

DDK 综合症部分相关基因的实时定量 PCR 分析

陈修栋¹, 桂宏翔¹, 赵泉阳², 王善强¹, 杨亚蒙¹, 景亚星², 郑振宇^{1,2*}

(1. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 为筛选与 DDK 综合症相关的基因, 对其中 4 个表达量差异显著的基因 (*EGF*、*Bcl-2*、*Mcl-1*、*EGF-R*) 进行荧光定量 PCR 分析, 以确定这些基因是否和 DDK 综合症相关。选用 8~10 周龄的清洁级小鼠, 雌雄比例 1:1 方式合笼交配, 以 DDK ♀ × BALB/c ♂ 交配组合为试验组、BALB/c ♀ × BALB/c ♂ 交配组合为对照组, 依据胚胎发育时间, 对植入前期 2 细胞期、4 细胞期、8 细胞期的胚胎进行观察和采集, 提取总 RNA 并进行反转录, 应用荧光定量 PCR 技术, 比较所选的候选基因在不同交配组合中各胚胎时期的表达差异。结果表明, 与对照组相比, *EGF*、*Bcl-2*、*Mcl-1* 3 个基因在 3 个时期表达差异都极显著; *EGF-R* 基因在 4 细胞期、8 细胞期 2 个时期表达差异极显著。表明 DDK 综合症和所选的 4 个候选基因的作用相关。

关键词: DDK 综合症; 荧光定量 PCR; 基因差异表达分析

中图分类号: S865.1⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)07-0141-05

Analysis of DDK Syndrome Related Gene by Real-time PCR

CHEN Xiu-dong¹, GUI Hong-xiang¹, ZHAO Xiao-yang², WANG Shan-qiang¹,

YANG Ya-meng¹, JING Ya-xing², ZHENG Zhen-yu^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou

450002, China; 2. College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to screen the genes associated with DDK syndrome, four significantly differential expression genes including *EGF*, *Bcl-2*, *Mcl-1*, and *EGF-R* were analyzed by RT-PCR. The 8-10 weeks old mice of clean grade were mated in accordance in the way that male and female ratio was 1:1, using the DDK ♀ × BALB/c ♂ mating combination as the experimental group while the BALB/c ♀ × BALB/c ♂ mating combination as control group. According to embryonic development, embryos implanted in the early 2-cell, 4-cell, and 8-cell stages were observed and collected. The total RNAs were extracted, reversly transcribed and analyzed using quantitative PCR technique to compare the expression differences of selected genes in different mating combinations and different stages of embryos. The expression differences of three genes, *EGF*, *Bcl-2*, and *Mcl-1*, in the three periods were extremely significant while the expression difference of *EGF-R* was extremely significant in the 4-cell and 8-cell stages, suggesting that the four candidate genes were related to the DDK syndrome.

Key words: DDK syndrome; quantitative PCR; analysis of gene differential expression

DDK 小鼠是一种 *M. m. domesticus* 亚种的德国小鼠, 由日本人培育而成。DDK 综合症指雄性 DDK 小鼠和其他品系的近交系雌鼠交配, 能使其正

常受孕, 而 DDK 雌鼠与别的品系的近交系雄性小鼠的子代胚胎在妊娠 3~5 d 后死亡, 几乎不孕^[1]。学者们通过胚胎和生理学方面的研究, 提出了“精卵

收稿日期: 2013-03-03

基金项目: 河南省教育厅高校杰出科研人才创新工程项目(006KYCX015)

作者简介: 陈修栋(1986-), 男, 河南淮阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物遗传工程。E-mail: chenxiudong2008@126.com

* 通讯作者: 郑振宇(1962-), 男, 吉林龙井人, 教授, 博士, 主要从事分子遗传学和动物遗传工程方面的研究。

E-mail: cbuniv@126.com

不亲和假说”,即 *Om* 基因(DDK 卵子基因)突变控制产生的卵子细胞质因子(cytoplasmic factor of eggs)与非 DDK 品系同一位点控制产生的精子因子(sperm factor)之间的不亲和,导致胚胎在早期死亡。*Om* 基因被定位于小鼠 11 号染色体上的 47 cM 处^[2-3],其介导产生的卵子细胞质因子被证明是一种 RNA 分子^[4]。

