

动物学报 51(5):884-891, 2005

Acta Zoologica Sinica

原位杂交检测 *pal-1* mRNA 在秀丽小杆线虫野生型和突变体早期胚胎中的分布^{*}

杨玉荣^{**} 傅 兴

厦门大学生命科学学院, 厦门 361005

摘 要 *pal-1* 是秀丽小杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 早期胚胎发育中决定体细胞命运的重要基因, 也是转录因子, 调控后续基因的表达, 凡含有该基因表达的细胞发育成体细胞。本文通过整体原位杂交技术检测 *pal-1* mRNA 在 *C. elegans* 野生型和 *par-1*、*par-2*、*par-3*、*par-4* 突变体、*spr-4* 突变体、*mex-5/mex-6* 突变体早期胚胎中的分布, 探讨这些基因在胚胎发育早期对 *pal-1* mRNA 的影响。实验结果表明: *par-1*、*par-3*、*par-4* 突变使 4 细胞胚胎 *pal-1* mRNA 完全丧失了野生型不对称分布模式, *pal-1* mRNA 分布在所有卵裂球中; *par-2* 对 *pal-1* mRNA 的分布影响较小, 在 *par-2* 突变体 4 细胞胚胎中 *pal-1* mRNA 分布与野生型相同。*spr-4*、*mex-5*、*mex-6* 也能影响 *pal-1* mRNA 的分布, 使其分布丧失不对称性。在 *par-1*、*par-4* 突变的情况下, *pal-1* mRNA 广泛存在, 但 PAL-1 蛋白也不表达, 显示对 *pal-1* mRNA 的翻译调控是 PAL-1 蛋白空间和时序不对称分布的主要原因 [动物学报 51 (5): 884-891, 2005]。

关键词 秀丽小杆线虫 *par* *pal-1* *spr-4* *mex-5* *mex-6* 原位杂交

Distribution of *pal-1* mRNA in *Caenorhabditis elegans* wild-type and mutant early embryos via *in situ* hybridization^{*}

YANG Yu-Rong^{**}, FU Xing

School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract This paper reports the distribution of *pal-1* mRNA in *Caenorhabditis elegans* early embryo of wild type, *par-1*, *par-2*, *par-3*, *par-4* mutant, *spr-4* mutant and *mex-5/mex-6* mutant via *in situ* hybridization. In wild type embryos, *pal-1* mRNA showed asymmetric localization in one cell, two cell and 4-cell embryos. At 4-cell embryo, posterior 2 cells showed higher levels than anterior cells. In *par-1*, *par-3*, *par-4* mutant embryos, *pal-1* mRNA lost asymmetric localization and were present everywhere. Loss function of *par-2* did not affect the distribution of *pal-1* mRNA. *spr-4*, *mex-5* and *mex-6* also affected *pal-1* mRNA asymmetric distribution. In *par-1*, *par-4* mutant, *pal-1* mRNA was present everywhere but no PAL-1 was detected in any cells of 4-cell embryos. This implies that the translational regulation of *pal-1* mRNA may be the reason for spatially and temporally asymmetric location of PAL-1 protein [Acta Zoologica Sinica 51 (5): 884-891, 2005].

Key words *Caenorhabditis elegans*, *par*, *pal-1*, *spr-4*, *mex-5*, *mex-6*, *In situ* hybridization

秀丽小杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 是土壤自由生活线虫, 由于其结构简单、发育快, 成为当今发育生物学的理想工具。*C. elegans* 中, 受精卵的极性由精原核的进入决定, 引起皮层和细胞质的重组, 导致母源性 mRNA 和蛋白质的不对

称分布 (Goldstein and Hird, 1996)。在 *C. elegans* 中已鉴定出了两大类母源性基因 (Bowerman, 1998), 一类是建立和维持细胞早期极性的基因 (如 *par-1*, 2, 3, 4, 5, 6), 一类是决定细胞特定命运的基因 (如 *pal-1*、*glp-1*、*skn-1*、*pie-1*)。

2004-08-24 收稿, 2005-06-12 接受

^{*} 国家自然科学基金 (No. 30370695)、教育部留学回国人员启动基金和厦门大学校级基金资助 [This research was jointly supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (No. 30370695), the Scientific Fund for Returned Oversea Scholars of the Ministry of Education and Xiamen University Start Fund]

^{**} 通讯作者 (Corresponding author). Email: yryang@jingxian.xmu.edu.cn

© 2005 动物学报 Acta Zoologica Sinica

par 基因的缺失会导致细胞大小、细胞周期、纺锤体方向和细胞命运决定子分布丧失不对称性。

par-1 编码一种 Ser/ Thr 激酶, 受精前 PAR-1 在 *C. elegans* 卵母细胞皮层均匀分布, 受精后 PAR-1 在受精卵 (P_0) 后端皮层出现 (Guo and Kemphues, 1995)。*par-2* 编码一种锌指蛋白, 分布在单细胞胚胎后端的皮层, 分裂后被分到后端子细胞 P_1 内。以后 PAR-2 不对称分布在生殖系分裂球 P_1 、 P_2 和 P_3 内 (Levitani et al., 1994), PAR-2 依赖于 *par-3* 的活性, 是 PAR-1 在皮层正确分布所必需的, 这种作用需要 *par-3* 的活性 (Boyd et al., 1996)。PAR-3 有 3 个 PDZ 域, 可能介导蛋白质间的相互作用。其分布与 PAR-1 相反, 出现在受精卵前端的皮层, 后端与 PAR-1 和 PAR-2 前端边界相邻 (Etemad-Moghadam et al., 1995)。PAR-4 蛋白具有 Ser/ Thr 激酶活性, 在胚胎中的分布没有不对称性 (Morton et al., 1992)。*par* 活性是合子极化和细胞命运决定子正确分布所需的, 目前对其作用机制了解很少。PAR 蛋白可能通过中间调控因子间接地调节母源决定子的分布, 如通过 RNA 结合蛋白 MEX-3 调节 PAL-1 蛋白的不对称分布 (Draper et al., 1996)。

