

# 小鼠睾丸特异基因在生精细胞中阶段性表达的定量分析

郭睿 李喜霞 王惠珍

(山西医科大学生物化学与分子生物学实验室 太原 030001)

**摘要:** 在 Balb/c 小鼠精子发生过程中,许多基因都具有严格的时空表达特性。实验利用半定量 RT-PCR 验证了 12 个小鼠精子发生相关基因的组织学分布,采用 SYBR Green 荧光定量 PCR 分析了它们在不同发育阶段生精细胞中的差异表达。结果显示,所有基因仅在睾丸组织中高表达; *Pmi1*、*Pmi2*、*Tnp1*、*Tnp2* 在长形精子细胞中的表达水平最高,分别是粗线期精母细胞阶段的 1.9、2.8、3.2 和 2 倍; *Dnajb3* 呈上调表达,在长形精子细胞中的含量是粗线期精母细胞阶段的 2.5 倍; *Akap4* 在长形精子细胞阶段的表达水平尤为突出,是粗线期精母细胞的 5.5 倍; *Spata3* 和 *Spata4* 在圆形及长形精子细胞中的表达量相近,分别是粗线期精母细胞阶段的 3 倍和 1.5 倍; *hils1* 和 *Tex24* 在圆形精子细胞阶段的表达水平最高,分别是粗线期精母细胞阶段的 1.9 和 1.4 倍; *Spag4l* 和 *Pap0lb* 从粗线期精母细胞到长形精子细胞阶段呈明显的下调表达,分别下降了 45% 和 34%。结果提示,被检测的基因具有明显的阶段特异性表达特征,为深入研究这些基因在小鼠精子发生过程中的作用提供了新资料,同时也为荧光定量 PCR 技术在精子发生相关基因定量表达研究中的可行性提供了充分例证。

**关键词:** 精子发生;荧光定量 PCR;小鼠;生精细胞

**中图分类号:** R321.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)01-39-08

## Stage-specific Expression Analysis of Mouse Testis-specific Genes in Spermatogenic Cells

GUO Rui LI Xi-Xia WANG Hui-Zhen

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

**Abstract:** Many testis-specific and stage-specific genes are required for mouse spermatogenesis. In this study, semi-quantitative RT-PCR was used to confirm the tissue distribution of 12 mouse testicular genes, and fluorescence quantitative PCR labeled with SYBR Green was applied to demonstrate the stage-specific expression of candidate genes at different spermatogenic stages. The results showed that all the genes examined were highly expressed in testis. The expression of *Pmi1*, *Pmi2*, *Tnp1*, and *Tnp2* was predominant in elongating spermatids, 1.9-, 2.8-, 3.2-, and 2-fold increase as compared with that in pachytene spermatocytes, respectively. *Dnajb3* expression was up-regulated 2.5-fold from pachytene spermatocytes to elongating spermatids. *Akap4* was strongly expressed at elongating spermatid stage, with 5.5-fold increase than that in pachytene spermatocytes. Both *Spata3* and *Spata4* were equally expressed in round and elongating spermatids, 3- and 1.5-fold increase as compared with pachytene spermatocytes, respectively. The expression levels of *hils1* and *Tex24* were the highest in round spermatids, with 1.9- and 1.4-fold

基金项目 国家自然科学基金青年项目(No. 30700911);

第一作者介绍 郭睿,女,博士,副教授;研究方向:分子发育生物学;E-mail: guoruipumc@yahoo.com.cn.

收稿日期:2008-07-14,修回日期:2008-11-10

increase from pachytene spermatocytes, respectively. *Spag4l* and *Pap0lb* were down-regulated from pachytene spermatocytes to elongating spermatids, decreasing 45 % and 34 %, respectively. The results not only demonstrate the stage-specific expression of these genes, but also provide new data for further investigations into the functions of these specific genes during spermatogenesis.

**Key words:** Spermatogenesis; Fluorescence quantitative PCR; Mouse; Spermatogenic cell

哺乳动物的精子发生是一个极其复杂而特异的细胞分化过程,表现出了许多体细胞所没有的现象。已知许多精子发生相关基因都呈现出明显的时空表达特性,在特定的细胞类型、特定的发育阶段转录表达,参与精原干细胞的增殖分化、同源染色体重组和精母细胞的减数分裂及精子细胞的形态学改变等特异过程<sup>[1]</sup>。发现并分析这类基因的表达特征可以为进一步认识哺乳类精子发生的分子机制提供前期基础和有价值的研究线索。

