绒山羊 Scp3 基因的克隆及睾丸中第一轮减数分裂的发生

侯越, 吴应积*, 罗奋华, 苏慧敏, 张学明, 张岩, 白音巴图, 刘陶迪

(内蒙古大学 哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010021)

摘要: 联合复合体蛋白 3 (synaptonemal complex protein 3, Scp3) 是雄性生殖细胞减数分裂中联会复合体形成必需的组成部分, 在哺乳动物生殖细胞减数分裂中具有重要功能。通过 RT-PCR 扩增和分子克隆的方法首次克隆到了绒山羊 Scp3 基因的编码区片段。测序结果表明, 绒山羊与牛的 Scp3 基因编码序列同源率达到 98%。根据测得的 DNA 序列, 设计引物, 用 RT-PCR 方法分析测定了青春前期绒山羊不同个体中睾丸组织的 Scp3 的转录表达。结果显示, 雄性绒山羊青春前期睾丸发育存在个体差异, 已分析的样品第一轮减数分裂发生的时间普遍为 73 天之后。这一结果为绒山羊的睾丸发育和精子发生过程的相关研究打下了基础。

关键词: 绒山羊; 联合复合体蛋白 3; 克隆; 睾丸发育; 减数分裂

中图分类号: Q593.4; Q954.4; Q959.842 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2009)03-0341-04

Cloning of Cashmere Goat Scp3 Gene and Determining the First Round Meiosis in the Testes

HOU Yue, WU Ying-ji*, LUO Fen-hua, SU Hui-min, ZHANG Xue-ming,
ZHANG Yan, BAI Yin-ba-tu, LIU Tao-di

(The Key Laboratory for Mammalian Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Inner Mongolia University, Inner Mongolia Hohhot 010021, China)

Abstract: The synaptonemal complex protein 3 (Scp3) plays a crucial role in synaptonemal complex formation and male germ cells meiosis. Until now, no studies on goat Scp3 have been reported. In present study, we cloned the Cashmere goat Scp3 cDNA using RT-PCR and molecular cloning techniques. The Scp3 sequence of Cashmere goat showed 98% identity with that of bovine. Primers were designed according to the sequence we got and RT-PCR was performed to analyze the expression of Scp3 in prepubertal Cashmere goat testes. The results showed that the testes development in prepubertal goat varies in different animals, and the first round of meiosis in analyzed Cashmere goat testes occurs mostly after 73 days after birth.

Key words: Cashmere goat; Synaptonemal complex protein 3; Cloning; Testes development; Meiosis

联合复合体(synaptonemal complex, SC)是真核生物在性细胞发生过程中第一次减数分裂前期同源染色体配对时形成的一种核内临时结构(Alberts, 1994), 是一种呈框架状结构的蛋白质复合体, 在进化上十分保守, 见于绝大多数物种的减数分裂中。联合复合体蛋白质(synaptonemal complex protein, SCP)出现于减数分裂 I 前期的细线期(leptotene), 消失于双线期(diplotene); SC与染色体的凝缩、同源染色体的配对、重组以及双链断裂(double-strand

break, DSB)的形成有关(Roeder, 1997; Zickler, Kleckner, 1999; Heyting, 1996)。

目前在哺乳动物中已经发现的联合复合体蛋白质有3种, 分别命名为Scp1、Scp2和Scp3。SCP的表达缺失或SCP的基因突变可引起SC的异常或SC功能丧失, 使减数分裂发生失败或非整倍体配子的产生, 导致哺乳动物癌症的发生、精子发生障碍和不育等其他疾病的发生(Pelttari et al, 2001)。Scp3是雄性生殖细胞中联会复合体形成必需的组成部

收稿日期: 2008-12-29; 接受日期: 2009-03-11

基金项目: 国家高科技项目(863 项目编号: 2005AA206110)子课题; 内蒙古自治区自然科学基金(200408020402)

*通讯作者(Corresponding author), E-mail: yingji_wu@yahoo.com

第一作者简介: 侯越(1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向为动物生殖与分子生物学

分,同时对精母细胞中染色体联会、减数分裂和精子的发生也起着重要的作用(Yuan et al,2000)。Scp3基因的变异也直接导致无精症(Miyamoto et al, 2003)。

