



# 单卵 RT-PCR 方法的优化和对牛卵母细胞中发育相关基因的表达研究\*

李彦欣<sup>1)</sup> 李世杰<sup>1,2)</sup> 赵定胜<sup>1)</sup> 赵春江<sup>1)</sup> 杜卫华<sup>1)</sup> 戴蕴平<sup>1)</sup> 李宁<sup>1)</sup>\*\*

(<sup>1)</sup> 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; <sup>2)</sup> 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001)

**摘要** 到目前为止, 虽然许多动物如羊、牛、猪、鼠、兔、马、骡等均已克隆成功, 但克隆技术普遍存在着克隆效率低、流产率高、畸胎、巨胎和死亡率高等问题. 为了较全面地探索其基因方面的原因, 需要对大量的候选基因进行分析. 而利用传统的 RT-PCR 方法从单个卵母细胞或胚胎中获得的 RNA 量不足以分析大量的基因. 为了解决这一问题, 利用并优化了一套全新的扩增细胞中整体 cDNA 的方法, 使微量材料进行大量的基因表达分析成为现实. 通过该方法研究了与发育相关的重要基因 *IL6*、*IF $\tau$* 、*CX43*、*PSMC3*、*oct4* 和 *DNMT1* 在牛卵母细胞中的表达. *IL6*、*IF $\tau$*  和 *CX43* 的表达与前人报告的结果相同, 而 *DNMT1* 和 *PSMC3* 在牛卵母细胞中表达情况此前未见报道.

**关键词** 单卵 RT-PCR 方法, 发育相关, 基因表达

**学科分类号** Q27

随着克隆技术的诞生, 研究者对卵中诱导体细胞重编程的机制越来越感兴趣, 并发现在卵中含有大量的 RNA, 而这些 RNA 编码哪些基因, 并对卵和胚胎的早期发育有什么作用还不完全清楚. 为了分析卵中基因表达的情况, 研究者们陆续建立了不少获得卵或胚胎中 cDNA 的方法: 如 Rizos 等<sup>[1]</sup> 用 10~25 个胚胎或卵一起提取所含 RNA, 经反转录所得 cDNA 只能作 10 次左右的反应. 为了减少 RNA 的损失, Daniels 等<sup>[2]</sup> 用一个卵在同一管中作反转录, 但一个卵反转录产物只能作 4 次反应; 进而 Schuitz 等<sup>[3]</sup> 用过柱子的方法来分离 mRNA, 但所得 mRNA 也只能对有限目的基因进行分析. 在 Brady 等<sup>[4]</sup> 建立并经 Bloor<sup>[5]</sup> 和 Metcalfe<sup>[6]</sup> 改进方法的基础上, 优化建立本方法, 解决了用一个卵或囊胚在没有改变各个基因的相对量的条件下, 得到的 cDNA 可对上百个基因进行分析. 到目前为止, 在研究家畜卵和胚胎的基因表达分析时, 还没有人利用过该方法.

目前研究认为, 囊胚的正常形成与胚胎发育相关基因表达是否正常及整个基因组的调控有关. 为此我们选择了与这几方面相关的 6 个基因: *oct4*、*CX43*、*DNMT1*、*IL6*、*IF $\tau$*  和 *PSMC3* 来观察牛卵母细胞中各种基因的表达情况. *oct4* (the octamer-binding transcription factor) 为 POU 转录因子家族成员, *oct4* 表达与未分化表型有关, 在早期胚胎发

育中起转录调节作用. 缝隙连接蛋白连接子 *CX43* (Connexin43) 对于维持细胞融合以及随后的囊胚形成是十分必要的. 由其构成的连接与水 and 防冷冻物质的运输有关. *DNMT1* (DNA methyltransferase) 是一个胚胎期重要的 DNA 甲基化转移酶, 与胚胎中基因组的印记相关, 也是胚胎基因组编程中的一个关键环节, 在鼠中敲除该基因对胚胎是致死的; 植入前胚胎产生的生长因子之一的白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 能激活  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶, 促进  $\text{Na}^+$  浓度梯度变化, 改变囊胚腔液体渗透压, 从而影响囊胚的形成; 植入前胚胎发育基因 *IF $\tau$*  (interferon tau) 与胚胎的早期分化和滋养层的功能相关, 在鼠中研究表明, 可调节胚胎植入前卵裂速度的快慢, 以及胚胎生存发育的能力; *PSMC3* 为 ATP 酶复合物的一个重要的保守部分, 敲除基因 *PSMC3* 的鼠胚胎在体外培养的第 5 天开始就出现胚胎细胞的萎缩, 不能分化为内细胞团和外面的滋养层<sup>[7-17]</sup>. 其中发育相关基因 *IL6*、*IF $\tau$* 、*CX43* 和 *oct4* 在牛卵母细胞中的表达情况已经有报

\* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G20000161) 和国家高技术“863”计划生物工程主题资助项目 (2001AA213091).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-62891146 或 010-62893323

