

小鼠卵母细胞和早期胚胎端粒酶活性的测定^{*}

敬晓棋, 雷安民, 王 晗, 杨学义, 窦忠英

(西北农林科技大学 国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了解小鼠早期发育过程中端粒酶的活性变化, 本研究利用端粒重复序列扩增法(TRA P)进行了小鼠卵母细胞和附植前胚胎端粒酶活性的测定。结果表明, 小鼠卵母细胞、桑椹胚和囊胚为端粒酶阳性, 而2-细胞和8-细胞为阴性。依据电泳条带在成像系统下的光密度, 计算相对总产品产量(TPG)的定量比较发现, 囊胚端粒酶活性最高, 为269 331; 桑椹胚次之, 为96 231; 卵母细胞最低, 为85 782。小鼠桑椹胚和囊胚胚胎记数及单细胞端粒酶活性比较结果显示, 囊胚单细胞 TPG 最低, 为3 45; 桑椹胚单细胞略高于囊胚, 为4 00; 而卵母细胞最高, 为85 782, 大约是囊胚细胞的25倍。

[关键词] 小鼠; 卵母细胞; 早期胚胎; 端粒酶活性

[中图分类号] Q 132 7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)06-0027-04

端粒是位于染色体末端的DNA-蛋白质复合物, 其功能是维持和保护染色体结构的完整和稳定, 防止染色体DNA被降解及染色体间的重组和末端融合, 是正常细胞分裂所必需的。端粒的存在也解决了人们长期以来难以解释的“DNA末端复制难题”^[1]。端粒DNA是一段富含嘌呤碱基的简单重复序列, 人和高等动植物的端粒为TTAGGG的串联重复。随着细胞的不断分裂, 端粒逐渐缩短, 因此, 许多学者将端粒称为细胞的“分裂钟”^[2]。当端粒缩短至一个关键的长度时, 会触发细胞复制性衰老, 细胞变大、扁平并停止分裂^[3]。体外培养的人成纤维细胞每倍增1次, 其端粒平均缩短 $(48 \pm 21) \text{ bp}$ ^[4]。

端粒酶是一种核糖核蛋白, 具有反转录酶的活性, 端粒酶能够以自身的RNA亚基为模板合成端粒重复序列, 从而恢复端粒长度。但是端粒酶只存在于生殖细胞、干细胞、肿瘤细胞及永生化的细胞中, 成体细胞一般无端粒酶活性^[5]。因此, 也就不难解释成体细胞为什么仅有有限的分裂次数。有研究^[6]表明, 大鼠腔前卵母细胞至排卵前卵母细胞都具有相当高的端粒酶活性(与转化的人293细胞相比), 但排卵后酶活性却显著降低; A型精原细胞具有非常高的端粒酶活性, 但是粗线期和圆形精子细胞的酶活性降低, 附睾的精子则完全无端粒酶活性^[7]; 其他的研究^[8, 9]表明, 包括人和牛在内的多种物种囊胚均

具有相当高的端粒酶活性。本研究旨在通过对小鼠早期胚胎不同时期端粒酶活性水平的测定, 为小鼠早期发育过程中的端粒酶活性变化勾划一个趋势图。

1 材料与方法

1.1 小鼠卵母细胞的收集

20 g左右的成年昆明小鼠(购自第四军医大学试验动物中心), 于下午17:00腹腔注射PM SG 8~10 IU/只, 48 h后腹腔注射hCG 8~10 IU/只。次日上午8:00用颈椎脱臼法处死小鼠, 无菌条件下取出两侧子宫及卵巢, 放入盛有2 mL含血清PBS的小皿中。在解剖镜下剪去子宫和卵巢上附着的脂肪后, 用眼科异物针刺破输卵管膨大部, 游离出卵母细胞复合体(COC)。将游离出的卵母细胞复合体置于盛有PBS的拣卵碗中, 加入0.5 mL质量分数0.3%的透明质酸酶消化3 min, 并用孔径70~80 μm 的玻璃针轻轻吹打, 使卵母细胞完全脱去颗粒细胞, 即可得到所需的裸卵。

