

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.20.004

Rap1 基因在斑马鱼胚胎早期发育过程中的时空表达谱研究*

杨小燕¹,何志旭^{1,2△},舒莉萍^{2,3},金 皎¹,黄 璟¹,吴莎莎¹,马健娟¹

(1. 贵州医科大学附属医院儿科 550004; 2. 贵州医科大学组织工程与干细胞实验中心 550004;

3. 贵州医科大学免疫学教研室, 贵阳 550004)

[摘要] 目的 选择斑马鱼作为实验动物模型,研究 Rap1 基因在胚胎早期发育过程中的时空表达规律。方法 从斑马鱼胚胎 cDNA 中克隆 Rap1 基因片段,将 Rap1 基因片段和 pCS2+ 质粒进行体外连接重组,重组质粒经双酶切、菌落聚合酶链反应(PCR)及测序鉴定正确后,经 T3RNA 体外转录体系合成 DIG 标记的 Rap1 基因反义 mRNA 探针,采用整胚原位杂交方法检测 Rap1 在斑马鱼胚胎早期发育过程的表达情况。结果 在斑马鱼胚胎 0.75 hpf 的细胞分裂连接处、3.70 hpf 和 6.00 hpf 的动物极、12.00~72.00 hpf 的脊索神经部位均可见 Rap1 基因的阳性杂交信号。结论 Rap1 基因在斑马鱼脊索神经系统的早期发育过程中可能起到重要的调控作用。

[关键词] Rap1 基因;斑马鱼;原位杂交;基因表达**[中图分类号]** Q132.4**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)20-2748-04

Spatiotemporal expression spectrum of Rap1 gene in zebrafish early development process*

Yang Xiaoyan¹, He Zhixu^{1,2△}, Shu Liping^{2,3}, Jin Jiao¹, Huang Jing¹, Wu Sasa¹, Ma Jianjuan¹

(1. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2. Tissue Engineering and Stem Cell Research Center, Affiliated Hospital of Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550004, China;

3. Teaching and Researching Section of Immunology, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[Abstract] **Objective** To choose zebrafish as the experimental animal model for studying the spatiotemporal expression rule of rap1 gen in zebrafish embryo early development process. **Methods** The Rap1 gene fragment was cloned from the zebrafish embryo cDNA, then the Rap1 gene fragment and pCS2+ plasmid were performed the in vitro connection and recombination was extracted, the combinant plasmid was correct after the double enzyme digestion, colony PCR and sequencing identification. T3 RNA polymerase in vitro transcription system was used to obtain the digoxin(DIG)-labeled anti-sense mRNA probe of Rap1 gene. The whole mount in situ hybridization method was adopted to detect the Rap1 expression in zebrafish embryo early development process. **Results** The positive hybridization signal of Rap1 gene was detected at the cell division junction region of 0.75 hpf, animal pole of 3.70 hpf and 6.00 hpf, and notochord of 12.00—72.00 hpf. **Conclusion** Rap1 gene might be involved in the early development process of notochord nervous system in zebrafish.

[Key words] Rap1 gene; zebrafish; in situ hybridization; gene expression

Rap1 又称 Ras 相关 GTP 结合蛋白,是 Kitayama 在筛选 NIH/3 细胞中抑制 Ras 蛋白转化功能的蛋白分子过程中发现的。Rap1 的两个亚型: Rap1a 和 Rap1b 在氨基酸序列上具有超过 90% 的同源性,且与 Ras 蛋白有高度同源性。Rap1 和其他 G 蛋白一样,表现为无活性的 GDP 结合形式和有活性的 GTP 结合形式两种构象^[1-2]。最初的研究认为 Rap1 主要是通过直接与 Ras 的下游效应子相互作用来干扰 Ras 信号通路,但最近更多的研究结果表明 Rap1 是一个功能独立的信号通路,通过控制不同的信号通路参与调节细胞的粘连、细胞间连接形成、细胞极性和细胞的增殖与分化^[3-4]。目前,随着研究的进展,对 Rap1 基因的生物功能有了较为深入的认识,但 Rap1 基因在活体内的表达情况报道较少,本研究选择斑马鱼作为模式生物,通过克隆 Rap1 基因,采用全胚胎原位杂交技术(whole mount in situ hybridization, WISH)探求 Rap1 基因在野生型斑马鱼胚胎早期发育过程中的表达情况,进而为 Rap1 基因在野生型斑马鱼胚胎发育早期功能的研究建立一定的基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 本实验所选的野生型斑马鱼 Tuebingen 和

