

文章编号: 1674-5566(2018)01-0016-08

DOI:10.12024/jsou.20170402037

斑马鱼中 Wnt 信号通过调控侧线基板形成影响侧线发育机制

葛玲玲^{1,2,3,4}, 宋佳坤^{1,2,3,4}, 范纯新^{1,2,3,4}

(1. 上海海洋大学 海洋生物系统与神经科学研究所, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 海洋生物科学国际联合研究中心, 中国科学技术部, 上海 201306; 4. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 鱼类侧线系统源自胚胎期的侧线基板, 侧线基板的特化受到多种信号的综合作用。利用转基因斑马鱼 *hsp:wnt8a-egfp* 和 *hsp:dkk1-egfp*, 增强或抑制 Wnt 信号, 通过 YO-PRO-1 染色和毛细血管计数, 研究斑马鱼中 Wnt 信号对侧线系统发育的影响。热诱导 Dkk1 过表达后, 斑马鱼侧线系统的神经丘不能形成。碱性磷酸酶染色和整体原位杂交结果表明: Wnt 信号是神经丘毛细血管前体细胞以及侧线基板标记基因 *Eyal* 和 *Six2b* 表达所必需的。综上结果: Wnt 信号可能通过调控侧线基板形成影响斑马鱼的侧线发育。

关键词: 斑马鱼; 侧线基板; 毛细血管; Wnt 信号

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

侧线系统是鱼类和两栖类体表一种重要的感觉系统, 有感觉水流、水压、水温、微弱电场变化的功能^[1-3], 对鱼类的摄食、避敌、生殖、集群、洄游等行为有着非常重要的作用^[4-7]。斑马鱼的侧线系统由一系列分散的神经丘构成, 包括前侧线系统(ALL)和后侧线系统(PLL)^[8]。侧线系统起源于头部神经基板中的侧线基板^[9]。*Six1/2*, *Six4/5* 和 *Eyal* 基因可作为头部神经基板和侧线神经丘前体细胞的标记基因^[9]。在小鼠内耳毛细胞分化中 *Eyal-Six1* 通过激活 *Atoh1a* 表达促进毛细胞的分化^[10], *Eyal* 和 *Six1/2* 在斑马鱼内耳和神经丘发育的过程中也是必需的^[11-12]。近期的研究表明: 侧线系统的发育受到 Wnt 等信号的调控^[13], 但具体的调控机制尚未完全阐明。

Wnt 信号通路是一条非常保守的信号转导途径, 广泛存在于所有动物中, 对胚胎的早期发育、组织器官发生、组织再生以及其他生理过程起着非常重要的作用^[14]。Wnt 信号也参与后侧线原基的迁移和次级神经丘形成^[15-16]。Wnt8 是经典 Wnt 信号途径的一类配体, 可通过 β -catenin 调控

下游基因转录。Wnt8 参与胚胎背-腹轴的建立, 促进侧中胚层的发育^[17]。Dkk (Dickkopf) 是 Wnt 信号通路中重要的拮抗因子之一, 能够特异地抑制经典 Wnt 信号通路^[18]。本研究将利用转基因斑马鱼操控经典 Wnt 信号, 研究 Wnt 信号对侧线基板和神经丘前体细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用 AB 品系斑马鱼, *hsp:wnt8a-egfp* 和 *hsp:dkk1-egfp* 转基因斑马鱼^[19] 均养在循环养殖系统中(上海海圣生物设备有限公司)。养殖系统水温维持在 28.5 °C, 按 14 h/10 h 的光暗周期, 每天早晚各喂食一次卤虫。胚胎饲养于灭菌后的胚胎水(63 mg/L CaSO₄, 10 mg/L MgSO₄, 4 mg/L KCl, 1.1 mg/L NaH₂PO₄, 0.01 mg/L 亚甲基蓝)中, 胚胎发育分期参照 KIMMEL 等^[20]。YO-PRO-1 购自 Life Technology, NBT 和 BCIP 购自 Roche。

收稿日期: 2017-04-28 修回日期: 2017-11-27

基金项目: 上海海洋大学国际海洋研究中心海洋生物系统和神经科学研究所(A1-0203-00-4007); 高峰团队重点实验室宋佳坤团队经费(A1-2018-14-0005-2); 上海高校水产学一流学科建设项目(A2-2019-14-001-4)

作者简介: 葛玲玲(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学。E-mail: gelling0321@163.com

通信作者: 范纯新, E-mail: cxfan@shou.edu.cn

1.2 热激处理胚胎

AB 品系斑马鱼分别与 *hsp:wnt8a-egfp* 和 *hsp:dkk1-egfp* 转基因斑马鱼杂交。将所得的部分胚胎在 5 hpf 热激 1 h,发现胚胎分别表现出头部化和尾部化的缺陷表型,这表明 *hsp:wnt8a* 和 *hsp:dkk1* 两个转基因鱼热激处理后确实过表达了 Wnt8a 和 Dkk1 蛋白。当胚胎发育至 17 hpf (hour-post fertilization) 时,将胚胎等分为实验组和对照组,各 54 条。实验组胚胎 39 °C 热激 1 h,然后放回 28.5 °C 培养箱继续培养;对照组胚胎持续培养在 28.5 °C 温箱中。