1.2 小鼠早期胚胎的收集

小鼠超排方案同1.1。但所不同的是于hCG注射后, 雌雄小鼠1:1合笼, 次日上午8:00将有阴道栓的小鼠检出, 集中饲养并按表1的时间、位置冲取早期胚胎。

^{*} [收稿日期] 2004-12-30

[基金项目] 国家“863”高技术发展计划项目(2002AA 216161); 国家自然科学基金项目(302000137); 国家教育部重大项目(03160)

[作者简介] 敬晓棋(1977-), 男, 陕西凤翔人, 在读硕士, 主要从事动物克隆相关研究。

[通讯作者] 窦忠英(1939-), 男, 陕西兴平市人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程与干细胞工程研究。E-mail: douzhongying@china.com

表 1 小鼠卵母细胞和早期胚胎的收集

Table 1 Position, time and number of oocyte and early embryo collection in mice

发育时期 Stage of develop- ment	收集部位 Position	注射 hCG 后 时间/h Time after injecting hCG	胚胎数量 Embryo number
卵母细胞 Oocyte	输卵管膨大部 Ampulla	12~ 16	33
2-细胞 2-cell	输卵管 Oviduct	42~ 48	15
8-细胞 8-cell	输卵管 Oviduct	60~ 68	11
桑椹胚 Morula	子宫角 U terine horn	75~ 80	19
囊胚 Blastocyst	子宫角 U terine horn	92~ 96	18

1.3 小鼠卵母细胞及早期胚胎的裂解

将收集到的小鼠卵母细胞及胚胎按 5 μL /枚的量加入 1 $\times$ CHAPS Lysis Buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA, 0.1 mmol/L Benzamide, 5 mmol/L β mercaptoethanol, 质量分数 0.5% CHAPS, 质量分数 10% Glycerol) 裂解液。冰上作用 30 min 后, 于 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\times g$ 离心 20 min, 取上清液于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存, 备用。

1.4 端粒酶活性测定

运用 TRAP 法进行端粒酶活性测定, 试剂盒为 Telomerase TRAPeze detection kit (No. S7700, Chemicon, USA), 试验按照其使用手册进行。主要操作过程如下: 5 μL PCR 反应液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 15 mmol/L MgCl₂, 630 mmol/L HCl, 体积分数 0.5% 的 Tween 20, 10 mmol/L EG-

TA), 1.0 μL dNTP, 1.0 μL TS 引物, 1.0 μL TRAP 引物混合物, 0.4 μL Taq 聚合酶 (5 U/ μL) 及 39.6 μL 无离子水混合后, 加入 2.0 μL 裂解的待测样品。PCR 分 2 步, 首先 30 $^{\circ}\text{C}$, 30 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 进行 33 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min。反应完成后加入 5 μL 溴酚蓝指示剂, 混匀。电泳时向质量分数 12.5% 的非变性 PAGE 中按 50 μL /孔的量加样, 400 V 电泳 1 h 或电泳至凝胶的 80% 时停止。凝胶在质量分数 0.01% 的 EB 溶液中浸染 30 min, 再经无离子水漂洗 20 min 后, 置于凝胶成像系统下观察。

1.5 端粒酶活性的定量比较

按电泳条带在成像系统下的光密度, 计算相对总产品产量 TPG (total product generated), 即

$$\text{TPG (units)} = \frac{(X - X_0)/C}{(R - R_0)/C_R} \times 100$$

式中, X , X_0 , C , R , R_0 , C_R 为 TRAP 试验电泳条带在凝胶成像系统下的光密度; X 为非失活样品的光密度; X_0 为热失活样品的光密度; C 为非失活样品内部标准对照的光密度; R 为 PCR 污染对照的光密度; R_0 为阳性对照的光密度; C_R 为 TSR8 模板对照的光密度。

