

文章编号: 1674-5566(2013)05-0650-07

## Tbx5 基因在牙鲆变态初期的表达

邹莎<sup>1,2,3</sup>, 范纯新<sup>1,2,3</sup>, 周婷婷<sup>1,2,3</sup>, 张昊<sup>1,2,3</sup>, 宋佳坤<sup>1,2,3</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学海洋科学研究院海洋生物系统和神经科学研究所, 上海 201306; 3. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

**摘要:** 鲽形目鱼类仔鱼经过变态后形成眼睛和偶鳍等器官左右不对称的稚鱼。Tbx 家族成员参与脊椎动物心脏、肢体和眼等器官的发育, 而 Tbx 基因与鲽形目鱼类变态的关系目前尚无报道。运用扫描电镜和软硬骨染色等方法对出膜后 2 d(变态早期)和 26 d(变态前期)的牙鲆仔鱼的形态进行观察, 牙鲆出膜后 2 d 胸鳍原基出现, 出膜后 26 d 胸鳍发育成熟, 而在出膜后 26 d 胸鳍和腹鳍仍左右对称。我们克隆了牙鲆 Tbx5 基因的 CDS 序列, 该序列编码的多肽具有部分 T-box 保守结构域, 与斑马鱼 Tbx5 同源性高达 93%。系统进化分析显示: 这段 CDS 序列与硬骨鱼的 Tbx5 基因聚为一支, 但与四足动物 Tbx5 相分离。整体原位杂交显示出膜后 26 d 的牙鲆仔鱼中, Tbx5 基因不仅在胸鳍、眼背侧、脊柱和尿囊表达, 且在胸鳍和眼背侧的表达呈现左右不对称, 左侧面(有眼侧)的表达量均高于右侧面(无眼侧)的表达量。综上结果显示, 牙鲆 Tbx5 基因可能参与了变态过程中眼睛与胸鳍左右不对称的形成。

**研究亮点:** 鲽形目鱼类都经历变态发育过程, 产生显著的左右不对称形态, 但调控该过程的分子机制尚不清楚。本文对牙鲆变态初期仔鱼进行了形态学观察, 并对牙鲆 Tbx5 进行克隆及其表达分析, 探讨 Tbx5 与牙鲆仔鱼眼睛与胸鳍不对称变态过程的关系, 为进一步研究牙鲆变态机制奠定基础。

**关键词:** 牙鲆; Tbx5 基因; 胸鳍; 眼睛; 表达

**中图分类号:** S 917; Q 349

**文献标志码:** A

鲽形目(Pleuronectiformes)鱼类俗称比目鱼, 是左右不对称的典型代表, 其胚胎发育和仔鱼阶段都保持左右对称, 而在仔鱼后期经历剧烈的变态过程, 形成一系列显著不对称性的体表结构。这成为系统分类的一个重要标准<sup>[1]</sup>。鲽形目仔鱼除头部结构不对称外, 躯干上偶鳍也明显不对称。大多数比目鱼变态前胸鳍和腹鳍两侧对称发育, 变态后有眼侧胸鳍略长于无眼侧胸鳍, 有眼侧腹鳍比无眼侧腹鳍略大<sup>[2]</sup>。

Tbx 家族成员是重要的形态建成因子, 如 Tbx4 和 Tbx5 分别特异地在后肢和前肢中表达<sup>[3-4]</sup>。另外, Tbx2, Tbx3, Tbx5 都在眼背侧特异性表达<sup>[5-7]</sup>。Tbx5 属于 T-box 家族中 TBX2 亚家族<sup>[8]</sup>。在鸡, 小鼠胚胎中发现 Tbx5 在心脏, 前肢和眼睛中均能检测到有表达<sup>[3, 9-11]</sup>。

BEGEMANN 和 INGHAM<sup>[12]</sup>在斑马鱼实验中发现 Tbx5 不仅在胸鳍, 还在眼背侧, 体节及心脏中有表达, CHAPMAND 等<sup>[13]</sup>研究发现 Tbx5 还在小鼠尿囊和生殖器中表达。这些都表明 Tbx5 的功能保守, 参与脊椎动物前肢和眼等器官的形态建成。Tbx5 还受 BMP4、Wnt 和 FGF 等多种信号调控<sup>[7, 14]</sup>。最近发现 Pitx2 可通过与 Tbx 基因附近染色质区域结合, 在腹部器官发育过程中调控包括 Tbx5 在内的多个 Tbx 基因的表达<sup>[15]</sup>。但目前关于 Tbx5 是否参与鲽形目鱼类的变态过程尚未见报道。因此本文以牙鲆为实验材料, 对其进行形态学观察, 并克隆 Tbx5 基因的 cDNA 片段, 对其在出膜后 26 d 仔鱼中的表达模式分析表明该基因可能参与了牙鲆的变态过程。