pCS2+ 质粒由上海生命科学院馈赠。斑马鱼养殖根据 Westerfield^[5] 描述的方法进行,水温 28.5℃,交替给予照明 14 h,黑暗 10 h,定时喂以饵料。直至雌、雄斑马鱼生殖功能发育成熟后,将雌、雄斑马鱼按 1:1 或 1:2 进行交配,次日清晨收集斑马鱼受精卵,斑马鱼胚胎的发育阶段按文献^[5]描述的形态特征区分。为了方便观察原位杂交结果,受精后超过 24 h 的胚胎给予 0.003% 苯硫脲(PTU)处理防止黑色素形成,收集后的胚胎经固定、脱水后保存于-20℃备用。

1.2 试剂 聚合酶链反应(PCR)引物(北京诺赛生物有限公司),质粒小抽试剂盒(Axygen 公司),限制性内切酶 ClaI 和 XbaI(Tiangen 公司),T3 酶(Ambion 公司),BCIP/NBT Alkaline phosphatase substrate kit IV (Vector Laboratories 公司),T4 连接酶(FBI 公司),Trizol(Invitrogen 公司),DIG RNA Labeling mix 和 Anti-digoxigenin AP-conjugate(Roche 公司),生物学显微镜(Nikon SMZ645),杂交炉(美国 UVP 公司 HL-2000),紫光分光光度计(岛津 UV1700),LRH 系列生化培养箱(上海一恒科技有限公司)。

1.3 克隆斑马鱼 Rap1 基因 根据斑马鱼 cDNA 文库中 Rap1

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(30960412);贵州省科技基础条件平台项目([2009]4005);贵州省优秀教育人才省长专项资金(\$2008-4)。作者简介:杨小燕(1986—),主治医师,硕士,主要从事小儿血液系统方面的研究。△ 通讯作者,E-mail:hzxmedical@163.com。

基因组序列,用 Premier5.0 软件设计引物,正向引物序列: CCA TCG ATA TGC GTG AAT ACA AGT TAG;反向序列引物:GCT CTA GAT TTC ACC CGC AGA ATT TG,同时引入 ClaI、XbaI 酶切位点及保护碱基。以收集 0.75~72.00 hpf 多个时相的 Tuebingen 野生型斑马鱼胚胎提取的总 RNA 逆转录得到的 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增,条件为:40 °C 30 min,30 个循环(94 °C 8 min,94 °C 30 s;55 °C 30 s,72 °C 1 min),最后 72 °C 10 min,PCR 产物大小为 321 bp,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4 pCS2+-Rap1 重组质粒的构建 pCS2+质粒利用钙转法转入 Ecoli DH5 α 感受态菌中,通过氨苄抗性筛选出阳性克隆,扩增后运用碱裂解法提取 pCS2+质粒 DNA,用 ClaI 和 XbaI 双酶切 pCS2+质粒,1%琼脂糖凝胶电泳后割胶回收。将 Rap1 基因的 PCR 产物用 ClaI 和 XbaI 双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳后割胶回收,将上述割胶回收产物在 T4 酶的作用下相连接,将连接产物运用钙转法转入 Ecoli DH5 α 感受态菌中,经氨苄抗性筛选出阳性克隆并扩增后,运用碱裂解法提取 pCS2+-Rap1 重组质粒。

