

# 一个在小鼠头部特异表达的新基因 BSG1 cDNA 的克隆及研究

吴婷<sup>1,4</sup> 张晶<sup>1,2</sup> 慈宏亮<sup>1,2</sup> 陈微<sup>3</sup> 翟永功<sup>1</sup> 桑建利<sup>4</sup>  
左明雪<sup>1</sup> 李亦平<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 北京师范大学生物医学研究所, 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 Forsyth 研究所; 4. 北京师范大学细胞生物学研究所, 北京 100875)

**[摘要]** 目的 克隆小鼠头部发育过程中特异表达的新基因并对新基因可能的功能进行初步分析。方法 采用消减差异筛选的方法筛选小鼠头部特异表达的新基因,并用生物信息学的方法对克隆到的新基因进行序列分析和蛋白结构域的预测。同时,还采用了小鼠胚胎原位杂交、小鼠脑部切片的原位杂交以及鸡胚的原位杂交方法研究 BSG1 基因的表达情况。结果 克隆到 1 个与小鼠头部发育相关的新基因 BSG1(brain specific gene 1),其 Gen Bank 的登录号为 AY210402。该基因包含 1 个 2133 bp 的完整阅读编码框,编码 1 个 710 aa 的 C2H2 型锌指蛋白。它与人的 KIAA0441 基因在氨基酸水平上有 82.8% 的同源性。该基因定位在小鼠的第 10 号染色体上,含 7 个外显子,6 个内含子。BSG1 主要在小鼠胚胎、鸡胚的头部表达,并且 BSG1 在小鼠头部表达的部位局限在海马、齿状回和小脑。结论 BSG1 是 1 个可能的转录因子,在脑部特异表达。对其研究有助于进一步揭示大脑发育的分子机理。

**[关键词]** BSG1 基因; 生物信息学; 锌指结构域; 海马; 齿状回; 小脑; 小鼠

**[中图分类号]** Q786 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0529-1356(2004)02-157

## CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL MOUSE GENE BSG1 cDNA SPECIFICALLY EXPRESSED IN BRAIN

WU Ting<sup>1,4</sup>, ZHANG Jing<sup>1,2</sup>, CI Hong-liang<sup>1,2</sup>, CHEN Wei<sup>3</sup>, ZHAI Yong-gong<sup>1</sup>, SANG Jian-li<sup>4</sup>, ZUO Ming-xue<sup>1</sup>, LI Yi-ping<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Biomedical Research Institute, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

2. Zhejiang Cell Biomedical Research College, Hangzhou 310006, China; 3. Forsyth Institute, Harvard University, USA;

4. Institute of Cell Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

**[Abstract]** **Objective** Cloning and characterizing mouse novel genes specifically expressed in brain during the development. **Methods** Cloning mouse novel genes by subtractive-different screening and characterizing novel gene by bioinformatics methods. At the same time, analyzing the expression pattern of novel gene by whole mount *in situ* hybridization of mouse embryos and chicken embryos and section hybridization of mouse brain. **Results** A novel gene BSG1(brain specific gene1) related to development of brain has been cloned and its GenBank accession number is AY210404. It is 2828 bp long and has a 2133 bp-long complete reading frame which encodes a C2H2 type zinc finger protein of 710 amino acid residues. It is 82.8% identical to human KIAA0441 gene at the amino acid level. The gene is on mouse chromosome 10 and comprises 7 exons and 6 introns. BSG1 is specifically expressed in mouse brain and chicken brain. In addition, the expression in mouse brain is specifically restricted to hippocampus, dentate gyrus and cerebellum. **Conclusion** BSG1 is a putative transcription factor and specifically expressed in brain. Study of BSG1 will contribute to reveal the molecular mechanism of the development of brain.

