

干扰素 α 应答基因的克隆及在兔早期胚胎发育中功能分析*

齐冰^{1,2)**} 何新^{1,2)**} 李文雍³⁾ 陈清轩^{1)***}

(¹⁾中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100080; ²⁾中国科学院研究生院, 北京 100049;

³⁾阜阳师范学院生物系, 阜阳 236041)

摘要 干扰素(interferon, IFN)在哺乳动物早期胚胎发育过程中具有重要的生理功能, 但是其作用机制尚不清楚. 通过筛选卵巢 cDNA 文库和 5'-RACE 方法, 克隆了兔卵巢干扰素 α 应答基因(interferon responsive gene, *IFRG*)的全长 cDNA (登录号: AJ584672). 利用 RT-PCR 证明 *IFRG* 在兔卵母细胞和植入前胚胎中均有表达, 这将为深入研究 IFN 在早期胚胎中的作用机制提供理论参考, 卵巢原位杂交表明 *IFRG* 在成熟卵泡(类型 5)的颗粒细胞中有表达, 在初级和次级卵泡的膜鞘细胞和粒层细胞中有很高的表达, 鉴于这些细胞与卵泡的发育密切相关, 推测 *IFRG* 在卵泡的发育、成熟和排卵中发挥重要作用.

关键词 兔, 植入前胚胎, 干扰素 α 应答基因, 表达谱, 原位杂交

学科分类号 Q291, Q786

1957年 Isaacs 和 Lindenmann 首先发现了病毒干扰现象, 即病毒感染的细胞能产生一种因子, 作用于其他细胞并干扰病毒的复制, 因而命名为干扰素(interferon, IFN).

许多研究表明, 哺乳动物在妊娠早期, 其滋养层细胞能分泌 IFN, 从而开始对 IFN 在早期胚胎发育中生理功能的研究探索. 滋养层蛋白 IFN τ 是最早被发现的胚胎来源的干扰素, 其分泌和产生具有时间和组织特异性. IFN τ 能够阻止子宫内膜黄体的作用而使母体对怀孕进行识别^[1,2], 此外 IFN τ 在胚胎植入子宫时也发挥重要作用^[3]. 研究小鼠早期胚胎发育时发现, IFN α 在小鼠的卵母细胞和植入前胚胎中都有表达, 推测 IFN α 在胚胎形成中起作用^[4].

近来的研究表明, I 型 IFN 的受体 IFNAR 在牛的桑葚胚和囊胚中均有表达, IFN 对牛的植入前胚胎发育具有生长促进作用, 而这种作用可能就是与 IFNAR 的表达相关^[5].

IFN 在早期胚胎发育中有重要的功能, 这种功能可能就是通过 JAK/STAT 信号通路实现的^[6,7]. 但目前为止还没有在早期胚胎中克隆到干扰素应答基因(interferon responsive gene, *IFRG*)的报道. 我们通过 mRNA 差异显示比较兔正常植入前胚胎和克隆胚胎时发现一异常表达的基因, 经过阳性鉴定后

从兔卵巢中克隆了全长的 cDNA, 命名为 *IFRG*. 通过 RT-PCR 和组织原位杂交实验, 对 *IFRG* 在兔卵子发生和早期胚胎发育中的功能做了初步研究.

1 材料和方法

1.1 材料

成熟的雌兔和雄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. M-MLV、AMV 酶、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、RNase A、pGEM-T Vector System 购自 Promega 公司; TdT 末端转移酶、DNase I、DL2000 分子质量标准购自大连宝生物公司; RNeasy Mini Kit for the Isolation of RNA 购自 Qiagen 公司; Superscript II、SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒购自 Gibco 公司; Smart RACE cDNA Amplification Kit、Smart TM cDNA Library Construction Kit 购自 Clontech 公司; DNA 胶回收试剂盒购自 Omega 公

*国家重点基础研究发展计划资助项目(G2000016107).

** 齐冰和何新为并列第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 010-82614427, E-mail: qingxuanchen@yahoo.com

收稿日期: 2006-05-17, 接受日期: 2006-05-31

司; NBT/BCIP 试剂盒购自华美生物公司; DNA Labeling Kit 购自大连宝生物公司.

1.2 方法

1.2.1 DNA 序列分析和反向 RNA 印迹. 通过 mRNA 差异显示比较正常兔植入前胚胎和移核植入前胚胎表达谱时, 从分离得到的差显片段中选择一个在移核兔囊胚中异常表达的基因片段作深入的研究. 该片段长度为 292 bp, 对其进行了 NCBI 比对. 将正常兔囊胚和移核兔囊胚分别制备 cDNA pool, 进行反向 RNA 印迹以证实该差显片段是否为阳性克隆.

