

小鼠胚泡着床期子宫内膜 LongSAGE 基因文库构建

徐以民 何俊琳 刘学庆 刘孝云 陈雪梅 王应雄*

(重庆医科大学公共卫生学院遗传优生教研室, 重庆 400016)

摘要 按照 LongSAGE 文库构建原理, 先后经子宫内膜总 RNA 提取、cDNA 合成、130 bp 双标签的产生、PCR 扩增、34 bp 双标签形成、连接成串联体、与载体连接、转化大肠杆菌等相关步骤构建小鼠胚泡着床期子宫内膜 LongSAGE 基因文库。经证实所构建文库的阳性克隆率达 100%, 克隆中插入的串联体长度介于 400~500 bp 之间, 成功构建了小鼠胚泡着床期子宫内膜 LongSAGE 基因文库。

关键词 小鼠; 子宫内膜; 着床; LongSAGE 文库

胚泡着床是建立妊娠的关键环节, 其间涉及子宫内膜容受态的建立、胚泡与子宫内膜上皮细胞的相互识别、定位及黏附, 进而穿透子宫内膜表面, 植入子宫内膜基质中, 完成着床过程。长期以来, 胚泡着床机制的研究一直是生殖医学领域研究的难点和热点之一。由于胚泡着床的细胞生物学与分子生物学机制十分复杂, 至今对其尚未完全阐明。人们以往一直试图从某些特定的分子与基因作为突破口, 探寻着床发生机制, 并发现着床期间特定分子与基因的表达随时相的不同而发生明显变化。但目前国内外尚无着床期子宫内膜基因表达变化规律的相关报道。人们发现, 只有处在一定发育阶段的胚泡与特定功能状态下的子宫内膜相接触, 才能着床, 这个特定阶段称为着床窗(implantation window)。因此, 探索着床期子宫内膜基因表达变化对阐明着床的分子机制尤为重要。

LongSAGE 是目前最新的基因表达系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)方法, 其原理是以转录子(cDNA)上特定区域 17~21 bp 的寡核苷酸序列作为标签来特异性代表该转录子, 然后用连接酶将多个标签(15~50 个)随机拼接并克隆至载体构建 LongSAGE 文库, 通过对全部标签序列进行分析获得基因转录的分布以及表达丰度等信息(尤其可以检测低丰度表达的基因, 甚至发现新基因^[1]), 以揭示特定时期基因转录水平的表达丰度及差异, 从而充分了解基因转录组全貌。因此, 本文根据 LongSAGE 方法构建小鼠胚泡着床期子宫内膜 LongSAGE

基因文库, 并用 PCR 法对该文库质量进行鉴定, 为进一步筛选与着床有关的相关基因打下基础。

1 材料与方法

1.1 小鼠子宫内膜总 RNA 的提取和 130 bp 双标签(ditag)制备

一级 NIH 小鼠, 6~8 周龄, 由重庆医科大学动物中心提供。选择动情周期中任意时期的未交配雌鼠于晚上 8 点与雄鼠(2:1)合笼, 次晨发现有阴栓者作为妊娠第 1 天(记为 d₁)。取妊娠第 5 天雌鼠, 经尾静脉注射 0.125 ml 0.5% 台盼蓝, 10 min 后脱颈处死, 75% 乙醇消毒, 解剖取出着色子宫角(证明已着床, 着色部位为着床位点), 冷 PBS 冲洗宫腔, 倒置显微镜(Olympus IMF-2)下计数冲洗掉的胚泡数(胚泡数应与着床位点数一致), 以确保胚泡去除, 并迅速用机械法剥离整个子宫内膜。

采用 TRIzol[®] 试剂(Invitrogen)一步法提取总 RNA。为控制 RNase 污染, 参照文献[2]的方法对所用器皿、器械事先全部经 0.1% DEPC 浸泡过夜至用前使其自然晾干, 目的是利用其残留的 DEPC 抑制内源性及外源性 RNase 活性。提取的总 RNA 用 DEPC 处理水溶解, 紫外分光光度法检测总 RNA 纯度及含量, 1% 甲醛变性电泳检测其完整性, -80

