

# 在小鼠发育过程中线粒体基因组新型 R 环的表达

李继霞 李胜利 孟霞 刘一农 王钜\*

(首都医科大学实验动物科学系, 北京 100069)

**摘要** 本实验室在成年小鼠线粒体 DNA(mtDNA)D 环上发现了一个新颖的轻链 RNA 转录本, 这个 RNA 能够同 DNA 双链结合, 形成一个稳定的 DNA-RNA 杂合结构(R 环)。在此基础上, 利用 RT-PCR 和 Northern 印迹法检测了小鼠线粒体基因组中 R 环的时空表达的特点。发现 R 环在小鼠不同组织、不同发育阶段中的表达水平有差异, 其表达模式具有分化的位相性和时序性, 提示 R 环有可能作为参与调控线粒体基因表达的分子, 因而具有重要意义。

**关键词** 线粒体; 线粒体 DNA; D 环; R 环

线粒体是细胞核外唯一含有 DNA 结构的细胞器, 具有母性遗传的特点, 在细胞生命活动中发挥多种功能, 如能量代谢、维持钙铁离子稳态、信号转导、细胞凋亡, 还在原血红素、脂质、氨基酸和核酸生物合成及代谢过程中起作用。因此, 线粒体可能在不同水平层面上影响胚胎发育如纺锤体形成、染色体分离和细胞周期调控等<sup>[1]</sup>。

近来, 有报道线粒体 DNA(mtDNA)拷贝数的减少及突变可能影响卵子受精及胚胎成活和发育, 除此之外, 与衰老和疾病也有一定的关系<sup>[2,3]</sup>。mtDNA 为一双链闭合环状分子, 除了编码多肽、rRNA 和 tRNA 基因外, 还包含一段连续的非编码控制区也称为 D 环。D 环存在于转运 RNA 脯氨酸(tRNA<sup>Pro</sup>)和苯丙氨酸(tRNA<sup>Phe</sup>)之间, 有一条单链的替代重链 DNA 同双链 DNA 结合形成三链的 D 环结构, 在 D 环含有 mtDNA 重链和轻链转录启动子和重链复制子, 在 mtDNA 的复制与转录中起着重要的作用<sup>[4-6]</sup>。Lee 等<sup>[7-9]</sup>在小鼠线粒体中发现了 DNA-RNA 杂合体(R 环)的存在, 杂合体中的 RNA 是重链复制引物 RNA, 表明线粒体的 D 环内存在着三链的 D 环结构和三链的 R 环结构。一般认为 D 环的轻链既不包含有意义的开放阅读框, 也没有稳定的重链 RNA 转录本存在<sup>[5,10,11]</sup>。然而, 黄朝峰等<sup>[12]</sup>在 mtDNA 上发现了一种新型稳定的 R 环结构, 该结构是由 D 环轻链 RNA(DL-RNA)与 D 环双链 DNA 相结合而形成的三链杂合体, 推测其可能在 mtDNA 复制和转录中扮演了重要角色。本研究在上述研究的基础上, 对新型 R 环的表达模式进行研究, 发现 R 环在不同组织、不同发育阶段中的表达水平有差异, 提示 R 环有可能作为参与调控线粒体基因表达的分子, 因而具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂 孕马血清促性腺激素(PMSG)购自天津华孚生物公司, 透明质酸酶、M<sub>2</sub> 和 M<sub>16</sub> 培养基购自 Sigma 公司, MEM 培养基购自 Gibco 公司, Tris 购自 Promega 公司, DTT 和 EB 购自 Amresco 公司, 动物细胞基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 快速纯化试剂盒、随机引物标记试剂盒和引物购自北京鼎国生物公司, M-MLV 逆转录酶购自 Gibco 公司, AMV 逆转录酶购自 Roche 公司, Taq 酶购自 TaKaRa 公司, 工具酶 DNase I、RNase A 购自 Promega 公司, TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司, Hybond-N<sup>+</sup> 尼龙膜购自 Amersham 公司, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dCTP 购自北京福瑞公司, 其他试剂为国产分析纯。

