

猪 *Prox1* 基因的染色体定位和亚细胞定位的研究

袁继红, 龙欢, 田明芳, 杨在清*

(华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070)

摘要: 在克隆猪 *Prox1* 基因(*sProx1*)的基础上, 对猪 *Prox1* 基因进行染色体定位分析, 并通过 EGFP 融合蛋白对该基因产物进行亚细胞水平定位。本研究将人和鼠的 *Prox1* 基因编码区在猪的 ESTs 数据库中进行检索, 然后根据 EST 进行序列拼接并设计引物对猪 *Prox1* 基因编码区进行克隆。通过对比人、鼠及其他物种 *Prox1* 基因第二个内含子序列, 设计引物扩增猪 *Prox1* 基因部分内含子, 根据克隆得到的部分内含子序列设计引物, 利用猪-仓鼠体细胞辐射杂种板 (IMpRH) 对猪 *Prox1* 基因进行染色体定位。根据已获得的猪 *Prox1* 基因编码区序列, 构建猪 *Prox1* 基因的融合绿色荧光超表达载体 EGFP-*Prox1*, 并转染猪肾 PK15 细胞, 12 h 后倒置荧光显微镜观察 *Prox1* 蛋白在亚细胞内的定位。结果表明: *Prox1* 基因定位于猪第 9 号染色体长臂的 26 区, 与标记 SW1651 紧密连锁; 构建猪 *Prox1* 基因的真核表达载体 pEGFP-N1-*Prox1*, 融合蛋白 EGFP-*Prox1* 定位于 PK15 细胞的细胞核中。

关键词: 猪; *Prox1*; 染色体定位; 绿色荧光融合超表达载体; 亚细胞定位

中图分类号: S828; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)03-0351-07

Study on Chromosomal and Subcellular Localization for Porcine *Prox1* Gene

YUAN Ji-hong, LONG Huan, TIAN Ming-fang, YANG Zai-qing*

(College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Full length coding sequence of porcine *Prox1* gene was cloned from liver cDNA. Then the chromosomal and subcellular localization of *sProx1* were investigated. In this study, Blast searches was employed to obtain homologous porcine ESTs in the porcine EST databases with the *Prox1* gene sequence of human and mouse, primers were designed and the mRNA sequence of *Prox1* gene was amplified by RT-PCR. Blasted the intron2 sequence of *Prox1* between human, mice and other kinds of species, a pair of primers was designed for the partly cloning of porcine *Prox1* intron2. Chromosome localization of *Prox1* was detected by IMpRH (INRA-Minnesota porcine radiation hybrid panel). pEGFP-N1-*Prox1* was constructed and PK15 cells were transfected with the plasmid. The subcellular localization of *Prox1* protein observed by inverted fluorescence microscope after 12 h. The complete *Prox1* cDNA sequence and the intron2 partial sequence was cloned (GenBank Accession NO. EF486324, EF571585). *sProx1* gene was physically mapped on porcine chromosome 9q26 and closely linked to marker SW1651, and recombinant plasmid pEGFP-N1-*Prox1* was constructed and EGFP-*Prox1* was expressed in the nucleus of PK15 cells.

Key words: pig; *Prox1*; chromosomal localization; p*Prox1*-EGFP; subcellular localization

果蝇 prospero 同源异形盒蛋白 1 (Prospero-related homeobox protein 1, *Prox1*) 是脊椎动物体内调控与发育相关基因表达的核转录因子, 拥有 2 个

高度保守的结构域——同源异型结构域和 Prospero 结构域, 因与果蝇的 Prospero 同源而得名。Prox1 与机体的生长发育及多个组织器官的功能有着密切

收稿日期: 2012-07-16

基金项目: 国家自然科学基金项目“SIRT1 对猪骨髓间充质干细胞成脂分化的调控机制”(30771585)

作者简介: 袁继红 (1967-), 女, 湖北武汉人, 硕士, 实验师, 主要从事动物脂肪沉积分子机理研究, E-mail: jhjhzy@mail.hzau.edu.cn

