

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20240428001

http://www.yykxjz.cn/

姜燕, 刘欣, 徐永江, 崔爱君, 王滨, 刘新富, 柳学周, 薛致勇. 黄条鲷 *otx2* 和 *eyal* 基因克隆及其在早期发育阶段的表达特性. 渔业科学进展, 2025, 46(3): 27-39

JIANG Y, LIU X, XU Y J, CUI A J, WANG B, LIU X F, LIU X Z, XUE Z Y. Molecular cloning and expression characteristics of *otx2* and *eyal* during the early development of *Seriola aureovittata*. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(3): 27-39

## 黄条鲷 *otx2* 和 *eyal* 基因克隆及其在 早期发育阶段的表达特性\*

姜燕<sup>1</sup> 刘欣<sup>1</sup> 徐永江<sup>1①</sup> 崔爱君<sup>1</sup> 王滨<sup>1</sup>  
刘新富<sup>1</sup> 柳学周<sup>1</sup> 薛致勇<sup>2</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛海洋科技中心 山东 青岛 266071;

2. 海阳市黄海水产有限公司 山东 烟台 265122)

**摘要** 为了研究黄条鲷(*Seriola aureovittata*)视觉和听觉等器官关键调控基因在早期发育过程的表达特性,本研究克隆了黄条鲷 *otx2* 和 *eyal* 的开放阅读框(ORF)序列,解析了其序列及系统进化的特性和时空表达特征。结果显示, *otx2* 的 ORF 长度为 876 bp, 编码 291 个氨基酸; *eyal* 的 ORF 长度为 1 962 bp, 编码 653 个氨基酸。*otx2* 和 *eyal* 均具有广泛的组织分布特性,其中, *otx2* 在眼组织中表达量最高,脑次之,均显著高于其余组织( $P<0.05$ ); *eyal* 在垂体中表达量最高,其次为卵巢,均显著高于其余组织( $P<0.05$ )。在胚胎发育过程中均可检测到 *otx2* 和 *eyal* 的表达,且均在胚胎发育后期表达上调;其中, *otx2* 在孵化期达到峰值, *eyal* 在胚体包卵黄 4/5 期达峰值。在仔稚幼鱼时期均可追踪到 *otx2* 和 *eyal* 的表达,且在前期相对表达量较高;其中, *otx2* 的表达呈先上调后下调的趋势,在 20 dph (days post-hatching)时最高( $P<0.05$ ), *eyal* 的表达量呈下调趋势,在 1 dph 时表达量最高( $P<0.05$ )。本研究为认识 *otx2* 和 *eyal* 在黄条鲷感知器官发育过程中可能的生理功能和研究感知器官的发育调控机制提供了分子认知基础。

**关键词** 黄条鲷; *otx2*; *eyal*; 组织表达; 胚胎发育; 仔稚幼鱼

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)03-0027-13

鱼类利用自己的感官系统全面地感知水体中传递的信息,从而达到导航、交流信息、觅食、寻找伴侣、躲避捕食者等目的(张瑞祺, 2020; 刘欣, 2023)。鱼的感官系统由视觉、听觉、味觉、嗅觉及侧线感觉系统组成。在鱼类早期发育过程中,感觉器官的发生发育与鱼类的环境适应、存活和生长发育密切相关,

相关基因的表达调控在这一过程中也发挥了关键作用。

同源异形框基因 2 (orthodenticle homeobox 2, *otx2*) 为 *otx* 家族成员之一,相对较保守,在脑、颅面与包括嗅觉、听觉和视觉等在内的感觉器官的发育过程中发挥重要作用(Nishida *et al*, 2003; Omodei *et al*, 2008;

\* 山东省重点研发计划(2021SFGC0701; 2024CXPT097; 2024LZGC022)、青岛海洋科技中心山东省专项经费(2022QNLM030001)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2023TD51)和国家海水鱼产业技术体系(CARS-47)共同资助。

姜燕, Email: jiangyan@ysfri.ac.cn

① 通信作者: 徐永江, 研究员, Email: xuyj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2024-04-28, 收修改稿日期: 2024-05-15

Torero Ibad *et al*, 2020; Nadanaka *et al*, 2020; 田玉楼等, 2018; 季文瑶等, 2019; 魏域玲等, 2021)。研究指出, *otx2* 能够激活使光感受器细胞末梢发生分化并维持这种效应所必需的锥杆同源盒基因 *Crx*; 而 *otx2* 缺失则会将分化的感光细胞转化为无腺样神经元, 导致松果体中完全缺乏松果体细胞, 进而影响松果体的正常发育(Nishida *et al*, 2003)。Yamamoto 等(2020)通过研究发现, *otx2* 高表达可以显著影响光感受器细胞的分化与发育, 而低表达则严重影响双极细胞的成熟和存活。因此, *otx2* 在视网膜中光感受器和双极细胞的分化与发育中必不可少, 是感光细胞产生和成熟过程中的关键调控因子(Nishida *et al*, 2003; Koike *et al*, 2007; Muranishi *et al*, 2011; Yamamoto *et al*, 2020; 邱莹等, 2015; 季文瑶等, 2019)。眼发育缺失基因 1 (*eye absent 1*, *eyal*)是 *eya* 家族中的一员, 在进化上相对保守, 对感觉祖细胞的早期发育、毛细胞分化至关重要, 并且在机体内耳、眼、舌、胸腺和肾脏等多种器官的发育过程中具有重要的调控作用, 还可作为侧线神经丘前体细胞和头部神经基板的标记性基因(Zou *et al*, 2006; Xu *et al*, 2021; Zhang R *et al*, 2023; Zhang T *et al*, 2023; 周婷婷等, 2013; 葛玲玲等, 2018)。已有研究表明, *eyal* 的缺失导致小鼠(*Mus musculus*)眼皮不能完全融合(黄骊等, 2003); 还能导致小鼠体内相关的祖细胞不能正常增殖, 使其出生时舌头变小, 味觉乳头生长受损, 且味觉乳头上皮中 *Six1* 的表达中断(Zhang T *et al*, 2023); 由 *eyal* 突变导致的鳃-耳-肾综合征在重度听力损失儿童患者中的比例达 2% (Zhang R *et al*, 2023; Wang *et al*, 2024)。可见, *eyal* 在机体感觉器官的发生、分化与发育过程中的调控作用至关重要。

目前,关于黄条鲷(*Seriola aureovittata*)视觉和听觉器官发育的分子调控机制研究尚未见相关报道。因此,本研究首次对黄条鲷 *otx2* 和 *eyal* 的开放阅读框(ORF)序列进行克隆,解析其系统进化特性及表达特征,以期揭示黄条鲷听觉与视觉等器官的早期发育特性提供分子生物学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验样品采集

实验用样品均取自海阳市黄海水产有限公司黄条鲷亲鱼人工繁育、苗种培育与养成过程。依据黄条鲷胚胎发育时序的划分(徐永江等, 2019),从精子、卵子到初孵仔鱼共设置 18 个取样时间点,每个时间点采集 3 份平行样品。仔稚幼鱼时期,分别于仔鱼孵化后(days post-hatching, dph)的 1、3、7、10、15、20、

25、30、40、50 和 60 dph 采集样品;其中,1~10 dph 采集整个鱼体作为样品,15~60 dph 分别在解剖镜下解剖并取其头部和内脏团组织作为样品。从工厂化循环水养殖池中随机捞取 3 尾 4 龄鱼,解剖并取其眼、脑、垂体、头肾、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、中肠和卵巢等组织。各实验鱼解剖与样品采集前均先采用 MS-222 对其进行麻醉处理,采集后迅速置于液氮中保存。

### 1.2 黄条鲷 *otx2* 和 *eyal* 基因克隆

黄条鲷样品总 RNA 的提取采用 RNAiso Plus 试剂盒(TaKaRa, 日本)完成,提取后分别通过 NanoDrop 2000C 分光光度计和 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度和质量。按照 TaKaRa 反转录试剂盒的操作说明合成 cDNA 第一链,将合成的 cDNA 模板保存于 -20 °C 冰箱中备用。

根据 NCBI 数据库中预测的黄条鲷 *otx2* 序列(XM 023417341)和 *eyal* 序列(XM 023416897.1),使用 Primer premier 5.0 设计引物(表 1)。基因克隆以黄条鲷 4 龄鱼脑组织 cDNA 为模板,PCR 体系(50  $\mu$ L): 25  $\mu$ L *rTaq* 酶, ddH<sub>2</sub>O 21  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L; 扩增程序: 95 °C 5 min, 38 个循环(95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 5 min, 4 °C 保存。

扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳后,将符合目的基因大小的条带按照胶回收试剂盒说明书进行切胶回收,胶回收产物与 pEASY-T1 Simple 载体(TransGene Biotech, 中国)、Trans1-T1 Phage Resistant 感受态细胞(TransGene Biotech, 中国)连接转化,在 37 °C 培养箱中培养 12 h,挑取阳性单克隆菌株送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

### 1.3 序列分析

通过在线软件 Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)和 DNAMAN 开展序列比对和同源性分析,通过在线软件 ExPASy([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))分析 2 个基因成熟蛋白的分子量和等电点,采用 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析预测蛋白的结构域。通过 NCBI 查找相关脊椎动物 OTX2 和 EYA1 的氨基酸序列(表 2),利用 MEGA7.0 软件,以邻接法 Neighbor-Joining(NJ)构建系统进化树。

### 1.4 基因定量表达分析

根据黄条鲷 *otx2* 和 *eyal* 的 ORF 区序列设计

表 1 本研究所用引物的序列  
Tab.1 Primer sequences used in this study

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	目的 Purpose
<i>otx2</i> F	ATGATGTCGTATCTAAAGCAACCACC	ORF 扩增
<i>otx2</i> R	TCACAGGACCTGGAATTTCCACG	ORF amplification
<i>eya1</i> F	ATGGAAATGCAGGATCTAGCCAGT	
<i>eya1</i> R	TCAGCCTTCTTTTCTCTCTTTCTTTTCT	
<i>otx2</i> qF	CATGGACTGCGGTTCTTACCTCAC	实时荧光定量 PCR
<i>otx2</i> qR	GCGTTCGTGCTCATCGGACTG	qRT-PCR
<i>eya1</i> qF	GTTGTTGGAGATGGTGTGGAAGAGG	
<i>eya1</i> qR	GTGTATGATGGTGGTGAGGTGCTAC	
<i>arp</i> F	TGCCATTGTCATACACTTGCTG	内参基因
<i>arp</i> R	GGGAACCATTGAAATCTTGAG	Reference gene

表 2 序列比对及进化树构建所用 OTX2 和 EYA1 的氨基酸序列  
Tab.2 The amino acid sequences of OTX2 and EYA1 used in sequence alignment and phylogenetic analyses

物种名 Species	NCBI Accession No.	
	OTX2	EYA1
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP 021440571.1	XP 036790572.1
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	XP 014066294.1	XP 045566715.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP 571326.1	XP 009295600.2
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	XP 035466484.1	XP 035475414.1
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	XP 023807693.1	XP 023805895.1
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	XP 008332346.1	XP 008305744.3
高体鲷 <i>Seriola dumerili</i>	XP 022606680.1	XP 022599976.1
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	XP 027139664.1	XP 027130260.1
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	XP 019940166.1	XP 019943326.1
大口黑鲈 <i>Micropterus salmoides</i>	XP 038584033.1	XP 038583289.1
鳊鱼 <i>Siniperca chuatsi</i>	—	XP 044032888.1
条纹鲈 <i>Morone saxatilis</i>	XP 035530138.1	XP 035520410.1
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	AAH77357.1	AAK31355.1
牛 <i>Bos taurus</i>	NP 001180130.1	XP 024857614.1
小鼠 <i>Mus musculus</i>	AAH29667.1	AAB48017.1
人 <i>Homo sapiens</i>	BAJ84005.1	NP 001357262.1
原鸽 <i>Columba livia</i>	—	XP 021153789.1
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	AAQ72465.1	XP 029698894.1
绵羊 <i>Ovis aries</i>	XP 004020461.2	XP 042110239.1
乌鳢 <i>Channa argus</i>	KAF3702683.1	—

qRT-PCR 引物(表 1), 选用 *arp* 为内参基因进行基因的表达特性分析。反应体系 20  $\mu$ L: TB Green Premix Ex Taq II 10  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.8  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L。PCR 扩增条件: 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5s, 60  $^{\circ}$ C 20 s, 共 45 个循环。目的基因和参考基因的标准曲线相关系数( $r^2$ )和扩增效率( $E$ ):  $0.99 < (r^2) < 0.999$ ,  $0.9 < E < 1.1$ 。每个待测样品设置 3 个

平行, 基因相对表达量参照  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算。

### 1.5 统计分析

采用 SPSS 26.0 软件对基因表达结果进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 通过 Duncan's 多重检验进行差异显著性分析, 显著性水平  $P$  设为 0.05, 当  $P < 0.05$  时认为差异显著。所有数据均采用平均值 $\pm$ 标

准误(Mean±SE)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄条鲷 *otx2*、*eya1* 基因序列特征

通过克隆获得黄条鲷 *otx2* 和 *eya1* 的 ORF 区序列。其中, *otx2* 的 ORF 序列长度为 876 bp, 编码 291 个氨基酸, 预测的 OTX2 蛋白质分子量为 31.84 kDa, 理论等电点为 9.40, 包含位于第 42~93 个氨基酸之间的同源结构域和 82 个氨基酸的 TF-Otx 结构域(图 1)。*eya1* 的 ORF 序列长度为 1 962 bp, 编码 653 个氨基酸, 预测的 EYA1 蛋白质分子量为 71.45 kDa, 等电点为 8.32, 其 C 端为编码 246 个氨基酸的 EYA 结构域(图 2)。

```

1  ATGATGTCGTATCTAAAGCAACCACCTTACACAGTCAATGGCCCTCAGTCTAACTACTTCC
1  M M S Y L K Q P P Y T V N G L S L T T S
61  GGAATGGACCTTTTGCATCCATCAGTGGCTATCCAGCAACGCCACGGAAGCAGAGAGA
21  G M D L L H P S V G Y P A T P R K Q R R
121 GAAAGGACTACTTTAGCGCGCACAGCTGGACGTTTGGAGGCGTTGTCGCAAAACT
41  E R T T F T R A Q L D V L E A L F A K T
                                     Homeobox
181 CGGTATCCGGACATATTCATGCGCGAAGAGTGGCGCTGAAATCAATCTACCTGAGTCC
61  R Y P D I F M R E E V A L K I N L P E S
241 CGCGTGCAGGTGTGGTTTAAGAACCGGGCGGCAAGTGTGCGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
81  R V Q V W F K N R R A K C R Q Q Q Q Q Q
301 CAGAACGGGGCCAGAACAAGTGGACCTGCCAAAAGAAAAGTTCGCCACAGGGAA
101 Q N G G Q N K V R P A K K K S S P T R E
361 GTGAGCTCAGAGAGCGGGCCAGCGCCAGTTCACGCCCCACCAGCACCACACAGTC
121 V S S E S G A S G Q F T P P T S T T T V
421 CCCGCCATCTCGACAGCACCAGCCAGTGTCCATCTGGAGCCAGCGTCCATCTCTCCG
141 P A I S T S T A P V S I W S P A S I S P
481 CTCTCAGACCCCTGTCTACCTCTCTCTCTGATGAGAGGTCCTACCCCATGACTAC
161 L S D P L S T S S S C M Q R S Y P M T Y
                                     TF-Otx
541 ACCCAGGCTCAGGCTACAGCCAGGGCTACGCGGCTCGAGTCTACTTCGGCGGCATG
181 T Q A S G Y S Q G Y A G S T S Y F G G M
601 GACTGCGGTTCTTACTCTACTCCATGCACCACAGTGTGAGGCCCGGGCTCGACTCT
201 D C G S Y L T P M H H Q L S G P G S T L
661 AGTCCGATGAGCAGCAACGGGTGCACAAGCCATCTGAACAGTCCCGGCGTCCCTCTCC
221 S P M S T N A V T S H L N Q S P A S L S
721 ACCCAGGCTACGGGACGTCCGGCTGGGCTTCAACTCCACAGCAGACTGCTGGATTAT
241 T Q G Y G T S G L G F N S T A D C L D Y
781 AAGACCAAGCGCGCGTGTGAAGCTGAACCTCAATGCCGATTGCTGGATTATAAG
261 K D Q A A A S W K L N F N A D C L D Y K
841 GATCAAACTTCTCGTGGAAATCCAGGCTCTGTGA
281 D Q T S S W K F Q V L *

```

图1 黄条鲷 *otx2* 的 ORF 序列和推导的氨基酸序列  
Fig.1 Open reading frame sequence and deduced amino acid sequence of *otx2* in *S. aureovittata*

将起始密码子加框, 加下划线的氨基酸序列  
表示保守结构域, \*表示终止密码子。

The start codon is boxed. The underscored amino acid sequence represents the conserved domains.  
\* represents the stop codon.

