

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 20060153293

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

文昌鱼神经胚差减文库构建和两个胚胎发育
相关基因的表达研究

Construction of cDNA subtracted library of amphioxus neurula
and expression analysis of two genes related to
embryo development

刘 晓 慧

指导教师姓名: 王 义 权 教 授

专 业 名 称: 动 物 学

论文提交日期: 2009 年 9 月

论文答辩日期: 2010 年 5 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: 陈良标

评 阅 人: _____

2010 年 6 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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

中文摘要	1
英文摘要	3
第一章 文献综述	5
一 文昌鱼概述	5
1 文昌鱼形态结构	5
2 文昌鱼的胚胎发育	5
3 文昌鱼的性别分化和性腺发育	6
二 文昌鱼-研究脊椎动物发育机制的模式动物	7
1 脊索动物早期胚胎发育研究的模型	8
2 脑和神经系统发育的研究模型	9
3 神经嵴和咽的发育	10
4 体节分节的模式	11
5 脊椎动物尾芽研究的模型	12
6 鉴定保守调控元件的模型	13
三 抑制性差减杂交技术	14
1 抑制性差减杂交技术的原理及优缺点	14
2 抑制性差减杂交技术的应用	16
四 脂肪酸结合蛋白 (FABP) 的研究进展	17
1 <i>FABP</i> 基因家族概述	17
2 <i>FABP</i> 基因的表达及功能	18
3 文昌鱼中 <i>FABP</i> 基因的研究	20
五 论文的选题和目的	21
参考文献	22
第二章 文昌鱼神经胚差减 cDNA 文库的构建	32
一 材料与方法	32
1 材料	32
2 方法	33

二 结果	50
1 神经胚差减 cDNA 文库的构建和测序分析.....	50
2 实时荧光定量 PCR 验证基因的差异表达.....	57
三 讨论	59
1 神经胚差减 cDNA 文库.....	59
2 已知基因的分析.....	60
3 未鉴定基因.....	61
参考文献	62
第三章 文昌鱼 FABP 基因的克隆和表达分析	65
一 材料与方法	66
1 材料.....	66
2 方法.....	66
二 结果	74
1 <i>AmphiFABP</i> 基因的克隆和同源性分析.....	74
2 <i>AmphiFABP</i> 基因的表达.....	77
三 讨论	80
参考文献	82
第四章 文昌鱼 N57 基因的克隆和表达分析	85
一 材料与方法	86
1 材料.....	86
2 方法.....	86
二 结果	89
1 N57 基因的克隆.....	89
2 N57 基因的同源性分析.....	89
3 N57 基因的表达分析.....	99
三 讨论	101
参考文献	103
第五章 文昌鱼性腺差减 cDNA 文库的构建	104
一 材料与方法	104

1 材料	104
2 方法	105
二 结果	105
1 性腺差减 cDNA 文库的构建和测序分析	105
2 实时荧光定量 PCR 验证基因的差异表达	111
三 讨论	113
参考文献	116
总结与展望	118
博士期间发表论文	120
致谢	121

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract in English.....	3
Chapter 1 Intrduction	5
1 Summary of amphioxus.....	5
2 Amphioxus-a model for studying developmental mechanisms.....	7
3 Subtractive suppression hybridization (SSH) technology	14
4 Progress in the study of fatty acid binding proteins	17
5 Goal of our research	21
Reference	22
Chapter 2 Construction of subtractive cDNA library of the neurula	32
1 Materials and methods.....	32
2 Results	50
3 Discussion.....	59
Reference	62
Chapter 3 Spationtemporal expression patterns of <i>AmphiFABP</i>.....	65
1 Materials and methods.....	66
2 Results	74
3 Discussion.....	80
Reference	82
Chapter 4 Spationtemporal expression patterns of <i>AmphiN57</i>.....	85
1 Materials and methods.....	86
2 Results	89
3 Discussion.....	101
Reference	103
Chapter 5 Construction of subtractive cDNA library of the gonad	104
1 Materials and methods.....	104

2 Results	105
3 Discussion.....	113
Reference.....	116
Conclusion	118
Publications	120
Acknowledgements	121

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学博硕士学位论文摘要库

文昌鱼神经胚差减文库的构建和两个胚胎发育相关 基因的表达研究

摘 要

文昌鱼在进化上占据重要的地位，它身体构造简单，皮肤和胚胎透明，肉眼即可观察到内部的发育情况，而且它基本躯体构成与脊椎动物相同，因此一直以来都是脊椎动物起源进化和发育机制研究的理想的模式动物。在文昌鱼胚胎发育的过程中，神经胚是一个非常关键的时期，涉及到许多重要器官的形成和组织分化，尤其是神经管的形成和体节的出现。

