

# 毛冠鹿睾丸组织 cDNA 文库的构建 及 P1 精蛋白基因的克隆

张文<sup>1</sup> 汤文文<sup>1</sup> 庞宏<sup>1</sup> 曹祥荣<sup>1\*</sup> 戴君勇<sup>1</sup> 张锡然<sup>1</sup> 徐春茂<sup>2</sup> 王强<sup>3</sup> 胡均<sup>2</sup>

(1 南京师范大学生命科学学院, 南京, 210097) (2 安徽省皖南野生动物救护中心, 休宁, 245400)

(3 成都动物园, 成都, 610081)

**摘要:** 为构建毛冠鹿睾丸组织 cDNA 文库, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 利用 SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) 技术合成 cDNA 第 1 链, 双链 cDNA 经 LD-PCR (Long-distance PCR) 扩增并经 *Sfi* I 酶切和过柱分级分离后, 克隆入经 *Sfi* I 酶切的  $\lambda$  Trip1EX2 载体, 经体外包装而成 cDNA 原始文库。该毛冠鹿睾丸组织 cDNA 原始文库含有独立克隆数为  $5.52 \times 10^5$ , 重组率达 90.8%。文库扩增后, 滴度达  $1.05 \times 10^9$  pfu/ml, 插入 cDNA 平均长度为 1.01 kb。通过随机挑取噬菌斑, 并克隆测序, 从该文库中克隆了毛冠鹿睾丸组织特异表达基因: P1 精蛋白基因 (GenBank 序列号: DQ299383), 该 cDNA 具有 5' 和 3' 非编码区, 从第 95 至 250 个核苷酸为一完整阅读框 (ORF), 此阅读框编码一个 51 Aa 的 P1 精蛋白。以上结果表明本文构建的毛冠鹿睾丸组织 cDNA 文库符合建库要求, 可作为进一步克隆毛冠鹿睾丸组织特异表达基因的可靠材料。

**关键词:** 毛冠鹿; 睾丸; cDNA 文库; P1 精蛋白

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2006) 02 - 0164 - 07

## Construction of cDNA library from testis of *Elaphodus cephalophus* and cloning of P1 protamine gene

ZANG Wen<sup>1</sup>, TANG Wenwen<sup>1</sup>, PANG Hong<sup>1</sup>, CAO Xiangrong<sup>1\*</sup>, DAI Junyong<sup>1</sup>, ZANG Xiran<sup>1</sup>, XU Chunmao<sup>2</sup>, Wang Qiang<sup>3</sup>, HU Jun<sup>2</sup>

(1 College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing, 210097, China)

(2 Wannan Wildlife Rescue and Rehabilitation Center, Xiuning, 245400, China)

(3 Chengdu Zoo, Chengdu, 610081, China)

**Abstract:** To construct a cDNA library of tufted deer (*Elaphodus cephalophus*) testis, the total RNA was extracted using TRIzol reagent and the first-strand cDNA was synthesized by using the SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) technique. The double-strand cDNA was amplified by LD-PCR (Long-distance-PCR) and then digested by *Sfi* I restriction enzyme. Following cDNA fractionation through CHROMASPIN-400 column, fragments over 500 bp were collected and ligated with  $\lambda$ Trip1Ex2 vector. The recombinants were packaged *in vitro* using Packagene Lambda DNA Packaging extract. The primary cDNA library contains  $5.52 \times 10^5$  independent clones, 90.8% of which are recombinant, the titer of the amplified library is  $1.05 \times 10^9$  pfu/ml and the average length of exogenous inserts is 1.01 kb. Testis-specific genes of tufted deer were isolated after the phage clones were randomly selected and sequenced. the full-length cDNA with both 5' and 3' untranslated regions of a testis-specific gene, P1 protamine, was obtained from the cDNA library (GenBank accession number: DQ299383). Sequence analysis showed that this 431 bp long cDNA spans an open reading frame from nucleotide 95 to 250, encoding a 51-aminoacid long protein. It is the first time that the P1 protamine gene of tufted deer has been cloned. These results show that the cDNA library is eligible and is useful for screening and cloning other testis-specific genes of tufted deer.

**Key words:** cDNA Library; P1 protamine; Testis; Tufted deer (*Elaphodus cephalophus*)

毛冠鹿 (*Elaphodus cephalophus*) 隶属鹿科 (Cervidae), 麂亚科 (Muntiacinae), 毛冠鹿属

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370789); 江苏省教育厅自然科学基金资助项目 (02KJD180006)

作者简介: 张文 (1978 -), 男, 硕士, 主要从事细胞遗传与分子遗传学研究. E-mail: zhangwen1978@tom.com

收稿日期: 2005 - 07 - 04; 修回日期: 2005 - 11 - 30

\* 通讯作者, correspondence author, E-mail: caoxiangrong@njnu.edu.cn

(*Elaphodus*), 是我国特有的保护动物, 主要分布于浙江、安徽、四川、湖南、江西、云南、广西和贵州各省。近年来, 由于非法捕杀、栖息地缩小及自身繁殖率低等因素, 其野生数量逐渐减少。目前, 有关毛冠鹿遗传学方面的研究, 主要集中于染色体多态, 及性染色体 (张锡然等, 1983; 王宗仁和全国强, 1984; 束峰珏等, 1998, 1999; 孔亚慧等, 2002; Cao *et al.*, 2005), 此外, 也有学者对毛冠鹿分子进化及其性别鉴定作了初步研究 (Wang and Lan, 2000; 曹祥荣等, 2002; 蒋华云等, 2004; 戴君勇等, 2005)。关于毛冠鹿的基因文库构建, 国内外未见报导, 本文利用 SMART (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript) 技术, 建立毛冠鹿睾丸组织 cDNA 基因文库, 目的有: 1. 可以有效地保存毛冠鹿种质资源; 2. 可以从该基因文库中克隆与毛冠鹿生殖、遗传性疾病及主要经济性状相关的功能基因, 从而进一步研究、开发和利用该物种; 3. 克隆毛冠鹿性染色体连锁基因, 用以研究毛冠鹿种内性染色体多态分子遗传机制。