1.5 pCS2+-Rap1 重组质粒的鉴定 (1)双酶切鉴定:用 ClaI 和 XbaI 双酶切 pCS2+-Rap1 重组质粒,通过 1%琼脂糖凝胶电泳判断酶切产物大小;(2)菌落 PCR 鉴定:pCS2+-Rap1b 重组质粒,通过 1%琼脂糖凝胶电泳判断扩增产物大小;(3)序列测定鉴定:将重组质粒送至北京赛诺生物技术公司测序鉴定。

1.6 地高辛标记的 Rap1 基因反义 mRNA 的制备 将 pCS2+-Rap1 重组质粒用 ClaI 进行单酶切,经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定后,用 DNA 纯化试剂盒割胶回收得到线性化的 pCS2+-Rap1 重组质粒。利用 T3 体外转录体系,以线性化的 pCS2+-Rap1 重组质粒 DNA 为模板,以地高辛标记的寡核苷酸为原料,经体外转录得到地高辛标记的 Rap1 反义 mRNA 探针后,用 NucAwayIM Spin Columns 纯化吸附柱回收 Rap1 反义 mRNA 探针,经 2%琼脂糖凝胶电泳鉴定后于 -70 °C 保存备用。

1.7 斑马鱼全时相胚胎原位杂交(WISH) 原位杂交按照 Kyryachenko 等^[6]的方法进行,收集 Tuebingen 野生型斑马鱼(0.75、3.70、6.00、12.00、18.00、24.00、36.00、48.00、72.00 hpf)9 个时相点的胚胎各 20 枚,多聚甲醛固定胚胎,甲醛梯度脱水后 -20 °C 保存备用、第 1 天在室温下用 1 \times PBST 洗去多余甲醛溶液,将胚胎移入 68 °C 杂交炉中预杂交 1 h,然后加入 Rap1 基因反义 mRNA 探针后 68 °C 杂交过夜。第 2 天洗去多余的探针后,加入 anti-GIG-AP 与 Rap1 基因反义 mRNA 探针结合过夜。第 3 天用 1 \times PBST 洗去未结合的抗体,再加入 BCIP/NBT 溶液显色,在体视显微镜下观察并记录结果后,用固定液对杂交胚胎进行再固定并且照相。

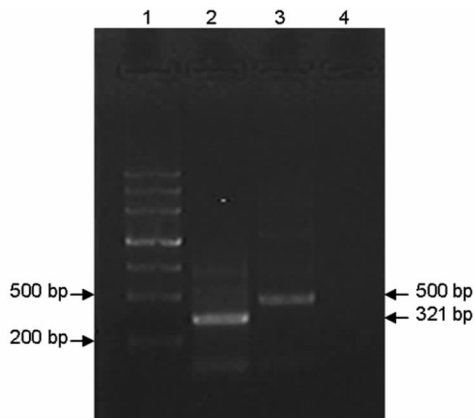
2 结果

2.1 Rap1 基因 RT-PCR 扩增结果 在图 1 中于第 2 泳道位 200~500 bp 可见一特异性扩增条带,大小与预期 321 bp 相符;同时,第 3 泳道 500 bp 处可见一条带,为内参 GAPDH 的 PCR 产物,大小与预期结果相符。

2.2 pCS2+-Rap1 重组质粒酶切鉴定结果 将 pCS2+-Rap1 重组质粒及 pCS2+质粒用 ClaI 和 XbaI 双酶切,结果显示:第 2 泳道为重组质粒双酶切后得到的 Rap1 基因片段,与 PCR 产物大小一致,而双酶切后得到的载体 DNA 片段与第 3 泳道载体双酶切片段大小一致,见图 2。

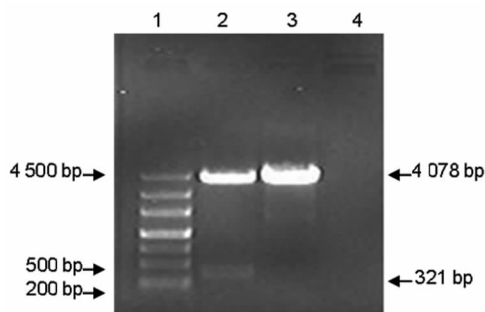
2.3 pCS2+-Rap1 重组质粒菌液 PCR 鉴定结果 以重组质粒菌液作为模板进行 PCR 扩增,经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果显示,200~500 bp 可见一特异性 PCR 片段,大小与预期

