

利用差减杂交分离具有进化保守性的 睾丸表达的基因*

黄晓 郭一清 程汉华 周荣家

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

关键词 性腺 差减杂交 性别逆转 进化

性别决定和分化的研究一直是生命科学中的一个重要领域。自 20 世纪 90 年代初在人和哺乳动物中找到了睾丸决定因子 (TDF) *SRY/Sry* 基因以来, 已经发现了几个与性别决定与分化相关的基因: *WT1*, *SF1*, *DAX-1*, *SOX9*, *DMRT1* 等 (Blanche *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1997), 研究还发现性别的决定和分化是一种由多基因参与的极其复杂的调控过程。尽管不同进化地位的生物具有不同的性别决定和发育的分子机制, 但是性别性状从低等的果蝇、线虫到高等的哺乳动物和人类都具有进化保守性, *DMRT1* 基因 (Raymond *et al.*, 1998) 的克隆也进一步表明性别发育从果蝇、线虫到哺乳动物都具有类似的分子机制。

黄鳝生命过程中具有典型的天然性转变现象, 早期为雌性, 产卵后转变为间性, 最后发育为雄性。组织学研究表明 (Liu *et al.*, 1951), 黄鳝从雌性转化为雄性是卵巢逐渐退化、精巢逐渐形成的过程, 在这一过程中, 大小卵母细胞逐渐腾出的空间由新生的精细胞和曲细精管填充, 最后生殖腺全部为盘曲的曲细精管及不同发育阶段的精细胞所填充而形成真正的精巢组织。因黄鳝在同一个体中控制雌、雄生殖细胞的顺序表达和成熟, 所以其性反转的过程是研究性别决定与分化及其进化机制的理想模型, 研究结果将有助于我们对性别决定与分化调控机制的更加全面的认识。据此, 本研究借助于该物种性腺逆转变化的特性, 从进化保守性角度出发, 分离人类睾丸特异表达基因中具有进化保守性的功能基因。

1 材料和方法

1.1 人睾丸特异的差减 cDNA 质粒文库的构建

人睾丸特异的差减 cDNA 购于 Clontech (美国) 公司, PCR 扩增按其手册进行。扩增引物 DNA 序列如下: 引物 1, 5'-TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT-3'; 引物 2, 5'-AGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGT-3'。以上引物各 1 μ l (400 pmol/L), 2.5 μ l 10 \times PCR 缓冲液, 1.5 μ l 的 Mg-Cl₂ (1.5 mM), 1 μ l 睾丸特异的差减 cDNA, 0.5 μ l 的 dNTP (0.2 mM), 17.3 μ l H₂O, 0.2 μ l (1U) Taq DNA 聚合酶。于 PCR 仪上 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 进行 11 个循环: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s。扩增结束后, 取 5 μ l 产物于 1% 的琼脂糖胶上电泳检测。20 μ l 的 PCR 产物经 CHROMA SPIN-100 纯化后, 按 Amersham Pharmacia 公司 (瑞典) 的平端连接试剂盒的方法进行连接。连接后的产物按常规方法电脉冲转化大肠杆菌 DH5⁺。转化后的细菌经蓝白斑检测插入率后, 全部涂布于 Amp 平板上进行扩增。收集扩增的文库, 加 DM-SO 至终浓度为 7%, 保存于 -70 $^{\circ}$ C。

1.2 文库的差减杂交

1.2.1 黄鳝性腺总 RNA 的提取 解剖 10 条黄鳝, 分别取出性腺, 取一小部分做冰冻切片, 常规 HE 染色, 以鉴定黄鳝的性别, 剩余的性腺冰冻于液氮中。确定性别后, 以总 RNA 提取试剂盒 (Promega 公司) (美国) 分别提取雌性及间性黄鳝的性腺的总 RNA。

1.2.2 探针的标记 各取 1~5 μ g 上述两种性腺

2001-08-28 收稿, 2001-12-20 修回

* 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30140013)

** 通讯作者, E-mail: mdgene@whu.edu.cn

第一作者简介 黄晓, 27 岁, 男, 博士研究生。研究方向: 发育遗传学

的总 RNA, 经无 RNA 酶的 DNA 酶 (Promega 公司) (美国) 37 处理 15 min 后, 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 干燥后加 3 μl 的 Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 用无 RNA 酶的去离子水加至总体积为 12 μl , 70 处理 5 min 后于冰上冷却, 在依次加入 6 μl 反应缓冲液, 3 μl 的 dTTP、dGTP、dATP (各 1 mM) 混合液, 1 μl 核糖核酸酶抑制剂 (1 U/ μl), 5 μl ^{-32}P -dCTP (0.6 mCi/ml), 3 μl AMV 逆转录酶 (1 U/ μl), 42 温浴 90 min 标记探针, 分别称为雌性探针和间性探针。

