

蒙古牛 *BMPRI*B 基因 mRNA 在 卵巢组织中的表达研究

王 峰^{1,2}, 刘永斌^{1,2}, 荣威恒^{1,2}, 田春英², 达 赖²

(1 内蒙古农业大学 动物科学与医学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2 内蒙古农牧业科学院, 内蒙古 呼和浩特 010030)

摘要: 为阐明 *BMPRI*B 基因在牛的卵泡发育和分化中的作用及其分子机理, 首先根据其他物种 *BMPRI*B 基因的保守序列设计特异性引物, 从蒙古牛卵巢中提取总 RNA, 采用 RT-PCR 技术扩增出蒙古牛 *BMPRI*B cDNA 序列; 将此片段克隆到 pGM-T 载体中, 提取重组质粒, 经 PCR 鉴定和 DNA 序列测定分析验证; 符合 BMP 家族基因结构特征, 然后根据此序列构建 cRNA 探针, 利用原位杂交技术检测牛卵巢 *BMPRI*B 基因 mRNA 的表达情况。原位杂交结果显示, 牛 *BMPRI*B 基因, 在初级卵泡和次级卵泡早期表达, 在颗粒细胞中表达, 在次级卵泡晚期也有表达。

关键词: 牛; *BMPRI*B; RT-PCR; 原位杂交

中图分类号: S823 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000- 7091(2008)05- 0058- 04

Study on the Expression of *BMPRI*B mRNA Mongolian Cattle Ovary

WANG Feng^{1,2}, LIU Yong-bin^{1,2}, RONG Wei-heng^{1,2}, TIAN Chun-ying², DA Lai²

(1. College of Animals Science and Medicine, Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010018, China; 2. Inner Mongolia Academy of Animal Sciences, Huhhot 010030, China)

Abstract: Specific primers was designed by conserver sequence of the other animals, total RNA was extracted from ovary of cow and the cDNA encoding cow *BMPRI*B was amplified by the reverse transcription PCR (RT-PCR), then the purified RT-PCR product was cloned into PMD18-T vector. The results of PCR analysis of recombinant plasmid and DNA sequencing demonstrated that the cow *BMPRI*B was belong to the family of bone morphogenetic protein, *BMPRI*B mRNA was specialized expressed in cow fore primary and secondary follicle and follicle granulose cell, and expressed terminal secondary follicle by using situ hybridization.

Key words: Mongolian cow; *BMPRI*B; RT-PCR; In situ hybridization

哺乳动物卵泡的生长发育是一个由许多激素和各种生长因子共同调节的复杂生理过程。尽管促性腺激素(FSH 和 LH)在卵泡后期的生长发育过程中起着重要作用^[1-3], 然而许多研究表明卵泡发育的起始并不受其直接调控。而卵泡内自身产生的生长因子可能在早期卵泡发育的启动与维持过程中起重要作用^[4]。

鉴于 *BMPRI*B 在卵泡发育过程中的重要调节作用, 本试验克隆了牛 *BMPRI*B 成熟肽编码区基因的 cDNA 序列, 并通过组织原位杂交检测其在卵巢内的表达情况。为进一步阐明 *BMPRI*B 在哺乳动物生殖生理过程中发挥作用的分子机制和生物学功能提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验动物及其组织

成年蒙古牛卵巢采自内蒙古黑城子示范牧场。牛屠宰后立刻刮取卵巢组织, 一部分于液氮中冷冻供总 RNA 提取用, 另一部分投入 4% 多聚甲醛溶液固定后制成石蜡包埋块备用。

1.2 试剂

RNA 提取试剂 Trizol 购于 GIBCO 公司; 反转录试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、凝胶 DNA 回收试剂盒、DNA Marker DL2000(分子量为 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp), X-Gal 和 IPTG 均购自宝生物工程(大连)公司; pGM-T 连接试剂盒、T7 引物和 SP6 引物购于 TIANGENE

收稿日期: 2008- 05- 11

基金项目: 畜禽种质资源平台项目(2005DKA21101); 内蒙古自然科学基金项目(200607010410)