1.2.2 IFRG 全长 cDNA 的克隆. 提取兔卵巢总 RNA, 进行 RNA 印迹. 用 Smart cDNA 文库构建试剂盒构建兔卵巢 cDNA 文库, 常规方法筛选 cDNA 文库, 得到 IFRG 完整的 3' 端. 根据筛选 cDNA 文库得到的序列设计了基因特异性引物(GSP): 5' GTGTATGTGGGCCACGGAAGCAGAT 3' 和巢式基因特异性引物(NGSP): 5' AGCTGGTGCAGTTCCCCAAAGTAC 3'. 利用 Smart RACE cDNA 扩增试剂盒进行 5'-RACE, 获得了该片段的全长 cDNA.

1.2.3 RT-PCR 分析. 根据 IFRG 的开放阅读框(ORF)设计引物 IFRG-1: 5' ATAGAATTCCCATGTTCTCAGATAATTCGCA 3' 和 IFRG-2: 5' ATACTCGAGTTACTTGCTTTGACCAAGTTTT 3'. 分别以卵母细胞和植入前胚胎的 cDNA pool 和不同组织的 RT 转录本为模板进行 PCR 扩增. PCR 的参数为 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 50 s, 经过 35 个循环后, 72℃ 延伸 7 min. PCR 产物克隆到 pGEM-T 载体上并进行测序.

1.2.4 卵巢组织原位杂交. 取新鲜的兔卵巢参照标准方法进行固定、包埋和切片^[9]. 用 DIG 核酸标记试剂盒分别以 T7 和 SP6 RNA 聚合酶进行体外转录制备正义探针和反义探针, 并进行组织原位杂交.

2 结 果

2.1 DNA 序列分析和反向 RNA 印迹

通过 mRNA 差异显示比较正常兔植入前胚胎和移核植入前胚胎表达谱, 从分离得到的差显片段中选择一个基因片段进行深入的研究. 该片段在正常的兔囊胚中表达而在移核兔囊胚中无表达(图 1). 从尿素变性聚丙烯酰胺凝胶上回收了 293 bp 的目的片段, 亚克隆到 pGEM-T 载体上, 进行测序. 经 NCBI 序列比对分析表明, 该片段与人源胚

胎期特异表达的 FLJ 115 有 85% 的同源性.

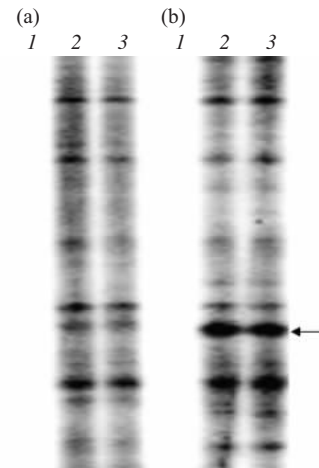


Fig. 1 Portion of an autoradiogram of amplicons obtained from mRNA differential display, reverse transcription and polymerase chain reaction using normal rabbit blastocyst and NT blastocyst

(a) Normal rabbit blastocyst. (b) NT blastocyst. Lanes 1 is a negative control. Lane 2 and 3 are from identical samples. Arrow points to the differential display band.

由于 mRNA 差异显示存在假阳性的问题, 因而通过反向 RNA 印迹实验进行验证(图 2). 杂交结果表明, 该基因在正常囊胚期有杂交信号而在 NT 的囊胚期没有杂交信号, 从而进一步确定该基因片段确实为一阳性克隆.

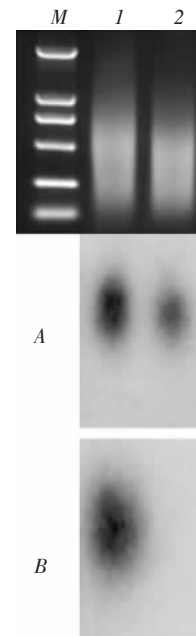


Fig. 2 Reverse Northern hybridization of cDNA pool from normal and NT blastocyst embryos

1: cDNA pool of normal blastocyst; 2: cDNA pool of NT blastocyst. A: Positive control of β -actin; B: Reverse Northern blotting with IFRG fragment. M: Molecular mass marker (DL2000).