pal-1 编码一个与 Caudal 同源的蛋白, 是决定后端卵裂球命运所需的 (Hunter and Kenyon, 1996)。尽管 *pal-1*mRNA 在卵母细胞和早期胚胎中广泛分布, 但 PAL-1 蛋白仅在 4 细胞期开始在后端两个卵裂球中检测到。PAL-1 在 *mex-3* 突变体的卵母细胞和胚胎所有细胞中都表达, 并导致依赖于 *pal-1* 前后端的同源异型转化。MEX-3 的分布和 PAL-1 是互补的。MEX-3 在成熟卵母细胞、单细胞和两细胞胚胎高水平表达, 而 4 细胞期 MEX-3 富集在前端卵裂球中。PAL-1 的表达调控依赖于 *pal-1* 3' UTR, 它将依赖于 *mex-3* 的抑制传给报告基因。这显示 MEX-3 可能直接抑制 PAL-1 的表达。Bowerman et al. (1997) 发现 MEX-3 的分布和活性依赖于 *par* 基因的活性。在 *par-1*、*par-4* 和 *par-3* 突变体 4 细胞胚胎中, MEX-3 在所有细胞中都高水平的表达, 说明 *par* 的活性是将 MEX-3 限制在前端所需要的。Huang et al. (2002) 报道了用免疫荧光抗体染色检测 *mex-5*、*mex-6* 和 *spn-4* 与 *par* 基因如何影响 PAL-1 表达, 并提出了解释它们之间相互作用的模型, 但目前该模型尚待进一步的实验证实。

虽然 PAL-1 蛋白在一些突变体中的分布国外

已有报道 (Bowerman et al., 1997; Huang et al., 2002), 但有关 *pal-1*mRNA 在这些突变体早期胚胎中的分布和变化情况尚未见报道。*pal-1*mRNA 的分布是否与 PAL-1 蛋白一致? 调控 PAL-1 的基因是怎样通过调节 *pal-1*mRNA 的分布和稳定性来控制 PAL-1 表达和不对称的分布? 为回答这些问题, 首先要研究 *pal-1*mRNA 在野生型胚胎和相关基因功能缺失突变体胚胎中的分布变化情况。本实验通过整体原位杂交检测 *pal-1*mRNA 在野生型和突变体胚胎中的分布变化情况, 来探明这些相关基因是如何影响 *pal-1*mRNA 的分布, 为进一步研究 PAL-1 的表达调控和基因之间相互作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所使用的虫株由 *Caenorhabditis Genetics Center* 提供, 虫株有 N2: wildtype; KK288: *rol-4 (sc8) par-1 (b274) IV/ nT1 [unc-? (n754) let-?] (IV; V)*; KK114: *daf-7 (e1372) par-2 (it5)* ; KK237: *lon-1 (e185) par-3 (e2074)* ; *sDp3 (; f)*; KK184: *par-4 (it47)* ; EU772: *spn-4 (or80) V/ nT1 [unc-? (n754) let-?] (;)*; JJ1244: *mex-6 (pk440)*; *un-30 (e191) mex-5 (zu199) IV/ nT1 (IV; V)*。

实验中所用的地高辛标记的 *pal-1* cDNA 反义链和正义链探针由 Craig P. Hunter 实验室合成。

1.2 实验方法 (Geraldine and Andrew 1995; 杨玉荣, 2003)

C. elegans 虫体接种于培养基, 培养 1 - 2 d。在解剖镜下挑取 15 - 20 条成熟的雌雄同体虫体, 置于多聚赖氨酸处理过的载玻片上的一滴水中, 切开虫体释放虫卵, 加一盖玻片, 吸掉多余水分。置液氮中速冻几秒, 弃盖玻片, 置于甲醇中 5 - 15 min。PBS 洗 5 - 15 min, 移于福尔马林固定液 (1 × PBS, 0.08 mol/L pH 6.9 HEPES, 1.6 mmol/L MgSO₄, 0.8 mmol/L EGTA, 3.7 % 福尔马林) 20 - 30 min。PBSTween (PBS 加 0.1 % Tween) 洗 5 - 10 min 3 次, 置预杂交液 (50 % 甲酰胺, 5 × SSC, 50 μg/ml 肝素, 100 μg/μl 鲑鱼精 DNA, 0.1 % Tween) 与 PBS 的混合液 (1:1 配制) 5 min, 移于预杂交液中 5 min。加入煮沸过的预杂交液于载玻片上, 置湿盒中 (含 50 % 甲酰胺水溶液) 48 温育 2 - 4 h。加煮沸过的探针于标本上, 覆盖石蜡膜置湿盒内 48 温育 12 - 16 h。用 48

杂交液 (50 % 甲酰胺, 5 ×SSC) 洗 15 min 2 次。依次转入杂交液与 PBSTween 以 4 1、3 2、2 3、1 4 配制的混合液洗 15 min。最后放入 PBSTween 洗 2 次各 15 min, 转入室温。PBT (1 ×PBS, 0.1 %BSA, 0.1 % Triton X-100) 洗 2 次各 15 min, 加抗地高辛碱性磷酸酶标记的抗体 (1 2 500 稀释于 PBT 中) 于标本上, 置湿盒中室温下孵育 2 h, PBT 洗 4 次各 10 min, 用 DETEK 液 (100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L Tris pH 9.5, 0.1 % Tween20, 1 mmol/L Levamisole) 洗 4 min 2 次, 加入 4.5 μl/ml NBT 和 3.5 μl/ml BCIP 及 10 μl/ml DAPI 于 DETEK 液中染色 0.5 - 1 h。PBS 洗 2 次终止染色, 加入 5 - 10 μl 的 70 % 甘油于标本上, 指甲油封片, Olympus 荧光显微镜观察拍照。