收稿日期: 2005-10-28 接受日期: 2006-01-24

国家自然科学基金(No.30270510)、重庆市重点攻关(No.7668)和重庆市计生委基金(No.2005-001)资助项目

* 通讯作者。Tel: 023-68485001, E-mail: wyx61221@yahoo.com.cn

℃贮存备用。

按照 I-SAGE™ Long Kit 试剂盒(Invitrogen)说明书, 将其 3' 端与磁珠相连的总 RNA 逆转录成 cDNA, 锚定酶 *Nla*III (识别位点为 CATG)消化合成的双链 cDNA, 分离与磁珠结合的 3' 端含有 poly (A)尾巴的 cDNA 片段, 并与含有 IIS 类限制酶识别位点的接头相连接, 再用标签酶 *Mme*I (为 IIS 类限制酶)处理样品, 释放带有接头的 LongSAGE 标签, 再经连接酶连接成带有两个接头(LS adapter A、B)的 130 bp 的双标签。随后根据优化的 PCR 反应条件, 按下述反应体系进行 130 bp 双标签大量扩增: 5 μl 10 × Ex Taq 缓冲液、4 μl dNTP Mix (各 2.5 mmol/L)、3 μl DMSO、1 μl 20 μmol/L LS DTP-1、1 μl 20 μmol/L LS DTP-2、1 μl 模板、0.25 μl TakaRa Ex Taq HS (5 U/μl), 补充去离子水至 50 μl。上游引物 LS DTP-1 为: 5'-GTG CTC GTG GGA TTT GCT GGT GCA GTA CA-3', 下游引物 LS DTP-2 为: 5'-GAG CTC GTG CTG CTC GAA TTC AAG CTT CT-3', 扩增条件为: 95 °C 2 min, 1 个循环; 95 °C 30 s、55 °C 1 min、70 °C 1 min, 27 个循环; 最后 70 °C 延伸 5 min。共进行 400 个 PCR 反应。PCR 产物经苯酚/氯仿/异戊醇抽提、糖原乙醇法沉淀, 用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离 130 bp 双标签, 再经胶回收后溶于 126 μl 的 LoTE 中。

1.2 *Nla*III 酶切 130 bp 双标签及 34 bp 双标签的形成

按照每 42 μl 的 130 bp 双标签用 12 μl *Nla*III(10 U/μl)酶切消化释放 34 bp 双标签, 取 5 μl 验证酶切效果。用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 34 bp 双标签, 胶回收可获得已去除接头的尾尾相连的 34 bp 双标签, 在双标签的两端含有锚定酶 *Nla*III 的酶切位点(CATG)。

1.3 串联体(concatemer)的形成与克隆

以上所得 34 bp 双标签立即加入 5 U T4 DNA 连接酶(Promega)进行连接, 总反应体积为 10 μl, 16 °C 4 h, 待反应完成后以 65 °C 10 min 来灭活连接酶, 此时 34 bp 双标签已连接成为串联体, -20 °C 贮存备用。

取 1 μg pZErO®-1 载体, 用 10 U *Sph* I (TaKaRa) 酶切, 37 °C 2 h, 总反应体积为 20 μl。苯酚/氯仿/异戊醇抽提、乙醇沉淀后溶于 30 μl LoTE, -20 °C 贮存备用。

本实验所用载体为 pZErO®-1, 该载体含两个选

择基因: *lacZα-ccdB* 融合基因(含多克隆位点), *Zeocin*™ 抗性基因, 可对转化菌株进行双重选择, 即只有当 *lacZα-ccdB* 融合基因被破坏或该基因多克隆位点由于基因片段的插入使其失活时, 该载体转化大肠杆菌后才可生长, 而未转化载体的大肠杆菌由于 *Zeocin*™ 抗生素的作用不能在含 *Zeocin*™ 的低盐 LB 平板上生长。后续实验证明, 载体经 37 °C 2 h 酶切后与串联体连接并转化大肠杆菌培养, 测序证实未发现携带有空质粒的大肠杆菌生长, 说明 37 °C 2 h 没对载体造成过度切割。