E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

收稿日期: 2004-01-12, 接受日期: 2004-02-25

道, 本实验通过对其表达研究来验证该方法的可行性, 而 *PSMC3* 和 *DNMT1* 在牛卵母细胞中的表达情况未见报道。

## 1 材料与方方法

### 1.1 牛卵母细胞的收集和体外成熟

从屠宰厂收集成年牛的卵巢放入 30℃ 的生理盐水中, 在 4 h 内送到实验室。将卵巢在 37℃ 的 PBS (GiBco) 液中洗 3 遍后取出放一容器内, 选择直径为 2~8 mm 的卵泡用 10 ml 注射器吸取卵泡液, 回收颗粒细胞紧密的卵丘-卵母细胞复合体。用成熟液洗涤 2 遍 (成熟培养液为 M199 (GiBco 公司) + 10% FBS (GiBco 公司) + 10 U/ml FSH (Sigma 公司) + 100 U/ml LH (Sigma 公司) + 1 mg/L Estradiol (Sigma 公司) + 100 U/ml 青霉素 (Sigma 公司) + 100 mg/L 链霉素 (Sigma 公司))。然后将 50~60 枚/孔的卵丘-卵母细胞复合体放入成熟液中, 在 38.5℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养成熟 18~20 h。将成熟培养后的卵丘-卵母细胞复合体放入 0.1% 透明质酸酶 (Sigma 公司) 的管内振荡 2~3 min。再用玻璃吸管轻轻吹打卵母细胞, 使卵丘与卵母细胞完全脱离。选取排出第一极体的形态较好的一个卵 (或 20 个) 带 0.5 μl 培养液放入除 RNA 酶的 PCR 管中, 迅速将其投入液氮中保存, 直到使用时取出。

### 1.2 单卵中 cDNA 的扩增

从液氮取出含单卵的 PCR 管, 待其恢复到 0℃ 时, 迅速加入 4 μl 混合裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 75 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 20 mmol/L DTT, 40 mg/L 牛血清白蛋白, 0.5% NP40, 10 pmol/L dNTPs, 25 pmol/L Oligo dT24, 1 U/μl RNAsin) 混合均匀, 离心后加入 10 μl 矿物油。在 65℃, 加热 1 min, 室温冷却 3 min, 放置在冰上。加入反转录酶 25 U (Promega 公司), 混匀后 37℃ 温浴 15 min, 65℃ 温浴 10 min 后置于冰上。这样将扩增的 cDNA 限制在 300~600 bp 的片段。

### 1.3 cDNA 的加尾反应

在同一 PCR 管中加入 1 倍反应液 (0.33 mol/L 二甲砷酸钾, 6.7 mmol/L CoCl<sub>2</sub>, 0.67 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L dATP, 0.5 U/μl TdT, Promega

公司) 并混合均匀, 37℃ 温浴 15 min, 65℃ 温浴 10 min 后置于冰上。这一步可将反转录获得的 cDNA 3'端加上 ployA 的尾巴。为以后 PCR 扩增全部 cDNA 提供了共有序列。

### 1.4 初步 PCR 扩增全部 cDNA

在同一 PCR 管中加入反应液 (终浓度为 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L dNTPs, 20 mg/L 牛血清白蛋白, 0.1% Triton X-100, 4 μmol/L 1dT24 引物, 0.1 U/μl Taq 酶) 混合均匀 (1dT24 的序列为: CATCTCGAGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-TTTTTT)。扩增的条件为: 94℃ 变性 2 min, 以 94℃ 变性 1 min, 42℃ 退火 2 min, 72℃ 延伸 6 min 的条件进行 25 个循环后, 以 94℃ 变性 1 min, 42℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min 的条件再进行 25 个循环, 在进行 25 个循环后加 1 U Taq 酶。

### 1.5 进一步 PCR 扩增全部 cDNA

以 1 μl 的上述 PCR 反应液作为模板, 在 50 μl 反应体系中加入 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L dNTPs, 2 μmol/L 1dT24 引物, 0.025 U Taq 酶, 用灭菌水补到 50 μl。PCR 条件为 94℃ 变性 2 min, 以 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s 的条件进行 50 个循环, 在进行 25 个循环后加 1 U Taq 酶。本方法以在反转录时不加反转录酶作为阴性对照。

### 1.6 参照基因 $\beta$ -actin 的扩增

将上述产物按一定倍数稀释后, 取 1 μl 作为模板, PCR 的反应体系为 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.025 U/μl Taq 酶, 1 μmol/L 的  $\beta$ -actin 引物, 以 62℃ 为退火温度进行 17 个循环。取 10 μl 反应产物用 2% 琼脂糖电泳鉴定。

