

端粒酶催化亚基基因在小鼠胚胎发育早期的转录活性*

王宇 姚慧 安晓荣 陈永福 苟克勉**

(中国农业大学生物学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要 用 RT-PCR 引物分别扩增成年昆明 (KM) 小鼠睾丸、脾脏、肾脏、肝脏和胸腺组织的总 RNA 发现, 端粒酶催化亚基基因 *tert* 在这些组织中都有转录, 目标产物正确组装到 PMD 18-T 载体后测序, 结果与已知 cDNA 序列一致. PMSG/hCG 超数排卵方法获得 KM 小鼠成熟卵母细胞和 CZB 溶液体外培养的胚胎 (KM ♀ × KM ♂), 用酸性 Tyrode's 溶液消化透明带后, 采用巢式 RT-PCR, 同时分析 *tert* 基因和持家基因 *hprt* 的转录发现, 对于单个样品来说, 全部卵母细胞 (15 h-post hCG, 10/10) 都存在 *hprt* 转录本, 其中, 只有 40% (4/10) 还同时存在 *tert* 转录本. 原核形成初期 (20 h-post hCG, 6/6) 和原核晚期 (30 h post-hCG, 8/8) 的受精卵, 以及发育至 2-C 早期的胚胎 (35 h-post hCG, 7/7) 都不转录 *tert* 基因, 只有 *hprt* mRNA 存在; 2-C 晚期 (50 h-post hCG) 时, 两个基因同时转录 (4/8) 和一个基因单独转录 (4/8) 的胚胎各占 50%; 从 4-C 阶段 (65 h-post hCG, 4/4) 开始, 包括 8-C 阶段 (75 h-post hCG, 4/4), 桑椹胚阶段 (93 h-post hCG, 4/4), 直至囊胚阶段 (118 h-post hCG, 4/4), 所有的胚胎都同时转录 *tert* 和 *hprt* 基因, 而且转录水平明显升高. 以 20 枚胚胎量为模板进行 RT-PCR 发现, 原核早期, 原核晚期的胚胎中仍然没有 *tert* 基因转录, 只有 *hprt* mRNA, 但是, 在 2-C 早期胚胎中同时检测到了 *hprt* 和 *tert* 两种 mRNA. 结果表明, 持家基因 *hprt* 在成熟卵母细胞受精前后, 以及胚胎早期发育过程中均存在转录本. 40% 卵母细胞中存在的 *tert* mRNA 在受精后很快降解, 检测不到; 胚胎基因组在 2-C 早期开始转录 *tert* mRNA, 转录水平逐渐上升. 结果暗示, 小鼠胚胎的基因组 DNA 在 2-C 早期开始启动, 功能基因 *tert* 也在此时开始转录, 可能与胚胎发育初期的染色体保护有关.

关键词 小鼠, 卵母细胞, 胚胎, *tert* 基因, *hprt* 基因, 端粒酶, RT-PCR

学科分类号 Q27

端粒酶由作为催化亚基的端粒酶反转录酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 和 RNA 模板分子 (telomerase RNA component, TR) 构成全酶. 端粒酶通过延伸染色体末端的端粒 DNA (TTAGGG 重复序列) 来保护增殖细胞中的染色体, 防止染色体发生融合、重组和退化^[1]. 人^[2,3]和小鼠^[4]的 TERT 亚基蛋白确认后不久, 它们的单拷贝全基因即被克隆成功^[5,6]. 端粒酶的表达有高度的调控机制, 它的表达取决于是否存在 TERT 亚基. 哺乳动物体内, 正常表达端粒酶活性的细胞包括干细胞、生殖细胞、连续增殖的细胞等, 其他组织细胞中不表达端粒酶或者活性较低. 剔除 *tert* 基因后, 突变小鼠的所有组织都失去端粒酶活性, 但是其表型表现正常, 有生育能力, 在前面数代中没有异常^[6]. 处于腔前和排卵前卵泡阶段的大鼠卵母细胞, 端粒酶活性比较高, 一旦排卵, 端粒酶活性显著降低, 这些卵母细胞受精后, 端粒酶活性在 4-C 期胚胎中重新出现^[7]. 与之相近, Xu 等^[8,9]发

