

原位杂交结合半薄切片对石鳖贝壳发育相关细胞的观察研究

夏玉秀^{1,2}, 郇聘¹, 刘保忠¹

(1. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 多板纲软体动物(石鳖)生有8片重复排列的贝壳, 与其他类群如腹足类、双壳类等有着显著的区别, 这些差异蕴含着重要的发育和演化意义。前期研究发现, 红条毛肤石鳖(*Acanthochitona rubrolineata*)幼虫贝壳发育组织的细胞排列欠规则, 在普通显微镜下不易识别单个细胞结构。本研究首先利用整装原位杂交手段鉴定出一些参与贝壳发育的细胞群体, 发现表达 *engrailed* 的细胞分布于贝壳发育区中央区域的突起部位(脊)和边缘区域, 其中脊区域的表达呈条纹状, 边缘区域的表达则与贝壳发育区的外周吻合, 但是对这些细胞的形态和排列模式等细节无法开展深入观察。接下来对石鳖幼虫进行了半薄切片, 发现可以识别出壳板发育区细胞及脊细胞的大致轮廓和分布模式, 但分辨率仍然受限。为了进一步提升分辨能力, 结合了整装原位杂交实验及半薄切片技术, 对表达 *engrailed* 基因的贝壳发育相关细胞开展了观察研究。结果显示, 对整装原位杂交后的幼虫进行半薄切片, 组织细胞结构保持完整, 细胞轮廓清晰, 能够清楚区分 *engrailed* 阳性细胞。观察表明, 这些细胞具有较高的核质比, 总体呈 V 形排列, 且贝壳发育区中央部位与边缘部位的 *engrailed* 阳性细胞在形态和排列上存在区别。这些结果证明, 将原位杂交与半薄切片结合, 可提升对细胞结构观察的分辨率, 实现同时从分子和细胞学层面研究石鳖贝壳发育相关细胞。本研究对进一步从细胞水平研究石鳖的贝壳发育过程、解析相关贝壳发育相关基因的功能有重要的支撑作用。研究结果对揭示更多贝壳起源的信息, 理解软体动物贝壳的起源和演化有重要意义。

关键词: 半薄切片; 原位杂交; 红条毛肤石鳖; 贝壳发育

中图分类号: Q344 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2024)1-0068-07

DOI: 10.11759/hyxx20230227001

软体动物贝壳形成是一个重要的发育事件, 具有重要的发育和演化生物学意义^[1-3]。在软体动物的诸多类群中, 贝壳数目不同, 形态也十分多样, 如腹足类一般1片贝壳, 双壳类一般有2片贝壳^[2, 4]。贝壳本身可有螺旋状、帽状乃至管状等多种形态。然而, 对腹足类和双壳类等在内的有壳亚门(Conchifera)软体动物, 其贝壳虽然表面上差异很大, 但均是由幼虫时期的单片贝壳发育而来, 早期贝壳发育模式比较相似^[6]。在软体动物的另一个亚门——有刺亚门(Aculifera), 情况则明显不同。其成员或者缺乏贝壳(无板纲), 或者具备8片贝壳(多板纲)。对生有贝壳的有刺亚门动物, 其贝壳在形成之初也不是1片, 而是7片, 与有壳亚门动物有明显的区别, 这种差别对贝壳发育机制研究可能有重要启发。化石记录也表明, 有刺亚门软体动物的贝壳似乎与其身体表面的钙质骨刺(或称棘刺)有密切联系^[6]。由于有壳亚门动物缺乏骨刺, 研究有刺亚门动物的贝壳发育或许可以揭示

更多贝壳起源的信息, 对于理解软体动物贝壳的起源和演化有重要意义。

多板纲软体动物俗称石鳖, 是有刺亚门的一大分支^[7], 其背部具有8片贝壳, 呈覆瓦状排列^[8]。目前, 对石鳖贝壳发育的研究还比较少, 对其早期贝壳发育的认识还主要局限在显微观察的层面。研究表明, 石鳖贝壳的形成过程主要包括以下两个方面。首先, 在担轮幼虫时期, 背部逐步形成贝壳发育区, 但无贝壳出现; 随后幼虫经历变态过程, 在贝壳发育区发育出贝壳结构^[9-10]。石鳖幼虫的贝壳发育区由各7个重复排列的壳板发育区(plate field)和脊(ridge)

