

# 牦牛、犏牛睾丸组织中 SYCP 3 基因 mRNA 表达水平研究

屈旭光, 李齐发\*, 刘振山, 董丽艳, 李新福, 郝称莉, 谢庄\*

(南京农业大学动物科技学院 动物生殖遗传与分子进化实验室, 南京 210095)

**摘要:** 本文采用 RT-PCR 和荧光定量 PCR 对牦牛 SYCP3 基因的组织表达, 以及 SYCP3 基因在牦牛和犏牛睾丸组织中的表达水平进行分析。结果表明, SYCP3 基因在牦牛睾丸组织中特异表达, 牦牛与犏牛睾丸组织中 SYCP3 基因的表达水平差异极显著 ( $P < 0.01$ )。睾丸和附睾组织切片显示, 牦牛睾丸组织中可见各级生精细胞, 附睾内可见发育良好的精子, 而犏牛睾丸组织中无次级精母细胞和更高级生精细胞, 附睾内未观测到精子, 与人和小鼠 SYCP3 基因缺失或表达水平降低出现的表型一致, 可以认为 SYCP3 基因的表达水平可能与犏牛的雄性不育有一定的关系。

**关键词:** SYCP3; 犏牛; 牦牛; 雄性不育; 组织表达谱; 荧光实时定量 PCR; 组织切片

中图分类号: S823.8<sup>+</sup>5.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)08-1132-05

## The Study on the Expression Level of SYCP3 mRNA in Yak and Cattle-yak Testis

QU Xu-guang, LI Qi-fa\*, LIU Zhen-shan, DONG Li-yan,

LI Xin-fu, HAO Chen-li, XIE Zhuang\*

(Laboratory of Animal Reproductive Genetics and Molecular Evolution, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The expression level of SYCP3 in yak and cattle-yak was studied by RT-PCR and real-time quantitative PCR in this paper. The results showed that SYCP3 was specific expressed in yak testis, and the difference of expression level between yak and cattle-yak was extremely remarkable ( $P < 0.01$ ). The tissue sections of testis and epididymis showed that there wasn't secondary spermatocytes or spermatids in cattle-yak testis, and sperm could't be observed in the epididymis. However, there were all levels of spermatogenic cells in yak testis, and sperms grew well in epididymis which was the same represent as man and mice lack or low express with SYCP3. SYCP3 gene was likely to have a relationship with male infertility of cattle-yak.

**Key words:** SYCP3; cattle-yak; yak; male infertility; expression profile; real-time quantitative PCR; tissue section

中国是世界上牦牛最多的国家, 占世界总数的 95% 以上<sup>[1-2]</sup>。牦牛 (*Poephagus Bos grunniens*) 是青藏高原高寒牧区人民赖以生存的生产资料和生活资料, 主要分布于青海、四川、西藏、甘肃、新疆、云南

等省区<sup>[3]</sup>, 具有适应力强、肉质好、用途广泛等优点, 但是随着生产的发展牦牛也逐渐暴露出生长缓慢、生产性能低等不足之处。为了提高牦牛的生产性能, 我国从 20 世纪 50 年代开始采用良种黄牛与牦

收稿日期: 2007-08-13

基金项目: 国家自然科学基金(30500360); 南京农业大学青年科技创新基金(KJ05011)

作者简介: 屈旭光(1983-), 男, 河南新密人, 硕士生, 主要从事动物生殖遗传研究, E-mail: quxuguang@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 李齐发(1975-), 男, 河南固始人, 副教授, 主要从事动物生殖遗传与分子进化研究, E-mail: liqifa@njau.edu.cn;

谢庄(1947-), 男, 江苏无锡人, 教授, 主要从事动物分子数量遗传学研究, E-mail: zxie@njau.edu.cn

牛进行杂交,杂种一代犏牛表现出很强的杂种优势:生长发育快、早熟,适应范围扩大,世代间隔缩小,奶、肉、役力等大幅度提高,深受牧区、半农半牧区和邻近农区群众的欢迎,但 F<sub>1</sub> 代犏牛雄性是不育的<sup>[4]</sup>。

