论文

中国知名大学及研究院所专栏 复旦大学生命科学学院专辑

配子母细胞特异因子 *gtsf1* 基因在斑马鱼生殖细胞发育中的功能初探

刘菲, 周安莉, 吴乔枫, 胡雨, 姚纪花*

复旦大学生命科学学院, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200438

* 联系人, E-mail: yaojh@fudan.edu.cn

收稿日期: 2016-01-19; 接受日期: 2016-02-11

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2012CB944603, 2011CB943804)资助

摘要 配子母细胞特异因子 1(Gtsf1)属 UPF0224 蛋白家族, 含一个保守的 CHHC 锌指结构域, 对生殖细胞的发育至关重要。小鼠(*Mus musculus*)和果蝇(*Drosophila melanogaster*)中 Gtsf1 的缺失分别导致雄性和雌性不育, 高不育风险(HIR)隐睾症患者的睾丸中 *GTSF1* 的 mRNA 和蛋白表达均显著下调, 但 *gtsf1* 在精子发生中的功能机制尚不完全清楚。利用类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)技术, 首次在斑马鱼(*Danio rerio*)中成功制备了 *gtsf1* 突变体。观察发现, 突变体的生长、表型正常, 但 *gtsf1* 纯合突变体(*gtsf1*^{-/-})成鱼全为雄性。进一步的组织学观察表明, *gtsf1*^{-/-}成鱼精巢中初级精母细胞数量基本正常, 次级精母细胞显著减少, 精细管管腔中精子极少或缺失。提示 *gtsf1* 在脊椎动物的精子发生过程中有保守的作用。本研究为阐明 *gtsf1* 在精子发育中的作用机制奠定了基础。

关键词 斑马鱼, *gtsf1*, TALEN, 生殖细胞, 雄性不育

生殖是生命的基本特征之一, 是生物体实现遗传信息传递、种族繁衍和进化必不可少的过程。脊椎动物大都进行有性生殖, 即通过两性生殖细胞精子和卵子的受精实现, 而生殖细胞的发育涉及许多基因和信号通路。配子母细胞特异因子 1(gametocyte-specific factor 1, Gtsf1)属于 UPF0224(unknown protein family 0224)蛋白家族, 此蛋白家族在进化上高度保守^[1], 近年的研究表明, Gtsf1 与动物生殖细胞的发育密切相关, 在 *DmGTSF1*^{-/-}突变体果蝇(*Drosophila melan-*

ogaster)的发育中, 雌性的卵巢滤泡层(ovary follicle layers)和卵母细胞消失, 而雄果蝇正常可育^[2]; 小鼠(*Mus musculus*)中, *Gtsf1*^{-/-}雌鼠正常可育^[1], 而 *Gtsf1*^{-/-}雄性小鼠在出生后的第 14 天出现生殖细胞大量凋亡, 究其原因是初级精母细胞在减数第一次分裂前期的偶线期前停止分裂, 最终导致雄性不育。近期, 在人的高不育风险(high infertility risk group, HIR)隐睾症患者睾丸中, 发现 *GTSF1* 的 mRNA 和蛋白表达均显著下调^[3]。因此, Gtsf1 在脊椎动物的生殖细胞发生分化中

引用格式: 刘菲, 周安莉, 吴乔枫, 等. 配子母细胞特异因子 *gtsf1* 基因在斑马鱼生殖细胞发育中的功能初探. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 458–467
Liu F, Zhou A L, Wu Q F, et al. Function of gametocyte-specific factor 1 in the development of zebrafish germ cells. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 458–467, doi: 10.1360/N052016-00123