作者简介: 王 峰(1972-), 男, 内蒙古托克托人, 副研究员, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖方面的研究。

通讯作者: 刘永斌(1977-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 助理研究员, 博士, 主要从事分子遗传学与牛羊育种方面的研究。

公司; 地高辛 RNA 标记试剂盒(T7/SP6)和地高辛核酸检测试剂盒购于 Roche 公司。

1.3 PCR 引物的设计及合成

根据 GenBank 中哺乳动物一羊和小鼠的 *BMPRII* 基因序列, 利用计算机软件 DNASTAR(Lasergene 5.01) 进行基因序列的相似性比对得出这些序列的保守区, 根据该 cDNA 保守区和引物设计原则设计一对 PCR 引物, 引物序列如下:

引物序列: P1: 5'-TCAGACGGTGTGATGAGGCATGA-3'; P2: 5'-AAGCCAGGTCAGCTATACAGCAA-3'。

预扩增片段约长 400 bp。

1.4 总 RNA 的提取

牛卵巢总 RNA 的提取主要参照文献[5] 中 Trizol 法进行。最后用无 RNase 去离子水溶解 RNA 沉淀, -70℃保存备用。

1.5 RT-PCR 反应

RT-PCR 反应液的组成: 8 μL 总 RNA(约 800 ng 总 RNA), 10 μL 5× 反应缓冲液, 2 μL 25 mmol/L MgCl₂, 1 μL dNTP, 1 μL AMV 反转酶(5 U/μL), 1 μL Taq DNA 酶(5 U/μL), 50 pmol 上游引物, 50 pmol 下游引物, 加无 RNase 去离子水至 50 μL。另外设一个阴性对照, 即在 RT-PCR 反应液中不加反转录酶 AMV, 以排除 RT-PCR 产物是基因组 DNA 的扩增产物。

用引物 P1、P2 扩增目的基因 cDNA 序列。反应条件如下: 45℃ 保温 45 min, 使 RNA 逆转录为 cDNA; 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 预变性 1 min; 94℃ 30 s, 47.5℃ 30 s, 72℃ 2 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。

1.6 目的基因的克隆与鉴定

按 PCR 产物纯化试剂盒先对 RT-PCR 扩增产物纯化, 然后用 T4 DNA 连接酶将纯化的 *BMPRII* 基因 cDNA 片段与 pGM-T 载体(含 T7 和 SP6 启动子) 连接, 产物转化宿主菌 DH5α 感受态细胞, 涂布含氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的 LB 选择平板上。从转化平板挑取白色菌落, 经培养后进行菌落 PCR 鉴定。将鉴定正确的阳性重组子送宝生物(大连) 工程公司进行序列测定。

1.7 探针模板的制备

用 PCR 产物作为探针标记的模板。以“1.5”中 P1、P2 引物扩增产物(400 bp) 的重组质粒为模板, 用 T7 和 SP6 引物再进行 PCR 扩增, 产生两端带有 T7 和 SP6 启动子的线性 DNA(约 600 bp), 以此 DNA 作为探针合成的模板。PCR 反应体系及条件如下: 5 μL 10× Buffer(含 Mg²⁺), 8 μL dNTP(2.5 mmol/L), 2 μL T7 引物(10 μmol/L), 2 μL SP6 引物(10 μmol/L), 5 ng 质粒 DNA, 0.5 μL Taq DNA 酶(5 U/μL), 加灭菌

水至 50 μL。94℃ 预变性 2 min; 94℃ 30 s, 46.5℃ 30 s, 72℃ 2 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 切下 600 bp 处条带, 用凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化。

1.8 地高辛标记

按照地高辛 RNA 标记试剂盒说明进行。以胶回收后的线性 DNA 为模板, 用 T7 和 SP6 RNA 聚合酶分别合成地高辛标记的反义和正义 *BMPRII* cRNA 探针。-70℃保存备用。

