

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620110153949

UDC\_\_\_\_\_

廈門大學

博 士 学 位 论 文

文昌鱼显微注射方法建立及 *Pax1/9* 基因功能研究

Application of microinjection method in amphioxus and functional study of *Pax1/9* gene

刘欣

指导教师姓名: 王义权教授

专业名称: 遗传学

论文提交日期: 2014年 月

论文答辩日期: 2014年 月

学位授予日期: 2014年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2014年05月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（      ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于      年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（      ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

# 目 录

|   |           |
|---|-----------|
| 摘要.....                                     | 1         |
| Abstract.....                               | 4         |
| <b>第一章 文献综述</b> .....                       | <b>7</b>  |
| <b>一 新兴模式动物——文昌鱼</b> .....                  | <b>7</b>  |
| 1 文昌鱼的进化地位与研究意义.....                        | 7         |
| 2 文昌鱼早期胚胎发育.....                            | 7         |
| 3 文昌鱼人工繁殖和生殖调控研究进展.....                     | 8         |
| 4 文昌鱼胚胎操作技术研究进展.....                        | 9         |
| 5 文昌鱼数据库资源.....                             | 11        |
| <b>二 咽区的进化与发育</b> .....                     | <b>11</b> |
| 1 脊椎动物咽囊和咽弓的进化与发育.....                      | 11        |
| 2 神经嵴和内胚层在脊椎动物咽区进化发育过程中的作用.....             | 13        |
| 3 脊椎动物咽区发育的调控机制.....                        | 14        |
| 4 文昌鱼咽区的发育.....                             | 15        |
| <b>三 Pax1/9 基因研究进展</b> .....                | <b>17</b> |
| 1 Pax1/9 基因功能演化.....                        | 17        |
| 2 脊椎动物 Pax1 和 Pax9 基因研究进展.....              | 18        |
| 3 文昌鱼 Pax1/9 基因研究进展.....                    | 20        |
| <b>四 选题意义和研究目的</b> .....                    | <b>21</b> |
| <b>第二章 文昌鱼显微注射方法的建立</b> .....               | <b>22</b> |
| <b>一 材料和方法</b> .....                        | <b>23</b> |
| 1 材料.....                                   | 23        |
| 2 方法.....                                   | 23        |
| <b>二 结果</b> .....                           | <b>35</b> |
| 1 显微注射效率和注射后胚胎的正常发育率.....                   | 35        |
| 2 文昌鱼胚胎中 LacZ 重组质粒的表达.....                  | 38        |
| 3 文昌鱼胚胎中 Rfp 重组质粒的表达.....                   | 40        |
| 4 影响显微注射效率的重要因素.....                        | 41        |
| <b>三 讨论</b> .....                           | <b>43</b> |
| 1 显微注射方法的高效性.....                           | 43        |
| 2 外源性基因的高效表达.....                           | 44        |
| <b>第三章 文昌鱼 Pax1/9 基因在咽鳃裂早期发育过程中的功能研究</b> .. | <b>46</b> |
| <b>一 材料和方法</b> .....                        | <b>47</b> |
| 1 材料.....                                   | 47        |
| 2 方法.....                                   | 47        |
| <b>二 结果</b> .....                           | <b>53</b> |
| 1 文昌鱼 Pax1/9 基因在早期胚胎中的时空表达谱.....            | 53        |

