

银鲫 *pou2* 基因在胚胎发育过程中的时空表达图式

尹 隽^{1,2} 周 莉¹ 刘 军¹ 杜新征¹ 桂建芳¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 用 RACE-PCR 方法从原肠期 SMART 文库中扩增到银鲫 *pou2* 基因的全长 cDNA, 其全长为 2421bp, 开放阅读框为 1416bp, 编码 471 个氨基酸, 与斑马鱼 *pou2* 基因的氨基酸序列一致性高达 91.0%。我们用 RT-PCR 和整体原位杂交的方法研究了银鲫 *pou2* 基因在胚胎发育过程中的时空表达图式。RT-PCR 结果显示, 银鲫 *pou2* 基因有母源转录本, 其合子基因在高囊胚期强烈表达, 在 50% 下包期和 90% 下包期也有高量的转录本, 但在 100% 下包期表达量急剧降低, 至体节期时已经完全检测不到其转录本。胚胎整体原位杂交结果显示其母源转录本在所有的胚盘细胞中。在高囊胚期和 50% 下包期, 高度表达的合子转录本仍在所有的胚盘细胞中, 但至 90% 下包期时, *pou2* 的表达向胚胎背部的正中中线汇聚, 集中在神经板的两侧区域和脑部的两条横向条带。在 100% 下包期时, *pou2* 的表达集中在神经板的中间区域以及预期形成的中后脑区域。至体节期时, 转录本消失, 这与 RT-PCR 结果高度一致。银鲫 *pou2* 基因的表达图式提示该基因在胚胎发育的早期具有重要作用, 它可能参与调控神经板的形成和中后脑细胞的发育命运。

关键词: 银鲫 *pou2* 基因; 胚胎发育; RT-PCR; 胚胎整体原位杂交

中图分类号: Q344⁺.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2007)05-0629-08

动物的胚胎发育是一个精细、严密而又微妙的调控过程, 需要各种调控因子和转录因子调控这个过程, 因而胚胎发育实际上是基因组中的多个发育基因在不同时间和空间进行特异性表达的结果。在鱼类中, 合子基因的表达最早始于中囊胚转换期, 一般在第十次卵裂左右, 此时细胞分裂的同步性丧失, 胚胎早期发育基因开始表达, 细胞获得一定的运动能力。胚胎发育早期, 合子基因的启动表达是胚胎发育过程中一个重要环节, 对细胞命运的决定起着至关重要的作用。

鱼类 *pou2* 基因产物属于第 1 类 POU 蛋白, 这类蛋白几乎都在胚胎早期进行合成, 对细胞决定和增殖中的关键基因起着调控作用^[1]。爪蟾 *XLPOU25*、*XLPOU60*、*XLPOU91*^[2,3]、斑马鱼 *pou2*^[4-6] 和哺乳动物的 *oct3/4*^[7,8] 等最初都是母源转录产物。爪蟾的 *XLPOU60* 从细胞质自主地向核内分配, 在受精卵内一开始就起着调控因子的作用, 在原肠胚早期表达迅速下降^[3]; 而 *XLPOU25* 和 *XLPOU91* 等在原肠早期上调, 但在原肠胚后期和神

经胚阶段又分别下调^[2]; 斑马鱼的 *pou2* 基因也是在原肠早期时表达上调, 在 6 体节期时检测不到转录本。这些结果表明该类基因主要是在胚胎发育早期发挥着调控作用^[5,6]。

近几年来, 由于基因敲除和基因过表达技术的发展以及一些突变体的获得, 有关 *pou2* 基因的相关研究成为一个研究热点。在爪蟾中 *pou2* 基因过表达, 会抑制爪蟾胚胎中胚层的形成^[9]; *pou2* 基因的敲除, 会导致爪蟾胚胎后部缩短以及前端神经系统的严重缺陷^[10]。*pou2* 基因发生突变的斑马鱼胚胎, 中后脑脑桥和后脑的发育受到显著的抑制^[4-6]。而小鼠 *oct4* 基因的缺失会导致早期胚胎的内部细胞团不能持续发育成胚胎干细胞^[11]。

鱼类以其产卵量大、胚胎体外发育、胚体透明和发育速度快等特点, 近年来已成为发育生物学研究的主要对象之一。银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 是一种天然的三倍体鱼类, 其天然群体中存在 5%—20% 的雄性个体, 且已发现其卵子具有雌核生殖和两性生殖两种不同的生殖方式^[12,13], 因而被认为是