* 通信作者: 杨在清, 教授, 博导, 主要从事动物脂肪沉积分子机理研究, E-mail: yangzq@mail.hzau.edu.cn

的联系,如晶体、视网膜、肝、脑、肾原基细胞和淋巴系统等^[1-5]。A. Lavado 等在对鼠脑的研究中发现,不仅前体细胞表达 *Prox1*,发育期和成熟期鼠脑的粒细胞和齿状脑回中也表达 *Prox1* 基因^[6]。另一些研究表明,*Prox1* 基因作为淋巴系统发生的启动基因,是胚胎发育中最早出现的淋巴分化标志,决定着淋巴囊和淋巴管的形成,是血管淋巴表型的关键调控基因,几乎在成人机体所有组织中均持续表达^[7-10]。M. K. Duncan 等通过对大鼠、鸡和人的晶状体中 *Prox1* 基因表达情况的研究发现,在晶状体发育的整个过程中,*Prox1* 蛋白在晶状体基板胞质、晶状体上皮细胞和出芽区中占优势^[3];然而在晶状体纤维细胞的分化过程中,*Prox1* 蛋白重新分配到细胞核中。在去核作用下,晶状体纤维细胞染色质浓缩,*Prox1* 蛋白仍留在细胞核内,但不与染色体 DNA 发生作用。因此,这表明在发育过程中,*Prox1* 蛋白在亚细胞水平上的分布情况对其功能也具有一定的影响^[3],而且有研究显示,*Prox1* 杂合小鼠在成年期出现肥胖症状^[11]。

目前,对 *Prox1* 基因的研究主要集中在人、鼠以及斑马鱼上。已有研究表明,在进化关系上,猪与人的关系比小鼠与人更为接近,在解剖学、生化、生理及遗传上的相似性使猪成为一个能运用于遗传学和生物医学领域研究的重要动物模型。目前有关猪 *Prox1* 基因的研究报道甚少,本研究以人、鼠等物种 *Prox1* 基因的序列为基础,以梅山猪为试验对象,对猪 *Prox1* 基因在染色体上的定位情况和 *Prox1* 蛋白的亚细胞定位进行了分析,为进一步阐明猪 *Prox1* 基因功能奠定基础。

表 1 猪 *Prox1* 基因克隆、定位和表达载体构建的引物

Table 1 Primers used for cloning, mapping and expression vector constructing of porcine *Prox1* gene

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	片段大小/bp Fragment size	退火温度/℃ Annealing temperature	用途 Usage
P1	ATGCCTGACCATGACAGCACAG	2 214	58	CDS 克隆
P2	TTCTACTCATGAAGCAGCTCTTGTAGG			
P3	TCAAGTGATTGGGTGACAATCCTTC	1 058	59	内含子克隆
P4	TCTCCACGTGCATCTTCATTTCTG			
P5	TGAGTAAGGACCTCGAATGGCG	329	59	染色体定位
P6	TCAAGTGATTGGGTGACAATCCTTC			
P7	CCGGAATTCGCCACCATGCCTGACCATGACAGCACA	2 213	58	表达载体构建
P8	GCGGGATCCCCTCATGAAGCAGCTCTTGTAGGC			

1 材料与方 法

1.1 材料

2 月龄雄性健康梅山猪, *E. coli* DH5 α 菌株(Kan⁺),猪肾细胞 PK15。

1.2 试剂和载体

M-MLV Transcriptase (Promega 公司), Ribonuclease Inhibitor (大连宝生物 TaKaRa 公司), *Taq* plus Polymerase, PCR buffer 10 \times , dNTPs(北京鼎国), GC PCR buffer 2 \times (TaKaRa), pMD18-T (TaKaRa), T4 DNA Ligase (TaKaRa), Opti-MEM I, lipofectamine2000; Agarose (Shanghai Yito Co Ltd.), DNA Marker DL2000, DNA Marker 1 kb ladder (TaKaRa), Trizol 试剂 (Invitrogen), 其他试剂为进口或国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 猪 *Prox1* 基因编码区的克隆 以人和鼠 *Prox1* 基因编码区为模板,在猪 EST 库中进行搜索,得到涵盖起始密码子和终止密码子的 EST(CJ003609 和 CB288181),根据该 EST 设计引物 P1 和 P2(表 1)对猪 *Prox1* 基因编码区进行克隆。PCR 反应条件:以猪肝 cDNA 为模板,PCR 反应体系为 25 μ L:含模板 1 μ L, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 浓度 1.5 mmol \cdot L⁻¹, dNTP 浓度 200 μ mol \cdot L⁻¹,引物终浓度为 0.1 μ mol \cdot L⁻¹, *Taq* DNA 聚合酶 1 U。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,58 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.2 猪 *Prox1* 基因部分内含子的克隆 参照人和鼠 *Prox1* 基因的内含子序列(NM_002763, NM_008937),找到第2个内含子3'端的同源序列设计 anti-sense 引物 P4; 根据猪 *Prox1* 基因(EF486324,本研究克隆得到)第2个外显子5'端的序列设计 sense 引物 P3。利用 Premier 5.0 软件设计引物,所设计的引物序列 P3、P4 见表1。扩增片段为 *Prox1* 基因的第2个内含子3'端部分序列。