2.2 全长 cDNA 的克隆

2.2.1 卵巢 cDNA 文库的构建和筛选. 卵巢组织的 RNA 印迹表明, 该片段在卵巢组织中有表达. 基于在单个胚胎中克隆全长基因比较困难, 因而构建兔卵巢 cDNA 文库以克隆全长 cDNA. 文库的滴度为 1.9×10^6 , 以回收 293 bp 的片段为探针, 筛选兔卵巢 cDNA 文库得到了 1 823 bp 的基因序列, 其具有完整的 3'端和加尾信号 AATAAA.

2.2.2 5'-RACE. 通过筛选兔卵巢 cDNA 文库, 得到

了目的基因完整的 3'端, 但是 5'端并不完整. 根据筛选 cDNA 文库得到的序列设计了基因特异性引物(GSP)和巢式基因特异性引物(NGSP), 进行 RACE, 得到了目的基因的 5'端. 进行拼接后得到了目的基因完整的 cDNA 序列. 该序列长度为 2 794 bp, 编码一个 131 个氨基酸的蛋白质. 将该基因编码的氨基酸序列进行 NCBI 序列比对, 发现与小鼠、人的 IFRG 有 98%的同源性(图 3), 因而将该基因命名为兔 IFRG.

2-MFSDNSHCPDCGQQWFPSLELGHWLYQTKLVENECYQVFLDRINR	45
3-MFSDNSHCPDCGQQWFPSLELGHWLYQTRLVENECYQVFLDRINR	45
1-MFSDNSHCPDCGQQWFPSLELGHWLYQTKLVENECYQVFLDRINR	45
1.....10.....20.....30.....40	
2-ADYCPECYPDNPNANRSLVLPWSFPLEWAPQNLTRWTFEKACHPFL	90
3-ADYCPECYPDNPNANRSLVLPWSFPLEWAPQNLTRWTFEKACHPFL	90
1-ADYCPECYPDNPNANRSLVLPWSFPLEWAPQNLTRWTFEKACHPFL	90
50.....60.....70.....80.....90	
2-LGPPLVRKRIHDSRVAGFNPALQLILSRDCTLNKKLGQSK	131
3-LGPPLVRKRIHDSRVAGFNPALQLILTRDCTLNKKLGQNK	131
1-LGPPLVRKRIHDSRIA GFNPALQLILTRDCTLNKKLGQSK	131
100.....110.....120.....130	

Fig. 3 Sequence alignment of rabbit IFRG (1) , human IFRG (2) and mouse IFRG (3)

2.3 IFRG 的表达谱分析

2.3.1 IFRG 在兔植入前胚胎中的表达谱分析. 为了研究 IFRG 在卵母细胞和植入前胚胎中的表达分布 (图 4), 我们根据 IFRG 的 ORF 设计引物进行 RT-PCR. 结果表明, IFRG 在兔卵母细胞和早期植入前胚胎中均有表达, 但表达丰度无显著差异.

较低.

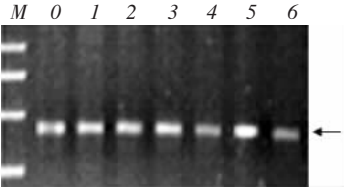


Fig. 4 RT-PCR of oocytes and preimplantation embryos
0: M II oocyte; 1: 1-cell embryo; 2: 2-cell embryo; 3: 4-cell embryo;
4: 8-16-cell embryo; 5: Morula embryo; 6: Blastocyst embryo. M:
Molecular mass marker (DL2000). Arrow points to the PCR products.

2.3.2 IFRG 在兔成体组织中的表达分析. 为了检测 IFRG 在兔成体组织中的表达分布, 我们用半定量 PCR 分析了 8 种组织中 IFRG mRNA 表达. 结果显示, IFRG 在所检测的组织中都有表达, 但表达丰度有差异(图 5), 在肝脏、脑和心脏中的表达量

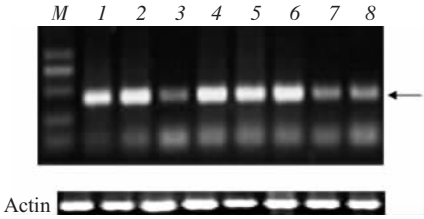


Fig. 5 RT-PCR analysis of IFRG in rabbit multi-organs
1: Rabbit 18-day embryo; 2: Ovary; 3: Liver; 4: Kidney; 5: Spleen; 6:
Lung; 7: Cerebra; 8: Heart; M: Molecular mass marker(DL2000). Arrow
points to the PCR products. Actin was used to control for differences in
loading.

2.4 IFRG 卵巢组织原位杂交分析

IFRG 在兔卵母细胞中有表达, 为了检测 IFRG 与卵子发生和成熟的关系, 进行了卵巢组织原位杂交实验(图 6). 结果表明, IFRG 在成熟卵泡的颗粒细胞中高表达, 在初级卵泡和次级卵泡的粒层细胞和膜鞘细胞中高表达, 而在血管中没有表达 (图中未显示).

