

## 小鼠 *DAZL* 基因启动子核心区域分析 及甲基化对其启动活性的影响

王颖洁<sup>1,2</sup>, 张文慧<sup>1</sup>, 朱睿<sup>1,2</sup>, 左其生<sup>1,2</sup>, 李东<sup>1,2</sup>, 王飞<sup>1,2</sup>,  
路镇宇<sup>1,2</sup>, 纪艳芹<sup>1,2</sup>, 王曼<sup>1</sup>, 张亚妮<sup>1,2</sup>, 李碧春<sup>1,2\*</sup>

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 扬州 225009)

**摘要:** 旨在确定小鼠 *DAZL* 启动子基本活性区, 并分析启动子区域甲基化对其启动子活性的影响, 探究小鼠 *DAZL* 的表达调控机制。采用 PCR 法扩增不同长度的小鼠 *DAZL* 启动子, 插入到 pEGFP-N1 和 pGL3-Basic 载体, 构建重组载体。将重组载体转染 GC-1 细胞系, 并通过添加适量 DNA 甲基化转移酶抑制剂 (5-azacytidine, 5-aza-C) 逆转各试验组启动子片段的甲基化水平, 然后利用双荧光素酶报告基因检测系统检测 *DAZL* 活性变化。双荧光素酶活性检测结果表明, 小鼠 *DAZL* 启动子基本活性区域为 5'侧翼区 -370 ~ -36 bp, 在 -370 ~ -166 bp 区域存在不可或缺的重要调控元件; 经 5-aza-C 处理后, 各缺失片段载体转染的 GC-1 细胞 *DAZL* 的启动子活性与对照组相比均有不同程度的提升, 但差异不显著。本试验确定了小鼠 *DAZL* 启动子基本活性区域, 证明降低小鼠睾丸 *DAZL* 启动子区域甲基化水平, 有助于 *DAZL* 在生殖细胞中特异性表达, 为进一步探究 *DAZL* 生物学功能和调控机制提供参考。

**关键词:** *DAZL*; 启动子甲基化; 5-aza-C; 基因活性

中图分类号: S865.133

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)03-0420-07

### Study on the core region of *DAZL* gene promoter and the effect of methylation on promoter activity in mice

WANG Yingjie<sup>1,2</sup>, ZHANG Wenhui<sup>1</sup>, ZHU Rui<sup>1,2</sup>, ZUO Qisheng<sup>1,2</sup>, LI Dong<sup>1,2</sup>, WANG Fei<sup>1,2</sup>,  
LU Zhenyu<sup>1,2</sup>, JI Yanqin<sup>1,2</sup>, WANG Man<sup>1</sup>, ZHANG Yanni<sup>1,2</sup>, LI Bichun<sup>1,2</sup>

(1. College of Animal Science & Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009;

2. Key Laboratory of Animal Breeding Reproduction and Molecular Design for Jiangsu Province, Yangzhou 225009)

**Abstract:** This study was aimed to determine the basic activity region of the mice *DAZL* gene promoter, analyze the effect of promoter methylation on gene activity, and explore the regulation mechanism of the *DAZL* gene expression. Different fragments of the mice *DAZL* gene promoter were cloned by PCR, and then recombined into pEGFP-N1 or/and pGL3-basic plasmids. The recombined plasmids pGL3-*DAZL* was transferred into GC-1 cells treated with 5-aza-C. The Dual-Luciferase® Reporter Assay System was performed to identify the activity of the *DAZL* gene. The result showed that the mice *DAZL* core promoter region was -370—-36 bp, which indicated that there might be important regulatory elements within -370—-166 bp; with the 5-aza-C treatment, the activity of the mice *DAZL* gene promoter fragment with different lengths were increased, but no significant difference was observed. In general, the effect of methylation of the mice *DAZL* gene promoter on the gene activity was studied and the results would lay a foundation for further exploring the regulation and biological function of the mice *DAZL* gene.