收稿日期: 2006-09-27; 修订日期: 2007-04-175

基金项目: 国家重大基础研究计划 973 计划项目 (2004CB117401) 资助

作者简介: 尹隽 (1981—), 女, 湖北鄂州人; 博士研究生; 研究方向为鱼类发育遗传学。E-mail: yinjun @ihb.ac.cn

通讯作者: 桂建芳, 男, 湖北黄梅人; 博士, 研究员; 研究方向为鱼类遗传学。E-mail: jfgui @ihb.ac.cn

研究鱼类卵子发育、受精、早期胚胎发育和进化遗传学的独特对象^[14-16]。最近,我们筛选了一批在银鲫卵子发生和早期发育中差异表达的基因,并鉴定了一些在鱼类卵子发生和早期发育中起着重要作用的基因,如 *cyclin A1*、*cyclin B*、*cyclin A2*^[17,18]、*hatching enzymes*^[19]、*C-type lectin*^[15]、*C1q-like factor*^[20]、*spindlin*^[21]和 *CNB P*^[22]等。在前期研究中,我们构建了银鲫原肠期胚胎与体节期胚胎的抑制性差减杂交 cDNA 文库,并筛选到一批差异表达的基因^[19],其中两个原肠期胚胎特异表达的阳性克隆 GS36-37 的序列与斑马鱼 *pou2* 具有较高的同源性。本研究进一步采用 RACE-PCR 的方法首先克隆了银鲫 *pou2* 基因的全长 cDNA,接着运用 RT-PCR 和胚胎整体原位杂交的方法,对银鲫 *pou2* 基因在胚胎早期发育中的时空表达图式进行了研究。

1 材料和方法

1.1 银鲫及其胚胎 D系银鲫取自中国科学院水生生物研究所关桥实验场,分两次注射绒毛膜促性腺激素和鲤鱼垂体催产,每千克雌鱼使用的剂量是:第一次注射 0.4mg 脑垂体 + 100 IU HCG,第二次只注射 400 IU 的 HCG。卵子用红鲤精液人工授精^[13],室温 (20℃) 发育,取不同发育时期胚胎冻存于 -80℃ 用于总 RNA 的提取。收集不同发育时期的胚胎用 DEPC 处理过的 4% 多聚甲醛溶液固定过夜 (至少固定 12h),梯度脱水保存于甲醇溶液中,置 -20℃ 备用。

1.2 RNA 的提取和 SMART cDNA 的合成 SMART cDNA 文库的构建参照以前的报道^[17,23,24]。分别按照 RNA Extraction Kit 试剂盒 (Pharmacia) 和 PolyA Tract mRNA Isolation System 试剂盒 (Promega) 的操作手册分离纯化银鲫原肠期和体节期的总 RNA 和 mRNA。按照 SMART cDNA 合成试剂盒 (Clontech) 合成银鲫原肠期和体节期胚胎的 SMART cDNA。

1.3 RACE-PCR 克隆银鲫 *pou2* 的全长 cDNA 根据 SMART cDNA 合成试剂盒提供的 SMART 寡聚核苷酸和 CDS 引物的序列合成了 SMART 5' 引物 (5'-AACGCAGAGTACGCGGG-3') 和 SMART 3' 引物 (5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAAGTACT (30) N-1 N-3'), 分别锚定于 SMART cDNA 的 5' 和 3' 端。根据所得到的银鲫 *pou2* 基因 cDNA 片段的开放阅读框设计上下游 RACE 引物,从原肠期 SMART cDNA 扩增全长。用上游 RACE 引物和 SMART 3' 引物扩增 cDNA 的 3' 端,用下游 RACE 引物和 SMART 5' 引物扩增 cDNA 的 5' 端。上游引物序列为:5'-TAGCTG-

GTGAGGTGACCCA-3'。下游引物序列为:5'-AACGCTAGCATTGCCCTTT-3'。PCR 扩增条件:94℃ 5min;94℃ 30s,60℃ 30s,72℃ 1min 20s,35 循环;72℃ 5min。拼接 5' 端和 3' 端,获得银鲫 *pou2* 基因的全长 cDNA。

1.4 氨基酸序列比较分析 核酸测序结果拼接后输入 NCBI 进行开放阅读框的查询和氨基酸序列推测。在 NCBI 数据库 (包含 GenBank, EMBL, DDBJ, PDB 的所有序列) 查找斑马鱼、爪蟾、人和小鼠等相应的氨基酸序列,用 Clustal X (1.8) 软件进行排序。用 MEGA3 软件^[25,26]构建 MP 树。

1.5 RT-PCR 分析银鲫 *pou2* 基因在不同胚胎发育时期的差异表达 用 SV Total RNA Isolation System (Promega) 提取银鲫不同胚胎发育时期和不同组织总 RNA,用 SuperScript II 逆转录酶 (GIBCO) 和随机引物 (5'-NNNNN-C-3', N=G, A, T, C) 合成单链 cDNA。用基因的正向引物和反向引物进行 PCR,以银鲫的 *-tubulin* 基因作为对照。银鲫 *pou2* RT 引物序列为 5'-AGAGACCACAGAGCCCGAC-3' 和 5'-GCTCATAATACTGTGCTTICAG-3'。*-tubulin* 扩增引物序列为 5'-GTGCACTGGTCTTICAGGGGTT-3', 5'-GGGAAGTGGATCCGTGGGTTAT-3'。

