

刘敏,何兴,蒲晓华,等. 合子基因 *mcm3* 在斑马鱼肝早期发育中的作用[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2): 129–134.
Liu M, He X, Pu XH, et al. Role of zygotic *mcm3* in the early development of zebrafish liver[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(2): 129–134.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.02.001

合子基因 *mcm3* 在斑马鱼肝早期发育中的作用

刘敏¹,何兴²,蒲晓华²,张雨¹,陈炳宇¹,黄四洲^{3*}

(1. 成都医学院基础医学院,成都 610500; 2. 成都医学院生物医学系,成都 610500; 3. 成都医学院基础医学院人体解剖与组织胚胎学教研室;发育与再生四川省重点实验室,成都 610500)

【摘要】 目的 研究斑马鱼合子基因 *mcm3* 是否参与了斑马鱼肝早期发育的调控。方法 运用原位杂交分析 *mcm3* 在斑马鱼发育早期表达谱;运用 *mcm3* MO 敲降 *mcm3* 基因功能,然后用原位杂交及转基因鱼胚胎分析肝的发育状况。结果 *mcm3* 为合子表达基因,在中囊胚期后到尾芽期广泛表达,而在体节发生期及以后分别在体节、头部及内胚层组织高表达。进一步研究发现在 *mcm3* 功能敲降后肝变小,而中胚层器官血管心脏的发育并未受到明显影响。*mcm3* mRNA 回救实验表明 *mcm3* 特异的调控了肝的发育。结论 斑马鱼合子基因 *mcm3* 参与了肝早期发育的调控。

【关键词】 合子基因 *mcm3*;肝发育;斑马鱼

【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2019)02-0129-06

Role of zygotic *mcm3* in the early development of zebrafish liver

LIU Min¹, HE Xing², PU Xiaohua², ZHANG Yu¹, CHEN Bingyu¹, HUANG Sizhou^{3*}

(1. School of Basic Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China. 2. School of Biomedical Sciences, Chengdu Medical College, Chengdu 610500. 3. Development and Regeneration Key Laboratory of Sichuan Province, Department of Anatomy, Histology and Embryology; School of Basic Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610500)

Corresponding author: HUANG Sizhou. E-mail: huangyuy1027@126.com

【Abstract】 **Objective** MCM3, a component of the MCM complex (MCM2–MCM7 complex), plays a critical role in the initiation of DNA replication and is a marker overexpressed in most malignant tumors such as liver cancer. However, whether it is involved in the early development of zebrafish liver is largely unknown. Our current study addressed whether zygotic *mcm3* contributes to the regulation of liver development in zebrafish. **Methods** Expression of zygotic *mcm3* was examined using *in situ* hybridization. *mcm3* was then knocked down by injecting a *mcm3* MO, and the liver developmental phenotype was analyzed in transgenic line (*fabp10: GFP*) and wild type embryos. **Results** Being as a zygotic gene, *mcm3* was expressed ubiquitously before the bud stage, whereas it was highly restricted in somite, head and endoderm-related tissues from the somite stage. After *mcm3* loss of function, the liver was smaller than that in the control embryos, but no other distinct developmental defects were observed. In addition, *mcm3* mRNA injection rescued the defect of liver development in the *mcm3* morphants. **Conclusion** Zygotic *mcm3* is involved in the regulation of early development of zebrafish liver.

【Keywords】 zygotic *mcm3*; liver development; zebrafish

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

【基金项目】国家自然科学基金项目(31741091);四川省教育厅自然科学基金重点项目(18ZA0142)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31741091), and Scientific Research Fund of Sichuan Provincial Education Department (18A0142).