|   |     |
|---|-----|
| 2 MO 降低 <i>Pax1/9</i> 基因表达.....                           | 55  |
| 3 siRNAs 降低 <i>Pax1/9</i> 基因表达.....                       | 58  |
| 4 注射 <i>Pax1/9</i> siRNA-1 后胚胎的组织形态学观察.....               | 60  |
| 5 抑制 <i>Pax1/9</i> 基因功能后咽区发育相关基因的表达.....                  | 62  |
| 6 <i>Six1/2</i> 、 <i>Tbx1/10</i> 和 <i>Eya</i> 基因敲低实验..... | 63  |
| <b>三 讨论</b> .....   | 67  |
| 1 <i>Pax1/9</i> 基因参与调控文昌鱼咽鳃裂的发育.....                      | 67  |
| 2 <i>Pax1/9</i> 基因在咽鳃裂早期发育过程中的功能.....                     | 68  |
| <b>第四章 文昌鱼 <i>Pax1/9</i> 基因在左右不对称形成中的功能研究</b> .....       | 70  |
| <b>一 材料和方法</b> .....                                      | 70  |
| 1 材料.....   | 70  |
| 2 方法.....   | 70  |
| <b>二 结果</b> .....   | 71  |
| 1 <i>Pax1/9</i> 基因过表达研究.....                              | 71  |
| 2 <i>Six1/2</i> 基因和 <i>Tbx1/10</i> 基因过表达研究.....           | 78  |
| <b>三 讨论</b> .....   | 83  |
| 1 外源 <i>Rfp</i> mRNA 在文昌鱼胚胎中的有效翻译.....                    | 83  |
| 2 <i>Pax1/9</i> 基因参与调控文昌鱼胚胎咽区的左右不对称发育.....                | 83  |
| <b>第五章 <i>Pax1/9</i> 基因在文昌鱼与斑马鱼胚胎发育中的功能比较</b> .....       | 85  |
| <b>一 材料和方法</b> .....                                      | 85  |
| 1 材料.....   | 85  |
| 2 方法.....   | 85  |
| <b>二 结果</b> .....   | 92  |
| 1 <i>Pax1/9</i> 直系同源基因序列分析.....                           | 92  |
| 2 斑马鱼 <i>Pax1a</i> 和 <i>Pax1b</i> 基因的时空表达谱分析.....         | 94  |
| 3 降低 <i>Pax1b</i> 基因表达对斑马鱼胚胎发育的影响.....                    | 97  |
| 4 <i>Pax1b</i> 蛋白表达水平检测和 mRNA 挽救实验.....                   | 99  |
| 5 杂合 <i>Pax1</i> mRNAs 挽救实验.....                          | 100 |
| <b>四 讨论:</b> .....  | 101 |
| 1 <i>Pax1/9</i> 基因在文昌鱼与斑马鱼胚胎中的时空表达谱比较分析.....              | 101 |
| 2 文昌鱼 <i>Pax1/9</i> 基因在进化过程中的功能演化.....                    | 102 |
| 3 C 端序列在 <i>Pax1/9</i> 基因功能演化过程中的重要作用.....                | 103 |
| <b>总结与展望</b> .....  | 104 |
| <b>参考文献</b> .....   | 107 |
| <b>攻读学位期间发表的论文</b> .....                                  | 121 |
| <b>致谢</b> .....   | 122 |

## Contents

|   |    |
|---|----|
| <b>Abstract in Chinese</b> .....  | 1  |
| <b>Abstract in English</b> .....  | 4  |
| <b>Chapter 1 Introduction</b> .....   | 7  |
| <b>1 An emerging model organism---amphioxus</b> .....   | 7  |
| 1 Phylogenetic position and research significance .....   | 7  |
| 2 Early embryogenesis of amphioxus .....  | 7  |
| 3 Research on laboratory culture and spawning induction of amphioxus .....  | 8  |
| 4 Research on experimental techniques on amphioxus embryos.....   | 9  |
| 5 Database of amphioxus .....   | 11 |
| <b>2 Development and evolution of the pharynx</b> .....   | 11 |
| 1 Development and evolution of pharyngeal pouches and arches in vertebrate..                                      | 11 |
| 2 The role of neural crest and endoderm in the development of the pharynx .....                                   | 13 |
| 3 Developmental mechanism of vertebrate pharynx .....   | 14 |
| 4 Development of amphioxus pharynx .....  | 15 |
| <b>3 Reserch on <i>Pax1/9</i> gene</b> .....  | 17 |
| 1 Functional evolution of <i>Pax1/9</i> gene .....  | 17 |
| 2 Reserch on vertebrate <i>Pax1</i> and <i>Pax9</i> genes .....   | 18 |
| 3 Reserch on amphioxus <i>Pax1/9</i> gene .....   | 20 |
| <b>4 Goal of our research</b> .....   | 20 |
| <b>Chapter 2 Application of microinjection method in amphioxus</b> .....  | 22 |
| <b>1 Materials and methods</b> .....  | 23 |
| 1 Materials .....   | 23 |
| 2 Methods.....  | 23 |
| <b>2 Results</b> .....  | 35 |
| 1 Normally developing ratio of injected eggs and efficiency of microinjection                                     | 35 |
| 2 Expression of <i>LacZ</i> reporter construct in amphioxus embryos .....   | 38 |
| 3 Expression of <i>Rfp</i> reporter construct in amphioxus embryos .....  | 40 |
| 4 Factors influencing on the efficiency of microinjection .....   | 41 |
| <b>3 Discussion</b> .....   | 43 |
| 1 Efficient microinjection method for unfertilized eggs .....   | 43 |
| 2 Efficient expression of the exogenous genes .....   | 44 |
| <b>Chapter 3 The role of <i>Pax1/9</i> gene in the early development of amphioxus pharyngeal gill slits</b> ..... | 46 |
| <b>1 Materials and methods</b> .....  | 47 |
| 1 Materials .....   | 47 |
| 2 Methods.....  | 47 |
| <b>2 Results</b> .....  | 53 |
| 1 Expression pattern of <i>Pax1/9</i> gene in amphioxus embryos .....   | 53 |
| 2 MO mediated knockdown of <i>Pax1/9</i> gene.....  | 55 |

