

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.19.009

一种新的简单有效的斑马鱼胚胎心脏富集和提纯方法*

杨洁¹ 姜气永² 黄朱亮¹ 李祖华¹ 郑芳^{1△}

(1 武汉大学中南医院临床基因诊断中心/检验科 湖北 武汉 430071; 2 中国科学院水生生物研究所 湖北 武汉 430072)

摘要 目的:设计一个从斑马鱼胚胎得到大量完整高纯度心脏的新方法,从而用于测定早期心脏的基因表达。**方法:**收集上百颗心肌特异表达绿色荧光(cmlc2-GFP)的转基因斑马鱼的胚胎放入冰浴的 10% 胎牛血清 L-15 培养基中,用一个 5 mL 注射器反复抽吸迫使胚胎卵黄囊和心包腔破裂,在荧光显微镜下用微量毛细吸管收集游离的心脏,同时用单独的 EP 管收集身体组织,最后用荧光定量 PCR 技术(RT-PCR)验证提纯心脏组织的生物活性和特异性。**结果:**提取的大部分胚胎心脏的形态是完整的,约 200 颗胚胎心脏中提取了 300 ng 总 RNA。提纯的活性心脏组织不仅高表达心脏特异性基因(cmlc2,myh6),而且几乎不表达非心脏组织的特异基因(six3b,ifabp)。**结论:**利用这个简便方法富集和提纯斑马鱼胚胎心脏可以得到高度纯化并具有生物活性的心脏组织。

关键词:斑马鱼胚胎;心脏纯化;cmlc2;myh6

中图分类号:Q959.468;R394-3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)19-3633-04

A New Simple but Effective Method of Collecting and Purifying Hearts from Zebrafish Embryos*

YANG Jie¹, LOU Qi-yong², HUANG Zhu-liang¹, LI Zu-hua¹, ZHENG Fang^{1△}

(1 Center for Gene Diagnosis, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430071, China;

2 Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei, 430072, China)

ABSTRACT Objective: In order to measure the gene expression of early cardiac tissue, a new method is designed to obtain a lot of intact high purity of hearts from zebrafish embryos. **Methods:** Firstly, hundreds of transgenic zebrafish embryos with myocardial specific expression of green fluorescence (cmlc2: GFP) were placed in ice cold L-15 medium for pumping repeatedly with a 5 mL syringe. After embryonic yolk sac and pericardial had been ruptured, dissociative hearts were sucked out with a micro-capillary pipette under the fluorescence microscope rapidly, meanwhile the body tissue was enriched with a separate tube. Finally, the purified cardiac tissue was verified its biological activity and purity using real-time quantitative PCR amplification of tissue-specific expression mRNA. **Results:** About 200 hearts were obtained from 200-300 zebrafish embryos, most of which were intact, and about 300 ng RNA were extracted from these hearts. The purified heart tissue was bioactive substance with high expression of cardiac-specific genes(cmlc2,myh6) and almost no expression of specific genes (six3b, ifabp) of non-cardiac tissue. **Conclusions:** A new simple method has been developed successfully to obtain purified and bioactive zebrafish heart tissue in our research.

Key words: Zebrafish embryo; Cardiac Purification; Cmlc2; Myh6

Chinese Library Classification(CLC): Q959.468; R394-3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)19-3633-04

前言

近年来斑马鱼作为一种新发现的模式生物已经引起人们的高度重视,其广泛应用在分子发育机制,药物的筛选以及各种疾病模式构建等领域^[1-6]。斑马鱼具有个体小,发育快,饲养简便等特点,更有意义的是斑马鱼胚胎是透明的,并且是在体外发育,容易观察和对其胚胎进行遗传操作^[7-10]。斑马鱼有非常强的再生潜能,如心脏、肝脏、视网膜、神经细胞等组织损伤后短期内可以完整再生,所以它也是研究再生的理想模型^[11-13]。在脊椎

动物的胚胎的早期发育中,心脏是最早形成并行使功能的器官,早期斑马鱼胚胎不借助心血管系统的功能维持生命,它主要靠被动扩散的方式进行呼吸作用。所以斑马鱼是一种用来研究心血管早期发育的良好模式生物。

