

# 延边黄牛体细胞克隆 早期胚胎端粒酶活性的测定

张 宇, 徐 颖, 吴 昊, 方南洙, 李钟淑\*

(延边大学 农学院, 吉林 龙井 133400)

**摘要:** 为了解延边黄牛体细胞克隆早期胚胎发育过程中端粒酶活性的变化规律, 采用实时荧光定量 PCR 法检测体细胞克隆早期胚胎及卵母细胞端粒酶活性。研究表明, 端粒酶活性在未成熟卵母细胞相对水平较高, 2- 细胞至 16- 细胞胚胎的端粒酶活性总体水平相对较低 ( $P < 0.05$ ), 桑椹胚的端粒酶活性总体水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 在囊胚阶段达到最高。

**关键词:** 实时定量 PCR; 早期胚胎; 端粒酶活性

中图分类号: S823.8<sup>+</sup>11.2 文献标志码: A 文章编号: 1000- 2286(2010)06- 1236- 04

## Detem ination of Telm erase A ctivity in Early Embryo Cloned from Som atic Cells of Yanbian Cattle

ZHANG Yu, XU Ying, WU Hao, FANG Nan-zhu, LI Zhong-shu\*

(College of Agronomy, Yanbian University, Longjing 133400, China)

**Abstract** The objective of this study was to examine the telomerase activity in early embryo cloned from somatic cells of Yanbian cattle by real-time PCR. The results were as follows: the telomerase activity in immature oocyte was higher; that of 2- cell~ 16- cell is lower than that of the others ( $P < 0.05$ ). Telomerase activity increased significantly in the morula stage ( $P < 0.05$ ), the highest was in the blastocyst stage.

**Key words** real time PCR; early embryo; telomerase activity

端粒酶是一种特殊的细胞核糖核蛋白反转录酶, 其核心酶包括蛋白亚基和 RNA 元件。端粒酶与细胞的永生化和转化有关, 能够以自身的 RNA 亚基为模板合成端粒重复序列。它具有恢复端粒长度的功能, 但是端粒酶只存在于生殖细胞、干细胞、肿瘤细胞及永生细胞中, 成体细胞一般没有端粒酶活性<sup>[1]</sup>。在 DNA 复制过程中端粒缺失可以被有活性的端粒酶修复回来, 端粒的重编程可能是由于早期胚胎不同时期的端粒酶而造成的<sup>[2]</sup>。有研究表明, 成熟卵母细胞的端粒酶活性相对较低, 胚胎细胞的端粒酶活性相对较高, 早期发育的胚胎都存在端粒酶活性, 而分化的组织和细胞检测不到端粒酶活性, 因此对其活性测定有着重要意义<sup>[3]</sup>。目前国内有关延边黄牛体细胞克隆早期胚胎端粒酶活性变化的研究还未见报道, 本研究将对延边黄牛体细胞克隆不同发育时期胚胎的端粒酶活性进行测定, 从而深入了解延边黄牛体细胞克隆胚胎早期发育过程中端粒酶活性的变化规律, 为阐明体细胞克隆核的重编程机制、改善克隆胚胎技术、提高克隆动物的生产效率提供参考依据。

收稿日期: 2010- 05- 04 修回日期: 2010- 06- 30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30860184)、振兴东北老工业基地项目 (发改高技 [2004] 2057号) 和延边州延边大学合作项目 (延大科合字 (2005) 06号)

作者简介: 张宇 (1984- ), 女, 硕士生, 主要从事动物遗传与生物技术研究, E-mail: zhangyu84845410@sina.com.cn

\* 通讯作者: 李钟淑, 教授, 博士后, E-mail: lizs1964@yahoo.com.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

延边黄牛卵巢采自延吉市牛屠宰场。HEK 293 细胞购自上海杰美基因生物科技公司。端粒酶活性 TRAP 实时定量检测试剂盒购自美国杰美基因大中华区销售总代理。

### 1.2 试验方法

1.2.1 卵母细胞的培养及重组胚体外发育 从抽取到的成年延边黄牛的卵巢卵泡液中挑选收集形态较好的卵母细胞, 培养箱中成熟培养 18~22 h, 挑选带极体的 M II 期卵母细胞进行去核, 用延边黄牛皮肤成纤维细胞进行注核操作, 在 38.5 °C,  $\varphi(\text{CO}_2) = 5\%$  培养箱中成熟培养 2~3 h 后, 进行融合激活。观察各时期细胞的发育情况, 同时进行半量换液, 采用分级冷冻法将胚胎分类收集在含有 RNA 酶抑制剂的冷冻液中, 液氮保存直至收集到足够试验使用的数量 (每 10 个胚胎为 1 组)。