1.1.2 动物 C57BL/6J 小鼠购自首都医科大学实验动物科学部。

### 1.2 方法

1.2.1 小鼠卵子和早期胚胎的获得 超排: 腹腔注射 10 IU PMSG, 48 h 后注射 10 IU 人绒毛膜促性腺激素(HCG)。HCG 注射后 14~16 h 采集卵子, 用 0.1% 透明质酸酶消化卵丘细胞。用于采集早期胚胎的母鼠则在注射 HCG 后与公鼠 1:1 合笼过夜, 次日清晨挑选有阴道栓的母鼠单独饲养, 记为妊娠 0.5 天, 在妊娠第 1 和 3.5 天, 采集 2 细胞胚胎和囊胚, 将消化后的卵子和胚胎在灭菌 3 蒸水液滴中洗涤 3 次后, 备用。

1.2.2 小鼠卵子和早期胚胎扩增模板的制备 在离心管中加入含有 5 个小鼠卵子或早期胚胎的 10  $\mu$ l

收稿日期: 2007-05-21 接受日期: 2007-06-27

北京市科委 248 重大创新工程项目: 方法学动物模型的标准化研究(No.H020220050390)

通讯作者: Tel/Fax: 010-83911316, E-mail: wangju53@263.net

灭菌三蒸水, 再加入 10  $\mu$ l 裂解液(20 mmol/L KOH, 50 mmol/L DTT), 65  $^{\circ}$ C 水浴 20 min, 最后加入 10  $\mu$ l 中和液(900 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 300 mmol/L KCl, 200 mmol/L HCl)中止反应。在上述管中加 1  $\mu$ l RNase A, 37  $^{\circ}$ C 温育 20 min, 用 2% SDS 终止反应, 酚-氯仿抽提, 乙醇沉淀, 得到了 16  $\mu$ l DNA 模板。在 DNA 模板中再加入 2  $\mu$ l DNase I, 2  $\mu$ l 10 $\times$  缓冲液 A, 37  $^{\circ}$ C 温育 20 min, 65  $^{\circ}$ C 保温 20 min, 酶切后得到的 RNA 作为逆转录模板使用。

**1.2.3 小鼠 10 天胚胎的获得** 将 6~8 周龄雌鼠与 8 周龄雄鼠按 1:1 比例合笼, 每天清晨观察雌鼠阴道口, 有阴道栓者即认定为怀孕 0.5 天。至妊娠 10 天用乌拉坦(5 ml/kg)腹腔麻醉, 常规消毒, 于无菌条件下取孕鼠子宫, 于 PBS 液中反复冲洗, 去除血污, 剪开子宫壁取出胚胎, 用 PBS 液反复冲洗, 备用。

**1.2.4 DNA 的提取及模板的制备** 2 月龄小鼠过量乙醚麻醉处死, 取出肝脏后用 PBS 液反复冲洗, 备用。剪碎组织, 然后应用动物组织基因组 DNA 提取试剂盒分别提取 10 天胚胎和 2 月龄小鼠 DNA, 再经 DNase I 酶切后, 得到的 RNA 作为逆转录模板使用。

**1.2.5 RNA 逆转录和 PCR** 引物为: pB: 5'-cat taa atc atc aat ggt tca-3'; pD: 5'-aat ttg gta ttg agt agc at-3', 长度为 577 bp<sup>[12]</sup>。应用 20  $\mu$ l 逆转录体系, 取 13  $\mu$ l 酶切过的模板于 0.2 ml 离心管中, 65  $^{\circ}$ C 保温 7.5 min, 离心数秒, 放置冰浴中, 然后依次加入 4  $\mu$ l 5 $\times$  逆转录缓冲液, 1  $\mu$ l 50 ng/ $\mu$ l 随机引物, 1  $\mu$ l 10 mmol/L dNTP, 40 U/ $\mu$ l M-MLV 和 5 U/ $\mu$ l AMV 逆转录酶混合物 1  $\mu$ l。室温放置 10 min, 37  $^{\circ}$ C 保温 30 min, 95  $^{\circ}$ C 5 min, 4  $^{\circ}$ C 2.5 min 后, 即刻使用或 -20  $^{\circ}$ C 长期冻存储存。采用 25  $\mu$ l PCR 反应体系, 2.5  $\mu$ l 10 $\times$  缓冲液, 0.5  $\mu$ l 10 mmol/L dNTP, 0.5  $\mu$ l 2 u/ $\mu$ l Taq 酶, 10  $\mu$ mol/L 引物各 1  $\mu$ l, 2  $\mu$ l 逆转录反应产物, 灭菌双蒸水补足 25  $\mu$ l。扩增条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 35 个循环(95  $^{\circ}$ C 45 s, 55  $^{\circ}$ C 55 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min), 72  $^{\circ}$ C 10 min。取 8  $\mu$ l PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 用凝胶成像系统检查拍照。