现, 体外成熟的牛卵母细胞中, 端粒酶活性也非常低, 胚胎期的端粒酶活性在 8-C 阶段以后才重新恢复. 遗憾的是, 目前还未见小鼠早期胚胎中关于 *tert* 基因转录模式的报道. 上述研究对早期胚胎的分析, 建立在同时分析多枚胚胎模板的基础上^[7-9], 由此引发的问题是, 样品中可能存在退化的或者发育失控的卵子或胚胎, 容易影响实验结果. 因此, 本文参照 Daniels 等^[10]建立的奶牛单枚胚胎的 RT-PCR 分析方法, 结合已知的小鼠 *tert* (GenBank AF073311) 和 *hprt* (GenBank BC004686) 基因序列, 以单枚卵母细胞或胚胎为样品, 研究了 *tert* 和 *hprt* 基因在小鼠卵子和胚胎发生过程中的转录模式, 为

*国家自然科学基金资助项目 (30270647), 北京市自然科学基金项目 (5012007), 农业生物技术国家重点实验室开放课题和国家高技术“863”计划项目 (2002AA206311) 资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62733463, E-mail: goukm@cau.edu.cn

收稿日期: 2004-10-26, 接受日期: 2004-12-08

探讨小鼠胚胎基因组的启动, 端粒修复及克隆动物恢复端粒的机理提供参考.

1 材料和方法

1.1 主要化学试剂与溶液

实验用 6~7 周龄昆明 (KM) 小鼠, 购自中国科学院实验动物中心, 在 20~22℃ 恒温, 洁净级动物房饲养, 光周期为 6:00~20:00. 胚胎培养用 CZB^[11], 5.56 mmol/L D- 葡萄糖, 4 g/L BSA; 胚胎操作液为 20 mmol/L HEPES-CZB, 5 mmol/L NaHCO₃, 消化透明带用酸性 Tyrode's 溶液, 按文献[12]所述方法配制.

除特殊注明外, 试剂和药品均购自 Sigma 公司. 与 RNA 有关的器皿全部用 DEPC (BBI 公司) 处理, PCR 引物合成及 DNA 测序由上海博亚公司完成.

1.2 方法

1.2.1 小鼠组织总 RNA 的提取及目标片段的克隆.

颈椎脱臼处死小鼠后, 将睾丸、脾、肾、肝和胸腺等新鲜组织分别在液氮中磨碎, 用 TRIzol (Invitrogen 公司) 法提取组织总 RNA. 紫外分光光度计测定 RNA 浓度, 准备进行 RT-PCR.

使用引物 T1 (5' AGCATTTCACCCAGCGTCTC 3') 和 T2 (5' CTTCAACCGCAAGACCGACA 3'), 分别从睾丸、脾、肾、肝和胸腺组织总 RNA, 用 RT-PCR 扩增 *tert* mRNA 片段 (GenBank AF073311). 具体方法为, 1~2 μg 的组织 RNA 和 1 μl 引物 T2 (10 μmol/L) 混合, 70℃ 保温 5 min 后, 迅速置于冰上, 往反应体系中加入 200 U 反转录酶 SuperScript II (Invitrogen 公司), 5 μl 5× 缓冲液, 1.25 μl 10 mmol/L dNTP, 1 μl RNAsin (Promega 公司), 加双蒸水补足至 25 μl, 然后 50℃ 保温 45 min, 70℃ 10 min, 完成反转录过程. 紧接着, 取 5 μl 上述反转录产物, 与 10 μl 5× 缓冲液, 4 μl 2.5 mmol/L dNTP, 1 μl Platinum Taq 酶 (Invitrogen 公司), 33 μl 双蒸水以及 1 μl 引物 T1 (10 μmol/L), 1 μl 引物 T2 (10 μmol/L) 完全混和, 用 GeneAmp PCR system 9600 (PERKIN ELMER 公司) 进行 *tert* 基因片段的 PCR 扩增 (94℃ 预变性 5 min 后, 40 个循环, 包括 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 60 s, 随后 72℃ 10 min, 4℃ 1 h). 用 1.5% 的琼脂糖进行 DNA 凝胶电泳, 检测扩增产物, 并且使用离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 吸收试剂盒 (北京天为时代公司), 回收脾脏组织的 RT-PCR 产物,

将其克隆至 PMD18-T 载体 (大连宝生物工程公司) 上测序.