### 2.2 黄条鲷 OTX2 和 EYA1 氨基酸序列比对和系统进化分析

黄条鲷 OTX2 氨基酸序列与高体鲷 (*Seriola dumerili*)、条纹鲈 (*Morone saxatilis*)、大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)、鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*) 的一致性均为 99.66%, 表现出高度的同源性; 其次是半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) (98.97%)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) (98.62%)、青鳉 (*Oryzias latipes*) (98.62%) (表 3 和图 3); 系统进化分析表明, 黄条鲷 OTX2 首先与高体鲷 OTX2 聚为一支, 然后与红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)、大口黑鲈和条纹鲈聚为一个大的分支(图 5)。黄条鲷的 EYA1 与牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 的 EYA1 表现出高度的同源性 (98.62%), 其次是高体鲷 (96.59%)、大菱鲆 (95.06%) 和大口黑鲈 (94.72%) (表 4 和图 4); 系统进化分析表明, 黄条鲷 EYA1 与牙鲆聚为一个分支, 且与大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、高体鲷、大菱鲆等聚为一个大的分支(图 6)。

### 2.3 黄条鲷 *otx2* 和 *eya1* 的组织表达分析

*otx2* 和 *eya1* mRNA 在黄条鲷 10 种组织中的表达结果如图 7 所示, 各组织中均检测到 *otx2* 和 *eya1* 的转录水平表达。其中, *otx2* mRNA 在眼中的相对表达量最高 ( $P < 0.05$ ), 脑次之, 二者均显著高于其他组织 ( $P < 0.05$ ); 随后依次是心脏、中肠、垂体、卵巢、肾脏、头肾和肝脏, 在脾脏中的相对表达量最低。*eya1* mRNA 在垂体中显著高表达 ( $P < 0.05$ ), 其次是卵巢和眼, 均显著高于其余组织 ( $P < 0.05$ ); 随后依次是脑、心脏、中肠、肾脏、脾脏、头肾和肝脏。

### 2.4 胚胎发育过程中 *otx2* 和 *eya1* 的表达模式

在黄条鲷胚胎发育的不同时期均可检测到 *otx2* 和 *eya1* mRNA 表达(图 8)。其中, *otx2* mRNA 在 2 种配子中均可检测到表达, 在 8 细胞期、64 细胞期、原口关闭期至孵化期均显著高表达 ( $P < 0.05$ ), 且在孵化期表达量最高 ( $P < 0.05$ ); 在胚胎发育其他时期的表达水平均较低。*eya1* mRNA 在 2 种配子中均可检测到表达, 且在卵子中的表达水平显著高于精子 ( $P < 0.05$ ); 从 2 细胞期开始, *eya1* mRNA 的表达水平先逐渐上调后下调, 到原肠胚中期时最低 ( $P < 0.05$ ), 随后又逐渐上调, 在胚体包卵黄 4/5 期时表达水平达到峰值 ( $P < 0.05$ ), 孵化期又显著下调 ( $P < 0.05$ )。

### 2.5 仔稚幼鱼发育过程中 *otx2* 和 *eyal* 的表达模式

*otx2* 和 *eyal* mRNA 在黄条鲮仔稚幼鱼生长发育过程中的相对表达特性如图 9 所示。*otx2* mRNA 相对表达量在整个追踪期整体呈先上调后下调的趋势, 其中, 在 3~25 dph 的相对表达量均显著高于 1 dph 和 30~60 dph 的相对表达量( $P < 0.05$ ), 且在 20 dph 的相对表达量最高( $P < 0.05$ ), 而 50 dph 和 60 dph 时最低( $P < 0.05$ )。 *eyal* mRNA 的相对表达量在整个追踪期内整体呈下调趋势, 1 dph 的表达量显著最高( $P < 0.05$ ), 30~60 dph 的表达水平均较低且均显著低于 7~25 dph 的水平( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 黄条鲮 *otx2* 和 *eyal* 的基因序列和组织表达特性

本研究从黄条鲮脑组织中克隆得到 *otx2* 的 ORF

区序列, 氨基酸序列同源性分析结果表明, 黄条鲮与大多数鱼类的 OTX2 类似, 具有较高的保守性; 系统进化分析表明, 黄条鲮 OTX2 与高体鲮聚为一个分支, 而黄条鲮与高体鲮均属于鲮科鲮属, 且与鲮形目鱼类聚为一个大的分支, 这一结果验证了克隆得到 *otx2* 的 ORF 序列的可靠性。魏域玲等(2021)对 *otx2* 在七彩神仙鱼(*Symphysodon haraldi*)的脑、肾脏、肝脏、性腺、心脏等组织的分布特征进行研究, 发现 *otx2* 在脑中显著高表达。季文瑶等(2019)研究发现, *otx2* 在牙鲆的脑和眼组织中特异性高表达。在本研究中, 通过组织表达特性分析发现, 黄条鲮 *otx2* 在眼和脑中显著高表达, 与牙鲆、七彩神仙鱼等的 *otx2* 表达特性相似, 表明 *otx2* 对鱼体脑、颅感觉器官的发育及其功能具有重要生理调控作用(Nishida *et al*, 2003; Omodei *et al*, 2008; Torero Ibad *et al*, 2020; 田玉楼等, 2018)。

```

1 ATCGAAATGCAGGATCTAGCCAGTCCACAGCCGAATAAGTGAAGCAGTGAATCTCCT
1 M E M Q D L A S P H S R I S G S S E S P
61 AATGGTCCCAACCTCGACAACCTCGCACATCAATAACAATTCATGACACCCAATGGCACT
21 N G P N L D N S H I N N N S M T P N G T
121 GAAGTTAAAACCGGACCAATGAGCAGCAGGAACTCGCCACCTCGGTAGCAGACACCTCT
41 E V K T E P M S S S E L A T S V A D T S
181 CTAGACAGCTTCTCAGGATCAGCTATTTGGAACCAAGTGGCTTCAGCCCAAGACAACTCAC
61 L D S F S G S A I G T S G F S P R Q T H
241 CAGTTCTTCCACAGATTTATCCTTCCAACAGAACATATCCGCATATTTCTTCTACCCCT
81 Q V T C P Q I Y P S N R T Y P H I L P T P
301 TCATCCAAAATATGGCTGCGTATGGCAGACGACGACACACAGGAATGACGAGCGCC
101 S S Q N M A A Y G Q T Q Y T T G M Q Q A
361 GCAGCTTATGCTAGCTACCCCGAGCTGGCCAGCCGTATGGCATCCAGCTTACGGCATA
121 A A Y A S Y P Q P G Q P Y G I P A Y G I
421 AAGACGGAGGGGGTCTGAGCCAGTCCCAATCCCGGGACAGACAGGTTTCTAAGCTAT
141 K T E G G L S Q S P G Q T G F L S Y
481 GGCTCTGGCTTCAACAGCCGCGAGACAGGACAGCTCCCTACAGCTACAGATGACGGGT
161 G S G F T T P Q T G Q A P Y S Y Q M Q G
541 GGTACTTTTACAACACTTCAGGATTTGATGAGGAAACACTCCCTGACAAATTCGACT
181 G T F T T T S G L Y A G N N S L T N S T
601 GGCTTCAACAGCACACAACAGGACTACCCAGTTATCCAGCCTTCGGCCAGGGCCAGTAT
201 G F N S T Q Q D Y P S Y P A F G Q G Q Y
661 GCTCAGTATTACAACAGCTCACCTACACTTCGCCCTACATGACGAGTAAACAACACGAC
221 A Q Y Y N S S P Y T S P Y M T S N N T S
721 CCTAGCAGCCCTCCACCACCACCTACACCTCCAGGACCCAGCCGCGGCATCACC
241 P S T P S T T T T Y T L Q E P P A G I T
781 AGTCAGGCCCTCACAGACAACTCTGCAGGAGGTACAGTACCATTACAGTCCATCAACC
261 S Q A L T D N S A G E Y S T I H S P S T
841 CCCATTAAGATTTCAGATTCAGATTCAGATTCGCGCGAGCCCTCGGATGGAAGTCAAGTGGC
281 P I K D S D S D R L R R A S D G K S R G
901 CGGGGAAGAAGGAACAACAACCCATCACCCGCGCCGACTCCGACCTTGAGCGAGTTTTC
301 R G R R N N N P S P P P D S D L E R V F
961 ATCTGGGACCTGGATGAAACAATCATCGTTTCCATTCTGCTTACGGGTCTTATGCC
321 I W D L D E T I I V F H S L L T G S Y A
HAD_Eya
    
```

```

1 021 AACAGATACGGACGGACCCACCGACATCTGTATCAAGAGGCCTGAGGATGGAAGAAATG
341 N R Y G R D P P T S V S R G L R M E E M
1 081 ATCTTCAACTTGGCCGACACACTTATTCTTTAAGCACTTAGAGGAATGTGATCAGGTC
361 I F N L A D T H L F F N D L E E C D Q V
1 141 CATATCGACGATGTGCTCTGACGACAACGGCAAGATCTAAGTACGTATAACTTCAGC
381 H I D D V S S D D N G Q D L S T Y N F S
1 201 GCTGATGGTTTCCACGACGACGACCAAGTCCCAACCTATGTCTGGCCACAGGCGTGGCG
401 A D G F H A A A T S A N L C L A T G V R
1 261 GGAGGCGTGGACTGGATGAGAAAACCTGGCCCTCCGCTACAGACGAGTAAAAGAAATCTAC
421 G G V D W M R K L A F R Y R R V K E I Y
1 321 ACCACCTACAAAATAACGTCGGAGGCTGCTGGGCCACGCCAAAAGGGAAGCTGGTTG
441 T T Y K N N V G G L L G P A K R E A W L
1 381 CAATTCGAGCAGAAAATGAAAGCCTTGACGACTCCTGGTTAACACTGGCACTGAAAGCA
461 Q L R A E I E A L T D S W L T L A L K A
1 441 CTAACATTAATCCACTCAAGGTCAAAGTGTGTAATATCCTGGTACCACCACACAGCTC
481 L T L I H S R S N C V N I L V T T T Q L
1 501 ATCCCTGCCCTGGCTAAGGCTCTGTCTATGGCTTGGGAATAGTCTTCTATCGAGAAT
501 I P A L A K V L L Y G L G I V F P I E N
1 561 ATTTATAGCGCAACCAAAATAGGGAAGGAGAGCTGCTTGGAGAGTAATTCAAAGGTTTC
521 I Y S A T K I G K E S C F E R V I Q R F
1 621 GGGAGGAAAGTTGTTTACATTTGTTGGAGATGGTGTGGAAGGAGGACCAAGGCTCAAAA
541 G R K V V Y I V V D G V E E E Q G S K
1 681 AAAGCACAACATGCCCTTCTGGAGGATCTCCAGCCATCAGACCTCATGGCCCTCCACCA
561 K A Q H A L L E D L Q P F R P H G P P P
1 741 CGCTTAGACTTGGAGTACTGTAGCACCTCACCACCATATACACCTGTCCACCTCA
581 R S R L G V L V A P H H H T P C S T S
1 801 GCACACCTGCAACCTTTCACCTTCCGCTCCAGCCCTGTCCACGCTTTGCCGCGAGCT
601 A H P A T F H L R P P A L S H A L P Q T
1 861 CCACACTCAGAAAAAAGGAAAAAAGCCCTCGGCTGCTTGGCGTCTGTTCT
621 P Q L R K K R K K K P P C A A W R L S
1 921 TCCACTCAGGAAAGAAAGAGGAGAAAAAGAGGCTGA
641 S T S Q E E K K R R K E G *
    
```

