band3 基因在斑马鱼早期胚胎中的表达*

庹媛媛[1]，尚鲁俊[2]，夏海雄[3]，何志旭[1,4**]，舒莉萍[2,3,4**]
(1. 贵州医科大学 儿科教研室，贵州 贵阳 550004；2. 贵州医科大学 免疫学教研室，贵州 贵阳 550004；3. 贵州医科大学 实验动物中心，贵州 贵阳 550004；4. 贵州医科大学 组织工程与干细胞实验中心，贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的**：用 *band3* 基因的反义 mRNA 探针进行斑马鱼全胚胎原位杂交，检测 *band3* 基因在野生型 Tüebingen 斑马鱼胚胎发育过程中的表达。**方法**：Trizol 法提取斑马鱼胚胎总 RNA 并设计特异性引物，采用 RT-PCR 法扩增 *band3* 基因 cDNA 编码区片段；通过基因重组技术构建 PBSK-*band3* 重组质粒，用 BamH Ⅰ 酶切得到线性化 PBSK-*band3*；以 T7 RNA 聚合酶转录合成反义地高辛标记的 *band3* RNA 探针，用全胚胎原位杂交法检测 *band3* 基因在斑马鱼胚胎早期的表达情况。**结果**：成功克隆 *band3* 基因片段，构建 PBSK-*band3* 重组质粒；经体外转录获得地高辛标记的反义 *band3* mRNA 探针，原位杂交后检测证实 *band3* 基因在斑马鱼胚胎早期发育过程中间细胞群(ICM)和主动脉性腺中肾区(AGM)呈现高表达。**结论**：地高辛标记的反义 *band3* mRNA 探针可检测到斑马鱼胚胎中 *band3* 基因的定位表达。

[关键词] 斑马鱼；胚胎；band3；全胚胎原位杂交；探针
[中图分类号] R321－33 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2016)07-0760-05
DOI：10. 19367/j. cnki. 1000-2707. 2016. 07. 004

Expression Pattern of *Band3* during Zebrafish Early Development

TUO Yuanyuan[1], SHANG Lujun[2], XIA Haixiong[2], HE Zhixu[1,3], SHU Liping[2,3,4]
(*1. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Guizhou Medcial University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Immunology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Laboratory Animal Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Tissue Engineering and Stem Cell Research Center, Guizhou Medcial University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

[**Abstract**] **Objective**: The antisense mRNA probe of *band3* gene was adopted to conduct Zebrafish whole embryos mount in situ hybridization to detect the expression of *band3* gene in wild-type TÜebingen zebrafish embryonic development. **Method**: Zebrafish embryo total RNA was extracted by Trizol, specific primers was designed and the cDNA coding region fragment *band3* was amplified by RT-PCR. The recombinant PBSK/*band3* plasmids was constructed by recombination technique and linearized with BamH I enzyme digestion. T7 RNA polymerase was adopted to synthesize antisense *band3* RNA probes labeled by digoxigenin. Zebrafish whole embryos mount in situ hybridization was adopted to detect *band3* gene expression in early zebrafish embryos. **Results**: The *band3* gene fragments were cloned and PBSK/*band3* recombinant plasmid was constructed successfully. The digoxigenin-labeled antisense *band3* probe was obtained in vitro transcription. After mount in situ hybridization, it was observed that *band3* gene was highly expressed in the middle cell population (ICM) and the renal region (AGM) of the aorta gonad in the early embryonic development of zebrafish. **Conclusion**: In this study, we prepare the antisense mRNA *band3* probe labeled with digoxigenin and detect the expression of *band3* gene in zebrafish embryos.