**Key words:** *Dazl*; promoter methylation; 5-aza-C; gene activity

收稿日期: 2015-10-16

基金项目: 国家自然科学基金 (31301959, 31472087), 高等学校博士学科点专项科研基金 (20123250120009) 和江苏高校优势学科建设工程项目 (苏政办发[2011]137号) 共同资助。

作者简介: 王颖洁, 硕士。E-mail: 861688743@qq.com

\* 通信作者: 李碧春, 博士, 教授。E-mail: yubcli@yzu.edu.cn

精子发生的过程非常复杂, 主要包括有丝分裂和减数分裂两个阶段, 同时存在众多的调控因子参与其中。而 *Dazl* (deleted in azoospermia like) 作为减数分裂的关键调控因子, 不仅在生殖细胞中特异表达, 而且参与调节生殖细胞的发育和分化。*Dazl* 是 *DAZ* 基因家族 (包括 *DAZL*、*BOULE*、*DAZ*) 的成员之一, 最早克隆于蝇类的睾丸组织<sup>[1]</sup>, 是一个高度保守的基因序列, 其编码产物是一种 RNA 结合蛋白, 能够通过 RRM (RNA recognition motif, RRM) 结构域与 mRNA 结合来调控其翻译水平<sup>[2]</sup>。*DAZ* 基因家族仅在生殖细胞中表达, 其中 *Dazl* 在睾丸组织和卵巢组织中均有表达, 且在减数分裂期间, *Dazl* 蛋白从精原细胞的细胞核转移到次级精母细胞、精细胞及精子的细胞质中<sup>[3-4]</sup>。

*Dazl* 突变或表达缺乏可导致精子发生过程中减数分裂障碍及雄性不育, 是精子发生过程中的重要调控因子。近年来, 国内已陆续在人、牛、山羊、小鼠和鸡<sup>[5-9]</sup>等物种上克隆了 *Dazl*, 这些研究主要针对 *Dazl* 的表达、缺失、多态性及突变的研究。精细胞中 *Dazl* 存在低甲基化而血液细胞及胚胎中却未发现甲基化, DNA 甲基化水平调控着 *Dazl* 在精细胞中的表达<sup>[11-13]</sup>, 但睾丸组织中 *Dazl* 正常 DNA 甲基化状态对其启动子表达活性的影响却未有报道。本研究通过构建小鼠 *Dazl* 启动子 5' 侧翼区

pEGFP-N1 重组载体及其不同长度片段的 pGL3-Basic 重组载体, 瞬时转染 GC-1 细胞, 利用双荧光素酶报告基因系统寻找 *Dazl* 的核心启动子区; 结合甲基化特异性 PCR 法的结果, 在添加 DNA 甲基化转移酶抑制剂 (5-azacytidine, 5-aza-C) 条件下, 检测其启动活性的变化, 进而分析其正常甲基化状态对 *Dazl* 启动子活性的影响, 以期为 *Dazl* 的表达调控机制等方面的研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验动物 BALB/C 小鼠来自扬州大学比较医学中心。pEGFP-N1 载体由本实验室保存, 大肠杆菌 TOP10 感受态、胶回收试剂盒、小提质粒试剂盒及 HotStart Taq PCR MasterMix 均购自北京天根公司, PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase、T4 DNA 连接酶、DL 5 000 DNA Marker 购自大连宝生物公司, 限制性内切酶购自 Fermentas 公司, 载体 pGL3-Basic、pRL-SV40 及荧光素酶检测试剂盒 Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System 均购自 Promega 公司, EZ DNA Methylation<sup>™</sup> Kit 购自 ZYMO RESEARCH 公司, Lipofectamine<sup>™</sup>2000 购自 Invitrogen 公司, GC-1 (小鼠精原细胞系) 购自 ATCC。引物合成及测序由上海英潍捷基公司完成。

表 1 *Dazl* 启动子不同长度片段引物序列

Table 1 The sequence of primers for constructing the vector of *Dazl* primer

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence	片段长度/bp Size	退火温度/℃ Annealing temperature
M0	CGCATTAATCGCTGCTCATTAACCAACCA Ase I	1395	58
M1	GGGGTACCCGCTGCTCATTAACCAACCA Kpn I	1395	58
M2	GGGGTACCGTCTGGTCACTGCTGTGTCCTTTG Kpn I	821	61
M3	GGGGTACCCAATGTGGCTGAAAAAGAGGGTGA Kpn I	653	58
M4	GGGGTACCGCAGCCGAGACCCTTACGTAGATGT Kpn I	334	61
M5	GGGGTACC CTCGCTTCGGGACTCCGCTGT Kpn I	130	62
M	CCCTCGAGGTGGAGCAGAAGCCACGCGA Xho I		

M0~M5. 上游引物; M. 共同下游引物 M0-M5. Sense primer; M. Common antisense primer

## 1.2 方法

**1.2.1 生物信息学分析** 分别利用在线预测软件 <http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>、[http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 对 *Dazl* 启动子核心区域进行预测, <http://www.urogene.org/>

[cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi](http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi) 预测其 CpG 岛。