1.3 YO-PRO-1 染色

用新鲜的胚胎水稀释配制 2 μmol/L YO-PRO-1 染色工作液,将发育至 3 dpf 的胚胎放入染色液中,避光染色 1 h。染色后的胚胎,先用胚胎水清洗两遍,然后转移至 MS-222 (0.1 mg/mL) 中麻醉 5 min。将其转移到平底的 96 孔板中,每个孔中放入一个胚胎,仅留少量胚胎水,并使胚胎侧向铺于板底以便观察。在荧光倒置显微镜 (Axio Observer Z1) 下进行神经丘和毛细胞计数并拍照。

1.4 碱性磷酸酶染色

胚胎经 4% PFA (用 PBS 配制) 室温固定 1 h,然后用 PBS 洗涤 3 次,再用 3% H₂O₂ 室温强光下使胚胎脱色完全。用 PBS 洗涤胚胎 5 min,再用显色缓冲液洗涤胚胎 3 次,每次 5 min。最后将胚胎浸没于含 NBT 和 BCIP 的显色液中,避光染色 10 ~ 15 min。待胚胎显色完成后,用 4% PFA 终止显色反应,再用 PBS 洗涤胚胎 2 ~ 3 次。最后将胚胎浸于 100% 甘油中用于观察拍照。

1.5 整体原位杂交

利用 NCBI 网站上 Primer-BLAST 设计 *Six2b* 和 *Eyal* 特异性引物 (包含部分编码序列),见表 1。以斑马鱼 30 hpf 胚胎 cDNA 为模板,PCR 扩增得到目的基因的片段,纯化并连接 pBSK + 载体,转化后送至生工生物工程 (上海) 有限公司测序鉴定,得到阳性克隆。以含有 *Six2b* 和 *Eyal* 特异性片段的质粒载体线性化后作为模板,使用 T7 RNA 聚合酶合成带地高辛标记的反义 RNA 探针。具体的原位杂交和显色过程参照文献 [21] 进行。

2 结果与分析

2.1 YO-PRO-1 染色标记神经丘毛细胞

YO-PRO-1 是一种细胞核染料,能特异性进入毛细胞。在 17 hpf (侧线基板形成期) 对转基因斑马鱼 *hsp:dkk1-egfp* 热激处理 1 h,待胚胎发育至 3 dpf 时,用 YO-PRO-1 染色后,荧光显微镜下对斑马鱼后侧线系统神经丘的毛细胞进行计数,同时以 AB 野生型斑马鱼作为阴性对照。结果显示:未进行热激处理的 *hsp:dkk1-egfp* 转基因斑马鱼后侧线系统神经丘数目为 8.75 ± 0.68 ,神经丘毛细胞数为 20.56 ± 2.39 ;热激处理后 *hsp:dkk1-egfp* 转基因斑马鱼中后侧线系统中未检测到毛细胞,而热激后的 AB 鱼与未热激的 AB 鱼毛细胞数量无显著变化,可见热激处理本身对毛细胞的损伤有限 (图版 I、表 2)。这表明经过热激处理诱导 Dkk1 过表达,导致斑马鱼后侧线神经丘的毛细胞无法正常发育,即侧线基板形成期的 Wnt 信号对斑马鱼后侧线神经丘毛细胞的发育是必需的。

表 1 实验所使用的引物序列

Tab.1 Primer sequences used for all the experiments

WISH 引物 Primer for WISH	引物序列 Primer sequence
Six2b-Forward	TGCCAGATGCTCGTATATGCTG
Six2b-Reverse	AGCGAAATCCACTTGGGAA
Eyal-Forward	TGACCTTGAGCCGCTGTTCAATTG
Eyal-Reverse	TTGCCAGCAGAAATGAAGCCCTG

表 2 后侧线系统神经丘毛细胞数目

Tab.2 Hair cells in neuromasts of the posterior lateral line

	无热激 No Heat Shock	热激 Heat Shock
神经丘 Neuromasts	8.75 ± 0.68	未检测到
毛细胞 Hair cell	20.56 ± 2.39	未检测到

2.2 Wnt 信号通路调控斑马鱼侧线系统发育

碱性磷酸酶是多潜能干细胞的重要标记,也可以用于标记斑马鱼神经丘的前体细胞^[22]。

在胚胎发育至 17 hpf 时,热激处理诱导 Dkk1 过表达,待仔鱼发育至 3 dpf 时,进行碱性磷酸酶染色。结果显示:未经热激的 *hsp:dkk1-egfp* 转基因斑马鱼神经丘处出现碱性磷酸酶信号;Dkk1 过表达后,斑马鱼侧线神经丘中的碱性磷酸酶信号减弱,且神经丘数量减少 (图 1)。这表明:Wnt 信号是斑马鱼侧线神经丘的前体细胞形成所必需

