

牛体细胞中端粒酶组分的表达及端粒酶活性的研究

岳永莉, 吴 侠, 旭日干, 于海泉

(内蒙古大学哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021)

摘 要: 端粒酶是一种能够以自身的 RNA 组分为模板在染色体末端添加端粒重复序列的核酸蛋白复合体酶, 主要由端粒酶 RNA 组分 (*TERC*) 与端粒酶逆转录酶组分 (*TERT*) 构成。通过对成年牛组织中端粒酶的这两种组分的表达情况及端粒酶活性状态进行检测, 探讨牛端粒酶组分的组织特异性表达以及与端粒酶活性之间的关系。应用 RT-PCR 检测了成年牛的心脏、肾脏、肝脏及睾丸中 *TERC* 和 *TERT* 基因的 mRNA 表达情况, 利用 TRAP 银染法检测各组织中的端粒酶活性状态。结果表明 *TERC* 基因在这 4 种组织中均有表达, 但转录水平在各组织之间有差异; *TERT* 基因仅在睾丸中表达, 在其他 3 种组织中均没有表达, 端粒酶活性同样只在睾丸中检测到。由此可见牛端粒酶活性在体细胞中普遍受到抑制, 仅在生殖腺中具有活性。端粒酶两种组分的转录是相互独立的, 逆转录酶 *TERT* 组分是端粒酶活性的关键成分。

关键词: 牛; 正常体细胞; 端粒酶

Study on Telomerase Activity in the Bovine Adult Tissues

YUE Yong-li, WU Xia, BOU Shorgan, YU Hai-quan

(Key Laboratory of China Education Ministry for Research of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract: Telomerase is a nucleotide-protein complex enzyme mainly composed of the telomerase RNA component (*TERC*) and the telomerase reverse transcriptase (*TERT*), which catalyzes the addition of repeat sequence to telomeric DNA with its RNA component as template. To study the relationship between the different expression of telomerase components and the activity of telomerase, the transcription of two main components of telomerase and the activity status of telomerase in adult bovine tissues were examined. RT-PCR was used to detect the transcription of *TERC* gene and *TERT* gene in the heart, kidney, liver and testis of adult cattle and the telomerase activity was determined by Telomeric Repeat Amplification Protocols (TRAP) with silver staining. The *TERC* mRNA was detected in all of the tissues above, with level increasing. The *TERT* mRNA was only detected in the testis, not in other tissues. The activity of telomerase was also only detected in the testis. These results demonstrate that testis has high activity of telomerase, which is repressed in most of bovine somatic tissues. The transcription of two components of telomerase is independent, and the *TERT* is the key component of bovine telomerase.

Key words: cattle; adult somatic cells; telomerase

端粒是染色体末端的特殊结构, 由简单的重复序列和结合蛋白构成, 哺乳动物的端粒重复序列为“TTAGGG”^[1]。由于半保留复制的缺陷, 正常体细胞中的端粒长度会随细胞分裂而缩短, 达到极限时, 则不能通过细胞周期的检测点 (checkpoint), 细胞将发生衰老或凋亡。而端粒酶能够特异地以其自身的 RNA 组分 (telomerase RNA component, *TERC*) 为模板, 在相关蛋白的参与下, 由其逆转录酶组分 (telomerase reverse transcriptase, *TERT*) 在染色体末端合成端粒重复序列, 维持端粒长度,

保持染色体的稳定, 从而调节细胞的衰老与凋亡。

端粒酶的活性状态与细胞的增殖状态相关, 在具有强分化增殖能力的细胞中端粒酶有很高的活性, 而在已分化的体细胞中端粒酶通常活性极低或不具有活性。另外, 研究表明, 端粒酶活性与干细胞永生以及肿瘤发生有关, 在约 90% 的肿瘤细胞和永生细胞系中都具有很高的端粒酶活性, Kim 等^[2]对 101 例人的肿瘤组织进行活体检测, 结果 90 例呈现端粒酶阳性, 说明癌细胞获得无限增殖能力的主要途径是激活细胞体内的端粒酶活性。

接收日期: 2007-04-25

基金项目: 教育部博士点基金项目 (20050126005), 内蒙古自然科学基金重点项目 (200508010403) 资助。

作者简介: 岳永莉 (1982-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 硕士研究生。E-mail: nmliudongjun@sina.com

端粒酶活性的表达具有种的特异性, 人只有在睾丸、卵巢等分化增殖旺盛的组织中检测到端粒酶活性, 大多数体细胞中不具有酶活性^[4]。而在小鼠、大鼠、鸡和猪等动物中, 不仅生殖系细胞表达酶活性, 在多种已分化的体细胞组织中同样有不同程度的表达^[4]。另有报道, 狗的正常个体细胞组织与患恶性淋巴瘤个体的端粒酶活性的检出概率基本一致, 没有组织表达特异性^[5]。

