

金鱼 *Prox1* 基因 cDNA 的克隆及其在眼睛发育中的表达分析

马冬梅^{1,2}, 朱华平^{1,2}, 桂建芳^{1,*}

(1. 中国科学院水生生物研究所 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 脊椎动物的 *Prox1* 基因, 与果蝇的转录因子 *prospero* 同源。为了探讨 *Prox1* 基因在金鱼眼睛发生过程中的表达图式, 我们从金鱼眼睛 SMART 库中克隆了 *Prox1* cDNA。它全长共 2851bp, 编码 739 个氨基酸。组织分布研究表明, *Prox1* 主要分布于眼、脑、心、肝、脾和肾中。整体原位杂交显示, *Prox1* mRNA 首先是在晶体期的晶体原基中有转录, 心跳期则在未成熟晶体的细胞中和视网膜的幼芽区可以检测到。晶体纤维形成后, 它主要定位于视纤维层和内网织细胞层。免疫组化显示, 心跳期 *Prox1* 蛋白的定位与 mRNA 相同, 晶体纤维形成以后, *Prox1* 蛋白主要定位在晶体上皮细胞内侧的晶体纤维上一个环状区域, 与 *Prox1* mRNA 的定位不同。这说明, *Prox1* 基因在晶体发生过程中有重要作用, 且在晶体的不同发育时期起的作用可能有所不同。另外, *Prox1* 在晶体发育过程中有一个从内向外的变化过程。

关键词: Homeobox 结构域; *Prospero* 结构域; 金鱼 (*Carassius auratus*); 眼睛发育

中图分类号: Q959.468; Q786; Q344 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2007)06-0589-08

Molecular Cloning and Expression Characterization of *Prox1* in Goldfish (*Carassius auratus*) Eye Development

MA Dong-mei^{1,2}, ZHU Hua-ping^{1,2}, GUI Jian-fang^{1,*}

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In vertebrates, *Prox1* is homologous to the *Drosophila* transcription factor, *prospero* gene. In order to explore *Prox1* expression pattern in goldfish, the 2832bp full-length cDNA was cloned, which encodes a protein with 739 amino acids, and the protein exhibits a 93% similarity to *Danio rerio* *Prox1*. The results of RT-PCR and Western-blotting analysis revealed *Prox1* expression in eye, brain, heart, liver, spleen and kidney, but not in the muscle of the goldfish. RT-PCR results indicated that there exists a small quantity of maternal *Prox1* mRNAs in the mature eggs, and the zygotic *Prox1* begins to transcribe from the gastrula embryos, and the expression level increased in the developmental process. Whole-mount *in situ* hybridization demonstrated that in the eye *Prox1* mRNA is first predominately detected in the lens placode at lens stage. Then the *Prox1* mRNA is localized in the whole puerile lens cells and retina germinative zone at the heartbeat stage. After lens fibers form, it can be detected predominantly in the optic fiber layer and inner plexiform layer. At the same time, the *Prox1* protein expression in the lens is detected by immunofluorescence. At the heartbeat stage, the localization of *Prox1* protein is the same as the mRNA. But when the lens fibers are forming, it is detected in a ring-shaped region on lens fibers under lens epithelium, which is different from the mRNA localization. The results suggest that the *Prox1* gene plays an important role during lens development, and the roles are different at different developmental stages. In contrast to expression patterns from the outside to the inside of the mouse, the *Prox1* localization in goldfish lens exhibits from inside to outside.

Key words: Homeobox domain; *Prospero* domain; Goldfish (*Carassius auratus*); Eye development

脊椎动物的 *Prox1* 基因与果蝇的一个 *prospero* 转录因子为同源基因, *prospero* 在果蝇发育中的中

枢神经系统和眼睛中有表达。*Prox1* 基因在脊椎动物许多器官的发育过程中起调节作用, 如晶体、视网

收稿日期: 2007-09-20; 接受日期: 2007-11-02

基金项目: 国家重点研究发展计划 (973) 项目 (2004CB117401) 资助

*通讯作者 (Corresponding author), 桂建芳, E-mail: jfgui@ihb.ac.cn, Fax: +86-27-87875132

膜、脑、肝、肾原基细胞和淋巴系统等 (Duncan et al, 2002; Belecky-Adams et al, 1997; Torii et al, 1999; Sosa-Pineda et al, 2000; Liu et al, 2003; Wigle & Oliver, 1999b), 原位杂交实验表明, 在斑马鱼、小鼠和鸡的胚胎发育过程中, 首先是在晶体基板或晶体原基细胞内可以检测到 *Prox1* mRNA 的大量表达 (Glasgow & Tomarev, 1998; Oliver et al, 1993; Tomarev et al, 1996)。它的表达图式说明它在胚胎发育的许多组织中起了重要作用, 其中包括晶体。在分析哺乳动物胚胎发育过程中 *Prox1* 基因的功能时, *Prox1* 缺失的纯合小鼠由于多种器官的缺陷活不到出生就死亡了。其中包括晶体发育的缺陷, 由于 *Prox1* 基因的缺失引起了细胞的不正常增殖, 细胞周期抑制因子 *Cdkn1b* 和 *Cdkn1c* 的下调表达, *E-cadherin* 的错误表达和不正确的细胞凋亡, 使得突变的晶体细胞不能正常极化和延伸, 最后导致晶体中空 (Wigle et al, 1999a)。这个结果说明, 在晶体发育过程中的 *Prox1* 基因活性对于晶体纤维的分化和延伸过程必不可少。

目前, *Prox1* 基因的研究主要集中在鸟类、小鼠和人, 对果蝇、蝶螈、爪蟾和斑马鱼也有一些研究。人、鸡、小鼠、爪蟾和斑马鱼的 *Prox1* cDNAs 已得到了克隆和分析 (Zinovieva et al, 1996; Tomarev et al, 1996, 1998; Mizuno et al, 1999; Glasgow & Tomarev et al, 1998), *Prox1* 基因的共同特征是具有 homeodomain 和 *Prospero* domain。

金鱼 (*Carassius auratus*) 是人们十分喜爱的观赏鱼, 品种众多, 色彩斑斓, 均起源于野生鲫鱼。就眼睛的变异来说, 金鱼的眼睛除正常眼外还有多种突变体形式, 如龙睛、望天眼、水泡眼等。为了研究金鱼眼睛发育的分子机制, 我们克隆并分析了编码金鱼 *Prox1* 蛋白的 *Prox1* cDNA。利用胚胎整体原位杂交和免疫荧光定位的方法初步探讨了 *Prox1* 在正常眼金鱼眼睛发育中的表达图式。

1 材料与方法

1.1 金鱼及其胚胎

金鱼亲鱼取自广东省东海水族公司。我们对金鱼进行人工繁殖, 并取不同发育时期的胚胎进行实验。各种组织, 包括眼、脑、心、肝、脾、肾和肌肉均取自一龄金鱼。

1.2 总RNA的提取和SMART cDNA合成

用Promega公司的SV Total RNA Isolation Kit

提取金鱼眼睛组织的总RNA, 方法按试剂盒说明书。SMART cDNA 的合成方法按照 SMART cDNA synthesis Kit (Clontech) 操作手册的说明。

1.3 *Prox1* cDNA的克隆

根据已知 *Prox1* 基因的保守序列, 设计2个引物: PR1: 5'-CAGTGATGCCTGACCATGAC-3' (5'引物, 53-72nt); PR2: 5'-ACTATTCATGCAGAAGCTCC-TG-3' (3'引物, 2278-2257nt)。

