

郑 鹏, 郑晓萌, 于 磊, 等. 牛 *DAZL* 基因序列分析、克隆及表达载体构建[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 34–36.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.010

牛 *DAZL* 基因序列分析、克隆及表达载体构建

郑 鹏, 郑晓萌, 于 磊, 赵 睿, 张贵学

(东北农业大学动物科学技术学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 利用生物信息学方法对牛 *DAZL* 基因的一级结构和同源性进行分析, 并根据牛 *DAZL* 基因序列设计引物来克隆该基因, 通过酶切、连接、转化构建该基因的表达载体, 成功克隆到了 *DAZL* 基因。生物信息学分析结果显示, 哺乳动物的 *DAZL* 基因同源性很高。此外, 构建了牛 *DAZL* 基因的带绿色荧光蛋白的真核表达质粒 pEGFP-N3-*DAZL*。

关键词: *DAZL* 基因; 序列; 克隆; 表达载体

中图分类号: S823.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0034-03

Deleted in azoospermia like (*DAZL*) 基因是 *DAZ* 基因家族中的一员, 最早克隆于蝇类的睾丸组织, 是一个在进化上高度保守的基因, 在脊椎动物的生殖细胞中特异表达, 是生殖细胞形成所必须的调控因子。*DAZL* 通过 RNA 识别基序与 mRNA 结合, 并以多聚体的方式在翻译水平发挥作用^[1]。*DAZL* 基因是 *BOULE* 基因通过基因修饰、倍增而来, 广泛分布于人类、鼠、爪蟾、蝶螈、斑马鱼、青鱼等物种中^[2]。许多物种的 *DAZL* 同系物对生殖细胞的分化都是非常重要的。*DAZL* 基因的突变、微缺失以及表达下调均可引起生精障碍, 导致雄性不育^[3]。Ruggi 等发现, 与正常鼠相比, 杂合 *DAZL* 基因缺陷鼠的畸形精子率增高, 但仍有正常生育力, 而纯合鼠表现为严重的生殖细胞减少, 成熟阻滞, 睾丸体积减小, 不能生育^[4]。此外, Schrans-Stassen 等研究证实, *DAZL* 基因敲除鼠表现出双睾丸干细胞数目减少、以及减数分裂早期精原细胞分化失败, 从而导致不育^[5]。因此, 研究 *DAZL* 基因及其编码蛋白对探索配子发生和成体生殖缺陷及修复具有重要意义。本试验主要对 *DAZL* 基因进行克隆和开展生物信息学分析, 并构建牛 *DAZL* 基因真核表达载体 pEGFP-N3-*DAZL*, 以期探索 *DAZL* 基因的功能和在精子发生过程中的作用提供前期基础和试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

成年牛(约 40 月龄)睾丸组织, 取自哈尔滨成高子屠宰场; Trizol Reagent 和 lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司, 反转录试剂盒购自 ABI 公司, pEASY-T1 Simple Cloning Kit 购自北京全式金生物技术有限公司, T₄ DNA 连接酶购自 NEB 公司, DMEM/F12、胎牛血清购自 Gibco 公司, PrimeSTAR HS

DNA 聚合酶、限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 及其他常规试剂均购自大连宝生物公司。

1.2 试验方法

1.2.1 牛 *DAZL* 基因的生物信息学分析 利用 DNASTra 软件分析 *DAZL* 的一级结构; 采用 Clustal X 进行 *DAZL* 基因同源性多重比对; 采用 MEGA4 程序构建分子进化树。

1.2.2 牛 *DAZL* 基因真核表达载体的构建 参照 GenBank 牛 *DAZL* 基因序列 (NM_001081725) 设计其编码区特异性克隆引物 F: CGGAATTCTATGCTGCTGCAAACTCTGAGACTC 和 R: CGGATCCAACAGACTTAAGCACTGCCCGACTT(上、下游分别引入 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切位点), 引物由华大基因公司合成。利用 Trizol 法提取成牛睾丸组织总 RNA, 并反转录成 cDNA, 以其为模板, 利用高保真 Prime-STAR HS DNA 聚合酶对牛 *DAZL* 基因全长编码区进行 RT-PCR 扩增, 目的片段经凝胶回收加 A 后连接到 pEASY-T1 simple 载体上, 进一步亚克隆到 pEGFP-N3 载体上。构建好的质粒经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定后, 送往北京华大公司测序。

