

筛选代表小鼠植入前胚胎 紧密化相关基因的 EST

李 汶, 卢光琇

(中南大学生殖与干细胞工程研究所, 长沙 410078)

摘要: 分别收集 181 及 241 枚昆明白小鼠 8 细胞早期胚胎及 8 细胞紧密化胚胎, 采用 SMART PCR 方法直接合成胚胎双链 cDNA。进而运用抑制消减杂交技术 (SSH) 对 8 细胞早期胚胎及 8 细胞紧密化胚胎的基因表达进行研究, 并将所获得的差异表达产物按片段大小分段分离纯化后克隆入 pUCm-T 载体中, 经 PCR 鉴定后挑选阳性克隆进行测序, 筛选出 27 个代表 8 细胞早期胚胎和紧密化 8 细胞胚胎差别表达基因的 cDNA 片段; 经与 GenBank 中收录的序列进行同源性匹配分析, 证实其中 17 个 cDNA 片段为新的 EST, 提交 GenBank 后被接受并给予了新序列编号。这 17 个片段均可能为与紧密化密切相关的新基因的表达片段, 为今后进一步克隆新的紧密化相关基因的全长 cDNA 及后续新基因的结构和功能研究打下基础。通过采用不同长度大小片段分别克隆的方法, 可获得较长片段的 EST, 避免差异表达大片段的丢失。

关键词: 植入前; 紧密化; 抑制消减杂交; 差异表达; 小鼠

中图分类号: Q343

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2004)02-0177-04

Identification of ESTs of Genes Related to Compaction in Preimplantation Embryos of Mouse

LI Wen, LU Guang-Xiu

(Institute of Reproductive and Stem Cell Engineering of Central-South University, Changsha 410078, China)

Abstract: A total of 181 8-cell embryos and 241 8-cell compacted embryos were collected respectively from Kunmingbai mouse and their cDNA was synthesized directly using SMART PCR. Genes, which expressed differently between early 8-cell embryos and 8-cell compacted embryos, were investigated using the method of suppression subtractive hybridization (SSH). Then PCR production was cloned into pUCm-T vector respectively according to the size after isolated and purified. Twenty-seven ESTs (expressed sequence tags) of genes expressed differently between early 8-cell embryos and 8-cell compacted embryos have been isolated and cloned, seventeen of those were novel ESTs after being confirmed by blaster matching in GenBank for homology analysis. And they were banked into GenBank with accession numbers. All 17 ESTs might be for novel genes related to compaction in compacted embryos. And longer ESTs may be obtained by cloning according to the size.

Key words: preimplantation embryo; compaction; suppression subtractive hybridization; differential expression; mouse

收稿日期: 2003-07-21; 修回日期: 2004-01-05

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (973 计划) 资助项目 (No. G1999055901) [Supported by National key Programming Project of Research and Development (973 project) (No. G1999055901)]

作者简介: 李 汶 (1968-), 女, 助理研究员, 博士研究生, 专业方向: 生殖遗传学。Tel: 0731-4805300, E-mail: wenshui14@sina.com

通讯作者: 卢光琇 (1939-), 女, 研究员, 博士生导师, 专业方向: 生殖遗传学。Tel: 86-731-4805319, Fax: 86-731-4497661,

E-mail: lgxdirector@sina.com

差别基因表达(differential gene expression)是哺乳动物胚胎发育过程中细胞分化的分子基础。在哺乳动物精卵结合形成合子至植入前的发育阶段,发生的形态变化事件有原核形成、8 细胞期胚胎紧密化和囊胚的形成。卵裂球的分化开始于紧密化的发生。目前,对紧密化现象的分子基础还知之不多,大多数研究都集中在翻译后水平的调控,而在基因水平的研究较少^[1]。

本研究旨在运用 SMART PCR 方法分别从适量的 8 细胞早期胚胎和紧密化 8 细胞胚胎合成并扩增双链 cDNA;运用抑制消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)分离、克隆和筛选代表 8 细胞早期胚胎和紧密化 8 细胞胚胎差别表达基因的 EST;并通过生物信息学方法对这些 EST 进行同源比较分析,阐明所获 EST 的生物学功能。为进一步克隆新的紧密化相关基因的全长 cDNA 打下基础。

1 材料和方法

1.1 试剂

Taq 酶、dNTP、琼脂糖等常用生化试剂购自 Sangon;胚胎体外操作培养液:Quinn's Advantage Cleavage Medium (SAGE BioPharma);RNAlater RNA Stabilization Reagent (QIAGEN);裂解液:0.8% Igepal (Sigma, UK),1 IU/ μL of RNase inhibitor (Gibco BRL, UK),5 mmol/L DTT (Gibco BRL, UK),配方参见参考文献[2];SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit (CLONTECH);Advantage[®] 2 PCR Kit (CLONTECH);PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit (CLONTECH)。