取上述 1 μl 酶切载体, 加入 2 μl 串联体, 3 U T4 DNA 连接酶(Promega), 总反应体积 10 μl, 16 °C 连接过夜, 苯酚/氯仿/异戊醇抽提、糖原乙醇法沉淀后溶于 12 μl LoTE 中, -20 °C 贮存备用。

1.4 电穿孔及载体内插入片段的 PCR 鉴定

冰上溶化 50 μl One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli* 菌, 加入 2 μl 串联体-载体的连接产物, 立即混匀, 按下述条件电穿孔(Gene Pulser Xcell™, Bio-Rad) (同时做阴性、阳性对照): 电压 1 800 V、电容 25 μF、电阻率 200 Ω、电极槽径 1 mm。转化后加入 25 μl SOC 培养基, 37 °C(200 r/min)摇床培养 1 h 后, 补加 750 μl SOC 培养基接种于含 50 μg/ml *Zeocin*™ 的低盐 LB 培养基, 37 °C 温育过夜。随机挑取培养菌落进行 PCR 扩增鉴定以观察是否有插入片段及插入片断大小和范围。

2 结果

2.1 总 RNA 提取与 130 bp 双标签制备

用紫外分光光度计(SmartSpec™ plus, Bio-Rad)进行分析, 显示所提取总 RNA 的 $A_{260/280}=1.99:1$, 说明总 RNA 纯度高, 用甲醛变性凝胶电泳鉴定其完整性, 发现 28S RNA 条带亮度约为 18S RNA 的 2 倍(图 1), 表明总 RNA 完整性较好。

在 130 bp 双标签制备过程中, 我们分别对总 RNA 逆转录成 cDNA、锚定酶 *Nla*III 对 cDNA 的酶切、酶切产物与接头连接的各步反应产物逐一进行了验证, 证实上述反应步骤都是成功的(图 2)。然后通过优化 PCR 反应条件, 对 130 bp 双标签进行大量扩增, 再经 12%PAGE 电泳成功回收到 130 bp 双标签(图 3)。

2.2 酶切 130 bp 双标签形成 34 bp 双标签

130 bp 双标签经 *Nla*III 酶切后, 取 5 μl 酶切产物经 12%PAGE 电泳证实, 发现 130 bp 双标签 80%

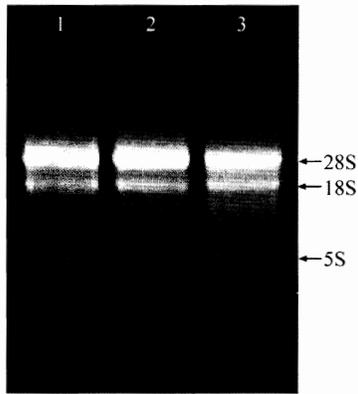


图1 1% 甲醛变性电泳检测总 RNA 完整性

1~3: 10 μ g 总 RNA。28S RNA 条带亮度约为 18S RNA 条带亮的 2 倍。

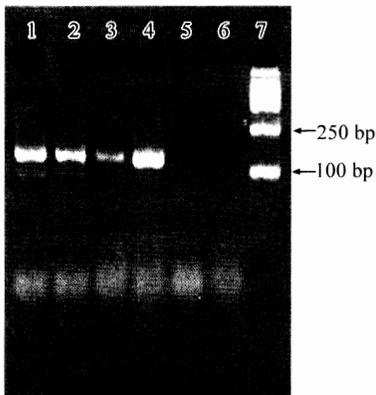


图2 双标签 PCR 扩增条件的优化

1~3: 模板分别按 1:80、1:160、1:320 稀释(130 bp 为双标签, 100 bp 为接头 LS 自身相互连接所致); 4: LS 对照模板, 1 μ g/ μ l (Invitrogen); 5: 阴性对照(无模板); 6: 阴性对照(无连接酶); 7: DNA marker DL2000 (TaKaRa)。

