

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00021

Pax5 基因在野生型斑马鱼全胚胎发育早期的表达

姚冬静¹, 舒莉萍^{2,3}, 何志旭^{1,2*}, 马建娟¹, 李 涛¹, 黄惠敏¹

1. 贵阳医学院儿科教研室, 贵阳 550004
2. 贵阳医学院组织工程与干细胞实验中心, 贵阳 550004
3. 贵阳医学院免疫学教研室, 贵阳 550004

[摘要] **目的** 为了深入了解在胚胎发育过程中,尤其是在早期 B 淋巴细胞的生成和中脑的发育过程中 pax5 基因可能的作用及其机制,选择斑马鱼作为实验动物,构建野生型斑马鱼 pCS²⁺-pax5 重组质粒,并观察 pax5 基因在野生型斑马鱼胚胎中的表达。**方法** 提取斑马鱼胚胎总 RNA 后经 RT-PCR 克隆斑马鱼 pax5 基因片段,将得到的 pax5 基因片段和 pCS²⁺ 质粒经 EcoR I、Xba I 双酶切后,在 T₄ DNA 连接酶的作用下插入 pCS²⁺ 质粒中,通过对重组质粒进行双酶切、菌落 PCR 以及插入片段序列测定鉴定后,经 T₃ RNA 体外转录体系合成地高辛标记的 pax5 基因的反义 mRNA 探针。将得到的探针用全胚胎原位杂交技术检测 pax5 基因在斑马鱼早期发育过程中的表达。**结果** 成功构建 pCS²⁺-pax5 重组质粒并制备了 pax5 基因的反义 mRNA 探针,通过斑马鱼原位杂交技术,发现在斑马鱼受精后 18~72 小时(18~72 hpf)胚胎头部的小脑、中脑后脑交界处均可观察到 pax5 基因阳性杂交信号;在 24~72 hpf 胚胎的耳蜗均可观察到 pax5 基因的阳性杂交信号,且随着时相的增长其表达逐渐增多;在 18~48 hpf 胚胎的脊索部位可见 pax5 基因的阳性杂交信号。**结论** 明确了 pax5 基因在斑马鱼胚胎的脑部、脊索神经系统高表达,并首次证实其在耳蜗听神经的早期发育过程中有表达,可能对斑马鱼早期胚胎神经系统的发育起着某些至关重要的作用。

[关键词] 斑马鱼;pCS²⁺载体;pax5 基因;反义 mRNA;原位杂交

[中图分类号] Q 132.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)01-0021-05

Expression of pax5 gene in wildtype zebrafish embryos

YAO Dong-jing¹, SHU Li-ping^{2,3}, HE Zhi-xu^{1,2*}, MA Jian-juan¹, LI Tao¹, HUANG Hui-min¹

1. Department of Pediatrics, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China
2. Tissue Engineering and Stem Cell Research Center, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China
3. Department of Immunology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China

[Abstract] **Objective** To study the role and related mechanisms of pax5 gene during the development of the embryos, especially in the early development of B cell and midbrain, and to observe the expression of pax5 gene in wildtype zebrafish embryos. **Methods** Total RNA of *Tuebingen* wildtype zebrafish embryos was extracted to obtain cDNA of pax5 gene by RT-PCR with specific primers. The cDNA of pax5 gene and pCS²⁺ vector were double digested with EcoR I and Xba I, and then ligated by T₄ DNA ligase. The recombinant vector was verified by double digestion, colony PCR screening and sequencing. The verified recombinant vector was then used to synthesize digoxin labeled anti-sense mRNA probe of pax5 gene using T₃ RNA polymerase *in vitro* transcription system. The generated probes were used to detect pax5 gene expression in zebrafish embryos by whole-mount *in situ* hybridization. **Results** The pCS²⁺-pax5 recombinant plasmid and the probe of digoxin-labeled anti-sense mRNA of pax5 gene was successfully constructed. Whole-mount *in situ* hybridization showed that pax5 gene was expressed in the cerebellum and midbrain hindbrain boundary from 18-72 h post-fertilization(hpf). In the cochlea pax5 gene was expressed from 24-72 hpf and the expression was increased as time went by. From 18-48 hpf pax5 gene is found in the notochord. **Conclusion** Pax5 gene is highly expressed in the brain and notochord of zebrafish embryos. Pax5 gene expression is found in the cochlea of the *Tuebingen* wildtype zebrafish's embryos for the first time. It is suggested that pax5 may play an important role in

