

鹌鹑 *gcl* 基因 BTB/POZ 结构域编码序列的克隆及组织中的表达

王焕楠 邓凤姣* 郑文萱

(武汉大学生命科学院 发育生物学教育部重点实验室 武汉 430072)

摘要：Germ cell-less(GCL)是与原始生殖细胞发生相关的重要因子,果蝇、斑马鱼、青鳞鱼和小鼠的 GCL 蛋白都含有一个进化上保守的 BTB/POZ 结构域。本研究应用简并 PCR 克隆技术,在鹌鹑(*Coturnix coturnix*)中扩增得到 319 bp 的 *gcl* 基因(包含 BTB/POZ 结构域编码序列)保守序列。通过与线虫、果蝇、斑马鱼、小鼠和人 *gcl* 同源序列的比对,发现该片段与它们的同源性分别为 52.4%、55.4%、84.6%、79.6% 和 76.8%。采用 RT-PCR 和 mRNA 整体原位杂交方法,研究了 *gcl* 基因在不同组织和原条期胚胎中的表达。结果显示,该基因在卵巢、精巢和肝中表达;*gcl* mRNA 存在于原条期胚胎的生殖新月区。

关键词：Germ cell-less ; 原始生殖细胞 ; BTB/POZ ; 鹌鹑

中图分类号：Q785 **文献标识码：**A **文章编号：**0250-3263(2007)02-27-05

Cloning and Expression of Quail *gcl* BTB/POZ Domain Coding Sequence

WANG Huan-Nan DENG Feng-Jiao* ZHENG Wen-Xuan

(Key Laboratory of MOE for Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract Germ cell-less (GCL) plays an essential role in the formation of primordial germ cells. An evolutionally conserved domain, BTB/POZ domain, was found in the GCL homologue proteins of *Drosophila*, zebrafish, medaka and mouse. A *gcl* conserved sequence of 319 bp, which contained BTB/POZ domain coding sequence, was isolated from Quail (*Coturnix coturnix*) genome DNA using the BTB degenerated primers. The conserved sequence of Quail *gcl* showed 52.4%, 55.4%, 84.6%, 79.6% and 76.8% identity to *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, zebrafish, mouse and human *gcl* homologous fragment respectively. RT-PCR revealed its expression in ovary, testis and liver. By whole-mount *in situ* hybridization, *gcl* mRNA was detected in the germinal crescent of primitive streak stage in Quail embryo.

Key words Germ cell-less ; PGCs ; BTB/POZ ; Quail

所有有性繁殖的高等生物,由生殖细胞分化产生配子,雌、雄配子结合形成合子。原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)是生殖细胞的前体细胞,在胚胎发育过程中繁殖,并逐渐迁移到生殖嵴中,最终分化成为精子或卵子^[1,2]。鸟类 PGCs 起源于 X 期的胚盘上胚层,而后逐渐迁移到下胚层,于原条期迁移至生殖新月区^[3,4]。随着胚胎循环系统的发育,PGCs 进入血管,迁移到胚体的心及头部间充质,最后定位到胚胎后端的生殖嵴^[5,6]。

原始生殖细胞的发生是一个复杂的多基因时空调控过程。在许多动物中,与原始生殖细胞发生相关的基因已被鉴定。*vasa* 基因在果蝇(*Drosophila melanogaster*)、斑马鱼(*Danio rerio*)等动物的生殖细胞中特异表达,被认为是早期

基金项目 国家自然科学基金资助(No. 30570968, 30370744) ;

* 通讯作者, E-mail: fsh4@whu.edu.cn ;

第一作者介绍 王焕楠,男,硕士研究生 研究方向:动物分子发育生物学 E-mail: whn0317@126.com

收稿日期: 2006-07-27, 修回日期: 2006-12-28

胚胎发育过程中生殖细胞的标志物。鸡(*Gallus domesticus*)的 *vasa* 基因在 PGCs 分化、迁移及成熟性腺中都表达^[7-9]。

Germ cell-less (GCL) 蛋白是生殖细胞发生的重要调控因子,1992 年在果蝇中首先发现^[10],随后果蝇 *gcl* 同源基因在小鼠(*Mus musculus*)、青鳉鱼(*Oryzias latipes*)等动物中被鉴定^[11-13]。GCL 蛋白是一个转录抑制因子^[14],通过蛋白质序列分析,发现果蝇、斑马鱼、青鳉鱼和小鼠的 GCL 蛋白都含有一个保守的结构域(BTB/POZ 结构域)。但是在不同动物胚胎发育过程中,*gcl* 基因的表达模式不同^[10-16]。进化上处于鱼类和哺乳类中间地位的鸟类,*gcl* 基因的结构和表达模式如何,目前尚未见报道。