**[Key words]** BSG1 gene; Bioinformatics; Zinc finger domain; Hippocampus; Dentate gyrus; Cerebellum; Mouse

研究脑部表达的特异基因将为我们了解脑的早期发育、神经系统的构建奠定基础,为防治脑发育异

常引起的疾病提供依据。神经系统是人体中最复杂、最精细、功能最奇妙的系统。脑组织是基因表达最丰富的组织,现已发现,许多脑疾患与基因的异常表达有关。同时,随着越来越多的国家进入老龄化社会,脑的分化、发育和生理功能已成为目前研究的热点。因此,在理论和实践上,分离脑表达的基因具有重要意义。我们应用消减差异筛选的方法寻找小鼠脑中特异表达的新基因,并对所克隆到的新基因 BSG1(brain specific gene 1)的序列特征进行生物信息

**[收稿日期]** 2002-12-27 **[修回日期]** 2003-05-13

**[基金项目]** 北京师范大学生物医学研究所科研启动经费资助项目

**[作者简介]** 吴婷(1978—),女(汉族),福建省厦门市人,在读硕士。

\* 通讯作者 (To whom correspondence should be addressed)

E-mail: YPLi@forsyth.org Tel: (010)62209071

学的分析,分析表明,BSG1与人的KIAA0441<sup>[1]</sup>基因在氨基酸水平上有82.8%的同源性。用胚胎和切片的原位杂交对该基因的表达情况进行研究。综合这些研究,我们对BSG1的可能功能进行了初步的预测。

## 材料和方法

### 1. 消减差异筛选脑特异基因

收集9.5 d小鼠胚胎的头部,用常规方法制备mRNA;取5 μg mRNA为模板,用随机引物进行反转录,反转录的同时掺入<sup>32</sup>PdCTP,反应条件为42℃,1 h;反应产物用0.1 mol/L NaOH重悬,65℃孵育20 min,使RNA模板水解;用0.1 mol/L醋酸中和探针,并用Sephadex G-50纯化探针。生物素标记的小鼠9.5 d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<sup>32</sup>P标记的cDNA探针与10倍过量的生物素标记的mRNA进行杂交。离心沉淀探针混合物并用20 μl水重悬,100℃加热变性1 min。加入等体积2倍工作浓度杂交缓冲液(Invitrogen),65℃杂交20~24 h。加入等体积HEPES缓冲液(10 mmol/L HEPES, pH 7.5, 1 mmol/L EDTA),20 μg链霉亲和素,冰上孵育10 min。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2轮消减杂交。

用7.5 d小鼠胚胎的cDNA文库(Clontech)中的5 × 10<sup>5</sup>个克隆进行筛选。每145 mm的平板上约1 × 10<sup>4</sup>个克隆,每板制两张膜用于与第2轮消减杂交得到的cDNA探针杂交。杂交、洗膜和曝光按照常规的方法进行<sup>[2]</sup>。为纯化克隆,还要在低浓度的条件下进行第2轮杂交。所得到的克隆用ABI377测序仪测序。

### 2. 用生物信息学方法对BSG1基因序列特征进行分析

将所得序列在NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)数据库中用BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)方法与已知序列进行比对。用ORF(Open Reading Frame)finder预测该基因的编码框。使用Mouse Genome数据库做BLAST分析,找到BSG1基因在小鼠基因组上的定位及分布,对其外显子和内含子进行分析。使用DNASTAR软件对小鼠的BSG1基因与人的KIAA0441基因的氨基酸序列进行同源性比较。用NCBI数据库对蛋白的结构域和可能的功能进行预测。

### 3. RT-PCR克隆BSG1的全长编码区序列

根据BSG1的cDNA序列用软件设计1对引物,

在5'端引物加入EcoR I酶切位点,在3'端引物加入Kpn I酶切位点。两引物序列为:

P1(sense), 5' GCGAATTCAGAAAATGGCAGACA-CAACCC3'

P2(antisense), 5' ATGGTACCAGCCCACGATAAA-GAATGGCTG3'。

提取小鼠胚胎的总RNA为模板,经M-MLV逆转录酶(Invitrogen)合成cDNA第1条链。使用高保真的DNA聚合酶(宝生物工程大连有限公司)扩增BSG1 cDNA序列。用QIAquick gel extraction kit(QIAGEN)试剂盒纯化回收。将PCR产物克隆至pBlue-script SK(-)载体上。

### 4. 小鼠胚胎的剥取

根据所需天数使小鼠进行交配并计算怀孕天数,断颈处死孕鼠,腹部乙醇(75%)消毒,剪开表皮、腹膜,拉出子宫,将子宫由基部剪下,放入PBS中清洗。将洗净的子宫转移到培养基中[1640培养基或DMEM培养基加抗生素(庆大霉素或双抗)]。将呈串珠状的子宫剪断,每取1个串珠放在实体镜下(含有培养基的平皿中),将子宫壁肌肉撕开露出里面的绒球,将其与子宫分离,用尖头镊子插到绒球当中,小心将其分开,转入干净的培养基中。将剥离的胚胎按收集天数集中,最后转入预冷的固定液中。