Balb/c 小鼠精子发生是在睾丸组织曲精小管内进行的,同时混杂存在着多种体细胞、支持细胞、间质细胞以及处于不同分化发育阶段的生精细胞。目前大多数研究是以睾丸组织或曲精小管直接作为实验材料,无法排除其他细胞对生精细胞的干扰,因此,不能对精子发生相关基因的特异性表达进行准确的细胞定位。本文首先利用重力沉降结合细胞贴壁培养的方法分离纯化了各类生精细胞,为进一步研究睾丸特异基因在生精细胞中的差异表达提供了可靠的实验材料。以往研究基因表达常用的方法有 Northern 杂交、RT-PCR,而近年发展起来的荧光定量 PCR 技术不仅实现了从定性到定量的飞跃,与 Northern 杂交、普通 PCR 相比,具有方便、快速、准确、灵敏度高、可靠性强、实时监测等优点,已广泛应用于基因的差异表达分析<sup>[2]</sup>。本实验应用荧光定量 PCR 技术结合生精细胞的分离纯化,分析了 12 个小鼠睾丸特异基因在不同生精细胞中的定量表达,旨在探讨荧光定量 PCR 分析技术在精子发生相关基因定量表达研究中的可行性。

实验首先分析了鱼精蛋白基因 (Protamine gene, *Pm*) 和转型蛋白基因 (Transition protein gene, *Tnp*) 的阶段特异性表达。这类基因具有

显著的阶段性差异表达特征,在减数分裂后的精子细胞中应呈高水平转录。因此,可以用来验证所获生精细胞的纯度。在此基础上,选择一些与精子细胞变态成形过程有关的候选基因进行定量分析。因为精子细胞变态成形是精子发生的关键环节,对相关基因的研究有助于揭示精子发生的分子机制。实验分析了热休克蛋白 Hsp40 同源蛋白 DnaJ B 亚家族成员 3 [DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 3, *Dnajb3*]、A 激酶锚定蛋白 4 [A kinase (PKA) anchor protein 4, *Akap4*]、精子细胞组蛋白 H1 类似蛋白 1 (histone H1-like protein in spermatids 1, *hils1*)、睾丸特异性多聚 A 聚合酶 [poly (A) polymerase beta (testis specific), *Pap0lb*]、精子相关抗原 4 类似蛋白 (sperm associated antigen 4-like, *Spag4l*) 编码基因及睾丸表达基因 24 (testis expressed gene 24, *Tex24*) 在不同类型生精细胞中的表达。虽然这些基因已经被证实为睾丸特异表达,但大多是应用睾丸组织或不同区段曲精小管为实验材料进行研究的,不能做到准确的细胞定位;有些基因则是采用普通 PCR 进行半定量分析的结果,无法获得客观的量化指标,对后续研究不能起到指导意义;甚至个别基因的表达特征因所用研究方法不同还存在一定差异,有必要进一步明确。精子发生相关基因 3 (spermatogenesis associated 3, *Spata3*) 和精子发生相关基因 4 (spermatogenesis associated 4, *Spata4*) 是近年才被发现的睾丸特异基因<sup>[3,4]</sup>,并且作为本课题组研究的主要靶标,对其进行准确的定量分析有助于后期深入研究。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物和样品处理** 体重 25 g 左右的成年雄性和雌性 Balb/c 小鼠,购自维通利华实

验动物有限公司。颈椎脱臼处死小鼠,取出脑、心、肺、肝、脾、肾、卵巢、子宫和睾丸组织,浸入 RNAlater 固定液中,贮存于 -80℃。

**1.2 总 RNA 的提取和 RT-PCR 分析** 总 RNA 的提取按照 RNeasy 试剂盒 (Qiagen) 说明进行。经 RNase-free DNase 处理后,用紫外分光光度计 (Eppendorf) 定量,1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。逆转录采用随机引物法,取 1 μg RNA

作为模板,利用 MMLV 逆转录酶 (Promega) 获得 cDNA 第一链。依据 GenBank 收录的各基因 cDNA 编码序列,运用 Primer Express 3.0 (ABI) 软件设计引物(表 1),Takara 公司合成。PCR 扩增条件为:94℃ 变性 20 s,52℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,进行 32 个循环。实验同时以 *-actin* 管家基因作为内参照,扩增 25 个循环。PCR 产物经 3%琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下成像。

