

小鼠 BTB/锌指结构新基因 Bsg6 的克隆及表达谱分析

慈宏亮^{1), 2)} **, 李昱华¹⁾ **, 陈微³⁾, 李亦平^{1), 2), 3)} *

¹⁾北京师范大学生命科学学院生物医学研究所, 北京 100875; ²⁾浙江赛尔生物医学研究院, 杭州 310006;

³⁾美国哈佛大学牙医学院 Forsyth 研究所, 波士顿 02115)

摘要 Bsg6 (brain specific gene 6) 是用消减差异筛选的方法克隆的小鼠头部特异表达新基因。Bsg6 基因 cDNA 长 3 871 bp, 编码一个 670 个氨基酸残基的蛋白, GenBank 登录号 AY635051, 位于小鼠第 4 号染色体, 由 2 个外显子构成。Bsg6 蛋白含有一个 N 端 BTB (Broad-complex, Tramtrack, and Bric-a-brac) 结构域和两个 C 端 C₂H₂ 型锌指结构域。小鼠 Bsg6 蛋白与其在人类和鸡中同源蛋白的同源性分别为 86.2% 和 79.1%。Bsg6 在小鼠胚胎中的表达具有一定动态性, 在 E8.5 的小鼠胚胎中, Bsg6 主要在前脑和神经管表达。在 E9.5 的小鼠胚胎中, Bsg6 的表达明显增强并主要集中在前脑的端脑部。Bsg6 在 E10.5 小鼠胚胎端脑的表达出现了下降, 但是在中脑和后脑的表达增加, 此外, Bsg6 mRNA 的表达还出现在肢芽和尾部。在 HH10 期的鸡胚中, Bsg6 主要在头部和神经管前端表达。Northern 杂交结果显示, Bsg6 在很多小鼠成体组织中没有表达, 但是在破骨细胞瘤中高表达。Bsg6 的表达谱提示, Bsg6 可能是在器官形成期对脑的发育起到重要作用的转录因子, 而且其表达受到严格的调控, 此外 Bsg6 还可能与肿瘤的发生有关。

关键词 Bsg6 基因; 差异筛选; 锌指蛋白; BTB 结构域

中图分类号 Q785; Q786

Cloning and Expression Analysis of a Novel Mouse Gene BTB/Zinc Finger Gene Bsg6

CI Hong-Liang^{1), 2)} **, LI Yu-Hua¹⁾ **, CHEN Wei³⁾, LI Yi-Ping^{1), 2), 3)} *

¹⁾ Biomedical Research Institute, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; ²⁾ Zhejiang Cell Biomedical Research College,

Hangzhou 310006, China; ³⁾ Forsyth Institute, Harvard School of Dental Medicine, Boston 02115, USA)

Abstract The subtractive differential screening was used to clone a novel mouse gene Bsg6 (brain specific gene 6) expressed specifically in E9.5 mouse embryo brain. As evaluated by DNA sequencing and bioinformatic analysis, the Bsg6 cDNA is 3 871 bp in length encoding a 670-amino-acid protein, the Genebank accession number is AY635051 and the Bsg6 gene is located on mouse chromosome 4 with 2 exons. Bsg6 protein contains a BTB (Broad-complex, Tramtrack, and Bric-a-brac) motif on the N terminus and two consecutive C₂H₂ zinc finger motifs on the C terminus. Mouse Bsg6 protein shows high similarity with human and chicken homology protein with identity of 86.2% and 79.1% respectively. Whole-mount *in situ* hybridization showed that mRNA level of Bsg6 in mouse embryos was vary in different regions of brain. Expression was found in brain and nerve tube of E8.5 mouse embryo. By E9.5, the transcripts of Bsg6 increased significantly and was found predominantly in forebrain. By E10.5, the expression of Bsg6 decreased

收稿日期: 2005-06-07, 接受日期: 2005-08-24

浙江赛尔生物医学研究院资助项目

** 并列第一作者

* 联系人 Tel: 010-58806656, E-mail: YPLi@forsyth.org

Received: June 7, 2005; Accepted: August 24, 2005

Supported by Zhejiang Cell Biomedical Research College

** Two authors contributed equally

* Corresponding author Tel: 010-58806656, E-mail: YPLi@forsyth.org

in forebrain, while increased in midbrain and hindbrain, expression was also found in limb and tail. *Bsg6* expression was also found in brain and anterior of nerve tube of HH10 chicken embryo. No *Bsg6* mRNA were found in adult mouse tissues, while *Bsg6* was expressed in mouse osteoclastoma cell line. The expression patterns of *Bsg6* gene suggest that *Bsg6* may play an important role and be under strict control in the developing brain in the organogenesis stage, *Bsg6* might also play a role in the tumor genesis.