1.2.2 卵母细胞和早期胚胎的裂解 将收集到的、已用链蛋白酶去除透明带的卵母细胞和胚胎按 10 个/管的量移入事先经 DEPC 水处理的 1 mL 离心管中, 向离心管中加入试剂盒 (GMS12106) 的 RNA 提取液, 激烈振荡 4 min, 混匀。冰上作用 30 min, 4 °C、13 000 g 离心 10 min, 以去除不溶性物质, 抽取上清液。采用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 有无, 提取的 RNA 立即进行端粒酶活性测定。

1.2.3 端粒酶活性的检测 反应体系总量为 25  $\mu\text{L}$ , 移取 15  $\mu\text{L}$  反应液到 0.5 mL PCR 管中。加入 4  $\mu\text{L}$  待测的细胞裂解悬液 (严格避免 RNA 污染), 加入 2.5  $\mu\text{L}$  染色液, 再加入 3.5  $\mu\text{L}$  补充液到总量 25  $\mu\text{L}$ , 放进 4 °C 微型台式离心机瞬时离心 5 s, 使用 1 000  $\mu\text{L}$  带滤芯枪头加入 1 滴封隔夜, 即刻放入荧光定量 PCR 仪。

荧光定量 PCR 反应程序为: 端粒延伸 30 °C 20 min, 然后 95 °C 预变性 30 s, 60 °C 90 s, 35 个循环。采集数据, 进行数据分析, PCR 产物置于 -20 °C 保存备用。

## 2 结果分析

2.1 定量用标准品 293 细胞 (人胚肾细胞) 标准曲线的绘制

293 细胞 (人胚肾细胞) 生长至 80% 铺满率 ( $1 \times 10^4$  细胞) 用于实验。将制备的标准样品 10 倍倍比稀释, 浓度依次为  $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^1$  个 (同一稀释梯度做 3 个重复孔对照) 经实时荧光定量 PCR 扩增后, 得到 S 型扩增曲线 (图 1)。根据扩增曲线, 电脑自动生成标准曲线, 通过 293 细胞初始浓度与实时荧光定量检测的  $C_T$  值建立的标准曲线相关系数  $r^2 = -1$ , 且重复性好, 可以作为检测延边黄牛体细胞克隆早期胚胎端粒酶活性的较为理想标准曲线 (图 2)。

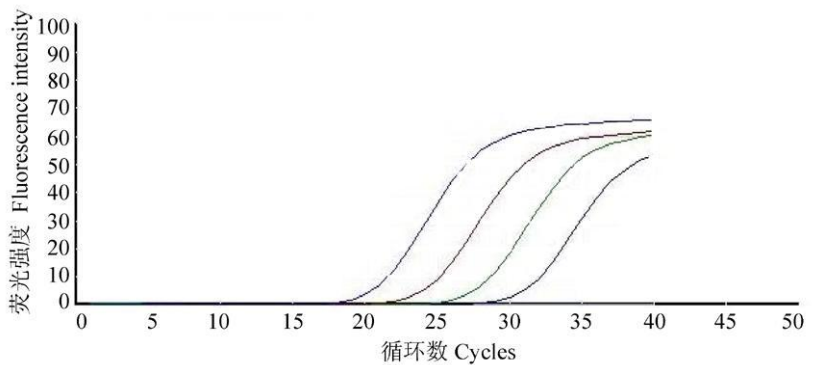


图 1 标准品 293 细胞的实时定量 PCR 扩增曲线

Fig 1 Real-time PCR amplification curves of standard 293 cells

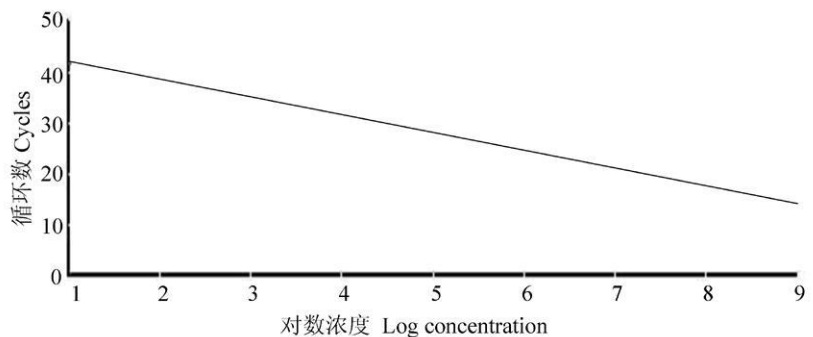


图 2 标准品 293 细胞建立的标准曲线

Fig 2 The standard curve of standard 293 cells

### 2 2 重组胚发育各时期胚胎实时定量 PCR 扩增曲线的绘制

重组胚发育各时期胚胎的实时定量 PCR 扩增曲线中用 293 细胞制作的标准曲线呈现出良好的 S 型扩增曲线, 阴性对照与热灭活对照样品经 40 次循环后仍无  $C_T$  值, 说明试验的敏感性好, 特异性强, 建立的实时定量 PCR 扩增曲线可以对样品进行准确定量(图 3)。

