

文章编号: 1674-5566(2018)01-0024-05

DOI:10.12024/jsou.20170502047

一种通过体表注射斑马鱼性腺的简易投药方法

杜新路^{1,2}, 吴嘉诚^{1,2}, 陆 梦^{1,2}, 严继舟^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 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: 验证了一种简便易行的斑马鱼性腺体表注射方法。首先解剖 10 条成年斑马鱼, 精确测量并勾画出性腺的综合体表投影; 然后注射阿尔新蓝染料确定注射路径和范围; 再分别注射葡聚糖德克萨斯红和 Sox9a-myc 过表达质粒与脂质体转染试剂混合物, 48 h 后分别用荧光显微镜和免疫印迹法检测荧光分布和融合基因表达。根据雄性斑马鱼平均体长、体宽和性腺的平均长宽, 确定注射点位于斑马鱼胸鳍上端水平线与腹鳍前端竖直线相交处向上 0.1 cm 处。注射 48 h 后, 发现阿尔新蓝和葡聚糖德克萨斯红多存在于性腺内部, 部分标记了周围器官边缘部位; 证实 Sox9a-myc 蛋白在卵巢中大量表达。结果表明建立的斑马鱼性腺体表投影体侧注射方法有效可行, 为以后斑马鱼的体内基因调控研究提供了简便易行的给药途径。

关键词: 斑马鱼; 显微注射; 性腺; 体表投影

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

性别分化能决定生物发育成雄性或者雌性的进程。在脊椎动物, 性别分化简单地分为两个阶段。在初级阶段, 性腺分化成既不是精巢也不是卵巢的阶段, 这个阶段不受某个关键基因的调控; 在性成熟阶段, 由于某个环境因素或多个基因的作用, 性腺开始形成特定的性状^[1]。

过去十年, 斑马鱼作为多种实验的载体已经成为一种具有很高研究价值的模型^[2-3], 它具有一些哺乳类和无脊椎动物的优点。斑马鱼的生殖间隔很短, 同时可以产生大量的后代并进行筛选工作; 有着先天和适应性的免疫系统; 在进化上更趋近于哺乳动物, 和一些哺乳动物比如人类和小鼠具有同源基因^[4]。

斑马鱼类在性别分化的过程中展现出一定的可塑性, 同时有着很强的调节机制^[5]。在幼鱼时期, 所有单独的个体会首先发育成一种包含未成熟卵母细胞的未分化的类卵巢性腺, 在 20 ~ 30 天时, 大约一半斑马鱼个体中未成熟的卵母细胞会发育成卵巢, 而剩下的个体中, 未成熟的卵母细胞凋亡并且发育出精巢的形态学特性^[6]。

许多文献报道了 Sox9 基因是脊椎动物性腺分化的关键基因^[7-9], 在斑马鱼性腺分化过程中, FSH 凭借第二信息因子 cAMP 以及多种激酶调控 Sox9 基因和 AMH。Sox9 基因表达调控使类卵巢性腺分化形成精巢和卵巢^[6], Sox9 有两种不同的转录本 Sox9a 和 Sox9b。17 天时, 部分斑马鱼性腺中 Sox9a 与 Cyp19a1a 共同作用于类卵巢, 第 21 ~ 25 天时 Sox9a 激活 AMH, AMH 抑制 Cyp19a1a 的表达, 从而卵母细胞凋亡然后形成精细胞; 另一部分斑马鱼性腺中 Sox9b 与 Cyp19a1a 共同作用使类卵巢性腺向成熟卵巢方向发展^[10]。而 Sox9a 表达于斑马鱼的脑部、肌肉、精巢和鱼鳍, 在成熟卵巢中不表达。

斑马鱼作为模式生物因个体太小, 体内性腺用药十分困难。显微注射作为在生物研究中的一种常用的技术, 尽管在斑马鱼腹部注射和鱼卵注射中广泛应用^[11-12], 也比斑马鱼卵和胚胎的浸泡效果好得多^[13]。但目前没有成熟的斑马鱼体内性器官给药的报道。本文试图建立一种简便的斑马鱼性腺体表投影给药途径。