Key words *Bsg6* gene; differential screening; zinc finger protein; BTB motif

中枢神经系统的发育是一个极其复杂的过程,涉及许多基因之间的相互作用,锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)作为一大类转录因子,在中枢神经系统发育过程中的基因调控上发挥重要的作用。ZFP是真核细胞中普遍存在的一类DNA结合蛋白,根据其锌指结构的特征,可以分为 C_2H_2 ($Cys(2)/His(2)$)型、 C_3H_4 型和 C_4H_4 型等,其中 C_2H_2 型ZFP构成一大类转录因子家族。在人类基因组中,约含有700个 C_2H_2 型ZFP转录因子^[1]。 C_2H_2 型锌指蛋白的N末端通常伴有不同的基元。它们调节亚细胞定位、DNA结合、基因的表达(通过选择性地控制与其他转录因子的结合或者与其他细胞成分的结合),这些基元包括BTB(Broad-complex, Tramtrack, and Bric-a-brac)结构域(也称为POZ(poxvirus and zinc finger)结构域)^[2],KRAB(Krüppel相关性保守盒)结构域,SCAN结构域等。BTB结构域一般为115个氨基酸左右,大多为疏水性氨基酸,估计大约有5%~10%的人类ZFP含有这一结构域^[1]。分析BTB结构域二级结构可以看出,BTB结构域由四段螺旋组成,螺旋间由折叠连接,所形成的三维空间结构是与其它蛋白作用的特征模体。BTB/ZFP通过N端的BTB结构域与其他调节因子形成同源或异源聚合体,通过C端的 C_2H_2 锌指结构域与DNA结合发挥调节转录的作用。

许多BTB/ZFP与其他分子形成组蛋白脱乙酰酶大分子抑制复合物抑制目的基因的表达,从而作为转录抑制因子在胚胎发育、细胞分化等过程中发挥重要的作用。目前已知的复合物包括HDAC(histone deacetylase complex), SMRT(silencing mediator of retinoid and thyroid receptor), N-CoR(nuclear corepressor)和Sin3A等。最新的研究发现,BTB/ZFP Kaiso同p120-catenin通过与 β -catenin/TCF类似的途径抑制Wnt的下游基因的表达从而调节Wnt通路,在胚胎颅面的发育中发挥重要的作用^[3]。

对BTB/ZFP的研究,尤其是对脑特异表达的BTB/ZFP的研究将有助于进一步了解颅面发育的分子机制,为此,我们应用消减差异筛选的方法寻找

小鼠胚胎脑特异表达的新基因,获得了一系列脑特异表达的ZFP基因,其中包括多个BTB/ZFP(*Bsg1*^[4]和*Bsg2*^[5]等),此外还有包含KRAB结构域的ZFP *Bsg3*^[6]等。这里我们报道对BTB/ZFP *Bsg6*(brain specific gene 6)的基因克隆和表达谱分析。*Bsg6*基因定位于小鼠第4号染色体,编码含有BTB结构域的 C_2H_2 锌指蛋白,*Bsg6* mRNA在胚胎的表达具有较强的动态性,在E9.5小鼠胚胎的头部高丰度表达,*Bsg6*在鸡胚表达也主要分布在脑部和神经管的前端,*Bsg6*在成体的多个组织没有表达,在破骨细胞瘤细胞系中高表达。这些结果说明,*Bsg6*可能在胚胎发育中的特定时期起到一定的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

健康小鼠购于北京大学医学部实验动物中心,受精鸡卵购于当地种蛋供应厂。E7.5小鼠胚胎(发现阴栓的当天记为E0.5胚胎)cDNA文库购于Clontech公司,消减试剂盒购于Invitrogen公司,Trizol购于北京鼎国生物技术有限责任公司,M_{MLV}逆转录酶购于Invitrogen公司,高保真*Pfu* DNA聚合酶购于宝生物工程大连有限公司,DIG核酸标记及检测试剂盒购于Roche公司。[⁻³²P]及Sephadex G-50购于Amersham公司,随机引物标记试剂盒购于Promega公司。引物均由北京博润公司合成,测序工作由上海生工生物工程技术有限公司完成。pBluescript SK(-)为本实验室保存。其它试剂均为国产分析纯产品。

1.2 消减差异筛选脑特异基因

消减差异筛选按照文献[4]中的方法进行。简述如下,收集E9.5小鼠胚胎的头部,用常规方法制备mRNA,用随机引物进行反转录,反转录的同时掺入³²PdCTP,用Sephadex G-50纯化探针。生物素标记的小鼠E9.5胚胎躯干的mRNA使用Invitrogen的消减试剂盒制备,实验步骤按其说明书进行。将³²P标记的cDNA探针与10倍过量的生物素标记的mRNA进行杂交。生物素化的RNA和RNA-cDNA与链霉亲和素形成的复合物用酚氯仿抽提除去,水相中的

cDNA 探针用乙醇沉淀法纯化,在相同条件下进行第二轮消减杂交.用 E7.5 小鼠胚胎的 cDNA 文库(Clontech)中的 5×10^5 个克隆进行筛选,杂交,洗膜和曝光按照常规的方法进行,所得到的克隆测序.