1.2 采集小鼠胚胎

按本室常规方法^[3,4],超排、收集 200 枚左右昆明白小鼠 8 细胞早期胚胎及 8 细胞紧密化胚胎(图 1),分别进行如下处理:

用 1~2mL PBS 溶液洗涤 3 次,去掉残余的颗粒细胞;将胚胎移至 DEPC 处理的 200 μL 薄壁管,去掉绝大部分 PBS 溶液,只留约 1 μL PBS。加入 3~6 μL RNAlater 处理 3~5min,去掉绝大部分 RNAlater;加入 3~6 μL 酸性 Tyrode 液(pH2.0~2.4),在体视镜下观察消化透明带。透明带刚被消化时,迅速去掉酸性 Tyrode 液,用 3~6 μL PBS 溶液洗涤两次;去掉绝大部分 PBS 溶液,只留约 1 μL

PBS,加入 3~6 μL 裂解液,12000g 稍许离心,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

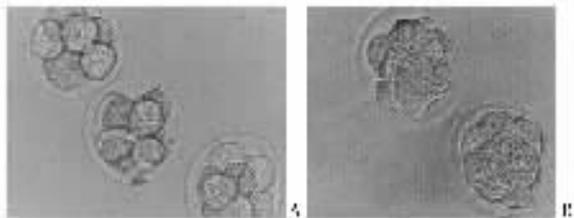


图 1 收集的用于研究的胚胎

A:8 细胞胚胎;B:紧密化胚胎。

Fig. 1 Embryos collected for study

A:8-cell embryos; B:compacted embryos(400 \times).

1.3 小鼠胚胎 ds cDNA 合成

从-20 $^{\circ}\text{C}$ 取出标本,65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5min 裂解细胞,释放 RNA,12000g 稍许离心收集标本裂解液于管底;取 3~6 μL 上清液移入新的 DEPC 处理的 200 μL 薄壁管,据 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit 操作说明稍作修改,合成 cDNA 第一链和第二链。

1.4 SSH 差异筛选

采用 CLONTECH 公司的 PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit,原理详见文献[4],操作参照说明书及本室实验基础^[5]进行,简述如下:

将 8 细胞紧密化胚胎的 cDNA(Tester)分为 2 管,分别与试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸衔接头 1 和衔接头 2R,然后分别与过量的 8 细胞胚胎的 cDNA(Driver)杂交,合并两种杂交产物后再与过量的 8 细胞胚胎的 cDNA(Driver)进行第 2 轮杂交。然后将杂交产物进行选择 PCR,使 Tester cDNA 中特异表达或高表达的片段得到扩增。

1.5 差异筛选片段的克隆和测序

为避免因不同长度片段的连接克隆效率不同而丢失大片段,故采取不同长度大小片段分别克隆的方法。将 8 细胞紧密化胚胎中特异表达或高表达的片段扩增产物经 PAGE 电泳分离,将不同大小段的产物回收纯化,分别进行连接反应连接至 pUCm-T 载体中,转化 JM105 细菌,进行克隆化和阳性克隆的筛选。提取重组质粒 DNA,在 PE 公司的 Model 377 自动测序仪上进行测序,测序引物为 T7 和 M13R 或 M13F。

1.6 对测序片段进行生物信息学分析

测序结果通过互联网使用 NCBI(National

Center for Biotechnology Information)提供的在线 BLAST 软件与 GenBank 中收录的序列进行同源性匹配分析。

2 结 果

2.1 小鼠胚胎 ds cDNA 合成

成功地分别直接从 181 枚昆明白小鼠 8 细胞早期胚胎和 241 枚昆明白小鼠 8 细胞紧密化胚胎裂解液中经 SMART PCR 合成其 ds cDNA (图 2)。

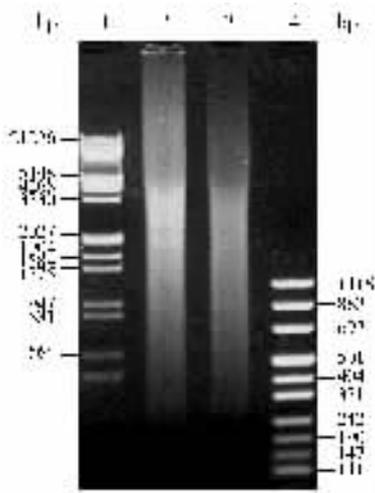


图 2 用 SMART-PCR 方法合成胚胎双链 cDNA

- 1: Lamda DNA/EcoR I + Hind III 核酸分子标记;
- 2: 8 细胞胚胎的双链 cDNA; 3: 紧密化双链 cDNA;
- 4: pUC mix 8 核酸分子标记。

Fig. 2 Results of ds cDNA synthesis of embryos by SMART PCR

- 1: Lamda DNA/EcoRI+HindIII marker;
- 2: cDNA of 8-cell embryos;
- 3: cDNA of compacted embryos; 4: pUC mix marker.