Scp3 基因在进化上高度保守。至今为止,人、大鼠、小鼠、牛的 Scp3 基因已经克隆其序列,而山羊的 Scp3 基因的序列至今还没有报道。本研究首次克隆了绒山羊的 Scp3 基因并与其他物种的 Scp3 基因进行了比对分析。

目前从分子细胞生物学角度对哺乳动物睾丸青春前期发育的研究还很少。对哺乳动物睾丸青春前期的发育研究大多是从形态学、激素调控、旁分泌的角度进行探讨(Chemes et al, 2008; Cazorla et al, 1998)。与雌性动物的减数分裂发生在卵子发生时期不同,雄性动物精子发生过程的减数分裂是动物出生后,在青春前期阶段发生的(Liu et al, 2007)。从细胞分化发育特征来看,青春前期睾丸发育可分为减数分裂前和减数分裂后两个明显的阶段。Scp3 是减数分裂特异的蛋白质(Yuan et al, 2002; Page, 2004)。因此我们选择 Scp3 基因的表达作为青春前期这两个阶段的分水岭。根据这个原理,我们应用 Scp3 基因的 DNA 序列信息,设计引物,以内蒙古自治区阿尔巴斯绒山羊为实验材料,首次对早期绒山羊个体 Scp3 基因的表达和第一轮减数分裂的时间点进行了初步探讨,以期研究绒山羊睾丸青春前期的发育打下基础。

1 材料与方法

1.1 试剂及耗材

pMD19-T载体、限制性内切酶和T4DNA连接酶、M-MLV反转录酶、Taq DNA聚合酶、DNA Marker等均购自TakaRa公司,总RNA提取试剂盒购至Watson和北京天根公司,胶回收试剂盒购至QIAGEN公司,其余质粒和菌株均为本实验室保存。其他化学试剂为国产的分析纯。

1.2 绒山羊Scp3基因的克隆

内蒙古白绒山羊新鲜的睾丸组织块从鄂尔多斯绒山羊生物技术繁育中心现场取得,总RNA提取利用总RNA提取试剂盒(Watson)按照使用说明书的操作程序进行。利用M-MLV反转录酶并按照使用说明书的操作程序进行cDNA第一链合成。PCR引物根据人、大鼠、小鼠、牛的Scp3基因的保守区,按牛的Scp3基因(BC102433)编码区的序列设计。引

物序列如下: P15'-GAAAAATGGTGGCCCTCTGG-AAG-3'; P25'-GGAGGTGAACAAAAAGAATGGT-3'。以得到的cDNA第一链为模板进行PCR,PCR反应体系为10 μ L,扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性4min; 94 $^{\circ}$ C变性40s, 56 $^{\circ}$ C退火40s, 72 $^{\circ}$ C延伸1min,共进行35个循环;然后72 $^{\circ}$ C延伸10min。Mg²⁺浓度通过梯度测试法优化。利用胶回收试剂盒回收目的片段PCR产物,连接到pMD19-T克隆载体上,经蓝白斑筛选、PCR检测和酶切鉴定,将所获阳性克隆送至北京华大基因研究所进行测序。

1.3 Scp3基因在早期个体中的转录表达

分别取45、56、66、69、73、86、95、102、110和122d的绒山羊睾丸组织,使用北京天根公司总RNA试剂盒提取各时期总RNA,利用M-MLV反转录酶合成cDNA第一链。以得到的cDNA第一链为模板,根据已克隆得到山羊Scp3的编码区的序列设计引物,用PCR方法分析鉴定Scp3基因在绒山羊早期个体睾丸组织中转录表达情况,PCR反应体系为10 μ L,扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C预变性4min; 94 $^{\circ}$ C变性40s, 58 $^{\circ}$ C退火40s, 72 $^{\circ}$ C延伸50s,共进行35个循环;然后72 $^{\circ}$ C延伸10min。以GAPDH作为内部参照,反应体系为10 μ L,扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C预变性4min; 94 $^{\circ}$ C变性40s, 59 $^{\circ}$ C退火40s; 72 $^{\circ}$ C延伸1min,共进行30个循环;然后72 $^{\circ}$ C延伸10min。所设计的山羊Scp3 PCR鉴定引物P3和P4和内部参照基因GAPDH的PCR引物序列如下:

P3: 5'-CGGGAAGTCTGCGAAACCATC-3'

P4: 5'-GGACACTTGCCATCTCTTGCTGC-3'

