

GTL2 基因在体细胞核移植牛中的印记状态分析*

王建春¹⁾ 李冬杰³⁾ 杜卫华⁴⁾ 樊宝良¹⁾ 李 宁²⁾ 李世杰^{1,2)**}

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

(³⁾河北科技大学生物科学与工程学院, 石家庄 050018; (⁴⁾中国农科院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094)

摘要 体细胞核移植技术(SCNT)在医学研究、畜牧业生产和拯救濒危动物方面有重要的应用价值, 而核移植效率低是制约其应用的主要因素. 印记基因在哺乳动物胚胎发育和出生后的正常生长中都具有十分重要的作用, *GTL2* 基因是在人和鼠中已被鉴定的印记基因, 它作为一种 RNA 调解分子调控目的 mRNA 的转录. 为了研究 *GTL2* 基因在自然繁殖牛和体细胞核移植牛中的印记状态, 首先应用 PCR-SSCP 方法对 *GTL2* 基因多态性进行检测, 鉴定自然繁殖牛和体细胞核移植牛中的杂合子, 进而利用 RT-PCR-SSCP 技术对 *GTL2* 基因在杂合子牛的心、肝、脾、肺、肾、大脑中的表达状态进行分析. 研究结果表明: *GTL2* 基因在自然繁殖牛的被检测的 6 个组织中均表现为单等位基因表达, 在体细胞核移植牛的心和肝中表现为单等位基因表达, 而在大脑、脾、肺、肾中为双等位基因表达, *GTL2* 基因在体细胞核移植牛的部分组织中表达紊乱有可能是造成体细胞核移植牛器官发育异常和核移植效率低下的原因之一.

关键词 牛, *GTL2*, 基因组印记, 体细胞核移植

学科分类号 Q38, Q341

体细胞核移植技术(SCNT)是培育优良动物品种的有效手段, 在畜牧业生产中具有巨大的经济价值. Walker 等^[1]对体细胞核移植牛和自然繁殖牛的肌肉组成进行了对比分析, 发现二者的肉质没有显著差异. 近日, 美国药物和食品管理部门的 Rudenko 等^[2]在文章中指出: 体细胞核移植动物以及它们的后代是安全食品. 此外, 体细胞核移植技术还有重要的医学价值, 即利用病人自身的体细胞进行核移植制造胚胎干细胞来实现治疗性克隆^[3,4].

虽然体细胞核移植技术在很多物种上已取得成功, 但核移植效率很低^[5], 仅为 3%~5%^[6]. 核移植动物存在高频率的表型异常, 如核移植的胚胎在妊娠后期表现为过度增长^[7], 即 LOS (larger offspring syndrome) 综合症^[8], 即使存活下来的动物也常伴有器官发育异常^[9]. 基因组印记是由表观遗传修饰决定的父源或母源基因的一个等位基因表达, 大多数印记基因在调控胚胎发育和出生后的生长中起重要作用, 体细胞核移植动物表现出的发育异常很可能与印记基因表达紊乱有关.

GTL2 (gene trap locus2) 基因是在人和鼠中被鉴

定的一个母源表达印记基因, 与 *DLK1* 交互印记, 在鼠中位于 12 号染色体末端^[10], 在人中位于 14 号染色体的一个基因簇内^[11], 编码一段不翻译的 RNA 分子, 其作用是作为一种 RNA 调解分子调控目的 mRNA 的转录^[12,13].

为了研究 *GTL2* 基因在自然繁殖牛中的印记状态和在新生死亡的体细胞核移植牛中基因表达是否异常, 本研究首先应用 PCR-SSCP 方法检测自然繁殖牛和新生死亡体细胞核移植牛中的单核苷酸多态性, 确定杂合子, 然后应用 RT-PCR-SSCP 方法分析 *GTL2* 基因在杂合子牛的心、肝、脾、肺、肾、大脑中的表达状态, 以寻找造成核移植动物器官发育异常及新生牛死亡的原因.

