

巢式 RT-PCR 检测昆明小鼠早期胚胎中 G6PD 基因表达^{*}

张守全 王 翀 杨关福 戴文滔

(华南农业大学动物科学系, 广州 510642)

摘要 根据小鼠肌肉的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PD)的 cDNA 序列设计并合成内外 2 对引物,以巢式 RT-PCR 方法检测昆明小鼠 1-、2-、4-、8-细胞期早期胚胎是否转录出 G6PD 的 mRNA,结果发现 1~8-细胞期早期胚胎的 mRNA 均能以外引物扩增产物为模板通过内引物扩增出一条 378 bp 特异性条带.表明昆明小鼠 1~8-细胞期早期胚胎的 G6PD 基因已表达,磷酸戊糖途径已是其代谢葡萄糖的主要方式之一.

关键词 昆明小鼠;早期胚胎;G6PD;RT-PCR;基因表达

中图分类号 Q 954.4

哺乳动物早期胚胎体外发育阻断(blocks to development *in vitro*)一直是困扰人们广泛应用诸多生物技术的难题,克服这一现象的方法主要集中在改进培养液成份(Devreker et al, 1997)、改善培养条件(O' Neill, 1997)和与输卵管上皮细胞协同培养(Hill et al, 1996),但其效果不甚理想.不同研究者发现培养液中葡萄糖对哺乳动物早期胚胎发育阻断相互矛盾的作用(Leppens—Luisier et al, 1997),成为近期研究的焦点之一.哺乳动物早期胚胎的葡萄糖代谢途径及其转变的研究则是解决这一焦点问题的主要手段,本试验以昆明小鼠为动物模型,将其早期胚胎葡萄糖代谢的关键酶之一——6-磷酸葡萄糖脱氢酶(glucose 6-phosphate dehydrogenase, G6PD)作为研究对象,据小鼠肌肉 G6PD 的 cDNA 序列设计 2 对引物,对小鼠早期胚胎总 RNA 进行巢式 RT-PCR 扩增,观察 G6PD 基因表达,推测 G6PD 活性,探索哺乳动物不同阶段的早期胚胎中糖代谢是否出现磷酸戊糖途径,进而确定葡萄糖对哺乳动物早期胚胎体外发育的生理作用.

1 材料与方法

1.1 实验动物

体成熟昆明小鼠,购自中山医科大学实验动物中心.

1.2 昆明小鼠早期胚胎获得

8~10 周龄昆明小鼠,腹腔注射 PMSG 15 IU,48 h 后,腹腔注射 HCG 15 IU,与公鼠同笼过夜.第 2 d 08:00 检查阴道栓,有阴道栓者,在注射 HCG 25~27 h 后,以颈部脱臼法处死小鼠,以 1 mL 注射器带 4 号针头并用 DEPC 处理的生理盐水采集 1-细胞期胚胎,在体视显微镜下观察到的 1-细胞胚胎 125 个放入 0.5 mL EP 管.类似方法获取 2-(HCG 后 44~48 h)、4-(HCG 后 56~62 h)、8-细胞(HCG 后 68~72 h)胚胎 84、75、80 个分别放入 0.5 mL 的 EP 管,置

—20℃冰箱保存备用(张守全等, 1995).

1.3 小鼠血液 DNA 和肝脏总 RNA 的提取

按常规方法(卢圣栋等, 1993)进行抽提. 血液 DNA 用于鉴定自行设计和合成引物的可靠性, 肝脏总 RNA 用于 RT-PCR 阳性对照.

1.4 胚胎的总 RNA 抽提

用 Promega 公司的总 RNA 提取试剂盒(RNAgents®, total RNA isolation system)并参照 Chomczynski 等(1987)和 Shaiker 等(1995)介绍的抽提方法, 抽提小鼠早期胚胎总 RNA, —70℃保存备用.

1.5 RT-PCR

引物设计及合成: 内外 2 对引物根据小鼠肌肉 G6PD 的 cDNA 序列(Zollo et al, 1993)借助计算机辅助软件设计. 外引物: G1(5′—GTGAACGTGTTTGGCAGCGGCAAC—3′)、G703(5′—TGCTCGATTCAGATGGGTCCAA—3′), PCR 产物长度 726 bp. 内引物: G146(5′—CAT-CAT-GGGTGCATCGGGTGACCT—3′)、G500(5′—TGACTCATGCAGGTCTCTGAATG—3′), PCR 产物长度 378 bp. 2 对引物均由上海生工生物工程有限公司合成.

