

文章编号: 1001- 411X (2001) 01- 0070- 04

昆明小鼠早期胚胎 PFK 基因转录产物的检测

王 翀, 张守全, 杨关福

(华南农业大学动物科学系, 广东 广州 510642)

摘要: 根据小鼠肝脏型 6-磷酸果糖激酶(PFK)的 cDNA 序列设计合成内外 2 对引物, 以巢式 RT-PCR 方法检测昆明小鼠早期胚胎是否转录出 PFK 的 mRNA. 结果发现, 1-细胞至桑椹期胚胎的 mRNA 均能以外引物扩增产物为模板通过内引物扩增出 1 条特异性目的片段. 表明昆明小鼠 1-、2-、4-、8-细胞至桑椹期胚胎的 PFK 以肝脏型的形式出现, 其 PFK 基因已转录, 糖酵解及三羧酸循环可能是早期胚胎葡萄糖代谢的主要方式.

关键词: 昆明小鼠; 早期胚胎; 6-磷酸果糖激酶; RT-PCR; 基因转录
中图分类号: Q954. 4 **文献标识码:** A

葡萄糖是培养体细胞的主要能量物质, 对胚胎细胞也不例外, 但培养液中的葡萄糖是否会造成哺乳动物早期胚胎体外发育阻断成为近期研究的焦点之一, 不同研究者得出不同的结论^[1-4]. 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问题的主要手段. 本试验以昆明小鼠为动物模型, 早期胚胎葡萄糖代谢的关键酶之一——6-磷酸果糖激酶(Phosphofructokinase, PFK)作为研究对象, 据小鼠肝脏型 PFK 的 cDNA 序列设计并合成 2 对引物^[3], 对小鼠早期胚胎总 RNA 进行巢式 RT-PCR 扩增, 检测 PFK 基因转录, 探索哺乳动物不同阶段早期胚胎糖代谢是否出现糖酵解和三羧酸循环途径.

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用体成熟 8~10 周龄的昆明小鼠购自中山医科大学实验动物中心.

1.2 早期胚胎采集

实验小鼠腹腔注射 PMSG 15 IU, 48 h 后, 腹腔注射 HCG 15 IU, 与公鼠同笼过夜. 第 2 d 上午 8:00 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. 将在体视显微镜下观察到的同期胚胎放入同一个 0.5 mL EP 管. 类似方法获取 2-、4-、8-细胞及桑椹期胚胎, 所获得各时期胚胎数和体内发育时间见表 1, 将冲取胚胎放入-20℃冰箱保存备用.

1.3 肝脏总 RNA 提取

按姜泊等^[4]组织 RNA 的制备方法提取小鼠肝脏 RNA, 作阳性对照和探索巢式 RT-PCR 扩增条件.

1.4 胚胎总 RNA 提取

采用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法, 用 Promega 公司的总 RNA 提取试剂盒(RNA-gents[®], total RNA isolation system)及其说明书方法抽提小鼠早期胚胎总 RNA, -70℃保存备用.

1.5 引物设计及合成

小鼠 PFK 存在有 3 种同工酶, A 型(肌肉型)、B 型(肝脏型)和 C 型(脑型), 由于肌肉型 PFK 严格限于肌肉组织内作用, 而肝脏型 PFK 不仅仅在肝脏中表达, 且在其他一些组织器官如脑、肾和肺中均有表达, 故本试验根据其肝脏型同工酶 cDNA 序列借助计算机辅助软件设计内外 2 对引物.

表 1 不同时期昆明小鼠早期胚胎数

Tab. 1 Number of early embryos from Kunming mice

项目 item	1-细胞 1-cell	2-细胞 2-cell	4-细胞 4-cell	8-细胞 8-cell	桑椹期 morulae
胚胎采集时间(HCG 后) time of collecting embryos (hours post HCG)/ h	25~27	44~48	56~62	68~72	96~120
胚胎数 number of embryos/ 枚	125	84	75	80	121

收稿日期: 2000-06-15 作者简介: 王 翀(1968-), 女, 实验师, 硕士.
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39600106)

外引物:
PFK₄ 5'-GCTACCGTGGACCTGGAGAAACTGC-3'
PFK₈₆₀ 5'-ACAGTCACTCGTGTATCGAAGCCCA-3'
PCR 产物长度 881 bp, 最佳退火温度 62 °C.

内引物:
PFK₆₁ 5'-CTGACCAGCGGCGGTGATGCGCA-3'
PFK₇₁₄ 5'-TCTCACACATGAAGTTCTCCCAG-3'
PCR 产物长度 676 bp, 最佳退火温度 59 °C.

2 对引物均由上海生工生物工程有限公司合成.

1.6 引物的检测

利用肝脏 RNA 对设计的内、外 2 对引物进行 RT-PCR 检测.