收稿日期: 2023-02-27; 修回日期: 2023-03-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(42076123)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 42076123]

作者简介: 夏玉秀(1998—), 女, 山东威海人, 硕士研究生, 主要从事软体动物发育生物学研究, E-mail: xiayuyiuc@163.com; 郇聘(1983—), 通信作者, 男, 山东新泰人, 博士生导师, 研究员, 主要从事软体动物发育和遗传学研究, E-mail: huanpin@qdio.ac.cn

两个部分组成,在其外部边缘区域还分布有分泌骨刺的细胞。壳板发育区是将来分泌贝壳的部位,脊部组织则将 7 片初生贝壳隔开。幼虫组织电子显微镜结构显示,幼虫背部重复排列的贝壳发育组织共包含四种类型细胞,其中壳板发育区由 3 型和 4 型细胞构成,脊区域由 1 型和 2 型细胞构成^[11]。然而,对于这些细胞功能、排布和结构的研究尚无报道。

随着贝壳发育研究进入分子水平,一些在贝壳发育细胞中特异性表达的基因得到鉴定。第一个已知的石鳖贝壳发育基因是 *engrailed*,这也是研究最广泛的软体动物贝壳发育基因,普遍表达于软体动物幼虫贝壳发育相关组织中^[12-14]。在石鳖幼虫中,*engrailed* 表达于贝壳发育区中央部位重复排列的 7 个条纹状区域,同时也表达在外部边缘的环状区域^[12]。进一步的分析结果表明,中央区域表达 *engrailed* 的细胞为脊部的 1 型和 2 型细胞。对这些细胞的起源及其在发育中的动态变化开展分析,对于理解石鳖贝壳发育机制有重要意义。然而,由于贝壳发育发生在贝类个体发育的早期阶段,此时的幼虫细胞缺乏形态上的区别,传统研究中仅能靠电子显微镜等工具来对相关细胞开展研究^[11]。贝壳发育基因的鉴定为识别不同的贝壳发育相关细胞提供了关键工具。现有的研究经验也表明,将贝壳发育相关的基因/分子和细胞开展联合分析,对于揭示贝壳发育机制有重要作用^[3, 15-20]。

本文研究对象为红条毛肤石鳖(*Acanthochitona rubrolineata*),广泛分布于青岛沿海^[21]。前期课题组对红条毛肤石鳖早期贝壳发育区开展了研究^[22-23],利用整装原位杂交技术揭示了贝壳形成相关基因 *engrailed* 的表达部位,确认 *engrailed* 基因在贝壳发育区的脊区域表达^[22]。进一步分析发现,红条毛肤石鳖幼虫表达 *engrailed* 的区域呈高柱状,而前人报道的另一种石鳖(*Lepidochitona caverna*)中,相应区域则十分扁平^[12],提示二者组织结构存在差异。这种差异可能对我们理解贝壳发育机制有重要提示。要揭示这种差异的成因,需要对相关细胞结构开展深入分析。然而对整装原位杂交后的幼虫进行直接观察时,发现分辨率十分有限,无法识别细胞轮廓,可能是由于相关细胞排列欠规则^[23],这限制了对相关细胞结构的深入观察,必须采取其他策略提升对细胞的分辨率,才能解决这一问题。

在生物组织和细胞研究中,半薄切片是一种常用的生物制样手段,其切片厚度为 0.5~3 μm ,介于超薄切片和石蜡切片之间^[24]。在此厚度下,细胞极少

互相交叠,内部结构清晰,半薄切片也由此成为研究组织结构、尤其是细胞排列不规则组织的高效手段。半薄切片还可通过染色可实现不同细胞的区分,目前常用的染色方法有甲苯胺蓝染色^[25]、HE 染色^[26]和天青-亚甲蓝染色等。为了对红条毛肤石鳖幼虫贝壳发育相关细胞开展深入观察,本研究将原位杂交处理后的幼虫进行半薄切片,提高了对相关细胞识别的分辨率,为研究石鳖贝壳发育提供了支持。

