

参与小鼠神经发育的 mCcd1 基因的组织表达

马鑫^{①②} 景孝堂^① 刘淑红^① 吴燕^① 范文红^{①*} 王子仁^② 范明^①

(^①军事医学科学院基础医学所 北京 100850 ; ^②兰州大学生命科学学院 兰州 730000)

摘要 :介绍了一种可能在神经发育过程中起重要调节作用的基因 mCcd1 在小鼠发育过程中的 mRNA 和蛋白质水平的表达变化。通过对新生和成年小鼠多组织免疫杂交 (Western Blot) 和反转录 PCR (RT-PCR) 检测发现 :该基因在多种组织中广泛表达 ,但脑部显示高表达 ,并且新生鼠各组织表达均高于成体。小鼠 11.5 d 胚胎切片免疫组化实验也支持这一结果。mCcd1 在神经系统发育早期的表达暗示它可能参与了神经系统的发育过程。

关键词 :mCcd1 基因 ;神经发育 ;基因表达 ;小鼠

中图分类号 :Q955 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2006)03-27-04

Tissue Expression of mCcd1-a a Gene Involved in Mouse Neural Development

MA Xin^{②②} JING Xiao-Tang^① LIU Shu-Hong^① WU Yan^①

FAN Wen-Hong^① WANG Zi-Ren^② FAN Ming^①

(^①Institute of Basic Medical Science ,Academy of Military Medical Science ,Beijing 100850 ;

^②College of Life Science ,Lanzhou University ,Lanzhou 730000 ,China)

Abstract :Ccd1 (coiled-coil-DIX1) is a novel gene that may regulate the development of nervous system. We studied the developmental expression pattern of mCcd1 at protein and mRNA levels in mice. The results of Western blot and RT-PCR on both postnatal and adult mice indicate that the expression of Ccd1 is mainly concentrated in the brain and its expression in tissues of the postnatal mice is higher than that in the adult. Furthermore ,immunohistochemistry of prenatal 11.5 d embryos also supports this conclusion. Altogether ,Ccd1 may play an important role in the development of nervous system as well as other systems in mouse.

Key words :mCcd1 gene ; Neural development ; Gene expression ; Mouse

Ccd1(coiled-coil-DIX1)是一个仅在脊椎动物中存在而且相当保守的基因 ,其功能研究较少。目前的研究发现其在斑马鱼(*Danio rerio*)的神经模式化过程中起到了正向的促进作用^[1] ,在对小鼠 9.5 ~ 11.5 d 胚胎的整体原位杂交结果表明 ,在小鼠胚胎发育的 11.5 d ,其在神经系统有特异的表达^[2]。但其蛋白和 mRNA 水平的定量表达研究少见报道。

我们对新生和成年小鼠各组织的鼠 Ccd1 (mouse-Ccd1 ,mCcd1)表达进行了 RT-PCR 和 Western blot 检验。结果发现 ,mCcd1 表达广泛

分布于小鼠各组织 ,但主要集中于脑部 ,而且在新生小鼠的表达明显高于成年小鼠。同时对于小鼠 11.5 d 胚胎切片利用本室自制的兔抗 Ccd1 多克隆抗体进行免疫组化染色。结果也表明 ,mCcd1 在胚胎发育过程中集中于脑部。

基金项目 国家 863 基金资助(No.2002BA 711A01-03) ;

* 通讯作者 ,E-mail :fanmingchina@163.com ;fanwenhong@yahoo.com ;

第一作者介绍 马鑫 ,男 ,硕士 ,研究方向 :神经发育相关基因功能 ,E-mail :lysosomemx@yahoo.com。

收稿日期 2005-11-07 ,修回日期 2006-03-11

说明 mCcd1 在小鼠神经的发育过程中的确可能存在一定的作用。另外其他组织的表达变化也提示了其对于多个系统的发育可能同样存在调节作用。

1 材料与方法

1.1 反转录 PCR (RT-PCR) 新生一周和成年小鼠取各主要组织于 Trizol Reagen(Invitrogen)中匀浆,氯仿抽提法提取总 RNA,紫外分光光度计 DU800(BEAKMAN)定量后利用反转录酶 M-MLV(Promega)将 mRNA 反转录为 cDNA,PCR 过程利用的引物为:

mCcd1(up 5'-ACAGATGAGCCAGACTCT-3'; down 5'-TGATTCTCTCCACTC-3');
mactir(up 5'-GACCTGACAGACTACCTCA-3'; down 5'-GGAGCCAGAGCAGTAATCT-3');

