

兔植入前移核胚中发育相关基因的差异表达分析*

李文雍^{1,2,3)} 齐冰^{1,2)} 王玉阁¹⁾ 郁卫东^{1,2)} 杜森¹⁾ 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 100039;

³⁾阜阳师范学院生物系, 阜阳 236032)

摘要 与早期胚胎发育相关的一些重要基因异常表达致使克隆胚细胞核的再程序化过程受阻, 是导致动物克隆失败的重要原因. 为了分离鉴定再程序化相关基因, 我们改进了 mRNA 差异显示技术, 成功地建立了单胚差示技术体系. 以不同发育时期的兔克隆胚 (M II 卵、2 细胞、4 细胞、8~16 细胞克隆胚胎) 为材料进行单胚差示, 分离了 80 个差异片段. 经反向 RNA 印迹验证、亚克隆、序列分析及 NCBI GenBank 数据库检索, 结果表明: A028 片段与 CstF3 基因有 93% 的同源性, 在早期胚胎发育过程中的表达有阶段特异性, 该基因在兔克隆胚的早期发育过程中起重要作用. RNA 印迹显示: 该基因在所检测的组织中, 只在卵巢中有表达. 这项研究为再程序化相关基因全长的克隆及功能研究奠定了良好的基础.

关键词 发育相关基因, 兔克隆胚胎, 再程序化, 单胚差异显示技术

学科分类号 Q27

近年来, 不断有哺乳动物和两栖类动物被成功克隆^[1,2], 这表明高度分化的哺乳动物体细胞也可在去核的卵母细胞中去分化和再程序化, 恢复全能性. 但克隆的效率极低, 少数发育到出生的克隆动物也表现各种不正常的表型, 即使表型正常者也有不同程度的潜在病态, 导致克隆动物出生后不久死亡^[3]. 高度分化的体细胞核植入去核的 M II 卵中, 随后发生哪些分子事件? 体细胞核再程序化达到什么程度才能使克隆胚胎正常发育? 克隆的分子机理如何? 这些关于动物克隆的基础理论问题是当前研究的热点.

哺乳动物高度分化的体细胞核, 或胚胎细胞核重演正常精卵受精后配子核的程序化发育过程, 这种无性繁殖下一代的过程就是克隆. 通过核移植使克隆胚获得启动卵裂和分化的能力, 其中卵裂和分化的启动是通过再程序化 (reprogramming), 即基因活性结构的重建而获得的. 首先, 供体核的一切转录活动都停止, 然后, 去核卵母细胞质中再程序化相关因子 (包括蛋白质, 核酸以及其他诸如甾体类分子的因子) 与染色体发生相互作用, 共同完成对卵裂和分化的启动^[4,5]. 卵母细胞在发生、发育和成熟的过程中, 胞质中积累了大量的蛋白质和 mRNA, 这些物质不仅为正常的胚胎发育、基因组激活提供了良好的物质储备, 而且也是克隆胚胎能够获得启动卵裂和分化能力的物质基础. 在不同动物的发育过程中, 合子基因组的大规模启动发生在不同的发育阶段. 在兔的早期胚胎发育中, 由母

源调控向合子型调控过度是在 8~16 细胞期完成的, 兔的克隆胚中这一调控过度的完成也在这一时期或更早些^[6].

一些重要基因的差异表达及其确切的开始和终止时间是移核胚再程序化发育的关键. 研究表明, 在 1 细胞期的克隆胚中, 伴随着去甲基化的产生, 甲基化程度有所降低, 但进一步的充分去甲基化并未发现, 而出现了过早的从头再甲基化以及过早的核的再组织. 这些都说明在植入前克隆胚胎中再程序化是不充分的. Dean 等认为, 在成熟的体细胞核中, 甲基化酶 Dnmt1 的存在形式与在卵质中的有所不同. 因此, 克隆胚中去甲基化不足和过早再甲基化导致供体核再程序化不足, 从而引起早期发育相关重要基因的异常表达, 以致克隆胚不能正常发育导致克隆失败. 因此, 对供体核再程序化分子机制的深入研究是将来解决这些问题的关键^[7]. 研究早期克隆胚胎基因表达模式, 以及对一些发育相关的重要基因在克隆胚早期发育过程中的表达分析, 对弄清克隆的分子机理进而提高克隆效率是十分重要的.