1.3 用生物信息学方法对 *Bsg6* 基因序列特征进行分析

将所得到的序列在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)用 BLAST(Basic Local Search Tool)方法与已知序列进行对比,以确证所得基因是新基因.用 ORF(open reading frame)finder 预测该基因的编码框.使用人类基因组数据库做 BLAST 分析,找到 *Bsg6* 基因在人类基因组上的定位,对其外显子和内含子进行分析.使用 Vector NTI9.0 软件对进行序列比对.用 NCBI 保守结构域数据库对蛋白的结构域和可能的功能进行预测.

1.4 RT-PCR 克隆 *Bsg6* 的全长编码区序列

根据 *Bsg6* 的 cDNA 序列设计一对引物,在 5 端引物加入 *EcoR* 酶切位点,在 3 端引物加入 *Kpn* 酶切位点.两引物序列为:

正向,5'-GGGAATCTTGGGICTCCACTCATCTT3';

反向,5'-CTGGTACCA GAAGTTACCACTGGCATT3'.

提取 E9.5 小鼠胚胎的总 RNA 为模板,常规 RT-PCR 扩增 *Bsg6* cDNA,克隆至 pBluescript SK⁻ 载体上并进行测序.

1.5 原位杂交

原位杂交参照文献[7]中的方法,以 2.0 kb 的小鼠 *Bsg6* 编码区的 cDNA 为模板,用 DIG 核酸标记试剂盒制备 DIG 标记的 RNA 探针,分别与 E8.5、E9.5、E10.5 小鼠胚胎和 HH10 期的鸡胚进行胚胎的整体原位杂交.

1.6 Northern 杂交

用 TRIzol 按照产品说明书一步法提取成年小鼠各组织的总 RNA,用 DEPC 抑制 RNA 的降解,每一电泳泳道取总 RNA 5 μ g 进行 1% 甲醛变性凝胶电泳,按常规方法转尼龙膜,膜经 80 $^{\circ}$ C 2 h 烘干.用随机引物标记试剂盒(Promega)对 *Bsg6* 的 cDNA 片段进行 [³²P]dCTP 探针标记.膜在 50% 甲酰胺,2 \times SSC,1% SDS,10% 硫酸葡聚糖和 0.1 mg/ml 鲑鱼精 DNA 的预杂交液中进行 42 $^{\circ}$ C 预杂交,标记好的探针经变性处理用于杂交.杂交在无甲酰胺的杂交液中杂交过夜,用 1% SDS,2 \times SSC 溶液在 42 $^{\circ}$ C 洗膜 2 次,再用 1% SDS,0.2 \times SSC 溶液洗膜 2 次,室温晾干后,-70 $^{\circ}$ C 下放射自显影,根据杂交信号的强弱进行 X 光片曝光得 Northern 杂交结果.

2 结果

2.1 消减差异筛选脑特异基因

为了获得小鼠胚胎发育中的脑特异基因,我们利用消减差异筛选的方法筛选 E9.5 小鼠胚胎脑特异基因,克隆到脑特异表达的基因 *Bsg6* (brain specific gene 6). *Bsg6* cDNA 长 3 871 bp (Fig. 1),编码区长 2 013 bp,编码一个 670 个氨基酸残基的蛋白,编码框含有起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA,是一个完整的开放阅读框,在终止密码子后面有多腺苷酸序列信号 (polyA signal) (Fig. 1). 经过与 GenBank 已知序列的比较,证明 *Bsg6* 是尚未被注册的新基因,我们向 GenBank 提交 *Bsg6* 获得登录号 AY635051.

2.2 对 *Bsg6* 序列的生物信息学分析

Bsg6 基因编码一个 670 个氨基酸残基的蛋白,对 *Bsg6* 蛋白结构域的分析显示该蛋白 N 端 25 ~ 119 氨基酸含有一个 BTB 结构域,606 ~ 628 氨基酸和 634 ~ 655 氨基酸为 2 个连续的 C₂H₂ 型锌指结构域 (Fig. 2). 这些结构域提示 *Bsg6* 蛋白可能是一个 BTB 家族的 ZFP.

在人类基因组序列中进行 BLAST 分析,确定 *Bsg6* 基因定位于小鼠染色体 4A5 ~ 4B1,包含 2 个外显子和 1 个内含子 (Fig. 3),跨越大约 20 kb. 起始密码子 ATG,终止密码子 TGA 和多腺苷酸序列信号都位于第 2 号外显子.