精蛋白是成熟精子的主要核蛋白, 为睾丸组织特异表达基因。精蛋白是一类小分子碱性蛋白, 在哺乳动物中分为两个家族: P1 家族和 P2 家族。P1 精蛋白存在于所有哺乳动物, P2 家族由 P2、P3 和 P4 蛋白组成, 仅存在于人、小鼠、仓鼠等少数哺乳动物中 (De Yebra *et al.*, 1998; Viguie *et al.* 1990; Corzett *et al.*, 2002)。所有哺乳动物的 P1 精蛋白分子都有相似的序列特征, 其 N 端的 6 个氨基酸残基均为 ARYRCC, 分子中心有几个串联在一起的“DNA 锚定结构域”, 这些结构域一般由 3~7 个连续的精氨酸残基组成, 它们之间通过 1 个或几个疏水氨基酸相连 (Brewer *et al.*, 2003)。由于其特殊的氨基酸分子组成, 使得它能比组蛋白更紧密地与 DNA 结合在一起, 从而使精子中的遗传物质高度浓缩, 保护了精子遗传信息并使其处于不活跃状态, 以保证受精过程的正常进行 (Balhorn *et al.*, 2000)。有研究表明精蛋白基因是进化速率较快的基因, 可以作为可靠的分子标记来研究动物之间的系统进化关系 (Rooney and zhang 1999; Lewis *et al.*, 2003), 因此克隆毛冠鹿 P1 精蛋白基因并推导其氨基酸序列, 可以用来进一步研究毛冠鹿在鹿科动物中进化地位及其与鹿亚科动物之间的进化关系。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 毛冠鹿睾丸组织样本取自安徽省皖南野生动物救护中心。

1.2 主要试剂 RNA 提取试剂盒 (TRIzol Reagent, Invitrogen)、mRNA 纯化试剂盒 (Oligotex mRNA kit, Qiagen)、cDNA 文库构建试剂盒 (SMART™ cDNA Library Construction Kit, Clontech) 购自上海吉泰生物科技有限公司; 噬菌体包装试剂盒 (Packagene Lambda DNA Packaging System, Promega) 购自南京生兴生物公司;  $\lambda$ TripIEx2 插入子筛选引物, 由上海生工生物工程技术服务公司合成。5' 端引物序列为: 5' - CTCGGGAAGCGCGC-CATTGTGTTGCT - 3'; 3' 端引物序列为: 5' - AT-ACGACTCACTATAGGGCGAATTGGCC - 3'。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 总 RNA 的提取及 Poly(A)<sup>+</sup> mRNA 纯化

取 -70℃ 保存的毛冠鹿睾丸组织 (300~400 mg), 用 TRIzol 试剂提取总 RNA。具体操作按说明书进行。总 RNA 提取后, 溶于 200  $\mu$ l 无 RNase 的水中, 经甲醛变性凝胶电泳及紫外荧光光度计测定其 OD<sub>260/280</sub> 鉴定质量。按 mRNA 纯化试剂盒使用手册, 用 Oligotex 纯化制备 Poly(A)<sup>+</sup> mRNA。

#### 1.3.2 cDNA 文库的构建

按 SMART™ cDNA 文库构建试剂盒说明书, 取 0.5  $\mu$ g 毛冠鹿睾丸组织 Poly(A)<sup>+</sup> mRNA 为模板, 以 SMART IV 寡核苷酸和 CDS III P/3' PCR 引物, PowerScript 逆转录酶逆转录合成 cDNA 第 1 链, 反应条件为 42℃ 水浴 1 h。取 2  $\mu$ l 第 1 链 cDNA 产物为模板, 用 CDS III / 3' PCR 引物和 5' PCR 引物, 在 PTC-200 PCR 仪上, LD-PCR (Long-distance PCR) 合成第 2 链 cDNA。反应条件为: 95℃ 预变性 20 s; 然后 95℃ 变性 5 s, 68℃ 下复性延伸 6 min, 反应进行 30 个循环。反应结束后取 5  $\mu$ l PCR 产物, 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测双链 cDNA。取 50  $\mu$ l 双链 cDNA 产物, 经蛋白酶 K 消化, 等体积苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1)、氯仿异戊醇 (24:1) 分别抽提; 乙醇沉淀后溶于 79  $\mu$ l 去离子水中; *Sfi* I 内切酶 50℃ 消化 2 h; CHROMA SPIN-400 柱分级分离, 收集 15 管分离产物, 每管约 40  $\mu$ l, 各取 4  $\mu$ l 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测。合并长度大于 500 bp 的分离物, 加入糖原和 NaAc, 用 95% 乙醇沉淀 cDNA, 弃上清, 自然干燥, 溶解于 7  $\mu$ l