2 结果

2.1 *DAZL* 基因的生物信息学分析

2.1.1 *DAZL* 基因一级结构分析 牛 *DAZL* 基因的 CDS 全长为 888 bp, 由 264 个腺嘌呤(A)、194 个胞嘧啶(C)、187 个鸟嘌呤(G)和 243 个胸腺嘧啶(T)组成, 4 种碱基的含量依次为 29.73%、21.85%、21.06%、27.36%。该基因 ORF 位于 1 888 bp, 编码 295 个氨基酸, 含 29 个强碱性氨基酸残基(K、R), 24 个强酸性氨基酸(D、E), 82 个疏水性氨基酸残基(A、I、L、F、W、V), 103 个极性氨基酸残基(N、C、Q、S、T、Y), 分子量为 33.02 Ku, 等电点为 8.78, 脯氨酸、丝氨酸、缬氨酸所占比例较高。

2.1.2 *DAZL* 基因同源性分析 从 NCBI 的 GenBank 数据库中选取人(*Homo sapiens*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、小鼠(*Mus musculus*)、牛(*Bos taurus*)、中国牦牛(*domestic yak*)、猪(*Sus scrofa*)、狨猴(*Callithrix jacchus*)、松鼠猴(*Saimiri sciureus*)、小黑猩猩(*Pan paniscus*)、獐猴(*Saguinus oedipus*)、原鸡(*Gallus gallus*)共 11 个物种的 *DAZL* 基因, 采用 Clustal X 进行多重比对, 结果显示牛与中国牦牛的同源性最高, 为 99%, 与小鼠、

收稿日期: 2014-03-21

基金项目: 黑龙江省普通高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室开放课题(编号: GXZSYS-2012-07); 东北农业大学博士启动基金(编号: 2012RCB27)。

作者简介: 郑 鹏(1979—), 男, 黑龙江兰西人, 博士, 讲师, 主要从事动物繁殖生理与繁殖技术研究。E-mail: zh-96128@163.com。

通信作者: 张贵学, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事动物繁殖生理与繁殖技术研究。E-mail: gxzhang@neau.edu.cn。

