

生殖医学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000431

生精相关基因 Znf230 在小鼠睾丸及精子中的表达和定位研究

宋红霞¹, 张思仲²(1. 重庆三峡医药高等专科学校药理教研室, 重庆 404000; 2. 四川大学华西医院医学遗传研究室、
生物治疗国家重点实验室疾病基因组学研究室, 成都 610041)

【摘要】目的:应用小鼠 Znf230 多克隆抗血清, 对 Znf230 在小鼠睾丸及精子中的表达及定位进行研究。**方法:**用 RT-PCR 分析、Western blot 检测、免疫组织化学和免疫荧光染色方法研究 Znf230 在小鼠不同发育阶段睾丸组织及精子中的表达及亚细胞定位情况。**结果:**小鼠从出生到成年的发育过程中, Znf230 的表达水平基本上是稳定的。小鼠出生 6 d 和 12 d 时, 该蛋白在精原细胞核中表达, 从出生 18 d 到精子发育成熟这个阶段, 该蛋白转移到圆形精子细胞、延长精子细胞和精子中表达, 具体定位于顶体区域和精子的尾部。**结论:**Znf230 可能在小鼠生精过程中起着重要的作用。

【关键词】Znf230; 表达; 定位; 生精相关基因**【中图分类号】**R394.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-04-16

Expression and localization of the spermatogenesis-related gene Znf230 in mouse testis and spermatozoa

Song Hongxia¹, Zhang Sizhong²

(1. Department of Pharmacology, Chongqing Three Gorges Medical College; 2. Department of Medical Genetics, West China Hospital; Division of Human Morbid Genomics, State Key Laboratory of Biotherapy of Human Diseases, Sichuan University)

【Abstract】Objective: To detect the expression and location of Znf230 in mouse testis and spermatozoa by Znf230 polyclonal anti-serum. **Methods:** Expression and localization of Znf230 in mouse testis at different developmental stages and epididymal spermatozoa were determined by RT-PCR, immunoblotting, immunohistochemistry and immunofluorescence. **Results:** Znf230 remained relatively stable and was expressed throughout postnatal development of the mouse testis. It was primarily expressed in the nuclei of spermatogonia (from postnatal d 6 to postnatal d 12) and subsequently in the acrosome system and the entire tail of round spermatids, elongated spermatids and spermatozoa (from postnatal d 18 to mature sperm). **Conclusion:** Znf230 may play an important role in mouse spermatogenesis.

【Key words】Znf230; expression; localization; spermatogenesis-related gene

生精过程是一个非常复杂的过程, 其中涉及到与细胞分裂、分化、发育等过程有关的许多基因, 识别这些基因以及研究其功能对于了解生精过程和男性不育是非常重要的^[1-3]。

Znf230 是四川大学生物治疗国家重点实验室疾病基因组学研究室 2003 年分离克隆出来的一个

新基因, 它是人类生精相关基因 ZNF230 的小鼠同源基因^[4-5]。Znf230 属于 C3HC4 型锌指蛋白, 大多数的 C3HC4 型锌指蛋白均为核内转录因子^[6]。先前研究证明, Znf230 可在 Cos7 细胞和 HepG2 细胞的细胞核中表达^[7-8]。Znf230 具有 DNA 结合能力, 可能作为睾丸特异的转录因子在小鼠生精过程中发挥作用^[4,8]。Znf230 上游序列具有启动子功能, 5' 上游 CpG 岛非甲基化对该基因的表达是必要的但不是足够的^[9-10]。尽管获得了上述结果, 但是该基因在睾丸组织和精子中的表达情况以及在生精过程中的作用尚未阐明。本实验通过 RT-PCR、免疫印迹、免疫组织化学等方法对 Znf230 在小鼠不同发育阶段睾丸

作者介绍: 宋红霞, Email: xdhx163@163.com,

研究方向: 生精基因的功能研究。

通信作者: 张思仲, Email: szzhang@mcwucms.com。

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30470960); 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(编号: 2004CB518805)。

本文首次发表在 BMB reports, 2008, 41(9): 664-669。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000431.html>