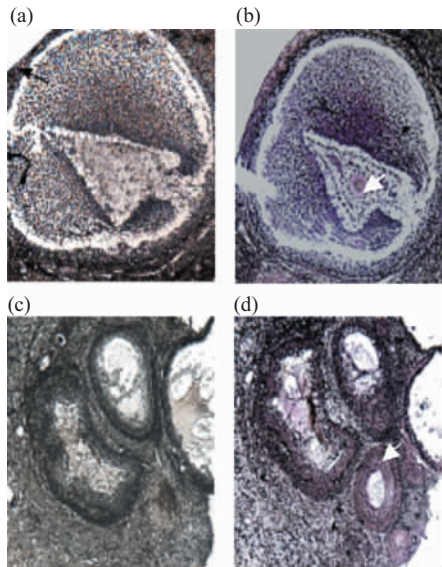


Fig. 6 *In situ* hybridization of *IFRG* in rabbit ovary

Panels (a) and (c) represent sense control. Panels (b) and (d) are antisense hybridization signals. Panels (a) and (b) represent type 5 follicles. Panels (c) and (d) represent other type follicles. The amplificatory is 4x.

3 讨 论

利用 mRNA 差异显示技术比较了兔正常植入前胚胎和 NT 植入前胚胎的基因表达, 在所分离的差异显示片段中选取一个在正常兔囊胚中有表达而在克隆兔囊胚中异常表达的基因片段作进一步研究. 该目的基因的登录号为 AJ584672, NCBI 比对并将其命名为兔 *IFRG*.

IFN 在哺乳动物早期胚胎发育中具有重要的生理功能, 但它是如何发挥作用的还知之甚少. IFN 的抗病毒作用是通过与相应受体结合后, 偶联和激活与细胞膜结合的 Janus 蛋白酪氨酸激酶 (Jak PTKs), 然后磷酸化激活信号转导子和转录激活子 (signal transducer and activator of transcription, STAT), 活化的 STAT1 和 STAT2 形成二聚体, 迁移到细胞核内, 与 P48 结合形成 IFG3 复合体, 从而识别特殊 *IFRG* 的启动子序列而诱导 *IFRG* 转录^[9]. *IFRG* 的产物通过几个方面抑制病毒的复制从而完成干扰素的抗病毒作用^[10].

近来, 在哺乳动物的早期胚胎中, 相继克隆了一些 IFN 及其受体. 因而推测其在早期胚胎发育中的作用也是通过 JAK/STAT 信号通路实现的. 但是对于 *IFRG* 在早期胚胎中的克隆还没有报道. 在兔

植入前胚胎中我们检测到了 *IFRG*, 这将为阐明 IFN 在早期胚胎发育中的作用提供有力的证据, 并将为进一步研究干扰素在早期胚胎发育中的作用机制奠定基础.

IFN 除了在早期胚胎发育中有重要作用外, 在卵母细胞的成熟中是否具有功能呢? 近来的研究发现调节 IFN γ 的水平将有利于排卵和受精^[11]. 在兔卵母细胞中我们也检测到了 *IFRG* 的表达, 因而推测 IFN 与卵子发生也有关系. 为了验证我们的推测, 做了原位杂交实验, 结果也表明, 在与卵子发生密切相关的初级卵泡和次级卵泡的膜鞘细胞和粒层细胞中, *IFRG* 高度表达, 同时在成熟卵泡内的颗粒细胞, 也检测到了 *IFRG* 的表达, 而在与卵子发生无关的血管中则没有检测到 *IFRG* 的表达. 因而证实 *IFRG* 与卵子的发生、成熟等生理过程密切相关.

哺乳动物的克隆效率低下, 主要表现为克隆胚胎常常不能形成正常的囊胚、原肠胚甚至流产, 能够成功发育分娩的寥寥无几, 即使一些个体成活也出现多种疾病或者畸形^[12~15]. 为分析克隆效率低下的原因, Daniels 等^[16]对比了 6 个发育相关基因在正常牛植入前胚胎和 NT 胚胎中的表达情况, 研究表明, *OCT4*、*FGF2* 和 *GPI30* 在正常和移核的胚胎中没有差异表达, 而 *FGF4*、*FGFr2* 和 *IL6* 在克隆牛的桑葚胚和囊胚中异常表达. *FGF4*、*FGFr2* 和 *IL6* 这 3 个基因都是胚胎发育所必需的, 推测这些基因的异常表达将使克隆胚胎出现异常. 我们所克隆的 *IFRG* 在兔 NT 囊胚中异常表达, 因而推测 *IFRG* 的异常表达也可能是克隆效率低的一个原因. 对于 *IFRG* 在早期胚胎发育中的生理功能还需要进行深入的研究.