1.6 地高辛标记的正反义 RNA 探针的合成 根据基因的全长 cDNA 设计一对 RNA 探针的特异引物,扩增一个大小为 630bp 的片段。引物序列为 5'-GAATCACCCCTCTTTTAACAAA-3', 5'-CTCGACCTCCAAGTCTCTGTAGT-3'。DNA 片段连入 pGEMT 载体。筛选得到反向连接的阳性克隆,分别用 *EcoRI* 和 *XhoI* 单酶切质粒,用地高辛标记试剂盒 (Roche 公司) 体外转录合成正反义 RNA 探针。

1.7 整体原位杂交 参照斑马鱼的整体原位杂交方法^[8]进行。所有杂交所用的溶液和移液管都用 DEPC 处理。取不同发育时期的胚胎,用 1×PBST 溶液洗去多余的甲醇溶液,原肠期之前的胚胎不用蛋白酶 K 处理,原肠期之后的胚胎用 0.5-1μL 的蛋白酶 K (1mg/mL) 处理 10min,然后用 4% 的多聚甲醛固定胚胎 20min,用 PBST 洗去多聚甲醛。将胚胎置于杂交液中 58℃ 预杂交 4h,然后分别加入所合成的正义或反义 RNA 探针于 58℃ 杂交 16h。多余的探针用 2×SSC 和 0.2×SSC 溶液漂洗。用 Blocking (2%, Roche) 和小牛血清封阻 1h,加入 anti-Dig-AP 抗体 (Roche) 与 RNA 探针结合 4 过夜。未结合的抗体用 MABT 溶液洗去,再加入 BCIP/NBT 溶液显色。用水洗去多余的显色液,甲醇脱色,将胚胎逐级渗透在甘油中,在显微镜下观察并拍照。