收稿日期: 2013-04-24 修回日期: 2013-05-29

基金项目: 国家自然科学基金(30970365); 上海市教育委员会科研创新项目(12YZ129); 973 计划前期研究专项(2011CB111608)

作者简介: 邹莎(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为发育生物学。E-mail: zousha21@163.com

通信作者: 宋佳坤, E-mail: jksong@shou.edu.cn

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 牙鲆仔鱼

牙鲆胚胎于 2011 年 4 月 25 日购自山东胶南市中海水产有限公司,随后于上海海洋大学养殖。养殖器具事先用高锰酸钾进行消毒,用盐卤配制盐度为 35 的海水,充分曝气 2 d 后使用,水温控制在 20 ℃ 左右。对于出膜后的仔鱼,每天定时投喂孵化卤虫 3 次<sup>[16]</sup>。分别在出膜后 2 d [平均全长(3.2 ± 0.2) mm] 和 26 d [平均全长(8.2 ± 0.8) mm] 对牙鲆仔鱼进行取样。另一部分用 4% 多聚甲醛 4 ℃ 固定过夜后,最终置于纯甲醇中,保存于 -80 ℃。

### 1.2 扫描电镜观察

将出膜后 2 d 和 26 d 的牙鲆(各 3 尾)经固定液(用 100 mmol/L PBS, pH 7.4 配制含 4% PFA 和 2.5% 戊二醛)于 4 ℃ 固定过夜,梯度乙醇脱水,临界点干燥,喷金,JEOL-6390LV 扫描电镜观察并拍照。

### 1.3 软骨质染色

新鲜的出膜后 26 d 仔鱼经过 4% PFA 于 4 ℃ 固定 3 d,再用蒸馏水清洗 3 d,每 6 小时换水一次,以去除残余固定液改善染液穿透性,置于 75% 乙醇中脱水 1 d。软骨染色:0.01% 阿尔新蓝溶液由 10 mg 阿尔新蓝,80 mL 95% 乙醇,20 mL 冰醋酸混合而成,提前一周配好。样品浸泡于该液 2 d 进行软骨染色。再经梯度乙醇(100%, 95%, 75%, 30%) 和蒸馏水分别浸泡 3 h,然后用胰酶溶液(配方为 1 mg 胰蛋白酶放入钠-硼酸盐缓冲液中;钠-硼酸盐缓冲液配方:30 mL 饱和钠-硼酸盐,70 mL 蒸馏水)于 37 ℃ 孵育 7 d 使肌肉消化彻底。硬骨染色:将样品置于 0.5% KOH 中 1 h,在室温避光条件下将样品浸入茜素红 S(茜素红 S 溶液配方为将茜素红粉末缓缓加入 0.5% KOH 溶液中并搅拌均匀直至溶液呈现紫红色)中 24 h 染成微紫红色,最后在室温浸于 0.5% KOH 中 0.5 h,去除深色色素,使组织更加透明<sup>[17-18]</sup>。转入 100% 甘油中,拍照。

### 1.4 牙鲆 *Tbx5* 基因的克隆

用 Trizol (Invitrogen) 抽提牙鲆仔鱼的总 RNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色检测 RNA 的完整性,并用分光光度计(Thermo NanoDrop 2 000)测定 RNA 浓度。参照

反转录系统(Promega),以总 RNA 为模板,Oligo(dT) 为引物,于 42 ℃ 孵育 1 h,反转录合成 cDNA。用 DNASTar 对相近物种 *Tbx5* 蛋白序列同源性比对,找出保守结构域,用 Primer 5.0 设计简并引物 *Tbx5-F*: 5'-GGTGGCCACCCGAGATGAT HATHAC-3' 和 *Tbx5-R*: 5'-GATCTTCAGCTGGG TGATYTTTRTGRT -3'。使用 GO-Taq DNA 聚合酶,以上述 cDNA 为模板,加入引物 *Tbx5-F* 和 *Tbx5-R* 进行 PCR 反应。程序为:94 ℃ 预变性 2 min,32 个循环扩增(94 ℃, 30 s; 55 ℃, 30 s; 72 ℃, 1 min),72 ℃ 延伸 7 min。所得产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用胶回收试剂盒(OMEGA)纯化目的片段,再连入 pGEM-T 载体(Promega)且用 TOP10 感受态转化。经过蓝白斑筛选,PCR 鉴定,送至上海生工生物技术有限公司进行序列测定。