图 2 黄条鲮 *eyal* 的 ORF 序列和推导的氨基酸序列

Fig.2 Open reading frame sequence and deduced amino acid sequence of *eyal* in *S. aureovittata*

将起始密码子加框, 加下划线的氨基酸序列表示保守结构域, \*表示终止密码子。

The start codon is boxed. The underscored amino acid sequence represents the conserved domains.

\* represents the stop codon.



表 3 黄条鲮 *otx2* 编码的氨基酸序列与其他物种的同源性百分比Tab.3 Percent of homology of the amino acid sequences of *otx2* between *S. aureovittata* and other species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	100														
2	99.65	100													
3	95.16	94.81	100												
4	93.75	93.40	94.79	100											
5	93.40	93.06	94.44	97.24	100										
6	93.75	93.40	94.79	98.28	98.28	100									
7	94.79	94.44	95.83	98.62	98.62	98.97	100								
8	94.44	94.10	95.49	98.28	98.28	98.62	99.66	100							
9	94.44	94.10	95.49	98.28	98.28	98.62	99.66	99.31	100						
10	94.44	94.10	95.49	98.28	98.28	98.62	99.66	99.31	100	100					
11	94.12	93.77	95.50	98.28	98.28	98.62	99.66	99.31	100	100	100				
12	90.62	90.28	90.28	89.90	90.59	89.90	90.94	90.59	90.59	90.59	90.28	100			
13	93.43	93.08	94.46	93.06	93.40	93.06	94.10	93.75	93.75	93.75	93.77	94.44	100		
14	92.73	92.39	93.43	92.36	92.71	92.36	93.40	91.89	93.06	93.06	92.73	94.10	97.92	100	
15	92.73	92.39	93.43	92.36	92.71	92.36	93.40	91.89	93.06	93.06	92.73	94.10	98.62	99.33	100

注: 1. 虹鳟; 2. 大西洋鲑; 3. 斑马鱼; 4. 大菱鲆; 5. 青鳉; 6. 半滑舌鲷; 7. 黄条鲮; 8. 高体鲮; 9. 大口黑鲈; 10. 鳊鱼; 11. 条纹鲈; 12. 非洲爪蟾; 13. 牛; 14. 小鼠; 15. 人。

Notes: 1. *Oncorhynchus mykiss*; 2. *Salmo salar*; 3. *Danio rerio*; 4. *Scophthalmus maximus*; 5. *Oryzias latipes*; 6. *Cynoglossus semilaevis*; 7. *Seriola aureovittata*; 8. *Seriola dumerili*; 9. *Micropterus salmoides*; 10. *Siniperca chuatsi*; 11. *Morone saxatilis*; 12. *Xenopus laevis*; 13. *Bos Taurus*; 14. *Mus musculus*; 15. *Homo sapiens*.

表 4 黄条鲮 *eya1* 编码的氨基酸序列与其他物种的同源性百分比Tab.4 Percent of homology of the amino acid sequences of *eya1* between *S. aureovittata* and other species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	100														
2	87.8	100													
3	90.36	93.41	100												
4	93.34	92.67	95.63	100											
5	93.04	92.54	95.65	98.06	100										
6	82.56	85.69	87.22	86.94	86.67	100									
7	82.74	85.86	87.56	87.46	87.01	94.18	100								
8	83.05	87.37	87.88	88.12	87.84	89.86	90.38	100							
9	84.55	88.49	90.19	89.42	89.3	90.97	91.48	91.63	100						
10	83.59	87.44	88.81	88.37	87.74	98.48	98.31	89.92	92.04	100					
11	84.86	87.97	90	89.23	88.95	93.69	94.03	91.12	93.64	95.18	100				
12	84.44	88.76	87.29	86.52	86.09	94.55	94.21	91.89	93.27	96.52	96.22	100			
13	85.3	88.93	90.29	89.86	89.74	96.59	95.06	92.55	94.25	97.01	96.88	98.03	100		
14	85.4	89.34	89.32	89.23	88.61	95.06	95.4	93.27	93.97	97.01	96.74	96.92	98.52	100	
15	85.57	89.17	90.69	89.93	89.81	94.72	95.57	92.78	94.46	96.52	97.06	97.37	98.19	98.37	100

注: 1. 小鼠; 2. 非洲爪蟾; 3. 原鸽; 4. 牛; 5. 人; 6. 黄条鲮; 7. 大黄鱼; 8. 虹鳟; 9. 斑马鱼; 10. 牙鲆; 11. 青鳉; 12. 半滑舌鲷; 13. 高体鲮; 14. 大菱鲆; 15. 大口黑鲈。

Notes: 1. *Mus musculus*; 2. *Xenopus laevis*; 3. *Columba livia*; 4. *Bos taurus*; 5. *Homo sapiens*; 6. *Seriola aureovittata*; 7. *Larimichthys crocea*; 8. *Oncorhynchus mykiss*; 9. *Danio rerio*; 10. *Paralichthys olivaceus*; 11. *Oryzias latipes*; 12. *Cynoglossus semilaevis*; 13. *Seriola dumerili*; 14. *Scophthalmus maximus*; 15. *Micropterus salmoides*.

