

# 端粒相关锌指蛋白基因 *TASL30* 在人早期胚胎与组织中的 mRNA 表达及染色体定位

冯耀东, 高立, 苟德明, 蒋达和, 毛歆, 李文鑫

(武汉大学生命科学院病毒学研究所, 武汉 430072)

**摘要:** 采用原位杂交和 RNA 点杂交方法, 观察了一种新的端粒相关锌指基因 *TASL30* 在早期人胚与 50 种器官组织中的 mRNA 表达。结果表明, *TASL30* 基因在早期人胚神经管中有明显表达, 其中在神经管的头端表达最强, 而在人的 50 种器官组织中均未检测到该基因的明显表达。另外通过 G-显带和染色体原位杂交, 将 *TASL30* 基因定位于人染色体 12q24~qter。

**关键词:** *TASL30* 基因; 原位杂交; RNA 点杂交; 基因定位

中图分类号: Q344+.13; Q343.1+7

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)06-0361-04

## mRNA Expression and Chromosome Localization of the Telomeric-associated Zinc Finger Gene *TASL30* in Human Early Embryo and Tissues

FENG Yao-dong, GAO Li, GOU De-ming, JIANG Da-he, MAO Xin, LI Wen-xin

(Institute of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** By means of in situ hybridization and RNA dot blot, mRNA expression of a telomeric-associated zinc finger gene (*TASL30*) was observed. The results showed that *TASL30* gene was expressed in significant amount in neural tube of early human embryo and the cephalic expression level was the highest, but none of recognizable positive signal was detected in 50 human tissues. By G-banding and chromosome in situ hybridization, *TASL30* gene was located in chromosome 12q24~qter.

**Key words:** *TASL30* gene; in situ hybridization; RNA dot blot; gene localization

锌指蛋白是人体中重要的转录调控因子, 它可以同 DNA 或 RNA 结合, 并通过激活或抑制基因的转录而参与配子形成、胚胎发育、细胞分化等重要生命活动, 它的异常表达更是与肿瘤及遗传病的发生直接相关<sup>[1~3]</sup>。自 1983 年以来, 已有近 200 种锌指蛋白基因被克隆和定位<sup>[4~5]</sup>。端粒是真核细胞染色体的末端结构, 是一种由许多重复序列及相关蛋白组成的复合体, 被认为是限制细胞生命及影响衰老过程的“分子钟”。与端粒 DNA 相邻的另一类重复 DNA 序列称为亚端粒 DNA 或端粒相关序列这一类序列

具有较高的特异性和多态性, 利用这一特性, 美国 NIH 及欧洲 IMMC 联合开发了一套可识别各个端粒的特异性端粒 DNA 探针。

我们在构建人体发育早期胚胎 cDNA 文库(3 周龄)的基础上, 通过筛选得到一个低丰度表达克隆 L30, 测序后与 NCBI 数据库比较同源性发现, L30 与端粒探针同源, 并含有 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型锌指基序, 为端粒相关锌指蛋白基因, 命名为 *TASL30* (在 GenBank 中登录号为 AF141655)。Northern 杂交显示 *TASL30* 基因在早期胚胎中表达, 而在成人肝、肾、膀胱及鼻咽癌

收稿日期: 1999-12-13; 修回日期: 2000-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 No. 39900092, 武汉市高新技术攻关计划项目 No. 996005123G

作者简介: 冯耀东(1975-) 男, 硕士生, 现从事细胞分子生物学研究。Tel: 027-87682831。李文鑫(1950-) 男, 教授, 博导, 现从事细胞分子肿瘤学研究, 通讯联系人, Fax: 027-87882661, E-mail: Liwxlab@whu.edu.cn。

细胞中均不表达<sup>[6]</sup>。为了进一步了解该基因的结构与功能信息,我们通过 mRNA 原位杂交和多器官的组织(50种)RNA 杂交,对该基因在早期胚胎和成体组织的 mRNA 表达作了检测。又通过 G-显带和染色体原位杂交,对 *TASL30* 基因在染色体上进行了定位。