PCR 扩增反应:以猪肝基因组 DNA 为模板,PCR 反应体系条件见 1.3.1。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3 克隆测序 用 Axygen 公司试剂盒回收 DNA 片段,按照说明书用 1% 琼脂糖凝胶进行回收,回收产物与 pMD18-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,LB(Amp⁺) 固体培养基培养 12~16 h。挑选阳性克隆经菌液 PCR、酶切鉴定,DNA 片段大小与预期相符,最后摇菌和测序。

1.3.4 染色体定位 染色体定位用猪辐射杂种板(INRA-UMN porcine Radiation Hybrid, IM-pRH),该试剂盒包括猪/仓鼠辐射杂种细胞系的基因组 DNA,以及仓鼠和猪基因组 DNA 阳性对照。

根据已获得的 *Prox1* 基因部分内含子序列,比对猪 *Prox1* 基因第二内含子部分序列和鼠 *Prox1* 基因第二内含子序列,选择同源性低的区段设计引物对,用以确保只扩增猪基因组中的 *Prox1* 基因,而与仓鼠基因组中对应的基因序列不发生配对扩增。染色体定位所使用的引物 P5、P6 见表1。PCR 扩增条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,59 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,34 个循环;72 °C 延伸 5 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,阳性结果用“1”表示,阴性结果用“0”表示,记录扩增情况。将 PCR 分型结果提交到 IMpRH 网站(<http://imprh.toulouse.inra.fr>)进行分析,利用目的基因连锁标记的染色体位点相对确定目的基因的染色体位置,并利用人与猪的比较基因组图谱,对目的基因在人和猪染色体上的位置进行比较分析。

1.3.5 猪 *Prox1* 基因融合荧光表达载体的构建及检测 根据 GenBank 中猪的 *Prox1* 序列(EF486324)设计 *Prox1* 的 cDNA 引物,并在上、下游引入酶切位点 *EcoR* I 和 *Bam* H I,引物 P7、P8 见表1。

以连接至 pMD18-T 上的 *sProx1* 序列为模板进行 PCR 扩增,扩增条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C

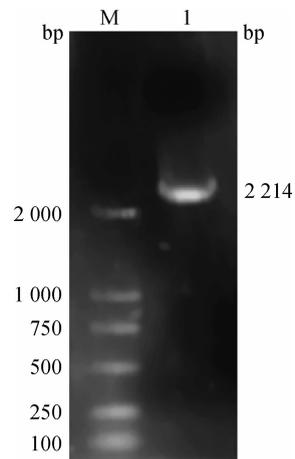
变性 40 s,58 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 2 min,34 个循环;72 °C 延伸 10 min。回收 DNA 片段,用 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切绿色荧光质粒表达载体 pEGFP-N1(4.7 kb) 和 DNA 片段,胶回收目的片段;T₄ DNA 连接酶 16 °C 连接过夜,产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑选阳性克隆经菌液 PCR、酶切鉴定,将含正确插入片段的重组质粒命名为 pEGFP-N1-*Prox1*,送测序公司测序。

1.3.6 猪 *Prox1* 基因的亚细胞定位 培养 PK15 猪肾细胞系,用基础培养液 DMEM 补加 10% 的小牛血清,在 37 °C 5% 的 CO₂ 培养箱中培养,细胞铺满后,用 0.25% 的胰酶消化传代。抽提 pEGFP-N1 菌株及 pEGFP-N1-*Prox1* 菌株的质粒,采用脂质体介导基因分别转染 PK15 猪肾细胞,转染细胞培养 12 h 后即可在倒置荧光显微镜下观察拍照。

