

尼罗罗非鱼整胚原位杂交技术的建立和初步应用

曹建萌¹, 卢迈新^{1*}, 叶 星¹, 曾祖聪^{1,2}, 高风英¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所,农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室,广东 广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

摘要: 为了研究尼罗罗非鱼胚胎发育和器官形成过程中基因功能和基因表达图式,本研究建立了尼罗罗非鱼的整胚原位杂交流程。尼罗罗非鱼的胚胎具有卵黄大、不透明、色素出现早等特点,因此现有鱼类整胚原位杂交方法不能完全适用于尼罗罗非鱼的胚胎,故本研究做了相应的调整和优化:通过提高 H₂O₂ 的浓度和添加 KOH,改良了尼罗罗非鱼胚胎的色素去除方法;使用冷丙酮代替蛋白酶 K 在提高胚胎通透性的同时保持胚胎完整;减少了探针回收和抗体回收后的洗涤次数,完善了结果的图像采集和胚胎保存方案。使用尼罗罗非鱼的重组激活基因 *Rag1* 作为探针基因,整胚原位杂交结果显示 *Rag1* 基因表达的位置与已报道的斑马鱼和日本青鳉的 *Rag1* 基因在胚胎中的表达位置高度保守,胚胎完整,基因表达位置清晰可见,表明此套尼罗罗非鱼的整胚原位杂交技术流程成功有效。

关键词: 尼罗罗非鱼;整胚原位杂交;胚胎发育;重组激活基因(*Rag1*)

中图分类号: Q 954.4; S 917.4

文献标志码: A

整胚原位杂交 (whole mount in situ hybridization, WISH) 又称整体原位杂交,是研究胚胎发育和器官形成过程中基因功能和基因表达图式的重要手段。原位杂交技术最早由 Gall 和 Pardue^[1] 建立,利用此技术在爪蟾 (*Xenopus laevis*) 染色体上成功定位了多拷贝顺序。Westerfield^[2] 最早将此技术引进到斑马鱼 (*Danio rerio*) 组织切片中检测基因的表达与定位。随着该技术的不断发展,其应用越来越广泛,目前所有的模式动物和植物中都有该技术的应用。该技术早期主要应用在组织切片和整体胚胎中,现在其应用领域正不断拓宽,Gerlach 等^[3] 在斑马鱼成体的肾脏中应用该技术标记了成体肾脏中的 *cadherin17* 和 *mafba* 基因 mRNA 的表达位置,实现了器官水平的整体原位杂交。

WISH 技术在鱼类的胚胎研究中同样得到了广泛的应用。Scemama 等^[4] 利用该技术检测了 *hoxa2a* 和 *hoxa2b* 基因在条纹鲈 (*Morone saxatilis*)

胚胎中的表达图式。在异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 胚胎发育的研究中,Liu 等^[5] 利用 WISH 技术研究了 *CagAFPIV* 基因从胚胎发育的 40% 下包时期到受精后 1 天 (day post-fertilization, dpf) 时期的表达图式。除了应用于基因表达图式的研究中,WISH 技术也应用于基因进化比较中。在研究比较 *nanog* 基因的 5' 上游序列在硬骨鱼和哺乳动物中进化和功能时,Marandel 等^[6] 利用 WISH 技术揭示 *nanog* 基因在银鲫 (*C. auratus*) 中的母源表达图式与其他物种的一致,在进化上是保守的。Escobar 等^[7] 克隆 *Paralichthys adspersus* 的 *IGF-1* 和 *IGF-1R* 基因后,通过 WISH 技术研究了这两个基因在 *P. adspersus* 8 dpf 和 9 dpf 胚胎中的表达位置,结果显示这两个基因在肌肉和脊索有特异表达,表明其可能在肌肉和神经系统的发育中发挥重要功能。此外,WISH 技术也应用于研究环境毒害因子对鱼类的影响。Iida 等^[8] 在研究四氯双苯环二恶英 (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin,

收稿日期:2014-06-16 修回日期:2014-09-05

资助项目:现代农业产业技术体系专项 (CARS-49);国家自然科学基金 (31272688);广东省科技计划项目 (2012A020602017)

通信作者:卢迈新,E-mail:mx-lu@163.com

TCDD)对真鲷(*Pagrus major*)神经系统的毒害作用时,利用 WISH 技术分析了经 TCDD 处理后分泌型轴突排斥因子 *Sema3A* 在真鲷神经系统的表达,其结果表明 TCDD 可影响真鲷周围神经系统的发育。