## 1 材料和方法

### 1.1 mRNA 原位杂交

1.1.1 DIG cDNA 探针制备 *TASL30* cDNA 3'端约 400bp 片段亚克隆在 PBlueScript 载体中,质粒的提取与纯化参照 Sambrook<sup>[7]</sup>方法。经 *EcoR* I 酶切,电泳后通过 Glass Milk(Clontech 公司产品)从凝胶中回收并纯化目的片段。随后进行探针标记,标记方法参照 DIG 标记与检测试剂盒说明。

1.1.2 组织切片制备 收集人早期(约四周龄)胚胎材料(由湖北省妇幼保健医院提供),经预冷的 4%多聚甲醛固定 2h,二甲苯透明,石蜡包埋,常规石蜡切片,厚为 7 $\mu$ m,将切片贴附在铺有 APES 的硅化载玻片,展片后 43 $^{\circ}$ C 烤片 24h,室温保存。

1.1.3 组织原位杂交及检测 石蜡切片杂交前用二甲苯脱蜡,梯度乙醇过度至 DEPC 水,0.2N HCl 水解 20min,0.3% TritonX-100/PBS 去膜处理 15min, PBS 洗涤 3 次,蛋白酶 K(8 $\mu$ g/ml) 37 $^{\circ}$ C 消化 10min, PBS 洗涤 3 次,4%多聚甲醛后固定 5min, PBS 洗去固定液。0.1mol/l 三乙醇胺/0.25% 乙酸胺处理 15min 去电荷。42 $^{\circ}$ C 预杂交(预杂交液:6 $\times$  SSC,50% 去离子甲酰胺,5 $\times$  Denhard, S 液,100 $\mu$ g/ml ssDNA,10% 硫酸葡聚糖)2h 后,将探针与预杂交液混合,煮沸变性,冷却后,滴加至经处理的组织切片上,封片并置 2 $\times$  SSC 湿盒中 42 $^{\circ}$ C 杂交 24h。阴性对照将探针换作等体积 DEPC 水。杂交后检测方法参照 DIG 标记与检测试剂盒说明。用明视野显微照相。

### 1.2 多组织 RNA 杂交

1.2.1 放射性探针制备 选用与 1.1 相同探针 50ng 和 50 $\mu$ Ci[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP 并采用随机引物法标记探针,再用 SephadexG-50 柱除去未掺入的 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP。

1.2.2 RNA 杂交 将点有 50 种组织的 RNA 尼龙膜(Clontech 公司产品)放在预杂交液(6 $\times$  SSC/0.1% SDS,50 $\mu$ g/ml ssDNA)中 65 $^{\circ}$ C 预杂交 30min,随后加入变性的 cDNA 探针,65 $^{\circ}$ C 杂交过夜。杂交后洗膜:1)2 $\times$  SSC/0.1% SDS 65 $^{\circ}$ C 洗涤 4 次,每次 20min;

2)0.1 $\times$  SSC/0.5% SDS 55 $^{\circ}$ C 洗涤 2 次,每次 20min。夹 X 光片进行放射自显影,-70 $^{\circ}$ C 曝光。

### 1.3 染色体原位杂交

1.3.1 探针制备 方法同 1.1.1。

1.3.2 中期染色体的制备 常规微量全血法制备染色体,健康人外周血由武汉大学校医院提供。取 0.5ml 全血加入 5ml RPMI1640 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 72h,终止培养前 4h,加入终浓度为 0.05 $\mu$ g/ml 的秋水仙素,常规制片。烤干,-20 $^{\circ}$ C 保存标本。杂交前进行 G-显带,4 $^{\circ}$ C 0.025% 胰酶处理 5~10min 后 Giemsa 染色,镜检,选取带纹清晰、分散良好的分裂相记录坐标,置 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.3.3 原位杂交及检测统计 原位杂交参照 Harper<sup>[8]</sup>的方法,稍加改进。分别选取 G-显带和未显带的染色体标本,G-显带的染色体标本用卡诺氏固定液脱色,4% 甲醛后固定 15min, PBS 冲洗,空气干燥。显带和未显带的染色体标本按相同方法杂交。100 $\mu$ g/ml RNase37 $^{\circ}$ C 处理 1h,2 $\times$  SSC 清洗 3 次,每次 5min,梯度乙醇脱水,每片子 50 $\mu$ l 杂交液(50% 甲酰胺,2 $\times$  SSC,10% 硫酸葡聚糖,500 $\mu$ g/ml ssDNA,适量探针),37 $^{\circ}$ C 杂交 16~20h,然后置于 2 $\times$  SSC/0.1% SDS 及 0.1 $\times$  SSC/0.1% SDS 各洗涤 3 次,检测方法同前,最后经 Giemsa 染色、镜检、照相、统计学处理,确定基因的位置。