的。

为检测 Wnt 信号对斑马鱼侧线神经丘前体细胞形成是否具有充分性作用,在胚胎发育至 17 hpf 时,热激处理诱导 Wnt8a 过表达,于 3 dpf 时取仔鱼利用碱性磷酸酶染色检测神经丘前体细胞情况。结果显示:未经热激的 hsp: wnt8a-egfp

转基因斑马鱼(对照组)神经丘处检测到较强的碱性磷酸酶信号;经热激的 hsp: wnt8a-egfp 转基因斑马鱼侧线神经丘中碱性磷酸酶信号相对于对照组显著减弱(图 2)。由此可见,过表达 Wnt8a 并不能促进斑马鱼神经丘前体细胞的形成,反而抑制前体细胞的形成。

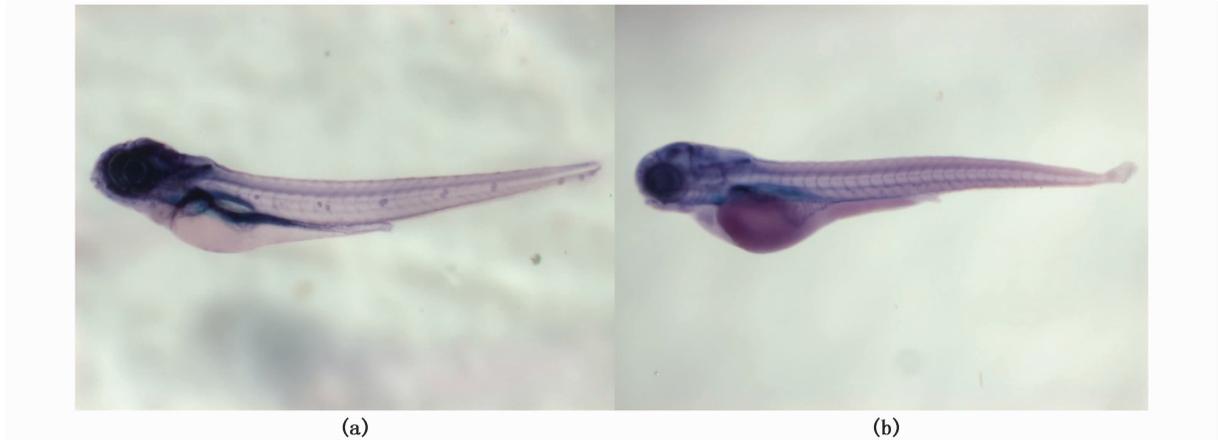


图 1 Dkk1 过表达对神经丘前体细胞的影响

Fig. 1 The effect of Dkk1 overexpression on the precursor cells of neuromasts

(a) 未经热激的 hsp: dkk1-egfp 转基因斑马鱼,神经丘的碱性磷酸酶染色;(b) 于 17 hpf 热激诱导 Dkk1 过表达后,神经丘的碱性磷酸酶染色

(a) hsp: dkk1-egfp transgenic zebrafish without heating shock, the neuromast were stained with NBT/BCIP; (b) The hair cells of neuromast of hsp: dkk1-egfp transgenic zebrafish heated at 17 hpf were stained with NBT/BCIP



图 2 Wnt8a 过表达对神经丘前体细胞的影响

Fig. 2 The effects of Wnt8a overexpression on the precursor cells of neuromasts

(a) 未经热激的 hsp: wnt8a-egfp 转基因斑马鱼,神经丘前体细胞的碱性磷酸酶染色;(b) 热激诱导 Wnt8a 过表达后,神经丘前体细胞的碱性磷酸酶染色

(a) hsp: wnt8a-egfp transgenic zebrafish without heating shock, the neuromast were stained with NBT/BCIP; (b) The hair cells of neuromast of hsp: wnt8a-egfp transgenic zebrafish heated at 17 hpf were stained with NBT/BCIP

2.3 Wnt 信号对 *Eya1* 和 *Six2b* 的表达调控

既然 Wnt 信号参与斑马鱼侧线神经丘前体细胞的调控,*Six2b* 和 *Eya1* 表达于神经基板和神经丘的前体细胞,参与毛细胞前体细胞的形成。

因此,推测 Wnt 信号是否通过对 *Six2b* 和 *Eya1* 基因的表达调控参与侧线发育。通过整体原位杂交技术检测了在 Wnt8a 和 Dkk1 过表达后,斑马鱼胚胎中侧线神经丘前体细胞标记基因 *Six2b* 和