肝脏 RNA 的反转录: 采用 GIBCOBRL 公司的 M-MLV 反转录酶, 反应体系包括: Tris-HCl (pH8.3) 50 mmol/L, KCl 75 mmol/L, DTT 10 mmol/L, MgCl₂ 3 mmol/L, dNTP 0.5 mmol/L, 下游引物 PFK₈₆₀ 0.75 μmol/L, RNasin (RNA 酶抑制剂) 200 U, 肝脏 RNA 3 μL, 总反应体积 20 μL, 并设一阴性对照 (无核酸酶的水), 于 37 °C 反应 1 h, 再于 95 °C 加热 10 min 以终止反应.

第一轮 PCR 反应: 将上述反转录产物用于 PCR 扩增, 反应体系包括: 上游引物 PFK₄ 0.15 μmol/L, MgCl₂ 1.8 mmol/L, 10×PCR Buffer 10 μL, Taq 酶 2.0 U, 加无核酸酶水补充至总体积 100 μL, PCR 反应按 94 °C 45 s、62 °C 45 s、72 °C 1 min, 30 个循环后于 72 °C 延伸 10 min.

巢式 PCR (Nested PCR) 扩增: 取上述第一轮 PCR 产物 20 μL 用于巢式 PCR 扩增, 反应体系包括: 引物 PFK₆₁ 0.3 μmol/L, PFK₇₁₄ 0.3 μmol/L, MgCl₂ 1.8 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, 10×PCR Buffer 5 μL, Taq 酶 2.0 U, 加无核酸酶水补充至总体积 50 μL, PCR 反应按 94 °C 45 s、

59 °C 45 s、72 °C 1 min, 30 个循环后, 于 72 °C 延伸 10 min.

1.7 胚胎池 RNA 的 RT-PCR 扩增

胚胎池 RNA 反转录: 反应体系同肝脏 RNA 反转录条件, 取相当于 15~20 个胚胎的池 RNA 作模板, 总反应体积 20 μL, 并设阳性对照 (小鼠肝脏 RNA) 和阴性对照 (无核酸酶的水), 于 37 °C 反应 1 h, 再于 95 °C 加热 10 min 以终止反应.

反转录后第一轮 PCR 扩增和巢式 PCR 扩增的反应条件同 1.6.

1.8 扩增产物检测

取 PCR 扩增产物 20 μL, 用 1.5 g/L 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.

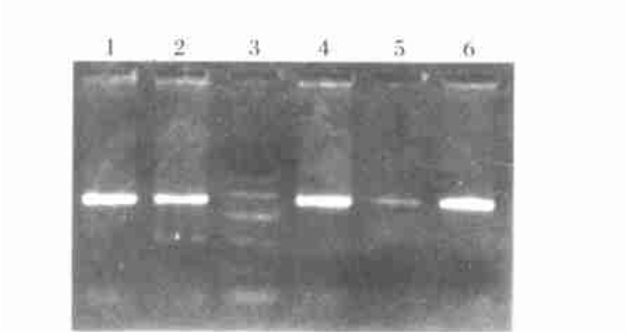
2 结果

2.1 引物设计和检测

据小鼠肝脏型 cDNA 序列设计的内、外 2 对引物, 以小鼠肝脏 RNA 为模板进行巢式 RT-PCR 扩增, 获得所需要的特异性内引物目的片段, 结果见图 1.

2.2 胚胎总 RNA 的巢式 RT-PCR 扩增试验

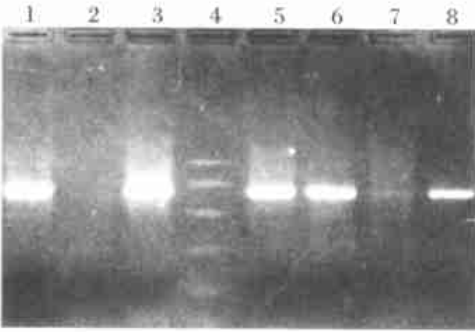
体内发育至不同阶段的小鼠早期胚胎的总 RNA 经反转录后, 以反转录的 cDNA 为模板, 用 1 对外引物 PFK₄、PFK₈₆₀ 进行第 1 轮 PCR 扩增, 其产物无法检测, 再以第 1 轮 PCR 产物为模板, 用 1 对内引物 PFK₆₁、PFK₇₁₄ 进行第 2 轮 PCR 扩增, 可见体内发育的小鼠早期胚胎在 1-、2-、4-、8-细胞至桑椹期都可以扩增出特异性的条带——内引物目的片段, 说明 1-细胞至桑椹期阶段的体内发育小鼠早期胚胎皆有 PFK 基因的表达, 早期胚胎 PFK 是以肝脏型出现. 本试验以小鼠肝脏总 RNA 为阳性对照, 以无核酸酶的水为阴性对照, 确保排除试验过程中假阳性和假阴性, 见图 2.