去离子水中。取 0 (作为对照组)、0.5、1.0 和 1.5  $\mu\text{l}$  cDNA 分别与 1  $\mu\text{l}$  载体  $\lambda\text{TriplEx2}$  (*sf*I 处理过的左右臂) 16  $^{\circ}\text{C}$  连接 12 h。Packagene Lambda DNA Packaging System 包装连接产物成为噬菌体颗粒, 构成原始文库, 每个包装反应总体积为 500  $\mu\text{l}$ 。取 1.0  $\mu\text{l}$  原始文库, 用噬菌体稀释液 10 和 20 倍稀释后, 从中各取 1.0  $\mu\text{l}$  转染宿主菌 XL1-Blue, 测定文库的容量。转染反应分别与顶层琼脂混匀后铺 8 个平板, 分别标为 C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、I<sub>1</sub>、I<sub>2</sub>、II<sub>1</sub>、II<sub>2</sub>、III<sub>1</sub> 和 III<sub>2</sub>, 其中 C 为对照组, I、II 和 III 为另外 3 组反应, 下标为 1 的表示噬菌体稀释 10 倍转染反应涂板, 下标为 2 的表示噬菌体稀释 20 倍转染反应涂板。同时在涂有 X-Gal (终浓度 2.5 mM) 和 IPTG (终浓度 2.5 mM) 的平板上铺平板, 以测定文库的重组率。

#### 1.4 cDNA 文库的扩增和鉴定

以每板  $5 \times 10^4$  个噬菌体形成单位 (plaque forming unit, pfu) 在 150 mm 平板上铺平板扩增文库; 将扩增文库作适度稀释后铺平板, 以测定文库的滴度。从中随机挑取 40 个噬菌斑, 以  $\lambda\text{TriplEx2}$  插入子筛选引物进行 PCR 扩增插入片段。PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。为进一步验证文库质量, 用本室设计的一对可扩增管家基因  $\beta_2$ -微球蛋白 ( $\beta_2$ -microglobulin) 基因 250 bp 序列的引物, 以扩增文库为模板进行 PCR, 同时设不加模板的阴性对照。引物序列如下: P1: 5' - TGA ATT GCT ATG TGT CTG GG - 3'; P2: 5' - CCT CCA TGA TGC TGC TTA CAT - 3'。PCR 反应体系: 10  $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu\text{l}$ , 引物 (25 mmol/l) 各 0.3  $\mu\text{l}$ , dNTP Mix (2.5 mmol/l) 2.5  $\mu\text{l}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (25 mmol/l) 1.5  $\mu\text{l}$ , Taq 酶 0.1  $\mu\text{l}$ , 模板 1.0  $\mu\text{l}$ , 加水至 25  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  40 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  50 s, 30 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  保温 7 min。反应产物以 1.1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

#### 1.5 阳性克隆 cDNA 测序及其生物信息学分析

从平板上随机挑取噬菌斑, 按试剂盒说明将 12 个阳性噬菌体克隆  $\lambda\text{TriplEx2}$  环化为 pTriplEx2, 送上海生工生物工程技术服务公司测序, 用序列分析软件 BLAST 将测序结果与 GenBank 中基因进行同源性比较。

## 2 结果

### 2.1 RNA 的完整性

紫外分光光度计测定表明总 RNA  $\text{OD}_{260/280}$  为 1.80, 甲醛变性电泳显示 28S 和 18S 条带清晰, 比例接近 2:1 (图 1), 说明 RNA 质量可行。用 Oligotex 试剂盒制备 mRNA, 除去大部分 28S 和 18S rRNA。

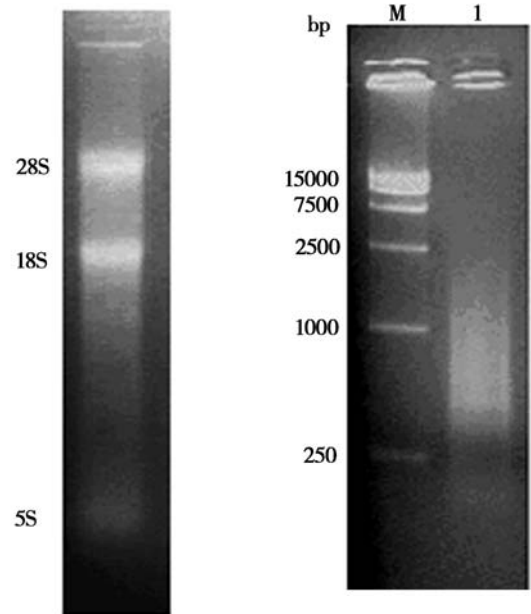


图 1 睾丸组织总 RNA 电泳  
Fig. 1 Gel electrophoresis of total RNA

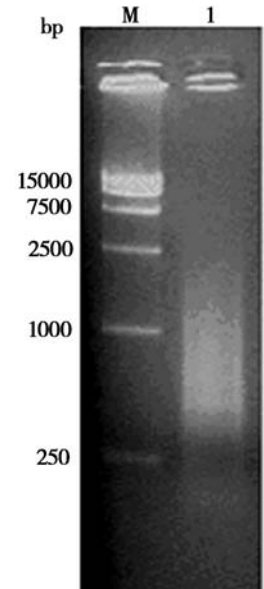


图 2 LD-PCR 产物电泳结果  
M: Marker; 1: LD-PCR 产物

Fig. 2 Gel electrophoresis of the LD-PCR

M: Marker; 1: Products of LD-PCR

### 2.2 单链和双链 cDNA 的合成及酶切

1.1% 琼脂糖凝胶电泳分析 LD-PCR 产物, 分子量大小约为 0.1 ~ 3 kb, 满足构建 cDNA 文库的要求 (图 2)。sfI 酶切后的 cDNA 经 CHROMA SPIN-400 柱分级分离, 结果表明: 7、8、9 号管洗脱物中 cDNA 可收集、浓缩用于连接反应 (图 3)。