2 结果与分析

电泳结果 (图 1) 显示, 小鼠卵母细胞、桑椹胚及囊胚端粒酶活性为阳性, 2-细胞和 8-细胞阶段为阴性。

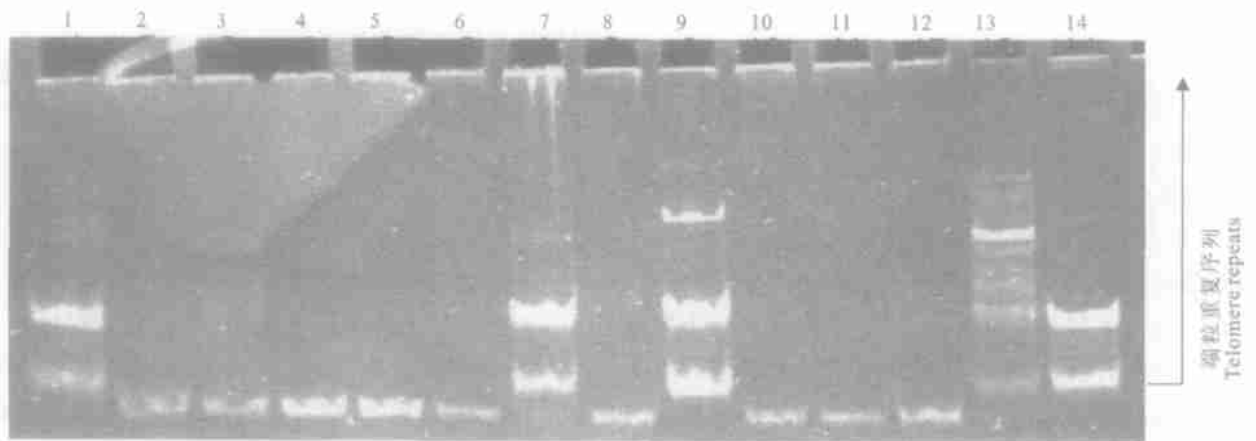


图 1 卵母细胞及早期胚胎端粒酶活性测定试验电泳结果

1, 3, 5, 7, 9 分别示卵母细胞、2-细胞、8-细胞、桑椹胚及囊胚样品; 2, 4, 6, 8, 10 待测样品的热失活样品; 11 阴性对照; 12 PCR 污染对照; 13 阳性对照; 14 TSR8 对照

Fig 1 Electrophoresis result of telomerase activity assay in mouse oocyte and embryos

1, 3, 5, 7, 9 Oocyte, 2-cell, 8-cell, morulae and blastocyst, respectively; 2, 4, 6, 8, 10 Heat-inactivated samples correspondingly; 11 Negative control; 12 PCR contamination control; 13 Positive control and lane; 14 TSR8 template control

依据电泳条带在成像系统下的光密度, 相对总产品产量 TPG (total product generated) 计算及定量比较发现, 囊胚端粒酶活性最高, 为 269.331; 桑椹胚次之, 为 96.231; 卵母细胞最低, 为 85.782 (图 2)。通过对小鼠桑椹胚和囊胚胚胎记数, 单细胞端粒

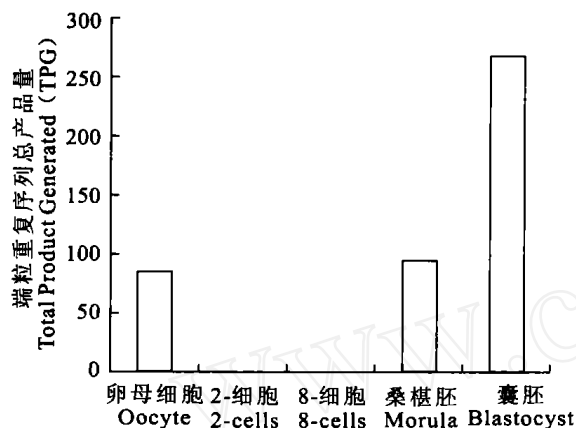


图2 小鼠卵母细胞及早期端粒酶活性的比较

Fig. 2 Telomerase activity in mouse oocyte and embryo

3 讨论

端粒的复制存在端粒酶依赖性途径和非端粒酶依赖性途径两种方式。Sonja Schaetzlein 等^[10]通过对 mTERC^{+/+} 和 mTERC^{-/-} 小鼠端粒酶活性和端粒长度的测定, 认为小鼠早期胚胎是通过端粒酶依赖性途径进行端粒复制的。目前, 国内还未见到早期胚胎端粒酶活性检测方面的研究报道, 特别是小鼠胚胎。

