

梁志康,冯静雯,谢保胜. 青海湖裸鲤胚胎不同发育时期 *TRH* mRNA 的原位杂交[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 760-764.

Liang ZK, Feng JW, Xie BS. In situ hybridization of *TRH* mRNA at different periods in the development of *Gymnocypris przewalskii* [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 760-764.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.011

青海湖裸鲤胚胎不同发育时期 *TRH* mRNA 的原位杂交

梁志康¹, 冯静雯¹, 谢保胜^{2*}

(1. 青海大学昆仑学院, 西宁 810016;

2. 高原生态与农业国家重点实验室, 青海大学生态环境工程学院, 西宁 810016)

【摘要】 **目的** 本试验旨在观察和分析青海湖裸鲤的不同发育时期胚胎促甲状腺激素释放激素 (thyrotropin-releasing hormone) *TRH* 基因的表达情况。**方法** 提取青海湖裸鲤的总 RNA 制备地高辛标记的反义 *TRH* 基因的 mRNA 探针, 用体视显微镜观察原位杂交的 *TRH* 基因表达情况。**结果** 显微观察显示青海湖裸鲤胚胎发育第 6~8 天在间脑出现了 *TRH* 基因的阳性杂交信号; 第 9~11 天的胚胎的间脑、中脑、后脑和髓脑多处出现阳性杂交信号, 间脑的表达量比其他脑组织的表达量高。**结论** 原位杂交表明 *TRH* 基因在青海湖裸鲤 6~11 d 胚胎中表达, 提示促甲状腺激素释放激素可能对青海湖裸鲤脑部的发育和成熟有重要的作用。

【关键词】 青海湖裸鲤; 胚胎发育期; 原位杂交; 促甲状腺激素释放激素

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0760-05

In situ hybridization of *TRH* mRNA at different periods in the development of *Gymnocypris przewalskii*

LIANG Zhikang¹, FENG Jingwen¹, XIE Baosheng^{2*}

(1. Kunlun College, Qinghai University, Xi'ning 810016, China. 2. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, College of Ecol-Environmental Engineering, Qinghai University, Xi'ning 810016)

Corresponding author: XIE Baosheng. E-mail: xbsjhjch@qhu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** This experiment is aimed to analyze the expression state of the thyrotropin releasing hormone (*TRH*) gene at different periods in the development of *Gymnocypris przewalskii* ("Przewalskii's naked carp") embryos. **Methods** The total RNA of *G. przewalskii* was extracted to make digoxin-labelled antisense mRNA of the *TRH* gene. *In situ* hybridization technology and stereomicroscopy were used to observe the expression status of the *TRH* gene in the *G. przewalskii* embryos. **Results** Microscopy showed that positive hybridization signals of the *TRH* gene appeared in the diencephalon in the 6-8-day embryo, and appeared in the diencephalon, midbrain, hindbrain and medulla in the 9-11-day embryo. The expression level in the diencephalon was higher than that in other brain areas. **Conclusions** *In situ* hybridization shows that the *TRH* gene is expressed in 6-11-day embryos of *G. przewalskii*, suggesting that *TRH* may play an important role in the brain development and maturation in *G. przewalskii*.

【Keywords】 *Gymnocypris Przewalskii*; embryonic development period; hybridization; *TRH*

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 国家自然科学基金 (30360632)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (30360632).

