

Nodal 信号通路相关基因 NOMO1 在斑马鱼早期胚胎发育过程中的表达

曹娜,张浩*,盛燕辉,杨荣,孔祥清

(南京医科大学第一附属医院心血管内科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究斑马鱼 NOMO1 基因在早期胚胎发育过程中的时空表达情况。方法:首先克隆斑马鱼 NOMO1 同源基因全长 cDNA,然后运用半定量 RT-PCR 技术初步检测 NOMO1 基因在斑马鱼早期胚胎的表达情况,最后通过原位杂交技术检测 NOMO1 基因在斑马鱼早期胚胎发育过程中的时空表达情况。结果:通过半定量 RT-PCR 及原位杂交技术显示 NOMO1 从受精卵时期开始即有表达,在 24 hpf(受精后 24 h)之前,NOMO1 基因表达广泛,并主要集中在中、内胚层。从 24 hpf 开始其表达主要集中于神经系统如前脑、中脑、小脑、脊索前板、眼和耳囊等处。在心脏处也有少量表达。结论:NOMO1 基因对斑马鱼早期胚胎发育具有一定的作用,推测 NOMO1 基因影响早期心脏发育。

[关键词] 斑马鱼;NOMO1 基因;基因克隆;Nodal 信号通路

[中图分类号] Q785

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)09-1186-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130903

The expression pattern of Nodal signaling pathway gene NOMO1 during early embryonic development in zebrafish

Cao Na, Zhang Hao*, Sheng Yanhui, Yang Rong, Kong Xiangqing

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression pattern of zebrafish gene NOMO1 during early embryonic development. **Methods:** The zebrafish ortholog of the mammalian NOMO1 cDNA was cloned, and semi-quantitative RT-PCR was used to preliminarily detect the expression level of NOMO1 during the zebrafish embryonic development. At the last step, the expression pattern of zebrafish NOMO1 among the early stage of embryonic development was described by whole *in situ* hybridization. **Results:** cDNA of zebrafish NOMO1 is 3 924 bp, which contains a complete coding sequence of 3 626 bp. The expression of zebrafish NOMO1 is widely distributed from fertilization to 24 hpf (hours-post-fertilization), which is most abundantly transmitted in the endoderm and mesendoderm. After 24 hpf, the expression mainly concentrates on the nervous system, such as prosencephalon, mesencephalon, cerebellum, precordial plate, otic vesicles, eyes, and at somewhat lower level in heart. **Conclusion:** According to the expression pattern of NOMO1, NOMO1 may be required for the development of the zebrafish embryo, and influence the heart development during the early period.

[Key words] zebrafish; NOMO1 gene; gene cloning; Nodal signaling

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(9): 1186-1190]

Nodal 信号通路是转化生长因子(TGF- β)家族中重要成员之一,它对脊椎动物胚胎发育具有重要的作用,在中、内胚层的分化、背腹轴的决定、神经外胚层诱导和分化以及左右不对称性的建立过程中

Nodal 信号均发挥了极大的调控效用^[1-2]。并且有报道还提出 Nodal 信号促进心室心肌的分化,对早期心脏发育的研究意义重大^[3]。研究显示,Nodal 与 I 型和 II 型丝氨酸/苏氨酸激酶受体以及 EGF-CFC 共同受体结合后,可磷酸化细胞质内的 smad2 和(或) smad3,磷酸化的 smad2 或 smad3 与 smad4 结合,并进入细胞核与转录因子 FoxH1、p53 和 Mixer 相互作用以发挥其生物学功能^[4-5]。而 Nodal 信号通路同时也受到一些调节因子的调控,例如 Lefty^[6]、Ceberus、

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金资助(30901473)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: haozhanghh@hotmail.com