Eya1 在斑马鱼神经丘中表达量的变化。实验结果显示:未经热激的 *hsp:dkk1-egfp* 转基因斑马鱼胚胎中,*Six2b* 和 *Eya1* 集中在 28 hpf 和 36 hpf 时神经丘和迁移的侧线原基中表达,48 hpf 时 *Six2b* 和 *Eya1* 在神经丘中表达;热激诱导 *Dkk1* 的过表达后,在 28 hpf、36 hpf、48 hpf 时未检测到 *Six2b* 和 *Eya1* 在迁移的侧线原基和神经丘处的表达(图版 II)。结果表明 *Dkk1* 过表达抑制 *Six2b* 和 *Eya1* 在斑马鱼迁移的侧线原基和神经丘处表达。

对照组即未经热激的 *hsp:wnt8a-egfp* 转基因斑马鱼中,28 hpf 和 36 hpf 时 *Six2b* 和 *Eya1* 在神经丘和迁移的侧线原基中表达,48 hpf 时 *Six2b* 和 *Eya1* 在神经丘中表达;热激诱导 *Wnt8a* 的过表达后,在 28 hpf、36 hpf、48 hpf 时侧线原基和神经丘处未检测到 *Six2b* 和 *Eya1* 的表达(图版 III)。结果表明 *Wnt8a* 过表达抑制 *Six2b* 和 *Eya1* 在斑马鱼迁移的侧线原基和神经丘处表达。

3 讨论

在侧线基板形成期抑制 Wnt 信号(*Dkk1* 过表达)导致神经丘发育受阻。碱性磷酸酶染色,结合 *Six2b* 和 *Eya1* 的表达变化表明:Wnt 信号可能通过抑制神经丘前体细胞中的 *Eya1* 和 *Six2b* 表达,使前体细胞无法正常发育,进而导致神经丘发育缺陷。此发现与斑马鱼 *Lef1* 突变体(经典 Wnt 信号的直接靶基因)中的表型类似(后侧线原基迁移受阻,缺少尾部神经丘),且 *Lef1* 突变体的侧线缺陷表型也是由后侧线原基中增殖细胞数量下降产生的^[15,23]。这表明 Wnt 信号确实是侧线神经丘前体细胞正常发育所必需。

低等脊椎动物的侧线系统与内耳和鳃上结构均发育起源于后部基板^[9]。在两栖类中,发现 Wnt 信号可促进后部基板标记基因的表达^[24],在斑马鱼中尽管 Wnt 信号是耳基板诱导所必需的,但是在鸡胚中异位表达 Wnt 不能充分诱导耳基板形成^[25-26]。这和在斑马鱼侧线系统中观察的结果相似,在基板形成期异位表达 *Wnt8a*,神经丘前体细胞,以及 *Eya1* 和 *Six2b* 基因的表达均受到抑制。推测在头部神经基板的诱导形成过程中,受到多个不同胚胎结构发出的动态信号,综合作用于基板区。而单纯异位表达 Wnt 信号,并不能特异性增强侧线基板中的 Wnt 信号,而是造成所有胚胎组织的 Wnt 信号均上调,因此造成侧线的

发育受到抑制。

参考文献:

- [1] BAKER C V H, BRONNER-FRASER M. Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction [J]. *Developmental Biology*, 2001, 232(1): 1-61.
- [2] WILKENS L A, HOFMANN M H. The paddlefish rostrum as an electrosensory organ: A novel adaptation for plankton feeding[J]. *Bio Science*, 2007, 57(5): 399-407.
- [3] GOULET J, ENGELMANN J, CHAGNAUD B P, et al. Object localization through the lateral line system of fish: theory and experiment[J]. *Journal of Comparative Physiology A*, 2008, 194(1): 1-17.
- [4] MOGDANS J, GEISEN S. Responses of the goldfish head lateral line to moving objects [J]. *Journal of Comparative Physiology A*, 2009, 195(2): 151-165.
- [5] NORTH CUTT R G. Distribution and innervation of lateral line organs in the axolotl [J]. *The Journal of Comparative Neurology*, 1992, 325(1): 95-123.
- [6] CHENG H, HUANG S Q, HEATWOLE H. Ampullary organs, pit organs, and neuromasts of the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus* [J]. *Journal of Morphology*, 1995, 226(2): 149-157.
- [7] SONG J K, YANH Y, POPPERA N. Damage and recovery of hair cells in fish canal (but not superficial) neuromasts after gentamicin exposure [J]. *Hearing Research*, 1995, 91(1/2): 63-71.
- [8] GHYSEN A, DAMBLY-CHAUDIÈRE C. The lateral line microcosmos [J]. *Genes & Development*, 2007, 21(17): 2118-2130.
- [9] SCHOSSER G. Making senses: development of vertebrate cranial placodes [M]. JEON K W. *International Review of Cell and Molecular Biology*. Amsterdam: Elsevier, 2010: 129-234.
- [10] AHMED M, WONG E Y M, SUN J B, et al. *Eya1-Six1* interaction is sufficient to induce hair cell fate in the cochlea by activating *Atoh1* expression in cooperation with *Sox2* [J]. *Developmental Cell*, 2012, 22(2): 377-390.
- [11] KOZLOWSKI D J, WHITFIELD T T, HUKRIEDE N A, et al. The zebrafish dog-eared mutation disrupts *eya1*, a gene required for cell survival and differentiation in the inner ear and lateral line [J]. *Developmental Biology*, 2005, 277(1): 27-41.
- [12] SCHLOSSER G, AWTRY T, BRUGMANN S A, et al. *Eya1* and *Six1* promote neurogenesis in the cranial placodes in a *SoxB1*-dependent fashion [J]. *Developmental Biology*, 2008, 320(1): 199-214.
- [13] THOMAS E D, CRUZ I A, HAILEY D W, et al. There and back again: development and regeneration of the zebrafish lateral line system [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 2015, 4(1): 1-16.