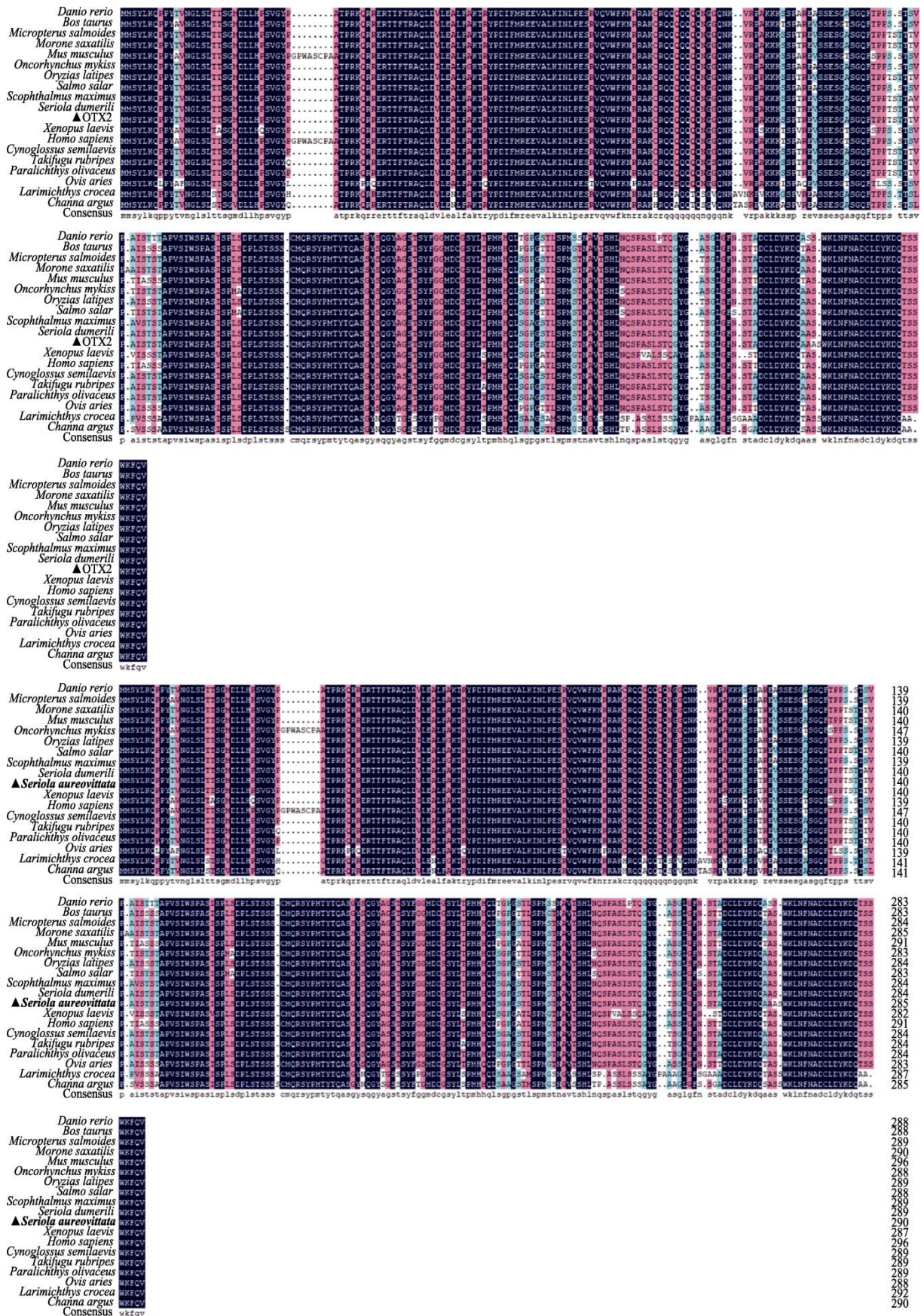


图 3 黄条鲮 OTX2 与其他物种氨基酸序列比对

Fig.3 Amino acid sequence alignment of *S. aureovittata* OTX2 with other species



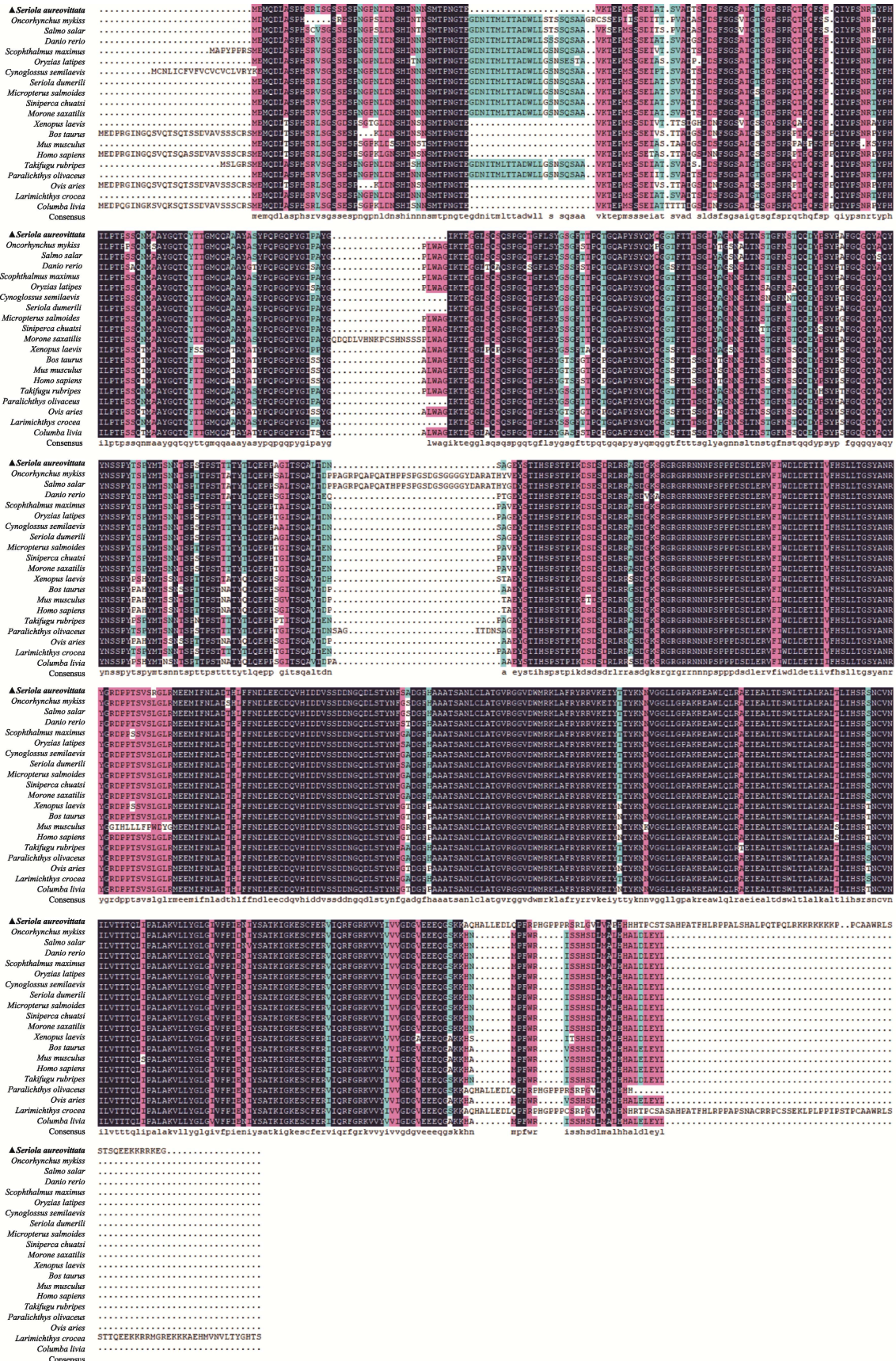


图4 黄条鲷 EYA1 与其他物种氨基酸序列比对  
 Fig.4 Amino acid sequence alignment of *S. aureovittata* EYA1 with other species



