

小鼠卵细胞质对供体核 DNA 甲基化和 *U2afbp-rs* 基因表达的调控*

李少华 于建宁 王丹秋 武 玮 林 飞 刘红林**

(南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

摘要 利用细胞核移植技术将 NIH3T3 细胞核和孤雌桑椹胚单个卵裂球, 分别移植到去核 MⅡ 期受体卵母细胞中, 通过免疫荧光染色后比较体外受精胚、孤雌胚、NIH3T3 核移植重组胚和孤雌桑椹胚核移植重组胚附植前各时期胚胎 DNA 甲基化水平的变化, 以探明克隆胚细胞核去分化与 DNA 甲基化的相互关系。利用 Real-time PCR 技术检测体外受精胚、孤雌胚和孤雌桑椹胚核移植重组胚附植前各时期胚胎中, 印记基因 *U2afbp-rs* 基因以及非印记基因 *eIF-4C* 基因表达量的变化, 以探明小鼠卵细胞质对克隆胚细胞核中印记基因表达的调控。结果表明, 克隆胚供体核基因组 DNA 在核移植后并没有发生主动去甲基化。孤雌桑椹胚核移植后重组胚中 *U2afbp-rs* 基因和 *eIF-4C* 基因的表达水平要显著低于对照孤雌胚, 但其表达量变化规律与对照孤雌胚相同, 说明了卵细胞质对供体核印记基因的表达具有一定的调控作用。

关键词 核移植, DNA 甲基化, 基因组印记, 基因表达调控, 核重序, *U2afbp-rs*

学科分类号 S813

1997年, Wilmut等^[1]首次报道了用成年体细胞克隆的动物——“Dolly”, 这首次证明了卵细胞质具有强大的“核重序”能力, 它已被喻为生物学发展史上一个重要的里程碑。随后, 各种克隆动物也相继诞生。人们从这些结果中也看到了体细胞核移植技术十分诱人的应用前景, 它在农业、物种保护、医疗等领域已展现出了强大的优越性。然而, 在体细胞核移植过程中, 细胞核的DNA甲基化、组蛋白修饰、基因组印记以及染色质重构等后成性修饰的异常都能造成供体核的核重序不完全, 从而造成核移植效率持续低下。其中, 供体核DNA甲基化和印记基因的异常是导致克隆动物围产期死亡及出生后生长异常的重要因素。受精过程中, 雄原核会发生主动的DNA去甲基化^[2,3], 然而, 核移植胚中是否发生供体核主动的DNA去甲基化作用? 以及卵细胞质能否改变供体核(来自发育至一定阶段的胚胎细胞)印记基因表达特征? 这些都未见有研究报道。本实验就上述两方面进行了初步研究, 试图在细胞核整体水平上探明克隆胚细胞核去分化与DNA甲基化的相互关系, 为探明哺乳动物孤雌和雌核胚发育失败的原因、寻找治疗人类与基因印记相关疾病、提高克隆效率以及深入认识细胞核去

分化的分子机制提供基础资料。

迄今已有十多个基因被确定在生殖细胞分化过程中发生印记, 这些基因包括: 胰岛素样生长因子 2 (*Igf2*)及其受体(*Igf2r*), *H19*, *U2af*结合蛋白相关片段 (*U2af* binding protein related sequence, *U2afbp-rs*)等^[4~6]。其中, *U2afbp-rs*基因在附植前胚胎就已表现出强烈的印记作用^[7]。为此, 本文选择该基因研究核移植胚胎早期发育过程中印记基因的表达特征。

1 材料与方法

1.1 材料

健康昆明种小鼠购于南京市青龙山实验动物场。PMSG和hCG购于宁波第二激素制品厂; Trizol 购于Invitrogen 公司; M-MLV逆转录酶和RNase抑制剂购于Promega 公司; Taq E、dNTP及Ex-taq E均购于TaKaRa公司; SYBR Green 购于南京生兴生物技术有限公司; 一抗5'-MeC单克隆抗体购于Ab-com公司; 二抗Cy3羊抗鼠 IgG由日本东京大学赠

* 国家自然科学基金资助项目(30471244)。

** 通讯联系人。Tel: 025-84397106, E-mail: liuhonglin@263.net

收稿日期: 2007-03-29, 接受日期: 2007-05-30

送; DAPI购于Sigma公司; 凝胶回收试剂盒购于天为时代有限公司; 丙酮酸钠、谷氨酰胺、60%乳酸钠、葡萄糖、HEPES、NaCl、KCl、NaHCO₃、EDTA · Na₂、CaCl₂、SrCl₂、MgSO₄ · 7H₂O、KH₂PO₄、石蜡油、BSA、透明质酸酶、青霉素G、硫酸链霉素、PVP、细胞松弛素B (cytochelasin B, CB)、PVA、甘露醇均购于Sigma公司; 所有引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 体外受精胚和孤雌胚的准备. 对3~4周龄的雌鼠进行超排: 腹腔注射PMSG 10U/只, 48 h后再注射相同剂量的hCG, 注射hCG 14~15 h后断颈处死雌鼠, 取输卵管并从输卵管壶腹部取出M II期卵母细胞于mWM培养液中. 从成年雄鼠附睾中取出精子, 并将精子放入提前孵育过夜的mWM培养液中, 在37℃、5% CO₂培养箱获能2 h. 将获能后精子加入M II期卵母细胞中, 受精4 h后将受精卵清洗后放入CZB培养液中培养. 为构建孤雌胚, 我们在注射hCG 17 h后处死雌鼠, 将输卵管壶腹部的M II期卵母细胞取出后, 放入含0.1%透明质酸酶中消化去除颗粒细胞, 清洗后转入含10 mmol/L Sr²⁺的CZB中激活10 min, 为了防止第二极体的排出, 清洗后将其放入含有5 g/L CB的CZB培养液中培养6 h, 然后再转入CZB中培养.