对高等哺乳动物而言, 获得足够多的早期胚胎材料是不易的, 要得到大量的克隆胚胎无疑更加困难, 这是克隆机理研究中的一大障碍. 为了解

* 国家重点基础研究发展规划项目 973 (2000016107).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62553160, E-mail: qingxuanchen@yahoo.com

收稿日期: 2003-03-27, 接受日期: 2003-06-05

决这一问题, 本室在现有的 mRNA 差异显示技术基础上, 发展并建立了单胚差示的技术体系 (single preimplantation embryonic mRNA differential display reverse polymerase reaction, SPEDDRT-PCR). SPEDDRT-PCR 不仅可以对基因表达的时空模式进行精确的定性和定量, 而且可以对克隆胚胎早期卵裂和分化的多样性进行细致的研究^[8]. 使用该技术用 3 对最优化的锚定引物对兔 M II 卵以及 2 细胞, 4 细胞, 8~16 细胞克隆胚进行 mRNA 差示比较, 对克隆胚胎在植入前发育阶段的基因表达模式进行研究, 获得了 80 个差异表达的片段, 经过反向 RNA 鉴定、亚克隆、序列分析和 GenBank 检索, 差异片段 A028 与 CstF3 基因有 93% 的同源性. 以 A028 为探针进行多组织 RNA 印迹, 该基因只有卵巢组织中有表达. CstF3 是一个重要的卵裂刺激因子, 在克隆胚卵裂期的发育中起重要作用^[9,10].

1 材料和方法

1.1 材料

6~8 月龄的雌性家兔 (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), 促卵泡素 (FSH, 宁波激素制品有限公司), 人绒毛膜促性腺素 (HCG, 上海第一生化药业公司), M-MLV 逆转录酶、无 RNase-DNase 水、DMEM 培养基、DTT (Gibco BRL 公司), AMV 逆转录酶 (Roche 公司), Primer RNase 抑制剂 (Eppendorff), Superscript II、RNA Guard (Amersham Pharmacia Biotech 公司), Taq DNA 聚合酶、pGEM-T 载体、X-Gal、IPTG、FCS、HEPES、透明质酸酶、NP-40 和 dNTPs (Promega 公司), 引物 HT₍₁₅₎G、HAP1、HT₍₁₅₎C、HAP2、HT₍₁₅₎A、HAP3、OligodT₍₂₄₎ (由上海生物工程公司合成), [α -³²P] dATP、[α -³²P] dCTP (比活度: 111 PBq/mol, 北京亚辉公司). DNA Labeling Kit (TaKaRa 公司), 其他试剂均为国产分析纯产品.

1.2 M II 卵和各期克隆胚胎的获得及处理

选健壮性成熟家兔按常规方法超排处理, 获取 M II 卵细胞, 将胎免成纤维细胞, 饥饿 1~2 天后, 作为供体, 在 Leitz Micromanipulator 下将 M II 卵细胞去核, 并将单一供体细胞移入, 电刺激融合产生重构克隆胚胎. 将重构胚胎在含胎牛血清的 M16 培养基中培养, 分别在 4 h、6 h、30 h 获得 2 细胞、4 细胞、8~16 细胞胚胎. M II 卵细胞用 0.5%

的透明质酸酶和机械的方法去除颗粒细胞, 并将其与 2 细胞、4 细胞、8~16 细胞的胚胎一样用酸性台氏液 (pH 2.0~2.5) 去除透明带, 之后用 PBS 清洗待用.

