

兔移核重构胚再程序化相关基因片段的分离与鉴定

郁卫东 李文雍 王玉阁 杨立新 刘桂生 杜 淼 陈清轩*

(中国科学院遗传和发育生物学研究所 中国科学院研究生院 北京 100080)

摘 要 用单个植入前胚胎 mRNA 差别显示方法(Single Preimplantation Embryonic mRNA Differential Display Reverse Polymerase Reaction, SPEDDRT-PCR),以家兔移核重构发育至 2 细胞、8 细胞时期的胚胎及囊胚作为起始材料。研究家兔移核重构胚再程序化相关基因的表达。获得了 25 个与再程序化相关的基因片段,完成了对所有片段的克隆、序列分析,其中 5 个反向 Northern 证实的片段在从 MII 到囊胚的发育阶段中呈现特异性表达的特点。这项研究为再程序化相关基因全长的分离以及功能研究奠定了良好的基础。

关键词 克隆,植入前胚胎,单个植入前胚胎 mRNA 差别显示,再程序化

中图分类号 Q781 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)01-0030-05

哺乳动物已分化的成体细胞核或胚胎细胞核重演正常精卵受精后配子核的程序化过程,无性繁殖下一代的过程就是克隆。核移植技术是克隆成功的关键,核移植最终的目的是使移核重构胚获得启动卵裂和分化的能力。其中卵裂和分化的启动是通过再程序化(Reprogramming)亦即基因活性结构的重建而获得的。首先,供体核的一切转录活动都停止,其次去核卵母细胞质中再程序化相关因子(蛋白质、核酸或其它诸如甾体类分子等因子)与染色体发生相互作用,共同完成对卵裂和分化的启动^[1,2]。

目前,克隆技术日臻完善,羊、牛、兔、猪、猴以及鼠等哺乳动物的体细胞克隆相继成功。但是克隆效率低和克隆动物发育存在缺陷是目前普遍存在的问题,而对供体核再程序化分子机制的深入研究是将来解决这些问题的关键^[3-7]。

在卵母细胞发生、发育和成熟的过程中,胞质中积累了大量的蛋白质和 mRNA,这些物质不仅为正常的胚胎发育,基因组激活提供了良好的物质储备,而且也是移核重构胚能够获得启动卵裂和分化能力的物质基础。研究正常植入前胚胎发育过程中的基因表达和植入前移核重构胚的基因表达同样重要。在发育过程中,一些 mRNA 的消耗,一些新的 mRNA 的产生以及这些基因的表达存在怎样的规律,某些基因表达量的变化规律都是迫切需要了解的,只有

这些环节得到深入的理解,克隆技术才能从根本意义上获得突破,才有可能广泛地运用到农业育种、生物医学等实践当中。

我们实验室在已有的实验基础之上建立了单个卵母细胞和植入前胚胎 DDRT-PCR 以及单胚胎构建 cDNA 文库的方法。单个植入前移核重构胚胎的 mRNA 差别表达研究不仅可以对基因表达的时空模式进行精确的定性和定量,而且可以对移核胚胎早期卵裂和分化的多样性进行细致的研究,这为研究克隆胚胎的再程序化过程奠定了良好的实验基础,是识别、分离和鉴定再程序化相关基因的有效技术^[8-22]。

1 材料和方法

1.1 材料

6~8 月龄的雌性家兔(由中国科学院遗传与发育生物学研究所实验动物中心提供),FSH 和 LH(由中国科学院动物学研究所提供),hCG(上海第一生化药业公司),透明质酸酶、NP-40 和 dNTPs(Sigma);M-MLV 逆转录酶、无 RNase-DNase 水、5 X 第一链合成缓冲液、DTT(Gibco);AMV 逆转录酶(Roche);Primer RNase 抑制剂(Eppendorff);RNase Guard(Amersham Pharmacia Biotech);Taq DNA 聚合酶、pGEM-T 载体、X-Gal 和 IPTG(Promega);3'引物

HT₍₁₅₎G 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTG-3', 5'引物 HAP1 5'-AAGCTTGATTGCC-3'(由上海生工生物工程公司合成);[α -³²P]dATP、[α -³²P]dCTP(比活性 3000X3, 7 × 10¹⁰ Bp/mmol/Lol 北京亚辉公司);DNA Labeling Kit(TaKaRa),其他试剂国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 超排 M II 卵和移核重构胚胎的获得:根据 Atale 方法,获取 M II 卵母细胞。常规方法获得胎兔成纤维细胞,饥饿 1~2d 后,作为供体,重构克隆的 2、8 细胞及囊胚胚胎^[13]。M II 卵母细胞经 0.5% 的透明质酸酶去除颗粒细胞后,与 2、8-细胞及囊胚一样用酸性台氏液(pH 2.0~2.5)去除透明带,PBS 清洗后加入 RT 反应体系以备 RT-PCR 反应使用。