【作者简介】刘敏(1994—),女,硕士研究生,专业:发育生物学。Email:956937813@qq.com

【通信作者】黄四洲(1977—),男,副研究员,硕士生导师,主要从事发育信号转导的研究。Email:huangyuy1027@126.com

在胚胎发育过程中细胞同时进行细胞增殖和细胞分化两个重要过程^[1]。在细胞周期过程中,小染色质复合体(MCM2-MCM7)在 DNA 复制起始中起着重要的作用^[2]。在细胞周期 M 期到 G1 期的转换期,通过 ORC、CDC6 和 CDT1 等的介导作用,MCM 复合体首先结合于 DNA 复制原点处。然后在 G1 和 S 期转换期形成前复制复合体(pre-RC)以后始 DNA 的复制。在 MCMs 复合体形成初始阶段,MCM2-7 以一种非活性的六聚体形式环抱双联 DNA(dsDNA)^[3-4]。到 G1 与 S 期转换时,在 DKK 调控下 Cdc45 和 GINS 与 MCM 复合体发生结合以形成 2CMG(Cdc45-MCM-GINS)复合体,从而使得 MCM 复合体的解旋酶活性得以激活^[5],起始 DNA 复制。MCM3 是 MCM 家族的重要成员之一,最近直接被证实对于 ORC/CDC6/CDT1/MCM2-7 复合体的形成起着至关重要的作用^[6]。同时发现 MCM3 磷酸化使得细胞周期不能通过细胞周期鉴定点^[7],从而导致细胞周期不能正常进行。另一方面作为 MCM 家族成员之一的 MCM3,在胚胎发育早期被认作是增殖细胞的重要标记基因,当细胞周期减慢时,其表达降低,而在终末分化细胞中,MCM3 不容易被检测到^[8]。相应的在肝癌、宫颈癌等众多快速增殖的癌症细胞中,MCM3、Ki67 及 PCN1 等增殖标记基因均呈高表达^[9-12]。因此 MCM3 也被用作在胚胎发育及疾病发生中细胞增殖的重要标记基因。

MCM 家族作为细胞周期 DNA 复制起始的调控因子及增殖细胞的标记基因已被广泛研究。但在增殖细胞中 MCM 家族的表达量远大于 DNA 复制所必须,暗示该家族成员在胚胎发育过程中可能参与了 DNA 复制以外的其他生物学功能^[13-14]。最近研究发现,在斑马鱼中家族成员之一 *mcm2* 作为 *foxn1* 的下游基因调控了胸腺 T 细胞的增殖^[15]; *mcm5* 也可能通过非细胞周期依赖性方式调控了体节极性的决定^[16];在小鼠中过量表达的 MCM3 也被证实发育环境压力下保证了红细胞的成熟^[17]。这些研究均表明 MCM 家族成员在胚胎发育过程中确实起着重要的作用。最近研究发现 *mcm3* 在斑马鱼中存在母源性 *mcm3* 及合子基因 *mcm3*。斑马鱼胚胎过表达母源性基因 *mcm3* 导致细胞增殖受阻,尾部发育缺失^[18],但是合子基因 *mcm3* 在发育中作用仍不清楚。

斑马鱼有体外受精、遗传操作简单、早期胚胎透明、发育迅速的优点,已经被广泛运用到器官发

育的研究中^[19-20]。本研究首先研究斑马鱼合子基因 *mcm3* 在胚胎早期发育中的表达模式,发现 *mcm3* 在肝等内胚层器官前体细胞中大量表达,暗示其可能参与了肝发育。进一步运用 MO 注射敲降及 mRNA 回救的方法研究发现,合子基因 *mcm3* 功能敲降使得肝变小,并且这种表型可以较好的被 *mcm3* mRNA 回救。同时我们发现 *mcm3* 功能敲降并不影响心脏和血管的发育,暗示 *mcm3* 特异的参与了肝发育的早期调控。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本文所用斑马鱼品系包括野生型(AB 品系)和 *Tg(Ifabp10:GFP)*, *Tg(flk1:GFP)*, *Tg(cmlc2:GFP)* 三种转基因品系。三种转基因品系由黄红辉教授和孙华钦老师赠送。斑马鱼严格按照标准饲养条件喂养^[21],实验胚胎在 28.5℃ 孵育箱中孵育至实验所需日期。