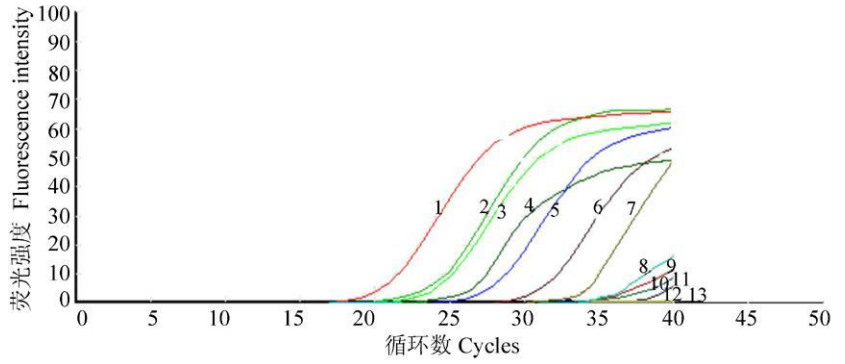
### 2 3 重组胚发育各时期胚胎相对端粒酶活性比较

对卵母细胞与重组胚发育各时期胚胎进行了 Real-time PCR 检测,  $C_T$  值检测结果, 8- 细胞  $C_T$  最大, 囊胚  $C_T$  最小, 2- 细胞至 16- 细胞  $C_T$  值差异不显著, 未成熟卵母细胞、桑椹胚、囊胚的  $C_T$  值与各时期细胞差异显著。依据得到的  $C_T$  值, 将其代入标准曲线计算公式  $y = mx + b$  (回归系数  $R^2 \geq 0.90$ ), 其中相关系数  $r^2 = -1$ ,  $y$  轴截距 ( $b$ ) 为 45.73 斜率 ( $m$ ) 为 -3.57,  $y$  表示  $C_T$  值。进行相对端粒酶活性 (Relative telomerase activity, RTA) 计算及定量比较, 测定延边黄牛卵母细胞以及不同发育阶段胚胎的端粒酶活性 (图 4), 端粒酶活性在未成熟卵母细胞相对水平较高, 2- 细胞至 16- 细胞胚胎的端粒酶活性总体水平相对较低 ( $P < 0.05$ ), 桑椹胚的端粒酶活性总体水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 在囊胚阶段达到最高。

## 3 讨 论

端粒酶活性是哺乳动物细胞全能性的重要标志之一<sup>[4]</sup>。在哺乳动物卵母细胞到发育的 IVF、NT 和 PA 胚胎各阶段均可检测出端粒酶活性<sup>[5-7]</sup>。目前, 在国内哺乳动物包括延边黄牛早期胚胎的端粒酶活性检测还没有报道。

本研究通过 TRAP 方法对延边黄牛卵母细胞和各发育阶段早期胚胎的端粒酶活性进行了测定, 结果延边黄牛未成熟卵母细胞和早期胚胎都具有端粒酶活性, 但其活性水平在各时期却存在差异。延边黄牛卵母细胞为端粒酶阳性, 其活性相对水平较高。延边黄牛 2- 细胞至 16- 细胞胚胎端粒酶活性之间差异不显著且端粒酶活性较低, 这应该是哺乳动物早期胚胎端粒酶活性的正常变化。8- 细胞胚胎端

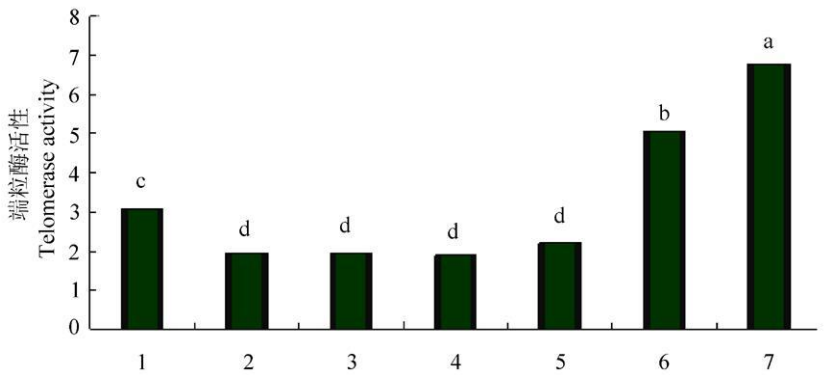


1~ 13  $1 \times 10^4$  293 细胞、囊胚、 $1 \times 10^3$  293 细胞、桑椹胚、 $1 \times 10^2$  293 细胞、 $1 \times 10^1$  293 细胞、未成熟卵母细胞、16- 细胞、4- 细胞、2- 细胞、8- 细胞、阴性对照 (-)、热灭活对照。