从金鱼眼睛的 SMART 库中扩增金鱼 *Prox1* 的片段, 将 PCR 产物回收后克隆到 pMD-18T 载体, 并测序。用 RACE 方法扩增得到其全长 cDNA, 在 NCBI 网站 BLAST 程序搜索同源基因, 并用 Vector NTI suite 8.0 软件进行多个序列比较分析。

1.4 *Prox1* 的原核表达及多克隆抗体的制备

以金鱼 *Prox1* cDNA N 端编码 293 个氨基酸的片段设计引物 PRE5 和 PRE3:

PRE5:

5'-GCGGATCCATGCCTGAACATGACAGC-3';

PRE3:

5'-GCGAATTCTTAGTCTTCAGATGTTTCCAT-3'。

以 PRE5 和 PRE3 为引物, SMART cDNA 为模板, 用高保真 Taq 酶进行 PCR 反应, 产物插入表达载体 pET-32a, 阳性克隆用 IPTG 诱导重组蛋白表达。蛋白纯化和多克隆抗体的制备方法参照 Dong et al (2004)。

1.5 RT-PCR和Western blot分析

用 Promega 公司的 SV Total RNA Isolation Kit 提取金鱼各时期胚胎和成鱼各组织的总RNA, 方法同上。取各种 RNA 用逆转录酶 Powerscrit 和 oligo (dT) 合成第一链模板 cDNA, 以 PR1 和 PR3 (5'-GAACGCATGCTGTCTTCGG-3'; 899-881nt) 为引物进行 PCR 反应, 以金鱼的 β -actin 基因作为对照。Western blot 的方法参照 Xu et al (2005)。

1.6 整体原位杂交

将 *Prox1* cDNA 片段 (58—899 nt) 克隆至 pGEM-T 载体, 以这个重组质粒为模板, 用 PR1 和 T7 引物扩增, PCR 产物纯化后用作反义 RNA 探针的模板; 用 SP6 和 PR3 引物扩增, PCR 产物纯化后用作正义 RNA 探针的模板。用 DIG RNA Labeling Mix (Roche) 中的 T7 和 SP6 RNA 聚合酶及地高辛 (digoxigenin) 标记的 UTP 在体外转录得一到反义和正义的 RNA 探针, 方法按照 DIG RNA Labeling Mix 操作手册的说明。整体胚胎原位杂交的方法参

照 Kawahara et al (2000)。

1.7 荧光免疫组织化学分析

方法参照 Dong et al (2004)。

2 结 果

2.1 *Prox1* cDNA 的克隆和序列分析

金鱼 *Prox1* 基因 cDNA 全长共 2851bp, 其中 223bp 的开放阅读框编码 739 个氨基酸。它的 3'非编码区(UTR)共 571bp, 5'非编码区较短只有 57bp。3'非编码区有 2 个典型的多聚腺苷酸信号序列(AATAAA), 一个在 19 个多聚腺苷酸的 poly(A)前 16bp 处, 另一个在 poly(A)开始处。在 3'非编码区还有 1 个与 mRNA 不稳定有关的序列(ATTTA)(图 1)。

氨基酸序列比对(图2)表明, 金鱼的*Prox1*蛋白与斑马鱼(*Danio rerio*) *Prox1*蛋白的同源性最高为 93%, 与人(*Homo sapiens*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、小鼠(*Mus musculus*)和狗(*Canis familiaris*)的同源性为 81%, 与鸡(*Gallus gallus*)的同源性为 80%, 与爪蟾(*Xenopus laevis*)的同源性为 77%。金鱼的*Prox1*蛋白 C-端 159 个氨基酸包括一个 homeodomain (HD; residues 581–636) 和一个 Prospero domain (PD; residues 637–739)。在 PD 中金鱼比其他物种的*Prox1*蛋白多一个谷氨酸 Q (Glu)。

2.2 *Prox1* 表达的组织分布

不同组织的 RT-PCR 检测(图 3A)表明, 金鱼 *Prox1* 主要是在心、肝、脑和眼中有高水平的转录, 在脾和肾里也有低水平的表达, 但在肌肉中则没有检测到表达。

原核表达的 *Prox1* 蛋白片段免疫家兔后, 制备的兔抗血清用来检测 *Prox1* 蛋白在金鱼的各组织中的表达特征。Western blot 分析(图 3B)表明, 一条大约 83 kD 的特异带可以在眼、心、肝、脾、肾和脑组织中检测到, 而在肌肉中检测不到这条特异带, 这与组织 RT-PCR 检测结果相符。

2.3 金鱼 *Prox1* 在胚胎发育过程中的表达图式和眼睛中的定位

在胚胎发育过程中, *Prox1* mRNA 在所有的时期都可以检测到。受精前, 母源的 *Prox1* mRNA 就少量的存在于卵内, 当胚胎发育到原肠胚期, 新的 *Prox1* mRNA 开始转录表达, 而且从原肠胚到出苗期有一个表达水平增加的趋势(图 4)。这与 *Prox1* 基因在其他脊椎动物已知的早期表达图式相似。

为了进一步研究 *Prox1* 在金鱼胚胎发育中的时空表达特征, 我们以 *Prox1* mRNA 片段为探针, 在金鱼不同时期的胚胎中进行整体原位杂交, 并切片观察。同时以 *Prox1* 蛋白的兔抗血清做免疫组化实验, 对 *Prox1* 蛋白进行荧光定位分析。实验结果表明, 在金鱼胚胎发育过程中, *Prox1* mRNA 首先在晶体期胚胎的晶体原基中被检测到。切成 12 μ m 厚的切片后, 在光学显微镜下观察, 晶体原基细胞增殖形成向视杯内的突起, *Prox1* mRNA 首先就被观察到分布于这个突起的表皮细胞内, 这说明 *Prox1* 可能与晶体的诱导和发生有关。晶体原基的表皮细胞向内继续分层增厚, 在所有晶体原基增生出的细胞中都可以观察到 *Prox1* mRNA 的强烈信号(图 5A 和 B)。

心跳期晶体原基的细胞不断增殖、分层, 晶体已形成一个椭圆形的球体, 仍附着于头部外胚层, 并准备脱离。在椭球形晶体内所有的无规则排列的细胞中都可以观察到 *Prox1* mRNA 的强烈信号, 且主要分布于晶体细胞的细胞质中(图 5C)。用荧光免疫组化的方法研究 *Prox1* 蛋白的定位, 结果表明 *Prox1* 蛋白在心跳期也主要定位于晶体细胞中, 与原位杂交的结果一致(图 5D)。

在出苗前期和出苗期, 晶体纤维形成, 但在晶体纤维中没有 *Prox1* mRNA 表达。*Prox1* mRNA 强烈的信号已转移至位于晶体和神经节细胞层之间的视纤维层中。同时, 在神经节细胞层和内核层之间的内网织层中也有 *Prox1* mRNA 强烈的信号(图 5E); 而出苗期 *Prox1* 蛋白的免疫定位结果表明, *Prox1* 蛋白主要定位于晶体上皮细胞内侧的晶体纤维上一个环状区域(图 5F)。