### 1.7 目的基因的扩增

取 1 μl 上述  $\beta$ -actin 刚出带的 10 倍浓度的反应液作为模板, PCR 的反应体系为 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.025 U/μl Taq 酶, 1 μmol/L 目的基因的引物。按表 1 中的退火温度进行 40 个循环。取 10 μl 反应产物用 2% 琼脂糖电泳鉴定。

**Table 1 Primers of genes related to development and condition for RT-PCR**

Genes	No. sequence	Primer pair sequence	Product /bp	Annealing /°C	Homology /%	Accession number
<i>β-actin</i>	M10277	gacagcagtcggttggacc caggtaaagccctggctgc	370	62	/	/
<i>IF<math>\tau</math></i>	AF196321	ctgaggaccacatgctaggt ttcaggtagacatggatgcc	385	59	/	/
<i>IL6</i>	X57317	cttcactccattoctgtct ccagtgtctccttgcctt	233	60	/	/
<i>CX43</i>	NM_174068	gtgatgcgaaaggaagaga catgaagatgatgaagatggt	306	60	100	/
<i>PSMC3</i>	BM076114	catccaccaagccaatcaca cgaagtgttgcgagtcacc	235	57	100	/
<i>oct4</i>	Af022987	tcccaggacatcaaagctct cgatgtggetaatttctgc	385	58	99.22	AY490804
<i>DNMT1</i>	NM001379	ggatgacagagaagacaagg cccctgggcattttttgg	250	53	89.60	AY486458

## 1.8 传统 RT-PCR 方法

将含有 20 个卵的 PCR 管从液氮中取出, 用 100  $\mu$ l ISOGEN 液一步法 (按照试剂程序) 提取卵中的 RNA, 用 15 U/ $\mu$ l DNA 酶 (Promega 公司) 除 DNA 37°C 35 min. 回收 RNA, 将全部 RNA 加入到 20  $\mu$ l 的标准反转录体系中进行反转录, 取 2  $\mu$ l 作为目的基因扩增的模板, 同上进行目的基因的鉴定.

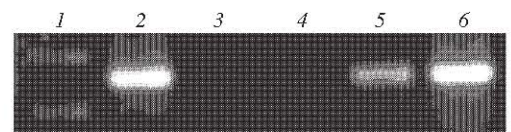
## 2 结 果

### 2.1 对 Bloor 和 Metcalfe 单卵 RT-PCR 方法的优化

为了更好地扩增单个卵中的 RNA, 我们作了两种比较: a. 将  $MgCl_2$  浓度从一般的 1.5 mmol/L 升高到 3 mmol/L 时差异较大. 在  $MgCl_2$  浓度为 1.5 mmol/L, 不管哪种 Taq 酶所得的 cDNA 均不能将 *β-actin* 扩出, 而升到 3 mmol/L 时可用 1  $\mu$ l 1/10 浓度的 cDNA 扩出, 并且结果稳定. 如果一个目的基因作 3 次重复, 一个卵所能扩增的目的基因的数量为  $50 \times 20/3$  即 333 个. b. 在 Bloor 和 Metcalfe 方法中, 需要用质量较好的酶, 如 Invitrogen Taq 酶, 因此价格方面比较贵, 对大批量试验费用较高. 我们发现, 用 Promega Taq 酶扩增时, 反应中间再加一次酶, 效果比用 Invitrogen Taq 酶更好, 而价格却较便宜, 从而使该项技术的成本下降了很多.

### 2.2 参照 *β-actin* 的扩增结果

将第二次扩增的 cDNA 产物分别稀释 5 倍, 10 倍和 20 倍后, 各取 1  $\mu$ l 进行 *β-actin* 的 PCR 扩增. 阳性对照为用传统方法提取的 cDNA; 阴性对照为不加反转录酶的反转录产物. 结果表明 (图 1): 稀释 10 倍以内可见目的带, 说明取 1  $\mu$ l 第二次扩增的 cDNA 产物便足够用于目的基因的扩增.



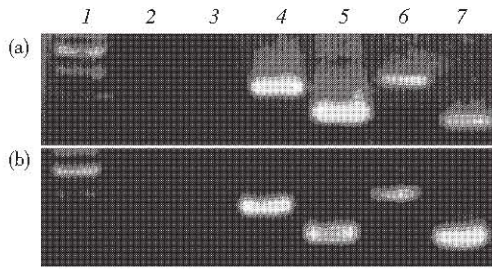
**Fig. 1 Results of 17 cycles *β-actin* PCR from amplification cDNA pools**

1: 1 kb marker; 2: cDNA gained by the conventional method; 3: amplification cDNA pools from single bovine oocyte without reverse transcriptase; 4~6: amplification cDNA pools from single bovine oocyte with reverse transcriptase. 4: cDNA diluted 20 $\times$ ; 5: cDNA diluted 10 $\times$ ; 6: cDNA diluted 5 $\times$ .