2 结果

2.1 pal-1 mRNA 在野生型早期胚胎中的分布

野生型单细胞胚胎普遍被染上颜色, 前端染色较浅, 后端染色较深 (图 1A: A、B), 说明母源性 *pal-1*mRNA 在受精卵中广泛分布, 但逐渐失去均匀分布, 由前端向后端富集。卵裂后形成两个大小不等的卵裂球, 前端大卵裂球 AB, 后端为小卵裂球 P₁。2 细胞胚胎染色不均匀, 后卵裂球比前端要深一些 (图 1A: C、D), 说明 *pal-1*mRNA 在两

个卵裂球中的分布不均匀, 后端的卵裂球 P₁ 中有较多的 *pal-1*mRNA 的分布。

胚胎第二次卵裂不同步, AB 先分裂, P₁ 后分裂, 出现 3 细胞胚胎形态 (图 1A: E、F), *pal-1*mRNA 主要分布在 P₁ 中。二次卵裂后胚胎形成 4 个卵裂球, AB 分裂成 ABa 和 ABp 细胞, P₁ 分裂成 EMS 和 P₂ 细胞。4 细胞胚胎后部的两个卵裂球 EMS 和 P₂ 染色较深而前部的 ABa 和 ABp 染色较浅 (图 1A: G、H), 表明 *pal-1*mRNA 集中在胚胎后端。8 细胞胚胎中, P₂ 和 EMS 的子细胞 (C 细胞、P₃ 细胞、E 细胞、MS 细胞) 染色较深 (图 1A: I、J), 其余卵裂球染色较浅。24 细胞胚胎染色很浅, 只在 C 和 D 子细胞中有较深的颜色 (图 1A: K、L)。胚胎染色统计结果如图 1B 所示。说明 *pal-1*mRNA 在野生型胚胎中主要以不对称的形式分布。

2.2 par-1 mRNA 在 par-1 (b274) 早期胚胎中的分布

par-1 (b274) 突变体单细胞胚胎可以染上较深的颜色, 分布均匀, 没有出现野生型胚胎前后分布不对称的现象 (图 2A: A、B), 说明 *par-1* 基因功能的缺失会导致胚胎极性的丧失, 进而影响母源性 *pal-1*mRNA 的分布。受精卵第一次分裂产生 2 个大小相同的子细胞 AB 和 P₁, 这 2 个细胞都染上了颜色 (图 2A: C、D); 4 细胞胚胎的 4 个卵裂球

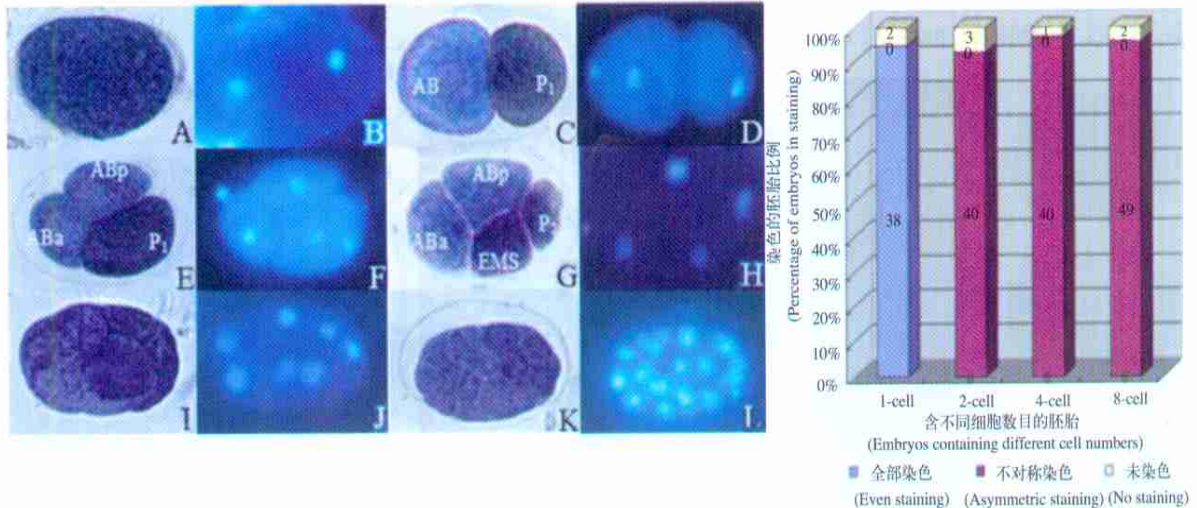


图 1A *pal-1*mRNA 在野生型 *C. elegans* 早期胚胎中的分布; B. 野生型 *C. elegans* 胚胎染色统计图

图中的 AB、P₁、ABa、ABp、EMS 和 P₂ 分别为 AB 细胞、P₁ 细胞、ABa 细胞、ABp 细胞、EMS 细胞、P₂ 细胞的缩写。

Fig. 1 A. Distribution of *pal-1* mRNA in the early embryo of wild type *C. elegans*; B. Statistics of embryo of wild-type *C. elegans*

AB, P₁, ABa, ABp, EMS and P₂ is the short name of the AB cell, P₁ cell, ABa cell, ABp cell, EMS and P₂ cell.