[**Key words**] zebrafish; embryo; *band3*; whole embryo mount in situ hybridization; probe

*[基金项目]国家自然科学基金(31260284；31360285)；贵州省科技基础条件平台项目[(2009)4005]；贵州省优秀科技省长专项基金(S2008－4)
**通信作者 E-mail：gyslp－456@163. com；hzx@gmc. edu. cn
网络出版时间：2016－07－17 网络出版地址：http://www. cnki. net/kcms/detail/52. 5012. R. 20160717. 1318. 052. html

band3(ae1; slc4a1)编码的蛋白是表达在红细胞膜上的主要蛋白质,这种蛋白质是红细胞膜上的阴离子 HCO_3^- 和 Cl^- 通道蛋白,也是 Ser/Thr 激酶的主要底物[1-3]。Band3 蛋白由 3 个亚基组成 1 个是跨膜区进行氯乙烯/碳酸氢盐交换,1 个是胞质 C-末端结构域和 1 个胞质 N-末端结构域。Band3 蛋白的胞质 C-末端结构域可以结合碳酸酐酶 II(CAII),形成一个代谢通道输送 HCO_3^-;Band3 蛋白的胞质 N-末端结构域与糖酵解酶、血红蛋白(Hb)及高铁血色原相互作用,维持红细胞的携氧功能以及形状[4]。已有研究发现,小鼠 band3 缺乏会导致异常红系造血,严重的溶血性贫血或早死。但是牛或斑马鱼则可以更好地耐受红细胞 band3 的缺乏[5-6]。本研究通过克隆野生型斑马鱼中的 *band3* 基因片段,并且利用基因重组技术构建 PBSK-*band3*,单酶切线性化质粒,通过 T7 RNA 聚合酶制备地高辛标记的反义 *band3* mRNA 探针,检测 *band3* 基因在斑马鱼胚胎早期的定位表达情况。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　野生型 Tüebingen 斑马鱼品系由上海生命科学院健康研究所刘廷析研究员馈赠,本实验室繁殖培育。养殖条件:(28 ± 2)℃,带有过滤系统的循环水系统养殖,12 h/d 光照,予以草履虫及虾卵饲养[7]。

1.1.2　主要实验试剂　大肠杆菌 Elico 如 DH5α 由本课题组保存,PBSK 质粒载体由上海生命科学院健康研究所刘廷析馈赠,Trizol 试剂、逆转录试剂 First. strand plus 购自 Invitrogen 公司,高保真 KOD-Plus PCR 酶购自 TOYOBO 公司,限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I、T4 DNA 连接酶以及 DNA Marker 均购自 Fermentas 公司,质粒小抽试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,地高辛 RNA 标记和检测试剂盒以及 NucAwaylM Spin Columns 购自 Ambion 公司,BCIP/NBT 购自 VECTORLab。测序由北京诺赛公司进行。

1.1.3　引物　根据 Genbank 数据库提供的斑马鱼 *band3* 基因全长。用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性扩增编码区片段的 PCR 引物。PCR 引物由京诺赛生物科技有限公司合成。上游引物 P1 为 5′-CGCGGATCCATTAAACGCCGCTACAAGCATTACC-3′,下游引物 P2 为 5′ -CCGGAATTCGACGATCAGC-CACATGCCCAC-3′;上游引物在起始密码 ATG 前下游引物在终止密码 TAA 前分别加入 EcoRI 和 BamHI 酶切位点。

1.2　方法

1.2.1　斑马鱼胚胎总 RNA 提取　取斑马鱼胚胎,选取受精后 0、18、24、36、48、72、96 和 120 h(hour post fertilization,hpf)的斑马鱼胚胎,各 20 枚,加入 0.15 mL TRlzol 试剂,充分匀浆。将斑马鱼 8 个时相胚胎的 TRlzol 匀浆室温放置 5 min,4 ℃,12 000 r/min 离心 10 min 后将匀浆并成 1 管,室温放置 5 min,然后每毫升 TRIzol 试剂加入 0.2 mL 氯仿。剧烈振荡 15 s,室温放置 2 min。4 ℃,12 000 r/min 离心 15 min。转移上层水相至新的离心管中。加入 0.5 mL 的预冷的异丙醇,室温放置 15 min 沉淀 RNA。4 ℃,12 000 r/min 离心 10 min。弃上清。加入 1 mL 75% 的乙醇。充分洗涤沉淀,4 ℃,12 000 r/min离心 10 min。弃上清,加入 1 mL 预冷的 75% DEPC 无水乙醇,4 ℃,750 g/min 离心 5 min,弃上清。加入 1 mL 预冷的 75% DEPC 无水乙醇,4 ℃,750 g/min 离心 5 min,弃上清。4 ℃,750 g/min 离心 5 min。弃多余的上清液。置空气中干燥(5 ~ 10 min),沉淀溶于 DEPC 水中。