- [14] LOGAN C Y, NUSSE R. The Wnt signaling pathway in development and disease [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2004, 20: 781-810.
- [15] MCGRAW H F, DRERUP C M, CULBERTSON M D, et al. Lef1 is required for progenitor cell identity in the zebrafish lateral line primordium[J]. *Development*, 2011, 138(18): 3921-3930.
- [16] WADA H, GHYSEN A, ASAKAWA K, et al. Wnt/Dkk negative feedback regulates sensory organ size in zebrafish [J]. *Current Biology*, 2013, 23(16): 1559-1565.
- [17] BAKER K D, RAMEL M C, LEKVEN A C. A direct role for Wnt8 in ventrolateral mesoderm patterning [J]. *Developmental Dynamics*, 2010, 239(11): 2828-2836.
- [18] NIEHRS C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators [J]. *Oncogene*, 2006, 25(57): 7469-7481.
- [19] STOICK-COOPER C L, WEIDINGER G, RIEHLE K J, et al. Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration[J]. *Development*, 2007, 134(3): 479-489.
- [20] KIMMEL C B, BALLARD W W, KIMMEL S R, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. *Developmental Dynamics*, 1995, 203(3): 253-310.
- [21] THISSE C, THISSE B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos [J]. *Nature Protocol*, 2007, 3(1): 59-69.
- [22] VILLABLANCA E J, RENUCCI A, SAPÉDE D, et al. Control of cell migration in the zebrafish lateral line; implication of the gene “tumour-associated calcium signal transducer” *tacstd* [J]. *Developmental Dynamics*, 2006, 235(6): 1578-1588.
- [23] VALDIVIA L E, YOUNG R M, HAWKINS T A, et al. Lef1-dependent Wnt/ β -catenin signalling drives the proliferative engine that maintains tissue homeostasis during lateral line development [J]. *Development*, 2011, 138(18): 3931-3941.
- [24] PARK B Y, SAINT-JEANNET J P. Hindbrain-derived Wnt and Fgf signals cooperate to specify the otic placode in *Xenopus* [J]. *Developmental Biology*, 2008, 324(1): 108-121.
- [25] FRETER S, MUTA Y, MAK S S, et al. Progressive restriction of otic fate: the role of FGF and Wnt in resolving inner ear potential [J]. *Development*, 2008, 135(20): 3415-3424.
- [26] PHILLIPS B T, STORCH E M, LEKVEN A C, et al. A direct role for Fgf but not Wnt in otic placode induction [J]. *Development*, 2004, 131(4): 923-931.

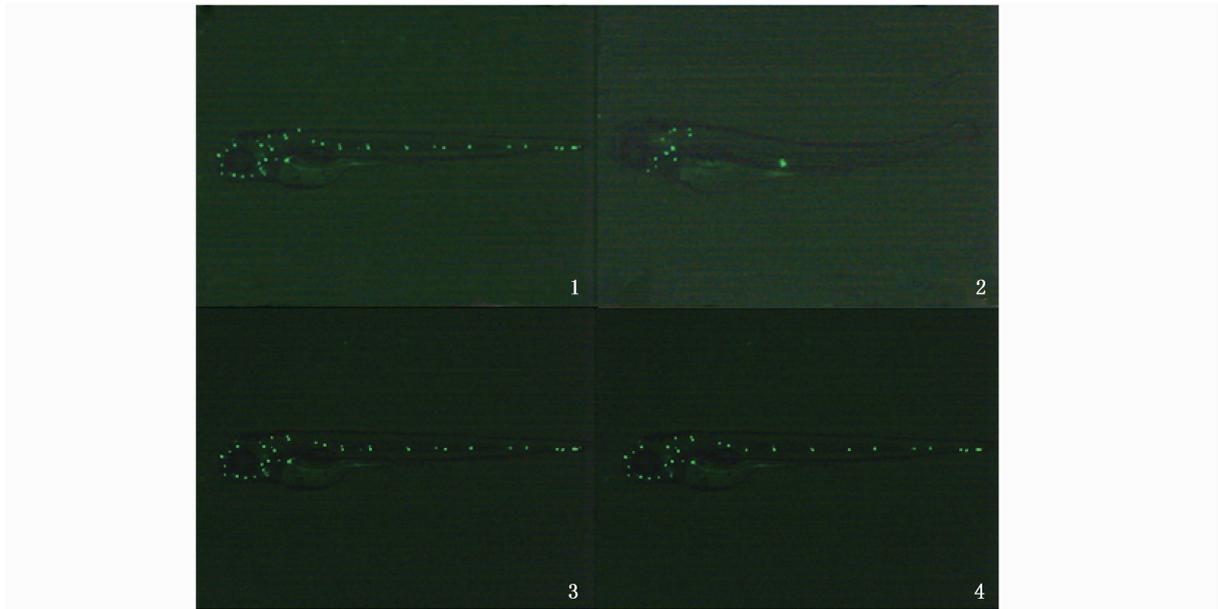
The Wnt signaling affects development of the lateral line by regulating the specification of lateral line placode in the zebrafish