**1.2.2 基因组 DNA 的提取** 酚氯仿法 (参考《分子克隆试验指南》(第 2 版)) 提取成年 BALB/C 小鼠睾丸基因组 DNA。测定 260 nm/280 nm 的 OD 比值及 DNA 浓度, -20℃ 保存、备用。

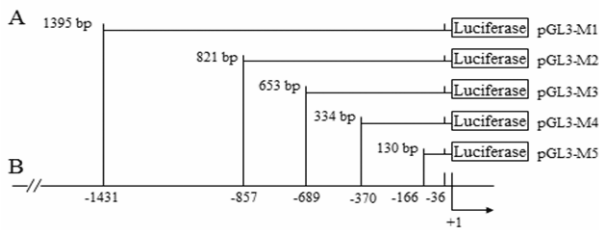


图 1 *Dazl* 启动子系列缺失片段 PCR 示意图

Figure 1 The PCR schematic representation of *Dazl* promoters

**1.2.3 小鼠 *Dazl* 启动子区不同片段的扩增** 根据 GenBank 上 C<sub>57</sub>BL/6J 小鼠 *Dazl* 序列 (GeneID: 13164) 转录起始位点上游 2000 bp 区域的序列特征分析结果, 同时基于 pEGFP-N1 质粒图谱信息, 在上下游引物的 5'端分别引入 *Ase* I、*Xho* I 酶切位点和保护碱基, 构建 pDAZL-EGFP 载体。然后以构建的 pDAZL-EGFP 为模板, 根据 pGL3-Basic 质粒多克隆位点信息, 分别在上下游引物 5'端引入 *Kpn* I、*Xho* I 酶切位点及保护碱基, 设计不同片段长度的上游引物及共同下游引物。引物序列和构建片段的位置分别见表 1。

以基因组 DNA 为模板, 通过 PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase 进行 PCR 扩增不同长度片段, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后进行胶回收, 将纯化后的 PCR 产物与 pMD<sup>™</sup>-19T Vector 连接, 并转化至感受态细胞 TOP10 中, 经 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定及测序正确后, 构建正确的克隆载体。

**1.2.4 载体构建** (1) pLinker-EGFP 载体的构建。采用限制性内切酶 *Ase* I 和 *Xho* I 酶切 pEGFP-N1 载体和长度为 113 bp 的 Linker (为 CMV 启动子上游载体骨架, 正链为: 5'-CGCATTAAT ACGCCAG CAACGCGCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTT GCTGGCCTTTTCTCACATGTTCTTTCCTGCGT TATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC CATGCATCTCGAG GGG-3'), 切除完整的 CMV 启动子, 连接入 Linker<sup>[13]</sup>。

(2) pDAZL-EGFP 载体的构建。用 *Ase* I 和 *Xho* I 分别双酶切克隆载体和 pEGFP-N1 质粒, 凝胶回收试剂盒回收酶切产物后, 连接, 并转化至感受态细胞 TOP10 中, 经双酶切鉴定及测序验证正确后命名为 pDAZL-EGFP。

(3) *Dazl* 启动子不同片段重组载体的构建。用 *Kpn* I 和 *Xho* I 分别双酶切克隆载体和 pGL3-Basic 载体, 酶切片段回收纯化后, 连接。转化后, 经双酶切鉴定及测序正确后分别命名 pGL3-M1、pGL3-M2、pGL3-M3、pGL3-M4 和 pGL3-M5。

**1.2.5 小鼠 *Dazl* 启动子 CpG 岛甲基化位点检测**

采用 EZ DNA Methylation<sup>™</sup> Kit (具体步骤参照说明书) 对基因组 DNA 进行重硫酸钠转化, 转化后回收的基因组 DNA 作为模板用于 PCR 扩增。并根据 CpG 岛预测结果, 分别设计 2 对引物 (表 2)。反应条件设定为: 94℃ 3 min, 94℃ 10 s, 55℃ 15 s, 72℃ 30 s, 72℃ 5 min, 35 个循环。

表 2 小鼠 *Dazl* 启动子 CpG 岛甲基化位点引物序列

Table 2 The sequence of primers for CpG island methylation of Mouse *Dazl* gene promoter

引物	引物序列(5'-3')
Primer	Primer sequence
F <sub>M</sub>	TTTGGTTATTGTTGTGTTTTTGTAT
R <sub>M</sub>	CAACCACATTAATAAAATTAATCC
F <sub>M1</sub>	TGAGTATCGTTTTGTGTTAGGATTAATTTATAGGGG
R <sub>M1</sub>	CTAAACCTCGCAAAAAAACCAAAAAACCCAC