3 讨 论

视网膜原始细胞在发育过程中精确调节它们本身的增殖与分化, 以确保每种细胞类型按正确的数量在适当时间出现。Dyer et al (2003) 发现, *Prox1* 蛋白可以调节小鼠胚胎视网膜中原始细胞的分裂状态, 缺失 *Prox1* 的细胞似乎不能停止分裂, 而 *Prox1* 的异位表达又可以使原始细胞脱离细胞分裂周期。其他的研究也表明, 在脊椎动物视网膜中, *Prox1* 蛋白的活性为原始细胞增殖和分化的充分必要条件。

Prox1 蛋白的一个重要特征是具有 homeobox 结构域(HD)和 *Prospero* 结构域。在 *prospero* 结构域中, 金鱼的 *Prox1* 蛋白在第 678 个氨基酸处比

PR1
→

TCTCAGCTGTGCCAGCTGACAGGCTTTCAAAGATGGCACAATAACAGTTCCAGTGA**ATG**CCTGACCATGACAGCATCC 81
M P D H D S T S
CTCTTAAGTAGACAAACCAAGAGAAGAGTTGACATAGGAGTGAAGAGGACTGTTGGGCAAGCGTCTGTGTTTTTCGCA 162
L L S R Q T K R R R V D I G V K R T V G Q A S V V F A
CGAGCAAAAGCAACCTTTTATGTCATGAATCCCAAGGCTCCGACCAAGGATGTTGAGTGTCTGTGTACAGCAGCA 243
R A K A T F F S A M N P H G S D Q D V E C S V V Q H A
GACAGCGAAAAGTCCAAGCTGCTTCGCAAGCTGTTGAAGCGCGCAAACTCTTATGGAGACGCTATGATGCCCTTCCGGGG 324
D S E K S N V L R K L L K R A N S Y G D A M M P F P G
GCAACCATCATCTCCAGCTTCTGAAAAACAATTGACCAAAATGGAGCAGTGAGACTAATTTCCAGGGAAGTGGCTC 405
A T I I S Q L L K N N L T K N G G S E T N F Q G S G L
TCGAGCACTGGTTCAGAGATCCAGCAAGAGGATGCTTGCAGCAATTCCTCAGGGGACGCCCTCAGGAGTGCTTTCCACCA 486
S S T G S E I Q Q E D A C S N S S R G S P Q E C L S P
TTCAACAGGCCCTCCATGACCAATTTGATATAGAGAGGCTAACAGATGAGCATCTTAGGGCCAAAAGAGCCGAGTGGAG 567
F N R P S M T Q F D I E R L T D E H L R A K R A R V E
AATATCATCGCTGGGATGAGCAATTCCTCCAGCTCAGCTCCGTGCAAGTGATAATGAGCGGAGGGGGCAGCCGAGCC 648
N I I R G M S H S P S V T L R A G D N E R E G A A Q P
CCGAGTCTCGTGAGAACTACCGGAAAAAAGCGCAAGCAGAACTACCAAGCAGCAGCAACAGAGTTTTCAGCAGCTC 729
P S P R E N Y R E N K R K **Q K L P Q Q Q Q Q S F Q Q I**
GTCTCTGCACGCAAGAGCAGAAACATGAAGAACGCCGGCAACTGAACTGCAGCTGGAGGACATGCAGAACGCTCCGG 810
V S A R K E Q K H E E R R Q L K L Q L E D M Q K Q L R

PR3
←

CAACTGCAAGAGAAGTTCTACAGATTTACGACAGCACTGATTCTGAGAACGACGAAGATGGAACATCTCCGAAGACAGC 891
Q L Q E K F Y Q I Y D S T D S E N D E D G N I S E D S
ATGCGTTCCGACAGAAATGGACAATCGTCCCATGCTCTCCAGATCGCTCCGACAAAGAGATGTCTGAGCTGGATCCG 972
M R S D R M D N R A H D S V P D R S D N E M S D V D P
GGGCACTTCTGGATCGAGCGTGTGCACTTATTCGAGAGCAGAACATAGTGACAGACGGGGACAAACCAAGCCGATGGG 1053
G H F L D R A C A L I R E Q N I V T D G D K P K R D G
TCACGAGGAAGAACCAGGACCAATCTCCATGCATGCAGAGGGCAACAGCTAGCAGAGACGCTAAAACAGGAGCTCAAT 1134
S R G K N Q G P I S M H A E G K Q L A E T L K Q E L N
ACAGCAATGTCCCAAGTAGTGACACTGGTGAAGGTCTTTGCTAAGCTCCACGCCAGTTCTCAGGTGTTCCCAACC 1215
T A M S Q V V D T V V K V F A K P P R P V P Q V F P P
CTGCAGATGCTCTGATCGTTTCGCACTCAATGGAGAAAACCAAACTTCCATACTGCCAACGAGCGTTGCAATGTTTT 1296
L Q M P P D R F A V N G E N P N F H T A N Q R L Q T T
GGTGTATGCATATTCCTAATCCCTGGACACTTTCGCTAACATGCAGGTGCCCAACTCGAATGACCAACAGAGGCCCTG 1377
G D V I I P N P L D T F A N M Q V P N S N D Q T E A L
CCTTTGGTAGTGAGAAAGAACTCTCAGATCAGACTGGGTCTCTTCCACACTGGGGGTACCATCATCCCTCCCTCCAC 1458
P L V V R K N S S D Q T G S L P T P G G H H P S L H
CCCTCAGACTTATCTTCGCAATGGGCTTTAGTCTCCCTCTTCCGCCATCTTCCCTCTCTAATGGGCTACCTC 1539
P S H L S S A M G F S P S F R H P F P L P L M G Y P
TTCCAAAGCCCTTAGGTGCCCAACAGGGCTTGGCCGTGAAAGGATAGGTCTTCTCCGAATCTCTGGATCTGTCCAGA 1620
F Q S P L G A P T G P C P G K D R S S P E S L D L S R
GAGACCACCATTTACGACCAAGATGTATCAACCATCTGAGCCACCATCGTTCCATCTACCAACACACCCAGGGAAT 1701
E T T I L R T K M S S N H L S H H R S I S P T H P N
GAAGGCTGTCTTGTCCCTCATCAAGTCAGAGTGTGGAGACCTTCAGGACATGTCTGACATCTCTCCATATTAGGAAT 1782
E G L S L S L I K S E C G D L Q D M S D I S P Y S G S
ACAATCCAAGAGGGCTTTCGCAACCATCTGAAGAAAGGCAAGCTGATGTTTTTCAACGACGCTACCCAGCTCCAAAC 1863
T I Q E G **L S P N H L K K A K I M F F Y A R Y P S S N**
ATGCTGAAGATGTTCTTCTCAGACGTGAAGTTCAACCGCTGCATCAGATCCAGCTGATCAAGTGGTTTCAGTAACCTCCGT 1944
M L K M F F S D V K F N R C I T S Q L I K W F S N R
GAGTCTTACTACATCCAGATGGAGAAATTCGCTCGGACGCCATCAACGACGGAATAACAGGGGACAGCAGCTGAGCGTG 2025
F F Y Y I Q M E K F A R Q A I N D G I T G A D E L S V
AGCCGGGACGCGAGCTTTCCGCGCTCTTAACATGCATCAACAAGGCCAACGATTGAGCAGGTTCCGGAGCGATTCT 2106
S R D C E L F R A L N M H Y N K A N D F E Q V P E R F
CCGGAAGTGCCACAGATCACATTACGGGAGTTTTCATGCCATTGTGGCAGGCAAGATGTTGATCCTTCTCGAAGAAAG 2187
P E V A Q I T L R E F F N A I V A G K D V D P S W K K
GCCATATACAGGTCATCTGCAAGCTGGACAGTGAGTCCAGAGATTTTAAATCTCCCAATTGCTCTGACGAGCTTCTG 2268
A I Y K V I C K L D S E V P E I F K S P N C L Q E L I
CATGAATAGTGATTTAATTGCGTACCAAGTATCATCCATCTTTCTGAATCTTACGAAGTAAGAAGTAGCATTCCTG 2349
H E stop
TTTTTAAGTCCAGCTACTTTAAATTTGACTTGGCTGTTAATTTTTTGGGGGAAAGTCTATCAAAATCTTGATTGTTTTG 2430
ACTGTGTTCAATCCTTACCCCTTTTCTTGGCTTTAAATGGGCATTACTATGTTGACCACAAATGGTTAACAAATGG 2511
AACTGACTCCCTTATTTCTCTCTTTTATGGTCATTTTGTGAGGGCTTTGTTTTATCCCGGATGTTGCAATGTGTG 2592
ATGGTTTTACTATTGCTGAATAAGATTGGATTGTAGCTTGTATAGATGAATATTATTATGATTAAATATAATTATTA 2673
CCATTAATGTTATTAATGCTGCAAAAAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAG 2754
TTGTTTCTCATGGCAATGCTACAGAAAAATAATTATCTTTGGAAACAAATAATACA**AAATAAGAGGGGTATACATTCAAA** 2835