1.2.2 细胞核移植. 注射 hCG 14~15 h 后断颈处死雌鼠, 从输卵管壶腹部取M II期卵母细胞消化清洗. 以去核M II期卵母细胞为核受体, 按照Kim等^[9]的方法对M II期卵母细胞进行去核. 以NIH 3T3细胞的细胞核为供体核, 将其移植到去核卵母细胞的卵周隙中, 在300 mmol/L的甘露醇融合液(含0.1 mmol/L MgSO₄、0.14 mmol/L PVA和3 g/L BSA)中, 用电融合的方法使供体核和受体卵融合, 融合电压为1 500 V/cm, 20 μs. 为了得到孤雌桑椹胚核移植胚, 我们以孤雌桑椹胚的单个卵裂球为供体核移植到去核卵母细胞卵周隙中, 然后利用电融合的方法使桑椹胚卵裂球与去核卵母细胞融合, 融合电压为1 600 V/cm, 40 μs. 将融合后的重组卵放入含10 mmol/L Sr²⁺和5 g/L CB的KSOM中激活3~6 h, 随后将激活后的重组胚转入KSOM中在37℃、5% CO₂培养箱培养.

1.2.3 免疫荧光及荧光量分析.

先将各时期胚胎放入含有3 g/L PVP/PBS的3.7%多聚甲醛中室温固定1 h, 然后在0.5% Triton X-100中室温孵育20 min, 再用2 mmol/L HCl室温

处理30 min, 处理完后用100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5)中和10 min, 用0.05% Tween-20清洗后, 用一抗5'-MeC单克隆抗体室温处理1 h, 再用二抗Cy3羊抗鼠IgG避光孵育45 min. 用3 mg/L的DAPI对细胞核进行染色15 min后压片, 并在荧光显微镜下观察, 拍照.

按照Aoki等^[9]的方法计算荧光强度: 用ImageJ Launcher荧光分析软件分别测出细胞核和细胞质5个不同区域恒定面积的荧光强度, 然后用细胞核的平均荧光强度减去细胞质的平均荧光强度即得到所测胚胎的荧光强度. 每个时期胚胎取12~15枚进行荧光统计分析.

1.2.4 Real-time PCR 检测各基因的表达.

按照Trizol试剂说明书操作提取各时期胚胎RNA, 检测并测定浓度后用M-MLV逆转录酶将mRNA反转录为cDNA. 具体过程如下: 取RNA 2 μg, Oligo dT₁₅ 1 μg, 加入0.1%DEPC水至10 μl, 在PCR仪上80℃反应5 min, 结束后迅速置冰上冷却. 在加入5×反应液 5 μl, dNTP (每种核苷酸10 mmol/L) 2.5 μl, RNase 抑制剂 20U, M-MLV 逆转录酶200U, 用DEPC水补至总体积25 μl, 离心后在PCR仪上42℃反应1 h, 95℃灭活5 min, 结束后将所得cDNA产物置于-20℃保存.

利用Real-time PCR比较各基因在体外受精胚、孤雌胚和核移植重组胚不同时期的表达特征. 我们以印记基因*U2afbp-rs*基因作为研究对象, 以非印记基因*eIF-4C*基因作为对照, 并以持家基因*β-actin*基因作为内参来进行PCR扩增. 各基因的引物序列分别为: *U2afbp-rs* 基因, F 5' CAGCCTTAAATCC TTGGGTG 3', R 5' GAAAAAGGAAGAGGCCCGC TA 3'; *eIF-4C*基因, F 5' AAGAAGTCTGAAGGC-CTATG 3', R 5' CAGAGAACTTGAATGTAGC 3'; *β-actin*基因, F 5' GAGGGGGAAATCGTGCGT-GACATCAA 3', R 5' GGAACCGCTCGTTGCAAT AGTGA 3'. RT-PCR检测目的基因, 扩增条件为95℃ 3 min; 95℃ 30 s, 退火30 s, 72℃ 30 s, 33个循环; 72℃ 5 min. 扩增产物经过8% PAGE胶电泳, 银染, 拍照.

Real-time PCR检测各基因的表达, 每个样品做3个重复, 反应条件为: 95℃ 1 min; 95℃ 10 s, 退火10 s, 72℃ 15 s, 82℃读板, 45个循环; 72℃ 5 min; 65~95℃, 每0.2℃读板一次; 72℃ 10 min.

1.2.5 统计学处理. 实验结果表示为 $\bar{x} \pm s$, 用SPSS 11.5 For Windows软件对数据进行分析.

2 结果与分析

2.1 体外受精胚、孤雌胚及孤雌桑椹胚核移植重组胚各时期*U2afbp-rs*基因、*eIF-4C*基因和 β -actin基因的检测

印记基因*U2afbp-rs*基因扩增片段的长度为

211 bp, 对照非印记基因*eIF-4C*基因扩增片段的长度为170 bp, 内参 β -actin基因扩增片段的长度为138 bp. 以各时期不同胚胎反转录后cDNA为模板进行RT-PCR扩增, 得到各基因单一的特异性目的条带(图1).

