

AS-PCR 在牛羊异种核移植上的应用

戴津泼, 华松, 张涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 利用 PCR 反应延伸过程中, 3 端碱基不配对, PCR 反应不能启动的等位基因特异性 PCR 分析法 (AS-PCR) 原理, 采用生物软件 DNA STAR 分析牛、羊线粒体细胞色素 b (Cytb) 基因, 以牛、羊碱基差异较大位点作为上游引物的 3 端来设计引物, 进行 PCR 扩增反应, 分析牛羊异种克隆胚中线粒体的变化情况。结果表明, AS-PCR 法是一种快速、有效鉴定异种重构胚中线粒体异质性的方法。

[关键词] AS-PCR; 核移植; 线粒体; 细胞色素 b

[中图分类号] S852.23

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)11-0001-04

线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 为双链环状, 长约为 16.5 kb, 含氧化磷酸化所需数百个基因中的 37 个, 包括 13 种多肽、22 种 tRNA 和 2 种 rRNA^[1]。在异种核移植过程中, 无论是将体细胞注入去核卵母细胞透明带下经电融合融入, 还是直接将体细胞核注入去核卵母细胞中, 均会将来自供体细胞的 mtDNA 带入到卵母细胞中, 使重构胚中出现受体来源线粒体和供体来源线粒体共存的情况^[2], 这将导致克隆获得后代的基因型与供体基因型不能完全一致。研究^[3]表明, 在重构胚的发育过程中, 线粒体代谢可能出现 3 种情况: 第 1 种是供体来源的线粒体被受体卵胞质中的泛素标记, 随后被蛋白酶水解作用降解并消失, 最后只剩下受体来源的线粒体; 第 2 种情况是两种来源的线粒体同时存在, 重构胚中的线粒体呈异质性; 第 3 种情况是受体来源的线粒体被降解, 供体来源的线粒体复制扩增, 在重构胚中占主导地位。因此, 在异种核移植中, 对不同来源线粒体进行跟踪监测是不可缺少的一步。本试验采用等位基因特异性 PCR 分析法 (Allele-Specific PCR, AS-PCR) 检测了牛羊异种克隆重构胚 (以羊颗粒细胞为供体, 牛卵母细胞为受体, 将羊颗粒细胞核注入去核的单个牛卵母细胞中获得的胚胎) 中 2 种不同来源的线粒体的共存情况, 旨在为异种克隆胚中线粒体异质性的鉴定提供有效、可行的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

关中奶山羊卵巢和秦川黄牛的卵巢均取自西安屠宰厂。2-细胞期、8-细胞期、桑椹胚期、囊胚期的牛羊异种核移植重构胚均由本实验室提供。

1.2 工具酶及试剂

EX Taq DNA 聚合酶和 dNTP 购自大连宝生物工程有限公司; Marker 购自加拿大 MBI 公司; Triton X-100 购自 Sigma 公司; 蛋白酶 K 购自德国 Merck 公司。

1.3 方法

1.3.1 PCR 模板的制备 用检胚针分别吸取单个牛卵母细胞、羊颗粒细胞及 2-细胞期、8-细胞期、桑椹胚期、囊胚期的牛羊异种核移植重构胚转移至 PCR 管中, 然后加入 20 μL 裂解液, 55℃ 水浴 30 min, 95℃ 水浴 5 min, 最后 12000 g 离心 5 min, 取所有上清液作为 PCR 模板。裂解液含质量分数 1% Triton X-100, 100 μg/mL 蛋白酶 K, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 用灭菌三蒸水配制。

1.3.2 引物设计与合成 利用 DNA STAR 的 MegAlign 功能对牛和羊线粒体的细胞色素 b (cytochrome b, Cytb) 基因 (GenBank 登录号分别为 AY885304 和 X56289) 间的差异进行比对, 结果见表 1。针对牛、羊在 Cytb 基因上的多态性设计引物, 上游引物为特异性引物, 下游引物为共同引物。羊的上

〔收稿日期〕 2005-11-07

〔基金项目〕 国家“863”高科技项目(2001AA213081)