GE Lingling^{1,2,3,4}, SONG Jiakun^{1,2,3,4}, FAN Chunxin^{1,2,3,4}

(1. *Institute for Marine Biosystem and Neurosciences, Institute for Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 2. *National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 3. *International Research Center for Marine Biosciences at Shanghai Ocean University, Ministry of Science and Technology, Shanghai 201306, China*; 4. *Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China*)

Abstract: The lateral line system originates from the embryonic lateral line placode. The specification of lateral line placode requires the collaboration of a variety of signalings. In order to study the role of Wnt signaling in the development of the lateral line system in zebrafish, we modulated the Wnt signaling by heating shock of the transgenic zebrafish, *hsp: Wnt8a-egfp* and *hsp: dkk1-egfp*, and evaluated the hair cell number by YO-PRO-1 staining. We found that hair cells in the zebrafish lateral line system cannot form normally after overexpression of Dkk1. Furthermore, we found Wnt signaling was also necessary for precursor cells formation using alkaline phosphatase staining and in situ hybridization of *Eya1* and *Six2b*. In summary, Wnt signaling affects the development of lateral line system through regulating lateral line placode formation.

Key words: zebrafish; lateral line placode; hair cell; Wnt signaling pathway

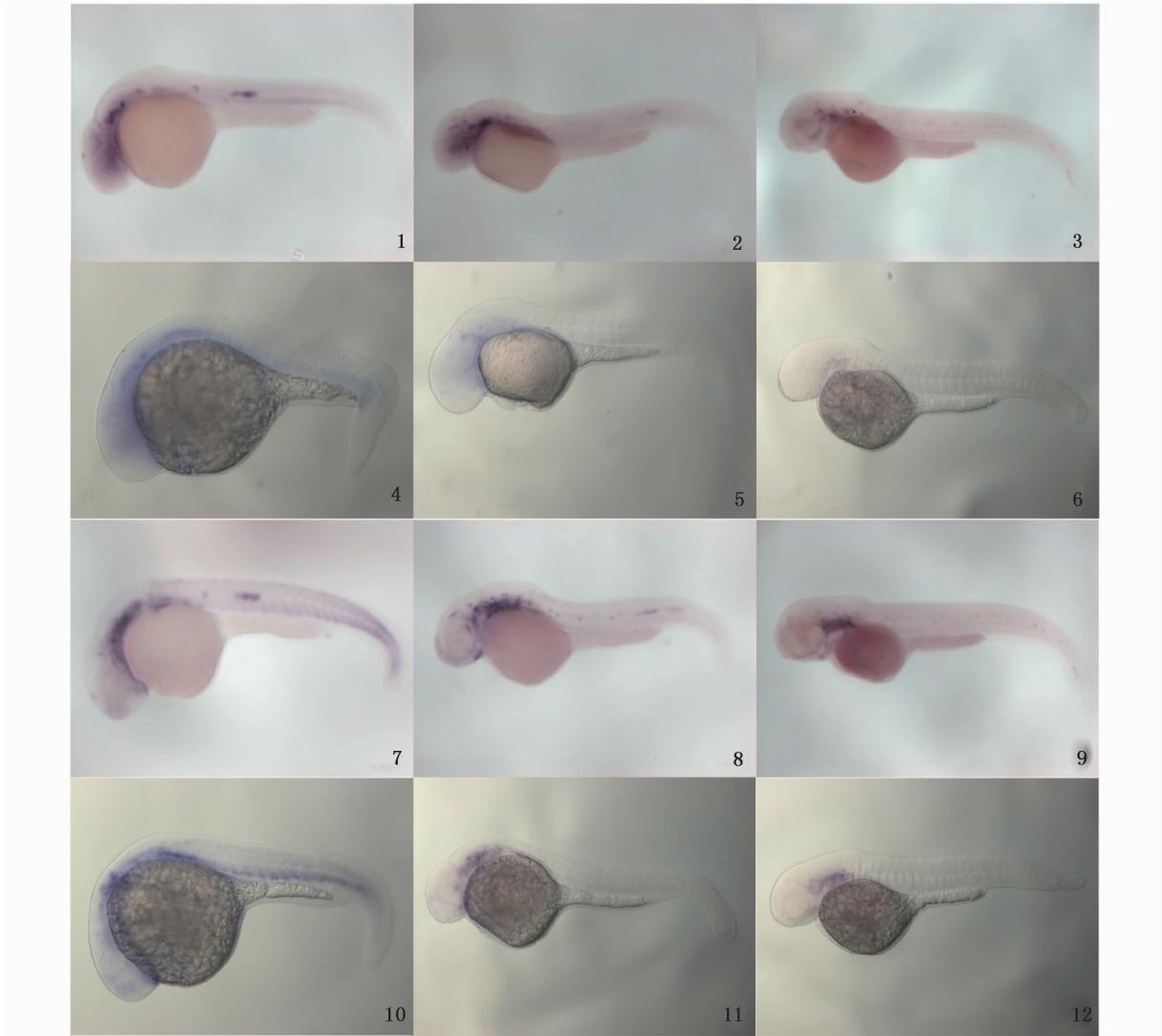


图版 I Dkk1 过表达对神经丘毛细胞的影响

Plate I The effect of Dkk1 overexpression on hair cell in neuromast

1. 未经热激的 hsp: dkk1-egfp 转基因斑马鱼, 神经丘毛细胞的 YO-PRO-1 染色; 2. 于 17 hpf 热激诱导 Dkk1 过表达后, 神经丘毛细胞的 YO-PRO-1 染色; 3. 未经热激的野生型斑马鱼 AB, 神经丘毛细胞 YO-PRO-1 染色; 4. 于 17 hpf 热激后, 神经丘毛细胞 YO-PRO-1 染色

1. hsp: dkk1-egfp transgenic zebrafish without heating shock, the hair cells of neuromast were stained with YO-PRO-1; 2. The hair cells of neuromast of hsp: dkk1-egfp transgenic zebrafish heated at 17 hpf were stained by YO-PRO-1; 3. AB wild type zebrafish without heating shock, the hair cells of neuromast were stained with YO-PRO-1; 4. The hair cells of neuromast of AB wild type zebrafish heated at 17 hpf were stained by YO-PRO-1