1.2.3 差减杂交 先用间性探针与文库进行菌落原位杂交, 挑取可能的阳性克隆, 提取质粒后, 以同样的量对应点于两张尼龙膜上, 再分别同雌性探针和间性探针进行点杂交。菌落原位杂交、质粒提取、点杂交等参照 Sambrook *et al.* (1989) 的方法, 杂交的具体条件为: 55 预杂交液 (6 \times SSC、5 \times Denhardt、0.5% SDS、100 mg/ml 经变性的鲑鱼精 DNA) 中预杂交 3 h, 更换预杂交液, 加入变性后的探针, 55 杂交过夜。杂交膜经 2 \times SSC/0.5% SDS 室温漂洗 5 min; 2 \times SSC/0.1% SDS 室温漂洗 15 min; 0.1 \times SSC/0.5% SDS 55 漂洗 15 min 两次后, -20 曝光 72 h。

1.3 序列分析

选取在间性与雌性之间有差异的克隆, ABI 377 型自动测序仪进行 DNA 序列测序, 采用 BLAST 在 GenBank 中进行序列分析。

2 结果

2.1 人睾丸特异的差减 cDNA 文库的构建

对人睾丸特异的差减 cDNA 经巢式引物进行 PCR 扩增后, 产物呈现为近 500 bp 处有最多扩增的 DNA 弥散 (图 1)。PCR 产物经纯化后质粒载体连接, 电转化法转化, 蓝白斑检测文库中 DNA 片段的插入率, 其中蓝斑比率小于 15%。

2.2 进化保守的人睾丸特异表达基因的克隆

我们对黄鳍性别的认定是通过组织学切片来确认的, 对人睾丸特异的文库先用间性探针进行筛选, 获得可能的 174 个阳性克隆。再分别用雌性和间性性腺探针进行差减杂交, 经比较分析, 得到了两个在差减杂交中有较明显差异的克隆 (图 2)。

3 讨论

睾丸特异的差减 cDNA 是经过与十几种其它的组织经两轮的差减杂交后的初级 PCR 产物, 具有极



图 1 人睾丸特异的差减 cDNA 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of subtracted human testis cDNAs
A: 1 kb DNA 对照 (1 kb DNA ladder) B: PCR 产物 (PCR products)

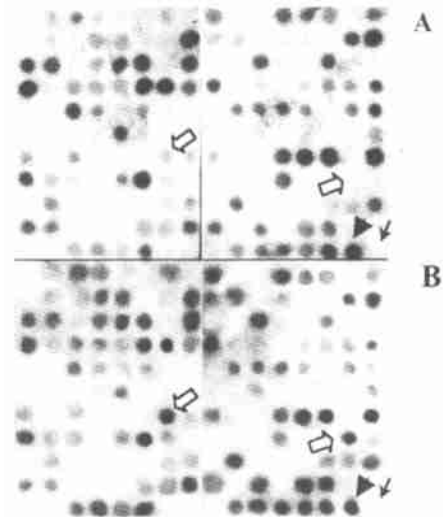


图 2 差减杂交筛选结果

Fig. 2 Screening of differential clones

A. 雌性黄鳍性腺探针杂交结果 (Clones by female probe) B. 间性黄鳍性腺探针杂交结果 (Clones by intersex probe)
白箭头所示为差异的克隆 (The white arrows show the differential clones) 粗黑箭头所示为黄鳍 *Sox17* [the thick black arrows indicate the rice field eel *Sox17* clone (as positive control)]
克隆阳性对照, 细黑箭头所指为 pBluescript 载体阴性对照 [The thin black arrows indicate the pBluescript plasmid (as negative control)]

高的睾丸组织特异性 (Diatchenko *et al.*, 1996)。PCR 产物用 CHROMA SPIN-100 纯化, 除去了引物和小片段, 保证了文库的质量。同时, 本文采用了高效的电转化法以获得尽可能高的转化效率。

研究表明性别决定从果蝇、线虫到哺乳类和人类都具有一定的进化保守性 (Capel, 2000)。本研究从性别决定的进化保守性出发, 以具有天然性逆转特性的黄鳍在性逆转过程中基因表达的差异性