**1.2.6 总 RNA 提取及半定量 RT-PCR** 小鼠卵子及早期胚胎的收集方法同上。收集 50 个卵子、50 个 2 细胞胚胎、50 个囊胚和 10 天胚胎后, 按 TRIzol 试剂说明书, 分别提取总 RNA; 24 h 新生小鼠和 2 月龄小鼠用过量乙醚麻醉处死, 取 100 mg 肝脏、心脏、肾脏、脾脏和脑组织, 用 1 ml TRIzol 试剂分别提取总 RNA; 核酸蛋白仪(Bio-Rad)定量。取 1  $\mu$ g 总 RNA 样品进行逆转录和 PCR 反应, 方法同上。R

环引物为: 5'-cat taa atc aat ggt tca-3'(重链引物 B); 5'-aat ttg gta ttg agt agc at-3'(轻链引物 D), 长度为 577 bp。细胞色素 *b*(Cyt *b*)引物为: 5'-att gac cta cct gcc cca tc-3'; 5'-ctc gtc cga cat gaa gga at-3', 长度为 247 bp。电泳图像经分析软件处理。因为同管扩增会产生杂带, 所以采用异管同时扩增 R 环和 Cyt *b*。

**1.2.7 Northern 印迹** 15  $\mu$ g RNA 通过 0.8% 的 1 $\times$ 3-丙磺酸(MOPS)琼脂糖凝胶电泳分离, 恒压 50 V, 电泳 1 h。RNA 在 0.05 mol/L NaOH 溶液中转印过夜至 Hybond-N<sup>+</sup> 尼龙膜上, 转印后的膜直接用于杂交。PCR 法合成 R 环和 Cyt *b* 探针, 采用 DNA 快速纯化试剂盒纯化 PCR 产物, 又利用随机引物标记试剂盒标记探针。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  标记探针后, 沸水浴 10 min 使探针变性, 然后加入到杂交液中和转印膜进行杂交, 42  $^{\circ}$ C 放置 10 h。杂交结束后, 根据具体情况在不同的温度下对杂交膜进行漂洗, -70  $^{\circ}$ C 放置 2 天进行放射自显影。将尼龙膜浸泡于 0.1% SDS 溶液中, 80  $^{\circ}$ C 漂洗 2 次, 然后按上述步骤进行第二次杂交。

## 2 结果

### 2.1 R 环表达水平随着小鼠发育逐渐增高

图 1 电泳结果显示, 小鼠卵子、2 细胞胚胎、囊胚和 10 天胚胎中均有 R 环的表达, 为了探讨 R 环的

	5	4	3	2	1	M
样品	DNA/RNA					
酶切1	A	A	A	A	A	A
酶切2	D	D	D	D	D	D
逆转录	+	+	+	+	+	-

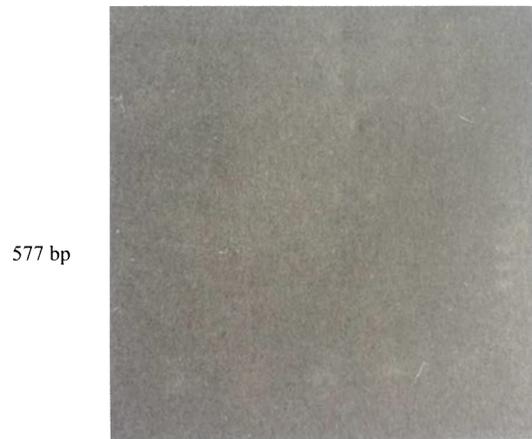


图 1 小鼠线粒体基因组中新型 R 环的扩增图

M: marker; 1: 卵子; 2: 2 细胞胚胎; 3: 囊胚; 4: 10 天胚胎; 5: 2 月龄小鼠; A: RNase A; D: DNase I; +: 以随机引物行逆转录; -: 未处理。

表达量是否与小鼠发育有关, 因此, 进一步做了半定量 RT-PCR 来检测不同发育时期小鼠 mtDNA R 环表达量的变化。首先提取了总 RNA, 然后进行 RT-PCR, 发现在卵子、2 细胞胚胎、囊胚、10 天胚胎和 2 月龄小鼠线粒体 DNA 上都有 R 环的表达, 表达量随着小鼠发育而增高, Northern 进一步证实了这个结果(图 2)。

