

## *Irx5a* 在野生型斑马鱼早期发育中的表达<sup>\*</sup>

舒莉萍<sup>1,2,3</sup>, 何志旭<sup>1,4\*\*</sup>, 许 威<sup>4</sup>, 丁可军<sup>4</sup>

(1. 贵州医科大学 组织工程和干细胞实验中心, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 实验动物中心, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 免疫学教研室, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州医科大学 儿科学教研室, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 观测 *Irx5a* 基因在 Tuebingen 野生型斑马鱼胚胎发育过程中的表达。方法: 利用 Trizol 法提取斑马鱼胚胎的总 RNA, 应用 RT-PCR 方法扩增 *Irx5a* 基因, 将其克隆入 pCS<sup>2+</sup> 质粒中, 经菌落 PCR、双酶切法及 DNA 测序鉴定正确后, 利用体外转录体系制备 *Irx5a* 的反义 mRNA 探针; 用该反义 mRNA 探针进行斑马鱼全胚胎原位杂交。结果: 构建和鉴定了 *Irx5a*-pCS<sup>2+</sup> 重组质粒, 经斑马鱼全胚胎原位杂交检测 *Irx5a* 基因的表达, 发现从 3.7 hpf 开始有表达, 并且在胚胎神经系统和造血系统都有明显表达。结论: *Irx5a* 基因可能参与了 Tuebingen 野生型斑马鱼胚胎发育早期的神经系统和造血系统的发育。

**[关键词]** *Irx5a*; pCS<sup>2+</sup> 质粒; DNA 重组; RNA 探针; 全胚胎原位杂交技术

**[中图分类号]** P321-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)07-0755-05

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.07.003

## Expression of *Irx5a* Gene in Early Development of Wild Type Zebrafish

SHU Liping<sup>1,2,3</sup>, HE Zhixu<sup>1,4</sup>, XU Wei<sup>4</sup>, DING Kejun<sup>4</sup>

(1. Tissue Engineering and Stem Cell Research Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Experimental Animal Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of

Immunology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Department

of Pediatrics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the expression of *Irx5a* gene in early development of the wild type zebrafish embryo of with whole mount in situ hybridization (WISH). **Methods:** Total RNA of zebrafish embryos in different development stage was extracted by Trizol. The cDNA of *Irx5a* gene was amplified by RT-PCR, and then cloned into pCS<sup>2+</sup> vector by BamH I and EcoR I restrictive enzyme sites. The recombinant gene was identified and confirmed by bacterial colony PCR, double enzyme digestion and DNA sequencing. Antisense mRNA probes of *Irx5a* gene was prepared by *in vitro* transcription system and underwent whole mount in situ hybridization with zebrafish embryos. **Results:** *Irx5a*-pCS<sup>2+</sup> recombinant plasmid was constructed and identified. After whole mount in situ hybridization, it was observed that *Irx5a* mRNA was expressed from 3.7 hpf and highly expressed in embryonic nervous system and hematopoietic system. **Conclusion:** *Irx5a* gene may be involved in the development of nervous system and hematopoietic system in the early stage of Tuebingen wild type zebrafish embryo development.

**[Key words]** *Irx5a*; pCS<sup>2+</sup> plasmid; DNA, recombination; RNA probe; whole mount in situ hybridization

<sup>\*</sup> [基金项目] 国家自然科学基金(31260284); 贵州省科技基础条件平台项目[ (2009)4005 ]; 贵州省优秀科技省长专项基金(S2008-4)

<sup>\*\*</sup> 通信作者 E-mail: hzx@gmc.edu.cn

网络出版时间: 2016-07-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160717.1318.046.html>