2 结果

2.1 猪 *Prox1* 基因编码区的克隆

以猪肝 cDNA 为模板,用引物 P1 和 P2 对猪 *Prox1* 基因编码区进行扩增,扩增片段大小为 2 200 bp 左右(图1),对测序结果进行分析,证明确实为目标片段,将其提交至 GanBank,获得序列号:EF486324。



M. DNA 相对分子质量标准 DL2000 DNA marker; 1. *Prox1* 扩增产物

M. DL2000 DNA marker; 1. *Prox1* amplification product

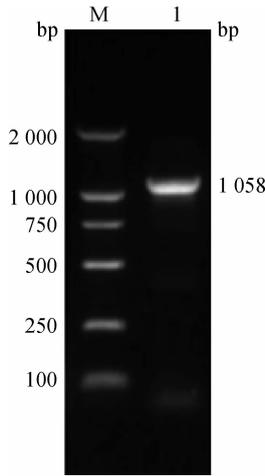
图1 *Prox1* 基因 cDNA 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of *Prox1* gene cDNA

2.2 猪 *Prox1* 基因内含子的克隆与序列分析

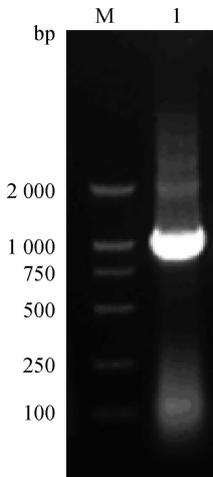
用合成的引物和猪肝基因组 DNA 为模板进行

扩增,扩增片段长度略大于 1 000 bp,与预期结果相符(图 2)。PCR 产物切胶回收后与 pMD18-T 连接并送去测序,测序结果证实该片段确实为目标片段,将序列提交至 GenBank 获得序列号:EF571585。

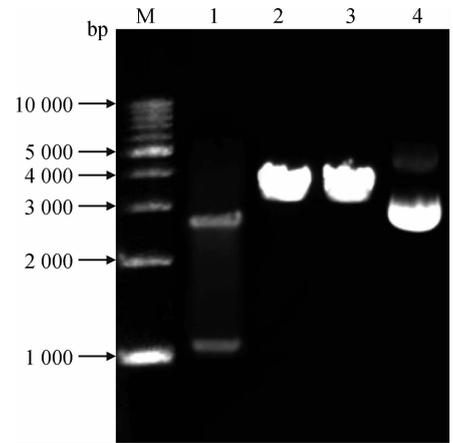


M. DNA 相对分子质量标准 DL2000 DNA marker; 1. *Prox1* 内含子
M. DL2000 DNA marker; 1. *Prox1* intron
图 2 *Prox1* 基因内含子 PCR 扩增结果
Fig. 2 PCR amplification results of *Prox1* intron

将 pMD18-T-*Prox1* 进行菌液 PCR,PCR 扩增片段大小约为 1 000 bp(图 3);并且进行酶切鉴定(图 4),分别用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam*H I 进行单酶切鉴定,以及 *Hind* III、*Bam*H I 双酶切鉴定,结果显示:单酶切在 3.7 kb 左右有明显条带,双酶切时在 1.1 和 2.6 kb 左右处有明显条带,与预期结果相符。



M. DNA 相对分子质量标准 DL2000 DNA marker; 1. *Prox1* 内含子
M. DL2000 DNA marker; 1. *Prox1* intron
图 3 pMD18-T-*Prox1* 菌液 PCR 检测结果
Fig. 3 Results of pMD18-T- *Prox1* bacteria PCR



M. DNA 相对分子质量标准 1 kb DNA ladder; 1. *Hind* III + *Bam*H I 双酶切产物; 2. *Bam*H I 单酶切产物; 3. *Hind* III 单酶切产物; 4. pMD18-T-*Prox1* 质粒
M. 1 kb DNA ladder; 1. Product digested by *Hind* III + *Bam*H I ; 2. Product digested by *Bam*H I ; 3. Product digested by *Hind* III ; 4. pMD18-T-*Prox1* plasmid
图 4 pMD18-T-*Prox1* 酶切鉴定结果
Fig. 4 Enzyme digestion results of pMD18-T-*Prox1*