收稿日期: 2017-05-05 修回日期: 2017-10-02

基金项目: 上海市教委水产高峰学科项目(13122236193)

作者简介: 杜新路(1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为细胞可塑性与性转化。E-mail: 15001959226@163.com

通信作者: 严继舟, E-mail: jyan2@shou.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 实验材料和试剂与仪器

AB 品系为本实验室自养的成年斑马鱼 (MS-222 100 × 麻醉剂, 阿尔辛蓝染料, 葡聚糖德克萨斯红荧光染料和 lipohigh 脂质体高效转染试剂均购置于上海生工生物技术公司)。试剂与仪器包括毛细吸管 glass capillary (World Precision Instruments, 美国)、显微注射仪 PV830 Pneumatic PicoPump™ (Olympus, 日本)、荧光显微镜 SteREO Discovery V12 (Carl Zeiss, 德国)、Anti-Sox9a 抗体 (Abcam, HK) 和 anti-myc 抗体 (北京全式基因生物技术公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 外源基因的准备

Sox9a-myc 质粒由实验室制备。简言之, 将 Sox9a 基因编码区 CDS 的全长序列插入到 M2 表达载体 (pEasy-blunt M2 expression kit-CM211-01, 北京全式基因生物公司) 中, PCR 扩增和测序验证 Sox9a 为正向插入并与 Myc 标签蛋白编码框正确连接。

1.2.2 注射设备的准备

使用拉针仪将毛细玻璃管拉成合适大小的注射针, 使用镊子将针尖开口, 调节注射设备的气压, 使内外气压达到平衡。

1.2.3 斑马鱼解剖和雄性斑马鱼模式图绘制

在解剖镜下对成年斑马鱼进行解剖, 了解斑马鱼内脏结构, 量取斑马鱼体长和体内器官并拍摄照片, 用 Photoshop 测量照片中斑马鱼重要内脏的比例, 并根据体长计算出各个距离的实际长度, 绘制雄性斑马鱼模式图。

1.2.4 阿尔辛蓝染料显微注射

对镊子、剪刀用酒精进行消毒, 将装液后的针头的游离端安在连接器上, 然后旋紧连接器以固定针头。在带有刻度的载玻片中央滴加一滴油滴, 用镊子夹断部分针尖, 将染料注射进油滴, 观察单次注射量并进行相应调整, 把 100 × MS-222 与水按 1:50 比例混合, 将待注射的斑马鱼转移至烧杯, 当斑马鱼鳃翕动缓慢, 身体被镊子触碰反应微弱时转移至注射台, 在斑马鱼头部滴加烧杯中的麻醉剂。用有凹槽的泡沫板放置被麻醉的斑马鱼, 根据模式图大致确定性腺位置, 用镊子拔去该部位的鳞片, 用剪刀或小刀刮开一个小

口, 再用镊子或剪刀将小口扩大至 1~2 mm, 找到性腺, 注意不要用力过大以免挤压内脏影响斑马鱼注射后的存活。将针头扎入性腺, 踩下踏板注射阿尔辛蓝染料 1 μL。注意不要针头扎得过深以免刺破鱼鳔导致斑马鱼死亡。

1.2.5 外源基因注射

将浓度为 450 ng/μL 质粒 Sox9a 与葡聚糖德克萨斯红染料和 lipohigh 脂质体转染试剂按照 2:1:2 的比例混匀, 按照上述方法分别注入 2 μL 到成年雌鱼与雄鱼的体内, 根据斑马鱼细胞转染质粒后在 48 h 后蛋白表达量最高, 因此尝试 2 d 后解剖斑马鱼, 并使用荧光显微镜对性腺部分拍照观察。

