

果蝇细胞周期蛋白 Cyclin D 在胚胎发育不同时期的表达

石松婷

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要: 细胞周期蛋白 Cyclin D (CycD) 是发育中重要的蛋白, 作者利用原位杂交法和免疫组化法, 分别对野生型的果蝇 *w¹¹¹⁸* 以及本研究室构建的一个转基因株系 *cycD-lacZ* 进行分析, 从而建立了在果蝇发育的早期——胚胎发育各阶段 *cycD* mRNA 的表达模式。结果表明: Stage 5 时期, *cycD* mRNA 集中于胚胎表面新生成的细胞处。Stage 10, 在发育中的神经系统, 前中肠和后中肠处可以检测到 *cycD* 的 mRNA。Stage 14, *cycD* 基因于中肠有着强烈的表达。*cycD* mRNA 在胚胎发育中的表达模式的确立, 为后期研究 CycD 在胚胎发育中所起的作用奠定了基础。

关键词: *cycD*; 原位杂交; 免疫组化; 果蝇

中图分类号: Q 342

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2007) S1-0186-05

黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 是生物学研究中最重要模式生物之一^[1]。早期经典遗传学理论的建立就得益于对果蝇的观察研究。在进入后基因组时代的今天, 随着果蝇全基因组序列的测定完成, 以及日渐成熟的果蝇实验技术, 果蝇在发育生物学, 神经生物学等当今诸多热点生命科学领域的研究中起着相当重要的作用。

细胞周期 (cell cycle) 是细胞生命活动的基本过程, 可以分成 G1, S, G2, M 4 个时期。已发现的与细胞周期相关的调控因子基本上可以分成三大类: 细胞周期蛋白 (Cyclin), 细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 (CKI)^[2]。细胞周期的每一个时期都有其特有的 Cyclin 和 CDK。其中 D 型周期蛋白是 G1 时期的细胞周期蛋白, 其在 G1 期存在并且大量表达。D 型周期蛋白促进细胞分裂的机制目前已基本阐述清楚, 主要是通过 Rb (G1 期周期抑制蛋白) 系统进行的。哺乳动物的 D 型细胞周期蛋白有 3 种: CycD1, CycD2, CycD3。CycD1 通过结合并激活 G1 时期特有的周期蛋白依赖性激酶 CDK4, 磷酸化 Rb, 磷酸化的 Rb 蛋白从其所结合的 E2F 转录因子上解离, E2F 转录因子起始转录推动细胞周期的基因, 从而推动细胞周期由 G1 时期进入到 S 时期^[3]。此外, 研究发现, 除了促进细胞进行分裂外, D 型周期蛋白还具有某些独立于 CDK 激酶活性的促进基因转录的功能^[4]。CycD1 可以结合组蛋白去乙酰基酶 P/

CAF, 亦可以结合转录因子 TF $\text{E}2\text{F}$ ^[5] 等, 通过和这些转录因子的结合, CycD1 起到促进基因转录的功能。

CycD 是目前在果蝇中发现的唯一的 D 型周期蛋白, 通过类似的机制推动细胞分裂。果蝇中和 CycD 结合的细胞周期蛋白依赖性激酶是 CDK4。已有研究表明 CycD 蛋白在果蝇的发育中发挥重要的作用。CycD 蛋白在果蝇体内的缺失, 会导致成体果蝇个体变小, 其体重将比正常的果蝇减少 10% ~ 20% 左右, 且幼虫翅原基 (wing disc) 的细胞数目明显减少。而且, 通过检测胚胎发育时期的中肠细胞, 发现突变体的 S 时期的细胞数目将大量的减少^[6]。在果蝇眼睛中过度表达 CycD 和 CDK4, 将会导致果蝇眼睛增大, 细胞数目增多。而在果蝇的翅原基内过表达 CycD 和 CDK4, 则会导致翅原基中产生过量的细胞^[7]。迄今为止, 关于 CycD 蛋白在果蝇发育中的具体作用机制尚未见到报道。在此我们利用 RNA 原位杂交和免疫组化方法, 阐明了 *cycD* mRNA 在果蝇胚胎发育中的时空表达模式, 推测 CycD 在果蝇早期的胚胎发育中起的作用, 为后期的 CycD 的调控机制的研究奠定了很好的基础。