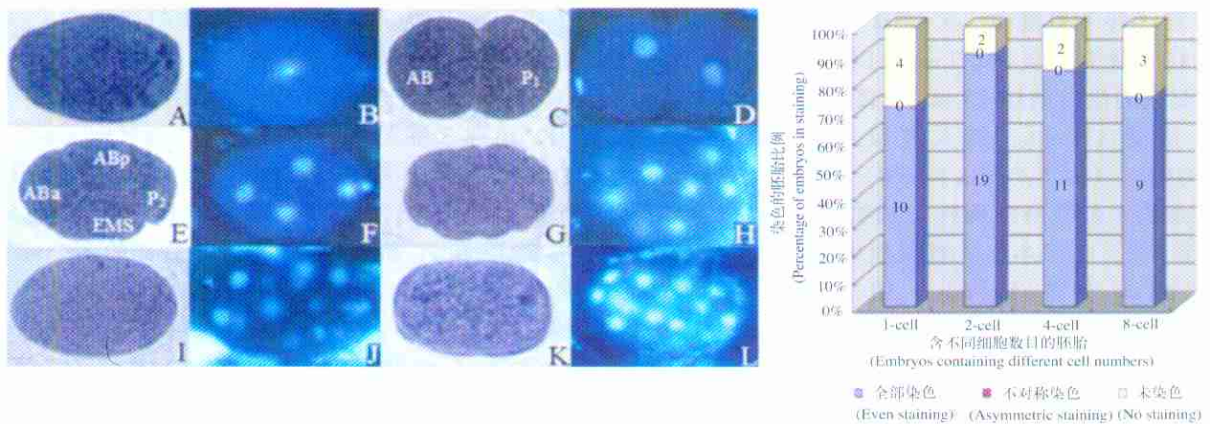


图 2 A. *pal-1*mRNA 在 *pal-1* (b274) 早期胚胎中的分布; B. *pal-1* (b274) 早期胚胎染色统计图

图中的 AB、P1、ABa、ABp、EMS 和 P2 分别为 AB 细胞、P1 细胞、ABa 细胞、ABp 细胞、EMS 细胞、P2 细胞的缩写。

Fig. 2 A. Distribution of *pal-1* mRNA in the early embryo of *par-1* (b274) mutant; B. Statistics of *pal-1* (b274) embryo staining

AB, P1, ABa, ABp, EMS and P2 is the short name of the AB cell, P1cell, ABa cell, ABp cell, EMS and P2 cell.

都染上了颜色 (图 2A: E、F); 8 细胞胚胎染色均一, 但颜色较浅 (图 2A: G、H); 16 细胞胚胎所有卵裂球也都染上颜色 (图 2A: I、J); 16 细胞以上胚胎染色更浅 (图 2A: K、L)。胚胎染色统计结果如图 2B 所示。*par-1* (b274) 突变体中 *pal-1*mRNA 的分布与野生型的有很大差异, *pal-1*mRNA 的分布丧失不对称性 (图 2B)。说明 *par-1* 是在 *pal-1* 上游表达的调控基因, 能影响 *pal-1*mRNA 的分布, 在野生型胚胎中将 *pal-1*mRNA 集中在后端。

2.3 *pal-1* mRNA 在 *par-2* (it5) 早期胚胎中的

分布

par-2 (it5) 突变体的单细胞胚胎都能染上颜色, 并且染色均匀 (图 3A: A、B), 说明母源性 *pal-1*mRNA 广泛均一地分布; 2 细胞胚胎的卵裂球都被染的很深, 颜色差异不太大 (图 3A: C、D), 4 细胞胚胎染色也是很深且后端的两个卵裂球 P₂ 和 EMS 染色比前端的 ABa 和 ABp 要深一些, (图 3A: E、F), 8 细胞胚胎 (图 3A: G、H)、16 细胞胚胎 (图 3A: I、J) 和 16 细胞以上的胚胎 (图 3A: K、L) 染色比较浅。统计结果如图 3B 所示。

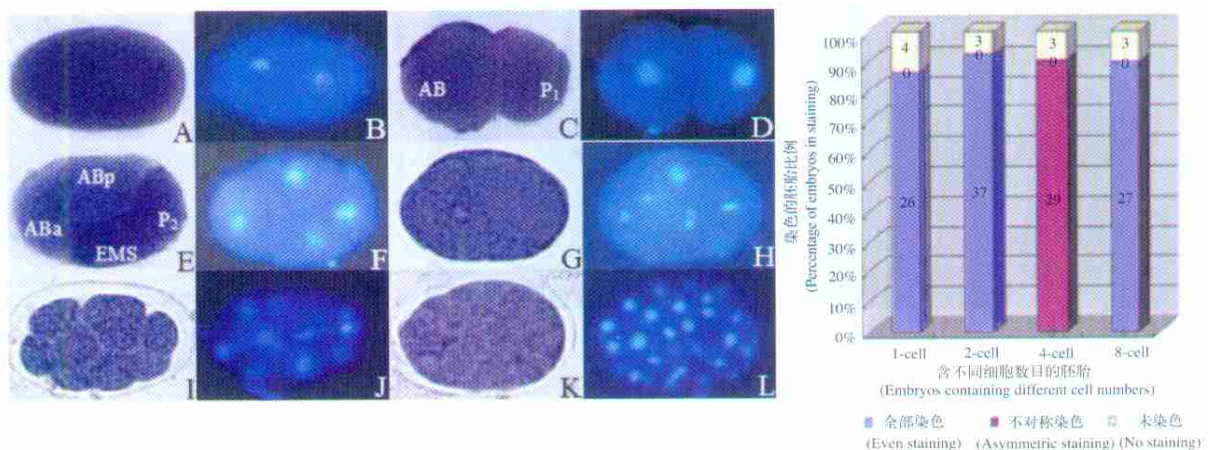


图 3 A. *pal-1* mRNA 在 *par-2* (it5) 早期胚胎中的分布; B. *pal-2* (it5) 早期胚胎染色统计图

图中的 AB、P1、ABa、ABp、EMS 和 P2 分别为 AB 细胞、P1 细胞、ABa 细胞、ABp 细胞、EMS 细胞、P2 细胞的缩写。

Fig. 3 A. Distribution of *pal-1* mRNA in the early embryo of *par-2* (it5) mutant. B. Statistics of *pal-2* (it5) embryo staining.