1.2.2 小鼠卵母细胞及胚胎的制备.

6~7 周龄的 KM 母鼠, 腹腔注射 7.5 U 的 PMSG (天津市华孚高新生物技术公司), 48 h 后, 腹腔再注射 7.5 U 的 hCG (宁波市激素制品有限公司) 进行超数排卵. 部分小鼠在注射 hCG 后 15 h, 从输卵管收集卵丘 - 卵母细胞 - 复合体, 移入 37℃ 预热的 HEPES-CZB, 含 300 U/ml 透明质酸酶, 保持 5 min, 去除卵丘细胞, HEPES-CZB 洗涤 3 次后, 将 PB1 清晰可见的卵母细胞移入 CZB 培养液, 置入 37℃ 5% CO₂ 培养箱, 准备去除透明带. 另一部分 PMSG/hCG 超数排卵处理的小鼠, 在注射 hCG 后立即与 3~4 月龄的 KM 种公鼠合笼. 注射 hCG 后 20 h, 从有阴栓母鼠的输卵管中收集受精卵, 用 37℃ 预热的 HEPES-CZB, 300 U/ml 透明质酸酶, 去除卵丘细胞, HEPES-CZB 洗涤 3 次后, 将受精卵移入 CZB, 5.56 mmol/L D- 葡萄糖, 4 g/L BSA 培养液, 置入 37℃ 恒温的 5% CO₂ 培养箱. 培养胚胎时, 使用 24 孔培养盘 (Nunc 公司), 培养体系为 600 μl, 每孔 40~50 枚胚胎, 覆盖 300 μl 石蜡油. 在注射 hCG 后 20, 30, 35, 50, 65, 75, 93 和 118 h 时, 分别收集原核早期、原核晚期、2-C 早期、2-C 晚期、4-C、8-C、桑椹和囊胚阶段的体外培养胚胎, 准备去除透明带.

参照文献[12]所述方法, 用酸性 Tyrode's 溶液 (pH 2.5) 溶解卵母细胞和胚胎的透明带. 将收集的卵母细胞和各个阶段的体外培养胚胎, 10 枚为 1 组, 分别放在 37℃ 预热的酸性 Tyrode's 溶液中, 在解剖镜下观察, 透明带溶解后, 迅速用大量 Hepes-CZB 溶液中和, 并且用 PBS (Hyclone 公司) 含 1% BSA 溶液洗涤, 然后分别取出单枚或者多枚去透明带的卵母细胞或各阶段胚胎, 放入 5 μl 冰浴的 0.8% Igepal (ICN 公司), 5 mmol/L DTT, 1 U/μl RNAsin (Promega 公司) 裂解液中, 用不含 RNA 酶的薄壁 PCR 管在 -80℃ 冰箱中保存, 准备进行 RT-PCR.

1.2.3 卵母细胞和胚胎的 RT-PCR.

去除透明带的卵母细胞或者胚胎, 解冻后, 80℃ 温育 5 min, 采用巢式 RT-PCR 一步法试剂盒 (Invitrogen 公司) 来扩增卵母细胞和胚胎中的 *tert* mRNA. 第 1 轮 PCR 使用引物 T1 和 T2, 目标产物为 997 bp; 第 2 轮 PCR 使用引物 T3 (5' CATTTCACCCAGCGTCTC 3') 和 T4 (5'

40% (4/10)的卵母细胞同时存在 *tert* 基因和 *hpert* 基因的转录本(*tert*⁺/*hpert*⁺, 表 1, 图 3-2); 另外有 60% (6/10)的卵母细胞只能获得 *hpert* 的反转录产物, 扩增不到 *tert* 的目标条带(*tert*⁻/*hpert*⁺, 表 1, 图 3-3).

