

小鼠 2-细胞胚胎 ATP 合成酶 6 基因特异表达分析及鉴定

杨立新, 郁卫东, 陈清轩*

(中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100080)

摘要 合子基因组活化是小鼠胚胎早期发育由细胞质调控向核调控转变的关键。小鼠合子基因组活化发生在 2-细胞胚胎阶段,通过对 2-细胞胚胎阶段特异性表达基因的分析,可以从分子水平上揭示早期小鼠胚胎的发育机理。用 DD-RT PCR 技术,从单个小鼠 2-细胞胚胎与成熟卵母细胞(MII 细胞)中分离了 2 个差异片段,片段 2 同小鼠睾丸中表达的一个未知片段具有高度同源性。经过 cDNA 文库构建、筛选,分离到其全长 cDNA。序列分析结果表明,该基因为小鼠 ATP 合成酶亚单位 6 基因。ATP 合成酶亚单位 6 基因由线粒体 DNA 编码,与细胞内 ATP 的合成相关。小鼠 2-细胞胚胎特异表达的 ATP 合成酶亚单位 6 基因可能与胚胎正常发育相关。

关键词 2-细胞胚胎, DD-RT PCR, cDNA 文库, ATP 合成酶亚单位 6 基因
中图分类号 Q291, Q786

Analysis and Identification of a Stage-specific ATPase 6 Gene Expression in Mouse 2-Cell Embryo

YANG Li-xin, YU Wei-dong, CHEN Qing-xuan*

(Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract Zygotic gene activation (ZGA) is the critical event that governs the transition from maternal to embryonic control of development. In the mouse, ZGA occurs during the 2-cell stage and appears to be regulated by the time following fertilization. Development is driven by the action of a series of stage specific expressed genes. Gene expression in 2-cell mouse embryo and MII cell was examined with mRNA differential display. The sequence analysis indicated that the gene is coincident with the ATPase 6 gene, which is encoded by mitochondrial DNA and is essential for the production of ATP. This result indicates that the expression of ATP synthesis related genes at the 2-cell stage may be required to maintain normal development.

Key words 2-cell embryos, DD-RT PCR, cDNA gene library, ATPase 6

哺乳动物的胚胎在着床前经历了几个重要事件:合子基因组转录起始;细胞分化和分化细胞之间的粘合^[1]。对这些事件的分析是了解器官形成的基础、是克隆动物应用技术发展的基础、同时对临床应用,如体外受精和胚胎正常发育的评价具有重要意义^[2]。从分子水平上对参与早期胚胎正常发育基因的分析,对这些基因功能的判断以及对这些基因表达调控的研究,将使我们能更深入地了解基因的功能异常而导致的先天性畸形和遗传性疾病的成因。但是,对早期胚胎发育所发生的分子事件知道的很少。研究表明,小鼠合子基因组转录起始于 2-细胞期,同时,合子基因组转录的起始时间和发生 2-细胞阻滞时间紧密相关^[3]。Biggers^[4]等人把分离的小鼠输卵管壶腹部和小鼠受精卵共培养,发现受精卵可

以通过 2-细胞阻滞,但是并不清楚发生 2-细胞阻滞的遗传机理。Minami^[5]等人的研究表明,发生 2-细胞阻滞的小鼠受精卵和经输卵管壶腹部共培养的通过 2-细胞阻滞期的受精卵,在转录水平上存在明显的差异。但是,由于很难得到足够量的卵和胚胎,使植入前胚胎发育机理研究受到限制。我们用单个 2-细

收稿日期:2002-07-09,接受日期:2002-08-29

国家重大基础研究发展规划(973)资助(No. 200016107)

*联系人 Tel: (010) 62553160, E-mail: Qingxuanchen@yahoo.com

杨立新,男,1966 年 9 月生,硕士,讲师

Received: July 9, 2002; Accepted: August 29, 2002

Supported by State Key Basic Research Program (973) (No. 200016107)

* Corresponding author Tel: (010) 62553160

E-mail: Qingxuanchen@yahoo.com

胞胚胎和成熟卵母细胞(M₂)差异显示技术,成功分离了2个2-细胞胚胎特异表达片段^[6]。经克隆、序列分析和 GenBank 检索表明,片段1和 NADH 脱氢酶亚单位2具有很高的同源性,片段2和小鼠睾丸中表达的一个未知片段具有很高的同源性。本文对片段2进行了进一步分析。