**1.2.6 细胞瞬时转染** 转染前, 将细胞接种于 24 孔板, 每孔  $5 \times 10^5$  个细胞, 待细胞完全贴壁生长至 80% 左右时, 参照 Lipofectamine<sup>™</sup>2000 使用说明书, 分别将重组质粒 pGL3-M 和内参质粒 pRL-SV40 以 35:1 的比例共转染至 GC-1 细胞中, 同时设置阳性对照组 (pGL3-Control 质粒与 pRL-SV40 质粒共转染) 和阴性对照组 (pGL3-Basic 质粒与 pRL-SV40 质粒共转染), 转染 48 h 后收集细胞, 进行双荧光素酶活性检测。每组 3 次重复。

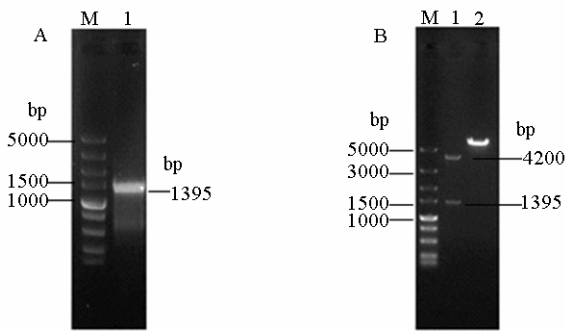
**5-aza-C 处理:** 转染 6 h 后换液时, 在培养基中分别添加 5-aza-C 至终浓度 10 μmol/L, 以等体积 PBS 为对照, 处理 2 d, 离心收集细胞。每组重复 3 次。

**1.2.7 双荧光素酶活性检测** 将收集后的细胞 70 μL 加入到 96 孔酶标板中, 参照 Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System 试剂盒说明书步骤, 检测双荧光素酶活性。启动子活性值为荧光素酶相对活性值 (Relative luciferase activity) 即萤火虫荧光素酶活性值/海肾荧光素酶活性值。采用“平均值±标准差”的形式表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组载体 pDAZL-EGFP 构建

所扩增的小鼠 *DAZL* 基因 5'侧翼区 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在 1 400 bp 处有清晰条带, 与预期片段大小一致 (图 2A)。重组载体 pDAZL-EGFP 经 *Ase* I、*Xho* I 单、双酶切鉴定后, 凝胶电泳呈现两条清晰条带, 其中一条约为 1 400 bp, 另一条约为 4 200 bp (图 2B), 经测序后与 GenBank 中小鼠 *DAZL* 基因 5'侧翼区序列相一致, 表明 pDAZL-EGFP 构建正确, 可以用于后续试验。



A: M. DNA 相对分子质量标准 DL5 000 DNA marker; 1. PCR 产物; B: M. DNA 相对分子质量标准 DL5 000 DNA marker; 1. *Ase* I/*Xho* I 双酶切重组质粒 pDAZL-EGFP; 2. *Xho* I 单酶切重组质粒 pDAZL-EGFP

A: M. DL5 000 DNA marker; 1. PCR product; B: M. DL5 000 DNA marker; 1. Recombinant plasmid digested with *Ase* I/*Xho* I; 2. Recombinant plasmid digested with *Xho* I

图 2 *DAZL* 5'侧翼区 PCR 扩增及 pDAZL-EGFP 单双酶切鉴定

Figure 2 PCR for 5' flanking of *DAZL* and identification of the plasmid pDAZL-EGFP

## 2.2 小鼠 *DAZL* 启动子活性定性分析

为检测所克隆的片段是否具有启动子活性, 将

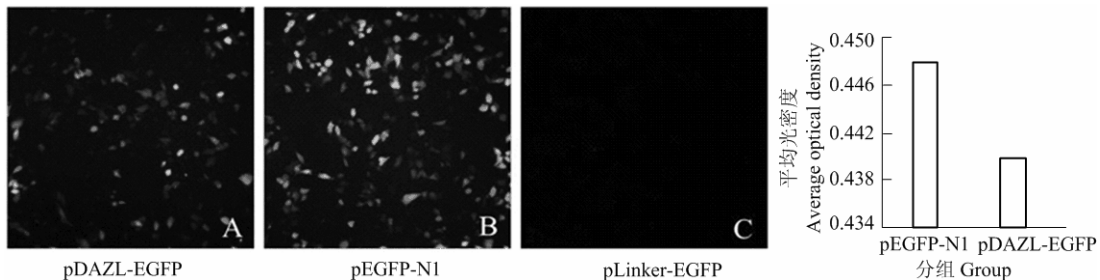
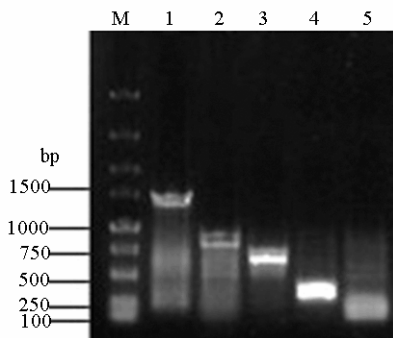


