

张宁, 余波, 石俊松, 等. 印记基因 *XIST* 和 *H19* DNA 甲基化水平与猪克隆胚胎发育效率关联分析 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(3): 9-16.  
ZHANG Ning, YU Bo, SHI Junsong, et al. Correlation between DNA methylation levels of imprinted genes *XIST* and *H19* and developmental efficiency of porcine cloned embryo[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(3): 9-16.

# 印记基因 *XIST* 和 *H19* DNA 甲基化水平与猪克隆胚胎发育效率关联分析

张宁<sup>1</sup>, 余波<sup>1</sup>, 石俊松<sup>2</sup>, 吴霄<sup>1</sup>, 吴珍芳<sup>1</sup>, 李紫聪<sup>1</sup>

(1 华南农业大学 动物科学学院/国家生猪种业工程技术研究中心, 广东 广州 510642;

2 广东温氏种猪科技有限公司, 广东 云浮 527400)

**摘要:**【目的】体细胞核移植 (Somatic cell nuclear transfer, SCNT) 在农业、生物医学等领域应用广泛, 但是克隆效率太低制约了该技术的应用和推广。本研究的目的在于探究印记基因 *XIST* 和 *H19* DNA 甲基化水平与克隆效率的联系。【方法】利用同一头猪源耳朵成纤维细胞培养获得 14 个细胞克隆团, 分别作为供体细胞进行 SCNT 试验, 统计比较以各克隆团为供体细胞生产克隆胚胎的囊胚率以及各囊胚的 *XIST* 和 *H19* 基因调控区的 DNA 甲基化水平, 对 *XIST* 和 *H19* 基因差异甲基化区域 DNA 甲基化水平与克隆胚胎的囊胚率进行相关性分析。【结果】以 1 号克隆团为供体细胞得到囊胚的 *XIST* 基因 DNA 甲基化水平最高且囊胚率最低, 分别为 65.04%、8.6%, 以 14 号克隆团为供体细胞得到 *XIST* 基因囊胚的 DNA 甲基化水平最低但囊胚率最高, 分别为 16.68%、38.2%; 相关性分析表明 *XIST* 基因的 DNA 甲基化水平与囊胚率之间存在高度负相关 ( $|r|=0.8125 > 0.8$ )。 *H19* 基因 A 侧甲基化平均水平最高和最低分别为 5.12% 和 0.61%, 相关性分析表明 *H19* 基因 A 侧 DNA 甲基化水平与囊胚率间只有极弱的相关 ( $|r|=0.1647 < 0.3$ ); *H19* 基因 G 侧 DNA 甲基化水平最高和最低分别为 90.92% 和 72.69%, 相关性分析表明 *H19* 基因 G 侧 DNA 甲基化水平与囊胚率间只有低度相关 ( $0.3 < |r|=0.3098 < 0.5$ )。【结论】*XIST* 基因 DNA 甲基化水平越低, 则克隆团囊胚率越高。研究结果对提高猪 SCNT 胚胎发育效率, 改善现有的猪 SCNT 技术体系提供了基础。

**关键词:** 猪; 体细胞核移植; 印记基因; 差异甲基化区域; 克隆团; 囊胚率; 克隆效率

中图分类号: S813.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2021)03-0009-08

## Correlation between DNA methylation levels of imprinted genes *XIST* and *H19* and developmental efficiency of porcine cloned embryo

ZHANG Ning<sup>1</sup>, YU Bo<sup>1</sup>, SHI Junsong<sup>2</sup>, WU Xiao<sup>1</sup>, WU Zhenfang<sup>1</sup>, LI Zicong<sup>1</sup>

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University/National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, Guangzhou 510642, China; 2 Guangdong Wenshi Breeding Pig Technology Co., Ltd., Yunfu 527400, China)

**Abstract:** 【Objective】 Somatic cell nuclear transfer (SCNT) is widely used in agriculture, biomedicine and other fields, but the low cloning efficiency restricts the application and promotion of this technology. The purpose of this study was to explore the relationship between the DNA methylation levels of imprinted genes (*XIST*, *H19*) and cloning efficiency. 【Method】 Fourteen cell clone groups were obtained by culturing the same