结果相符,见图 3。



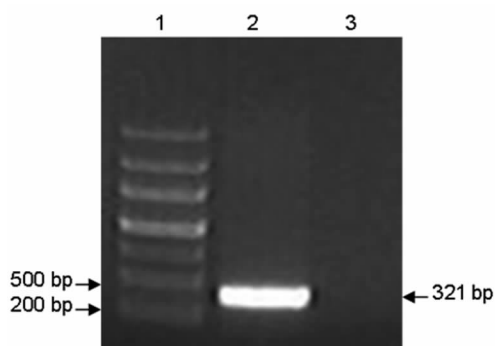
1:DNA Marker III;2:Rap1 PCR 产物;3:GAPDH PCR 产物;4:空白对照。

图 1 Rap1 基因 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果



1:DNA Marker III;2:pCS2+-Rap1 重组质粒;3:pCS2+;4:空白对照。

图 2 pCS2+-Rap1 重组质粒与 pCS2+载体质粒 ClaI 和 XbaI 双酶切结果



1:DNA Marker III;2:Rap1 PCR 产物;3:空白对照。

图 3 pCS2+-Rap1 重组质粒菌液 PCR 结果

2.4 pCS2+-Rap1 重组质粒测序结果 在 Genbank 中比对后显示,测序结果与 Rap1 基因一致,见图 4。

2.5 Rap1 基因在野生型斑马鱼胚胎中的表达情况 全胚胎原位杂交结果表明,在 Tuebingen 野生型斑马鱼胚胎 0.75~72.00 hpf 发育过程中均可检测到 Rap1 基因表达信号,但表达部位不同。Rap1 在受精后 0.75 hpf 集中出现在细胞分裂连接处,3.70 hpf 和 6.00 hpf 普遍性表达,斑马鱼体节形成期 12.00 hpf 开始特异性表达于胚胎脊索部位,表达逐渐增强,30.00 hpf 达高峰,之后 Rap1 在斑马鱼胚胎脊索部位表达信号逐渐减弱,一直持续至 72.00 hpf,见图 5。

