

牛不同供体核克隆囊胚 *Xist* 基因 DNA 甲基化程度的比较研究*

曹更生^{1,2)} 高宇^{1,3)} 戴蕴平¹⁾ 李荣³⁾ 赵要风¹⁾ 李宁^{1)**}

(¹⁾中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094;

²⁾河南大学生命科学学院, 开封 475001; ³⁾中国农业大学动物科技学院, 北京 100094)

摘要 利用亚硫酸氢盐测序法分析 Holstein 奶牛胎儿成纤维细胞 (FFB) 和输卵管上皮细胞 (FOV) 来源的克隆囊胚 *Xist* 基因 DNA 甲基化状况, 以体外受精囊胚 (IVF) 和供体细胞作对照. 克隆囊胚 *Xist* 基因处于较低程度的 DNA 甲基化状态, 其中, FFB 来源的克隆囊胚 *Xist* 基因 DNA 甲基化程度为 43%, 而 FOV 来源的克隆囊胚仅为 17%. 在体外受精囊胚中, *Xist* 基因 DNA 甲基化处于中等状态, 为 49%. 然而, 在体细胞中, *Xist* 基因的甲基化程度较高, FFB 为 66%, FOV 为 63%. 这些结果说明, *Xist* 基因 DNA 甲基化是可以被重编程的, 所检测的 CpG 岛可能调节 *Xist* 基因的表达. 结合已发表的实验数据, 在同一个体中, FFB 来源的克隆囊胚发育率比 FOV 的低, 但其克隆牛胎儿的妊娠率和产犊率比 FOV 的高, 这暗示不同供体核克隆囊胚的重编程是有差异的, 并可能影响到胚胎及个体的发育.

关键词 X 失活特异转录物, DNA 甲基化, 克隆囊胚

学科分类号 S814.8

为消除两性性染色体基因在表达量上的差异, 雌性哺乳动物的一条 X 染色体在胚胎发育时失活. X 失活特异转录物 (X inactive specific transcript, *Xist*) 是导致 X 染色体失活的关键基因, 它是一种非编码的 RNA 基因, 在胚胎发育早期, 从 X 染色体失活中心 (X inactivation center, *Xic*) 被转录出来, 当 *XIST* 转录物扩散至整个 X 染色体上时, 该染色体将变成非活性的 X 染色体 (Xi). 而克隆胚胎的核来源于体细胞, 它们必须适当地消除分化细胞的细胞记忆, 适时失活 X 染色体, 克隆胚胎才能正常发育. 因此, X 染色体失活发生异常, 可能影响到动物的克隆效率和个体发育^[1].

为提高克隆效率和解决克隆动物发育异常等问题, 近年来, 生物学家对动物克隆机理进行了一系列的研究, 目前认为表观修饰异常是导致动物克隆异常的主要原因, 而 X 染色体作为研究表观修饰的模式材料, X 染色体失活是克隆机理的研究热点之一. Eggan 等^[2]将绿色荧光蛋白 (GFP) 转染到小鼠父源的 X 染色体 (Xp) 上, 以此来监测 Xp 在小鼠克隆胚胎早期的失活变化状况, 结果发现, 处于卵裂期的克隆胚胎, 其两条 X 染色体均处于活性状态,

而在胚胎附植前期, 将来发育成胎儿的内细胞团细胞, 其 X 染色体有一条发生随机失活, 而将来发育成胎盘等胚外组织的滋养层细胞, 其父源 Xp 发生印记失活. Nolen 等^[3]认为, 尽管失活的 X 染色体在小鼠克隆胚胎发育中能被再次激活, 但却不能对 *Xic* 进行有效的调节, 同时, 研究还发现克隆胚胎存在着大量表观修饰的异质性 (heterogeneity). 在印记基因的研究中发现, 小鼠克隆囊胚仅有 4% 的印记基因表达是正常的, 而其他绝大多数印记基因表达为异常^[4]. 与自然受精胚胎相比, 克隆胚胎在桑椹胚和囊胚期常染色体区的 DNA 处于低甲基化水平, 而异染色体区的 DNA 则处于高甲基化水平^[5]. 对克隆牛胎儿的研究发现, 无论在单个基因 (*Leptin a* 和 *POU5F1*) 水平, 还是在整个基因组水平, 均存在着 DNA CpG 岛甲基化异常现象^[6,7]. Xue 等^[8]对 *MAOA* 及其他 9 个 X 染色体连锁基因的研究