|  |            |
|--|------------|
| 3 siRNAs mediated knockdown of <i>Pax1/9</i> gene .....  | 58         |
| 4 Morphological observation on the knockdown embryos .....   | 60         |
| 5 The expression of pharynx marker genes after the knockdown of <i>Pax1/9</i> .....                                      | 62         |
| 6 Knockdown of <i>Six1/2</i> , <i>Tbx1/10</i> and <i>Eya</i> genes .....   | 63         |
| <b>3 Discussion.....</b>   | <b>67</b>  |
| 1 <i>Pax1/9</i> is required for the development of amphioxus gill slits .....  | 67         |
| 2 The action of <i>Pax1/9</i> gene in early pharyngeal development.....  | 68         |
| <b>Chapter 4 The function of amphioxus <i>Pax1/9</i> gene in the establishment of left-right asymmetry .....</b>         | <b>70</b>  |
| <b>1 Materials and methods .....</b>   | <b>70</b>  |
| 1 Materials .....  | 70         |
| 2 Methods.....   | 70         |
| <b>2 Results .....</b>   | <b>71</b>  |
| 1 Overexpression of <i>Pax1/9</i> gene .....   | 71         |
| 2 Overexpression of <i>Six1/2</i> and <i>Tbx1/10</i> gene.....   | 78         |
| <b>3 Discussion.....</b>   | <b>83</b>  |
| 1 Efficient translation of the exogenous <i>Rfp</i> mRNA in amphioxus embryos .....                                      | 83         |
| 2 <i>Pax1/9</i> gene is involved in the establishment of left-right asymmetry.....                                       | 83         |
| <b>Chapter 5 Functional comparison of <i>Pax1/9</i> gene in amphioxus and zebrafish.....</b>                             | <b>85</b>  |
| <b>1 Materials and methods .....</b>   | <b>85</b>  |
| 1 Materials .....  | 85         |
| 2 Methods.....   | 85         |
| <b>2 Results .....</b>   | <b>92</b>  |
| 1 Sequence analysis of <i>Pax1/9</i> orthologues.....  | 92         |
| 2 The expression pattern of <i>Pax1a</i> and <i>Pax1b</i> genes in zebrafish.....  | 94         |
| 3 <i>Pax1b</i> knockdown in the embryos of zebrafish.....  | 97         |
| 4 Western blot and rescue experiment .....   | 99         |
| 5 Rescue experiment with chimeric <i>Pax1</i> mRNAs.....   | 100        |
| <b>3 Discussion.....</b>   | <b>101</b> |
| 1 The comparison of spatial-temporal expression patterns of amphioxus <i>Pax1/9</i> and zebrafish <i>Pax1</i> genes..... | 101        |
| 2 Functional evolution of <i>Pax1/9</i> gene .....   | 102        |
| 3 The C-terminal region of <i>Pax1</i> gene plays important role in gene function evolution .....                        | 103        |
| <b>Summary and prospects .....</b>   | <b>104</b> |
| <b>Reference.....</b>  | <b>107</b> |
| <b>Publications .....</b>  | <b>121</b> |
| <b>Acknowledgements .....</b>  | <b>122</b> |