表 1 RT-PCR 及定量 PCR 所用引物

Table 1 Primer pairs used for RT-PCR and quantitative PCR

基因名称(收录号)		引物序列(5' 3')	相对位置	产物长度
Gene name (Accession No.)		Primer sequence (5' 3')	Relative position	Product size (bp)
<i>Akap4</i> (NM009651)	上游 Forward	CAA CCA GAA GCA AGG AAA C	746 ~ 765	132
	下游 Reverse	GCA TAA GGG CAG AGA CAA	859 ~ 877	
<i>Spag4l</i> (NM029599)	上游 Forward	TGA CAC CTG GGA ACT GCT	656 ~ 674	218
	下游 Reverse	TGG CTG AAA CTG GAA TCC	855 ~ 873	
<i>Tex24</i> (NM001013609)	上游 Forward	CCC TGA CCC TAA TCC AAG C	279 ~ 298	97
	下游 Reverse	CCC AAC AAA TGT CTG CCT G	356 ~ 375	
<i>Papolb</i> (NM019943)	上游 Forward	TCA GTC GIT TCC AGC ACC	1 257 ~ 1 275	83
	下游 Reverse	GCT TCT TCA ACA CTA ACC CG	1 319 ~ 1 339	
<i>Spata3</i> (NM027300)	上游 Forward	ATT TCA CCG CAG ACT AGC TC	52 ~ 71	281
	下游 Reverse	CAC TGC TGC TTT CCT GCT TG	287 ~ 306	
<i>Spata4</i> (NM133711)	上游 Forward	TGT CGG AAC TAC TAA GCA ATC	578 ~ 599	196
	下游 Reverse	CCT CTT GAC TTG TAT CTG CG	753 ~ 773	
<i>Tnp1</i> (NM009407)	上游 Forward	AGG AGA GGC AAG AAC CGA GC	37 ~ 57	131
	下游 Reverse	TCA CAA GTG GGA TCG GTA	151 ~ 168	
<i>Tnp2</i> (NM013694)	上游 Forward	CCT CAA AGT CAC ACC AGT AAC CAG	61 ~ 85	200
	下游 Reverse	GTC TTC CTG TTC TTG GGG CA	240 ~ 260	
<i>Pmm1</i> (NM013637)	上游 Forward	AGA TAC CGA TGC TGC CGC	7 ~ 25	136
	下游 Reverse	ACC TTA TGG TGT ATG ACC G	123 ~ 142	
<i>Pmm2</i> (NM008933)	上游 Forward	CAC CAC CAC CAC AGA CA	139 ~ 156	151
	下游 Reverse	ATC TCC TCC TCC TTC GG	272 ~ 289	
<i>Dnajb3</i> (NM008299)	上游 Forward	GGC TTC GCT TCG TTA GAT AC	463 ~ 483	130
	下游 Reverse	TTT CGG TGG AGG TTG ACA	574 ~ 592	
<i>hils1</i> (NM018792)	上游 Forward	TTG TGT GTC CCT TGC TAC C	159 ~ 178	225
	下游 Reverse	TGG CTC TTC TGT CTG TCC T	364 ~ 383	
<i>-actin</i> (NM007393)	上游 Forward	CTA TTG GCA ACG AGC GGT	746 ~ 764	132
	下游 Reverse	GGT CTT TAC GGA TGT CAA CG	857 ~ 877	

**1.3 生精细胞的分离和纯化** 各阶段生精细胞的分离纯化主要依据文献<sup>[5]</sup>描述进行。分别利用 9、14、21、35、60 d 龄雄性小鼠分离获得精原细胞、前细线期精母细胞、粗线期精母细胞、圆形精子细胞和长形精子细胞,所需小鼠数量依次为 25、20、15、10、5 只。生精细胞的分离纯

化过程简述如下:颈椎脱臼处死小鼠,无菌操作取出双侧睾丸,置于冰冷的 PBS 溶液中。剥去白膜,将曲精小管充分分离,并剪成 1 cm 长的小段,移入离心管中,PBS 溶液洗涤数次。加入胶原酶至终浓度 0.25%,33℃ 温育消化,间断敲打,使之成为细胞悬液,镜检时视野中为散在的