* 国家高技术研究发展计划(2007AA100504)和河北省自然科学基金(C2006001032)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0312-5016895, E-mail: lishijie20005@163.com

收稿日期: 2008-01-30, 接受日期: 2008-08-05

1 材料和方法

1.1 实验动物

1.1.1 实验样品及处理. 实验动物是 5 头出生 48 h 内死亡的雌性体细胞核移植牛(9C1~9C5), 6 头出生后 48 h 内直接屠宰的雌性自然繁殖牛作为正常对照(9N1~9N6). 采集其组织样本, 包括大脑、心脏、肾、肝、肺、脾组织, 装入事先准备好的采样袋, 立即投入液氮中, -70℃ 冰箱保存备用.

1.1.2 主要试剂. TaqDNA 聚合酶、pMD18-T 载体、DNase- I (RNase Free)、Rnase Inhibitor 购自 TaKaRa 公司; TRIzol 试剂盒购自 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒购自 Promega 公司; UNIQ-10 胶回收试剂盒购自上海 Sangon 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 PCR-SSCP 检测 SNP. 酚仿抽提法提取体细胞核移植牛(9C1~9C5)和正常对照牛(9N1~9N6)肺脏组织的基因组, 根据羊的 *GTL2* 基因部分序列(AY017217)^[14]设计引物. 上游引物: 5' CCCACC-AGCAAACAAAGCAAC 3'; 下游引物: 5' CATC-AAGGCAAAAAGCACATCG 3'. 25 μl PCR 反应体系: 2.5 μl 10×缓冲液, 2 μl 2.5 mmol/L dNTPs, 0.1 μl Taq DNA 聚合酶, 上下游引物(10 μmol/L)各 1 μl, 模板 1 μl, 补充双蒸水至 25 μl. 扩增条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 20 s, 30 个循环, 72℃ 延伸 7 min. 扩增产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测. 对 PCR 产物进行 SSCP 分析, 1 μl RCR 产物加 6 μl 凝胶加样缓冲液, 98℃ 变性 10 min, 迅速置于冰上 10 min 后上样. 聚丙烯酰胺凝胶电泳浓度为 13%(29:1), 120 V 电压, 4℃ 电泳 12 h. 银染显色. 重复 PCR-SSCP 实验 5 次.

1.2.2 序列测定. 选取不同带型的 PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶中电泳, 并用 UNIQ-10 胶回收试剂盒回收, 回收产物连接到 pMD18-T 载体上, 并转化 DH5α 菌株, 电泳检测后, 送至 TaKaRa 公司测序, 鉴定杂合子.

1.2.3 总 RNA 提取和 cDNA 的合成. 利用 TRIzol 试剂盒提取杂合动物的心、肝、脾、肺、肾、大脑的总 RNA, 用无 RNA 酶的 DNase- I 去除可能的 DNA 污染, -70℃ 保存待用. 利用反转录试剂盒进行 cDNA 的合成. 20 μl 反应体系中含有大约 1 μg 的 RNA, 反转录反应程序按厂家提供的产品说明书进行, Oligo(dT)和 AMV 反转录酶引导合成

cDNA. 反应过程首先是 65℃ 变性 10 min, 打开 RNA 的二级结构, 然后每个反应体系中加入 5U 的反转录酶, 37℃ 延伸 50 min, 70℃ 保温 15 min 终止反应. cDNA 于 -20℃ 保存待用.

1.2.4 RT-PCR-SSCP 分析等位基因的表达. 对杂合动物的组织包括心、肝、脾、肺、肾、大脑的 RT-PCR 产物进行基因表达分析. 1 μl RCR 产物加 6 μl 凝胶上样缓冲液, 98℃ 变性 10 min, 迅速置于冰上 10 min. 聚丙烯酰胺凝胶电泳浓度为 13%(29:1), 120V 电压, 4℃ 电泳 12 h. 通过银染, 获得图像. 重复 RT-PCR-SSCP 实验 5 次.