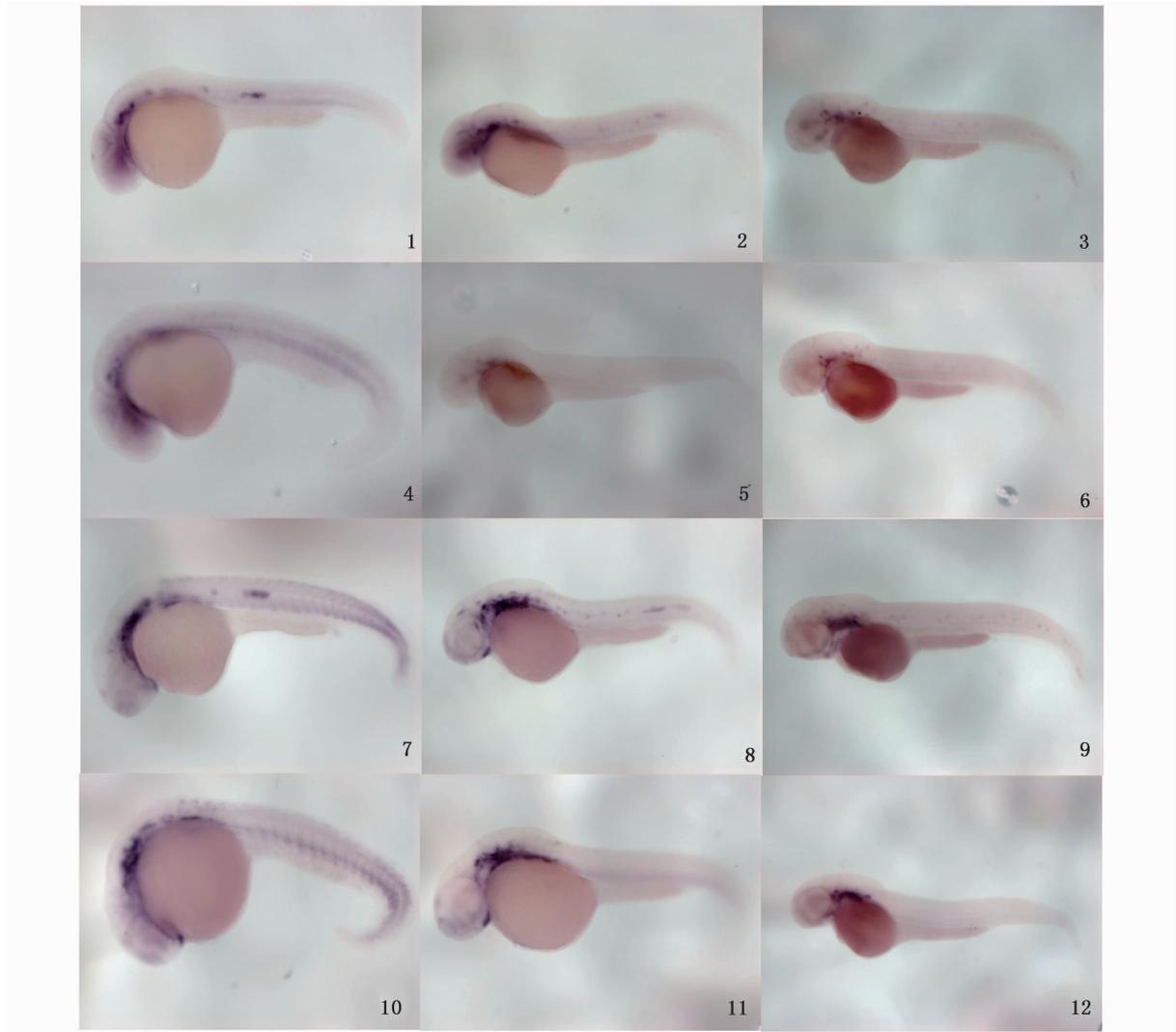


图版 II 整体原位杂交分析毛细胞相关基因 *Six2b* 和 *Eyal1*
在 *hsp:dkk1-egfp* 转基因斑马鱼胚胎不同发育阶段的表达

**Plate II The expression pattern of hair cell related genes *Six2b*
and *Eyal1* in different stages of transgenic zebrafish *hsp:dkk1-egfp***

1-3. 未经热激的 *hsp:dkk1-egfp* 转基因斑马鱼, *Six2b* 基因分别在 28 hpf、36 hpf、48 hpf 时的表达; 4-6. 于 17 hpf 热激诱导 *Dkk1* 过表达后, *Six2b* 基因分别在 28 hpf、36 hpf、48 hpf 时的表达; 7-9. 未经热激的 *hsp:dkk1-egfp* 转基因斑马鱼, *Eyal1* 基因分别在 28 hpf、36 hpf、48 hpf 时的表达; 10-12. 于 17 hpf 热激诱导 *Dkk1* 过表达后, *Eyal1* 基因分别在 28 hpf、36 hpf、48 hpf 时的表达

1-3. *hsp:dkk1-egfp* transgenic zebrafish without heating shock, the expression pattern of gene *Six2b* at the stage of 28 hpf, 36 hpf and 48 hpf, respectively; 4-6. The expression pattern of gene *Six2b* at the stage of 28 hpf, 36 hpf and 48 hpf respectively in *hsp:dkk1-egfp* transgenic zebrafish heated at 17 hpf; 7-9. *hsp:dkk1-egfp* transgenic zebrafish without heating shock, the expression pattern of gene *Eyal1* at the stage of 28 hpf, 36 hpf and 48 hpf, respectively; 10-12. The expression pattern of gene *Eyal1* at the stage of 28 hpf, 36 hpf and 48 hpf respectively in *hsp:dkk1-egfp* transgenic zebrafish heated at 17 hpf



