

文章编号: 1674 - 5566(2015)03 - 0321 - 05

牙鲆胚胎阶段 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 基因的表达

陈 洁, 鲍宝龙

(上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘 要: 在眼睛发育过程中, Paired Box 6 (*pax6*) 和 T-Box Transcription Factor 3 (*tbx3*) 界定了视网膜发生区域, Retinal Homeobox Protein 1 (*rx1*) 确定了视杯的形成范围。本研究调查了 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 基因是否在左右眼睛发生区域的表达范围存在差异。荧光定量 PCR 显示, 牙鲆 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 基因从受精后 20 h 开始表达。RNA 整体原位杂交检测发现 *pax6* 基因在牙鲆胚胎左右眼睛发生区域表达, 左侧表达范围较右侧略大, 同时 *pax6* 在前脑以及神经管处也有表达; *tbx3* 和 *rx1* 基因在牙鲆胚胎左右眼睛发生区域表达, 左右侧表达范围无明显可见差异。提示我们, 胚胎阶段眼睛发育过程中 *pax6* 在左右视网膜的表达范围存在的差异, 是否可能导致牙鲆仔、稚鱼左右眼眶上和眶下成纤维细胞前体数量上存在差异, 并最终导致变态阶段甲状腺激素诱导下的眼睛移动?

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 是我国重要的海水养殖鱼类, 也是研究比目鱼类(鲽形目鱼类) 变态的主要对象。比目鱼类变态过程中, 其中一只眼睛从一侧逐渐移动到头部的另一侧, 这种移动是眶下皮肤组织中正在分裂的成纤维细胞的数量要多于眶上的结果, 如牙鲆, 其右侧眼睛逐渐移到左侧, 是右眼眶下正在分裂的成纤维细胞数量多于眶上。而非移动眼则相反, 眶上正在分裂的成纤维细胞要多于眶下^[1-2]。变态过程中导致眼睛移动的眶上和眶下成纤维细胞数目的差异, 有无可能在胚胎阶段眼睛形成过程中眶上和眶下就存在微小细胞数目上的差异, 这种差异到变态阶段在甲状腺激素诱导下, 通过细胞分裂使眶上和眶下成纤维细胞数量差异更明显, 最终导致眼睛移动呢?

脊椎动物眼睛起源于胚胎神经板前部一个由原始神经外胚层组成的视网膜发生区域, 随着

研究亮点: 通过胚胎整体原位杂交实验, 调查了牙鲆眼原基发生相关的 *pax6*、*rx1* 和 *tbx3* 基因, 发现牙鲆眼睛发育过程中, *pax6* 基因在左侧眼睛发生区域的表达范围略大于右侧。*tbx3* 和 *rx1* 基因在牙鲆胚胎左右眼睛发生区域无明显可见差异。提示我们, *pax6* 基因可能在眼原基发生阶段决定了牙鲆右眼移动。

关键词: 牙鲆; 眼睛发育; *pax6* 基因; *tbx3* 基因; *rx1* 基因; 眼睛移动

中图分类号: S 917

文献标志码: A

眼睛的发育, 该区域逐渐被一分为二, 各自形成视柄和视泡, 最终形成左右眼^[3]。在这过程中 *pax6* 界定了眼组织区域, *tbx3* 也被检测到在视网膜区域表达^[4], *rx1* 确定了视杯的形成范围^[5]。本研究调查牙鲆左右视网膜发生区域 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 基因的表达, 来探讨这些基因是否有可能在胚胎阶段眼睛形成过程中导致眶上和眶下区域成纤维细胞前体数量上的差异。

1 材料与方法

1.1 实验材料

牙鲆胚胎、仔鱼购自青岛忠海水产有限公司, 孵化水温为 17 ~ 18 °C, 从受精后 10 h 开始采样, 每隔 5 小时采样一次, 用 4% PFA 固定后换成甲醇保存于 4 °C 以备原位杂交用。用 RNA 保护液固定保存于 -20 °C 用于 RNA 抽提。所采样中, 受精后 10 h 和 15 h 胚胎处于原肠期, 20 h 胚

收稿日期: 2014-07-15 修回日期: 2015-03-16

基金项目: 国家自然科学基金(31072201)