由于斑马鱼早期胚胎很难获得单个器官,所以早期胚胎单个器官的基因定量表达很难评估。虽然整体原位杂交技术可以对斑马鱼胚胎早期的发育进行时空表达的检测,但其敏感性较差,对于基因转录不显著的差异很难检测出来。此外,真正的定量技术,如实时荧光定量 PCR 或者是基因芯片杂交技术,当用

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81472024)

作者简介:杨洁(1990-),女,硕士研究生,主要研究方向:斑马鱼模式生物和家族遗传性心脏病,

电话:13545174696, E-mail: 2012203030035@whu.edu.cn

△通讯作者:郑芳,女,博士生导师,教授,主要研究方向:单基因遗传病的基因诊断, E-mail: zhengfang@whu.edu.cn

(收稿日期:2015-02-26 接受日期:2015-03-18)

全胚胎作为样本时,其高分辨率只能代表整体的表达水平。所以若想测量个别器官的基因表达,就必须把所需要的组织从整体胚胎中完整的分离出来。此外分离纯化器官还可促进干细胞或者祖细胞在体外的研究,例如在试管内可以进行干细胞培养,观察干细胞细胞迁移等实验。

为了能够示踪心脏位置,我们使用的是心脏特异表达绿色荧光(cmlc2;GFP)的转基因斑马鱼胚胎。用一个 5 mL 注射器重复抽吸斑马鱼胚胎,迫使胚胎卵黄囊和心包腔破裂。随后在荧光显微镜下用微量毛细吸管迅速进行纯化,最后用荧光定量 PCR 扩增一系列组织特异性表达的 mRNA 验证提纯后心脏的纯度。

1 材料与方法

1.1 实验动物

心脏特异表达绿色荧光的转基因斑马鱼 (cmlc2;GFP 品系)来自于中国科学院水生生物研究所分子病理学科组。按照 Zebrafish Book^[14]进行饲养和产卵,并对其胚胎发育阶段进行分期,通常以受精后小时数(hpf)表示。受精前晚,雌鱼雄鱼分开,次日清晨雌雄鱼交配获得受精卵,28.5 ℃ 养殖水 (6 mg/mL 海盐)中孵化,晚上显微镜观察去除死卵以及发育畸形的鱼卵,养殖水每天更换两次。

1.2 主要实验材料

RNA 提取试剂盒 (Qiagen RNeasy Protect Mini Kit RNA)、逆转录试剂盒 (Fermentas)、SYBR Premix Ex Taq 定量试剂盒 (Takara,Japan)、胎牛血清(Hyclone)、L-15 培养基(Invitrogen)。

1.3 主要实验仪器

5 mL 注射器、直径 50 mm 塑料培养皿、德国 Eppendorf 超速离心机、15 cm 玻璃吸管、奥林巴斯荧光显微镜、Bio-Rad C1000 荧光定量 PCR 仪、Thermo 核酸蛋白测定仪。

1.4 斑马鱼胚胎心脏提取

1.4.1 制作所需器材 把 15 cm 玻璃吸管尖端放在酒精灯上拉细,使其直径范围在 60 μM-100 μM 之间,保证斑马鱼胚胎心脏能顺利通过且不损伤心脏,同时非心脏组织难以通过。用一个内径为 7 mm 的医用硅胶管一端连上拉细吸头的玻璃吸管,另外一端连上一个 1 mL 的移液枪头。

1.4.2 收集斑马鱼胚胎 收集 72 h 活的斑马鱼胚胎 200-300

颗置于 1.5 mL EP 管中,L-15 培养基加入胎牛血清配成 10%胎牛血清 L-15 培养基,用冰浴的 10%胎牛血清 L-15 培养基洗三次,每次 1 min,最后一次清洗斑马鱼胚胎中的培养基不用弃去。

1.4.3 破坏斑马鱼心包腔 用一个 5 mL 注射器迅速抽吸 EP 管中的胚胎,再迅速的打回离心管里,频率是一秒一次,连续 3-5 次,肉眼可看到斑马鱼胚胎卵黄囊和心包腔碎裂。