收稿日期: 2020-08-06 网络首发时间: 2021-04-06 08:55:07

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20210402.1653.012.html>

作者简介: 张宁 (1994—), 男, 硕士研究生, E-mail: [1249133219@qq.com](mailto:1249133219@qq.com); 通信作者: 李紫聪 (1979—), 男, 教授, 博士, E-mail: [lizicong@scau.edu.cn](mailto:lizicong@scau.edu.cn)

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金 (2019B1515210027)

pig-derived ear fibroblasts, and were used as the donor cells for SCNT experiments. We statistically compared the blastocyst rates and DNA methylation levels of *XIST* and *H19* gene regulatory regions for each sac of cloned embryos produced with each clone group as donor cells. We analyzed the correlation between the DNA methylation levels of differentially methylated regions for *XIST* and *H19* genes and the blastocyst rates of cloned embryos. 【Result】 The DNA methylation level of *XIST* gene of blastocysts obtained from clone group 1 as donor cells was the highest (65.04%) and the blastocyst rate was the lowest (8.6%). The DNA methylation level of *XIST* gene of blastocysts obtained from clone group 14 as donor cells was the lowest (16.68%) and the blastocyst rate was the highest (38.2%). The correlation analysis showed that there was a strong negative correlation between the *XIST* gene methylation level and the blastocyst rate ( $|r|=0.8125>0.8$ ). The highest and lowest DNA methylation levels of *H19* gene A side were 5.12% and 0.61% respectively. Correlation analysis showed that there was only a very weak correlation between the DNA methylation level of *H19* gene A side and blastocyst rate ( $|r|=0.1647<0.3$ ). The highest and lowest DNA methylation levels on the G side of *H19* gene were 90.92% and 72.69% respectively. Correlation analysis showed that there was only a low correlation between the DNA methylation level on the G side of *H19* gene and the blastocyst rate ( $0.3<|r|=0.3098<0.5$ ). 【Conclusion】 The lower the DNA methylation level of *XIST* gene, the higher the blastocyst rate of the clone group. The research results provide a basis for improving the efficiency of pig SCNT embryonic development and improving the existing pig SCNT technology system.

**Key words:** pig; somatic cell nuclear transfer; imprinted gene; differentially methylated region; clone group; blastocyst rate; cloning efficiency

1962 年世界上第 1 例体细胞克隆动物诞生<sup>[1]</sup>, 1962 年英国发育生物学家 Gurdon 利用蟾蜍幼体的肠上皮细胞作为供体细胞进行体细胞核移植, 最终发育成为了蝌蚪。但是总体而言克隆技术发展较为缓慢, 直到世界上第 1 例体细胞克隆哺乳动物 Dolly 羊的诞生<sup>[2]</sup>, 体细胞克隆技术得到快速的发展, 体细胞克隆技术相继在奶牛<sup>[3]</sup>、小鼠<sup>[4]</sup>、山羊<sup>[5]</sup>、猪<sup>[6]</sup>、狗<sup>[7]</sup>、水牛<sup>[8]</sup>、骆驼<sup>[9]</sup>、猴<sup>[10]</sup> 等动物上获得成功。与此同时动物体细胞克隆技术在保存和复制扩繁优秀生产性状的农业动物、保存或恢复濒危甚至是已灭绝的动物、作为异种器官移植的供体动物以及治疗性克隆、转基因生物反应器生产药物蛋白和人类疾病模型的构建中拥有着广泛的作用。

虽然克隆技术在很多领域上都有着广泛的应用, 但是就目前来说克隆技术的发展依然非常的缓慢, 其中最主要的原因是克隆效率的限制。以猪为例, 猪的克隆效率普遍只有 1%~3%<sup>[11]</sup>。导致克隆效率低的原因主要有供体核表观遗传修饰的异常以及动物体细胞克隆中各种复杂的试验技术。表观遗传修饰主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、基因组印记、X 染色体失活<sup>[12-13]</sup>。其中 DNA 甲基化在众多基因组的表观遗传修饰中是极为重要的<sup>[14]</sup>。DNA 甲基化的异常会导致很多功能基因的异常表达, 尤其是印迹基因 (*XIST*、*H19*) 的异常表达将会导致克隆胚胎的异常发育<sup>[15]</sup>。Jiang 等<sup>[16]</sup>在死亡的克隆猪