图版Ⅲ 整体原位杂交分析毛细胞相关基因 *Six2b* 和 *Eyal*
在 *hsp:wnt8a-egfp* 转基因斑马鱼胚胎不同发育阶段的表达

Plate III The expression pattern of hair cell related genes *Six2b* and *Eyal* in different stages of transgenic zebrafish *hsp:wnt8a-egfp*

1-3. 未经热激的 *hsp:wnt8a-egfp* 转基因斑马鱼, *Six2b* 基因分别在 28 hpf、36 hpf、48 hpf 时的表达; 4-6. 于 17 hpf 热激诱导 Dkk1 过表达后, *Six2b* 基因分别在 28 hpf、36 hpf、48 hpf 时的表达; 7-9. 未经热激的 *hsp:wnt8a-egfp* 转基因斑马鱼, *Eyal* 基因分别在 28 hpf、36 hpf、48 hpf 时的表达; 10-12. 于 17 hpf 热激诱导 Dkk1 过表达后, *Eyal* 基因分别在 28 hpf、36 hpf、48 hpf 时的表达

1-3. *hsp:wnt8a-egfp* transgenic zebrafish without heating shock, the expression pattern of gene *Six2b* at the stage of 28 hpf, 36 hpf and 48 hpf, respectively; 4-6. The expression pattern of gene *Six2b* at the stage of 28 hpf, 36 hpf and 48 hpf respectively in *hsp:wnt8a-egfp* transgenic zebrafish heated at 17 hpf; 7-9. *hsp:wnt8a-egfp* transgenic zebrafish without heating shock, the expression pattern of gene *Eyal* at the stage of 28 hpf, 36 hpf and 48 hpf, respectively; 10-12. The expression pattern of gene *Eyal* at the stage of 28 hpf, 36 hpf and 48 hpf respectively in *hsp:wnt8a-egfp* transgenic zebrafish heated at 17 hpf