1 材料和方法

1.1 材料

6周~8周龄的雌性、雄性昆明白小鼠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;PMSG为天津市华孚高新技术公司产品;hCG为上海第一生化药业公司产品;透明质酸酶、NP-40和dNTPs为Sigma公司产品;M-MLV逆转录酶为Gibco公司产品;AMV逆转录酶为Roche公司产品;Primer RNase抑制剂为Eppendorf公司产品;RNase Guard为Amersham Pharmacia Biotech产品;Taq DNA聚合酶、pGEMT载体、X-Gal、IPTG和Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System为Promega公司产品;RNeasy Mini Kit为QIAGEN产品;SMART cDNA Library Construction Kit为CLONTECH产品;Random Primer DNA Labeling Kit为TaKaRa产品;所用3引物HT₍₁₅₎G5-AA GCTTTTTTTTTTTT TTTTTTG-3和5引物HAPI 5-AA GCTTGATT GCC3由上海生物工程公司合成;其它试剂为国产分析纯产品。

1.2 单个M₂细胞和2-细胞胚胎特异表达片段的分离

1.2.1 M₂细胞和2-细胞胚胎的制备 采用Capco的方法,分别给6周~8周大小的雌性昆明白小鼠注射PMSG及HCG,获取M₂细胞和2-细胞胚胎^[7]。M₂细胞经0.5%的透明质酸酶去除颗粒细胞后,与2-细胞胚胎一样用酸性台氏液(pH 2.0~2.5)去除透明带,PBS清洗后加入RT反应体系。成年雄性昆明白小鼠脱臼处死,取出睾丸,迅速放入液氮中研磨、匀浆提取总RNA。

1.2.2 RT-PCR 差别显示 详细步骤请参阅文献[6,8]。在逆转录体系中加入含单个卵母细胞或2-细胞胚胎的0.5 μl PBS进行逆转录,反应参数是65 5 min,冰浴5 min,加入40 U/μl M-MLV和5 U/μl AMV逆转录酶Mix 0.5 μl,42 保温60 min,75 变性5 min后,即刻使用或-80 冻存储用。将PCR反应体系加入上述RT反应体系中进行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 min 30 s,共39个循环;72 5 min。用含8 mol/L尿素的6%聚丙烯酰胺凝胶电泳。放射自显影,-20、2 d。切下2条目的条带,经溶解、PCR再扩增。阳性片段克隆到pGEMT载体,测序、GenBank检索。检索结果表明,片段1和NADH脱氢酶亚单位2具有很高的同源性(99.8%),片段2和小鼠睾丸中表达的一个未知片段具有很高的同源性(98%)。

1.3 cDNA文库的构建和文库筛选

用RNeasy Mini Kit从小鼠睾丸中提取总RNA。用SMART cDNA Library Construction Kit构建cDNA文库。经PCR扩增、过柱,分级分离。选择大于800 bp的组分,经连接、包装,建立cDNA文库。方法参照SMART cDNA Library Construction Kit User Manual。

1.4 阳性克隆的鉴定和序列分析

从文库中挑选阳性克隆噬斑,经二次筛选,确认阳性克隆。挑选分隔好的阳性噬斑转入噬菌体溶解液中,转染BM25.8菌株,经BM25.8菌株酶切、环化,形成pTriplex2(参照CLONTECH User Manual)。用Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System提取、纯化质粒。纯化的质粒经Sfi I酶切,凝胶电泳分析插入片段大小,然后进行测序及序列分析。

2 结果

2.1 Northern 杂交

用Random Primer DNA Labeling Kit标记回收扩增的目的片段。用标记的探针和提取的小鼠睾丸总RNA进行Northern杂交。结果见图1。

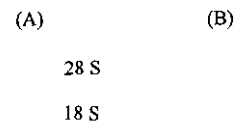


Fig. 1 Northern blot analysis of fragment 2

(A) Total RNA from mouse testis;

(B) The result of Northern blot

2.2 文库构建及筛选

建立的小鼠睾丸cDNA文库,经测定,文库滴度为 2.3×10^6 ,重组率为89%。获得2个阳性克隆,经酶切鉴定大小为800~900 bp。

2.3 阳性克隆的鉴定及序列分析

纯化质粒酶切结果见 Fig 2. 克隆的小鼠 2-细胞胚胎特异表达的 cDNA 测序结果见 Fig. 3.