*国家自然科学基金 (30221005) 和国家重大基础研究发展规划 (2006CB102100) 资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 010-62731146, 010-62733323

E-mail: ninglbau @public3.bta.net.cn

收稿日期: 2006-04-22, 接受日期: 2006-06-02

究中发现, 死亡克隆牛 10 个基因中有 9 个异常表达, 而且 *Xist* 基因也处于低甲基化状态, 因此, 他们认为不完全的重编程使 X 染色体产生了异常的表观遗传修饰, 进而影响了 X 染色体基因的表达. 这个课题组还利用芯片技术对发育 7 天的克隆囊胚进行研究, 结果发现, 克隆和正常囊胚在基因表达方面差异很小, 基于此, 他们认为克隆胚胎可能能够进行比较完全的重编程, 但随着个体发育的进行, 表观修饰错误积累越来越多, 最终导致克隆动物发育的异常^[9]. 但是, 关于体外受精胚胎 (IVF) 和克隆牛胚胎 *Xist* 基因甲基化状况至今没有任何报道. 本文分析了不同供体核克隆牛囊胚 *Xist* 基因 DNA 甲基化状况, 拟从 X 染色体失活的角度阐述, 不同供体核克隆牛胚胎 *Xist* 基因 DNA 的重编程对克隆囊胚的发育率造成的影响.

1 材料与方法

1.1 实验药品及材料

亚硫酸氢钠和对苯二酚购自 Sigma 公司, T 载体试剂盒购自 TaKaRa 宝生物工程有限公司, Taq DNA 聚合酶购自北京天为时代科技有限公司, dNTP 购自 Promage 公司, 引物由上海生工技术公司合成.

细胞和胚胎的培养器皿购自 Costar 或 Nunc 公司; DMEM/F12 和胰酶购自 Gibco 公司; FBS 购自 Hyclone 公司; 其他细胞及胚胎培养的药品除特殊注明外, 均购自 Sigma 公司.

Holstein 奶牛的胎儿及成体牛来自北京市奶牛中心. 黄牛卵巢来自北京周边地区屠宰场.

1.2 牛胎儿成纤维细胞系的建立及培养

将妊娠 50~60 天的 Holstein 奶牛处死后, 取其输卵管和子宫, 3~5 h 内运回实验室. 在无菌条件下, 剖取胎儿, 将其在 70% 酒精中浸泡 30 s. 用含有 5× 双抗的 DPBS 漂洗几遍后, 无菌剪取其耳部及脊背部的表皮组织数块, 置于含 5× 双抗和 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 在直径为 60 mm 的平皿中将表皮组织剪碎成 1 mm³ 大小的小块, 用 DMEM/F12 清洗 2 次后, 分批植于含 5 ml DMEM/F12+10% FBS 的 T-25 培养瓶中, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 6~7 天, 每 2 天换液 1 次. 待细胞生长汇合后, 以 0.25% 胰酶消化传代 2~3 次, 分批以 DMEM/F12+20% FBS+10% DMSO 冻存.