图 3 小鼠 *DAZL* 基因 5'侧翼区片段启动子活性定性检测 (40×)

Figure 3 The activity analyze of the cloned flanking of *DAZL* (40×)



M. DNA marker; 2-5. PCR 产物 PCR product

图 4 小鼠 *DAZL* 基因启动子不同长度缺失片段 PCR 电泳  
Figure 4 PCR product electrophoresis for different lengths fragments of *Dazl* promoter

## 2.4 小鼠 *DAZL* 启动子活性检测

将上述成功构建的 5 个不同片段的小鼠 *DAZL*

*pDAZL-EGFP*、*pLinker-EGFP* 和 *pEGFP-N1* 分别转染 GC-1 细胞。转染 48 h 后, 荧光显微镜下观察, *pDAZL-EGFP* 转染的 GC-1 细胞可以观察到绿色荧光 (图 3A), 但其荧光强度较 *pEGFP-N1* 阳性对照组 (图 3B) 弱, 而缺失启动子的 *pLinker-EGFP* 阴性对照组未检测到绿色荧光蛋白 (图 3C)。因此, 所克隆的小鼠 *DAZL* 启动子片段可以启动 GFP 蛋白的表达, 具有启动子活性。

## 2.3 系列缺失载体的构建

以所构建的 *pDAZL-EGFP* 载体为模板, 通过 PCR 方法扩增不同长度片段 1395、821、653、334 和 130 bp, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果表明, 所获得的不同长度的片段大小与预期大小一致 (图 4)。

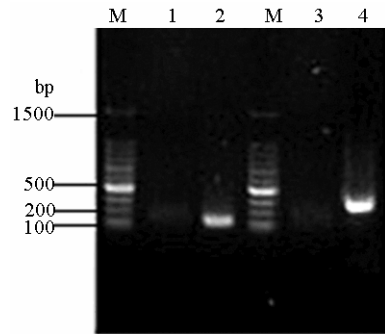
扩增产物经回收纯化、酶切消化、再回收纯化后, 连接到 *pGL3-Basic*。提取质粒, 分别用 *Kpn* I、*Xho* I 双酶切所构建的系列缺失载体, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 分别获得相应启动子片段及载体片段的清晰条带 (图 5), 且测序后正确, 并依次命名为 *pGL3-M1*、*pGL3-M2*、*pGL3-M3*、*pGL3-M4* 和 *pGL3-M5*。

重组质粒与 *pRL-SV40* 质粒共转染 GC-1 细胞系, *pGL3-Basic* 质粒作为阴性对照。转染后 48 h 检测各启动子片段活性 (图 6)。结果表明, 小鼠 *DAZL* 启动子不同长度片段在 GC-1 细胞中具有不同的启动子活性, *pGL3-M3* 启动活性最高, 而 *pGL3-M5* 启动子活性基本丧失, *pGL3-M4* 的启动子活性与 *pGL3-M5* 及阴性对照差异显著, 说明在 -370~-166 bp 区域存在启动子基本的调控元件, 其对启动子活性具有决定性的影响, -370~-36 bp 是 *DAZL* 启动子的基本活性区域。 *pGL3-M3* 与 *pGL3-M4* 的启动子活性差异显著, 说明 -689~-370 bp 区域可能存在正调控元件。