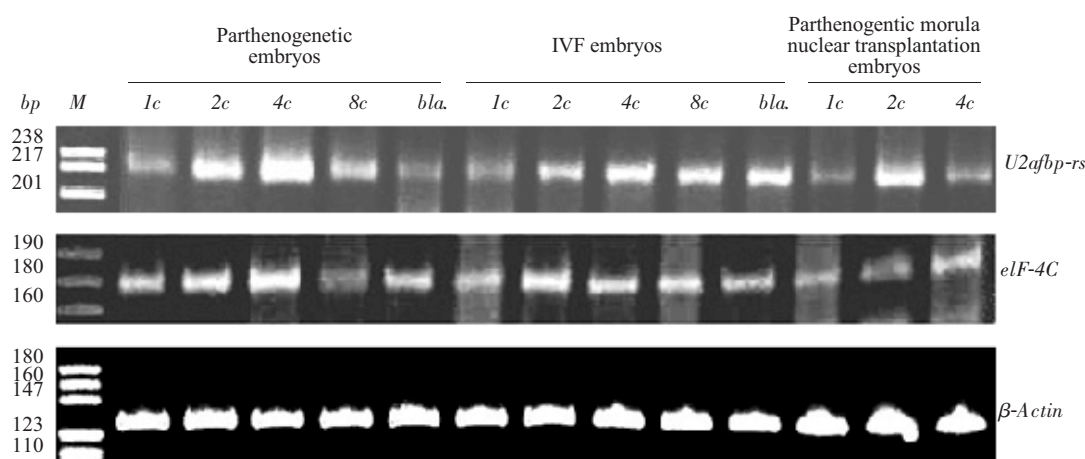


Fig. 1 RT-PCR of *U2afbp-rs*, *eIF-4C* and β -actin mRNA in differential developmental stage of three differential types of mouse embryos

Total RNA was extracted from differential developmental stage of three differential types of mouse embryos, all these RNA was reverse-transcribed into cDNA as described in **Materials and methods**. The PCR products were electrophoresed in 8% PAGE gel, which was subsequently analyzed with a computer flatbed scanner after silver staining. 1c, 2c, 4c, 8c and bla. represent the RT-PCR products of 1-cell, 2-cell, 4-cell, 8-cell and blastocyst developmental stage embryos respectively. M represents the pBR322 DNA/*Msp* I markers. IVF: *In vitro* fertilization.

2.2 体外受精胚、孤雌胚及孤雌桑椹胚核移植重组胚各时期*U2afbp-rs*基因和*eIF-4C*基因表达特征的比较

由图1可以看出*U2afbp-rs*基因和*eIF-4C*基因在各时期不同胚胎中都有表达, 为检测小鼠卵细胞质对印记基因*U2afbp-rs*基因表达量的调控, 我们以非印记基因*eIF-4C*基因的表达特征为对照, 通过Real-time PCR的方法, 比较*U2afbp-rs*基因和*eIF-4C*基因在体外受精胚、孤雌胚和孤雌桑椹胚核移植重组胚中的表达特征的变化(以 β -actin基因为内标). Real-time PCR反应中*U2afbp-rs*基因、*eIF-4C*基因和 β -actin基因的定量标准曲线相关系数分别达到0.998、0.997、0.996.

2.2.1 体外受精胚、孤雌胚及孤雌桑椹胚核移植重组胚各时期*U2afbp-rs*基因的表达特征. 我们检测了体外受精胚和孤雌胚附植前胚胎以及孤雌桑椹胚核移植重组胚1、2、4-细胞期胚胎中*U2afbp-rs*基因的表达(图2a). 由图2a可以看出, 体外受精胚胎中,*U2afbp-rs*基因在2-细胞期胚胎中是瞬时高表达的, 随后到4-细胞期的表达量大幅度降低, 说明了*U2afbp-rs*基因是一个合子基因组激活过程中瞬时高

表达的基因. 孤雌胚中,*U2afbp-rs*基因表现出同样的2-细胞期瞬时高表达特征. 与体外受精胚不同的是, 孤雌胚中*U2afbp-rs*基因的表达量要普遍高于体外受精胚. 而且从4-细胞期到囊胚期的过程中, 体外受精胚*U2afbp-rs*基因的表达是逐渐升高的, 而在孤雌胚中的表达则是持续下降, 到囊胚期时,*U2afbp-rs*基因的表达量降到最低. 在孤雌桑椹胚核移植重组胚中,*U2afbp-rs*基因的表达量变化规律无显著变化, 但其各时期的表达水平要显著低于同时期孤雌胚中的表达.

2.2.1 体外受精胚、孤雌胚及孤雌桑椹胚核移植重组胚各时期*eIF-4C*基因的表达特征. 检测体外受精胚和孤雌胚附植前胚胎以及孤雌桑椹胚核移植重组胚1、2、4-细胞期胚胎中*eIF-4C*基因的表达(图2b). 图2b结果显示, 在体外受精胚中,*eIF-4C*基因在2-细胞期胚胎也是瞬时高表达, 与Davis等^[10]认为*eIF-4C*基因是一个合子基因组激活过程中瞬时高表达基因的实验结果是相一致的. 由图2b还可以看出, *eIF-4C*基因在三种胚胎中的表达量变化规律与*U2afbp-rs*基因相似, 都在2-细胞期瞬时高表达.

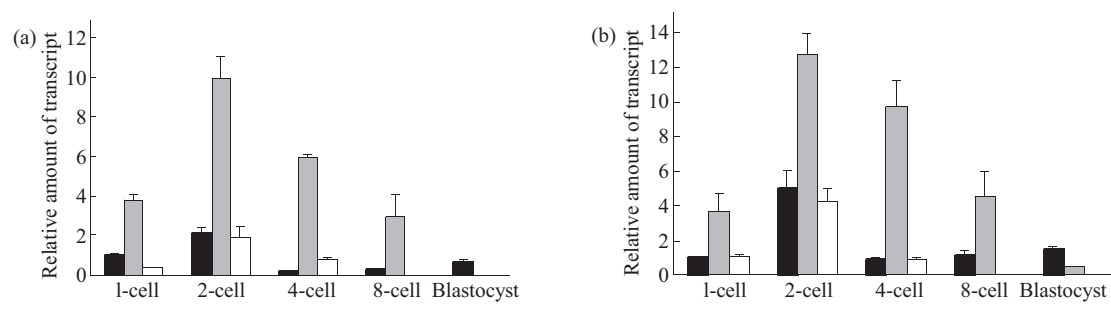


Fig. 2 The developmental changes of *U2afbp-rs* and *eIF-4C* mRNA expression during differential developmental stage of IVF, parthenogenetic and parthenogenetic morula nuclear transplantation embryos