以上被酶切, 溴化乙锭染色后可见明显的 34 bp 条带(即 34 bp 双标签带)、40 bp 条带(为 LS 接头)各一条, 以及介于 80~90 bp 之间的一条带(为 *Nla* III 不完全酶切所致)(图 4)。实验证明酶切效果较好。

2.3 串联体形成与载体克隆

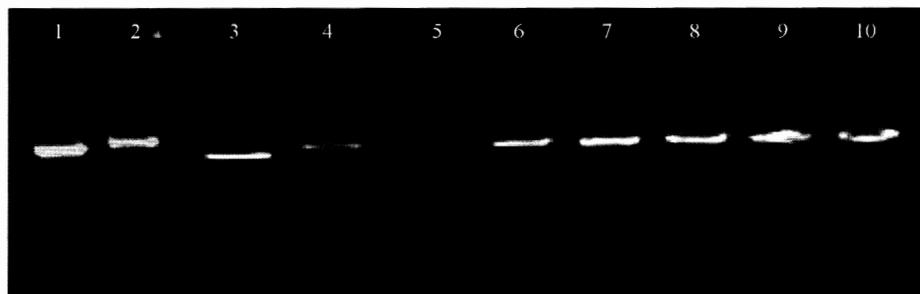


图5 电泳示 pZER0-1 酶切效果

1: 酶切 30 min 反应产物; 2、4、5: 未经酶切的 pZER0-1 载体; 3: 酶切 1 h 40 min 反应产物; 6~10: 分别经 2 h、2.5 h、3 h、3.5 h、4 h 酶切的反应产物。

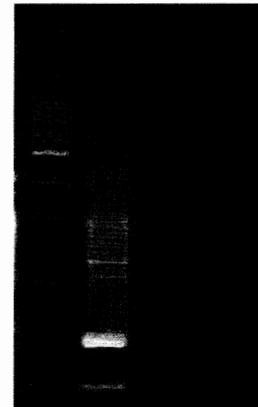


图3 12%PAGE 电泳分离 130 bp 双标签

M: 100 bp ladder marker (TaKaRa); 1: 可见一条较强 130 bp 条带和一条较弱 100 bp 条带(100 bp 条带为接头 LS 自身相互连接所致)。

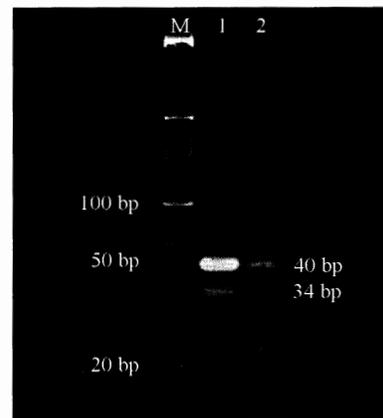


图4 12%PAGE 电泳验证 130 bp 双标签酶切效果

M: 100 bp ladder marker (TaKaRa); 1: 可见一条 34 bp 条带、一条 40 bp 条带(为 LS 接头)和一条较弱 80~90 bp 条带(为 *Nla* III 酶切不完全所致); 2: 40 bp 条带(为 LS 接头)。

获得的 34 bp 双标签立即连接形成串联体, 我们设置了 16 $^{\circ}$ C 2 h、3 h、4 h 三个时间点进行连接反应, 从后来测序结果可知, 16 $^{\circ}$ C 4 h 连接效果较理想, 串联体约在 400~500 bp 左右。为避免