上发现 *XIST* 基因的异常表达。Wianny 等<sup>[17]</sup>发现 *H19* 基因在哺乳动物的胚胎发育中有着重要的作用, 而且完全敲除 *H19* 基因将导致胚胎死亡。

*XIST* 是 X 染色体失活的关键基因。*XIST* 基因在体外受精 (*In vitro* fertilization, IVF) 和体内受精 (*In vivo* fertilization, IVV) 的胚胎中仅在父系来源的 X 染色体上表达, 但是在克隆动物的早期胚胎中父系来源和母系来源的 X 染色体都会被激活。母系来源 X 染色体 *XIST* 基因的异常表达会导致母源 X 染色体的失活以及早期胚胎整体转录物的改变<sup>[18]</sup>, 从而可能导致早期胚胎以及胚胎附植后发育异常。Nolen 等<sup>[19]</sup>在 2005 年研究发现在克隆小鼠的囊胚期阶段出现了 2 条 X 染色体都失活的现象。同时, 在很多研究中都发现在克隆胚胎中 X 染色体相关基因的大规模下调<sup>[20-21]</sup>。所以在小鼠上通过使用敲除 *XIST* 的细胞系作为供体细胞代替体细胞或者在克隆胚胎 1 细胞期注射人为设计的针对 *XIST* 基因的小干扰 RNA 极大地提高了胚胎的发育效率<sup>[20-21]</sup>。*H19* 基因是发现得比较早的 1 个印记基因, 位于猪的 2 号染色体上, 编码 1 个 2.3 kb 的非编码 RNA 分子<sup>[22]</sup>。*H19* 基因与胚胎的生长发育有很重要的关系, 有研究发现 *H19* 基因的失活可以导致新生雌性胎儿的体质量比正常高 27%<sup>[23]</sup>。

本研究利用同一头猪来源的耳朵成纤维细胞培养得到 14 个细胞克隆团, 以这些克隆团为供体

细胞进行体细胞核移植试验,并且统计了各克隆团的囊胚率以及各囊胚的 *XIST* 和 *H19* 基因调控区的 DNA 甲基化水平,以期找到与猪克隆胚胎发育效率相关的重要印记基因的表观遗传修饰,为将来通过调控相关的印记基因的表观遗传修饰或表达来提高猪克隆效率提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

亚硫酸盐转化试剂盒 EZ DNA Methylation-Gold™ Kit、ZymoTaq™ PreMix(ZYMO RESEARCH 公司);普通 PCR 用的 TaqMix(广州东盛生物科技有限公司);TA 连接试剂 InsTAclone™ PCR Cloning Kit(上海拜力生物科技有限公司);DL500 DNA Marker(大连宝生生物工程有限公司);PCR 产物纯化试剂盒 E.Z.N.A Cycle-Pure Kit、氨苄青霉素(Amp)(北京天泽生物制品有线公司);核酸染料(北京康润诚业生物科技有限公司)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 *H19*、*XIST* 基因差异甲基化区域的选择 已经有文献报道 *H19* 的差异甲基化区域(Differentially methylated region, DMR)<sup>[24]</sup>,参考这些研究报道利用甲基化引物设计网站(<http://www.urogene.org/methprimer/>) 在 *H19* 基因(GenBank: AY044827.1) 的启动子区域设计甲基化引物,扩增并检测该区域的片段。本研究的 *XIST* 基因的 DMR 位于 *XIST* 基因的 5' 端的侧翼区域,是由 Xu 等<sup>[25]</sup> 在 2013 年发现的。

1.2.2 *H19* 的 2 个等位基因含有父母本差异碱基的供体细胞的筛选和获取 从广东温氏食品有限公司挑选 26 头杂交公猪(品种包括杜洛克×二花脸,大约克×莱芜和四元杂商品猪),每头公猪采集耳组织样品并抽提 DNA。通过 PCR 扩增 *H19* 基因的调控区(CTCF3 片段附近),并将 PCR 产物测序来寻找 *H19* 的 2 个等位基因含有父母本差异碱基的