反应条件 95℃ 10 min; 94℃ 1 min; 58℃ 1 min; 72℃ 1 min; 30 个循环;PCR 产物经 1.2% 琼脂糖电泳后凝胶成像仪扫描观察。

1.2 免疫杂交(Western blot) 取新生一周和成年小鼠各主要组织在蛋白裂解液中匀浆。冰上裂解 30 min 后 13 000 r/min 离心 15 min 取上清 -80℃ 保存;12% 的 SDS-PAGE 胶 140 V 电泳 90 min,半干法(semi-dry)21 V 转膜 50~70 min; TBS-T(pH 7.4 TBS 0.1% Tween 20)漂洗 3 × 10 min。5% 脱脂奶粉(TBS-T 配制)室温封闭 2 h; 本室自制的兔抗 Ccd1 多克隆抗体 1:1 500 结合 4℃ 摇晃结合过夜,TBS-T 漂洗 3 × 10 min; 山羊抗兔辣根过氧化物酶标记二抗(中山公司)1:3 000 室温结合 2 h;TBS-T 漂洗 3 × 10 min;DAB 试剂盒(中山公司)显色。

1.3 免疫组化(Immunohistochemistry) 鼠 11.5 d 胚胎石蜡切片梯度酒精脱蜡复水;0.1 mol/L 的 PBS(pH 7.4)洗 3 × 10 min;0.3% 的 Triton X-100 穿透 30 min;3% 双氧水 10 min 封闭内源性的辣根过氧化物酶;PBS 洗 3 × 10 min; 5% 羊血清封闭 30 min;加本室自制的兔抗 Ccd1 多克隆抗体 1:500 4℃ 过夜;PBS 洗 3 × 10 min; 山羊抗兔辣根过氧化物酶标记二抗 1:1 500 室温孵育 2 h;PBS 洗 3 × 5 min;DAB 试剂盒镜检

显色;PBS 浸泡去除多余 DAB 后梯度酒精脱水封片,镜下观察。

2 结果

2.1 mCcd1 在新生小鼠各组织中的表达分布 兔抗 Ccd1 多克隆抗体为本室自制,为了检测其特异性,利用 pCDNA4.1 构建了 Ccd1 的过表达载体,并且转染 p19 细胞。利用自制 Ccd1 抗体和抗 pCDNA4.1 载体自带的 myc 标签抗体对 Ccd1 抗体的特异性进行检测。结果可见,过表达 Ccd1 和正常的 p19 细胞在利用抗 Ccd1 抗体检测时在 50 ku 左右有单一的条带,而 myc 抗体检测也在 50 ku 处有单一表达,说明抗体特异性良好,可以用于后续实验(图 1)。

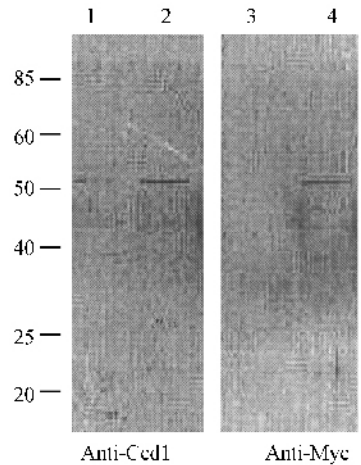


图 1 Ccd1 抗体特异性的 Western blot 检测
Fig. 1 Specificity detection of Ccd1 antibody by Western Blot

1 3. P19 细胞; 2 4. 过表达 Ccd1 的 P19 细胞。

1 3. P19 cell; 2 4. P19 cell with Ccd1 overexpression.

对于新生一周的小鼠各主要组织检测 mCcd1 的 mRNA 表达。结果表明,mCcd1 在新生一周各组织的表达都较广泛,大脑、小脑、眼睛、肺、心、脾、肝、肾、肌肉都有表达,其中肺、脾和肾的表达水平较低。