1.4.4 收集斑马鱼胚胎心脏 准备一个新的 50 mm 培养皿放置在冰上,培养皿中加入足量 10%胎牛血清 L-15 培养基。在荧光显微镜下把碎裂的斑马鱼胚胎注入 50 mm 塑料培养皿中。用口腔控制医用硅胶管的移液枪头端的压力,促使医用硅胶管的玻璃吸管端迅速的吸起散落在身体碎片中的完整心脏,并把吸起来的心脏放入新的冰浴的 10%胎牛血清 L-15 培养基中,重复这个操作直到培养皿中的斑马鱼胚胎心脏抽吸干净。

1.4.5 纯化斑马鱼胚胎心脏 准备一个新的 50 mm 培养皿放置在冰上,培养皿中加入足量 10%胎牛血清 L-15 培养基。用相同方法将收集的斑马鱼心脏吸取出来放入新的冰浴的 10%胎牛血清 L-15 培养基中。这样重复三次,直到最后显微镜下培养基中只有心脏组织。将提纯的斑马鱼心脏置于 1.5 mL EP 管中,身体组织收集到另一个 1.5 mL EP 管中,低温低速(1000 rpm,4 ℃)离心一分钟。小心的弃去上层培养基,备用。

1.4.6 RNA 的提取 严格按照 Qiagen 公司的 RNeasy Protect Mini Kit RNA 提取试剂盒的操作步骤,分别提取收集的心脏组织和身体组织的 RNA,用核酸蛋白浓度测定仪测定总的 RNA 浓度及纯度,A260/A280=1.8-2.0,并用 1%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,提取的 RNA 放 -80℃ 保存。

1.4.7 cDNA 的合成 按照 Fermentas 逆转录试剂盒的说明书,分别取 1 μg 提纯心脏 RNA 和身体组织 RNA,以 Oligo-dT18 为引物进行逆转录反应,产物 -20 ℃ 保存。

1.5 荧光定量 PCR 验证

1.5.1 引物序列 共合成五个跨外显子区特异的荧光定量 PCR 引物,以管家基因 β -actin 为内参,目的基因是四个组织特异性表达基因(cmlc2,myh6,ifabp,six3b)。引物全部由武汉擎科生物公司合成。并通过普通 PCR,RT-PCR 对引物的特异性进行鉴定。引物序列见表 1。

表 1 组织特异性表达 mRNA 的引物序列
Table 1 Primers sequences of Tissue-Specific mRNA

Genes	Tissue-specific expression	Sequences of primers (5'-3')	Length of fragment	Annealing temperature
β -actin	The whole body	GCCGTGACCTGACTGACT ACCT CGC AAG ATT CCA TAC CCA AGA	273bp	60 ℃
cmlc2 ^[15]	Myocardium	GGAGAGAAGCTCAATGGCACA GTCATTAGCAGCCTCTTGAACCTCA	116bp	60 ℃
myh6 ^[16]	Atrial myocardium	TGGCGATGCTGACGTTTCTT TCACGGTGACACAAAACAGCC	108bp	60 ℃
ifabp ^[17]	Intestine	AGTCAGCACTTTCCGCACACT TCCCTCTATGACCCAGGATCCT	106bp	60 ℃
six3b ^[18]	Brain/eyes	CTTACCCCAATCCGAGCAAGA GCTGAAGCCTGTTTTTGGCA	129bp	60 ℃

1.5.2 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 使用 Bio-Rad C1000 荧光定量 PCR 仪进行荧光定量分析, 首先验证所有引物扩增效率, 结果显示目的基因和管家基因的扩增效率均在 90%~100% 之间, 呈线性扩增。反应利用 Takara 的荧光定量 PCR 试剂盒进行, 用逆转录的 cDNA 为模板, 斑马鱼的 β -actin 基因为内参基因, 采用 25 μ L 体系: 上下游引物均 1 μ L (10 pmol/ μ L), cDNA 1 μ L, SYBR Premix Ex Taq 12.5 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。优化后各基因的最佳反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, (95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s)40 个循环, 增加一个溶解曲线分析, 构建标准曲线, 设置阴性对照模板是 ddH₂O。用提纯心脏的 cDNA 和身体的 cDNA 扩增四个目的基因和内参基因 β -actin 时都需要做三个复孔, 取平均值作为该样本最终 CT 值。最后用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法计算基因的相对表达量。独立实验重复三次。

1.6 统计学方法

用数据采用 SPSS 19.0 软件进行分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用独立样本 t 检验比较, $P < 0.05$ 认为差异显著, 有统计学意义。