## 2 研究结果

组织原位杂交结果显示:在 4 周龄早期人胚中,*TASL30* 基因 mRNA 在神经管明显表达,其表达量在神经管不同部位有一定差别,神经管的头端阳性杂交信号最强(见图 1a),该部位后期发育为人的脑。阴性对照的切片中,无阳性杂交信号或只呈现本底水平的染色(见图 1b)。以上结果表明,*TASL30* 基因在早期人胚神经管中有表达,并且主要集中在头端。

多组织 RNA 杂交结果显示:与阳性对照(人基因组 DNA)比较,点有 50 种正常人器官组织的 RNA 膜上未能检测到 *TASL30* 的明显杂交信号。这是由于 Clontech 公司的 50 种组织 RNA 来自于成体组织,而 *TASL30* 基因 mRNA 只在胚胎发育早期特异性表达,在胚胎后期和成体组织中不表达或表达量太低以致无法检测到明显的阳性杂交信号。

观察 141 个杂交后的分裂相,其中 89 个未显带的杂交分裂相中,61 个分裂相杂交信号出现在第 12 号染色体长臂末端(见图 2a),占 58.43%;另外 52 个

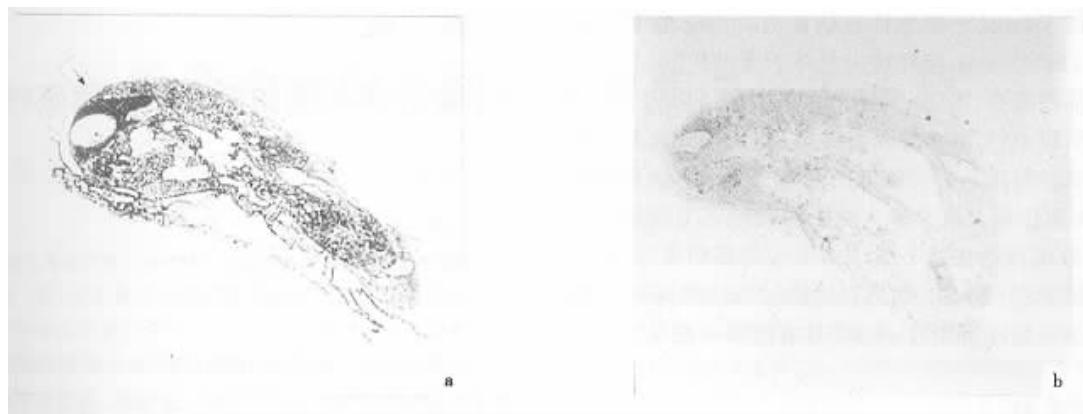


图 1 *TASL30* 在早期人胚中的表达

a. 在神经管的表达(↑示神经管头端) b. 阴性对照。

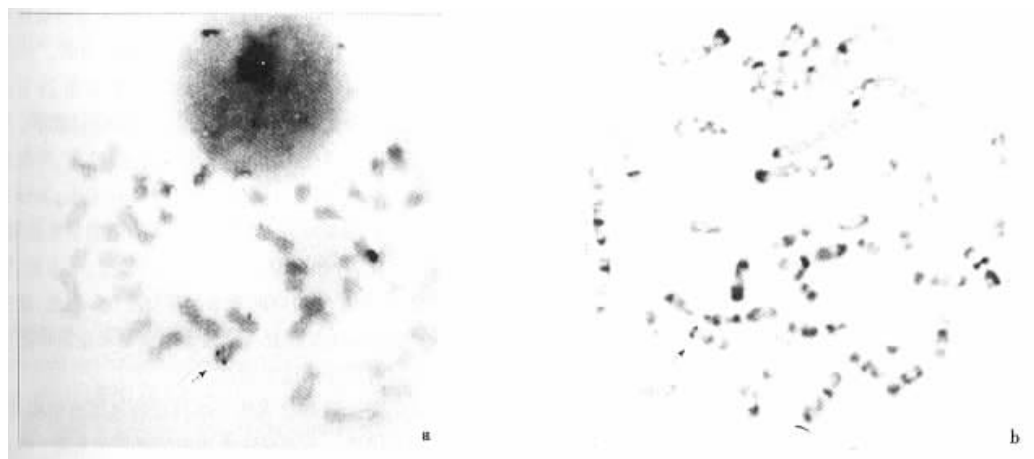


图 2 *TASL30* 在染色体上的定位

a. 未显带杂交分裂相 b. 显带杂交分裂相。

显带的杂交分裂相中,有 24 个分裂相的杂交信号出现在 12q24~qter(见图 2),占 46.15%,其余杂交信号均随机分布。统计结果显示杂交信号出现在 12q24~qter 与出现在其它位置的比差极其显著( $P < 0.001$ ),由此可将 *TASL30* 基因定位于 12q24~qter。