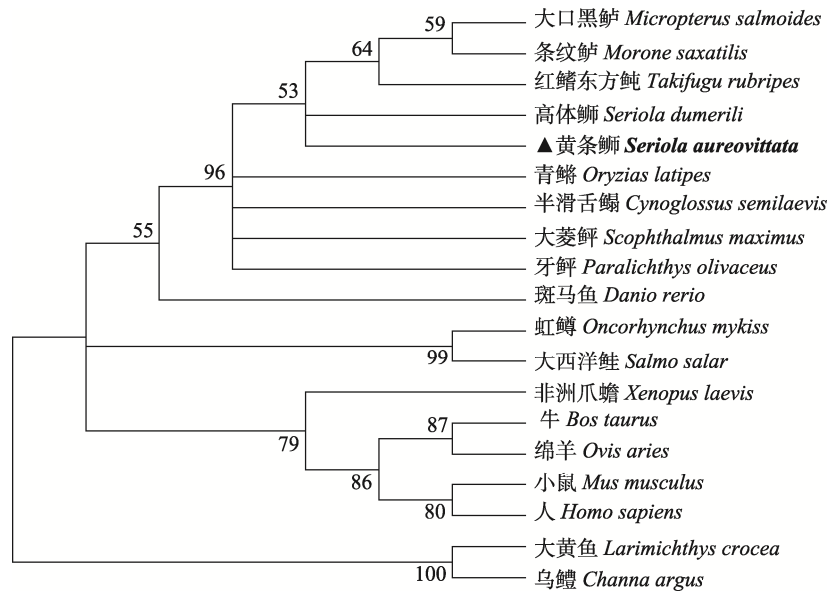


图 5 基于 NJ 法构建的黄条鲷 OTX2 与其他物种的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of *S. aureovittata* OTX2 with other species based on NJ method

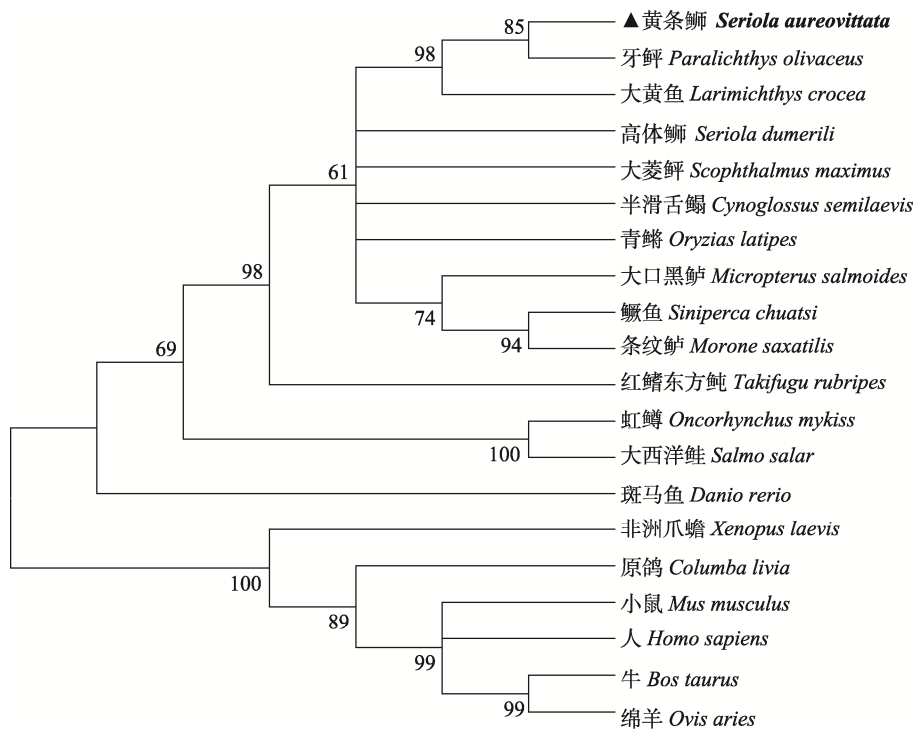


图 6 基于 NJ 法构建的黄条鲷 EYA1 与其他物种的系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of *S. aureovittata* EYA1 with other species based on NJ method

本研究从黄条鲷脑组织中克隆得到了 *eyal* 的 ORF 区序列, 黄条鲷与其他脊椎动物的 EYA1 氨基酸序列同源分析表明, 该基因具有较高的保守性; 在系统进化树中与鲈形目牙鲆、鲈形目大黄鱼和高体鲷等较为相近。本研究发现, *eyal* 在黄条鲷垂体中显著高表达, 其次是卵巢和眼, 由此推测, *eyal* 参与了视觉神经和器官功能的发挥, 且有可能通过垂体激

素的合成与分泌参与生殖调控相关通路, 但还需开展进一步的实验研究。

### 3.2 黄条鲷 *otx2* 和 *eyal* 在早期发育阶段的表达特性

在黄条鲷早期胚胎发育过程中均可检测到 *otx2* 的表达, 但在不同时期表达水平不同, 从原口关闭期至孵化期均显著高表达, 推测这是因为在这期间胚体

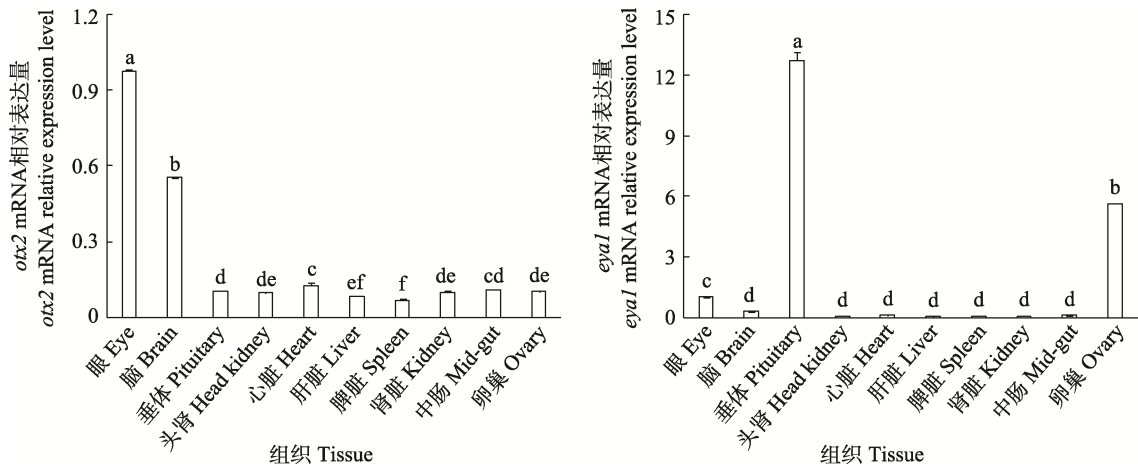


图7 黄条鲷各组织中 *otx2* 和 *eyal* mRNA 相对表达量

Fig.7 Relative expression levels of *otx2* and *eyal* mRNA in different tissues of *S. aureovittata*

不同小写字母表示不同组织之间存在显著性差异( $P<0.05$ )。

Different lowercase letters indicate significant differences among different tissues ( $P<0.05$ ).

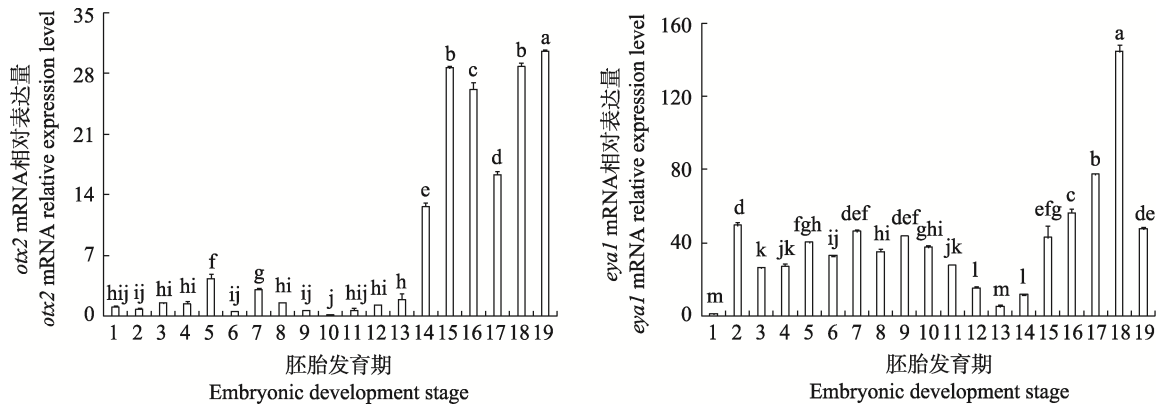


图8 黄条鲷胚胎发育过程 *otx2* 和 *eyal* mRNA 的相对表达量

Fig.8 Relative expression levels of *otx2* and *eyal* mRNA during embryonic development of *S. aureovittata*

