

# 多疣壁虎胚胎发育过程中角蛋白的表达分析

陈铭月, 王飞飞, 李 鹏, 严 洁, 周开亚

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 角蛋白包括  $\alpha$  角蛋白和  $\beta$  角蛋白两种类型. 迄今  $\alpha$  角蛋白被发现存在于所有的脊椎动物中, 而  $\beta$  角蛋白仅存在于鸟类和爬行类表皮及其附属物中. 本研究通过同源搜索比对鉴定了多疣壁虎 (*Gekko japonicus*) 的 1 个  $\beta$  角蛋白基因: *G. japonicus* claw keratin-like (LOC107121854), 暂命名为 *ge-gprp-13*, 和 1 个  $\alpha$  角蛋白基因: *G. japonicus* keratinocyte associated protein 2 (KRTCAP2), 暂命名为 *ge-krtcap2*. 利用荧光定量 PCR 方法比较分析了多疣壁虎 *ge-gprp-13* 和 *ge-krtcap2* 基因在其胚胎发育过程中的 mRNA 表达模式. 研究结果表明, 在多疣壁虎胚胎发育的不同时期,  $\alpha$  角蛋白基因 (*ge-krtcap2*) 和  $\beta$  角蛋白基因 (*ge-gprp-13*) 的表达模式不同: 在趾部发育的初期,  $\alpha$  角蛋白基因先表达, 而  $\beta$  角蛋白基因主要在趾部发育的后期进行表达, 并且在趾部形成的整个过程中,  $\beta$  角蛋白基因的表达量远远高于  $\alpha$  角蛋白基因的表达量.

[关键词] 多疣壁虎,  $\alpha$  角蛋白,  $\beta$  角蛋白, mRNA 表达

[中图分类号] Q951+3 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2019)02-0099-06

## The mRNA Expression of Keratin Genes in Embryonic Development of *Gekko japonicus*

Chen Mingyue, Wang Feifei, Li Peng, Yan Jie, Zhou Kaiya

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** Reptile epidermis contains two types of keratins— $\alpha$ -keratins and  $\beta$ -keratins. Up to date,  $\alpha$ -keratins are reported to be present in all vertebrates, while  $\beta$ -keratins are only found in birds and reptiles. In the present study, two keratin genes of *Gekko japonicus* were identified from the National Center of Biotechnology Information database, one  $\beta$ -keratin gene, *G. japonicus* claw keratin-like (LOC107121854) tentatively named *ge-gprp-13* and one  $\alpha$ -keratin gene, *G. japonicus* keratinocyte associated protein 2 (KRTCAP2) tentatively named *ge-krtcap2*. The mRNA expression of keratin genes during embryonic development of the gecko was studied by using fluorescence quantitative real-time PCR. The results showed that the  $\alpha$ -keratin gene (*ge-krtcap2*) and the  $\beta$ -keratin gene (*ge-gprp-13*) have different expression patterns in different stages of embryonic development of the gecko. In the early stage of toe development, the  $\alpha$ -keratin gene is expressed first, while the  $\beta$ -keratin gene is mainly expressed in the later stage of toe development. And during the formation of the toe, the expression level of the  $\beta$ -keratin gene is much higher than the  $\alpha$ -keratin gene.

**Key words:** *Gekko japonicus*,  $\alpha$ -keraton,  $\beta$ -keraton, mRNA expression

爬行类是体被角质鳞片、在陆地繁殖的变温羊膜动物, 在脊椎动物从水栖过渡到陆地生活的演化过程中, 通过表皮角质化以防止机械损伤、紫外辐射和水分流失以及羊膜卵繁殖等获得了在陆地生存和繁殖的能力. 爬行类表皮主要由两种角蛋白—— $\alpha$  角蛋白和  $\beta$  角蛋白组成<sup>[1]</sup>. 迄今,  $\beta$  角蛋白仅被发现存在于鸟类和爬行动物中<sup>[2-3]</sup>, 主要构成爬行动物和鸟类的鳞片、爪以及鸟类的喙和羽毛等.  $\beta$  角蛋白含有甘氨酸-甘氨酸-半胱氨酸重复序列, 形成  $\beta$  折叠结构, 分子量一般为 10 kDa~21 kDa<sup>[4-5]</sup>. 而  $\alpha$  角蛋白存在于所有的脊椎动物中.  $\alpha$  角蛋白由中间丝或细胞角蛋白构成, 形成  $\alpha$ -螺旋二级结构<sup>[6-8]</sup>, 分子量一般为 40 kDa~

收稿日期: 2019-01-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31672269)、江苏省高校优势学科 II 期项目 (PAPD)、江苏省高等学校自然科学研究面上项目 (17KJD240001)、江苏高校品牌专业建设工程一期项目-生物科学 (PPZY2015B117).