和精子中的表达和定位情况进行研究。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

Trizol 试剂、逆转录酶和 RIPA 购于北京百泰克公司; HRP 羊抗兔 IgG 和免疫组化染色试剂盒为北京中杉生物技术公司产品; DAB、FITC 荧光二抗为大连宝生物公司产品; ECL 增强化学发光试剂盒为 PIERCE 公司产品; 小鼠 Znf230 多克隆抗血清及免疫前兔血清^[1]由本实验室保存。小鼠由四川大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 分析 分别取出生后 1、3、6、9、12、18、25 d 和成年小鼠的睾丸组织提取总 RNA, 逆转录酶作用下合成 cDNA。通过上游引物 5'-AGCAGTCACCTTGGTTCGAG-AAAG-3', 下游引物 5'-AATTCATGATCCGCGATGCTTCC-AC-3' 扩增 234 bp 的 Znf230 片段, 同时扩增 517 bp 的 β -actin 片段作为内对照。扩增参数如下: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 循环结束后 72 °C 终延伸 5 min。取 5 μ l 的 PCR 产物作琼脂糖凝胶电泳。

1.2.2 Western blot 检测 取出生后不同时期的小鼠睾丸组织(1、3、6、9、12、18、25 d、成年)进行液氮研磨和 RIPA 裂解, 提取总蛋白, Bradford 法测定蛋白浓度。取 20 μ g 蛋白上样, 电泳转膜, 抗血清作为一抗 1:5 000 稀释后与膜上的蛋白进行孵育, 再用 1:7 500 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 进行检测, ECL 显色后曝光。 β -actin 作为内参照, 重复实验 3 次。

1.2.3 免疫组织化学分析 小鼠不同发育阶段的睾丸组织(1、3、6、9、12、18、25 d、成年)10%甲醛固定、石蜡包埋、切片、脱蜡水化, 枸橼酸钠抗原修复; 双氧水去内源性过氧化物酶; 正常山羊血清封闭; 1:500 稀释的兔多克隆抗血清 4 °C 孵化过夜; 结合 1:1 000 稀释的生物素化二抗工作液; 洗涤后加辣根酶标记链霉卵白素工作液; DAB 显色、苏木精复染、中性树胶封片, 阳性染色为棕黄色。以免免疫前血清为对照, 重复实验 3 次。同时取成年小鼠睾丸组织切片进行 PAS(过碘酸-雪夫)染色, 该方法可以将顶体系统染成紫红色^[12]。

1.2.4 小鼠精子免疫细胞化学和免疫荧光染色 3 μ l 精子悬液涂在干净的载玻片上, 晾干。将玻片放入 95%乙醇中固定 30 min, 晾干。羊血清工作液室温封闭 2 h, 小鼠精子免疫细胞化学后续步骤同免疫组织化学方法。免疫荧光染色步骤如下: 羊血清室温封闭后加入 Znf230 抗血清(1:200 稀释于一抗稀释液中), 4 °C 过夜; 加入山羊抗兔荧光二抗(FITC 标记, 1:100 稀释于含 0.1%BSA 的 PBS); 封片后荧光显微镜观察。以免免疫前血清为对照, 重复实验 3 次。

1.2.5 Western blot 分析 收集精子细胞, 精子顶体和尾部片段以及二者的裂解液均按 Herrada 和 Wolgemuth^[13]描述的方法进行收集, 分别取成年小鼠睾丸组织的裂解液, 精子顶

体区域和尾部片段的蛋白裂解液 20 μ g 总蛋白进行 Western blot, 方法同上。

2 结果

2.1 Znf230 在小鼠不同发育阶段睾丸组织中的表达

RT-PCR 分析结果显示: 扩增出一条 234 bp 的 Znf230 DNA 片段和 517 bp 的 β -actin DNA 片段, 并且从出生到成年的整个发育阶段, Znf230 的表达基本上是稳定的(图 1)。Western blot 检测结果与 RT-PCR 分析结果基本相同, 除了 18 d 的时候有个相对短暂的中度的下降, Znf230 在小鼠出生后的表达水平基本上也是平稳的(图 2)。

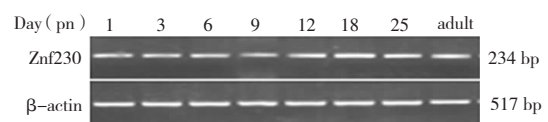


图 1 小鼠不同发育阶段睾丸组织中 Znf230 的 mRNA 表达

Fig.1 mRNA expression of Znf230 in mouse testis at different development stages detected by RT-PCR