用 Vector NTI9.0 软件对小鼠 *Bsg6* 蛋白 (mBsg6) 与人类的同源蛋白 KIAA0354 (hBsg6) 以及鸡的同源蛋白 XP_428814.1 (gBsg6) 的氨基酸序列进行比对,发现小鼠 *Bsg6* 蛋白与人类 KIAA0354 的同源性为 86.2%,与鸡的同源蛋白 XP_428814.1 的同源性为 79.1% (Fig. 4),这提示 *Bsg6* 在脊椎动物中具有较高的保守性.

2.3 *Bsg6* 基因的表达谱分析

很多锌指蛋白都在胚胎发育中发挥重要作用,为了研究 *Bsg6* 的功能,我们用整体原位杂交的方法研究了 *Bsg6* 在小鼠胚胎和鸡胚中的表达.用 *Bsg6* 基因 2.0 kb 编码区的序列为探针进行的整体原位杂交结果显示 *Bsg6* 的表达具有一定的动态性.在 E8.5 的小鼠胚胎中,*Bsg6* 主要在前脑和神经管表达 (Fig. 5A),1 d 以后,*Bsg6* 的表达明显增强并主要集中在前脑的端脑部 (Fig. 5B). *Bsg6* 在 E10.5 小鼠胚胎端脑的表达出现了下降,但是在中脑和后脑的表达增加,在这一时期 *Bsg6* 的表达还出现在胚胎的

```

1   GGCCCTCCGCCGGTCTCAAAGAACCAGCGGAAACGGGCTGAAGGACGGGGAGCGAGGGCCGGGGGGCGGAAGTCACAGCCGGGAAGCCAGTCTGGA
101  CCTTCCCCTCCTTCTCAGGGTCGGTCCGAGCGGAGGAGGGCCACCGCCTCCTCCTCGAGGAGAAAGGGGGCGGAGCCCGGCTCAGGTGAGCGGAC
201  CTATCAGCTAGAGTGGCTTGGCCGCGCGCGCGGGCCGCTACGTCGACGGGTTGTGCACCGGGAGCCCGGAGGACTCCGGGACCGGACCGCC
301  TTCCGGGGCCCGCTGTCCACCCCTGTCTACTGCTGAGGGATTGTTACCTTCGCCTCGGTGGGGCCAGGAGGTTGAGTCTCAGTCTTGTGCGCAGG
401  CGTCCCCTGTGTCCGACCGCCCGCTGTCCGTGCGGGTGGCGAGGACTAGTCCCTGCAGATCTGCTGCTGGACATGGAGCCCTCGGGATGCTGTGG
501  GAACCCGCGCTCGGATCTGCATCCTAGCGGATGAGCCGAGGAGCGGCTGCCCTGCGGGATGGAGGCGAGTGGCTCTCTTGTATCTGCCCCTGGGTCCTC
601  CTGAGCGATGAGGTTTCCTTATCAGACGCAAGCCATAAGCTGTCTGGATTCGGGAGCCAGCGCCGACGACAGCGGTGAGTACGCGTTTGGGAATGC
701  CCCAACTTGTAGACAAAAGTGTATTAGTAGCATTATTGAAATGGCCACTTCTTCCAGGCTTCGTGCGGAGGAGCTGTGGGGTCCGGTGGTAAGAGACAG
801  GGTCCTATCTTCCCCTGGAGGACCGACTGCTTAGCACATAAAACAGTAGAAAATAAGGGAGCGGTTTAAAGGTTTCTGCTTTGTTTTTCTAAAG
901  TGCCACTTACTATGGTCAGTCTGCGTCCGAGCATCGTGGCAACACTGTAGGAACACATTGTTGTTATTTTATTTTGGAGAAAATTTTGGGTCAA
1001 AGACTCTTGTATACCTTAGTAGCGTATCTGAGTCTAGGTAATTAATAAATTAATAAATTCGCAATTTCAAGGACTGAAAGAAAAACATTTCCAAAAT
1101 GTTCTTGTACTGCTGAGTTGAATTTACATACATTTAGGTTTTTAGAGATTGAAGGAACTGTGCCTTACTCGTTCGTGATTTGCTTTGTATGACATG
1201 TGTACTTTATATGGTTTTAAAGAGTGGACCGGGCACTTCCTTAGTTTGTAGAGATTTTGTCTTCAATTTCTGAAAAGTCTCGTGGTGGCAGTAAGCT
1301 AAAGGCTTACTGGTAGGGGAAAGGAGATGGCAAAAGAGAGTGAAGAGAAAAGCTTGAAGTAAAGGAGCCACTTAAACCTTCTGGAATCTC
      M D F P G H F E Q I F Q
1401 AGCGAQTGGGAAGAGAGACAGAGCTGGCCTCTGCTGCAGCCTTGGTAGCCCGCAGGACAATGGATTTCTCGGTCACTTTCAGCAGATCTTITCA
      • Q L N Y Q R L H G Q L C D C V I V V G N R H F K A H R S V L A A C
1501 GCAGCTGAAGTACCAGAGACTTTCATGGCAGCTGTGTGACTGTGTCTTGTAGTGGGAAACAGGCATTTCAAAGCCACCCTCCGTGTCGACGATGC
      S T H F R A L F S V A E G D Q T M N M I Q L D S E V V T A E A F A A
1601 AGTACGCAATTCGGTGGCGAAGGAGATCAGACCATGAACATGATCCAGCTAGATAGTGGTGGTGCACCGGAGGCTTCGCGG
      • L I D M M Y T S T L M L G E S N V M D V L L A A S H L H L N S V V
1701 CCCTGATGACATGATGATACCTCCACCCTATGCTAGGGGAGGCAACCTTATGGATGCTCTTATTGGCAGCCTCTCACTGATCTGAACTCCGTTGT
      • K A C K H Y L I T R T L P M S P S S E R A Q E Q S A R M Q R S F M
1801 TAAGGCATGTAACATTACCTGACGACAAGGACGCTCCCATGCTCCCTCTAGTGAGCGTCTCAGGAGCAGAGTGCCCGCATCCAGCCCTCTTTATG
      L Q Q L G L S I V S S A L S S S Q S A E E P T A P M S S S M R S S L
1901 CTGACGACGCTGGCAGTGTGAGCTCAGCCCTCAGTTCAGCCAGAGTGGCCAGGAGCCGACGCGCCCTATAGCTCATCCATCCGACGACGCC
