

兔胚胎时期特异性基因相关新片段的克隆

齐冰 常正尧 李效良 李永芳 陈清轩 李文雍*

(泰山医学院生物科学系 泰安 271016; 中国科学院遗传与发育生物学研究所 北京 100101;
阜阳师范学院生命科学院 安徽 阜阳 236041)

摘要:阶段特异性基因的表达是早期胚胎发育过程中的重要事件,对植入前胚胎基因表达模式的研究是进一步研究植入前胚胎发育调控机制的前提。本实验利用 mRNA 差异显示技术来研究兔 (*Oryctolagus cuniculus domestica*) 植入前各期胚胎的基因表达差异。在获得的 42 个阳性阶段特异性表达的基因中,有 5 个在 NCBI 和 EMBL 数据库中没有同源序列,登录 EMBL,申请了登录号。这些新基因片段都是桑葚期特异表达的基因,而且在以后的囊胚期也有表达。兔由母源型调控向合子型调控的过渡是在 8~16 细胞期开始的,在桑葚期开始表达的这些基因片段应该是兔胚胎时期特异性基因。这些基因的克隆将为进一步研究兔的植入前胚胎发育模式奠定基础。

关键词:兔; mRNA 差异显示技术; 桑葚胚; 合子型基因

中图分类号: Q132 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)04-41-06

Cloning of Stage-specific Gene Fragments in Rabbit Embryos

QI Bing CHANG Zheng-Yao LI Xiao-Liang LI Yong-Fang
CHEN Qing-Xuan LI Weir-Yong*

(Department of Biological Sciences, Taishan Medical University, Taian, Shandong 271016;
Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101;
Department of Biology, Fuyang Normal College, Fuyang, Anhui 236041, China)

Abstract: Proper expression of stage-specific genes is very important for early embryo development. The mRNA differential display was used to study the stage-specific genes in rabbit preimplantation embryos. A total of 42 positive differential fragments were obtained, of which 5 fragments had no homolog in the NCBI and EMBL. These fragments were submitted to the EMBL and accession numbers were given. All these 5 genes were specifically expressed in morula stage. Maternal-to-zygotic transition of rabbit starts from 8 - 16 cell stage, and therefore, these genes should be embryo-specific. This research would lay a foundation for further investigating the transcriptional modulation of rabbit preimplantation embryo development.

Key words: Rabbit (*Oryctolagus cuniculus domestica*); mRNA differential display; Morula stage embryo; Zygotic gene

阶段特异性基因表达是早期胚胎发育过程中的重要事件。有实验表明,转录要求复合体(transcription-requiring complex, TRC)的合成在小鼠(*Mus musculus domesticus*) 2-细胞胚胎阶段大量增加,超过胚胎蛋白质合成量的 4%。而

基金项目 泰山医学院博士科研启动基金项目,国家自然科学基金项目(No. 30871415);

* 通讯作者, E-mail: liwyfyu@yahoo.com.cn;

第一作者介绍 齐冰,女,博士,副教授;研究方向:哺乳动物胚胎发育; E-mail: qbczy@yahoo.com.cn.

收稿日期:2008-12-18,修回日期:2009-05-19

在卵母细胞、卵子和受精卵中却不表达,同时在 4-细胞胚胎阶段停止表达^[1]。Rnf35 (RING finger) 在小鼠早期胚胎中表达,但是在囊胚前期沉默^[2]。通过对小鼠囊胚内细胞团和外细胞团发育过程与基因表达模式的研究,认为差异基因的表达控制了内、外细胞团的分化^[3]。通过抑制植入前胚胎阶段特异性基因的表达,能够完全阻止胚胎的发育,说明在植入前胚胎的特定阶段,特异基因的表达是胚胎发育过程中的一种重要的调控机制^[4]。

对有性生殖的动物而言,胚胎发育的第一阶段基本上属于母源型调控,即由卵母细胞发生期间合成的大量蛋白质和 mRNA 调控。母型 mRNAs 逐步消耗,需要合子型基因的适时表达并完全取而代之,实现母型向合子型调控的过渡。小鼠是在 2-细胞期开始母源型调控向合子型调控的过渡^[5],而兔 (*Oryctolagus cuniculus domestica*) 却是在 8~16 细胞期开始的^[6]。合子基因组活化是胚胎发育的重要事件,为了弄清兔的胚胎发育模式,我们利用 mRNA 差异显示方法,来研究兔植入前胚胎发育的过程。

