

# chOPG RNA 探针的制备及其在鸡骨组织的原位杂交

张风荣 侯加法

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)07-0521-04

**摘要:**目的 制备地高辛标记的禽 OPG cRNA 探针。方法 将目的片段重组到 T 载体中,构建 chOPG/pGM-Teasy 重组质粒, EcoRI 酶切鉴定并测序验证。分别用 SalI 和 NcoI 进行酶切得到线性化 DNA 模板,用 Sp6 和 T7 RNA 聚合酶体外转录合成地高辛标记的正反义 RNA 探针。运用斑点杂交的方法检验探针的标记效率,并通过骨组织原位杂交反应进一步检测探针标记是否制备成功。结果 成功构建出 chOPG/pGM-Teasy 质粒。结论 获得的高效正、反义 chOPG cRNA 探针,为进一步研究 OPG 在蛋鸡各组织中的表达奠定基础。

**关键词:** 体外转录; 地高辛标记; chOPG; 原位杂交

doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.07.010

**Preparation of cRNA probe of chOPG and its in situ hybridization of bone tissue in chicken** ZHANG Fengrong, HOU Jiafa. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

**Abstract:** **Objective** To get chOPG cRNA probe labeled by digoxigenin. **Methods** A fragment of chOPG gene was inserted into T vector, and identified with sequencing. Then we linearized the circular plasmid with appropriate restriction enzymes, and synthesized the cRNA probe in vitro by SP6 and T7 RNA polymerase. Dot blotting and in situ hybridization of bone were adopted to detect the labeling efficiency. **Results** chOPG cRNA probe was successfully synthesized. **Conclusion** Higher sensitivity and credibility chOPG cRNA probe labeled by digoxigenin could be a good tool for further studying the function of OPG.

**Key words:** In vitro transcription; Digoxigenin label; chOPG; In situ hybridization

OPG 于 1997 年由两个独立的工作小组同时发现, Simonet 等<sup>[1]</sup>在测序胎鼠小肠 cDNA 文库时发现一段序列,它表达的蛋白能明显抑制破骨细胞(Osteoclast, OC)的形成,并引起骨密度升高,将其命名为骨保护素。同时, Yasuda 等<sup>[2]</sup>在研究破骨细胞调控的过程中也分离出一种可以抑制破骨细胞功能的细胞因子,故称之为破骨细胞形成抑制因子(Osteoclastogenesis inhibitor factor, OCIF),基因序列分析证实它们是同一种物质。OPG 是由 401 个氨基酸残基组成的肝素结合分泌型糖蛋白<sup>[3]</sup>,属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员。OPG 是 RANKL 的诱饵性受体与 RANKL 竞争性结合,从而阻断 RANKL 和 RANK 二者的联系,抑制破骨细胞分化的最终阶段,抑制成熟破骨细胞的活性并诱导其凋

亡<sup>[4-8]</sup>,提示对 OPG 的深入研究和应用,将为骨质疏松等骨骼疾病的发病机制、预防及治疗开创一个新的途径,已成为骨骼生物学领域的一个研究热点。近年来研究表明,体内调节骨代谢的众多激素和细胞因子均通过调节 OPG/RANKL 的平衡而发挥作用<sup>[9-11]</sup>。由于异常增强的破骨细胞生成和骨吸收作用是骨质疏松症的特点,以破骨细胞作为治疗该疾病的靶细胞,应用 OPG 阻断 RANKL/RANK 通路,有望成为骨质疏松症的新的治疗手段。本文通过体外转录的方法成功制备出 chOPG cRNA 探针,为进一步探讨 OPG 在禽骨代谢中的功能提供其研究手段。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

产蛋后期的 ISA 笼养蛋鸡,购自南京某鸡场。chOPG 模板由本实验室博士姚静提供<sup>[12]</sup>。TaqDNA 聚合酶购于 TaKaRa 公司,限制性内切酶 EcoRI 购于