单细胞。1 000 r/min 离心 5 min,收集沉淀, PBS 洗涤数次,经 200 目细胞筛过滤后,将细胞沉淀重悬于含 0.5% BSA 的 10 ml PBS 中,制成单细胞悬液。固定好沉降池,从池底部出口缓慢加入单细胞悬液。将含有 4% 和 2% BSA 的 1640 培养基各 250 ml 倒入梯度发生器内,调整流速,使培养基以 15 ml/min 的速度从底部出口进入沉降池,最终形成 2%~4% 的 BSA 连续梯度。4 沉降 3 h,使生精细胞因大小、密度不同在 BSA 梯度介质中通过自然重力沉降而分层。收集细胞,苏木素染色,光镜下观察每管细胞的组成及纯度。将纯度 85% 的同类细胞合并,接种到无菌培养瓶中,37<sup>o</sup> 5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养 6~8 h,因支持细胞贴壁生长,而生精细胞呈悬浮状态,故吸出培养液,经离心、沉淀后,获得纯化的各类生精细胞。其相应纯度分别为:精原细胞 90%、前细线期精母细胞 88%、粗线期精母细胞 95%、圆形精子细胞 96%、长形精子细胞 92%。如前所述,使用 RNeasy 试剂盒提取细胞总 RNA 并经 MMLV 逆转录获得 cDNA 第一链。

**1.4 荧光定量 PCR 反应** 实时荧光定量 PCR 采用 Ct 法。使用 SYBR<sup>R</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 试剂盒 (Takara) 在 StepOnePlus<sup>TM</sup> Real Time PCR 扩增仪 (ABI) 上进行。首先将逆转录获得的 cDNA 进行连续 10 倍稀释 (1/10~1/100 000) 作为模板,采用优化的反应条件进行 *-actin* 的定量 PCR 反应,考察随模板浓度变化扩增曲线的起峰情况,以便最终选择模板的使用浓度。确定模板使用浓度后,建立 20  $\mu$ l 反应体系,包括 2  $\times$  SYBR<sup>R</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 10  $\mu$ l, cDNA 模板 2  $\mu$ l, 引物各 0.4  $\mu$ l (10 pmol/L)。具体反应条件为: 95<sup>o</sup> 预变性 10 s, 94<sup>o</sup> 变性 15 s, 52<sup>o</sup> 退火 25 s, 72<sup>o</sup> 延伸 25 s, 共进行 40 个循环。每个样本同时设立 3 个平行管,每次反应均设置熔解曲线分析,以证实无非特异性扩增。反应完成后,系统软件将自动给出每个样本扩增的 Ct 值,又根据目的基因和管家基因的 Ct 值,计算出目的基因的相对表达量,以  $2^{-Ct}$  表示。在判定目的基因的阶段性差异表达时,设定粗线期精母细

胞阶段的表达量为 1,则其他细胞阶段基因的表达量以相对倍数表示。扩增后的产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳进行分离、鉴定。上述定量分析实验均重复 3 次。

## 2 结果

**2.1 RT-PCR 分析组织特异性表达** 半定量 RT-PCR 分析显示 *Pmm1*、*Pmm2*、*Tnp1*、*Tnp2*、*Papolb*、*Tex24*、*Dnajb3*、*hils1*、*Spag4l* 和 *Spata3* 仅仅在睾丸组织中高表达。*Akap4* 和 *Spata4* 除在睾丸组织中具有高水平表达外,在卵巢、子宫组织中也能检测到微量表达 (图 1)。

**2.2 荧光定量 PCR 分析阶段特异性表达** 通过对管家基因 *-actin* 的荧光定量扩增曲线 (图 2) 进行分析,发现 100 倍稀释的模板 cDNA 浓度可获得理想的扩增效率,因此,在定量分析基因的差异表达时,以该浓度作为模板最终的使用浓度。实验中每对引物的熔解曲线均呈现单一峰值,表示无非特异性扩增存在。对扩增后产物进行 3% 琼脂糖凝胶电泳分析,也表明目的条带大小均与预期一致,且无非特异性杂带出现 (图 3)。以粗线期精母细胞阶段的基因表达量为 1,计算获得各基因在不同发育阶段生精细胞中的相对表达量如图 4 所示。

从图 3 和图 4 可以看到 12 个候选基因在精原细胞阶段均不表达。在前细线期精母细胞中,也只有 *Dnajb3*、*Spata3*、*Spata4*、*Tex24* 和 *Spag4l* 被检出有微弱的扩增信号。但从粗线期精母细胞到长形精子细胞阶段,所有候选基因均表现出不同的差异表达特征。*Pmm1*、*Pmm2*、*Tnp1* 和 *Tnp2* 主要在圆形及长形精子细胞阶段高表达,呈明显的上调趋势。*Pmm1* 在长形精子细胞中的表达水平是粗线期精母细胞阶段的 1.9 倍;*Pmm2* 则达到了 2.8 倍;*Tnp1* 在圆形和长形精子细胞中的表达较粗线期精母细胞阶段显著增高,分别上升 2.8 和 3.2 倍;*Tnp2* 在长形精子细胞中的表达水平是粗线期精母细胞中的 2 倍。另外,还可以明显看到,*Akap4* 基因在长形精子细胞阶段的表达非常突出,分别是粗线期精母细胞和圆形精子细胞阶段的 5.5 倍和