Western blot 检验蛋白水平的表达结果表明,新生一周小鼠该蛋白在脾脏以外的多个组织都表达,如脑、肺、心、肾和肝脏但脑中表达显著高于其他组织(图 2)。

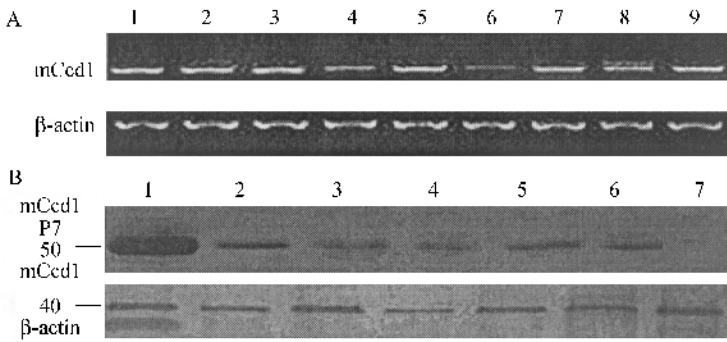


图 2 Ccd1 在新生小鼠各组织中的表达

Fig. 2 Expression of mCcd1 in postnatal mice

A. 新生一周小鼠各组织中 mRNA 表达。1~9 分别为大脑、小脑、眼睛、肺、心、脾、肝、肾、肌肉。

B. 新生一周小鼠各组织中 mCcd1 蛋白表达。1~7 分别为大脑、肺、心、肝、肾、肌肉、脾。

A. The mCcd1 mRNA expression in postnatal one week tissues. 1-9 Cerebrum, Cerebellum, Eye, Lung, Heart, Spleen, Liver, Kidney, Muscle.

B. The mCcd1 protein expression in postnatal one week tissues. 1-7 Cerebrum, Lung, Heart, Liver, Kidney, Muscle, Spleen.

2.2 mCcd1 在成体小鼠各组织中的表达分布

成体小鼠各组织 mCcd1 的 mRNA 表达和新生鼠相比同样表达广泛,但与新生鼠相比 mCcd1 在成体的表达明显降低。在检测的所有组织中,在大脑、小脑、肝、肾、睾丸有较高水平的表达,眼、肺、心、肌肉、卵巢表达水平较低,脾脏不

表达 mCcd1。Western blot 检验蛋白水平结果表明,心脏和脾脏都未检测到它的表达。而在大脑、小脑、肺、肾、卵巢和睾丸中都表达。相比新生小鼠,成体的 mCcd1 表达水平明显降低(图 3)。

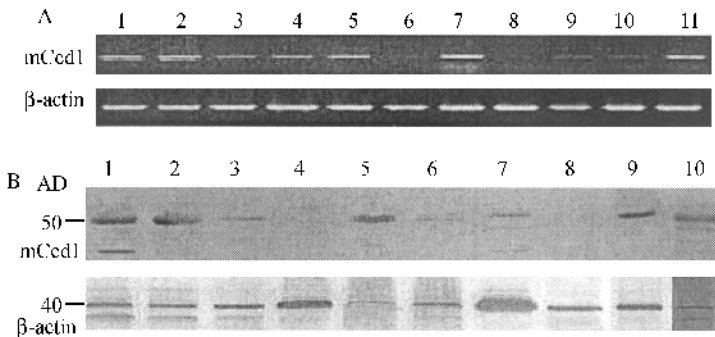


图 3 mCcd1 在成体鼠各组织中的表达

Fig. 3 Expression of mCcd1 in adult mice

A. 成体鼠各组织中 mRNA 表达。1~11 分别为大脑、小脑、眼睛、肺、肝、心、肾、脾、肌肉、卵巢、睾丸。

B. 成体鼠各组织 mCcd1 蛋白表达。1~10 分别是小脑、大脑、肺、心、肝、肾、肌肉、脾、卵巢、睾丸。

A. The mCcd1 mRNA expression in adult mice. 1-11 Cerebrum, Cerebellum, Eye, Lung, Liver, Heart, Kidney, Spleen, Muscle, Ovary, Testis.

B. The mCcd1 protein expression in adult mice. 1-10 Cerebellum, Cerebrum, Lung, Heart, Liver, Kidney, Muscle, Spleen, Ovary, Testis.

2.3 小鼠胚胎组织切片中 mCcd1 的表达

11.5 d 小鼠胚胎切片组化结果(图 4)表明,胚胎 11.5 d mCcd1 的表达主要集中在神经系统:中脑(midbrain, MB);延髓(medulla oblongata, MO);脊髓(spinal cord, SC)^[31]。

3 讨论

Ccd1 基因是利用差异显示技术筛选胎脑和成年大脑差异表达基因过程中筛选出来的一个新基因。我们利用数据库资源对该基因的同源基因进行了生物信息学分析,发现该基因只

在脊椎动物中存在而且相当保守。Shiomi、Uchida 等于 2003 年报道了利用显微注射的方法研究斑马鱼 *Ccd1* 的在胚胎发育过程中的功能 结果发现它是作为 Wnt 信号通路的一个正调节因子起作用^[1]。景孝堂等于 2005 年对小鼠 9.5 ~ 11.5 d 胚胎进行整体原位杂交的实验表明 胚胎 11.5 d *mCcd1* 有明显表达 且主要集