1 材料与方法

1.1 石鳖采集及幼虫培养

成体石鳖采集自青岛沿海。在实验室环境下,性成熟的石鳖数小时内即可产卵排精。将精子和卵细胞悬液混合进行人工受精后,筛绢过滤去除杂组织,将过滤后的受精卵置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 海水中恒温培养。收集受精后 48 h(48 hpf)的担轮幼虫,用氯化镁溶液麻醉。用于制备半薄切片的样品使用 2.5%戊二醛固定 24 h 后,用梯度乙醇进行溶液置换到 70%乙醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。用于原位杂交检测的样品使用 4%多聚甲醛固定过夜,梯度置换至 100%甲醇,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 整装原位杂交

提取石鳖幼虫总 RNA 后合成 cDNA,利用 *engrailed* 基因的特异性引物(F: AAGTTCCTGGCAT CATTCTAG, R: GTCTATCTCCTCATCGTCCCTTC)扩增其基因片段,将胶回收后产物利用微型分光光度计(NanoDrop[®] ND-1000)测定 DNA 浓度后作为模板,体外转录为 RNA 探针,用于下一步的杂交。

整装原位杂交步骤简述如下:

- 1)将保存在甲醇中的样品梯度复水,经过蛋白酶 K 消化、乙酰化处理后,加入杂交液,65 $^{\circ}\text{C}$ 下预杂交 2 h。
- 2)预杂交后,加入含变性后探针的杂交液,65 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜。
- 3)次日多次洗涤以去除未结合的探针,加入封闭液常温孵育 2 h 后,加入地高辛抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。
- 4)用 PBST 缓冲液洗去多余抗体,加入 NBT/NCIP 底物,避光显色。
- 5)显色完成后,加入 90%甘油,于显微镜(Nikon 80i)下观察。

1.3 半薄切片

由于半薄切片的切片厚度可以在一个范围内浮动,为了检测切片厚度对观察的影响,在半薄切片

中选择了不同的厚度, 比较了不同厚度下对细胞形态的分辨程度, 以及原位杂交信号的识别准确度及信号丢失情况。此外, 为减少个体差异对实验的影响, 在进行切片时选择对同一个幼虫开展不同厚度的切片。切片及染色步骤简述如下。

1.3.1 切片制备

1) 溶液置换: 70%乙醇 → 80%乙醇 → 90%乙醇 → 100%乙醇(洗涤3次) → 100%乙醇: 100%丙酮(体积比为1:1) → 100%丙酮(洗涤3次), 每次洗涤时间为10 min。

2) 树脂渗透: 100%丙酮: 树脂(体积比为3:1), 室温(20~25 °C) 4 h → 100%丙酮: 树脂(体积比为1:1), 室温, 过夜 → 100%丙酮: 树脂(体积比为1:3), 室温 4 h → 树脂 2 h。

3) 树脂包埋和固化: 在模具中将包含幼虫的树脂进行固化(37 °C-45 °C-60 °C, 每个温度均固化24 h)。

4) 制样和切片: 将包含幼虫的树脂研磨到适宜大小后, 用超薄切片机(LEICA EM UC7)切片。切片置于载玻片上进行后续染色和观察。

1.3.2 半薄切片染色

利用天青II染料(Solarbio, A9650)和1%亚甲蓝染色液(Solarbio, G1303)的混合溶液对切片进行染色, 具体步骤如下:

1) 混合染液的配制: 将1%天青II溶液和1%亚甲蓝溶液按体积比1:1等量混匀, 过滤后使用。

2) 将带有切片的载玻片置于杂交炉中烘干(60 °C, 20 min)。

3) 将混合染液滴加在每个切片上, 60 °C染色1 h, 染色后用纯水冲洗玻片上的染料, 直至洗净。

4) 将载玻片放置纯水中分色2 min, 取出后自然晾干, 然后显微镜观察。

2 结果

2.1 红条毛肤石鳖 *engrailed* 基因在贝壳发育区的表达

在担轮幼虫阶段(48 hpf), 石鳖的贝壳发育区已经基本发育完全, 能够清晰观察到壳板发育区和脊交替排列(图1)。*engrailed* 是目前研究最广泛的贝壳形成基因^[12], 课题组先前研究已证实 *engrailed* 基因在红条毛肤石鳖背部的表达与贝壳的发育有关^[22, 27]。与前述报道相同, 整装原位杂交结果表明 *engrailed* 基因在贝壳发育区中央区域的表达呈重复条带模式,

并且这些条带均位于脊的位置(图1b)。脊部细胞突出于背部体表, 与位于脊部之间、内陷的壳板发育区明显不同, 第1个脊显著小于后部的6个(图1b, 黑色三角)。从侧面看, 脊部的 *engrailed* 杂交信号呈明显的长柱状。除上述区域外, *engrailed* 还表达在贝壳发育区边缘部位。如图1所示中, 在担轮环前后的末端位置均检测到 *engrailed* 的表达(黑色箭头), 这些表达形成了一个环形区域, 包围了整个贝壳发育区(图1a)。这与在其他石鳖种类中的结果基本类似^[10]。然而, 上述结果确定了 *engrailed* 基因表达在脊上, 但相关细胞的分布及细胞特征无法辨别, 限制了对结果的进一步解读。

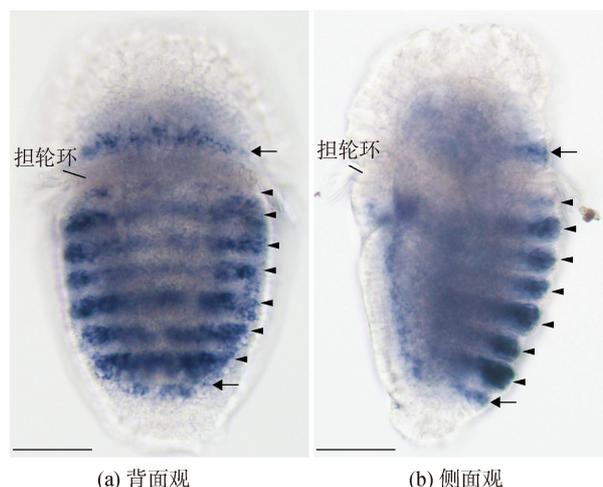


图1 红条毛肤石鳖受精后48 h 幼虫的 *engrailed* 基因表达
Fig.1 *Engrailed* expression in a 48-hpf larva of *A. rubrolineata*

注: 黑色箭头为贝壳发育区边缘的 *engrailed* 表达, 黑色三角为贝壳发育区中央区域的 *engrailed* 表达, 比例尺为50 μm

2.2 红条毛肤石鳖幼虫的半薄切片观察

为了解析贝壳发育相关细胞的特征和分布情况, 对48 hpf 石鳖幼虫进行了常规的冷冻及石蜡切片。结果发现, 由于石鳖背部的贝壳发育细胞排列欠规则, 且横截面很小^[23], 当进行常规纵向切片时(8~20 μm), 不同细胞仍交叠在一起, 无法区分单个的细胞(结果未展示)。考虑到这种困难主要是细胞横截面过小及排列不规则导致的, 推测进一步减小切片厚度可能可以解决该问题, 因此进一步开展了半薄切片实验。

半薄切片结果表明, 随着切片厚度的减小, 对细胞结构的识别程度有了明显提高。如图2所示, 半薄切片下不同区域的幼虫细胞展示清晰, 不同细胞

的分布和形态特征存在较大差别。担轮环前区域的细胞排列规整,半薄切片后经天青-亚甲蓝染色能够清晰地观察到细胞核,并区分不同细胞(图 2, 黑色框)。担轮环后区域则不同,壳板发育区和脊细胞的重叠现象明显。该区域虽然也能够勉强分辨细胞核,但细胞分界模糊,细胞分属仍然不清楚,无法准确