在鱼类中 WISH 技术发展迅速,已发展出双色 WISH 技术和多色荧光 WISH 技术,如 Cao 等^[9]在斑马鱼中利用双色 WISH 技术研究了 *HMGB3* 基因过表达后对中胚层基因 *ntl* 的抑制作用;Lauter 等^[10]使用荧光 WISH 技术在斑马鱼脑区可同时标记 3 个基因的表达。但是荧光 WISH 使用的试剂比较贵,与传统显色方式相比,荧光比较容易淬灭,需要及时通过荧光解剖镜(或显微镜)获取杂交结果,而传统显色的胚胎可以在合适的条件下长久保存。

在罗非鱼中,LePabic 等^[11]和 Lyon 等^[12]参考和沿用了斑马鱼等的 WISH 方法,分别研究了 *Hox* 基因家族中 *Hox2* 和 *Hox3-6* 基因在胚胎发育中的时空表达图式。LePabic 等^[11]同时比较了尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和条纹鲈中 *Hox2* 基因的表达图式,结果表明 *Hox* 基因家族中的不同基因在尼罗罗非鱼后脑和咽弓发育具有不同的表达图式。LePabic^[11]和 Lyon^[12]采用此 WISH 技术解释了 *Hox* 基因在罗非鱼后脑和咽弓发育具有不同的表达图式,但由于未能解决罗非鱼胚胎色素的去除问题,其结果中大量色素的存在影响对基因表达位置的判别。本研究团队参考已有的鱼类胚胎原位杂交方法^[4,11-13]开展尼罗罗非鱼胚胎 WISH 分析,但难以得到理想的原位杂交结果,主要问题总结如下:1)色素去除后,胚胎中留存大量气泡,影响探针的进入和杂交,应该有基因表达的位置因气泡原因无阳性杂交信号;2)不易掌握蛋白酶 K 的消化条件,胚胎要么因消化过度杂交信号杂背景深,要么因消化不充分杂交信号弱;3)探针回收和抗体回收后,清洗次数多,时间长。说明尼罗罗非鱼胚胎有自身的特性,不能完全沿用其他鱼类中使用的方法。因此,本研究通过改良胚胎色素去除方法、提高胚胎通透性以及优化相关实验操作程序等,建立了适合于罗非鱼胚胎的 WISH 技术。

重组激活基因(*Rag1*)在鱼类中比较保守,在胚胎早期发育过程中主要在胸腺中表达,其表达位置在胚胎两侧呈对称分布,表达范围仅仅局限在胸腺(或胸腺原基)的位置^[14],比较适合于判断 WISH 技术是否成功建立。在斑马鱼中,张春霞

等^[15]使用 *Rag1* 做探针验证了其建立的 WISH 技术。因此本研究选用尼罗罗非鱼的 *Rag1* 验证建立的罗非鱼 WISH 技术。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验动物 雌雄尼罗罗非鱼分缸单独饲养,观察雌性罗非鱼的泄殖孔,如果颜色变红,轻轻挤压腹部有卵子自动流出,则表示卵细胞发育成熟,可以人工采卵。采卵时将卵子挤到干净的大烧杯中,用同样的方法挤入精液,用羽毛轻轻搅拌,使精卵充分混合。然后加入清水,轻轻搅拌之后静置 1 min,倒去污水,清洗并获取人工授精的尼罗罗非鱼卵。27 ℃下人工孵化器中培养胚胎并在所需时间点取样,胚胎自然出膜前需在显微镜下用显微镊徒手剥去卵壳,然后加入 4% 多聚甲醛(PFA),置于 4 ℃过夜固定。

主要试剂 T7 RNA polymerase (Thermo, EP0111); Sp6 RNA polymerase (Thermo, EP0131); DNase I (Promega, M610A); Heparin sodium salt (Sigma, H4784); 酵母 tRNA (Solarbio, G8670); Blocking Reagent (Roche, 11096176001); anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments (Roche, 11093274910); NBT/BCIP (Roche, 11442074001); PFA (Merck, 104005); mini RNA Quick Spin Columns (Roche, 11814427001); DTT (Sigma, 646563 - 10 × 0.5 mL)。

主要仪器 摇床 (TS-8, QilinBeiER)、杂交炉 (Prefect Blot, PenQLab)、水浴锅 (DK-8D, 上海一恒科技有限公司)、核酸蛋白检测仪 (Biophotometer plus, Eppendorf)。