近年来随着克隆动物研究的进展, 关于克隆动物寿命等问题的讨论, 引导人们对家畜的端粒及端粒酶进行了一些研究, 目前有关牛端粒酶活性方面的研究主要集中在卵母细胞及早期胚胎, 而对于牛成体细胞组织中端粒酶两种组分 *TERC* 和 *TERT* 基因的表达以及端粒酶活性等方面的研究还未见报道。本研究对成年牛的心脏、肾脏、肝脏和睾丸这 4 种组织中的 *TERC* 与 *TERT* 基因的转录情况以及端粒酶活性状态进行了检测。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞组织来源 所用材料为本地屠宰场获得的黑白花种公牛的新鲜的心脏、肾脏、肝脏以及睾丸组织。

1.1.2 试剂与仪器 RNA 提取及 RT-PCR 的试剂均购自大连宝生物有限公司, 乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、 β -巯基乙醇、Tween-20、焦磷酸乙二酯(DEPC)购自 Sigma 公司, 其它药品均为国产分析纯。裂解液[10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5), 1.0 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 1.0 mmol·L⁻¹ EGTA, 0.1 mmol·L⁻¹ PMSF, 0.5% CHAPS, 5 mmol·L⁻¹ β -巯基乙醇, 10%甘油]; 10×TRAP buffer[200 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 630 mmol·L⁻¹ KCl, 0.05% Tween-20, 1.0 mmol·L⁻¹ EGTA, 1 mg·L⁻¹ BSA]。主要仪器: PCR 仪 (Biometra)、凝胶成像仪 (Bio-RAP)、垂直电泳仪 (北京六一厂)。

1.1.3 引物序列 根据已报道的牛 *TERC* 基因 (Genbank, Accession No.001576) 和 2006 年 Zhao 公布的牛 *TERT* 基因序列 (Genbank, Accession No.464899) 设计 RT-PCR 引物, 序列见表 1, 其中阳性对照 GAPD 的引物设计参考文献[6]。TRAP 反应的引物序列参考文献[2], TS 引物 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3', CX 引物 5'-CCC TTACCCTTACCCTTACCCTA-3', 均由大连宝生物有限公司合成。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因及寡核苷酸 Oligos	序列 Sequence	PCR 产物 PCR product (bp)
bTERC	上游 upstream 5'-GGCAGCCATTTCTCATCTAACCTAA-3'	289
	下游 downstream 5'-CTGACAGAGCCCAACTCTTCACGG-3'	
bTERT	上游 upstream 5'-CTGGGCGTCAGACAACACTTAG-3'	795
	下游 downstream 5'-GTTCTCCATGTCCCCATAGCAG-3'	
GAPD	上游 upstream 5'-TTCAACGGCACAGTCAAGG-3'	119
	下游 downstream 5'-ACATACTCAGCACCAGCATCAC-3'	

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 提取心脏、肾脏、肝脏以及睾丸这 4 种组织的总 RNA, cDNA 的合成按照逆转录酶 AMV 的推荐程序进行, 同时作不加 AMV 的阴性对照。PCR 反应体系为: 2 μ l 反转录液, 2 μ l PCR buffer (10×), 1.2 μ l dNTP (2.5 mmol·L⁻¹), 上、下游引物 (50 μ mol·L⁻¹) 各 0.2 μ l, 0.2 μ l rTaq, 总反应体系为 20 μ l。PCR 条件为: *TERC* 94°C 2 min, 然后 94°C 30s, 64°C 30s, 72°C 1 min 扩增 30 个循环, 72°C 10 min; *TERT* 为 94°C 2 min, 然后 94

°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min 扩增 30 个循环, 72°C 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后用 EB 染色观察。

1.2.2 TRAP 银染法检测端粒酶活性 在液氮中将组织磨碎, 取 100 mg 加入 200 μ l 预冷的裂解液, 匀浆后冰浴 30 min, 4°C 14 000 rpm 离心 20 min。取上清存于 -80°C 冰箱。另取部分细胞提取液用考马斯亮蓝 G250 染色法进行蛋白定量。根据 Kim 等^[2]的 TRAP 法检测端粒酶活性。PCR 体系为: 10×TRAP buffer 5 μ l, 10 mmol·L⁻¹ dNTP 0.125 μ l,