通讯联系人: 严洁, 副教授, 研究方向: 动物遗传与系统地理. E-mail: janeiam@163.com

68 kDa<sup>[9]</sup>. 在爬行类的表皮中,  $\alpha$  角蛋白和  $\beta$  角蛋白构成不同的鳞片角质层:  $\alpha$  角蛋白构成表皮中柔软的  $\alpha$  层, 这些  $\alpha$  蛋白质由脂类材料包围, 形成可拉伸的层, 从而减少水分的损失;  $\beta$  角蛋白构成了坚硬的表皮和粘性刚毛<sup>[10]</sup>, 坚硬的表皮保护鳞片免受机械损伤, 而粘性刚毛可以使得壁虎类动物在不同的物体表面上均可运动自如<sup>[11]</sup>. 多疣壁虎(*Gekko japonicus*)是爬行纲、有鳞目、蜥蜴亚目、壁虎科中的一种小型夜行性动物, 在中国东部有广泛的分布. 多疣壁虎通常于每年的5~8月繁殖, 年产1~3窝卵, 每窝一般为2枚, 在温湿度较为适合的条件孵化成功率高<sup>[12-14]</sup>. 基于胚胎发育过程中头部、咽、四肢等形态变化及皮肤色素沉积和被鳞的情况, 多疣壁虎胚胎发育被分为42个时期, 33期指和趾开始显现, 39期指、趾底部膨大, 形成单行攀瓣<sup>[15]</sup>. 多疣壁虎的指趾上不但含有  $\alpha$  角蛋白构成的柔软的  $\alpha$  层, 也含有  $\beta$  角蛋白构成的坚硬鳞片, 且在其趾垫上长有  $\beta$  角蛋白构成的刚毛, 因此多疣壁虎的指趾部是研究角蛋白分布的理想部位. 虽然国内外对爬行动物角蛋白已经进行了较为深入的研究, 了解了其物理化学性质以及在体内的分布, 但对多疣壁虎  $\alpha$  角蛋白和  $\beta$  角蛋白在其胚胎发育时期的表达模式还未见相关研究报道. 在本研究中, 从多疣壁虎全基因组中筛选获得了  $\alpha$  角蛋白基因和  $\beta$  角蛋白基因, 暂时命名为 *ge-krtcap2* 和 *ge-gprp-13*, 采用荧光定量 PCR 检测了多疣壁虎 *ge-krtcap2* 和 *ge-gprp-13* 在其不同发育时期的表达模式.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

依据南京师范大学学术委员会伦理专业委员会规定(SYXK(苏)2015-0028), 实验所用的多疣壁虎于2018年5月至8月捕自江苏南京旧城区附近, 所捕捉的多疣壁虎多为怀卵的雌性成体, 随后将其饲养于专用网笼内(50 cm×30 cm×25 cm), 饲养温度为28℃, 并在笼子内放置报纸和纸浆鸡蛋托等遮蔽物供其躲避. 每天定时投放食物和补给水分, 投食有诱捕的昆虫、人工饲养的黄粉虫和蟋蟀等, 水分中添加钙粉和维生素<sup>[16]</sup>, 投放食物时间固定在晚上, 避免扰乱多疣壁虎作息, 定期投放也可避免食物变质而影响壁虎健康.

为了更好地收集多疣壁虎所产的卵并且保证卵的完整性, 将快要产卵的雌性壁虎单独饲养于产卵盒中, 在产卵盒内6个平面包裹上保鲜膜, 避免卵壳粘附到容器壁上收集卵时被扯碎. 产卵后2 h内收集卵<sup>[17]</sup>, 用灯光检查卵的受精状况, 若卵壳内有血管发育则为受精卵. 将收集的受精卵编号后置于含有孵化基质的孵化盒中, 孵化基质由干蛭石和水按质量比1:1配置, 放置于28℃的孵化箱中. 参考胚胎发育分期结果<sup>[15]</sup>, 取孵化至34期(13 d~19 d)、36期(22 d~28 d)、39期(33 d~40 d)、42(46 d~56 d)期4个时期的胚胎, 观察4个时期的胚胎发育过程中指趾部的特征, 然后进行后续研究(具体观察方法见1.2.1多疣壁虎胚胎指趾部观察).