果蝇胚胎的发育是指从受精卵到一期幼虫的孵化这一过程, 在 25℃ 时需要 22 个小时左右, 一共经历 17 个时期 (stage)。本文研究的是在形态上有代表性, 且发育上也有明显事件的 3 个时期: stage 5 (刚刚结束卵裂过程, 在胚胎表面有一层细胞的出现), stage 10 (原肠作用结束, 主要事件是肠道的发育和神经系统发育), 和 stage 14 (胚胎发育的晚期, 此时基本上几个重要系统的发育已经临近结束, 胚胎中出现了完整的肠道, 神经系统的发育也趋近完成)。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验中所用的限制性内切酶 Xba^{iv}和 Kpn^{iv}均购自 Takara 公司. T7 RNA 聚合酶系统购买自 Promega 公司. Digoxigenin-UTP 试剂购买自德国的 ROCHE 公司. pBluescript $\text{⑈SK}(+)$ 质粒购买自天根生化.

葡萄汁固体果蝇培养基(1L)配方:

30 g 琼脂

700 mL 双蒸水

300 mL 葡萄汁(汇源 100% 葡萄汁)

果蝇株系: w^{1118} : 野生型果蝇

cycD-lacZ: 本实验室自行构建的转基因果蝇株系. 该转基因株系携带有带 *cycD* 的启动子区域及下游的 LacZ 报告基因, 能够在体内用 LacZ 的表达模拟 *cycD* mRNA 的表达

1.2 实验方法

(1) *cycD* 探针的合成

用果蝇基因组 DNA 对 *cycD* 基因外显子的一段 700 bp 的序列进行 PCR 扩增, 引物: GCTCTAGAGTTCCCATATCGGAGTTAC (上游), CCCCATGGTGAAGGTAGTAGGTAAGC(下游), Xba^{iv}和 Kpn^{iv}酶切纯化后克隆入 pBluescript $\text{⑈SK}(+)$ 质粒. 用 T7 聚合酶转录系统, 从质粒上转录 RNA. 其中, 转录体系的 UTP 由 Digoxigenin (Dig) 标记. 转录出来的 RNA 片断利用乙醇沉淀法纯化.

(2) 果蝇胚胎的收集和固定

将 100~200 只果蝇置于葡萄汁配置的固体果蝇培养基上, 收集 16 个小时内, 果蝇在培养基上所产生的所有的胚胎, 并按照如下步骤固定. 胚胎在 1:4 稀释的次氯酸钠溶液中静置 5 min 以移除胚胎外膜的几丁质成分. 用洗液(0.7% NaCl/0.02% TritonX-100)冲洗胚胎直至次氯酸钠溶液完全去除干净. 然后用吸水纸去除过量的溶液. 将干燥的胚胎转入 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 1:1 体积的庚烷/固定剂(庚烷和固定剂互不相溶而形成双层溶液, 其中庚烷位于液相上层而固定剂位于液相下层. 固定剂成分: 溶解于 PEM 溶液中的浓度为 4% 的多聚甲醛, PEM 溶液成分: 0.1 mol/L PIPES(pH 7.0)/1 mmol/L EGTA/ 2 mmol/L MgSO₄). 此时胚胎位于固定剂和庚烷溶液的中间层, 剧烈震荡 20 min 后, 胚胎仍处于液相的中间层. 将处于液相下层的固定液完全去除. 用新鲜的

庚烷溶液洗涤胚胎两次后, 将庚烷去除. 最后加入 1 mL 的 1:1 体积的庚烷/甲醇混合液(双层溶液, 其中庚烷处于液相上层而甲醇处于液相下层), 剧烈震荡 1 min 以去除胚胎的卵黄膜. 震荡前胚胎位于溶液的中间层, 震荡结束后, 去除卵黄膜的胚胎将沉降到离心管底部. 此时将位于中间层的未去除卵黄膜的胚胎及上层的庚烷完全去除干净. 继续用甲醇洗涤沉降在管底的胚胎 2~3 次. 将通过此法固定好的胚胎置于甲醇中, 于 -20℃ 保存.