# 文昌鱼显微注射方法建立及 *Pax1/9* 基因功能研究

## 摘要

文昌鱼的器官构造和基因组成都较为简单,是研究胚胎发育机制以及脊椎动物器官起源的理想材料。然而,作为一种新兴的模式动物,目前文昌鱼研究领域的常用实验技术仍比较单一。显微注射技术是发育生物学研究中的一项重要实验技术,但是至今文昌鱼卵显微注射技术的应用还很不成熟。本文以白氏文昌鱼为材料,优化了文昌鱼显微注射步骤,用诱导产出的未受精卵进行显微注射,建立了一套高效的文昌鱼卵显微注射方法,并分别以 KCl、 $\beta$ -actin 启动子驱动的 *LacZ* 报告基因重组质粒以及 *Rfp* 报告基因重组质粒为注射溶液,通过统计注射后的受精率、胚胎发育时的出膜率、正常发育率以及胚胎表达 *LacZ* 和 *Rfp* 信号的阳性率对建立的显微注射技术进行了评估。结果显示,在 KCl 溶液注射组中,其发育情况与未注射对照组无显著差异,大于 99.2% 的未受精卵在注射后可以正常受精,94.3% 的受精卵发育至神经胚后可以正常出膜,55.9% 的胚胎可以正常存活到 2 天幼体时期。在 2 种重组质粒注射组中,受精率及出膜率都与 KCl 注射组无差异,但是正常发育率比 KCl 注射组稍低。注射带有  $\beta$ -actin 启动子的 *LacZ* 重组质粒和 *Rfp* 重组质粒后,胚胎表达 *LacZ* 和 *Rfp* 的阳性率分别为 91.8% 和 80.5%。本研究建立的文昌鱼未受精卵显微注射技术,为接下来在文昌鱼胚胎中开展基因功能研究提供了技术保障。

咽区的出现是脊索动物的共同特征,文昌鱼咽区结构简单,不存在神经嵴细胞,有利于分析内胚层在咽区发育过程中的作用。脊椎动物 *Pax1* 和 *Pax9* 基因,属于 *Pax1/9* 基因亚家族,作为重要的转录因子,参与调控了咽区的发育过程。在未经过两轮基因组加倍的文昌鱼中,古老的 *Pax1/9* 基因在咽区内胚层具有强烈的表达信号,暗示它在咽区的发育过程中起重要作用,但是该基因在此过程中到底发挥什么作用以及它是如何行使功能的问题仍有待研究。时空表达谱检测结果显示,文昌鱼 *Pax1/9* 基因在神经胚早中期开始表达,表达量在神经胚中期达到最高。在神经胚早中期,该基因就已经在整个咽区内胚层表达,而此时鳃裂原基还未形成。待胚胎发育至神经胚中期,*Pax1/9* 仍在咽区内胚层表达,但是在将



发育成鳃裂原基的区域,其表达量明显下降。在幼体早期,当鳃裂原基形成之后,可以明显地观察到在加厚的鳃裂原基区域没有 *Pax1/9* 基因的表达信号,但是在原基的背部内胚层以及相邻原基之间的间隔区域仍保留了很强的表达信号。注射反义寡聚核苷酸或小干扰 RNA 抑制 *Pax1/9* 基因表达后,会导致 3 天幼体的鳃裂发育畸形,包括鳃裂变小和第一和第二鳃裂原基的融合。抑制 *Pax1/9* 基因功能之后, *Six1/2* 和 *Tbx1/10* 基因在咽区的表达量开始下调。基于以上的结果,我们推测 *Pax1/9* 基因在咽内胚层的表达是咽鳃裂正常发育所必须的,并且该基因可能在胚胎发育早期通过调节 *Six1/2* 和 *Tbx1/10* 的表达,影响之后鳃裂的发育。

文昌鱼幼体咽区呈现明显的不对称形态,口位于胚胎身体左侧,鳃裂位于右侧。对 *Pax1/9* 基因进行过表达研究时发现,在注射了适量 *Pax1/9* mRNA 的 3 天幼体中,胚胎身体的左侧和右侧各形成了一个口,且位置较为对称,鳃裂则位于腹面中央,说明该基因还参与调控了胚胎左右不对称的发育过程。在神经胚中期,与左右不对称发育相关的 *Nodal* 和 *Pitx* 基因,受到注射 *Pax1/9* mRNA 的影响,由本来的只在左侧表达转变成左右两侧对称表达。因此, *Pax1/9* 基因可能是通过调节早期胚胎中 *Nodal* 和 *Pitx* 基因的表达区域,从而影响之后胚胎的不对称发育。此外,注射 *Six1/2* mRNA 后的文昌鱼胚胎中,口同样出现在胚体两侧且鳃裂在腹侧, *Nodal* 基因和 *Pitx* 基因的表达区域也从左右不对称转变成左右对称。然而,注射 *Tbx1/10* mRNA 后的胚胎,发育正常,未观察到此类表型。由此可见, *Six1/2* 基因具有调控左右不对称发育的功能,而 *Tbx1/10* 基因可能不具备此功能。

