

单个植入前胚胎 mRNA 差异显示方法的建立*

郁卫东^{1,2)} 杨立新^{1,2)} 李文雍^{1,2)} 刘桂生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)

摘要 在已有的研究基础上, 优化和建立了单个植入前胚胎的 mRNA 差异显示 (single preimplantation embryo differential display polymerase chain reaction, SPEDDRT-PCR). 以小鼠单个成熟的卵母细胞和单个的 2 细胞期胚胎作为起始材料, 比较二者之间基因的表达差异. 选择在卵母细胞中不表达而在 2 细胞期表达的差异片段. 进行 GenBank 检索和表达序列标签 (EST) 库电子克隆. 与多胚研究方法一样, 由线粒体编码的和 2 细胞特异表达的 NADH 脱氢酶亚单位 2 和 ATPase 6 证实了 SPEDDRT-PCR 方法是可行而且可靠的, 是一种需要材料极少、应用广泛而有效的基因分离方法.

关键词 植入前胚胎, 早期胚胎发育, 单胚胎 mRNA 差异显示

学科分类号 Q27

缺乏足够的实验材料和有效的实验技术一直是阻碍研究哺乳动物植入前胚胎发育的主要因素. 目前, mRNA 差异显示 (mRNA differential display polymerase chain reaction, DDDRT-PCR) 是识别和分离发育相关基因的主要技术^[1,2].

1992 年 Liang 等^[2]建立的 mRNA 差异显示方法, 在生物医学等诸多领域得到了广泛的应用, 发现了许多新的差异表达基因. 1994 年 James 和 Richard 首先利用 DDDRT-PCR 对小鼠早期植入前胚胎的基因表达进行了研究, 之后, 相关的文献逐渐增多, 技术上也取得了一定的进展^[3~11]. 目前对逆转录之前核糖核酸的处理, 基本有两种办法: 一种需要先提取总 RNA, 然后进行逆转录; 而另一类则不需提取总 RNA 就可直接进行逆转录. 前者存在着需要材料多 (多于 50 枚植入前胚胎) 和胚胎不同步发育的缺点, 而后者虽然将使用的起始材料降为了 10 枚, 但依然存在不同步发育的问题^[6].

植入前胚胎的基因表达研究, 需要对基因表达的时空模式进行精确的定性和定量, 而且对于象人类植入前胚胎或者特殊处理的哺乳动物重构胚胎这样的珍稀材料, 往往只能用更少的乃至一个胚胎来进行研究^[12]. 为此, 我们在已有的研究基础上对早期植入前胚胎的 mRNA 差异显示方法进行了改进, 建立了单个植入前胚胎的 mRNA 差异显示方法. 该方法不仅能够准确而稳定地反应出早期植入前胚胎发育过程中特异性基因的表达模式, 还能够达到或超过多胚胎差异显示的效果. 该方法的建立为研究哺乳动物正常植入前胚胎的基因表达,

以及克隆胚胎再程序化相关基因的表达奠定了基础, 是发现发育相关基因和再程序化过程中特异表达基因的有效方法^[13].

1 材料和方法

1.1 材料

6~8 周龄的雌性昆明种小白鼠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; 孕马血清 (PMSG) 由天津市华孚高新技术公司生产; 人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 由上海第一生化药业公司生产; 透明质酸酶、NP-40 和 dNTPs 购自 Sigma 公司; M-MLV 逆转录酶购自 Gibco 公司; AMV 逆转录酶购自 Roche 公司; Primer RNase 抑制剂购自 Eppendorff 公司; RNase Guard 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司; Taq DNA 聚合酶、pGEM-T 载体、X-Gal 和 IPTG 购自 Promega 公司; 所用 3' 引物 HT (15) G 5'-AAGCTTTT-TTTTTTTTTTTT-3' 和 5' 引物 HAPI 5'-AAGCTTGATTGCG 3' 由上海生工生物工程公司合成; (α -³²P) dATP、(α -³²P) dCTP (比活性 7×10^{10} Bq/mmol) 购自北京亚辉公司; 随机引物标记盒购自 TaKaRa 公司; 其他试剂为国产分析纯产品.

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (2000016107).