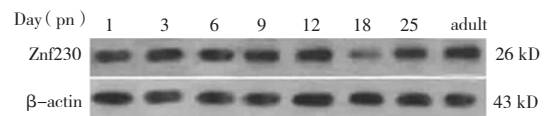


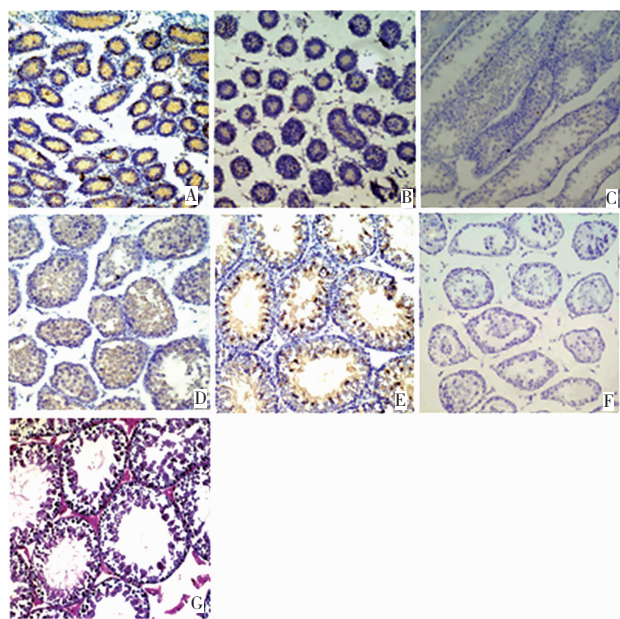
图 2 小鼠不同发育阶段睾丸组织中 Znf230 蛋白表达

Fig.2 Protein expression of Znf230 in mouse testis at different development stages detected by Western blot

2.2 Znf230 在小鼠不同发育阶段睾丸组织中的亚细胞定位

为了确定 Znf230 在小鼠睾丸组织中的时间和空间表达情况, 取出生后不同阶段的小鼠睾丸组织进行免疫组织化学分析。从图 3 和图 4 来看, Znf230 主要在精原细胞、圆形精子、延长精子和精子细胞中表达, 而不在其它细胞中表达。出生 6 d 的小鼠, 曲精管中主要为精原细胞和支持细胞, 这时 Znf230 主要在精原细胞核中表达(图 3A 和 4A); 出生 12 d 的小鼠, 精原细胞分化为初级精母细胞, Znf230 仍在精原细胞核中表达(图 3B 和 4B); 出生 18 d 的小鼠, 圆形精子细胞开始形成, Znf230 转移到圆形精子细胞中表达, 呈现月牙形状(图 4C), 此时不在精原细胞中表达; 出生 25 d 的小鼠, 圆形精子细胞逐步分化为延长精子细胞和成熟精子, 此时圆形和延长精子细胞大部分都被染成黄色(图 3D); 成熟的小鼠睾丸, Znf230 主要以 3 种不同的形态存在于顶体系统: 早期的圆形精子细胞, Znf230 定位在核上一个非常小的区域, 看上去像核上的一个点, 它主要在顶体系统的 Golgi 阶段表达(图 4D); 随着圆形精子细胞的发育, 阳性区域覆盖了大约核的一半, 看上去像一顶帽子(图 4E); 延长精子细胞的头部也有 Znf230 表达, 阳性染色为对应着顶体的一个延长区域(图 4F)。PAS(过碘酸-雪夫)染色证实 Znf230 确实是在顶体系统表达(图 3G)。最后, 该蛋白也出现在附睾精子细胞中, 在精

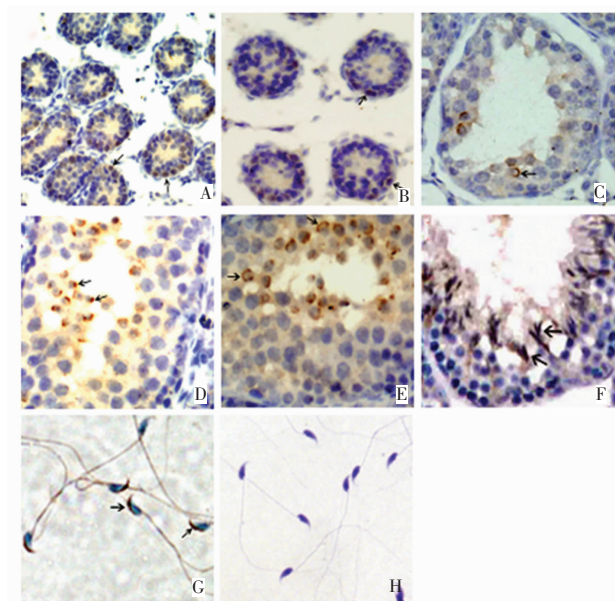
子顶体和整个尾巴表达(图 4G)。阴性对照无阳性染色(图 3F 和 4H)。



A. 出生 6 d 的小鼠;B.出生 12 d 的小鼠;C. 出生 18 d 的小鼠;D. 出生 25 d 的小鼠;E. 成年小鼠,A~E: Zn230 多克隆抗血清作为一抗 (阳性染色为棕黄色);F. 兔免疫前血清作为一抗,为阴性对照;G. PAS 染色(阳性染色为紫红色)