1.9 原位杂交

将包埋好的牛卵巢组织切成 9 μm 连续切片若干张, 在 DEPC 水中展片, 裱于粘附剂处理过的载玻片上, 42℃ 烤 4 h 以上; 切片经二甲苯脱蜡, 梯度酒精复水, 1× PBS 冲洗后, 用 25 μg/mL 蛋白酶 K 37℃ 消化 30 min, 0.1 mol/L 甘氨酸 10 min 终止蛋白酶 K 的消化; 1× PBS 冲洗, 入 0.25% 乙酰胺(0.1 mol/L 三乙醇胺配制) 去电荷处理; 2× SSC 冲洗, 滴加 50% 去离子甲酰胺于每张切片, 在加有 2× SSC 的湿盒中 45℃ 预杂交 30 min; 倾去预杂交液滴加 25 μL 杂交液(50% 去离子甲酰胺、10% 葡聚糖硫酸酯、1× Denhardt's 溶液、10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 0.3 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA pH8.0, 10 mmol/L 变性鲑精 DNA, 约 500 ng/mL 变性探针) 于每张切片, 2× SSC 湿盒中 45℃ 杂交过夜; 37℃ 下 SSC 梯度系列洗涤, 20 μg/mL RnaseA 37℃ 消化 30 min, 0.1× SSC 40℃ 洗涤 2 次; 洗涤液内停留片刻后滴加封闭液孵育 30 min, 抗体液 37℃ 孵育 2 h; 洗涤液冲洗, 探测液平衡, NBT/BCIP 显色液避光显色 14~16 h; TE 缓冲液终止显色反应, 梯度酒精脱水、伊红复染(70% 酒精、80% 酒精、90% 酒精、1% 伊红、95% 酒精、100% 酒精各 2 min), 二甲苯透明, 中性树脂封片, 镜检。设两组阴性对照: 杂交液中不加探针(空白对照) 和加正义探针, 其余步骤均与试验组相同。

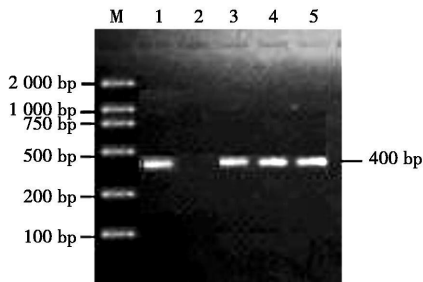
2 结果与分析

2.1 牛卵巢总 RNA 的制备

采用 Trizol 法获得总 RNA, 吸取 5 μL 做 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示, 28 s, 18 s 2 条带清晰明亮, 表明 RNA 完整性好。

2.2 目的基因的扩增

通过 RT-PCR 技术, 用引物 P1、P2 扩增出目的基因的 5' 端序列为 400 bp(图 1), 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析, 设阴性对照即不加反转录酶 AMV 的无扩增产物, 说明该扩增产物是以 mRNA 为模板扩增出来的。



1, 3~ 5. RT-PCR 产物; 2. 未加反转录酶 AMV 的阴性对照。
M. DL2000 DNA Marker; 1, 3~ 5. Product of RT-PCR;
2. Negative control without AMV.

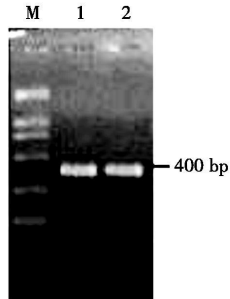
图 1 牛 *BMPRIB* RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳
Fig.1 Electrophoresis analysis of cow *BMPRIB* cDNA RT-PCR product

2.3 重组质粒的筛选和鉴定

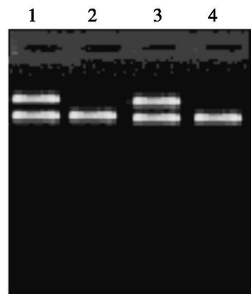
阳性克隆筛选的方法和原理见文献[5]。用 PCR 扩增法鉴定重组子, 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析, 结果见图 2, 表明成功克隆到了 *BM-PRIB* 基因。