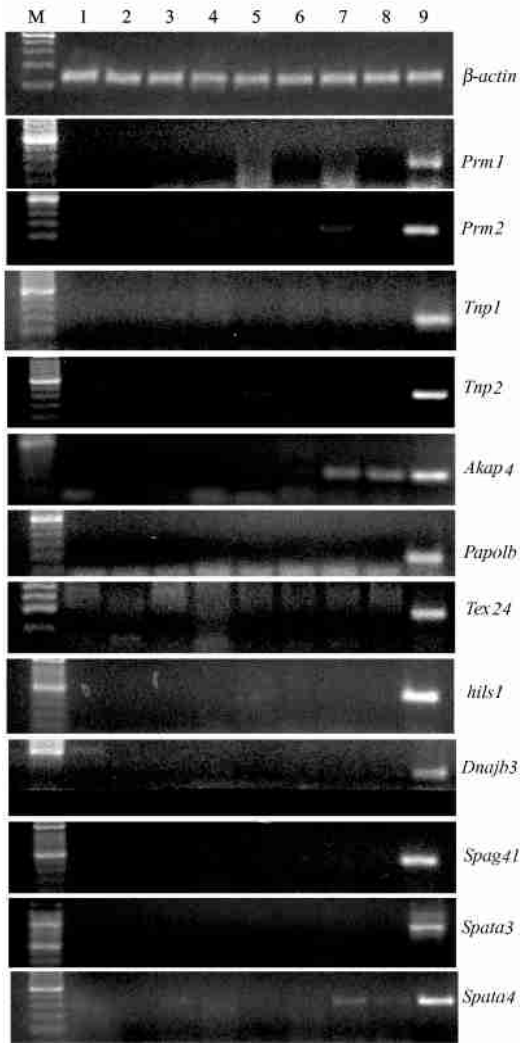


图 1 RT-PCR 验证组织特异性分布

Fig.1 Tissue distribution of candidate genes as confirmed by RT-PCR

M: 50 bp DNA 分子量标准; 1: 脑; 2: 心; 3: 肺; 4: 肝; 5: 脾; 6: 肾; 7: 卵巢; 8: 子宫; 9: 睾丸; *-actin* 为内参照。  
 M: 50 bp ladder DNA marker; 1: Brain; 2: Heart; 3: Lung; 4: Liver; 5: Spleen; 6: Kidney; 7: Ovary; 8: Uterus; 9: Testis; *-actin* is a positive control.

3.3 倍; *Dnajb3* 基因表现为逐步上调表达, 在长形精子细胞阶段的表达水平达到了粗线期的 2.5 倍; *Spata3* 在精子细胞中的表达显著增高, 是粗线期精母细胞阶段的 3 倍, 但在圆形和长形精子细胞中无显著差异; *Spata4* 基因上调表达趋势不明显, 从粗线期阶段到长形精子细胞阶段仅仅增高了 50%; *hils1* 和 *Tex24* 在圆形精

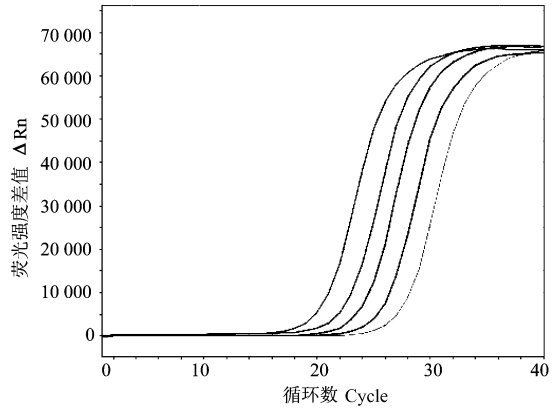


图 2 以 1 10~1 100 000 稀释 cDNA 为模板扩增 *-actin* 的扩增曲线

Fig. 2 Amplification of *-actin* with diluted cDNA samples at 1 10 - 1 100 000

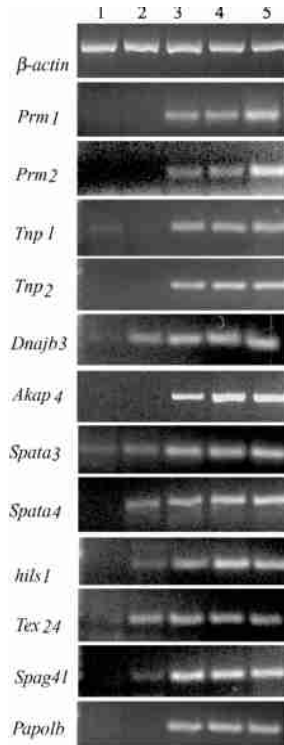


图 3 荧光定量 PCR 分析基因的阶段性表达

Fig. 3 Stage-specific analysis of candidate genes by fluorescence quantitative PCR