图 3 睾丸组织 Zn230 的免疫组化分析 (200 ×)

Fig.3 Immunohistochemistry of Zn230 in mouse testis (200 ×)



A. 出生 6 d 的小鼠;B.出生 12 d 的小鼠;C. 出生 18 d 的小鼠;D~F. 成年小鼠;G~H. 精子;A~G. Zn230 多克隆抗血清作为一抗 (阳性染色为棕黄色);H. 兔免疫前血清作为一抗,为阴性对照

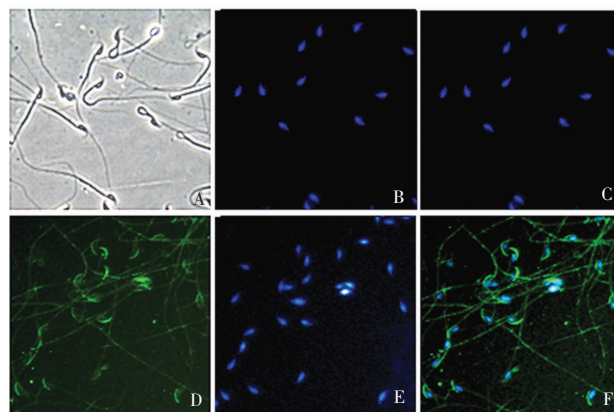
图 4 睾丸组织 Zn230 的免疫组化分析 (400 ×)

Fig.4 Immunohistochemistry of Zn230 in mouse testis (400 ×)

2.3 Zn230 在成年小鼠附睾精子细胞中的定位

为了证实 Zn230 在精子细胞上表达以及确定它的亚细

胞定位,应用间接免疫荧光染色方法进行了 Zn230 的定位研究。结果与前面相同,Zn230 在精子头部的顶体区域和整个尾巴上表达(阳性表达为绿色区域),阴性对照无阳性染色(图 5)。



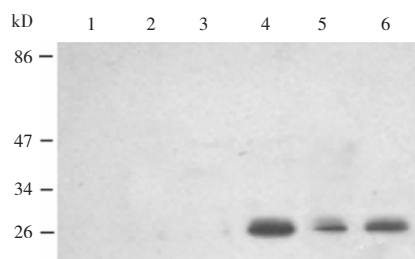
A. 空白对照图片;D. 免疫荧光染色图片 (绿色);B、E. DAPI 染色的精子细胞核 (蓝色);C. A 和 B 重叠;F. D 和 E 重叠;A~C. 兔免疫前血清作为一抗,为阴性对照;D~F. Zn230 多克隆抗血清作为一抗 (阳性表达为绿色)

图 5 小鼠精子 Zn230 免疫荧光染色分析 (400 ×)

Fig.5 Immunofluorescence analysis of Zn230 in mouse spermatozoa (400 ×)

2.4 Western blot 分析

Western blot 结果显示:抗血清检测到一条大约 26 kD 的蛋白条带,免疫前血清没有检测到任何条带。此结果提示,Zn230 在睾丸组织、精子顶体和尾巴中表达(图 6)。



1、4. 成熟小鼠睾丸组织裂解液;2、5. 精子顶体裂解液;3、6. 精子尾巴裂解液;1~3. 兔免疫前血清作为一抗,为阴性对照;4~6. Zn230 多克隆抗血清作为一抗

图 6 Western blot 分析

Fig.6 Western blot analysis of Zn230 in adult mouse testis, sperm acrosome and tail

3 讨论

哺乳类动物的精子发生是一个复杂的细胞分化过程,可分为 3 个阶段:有丝分裂期、减数分裂期和精子形成期^[14]。小鼠精子发生具有清晰可分的阶

段性,从出生开始到产后 34 d 左右第一轮精子发生完成。出生 6 d 时生精上皮基本由支持细胞和 A 型精原细胞组成;出生 8 d B 型精原细胞开始分化;出生 10 d 出现第一个减数分裂的精母细胞;出生 18~25 d 圆形精子细胞大量形成并逐步分化成精子^[15]。本实验 RT-PCR 和 Western blot 检测结果认为:小鼠从出生到成年的整个发育过程中,睾丸组织 Znf230 的表达水平基本上是稳定的。