1.2 原位杂交所需试剂

- 10 × PBS 母液 (1 L, pH 7.0, 室温保存)。
- 4% 多聚甲醛 (1 L, 配制后过滤, 4 ℃ 保存)。
- 20 × SSC 母液 (1 L, pH 7.0, 室温保存)。
- 酵母 tRNA 母液 (50 mg/mL, -20 ℃ 保存)。
- 肝素母液 (50 mg/mL, -20 ℃ 保存)。
- 蛋白酶 K 母液 (10 mg/mL, -20 ℃ 保存)。
- 2 × MAB 母液 (1 L, pH 7.5, 室温保存)。
- 10 × Blocking Reagent 母液 (-20 ℃ 保存)。
- 5 mol/L NaCl (室温保存)。
- 1 mol/L Tris-HCl (pH 9.5, 室温保存)。
- 1 mol/L MgCl₂ (室温保存)。

PBST(1 L,室温保存)。

预杂交缓冲液 Hyb - (40 mL, -20 °C 保存,使用前 65 °C 预热)。

杂交缓冲液 Hyb + (40 mL, -20 °C 保存,使用前 65 °C 预热)。

DEPC 水(1 L,1% DEPC,室温保存)。

MABT 溶液(1 L,室温保存)。

抗体溶液(现用现配,1:5 000 溶于封闭液)。

左旋咪唑母液(1 mL,60 mg/mL, -20 °C 保存)。

洗液 I(40 mL,使用前 65 °C 预热):4 mL 20 × SSC,20 mL 去离子甲酰胺,400 μL 10% Tween-20,补灭菌超纯水至 40 mL。

洗液 II(40 mL,使用前 65 °C 预热):4 mL 20 × SSC,400 μL 10% Tween-20,补灭菌超纯水至 40 mL。

洗液 III(40 mL,使用前 65 °C 预热):4 mL 洗液 II,400 μL 10% Tween-20,补灭菌超纯水至 40 mL。

封闭液(40 mL, -20 °C 保存):800 μL 10 × Blocking Regent 母液,4 mL 绵羊血清,20 mL 2 × MAB 母液,用灭菌去离子超纯水定容至 40 mL。用前解冻后离心。

平衡缓冲液(40 mL,现用现配):1 mol/L Tris-HCl(pH 9.5)4 mL,5 mol/L NaCl 0.8 mL,1 mol/L MgCl₂ 2 mL,10% Tween-20 400 μL,用去离子超纯水定容至 40 mL。

1.3 探针载体构建和 RNA 探针合成

参考 Fujimura 等^[16]的研究取不同发育时期的罗非鱼胚胎,提取总 RNA,反转录获得 cDNA。参考斑马鱼、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)、红笛鲷(*Lutjanus sanguineus*)等鱼类的 *Rag1* 的保守区,设计尼罗罗非鱼 *Rag1* 基因的克隆引物:*tRag1F* 5'-TGGTCTTCGTCGGTGGAT-3'; *tRag1R* 5'-TTCTCATCATATCCCGTGCCCCCTGA-3'。克隆罗非鱼的 *Rag1* 同源基因到 pEASY-T3 载体中,获得重组载体 pEASY-T3-*Rag1*。以重组载体为模板,M13R 和 M13F 为引物 PCR,产物经纯化后可作为探针合成的模板。合成 RNA 反义探针所用合成酶的确立原则:pEASY-T3-*Rag1* 如果用 T7 引物测序,测序结果为同向,则用 Sp6 合成,若为反向则用 T7 合成;如果用 Sp6 引物测序,同向用 T7 合成,反之用 Sp6 合成;正义探针的合成则需要相反的酶。

RNA 反义探针合成体系(50 μL)为:DEPC 水 18 μL,PCR 纯化产物 15 μL,5 × Transcription Buffer 10 μL,DTT 1 μL,DIG-labeling Mix 3 μL,RNase 抑制剂 1 μL,Sp6/T7 RNA 合成酶 2 μL。合成反应在 37 °C 水浴锅中进行 1 h,然后加入 2 μL DNase I 消化 15 min,以去除 DNA 模板。将 mini Qucik Spin RNA Columns RNA 纯化柱子装到 2 mL 离心管中,短暂离心后将柱子下端封口掰断,重新装回 2 mL 离心管中,1 000 × g 离心 2 min 去除保护液。将离心好的柱子装到 RNase-free 的 1.5 mL 离心管中,将消化好的 RNA 探针合成液沿离心形成的斜面小心加到 RNA 纯化柱中,1000 g 离心 4min,获取 RNA 探针纯化液。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测合成探针的质量,使用 Biophotometer plus 核酸蛋白检测仪检测探针浓度,用 Hyb + 杂交缓冲液稀释至 10 ng/μL, -20 °C 冻存。使用时再用 Hyb + 稀释 10 ~ 20 倍。