[收稿日期] 2011-08-26 **[接受日期]** 2011-12-16

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30960412),贵州省科技基础条件平台项目[(2009)4005],贵州省优秀科技教育人才省长专项资金(S2008-4). Supported by National Natural Science Foundation of China(30960412), Science and Technology Basic Platform Project of Guizhou Province [(2009)4005], and Special Funds of Guizhou Governor for the Excellent Talents in Science and Technology Education(S2008-4).

[作者简介] 姚冬静, 硕士生. E-mail: yaodongjingsu@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0851-6908098, E-mail: hezx306@yahoo.com.cn

the development of the nervous system in the early zebrafish embryos.

[Key words] zebrafish; pCS²⁺ vector; pax5 gene; antisense mRNA; *in situ* hybridization

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1): 21-25]

Pax5 是 pax 基因家族中研究最多的成员之一, 主要在胚胎发育过程中表达, 尤其是在早期 B 淋巴细胞的生成和中脑的发育起着重要的作用^[1], 但是 pax5 基因在这一过程中的作用以及分子机制至今并不十分清楚, 为了深入地了解这一机制, 我们选择了斑马鱼作为实验动物进行了初步研究。本研究通过构建并鉴定 pCS²⁺-pax5 重组质粒, 体外转录表达斑马鱼 pax5 基因反义 mRNA 探针, 并运用全胚胎原位杂交技术检测了斑马鱼 pax5 基因在野生型斑马鱼发育过程中的表达情况, 从三维、立体视角观察 pax5 基因在造血发育早期尤其是 B 淋巴细胞的形成以及发育过程中的表达和可能的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物 野生型 *Tuebingen* 斑马鱼由上海生命科学院健康研究所刘廷析研究员馈赠, 在本实验室繁殖培育, 养殖条件: (28±2)°C, 用带有过滤系统的循环水系统养殖, 12 h/d 光照。

1.2 菌株及质粒 PCR 引物由北京诺赛基因组研究中心合成; *E. coli* DH5 α 由本课题组保存; pCS²⁺ 质粒载体由上海生命科学院健康研究所刘廷析研究员馈赠。

1.3 酶类及其他试剂 TRIzol 试剂、反转录试剂 First-strand plus 购自 Invitrogen 公司, 高保真 KOD-Plus PCR 酶购自 Toyobo 公司, 限制性内切酶 *EcoR* I、*Xba* I、T₄ DNA 连接酶和 DNA marker 均购自 Fermentas 公司; 质粒小量抽提试剂盒购自 Axygen 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司; 地高辛 RNA 标记和检测试剂盒、NucAwayTM Spin Columns 购自 Ambion 公司; BCIP/NBT 购自 VectorLab 公司。

1.4 cDNA 的合成 收集 0.75~72 hpf (hours post-fertilization, 受精后小时) 多个时相的斑马鱼胚胎脱卵膜后置于 1.5 ml 的 Eppendorf 管中, 加入 1 ml TRIzol 充分匀浆处理, 室温静置 5 min, 经氯仿、普鲁泊福、75% 乙醇洗涤沉淀晾干后, 加入适量 DEPC 水溶解。将提取的总 RNA 利用 Super-ScriptTM III First-strand Synthesis System 试剂盒的随机引物进行反转录, 反应在 AG22331 型热循环仪 (Eppendorf 公司) 上按试剂盒说明书进行操作。