2.4 牛 *BMPRIB* cRNA 探针的合成及标记

用 T7 和 SP6 RNA 聚合酶分别合成地高辛标记的反义和正义 *BMPRIB* cRNA 探针。用 DNase iv 消化以去除 DNA 模板。取 2 μ L 做 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果见图 3。



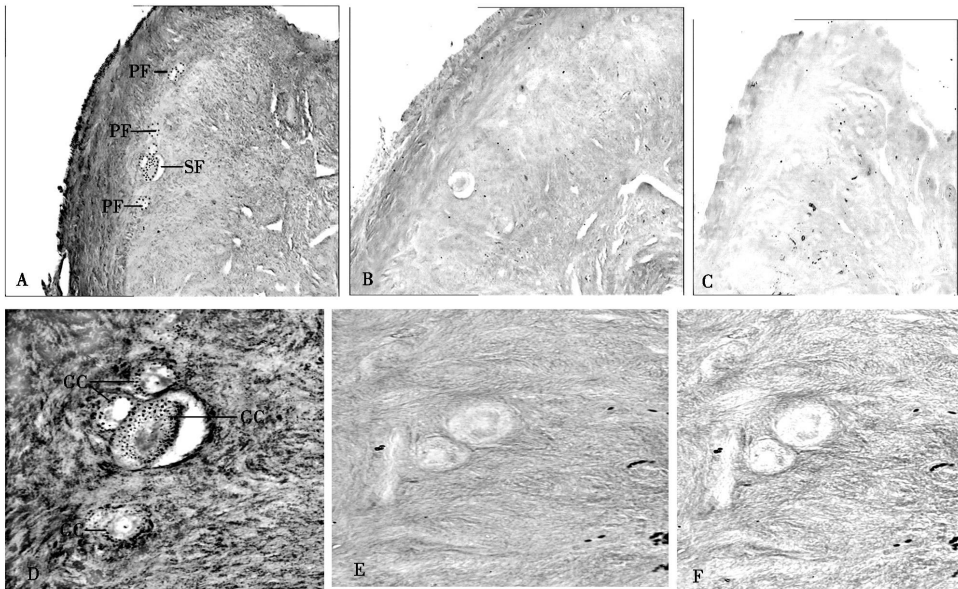
1, 2. PCR 鉴定结果。
M. DL2000 DNA Marker; 1, 2. PCR analysis of sequence.
图 2 重组质粒 *PMD18-T BMPRIB* 的菌落 PCR 鉴定分析
Fig.2 PCR electrophoresis analysis of recombinant plasmid (*PMD18-T Cow BMPRIB*)



1. 正义探针; 2. DNase iv 消化后的正义探针;
3. 反义探针; 4. DNase iv 消化后的反义探针。
1. Sense probe; 2. Sense probe after digesting with DNase iv;
3. Antisense probe; 4. Antisense probe after digesting with DNase iv.

图 3 探针电泳图

Fig.3 Electrophoresis analysis of probe



A. 初级和次级卵泡杂交结果; B. A 的空白对照; C. A 的正义对照; D. 接近成熟卵泡杂交结果; E. D 的空白对照; F. D 的正义对照。
A. Results of hybridization in primary and secondary follicles; B. Blank control of A; C. Control of A with sense probe; D. Results of hybridization in late secondary follicles; E. Blank control of D; F. Control of D with sense probe.

图 4 原位杂交结果

Fig. 4 In situ location of *BMPRIB* mRNA in bovine follicles

2.5 原位杂交

用地高辛标记的牛 *BMPRIB* cRNA 探针检测 *BMPRIB* mRNA 在卵巢内的表达部位及相对丰度。结果显示, *BMPRIB* 从初级卵泡阶段开始表达, 在卵

母细胞内有强阳性信号, 其他部位未见特异性信号。在初级卵泡和次级卵泡早期, 信号在卵母细胞内呈点状均匀分布(图 4-A), 而在次级卵泡晚期接近成熟时信号靠近卵母细胞膜周边(图 4-D)。同步进行