(3) 果蝇胚胎的免疫组化实验

所选用的果蝇株系是 w^{1118} 株系和本室显微注射法所得到的 *cycD-lacZ* 果蝇株系. 胚胎的固定方法如上所描述, 胚胎的染色方法参考 Rubin 实验室的“*Drosophila protocol*”中的免疫组化染色. 我们所使用的抗体: 一抗是来源于兔的 anti-LacZ (1:10 000), 二抗是 Cy3 标记的山羊抗兔抗体 (1:1 000).

(4) 果蝇胚胎和成虫盘的原位杂交实验

所选用的果蝇株系是 w^{1118} 果蝇株系, 所使用的胚胎是先前所收集的于 -20℃ 下保存于甲醇中的胚胎. 胚胎原位杂交的方案依据 Sullivan 的“*Drosophila protocol*”^[8] 进行. 幼虫成虫盘的剥离, 固定和原位杂交的方案依据 Sullivan 的“*Drosophila protocol*”^[8] 中的实验步骤进行. *cycD* 的探针用 Dig 分子标记, 抗体是抗 Dig 的带有碱性磷酸酶 (AP) 活性的抗体 (AP conjugated anti-Dig, 购买自德国 ROCHE 公司). 通过观察碱性磷酸酶 AP 底物反应产生的沉淀物, 进行检测. 该实验中探针浓度是 1 ng/mL, 抗体的浓度是 1:2 000.

2 实验结果

2.1 *cycD* 反义探针特异性的检验

原位杂交检测 *cycD* mRNA 在果蝇晚三期幼虫的眼睛成虫盘 (eye imaginal disc) 的表达. 在眼睛中 *cycD* 的 mRNA 的集中于眼睛成虫盘的形态发生沟 (MF: morphogenetic furrow) (图 1B), 该模式和文献所记载的表达模式一致^[9]. 而在未加入探针的对照实验中, 形态发生沟处无法检测到任何信号 (图 1A). 此结果证明了合成探针的特异性.

2.2 原位杂交检测在不同的发育时期野生型果蝇胚胎中 *cycD* mRNA 的表达模式

通过原位杂交方法, 初步检测了 *cycD* mRNA 在胚胎中的表达模式. 在 stage5 时期, *cycD* 的 mRNA 主要集中于胚胎表面新生成的细胞中 (图 2A), 而在

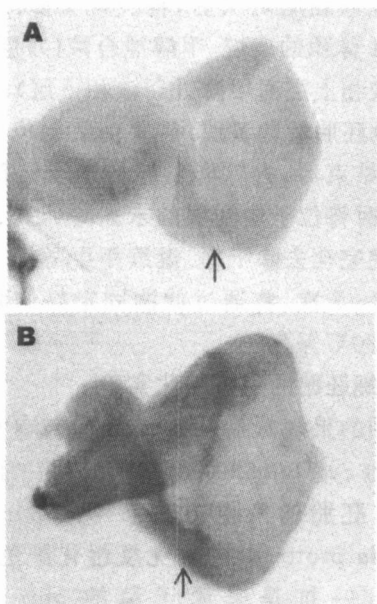


图1 原位杂交法检测 *cycD* mRNA 在眼睛中的表达
(箭头所示位置为形态发生沟)

Fig. 1 *In situ* hybridization to detect *cycD* mRNA in *Drosophila* eye imaginal disc

stage10 时期, *cycD* 的 mRNA 于发育中的神经系统、前中肠和后中肠中被检测到(图 2B)。在 stage14 时期, *cycD* 基因在刚刚形成的完整中肠内有强烈的表达(图 2C)。而在对照组(未加入探针的野生型果蝇胚