有重要的作用,但相关机制尚有许多未知。

在生殖细胞的发生中, Piwi 起了关键作用. Piwi 通过与 piRNA 结合的途径介导转座子的沉默,从而维持生殖细胞中基因组稳定. 研究表明,在果蝇卵巢体细胞中, DmGTSF1 是 Piwi-piRNA 途径的辅因子 (Piwi-interacting RNAs cofactor)^[2]. 目前,有较多的研究侧重于 piRNA 的生物发生和 Piwi-piRNA 途径的功能,对于 piRISC 中包括 DmGTSF1 在内的 piRNA 辅因子的研究较少^[4]. 小鼠中的研究发现, *Gtsfl* 与逆转录转座子的抑制相关,然而具体的功能及作用机制不明^[1]. 此外, *Gtsfl* 是否参与 Piwi 蛋白非依赖途径仍不清楚. *gtsfl* 基因在斑马鱼 (*Danio rerio*) 中尚未有研究报道, 斑马鱼中 *gtsfl* 有一个旁系同源基因, *gtsfl* 与人 (*Homo sapiens*)、小鼠、原鸡 (*Gallus gallus*)、美洲鳄 (*Alligator mississippiensis*)、非洲爪蛙 (*Xenopus laevis*) 和果蝇的蛋白序列同源性分别为 40.7%, 40.1%, 40%, 34.3%, 30.7%, 12.6%. *Gtsfl* 蛋白有一个 CHHC 锌指结构域 (CHHC Zn-finger domain), 该结构域中含有两个 U11-48K 基序 (U11-48K motif), 两个基序之间被一段连接肽 (linker) 分隔, 此结构域预测可以与 RNA 进行结合^[5]. 分析发现, 斑马鱼的 CHHC 锌指结构域与人、小鼠、原鸡的同源性分别为 68.9%, 67.2%, 63.9%, 与美洲鳄、非洲爪蛙蛋白同源性均为 62.3%, 说明此结构域同源性较高, 在进化过程中较保守. 另外, 原位杂交表达谱显示, 斑马鱼 *gtsfl* 在囊胚期前普遍且强烈表达, 此后表达量迅速降低, 尾芽期后无明显信号. 为了印证 *gtsfl* 对斑马鱼雌雄育性的影响及探讨其在生殖细胞发育中的功能及机制, 本研究拟在斑马鱼中开展. 类转录激活因子效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 是近年发展的一类基因编辑技术, 该技术突变效率高, 脱靶率较低^[6,7], 并已在包括斑马鱼在内的许多物种中成功实现了基因敲除^[8,9]. 本研究利用 TALEN 技术对斑马鱼的 *gtsfl* 基因进行靶向敲除, 在获得斑马鱼 *gtsfl* 纯合突变体 (*gtsfl*^{-/-}) 的基础上, 对 *gtsfl* 的功能进行初步的探讨, 目的是深入研究该基因在脊椎动物生殖细胞发育中的详尽功能与相关机制.

1 材料与方法

1.1 材料

AB 系野生型 (wild type, WT) 斑马鱼, 由清华大

学生物技术系孟安明教授馈赠, 本实验室繁殖培育.

1.2 方法

(1) 斑马鱼 *gtsfl* 基因序列分析. 从 NCBI 中查询到人、小鼠、斑马鱼及果蝇 *gtsfl* 基因的蛋白序列, 用 GeneDoc Version 2.6.0.2 软件中进行比对.

(2) 斑马鱼 *gtsfl* 基因早期发育阶段的原位杂交表达谱分析. (i) 反义探针制备. 用 Trizol 法抽取斑马鱼早期发育时间节点的胚胎总 RNA, RT-PCR 法合成 cDNA, 以 oblong 时期的 cDNA 为模版, 用 *gtsfl*-F/R 扩增 *gtsfl* 基因 (表 1). 将 PCR 产物连接入 pGEM-T Easy 载体 (Promega, 美国), 转化大肠杆菌 DH5 α 中并培养, 菌液进行测序分析. 提取的重组质粒用 Not I 内切酶 (NEB, 美国) 线性化, 用 T7RNA 聚合酶 (Promega) 体外转录地高辛标记的反义探针. (ii) 整胚原位杂交. 用 4% 的多聚甲醛固定不同发育时期的胚胎 (4℃ 冰箱中过夜), 甲醇/磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBST) 梯度脱水, 于 -20℃ 冰箱中备用. 原位杂交第一天胚胎梯度复水, 24 h 后的胚胎进行蛋白酶 K (proteinase K, PK) 处理, 先后分别用负杂交液, 杂交液于 68℃ 杂交炉内预杂交, 两种杂交液的杂交时间分别为 15 min 和 8 h, 换用加入 *gtsfl* 反义探针的正杂交液于 68℃ 杂交炉内杂交 12~16 h. 第 2 天回收探针, 用柠檬酸钠缓冲液 (sodium citrate, SSCT) 梯度漂洗胚胎, 之后马来酸缓冲液 (maleic acid buffer, MABT) 漂洗, 4℃ 冰盒封闭液 (blocking solution) 封闭 1 h, PBST 漂洗, Anti-Dig AP 抗体于 4℃ 杂交过夜. 第 3 天, PBST 漂洗胚胎, BM purple AP Substrate 显色, PBST 漂洗.

(3) TALEN 识别的斑马鱼 *gtsfl* 基因靶位点的设计和靶位点序列的确认. 斑马鱼的 *gtsfl* 基因位于第 23 号染色体上, 该基因中含有 8 个外显子, 根据 TALEN 设计方法原则^[10,11], 针对 *gtsfl* 的第二外显子选取了一个靶位点, 根据本实验室提交的 *gtsfl* 的 ORF 序列 (登录号为 JN680266) 比对, 该靶位点位于前 2/3, 在左右臂间的 Spacer 区含有 Bpm I 的酶切位点^[12], 如图 1 所示, 随后将左右臂序列在 NCBI 和 Ensembl 数据库中比对, 确定目的序列的唯一性. 为确保所设计的靶位点与实验材料的靶位点序列的一致性, 取 AB 系 WT 斑马鱼的尾鳍并抽取全基因组 DNA, 以 Test-F 和 Test-R 作为引物进行 PCR 扩增和