在睾丸组织中,生精细胞的类型可以根据存在于生精管中的不同形态和位置来区分^[16]。在本实验中,小鼠出生 6 d 和 12 d 时,Znf230 在精原细胞核中表达,从 18 d 到精子发育成熟这个阶段,Znf230 不在精原细胞核中表达,而是转移到了圆形、延长精子细胞和精子中,具体定位于顶体系统和精子的尾部。Znf230 可能在小鼠生精过程中起着重要的作用。

关于 Znf230 早期在精原细胞表达,后期在圆形、延长精子细胞和精子中表达的现象,作者认为:Znf230 在睾丸组织中存在 2 个转录本,分别为 1 kb 和 4.4 kb,通过在数据库中对 2 个转录本的比对,发现这 2 个转录本表达同一蛋白^[4]。这 2 个转录本很有可能在不同的发育阶段表达,一个在精原细胞核中表达,另一个在单倍体细胞的顶体和尾部表达,为了确定哪个转录本表达的更早些,需要进行更多的研究。

总之,作为一种新型的锌指蛋白,Znf230 可能是精原细胞核、圆形和延长精子细胞以及精子顶体和尾部的新型蛋白。作为一种重要的生精相关蛋白,Znf230 在精子形成不同阶段的功能应进行详细的研究。

参 考 文 献

- [1] Escalier D.Impact of genetic engineering on the understanding of spermatogenesis[J].Hum Reprod Update,2001,7(2):191-210.
- [2] Maduro MR,Lamb DJ.Understanding new genetics of male infertility[J].J Urol,2002,168(5):2197-2205.
- [3] Cooke HJ,Hargreave T,Elliott DJ.Understanding the genes involved in spermatogenesis;a progress report[J].Fertil Steril,1998,69(6):989-995.
- [4] Qiu WM,Zhang SZ,Xiao CY,et al.Molecular cloning and characterization of a mouse spermatogenesis-related ring finger gene znf230[J].Biochem Biophys Res Commun,2003,306(2):347-353.
- [5] Zhang SZ,Qiu WM,Wu H,et al.The shorter zinc finger protein ZNF230 gene message is transcribed in fertile male testes and may be related to human spermatogenesis[J].Biochem J,2001,359(Pt3):721-727.
- [6] Freemont PS.The RING finger.A novel protein sequence motif related to the zinc finger[J].Ann N Y Acad Sci,1993(684):174-192.
- [7] Xu WM,Zhang SZ,Qiu WM,et al.Construction of recombinant ZNF230/GFP fused plasmids and their expression and cellular localization[J].Hereditas(Beijing),2004,26(4):451-454.
- [8] 卢攀,张思仲,刘运强.人睾丸特异表达蛋白 RNF141 与特定 DNA 序列结合的初步研究[J].山东医药,2010,50(13):55-56.
- [9] 刘运强,陶大昌,张思仲,等.小鼠 Znf230 基因启动子与 LacZ 报告基因融合载体的构建及其在细胞中的表达[J].四川大学学报(自然科学版),2006,43(2):420-424.
- [10] Liu YQ,Tao DC,Yang Y,et al.Unmethylated state of 5' upstream CpG islands may be necessary but not sufficient for the testis-enriched expression of ZNF230/Znf230[J].Genes Genom,2014,36(2):163-169.
- [11] 宋红霞,张思仲,杨季云.小鼠 Rnf141 多克隆抗体的制备及鉴定[J].四川大学学报:医学版,2008,39(5):697-700.
- [12] Leblond CP,Clermont Y.Spermiogenesis of rat,mouse,hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique[J].Am J Anat,1952,90(2):167-215.
- [13] Herrada G,Wolgemuth DJ.The mouse transcription factor Stat4 is expressed in haploid male germ cells and is present in the perinuclear theca of spermatozoa[J].J Cell Sci,1997,110(Pt14):1543-1553.
- [14] Cooke HJ,Saunders PT.Mouse models of male infertility[J].Nat Rev Genet,2002,3(10):790-801.
- [15] Bellve AR,Cavicchia JC,Millette CF,et al.Spermatogenic cells of the prepubertal mouse.Isolation and morphological characterization[J].J Cell Biol,1977,74(1):68-85.
- [16] Wolgemuth DJ,Rhee K,Wu S,et al.Genetic control of mitosis, meiosis, and cellular differentiation during mammalian spermatogenesis[J].Reprod Fertil Dev,1995,7(4):669-683.

(责任编辑:唐宗顺)