引物检测: 以小鼠血液 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 检测自行设计引物是否可扩增出目的片段. PCR 扩增条件见表 1, PCR 反应按 94℃45 s, 60℃45 s, 72℃1 min, 30 个循环后于 72℃延伸 10 min.

反转录反应: 采用 GIBCOBRL 公司的 M-MLV 反转录酶进行反转录, 设一阳性对照(小鼠肝脏总 RNA), 阴性对照(无核酸酶的水), 于 37℃反应 1 h, 95℃加热 10 min 终止反应.

第 1 轮 PCR 反应: 将上述反转录产物用于 PCR 扩增, 其反应条件见表 1, PCR 反应按 94℃45 s, 60℃45 s, 72℃1 min, 30 个循环后于 72℃延伸 10 min.

表 1 PCR 反应条件

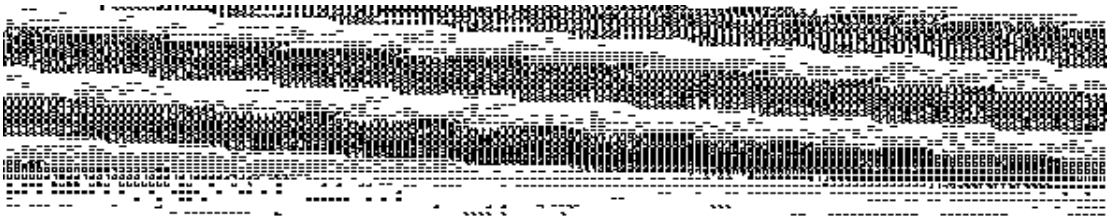
项目	$V/\mu\text{L}$			$c/(\mu\text{mol}^{\circ}\text{L}^{-1})$							w [NP(40)] /%	酶活性 (Taq)/u	
	反应 体积	模板	10×PCR Buffer	G1	G146	G500	G703	MgCl ₂	Tris— HCl	KCl			dNTP
DNA 的 PCR	25	3(DNA)	2.5	0.2			0.24	1.8			0.1		1.0
第 1 轮 PCR	100	20(反转 录产物)		0.15			0.75 ¹⁾	1.8	10	50	0.5 ¹⁾	0.08	2.0
第 2 轮 PCR	50	20(第 1 轮 PCR 产物)	5		0.3	0.3		1.8			0.2		2.0

1) 表示反转录时加入的终浓度

巢式 PCR(Nested PCR) 取上述第 1 轮 PCR 产物 20 μL 用于第 2 轮扩增, 反应体积及条件见表 1, PCR 反应按 94℃45 s, 58℃45 s, 72℃1 min, 30 个循环后, 于 72℃延伸 10 min.

1.6 扩增产物检测

取 PCR 扩增产物 20 μL, 用 15 g/L 的琼脂糖凝胶, 在 TAE 缓冲液中 100 V 电泳 45 min, EB 染色, 紫外透射仪下观察结果(见图 1、2).



1、3、4、5 为肝脏 RNA，2、6、9 为空白对照，7、8 为 DNA，10 为 Marker
(自上而下条带分别代表 1 857、1 058、929、383 bp 等)

图 1 小鼠血液 DNA 的 PCR 和肝脏 RNA 的 RT-PCR 扩增结果

1 为空白对照，2~6 分别为肝脏 RNA、1~、2~、4~、8~ 细胞
期胚胎 RNA 第 2 轮扩增，8~12 分别为其第 1 轮扩增，7 为
Marker (自上而下条带分别代表 1 057、770、612、495、392、345、
341 bp 等)

图 2 不同时期小鼠早期胚胎巢式 RT-PCR 扩增结果

2 结果

2.1 引物设计和检测

根据小鼠肌肉 G6PD 的 cDNA 序列设计的引物，以小鼠血液 DNA 为模板检测其扩增片段的特异性，结果见图 1，引物 G1 和 G703 扩增产物为 726 bp，符合本试验的要求，其扩增条件可供 RT-PCR 参考。