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2002-10-17, 接受日期: 2002-11-26

1.2 方法

1.2.1 超排 M II 卵和 2 细胞受精卵的获得: 采用 Capco 的方法分别给 6~8 周龄的雌性昆明种小白鼠注射 PMSG 及 hCG, 获取 M II 卵母细胞和 2 细胞胚胎^[14]. M II 卵母细胞经 0.5% 的透明质酸酶去除颗粒细胞后, 与 2 细胞胚胎一样用酸性台氏液 (pH 2.0~2.5) 去除透明带, PBS 清洗后立即进行 RT-PCR 反应.

1.2.2 RT-PCR 反应体系的建立: 逆转录体系含有 1 × 逆转录缓冲液; 20 mmol/L DTT; 0.5% NP-40; 20 μmol/L dNTPs; 4 μmol/L HT (15) G Anchor Primer; 0.25 μl RNase 抑制剂和 RNase Guard mix; 加入无 RNase DNase 水至 4.5 μl (以 20 μl 逆转录体系为例: 5 × 逆转录缓冲液 4 μl, 10% NP-40 1 μl, 200 μmol/L dNTPs 2 μl, 20 μmol/L 锚定引物 4 μl, RNase 抑制剂混合物 1 μl, 加水 6 μl 至总体积 18 μl, 最后分成 4 份, 每份 4.5 μl. 然后加入含单个卵母细胞或 2 细胞胚胎的 0.5 μl PBS 进行逆转录, 反应参数是 65℃ 5 min, 冰浴 5 min, 加入 40 U/μl M-MLV 和 5 U/μl AMV 逆转录酶混合物 0.5 μl, 42℃ 保温 60 min, 75℃ 变性 5 min 后, 即刻使用或 -80℃ 冻存备用; 本研究还设置了无逆转录酶的 RT 体系以及只加入 PBS 的 RT 体系作为阴性对照.

PCR 体系含有 1 × PCR 缓冲液, 2.5 mmol/L MgCl₂, 4 μmol/L HT (15) G 锚定引物, 4 μmol/L HAP1 引物, 1.4 × 10⁷ Bq/mmol (α-³²P) dATP, 0.8 μmol/L dNTPs, 0.2 μl Taq DNA 聚合酶, 加入无 RNase 和 DNase 水至 15 μl, 一同加入上述 RT 反应体系中进行 PCR 反应, 反应条件是: 94℃ 变性 10 min, 40℃ 退火 5 min, 72℃ 延伸 5 min; 94℃、30 s, 40℃、2 min, 72℃、90 s, 共 39 个循环; 72℃、5 min. 设置 PCR 空白对照. 用含 8 mol/L 尿素的 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 放射自显影, -20℃, 2 天.

1.2.3 差异条带的回收及再扩增: 切下感兴趣的差异条带, 放入 1.5 ml 的 EP 管中, 加入 100 μl TE, 室温浸泡 10 min, 沸水浴 15 min, 12 000 g 离心 2 min, 取上清, 加入 8 μl 醋酸钠 (3 mol/L)、300 μl 无水乙醇与 2.5 μl 糖原 (20 g/L), -20℃ 共沉淀过夜. 离心、洗涤、干燥, 溶于 10 μl DEPC 处理水中. 在 50 μl 反应体体积 (按 1.2.2 所述, 不加 (α-³²P) dATP) 中进行 PCR 程序: 94℃、10 min; 94℃、1 min, 40℃、90 s, 72℃、

90 s, 20 个循环, 72℃、10 min; 94℃、10 min; 94℃、1 min, 42℃、90 s, 72℃、90 s, 20 个循环; 72℃、10 min. 2% 的琼脂糖电泳鉴定 PCR 产物.

1.2.4 克隆及序列分析: 将 PCR 产物克隆到 pGEM-T 载体, 然后热激转化感受态大肠杆菌 JM109, 随机挑取 1 个白斑接入 3 ml 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡过夜. 用 1.5 ml 菌液提取质粒进行 PCR 鉴定. 另外 1.5 ml 菌液进行测序. 对测序结果进行 GenBank 同源性检索, 在 EST 库中进行电子克隆.

1.2.5 反向 RNA 印迹所需 cDNA 的获得: 按照 Shimono^[1]描述的方法进行, 只是将转录前的变性时间延长为 5 min.

1.2.6 反向 RNA 印迹鉴定: 将从单个的 M II 卵和 2 细胞期胚胎扩增出的 cDNA, 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差异表达 cDNA 片段作为探针, 进行反向 RNA 印迹. 杂交液为 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, 封入保险膜中, 放射自显影, -20℃, 5 天.