cDNA reverse-transcribed from differential developmental stage of differential types embryos was quantified by Real-time PCR. The results are expressed as the $\bar{x} \pm s$. (a) Patterns of *U2afbp-rs* expression in IVF, parthenogenetic and parthenogenetic morula nuclear transplantation embryos. (b) Patterns of *eIF-4C* expression in IVF, parthenogenetic and parthenogenetic morula nuclear transplantation embryos. 1-cell, 2-cell, 4-cell, 8-cell and blastocyst represent the relative amount of transcripts of 1-cell, 2-cell, 4-cell, 8-cell and blastocyst developmental stage embryos respectively; IVF: *in vitro* fertilization embryos; Par.: Parthenogenetic embryos; PMNT: Parthenogenetic morula nuclear transplantation embryos. : IVF; : Par; : PMNT.

2.3 体外受精胚、孤雌胚及重组胚基因组DNA甲基化免疫荧光分析

为研究核重序过程中卵细胞质对供体核DNA

甲基化的影响，我们用免疫荧光的方法对体外受精胚、孤雌胚以及重组胚各时期的DNA进行了甲基化检测。

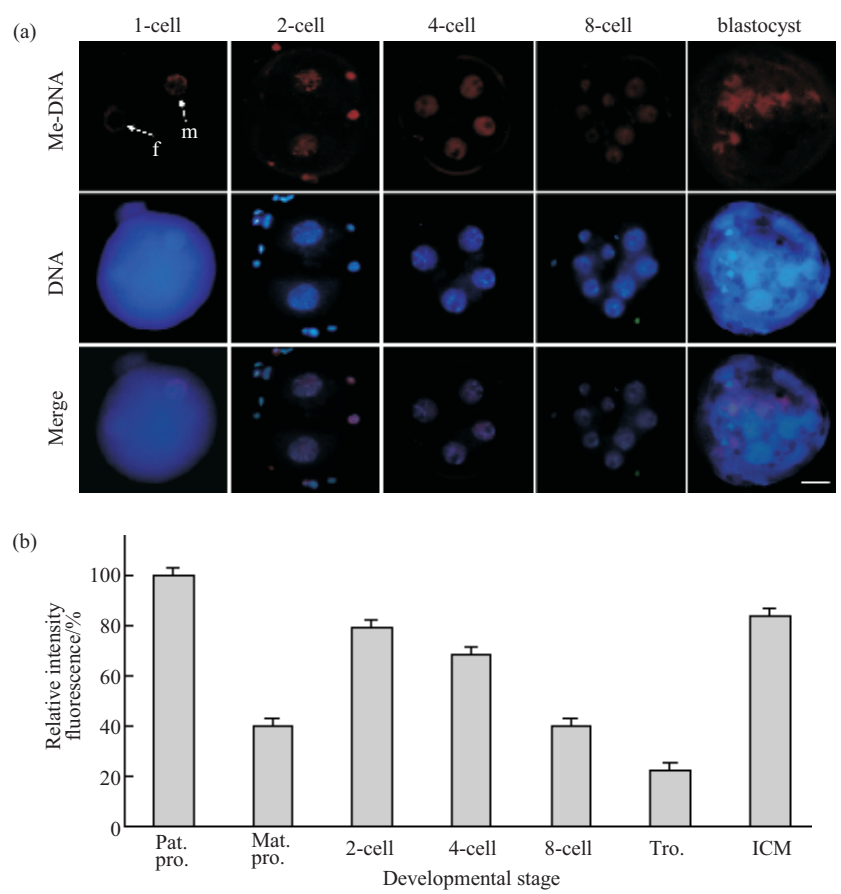


Fig. 3 Changes in DNA methylation levels during pre-implantation development in the mouse

(a) Im munofluorescent micrographs of the pre-implantation embryos. Embryos that were prepared by *in vitro* fertilization were subjected to immunocytochemistry with antibody to DNA methylation (5'-MeC). The antibody was localized with Cy3-conjugated secondary antibody (red), and DNA was stained with DAPI (blue). Arrows indicate the male (m) and female (f) pronuclei. Scale bar, 20 μm . (b) Semi-quantification of methylated DNA in the pre-implantation mouse embryos. The averaged value of the fluorescence intensity in the 1-cell embryos' female pronuclei was arbitrarily set at 100%. Mat.Pro.: Female pronuclei; Pat.Pro.: Male pronuclei; Tro: Trophoblast of blastocyst produced by IVF; ICM: Inner cell mass of blastocyst producedby IVF.

2.3.1 体外受精胚各时期及 NIH3T3 体细胞核移植重组胚基因组DNA甲基化免疫荧光分析. 为研究核重序过程中卵细胞质对体细胞供体核的DNA甲基化调控作用, 我们以体外受精胚为对照, 以NIH3T3细胞为核供体构建重组胚, 并用免疫荧光的方法检测了体外受精胚以及NIH3T3细胞移植前后的DNA甲基化变化情况(图3, 图4). 图3进一步证实了小鼠附植前各时期胚胎发育过程中的甲基化变化模式. 受精后雄原核迅速发生DNA的去甲基化, 这种去甲基化在受精后4 h内完成^[1], 从2-细胞期至桑椹胚期核DNA的甲基化水平逐渐降低, 这种DNA甲基化程度的降低被认为是一个被动的稀释过程. 到囊胚期时, 内细胞团因重新甲基化而使DNA甲基化水平显著升高, 而滋养层细胞的甲基化程度降到最低. 由图4可以看出, 核移植前后体细胞供体核的甲基化水平并未发生显著变化, 说明

了在体细胞核移植核重序过程中, 供体核并没有发生主动的DNA去甲基化作用.