## 2.2 R 环在小鼠不同器官的表达水平存在差异

图 3 的结果表明, 在小鼠心脏、肝脏、脾脏、肾脏和脑组织中均有 R 环的表达, 组织不同, 表达量也各不相同。通过检测 24 h 新生小鼠和 2 月龄小鼠发现, R 环在肾脏中的表达量高于在其他脏器组织中的表达, 脑组织的表达水平仅次于肾脏; 2 月龄小鼠各脏器组织中的 R 环表达量显著高于 24 h 新生小鼠。

## 3 讨论

哺乳动物线粒体 DNA 的 D 环是其复制和转录的起始区域, 其中 D 环重链 RNA 与复制和转录功能密切相关, 但轻链 RNA 被认为没有重要的功能, 因此几乎没有有关 D 环的轻链 RNA 的研究。2003 年, 本实验室<sup>[12]</sup>揭示了一个轻链 RNA 存在于小鼠线粒体 D 环, 互补于 D 环的重链, 跨越了几乎整个 D 环, 它不能被 DNase I 和 RNase A 结合反应所消化, 但不能被两种酶单独作用消化, 用特异性的引物 B(重链引物)和 D(轻链引物)代替随机引物进行逆转录反应, 当用引物 D 为逆转录引物时, 能得到扩增产物, 而用引物 B 不能得到相应条带。这个 RNA 转录本并且能够耐受 RNase A 和 RNase T1 酶的切割, 但对 RNase H 酶敏感。在这种 RNA 存在的情况下, D 环的 DNA 不能

