

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620121152455

UDC _____

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

文昌鱼胚胎发育中 *Hedgehog* 基因功能分析
及相关基因突变体构建

Functional analysis of *Hedgehog* gene in amphioxus
embryogenesis and mutants construction related to the
Hedgehog signaling pathway

王 慧

指导教师姓名: 王义权教授

专业名称: 遗传学

论文提交日期: 2015年4月

论文答辩日期: 2015年5月

学位授予日期: 2015年6月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015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

摘 要	1
Abstract	3
第一章 前言	5
一 文昌鱼——进化发育研究中的重要动物	5
二 Hedgehog 基因及其信号通路简介	6
三 论文的选题和目的	7
第二章 文昌鱼 <i>Hedgehog</i> 基因敲低和过表达研究	8
一 材料与方法	8
1 实验用动物	8
2 siRNA 的设计与合成	8
3 mRNA 合成	9
4 胚胎显微注射	9
5 <i>Hh</i> 、 <i>Ptch</i> 和 <i>Gli</i> 基因实时荧光定量 PCR 检测	10
6 探针的合成与纯化	11
7 <i>Hh</i> 和 <i>Ptch</i> 基因整胚原位杂交检测	12
8 神经胚中期胚胎组织学观察	14
二 结果	16
1 实时荧光定量 PCR (RTqPCR) 检测基因敲低的效率	16
2 原位杂交和石蜡切片检测敲低作用对胚胎的影响	17
3 过表达 <i>Hh</i> 基因后相关靶基因表达水平的检测	19
4 过表达后胚胎的形态学观察	21
5 过表达后胚胎存活率和正常发育率统计	23
三 讨论	25
1 敲低 <i>Hedgehog</i> 基因后未见表型变化的原因分析	25
2 过表达 <i>Hedgehog</i> 基因可导致幼体眼点过度发育	26
第三章 文昌鱼 <i>Hedgehog</i> 基因敲除和突变体表型分析	27
一 材料与方法	27
1 实验用动物	27
2 TALEN 靶位点选取与 TALEN 质粒构建	27
3 TALEN 突变效率检测	28
4 TALEN 突变体筛选	28

二 结果	29
1 TALEN 突变效率检测结果.....	29
2 F ₀ 代成体所产配子的筛选结果.....	30
3 F ₁ 代亚成体逐尾检测结果.....	31
4 F ₂ 代纯合突变体鉴定.....	32
5 纯合突变体表型分析.....	34
三 讨论	36
1 文昌鱼中 TALEN 造成的突变能够成功遗传.....	36
2 <i>Hh</i> 基因突变后对文昌鱼胚胎发育的影响.....	37
第四章 Hedgehog 信号通路中其它相关基因突变体的构建	38
一 材料与方法	38
1 实验用动物.....	38
2 TALENs 靶位点选取与 TALENs 质粒构建.....	38
3 TALENs 突变效率检测.....	39
4 TALENs 突变体筛选.....	40
二 结果	40
1 文昌鱼 <i>SuFu</i> 、 <i>Ptch</i> 、 <i>Kif3a</i> 、 <i>Fu</i> 和 <i>Ift88</i> 基因突变效率检测.....	40
2 F ₀ 代成体所产配子的筛选结果.....	41
3 <i>SuFu</i> F ₁ 代亚成体逐尾检测.....	44
4 <i>SuFu</i> F ₂ 代纯合突变体鉴定.....	45
三 讨论	47
1 TALENs 在文昌鱼不同基因位点的编辑效率存在差异.....	47
2 文昌鱼 <i>SuFu</i> 基因同脊椎动物在 Hh 信号转导中是负调节因子.....	48
总结与展望	49
参考文献	51
致 谢	54

Contents

Abstract in Chinese.....	1
Abstract in English.....	3
Chapter 1 Introduction.....	5
1 Amphioxus—an important animal in developmental biology.....	5
2 A brief introduction of Hedgehog gene and Hedgehog pathway.....	6
3 Goal of our research.....	7
Chapter 2 Analysis of the function of <i>Hedgehog</i> gene using knockdown and over-expression methods.....	8
1 Materials and Methods.....	8
2 Results.....	16
3 Discussion.....	25
Chapter 3 Knockout of <i>Hedgehog</i> gene and analysis of mutants’ phenotype.....	27
1 Materials and Methods.....	27
2 Results.....	29
3 Discussion.....	36
Chapter 4 Mutants construction related to the Hedgehog signaling pathway.....	38
1 Materials and Methods.....	38
2 Results.....	40
3 Discussion.....	47
Summary and prospects.....	49
Reference.....	51
Acknowledgement.....	54