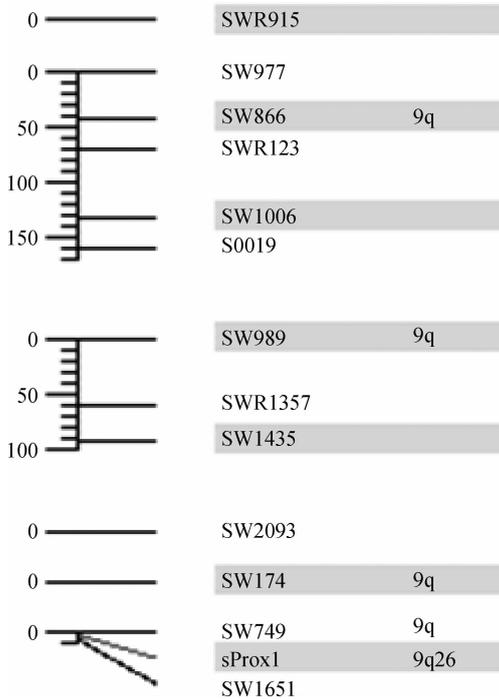
2.3 猪 *Prox1* 基因的染色体定位

以 IMpRH 克隆板中的 118 管 DNA 为模板,对猪 *Prox1* 染色体定位的扩增结果,按照有明显的目的条带的阳性克隆为‘1’、阴性克隆无目的条带为‘0’、极微弱或不好判断的为‘?’、对 PCR 扩增结果判读分型。*Prox1* 辐射杂种板定位的 PCR 分型结果为:000011100101000100000000001100001010010010100010110010000100010000101100100100101100000100011000011000001010100110101。

将以上分型结果提交于 IMpRH 数据统计分析服务器(<http://imprh.toulouse.inra.fr>)进行分析,获得 *Prox1* 基因的最终定位结果,分析结果表明,最近的标记是 SW1651,LOD 值为 7.9,将 *Prox1* 基因定位于猪第 9 号染色体长臂的 2 区 6 带(图 5)。一般认为,当某连锁标记 LOD 值大于 5 时,该连锁标记提供的定位信息是可靠的。

2.4 融合绿色荧光超表达载体的鉴定

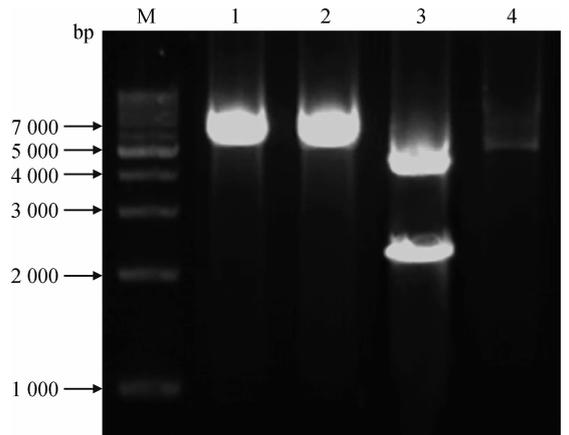
将 pEGFP-N1-*Prox1* 进行酶切鉴定。分别用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Bam*H I 进行单酶切鉴定, *Eco*R I、*Bam*H I 双酶切鉴定,结果显示单酶切在 7 kb 左右有明显条带,双酶切在 4.7 和 2.2 kb 处有清晰条带,与预期结果相符,将挑选的菌株送测序公司测序,测序结果与猪 *Prox1* 基因的 DNA 序列相符。说明 pEGFP-N1-*Prox1* 构建成功(图 6)。