以同样的方法合成正义探针,在实验中做对照使用。

1.4 尼罗罗非鱼整胚原位杂交实验流程

探针杂交(第 1 天):选择合适时期的胚胎,在摇床上用 PBST 洗 3 次,每次 5 min;如果胚胎长有色素,需在此步骤后,先用 PBS 洗 10 min,再进行后续脱色处理。脱色液需现用现配:10 mL 脱色液含有 7 mL 灭菌水,2 mL H₂O₂(30%),1 mL KOH(质量浓度 5%),混匀后加入装有胚胎的 EP 管中,开盖置于解剖镜的外置光源下脱色。脱色完毕可用预冷的丙酮处理胚胎, -20 °C 下通透 15 ~ 30 min(胚胎发育时期靠后通透时间可相应增加);然后在摇床上用 PBST 洗 3 次,每次 5 min,洗脱丙酮;去除 PBST 后加入预杂交液 Hyb -,在杂交炉中 65 °C 反应 15 min;之后除去 Hyb - 并加入预杂交液 Hyb +,杂交炉中 65 °C 预杂交 4 h;预杂交完成后加入 1 mL 用杂交液 Hyb + 稀释的 RNA 探针(探针浓度为 1 ng/μL),60 °C 杂交过夜。

抗体孵育(第 2 天):回收探针,贮存于 -20 °C(可回收利用 3 次左右);然后进行洗涤,在 60 °C 杂交炉中,用洗液 I 洗涤 2 次,每次 30 min;去除洗液 I 加入洗液 II 洗涤 1 次,15 min;再用洗液 III 洗涤 2 次,每次 30 min;然后在室温条件下,置于摇床用 MABT 洗 3 次,每次 5 min;洗涤完成后用封闭液进行封闭,室温孵育 4 h;然后去除封闭液,加入抗体(1:5 000 稀释到封闭液中),放于 4 °C 孵

育过夜。

显色(第3天):回收抗体,贮存于 -20°C (可回收利用3次左右);然后洗去非特异结合的抗体,在慢速摇床上(室温)用MABT洗涤2次,每次30 min;同样条件下再用PBST洗涤2次,每次30 min;然后加入平衡缓冲液(加入左旋咪唑,终浓度为 0.5 mg/mL),平衡10 min;最后加入新鲜的显色液(左旋咪唑母液稀释50倍、NBT/BCIP稀释20倍到平衡缓冲液中),避光显色,每隔15 min镜检,观察显色情况;在显色完成后,用4% PFA室温避光固定10 min,终止显色反应,用70%酒精洗涤1~4次,每次30 min,去除背景颜色。胚胎洗涤完毕后,加入新的70%酒精,封口膜封口,可在 -20°C 避光保存3年。

1.5 尼罗罗非鱼整胚原位杂交结果图像采集

制备底部铺有2%琼脂糖凝胶的培养皿,待琼脂凝固后加入70%酒精,慢速摇床上平衡1 h,置放新鲜的70%酒精,不用时存放于 4°C 冰箱。在外置光源下,将尼罗罗非鱼胚胎置于70%酒精琼脂培养皿中,皿底部垫有白色A4打印纸,用

OLYMPUS SZX7体视显微镜和OLYMPUS DP25CCD进行观察及成像。

2 尼罗罗非鱼整胚原位杂交结果

2.1 探针合成效果和特异性验证

电泳检测的结果显示,本实验中合成的*Rag1*正义探针(图1-a,1)和反义探针(图1-a,2)的条带特异,无降解造成的拖尾,该结果显示合成的探针质量比较好。整胚原位杂交结果显示,*Rag1*在胚胎后脑脑区下端、胸鳍前有特异的信号区,且在躯体两侧呈对称分布(图1-b),而正义探针对照组则无任何信号(图1-c)。

2.2 胚胎通透条件改良

本研究对9~10 dpf的尼罗罗非鱼胚胎使用冷丙酮替代蛋白酶K,在 -20°C 下通透30 min,结果显示胚胎结构完整,*Rag1*基因的杂交信号特异,染色清晰无杂信号(图2-b)。而使用传统的蛋白酶K消化,如果消化过度则杂交信号杂乱,显色背景深(图2-a);如果消化不充分,探针无法充分渗透到组织中,导致杂交信号微弱,染色浅(图2-c)。

