 3 个阶段的发育, 它们的功能由于 *lin-4* 的表达而受到抑制, 决定了后来细胞的发育命运。*lin-4* 的表达调节其下游基因 *lin-14*、*lin-28*、*daf-12*, 继而影响 *let-7*, 而 *let-7* 又影响其下游基因 *lin-41*<sup>[13]</sup>。*lin-4* mRNA 在胚胎前期表达, 而在形成 11 期幼虫时没有表达, 以后又开始表达, 是什么调节了 *lin-4* 的表达? 目前还未知。

最近报道 *lin-4* 和 *lin-14* 对 *C. elegans* 成虫的寿命起作用, *lin-4* 的表达量降低会加速器官老化缩短寿命, 增加其表达量或者降低其靶基因 *lin-14* 的表达量可以延长寿命<sup>[14]</sup>。这是否与幼虫中 *lin-4* 过量表达导致的早熟事件调节机制相同<sup>[1]</sup>? 目前也还未知。

*lin-4*、*lin-14*、*lin-28* 基因的突变体都表现出阴门异常, Euling 等<sup>[15]</sup>也曾报道这 3 个基因与阴门前体细胞(VPCs)的发育有关。这 3 个基因在阴门发育中究竟起了什么样的作用? 是通过 *lin-4* 对 *lin-14*、*lin-28* 的抑制起作用? 还是通过其他的信号转导途径起作用? 目前还没有这方面的报道。尽管在其他动物中找到了 *let-7*、*lin-41* 和 *lin-28* 类似的基因, 而且 *lin-28* 也在小鼠胚胎发育中起到一定的作用<sup>[10]</sup>, 特别是 *let-7* 还能调控抑癌基因 *ras* 的活性。但目前脊椎动物中还没有找到 *lin-4* 类似的基因, 是否在其他动物中 *lin-4* 不存在或是 *lin-28* 通过其他的基因进行调控, 目前尚未知, 还有待于进一步探索。

### 参考文献(References)

- [1] Feinbaum R et al. *Dev Biol*, 1999, **210**: 87
- [2] Ambros V. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, **10**: 428
- [3] Olsen PH et al. *Dev Biol*, 1999, **216**: 671
- [4] Lee RC et al. *Cell*, 1993, **75**: 843
- [5] Feinbaum R et al. *Dev Biol*, 1999, **210**: 87
- [6] Wightman B et al. *Cell*, 1993, **75**: 855
- [7] Moss EG et al. *Cell*, 1997, **88**: 637
- [8] Moss EG et al. *Dev Biol*, 2003, **258**: 432
- [9] Seggerson K et al. *Dev Biol*, 2002, **243**: 215
- [10] Yang DH et al. *Gene Expr Patterns*, 2003, **3**: 719
- [11] 杨玉荣. *厦门大学学报*, 2003, **42**: 665
- [12] Seydoux G et al. *Methods Cell Biol*, 1995, **48**: 323
- [13] Johnson SM. et al. *Dev Biol*, 2003, **259**: 364
- [14] Boehm M et al. *Science*, 2005, **310**: 1954
- [15] Euling S et al. *Cell*, 1996, **84**: 667



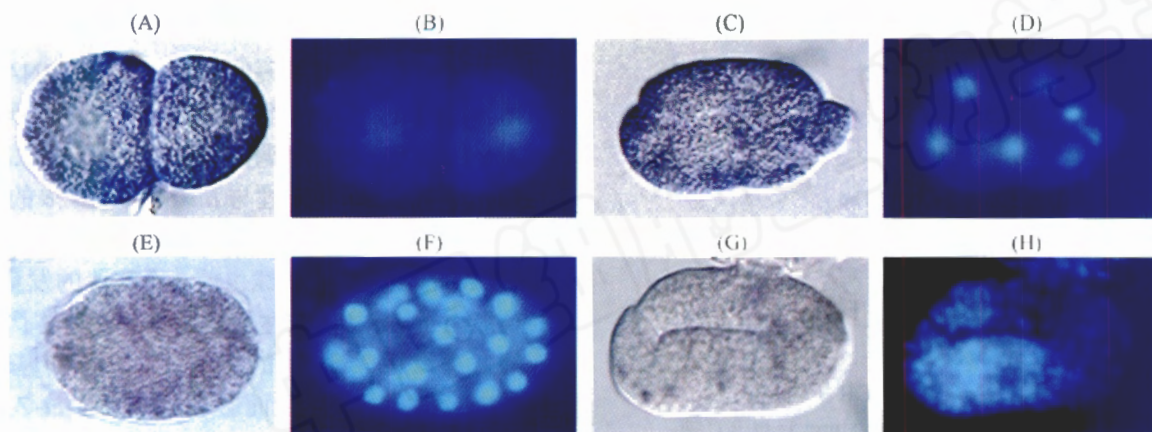


图5 野生型胚胎中 *lin-4* mRNA 的表达

A: 两细胞胚胎 mRNA 表达; B: 两细胞细胞核荧光染色; C: 八细胞胚胎 mRNA 表达; D: 八细胞胚胎细胞核荧光染色; E: 中期胚胎 mRNA 表达; F: 中期胚胎细胞核荧光染色; G: 晚期胚胎 mRNA 表达; H: 晚期胚胎细胞核荧光染色。