作者单位: 210095 南京,南京农业大学动物医学院

通讯作者: 侯加法, Email: jfhou@njau.edu.cn

TaKaRa 公司,限制性内切酶 SalI、NcoI 购于 Fermentas 公司, pGM-Teasy 载体、T4DNA 连接酶购于天根公司,地高辛 RNA 标记试剂盒购于 Roche 公司,凝胶回收试剂盒购于 Axygen Biosciences 公司。

## 1.2 目的基因片段的扩增

设计引物,由上海英骏生物技术公司合成:上游: 5'-ACAGGACCGTGTCTGCGAGT-3', 下游: 5'-TGAAACCCAGAGCACTACAG-3'。预期扩增 PCR 产物长度为 215 bp,其编码区为 374 ~ 393 和 569 ~ 588。

以本实验室提供的 chOPG 为模板进行 PCR 扩增,条件为 95 °C,预变性 5 min; 94 °C,变性 45 s; 53 °C,退火 45 s; 72 °C,延伸 1 min。循环 30 次。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,用凝胶回收试剂盒回收扩增条带, -20 °C 保存备用。

## 1.3 重组质粒 chOPG/PGM-T(+) 的构建<sup>[13]</sup>

将回收的目的 DNA 片段与 T 载体连接,转化大肠杆菌感受态细胞后挑选菌落,提取质粒,用限制性内切酶 EcoRI 酶切初步鉴定后,送南京基天有限公司测定其序列。

## 1.4 RNA 转录模板的制备

将 chOPG/PGM-T(+) 接种到含有 AMP 的 LB 培养基中,37 °C 振荡过夜,提取质粒,分别用限制性内切酶 NcoI 和 SalI 进行酶切,使其完全线性化。酚/氯仿(1:1),无水乙醇沉淀,70% 乙醇洗涤,干燥后溶于 50  $\mu$ L DEPC 水中,用紫外分光光度计进行定量。线性化的质粒作为体外转录的模板,保存于 -20 °C 备用。

## 1.5 chOPG RNA 探针的制备

采用 Sp6 和 T7RNA 聚合酶,按照 Roche 地高辛标记试剂盒提供的步骤,分别标记 NcoI 和 SalI 酶切回收的片段。用紫外分光光度计测定探针浓度。将所标记的探针和标准探针(试剂盒提供已知浓度的对照 RNA 探针)共同按梯度稀释点样于尼龙膜上,采用斑点杂交(dot blotting)的方法分析所标记探针的浓度和灵敏度。

## 1.6 原位杂交技术鉴定 chOPG cRNA 探针<sup>[14]</sup>

原位杂交具体方法参照 Roche 公司的实验手册并结合加以改进。取 56 周龄的健康产蛋鸡的长骨,4% 多聚甲醛固定不超过 12 h, PBS 冲洗, EDTA 脱钙, ddH<sub>2</sub>O 冲洗, 梯度酒精脱水、二甲苯透明和浸腊包埋切片。将切成 5  $\mu$ m 的薄片黏附于涂有黏附剂的载玻片上,40 °C 恒温箱内过夜干燥切片。用新鲜二甲苯脱蜡 2  $\times$  10 min, 梯度酒精脱水各 5 min,