1.3 SPEDDRT-PCR 反应

逆转录和 PCR 扩增按文献 [8, 11] 操作, 单个 M II 卵细胞或胚胎 (PBS 缓冲液不超过 0.5 μ l) 加入到 4.5 μ l 裂解缓冲液中 (1 $\times$ M-MLV 缓冲液, 5 mmol/L DTT, 0.8% NP-40, 2U primer RNase 抑制剂, 2U RNase guard, 20 μ mol/L dNTPs, 4 μ mol/L 锚定引物 (HT₍₁₅₎G) 加入无 RNase-DNase 水至 4.5 μ l). 将反应管转移至冰上, 小心振荡 1 min, 4℃ 下 1 000 r/min 离心 2 min, 65℃ 变性 5 min, 室温放置 2 min 使锚定引物与 mRNA 退火, 4℃ 离心 2 min, 冰浴 5 min, 加入 50U M-MLV 和 6U AMV 逆转录酶, 42℃ 保温 15 min, 65℃ 10 min 灭活逆转录酶. 设置 RT 体系和单纯加入 PBS 的空白对照.

5 μ l 逆转录产物用于 PCR, 反应体系为 20 μ l (1 $\times$ PCR 缓冲液, 2.5 mmol/L MgCl₂, 2.5 μ mol/L HT₍₁₅₎G, 0.5 μ mol/L HAP1, 7.4 $\times 10^3$ Bq [α -³²P] dATP, 0.8 μ mol/L dNTPs, 2.5U Taq DNA 聚合酶, 加入无 RNase-DNase 水至 20 μ l). 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% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳. 在 -20℃, 放射自显影 2~3 天.

1.4 差别条带的回收及再扩增

从胶上小心切下差别条带, 转入盛有 100 μ l 去离子水的 EP 管中, 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, 乙醇糖原法沉淀. 将 50 μ l 的 PCR 反应体系 (按上述条件, 不加 [α -³²P] dATP) 进行 PCR: 94℃ 10 min; 94℃ 1 min, 40℃ 1.5 min, 72℃ 1.5 min, 20 个循环, 72℃ 10 min; 94℃ 10 min; 94℃ 1 min, 42℃ 1.5 min, 72℃ 1.5 min, 20 个循环; 72℃ 10 min. 1.5% 的琼脂糖电泳鉴定 PCR 产物.

1.5 亚克隆及序列分析

按操作手册将 PCR 产物连接到 pGEM-T 载体上, 热激转化到感受态的大肠杆菌 JM109, 重组质粒进行蓝白斑筛选. 随机挑取白色克隆接种到 LB 液体培养基中, 37℃ 过夜培养, 提取质粒并通过 PCR

(与上述相同的引物和参数)对插入的片段进行检测。将条带单一且大小与前面相符的片段测序,对测序结果进行 NCBI GenBank 数据库同源性检索。

1.6 反向 RNA 印迹鉴定

单胚差异显示所获得的条带经过反向 RNA 印迹进行鉴定。将单一的 M II 卵、2 细胞期、4 细胞、8~16 细胞期胚胎经酸性台氏液 (pH 2.0~2.4) 处理,去除透明带,迅速移入 PBS 溶液中。取一枚卵或胚胎 (不要超过 0.5 μ l PBS) 加到冰上预冷的 4.5 μ l 裂解液中 (1 $\times$ 第一链缓冲液; 0.8% NP-40; 3U prime RNase 抑制剂; 3U RNA guard; 20 μ mol/L dNTPs, 5 μ mol/L 3'-引物 dT₂₄) 混匀后 4℃ 离心 2 min, 65℃ 变性 5 min, 室温退火 2 min。4℃ 离心后放冰上,加入逆转录酶 AMV 6U 和 Superscript II 50U,于冰上加入 4.5 μ l 末端转移反应混合液 (1 $\times$ 末端转移反应缓冲液, 0.8 mmol/L dATP, 12U 末端转移酶), 37℃ 水浴 15 min, 65℃ 10 min 灭活酶。加入 90 μ l 冰上预冷的 PCR 反应混合液 (1 $\times$ PCR 反应缓冲液, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.02% BSA, 0.05% Triton X-100, 1 mmol/L dNTPs, 0.5 μ mol/L 3' 引物 dT₂₄, 10U Taq DNA 聚合酶), 按下列程序进行 PCR: 94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 42℃ 2 min, 72℃ 6 min; 25 个循环, 且每一个循环自动增加 10 s 延伸时间。紧接着执行下列程序: 94℃ 4 min, 每个反应补加 5U Taq DNA 聚合酶, 94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 42℃ 2 min, 72℃ 6 min, 25 个循环。将获得的 cDNA Pool 进行 2% 琼脂糖电泳,照相,转到 Hybond-XL 膜上,以随机引物法标记所获得的 cDNA 片段作为探针,进行反向 RNA 印迹。常规方法杂交、洗膜,杂交液 (1% BSA、1 mmol/L EDTA、0.5 mol/L 磷酸钠、7% SDS), 65℃ 预杂交 10 min, 加入变性的 DNA 探针。65℃ 杂交过夜。洗膜: 用洗液 I (0.5% BSA、1 mmol/L EDTA、40 mmol/L 磷酸钠 pH 7.2、5% SDS) 洗 3 次,每次 10 min; 用洗液 II (1 mmol/L EDTA、20 mmol/L 磷酸钠、pH 7.2、1% SDS) 洗 3 次,每次 20 min。洗膜完毕后, -20℃, 放射自显影 5 天。