      • D Q R T P F P M R R L H K R K Q S V E E R A R Q R L R S S M E E S
2001 TGGACCGCGGACCCCTCCCATGAGACGCTTACAAGCGCAACAGTCTGTAGAGGAGCGGGCCCGGAGCGCCCTCGCATCTCCATGGAGGAAT
      • A I S D V T P E S G P A G V H S R E E F F S P D S L K I V D N P K
2101 TGCCATTTGATGTTACTCAGAGAGCGGCTGCGGAGTTCATTCGCGGAGGAATTTCTTACCAGGATCTCTGAAAATTGTGGATAATCTAAA
      P D G M A D N Q E D G A M M F D R P F G A Q E D A Q V P S Q S D G S
2201 CCCGATGGGATGGCTGACAAACAGGAGCGGTGCCATGATGTTTGTATCGCCCTTTGGTGCCCAAGAGATGCTCAAGTCCCGCAGCTCAGATGGCA
      • A G N M A S R A T Q V E T S F E Q E A V A E K G S F Q C E N P E V
2301 GTGCTGGCAACTCGCTCTGTCGAAGTGTGAAACAGTGTGAACAGGCGGTGGCTGAGAAAGGAGTTCAGCTGTGAAAATCTGAGT
      • G L G E K E H M R V V V K S E P L S S P E P Q D E V S D T G T S Q A
2401 TGCCCTCGGGGAGAGGAGCAGTGAAGTGTGAGGCTGAGCCCTGAGCTCCCGAGCGCAGGATGAAGTGAAGCAGCTGACCTCCCAAGCA
      E G S E V E G V V V S A E K I D L S P E S S D R S F S D P Q S
2501 GAGGGCAGTGAAGTGTGGAGGTTGAAAGGAGTGGTGGTCCGAGAGAGATAGACCTCAGCCCTGAAAGCAGTACCGGAGCTTTCCGATCCCCAGT
      • S T D R V G D I H I L E V T N N L E H K T S F S I S N F L N K S R
2601 CCAGCACCGGAGGTCGGGGACATCCACATCTTGAAGTCAAGAAATCTAGAACATAAGACCTTTTGGTATTTTCCAAATTTTCCATCTTCCCAAGAGCAG
      • G S N F S A S Q S T D D N L P N T T S D C R L E G E A P Y L L S P
2701 GGGAGTAATTTAGTCAAGTCAAGGACTGACGACCTCCCAACACCAGTGAAGTGTAGGCTCGAGGGCGAGGCCCTTATCTGTGAGTCCA
      E A G P A G S P A G S P A G S H A V E N P F S E P A D S H F V R P M Q E
2801 GAGGCTGGCCAGCAGGTGGCCCTTCTCTGCCCTGGTCCCATGTAGAGAACCCGTTGAGTGGCTGAGCTCCCACTTCGTCAGACCTATGCAGG
      • V M G L P C V Q T S G Y Q G E Q F G M D F S R S G L G L H S S F S
2901 AGGTGATGGGCTGCCCTGTGTGACAGCTCAGGCTACCAAGGAGAAATTCGGGATGGATTTTCCAGGCTCGGCTGGGTCTCCACTCATCTCTC
      • R A M M G S P R G G A S N F P Y Y R R I A P K M P V V T S V R S S
3001 CAGGGCCATGATGGGTTCCCCACGAGGAGGGCCAGTAACCTTCCATATTACCGACGAATAGCTCCAAAAATGCCAGTGGTAAGTCTGTGAGGAGCTCG
      Q I S E N S A S S Q L M M N G A T S F E N G H T S Q P G P P Q L T R
3101 CAGATCTGAAAATTCAGCAGTCCCGAGTATGATGAACGGGGCCACTCATTTGAAAATGGCCACACCTCCAGCCCTGGCCCTCTCAGTGTAGCA
      • A S A D V L S K C K K A L S E H N V L V V E G A R K Y A C K I C C
3201 GGGCATCTGCTGATGCTTGTCAAAGTCAAGAGGCTTATCCGAGCACAATGCTTGGTGTGGAGGAGCTCGAAAAGTATGCCCTGCAAAAATCTGCTG
      • K T F L T L T D C K K H I R V H T G E K P Y A C L K C G K R F S Q
3301 TAAAACCTTCTGACTGACCGATGCAAGAACACATCCGGTCCACAGGAGAAAAGCCGTACCGCTGCCTCAAGTGTGGCAACCGTTACGTCAG
      S S H L Y K S K T I T C L R W Q S S N L P S T L L *
3401 TCCAGCCACTATATAAACACTCGAAAACGACTGCCTCGCTGGCAGCAGCAGCACTCCCGCAGCACCCTGCTGATCGCTTCTCGCCACAGCGCACA
3501 GGCCAGTCTGCACTGAACTAAAACCGCTGTAGGACGCGAGCTCTTCTGACTGACTCGTCTCACTGTCCAGTGGCTCATGATTTCAACCGCAAGAT
3601 AAGCAGAGAACTGTTAGGTGTAGCACTTACCCTGCATTTCTTAGGGTGGAGAAATGCAGTCCATAAGTAGGTTGATCTTGTGTAAGAATATAAAT
3701 TAAAAATGAAAGTCAAGAAAACATTTAACACTATTTAAAGCTCTGTGAAGCATTAAATTAAGTCTCTGTATCTGTGATGGGAGTATCCATCCCT
3801 GTACAGCAATCGAACAATACTGTGTGAACCGGTGACTTGGTGTATCTGAAAAAATAAAAAAAAAA

