

Tol2 转座子介导斑马鱼 *rps26* 基因附近增强子捕获及注解分析

桑亚通, 沈丹, 陈伟, 产舒恒, 顾浩, 高波, 宋成义

扬州大学 动物科学与技术学院 农业与农产品安全国际合作联合实验室, 江苏 扬州 225009

桑亚通, 沈丹, 陈伟, 等. *Tol2* 转座子介导斑马鱼 *rps26* 基因附近增强子捕获及注解分析. 生物工程学报, 2018, 34(3): 449-458.

Sang YT, Shen D, Chen W, et al. Enhancer trapping nearby *rps26* gene in zebrafish mediated by the *Tol2* transposon and its annotation. Chin J Biotech, 2018, 34(3): 449-458.

摘要: 随着人类等生物大规模基因组测序工作的完成, 认识和理解基因组上表达调控元件成为后基因组时代的重要研究任务, 增强子捕获技术是一种鉴定基因组上增强子元件及其对基因表达调控机制的有效方法。本研究选择 *Tol2* 转座子系统介导制备的稳定增强子捕获品系 TK4 系 (头部和躯干特异性 *GFP* 表达), 利用 Splinkerette PCR (sp-PCR)、原位杂交和比较基因组学等技术手段进行所捕获增强子的解析研究。将 TK4 系的 F1 代与野生型斑马鱼杂交, 收集受精卵, 于 6 hpf (Hour post fertilization)、24 hpf、48 hpf、3 dpf (Day post fertilization)、4 dpf、5 dpf 六个发育阶段通过荧光显微镜检测绿色荧光蛋白报告基因的表达模式; 然后通过 sp-PCR 方法克隆到 *Tol2* 转座子插入位点斑马鱼基因组侧翼序列, 经比对分析表明插入位点位于基因组 23 号染色体 27749253 位置, 在 *rps26* 基因的 intron1 中, 且报告基因插入方向与基因方向相反。在插入位点 100 kb 的基因组范围内有 7 个基因, 分别为 *arf3a*、*wnt10b*、*wnt1*、*rps26*、*IKZF4*、*dnajc22* 和 *lmbr11*。通过 VISTA 程序对不同脊椎动物基因组同源序列比对结果显示, 在 *rps26* 基因下游有 2 个潜在保守的非编码序列区 CNS1 (Conserved non-coding sequence) 和 CNS2, 为可能的增强子元件。胚胎原位杂交表明: *rps26* 基因的两个转录本有母源性表达, *rps26-201* 在合子中的表达早于 *rps26-001*, 而 TK4 系斑马鱼的 *GFP* 在早期 (6 hpf) 不表达, 后期 *rps26* 与 *GFP* 的表达模式既存在相似性, 也存在差异性, 提示两者可能既接受共同的增强子调控, 但也存在不同增强子调控, 所获得的 2 个潜在的增强子 (CNS1 和 CNS2) 可能对附近的基因 (包括 *rps26*) 发挥差异的时空表达调控作用。本研究首次成功获得 *rps26* 基因附近 2 个潜在增强子, 为深入研究这两个增强子对基因组附近基因的表达调控机制奠定基础, 本研究所采用的结合技术手段也为增强子解析提供参考。

关键词: 增强子捕获, 注解, *Tol2*, 斑马鱼

Received: August 3, 2017; **Accepted:** November 15, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31671313, 31572364).

Corresponding author: Chengyi Song. Tel: +86-514-87979034; E-mail: cysong@yzu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31671313, 31572364) 资助。

Enhancer trapping nearby *rps26* gene in zebrafish mediated by the *Tol2* transposon and its annotation

Yatong Sang, Dan Shen, Wei Chen, Shuheng Chan, Hao Gu, Bo Gao, and Chengyi Song

Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-product Safety, College of Animal Science & Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: With the completion of large-scale genome sequencing of human beings and other organisms, understanding the expression of control elements on the genome has become an important research task in the post-genome era. The enhancer trapping technology is an effective method for identifying enhancer elements in the genome and understanding its mechanism for gene expression regulation. In this study, we selected the stable enhancer trapping line TK4 (head and trunk specific *GFP* expression), which is generated with the mediation of *Tol2* transposon system, and analyzed the trapped enhancers with the techniques of Splinkerette PCR (sp-PCR), *in situ* hybridization and comparative genomics. We crossed F1 individuals of TK4 line with wild-type zebrafish, collected fertilized eggs, and then detected the expression pattern of green fluorescent protein reporter gene by fluorescence microscopy at six different developmental stages, 6 hpf (hour post fertilization), 24 hpf, 48 hpf, 3 dpf (day post fertilization), 4 dpf and 5 dpf. The zebrafish genome flank sequence near the insertion site of *Tol2* transposon was cloned by sp-PCR, and the results revealed that the insertion located at the position 27749253 of chromosome 23, and the transgene inserted reversely inside the intron 1 of *rps26* gene. Within the 100 kb region of the insertion site, totally, seven genes including *arf3a*, *wnt10b*, *wnt1*, *rps26*, *IKZF4*, *dnajc22* and *lmb11* were identified. Comparative genomic analysis by VISTA program revealed that there were two potential enhancer elements in the downstream of *rps26* gene, which were conserved non-coding sequence (CNS) 1 and CNS2. The results of *in situ* hybridization showed that two transcripts of *rps26* gene were maternal expression, the expression of *rps26-201* in zygote was earlier than that of *rps26-001*, and the *GFP* signal of TK4 line zebrafish was not detectable before 6hpf, the expression patterns of *rps26* and *GFP* at the late stages display similarity, and also represent differences, which suggested that the expression of *rps26* and *GFP* may be controlled by the same enhancer, and also by the different enhancer, and two potential enhancers (CNS1 and CNS2) may play a differential regulation roles on the spatial and temporal expression of nearby genes (including *rps26*). In this study, we successfully obtained two potential enhancers near *rps26* gene for the first time, which laid a foundation for further study of the regulation mechanism between these two enhancers and nearby genes in the genome, and the combination technique used in this study also provides a reference for enhancer analysis.