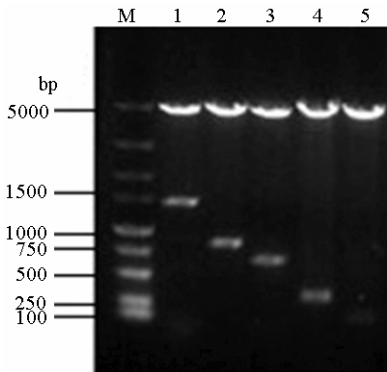
## 2.5 小鼠 *Dazl* 启动子区域甲基化位点定性分析

分别以重亚硫酸盐处理后的小鼠睾丸组织基因组 DNA 和正常的基因组 DNA 为模板, 以  $F_M$ 、 $R_M$

和  $F_{M1}$ 、 $R_{M1}$  为引物，通过 PCR 方法分别扩增其特异性片段，1.5%琼脂糖凝胶电泳检测结果表明(图 7)，泳道 1、3 无明显条带，泳道 2、4 呈现特异性条带，即以  $F_M$ 、 $R_M$  为引物(泳道 1)、以  $F_{M1}$ 、 $R_{M1}$  为引物(泳道 3)不能扩增出正常的基因组 DNA 为模板的 PCR 特异条带，而以  $F_M$ 、 $R_M$  为引物(泳道 2)、以  $F_{M1}$ 、 $R_{M1}$  为引物(泳道 4)可以特异地扩增出以处理组 DNA 为模板的 PCR 特异条带，表明在-850~-650 bp、-380~-56 bp 存在甲基化位点，与预测结果相符。



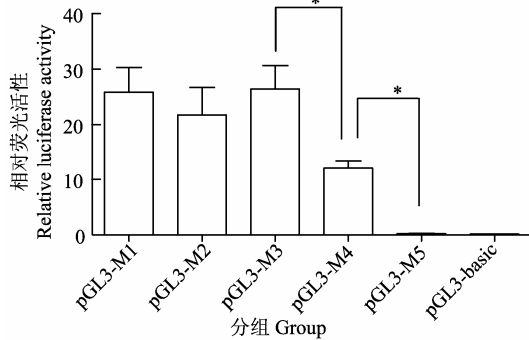
M. DNA 相对分子质量标准 100 DNA marker; 1. 以  $F_M$ 、 $R_M$  为引物 PCR 扩增正常的基因组 DNA; 2. 以  $F_M$ 、 $R_M$  为引物 PCR 扩增实验组基因组 DNA; 3. 以  $F_{M1}$ 、 $R_{M1}$  为引物 PCR 扩增正常的基因组 DNA; 4. 以  $F_{M1}$ 、 $R_{M1}$  为引物 PCR 扩增实验组的基因组 DNA



M. DNA marker; 1-4. pGL3-DAZL 重组质粒双酶切鉴定结果 Recombinant plasmid digested with *Ase I*/*Xho I*

图 5 pGL3-DAZL 系列缺失载体的酶切鉴定

Figure 5 The identification of restriction enzyme digestion of series of the plasmid pGL3-DAZL



\* 表示显著差异 ( $P < 0.05$ ) means significant difference

图 6 小鼠 *DAZL* 启动子系列缺失片段在 GC-1 细胞中的活性检测

Figure 6 The activity of different fragments of *Dazl* promoter

### 2.6 DNA 甲基化对小鼠 *DAZL* 启动子活性的影响

5-aza-C 分别处理转染双荧光素酶报告基因载体 *pGL3-M1*、*pGL3-M2*、*pGL3-M3*、*pGL3-M4* 和 *pGL3-M5* 的 GC-1 细胞 2 d 后，检测小鼠 *DAZL* 基因启动子活性的变化(图 8)。结果表明，试验组 *pGL3-M1*、*pGL3-M2*、*pGL3-M4* 和 *pGL3-M5* 的活性较相应的对照组均有不同程度的提高，但其差异均不显著。

M. DL5 000 DNA marker; 1. PCR of normal DNA using  $F_M$  and  $R_M$  as primers; 2. PCR of control DNA using  $F_M$  and  $R_M$  as primers; 3. PCR of normal DNA using  $F_{M1}$  and  $R_{M1}$  as primers; 4. PCR of control DNA using  $F_{M1}$  and  $R_{M1}$  as primers