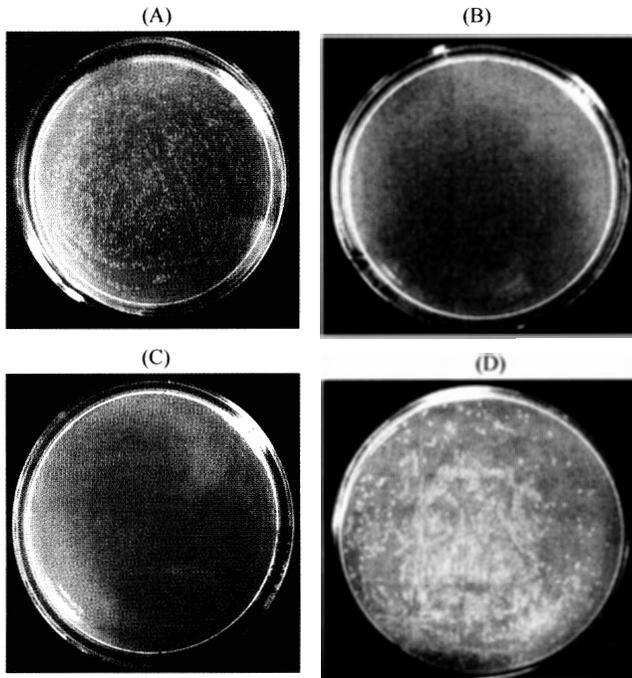


图6 电穿孔后细菌转化产物培养结果

(A)含有小鼠子宫内膜 cDNA 标签的载体转化 TOP10 *E. coli* 菌后在含有 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Zeocin™ 的低盐 LB 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养结果; (B) 阴性对照(无 DNA): 在含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Zeocin™ 的低盐 LB 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养未发现有菌落生长; (C) 阴性对照(无连接酶): 在含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Zeocin™ 的低盐 LB 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养未发现有菌落生长; (D) 阳性对照(pUC19 质粒): 在含 0.1 mg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养可见阳性对照有大量菌落生长。

胶回收步骤可能造成的双标签损失, 我们没有将上述连接产物用 8%PAGE 电泳及胶回收来进行串联体纯化, 而是直接与线性载体连接。我们在对 pZErO®-1 载体线性化时, 也设置了几个酶切时间点: 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min、1 h 40 min、2 h、2 h 30 min、3 h, 1% 琼脂糖凝胶电泳证实, 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h 载体酶切效果最好(图 5)。

2.4 电穿孔

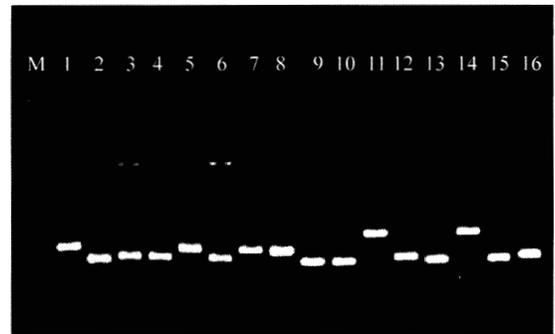


图7 转化菌质粒转化产物 PCR 鉴定

M: DNA ladder marker, λ -EcoT14 I digest (TaKaRa); 1~16: 所有菌落所含插入片段均大于 400 bp。

将上述串联体-载体的连接产物通过电穿孔转化 One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli* 菌, 同时设两个空载体阴性对照(无 DNA 和无连接酶), 一个阳性对照(选用 pUC19 质粒)。观察电穿孔后菌落生长情况时发现, 两个阴性对照均无细菌生长, 阳性对照有大量菌落生长, 证明电穿孔条件合适。将插入有连接产物 cDNA 标签的载体转化大肠杆菌后培养可见: 每个平板菌落数大于 600(图 6), 证明电转化成功。随机挑选 16 个克隆进行 PCR 扩增, 发现插入片段均在 400~500 bp 之间(图 7), 能满足测序要求, 证明文库质量良好。

2.5 部分克隆测序

随机挑选含有效重组体的转化菌落进行测序, 测序结果证实双标签串联排列, 与预期 LongSAGE 重组体的 DNA 排列形式相符(图 8)。

3 讨论

胚到着床是胚泡与子宫内膜两者相互识别、黏附和容纳的过程, 需要子宫内膜容受性的改变, 涉及到众多因素调节。Sharkey^[3]认为着床是在激素调

260 270 280 290 300 310 320 330 340
 TCA TGA C TAA ACC AT CAG A GA A TAA GG ATA A T T C A A C A T G C T A G G T G G G A A G A G G G G A C C A A T G A C A A T C C A C T C C A T G T A G