Keywords: enhancer trap, annotation, *Tol2* transposon, zebrafish

增强子是能强化转录起始的一段 DNA 序列,最早是由 Benerji 在 SV₄₀ DNA 中发现^[1],随后在病毒及真核生物基因组中均发现了增强子元件的存在。已有研究表明增强子在基因表达调控中通过介导转录因子与靶基因的结合,参与基因的表达调控,发挥重要作用。与启动子不同的是,增强子对基因的调控不具有方向性,且不受两者距离的影响,无论位于基因的上游或下游,甚至基因的内含子中,均可调控靶基因的表达^[2-3]。因此,增强子的获得对于研究基因表达调控模式具有重要意义,但传统方法进行增强子注解效率低下。研究证实增强子捕获技术是一种有效的增强子注

释方法^[4],最早在 1979 年 Casadaban 等以 *LacZ* 为目的基因,将一个启动子缺失的乳糖操纵子载体通过噬菌体感染随机整合到大肠杆菌基因组上,最终获得了一些特异性表达的基因^[5]。受此研究启发,研究人员对启动子捕获载体进行改造,将一个报告基因和最小启动子融合取代缺失启动子的报告基因,该启动子不能单独驱动报告基因的表达,而当插入位点附近存在增强子元件时,则启动子被激活从而驱动报告基因的表达,这种方法即为增强子捕获。首个转座子介导的增强子捕获载体是基于 P 转座子设计的,以 β -半乳糖苷酶基因为报告基因,成功应用于果蝇的增强子捕

获研究^[6]。之后,转座子介导增强子捕获技术广泛应用于各种动物的增强子研究。Grabher 等^[7]在青鳉中成功应用了以转座子为介导的增强子捕获技术,Balciunas 等^[8]利用 *SB* 转座子,在斑马鱼中进行增强子捕获研究,获得了 9 种具有不同的组织或器官特异性 *GFP* 表达模式的斑马鱼品系。除此之外,研究人员对增强子捕获系统进行改进,利用酵母二元杂交系统 (*Gal4-UAS*) 进行增强子捕获。目前,二元的 *Gal4-UAS* 系统也已经成功应用于斑马鱼和果蝇的增强子捕获研究^[9-11]。

斑马鱼作为研究脊椎动物的模型,具有养殖方便、繁殖周期短、产卵量大、胚胎体外受精、体外发育、胚体透明等优点,已成为生命科学研究的重要工具。近年来,*Tol2* 转座子已成功应用于斑马鱼的增强子捕获研究^[12]。本研究通过 *sp-PCR*、原位杂交和比较基因组学等技术手段对本实验室已经建立的 *Tol2* 转座子介导的增强子捕获品系 (TK4) 进行鉴定,以期解析所捕获的增强子。

1 材料与方法

1.1 材料

Tuebingen 斑马鱼购自国家斑马鱼资源中心;*Tol2* 转座子介导的增强子捕获转基因斑马鱼 F1 代 TK4 系为本实验室制备。

基因组提取试剂盒、纯化试剂盒、切胶回收试剂盒购自宝生物工程有限公司;限制性内切酶 *Sau3A I*、T4 DNA 连接酶、退火缓冲液均购自 NEB 有限公司;无 RNA 酶 DNase I、RNasein、NaOH、链酶蛋白酶、多聚甲醛、PTU、HEPES、Tween20、tRNA、肝素钠、苯酚、氯仿、HCl、BCIP、NBT 等购自 Sigma 公司;地高辛标记 RNA 混合液、蛋白酶 K、羊抗地高辛标记物抗体等购自 Roche 公司;转录缓冲液、T7 RNA 聚合酶等购自 Promega 公司;去离子甲酰胺购自 CarloErba;羊血清、无水甲醇、NaCl、KCl、MgCl₂、无水乙

醇等购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 TK4 系斑马鱼的来源与荧光检测

TK4 系由本实验室前期通过 *Tol2* 转座子介导制备的稳定增强子捕获品系 F1 代,该转基因增强子捕获载体中含一个 *krt4* (*keratin4*) 迷你启动子和 *GFP* 表达盒 (图 1A)。将 TK4 系与 TU 系野生型斑马鱼进行交配,获得 F2 代胚胎,在 E3 溶液中培养至特定的发育时期以备荧光检测。在体式荧光显微镜 (M165FC, Lecia, 德国) 下观察不同时期的胚胎 *GFP* 的表达并做好记录。本实验中观察的胚胎 *GFP* 的表达时期分别是 6 hpf、24 hpf、48 hpf、3 dpf、4 dpf、5 dpf。