1: 精原细胞; 2: 前细线期精母细胞; 3: 粗线期精母细胞; 4: 圆形精子细胞; 5: 长形精子细胞; *-actin* 作为内参照。  
 1: Spermatogonia; 2: Preleptotene spermatocytes; 3: Pachytene spermatocytes; 4: Round spermatids; 5: Elongating spermatides; *-actin* is a positive control.

子细胞中的表达水平最高,其中 *hils1* 的表达量是粗线期精母细胞和长形精子细胞阶段的 2 倍; *Tex24* 的表达水平分别是粗线期的 1.3 倍、长形精子细胞阶段的 2.4 倍; *Spag4l* 和 *Papolb*

从粗线期精母细胞阶段到长形精子细胞阶段呈下调表达, *Spag4l* 在圆形和长形精子细胞中的表达量分别下降了 33% 和 45%; *Papolb* 在长形精子细胞中的表达量下降了 34%。

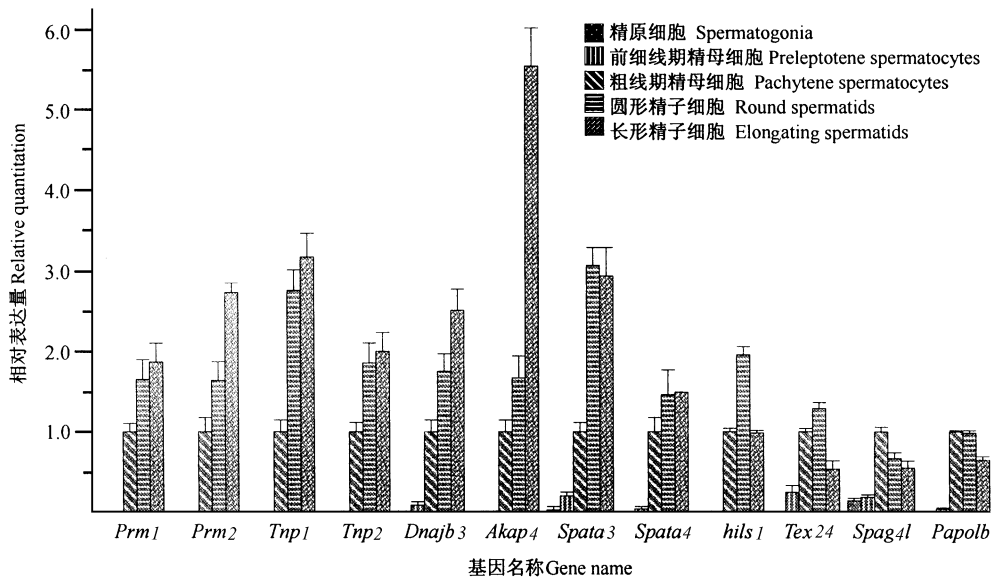


图 4 荧光定量 PCR 分析基因的相对表达量

Fig. 4 Relative quantitation of candidate genes by fluorescence quantitative PCR

### 3 讨论

睾丸组织及生精细胞内有许多组织特异和时间特异性表达基因,正因为如此,生精细胞才表现出其他细胞所没有的特性,发生减数分裂、基因重组、核蛋白转型、核浓缩、精子变态成形等特殊现象。实验中所检测的 12 个基因都具有明显的睾丸组织表达特征,同时也是精子发生中、后期特异表达的基因,具有显著的阶段特异性。这些基因的差异表达可能与减数分裂和精子细胞变态成形过程有关。

在精子细胞变态成形早期,伴随着核浓缩现象出现了核组蛋白-鱼精蛋白的转换。体细胞组蛋白逐渐被睾丸特异性组蛋白 1 (testis-specific histone 1, H1T) 代替,随后过渡蛋白 (transition protein, TP) 又代替了 H1T,但最终被鱼精蛋白 (protamine, MP) 取代。TP 的编码基因 *Tnp1*、*Tnp2* 和 MP 的编码基因 *Ppm1*、*Ppm2* 在减数分裂后期表达上调,主要存在于精子细胞中。