厦门大学博硕士学位论文摘要库

文昌鱼胚胎发育中 Hedgehog 基因功能分析及相关基因突变体构建

摘要

Hedgehog (*Hh*) 基因在动物胚胎发育过程中有着重要的作用, 该基因最早在果蝇中发现, 参与果蝇分节极性 (segment polarity) 的形成及翅原基前后组织中心的建立; 在海胆中, 参与中胚层的分化; 而在脊椎动物中, 该基因主要参与中枢神经系统 (CNS)、轴旁中胚层及附肢的发育。在头索动物文昌鱼中, 前人基于 *Hh* 的表达谱分析, 推测该基因参与神经管的发育及左右轴的建立, 提出 *Hh* 对神经管腹侧神经元分化的作用可能是一原始特征。

本文用基因敲低、过表达和敲除 3 种方法对文昌鱼 *Hh* 基因在胚胎发育中的功能做了进一步研究。在敲低实验中, 注射小干扰 RNA 可显著降低 *Hh* 基因的表达, 但没有观察到胚胎发育有何异常, *Hh* 信号通路存在负反馈调节, 这种调节可能使细胞缓冲了 *Hh* 信号下调的影响, 另外, *Hh* 作为形态发生素能够通过多种方式起作用, 其中一种方式跟 *Hh* 信号作用的时间有关, 它不受限于 *Hh* 信号的浓度, 我们敲低 *Hh* 的表达至少对这种应答方式没有影响。在过表达实验中, 注射 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mRNA 可显著提高靶基因 *Ptch* 的表达水平, 胚胎生长至幼体中期出现了明显的畸形特征, 表现为口变大、眼点和尾鳍过度生长, 对胚胎存活率和正常发育率的统计结果显示, 过表达 *Hh* 不会导致胚胎死亡, 也不影响胚胎的早期发育, 在幼体中期, 90% 的幼体生长有过度发育的眼点, 脊椎动物的 *Shh* 参与眼的发育, 文昌鱼的眼点与脊椎动物的眼同源, 因此我们推测 *Hh* 对眼发育的影响可能是它的一种原始功能。

TALEN 技术是最近兴起的基因组编辑技术, 目前已成功应用于多个物种的基因组定点突变。本实验室成功在文昌鱼中建立了 TALEN 诱导的基因敲除技术, 本文即利用 TALEN 技术对 *Hh* 基因进行了敲除研究, 经过精心饲养与耐心筛选, 现已获得 *Hh* 基因的纯合突变体, 该纯合突变体在发育过程中出现了严重畸形, 包括无口、咽鳃区组织呈对称分布和尾部弯曲。其无口的特征与过表达 *Hh* 基因导致口变大的结果相反, 表明 *Hh* 是口正常发育所必须的, 但在 *Hh* 纯合突变体中, 没有观察到眼点及尾鳍出现与过表达对应的变化, 推测可能是过表达 *Hh* 基

因对这些部位的作用不是直接的。

本文还构建了 Hh 信号通路中另 5 个相关基因 (*SuFu*, *Fu*, *Ptch*, *Kif3a* 和 *Ift88*) 的突变体。目前, *SuFu* 基因已筛选到 F₂ 代并且已经鉴定出了纯合突变体, *SuFu* 纯合突变体表现出口变大、眼点和尾鳍过度生长的畸形特征, 与 *Hh* 过表达后的表型相似, 表明 *SuFu* 在 Hh 信号通路中是负调节因子。其它 4 个基因的 TALEN 突变体 F₁ 代尚未成熟, 还不能获得 F₂ 代。

关键词: 文昌鱼; 胚胎发育; *Hedgehog* 基因; 基因过表达; TALEN 基因敲除; 突变体

Functional analysis of *Hedgehog* gene in amphioxus embryogenesis and mutants construction related to the *Hedgehog* signaling pathway

Abstract

Hedgehog (*Hh*) gene first discovered in *Drosophila* is essential for embryogenesis and is involved in the establishment of segment polarity and A-P organizing center of the wing disc. It was shown to participate in organizing the mesoderm in sea urchin and pattern the central nervous system (CNS), paraxial mesoderm as well as limb in vertebrates. In cephalochordate, it took the roles in patterning the ventral neural tube and the development of the left/right axis based on the observation of *Hh* expression pattern in amphioxus embryos. Since the vertebrate *Shh*-type genes can specify a series of cell fates in ventral neural tube, the author suggested that the role of *Hh* in patterning the ventral neural tube was an ancestral feature.