2.3.2 孤雌胚及孤雌桑椹胚核移植重组胚各时期基因组DNA甲基化免疫荧光分析. 我们同样对孤雌胚以及以孤雌桑椹胚单个卵裂球为核供体构建的核移植重组胚进行DNA甲基化免疫荧光检测, 以此来分析卵细胞质能否改变发育到一定阶段的胚胎细胞的甲基化水平(图5). 由图5a,c可以看出, 小鼠孤雌胚附植前各时期胚胎发育过程中, 1-细胞期到桑椹胚阶段DNA甲基化的变化同样是一个被动稀释的过程, 到囊胚期时, 内细胞团同样发生重新甲基化, 而滋养层细胞甲基化水平因被逐步稀释而降至最低. 图5b,c中, 孤雌桑椹胚在移植前以及移植后1-细胞期的DNA甲基化水平无显著变化, 到2-细胞期时, 胚胎的DNA甲基化水平有所下降.

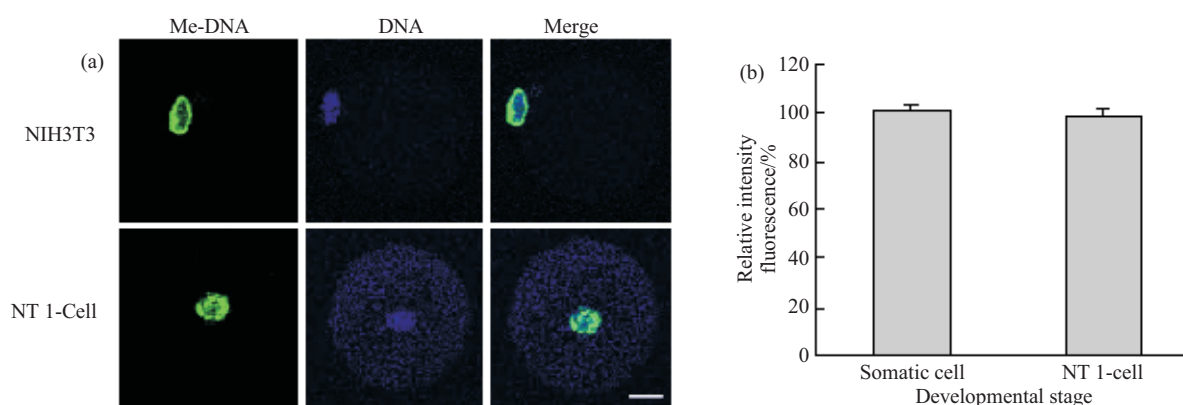


Fig. 4 Changes in DNA methylation levels between pre-and post-transplantation somatic cell

(a) Immunofluorescent micrographs of NIH3T3 cells and nuclear transplantation 1-cell embryos. NIH3T3 cell nuclear was transplanted into an enucleated M II oocyte, then these nuclear transplanted embryos were treated with 10mmol/L Sr^{2+} in KSOM for 3h. These embryos and NIH3T3 cells were subjected to immunocytochemistry with antibody to DNA methylation (5'-MeC). The antibody was localized with FITC-conjugated secondary antibody (green), and DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar, 20 μm . (b) Semi-quantification of methylated DNA in pre-transplantation NIH3T3 cells and post-transplantation 1-cell embryos (NT 1-cell). The average value of the fluorescence intensity in the NIH3T3 cells was arbitrarily set at 100%.

3 讨 论

3.1 孤雌胚中 *U2afbp-rs* 基因和 *eIF-4C* 基因表达的异常

U2afbp-rs 基因是一个母源印记基因, 成年小鼠专有的表达父源的 *U2afbp-rs* 等位基因. 小鼠正常体外受精胚中, *U2afbp-rs* 基因就开始表现出正常的印记作用, 选择性的表达来自父本的等位基因. 然而, 该基因在孤雌胚中的印记却可能发生异常. 在本实验中, *U2afbp-rs* 基因在孤雌胚附植前胚胎中的表达要高于正常的体外受精胚, 到囊胚期时孤雌胚

中该基因的表达量才降到最低, 表现出母源等位基因的印记. 由于染色质结构状态对基因表达也有重要的调控作用, 孤雌胚中这种异常的印记现象可能与染色质结构状态有关. Sotomaru等^[12]对妊娠9.5天的孤雌胚和雄性单性生殖胚胎中 *U2afbp-rs* 基因进行的检测显示, 该母源印记基因在孤雌胚和正常的体外受精胚中的表达量平均水平相当, *U2afbp-rs* 基因在有些孤雌胚胎中的表达要低于正常体外受精胚, 在有些孤雌胚胎中的表达远高于正常体外受精胚. 在雄性单性生殖胚胎中的检测也表现出同样

的结果。他们又利用DNase- I 对该基因的染色质状态进行了检测，结果表明，孤雌胚的染色质状态和体外受精胚都处于开放状态，相反，雄性单性生殖胚中则处于相对较为浓缩的状态，这可能是导致 *U2afbp-rs* 基因印记异常表达的原因。这说明了，印记基因在受精胚胎中正常的父母源等位表达的模式在单性生殖胚胎中并不是一直保持不变的，父母双

方基因组的同时存在是维持*U2afbp-rs*基因单等位特异性表达所必需的。2006年，Andollo等^[13]利用视黄酸诱导ES细胞分化时对*U2afbp-rs*基因的表达检测结果显示，*U2afbp-rs*基因的表达是由染色质结构的改变而非DNA甲基化调控的。