2 结 果

2.1 SPEDDRT-PCR 反应条件的优化

分别对常规的 DDRT-PCR 方法作了如下的修改: a. 由于哺乳动物正常的 (尤其是人类或者珍稀的濒危动物) 和克隆的植入前胚胎用于研究的材料来源困难, 所以将起始材料减少到单个胚胎的水平; b. 可以进行无总 RNA 提取过程的逆转录反应, 使用 NP-40 作为胞浆裂解剂可以在不破坏细胞核, 避免基因组污染的情况下进行逆转录反应, 没有 RNA 的丢失, 同时使用了两种 RNase 抑制剂分别从 5' 和 3' 端对 mRNA 进行保护, 创造一个无 RNase 的环境; c. 在整个实验操作过程中, 单胚的操作过程和精细程度要高于多胚胎的操作, 其中酸性台氏液的处理时间因胚胎所处的时期不同而不同 (M II 处理时间为 3~5 min, 而对于 2 细胞期胚胎来说只需 0.5~1 min); d. 系统规模性的研究需要建立单胚胎反应系统. 图 1 显示的是 M II 与 2 细

胞胚胎之间部分聚丙烯酰胺凝胶电泳 DDRT-PCR 的结果, 上面的长箭头代表 NADH 脱氢酶亚单位 2, 下面的短箭头代表 ATPase-6. 这里还显示了未加逆转录酶和未加胚胎的两个阴性对照. 图 2 显示的是 NADH 脱氢酶亚单位 2 和 ATPase-6 差异片段的 1.5% 琼脂糖电泳结果.

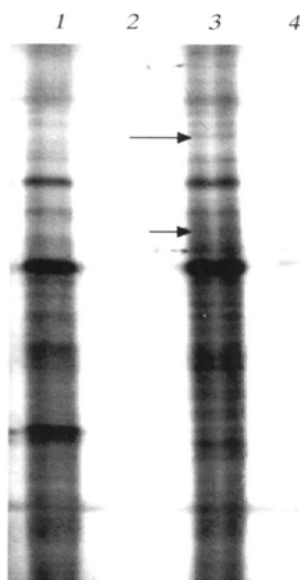


Fig. 1 Partial DDRT-PCR results between M II and 2-cell mouse embryo

1: M II; 2: negative control without reverse transcriptase; 3: 2-cell mouse embryo; 4: negative control without embryo. →: differential bands of NADH dihydratase 2 and ATPase 6.

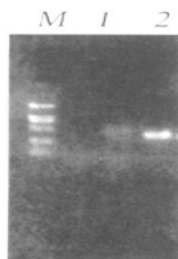


Fig. 2 2% agaroses electrophoresis of two differential bands PCR products

M: DL-2000 marker; 1: NADH dihydratase 2; 2: ATPase 6.

2.2 SPEDDRT-PCR 的可靠性鉴定

首先进行了多个 M II 卵母细胞差异显示与单个卵母细胞差异显示带型和条带数的比较 (图 3), 带型和条带数没有差别.

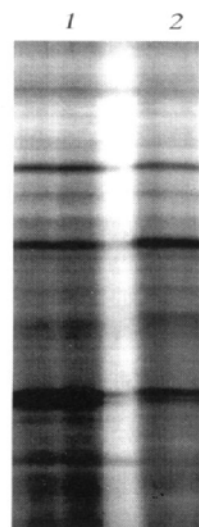


Fig. 3 DDRT-PCR results of 10 M II oocytes and one oocyte

1: 10 M II oocytes; 2: one oocyte.

Naojiro 等^[10] 用小鼠植入前胚胎进行的常规 DDRT-PCR 已经证明 ATPase-6 具有在 2 细胞期阶段性表达的特点, 而 NADH 脱氢酶亚单位 2 在表达序列标签 (EST) 库的检索中发现在未受精卵和 2-细胞期胚胎中都有表达, 这一点与本研究的结果不同, 我们在 SPEDDRT-PCR 的研究中发现 NADH 脱氢酶亚单位 2 只在 2 细胞期表达, 而在 M II 卵母细胞中没有表达, 为了检验我们实验结果的可靠性, 进行了 NADH 脱氢酶亚单位 2 差异片段的反向 RNA 印迹实验, 结果与我们的 SPEDDRT-PCR 结果一致 (图 4, 5 和 6), 说明 SPEDDRT-PCR 能够更加精确地反映发育过程中基因的差异表达模式, 这是多胚胎差异显示所无法比拟的. 为了进一步说明 cDNA pool 的可靠性, 使用