*Irx* 基因(*Iroquois gene*)是 Bosse 等<sup>[1]</sup>于 1996 年在研究果蝇的外部感知器官形成过程中最早发现的一类重要的同源盒基因家族,主要有 *Irx1*、*Irx2*、*Irx3*、*Irx4*、*Irx5* 和 *Irx6* 共 6 个家族成员,其中 *Irx5* 在早期胚胎发育过程中起重要作用,主要与肺组织分化及视网膜视锥细胞形成有关<sup>[2-3]</sup>。*Irx5* 对小鼠的心肌发育也有重要作用<sup>[4]</sup>,但其作用机制尚不明确。本研究以斑马鱼作为研究对象,构建 *pCS<sup>2+</sup>-Irx5a* 重组质粒,通过体外转录获得 *Irx5a* 基因的地高辛标记的反义 mRNA 探针,并用全胚胎原位杂交技术(whole mount in situ hybridization, WISH)检测了 *Irx5a* 基因在野生型 Tuebingen 斑马鱼发育过程中的基因表达,探讨 *Irx5a* 基因在斑马鱼发育过程中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与试剂

野生型 Tuebingen 斑马鱼系,养殖在带有过滤消毒系统、(28 ± 2)℃ 恒温的循环水系统,光照时间 12 h/d<sup>[5]</sup>,课题组自行繁育。*pCS<sup>2+</sup>* 质粒和 DH5 $\alpha$  菌株由本研究中心留存、PCR 引物由北京三博远志生物有限公司合成,Trizol、First-strand plus kit 购于 Invitrogen 公司;质粒小抽试剂盒购于 Axygen 公司,DNA 凝胶回收试剂盒购于上海申能公司,BamH I 和 EcoR I 内切酶、T4 连接酶均购于 FBI 公司,KOD DNA 聚合酶购于 TOYOBO 公司,T3 RNA polymease 和 spin column 购于 Ambion 公司,地高辛 RNA 标记和检测试剂盒及 NucAwayIM Spin Columns 购于 Ambion 公司,BCIP/NBT 购于 VEC-TOR Lab。

### 1.2 方法

**1.2.1 斑马鱼胚胎总 RNA 提取** 分别收集受精后 0.75 ~ 72 h (hours post-fertilization, hpf) 不同时期的 Tuebingen 野生型斑马鱼胚胎,胚胎脱膜后,收集于 1.5 mL 的 Epp 管中,移入 1 mL Trizol 将其充分匀浆,室温下放置 5 min,用酚氯仿法提取总 RNA,75% 乙醇洗涤,加入适量 DEPC 水溶解,冷冻保存备用。

**1.2.2 *Irx5a* 基因扩增** 采用逆转录-PCR (RT-PCR) 方法,以抽提的斑马鱼总 RNA 为模板,利用 SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis System kit 的随机引物进行逆转录,反应在 AG22331 型热循环仪(eppendorf 公司)上按试剂盒说明操作步骤进

行。扩增 *Irx5a* 目的基因,PCR 上下游引物分别引入 BamH I 及 EcoR I 酶切位点。上游引物(F)序列为 5'-CGGGATCCTATGGAGACCCAGCTT-3',下游引物(R)序列为 5'-CGGAATTCAGAACGGAGG-GAGAGG-3';以逆转录得到的 cDNA 为模板,进行 *Irx5a* 的 RT-PCR 扩增,扩增条件为:40 ℃ 30 min, 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 共 30 次循环, 72 ℃ 最后延伸 10 min, PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,以 DNA 胶回收试剂盒回收进行胶 *Irx5a* 扩增产物。

**1.2.3 *Irx5a* 体外转录载体的构建** 将上述回收的 *Irx5a* PCR 产物片段及 *pCS<sup>2+</sup>* 质粒分别用 BamH I 及 EcoR I 双酶切,经电泳割胶回收后,用 T4 DNA 连接酶进行连接反应。将连接产物运用钙转法转入大肠杆菌 *E. coli* DH $\alpha$  感受态,经氨苄抗性筛选出阳性克隆并扩增后,运用碱裂解法提取 *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>* 重组质粒。

**1.2.4 *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>* 重组质粒的鉴定** 分别用以下 3 种方法对 *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>* 重组质粒进行鉴定:(1) 用 BamH I 和 EcoR I 对 *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>* 重组质粒双酶切后,琼脂糖凝胶电泳鉴定;(2) 加入 1.2.2 项下提及的引物,对阳性克隆进行菌落 PCR 扩增,通过琼脂糖凝胶电泳判断扩增产物大小;(3) 将 *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>* 重组质粒 DNA 送北京三博远志公司进行在测序鉴定。