同样，在非印记基因*eIF-4C*表达检测的结果中也看出了相似的结果，可能也是孤雌胚中*eIF-4C*基

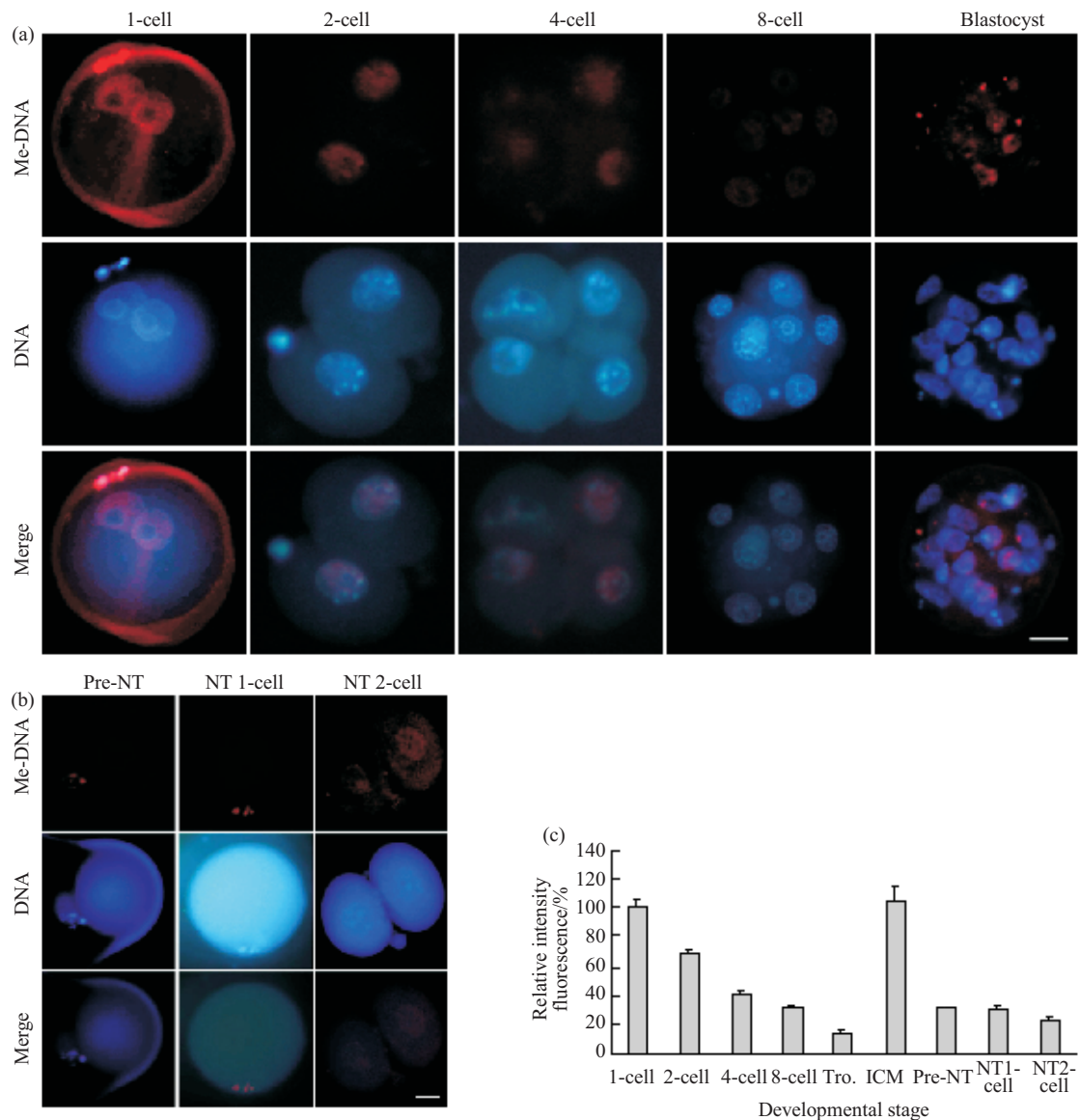


Fig. 5 Changes in DNA methylation levels during pre-implantation development of parthenogenetic embryos and parthenogenetic morula nuclear transplantation embryos in the mouse

(a) Immunofluorescent micrographs of the pre-implantation parthenogenetic embryos. Mouse parthenogenetic embryos were subjected to immunocytochemistry with antibody to DNA methylation (5'-MeC). The antibody was localized with Cy3-conjugated secondary antibody (red), and DNA was stained with DAPI(blue). Scale bar, 20 μ m. (b) Immunofluorescent micrographs of parthenogenetic morula nuclear transplantation embryos. Zona pellucida of parthenogenetic morula was digested by 0.5% pronase, and then digested with 0.25% trypsin-0.02% EDTA. Each morula cleaved cell was transplanted under enucleated M II oocytes (Pre-NT), these cells were fused by a DC pulse of 1 600 V/cm for 40 μ s in 300 mmol/L mannitol. These fused cells were activated 10 mmol/L Sr^{2+} for 3~6h, and then cultured in CZB until these embryos developed to 1-cell stage (NT 1-cell) and 2-cell stage (NT 2-cell). Scale bar, 20 μ m. (c) Semi-quantification of methylated DNA in parthenogenetic embryos and parthenogenetic morula nuclear transplantation embryos. The averaged value of the fluorescence intensity in 1-cell parthenogenetic embryos was arbitrarily set at 100%. Tro.: Trophoblast of blastocyst produced by parthenogenesis; ICM: Inner cell mass of blastocyst produced by parthenogenesis.