```

Fig. 1 cDNA sequence of the mouse Bsg6 gene

Coding sequences are shown together with the translated amino acid sequence. Conserved domains are boxed. Initiative code (ATG), stop code (TAG) and polyadenylation signal sequences (AATTAAA) are underlined

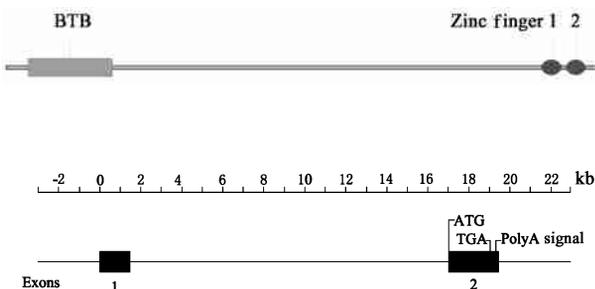


Fig. 2 The conserved domains of mouse Bsg6 protein

The first box represents BTB motif (position: 25 ~ 119). The two consecutive ellipses represent C₂H₂ zinc finger domains (Position: 606 ~ 628, 634 ~ 655)

Fig. 3 Genomic organization of mouse Bsg6 gene

Schematic diagram of the mouse Bsg6 gene with flanking regions. The Bsg6 gene is composed of 2 exons and 1 intron distributed over approximately 20 kb. Solid bars represent exons. The locations of initiative code (ATG), stop code (TAG) and polyadenylation signal sequences (PolyA Signal) are indicated



Fig. 4 Amino acid sequence alignment of human, mouse and chicken *Bsg6* protein

The identity of mouse *Bsg6* (*Mus musculus Bsg6*, mBsg6) to human KIAA035 (*Homo sapiens Bsg6*, hBsg6) and chick XP_428814.1 (*Callus gallus Bsg6*, gBsg6) were 86.2% and 79.1%, respectively



Fig. 5 Expression pattern of *Bsg6* in mouse and chicken embryos by whole mount in situ hybridization

Bsg6 was expressed in the forebrain (shown by arrow) and neural tube of E8.5 mouse embryo (A). By E9.5, *Bsg6* was expressed predominantly in the forebrain (shown by arrow) (B), while by E10.5 (C), *Bsg6* becomes abundant in forebrain, midbrain, hindbrain, limbs and tail (shown by arrows). *Bsg6* was also expressed in anterior of the neural tube (shown by arrow) in HH10 stage chicken embryo (D)

肢芽和尾部 (Fig. 5C). 由于 *Bsg6* 基因具有较高的保守性, 我们用原位杂交方法检测了 *Bsg6* 在 HH10 期的鸡胚中的表达, 结果发现 *Bsg6* 主要在该时期鸡胚头部和神经管前端表达 (Fig. 5D).