### 2.3 原始 cDNA 文库质量的鉴定

用包装蛋白包装连接产物, 获得毛冠鹿睾丸组织原始文库及对照组, 文库经梯度稀释后转染宿主菌 XL1-Blue 涂平板, 8 个平板独立噬菌斑数分别为: C<sub>1</sub> 2 个、C<sub>2</sub> 0 个、I<sub>1</sub> 31 个、I<sub>2</sub> 16 个、II<sub>1</sub> 34 个、II<sub>2</sub> 18 个、III<sub>1</sub> 46 个和 III<sub>2</sub> 21 个, 按独立克隆数 = 独立噬菌斑数  $\times$  稀释倍数  $\times$  原始文库体积 ( $\mu\text{l}$ ) 计算原始文库独立克隆数, 包装反应产物所含的独立克隆数分别为  $1.57 \times 10^5$  个、 $1.75 \times 10^5$  个和  $2.2 \times 10^5$  个。将三者混合, 总的独立克隆数为  $5.52 \times 10^5$  个。蓝-白斑筛选结果为: 蓝斑为 23 个, 总噬菌斑数为 239 个, 按重组率 (%) = 白

斑数/总噬菌斑数  $\times 100\%$  计算, 文库重组率为  $(249 - 23) / 249 \times 100\% = 90.8\%$ 。文库实际克隆数为  $5.52 \times 10^5 \times 90.8\% = 5.01 \times 10^5$  个。

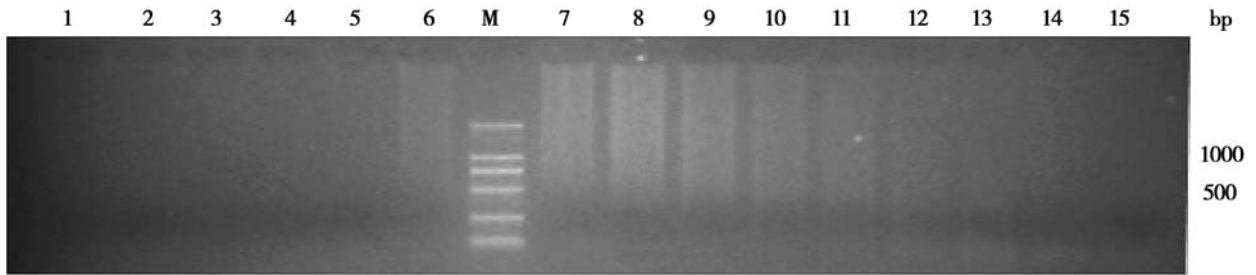


图3 LD-PCR产物经 *Sfi* I 酶切及分级分离后电泳鉴定. M: DL2000 Marker; 1-15: 经酶切、分级分离后 LD-PCR 产物  
Fig. 3 Gel electrophoresis of the LD-PCR products digested by *Sfi* I and fractionated through the CHROMA SPIN-400 Column. M: DL2000 Marker; Lane 1-15: Digested and fractionated LD-PCR products

#### 2.4 扩增文库质量的鉴定

扩增后文库滴度为  $1.05 \times 10^9$  pfu/ml, 取随机挑取的 40 个噬菌斑经 PCR 后, 电泳检查插入子的大小, 平均插入长度为 1.01 kb (图 4)。以扩增文库液为模板, PCR 扩增  $\beta_2$ -MG 基因片段结果显示: 在 250 bp 处有阳性目的条带, 而阴性对照无条带 (图 5)。

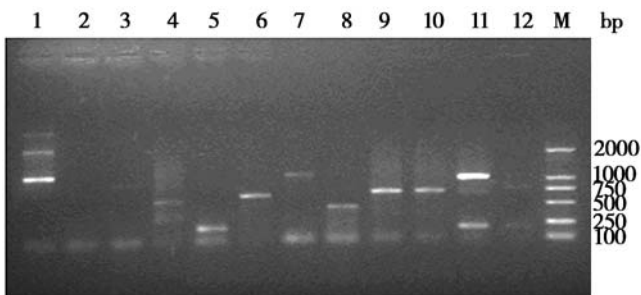


图4 PCR 鉴定插入片段大小的电泳结果

M: DL2000; Marker; Lane 1-12: 噬菌斑 PCR 扩增产物

Fig. 4 The size identification of the inserted cDNA by PCR

M: DL2000 Marker; Lane 1-12: PCR products of phage clones

#### 2.5 P1 精蛋白基因的克隆和序列分析

取 12 个阳性克隆, 进行测序以选择睾丸组织特异表达的基因作为进一步分析的对象。从构建的 cDNA 基因文库中克隆到具有 5' 和 3' 非编码区的毛冠鹿 P1 精蛋白基因。其核苷酸序列及由其推导的氨基酸序列如图 6 所示: 该 cDNA 序列全长 431 bp, 在序列 3' 末端有终止信号 AATAAA, 从 95 至 250 为一开放阅读框, 编码 51 个 Aa, 通过 [http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) 网站, Compute pI/Mw tool 分析得该蛋白理论等电点 (pI) 及分子量 (Mw) 分别为 12.18 和 6796.14 Da。毛冠鹿 P1 精蛋白中含 25 个精氨酸, 7 个半胱氨酸。