本试验显示端粒酶阳性样品的条带为不连续的 2~3 个条带, 这可能是小鼠端粒酶酶的进程性 (processivity) 较差的缘故。尽管不同哺乳动物之间, 其端粒酶本身具有一定的保守性, 但不同物种间酶的进程性是存在差异的。人端粒酶具有良好的进程性, 其以连续性模式延伸引物, 所产生的是一系列相差 6 bp 的梯度条带^[11], 然而在同样条件下, 小鼠端粒酶则只能产生少量的不连续条带^[12]。

本试验结果表明, 小鼠卵母细胞具有一定的端粒酶活性, 然而 2-细胞和 8-细胞却检测不到酶活性; 桑椹胚期端粒酶活性又大幅升高, 且于囊胚期达到最高水平。XU Jie 等^[13]研究认为, 牛体外受精时端粒酶活性会短暂升高, 之后酶活性逐渐降低, 8-细胞后又开始升高直至活性最高的囊胚, 这与本试验的结果相类似。本试验中未进行小鼠受精卵的端粒酶活性研究, 所以还不能确定小鼠受精卵是否也会

酶活性的比较结果显示, 囊胚单细胞端粒酶活性最低, 为 3.45; 桑椹胚单细胞略高于囊胚, 为 4.00; 而卵母细胞的最高, 为 85.782, 大约是囊胚细胞的 25 倍 (图 3)。

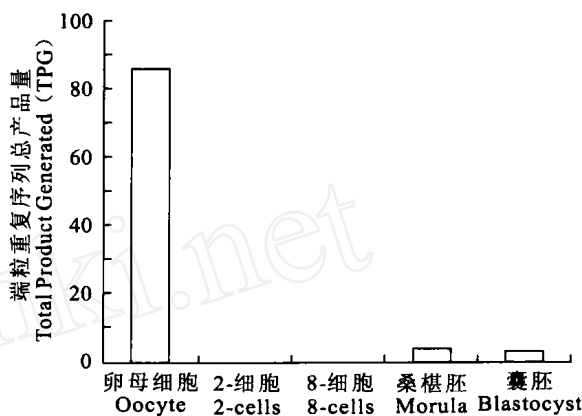


图3 小鼠胚胎单个细胞端粒酶活性的比较

Fig. 3 Telomerase activity of single cell in mouse embryo

短暂的升高。小鼠 2-细胞和 8-细胞胚胎端粒酶活性的消失可能与其发育过程中的 2-细胞阻滞有关。阻滞期是哺乳动物能否正常完成发育的关键, 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。作为小鼠发育的阻滞期 2-细胞阶段, 活化的端粒酶蛋白和卵母细胞中所贮存的端粒酶 mRNA 此时已消耗殆尽, 然而胚胎基因组才刚开始活化, 新的端粒酶还未合成, 因此 2-细胞和 8-细胞都未检测到端粒酶活性。此结果也与对牛体外受精时端粒酶活性的研究^[13] 结论相一致, 因为牛的阻滞期是 8-细胞阶段。

尽管就整个胚胎而言, 小鼠卵母细胞、桑椹胚和囊胚 3 个阶段中, 卵母细胞端粒酶活性最低, 8-细胞阶段次之, 囊胚阶段最高。然而, 小鼠胚胎细胞计数结果显示, 桑椹胚平均细胞数为 (24 ± 0.8) ($n=18$), 囊胚为 (78 ± 0.3) ($n=13$)。以此胚胎细胞计数结果进行单个胚胎细胞端粒酶活性的比较, 结果发现卵母细胞活性最高, 单个桑椹胚细胞次之, 而单个囊胚细胞最低。该结果与 Xu 和 Yang^[13] 在牛胚胎细胞上得出的结论相一致。

Li 等^[14]研究了野生型和 TR^{-/-} 小鼠早期胚胎的发育能力, 认为端粒酶活性低甚至无端粒酶活性并不能阻止胚胎发育至囊胚, 表明端粒酶活性并不是早期胚胎发育所必需的, 其活性的高低只是决定了后代端粒的长短。那么, 核移植过程中卵母细胞能