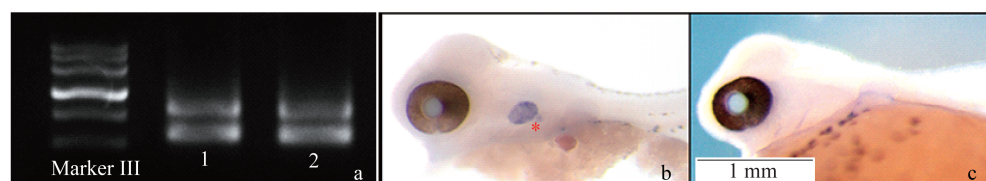


图1 *Rag1* 探针电泳检测和探针特异性验证

(a)1. *Rag1* 正义探针; 2. *Rag1* 反义探针。(b)*Rag1* 反义探针整胚原位杂交结果。(c)*Rag1* 正义探针原位杂交结果。所有胚胎为5 dpf 侧面观,头在左尾在右,标尺在(c)图。红色“*”指示*Rag1*在罗非鱼胚胎中表达的位置

Fig.1 Electrophoresis and specific detection of *Rag1* probes

(a)1. *Rag1* sense probe; 2. *Rag1* antisense probe. (b) WISH of *Rag1* antisense probe. (c) WISH of *Rag1* sense probe. All embryos were mounted with their anterior sides to the left and their lateral sides toward the reader at 5 dpf, scale is in image(c). The expression positions of *Rag1* are indicated by red “*” above the dorsal sides of the embryos



图2 不同通透条件下的原位杂交结果

(a)蛋白酶K消化过度;(b)冷丙酮通透;(c)蛋白酶K消化不充分。所有胚胎为9~10 dpf 侧面观,头在右尾在左,标尺在(c)图。红色三角指示*Rag1*在罗非鱼胚胎中表达的位置

Fig.2 The results of WISH in different permeabilization conditions

(a) Over digestion by Proteinase K. (b) Permeated by cold acetone. (c) Deficient digestion by Proteinase K. All embryos were mounted with their anterior sides to the right and their lateral sides toward the reader at 9-10 dpf, scale is in image(c). The expression positions of *Rag1* are indicated by red triangles above the dorsal sides of the embryos

2.3 色素去除方法的改良

在不同发育时期的胚胎中,使用 6% 的 H_2O_2 和 0.5% 的 KOH 混合液在强光下处理胚胎。结果显示 5 dpf 未去色素的胚胎,在 *Rag1* 基因表达的区域无色素,暂不影响对染色区域的判断(图

3-a、a'),但在发育至 10 dpf 时,*Rag1* 基因表达的区域和周围组织色素多,影响对结果的判断(图 3-b、b')。与之形成鲜明对比的是使用本研究的色素去除方法,色素去除完全,显色区域和周围组织颜色对比鲜明(图 3-c ~ d')。

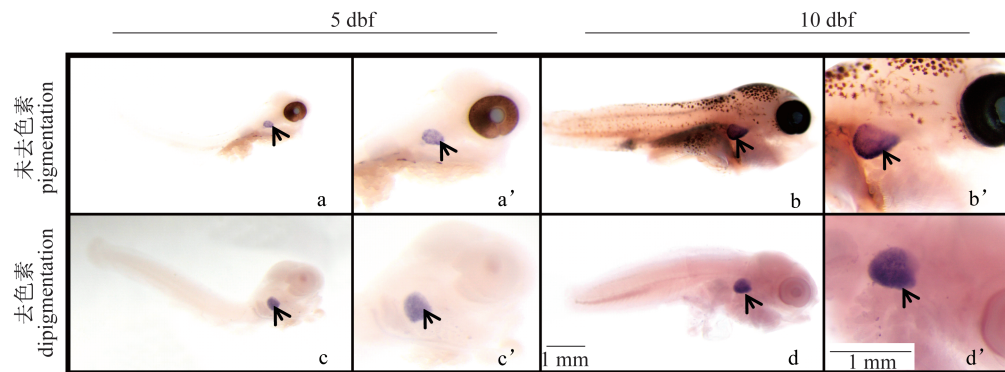


图 3 尼罗罗非鱼 *Rag1* 基因整胚原位杂交结果

(a),(a'),(b),(b') 胚胎未去色素;(c),(c'),(d),(d') 胚胎去色素;(a),(a'),(c),(c') 受精后 5 天的胚胎;(b),(b'),(d),(d') 受精后 10 天的胚胎。所有胚胎为侧面观,头在右尾在左,(a),(b),(c),(d) 的标尺在(d) 图,(a'),(b'),(c'),(d') 的标尺在(d') 图。黑色箭头指示 *Rag1* 在尼罗罗非鱼胚胎中表达的位置