这一点从本实验结果可以得到更为准确的数据支持: *Ppm1*、*Ppm2*、*Tnp1* 和 *Tnp2* 的 mRNA 水平较粗线期精母细胞阶段分别增高 1.9 倍、2.8 倍、3.2 倍和 2 倍。HILS1 是小鼠圆形精子细胞特异表达的组蛋白变体,RT-PCR 分析显示其编码基因在精子发生后期的长形精子细胞阶段高表达<sup>[6,7]</sup>。但本文定量分析结果表明 *hils1* mRNA 在圆形精子细胞中的表达水平远远高于其他阶段。据推测 HILS1 蛋白在许多方面都与 H1T 很相似,极有可能参与精子核组蛋白-鱼精蛋白的转换,因此,其 mRNA 和蛋白产物的出现应早于 *Tnp* 和 *Ppm*。结合前述 *Ppm1*、*Ppm2*、*Tnp1* 和 *Tnp2* mRNA 的表达特征, *hils1* 在圆形精子细胞阶段的突出表达与其所编码蛋白可能具有的功能是相吻合的。

许多精子发生后期特异基因及成熟精子表面蛋白基因在转录后都存在特异的翻译抑制现象<sup>[8]</sup>,转录本 mRNA poly A 尾的长度可能是造成这一现象的原因之一。PAPOLb 是睾丸特异

性的 Poly A 聚合酶,参与多种睾丸特异基因转录本 3 尾的聚合延伸,基因敲除实验证实 *Papalb* 缺失小鼠的精子发生过程被阻断在精子变态成形期<sup>[9, 10]</sup>。本研究定量分析表明 *Papalb* 基因主要在粗线期和精子变态成形早期表达,后期则有所下降,说明其编码蛋白主要在精子形成的早期发挥作用,在发育时间上与其预期功能是一致的。AKAP4 是精子纤维鞘含量最丰富的蛋白,Northern blot 分析显示 *Akap4* 在减数分裂后阶段高表达<sup>[11]</sup>。本次定量分析数据表明该基因在长形精子细胞中的表达水平分别是粗线期精母细胞的 5.5 倍和圆形精子细胞的 3.3 倍,说明 AKAP4 蛋白是在精子形成晚期才参与鞭毛纤维鞘的构成。

*DNAJb 3* 是精子细胞特异性热休克蛋白 DNAJ 家族成员,与顶体发生密切相关。免疫组织化学染色证实该蛋白主要分布在长形精子细胞中<sup>[12]</sup>。本文结果显示 *Dnajb3* 的表达呈逐渐上调,与其蛋白水平的变化是一致的。睾丸表达基因 *Tex24* 在精子发生过程中也具有明显的阶段特异性,RT-PCR 结果显示在前细线期、偶线期、粗线期和圆形精子细胞阶段均可检测到 *Tex24* mRNA 的扩增信号<sup>[13]</sup>。本文定量结果进一步给出了客观的数值差异,确认 *Tex24* 主要在圆形精子细胞和粗线期精母细胞中高表达。

*Sgap4l* 在 3 周龄小鼠睾丸组织中大量表达,原位杂交阳性信号位于精母细胞和圆形精子细胞胞浆内<sup>[14]</sup>。定量分析发现 *Sgap4l* 在粗线期精母细胞阶段显著表达,而在长形精子细胞中的表达水平下降到了 50%。*Spata3* 和 *Spata4* 是近年发现的两个新基因,可能与生精细胞的凋亡现象有关<sup>[3, 4]</sup>,RT-PCR 分析表明 *Spata3* 和 *Spata4* 属于减数分裂后基因,主要在精子细胞阶段表达。本文定量分析结果显示 *Spata3* 在圆形和长形精子细胞中的表达水平相近,大约为粗线期的 3 倍;*Spata4* 在圆形和长形精子细胞中的表达水平一致,为粗线期精母细胞阶段的 1.5 倍。

综合上述定量分析结果,可以肯定应用荧光定量 PCR 技术能够更方便、更直接、更准确

地对精子发生相关基因进行定量分析,所获数据可以更客观地反映基因的阶段性差异表达特性,同 Northern 杂交、普通 PCR 相比,荧光定量 PCR 技术具有独特的优势。同时,实验所得基因的阶段性差异表达结果为深入研究相关蛋白产物的功能提供了有力的数据支持。