ddH<sub>2</sub>O 漂洗 2  $\times$  5 min, PBS(pH 7.4) 孵育 2  $\times$  5 min, 甘氨酸/PBS 孵育 2  $\times$  5 min, 0.3% TrionX-100/PBS 处理 15 min, PBS 漂洗 2  $\times$  5 min, 蛋白酶 K37 °C 消化 30 min, 4 °C 4% 多聚甲醛/PBS 后固定至少 5 min, PBS 漂洗 2  $\times$  5 min, 0.25% 乙酸酐/0.1 M 三乙醇胺缓冲液震荡孵育 2  $\times$  5 min, 预杂交缓冲液 37 °C 至少孵育 10 min, 沥干预杂交缓冲液, 每张切片滴加 20  $\mu$ L 杂交液(探针浓度 5 ~ 10 ng), parafilm 膜封片, 42 °C 湿盒中杂交过夜。浸泡在 2  $\times$  SSC 中 5 ~ 10 min 移去 parafilm 膜, 2  $\times$  SSC, 37 °C 振荡漂洗 2  $\times$  15 min, 1  $\times$  SSC, 37 °C 振荡漂洗 2  $\times$  15 min, 0.1  $\times$  SSC, 37 °C 振荡漂洗 2  $\times$  30 min。Buffer I 洗涤 2  $\times$  10 min, 封闭液封闭 30 min, 弃去封闭液加入羊抗地高辛-碱性磷酸酶 Fab 片段 37 °C 2 h。Buffer I 洗涤 2  $\times$  10 min, Buffer II 孵育切片 10 min, NBT/BCIP 显色 2 ~ 24 h, 光镜下观察染色结果。Buffer III 终止显色, 蒸馏水洗涤, 梯度酒精、二甲苯脱水, 中性树脂胶封片, 显微镜分析结果。

## 2 结果

### 2.1 chOPG/PGM-T 重组质粒酶切鉴定

将 PCR 产物克隆到 T 载体上,并以限制性内切酶 EcoRI 酶切鉴定,经琼脂糖凝胶电泳鉴定,可见小于 250 bp 的酶切片段,与预期结果相符(图 1)。

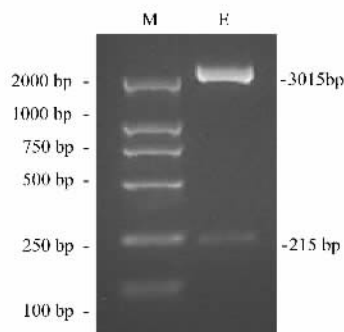


图 1 chOPG/PGM-T Easy EcoRI 酶切鉴定电泳图

M: DNA Marker(DL-2000);

E: chOPG 片段 215 bp, PGM-Teasy Vector 3015 bp

### 2.2 正、反义 chOPG cRNA 探针效价检测

将标记的正、反义探针和试剂盒提供的标准探针(100 ng/ $\mu$ L)同时进行 10 倍梯度稀释,即从  $10^{-1}$  ~  $10^{-6}$  个稀释度,点于尼龙膜上,如图 2 所示。本实验通过 Sp6 和 T7 RNA 聚合酶转录得到的地高辛标记 chOPG 正、反义 RNA 探针总量分别为 6  $\mu$ g 和 9  $\mu$ g。

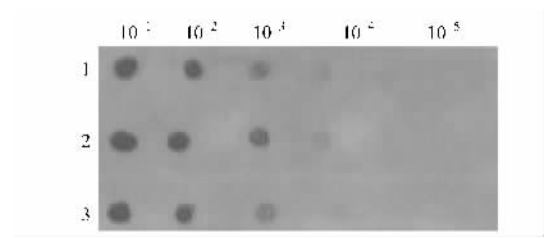


图 2 chOPG RNA 探针斑点杂交

1. 标准探针 (Control probe) (100 ng/ $\mu$ l) 2. 反义探针 (Anti-senseprobe) 3. 正义探针 (Senseprobe)

2.3 原位杂交

采用标记好的 chOPG RNA 探针进行原位杂交反应,观察探针的特异性。通过杂交反应,用 NBT/BCIP 显色,在鸡的骨组织上能看到清晰的蓝色杂交信号,提示鸡骨组织可表达 OPGmRNA,同时也进一步说明该探针为反义探针(图 3),证明成功制备出 chOPG RNA 探针。下图箭头所指为典型的原位杂交信号,由图中可以看出 chOPG 在骨组织中主要在骨基质和骨细胞表达。