图 1 *Prox1* cDNA 的核酸序列和推测的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and predicted amino acid sequences of the *Prox1* cDNA

黑体字显示的是起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG 和 TGA。多聚腺苷酸的加尾信号 AATAAA 用斜体字表示；mRNA 不稳定的模体 ATTTA 用下划线表示。高比例谷氨酸的区域用框表示。预测的 homeodomain (HD；氨基酸残基 581-636) 和 *Prospero* domain (PD；氨基酸残基 637-739) 分别用灰色和黑色表示。另外，引物 PR1 和 PR3 在序列中用箭头标注。

The boldfaces show the start codon (ATG) and the terminal codon (TAG and TGA). The polyadenylation signal (AATAAA) is shown in italics and the motif associated with mRNA instability (ATTTA) is underlined. The Glutamine-rich region profile was indicated with boxes. The putative homeodomain (HD; residues 581–636) is shown in gray, and an associated “*Prospero* domain” (PD; residues 637–739) is shown in black. In addition, the primers (PR1 and PR3) used in this research were shown with arrows.

	1	100
<i>Carassius auratus</i>	(1) MPDHDSTLLSRQTKRRVDIGVKTIVGTASAFFAKARATFFSAMNPQGSQDVEYSVQHADGEKSNLRLKLLKRANSYEDAMFFPGATTISQLLKN	
<i>Danio rerio</i>	(1) MPDHDSTLLSRQTKRRVDIGVKTIVGTASAFFAKARATFFSAMNPQGSQDVEYSVQHADGEKSNLRLKLLKRANSYEDAMFFPGATTISQLLKN	
<i>Xenopus laevis</i>	(1) MPDHDSTLLSRQTKRRVDIGVKTIVGTASAFFAKARATFFSAMNPQGSQDVEYSVQHADGEKSNLRLKLLKRANSYEDAMFFPGATTISQLLKN	
<i>Gallus gallus</i>	(1) MPDHDSTLLSRQTKRRVDIGVKTIVGTASAFFAKARATFFSAMNPQGSQDVEYSVQHADGEKSNLRLKLLKRANSYEDAMFFPGATTISQLLKN	
<i>Canis familiaris</i>	(1) MPDHDSTLLSRQTKRRVDIGVKTIVGTASAFFAKARATFFSAMNPQGSQDVEYSVQHADGEKSNLRLKLLKRANSYEDAMFFPGATTISQLLKN	
<i>Homo sapiens</i>	(1) MPDHDSTLLSRQTKRRVDIGVKTIVGTASAFFAKARATFFSAMNPQGSQDVEYSVQHADGEKSNLRLKLLKRANSYEDAMFFPGATTISQLLKN	
<i>Mus musculus</i>	(1) MPDHDSTLLSRQTKRRVDIGVKTIVGTASAFFAKARATFFSAMNPQGSQDVEYSVQHADGEKSNLRLKLLKRANSYEDAMFFPGATTISQLLKN	
<i>Rattus norvegicus</i>	(1) MPDHDSTLLSRQTKRRVDIGVKTIVGTASAFFAKARATFFSAMNPQGSQDVEYSVQHADGEKSNLRLKLLKRANSYEDAMFFPGATTISQLLKN	
	101	200
<i>Carassius auratus</i>	(101) LTKNGGSEPNFQSGSLSTGSEIHQEDACINSNRDSPFQCLSPFPSPMTQFDEIRLIDEHLRAKRAVENIIRGMSHSPVILRAGNREBGAQPPSP	
<i>Danio rerio</i>	(101) LTKNGGSEPNFQSGSLSTGSEIHQEDACINSNRDSPFQCLSPFPSPMTQFDEIRLIDEHLRAKRAVENIIRGMSHSPVILRAGNREBGAQPPSP	
<i>Xenopus laevis</i>	(101) MNKNGGTEPSQASGLSTGSEIHQEDACINSNRDSPFQCLSPFPSPMTQFDEIRLIDEHLRAKRAVENIIRGMSHSPVILRAGNREBGAQPPSP	
<i>Gallus gallus</i>	(101) MNKNGGTEPSQASGLSTGSEIHQEDACINSNRDSPFQCLSPFPSPMTQFDEIRLIDEHLRAKRAVENIIRGMSHSPVILRAGNREBGAQPPSP	
<i>Canis familiaris</i>	(101) MNKNGGTEPSQASGLSTGSEIHQEDACINSNRDSPFQCLSPFPSPMTQFDEIRLIDEHLRAKRAVENIIRGMSHSPVILRAGNREBGAQPPSP	
<i>Homo sapiens</i>	(101) MNKNGGTEPSQASGLSTGSEIHQEDACINSNRDSPFQCLSPFPSPMTQFDEIRLIDEHLRAKRAVENIIRGMSHSPVILRAGNREBGAQPPSP	
<i>Mus musculus</i>	(101) MNKNGGTEPSQASGLSTGSEIHQEDACINSNRDSPFQCLSPFPSPMTQFDEIRLIDEHLRAKRAVENIIRGMSHSPVILRAGNREBGAQPPSP	
<i>Rattus norvegicus</i>	(101) MNKNGGTEPSQASGLSTGSEIHQEDACINSNRDSPFQCLSPFPSPMTQFDEIRLIDEHLRAKRAVENIIRGMSHSPVILRAGNREBGAQPPSP	
	201	300
<i>Carassius auratus</i>	(201) RENYRENRKQKLPGQQQSGFQQLVSARKEQKEERRLQKLQLEDMAQKLRLQLEKFFQIYDSTDSNEDGNLSEDSMRSEIDARAQDSVG-RSDNEM	
<i>Danio rerio</i>	(201) RENYRENRKQKLPGQQQSGFQQLVSARKEQKEERRLQKLQLEDMAQKLRLQLEKFFQIYDSTDSNEDGNLSEDSMRSEIDARAQDSVG-RSDNEM	
<i>Xenopus laevis</i>	(201) RESYRENRKQKLPGQQQSGFQQLVSARKEQKEERRLQKLQLEDMAQKLRLQLEKFFQIYDSTDSNEDGNLSEDSMRSEIDARAQDSVG-RSDNEM	
<i>Gallus gallus</i>	(201) RESYRENRKQKLPGQQQSGFQQLVSARKEQKEERRLQKLQLEDMAQKLRLQLEKFFQIYDSTDSNEDGNLSEDSMRSEIDARAQDSVG-RSDNEM	
<i>Canis familiaris</i>	(201) RESYRENRKQKLPGQQQSGFQQLVSARKEQKEERRLQKLQLEDMAQKLRLQLEKFFQIYDSTDSNEDGNLSEDSMRSEIDARAQDSVG-RSDNEM	
<i>Homo sapiens</i>	(201) RESYRENRKQKLPGQQQSGFQQLVSARKEQKEERRLQKLQLEDMAQKLRLQLEKFFQIYDSTDSNEDGNLSEDSMRSEIDARAQDSVG-RSDNEM	
<i>Mus musculus</i>	(201) RESYRENRKQKLPGQQQSGFQQLVSARKEQKEERRLQKLQLEDMAQKLRLQLEKFFQIYDSTDSNEDGNLSEDSMRSEIDARAQDSVG-RSDNEM	
<i>Rattus norvegicus</i>	(201) RESYRENRKQKLPGQQQSGFQQLVSARKEQKEERRLQKLQLEDMAQKLRLQLEKFFQIYDSTDSNEDGNLSEDSMRSEIDARAQDSVG-RSDNEM	
	301	400
<i>Carassius auratus</i>	(301) SDVDPGCFIDRARALIREHQ-IASDNHHEKIDAPPKDKDNLHFFPQEGKHLAELRLQELNAMSQVVDTVVIVF-AKPPRPVQVFFPLQMB-PDRFAVN	
<i>Danio rerio</i>	(301) SDVDPGCFIDRARALIREHQ-IASDNHHEKIDAPPKDKDNLHFFPQEGKHLAELRLQELNAMSQVVDTVVIVF-AKPPRPVQVFFPLQMB-PDRFAVN	
<i>Xenopus laevis</i>	(300) FDLDPGCFIDRARALIREHQ-IASDNHHEKIDAPPKDKDNLHFFPQEGKHLAELRLQELNAMSQVVDTVVIVF-AKPPRPVQVFFPLQMB-PDRFAVN	