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果

用 *GTL2* 引物对 11 头牛的基因组进行扩增, 获得一个 174 bp 的扩增产物, 对其进行测序, 测序结果为: CCCACCAGCAAACAAAGCAAC-CACTGGGCAGTGACCGCCCCCCCAGGCCGCC-GAAGATTGAAGAGGACCCGAACCTGACCAACC-AGCTGTCCCTCTTGCTAAGTGTTGAAACCAG-TGCCCTAGTGAGGGGGCACTGGCTAACCTCG-GACTTTCGATGTGCTTTTTGCCTTGATG. 对所得序列与羊的 *GTL2* 基因序列(AY017217)进行同源比较, 相似性达 90.8%. PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1.

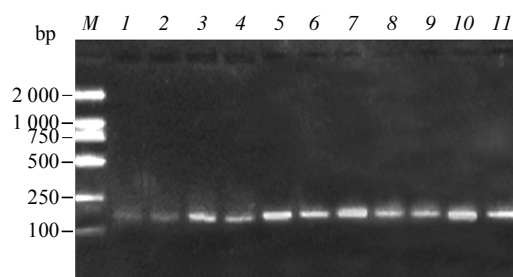


Fig. 1 PCR products of *GTL2* gene were resolved on 1.5% agarose gels

M: DL2000 marker; 1~11: The 174 bp PCR products of *GTL2* gene.

2.2 多态性检测

用 PCR-SSCP 方法对 *GTL2* 基因扩增产物进行多态性分析, 发现 *GTL2* 基因在自然繁殖牛(图 2)和体细胞核移植牛(图 3)中均存在一个多态位点, 纯合型命名为 AA, 杂合型称为 AB(9N1, 9C3), 未发现另一种纯合基因型 BB.

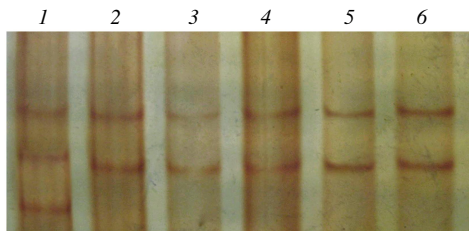


Fig. 2 Identification of an SNP of *GTL2* gene in the bovine produced by natural reproduction by PCR-SSCP
An SSCP image of two different banding patterns of PCR products with different genotypes at the SNP. 1: AB genotype; 2~6: AA genotype.

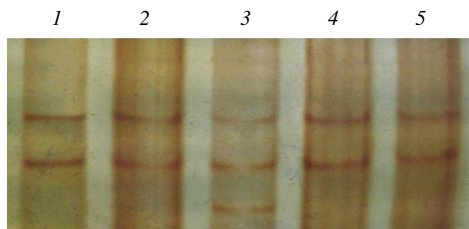


Fig. 3 Identification of an SNP of *GTL2* gene in the somatic cell nuclear transfer cattle by PCR-SSCP
An SSCP image of two different banding patterns of PCR products with different genotypes at the SNP. 3: AB genotype; 1, 2, 4, 5: AA genotype.

2.3 序列测定

对图 2 和图 3 中显示不同基因型的 PCR 产物进行测序分析, 测序结果: AA 型(图 4), AB 型(图 5). 结果表明: *GTL2* 基因扩增产物的第 77 个碱基处发生了一个 G/A 的改变, 突变位点用箭头表示.

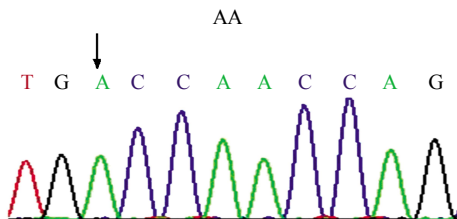


Fig. 4 Gene sequencing of AA genotype
AA genotype: An animal homozygous for allele A.

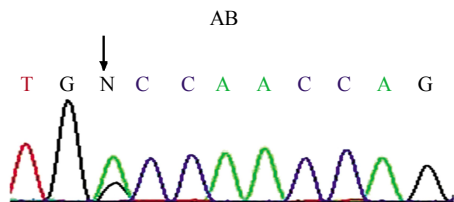


Fig. 5 Gene sequencing of AB genotype
AB genotype: An animal heterozygous for the SNP has double peaks of both A and G nucleotides at the SNP.