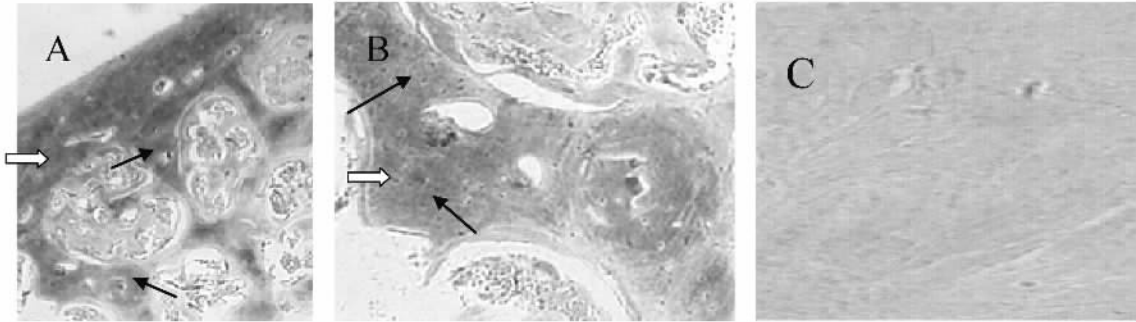


图 3 原位杂交结果

A: 骨组织,  $\times 100$  B: 骨组织,  $\times 200$  ( $\uparrow$ : 阳性骨细胞;  $\uparrow$ : 阳性骨基质); C 阴性对照,  $\times 100$

3 讨论

骨保护素是一个与 TNF 受体超家族成员具有同源性的神秘蛋白,其功能是作为 RANKL 的可溶性诱饵受体和 RANK 竞争性结合 RANK-L, 阻断 RANKL 与 RANK 结合,从而阻断 OC 的形成和成熟过程。因此,OPG 是破骨细胞体外成熟和活化的有效的抑制剂<sup>[9]</sup>。近年来研究表明,体内调节骨代谢的众多激素和细胞因子均通过调节 OPG/RANKL 的平衡而发挥作用。OPG/RANKL/RANK 系统的确立是过去 10 年间人们在骨吸收和骨形成领域研究中最重要发现,了解 OPG/RANKL/RANK 系统的调控机制,有助于新药的开发和治疗手段的更新。

与放射性标记探针相比,地高辛标记的 cRNA 探针具有一定的优越性,既安全易保存,又操作简便,省时间 与 DNA 探针相比,cRNA 探针为单链,杂交前不用高温变性,避免了应用双链 DNA 探针在杂交反应中存在的两条链之间的复性问题和第二条竞争性杂交问题,且形成的 cRNA-RNA 杂交体更稳定,杂交反应后可用 RNA 酶洗脱除去未结合的探针,故其特异性强;与生物素探针相比,地高辛标记的 cRNA 探针不受组织和细胞中内源性生物素的干扰<sup>[17,18]</sup>。而采用人工方法合成寡核苷酸探针,一般

片段较短,易发生碱基错配。本研究采用体外转录的方法,在转录 RNA 的同时进行 DIG 标记,方法更为简捷。因此,使用 cRNA 探针可使试验具有更高的灵敏度和可信度。

试验过程中防止 RNA 酶污染是保证试验成功的关键。由于 RNA 酶广泛存在组织之中且稳定性很高,故组织中的 mRNA 极易被 RNA 酶降解而得出阴性结果。因此,如何最大限度地既保存组织细胞中 mRNA 含量,又较好地保持组织细胞结构,是解决 mRNA 原位杂交效果的关键。4% 多聚甲醛固定剂具有这两方面的功能,因多聚甲醛不会与蛋白质产生广泛的交叉连接,不会影响探针穿透入组织或细胞。其他固定剂如醋酸-酒精的混合液、Bouin's 液、Carnoy's 液等能为增加核酸探针的穿透性提供最佳条件,但它们不能最大限度的保存 RNA,而且对组织结构也有损伤。戊二醛能够较好的保存 RNA 和组织形态结构,但由于和蛋白质产生广泛的交叉连接,从而大大地影响了核酸探针的穿透性。至今,多聚甲醛仍被公认为是 ISHH 较为理想的固定剂<sup>[14]</sup>。另外固定时间也不宜过长,最好 4 h 以内,最多不超过 12 h,固定时间过长会增加细胞内生物分子的交联,影响探针的穿透力,降低杂交效果。组织中的 RNA 降解速度很快,为取得较好的杂交效果,从取