本文以鹌鹑(*Coturnix coturnix*)为材料,采用扩增青鳉鱼 *gcl* 基因的简并引物^[13],从基因组 DNA 中扩增得到 GCL BTB/POZ 结构域的编码序列;同时应用 RT-PCR 和 mRNA 整体原位杂交方法,研究了 *gcl* 基因在不同组织和原条期胚胎中的表达,结果为脊椎动物原始生殖细胞形成机制的研究提供基础理论资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物 鹌鹑及其种蛋购自武汉市大东门集贸市场。鹌鹑种蛋经消毒后,于 $(37.8 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,相对湿度 55% ~ 60% 孵化。鹌鹑胚胎根据 Hamburger 和 Hamilton^[17] 建立的标准分期。

1.2 试剂 RNAROSE REAGENT 为上海华瞬公司产品。*Taq* DNA 聚合酶为 CASarray 公司产品。M-MLV 逆转录酶、RNase、dNTP、DNase、Tris、低熔点琼脂糖、pGEM-T 载体连接试剂盒为 Promega 公司产品。DNA 凝胶回收试剂盒为 Omega 公司产品。DIG-11-UTP、anti-DIG-AP body 为 Roche 公司产品。限制性内切酶 *Sal* I、*Sac* II 为 TaKaRa 公司产品。多聚赖氨酸、多聚甲醛为 Sigma 公司产品。

1.3 鹌鹑 GCL BTB/POZ 结构域编码序列的 PCR 扩增 根据《分子克隆实验指南》(第三版)中提取 DNA 的方法,提取鹌鹑肌肉组织基因组 DNA^[18]。以获得的基因组 DNA 为模板,

采用 Scholz 等^[13] 扩增青鳉鱼 *gcl* 基因的简并引物(位于简并位置的核苷酸用括号标出):

正向引物 5'-ACATCTACCA (AG) AC (AG) CTGTT(CT) (ACT)TGAATG-3';

反向引物 5'-TC (AGT) CC (AG) CACTGCTG (GT) ATCA (AGT) (AGT) CCATC-3', 扩增鹌鹑 GCL BTB/POZ 结构域编码序列。

PCR 反应体系总体积为 25 μl (1 $\times$ Buffer、2.5 mmol/L MgCl_2 、0.25 mmol/L dNTP、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 两种引物、1 U *Taq* DNA 聚合酶、100 ng 基因组 DNA),扩增条件为:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^\circ\text{C}$ 45 s,57 $^\circ\text{C}$ 45 s,72 $^\circ\text{C}$ 45 s,35 个循环;后延伸 72 $^\circ\text{C}$ 10 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 PCR 扩增产物的克隆和测序 PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,目的片段用 DNA 回收试剂盒回收、纯化,并连接到质粒载体 pGEM-T 中。将含有目的片段的质粒(pGEM-Tgcl)转化到大肠杆菌 DH-5 α 中,在含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板培养,挑取单克隆测序(华诺公司)。

1.5 不同动物 *gcl* 基因同源序列的比对 用 Vector NTI Suite 8 软件中的 AlignX 和 GeneDoc 对鹌鹑 *gcl* 基因同源序列和从 GenBank 中获取的线虫 (accession no. NM_070184)、果蝇 (accession no. NM_165622)、斑马鱼 (accession no. NM_207050)、小鼠 (accession no. NM_011818) 以及人 (accession no. BC007420) *gcl* 基因序列进行比对分析。

1.6 RT-PCR 检测 *gcl* 基因在不同组织中的表达 取鹌鹑卵巢、精巢和肝组织,PBS 洗涤,根据 RNAROSE REAGENT 说明书提取总 RNA,得到的总 RNA 用 DNase I 消化 15 min。以获得的 RNA 为模板,采用 Oligo dT₁₈ 引物,通过 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA 第一链。根据测序结果合成鹌鹑 *gcl* 基因特异引物:

正向引物 5'-CATCTACCAAACGCTGTTTCATGAATG-3';反向引物 5'-TCGCCGCACTGCTGGATCAAGCCATC-3',以 cDNA 第一链为模板,