1.2.2 RT-PCR 反应体系的建立^[9]:逆转录体系含有 1 X 第一链合成缓冲液,20mmol/L DTT,0.5% NP-40,20 μ mol/L dNTPs;4 μ mol/L HT₍₁₅₎G;0.25 μ L Primer RNase Inhibitor 和 RNase Guard 的混合物;加入无 RNase 的 DNase 水至 4.5 μ L。然后加入含单个卵母细胞或 2-细胞胚胎的 0.5 μ L PBS 进行逆转录,反应参数是 65 $^{\circ}$ C 5min,冰浴 5min,加入 40u / μ L /M-MLV 和 5u/ μ L LAMV 逆转录酶混合物 0.5 μ L,42 $^{\circ}$ C 保温 60min,75 $^{\circ}$ C 变性 5min 后即刻使用或 -80 $^{\circ}$ C 冻存备用,设置 RT 体系和单纯加入 PBS 空白对照。

PCR 体系含有 1 × PCR 缓冲液,2.5mmol/L MgCl₂,4 μ mol/L HT(15)G Anchor Primer,4 μ mol/L HAP1 Primer,0.2 μ Ci [α -³²P]dATP 0.8 μ mol/L dNTPs,0.2 μ L Taq DNA 聚合酶,加入无 RNase-DNase 水至 15 μ L,一同加入上述 RT 反应体系中进行 PCR 反应:94 $^{\circ}$ C 变性 10min,40 $^{\circ}$ C 退火 5min,72 $^{\circ}$ C 延伸 5min;94 $^{\circ}$ C、30 秒,40 $^{\circ}$ C、2min,72 $^{\circ}$ C、1.5 min,共 39 个循环;72 $^{\circ}$ C、5min。设置 PCR 空白对照。用含 8mol/L 尿素的 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。放射自显影,-20 $^{\circ}$ C、2d。

1.2.3 差别条带的回收及再扩增^[9]:回收差别条带(乙醇糖原法沉淀),在 50 μ L 反应体系(按上述条件,只是不加 [α -³²P]dATP)中进行 PCR:94 $^{\circ}$ C、10min;94 $^{\circ}$ C、1min,40 $^{\circ}$ C、1.5 min,72 $^{\circ}$ C、1.5min,20 个循环;72 $^{\circ}$ C、10min;94 $^{\circ}$ C、10min;94 $^{\circ}$ C、1min,42 $^{\circ}$ C、1.5 min,72 $^{\circ}$ C、1.5 min,20 个循环,72 $^{\circ}$ C、10min。2% 的琼脂糖电泳鉴定 PCR 产物。

1.2.4 克隆及序列分析:将 PCR 产物克隆到 pGEM-T 载体,热激转化后挑取白斑进行测序。对测序结果进行 GenBank 同源性检索。

1.2.5 反向 Northern 杂交所需 cDNA 的获得:按照

Shimono 描述的方法进行^[1],只是将转录前的变性时间延长为 5min。

1.2.6 反向 Northern 杂交鉴定:将从单一的 M II 卵、2-细胞期、8-细胞期胚胎囊胚扩增出的 cDNA,进行 2% 琼脂糖电泳,照相,转到 Hybond-XL 膜上,以随机引物法标记所获得的 cDNA 片段作为探针,进行反向 Northern 杂交。常规方法杂交、洗膜,然后于 -20 $^{\circ}$ C 放射自显影 5 d。