In the present study, we detected the function of *Hh* in amphioxus embryogenesis using knockdown, over-expression and knockout methods. In knockdown experiments, the expression level of *Hh* was significantly down-regulated after siRNA injection, but the embryos developed naturally. It is known that Hh signaling pathway has negative feedback, which might moderate knockdown effects. In addition, as a morphogen Hh protein can specify cell fate in several different ways. One of these ways is that the duration of exposure to the signal determines cell fate. We knockdown the expression level of *Hh* at least have no influence on this responding pattern. In over-expression experiments, injecting of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mRNA considerably increased the expression level of *Ptch*, a target gene of *Hh*, indicating the effectiveness of mRNA. The embryos after injection developed abnormally at the mid-larva stage. The larva appeared over-developed mouth, frontal eye and caudal fin.

Statistical data show that no significant differences of survival ratio or normally developing were observed between the embryos injected with *Hh* mRNA and negative control. However, about 90% of larvae in experiment group had an over-developed frontal eye at mid-larva stage. Since the vertebrate *Shh* gene has a role in eye development and the frontal eye of amphioxus has been homologized to vertebrate eyes, we assume that the role of *Hh* in eye development may be its one of ancestral features.

The engineered nuclease TALEN is a newly developed genome editing tool. We used this method to generate *Hh* mutants of amphioxus for further study. After careful breeding and patient screening, we now successfully obtained *Hh* homozygous mutants. Embryos lacking *Hh* gene function have many defects, including lack of mouth, symmetric patterning in the pharyngeal region and curved tail. The feature of no mouth is in accordance with the result led by over-expression experiment. This indicates *Hh* is necessary for mouth development. However, the other features do not accord with over-expression results. We speculate *Hh* may function indirectly in these regions.

We also constructed mutants of other five genes (*SuFu*, *Fu*, *Ptch*, *Kif3a* and *Ifi88*) related to the hedgehog signaling pathway using TALEN method. At present, we have already obtained *SuFu* homozygous mutants. They had phenotypes (over-developed mouth, frontal eye and caudal fin) similar to that of embryos over-expressed with *Hh*. This indicates *SuFu* is an inhibitor. Embryos in F₁ generation carried mutations of the other four genes are immature for the moment.

Key words: amphioxus, embryogenesis, *Hedgehog* gene, over expression, TALEN knockout, mutant.

第一章 前言

一 文昌鱼——进化发育研究中的重要动物

脊索动物门 (Phylum Chordata) 是动物界最高等的一门, 现存的脊索动物约 41000 种, 分为 3 个亚门——尾索动物亚门 (Urochordata)、头索动物亚门 (Cephalochordata) 和脊椎动物亚门 (Vertebrata)^[1]。文昌鱼隶属于头索动物亚门, 是脊索动物门中最古老的一支, 介于无脊椎动物与脊椎动物之间^[2]。

文昌鱼的胚胎发育过程与脊椎动物相似, 历经囊胚、原肠胚、神经胚和幼体四个时期。25°室温下, 日本文昌鱼卵子在受精后 50-60 min 即开始发生第一次卵裂, 之后每隔 20 min 左右便发生一次卵裂, 文昌鱼的卵裂方式为完全卵裂, 并且是辐射状对称的^[3]。文昌鱼胚胎的桑葚胚期与囊胚期之间没有明显界限, 第八次卵裂产生 256 个细胞, 此时囊胚已完全形成, 之后的细胞分裂开始变的不同步^[4]。原肠作用开始时, 植物极预定内胚层细胞伸长, 形成扁平加厚的植物极板, 植物极变平坦是原肠作用开始的标志。之后, 植物极板向内弯曲内陷, 此时的原肠胚与两栖类的原肠胚不同, 背唇和腹唇很难分辨, Hirakow 和 Kajita 用扫描电镜也很难观察到区别^[5]。内陷的细胞层逐渐挤压囊胚腔, 与动物极细胞靠近, 最终形成一个由双层细胞构成的杯状结构, 外面一层为外胚层, 以后分化成表皮和神经系统; 里面一层为中内胚层, 包括了中胚层和内胚层, 以后分别分化为脊索、肌节和消化管^[3]。