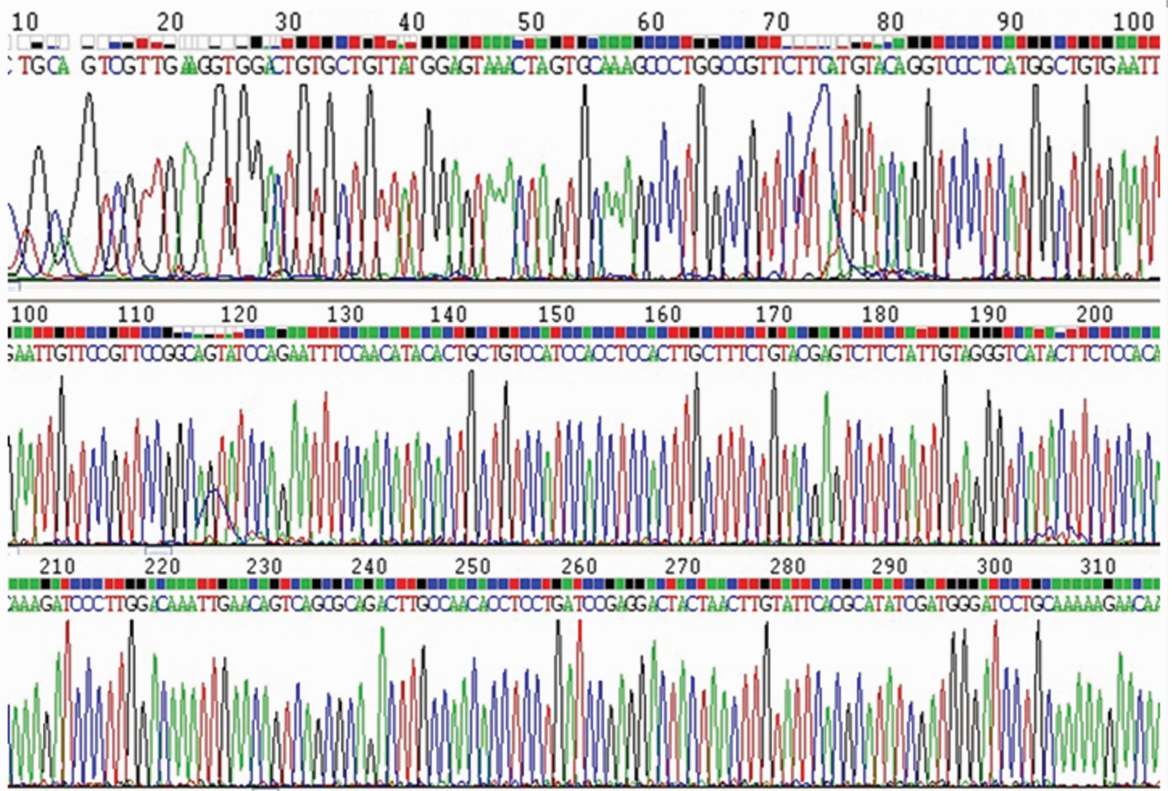


图 4 pCS2+-Rap1 重组质粒测序结果

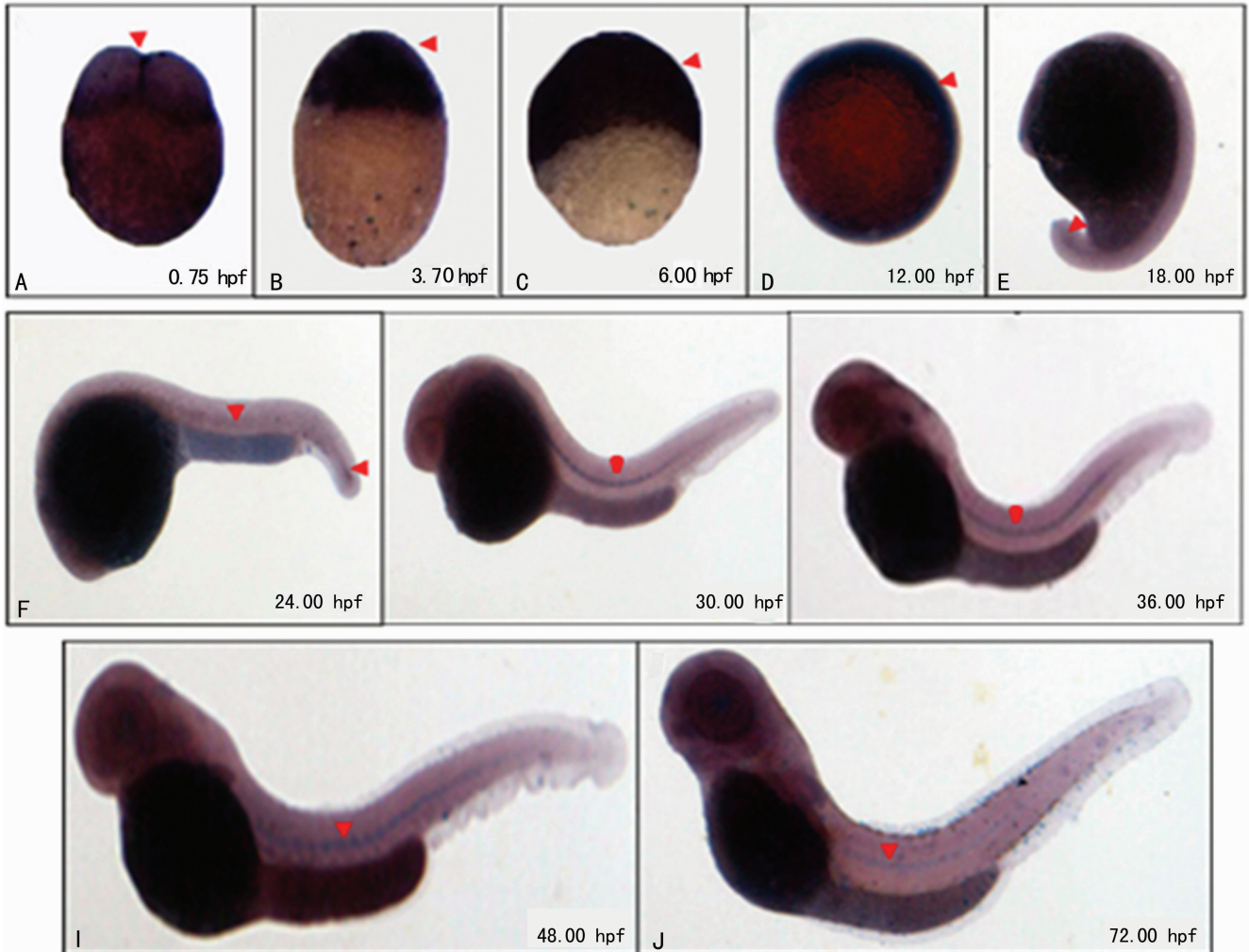


图 5 Rap1 基因在野生型斑马鱼早期发育过程中的表达情况

3 讨 论

斑马鱼作为一种新兴的模式生物是研究基因功能的有效载体,全基因组测序已完成,其与哺乳动物在分子途径调控上高度保守。另外,与其他模式生物相比,斑马鱼是体外受精和发育,体积小,生殖周期短,生殖能力强,胚胎发育快且胚体透明,可以高效、连续和动态观察胚胎的发育^[7-9]。WISH 可以从整体水平反映胚胎发育过程中基因表达的时空顺序,常被广泛应用于胚胎发育调控基因表达的研究^[10]。通过对斑马鱼胚胎进行原位杂交,可以从三维、立体角度观察 Rap1 基因在斑马鱼胚胎体内的表达情况,这将为进一步研究 Rap1 基因的分子调控机制提供一定的理论基础。

Rap1 基因属于 Ras 超家族的小 GTP 结合蛋白之一。Rap1 被激活之后,通过调节下游效应分子将信号传导入细胞核内,参与一系列生物学活动^[11-12]。研究表明,Rap1 调节细胞间黏附,影响细胞间黏附连接的定位和完整性^[13-14]。