2.2 SSH 的结果

如图 3 所示,经抑制消减杂交后第一轮 PCR 扩增产物很少,且比抑制消减杂交前少;经巢式 PCR 进行第 2 轮扩增后可见 200~1 000bp 之间的较明显的 PCR 产物,而且带型与抑制消减杂交前明显不同。

2.3 克隆及序列分析

杂交后 PCR 产物经片段大小分段纯化、克隆后,随机挑选 108 个白色菌落经 PCR 鉴定(图 4),挑选与分段纯化的片段大小相符、插入片段大小不同的阳性克隆 27 个,进行测序分析。经序列间的两两比较和与 GenBank 中收录的序列进行同源性匹配分析,共获 17 个不同的 cDNA 序列。将所获的 17 个序列以 EST 形式提交 GenBank,已被接受并给 予 新 序 列 编 号: BQ740249, BQ740250,

BQ740251, BQ740252, BQ740253, BQ740254, BQ740255, BQ740256, BQ740257, BQ740258, BQ740259, BQ740260, BQ740261, BQ740262, BQ740263, BQ740264, BQ740265。

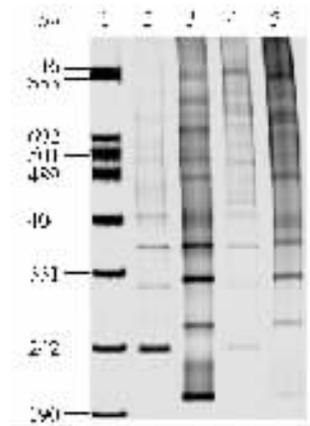


图 3 消减杂交前后 PCR 产物的电泳结果

- 1: pUC mix 8 核酸分子标记; 2: 杂交后的初级 PCR 产物;
- 3: 杂交后的次级 PCR 产物; 4: 杂交前的初级 PCR 产物;
- 5: 杂交前的次级 PCR 产物。

Fig. 3 Electrophoresis of PCR products before and after subtractive hybridization

- 1: pUC mix marker; 2: primary PCR products after hybridization;
- 3: nested PCR products after hybridization;
- 4: primary PCR products before hybridization;
- 5: nested PCR products before hybridization.

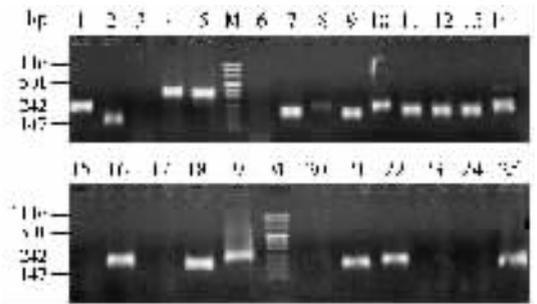


图 4 部分白色菌落的 PCR 鉴定; M pUC mix8 核酸分子标记

- 1, 2, 4, 5, 7, 9~14, 16, 18, 19, 21, 22, 25: 部分阳性克隆的 PCR 产物;
- 3, 6, 8, 15, 17, 20, 23, 24: 阴性克隆。

Fig. 4 PCR identification of partial white clones

- M: pUC mix marker; 1, 2, 4, 5, 7, 9~14, 16, 18, 19, 21, 22, 25:
- PCR results of partial positive clones;
- 3, 6, 8, 15, 17, 20, 23, 24: negative clones.

3 讨 论

研究表明,在小鼠植入前胚胎的发育过程中,一直到 8 细胞胚胎早期,每个卵裂球仍是全能性的

(totipotent), 具有分化形成各种类型的组织乃至发育成正常个体的潜能; 各个卵裂球仍是独立的, 能在体视镜下清晰分辨(图 1A)。随着 8 细胞胚胎晚期紧密化现象(compaction)的发生, 细胞由圆变扁(flattening), 细胞间由点状接触变为紧密相嵌, 难以区分各个卵裂球的边界(图 1B); 卵裂球间形成各种连接, 包括间隙连接、黏附连接、紧密连接, 这些连接的形成, 使原来松散接触、对称分布、无细胞间通讯的胚胎状态转化为互相通讯、高度极化的紧密联系的整体^[1]。在紧密化过程中胚胎细胞表面和细胞成分分布均发生高度极化(polarization), 形成顶区(apical domain)和基侧区(basolateral domain)^[6,7]。胚胎细胞分化正是基于细胞极化和紧密化过程中形成的紧密连接。这些生命过程都离不开基因调控。