胎)处于相同时期的胚胎中(图 2D~F), 未检测到任何染色信号。

2.3 免疫组化法检测携带有 *cycD-lacZ* 报告基因的转基因果蝇株系的 LacZ 的表达模式

转基因果蝇株系 *cycD-lacZ* 是以 *cycD* 的启动子驱动 LacZ 蛋白表达的转基因株系, 因此胚胎中外源性的 LacZ 蛋白的表达即可模拟 *cycD* 基因的表达模式。通过免疫组化法检测到 LacZ 蛋白的表达模式, 可以间接地考察 *cycD* 基因的 mRNA 在体内的表达模式。

对 *cycD-lacZ* 果蝇系的胚胎进行免疫荧光染色, 并用野生型的果蝇(*w¹¹¹⁸*)胚胎作为对照。在正常曝光时间(曝光时间 6s), *cycD-lacZ* 果蝇胚胎有明显的染色信号(图 3A), 而在 *w¹¹¹⁸* 果蝇胚胎内无法检测到任何的染色信号(图 3B)。 *w¹¹¹⁸* 果蝇胚胎只在过度曝光(曝光时间 40 s)的情况下才能检测到染色信号(图 3C), 并且染色模式图和正常的曝光时间下 *cycD-lacZ* 胚胎的 LacZ 的模式图不一致, 过度曝光显示胚胎中有许多亮斑存在。过度曝光条件下所检测到的染色信号来源于该实验所产生的背景。在转基因果蝇 *cycD-lacZ* 的胚胎中, 正常曝光时间下能够检测到强烈的 LacZ 的表达来源于外源表达的 LacZ。通过免疫组化