〔作者简介〕 戴津泼(1981-), 男, 浙江温州人, 在读硕士, 主要从事胚胎工程及分子生物学研究。E-mail: Justin4223305@yahoo.com.cn

〔通讯作者〕 张涌(1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事胚胎工程和发育生物学研究。

游特异性引物GO (282~304)序列为: 5'-A TT CA T ACA T A T CGG ACG A GG TC-3'; 牛的上游特异性引物CA (552~574)序列为: 5'-CCT TCC ATT CAT CA T CA T A GC AA-3', 下游共同引物GC (934~957)序列为: 3'-GTT GCT TCG TAT TAT

AAG GCG GGT-5' (括号内的数字为引物碱基对在*Cy tb*基因上的位置)。引物均由上海生物工程服务公司合成。

表1 牛、羊线粒体部分*Cy tb*基因比对结果

Table 1 Polymorphic DNA sequences of *Cy tb* gene of cattle and goat

物种 Species	位点 Site																							
	284	285	288	291	292	294	303	304	312	315	318	321	324	342	357	364	366	367	368	372	384	390	393	420
牛 Cattle	T	C	A	T	A	C	T	C	T	A	A	T	C	C	G	G	A	C	G	C	C	T	T	
羊 Goat	A	T	G	C	G	A	C	T	C	G	T	C	T	T	A	A	G	T	A	T	A	C	C	
物种 Species	位点 Site																							
	426	444	448	450	465	468	477	478	498	519	522	525	540	546	555	569	573	574	576	594	612	624	634	636
牛 Cattle	G	T	C	C	T	T	C	C	G	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	A	C	C	A	
羊 Goat	A	C	T	A	C	C	T	T	C	A	C	T	T	T	T	A	A	T	A	C	A	T	C	
物种 Species	位点 Site																							
	643	644	648	660	666	672	681	684	693	697	699	700	711	713	714	736	747	777	792	804	807	810	813	819
牛 Cattle	A	C	T	T	T	T	A	T	C	A	G	C	T	T	C	A	T	A	T	G	A	A	T	
羊 Goat	G	T	C	C	C	G	C	G	C	C	T	A	C	T	G	C	A	C	A	G	C	C		
物种 Species	位点 Site																							
	823	841	873	884	886	891	900	901	903	905	906	909	910	912	916	918	921	927	930	954	958	970	979	980
牛 Cattle	C	C	C	T	C	C	C	T	A	T	A	T	G	A	T	C	C	A	T	C	A	A	T	
羊 Goat	T	T	A	C	T	T	C	T	C	T	A	A	C	C	A	A	C	C	A	C	C	G	C	

注: — 羊上游引物3'端; . 牛上游引物3'端

Note: — 3' end of goat upstream primer; . 3' end of cattle upstream primer

1.3.3 AS-PCR 反应 (1)引物特异性检测。分别以单个牛卵母细胞、羊颗粒细胞裂解产物或两者混合物的上清液20 μL为模板, 加入5 μL PCR Buffer, 2 μL dNTP (100 μmol/L), 上下游引物 (20 μmol/L)各1 μL, 0.5 μL EX Taq 酶, 最后加灭菌水补成50 μL PCR 反应体系。PCR 反应步骤为: 94℃下变性10 m in; 94℃ 1 m in, 58℃, 30 s, 72℃ 1 m in, 30 个循环; 72℃ 10 m in。将扩增产物在10 g/L 凝胶电泳观察扩增结果。

(2)不同发育阶段重构胚*Cy tb*基因的PCR 扩增。分别以2-细胞期、8-细胞期、桑椹胚期、囊胚期牛羊异种核移植重构胚的裂解产物上清液作为模板, 进行PCR 扩增后, PCR 反应体系及其条件同1.3.3 (1), 扩增产物在10 g/L 凝胶电泳。