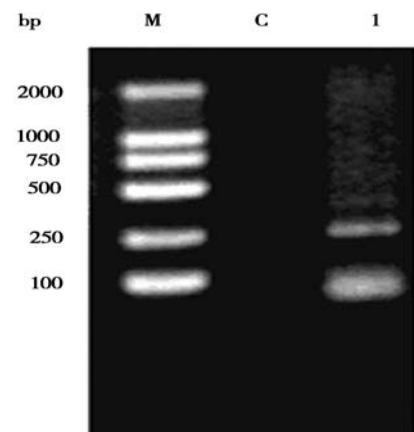


图5  $\beta_2$ -MG 基因 PCR 扩增电泳结果

M: DL2000 Marker; Lane C: 阴性对照;

Lane 1: PCR products of  $\beta_2$ -MG

Fig. 5 PCR of  $\beta_2$ -MG gene. M: DL2000 Marker; Lane

C: negative control; Lane 1: PCR products of  $\beta_2$ -MG

25 个精氨酸主要分成 3 簇, 第 1、2 两簇之间由半胱氨酸和组氨酸相连, 第 2、3 两簇之间由苯丙氨酸和甘氨酸相连, 构成 3 个“DNA 锚定结构域”。运用 BLAST, 分析该精蛋白基因 CDS (Coding Sequence) 区及其推导的氨基酸序列与人 (AF215707, AAB34977)、牛 (NM-174156, AAA30741)、猪 (M80678, AAB28721)、大鼠 (NM\_001002850, P10118) 及小鼠 (M27500, P02319) P1 精蛋白 CDS 序列的同源性, 其可比序列同源性如表 1, 可见毛冠鹿 P1 精蛋白氨基酸序列同源性与人最高, 与牛同源性最低。因为牛和毛冠鹿 P1 精蛋白基因 CDS 之间同源性高达 94%, 所以我们将该 cDNA 序列和牛的 P1 精蛋白基因组 DNA 用 BLAST 比对, 比对结果显示: 在 cDNA 第 204 和 205 核苷酸之间有 1 个内含子, 该内含子在牛基因组中为 101 bp (图 7)。

表 1 毛冠鹿 P1 精蛋白基因 CDS 序列及由其推导的氨基酸序列与其他 5 种哺乳动物 P1 精蛋白的可比序列同源性 (%) 比较  
 Table 1 Homologous comparison (%) of coding sequences and deduced amino acids of P1 protamine gene of tufted deer with the P1 protamine from other 5 species of mammalian

	牛 Cow	大鼠 Rat	人 Human	猪 Pig	小鼠 Mouse	毛冠鹿 Tufted deer
CDS 可比序列同源性 The homology for the comparable sequences of CDS	94%	85%	77%	83%	86%	100%
蛋白质序列同源性 The homology for the sequences of protein	92%	71%	56%	78%	69%	100%

1 GACAGCCCACAAATTCACCTGCTCACAGGTTGG

35 CTGGCTCAACCAAGGCGGTATCCCCTGCTCTGAGCATCCAGGCCGAATCCACCCAGCACC

95 **ATGCCAGATACCGATGCTGCCTCACCCATAGCCGGAGCAGATGCCGCCGCCCGAAGA**  
 M A R Y R C C L T H S R S R C R R R R R

155 CGAAGATGTCACAGACGAAGGAAGCGCTTTGGTCCGAGGCCAGGAGGAGAGTGTGCTGC  
 R R C H R R R K R F G R R R R R V C C

215 CGCCGCTACACCGTCGTAAGGTGTACAAGACAGTAACCGCACAGTAGCAAGACCACCGCA  
 R R Y T V V R C T R Q \*

275 CTCCTGCCTGAAAGATAACCAGCCTTCAAGACCCTCTTGCCACATCTTGAACATGCCACC

335 ATTCCAATGACATGAACAGGAGCCTGCTAACGAACAATGCCACCTGTCAATAAAATGTTGA

395 AAGACACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

图 6 毛冠鹿 P1 精蛋白基因 cDNA 全序列及推导的氨基酸序列. 阴影部分为起始密码子 ATG, 星号为终止密码子 TAA, 下划线为终止信号 AATAAA

Fig. 6 P1 protamine cDNA nucleotides and deduced amino acids cloned from tufted deer. The sequence in the shade indicates the initial codon ATG, the sequence with asterisk indicates stop codon TAA, and the sequence underlined indicates a polyadenylation signal AATAAA