AB, P1, ABa, ABp, EMS and P2 in the Fig is the short name of the AB cell, P1 cell, ABa cell, ABp cell, EMS and P2 cell.

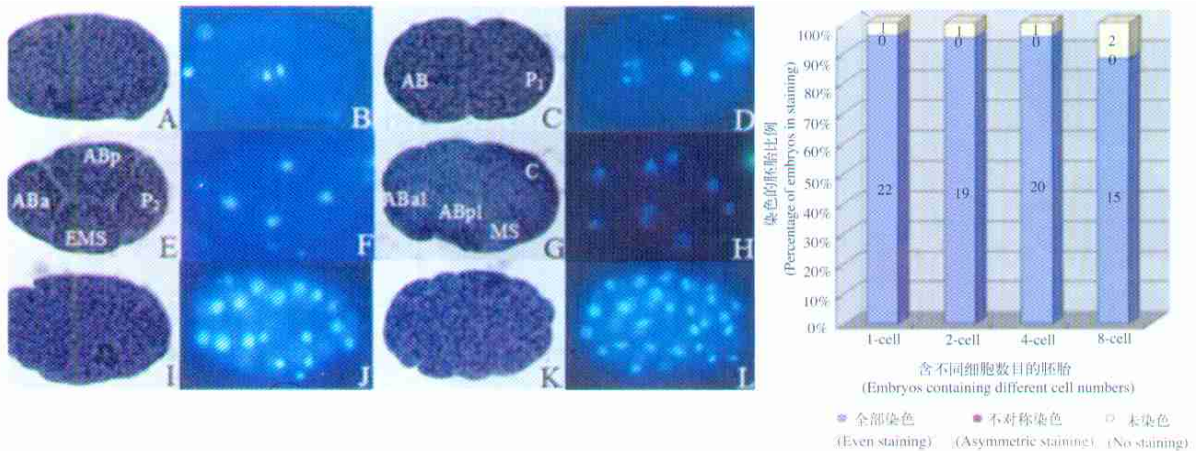


图 4 A. *pal-1* mRNA 在 *par-3* (e2074) 早期胚胎中的分布; B. *par-3* (e2074) 早期胚胎染色统计图图中的 AB、P1、ABa、ABp、EMS 和 P2 分别为 AB 细胞、P1 细胞、ABa 细胞、ABp 细胞、EMS 细胞、P2 细胞的缩写。

Fig. 4 A. Distribution of *pal-1* mRNA in the early embryo of *par-3* (e2074) mutant; B. Statistics of *par-3* (e2074) embryo staining

AB, P1, ABa, ABp, EMS and P2 in the Fig. is the short name of the ABcell, P1cell, ABa cell, ABp cell, EMS and P2 cell.

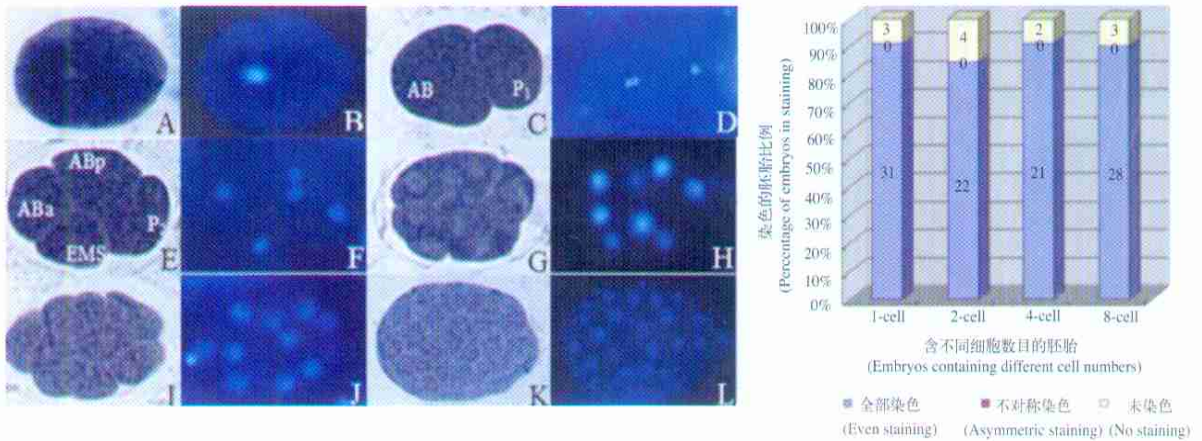


图 5 A. *pal-1* mRNA 在 *par-4* (it47) 早期胚胎中的分布; B. *par-4* (it47) 早期胚胎染色统计图

图中的 AB、P1、ABa、ABp、EMS 和 P2 分别为 AB 细胞、P1 细胞、ABa 细胞、ABp 细胞、EMS 细胞、P2 细胞的缩写。

Fig. 5 A. Distribution of *pal-1* mRNA in the early embryo of *par-4* (it47) mutant; B. Statistics of *par-4* (it47) embryo staining

AB, P1, ABa, ABp, EMS and P2 is the short name of the ABcell, P1cell, ABa cell, ABp cell, EMS and P2 cell.

par-2 的突变对 *pal-1*mRNA 的分布影响是有限的, 2 细胞期没有明显的不对称性分布, 而 4 细胞期与野生型的差别不大 (图 3B), 说明 *par-2* 对 4 细胞期 *pal-1*mRNA 分布的影响较小。

2.4 *pal-1* mRNA 在 *par-3* (e2074) 早期胚胎中的分布

par-3 (e2074) 突变体的单细胞胚胎染色很深且均匀 (图 4A: A、B); 2 细胞胚胎的两个卵裂球 AB 和 P₁ 染色程度相同, (图 4A: C、D), 4 细胞胚胎的 4 个卵裂球中都能检测到 *pal-1*mRNA 的存在 (图 4A: E、F), 8 细胞胚胎的 C、MS、ABal