国内外学者大都是从繁殖学、胚胎学及遗传学方面对 DDK 小鼠极性不育现象展开研究,关于胚胎致死的分子机制和 *Om* 基因的作用机制至今仍不清楚。笔者所在的河南农业大学动物遗传工程实验室在小鼠卵子突变基因与修饰基因的发现与定位、DDK 小鼠与其他亚种小鼠间精卵亲和关系等方面做了大量的研究工作,并针对 *Om* 基因的研究做出了全面分析。鉴于 *Om* 基因研究一直围绕 QTLs 定位及其遗传特性方面,因此有必要开展对卵子突变基因作用机制方面的研究。本实验室已经选取 8 个功能基因(*TGF*、*C-MYC*、*LIF*、*H-RAS*、*Mcl-1*、*Bcl-2*、*EGF*、*EGF-R*)作为 DDK 综合症的候选基因,并进行了初步探索,发现在 DDK ♀ × BALB/c ♂ 交配组合的各时期胚胎中 *Mcl-1*、*Bcl-2*、*EGF*、*EGF-R* 表达量均显著下调。所以,本研究选择 *Mcl-1*、*Bcl-2*、*EGF*、*EGF-R* 4 个差异显著的基因进行更深入的研究,通过对与胚胎发育相关的基因表达检测,有可能为研究人类不孕症模式动物开发、试验体系建立提供依据和借鉴。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验小鼠 DDK 小鼠购于日本理化中心, BALB/c 品系小鼠购于河南省实验动物中心,在实验室繁殖扩群。雌鼠选用 8~10 周龄、体质量 25 g 左右的未经产母鼠,雄鼠选用体质量 30 g 左右的成年公鼠。试验小鼠按常规方法饲养,光照时间为 7:00—19:00,饲养温度控制在 18~22 ℃,空气湿度为 60%~80%,自由采食、饮水。

正常交配,收集不同交配组合(DDK ♀ × BALB/c ♂, BALB/c ♀ × BALB/c ♂)小鼠 2 细胞期、4 细胞期及 8 细胞期植入前胚胎各 90~110 枚。

1.1.2 试验试剂 RNA 提取及纯化试剂、RNAprep Micro 试剂盒、0.5 × TBE 缓冲液(pH 值 8.5)、0.5 μg/mL 溴化乙啶、胶回收试剂盒均购自 TIANGEN 公司, DNase I 酶、RT-PCR 试剂、琼脂糖凝胶电泳及回收试剂、DL2000 DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 试验器材 PCR 仪(Eppendorf 公司),恒温水浴锅(江苏金坛中大仪器厂),紫外分光光度计(尤尼柯仪器有限公司),电泳仪(北京六一仪器厂),电泳槽(北京六一仪器厂),台式高速冷冻离心机(美国基因公司),酸度计(上海宇隆仪器有限公司),UVP 凝胶成像系统(美国 UVP 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠早期胚胎的采集和处理 把试验组(DDK ♀ × BALB/c ♂)与对照组(BALB/c ♀ × BALB/c ♂)分别合笼交配后,依据表 1 的时间采集胚胎。

表 1 小鼠早期胚胎采集时间

项目	胚胎时期		
	2 细胞	4 细胞	8 细胞
时间/h	44	55	65

注:表中时间是合笼后时间。

依据表 1 中的时间,挑选处于不同孕期的小鼠各 8 只,用颈椎脱臼法处死,打开腹腔分离输卵管,在超净工作台上用 PBS 缓冲液清洗 3 次,然后放入 PBS 缓冲液中,剔除脂肪组织,在体视显微镜下挑选胚胎。把采集到的不同组合小鼠各细胞期受精卵(各 90~110 枚),加入酸性台氏液 500 μL,颠倒摇晃 1 min,离心(5 000 r/min, 4 ℃)5 min,弃上清。