2 结果

2.1 DD-RT-PCR 6% 聚丙烯酰胺电泳

从图 1 中可以看到,类似于正常胚胎发育时的情况,大部分的差异片段出现在 8-细胞期,这些差异不仅存在质的差异,而且还存在着表达量的差异。

1 2 3 4 5 6 7

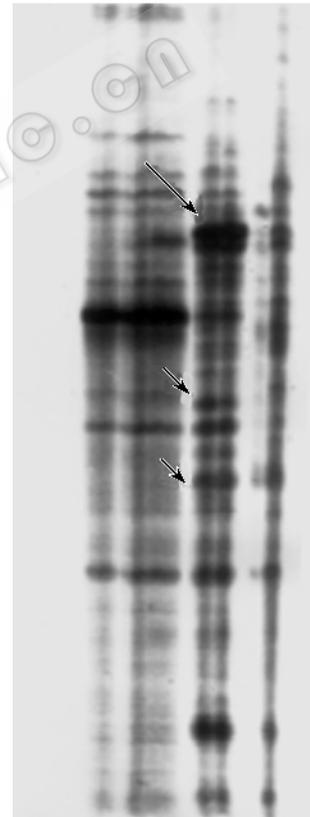


图 1 单个植入前兔胚差异显示图谱

Fig. 1 Profile of SPEDDRT-PCR

1. RT negative control; 2. PBS negative control; 3. PCR negative control; 4. 2-cell reconstructed embryo; 5. 4-cell reconstructed embryo; 6. 8-cell reconstructed embryo; 7. Reconstructed blastocyst. → are partial fragments of DDRT-PCR

2.2 5 个差异片段为探针与各个时期 cDNA pool 进行反向 Northern 杂交

图 2 杂交结果显示的是 5 个差异片段在克隆胚

胎发育不同时期的表达模式(Expression profile)。说明在发育的不同时期这些基因可能起着不同的作用,可能是再程序化过程顺利进行的关键。

2.3 差别显示条带的 BLAST 检索

表中显示了用一套锚定引物所获得的差异表达片段在 GenBank 中的检索结果。其中大部分的基因目前只见于 EST 库中,因此详细的功能尚不清楚,由此可见,目前对于正常或克隆胚胎发育过程中期特异性基因表达的规律还知之甚少。

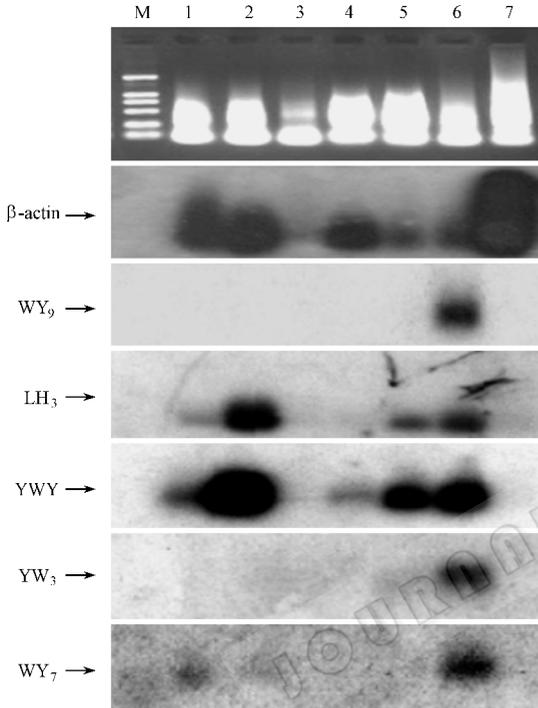


图2 反向 Northern 杂交图谱

Fig.2 Profile of Northern blot

M. DL2000 DNA marker ; 1. MI oocyte ; 2. Denucleated MII oocyte ; 3. Fused reconstructed embryo ; 4. Activised reconstructed embryo ; 5. 4-cell reconstructed embryo ; 6. 8-cell reconstructed embryo ; 7. Reconstructed blastocyst

3 讨 论

哺乳动物体细胞克隆以其在农业育种和生物学领域广泛的应用前景,正吸引着越来越多的研究人员从事这一领域的研究。核移植技术的日臻完善为哺乳动物体细胞的成功克隆奠定了良好的基础。但是,哺乳动物克隆效率很低,严重地阻碍了这项技术的发展^[1-7]。从理论上对供体核再程序化分子基础的研究是解决这些问题的第一步。

哺乳动物植入前胚胎的发育,其实质是基因在时间和空间上程序上表达的过程,正常发育要求基因按照一定的时间和空间顺序合理表达。再程序化

过程就是已经分化的体细胞核对胚胎合子核程序化过程的重演去分化,这涉及供体核核膜破裂,染色体重建,再程序化因子与染色体特定部位的结合,最终完成母源调控向合子型调控的转换。这一过程中,卵母细胞中贮存物质(主要是蛋白质和 mRNA)与合子自身合成物质之间有效的传接是再程序化顺利进行的保证^[1,2]。

胚胎发育的基因表达调控机制是相当精确的,不仅有质的精确性,而且还存在着量的精确性,其中量的精确性似乎更加重要。要想对植入前胚胎早期发育的基因表达进行系统而精确的研究,就必须有一套研究基因差别表达行之有效的方法。DDRT-PCR 是研究基因差别表达的有效方法,对材料受到极大限制的胚胎早期研究来说,我们实验室建立的 SPEDDRT-PCR 方法不仅克服了材料不足和发育不同步的难点,同时符合了对基因表达精确性的要求,而且还可以对胚胎早期的基因表达进行大规模的系统研究^[8-9]。