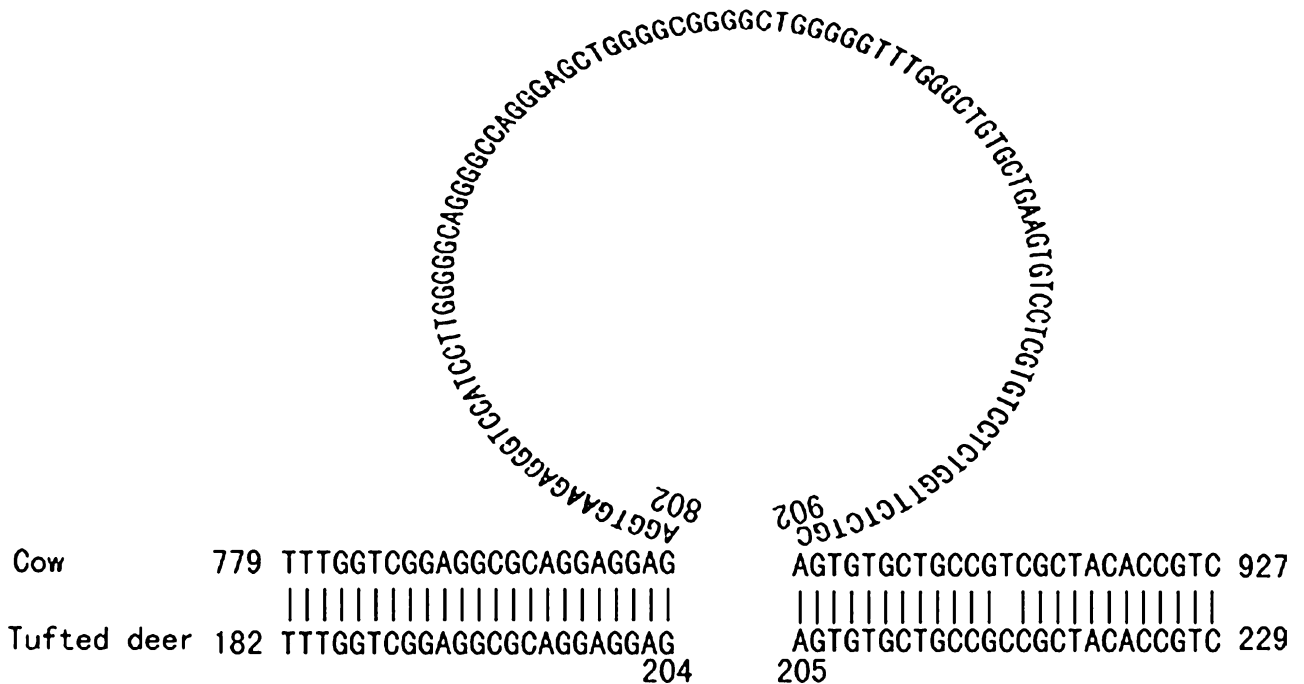


图 7 毛冠鹿 P1 精蛋白基因 cDNA 全序列与牛 P1 精蛋白基因组 DNA 比对结果  
 Fig. 7 Comparison of the cDNA sequence of P1 protamine gene to the genomic sequence of P1 protamine from cow

### 3 讨论

毛冠鹿属仅有毛冠鹿一种动物, 其遗传资源是鹿科动物遗传基因库重要的组成部分。近年来虽然有人工饲养毛冠鹿, 但其野生数量的逐渐减少却令人担忧, 根据野外实地考察和猎户访问, 造成毛冠鹿数量减少的主要原因是: (1) 非法捕杀: 毛冠鹿茸、尾、角、鞭、胶、筋等都是良好的中药原料, 致使毛冠鹿成为非法捕猎者的重要捕杀对象, 李义明和李典谟 (1995) 在广西及广西中越边境野生动物贸易调查中发现, 毛冠鹿产品在药店中占有率高达 76.47%; (2) 栖息地缩小: 笔者调查了解, 在安徽皖南山区, 由于农民对山坡的开垦, 许多林地和草坡变成了农田, 导致毛冠鹿很少到低海拔山区活动, 从而使毛冠鹿的分布被隔离成斑块状; (3) 毛冠鹿自身因素: 调查表明野生毛冠鹿雄性数量显著少于雌性数量。由于以上几点原因, 在原产地建立毛冠鹿保护区, 结合人工饲养繁殖, 对于研究毛冠鹿进化遗传学、保护生物学及资源利用都是非常必要的。我们本次构建了毛冠鹿睾丸组织 cDNA 文库, 以文库的方式长期保存毛冠鹿遗传资源, 还可以从该基因文库中, 通过核苷酸探针杂交及 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 等方法克隆功能基因进而进行毛冠鹿生殖遗传学、疾病遗传学及进化遗传学研究。毛冠鹿在种内出现多样性的染色体数目和形态, 先后报导过的核型有: 雄性  $2n = 47, 48$ , 雌性  $2n = 46, 47, 48$ , 其染色体多态主要体现在性染色体上 (Cao *et al.*, 2005; 张锡然等, 1983; 王宗仁和全国强, 1984; 束峰珏等, 1998, 1999; 孔亚慧等, 2002)。Wang 和 Lan (2000) 等通过系统发生学方法分析发现毛冠鹿的进化地位处于獐 ( $2n = 70$ ) 与小鹿 ( $2n = 46$ ) 之间, 毛冠鹿可能是染色体在进化过程中的一个过渡状态。因此克隆和研究毛冠鹿性染色体连锁基因, 对揭示毛冠鹿性染色体进化及其演变的分子机制意义重大。Wang 等 (2001) 用 cDNA 消减法获得 25 个在小鼠精原细胞中特异表达的基因, 其中 13 个是 Y 或 X 染色体连锁基因, Ross 等 (2005) 在人的 X 染色体常染色质区发现 1 098 个基因, 其中 99 个在睾丸组织中表达, Lercher 等 (2003) 通过分析人类 SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 数据显示 X 染色体连锁基因在性腺细胞中高表达, 可见睾丸组织 cDNA 文库是克隆性染色体连锁基因的良好材料。因此我们可以利用该 cDNA 文库克隆