Rap1GEFs,如 PDZ-GEF 和 C3G,直接连在 E-钙黏蛋白或其他连接蛋白上,影响细胞的连接功能^[15];此外,Rap1 在细胞连接处累积,如 Rap1 的效应分子 fadin/AF6 和某些调控肌动蛋白骨架的蛋白,都是连接蛋白^[16-17]。本研究结果发现 Rap1 在胚胎细胞分裂连接处有 Rap1 表达信号,从体内试验证实了 Rap1 基因在细胞黏附连接形成位点局部可能发挥着重要作用。

细胞的极性是多数细胞的共同特征,是细胞分化和细胞行使正常功能的基础,细胞极性的建立对于生物体的生长发育至关重要。研究显示,Rap1 参与了果蝇胚胎细胞极性的建立,并起到关键作用^[18-19]。本研究发现 Rap1 基因在胚胎发育早期动物极广泛表达,可见 Rap1 基因为母源性表达基因,其在胚胎早期生长发育过程中起着重要作用。此外,从斑马鱼受精后 12.00 hpf 体节形成开始至 72.00 hpf,在斑马鱼胚胎脊索均可见 Rap1 表达,表达信号随着体节生长发育逐渐增强,于 30.00 hpf 达高峰,48.00 hpf 表达信号减弱,持续至 72.00 hpf。El-Kadi 等^[20]在爪蟾的研究中发现,Rap1 在神经板(背部外胚层)、神经管等神经系统高表达。结合本研究结果,提示在脊椎动物,Rap1 在神经系统的表达模式具有高度保守性,并且可能参与调控斑马鱼胚胎脊索神经系统的早期发育过程。