图 2 红条毛肤石鳖受精后 48 h 幼虫的半薄切片(纵切面)

Fig. 2 Longitudinal semithin section of a 48-hpf larva of *A. rubrolineata*

注:黑色框及白色框标识了两部分贝壳发育相关细胞,其分辨率存在差别,比例尺为 20 μm

2.3 原位杂交与半薄切片结合观察

通过上述结果可以看出,单独的整装原位杂交或半薄切片均无法辨析石鳖幼虫背部的贝壳发育相关细胞,因此将二者结合可能为一种有效的策略。故先将 48 hpf 的石鳖幼虫进行整装原位杂交实验,再对显色后的幼虫进行半薄切片。结果表明,半薄切片进行天青-亚甲蓝染色后,原位杂交信号与后期染色分别呈现为深蓝及浅蓝色,差别明显,可以准确区分(图 3)。

图 3 展示的是同一石鳖幼虫分别进行 1 μm 和 3 μm 半薄切片的结果。1 μm 的切片细胞分辨率最高,可以更好地避免细胞重叠。从图 3a 中可以清晰地识别 *engrailed* 阳性细胞的位置和轮廓,然而由于切片过薄,丢失了一部分信号区域。例如靠近担轮环部位的阳性信号区域显著小于幼虫后部,第一个脊部的信号甚至已经完全丢失(图 3a, 空心三角)。相较而言,3 μm 的切片中细胞的分辨率略有降低(图 3b),但并未干扰对细胞的识别,同时此厚度下的切面保留了全部的表达位置。二者相比,3 μm 厚度的切片更适合对石鳖贝壳发育相关细胞的观察。

如图 3a 所示,可以发现表达 *engrailed* 细胞的核质比很大,细胞质仅占细胞体积的很少部分。从图 3b 中能够观察到更多特征,主要包括:(1)每处表达 *engrailed* 基因的细胞分布在脊的突起部位;(2)每个脊部的 *engrailed* 阳性细胞呈 V 形排列。此外,除了脊部的表达,还观察到在贝壳发育区边缘的 *engrailed* 阳性细胞形态和位置明显不同于脊部细胞(图 3b, 白色虚线外部)。这些细胞基本不呈单层排列,

定位不同细胞群体的范围(如 *engrailed* 基因表达的区域)(图 2, 白色框)。考虑到两部分组织的细胞横截面类似,担轮环后部组织的这种模糊形态可能是由于细胞排布不够规则导致的。如果要进一步识别具体的细胞类型(如表达 *engrailed* 基因的细胞),有必要同时结合原位杂交和半薄切片两种方法。

并深入幼虫身体内部。这些差异表明,尽管贝壳发育区中央和边缘的细胞均表达 *engrailed*,但二者的发育模式存在差异,可能有不同的生理功能。



(a) 1 μm 厚度的幼虫纵切面



(b) 3 μm 厚度的幼虫纵切面

图 3 受精后 48 h 幼虫整装原位杂交后的半薄切片

Fig. 3 Semithin sections of a 48-hpf larva after whole-mount *in situ* hybridization

注:黑色箭头为担轮环前的 *engrailed* 表达,黑色三角为脊部的 *engrailed* 表达。b 图中的白色箭头为贝壳发育区后部边缘的 *engrailed* 表达,白色虚线为贝壳发育区中央区域和边缘区域的分界线。比例尺为 20 μm

3 讨论

对贝类贝壳发育机制的解析离不开对相关细胞结构的深入观察和解读^[3, 17, 19]。本研究结合整装原位杂交和半薄切片技术,实现了对石鳖幼虫背部贝壳发育区中表达 *engrailed* 细胞的准确识别和观察,显著提升了对细胞结构观察的分辨率,为后续的贝壳发育机制解析提供了支持。