图 5 *Prox1* 染色体定位图谱Fig. 5 Chromosome map of *Prox1*

2.5 重组质粒转染细胞的检测结果

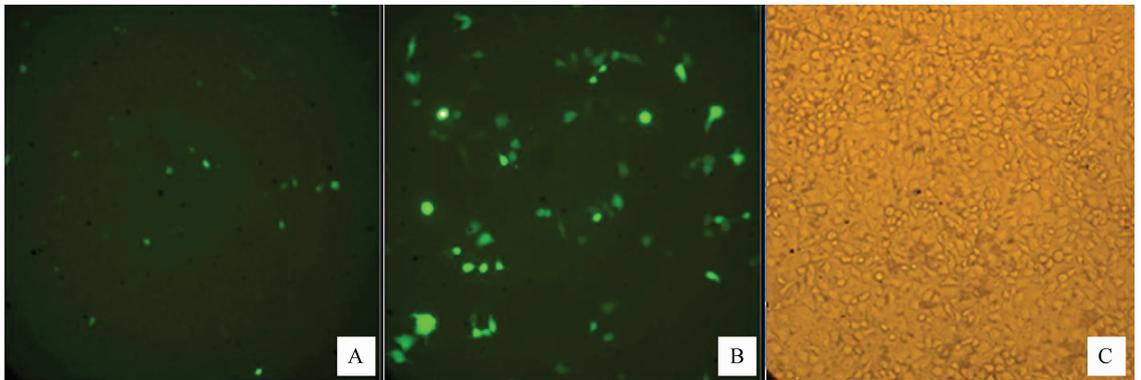
转染 12 h 后荧光倒置显微镜下观察, 转染

pEGFP-N1-*Prox1* 载体的猪肾细胞 PK15 表达绿色荧光融合蛋白, 但只在细胞核中表达。转染 pEGFP-N1 空载体的猪肾细胞 PK15 中细胞质及细胞核均有绿色荧光蛋白的表达(图 7)。



M. DNA 相对分子质量标准 1 kb DNA ladder; 1. *Bam*H I 单酶切产物; 2. *Eco*R I 单酶切产物; 3. *Bam*H I + *Eco*R I 双酶切产物; 4. pEGFP-N1-*Prox1*

M. 1 kb DNA ladder; 1. Product digested by *Bam*H I; 2. Product digested by *Eco*R I; 3. Product digested by *Bam*H I + *Eco*R I; 4. pEGFP-N1-*Prox1*

图 6 pEGFP-N1-*Prox1* 重组质粒酶切鉴定图谱Fig. 6 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pEGFP-N1-*Prox1*

A. pEGFP-N1-*Prox1* 载体转染猪肾细胞 PK15; B. pEGFP-N1 空载体转染猪肾细胞 PK15; C. 正常光照下猪肾细胞 PK15

A. PK15 cells by transfecting pEGFP-N1-*Prox1*; B. PK15 cells by transfecting pEGFP-N1; C. PK15 cells

图 7 转染 pEGFP-N1-*Prox1* 和 pEGFP-N1 猪肾细胞 PK15 200×Fig. 7 PK15 cells by transfecting pEGFP-N1-*Prox1* and pEGFP-N1, respectively 200×

3 讨论

1996 年 R. D. Zinovieva 等首次报道了关于人 *Prox1* 基因的结构与定位, 人 *Prox1* 的基因长度大约 40 kb, 至少含有 5 个外显子和 4 个内含子, 编码

分子质量为 83 ku 的 *Prox1* 蛋白, 定位于染色体 1q32.2-1q32.3, 人 *Prox1* 基因的 DNA 序列与鸡有 89% 的同源性, 其编码蛋白与鸡有 94% 的一致性^[12]。 *Prox1* 作为核转录因子, 通过不同的转录途径控制着细胞的增殖和分化^[13], 不仅在哺乳动物中