GAGAATTGAGATTGGGAAGAGTTGGTGCGGTGAGTTTCTAGGC	43
CTTTCTGAAGCCCTTATTGATGCGCTCACACAAGGACTGCGCACATTTCCACACAGTT	103
TCTACAAGAGCATCCTGGTACTGAGATAATGATCGCTGTGATTGACTATCAAACCAACA	163
GATATTGGGACGACAATTTGAGGCTTCGAAATCAAATTTGGTTTACAAGACTGGTATT	223
GCCTCAACGCTTTCTCTCTTGAAGTTTTTTTTTTTATCTACATAACTTTGTGAGAAG	283
ATGACGGAGAGACCACAGAGCCCGACAGGAGCGGACTGCAGACCCTACGAGTTCAACAGG	343
M T E R P Q S P T G A D C R P Y E F N R	20
GCCATGTATCCTCAGGCCCGGGCCTGGATGGACTTGGCGGAGCGTCTTTGCAGTTCGCG	403
A M Y P Q A P G L D G L G G A S L Q F A	40
CACGGCATGCTCAGGATCCAAGCTGCTTTTAACAAAGCCCATTTCAACGGAATCAGC	463
H G M L Q D P S L L F N K A H F N G I S	60
GCTACAACACCAAACTTCTCCCATTTTCAGGCGATTTTAAACGAACGATCTGCAA	523
A T T H Q T F F P F S G D F K T N D L Q	80
GGTAGTGATTTTGGCAACCCAAACACTGGTACCGTTTGTGCACCCGAGTTACCGGG	583
G S D F A Q P K H W Y P F A A P E F T G	100
CAGGTGCGGGAGCGATGTCAGCCACCCAGCCGCGAACATCAGCCCGCTATCGTGAA	643
Q V A G A M S A T Q P A N I S P P I A E	120
ACCAGGGAACAATCAAGATTACAACGCTAAAAACGAAAAGGATGTAGATGAATACACC	703
T R E Q I K I T T V K T E K D V D E Y T	140
AACGAAGAAAAAGCCGACGTACAATAAACCTCACACCCGGGACATCATCCGTGACC	763
N E E N K P T S Q Y N L T P G T S S V T	160
AACGGCGTGAATATTACACACCTGGAACCCCTCTTTTGGCCTGGACTGCCTACATT	823
N G V N Y Y T P W N P S F W P G L P H I	180
ACAGCTCCGCTAATATTTCCCAAGCTCCCCGACACCCTCCGATCATCCCATCGCTG	883
T A S A N I S Q A P P T P S A S S P S L	200
TCTCCATCTCCACCGGAAATGGGTCGGAAGCCTGGGGTTTTCAACGGAGGCTCCGCG	943
S P S P P G N G F G S L G F F N G G S A	220
CAAAACACCCCTTCGGTTCAGGCGCAGAGCGCACCCAGGAGCAGCGCTCCTCCAGTGA	1003
Q N T P S V Q A Q S A P R S S G S S S G	240
GGGTGAGTGATTCTGAGGAGGAGAATCTGACTACAGAGGACTTGGAGCAGTTTGCC	1063
G C S D S E E E E N L T T E D L E Q F A	260
AAAGAGCTCAACACAAGGCATCACACTGGGCTTCACGACGGGACGTGGGGCTCGCG	1123
K E L K H K R I T L G F T Q A D V G L A	280
CTGGAAACCTATATGGCAAAATGTTCACTCAGACGACTATCTGCCGCTTCGAGGCTCTC	1183
<u>L G N L Y G K M F S Q T T I C R F E A L</u>	300
CAACTCAGTTTCAAGAATATGTGCAAACTGAAGCCGCTGCTCCAGAGGTGGTTGAATGAG	1243
<u>Q L S F K N M C K L K P L L Q R W L N E</u>	320
GCAGAGAATTCCGAAAACCTCAGGATATGTACAAAATTGAACGGGTGTTCTGTGGACACA	1303
<u>A E N S E N P Q D M Y K I E R V F V D T</u>	340
AGAAAAAGAAAGCGAGGACAGTTTGAAGGACCCGTCCGTTGTGCTCTGGAGTCGTAC	1363
R K R K R R T S L E G T V R C A L E S Y	360
TTTATGAAGTGCCCAAGCCCAACACTCTGGAGATCAGCAGACATCTGATGACCTAGGC	1423
F M K C P K P N T L E I T H I S D D L G	380
CTGGAGAGAGATGTAGTACGTGTGTGGTTCTGCAACCGTAGACAAAAGGAAAAACGTCTA	1483
L E R D V V R V W F C N R R Q K G K R L	400
GCATTGCCCTTTGATGACGAATGCGCTGAAGCACAGTATTATGAGCAGAGTCCACCACTT	1543
A L P F D D E C A E A Q Y Y E Q S P P P	420
CCACCCACATGGGTGGCAGACCCACCCAGGGCAAGGCTATCCTGGACACGCCATCCC	1603
P P H M G G T A H P G Q G Y P G P A H P	440
GGAGGAGCCCTGCCCTATACATGCCATCCCTCCACCGACCCGAGGTCTTTAAAAATGCT	1663
G G A P A L Y M P S L H R P E V F K N A	460
CTGCACCCCTGGACTGGTGGGTACCTCACCAGCTAAACTTTATAGAAATGCTCCAAGCCA	1723
L H P G L V G H L T S stop	471
AGCTATGGATCAGATCAGTCATATTATGTAACGTTGCTTTTTTTTGTCTTTTTTTTTC	1783
TTTCCATATGTTCTTTGGGATGCTCTGATTGCACACTAGGAGGCTGGTGAATCATTGTAT	1843
AATGGGTGCTTGTGAACTAATGCGTTTGCACATGAAGTCATGGGTTCAGATGTGATTT	1903
TTATAGTTGGTTTTTATTACTTTTTGCTCCTGTATCAATTTTAAATGTACATATATTGA	1963
TGATTTCCAAAGTATATTCCATATTGTCTGCATTGTTTTCTCCACCTTTCTGTGTGA	2023
ACTGGCAGCAAAATTCGAGACTTCATGAGTTAATTACTTGATTTTAAAGAGATGGATTT	2083
TTTTTCTACTACAATTTGGAGGGACCTTTTTTCAGATGGTTTGCAAAGGACATCAGTC	2143
ACTGTTCTTTTTCTCAATGCTTGCACTCTTCCATCTTAATTGAAAGTGATTCTAGGT	2203
GTAATATCTTTTTATCAGGGTGATAGATGAAATTTGCTGCCAGTTTGAAATCCTCTGAGG	2263
TCATGTGCCTATCTTTTTGGTGTATCATGATGCTCATCCCTATGCAACATAAATGA	2323
AAGCTAATTTGATAATTTATTGACGTTTATTGCTCAACACATGCAATATTATGGGTAGC	2383
AATAAACATTTCCATTGACAGTCTAAAAA	2421

图1 银鲫 *pou2* 基因 cDNA 序列和氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence of gibel carp *pou2* cDNA and the deduced amino acid sequence
保守的 POU 结构域用下划线标出 The conserved POU domain is underlined

2 结 果

2.1 银鲫 *pou2* 基因全长 cDNA 的特征

银鲫 *pou2* 基因的全长 cDNA 为 2421bp (图 1), 有一个 1416bp 的开放阅读框, 编码 471 个氨基酸, 5'端非编码区长 283bp, 3'端非编码区长 722bp。SignalP 3.0 程序^[27]预测银鲫 POU2 蛋白没有信号肽; NetPhos 2.0^[28]预测其可能存在 31 个磷酸化位点; NCBI 上 (blastp) 预测它存在一个保守的 POU 结构域。

2.2 银鲫 POU2 蛋白与其同源蛋白的比较及其系统发育关系

根据 POU 区的全部序列同源程度, POU 蛋白被分为五大类, 鱼类 *pou2* 基因从属于 POU 家族的第五类 POU⁻。氨基酸比对排列分析 (图 2) 表明, 银鲫 POU2 与斑马鱼 POU2 在氨基酸水平上的一致性高达 90.3%, 与青鳉 POU2 蛋白的一致性为 63.8%, 与爪蟾、小鼠和人的第五类 POU 蛋白一致性在 27.0%—36.2% 之间。用 MEGA 软件构建 MP 树, 如图 3, 银鲫 POU2 蛋白同斑马鱼和青鳉的 POU2 蛋白的系统发育关系较近, 而与两栖类和哺乳类的系统发育关系还是相对较远。