### 2.3 用单卵 RT-PCR 方法扩增目的基因

依照 *β-actin* 的扩增结果, 我们对 6 个牛卵母细胞进行重要发育相关基因 *IL6*、*IF $\tau$* 、*CX43*、*PSMC3*、*oct4*、*DNMT1* 的扩增, 结果见图 2, 在 4 个牛卵母细胞中的表达情况见表 2. 其中 *IL6*、*IF $\tau$*  未见目的带, 说明这两个基因在牛卵母细胞中未见

表达; 而 *CX43*、*PSMC3*、*oct4*、*DNMT1* 有目的带, 说明这四个基因在牛卵母细胞中有表达。



**Fig. 2 The comparative RT-PCR results of genes related with development by cDNA pools from single bovine oocyte with the conventional method**

For target gene amplification 1  $\mu$ l of normalized cDNA was used as template in a 25  $\mu$ l final reaction volume by cDNA pools from single bovine oocyte, but 2  $\mu$ l cDNA was used by the conventional method. (a) by cDNA pools from single bovine oocyte; (b) by the conventional method. 1: 1 kb marker; 2: *IL6*; 3: *IF7*; 4: *CX43*; 5: *DNMT1*; 6: *oct4*; 7: *PSMC3*.

**Table 2 The expression of genes related to development in bovine oocytes**

Genes	Oocyte No. 1	Oocyte No. 2	Oocyte No. 3	Oocyte No. 4
<i><math>\beta</math>-actin</i>	+	+	+	+
<i>IF7</i>	-	-	-	-
<i>IL6</i>	-	-	-	-
<i>CX43</i>	+	+	+	+
<i>PSMC3</i>	+	+	+	+
<i>oct4</i>	+	+	+	+
<i>DNMT1</i>	+	+	+	+

**2.4 用传统方法扩增目的基因**

如图 2 可见, 用传统方法鉴定重要发育相关基因 *IL6*、*IF7*、*CX43*、*PSMC3*、*oct4* 和 *DNMT1* 在卵中表达的结果与单卵 RT-PCR 方法相同 (表 2)。

**2.5 扩增片段的测序**

回收 *CX43*、*PSMC3*、*oct4*、*DNMT1* 扩增片段, 测序并与牛或人的相应序列比较 (图 3)。 *oct4* 在同一物种中有多态, 该序列比较同源性达到 99.22%, 基因序列在 GenBank 上的编号为 AY490804, 预测的氨基酸序列同源性达到 100%; *DNMT1* 在牛上还没有序列, 与人的该序列比较同源性达到 89%, 基因序列在 GenBank 上的号为 AY486458, 预测的氨基酸序列同源性达到 100%; *CX43*、*PSMC3* 在同种内未见有多态。

**3 讨 论**

本实验利用了一种扩增单卵中 cDNA 的新方法, 用本方法可较真实地体现单卵中大量基因的表达情况。如果一个目的基因作 3 次重复, 一个卵所能扩增的目的基因数量为  $50 \times 20/3$  既 333 个。并且对卵中重要发育基因的表达情况与传统方法对比, 所得结果相同。说明该方法具有可行性, 但该方法还未在研究家畜卵和胚胎的基因表达分析中应用。

单卵 RT-PCR 的原理是基于以下几个环节: a. 用含 0.5% NP40 的反转录体系, 在 65 $^{\circ}$ C 将卵裂解, 使 RNA 释放出来; b. 在 37 $^{\circ}$ C, 15 min 将卵中的 mRNA 反转录为 cDNA, 而反转录时间限制在 15 min, 是为了将反转录产物限制在 300 ~ 1 000 bp, 防止由于 cDNA 长度差异引起扩增数量的不同。这样较真实地反映卵中各个基因的表达情况; c. 为第一链 cDNA 3' 端加 ployA 的尾巴, 使不同 cDNA 有了共同的两末端, 从而可用同一引物扩增出不同的 cDNA 片段; d. 利用此引物以三种不同的 PCR 反应条件进行扩增, 可使所有的 cDNA 尽可能都被扩增; e.  *$\beta$ -actin* 为细胞中的持家基因, 用其确定目的基因的模板量, 这样也作到了对目的基因表达相对的定量。

本方法与其他卵的 RT-PCR 方法相比, 其优点为: a. 所用卵量少, 所得 cDNA 量多。如 Daniels 等<sup>[2]</sup> 也用一个卵在同一管中作反转录, 但反转录产物总量为 20  $\mu$ l, 并且扩增一个目的基因需 5  $\mu$ l, 所以一个卵只能作 4 次反应。而大多数方法则需用 10 ~ 25 个胚胎或卵, 所得 cDNA 也只能作 10 次左右的反应。本方法从一个卵中所得的 cDNA 作 1 000 次反应, 如果一个目的基因重复 3 次, 可分析 333 个基因; b. 由于该方法基本上在一个 PCR 管中进行, 与各种提取 RNA 的方法 (Trisol, Isogen 和过柱法)<sup>[1-3]</sup> 相比, 该方法没有 RNA 的损失; c. 与标准的 cDNA 扩增方法相比, 该方法扩增的是 cDNA 的 300 ~ 1 000 bp 的片段, 这样避免了因 cDNA 长短不同造成的 cDNA 扩增量上的差异, 更真实地反映各种基因的表达情况; d. 利用持家基因  *$\beta$ -actin* 的 17 循环扩增结果, 决定目的基因的模板量, 某种程度上作到了相对定量。但本方法也有其自身的缺点: a. 由于 cDNA 的扩增限制在 300 ~ 1 000 bp 之间, 所以用此 cDNA 不能扩增较长的 cDNA 片段, 这也是有得必有失; b. 由于