1.2.2　扩增 *band3* 片段　参考 Thermo 试剂盒说明,将总 RNA 逆转录生成 cDNA,以此 cDNA 第一链作为模板. 进行 PCR 扩增。PCR 反应程序:95 ℃ 8 min(95 ℃ 40 s、56.4 ℃ 30 s、68 ℃ 30 s),35 个循环,68 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测,按北京天根生化科技有限公司的割胶回收试剂盒说明书操作回收 300 bp 左右的目的条带。

1.2.3　*band3* 表达载体构建及鉴定　将割胶回收的 *band3* PCR 产物和 PBSK 载体分别用 EcoRI 和 BamHI 酶酶切。通过 T4 连接酶将 *band3* 和 PBSK 载体连接重组,并送往北京赛诺公司进行测序鉴定。将测序正确的 PBSK-*band3* 重组质粒转化入 DH5α 宿主菌。经单克筛选后挑取单克隆,并提取质粒用 EcoRI、BamH I 进行双酶切鉴定。见图 1。

1.2.4　地高辛标记的 *band3* 基因反义 mRNA 的制备　将经测序和酶切鉴定正确的 PBSK-band3 重组质粒经 BamHI 酶酶切线性化之后,通过 T7 反义逆转录聚合酶制备反义 *band3* 基因反义 mRNA 探针。用 NucAwaylM Spin Columns 纯化吸附柱回收 Band3 反义 mRNA 探针,经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后于 -70 ℃保存备用。

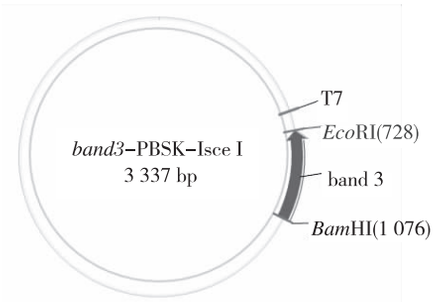


图 1　构建 PBSK-*band3* 重组质粒示意图

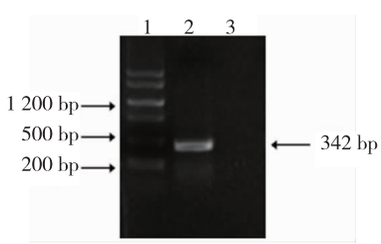
Fig. 1　Schematic diagram of PBSK-*band3* recombinant plasmid

1.2.5　斑马鱼全胚胎原位杂交(whole mount in situ hybridization,WISH)　收集 Tuebingen 野生型斑马鱼受精后 0.75、3.75、6、9、12、18 、24、30、36、48 和 72 hpf 共 11 个不同时相的胚胎,用 3% 多聚甲醛固定。用 1×PBST 溶液洗去多聚甲醛,用甲醇进行梯度脱水后,将胚胎置于 68 ℃杂交炉中进行预杂交 1 h,加入制备好的地高辛标记的 band3 反义 mRNA 探针,于 68 ℃杂交炉中过夜,用不同浓度的 SSCT 将多余的探针洗去,加入地高辛抗体后过夜,用 MABT 将多余的抗体洗掉,加入 BCIP/NBT 染液对杂交胚胎进行染色,体视显微镜下观察并记录,用固定液对杂交胚胎进行再固定并且照相。

2　结果

2.1　*band3* 基因扩增

可见到一特异性扩增带,位于 200 ~ 500 bp,大小与预期的 342 bp 相符,见图 2。



注:1 为 DNA Maker,2 为 *band3* PCR 产物,3 为空白对照

图 2　*band3* 基因扩增

Fig. 2　*hoxd3* gene amplification

2.2　PBSK-*band3* 重组质粒酶切鉴定与测序

用 EcoR I 和 Xba I 双酶切得到的 *band3* 基因片段约 300 bp,与 RT-PCR 产物大小一致;另外,得到的另 1 个 DNA 片段约 3 000 bp,与 PBSK 质粒大小一致。PBSK-*band3* 重组质粒测序与 *band3* 基因完全一致。见图 3、图 4。