为了筛选在这一胚胎发育阶段中起到重要调控作用的基因，我们应用抑制性差减杂交技术构建了白氏文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*) 神经胚差减文库，测序得到的204个EST序列去掉重复序列后进行拼接，得到了82个单独的拼接体。序列比对分析发现82个拼接体中56%与其它物种中的已知基因同源，其余的44%与已知基因没有明显的相似性，将其暂定为未鉴定基因。用RTqPCR对这些基因在原肠胚和神经胚中的差异表达进行验证，结果显示70%在神经胚阶段呈现高表达。进一步对未鉴定基因进行详细的序列分析，发现其中3个在佛罗里达文昌鱼中存在同源基因，但在其它物种中未发现有同源基因存在，因此认为它们是文昌鱼特有的基因。对这些特有基因进行深入的研究将会为文昌鱼神经胚发育的研究工作提供更多有价值的资料。

在神经胚差减文库中，我们筛选到了一个脊椎动物FABP基因的同源基因-*AmphiFABP*，进一步应用RACE PCR扩增了该基因的cDNA全序列，并对其在不同发育时期胚胎中的表达情况进行了研究，以期弄清其与脊椎动物FABP基因家族的关系。系统进化分析表明，该基因是脊椎动物中6个FABP家族成员 (*H-FABP*、*B-FABP*、*E-FABP*、*M-FABP*、*A-FABP*和*T-FABP*) 共同的祖先基因。RTqPCR和原位杂交分析结果表明，在文昌鱼神经胚早期，*AmphiFABP*基因的表达量远高于其它时期，其表达部位主要集中在背部的神经外胚层和体节中，说明*AmphiFABP*基因与文昌鱼的神经管形成和体节出现相关。

此外，我们还扩增了神经胚差减库中发现的文昌鱼*AmphiN57*基因的全长cDNA，佛罗里达文昌鱼基因组的搜索结果显示，除*AmphiN57*外，文昌鱼中还有另外两个与*AmphiN57*高度相似的基因*Bf N57L*和*Bf N57L2*，以上三种基因的蛋白都含有2个EF-hand (EFh) 结构域，属于EFh钙结合蛋白超家族的成员。同源性分析发现，其它

物种中不存在*AmphiN57*等三种基因的直系同源基因，只有NCS蛋白家族某些成员的EFh结构域与*AmphiN57*等三种蛋白有较低的相似性（小于20%），结合序列比对和系统进化树的结果，推测以上三个基因由NCS家族成员倍增后特化形成，它们共同组成NCS基因家族在文昌鱼中特有的一个亚家族。时空表达分析发现，*AmphiN57*基因特异的在原肠胚和神经胚阶段表达，神经胚阶段其表达量急剧增加，且在中胚层、内胚层和神经外胚层都有表达，由此推测该基因可能对胚胎发育过程中的神经系统形成和胚层分化具有重要的调控作用。

本研究还以日本文昌鱼(*Branchiostoma japonicum*) 性腺cDNA为材料构建了文昌鱼雌雄性腺的差减cDNA文库。正向差减杂交以卵巢为试验方、精巢为驱动方，反向差减杂交以精巢为试验方、卵巢为驱动方，最后获得的正、反向差减文库分别含459、243个重组子。PCR扩增鉴定正、反向差减cDNA文库的插入片段，其中90%左右的克隆皆能扩增出有效产物，插入片段范围为200-600 bp，符合差减文库PCR产物片段的大小。随机选取30个阳性克隆测序分析，得到26个有效基因片段，进一步从中选取16个序列，用RTqPCR对文库质量进行验证，结果表明所建文库能够达到富集雌雄性腺差异表达基因的目的。文昌鱼性腺差减文库的构建，为进一步分离、鉴定性腺分化和发育相关基因奠定了基础。

关键词：文昌鱼；胚胎发育；差减文库；*AmphiFAPB*基因；*AmphiN57*基因

Construction of cDNA subtracted library of amphioxus neurula and expression analysis of two genes related to embryo development

Abstract

Amphioxus is an ideal model organism for understanding the origin and developmental mechanism of vertebrates, because its evolutionary position is very important and the body plan is similar to that of vertebrates. During the developmental stages of amphioxus embryos, neurula is very important considering the formation of neural tube and the emergence of somites.