#### 1.1.2 主要试剂

三氯甲烷(丁贝生物科技有限公司, 中国南京)、RNA提取试剂盒: TransZol™ UP Plus RNA Kit (TransGen Biotech, 中国北京)、逆转录试剂盒: PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real-Time) (TaKaRa, 中国大连)、RNA保护试剂: RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen, 德国)、2×EasyTaq PCR SuperMix (TransGen Biotech, 中国北京)、Easypure PCR purification kit (TransGen Biotech, 中国北京)、实时荧光定量PCR反应试剂盒 SYBR® Premix Ex-Taq™ (TaKaRa, 中国大连).

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 多疣壁虎胚胎指趾部观察

取发育至34期、36期、39期和42期的卵, 每个时期至少取卵3枚, 在PBS溶液中解剖, 体视显微镜(Nikon SMZ1270)下观察胚胎指趾部的形态特征, 使用NIS-Elements F软件拍照, 测量记录主要的形态特征.

#### 1.2.2 总RNA的抽提

在无RNAase环境中取多疣壁虎34期、36期、39期、42期胚胎趾垫部表皮, 每个时期取3个样品, 迅速转移至1.5 mL RNAase-free离心管中. 依据RNA抽提相关试剂使用说明书操作提取总RNA, 将获得的总RNA分装, 取1  $\mu$ L用于浓度和纯度检测, 2  $\mu$ L用于0.8%琼脂糖凝胶电泳检测, 剩余的RNA于-80℃保存.

1.2.3 逆转录合成 cDNA

本研究使用 PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real-Time) 反转录试剂盒,对多疣壁虎 4 个时期的胚胎样品 RNA 进行反转录,整个过程于冰盒上在超净台无菌操作,依据试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA. cDNA 反应体系:5×PrimeScript RT Master Mix (for Real Time), 4 μL; EASY Dilution (for Real Time PCR), 2 μL; Total RNA (质量浓度 100 ng/μL), 1 μL; RNAase Free Water, 13 μL; 总反应体积为 20 μL. 反应条件:37 ℃, 15 min; 85 ℃, 5 s. 将合成的 cDNA 测浓度后用 RNAase Free Water 稀释到 100 ng/μL, 分装后储存于-20 ℃备用.

1.2.4 引物设计与荧光定量 PCR 反应

根据多疣壁虎角蛋白基因 (*ge-krtcap2* 和 *ge-gprp-13*) 序列, 采用 Primer premier 5.0 (premier, 加拿大) 软件设计特异性引物. 内参特异性引物根据安乐蜥 (*Anolis carolinensis*) cDNA 文库中的  $\beta$ -actin 基因序列 (AF199487.1) 设计. 所有引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物信息见表 1.

表 1 多疣壁虎 keratin 基因荧光定量表达分析所用引物

Table 1 Primers used for q-PCR expression analysis of the *G. japonicus* keratin gene

应用	引物	序列 (5'→3')
Real-time qPCR	<i>beta-actin</i> -F	5'-TTGTGAGGATGCTGGATGAGA-3'
	<i>beta-actin</i> -R	5'-CCATCTCCTGCTCGAAGTCC-3'
<i>ge-kytoap2</i>	<i>ge-krtcap2</i> -F	5'-ATTGATCCACCGAGTCTGCG-3'
	<i>ge-krtcap2</i> -R	5'-CTGGTACTGGTACAGCGTGG-3'
<i>ge-gprp-13</i>	<i>ge-gprp-13</i> -F	5'-CTTGC GGCTGTTGGATCATGC-3'
	<i>ge-gprp-13</i> -R	5'-GGATGACGACTTCAGACCCC-3'