1.1.2 试剂与仪器

探针合成试剂盒为 DIG RNA Labeling kit (Roche);Mopholino 购自 GeneTools 公司(*mcm3*MO: 5-AAAAGTTCAGTGCAGAACACCTCGT-3; ContMO: 5-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3);mRNA 合成试剂盒为 mMessage mMachine SP6 (Ambion-Thermo Fisher);cDNA 反转录试剂盒为 Reverse Transcription (#K1622, Thermo);原位杂交试剂盒 (Roche);限制性内切酶及 Q5 高保真酶 (NEB);PCR purification kit (D6492-01, Qiagen);拍照所用显微镜主要为 Olympus SZX2-ILLT 和 Olympus U-HGLGPS 荧光显微镜。

1.2 方法

1.2.1 MO 和 mRNA 注射

利用 mMessage mMachine SP6 转录试剂盒 (Ambion-Thermo Fisher, UK)体外合成了注射用斑马鱼的全长 *mcm3* mRNA。将 *mcm3* MO (300 μmol/L)和 mRNA (100 ng/μL)分别或共注射于 1~4 细胞期的斑马鱼胚胎中。

1.2.2 探针制备与原位杂交

用线性化载体或 PCR 产物为模板,使用 sp6 或 T7 转录酶合成地高辛标记的 RNA 反义探针 (DIG RNA Labeling kit 试剂盒)。纯化及电泳鉴定正确后,于 -20℃ 保存备用。目的胚胎收集并用 4%PFA 固定

过夜,第 2 天用 PBST 洗 3 次(每 5 min 1 次),无水甲醇脱水 3 次(每次 15 min),最后放入-20℃ 备用。原位杂交流程按之前的报道方法进行^[16]。

1.2.3 *mCherry* mRNA 和 *mcm5* mRNA 的合成

用限制性内切酶将构建好的质粒酶切线性化,使用 DNA 纯化试剂盒回收线性化的 DNA 模板。后用 mMessage mMachine SP6 转录试剂盒体外转录合成 mRNA,再使用酚氯仿抽提 mRNA,异丙醇沉淀。测浓度后跑胶检测并分装放于-80℃ 冰箱保存待用。

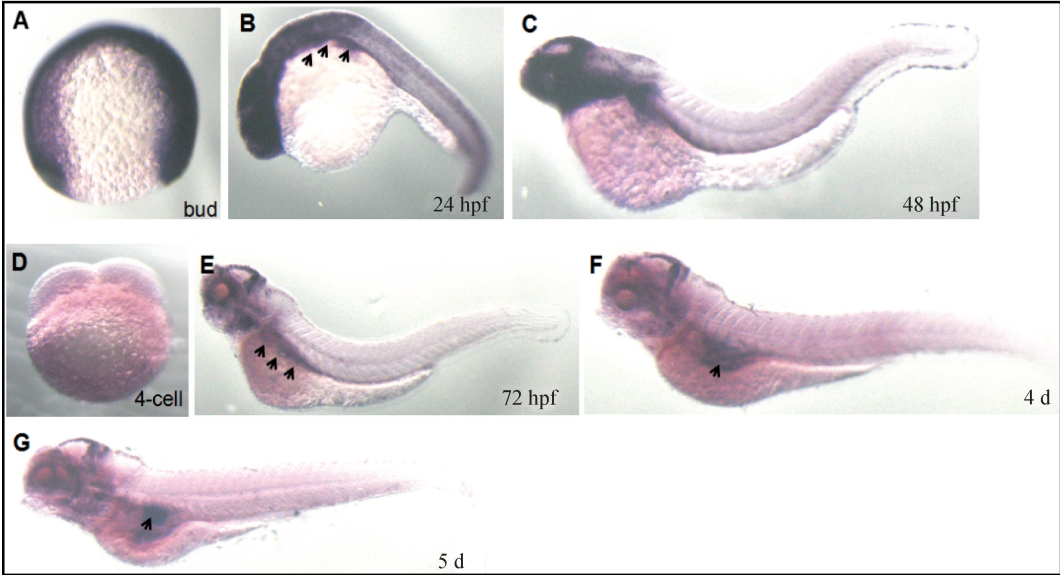
1.2.4 荧光体视显微镜拍照

活体胚胎用麻醉剂 tricane 麻醉后拍照,原位杂交及其他需要定位的胚胎将胚胎放于 100% 甘油或 1% 低熔点琼脂凝胶中固定,后使用 Olympus SZX2-ILLT 或 Olympus U-HGLGPS 荧光显微镜观察及拍照。