<i>Gallus gallus</i>	(300) CELDPGCFIDRARALIREHQ-IGENKPKREGP-KEKDKQNSFPHPQEGKHLAELRLQELNAMSQVVDTVVIVF-AKPPRPVQVFFPLQMB-PDRFAVN	
<i>Canis familiaris</i>	(300) CELDPGCFIDRARALIREHQ-IGENKPKREGP-KEKDKQNSFPHPQEGKHLAELRLQELNAMSQVVDTVVIVF-AKPPRPVQVFFPLQMB-PDRFAVN	
<i>Homo sapiens</i>	(300) CELDPGCFIDRARALIREHQ-IGENKPKREGP-KEKDKQNSFPHPQEGKHLAELRLQELNAMSQVVDTVVIVF-AKPPRPVQVFFPLQMB-PDRFAVN	
<i>Mus musculus</i>	(300) CELDPGCFIDRARALIREHQ-IGENKPKREGP-KEKDKQNSFPHPQEGKHLAELRLQELNAMSQVVDTVVIVF-AKPPRPVQVFFPLQMB-PDRFAVN	
<i>Rattus norvegicus</i>	(300) CELDPGCFIDRARALIREHQ-IGENKPKREGP-KEKDKQNSFPHPQEGKHLAELRLQELNAMSQVVDTVVIVF-AKPPRPVQVFFPLQMB-PDRFAVN	
	401	500
<i>Carassius auratus</i>	(398) GENFNHTANQLQCFQGVIIIPNLDTFGNSVMPSSDQTEALPLVVRKNSDQSGASGPAGGHH-PLHQSPLSATAGTITTSFRFPFPLPMAVFFQ	
<i>Danio rerio</i>	(398) GENFNHTANQLQCFQGVIIIPNLDTFGNSVMPSSDQTEALPLVVRKNSDQSGASGPAGGHH-PLHQSPLSATAGTITTSFRFPFPLPMAVFFQ	
<i>Xenopus laevis</i>	(398) GEHENFHTANQLQCFQGVIIIPNLDTFGNSVMPSSDQTEALPLVVRKNSDQSGASGPAGGHH-PLHQSPLSATAGTITTSFRFPFPLPMAVFFQ	
<i>Gallus gallus</i>	(396) GENFNHTANQLQCFQGVIIIPNLDTFGNSVMPSSDQTEALPLVVRKNSDQSGASGPAGGHH-PLHQSPLSATAGTITTSFRFPFPLPMAVFFQ	
<i>Canis familiaris</i>	(397) GENFNHTANQLQCFQGVIIIPNLDTFGNSVMPSSDQTEALPLVVRKNSDQSGASGPAGGHH-PLHQSPLSATAGTITTSFRFPFPLPMAVFFQ	
<i>Homo sapiens</i>	(397) GENFNHTANQLQCFQGVIIIPNLDTFGNSVMPSSDQTEALPLVVRKNSDQSGASGPAGGHH-PLHQSPLSATAGTITTSFRFPFPLPMAVFFQ	
<i>Mus musculus</i>	(397) GENFNHTANQLQCFQGVIIIPNLDTFGNSVMPSSDQTEALPLVVRKNSDQSGASGPAGGHH-PLHQSPLSATAGTITTSFRFPFPLPMAVFFQ	
<i>Rattus norvegicus</i>	(397) GENFNHTANQLQCFQGVIIIPNLDTFGNSVMPSSDQTEALPLVVRKNSDQSGASGPAGGHH-PLHQSPLSATAGTITTSFRFPFPLPMAVFFQ	
	501	600
<i>Carassius auratus</i>	(497) SPLGAPGSGFSGKDRASPELDTLRTTSLRTKMSHSHLSHP-CSPAHPSTAEGLSLSLIKSECGDLQMSDISPYSGSAM-GEGLSPNHLKAKLM	
<i>Danio rerio</i>	(498) SPLGAPGSGFSGKDRASPELDTLRTTSLRTKMSHSHLSHP-CSPAHPSTAEGLSLSLIKSECGDLQMSDISPYSGSAM-GEGLSPNHLKAKLM	
<i>Xenopus laevis</i>	(496) NPLGAPFISFGKDGSSPELDTLRTTSLRTKMSHSHLSHP-CSPAHPSTAEGLSLSLIKSECGDLQMSDISPYSGSAM-GEGLSPNHLKAKLM	
<i>Gallus gallus</i>	(494) SPLGAPGSGFSGKDRASPELDTLRTTSLRTKMSHSHLSHP-CSPAHPSTAEGLSLSLIKSECGDLQMSDISPYSGSAM-GEGLSPNHLKAKLM	
<i>Canis familiaris</i>	(495) SPLGAPGSGFSGKDRASPELDTLRTTSLRTKMSHSHLSHP-CSPAHPSTAEGLSLSLIKSECGDLQMSDISPYSGSAM-GEGLSPNHLKAKLM	
<i>Homo sapiens</i>	(495) SPLGAPGSGFSGKDRASPELDTLRTTSLRTKMSHSHLSHP-CSPAHPSTAEGLSLSLIKSECGDLQMSDISPYSGSAM-GEGLSPNHLKAKLM	
<i>Mus musculus</i>	(495) SPLGAPGSGFSGKDRASPELDTLRTTSLRTKMSHSHLSHP-CSPAHPSTAEGLSLSLIKSECGDLQMSDISPYSGSAM-GEGLSPNHLKAKLM	
<i>Rattus norvegicus</i>	(495) SPLGAPGSGFSGKDRASPELDTLRTTSLRTKMSHSHLSHP-CSPAHPSTAEGLSLSLIKSECGDLQMSDISPYSGSAM-GEGLSPNHLKAKLM	
	601	700
<i>Carassius auratus</i>	(593) FFYTRYPSNMLKTYFSDVKFNRCITSQLIKWFSNREFYIYQAEYFARGAINDGVTSEELSIITRDCETALNHNKANDFE-VERPLEVAQITLR	
<i>Danio rerio</i>	(594) FFYTRYPSNMLKTYFSDVKFNRCITSQLIKWFSNREFYIYQAEYFARGAINDGVTSEELSIITRDCETALNHNKANDFE-VERPLEVAQITLR	
<i>Xenopus laevis</i>	(595) FFYTRYPSNMLKTYFSDVKFNRCITSQLIKWFSNREFYIYQAEYFARGAINDGVTSEELSIITRDCETALNHNKANDFE-VERPLEVAQITLR	
<i>Gallus gallus</i>	(591) FFYTRYPSNMLKTYFSDVKFNRCITSQLIKWFSNREFYIYQAEYFARGAINDGVTSEELSIITRDCETALNHNKANDFE-VERPLEVAQITLR	
<i>Canis familiaris</i>	(592) FFYTRYPSNMLKTYFSDVKFNRCITSQLIKWFSNREFYIYQAEYFARGAINDGVTSEELSIITRDCETALNHNKANDFE-VERPLEVAQITLR	
<i>Homo sapiens</i>	(592) FFYTRYPSNMLKTYFSDVKFNRCITSQLIKWFSNREFYIYQAEYFARGAINDGVTSEELSIITRDCETALNHNKANDFE-VERPLEVAQITLR	
<i>Mus musculus</i>	(592) FFYTRYPSNMLKTYFSDVKFNRCITSQLIKWFSNREFYIYQAEYFARGAINDGVTSEELSIITRDCETALNHNKANDFE-VERPLEVAQITLR	
<i>Rattus norvegicus</i>	(592) FFYTRYPSNMLKTYFSDVKFNRCITSQLIKWFSNREFYIYQAEYFARGAINDGVTSEELSIITRDCETALNHNKANDFE-VERPLEVAQITLR	
	701	747
<i>Carassius auratus</i>	(693) EFFNAILAGADVDPSSWKAIVYICKLDSEVPEIFKSPNCLQELLHE	
<i>Danio rerio</i>	(693) EFFNAILAGADVDPSSWKAIVYICKLDSEVPEIFKSPNCLQELLHE	
<i>Xenopus laevis</i>	(694) EFFNAILAGADVDPSSWKAIVYICKLDSEVPEIFKSPNCLQELLHE	
<i>Gallus gallus</i>	(690) EFFNAILAGADVDPSSWKAIVYICKLDSEVPEIFKSPNCLQELLHE	
<i>Canis familiaris</i>	(691) EFFNAILAGADVDPSSWKAIVYICKLDSEVPEIFKSPNCLQELLHE	
<i>Homo sapiens</i>	(691) EFFNAILAGADVDPSSWKAIVYICKLDSEVPEIFKSPNCLQELLHE	
<i>Mus musculus</i>	(691) EFFNAILAGADVDPSSWKAIVYICKLDSEVPEIFKSPNCLQELLHE	
<i>Rattus norvegicus</i>	(691) EFFNAILAGADVDPSSWKAIVYICKLDSEVPEIFKSPNCLQELLHE	