1.3 转基因在基因组上插入位点鉴定

参照文献^[13],通过 *sp-PCR* 进行转基因在基因组上插入位点鉴定。首先根据转座元件序列设计两轮 PCR 引物,接头序列参考文献^[13],引物序列及接头序列如表 1 所示。然后进行 *sp-PCR*,具体步骤如下:采用 TaKaRa 的基因组提取试剂盒提取饲养 20 d 的 F2 代斑马鱼的基因组,用 *Sau3A I* 对基因组进行酶切,以产生 GATC 末端进行后续接头连接。50 μL 反应体系为:基因组 DNA 5 μL , 10 \times NEB 缓冲液 5 μL , *Sau3A I* 3 μL , 双蒸水补齐至 50 μL 。将反应体系置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜处理,之后用 DNA 片段纯化试剂盒 (TaKaRa 公司) 进行纯化并用 45 μL 双蒸水洗脱。接头连接 50 μL 体系包括:基因组酶切 37 μL , 10 \times T4 DNA 连接酶缓冲液 5 μL , 接头 6 μL , T4 DNA 连接酶 (400 U/ μL) 2 μL ;连接反应条件:16 $^{\circ}\text{C}$, 16 h。其中,使用 SPLNK-BOT 2 μL , SPLNK-GATC-TOP 2 μL , 退火缓冲液 46 μL 进行接头合成。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min;自然降至室温。之后进行两轮 PCR,其中第一轮 PCR 体系 (50 μL) 为:连接基因组 DNA 10 μL , 双蒸水 11 μL , 2 \times Taq mix 25 μL , SPLINK 1 2 μL , *Tol2/SP1R* 2 μL 。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$

2 min, 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。第二轮 PCR 体系 (50 μ L) 为:第一轮 PCR 产物 1 μ L, 双蒸水 20 μ L, 2 \times Taq mix 25 μ L, SPLINK 2 2 μ L, Tol2/SP2R 2 μ L。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。反应完成后,将 PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳中进行电泳检测并切胶回收,测序。

1.4 增强子注解

将测序获得的染色体侧翼 DNA 序列通过 BLASTN 与 ENSEMBL 的斑马鱼基因组数据库 (GRCz10) 进行比对。为了检测整合位点附近的增强子元件,再从 Ensembl 浏览器上下载斑马鱼 *Danio rerio*、青鳉 *Oryzias latipes*、东方红鳍鲃 *Takifugu rubripes*、秀美花鳉 *Poecilia formosa*、罗非鱼 *Oreochromis niloticus*、矛尾鱼 *Latimeria chalumnae*、非洲爪蟾 *Xenopus tropicalis*、鸡 *Gallus gallus*、大鼠 *Rattus norvegicus*、小鼠 *Mus musculus*、人 *Homo sapiens* 的整合位点侧翼序列上下游各 50 kb 区域的基因组序列 (www.ensembl.org), 并将所得到的序列进行比对分析 (<http://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>)。

表 1 sp-PCR 引物序列与接头序列^[13]

Table 1 sp-PCR primers and linker sequences^[13]

Name	Sequence (5'-3')
SPLINK 1	CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACC
Tol2/SP1R	TCAAAGTCCCTCTGCGTGTC
SPLINK 2	GTGGCTGAATGAGACTGGTGTCGAC
Tol2/SP2R	GCTGGCTGACCAATTTTATACACACTC
SPLNK-GATC-TOP	GATCCCACTAGTGTGACACCAGTCTCTAATTTTTTTTTTAAAAAAA
SPLNK-BOT	CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACCGTGGCTGAATGAGACTGGTGTCGACACTAGTGG

表 2 探针 *rps26-001* 与 *rps26-201* 引物序列

Table 2 Probe *rps26-001* and *rps26-201* primer sequences

Name	Sequence (5'-3')
<i>rps26-001</i> -F1	CTAAGAAGGGACGAGGGCAT
<i>rps26-001</i> -R1	GCGTAATACGACTCACTATAGGGGCTTCACATAGAGTTTGGGCA
<i>rps26-201</i> -F2	GCCGCCGTGTGAACTATAAA
<i>rps26-201</i> -R2	GCGTAATACGACTCACTATAGGGTGGCTTCAGAGATGTCCCTG

1.5 原位杂交

根据插入位点处的内源基因 *rps26* 编码序列设计反义 RNA 原位杂交探针, 探针 *rps26-001* 以及探针 *rps26-201* 引物序列 (表 2)。采用地高辛和 T7 RNA 聚合酶标记合成反义 RNA 探针。参考文献[14]进行斑马鱼胚胎原位杂交, 通过体式显微镜 (M165FC, Lecia, 德国) 采集图片。