否对无端粒酶活性的体细胞进行有效的重编程, 从而产生端粒正常的克隆动物? Xu 和 Yang^[15]的研究发现, 体细胞克隆牛与体外受精牛早期胚胎端粒酶活性水平无明显差异, 而且整个早期发育过程中端粒酶活性具有类似的变化趋势。尽管 Shiels 等^[16]测定克隆绵羊“多莉”的端粒后发现, 其长度仅与供体细胞的端粒长度相当, 比同龄对照组绵羊端粒短, 并且多莉表现出多种早衰迹象。然而包括牛^[17]、绵羊^[18]、猪^[19]在内的多种克隆动物的其他研究表明,

克隆动物与正常繁殖动物之间端粒长度无明显差异。Miyashita 等^[20]的研究表明, 克隆牛精子与对照组牛精子的端粒长度差异不显著, 而且利用其精液体外授精所获得的牛各组织细胞的端粒长度也在正常范围之内。结合本试验作者认为, 卵母细胞能够对端粒酶基因进行有效的重编程, 使体细胞核移植产生的桑椹胚和囊胚具有与正常胚胎相似的端粒酶活性, 并产生端粒正常的克隆动物。

[参考文献]

- [1] Zakian V A. Telomeres: beginning to understand the end[J]. Science, 1995, 270: 1601- 1607.
- [2] Holt S E, Shay J W, Wright W E. Refining the telomere-telomerase hypothesis of aging and cancer[J]. Nat Biotechnol, 1996, 14: 836- 839.
- [3] Faragher R G, Kipling D. How might replicative senescence contribute to human aging? [J]. Bioessays, 1998, 20: 985- 991.
- [4] Levy M Z, Allsopp R C, Futcher A B, et al. Telomere end-replication problem and cell aging[J]. J Mol Biol, 1992, 225: 951- 960.
- [5] Morin G B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTA GGG repeats[J]. Cell, 1989, 59: 521- 529.
- [6] Eisenhauer K M, Gerstein R M, Chiu C P, et al. Telomerase activity in female and male rat germ cells undergoing meiosis and in early embryos[J]. Biol Reprod, 1997, 56: 1120- 1125.
- [7] Achim V, Ravindranath N, Dym M. Telomere length in male germ cells is inversely correlated with telomerase activity[J]. Biol Reprod, 2000, 63: 591- 598.
- [8] Wright W E, Piatyszek M A, Rainey W E, et al. Telomerase activity in human germ line and embryonic tissues and cells[J]. Dev Genet, 1996, 18: 173- 179.
- [9] Betts D H, Bordonnon V, Smith L, et al. Telomerase activity in bovine blastocysts, fetal fibroblast and stem cell-like cell lines cultured under various conditions (abstract) [J]. Theriogenology, 1999, 51: 181.
- [10] Sonja Schaeetzlein, Andrea Lucas-Hahn, Erika Lemme, et al. Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis[J]. PNAS, 2004, 101(21): 8034- 8038.
- [11] Sun D, Lopez-Gajardo C C, Quada J, et al. Regulation of catalytic activity and processivity of human telomerase[J]. Biochemistry, 1999, 38: 4037- 4044.
- [12] Prose K R, Avilion A A, Greider C W. Identification of a nonprocessive telomerase activity from mouse cells[J]. PNAS, 1993, 90: 1493- 1497.
- [13] Xu Jie, Yang Xiang-zhong. Telomerase activity in bovine embryos during early development[J]. Biol Reprod, 2000, 63: 1124- 1128.
- [14] Liu L in, Andrea Lucas-Hahn, Erika L, et al. An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development[J]. Development Biology, 2002, 249: 74- 84.
- [15] Xu Jie, Yang Xiang-zhong. Telomerase activity in early bovine embryos derived from parthenogenetic activation and nuclear transfer[J]. Biol Reprod, 2001, 64: 770- 774.
- [16] Shiels P G, Kind A J, Campbell K H, et al. Analysis of telomere lengths in cloned sheep[J]. Nature, 1999, 399: 316- 317.
- [17] Dean H Betts, Vilceu Bordonnon, Jonathan R Hill, et al. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle[J]. PNAS, 2001, 98: 1077- 1082.
- [18] Clark A J, Ferrier P, Alslan S, et al. Proliferative lifespan is conserved after nuclear transfer[J]. Nat Cell Biol, 2003, 5: 535- 538.
- [19] Le Jiang D, Bart Carter, Xu Jie, et al. Telomere lengths in cloned transgenic pigs[J]. Biol Reprod, 2004, 70: 1589- 1593.
- [20] Norikazu Miyashita, Kazuo Shiga, Tatsuo Fujita, et al. Normal telomere lengths of spermatozoa in somatic cell-cloned bulls[J]. Theriogenology, 2003, 59: 1557- 1565.