【作者简介】 梁志康 (1995—) 男, 本科, 研究方向: 细胞生物学。Email: 2272674301@qq.com

【通信作者】 谢保胜 (1965—) 男, 教授。Email: xbsjhjch@qhu.edu.cn

70 年代, Giullemin 和 Schall 先后在绵羊和猪的下丘脑中分离提纯促甲状腺激素释放激素(thyrotropin-releasing hormone, TRH), 该激素是由焦谷氨酸-组氨酸-脯氨酸组成的一类神经多肽分子^[1]。促甲状腺激素释放激素在中枢神经系统的脑部、垂体、脊髓和甲状腺等均有表达, 且该基因序列在脊椎动物中具有保守性^[1]。除了对脑垂体的调节作用外, 对神经系统具有保护和促进生长的作用^[2]、对皮肤的新生成和抑制肠道胃酸的分泌等均有作用^[3]; 此外, 在器官和组织上生长、分化和代谢方面也有影响^[4]。而促甲状腺激素释放激素在青海湖裸鲤的研究尚未发现报道, 尤其是在裸鲤胚胎发育中的 TRH 基因表达水平的研究更未提及。为此, 对青海湖裸鲤胚胎的 TRH 基因的原位杂交进行了研究, 分析其表达部位和表达时期的时空特点, 获得 TRH 基因在青海湖裸鲤的发育相关表达的初步研究, 为以后进一步研究青海湖裸鲤的细胞与发育生物学提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验用青海湖裸鲤及其胚胎由青海湖裸鲤救护中心刚察县孵化站提供(青海, 刚察)。亲鱼采自沙柳河野生健康的成年青海湖裸鲤, 室外人工授精, 孵化车间进行孵化, 孵化水温 11~13℃。1~11 d 胚胎用 4% 的多聚甲醛固定 48 h, 置于 -20℃ 保存, 用于整胚原位杂交, 参照文献^[5-6]进行操作。成年鱼麻醉取脑组织至于冻存管后, 立刻放液氮中保存备用。

1.1.2 试剂与仪器

Takara MiniBest Universal RNA Extraction Kit 试剂盒(Takara)、primerscrit™ II 1st strand cDNA synthesis kit 试剂盒(Takara)、Green Taq mix 试剂盒(Vazyme)、DNA 纯化试剂盒(Takara)、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒(Sangon Biotech)、T 载体 PCR 产物快速连接试剂盒(Promega)、HM(-)、HM(+)、脱色液、封闭液、显色液、终止液等。

尼康体视显微镜(Nikon SMZ18, 日本)、核酸检测仪(Implen N60, 德国)、循环浴槽(PolyScience, 美国)、凝胶成像仪(Uvitec Essential V6, 英国)、高速冷冻离心机(Eppendorf, 德国)、梯度 PCR 仪(Eppendorf, 德国)、离心机(Sigma, 德国)、BG-

Power300 电泳仪(Baygene, 中国)等。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成

从青海大学生态环境工程学院青海湖裸鲤转录组测序结果得到的 TRH 基因序列, 使用 Primer Premier 5.0 设计引物, 扩增基因片段长度为 552 bp, 引物序列为 TRH-F: 5'-GCAGGA CCGAGGT TGTTCATGAG-3'; TRH-R: 5'-TCCAGTCCTCGCAC AGTCTCTTC-3'。引物合成由生工生物工程(上海)公司完成。

1.2.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

从液氮中取出脑组织, 用组织研磨器(Tiagen)进行研磨, 使用 Takara MiniBest Universal RNA Extraction Kit 提取总 RNA, 核酸微量仪检测提取的 RNA 浓度和纯度。

1.2.3 PCR 扩增与纯化

使用 Green Taq mix 试剂盒, 常规 PCR 扩增。回收扩增产物并用 DNA 纯化试剂盒纯化, 检测回收条带。

1.2.4 连接、转化和测序

目的片段与 PGEM-T 载体链接并转化至 DH5 α 大肠杆菌。LB 培养基 37℃ 培养, 经菌液 PCR 菌液验证后测序。

1.2.5 提取质粒

利用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒 DNA, 检测质粒的浓度和纯度。

1.2.6 制备探针

分析测序结果: TRH 基因插入方向为正向, 上游引物在 T7 端, 选择的酶切位点在 T7 端。将上述提取的重组质粒用 Sac II 酶酶切, 用地高辛抗体和 SP6 RNA 聚合酶制备 RNA 探针^[7]。

1.2.7 原位杂交

杂交第 1 天: 取 1~11 d 的青海湖裸鲤胚胎各五个至 EP 管中; 复水处理; 胰蛋白酶处理胚胎, 1~3 d 的胚胎不做处理, 4~11 d 的胚胎蛋白酶 K 处理时间依次为 20、25、30、35、40、45、50、60 min。脱色处理, 1~11 d 的胚胎脱色液处理时间依次为 0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、14、16 min。将胚胎放入杂交槽中, 加入 400 μ L 预热的 HM(-), 70℃ 水浴 2 h。弃 HM(-), 加入 500 μ L HM(+) 与 TRH 探针混合液。杂交槽避光, 70℃ 水浴过夜。