2 结果

2.1 胚胎心脏提取情况

共收集了约 200 颗心脏, 得到的胚胎心脏大部分形态完整, 少数心脏仅观察到心室, 可能是由于反复抽吸造成的, 从提纯后的胚胎心脏组织中提取了约 300 ng 的 RNA。如图 1 所示。图(A)(B)(C)(D)是在心脏富集阶段所用的器材, 其中包括(A)(B)利用 5 mL 注射器反复抽吸血清 L-15 培养基中的胚胎去破坏卵黄膜和心包膜。(C)图从左向右是 5 mL 注射器, 拉针后的玻璃吸管, 50 mm 塑料培养皿。(D)图是一端连上拉针后的玻璃吸管, 另外一端连上一个 1 mL 的移液枪头的医用硅胶管(内径为 7 mm)。(E)图是心脏特异表达绿色荧光(cmlc2-GFP)的转基因斑马鱼 72 h 胚胎。(F)图是剥离的单个带绿色荧光的跳动心脏。(G)图是大量纯化后的心脏组织, 箭头所示为心室和心房组织。从图中可以看到散在的心脏, 组织纯度良好, 几乎无杂质。

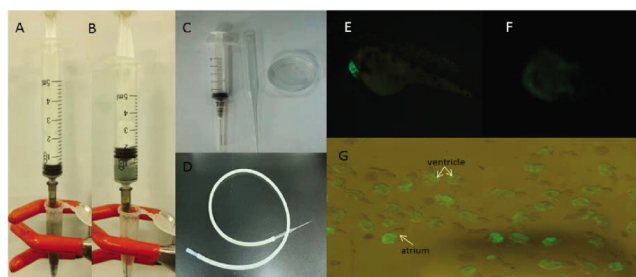


图 1 斑马鱼心脏提纯

Fig. 1 Purification of embryonic hearts from zebrafish

Note: A and B: Using a 5 mL syringe to damage the yolk membrane and pericardium by repeating aspiration; C: Left to right: 5 mL syringe, 15 mL glass pipette with tip diameter in the range between 60 μ m-100 μ m, 50 mm Plastic dish; D: Two ends of the medical silicone tube (inner diameter of 7mm) are connected to a 15mL glass pipette and a 1 mL pipette tip; E: 3-day-old myocardial green fluorescent protein (GFP)+ embryos; F: A single beating 3-day-old myocardial green fluorescent protein (GFP)+ heart; G: A large number of cardiac tissues after purification, the arrow shows the ventricular and atrial tissue.

2.2 组织表达特异性基因在斑马鱼提纯心脏和斑马鱼身体中的表达

组织特异性基因包括四个基因, 其中 cmlc2 主要表达在心肌组织, myh6 主要表达在心房肌组织, ifabp 主要表达在小肠组织, six3b 主要表达在脑或者眼组织。结果见图 2 和 3。图 2 显示提纯心脏组织中 cmlc2 和 myh6 的相对表达量很高, 和身体的 cmlc2 和 myh6 表达相比有显著性差异。提纯心脏的 cmlc2 的表达量是身体的 4840 倍, 证明提纯心脏组织的生物活性高 RNA 含量丰富。由于胚胎心房组织含量低且易损坏, 而提纯心脏组织 myh6 的表达量是身体的 24021 倍。证明虽然吸取的过程中我们损失了一部分心房, 但是最终仍然获得了含量丰富的活性心房组织。图 3 则显示提纯心脏组织几乎不表达 six3b, 和身体的 six3b 表达相比有显著性差异, $P < 0.001$ 。三次独立实验中提纯心脏 ifabp 基因的扩增和空白对照完全一致, 均显示无任何扩增, 而 ifabp 在身体的扩增呈现高表达状态, 证明提纯心脏组织的 ifabp 基因完全没有表达。结合图 1 中的(G)图视觉检查提纯心脏组织纯度良好, 这些数据说明提取的心脏组织是高度纯化并且特异性很高具有生物活性的组织。

