

文章编号: 1007- 2985(2006) 02- 0080- 04

# p21 基因在小鼠胚胎发育过程中的表达

李 鹂<sup>1,2</sup>, 黄衡宇<sup>1,2</sup>, 谢永芳<sup>3</sup>

(1. 吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首 416000; 2. 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650091; 3. 重庆邮电学院生物信息学院, 重庆 400065)

**摘 要:**以 E9 日龄至 E14 日龄昆明种正常小鼠胚胎为材料, 利用质粒扩增的、地高辛标记的基因探针在组织切片上进行 DNA- mRNA 分子原位杂交, 研究了 p21 基因在小鼠胚胎发育过程中的表达. 结果表明: p21 基因从 E10 日开始参与小鼠胚胎发育, 其表达特异性随着胚胎发育进程逐渐增强, 与它在细胞周期中的负调控作用相一致. p21 基因表达强度较稳定, 与其 mRNA 稳定有关.

**关键词:**原位杂交; p21 基因; 细胞周期调控; 基因表达

**中图分类号:** Q343

**文献标识码:** A

小鼠的胚胎发育是一个极为特殊的分化过程, 这个过程既包括细胞数目的不断增殖, 也包括细胞不断地退出细胞周期, 分化为具有不同功能的终末细胞. 小鼠胚胎发育过程同样受着细胞周期的调控, 而且可以设想细胞周期调控基因在胚胎发育过程中的作用与离体细胞或一般体细胞中的作用是有差异的. 一个细胞可与其邻近细胞相互促进细胞分化和组织器官发生; 分化成熟的细胞可产生抑素抑制邻近细胞发生同样的分化, 以防止器官组织的过度发育. 目前已有不少实验证明细胞周期调控基因在胚胎发育过程中的作用与在一般体细胞中的作用不同<sup>[1-2]</sup>. 本研究以小鼠胚胎为实验材料, 利用质粒扩增的、地高辛标记的基因探针进行组织切片上的 DNA- mRNA 分子原位杂交, 有选择性地研究 p21 基因在胚胎发育过程中转录(mRNA 合成)水平上的表达变化, 探讨小鼠胚胎发育的分子机制, 为探讨 p21 基因在胚胎发育中的可能作用提供实验依据.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 胚胎 实验用昆明种小白鼠, 购于中科院昆明动物所. 成年雌鼠 30 只和成年雄鼠 10 只, 雌雄(3: 1)合笼过夜. 次日早晨检查阴栓, 见有阴栓日以 0 日计算胎龄. 分别于第 9、第 10、第 11、第 12、第 13、第 14 日取孕鼠断颈处死, 立即取出鼠胚, 进行石蜡切片的固定和包埋等处理.

1.1.2 试剂来源 地高辛检测试剂盒、地高辛标记试剂盒均购自德国 Boehringer Mannheim 公司, p21 基因探针重组质粒由美国冷泉港实验室 Beach 教授赠送, 其他试剂和药品均为国产 A. R 级或进口分装.

### 1.2 方 法

1.2.1 载玻片的预处理 按文献[3]并稍加修改进行洗衣粉浸泡, 清水彻底清洗, 烘干, 1 N HCl 煮 20 min,

\* 收稿日期: 2006- 02- 09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39760034)

作者简介: 李 鹂(1973- ), 女(苗族), 湖南省吉首市人, 博士, 吉首大学生物资源与环境科学学院讲师, 主要从事细胞及分子生物学研究.

四蒸水洗至 pH 值为 6.5, 180 °C 烘烤 3 h 以上. 恢复室温后, 浸泡于体积分数为 0.01% 的 APES 溶液(3- 氨丙基三乙氧基硅烷(APES) 丙酮溶液) 中 10 s, 丙酮清洗 3 次, 新鲜的四蒸水冲洗 1 次, 空气干燥, 4 °C 存放备用.

1.2.2 杂交前组织处理 以下各步骤直至杂交, 所有的容器和称量勺、搅拌器等物品均在 160~ 180 °C 烤箱内烤 4 h. 配溶液的四蒸水经高压灭菌.

在旋转式石蜡切片机上切 7 μm 厚组织切片, 用甘油蛋白粘片剂贴在预处理的载玻片上, 37 °C 温育 24 h 后, 室温干燥备用. 杂交前石蜡切片经二甲苯脱蜡 2 次, 每次 20 min, 无水乙醇洗 2 次, 每次 10 min, 空气干燥, 2×SSC 饱和 20 min. 入预杂交液.