文昌鱼躯体结构简单, 但有与脊椎动物相同的躯体构筑方式 (body plan), 是研究脊椎动物发育机制和器官起源的重要动物模型。文昌鱼具有咽鳃裂、脊索和背神经管等典型的脊椎动物特征, 但是, 它没有神经嵴以及头部成对的感觉器官^[6]。另外, 文昌鱼的基因组也比较简单, 其基因组大都只有单拷贝的基因, 并没有发生大规模的基因倍增事件^[7]。

近年来, 研究人员实现了白氏文昌鱼的全年产卵^[8]以及利用基因编辑工具 TALEN 实现了基因敲除^[9], 这为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。

二 Hedgehog 基因及其信号通路简介

Hedgehog 基因最早发现于 1980 年, 由德国女科学家 Nüsslein-Volhard 和美国科学家 Wieschaus 在大规模筛选影响果蝇胚胎躯体结构的基因时发现的^[10]。果蝇胚胎大约在受精后 24 小时孵出成为幼虫, 幼虫的腹侧表皮具有分节特征, 整个躯体共有 3 个胸部节段 (segment) 和 8 个腹部节段组成, 每个节段分两部分, 前端有齿状突起 (denticle), 并且大多数突起指向后端, 而后端则平整光滑没有突起, 节段与节段之间形态学上没有明显的区别, 以突起带的前端为边界线。他们在筛选突变体时, 发现 Hedgehog 基因突变后幼虫每个节段的后端缺失了, 这样整个幼虫腹侧看起来都是突起, 因此, 他们就把这个基因命名为 Hedgehog。

1992-1993 年间, Hedgehog (*Hh*) 基因由不同的学者首先从果蝇中克隆出来, 之后从其它物种中也陆续克隆得到其同源基因。在果蝇、海胆和文昌鱼中均有 1 个 *Hh*^[11, 12], 在海鞘中有 2 个^[13], 在脊椎动物鸡、小鼠、大鼠和人类中有 3 个^[14], 分别命名为 Sonic Hedgehog (*Shh*)、Indian Hedgehog (*Ihh*) 和 Desert Hedgehog (*Dhh*), 其中, *Shh* 和 *Ihh* 与果蝇的 *Hh* 演化关系最近, 斑马鱼中共有 5 个 *Hh* 同源基因^[15], 2 个 *Shh* 类基因: *Shh* 和 *Twihh* (tiggywinkle hedgehog), 3 个 *Ihh* 样基因: *Ihh*、*Ehh* (echidna hedgehog) 和 *Qhh* (qiqihar hedgehog)。

Hedgehog 家族蛋白是一类分泌型信号分子, 在动物胚胎发育过程中有着重要的作用。果蝇的 Hedgehog 蛋白参与分节极性(segmental polarity)的形成及翅原基前后组织中心的建立^[16]; 海胆的 Hedgehog 蛋白参与中胚层的分化^[17], 在海胆中, 如果破坏 Hedgehog 蛋白信号的传递, 那么所有中胚层来源的组织都会受到影响; 脊椎动物的 Sonic Hedgehog 蛋白参与中枢神经系统 (CNS)、轴旁中胚层以及附肢的发育, Indian Hedgehog 蛋白参与骨骼的发育^[14]。

Hedgehog 蛋白 (Hh) 以前体形式合成, 其 N 末端具有信号活性, 加工成熟的 Hh 蛋白才能分泌出去。Patched (Ptch) 是 Hh 的受体, 它是一个 12 次跨膜蛋白, 在没有 Hh 信号时, 它会抑制另外一个跨膜蛋白 Smo 的活性, Ptch 与 Hh 的结合会解除这种抑制。在受体细胞中, Cubitus interruptus (Ci) 是 Hh 信号的转录效应因子, 它可以与 Costal 2 (Cos2) 结合; Cos2 是一种微管结合蛋白, 它不但可以结合 Ci 而且还会募集 PKA、GSK、CK1、Fu 和 SuFu 这几种蛋白质, 从而形成一个复合体。在没有 Hh 信号时, Smo 也没有活性, 此时, 复合体上的激