### 1.5 生物信息学分析

将测序所得的 cDNA 序列利用 NCBI 网站中 BLAST 工具,与 GenBank 数据库中序列同源比对;选取多个代表性物种的 *Tbx5* 基因,并以斑马鱼 *Tbx4* 基因为外类群,用 MEGA 4.0 软件以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树。

### 1.6 整体原位杂交

以连有 *Tbx5* 基因片段的线性化重组质粒为模板,用 SP6 RNA 聚合酶合成地高辛(DIG)标记(Roche)的 *Tbx5* 基因反义 RNA 探针。实验所用玻璃容器在 180 ℃ 高温下烘烤 7 h,溶液用 0.1% 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理防止核酶污染。首先将保存于 -80 ℃ 甲醇中的牙鲆仔鱼经梯度甲醇复水至含 0.1% Tween-20 的 PBS 溶液(PBST)中;用 10% 双氧水强光下脱色 30 ~ 60 min, PBST 洗涤 3 次,每次 10 min,再用蛋白酶 K (10 μg/mL) 于 37 ℃ 消化 25 min,漂洗数次,室温 4% PFA 固定 20 min,将仔鱼转至杂交液[配方:50% 去离子甲酰胺,5 × SSC (pH 7.0), 0.1% Tween-20, 500 mg/mL 酵母 tRNA, 100 μg/mL 肝素]中于 65 ℃ 预杂交 3 h;之后将 *Tbx5* 探针加入杂交液(0.5 μg/mL)中孵育,65 ℃ 杂交 16 h 后仔鱼经由 2 × SSC 梯度稀释的杂交液于 65 ℃ 进行洗涤,分别洗 10 min;然后用 0.2 × SSC 于 65 ℃ 洗涤 2 次,每次 30 min;再在室温下用 PBST 梯度稀释的 0.2 × SSC 洗涤,各洗 15 min,室温封闭液(用 PBST 配制含 1% 小牛血清白蛋白)封闭仔鱼 3 h;

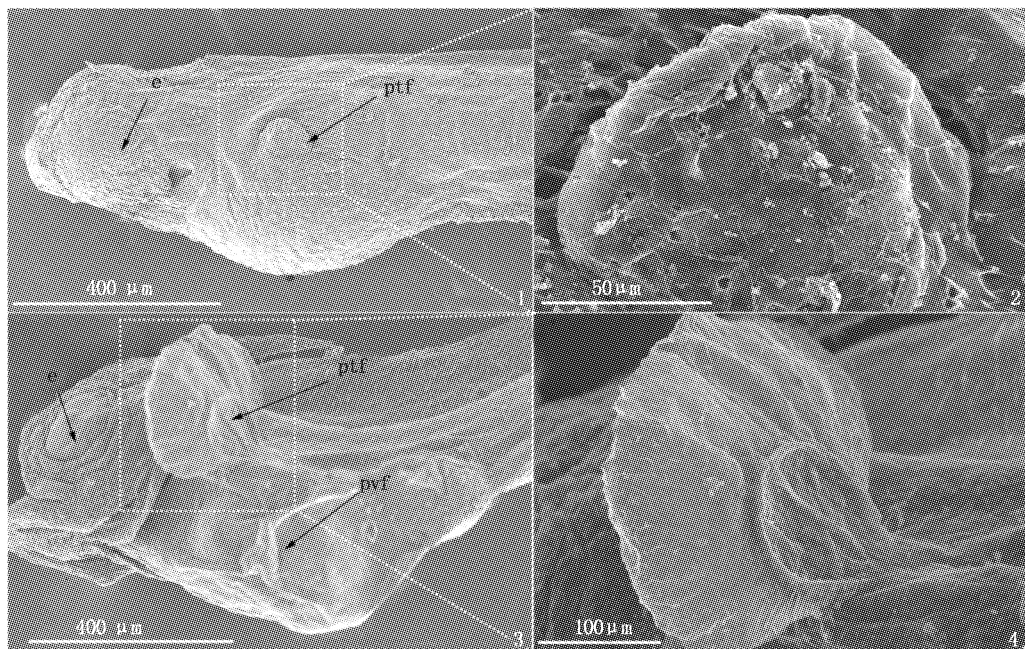
再经抗 DIG 碱性磷酸酶联抗体 (Roche; 按 1:8 000 用封闭缓冲液稀释) 于 4 °C 孵育过夜; 再经显色缓冲液 [配方: 100 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 9.5), 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween-20] 洗 3 次; 最后于 NBT/BCIP 显色液中暗处显色。显色完成后用终止液终止反应, 在甲醇中洗滌 30 min 后转入 100% 甘油中拍照。