1992 年 Liang 等建立的 mRNA 差异显示方法,在生物医学等诸多领域得到了广泛的应用,发现了许多新的差别表达基因^[7]。1994 年首先利用 DDRT-PCR 对小鼠早期植入前胚胎的基因表达进行了研究^[8],之后相关的文献逐渐增多,技术上也取得了一定的进展^[9~15]。本实验利用 mRNA 差异显示技术来研究兔植入前胚胎发育,以期获得阶段特异性表达的基因,为阐明兔的早期胚胎发育模式打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料 6~8 月龄的雌性家兔,由泰山医学院实验动物中心提供。DH5 菌,用于质粒的扩增与转化。pGEM-T 用于 PCR 产物的克隆,购自 Promega 公司;Taq DNA 聚合酶购买自 Promega 公司;Superscript 为 GIBCO BRL 产品。RNeasy Mini Kit for the Isolation of RNA 购自 Qigen 公司;SuperScrip™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒购自 GIBCO 公司。实

验中所用的其他试剂还包括 FSH(宁波激素制品有限公司),hCG(上海第一生化药业公司);透明质酸酶(Sigma 公司),Glycogen (Roche 公司);Primer RNase 抑制剂(Eppendorf),DNase Gbco/BRL),RNA Guard (Amersham Pharmacia Biotech),Oligo (dT)-18(MBI Fermentas)。[⁻³²P] dATP(比活性 3 000 Ci/mmol) 购自北京亚辉公司。其他试剂均为国产分析纯产品。3 引物 HT(15) G 和 5 引物 HAPI (5'-AAGCTTGATTGCC-3') 由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 各期植入前胚胎的获得 选择健壮、性成熟、处于发情间期的 6~8 月龄的雌性家兔,分 6 次肌肉注射 FSH(垂体促滤泡素),每次 5 IU,间隔 12 h,最后一次注射 FSH 12 h 后,静脉注射 100 IU 的 hCG(人绒毛膜促性腺激素)。注射 hCG 13 h 后,经外科手术,用 PBS 冲洗输卵管,以收集处于 M 期的卵母细胞。加入透明质酸酶(300 IU/ml)并附以机械处理去除卵母细胞周围的颗粒细胞,PBS 洗 3 次备用。将正常的雄兔与注射 hCG 的雌兔立即交配,使之受孕。受孕 13 h 后即可获得 1-细胞期胚胎(受精卵)。交配后 24 h 取 2-细胞期胚胎,交配后 40 h 取 4-细胞期胚胎,交配后 54 h 取 8~16 细胞期胚胎,交配后 82 h 取桑葚期胚胎,而在交配后 94 h 取囊胚期胚胎。

1.2.2 mRNA 差异显示(DDRT-PCR)

1.2.2.1 总 RNA 的提取 将获得的不同时期的植入前胚胎(5 枚)放入 PBS 中,4 12 000 r/min 离心 30 min,将胚胎沉淀在管底,弃去上清;加入 600 μl RLT buffer,涡旋振荡 2 min,使胚胎细胞离散。加入等体积的无水乙醇,吸打混匀后上柱,离心后弃去流液;加入 600 μl RW1,离心后弃去流液;换一新的收集管,加入 500 μl RPE,离心后弃去流液;重复上述步骤一次;加入 30 μl 无 DNase-RNase 的水,静置 5 min 后离心,重复一次。

1.2.2.2 总 RNA 样品去除 DNA 污染 向收集的总 RNA 中加入 DNase 后,37 温浴 30 min,酚/氯仿、氯仿分别抽提后加入 2 倍体积的无水