Coco、Charon^[7-8]等通过结合 Nodal 或结合 EGF-CFC 共同受体起到抑制 Nodal 信号通路的作用。

NODAL modulator 1(NOMO1)基因编码的跨膜蛋白与 TMEM147、Nicalin 形成蛋白复合体,这种复合体位于内质网上,研究表明在斑马鱼胚胎发育早期,此蛋白复合体可能通过修饰或结合 Nodal 信号通路的成员,从而达到抑制 Nodal 信号通路的作用^[9-11]。本课题组通过抑制性差减杂交(suppressive subtractive hybridization,SSH)技术发现 NOMO1 基因在室间隔缺损患者心肌组织中的表达下调^[12],说明 NOMO1 基因的表达改变可能与心脏发育相关,但 NOMO1 基因在胚胎心脏发育过程中的时空表达情况并不清楚。与小鼠、鸡等模式脊椎动物相比,斑马鱼体型较小,养殖花费少,且具有体外受精、胚胎透明、体外发育、胚胎早期发育快等特点^[13]。因此本研究选用斑马鱼作为模式动物,对 NOMO1 基因进行初步的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验中斑马鱼来自南京大学模式动物研究所,饲养按照常规的方法进行^[14]。保持鱼箱水温 28.5℃,每日予以固定光照 14 h、黑暗 10 h,早晚各喂食一次。收集的胚胎在 28.5℃的恒温培养箱中培养。

RNA 提取及 RT-PCR 试剂:TRIzol、逆转录酶 M-MLV(Invitrogen 公司,美国),RNA 酶抑制剂、Oligo dT、dNTP、核酸分子量标准 DL5000、凝胶回收试剂盒、pMT 载体(TaKaRa 公司,日本),Taq 酶(Promega 公司,美国)。载体构建及质粒提取等:pGEMT-easy 载体、DNA 连接酶试剂盒(Promega 公司,美国),Trans5a 品系感受态细胞(Transgene 公司,中国),质粒提取试剂盒(Axygen 公司,美国),探针合成试剂盒 MAXIscript *In Vitro* Transcription Kit 试剂盒(Ambion 公司,美国),地高辛标记的 UTP(Digoxin-11-UTP,Roche 公司,美国)以及原位杂交过程中使用到的 Tween-20(Amresco 公司,美国),甲酰胺(Ambion 公司,美国),柠檬酸三钠、酵母 RNA(500 μg/ml)和肝素(50 μg/ml)、马来酸、包埋剂(Sigma 公司,美国),Blocking reagent(Roche 公司,美国)、徕卡 MZI6F 立体显微镜(Leica 公司,英国)等。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的抽提和 RNA 的逆转录

收集所需时期的斑马鱼胚胎,每时期约 80 个,

分别放入 2 ml EP(Eppendorf)管中,吸去多余的水,加入 1ml TRIzol,依照使用说明提取各个时期的总 RNA,并保存于-80℃冰箱中。每管取 2 μg 总 RNA 按照逆转录酶 M-MLV 说明书,逆转录出各个时期的 cDNA。

1.2.2 克隆 NOMO1 cDNA 及 NOMO1 基因表达半定量分析

1.2.2.1 克隆 NOMO1 cDNA

通过 NCBI 网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)与人 NOMO1 蛋白氨基酸序列比对(BLASTP),最终获得编码斑马鱼 NOMO1 氨基酸序列的 mRNA 序列(XM_002662315.1)。并以此设计出 NOMO1 cDNA 全长的引物:5'-CGACTCCAGTGCTGCACG-3'/5'-CAGCCATCCTCCCTGAGC-3',以上文中准备好的 24 hpf(受精后 24 h)胚胎的 cDNA 作为模板使用 LAtaq DNA 聚合酶(Promega 公司,美国)进行扩增反应。反应条件为:95℃ 3 min 30 个循环(94℃ 30 s,57℃ 3.5 min,72℃ 2 min),72℃ 7 min,所得产物 1%琼脂糖凝胶电泳,切胶回收 3 965 bp 的目标条带,重组入 pGEMT-easy 载体中。运用快速 DNA 连接酶试剂盒进行连接。然后进行转化,将全部连接产物(5 μl)加入到 50 μl Trans5a 品系感受态细胞中,混匀,冰浴 30 min,42℃热激 1.5 min,然后快速转移到冰上,放置 1 min。加入 125 μl LB 培养基,摇菌 45 min 后,将菌液涂在含氨苄青霉素(AMP,50 μg/ml)的 LB 固体培养基上,放入 37℃培养箱过夜。待 LB 固体培养基上长出克隆后,挑单克隆,摇菌,运用质粒提取试剂盒提取质粒后使用 PCR 或酶切等方法进一步确认。将确定含有目的片段的重组质粒的菌液送到上海华大基因公司,进行测序。获得 NOMO1 cDNA 序列进一步通过 NCBI 网站分析确认。相应的含目的片段的重组质粒记为 pGEMT-easy-nomo1,剩余的一部分菌液用于保种(菌液中加入 10%~50%甘油),冻存于-80℃。