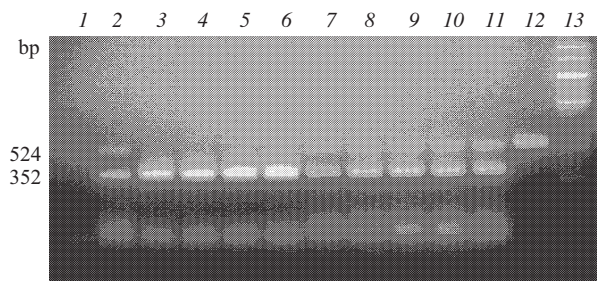


Fig.3 Analysis of nested RT-PCR pattern of *tert*/*hpert* genes on single-copy matured oocyte or preimplantation embryo at various stages in mouse

The 524 bp and 352 bp bands corresponding to the PCR product of the *tert* and *hpert* gene fragment, respectively. Transcripts of *hpert* were detected at all stages of preimplantation development analysed and oocyte (15 h-post hCG). 1: reaction lacking reverse transcriptase as negative control; 2: *tert* transcripts were only found in 40 % (4/10) of matured oocytes; 3: no *tert* transcripts were detected in 60 % (6/10) of matured oocytes; 4: embryo at early pronuclear stage (20 h-post hCG, 6/6); 5: late pronuclear stage (30 h post-hCG, 8/8); 6: early 2-C stage (35 h-post hCG, 7/7); 7: half of embryo analysed at late 2-C stage (50 h-post hCG, 4/8) shown expression of *tert* and *hpert* genes simultaneous (lane 7); 8: 4-cell stage (65 h-post hCG, 4/4); 9: 8-cell stage (75 h-post hCG, 4/4); 10: morulae stage (93 h-post hCG, 4/4); 11: the blastocyst stage (118 h-post hCG, 4/4); 12: the positive control of *tert* cDNA; 13: DNA marker.

单枚胚胎的巢式 RT-PCR 结果如图 3 (4~11) 和表 1 所示. 具体来看, 刚刚形成原核 (20 h-post hCG) 的受精卵(图 3-4, 6/6), 接近分裂的原核晚期 (30 h-post hCG) 的受精卵 (图 3-5, 8/8), 以及发育至 2-C 早期 (35 h-post hCG) 的胚胎(图 3-6, 7/7), 持家基因 *hpert* 的转录正常, 但是均不转录 *tert* 基因(*tert*⁻/*hpert*⁺). 2-C 晚期 (50 h-post hCG) 时, 部分胚胎 (4/8) 的基因组 DNA 开始启动, 同时开始转录 *tert* 基因和 *hpert* 基因(*tert*⁺/*hpert*⁺, 图 3-7), 部分胚胎只转录其中 1 个基因 (*tert*⁻/*hpert*⁺, 2/8; *tert*⁺/*hpert*⁻, 2/8). 从 4-C 阶段(65 h-post hCG, 图 3-8, 4/4)开始, 包括 8-C 阶段(75 h-post hCG, 图 3-9, 4/4), 桑椹胚阶段(93 h-post hCG, 图 3-10, 4/4), 直至囊胚阶段(118 h-post hCG, 图 3-11, 4/4), 所有的胚胎都同时转录 *tert* 和 *hpert* 基因(*tert*⁺/*hpert*⁺), 而且转录水平明显升高, 当胚胎发育至桑椹胚和囊胚期时,

无论是 *hpert* 还是 *tert* 的转录水平都很高, 第 1 轮 PCR 就能扩增到 *tert* 和 *hpert* 基因的产物.

以单个受精卵和 2-C 早期 (图 3-4~6) 的胚胎为模板时, 只证明了 *hpert* mRNA 的存在, 没有发现 *tert* 基因的转录(*tert*⁻/*hpert*⁺). 继续增加模板数量, 使用 20 枚胚胎进行 RT-PCR 时, 原核早期 (图 4-2) 和原核晚期 (图 4-3) 的单细胞胚胎中仍然没有 *tert* 转录, 只有 *hpert* 转录本存在(*tert*⁻/*hpert*⁺). 但是, 在 2-C 早期却检测到了 *tert* mRNA 的存在(*tert*⁺/*hpert*⁺, 图 4-4).