1.2.2 总 RNA 的提取、纯化 将酸性台氏液处理后的胚胎细胞,加入 350 μL 裂解液 TRK 涡旋振荡 15 s,使裂解液匀质化,同时加入 3 μL Linear Acrylamide 和 1 μL Carrier RNA 到混合物中;加入 250 μL 70%乙醇,用移液器混匀,并迅速移至吸附柱上(吸附柱置于 2 mL 收集管中);12 000 r/min,常温离心 30 s,弃废液;加入 400 μL 缓冲液 RWC,操作轻柔;12 000 r/min,常温离心 30 s;加入 500 μL 缓冲液 RWB 常温离心 30 s,弃废液,重复此步骤;把柱子重新加到一个收集管中,15 000 r/min,常温离心 2 min;将吸附柱放入 1.5 mL 的 RNase-free 离心管中,在吸附柱的膜中央加入 RNase-free ddH₂O 15 μL,室温下孵育 2 min,离心所得到的溶液即为提取的总 RNA。

1.2.3 总 RNA 质量检测 取所得 RNA 溶液 2 μL,稀释 25 倍。用紫外分光光度计检测提取的总 RNA 的浓度(OD₂₆₀)和纯度(OD₂₆₀/OD₂₈₀)。

1.2.4 反转录 取 0.2 mL 无 RNase 污染的离心管,在冰上操作,方法如下:加入 5 × gDNA Eraser Buffer 2.0 μL、gDNA Eraser 1.0 μL、Total RNA 4.0 μL,加 RNase-free ddH₂O 补至 10.0 μL,42 ℃孵育 2 min,4 ℃保存。

反转录反应的反应液在冰盒中进行配制。为了保证反应液配制的准确性,进行各项反应时,应先按照反应数+1 的量配制 Master Mix,加入 5×PrimeScript™ Buffer 24.0 μL、PrimeScript™ RT Enzyme Mix 1.0 μL、RT Primer Mix 1.0 μL、基因

组 DNA 除去反应液 10.0 μL,用 RNase-free ddH₂O 加到 20.0 μL,分装到每个反应管中。37℃ 孵育 2 min,85℃ 灭活 5 s,4℃ 下保存。
1.2.5 实时定量 PCR 以 GenBank 中各候选基因的 cDNA 序列为模板进行扩增,引物序列见表 2。

表 2 候选基因及引物

引物名称	引物序列	退火温度/℃	产物长度/bp
EGF	5'-CCTCATATGATGGATACTGCCTCAA-3'	64	199
	5'-ACCAGTGCCACCATGCAGA-3'		
Bcl-2	5'-TGAAGCGGTCCGGTGGATA-3'	65	104
	5'-CAGCATTTGCAGAAAGTCCTGTGA-3'		
Mcl-1	5'-GGGACTGGCTTTGTCAAACAAAGA-3'	65	192
	5'-AGTTTGGTGGCTGGAGCTTTAAGA-3'		
EGF-R	5'-TTGGGTATCCCGAAG-3'	65	225
	5'-GCCTGATAACTGGACTGA-3'		

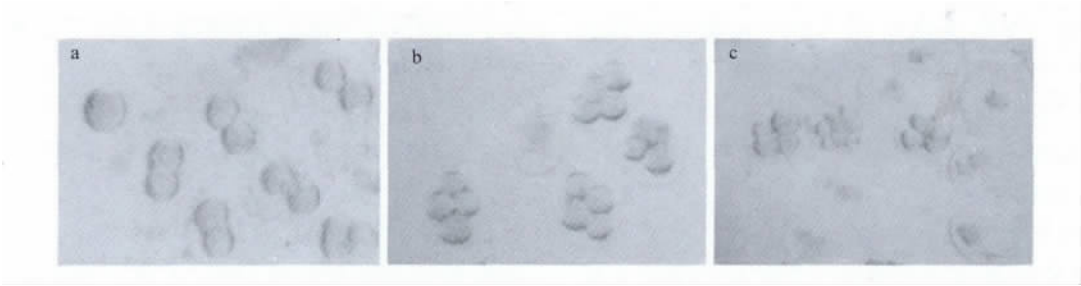
以小鼠 *βactin* 基因作为内参基因,采用相对定量法进行分析。每个反应包括 10 μL 2×Trans Start™ Green qPCR super Mix、上游及下游引物各 250 nmoL/L、cDNA 模板 50 ng,加 ddH₂O 补充至 20 μL。
PCR 反应程序:95℃ 30 s; 95℃ 5 s,60℃ 30 s,共 40 个循环;再从 60℃ 升到 95℃。用相对定量法进行基因的表达差异分析,试验设计和数据分析用 2^{-ΔΔC_t} 法,并用 SAS 8.0 统计软件对各数据