1.2.2.2 NOMO1 基因表达半定量分析

克隆的 NOMO1 cDNA 经验证后,运用 NOMO1 cDNA 全长的引物:5'-CGACTCCAGTGCTGCACG-3'/5'-CAGCCATCCTCCCTGAGC-3',以各个时期的 cDNA 作为模板进行 PCR,反应条件同上,同时内参 β-actin,大小 716 bp,引物序列为 5'-TCCGGTATGTGCAAAGCCGG-3'/5'-CCACATCTGC-TGGAAG-TGG-3',PCR 反应条件相同。然后将等体积的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,分析结果。

1.2.3 NOMO1 探针的制备

由于NOMO1 cDNA全长3 924 bp,为方便探针的合成,取其中一段(2 324 bp)来进行NOMO1探针的合成。首先提取重组质粒pGEMT-easy-nomo1,使用*pst* I酶切,进行1%琼脂糖凝胶电泳,对2 324 bp条带进行切胶回收。重组入pGEMT-easy载体中,依照上文,完成连接、转化,挑单克隆,最后提取质粒后通过PCR、酶切确认重组质粒中包含有目标片段。将该重组质粒标记为pGEMT-easy-nomo1(probe)。

合成探针时,先用限制性内切酶*Sph* I将模板质粒pGEMT-easy-nomo1(probe)线性化,使用MAX-Iscrip*t In Vitro* Transcription Kit试剂盒依照说明书sp6方向合成探针,操作中加入地高辛标记的UTP(Digoxin-11-UTP)。

1.2.4 胚胎整体原位杂交

根据实验要求收集不同时期的胚胎,按照胚胎整体原位杂交的方法完成胚胎的固定、脱水、复水、预杂交、加探针、洗探针和显色步骤^[15]。显色后将胚胎转移入24孔板中(Costar公司,美国),加入包埋剂(按2:1混合的Bezyllbenzoate和Benzylalcohol)。静置几分钟后,使用立体显微镜拍照。图像使用Adobe Photoshop CS5 Extended软件进行裁剪,调节亮度和对比度。

2 结果

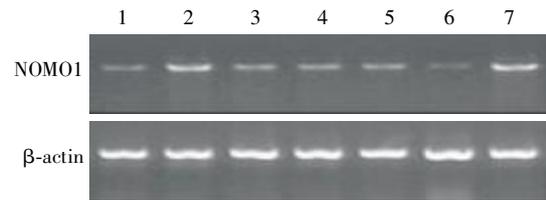
2.1 斑马鱼NOMO1基因的序列分析

NOMO1 cDNA序列全长3 924 bp,囊括了全部大小为3 626 bp的编码序列,预测编码1 208个氨基酸。使用NCBI序列分析显示NOMO家族基因序列具有高度保守性,本研究发现斑马鱼NOMO1氨基酸序列与人类氨基酸序列(NP_001004067.1)相比对,两者具有70%相似度,与鸡(XP_414903.2)、鼠(NP_001121443.1)、爪蟾(NP_001121443.1)氨基酸序列分别有70%、69%、68%相似度。这说明在脊椎动物进化过程中,NOMO1基因在结构与功能上保持高度的保守性。

2.2 斑马鱼NOMO1基因的表达分布

通过对胚胎发育早期多个时间段(5、8、12、16、24、36、48 hpf)进行RT-PCR分析(图1),结果显示NOMO1基因在胚胎发育早期呈连续性表达。

原位杂交检测结果如图2所示。从受精卵时期(1-细胞)NOMO1基因开始表达(图2A),在1-细胞至24 hpf期间NOMO1基因的表达广泛分布在胚胎的中内胚层(图2A~D)。从24 hpf开始NOMO1开始逐渐集中表达于神经系统各个部位(图2E~J),包