2 结果

2.1 斑马鱼合子基因 *mcm3* 在胚胎早期发育中的表达模式

为研究合子基因 *mcm3* 在斑马鱼发育早期中的作用及功能,我们运用整胚原位杂交检测 *mcm3* 基因在斑马鱼中的时空表达模式。研究表明, *mcm3* 在胚胎中囊胚转换前未见表达(图 1D),在 bud 时期及以前 *mcm3* 广泛表达(图 1A)。在体节发生期到 24 hpf, *mcm3* 基因广泛表达于头部,眼睛,体节以及内胚层区域(图 1B)。受精后 48 h~4 d(图 1C, E-G), *mcm3* 基因在头部,鱼腮及胸腺等区域高表达,且在肝等内胚层组织器官有较强的表达(箭头所指)。以上数据表明,合子基因 *mcm3* 在胚胎早期发育过程中可能参与了肝内胚器官发育的调控。



注: A-G. *mcm3* 在胚胎各个时期的表达模式。 *mcm3* 在 4 细胞期不表达(D), 在 bud 时期呈广泛表达(A)。在 24 hpf *mcm3* 主要表达在头部、眼睛及内胚层区域(B, 箭头所示); 在 48 hpf 主要在眼睛、中后脑边缘、腮及内胚层表达(C); 在 72 hpf 之后主要在腮、中后脑边缘及部分内胚层组织表达(E-G)。

图 1 *mcm3* 在斑马鱼发育早期的表达模式

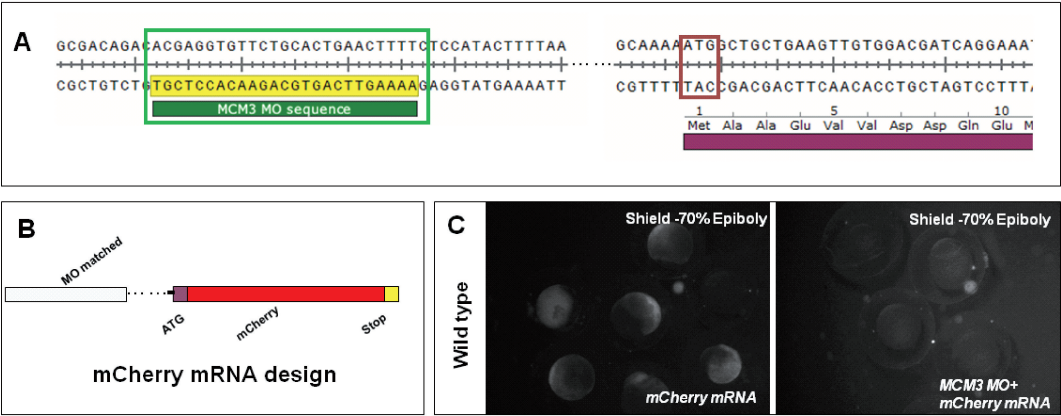
Note. A-G. The expression pattern of *mcm3*. *mcm3* was not expressed in the 4-cell stage (D), it was expressed ubiquitously in the bud stage (A), while the expression was restricted in the head, eye and endoderm related tissues at 24 hpf. At 48 hpf, it was dominantly expressed in the eye, the boundary of mid-hindbrain, gill and endoderm tissues (C). After 72 hpf, *mcm3* was only expressed in the boundary of mid-hindbrain, gill and partial part endoderm tissues (E-G).

Figure 1 Expression pattern of *mcm3* in early development of zebrafish

2.2 合子基因 *mcm3* MO 的设计及功能验证

为研究 *mcm3* 敲降后是否影响胚胎早期内胚层肝的发育,我们合成了 *mcm3* MO 以阻断胚胎内源性 *mcm3* mRNA 的翻译(图 2A)。与此同时,构建了体外转录的 *mCherry* mRNA 的载体以验证 *mcm3* MO 是否工作。在该载体中于 *mCherry* 编码区的上游添