杂交第 2 天: 回收探针; HM(-) 和 SSC(柠檬酸钠缓冲液) 处理 70℃ 水浴, 避光。在如下梯度洗涤:

100% HM(-), 15 min; 75% HM(-)+25% 2 × SSC, 15 min; 50% HM(-)+50% 2 × SSC, 15 min; 25% HM(-)+75% 2 × SSC, 15 min; 2 × SSC, 15 min; 0.2 × SSC, 30 min, 2 次。

室温下在慢速摇晃的摇床上进行以下梯度洗涤:

75% 0.2 × SSC+25% PBST, 10 min; 50% 0.2 × SSC + 50% PBST, 10 min; 25% 0.2 × SSC + 75% PBST, 10 min; 100% PBST, 10 min;

各杂交槽中加入封闭液 500 μL, 2 h 后弃封闭液。在杂交槽中加入抗体+封闭液 500 μL, 摇床 1 h, 4℃ 冰箱过夜。

杂交第 3 天: 吸出抗体+封闭液, 快速加入 500 mL PBST, 摇床 10 min; 加入 500 mL PBST, 摇床避光 6×15 min; 加入 500 μL staining buffer, 3×5 min 显色; 显色完成后, 加入 Stopping staining, 停止显色; 采集图像。

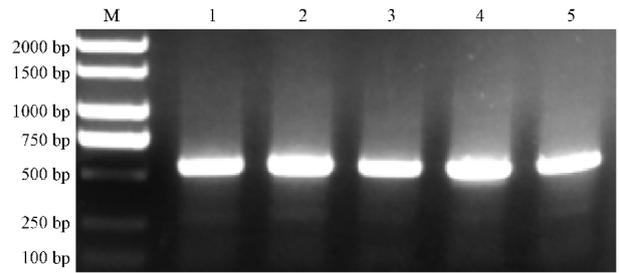
2 结果

2.1 PCR 扩增 TRH 基因

电泳条带清晰明亮, 与预期条带 552 bp 的长度一致。(图 1)

2.2 质粒 DNA 酶切鉴定结果

用 sac II 酶酶切 TRH 基因的质粒后得到的 DNA 序列, 结果显示条带单一, 检测浓度满足制作探针的要求。



注: M: 2000 marker; 1, 2, 3, 4, 5 均为相同的 TRH 基因 PCR 产物。

图 1 青海湖裸鲤 TRH 基因的 PCR 扩增片段

Note: M: 2000 marker; 1, 2, 3, 4, 5 are PCR products of the same TRH gene.

Figure 1 PCR amplification fragments of the TRH gene in *Gymnocypris przewalskii*

2.3 TRH 基因的 CDS 区分析与同源性比较

DNASTAR 软件分析 TRH 基因 CDS 为 606 bp, 编码 201 个氨基酸(见图 2)。在 NCBI 网上比对与其他鱼类氨基酸的同源性, 并用 Clustal X2.1 和 GeneDoc 软件做同源性比对图。如图 2 所示, 裸鲤 TRH 基因编码的氨基酸序列与鲤鱼 (*Cyprinus carpio*, XP_018964823.1)、鲫鱼 (*Carassius auratus*, XP_026126278.1)、犀角金线鲃 (*Sinocyclocheilus rhinoceros*, XP_016394563.1)、滇池金线鲃 (*Sinocyclocheilus graham* XP_016106118.1)、斑马鱼 (*Danio rerio*, NM_001012365.2) 的同源性分别为 144/187 (77%)、139/187 (74%)、129/187 (69%)、117/189 (62%)、105/189 (56%)。提示青海湖裸