1~7:分别代表5、8、12、16、24、36、48 hpf。

图1 斑马鱼基因NOMO1在不同时期的胚胎中的RT-PCR表达结果

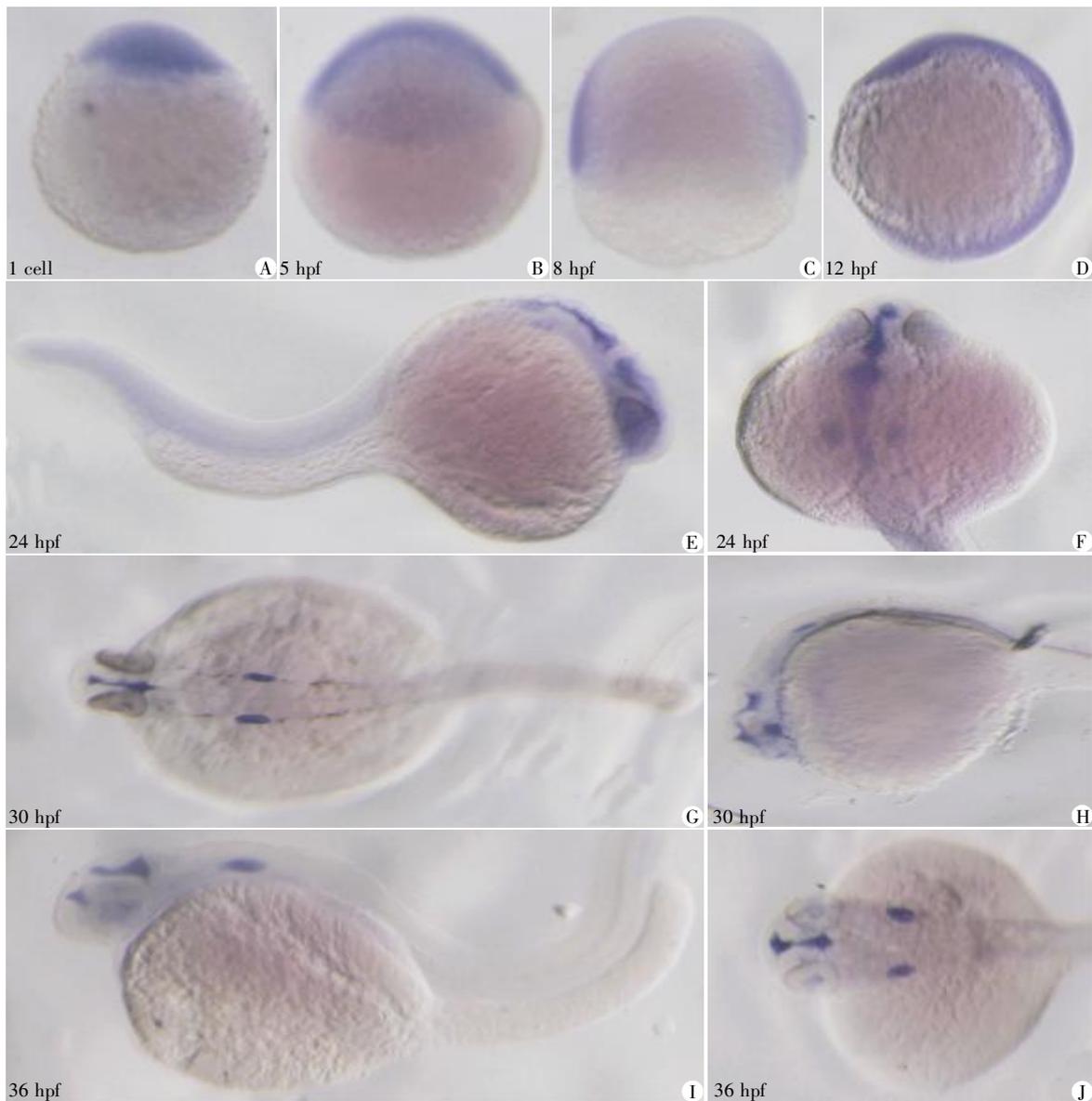
Figure 1 The expression of zebrafish NOMO1 during different stages

括前脑、中脑、小脑、脊索前板、耳囊、眼等处,但在其他部位如心脏仍可见少量表达。

3 讨论

斑马鱼由于其体型小、发育快、胚胎透明、拥有简单的一心房一心室的的心脏,尤其是其早期胚胎的存活可不依赖心血管系统,而直接通过被动扩散的方式获取氧气的特点^[16],使其成为近年来研究心血管的遗传学、发育生物学以及细胞生物学等方面的热门模式动物。本文通过对斑马鱼NOMO1基因cDNA克隆及序列分析,发现NOMO1基因在进化过程中具有高度的保守性,比较不同物种NOMO1氨基酸序列,发现斑马鱼mRNA序列与人类NOMO1氨基酸序列者具有70%相似度,与鸡、鼠、爪蟾mRNA序列分别有70%、69%、68%相似度。这一发现验证了脊椎动物NOMO1基因的同源性,并反映了在进化过程里,NOMO1基因在结构及功能上的高度保守。因此,结合斑马鱼的优势和NOMO1基因的高度保守性,本研究选择斑马鱼作为研究NOMO1基因对心脏发育影响的模式动物。