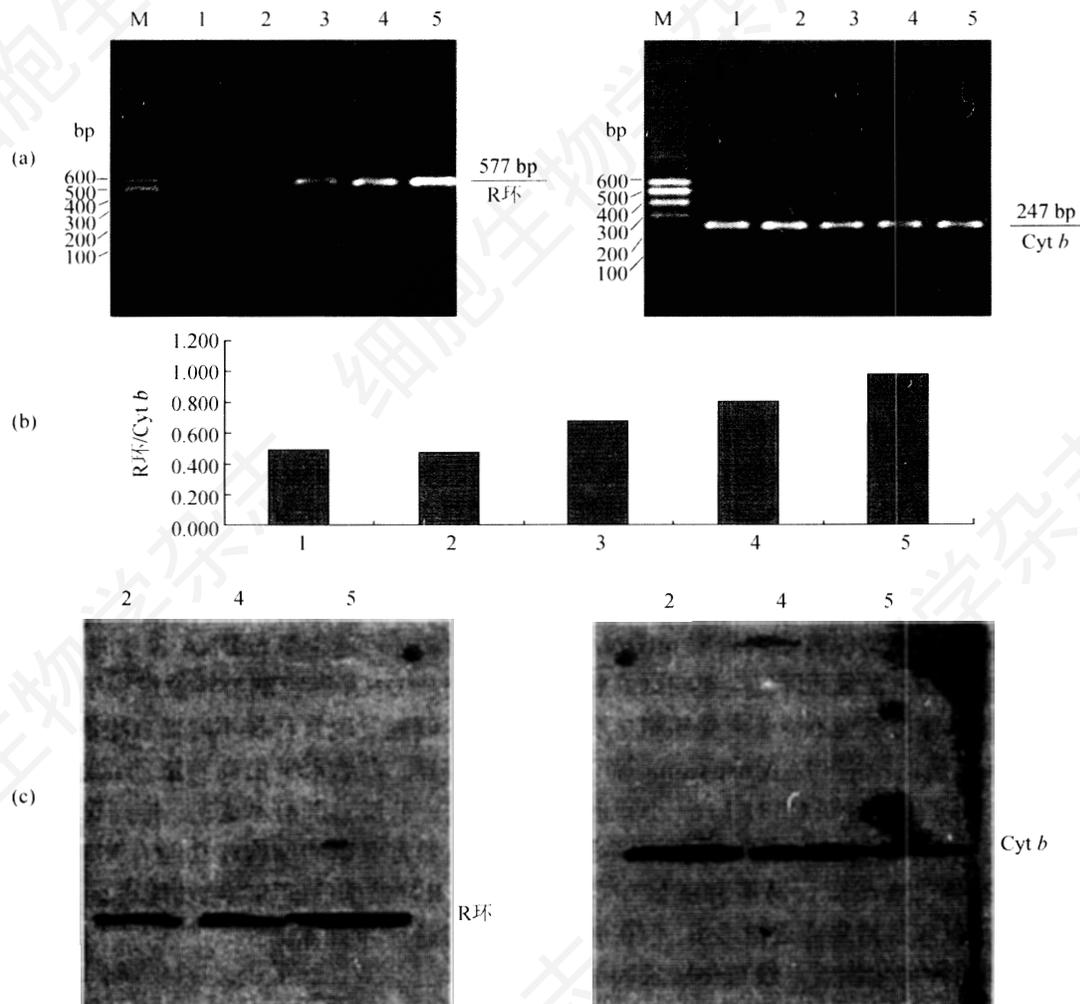


图 2 R 环在小鼠不同发育时期的表达

M: marker; 1: 卵子; 2: 2-细胞胚胎; 3: 囊胚; 4: 10 天胚胎; 5: 2 月龄小鼠; a: 半定量 RT-PCR 扩增 R 环电泳图; b: 光密度比值柱形图; c: Northern 印迹检测 R 环表达量的变化。

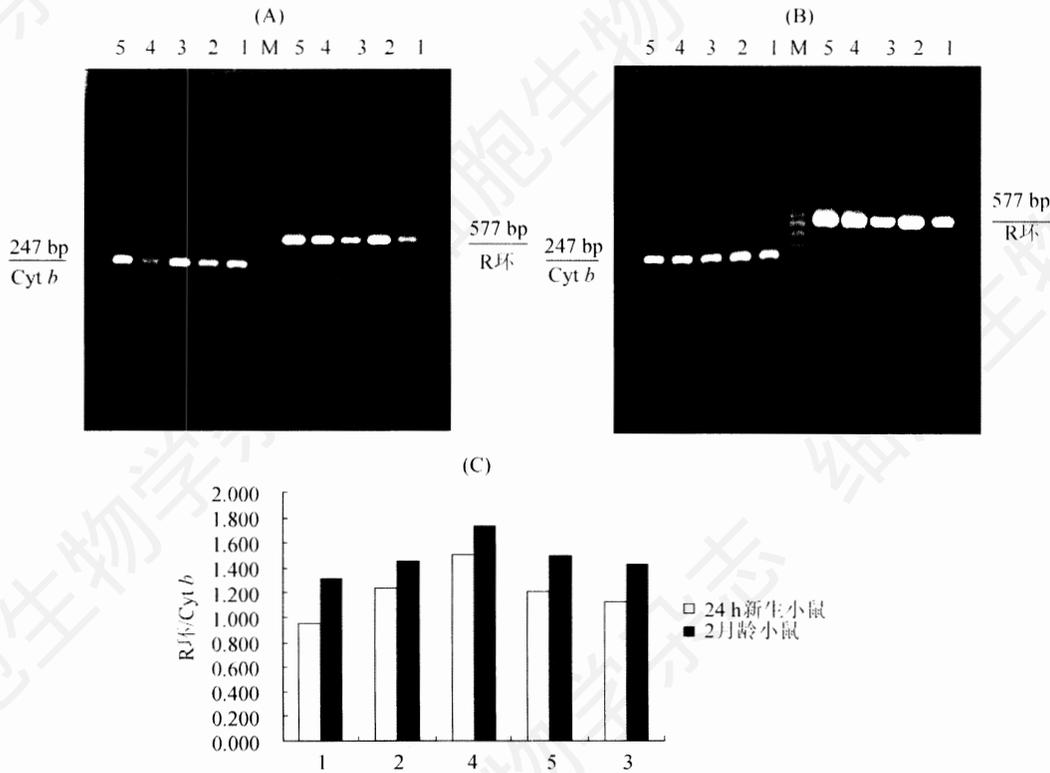


图3 R环在小鼠不同组织中的表达

M: marker; 1: 心脏; 2: 肝脏; 3: 脾脏; 4: 肾脏; 5: 脑组织; a: 24 h 新生小鼠; b: 2月龄小鼠; c: 半定量柱形图。