进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同交配组合早期胚胎的形态学观察

观察获得的早期胚胎,并选择发育良好、形态正常的胚胎。挑选的各时期早期胚胎见图 1。采集到的胚胎,形态正常、质地均匀、发育良好,可用于下一步试验。



a. 2 细胞期胚胎; b. 4 细胞期胚胎; c. 8 细胞期胚胎

图 1 不同时期小鼠早期胚胎

2.2 总 RNA 提取结果

提取各个时期受精卵的总 RNA,用紫外分光光度计检测其纯度,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值均在 1.7~2.0,RNA 质量基本完好,未发生降解,可以用于后续试验。

2.3 实时定量 PCR 分析结果

实时定量的每个基因设置 3 个平行,数据分析为 *C_t* 值均值±标准差(表 3),采用 2^{-ΔΔC_t} 法进行基因的表达差异分析,结果见表 4。

表 3 小鼠胚胎候选基因及内参基因 *C_t* 值

胚胎时期	交配组合	候选基因				内参基因 <i>βactin</i>
		<i>Bcl-2</i>	<i>EGF</i>	<i>Mcl-1</i>	<i>EGF-R</i>	
2 细胞	对照组	28.60±0.64	28.26±0.57	32.01±0.83	0	28.76±0.75
	试验组	30.10±0.42	29.58±0.58	33.29±0.47	0	27.80±0.55
4 细胞	对照组	28.03±0.67	27.75±0.76	30.05±0.54	26.65±0.45	25.10±0.87
	试验组	29.75±0.63	30.18±0.66	31.21±0.74	28.05±0.48	25.96±0.72
8 细胞	对照组	23.36±0.48	24.62±0.59	22.07±0.62	22.43±0.42	15.45±0.91
	试验组	26.90±0.51	29.95±0.42	23.98±0.47	23.56±0.53	16.68±0.62

表 4 小鼠胚胎各时期候选基因的实时定量结果

胚胎时期	交配组合	候选基因			
		<i>Bcl-2</i>	<i>EGF</i>	<i>Mcl-1</i>	<i>EGF-R</i>
2 细胞	对照组	0.16±0.05 ^a	0.29±0.04 ^a	0.30±0.02 ^a	0
	试验组	0.27±0.04 ^b	0.37±0.04 ^b	0.38±0.03 ^b	0
4 细胞	对照组	0.47±0.03 ^a	0.41±0.08 ^a	0.41±0.07 ^a	0.42±0.07 ^a
	试验组	0.68±0.06 ^b	0.71±0.05 ^b	0.67±0.06 ^b	0.58±0.03 ^b
8 细胞	对照组	0.53±0.05 ^a	0.68±0.04 ^a	0.64±0.05 ^a	0.66±0.06 ^a
	试验组	1.00±0.02 ^b	1.00±0.03 ^b	1.00±0.02 ^b	1.00±0.04 ^b

注:同时期胚胎中同列数据肩标字母不同表示差异极显著($P<0.01$)。

由表 4 可知,在 2 种交配组合中,2 细胞期检测到 *EGF*、*Bcl-2*、*Mcl-1* 3 个基因表达;4 细胞期和 8 细胞期检测到 *EGF*、*EGF-R*、*Bcl-2*、*Mcl-1* 4 个基因的表达;且试验组中各细胞期基因表达下调差异均极显著。