因染色质状态的异常导致了该基因的表达。

3.2 孤雌桑椹胚核移植重组胚中 *U2afbp-rs* 基因和 *eIF-4C* 基因的表达

本文以卵细胞质对孤雌桑椹胚单个卵裂球为核供体构建了核移植重组胚,以期研究卵细胞质对发育至一定阶段的胚胎细胞印记基因表达特征的影响。从图2中可以看出,卵细胞质使供体核发生了一定程度的核重序作用,克隆胚中印记基因 *U2afbp-rs* 和非印记基因 *eIF-4C* 在胚胎前期发育过程,又重新出现 2-细胞期瞬时高表达的现象,但其表达要显著低于孤雌胚中同时期的表达,卵细胞质对孤雌桑椹胚供体核的重序不完全。Inoue等^[14]检测了以颗粒细胞为核供体的体细胞克隆小鼠中印记基因的表达特征,研究结果显示,印记基因 *Igf2*、*Igf2r* 和 *H19* 基因在体细胞克隆胚中的表达都和对照组体外受精胚无显著差异,而印记基因 *Peg1/Mest*、*Meg1/Grb10* 和 *Meg3/Gtl1* 的表达则要显著低于对照组,4个非印记基因的表达也是显著低于对照组的。传统模式认为^[15],克隆动物表型的异常都是由于克隆动物中印记基因表达的异常所导致的。2003年,Mann等^[16]对克隆小鼠附植前胚胎中印记基因的结果显示,克隆胚中印记基因的表达和甲基化都发生异常,说明了核移植过程中的核重序不完全。由于表型正常的克隆动物中普遍存在着印记基因表达错误的现象,Humphreys等^[17]认为,哺乳动物的发育能忍受一定程度的后成性修饰的错误,克隆胚胎的死亡可能仅仅是由于很多正常基因在多位点上的调节发生随机丢失累积在一起而造成的。即使看起来健康的克隆动物也同样存在着基因表达方面的异常,只是这种微小的影响很难被人们所察觉,但它可能会导致动物某些生理方面的异常。

3.3 核移植胚中供体核是否发生DNA的主动去甲基化

哺乳动物中,DNA甲基化在调节胚胎发育过程中基因表达^[18,19]和染色质结构^[20]起着重要的作用,基因组的广泛去甲基化可能是形成多能干细胞时的先决条件,这对胚胎后期的发育也是很重要的。一些研究也表明,调节基因启动子区域的异常DNA甲基化还会导致这些基因的沉默,这也是肿瘤继续发展的一种途径^[21~23],DNA的异常甲基化也是肿瘤产生的一个重要途径之一^[24]。DNA去甲基化对基因组印记也具有重要的调节作用,Reik等^[25]的研究表明,父源基因组的去甲基化能使储藏的一些母源因子结合到父源基因组上,从而发生特异性等位基因

的印记。研究核移植胚中供体核的DNA主动去甲基化作用,对寻找治疗人类一些相关疾病具有重要的意义。

本实验以小鼠体外受精胚胎和孤雌胚胎为对照,用5'-MeC单克隆抗体对对照组进行免疫荧光染色,进一步验证了小鼠附植前各时期胚胎发育过程中的甲基化变化模式,即受精或激活后基因组DNA甲基化程度逐渐降低,到囊胚期时,内细胞团发生重新甲基化,而滋养层细胞则降到最低。基因组DNA的去甲基化在小鼠体内发育早期的胚胎发育中就已经发现,到囊胚期过程中基因组DNA甲基化水平大幅度降低^[26,27]。去甲基化最早是发生在DNA复制前的雄原核期,称之为主动去甲基化。在第一次细胞周期完成之后,由于维持甲基化的酶DNMT1的减少,DNA的甲基化水平继续降低^[28],称之为被动去甲基化,并且去甲基化主要发生在持家基因和重复序列当中。

本研究以NIH3T3细胞核和孤雌桑椹胚单个卵裂球为核供体,将其移植到去核MⅡ期卵母细胞中,成功构建了重组胚,并对重组胚各时期的基因组DNA甲基化状态进行了检测,以期研究供体核的主动去甲基化作用。结果表明,在NIH3T3体细胞克隆胚中,供体核DNA甲基化水平在核移植前后无显著变化,说明了体细胞供体核并没有发生主动去甲基化作用。在孤雌桑椹胚克隆胚中,供体核DNA甲基化水平在融合前和1-细胞胚胎期也无显著变化,说明了孤雌桑椹胚供体核也没有发生主动去甲基化作用。但孤雌桑椹胚克隆胚在2-细胞期时,基因组DNA的甲基化程度有所下降,这可能是由于细胞分裂过程中的被动稀释所产生的。多项研究结果表明^[29,30],大多数物种克隆胚胎附植前的核重序是不完全的,其中供体核DNA主动去甲基化的重序尤其不完全,而且克隆胚胎附植前重新甲基化的现象提前发生。这种供体核DNA去甲基化重序不完全的现象可能是由供体核中DNMT1水平较高所造成的,DNMT1是维持DNA甲基化的甲基转移酶,而卵细胞中维持DNA甲基化的甲基转移酶则是以DNMT0的形式存在的。克隆动物附植前的核重序表现出一定的种属特异性,在克隆猪的附植前发育研究中,其着丝粒卫星DNA和PRE-1短分散序列(SINE)都表现出相似的逐渐去甲基化模式,甲基化重序过程与其正常受精胚胎相似,但和牛的甲基化重序过程却截然不同^[31]。这种克隆动物甲基化重序的物种差异说明,当体细胞转移到受体卵母细胞

后, 其初始的高甲基化状态会面临2种相反的后成修饰, 通过DNA复制周期维持甲基化活性或者发生去甲基化, 这是由卵母细胞内未知的特异细胞因子和供体细胞特异细胞因子间的竞争来决定的, 来自供体细胞的特异细胞因子会阻碍卵母细胞特异细胞因子的重序作用, 这种供体细胞在不同物种间的去甲基化差异的原因还有待于进一步研究。