**1.2.5 地高辛标记的 *Irx5a* 反义 mRNA 探针制备** 将 *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>* 重组质粒用 BamH 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 *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>* 重组质粒。利用体外转录体系,以线性化的 *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>* 重组质粒 DNA 为模板,以地高辛标记的寡核苷酸为原料,经体外转录得到地高辛标记的 *Irx5a* 反义 mRNA 探针后,用 NucAway<sup>TM</sup> Spin Columns 纯化吸附柱回收 *Irx5a* 反义 mRNA 探针,经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,于 -70 ℃ 保存备用。

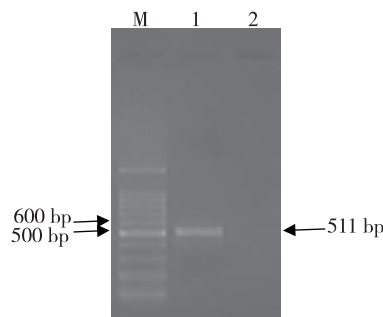
**1.2.6 斑马鱼全胚胎原位杂交** 选取 0.75 ~ 72 hpf 不同时间点野生型斑马鱼胚胎进行全胚胎原位杂交,用 1 × PBST 溶液洗去固定液,甲醇进行梯度脱水,将胚胎置于 68 ℃ 杂交炉中进行预杂交 1 h,加入制备好的地高辛标记的 *Irx5a* 反义 mRNA 探针,于 68 ℃ 杂交炉中过夜,用不同浓度的 SSCT 将多余的探针洗去,加入地高辛标记的抗体后过夜,用 MABT 将多余的抗体洗掉,加入 BCIP/NBT 染液对杂交胚胎进行染色,在体视显微镜下观察并

记录结果后,用固定液对杂交胚胎进行再固定并且照相。

2 结果

2.1 *Irx5a* 目的基因

经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,在 500 ~ 600 bp 处见一特异扩增条带,与预期 511 bp 片段大小一致(图 1)。



注:M 为 DNA Marker,1 为 PCR 扩增产物,2 为空白对照

图 1 RT-PCR 扩增 *Irx5a* 基因琼脂糖凝胶电泳

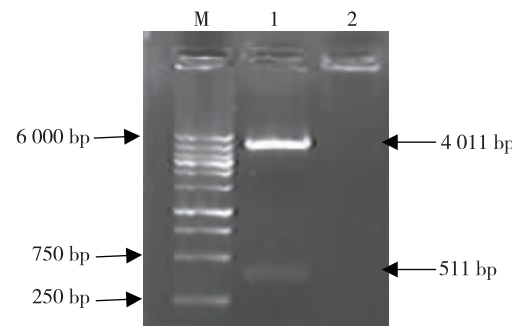
Fig. 1 Results of agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplified *Irx5a* gene

2.2 *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>* 重组质粒鉴定

*Irx5a-pCS<sup>2+</sup>* 重组质粒 DNA 经 BamH I 及 EcoR I 双酶切后,酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳得到一大小约为 511 bp 的片段,与 RT-PCR 产物大小一致,而另一片段大小与空质粒酶切得到的片段大小一致(图 2)。将重组质粒 *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>* 作为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见 500 ~ 600 bp 之间有一特异性条带(图 3),与预期的 511 bp 相符。重组质粒 *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>* 测序结果经检索比对,与斑马鱼 *Irx5a* 的基因序列及方向正确,见图 4。