1.2.3 Dig- cDNA 探针的制备 含 p21 基因重组质粒采用“氯化钙法”<sup>[4-5]</sup> 程序操作. 经宿主菌 HB101 扩增, 按“碱裂解法”<sup>[4-5]</sup> 分离纯化, 获得 p21 质粒.

用地高辛标记试剂盒, 按 PCR 法标记 p21 探针<sup>[6]</sup>. 过程如下: 1) 第 1 次 PCR 扩增: 依次加入 2.5 μL 5' - 引物, 2.5 μL 3' - 引物, 2.5 μL 10×buffer, 1 μL 10×dNTP, 2 μL Mg<sup>2+</sup>, 0.5 μL p21 质粒, 0.2 μL Tag 酶, 混匀后设置程序 1×93 °C 3 min, 30×(93 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min), 72 °C 10 min; 2) 第 2 次 PCR 扩增: 将第 1 次 PCR 扩增产物取一半入 PCR 管, 依次加入 2.5 μL 5' - 引物, 2.5 μL 3' - 引物, 1.25 μL 10×buffer, 2 μL Mg<sup>2+</sup>, 2.5 μL dUTP 标记底物, 0.2 μL Tag 酶, 其余程序同上.

1.2.4 预杂交与杂交(具体杂交方法按文献[3], 并稍加修改进行).

预杂交: 将预杂交液(50% 去离子甲酰胺, 5×SSC, 5% (w/v) 的 Blocking Reagent, 0.2% SDS, 四蒸水) 滴在有杂交组织材料的载片上, 约 40~ 50 μL, 42 °C 孵育 4~ 5 h.

杂交: 在预杂交液中加入适量的变性标记探针, 探针浓度为 50 μg/L, 在 42 °C 湿盒杂交过夜.

杂交后的洗片过程: 杂交后 2×SSC 室温洗 1 h, 1×SSC 室温洗 1 h, 0.5×SSC 37 °C 洗 30 min, 0.5×SSC 室温洗 30 min, buffer I (0.1 mol/L tris- HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 值 7.5) 过渡后, 用封闭剂(3% 牛血清白蛋白, 0.3% TritonX- 100, buffer I 稀释) 室温孵育 2 h, 以消除非特异性抗原.

1.2.5 免疫反应及检测 抗地高辛抗体- 碱性磷酸酶交联剂(anti- digoxigenin- alkaline phosphatase, anti- dig- AP) 用 buffer I 按 1: 500 稀释, 室温孵育过夜; buffer I 洗 2 次(15 min×2), NBT 显色液暗盒显色 6 h; EDTA 终止反应; 乙醇系列脱水, 二甲苯透明, 树脂封片, Olympus 显微镜下观察.

## 2 实验结果

在小鼠不同发育时期的胚胎切片中检测到不同程度的 p21 表达信号(表 1).

9 日龄小鼠胚胎组织切片上, p21 探针几乎未检测到阳性信号.

10 日龄小鼠胚胎组织切片上, p21 探针开始检测到弱的阳性信号.

11 日龄小鼠胚胎组织切片上, p21 探针检测到的阳性信号仍然很弱, 但已开始出现区域特异性, 主要分布在脑壁的部分区域及神经节锥形等部位.

12 日龄小鼠胚胎组织切片上, p21 探针检测到的阳性信号与第 11 日龄强度几乎无变化, 但区域特异性明显增强. 眼球晶状体和视网膜的阳性信号极弱, 几乎未能观察到; 脑壁的阳性信号较弱, 均一散布在脑组织中; 心脏中几乎未检测到阳性信号; 消化道开始有较弱的阳性信号出现在内壁细胞中; 肝组织中无阳性信号存在.

13 日龄小鼠胚胎组织切片上, p21 探针检测到较强的阳性信号, 同时区域特异性变得更为明显. 眼球

表 1 p21 基因在小鼠胚胎发育过程中的表达

器官	11 日龄	12 日龄	13 日龄	14 日龄
眼球组织	-	-	+	++
脑组织	+	+	+	+
心脏组织	-	-	++	+
肺组织	Δ	Δ	+	++++
消化道	Δ	+	+	++
脊柱	Δ	Δ	+++	++++
面颌骨	Δ	Δ	+	++

注 Δ 一未观察到该组织; - 一无表达或表达极弱; + 一有弱表达; ++ 一有较弱的表达; +++ 一有强烈的表达; ++++ 一有极强烈的表达

中开始出现阳性信号, 主要分布在晶状体胞质中; 脑壁的阳性信号仍然较弱, 均一散布在脑组织中; 心脏有较弱的阳性信号突然出现, 散布在心肌层以及由心肌层突入腔内形成的心肌小梁中; 肺组织中有较弱的阳性信号, 在高倍镜下观察, 阳性信号主要集中在气管、支气管分支的管腔内壁上皮细胞和管壁细胞中; 消化道的阳性信号仍然较弱, 分布在内壁细胞中; 背侧的脊柱椎体中出现大量强烈的阳性杂交信号, 在高倍镜下观察, 椎体之间的分隔不明显, 阳性信号分布在椎体细胞和间隔中; 面颌骨、后肢芽出现较弱阳性信号; 肝组织中无阳性信号存在。