2 结果与分析

2.1 F2 代胚胎不同发育时期 *GFP* 表达

将 TK4 系 F1 与 TU 系斑马鱼进行杂交, 收集胚胎于 E3 培养液中培养至特定的发育时期进行观察并拍照记录。结果如图 1 所示, 在胚胎发育至 6 hpf 未观察到 *GFP* 表达 (图 1B), 在胚胎发育至 24 hpf 时观察到 *GFP* 表达, 表达部位主要集中于头部和躯干 (图 1C)。随着发育时间的延长, 组织器官逐渐分化, 48 hpf 时 *GFP* 表达部位主要集中于头部、眼睛、下颌、脊髓和肌肉等 (图 1D)。从 48 hpf 发育至 5 dpf, *GFP* 表达部位基本稳定, 主要集中于中脑、后脑、眼睛、下颌和脊髓, 肌肉的 *GFP* 荧光表达强度逐渐减弱 (图 1E-G)。

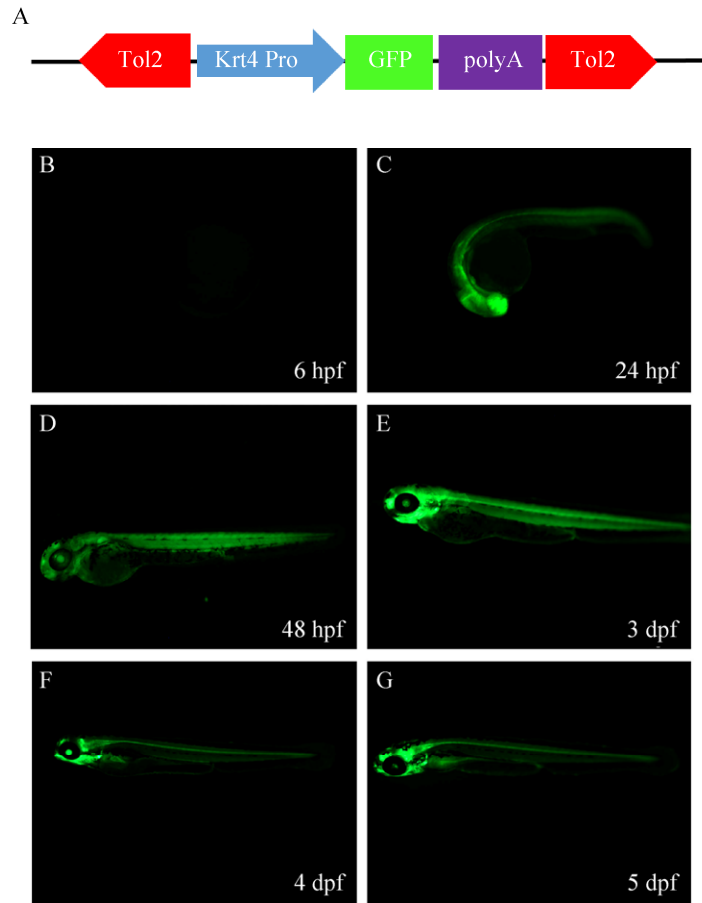


图1 TK4增强子捕获转基因斑马鱼不同发育时期的荧光表达情况 (A:TK4增强子捕获品系转基因构件示意图; B-G为不同发育阶段胚胎荧光检测)

Fig. 1 *GFP*-expression of TK4 enhancer trapping transgenic zebrafish at different developmental stages. (A) Transgenic components of TK4 enhancer trapping line. (B–G) *GFP*-expression at different developmental stages.

2.2 增强子捕获转基因斑马鱼的增强子注解

将测序结果中得到的 *Tol2* 转座子插入位点的侧翼 DNA 序列在 ENSEMBL 的斑马鱼基因组数据库 (GRCz10) 中进行比对, 结果显示捕获载体插入 23 号染色体 *rps26* 基因的 intron1 中, 且报告基因的插入方向与 *rps26* 基因的方向相反。从 Ensembl 浏览器上下载斑马鱼、青鳉、东方红鳍鲃、秀美花鳉、罗非鱼、矛尾鱼、非洲爪蟾、鸡、大鼠、小鼠、人的插入位点侧翼序列上下游各 50 kb 区域的同源基因组序列以及注解文件, 并将所得到的序列进行比对分析, 结果如

图 2 所示, 载体插入位置为黑色箭头所指。在 100 kb 的基因组范围内有 7 个基因, 分别为 *arf3a*、*wnt10b*、*wnt1*、*rps26*、*IKZF4*、*dnajc22* 和 *lmbr11*。在 *rps26* 基因的下游有 2 个 CNS, 其中 CNS1 较 CNS2 相似序列的保守度 (Identity) 更高, 相似序列的宽度 (Width) 更广, 并且这两个元件在真骨鱼类 (青鳉、东方红鳍鲃、秀美花鳉和罗非鱼) 中高度保守, 但是在两栖类 (非洲爪蟾)、鸟类 (鸡) 和哺乳类 (小鼠、大鼠和人) 中均不保守。结果提示这两个 CNS 可能为潜在的增强子。