公猪。将该头猪的耳朵成纤维细胞通过单细胞接种,产生 14 个相同遗传背景的单细胞克隆团,分别作为供体细胞制备克隆胚胎。因公猪只有 1 条 X 染色体,只携带 1 个 X 染色体连锁的 *XIST* 等位基因,不用区分其父母本等位基因。

1.2.3 体细胞核移植、胚胎收集 在广州嘉禾望岗屠宰场收集猪的卵巢,将收集到的卵巢用含双抗和生理盐水的 4 L 保温瓶保存好,快速运回实验室。用未开封的一次性注射器将卵母细胞从 3~8 mm 的卵泡中抽提出来。将抽提好的卵泡液倒入 50 mL 的细胞用的离心管中静置 10 min,小心去除上清液,再用 DPBS 缓冲液清洗 3 次沉淀。将清洗好的沉淀吸到 10 cm 细胞培养板中,挑选完好的复合体。将选好的复合体培养成熟,然后用透明质酸酶处理,将处理好的复合体用口吸管在体视镜下挑选出排出第一极体的成熟卵母细胞,在 Spindle-view 系统下观察进行去核操作。将挑选好的体细胞注入已去核的形态结构完整的卵母细胞卵周隙中,然后将重构胚胎激活。最后将激活好的胚胎置于培养箱中培养,本试验的核移植是在下午进行的,当天作为核移植的第 0 天,在第 7 天下午统一收集胚胎,并记录形态,将每个囊胚单独收集到 1 个 PCR 管中,样品暂时保存在 -80 °C 冰箱中。

1.2.4 胚胎亚硫酸测序 分批使用 EZ DNA Methylation-Direct™ Kit 处理样品,试验操作流程参照试剂盒说明书,产物保存在 -20 °C 冰箱。因为胚胎样品的浓度低(DNA 质量浓度通常低于 1 ng/μL),所以使用巢氏 PCR 对产物进行扩增,引物序列如表 1 所示。巢氏 PCR 分成 2 轮扩增。第 1 轮 PCR 酶为 ZymoTaq™ PreMix。反应程序如下:95 °C 10 min, 94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 30 s、30 个循环,72 °C 7 min,16 °C 1 h。反应体系为 15 μL。第 2 轮,以稀释 2 倍的第 1 轮产物为模版,PCR 酶为普通 Taq 酶。反应程序如下:95 °C 3 min,94 °C 25 s、59 °C 25 s、72 °C 25 s、45 个循环,72 °C 10 min,16 °C 1 h。

表 1 猪 *H19* 和 *XIST* 基因巢氏 PCR 引物信息

Table 1 Primer information for nest PCR of porcine *H19* and *XIST* genes

基因	引物	引物序列(5'→3')	退火温度/°C
Gene	Primer	Primer sequence	Annealing temperature
<i>H19</i>	H19-OF	GGTTTATAGGGGATATTTTTT	50
	H19-OR	CTAAACACCCAACCTTTAACAC	
	H19-IF	GTAGGGTTTTTGGTGGTATAGGG	55
	H19-IR	AAAATAAAACAAAACCCACACTTA	
<i>XIST</i>	XIST-OF	GTGTGTATTTTTTGATAAATTTTGT	55
	XIST-OR	CRATACTAACTAACTAAATAAAAAC	
	XIST-IF	GGATAATATGGTTGATTTTGTATGTG	59
	XIST-IR	CACCACCCTTCTAATTAATATATATC	

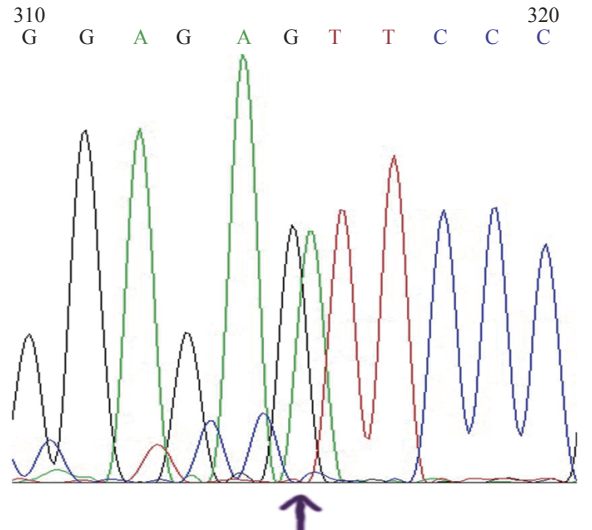
将经过 2 轮巢氏 PCR 扩增好的产物吸取 10 μL 点在 30 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳, 将有明显条带的样品回收并且测定其浓度。最后将产物连接、转化、挑菌、送华大基因测序, 每个样品至少要获得 10 个以上的有效测序结果。