毛冠鹿性染色体连锁基因, 作为性染色体标识, 探讨毛冠鹿性染色体多态的分子基础。

构建 cDNA 文库有两大主要难题, 一是 RNA 的质量, 本实验提取的 RNA 无论是完整性还是纯度均已经达到建库要求; 二是库容问题, 笔者认为库容和转化效率成正相关, 而转化效率与受体感受菌质量有关。本文库的库容虽然还没有达到质量良好的 cDNA 文库应有的  $10^6$  个克隆数的要求。但基本满足库容不少于  $5.0 \times 10^5$  个克隆数和平均插入片段不小于 1.0 kb 的标准 (黄培堂等, 2002)。而且我们根据  $\beta_2$ -MG 基因的保守序列设计引物, 以文库为模板进行 PCR 扩增, 有特异目的条带产生, 进一步说明文库可以用于睾丸相关基因的克隆。本文报道的毛冠鹿精蛋白 cDNA 包含了完整的 5' 和 3' 端非编码序列, 有完整的阅读框, 3' 端有终止信号 AATAA, 这显示了用 SMART 技术构建 cDNA 文库的优点, 进一步可应用 RACE 方法从该 cDNA 文库中克隆毛冠鹿性染色体连锁基因全长 cDNA。

毛冠鹿 P1 精蛋白共有 25 个为精氨酸残基, 其中有 7 个位置分散, 另外 18 个分成 3 簇, 构成 3 个“DNA 锚定结构域”。在大多哺乳动物中这些结构域由 1 个或者几个中性氨基酸相连接, P1 精蛋白正是通过这些“DNA 锚定结构域”缠绕在 DNA 双螺旋的大沟中 (Hud *et al.*, 1994; Prieto *et al.*, 1997), 且寡聚精氨酸上所带的正电荷可以中和 DNA 骨架上磷酸基团所带的负电荷, 从而使精子核 DNA 包装比显著提高, 几乎是体细胞的 40 倍 (Pogany *et al.*, 1981; Hud *et al.*, 1994; Mascotti and Lohman, 1997)。有研究表明精蛋白“DNA 结合结构域”中精氨酸残基比赖氨酸残基更能紧密地和 DNA 上的磷酸基团结合, 这是由于精氨酸的胍基不但能和 DNA 上的磷酸基团形成氢键而且能形成“盐桥” (Pogany *et al.*, 1981; Mascotti and Lohman, 1997)。在 P1 精蛋白序列进化过程中, 为了精子核 DNA 最有效地高度聚缩, 精蛋白的“DNA 结合结构域”中偏向于使用精氨酸而不是赖氨酸 (Brewer *et al.*, 2003)。所以在哺乳动物 P1 精蛋白中赖氨酸替代精氨酸的现象极为少见。从图 6 中可见毛冠鹿 P1 精蛋白第 2 个寡聚精氨酸簇是“RRRKR”, 出现了赖氨酸残基和精氨酸一起成簇的现象, cDNA 序列显示该赖氨酸残基对应的密码子为 AAG, 和编码精氨酸的密码子之一 AGG, 中间仅一个碱基差别。毛冠鹿精蛋白为何出现这种现