表 1 用于 TALEN 靶点序列确认及活性检测的 PCR 引物信息

引物名称	引物序列(5'→3')	引物用途
<i>gtsf1</i> -F	GCCAGCACGCGACTGCTTCAA	基因克隆上游引物
<i>gtsf1</i> -R	CACACTGACCATAGCCACTGAGCA	基因克隆下游引物
Test-F	ACCCGAGCGTATTGCTAC	基因敲除分析上游引物
Test-R	TACAACCCACCTTTCTGC	基因敲除分析下游引物

图 1 斑马鱼 *gtsf1*-TALEN 左右臂及靶位点示意图
左臂与右臂序列中间为间隔序列

测序验证(表 1). 另外, PCR 产物还进行 *Bpm* I (NEB) 酶切效率的验证^[13].

(4) TALEN 表达载体的构建. TALEN 左右臂由斯丹赛公司构建, 具体步骤为: 将连接好质粒转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 培养并进行小量质粒抽提, 酶切鉴定和最终的测序鉴定, 以确保所构建的 TALEN 表达载体序列的正确性. 将序列完全正确的 TALEN 左右臂表达载体进行扩大培养, 大量抽提质粒, 备体外转录用.

(5) TALEN 质粒的体外转录. 用内切酶 *Not* I (NEB)将 TALEN 质粒分别进行酶切线性化, 将酶切产物进行电泳, 检测是否完全酶切, 将完全酶切的产物用 QIAquick PCR 纯化试剂盒进行直接回收, 并经过乙醇沉淀回收(1/20 体积的 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt dehydrate, EDTA) 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠和 2 倍体积的无水乙醇混合均匀于-20 $^{\circ}$ C 中沉淀过夜), 用 SP6 体外转录试剂盒(Ambion, 美国)进行体外转录, 之后将体外转录产物经过酚氯仿回收并测定浓度.

(6) TALEN 体外转录 mRNA 显微注射斑马鱼胚胎. 将体外转录的 TALEN 左右臂 mRNA 混合(终浓度分别为 600 ng/ μ L), 65 $^{\circ}$ C 处理 5 min, 立即取出置于冰上避免复性, 待完全冷却后于离心机中短暂离心 15 s, 置于冰上, 吸取混合液 2 μ L, 显微注射至斑马鱼单细胞受精卵, 将剩余未注射的同批 WT 胚胎设为对照组.

(7) TALEN 活性检测. 挑取 WT 对照组和注射后发育至 48 h 的 F₀代胚胎各 5 枚, 去卵膜后分别放至 2 mL 的 EP 管中, 抽取全基因组 DNA 测浓度. 以

抽取的全基因组 DNA 为模板, 以 Test-F/R 为引物进行 PCR 扩增, 用内切酶 *Bpm* I 对 PCR 产物进行酶切检测. WT 基因组序列的靶位点处因存在 *Bpm* I 的酶切位点, 因而能被 *Bpm* I 完全酶切, 显示两条带. 若注射后的胚胎中存在靶位点突变的嵌合个体, 则不能被 *Bpm* I 完全酶切而显示有 3 条. 此外, 可以通过未切开条带亮度占总条带亮度的百分比来估算突变的效率.

(8) 斑马鱼 *gtsf1* 基因敲除的突变体筛选. 选取 5 尾 F₀代成鱼分别与 WT 外交, 所产 F₁代胚胎发育至 48 h 每 5 枚为一组抽取全基因组 DNA, 以全基因组 DNA 为模板, 以 Test-F/R 作为引物进行 PCR 扩增, *Bpm* I 酶切检验, 将未切开条带回收, 克隆至 pGEM-T 载体(Promega)测序分析, 计算种系传递效率. 将检测出含有突变的同胞 F₁代培育至成鱼后分别剪尾鳍抽取全基因组 DNA, 经 PCR、酶切及测序分析确定突变基因型. 将基因型确定的 F₁突变体与 AB 系 WT 外交, 扩大 F₁代群体, 逐条检测 F₁代突变个体, 将扩大后的 F₁代中突变基因型相同的雌雄个体内交, 所得 F₂代培育至成鱼, 检验突变, 获得纯合突变体.

(9)原位杂交检测斑马鱼 *gtsf1*^{-/-}性腺中 *gtsf1* mRNA 的表达. 解剖 4 月龄的 WT 与 *gtsf1*^{-/-}雄鱼取出性腺, 4%多聚甲醛室温下固定 1 h, 30%蔗糖 4 $^{\circ}$ C 脱水过夜, OCT(optimal cutting temperature compound)包埋剂包埋进行冰冻切片. 第 1 天, 用含 *gtsf1* 反义探针的杂交液对切片于 65 $^{\circ}$ C 杂交过夜. 第 2 天, 漂洗切片, 封闭液封闭后, 用 Anti-Dig AP 抗体室温杂交过夜. 第 3 天, 用稀释的四唑硝基蓝/5-溴-4-氯-3-吡啶-

磷酸盐(nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, NBT/BCIP)显色过夜. 第 4 天, 显色后用 PBST 漂洗, 甘油封片后用镜检拍照.