0.1 ng TS 引物, rTaq 0.25 μ l, 6 μ g 端粒酶蛋白提取液, DEPC 水补足到 50 μ l。在 PCR 仪上进行端粒酶延伸反应以及 PCR 反应, 条件为: 25 $^{\circ}$ C 30 min, 94 $^{\circ}$ C 2 min 灭活端粒酶, 4 $^{\circ}$ C 2 min, 此时加入 0.1 ng CX 引物, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s 扩增 38 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 20 μ l PCR 产物进行 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳, 100 V 4h。电泳结束后, 将凝胶取出置 10% 乙醇固定 30 min, 然后在 1% 硝酸中轻摇 3 min, 0.1% 硝酸银轻摇染色 30 min, 最后在 2% 碳酸钠溶液中显色, 待条带清晰后, 用 4% 的冰乙酸终止反应, 制膜保存。每次试验均设两组阴性对照: ①将组织提取液热处理(煮沸 5 min)使蛋白质变性后作为模板参与反应; ②以水代替组织蛋白提取液作为模板进行反应。

2 结果与分析

分别对 4 种组织中 *TERC* 和 *TERT* 基因的 cDNA 进行 RT-PCR 扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳, 片段大小与预期结果相符(见图 1)。从 PCR 结果来看, *TERC* 基因在 4 种组织中均有表达, 但转录水平不同, 心脏中最低, 肾脏和肝脏的水平较高, 睾丸最高(阳性对照 GAPD 表达量基本一致)。而 *TERT* 基因在心脏、肾脏和肝脏中均无条带出现, 只有睾丸有明显的条带出现, 说明 *TERT* 基因只在睾丸中转录表达。

TRAP 结果显示, 4 种组织中只有睾丸检测到了特异的相距 6 bp 的阶梯状条带, 表现为端粒酶阳

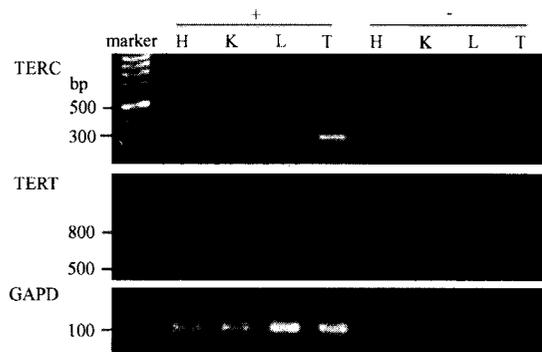


图 1 牛 4 种组织中的 *TERC* 和 *TERT* 基因的 RT-PCR 结果
Fig. 1 RT-PCR result of *TERC* gene and *TERT* gene in the bovine tissues

H. 心脏; K. 肾脏; L. 肝脏; T. 睾丸
H. Heart; K. Kidney; L. Liver; T. Testis

性, 而心脏、肾脏和肝脏则表现为端粒酶阴性(见图 2)。

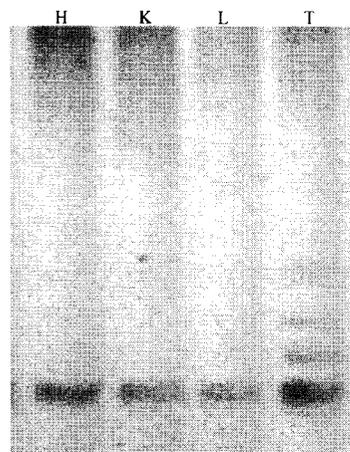


图 2 TRAP 银染法鉴定牛 4 种组织中端粒酶活性

Fig. 2 TRAP detection of telomerase activity in the bovine tissues

H. 心脏; K. 肾脏; L. 肝脏; T. 睾丸
H. Heart; K. Kidney; L. Liver; T. Testis

3 讨论

本试验对 *TERT* 基因以及 *TERC* 基因在成体牛不同组织的转录情况进行对比研究, 并检测了端粒酶活性, 结果表明, 逆转录酶组分对于牛端粒酶的活性起关键作用。为确保 RT-PCR 的扩增产物是来源于 cDNA 而不是基因组 DNA, 将 *TERT* 引物的上下游设计在了不同的外显子上, 由 PCR 片段的大小可以确定产物的模板来源。*TERC* 本身是 RNA 基因, 其基因序列与转录出来的 RNA 序列是一致的, 因此在合成 cDNA 第一条链时, 设不加逆转录酶的阴性对照, 实验组与阴性对照组均以相同条件进行 RT-PCR, 结果阴性对照组没有出现条带, 证明 RT-PCR 产物是以 cDNA 为模板的, *TERT* 基因的试验结果也一样, 充分说明了 RT-PCR 试验结果的可信度。在端粒酶活性检测中, 为避免 TRAP 反应的假阳性, 设计了以蛋白质变性处理的组织提取液, 和以水为模板的两组阴性对照, 结果均无阶梯状条带出现(结果未列出)。