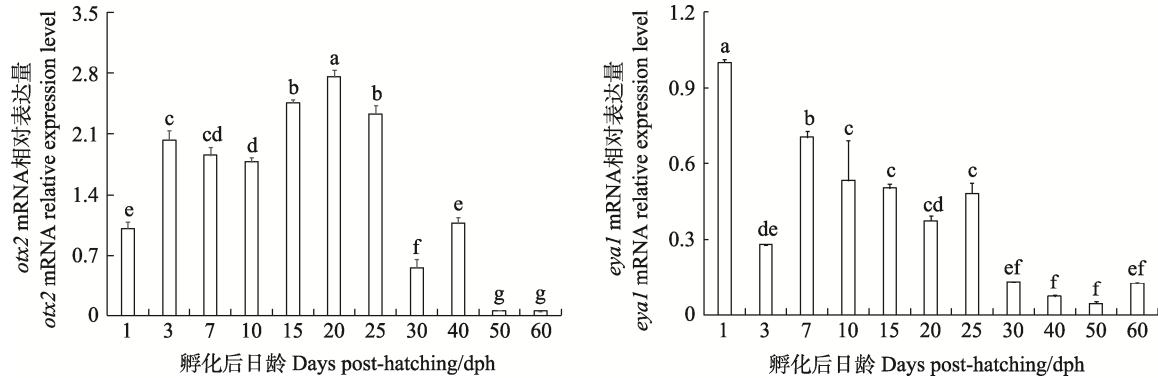
1. 精子; 2. 卵子; 3. 2 细胞期; 4. 4 细胞期; 5. 8 细胞期; 6. 16 细胞期; 7. 64 细胞期; 8. 多细胞期; 9. 桑葚胚期; 10. 高囊胚期; 11. 低囊胚期; 12. 原肠胚早期; 13. 原肠胚中期; 14. 原口关闭期; 15. 神经胚期; 16. 胚体包卵黄 2/3; 17. 胚体包卵黄 3/4; 18. 胚体包卵黄 4/5; 19. 孵化期。不同小写字母表示各发育期之间存在显著性差异( $P<0.05$ )。

1. Sperm; 2. Unfertilized egg; 3. 2-cell stage; 4. 4-cell stage; 5. 8-cell stage; 6. 16-cell stage; 7. 64-cell stage; 8. Poly-cell stage; 9. Morula stage; 10. High blastula stage; 11. Low blastula stage; 12. Early gastrula stage; 13. Mid-gastrula stage; 14. Gastrula opening close stage; 15. Neurula stage; 16. Embryo encircling 2/3 of yolk sac; 17. Embryo encircling 3/4 of yolk sac; 18. Embryo encircling 4/5 of yolk sac; 19. Hatching.

Different lowercase letters represent significant differences among different embryonic development stages ( $P<0.05$ ).

锥形形成、神经胚逐渐形成神经嵴、视囊开始发生发育、晶体逐渐形成(徐永江等, 2019), 由此调控光感受器细胞和双极细胞发生与分化的关键因子 *otx2* 表达上调, 以促进视觉器官的发育。在团队的研究过程中发现, 黄条鲷孵化后至 30 dph 是视网膜发育与完善阶段, 通过对单位面积内视锥细胞(C)、神经节细胞(G)和外核层细胞核(ON)数量及 ON/C、ON/G 的比值进行统计分析发现, 在 25 dph 与 30 dph 间差异不显著, 且在 20 dph 仅有 G 的数量显著高于 25 dph 和

30 dph (刘欣, 2023)。这与黄条鲷胚胎孵化后, *otx2* 表达整体呈先上调后下调的趋势, 且在 20~25 dph 表达水平相对较高、30 dph 开始表达水平相对较低且稳定的特性相一致。也由此推测, *otx2* 在黄条鲷胚胎及早期发育阶段视觉系统相关结构与细胞的发生、分化和成熟过程具有重要的调节功能, 这与小鼠等其他脊椎动物研究结果一致(Nishida, 2003; Koike, 2007; Muranishi, 2011; Yamamoto *et al*, 2020; 邱莹等, 2015; 季文瑶等, 2019)。

图9 黄条鲮仔稚鱼发育过程中 *otx2*、*eya1* mRNA 相对表达量Fig.9 Relative expression levels of *otx2* and *eya1* mRNA during growth and development of *S. aureovittata*

不同小写字母表示不同日龄间存在显著性差异( $P<0.05$ )。

Different lowercase letters represent significant differences among different days ( $P<0.05$ ).

研究表明, *eya1* 的正常表达与内耳、视网膜、味蕾等颅感觉器官的发生发育息息相关(Zou *et al*, 2006; Xu *et al*, 2021; Zhang T *et al*, 2023)。在斑马鱼(*Danio rerio*)的研究中发现, *eya1* 首先在颅胎盘前体细胞中被检测到, 随后在垂体前叶、嗅觉和耳部基板中继续表达; 在发育的内耳中, *eya1* 的表达被限制在耳囊腹侧, 而此处是听神经节前体细胞产生和感觉板块分化之处(Sahly *et al*, 1999)。在非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)胚胎发育的过程中, 通过特异性抗体证实了EYA1在颅基、源性感觉原基(嗅上皮、耳小泡和侧线原基)、颅神经节等位置的表达(Almasoudi *et al*, 2021)。这些研究表明, 胚胎发育期是幼体乃至成体感觉器官发生与分化的关键时期, 在这一阶段相关基因已发挥关键的调控作用。本研究中, 在黄条鲮早期胚胎发育过程中, *eya1* 在胚体包卵黄 2/3 至 4/5 期显著高表达, 通过比对胚胎发育时序发现, 这一阶段为器官发生期至肌肉效应期(徐永江等, 2019)。推测这一时期是黄条鲮视觉、听觉、味觉等感觉细胞分化的关键时期, 这与实验结果中 *eya1* 在胚胎发育后期出现高表达的趋势相一致。在黄条鲮仔稚鱼发育过程中, *eya1* 在 1 dph 显著高表达, 之后整体呈现下调趋势, 并在 30 dph 开始趋于稳定。推测前 25 dph 是黄条鲮仔稚鱼听觉、视觉等感觉器官发育和完善的阶段, 与 *otx2* 的表达趋势相一致, 但后续还需组织形态学等相关研究的进一步证实。

## 参 考 文 献

ALMASOUDI S H, SCHLOSSER G. Eya1 protein distribution during embryonic development of *Xenopus laevis*. *Gene Expression Patterns*, 2021, 42: 119213

GE L L, SONG J K, FAN C X. The Wnt signaling affects development of the lateral line by regulating the specification of lateral line placode in the zebrafish. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2018, 27(1): 16 - 23 [葛玲玲, 宋佳坤, 范纯新. 斑马鱼中 Wnt 信号通过调控侧线基板形成影响侧线发育机制. 上海海洋大学学报, 2018, 27(1): 16-23]

HUANG L, WEI Z B, LIU S G. Primary study on Eya1 gene's functions in mouse eye development. *Journal of Sichuan University (Natural Science)*, 2003, 40(6): 1183 - 1186 [黄骊, 魏竹波, 刘世贵. Eya1 基因在小鼠眼发育过程中功能的初步研究. 四川大学学报(自然科学版), 2003, 40(6): 1183-1186]

JI W Y, FU Y S, SHI Z Y, *et al*. Expression of miR-124 and Otx2 during metamorphosis and verification of their targeting relationship in *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(6): 1040 - 1048 [季文瑶, 付元帅, 施志仪, 等. miR-124 和 Otx2 在牙鲆变态发育期间的表达调控及其靶向关系验证. 中国水产科学, 2019, 26(6): 1040-1048]

KOIKE C, NISHIDA A, UENO S, *et al*. Functional roles of Otx2 transcription factor in postnatal mouse retinal development. *Molecular and Cellular Biology*, 2007, 27(23): 8318-8329

LIU X. Study on the physiological structure and developmental characteristics of auditory and visual organs of *Seriola aureovittata*. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2023 [刘欣. 黄条鲮听觉和视觉器官生理结构与发育特征研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2023]