Fig. 3 Whole mount in situ hybridization of Nile tilapia *Rag1* at 5 dpf and 10 dpf

(a),(a'),(b),(b') embryos with pigments;(c),(c'),(d),(d') embryos without pigments;(a),(a'),(c),(c') embryos at 5 dpf;(b),(b'),(d),(d') embryos at 10 dpf. All embryos were mounted with their anterior sides to the right and their lateral sides toward the reader, the scale of image(a),(b),(c),(d) is in image(d), the scale of image(a'),(b'),(c'),(d') is in image(d'). The expression positions of *Rag1* are indicated by black arrows above the dorsal sides of the embryos

3 讨论

因尼罗罗非鱼胚胎与其他鱼类胚胎相比具有卵黄大、不透明、色素出现早的特点,故本研究在建立尼罗罗非鱼 WISH 技术的过程中,参考 Scemama 等^[4]在条纹鲈中和 Thisse 等^[13]在斑马鱼中使用的方法基础上进行了相应的优化。通过提高 H_2O_2 的浓度和添加 KOH,改良了尼罗罗非鱼胚胎的色素去除方法;使用冷丙酮代替蛋白酶 K 在提高胚胎通透性的同时保持胚胎完整;减少了探针回收后和抗体回收后的洗涤次数,完善了结果的图像采集和胚胎保存方案。

本研究使用 PCR 产物而非线性化的载体做为 RNA 探针合成的模板,其合成效率高,电泳检测条带单一,无拖尾现象,但是以两条大小不一的条带形式存在,可能与 RNA 探针自身形成三级结构有关。在实验过程中,探针需要经过 65 °C 高温处理 10 min,然后冰浴处理 5 min。该处理可以打开 RNA 探针的三级结构,使探针更容易与体内的靶 mRNA 结合。因此电泳中 RNA 探针双带的现

象并不影响后续的杂交进程。此外,本研究中还合成了 *Rag1* 的正义探针,结果显示使用反义探针可以清晰地标记该基因的表达位置,但正义探针的对照组无任何杂交信号出现,说明 *Rag1* 反义探针是特异的。

按照本研究建立的流程,得到高质量的尼罗罗非鱼整胚原位杂交结果(图 3-c、c',d,d')。结果显示,*Rag1* 基因表达的位置与已报道的斑马鱼 *Rag1* 基因^[17]和日本青鳉 (*Oryzias laticeps*) 的 *Rag1* 基因^[18]在胚胎中的表达位置高度保守。尼罗罗非鱼的胚胎与条纹鲈和斑马鱼胚胎相比卵黄大,拍照时卵黄影响基因表达位置的确定,故将卵黄去除,已有报道也有类似的处理方法^[11-12]。

除此以外,本研究改良了通透方案。在斑马鱼的整胚原位杂交中,如果胚胎发育超过 1 天,需要用蛋白酶 K 消化,以达到提高皮肤通透性,增加探针进入能力的目的^[2]。尼罗罗非鱼的胚胎大、卵黄大,使用蛋白酶 K 消化不容易掌握最佳消化时间,消化不足导致探针进入少,染色浅(图 2-c);消化过度则会导致染色背景深,杂交信号杂

乱(图2-a)。樊竑冶等^[19]在斑马鱼中关于蛋白酶K的研究结果与本文一致,即消化过度则染色背景深,杂交信号乱,消化不足则染色浅,杂交信号弱;但与张春霞等^[15]的研究结果相反。比较本研究 and 樊竑冶、张春霞的研究可以发现,杂交温度为60℃时会出现蛋白酶K消化过度染色深背景深,消化不充分杂交信号弱的现象,而杂交温度为65℃时,则出现相反的结果。说明不同程度的蛋白酶K消化后胚胎杂交信号的表现可能与杂交探针和杂交温度等条件相关。丙酮作为通透剂一般用在免疫组化检测中,经冷丙酮处理后细胞通透性增强,可使抗体(抗体分子通常在150 Kda大小左右)等大分子进入^[20],但在原位杂交中未见将其作为通透剂使用。为此,我们尝试使用冷丙酮替代蛋白酶K,在-20℃下进行通透,结果显示此法比较温和,不会破坏胚胎结构(图3-a, a', b, b', c, c', d, d';图2-b),既能增强探针进入胚胎的能力,同时不影响探针的杂交、抗体结合和显色反应,因此冷丙酮可以在尼罗罗非鱼中作为通透剂替代蛋白酶K。本研究中,尼罗罗非鱼胚胎发育至受精后10天仍能清晰地观察到*Rag1*基因的表达且胚胎结构完整,说明此通透方案较蛋白酶K法简便实用。