本研究采用 SSH 方法从 8 细胞紧密化胚胎中克隆了 17 个差异表达 cDNA 片段, 这些片段即代表了在 8 细胞期胚胎紧密化事件中差异表达的部分基因。通过 internet 用 NCBI 提供的在线 BLAST 软件与 GenBank 中收录的序列进行同源性匹配分析, 证实 17 个片段均可能为新基因的表达片段, 为进一步克隆新的紧密化相关基因的全长 cDNA 及后续新基因的结构和功能研究打下基础。

本实验所获得的 8 细胞紧密化过程中差异表达 EST 通过 internet 用 NCBI 提供的在线 BLAST 软件与 GenBank 中收录的序列进行同源性匹配分析, 证实部分 EST 与一些已知 β 型 cAMP 依赖的蛋白激酶抑制因子、甲状腺素受体相关蛋白、 2β 型磷脂酰肌醇(PI)4 激酶、白细胞翻译启动因子 2β 亚基、核糖体蛋白 L44 及 L41、60S 核糖体蛋白 L34、微管相关蛋白 1 轻链 3、12S 及 16S 核糖体 RNA 等已知基因有较高的同源性, 推测胚胎紧密化时上述基因表达上调; 也暗示胚胎紧密化过程其翻译水平和蛋白质合成都有所增强。

运用 internet 用 NCBI 提供的在线 BLAST 软件对所获 EST 进行两两比较, 发现一些 EST 中含有一个或多个(多至 9 个)22 核苷酸的短片段的串联重复。对比分析证明该串联重复的核苷酸短片段与消减杂交实验中所用的 nest-PCR 引物均不相似。出现这种情况的可能原因是: 在经内切酶 *Rsa* I 酶切后的 cDNA 与接头连接时, 一些小片段发生自身连接; 这些自身连接的小片段串联重复序列也可与接头连接, 进而被筛选、克隆出来。这可能

是消减杂交技术中无法避免的一种实验误差。

本实验中考虑了克隆时不同大小的 cDNA 片段的连接效率不同, 采用不同长度大小片段分别克隆的方法, 因此所得到的 EST 中有较长的片段, 500bp 以上的 EST 占 42%, 而且 700~800bp 以上的 EST 占 10%, 有的就包含了一个 cDNA 全长。避免了差异表达大片段的丢失。

胚胎紧密化过程是哺乳动物发育过程中一个明显的形态学事件, 也是一个复杂的生物学过程, 其调控必定有众多的基因参与。本研究所获的 EST 只是代表了这些与紧密化密切相关的基因的部分。这些基因与紧密化的关系还有待于进一步的研究。

参考文献(References):

- [1] B C J M Fauser, A J Rutherford, R M Schultz. Preimplantation embryo development. *Molecular Biology in Reproductive Medicine. Published in the USA by The Parthenon Publishing Group Inc*, 1999, 313~327.
- [2] Cathy Holding, Virginia Bolton, Marilyn Monk. Detection of human novel developmental genes in cDNA derived from replicate individual preimplantation embryos. *Mol. Hum. Reprod.*, 2000, 6, 801~809.
- [3] FAN Li-Qing, LU Guang-Xiu, LU Hui-Lin. A Primary Study of established a genetic diagnosis model in mouse 4-cell embryos. *Genetics and Diseases*, 1991, 8(3):152~154.
范立青, 卢光琇, 卢惠霖. 建立 4-细胞鼠胚遗传学诊断模型的初步探索. *遗传与疾病*, 1991, 8(3):152~154.
- [4] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov E D, Siebert P D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6025~6030.
- [5] JIANG Hong, LI Lu-Yun, LU Guang-Xiu. Molecular cloning of genes related to apoptosis in spermatogenic cells of mouse. *Acta Biochim biophys sin*, 2001, 33(4): 421~425.
姜宏, 李麓芸, 卢光琇. 小鼠生精细胞凋亡相关基因的分子克隆. *生物化学与生物物理学报*, 2001, 33(4):421~425.
- [6] LI Wen, LU Guang-Xiu. Advances in Molecular Basis for Compaction of Mouse Embryos. *Life Science Research*. 2002, 6(1):1~4.
李汶, 卢光琇. 小鼠胚胎紧密化现象分子基础的研究进展. *生命科学研究*, 2002, 6(1):1~4.
- [7] Hiroyuki Suzuki, Tomoko Azuma, Hisaichi Koyama, Xiangzhong Yang. Development of Cellular Polarity of Hamster Embryos during Compaction. *Bio of Reprod.* 1999, 61, 521~526.