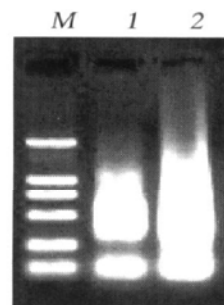


Fig. 4 2% agaroses electrophoresis results of cDNA pool reversed from single M II oocyte and 2-cell embryo

M: DL-2000 marker, from up to down 2 kb, 1 kb, 0.75 kb, 0.5 kb, 0.25 kb 及 0.1 kb; 1: M II cDNA pool; 2: 2-cell embryonic cDNA pool.

β -actin^[7, 12]作为探针进行反向 RNA 印迹实验, 证明 cDNA pool 是可靠的 (图 5).

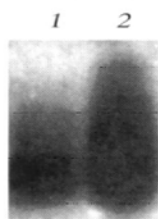


Fig. 5 Reverse Northern blot results of β -actin with M II oocyte cDNA pool and 2-cell embryonic cDNA pool

1: M II oocyte cDNA pool; 2: 2-cell embryonic cDNA pool.

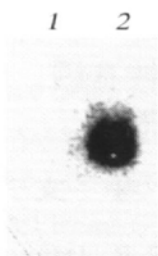


Fig. 6 Reverse Northern blot results of NADH dehydrogenase 2 with M II oocyte cDNA pool and 2-cell embryonic cDNA pool

1: M II oocyte cDNA pool; 2: 2-cell embryonic cDNA pool.

2.3 发育相关差异片段电子克隆和 GenBank 检索

2.3.1 NADH 脱氢酶亚单位 2 片段及其基因: 划线部分是 SPEDDRT-PCR 差异片段与基因序列相同的部分.

AAGCTTTTTTTTTTTTTTTT
 GAGTTATTGTTGGTTGGAATATTGTTAGTG
 AAGTGAATAAATTAGACGAGTATAAAAGAA
 TAGGTTTAGTAGAGCTATTATTGCTATGAGT
 GTTGCTATAATTAGACAGTTGTTTTTATAA
 GTTCTGTGATGATAATTCATTTTGGCAAGAA
 TCCTGTTAGTGTTGGAAGGCCTCTAGGGAT
 AGTAATATCAGTGAGATTATAGTTAGTATTG
 CTGGAGTTTTATTTATAGAAAGTGAGATTGA
 GTTGATGGTTATAGAGTTATTTAGTATAAGT
 GCTATAAATATAGGGGCTGTAAGAATAATAT
 AGATTATGAGTTGAGTAGAGTGAGGNGANG
 NGGTNTGTAAGGAAGAATTGCTAATATCCAT
 CCTATGTGCG **GGCAATCAAGCTT**

ataaatcctatcaccttgccatcatctacttcacaatcttcttaggtcc
 tghtaatcacaatatccagcaccaacctaatactaatatgagtaggctggaat
 tcagcctactagcaattatccccatactaatcaacaaaaaacccacgatca

actgaagcagcaacaaaatacttcgtcacacaagcaacagcctcaatattat
 cctcctggccatcgtactcaactataaacaactaggaacatgaatattcaaca
 acaacaaaacgggtcttactcctaacataacattaatagccctatccataaaact
 aggcctcgccccattccactctgattaccagaagtaactcaaggatccac
 tgcacataggacttattctcttacctgacaaaaattgctccctatcaatttt
 aattcaaatttaccgctactcaactctactatcatttaatactagcaattact
 tctattttcataggggcatgaggaggacttaacaaacacaaatcggaaaaa
 ttatagcctattcatcaattgcccacataggatgaatattagcaa
 ttcttcttacaacccatccctcactctactcaacctcataatctatatttctt
 acagccctatattcatagcattataactaaataactctataacatcaactca
 atctcactctatgaaataaaactccagcaataactataatctcactgata
 ttactatccctaggaggccttccaccactaacaggattcttaccaaaatgaat
 tatcatcacagaacttataaaaaacaactgtctaattatagcaacactcatag
 caataatagctctactaaacctattctttatactcgctaatttatccacttc
 actaacaatatttccaaccaacaataactcaaaaataaactcaccaacaa
 aaactaaacccaacctaatatttccacctagctatcataagcacaataacc
 ctaccctagcccccaactaatacctag