1.2.5 数据处理及统计分析 对测序结果编号, 存为 fas 格式, 再用 BiQ Analyzer 软件进行分析, 制作高分辨的甲基化串珠图。利用 SPSS25.0 的单因素 ANOVA 程序的 LSD 方法对甲基化水平进行多重比较。利用 Pearson 相关系数 ( $r$ ) 将 *XIST* 基因、*H19* 基因甲基化水平与囊胚率进行相关性分析。 $r > 0$  为正相关,  $r < 0$  为负相关;  $|r| < 0.3$ , 相关性极弱;  $0.3 \leq |r| < 0.5$ , 低度相关;  $0.5 \leq |r| < 0.8$ , 中度相关;  $|r| \geq 0.8$ , 高度相关;  $|r| > 0.95$ , 存在显著相关<sup>[26]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 *H19* 父母本差异碱基的寻找

在 *H19* 基因的 CTCF3 片段附近设计引物对 26 头杂交公猪样品进行检测, 最后筛选到有 1 头猪的样品有差异碱基 (图 1)。然后设计引物进行测序, 测序结果如图 2 所示。在图中可以明显的看到在某些序列上的差异, 一些序列里几个位点全部为 A, 而另一些序列里几个位点全部是 G。于是用 A 和 G 来区分父母本 2 个等位基因, 最后分开分析细胞克隆团囊胚 *H19* 基因的甲基化结果。



图中箭头标明了差异碱基的位置

The arrow in the figure indicates the position of the differential base

图 1 差异碱基测序峰图

Fig. 1 Differential base sequencing peak diagram

### 2.2 *H19* 基因差异甲基化区域选择结果

*H19* 基因差异甲基化区域是通过设计甲基化引物再将其扩增得到的。其扩增的区域如图 3 所示, 该区域的总长度为 241 bp, 共有 15 个 CpG 岛。

### 2.3 胚胎收集情况统计

统一在核移植后的第 7 天下午收集胚胎, 在显微镜下观察胚胎的形态并进行记录。具体的统计结果如表 2, 共使用了 14 个细胞克隆团 (编号为: 1、2、

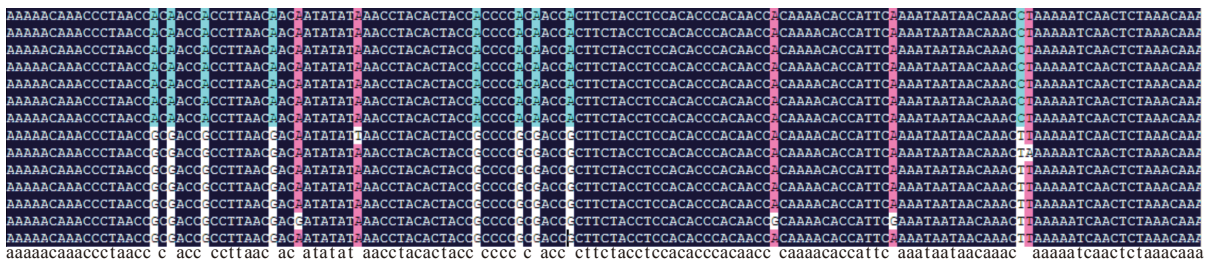
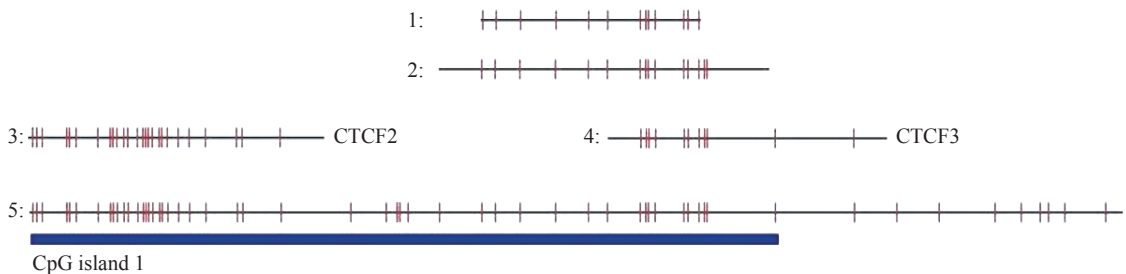