乙醇, 3 mol/L 醋酸钠 - 20 ℃ 沉淀过夜, 70 % 乙醇洗 2 次, 将沉淀重悬于 20 μl 无 DNase-RNase 的水中。

1.2.2.3 反转录 在上述 20 μl RNA 中, 加入 2 μl 10 mmol/L 的 Oligo (dT)-18, 70 ℃ 变性 5 min, 冰上 2 min。依次加入 5 × first buffer 10 μl, RNA Guard 1 μl, Primer RNase 抑制剂 1 μl, 0.1 mol/L DTT 2 μl, 10 mmol/L dNTP 2 μl, Superscript 1 μl, 加水至终体积 50 μl。混匀后, 42 ℃ 逆转录 1.5 h。70 ℃ 5 min 以灭活逆转录酶。

1.2.2.4 放射性同位素 PCR 标记 5 μl 逆转录产物用于 PCR, 反应体系为 20 μl, 包括 10 × PCR 缓冲液 2 μl, 2 μl 25 mmol/L MgCl₂, 2 μl 25 μmol/L HT(15) G, 2 μl 25 μmol/L HAPI, 0.5 μl [³²P]dATP, 1 μl 1 μmol/L dNTPs, 0.5 μl Taq DNA 聚合酶, 加入无 RNase-DNase 水至 20 μl。进行 PCR 反应: 94 ℃ 变性 10 min, 40 ℃ 退火 5 min, 72 ℃ 延伸 5 min; 94 ℃ × 30 s, 40 ℃ × 2 min, 72 ℃ × 1.5 min, 共 39 个循环; 最后一个循环, 72 ℃ × 5 min。设置 PCR 空白对照。PCR 产物用含 8 mol/L 尿素的 6 % 聚丙烯酰胺凝胶(尿素 33.6 g, 40 % 聚丙烯酰胺 8 ml, 10 × TBE 8 ml, 加水 32 ml 溶解后, 定容至 80 ml, 制胶前加入 350 μl 10 % 的 APS 和 35 μl TEMED)电泳 4 ~ 5 h, 恒功率 40 W。取胶, - 20 ℃ 压 X 光片, 放射自显影 2 ~ 3 d。

1.2.2.5 差别条带的回收及再扩增 研究比对 X 光胶片, 标出差异条带, 根据所作标记从胶上小心切下差别条带, 转入 100 μl 去离子水中, 于室温下放置 10 min, 100 ℃ 沸水煮 15 min, 1 700 g 离心 2 min, 上清移到新的管中, 加入 8 μl 醋酸钠 (3 mol/L)、300 μl 无水乙醇与 2.5 μl 糖原 (20 mg/ml), - 20 ℃ 共沉淀过夜, 离心、洗涤、干燥, 溶于 10 μl DEPC 处理水中备用。在 50 μl 反应体系中(按 1.2.2.4 反应体系的浓度, 但不加 [³²P]dATP, 不同差异条带的回收产物扩增引物都用 HT(15) G 和 HAPI), 进行 PCR: 94 ℃ 10 min; 94 ℃ 1 min, 40 ℃ 90 s, 72 ℃ 90 s, 20 个循环; 72 ℃ 10 min; 94 ℃ 10 min; 94 ℃ 1 min, 42 ℃ 90 s, 72 ℃ 90 s, 20 个循环; 72 ℃ 10 min。

1.5 % 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.2.2.6 亚克隆及序列分析 按操作手册将上述 PCR 产物进行纯化, 连接到 pGEM-T 载体上, 反应体系 10 μl (1 × T4 DNA 连接缓冲液, pGEM-T 50 ng, PCR 产物 3 μl, T4 DNA 连接酶 30 U), 轻轻混匀, 4 ℃ 连接过夜。常规方法 (CaCl₂ 法) 制备新鲜的感受态大肠杆菌 JM109, 取 200 μl 感受态 JM109 于 1.5 ml EP 管中, 加入 3 μl 连接产物, 轻旋混匀, 冰浴 30 min, 42 ℃ 热激转化 90 s, 快速将离心管移到冰上 2 min, 加入 800 μl LB 液体培养基 (不含氨苄青霉素), 37 ℃ 震荡培养 1 h, 使 JM109 复苏并表达质粒编码的抗生素标记。取 200 μl 上述转化菌与 4 μl 的 IPTG (200 mg/ml)、16 μl 的 X-gal (50 mg/ml) 混匀, 涂布于含有氨苄青霉素 (100 μg/ml) 的 LB 平板上, 37 ℃ 培养过夜。重组质粒进行蓝、白斑筛选, 随机挑取一个白色单克隆接种到 3 ml 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 ℃ 振荡培养过夜, 提取质粒并用与上述相同的引物和参数进行 PCR, 检测插入片段, 将条带单一且大小与前面相同的送去测序。