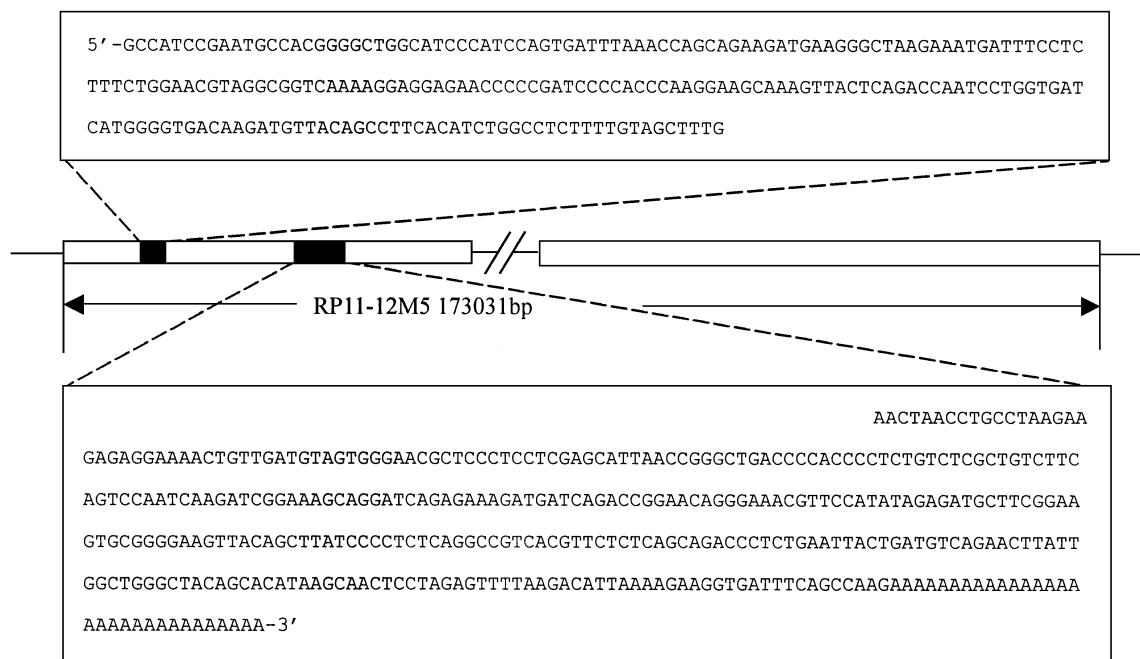


图 3 未知基因 EST 及其 DNA 序列在 RP11-12M5 中的位置

Fig. 3 DNA sequences of the EST of an unknown gene and its position on the RP11-12M5 clone

为模式, 从人睾丸特异表达的基因中筛选具有进化保守性的功能基因。

两个差异克隆经 ABI 377 型自动测序仪测序分析, 其中一个的插入片段长度为 895 bp, 在 GenBank 中用 Blast 搜索后发现其与编号为 AJ011779 基因的部分序列一致, 该基因全长 3 353 bp, 在人中编码与酵母 *Sec63 p* 同源的蛋白。酵母 *Sec63 p* 是一种内质网跨膜蛋白, 含有一个 J-Domain, 能与热休克蛋白 Hsp70 家族的成员 Bip (Kar2p) 作用 (Misselwitz *et al.*, 1998), 促进翻译后蛋白的转移。在人类, 该基因位于 6q21 (Woollatt *et al.*, 1997) 与酵母 *Sec63 p* 的同源性为 53%, 一致性为 25.6% (Skowronek *et al.*, 1998)。本研究发现 *Sec63 p* 基因是一个从酵母、黄鳝到人类高度保守的功能基因, 黄鳝和人中 *Sec63 p* 同源基因的具体功能还有待进一步研究。有趣的是该基因家族另一成员 *Sec61* 基因在小鼠性腺中表达, 并且涉及性腺的发育过程 (Karin *et al.*, 2000)。本实验获得

的另一个克隆长度为 596 bp, 在 GenBank 进行 EST 搜索时发现它与编号为 BG723880 (长度为 568 bp) 的 EST 有 97% 的一致性。在搜索时还发现它与位于 1 号染色体的克隆 RP11-12M5 有两段相一致, 在中间 218 bp 处被分裂为两段, 对其 5 端上游附近进行分析却没有找到合适的开读框架, 具体结构见图 3。因此这一克隆还是一个未知基因的 EST, 其具体结构和功能还有待进一步研究。