1.7 多组织 RNA 印迹

选择 6 月龄雌、雄兔各一只,耳缘静脉注射空气处死后,迅速取肝脏、心脏、肾脏、脑、脾脏、睾丸和卵巢,称重,液氮中速冻,用 RNeasy Mini Kit,按试剂盒说明操作,提取总 RNA,并对总 RNA 进行完整性和定量分析,1.2% 的甲醛变性胶

电泳,照相、转膜,将 A028 标记作为探针,进行 RNA 印迹,并以 18 S 核糖体 RNA 为阳性对照。

2 结 果

2.1 SPEDDRT-PCR 分析结果

对常规的 DDRT-PCR 方法而言,要获得足够的哺乳动物植入前胚胎很困难,要获得足够量的植入前克隆胚胎用于早期发育研究则更困难,单个植入前胚胎 mRNA 差异显示技术的建立使起始材料减少到单个胚胎的水平。不经过总 RNA 提取过程,使用较为温和的 NP-40 作为胞膜裂解剂,可以不破坏核膜,避免基因组污染的情况下进行逆转录反应,减少 RNA 丢失,同时使用了两种 RNase 抑制剂分别从 5' 和 3' 端对 mRNA 进行保护。经多个 M II 卵母细胞 (10 个) 与单个 M II 卵母细胞进行 DDRT-PCR 所获得的扩增条带数及带型质量一致,说明本方法是可靠的^[12]。用 3 对最优化的锚定引物对 (5' AAGCTTTTTTTTTTTTTTTC 3' 和 5' AAGCTTGATTGCC 3'; 5' AAGCTTTTTTTTTTTTTT-G 3' 和 5' AAGCTTTGGTCAG 5'; 5' AAGCTTTT-TTTTTTTTTTTTA 3' 和 5' AAGCTTAACGAGG 5') 进行 DDRT-PCR,结果显示克隆胚胎有类似于正常胚胎发育时的情况,大部分的差异片段出现在 8~16 细胞期,这些差异包括有和無的差异和表达量的差异。对差异显著且有发育阶段特异性的差异片段进行回收和再扩增,图 1 所示为部分再扩增片段的 1.2% 琼脂糖电泳结果。条带单一清晰,大小在 250~500 bp。

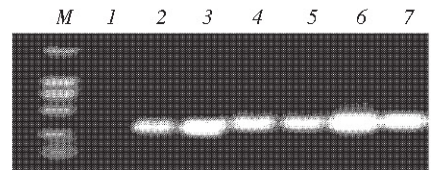


Fig. 1 Results of identification of selected amplicons

M: DNA molecular mass marker (DL2000, from up to down 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100); 2: A028 fragment.