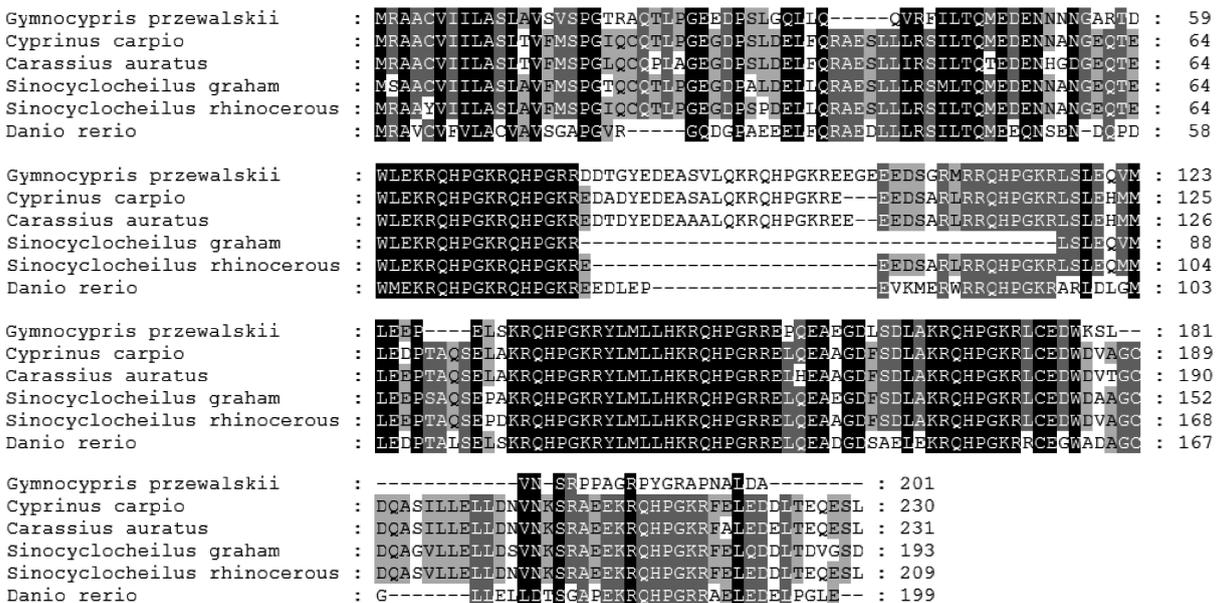


图 2 青海湖裸鲤与其他鱼类的 TRH 的氨基酸序列同源性比较

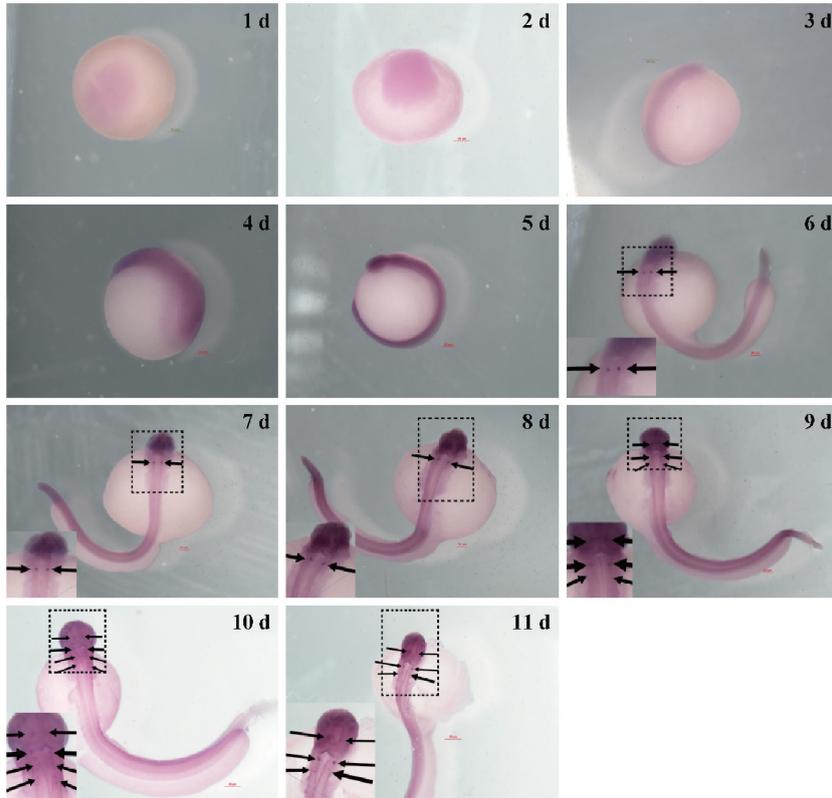
Figure 2 Comparison of the homologous alignments of the amino acid sequences of TRH of *Gymnocypris przewalskii* with that of other Fishes