1、2、4、5、6 均为肝脏 RNA, 3 为 PCR Marker (自上而下条带分别代表 1 857、1 058、929、383 bp 等)
lane 1, 2, 4, 5, 6, liver RNA; lane 3, PCR Marker (from top to bottom is 1 857, 1 058, 929, 383 bp, respectively)

图 1 巢式 RT-PCR 扩增小鼠肝脏总 RNA 结果

Fig. 1 Nested RT-PCR on total RNA extracted from mouse liver



1、5、6、7、8 分别为 1-、2-、4-、8 细胞及桑椹期胚胎, 2 为空白对照, 3 为肝脏 RNA 阳性对照, 4 为 PCR Marker
lane 1, 5, 6, 7, 8, 1-, 2-, 4-, 8-cell and morulae embryos; lane 2, negative control; lane 3, positive control (liver RNA); lane 4, PCR Marker

图 2 巢式 RT-PCR 扩增小鼠早期胚胎总 RNA 结果

Fig. 2 Nested RT-PCR on total RNA extracted from early mouse embryos

3 讨论

动物组织如肝脏材料丰富,其总RNA易于提取,而昆明小鼠早期胚胎量少且不易获得,其mRNA量更微。因此,本试验首先以肝脏总RNA进行RT-PCR扩增,获得所需要的特异性内引物目的片段,为早期胚胎总RNA的巢式RT-PCR扩增提供反应条件。本试验采用70~125枚的早期胚胎抽提总RNA,取相当于15~20个胚胎的池RNA反转录后用于巢式RT-PCR扩增,与Harvey等^[3]用50~150枚小鼠早期胚胎抽提总RNA扩增抗氧化剂酶基因,Zhang等^[6]用100~150枚大鼠早期胚胎抽提总RNA首先进行反转录,然后取部分反转录产物(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,进行巢式RT-PCR扩增,用以检测各个阶段早期胚胎mRNA的转录是可行的^[7]。

图1中“5”及图2中“7”(8-细胞期胚胎)扩增带较弱,可能有以下两方面因素引起:1)其中总RNA含量相对较低;2)操作过程中的偶然误差造成。还有待于进一步探讨。

PFK是糖酵解及三羧酸循环的关键酶,催化不可逆反应。葡萄糖在PFK等一系列酶作用下降解为丙酮酸并伴随生成ATP,是葡萄糖分解产生能量的代谢途径,只有PFK的存在才能进行糖酵解,葡萄糖酵解产生丙酮酸,丙酮酸在有氧条件下进入三羧酸循环,而在厌氧条件下生成乳酸。

本试验按照肝脏型PFK的基因序列设计合成内外2对引物,以巢式RT-PCR扩增检测PFK基因的转录情况,发现1-、2-、4-、8-细胞及桑椹期小鼠胚胎均能扩增出1条特异性的目的片段,说明早期胚胎均有PFK基因的转录,PFK是以肝脏型出现,1-细胞期至桑椹期胚胎可以进行糖酵解和三羧酸循环,从而为早期的胚胎细胞分裂及发育提供能量。

Leppens等^[8]通过小鼠体外受精的原核胚在含有葡萄糖与不含葡萄糖的培养液中交替培养,研究早期胚胎糖酵解活跃程度,结果只能证明2-细胞期胚胎转移到不含葡萄糖培养液中,其囊胚期糖酵解异常活跃,而将2-细胞期胚胎转移到含有葡萄糖的培养液,囊胚期糖酵解水平却很低,其对1-细胞~8-细胞早期胚胎是否进行糖酵解代谢仍难以确定。Wales等^[9]通过 $[U-^{14}C]$ 标记葡萄糖测定 CO_2 产物及乳酸的累积量,得出人的未受精卵及着床前胚胎,早期3 d的胚胎由于糖酵解的阻断作用不能利用葡萄

糖,3 d及3 d以后的胚胎己糖激酶(含G6PD、PFK、LDH)活性大大增强,产生乳酸的量大大增加,从而推断出早期人胚胎在3 d(即8-细胞期)及以后才能有效地利用糖酵解途径及三羧酸循环产生的能量,在小鼠上亦有类似的结论,而Saito等^[10]却证明超排未受精卵中不含己糖激酶,不能利用葡萄糖。未受精卵及2-细胞~4-细胞胚胎利用丙酮酸作为主要营养物质^[11],说明早期胚胎已能进行三羧酸循环,供给胚胎能量,对于糖酵解在不同哺乳动物早期胚胎中的利用情况,在猪、羊、牛等均有报道,但早期胚胎卵裂阶段糖酵解相对较低,并随着胚胎的发育稳定增长,且胚胎不同发育阶段对葡萄糖有不同浓度需要。