解剖注射 2 d 后的斑马鱼性腺, 提取蛋白, 并进行 Western Blot 实验验证蛋白表达^[14-15]。

2 结果

2.1 雄性斑马鱼模式图

对 10 条成年斑马鱼进行解剖, 并对体长和体内主要器官, 特别是性腺大小进行测量, 计算平均值并确定性腺的相对位置。因为卵巢体积较大, 精巢则相对偏小, 因此主要对精巢的位置进行分析计算。雄性斑马鱼平均体长 (3.87 ± 0.10) cm, 宽 (0.76 ± 0.05) cm。经过解剖观察, 性腺位于斑马鱼体侧皮下中间位置, 为图 1 中 T 所标注器官, 平均长度为 (0.82 ± 0.06) cm, 宽 (0.15 ± 0.02) cm。注射位点的体表投影位置应位于胸鳍上端水平线与腹鳍前端竖直线交叉处 (红色虚线) 上方约 0.1 cm 处, 图 1 中红点标注体外投影显微注射进针位置, 相比细小精巢, 卵巢体积大, 采用精巢注射途径也十分有效。

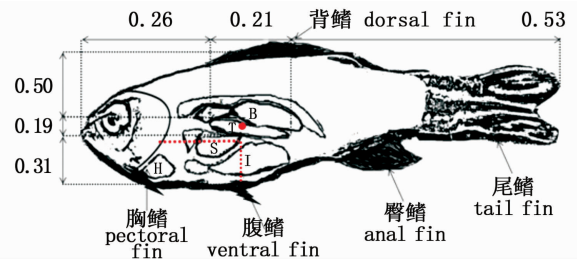


图 1 雄性斑马鱼精巢相对位置及体外注射进针位置

Fig. 1 The relative position of the male zebrafish gonad and the position of the needle in vitro

T. testis; K. kidney; b. swimming bladder; S. stomach; L. liver; I. intestines; H. heart

2.2 阿尔新蓝性腺注射实验

为了证明注射试剂能够作用整个性腺,按照解剖实验结果对雌性成年斑马鱼进行染料注射,蓝色物质为阿尔新蓝染料。如图 2,48 h 后解剖观察,结果发现在注射位点周围聚集有部分阿尔