本试验结果显示, 牛端粒酶的 *TERC* 与 *TERT* 基因在 4 种组织中的表达规律不尽相同, *TERC* 在检测的 4 种组织中均有表达, 转录水平在心脏中最

低,肾脏和肝脏的水平较高,睾丸最高;而 *TERT* 则仅在睾丸中表达,说明二者的转录是相互独立的。而且端粒酶活性检测结果与 *TERT* 基因的转录规律一致,同样独立于 *TERC* 的转录。因此可以得出结论, *TERC* 是端粒酶活性所必须的,但不是决定因素;而 *TERT* 是牛端粒酶的关键成分,与酶活性相关,可以作为判断牛的器官组织中端粒酶活性存在与否的依据,且 *TERT* 主要是在转录水平受到调控。

在牛的肾脏与肝脏这两种组织没有检测到端粒酶活性,这与 King 等^[7]的文献报道结果一致。而且牛的心脏中同样没有检测到酶活性,这与小鼠、大鼠、鸡等^[4]的研究结果不同,但与猪^[8]的报道一致。牛的生殖腺睾丸与以上报道的物种情况相同,均具有高水平的端粒酶活性,这是由生殖干细胞特有的功能所决定的。以上可能反映了成年牛体细胞组织中绝大多数是已分化的细胞,而未分化或具有分化增殖潜能的细胞数量极少,其端粒酶活性检测不出。从目前已报道的研究结果来看,牛的端粒酶表达模式与小鼠、大鼠具有较大差异,而与人端粒酶的表达模式接近。

对于牛卵母细胞至早期胚胎的端粒酶活性表达情况,King 等^[9]基于多个胚胎检测的研究显示,牛端粒酶活性在卵母细胞成熟过程中不断降低,在 IVF 受精卵及随后的早期卵裂过程中进一步降低,直到桑椹胚和囊胚阶段显著升高。但随后 Jie 等^[10]基于单个胚胎检测的试验更正了以上结论,认为牛的端粒酶活性从卵母细胞到 IVF 受精卵阶段显著升高后逐渐下降,到 8-细胞期之后又一次升高,直至囊胚期达到最大。此后他们又证明,经孤雌激活与核移植得到的牛胚胎与体外受精胚胎在早期发育过程中的端粒酶活性情况无明显差异^[11]。这些发现可能与卵母细胞成熟过程中所积累的母源性端粒酶

向合子基因型表达转变有关。而胚胎基因组中端粒酶两种组分表达的时空调控以及对早期胚胎发育的作用仍有待进一步研究。

致谢:作者对于内蒙古大学实验动物研究中心的所有工作人员和同学在本研究工作中所给予的帮助与指导表示衷心的感谢。

参 考 文 献

- [1] Blackburn E H. Structure and function of telomeres. *Nature*, 1991, 350: 569-573.
- [2] Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, 266: 2011-2015.
- [3] Counter C M., Hirte H W, Bacchetti S, et al. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 2900-2904.
- [4] Stephen C H, Lee L O, Connie P N, et al. Cloning of rat telomerase catalytic subunit functional domains, reconstitution of telomerase activity and enzymatic profile of pig and chicken tissues. *Life Sciences*, 2003, 73: 2749-2760.
- [5] Carioto L M, Kruth S A, Betts D H, et al. Telomerase activity in clinically normal dogs and dogs with malignant lymphoma. *Am J Vet Res*, 2001, 62(9): 1442-1446.
- [6] Karen G, Mario V P, Ann V S, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC Developmental Biology*, 2005, 5: 27.
- [7] King W A, Betts D H, Carter R F, et al. Telomerase and telomerase activity in bovine oocytes, embryos and fetuses. *Theriogenology*, 1998: 182.
- [8] Fradiani P A, Ascenzi F, Lavitrano M, et al. Telomeres and telomerase activity in pig tissues. *Biochimie*, 2004, 86: 7-12.
- [9] King W A, Betts D H. Telomerase activity and telomere detection during early bovine development. *Developmental Genetics*, 1999, 25: 397-403.
- [10] Xu J, Yang X Z. Telomerase activity in bovine embryos during early development. *Biology of Reproduction*, 2000, 63: 1124-1128.
- [11] Xu J, Yang X Z. Telomerase activity in early bovine embryos derived from parthenogenetic activation and nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, 2001, 64: 770-774.