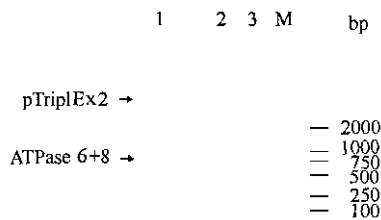


Fig. 2 Restriction analysis of vector pTriplEx2;

1: pTriplEx2 vector; 2, 3: pTriplEx2 digested by *Sfi* I; M: DNA marker DL2000

```

1  GGGATGCCACAAC TAGATACATCAACATGATTTATCACAATTATCTCATCAATAATTACCCTATTTATCTTATTTCAACT 80
81  AAAGTCTCATCACA AACATTCCCACTGCACCTTCACCAAAATCACTAAACAACCATAAAAGTAAAAACCCCTTGAGA 160
161  ATTAAATGAACGAAA ATCTATTTGCCTCATTCTATACCCCAACAATAATAGGATTCCEAATCGTTGTAGCCATCATT 240
241  TATTTCTTCAATCCT ATTTCCCATCTCAAACGCCTAATCAACAACCGTCTCCATTCTTTCCAACACTGACTAGTTAA 320
321  ACTTATTATCAACA AATAATGCTAATCCACACACCAAAAGGACGAACATGAACCCTAATAATTGTTTCCCTAATCAT 400
401  ATTTATTGGATCAACA AATCTCCTAGGCCTTTTACCACATACATTTACACCTACTACCCAACATCCATAAATCTAAGT 480
481  ATAGCCATCCACTAT GAGCTGGAGCCGTAATTACAGGCTTCGGACACAACTAAAAAGCTCACTTGCCCACTTCTCT560
561  TTCCCAAGGAACTCCA ATTTCACTAATTCCAATACTTATTATTATTGAAACAATTAGGCCCTATTAATGGCATTAGCAG 640
641  TCCGGCTTACAGCTA ACATTACIGCAGGACACTTATTAATACACCTAATCGGAGGAGCTACTCTAGTATTAATAATATT 720
721  AGCCCAACAACAGCT ACCATTACATTTATTATTTACTTCTACTCACAATTCTAGAAATTGCAGTAGCATTAATTCAAG 800
801  CCTACGTATTCACCC TCTAGTAAGCCTATATCTACATGATAATACCCGAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 880
881  ACATGTC
  
```

Fig. 3 The nucleotide sequence of ATPase 8 + 6

期到囊胚期并不复制. 线粒体和核基因组中构成呼吸链成分的基因从小鼠 2-细胞胚胎阶段协同活化、转录并且在卵裂期显著增强. Barnes 等人^[13] 研究证实, 小鼠在发生 2-细胞阻滞时能源产生不足, 在培养基中添加谷氨酰胺可以克服小鼠 2-细胞阻滞. 说明 ATP 的大量产生在小鼠 2-细胞胚胎发育过程中具有重要作用. 体外培养的能通过 2-细胞阻滞期的小鼠胚胎和 ATP 合成酶相关基因的高转录活性有关. Minami^[5] 等人认为呼吸链组成成份的起始转录对在体外成熟、受精和卵裂的小鼠 2-细胞胚胎的发育具有重要作用. 我们的实验结果证实小鼠受精卵在体内 2-细胞胚胎阶段的发育和 ATP 合成酶的转录活性具有相关性. 并且认为输卵管内的某种物质^[14] (可能是甾类激素) 可能是激活线粒体 DNA 转录的因子.

3 讨论

哺乳动物线粒体 DNA 编码 13 种多肽、2 种 rRNA 和 22 种 tRNA. 氧化呼吸链的 5 个复合体中有 4 个复合体或亚单位的一些组成由线粒体 DNA 编码^[9]. ATP 合成酶由 14 个亚单位组成, 其中亚单位 6 和 8 由线粒体 DNA 编码^[10]. 本研究中分离的线粒体 ATP 合成酶亚单位 6 由 870 个碱基组成, 1 ~ 168 碱基和 ATP 合成酶亚单位 8 具有较高的同源性. 再程序化研究指出, 卵细胞受精后, 受精卵立即对父源基因组进行去甲基化. 同时, 母源基因组伴随着 DNA 的复制也发生去甲基化作用^[11]. 去甲基化需要能量, ATP 的快速合成为 2-细胞胚胎调控转化及再程序化提供能量. Taylor^[12] 等人证实, 小鼠线粒体 DNA 转录从 2-细胞胚胎开始, 但是线粒体 DNA 从发育早