## 2 结果

### 2.1 牙鲆仔鱼的形态学观察

我们首先利用扫描电镜观察发现出膜后 2 d 的牙鲆紧贴鳃盖后方出现胸鳍芽, 但此时腹鳍芽尚未出现 (图版 I - 1, 2)。出膜后 26 d 的牙鲆胸

鳍进一步加长增宽, 已经分化为界限分明的两部分: 顶部的鳍条区和基部的支鳍骨区; 而此时腹鳍也于胸鳍下方形成 (图版 I - 3, 4)。为进一步阐明此阶段牙鲆胸鳍和腹鳍的骨化状态, 我们利用阿尔新蓝和茜素红分别对出膜后 26 d 的牙鲆仔鱼的软骨和硬骨进行染色。出膜后 26 d 的牙鲆仔鱼大部分骨化形成硬骨, 仅围眶骨、舌颌骨和鳍基软骨等部位保持软骨状态 (图版 II - 1, 2)。同时我们还发现, 此阶段牙鲆胸鳍和腹鳍在组成结构上有差异: 胸鳍中仅后匙骨和乌喙骨骨化完成, 而鳍条和支鳍骨部位仍保持软骨结构; 腹鳍中的无名骨和支鳍骨均为硬骨, 仅在两者之间的鳍基软骨部位保持软骨状态 (图版 II - 3, 4)。



图版 I 牙鲆 (左侧面观) 胸鳍发育的电镜结果

Plate I Scanning electron micrographs of pectoral fins in flounder, *Paralichthys olivaceus*

1, 2. 出膜后 2 d 牙鲆胸鳍芽基以及放大图; 3, 4. 出膜后 26 d 牙鲆胸鳍形态及胸鳍部分放大图; e. 眼睛; ptf. 胸鳍; pvf. 腹鳍。

### 2.2 牙鲆 *Tbx5* 基因的克隆与表达

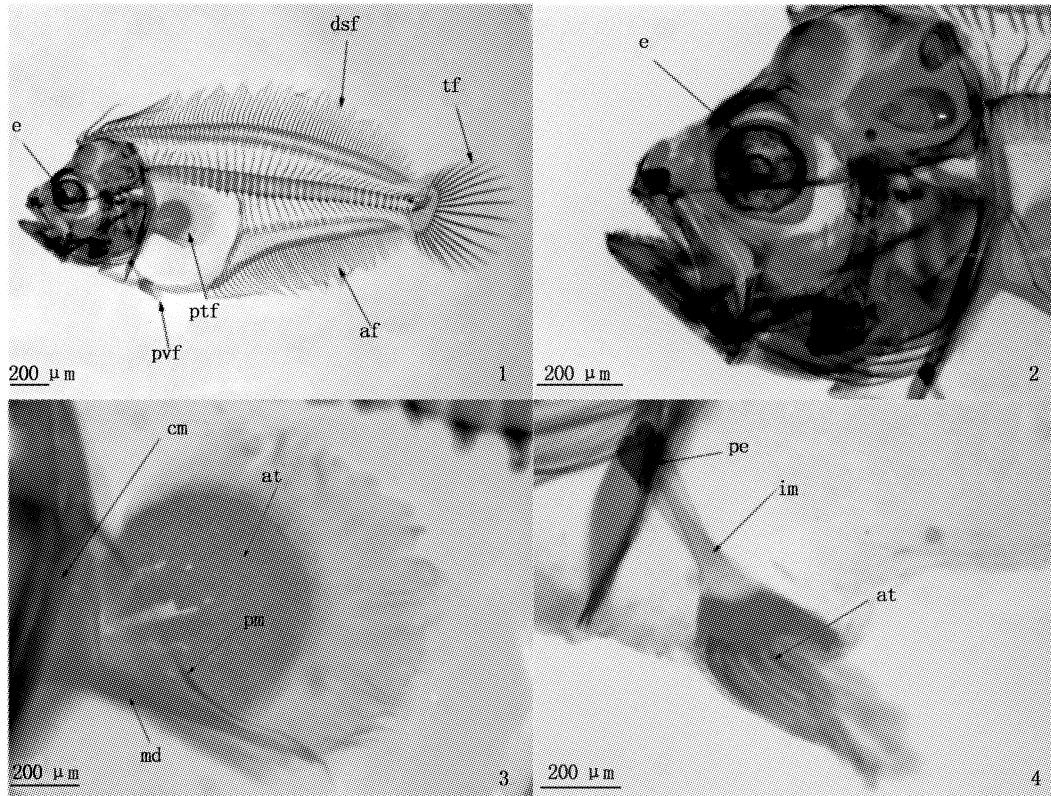
所克隆的 *Tbx5* 基因的 cDNA 片段长度为 487 bp, 通过 BlastX 与 GenBank 数据库比对发现与斑马鱼同源性最高达到 93%, 该序列具有部分 T-domain 保守结构域, 含有二聚体接口和 DNA 结合域, 因此, 确定该片段为牙鲆 *Tbx5* 基因的 cDNA 片段。运用 MEGA 4.0 构建代表性 *Tbx5* 的系统进化树。经分析发现 *Tbx5* 与斑马鱼 (*Danio rerio*) 和青鳉 (*Oryzias latipes*) 等 *Tbx5* 基因共同位于硬骨鱼分支, 而与包括鸡 (*Gallus*