2.3.2 ATPase-6 片段及其基因: 划线部分是 SPEDDRT-PCR 差异片段与基因序列相同的部分.

AAGCTTGA TTGCC

CACCTTCCTTCCACAAGGAACTCCAATTTCACT
AATTCCAATACTTATTATTATTGAAGCAATTA
GCCTATTTATTCAACCAATGGCATTAGCAGTC
CGGCTTACAGCTAACATTACTGCAGGACACTT
ATTAATTCACCTAATCGGAGGAGCTACTCTAG
TATTAATAAATATTAGCCACCAACAGCTACCA
TTACATTTATTATTTTACTTCTACTCACAATT
CTAGAATTTGCAGTAGCATTAATTCAAGCCTA
CGTATTCACCTCCTAGTAAGCCTATATCTAC
ATGATAATA
CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTT

Attaaaatgaacgaaaatctatttgccatcatttaccacaacaataatag
 gattcccaatcggttagccatcattatatttcttcaatcctattcccact
 caaaaacgcctaatcaacaacgctctccattcttccaacactgactagttaa
 acttattatcaacaaataatgctaataccacacacaaaaggacgaacatga
 accctaatattgtttccctaatcatatttattggatcaacaaatctcctaggc
 cttttaccacatacatttacctactaccaactatccataaatctaatgata
 gccattccactatgagctggagccgttaattacaggcttccgacacaaacta
 aaaagctcacttggccacttcttccacaagggaactccaatttcaataatcc
 aatacttattattattgaacaattagcctatttattcaaccaatggcattagca
 gtccggcttacagctaacattactgcaggacacttataatcacctaatcgg
 aggagctactctagtattataaatattagcccaccaacagctaccattacat
 ttattattttacttctactcacaattctagaatttgcagtagcatttaattcaagc
 ctacgtattcaccctcctagtaagcctatctacatgataatacataatga

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照一定的时间和空间顺序合理表达.再程序化过程就是已经分化的体细胞核去分化,然后再重演受精卵的发育,获得启动卵裂和分化的能力过程,这涉及供体核核膜破裂,染色体重建,再程序化因子与染色体特定部位的结合,最终完成母源调控向合子型调控的转换(transition).这一过程中,卵母细胞中贮存物质(主要是蛋白质和 mRNA)与合子自身合成物质之间有效的交接是再程序化顺利进行的保证^[4, 15].

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,其中量的精确性似乎更加重要^[1, 3, 5, 6, 16].要想对植入前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^[2],而对于受到材料限制的早期胚胎研究来说,本实验室建立的 SPEDDRT-PCR 方法不仅克服了材料不足和发育不同步的限制,符合了对基因表达精确性的要求,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.

本研究采用的是不经过核酸提取的 DDRT-PCR 方法,在同一个管中进行 RT 和 PCR 反应,不存在核酸的任何丢失,使用单个的植入前胚胎后,如图 2 所示,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,说明本研究方法是可行的.

同类型的多胚胎差异显示研究结果表明:在比较 M II 和 2 细胞期胚胎的过程中,ATPase 6 具有 2 细胞期阶段表达的特点^[10],这与我们的实验结果是相吻合的;而 NADH 脱氢酶亚单位 2 在 GenBank 检索的过程中却发现在未受精卵及 2 细胞期都有 EST 表达的特点,与本研究的结果不同,为此我们用 β -actin 和 NADH 脱氢酶亚单位 2 作探针进行反向 RNA 印迹^[14],证明 NADH 脱氢酶亚单位 2 的确只在 2 细胞期表达而在 M II 中没有表达.这一点也是与细胞活跃的代谢特点息息相关的,因为在 2 细胞期时,小鼠胚胎基因组激活需要大量的 ATP,而在 M II 期时,卵母细胞应该是处于代谢最低的阶段.这样不仅证明 SPEDDRT-PCR 方法具有与多胚胎差异显示同样的可靠性,而且比

多胚胎差异显示具有更高的精确度.此外,我们还设计了相应的阴性对照进一步强调本实验系统的可靠性,一次至少同时进行三个胚胎的单独操作也体现了在统计学上重复性,更加强了系统的可靠性.