1.2.3 序列比对及新片段的提交 将克隆得到的阳性片段进行 NCBI 比对, 将同源性很低的新片段提交 EMBL。

2 结 果

2.1 植入前各期差异显示条带 利用一对锚定引物对兔植入前各期胚胎进行 mRNA 差异显示分析, 结果如图 1 所示。1 和 2 两个阴性对照的泳道都没有条带, 表明反应体系中的各种试剂没有污染, 没有基因组 DNA 的污染。在各期比较中发现: 各期均有特异性表达的条带, 但多数集中在 8 ~ 16 细胞期及桑葚胚。

2.2 差异显示片段回收后测序 对胚胎各期表达量有显著差异的片段以及胚胎各期特异性表达的片段进行回收和再扩增, 图 2 所示为部分再扩增片段的 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳结果, 条带较清晰。

2.3 差异表达片段 GenBank 检索结果 对成功亚克隆的 60 个片段进行测序分析。挑选两

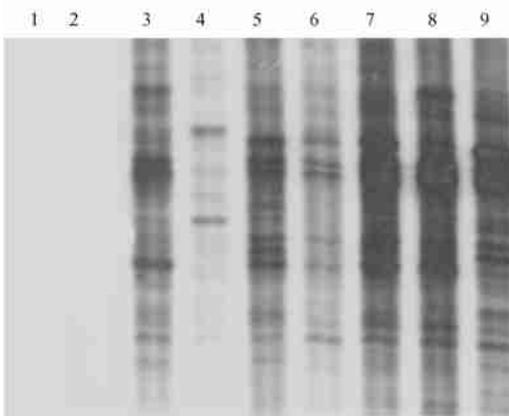


图1 兔植入前胚胎 mRNA 差异显示结果

Fig. 1 mRNA differential display of rabbit preimplantation embryos

1. 阴性对照 (转录模板为水); 2. 阴性对照 (不加逆转录酶); 3. M 卵母细胞; 4. 1-细胞期胚胎; 5. 2-细胞期胚胎; 6. 4-细胞期胚胎; 7. 8~16 细胞期胚胎; 8. 桑葚期胚胎; 9. 囊胚期胚胎。

1. Negative control (transcription template is water); 2. Negative control (without reverse transcriptase); 3. M oocyte; 4. 1-cell embryo; 5. 2-cell embryo; 6. 4-cell embryo; 7. 8 - 16 cell embryo; 8. Morula; 9. Blastocyst.

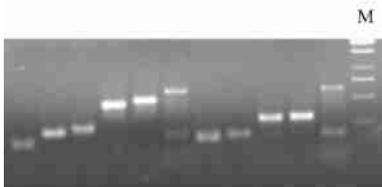


图2 差异条带的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose electrophoresis of differential fragments

M. DL2000 DNA 分子量标准;其余的为亚克隆的片段。

M. DL 2000 DNA marker; Others are sub-cloned fragments.

端引物 HT(15) G和 HAP1 都有且片段大小与琼脂糖凝胶电泳检测的片段大小相符的 42 个阳性片段进行 GenBank 数据库同源性检索,用 BLAST 进行 nr 和 EST 检索。其中有 5 个片段在 nr 和 EST 数据库中都没有同源性的基因,将其称之为新基因片段。将这些新片段提交 GenBank 获得登录号 (表 1)。这 5 个基因在桑葚胚之前的时期没有表达,在桑葚胚开始表达,

并且在囊胚中也有表达。获得的 5 个差异表达新基因片段的 EST 序列见图 3。

表 1 新基因片段及登录号

Table 1 Accession number of new fragments

克隆号 Clone number	片段大小(bp) Size of fragments	登录号 Accession number
S-1	384	AJ616738
S-2	384	AJ616739
S-3	324	AJ616740
S-4	312	AJ616856
S-5	106	AJ616857