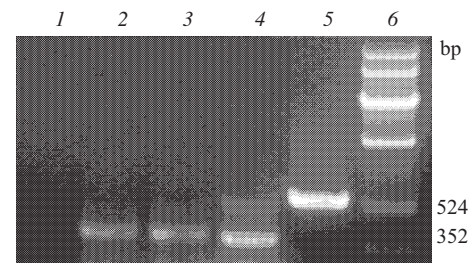


Fig.4 Analysis of RT-PCR pattern of *tert*/*hpert* genes on multi-copy (20) embryos from 1-C to early 2-C stage in mouse

The 524 bp and 352 bp bands corresponding to the PCR product of the *tert* and *hpert* gene fragment, respectively. 1: negative reaction lacking reverse transcriptase; 2,3: no *tert* mRNA was present in multi-copy (20 embryos/sample) embryo samples at early and late pronuclear stage; 4: embryos at early 2-C stages shown *tert* transcripts; 5: the positive control of *tert* cDNA; 6: DNA marker.

3 讨 论

本文在建立 RT-PCR 条件的过程中, 为了确保扩增产物来源于 cDNA 而不是基因组, 我们采取了两个措施: 一方面, 每对引物的上下游都设计在不同的外显子上, 可以根据产物长度判断目标条带是 cDNA 的扩增结果, 而不是基因组 DNA 的产物; 另一方面, 每一次 RT-PCR 实验中, 都安排了只添加 Taq 酶, 无反转录酶的阴性对照实验, 结果没有出现 997 bp 的扩增片段, 也说明目标产物源于 *tert* 的 cDNA, 而不是基因组 DNA. 最后, 将扩增产物经回收后克隆于 PMD18-T 载体上, 并且进行了测序和比较, 与 GenBank 库中已知的小鼠 TERT 催化亚基的 cDNA 序列 (AF073311) 完全一致, 表明我们确实获得的是 *tert* 基因的转录产物. 本文的实验结果发现, *tert* 基因在 KM 小鼠的睾丸、脾脏、肾脏、肝脏和胸腺等多种组织中均转录, 与 C57BL/6J 品系小鼠^[14]和基因剔除小鼠^[6]的辜

丸、脾脏、肾脏、肝脏和胸腺组织的转录分析结果相一致,表明 *tert* 基因在小鼠组织中的转录没有品系区别。

本文结果发现, PMSG/hCG 超数排卵处理后, 40% 的成熟卵母细胞同时存在 *tert* 和 *hprt* 的 mRNA, 60% 的卵母细胞中没有 *tert* 的 mRNA 存在, 目前还无法推测造成这种差异的原因。估计在促性腺激素的刺激作用下, 部分卵母细胞成熟不良, 导致 *tert* 基因的 mRNA 量表现异常, Eisenhauer 等^[7]发现, 大鼠的成熟卵母细胞中, *tert* mRNA 的水平非常低。因此, 我们推断, 不存在 *tert* mRNA 的小鼠卵母细胞应该属于成熟良好的卵母细胞。哺乳动物的成熟卵母细胞中, 常常储存有大量的功能基因 mRNA^[15], 如 tPA^[16], 建立胚胎基因组转录模式需要的母源性蛋白 *mater*^[17], 与胚胎基因组甲基化相关的 *dnmt1*^[18]等。卵母细胞受精后, 这些 mRNA 才开始翻译成蛋白质, 行使相应的功能, 参与胚胎甚至胎儿的发育过程。本文结果发现, 原核期的受精卵中没有 *tert* mRNA 存在 (图 4-2, 4-3), 因此, 对于储存有 *tert* mRNA 的卵母细胞来说, 这些 mRNA 在受精后很快消失, 在卵裂前没有明显的生物学意义。胚胎发育早期的端粒酶 *tert* 基因在 2-C 早期开始转录, 水平较低, 需要足够的胚胎数量才能检测到 (图 4-4), 显示整个基因组在 2-C 早期阶段已经开始启动, 而且是刚刚开始启动。支持小鼠胚胎基因组的转录在 2-C 早期开始启动的观点^[19,20], *tert* 基因在哺乳类胚胎基因组启动后立即转录的结论, 已经在牛^[8,21]和大鼠^[7]中得到了证实。