图 7 *DAZL* 基因启动子区域甲基化位点定性分析

Figure 7 The qualitative analysis of *DAZL* promoter methylation

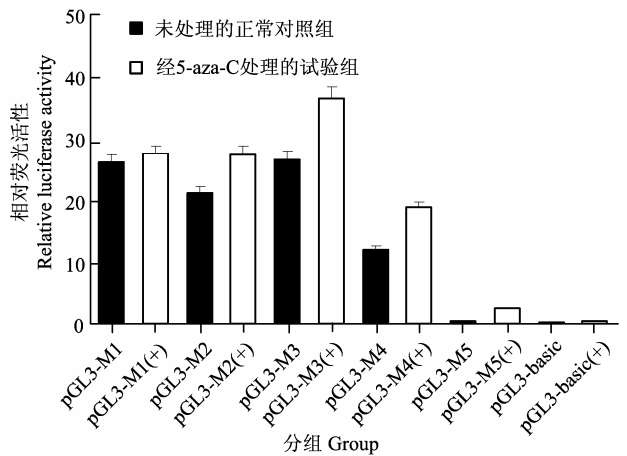


图 8 5-aza-C 处理前后的启动子活性检测

Figure 8 The activity of normal and control groups treated by 5-aza-C

### 3 讨论

*pEGFP-N1* 作为一种报告基因载体灵敏度高、荧光稳定且无需辅助因子或底物的参与即可表达荧光，对细胞无毒害作用，常用于活细胞中外源基因的定位及迁移观察。同时，*pEGFP-N1* 载体由于自身结构的特点，也可用于外源基因启动子的活性分析<sup>[13]</sup>，此方法虽然可以简单、直观地定性分析启动子活性，但很难精确地对其进行定量分析。而双荧光素酶报告基因检测系统将两个报告基因（海肾荧光素酶报告基因和萤火虫荧光素酶报告基因）用于同一试验系统中，以海肾荧光素酶报告基因为内对照，与萤火虫荧光素酶报告基因进行相互测量，使

萤火虫荧光素酶报告基因的测量结果正态化,可直接反映启动子活性的强度,完成定量分析。在本试验中,将所克隆的小鼠 *DAZL* 启动子片段完全替换 *pEGFP-N1* 载体的 CMV 启动子,构建 *pDAZL-EGFP* 重组载体,同时构建启动子缺失载体 *pLinker-EGFP* 作为阴性对照,结果显示,所克隆的 -1431~-36 bp 片段可以启动 EGFP 蛋白的表达,具备启动活性。以所克隆的片段为模板,进一步构建 5 个不同长度的系列缺失载体 *pGL3-M1*、*pGL3-M2*、*pGL3-M3*、*pGL3-M4* 和 *pGL3-M5*,经双荧光素酶报告基因检测系统分析,发现 *pGL3-M1* 和 *pGL3-M3* 这 2 个载体的活性强度最高,而 *pGL3-M5* 载体几乎丧失了启动活性,且与 *pGL3-M4* 的活性强度差异显著,说明在 -370~-166 bp 区域存在不可或缺的基本调控元件。*pGL3-M3* 和 *pGL3-M4* 之间启动活性也存在差异显著,说明 -689~-370 bp 间可能存在某些重要的正调控元件。因此,将在后续研究中采用 EMSA、染色质免疫沉淀等技术进一步挖掘其核心调控元件,进一步揭示小鼠 *DAZL* 生物学功能和调控机制。

DNA 甲基化是表观遗传常见的一种修饰,该反应以 S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体,由 DNA 甲基转移酶催化发生。基因启动子区域 CpG 岛具有重要的招募转录因子的作用,其高甲基化修饰反而会影响到对转录因子的招募,进而使其下游基因的转录活性降低,甚至导致基因表达沉默<sup>[14]</sup>。因此,启动子 CpG 岛的甲基化状态对其启动子活性和基因的表达水平都有重要的影响。由于甲基化修饰的可逆性,在不引起基因序列改变的情况下,可通过药物来降低甲基化的程度<sup>[14]</sup>。DNA 甲基化转移酶抑制剂 (5-azacytidine, 5-aza-C) 是 DNA 甲基化转移酶抑制剂,在 DNA 复制过程中与 DNA 甲基化转移酶形成共价复合物,抑制该酶的甲基转移活性,进而实现去甲基化功能,研究表明<sup>[15-16]</sup>,较低浓度的 5-aza-C 可实现基因的甲基化水平的逆转,从而达到引起 DNA 去甲基化的目的。本试验中,为了分析 DNA 甲基化状态对小鼠睾丸组织中 *DAZL* 启动子活性的影响,采用甲基化特异性 PCR 法 (MSP)<sup>[17]</sup> 快速对 *DAZL* 启动子区域是否存在甲基化位点进行定性分析,并通过双荧光素酶报告基因检测系统来检测 5-aza-C 处理前后的系列缺失的活性变化,分析启动子 DNA 甲基化对其启动活性的影响。结果发现,各试验组的活性强度均有一定程度的提升,但与所对应的对照组相比差异并不显著,说明小鼠 *DAZL* 启动子区域甲基化水平对其活性影响并不显著,甲基化水平较低。Maatouk 等研究人类睾丸组

织的 *DAZL* 5'侧翼甲基化时发现,生精细胞中 *DAZL* 的甲基化水平较低,在体细胞中甲基化水平较高,这表明 *DAZL* 5'侧翼甲基化可能参与了 *DAZL* 基因生殖细胞特异性表达调节<sup>[11-12]</sup>。之后,刘振山等<sup>[19]</sup>在犏牛中也得到了类似的结果。章寒琼等<sup>[20]</sup>在研究中发现,*DAZL* 在减数分裂期间处于低甲基化水平,这种低甲基化状态对维持正常的减数分裂具有重要作用。本试验从 DNA 甲基化对其启动子活性影响的角度出发,也证明了 *DAZL* 启动子区域低甲基化状态有助 *DAZL* 在生殖细胞中特异性表达。