*gallus*)、爪蟾 (*Xenopus laevis*)、小鼠 (*Mus musculus*) 和人 (*Homo sapiens*) 等四足动物的 *Tbx5* 基因相分离 (图 1)。

为阐明 *Tbx5* 基因与牙鲆胸鳍发育的关联性, 我们利用整体原位杂交检测了 *Tbx5* 基因在出膜后 26 d 的表达模式。*Tbx5* 基因呈组织特异性表达, 主要在胸鳍、眼背侧、脊柱和尿囊等结构表达, 而腹鳍位置未检测到信号 (图版 III - 1, 2)。出膜后 26 d 牙鲆的胸鳍和眼等器官发育已基本完成, 此时 *Tbx5* 的高表达暗示可能与变态中眼迁

移和鳍的不对称性相关。另外,我们发现出膜后 26 d 牙鲆仔鱼中 *Tbx5* 基因在眼背侧和胸鳍的表达呈现左右不对称,左侧(有眼侧)的表达高于右

侧(无眼侧)相对应部位的表达(图版 III - 3 ~ 6), 而 *Tbx5* 在脊柱两侧的表达差异不明显(图版 III - 7, 8)。



图版 II 牙鲆软硬骨染色左侧面观

Plate II Left lateral view of bone and cartilage staining in flounder, *Paralichthys olivaceus*

1. 出膜后 26 d 牙鲆软硬骨染色左侧面观; 2. 头部放大图; 3. 胸鳍放大图; 4. 腹鳍放大图; e. 眼睛; ptf. 胸鳍; pvf. 腹鳍; dsf. 背鳍; af. 臀鳍; tf. 尾鳍; pm. 后匙骨; cm. 匙骨; md. 乌喙骨; at. 支鳍骨; pe. 前软骨; im. 无名骨。

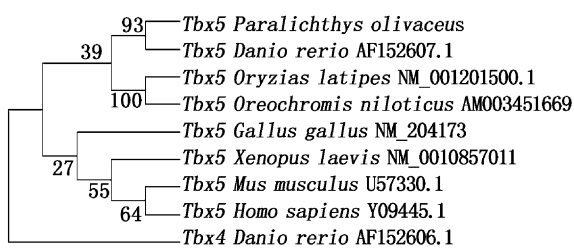


图 1 基于不同物种 *Tbx5* 用 MEGA 4.0 构建的系统进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree of *Tbx5* and representative *Tbx5* from other species constructed by MEGA 4.0 Bootstrap