作者简介: 陈 洁(1989—), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类发育生物学。E-mail: cjwzzx@126.com

通信作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

胎为神经胚时期,25 h 到 35 h 胚胎为器官形成期,40 h 到 50 h 胚胎为尾部游离期,55 h 之后为初孵仔鱼。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取 -20 °C 保存的样本于液氮中研磨,参照 TRIzol (Invitrogen) 说明书抽提 RNA,用 DNase I 去除基因组 DNA 污染,所得的 RNA 保存于 -80 °C。利用 Promega 反转录系统,以总 RNA 为模板,oligo(dT) 为引物于 72 °C 反应 5 min、冰浴 5 min 后 42 °C 反应 1.5 h 反转录合成 cDNA。

1.3 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 基因片段克隆

简并引物设计方法参照陈彩芳等^[6] CODEHOP 法进行,分别设计牙鲈 *pax6* 引物 *pax6*-F1 和 *pax6*-R1 (表 1),克隆长度为 259 bp,退火温度为 57.3 °C;牙鲈 *tbx3* 引物 *tbx3*-F1 和 *tbx3*-R1 (表 1),克隆长度为 370 bp,退火温度:63.0 °C;牙鲈 *rx1* 引物 *rx1*-F1 和 *rx1*-R1 (表 1),克隆长度为 228 bp,退火温度为 61.0 °C。PCR 扩增后产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,用 AXYGEM 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化 PCR 产物。所得产物连接至 pGEM-T 载体后转化到大肠杆菌感受态细胞 Top10,阳性克隆送生工生物工程(上海)有限公司测序。

表 1 PCR 扩增所用引物序列
Tab.1 PCR amplification primers used in this study

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
<i>pax6</i> -F1	CAGGCTAGAATGCAGGTGTGG
<i>pax6</i> -R1	GATGCTGAAGCTGGGCATGG
<i>tbx3</i> -F1	AGTTCACACAAGAGGGGCACNGARATGGT
<i>tbx3</i> -R1	GGAACCGGGGCTGCTAYTTRTGCAT
<i>rx1</i> -F1	ACGACGAGCAGCCCAARAARAARCA
<i>rx1</i> -R1	CTTCATGCTGGAGGCGTCNATYTTTYTC
<i>pax6</i> -F2	CCCTGTAACCCACCCACTTCACCATC
<i>pax6</i> -R2	TTGCCTCTTCTCAACCCTCTCTCGC
<i>tbx3</i> -F2	CGACCCCGAAATGCCAAAGAGGATG
<i>tbx3</i> -R2	CTTCTCGGAGATGTTGTTCCCTCAGC
<i>rx1</i> -F2	CAACCGCACCACATTCCACCCTAC
<i>rx1</i> -R2	GGAACCAGACCTGAACTCGGACCTC
<i>β-actin</i> -F	GGAATCGTGCCTGACATTAAG
<i>β-actin</i> -R	CCTCTGGACAACGGAACCTCT

1.4 实时荧光定量 PCR

设计引物 (*pax6*-F2, *pax6*-R2, *tbx3*-F2, *tbx3*-R2, *rx1*-F2 和 *rx1*-R2) 进行 RT-qPCR,以 *β-actin* 作为内参基因(表 1),设 3 个重复,体系为 20 μL:

上下游引物各 1.0 μL (10 μmol), iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad) 10 μL, cDNA 2 μL, RNase free H₂O 补足至 20 μL。RT-qPCR 反应条件如下:95 °C 3 min,95 °C 10 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,共 40 个循环;65 °C 至 95 °C 5 s,用 Bio-Rad CFX-96 软件进行溶解曲线分析和 Ct 值分析,相对表达量计算采用 2^{-ΔΔCt} 法,其数值用平均值 ± 标准误 (Mean ± SE) 表示。

1.5 RNA 整体原位杂交

将 1.3 得到的含 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 序列的阳性克隆经测序验证后大量扩增抽提质粒。分别用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Sal* I 线性化质粒,以线性化的质粒为模板分别用 SP6 和 T7 RNA 聚合酶体外合成含地高辛标记的 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 基因正义和反义 RNA 探针。