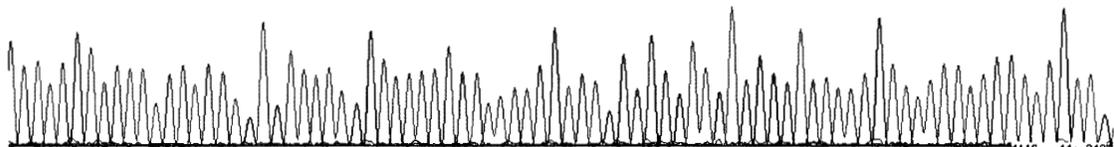


图8 标签测序图

标签测序图的一段, 为连续 2 个双标签, 以 CATG(*Nla* III 酶切位点)间隔。

控下多种细胞因子相互影响、相互作用共同的复杂的发育过程, 激素-细胞因子-黏附分子等诸多因素间形成一网络系统, 影响胚泡着床过程及早期妊娠的建立与维持, 同时受到相关基因的调控。胚泡与子宫内膜两者遗传构成完全不同, 然而子宫内膜却可容纳而没有排斥胚泡, 因此研究围着床期间子宫内膜组织、细胞在不同生理环境下究竟有哪些基因参与调控、并发挥关键作用, 将对人类生殖调控中助孕技术及抗着床技术的发展有重要意义, 并为分析或揭示着床过程发生的分子机制提供重要信息。

以往对胚泡着床机制的研究多集中于某些分子和某些基因功能和表达水平的研究^[4-6], 因此, 我们期望借助 LongSAGE 技术建立围着床期小鼠子宫内膜 LongSAGE 基因文库, 筛选差异表达基因, 获取与胚泡着床相关的关键基因。

本文利用 LongSAGE 技术建立小鼠胚泡着床期

子宫内膜 LongSAGE 基因文库, 对其操作的每个阶段都进行了严格有效的监控(包括总 RNA 纯度、含量分析及完整性鉴定、cDNA 合成和 *Nla*III 酶切效率验证、接头连接效果、双标签 PCR 扩增条件优化、130 bp 双标签酶切鉴定、载体酶切鉴定、优化电穿孔条件和文库质量的鉴定), 以确保获得高质量的文库, 为我们后续的高通量筛选胚泡着床相关基因打下了非常重要的实验基础。

参考文献 (References)

- [1] Dai JL *et al. Methods Mol Med*, 2005, **103**: 161
- [2] J. 萨姆布鲁克等。分子克隆实验指南, 第3版, 北京: 科学出版社, 2003
- [3] Sharkey A. *Rev Reprod*, 1998, **3**: 52
- [4] Velculescu VE *et al. Science*, 1995, **270**: 484
- [5] Hauser MA *et al. Hum Mol Genet*, 2003, **12**: 671
- [6] Saha S *et al. Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 508

Construction of a LongSAGE Library of Mouse Endometrium during Implantation

Yi-Min Xu, Jun-Lin He, Xue-Qing Liu, Xiao-Yun Liu, Xue-Mei Chen, Ying-Xiong Wang*
(School of Public Health, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract According to the principle of LongSAGE library construction, we have constructed the LongSAGE library through several procedures, such as total RNA isolation from mouse endometrium, cDNA synthesis, 130 bp ditag formation, amplification of ditags, isolation of the 34 bp ditags, concatemer formation, cloning the concatemers into pZErO[®]-1, transformation. It is verified that the positive ratio of constructed LongSAGE library is 100% and the length of inserting fragments is more than 400 bp. These results suggest that the LongSAGE library of mouse endometrium during implantation is successfully generated.

Key words mouse; endometrium; implantation; LongSAGE library

Received: October 28, 2005 Accepted: February 5, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30270510), Chongqing Science Technology Commission (No.7668) and Chongqing Population and Family Planning Commission (No.2005-001)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485001, E-mail: wyx61221@yahoo.com.cn