用设计好的引物对多疣壁虎 2 个角蛋白基因 (*ge-krtcap2* 和 *ge-gprp-13*) 在其 4 个胚胎发育时期趾部的 mRNA 表达情况进行检测. 按照实时定量 PCR 试剂盒 SYBR® Premix Ex-Taq™ (Tli RNaseH Plus) 说明书进行实验操作. 本试验样品和内参均进行 2 次生物学重复和 3 次技术重复, 加样时在冰盒上操作, 预计扩增片段长度为 200 bp 左右, 荧光定量 PCR 反应体系: 2×SYBR® Premix Ex-Taq, 10.0 μL; 上游引物和下游引物 (10 μmol/L), 各 0.8 μL; ROX Reference Dye II (50×), 0.4 μL; cDNA 模板 (100 ng), 1.0 μL; Deionized H<sub>2</sub>O, 7 μL; 总反应体系 20 μL. 反应程序: 95 ℃, 15 s; 然后开始 40 个循环: 95 ℃, 5 s; 60 ℃, 30 s; 最后 95 ℃, 15 s; 60 ℃, 1 min; 95 ℃, 15 s.

1.2.5 数据处理与统计分析

导出的试验数据采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法<sup>[18]</sup> 计算目的基因 mRNA 的相对表达量, 以 *ge-gprp-13* 在多疣壁虎胚胎 34 期趾部表达量为参照绘制表达量图. 使用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析和 LSD 法多重比较, 采用 (平均值±标准差) 表示, 显著性由 *t* 检验得出, 显著性水平为  $\alpha=0.05$ , 不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ).

2 结果

2.1 多疣壁虎 4 个胚胎发育时期趾部形态特征

多疣壁虎刚排出体外的受精卵胚胎一般已发育至 28 期, 整个胚胎可划分为 42 个时期, 发育至 34 期五指和五趾明显可见, 本研究主要比较观察多疣壁虎胚胎的指趾部发育特征, 因此取材从 34 期开始. 34 期、36 期、39 期和 42 期各个时期趾部具有不同的发育特征.

34 期 (图 1 a、b) 此时趾部形态清晰可见, 趾间有蹼状结构, 背腹面均为透明肉质结构, 趾部有关节出现, 但表现不够明显 (a 为趾部腹面, b 为趾部背面).

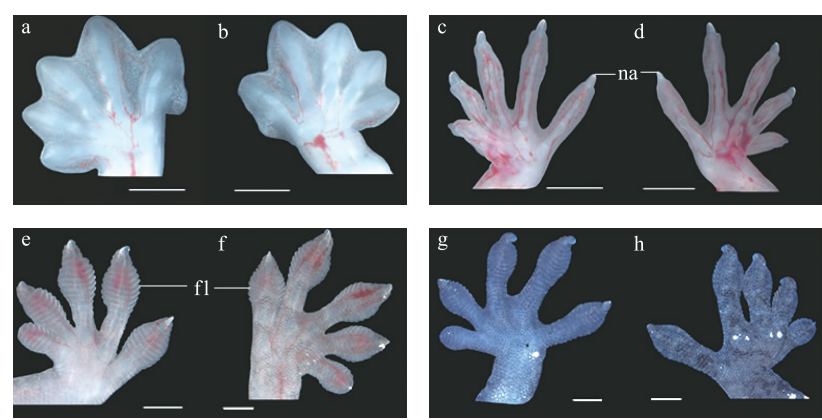
36 期 (图 1 c、d) 相比较 34 期、36 期趾部形态更为完整, 五趾轮廓清晰, 趾间的蹼已退化, 趾部骨骼逐渐发育, 关节明显可见, 在趾部顶端出现爪 (c 为趾部腹面, d 为趾部背面).

39 期 (图 1 e、f) 趾部腹面顶端发生膨大, 皮肤皱褶形成不对分的攀瓣, 排列整齐, 此时趾部皮肤色素开始沉淀, 趾背面鳞片因色素沉淀变得明显可见 (e 为趾部腹面, f 为趾部背面).

42 期 (图 1 g、h) 趾部基本发育完整, 此时色素沉淀明显, 背部鳞片更加清晰, 形态和刚孵出的幼体类似 (g 为趾部腹面, h 为趾部背面).