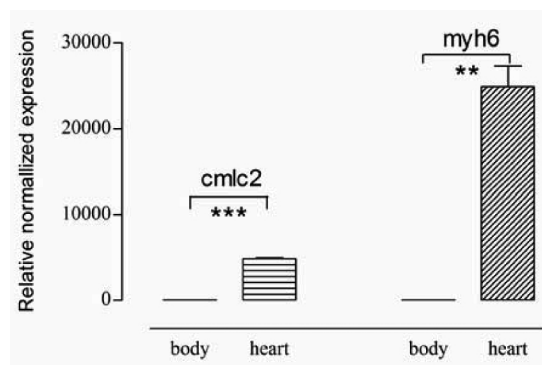


图 2 心脏表达特异性基因 cmlc2 和 myh6 在提纯心脏和身体中的比较

Fig. 2 Comparison of expression of cardiac-specific genes cmlc2 and myh6 in purified cardiac tissue and body tissue

Note: ***, represented the relative normalized expression of cmlc2 gene had significant differences ($P < 0.001$) between the purified cardiac tissue and body tissue; **, represented the relative normalized expression of myh6 gene had significant differences ($P < 0.01$) between the purified cardiac tissue and body tissue.

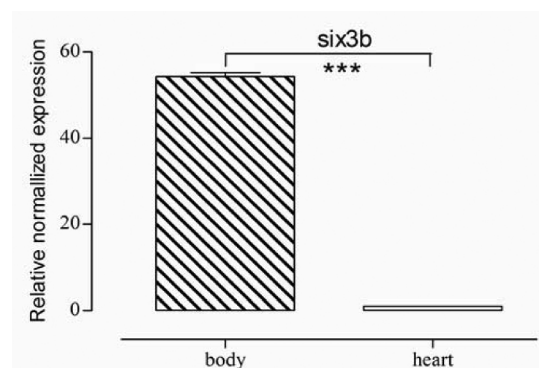


图 3 脑 / 眼睛表达特异性基因 six3b 在提纯心脏和身体中的比较

Fig. 3 Comparison of expression of brain/eye-specific gene six3b in purified cardiac tissue and body tissue

Note: ***, represented the relative normalized expression of six3b gene had significant differences ($P < 0.001$) between the purified cardiac tissue and body tissue.

3 讨论

由于哺乳动物的胚胎发育是在子宫内,所以必须借助复杂的显微外科手术才能研究胚胎或者是发育的单个器官。相比之下,斑马鱼的胚胎发育是在体外进行,并且一次可得到数量较多的胚胎个体。像所有的斑马鱼器官一样,斑马鱼胚胎心脏的发育非常迅速,斑马鱼只有一个心室和心房,通常在受精后 24 h 发育成心管,两天后发育成两心腔并完成环化。72 h 脱掉卵膜形成幼鱼。心脏的发育在脊柱动物发育过程中相当保守,斑马鱼心脏和哺乳动物有着很高的相似性^[19,20]。在有些情况下,心脏或者是血管的某些基因突变后可能致使胚胎死亡,这种情况导致哺乳动物的早期心脏发育障碍无法观察,但是由于斑马鱼早期一周胚胎可通过水中氧的渗透存活,如此可观察到心脏的疾病的早期发展。所以斑马鱼是研究早期心脏发育的理想模型。能得到高度纯化并具有生物活性的组织是很多发育生物学研究的前提,例如现在高速发展的基因组学,转录组学,表观基因组学,蛋白质组学和代谢组学都是从分子水平上认识生命现象,这些研究的基础首先需要得到足量的纯化的具有生物活性的组织材料。虽然斑马鱼胚胎数量多,但斑马鱼胚胎太小,很难通过传统解剖手段得到足量的心脏器官。本实验建立起一种新的实验方法,通过使用简单的试验器材和简易的操作就可一次提纯大量的斑马鱼胚胎心脏器官。这不仅对于研究早期心脏的基因表达有着重要意义,同时给其他广泛的生物基础研究提供了有效的原材料。