鲤与鲤鱼、鲫鱼、犀角金线鲃和金鱼的同源性较高;与斑马鱼的同源性较低。

2.4 原位杂交结果

为更准确地证明实验的反义探针的特异性,用 T7 制备质粒 DNA 正义探针,1~11 d 的胚胎原位杂交实验结果显示大脑和脊髓以及其他各组织均未发现杂交信号,胚胎浅层和组织深处的颜色均一,

无明显的标记。表明阴性探针不与靶基因产生特异性杂交。用 SP6 制作反义探针,胚胎原位杂交显示其间脑、中脑、后脑和髓脑出现阳性杂交信号,且随着胚胎的发育,表达点不断增多,间脑表达效果明显。表明阳性探针与胚胎的靶基因产生特异性结合,以及 *TRH* 基因表达具有时间特异性和空间特异性。(见图 3)



注:1 d: 2 细胞期;2 d: 低囊胚期;3 d: 原肠晚期;4 d: 神经胚期;5 d: 视泡形成期;6 d: 尾芽期;7 d: 肌肉效应期 1;8 d: 肌肉效应期 2;9 d: 心脏搏动期 1;10 d: 心脏搏动期 2;11 d: 嗅板期。

图 3 原位杂交阳性探针图($\times 2$)

Note. 1 d, Two-cells stage. 2 d, Low blastula stage. 3 d, Late gastrula stage. 4 d, Neurula stage. 5 d, Optic vesicle stage. 6 d, Tail bud stage. 7 d, Somites stage 1. 8 d, Somites stage 2. 9 d, Heart beating stage 1. 10 d, Heart beating stage 2. 11 d, Olfactory placode stage.

Figure 3 Positive probe in situ hybridization($\times 2$)

3 讨论

青海湖裸鲤胚胎发育至视泡期之前,没有观察到 *TRH* 基因杂交信号,可能是由于该时期中枢神经系统尚未发育完善,处于神经管至脑泡脑的发育阶段。肌肉效应期阶段观察到 *TRH* 基因在脑泡脑的间脑部位有较清晰的杂交信号,而在中脑、后脑、髓脑和脊髓处没有观察到杂交信号。心脏搏动期至嗅板期阶段,间脑、中脑、后脑和髓脑检测到 *TRH* 基

因均有表达,间脑的表达量明显高于其他脑部位。提示 *TRH* 基因表达最早时期出现于肌肉效应期,且主要表达部位在间脑,此后在脑组织广泛区域均有表达。提示 *TRH* 除对垂体有促进作用之外,对其他脑区可能发挥神经调质的作用。

TRH 作为下丘脑-垂体-甲状腺(hypothalamus-pituitary-thyroid, HPT)轴的关键神经信息分子^[8-9],能够促进垂体前叶释放促甲状腺激素(TSH),而 TSH 可促使甲状腺泡释放甲状腺激素(THs),从而

加强机体的基础代谢。有报道,促甲状腺激素释放激素具有广泛的生物学功能,能够促进生长激素的分泌,进而促进肌肉的生长以及长骨的生长^[10]。张晓娜等^[11]也证实了鱼类甲状腺激素对鱼类胚胎发育、仔鱼的变态发育、提高存活率和促进生长等方面均有作用。青海湖裸鲤在高盐碱,寒冷的生境中得以生存、生长和繁殖,TRH 发挥着极其重要的调节作用,该基因在裸鲤胚胎期就得以表达,这更有力地验证了这一推测。另外,TRH 基因在裸鲤中枢神经系统具有时空特异性表达的特点,表明该基因是可作为中枢神经发育的分子标记物,对进一步研究该基因在裸鲤发育生物学的特殊作用具有重要意义。青海湖裸鲤与其他鲤科鱼类 TRH 同源性比较得出,TRH 蛋白具有一定的保守性。从进化的角度看,青海湖裸鲤的 TRH 基因突变的程度相对较低,是否存着另外特殊的作用,有待进一步研究。此外,利用 RISPR/Cas9 技术对青海湖裸鲤 TRH 基因进行编辑^[12],来进一步验证该基因对裸鲤生物学功能影响将是我们未来的研究方向。