为了提升观察分辨率,首先对石鳖幼虫开展了半薄切片。虽然能够清晰识别出不同区域细胞的分布和形态,但受位置、个体以及切片厚度等影响无法精准定位到所需要的单个细胞(如表达 *engrailed* 基因的细胞)。此外,石鳖幼虫呈椭圆形,包埋时无法保证幼虫身体完全水平,导致切片的角度无法一致。尽管采用相同的操作进行纵向切片,但实验中发现,切片角度的微小偏差都会导致幼虫组织呈现不同的形态,给比较不同的切片结果带来了困难。此外,石鳖早期发育的同步率虽然较高,但个体之间仍存在发育阶段上细小的差别,导致幼虫的形态如体长、体宽和厚度等都有可能存在差异,进一步增加了制片和观察的难度。本研究发现,48 hpf 的幼虫贝壳发育区发育完全,壳板发育区与脊的位置分界清楚,发育不同步造成的个体差异可以忽略,因此选择了该阶段的幼虫作为研究对象。同时,利用原位杂交信号辅助识别细胞群体,大大增加了观察的分辨率和结果的可信程度。

本研究表明,原位杂交后的半薄切片清晰展示了贝壳发育细胞的形态。两种切片厚度呈现出的效果存在一定的差异,各有优劣。1 μm 切片下可以实现最高程度的分辨率,但由于切片过薄丢失了部分表达位置。此外,石鳖的细胞存在一定厚度,过薄的切片也会导致无法全面展示组织的结构。相比而言,3 μm 的切片能够全面展示出不同位置的阳性细胞,并且勾勒出 *engrailed* 表达区域的整体分布模式。虽然部分细胞的清晰度有所下降,但整体上达到了对相关结构的最佳识别和解读效果。

对相关细胞结构的观察表明,红条毛肤石鳖 48 hpf 幼虫中表达 *engrailed* 基因的细胞分布在同一水平线上,没有明显的凹陷现象(图 3b)。整体的 V 形排列模式以及不同细胞的重叠效应,可能是整装原位杂交时呈现高柱状信号的原因。此外,还清晰地发现 *engrailed* mRNA 在整个脊细胞中均有分布。而在 *L. caverna* 等种类的石鳖中, *engrailed* 阳性细胞具有不同的特征和排列方式^[12]。该研究发现, *L. caverna* 中表达 *engrailed* 的细胞位置深浅不一,该部位表现出明显的凹陷,且 *engrailed* mRNA 仅在脊细胞的基部分布^[12],与红条毛肤石鳖差别明显。目前尚无法确定这些不同的观察结果是由于物种本身的差别还是发育阶段的不同导致的。根据现有的贝壳形成理论,贝壳相关组织的内陷对贝壳物质的分泌和贝壳形成可能有重大的影响(如可能对于形成密封的钙化腔室有

关键作用)^[1, 11]。因此,后续研究中有必要继续关注不同石鳖种类贝壳发育细胞的差异。

多板纲在软体动物演化历史中占据重要的地位,探索其贝壳发育过程有重要的发育和演化生物学意义。目前对于多板纲贝壳发育的相关研究较少,且大部分重点关注成体贝壳^[28],对于早期贝壳发育这一复杂发育事件的研究还比较薄弱。与腹足类和双壳类不同^[3, 17, 19-20],石鳖背部细胞呈细长柱状^[27],且排列欠规则,对其开展观察存在较大难度。本研究通过调整实验策略,结合整装原位杂交和半薄切片实验方法,实现标记基因及观察细胞结构的目的。借助基因的标记作用,可以精准定位相关细胞,实现对细胞结构和排列模式的深入观察,有望在对石鳖贝壳早期发育机制的研究中发挥重要的支持作用。

参考文献:

- [1] CLARK M S, PECK L S, ARIVALAGAN J, et al. Deciphering mollusc shell production: the roles of genetic mechanisms through to ecology, aquaculture and biomimetics[J]. *Biological Reviews*, 2020, 95(6): 1812-1837.
- [2] MCDUGALL C, DEGNAN B M. The evolution of mollusc shells[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 2018, 7(3): 1-13.
- [3] JACKSON D J, DEGNAN B M. The importance of evo-devo to an integrated understanding of molluscan biomineralisation[J]. *Journal of Structural Biology*, 2016, 196(2): 67-74.
- [4] WANNINGER A, WOLLESEN T. The evolution of molluscs[J]. *Biological Reviews*, 2019, 94(1): 102-115.
- [5] HAAS W. Evolution of calcareous hardparts in primitive molluscs[J]. *Malacologia*, 1981, 21: 403-418.
- [6] VINTHER J. The origins of molluscs[J]. *Palaeontology*, 2015, 58(1): 19-34.
- [7] 张均龙, 徐凤山, 张素萍. 多板纲软体动物系统分类学研究进展[J]. *海洋科学*, 2013, 37(4): 111-117.
ZHANG Junlong, XU Fengshan, ZHANG Suping. Progress of the systematics of Polyplacophora (Mollusca)[J]. *Marine Sciences*, 2013, 37(4): 111-117.
- [8] 陈道海, 孙世春. 9 种石鳖壳板的形态研究[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2010, 40(6): 53-60.
CHEN Daohai, SUN Shichun. Observations on the shell plates of 9 chiton species (Polyplacophora)[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2010, 40(6): 53-60.
- [9] LEISE E M. Chiton integument: Metamorphic changes in *Mopalia muscosa* (Mollusca, Polyplacophora)[J]. *Zoomorphology*, 1984, 104(6): 337-343.

- [10] WANNINGER A, HASZPRUNAR G. Chiton myogenesis: Perspectives for the development and evolution of larval and adult muscle systems in molluscs[J]. *Journal of Morphology*, 2002, 251(2): 103-113.
- [11] KNIPRATH E. Ontogenetic plate and plate field development in two chitons, *Middendorffia* and *Ischnochiton*[J]. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, 1980, 189(2): 97-106.
- [12] JACOBS D K, WRAY C G, WEDEEN C J, et al. Molluscan *engrailed* expression, serial organization, and shell evolution[J]. *Evolution and Development*, 2000, 2(6): 340-347.
- [13] WANNINGER A, HASZPRUNAR G. The expression of an engrailed protein during embryonic shell formation of the tusk-shell, *Antalis entalis* (Mollusca, Scaphopoda)[J]. *Evolution and Development*, 2001, 3(5): 312-321.
- [14] NEDERBRAGT A J, VAN LOON A E, DICTUS W J A G. Expression of *Patella vulgata* orthologs of *engrailed* and *dpp-BMP2/4* in adjacent domains during molluscan shell development suggests a conserved compartment boundary mechanism[J]. *Developmental Biology*, 2002, 246(2): 341-355.
- [15] JACKSON D J, WÖRHEIDE G, DEGNAN B M. Dynamic expression of ancient and novel molluscan shell genes during ecological transitions[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, 7: 160.
- [16] SAMADI L, STEINER G. Involvement of Hox genes in shell morphogenesis in the encapsulated development of a top shell gastropod (*Gibbula varia* L.)[J]. *Development Genes and Evolution*, 2009, 219: 523-530.
- [17] HOHAGEN J, JACKSON D J. An ancient process in a modern mollusc: Early development of the shell in *Lymnaea stagnalis*[J]. *BMC Developmental Biology*, 2013, 13(1): 1-13.
- [18] HASHIMOTO N, KURITA Y, WADA H. Developmental role of *dpp* in the gastropod shell plate and co-option of the *dpp* signaling pathway in the evolution of the operculum[J]. *Developmental Biology*, 2012, 366(2): 367-373.
- [19] YANG W, HUAN P, LIU B. Early shell field morphogenesis of a patellogastropod mollusk predominantly relies on cell movement and F-actin dynamics[J]. *BMC Developmental Biology*, 2020, 20(1): 18.
- [20] LIU G, HUAN P, LIU B. Identification of three cell populations from the shell gland of a bivalve mollusc[J]. *Development Genes and Evolution*, 2020, 230(1): 39-45.
- [21] 李媛媛. 中国沿海红条毛肤石鳖(*Acanthochitona rubrolineatus*)系统地理学研究[D]. 烟台: 烟台大学, 2019.
- LI Yuanyuan. Phylogeography of *Acanthochitona rubrolineatus* along China Sea coast[D]. Yantai: Yantai University, 2019.
- [22] 王倩. 笠贝和石鳖 *Hox* 基因在早期发育中的表达规律研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2019.
- WANG Qian. A study of Hox gene expression patterns in limpet and chiton early development[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2019.
- [23] 杨伟红. 笠贝和石鳖贝壳形成区早期形态建成机制的初步研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2020.
- YANG Weihong. Early shell field morphogenesis in the Gastropoda *Lottia goshimai* and the Polyplacophora *Acanthochitona rubrolineata*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2020.
- [24] 王伟, 朱佩燕. 利用 Spurr 树脂包埋制备植物半薄切片方法研究[J]. *安徽农学通报*, 2014, 20(16): 16, 131.
- WANG Wei, ZHU Peiyan. Study on plant Spurr resin semithin section method[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2014, 20(16): 16, 131.
- [25] 崔新明, 李爽, 董超, 等. 不同包埋剂对半薄切片甲苯胺蓝染色效果的影响[J]. *电子显微学报*, 2018, 37(1): 91-93.
- CUI Xinming, LI Shuang, DONG Chao, et al. The effect of different embedding medium on the semi-thin section dyed with toluidine blue[J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2018, 37(1): 91-93.
- [26] 吴洪娟, 周力, 李桂芝, 等. 肥大细胞电镜半薄切片染色方法[J]. *电子显微学报*, 2012, 31(5): 452-454.
- WU Hongjuan, ZHOU Li, LI Guizhi, et al. Staining method of mast cell in semithin section[J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2012, 31(5): 452-454.
- [27] HUAN P, WANG Q, TAN S, et al. Dorsoventral decoupling of Hox gene expression underpins the diversification of molluscs[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117(1): 503-512.
- [28] CONNORS M J, KALLAI I, GAZIT D, et al. Three-dimensional structure of the shell plate assembly of the chiton *Tonicella marmorea* and its biomechanical consequences[J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2012, 52(sup. 1): E34-E34.