### 3 讨论

在人体锌指蛋白基因中, $C_2H_2$ 型是最为常见的一种,其特征性结构(基序)为  $CX_2CX_2HX_3H$ (其中 C:半胱氨酸, H:组氨酸, X:任意氨基酸)这一基序在基因间呈线性排列,其间以 TGEKPY 的高保守序列相连接。端粒相关锌指蛋白基因 *TASL30* 在羧基端含 24 个锌指基序,均符合  $C_2H_2$ 型锌指基因的保守序列,在 N 端起始密码子下游不远处还含有可作为潜

在的转录抑制结构以介导蛋白之间相互作用的 KRAB 结构域<sup>[9]</sup>,从而间接提示 *TASL30* 可能是一种在转录调控中起抑制作用的  $C_2H_2$ 型锌指基因。*TASL30* 基因是从 3 周龄人胚胎 cDNA 文库中筛选得到的,这一时期正是人脑、心等重要器官开始分化的关键时期,多种与发育有关的调控基因、促分化基因和原癌基因都在这一时期表达,而成体后可能不表达<sup>[10]</sup>。*TASL30* 基因表达在早期胚胎的神经管中,尤其在神经管的头端表达最高,而在 50 种正常人的器官组织中未能检测到表达。提示该基因可能是与脑的生长发育相关的调控基因,而且在表达上可能具有时空特异性,在早期胚胎特异性表达,而在胚胎后期与成体组织中表达量低或不表达。除此之外,*TASL30* 基因的 5'端还有一段序列(128bp)与 Ning 等克隆的一个特异性端粒探针 100% 同源<sup>[11]</sup>。该端粒探

针定位于人 12 号染色体亚端粒区。TASL30 基因定位于 12q24 ~ qter, 同样在染色体的亚端粒区, 二者是否有某种联系, 需进一步研究。过去的研究中, 一直认为端粒 DNA 不能编码蛋白质, 也无法肯定在端粒区或亚端粒区是否有基因的表达<sup>[12-13]</sup>, 本研究通过 mRNA 原位杂交在早期人胚胎的神经管中检测到了 TASL30 基因的表达, 这一结果与苟德明等 Northern 杂交结果<sup>[6]</sup>一致, 本结果对于探讨端粒相关 DNA 能否转录有翻译活性的 mRNA 具有重要的意义。