被 HaeIII 酶切割。这些发现说明这个新颖的轻链 RNA 能够同 D 环的 DNA 形成三链结构。线粒体基因组是基因组结构中最紧凑的典范, mtDNA 每一部分均有其特定的功能, 因此在 D 环存在一个多余的 RNA 结构必然有其意义。本研究取得了一致性的结果, 证实小鼠的早期胚胎及成年小鼠的重要脏器组织中都存在有这个轻链 RNA 转录本。

mtDNA 含量的变化及突变与卵子受精、胚胎发育、衰老和疾病等有关<sup>[13]</sup>。有研究表明 mtDNA 的缺失及含量减少和 ATP 含量的降低会影响到细胞的新陈代谢, 这是造成卵母细胞不能正常受精和早期胚胎发育停滞的最直接的原因<sup>[14]</sup>。Masuyama 等<sup>[15]</sup>利用实时 PCR 对不同发育时期 C57BL/6J 小鼠的 mtDNA 含量进行了分析, 结果显示 mtDNA 含量因小鼠不同发育时期而异; 在心脏、肾脏和脾脏中的 mtDNA 含量随着小鼠年龄增加而逐渐增多, 但在脑组织中并没有观察到这种变化模式。线粒体转录因子 A(mtTFA)和线粒体单链 DNA 结合蛋白(mtSSB)是 mtDNA 含量的调控因子, 因此对不同发育时期的 mtTFA 和 mtSSB 进行定量分析, 发现这两个分子表达水平与 mtDNA 含量变化无必然联系, 所以推测可

能还存在其他因素来调控 mtDNA 含量。本研究结果发现 R 环的表达水平因 C57BL/6J 小鼠不同发育时期而异, 随着小鼠生长发育其表达水平逐渐增高, 说明 R 环的表达水平可能与小鼠发育、衰老过程有关; R 环的表达与 mtDNA 含量的变化模式在时间上具有一致性即都随着小鼠发育逐渐增高, 而且 R 环又位于线粒体基因组的复制控制区(D 环), 该区即是 mtDNA 的信息交换区又是 mtDNA 的复制转录调控区, 这提示我们 R 环可能也是 mtDNA 含量的调控因子, 参与到调控 mtDNA 的复制与转录过程中。

本研究发现 R 环在不同器官组织中的表达水平也有差异, 表达水平由高到低的组织依次为肾脏、脑组织、肝脏、脾脏和心脏, 推测这种差异的产生可能与器官组织的结构和功能有关。迄今为止, 我们对于 R 环结构的确切生物功能还不十分清楚, 这需要我们进一步探索。

#### 参考文献(References)

- [1] May-Panloup P *et al. Reprod Biol Endocrinol*, 2005, **3**: 65
- [2] Van Blerkom J. *Reproduction*, 2004, **128**: 269
- [3] Khaidakov M *et al. Mutat Res*, 2003, **526**: 1

- [4] Shadel GS et al. *Annu Rev Biochem*, 1997, **66**: 409  
[5] Clayton DA. *Hum Reprod*, 2000, **15**: 11  
[6] Kasamatsu H et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, **68**: 2252  
[7] Lee DY et al. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 24262  
[8] Lee DY et al. *Genes Dev*, 1997, **11**: 582  
[9] Lee DY et al. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 30614  
[10] Chang DD et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 351  
[11] Clayton DA. *Ann Rev Biochem*, 1984, **53**: 573  
[12] 黄朝峰等. *自然科学进展*, 2003, **13**: 517  
[13] Spikings EC et al. *Biol Reprod*, 2007, **76**: 327  
[14] 董为人等. *南方医科大学学报*, 2006, **26**: 1079  
[15] Masuyama M et al. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1723**: 302

## The Expression of a Novel R-loop in Mouse Mitochondrial DNA during Developmental Phase

Ji-Xia Li, Sheng-Li Li, Xia Meng, Yi-Nong Liu, Ju Wang\*

(Department of Laboratory Animal Science, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

**Abstract** A novel RNA species that is coded by and complementary to heavy-strand at the mtDNA D-loop region combines with DNA double strand, forming a stable DNA-RNA hybrid (R-loop) spanning the whole H-strand of D-loop region in mouse mtDNA. In this study, we detected the temporal-spatial expression pattern of R-loop in mouse mitochondrion by RT-PCR and Northern blot. An age-dependent increase of R-loop and the differences of R-loop among tissues were found. The differential spatial and temporal expression pattern of R-loop indicates that the biological function of R-loop might be a regulator to control mitochondrial genome expression.

**Key words** mitochondria; mitochondrial DNA; D-loop; R-loop

Received: May 21, 2007 Accepted: June 27, 2007

This work was supported by the Science and Technology Committee of Beijing (No.H020220050390)

\* Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-83911316, E-mail: wangju53@263.net