3 结论与讨论

DDK 小鼠胚胎致死的作用机制(RNA 与蛋白质水平)尚不清楚。Renard 等^[2]曾从 DDK 卵子及原核期受精卵中提取 RNA,利用显微注射技术将其注入 BALB/c 等品系小鼠的自交受精卵中,这些胚胎均出现了与 DDK 综合症相似的致死现象,因此确定该基因控制的卵子细胞质因子是一种 RNA 分子,并且该分子是以持续累加的形式起作用的。其原因可能为 *Om* 基因控制的卵子细胞质因子在 2 细胞期精卵基因组融合时对合子基因组中特定位点的修饰,导致其合子基因表达过程中阻碍胚泡形成基因突变的发生,进而造成小鼠胚胎致死现象。但是未能准确把握突变基因表达的时间及空间性。基于此,柴保国^[5]利用半定量技术,以 DDK ♀×BALB/c ♂ 交配组合为试验组、DDK ♀×DDK ♂ 和 BALB/c ♀×BALB/c ♂ 为对照组,对小鼠早期胚胎细胞中 8 个功能基因进行了表达差异检测,证实了 *Om* 基因控制的卵子细胞质因子以某种机制作用于 *Mcl-1*、*Bcl-2*、*EGF*、*EGF-R*,从而间接地引发早期胚胎致死现象。此外,还发现 DDK ♀×BALB/c ♂ 交配组合产生的胚胎细胞在 8 细胞期后,出现大量凋亡现象,无法进行下一步试验。

研究发现^[6],*EGF-R* 基因的 mRNA 在小鼠的 4 细胞期胚胎中就可以检测,*EGF* 通过自分泌或者旁分泌途径作用于 *EGF-R* 基因,调节胚胎的生长发育。上皮生长因子(EGF)在 4 细胞期之前促进卵裂,桑葚胚期后起调节分化的作用。研究表明^[7],0.05 ng/mL 的 EGF 可以减轻 2 细胞期阻滞、调节桑葚胚胚胎的分化。囊胚体外培养时,在培养基中加入 EGF 可以使其孵化率得到显著提高,且适当浓

度的 EGF 可以调节早期胚胎的发育和着床。EGF 在胚泡附植、早期胚胎发育以及胚胎的分化增生过程中有着重要的调节作用。

Bcl-2 和 *Mcl-1* 都是凋亡基因^[8],1999 年 Lockshin 等^[9]在正常人类囊胚细胞中检测到 *Bcl-2* 基因高表达,但在同时期的碎裂胚胎中没有检测到其表达。因此,人们认为 *Bcl-2* 的高表达能够抑制细胞凋亡,其表达量升高可以有效降低胚胎细胞凋亡率。随着胚胎生长发育以及细胞数量不断增加,*Bcl-2* 表达量也不断增加,这有利于胚胎的生长发育。*Mcl-1* 基因表达量的增加出现在人类原始生殖细胞始基卵泡(胚胎第 18~20 周)的形成过程中,且只在卵细胞中表达。因此,推测 *Mcl-1* 可能对始基卵泡形成和生长起保护作用。*Mcl-1* 基因的缺失会导致着床期胚胎的死亡以及孵化期前囊胚成熟的延迟,囊胚细胞中 *Mcl-1* 基因的无义突变可导致其无法植入^[10]。

本试验在对 2、4、8 细胞期候选基因表达的研究中发现,各时期均有 *EGF*、*Bcl-2*、*Mcl-1* 基因表达,*EGF-R* 基因在 4、8 细胞期有表达。为进一步确认候选基因是否与 DDK 小鼠胚胎致死相关,本试验以 DDK ♀×BALB/c ♂ 交配组合作为试验组、BALB/c ♀×BALB/c ♂ 交配组合作为对照组,依据小鼠胚胎发育的时间,分别采集和观察 2 组交配组合中植入前期 2、4、8 细胞期的胚胎。并首次采用实时定量 PCR 技术,比较 *EGF*、*Bcl-2*、*Mcl-1*、*EGF-R* 4 个候选基因在不同交配组合中各胚胎时期的表达差异,为进一步研究 DDK 综合症的分子机制及 *Om* 基因的作用机制提供了更准确的依据。

本试验应用实时定量 PCR 技术,检测了候选基因在 DDK ♀×BALB/c ♂ 交配组合和 BALB/c ♀×BALB/c ♂ 交配组合小鼠的早期胚胎细胞中的表达量差异,证实了 *Om* 基因可能通过其控制的细胞质物质作用于 *Mcl-1*、*Bcl-2*、*EGF*、*EGF-R* 候选基因,并通过降低其表达引发早期胚胎致死现象。*Mcl-1*、*Bcl-2*、*EGF*、*EGF-R* 4 个候选

(下转第 149 页)