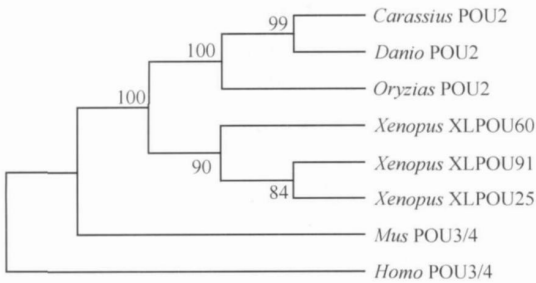


图 3 银鲫 POU2 与其他脊椎动物同源蛋白的系统发育树
Fig.3 Phylogenetic tree of gibel carp POU2 and other vertebrate homologues

该图用 Clustal X (1.8) 和 Mega3.0 软件生成

The figure is made by Clustal X (1.8) and Mega (3.0) programs.
Danio POU2, BAA05901.1; *Oryzias* POU2, AAT64911.1; *Xenopus* XLPOU60, AAA49997.1; *Xenopus* XLPOU91, AAA49999.1; *Xenopus* XLPOU25, AAA49996.1; *Mus* POU3/4, NP_038661.1; *Homo* POU3/4; NP_002692.2

2.3 银鲫 *pou2* 基因在胚胎发育过程中的表达时序

RT-PCR 检测 (图 4) 表明, 银鲫 *pou2* 基因的母源转录本一直存在于未受精的卵子和发育至多胞期的

胚胎中; 当胚胎发育至囊胚期时, 合子基因转录开始启动, *pou2* 此时开始大量表达, 且这种高表达仅持续至 50% 下包期 (原肠中期) 和 90% 下包期 (原肠晚期); 到 100% 下包期 (神经胚期) 时, *pou2* 的表达量急剧减少。当胚胎发育至体节期时, RT-PCR 已检测不到 *pou2* 的转录本。

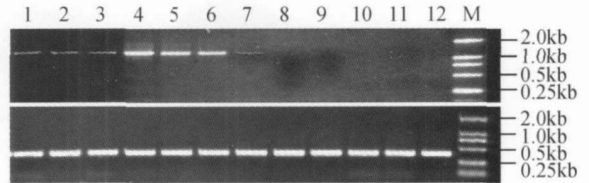


图 4 RT-PCR 检测银鲫 *pou2* 基因在胚胎发育过程中的时序表达
Fig.4 Expression characterization of gibel carp *pou2* gene during embryogenesis revealed by RT-PCR

1. 未受精; 2. 二胞期; 3. 多胞期; 4. 高囊胚期; 5. 50% 下包期; 6. 90% 下包期; 7. 100% 下包期; 8. 体节期; 9. 肌肉效应期; 10. 心跳期; 11. 出苗前期; 12. 鱼苗期。

M: DL2000 DNA 分子量标准

1. Oocytes; 2. Two-cell stage; 3. Multi-cellular stage; 4. Blastula; 5. 50% epiboly; 6. 90% epiboly; 7. 100% epiboly; 8. Somatic stage; 9. Muscle contraction stage; 10. Heartbeat stage; 11. Hatching; 12. Larvae. M: DL 2000 DNA molecular weight marker

2.4 银鲫 *pou2* 基因在胚胎发育过程中的时空表达特征及其发育行为

用地高辛标记的 RNA 反义探针对银鲫发育各个时期的胚胎进行整体原位杂交分析的结果表明, 在一胞期 (图 5A)、二胞期 (图 5B)、十六胞期 (图 5C) 的胚胎中, 银鲫 *pou2* 基因的母源转录本均匀地分布在每一个胚盘细胞中。当胚胎发育至囊胚期 (图 5D) 时, 所有的囊胚细胞都呈深紫色, 表明 *pou2* 基因的合子转录本已开始大量表达。在 50% 下包期 (图 5E) 时, *pou2* 基因的转录本仍然均匀地分布在每一个细胞中。当胚胎下包至 90% (图 5F) 时, *pou2* 在胚胎的表达向背部的正中中线汇聚, 逐渐集中在神经板的两侧区域和脑部的两条横向条带, 这使得信号呈现出一个双 T 型的结构。可以看出这个时期的神经板正在由两端向中间汇聚。在胚胎发育至 100% 下包期 (图 5G) 时, *pou2* 的表达集中在神经板的背中线区域以及此时在脑中分得更开的两条横向条带。至体节期 (图 5H) 时, 在胚胎中已经完全检测不到 *pou2* 的转录本。