酶就会把 Ci 蛋白磷酸化，磷酸化的 Ci 蛋白进而被蛋白酶体分解，结果产生一个具有抑制活性的 CiR，CiR 可以进入细胞核抑制靶基因的转录。在有 Hh 信号时，Ptc 解除对 Smo 的抑制，然后 Smo 被转移到细胞膜上，并且是以具有活性状态的形式存在，可以促进复合体的解离，使 Ci 从复合体中释放出来，但是 Ci 不能进入细胞核，SuFu 会结合 Ci 从而把它滞留在细胞质中，这种情况下，Hh 信号通路只有部分活性。在有高浓度 Hh 信号时，Fu 会把 SuFu 蛋白磷酸化，磷酸化的 SuFu 蛋白就不再结合 Ci 了，这时，Ci 可以自由进入细胞核，进而激活靶基因的转录^[18]（图 1-1）。

在脊椎动物中，Hh 信号的传递需要纤毛，Hh 结合 Ptc 以后，Smo 会被转运到纤毛膜上，位于纤毛膜上的 Smo 才有活性，如果纤毛结构出现异常，则 Hh 信号通路同样也无法激活^[18]，这是脊椎动物中 Hh 信号转导与无脊椎动物中 Hh 信号转导之间的最显著差异。

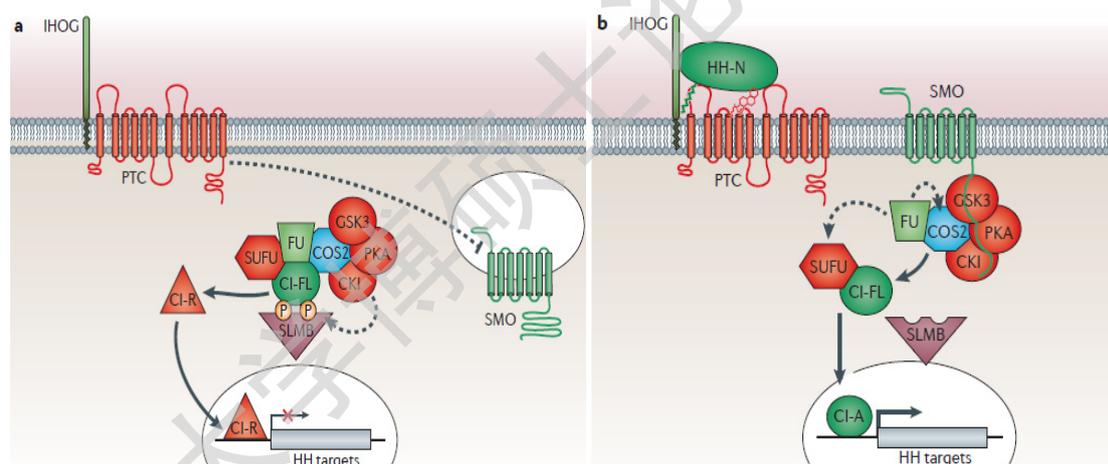


图 1-1 果蝇中 Hedgehog 信号的转导（引自 Ingham, 2011）

Fig.1-1 The Hedgehog signaling pathway in *Drosophila melanogaster* (From Ingham, 2011)

三 论文的选题和目的

Shh 在脊椎动物胚胎发育过程中具有重要作用，文昌鱼 *Hh* 在胚胎中的表达位置与脊椎动物相似^[11]，这提示文昌鱼中 *Hh* 的功能可能与脊椎动物 *Shh* 的功能有着某些共同之处。基于本实验室文昌鱼繁殖技术和显微注射技术的成熟^[8, 19]，本文用 siRNA 介导的敲低文昌鱼胚胎中 *Hh* 表达和注射体外合成的 mRNA 实现

该基因过表达的方法,研究 *Hh* 表达水平受到扰动下的文昌鱼胚胎发育所受影响,以此探讨文昌鱼 *Hh* 基因的功能。进而本文又用 TALEN 技术敲除文昌鱼 *Hh*, 构建文昌鱼 *Hh* 突变体,并对双突变文昌鱼胚胎的生长发育进行详观察,以探究该基因在文昌鱼早期胚胎发育中的功能。此外,本文还构建了 5 个 *Hedgehog* 信号通路中其它相关基因的突变体,为研究该信号通路的演化历程奠定基础。