1.5 斑马鱼 pax5 基因编码序列的 PCR 扩增 根据斑马鱼 pax5 基因的 mRNA 序列 (BC129478), 同时引入 *EcoR* I、*Xba* I 酶切位点以及保护碱基, 设计 pax5 序列的引物, 上游引物 P1: CG GAA TTC CCT CCC TCA CTG GAA TGG TA, 下游引物 P2: GC TCT AGA CGT GTG GCT GCG CTA TAG TA。RT-PCR 扩增条件: cDNA 合成 40°C 30 min, 94°C 预变性 2 min, 94°C 变性 30 s, 68°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 共 30 次循环, 最后延伸 72°C 10 min。PCR 产物大小为 228 bp。以反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.6 斑马鱼 pax5 基因的克隆及序列分析 将 pCS²⁺ 质粒利用钙转法转入 *E. coli* DH5 α 感受态菌中, 通过氨苄抗性筛选出阳性克隆, 扩增后运用碱裂解法提取 pCS²⁺ 质粒 DNA 后, 用 *EcoR* I 以及 *Xba* I 双酶切, 行 1% 琼脂糖凝胶电泳后割胶回收。将 pax5 基因的 PCR 产物用 *EcoR* I 以及 *Xba* I 双酶切, 行 1% 琼脂糖凝胶电泳后割胶回收, 将回收产物与上述得到的经 *EcoR* I 及 *Xba* I 双酶切的 pCS²⁺ 质粒在 T₄ DNA 连接酶的作用下相连接, 将连接产物运用钙转法转入 *E. coli* DH5 α 感受态菌中, 运用氨苄抗性筛选出阳性克隆并扩增后, 运用碱裂解法提取 pCS²⁺-pax5 重组质粒。鉴定 pCS²⁺-pax5 重组质粒的方法有 3 种: (1) 用 *EcoR* I 以及 *Xba* I 双酶切重组质粒, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳判断酶切产物大小, 即双酶切鉴定; (2) 用菌落 RT-PCR 鉴定重组质粒, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳判断扩增产物大小; (3) 将重组质粒送至测序公司进行序列测定。

1.7 地高辛标记的 pax5 反义 mRNA 探针制备 将 pCS²⁺-pax5 重组质粒用 *EcoR* I 进行单酶切, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 用 DNA 纯化试剂盒割胶回收得到线性化的 pCS²⁺-pax5 重组质粒。利用 T₃ RNA 体外转录体系, 以线性化的 pCS²⁺-pax5 重组质粒 DNA 为模板, 以地高辛标记的寡核苷酸为原料, 转录得到地高辛标记的 pax5 反义 mRNA 探针后, 用 NucAwayTM Spin Columns 纯化吸附柱回收 pax5 反义 mRNA 探针, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 于 -70°C 保存备用。

1.8 斑马鱼全胚胎原位杂交 选取斑马鱼 0.75~72 hpf 之间的不同时相点胚胎进行全胚胎原位杂交, 用 $1\times$ PBST 洗去固定液后, 再用甲醇梯度脱水, 将胚胎置于 68°C 杂交炉中预杂交 1 h, 加入制备好的地高辛标记的 pax5 反义 mRNA 探针于 68°C 杂交炉中过夜, 用不同浓度的 SSCT 将多余的探针洗去, 加入地高辛抗体后过夜, 用 MABT 将多余的抗体洗掉, 加入 BCIP/NBT 染液对杂交胚胎进行染色, 在体视显微镜下观察并记录结果后, 用固定液对杂交胚胎进行再固定并拍照。

2 结果

2.1 Pax5 基因 RT-PCR 结果 RT-PCR 产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 可见到一特异性扩增带, 位于 200~500 bp 之间, 大小约 228 bp, 与预期相符 (图 1)。