PCR 反应条件同 1.4。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 整体原位杂交 (whole-mount *in situ* hybridization) 根据《分子克隆实验指南》中的碱裂解法提取 pGEM-Tgcl 质粒^[18], 分别用 *Sal* I、*Sac* II 进行单酶切, 纯化、回收后, 体外转录合成地高辛标记的鹌鹑 *gcl* 正、反义 RNA 探针。取原条期的鹌鹑胚胎, 参照 Reifers 等^[19] 的方法进行 mRNA 整体原位杂交, 采用 NBT/BCIP 显色系统检测杂交信号。实验组加反义探针, 阴性对照组分别为加正义探针和不加探针。

2 结果

2.1 鹌鹑 GCL BTB/POZ 结构域编码序列的扩增和测序 采用扩增青鳉鱼 GCL BTB/POZ 结构域编码序列的简并引物, 以鹌鹑基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增, 扩增产物用 1.2% 琼

脂糖凝胶电泳检测, 得到扩增片段约为 320 bp (图 1)。目的片段经试剂盒回收、纯化, 连接到质粒载体 pGEM-T 中, 再转化到大肠杆菌 DH-5 α 中, 单克隆测序, 得到插入片段的长度为 319 bp, 与预期鹌鹑 *gcl* 基因同源序列的片段大小相符。

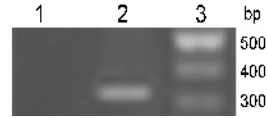


图 1 鹌鹑基因组 DNA 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 The PCR amplification result of genome DNA in Quail

1. 阴性对照; 2. *gcl* 基因片段, 约 320 bp;
3. DNA 分子量标准 (NEB 100 bp DNA ladder)。

1. Negative control; 2. *Gcl* gene fragment, about 320 bp;
3. Molecular marker (NEB 100 bp DNA ladder)。

2.2 不同动物 *gcl* 基因同源序列的比对

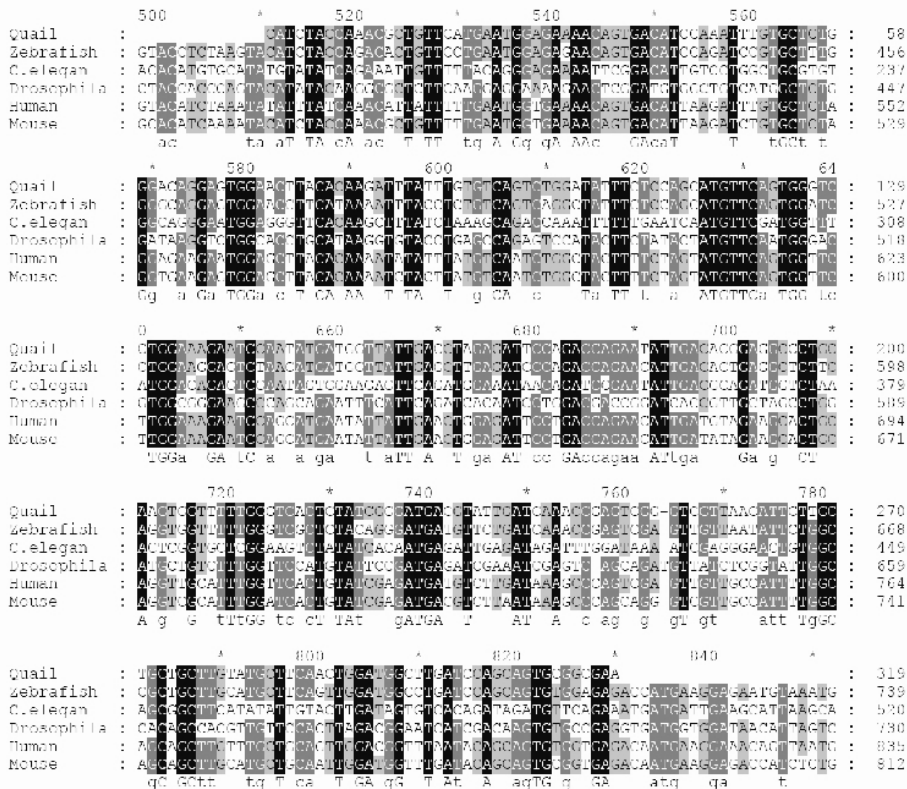


图 2 鹌鹑 *gcl* 基因同源序列与线虫、果蝇、斑马鱼、小鼠和人 *gcl* 基因序列的比对分析

Fig. 2 The comparison of Quail *gcl* homologous sequence with that of *C. elegans*, *Drosophila*, *Zebrafish*, *Mouse* and *Human*