参 考 文 献(References)

- [1] 王国良. 促甲状腺激素释放激素的分布及生理作用 [J]. 生理科学进展, 1990, 21(3): 275-278.
Wang GL. Distribution and physiological effects of thyrotropic hormone releasing hormone [J]. Prog Physiol Sci, 1990, 21(3): 275-278.
- [2] 王磊, 吕刚, 曹阳, 等. 静脉注射 TRH 治疗损伤神经的实验研究 [J]. 中国医学工程, 2012, 20(9): 36-37.
Wang L, Lv G, Cao Y, et al. Experimental study on the treatment of nerve injury by intravenous TRH [J]. Chin Med Eng, 2012, 20(9): 36-37.
- [3] Fröhlich E, Wahl R. The forgotten effects of thyrotropin-releasing hormone: metabolic functions and medical applications [J]. Front Neuroendocrinol, 2018, 52(6): 29-43.
- [4] Galas L, Raoult E, Tonon MC, et al. TRH acts as a multifunctional hypophysiotropic factor in vertebrates [J]. Gen Comp Endocrinol, 2009, 164(1): 40-50.
- [5] 张春霞, 刘峰. 斑马鱼高分辨率整胚原位杂交实验方法与流程 [J]. 遗传, 2013, 35(4): 422-428.
Zhang CX, Liu F. A brief protocol for high-resolution whole mount in situ hybridization in zebrafish [J]. Hereditas, 2013, 35(4): 422-428.
- [6] Chitramuthu BP, Bennett HP. High resolution whole mount in situ hybridization within zebrafish embryos to study gene expression and function [J]. J Vis Exp, 2013, 80: e50644.
- [7] 范沛, 陈丽颖, 赵瑞丽, 等. 地高辛标记探针原位杂交组织化学技术及其应用 [J]. 科技创新导报, 2007, 4(35): 25.
Fan P, Chen LY, Zhao RL, et al. In situ hybridization histochemistry of digoxin labeled probe and its application [J]. Sci Technol Innov Herald, 2007, 4(35): 25.
- [8] 左卫星, 张志飞, 刘志民, 等. 参与下丘脑-垂体-甲状腺轴负反馈调控的分子元件研究进展 [J]. 生物技术进展, 2017, 7(6): 601-607.
Zuo WX, Zhang ZF, Liu ZM, et al. Review on molecular components participating negative feedback regulation in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis [J]. Curr Biotechnol, 2017, 7(6): 601-607.
- [9] Blanton ML, Specker JL. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction [J]. Crit Rev Toxicol, 2007, 37(1-2): 97-115.
- [10] 夏冰, 王钢, 王捷. 促甲状腺激素释放激素的广泛生物学作用 [J]. 实用医学杂志, 2014, 30(22): 3669-3670.
Xia B, Wang G, Wang J. Extensive biological effects of thyroid stimulating hormone releasing hormone [J]. J Pract Med, 2014, 30(22): 3669-3670.
- [11] 张晓娜, 田华, 汝少国. 鱼类甲状腺轴对胚胎发育、仔鱼变态及性别分化的调控作用研究进展 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(S1): 94-101.
Zhang XN, Tian H, Ru SG. Research progress on the regulation of thyroid axis on embryo development, larval metamorphosis and sex differentiation [J]. Period Ocean Univ Chin, 2012, 42(S1): 94-101.
- [12] Lin CY, Oulhen N, Wessel G, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in sea urchins [J]. Methods Cell Biol, 2019, 151: 305-321.

[收稿日期] 2019-05-30