2.2 多疣壁虎 4 个胚胎发育时期趾部总 RNA 检测

4 个时期趾部组织提取的总 RNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 34 期、36 期、39 期和 42 期的 RNA 凝胶检测结果如图 2 所示, 清晰可见 28 S 和 18 S 的条带, 且其比值接近 2:1, OD260/OD280 为 1.90, 表明提取的 RNA 质量较好, 可用于后续逆转录合成 cDNA.

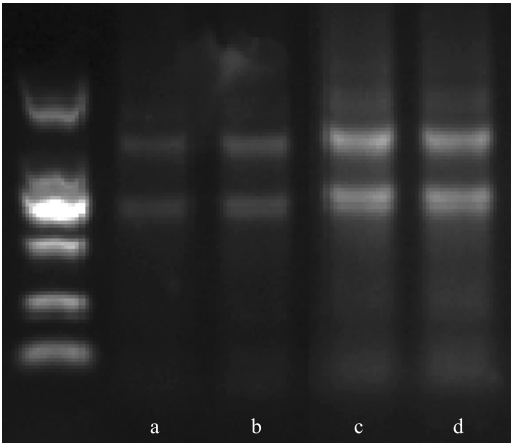


a:34 期趾部腹面;b:34 期趾部背面;c:36 期趾部腹面;d:36 期趾部背面;e:39 期趾部腹面;f:39 期趾部背面;g:42 期趾部腹面;h:42 期趾部背面;Na:趾甲;fl:攀瓣.  
图 1 多疣壁虎胚胎不同发育时期趾部形态

Fig. 1 Toe morphology of *G. japonicus* embryos at different developmental stages

2.3 *ge-krtcap2* 和 *ge-gprp-13* 在多疣壁虎 4 个发育时期趾部的 mRNA 表达模式

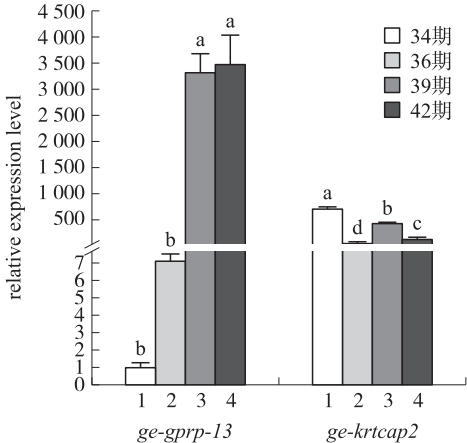
采取荧光实时定量 PCR 检测多疣壁虎 *ge-krtcap2*、*ge-gprp-13* 基因在 4 个胚胎发育时期(34 期、36 期、39 期、42 期)的 mRNA 表达模式,以安乐蜥  $\beta$ -actin 基因作为内参基因,以  $\beta$ -*ge-gprp-13*-F/ $\beta$ -*ge-gprp-13*-R、 $\alpha$ -*ge-krtcap2*-F/ $\alpha$ -*ge-krtcap2*-R 为目的基因引物进行检测. 以多疣壁虎 34 期的 *ge-gprp-13* 基因表达量设为参照. 结果显示,*ge-gprp-13* 在 4 个时期表达量呈上升趋势,在 34、36 期表达量较低,在 39 期相比较 36 期其表达量大量上调,在 42 期表达量仍逐渐上调,到达最高值. 而 *ge-krtcap2* 在 4 个发育时期的表达量呈现完全不同的变化趋势,*ge-krtcap2* 在 34 期表达量最高,在 36 期表达量有下调趋势,而在 39 期表达量又轻微升高,随后在 42 期表达量下降,总体来说,*ge-krtcap2* 在 4 个时期呈下降趋势,并且在各个时期的表达量差异不是特别明显(图 3). 从 *ge-gprp-13*、*ge-krtcap2* 两个基因的 mRNA 表达结果来看,趾部发育前期(34 期和 36 期)*ge-krtcap2* 表达量高于 *ge-gprp-13*,而在趾部发育后期(39 期和 42 期)*ge-gprp-13* 的表达量显著高于 *ge-krtcap2* 的表达量.



a:34 期;b:36 期;c:39 期;d:42 期

图 2 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 RNA agarose gel electrophoresis analysis



1:34 期;2:36 期;3:39 期;4:42 期,以 34 期 *ge-gprp-13* 的表达量为参照,a、b、c、d 不同字母分别表示不同时期表达量的差异,差异水平显著( $P<0.05$ ).

