

# 小鼠睾丸组织特异表达基因 *Rnf148* 的鉴定及其编码 E3 泛素连接酶的功能分析\*

刘运强<sup>1</sup>, 陶大昌<sup>1</sup>, 廖顺尧<sup>2</sup>, 杨元<sup>1</sup>, 马用信<sup>1</sup>, 张思仲<sup>1</sup>

1. 四川大学华西医院 医学遗传学研究室 生物治疗国家重点实验室 疾病基因组学研究室(成都 610041);

2. 四川省人民医院·四川省医学科学院 器官移植研究所(成都 610061)

**【摘要】** 目的 研究小鼠 *Rnf148* 基因表达的时空特异性及其环指结构域的 E3 泛素连接酶功能。方法 提取不同成年小鼠组织、不同胚胎期组织和出生后小鼠睾丸组织的总 RNA, 通过实时荧光 RT-PCR 和 Northern 杂交分析小鼠 *Rnf148* 基因的表达谱。构建包含整个 *Rnf148* 蛋白的环指结构域与谷胱甘肽-S-转移酶(GST)的融合蛋白原核表达载体, 在 BL21 细菌中诱导表达后, 经 GST 琼脂糖凝胶纯化 GST-*Rnf148* 重组蛋白。体外泛素化反应试验检测 GST-*Rnf148* 重组蛋白的 E3 泛素连接酶功能。结果 在小鼠 13 种不同器官组织中, *Rnf148* mRNA 仅存在于睾丸组织中。进一步 Northern 杂交验证了只在小鼠睾丸组织表达一个 1.2 kb 左右的 *Rnf148* 基因 mRNA 片段。小鼠 *Rnf148* 基因在胚胎期及出生后 3 周内不表达, 出生后 21 d 开始表达, 25 d 后达到表达高峰并一直持续表达。实验成功诱导表达并纯化了 GST-*Rnf148* 重组蛋白, 体外蛋白泛素化反应显示该重组蛋白具有 E3 泛素连接酶的功能。结论 小鼠 *Rnf148* 基因特异地表达在出生 3 周后的睾丸组织中, *Rnf148* 蛋白的环指结构域具有泛素连接酶活性。

**【关键词】** 小鼠 *Rnf148* 基因 睾丸特异表达 环指结构域 E3 泛素连接酶

**Identification and Functional Analysis of a Testis-specific E3 Ubiquitin Ligase Gene *Rnf148* in Mouse** LIU Yun-qiang<sup>1</sup>, TAO Da-chang<sup>1</sup>, LIAO Shun-yao<sup>2</sup>, YANG Yuan<sup>1</sup>, MA Yong-xin<sup>1</sup>, ZHANG Si-zhong<sup>1</sup>. 1. Department of Medical Genetics & Division of Human Morbid Genomics, State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Institute of Organ Transplantation, Sichuan Academy of Medical Science, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610061, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the temporal and spatial features of mouse *Rnf148* gene expression and the function of RING finger domain of *Rnf148* protein. **Methods** The whole RNA was extracted from different tissues of adult mice, embryo in four developmental stages, and testes of postnatal mice respectively. RT-PCR and Northern blotting analysis were used to investigate the expression of *Rnf148* gene in the above tissues. The *in vitro* expression vector for GST-*Rnf148* fused protein was constructed, which encompassing the entire RING domain of *Rnf148* protein. GST-*Rnf148* fused protein was expressed in *Escherichia coli*. BL21(DE3) cells and purified with glutathione-sepharose 4B. *In vitro* ubiquitination assay was performed to analyze whether GST-*Rnf148* fused protein possess the function of E3 ubiquitin ligase. **Results** The Mice *Rnf148* mRNA expression was only observed in testis, and Northern blotting confirmed that there was only one 1.2 kb mRNA band present in mice testis. *Rnf148* mRNA started to appear in the testis of day 21 mice, and then increased dramatically and reached to the highest level in day 25, and continued to express thereafter. GST-*Rnf148* fused protein was induced and purified, *in vitro* ubiquitination reaction showed that the recombinant protein has E3 ubiquitin ligase activity. **Conclusion** *Rnf148* gene is specifically expressed in mice testis.