In order to isolate genes concerning this crucial stage at the embryonic developmental processes, we constructed a neurula cDNA subtracted library for amphioxus *Branchiostoma belcheri*, and identified 204 ESTs composing of 82 single contigs. Comparative analysis revealed that 55% of those single contigs were homologous to various known genes in other organisms, whereas 44% of them, unidentified contigs, had no significant similarity to known genes. Real-time quantitative PCR (RTqPCR) analysis showed that 70% of the single contigs were validated to be up-regulated in the neurula. Besides, we also analyzed several unidentified contigs in detail and found three novel genes in amphioxus. Thus, we believe more deep investigations on those unidentified contigs will disclose more valuable data related to the neurular development of amphioxus.

We isolated fatty acid binding protein gene (*AmphiFABP*) from the subtracted library and sequenced its full-length cDNA via RACE method. The result of phylogenetic analysis showed that *AmphiFABP* is the ancestral gene of 6 FABP genes in vertebrates. RTqPCR and in situ hybridization analyses indicated that *AmphiFABP* is highly up-regulated on neural plate and somites, indicating that it is involved in the development of neural tube and somite at neurula stage.

Furthermore, we amplified the full-length of *AmphiN57* screened from the neurula cDNA subtracted library. Comparative analysis showed that there are 2 *AmphiN57-like* genes (*Bf N57L* and *Bf N57L2*) in addition to the *AmphiN57* in *Branchiostoma floridae*

genome. Being of containing two EF-hand (EFh) motifs in those deduced proteins, we considered them as members of EFh superfamily. Homology analysis of *AmphiN57s* detected no orthologous in other species, and just revealed little similarity between those newly identified genes and the NCS family members in their EFh motifs. Therefore, we presumed that *AmphiN57* and *AmphiN57-like* genes may be formed by duplication and specialization of NCS family members, they constitute a new subfamily, which only occurs in amphioxus. Temporal and spatial expression showed that *AmphiN57* gene especially expressed in gastrula and neurula during the embryo development. At neurula stage, *AmphiN57* is highly up-regulated and it expressed in the mesoblast, hypoblast and neural ectoderm. These results indicated that *AmphiN57* may play important roles in the formation of neural tube and the differentiation of layers.

In addition to above researches, we also constructed two subtracted cDNA libraries for gonads. cDNA from ovary was adopted as tester for the construction of a forward library, and then as a driver for the reverse library construction. Two directional subtracted cDNA fragments were inserted into plasmid vectors, and subsequently the vectors were transferred into *E1coli* DH5 α . As a result, forward and backward subtracted cDNA libraries containing 459 and 243 clones respectively, were obtained and subjected to PCR analysis. Results confirmed that about 90% of the clones contained inserts of 200-600 bp in the two libraries, in accord with our prediction. Thirty of the positive clones were selected and sequenced randomly, and, of those sequenced clones, twenty six gene fragments were obtained. Then, sixteen sequenced genes were further analyzed via RTqPCR. The results indicated that these genes were expressed differently between male and female gonads. The subtractive cDNA libraries of amphioxus gonads provide a foundation for further studies of the genes related to sexual differentiation and gonadal development.

Key words: Amphioxus; embryo development; subtracted library; *AmphiFABP* gene; *AmphiN57* gene

第一章 文献综述

一. 文昌鱼概述

文昌鱼 (amphioxus 或 lancelets) 隶属脊椎动物门 (Phylum Chordata) 头索动物 (Cephalochordata), 其身体构造简单, 兼具无脊椎和脊椎动物的部分特征, 是无脊椎动物进化到脊椎动物过程中的一个重要的过渡类群^[1]。文昌鱼与无脊椎动物 (如棘皮动物) 的相似之处为: 表皮为单层上皮, 其外有角质层; 结缔组织不发达; 胚胎有纤毛; 许多器官有分节等。同时, 其与脊椎动物有更多的共同特征: 两者都有脊索和背神经管; 成体和胚胎均有鳃裂和肌节; 胚胎发生时期还有神经管和消化道相通的神神经肠管等特点^[2]。随着分子生物学技术的不断发展和应用, 文昌鱼的研究工作已取得了很大进展, 佛罗里达文昌鱼 (*Branchiostoma floridae*) 基因组测序工作的完成, 为研究脊椎动物重要调控因子的同源基因提供了重要的基础资料, 为研究文昌鱼发育和调控机制奠定了良好的基础。