2 结果与分析

2.1 斑马鱼 *gtsf1* 基因序列分析

使用 GeneDoc Version 2.6.0.2 软件中分析 *gtsf1* 基因在不同物种中的蛋白序列同源性, 发现斑马鱼 *gtsf1* 与人、小鼠、原鸡、美洲鳄、非洲爪蛙和果蝇的蛋白序列同源性分别为 40.7%, 40.1%, 40%, 34.3%, 30.7%, 12.6%. *Gtsf1* 蛋白有一个 CHHC 锌指结构域, 分析发现, 斑马鱼的该结构域与人、小鼠、原鸡的同源性为 68.9%, 67.2%, 63.9%, 与美洲鳄、非洲爪蛙蛋白同源性均为 62.3%, 说明此结构域在以上物种中同源性较高, 在进化过程中较保守(图 2).

2.2 斑马鱼 *gtsf1* 基因在胚胎发育阶段的表达谱分析

用 *gtsf1* 反义探针分别与不同发育时期的斑马鱼胚胎进行原位杂交, 结果显示, 从 1 细胞到 30% 外包期(囊胚期)*gtsf1* 普遍且强烈表达, 此后表达降低, 尾芽期后, 表达信号明显减弱(图 3). 与本课题组此前深度测序(与复旦大学生命科学学院马红教授合作)的结果: 64 细胞期至 30% 外包期之间, *gtsf1* 表达量较高, 随后表达降低吻合, 详见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=GSE45706>.

2.3 TALEN 活性检测

挑取 WT 对照组和注射后发育至 48 h 的 F_0 代胚胎各 5 枚, 抽取全基因组 DNA, 以此为模板进行 PCR 扩增, *Bpm* I 酶切, 结果如图 4A 所示, WT 对照组的

靶序列酶切完全, 而注射了 TALEN 左右臂 mRNA 的实验组酶切不完全, 说明 F_0 胚胎中含有突变个体. 通过估算未切开条带亮度占总条带亮度的百分比, 测得突变效率约为 16.7%.

2.4 斑马鱼 *gtsf1* 基因敲除的突变体筛选

检测发现, 5 尾 F_0 代中有 3 尾外交 F_1 代胚胎含有突变, 因此, 该位点突变的种系传递效率为 $3/5=60\%$ (种系传递效率为生殖细胞携带突变的阳性 F_0 成鱼的比例). 将含有突变的 F_1 代养至成鱼后取尾鳍抽取全基因组 DNA, 通过酶切和测序的方法检测突变并确定突变基因型, 共检测到 6 种突变的基因型, 如图 4B 所示, 将突变基因型为-10 的 F_1 突变体成鱼与 AB 系 WT 成鱼再次外交(此 F_1 代中没有成对的突变基因型相同的杂合突变雌雄个体), 扩大培养 F_1 代, 从中获得了突变基因型(-10)相同的杂合突变雌雄个体, 将突变基因型为-10 的杂合突变雌雄个体自交, 获得了突变基因型为-10 的纯合突变体, 结果如图 4C 所示.

2.5 斑马鱼 *gtsf1*^{-/-} 性腺中 *gtsf1* mRNA 基本不表达

为了证实 TALEN 敲除后纯合突变体的 *gtsf1* 的功能缺失, 用原位杂交的方法对 WT 和 *gtsf1*^{-/-} 精巢中 *gtsf1* 基因在 mRNA 表达水平进行了验证, 结果如图 5 所示, WT 精巢中 *gtsf1* 在精原细胞, 初级精母细胞和次级精母细胞中有较高的表达, 而在 *gtsf1*^{-/-} 精巢中 *gtsf1* 基本不表达, 因此, *gtsf1* 功能已缺失.

2.6 斑马鱼 *gtsf1*^{-/-} 的表型和育性

观察发现, 筛选出的 *gtsf1*^{-/-} 与 WT 及 *gtsf1*^{+/-} 相比生长速度无显著差异, 表型也似正常(图 6), 然而 *gtsf1*^{-/-} 成鱼全部为雄性, 且 *gtsf1*^{-/-} 的数量多于预期

图 2 *Gtsf1* 蛋白 CHHC 锌指结构域在部分物种中的同源性分析

斑马鱼与人类、家鼠、原鸡、美洲鳄和非洲爪蛙 *Gtsf1* 蛋白 CHHC 锌指结构域的同源性比对. 可见斑马鱼与上述物种的 CHHC 锌指结构域具有较高的同源性, 斑马鱼与它们的序列相似度分别为 68.9%, 67.2%, 63.9%, 62.3%, 62.3%. 氨基酸颜色的深浅根据同源型高低由软件 GeneDoc 做出: 黑色(100%相同)、灰色(80%相同)、浅灰色(60%相同). 显示 *gtsf1* 基因进化保守性