在整个再程序化过程中,基因的选择性表达决定了机体整个生命过程,基因表达的变化处于控制生物学调节机制的中心位置,基因表达水平的变化是最根本的变化,也是最敏感的变化,反映了机体特定阶段的生命特征。

本研究分析了兔体细胞移核后,植入前的 2-8-细胞及囊胚期 mRNA 的表达情况,发现了 4 个全新的和 21 个功能未知的 EST 片段。我们在选择差别表达片段时,不仅要识别细胞期特异性表达(Stage specific expression)的片段,而且还要识别量上有差别的片段。在已经证实的 5 个片段中, YW₃ 和 WY₉ 是 8 细胞特异性表达的,是兔基因组激活时表达基因, GenBank 检索发现前者与人类的 Pim-1 基因同源,这是一个原癌基因,到底在胚胎发育早期起什么样的作用,尚不清楚;后者则是一个未知基因。 WY₇ 不仅在 8 细胞期表达,在卵母细胞和去核的卵母细胞中也有表达,因此我们推测这个基因可能就是在卵母细胞发生过程中产生的,并贮存起来作为母源性调控物质供受精卵或移核重构胚发育所用。 LH₃ 和 YWY 具有量的差别,这在杂交结果中已经有明显的显示,在 2-8-细胞期及囊胚期有量的变化。这些结果不仅证实了程序化或再程序化涉及多个因素,而且也为再程序化的研究打开了一扇大门。如果能够对正常的胚胎作类似的工作,再将二者进行系统的比较,对再程序化的研究会更加有意义。

表 1 差别显示条带的 BLAST 检索结果

Table 1 Features of Sequenced Clone and Results of BLAST Search

Clone	Size(bp)	DNA homology(BLASTN)	Accession No.	Identity/%	Overlap
WY1	367	GK Homo sapiens cDNA clone	AV718018	99%	363
WY2	351	NCI_CGAP_Kid11 Homo sapiens cDNA clone	BE501857	91%	57
WY3	331	NIH_MGC_75 Homo sapiens cDNA clone	BG401767	85%	47
WY4	323	Homo sapiens cDNA	BF802558	92%	253
WY5	318	Novel			
WY6	304	MARC IPIG Sus scrofa cDNA	BG608776	85%	207
WY7	292	MARC 3BOV Bos taurus cDNA	BM106704	89%	224
WY8	254	Homo sapiens cell division cycle 27	XM_032188.1	93%	204
WY9	239	Homo sapiens cDNA clone	AW300959	89%	183
WY10	234	HR85 islet Homo sapiens cDNA	BM312630	96%	150
WY11	213	MARC 3BOV Bos taurus cDNA 5'	BF706750	100%	50
WY12	208	Novel			
WY13	201	pregnant_uterus Homo sapiens cDNA	AA147637	96%	180
WY14	185	Novel			
YW1	313	Homo sapiens KIAA0942 protein	AB023159	93%	52
YW3	334	Homo sapiens pim-1 oncogene	XM_043450	94%	180
HL1	243	CS box-containing WD protein	BC015887	83%	147
HL2	237	Soares_testis_NHT Homo sapiens cDNA	AI082142	89%	173
HL3	234	Mus musculus , clone MGC 37960 IMAGE	BC021954	81%	140
LH1	267	Mouse Newborn Brain cDNA	BM117157	97%	218
LH2	263	NCI_CGAP_Kid11 Homo sapiens Cdna	AI796660	90%	172
LH3	261	Mus musculus 13 days embryo head cDNA	AK013963	91%	53
YWY1	320	Novel			
SSF1	151	adult male cerebellum cDNA clone	BB668485	100%	113
SSF2	210	Homo sapiens CGI-148 protein	NM_016078.1	93%	59

REFERENCES (参考文献)