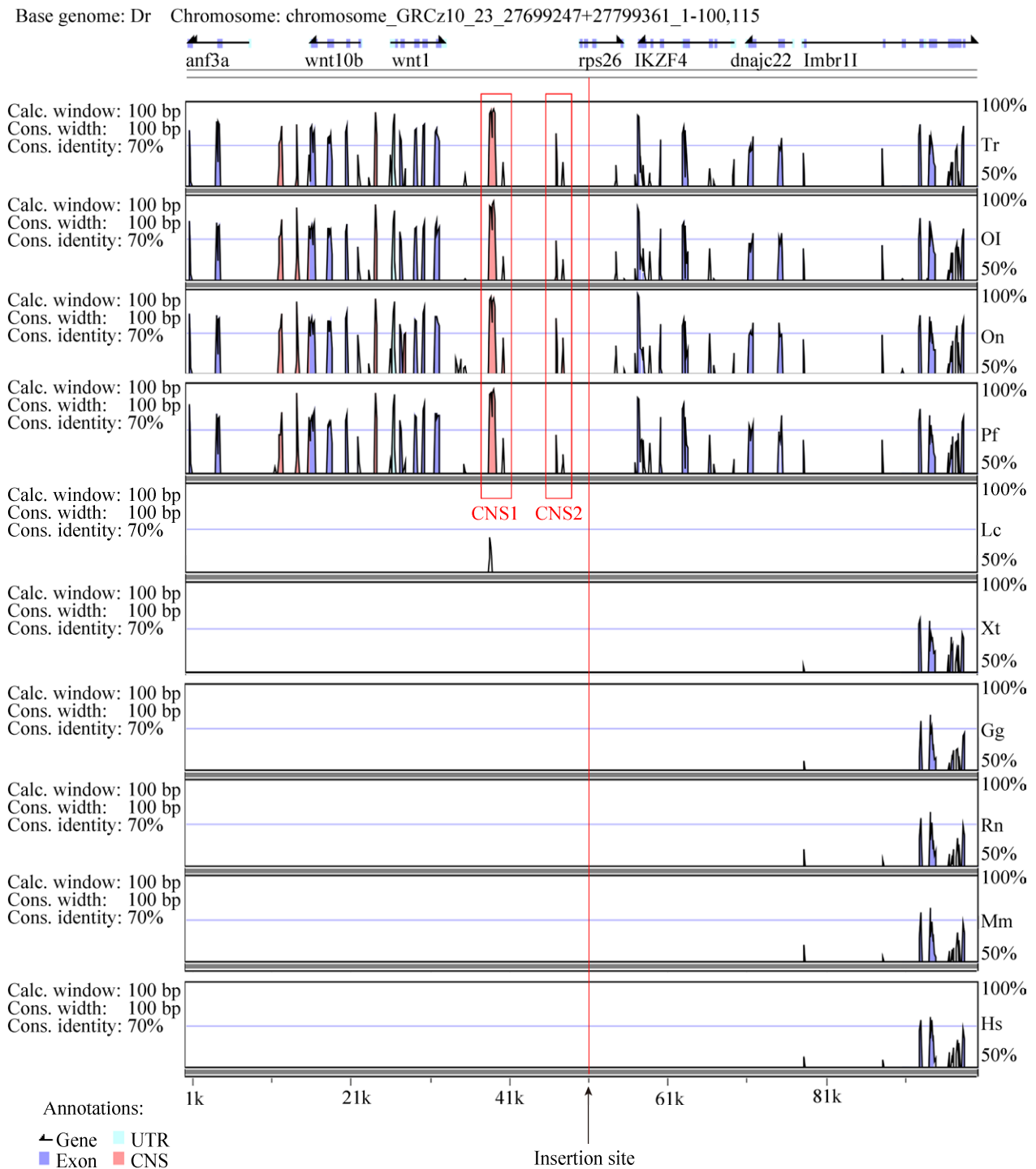


图2 插入位点侧翼区比较基因组学分析

Fig. 2 Comparative genomic analysis of the flank sequences of the insertion site. Dr: *Danio rerio*; Tr: *Takifugu rubripes*; OI: *Oryzias latipes*; Pf: *Poecilia formosa*; On: *Oreochromis niloticus*; Lc: *Latimeria chalumnae*; Xt: *Xenopus tropicalis*; Gg: *Gallus gallus*; Rn: *Rattus norvegicus*; Mm: *Mus musculus*; Hs: *Homo sapiens*; UTR: untranslated region; CNS: conserved non-coding sequence.

2.3 原位杂交

由于载体的插入位点是在 *rps26* 基因的 1 号内含子中, 为了验证 TK4 的 *GFP* 表达模式是否与 *rps26* 基因表达模式一致, 进行了受精至 3 dpf 斑马鱼早期胚胎原位杂交实验。斑马鱼 *rps26* 基因存在两个可变剪切转录本, 分别为 *rps26-001* 和 *rps26-201*, 根据这两个转录本分别设计原位杂交探针, 检测 *rps26* 基因在斑马鱼早期胚胎中的表达特性。结果显示, 两个转录本在单细胞受精卵中 (0.2 hpf) 已经启动表达, 提示存在母源性表达; 而 *rps26-001* 在 0.75 hpf 时表达有所减弱, 至 4 hpf 时表达又开始增强, *rps26-201* 在 0.75 hpf 表达明显高于 *rps26-001*, 表明 *rps26-201* 的表达启动要早于 *rps26-001*; 在 4 hpf 至 48 hpf 的发育