Investigation of chiton cells related to shell development through *in situ* hybridization combined with semithin sectioning

XIA Yuxiu^{1, 2}, HUAN Pin¹, LIU Baozhong¹

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Feb. 27, 2023

Key words: semithin sectioning; *in situ* hybridization; *Acanthochitona rubrolineata*; shell development

Abstract: Polyplacophoran mollusks (chiton) have eight serially arranged shell plates, which have important developmental and evolutionary implications and are considerably different from those in other molluscan lineages, such as gastropods and bivalves. Previous studies have revealed that shell-formation cells of *Acanthochitona rubrolineata* are irregularly arranged, making it difficult to discern single cells under ordinary microscopy. In this study, we initially investigated shell-formation tissues through *in situ* hybridization. *Engrailed*-positive cells were observed in the ridges of the central and marginal regions of the shell field. Expressions in the ridges exhibited a striped pattern, and the expression in the marginal region restricted the periphery of the shell field. However, the morphology and arrangement patterns of these cells could not be clearly discerned. Moreover, larval cells could be better recognized in semithin sections, which was still limited. Therefore, we combined semithin sectioning and *in situ* hybridization to further improve cellular resolution. Semithin sectioning of the larvae after *in situ* hybridization revealed intact tissue morphology with discernable cell outlines, and the *engrailed*-positive cells could be clearly distinguished. These cells had high nucleus-to-cytoplasm ratios and exhibited an overall V-shaped arrangement pattern. Additionally, the *engrailed*-positive cells in the central and marginal regions of the shell field exhibited different arrangement patterns and cell shapes. These results demonstrated that combining *in situ* hybridization and semithin sectioning could improve the resolution at the cellular level. Thus, the proposed strategy will help investigate the cellular mechanisms underlying chiton shell formation and the roles of shell-formation genes. Moreover, the proposed strategy can help further elucidate the origin and evolution of molluscan shells.

(本文编辑: 杨 悦)