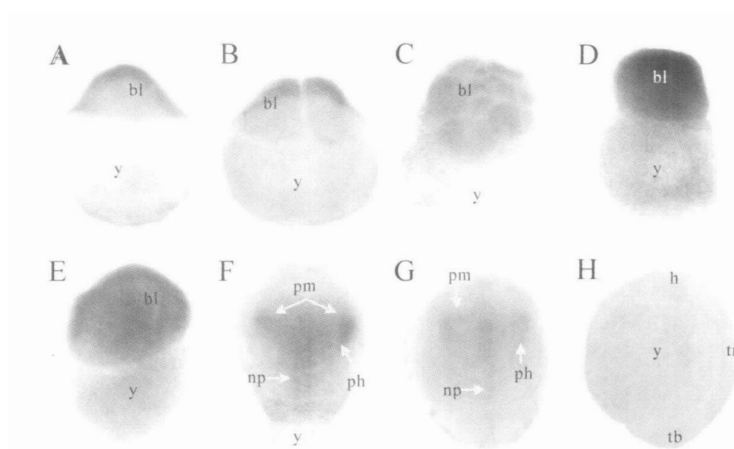


图5 整体原位杂交检测银鲫 *pou2* 基因的在胚胎发育过程中的时空表达特征

Fig. 5 Expression pattern of gibel carp *pou2* gene revealed by WISH during embryogenesis

A:一胞期;B:二胞期;C:十六胞期;D:高囊胚期;E:50 %下包期;F:90 %下包期;

G:100 %下包期;H:体节期. bl:胚盘细胞;h:头部;np:神经板;ph:预定的后脑区;

pm:预定的中脑区;tb:尾芽;tr:躯干;y:卵黄

A:One-cell embryo; B: Two-cell embryo; C: Sixteen-cell embryo; D: Blastula embryo;

E: 50 %epiboly embryo; F: 90 % epiboly embryo; G: 100 % epiboly embryo; H: Somatic

embryo. bl: Blastomere; h: Head; np: Neural plate; ph: Presumptive hindbrain; pm:

Presumptive midbrain; tb: Tail bud; tr: Trunk; y: Yolk

3 讨论

银鲫 *pou2* 基因和斑马鱼 *pou2* 基因的表达图式极其相似^[4-6]。整体原位杂交表明,斑马鱼 *pou2* 基因母源性转录本在囊胚期胚胎均匀分布^[5]。原肠作用期间, *pou2* mRNA 存在于整个胚盘区域^[5]。在90 %和100 %下包期的斑马鱼胚胎中, *pou2* 的表达也集中于神经板以及在脑部的两条横向条带中;斑马鱼 *pax2.1*、*eng2*、*gbx1*、*fgf8* 等中、后脑标志基因与 *pou2* 基因的共定位实验表明在脑部的这两条横向条带是预期形成中脑和后脑的区域。因此,在90 % (图5F)和100 %下包期(图5G)时, *pou2* 基因在银鲫胚胎中的这两条横向条带也可能是将来发育成中脑和后脑的区域。从现有结果来看,尽管银鲫 *pou2* 基因存在着母源转录本,但合子 *pou2* 基因从高囊胚期开始在所有细胞中强烈表达并持续到胚胎下包50 %。在胚胎发育至下包90 %和100 %时,银鲫 *pou2* 基因的转录本主要分布于神经板和预期的中后脑区域,至体节形成期时转录本消失。银鲫 *pou2* 基因的表达模式提示该基因在胚胎发育的早期具有重要作用,它可能参与调控神经板和中后脑细胞的发育命运。

尽管银鲫 *pou2* 与斑马鱼 *pou2* 的表达位置是非常相似的但是两者的表达时间却有先后之别。斑马

鱼在胚盘下包30 %—40 %时启动合子 *pou2* 基因的表达,在6体节期时停止表达^[4-6]。而银鲫在胚胎还未开始下包的高囊胚期,合子 *pou2* 基因就开始进行的表达,在体节出现时转录本消失,即较斑马鱼的合子 *pou2* 基因提前开始表达,并且也提前结束表达。这暗示三倍体银鲫可能比二倍体斑马鱼提前进入中囊胚转换期。有资料表明单倍体鱼类较二倍体鱼类胚胎迟一个细胞周期进入中囊胚转换^[33,34],而四倍体胚胎则提早一个周期进入中囊胚转换^[35,36]。一般认为中囊胚转换是由于染色质上的某些成分启动了细胞质中一些目前尚未知道的特殊因子所致。银鲫的三倍体特性和独特的生殖方式暗示其具有特殊的调控生殖和胚胎发育的分子机制,雌核发育的三倍体银鲫可能正是因为具有某些特异于二倍体鱼类的染色质成分,从而使得银鲫 *pou2* 基因比斑马鱼 *pou2* 基因的表达提前开始和终止。