参考文献 (References)

- 1 Watson A J, Kidder G M, Schultz G A. How to make a blastocyst. *Biochem Cell Biol*, 1992, **70**: 849 ~ 855
- 2 Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M, Johnson K R, Yanagimachi R. Full-term development of mice from nucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, **394**: 369 ~ 374
- 3 Telford N A, Watson A J, Depamphilis M L. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev*, 1990, **26**: 90 ~ 100
- 4 Biggers J D, Gwatkin R L B, Brinster R L. Development of mouse embryos in organ culture of fallopian tubes on a chemically defined medium. *Nature*, 1962, **194**: 747 ~ 749
- 5 Minami N, Sasaki K, Aizawa A, Miyamoto M, Imai H. Analysis of gene expression in mouse 2-cell embryos using fluorescein differential display: comparison of culture environments. *Biol Reprod*, 2001, **64**: 30 ~ 35
- 6 郁卫东, 李文雅, 王玉阁, 杨立新, 刘桂生, 杜焱, 陈清轩. 兔移核

- 重构胚再程序化相关基因片段的分离与鉴定. 生物工程学报 (Yu Wei-dong, Li Wen-yong, Wang Yur-ge, Yang Li-xin, Liu Gui-sheng, Du Miao, Chen Qing-xuan. Isolation and identification of reprogramming genes related to the development of the rabbit reconstructed embryos. *Chin J Biotech* , 2003 , **19** (1) : 30 ~ 34
- 7 Capco D G. Cytoskeletal mechanisms during animal development. *Curr Topics Dev Biol* , 1995 , **31** : 307 ~ 309
- 8 李文雍, 郁卫东, 刘桂生, 陈清轩. 用 DDRT-PCR 技术克隆小鼠早期胚胎发育相关基因. 中国生物化学与分子生物学报 (Li Wen-yong, Yu Wei-dong, Liu Gui-sheng, Chen Qing-xuan. Cloning of early mouse embryo development related genes using modified DDRT-PCR. *Chin J Biochem Mol Biol*) , 2002 , **18** (6) : 728 ~ 732
- 9 Raikhinstern M, Hanukoglu I. Mitochondrial genome encoded RNAs: differential regulation by corticotropin in bovine adrenocortical cells. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1993 , **90** : 10509 ~ 10513
- 10 Takayuki Ozawa. Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol Rev* , 1997 , **77** : 425 ~ 451
- 11 Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* , 2001 , **293** : 1089 ~ 1093
- 12 Piko L, Taylor KD. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Dev Biol* , 1987 , **123** : 364 ~ 374
- 13 Barnes FL, Eyestone W H. Early cleavage and the maternal transition in bovine embryos. *Theriogenology* , 1990 , **33** : 141 ~ 154
- 14 徐庆勇, 刘桂生, 陈清轩. 山羊发情相关输卵管糖蛋白 (g EGP) 基因的克隆. 中国生物化学与分子生物学报 (Xu Qing-yong, Liu Gui-sheng, Chen Qing-xuan. Cloning of the goat (*Capra hircus*) estrus-associated oviductal glycoprotein (g EGP) gene. *Chin J Biochem Mol Biol*) , 2002 , **18** (4) : 520 ~ 523

第五届医学生物化学与分子生物学学术会议征稿通知

第五届医学生物化学与分子生物学学术会议定于 2003 年 11 月在广州召开. 本次会议的主题为“21 世纪的分子医学”. 围绕会议主题, 欢迎同行踊跃投稿.

论文摘要要求如下: 每份稿件占 A4 纸半页; 格式: 题目: 黑体小三, 作者: 宋体加粗 5 号, 单位: 宋体小五, 正文: 宋体五号; 正文只用文字描述, 不含图表; 摘要以电子版附件方式 (DOC, RTF 或 TXT) 发至以下地址: miaosy@ms.cams.ac.cn; 如有困难者, 可直接邮寄稿件, 我们代为打印排版. 邮寄地址: 北京东单三条 5 号, 缪时英收, 邮编 100005; 稿件截止日期: 2003 年 7 月 10 日; 每份稿件收取版面费 50 元, 超版面按一页收取. 代为打印者加收 15 元. 稿件经评审后收录于论文集.

(中国生物化学与分子生物学会医学委员会 缪时英)