和 ABpl 细胞染色较深 (图 4A: G、H); 16 细胞胚胎 (图 4A: I、J) 以及 16 细胞以上的胚胎都有染色, 其中一两个细胞染色特别深 (图 4A: K、L)。 *par-3* 也能影响胚胎极性和 *pal-1*mRNA 的不对称分布与表达 (图 4B), 说明 *par-3* 对 *pal-1*mRNA 的分布具有一定抑制作用, *par-3* 突变使 *pal-1*mRNA 在 4 细胞胚胎的不对称分布丧失。

2.5 *pal-1* mRNA 在 *par-4* (it47) 早期胚胎中的分布

par-4 (it47) 突变体的单细胞胚胎染上很深的颜色, (图 5A: A、B); 2 细胞胚胎具有两个大

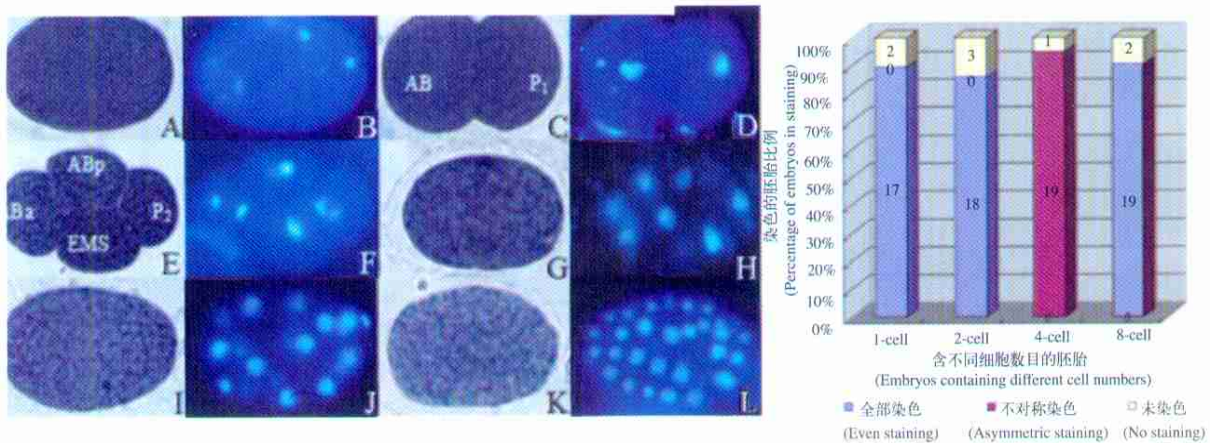


图 6 A. *pal-1* mRNA 在 *spn-4* (*or80*) 早期胚胎中的分布; B. *spn-4* (*or80*) 早期胚胎染色统计图
图中的 AB、P1、ABa、ABp、EMS 和 P2 分别为 AB 细胞、P1 细胞、ABa 细胞、ABp 细胞、EMS 细胞、P2 细胞的缩写。

Fig. 6 A. Distribution of *pal-1* mRNA in the early embryo of *spn-4* (*or80*) mutant; B. Statistics of *spn-4* (*or80*) embryo staining

AB, P1, ABa, ABp, EMS and P2 in the Fig. is the short name of the ABcell, P1cell, ABa cell, ABp cell, EMS and P2 cell.

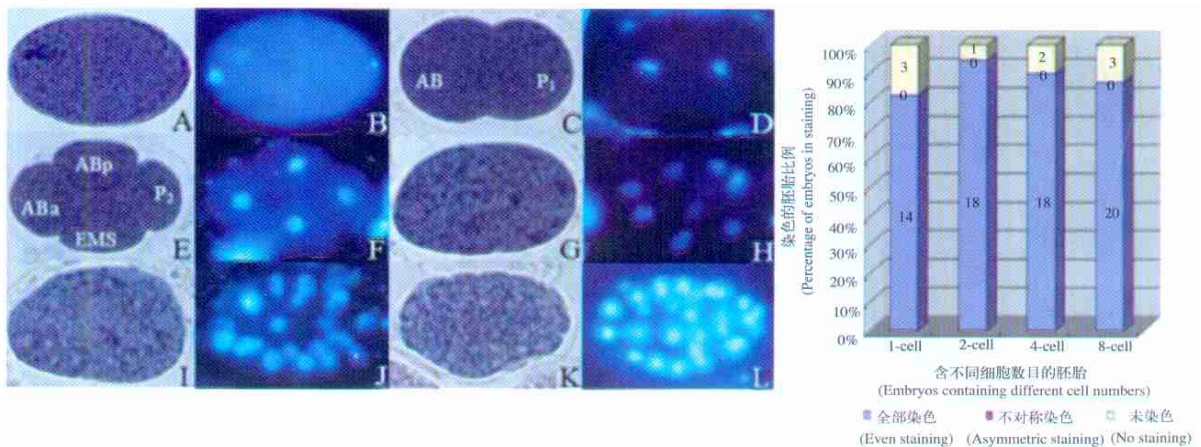


图 7 A. *pal-1* mRNA 在 *mex-5* (*zu199*) / *mex-6* (*pk440*) 早期胚胎中的分布; B. *mex-5* (*zu199*) / *mex-6* (*pk440*) 早期胚胎染色统计图

图中的 AB、P1、ABa、ABp、EMS 和 P2 分别为 AB 细胞、P1 细胞、ABa 细胞、ABp 细胞、EMS 细胞、P2 细胞的缩写。

Fig. 7 A. Distribution of *pal-1* mRNA in the early embryo of *mex-5* (*zu199*) / *mex-6* (*pk440*) mutant; B. Statistics of *mex-5* (*zu199*) / *mex-6* (*pk440*) embryo staining

AB, P1, ABa, ABp, EMS and P2 is the short name of the ABcell, P1cell, ABa cell, ABp cell, EMS and P2 cell.