为了研究 *Bsg6* 在成体组织中的功能, 我们用



Fig. 6 Mouse *Bsg6* mRNA expression analysis by Northern blot in adult mouse tissues and cell lines

1: Cell Line ROB30; 2: HOC (osteoclastoma cell); 3: skeleton muscle; 4: thymus; 5: ovary; 6: kidney; 7: spleen; 8: liver; 9: lung; 10: heart; 11: testis; 12: brain

3 讨论

脑是生物体中最复杂的器官, 与其他器官相比脑具有独特的基因表达谱, 脑特有的基因占有很大的比例. 对脑特异基因的研究将有助于我们揭示脑发育的过程和机理、神经系统的构建、脑的功能以及脑部疾病发生的分子机制, 以期找到治疗脑发育缺陷和脑部疾病的分子靶点. 本文利用消减差异筛选的方法克隆到在小鼠脑中特异表达的新基因 *Bsg6*.

消减差异筛选法是一种简便的系统研究基因表达谱差异的有效方法, 此方法结果可靠、假阳性率低、重复性好. 我们用这种方法曾经成功地克隆了若干脑特异基因, 包括 *Bsg1*^[4], *Bsg2*^[5] 和 *Bsg3*^[6] 等, 通过对这些基因的表达谱分析, 显示它们在 E9.5 小鼠胚胎头部表达丰度都明显高于在躯干的表达丰度, 在本研究中发现 *Bsg6* 在 E9.5 小鼠胚胎头部的表达丰度也是明显高于躯干的表达丰度 (Fig. 5B). 这些结果显示, 消减差异筛选法可以成功地筛选 E9.5 小鼠胚胎头部特异表达基因.

Bsg6 基因定位于小鼠染色体 4A5 ~ 4B1, 包含 2 个外显子和 1 个内含子 (Fig. 3), 跨越大约 20 kb. *Bsg6* 基因 cDNA 全长 3 871 bp, 编码区长 2 013 bp, 编码一个 670 个氨基酸残基的蛋白, 该蛋白编码一个含有 BTB 结构域的 C₂H₂ 型锌指蛋白. BTB 结构域主要存在于锌指蛋白的 N 末端, 以及存在于含有 Kelch 基序的蛋白中, 如 Klech 和痘病毒蛋白家族. BTB/POZ 结构域可以调节 BTB/POZ 蛋白的自我联合^[2], 参与同源二聚体和一些异源二聚体的形成, 以及蛋白质与蛋白质的相互作用. 一些锌指蛋白中的 POZ 结构域还调节转录的抑制, 抑制 DNA 结合结构域与 DNA 序列的结合^[3]. C₂H₂ 型锌指结构域是一

Northern 杂交分析了 *Bsg6* 在成体小鼠多个器官中的表达. 结果显示, *Bsg6* 在成体小鼠的骨骼肌、胸腺、卵巢、肾脏、脾脏、肝脏、肺、心、睾丸和脑中都没有表达, 而在破骨细胞肿瘤细胞系 (HOC) 中出现表达 (Fig. 6 第 2 泳道).

类结合核酸的重要结构域. 锌指蛋白在基因的表达调控, 细胞分化, 胚胎发育等生命过程中发挥重要作用, 其中某些锌指蛋白还可能与特定的疾病的发生有关. *Bsg6* 蛋白的这些重要结构域提示 *Bsg6* 可能是一个重要的转录因子, 参与基因的表达调控和胚胎发育等重要过程.

对 *Bsg6* 的表达谱分析显示, *Bsg6* 在小鼠胚胎中的表达具有一定动态性, *Bsg6* 在小鼠胚胎的表达在 2 d 的时间里经历了表达量和表达部位的显著变化. 在 E8.5 的小鼠胚胎中, *Bsg6* 主要在前脑和神经管表达 (Fig. 5A), 在 E9.5 的小鼠胚胎中, *Bsg6* 主要在前脑中表达 (Fig. 5B). *Bsg6* 在 E10.5 小鼠胚胎端脑的表达出现了下降, 但是在中脑和后脑的表达明显增加, 此外表达还出现在肢芽和尾部 (Fig. 5C). *Bsg6* 在人类, 小鼠和鸡中存在高度保守的同源基因 (Fig. 4), 在 HH10 期的鸡胚中, *Bsg6* 主要在头部和神经管前端表达 (Fig. 5D). HH10 期的鸡胚处于组织发生期, 相当于 E9.5 小鼠胚胎的发育阶段, *Bsg6* 在 HH10 期的鸡胚中的表达与其在 E9.5 小鼠胚胎中的表达非常相似, 这更说明 *Bsg6* 在胚胎中枢神经系统的发育中发挥重要的作用. 与发育中的胚胎不同的是, *Bsg6* 在被研究的多个成体组织中都没有表达, 这说明 *Bsg6* 的功能可能仅限在一定的时期和一定的组织. 有趣的是, *Bsg6* 在破骨细胞肿瘤细胞系中呈现了高的表达, 这说明 *Bsg6* 可能在肿瘤的发生中发挥一定的作用. 这些结果提示, *Bsg6* 可能是在器官形成对脑的发育起到重要作用的转录因子, *Bsg6* 仅在特定的时期在特定的部位发挥作用, 其表达受到严格的调控. *Bsg6* 的克隆和表达谱分析对进一步研究其在胚胎发育中的功能奠定了基础.