黄牛、牦牛和犏牛的染色体数目相同,均为 60 (2n=60),组型没有太大差异<sup>[4-5]</sup>,因此犏牛雄性不育是有希望克服的。胡欧明等<sup>[6-7]</sup>研究发现,犏牛精子发生从初级精母细胞开始以后逐级受阻,犏牛精原细胞在减数分裂过程中仅有少数精母细胞的常染色体能形成联会复合体(Synaptonemal complex, SC)结构, X、Y 染色体没有明显的联会现象;组织学观察发现犏牛睾丸中的精母细胞数量很少,无精子细胞及精子<sup>[8]</sup>,因此,联会复合体不能正常形成可能是导致 F<sub>1</sub> 代犏牛雄性不育的原因。SYCP3(Synaptonemal complex protein 3)是联会复合体的重要组成部分<sup>[9]</sup>,与精子发生过程中的减数分裂密切相关<sup>[10-11]</sup>。研究发现,SYCP3 基因的表达水平与非阻塞性无精子症人群精子发生失败的程度相关<sup>[12]</sup>,而 SYCP3 基因的缺失会使联会复合体无法形成,影响 DNA 修复和重组蛋白的核心功能,导致减数分裂不能正常进行、精子发生失败,引起人<sup>[13-14]</sup>、小鼠<sup>[11]</sup>的不育。

本研究采用 RT-PCR 和荧光定量 PCR 技术对牦牛 SYCP3 基因的组织表达,以及 SYCP3 基因在牦牛和犏牛睾丸组织中的表达水平进行分析,从分子水平上探讨 SYCP3 基因 mRNA 的表达水平与犏牛雄性不育的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验动物

选取四川松潘、茂县牦牛屠宰场成年健康的公牦牛、公犏牛各 6 头,屠宰后采集下丘脑、垂体、睾丸、附睾、副性腺、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肺脏、胸肌等组织样,立即置于液氮中速冻, -70 °C 保存,用于提取组织总 RNA;在每个睾丸及附睾前、中、后段各取一约 2 cm×2 cm 的组织块,用 10% 中性甲醛现场固定,用于制作石蜡切片。

### 1.2 组织总 RNA 提取和反转录

用异硫氰酸胍-酚-氯仿 RNA 一步提取法提取各组织总 RNA,紫外分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度(OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> = 1.8~2.0)。用随机引物对总 RNA 进行反转录,反应体系为 25 μL: 2 μg 总 RNA, 1 μg 随机引物, 0.4 mmol/L dNTPs, 20 U RNasin, 200 U M-MLV 反转录酶(Promega 公司),

5 μL 5×RT Buffer(含 250 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 50 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 250 mmol/L KCl, 50 mmol/L DTT, 2.5 mmol/L Spermidine)。反应程序:先加 RNA 原液, dNTP 和随机引物, 70 °C 变性 5 min 后立即放冰上冷却,再加其余试剂,混匀后 37 °C 60 min, 95 °C 5 min。RT 产物 -20 °C 保存备用。

### 1.3 RT-PCR 反应与克隆测序

利用小鼠 SYCP3 基因 mRNA 全序列(GenBank 登录号为 AC125486)在 GenBank 数据库中进行检索,得到 1 条与其同源性很高的黄牛的相关 mRNA 序列(BC102433),利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,上游引物为 5'-GAGAAACAAGG-GAAGAAAAGG-3',下游引物为 5'-TGCTG-GAACAAAGTCAGAAAC-3',引物由大连宝生物工程公司合成。反应体系为 10 μL: 0.5 μL RT 产物, 1 U Taq DNA 聚合酶(TaKaRa 公司), 1 μL 10×PCR Buffer, 0.25 mmol/L dNTPs, 1.25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μmol/L 上游和下游引物。反应程序: 94 °C 3 min; 35 个循环(94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30 s); 72 °C 5 min。PCR 产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染后用凝胶成像系统拍照。

PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下割取目的片段,用 V-gene DNA 凝胶回收试剂盒(TIANGEN 公司)回收纯化。纯化的 PCR 产物送上海英骏生物技术有限公司做克隆测序。