## 参考文献:

- [1] Tommerup N, Vissing H. Isolation and fine mapping of 16 novel human zinc finger-encoding cDNA identity putative candidate genes for developmental and malignant disorders [J]. *Genomics*, 1995, 27: 259 ~ 264.
- [2] Madden S L, Cook D M, Morris J F. Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product [J]. *Science*, 1991, 253: 1550 ~ 1553.
- [3] Noce T, Fujiwara Y, Sezaki M, et al. Expression of a mouse zinc finger protein gene in both spermatocytes and oocytes during meiosis [J]. *Developmental Biology*, 1992, 153: 356 ~ 367.
- [4] Bellefroid E J, Lecocq P J, Benhinda A. The human genome contains hundreds of genes encoding for finger proteins of the kruppel type [J]. *DNA*, 1989, 8: 377 ~ 387.
- [5] Pellegrino G R, Berg J M. Identification and characterization of "zinc-finger" domains by the polymerase chain reaction [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 671 ~ 675.
- [6] 苟德明, 李文鑫, 冯耀东, 等. 一种新的人端粒相关锌指蛋白 cDNA 的克隆及鉴定 [J]. *实验生物学报* 2000, 33(1): 27 ~ 34.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, [M]. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor, 1989.
- [8] Harper M E, Sarunders G F. Localization of singer copy DNA sequence on G-banded human chromosome by in situ hybridization [J]. *Chromosoma*, 1981, 83: 431 ~ 439.
- [9] Witzgall R O, Leary E, Leaf A, et al. The kruppel-associated box - A (KRAB - A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 4514 ~ 4518.
- [10] Adjaye J, Danibles R, Bilton V, Monk M. cDNA libraries from singer human preimplantation embryos [J]. *Genomics*, 1997, 46: 337 ~ 344.
- [11] Ning Y, Flint J. A complete set of human telomeric probes and their clinical application [J]. *Nat Genet*, 1996, 14: 86 ~ 89.
- [12] Weber B, Collins C, Robbins C. Characterization and organization of DNA sequences adjacent to human telomere associated repeat (TTAGGG)<sub>n</sub> [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 3353 ~ 3361.
- [13] Lagercrantz J, Lagercrantz S. Nucleotide sequence of a cDNA clone (SUBT1) partly homologous to a human subtelomeric repeats sequence [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1996, 39: 303 ~ 306.

## · 会 讯 ·

### “小麦分子与细胞遗传学国际研讨会”

#### 简 介

李振声, 王道文

(中国科学院遗传研究所植物细胞与染色体工程国家重点实验室, 北京 100101)

小麦是世界上最重要的粮食作物之一, 其遗传学研究历来受到各国政府和科学家的重视。近年来, 随着分子生物学技术的发展与应用, 麦类植物遗传学研究日新月异, 硕果累累。为了能及时了解近几年来麦类植物遗传学研究的成果, 增进国内外研究者间的交流, 经中国科学院遗传研究所植物细胞与染色体工程国家重点实验室(PCCE)组织, “小麦分子与细胞遗传学国际研讨会”于 2000 年 4 月 26 至 28 日在北京顺利召开。与会代表 40 多名, 分别来自中国、日本、澳大利亚、美国、英国及瑞士。会议共作学术报告 37 个, 共收到论文摘要 33 篇。参会的部分国外代表(如 Mike Gale, John Snape, Bikram Gill 和 Takashi Endo)是 PCCE 实验室的学术顾问, 参会的部分国内代表(如李振声、许智宏、陈佩度、辛志勇、贾继增和王道文)为重点实验室的学术委员会委员。因此, 此次研讨会将对 PCCE 实验室在过去几年的学术进展和在新世纪里的发展方向亦具有重要的历史意义。

会议期间, 国外代表就禾本科植物基因组结构共线性, 基因分布共线性, 小麦与环境互作的遗传学基础, 小麦品质改良, 由杀配子基因引起的小麦染色体结构的不稳定性以及小麦细胞遗传学技术与材料在小麦基因组研究中的应用潜力作了比较详细地讲解。此外, Bikram Gill 还向代表们介绍了美国科学基金会 1999 年度资助的“小麦基因组可表达组份的结构与功能”项目的研究内容与目标。PCCE 实验室研究人员就小麦高效吸收和利用磷元素的遗传学基础、小麦染色体工程系列材料蓝粒小麦的创制与遗传分析、小麦花粉植株基因组结构变异的机制与应用、利用外源基因改良小麦品质、Pm20 抗白粉病基因的分子标记以及利用双代换系杂交创制小麦易位系等内容作了学术报告。兄弟单位的代表就小麦抗白粉病和黄矮病的分子育种工作、小麦春化基因的遗传功能分析、小麦高分子麦谷蛋白基因的功能与我国小麦品质育种的关系以及小麦花粉发育过程中基因表达变化规律也作了精彩的报告。整个会议在积极而友好的气氛中进行, 代表们积极发言, 讨论热烈, 无缺席或早退的现象发生。我们对国内外同行对本次研讨会的支持表示衷心的感谢, 同时希望下一次研讨会能开得更好。

本次研讨会的论文摘要将在《遗传》上发表。