枢神经系统和淋巴管的发育中发挥着关键性的作用,而且在胰腺组织的发生与发展中也尤为重要, J. Wang等^[14]研究发现,作为胰腺组织发生的重要转录因子——*Prox1* 的缺失,将严重影响胰腺被膜的形态发生,阻碍胰腺的生长和引起外分泌部细胞的异常增加,因此,*Prox1* 可能与为使胰腺在组织发育中有充足的岛细胞而阻止多功能胰腺前体细胞分化为外分泌部细胞有关。在对胰腺特异缺失 *Prox1* 的老鼠的研究中表明,胰腺发育的早期,*Prox1* 控制着腺泡细胞的膨出,在胚胎发育的晚期,*Prox1* 对胰腺导管细胞的增殖和形态发生起调控作用^[15]。而 *Prox1* 与核受体基因 *ffla* 在红肌肌原纤维集结中有互补作用,推测 *Prox1* 在肌肉的形态发生中也有非常重要的作用^[16]。本研究根据同源序列法,利用基因序列在各个物种间高度保守的特点,以现有的人、小鼠等物种的基因数据为参照,成功的克隆了猪 *Prox1* 基因第 2 内含子 3' 端序列,该序列的长度是 1 058 bp,并以此作为定位 PCR 扩增的靶序列,设计定位引物,PCR 扩增完毕后提交结果,成功定位了猪 *Prox1* 基因,即猪第 9 号染色体长臂的 26 区,与 SW1651 标记的 LOD 值为 7.9。而且这些染色体区域所在的连锁群和人同源基因定位的 1q32 所在的连锁群分别有对应关系,表明了此基因在进化上的保守性。

由于绿色荧光蛋白基因可以产生绿色荧光并在异源组织中表达,检测时不需要任何底物和辅助因子参与,不影响宿主细胞,因而可以鉴定、跟踪、分选表达 GFP 的活细胞^[17]。通过构建带有绿色荧光蛋白的真核表达系统来分析 *Prox1* 基因的亚细胞定位可能为其功能研究提供重要的线索。为了探索 *Prox1* 基因在细胞中的定位及表达情况,本试验以猪肾细胞 PK15 为宿主细胞,转染带有荧光标记的重组质粒,初步研究 *Prox1* 基因在细胞中的定位,荧光倒置显微镜下发现融合蛋白在细胞核表达,这与在小鼠^[18]、人^[19] 中的亚细胞定位相同,而且猪和小鼠 *Prox1* 基因序列的同源性也较高,这是否预示着 *Prox1* 在猪体内的功能与小鼠体内相似还需要做进一步的研究。

4 结 论

本研究采用 RT-PCR 方法克隆了猪 *Prox1* 基因的 CDS 区并获得了登录号(EF486324),成功克隆该基因第二内含子的 3' 端部分序列,并将 *Prox1*

基因染色体定位于猪第 9 号染色体长臂的 26 区;通过构建融合绿色荧光超表达载体并实行了体外表达,初步将猪 *Prox1* 基因定位于猪肾细胞 PK15 的细胞核,为进一步研究其细胞内的作用机制和生物学功能奠定了基础。

参考文献:

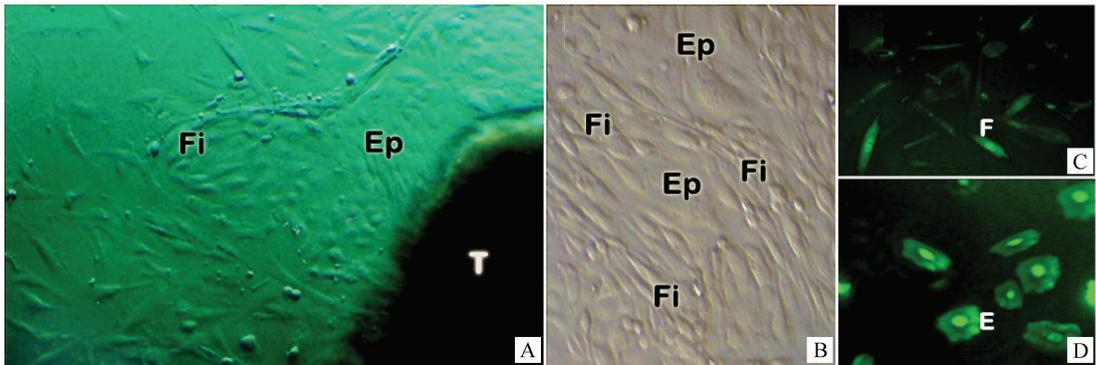
- [1] BELECKY-ADAMS T, TOMAREV S, LI H S, et al. Pax-6, Prox1, and Chx10 homeobox gene expression correlates with phenotypic fate of retinal precursor cells[J]. *Invest Ophthalmol Visual Sci*, 1997, 38: 1293-1303.
- [2] DONG C H, YANG S T, YANG Z A, et al. A C-type lectin associated and translocated with cortical granules during oocytematuration and egg fertilization in fish[J]. *Dev Biol*, 2004, 265: 341-354.
- [3] DUNCAN M K, CUI W W, OH D J, et al. Prox1 is differentially localized during lens development[J]. *Mech Dev*, 2002, 112: 195-198.
- [4] DYER M A, LIVESEY F J, CEPKO C L, et al. Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina [J]. *Nat Genet*, 2003, 34: 53-58.
- [5] EASTER S S, NICOLA JR G N. The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Dev Biol*, 1996, 180: 646-663.
- [6] LAVADO A, OLIVER G. Prox1 expression patterns in the developing and adult murine brain [J]. *Dev Dyn*, 2007, 236: 518-524.
- [7] OLIVER G, SOSAR PINEDA B, GEISENDORF S, et al. Prox 1, a prospero related homeobox gene expressed during mouse development [J]. *Mech Dev*, 1993, 44(1): 3-16.
- [8] 董胜翔, 黄 钢. Prox1: 一种与实体肿瘤淋巴结转移相关的细胞内标志[J]. *肿瘤基础与临床*, 2007, 20(2): 183-184.
- [9] KIM H, NGUYEN V P, PETROVA T V, et al. Embryonic vascular endothelial cells are malleable to reprogramming via Prox1 to a lymphatic gene signature [J]. *BMC Dev Biol*, 2010, 10: 72.
- [10] HONG Y K, HARVEY N, NOH Y H, et al. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate [J]. *Dev Dyn*, 2002, 225(3): 351-357.
- [11] HARVEY N L, SRINIVASAN R S, DILLARD M E, et al. Lymphatic vascular defects promoted by

- Prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity [J]. *Nat Genet*, 2005,37(10):1072-1081.
- [12] ZINOVIEVA R D, DUNCAN M K, JOHNSON T R, et al. Structure and chromosomal localization of the human homeobox gene Prox 1 [J]. *Genomics*, 1996, 35(3):517-522.
- [13] ELSIR T, ERIKSSON A, ORREGO A, et al. Expression of Prox-1 is a common feature of high-grademalignant astrocytic gliomas [J]. *J Neuro-pathol Exp Neurol*, 2010,69(2):129-138.
- [14] WANG J, KILIC G, AYDIN M, et al. Prox1 activity controls pancreas morphogenesis and participates in the production of "secondary transition" pancreatic endocrine cells[J]. *Dev Biol*, 2005, 286:182-194.
- [15] WESTMORELAND J J, KILIC G, SARTAIN C, et al. Pancreas-specific deletion of Prox1 affects development and disrupts homeostasis of the exocrine pancreas[J]. *Gastroenterology*, 2012,142(4):999-1009.
- [16] SHEELA S G, LEE W C, LIN W W, et al. Zebrafish ftz-1la (nuclear receptor 5a2) functions in skeletal muscle organization [J]. *Dev Biol*, 2005, 286:377-390.
- [17] 刘 莉,周 政,采克俊,等. EGFP LacZ 双报告基因真核表达载体的构建及体外表达[J]. 中国生物工程杂志, 2009,29(1):65-69.
- [18] MISRA K, GUI H, MATISE M P. Prox1 regulates a transitory state for interneuron neurogenesis in the spinal cord[J]. *Dev Dyn*, 2008,237:393-402.
- [19] VAN TRAPPEN P O, PEPPER M S. Lymphatic dissemination of tumour cell and the formation of micrometastasis[J]. *Lancet Onco*, 2002, 3(1):44-52.

(编辑 郭云雁)

勘 误

由于编辑工作失误,2013 年第 2 期 312 页图 1 中的图序有遗漏,特更正如下,并向作者、读者致歉。



A. 原代培养的 bECs(200×); B. 传代培养的 bECs(200×); C. 波形蛋白荧光标记的成纤维细胞(400×); D. 角蛋白荧光标记的上皮细胞(400×)。T. 组织块; Fi. 成纤维样细胞; Ep. 上皮样细胞; F. 成纤维细胞; E. 上皮细胞

图 1 bECs 培养与免疫荧光标记

Fig. 1 *In vitro* cultured bovine endometrial cells and immunofluorescent staining