### 1.4 荧光实时定量 PCR

以看家基因 3-磷酸甘油醛脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参,根据 GenBank 黄牛 GAPDH 基因序列(U85042)用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,上游引物为 5'-CACCCCTCAAGATTGTCAGC-3',下游引物为 5'-TCATAAGTCCCTCCACGAT-3',引物由大连宝生物工程公司合成。每个样品 2 个重复,用克隆有目的片段的质粒梯度稀释后作为标准品,制作标准曲线。反应体系为 20 μL: 1 μL RT 产物, 1 U EX Taq HS DNA 聚合酶(TaKaRa 公司), 4 μL 5×PCR Buffer, 0.3 mmol/L dNTP, 3.75 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μmol/L 目的基因上游和下游引物, 1 μL 20×SYBR green I。反应程序: 95 °C 1 min; 95 °C 10 s, 54 °C 10 s, 72 °C 15 s, 读板(Plate Read), 40 个循环; 72 °C 5 min; 进行熔解曲线分析: 65~94 °C, 每隔 0.2 °C 读板 1 次, 温度恒定 1 s 后读板; 72 °C 5 min。定量结果用 SPSS11.0 软件进行统计分析。

### 1.5 组织切片的制备

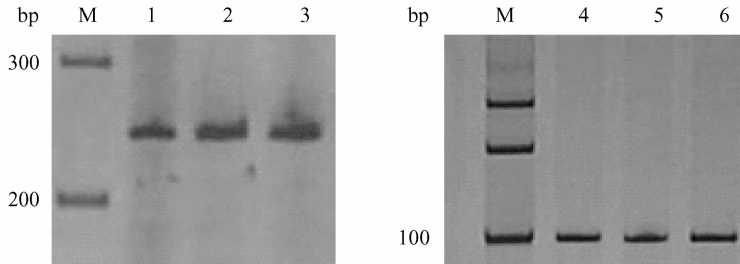
把 10% 中性甲醛固定的睾丸、附睾组织洗去固定液,经 70%、80%、95%、100% 系列酒精脱水,二甲苯透明、透蜡、石蜡包埋、切片(厚度为 5  $\mu\text{m}$ )、托片、烘干,再用 H. E 染色并封片保存,拍照。

## 2 结果与讨论

### 2.1 牦牛、犏牛 *SYCP3* 和 *GAPDH* 基因 RT-PCR 扩增结果

以牦牛、犏牛睾丸组织总 RNA 为模板,用所设

计的 *SYCP3* 和 *GAPDH* 引物分别进行 RT-PCR 扩增,结果见图 1。通过测序发现,*SYCP3* 基因的扩增产物为 251 bp,*GAPDH* 基因的扩增产物为 101 bp。用 DNAMAN5.2.2 对测序结果与引物设计源序列进行同源性比较,结果发现:牦牛、犏牛 *SYCP3* 扩增片段与引物设计源序列同源性为 100%;*GAPDH* 基因扩增片段的序列与引物设计源序列也完全相同,表明 PCR 扩增片段为牦牛、犏牛特异的 *SYCP3* 和 *GAPDH* 基因 cDNA 片段。



M. DNA 分子量标记(100 bp ladder);1. 犏牛 *SYCP3* 基因扩增片段;4. 犏牛 *GAPDH* 基因扩增片段;2,3. 牦牛 *SYCP3* 基因扩增片段;5,6. 牦牛 *GAPDH* 基因扩增片段

M. DNA molecular weight marker(100 bp ladder);1, 4. Fragments amplified of *SYCP3* and *GAPDH* respectively in cattle-yak ;2, 3 and 5,6. Fragments amplified of *SYCP3* and *GAPDH* respectively in yak

图 1 牦牛、犏牛 *SYCP3* 和 *GAPDH* 基因的 RT-PCR 电泳图

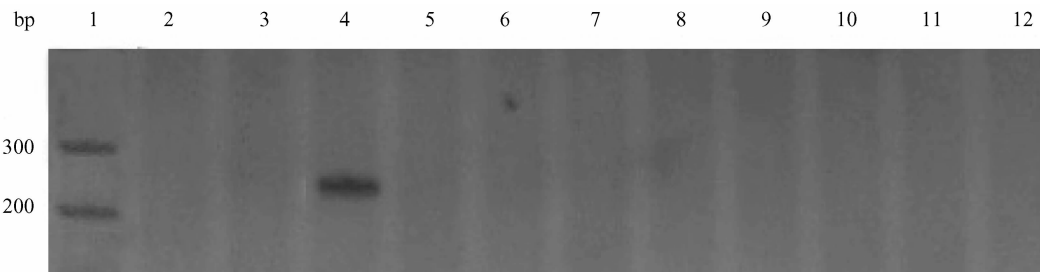
Fig. 1 RT-PCR of *SYCP3* and *GAPDH* mRNA of yak and cattle-yak testis