3 讨论

哺乳动物胚胎发育开始于雌雄配子的融合。受精卵也就是合子产生后的发育,包括以下 3 阶段:第一阶段为细胞分裂,由单个受精卵逐步发育分裂成多细胞;第二阶段为细胞运动、三胚层形成;第三阶段为组织与器官的形成。哺乳动物植入前的胚胎发育涉及到前两个阶段。第一阶段主要由母源型基因调控,随着母源型转录本的消耗,取而代之的是新转录本的合成^[16]。新转录本包括两类 mRNA,一类等同于母源型转录本的合子型 mRNA,另一类为胚胎基因组新表达而在卵母细胞中并不存在的 mRNA。

不同动物由母源型调控向合子型调控过渡的时间不一样。模式动物小鼠是在 2-细胞期,而兔是在 8-细胞期。归根结底,哺乳动物植入前胚胎发育的模式就是基因在时间和空间上程序化差异表达的过程。本研究在常规 mRNA 差异显示方法的基础上,进行了方法改良,成功获得了 42 个胚胎时期特异性表达的阳性片段。其中有 5 个基因片段在 nr 和 EMBL 中同源性都很低,因而进行了新基因片段的提交并获得了登录号。这 5 个新的基因片段,在桑葚胚以前的各期没有表达,因而推测这些基因片段是合子型基因,调控着兔植入前胚胎发育的进程。由于 mRNA 差异显示技术所获得的片段比较小,并且位于基因的 3' 端,要想彻底弄清这些新片段,必须要克隆得到这些片段的基因全长序

AJ616738

TTCCCTTTTTTTTTTTTTTTACTTAAACATTTTTATGAGGATTTAGATGGAATTTTTTTGTGTCAGTTAATGTTGGT
TCCAGAGCTTCAGACTGTTGAGATCTGCTTTATAACAGTCACTGTAATAACCCTTGGAGATGGGGTGGGGG
GTGGCTCAGTTTAGTTACATCCTCAAGGCAAACCTCTTAGTGGAAAATAAATGTTCTTTAGTTATATTTTTCTC
TGAGTGATGGTGTGTTGTTGGTCTCTGAACATTTAATTTGCTTGCAAAGTGTCAGTTTCAAACCAATAGGC
TACTACACAGAGAATTTGAAGAAAATTTGTATATGTGTGGATATGCCTTTGCGGTGGTTTATATAAAGCTAAT
AAACTTCTACTTCATTTTTG

AJ616739:

TACTTACACCAATTTTTTTCTTTTTATCGCTAAAATATGGCACGGCAAGGTTCTTTTGATAAGTTCATCGG
CAATATTTAATCCGCCAACTTGAACAATTGCTAAGATTCTCCGCCAAATTTATCCCATTTTTTACATCAAG
CATTATTTCTCTTTTTCCAACATAAATTTGTTGTAAATTCAGTTGCAAGATTGCAAGTCATTTTCTTTTTTAC
ATTTAGCTTTTGAGCCTTTCTCTGGAGTATCGACACCATAAATCCTTACACTCAGCCCTAATCTTTAAGTAA
TGAGCCGTCTTTTGATGTATCAAGTTAATAGTGTGCCATCAGTAATTTTTTCCACTTTATAAACATAAAGG
TTTTTGGCTTCGACATTG

AJ616740:

CATTA AAAATATAAAATAGCTGCCAGTGCCCTCTTTTTGTTCTTCATAATGATTTATACATAACTCAATTCCA
TTGATATGTGTGTATGAATTTCTATATGATTGTGTTACTGAAAATGGGAAGGAATAGAGAAAAAATAA
AAAATGAAAATAAGAGAATATGCGCTGTCTTAAAGAAAAGAGATACAAAACGGGCAAGGAAGCAGG
CCTGAGCCACGAAGCTGGTTGGCTATGGAGCCCATGTTCCAGGCCACAAGTGCATCCAGCACCCAAAAT
GTCCTGTTAAGGATTTCTCCTTAGGAAGCAAAGTTG