2.3　地高辛标记的 *band3* 反义 mRNA 探针的制备

将经 BamH I 单酶切的 PBSK-*band3* 重组质粒经地高辛标记后经 T7 逆转录成功制备反义 mRNA 探针,见图 5。

2.4　斑马鱼全胚胎原位杂交结果

Tuebingen 野生型斑马鱼 18 ~ 24 hpf 胚胎的中中间细胞区(ICM,蓝色箭头所示),30 ~ 48 hpf 主动脉性腺中肾区(AGM,红色箭头所示)有蓝黑色阳性杂交信号 *band3* 基因的表达。见图 6。

3　讨论

本实验利用斑马鱼这种模式生物研究 *band3* 基因,斑马鱼具有体积小,繁殖迅速,胚胎透明,可以实现目的基因的可失踪观察等生物学特点,是作为研究血液疾病研究的理想模式生物[8]。

WISH 可以整体水平反映特定基因在胚胎发育过程中的时空表达情况,是研究胚胎发育过程中调控基因表达的常用技术。该技术成熟,地高辛所标记的探针具有较高灵敏度[9-10],本实验通过设计斑马鱼 *band3* 基因片段的引物,提取斑马鱼胚胎总 RNA,成功通过 RT-PCR 扩增出 band3 基因片段,将扩增的 *band3* 基因片段通过 T4 DNA 连接酶与载体 PBSK 质粒进行定向重组,得到 PBSK-*band3* 重组质粒,经过双酶切以及序列测定确定 PBSK-band3 重组质粒构建成功,并在此基础上以 PBSK-*band3* 重组质粒为模板进行 T7 体外转录,得到了片段为 200 bp ~ 500 bp 的地高辛标记的 *band3* 反义 mRNA 探针,并进行斑马鱼全胚胎原位杂交技术观察 *band3* 反义 mRNA 探针在 Tuebingen 野生型斑马鱼胚胎早期发育过程中的时空表达情况。

band3 基因表达的蛋白是红细胞膜上主要的蛋白,由 3 个亚基组成。是红细胞膜阴离子通道蛋白,也是 Ser/Thr 激酶的主要底物。本研究发现,*band3* 基因在肾脏 α-闰细胞和在心肌细胞中有所表达,说明 *band3* 基因与红系造血有关,其作用可能是助于红细胞提高二氧化碳的运输和维持形状。在某些导致红细胞破坏的疾病中,如地中海贫血、遗传性球形红细胞增多症、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症等[11-12]。Band3 蛋白发生磷酸化的结构变化,破坏整个红细胞膜的蛋白结构,影响红细胞的脆性和变形能力,从而发生一系列病理反应。今后



图 3　PBSK-*band3* 重组质粒测序

Fig. 3　PBSK-*band3* recombinant plasmid sequencing

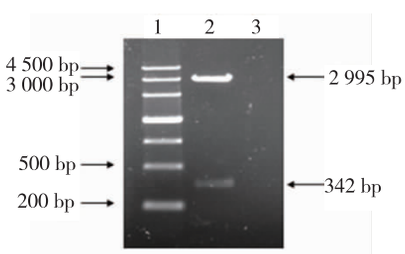
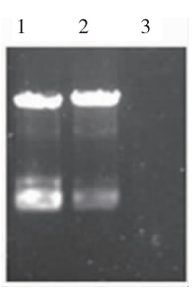