2.4 *GTL2* 基因印记状态分析

选取自然繁殖牛和体细胞核移植牛的杂合子(9N1, 9C3), 对其心、肝、脾、肺、肾、大脑 6 个组织进行 RT-PCR-SSCP 等位基因表达分析. 结果表明: 在自然繁殖牛杂合子(9N1)的 6 个组织中, 与表现 3 条条带的基因组 DNA 扩增产物相比, 只有 2 条明显的条带, 即 *GTL2* 基因在这 6 个组织中均表现出单等位基因表达(图 6); 在被检测的体细胞核移植牛杂合子(9C3)的 6 个组织中, *GTL2* 基因在大脑、脾、肾、肺 4 个组织中表现为双等位基因表达, 在心 and 肝中为单等位基因表达(图 7).

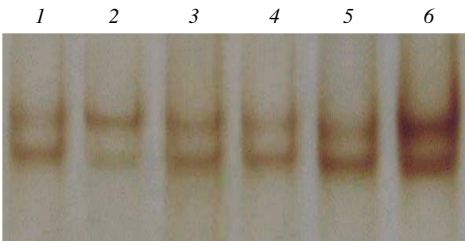


Fig. 6 An SSCP image of the allele-specific expression pattern of the *GTL2* gene in the cattle produced by natural reproduction
1~6: Expression pattern of *GTL2* in the cattle heart, liver, spleen, lung, kidney, brain.

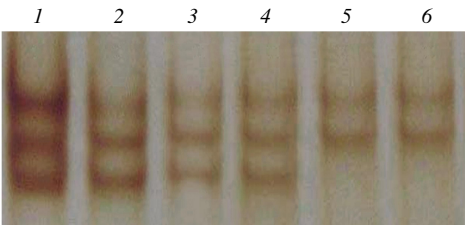


Fig. 7 An SSCP image of the allele-specific expression pattern of the *GTL2* gene in the somatic cell nuclear transfer cattle showing biallelic expression of *GTL2*
1~4: Biallelic expression pattern of *GTL2* in the cattle brain, spleen, lung, kidney; 5~6: Monoallelic expression pattern of *GTL2* in the cattle heart and liver.

3 讨 论

基因组印记是一种表观遗传现象, 只有特定的一个等位基因表达. 目前 *GTL2* 基因在牛中还没有明确的序列. 本研究, 应用羊的 *GTL2* 基因序列设计引物, 扩增出 174 bp 的牛 *GTL2* 基因序列, 并且在此片段上寻找到一个 SNP 位点, 为研究 *GTL2* 基因的等位基因表达状态奠定了基础. 研究 *GTL2* 基因在自然繁殖牛中的表达, 发现与小鼠、人和羊中一样, 牛中的 *GTL2* 基因也是印记的, 而且在被

检测的心、肝、脾、肺、肾、大脑 6 个组织中均表现为单等位基因表达, 这与 Dindot 等^[15]的研究结果一致, Dindot 等应用种间杂交的方法制备了 72 日龄的家牛与野牛的杂交胚胎, 并证明了 *GTL2* 基因在杂交胚胎中表现为母源等位基因表达. *GTL2* 基因印记状态在种间的保守性表明了哺乳动物发育过程中这一基因印记的重要性.

在新生死亡的体细胞核移植牛中, *GTL2* 基因在大脑、脾、肾、肺 4 个组织中表现为双等位基因表达, 呈现印记状态紊乱. Zhang 等^[16]分析了 *H19* 基因在 4 头出生死亡的体细胞核移植牛中的表达, 发现其中 3 头克隆动物表现为双等位基因表达. 这些克隆牛虽然发育到了出生, 但出生后不久就死亡了, 这说明发育到出生的克隆牛可以承受高度的印记紊乱. 在克隆鼠中, Mann 等^[17]报道了只有 4% 的克隆鼠胚胎具有所测印记基因的正常表达形式, 而在发育至足月并且出生后存活的克隆鼠中, 印记基因有相对正常的表达, 这也许可以帮助我们解释克隆鼠的低效率. Dindot 等^[18]在 40 日龄的克隆牛胎儿和胎盘中发现, *GTL2* 基因和 *IGF2* 基因呈现正常的等位基因表达, 这些克隆胎儿的供体细胞是来自家牛与野牛种间杂交得到的同一头牛. 由于这些胚胎在妊娠早期就被用来进行印记检测了, 所以不知它们能否活到出生.