图 2 *H19* 基因父母本差异碱基的测序结果

Fig. 2 *H19* gene sequencing results of differential bases of parents



图中 1-4 为扩增的 4 个短片段, 5 为连接 1-4 得到的片段, 其中蓝色区域为差异甲基化区域

In the figure, 1-4 are the amplified four short fragments, 5 is the fragment obtained by connecting 1-4 fragments, and the blue area is the differentially methylated area

图 3 *H19* 基因差异甲基化区域

Fig. 3 Differential methylation regions of *H19* gene

表2 胚胎收集情况统计  
Table 2 Statistics of embryo collection

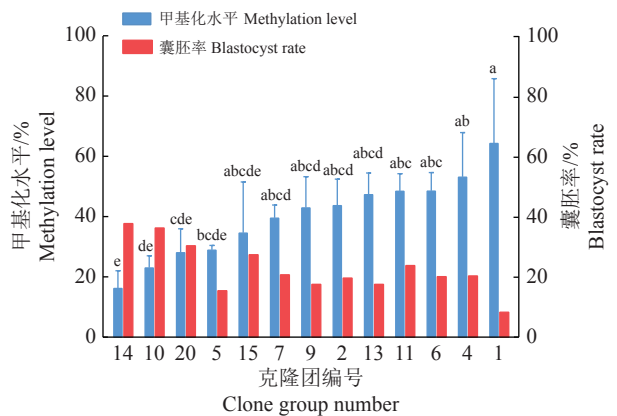
克隆团编号 Clone group number	重构胚胎数 Number of reconstructed embryos	卵裂胚胎数 Number of cleavage embryos	囊胚数 Number of blastocyst	卵裂率/% Cleavage rate	囊胚率/% Blastocyst rate
1	35	25	3	71.4	8.6
2	20	17	4	85.0	20.0
4	29	20	6	69.0	20.7
5	19	10	3	52.6	15.8
6	39	35	8	89.7	20.5
7	38	30	8	78.9	21.1
8	30	21	1	70.0	3.3
9	39	32	7	82.1	17.9
10	30	24	11	80.0	36.7
11	33	25	8	75.8	24.2
13	28	19	5	67.9	17.9
14	34	30	13	88.2	38.2
15	18	11	5	61.1	27.8
20	26	19	8	73.0	30.8

4、5、6、7、8、9、10、11、13、14、15、20) 进行核移植试验, 得到 418 个重构胚胎, 收集到 90 个囊胚。其中以 14 号克隆团作为核移植的供体细胞囊胚率最高, 为 38.2%, 以 1 号克隆团为核移植的供体细胞囊胚率最低, 为 8.6%。以 8 号克隆团作为供体细胞进行核移植试验只得到 1 个囊胚, 囊胚数太少, 没有被用于后续试验。

2.4 细胞克隆团囊胚的 *XIST* 基因的甲基化结果以及与囊胚率的关联分析

利用亚硫酸盐测序统计了 87 个囊胚 *XIST* 的甲基化情况, 其中有 77 个囊胚数据是有效的 (每个囊胚有 10 个以上的有效测序结果, 表示该囊胚的数据是有效的)。对不同单细胞克隆团 *XIST* 基因 DNA 甲基化水平以及囊胚率进行比较 (图 4), 其中 14 号克隆团的甲基化水平最低, 仅为 16.68%, 1 号克隆团的甲基化水平最高, 为 65.04%。与此同时为了研究不同单细胞克隆团囊胚 *XIST* 基因甲基化程度之间的差异, 利用单因素 ANOVA 程序的 LSD 方法对甲基化水平进行多重比较, 结果 (图 4) 表明 10、14、20 号克隆团的甲基化水平显著低于 1、4 号克隆团 ( $P<0.05$ )。