(a)	<i>CX43</i> NM174068	<b>GTGATGCCAAGGABAGAGAGCTGAACAAGGAGGAGGAACCAACTTGTGTGCCAAGCTGATGTGCCAACGTGGAG</b>	80
		<b>GTGATGCCAAGGABAGAGAGCTGAACAAGGAGGAGGAACCAACTTGTGTGCCAAGCTGATGTGCCAACGTGGAG</b>	80
		gtgatgcgaaaggaaagagagctgaacaagaaggaggaggactcaaagtgtgtgccaaactgatgtgtgccaacgtggg	
	<i>CX43</i> NM174068	<b>CATGCACITGPAAGCAGATTGAAATTAAGAAAGTTTCAGTATGGCATTGAAAGGACGCGCAAGGTGAAGTGGCAGGGGGCT</b>	160
		<b>CATGCACITGPAAGCAGATTGAAATTAAGAAAGTTTCAGTATGGCATTGAAAGGACGCGCAAGGTGAAGTGGCAGGGGGCT</b>	160
		catgcaacttgaaagcagattgaaatgaagaagtccaagtattggcattgaaagagcaagcaagggtgaagagtgcgagggggct	
	<i>CX43</i> NM174068	<b>TGCTGAGAACCTACATCATCAGTATCCTCTTCAGCTTGCTTGGAGGTGGCCCTTCCTGTGTATCCAGTGGTACATCTAT</b>	240
		<b>TGCTGAGAACCTACATCATCAGTATCCTCTTCAGCTTGCTTGGAGGTGGCCCTTCCTGTGTATCCAGTGGTACATCTAT</b>	240
		tgtctgagaacctacatcatcagtatccctctcaagtctgtctctcaggtggcctctctgtgatccagtggtacatctat	
	<i>CX43</i> NM174068	<b>GGGTTTACGCTTTCAGTGGCTTTTACACTTGCAPPAAGAGTCCCTGCCCCACATCAGTGTGACTGTTTCCTTTCCTGGCCAC</b>	320
		<b>GGGTTTACGCTTTCAGTGGCTTTTACACTTGCAPPAAGAGTCCCTGCCCCACATCAGTGTGACTGTTTCCTTTCCTGGCCAC</b>	320
		ggggtcagcttgagtgccgtttcacttgcaaaaagagatccctgcccaatcaggtggactgtttcctttctcggcccac	
	<i>CX43</i> NM174068	<b>GGAGAAAACCATCTTCATCATCTTCATG</b>	348
		<b>GGAGAAAACCATCTTCATCATCTTCATG</b>	348
		ggagaaaacccatcttctcatctctcatg	
(b)	<i>PSMC3</i> BM076114	<b>CATCCACCAGCCATCACAGGCAGGAAGTAGGTCTGCCGGTAGAGGTTTTGATCACTGGCCACTTGCCTTCCTTTTG</b>	80
		<b>CATCCACCAGCCATCACAGGCAGGAAGTAGGTCTGCCGGTAGAGGTTTTGATCACTGGCCACTTGCCTTCCTTTTG</b>	80
		catccaccagccaatcaagggcaggaaagtaggtctgcccggtagaggttttgatcaactggcgaacttgccttctcttgg	
	<i>PSMC3</i> BM076114	<b>GAGTCTAGATCAATGTTTGCACCATCTTCCTCTTGGTCGTTAGGATCAACATCTAGAAGCTGCATGAGCTTGGAGCCAG</b>	160
		<b>GAGTCTAGATCAATGTTTGCACCATCTTCCTCTTGGTCGTTAGGATCAACATCTAGAAGCTGCATGAGCTTGGAGCCAG</b>	160
		gaggtctagatcaatgatttcgacctctctctctctctctgtgtctaggatcaaatctagaagctcagtagtctggagaccag	
	<i>PSMC3</i> BM076114	<b>ATACGGCAGCTCTTGTTTCACTTTCATTTTCCTCGCTGTCITCTTTGATCTTGTCTTCAATGGCCTTGNAGTTCGTGGTGCA</b>	240
		<b>ATACGGCAGCTCTTGTTTCACTTTCATTTTCCTCGCTGTCITCTTTGATCTTGTCTTCAATGGCCTTGNAGTTCGTGGTGCA</b>	240
		atacggcagctcttgtttcactttgattttctcgtctgttctctttagatcttctccttcaatggcctgnagtctcgtgggtga	
	<i>PSMC3</i> BM076114	<b>CTCGCACCACITCG</b>	254
		<b>CTCGCACCACITCG</b>	254
		ctcgcacaactctg	