2.3 斑马鱼全胚胎原位杂交

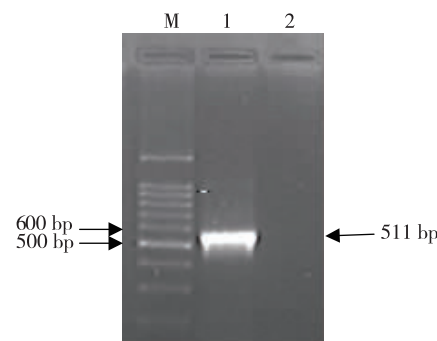
0.75 ~ 72 hpf 的 Tuebingen 野生型斑马鱼胚胎的原位杂交结果显示,3.7 hpf 可以观察到 *Irx5a* 基因的表达信号(箭头所示),9、12 hpf 斑马鱼胚胎后脑神经板及腹部中胚层可观察到明显的阳性杂交信号,18 hpf 胚胎中脑、间脑、后脑、咽弓及侧板中胚层可观察到阳性杂交信号,24、30、36 及 48 hpf 斑马鱼胚胎中脑、间脑、后脑、咽弓、脊索、耳泡囊及脊髓可见黑色的阳性杂交信号,72 hpf 斑马鱼胚胎中脑、间脑、后脑、耳泡囊及视网膜神经节细胞层可见黑色的阳性杂交信号。见图 5。



注:M 为 DNA Marker,1 为 *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>* 重组质粒经 BamH I 及 EcoR I 双酶切产物,2 为空白对照

图 2 *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>* 重组质粒经 BamH I 及 EcoR I 双酶切产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Results of agarose gel electrophoresis of BamH I and ECOR I double enzyme digestion of recombinant plasmid *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>*



注:M 为 DNA Marker,1 为菌落 PCR 产物,2 为空白对照

图 3 菌落 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 3 Bacterial colony PCR analysis of recombinant plasmid *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>*

3 讨论

斑马鱼是从上世纪末开始新兴的模式生物,其体外受精并发育,并且早期发育胚胎通体透明,有利于进行胚胎动态地活体观察和科学研究<sup>[6-8]</sup>,这些重要优势为研究观察生物早期组织器官的发生和形成,以及胚胎早期的生长发育提供便利。

本研究首先提取野生型斑马鱼胚胎总 RNA,经 RT-PCR 克隆得到 *Irx5a* 基因片段,通过限制性内切酶将其定向插入到 *pCS<sup>2+</sup>* 载体中,经菌落 PCR、双酶切及 DNA 测序鉴定,证实插入的 *Irx5a* 目的基因片段大小和方向正确无误,成功获得 *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>* 重组质粒。接着将 *Irx5a-pCS<sup>2+</sup>* 重组质粒通过体外转录得到了地高辛标记的 *Irx5a* 反义