2.2 差异片段序列分析结果

对成功亚克隆的 80 个片段进行 GenBank 数据库同源性检索,用 BLAST 进行 nr 和 EST 检索,其中大约 32.4% 的基因与现存的 DNA 序列无同源性,约 35.2% 的基因仅见于 EST 库中,但基因的功能尚不清楚,有 32.4% 的基因与数据库中现存的 DNA 序列有很高的同源性,且基因的功能有所

了解(数据未显示). 图 2 所示, A028 与卵裂刺激因子 CstF3 基因有 93% 的同源性. 人类卵裂刺激因子的 77 ku 亚基在卵裂期 mRNA 前体加尾的过程中是必需的. 卵裂刺激因子在 mRNA 的 3' 端形成

时, 有助于卵裂多聚腺苷酸化特殊因子 (CPSF) 与上游多聚腺苷酸化序列结合. CstF-77 活性的降低影响一些 mRNA 3' 端的形成, 而其中大多数 mRNA 与有丝分裂有关.



Fig. 2 Nucleotide sequence of A028 and comparison of identification with CstF3

(a) nucleotide sequence of A028; (b) comparison of identification between A028 and CstF3, Score = 278 bits, Expect = 2e - 72, Identities = 187/200 (93%), Gaps = 2/200 (1%).

2.3 反向 RNA 印迹验证

如图 3 所示, RNA 印迹结果表明 A028 差异片段和 β -actin 阳性对照在克隆胚胎不同发育时期的表达模式, A028 在克隆胚胎的 8 ~ 16 细胞期有高丰度表达, 而在 M II 卵、2 细胞和 4 细胞克隆胚中均无表达, 这一时期正是合子基因组激活期, 推测该基因可能是合子基因组激活的产物. 它与胚胎

进一步卵裂有关, 可能与克隆胚胎再程序化相关, 是早期胚胎发育过程顺利进行的关键. 第一泳道 cDNA pool 显示最亮的带, 说明 M II 卵中储存有大量母源 mRNA, 2 细胞期胚胎 (第二泳道) 显示最弱的带, 表明部分母源 mRNA 已被消耗, 而合子基因组尚未被激活, 这一时期的 mRNA 种类和丰度要比其他各期低.

2.4 多组织 RNA 印迹结果

A028 在所检测的组织中, 仅卵巢中有表达, 其他组织中均无表达 (图 4).

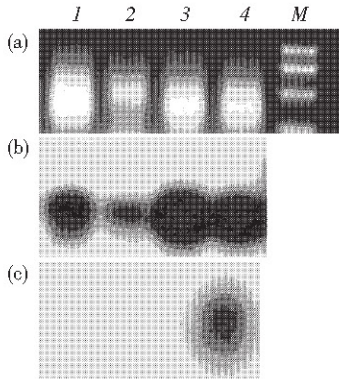


Fig. 3 Reverse Northern blot analyses of selected gene (a) cDNA pool from different stage of NT embryo. M: DNA marker; 1: M II -egg; 2: 2-cell stage NT embryo; 3: 4-cell stage NT embryo; 4: 8 ~ 16-cell stage NT embryo. (b) β -actin positive control. (c) A028 CSITF3 gene.

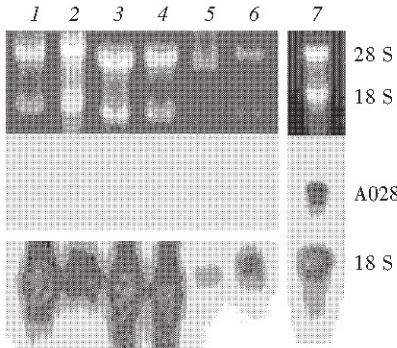


Fig. 4 Tissue distribution of A028 by Northern analysis 1: heart; 2: kidney; 3: liver; 4: spleen; 5: testis; 6: brain; 7: ovary.