参考文献

- Wilm ut I, Schnieke A E, Campbell K H, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385** (6619): 810~813
- Mayer W, Niveleau A, Walter J, *et al.* Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 2000, **403** (6769): 501~502
- Oswald J, Engemann S, Lane N, *et al.* Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol*, 2000, **10** (8): 475~478
- Liu H, Kim J M, Aoki F. Regulation of histone H3 lysine 9 methylation in oocytes and early preimplantation embryos. *Development*, 2004, **131** (10): 2269~2280
- Monk M. Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution. *Dev Genet*, 1995, **17** (3): 188~197.
- Hatada I, Sugama T, Mukai T. A new imprinted gene cloned by a methylation-sensitive genome scanning method. *Nucl Acids Res*, 1993, **21** (24): 5577~5582
- Latham K E, Rambhatla L, Hayashizaki Y, *et al.* Stage-specific induction and regulation by genomic imprinting of the mouse *U2afbp-rs* gene during preimplantation. *Dev Biol*, 1995, **168** (2): 670~676
- Kim J M, Ogura A, Nagata M, *et al.* Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in embryos reconstructed by somatic nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2002, **67** (3): 760~766
- Aoki F, Worrad D M, Schultz R M. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol*, 1997, **181** (2): 296~307
- Davis W, De Sousa P A, Schultz R M. Transient expression of translation initiation factor eIF-4C during the 2-cell stage of the preimplantation mouse embryo: identification by mRNA differential display and the role of DNA replication in zygotic gene activation. *Dev Biol*, 1996, **174** (2): 190~201
- Santos F, Hendrich B, Reik W, *et al.* Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol*, 2002, **241** (1): 172~182
- Sotomaru Y, Kawase Y, Ueda T, *et al.* Disruption of imprinted expression of *U2afbp-rs/U2af1-rs1* gene in mouse parthenogenetic fetuses. *J Biol Chem*, 2001, **276** (28): 26694~26698
- Andollo N, Boyano M D, Andrade R, *et al.* Epigenetic regulation of the imprinted *U2af1-rs1* gene during retinoic acid-induced differentiation of embryonic stem cells. *Dev Growth Differ*, 2006, **48** (6): 349~360
- Inoue K, Kohda T, Lee J, *et al.* Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science*, 2002, **295** (5553): 297
- Dean W, Bowden L, Aitchison A, *et al.* Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes. *Development*, 1998, **125** (12): 2273~2282
- Mann M R, Chung Y G, Nolen L D, *et al.* Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod*, 2003, **69** (3): 902~914
- Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, *et al.* Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*, 2001, **293** (5527): 95~97
- Jones P L, Veenstra G J, Wade P A, *et al.* Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, 1998, **19** (2): 187~191
- Nan X, Ng H H, Johnson C A, *et al.* Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 1998, **393** (6683): 311~312
- Hashimshony T, Zhang J, Keshet I, *et al.* The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development. *Nat Genet*, 2003, **34** (2): 187~192
- Baylin S B. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2005, **2** (12): S4~S11
- Baylin S B, Ohm J E. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?. *Nat Rev Cancer*, 2006, **6** (2): 107~116
- McGarvey K M, Fahrner J A, Greene E, *et al.* Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Res*, 2006, **66** (7): 3541~3549
- Baylin S B, Esteller M, Rountree M R, *et al.* Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human Mol Genetics*, 2001, **10** (7): 687~692
- Reik W, Walter J. Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. *Nat Genet*, 2001, **27** (3): 255~256
- Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development*, 1987, **99** (3): 371~382
- Kafri T, Ariel M, Brandeis M, *et al.* Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev*, 1992, **6** (5): 705~714
- Rougier N, Bourc'his D, Gomes DM, *et al.* Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev*, 1998, **12** (14): 2108~2113
- Kang Y K, Koo D B, Park J S, *et al.* Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet*, 2001, **28** (2): 173~177
- Dean W, Santos F, Stojkovic M, *et al.* Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (24): 13734~13738
- Kang Y K, Koo D B, Park J S, *et al.* Typical demethylation events in cloned pig embryos. clues on species-specific differences in epigenetic reprogramming of a cloned donor genome. *J Biol Chem*, 2001, **276** (43): 39980~39984

Regulation of DNA Methylation and *U2afbp-rs* Gene Expression in Early pre-implantation Cloned Mice*

LI Shao-Hua, YU Jian-Ning, WANG Dan-Qiu, WU Wei, LIN Fei, LIU Hong-Lin**

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Embryos that were produced by parthenogenesis were cultured to morula, then each cell of morulas was transferred into enucleate M II oocytes, as called parthenogenetic morula nuclear transplantation embryos here. NIH3T3 cell nucleus were also transferred into enucleate M II oocytes. In order to prove up the relationship between nuclear reprogram and DNA methylation during the process of nuclear transplantation, the two cloned pre-implantation embryos together with *in vitro* fertilization (IVF) and parthenogenetic embryos were subjected to immunocytochemistry with antibody to DNA methylation (5'-MeC). In order to research the regulation of oocyte cytoplasm to the relative expression level of imprint genes, the relative expression level of *U2afbp-rs* gene which is maternally imprint and non-imprint *eIF-4C* gene in pre-implantation IVF, parthenogenetic and parthenogenetic morula nuclear transplantation embryos by real-time PCR were detected. The results show that neither the genomic DNA of NIH3T3 cloned embryos nor parthenogenetic morula nuclear transplantation embryos were demethylated actively. Although both the relative expression level of *U2afbp-rs* gene and *eIF-4C* gene in parthenogenetic morula nuclear transplantation embryos were lower than control parthenogenetic embryos, the expression of the two genes were similar to the control parthenogenesis group. These results suggest that the imprinting gene expression of donor nuclear are regulated by oocyte cytoplasm.

Key words nuclear transfer, DNA methylation, genomic imprinting, regulation of gene expression, nuclear reprogramming, *U2afbp-rs*

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30471244).

**Corresponding author. Tel: 86-25-84397106, E-mail: liuhonglin@263.net

Received: March 29, 2007 Accepted: May 30, 2007