GAPDHS: 5'-GTTCCACGGCACAGTCAAGG-3'

GAPDHA: 5'-GTCCCTCCACGATGCCAAAG-3'

2 结 果

2.1 绒山羊Scp3基因的克隆

以3个月以上月龄的绒山羊睾丸组织为材料,提取总RNA,并以反转录获得的cDNA为模板,采用RT-PCR扩增Scp3基因片段。图1显示得到两个扩增产物,一个在800bp左右,称之为Scp3-S,与预期的DNA分子大小相符;同时出现一条非特异性扩增带,分子量在1000bp左右,称之为Scp3-L。分别回收PCR扩增的DNA片段,通过AT克隆法与pMD-19-T质粒载体连接,并转化感受态*E. coli* DH5 α 。利用抗生素和蓝白斑 α 互补筛选阳性重组体。随机挑取氨卡青霉素抗性的白色菌落,粗提质

粒然后进行PCR鉴定以及*EcoR* I 和*Sal* I 双酶切鉴定。所获阳性克隆送至北京华大基因研究所进行测序。

将基因测序结果与现有的牛、人等物种已公布的*Scp3*序列经BLAST比对，比对结果表明*Scp-L*与公布的其他物种的*Scp3*基因不具有同源性，而*Scp-S*则与已公布人、大鼠、小鼠*Scp3*序列具有较高的同源性，与牛的序列比对同源性更高达95%以上（表1）。以上结果表明，800bp左右的扩增产物为绒山羊的*Scp3*基因，通过与已公布的人、大鼠、小鼠、牛的编码区比对，确定得到的序列包括了编码区从起始密码子到终止密码子共有705个碱基。

表 1 绒山羊与其他已公布物种 *Scp3* 编码区序列的同源性比较
Tab. 1 Homology of the Cashmere goat *Scp3* coding sequence to those of other species

物种 Species	同源性 Homology (%)
人 Human (GeneBank 登录号: NM_153694)	89
大鼠 Rat (GeneBank 登录号: NM_011517)	84
小鼠 Mouse (GeneBank 登录号: NM_013041)	83
牛 Cattle (GeneBank 登录号: BC102433)	98

2.2 *Scp3*基因在早期不同时期个体睾丸组织中的表达情况

不同时期的睾丸组织取相同含量的总RNA，反转录的cDNA为模板，进行RT-PCR，同时以GAPDH为内部参照，分别检测了45、56、66、69、73、86、95、102、110和122d这几个时间点*Scp3*基因在绒山羊青春前期个体中的表达情况（图2），结果表明：56 d的绒山羊睾丸组织样品检测到*Scp3*基因的转录表达，45、66和69d三个样品中没有检测*Scp3*基因的转录表达，从73d后的所有样品都检测到*Scp3*基因的转录表达。

3 讨 论

本文通过对已报道的不同物种的*Scp3* cDNA的同源性的分析，利用RT-PCR克隆绒山羊的*Scp3* cDNA，测序得到的序列与已公布的大鼠、小鼠、人的*Scp3*的cDNA比对，同源性达83%以上，与牛的同源性更高，达到98%（表1）。测序结果显示绒山羊的*Scp3*基因的编码区cDNA片段已经克隆成功。

本研究从分子细胞生物学角度对绒山羊睾丸青春前期的生殖发育进行研究。山羊的青春期起始于出生后4个月左右(Nishimura et al, 2000)。在此之

图 1 不同MgCl₂浓度下RT-PCR扩增绒山羊*Scp3*基因片段

Fig. 1 RT-PCR products of Cashmere goat *Scp3* at different concentration of MgCl₂

图 2 *Scp3* 基因在不同时期表达情况的检测
Fig. 2 RT-PCR results of *Scp3* expression in testes of Cashmere goat at different days after birth

Upper panel, expression of *Scp3* transcript in testes of 45, 56, 66, 69, 73, 86, 95, 102, 110 and 122 days as indicated; lower panel, expression of GAPDH in the testes; M, DNA marker.