AJ616856:

TGTATGGTGATAAATCTCAAACCTGACTTGAAGTTAGGTACATCCATCTGGCTCATACAAATAGAATATATAC
TTTTTGGTAATGGAGGTGGGCATAGATTCTACTTGTATGTCAGAATTTGATAGCTTAAACCTTGAAGCAAATAG
ACATTTGAAAGCTTTTATAAAAATTTGAGGCCTTTAGGAGTTTCTTTGAGTCCATATTATGGGCCAGTTGACA
AAATTAATAACTATATGGTTACTGTACTATGGTCTGTACTCTTTATAAAAATGTTTAGAGGGATTAAGTCCCAG
AATAAAAATGCGGCTTGTTT

AJ616857:

AATTTAGTTTAATACTTGGTTATTTTACACAATTACACCTTATTTATTATAATAAACACATCATTAAATGATAAAC
AGTTGATAAATAAAGATACATGGATTTGTAC

图 3 新基因片段的 EST 序列

Fig. 3 EST sequence of new fragments

列。因而下一步的工作将是克隆这些新片段的全长 cDNA 序列,以期进一步揭示兔植入前胚胎发育的过程。

参 考 文 献

- [1] Davis WJ ,De Sousa P A ,Schultz R M. Transient expression of translation initiation factor eIF-4C during the 2-cell stage of the preimplantation mouse embryo: identification by mRNA differential display and the role of DNA replication in zygotic gene activation. *Dev Bio* ,1996 ,**174**(2) :190 ~ 201.
- [2] Huang C J ,Wu S C ,Choo K B. Transcriptional modulation of the pre-implantation embryo-specific Rnf35 gene by the Y-box

protein NF- Υ /CBF. *Biochem J* ,2005 ,**387**(2) :367 ~ 375.

- [3] Plusa B ,Pliszek A ,Frankenberg S , *et al*. Distinct sequential cell behaviors direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* , 2008 , **135**(18) : 3 081 ~ 3 091.
- [4] Sun F ,Fang H ,Li R , *et al*. Nuclear reprogramming: the zygotic transcription program is established through an "erase-and-rebuild" strategy. *Cell Res* ,2007 ,**17**(2) :117 ~ 134.
- [5] Flach G ,Johnson M H ,Braude PR , *et al*. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J* ,1982 ,**1**(6) :681 ~ 686.
- [6] Brunet-Simon A ,Henrion G ,Renard J P , *et al*. Onset of zygotic transcription and maternal transcript legacy in the

- rabbit embryo. *Mol Reprod Dev*, 2001, **58**(2): 127 ~ 136.
- [7] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257**(14): 967 ~ 971.
- [8] Zimmermann J W, Schultz R M. Analysis of gene expression in the preimplantation mouse embryo: use of mRNA differential display. *PNAS*, 1994, **91**(12): 5 456 ~ 5 460.
- [9] Henrion G, Renard J P, Chesn é 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.
- [10] Ma J, Svoboda P, Schultz R M, *et al.* Regulation of zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo: global activation and repression of gene expression. *Biol Rep*, 2001, **64**: 1 713 ~ 1 721.
- [11] Minami N, Sasaki K, Aizawa 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.
- [12] Natale D R, Kidder G M, Westhusin M E, *et al.* Assessment by differential display-RT-PCR of mRNA transitions and amanitin sensitivity during bovine perattachment development. *Mol Reprod Dev*, 2000, **55**: 152 ~ 163.
- [13] Robert C, Barnes F L, Hue I, *et al.* Subtractive hybridization used to identify mRNA associated with the maturation of bovine oocyte. *Mol Reprod Dev*, 2000, **57**: 167 ~ 175.
- [14] 郁卫东, 杨立新, 李文雍等. 单个植入前胚胎 mRNA 差异显示方法的建立. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30**(2): 143 ~ 148.
- [15] 李文雍, 齐冰, 王玉阁等. 兔植入前移核胚中发育相关基因的差异表达分析. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30**(5): 813 ~ 818.
- [16] Telford N A, Watson J, Schultz G A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev*, 1990, **26**: 90 ~ 100.