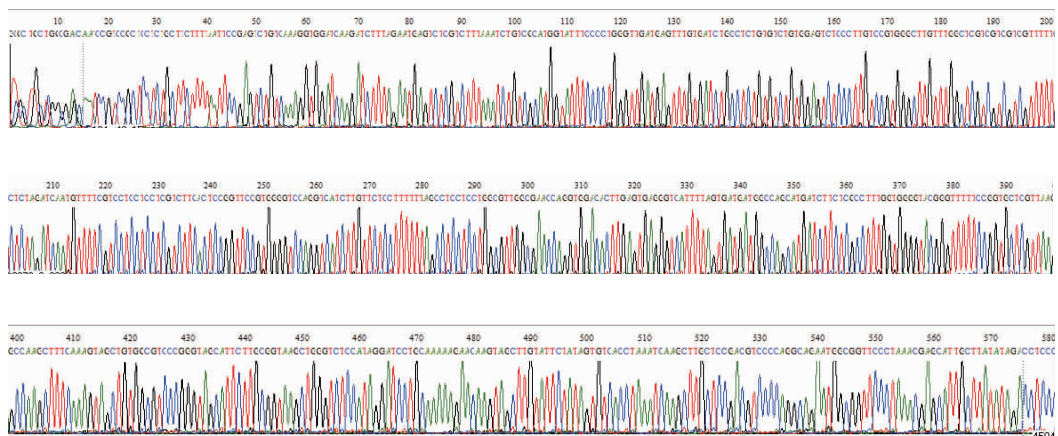


图 4 *Irx5a*-pCS<sup>2+</sup> 重组质粒测序结果

Fig. 4 Gene sequencing analysis of recombinant plasmid *Irx5a*-pCS<sup>2+</sup>

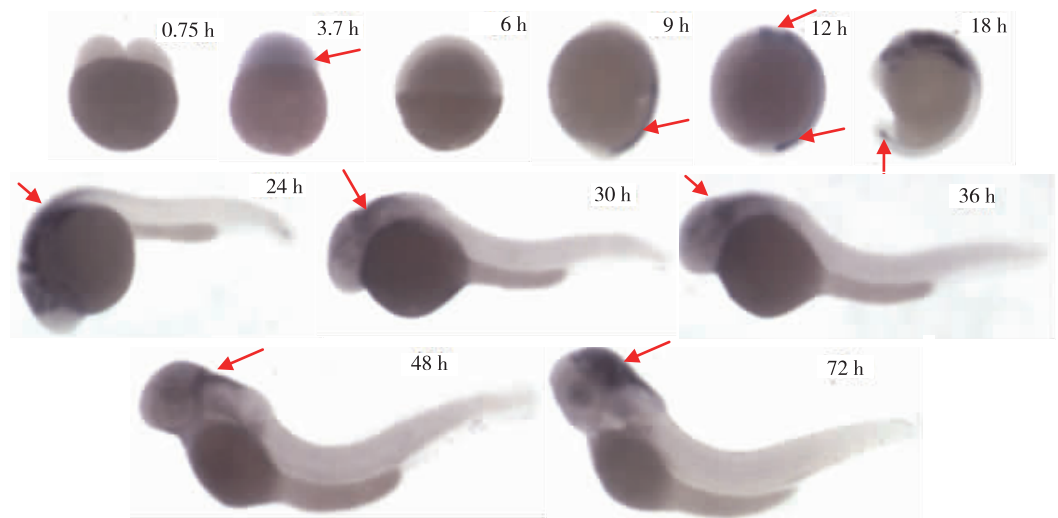


图 5 0.75 ~ 72 hpf 野生型斑马鱼胚胎 *Irx5a* 基因表达谱

Fig. 5 Expression pattern of *Irx5a* in 0.75 ~ 72 hpf of wild type zebrafish embryo

mRNA 探针,通过 WISH,对 Tuebingen 野生型斑马鱼胚胎 *Irx5a* 基因的表达情况进行了检测和观察。通过 WISH 从整体水平上反映了胚胎发育过程中 *Irx5a* 基因表达的时空顺序。

*Irx* 基因作为一个古老的基因家族在进化过程中高度保守。*Irx5* 基因在斑马鱼分为 *Irx5a*、*Irx5b* 两个基因,分别定位于斑马鱼的第 8 和 13 号染色体。根据产物蛋白质氨基酸序列近似性以及染色体定位分析,*Irx5a* 与人类、小鼠的 *Irx5* 基因同源性更为接近。以往的研究提示,*Irx5* 基因可能与小鼠神经系统发育、心肌发育、肺泡表面物质的形成等都有密切的关系<sup>[9-12]</sup>,但是该基因在发育过程中确切的表达谱以及生物学功能迄今为止仍不清楚。

鉴于此,本研究旨在了解 *Irx5a* 在斑马鱼发育过程中的表达情况。本研究发现,0.75 hpf 斑马鱼胚胎细胞发生了第 1 次有丝分裂期,没有观察到 *Irx5a* 基因的表达,提示 *Irx5a* 基因可能未参与胚胎单细胞首次分裂为 2 细胞的过程;在 3.7 hpf 的胚胎中观察到有表达,提示 *Irx5a* 基因可能是母源性基因,6 hpf 斑马鱼胚胎逐渐向三个胚层开始分化,9 hpf 是斑马鱼第 1 个体节形成期,*Irx5a* 基因持续有表达,其表达位置主要在腹部中胚层;斑马鱼原始造血初期(12 hpf),*Irx5a* 基因表达位置主要在后脑神经节及腹部中胚层,而腹部中胚层是原始造血初期造血组织的重要起始位置;18 hpf 观察到 *Irx5a* 基因在斑马鱼胚胎中脑、间脑、后脑、咽