(c)	<i>oct4</i> A022987	<b>TCCAGGACATCAAAAGCTCTTACAAAAGCCCTTGAACAATTTGCAAGCTCTTAAAGCACAAGGATCACACTAGGATA</b>	80
		<b>TCCAGGACATCAAAAGCTCTTACAAAAGCCCTTGAACAATTTGCAAGCTCTTAAAGCACAAGGATCACACTAGGATA</b>	80
		tccagagacatcaaaagctcttcaaaaagcccttgaacaatttgcaagctctttaaagcacaaggatcacactaggata	
	<i>oct4</i> A022987	<b>TACCCAGGCTCATGTGGGGCTCACCCCTGGGGTTCTCTTTTGAAAGGGTGTACAGCCAAAACGACTACTCTGCCATTTTGGG</b>	160
		<b>TACCCAGGCTCATGTGGGGCTCACCCCTGGGGTTCTCTTTTGAAAGGGTGTACAGCCAAAACGACTACTCTGCCATTTTGGG</b>	160
		taccagagc gatgtggggctcacctcggggttctcttttgaaagggttccagccaaaacgactactctgcc tttttgag	
	<i>oct4</i> A022987	<b>CTTTGCAGCTCAGTTTCAAGAACATGTGTAAAGCTCGGCCCTTGCTGCAGAAAGTGGGTGGAGCAAGCTCACAACAACGAG</b>	240
		<b>CTTTGCAGCTCAGTTTCAAGAACATGTGTAAAGCTCGGCCCTTGCTGCAGAAAGTGGGTGGAGCAAGCTCACAACAACGAG</b>	240
		ctttgcagctcagtttcaagaacatgtgtaaagctcggccctgctgcagaagtggttgaggaaagctgacaacaacgag	
	<i>oct4</i> A022987	<b>AATCTGCAGGAGATATGC AAGGCAGACCCCTTGTCAGGCCGAAAGCAGAAAAGCGGACGATATCGAACAACAGTGCAG</b>	320
		<b>AATCTGCAGGAGATATGC AAGGCAGACCCCTTGTCAGGCCGAAAGCAGAAAAGCGGACGATATCGAACAACAGTGCAG</b>	320
		aatctgcaggagatattgc aaggcagacccttgtcagccgaaagcagaaaagcgagatctgaaacaacagtgcag	
	<i>oct4</i> A022987	<b>AGGCAACTCTGAGAGCATGTTCCTGCAGTGCCCGAAGCCACCCCTGCAGCAAAATTAGCCACATCG</b>	385
		<b>AGGCAACTCTGAGAGCATGTTCCTGCAGTGCCCGAAGCCACCCCTGCAGCAAAATTAGCCACATCG</b>	385
		aggcaactctgagagcatgttctctgagtgcccgaagcccacccctgcagcaaattagccacatcg	
(d)	<i>DNMT</i> NM001379	<b>GGATCACAAGCAGCACAGGACAACTCCCTTACAGCCGCGCCATCTGCCCCTCTGTGAGTTTGTCAACACCCTCAGTGTG</b>	80
		<b>GGATCACAAGCAGCACAGGACAACTCCCTTACAGCCGCGCCATCTGCCCCTCTGTGAGTTTGTCAACACCCTCAGTGTG</b>	80
		ggatcacaagcagcacaggaagaa gccct aagcgcggcg tgtggctctgtgag t tgtca cagcc gagtgtg	
	<i>DNMT</i> NM001379	<b>GAAAATCTTAAACCTCTGAAAGCAATAGCCTTAAATTTTCCTGCTAGCCGAGCAGCAACAGCCCTGCCAAGCAGAGCTGT</b>	160
		<b>GAAAATCTTAAACCTCTGAAAGCAATAGCCTTAAATTTTCCTGCTAGCCGAGCAGCAACAGCCCTGCCAAGCAGAGCTGT</b>	160
		gaaaatcttaaaccctctgaaagcaatagccttaaatttcctgctagccgagcagcaaacagccctgccaaagcagagctgt	
	<i>DNMT</i> NM001379	<b>CCCAACTTGGCCCTGAAAGCAGGACAGTGCATCAGGAGACTGATGAGCAATATCCAAAGATGCCATCACCCAAAPAAAT</b>	240
		<b>CCCAACTTGGCCCTGAAAGCAGGACAGTGCATCAGGAGACTGATGAGCAATATCCAAAGATGCCATCACCCAAAPAAAT</b>	240
		cccacttggccctgaaagcaggaagca gtagcagagactgatgagcaatattccaaagatgccatcacccaaapaaat	
	<i>DNMT</i> NM001379	<b>GCACCAAGGG</b>	250
		<b>GCACCAAGGG</b>	250
		gcaccagggg	