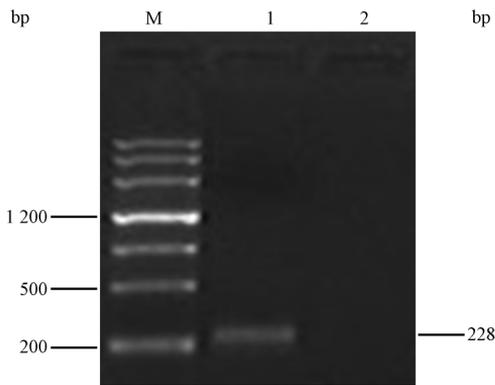


图 1 Pax5 基因 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 1 Electrophoresis of RT-PCR product of pax5 gene

M: DNA marker III; 1: Pax5 PCR product; 2: Blank control

2.2 pCS²⁺-pax5 重组质粒酶切鉴定结果 将筛选的重组质粒经 *Eco*R I 以及 *Xba* I 双酶切鉴定, 将酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。 *Eco*R I 以及 *Xba* I 双酶切得到的 pax5 基因片段为 228 bp, 与扩增的 pax5 cDNA 相符, 另外可见另一个 DNA 片段约 4 100 bp, 与 pCS²⁺ 质粒经 *Eco*R I 以及 *Xba* I 双酶切后产物大小一致 (图 2)。

2.3 pCS²⁺-pax5 重组质粒菌落 RT-PCR 鉴定结果 将通过氨苄抗性筛选的重组质粒作为模板进行 PCR 扩增, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 可见到一特异性扩增带, 位于 200~500 bp 之间, 大小约 228 bp, 与预期相符 (图 3)。

2.4 pCS²⁺-pax5 重组质粒测序结果 通过氨苄抗性筛选的重组质粒经北京诺赛生物有限公司测序, 结果经 GenBank 检索, 发现与 pax5 基因完全一致 (图 4)。

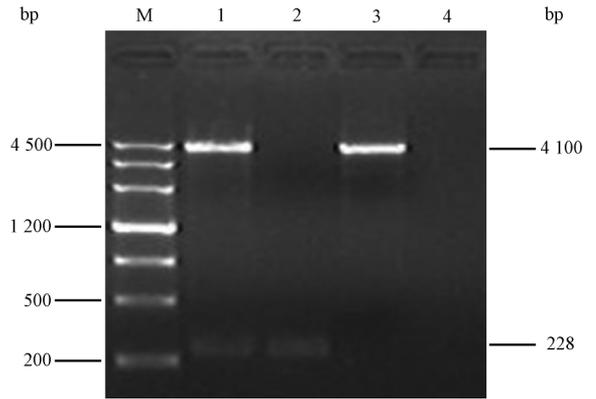


图 2 pCS²⁺-pax5 重组质粒 *Eco*R I、*Xba* I 双酶切产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 2 Electrophoresis of double digested product of pCS²⁺-pax5

recombinant plasmid by *Eco*R I and *Xba* I

M: DNA marker III; 1: pCS²⁺-pax5; 2: Pax5 PCR product; 3: pCS²⁺; 4: Blank control

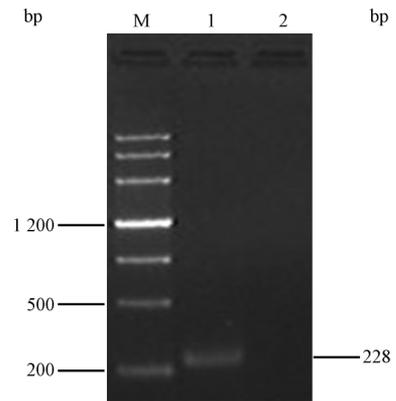


图 3 pCS²⁺-pax5 重组质粒菌落 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 3 Electrophoresis of RT-PCR product of bacterial colony for recombinant plasmid pCS²⁺-pax5