1.3 牛克隆囊胚的获得

从屠宰场收集成年牛卵巢, 在 38.5℃、5% CO₂

培养箱中成熟培养 18~20 h. 将成熟的卵母细胞放入 0.1% 的透明质酸酶中, 使卵丘与卵母细胞完全脱离, 挑选形态完整、胞质均匀并排出第一极体的卵母细胞作为胞质受体. 培养传代 5~15 次的胎儿成纤维细胞, 使其生长到 80% 以上汇合时, 作为供体核. 将卵母细胞去核后, 放入融合液中平衡 (现用现配), 电融合后, 将重构胚移入操作液中培养 0.5 h, 挑选融合胚进行激活处理. 将重构胚放入 A23187 液中处理 5 min, 再放入 6-DMAP 液中培养 5 h. 然后将激活的重构胚放入 CR1aa + BSA 液中处理 2 天, 将发育到 4~8 细胞期的胚胎移入铺有牛颗粒细胞的四孔板中, 用 CR1aa+5% FCS 培养液, 在 38.5℃、5% CO₂ 培养箱中培养 7~8 天.

1.4 克隆囊胚的亚硫酸氢钠处理

取培养 7~8 天的囊胚 8~10 枚, 在体式镜下机械去除透明带, 用 PBS 清洗 1 遍, 离心除去多余的 PBS 溶液. 亚硫酸氢钠处理依据文献并稍加修改^[10, 11], 具体步骤如下: 加入 17 μl 1 mmol/L SDS 和 280 mg/L 的蛋白酶 K, 在 37℃ 处理 1~1.5 h, 加入 10 μl 矿物油, 98℃ 处理 15 min, 再加入 3 μl 2 mol/L 的 NaOH (NaOH 的终浓度为 0.3 mol/L), 在 50℃ 水浴放置 15 min, 加入 2 倍体积的 2% 低熔点琼脂糖, 充分混匀.

配制 5 mol/L 的亚硫酸钠溶液 (pH 5.0): 将 1.9 g 亚硫酸氢钠溶于 2.5 ml 重蒸水中, 然后与 750 μl 2 mol/L 的 NaOH 混合, 再将 55 mg 对苯二酚溶于 500 μl 的水中, 混合以上 2 种溶液.

吸取 20 μl 琼脂糖-DNA 混合液, 打入预冷的矿物油中形成小球, 在 -20℃ 放置 30 min; 移走矿物油, 加入 500 μl 5 mol/L 的亚硫酸钠溶液, 50℃ 处理 8 h, 然后移去亚硫酸钠溶液, 用 1×TE (pH 8.0) 洗涤 4×15 min, 加入 500 μl 0.2 mol/L 的 NaOH 洗涤 2×15 min, 移走 NaOH 溶液, 用 1 ml 1×TE (pH 8.0) 洗涤 3×10 min, 移去溶液, 琼脂糖小球可在 -20℃ 中保存. PCR 扩增前, 琼脂糖小球用灭菌水洗涤 2×15 min. 使用上述方法, 没有发现亚硫酸盐处理不完全的现象.

1.5 PCR 扩增、克隆及测序

将上述亚硫酸氢钠处理过的琼脂糖小球加热, 使其融化, 取 2~5 μl 作为模板, 采用半巢式 PCR 进行扩增. 第一轮引物序列如下: PrimerFL1261-1286: 5' TTTGTTGTAGGGATAAT-ATGGTTGAT 3', PrimerR1456-1481: 5' CCACC-CTTTCTAATTAAATAAAACAC 3'. 反应条件:

94°C 5 min; 94°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min.

将第一轮扩增产物稀释 10 倍作为模板, 进行第二轮 PCR 反应, 第二轮扩增引物序列为:

PrimerFS1280-1306: 5' GGTGATTTTGTTA-TGTGGATATTATG 3', PrimerR1456-1481: 5' CCACCCTTTCTAATTAAATAAAACAC 3'. 反应条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min. 扩增目的片段大小为 202 bp. 用 1.5% 琼脂糖胶回收第二轮 PCR 扩增产物, 与 TaKaRa 公司生产的 pMD18-T 载体进行连接, 转化涂板后, 挑选阳性克隆, 使用商品化通用引物在 ABI 377 测序仪上测序.

```

TTTGCTGCAGGGACAATATGGCTGACCTTGTTCATGTGGATATCATGGCAGTTTGTCACGT          60
TTTGTGTTAGGGATAATATGGTTGATTTTGTATGTGGATATTATGGTAGTTTGTTACGT
                                     CpG1
GGATATCGTGGCAGGGGTGTTTGACCGTTACATTCTTGGCGGGCTTTGCATCAGAGGGC          120
GGATATCGTGTTAGGGGTGTTGATCGTTATATTTTGGCGGGTTTGTATTAGAGGGT
      CpG2                CpG3                CpG4
CTGCGCATTGTTAAAGATGGCGTGTCTTTGGCGCGGACAAAGTGAAGGAGGGATTGGCA          180
TTGTCGTATTGTTAAAGATGGCGTGTTTGTCGCGGATAAAGTGAAGGAGGGATTGGTA
      CpG5                CpG6                CpG7CpG8
ATGTTAGATTGCCGCGTGTCCACCCAATCAGAAAGGGTGG          221
ATGTTAGATTGCCGCGTGTTTTATTTAATTAGAAAGGGTGG
      CpG9CpG10

```

Fig. 1 DNA sequence of 5' regulatory region of *Xist* gene (upper stands) and the sequence of Bisulfite-PCR (lower stands)

Primer sequences are underlined. CpG sites are shown in bold.

2.2 体外受精囊胚 *Xist* 基因调控区 CpG 位点 DNA 甲基化检测

8 枚 Holstein 奶牛体外受精囊胚 *Xist* 基因的 DNA 甲基化结果见图 2, 在 *Xist* 基因调控区被检测的 CpG 位点中, 约有 49% 的位点是甲基化的, 如图中箭头所示, 甲基化与非甲基化仅有一个位点差异, 甲基化与非甲基化的整齐度较为一致.

2.3 FFB 及其克隆囊胚 *Xist* 基因调控区 DNA 甲基化检测

培养 3 代的牛胎儿成纤维细胞 (FFB) *Xist* 基因调控区 DNA 甲基化的结果见图 3a, 在所有被检测的 CpG 位点中, 甲基化的 CpG 位点占 66%, 而 10 枚 FFB 来源的克隆囊胚甲基化位点占 43%, 与

2 结 果

2.1 *Xist* 基因 CpG 岛的分析及靶序列的选择

在 NCBI 网站上查得牛的 *Xist* 基因序列 (GenBank accession No.NR 001464), 通过 MethPrimer 网站 (www.urogene.org/methprime) 对该基因 5' 端 5 kb 的序列进行 CpG 岛预测分析. 结果显示, 在 1 296~1 502 bp 处存在一 CpG 岛, 序列见图 1. 将该序列与牛的基因组序列进行比对, 找到 *Xist* 基因 5' 调控区上游约 10 kb 的序列, 以同样的方法进行 CpG 岛预测, 再没有预测到其他的 CpG 岛. 将预测到的 CpG 岛序列作为靶序列, 设计半巢式引物进行 PCR 扩增, 来检测 *Xist* 基因调控区 DNA 甲基化状况.

其供体细胞相比, 甲基化程度有所减少, 但甲基化水平与体外受精囊胚接近, 只是相比之下, 其甲基化的 CpG 位点分布不够均匀, 整齐度不好 (图 3b).

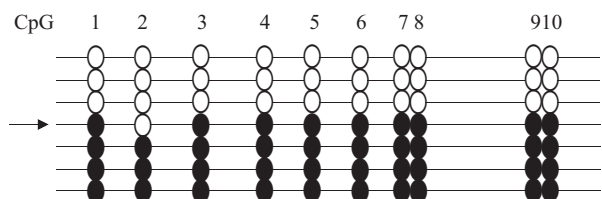


Fig. 2 Methylation patterns of 10 conserved CpG sites within the 5' regulatory region of *Xist* gene in *in vitro* fertilized blastocysts

Open and closed circles indicate unmethylated and methylated CpG sites, respectively.