图 2 用 Vector NTI suite 8.0 软件对金鱼 *Prox1* 蛋白序列和其他脊椎动物 7 种已知的 *Prox1* 蛋白序列 (人、狗、小鼠、大鼠、鸡、爪蟾和斑马鱼) 的比较排列结果

Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequence of goldfish *Prox1* protein with seven known *Prox1* sequences [*Homo sapiens* (NP_002754), *Canis familiaris* (XP_858135), *Mus musculus* (AAH51411), *Rattus norvegicus* (XP_223067), *Gallus gallus* (JC5495), *Xenopus laevis* (BAB17310), *Danio rerio* (AAC70926)] of the vertebrates from GenBank by the software Vector NTI suite 8.0 program

高比例谷氨酸的区域用黑体字表示。预测的 homeodomain (HD; 氨基酸残基 581–638) 和 *Prospero* domain (PD; 氨基酸残基 637–739) 分别用框和斜体字表示。

The Glutamine-rich region profile is indicated in boldface. The putative homeodomain (HD; residues 581–636) are shown in boxes and an associated “*Prospero* domain” (PD; residues 637–739) are shown in italics.

斑马鱼、人、狗、大鼠、小鼠、鸡和爪蟾的 *Prox1* 蛋白多一个谷氨酸 (Glu, Q), 但这个谷氨酸处于 α_4 和 α_5 2 个 α 螺旋之间的自由回转区域 (Ryter et al, 2002), 所以它可能对 *prospero* 结构域的结构无重要影响。

我们研究了 *Prox1* 基因在金鱼晶体中的表达图式。 *Prox1* mRNA 首先是在晶体原基中可以检测到, 然后是在整个晶体中可以检测到, 这与斑马鱼、小鼠和鸡的表达图式相同 (Glasgow & Tomarev, 1998; Oliver et al, 1993; Tomarev et al, 1996)。鱼类晶体的

形态发生与哺乳类和鸟类不同, 鱼类晶体的形态发生开始于头部外胚层晶体原基的增生分层, 晶体原基增厚向视杯内形成突起, 进而形成椭圆形的稚嫩晶体。而不像哺乳类和鸟类头部外胚层晶体原基内陷形成晶体凹, 进而形成中空的晶体囊的过程 (Easter et al, 1996)。所以鱼类晶体在整个形态发生过程中是实心的, 并没有经历一个形成中空囊状的过程。在晶体原基出现的时期, 晶体原基微微向内突起, *Prox1* mRNA 定位于头部外胚层上晶体原基的最内一层细胞中, 至发育到椭圆形的稚嫩晶