此外,如果尼罗罗非鱼胚胎未去色素,虽能观察到基因的表达位置,但不能判别在色素存在的位置基因是否有表达(图3-a, a', b, b')。在罗非鱼已有的报道中并没有去除色素^[11-12],所以影响结果的观察。在斑马鱼中,一般通过在胚胎的培养液中加入苯基硫脲(N-Phenylthiourea, PTU)来抑制胚胎发育过程中色素的形成,但对于PTU何时加入培养液,使用何种浓度,持续作用多长时间,都有严格的控制,并且PTU对胚胎有一定的毒害作用,使用不当会造成胚胎发育的异常^[2,21]。此外,PTU具有剧毒,小剂量的外泄都会对饮用水造成危害,所以本实验使用更环保的H₂O₂ + KOH方式去除胚胎已经形成的色素,并获得较理想的效果(图3-c, c', d, d')。尼罗罗非鱼胚胎是斑马鱼胚胎的3~5倍大,如按斑马鱼中使用的3% H₂O₂来去除色素^[2,15],则去除色素的速度缓慢,导致气泡产生速度慢,在胚胎的皮下、鳃部和脑区经常积存气泡,不利于后续探针的吸附,无法得到基因的确切表达位置。故本研究进行了相应优化,通过提高H₂O₂的浓度(6%),增加KOH,

增强了色素去除的能力,可以在彻底去除色素的同时确保胚胎内无气泡存留。同时,胚胎在色素去除后仍然保持完整,最终结果更易于观察,基因表达的位置清晰准确(图3-c, c', d, d')。

与条纹鲈和斑马鱼的整胚原位杂交相比,本研究建立的尼罗罗非鱼整胚原位杂交流程简化了探针回收和抗体回收后的洗涤工作,减少了换液次数,从探针或者抗体回收后洗8次,每次15 min,减少至洗涤2次,每次30 min,并且最终结果并不受影响,说明简化后的洗涤方案有效。此外,在保存原位杂交结果时,使用70%的酒精做保存液,加封口膜后在低温冰箱中避光保存,能够确保原位杂交的染色效果不受影响。保存方法的改进为相关的科学研究提供了充足的时间,避免出现在一般保存条件下的材料变质无法使用的现象。

本研究根据尼罗罗非鱼胚胎发育的特点,通过改良尼罗罗非鱼胚胎的色素去除和胚胎通透方案,首次使用冷丙酮替代蛋白酶K作为胚胎的通透剂,并简化探针和抗体回收后的洗涤方案,完善结果的图像采集和胚胎的保存方案,成功地建立了一套适用于尼罗罗非鱼的整胚原位杂交技术,可应用于尼罗罗非鱼胚胎发育和器官形成过程基因功能和基因表达图式的研究中。

参考文献:

- [1] Gall J G, Pardue M L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1969, 63(2): 378 - 383.
- [2] Westerfield M. The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) [M]. 5th ed. Eugene: University of Oregon Press, 2007.
- [3] Gerlach G F, Schrader L N, Wingert R A. Dissection of the adult zebrafish kidney [J]. Journal of Visualized Experiments, 2011, 29(54): 2839.
- [4] Scemama J L, Vernon J L, Stellwag E J. Differential expression of *hoxa2a* and *hoxa2b* genes during striped bass embryonic development [J]. Gene Expression Patterns, 2006, 6(8): 843 - 848.
- [5] Liu J X, Zhai Y H, Gui J F. Molecular characterization and expression pattern of *AFPIV* during embryogenesis in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36(7): 2011 - 2018.