参考文献

- [1] 赵春艳,赵宝昌.小分子 G 蛋白 Rap1 介导的细胞信号传导通路[J].国际检验医学杂志,2006,27(12):1132-1133.
- [2] 易萍,李晓辉.G 蛋白 Rap1 活化新机制:GEFs 研究进展[J].国外医学:分子生物学分册,2000,21(5):293-296.
- [3] Kooistra MR,Dubé N,Bos JL.Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation[J].J Cell Sci,2007,120(Pt 1):17-22.
- [4] Philip J,Stork S,Dillon TJ.Multiple roles of Rap1 in hematopoietic cells; complementary versus antagonistic functions[J].Blood,2005,106(9):2952-2960.
- [5] Westerfield M.The zebrafish book:a guide for the laboratory use of zebrafish(danio rerio) [M].5th ed.Eugene: Univ of Oregon Press,2007:231-236.
- [6] Kyryachenko S,Kyrylkova K,Leid M,et al.Determination of gene expression patterns by whole-mount in situ

hybridization[J].Methods Mol Biol,2012,887(25):15-22.

- [7] Driever W,Stemple D,Schier A,et al.Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development [J].Trends Genet,1994,10(5):152-159.
- [8] Howe K,Clark MD,Torroja CF,et al.The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J].Nature,2013,496(7446):498-503.
- [9] Vacaru AM,Unlu G,Spitzner M,et al.In vivo cell biology in zebrafish - providing insights into vertebrate development and disease[J].J Cell Sci,2014,127(Pt 3):485-495.
- [10] Hargrave M,Koopman P.In situ hybridization of whole-mount embryos[J].Methods Mol Biol,2000(123):279-289.
- [11] Stork PJ,Dillon TJ.Multiple roles of Rap1 in hematopoietic cells: complementary versus antagonistic functions [J].Blood,2005,106(9):2952-2961.
- [12] Caron E.Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein;a pattern emerges[J].J Cell Sci,2003,116(Pt 3):435-440.
- [13] Bos JL,De Bruyn K,Enserink J,et al.The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion[J].Biochem Soc Trans,2003,31(Pt 1):83-86.
- [14] Bos JL,de rooij J and reedquist KA.rap1 signalling: adhering to new models[J].Nat Rev Mol Cell Biol,2001,2(5):369-377.
- [15] Hogan C,Serpente N,Cogram P,et al.Rap1 regulates the formation of E-cadherin-based cell-cell contacts[J].Mol Cell Biol,2004,24(15):6690-6700.
- [16] Boettner B,Govek EE,Cross J,et al.The junctional multidomain protein AF-6 is a binding partner of the Rap1A GTPase and associates with the actin cytoskeletal regulator profilin[J].Proc Natl Acad Sci U S A,2000,97(16):9064-9069.
- [17] Ebnet K,Schulz CU,Meyer Zu Brickwedde MK,et al.Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1 [J].J Biol Chem,2000,275(36):27979-27988.
- [18] Choi W,Harris NJ,Sumigray KD,et al.Rap1 and canoe/afadin are essential for establishment of apical-basal polarity in the drosophila embryo[J].Mol Biol Cell,2013,24(7):945-963.
- [19] O'keefe DD,Gonzalez-Niko E,Burnett M,et al.Rap1 maintains adhesion between cells to affect Egfr signaling and planar cell polarity in Drosophila[J].Dev Biol,2009,333(1):143-160.
- [20] El-Kadi EA,Durston A.The small GTPase Rap1 is an immediate downstream target for Hoxb4 transcriptional regulation[J].Mech Dev,2002,113(2):131-139.