RNA 整体原位杂交步骤主要参考文献[7]进行。甲醇保存的胚胎,首先去掉卵膜。然后经过梯度复水至 PBST (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4, 0.1% Tween20)。样品置于双氧水中强光照去色素,蛋白酶 K 消化,用 4% PFA 于 4 °C 固定。将胚胎放置于杂交液中 70 °C 杂交过夜。杂交完毕洗脱探针。在 37 °C, 1:5 000 的地高辛抗体 4 °C 孵育过夜后,用 NBT/BCIP 暗室中显色 (2~3 h)。显色完毕后,0.5 × PBST 漂洗,4 °C 下 4% PFA 中保存。用尼康 SMZ 1500 显微镜观察和记录整体信号。

2 结果

2.1 *pax6*、*rx1* 和 *tbx3* 序列分析

本研究克隆所得到的牙鲈 *pax6* 部分 cDNA 序列长度为 259 bp,与青鳉 (*Oryzias latipes*)、罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) 的相似性分别为 93%、92% 和 85%。*pax6* 氨基酸序列进化分析表明,牙鲈先与青鳉和罗非鱼的 *pax6* 聚为一支,再与斑马鱼和非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 等 *pax6* 聚为一大支。

本研究克隆所得到的牙鲈 *tbx3* 部分 cDNA 序列长度为 370 bp,与青鳉、斑马鱼和西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*) 的相似性依次为 91%、86% 和 82%。*tbx3* 氨基酸序列进化分析表明,牙鲈先与青鳉、斑马鱼、西伯利亚鲟和鸡 (*Gallus gallus*) 聚为一支,再与非洲爪蟾、人 (*Homo sapiens*) 和小鼠

(*Mus musculus*) *tbx3* 聚为一大支。

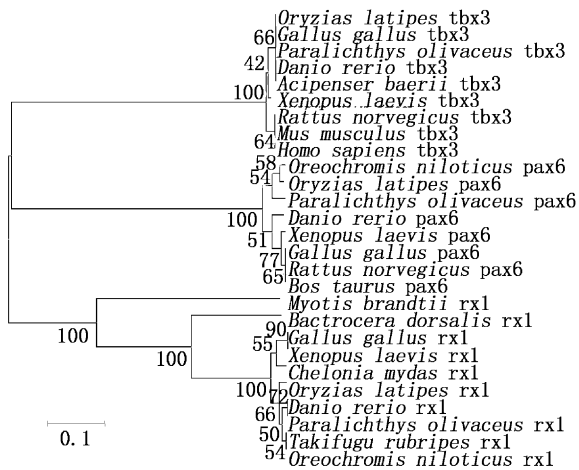


图 1 基于不同物种的 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree of *pax6*, *tbx3* and *rx1*

Bootstrap 置信度百分率在节点标明。

Bootstrap majority consensus values are indicated at each branch point in percent.

本研究克隆所得到的牙鲆 *rx1* 部分 cDNA 序列长度为 228 bp, 与斑马鱼、罗非鱼和红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 的相似性依次为 97%、91% 和 89%。rx1 氨基酸序列进化分析表明, 牙鲆先与斑马鱼、罗非鱼、红鳍东方鲀和青鳉等鱼类 *rx1* 聚为一支, 再与其他物种 *rx1* 聚为一大支。

2.2 牙鲆胚胎 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 基因定量表达

利用荧光定量 PCR 检测牙鲆胚胎发育过程 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 基因的表达量 (图 2), 发现 *pax6* 在受精后 10 h 原肠胚早期没有表达, 受精后 20 h 神经胚期才开始表达, 之后其表达量逐渐加强; *tbx3* 在受精后 20 h 开始表达, 受精后 50 h 尾部游离期前表达量逐渐增强, 而后减弱; *rx1* 在受精后 20 h 开始表达, 随后持续表达, 表达量逐渐增多, 在 75 h 开始减弱。

2.3 牙鲆胚胎发育中 *pax6*、*rx1* 和 *tbx3* 空间表达

牙鲆胚胎在受精后 30 h 视泡变为椭圆形的视杯, 35 h 晶体泡初现, 50 h 为尾部游离期即将进入初孵期, 75 h 为初孵仔鱼。我们选取上述时期进行 RNA 原位杂交, 检测 *pax6*、*rx1* 和 *tbx3* 的时空表达。*pax6* 基因在牙鲆 30 h 到 75 h 胚胎左右视网膜及晶状体处均有表达, 左侧视网膜表达区域较右侧区略大 (图版 - 1 ~ 5), 在 75 h 胚胎左右视网膜差异尤为明显 (图版 - 4, 5), 前脑以