现有已被发现的第五类POU基因几乎都是在胚胎发育早期表达的。如爪蟾的 *XLPOU25*、*XLPOU60*、*XLPOU91*^[2,3],斑马鱼的 *pou2*^[4-6],小鼠的 *oct3/4*^[7,8],人的 *oct3/4*^[29],牛的 *POU5 F1*^[30]。这些基因都有母源转录本,并且都是在神经胚期前后停止表达。我们所研究的银鲫 *pou2* 基因也是这样。尽管这些基因的表达模式是相似的,但它们在不同物种中的功能又存在着分歧。哺乳动物的 *pou* 基因

在早期胚胎干细胞的发育以及种质细胞的维系中起着重要的作用^[11,31];两栖类的 *pou* 基因主要调控胚胎前端神经系统和神经层的发育^[9,10];而斑马鱼的 *pou* 基因主要调控胚胎中脑、后脑以及中后脑桥的发育^[4,6]。因此对鱼类 *pou* 基因的研究有助于理解这类基因在不同物种中的功能演化。

银鲫是一种独特的、可进行雌核发育生殖的物种,是进化遗传学和发育生物学研究的独特体系。银鲫 *pou2* 基因的研究或许能够揭示出单性物种早期胚胎发育的某些特殊性,同时为进化遗传学和发育生物学的研究提供一些有意义的资料。银鲫 *pou2* 基因是否和斑马鱼 *pou2* 基因的功能一致,还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Yang Q S, Wu M. POU-domain protein structure and its function in development [J]. *Prog. Biochem. Biophys.*, 1999, **26**(2): 114—117 [杨岐生, 吴敏. POU 同源域蛋白的结构及发育中的功能. 生物化学与生物物理进展, 1999, **26**(2): 114—117]
- [2] Hinkley C S, Martin J F, Leibham D, Perry M. Sequential expression of multiple POU proteins during amphibian early development [J]. *Mol. Cell. Biol.*, 1992, **12**(2): 638—649
- [3] Whitfield T T, Heasman J, Wylie C C. Early embryonic expression of XLPOU-60, a *Xenopus* POU-domain protein [J]. *Dev. Biol.*, 1995, **169**(2): 759—769
- [4] Belting H G, Hauptmann G, Meyer D, et al. Spiel ohne grenzen/ *pou2* is required during establishment of the zebrafish midbrain-hindbrain boundary organizer [J]. *Development*, 2001, **128**(21): 4165—4176
- [5] Hauptmann G, Gerster T. Pou-2-a zebrafish gene active during cleavage stages and in the early hindbrain [J]. *Mech. Dev.*, 1995, **51**(1): 127—138
- [6] Hauptmann G, Belting H G, Wolke U, et al. Spiel ohne grenzen/ *pou2* is required for zebrafish hindbrain segmentation [J]. *Development*, 2002, **129**(7): 1645—1655
- [7] Rosner M H, Vignani M A, Ozato K, et al. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo [J]. *Nature*, 1990, **345**(6277): 686—692
- [8] Scholer H R, Dressler G R, Balling R, et al. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex [J]. *Embo. J.*, 1990, **9**(7): 2185—2195
- [9] Cao Y, Siegel D, Knoche W. *Xenopus* POU factors of subclass V inhibit activin/ nodal signaling during gastrulation [J]. *Mech. Dev.*, 2006, **123**(8): 614—625
- [10] Morrison G M, Brickman J M. Conserved roles for Oct 4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development [J]. *Development*, 2006, **133**(10): 2011—2022
- [11] Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct 4 [J]. *Cell*, 1998, **95**(3): 379—391
- [12] Wu Q J, Gui J F. Fish Genetics and Breeding Engineering [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers. 1999, 41—62 [吴清江, 桂建芳. 鱼类遗传育种工程. 上海: 上海科学技术出版社. 1999, 41—62]
- [13] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) as revealed by RAPD assays [J]. *J. Mol. Evol.*, 2000, **51**(5): 498—506
- [14] Gui J F. Zebrafish, the ideal model for the study of molecular developmental biology [J]. *Bioengineering Progress*, 1995, **16**(3): 30—33 [桂建芳. 分子发育学研究的理想模式-斑马鱼. 生物工程进展. 1995, **16**(3): 30—33]
- [15] Dong C H, Yang S T, Yang Z A, et al. A C-type lectin associated and translocated with cortical granules during oocyte maturation and egg fertilization in fish [J]. *Dev. Biol.*, 2004, **265**(2): 341—354
- [16] Yang L, Gui J F. Positive selection on multiple antique allelic lineages of transferrin in the polyploid *Carassius auratus* [J]. *Mol. Biol. Evol.*, 2004, **21**(7): 1264—1277
- [17] Xie J, Wen J J, Chen B, Gui J F. Differential gene expression in fully-grown oocytes between gynogenetic and gonochoristic crucian carps [J]. *Gene*, 2001, **271**(1): 109—116
- [18] Xie J, Wen J J, Yang Z A, et al. Cyclin A2 is differentially expressed during oocyte maturation between gynogenetic silver crucian carp and gonochoristic color crucian carp [J]. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.*, 2003, **295**(1): 1—16
- [19] Liu J, Shi Y H, Yin J, et al. Screen of differentially expressed genes between gastrula embryos and tail bud embryos in gynogenetic gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005, **32**(3): 253—263 [刘军, 石耀华, 尹隽, 等. 雌核发育银鲫原肠期胚胎和尾芽期胚胎差异表达基因的呈现. 遗传学报, 2005, **32**(3): 253—263]
- [20] Chen B, Gui J E. Identification of a novel Clq family member in color crucian carp (*Carassius auratus*) ovary [J]. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 2004, **138**(3): 285—293
- [21] Wang X L, Sun M, Mei J, et al. Identification of a Spindlin homolog in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 2005, **141**(2): 159—167
- [22] Liu J X, Gui J F. Expression pattern and developmental behaviour of cellular nucleic acid-binding protein (CNBP) during folliculogenesis and oogenesis in fish [J]. *Gene*, 2005, **356**: 181—192
- [23] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, **93**(12): 6025—6030
- [24] Zhang Y B, Zhang Q Y, Xu D Q, et al. Identification of antiviral-relevant genes in the cultured fish cells induced by UV-inactivated virus [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2003, **48**(6): 581—588
- [25] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform.* 2004, **5**(2): 150—163