SPEDDRT-PCR 是一种分离和鉴别差异表达基因的可靠方法,它可以极大地节省材料,使得对植入前胚胎发育进行多个精确时间段进行系统研究成为可能.同时由于克服了多胚胎操作同步性差的问题,可以发现更多的瞬时表达基因或突变和致畸基因,而这些基因又是发育所至关重要的.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^[1, 15, 16].目前,该方法已经被应用到了核移植后再程序化的研究上,此外,它也可用于人类植入前胚胎的研究.如果进一步优化实验条件,还可用于其他领域,比如,转基因,细胞的分化,胚胎干细胞以及胚胎诱导等等.

参 考 文 献

- 1 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
- 2 Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, 257 (5072): 967~ 971
- 3 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
- 4 Conway G. Novel gene expressed during Zebrafish gastrulation identified by differential RNA display. *Mech Dev*, 1995, 52 (2~3): 383~ 387
- 5 Li S H, Han W H. mRNA differential display and its application to the identification of development related genes. *Dev Rep Biol*, 1997, 6 (2): 67~ 75
- 6 Atale D R, Kidder G M, Westhusin M E, *et al.* Assessment by differential display-RT-PCR of mRNA transitions and α amanitin sensitivity during bovine perattachment development. *Mol Reprod Dev*, 2000, 55 (2): 152~ 163
- 7 Adjays J, Daniel R, Bolton V, *et al.* cDNA libraries from single human preimplantation embryos. *Genomics*, 1997, 46 (6): 337~ 344
- 8 Henrign G, Renard J P, Chesne P, *et al.* Differential regulation of the translation and the stability of two maternal transcripts in preimplantation rabbit embryos. *Mol Reprod Dev*, 2000, 56 (1): 12~ 25
- 9 Zimmermann J W, Schultz R M. Analysis of gene expression in the preimplantation mouse embryo: Use of mRNA differential display. *Dev Biol*, 1994, 91 (12): 5456~ 5460
- 10 Naojiro M, Kana S, Akira A, *et al.* Analysis of gene expression in mouse 2-cell embryos using fluorescein differential display: comparison of culture environments. *Biol Reprod*, 2001, 64 (1): 30~ 35
- 11 Ma J, Svoboda P, Schultz R M, *et al.* Regulation of zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo: global activation and repression of gene expression. *Biol Reprod*, 2001, 64 (6): 1713~ 1721

- 12 Adjays J, Daniel R, Monk M. The construction of cDNA libraries from human single preimplantation embryos and their use in the study of gene expression during development. *J Assist Reprod Genet*, 1998, **15** (5): 344~ 348
- 13 Rideout W M 3rd, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of genome, *Science*, **2001** (293): 1093~ 1098
- 14 Capco D G. Cytoskeletal mechanisms during animal development. *Curr Top Dev Biol*, 1995, **31** (2): 307~ 309
- 15 Liang P, Pardee A B. Differential display: a general protocols. *Molecular Biotechnology*, 1998, **10** (3): 261~ 267
- 16 Brady G, Billia F, Knox J, *et al.* Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cell. *Curr Biol*, 1995, **5** (8): 909~ 922

Establishment of Single Preimplantation Embryos Differential Display Polymerase Chain Reaction^{*}

YU Wei-Dong^{1,2)}, YANG Li-Xin^{1,2)}, LI Wei-Yong^{1,2)}, LIU Gu-Sheng¹⁾, CHEN Qing-Xuan¹⁾**

⁽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 100039, China)*

Abstract Based on previous studies, mRNA differential display using a single mouse oocyte or a 2-cell embryo as starting materials was established. cDNA fragments, which were expressed in 2-cell stage mouse embryos but not in M II stage, were performed computer cloning and GenBank search. Two genes, NADH dehydrogenase gene subunit-2 and ATPase-6, which encoded by mitochondrial genome, were found to be stage-specifically expressed in 2-cell-stage pre-implantation embryos. These results, which were the same as multi-embryonic mRNA differential display, strongly suggest that single preimplantation embryos differential display polymerase chain reaction (SPEDDRT-PCR) is a credible, practical and effective method that needs only a single embryo.

Key words preimplantation embryos, early embryonic development, 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: October 17, 2002 Accepted: November 26, 2002