14 日小鼠胚胎组织切片上, p21 探针检测到强烈的阳性信号, 区域特异性较第 13 日龄更强。眼球中的阳性信号较强; 脑壁的阳性信号与第 13 日龄的强度相似, 稳定而均一的分布在脑组织中; 心脏的阳性信号急剧变弱, 颜色较淡; 肺组织的阳性信号急剧增强, 主要集中在气管、支气管分支的管腔内壁上皮细胞, 颜色极深; 消化道空腔内壁有阳性信号, 在高倍镜下观察, 阳性信号集中分布于内层上皮细胞; 背侧的脊柱椎体中阳性信号较第 13 日龄强度更强, 以颗粒状密集成团分布于椎体细胞中, 椎体之间的阳性信号已经极弱, 几乎未有标记; 肋骨的阳性信号也较强; 面颌骨中阳性信号集结成团状, 颜色较深; 前、后肢芽有较弱阳性信号存在; 另有一些截面上可见脐带内层 2~3 层细胞有阳性信号存在; 肝组织中无阳性信号存在。

### 3 讨论

细胞周期的调控机制极其复杂, 本研究仅仅只是初步探讨 p21 基因在胚胎发育过程中的表达变化, 以了解其生理功能的复杂性。p21 基因主要通过两方面调控细胞周期, 一方面 p21 基因与 cyclin、CDK、PCNA 形成四聚体复合物, 能有效抑制多种 cyclin-CDK 复合物的活性, 从而引起细胞 G1 期阻滞而不进入 S 期<sup>[7]</sup>, 此外它可在 CDK 缺乏时借助与 DNA 聚合酶的亚单位 PCNA 结合, 使 DNA 的复制受阻<sup>[8]</sup>。一旦 p21 基因功能丧失, 可使细胞在负生长信号存在条件下继续增殖。目前已知 p21 作为 p53 的下游效应分子, 主要与辐射引起的 G1 期阻滞有关, 使细胞退出细胞周期<sup>[9]</sup>, 从而协调细胞周期进程, 被视为细胞增殖抑制基因。

#### 3.1 p21 基因在小鼠胚胎不同发育时期中的表达

胚胎第 9 日是胚胎发育中器官原基形成时期, p21 基因不表达, 说明 p21 基因与第 9 日龄的小鼠胚胎发育过程无关。从第 10 日龄小鼠胚胎中检测到极弱的特异性表达信号。第 10 日龄正是小鼠胚胎各器官组织形成分化原基的时期, 同时也是细胞快速增殖的时期, p21 基因作为细胞增殖抑制基因在这一时期表达极弱, 与其生物学功能一致。p21 的表达信号在第 11 日和第 12 日较弱, 可能是因为第 11 日和第 12 日多数器官的细胞增长较快, p21 基因的弱表达有利于这些细胞的增殖。p21 的表达信号在第 13 日和第 14 日较强, 可能是因为第 11 日和第 12 日胚胎器官已经基本形成, p21 基因的表达有利于抑制这些细胞的增殖速度, 使细胞转入进一步的分化。

#### 3.2 p21 基因在小鼠胚胎不同器官中的表达

p21 基因在小鼠胚胎第 11 日和第 12 日龄眼球组织中均未表达, 直到第 13 日龄才出现较弱的表达信号, 说明眼球细胞在第 11 日和 12 日龄是以细胞增殖为主, 随着小鼠胚胎的发育, 眼球细胞的增殖逐渐被抑制, 转化为以分化为主。

p21 基因在脑组织中的表达从第 10 日就开始出现, 其表达强度在第 11—第 14 日变化不大, 相当稳定, 仅有区域特异性在改变。由于脑组织在小鼠胚胎中是各器官组织的控制中枢, 发育地位十分重要, 在早期胚胎中脑组织就占据整个胚胎体积的一半甚至更多, 因此它的发育分化需要一个相对稳定的调控。由于脑壁在第 11 日、第 12 日明显增厚, 脑组织室管膜层细胞分裂极多<sup>[10]</sup>, p21 基因在小鼠胚胎脑组织中的作用可能是与细胞增殖基因互相协调, 进而控制脑组织有步骤地在不同区域逐渐增殖, 这与 p53 基因在小鼠胚胎脑组织中的表达十分相似<sup>[11]</sup>, 从而保证脑组织在小鼠胚胎发育过程中能够处于一个稳定的发育分化环境。

p21 基因在小鼠胚胎第 11 日、第 12 日的心脏组织无表达, 阳性信号至第 13 日龄时突然以较强强度出现, 在第 14 日龄仍然能观察到阳性信号, 说明其表达有一定的时间性, 主要集中在第 13 日和第 14 日。从我们对其他细胞生长抑制基因做的实验结果来看<sup>[12]</sup>, p21 基因很有可能与 p16 基因起着互补的作用, 当 p16 基因表达强烈时, p21 基因不表达, 当 p16 基因表达减弱后, p21 基因开始表达, 两者共同起着抑制细胞增