通过半定量RT-PCR以及原位杂交分析可以看出,NOMO1基因在斑马鱼胚胎早期持续有表达,并在受精卵形成时即开始表达,说明NOMO1基因在斑马鱼早期胚胎发育过程中发挥着重要的作用。NOMO1基因的原位杂交的表达图式表明,在24 hpf之前NOMO1基因表达分布广泛,主要位于中胚层及内胚层。24 hpf开始,NOMO1基因的表达主要分布在神经外胚层区域,如前脑、中脑、小脑、脊索前板、耳囊、眼等处,而在其他部位分布较少。已知NOMO1基因编码一种跨膜蛋白,并与TMEM147、Nicalin结合形成蛋白复合体,抑制Nodal信号通路。结合其在斑马鱼早期胚胎的表达图式,提示NOMO1基因可能在中内胚层及神经外胚层的发育过程中发挥一定功能。



A~D: *NOMO1* 基因呈广泛表达,并集中分布在中内胚层;E~J: *NOMO1* 基因表达主要集中在神经系统如前脑、中脑、小脑、脊索前板、耳囊、眼等,在其他部位如心脏也可见少量表达。图中左下角示胚胎所处的发育时间点。胚胎体位: A~C、I、H: 侧面观,头端向左; D: 侧面观,头端向上; E: 侧面观,头端向右; F: 背面观,头端向上; G、J: 背面观,头端向左。

图 2 斑马鱼 *NOMO1* 基因的表达图式

Figure 2 The expression pattern of zebrafish *NOMO1*

斑马鱼的心脏发育主要包括以下几个重要阶段: ①从囊胚期开始,心脏前体细胞位于两侧中胚层,并在原肠胚时期迁移至前端侧板中胚层(ALPM)。在前端侧板中胚层,一些转录因子如 *nkx2.5*、*gata5*、*hand2* 的表达促进心肌细胞的分化; ②大约在 20-体节期(约 19 hpf)两侧的心肌细胞向中轴不断迁移、会聚形成心盘结构; ③心盘心肌细胞通过旋转和扩展形成心管^[17]; ④约在 48 hpf 完成心脏的环化过程,最终形成具有房室结构的成熟心脏^[18]; 本文研究结果显示 *NOMO1* 基因在胚胎发育早期

(24 hpf 前)在中胚层有广泛的分布。同时,本课题组之前的研究中也发现,*NOMO1* 基因在室间隔缺损患者心肌组织中表达较正常人低,说明 *NOMO1* 基因在心肌组织中有表达,并可能与室间隔缺损有关^[12],也发现在大鼠胚胎的心脏发育过程中 *NOMO1* 基因呈动态表达^[19]。说明 *NOMO1* 基因可能对心脏发育具有一定的影响。

此外,在心肌细胞向中线迁移形成心管的过程中,*Nodal* 信号联合 *Bmp* 信号通路通过影响心肌细胞的迁移速率最终导致心肌细胞融合形成偏向左侧

的心管^[20-22]。并且有报道指出,在心脏发育过程中,缺少左右不对称性形成这个过程,尤其是在 Nodal 信号通路相关基因的突变体中很容易引起先天性心脏病,如大动脉转位、室间隔或房间隔缺损等^[23-24]。说明 Nodal 信号对心脏的早期发育具有重要的影响。而 NOMO1 基因可以通过抑制 Nodal 信号影响早期胚胎发育,因此,未来需要验证 NOMO1 基因对心脏发育的影响,并可以从 Nodal 信号通路入手进一步明确其作用机制。

综上所述,通过对斑马鱼 NOMO1 基因的表达序列分析及表达分布的初步研究,发现在脊椎动物进化过程中,NOMO1 基因保持高度的保守性,对早期胚胎发育具有一定的影响,并且推测 NOMO1 基因对早期心脏发育具有一定的影响。