**【Key words】** Mice *Rnf148* gene Testis-specific expression RING finger domain E3 ubiquitin ligase

哺乳动物精子发生是从精原细胞发展成为成熟精子的一系列复杂细胞分化过程, 历经有丝分裂、减数分裂和精子形成 3 个阶段<sup>[1]</sup>。这一特殊的细胞增

殖分化过程受众多因素的影响, 其中生精细胞内基因的表达调控在精子发生中起关键作用。据报道, 在小鼠基因组中约有 4% 的基因(大概 2 300 多个)为睾丸特异表达的基因<sup>[2]</sup>。鉴定、克隆这些基因并对它们的功能进行研究将对阐明精子发生的机制起

着重要作用,并为开发新的避孕药物提供新靶点<sup>[3]</sup>。

泛素化反应是一系列高度特异的蛋白相互识别、作用的过程,是十分重要的细胞调控机制,控制着众多生理和病理事件发生,在精子发生、受精和精子质量控制的生理过程中都起着重要作用<sup>[4]</sup>。泛素化修饰通过由泛素激活酶(E1)、泛素结合酶(E2)及泛素连接酶(E3)参与介导的酶促级联反应完成,最后经蛋白酶体降解。其中,E3泛素-蛋白连接酶在决定泛素化反应的特异性和下游底物蛋白的降解中起着重要作用。E3泛素-蛋白连接酶通常具有一些特定的结构域以识别E2及其底物蛋白,例如环指结构(RING)、植物同源结构(PHD)以及HECT和U-box结构域等<sup>[5]</sup>。其中,RING结构域通常具有C3HC4[CX2CX(9-39)CX(1-3)HX(2-3)CX2CX(4-48)CX2C]或者C3H2C3[CX2CX(9-39)CX(1-3)HX(2-3)HX2CX(4-48)CX2C]保守结构,其能够结合两个锌离子,参与信号传导、转录调控、细胞凋亡等生物学过程<sup>[6]</sup>。目前,已有一些睾丸特异表达的E3泛素连接酶基因被鉴定、克隆,并进行一定的功能研究<sup>[7-10]</sup>。小鼠*Rnf148*基因位于已报道的睾丸特异表达的E3泛素连接酶编码基因*Rnf133*<sup>[10]</sup>的下游3.8 kb处,也具有C3H2C3结构的环指结构域,而其是否也具有睾丸组织特异表达特征以及E3泛素连接酶的编码功能目前尚未见报道。因此,本研究检测了小鼠*Rnf148*基因的组织表达特征,并对其E3泛素连接酶功能进行了研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

C57BL/6J小鼠,由四川大学实验动物中心提供。RNAeasy Mini kit RNA提取试剂盒购自北京百泰克公司,mRNA逆转录试剂盒购自Fermentas公司,SYBR Premix Ex Taq II实时荧光定量PCR试剂盒购自大连宝生物公司,小鼠胚胎期组织(7、11、15、17 d)cDNA及Northern杂交膜购自Clontech公司,地高辛(DIG)Northern杂交试剂购自Roche公司;蛋白纯化谷胱甘肽-S-转移酶(GST)琼脂糖凝胶购自GE公司。

### 1.2 小鼠组织总RNA的提取及其cDNA第一链的合成

从健康成年小鼠(雌雄各5只)的心、肝、脑、肺、肾、脾、胰、小肠、肌肉、胸腺、睾丸、卵巢和胎盘等13种组织中提取总RNA;从出生后2、7、14、21、22、23、24、25、26、27、28、35、42、49 d和4个月小鼠的辜

丸组织中提取总RNA。然后取1 μg总RNA通过逆转录试剂盒的随机引物合成cDNA第一链。

### 1.3 小鼠器官组织*Rnf148*基因的RT-PCR和实时荧光定量-PCR分析

RT-PCR分析采用小鼠*Rnf148*基因的特异引物:5'-GAACCCACTTGGACCTACTC-3'(Forward)和5'-TGCCAGGTTGATTTTATGAG-3'(Reverse)。对成年小鼠不同组织及不同发育阶段的组织cDNA进行PCR扩增分析,同时用*GAPDH*作为内参。*DAPDH*引物:5'-TGAAGGTCGGTGTGAACG GATTTGGC-3'(Forward)和5'-CATGTAG GCCATGAGGTCCACCAC-3'(Reverse)。PCR反应条件为:94℃预变性1 min,然后94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,循环30次后,72℃延伸10 min。PCR产物采用15 g/L琼脂糖凝胶电泳分离后进行分析。