Fig. 3 Gene sequence alignments

(a) *CX43* sequenced and *CX43* NM174068; (b) *PSMC3* sequenced and *PSMC3* BM076114; (c) *oct4* sequenced and *oct4* A022987; (d) *DNMT1* sequenced and human *DNMT1* NM001379.

在用 1dT24 扩增的两次 PCR 反应时, 为了提高扩增产物, 所用循环数较多, 时间较长, 因而对 Taq 酶也有一定要求, 最好用活力强而持久的 Taq 酶. 我们通过提高 MgCl<sub>2</sub> 的浓度, 扩增中间加 Taq 酶的方法, 降低了试剂成本提高了扩增效率, 避免了这一遗憾. 综上所述, 该方法较适用于从微量样本中获取 cDNA, 并进行大量的基因表达分析.

CX43 基因对维持细胞连接以及囊胚形成是十分必要的. 本实验的结果表明, 在体外成熟的牛卵母细胞中有 CX43 的表达. Reuss 等<sup>[9]</sup>的研究发现 CX43 在小鼠的受精卵中表达. Wrenzycki 等<sup>[18]</sup>研究也表明 CX43 在牛卵母细胞中有表达, 但从 8 ~ 16 细胞期开始减少, 到桑葚胚或囊胚时又开始表达<sup>[19,20]</sup>. 这些结果证明在牛卵母细胞中有 CX43 的表达. 这可能与其后的卵裂球间连接的建立相关.

本实验结果表明在体外成熟的牛卵母细胞中有 *oct4* 的表达. van Eijk 等<sup>[21]</sup>研究也证明 *oct4* 在牛卵母细胞到囊胚期中均有表达, 而后主要在原生殖细胞和干细胞中表达. 这进一步证明 *oct4* 在牛卵母细胞中有表达的观点. 我们的结果表明 *IL6* 在牛卵母细胞中未见表达. Daniels 等<sup>[11]</sup>研究也证明 *IL6* 在卵中不表达, 直到 8 细胞期之后才有表达, 植入前胚胎发育基因 *IF $\tau$*  与胚胎的早期分化和滋养层的功能相关. 在小鼠中研究表明, 其可调节鼠胚植入前卵裂速度的快慢, 以及胚胎生存发育的能力. 我们研究未见 *IF $\tau$*  在牛卵母细胞中表达. Wrenzycki 等<sup>[18]</sup>在牛胚胎发育的研究中证明, *IF $\tau$*  主要在牛的囊胚和孵化囊胚中表达, 在囊胚之前的胚胎发育各阶段未见表达. 这进一步证实了我们的结果, 说明该基因可能与囊胚期的发育有关, 是一个发育阶段性表达的基因.

*DNMT1* 是胚胎期重要的 DNA 甲基化酶, 在培养的成纤维细胞中有低水平的 *DNMT1* 家族基因表达. 如果细胞中 *DNMT1* 表达过高, 说明细胞的甲基化出现错误<sup>[12]</sup>. 在卵中的表达情况未见报道. 本实验结果初步证明在卵中有高水平 *DNMT1* 的表达. 这可能与胚胎基因组的重编程相关. 本实验的结果说明 *PSMC3* 在牛卵母细胞中有大量表达. Mohan 等<sup>[17]</sup>对牛的衰减杂交证明, 该基因可在牛的桑葚胚和囊胚中表达, 但在卵中表达情况未见报道.

总之, 本实验建立了一种新的分析微量样品中基因表达的方法, 并利用该方法, 我们分析了牛卵母细胞中 6 个对胚胎发育有重要作用的基因表达情

况. 这首先证实了该方法具有可行性, 并且也对这 6 个基因在牛卵母细胞中表达有了进一步的了解: *CX43*、*oct4*、*DNMT1* 和 *PSMC3* 在牛卵母细胞中有表达, 而 *IL6* 和 *IF $\tau$*  不在牛卵母细胞中表达. 其中 *DNMT1* 和 *PSMC3* 在牛卵母细胞中表达情况未见他人报道.

致谢 感谢基因达公司张爱真、罗洁、牛慧玲、谢媛、王莉莉、王海平、李荣、万荣、刘颖、王美丽、郑敏等的无私帮助.