殖、促进细胞分化的作用。

p21 基因在小鼠胚胎肺组织、消化道、脊柱和面颌骨中的表达基本上都发生在第 13 日龄后, 而且强度在第 14 日龄变得更强。对这样的现象可以从下列两方面来解释: 一是在急剧增殖的小鼠胚胎细胞中, 为防止细胞提前进入 S 期, p21 基因在 G1 早期抑止新合成的 CDK- cyclin 复合物活性, 与其他细胞增殖基因相互协调, 保证器官的程序化的发育过程; 二是此时胚胎发育过程中, 许多间充质细胞或新生细胞要分化为终末细胞, 由于 p21 的表达对调控机体的发育分化有极其重要的作用, 故 p21 的表达是与细胞分化有关。肝组织均未观察到 p21 基因的表达, 说明肝组织的发育与 p21 基因无关。

整体而言, p21 基因在小鼠胚胎发育过程中的表达强度或者比较稳定, 或者呈有规律性的增强, 这与其 mRNA 在细胞周期各期相中无明显改变有关<sup>[13]</sup>。

## 参考文献:

- [ 1 ] MULLER R, SLAMON D J, TREMBLAY J M, et al. Differential Expression of Cellular Oncogenes During Pre- and Postnatal Development of the Mouse. *Nature*, 1982, 299: 640- 644.
- [ 2 ] CHAPMAN D L, WOLEGMUTH D J. Identification of a Mouse B-Type Cyclin Which Exhibits Developmentally Regulated Expression in the Germ Line [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1992, 33: 259- 269.
- [ 3 ] G H 凯勒, M M 马纳克(著), 孙士勇(译). DNA 探针技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [ 4 ] F 奥斯伯, R 布伦特, R E 金斯顿, 等, 颜子颖等译, 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [ 5 ] 孟 玲, 谭德勇, 王焕校. CaCl<sub>2</sub> 法转化最佳条件的探讨 [J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 1996, 16(2): 106- 108.
- [ 6 ] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯(著), 金冬雁(译). 分子克隆实验指南(第 2 版) [M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [ 7 ] GULBS J M, KELMAN Z, HURWITZ J, et al. Structure of the e Terminal Region of p21 Complexed with Human PCNA [J]. *Cell*, 1996, 87( 2 ): 297- 306.
- [ 8 ] LI R, WAGA S, HANNON G J, et al. Differential Effects by the p21 CDK Inhibitor on PCNA-Dependent DNA Replication and Repair [J]. *Nature*, 1994, 369: 574- 578.
- [ 9 ] EL-DEIRY W S, TOKINO T, VELCULESCU V E. et al. WAF1, A Potential Mediator of p53 Tumor Suppression [J]. *Cell*, 1993, 75( 4 ): 817- 825.
- [ 10 ] 俞慧珠, 叶百宽. 小白鼠胚胎发生 [M]. 北京: 科学出版社, 1985.
- [ 11 ] 李 鹞, 黄衡宇. p53 基因在小鼠胚胎发育过程中的表达 [J]. *吉首大学学报(自然科学版)*, 2000, 21(4): 63- 66.
- [ 12 ] 李 鹞, 黄衡宇, 谢永芳. p16 基因在小鼠胚胎发育过程中的表达 [J]. *吉首大学学报(自然科学版)*, 2002, 23(3): 36- 39.
- [ 13 ] 刘平湖, 童坦君. 细胞周期负调控 [J]. *细胞生物学杂志*, 1996, 18(4): 149- 153.

## Study of Gene Expression of p21 with in Situ Hybridization Technique

LI Li<sup>1,2</sup>, HUANG Heng-yu<sup>1,2</sup>, XIE Yong-fang<sup>3</sup>

( 1. College of Resources and Environmental Science, Jishou University, Jishou 416000, Hunan China; 2. the Biology Department of College of Life Science and Chemistry; Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan China; 3. College of Bioformatic, Chongqing of Post and Telecommunications University, Chongqing 400065, China)

**Abstract:** Using in situ hybridization technique with dig labeled probe, the expression of p21 gene in mice's embryo development has been studied in this paper. The results can be summarized as follows: p21 gene does not take part in the formation of organ primordial during the development of embryo of age 9ds. It starts to express in the embryo of age 10ds and then express stronger with the development of the embryo. It seems to suggest that p21 gene is concord with the negative regulation of cell cycle. The little change in expression strengthen may relates with its stable mRNA.

**Key words:** in situ hybridization; p21; cell cycle regulation; gene expression

(责任编辑 易必武)