参考文献 (References)

- Lander E S, Linton L M, Birren B, Nusbaum C, Zody M C, Baldwin J, Devon K, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, **409**(6822):860~921
- Bardwell V J, Treisman R. The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev*, 1994, **8**(14):1664~1677
- Park J I, Kim S W, Lyons J P, Ji H, Nguyen T T, Cho K, Barton M C, et al. Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets. *Dev Cell*, 2005, **8**(6):843~854
- 吴婷,张晶,慈宏亮,陈微,翟永功,桑建利,左明雪,李亦平. 一个在小鼠头部特异表达的新基因 BSG1 cDNA 的克隆及研究. 解剖学报 (Wu Ting, Zhang Jing, Ci Hong-Liang, Chen Wei, Zhai Yong-Gong, Sang Jian-Li, Zuo Ming-Xue, Li Yi-Ping. Cloning and characterization of a novel mouse gene BSG1 cDNA specifically expressed in brain. *Acta Anat Sin*), 2004, **35**(2):157~160
- 杨玮,岳凌生,姚艺桑,邹星,慈宏亮,陈微,李亦平. 包含 BTB 锌指结构的新基因 Bsg2 结构特性及其在发育阶段的组织表达特异性. 中国生物化学与分子生物学报 (Yang Wei, Yue Ling-Sheng, Yao Yi-Sang, Zou Xing, Ci Hong-Liang, Chen Wei, Li Yi-Ping. Structural characteristic and special expression pattern during development of a novel gene Bsg2 containing BTB and zinc finger domain. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2004, **20**(6):725~731
- 姚艺桑,付佳琪,陈微,杨玮,邹星,李宁,李亦平. 小鼠胚胎脑特异表达的新基因 bsg3 的克隆及初步研究. 北京师范大学学报(自然科学版) (Yao Yi-Sang, Fu Jia-Qi, Chen Wei, Yang Wei, Zou Xing, Li Ning, Li Yi-Ping. Cloning and characterization of a novel mouse gene Bsg3 cDNA specifically expressed in brain. *J Beijing Norm Univ (Natural Science)*, 2004, **40**(3):397~403
- Stern C D, Holland P W H. *Essential Developmental Biology: A Practical Approach*, Oxford: Oxford University Press. 1993

中国生物化学与分子生物学会 2006 年继续教育、技术培训计划表

序号	技术培训项目	主要内容	时间	规模 (人)	地点	联系人	电话
1	第十三届全国分子生物学实验技术理论与操作培训班	基因克隆,基因重组,基因表达,基因转化及转基因检测,分子标记,生物信息等	7~8月	80	北京	许雷	010-68919695
2	分子生物技术培训班	分子生物技术培训	8月上旬	40	北京	魏群 孙秀英	010-58807365 010-58808197
3	海洋生物技术高级就业班	海洋生物工程技术及海洋天然产物的分离纯化与鉴别技术等	10月	60	上海	缪辉南	021-25070306— 8021,8012,8002
4	生物芯片技术在恶性肿瘤的实验室诊断与预防中的应用训练班	突变与肿瘤;肿瘤标志物的研究进展;氧化应激操作与基因突变;抗突变与肿瘤预防;肿瘤标志物在临床诊断中为应用;生物芯片技术在药物筛选中的应用;蛋白芯片的研究进展;全自动蛋白芯片检测分析仪简介	10月	40	北京	王玲 汪德清	010-66939433
5	生物质谱技术的临床应用训练班	质谱技术在蛋白质组学及临床中的应用;质谱技术在检测微量元素中的尖用;新的串联质谱方法在胰岛素信号传导系统中翻译后修饰作用的应用;质谱技术在代谢研究中的应用;质谱技术在神经退行性疾病中的研究应用;质谱技术在精神紊乱方面的应用;质谱技术演示	12月	50	北京	王玲 汪德清	010-66939433
6	分子生物学技术学习班	分子生物学技术学习	5月	30	北京	朱滨	010-82802454
7	医学分子生物学研修班	医学分子生物学研修	8月底	40	北京	朱滨	010-82802454