微卫星 DNA 分析证明异种克隆大熊猫重构胚的核来自大熊猫供体

丁波^① 施鹏^① 向余劲攻^① 张亚平^{①*} 陈大元^② 孙青原^② 李光鹏^②
王敏康^② 刘翼龙^② 康莉^② 韩之明^② 宋祥芬^② 李劲松^② 陈玉村^③

①中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室, 昆明 650223; ②中国科学院动物研究所计划生育与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080; ③福州大熊猫研究中心, 福州 350001. * 联系人, Email: zhangyp@public.km.yn.cn

摘要 建立了一种从早期囊胚中提取 DNA 以进行核内和核外 DNA 分析的方法. 用这种方法从异种克隆大熊猫重构胚中提取总 DNA, 以大熊猫特异的微卫星 DNA 引物成功地扩增出了微卫星座位 g^{010} . PCR 产物双向测序表明, 2 个重构胚与大熊猫供体对照序列完全一致. 结果证明该异种大熊猫重构胚的核的确来自大熊猫供体细胞核.

关键词 大熊猫 异种克隆 微卫星 DNA 细胞核

最近, 陈大元等人^[1]获得了来自大熊猫供体的异种重构胚, 相关实验表明, 3 种(骨骼肌细胞、子宫上皮细胞和乳腺细胞)组织来源的体细胞在去核兔卵质中均可去分化、恢复全能性和替代合子核进行卵裂, 并支持早期重构胚发育. 线粒体 DNA 序列分析证实, 重构胚中存在有大熊猫线粒体. 这一工作引起了国际学术界的关注^[2]. 体细胞克隆可以把某一个体的遗传物质完整地传递下去, 因而它对于保存并传播优良个体和珍稀濒危动物的基因组具有重大意义^[1]. 所以, 确定异种重构胚的核是否来自于供体的核就显得异常关键. 染色体核型分析证明重构胚细胞的染色体数目与供体大熊猫的相同, 与受体家兔的有异. 虽然线粒体 DNA 分析结果显示重构胚中存在有大熊猫的线粒体, 但尚缺乏核 DNA 水平的证据.

重构胚 DNA 分析的技术难点在于建立单胚的微量 DNA 提取技术. 我们前期的工作表明, 微卫星 DNA 具有高度的特异性, 是物种和个体鉴别十分有效的遗传标记^[3,4]. 本文通过大熊猫特异的微卫星 DNA 分析, 对上述问题进行了探讨.

1 材料与方法

(i) 供体阳性对照来源. 12 岁雌性成年大熊猫死后 30 min 内取子宫组织, 按常规苯酚-氯仿抽提方法提取总 DNA.

(ii) 阴性对照来源. 受体日本大耳白兔肌肉组织, 总 DNA 提取同上.

(iii) 微卫星 DNA 引物. 大熊猫特异性微卫星 DNA 座位引物序列 g^{010} 见文献[4].

(iv) 重构胚微卫星 DNA 提取. 取待鉴定重构胚一枚放入装有约 5 μ L 超纯水的 0.5 mL 微量离心管中, 加入等量的碱性裂解液(200 mmol/L KOH, 50 mmol/L 二硫苏糖醇), 65℃水浴 10 min. 加入 5 μ L 中和液(900 mmol/L Tris-HCl, pH = 8.3, 300 mmol/L KCl, 200 mmol/L HCl)后, 模板待用.

(v) 重构胚微卫星 DNA 扩增. 第 1 次 PCR 条件为 95℃预变性 3 min, 95℃变性 40 s, 50℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min. 共 25 个循环. 第 2 次 PCR 条件: 95℃预变性 3 min, 94℃变性 50 s, 57℃退火 1 min, 73℃延伸 30 s. 共 40 个循环. 反应用 50 μ L 体积, 其中加入 5 μ L

10×PCR buffer, 2 μL dNTPs (各 2.5 mmol/L) , 2 μL BSA, 各 1 μL 引物(10 μmol/L), 1 μL Taq 酶 (3 U/μL), 2 μL 模板, 用双蒸水补足 50 μL.

(vi) 微卫星 DNA 序列测定. PCR 反应产物经回收纯化后直接在 ABI 377 全自动 DNA 测序仪(Perkin-Elmer)上进行. 正反链同时测定以保证结果的可靠性.

2 结果与分析

经过优化 PCR 条件后, 我们成功地从 1 号和 2 号两个重构胚及供体大熊猫阳性对照 DNA 中扩增出了微卫星座位 g^{010} . 受体阴性对照和无模板 DNA 阴性对照均没有扩增产物. PCR 结果见图 1.

1 号、2 号重构胚和阳性对照 PCR 产物经序列分析后均得到 133 bp 长的产物, 3 个样品序列完全一致. 序列分析结果见图 2.