置信度百分率在节点标明。

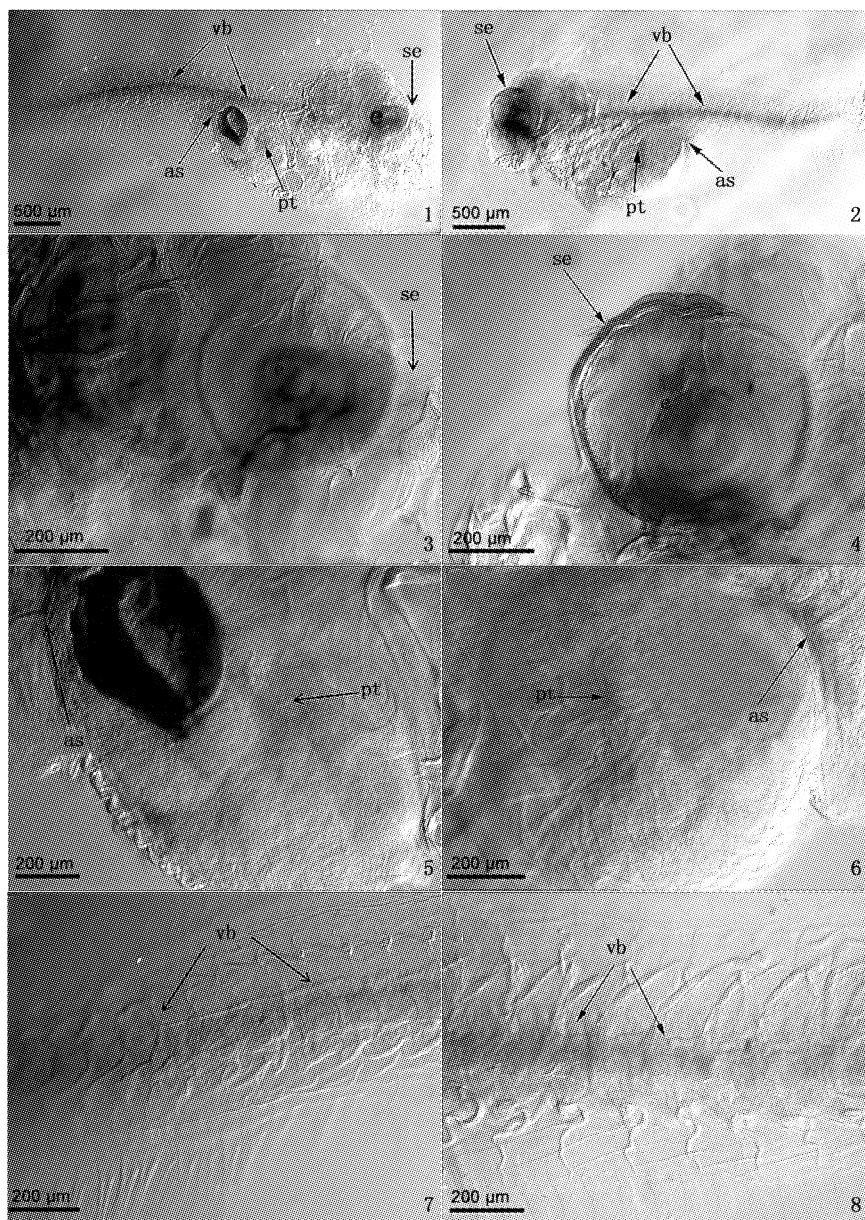
### 3 讨论

本研究首先从形态学观察到牙鲆胸鳍与腹

鳍发生的时间点,利用扫描电镜发现出膜后 2 d 牙鲆出现胸鳍原基,无腹鳍芽,出膜后 26 d 牙鲆的胸鳍进一步加宽加长,有研究发现半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)、条斑星鲽 (*Verasper moseri*) 和圆斑星鲽 (*Verasper variegates*) 胸鳍原基出现的时间分别是出膜后 1、2 和 3 d<sup>[19-20]</sup>,表明这几种比目鱼的胸鳍原基形成时间比较接近。而犬齿牙鲆 (*Pseudorhombus arsius*) 的胸鳍原基在胚胎期就已经形成<sup>[21]</sup>,可能是由于环境条件或种的生活史不同造成的器官形成时间上的差异。我们运用阿尔新蓝和茜素红对出膜后 26 d 牙鲆进行软硬骨染色,发现该阶段的牙鲆腹鳍胸位,且腹鳍骨化程度大于胸鳍。但值得注意的是该阶段左右两侧的胸鳍和腹鳍未表现出明显差异。除眼的移动外,鳍的不对称性是比目鱼变态发育的另一个重要表现,多数比目鱼成体时表现为有

眼侧胸鳍较无眼侧胸鳍大,无眼侧腹鳍侧位,如大斑鳊鲆(*Psetina ijimae*)等<sup>[2]</sup>。少数种类(如半滑舌鳎)在变态前胸鳍达到最大,随着变态逐渐萎缩消失<sup>[20]</sup>。漠斑牙鲆成体的左胸鳍也稍大于右胸鳍<sup>[22]</sup>,但从发育开始到变态初期这段时间左

右胸鳍都未表现出明显差异。我们推测比目鱼成体的胸鳍和腹鳍不对称性的发生过程可能与眼的移动相关,但牙鲆的眼和鳍的变态事件是否确实相偶联还有待进一步研究。



图版 III *Tbx5* 基因在出膜后 26 d 牙鲆仔鱼中的左右两侧表达

Plate III *Tbx5* gene expression in flounder larva at 26 days post hatching

1. 整体右侧面观; 2. 整体左侧面观; 3. 右侧面眼部放大图; 4. 左侧面眼部放大图; 5. 右侧面胸腹部放大图; 6. 左侧面胸腹部放大图; 7. 右侧面躯干部分放大图; 8. 左侧面躯干部分放大图; se. 眼背侧; pt. 胸鳍; as. 尿囊; vb. 脊柱。