过程中两个转录本均有表达; 在发育至 24 hpf 时, 表达呈现全身性的特点, 无明显组织和细胞特异性, 而发育至 48 hpf 时, 表达部位主要集中于头部及中脑, 呈现明显的组织特异性; 发育至 3 dpf 时, 组织特异性表达更加明显, 主要集中于中脑-后脑连接处、眼眶以及原肾管等部位表达, 各阶段 *rps26-201* 的表达信号要高于 *rps26-001*。 *rps26-001* 和 *rps26-201* 的表达在早期胚胎 (受精至 24 hpf) 中呈现无明显组织和细胞特异性, 且启动较早, 而 *GFP* 在 6 hpf 时尚无表达信号, 至 24 hpf 则呈现一定的组织特异性, 两者并不一致, 但后期 *rps26-001* 和 *rps26-201* 的表达与 *GFP* 表达模式部分相似, 包括主要集中在脑部, 特别是中脑信号比较强。

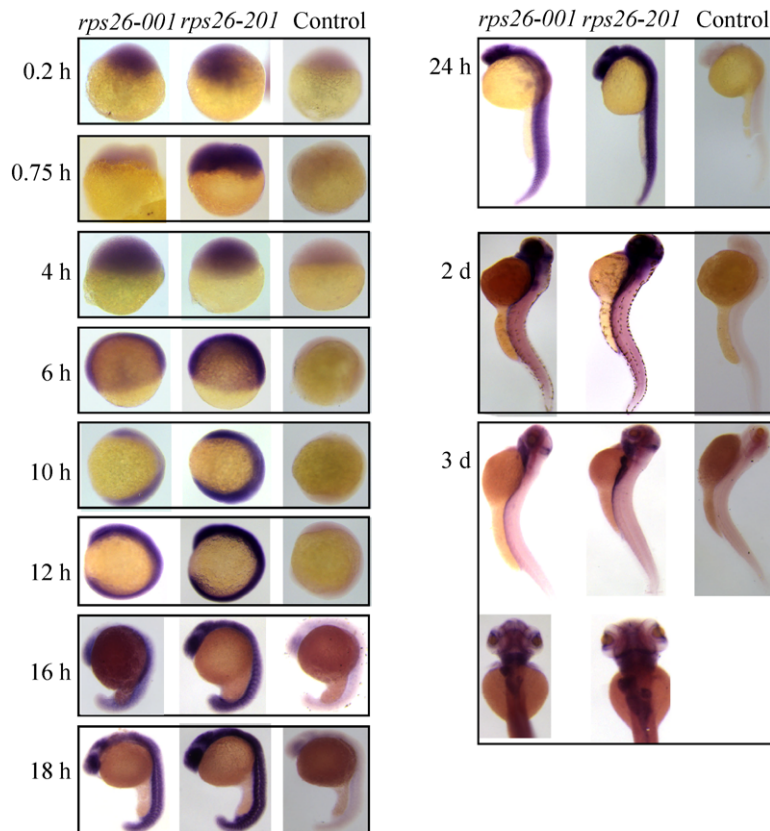


图3 *rps26-001* 和 *rps26-201* 转录本在不同发育阶段斑马鱼胚胎中原位杂交

Fig. 3 *In situ* hybridization for *rps26-001* 和 *rps26-201* transcripts at different stages of zebrafish embryos.

3 讨论

转座子是在基因组内可自主移动的一段 DNA 序列,最早是由 McClintock 在研究玉米籽粒颜色遗传时发现的^[15]。而 *Tol2* 转座子则是由 Koga 等在研究白化青鳞鱼时发现^[16],属于 hAT 转座子超家族。目前,*Tol2* 转座子因其可携带较长的插入片段等优势,已广泛应用于斑马鱼、爪蟾、鸡和小鼠等模式脊椎动物的研究中^[12,17-19]。最近研究表明,*Tol2* 转座子已成功应用于斑马鱼的功能基因^[20]和增强子捕获^[21-23]的研究中。传统的增强子捕获技术需要耗费大量的人力物力,为了分离到单性状的个体,需要制备大规模的 G3 代突变群体,除此之外,传统方法很难分离得到增强子。目前在斑马鱼上进行增强子捕获研究最有效的方法是利用转座子介导的增强子捕获技术,这一技术为研究相关基因的调控模式提供了很好的工具。近年来,利用转座子介导的增强子捕获技术获得插入突变体库进而对相关器官功能、疾病等的研究已取得较大进展。Parinov 等^[12]利用 *Tol2* 转座子介导斑马鱼增强子捕获技术,建立突变品系,研究斑马鱼发育的相关功能基因。Xue 等^[24]通过 *Tol2* 转座子介导的大规模增强子诱捕筛选到 26 个血管特异表达绿色荧光蛋白 (EGFP) 报告基因的转基因斑马鱼系,其中有一些品系在胚胎的某些特异血管结构中表达绿色荧光蛋白。最终获得 EGFP 报告基因受 *hhex* 或 *ets1a* 基因增强子控制的转基因斑马鱼品系,而 *hhex* 和 *ets1a* 基因对血管与血细胞前体的发育具有重要作用,因此,该品系为深入研究这两个基因在血管与血液发育中的作用机制提供了新的机遇。Huang 等^[25]利用 *Tol2* 转座子系统介导的增强子捕获技术构建得到了心肌特异性表达 *GFP* 的转基因斑马鱼,且在心房和房室管中观察到了特异性表达的 *GFP*。