(下转第 34 页)

- [3] Jasninka K, Raphael Y, Ram in S, et al Sodium-ascorbate cotransport controls intracellular ascorbate concentration in primary astrocyte cultures expressing the SVCT2 Transporter[J]. Brain Res, 2000, 881: 144- 151.
- [4] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996 68- 89.
- [5] Pala S L. 神经元形态与功能[M]. 上海: 上海科技出版社, 1986.
- [6] 周德庆, 路新枝, 管华诗. 新生大鼠海马神经元体外分散培养技术研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(1): 47- 52.
- [7] Burns J J. Biosynthesis of L-ascorbic acid basic defect in scurvy[J]. Am J Med, 1959, 26: 740- 748.
- [8] Lutsenko E A, Carcamo J M, Golde D W. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress[J]. J Biol Chem, 2002, 277(19): 16895- 16899.
- [9] Guo B, Yuan Y, Wu Y, et al Assay and analysis for anti- and pro-oxidative effects of ascorbic acid on DNA with the bulk acoustic wave impedance technique[J]. Anal Bio Chem, 2002, 305(2): 139- 148.
- [10] 周德庆, 管华诗. Vc 对体外培养的大鼠海马神经元生长发育的影响[J]. 莱阳农学院学报, 1998, 15(1): 1- 5.

Effect of Vitamin C (ascorbic acid) on the growth of newborn rat hippocampal neuron *in vitro*

L IU Xin-yang, AN Zhi-xing, WU Yue-hong, ZHANG Yong

(Institution of Bio-Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The effects of Vitamin C (Vc) with different concentrations on the growth of hippocampal neurons from newborn rat were detected with MTT method by dissociated cell culture, and the morphological changes and the differentiation degrees were observed. Results indicated that the number of survived neurons in 2 nmol/L and 20 nmol/L Vc groups were almost the same as control group (no Vc in medium ($P > 0.05$)). The number of survived neurons in 200 nmol/L Vc group was significantly higher than that of control group ($P < 0.01$), and the survived neurons in 2 000 nmol/L Vc group were scanty, which could lead to cell apoptosis. The number and the length of neuronal processes as well as the area of neurons in 200 nmol/L group were all increased markedly, enhanced significantly as compared with control. These results indicated that the suitable amount of Vc could improve neuron growth *in vitro*.

Key words: vitamin C; hippocampal neuron; *in vitro* culture

(上接第 30 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)06-0027-EA

Telomerase activity in mouse oocyte and embryos during early development

JING Xiao-qi, LEI An-min, WANG Han, YANG Xue-yi, DOU Zhong-yang

(Shaanxi Branch of National Stem Cells Engineering & Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The telomerase activity in mouse oocyte and preimplantation embryo was examined using the polymerase chain reaction-based on telomeric repeat amplification protocol (TRAP). Telomerase activity was detected in mouse oocyte, morulae and blastocyst and not in 2-cells and 8-cells embryo. The quantitative comparison results showed, by ladder densitometric methodology, that the total product generated (TPG) were 85 782, 96 231, 269 331 units in mouse oocyte, morulae and blastocyst respectively. However, the TPG of single cell of morulae and blastocyst were 4 00, 3 45 units. So, the oocyte had the highest telomerase activity level about 25-fold of blastocyst.

Key words: mouse; oocyte; early embryos; telomerase activity