- [1] Kanka J. Nuclear transplantation : reprogramming of transplanted-nuclei. *Reprod Nutr Dev* 1999 **39** :545 - 554
- [2] Trounson A ,Lacham-Kaplan O ,Diamente M *et al.* Reprogramming cattle somatic cells by isolated nuclear injection. *Reprod Fertil Dev* , 1998 **10** :645 - 650
- [3] Wilmut I ,Schnieke AE ,Mewhir J *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* ,1997 **385** :810 - 813
- [4] Wakayama T ,Perry A C F ,Zuccotti M *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* ,1998 **394** :369 - 374
- [5] Kato Y ,Tani T ,Sotomaru Y *et al.* Eight clones cloned from somatic cells of a single adult. *Science* ,1998 **282** :2095 - 2098
- [6] Wells D N ,Misica P M ,Tervit H R. Production of cloned calves following nuclear with cultured adult mural granulosa cell. *Biol Reprod* , 1999 **60** (4) :996 - 1005
- [7] Kono T. Influence of epigenetic changes during oocyte growth on nuclear reprogramming after nuclear transfer. *Reprod Fertil Dev* ,1998 , **10** :593 - 598
- [8] LI W (李文雍) ,YU W (郁卫东) ,CHEN Q (陈清轩) . Epigenetic modification and its impact on animal cloning. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) 2002 , **18** (6) :9 - 12
- [9] YU W (郁卫东) ,YANG L (杨立新) ,CHEN Q (陈清轩) *et al.* Establishment of single preimplantation embryos differential display polymerase chain reaction. *Progress in Biochemistry and Biophysics* (生物化学和生物物理进展) ,2003 (under revision)
- [10] Shimono A ,Behringer R. Differential screens with subtracted PCR-generated cDNA libraries from subregions of single mouse embryos. *Methods Mol Biol* 2000 **136** :333 - 344
- [11] Liang P ,Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* , 1992 , **257** (5072) :967 - 971
- [12] Robert Claude ,James Frank L ,Hue Isabelle *et al.* Subtractive hy-

- bovine oocyte. *Mol Reprod Dev*, 2000 **57** :167 – 175
- [13] Atale David R ,Kidder Gerald M ,Westhusin Mark E *et al.* Assessment by differential display-RT-PCR of mRNA transitions and- α -amanitin sensitivity during bovine perattachment development. *Mol Reprod Dev* 2000 , **55** : 152 – 163
- [14] Adjays J , Daniel R , Bolton V *et al.* cDNA libraries from single human preimplantation embryos. *GENOMICS* ,1997 **46** 337 – 344
- [15] Henrign G , Renard J P , Chesne P *et al.* Differential regulation of the translation and the stability of two maternal transcripts in preimplantation rabbit embryos. *Mol Reprod Dev* 2000 **56** :12 – 25
- [16] James W , Zimmermann U , Schultz R M. Analysis of gene expression in the preimplantation mouse embryo : Use of mRNA differential display. *Dev Biol* ,1994 **91** :5456 – 5460
- [17] Naojiro M , Kana S , Akira A *et al.* Analysis of gene expression in mouse 2-cell embryos using fluorescein differential display : comparison of culture environments. *Biol Rep* , 2001 **64** 30 – 35
- [18] Ma J , Svoboda P , Schultz R M , Stein P. Regulation of zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo : global activation and repression of gene expression. *Biol Rep* , 2001 **64** :1713 – 1721
- [19] Adjays J , Daniel R , Monk M. The construction of cDNA libraries from human single preimplantation embryos and their use in the study of gene expression during development. *J Assisted Reproduction and Genetics* ,1998 **15** (5) 344 – 348
- [20] Capco D G. Cytoskeletal mechanisms during animal development. *Current Topics in Development Biology* , 1995 , **31** 307 – 309
- [21] Liang P ,Pardee A B. Differential display methods and protocols , differential screening of differential display cDNA products by reverse Northern. New Jersey :Humana Press , 1992
- [22] Brady G , Billia F , Knox J *et al.* Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cell. *Current Biology* ,1995 **5** 909 – 922

Isolation and Identification of Reprogramming Genes Related to the Development of the Rabbit Reconstructed Embryos

YU Wei-Dong LI Wen-Yong WANG Yu-Ge YANG Li-Xin LIU Gui-Sheng DU Miao CHEN Qing-Xuan*

(*Institute of Genetics and Developmental Biology , Chinese Academy of Sciences ; Graduated School of Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China*)

Abstract By the method of single preimplantation embryos differential display polymerase chain reaction (SPEDDRT-PCR) 25 reprogramming cDNA fragments were obtained from single 2-cell 8-cell embryos and blastula . After cloning and sequencing , five of them were identified by reverse-Northern and characterized with stage-specific expression during reconstructed embryo development . This results will help to isolate full length reprogramming genes and study their function during embryonic development .

Key words cloning , preimplantation embryos , single embryos mRNA differential display , reprogramming

Received : 07-24-2002

This work was supported by a grant from the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No. 2000016107) .

* Corresponding author. Tel 86-10-62553160 ; Fax 86-10-62551951 ; E-mail : Qingxuanchen@yahoo.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>