M: DNA Maker III; 1: Pax5 PCR product; 2: Blank control

2.5 斑马鱼全胚胎原位杂交结果 在斑马鱼 18~72 hpf 胚胎头部的小脑、中脑后脑交界处 (蓝色箭头所示) 均可观察到 pax5 基因的蓝黑色阳性杂交信号, 从 30 hpf 开始在后脑中出现了 pax5 基因的蓝黑色阳性杂交信号, 至 72 hpf 其表达开始减弱。在 24~72 hpf 胚胎的耳蜗 (黄色箭头所示) 均可观察到 pax5 基因的蓝黑色阳性杂交信号, 并且随着时相的增长其表达逐渐增多。18~48 hpf 胚胎的脊索部位 (红色箭头所示) 可以观察到 pax5 基因的蓝黑色阳性杂交信号, pax5 基因在 18 hpf 开始在脊索表达, 至 24 hpf 其表达逐渐增多, 30~36 hpf 达到高峰, 48 hpf 表达明显下降, 72 hpf 其脊索中几乎观察不

到 *pax5* 基因的表达(图 5)。在斑马鱼原始造血和早期成体造血区域中并未观察到 *pax5* 基因的表达。

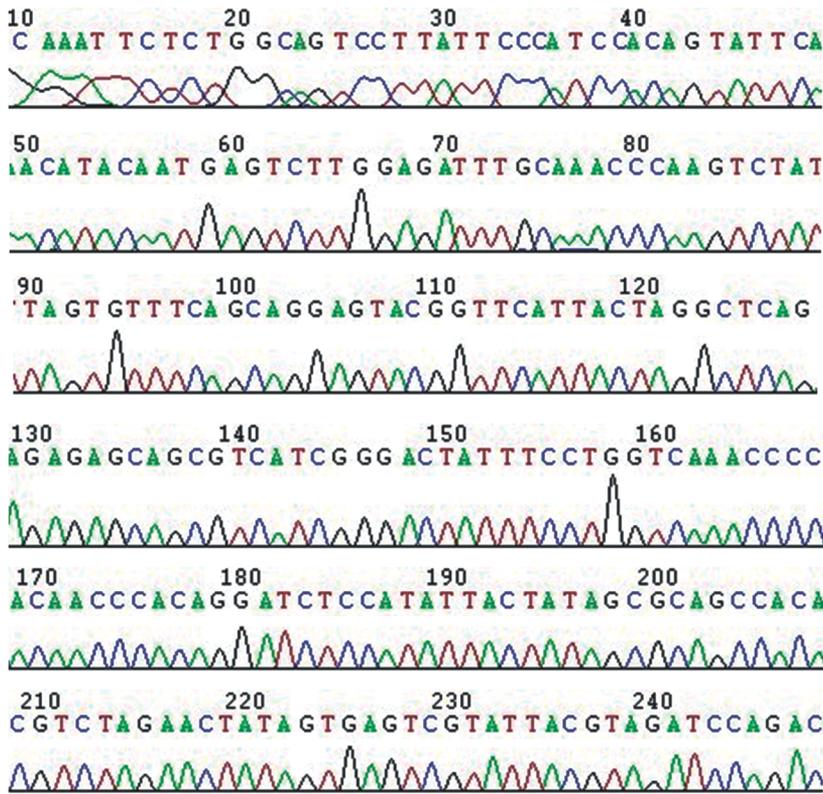


图 4 pCS²⁺-*pax5* 重组质粒测序结果

Fig 4 Gene sequencing analysis of recombinant plasmid pCS²⁺-*pax5*

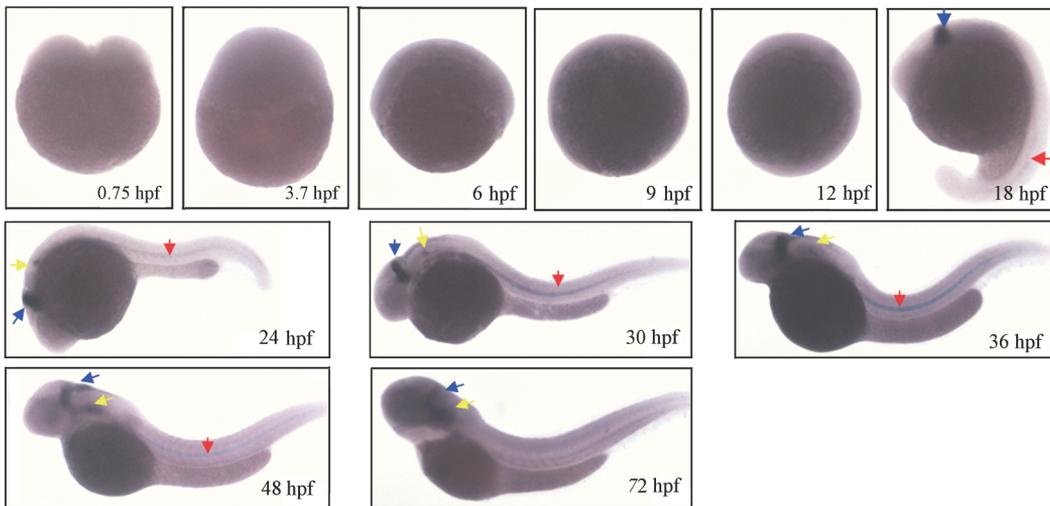


图 5 Pax5 基因的斑马鱼全胚胎原位杂交结果

Fig 5 Whole-mount *in situ* hybridization with *pax5* gene in zebrafish embryos at different periods after fertilization