### 5. 鸡胚胎的剥取

选取所需发育时期的种蛋,75%酒精消毒蛋壳,用单面刀片沿鸡蛋中轴轻轻地将蛋壳锯出1小浅沟,用无齿尖镊40度角插入蛋壳与壳膜之间,向下轻压壳膜使之与蛋壳分离后向上挑开蛋壳。再用尖镊在鸡蛋大头侧钻1小孔,使鸡蛋大头气室中的气体溢出,由于液压作用,卵黄下沉,与壳膜之间出现一定的空间,利于操作而不损伤鸡胚。挑开壳膜,扩大裂口至2 cm左右,用眼科小尖剪在鸡胚透明区外3~5 mm处环形剪开卵黄膜,将鸡胚移出,转入预冷的固定液中。

### 6. 原位杂交

原位杂交参照文献[2]中的方法,以2.1 kb的小鼠BSG1编码区的cDNA为模板,用DIG nucleic acid labeling kit(Roche)制备DIG标记的RNA探针,分别与9.5 d的小鼠胚胎和第X期的鸡胚进行整体胚胎的原位杂交,并与小鼠脑石蜡切片进行原位杂交。

## 结 果

### 1. BSG1基因的克隆和序列特征分析

利用消减差异筛选的方法对7.5 d小鼠胚胎的cDNA文库进行筛选,克隆到脑特异表达的基因BSG1的cDNA序列,长2828 bp。生物信息学的方法证实该基因为1个新基因。我们向NCBI提交了该

序列,其 GenBank 登录号为 AY210402。

用 ORF finder 对 BSG1 基因的编码框进行预测,得到 1 个 2133 bp 长的编码区序列,位于 BSG1cDNA 的 179-2311 核苷酸位置。含有起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA,是 1 个完整的编码框,并且在终止密码子后面找到了 Poly A 的信号 AATAAA(图 1)。在 Mouse Genome 数据库中做 BLAST 分析,结果 BSG1 定位在小鼠的第 10 号染色体上,包含 7 个外显子,6 个内含子(图 1)。

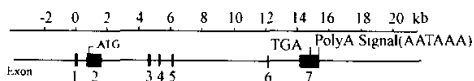


图 1 BSG1 基因在染色体上的分布。小鼠 BSG1 基因的 7 个外显子和 6 个内含子分布在染色体上 15 kb 的范围。实体方块部分代表外显子,用数字标出。起始密码子 ATG,终止密码子 TGA 和多聚腺苷酸信号也在图中注明

Fig.1 Genomic organization of BSG1 gene. The mouse BSG1 gene is composed of 7 exons and 6 introns distributed over approximately 15 kb. Solid bars represent exons. The locations of initiative code ATG, stop code TGA and polyadenylation signal (PolyA Signal) are indicated.

小鼠 BSG1 基因和人 KIAA0441 基因的氨基酸序列的同源性比较结果显示两者的同源性达 82.8%。

对 BSG1 基因结构域的分析显示该基因 N 末端从第 27 ~ 133 氨基酸含有 1 个 BTB (BR-C, ttk and bab) 结构域,159 ~ 171 氨基酸为 1 个 AT\_hook 结构域。C 末端含有 8 个相连的 C2H2 型锌指结构域,每个锌指结构域均含有 23 个氨基酸,它们所在的氨基酸位置分别为,293 ~ 315,321 ~ 343,349 ~ 371,377 ~ 399,405 ~ 427,433 ~ 455,461 ~ 483,489 ~ 511(图 2)。这些结构域提示 BSG1 基因可能是 1 个转录因子。

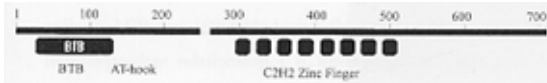


图 2 BSG1 基因的预测结构域。第 1 个是 BTB 结构域。第 2 个是 AT\_hook 结构域。最后 8 个连续的是 C2H2 型锌指结构域。

Fig.2 The predicted domains of BSG1 gene. The first one represents BTB domain. The second one represents AT\_hook domain. The last consecutive eight bars represent eight C2H2 type zinc finger domains.