3 讨 论

哺乳动物植入前胚胎的发育,其实质是基因在时间和空间上程序化差异表达的过程,正常发育要求基因按一定的时空顺序表达.克隆胚的发育就是已经高度分化的体细胞核去分化和再程序化过程,即重演受精卵的发育,获得启动卵裂和分化能力的过程.发育基因表达调控机制是相当精确的,不仅有质的精确性,而且还存在着量的精确性,目前认为量的精确性似乎更加重要^[12,13].对植入前克隆胚胎早期发育的基因表达进行系统而精确的研究,就必须有一套研究基因差异表达行之有效的方法.DDRT-PCR是研究基因差异表达的有效方法,但在早期胚胎研究中因受材料限制而无法应用.本实验室建立了SPEDDRT-PCR方法,该方法不仅克服了材料不足和发育不同步的限制,而且还可以对胚胎早期的基因表达进行大规模的系统研究.研究表明,SPEDDRT-PCR是一种有效、精确和可靠的分离与鉴别差异表达基因的方法,可以发现更多的瞬时表达基因或突变致畸基因,而这些基因对克隆胚的发育至关重要.这样就大大提高了对植入前胚胎基因表达规律研究的精确性^[8].

因为在兔的早期胚胎发育过程中母型调控向合子型调控的完成是在8~16细胞期,本研究分析了兔MⅡ卵母细胞和兔体细胞移核植入前的2,4,8~16细胞期mRNA的表达情况.我们在选择差异表达片段时,不仅要识别细胞期特异性表达(stage specific expression)的片段,而且还要识别量上有差异的片段.在所获得的80个差异片段中,已经证实的A028是8~16细胞特异性表达的,是兔基因组激活时表达基因,GenBank检索发现A028与CstF3基因同源.在mRNA的3'端形成时,卵裂刺激因子(CstF)从多聚腺苷酸化位点上与下游富含GU序列相结合,这种结合有助于卵裂多聚腺苷酸化特殊因子(CPSF)与上游多聚腺苷酸化序列(AAUAAA)结合的稳定性.CstF-64的64 ku亚基含有一个RNA结合域,这个结合域是与CstF RNA结合活性相关的.它与CstF-77相互作用,CstF-77又与CPSF相互作用.人类卵裂刺激因子的77 ku亚基在卵裂期mRNA前体加尾的过程中是必需的.实验结果表明,CstF-77活性的降低影响一些mRNA 3'端的形成,而其中大多数mRNA与有丝分裂有关^[9].一些母源的mRNA进行胞质多聚腺苷酸化,这种多聚腺苷酸化与这些mRNA的

翻译活性有功能上的联系,多聚腺苷酸化的抑制可以降低翻译活性.对家兔而言,一些母源性mRNA的翻译及转录后修饰(如多聚腺苷酸化)是与翻译活性相关的.mRNA多聚腺苷酸尾加长,则翻译活性增加,反之则减弱.一些母源mRNA的翻译活性需要胞质的腺苷酸化,而且胞质腺苷酸化可能影响发育的一些事件.我们证明在兔胚胎中这两种转录本都被腺苷酸化,并且多聚腺苷酸化的受阻将会抑制翻译^[10].目前,在很多哺乳动物的早期胚胎发育中,母源mRNA的转录后调节尚不清楚.然而在家兔中,大量的母源多聚腺苷酸化mRNA在受精和合子基因组激活之间没被降解.通过比较不同发育阶段的兔植入前移核胚的基因表达模式,进而确定了转录本的表达模式.在整个再程序化过程中,基因的选择性表达决定了机体整个生命过程,基因表达的变化处于控制生物学调节机制的中心位置,基因表达水平的变化是最根本的变化,也是最敏感的变化,反映了机体特定阶段的生命特征.用RNA印迹对A028在各种组织中的表达进行分析,发现A028在所检测的组织中仅在卵巢中有表达,推测A028在卵巢中表达,可能与卵巢中卵泡的发生以及卵母细胞的形成有关.目前,本室正进行A028的cDNA全长克隆,并通过组织原位杂交,构建表达库对该基因的功能进行研究.