MURANISHI Y, TERADA K, INOUE T, *et al*. An essential role for RAX homeoprotein and NOTCH-HES signaling in Otx2 expression in embryonic retinal photoreceptor cell fate determination. *The Journal of Neuroscience*, 2011, 31(46): 16792-16807

NADANAKA S, MIYATA S, BAI Y Q, *et al*. Reconsideration



- of the semaphorin-3A binding motif found in chondroitin sulfate using *Galnac4s-6st*-knockout mice. *Biomolecules*, 2020, 10(11): 1499
- NISHIDA A, FURUKAWA A, KOIKE C, *et al.* *Otx2* homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nature Neuroscience*, 2003, 6(12): 1255–1263
- OMODEI D, ACAMPORA D, MANCUSO P, *et al.* Anterior-posterior graded response to *Otx2* controls proliferation and differentiation of dopaminergic progenitors in the ventral mesencephalon. *Development*, 2008, 135(20): 3459–3470
- QIU Y, PENG G H. Research advances in OTX2 and CRX regulating development and differentiation of retinal photoreceptors. *Recent Advances in Ophthalmology*, 2015, 35(3): 287–289 [邱莹, 彭广华. OTX2 和 CRX 调控视网膜光感受器细胞发育分化的研究进展. *眼科新进展*, 2015, 35(3): 287–289]
- SAHLY I, ANDERMANN P, PETIT C. The zebrafish *eya1* gene and its expression pattern during embryogenesis. *Development Genes and Evolution*, 1999, 209(7): 399–410
- TIAN Y L, YU M, SHI Y J, *et al.* Effect of OTX2 downregulation on proliferation and autophagy in MC3T3-E1 cells. *Journal of China Medical University*, 2018, 47(11): 1015–1020 [田玉楼, 于默, 史娅婕, 等. OTX2 基因表达下调对 MC3T3-E1 细胞增殖分化和自噬的影响. *中国医科大学学报*, 2018, 47(11): 1015–1020]
- TORERO IBAD R, MAZHAR B, VINCENT C, *et al.* OTX2 non-cell autonomous activity regulates inner retinal function. *Eneuro*, 2020, 7(5): ENEURO.0012–19.2020
- WANG F, ZHANG R Z, JIAN J, *et al.* Identification and functional study of enhancers of *EYA1*: The causative gene of branchio-oto-renal syndrome. *Developmental Neuroscience*, 2024, 46(5): 333–340
- WEI Y L, WEN B, GAO J Z, *et al.* OTX2 gene cloning and expression analysis of *Symphysodon haraldi*. *Freshwater Fisheries*, 2021, 51(3): 13–19 [魏域玲, 温彬, 高建忠, 等. 七彩神仙鱼(*Symphysodon haraldi*) OTX2 基因克隆及其表达分析. *淡水渔业*, 2021, 51(3): 13–19]
- XU J S, LI J, ZHANG T, *et al.* Chromatin remodelers and lineage-specific factors interact to target enhancers to establish proneurosensory fate within otic ectoderm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(12): e2025196118
- XU Y J, ZHANG Z R, LIU X Z, *et al.* Morphometric characteristics of the embryonic and postembryonic development of yellowtail kingfish, *Seriola aureovittata*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(1): 172–182 [徐永江, 张正荣, 柳学周, 等. 黄条鲷早期生长发育特征. *中国水产科学*, 2019, 26(1): 172–182]
- YAMAMOTO H, KON T, OMORI Y, *et al.* Functional and evolutionary diversification of *Otx2* and *crx* in vertebrate retinal photoreceptor and bipolar cell development. *Cell Reports*, 2020, 30(3): 658–671
- ZHANG R Q. The structure and development of vision and lateral line system of mandarin fish and its predatory behavior characteristics. Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2020 [张瑞祺. 鳊视网膜、侧线系统结构与发育及捕食行为特征分析. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2020]
- ZHANG R Z, SUN Y H, ZHANG Q, *et al.* Overexpression of miR-124-3p affects zebrafish inner ear development and hearing function via downregulation of *EYA1* gene expression. *Neuroscience Letters*, 2023, 802: 137172
- ZHANG T, XU P X. The role of *Eya1* and *Eya2* in the taste system of mice from embryonic stage to adulthood. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2023, 11: 1126968
- ZHOU T T, FAN C X, ZOU S, *et al.* The expression of *Eya1-Six1* signaling in the regeneration of hair cell in zebrafish lateral line neuromasts. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(6): 801–806 [周婷婷, 范纯新, 邹莎, 等. *Eya1-Six1* 信号在斑马鱼侧线神经丘毛细胞再生过程中的表达. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(6): 801–806]
- ZOU D, SILVIUS D, RODRIGO-BLOMQUIST S, *et al.* *Eya1* regulates the growth of otic epithelium and interacts with *Pax2* during the development of all sensory areas in the inner ear. *Developmental Biology*, 2006, 298(2): 430–441

(编辑 冯小花)

## Molecular Cloning and Expression Characteristics of *otx2* and *eya1* During the Early Development of *Seriola aureovittata*

JIANG Yan<sup>1</sup>, LIU Xin<sup>1</sup>, XU Yongjiang<sup>1</sup>①, CUI Aijun<sup>1</sup>, WANG Bin<sup>1</sup>, LIU Xinfu<sup>1</sup>, LIU Xuezhou<sup>1</sup>, XUE Zhiyong<sup>2</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266071, China; 2. Haiyang Yellow Sea Aquaculture Co., Ltd., Yantai 265122, China)

**Abstract** Yellowtail kingfish (*Seriola aureovittata*) is a pelagic migratory fish species with a global distribution. In recent years, interest in the aquaculture of this species has increased worldwide because of its high flesh quality and fast growth. As a large and fast-swimming pelagic fish, yellowtail kingfish has good adaptability to land-based industrial recirculating and offshore net cage modes. With the development of aquaculture technology, more attention has been paid to animal behavior research, which will promote the welfare level in aquaculture. Light, sound, temperature, density, and flow velocity are important factors affecting the welfare of farmed fish. The development, morphological structure, and regulatory mechanism of sensory organs, including visual, gustatory, olfactory, and auditory organs, are becoming increasingly important in the study of animal behavior.

Orthodenticle homeobox 2 (OTX2) and eye absent 1 (EYA1) play important roles in regulating the ontogeny, differentiation, and development of visual, gustatory, olfactory, and auditory organs. In order to study the expression characteristics of *otx2* and *eya1* in yellowtail kingfish during early development, *otx2* and *eya1* were identified from brain tissue with specific kits. The lengths of *otx2* and *eya1* open reading frame domain were 876 and 1,962 bp encoding 291 and 653 amino acids, respectively. Among these, OTX2 consists of a homologous domain from the 42nd to 93rd amino acids and a TF-Otx domain containing 82 amino acids; the C-terminal of EYA1 is an EYA domain encoding 246 amino acids. These two genes had a wide range of tissue expression characteristics, including in eye, brain, pituitary, head kidney, heart, liver, spleen, kidney, mid-gut, and ovary tissues. The highest expression level of *otx2* was obtained in eye tissues followed by brain tissues, and the values in these two tissues were significantly higher than those in other tissues ( $P < 0.05$ ). The highest expression level of *eya1* was obtained in pituitary tissues followed by ovary tissues, and the values in these two tissues were significantly higher than those in other tissues ( $P < 0.05$ ). During embryonic development, expression of *otx2* and *eya1* could be detected at each stage, and levels were upregulated at a late stage, during which *otx2* and *eya1* reached peak values at hatching stage and when the embryo encircled 4/5 of the yolk sac, respectively. At the larval and juvenile stages, the expression of *otx2* and *eya1* could be detected, with high expression levels at the early stage, during which the expression level of *otx2* was first upregulated and then downregulated; the expression level at 3–25 dph (days post-hatching) was significantly higher than those at 1 dph and 30–60 dph, with the highest level reached at 20 dph ( $P < 0.05$ ). The expression of *eya1* showed a downward trend, with the highest level reached at 1 dph ( $P < 0.05$ ); the expression levels at 30–60 dph were significantly lower than those at 7–25 dph ( $P < 0.05$ ). This study provides a molecular basis for understanding the physiological functions of *otx2* and *eya1* during the development of sensory organs and the regulatory mechanisms in yellowtail kingfish.

**Key words** *Seriola aureovittata*; *otx2*; *eya1*; Tissue expression; Embryonic development; Larva and juvenile

① Corresponding author: XU Yongjiang, Email: xuyj@ysfri.ac.cn