对人类样品的 RT-PCR 分析发现, 持家基因 *hprt* mRNA 存在所有卵母细胞和早期胚胎发生的各个阶段^[22]。我们也发现, 小鼠的全部卵母细胞中均有 *hprt* mRNA 存在, 因此, 认为持家基因 *hprt* 也属于卵母细胞中转录后储存的功能基因, 受精卵和 2-C 早期的胚胎 (图 3 4~6; 图 4 2~4) 中存在的 *hprt* mRNA, 应当来源于卵母细胞, 而不是胚胎基因组 DNA 新转录的产物, 母源的 *hprt* mRNA 一直维持到 2-C 早期, 即胚胎基因组开始转录新的 *hprt* 基因为止。在 2-C 晚期, 母源的 *hprt* mRNA 可能已经完全降解, 在这个时期, 如果胚胎基因组的转录模式还没有完全建立或者有错误的话, 功能基因的转录就出现异常。本文中, 2-C 晚期的胚胎, 只有 50% 同时转录 2 种 mRNA, 另外 50% 只转录出其中 1 种 mRNA (表 1), 可能就是这个原因, 人

类胚胎中也存在这种只转录其中 1 个基因的现象^[22]。对于转录正常启动的胚胎来说, 它们能够正常的发育下去, 而且一直在同时转录这两种功能基因, 并且随着胚胎细胞数的增多, 转录活性越来越明显, 只需要普通的 RT-PCR 就能检测到。

研究奶牛^[23,24]和绵羊^[25]的体细胞克隆发现, 重新编程是衰老细胞逆转的重要机制。分化的体细胞经过卵母细胞的重新编程后, 端粒长度可能恢复到该细胞基因型的水平, 这个恢复过程从重构胚胎基因组启动开始, 需要很长的一段时期。当然, 核移植过程并不总是完全复始端粒长度, 目前, 还不能辨别其中的关键。在胚胎发育早期阶段, 对端粒的完全恢复非常重要, 有利于胚胎分化出的所有组织中染色体的稳定。因此, 本文建立的 *tert* 等功能基因在胚胎发育早期的转录模式, 可以为小鼠重新编程体细胞端粒的恢复及其机制提供有益的参考。

参 考 文 献

- 1 Cristofari G, Lingner J. Fingering the ends: how to make new telomeres. *Cell*, 2003, **113** (5): 552~554
- 2 Meyerson M, Counter C M, Eaton E N, *et al.* hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*, 1997, **90** (4): 785~795
- 3 Nakamura T M, Morin G B, Chapman K B, *et al.* Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, 1997, **277** (5328): 955~959
- 4 Greenberg R A, Allsopp R C, Chin L, *et al.* Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene*, 1998, **16** (13): 1723~1730
- 5 Wick M, Zubov D, Hagen G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene*, 1999, **232** (1): 97~106
- 6 Yuan X, Ishibashi S, Hatakeyama S, *et al.* Presence of telomeric G-strand tails in the telomerase catalytic subunit TERT knockout mice. *Genes Cells*, 1999, **4** (10): 563~572
- 7 Eisenhauer K M, Gerstein R M, Chiu C P, *et al.* Telomerase activity in female and male rat germ cells undergoing meiosis and in early embryos. *Biol Reprod*, 1997, **56** (5): 1120~1125
- 8 Xu J, Yang X. Telomerase activity in bovine embryos during early development. *Biol Reprod*, 2000, **63** (4): 1124~1128
- 9 Xu J, Yang X. Telomerase activity in early bovine embryos derived from parthenogenetic activation and nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2001, **64** (3): 770~774
- 10 Daniels R, Hall V, Trounson A O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol Reprod*, 2000, **63** (4): 1034~1040
- 11 Chatot C L, Lewis J L, Torres I, *et al.* Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol Reprod*, 1990, **42** (3): 432~440
- 12 Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, *et al.* *Manipulating The Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003. 141~208