(表 2), WT, *gtsfl*^{+/-}和 *gtsfl*^{-/-} 3 种基因型的比率并不符合孟德尔分离比(1:2:1)。为了检测 *gtsfl*^{-/-} 的育性, 随机选取了 8 条 *gtsfl*^{-/-}, 分别与 WT 雌鱼交配, 分别交配 3 次, 其中 7 条所产胚胎 100% 卵裂异常, 无法正常

发育, 具体表现为: 1 细胞期时胚胎正常, 当对照组 WT 胚胎进入 2 细胞期时, 卵裂开始出现异常, 胚胎动物极有较高隆起, 未见分裂沟, 至 30%外包期, 异常胚胎开始出现解体现象, 70%外包期时, 约 2/3 解体死亡, 至 90%外包期胚胎全部死亡, 结果见图 7. 仅 1 条 *gtsf1*^{-/-}雄鱼交配的后代胚胎中有 8.8%的胚胎卵裂正常. 将异常胚胎抽取全基因组, PCR 及测序未检测到突变基因型, 表明异常胚胎为假卵裂, 进一步提示 *gtsf1*^{-/-}雄鱼的精子可能异常或缺失而致雄性不育.

2.7 斑马鱼 *gtsf1*^{-/-}精巢的组织学检查

为了检验 *gtsf1*^{-/-}精巢中精子及生精细胞有无异常, 对 *gtsf1*^{-/-}成熟的雄鱼(4 月龄)进行了组织学检查(图 8), 观察表明, *gtsf1*^{-/-}精细管腔中只有极少量精子细胞, 精子基本缺如, 统计学初步分析显示, 初级精母细胞数量无显著异常, 次级精母细胞数量显著减少, 提示该基因在斑马鱼精子发生的减数第一次分裂过程中起关键作用.

2.8 斑马鱼、小鼠及果蝇中 *gtsf1*^{-/-}等突变体的表型比较

考虑 DmGTSF1 是 Piwi-piRNA 途径中的辅因子^[2], 因此, 又对斑马鱼、小鼠、及果蝇中的 *gtsf1*^{-/-}和 *piwi*^{-/-}表型等分别进行了比较(表 3).

比较斑马鱼、小鼠和果蝇 *gtsf1*^{-/-}的表型发现, 斑马鱼中无雌性个体, 雄性不育, 精巢中次级精母细胞显著减少, 无精子; 小鼠中的雌性可育, 雄性不育, 精巢中的初级精母细胞减数第一次分裂不能完成^[1]; 而果蝇中是雌性不育, 卵巢滤泡层和卵母细胞消失, 但雄性正常可育^[2,4]. 比较 3 种动物 *gtsf1* 和 *piwi* 突变体的表型发现, 斑马鱼中两者的表型有些相似, 即无雌性个体, 雄性不育, 但又有差异: 如 40 天后的斑马鱼 *ziwi*^{-/-}精巢中无生殖细胞^[15], 而 4 月龄 *gtsf1*^{-/-}初级精母细胞数量正常, 次级精母细胞显著减少, 无精子; 在小鼠中, 两种突变体的表型非常相似, 都表现为初级精母细胞减数第一次分裂不能完成, 雄性不育^[1,17-19]. 这一结果提示, 在雄性生殖细胞的发生过

表 2 *gtsf1*^{+/-}♀×*gtsf1*^{+/-}♂内交后代突变检测遗传学数据统计

类型	实验批次					
	1		2		3	
WT/尾	2	2	6	2	3	2
<i>gtsf1</i> ^{+/-} /尾	4	13	1	8	4	10
<i>gtsf1</i> ^{-/-} /尾	0	23	0	29	0	14
合计/尾	44		41		34	
分类	雌鱼(♀)	雄鱼(♂)	雌鱼(♀)	雄鱼(♂)	雌鱼(♀)	雄鱼(♂)

图 5 斑马鱼成鱼(140 天)精巢中 *gtsf1* mRNA 的表达情况

原位杂交方法检测 140 天成鱼精巢中 *gtsf1* 的表达. A, B 分别为 WT 和 *gtsf1*^{-/-}精巢组织冰冻切片原位杂交鉴定的 *gtsf1* 的表达情况. WT 中 *gtsf1* 基因有较强的表达, 表达部位主要在精原细胞 Sg, 初级精母细胞 Sc I 和次级精母细胞 Sc II 中, 而 *gtsf1*^{-/-}精巢中 *gtsf1* 基本不表达. 此结果说明, *gtsf1* 已成功敲除. Sg: 精原细胞; Sc I: 初级精母细胞; Sc II: 次级精母细胞

图6 斑马鱼成鱼(4月龄)的表型

由上到下分别显示野生型(WT), 杂合体(*gtsfl*^{+/+})和纯合体(*gtsfl*^{-/-})的表型. 可见3者的体长表型无显著差异

程中, 斑马鱼 *gtsfl* 与 *ziwi* 或 *zili* 的功能可能密切相关, 但与小鼠中的可能有些差异. 斑马鱼 *gtsfl* 在 Piwi 途径中的具体作用及其调控生殖细胞的发生机制有待进一步阐明.