体细胞核移植动物存在大量的表型异常和不同程度的发育缺陷, 主要表现为胚胎的过度增长, 发育至成年的几率很低, 这与许多印记基因甲基化异常进而表达失调导致的症状相似. CpG 双核苷酸 C 残基的 DNA 甲基化与组织特异性基因的表达密切相关^[19]. Liu 等^[20]在 2007 年发表文章指出, 4 头自发性流产的克隆牛胎儿中 4 个印记基因(*Peg3*, *Xist*, *Peg10* 和 *MAOA*)的差异甲基化区域(DMRs)有不同程度的甲基化异常. 异常的 DNA 甲基化会影响供体核的表观重编程, 是体细胞克隆效率低下和克隆动物器官发育异常的原因之一^[21]. 大量研究试验表明, 供体核的不完全重编程是某些有重要作用的基因没有表达或表达异常使核移植效率低的内在机制^[22, 23].

虽然对哺乳动物进行体细胞核移植在 10 年前就成功了, 而对核重编程的研究还处于初期阶段, 进一步研究核重编程的分子机制将使体细胞核移植变得乐观. 如果能反向控制细胞的分化阶段, 体细胞核移植将不再是学术上的难题^[24]. 在本研究中, 我们发现, 在自然繁殖牛中 *GTL2* 基因是印记的,

在发育异常的体细胞核移植牛的部分组织中存在 *GTL2* 印记混乱, 而印记混乱的作用机制有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Walker S C, Christenson R K, Ruiz R P, *et al.* Comparison of meat composition from offspring of cloned and conventionally produced boars. *Theriogenology*, 2007, **67**(1): 178~184
- 2 Rudenko L, Matheson J C. The US FDA and animal cloning: risk and regulatory approach. *Theriogenology*, 2007, **67**(1): 198~206
- 3 Hwang W S, Lee B C, Lee C K, *et al.* Cloned human embryonic stem cells for tissue repair and transplantation. *Stem Cell Rev*, 2005, **1**(2): 99~109
- 4 Blum H E. Stem cells--basic aspects and therapeutic perspectives. *Schweiz Rundsch Med Prax*, 2007, **96**(14): 539~543
- 5 Keefer C L. Lessons learned from nuclear transfer (cloning). *Theriogenology*, 2008, **69**(1): 48~54
- 6 Fulka J Jr, Fulka H. Somatic cell nuclear transfer (SCNT) in mammals: the cytoplasm and its reprogramming activities. *Adv Exp Med Biol*, 2007, **591**: 93~102
- 7 Chavatte-Palmer P, de Sousa N, Laigre P, *et al.* Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones. *Theriogenology*, 2006, **66**(4): 829~840
- 8 Young L E, Fairburn H R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. *Theriogenology*, 2000, **53**(2): 627~648
- 9 Farin C E, Farin P W, Piedrahita J A. Development of fetuses from *in vitro*-produced and cloned bovine embryos. *J Anim Sci*, 2004, **82**: 53~62
- 10 Takada S, Tevendale M, Baker J, *et al.* Delta-like and *GTL2* are reciprocally expressed, differentially methylated linked imprinted genes on mouse chromosome 12. *Curr Biol*, 2000, **10**(18): 1135~1138
- 11 Temple I K, Shrub V, Lever M, *et al.* Isolated imprinting mutation of the *DLK1/GTL2* locus associated with a clinical presentation of maternal uniparental disomy of chromosome 14. *J Med Genet*, 2007, **44**(10): 637~640
- 12 Charlier C, Segers K, Wagenaar D, *et al.* Human-ovine comparative sequencing of a 250 kb imprinted domain encompassing the callipyge (*clpg*) locus and identification of six imprinted transcripts: *DLK1*, *DAT*, *GTL2*, *PEG11*, *antiPEG11*, and *MEG8*. *Genome Res*, 2001, **11**(5): 850~862
- 13 Williams A E, Moschos S A, Perry M M, *et al.* Maternally imprinted microRNAs are differentially expressed during mouse and human lung development. *Dev Dyn*, 2007, **236**(2): 572~580
- 14 Bidwell C A, Shay T L, Georges M, *et al.* Differential expression of the *GTL2* gene within the callipyge region of ovine chromosome 18. *Anim Genet*, 2001, **32**(5): 248~256
- 15 Dindot S V, Kent K C, Evers B, *et al.* Conservation of genomic imprinting at the *XIST*, *IGF2*, and *GTL2* loci in the bovine. *Mamm Genome*, 2004, **15**(12): 966~974