图 4　PBSK-*band3* 质粒的双酶切结果

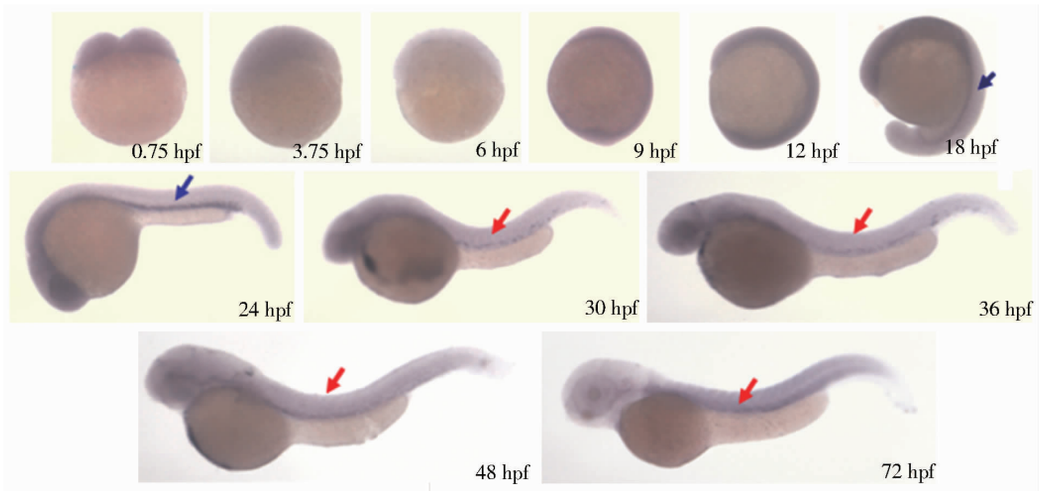
Fig. 4　Results of double enzyme digestion of PBSK-*band3* plasmid



注:1、2 为反义 *band3* mRNA

图 5　地高辛标记的反义 *band3* mRNA

Fig. 5　Digoxigenin-labeled antisense *band3* mRNA



注:蓝色箭头所示 ICM,红色箭头所示 AGM

图 6　*band3* 基因在野生型 Tuebingen 斑马鱼全胚胎中的表达

Fig. 6　Expression of *band*3 gene in wild-type TÜebingen zebrafish embryo

可以进一步研究 band3 的表达对红细胞膜结构的影响。

4　参考文献

[1] Damien BR, Bernard P, Franck B, et al. Band 3 missense mutations and stomatocytosis: insight into the molecular mechanism responsible for monovalent cation leak[J]. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Cell Biology, 2011:136802.

[2] Achille I, Luigia De Falco, Franck B. A novel erythroid anion exchange variant (Gly796Arg) of hereditary stomatocytosis associated with dyserythropoiesis[J]. Haematologica, 2009(8):1049 – 1059.

[3] Reithmeier RA, Casey JR, Kalli AC, et al. Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context[J]. Biochim Biophys Acta, 2016(7):1507 – 32.

[4] Gayani C, Kodippili, Spector J, et al. Imaging of the diffusion of single band 3 molecules on normal and mutant erythrocytes[J]. Blood, 2009(113): 6237 – 6245.

[5] Southgate CD, Chishti AH, Mitchell B, et al. Targeted disruption of the murine erythroid band 3 gene results in spherocytosis and severe haemolytic anaemia despite a normal membrane skeleton[J]. Nature Genetics, 1996(2):227 – 230.

[6] Ribeiro ML, Alloisio N, Almeida H, et al. Severe hereditaryspherocytosis and distal renal tubular acidosis associated with the total absence of band 3[J]. Blood, 2000(4): 1602 – 1604.

[7] 舒莉萍,何志旭,姚冬静,等. 野生型斑马鱼胚胎中 hoxd3 基因 mRNA 的表达谱[J]. 浙江大学学报, 2012(1):69 – 74.

[8] Jill LO, de J, Leonard IZ. Use of the Zebrafish System to Study Primitive andDefinitive Hematopoiesis. Annu[J]. Rev Genet, 2005(39):481 – 501.

[9] Shu LP, Zhou ZW, Zhou T, et al. Ectopic expression of Hoxb4a in hemangioblasts promotes hematopoietic development in early embryogenesis of zebrafish[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2015(11):1275 – 1286

[10] He ZX, Shu LP, Yang XY, et al. The role of rap1b in Hoxb4 Transgenic Zebrafish Line[J]. Blood, 2011(21): 3413.

[11] Lesley JB, Roland BM. Leticia Ribeiro. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane[J]. Blood, 2003(101):4180 – 4188.

[12] Emanuela F, Katie G, Antonella P. Regulation of membrane-cytoskeletal interactions by tyrosine[J]. Blood, 2011(117): 5998 – 6006.

(2016-05-03 收稿,2016-06-26 修回)

中文编辑: 文箐颖; 英文编辑: 刘　华