3 讨论

本研究采用具有设计简单, 毒性低, 脱靶效应小^[6,7]的 TALEN 技术对斑马鱼的 *gtsfl* 基因进行靶向敲除, 成功获得了该基因敲除的突变体, 其突变发生在第二外显子上, 突变类型为复杂型突变, 具体为 12 个碱基(序列为 AAAGTACAGGGC)缺失突变后又插入了 AA 两个碱基, 形成了-10 的突变基因型; 该突变基因预计将从编码的第 18 个氨基酸开始发生移码突变, 最终形成仅含 73 个氨基酸残基的产物. 对于 *gtsfl* 的敲除在 RNA 表达水平上用原位杂交的方法进行了鉴定, *gtsfl*^{-/-}精巢中 *gtsfl* 基因基本不表达, 说

图7 受精后 3.5 h(hours post fertilization, hpf)囊胚期的斑马鱼胚胎

A: WT 对照; B: *gtsfl*^{-/-}♂×WT♀胚胎, 可见卵裂异常

表3 *gtsfl*^{-/-}与 *piwi*^{-/-}在斑马鱼、小鼠及果蝇中的比较

分类	物种			
	斑马鱼		小鼠	果蝇
<i>gtsfl</i> ^{-/-}	育性	无雌性个体, 雄性不育	雌性可育, 雄性不育 ^[1]	雌性不育, 雄性可育 ^[2,4]
	生殖细胞发育	次级精母细胞显著减少, 无精子	初级精母细胞停滞在偶线期, 无精子 ^[1]	卵巢滤泡层消失, 卵母细胞凋亡 ^[2,4]
<i>piwi</i> ^{-/-}	育性	2 个同源基因: <i>ziwi/piwil1</i> , <i>zili/piwil2</i> . <i>ziwi</i> ^{-/-} 和 <i>zili</i> ^{-/-} , 均为雄性不育, 无雌性个体 ^[14,15]	3 个同源基因 <i>Miwi/Piwil1</i> , <i>Mili/Piwil2</i> , <i>Miwi2/Piwil4</i> . <i>Miwi</i> ^{-/-} , <i>Mili</i> ^{-/-} , <i>Miwi2</i> ^{-/-} , 均为雄性不育 ^[16-19]	3 个同源基因: 基因 <i>Ago3</i> ^{-/-} 雌性不育, 雄性半育(semifertile) ^[20] , <i>aub</i> ^{-/-} , <i>piwi</i> ^{-/-} 雌雄性不育 ^[21,22]
	生殖细胞发育	21 天的 <i>ziwi</i> ^{-/-} 性腺中生殖细胞大量减少或缺失, 40 天的 <i>ziwi</i> ^{-/-} 性腺中无生殖细胞 ^[15] ; 35 天的 <i>zili</i> ^{-/-} 性腺中生殖细胞大量减少 ^[14]	<i>Miwi2</i> ^{-/-} 减数第一次分裂不能完成, 睾丸逐渐退化 ^[17] ; <i>Miwi</i> ^{-/-} 停滞在圆形精细胞(round spermatids)阶段, 无精子 ^[18] ; <i>Mili</i> ^{-/-} 无精子 ^[19]	<i>ago3</i> ^{-/-} 雄果蝇的生殖干细胞缺失 ^[20] ; <i>aub</i> ^{-/-} 雄果蝇的精母细胞和精细胞中出现针状结晶 ^[21] ; <i>piwi</i> ^{-/-} 雌雄成年果蝇的生殖干细胞(germ-line stem cells)缺失 ^[22]
Piwi 与 Gtsf1 的相互作用		未知	未知	Gtsf1 可与 Piwi 直接结合 ^[2,4]

图 8 4 月龄的斑马鱼性腺组织切片

A: WT 性腺组织切片可见精细管腔中充满了大量精子(红色箭头); B: *gtsfl*^{-/-}性腺组织切片, 在 *gtsfl*^{-/-}精细管腔中未见有精子(红色箭头); C: A 中红色方框区域的局部放大图, 可见精小囊中有精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞, 管腔中大量的精子; D: B 中红色方框区域的局部放大图, 可见精原细胞、初级精母细胞数量正常, 次级精母细胞和精细胞显著减少, 未见有精子. Sg: 精原细胞; Sc I: 初级精母细胞; Sc II: 次级精母细胞; St: 精细胞; Sz: 精子(石蜡切片, 苏木精-伊红染色)

明 *gtsfl* 功能已缺失. 形态学观察表明, 斑马鱼 *gtsfl*^{+/-}和 *gtsfl*^{-/-}的生长发育正常, 表型也无明显异常, 但 *gtsfl*^{-/-}全部为雄鱼, 性腺的组织切片显示, 初级精母细胞数量基本正常, 次级精母细胞显著减少, 大部分的 *gtsfl*^{-/-}(7/8)精子基本缺失, 只有极少部分 *gtsfl*^{-/-}(1/8)存在极少量的精子.