2 结果与分析

2.1 引物的特异性检测结果

引物的特异性检测结果如图1所示。从图1可以

看出, 上游特异性引物CA 和下游共同引物GC 能以牛线粒体为模板扩增出长约675 bp 的部分*Cy tb*基因片断, 但不能扩增羊的部分*Cy tb*基因; 上游特异性引物GO 和下游共同引物GC 能以羊线粒体为模板扩增出长约400 bp 的部分*Cy tb*基因片断, 却不能扩增牛的部分*Cy tb*基因片断, 两对引物扩增后均无杂带, 表明设计引物的特异性较强, 可以满足本试验要求。

2.2 不同发育阶段重构胚*Cy tb*基因的PCR 扩增结果

不同发育阶段牛羊异种核移植重构胚*Cy tb*基因的PCR 扩增结果见图2。由图2可知, 在重构胚的2-细胞期、8-细胞期、桑椹胚期均能检测到牛和羊的部分*Cy tb*基因片段, 表明在这些发育阶段, 重构胚中牛和羊的线粒体共存。而在桑椹胚期后的囊胚期, 只检测到牛的部分*Cy tb*基因片段, 表明重构胚中供体来源的线粒体数量减少 (PCR 方法已检测不到) 或被完全降解了。

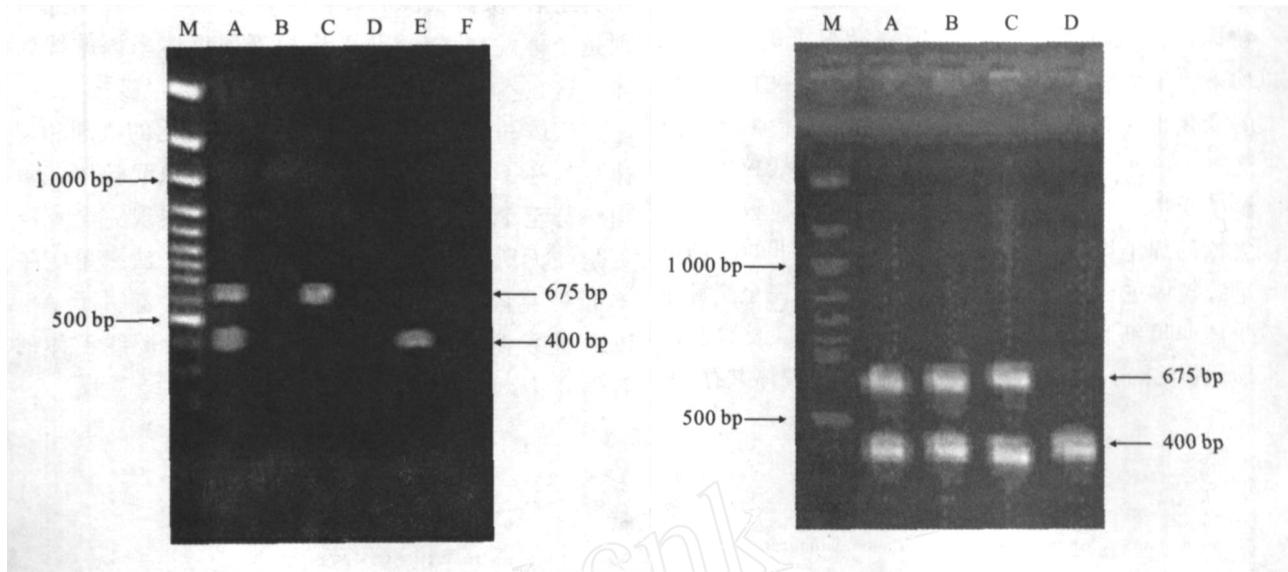


图1 引物特异性扩增结果

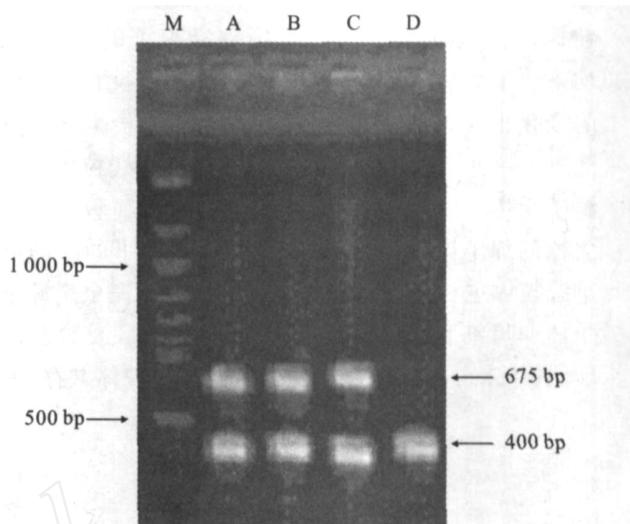
M. 3 kb marker; A. 牛卵母细胞和羊颗粒细胞的上清液中加入GC, GO 和 CA, GO 2 对引物; B. 牛卵母细胞上清液中加入引物 GO 和 GC; C. 牛卵母细胞上清液中加入引物CA 和 GC; D. 羊颗粒细胞上清液中加入引物CA 和 GC; E. 羊颗粒细胞上清液中加入引物GO 和 GC; F. 阴性对照

Fig 1 Specific amplification results

M. 3 kb marker; A. Cattle oocyte supernatant with primers GC, CA and GO; B. Cattle oocyte supernatant with primers GO and GC; C. Cattle oocyte supernatant with primers CA and GC; D. Goat granular cell supernatant with primers CA and GC; E. Goat granular cell supernatant with primers; F. Negative control (no template with primers GO, GC and CA)

3 分析和讨论