## 2. 原位杂交

以 DIG 标记的 BSG1 基因探针针对 9.5 d 的小鼠胚胎进行整体原位杂交,小鼠头部呈阳性反应(图 3),同时对第 X 期的鸡胚进行胚胎整体的原位杂交,其头部也呈阳性反应(图 4)。结果表明,BSG1 基因在头部组织中特异表达。进一步对小鼠脑石蜡切片进行的原位杂交结果显示,BSG1 在脑中的表达主要局限在小脑皮层、海马和齿状回的部位(图 5)。

这说明利用消减差异筛选法所得到的 BSG1 基因属于头部特异表达的基因。

## 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,但是由于这些基因的表达量都很低,用常规方法研究比较困难,所以人们对脑中特异表达的基因知之甚少。我们用消减差异筛选的方法寻找小鼠脑中的特异基因。克隆到了 1 个在小鼠脑中海马、齿状回和小脑部位特异表达的新基因 BSG1。

生物信息学的发展以及大量数据库的出现,为我们对新基因的研究提供了强有力的工具。通过分析我们发现,该基因定位在小鼠的第 10 号染色体上,含有 1 个 2133bp 的阅读框,编码 1 个含有 710 个氨基酸的锌指蛋白。起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA,并且在终止密码子后面,有 Poly A 的信号 AATAAA,因此可以认为我们所克隆到的 BSG1 的 cDNA 包含了 1 个完整的阅读编码框。生物信息学的方法预测它含有 1 个 BTB 结构域,1 个 AT\_hook 结构域和 8 个连续的 C2H2 型锌指结构域。蛋白 N 末端的 BTB 结构域是一个进化上保守的蛋白-蛋白相互作用的结构域,它存在于许多与发育调节相关的转录因子中<sup>[3]</sup>。BTB 结构域参与同源二聚体和一些异源二聚体的形成<sup>[4]</sup>。最近发现的 BTB 锌指蛋白 ZNF131 与神经系统的发育相关<sup>[5]</sup>。AT\_hook 结构域富含 A/T 序列,是一个与 DNA 结合的基元。C2H2 型锌指结构域是一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发生有关。有许多 C2H2 型锌指蛋白,例如 Zic<sup>[6]</sup>、Krox20<sup>[7]</sup>、Krox24<sup>[8]</sup> 和 Znf131<sup>[5]</sup> 均被发现与中枢神经系统的发育有密切关系。BSG1 基因上的这些重要的结构域提示 BSG1 可能是 1 个重要的转录因子,参与了基因的表达调控和胚胎发育等重要过程。同源性分析显示,BSG1 与人的 KIAA0441 基因在氨基酸上有 82.8% 的同源性。KIAA0441 是在人头部特异表达,与脑发育相关的基因。这提示 BSG1 很可能是一个进化上保守的与头部发育相关的基因。

胚胎的原位杂交和切片的原位杂交结果显示,BSG1 基因在胚胎发育中主要在头部表达,这也进一步说明 BSG1 基因可能与头部的发育有关。此外,小鼠脑切片的原位杂交结果显示,BSG1 基因在海马、齿状回、小脑结构中有强烈表达。海马是学习和记忆的重要物质基础,与情绪活动及内脏反应也有密切关系,并且是免疫调节的高级中枢之一,与许多

疾病有密切关系。BSG1 基因在海马结构中的强烈表达进一步提示, BSG1 与海马的发育和功能密切相关。对 BSG1 基因的研究将有助于我们进一步揭示脑和神经系统的发育, 以及相关疾病的分子机制。

参 考 文 献

[ 1 ] Ishikawa K, Nagase T, Nakajima D, et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VII 78 new cDNA clones from brain which code for large proteins *in vitro* [ J ]. DNA Res, 1997, 4 ( 5 ): 307-313.

[ 2 ] Wilkinson DG. *In situ* hybridization. In: Stern CD, Holl PWH, eds. *Essential Development Biology: A Practical Approach* [ M ]. Oxford, UK: IRL Press, 1993: 257-274.

[ 3 ] Albagli O, Dhordain P, Deweindt C, et al. The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins [ J ]. Cell Growth Differ, 1995, 6 ( 9 ): 1193-1198.