- 13 Koopman P, Gubbay J, Collignon J, *et al.* *Zfy* gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. *Nature*, 1989, **342** (6252): 940~942
- 14 Martin-Rivera L, Herrera E, Albar J P, *et al.* Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (18): 10471~10476
- 15 Eichenlaub-Ritter U, Peschke M. Expression in *in vivo* and *in vitro* growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Hum Reprod Update*, 2002, **8** (1): 21~41
- 16 Wassarman P M, Albertini D F. The mammalian ovum. In: Knobil E, Meill J D, eds. *The Physiology of Reproduction*, **2**. New York: Raven Press, 1994. 79~122
- 17 Tong Z B, Gold L, Pfeifer K E, *et al.* Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nat Genet*, 2000, **26** (3): 267~268
- 18 Howell C Y, Bestor T H, Ding F, *et al.* Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the *Dnmt1* gene. *Cell*, 2001, **104** (6): 829~838
- 19 Kageyama S I, Nagata M, Aoki F. Isolation of nascent messenger RNA from mouse preimplantation embryos. *Biol Reprod*, 2004, **71** (6): 1948~1955
- 20 Rinaudo P, Schultz R M. Effects of embryo culture on global pattern of gene expression in preimplantation mouse embryos. *Reproduction*, 2004, **128** (3): 301~311
- 21 Betts D H, King W A. Telomerase activity and telomere detection during early bovine development. *Dev Genet*, 1999, **25** (4): 397~403
- 22 Daniels R, Lowell S, Bolton V, *et al.* Transcription of tissue-specific genes in human preimplantation embryos. *Hum Reprod*, 1997, **12** (10): 2251~2256
- 23 Betts D H, Bordinon V, Hill J R, *et al.* Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (3): 1077~1082
- 24 Tian X C, Xu J, Yang X. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nat Genet*, 2000, **26** (3): 272~273
- 25 Clark A J, Ferrier P, Aslam S, *et al.* Proliferative lifespan is conserved after nuclear transfer. *Nat Cell Biol*, 2003, **5** (6): 535~538

Gene Transcription of Mouse Telomerase Catalytic Subunit in Preimplantation Embryos*

WANG Yu, YAO Hui, AN Xiao-Rong, CHEN Yong-Fu, GOU Ke-Mian**

(State Key Laboratories for Agrobiotechnologies, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Telomerase is a ribonucleoprotein complex that elongates telomeres, allowing to stabilize the ends of chromosomes during cell proliferation. Here nested PCR method was used to describe the transcriptional patterns of mTERT (mouse telomerase reverse transcriptase) gene, encoding the catalytic subunit of mouse telomerase expressed both in murine adult tissues and preimplantation embryos cultured in CZB medium from zygote to blastocyst. The analysis revealed that the mTERT mRNA expression in adult tissues, such as testis, spleen, kidney, liver, and thymus. For single-copy zona-free oocyte or embryo samples, the *tert* transcript in 60% (6/10) of matured oocytes (15 h-post hCG) had been not found, while the transcripts of housekeeping gene *hprt* located in all matured oocytes (10/10). No *tert* mRNA was present in single-copy embryo samples at early (20 h-post hCG, 6/6), late (30 h post-hCG, 8/8) pronuclear stage, or early 2-C stages (35 h-post hCG, 7/7), although the *hprt* mRNA transcriptions were found during this period. Interestingly, the embryos at early 2-C stage expressed of *tert* and *hprt* gene together in multi-copy (20 embryos/sample) embryo samples. Half of single-copy embryos (4/8) shown expression of two genes simultaneous at late 2-C stage (50 h-post hCG), while the other half of them (4/8) only transcript either *tert* (2/4) or *hprt* gene (2/4). Expression of *tert* and *hprt* genes were detected simultaneous in all single-copy embryos developed at 4-C (65 h-post hCG, 4/4), 8-C (75 h-post hCG, 4/4), morulae (93 h-post hCG, 4/4) and blastocyst (118 h-post hCG, 4/4) stages and the level of transcription increased. These results suggested that *tert* gene was began to express in embryos at early 2-C stage during the process of embryonic genome activation and the level of transcription was increased during embryogenesis.

Key words mouse, oocyte, embryo, *tert* gene, *hprt* gene, telomerase, RT-PCR

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30270647), Beijing Municipal Natural Sciences Foundation, China (5012007) and State 863 High Technology R&D Project of China (2002AA206311).

**Corresponding author. Tel: 86-10-62733463, E-mail: goukm@cau.edu.cn

Received: October 26, 2004 Accepted: December 8, 2004