从鹌鹑中获得的319 bp序列和从GenBank中获取的线虫、果蝇、斑马鱼、小鼠以及人 *gcl* 基因同源序列进行比对分析,结果表明,该片段与线虫、果蝇、斑马鱼、小鼠以及人 *gcl* 基因序列的同源性分别为 52.4%、55.4%、84.6%、79.6% 和 76.8% (图 2),表明获得的序列与其他动物 *gcl* 基因具有较高的同源性。

2.3 鹌鹑 *gcl* 基因在不同组织中的表达 分别提取鹌鹑卵巢、精巢、肝总 RNA,以 Oligo dT₁₈ 为引物,逆转录合成 cDNA 第一链;用根据测序结果合成的鹌鹑 *gcl* 基因特异引物,以 cDNA 第一链为模板,进行 RT-PCR。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示在卵巢、精巢及肝的 cDNA 中都能扩增到约 320 bp 的片段(图 3),此片段与从基因组 DNA 中扩增到的片段大小相吻合,说明 *gcl* 在卵巢、精巢和肝中表达。

2.4 鹌鹑 *gcl* mRNA 在原条期胚胎中的表达 用地高辛标记 RNA 探针,取鹌鹑原条期的胚

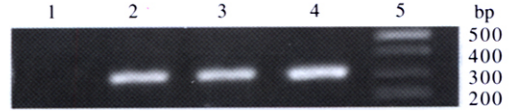


图 3 鹌鹑不同组织 RT-PCR 扩增结果
Fig. 3 The RT-PCR amplification result of *gcl* in different tissues in Quail

1. 阴性对照; 2. 肝; 3. 精巢; 4. 卵巢;
5. DNA 分子量标准 (NEB 100 bp DNA ladder)。
1. Negative control; 2. Liver; 3. Testis; 4. Ovary;
5. Molecular marker (NEB 100 bp DNA ladder)。

胎进行 *gcl* mRNA 整体原位杂交,采用 NBT/BCIP 显色系统,蓝紫色显示阳性信号。

实验组加反义 RNA 探针检测原条期胚胎,发现在原条期的生殖新月区充满了蓝紫色阳性信号(图 4:A 箭头所示),而其他区域未见到蓝紫色信号。加正义探针和未加探针的阴性对照组胚胎中无蓝紫色信号出现(图 4:B、C)。结果表明鹌鹑 *gcl* mRNA 在原条期的生殖新月区大量表达。

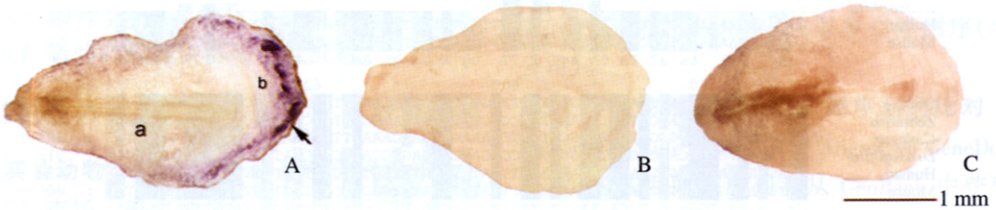


图 4 鹌鹑原条期胚胎整体原位杂交结果

Fig. 4 The whole-mount *in situ* hybridization result of Quail embryos at primitive streak stage

A. 反义探针; B. 正义探针; C. 无探针; a. 原条; b. 生殖新月。

A. Anti-sense probe; B. Sense probe; C. No probe; a. Primitive streak; b. Germinal crescent.

3 讨论

3.1 鹌鹑与其他动物 *gcl* 基因同源序列的比对 BTB/POZ 结构域是一种介导蛋白质-蛋白质相互作用的区域,通常位于蛋白质的 N 端,约由 115 个氨基酸残基组成,在进化上很保守^[15,16]。通过鹌鹑 GCL BTB/POZ 结构域编码序列与线虫、果蝇、斑马鱼、小鼠和人 GCL BTB/POZ 结构域编码序列的比对分析,发现其与斑马鱼的同源性最高(84.6%),与线虫的同源性最低(52.4%),与果蝇、小鼠和人的同源性分别

为 55.4%、79.6% 和 76.8%。以上结果表明鹌鹑 GCL BTB/POZ 结构域编码序列与无脊椎动物线虫和果蝇的同源性相对较低,与脊椎动物斑马鱼、小鼠和人的同源性较高,反映了动物由低等到高等的进化关系。

3.2 鹌鹑 *gcl* 基因在不同组织中的表达 在果蝇、斑马鱼、鸡等动物中 *vasa* 基因都仅在生殖细胞系表达,被认为是生殖细胞的标记物^[7-9]。*gcl* 基因虽然在不同动物的生殖细胞中都表达,但在胚胎发育过程中的表达模式不同。在果蝇中, *gcl* 基因在卵母细胞中表达,