本论文还对文昌鱼 *Pax1/9* 和斑马鱼 *Pax1* 基因在胚胎发育过程中的功能做了分析比较。在文昌鱼中,单一的 *Pax1/9* 基因表达区域集中在咽区内胚层和尾端体节。而斑马鱼中有两个 *Pax1* 基因,分别是 *Pax1a* 和 *Pax1b*,原位杂交结果显示 *Pax1a* 主要在咽囊和中胚层生骨节表达,而 *Pax1b* 在咽囊、脊索、尾部体节以及前鳍原基处表达,说明 *Pax1/9* 基因在文昌鱼咽区中表达的特征,在斑马鱼中得到保留,而该基因在体节中胚层的表达区域却发生了演化。注射 *Pax1b*-MO 抑制其基因功能后,直接导致了斑马鱼胚胎脊柱、尾部体节、咽部骨骼和前鳍均出现不同程度的畸形,说明 *Pax1b* 参与了这些器官的发育过程。文昌鱼 *Pax1/9* mRNA 不能挽救此缺陷表型,而小鼠 *Pax1* mRNA 却能在一定程度上缓解缺陷表型。基于以上结果,我们推测脊椎动物中 *Pax1* 的功能可能主要是参与体节中胚

层的骨骼系统发育，而原始文昌鱼 *Pax1/9* 基因在体节中胚层的功能可能与生肌节发育相关。此外，*Am(N)Dr(C)Pax1* mRNA 能够部分挽救抑制 *Pax1b* 功能后的缺陷表型，而 *Dr(N)Am(C)Pax1* mRNA 不能挽救缺陷表型，暗示 *Pax1b* 新功能的出现可能与该基因和文昌鱼 *Pax1/9* 基因 C 端序列的差异有关。

**关键词：**文昌鱼；显微注射；*Pax1/9* 基因；咽区；左右不对称；斑马鱼

## **Application of microinjection method in amphioxus and functional study of *Pax1/9* gene**

### **Abstract**

Amphioxus is now believed to be a promising model animal for evolutionary and developmental studies for its simple body plan and genome content. However, as an emerging model organism, amphioxus is lack of most molecular techniques applied in other well-developed model animals. Microinjection is a powerful technique for gene manipulation, and thus is one of useful approaches in the studies of gene function and embryonic development. Although the method has been exploited in Florida and European amphioxus, it still remains to be optimized and introduced into other amphioxus species. In order to introduce the technique into Asian amphioxus *Branchiostoma belcheri*, we followed and optimized previous description, and respectively injected KCl,  $\beta$ -actin-*LacZ* or  $\beta$ -actin-*Rfp* plasmid into unfertilized eggs. Results displayed that more than 99.2% of eggs injected with KCl were able to be fertilized, 94.3% of them could hatch normally and 55.9% survived until 2-day larvae, all of which were nearly equivalent to those obtained from normally fertilized eggs. Embryos injected with two plasmid constructs also showed very high fertilizing and hatching ratios, but normally developing ratios were slightly lower than that of KCl injection. Of those embryos, 91.8% expressed exogenous *LacZ* gene and 80.5% exhibited foreign *Rfp* expression, which were driven by a promoter from amphioxus  $\beta$ -actin gene. These data indicated a successful modified microinjection method for the unfertilized eggs of Asian amphioxus, which further facilitated the study of gene function in developmental research.