加了一段完全与 *mcm3* MO 相匹配的 DNA 序列,体外转录后获得 *mCherry* mRNA 可与 *mcm3* MO 相结合(图 2B)。如果合成的 *mcm3* MO 能很好地抑制内源性 *mcm3* mRNA 的翻译,理论上 *mCherry* mRNA 的翻译也将受到 *mcm3* MO 的抑制而表达减弱。结果显示,单独注射了 *mCherry* mRNA 的野生型胚胎,



注: A. 标记 *mcm3* MO 所对应的基因位点; B. *mCherry* mRNA 的设计策略; C. 单独注射 *mCherry* mRNA 及共注射 *mCherry* mRNA 和 *mcm3* MO 后胚胎荧光表达图。

图 2 *mcm3* MO 设计及功能验证

Note. A. Gene locus of *mcm3* MO. B. Design strategy of *mCherry* mRNA. C. Fluorescence image of embryos after injection of *mCherry* mRNA alone and co-injection of *mCherry* mRNA and *mcm3* MO.

Figure 2 *mcm3* MO designing and functional verification

在 Shield 到 70% 外卵黄外包时期有较强的红色荧光。而共注射了 *mcm3* MO 以及 *mCherry* mRNA 的胚胎中,红色荧光明显减弱(图 2C)。以上结果间接表明,体外合成的 *mcm3* MO 能很好的抑制胚胎内源性 *mcm3* mRNA 翻译。

2.3 合子基因 *mcm3* 在肝发育中的作用

肝是内胚层来源的重要器官,为验证是否 *mcm3* 参与了肝的发育调控,我们在 *Tg(fapb10;GFP)* 转基因中注射 *mcm3* MO 以阻断 *mcm3* 翻译来分析肝发育是否受到影响。结果表明,在 *mcm3* 功能敲降后胚胎发育早期没有任何缺陷(数据未提供)。待胚胎发育到第 3 天与对照组相比,眼睛稍微变小(图 3A,箭头),但无明显的其他外观发育缺陷(图 3A)。仔细分析进一步发现,当 *mcm3* 功能敲降时 3.5 d 胚胎肝明显变小,只有正常胚胎肝的 1/10 左右(图 3B)。为证实 *mcm3* 在肝发育中的特异性作用,我们在 *Tg(flk1;GFP)* 及 *Tg(cmlc2;GFP)* 转基因胚胎中注射 *mcm3* MO 以敲降 *mcm3* 以分析血管和心脏的发育是否受到影响,但并未发现血管和心脏发育的明显异常(图 3C-D)。以上结果表明,*mcm3* 对胚胎早期肝的发育具有特异的正调控作用。