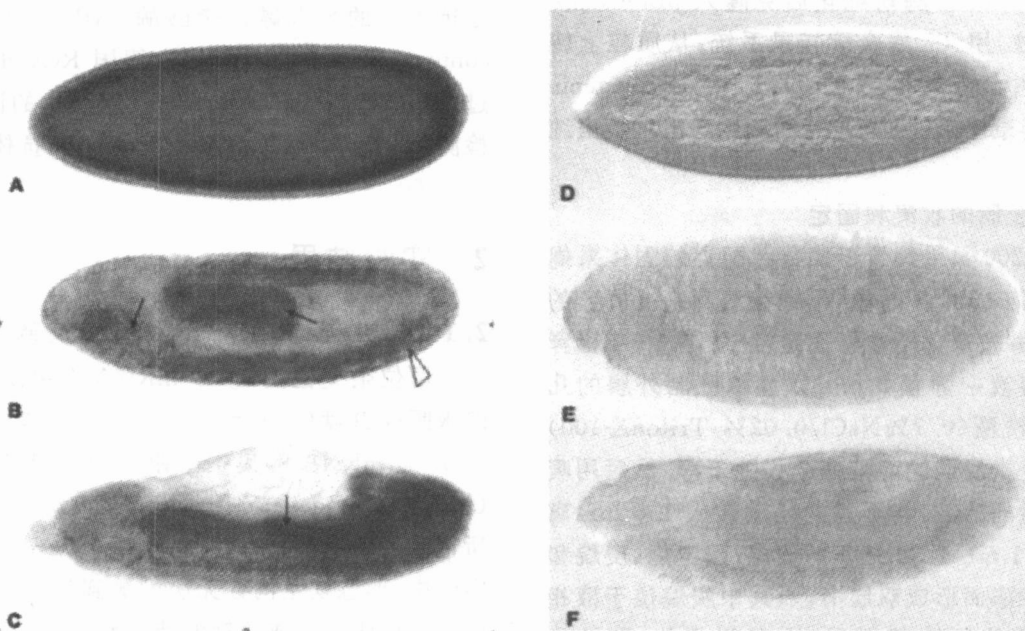


图2 原位杂交法检验 *cycD* 的 mRNA 在野生型果蝇胚胎的表达模式

(A)(D) 为 Stage 5 时期的胚胎, (B)(E) 为 stage10 时期胚胎, 黑色实心箭头所指示的分别是前中肠和后中肠部位, 黑色空心箭头所指示的是发育中的神经系统; (C)(F) 为 stage14 时期的胚胎, 黑色实心箭头所指示的是肠道部位, 此时的肠道基本发育完全, 前中肠和后中肠已经完全融合。A~C 是实验组, 而 D~F 是未加入任何探针的对照组

Fig. 2 *In situ* hybridization to detect *cycD* mRNA in wt embryo

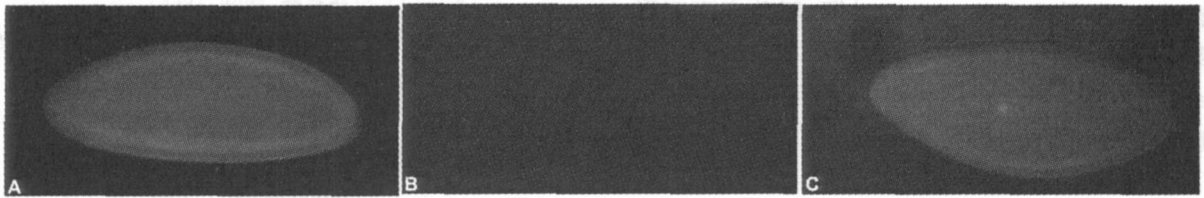


图 3 免疫组化法检测 LacZ 在转基因果蝇 *cycD-lacZ* 和野生型果蝇 *w¹¹¹⁸* 的表达

(A) 正常曝光时间(6 s)下 stage5 时期的 *cycD-lacZ* 胚胎; (B) 正常曝光时间(6 s)下 stage5 时期的 *w¹¹¹⁸* 胚胎; (C) 和 B 在相同的视野下, 过度曝光(40 s)的 *w¹¹¹⁸* 胚胎.

通过 A, B, C 图的对比, 可知 *cycD-lacZ* 果蝇株系的 LacZ 的表达非常的强烈, 实验背景可以忽略. 通过该免疫组化法可以敏感地检测到该转基因果蝇株系的外源性 LacZ

Fig. 3 Immunostaining to detect LacZ expression in transgenic *Drosophila cycD-lacZ* embryo and *w¹¹¹⁸* embryo