Pharynx is one of the major characteristics of chordates. Cephalochordate amphioxus has unique advantages in studying pharynx development for its embryos lack neural crest and pharynx develops mainly from endoderm cells. *Pax1* and *Pax9*, belong to *Pax1/9* gene subfamily, play important roles in vertebrate pharyngeal

patterning. In amphioxus, the single *Pax1/9* gene was also found to be expressed in the pharynx, but its function awaited to be investigated. Here, we determined *Pax1/9* gene expression pattern in different stages of amphioxus embryos, and examined embryonic morphological changes after knockdown of *Pax1/9* gene. The results indicated that *Pax1/9* expression initiated in early mid-neurula and rapidly reached its highest level in mid-neurula. And the *Pax1/9* transcript localized in most endoderm of the developing pharynx in early mid-neurula, and in succeeding developing stages, the gene expression was down-regulated strikingly in the region that would form gill slits and was maintained in the border region. The knockdown of *Pax1/9* gene using both morpholino and siRNAs caused embryonic defects in the first three gill slits and fusion of the front two gill slits, and reduced expression of pharyngeal marker genes *Six1/2* and *Tbx1/10*. So we concluded that *Pax1/9* gene played important roles in the initial differentiation of amphioxus pharyngeal endoderm as well as in subsequent formation of gill slits and border region, probably through modulating the expression of *Six1/2* and *Tbx1/10*.

A mouth-newly-opened amphioxus is morphologically asymmetry in the pharyngeal region. Its mouth forms on the left and the gill slits develop on the right. Here, in the embryos injected with *Pax1/9* mRNA, two mouths symmetrically formed on both left and right sides of the body, and the gill slits located ventrally at 3-day larval stage. Moreover, *Nodal* and *Pitx* genes were asymmetrically expressed on the left side of the body in the normal embryos at mid-neurula stage, but the overexpression of *Pax1/9* was sufficient to make these genes symmetrically express on both two sides of the body. So we speculated that *Pax1/9* gene might regulate the expression of *Nodal* and *Pitx* genes at early developing stage, and consequently affected the development of asymmetrical left-right axis of the body. Additionally, overexpression of *Six1/2* gene produced a similar symmetrical location of the mouth and gill slit, and symmetrically altered the expression of *Nodal* and *Pitx* genes, however, the embryos injected with *Tbx1/10* mRNA developed normally. These suggested that *Six1/2* might also play important role in the establishment of left-right axis but *Tbx1/10* might not.

In order to analyze the functional evolution of amphioxus *Pax1/9* gene, we detected the functional conservation and diversification between *Pax1/9* gene and zebrafish *Pax1* gene. In amphioxus, *Pax1/9* gene was expressed in pharyngeal endoderm and somatic mesoderm at posterior end of the embryo. In zebrafish, the genome contained two *Pax1* paralogous, *Pax1a* and *Pax1b*. The results displayed that *Pax1a* was expressed in pharyngeal pouch and mesoderm sclerotome, and *Pax1b* was expressed in endodermal pharyngeal pouch, caudal somites, notochord and fin bud, suggesting that the expression of zebrafish *Pax1* was similar in the pharyngeal region but diverse in the somatic mesoderm in relative to that of amphioxus *Pax1/9*. And the knockdown of zebrafish *Pax1b* gene function led to the defects in vertebral column, tail, pharyngeal skeleton and pectoral fin, suggesting that *Pax1b* played an essential role in the formation of them. Besides, the mouse *Pax1* mRNA, but not the amphioxus *Pax1/9* mRNA, could rescue the MO-induced defects. These data demonstrated that vertebrate *Pax1* were most obviously involved in the development of mesoderm skeleton, which might originated from myogenic function in amphioxus. Furthermore, the chimeric *Am(N)Dr(C)Pax1* could partially rescue the defects and the *Dr(N)Am(C)Pax1* mRNA could not, suggesting that divergence between C-terminal regions of amphioxus *Pax1/9* and zebrafish *Pax1b* possibly endowed *Pax1b* with new function.

**Key words:** amphioxus; microinjection; *Pax1/9* gene; pharynx; left-right asymmetry; zebrafish

# 第一章 文献综述

## 一 新兴模式动物——文昌鱼

### 1 文昌鱼的进化地位与研究意义

文昌鱼隶属于脊索动物门头索动物亚门,是从无脊椎动物到脊椎动物进化过程中的一个重要过渡类群<sup>[1]</sup>。在形态方面,虽然文昌鱼身体结构简单,但是与脊椎动物有许多共同特征<sup>[2]</sup>,在胚胎发育特定时期都具有神经管和脊索、鳃裂、肌节以及神经肠管<sup>[3]</sup>。然而文昌鱼也缺少一些典型脊椎动物所特有的结构,如成对的感觉器官、成对的附肢以及神经嵴细胞等<sup>[4]</sup>。在基因组组成方面,文昌鱼基因组没有发生过倍增,是脊椎动物基因组的简化版<sup>[5]</sup>,并且大部分脊椎动物基因家族的成员都能在文昌鱼基因组中找到一个具有代表性的同源基因<sup>[6]</sup>。由此可见,文昌鱼的基因组能够给我们提供更多的原始脊椎动物或脊椎动物祖先的基因组信息<sup>[7]</sup>。所处的系统发生位置、简单的形态结构以及基因组特征决定了文昌鱼是一种极具潜力的模式动物,是揭示脊椎动物基因组进化历程的理想材料<sup>[8]</sup>,在研究动物发育机制以及脊椎动物器官起源和功能演化方面具有不可替代的优势<sup>[9]</sup>。