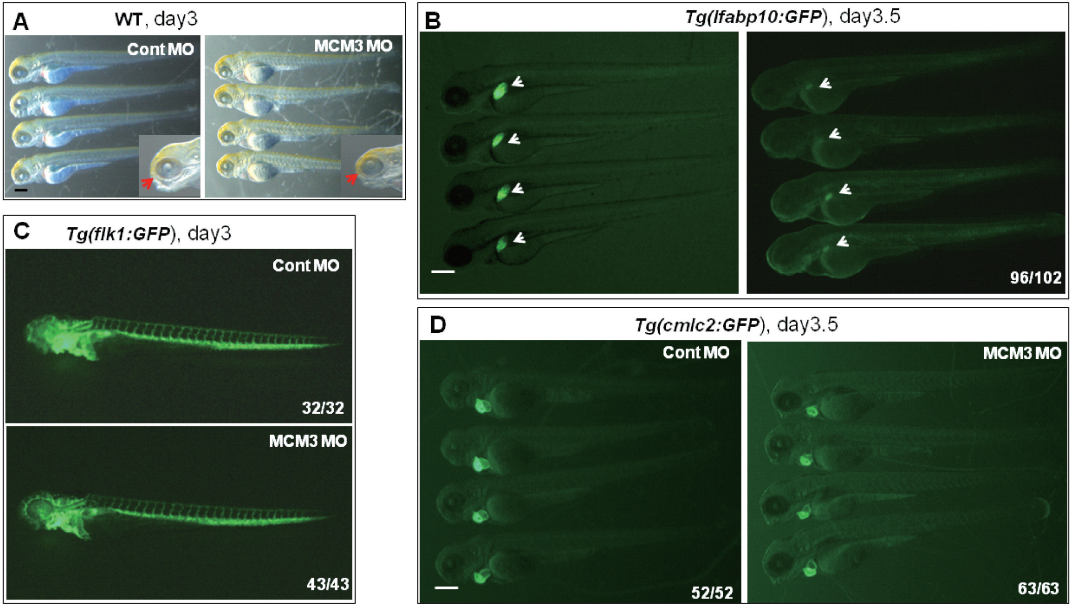
2.4 合子基因 *mcm3* mRNA 对肝表型的回救

为验证 *mcm3* 在肝发育中的特异性作用,我们分析 *mcm3* mRNA 是否能回救 *mcm3* MO 注射导致的肝变小的表型。结果显示,与单独注射 *mcm3* MO 的胚胎相比,共注射 *mcm3* MO 及 mRNA 的 *Tg(lfapb10;GFP)* 胚胎在 3.5 d 时肝明显变大,表型得

到回救(图 4A, a1-a4, 白色箭头),这表明 *mcm3* 特异的参与了肝早期发育的调控。由于转基因背景的胚胎可能导致部分非特异性表型,为了进一步证实 *mcm3* 在肝早期发育中的作用,我们在野生型胚胎中检测肝发育早期的另一内源性标记基因 *cp*。结果表明,在 *mcm3* 功能敲降时肝标记基因 *cp* 表达面积明显减小(图 4B, b1-b2),并且 *mcm3* RNA 注射较好的回救了 *mcm3* MO 注射所导致的肝发育缺陷(图 4C, c1-c3)。

3 讨论

虽然 MCM 家族在细胞周期中调控 DNA 复制的功能已经很清楚,但是其在胚胎发育中的功能报道较少。在小鼠中 MCM3 功能敲除使得红细胞不能正常成熟,血液干细胞功能缺陷^[17],但在其他增殖细胞中的功能未见报道。我们课题组运用斑马鱼模式动物研究的优势,对合子基因 *mcm3* 在胚胎发育早期的表达模式以及其在肝发育中的功能进行了研究。表达模式表明合子 *mcm3* 全长基因表达模式与我们已经报道的 *mcm5* 的表达有许多相似的地方^[16]:在体节期前广泛表达,而后在体节、肌肉、神经、内胚层细胞处高表达。但以 *mcm3* 编码区的 5' 端 500 bp 片段为探针进行原位杂交检测,发现 *mcm3* 在体节发生晚期及 24 hpf 只在体节大量表达,而在头部等区域表达很弱(数据未提供),暗示合子 *mcm3* 可能存在另一个或多个不同的同源基因或者不同的剪切方式。最近有研究报道斑马鱼