参 考 文 献

- 1 Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385** (6619): 810~813
- 2 Chesne P, Adenot P G, Viglietta C, *et al.* Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotechnology*, 2002, **20** (4): 366~369
- 3 Solter D. Mammalian cloning: advances and limitations. *Nat Rev Genet*, 2000, **1** (3): 199~207
- 4 Kanka J. Nuclear transplantation: reprogramming of transplanted nuclei. *Reprod Nutr Dev*, 1999, **39** (5~6): 545~554
- 5 Trounson A, Lacham-Kaplan O, Diamante M, *et al.* Reprogramming cattle somatic cells by isolated nuclear injection. *Reprod Fertil Dev*, 1998, **10** (7~8): 645~650
- 6 Kikyo N, Wolffe A P. Reprogramming nuclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons. *J Cell Sci*, 2000, **113** (Pt 1): 11~20
- 7 Kono T. Influence of epigenetic changes during oocyte growth on nuclear reprogramming after nuclear transfer. *Reprod Fertil Dev*, 1998, **10** (7~8): 593~598
- 8 郁卫东, 杨立新, 李文雅, 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): 308~313
- 9 Yu W D, Yang L X, Li W Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30** (2): 308~313
- 10 Audibert A, Simonelig M. The suppressor of forked gene of

- Drosophila*, which encodes a homologue of human CstF-77K involved in mRNA 3'-end processing, is required for progression through mitosis. *Mech Dev*, 1999, **82** (1~2): 41~50
- 10 Hatton L S, Eloranta J J, Figueiredo L M, *et al.* The *Drosophila* homologue of the 64 kDa subunit of cleavage stimulation factor interacts with the 77 kDa subunit encoded by the suppressor of forked gene. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28** (2): 520~526
- 11 Daniels R, Lowell S, Bolton V, *et al.* Transcription of tissue-

- specific genes in human preimplantation embryos. *Human Reproduction*, 1997, **12** (10): 2251~2256
- 12 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** (2): 167~175
- 13 Shimono A, Behringer R R. Differential screens with subtracted PCR-generated cDNA libraries from subregions of single mouse embryos. *Methods Mol Biol*, 2000, **11** (136): 333~344

Differential Expression Analyses of Development-related Gene in Rabbit Preimplantation NT Embryos *

LI Wen-Yong^{1,2,3)}, Qi Bing^{1,2)}, WANG Yu-Ge¹⁾, YU Wei-Dong^{1,2)}, DU Miao¹⁾, CHEN Qing-Xuan¹⁾ **

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

(²⁾ *Graduated School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;*

(³⁾ *Department of Biology, Fuyang Teachers College, Fuyang 236032, China)*

Abstract Abnormal expression of developmentally important genes leads to inadequate reprogramming development of NT embryo which subsequently causes failure in animal cloning. To identify reprogramming-associated genes in rabbit NT embryo, mRNA differential display has been developed and SPEDDRT-PCR method was set up successfully to overcome the paucity of the biological materials. Using this modified technique, the mRNA content of rabbit NT embryos at different developmental stages (from oocyte to 8~16-cell embryo) were compared, eighty differential displayed bands at different stage in rabbit NT embryo were isolated. A028 amplicon was confirmed by reverse Northern blot. Nucleotide sequences were determined for these cDNAs and database searches identified using NCBI BLAST program. The data suggested that A028 displayed high homology (93%) to CstF3 gene for cleavage stimulation factor, which involved in pre-mRNA 3'-end processing and is required for progression through mitosis. This gene was probably related with preimplantation embryo development, and might play important roles in development of rabbit NT embryo. Of seven organ tissues examined by Northern blot analysis, A028 was only found in ovary. This work paves the way of cloning of the full length of A028 cDNA and further study on gene function.

Key words development-related gene, rabbit NT embryo, reprogramming, single embryos mRNA differential display

* This work was supported by a grant from The Special Funds for Major State Basic Research of China (2000016107).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62553160, E-mail: qingxuanchen@yahoo.com

Received: March 27, 2003 Accepted: June 5, 2003