的阴性对照(空白对照和正义探针对照)均无信号,说明阳性信号是特异性杂交的结果。

3 讨论

不同的骨形态发生蛋白其表达方式和生理功能不同。从已经克隆的人、羊、小鼠的 *BMPRII* 基因的 DNA 序列以及在卵母细胞中的表达可以推测,该基因可能涉及到卵母细胞的增殖、分化的调节,该基因的突变或失活可能影响动物的繁殖性状。因此,开展对 *BMPRII* 基因的研究将有助于人们从基因的角度上阐明不育或多胎的形成和发展机制,对医学和畜牧业等领域将产生积极的影响。

我们根据已发表的人、小鼠和绵羊等 *BMPRII* 基因的 cDNA 序列,利用计算机软件进行同源性比较,获得了这些 BMP 的保守序列,根据这些保守序列和引物设计原则设计并合成特异性引物,以牛卵巢为材料提取的总 RNA 作模板,采用 RT-PCR 法,成功扩增出牛 *BMPRII* 基因的部分 cDNA 序列。

从 *BMPRII* 在目前所研究的哺乳动物中的共同表达倾向,即在卵母细胞中的优先表达,不难看出 *BMPRII* 在卵泡的发育和卵母细胞的生长过程中发挥着重要的调节作用^[6]。Wilson 等用原位杂交方法发现 *BMPRII* 特异在卵巢中的卵母细胞和颗粒细胞上表达。*BMPRII* mRNA 在所有卵泡的颗粒细胞中的表达相似,颗粒细胞可能是 BMPs 表达的主要位点。Yamada 等在 1996 发现在神经胶质瘤组织当中 *BMPRII* 都有一定的表达,而且与早期星形细胞瘤(Astrocytomas)组织相比,在神经胶质瘤当中 *BMPRII* 的数量明显较多。不仅如此 OP-1/BMP7 在神经胶质瘤当中也有大量的表达。Erickson G F 等发现 *BMPRII* mRNA 在子宫中也有表达。子宫内膜/子宫的周期循环伴随着几种 BMPs 成员(包括配基、受体和阻遏物)的表达。编码 BMP 受体的 mRNA 在上皮细胞中(*BMPRII*、*BMPRI* 和 *BMPRII*)、periluminal 基质

(*BMPRII* 和 *BMPRI*) 和平滑肌细胞(*BMPRII* 和 *BMPRI*)中表达。所有这 3 种受体的表达均表现出明显的周期性^[7,8]。

总之,*BMPRII* 在卵母细胞和颗粒细胞中的特异性表达说明 *BMPRII* 是卵泡发育和卵母细胞生长所必需的,并在排卵、受精等雌性生殖过程中许多阶段发挥着重要作用,但又存在种属差异。而 *BMPRII* 在其他组织中的表达说明该基因可能还有其他潜在的功能,有待进一步研究。弄清 *BMPRII* 在不同物种中的生物学功能和作用机制有助于我们更好地理解哺乳动物繁殖机理,对医学和畜牧业等领域将产生积极的影响。

参考文献:

- [1] Richards J S. Maturation of ovarian follicles: actions on interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation[J]. *Physiol Rev*, 1980(60): 55.
- [2] Fortune J E. Ovarian follicular growth and development in mammals[J]. *Biol Reprod*, 1994, 50: 225–232.
- [3] Roche J F. Control and regulation of folliculogenesis: a symposium in perspective[J]. *Rev Reprod*, 1996, 1: 19–27.
- [4] Finellay J K. Peripheral and local regulations of folliculogenesis[J]. *Reprod Fertil Dev*, 1994(6): 127–139.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [6] Monget P, Fabre S, Mulsant P, et al. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2002, 23(1–2): 139–154.
- [7] Mishina Y, Suzuki A, Ueno N, et al. Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis[J]. *Genes Dev*, 1995, 9(24): 3027–3037.
- [8] Solheim E. Chromosomal location of three human genes encoding bone morphogenetic protein receptors[J]. *Mamm Genome*, 1999, 10(3): 299–302.