材到进入固定的时间应不超过 30 min,尽可能减少 RNA 的降解<sup>[15-19]</sup>。为排除 RNA 酶的干扰,要求所有的实验器材在经过常规清洗之后应在 180℃ 高温烘烤 5 h 以上,所有试剂均应用经 DEPC 处理的双蒸水配制。在整个实验过程中要使用干净的手套、帽子防止外源性酶的污染。

骨组织由于矿物盐的存在,使原位杂交非常困难,为此必须对骨组织先进行脱钙,但脱钙过程对 RNA 有明显的降解作用。与其他脱钙剂相比,EDTA 可减少组织损伤,尤可减少细胞超微结构的损伤。常规骨组织脱钙使用的是酸性脱钙液,易使组织酸化,操作不当易破坏组织细胞的形态结构,细胞核不易着色。另外,强酸溶解钙盐时也容易破坏蛋白和杂交信号。EDTA 是一种优良的脱钙螯合剂,对组织破坏性小,能保持组织细胞的完整结构,对细胞显微化学改变小,不易破坏杂交信号,为高质量的骨组织原位杂交试验提供了保证。

原位杂交组织化学和分子生物学方法均可在组织切片中用于表达和定位 RNA,原位杂交方法的一个优势在于不必将基因从组织中提取出来。这样,原位杂交对于检测特异基因非常有用,特别是骨组织中的 RNA,因为从高度矿化的硬骨组织中提取 RNA 是非常困难的,故采用原位杂交的方法对检测基因在骨组织中的表达和定位是方便有效的手段。

## 【参 考 文 献】

- [1] Simonet W S, Lacey D L, Dunstan C R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89(2): 309-319.
- [2] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*, 1998, 139(3): 1329-1337.
- [3] Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, et al. Characterization of structural domain of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem*, 1998, 273(9): 5117-5123.
- [4] Simonet W S, Lacey D L, Dunstan C R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89(2): 309-319.
- [5] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitor factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*, 1998, 139(3): 1329-1337.
- [6] Hofbauer L C, Khosla S, Dunstan C R, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(1): 2-12.
- [7] Blair J M, Zheng Y, Dunstan C R. RANK Ligand. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(6): 1077-1081.
- [8] Bai Y D, Yang F S, Xuan K, et al. Inhibition of RANK/RANKL signal transduction pathway: A promising approach for osteoporosis treatment. *Med Hypotheses*, 2008, 71(2): 256-258.
- [9] Lars E T, William J B, Josef M P. RANK-L and RANK T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol*, 2002, 20: 795-797.
- [10] Hofbauer LC, Schoppert M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA*, 2004, 28: 292(4): 490-495.
- [11] 姚静,侯加法. OPG/RANK/RANKL 系统的研究进展. *动物医学进展*, 2006, 27(5): 5-9.
- [12] 姚静. 鸡骨保护素(chOPG)基因的克隆、表达及生物学活性研究. 南京: 南京农业大学, 2007: 97-110.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南. 3 版. 黄培堂, 等, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 742-748.
- [14] 蔡文琴, 王伯云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都: 四川科学技术出版社, 1994: 408-409.
- [15] 黄淇, 赵瑞波. 组织固定对石蜡切片 mRNA 原位杂交的影响. *黑龙江医学*, 2002, 26(7): 521.
- [16] 曾晓蓓, 尚宏伟, 王秀琴, 等. 原位杂交组织化学标本的保存方法. *解剖学杂志*, 1999, 22(5): 469-470.
- [17] 向正华, 刘厚奇. 核酸探针与原位杂交技术. 上海: 第二军医大学出版社, 2001: 26-168.
- [18] 刘厚奇, 向正华. 原位检测技术. 北京: 人民军医出版社, 2002: 141-165.
- [19] 侯刚, 强劳明. RNA 原位杂交技术难点及针对措施. *四川解剖学杂志*, 2006, 16(1): 60-61.

(收稿日期: 2009-03-10)