添加保护剂来减少蛋白质的脱水损伤。聚乙二醇会与蛋白质表面形成氢键,代替水的存在,使蛋白质在缺水条件下仍能保持稳定的结构,从而减少酶活性的损失,而且由于大分子结合修饰,使酶的空间结构发生了某些细微的改变,对酶有一定的激活作用从而提高酶活性^[8]。

总之,草鱼内脏复合蛋白酶的最佳提取、分离、干燥工艺为:按照固液比 1:4 向草鱼内脏中加入工业己烷进行脱脂,然后按照固液比 1:5 向其中加入 pH 值为 8 的磷酸盐缓冲液,在 20℃ 条件下浸提 80 min,再用超声仪在频率 15 kHz、功率 50 W 的条件下处理 4 min 进行辅助提取,6 000 r/min 离心 15 min;然后添加质量浓度为 8 g/L 的茶多酚进行初步分离纯化;最后添加聚乙二醇至其终质量浓度为 20 g/L,按 6 mm 装液厚度快速冷冻,干燥 24 h,将复合蛋白酶液制成固态粉剂,此条件下酶比活为 4.33 U/mg。

参考文献:

- [1] 刘忠义. 草鱼肠道胰蛋白酶(GT-A)的纯化及其部分理化性质初探[J]. 西北农林科技大学学报, 2007, 35(10):189-195.
- [2] 张继平,林建成. 草鱼碱性磷酸酶的分离纯化与部分性质研究[J]. 厦门大学学报, 2005, 44(5):684-687.
- [3] 郝志明. 罗非鱼内脏中酶的筛选及其蛋白酶、超氧化物歧化酶的研究[D]. 湛江:广东海洋大学, 2006.
- [4] 郭彩华,陈昭华. 罗非鱼肠道蛋白酶的分离纯化及部分性质研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(4):100-104.
- [5] 黄卓烈. 生物化学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社, 2010:86-88.
- [6] 孙君社,江正强,刘萍. 酶与酶工程及其应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2006.
- [7] 何莉萍,刘良忠,江丽丽,等. 三种方法提取草鱼内脏油脂的比较[J]. 食品工业科技, 2007, 28(12):155-157.
- [8] 彭志英. 食品酶学导论[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2002:166-180.

(上接第 144 页) 基因的表达差异与 DDK 综合症中的胚胎致死现象存在一定相关性。

参考文献:

- [1] Wakasugi N, Tomita T, Kondo K. Differences of fertility in reciprocal crosses between inbred strains of mice; DDK, KK and NC[J]. Reprod Fertil, 1967, 13(1): 41-50.
- [2] Renard J P, Baldacci P, Richoux-Duranthon V. A maternal factor affecting mouse blastocyst formation[J]. Development, 1994, 120(4):797-802.
- [3] Pardo-Manuel de Villena F, Slamka C, Fonseca M, et al. Transmission-ratio distortion through F₁ females at chromosome 11 loci linked to *Om* in the mouse DDK syndrome[J]. Genetics, 1996, 142(4):1299-1304.
- [4] Abe A, Inoue K, Tanaka T, et al. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR[J]. Clin Microbiol, 1999, 37(9):2899-2903.
- [5] 柴保国. 小鼠早期胚胎发育相关功能基因作用机理研究[D]. 郑州:河南农业大学, 2010.
- [6] Pantaleon M, Whiteside E J, Harvey M B, et al. Func-

tional growth hormone receptors and GH expressed by preimplantation mouse embryos; a role for GH in early embryogenesis? [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(10):25-30.

- [7] 严云勤,谭景和,张黎霞. 小鼠早期胚胎发育过程中 TGF- α 和 EGF-R mRNA 的表达[J]. 动物学报, 2002, 48(4):567-569.
- [8] McEalfe A D, Huiner H R, Bloor D J, et al. Expression of 11 members of the BCL-2 family of apoptosis regulatory molecules during human preimplantation embryo development and fragmentation[J]. Mol Reprod Dev, 2004, 68(1):35-50.
- [9] Lockshin R A, Williams C M. Programmed cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms[J]. J Insect Physiol, 1964, 10(4):643-649.
- [10] Domashenko A D, Latham K E, Hatton K S. Expression of myc-family, myc-interacting and myc target genes during preimplantation mouse development[J]. Mol Reprod Dev, 1997, 4(7):57-65.