实时荧光定量-PCR分析所用*Rnf148*基因的引物同上,内参为β-actin,引物:5'-GACGATG CTCCCCGGGCTGTATTC-3'(Forward)和5'-T CTCTTGCTCTGGGCCTCGTCACC-3'(Reverse)。在Bio-Rad iCycler进行检测。反应条件为:95℃1 min预变性,95℃10 s变性,60℃30 s,共40循环。结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示,以4个月小鼠睾丸组织的*Rnf148* mRNA量作为绝对值1,计算各发育阶段睾丸组织的*Rnf148* mRNA相对表达量,采用*t*检验进行统计分析。

### 1.4 小鼠*Rnf148*基因的RNA探针合成

把上述小鼠RT-PCR所获得的基因特异片段连接到pGEM-T easy载体上,经测序验证后,大量扩增,然后用*Sal*I限制性内切酶酶切,凝胶电泳回收。回收片段经分光光度计定量后,将1 μg DNA稀释到16 μL灭菌水中,在沸水中变性10 min后,马上浸入冰水中。然后加入4 μL Mix DIG-High Prime,37℃孵育过夜。最后加入2 μL 0.2 mol/L EDTA溶液(pH8.0)终止反应。载体用*Nco*I限制性内切酶酶切,同样经上述体外转录后,所获得转录产物作为Northern杂交的阴性参照。

### 1.5 小鼠*Rnf148*基因的Northern杂交分析

Northern杂交分析参照Clontech公司的多组织Northern杂交用户手册进行。阳性对照为小鼠β-actin cDNA探针。

### 1.6 GST-Rnf148重组蛋白的原核表达载体构建及重组蛋白的诱导表达

为检测小鼠*Rnf148*蛋白C3H2C3环指结构域

是否具有 E3 泛素连接酶的功能,构建包含从 257 至 316 位氨基酸的整个环指结构域与 GST 融合蛋白原核表达载体。采用引物:5'-ATGAATTCG GACGGAGATAAGGAGTTA-3' (Forward)和 5'-AGCGGCCGCTTAAGGTTTCAGGATGTCA-3' (Reverse)扩增含小鼠 *Rnf148* 的 RING 结构域的编码区序列,所得 PCR 产物首先克隆到 T 载体中,然后再亚克隆到 pGEX-3x-5 载体中。重组质粒转化至感受态大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,然后经过 IPTG 诱导表达。

### 1.7 重组蛋白纯化和浓度测定

将细菌重悬物超声破碎,离心后按照 GST 琼脂糖凝胶纯化说明书纯化细菌裂解上清。然后将纯化后的洗脱液进行 SDS-PAGE 分析。最后按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定 GST-Rnf148 融合蛋白的浓度。

### 1.8 体外泛素化反应

参照 Joazeiro 等<sup>[11]</sup>的方法,在 20  $\mu$ L 的反应体系中加入 100 ng E1、50 ng GST-UBC4、5  $\mu$ g GST-Rnf148 融合蛋白、2  $\mu$ g FLAG-标签的泛素和反应缓冲液 [2 mmol/L ATP、2 mmol/L DTT、50 mmol/L Tris-HCl (pH7.5)、2.5 mmol/L  $MgCl_2$ ]。30  $^{\circ}C$ ,反应 90 min,然后采用 5 $\times$ SDS 上样缓冲液终止反应,采用 Western blot 检测 FLAG 标签的泛素。

## 2 结果

### 2.1 小鼠 *Rnf148* 基因的组织表达谱

由图 1A 可见,在成年小鼠 13 种不同器官组织中,*Rnf148* mRNA 仅存在于睾丸组织。进一步通过 Northern 杂交分析,发现成年小鼠 8 种不同器官组织总 RNA 中只有睾丸组织中出现一条 1.2 kb 左右的杂交信号(图 1B)。

### 2.2 小鼠 *Rnf148* 基因在不同发育阶段的表达谱

首先,对小鼠出生前 4 个时期的胚胎组织和出生后 2、7、14、21、28、35、42、49 d 及 4 月龄雄鼠睾丸组织的 mRNA 进行 RT-PCR 分析,发现出生前及出生后 3 周内,*Rnf148* 基因不表达,28 d 龄后小鼠的睾丸组织有 *Rnf148* 基因的表达(图 2A)。进一步检测出生后 21 至 28 d 小鼠睾丸组织的 *Rnf148* mRNA 的表达,RT-PCR 分析显示 *Rnf148* 基因在出生后 22 d 的小鼠睾丸组织可见表达,其后表达不断增强(图 2B);而实时荧光定量-PCR 结果显示,出生后 21 d 的小鼠睾丸组织中已有 *Rnf148* 基因的