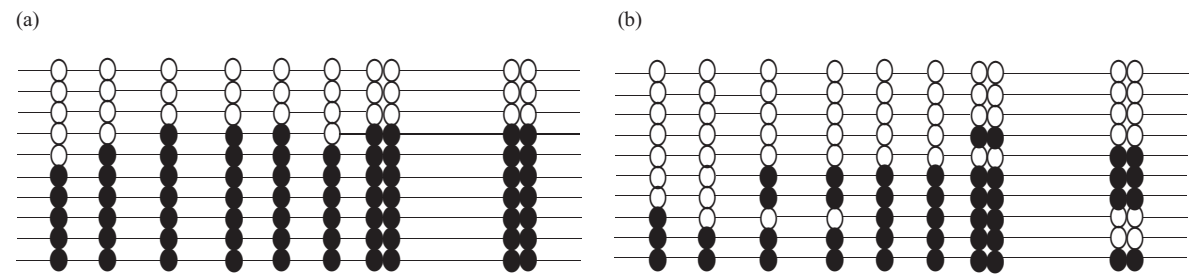


Fig. 3 Methylation patterns of 10 conserved CpG sites of 5' regulatory region of *Xist* gene in FFB (a) and its cloned blastocysts (b)

Open and closed circles indicate unmethylated and methylated CpG sites, respectively.

2.4 FOV 及其克隆囊胚 *Xist* 基因调控区 DNA 甲基化检测

培养 3 代的输卵管上皮细胞 (FOV) *Xist* 基因 DNA 甲基化检测结果见图 4a, 在被检测的 CpG 位点中有 63% 的位点是甲基化的. FFB 的检测结果与 FOV 相似, 说明体细胞的甲基化程度比较高, 但

是甲基化位点的分布并不均匀, 整齐度稍差, 而 8 枚 FOV 来源的克隆囊胚的检测结果见图 4b, 仅有约 17% 的位点是甲基化. 因此, 与 FFB 来源的克隆囊胚及体外受精囊胚相比, FOV 来源的克隆囊胚 *Xist* 基因 DNA 甲基化水平处于相对较低的状态.

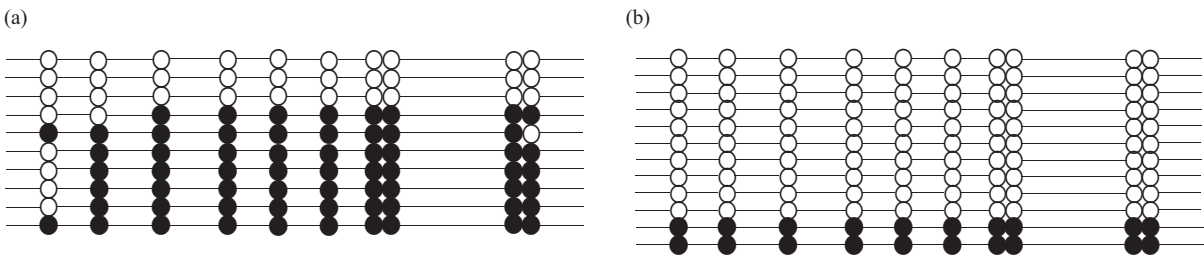


Fig. 4 Methylation patterns of 10 conserved CpG sites within the 5' regulatory region of *Xist* gene in FOV (a) and cloned blastocysts (b)

Open and closed circles indicate unmethylated and methylated CpG sites, respectively.

3 讨 论

雌性哺乳动物早期胚胎发育时, X 染色体发生失活, 这是哺乳动物个体发育的重要事件, 因此, X 染色体失活是否正常进行, 将对动物胚胎发育、妊娠及出生都具有重要影响.