[ 4 ] Collins T, Stone JR, Williams AJ. All in the family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN domains [ J ]. Mol Cell Biol, 2001, 21 ( 11 ): 3609-3615.

[ 5 ] Trappe R, Buddenberg P, Uedelhoven J, et al. The murine BTB/POZ zinc finger gene Znf131: predominant expression in the developing central nervous system, in adult brain, testis, and thymus [ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 296 ( 2 ): 319-327.

[ 6 ] Nagai T, Aruga J, Takada S, et al. The expression of the mouse Zic1, Zic2, and Zic3 gene suggests an essential role for Zic genes in body pattern formation [ J ]. Dev Biol, 1997, 182 ( 2 ): 299-313.

[ 7 ] Chavrier P, Vesque C, Galliot B, et al. The segment-specific gene Krox-20 encodes a transcription factor with binding sites in the promoter region of the Hox-1.4 gene [ J ]. EMBO J, 1990, 9 ( 4 ): 1209-1218.

[ 8 ] Christy BA, Lau LF, Nathans D. A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences [ J ]. Proc Natl Acad Sci, 1988, 85 ( 21 ): 7857-7861.

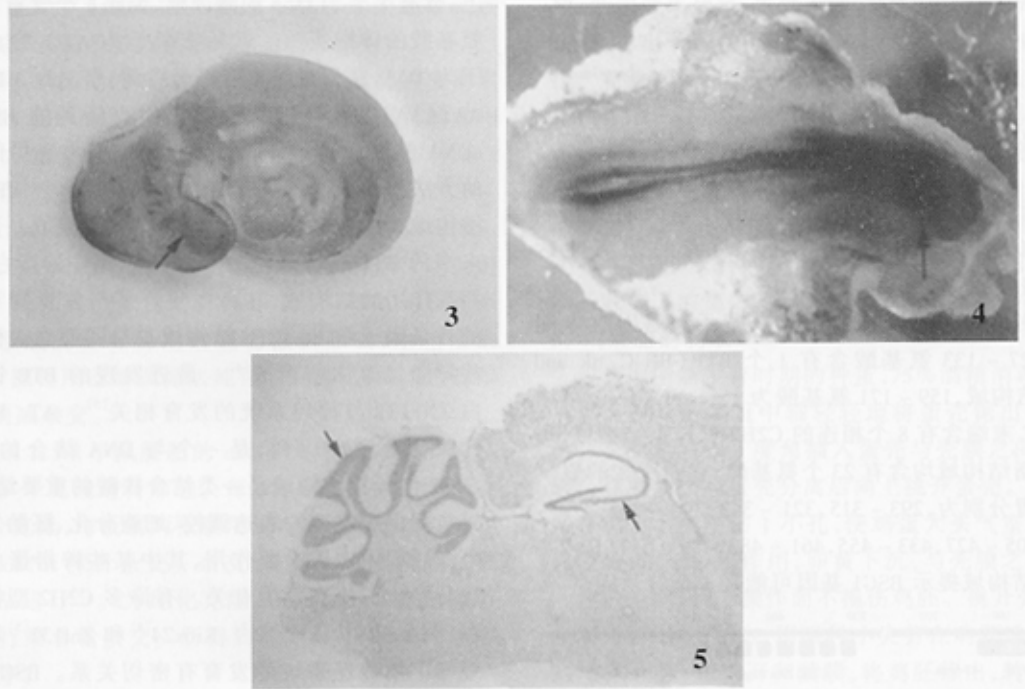


图 3 小鼠胚胎 9.5 d 的原位杂交, BSG1 基因在小鼠胚胎的头部(↑)特异表达。

图 4 第 X 期鸡胚胎的原位杂交, BSG1 基因在鸡胚头部特异表达(↑)。

图 5 小鼠头部切片的原位杂交, BSG1 基因在小脑、海马、齿状回中表达(↑)。

Fig.3 Whole-mount *in situ* hybridization of E9.5 mouse embryo. BSG1 gene is expressed specifically in mouse embryo head (arrow).

Fig.4 Whole-mount *in situ* hybridization of chicken embryo at stage X. BSG1 gene is expressed specifically in chicken embryo head (arrow).

Fig.5 Section *in situ* hybridization of mouse brain. BSG1 gene is expressed in mouse cerebellum, hippocampus and dentate gyrus (arrows).

(编辑 安晓意)