图 3 多疣壁虎 *ge-gprp-13* 和 *ge-krtcap2* 在 4 个发育时期的 mRNA 相对表达情况

Fig. 3 Relative mRNA expression of *ge-gprp-13* and *ge-krtcap2* in 4 developmental stages of *G. japonicus*

3 讨论

壁虎类动物皮肤一般由外层的表皮及内层真皮结构组成,表皮结构由外及里共 6 层,分别为角质层

(oberhautchen)、 $\beta$ 层( $\beta$  layer)、中间层(mesos region layer)、 $\alpha$ 层( $\alpha$  layer)、空隙层(lacunar layer)和透明层(clear layer)<sup>[19]</sup>。 $\beta$ 层含有 $\beta$ 角蛋白,这些角蛋白形成的坚硬表皮,可以起到机械保护作用;而 $\alpha$ 层含有 $\alpha$ 角蛋白,这些 $\alpha$ 角蛋白由脂类材料包围,因此 $\alpha$ 角质层可以有效防止水分散失。虽然 $\alpha$ 角蛋白和 $\beta$ 角蛋白在爬行动物体内的分布和作用已经被广泛研究了许多年,但爬行动物 $\alpha$ 角蛋白和 $\beta$ 角蛋白在胚胎发育阶段的表达模式还知之甚少。本研究中,采用荧光定量PCR技术检测了多疣壁虎*ge-gprp-13*和*ge-krtcap2*基因在其胚胎不同发育阶段的表达模式。

根据多疣壁虎趾部发育形态特征,选取了34期、36期、39期和42期的胚胎趾部进行形态观察和mRNA表达分析。荧光定量PCR试验结果显示,从34期到42期,*ge-gprp-13*基因的表达量逐渐升高,在34期,*ge-gprp-13*基因表达量较低,在42期,mRNA表达至最高值。在胚胎发育的34期~42期,多疣壁虎趾部形态逐渐变得完整, $\beta$ 角蛋白逐渐积累,形成了色素沉淀的外表皮。结合定量PCR结果和形态观察结果可知,*ge-gprp-13*基因的表达量趋势和趾部的形态发育相吻合。在胚胎发育的39期,趾部形成攀瓣(图1 e、f),而此时*ge-gprp-13*的表达量突然升高,这与*ge-gprp-13*基因参与攀瓣的形成是一致的。另外有研究表明<sup>[4]</sup>, $\beta$ 角蛋白和刚毛的形成有关,虽然在胚胎的发育过程中,没有观察到刚毛结构,但是为进一步研究刚毛形成的分子机制提供了基础。而*ge-krtcap2*基因在胚胎发育时期呈现完全不同的表达模式,*ge-krtcap2*基因在34期具有最高的表达量,随后在36期表达量降低,在39期又出现增高的趋势,在42期表达量出现下调,虽然在各个时期表达量各不相同,但是表达量总体稳定并且呈现下调趋势(图3)。结果表明,*ge-krtcap2*基因在趾部发育的整个时期内表达。由此推测,在趾部形成的早期, $\alpha$ 角蛋白开始大量积累形成柔软的 $\alpha$ 层。随着趾部发育的逐渐完善, $\alpha$ 层的形成趋于完整,*ge-krtcap2*基因的表达量逐渐下降。

对比*ge-gprp-13*和*ge-krtcap2*基因在趾部的表达,本研究发现在多疣壁虎趾部发育的早期,*ge-krtcap2*基因的表达量高于*ge-gprp-13*基因的表达量,而在趾部发育后期,*ge-gprp-13*基因的表达量远远高于*ge-krtcap2*基因的表达量,因此推测 $\beta$ 角蛋白在体内的积累可能是在 $\alpha$ 角蛋白积累的基础上进行的,也就是说在胚胎发育的过程中,表皮结构的发育是由内到外进行,先形成 $\alpha$ 角蛋白构成的柔软表皮,然后在这层表皮的基础上 $\beta$ 角蛋白逐渐积累,形成坚硬的外表皮,起到主要的机械保护作用。在蜥蜴尾部再生的研究中发现,在尾部表皮的再生过程中,先形成柔软可伸展的表皮然后逐渐被不可伸展的鳞状表皮所取代<sup>[20]</sup>。短吻鳄胚胎表皮相关的研究也表明,在短吻鳄表皮生成的过程中, $\beta$ 角蛋白分子直接沉积在 $\alpha$ 角蛋白上,而不是一开始就产生 $\beta$ 角蛋白,然后与 $\alpha$ 角蛋白混合生长在一起<sup>[21]</sup>。另外有研究显示,在鳄鱼中,胚胎表皮形成角质的过程和鸟类以及哺乳动物的角质化过程相似,都是在胚胎发育的末期形成增厚的角质化<sup>[22]</sup>。这些研究结果表明,无论在爬行动物表皮再生的发育过程中,还是在胚胎期间表皮发育过程中,都有相似的生长模式,都是先形成柔软的表皮,再形成坚硬的外表皮。这和本研究结果相似,多疣壁虎作为爬行类的一种,在其趾部表皮的发育过程中, $\alpha$ 角蛋白基因先进行表达,形成柔软的表皮,然后 $\beta$ 角蛋白基因再进行表达,形成坚硬的外表皮。