Xist 基因是调节 X 染色体失活的重要基因, 它是单等位基因表达的(monoallelic expression), 其表达受 5'调控区 CpG 岛 DNA 甲基化的调节. 在小鼠的研究中发现, *Xist* 基因的低甲基化, 可导致 *Xist* 基因的表达, 使位于 X 染色体上的基因沉默^[12]; 另外, *Xist* 基因 DNA 甲基化状态对 *Xist* 表达的影响可能与个体发育的某些时期相关, Beard 等^[13]认为胚胎期 *Xist* 基因的表达与其 DNA 甲基化可能没有明显的相关性, 但是, 体细胞 *Xist*

基因 DNA 低甲基化可能会导致 *Xist* 基因的表达. 关于牛 *Xist* 基因的研究报道较少, Xue 等^[8]在 2002 年用甲基化敏感的限制性内切酶对 *Xist* 基因甲基化程度进行研究, 发现死亡克隆牛 *Xist* 基因均处于低甲基化状态, 但在 Dindot 等^[14]的研究中却未能发现 *Xist* 基因 DNA 甲基化的变化. 在本实验中, 对体外受精囊胚和不同供体核克隆囊胚的研究发现(图 5), 体细胞 *Xist* 基因 DNA 甲基化程度较高, FFB *Xist* 基因甲基化的 CpG 位点占所检测 CpG 总位点的 66%, 与 FOV 的 63%接近, 而体外受精囊胚中该基因处于中等 DNA 甲基化水平, 所占比例为 49%, 但是克隆囊胚处于较低的甲基化状态, 特别是 FOV 来源的克隆胚胎仅有 17% 的位点是甲基化的. 从实验结果看, 在体外受精囊胚和

FFB中, 2条X染色体上 *Xist* 基因的 DNA 甲基化程度是完全不同的, 符合单等位基因表达 (monoallelic expression) 的特征, Xa 上的 *Xist* 基因 5' 调控区, 各 CpG 位点可能是完全甲基化的, 而 Xi 上的可能是完全未被甲基化的. 在克隆囊胚中, *Xist* 基因的 DNA 甲基化程度相对其供体核都有所降低, 这说明 *Xist* 基因是可以被重编程的, 并且重编程在不同供体核之间也有一定差异. 由于该 CpG 岛能够被重编程, 因此, 所检测的 CpG 岛可能在调节 *Xist* 基因的表达中起作用. 结合本实验室

已发表的实验数据^[15], Holstein 奶牛同一个体的 FFB 和 FOV 来源的重构胚, FFB 来源的克隆囊胚发育率比 FOV 的低, 但其克隆牛胎儿的妊娠率和产犊率都比 FOV 来源的高. 由此得出, 不同供体核克隆囊胚 *Xist* 基因 DNA 甲基化是不同的, FOV 来源的克隆胚胎 *Xist* 基因低甲基化可能有利于囊胚的发育, 这也从侧面说明不同供体核克隆囊胚的重编程是有差异的, 这种差异影响到胚胎及其个体的发育.

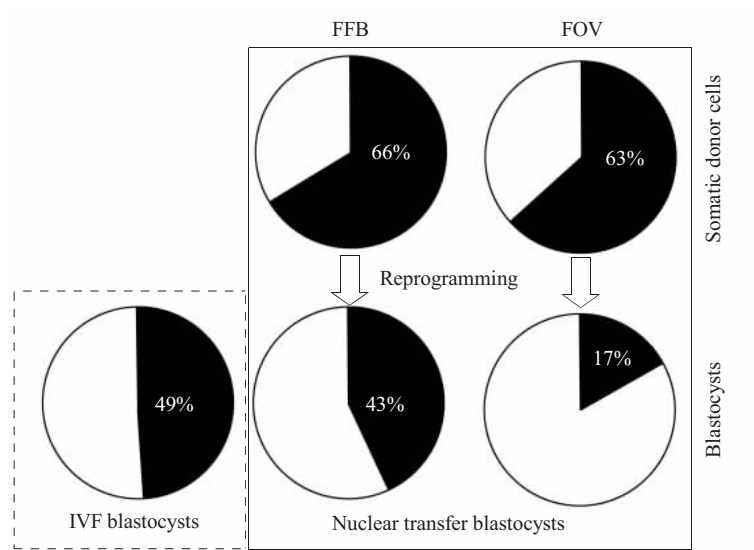


Fig. 5 DNA methylation levels of the *Xist* gene in cloned blastocysts derived from FFB and FOV

■: Methylated; □: Unmethylated.