前，睾丸发育可分为减数分裂前和减数分裂后两个明显的阶段。*Scp3*是第一次减数分裂期特异表达的蛋白质(Yuan et al, 2002; Page, 2004)。因此我们选择*Scp3*基因的表达作为青春前期这两个阶段划分的标记，对*Scp3*在绒山羊青春前期睾丸组织的表达情况进行检测，首次研究了绒山羊睾丸第一轮减数分裂出现的时间。在本文采集的样品中，56 d的绒山

羊睾丸组织样品检测到Scp3基因的转录表达, 45、66和69d的样品未见Scp3有明显的转录表达, 而73d后的所有样品都检测到Scp3基因的转录表达。这一结果表明, 雄性绒山羊青春前期睾丸发育存在个体差异, 已分析的样品第一轮减数分裂发生的时间普遍为73天之后。由于个体发育情况有差异, 有的个

体青春前期的第一轮减数分裂出现时间可能提前。这一时间段的确定为我们今后进一步研究绒山羊的青春前期的睾丸发育提供了时间依据, 为绒山羊的青春前期精子发生过程减数分裂的发生研究奠定了基础。

参考文献:

- Alberts B, Bray D, Lewis J. 2002. Molecular Biology of the Cell (4th Ed) [M]. New York: Publishing Inc, 1135-1137.
- Cazorla O, Seck M, Pisselet C, Perreau C, Saumande J, Fontaine J, de Reviers M, Hochereau-de Reviers MT. 1998. Anti-Müllerian hormone (AMH) secretion in prepubertal and adult rams[J]. *J Reprod Fertil*, **112**(2): 259-266.
- Chemes HE, Rey RA, Nistal M, Regadera J, Musse M, González-Peramato P, Serrano A. 2008. Physiological androgen insensitivity of the fetal, neonatal and early infantile testis is explained by the ontogeny of the androgen receptor expression in sertoli cells[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, **93**(11): 4408-4412.
- Sun F, Handel MA. 2008. Regulation of the meiotic prophase I to metaphase I transition in mouse spermatocytes[J]. *Chromosoma*, **117**(5): 471-485.
- Heyting C. 1996. Synaptonemal complex: structure and function[J]. *Curr Opin Cell Bio*, **8**(3): 389-396.
- Lin YK. 1995. Advances in researches on synaptonemal complex[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, **17** (1): 22-26. [林亚康. 1995. 联合复合体的研究进展. 细胞生物学杂志, **17**(1): 22-26.]
- Liu JY, Wang XR, Zeng XL, Song YC. 2004. Synaptonemal complexes analysis in male fertility impairment in two men[J]. *Hereditas*, **26**(1): 13-17. [刘静宇, 王晓然, 曾宪录, 宋运淳. 2004. 2例男性育性障碍患者的联合复合体分析. 遗传, **26** (1): 13-17.]
- Miyamoto T, Hasuike S, Yorgev L, Maduro MR, Ishikawa M, Westphal H, Lamb DJ. 2003. Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in *Scp3*[J]. *The Lancet*, **362**: 1714-1719.
- Morelli MA, Werling U, Edelmann W, Roberson MS, Cohen PE. 2008. Analysis of meiotic prophase I in live mouse spermatocytes[J]. *Chromosome Research*, **16**(5): 743-760.
- Nishimura S, Okano K, Yasukouchi K, Gotoh T, Tabata S, Iwamoto H. 2000. Testis developments and puberty in the male Tokara (Japanese native) goat[J]. *Anim Reprod Sci*, **64**(1-2): 127-131.
- Page SL, Hawley RS. 2004. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**: 525-558.
- Peltari J, Hoja MR, Yuan L, Liu JG, Brundell E, Moens P. 2001. A meiotic chromosomal core consisting of cohesion complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells[J]. *Mol Cell Biol*, **21**: 5667-5677.
- Roeder GS. 1997. Meiotic chromosomes: It takes two to tango[J]. *Gene Dev*, **11**: 2600-2621.
- Liu Y, Wu C, Lyu Q, Yang D, Albertini DF, Keefe DL, Liu L. 2007. Germline stem cells neo-oogenesis in the adult human ovary[J]. *Developmental Biology*, **306**: 112-120.
- Yuan L, Liu JG, Hoja MR, Wilbertz J, Nordqvist K, Hooq C. 2002. Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3[J]. *Science*, **296**: 1115-1118.
- Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Hoog C. 2000. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis and male fertility[J]. *Mol Cell*, **5**: 73-83.
- Zickler D, Kleckner N. 1999. Meiotic chromosomes: Integrating structure and function[J]. *Annu Rev Genet*, **33**: 603-754.