前已提及, 小鼠中 *Gtsfl*^{-/-}雄性不育, 初级精母细胞停滞在偶线期, 不能完成减数第一次分裂^[1]. 本研究发现, 斑马鱼 *gtsfl*^{-/-}无雌性个体, 雄性不育, 初级精母细胞可以正常形成, 而次级精母细胞显著减少. *GTSF1* 在人的高风险不育(high infertility risk group, HIR)隐睾症患者睾丸中表达显著下调. 提示 *gtsfl* 对脊椎动物雄性生殖细胞发育的影响有保守的功能. 因此, 利用斑马鱼阐明 *gtsfl* 在雄性精子发生过程中的作用及其相关机制具有普遍意义.

目前, 针对 *gtsfl* 影响雄性精子发生过程的机制研究仍很少. 小鼠中的研究发现, *Gtsfl* 的缺失能够导

致小鼠睾丸中 Line-1 型和 IAP 型转座子转录调控区域去甲基化和转录水平的上调^[1], 而 Line-1 型和 IAP 型转座子的表达又受 Piwi-piRNA 途径调控, 因此, 在小鼠雄性生殖细胞的发生过程中, *gtsfl* 与 Piwi 途径可能密切相关. 本研究发现, 斑马鱼 *gtsfl*^{-/-}表型与 Houwing 等人^[15]发现的 *ziwi*^{-/-}表型相似, 雄性不育, 全部为雄鱼, 但又有差异: 表现为 *ziwi*^{-/-}精巢中各级生精细胞都缺失, 而 *gtsfl*^{-/-}精巢中初级精母细胞数量正常. 另外, *gtsfl*^{+/-}内交后的 F₂ 代中, WT, *gtsfl*^{+/-}和 *gtsfl*^{-/-}的遗传比例并不符合孟德尔遗传定律的分离比, 且更倾向于遗传突变, 这与 piRNA 途径功能异常的表型一致^[23]. 因此, 推测 *gtsfl* 与斑马鱼中 *piwi* 同源基因 *ziwi* 或 *zili* 的功能有重要的相关性. *gtsfl* 可能是 Piwi-piRNA 途径中的关键因子, 并且可能通过 Piwi-piRNA 途径调控初级精母细胞发育为次级精母细胞的第一次减数分裂过程. 本课题组观察到 *gtsfl*^{-/-}全部发育为雄性, 出现此表型的原因可能

为: *gtsfl*^{-/-}雌性在发育过程中夭折、*gtsfl* 的突变导致性别分化异常及 *gtsfl*^{-/-}雌性发生了性逆转。斑马鱼的性腺发育较特殊, 斑马鱼中未发现性染色体, 其性腺分化前都存在一个类似卵巢样结构(幼体卵巢), 在受精 21~23 天后才发生两性分离^[24], 因此, 斑马鱼雄性的性腺发育分化经历了一个幼体卵巢到精巢(juvenile ovary-to-testis)的转化过程, 在此过渡阶段发育为雄性的性腺中, 卵母细胞开始凋亡, 精母细胞出现并发育, 到 30 天左右完成向精巢的转化。根据本课题组在 F₂ 代养殖过程中并未发现突变体的大量死亡的结果推测, *gtsfl* 的缺失通过影响雌性生殖细胞

的发育而导致性别分化的异常或 *gtsfl*^{-/-}雌性发生性逆转。以上表明, *gtsfl* 基因对斑马鱼的雌雄性生殖细胞正常发育至关重要, 具体的功能及机制有待进一步的研究。

斑马鱼 *gtsfl* 突变体的成功制备为深入开展性腺和生殖细胞的发生机制研究提供了重要的模型。后续工作将围绕斑马鱼 *gtsfl* 是否与 *ziwi/zili* 的作用关联? *gtsfl* 如何影响初级精母细胞的减数第一次分裂等问题展开。本文将阐明脊椎动物精子的发育过程积累重要资料, 对揭示男性不育的相关机制也可提供有益的帮助。