### 2 文昌鱼早期胚胎发育

早在 19 世纪 60 年代, Kowalevsky 就细致地观察了文昌鱼的胚胎发育过程<sup>[10]</sup>。之后, Conklin 以及童第周的研究工作,加深了我们对文昌鱼胚胎发育过程的了解<sup>[11,12]</sup>。文昌鱼是体外受精发育,胚胎透明且早期发育快,便于观察<sup>[13]</sup>。文昌鱼卵体积小、卵黄含量少,是典型的均黄卵<sup>[13]</sup>。在第三次卵裂形成 8 细胞时,在分裂球之间出现明显的空隙<sup>[14]</sup>。第八次分裂之后,形成 256 个细胞,产生了中空的囊胚腔,胚胎进入囊胚期<sup>[15]</sup>。原肠作用在胚胎发育过程中起着至关重要的作用,胚胎进入原肠胚期之后,出现了扁平的植物极<sup>[16]</sup>。然后,植物极整体发生内陷,形成一个杯状的双层结构,内侧的一层细胞将分化成中胚层和内胚层,外侧的一层细胞将参与形成神经系统等,同时出现原肠腔以及一个与外界相通的胚孔<sup>[16]</sup>。

随着胚胎的发育,原肠胚背部的外侧细胞开始变为平坦,同时细胞层加厚形成了神经板,神经板的形成意味着胚胎进入神经胚阶段,此阶段涉及到许多重要

的发育事件，包括器官的形成以及中胚层分节等等<sup>[17]</sup>。神经板向下凹陷，神经褶从后端胚孔处往前在神经板的两侧开始形成，并逐渐向背中线合并形成神经管，后端的神经管没有闭合而与胚孔相通形成神经肠管<sup>[17]</sup>。另外，脊索板在原肠的背部中央形成，脊索板逐渐与两侧的内胚层细胞分离，形成一条棒状的脊索<sup>[18]</sup>。同时，两侧的中胚层细胞与邻近的脊索板和内胚层分离，将来发育成体节<sup>[18]</sup>。

在脊索与中胚层及内胚层脱离之后，由内胚层细胞围绕形成原肠腔（消化道），同时在消化道前端形成一对突起，并且呈现两侧对称形态<sup>[14]</sup>。右边的突起位于脊索和外胚层之间，向前伸到消化道前方，将来成为漏斗状的口前腔，左边的突起转向背面，将来发育成哈氏窝<sup>[14]</sup>。在哈氏窝后面的左侧，内胚层和外胚层相互紧贴融合，形成口；消化道前端腹面出现一凹陷，形成内柱，它是脊椎动物甲状腺的同源器官；咽区腹部内胚层加厚，形成鳃裂原基，原基在形成过程中逐渐向胚胎右侧迁移，最终内外胚层融合形成鳃裂<sup>[14]</sup>。

### 3 文昌鱼人工繁殖和生殖调控研究进展

如今文昌鱼俨然成为了一种潜在的新型实验室模式动物<sup>[19]</sup>，但是由于受限于胚胎材料的获得，至今文昌鱼还没有在发育生物学领域中得到广泛应用。为此，研究人员经过多年的努力探索，终于在文昌鱼实验室人工繁育以及生殖调控等方面取得了一系列突破性进展，为开展实验研究提供了充足的胚胎材料，推动了文昌鱼实验室模式化的进程。