象,其原因有待于进一步研究探讨。

### 参考文献:

- Brewer L, Corzett M, Lan E Y, Balhorn R. 2003. Dynamics of Protamine 1 Binding to Single DNA Molecules. *J Biol Chem*, **278** (43): 42403 - 42408.
- Balhorn R, Brewer L, Corzett M. 2000. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: Analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Mol Reprod Dev*, **56** (S2): 230 - 234.
- Cao X R, Shu F J, Zhang X R, Bi C M, Li C J, Hu J, Fang J Y. 2002. Phylogenetic relationships of *Elaphodus cephalophus* and three *Muntiacus* species revealed by mitochondrial Cytochrome b nucleotide sequence. *Acta Zoologica Sinica*, **48** (1): 44 - 49. (in Chinese)
- Cao X, Jiang H, Zhang X. 2005. Polymorphic karyotypes and sex chromosomes in the tufted deer (*Elaphodus cephalophus*): cytogenetic studies and analyses of sex chromosome-linked genes. *Cytogenet Genome Res*, **109** (4): 512 - 518.
- Corzett M, Mazrimas J, Balhorn R. 2002. Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol Reprod Dev*, **61** (4): 519 - 527.
- Dai J Y, Cao X R, Shi L, Zang X R, Xu C M, Hu J. 2005. Phylogenetic relationship between Tufted deer (*Elaphodus cephalophus*) and *Muntiacus* deer is revealed by the exon and intron of K<sup>+</sup> Channel Gene. *HEREDITAS*, **27** (1): 95 - 100. (in Chinese)
- De Yebra L, Balleza J L, Vanrell J A, Corzett M, Balhorn R, Oliva R. 1998. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil Steril*, **69** (4): 755 - 759.
- Hud N V, Milanovich F P, Balhorn R. 1994. Evidence of novel secondary structure in DNA-bound protamine is revealed by Raman spectroscopy. *Biochemistry*, **33**: 7528 - 7535.
- Jiang H Y, Cao X R, Zhang X R, Xu C M, Hu J. 2004. Cloning of ZFY/ZFX Gene of the Tufted deer and identification of its sex. *HEREDITAS*, **26** (4): 465 - 468. (in Chinese)
- Kong Y H, Zhang X R, Cao X R, Xu Z P, Hu J, Xu C M. 2002. A new karyotype of *Elaphodus Cephalophus* and discussion of its sex chromosomes. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science)*, **4** (25): 77 - 80. (in Chinese)
- Lewis J D, Song Y, de Jong M E, Bagha S M, Ausio J. 2003. A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma*, **111**: 473 - 482.
- Lercher M J, Urrutia A O, Hurst L D. 2003. Evidence that the human X chromosome is enriched for male-specific but not female-specific genes. *Mol Biol Evol*, **20** (7): 1113 - 1116.
- Li Y M, Li D M. 1995. The Introduction of World Wildlife Trade in Guangxi and on the border between China and Vietnam. In: CCI-CED, Biodiversity Conservation in China. Beijing: China Environmental Science Press, 112 - 158. (in Chinese)
- Mascotti D P, Lohman T M. 1997. Thermodynamics of oligoarginines binding to RNA and DNA. *Biochemistry*, **36**: 7272 - 7279.
- Prieto M C, Maki A H, Balhorn R. 1997. Analysis of DNA-protamine interactions by optical detection of magnetic resonance. *Biochemistry*, **36**: 11944 - 11951.
- Pogany G C, Corzett M, Weston S, Balhorn R. 1981. DNA and protein content of mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. *Exp Cell Res*, **136** (1): 127 - 36.
- Rooney A P, Zhang J. 1999. Rapid Evolution of a Primate Sperm Protein: Relaxation of Functional Constraint or Positive Darwinian Selection. *Mol Biol Evol*, **16** (5): 706 - 710.
- Ross M T, Grafham D V, Coffey A J. 2005. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*, **434** (7031): 279 - 280.
- Shu F J, Zhang X R, Nie L W, Shan X N. 1998. Study on a New Karyotype of *Elaphodus cephalophus* and C-band. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science)*, **4** (21): 80 - 82. (in Chinese)
- Shu F J, Zhang X R, Cao X R, Li C J. 1999. Studies of the Polymorphism of *Elaphodus cephalophus* B Chromosomes and Its Transmit Mechanism. *HEREDITAS*, **21** (6): 23 - 26. (in Chinese)
- Viguie F, Domenjoud L, Rousseau-Merck M F, Dadoune J P, Chevriaillier P. 1990. Chromosomal localization of the human protamine genes, PRM1 and PRM2, to 16p13.3 by in situ hybridization. *Hum Genet*, **85** (2): 171 - 174.
- Wang Z R, Quan G Q. 1984. Karyotype of *Elaphodus cephalophus*. *Zoological Research*, **5** (1): 78. (in Chinese)
- Wang W, Lan H. 2000. Rapid and parallel chromosomal number reductions in muntjac deer inferred from mitochondrial DNA phylogeny. *Mol Biol Evol*, **17** (9): 1326 - 1333.
- Wang P J, McCarrey J R, Yang F, Page D C. 2001. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet*, **27** (4): 422 - 426. (in Chinese)
- Zhang X R, Wang J H, Chen Y Z. 1983. Somatic chromosome studies of the tufted deer (*Elaphodus cephalophus*). *Zoological Research*, **4** (1): 89 - 93. (in Chinese)
- 王宗仁, 全国强. 1984. 毛冠鹿染色体组型. *动物学研究*, **5** (1): 78 - 93.
- 孔亚慧, 张锡然, 曹祥荣, 徐志鹏, 胡均, 徐春茂. 2002. 新发现的毛冠鹿的一核型与性染色体探讨. *南京师大学报 (自然科学版)*, **4** (25): 77 - 80.
- 束峰珏, 张锡然, 聂刘旺, 单祥年. 1998. 毛冠鹿一种新核型及 C-带分析. *南京师大学报 (自然科学版)*, **4** (21): 80 - 82.
- 束峰珏, 张锡然, 曹祥荣, 李朝军. 1999. 毛冠鹿 B 染色体多态及遗传机制探讨. *遗传*, **21** (6): 23 - 26.
- 李义明, 李典谟. 1995. 广西及广西中越边境野生动物贸易调查. 见: 中国环境与发展国际合作委员会, 保护中国的生物多样性. 北京: 中国环境科学出版社, 112 - 158.
- 张锡然, 王建华, 陈玉泽. 1983. 毛冠鹿体细胞的染色体研究. *动物学研究*, **4** (1): 89 - 93.
- 曹祥荣, 束峰珏, 张锡然, 毕春明, 李朝军, 胡均, 方笺阳. 2002. 毛冠鹿与 3 种鹿属动物的线粒体细胞色素 b 基因序列分析及进化关系. *动物学报*, **48** (1): 44 - 49.
- 黄培堂等译. 2002. 分子克隆试验指南 (第三版). 北京: 科学出版社, 912 - 915.
- 蒋华云, 曹祥荣, 张锡然, 徐春茂, 胡均. 2004. 毛冠鹿 ZFY、ZFX 基因片段的克隆与性别鉴定. *遗传*, **26** (4): 465 - 468.
- 戴君勇, 曹祥荣, 石磊, 张锡然, 徐春茂, 胡均. 2005. 鹿亚科动物钾离子通道基因片段及其内含子序列的克隆与进化分析. *遗传*, **27** (1): 95 - 100.