本课题组采用 *Tol2* 转座子介导的增强子捕获技术获得了大量斑马鱼插入突变体,通过报告基因 *GFP* 可确定捕获的增强子和内源基因时空表达特性,大大提高了筛选效率。我们已通过表型筛选建立了若干个突变品系,本研究所用的 TK4 系斑马鱼表型为头部和躯干具有较为明显的 *GFP* 表达,通过 sp-PCR 的方法成功地克隆到了 *Tol2* 转座子插入位点的侧翼基因组序列,揭示了 TK4 系的插入位点是 *rps26* 基因的 1 号内含子,并且报告基因的插入方向与基因相反。同时结合比较基因组学手段,通过跟其他物种进行同源比对,发现在 *rps26* 基因下游有 2 个潜在的增强子信号 (CNS1 和 CNS2),其中 CNS1 较为明显,在鱼类中保守性较强。在 CNS1 的上下游有很多基因,包括 *arf3a*、*wnt10b*、*wnt1*、*rps26*、*IKZF4*、*dnajc22* 和 *lmbr11*。已有研究表明,*Wnt1* 在小鼠的中脑和前后脑的形成中起重要作用,在斑马鱼中需要 *wnt1* 和 *wnt10b* 来维持中脑和后脑连接处的 Pax2.1 和 Fgf8 的阈值水平^[26]。*rps26* 基因编码的核糖体蛋白就是核糖体小亚基 40S 的组成部分,该蛋白属于 *rps26e* 核糖体蛋白家族^[27]。*IKZF4* 也称转录因子 *Eos*,是锌指蛋白转录因子 *ikaros* 家族中的一员。作为负性调节因子可以参与许多基因的表达调控^[28]。有研究表明,*Eos* 位于细胞核中,在中枢神经和周围神经系统的发育过程中扮演重要角色^[29]。*Eos* 对淋巴系细胞发育和形成过程也有重要作用^[30]。*dnajc22* 作为果蝇 *wurst* 基因的同源物,目前研究较少,而果蝇 *wurst* 基因编码一种 J 结构域跨膜蛋白,该蛋白是果蝇气管尺寸和气道清除的必要调节因子^[31]。对于基因 *arf3a* 和 *lmbr11* 的功能及其表达特性,目前尚未见报道。目前关于这些基因的表达调控机理也尚未见报道。而该品系的建立及注释对于进一步研究这些基因的功能特点及其表达调控机制提供了很好的模式动物。Gharbi 等^[32]所捕获的转基因斑马鱼品

系中, 通过原位杂交验证了捕获的内源性基因 *kctd15a* 与转基因斑马鱼荧光蛋白表达模式基本一致, 而且在后期的发育过程中也有着相似的时空表达特征。在 Liu 等^[4]所捕获的转基因斑马鱼品系中, 通过对 *EGFP* 和捕获的内源性基因设计反义 RNA 探针来检测内源性基因的表达模式比较, 发现 *EGFP* 的表达模式与所捕获到的内源性基因基本一致。在刘帅军等^[33]所捕获的转基因斑马鱼品系中, 通过原位杂交验证了捕获的内源性基因 *denraa* 与转基因斑马鱼 *GFP* 表达模式基本一致。而本研究中通过比较 TK4 的 *GFP* 表达模式与 *rps26* 基因原位杂交结果, 发现两者表达模式存在相似之处, 但也并不完全一致, 提示两者可能既接受共同的增强子调控, 但也存在不同增强子调控, 所获得的 2 个潜在的增强子 (CNS1 和 CNS2) 可能对附近的基因 (包括 *rps26*) 发挥差异的时空表达调控作用, 但需进一步深入研究验证。

4 结论

本研究首次获得了 *rps26* 基因的 2 个潜在增强子调控元件, 揭示了 *rps26* 基因表达特性及其与潜在增强子调控的可能联系。研究结果为深入理解和研究 *rps26* 基因调控机制提供重要参考; 同时本研究所尝试的增强子研究综合技术手段 (包括转座子介导的增强子捕获、sp-PCR、比较基因组学和原位杂交等) 也为后基因组时代解析基因表达调控提供方法参考。