2.2 肝脏总 RNA 的 RT-PCR 扩增试验

动物组织如肝脏的总 RNA 易于提取，材料丰富，本试验首先以肝脏总 RNA 进行 RT-PCR 扩增，以期来源不易的微量早期胚胎总 RNA 的 RT-PCR 扩增提供参考反应条件。其结果见图 1，以一对外引物 G1、G703 进行的 RT-PCR 结果，可见一条清晰的 726 bp 特异条带。

2.3 胚胎总 RNA 的巢式 RT-PCR 扩增试验

体内发育至不同阶段的小鼠早期胚胎的总 RNA 经反转录后，以反转录的 cDNA 为模板，用一对外引物 G1、G703 进行第 1 轮 PCR 扩增，其产物无法检测，再以第 1 轮 PCR 产物为模板，用一对内引物 G146、G500 进行第 2 轮 PCR 扩增，可见体内发育的小鼠早期胚胎在 1~、2~、4~ 和 8~ 细胞期都可以扩增出 378 bp 的特异性的条带——内引物扩增片段，说明 1~8~ 细胞阶段的体内发育小鼠早期胚胎皆有 G6PD 基因的转录。本试验以小鼠肝脏总 RNA 为阳性对照，以无核酸酶的蒸馏水为阴性对照，确保排除试验过程中的假阳性和假阴性。经 3 次重复稳定试验结果见图 2。与 2.2 试验相比，小鼠肝脏总 RNA 第 1 轮 PCR 扩增没有检测到可见条带，主要原因是其作为胚胎总 RNA 的阳性对照，用于反转录肝脏总 RNA 添加量微的结果，直到第 2 轮 PCR 扩增后，才获得 378 bp 的特异条带。

3 讨论

RT-PCR 方法具有灵敏度高，特异性强、快速、简便等特点，但试验过程中要注意操作的严谨性，既要避免假阳性，又要避免假阴性，故每次试验都要设阳性对照和阴性对照，在严格控制试验条件一致的情况下，它是探讨转录水平变化的有效手段之一。本试验所用材料为昆明

小鼠早期胚胎,量少且不易获得,其 mRNA 量更微,所以采用 70~125 枚早期胚胎抽提总 RNA,反转录后产物全部用于巢式 RT-PCR 扩增,与 Harvey 等(1995)用 50~150 枚小鼠早期胚胎抽提总 RNA 扩增抗氧化剂酶基因和 Zhang 等(1994)用 100~150 枚大鼠早期胚胎抽提总 RNA,取部分反转录产物(相当于 10~15 枚胚胎的量)用于巢式 PCR 扩增血纤维蛋白溶酶原激活剂基因的方法类似,可获得所需要的特异片段,说明用多个早期胚胎提取总 RNA,并进行 RT-PCR 方法是可行的,能检测出各个阶段早期胚胎 mRNA 的转录。

G6PD 是葡萄糖代谢的关键酶之一,它是磷酸戊糖途径的调控酶,催化不可逆反应,只有 G6PD 的存在糖代谢才可进行磷酸戊糖途径。本试验以巢式 RT-PCR 扩增小鼠早期胚胎 G6PD 表达情况,发现 1-、2-、4-、8-细胞期胚胎均扩增出一条 378 bp 的特异性条带,说明这些阶段的胚胎可进行磷酸戊糖途径的糖代谢。这一结果与 O' Fallon 等(1986)在小鼠和 Flood 等(1988)在猪的早期胚胎以对人体有害的放射性 ^{14}C 和 ^3H 标记葡萄糖测定代谢产物,推测出存在磷酸戊糖途径的结论相似;Saito 等(1994)试图避开放射性元素,通过测定 2-脱氧葡萄糖和 6-磷酸 2-脱氧葡萄糖的含量,仅能粗略推测小鼠早期胚胎对葡萄糖的利用情况,然而这些试验只能测定葡萄糖代谢产物变化,其时效性欠佳,本试验从 G6PD 基因转录水平探讨小鼠早期胚胎的磷酸戊糖途径出现的可能性,并对以测定葡萄糖代谢产物探讨胚胎磷酸戊糖途径的研究提供遗传上的理论依据。