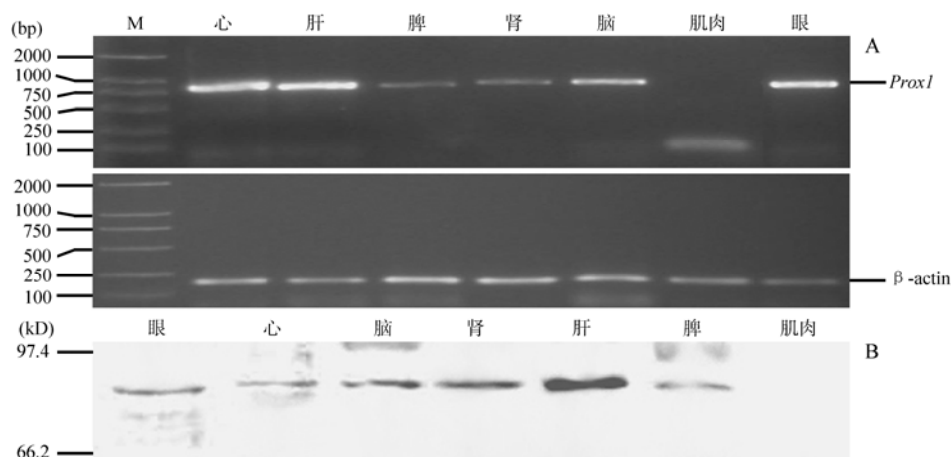


图 3 RT-PCR 和 Western-blot 检测 *Prox1* 在金鱼组织里的表达特征

Fig. 3 Expression characterization of *Prox1* in various tissues of the goldfish

A: *Prox1* 在不同组织转录水平的 RT-PCR 分析。在心、肝、脑和眼中有各有一条约 850bp 的明亮条带, 在肾和脾中也有低水平的转录, 但在肌肉中没有检测到。以 β -actin 作对照调节模板浓度。M 是 DL2000 DNA 分子量标准。B: *Prox1* 蛋白在金鱼组织中 Western-blot 检测。

A: RT-PCR detection of *Prox1* transcript in various tissues. Approximately 850 bp bands were detected in heart, liver, brain and eye, as well as lower levels in the spleen and kidney, but none in muscle. β -actin was used as control. M is DL2000 DNA weight marker. B: Western blotting detection of *Prox1* protein in various tissues.

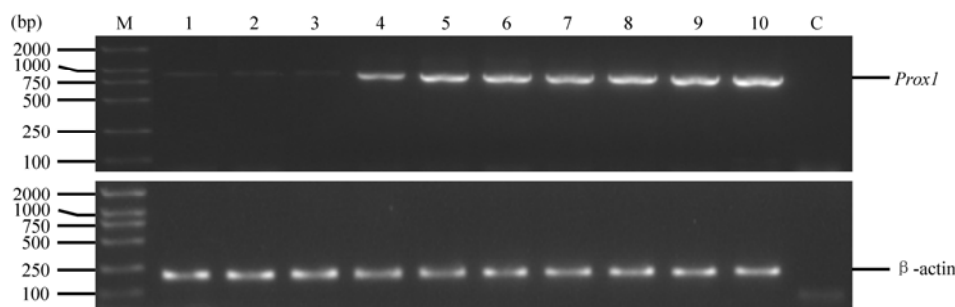


图 4 胚胎发育时序 *Prox1* 的 RT-PCR 检测

Fig. 4 RT-PCR detection of *Prox1* mRNA during goldfish embryogenesis

β -actin 是作为 RT-PCR 的参照调节模板浓度。1. 受精前; 2. 受精后; 3. 囊胚期; 4. 原肠胚期; 5. 视泡期; 6. 尾芽期; 7. 晶体期; 8. 心跳期; 9. 出苗前期; 10. 出苗期; M. DL2000 分子量标准; C. 阴性对照。

β -actin was used as the RT-PCR control. 1 to 10 respectively indicated 10 samples from mature eggs (1), fertilized eggs (2), blastula embryos (3), gastrula embryos (4), optic vesicle embryos (5), tail bud embryos (6), lens embryos (7), heartbeat embryos (8), hatching embryos (9), and hatched larvae (10). The amplified fragments of *Prox1* and β -actin were indicated. M is DL2000. C is the PCR products with TE instead of cDNA templates.

体, *Prox1* mRNA 定位于稚嫩晶体中不规则排列的每个细胞中。

在出苗期的金鱼中, 晶体纤维形成, 在初级晶状体纤维成长的同时, 细胞内合成大量的晶状体蛋白, 使晶状体蛋白充满整个细胞, 并挤出细胞。初级晶状体纤维的细胞核密集在一起, 所以被 PI 染为红色。此时, *Prox1* mRNA 不位于晶体纤维之中, 而是向外迁移。强烈的信号显示此时 *Prox1* mRNA 定位于视纤维层和内网织层, 视纤维层是位于后部晶体上皮与神经节细胞层之间的纤维层, 神经节细胞的树突分布在内网织层, 其轴索进入视神经纤维层内, 走向视神经乳头, 汇集成视神经 (苏木精和伊红染色图未显示)。也就是说 *Prox1* mRNA 的信号主要定位于节细胞的轴突与树突。与 *Prox1* mRNA 的定位不同, *Prox1* 蛋白则主要定位于靠近晶体上皮细胞内侧的即将发育成初级晶体纤维处的一个环

状区域内, 此时初级晶状体纤维还没有分化完全, 所以还没有被 PI 染为红色。在心跳期 *Prox1* mRNA 和 *Prox1* 蛋白都定位于整个晶体内, 而到了出苗期 *Prox1* 蛋白的定位向外迁移, 只位于晶体表皮内侧的一个环状区域, 而此时的 *Prox1* mRNA 的定位也向外迁移到视纤维层和内网织层。这些结果说明 *Prox1* 蛋白在金鱼晶体的分化过程中的定位有一个由内向外的变化过程, 而且 *Prox1* 基因在晶体的不同发育时期起的作用可能有所不同。而作为一个转录因子, *Prox1* 蛋白在核内分布较少, 而主要定位在细胞质内。在真核生物中, 转录因子的功能由于受蛋白-蛋白之间相互作用的调节变得精密、复杂, 完整的转录调控功能通常以复合物的方式在一系列调控通路中来完成, 这就意味着并非所有的转录因子都直接与 DNA 结合, 所以 *Prox1* 蛋白作为转录因子在这一时期的金鱼眼睛细胞核中很少分布也是正