总之,前人只是以酶促反应推测PFK活性,进而判定早期胚胎是否存在糖酵解和三羧酸循环及其强弱,本试验表明早期胚胎(1-细胞至桑椹期)存在肝脏型PFK基因的转录,从分子水平证明昆明小鼠1-细胞至桑椹期胚胎利用糖酵解和三羧酸循环代谢途径提供能量是可能的。

参考文献:

- [1] KHURANA N K, NIEMANN H. Early metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo* [J]. *Biol Reprod*, 2000, 62: 847—856.
- [2] LANE M, GARDNER D K. Lactate regulate pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo [J]. *Biol Reprod*, 2000, 62: 16—22.
- [3] GEHRICH S C, GEKAKIS N, SOOK S H. Liver (B-type) Phosphofructokinase mRNA [J]. *Biol Chem*, 1998, 263 (24): 11 755—11 759.
- [4] 姜泊, 张亚历, 周殿元, 等. 分子生物学常用实验方法 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 59.
- [5] HARVEY M B, ARCELLANA-PANILILIO M Y, ZHANG X, et al. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine cultures employed for embryo coculture [J]. *Biol Reprod*, 1995, 53: 532—540.
- [6] ZHANG X, KIDDER M G, ZHANG C, et al. Expression of plasminogen activator genes and enzymatic activities in rat preimplantation embryos [J]. *Reprod Fert*, 1994, 101: 235—240.
- [7] 王翀, 张守全, 杨关福, 等. 昆明小鼠早期胚胎RT-PCR方法的探讨 [J]. *Animal Biotechnology Bulletin*, 1998, 6(1): 122—126.
- [8] LEPPENS-LUISIER G, SAKKAS D. Development glycolytic activity and viability of preimplantation mouse embryos subjected to different periods of glucose starvation [J]. *Biol Reprod*, 1997, 56: 589—596.
- [9] WALES R G, WHITTINGHAM D G, HARDY K, et al.

Metabolism of glucose by human embryos[J] . Reprod Fert, 1987, 79: 289— 297.

[10] SAITO T, HIROI M, KATO T. Development of glucose utilization studied in single oocytes and preimplantation embryos from mice[J] . Biol Reprod, 1994, 50: 266— 270.

[11] BRISON D R, LEESE H J. Energy metabolism in late preimplantation rat embryos[J] . Reprod Fertil, 1991, 93: 245— 251.

The Detection of PFK Gene Transcripts by Nested RT-PCR
in Early Embryos of Kunming Mouse

WANG Chong, ZHANG Shou-quan, YANG Guan-fu
(Dept. of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Inner and outer primer pair were designed and synthesized according to the cDNA sequence of liver type phosphofructokinase (PFK) of the mouse. A nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (Nested RT-PCR) was used to determine the transcript pattern of mRNA encoding mouse PFK throughout 1-, 2-, 4-, 8-cell and morulae embryos. The results showed that 1-cell to morulae mouse embryos mRNA could be amplified to give an expected band using the inner primer pair on the templates provided by the products of the first PCR using the outer primer pair. These observations indicated that the transcripts of PFK gene existed and that the PFK of early mouse embryos is of the liver type. Glycolysis and tricarboxylic acid cycle (TCA) appear to be the important mode of glucose metabolism in 1-cell to morulae mouse embryos.

Key words: Kunming mouse; early embryos; PFK; RT-PCR; gene transcripts

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 65 页)

[10] SRIVASTAVA O B, van HUYSTEE R B. An interrelationship among peroxidase, IAA oxidase and polyphenol oxidase from peanut cells[J] . Can J Bot, 1977, 55: 2 630— 2 635.

Effects of Permethrin on Several Oxidative Enzyme
Activities in Cucumber Leaves

GUAN Ri-qiang, HUANG Zhuo-lie
(College of Biotechnology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The results of this investigation indicated that permethrin (PER) in 20 ~ 400 mg °L⁻¹ increased the activities of catalase and glycolate oxidase in cucumber leaves by 3.35% ~ 32.71% and 4.42% ~ 34.51%, respectively. PER in 20 ~ 200 mg °L⁻¹ increased the activity of peroxidase by 9.70% ~ 29.10%. PER in 50 ~ 250 mg °L⁻¹ increased the activity of indoleacetic acid oxidase by 13.58% ~ 32.10%. The activity of ascorbate oxidase was decreased by 3.18% ~ 20.69% by PER in the concentrations of 50 ~ 300 mg °L⁻¹. After the cucumber seedlings were treated with 200 mg °L⁻¹ PER for 1 ~ 6 days, the activity of peroxidase increased by 10.37% ~ 43.17%.

Key words: cucumber; permethrin; catalase; peroxidase; glycolate oxidase; ascorbate oxidase; IAA oxidase

【责任编辑 柴 焰】