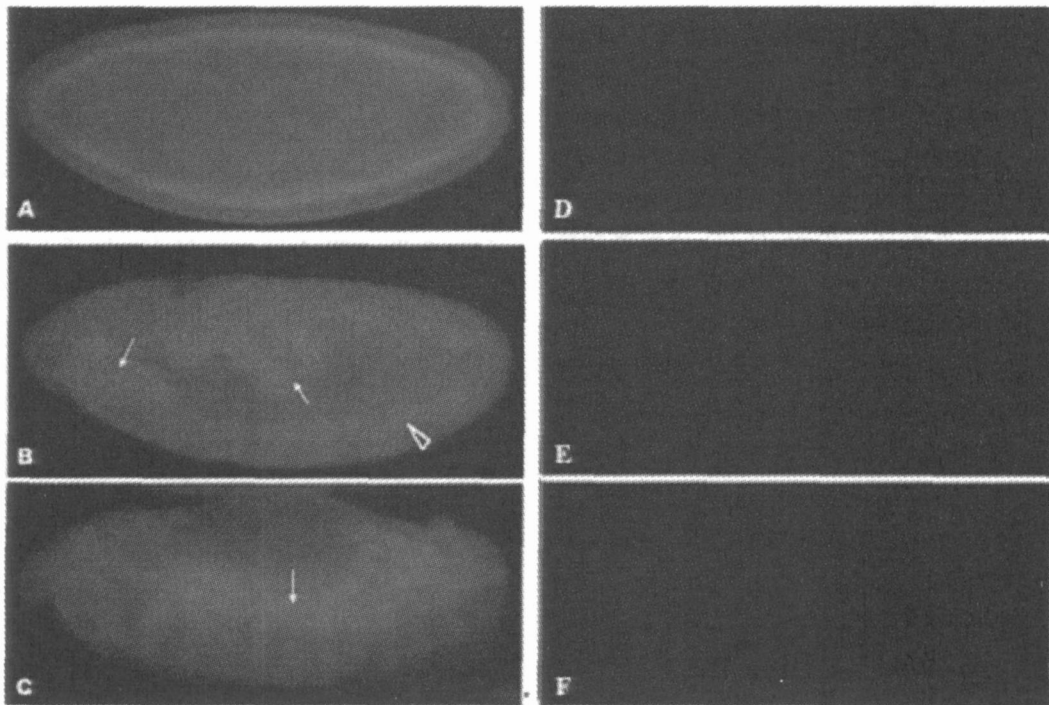


图 4 通过免疫组化的方法检验突变株系 *cycD-lacZ* 的胚胎中的 LacZ 的表达

(A)~(C) 显示 LacZ 蛋白在 *cycD-lacZ* 转基因果蝇株系的表达模式; (D)~(F) 检测 LacZ 在 *w¹¹¹⁸* 胚胎中的表达模式; (A) (D) 为 stage5 时期的胚胎染色结果; (B) (E) 为 stage10 时期胚胎染色的结果; (C) (F) 为 stage14 时期的染色结果; (B) 中的白色实心箭头指示前中肠和后中肠结构, 白色空心箭头标识的是发育中的神经系统; (C) 中的白色箭头标识中肠结构

Fig. 4 Immunostaining to detect LacZ in transgenic *Drosophila cycD-lacZ* embryos

法可以敏感地检测到该转基因果蝇株系的外源性 LacZ.

而后, 用同样的染色方法对不同时期的转基因果蝇株系 *cycD-lacZ* 的胚胎进行染色. 结果表明, LacZ 的表达模式和原位杂交所检测到的 *cycD* mRNA 基本一致. 在 stage5 时期(图 4A), 在胚胎表面新生成的细胞处可观察到强烈的 LacZ 蛋白的表达. 而在 stage10 时期(图 4B), LacZ 集中于前中肠, 后中肠和神经系统. 在 stage14 时期(图 4C), 则在肠道中有非常强烈的染色. 对照组野生型果蝇胚胎(图 4D~F)

中, 在同等的曝光条件下, 无检测到任何荧光信号.

3 讨论

果蝇由受精卵到一期幼虫的发育过程中, 正是细胞进行大量分裂和分化的时期, 处于这一个时期的胚胎, 为我们研究细胞分裂的分子调控机制提供了一个很好的实验模型. 通过对野生型果蝇的 RNA 进行原位杂交检测和对转基因果蝇株系的免疫组化染色, 我们阐明了在果蝇胚胎发育的不同时期, *cycD* 基因的

表达模式. 在胚胎发育的 *stage5* 时期, 胚胎表面新形成的细胞处能检测到强烈的 *cycD* 的 mRNA 信号. 而在 *stage10* 时期, *cycD* 基因主要于胚胎的神经系统, 前中肠和后中肠处表达. 而在 *stage14* 时期, *cycD* 的 mRNA 主要集中于刚刚形成的肠道中.