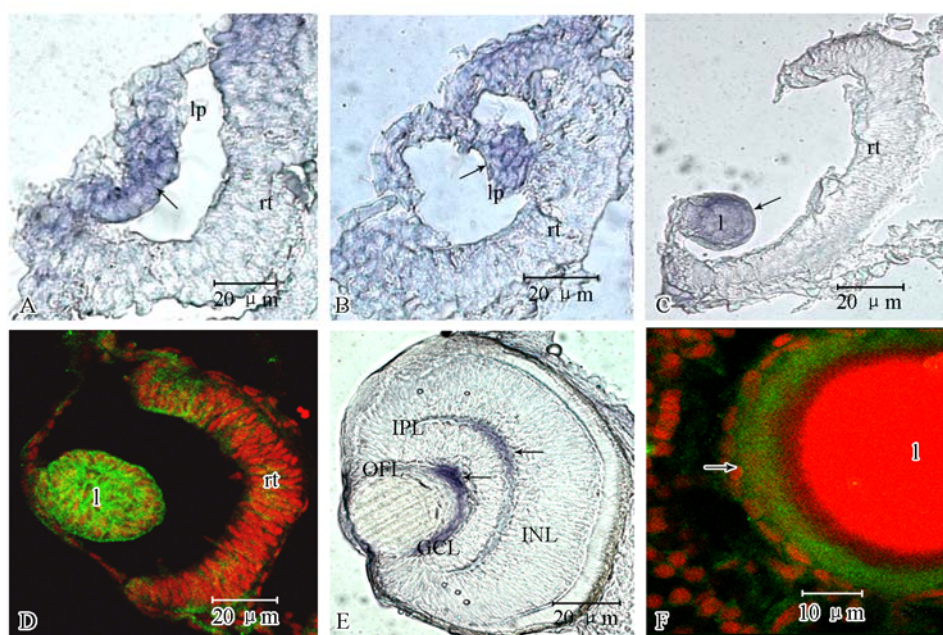


图 5 A和B: *Prox1* mRNA在金鱼晶体期胚胎晶体中的定位, 箭头表示*Prox1* mRNA主要定位于晶体原基。C: *Prox1* mRNA在金鱼心跳期胚胎眼睛中的原位杂交定位。D: *Prox1*蛋白在金鱼心跳期胚胎眼睛中的免疫荧光定位。E: *Prox1* mRNA在金鱼出苗期胚胎眼睛中的原位杂交定位。如箭头所示, 主要定位于晶体和神经节细胞层之间的视纤维层, 以及神经节细胞层和内网织层之间的内网织层中。F: *Prox1*蛋白在金鱼出苗期胚胎眼睛中的免疫荧光定位, 主要定位于晶体表皮细胞内侧晶体纤维的环状区域。说明: 绿色荧光为FITC, 显示的是*Prox1*蛋白在组织中的定位; 红色荧光为PI染色, 显示核所在的位置。rt: 视网膜; l: 晶体; lp: 晶体原基; OFL: 视纤维层; GCL: 神经节细胞层; IPL: 内网织层; INL: 内核层。

Fig. 5 A and B: The localization of *Prox1* mRNA at lens stage in goldfish embryo eye. *Prox1* mRNA (indicated by arrows) was also prominently detected in the lens primordium which gave rise to the lens. C: The *in situ* hybridization localization of *Prox1* mRNA in eye of the embryos at heartbeat stage. D: Immunofluorescence localization of *Prox1* protein in eye of the embryos at heartbeat stage. E: *Prox1* mRNA localization *in situ* hybridization in the eye of goldfish. The staining is shown by arrows. *Prox1* mRNA was detected in the optic fiber layer (OFL) between lens and ganglion cell layer (GCL) and inner plexiform layer (IPL). F: Immunofluorescence localization of *Prox1* protein. *Prox1* protein was detected in the ring region on the lens fiber under the lens epithelium, as it was different from mRNA. Note: Green fluorescence immunostained by FITC showing the localization of *Prox1* protein, red fluorescence stained by PI that showing the nuclear position. rt, retina; l, lens; lp, lens placode; OFL, optic fiber layer; GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer.

常的。

在小鼠的晶体形态发生过程中, *Prox1* 蛋白首先是在 9.5 dpc 小鼠的晶体原基和邻近的头部分胚层中检测到。10.5 dpc, *Prox1* 蛋白定位于晶体凹壁上将来发育成晶体表皮的细胞中。16.5 dpc, *Prox1* 蛋白主要分布于晶体内层晶体纤维的细胞核中。到小鼠

晶体发育成熟, 一直保持这种表达图式 (Duncan et al, 2002)。在小鼠中 *Prox1* 蛋白的表达模式显示了一个由晶体外层到晶体内层迁移的过程, 但在金鱼晶体形态发生中, 并没有表现出由晶体外层到晶体内层迁移的过程。这为不同种类的脊椎动物眼睛的发育可能存在不同的调控机制提供了证据。

参考文献:

- Belecky-Adams T, Tomarev S, Li HS, Ploder L, McInnes RR, Sundin O, Adler R. 1997. *Pax-6*, *Prox1*, and *Chx10* homeobox gene expression correlates with phenotypic fate of retinal precursor cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **38**: 1293-1303.
- Dong CH, Yang ST, Yang ZA, Zhang L, Gui JF. 2004. A C-type lectin associated and translocated with cortical granules during oocyte maturation and egg fertilization in fish [J]. *Dev Biol*, **265**: 341-354.
- Duncan MK, Cui WW, Oh DJ, Tomarev SI. 2002. *Prox1* is differentially localized during lens development [J]. *Mech Dev*, **112**: 195-198.
- Dyer MA, Livesey FJ, Cepko CL, Oliver G. 2003. *Prox1* function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina [J]. *Nature Genetics*, **34**: 53-58.
- Easter SS Jr, Nicola GN. 1996. The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Developmental biology*, **180**: 646-663.
- Glasgow E, Tomarev SI. 1998. Restricted expression of the homeobox gene *prox 1* in developing zebrafish [J]. *Mech Dev*, **76**: 175-178.
- Kawahara A, Wilm T, Solnica-Krezel L, Dawid IB. 2000. Antagonistic role of *regal* and *bozozok/dharma* homeobox genes in organizer formation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**: 12121-12126.
- Liu YW, Gao W, Teh HL, Tan JH, Chan WK. 2003. *Prox1* is a novel coregulator of *Ff1b* and is involved in the embryonic development of the zebra fish interrenal primordium [J]. *Molecular and Cellular Biology*, **23** (20): 7243-7255.
- Mizuno N, Mochii M, Yamamoto TS, Takahashi TC, Eguchi G, Okada TS. 1999. *Pax-6* and *Prox 1* expression during lens regeneration from *Cynops* iris and *Xenopus* cornea: evidence for a genetic program common to embryonic lens development [J]. *Differentiation*, **65** (3): 141-149.
- Oliver G, Sosa-Pineda B, Geisendorf S, Spana EP, Doe EQ, Gruss P. 1993. *Prox1*, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development [J]. *Mech Dev*, **44**: 3-16.
- Ryter JM, Doe CQ, Matthews BW. 2002. Structure of the DNA binding region of prospero reveals a novel *homeo-Prospero* domain [J]. *Structure*, **10**: 1541-1549.
- Sosa-Pineda B, Wigle JT, Oliver G. 2000. Hepatocyte migration during liver development requires *Prox1* [J]. *Nat Genet*, **25**: 254-255.
- Tomarev SI, Sundin O, Banerjee-Basu S, Duncan MK, Yang JM, Piatigorsky J. 1996. Chicken homeobox gene *Prox1* related to *Drosophila prospero* is expressed in the developing lens and retina [J]. *Dev Dyn*, **207** (1): 120.
- Tomarev SI, Zinovieva RD, Chang B, Hawes NL. 1998. Characterization of the mouse *Prox1* gene [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **248**: 684-689.
- Torii M, Matsuzaki F, Osumi N, Kaibuchi K, Nakamura S, Casarosa S, Guillemot F, Nakafuku M. 1999. Transcription factors *Mash-1* and *Prox-1* delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system [J]. *Development*, **126**: 443-456.
- Wigle JT, Chowdhury K, Gruss P, Oliver G. 1999a. *Prox1* function is crucial for mouse lens-fibre elongation [J]. *Nat Genet*, **21**: 318-322.
- Wigle JT, Oliver G. 1999b. *Prox1* function is required for the development of the murine lymphatic system [J]. *Cell*, **98**: 769-778.
- Xu HY, Peng JX, Gui JF, Hong YH. 2005. Gibel carp germ cell marker *Vasa*: cDNA cloning and its antibody preparation [J]. *Acta Zoologica Sinica*, **51** (4): 732-742. [徐红艳, 彭金霞, 桂建芳, 洪云汉. 2005. 银鲫种系细胞标记分子 *Vasa*: cDNA 克隆及其抗体制备. 动物学报, **51** (4): 732-742.]
- Zinovieva RD, Duncan MK, Johnson TR, Torres R, Polymeropoulos MH, Tomarev SI. 1996. Structure and chromosomal localization of the human homeobox gene *Prox 1* [J]. *Genomics*, **35**: 517-522.