小不同的卵裂球，但染色没有太大差别（图 5A：C、D）。4 细胞胚胎仍是很均匀的染色（图 5A：E、F），8 细胞胚胎（图 5A：G、H）、16 细胞胚胎（图 5A：I、J）和 16 细胞以上的胚胎（图 5A：K、L）染色都很浅且均匀，说明 *par-4* 对 *pal-1* mRNA 的分布有一定影响，*par-4* 突变使 *pal-1* mRNA 在 4 细胞胚胎的不对称分布丧失，统计结果如图 5B 所示。

2.6 *pal-1* mRNA 在 *spn-4* (*or80*) 早期胚胎中的分布

spn-4 (*or80*) 突变体的单细胞胚胎也被染上颜色，细胞前后端的颜色相差不大（图 6A：A、B），2 细胞胚胎 AB 和 P1 卵裂球也都染上颜色（图 6A：C、D），4 细胞胚胎的 4 个卵裂球中都能检测到 *pal-1* mRNA（图 6A：E、F），但后端的卵裂球 P2 和 EMS 的染色较深一些；8 细胞（图 6A：G、H）、16 细胞（图 6A：I、J）和 16 细胞以上的胚胎（图 6A：K、L）也都染上了颜色，没有明显的不对称分布情况出现。统计结果如图 6B 所示。

在 *spn-4* 突变体中，*pal-1* mRNA 的分布与野

生型的不完全相同,说明 *spn-4* 也能在较早时期调控 *pal-1*mRNA 的分布与表达。

2.7 *pal-1* mRNA 在 *mex-5* (*zu199*) / *mex-6* (*pk440*) 早期胚胎中的分布

mex-5 (*zu199*) / *mex-6* (*pk440*) 突变体的单细胞胚胎也普遍染上了很深的颜色 (图 7A: A、B), 与野生型不同的是所检测到的 *pal-1*mRNA 的分布没有不对称性; 2 细胞胚胎的 AB 和 P₁ 卵裂球中也能检测到 *pal-1*mRNA, 无明显差异 (图 7A: C、D); 4 细胞胚胎 4 个卵裂球都染上颜色 (图 7A: E、F), 没有明显差异。8 细胞 (图 7A: G、H)、16 细胞 (图 7A: I、J) 和 16 细胞以上胚胎 (图 7A: K、L) 也都染上颜色, 无明显不对称分布出现。染色统计结果如图 7B 所示。*mex-5/mex-6* 突变体与野生型 *pal-1*mRNA 分布差异说明, *mex-5* 和 *mex-6* 也参与到 *pal-1*mRNA 分布调控中, 从而抑制 PAL-1 的表达。

3 讨 论

是何种机制造成 PAL-1 蛋白在空间和时序发生不对称分布? 目前国外报道发现 PAL-1 蛋白的空间和时序分布依赖于 MEX-3 蛋白的表达 (Bowerman, 1998)。MEX-3 的分布和活性依赖于 *par* 基因的活性。在 *par-1*, *par-4* 和 *par-3* 突变体 4 细胞胚胎中, MEX-3 在所有细胞高水平的表达 (Bowerman et al., 1997)。同时 MEX-3 蛋白的分布也依赖于其它一些基因的调控, 如 *mex-5*、*mex-6* 和 *spn-4* 等, 它们通过影响 MEX-3 的表达从而影响 PAL-1 的表达。

目前已知 PAL-1 蛋白和 MEX-3 蛋白在野生型和 *par*, *mex-5*, *mex-6* 以及 *spn-4* 基因突变体中的分布情况。通过原位杂交检测这些突变体中 *pal-1*mRNA 的分布情况, 与已报道的 PAL-1 蛋白分布 (Bowerman et al., 1997; Huang et al., 2002) 进行对照, 可了解这些调控 *pal-1* 表达的基因是如何在 mRNA 水平起作用的。本实验结果与 PAL-1 蛋白分布对比可知: *pal-1*mRNA 在野生型单细胞胚胎就已开始逐渐失去均一分布状态, 而此时 PAL-1 蛋白由于受到某种抑制还未表达。2 细胞胚胎 *pal-1*mRNA 逐步向后端富集; 4 细胞胚胎 PAL-1 蛋白开始表达, 仅在后两个卵裂球细胞核中才能检测到, 我们在胚胎前端也能检测到 *pal-1*mRNA 的存在, 说明 PAL-1 的不对称分布还不完全是由母性 *pal-1*mRNA 的分布来决定的, 还有其

它因子在前端抑制 *pal-1*mRNA 的翻译。

在 *par-1* 突变体 4 细胞胚胎中可以发现, *pal-1*mRNA 在所有卵裂球中都能检测到, 而 4 个卵裂球中都没有 PAL-1 蛋白的表达。说明 *par-1* 对 *pal-1* 的调控是发生在翻译水平, 通过抑制 *pal-1*mRNA 的翻译来抑制蛋白表达。

在 *par-2* 突变体的早期胚胎中, *pal-1*mRNA 的分布在单细胞和 2 细胞胚胎中没有明显的不对称分布形式, 在 4 细胞胚胎中与野生型一样, 且 PAL-1 蛋白的分布也与 *pal-1*mRNA 一致。同时 *pal-1*mRNA 和蛋白的分布在 4 细胞胚胎中与野生型完全一样。说明 *par-2* 对 PAL-1 表达调控影响不大, 可能没有作用。