弓及侧板中胚层高表达,以及在尾部的动静脉血管丛低表达,其中侧板中胚层是早期巨噬细胞及其它髓系细胞的前体的起源区,与原始造血发育密切相关;24、30 及 36 hpf 斑马鱼胚胎的 *Irx5a* 基因主要在中脑、间脑、后脑等神经组织中表达;在初步具有成鱼相关组织形态及器官功能的 48 和 72 hpf 斑马鱼胚胎中 *Irx5a* 基因在中脑、间脑、后脑、耳泡囊表达强度较高,在 72 hpf 斑马鱼胚胎 *Irx5a* 基因在视网膜神经节细胞层表达。综上,*Irx5a* 基因系母源性基因,其在胚胎发育过程中贯穿于整个神经系统的发育时期,其对神经系统的发育可能发挥着重要作用;*Irx5a* 基因同样在原始造血过程中的重要造血组织中高表达,这就提示 *Irx5a* 基因可能参与斑马鱼原始造血的发育;同时,在视网膜神经节细胞开始发育的 72 hpf 斑马鱼胚胎 *Irx5a* 基因在视网膜神经节细胞层的表达,结合与往的研究对视网膜双极细胞分化影响的研究,充分说明 *Irx5a* 基因在促进视网膜神经节细胞分化、发育过程中起重要作用,为进一步研究 *Irx5a* 的功能奠定了重要的理论基础。

#### 4 参考文献

- [1] Bosse A, Stoykova A, Nieselt-Struwe K, et al. Identification of a novel mouse Iroquois homeobox gene, *Irx5*, and chromosomal localisation of all members of the mouse Iroquois gene family[J]. *Dev Dyn*, 2000 (1):160–174.
- [2] Cheng CW, Chow RL, Lebel M, et al. The Iroquois homeobox gene, *Irx5*, is required for retinal cone bipolar cell development[J]. *Dev Biol*, 2005 (1):48–60.
- [3] Van Tuyl M, Liu J, Groenman F, et al. Iroquois genes influence proximo-distal morphogenesis during rat lung development[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006 (4):L777–L789.
- [4] Costantini DL, Arruda EP, Agarwal P, et al. The homeodomain transcription factor *Irx5* establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient[J]. *Cell*, 2005 (2):347–358.
- [5] Zhou T, Wang L, Zhu KY, et al. Dominant-negative *C/ebpα* and polycomb group protein *Bmi1* extend short-lived hematopoietic stem/progenitor cell life span and induce lethal dyserythropoiesis[J]. *Blood*, 2011 (14):3842–3852.
- [6] Shu LP, Zhou ZW, Zhou T, et al. Ectopic expression of *Hoxb4a* in hemangioblasts promotes hematopoietic development in early embryogenesis of zebrafish[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015 (11):1275–1286.
- [7] He ZX, Shu LP, Yang XY, et al. The Role of *rap1b* in *Hoxb4* Transgenic Zebrafish Line[J]. *Blood*, 2011(21):3413.
- [8] 舒莉萍,何志旭,姚冬静,等. 野生型斑马鱼胚胎中 *hoxd3* 基因 mRNA 的表达谱[J]. *浙江大学学报:医学版*, 2012(1):69–74.
- [9] Theokli C, Morsi El-Kadi AS, Morgan R. TALE class homeodomain gene *Irx5* is an immediate downstream target for *Hoxb4* transcriptional regulation[J]. *Dev Dyn*, 2003 (1):48–55.
- [10] Myrthue A, Rademacher BL, Pittsenbarger J, et al. The iroquois homeobox gene 5 is regulated by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in human prostate cancer and regulates apoptosis and the cell cycle in LNCaP prostate cancer cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2008 (11):3562–3570.
- [11] Bonnard C, Strobl AC, Shboul M, et al. Mutations in *IRX5* impair craniofacial development and germ cell migration via *SDF1*[J]. *Nat Genet*, 2012 (6):709–713.
- [12] Wu Y, Davison J, Qu X, et al. Methylation profiling identified novel differentially methylated markers including *OPCML* and *FLRT2* in prostate cancer[J]. *Epigenetics*, 2016 (4):247–258.

(2016-05-30 收稿,2016-06-29 修回)

中文编辑:吴昌学;英文编辑:刘 华