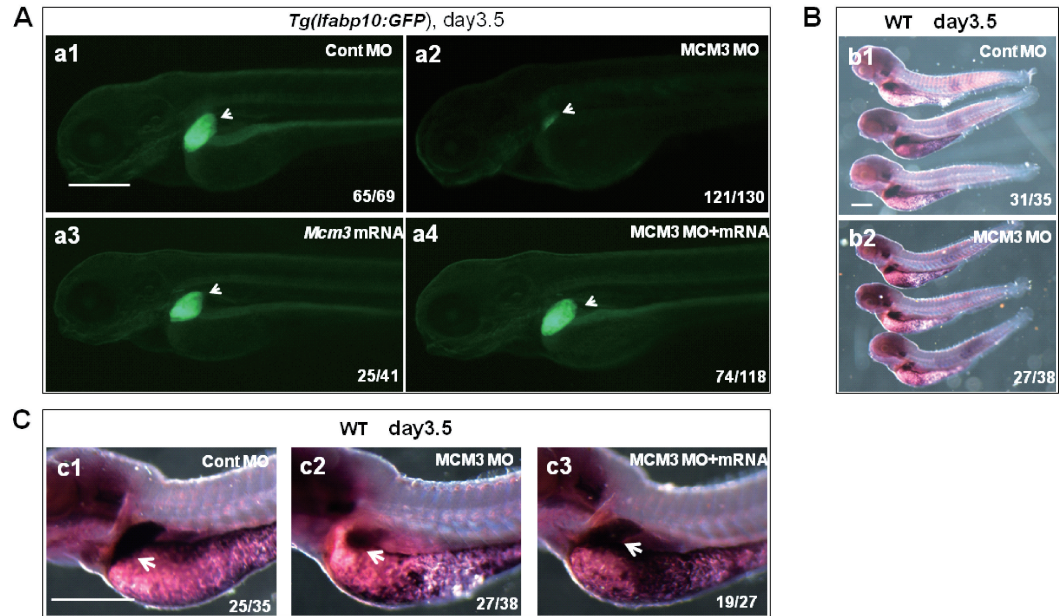


注:A. 在胚胎发育第 3 天时注射 *mcm3* MO 的胚胎眼睛稍微变小,但无其他任何畸形;B.与对照组比较 *mcm3* 功能敲降后肝明显变小(白色箭头标注);C,D. *mcm3* 功能敲降后血管(C)和心脏(D)发育正常。标尺:100 μm。

图 3 *mcm3* 敲降后肝变小

Note. A. On the third day of embryonic development, the embryo injected with *mcm3* MO had a smaller eye but no other abnormalities. B. Compared with the control group, the liver was smaller after *mcm3* knockdown (white arrow). C, D. After *mcm3* knockdown, blood vessels (C) and heart (D) were developed normally. Bar=100 μm.

Figure 3 Liver is smaller after *mcm3* knockdown



注:A. 在单独注射 control MO(a1)、*mcm3* MO(a2)、*mcm3* mRNA(a3)、共注射 *mcm3* MO 和 *mcm3* mRNA(a4)的 *Tg(fabp10:GFP)* 转基因胚胎中肝的比较;B. 在野生型胚胎中,注射 *mcm3* MO 导致胚胎肝变小;C. 在野生型胚胎中 *mcm3* mRNA 注射回救了注射 *mcm3* MO 胚胎中的肝发育缺陷。标尺:100 μm。

图 4 *mcm3* mRNA 注射回救了 *mcm3* MO 注射后的肝发育缺陷

Note. A. Comparison of liver in the *Tg(fabp10:GFP)* transgenic embryos with control MO (a1), *mcm3* MO (a2), *mcm3* mRNA (a3), co-injection of *mcm3* MO and *mcm3* mRNA (a4). The liver in *Tg(fabp10:GFP)* embryos injected with control MO (a1), *mcm3* MO (a2), *mcm3* mRNA (a3), respectively, as well as embryos co-injected with *mcm3* MO and *mcm3* mRNA (a4). B. In the wild-type embryos, injection of *mcm3* MO resulted in a smaller liver than the control embryos. C. In wild-type embryos, *mcm3* mRNA was injected to rescue the liver development defects caused by injection of *mcm3* MO. (arrow). Bar=100 μm.

Figure 4 *mcm3* mRNA rescued the liver development defects caused by *mcm3* MO injection

mcm3 存在着母源性和合子转录两种类型^[21]。研究发现母源性 *mcm3* 基因过表达直接导致细胞增殖受阻,并且胚胎发育到 24 h 时尾部出现不同程度的变短或缺失,而过表达合子基因 *mcm3* 后的胚胎发育缺陷未见报道^[21]。这些研究暗示在胚胎发育过程中,在斑马鱼中可能 *mcm3* 较其他 *mcm* 家族因子其调控发育的具体过程及分子机制有一定不同之处,这为我们研究 MCM 家族细胞周期因子在发育中的功能开辟了一条新的道路。

在这里我们的研究表明 *mcm3* 调控了肝发育,但在调控肝发育过程中 *mcm3* 是通过细胞周期依赖还是非依赖的形式进行还不得而知;*mcm3* 是否也调控了其他内胚层及外胚层组织的发育调控也有待我们后续的工作进一步阐明。

参 考 文 献(References)