- [6] Marandel L, Labbe C, Bobe J, *et al.* *nanog* 5'-upstream sequence, DNA methylation, and expression in gametes and early embryo reveal striking differences between teleosts and mammals [J]. *Gene*, 2012, 492(1): 130 - 137.
- [7] Escobar S, Fuentes E N, Poblete E, *et al.* Molecular cloning of *IGF-1* and *IGF-1* receptor and their expression pattern in the Chilean flounder (*Paralichthys adspersus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2011, 159(3): 140 - 147.
- [8] Iida M, Kim E Y, Murakami Y, *et al.* Toxic effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the peripheral nervous system of developing red seabream (*Pagrus major*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 128 - 129: 193 - 202.
- [9] Cao J M, Li S Q, Zhang H W, *et al.* High mobility group B proteins regulate mesoderm formation and dorsoventral patterning during zebrafish and *Xenopus* early development [J]. *Mechanisms of Development*, 2012, 129(9 - 12): 263 - 274.
- [10] Lauter G, Söll I, Hauptmann G. Multicolor fluorescent in situ hybridization to define abutting and overlapping gene expression in the embryonic zebrafish brain [J]. *Neural Development*. 2011, 6: 10.
- [11] Le Pabic P, Stellwag E J, Brothers S N, *et al.* Comparative analysis of *Hox* paralog group 2 gene expression during Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) embryonic development [J]. *Development Genes and Evolution*, 2007, 217 (11 - 12): 749 - 758.
- [12] Lyon R S, Davis A, Scemama J L. Spatio-temporal expression patterns of anterior *Hox* genes during Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) embryonic development [J]. *Gene Expression Patterns*, 2013, 13 (3 - 4): 104 - 108.
- [13] Thisse C, Thisse B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(1): 59 - 69.
- [14] Iwanami N, Higuchi T, Sasano Y, *et al.* WDR55 is a nucleolar modulator of ribosomal RNA synthesis, cell cycle progression, and teleost organ development [J]. *Plos Genetics*, 2008, 4(9): e1000171.
- [15] Zhang C X, Liu F. A brief protocol for high-resolution whole mount in situ hybridization in zebrafish [J]. *Hereditas*, 2013, 35(4): 522 - 528. [张春霞, 刘峰. 斑马鱼高分辨率整胚原位杂交实验方法与流程. *遗传*, 2013, 35(4): 522 - 528.]
- [16] Fujimura K, Okada N. Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). Developmental staging system [J]. *Development Growth & Differentiation*, 2007, 49(4): 301 - 324.
- [17] Iwanami N, Mateos F, Hess I, *et al.* Genetic evidence for an evolutionarily conserved role of IL-7 signaling in T cell development of zebrafish [J]. *Journal of Immunology*, 2011, 186(12): 7060 - 7066.
- [18] Iwanami N, Takahama Y, Kunimatsu S, *et al.* Mutations affecting thymus organogenesis in Medaka, *Oryzias laticeps* [J]. *Mechanisms of Development*, 2004, 121(7 - 8): 779 - 789.
- [19] Fan H Y, Peng Z L, Xie H P, *et al.* Improvement of whole-mount in situ hybridization to zebrafish embryos [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2010, 19(1): 115 - 119. [樊宏冶, 彭忠禄, 谢华平, 等. 斑马鱼整体原位杂交的技术改良. *激光生物学报*, 2010, 19(1): 115 - 119.]
- [20] Inoue D, Wittbrodt J. One for all-a highly efficient and versatile method for fluorescent immunostaining in fish embryos [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19713.
- [21] Sun G J, Pan J, Liu K C, *et al.* Effects of N-Phenylthiourea (PTU) on melanogenesis and early development in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(7): 387 - 390. [孙桂金, 潘杰, 刘可春, 等. 苯硫脲对斑马鱼黑色素生成及早期发育的影响. *水产科学*, 2011, 30(7): 387 - 390.]

A novel protocol of whole mount in situ hybridization (WISH) and its primary application in Nile tilapia

CAO Jianmeng¹, LU Maixin^{1*}, YE Xing¹, ZENG Zucong^{1,2}, GAO Fengying¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of

Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To investigate the expression pattern and function of genes expressed in the development and organogenesis of Nile tilapia embryos, whole mount in situ hybridization (WISH) of Nile tilapia embryo was established based on the commonly used protocols in zebrafish (*Danio rerio*) and striped bass (*Morone saxatilis*). However, the WISH protocols of zebrafish and striped bass are not completely viable for Nile tilapia embryos because of their huge, opaque yolk with early pigment formation. Thus we optimized the protocol for its application in Nile tilapia. Specifically, we improved the methods of removing the pigments by H₂O₂ and KOH, and enhanced tissue permeabilization in tilapia embryos using cold acetone instead of proteinase K, reduced the times of washing embryos after being incubated in probes or antibodies, and optimized the system of image collection and the storage of embryos post-WISH. Using the recombination activating gene 1 (*Rag1*) of Nile tilapia as the probe gene, the result of WISH in Nile tilapia embryos showed that its expression pattern was highly conserved compared with zebrafish *Rag1* and medaka (*Oryzias latipes*) *Rag1*. The embryos post-WISH were unbroken and the gene expression position was distinct. The results indicated that the protocol of WISH in Nile tilapia was effective and entirely feasible.

Key words: *Oreochromis niloticus*; whole mount in situ hybridization; embryonic development; recombination activating gene 1 (*Rag1*)

Corresponding author: LU Maixin. E-mail: mx-lu@163.com