荧光定量PCR试验结果还显示,在整个胚胎发育的过程中, $\beta$ 角蛋白基因的表达量要远远高于 $\alpha$ 角蛋白基因的表达量,表明在多疣壁虎的趾部 $\beta$ 角蛋白的积累多于 $\alpha$ 角蛋白的积累,因此 $\beta$ 角蛋白是构成多疣壁虎趾部的主要角蛋白。之前研究表明<sup>[21]</sup>,鸟类和爬行类皮肤附属物主要由 $\alpha$ 角蛋白和 $\beta$ 角蛋白构成,并且 $\alpha$ 角蛋白和 $\beta$ 角蛋白基因的差异组合可以造成皮肤附属物的结构多样性。在对鸡皮肤中 $\alpha$ 角蛋白基因和 $\beta$ 角蛋白基因的相互作用的研究中也发现, $\alpha$ 和 $\beta$ 角蛋白基因的组合有助于不同禽类皮肤附属物的形态和结构多样性<sup>[23]</sup>。由此可见,在爬行动物和鸟类中, $\alpha$ 角蛋白和 $\beta$ 角蛋白基因的差异组合与皮肤附属物的形态有关。在多疣壁虎趾部, $\beta$ 角蛋白的积累量明显多于 $\alpha$ 角蛋白,这可能与多疣壁虎趾部的刚毛以及趾部顶端爪的形成有关。在对壁虎表皮分化的研究中发现,再生表皮中 $\beta$ 角蛋白基因的表达量明显高于正常生长的表皮<sup>[24]</sup>。在本研究中, $\beta$ 角蛋白基因在趾部发育的后期有很高的表达量,这些结果表明在爬行动物表皮的生成过程中 $\beta$ 角蛋白进行了大量的积累。 $\beta$ 角蛋白是爬行动物和鸟类特有的一种角蛋白,而多疣壁虎趾部含有刚毛结构可以使多疣壁虎在墙壁上爬行自如,因此趾部 $\beta$ 角蛋白大量积累形成刚毛和爪等皮肤附属结构也是进化的结果。

本研究结果表明,多疣壁虎 $\alpha$ 角蛋白和 $\beta$ 角蛋白基因在其胚胎发育不同时期的mRNA表达模式不



同,  $\alpha$  角蛋白基因主要在趾部发育前期表达,  $\beta$  角蛋白基因主要在趾部发育后期表达. 并且在趾部发育的整个过程中,  $\beta$  角蛋白基因的表达量远远大于  $\alpha$  角蛋白基因的表达量. 研究结果为爬行动物胚胎发育过程中表皮发育调控基因的时空表达和刚毛形成的分子机制研究提供了基础.