- [1] Liu X, Huang S, Ma J, et al. NF- κ B and Snail1a coordinate the cell cycle with gastrulation [J]. J Cell Biol, 2009, 184(6): 805–815.
- [2] Shinya M, Machiki D, Henrich T, et al. Evolutionary diversification of MCM3 genes in *Xenopus laevis* and *Danio rerio* [J]. Cell Cycle, 2014, 13(20): 3271–3281.
- [3] Takara TJ, Bell SP. Putting two heads together to unwind DNA [J]. Cell, 2009, 139(4): 652–654.
- [4] Remus D, Beuron F, Tolun G, et al. Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing [J]. Cell, 2009, 139(4): 719–730.
- [5] Ilves I, Petojevic T, Pesavento JJ, et al. Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins [J]. Mol Cell, 2010, 37(2): 247–258.
- [6] Riera A, Tognetti S, Speck C. Helicase loading: how to build a MCM2-7 double-hexamer [J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, 30: 104–109.
- [7] Han X, Mayca Pozo F, Wisotsky JN, et al. Phosphorylation of minichromosome maintenance 3 (MCM3) by checkpoint kinase 1 (Chk1) negatively regulates DNA replication and checkpoint activation [J]. Biol Chem, 2015, 290(19): 12370–12378.
- [8] Davuluri G, Gong W, Yusuff S, et al. Mutation of the zebrafish nucleoporin *elys* sensitizes tissue progenitors to replication stress [J]. PLoS Genet, 2008, 4(10): e1000240.
- [9] Gan N, Du Y, Zhang W, et al. Increase of Mcm3 and Mcm4 expression in cervical squamous cell carcinomas [J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2010, 31(3): 291–294.
- [10] Zhuang L, Yang Z, Meng Z. Upregulation of BUB1B, CCNB1, CDC7, CDC20, and MCM3 in tumor tissues predicted worse overall survival and disease-free survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018(163): 1–8.
- [11] Rezvani G, Andisheh-Tadbir A, Ashraf MJ, et al. Evaluation of minichromosome maintenance-3 (MCM3) in oral squamous cell carcinoma [J]. J Dent Shiraz Univ Med Sci. 2015, 16(2): 87–92.
- [12] Zhong H, Chen B, Neves H, et al. Expression of minichromosome maintenance genes in renal cell carcinoma [J]. Cancer Manag, 2017, 9: 637–647.
- [13] Woodward AM, Gohler T, Luciani MG, et al. Excess Mcm2-7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress [J]. Cell Biol, 2006, 173(5): 673–683.
- [14] Ge XQ, Jackson DA, and Blow JJ. Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress [J]. Genes Dev, 2007, 21(24): 3331–3341.
- [15] Ma D, Wang L, Wang S, et al. Foxn1 maintains thymic epithelial cells to support T-cell development via mcm2 in zebrafish [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(51): 21040–21045.
- [16] 张雨, 吴永梅, 刘敏, 等. 斑马鱼 *mcm5* 基因的表达分析及在体节发生中的功能 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 8–14.
- Zhang Y, Wu Y, Liu M, et al. The expression pattern of zebrafish *mcm5* and its role in somitogenesis [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(10): 8–14.
- [17] Alvarez S, Diaz M, Flach J, et al. Replication stress caused by low MCM expression limits fetal erythropoiesis and hematopoietic stem cell functionality [J]. Nat Commun, 2015, 6, 8548.
- [18] Shinya M, Machiki D, Henrich T, et al. Evolutionary diversification of MCM3 genes in *Xenopus laevis* and *Danio rerio* [J]. Cell Cycle, 2014, 13(20): 3271–3281.
- [19] 黄超, 张冲, 蒋发明, 等. 斑马鱼消化器官发育缺陷突变体的遗传筛选 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(05): 441–445.
- Huang C, Zhang C, Jiang F, et al. Genetic screening of zebrafish mutants with developmental defects in the digestive organs [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(05): 441–445.
- [20] 王政, 李金鹏, 闫一芳, 等. *isthmin 1* 对斑马鱼胚胎汇聚延伸运动的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2): 40–45.
- Wang Z, Li J, Yan Y, et al. *ism1* regulates convergence and extension movements during zebrafish gastrulation [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(2): 40–45.
- [21] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. Dev Dyn, 1995, 203(3): 253–310.

[收稿日期] 2019-01-14