人、狨猴、小黑猩猩、猪、獼猴、松鼠猴、大鼠、原鸡的同源性分别为 98%、97%、97%、97%、97%、96%、96%、92%、80% (图 1)。

2.1.3 分子进化树构建 使用 MEGA4 程序, 采用 Neighbor-Joining 算法, Bootstrap 设为 1 000, 构建分子进化

树, 从树的拓扑结构上来看, 牛的 *DAZL* 基因与中国牦牛的关系最近, 与大鼠和小鼠一同构成了一个小群, 同人、獼猴、猪共同构成一个亚类群 (图 2)。

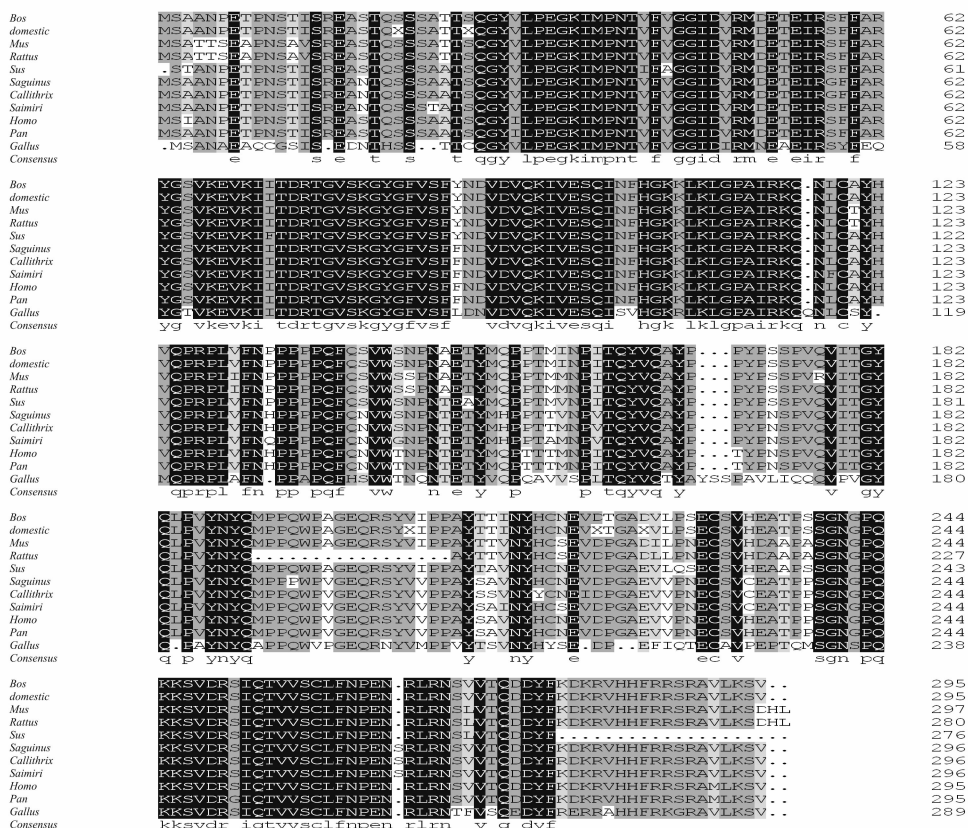


图1 *DAZL* 氨基酸的同源性比较

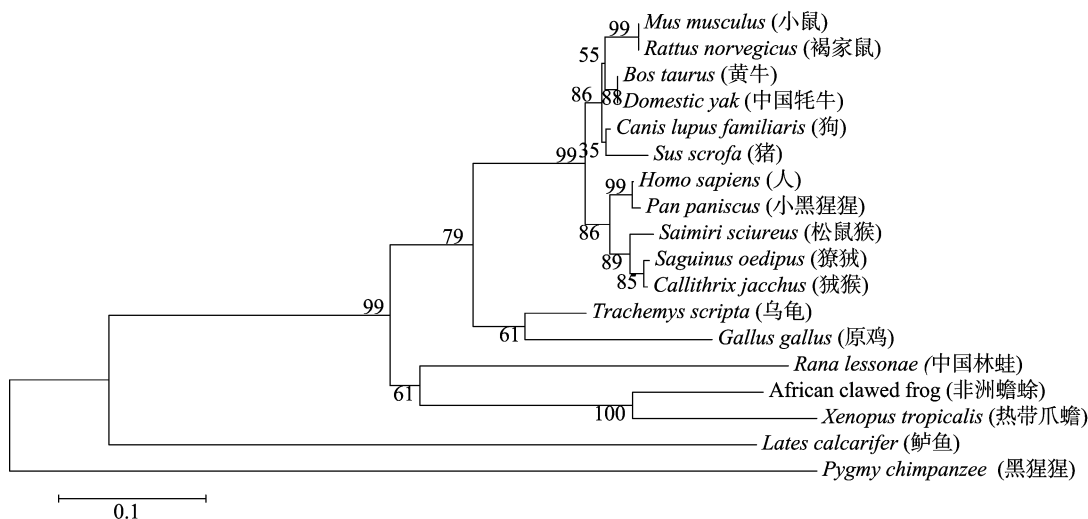


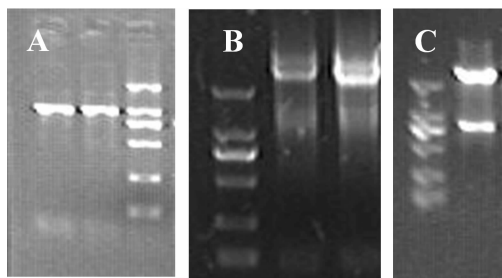
图2 基于 Neighbor-Joining 算法的 *DAZL* 基因分子进化树

2.2 *DAZL* 基因编码区的克隆

提取的 RNA 进行反转录合成 cDNA, 检测内参基因和 *DAZL* 基因的表达情况, 结果发现成年牛睾丸中有 *DAZL* 基因的表达。

以成年牛睾丸组织 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增出

1 条与预期长度相符的片段, 得到了 *DAZL* 基因的全部编码区 (图 3 - A)。将扩增出与预期长度相符的片段进行胶回收, 与 PMD18 - T 载体连接, 转化, 对构建的载体进行 PCR 鉴定和 *EcoR* I、*Bam*H I 双酶切鉴定, 结果显示在 902 bp 处出现特异条带 (图 3 - B、图 3 - C), 与预期的插入片段大小相符。

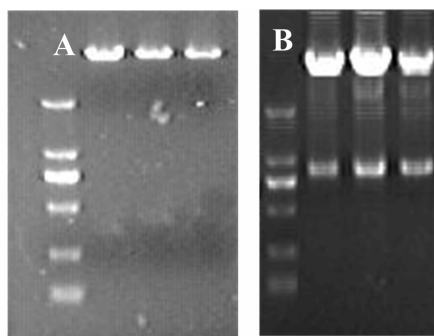


A—扩增 *DAZL* 基因的全部编码区；B—与载体连接的 PCR 鉴定；C—载体双酶切鉴定

图3 牛 *DAZL* 基因编码区的克隆、PCR 及双酶切结果

2.3 表达载体的制备与鉴定

将 *DAZL* - PMD18 - T 和 PEGFP - N3 进行 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切、胶回收,然后按摩尔比 1 : 1 的量,用 T4 DNA 连接酶进行连接,得到构建的载体,然后将构建好的 *DAZL* 表达载体进行 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切及 PCR 鉴定,琼脂糖凝胶检测为所要片段大小(图 4)。转化,挑菌阳性克隆进行序列测定,测序正确的质粒用于下一步的试验。