### 2.2 牦牛 *SYCP3* 基因的组织表达谱分析

利用 RT-PCR 对成年牦牛下丘脑、垂体、睾丸、附睾、副性腺、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肺脏、胸肌等 11 种组织中 *SYCP3* 基因的表达进行检测,结果见图 2。从图 2 可以看出,牦牛 11 个组织中仅在睾丸组织中检测到 *SYCP3* 基因的表达,说明牦牛 *SY-*

*CP3* 基因是睾丸特异表达的基因。

*SYCP3* 蛋白是 1 个 DNA 结合蛋白,定位于联合会复合体的侧成分<sup>[9]</sup>,在睾丸中特别是在初级精母细胞中表达<sup>[9,11]</sup>,在同源染色体配对中发挥重要作用,是精子发生过程中雄性减数分裂所必须的。Miyamoto 等<sup>[14]</sup> 和 Wang 等<sup>[12]</sup> 研究发现 *SYCP3* 基



1. DNA 分子质量标准(100 bp ladder);2. 下丘脑;3. 垂体;4. 睾丸;5. 附睾;6. 副性腺;7. 心脏;8. 肝脏;9. 脾脏;10. 肾脏;11. 肺脏;12. 胸肌

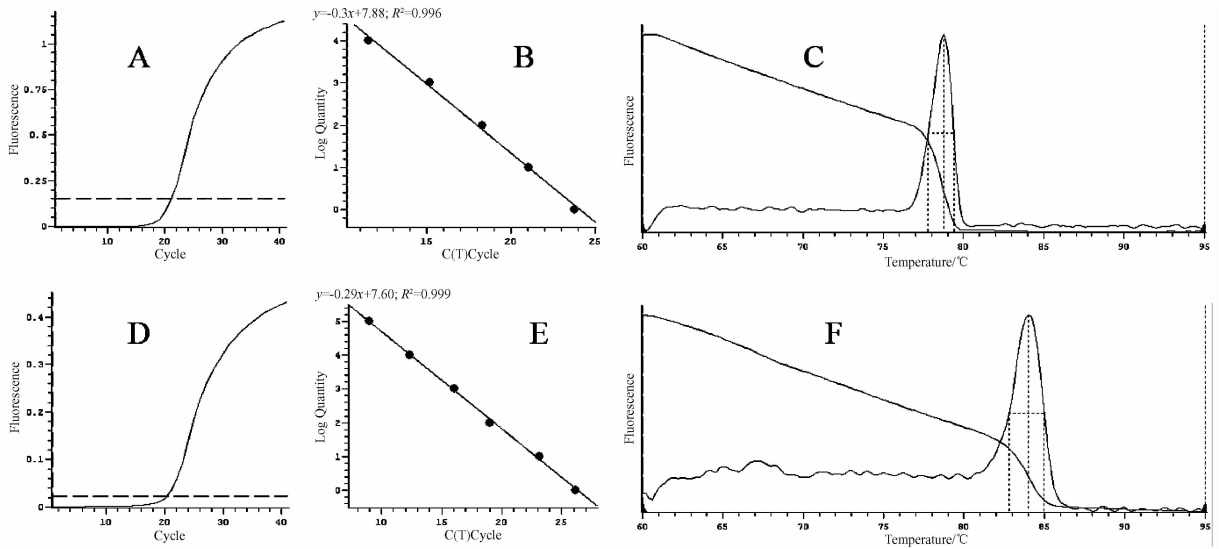
1-12. DNA marker (100 bp ladder), hypothalamus, hypophysis, testis, epididymis, accessory genital glands, heart, liver, spleen, kidney, lung, chest muscle

图 2 牦牛 *SYCP3* 基因在各组织中的表达

Fig. 2 The expression profile of *SYCP3* in yak

因在哺乳动物如人、小鼠等睾丸组织特异表达,与本研究结果一致,提示 SYCP3 基因可能与牦牛、犏牛精子发生过程中的减数分裂有关,是影响牦牛精子发生过程的 1 个重要候选基因。