综上所述,利用这个简单方法可以在短时间内从斑马鱼胚胎中获取大量完整高纯度的有生物活性的心脏,如文中所述,200 颗左右的心脏即可得到超过 300 ng 的 RNA 活性,同时用 RT-PCR 证明,提纯心脏组织高表达心脏特异性基因(*cmlc2*, *myh6*),测定这些心脏特异性基因的表达对于检测能引起心肌细胞增殖缺陷的突变体是非常有用的,我们只需要提纯野生型和突变型斑马鱼胚胎的心脏进行 RT-PCR 就可以比较两者早期的胚胎心脏基因表达差异,此外,现在许多基因的表达谱可以进行微阵列或基因表达系列分析,如果结合斑马鱼胚胎心脏提纯技术,我们就可以进一步去识别心脏早期表达蛋白质的上下游效应,这可以有效提高早期胚胎蛋白组学的灵敏度、准确性。所以这个斑马鱼心脏提纯方法可以为斑马鱼做心血管方面的研究提供一个新的研究方向和研究思路。

参考文献(References)

- [1] Wilkinson RN, Jopling C, Van Eeden FJ. Zebrafish as a model of cardiac disease[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2014, 124: 5-91
- [2] Staudt D, Stainier D. Uncovering the molecular and cellular mechanisms of heart development using the zebrafish [J]. *Annu Rev Genet*, 2012, 46: 397-418
- [3] Cachat J, Kyzar EJ, Collins C, et al. Unique and potent effects of acute ibogaine on zebrafish: the developing utility of novel aquatic models for hallucinogenic drug research [J]. *Behav Brain Res*, 2013, 236(1): 258-269
- [4] Tavares B, Santos LS. The importance of zebrafish in biomedical research[J]. *Acta Med Port*, 2013, 26(5): 583-592
- [5] 赵丹, 程燕, 陈衍晨, 等. 模式生物斑马鱼在新生儿缺氧性脑损伤研究中的应用[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2014, 14(29): 1100-1104
Zhao Dan, Cheng Yan, Chen Yan-chen, et al. The zebrafish as a model organism for the research of neonatal hypoxia brain injury[J]. *Chin J Appl Clin Pediatr*, 2014, 14(29): 1100-1104
- [6] 常嘉, 陆亮, 常艳. 斑马鱼胚胎发育毒性模型评价方法的验证[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 2(28): 290-295
Chang Jia, Lu Liang, Chang Yan. Validation of zebrafish embryo toxicity evaluation method[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2014, 2(28): 290-295
- [7] Zu Y, Tong X, Wang Z, et al. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(4): 329-331
- [8] Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, et al. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system [J]. *Nature*, 2012, 491(7422): 114-118
- [9] Seruggia D, Montoliu L. The new CRISPR-Cas system: RNA-guided genome engineering to efficiently produce any desired genetic alteration in animals[J]. *Transgenic Res*, 2014, 23(5): 707-716
- [10] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 227-229
- [11] Ceci ML, Mardones-Krsulovic C, Sanchez M, et al. Axon-Schwann cell interactions during peripheral nerve regeneration in zebrafish larvae[J]. *Neural Dev*, 2014, 9(1): 22
- [12] Wan J, Zhao XF, Vojtek A, et al. Retinal Injury, Growth Factors, and Cytokines Converge on beta-Catenin and pStat3 Signaling to Stimulate Retina Regeneration[J]. *Cell Rep*, 2014, 9(1): 285-297
- [13] Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4(5): 504-512
- [14] Westerfield M. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio Rerio*) [M]. M. Westerfield, 2007
- [15] Yelon D, Horne SA, Stainier DY. Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish[J]. *Dev Biol*, 1999, 214(1): 23-37
- [16] Berdoudo E, Coleman H, Lee DH, et al. Mutation of weak atrium/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish [J]. *Development*, 2003, 130(24): 6121-6129
- [17] Andre M, Ando S, Ballagny C, et al. Intestinal fatty acid binding protein gene expression reveals the cephalocaudal patterning during zebrafish gut morphogenesis[J]. *Int J Dev Biol*, 2000, 44(2): 249-252
- [18] Seo H C, Drivenes, Ellingsen S, et al. Expression of two zebrafish homologues of the murine Six3 gene demarcates the initial eye primordia[J]. *Mech Dev*, 1998, 73(1): 45-57
- [19] Baldessari D, Mione M. How to create the vascular tree? (Latest) help from the zebrafish[J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 118(2): 206-230
- [20] Schoenebeck JJ, Yelon D. Illuminating cardiac development: Advances in imaging add new dimensions to the utility of zebrafish genetics[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2007, 18(1): 27-35