1~ 13  $1 \times 10^4$  293 cells blastocyst (BL);  $1 \times 10^3$  293 cells morula (MR);  $1 \times 10^2$  293 cells;  $1 \times 10^1$  293 cells immature (M); 16- cell 4- cell 2- cell 8- cell negative lysis buffer control (-); Heat-inactivated (HI).

图 3 重组胚发育各时期胚胎实时定量 PCR 扩增曲线

Fig. 3 Real-time PCR amplification curves of reconstructed embryo in different stages



1~ 7: 未成熟卵母细胞、2- 细胞、4- 细胞、8- 细胞、16- 细胞、桑椹胚、囊胚; 不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

1~ 7: immature (M); 2- cell 4- cell 8- cell 16- cell morula (MR); blastocyst (BL). Different letters above the bars represent significant differences ( $P < 0.05$ ).

图 4 卵母细胞与重组胚发育各时期胚胎端粒酶活性测定值的比较

Fig. 4 Compared telomerase activity of oocytes and reconstructed embryo in different stages

粒酶活性降至最低, 为整个早期胚胎的最低水平, 与水牛<sup>[8]</sup>和人<sup>[9]</sup>的胚胎研究结果相一致。8- 细胞后端粒酶活性又显著升高, 到囊胚时达到最高, 8- 细胞阶段端粒酶活性降低的原因可能是与哺乳动物胚胎发育阻滞有关。从基因调控来讲, 阻滞期是母源基因调控向合子型基因调控的转变期, 因而阻滞期是哺乳动物能否正常完成发育的关键时期, 延边黄牛发育阻滞期是 8- 细胞期, 也就说 8- 细胞期之前的胚胎所具有的活性的端粒酶蛋白是卵母细胞所存在的母源蛋白。随着胚胎的发育, 这些端粒酶蛋白逐渐被消耗, 端粒酶活性也逐渐降低这也正好说明桑椹胚端粒酶活性又再次升高的原因, 且至囊胚时达到最高, 与 Lanza 等<sup>[10]</sup>和 Tian 等<sup>[11]</sup>各自报道牛核移植 (NT) 囊胚的高端粒酶活性相一致。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Achim V, Ravindranath N, Dym M. Telomere length in male germ cells is inversely correlated with telomerase activity[ J]. *Biol Reprod* 2000, 63( 2): 591- 598
- [ 2 ] Lin J Ly H, Hussain A, et al A universal telomerase RNA core structure includes structured motifs required for binding the telomerase reverse transcriptase protein[ J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101( 41): 14713- 14718
- [ 3 ] Greider CW, Blackburn E H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts[ J]. *Cell* 1985( Part 1), 43 405- 413.
- [ 4 ] Betts D H, Perrault S D, Petrik J, et al Telomere length analysis in goat clones and their offspring[ J]. *Mol Reprod Dev* 2005, 72( 4): 461- 470
- [ 5 ] Blackburn E H, Szostak J W. The molecular structure of centromeres and telomeres[ J]. *Ann Rev Biochem*, 1984, 53 163- 194
- [ 6 ] Achim V, Ravindranath N, Dym M. Telomere length in male germ cells is inversely correlated with telomerase activity[ J]. *Biol Reprod* 2000, 63( 2): 591- 598
- [ 7 ] Harington L I Biochemical aspects of telomerase function[ J]. *Cancer Letters* 2003, 194( 2): 139- 154
- [ 8 ] Betts D H, Bordignon V, Smith L, et al Telomerase activity in bovine blastocysts fetal fibroblast and stem cell- like cell lines cultured under various conditions[ J]. *Theriogenology*, 1999, 51( 1): 181.
- [ 9 ] Wright W E, Platyszek M A, Rainey W E, et al Telomerase activity in human germ line and embryonic tissues and cells [ J]. *Dev Genet* 1996 18( 2): 173- 179
- [ 10 ] Lanza R P, Chelil J B, Blackwell C, et al Extension of cell life- span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells[ J]. *Science* 2000 288( 5466): 665- 669.
- [ 11 ] Tian X C, Xu J, Yang X Z Normal telomere lengths found in cloned cattle[ J]. *Nat Genet* 2000, 26( 3): 272- 273