### 2.3 牦牛和犏牛睾丸组织 SYCP3 基因 mRNA 表达水平分析

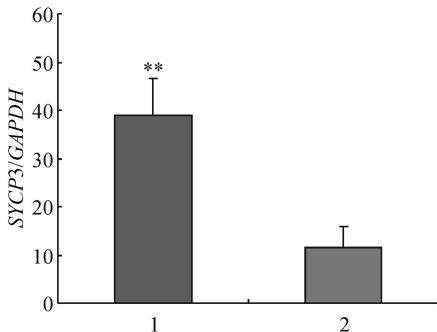


A. SYCP3 基因的扩增曲线; B. SYCP3 基因的标准曲线; C. SYCP3 基因的熔解曲线; D. GAPDH 基因的扩增曲线; E. GAPDH 基因的标准曲线; F. GAPDH 基因的熔解曲线

A and D, B and E, C and F represent the amplification, standard and melting curves of the SYCP3, GAPDH genes, respectively

图 3 SYCP3 及 GAPDH 基因的扩增曲线、标准曲线和熔解曲线

Fig. 3 The amplification, standard and melting curves of SYCP3 and GAPDH genes



1. 牦牛; 2. 犏牛; \*\*, 表示牦牛和犏牛 SYCP3 表达量差异极显著 ( $P < 0.01$ )

1. Yak; 2. Cattle-yak; \*\*, Denote the difference of expression level between yak and cattle-yak is extremely remarkable ( $P < 0.01$ )

图 4 牦牛和犏牛睾丸组织中 SYCP3 基因 mRNA 的表达水平

Fig. 4 Developmental changes of SYCP3 mRNA expression in yak and cattle-yak's testis

对牦牛和犏牛睾丸组织 SYCP3 基因 mRNA 表达水平进行了荧光定量检测(图 3), 结果见图 4, 从图 4 可以看出牦牛睾丸组织 SYCP3 基因 mRNA 表达量 ( $38.88 \pm 7.564$ ) 极显著高于犏牛 ( $11.470 \pm 4.301$ ) ( $P < 0.01$ )。

Aarabi 等<sup>[13]</sup> 研究发现 SYCP3 在 60% 的非阻塞性无精子症患者睾丸组织中表达, 且其表达水平与精子发生障碍的程度相关, 表达水平越低精子发生水平越低, 而 SYCP3 基因没有表达的患者则表现为精子发生中止。本文研究发现 SYCP3 基因在精子发生正常的牦牛睾丸组织中高表达, 而在精子发生障碍(无精子)的犏牛睾丸组织中表达水平很低, 与 Aarabi 等<sup>[13]</sup> 的研究结果一致, 说明 SYCP3 基因的表达水平与犏牛雄性不育有一定的关系。

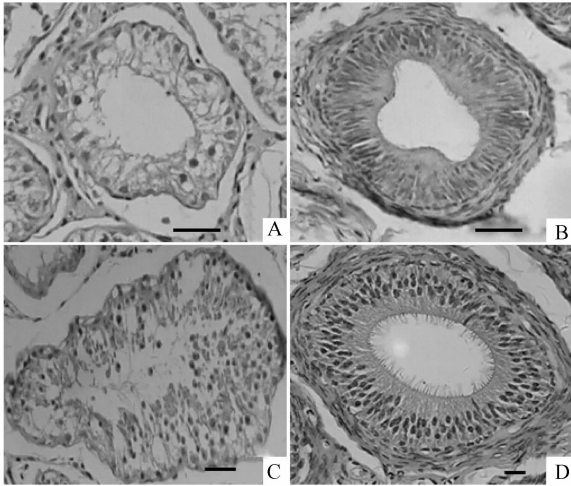
### 2.4 牦牛和犏牛睾丸、附睾组织学观察

Li 等<sup>[11]</sup> 对正常和 SYCP3 基因缺失小鼠进行睾丸组织学观察发现, 正常小鼠的睾丸组织中可见逐级发生的精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精细胞等, 而在 SYCP3 缺失的小鼠睾丸组织中, 只看到薄薄的一层精原细胞。Aarabi 等<sup>[13]</sup> 研究发现 SYCP3 基因低表达的患者睾丸组织中也只有