1. 文昌鱼的形态结构

我国常见的文昌鱼属白氏文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*) 和日本文昌鱼 (*Branchiostoma japonicum*) 两种, 主要分布在青岛、厦门等地^[3]。文昌鱼的体形类似小鱼, 无明显的头部分化, 全身半透明, 身体细长而左右侧扁。文昌鱼尚未形成骨质的骨骼, 主要以纵贯全身的脊索作为支持身体的中轴支架, 因其脊索终生维持并直通到头部前端, 因此称为头索动物。文昌鱼具有肌肉系统、呼吸系统、消化系统、排泄系统、生殖系统和神经系统。肌肉主要是横纹肌, 背部的肌肉厚实而腹部比较单薄; 咽腔是文昌鱼完成呼吸作用的部位, 咽壁两侧具脊索动物的主要特征一咽鳃裂; 消化系统简单, 仅有咽、肠和肝盲囊; 排泄系统由排泄乳突, 褐色漏斗, 头部哈氏肾管和原肾组成; 生殖腺位于体腔里, 成熟的卵巢呈黄色, 精巢呈乳白色; 文昌鱼的中枢神经系统由背部中空的神经管构成, 在其前段第一和第二体节处略微膨大成脑泡^[4]。

2. 文昌鱼的胚胎发育

早在 18 世纪, 就有许多学者对各地文昌鱼的发育进行了大量细致的研究, 其中 Conklin^[5]的精细研究, 使我们对文昌鱼的胚胎发育有了较为全面和正确的了解。Conklin 发现文昌鱼卵子的构造与海鞘卵子相同, 有 5 种器官形成物质, 即外胚层、中胚层、内胚层、神经和脊索形成物质, 而且这 5 种物质的分布区域也与海鞘卵子一

样。上世纪 50-60 年代，我国的童第周先生所进行的一系列研究工作，使我们对文昌鱼的胚胎发育有了进一步的认识^[6, 7]。

文昌鱼是体外受精、体外发育且胚胎透明，因此能很好的观察其胚胎发育的过程。文昌鱼排出的成熟卵子处于第二次减数分裂中期，卵子受精后，卵母细胞完成第二次减数分裂，放出第二极体^[8, 9]。精子进入卵后向动物极移动，两个原核在赤道面上相遇融合，开始进行卵裂。经八次分裂后，囊胚完全形成。原肠作用开始时，囊胚的植物极变为扁平，之后整个植物极内陷，但背腹唇不容易分辨。随着胚胎的发育，内陷的细胞层逐渐排挤囊胚腔而与动物极细胞靠近，形成双层壁的杯状结构，外面一层为神经系统和表皮层，里面一层为脊索、中胚层和内胚层，三者围成的腔即为原肠腔，与外界相通的孔为胚孔^[10, 11]。

神经胚期是文昌鱼发育的一个关键阶段，这个时期涉及到许多重要器官的形成和中胚层的分节。首先是原肠胚背部变平坦，形成背神经板，它将形成整个神经系统。之后从胚胎的后端开始向前在神经板的两侧出现两条纵褶，即神经褶。它们向上向中央在背中线上合并形成神经管，此时神经板与表皮层脱离，表皮层向上伸展，从后向前合拢，结果表皮层盖在神经管背面并连成一片。当神经板开始形成神经管时，原肠背壁的两侧中胚层带开始与脊索板及内胚层分离，同时这条中胚层带分节，每节由许多方形细胞组成，此即中胚层分节（图 1-1）。脊索板进而与两侧相连的内胚层细胞脱离而形成一实体的棒状脊索^[12, 13]。

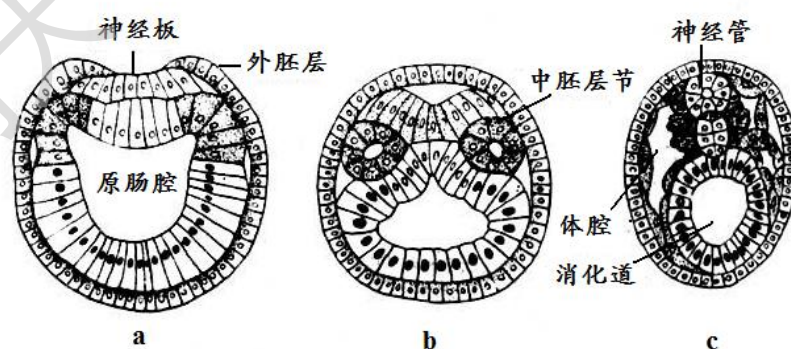


图 1-1 文昌鱼胚胎器官原基的形成（横切面）^[12]

Fig. 1-1 The formation of organ primordium of amphioxus embryo

3. 文昌鱼的性别分化和性腺发育

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 for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库