新蓝染料,多数已经扩散并包围整个卵巢。精巢不同于卵巢,因为体积较小,阿尔新蓝渗透到精巢和鱼鳔。说明注射试剂会随着时间弥散至整个性腺。

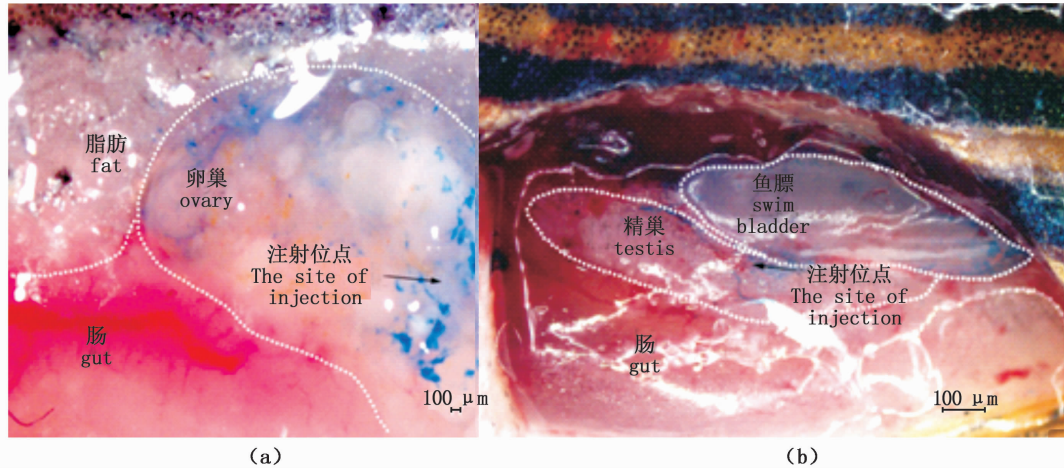


图 2 阿尔新蓝染料注射性腺示意图

Fig. 2 Alcian blue dye injection of gonad

(a) 阿尔新蓝注射卵巢示意图; (b) 阿尔新蓝注射精巢示意图

(a) Alcian blue dye injection of ovary; (b) Alcian blue dye injection of testis

2.3 外源基因注射荧光实验图

为了确认混合试剂进入性腺,在外源基因注射后观察斑马鱼性腺中葡聚糖德克萨斯红荧光标记的细胞。图版所示在外源基因注射 48 h 后,在卵巢和精巢的注射位点都出现了红色荧光,并且在精巢下部和卵巢间隙也出现红色荧光,证明混合试剂已经扩散至整个性腺。精巢因为体积较小的缘故,荧光部分标记了性腺四周部分器官。

2.4 Western blot 结果

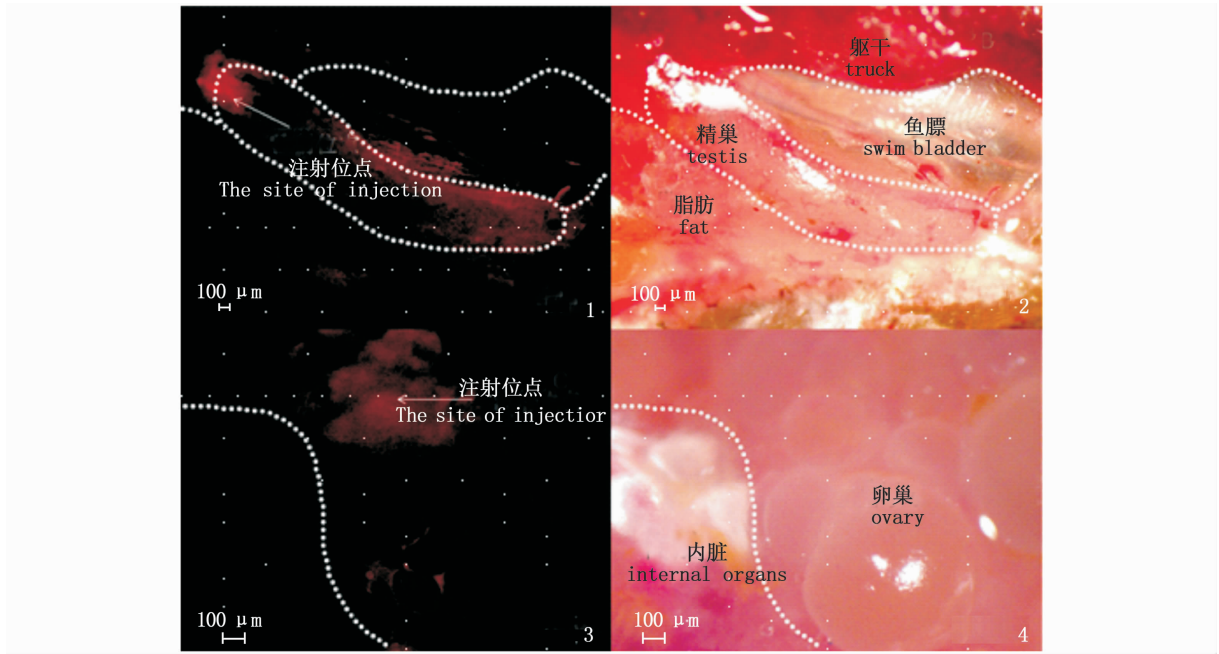
相对未注射实验组,Sox9a 蛋白在成熟卵巢中不表达。Myc 蛋白为所构建 M2 表达载体上的标签蛋白,结果显示抗 Myc 抗体识别 Sox9a-Myc 融合蛋白(大小为 110 ku),而抗 Sox9a 抗体识别 Sox9a-Myc(110 ku)。未注射卵巢在 110 ku 位置并不显示表达 Sox9a-MYC 蛋白,可以证明外源基因注射的卵巢同时表达 Sox9a-Myc 蛋白(图 3)。