A—与载体连接的 PCR 鉴定；B—载体双酶切鉴定

图4 载体双酶切鉴定结果

3 讨论

不同物种 *DAZL* 基因具有高度的同源相似性,参与调控生殖细胞的发育和分化。有研究表明,*DAZL* 基因的缺失或突变会引起精子发生过程中减数分裂阻滞,导致精子缺乏和男性不育^[3]。小鼠 *DAZL* 基因突变可影响两性生殖细胞的功能,*DAZL* 基因敲除鼠表现出不育^[5]。*DAZL* 和 *BOULE* 都是 *DAZ* 家族的重要成员,二者都具有典型的 RNA 识别基序(RNA recognition motifs, RRM)和 *DAZ* 重复序列^[6],能够与一系列影响精子发生基因的 mRNA 结合,如 *CDC25A*、*TPX1*、*DDX4* 和 *TSSK3* 等^[7],并以多聚体的方式在翻译水平发挥作用。

将目的基因超表达是研究基因功能的主要手段之一^[8-9],即将目标基因与合适的载体相连接,使其在体外或体内过量表达,观察该基因超量表达后细胞或组织或机体所发

生的表型变化,从而对该基因的功能作出评价。Yu 等利用 *DAZL* 基因的超表达技术,将胚胎干细胞诱导分化成精子样细胞^[10-11],可见 *DAZL* 基因是精子发生的一个主要基因。本试验扩增牛 *DAZL* 基因的编码区,构建了 PEGFP - N3 - *DAZL* 表达载体,为进一步探讨 *DAZL* 基因超表达的体细胞能否向精细胞方向分化、*DAZL* 基因超表达的生殖干细胞能否加速分化形成精子奠定基础。

4 结论

本试验成功构建了牛 *DAZL* 基因的带绿色荧光蛋白的真核表达质粒 pEGFP - N3 - *DAZL*,为阐明 *DAZL* 基因调控精子发生的机制奠定基础。

参考文献:

- [1] Moore F L, Jaruzelska J, Dorfman D M, et al. Identification of a novel gene, DZIP (DAZ - interacting protein), that encodes a protein that interacts with DAZ (deleted in azoospermia) and is expressed in embryonic stem cells and germ cells [J]. *Genomics*, 2004, 83 (5): 834 - 843.
- [2] Saxena R, Brown L G, Hawkins T, et al. The *DAZ* gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned [J]. *Nature Genetics*, 1996, 14 (3): 292 - 299.
- [3] Reynolds N, Cooke H J. Role of the *DAZ* genes in male fertility [J]. *Reproductive BioMedicine Online*, 2005, 10 (1): 72 - 80.
- [4] Ruggiu M, Saunders P T, Cooke H J. Dynamic subcellular distribution of the *DAZL* protein is confined to primate male germ cells [J]. *Journal of Andrology*, 2000, 21 (3): 470 - 477.
- [5] Schrans - Stassen B H, Saunders P T, Cooke H J, et al. Nature of the spermatogenic arrest in *Dazl*^{-/-} mice [J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 65 (3): 771 - 776.
- [6] Eberhart C G, Maines J Z, Wasserman S A. Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human deleted in azoospermia [J]. *Nature*, 1996, 381 (6585): 783 - 785.
- [7] Liu Z, Li Q, Pan Z, et al. Comparative analysis on mRNA expression level and methylation status of *DAZL* gene between cattle - yaks and their parents [J]. *Animal Reproduction Science*, 2011, 126 (3/4): 258 - 264.
- [8] 束婧婷, 宋卫涛, 朱文奇, 等. *PGC - la* 基因在两种类型鸡骨骼肌间的表达差异 [J]. *江苏农业学报*, 2013, 29 (1): 121 - 125.
- [9] 蒋香菊, 吴阳升, 林嘉鹏, 等. 绵羊 *AMH* 基因的克隆、序列分析与原核表达 [J]. *江苏农业学报*, 2013, 29 (6): 1386 - 1392.
- [10] Yu Z, Ji P, Cao J, et al. *Dazl* promotes germ cell differentiation from embryonic stem cells [J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2009, 1 (2): 93 - 103.
- [11] Kee K, Angeles V T, Flores M, et al. Human *DAZL*, *DAZ* and *BOULE* genes modulate primordial germ - cell and haploid gamete formation [J]. *Nature*, 2009, 462 (7270): 222 - 225.