痕量表达,且表达逐日增强,25 d 即达到表达高峰,表达量为 21 d 的 100 多倍,随后 26、27、28 d 及 4 月龄的表达量与 25 d 表达差异无统计学意义(图 2C)。

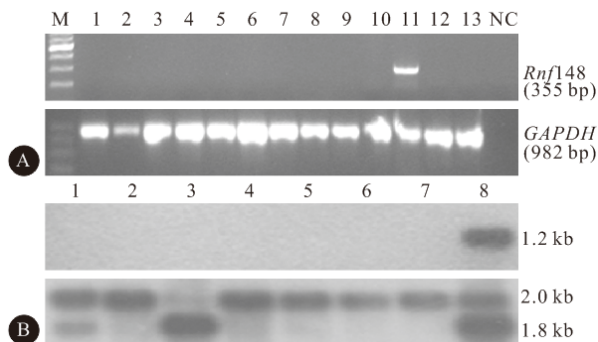


图 1 小鼠 *Rnf148* 基因的组织表达谱

Fig 1 The expression pattern of mouse *Rnf148* gene in different tissues

A: RT-PCR analysis of *Rnf148* gene in 13 different tissues from adult mice. *Rnf148* is only amplified from the RNA of testis. 1: Heart; 2: Liver; 3: Brain; 4: Lung; 5: Kidney; 6: Spleen; 7: Pancreas; 8: Intestine; 9: Skeletal muscle; 10: Thymus; 11: Testis; 12: Ovary; 13: Placenta; M: 100 bp ladder; NC: Negative control. B: Northern blot analysis of *Rnf148* gene in 8 different tissues from mice. One band about 1.2 kb only exists in testis tissue;  $\beta$ -actin is the internal control with two bands of 2.0 kb and 1.8 kb. 1: Heart; 2: Brain; 3: Spleen; 4: Lung; 5: Liver; 6: Skeletal muscle; 7: Kidney; 8: Testis

### 2.3 小鼠 *Rnf148* 基因的 cDNA 全序列的结构特征

如图 3 所示,小鼠 *Rnf148* 基因 cDNA 全长 1 290 bp,开放阅读框为 951 个核苷酸(nucleotide, nt),起始密码子 ATG 位于 163 nt,终止密码子 TAA 位于 1111 nt,基因编码一个含 316 个氨基酸的多肽。在 InterPro 数据库中比较该基因编码的氨基酸序列,发现其序列 98~173 氨基酸(amino acid, aa)为蛋白酶相关结构域(protease associated domain, PA),其 C 端含有一个 C3H2C3 型的环指结构域(269~316 aa)。通过与小鼠 *Rnf133*、*Rnf130* 蛋白质相似结构域对比分析发现,三者的 C3H2C3 结构域有高度同源性(图 4A)。

### 2.4 小鼠 *Rnf148* 蛋白 C3H2C3 环指结构域的 E3 泛素连接酶功能

构建的原核表达载体通过 BL21 细菌表达, GST 琼脂糖凝胶纯化,获得 GST-Rnf148 融合蛋白(图 4B)。体外蛋白泛素化反应结果显示,它们都具有 E3 泛素连接酶的功能(图 4C)。

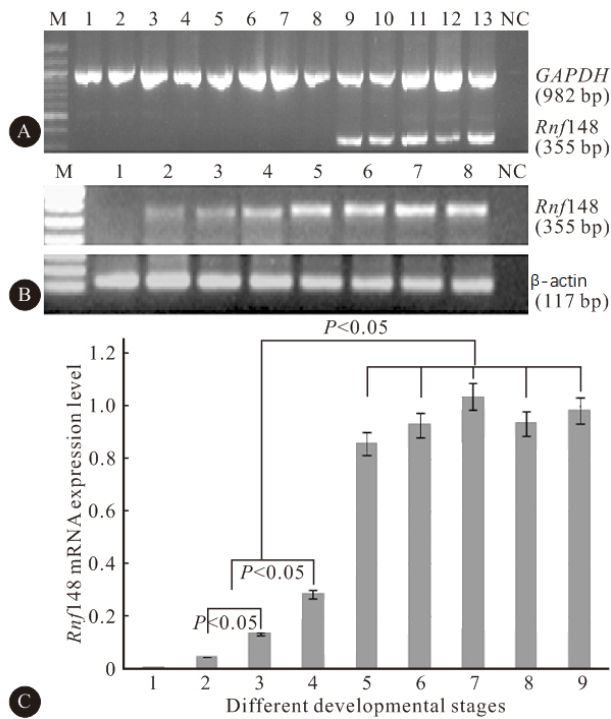


图 2 小鼠 *Rnf148* 基因在不同发育阶段的表达谱

Fig 2 The expression pattern of mouse *Rnf148* gene in different developmental stages