AS-PCR 法是由U gozzoli 和W allace 在1991 年发明的一种用于检测单碱基突变的PCR 方法。其原理是, *Taq* DNA 聚合酶对于3 端错配的引物, 以低于正常配对末端的速度延伸, 当错配的碱基数达到一定数量或PCR 条件达到一定严谨程度时, 3 端碱基错配的引物则不能延伸, PCR 反应终止^[4]。本试验中, 羊的特异性上游引物GO 会和牛模板DNA 在3 端形成TC GA 的错配, 而牛的特异性上游引物CA 会和羊的模板DNA 在3 端形成CC TT 的错配, 再加上较高的退火温度(58), 这就使错配的PCR 反应不能发生。此外, 本试验中模板的制备是较为关键的一步, 细胞裂解液中含有Triton X-100, 蛋白酶K 和Tris-HCl, 其中Triton X-100 是一种非离子型表面活性去污剂, 其能温和地破坏细胞膜和线粒体的膜结构, 并且适量的Triton X-100 不会影响*Taq* DNA 聚合酶的活性; 蛋白酶K 能水解消化蛋白质特别是组蛋白, 使DNA 游离出来, 且蛋白酶K

图2 不同发育阶段重构胚 *Cy tb* 基因 PCR 扩增结果

M. 3 kb marker; A. 2-细胞期重构胚上清液中加入引物GC, CA 和 GO; B. 8-细胞期重构胚上清液中加入引物GC, CA 和 GO; C. 桑椹胚期重构胚上清液中加入引物GC, CA 和 GO; D. 囊胚期重构胚上清液中加入引物GC, CA 和 GO

Fig 2 Amplification results of reconstructed embryos at different development stages

M. 3 kb marker; A. 2-cell stage reconstructed embryo supernatant with primers GC, CA and GO; B. 8-cell stage reconstructed embryo supernatant with primers GC, CA and GO; C. Morula stage reconstructed embryo supernatant with primers GC, CA and GO; D. Blastocyst stage reconstructed embryo supernatant with primers GC, CA and GO

在95 高温水浴后能被灭活; Tris-HCl 确保了模板的pH 稳定。因此, 这种制备方法能够有效的提取PCR 模板。AS-PCR 法只能定性检测重构胚中线粒体的来源, 如果能够将其与实时荧光定量PCR 检测法结合, 就能精确地检测重构胚中供体来源和受体来源线粒体的数量和比例。这也是本试验下一步的研究方向。