*Tbx* 家族是古老的基因家族,具有多个成员,存在于所有后生动物中,且高度保守,它们参与肢体、眼和心脏等多个重要器官的发育。本研究

运用整体原位杂交展示了 *Tbx5* 基因在出膜后 26 d 的牙鲆左右两侧的表达情况。*Tbx5* 在胸鳍,眼背侧,脊柱和尿囊中特异表达,据报道,*Tbx5* 基因

在小鼠的尿囊<sup>[12]</sup>和鸡的脊索中也有表达<sup>[10]</sup>,但在这些部位的表达为部分物种所特有。*Tbx5*在目前已报道的脊椎动物发育过程中眼背侧和上肢(或胸鳍)中都有表达<sup>[3,10,23]</sup>,表明了*Tbx5*基因在脊椎动物眼睛和上肢的发育中的作用非常保守。但*Tbx5*基因主要在爪蟾和鸡等物种的器官形态建成中高表达,但在成熟器官内表达明显下降<sup>[14]</sup>。此外,*Tbx5*在眼背侧和胸鳍的表达呈现左右不对称现象,目前有研究表明*Pitx2*基因是心脏等器官不对称性的关键基因,*Pitx2*可通过与*Tbx*基因附近染色质区域结合,在腹部器官发育过程中调控包括*Tbx5*在内的多个*Tbx*基因的表达<sup>[15]</sup>。另外,*Pitx2*在牙鲆变态期重新表达,暗示其可能参与牙鲆眼睛的不对称性发育<sup>[24-25]</sup>。因此,我们推测*Tbx5*基因可能也参与了牙鲆变态发育中眼和胸鳍不对称性的形成。

上海海洋大学鲍宝龙教授提供了实验材料,上海海洋大学海洋生态系统和神经科学研究所王学龙和李超同学在软硬骨染色和临界点干燥中给予了帮助,谨致谢忱!