及神经管也有表达 (图版 - 1 ~ 5); *rx1* 基因只在视网膜区表达 (图版 - 7 ~ 11), 30 h 到 50 h 胚胎, *rx1* 表达逐渐增强, 到了 75 h 胚胎, *rx1* 只在晶状体一周表达, 且表达较弱 (图版 - 10, 11), 30 h 到 75 h 左右侧视网膜区大小无明显可见差异 (图版 - 7 ~ 11)。*tbx3* 基因在牙鲆 30 h 到 50 h 胚胎视网膜区表达 (图版 - 13 ~ 15), 75 h 胚胎在视网膜区不表达, 而在身体其他部位持续表达 (图版 - 16, 17), 30 h 到 75 h 左右侧视网膜区大小无明显可见差异 (图版 - 13 ~ 17)。*pax6*、*rx1* 和 *tbx3* 原位杂交的阴性对照均没见明显信号 (图版 - 6, 12, 18)。

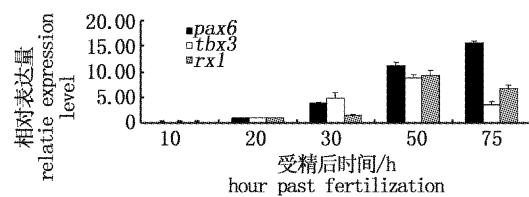


图 2 牙鲆胚胎发育过程 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 基因的表达

Fig. 2 Detection of *pax6*, *tbx3* and *rx1* expression in embryos of *Paralicthys olivaceus* by reverse transcription qPCR

3 讨论

本研究所克隆到的 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 的核苷酸序列与其他已知鱼类的同源序列的相似性均高于 80% 以上, 表明 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 这 3 个基因在鱼类各科属间保持着较高的相似性。从氨基酸序列的系统进化树中可以看出, 牙鲆 *pax6* 序列与青鳉和罗非鱼聚为一支, 牙鲆 *tbx3* 序列与青鳉、斑马鱼和西伯利亚鲟聚为一支, 牙鲆 *rx1* 序列与斑马鱼、罗非鱼、红鳍东方鲀和青鳉聚为一支, 也表明本研究所克隆到的应是牙鲆 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 牙鲆胚胎阶段的 RNA 原位杂交信号显示, 其主要在眼睛形成区域或神经管表达, 与牙鲆上述 3 个基因同源的非洲爪蟾 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 基因也存在相似的表达情况^[4-5]。

根据荧光定量 PCR 分析的 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 基因在牙鲆胚胎的表达情况, 可以发现 *pax6*、*rx1* 和 *tbx3* 均在受精后 20 h 左右开始表达。此 3 个基因在牙鲆胚胎过程中的表达时序与非洲爪蟾基本一致, 在非洲爪蟾中, *pax6* 在受精后第 12 阶

段(13 h 15 min)开始表达, *tbx3* 在受精后第12.5 阶段(14 h 15 min)开始表达, *rx1* 在受精后第14 阶段(16 h 15 min)开始在表达^[4,8]。结合牙鲆胚胎眼睛发育时间和荧光定量结果,我们选取受精后30 h 至75 h 的胚胎和仔鱼作为原位杂交对象。

眼睛的发育很大程度上受 *pax6* 和 *rx1* 的调节, *tbx3* 也参与了眼睛早期形态建成^[4], 这3 个基因作为眼睛发育的重要基因, 对控制细胞的增殖和分化起着重要作用^[9-12]。 *pax6* 基因在牙鲆左右视网膜及晶状体处均有表达, 前脑以及神经管也有表达。 *tbx3* 和 *rx1* 基因在视网膜表达, 上述基因表达位置与非洲爪蟾中的位置大致相同^[4,12]。视网膜发生区域 *pax6* 表达的细胞并不一定会全部形成眼睛, *pax6* 在牙鲆胚胎左侧视网膜发生区域较右侧略大, 而与决定视杯形成范围的 *rx1* 基因和界定视网膜形成区域的 *tbx3* 基因表达在左右侧没有差异, 提示我们, 左侧的 *pax6* 表达的细胞可能有更多的遗留在后续所形成眼睛的周围, 这些眼睛周围特定细胞数量上的差异有无可能在牙鲆变态阶段在甲状腺激素诱导下细胞分裂, 导致左右眼眶上眶下细胞的差异并最终导致眼睛移动呢? 需要今后进一步调查 *pax6* 和 *rx1* 在其它比目鱼类胚胎阶段眼睛发育过程的表达型式, 并进行后续的功能验证。