中于端脑、眼原基、间脑、中脑、菱脑、脊髓^[2]。我们对新生和成体小鼠多组织的 Western blot 及 RT-PCR 的实验结果从转录和转译两个水平都证明了 *mCcd1* 在脑部的高表达。对 11.5 d 的胚胎染色表明了其在胚胎中脑和后脑的定位。这些实验结果从不同的侧面验证了其在神经发育过程中可能起着重要的调节作用。

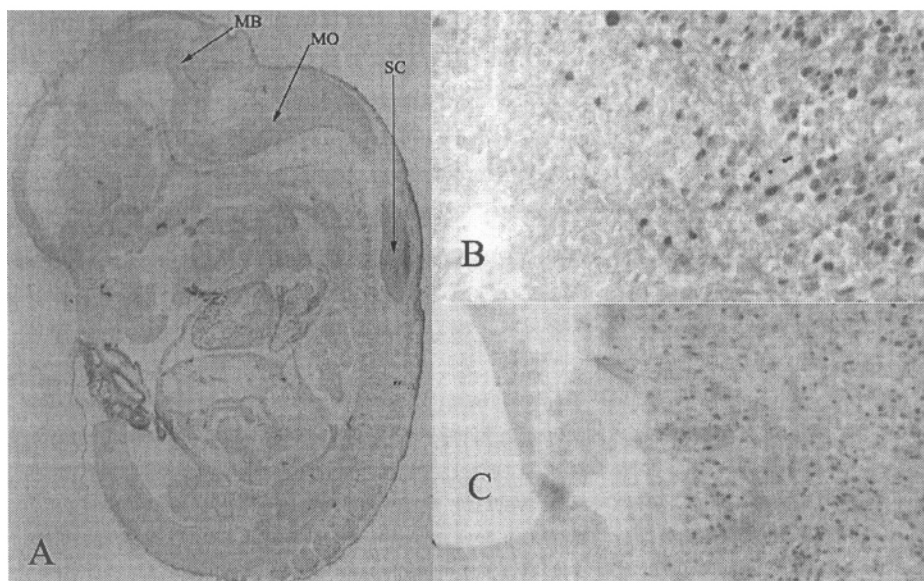


图 4 *mCcd1* 在小鼠胚胎神经系统中的表达

Fig. 4 Expression of *mCcd1* in mouse embryo's neural system

A :11.5 d 小鼠胚胎 1.2×2.5 ; B :中脑局部 10×3.3 ; C :中脑局部 4×3.3。

A :11.5 d embryo 1.2×2.5 ; B :midbrain 10×3.3 ; C :midbrain 4×3.3。

MB :中脑 (midbrain) ; MO :延髓 (medulla oblongata) ; SC :脊髓 (spinal cord)。

另外 *Ccd1* 是一个具有螺旋-螺旋结构域和 Dishevelled-Axin (DIX) 结构域的蛋白^[1,4]。其中螺旋-螺旋结构域在大约 10% 的蛋白分子中都存在 该结构域对蛋白质的组装和发挥功能非常重要。虽然单个螺旋-螺旋结构很简单 但它们可以平行或反向平行排列组装成不同的结构。而且可以和其他结构域相互作用形成同源或异源二聚体或多聚体 这些性质使它们功能多样 参与许多重要的生命过程^[5]。我们发现对比新生和成体鼠各组织 (如 肺、心、肝、肾等) 在新生阶段 *mCcd1* 的表达明显高于成体鼠。这也提示 *Ccd1* 可能参与了多个系统的发育过程 这一观点还需要进一步的实验来验证。

参 考 文 献

[1] Shiomi K ,Uchida H ,Keino-Masu K ,et al . *Ccd1* ,a novel protein with a DIX Domain ,is a positive regulator in the Wnt signaling during zebrafish neural patterning . *Curr Biol* 2003 **13** :73 ~ 77 .
 [2] 景孝堂 吴燕 刘淑红等 . 整体原位杂交研究 *mCcd1* 在小鼠胚胎发育过程中的表达 . 军事医学科学院院刊 ,2005 , **29** (1) :49 ~ 54 .
 [3] Kaufman M H . *The Atlas of Mouse Development* . London : Academic Press ,1992 .
 [4] Katoh M ,Katoh M . KIAA1735 gene on human chromosome 11q23.1 encodes a novel protein with myosine-tail homologous domain and C-terminal DIX domain . *Int J Oncol* 2003 **23** (1) : 145 ~ 150 .
 [5] Burkhard P ,Stetefeld J ,Strelkov S V . Coiled-coils : a highly versatile protein folding motif . *Trends Cell Biol* 2001 **11** :82 ~ 88 .