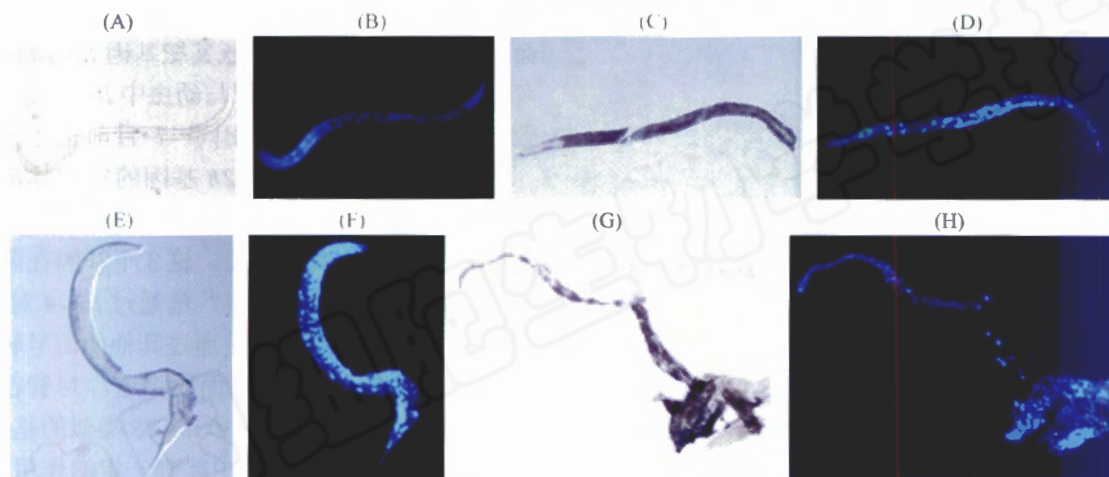


图6 *lin-4* mRNA 在野生型虫体中的表达

A: L1 期 mRNA 表达; B: L1 期细胞核荧光染色; C: L4 期 mRNA 表达; D: L4 期细胞核荧光染色; E: 成虫 mRNA 表达; F: 成虫细胞核荧光染色; G: 生殖腺 mRNA 表达; H: 生殖腺细胞核荧光染色。

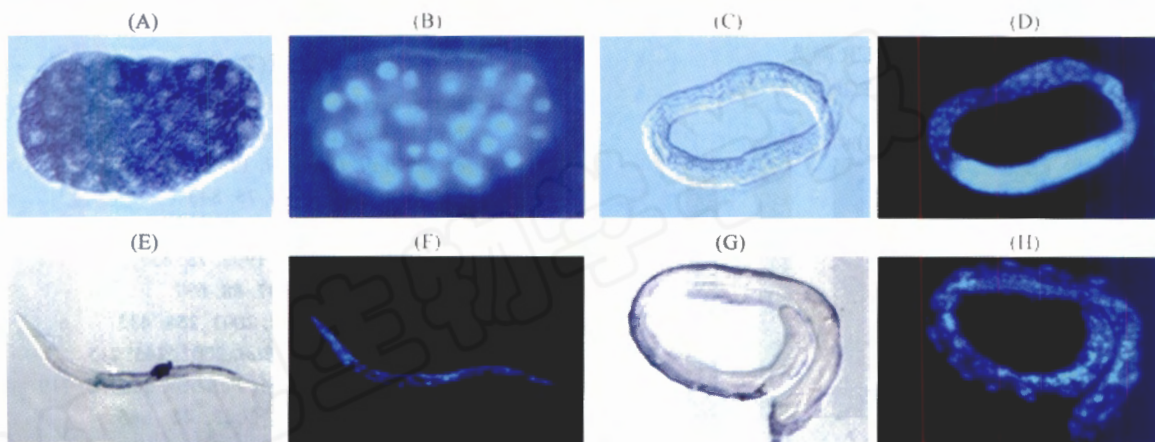


图7 *lin-4* mRNA 在 *lin-14*、*lin-28* 突变体中的区域性表达

A: MT1524 中期胚胎 mRNA 表达; B: MT1524 中期胚胎细胞核荧光染色; C: MT1524 L1 幼虫 mRNA 表达; D: MT1524 L1 幼虫细胞核荧光染色; E: MT1524 成虫 mRNA 表达; F: MT1524 成虫细胞核荧光染色; G: DR441 成虫 mRNA 表达; H: DR441 成虫细胞核荧光染色。

## Detection of *lin-4* mRNA in *Caenorhabditis elegans* Wild Type and Mutants via *in Situ* Hybridization

Ya-Jun Gao, Yu-Rong Yang\*

(Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** *lin-4* is an important heterochronic gene as well as a microRNA which plays an crucial role in regulating the larval stage transition in *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*). To determine the function of *lin-4* in the temporal and spatial development of *C.elegans*, we analyzed the expression of *lin-4* mRNA in wild type and mutants of *lin-14* and *lin-28* via *in situ* hybridization. The results showed that *lin-4* mRNA presented in the early embryos of wild type, and could not detected in the later embryos or L1 larvae. The level of it continued to increase through L2 to adult worms. During subsequent stages of development, it presented in the epidermis, and also in the germline of adult worms. In *lin-14* and *lin-28* mutants, the expression of *lin-4* mRNA pattern was same as wild type which implied *lin-14* and *lin-28* was the down streamed gene of *lin-4*.

**Key words** *Caenorhabditis elegans*; *lin-4*; *lin-28*; *lin-14*; *in situ* hybridization

Received: September 27, 2006 Accepted: December 6, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470881)

\*Corresponding author. Tel: 86-592-2181792, Fax: 86-592-2182066, E-mail: yryang@jingxian.xmu.edu.cn