[参考文献]

- [1] Weng W,Stemple DL. Nodal signaling and vertebrate germ layer formation[J]. Birth Defects Res C Embryo Today,2003,69(4):325-332
- [2] Okada Y,Takeda S,Tanaka Y,et al. Mechanism of Nodal flow;a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination[J]. Cell,2005,121(4):633-644
- [3] Keegan BR,Meyer D,Yelon D. Organization of cardiac chamber progenitors in the zebrafish blastula[J]. Development,2004,131(13):3081-3091
- [4] Schier AF. Nodal signaling in vertebrate development[J]. Annu Rev Cell Dev Biol,2003,19:589-621
- [5] Massagué J,Seoane J,Wotton D. Smad transcription factors[J]. Genes Dev,2005,19(23):2783-2810
- [6] Chen Y,Schier AF. Lefty proteins are long-range inhibitors of squint-mediated Nodal signaling[J]. Curr Biol,2002,12(24):2124-2128
- [7] Cheng SK,Olale F,Brivanlou AH,et al. Lefty blocks a subset of TGFbeta signals by antagonizing EGF-CFC coreceptors[J]. PLoS Biol,2004,2(2):E30
- [8] Chen C,Shen MM. Two modes by which lefty proteins inhibit Nodal signaling[J]. Curr Biol,2004,14(7):618-624
- [9] Haffner C,Frauli M,Topp S,et al. Nicalin and its binding partner Nomo are novel Nodal signaling antagonists[J]. EMBO J,2004,23(15):3041-3050
- [10] Haffner C,Dettmer U,Weiler T,et al. The Nicastrin-like protein Nicalin regulates assembly and stability of the Nicalin-Nodal modulator(NOMO)membrane protein complex[J]. J Biol Chem,2007,282(14):10632-10638
- [11] Dettmer U,Kuhn PH,Abou-Ajram C,et al. Transmembrane protein 147 (TMEM147)is a novel component of the Nicalin-NOMO protein complex [J]. J Biol Chem,2010,285(34):26174-26181
- [12] Zhang H,Zhou L,Yang R,et al. Identification of differentially expressed genes in human heart with ventricular septal defect using suppression subtractive hybridization [J]. Biochem Biophys Res Commun,2006,342(1):135-144
- [13] Beis D,Stainier DY. *In vivo* cell biology;following the zebrafish trend[J]. Trends Cell Biol,2006,16(2):105-112
- [14] Kimmel CB,Ballard WW,Kimmel SR,et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. Dev Dyn,1995,203(3):253-310
- [15] Zhao Q,Dobbs-McAuliffe B,Linney E. Expression of cyp26b1 during zebrafish early development [J]. Gene Expr Patterns,2005,5(3):363-369
- [16] Bakkens J. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease [J]. Cardiovasc Res,2011,91(2):279-288
- [17] Glickman NS,Yelon D. Cardiac development in zebrafish: coordination of form and function [J]. Semin Cell Dev Biol,2002,13(6):507-513
- [18] Stainier DY.Zebrafish genetics and vertebrate heart formation[J]. Nat Rev Genet,2001,2(1):39-48
- [19] 徐春阳,杨荣,张浩,等. NOMO1 基因在大鼠胚胎心脏发育过程中的表达[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2013,33(6):728-731
- [20] Baker K,Holtzman NG,Burdine RD. Direct and indirect roles for Nodal signaling in two axis conversions during asymmetric morphogenesis of the zebrafish heart[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2008,105(37):13924-13929
- [21] Rohr S,Otten C,Abdelilah-Seyfried S. Asymmetric involution of the myocardial field drives heart tube formation in zebrafish[J]. Circ Res,2008,102(2):e12-19
- [22] Smith KA,Chocron S,von der Hardt S,et al. Rotation and asymmetric development of the zebrafish heart requires directed migration of cardiac progenitor cells [J]. Dev Cell,2008,14(2):287-297
- [23] Ramsdell AF. Left-right asymmetry and congenital cardiac defects:getting to the heart of the matter in vertebrate left-right axis determination[J]. Dev Biol,2005,288(1):1-20
- [24] Bisgrove BW,Morelli SH,Yost HJ. Genetics of human laterality disorders:insights from vertebrate model systems[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet,2003,4(1):1-32

[收稿日期] 2013-04-13