第二章 文昌鱼 *Hedgehog* 基因敲低和过表达研究

在发育生物学研究中,研究基因功能常用的手段是基因敲低和过表达技术。小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 是 RNA 干扰的引发物,它能够激发与之互补的目标 mRNA 沉默^[20],本文利用 siRNA 来敲低 *Hedgehog* (*Hh*) 基因的表达,然后分析 *Hh* 表达水平下调后对胚胎的影响,进而推测 *Hh* 在胚胎发育过程中的功能。另外,我们还体外合成 *Hh* 的 mRNA 并将其注入文昌鱼成熟未受精卵中,进行过表达研究,分析 *Hh* 表达水平上调后对胚胎的影响。我们期望通过敲低和过表达这样一正一反转录水平的修饰来分析 *Hh* 的作用。

一 材料与方法

1 实验用动物

本章实验共用了 2 种文昌鱼:白氏文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*) 和佛罗里达文昌鱼 (*Branchiostoma floridae*),均为本实验室人工繁殖。敲低实验和过表达实验所用胚胎分别来自白氏文昌鱼和佛罗里达文昌鱼。

2 siRNA 的设计与合成

我们根据白氏文昌鱼 *Hh* 基因序列 (GenBank 登录号 AJ245882.2),设计合成了两个 siRNA,序列见表 2-1。

表 2-1 siRNA 序列

Table 2-1 Sequence of siRNA

名称	Sense (5' -3')	Antisense (5' -3')
<i>Hh</i> siRNA-1	CCAGUACGGUUCGACAUAAATT	UUAUGUCGAACCGUACUGGTT
<i>Hh</i> siRNA-2	GCGAAGUUCUGACGUUCAUTT	AUGAACGUCAGAACUUCGCTT

Hh siRNA-1 和 *Hh* siRNA-2 所针对的靶序列分别位于文昌鱼 *Hh* 基因的 5' UTR 区和 CDS 区。这些 siRNA 序列均由英潍捷基（上海）贸易有限公司合成，此外，我们还在该公司合成了一条由公司提供的通用的 control siRNA 作为阴性对照。购买来的 siRNA 粉末短暂离心后加 Nuclease-free H₂O 至 1 μg/μL，分装后贮存于 -80°C 冰箱。

3 mRNA 合成

全长 *Hh* 扩增自白氏文昌鱼神经胚中期胚胎的 cDNA 模板，引物为：Hh-F: 5' - GAATTCGAATTTAGCCGTTAATAGGGAG-3'（加 *Eco*RI 酶切位点），Hh-R: 5' - ACTAGTTACACACAGCCGAGTAGACACTT-3'（加 *Spe*I 酶切位点）。PCR 产物首先重组到 pGEM-T Easy 载体（Promega Cat#A1360）中，经测序确认后用 *Eco*RI 和 *Spe*I 双酶切，再连接到 pXT7 载体的 T7 启动子下游多克隆位点中。Hh-pGEM-T Easy 重组质粒用来合成 *Hh* 基因的探针，Hh-pXT7 重组质粒用来合成 mRNA。转化所用菌种有 DH5α 和 TOP10，选正确的克隆摇菌并提取质粒，质粒的提取用 Omega 公司的试剂盒（Omega Cat#D6943-02）。Hh-pXT7 用 *Pst*I 酶切，产生线性化的质粒，回收后作为合成带帽 mRNA 的模板，mRNA 的合成用 mMESSAGE mMACHINE T7 Kit 试剂盒（Ambion Cat#AM1344）。

在过表达实验中，我们用 *Rfp* mRNA（编码红色荧光蛋白的 mRNA）做对照。完整的 *Rfp* 基因编码区扩增自 pmCherry-1 质粒（购自 Clontech 公司），引物序列为：*Rfp*-F: 5'-GTTGGTACCGTCGCCACCATGGTGAGCAAG-3'，*Rfp*-R: 5'-GCCACTAGTCTACTTGTACAGCTCGTCCA-3'。PCR 产物经双酶切回收后，重组到 pXT7 载体中用于合成 mRNA。

4 胚胎显微注射

胚胎的显微注射参照 Liu 等^[19]，注射针使用 P97 程序水平微电极控制仪（Sutter 公司）将硼硅酸盐玻璃管（WPI，型号 1B100F-4）按参数：热度=675，

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.