GCL 蛋白存在于极细胞以及极细胞的核膜中^[10]。在小鼠中, *gcl* 基因在精巢中大量表达, 在卵巢及其他组织中少量表达, 在胚胎发育过程中直到原始生殖细胞迁移到生殖嵴后才表达^[11,12]。在青鳉鱼中, *gcl* 基因在精巢中少量表达, 而在卵巢中却有大量表达^[13]。RT-PCR 显示鹌鹑 *gcl* 基因在卵巢、精巢和肝中都有表达, 与其他动物 *gcl* 基因的表达模式存在差别。我们推测鹌鹑 *gcl* 基因不但在生殖细胞的发生过程中起作用, 而且在其他组织中具有功能。

3.3 鹌鹑 *gcl* mRNA 在原条期胚胎中的表达

鸟类 PGCs 起源于 X 期的胚盘上胚层, 而后逐渐迁移到下胚层, 于原条期迁移至生殖新月区^[3,4]。随着胚胎循环系统的发育 PGCs 进入血管, 10 体节期时首次迁移到胚体上, 聚集于心及头部间充质中, 最后定位到胚胎后端的生殖嵴中^[5,6]。mRNA 整体原位杂交结果显示, 在原条期, 鹌鹑 *gcl* mRNA 于生殖新月中大量表达, 与鸟类 PGCs 在原条期存在的位置一致, 结果说明 *gcl* 在 PGCs 形成过程中可能发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Wylie C. Germ cells. *Cell*, 1999, **96** :164 ~ 165.
- [2] Starz-Gaiano M, Lehmann R. Moving towards the next generation. *Mechanisms of Development*, 2001, **105** :5 ~ 18.
- [3] Eyal-Giladi H, Ginsburg M, Farbarov A. Avian primordial germ cell are of epiblastic origin. *J Embryol Exp Morph*, 1981, **65** :139 ~ 147.
- [4] Ginsburg M, Eyal-giladi H. Temporal and spatial aspects of the gradual migration of primordial germ cells from the epiblast into the germinal crescent in the avian embryo. *J Embryol Exp Morph*, 1986, **95** :53 ~ 71.
- [5] Kuwana T. Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. *Develop Growth and Differen*, 1993, **35** :237 ~ 243.
- [6] 李碧春, 陈国宏, 李厚达等. 鸡原始生殖细胞迁移和聚集规律的研究. *江苏农业研究*, 2000, **21** (2) :1 ~ 6.
- [7] Hay B, Jan L Y, Jan Y N. A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell*, 1988, **55** :577 ~ 587.
- [8] Raz E. Primordial germ cell development in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol*, 2002, **13** :489 ~ 495.
- [9] Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, et al. Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development*, 2000, **127** :741 ~ 750.
- [10] Jongens T A, Hay B, Jan L Y, et al. The germ cell-less gene product: a posteriorly localized component necessary for germ cell development in *Drosophila*. *Cell*, 1992, **70** :569 ~ 584.
- [11] Kimura T, Yomogida K, Iwai N, et al. Molecular cloning and genomic organization of mouse homologue of *Drosophila* germ cell-less and its expression in germ lineage cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, **262** :223 ~ 230.
- [12] Leatherman J L, Kaestner K H, Jongens T A. Identification of a mouse germ cell-less homologue with conserved activity in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*, 2000, **92** :145 ~ 153.
- [13] Scholz S, Domaschke H, Kanamori A, et al. germ cell-less expression in medaka (*Oryzias latipes*). *Molecular Reproduction and Development*, 2004, **67** :15 ~ 18.
- [14] Leatherman J L, Levin L, Boero J, et al. germ cell-less acts to repress transcription during the establishment of the *Drosophila* germ cell lineage. *Current Biology*, 2002, **12** :681 ~ 685.
- [15] Zollman S, Godt D, Prive G G, et al. The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** :717 ~ 721.
- [16] Bardwell V J, Treisman R. The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes & Development*, 1994, **8** :664 ~ 677.
- [17] Hamburger V, Hamilton H L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*, 1951, **88** :49 ~ 60.
- [18] Sambrook J, Russell D W (黄培堂等译). 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 2002, 26 ~ 30, 479 ~ 483.
- [19] Reifers F, Bohli H, Walsh E C, et al. Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar (ace) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development*, 1998, **125** :381 ~ 395.