REFERENCES

- [1] Banerji J, Rusconi S, Schaffner W. Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*, 1981, 27(2): 299–308.
- [2] Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T, et al. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature*, 2005, 435(7042): 637–645.
- [3] Lomvardas S, Barnea G, Pisapia DJ, et al. Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell*, 2006, 126(2): 403–413.
- [4] Liu CY, Song GL, Mao L, et al. Generation of an enhancer-trapping vector for insertional mutagenesis in zebrafish. *PLoS ONE*, 2015, 10(10): e0139612.
- [5] Casadaban MJ, Cohen SN. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: *in vivo* probe for transcriptional control sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(9): 4530–4533.
- [6] Bellen HJ, O’Kane CJ, Wilson C, et al. P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes Dev*, 1989, 3(9): 1288–1300.
- [7] Grabher C, Henrich T, Sasado T, et al. Transposon-mediated enhancer trapping in medaka. *Gene*, 2003, 322: 57–66.
- [8] Balciunas D, Davidson AE, Sivasubbu S, et al. Enhancer trapping in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *BMC Genomics*, 2004, 5(1): 62.
- [9] Bellen HJ. Ten years of enhancer detection: lessons from the fly. *Plant Cell*, 1999, 11(12): 2271–2281.
- [10] Distel M, Wullmann MF, Köster RW. Optimized Gal4 genetics for permanent gene expression mapping in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(32): 13365–13370.
- [11] Asakawa K, Kawakami K. The *Tol2*-mediated Gal4-UAS method for gene and enhancer trapping in zebrafish. *Methods*, 2009, 49(3): 275–281.
- [12] Parinov S, Kondrichin I, Korzh V, et al. *Tol2* transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes *in vivo*. *Dev Dyn*, 2004, 231(2): 449–459.
- [13] Potter CJ, Luo LQ. Splinkerette PCR for mapping transposable elements in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 2010, 5(4): e10168.
- [14] Thisse C, Thisse B. High-resolution *in situ* hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc*, 2008, 3(1): 59–69.
- [15] McClintock B. Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1951, 16: 13–17.
- [16] Koga A, Suzuki M, Inagaki H, et al. Transposable element in fish. *Nature*, 1996, 383(6595): 30.
- [17] Hamlet MRJ, Yergeau DA, Kuliyeve E, et al. *Tol2*

- transposon-mediated transgenesis in *Xenopus tropicalis*. *Genesis*, 2006, 44(9): 438–445.
- [18] Sato Y, Kasai T, Nakagawa S, et al. Stable integration and conditional expression of electroporated transgenes in chicken embryos. *Dev Biol*, 2007, 305(2): 616–624.
- [19] Keng VW, Ryan BJ, Wangenstein KJ, et al. Efficient transposition of *Tol2* in the mouse germline. *Genetics*, 2009, 183(4): 1565–1573.
- [20] Clark KJ, Urban MD, Skuster KJ, et al. Transgenic zebrafish using transposable elements. *Methods Cell Biol*, 2011, 104: 137–149.
- [21] Asakawa K, Suster ML, Mizusawa K, et al. Genetic dissection of neural circuits by *Tol2* transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(4): 1255–1260.
- [22] Fisher S, Grice EA, Vinton RM, et al. Evaluating the biological relevance of putative enhancers using *Tol2* transposon-mediated transgenesis in zebrafish. *Nat Protoc*, 2006, 1(3): 1297–1305.
- [23] Kondrychyn I, Teh C, Garcia-Lecea M, et al. Zebrafish Enhancer TRAP transgenic line database ZETRAP 2.0. *Zebrafish*, 2011, 8(4): 181–182.
- [24] Xue YL, Xiao A, Wen L, et al. Generation and characterization of blood vessel specific EGFP transgenic zebrafish via *Tol2* Transposon mediated enhancer trap screen. *Prog Biochem Biophys*, 2010, 37(7): 720–727.
- [25] Huang W, Deng Y, Dong W, et al. The effect of excess expression of GFP in a novel heart-specific green fluorescence zebrafish regulated by *nppa* enhancer at early embryonic development. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(2): 793–799.
- [26] Lekven AC, Buckles GR, Kostakis N, et al. *Wnt1* and *wnt10b* function redundantly at the zebrafish midbrain-hindbrain boundary. *Dev Biol*, 2003, 254(2): 172–187.
- [27] Hou YL, Sun B, Hou WR. cDNA cloning and sequence analysis of ribosomal protein S26 gene (rps26) from the giant panda. *J Beijing Norm Univ: Nat Sci*, 2010, 46(2): 177–181 (in Chinese).
侯怡铃, 孙冰, 侯万儒. 大熊猫核糖体蛋白 S26 亚基基因 (rps26) 的 cDNA 克隆及序列分析. *北京师范大学学报: 自然科学版*, 2010, 46(2): 177–181.
- [28] Caballero R, Setien F, Lopez-Serra L, et al. Combinatorial effects of splice variants modulate function of Aiolos. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 15): 2619–2630.
- [29] Bao JX, Lin HN, Ouyang YN, et al. Activity-dependent transcription regulation of PSD-95 by neuregulin-1 and Eos. *Nat Neurosci*, 2004, 7(11): 1250–1258.
- [30] Pan F, Yu H, Dang EV, et al. Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4⁺ regulatory T cells. *Science*, 2009, 325(5944): 1142–1146.
- [31] Behr M, Wingen C, Wolf C, et al. Wurst is essential for airway clearance and respiratory-tube size control. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(7): 847–853.
- [32] Gharbi N, Zhao XF, Ellingsen S, et al. Zebrafish enhancer trap line showing maternal and neural expression of *kctd15a*. *Dev Growth Differ*, 2012, 54(2): 241–252.
- [33] Liu SJ, Shen D, Zhong JH, et al. The annotation of enhancer-trapping mediated by the SB transposon in zebrafish. *Biotechnol Bull*, 2017, 33(5): 153–158 (in Chinese).
刘帅军, 沈丹, 钟继汉, 等. SB 转座子介导的斑马鱼增强子捕获注解分析. *生物技术通报*, 2017, 33(5): 153–158.

(本文责编 郝丽芳)