精原细胞和少量的精母细胞。

为了观察睾丸组织 *SYCP3* 基因 mRNA 表达水平呈极显著差异的牦牛、犏牛精子发生状况, 本文对牦牛和 F<sub>1</sub> 代犏牛的睾丸和附睾组织进行了组织切片分析(图 5), 结果发现犏牛睾丸组织生精小管管腔大小及形态不一致, 管壁皱缩, 生精小管上皮多由 1~2 层精原细胞构成, 有些精原细胞已经死亡, 初级精母细胞很少, 无次级精母细胞(图 5A), 附睾内未观测到精子(图 5B), 而牦牛睾丸组织生精小管发育正常, 可见各级生精细胞(图 5C), 附睾内可见发育良好的精子(图 5D)。

*SYCP3* 基因低表达的犏牛所表现出来的睾丸组织表型与小鼠<sup>[11]</sup>、人<sup>[13]</sup> *SYCP3* 基因缺失或低表达的表型基本一致, 进一步说明 *SYCP3* 基因可能与犏牛的雄性不育有一定的关系。



A 为犏牛睾丸组织切片(HE×13)。B 为犏牛附睾组织切片(HE×6.5)。C 为牦牛睾丸组织切片(HE×6.5)。D 为牦牛附睾组织切片(HE×13)

A. The tissue sections of cattle-yak testis(HE×13).  
B. The tissue sections of cattle-yak epididymis (HE×6.5).  
C. The tissue sections of yak testis(HE×6.5).  
D. The tissue sections of yak epididymis (HE×13)

图 5 牦牛和犏牛睾丸、附睾的组织切片

Fig. 5 The observation of the testis and epididymis in yak and cattle-yak by light microscope

#### 参考文献:

[1] 李齐发, 李隐侠, 赵兴波, 等. 牦牛线粒体 DNA 细胞色素 b 基因序列测定及其起源、分类地位研究[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(11): 1118-1123.

- [2] GU Z, ZHAO X, LI N, et al. Complete sequence of the yak(*Bos grunniens*) mitochondrial genome and its evolutionary relationship with other ruminants [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2007, 42(1): 248-255.
- [3] 陆仲磷. 中国的牦牛资源[J]. *中国草食动物*, 1999, 1(2): 42-45.
- [4] 《中国牦牛学》编写委员会. 中国牦牛学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1989: 244-252.
- [5] 郭爱朴. 牦牛、黄牛及其杂交后代犏牛的染色体比较研究[J]. *遗传学报*, 1983, 10(2): 137-143.
- [6] 胡欧明, 钟金城, 蔡立, 等. 犏牛精子发生水平的研究[J]. *西南民族学院学报(自然科学版)*, 1999, 25(1): 80-82.
- [7] 胡欧明, 钟金城, 陈智华, 等. 犏牛精母细胞联合会复合体与雄性不育关系的研究[J]. *西南民族学院学报(自然科学版)*, 2000, 26(1): 61-65.
- [8] 张旭静. 牦牛和普通牛种间杂种公牛睾丸的组织学观测与研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2001, 32(4): 314-318.
- [9] SCHALK J A, DIETRICH A J, VINK A C, et al. Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat [J]. *Chromosoma*, 1998, 107(8): 540-548.
- [10] BOTELHO R J, DINICOLO L, TSAO N, et al. The genomic structure of *SYCP3*, a meiosis-specific gene encoding a protein of the chromosome core [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1518(3): 294-299.
- [11] LI Ys, LIU J G, ZHAO J, et al. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility [J]. *Mol Cell*, 2000, 5(1): 73-83.
- [12] WANG P J, MCCARREY J R, YANG F. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia [J]. *Nat Genet*, 2001, 27: 422-426.
- [13] AARABI M, MODARRESSI M H, SOLTANGHORAEE H, et al. Testicular expression of synaptonemal complex protein 3 (*SYCP3*) messenger ribonucleic acid in 110 patients with nonobstructive azoospermia [J]. *Fertil Steril*, 2006, 86(2): 325-331.
- [14] MIYAMOTO T, HASUIKE S, YOGEV L, et al. Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in *SYCP3* [J]. *Lancet*, 2003, 362(9397): 1714-1719.