参考文献:

- [1] BAO B L, KE Z H, XING J B, et al. Proliferating cells in suborbital tissue drive eye migration in flatfish [J]. *Developmental Biology*, 2011, 351(1): 200-207.
- [2] 鲍宝龙. 比目鱼类的眼睛移位和不对称的进化起源[J]. *上海海洋大学学报*, 2012, 21(5): 728-736.
BAO B L. The eye migration and evolutionary origin of flatfish asymmetry [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(5): 728-736.
- [3] YANG X J. Roles of cell-extrinsic growth factors in vertebrate eye pattern formation and retinogenesis[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2004, 15(1): 91-103.
- [4] LI H S, TIERNEY C, WEN L, et al. A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate [J]. *Development*, 1997, 124(3): 603-615.
- [5] ZAGHLOUL N A, MOODY S A. Alterations of *rx1* and *pax6* expression levels at neuralplate stages differentially affect the production of retinal cell types and maintenance of retinal stem cell qualities [J]. *Developmental Biology*, 2007, 306(1): 222-240.
- [6] 陈彩芳, 温海深, 何峰, 等. 程序化设计的简并引物克隆半滑舌鳎 CYP17 基因 [J]. *中国海洋大学学报*, 2009, 39(6): 1213-1218.
CHEN C F, WEN H S, HE F, et al. Programming design of degenerate primers and cloning half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* CYP17 gene [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2009, 39(6): 1213-1218.
- [7] 陈文君, 鲍宝龙. 牙鲆纤维蛋白原相关蛋白 (FREPI) 基因的克隆和表达分析 [J]. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(4): 488-495.
CHEN W J, BAO B L. Cloning and expression analysis of a fibrinogen-related protein (FREPI) gene from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(4): 488-495.
- [8] MATHERS P H, GRINBERG A, MAHON K A, et al. The *Rx* homeobox gene is essential for vertebrate eye development [J]. *Nature*, 1997, 387(6633): 603-607.
- [9] CVEKL A, PLATIGORSKY J. Lens development and crystalline gene expression; many roles for *Pax6* [J]. *Bioessays*, 1996, 18(8): 621-630.
- [10] 钟兴武, 葛坚, 邓文国, 等. 光学离焦性近视眼视网膜 *pax-6* 基因表达的研究 [J]. *中华眼底病杂志*, 2003, 19(4): 442.
ZHONG X W, GE J, DENG W G, et al. Expression of *pax-6* in retina of eyes with myopia induced by optical defocus [J]. *Chinese Journal of Ocular Fundus Diseases*, 2003, 19(4): 442.
- [11] ASHERY-PADAN R, GRUSS P. Pax6 lights-up the way for eye development [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, 13(6): 706-714.
- [12] NELSON S M, PARK L, STENKAMP D L. Retinal homeobox 1 is required for retinal neurogenesis and photoreceptor differentiation in embryonic zebrafish [J]. *Developmental Biology*, 2009, 328(1): 24-39.