A: RT-PCR analysis of *Rnf148* gene in 13 different stages of mice development. M: 100 bp ladder; 1-4: 7<sup>th</sup>, 11<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 17<sup>th</sup> day embryo; 5-12: 2<sup>nd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>th</sup>, 28<sup>th</sup>, 35<sup>th</sup>, 42<sup>th</sup>, 49<sup>th</sup> day postnatal; 13: 4 months postnatal; NC: Negative control. B: RT-PCR analysis of *Rnf148* gene in the testes from 4<sup>th</sup> week postnatal mice. M: 100 bp ladder; 1-8: 21<sup>st</sup>, 22<sup>nd</sup>, 23<sup>rd</sup>, 24<sup>th</sup>, 25<sup>th</sup>, 26<sup>th</sup>, 27<sup>th</sup>, 28<sup>th</sup> day postnatal; NC: Negative control. C: Quantitative RT-PCR analysis of *Rnf148* gene in the testes from different stages of mice. 1-8: 21<sup>st</sup>, 22<sup>nd</sup>, 23<sup>rd</sup>, 24<sup>th</sup>, 25<sup>th</sup>, 26<sup>th</sup>, 27<sup>th</sup>, 28<sup>th</sup> day postnatal; 9: 4 months postnatal

### 3 讨论

哺乳动物的睾丸组织中存在大量特异性表达的基因,也称为 Chauvinist 基因<sup>[12]</sup>。鉴定和研究这些基因的功能对探讨调控精子发生过程有着重要意义。本研究首次报道小鼠 *Rnf148* 基因在睾丸组织特异表达,在胚胎期及出生后 21 d 前不表达,表达特征与小鼠 *Rnf133*<sup>[10]</sup> 基本一致。从出生后第 3 周开始,表达逐日增强,25 d 后达到表达高峰,这时小鼠逐渐性成熟,体内开始有成熟精子形成<sup>[1]</sup>,因此推测小鼠 *Rnf148* 蛋白可能与精子成熟或大量形成有关。但是,我们需要进一步研究小鼠 *Rnf148* 在组织细胞和时间上的表达特性,以及这种表达特点与精子发生的关系,以此深入研究其在精子发生过程



图 3 小鼠 *Rnf148* 基因核苷酸及其氨基酸序列

Fig 3 Nucleotide (nt) and deduced amino acid (aa) sequences of mouse *Rnf148* gene

The deduced aa sequence of mouse *Rnf148* ORF is shown beneath the DNA sequences. The numbers in the left and right margins indicate the nt and aa positions, respectively. The predicted ring finger C3H2C3 motif is boxed. The primers for the construction of GST-Rnf148 vectors are underlined and the RT-PCR primers for mouse *Rnf148* gene are double underlined. The tailing signal AATAAA is underlined and shaded

中的作用。

小鼠 *Rnf148* 蛋白具有环指结构域,体外泛素化实验表明其具有泛素连接酶活性,因此,其可能参与蛋白泛素化水平的调控系统。该系统在精子发生、受精以及精子质量控制中都起着重要作用<sup>[4]</sup>。另外, *Rnf148* 蛋白还具有 PA 结构,其也是一种蛋白相互识别的结构<sup>[13]</sup>,因此,我们将进一步分析与二者结合的蛋白,了解它们之间的相互作用,深入研究 *Rnf148* 蛋白的生物学功能。

总之,小鼠 *Rnf148* 基因特异地表达在出生 3 周后的睾丸组织中,其编码的蛋白具有泛素连接酶活性的环指结构域,因此推测其参与精子发生过程的蛋白质泛素化水平的调控系统,可能与精子成熟或大量形成有关。基因敲除技术作为后基因组时代研究基因功能的重要策略之一,众多基因敲除小鼠的不断建立为精子发生相关基因的功能研究提供了不可或缺的工具<sup>[14,15]</sup>。因此,我们将对小鼠 *Rnf148* 基因进行敲除工作,以期通过 *Rnf148* 基因敲除小鼠在细胞、器官和整体水平上的各种表型改变,深入研究其在精子发生过程的功能及其作用机理。