图 1 大熊猫微卫星座位 g^{010} 的 PCR 扩增
1—— 阴性对照, 2—— 受体阴性对照,
3—— 供体阳性对照, 4—— 重构胚 1,
5—— 重构胚 2

	5' 引物	50
大熊猫	(GTTGCTCAAA GTTGACTTGA TGC)TATACAT GTACATGGAT ATATATACAT GCATATGTGT	
重构胚 1	(GTTGCTCAAA GTTGACTTGA TGC)TATACAT GTACATGGAT ATATATACAT GCATATGTGT	
重构胚 2	(GTTGCTCAAA GTTGACTTGA TGC)TATACAT GTACATGGAT ATATATACAT GCATATGTGT	
		100
大熊猫	ATACACACAC ACACATACAT TATGGATATA TTTATCTGCA CAGACATAAA (GAAAAATTAA	
重构胚 1	ATACACACAC ACACATACAT TATGGATATA TTTATCTGCA CAGACATAAA (GAAAAATTAA	
重构胚 2	ATACACACAC ACACATACAT TATGGATATA TTTATCTGCA CAGACATAAA (GAAAAATTAA	
	3' 引物	133
大熊猫	GCCTGGCAGC CTA)	
重构胚 1	GCCTGGCAGC CTA)	
重构胚 2	GCCTGGCAGC CTA)	

图 2 大熊猫微卫星座位 g^{010} 序列
括号内为引物序列, 大熊猫为供体阳性对照, 重构胚 1 和 2 为囊胚期重构胚

3 讨论

1997 年以来, 随着体细胞克隆羊“多莉”的诞生, 同种克隆在 小鼠^[5]、牛^[6]等其他动物上相继获得成功. 但对于种群数量稀少的珍稀濒危动物大熊猫来说, 由于受体卵母细胞很难获得, 因此异种克隆成为更加可行的探索. 随之而来的问题是: 当获得了早期重构胚后, 要确定新生核是来自供体大熊猫的核还是受体兔的核, 即要证明是大熊猫的体细胞核支持了早期胚胎发育. 在我们早期的工作中, 已经从大熊猫基因组文库中分离克隆出了大熊猫特异的微卫星 DNA 座位, 为本研究奠定了基础. 由于微卫星 DNA 座位属于核基因特异标记, 我们克隆获得的大熊猫微卫星序列具有一定的变异度, 即使在同一科的不同物种间也存在碱基取代的差异, 同种不同个体间主要为序列长度的差异. 这种 DNA 序列具有显著的物种鉴别性. 同时, 相应的引物也很难在远缘物种中扩增^[3, 4], 因此只要能够扩增出相应的 PCR 产物, 并鉴定确实

是该微卫星座位,便可从分子水平证明重构胚的核是来自供体大熊猫的核,而排除了来自受体兔卵的可能. 本实验成功地从两个重构胚中扩增出了大熊猫特异微卫星 DNA 座位 g^{010} , 经序列分析证实与供体大熊猫的完全一致. 因此,这两个重构胚的核是来自供体大熊猫体细胞的核.

我们曾用来自大熊猫的线粒体 DNA 引物从相应的重构胚中得到了扩增产物,通过序列分析并与供体大熊猫和大熊猫群体的比较^[7],证明重构胚中存在供体大熊猫的线粒体 DNA,但尚不能排除供体细胞与受体卵线粒体在胚胎发育中共存的可能性. 本实验结果进一步证实了重构胚的核的确来自供体,为重构胚中线粒体的变化规律及其机制的研究奠定了基础.

在重构胚的分子鉴定中,建立有效的微量 DNA 提取分析技术是十分关键的. 我们尝试了多种方法,结果均不理想. 通过反复的摸索,终于建立了一种从早期胚胎中提取 DNA 并进一步进行核内和核外 DNA 分析的简洁有效方法. 实验操作便利,所用的均为最常见的试剂,因此本实验方法有一定的推广普及潜力.

致谢 本工作为科学技术部重点科技资助项目.

参 考 文 献

- 1 陈大元,孙青原,刘冀琰,等. 大熊猫供核体细胞在兔卵胞质中可去分化而支持早期重构胚发育. 中国科学, C 辑, 1999, 29(3): 324~330
- 2 News in brief. Cloning giant pandas comes a step closer. Nature, 1999, 400: 10
- 3 Zhang Y P, Ryder O A, Fan Z Y, et al. Non-invasive giant panda paternity exclusion. Zoo Biol, 1994, 13: 569~573
- 4 张亚平, 王 文, 宿 兵, 等. 大熊猫微卫星 DNA 的筛选及其应用. 动物学研究, 1995, 16(4): 301~306
- 5 Wakayama T, Perry A C F, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature, 1998, 394: 369~374
- 6 Kati Y, Tani T, Sotomaru Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. Science, 1998, 282: 2095~2098
- 7 张亚平, Ryder O A, 范志勇, 等. 大熊猫 DNA 序列变异及其遗传多样性研究. 中国科学, C 辑, 1997, 27(2): 139 ~ 144

(1999-10-25 收稿, 2000-03-22 收修改稿)