#### [参考文献]

- [1] ALIBARDI L. Cell biology of adhesive setae in gecko lizards[J]. *Zoology*, 2009, 112(6): 403–424.
- [2] SAWYER R H, GLENN T, FRENCH J O, et al. The expression of beta( $\beta$ ) keratins in the epidermal appendages of reptiles and birds[J]. *American zoologist*, 2000, 40(4): 530–539.
- [3] ALIBARDI L, SAWYER R H. Immunocytochemical analysis of beta keratins in the epidermis of chelonians, lepidosaurians, and archosaurians[J]. *The journal of experimental zoology*, 2002, 293(1): 27–38.
- [4] ALIBARDI L. Immunolocalization of specific keratin associated beta-proteins (beta-keratins) in the adhesive setae of *Gekko gecko*[J]. *Tissue and cell*, 2013, 45(4): 231–240.
- [5] GREENWOLD M J, SAWYER R H. Linking the molecular evolution of avian beta(beta) keratins to the evolution of feathers[J]. *Journal of experimental zoology part b, molecular and developmental evolution*, 2011, 316(8): 609–616.
- [6] STEINERT P M. Structure, function, and dynamics of keratin intermediate filaments[J]. *The journal of investigative dermatology*, 1993, 100(6): 729–734.
- [7] COULOMBE P A, OMARY M B. ‘Hard’ and ‘soft’ principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments[J]. *Current opinion in cell biology*, 2002, 14(1): 110–122.
- [8] FUCHS E, CLEVELAND D W. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease[J]. *Science*, 1998, 279(5350): 514–519.
- [9] WYLD J A, BRUSH A H. The molecular heterogeneity and diversity of reptilian keratins[J]. *Journal of molecular evolution*, 1979, 12(4): 331–347.
- [10] ALIBARDI L. Ultrastructural autoradiographic and immunocytochemical analysis of setae formation and keratinization in the digital pads of the gecko *Hemidactylus turcicus* (Gekkonidae, Reptilia) [J]. *Tissue and cell*, 2003, 35(4): 288–296.
- [11] ALIBARDI L, TONI M. Cytochemical, biochemical and molecular aspects of the process of keratinization in the epidermis of reptilian scales[J]. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 2006, 40(2): 73–134.
- [12] 计翔, 王培潮. 多疣壁虎卵的孵化特征[J]. *动物学研究*, 1991(1): 28–72.
- [13] 计翔, 王培潮. 温度对多疣壁虎摄食量和同化效率的影响[J]. *杭州师范学院学报(自然科学版)*, 1990(6): 90–94.
- [14] 计翔, 王培潮, 洪卫星. 多疣壁虎的繁殖生态研究[J]. *动物学报*, 1991(2): 185–192.
- [15] 赵若男, 张黎悦, 吴鹏飞, 等. 多疣壁虎胚胎发育分期的形态学特征[J]. *动物学杂志*, 2017, 52(6): 987–995.
- [16] 朱灵君, 胡凌君, 张永普, 等. 不同多疣壁虎种群繁殖特征的比较[J]. *生态学杂志*, 2009, 28(4): 692–697.
- [17] 许雪峰, 计翔. 多疣壁虎的雌性繁殖及孵化温度对孵化期和孵出幼体特征的影响[J]. *生态学杂志*, 2001(6): 8–11.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [19] ALIBARDI L, TONI M. Cytochemical and molecular characteristics of the process of cornification during feather morphogenesis[J]. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 2008, 43(1): 1–69.
- [20] ALIBARDI L, MICHIELI F, DALLA VALLE L. Low-cysteine alpha-keratins and corneous beta-proteins are initially formed in the regenerating tail epidermis of lizard[J]. *Journal of morphology*, 2017, 278(1): 119–130.
- [21] ALIBARDI L, YHOMPSON M B. Fine structure of the developing epidermis in the embryo of the American alligator (*Alligator mississippiensis*, Crocodilia, Reptilia) [J]. *Journal of anatomy*, 2001, 198(Pt 3): 265–282.
- [22] ALIBARDI L, YHOMPSON M B. Keratinization and ultrastructure of the epidermis of late embryonic stages in the alligator (*Alligator mississippiensis*) [J]. *Journal of anatomy*, 2002, 201(1): 71–84.
- [23] WU P, NG C S, YAN J, et al. Topographical mapping of alpha- and beta-keratins on developing chicken skin integuments: functional interaction and evolutionary perspectives[J]. *Proceedings of the national academy sciences of the United States of America*, 2015, 112(49): E6770–9.
- [24] DALLA V L, NARDI A, TOFFOLO, et al. Cloning and characterization of scale beta-keratins in the differentiating epidermis of geckoes show they are glycine-proline-serine-rich proteins with a central motif homologous to avian beta-keratins[J]. *Developmental dynamics*, 2007, 236(2): 374–388.

[责任编辑: 黄 敏]