在 *par-3* 突变体早期胚胎中, 所有的卵裂球都能检测到 *pal-1*mRNA 的分布, *pal-1*mRNA 也失去了不对称性。但 PAL-1 蛋白有多种表达模式, 可检测到分布在 4 个卵裂球或 4 个卵裂球都没有及仅后两个卵裂球存在 (Draper et al., 1996; Bowerman et al., 1997)。这说明除了 *par* 基因和 MEX-3 外, 可能还有一些基因控制着 *pal-1* 的表达。近年国外也报道 PAR-3 可能与 PAR-6 和 PKC-3 形成 PAR-3/ PAR-6/ PKC-3 的复合体 (Kay and Hunter, 2001; Monica et al., 2001), 而 CDC-42 可能与 PAR-6 相互作用来激活复合体 (Monica et al., 2001; Peterson et al., 2004), 因此 *par-3* 对 PAL-1 蛋白的表达调控较为复杂, 可能这些蛋白都参与其中。

在 *par-4* 突变体的早期胚胎中, 检测结果与 *par-1* 突变体类似。*pal-1*mRNA 在四细胞胚胎的所有卵裂球中都存在, 但 PAL-1 蛋白在 4 个卵裂球中都不表达 (Bowerman, 1998)。由于 *par-4* 的缺失, 造成 MEX-3 在所有卵裂球中都存在 (Bowerman et al., 1997)。可能由于 MEX-3 抑制, 尽管 *pal-1*mRNA 在 *par-4* 突变体 4 细胞胚胎中到处存在, PAL-1 也不能在任一卵裂球中表达。

在 *spn-4* 突变体的早期胚胎中, *pal-1*mRNA 的分布并没有完全丧失不对称性, 尤其 4 细胞胚胎中, 后两个卵裂球中 *pal-1*mRNA 分布较多, 且能够表达出 PAL-1 蛋白, 前端也有较弱的表达。

在 *mex-5/mex-6* 突变体早期胚胎的所有卵裂球中都能检测到 *pal-1*mRNA 的分布。推测 *mex-5* 和 *mex-6* 可能是保护胚胎前端分布的 MEX-3 不被降解, 缺失会破坏 MEX-3 的不对称分布且减少 MEX-3 对 *pal-1* 的抑制。因此 *pal-1*mRNA 在胚胎

中的分布是均匀的,且在4细胞的所有卵裂球中都能够表达 PAL-1 蛋白。

通过对母源性 *pal-1*mRNA 在野生型和 *par-1*、*par-2*、*par-3*、*par-4* 基因, *mex-5/mex-6* 以及 *spn-4* 基因突变体早期胚胎中分布变化的检测,表明 *par-1*、*par-3*、*par-4* 基因, *mex-5/mex-6* 以及 *spn-4* 基因能够影响 *pal-1* 的表达调控,且这种调控是作用在 *pal-1*mRNA 上的。由于这些基因的作用使得 *pal-1*mRNA 在某些卵裂球中受到抑制,从而影响了 PAL-1 的表达。进一步探讨相关基因的 mRNA 和表达产物在各种突变体中的分布变化以及 *pal-1*mRNA 的 3' UTR 在翻译调控中所起的作用,可以为揭示 *pal-1* 基因的表达调控和胚胎极性信息的传导方式提供重要的依据。

参考文献 (References)

- Bowerman B, 1998. Maternal control of pattern formation in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Curr. Top. Dev. Biol.* 39: 73 - 117.
- Bowerman B, Ingram M, Hunter CP, 1997. The maternal *par* genes and the segregation of cell fate specification activities in early *C. elegans* embryos. *Development* 124: 3 815 - 3 826.
- Boyd L, Guo S, Levitan D, Stinchcomb DT, Kempfues KJ, 1996. PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in *C. elegans* embryos. *Dev.* 122: 3 075 - 3 084.
- Draper BW, Mello CC, Bowerman B, Hardin J, Priess JR, 1996. MEX-3 is a KH domain protein that regulates blastomere identity in early *C. elegans* embryos. *Cell* 87: 205 - 216.
- Etemad-Moghadam B, Guo S, Kempfues KJ, 1995. Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans*. *Cell* 83: 743 - 752.
- Geraldine S, Andrew F, 1995. Whole-mount *in situ* hybridization for the detection of RNA in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Methods in Cell Biology* 48: 323 - 337.
- Goldstein B, Hird SN, 1996. Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 122: 1 467 - 1 474.
- Guo S, Kempfues KJ, 1995. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/ Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81: 611 - 620.
- Huang NN, Mootz DE, Walhout AJ, Vidal M, Hunter CP, 2002. MEX-3 interacting proteins link cell polarity to asymmetric gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 129: 747 - 759.
- Hunter CP, Kenyon C, 1996. Spatial and temporal controls target *pal-1* blastomere-specification activity to a single blastomere lineage in *C. elegans* embryos. *Cell* 87: 217 - 226.
- Kay AJ, Hunter CP, 2001. CDC-42 regulates PAR protein localization and function to control cellular and embryonic polarity in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 11: 474 - 481.
- Levitan DJ, Boyd L, Mello CC, Kempfues KJ, Stinchcomb DT, 1994. *par-2*, a gene required for blastomere asymmetry in *Caenorhabditis elegans*, encodes zinc-finger and ATP-binding motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 6 108 - 6 112.
- Monica G, Abraham MC, Julie A, 2001. CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 11: 482 - 488.
- Morton DG, Roos JM, Kempfues KJ, 1992. *par-4*, a gene required for cytoplasmic localization and determination of specific cell types in *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. *Genetics* 130: 771 - 790.
- Peterson FC, Penkert RR, Volkman BF, Prehoda KE, 2004. Cdc42 regulates the *par-6* PDZ domain through an allosteric CRIB-PDZ Transition. *Molecular Cell* 13: 665 - 676.
- Yang YR, 2003. The distribution of *mex-3* mRNA in *C. elegans* wild type embryos via *in situ* hybridization. *Journal of Xiamen University (Natural Science)* 42 (5): 665 - 670 (In Chinese).
- 杨玉荣, 2003. 原位杂交检测 *mex-3*mRNA 在 *C. elegans* 野生型胚胎发育中的分布. *厦门大学学报 (自然科学版)* 42 (5): 665 - 670.