#### 参考文献:

- [1] 鲍宝龙. 比目鱼类的眼睛移位和不对称的进化起源[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(5): 728-736.
- [2] 李思忠,王惠民. 中国动物志:硬骨鱼纲,鲽形目[M]. 北京: 科学出版社,1995.
- [3] ISAAC A, RODRIGUEZ C, RYAN A, et al. Tbx genes and limb identity in chick embryo development [J]. Development, 1999, 125: 1867-1875.
- [4] BASSON C T, BACHINSKY D R, LIN R C. Mutations in human TBX5 cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome[J]. Nature Genetics, 1997, 15(4): 411.
- [5] LOOSLI F, WINKLER S, BURGTORF C, et al. Medaka eyeless is the key factor linking retinal determination and eye growth[J]. Development, 2001, 128(20): 4035-4044.
- [6] PICKER A, BRAND M. Fgf signals from a novel signaling center determine axial patterning of the prospective neural retina[J]. Development, 2005, 132(22): 4951-4962.
- [7] BEHESTI H, HOLT J K L, SOWDEN J C. The level of BMP4 signaling is critical for the regulation of distinct T-box gene expression domains and growth along the dorsoventral axis of the optic cup[J]. Development Biology, 2006, 6(1): 22-62.
- [8] AGULNIK S I, GARVEY N, HANCOCK S, et al. Evolution of mouse T-box genes by tandem duplication and cluster dispersion[J]. Genetics, 1996, 144(1): 249-254.
- [9] CHAPMAN D L, GARVEY N, HANCOCK S, et al. Expression of the T-box family genes *Tbx1-Tbx5* during early mouse development[J]. Developmental Dynamics, 1999, 206: 379-390.
- [10] GIBSON-BROWN J, AGULNIK S I, SILVER L M, et al. Involvement of T-box genes *Tbx2-Tbx5* in vertebrate limb specification and development [J]. Development, 1998, 125: 2499-2509.
- [11] OHUCHI H, TAKEUCHI J, YOSHIOKA H, et al. Correlation of wing-leg identity in ectopic FGF-induced chimeric limbs with the differential expression of chick *Tbx5* and *Tbx4* [J]. Development, 1999, 125: 51-60.
- [12] BEGEMANN G, INGHAM P W. Developmental regulation of *Tbx5* in zebrafish embryogenesis [J]. Mechanisms of Development, 2000, 90(2): 134-304.
- [13] CHAPMAN D L, GARVEY N, HANCOCK S, et al. Expression of the T-box family genes *Tbx1-Tbx5* during early mouse development [J]. Developmental Dynamics, 1999, 206: 379-390.
- [14] KOSHIBA-TAKEUCHI K, TAKEUCHI J K, MATSUMOTO K, et al. *Tbx5* and the retinotectum projection [J]. Science, 2000, 287: 134-137.
- [15] HILTON T, MICHAEL K G, CHRISSA K. *Pitx2*-dependent occupancy by histone deacetylases is associated with t-box gene regulation in mammalian abdominal tissue [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(15): 11129-11142.
- [16] 谢彩霞,邢巨斌,鲍宝龙. 牙鲆 *epigen* 基因的克隆以及在变态过程中的表达 [J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(5): 577-582.
- [17] SONG J, PARENTI L R. Clearing and staining whole fish specimens for simultaneous demonstration of bone, cartilage and nerves [J]. Copeia, 1995, 1: 114-118.
- [18] 黎敏斯,王舒婷,孙晋虎. 鸡胚颅面部软硬骨骼双重染色的实验研究 [J]. 中华临床医师杂志, 2012, 6(11): 3056-3058.
- [19] 叶建生. 漠斑牙鲆的生物学特性及其池塘养殖技术 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011(19): 141-143.
- [20] 张春霖,成庆泰,郑葆珊,等. 黄渤海鱼类调查报告 [M]. 北京: 科学出版社, 1995: 298-300.
- [21] SMITH T I J, MCVEY D C, JENKINS W E. Broodstock management and spawning of southern flounder, *Paralichthys lethostigma* [J]. Aquaculture, 1999(1/2): 87-99.
- [22] 秦志清,林越超,张雅芝. 漠斑牙鲆仔、稚、幼鱼的形态发育研究 [J]. 台湾海峡, 2008, 27(4): 471-483.
- [23] GIBSON-BROWN J J, AGULNIK S I, CHAPMAN D L, et al. Evidence of a role for T-box genes in the evolution of limb morphogenesis and the specification of forelimb/hindlimb identity [J]. Mechanisms of Development, 1996, 56(1/2): 93-101.
- [24] SCHREIBER A M. An asymmetric perspective on metamorphosis [J]. Animal Metamorphosis, 2013, 103: 167-194.
- [25] HASHIMOTO Y, NIIKURA T, ITO Y. Neurotoxic mechanisms by Alzheimer's disease-linked N141I mutant presenilin2 [J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2002, 300(3): 736-745.

## The expression pattern of *Tbx5* gene at metamorphosis stage in *Paralichthys olivaceus*

ZOU Sha<sup>1,2,3</sup>, FAN Chun-xin<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Ting-ting<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Hao<sup>1,2,3</sup>, SONG Jia-kun<sup>1,2,3</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Institute for Marine Biosystem and Neurosciences, Institutes for Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of Exploration of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Flatfish larvae metamorphose from bilaterally symmetrical larvae into asymmetrically shaped juveniles with two eyes on ocular side, and the ocular side pectoral fin is larger than the one on blind side. Many members of Tbx family take part in many organogenesis processes, including heart, limb and eye. However, the relationship between *Tbx* gene and flatfish larval metamorphosis has not been reported. We used scanning electron microscopy (SEM) and bone/cartilage staining method to observe the morphology in *Paralichthys olivaceus* pre-metamorphosis stage (2 dph) and pro-metamorphosis stage (26 dph) larvae. The results indicate that pectoral fin bud appears at 2 dph, and pectoral and pelvic fins mature at 26 dph. The pectoral and pelvic fins are still bilaterally symmetric by that stage. Then we cloned partial CDS of *Tbx5* gene, which encoded a polypeptide with conserved T-domain, sharing 93% identity with zebrafish *Tbx5*. Phylogenetic analysis reveals that this partial CDS is grouped with teleost branch, but separated with tetrapod branch. The whole-mount *in situ* hybridization shows that *Tbx5* gene is expressed in pectoral fins, eyes, vertebra, and allantoic vesicle at 26 dph larvae of *Paralichthys olivaceus*. In addition, the expression of *Tbx5* gene in eyes and pectoral fins are asymmetric between the left and the right sides, which is more highly expressed in the eyes and pectoral fins of the left side (ocular side) than the right side (blind side). All these results suggest that *Tbx5* genes may be involved in the metamorphosis process of *Paralichthys olivaceus*.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*; *Tbx5* gene; pectoral fins; eyes; expression