早在 20 世纪 50 年代，童第周等人就在实验室内使文昌鱼产卵，获得了文昌鱼胚胎<sup>[20,21]</sup>；1990 年，杜琦开展了文昌鱼的人工育苗研究<sup>[22]</sup>；之后，吴贤汉等人在 1994 年至 2000 年期间，对文昌鱼幼体的饲养进行了长期的研究，并且将实验室繁殖的子一代文昌鱼幼体饲养到性成熟阶段，但是没有在实验室条件下得到子二代<sup>[23-25]</sup>；1999 年至 2001 年，张士瑾等人将野外的文昌鱼采回实验室进行繁殖，并将产卵后的文昌鱼亲鱼继续养殖到再次产卵<sup>[26-28]</sup>；2003 年至 2004 年，Kubokawa 和 Mizuta 也成功地让文昌鱼在实验室内产卵<sup>[29,30]</sup>；2005 年，方永强等在实验室内实现了文昌鱼自然产卵，并将幼体饲养至变态期<sup>[31]</sup>。但是在以上的研究中，使用的文昌鱼亲本都是从海区采集回来的性腺发育即将成熟的个体，所以均不是真正意义上的连续繁殖成功。从 2003 年开始，张秋金等人在实验室内持续进行了三年的文昌鱼全人工养殖，2005 年在实验室内得到了子一代文昌

鱼, 然后于 2006 年顺利培育出了白氏文昌鱼和日本文昌鱼的子二代, 真正实现了文昌鱼实验室全人工连续繁殖<sup>[32-34]</sup>。之后, 为了解决文昌鱼自然条件下繁殖季节较短的问题<sup>[34]</sup>, 李光等人在 2011 年至 2012 年期间, 通过减小养殖群体密度、提高培养温度、提供充足的饵料以及保持养殖环境清洁等措施, 实现了白氏文昌鱼的全年连续繁殖<sup>[35,36]</sup>。同时, Benito-Gutiérrez 也实现了欧洲文昌鱼的全年连续繁殖<sup>[37]</sup>。

在生殖调控方面, 研究人员分别尝试使用激素类似物、电刺激和温度刺激等方式, 诱发文昌鱼自然产卵释精。20 世纪 80 年代, 张建使用激素类似物来诱导文昌鱼性成熟个体产卵<sup>[38]</sup>。2004 年, Holland 等在文昌鱼的繁殖季节, 从野外采集性腺成熟的成体文昌鱼, 利用电刺激的方法成功地诱导佛罗里达文昌鱼产卵产精<sup>[39]</sup>。之后, Fuentes 等人通过改变饲养温度, 促使实验室内养殖的欧洲文昌鱼顺利在野外海区文昌鱼繁殖期之外的时间产卵<sup>[40,41]</sup>。2012 年至 2013 年, 李光等人在白氏文昌鱼中, 实现了热诱导法控制成熟个体产卵排精<sup>[35,36]</sup>。至此, 通过研究人员的不懈努力, 已成功实现了文昌鱼实验室内全年繁殖和诱导产卵排精, 这从根本上解决了文昌鱼胚胎材料获取困难的问题, 为最终将文昌鱼培育成发育生物学领域的良好模式动物打下了基础。

#### 4 文昌鱼胚胎操作技术研究进展

随着繁殖技术的发展, 文昌鱼已经日益成为发育生物学研究中的一种常用实验动物<sup>[42]</sup>。虽然在世界范围内现存 31 种文昌鱼<sup>[43,44]</sup>, 但是近年来在实验室内开展的发育生物学研究主要集中在其中的 4 种文昌鱼<sup>[45]</sup>, 分别是: 佛罗里达文昌鱼 (*Branchiostoma floridae*)、欧洲文昌鱼 (*B. lanceolatum*)、亚洲的白氏文昌鱼 (*B. belcheri*) 和日本文昌鱼 (*B. japonicum*)。其中, 亚洲的两种文昌鱼在 2005 年之前, 一直被认为是一个种。之后, 研究人员通过分子生物学技术对文昌鱼进行了物种鉴定, 证明它们其实是两个独立物种<sup>[46,47]</sup>。

为了进一步推动文昌鱼的广泛应用, 许多发育生物学常用的胚胎操作技术被逐步引入到文昌鱼胚胎发育学研究中。由于文昌鱼胚胎接近透明, 早期发育快, 且器官系统比脊椎动物简单, 便于研究文昌鱼胚胎中基因的空间表达模式。所以研究人员最早使用原位杂交和免疫组化技术, 来检测基因在转录水平和翻译水平上的空间定位, 从而推测相应的基因功能<sup>[48,49]</sup>。之后, 小分子化合物开始引入到



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