本试验通过构建一系列不同长度的小鼠 *DAZL* 启动子片段,利用双荧光素酶报告基因系统确定了 *DAZL* 基因核心启动子区,分析了小鼠 *DAZL* 启动子区域甲基化水平对其启动子活性的影响。该研究为进一步探究 *DAZL* 生物学功能和调控机制提供参考。

## 参考文献:

- [1] 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.
- [2] RUGGIU M, COOKE H J. In vivo and in vitro analysis of homodimerisation activity of the mouse Dazl1 protein[J]. *Gene*, 2000, 252(1): 119-126.
- [3] RUGGIU M, SAUNDERS P T K, 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.
- [4] XU E Y, MOORE F L, PERA R A R. A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(13): 7414-7419.
- [5] 张庆波, 李齐发, 李家璜, 等. 牛精子发生相关新基因 *b-DAZL* 的克隆、生物信息学分析与组织表达研究[J]. *自然科学进展*, 2008, 18(5): 493-504.
- [6] 张艳丽, 钟部帅, 樊懿萱, 等. 山羊 *DAZL* 基因的克隆及在山羊骨髓间充质干细胞中的表达[J]. *南京农业大学学报*, 2012, 35(6): 104-110.
- [7] 闻小慧, 张家颖, 左文静, 等. 常染色体 *DAZL* 基因单核苷酸多态性与男性不育相关性研究[J]. *中华男科学杂志*, 2007, 8(13): 713-717.
- [8] TSCHANter P, KOSTOVA E, LUETJENS C M, et al. No association of the A260G and A386G *DAZL* single nucleotide polymorphisms with male infertility in a Caucasian population[J]. *Human Reproduction*, 2004, 19(12): 2771-2776.
- [9] 王龙, 周莹, 胡玥, 等. 小鼠 *Dazl* 基因融合蛋白表达载体的构建及转染[J]. *中国兽医学报*, 2013, 33(2):

- 236-240.
- [10] 郑蒙蒙, 李伟, 施青青, 等. 鸡 *Dazl* 基因的克隆及其亚细胞定位研究[J]. 中国家禽, 2013, 35(6): 8-12.
- [11] CHAI N N, PHILLIPS A, FERNANDEZ A, et al. A putative human male infertility gene *DAZLA*: genomic structure and methylation status[J]. Molecular Human Reproduction, 1997, 3(8): 705-708.
- [12] MAATOUK D M, KELLAM L D, MANN M R W, et al. DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ cell genes in both germ cell and somatic cell lineages[J]. Development, 2006, 133(17): 3411-3418.
- [13] 赵敏英, 赵涛, 彭弋峰. *DAZL* 基因对人类生殖细胞分化和性腺发育影响的研究进展[J]. 生殖医学杂志, 2010, 19(1): 71-74.
- [14] 王洪梅, 张利博, 侯明海, 等. 牛 *Nramp1* 基因启动子的克隆及其活性分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(5): 1022-1028.
- [15] HERMAN J G, BAYLIN S B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation[J]. New England Journal of Medicine, 2003, 349(21): 2042-2054.
- [16] 向波, 李文娟, 易梅, 等. DNA 甲基化对 *NOR1* 基因启动子活性和基因表达的影响[J]. 中南大学学报 (医学版), 2011, 37(8): 765-770.
- [17] QIU G H, TAN L K S, LOH K S, et al. The candidate tumor suppressor gene *BLU*, located at the commonly deleted region 3p21. 3, is an E2F-regulated, stress-responsive gene and inactivated by both epigenetic and genetic mechanisms in nasopharyngeal carcinoma[J]. Oncogene, 2004, 23(27): 4793-4806.
- [18] HERMAN J G, GRAFF J R, MYÖHÄNEN S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996, 93(18): 9821-9826.
- [19] 刘振山. 犏牛及其亲本 *IGF2*, *H19*, *SNRPN* 和 *DAZL* 等四个基因表达活性及其 DNA 甲基化修饰分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [20] 章寒琼, 张西锋, 潘博, 等. BPA 不影响卵母细胞减数分裂相关基因 *Dazl* 的甲基化[J]. 青岛农业大学学报 (自然科学版), 2011, 28(2): 83-87.