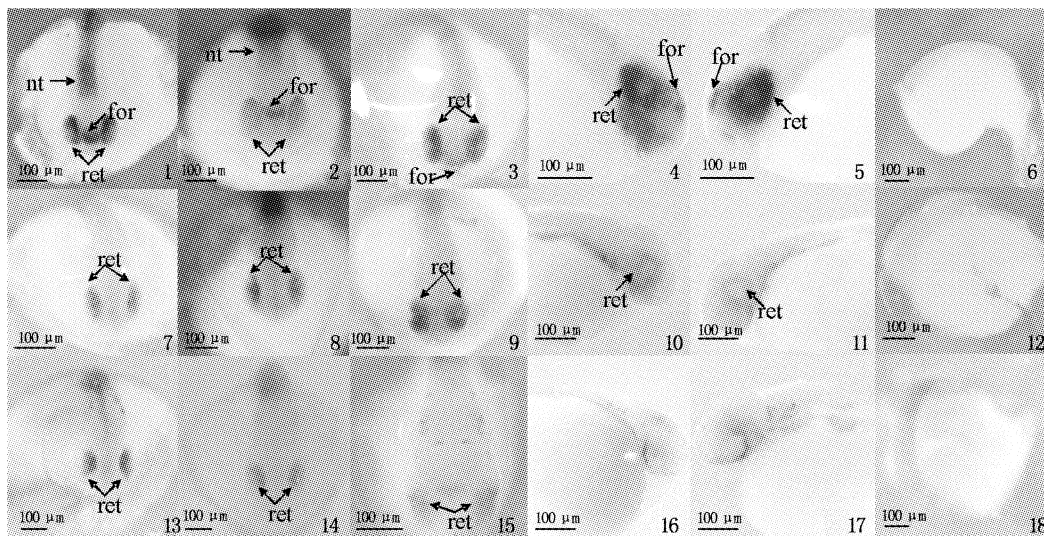
Expression of *pax6*, *tbx3* and *rx1* genes during embryonic development in flounder (*Paralichthys olivaceus*)

CHEN Jie, BAO Baolong

(The Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: During eye development, *pax6* and *tbx3* define retina field, and *rx1* defines optic cup field. We investigated whether *pax6*, *rx1* and *tbx3* expressed differently between left and right retinas in *Paralichthys olivaceus*. Quantity RT-PCR showed that *pax6*, *tbx3* and *rx1* began to express at 20 hours past fertilization. The whole mount RNA in situ hybridization further showed that *pax6* expressed mainly in the left and right retinas, and the expression region of left retina is a little bigger than that in right retina. The signal of *tbx3* and *rx1* was seen in the retina and their expression region showed no visible difference between left and right retinas. The difference in expression region of *pax6* between left and right retinas reminds us whether there exists a possibility that the difference will cause cell number difference between supraorbital and suborbital areas, which finally causes eye migration through the induction of thyroid hormone during metamorphosis.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; eye development; *pax6*; *rx1*; *tbx3*; eye migration



图版 牙鲆 *pax6*、*tbx3* 和 *rx1* 基因在胚胎中的表达

Plate *pax6*, *tbx3* and *rx1* expression in embryos of *Paralichthys olivaceus*

1-3. 牙鲆 30 h、35 h 和 50 h 胚胎 *pax6* 基因表达图; 4. 仔鱼右侧图; 5. 仔鱼左侧图; 6. 牙鲆 30 h 胚胎 *pax6* 基因阴性对照; 7-9. 牙鲆 30 h、35 h 和 50 h 胚胎 *rx1* 基因表达图; 10. 仔鱼右侧图; 11. 仔鱼左侧图; 12. 牙鲆 30h 胚胎 *rx1* 基因阴性对照; 13-15. 牙鲆 30 h、35 h 和 50 h 胚胎 *tbx3* 基因表达图; 16. 仔鱼右侧图; 17. 仔鱼左侧图; 18. 牙鲆 30 h 胚胎 *tbx3* 基因阴性对照; ret. 视网膜区; nt. 神经管; for. 前脑。

1-3. *pax6* gene expression of 30 h, 35 h and 50 h embryos of *Paralichthys olivaceus*; 4. right side of larve; 5. left side of larve; 6. *pax6* gene negative control of 30 h embryos of *Paralichthys olivaceus*; 7-9. *rx1* gene expression of 30 h, 35 h and 50 h embryos of *Paralichthys olivaceus*; 10. right side of larve; 11. left side of larve; 12. *rx1* gene negative control of 30 h embryos of *Paralichthys olivaceus*; 13-15. *tbx3* gene expression of 30 h, 35 h and 50 h embryos of *Paralichthys olivaceus*; 16. right side of larve; 17. left side of larve; 18. *tbx3* gene negative control of 30 h embryos of *Paralichthys olivaceus*; ret. retina; nt. neural tube; for. forebrain.