## 参 考 文 献

- [1] Sluka P, O'Donnell L, Stanton P G. Stage-specific expression of genes associated with rat spermatogenesis: characterization by laser-capture microdissection and real-time polymerase chain reaction. *Biology of Reproduction*, 2002, **67** (3): 820~828.
- [2] Vanguilder H, Vrana K, Freeman W. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 2008, **44**(5): 619~626.
- [3] 傅俊江,卢光秀,李麓芸等. 睾丸生精细胞凋亡相关基因 TSARG1 与 *Misarg1* 的分子克隆及 *Misarg1* 基因的表达谱分析. *遗传学报*, 2003, **30**(1): 25~29.
- [4] Liu S F, He S, Liu B W, et al. Cloning and characterization of testis-specific spermatogenesis associated gene homologous to human SPATA4 in rat. *Biol Pharm Bull*, 2004, **27** (11): 1 867~1 870.
- [5] Yu Z, Guo R, Ge Y, et al. Gene expression profiles in different stages of mouse spermatogenic cells during spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 2003, **69**(1): 37~47.
- [6] Wei Y, Lang M, Burns K H, et al. HILSI is a spermatid-specific linker histone HI-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *PNAS*, 2003, **100**(18): 10 546~10 551.
- [7] Depa-Martyn ów M, Kempisty B, Lianeri M, et al. Association between fertilin beta, protamines 1 and 2 and spermatid-specific linker histone HI-like protein mRNA levels, fertilization ability of human spermatozoa, and quality of preimplantation embryos. *Folia Histochem Cytobiol*, 2007, **45**(Suppl 1): S79~S85.
- [8] Hecht N B. Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays*, 1998, **20**(7): 555~561.
- [9] Choi H S, Lee S H, Kim H, et al. Germ cell-specific gene 1 targets testis-specific poly (A) polymerase to the endoplasmic reticulum through protein-protein interactions. *FEBS Lett*, 2008, **582**(8): 1 203~1 209.
- [10] Kashiwabara S, Noguchi J, Zhuang T, et al. Regulation of spermatogenesis by testis-specific, cytoplasmic poly (A) polymerase TPAP. *Science*, 2002, **298** (5 600): 1 999~

- 2 002.
- [11] Brown P R, Miki K, Harper D B, *et al.* A-kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum. *Biology of Reproduction*, 2003, **68** (6) : 2 241 ~ 2 248.
- [12] Meccariello R, Cobellis G, Berruti G, *et al.* Mouse sperm cell-specific DnaJ first homologue: an evolutionarily conserved protein for spermiogenesis. *Biology of Reproduction*, 2002, **66** (5) : 1 328 ~ 1 335.
- [13] Fan J, Graham M, Akabane H, *et al.* Identification of a novel male germ cell-specific gene TESP-1 in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, **340** (1) : 8 ~ 12.
- [14] Xing X W, Li L Y, Liu G, *et al.* Identification of a novel gene SRG4 expressed at specific stages of mouse spermatogenesis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2004, **36** (5) : 351 ~ 359.

## 重庆翼手类一新纪录——三叶蹄蝠

2008年7月,红玫瑰洞穴探险俱乐部(Hong Meigui Cave Exploration Society)成员在重庆市武隆喀斯特世界自然遗产地考察洞穴期间,拍摄到了一些蝙蝠照片。其中一种鼻叶特征明显,顶叶中部具2条纵沟将顶叶分为3叶;中鼻叶较小,棒状,中部微具3条凸纵棱;马蹄叶外侧有2片附小叶。经鉴定,该种是三叶蹄蝠(*Aselliscus stoliczkanus* Dobson, 1871)(图1, M Ficco 摄),为重庆市翼手类新纪录。采集地点位于重庆市武隆县火炉镇干洞(E107.9070°, N29.3972°; 洞口海拔256 m)。据王应祥(《中国哺乳动物种和亚种分类名录与分布大全》,2003)、Smith & Xie(《A Guide to the Mammals of China》,2008),三叶蹄蝠在中国的分布纪录为云南、贵州、广西和江西的西南部。《中国哺乳动物彩色图鉴》(潘清华等主编,2007)中该种的分布图还包括湖南。可见,三叶蹄蝠在重庆市的发现使该物种的分布区域又向北推进,成为目前已知该种分布范围的最北限。



图1 三叶蹄蝠

张劲硕 LYNCH Erin KREJCA K Jean FICCO Mike

(中国科学院动物研究所 北京 100101;

Hong Meigui Cave Exploration Society; Zara Environmental LLC, Buda, Texas, USA)