Cy tb 基因是线粒体DNA 中编码细胞色素氧化酶一个亚基的1 个基因。在物种的进化中, *Cy tb* 基因在同种动物中较为稳定, 而在异种动物中差异较大^[5], 因此本试验采用*Cy tb* 基因, 作为牛、羊异种克隆中AS-PCR 法鉴定线粒体扩增的目的基因, 利用其在牛、羊mtDNA 中的多态性来设计引物, 通过比较扩增片段大小来确定重构胚中线粒体的变化, 结果表明AS-PCR 法鉴定效果较好。

目前, 线粒体鉴定是体细胞克隆中的研究热点。1999 年, Evans 等^[2]利用核酸限制性片段长度多态性(RFLP)方法, 检测了来源于母羊乳腺细胞的克隆羊Dolly 和其他来源于胎儿体细胞克隆绵羊的线

粒体, 结果表明, 10 头体细胞克隆绵羊的 mtDNA 均来源于受体卵母细胞。在异种动物克隆中, 线粒体的变化也受到广泛关注。Lanza 等^[6]分析了异种克隆野牛胎儿 11 种组织中的线粒体发现, 线粒体均来源于受体。Loi 等^[7]将欧洲盘羊的颗粒细胞注入到去核的绵羊卵母细胞中, 对核移植后产下的欧洲盘羊线粒体进行分析, 结果表明, 其线粒体完全来源于受体卵母细胞。这些研究均表明, 在囊胚发育阶段前, 供体来源的线粒体与受体来源的线粒体共存, 而在其之后, 供体来源的线粒体逐渐被降解, 在胎儿特别

是个体发育之后, 几乎检测不到供体来源的线粒体。这在本试验中也得到了初步证实。

供体和受体线粒体在重构胚中变化的机理和规律目前还不甚清楚, 对如何使供体来源线粒体在重构胚甚至个体中占据主导地位, 从而实现完全克隆更是一无所知。本试验建立了 A S-PCR 法来鉴定牛羊异种克隆胚中线粒体的共存情况, 表明了 A S-PCR 是检测异种核移植胚胎中不同来源线粒体的有效方法。

[参考文献]

- [1] Cummings J M. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction[J]. Reviews of Reproduction, 1998(3): 172-182
- [2] Evans M J, Gurer C, Loike J D, et al. Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer derived cloned sheep[J]. Nature Genetics, 1999, 23(1): 90-93
- [3] Do J T, Lee J W, Lee B Y, et al. Fate of donor mitochondrial DNA in cloned bovine embryos produced by microinjection of cumulus cells [J]. Biological Reproduction, 2002, 67(2): 555-560
- [4] Ugozzoli L, Wallace R B. A allele-specific polymerase chain reaction[J]. Methods, 1991, 2: 42-48
- [5] Steinborn R, Zakhartchenko V, Wolf E, et al. Nonbalanced mix of mitochondrial DNA in cloned cattle produced by cytoplast blastomere fusion[J]. FEBS Letters, 1998, 426(3): 357-361.
- [6] Lanza R P, Cibelli J B, Diaz F, et al. Cloning of endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer[J]. Cloning, 2000, 2 (2): 79-90
- [7] Loi P, Ptak G, Barboni B, et al. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using postmortem somatic cells [J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(10): 962-964

Application of A S-PCR in interspecies transplantation between goat and cattle

DAI Jin-po, HUA Song, ZHANG Yong

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

Abstract: In the PCR elongation process, the reaction can't start when 3'-end-base doesn't match. To study the heteroplasmy of mitochondria, bio-assay software DNA STAR was used to align *Cyt b* gene of cattle and goat. Then PCR primers were designed with different bases between goat and cattle with 3'-end-base as upstream primers. The change of mitochondria in interspecies goat-cattle nuclear transferred embryos was identified by A S-PCR. The results indicate that A S-PCR is a rapid and efficient method to identify mitochondria heteroplasmy in interspecies reconstructed embryos.

Key words: A S-PCR; interspecies nuclear transfer; mitochondria; cytochrome b