磷酸戊糖途径在小鼠早期胚胎(本试验观察 1~8-细胞期的胚胎)均出现,小鼠(O' Fallon et al, 1986)和猪(Flood et al, 1988)1~4-细胞期胚胎的磷酸戊糖途径的糖代谢比 8-细胞至囊胚期胚胎更旺盛。早期胚胎尤其是 1~4-细胞期胚胎与机体其它合成旺盛的组织器官类似,通过磷酸戊糖途径可获得一定能量;产生的磷酸戊糖为细胞分裂迅速的早期胚胎提供核酸合成的原料。利用新的实验手段对哺乳动物早期胚胎能量代谢和氨基酸代谢(Chatot et al, 1997)的进一步研究,将有助于揭示哺乳动物早期胚胎体外发育阻断现象的机理。

参 考 文 献

- 卢圣栋,李尹雄,胡晓年,等. 1993. 现代分子生物学实验技术. 北京:高等教育出版社, 95~149
- 张守全,孙拓. 1995. 昆明白小鼠 1 细胞胚胎体外培养系统的研究. 动物学报, 41(4): 432~438
- Chatot C L, Lawgy I R, Gerwan B, et al. 1997. Analysis of glutaminase activity and RNA expression in preimplantation mouse embryos. Molecular Reprod Develop, 47(3): 248~254
- Chomczynski P, Sacchi E. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 162: 156~159
- Devreker F, Hardy K. 1997. Effects of glutamine and taurine on preimplantation development and cleavage of mouse embryos *in vitro*. Biol Reprod, 57: 921~928
- Flood M R, Wiebold J L. 1988. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. J Reprod Fert, 84: 7~12
- Harvey M B, Arcellana-Panlilio M Y, Zhang X, et al. 1995. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine cultures employed for embryo coculture. Biol Reprod, 53: 532~540
- Hill J L, Walker S K, Brown G H, et al. 1996. The effects of an ovine oviductal estrus-associated glycoprotein on early embryo development. Theriogenology, 46: 1367~1377
- Leppens-Luisier G, Sakkas D. 1997. Development glycolytic activity and viability of preimplantation mouse embryos

- subjected to different periods of glucose starvation. *Biol Reprod* 56: 589~596
- O' Fallon J V, Wright R W Jr. 1986. Quantitative determination of the pentose phosphate pathway in preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 34: 58~64
- O' Neill C. 1997. Evidence for the requirement of autocrine growth factors for development of mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Biol Reprod* 56: 229~237
- Saito T, Hiroi M, Kato T. 1994. Development of glucose utilization studied in single oocytes and preimplantation embryos from mice. *Biol Reprod* 50: 266~270
- Shaker A M, Dellow K, Blayney M, et al. 1995. Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acid in human preimplantation embryos. *Biol Reprod* 53: 974~981
- Zhang X, Kidder M G, Zhang C, et al. 1994. Expression of plasminogen activator genes and enzymatic activities in rat preimplantation embryos. *J Reprod Fert* 101: 235~240
- Zollo M, D' Urso M, Schlessinger D, et al. 1993. Sequence of mouse glucose-6-phosphate dehydrogenase cDNA. *DNA Seq* 3(5): 319~322

Expression of G6PD Gene by Nested RT-PCR in Kunming Mouse Early Embryos

Zhang Shouquan Wang Chong Yang Guanfu Dai Wentao
(Dept. of Anim. Sci., South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract Inner pair primers and outer pair primers were designed and synthesized according to the cDNA sequence of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) in mouse muscles. The nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (Nested RT-PCR) was used to determine the pattern of expression of mRNA encoding G6PD in 1-, 2-, 4-, 8-cell mouse embryos. The results showed that 1~8-cell embryos could amplify at an expected band of 378 bp using the inner pair primers and as template the first PCR product obtained by using the outer pair primers. These observations indicate that expression of G6PD gene exists and the pentose phosphate pathway is an important pattern of glucose metabolism in 1~8-cell mouse embryos.

Key words Kunming mouse; early embryos; G6PD; RT-PCR; gene expression

【责任编辑 柴 焰】