参 考 文 献

- Rideout W M, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*, 2001, **293**(5532): 1093~1098
- Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, *et al.* X-chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science*, 2000, **290** (5496): 1578~1581
- Nolen L D, Gao S, Han Z, *et al.* X chromosome reactivation and regulation in cloned embryos. *Dev Biol*, 2005, **279** (2): 525~540
- 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
- Bourc'his D, Le Bourhis D, Patin D, *et al.* Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr Biol*, 2001, **11** (19): 1542~1546
- Kremenskoy M, Kremenska Y, Suzuki M, *et al.* Epigenetic characterization of the cpG islands of bovine leptin and pou5f1 genes in cloned bovine fetuses. *J Reprod Dev*, 2006, **52** (2): 277~285
- Kremenskoy M, Kremenska Y, Suzuki M, *et al.* DNA methylation profiles of donor nuclei cells and tissues of cloned bovine fetuses. *J Reprod Dev*, 2006, **52** (2): 259~266
- Xue F, Tian X C, Du F, *et al.* Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet*, 2002, **31** (2): 216~220
- Smith S L, Everts R E, Tian X C, *et al.* Global gene expression profiles reveal significant nuclear reprogramming by the blastocyst stage after cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (49): 17582~17587
- Chen T, Zhang Y L, Jiang Y, *et al.* The DNA methylation events in normal and cloned rabbit embryos. *FEBS Lett*, 2004, **578** (1~2): 69~72
- Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24** (24): 5064~5066
- Panning B, Jaenisch R. DNA hypomethylation can activate *xist* expression and silence X-linked genes. *Genes Dev*, 1996, **10**(16):

- 1991~2002
- 13 Beard C, Li E, Jaenisch R. Loss of methylation activates *xist* in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev*, 1995, **9** (19): 2325~2334
- 14 Dindot S V, Kent K C, Evers B, *et al.* Conservation of genomic imprinting at the *xist*, *igf2*, and *gtl2* loci in the bovine. *Mamm Genome*, 2004, **15** (12): 966~974
- 15 Gong G, Dai Y, Zhu H, *et al.* Generation of cloned calves from different types of somatic cells. *Sci China C Life Sci*, 2004, **47** (5): 470~476

Methylation Patterns of The *Xist* Gene in Cloned Bovine Blastocysts Derived From Different Somatic Donor Cells*

CAO Geng-Sheng^{1,2}, GAO Yu^{1,3}, DAI Yun-Ping¹, LI Rong³, ZHAO Yao-Feng¹, LI Ning¹)**

⁽¹⁾ The State Key Laboratories for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

⁽²⁾ College of Life Science, Henan University, Kaifeng 475001, China;

⁽³⁾ College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Using bisulphate sequencing, methylation patterns of the *Xist* gene in cloned blastocysts derived from bovine fetal fibroblasts (FFB) or oviduct epithelial cells (FOV) were investigated, as compared to that in donor cells and *in vitro* fertilized (IVF) blastocysts. Hypomethylation of the *Xist* gene was observed in the cloned blastocysts (43% and 17% in FFB and FOV derived blastocysts, respectively), while the *Xist* gene in 49% IVF blastocysts appeared to be methylated. On the contrast, somatic donor cells showed high percentage of methylation (66% and 63% in FFB and FOV cells, respectively). These results suggest that the DNA methylations of the *Xist* gene were reprogrammable and the detected CpG islands may regulate expression of the *Xist* gene. Altogether with the previous data, It was shown that development rate of cloned blastocysts derived from FFB is lower than that from FOV of the same origin, while pregnancy and birth rates appear to be opposite. It can be proposed that cloned blastocysts derived from different types of somatic cells differ in DNA reprogramming that may affect embryo and fetal development.

Key words X inactive specific transcript, DNA methylation, cloned blastocysts

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China and The State Major Basic Research Development Program.

**Corresponding author. Tel: 86-10-62731146, 86-10-62733323, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

Received: April 22, 2006 Accepted: June 2, 2006