CycD 在胚胎的发育中, 有可能起到促进细胞进行分裂的作用. 根据已知的果蝇胚胎发育过程, *cycD* mRNA 的这种表达模式恰与每个时期富含分裂细胞的部位相对应. *stage5* 时期, 细胞正在胚胎表面进行分裂^[10], 而在 *stage10* 时期, 胚胎背部刚刚出现的后中肠正在向胚胎后部延伸, 而腹部的前中肠也正在向后中肠延伸以期与之融合, 并且前中肠和后中肠区域的细胞正在旺盛地分裂. 神经系统的细胞在 *stage10* 时期也正在旺盛地分裂^[10]. 而在 *stage14* 时期, 根据文献报道, 此时中肠有大量的 S 期细胞的存在, 暗示此时中肠细胞的染色体正在大量的复制^[11]. *cycD* mRNA 的表达模式与正在分裂的细胞的模式很相似, 可推测, 在胚胎发育的过程中, CycD 的主要功能和促进细胞分裂有关. CycD 有可能通过推动细胞由 G1 期进入 S 时期, 从而促进细胞分裂.

D 型周期蛋白的表达增高, 可以在许多类型的癌细胞中被检测到, 是细胞癌变的一个重要标记性蛋白. 我们通过研究果蝇 D 型周期蛋白 CycD 在果蝇发育中的调控机制, 为肿瘤细胞突变机制的研究奠定了很好的基础. 同时, 关于调控机制的研究, 也有助于找出抑制肿瘤细胞分裂的方案.

参考文献:

[1] 万永奇, 谢维. 生命科学与人类疾病研究的重要模型

——果蝇[J]. 生命科学, 2006, 18(5): 425– 429.

- [2] 邹向阳, 李连宏. 细胞周期调控与肿瘤[J]. 国际遗传学杂志, 2006, 29(1): 70– 73.
- [3] Coqueret O. Linking Cyclins to transcription control[J]. Gene, 2002, 299: 35– 55.
- [4] McMahon C, Suthiphongchai T, Ewen M E, et al. P/CAF associates with cyclinD1 and potentiates its activation of the estrogen receptor[J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1999, 96(10): 5382– 5387.
- [5] Adnane J, Shao Z, Robbins P D. CyclinD1 associates with the TBP-associated factor TAF(250) to regulate Sp1-mediated transcription[J]. Oncogene, 1999, 18: 239– 247.
- [6] Emmerich J, Meyer C A, Lehener C, et al. CyclinD doesn't provide Essential Cdk4-Independent Functions in *Drosophila*[J]. Genetics, 2004, 168: 867– 875.
- [7] Datar S A, Jacobs H W, Edgar B A, et al. The *Drosophila* CyclinD/CDK4 promote cellular growth[J]. EMBO, 2000, 19(17): 4543– 4554.
- [8] Sullivan W, Ashburner M, Hawley R S. *Drosophila* protocols[M]. USA: Cold spring harbor laboratory press, 2000.
- [9] Tsai Y C, Sun Y H. Long-range effect of Upd, a ligand for JAK/STAT pathway, on cell-cycle in *Drosophila* eye development[J]. Genesis, 2004, 39: 141– 153.
- [10] Roberts D B. *Drosophila*: a practical approach[M]. UK: Oxford University Press, 1997.
- [11] Chen X, Hou S X. CycD-Cdk4 and cyclin E-Cdk2 Regulate the JAK/STAT signal transduction pathway in *Drosophila*[J]. Developmental Cell, 2003, 4: 179– 190.

Expression Patterns of *cycD* mRNA in Different Stages of *Drosophila* Embryo

SHI Song-ting

(Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Cyclin D (CycD), an important cell cycle regulator, plays various roles in *Drosophila* development. By the method of RNA *in situ* hybridization and immunostaining, the author detected the expression patterns of *cycD* mRNA in different stages of *Drosophila* embryos. The results showed that at Stage 5, *cycD* mRNA was observed in all cells on the surface of the embryos; at stage10, *cycD* mRNA was detected in the developing nervous system, the anterior midgut (AMG) and posterior midgut (PMG); at stage14, expression of *cycD* mRNA was concentrated in the region of midgut. The establishment of this expression pattern of *cycD* mRNA during embryogenesis makes good foundations for further study of CycD function in *Drosophila* embryo development.

Key words: *cycD*; *in situ* hybridization; immunostaining; *Drosophila*