3 讨论

体外注射一直被运用进行多种实验,有文章报道成功使用体外注射 Cas9/gRNA 到斑马鱼卵

的方法来进行基因编辑^[16]和注射 TALEN mRNA 到有爪蟾卵母细胞进行基因敲降^[17]的实验。有研究显示,相比浸泡实验斑马鱼胚胎在迟钝爱德华菌病原体浸泡实验中感染率在 25% ~ 75% 之间,而注射实验感染率为 100%,因此浸泡实验具有局限性,注射实验则相比更具有优势^[18]。

本实验是为了研究斑马鱼活体外源基因性腺注射方法的可行性。不同于以上体外注射实验,此实验首先检验了外源基因能否准确注射进入并作用整个斑马鱼性腺,其次验证了外源基因能否在斑马鱼性腺内顺利表达。为了建立斑马鱼体外性腺定点注射方法,首先采用解剖的方法获取斑马鱼相应器官的位置和比例,然后绘制草图与成年斑马鱼按照比例进行比对,确定性腺定点注射的位置位于胸鳍上端水平线与腹鳍前端竖直线交叉处上方约 0.1 cm 处。体外注射斑马鱼外源基因混合物,荧光结果表明注射位置正确,并大部分位于相应器官内,然后采取 Western Blot 的方法验证外源基因的表达。如果进行多点注射,则以图 1 所示位置为中心,水平线向右旋转 15° 前后 0.1 cm 位置进行注射。



图版 外源基因注射到性腺的荧光观察

Plate Fluorescence observation of exogenous gene injection into gonad

1. 外源基因注射精巢的荧光标记; 2. 外源基因注射精巢的常光观察; 3. 外源基因注射卵巢的荧光标记; 4. 外源基因注射卵巢的常光观察

1. Fluorescence observation of exogenous gene injection into testis; 2. Light observation of exogenous gene injection into testis; 3. Fluorescence observation of exogenous gene injection into ovary; 4. Light observation of exogenous gene injection into testis

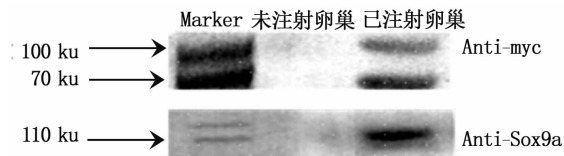


图3 Western blot 检测 Sox9a-myc 蛋白

Fig. 3 Sox9a and Myc protein in Western blot

虽然此方法还有许多改进地方,体外注射的效果因实验者熟练程度与手法而有差异,但可以为斑马鱼体外给药途径,同时也为体内研究斑马鱼性腺转化过程中基因调控提供了方便。

参考文献:

[1] DRANOW D B, HU K, BIRD MA, et al. Bmp 15 is an Oocyte-Produced signal required for maintenance of the adult female sexual phenotype in zebrafish [J]. PLoS Genetics, 2016, 12(9): e1006323.

[2] 曹静晖, 魏雅岚, 严继舟. 在斑马鱼仔鱼脑部异体移植胚胎细胞的尝试[J]. 淡水渔业, 2016, 46(4): 3-8.

CAO J H, WEI Y L, YAN J Z. Trials on embryo cell allotransplantations in *Danio rerio* larval brain [J]. Freshwater Fisheries, 2016, 46(4): 3-8.

[3] HOWE K, CLARK D M, TORROJAC F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. Nature, 2013, 496(7446): 498-503.

[4] PATTERSON H, SARALAHTI A, PARIKKA M, et al. Adult zebrafish model of bacterial meningitis in *Streptococcus agalactiae* infection [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2012, 38(3): 447-455.

[5] LIN C Y, CHIANG C Y, TSAI H J. Zebrafish and Medaka; new model organisms for modern biomedical research [J]. Journal of Biomedical Science, 2016, 23: 19.

[6] SUN D, ZHANG Y, WANG C, et al. Sox9-related signaling controls zebrafish juvenile ovary-testis transformation [J]. Cell Death & Disease, 2013, 4(11): e930.