## 参 考 文 献

- Rizos D, Lonergan P, Boland M P, *et al.* Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biology of Reproduction*, 2002, **66**: 589 ~ 595
- Daniels R, Lowell S, Bolton V, *et al.* Transcription of tissue-specific genes in human preimplantation embryos. *Human Reproduction*, 1997, **12**: 2251 ~ 2256
- Schuitz G A, Harvey N B, Watson A J. Regulation of early embryonic development by growth factors: growth factor gene expression in cloned bovine embryos. *J Animal Science*, 1996, **74** (Suppl 3): 50 ~ 57
- Brady G, Iscove N N. Construction of cDNA libraries from single cells. *Methods Enzymological*, 1993, **225**: 611 ~ 623
- Bloor D J, Metcalfe A D, Rutherford A, *et al.* Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. *Molecular Human Reproduction*, 2002, **8**: 237 ~ 245
- Metcalfe A D, Bloor D J, Lieberman B A, *et al.* Amplification of representative cDNA pools from single human oocytes and pronucleate embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 2003, **65**: 1 ~ 8
- Meisser A, Cameo P, Islami D, *et al.* Effects of interleukin-6 (IL6) on cytotrophoblastic cells. *Molecular Human Reproduction*, 1999, **5**: 1055 ~ 1058
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, *et al.* Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor *oct4*. *Cell*, 1998, **95**: 379 ~ 391
- Reuss B, Hellmann P, Traub O, *et al.* Expression of connexin 31 and connexin 43 (CX43) in early rat embryos. *Development Genetics*, 1997, **21**: 82 ~ 90
- Desai N, Scarrow M, Lawson J, *et al.* Evaluation of the effect of interleukin-6 and human extracellular matrix on embryonic development. *Human Reproduction*, 1999, **14**: 1588 ~ 1592
- Daniels R, Hall V, Trownson A O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biology of Reproduction*, 2000, **63**: 1034 ~ 1040
- Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, *et al.* Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biology of Reproduction*, 2001, **65**: 309 ~ 317
- Robertson K D, Uzulogyi E, Liang G, *et al.* The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b co-ordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27**: 2291 ~ 2298
- Wrenzycki C, Herrmann D, Caruath J W, *et al.* Expression of the gap junction gene connexin43 (CX43) in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *J Reproduction and Fertility*,

- 1996, **108**: 17~24
- 15 Wrenzycki C, Herrmann D, Lemme E. Transcriptional level of developmentally important genes in bovine preimplantation embryos generated *in vitro*. *Theriogenology*, 1998, **49**: 191
- 16 陈 瑛, 张玉兰, 胡桂英. 囊胚形成的基因调控. *生殖与避孕*, 2001, **21** (5): 259~262  
Chen Y, Zhang Y L, Hu G Y. Procreation and Contraception, 2001, **21** (5): 259~262
- 17 Mohan M, Ryder S, Claypool P L, *et al.* Analysis of gene expression in the bovine blastocyst produced *in vitro* using suppression-subtractive hybridization. *Biology of Reproduction*, 2002, **67**: 447~453
- 18 Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath J W, *et al.* Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Molecular Reproduction and Development*, 1999, **53**: 8~18
- 19 Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath J W, *et al.* Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in ICM supplemented with BSA. *J Reproduction and Fertility*, 1998, **112**: 387
- 20 Niemann H, Wrenzycki I C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*, 2000, **53**: 21
- 21 van Eijk M J, van Rooijen M A, Modina S, *et al.* Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1'. *Biology of Reproduction*, 1999, **60**: 1093~1103

## Optimized Method for Amplification cDNA Pools From Single Bovine Oocyte and Expression of Genes Related to Development of Bovine Oocyte\*

LI Yan-Xin<sup>1)</sup>, LI Shi-Jie<sup>1,2)</sup>, ZHAO Ding-Sheng<sup>1)</sup>,  
ZHAO Chun-Jiang<sup>1)</sup>, DU Wei-Hua<sup>1)</sup>, DAI Yun-Ping<sup>1)</sup>, LI Ning<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>The State Key Laboratories of Agrobiotechnology for Livestock and Poultry, China Agriculture University, Beijing 100094, China;

<sup>2)</sup>College of Life Science, Hebei Agriculture University, Baoding 071001, China)

**Abstract** Nuclear transfer has been used to clone several mammalian species, including sheep, goats, cattle, pigs, mice, rabbits, horses, and mules. However, still there are many problems such as low efficiency, high abortion, malformation, huge fetus, high neonatal death need to settle. So it was important to analyze a wide variety of genes in individual cloned embryos. But using conventional RT-PCR strategies permitted analysis of only a few genes in one embryo. A global RT-PCR strategy has been used, allowing the analysis of almost hundreds of genes from a single embryo. This method was not seen used to analyze the genes in cloned embryos. Bovine oocytes have been used to investigate the expression of genes related to development such as *IL6*, *IF $\tau$* , *CX43*, *PSMC3*, *oct4*, *DNMT1*. The results were same as those obtained by using conventional RT-PCR strategies. Further it forth the first time reported the expression of *DNMT1* and *PSMC3* gene in bovine oocytes.

**Key words** amplification cDNA pools, related to development, gene expression

\* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G20000161) of China and State 863 High-Technology R&D Project of China (2001AA213091).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-10-62891146, 86-10-6289332, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

Received: January 12, 2004 Accepted: February 25, 2004