Arrowheads mark the *pax5* expression domain. Blue arrowheads indicate the cerebellum and midbrain hindbrain boundary, red arrows mark notochord, yellow arrowheads indicate cochlea. hpf: Hours post-fertilization. Original magnification: $\times 30$

3 讨论

哺乳动物的 *pax* 基因编码包含 9 个参与发育调节的亚家族, 均有一个高度保守的长度为 128 个氨

基酸的 DNA 的结合基元(成对结构域), 故归入同一家族^[2], 它们编码一组在细胞发育及疾病形成过程中起重要作用的 *pax* 转录因子, 这 9 个 *pax* 基因均被认为是重要的发育调节物, 在进化过程中高度

保守^[3]。

Pax5 基因作为 pax 基因家族的一员, 与 pax2 和 pax8 基因一起被划分为第三亚类同源转录因子^[4], pax5 包含由两部分构成的负责 DNA 结合的对结构域、1 个编码特征性八肽的序列和 1 个同型盒同源区。在人和小鼠中, pax5 基因分别定位于 9 号和 4 号染色体^[5], 包含外显子 1 以及外显子 2~10, 通过不同的剪接方式产生两种转录产物 1A-10 和 1B-10。其中, 外显子 1A-10 在 B 细胞中转录编码 B 细胞特异性激活蛋白(BASP)^[6]。

已经证实, 在人和小鼠中, 编码转录因子 BASP 的 pax5 基因在早期 B 淋巴细胞的生成和中脑的发育起着重要的作用^[7]。研究表明, pax5 基因在小鼠的神经管中有表达, 而在果蝇胚胎神经系统发育早期, pax5 基因也起到了至关重要的作用^[8], 但是这些作用的具体分子机制尚不清楚, 为了进一步研究这个基因的转录调节作用的分子机制, 本课题组选择了一种新兴的模式生物斑马鱼作为实验动物, 其与哺乳动物在分子途径调控造血上高度保守^[9]。另外, 与其他模式生物相比, 斑马鱼是体外受精和发育, 可以高效、连续和动态观察胚胎的发育, 这将为进一步研究 pax5 基因的分子调控机制提供了重要的基础。