[7] BURNS R F, LANHAM A K, XIONG K M, et al. Analysis of the Zebrafish *sox9b* promoter: identification of elements that recapitulate organ-specific expression of *sox9b* [J]. Gene, 2016, 578(2): 281-289.

[8] JØRGENSEN A, MORTHORST J E, ANDERSEN O, et al. Expression profiles for six zebrafish genes during gonadal sex differentiation [J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2008, 6: 25.

[9] CHABOISSIER M C, KOBAYASHI A, VIDAL V I P, et al. Functional analysis of *Sox8* and *Sox9* during sex determination in the mouse [J]. Development, 2004, 131(9): 1891-1901.

- [10] RODRÍGUEZ-MARI A, YAN YL, BREMILLER R A, et al. Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (amh) relative to *Sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development[J]. *Gene Expression Patterns*, 2005, 5(5): 655-667.
- [11] KINKEL M D, EAMES S C, PHILIPSON L H, et al. Intraperitoneal injection into adult zebrafish[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2010(42): e2126.
- [12] 刘丽丽, 王健, 王海胜, 等. 斑马鱼转基因平台的建立[J]. *生物技术通报*, 2013, 29(10): 120-126.
LIU L L, WANG J, WANG H S, et al. Foundation of platform for zebrafish transgenic technology [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013,29(10): 120-126.
- [13] CHEN Y Z, YANG Y L, CHU W L, et al. Zebrafish egg infection model for studying *Candida albicans* adhesion factors [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143048.
- [14] DE PAULI L F, SANTOS E G, ARCANGELO F P D, et al. Differential expression of the nucleolar protein fibrillarin during mammalian spermatogenesis and its probable association with chromatoid body components[J]. *Micron*, 2017, 94: 37-45.
- [15] RONG R J, WU P C, LAN J P, et al. Western blot detection of PMI protein in transgenic rice[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2016, 15(4): 726-734.
- [16] XIE S L, BIAN W P, WANG C, et al. A novel technique based on invitro oocyte injection to improve CRISPR/Cas9 gene editing in Zebrafish[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 345-355.
- [17] NAKAJIMA K, YAOITA Y. Highly efficient gene knockout by injection of TALEN mRNAs into oocytes and host transfer in *Xenopus laevis* [J]. *Biology Open*, 2015, 4(2): 180-185.
- [18] VAN SOEST J J, STOCKHAMMER O W, ORDAS A, et al. Comparison of static immersion and intravenous injection systems for exposure of zebrafish embryos to the natural pathogen *Edwardsiella ictaluri* [J]. *BMC Immunology*, 2011, 12: 58.

A simple and feasible method for drug administration from body surface injection into zebrafish gonad

DU Xinlu^{1,2}, WU Jiacheng^{1,2}, LU Meng^{1,2}, YAN Jizhou^{1,2}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Germplasm Genetic Resources Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To explore a simple and feasible method for drug injection into zebrafish gonad, the integrated surface projection of the sex gonads was firstly figured out by dissection, precise measurements and calculation of ten adult zebrafish. Injections of the Alcian blue dye were tried to determine the in vitro injection path and injection area. Then dextran texas red and *sox9a*-myc overexpressed plasmid gene with liposome transfection reagent mixture were injected into the gonads. 48 h later, dextran texas red distribution was examined under fluorescence microscopy and *Sox9a*-myc expression was determined by using Western blot. Based on the relative size and location of the sex gonads, injection site was determined upward about 0.1 cm from the intersect between pectoral fin upper horizontal and the front end vertical line of ventral fin. 48 h after injection, Alcian blue and dextran texas red fluorescence were observed in the gonad and surrounding organ. Meanwhile overexpression of *Sox9a*-myc was detected in ovary using Western blotting analysis. These results suggest that our established gonadal injection method is effective and feasible, which could facilitate the in vivo study of zebrafish sex gene regulation via gonadal drug administration.

Key words: zebrafish; microinjection; gonad; surface projection