总之, 黄鳝由雌性、间性向雄性的性别逆转是研究性别决定与分化发育的很好模式, 由雌性向间性发育的过程与哺乳类睾丸的形成过程类似, 该过程基因表达的变化反映了性别决定基因表达的启动过程。而且鱼类属于低等脊椎动物, 在进化上处于承前启后的地位, 因此对黄鳝性别反转发育过程基因表达规律的探讨将有助于认识人类性别决定机制。本文发现的两个基因从鱼类到人类都具进化保守性, 且在性腺分化过程中具有特异表达, 提示其在性别决定和分化中的重要功能。

参 考 文 献 (References)

- Capel, B. 2000 The battle of the sexes. *Mechanisms of Development* **92**: 89 ~ 103.
- Diatchenko, L., Y. F. Lau, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov and P. D. Siebert 1996 Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (12): 6 025 ~ 6 030.
- Huang, X., R. J. Zhou, H. H. Cheng, Y. Q. Guo and Q. X. Yu 1998 The *SOX* Genes in two species of fresh water fishes. *Acta Zoologica Sinica* **44**: 239 ~ 240.

- Karin, W. and G. H. Bernhard 2000 Large-scale screen for genes involved in gonad development. *Mechanisms of Development* **98**: 51 ~ 70
- Liu, C. K. and K. Y. Ku 1951 Histological change in the gonad of *Monopterus* during sex transformation. *SINENSIA*, N. S. **2** (1 ~ 2): 85 ~ 109 [刘建康, 顾国彦 1951 鲮鱼性逆转时生殖腺组织的改变. *中国水生生物学汇报* **2** (1 ~ 2): 85 ~ 109.]
- Misselwitz, B., O. Staeck, K. E. Matlack and T. A. Rapoport 1998 Interaction of BiP with the J-domain of the *Sec63 p* component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex. *J. Biol. Chem.* **9** (12): 3 455 ~ 3 473.
- Raymond, C. S., C. E. Shamu, M. M. Shen, K. J. Seifert, B. Hirsch, J. Hodgkin and D. Zarkower 1998 Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* **391**: 691 ~ 695.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis 1989 *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Skowronek, M. H., M. Rotter and I. G. Haas 1998 Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like *Sec63 p* homolog. *Biol. Chem.* **2** (5): 593 ~ 603.
- Woollatt, E., K. A. Pine, J. Shine, G. R. Sutherland and T. P. Iismaa 1997 Human *Sec63* endoplasmic reticulum membrane protein, map position 6q21. *Chromosome Res.* **278** (5344): 1 728 ~ 1 729.
- Zhou, R. J., Y. Q. Guo, H. H. Cheng, Y. Mao and Q. X. Yu 1997 Comparative tree of sex-determining region Y (*SRY*) and *SRY* box genes. *Acta Zoologica Sinica* **43**: 192 ~ 196.

外 文 摘 要 (Abstract)

ISOLATION OF CONSERVED GENES IN THE HUMAN TESTIS BY SUBTRACTIVE HYBRIDIZATION *

HUANG Xiao GUO Yi-Qing CHENG Han-Hua ZHOU Rong-Jia **

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, P. R. China)

The mechanisms of sexual development and regulation display extraordinary diversity between phyla. However, recent studies show that there must be underlying evolutionary conservatism between different mechanisms. In order to examine evolutionary conservatism in molecular mechanisms of sex determination, the natural sex reversal process of the rice field eel (*Monopterus albus*) was used to identify conserved functional genes involved in sex determination and differentiation. Firstly, a mini cDNA library was constructed from the cDNAs expressed specifically in the human testis. The cDNA library was screened with first strand cDNA probes from the intersex gonads of rice field eels. Secondly, likely positive clones were arrayed onto two nylon membranes, which were then hybridized with the first strand cDNAs probes from rice field eel intersex and female gonads respectively. Two positive clones were obtained, which showed obvious differential expression between intersex and female gonads. DNA sequencing analysis reveal that the insert fragments of these two clones were 895 bp and 596 bp long respectively. BLAST results indicate that the 895 bp fragment is the 3' part of the No. AJ011779 gene, located on 6q21, encoding a homologue of yeast *Sec63 p* protein. An interesting finding is that one member of the human *Sec* gene family, *Sec61*, is expressed in the testis and involved in the process of testis development. The 596 bp fragment was 97% identical with the No. BG723880 EST, located on clone RP11-12M5 of chromosome 1. This needs further study. We infer that these two genes should also play a role in sexual development.

Key words Rice field eel (*Monopterus albus*), Gonad, Subtractive hybridization, Sex reversal, Evolution

* This project is supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39770392)

** Corresponding author. E-mail: mdgene@whu.edu.cn