本实验通过设计斑马鱼 pax5 基因的引物, 提取斑马鱼胚胎总 RNA, 成功扩增出 pax5 基因片段, 将扩增出来的 pax5 基因片段通过 T₄ DNA 连接酶与载体 pCS²⁺ 质粒进行定向重组, 得到 pCS²⁺-pax5 重组质粒, 经过双酶切、菌落 RT-PCR 以及序列测定鉴定 pCS²⁺-pax5 重组质粒构建成功, 并在此基础上以 pCS²⁺-pax5 重组质粒为模板进行体外转录, 得到了片段大小为 200~500 bp 之间的地高辛标记的 pax5 反义 mRNA 探针, 并经过斑马鱼全胚胎原位杂交技术检测了 pax5 反义 mRNA 探针在 *Tuebingen* 野生型斑马鱼胚胎早期发育的过程中的表达, 从而检测了 pax5 mRNA 在斑马鱼胚胎发育早期的表达, 以期了解该基因在胚胎发育早期的表达情况。

本研究发现, 在斑马鱼早期发育胚胎的小脑、中脑后脑交界处以及后脑均有表达, 并首次发现了 pax5 基因在脊索以及耳蜗中表达, 提示 pax5 基因在斑马鱼胚胎的脑部、脊索神经系统以及耳蜗听神经的早期发育过程中可能起到了重要的作用。而在斑马鱼原始造血和早期成体造血区域中并未观察到

pax5 基因的表达, 提示在斑马鱼造血发育早期 pax5 基因的表达量很少, 甚至没有表达, 斑马鱼造血系造血主要是在胸腺中完成, 而斑马鱼胸腺发育主要发生在 72 hpf 以后的胚胎, 为进一步研究该基因在 B 细胞中的作用奠定了基础。

通过本实验, 了解了 pax5 基因在斑马鱼全胚胎发育早期的表达情况, 为进一步研究 pax5 基因在胚胎早期发育过程中可能起到的重要作用及其分子机制奠定了重要基础。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

志谢 本研究得到上海生命科学院健康研究所刘廷析研究员和邓敏研究员的大力支持和无私帮助, 在此表示衷心感谢!

[参考文献]

- [1] Kanteti R, Nallasura V, Loganathan S, Tretiakova M, Kroll T, Krishnaswamy S, et al. PAX5 is expressed in small-cell lung cancer and positively regulates c-Met transcription[J]. *Lab Invest*, 2009, 89: 301-314.
- [2] Suga H, Tschopp P, Graziussi D F, Stierwald M, Schmid V, Gehring W J. Flexibly deployed Pax genes in eye development at the early evolution of animals demonstrated by studies on a hydrozoan jellyfish [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 14263-14268.
- [3] Keller R G, Desplan C, Rosenberg M I. Identification and characterization of *Nasonia* Pax genes[J]. *Insect Mol Biol*, 2010, 19 (Suppl 1): 109-120.
- [4] Codutti L, van Ingen H, Vascotto C, Fogolari F, Corazza A, Tell G, et al. The solution structure of DNA-free Pax-8 paired box domain accounts for redox regulation of transcriptional activity in the pax protein family[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 33321-33328.
- [5] Neurath M F, Stüber E R, Strober W. BSAP: a key regulator of B-cell development and differentiation [J]. *Immunol Today*, 1995, 16: 564-569.
- [6] Tagoh H, Ingram R, Wilson N, Salvagiotto G, Warren A J, Clarke D, et al. The mechanism of repression of the myeloid-specific *c-fms* gene by Pax5 during B lineage restriction [J]. *EMBO J*, 2006, 25: 1070-1080.
- [7] Davidson A J, Zon L I. The 'definitive' (and 'primitive') guide to zebrafish hematopoiesis [J]. *Oncogene*, 2004, 23: 7233-7246.
- [8] Urbach R. A procephalic territory in *Drosophila* exhibiting similarities and dissimilarities compared to the vertebrate mid-brain/hindbrain boundary region [J]. *Neural Dev*, 2007, 2: 23.
- [9] de Jong J L, Zon L I. Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis [J]. *Annu Rev Genet*, 2005, 9: 481-501.