参考文献

- 1 Yoshimura T, Toyoda S, Kuramochi-Miyagawa S, et al. *Gtsfl/Cue110*, a gene encoding a protein with two copies of a CHHC Zn-finger motif, is involved in spermatogenesis and retrotransposon suppression in murine testes. *Dev Biol*, 2009, 335: 216–227
- 2 Ohtani H, Iwasaki Y W, Shibuya A, et al. *DmGTSF1* is necessary for Piwi-piRISC-mediated transcriptional transposon silencing in the *Drosophila* ovary. *Genes Dev*, 2013, 27: 1656–1661
- 3 Hadziselimovic F, Hadziselimovic N O, Demougin P, et al. Piwi-pathway alteration induces LINE-1 transposon derepression and infertility development in cryptorchidism. *Sex Dev*, 2015, 9: 98–104
- 4 Dönertas D, Sienski G, Brennecke J. *Drosophila* Gtsf1 is an essential component of the Piwi-mediated transcriptional silencing complex. *Genes Dev*, 2013, 27: 1693–1705
- 5 Andreeva A, Tidow H. A novel CHHC Zn-finger domain found in spliceosomal proteins and tRNA modifying enzymes. *Bioinformatics*, 2008, 24: 2277–2280
- 6 Li T, Huang S, Zhao X, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 6315–6325
- 7 Forner J, Pfeiffer A, Langenecker T, et al. Germline-transmitted genome editing in *Arabidopsis thaliana* using TAL-effector-nucleases. *PLoS One*, 2015, 10: e0121056
- 8 沈延, 肖安, 黄鹏, 等. 类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)介导的基因组定点修饰技术. *遗传*, 2013, 35: 395–409
- 9 Sun N, Zhao H. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110: 1811–1821
- 10 Cermak T, Doyle E L, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: e82
- 11 Liu J, Li C, Yu Z, et al. Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy. *J Genet Genomics*, 2012, 39: 209–215
- 12 Huang P, Xiao A, Zhou M, et al. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 699–700
- 13 沈延, 黄鹏, 张博. TALEN 构建与斑马鱼基因组定点突变的实验方法与流程. *遗传*, 2013, 35: 533–544
- 14 Houwing S, Berezikov E, Ketting R F. Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish. *EMBO J*, 2008, 27: 2702–2711
- 15 Houwing S, Kamminga L M, Berezikov E, et al. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in zebrafish. *Cell*, 2007, 129: 69–82
- 16 Hirakata S, Siomi M C. piRNA biogenesis in the germline: from transcription of piRNA genomic sources to piRNA maturation. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1859: 82–92
- 17 Carmell M A, Girard A, van de Kant H J, et al. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev Cell*, 2007, 12: 503–514
- 18 Deng W, Lin H. miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell*, 2002, 2: 819–830

- 19 Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*, 2004, 131: 839–849
- 20 Li C, Vagin V V, Lee S, et al. Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies. *Cell*, 2009, 137: 509–521
- 21 Schmidt A, Palumbo G, Bozzetti M P, et al. Genetic and molecular characterization of sting, a gene involved in crystal formation and meiotic drive in the malegerm line of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 1999, 151: 749–760
- 22 Cox D N, Chao A, Baker J, et al. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev*, 1998, 12: 3715–3727
- 23 Ishizu H, Siomi H, Siomi M C. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes Dev*, 2012, 26: 2361–7233
- 24 von Hofsten J, Olsson P E. Zebrafish sex determination and differentiation: involvement of FTZ-F1 genes. *Reprod Biol Endocrinol*, 2005, 3: 63

Function of Gametocyte-Specific Factor 1 in the Development of Zebrafish Germ Cells

LIU Fei, ZHOU AnLi, WU QiaoFeng, HU Yu & YAO JiHua

State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

Gametocyte-specific factor 1 (*Gtsf1*), a member of the UPF0224 family, contains a conserved CHHC Zn-finger domain and is essential for the development of germ cells. Deficiencies in *Gtsf1* result in male sterility in mice and female infertility in fruit flies. Additionally, both the mRNA and protein of *GTSF1* are significantly reduced in the testis of high-infertility-risk cryptorchidism patients. However, the mechanisms remain unclear. In this study, zebrafish *Gtsf1* mutants were generated using TALEN technology. The phenotypes of zebrafish mutants appeared to be normal. However, all zebrafish homozygous *Gtsf1* mutants (*gtsf1*^{-/-}) were male. Histologic section analysis showed that the number of secondary spermatocytes was significantly reduced in the zebrafish *Gtsf1*^{-/-} gonads, and the number of sperm was low or nearly absent in the testicular seminiferous tube cavity. The number of preliminary spermatocytes was similar to that of wild-type. These results indicate that *Gtsf1* plays a conserved role in vertebrate spermatogenesis. Our results provide a foundation for studies of the mechanism of *Gtsf1* during vertebrate spermatogenesis.

zebrafish, *gtsf1*, TALENs, germ cells, male infertility

doi: 10.1360/N052016-00123