参 考 文 献

- 1 Roberts R M, Ealy A K, Alexenko A P, *et al.* Trophoblast interferons. *Placenta*, 1999, **20** (4): 259~264
- 2 Spencer T E, Bazer F W. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front Biosci*, 2002, **7**: 1879~1898
- 3 Ushizawa K, Herath C B, Kaneyama K, *et al.* cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004, **2**: 77~93
- 4 Riego E, Perez A, Martinez R, *et al.* Differential constitutive expression of interferon genes in early mouse embryos. *Mol Reprod Dev*, 1995, **41** (2): 157~166
- 5 Takahashi M, Tkahashi H, Hamano S, *et al.* Possible role of interferon- τ on *in vitro* development of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 2003, **49** (4): 297~305

- 6 Truchet S, Wietzerbin J, Debey P. Mouse oocytes and preimplantation embryos bear the two sub-units of interferon-gamma receptor. *Molecular Reproduction and Development*, 2001, **60** (3): 319~330
- 7 Imaakawa K, Tamura K, Lee R S, *et al.* Temporal expression of type I interferon receptor in the peri-implantation ovine extra-embryonic membranes: demonstration that human IFN alpha can bind to this receptor. *Endocr J*, 2002, **49** (2): 195~205
- 8 Wong C K, Ho M A, Wanger G F. The co-localization of stanniocalcin protein, mRNA and kidney cell markers in the rat kidney. *J Endocrinol*, 1998, **158** (2): 184~189
- 9 Darnell J D, Kerr I M, Stark G R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 1994, **264** (5164): 1415~1421
- 10 Der S D, Zhou A, Williams B R G, *et al.* Identification of genes differentially regulated by interferon α , β and γ using oligonucleotide arrays. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1998, **95** (26): 15623~15628
- 11 Vassiliadis S, Relakis K, Papageorgiou A, *et al.* Endometriosis and infertility: a multi-cytokine imbalance versus ovulation, fertilization and early embryo development. *Clin Dev Immunol*, 2005, **12** (2): 125~129
- 12 Wakayama T, Yanagimachi R. Cloning laboratory mouse. *Cell Dev Biol*, 1999, **10** (3): 253~258
- 13 Solter D. Mammalian cloning: advances and limitations. *Nat Rev* 2000, **1** (3): 199~207
- 14 Kishikawa H, Wakayama T, Yanagimachi R. Comparison of oocyte-activating agents for mouse cloning. *Cloning*, 1999, **1** (3): 153~159
- 15 Wakayama T, Yanagimachi R. Mouse cloning with the nucleus donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev*, 2001, **58** (4): 376~383
- 16 Daniels R, Hall V, Trounson A O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biology of Reproduction*, 2000, **63** (4): 1034~1040

Molecular Cloning and Functional Analysis of IFRG in Rabbit Oocytes and Preimplantation Embryos*

QI Bing^{1,2)*}, HE Xin^{1,2)**}, LI Wen-Yong³⁾, CHEN Qing-Xuan^{1)***}

⁽¹⁾ Institute of Genetics and Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

⁽²⁾ Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

⁽³⁾ Fuyang Normal Colledge, Fuyang 236041, China)

Abstract Interferons (IFNs) play important physiological roles in early embryo development, but its mechanism is still unclear. The full length cDNA of interferon responsive gene (IFRG) was cloned in rabbit ovary (Accession No. AJ584672). The expression profile of IFRG in oocytes and preimplantation embryos was detected using RT-PCR. IFRG was expressed in oocytes and preimplantation embryos in rabbit, which provided some clues for better understanding the role of IFNs during embryo development. *In situ* hybridization showed that IFRG was highly expressed in granulosa, thecal and cumulus cells, which were consanguineous interrelation to follicles development. So it was proved that IFRG expression was involved in the follicles development, maturation and ovulation in rabbit.

Key words rabbit, preimplantation embryo development, interferon α responsive gene, expression profile, *In situ* hybridization

*This work was supported by a grant from National Basic Research Program of China (G2000016107).

** QI Bing and HE Xin contributed equally.

***Corresponding author . Tel: 86-10-82614427, E-mail: qingxuanchen@yahoo.com

Received: May 17, 2006 Accepted: May 31, 2006