- 16 Zhang S, Kubota C, Yang L, *et al.* Genomic imprinting of H19 in naturally reproduced and cloned cattle. *Biol Reprod*, 2004, **71**(5): 1540~1544
- 17 Mann M R, Chung Y G, Nolen L D, *et al.* Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod*, 2003, **69**(3): 902~914
- 18 Dindot S V, Farin P W, Farin C E, *et al.* Epigenetic and genomic imprinting analysis in nuclear transfer derived *Bos gaurus*/*Bos taurus* hybrid fetuses. *Biol Reprod*, 2004, **71**(2): 470~478
- 19 Shiota K, Kogo Y, Ohgane J, *et al.* Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. *Genes to Cells*, 2002, **7**(9): 961~969
- 20 Liu J H, Yin S, Xiong B, *et al.* Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. *Mol Reprod Dev*, 2007, **75**(4): 598~607
- 21 Kremenskoy M, Kremenska Y, Suzuki M, *et al.* Epigenetic characterization of the CpG islands of bovine *Leptin* and *POU5F1* genes in cloned bovine fetuses. *J Reprod Dev*, 2006, **52**(2): 277~285
- 22 Daniels R, Hall V, Trounson A O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryo reconstituted with granulosa cell nuclei. *Biol Reprod*, 2000, **63**(4): 1034~1040
- 23 Tamashiro K L, Wakayama T, Akutsu H, *et al.* Cloned mice have an obese phenotype not transmitted to their offspring. *Nat Med*, 2002, **8**(3): 262~267
- 24 Loi P, Galli C, Ptak G. Cloning of endangered mammalian species: any progress?. *Trends Biotechnol*, 2007, **25**(5): 195~200

Genomic Imprinting of *GTL2* in Somatic Cell Nuclear Transfer Cattle*

WANG Jian-Chun¹⁾, LI Dong-Jie³⁾, DU Wei-Hua⁴⁾, FAN Bao-Liang¹⁾, LI Ning²⁾, LI Shi-Jie^{1,2)**}

¹⁾College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

²⁾State Key Laboratories For Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

³⁾College of Life Science and Technology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China;

⁴⁾Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100094, China)

Abstract Somatic cell nuclear transfer (SCNT) has great value in medicine, stock breeding and saving endangered animals, but the low efficiency of SCNT restricts its application. Imprinted genes regulate fetal growth and many are essential for normal development in mammals. *GTL2* is imprinted in human and mouse, which act as noncoding RNAs regulating the translation of target mRNA. In order to identify the expression of *GTL2* in cattle produced by natural reproduction and by SCNT, a single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *GTL2* through PCR-SSCP was identified and the *GTL2* expression patterns in six organs of hybrids was analyzed by RT-PCR-SSCP. The results demonstrated that *GTL2* was monoallelic expression in all six examined organs of cattle produced by natural reproduction, and showed monoallelic expression in heart and liver but biallelic expression in brain, spleen, lung and kidney of cattle produced by SCNT that died shortly after birth. The abnormal expression of *GTL2* may contribute to the organ development defects and the low efficiency of SCNT.

Key words cattle, *GTL2*, genomic imprinting, somatic cell nuclear transfer

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2007AA100504) and Natural Science Foundation of Hebei (C2006001032).

**Corresponding author.

Tel: 86-312-5016895 E-mail: lishijie20005@163.com

Received: January 30, 2008 Accepted: August 5, 2008