- [26] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers [J]. *Comput. Appl. Biosci.*, 1994, **10**(2):189—191
- [27] Bendtsen J D, Nielsen H, von Heijne G, *et al.* Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0 [J]. *J. Mol. Biol.*, 2004, **340**(4):783—795
- [28] Blom N, Cammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites [J]. *J. Mol. Biol.*, 1999, **294**(5):1351—1362
- [29] Tai M H, Chang C C, Kupele M, *et al.* Oct 4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 2005, **26**(2):495—502
- [30] van Eijk M J, van Rooijen M A, Modina S, *et al.* Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1 [J]. *Biol. Reprod.*, 1999, **60**(5):1093—1103
- [31] Stoop H, Honecker F, Cools M, *et al.* Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study [J]. *Hum. Reprod.*, 2005, **20**(6):1466—1476
- [32] Reim G, Mizoguchi T, Stainier D Y, *et al.* The POU domain protein spg (pou2/Oct4) is essential for endoderm formation in cooperation with the HMG domain protein casanova [J]. *Dev. Cell*, 2004, **6**(1):91—101
- [33] Kane D A, Kimmel C B. The zebrafish midblastula transition [J]. *Development*, 1993, **119**(2):447—456
- [34] Rott N N, Sheveleva G A. Changes in the rate of cell divisions in the course of early development of diploid and haploid loach embryos [J]. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 1968, **20**(2):141—150
- [35] Newport J, Kirschner M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage [J]. *Cell*, 1982, **30**(3):675—686
- [36] Mita I, Obata C. Timing of early morphogenetic events in tetraploid starfish embryos [J]. *J. Exp. Zool.*, 1984, **229**:215—222

TEMPORAL AND SPATIAL EXPRESSION PATTERN OF GIBEL CARP POU2 GENE DURING EMBRYO GENESIS

YIN Jun^{1,2}, ZHOU Li¹, LIU Jun¹, DU Xin-Zheng¹ and GUI Jian-Fang¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract :Full-length cDNA of Gibel carp *pou2* gene was cloned from gastrula SMART cDNA library through RACE-PCR. It consists of 2421bp, with an ORF of 1416 bp encoding a protein of 471aa. The complete amino acid sequence shares 91.0 % identity with zebrafish *pou2* gene product. Temporal and spatial expression pattern of gibel carp *pou2* during embryogenesis was investigated by RT-PCR and whole-mount *in situ* hybridization. RT-PCR result indicates that there is maternal transcript of gibel carp *pou2* in early embryos and the zygotic *pou2* transcript is abundantly expressed from blastula stage. Large amount of *pou2* transcript is detected at both 50 % and 90 % epiboly stages. At 100 % epiboly stage, however, the *pou2* transcript reduces rapidly and disappears at the later embryogenesis. Whole-mount *in situ* hybridization shows that the maternal transcript ubiquitously exists in all blastomere cells. In blastula embryos and 50 % epiboly embryos, the zygotic *pou2* transcript is also distributed in every blastomere cell. At the stage of 90 % epiboly, expression of *pou2* converges to the dorsal midline of embryos and locates in two waves of lateral neural plate and two transverse stripes in the brain region. In embryos at 100 % epiboly, *pou2* transcript is restricted in the neural plate and areas of presumptive midbrain and hindbrain. From somite stage, gibel carp *pou2* can not be detected any more, which is consistent with the RT-PCR result. The expression pattern of gibel carp *pou2* suggests that this gene should play an important role during early stages of embryogenesis. It might regulate the formation of neural plate and the fate of midbrain and hindbrain cells during early embryogenesis.

Key words :Gibel carp; Pou2; Embryogenesis; RT-PCR; Whole mount *in situ* hybridization