为了研究单细胞克隆团囊胚的 *XIST* 基因的 DNA 甲基化水平与该单细胞克隆团为供体细胞得到的囊胚率之间的关联性, 对 2 组数据进行 Pearson 相关系数分析和回归分析 (图 5)。得到的 Pearson 相关系数  $r=-0.8125$ ,  $|r|>0.8$ ,  $R^2=0.6602$ , 所以单细



柱子上方的不同小写字母表示克隆团间甲基化水平差异显著 ( $P<0.05$ , LSD 法)

Different lowercase letters on bars indicate significant differences in methylation levels among clone groups ( $P<0.05$ , LSD method)

图 4 不同单细胞克隆团制备的囊胚的 *XIST* 基因 DNA 甲基化水平和囊胚率

Fig. 4 The DNA methylation levels and blastocyst rates of *XIST* genes of blastocysts prepared from different single-cell cloning groups

胞克隆团囊胚的 *XIST* 基因的甲基化程度与囊胚率间有高度负相关性。

2.5 细胞克隆团囊胚的 *H19* 基因的甲基化结果及与囊胚率的关联分析

由于父母本差异碱基的存在, 细胞克隆团囊胚 *H19* 基因的 DNA 甲基化水平统计结果以等位基因 A 和 G 分开统计结果, 分为 A 侧和 G 侧。A 侧等位基因总共有 56 个囊胚数据是有效的, 这 56 个囊胚

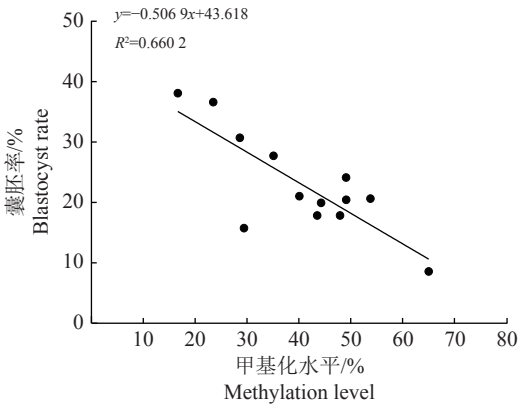
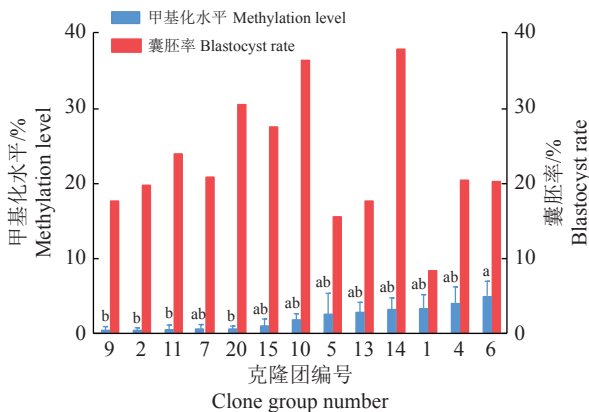


图 5 不同单细胞克隆团制备的囊胚的 *XIST* 基因 DNA 甲基化水平与囊胚率的关联分析

Fig. 5 The correlation analysis between the DNA methylation levels of *XIST* genes and the blastocyst rates of blastocysts prepared from different single-cell cloning groups

是以 13 个细胞克隆团为供体细胞克隆得到的; 其中 DNA 甲基化水平最高的细胞克隆团是 6 号克隆团, 均值为 5.12%, 最低为 9 号克隆团, 均值为 0.61%(图 6)。G 侧等位基因总共得到了 54 个有效结果, 包括 12 个细胞克隆团的 DNA 甲基化水平; 其中 DNA 甲基化水平最高的细胞克隆团是 4 号克隆团, 均值为 90.92%, 最低为 11 号克隆团, 均值为 72.69%(图 7)。A 侧等位基因的 DNA 甲基化水平整体趋近于 0, G 侧等位基因 DNA 甲基化水平为 60%~100%。对 *H19* 基因 A 侧等位基因 DNA 甲基化水平的多重比较结果(图 6) 显示, 只有 6 号克隆团与 2 号、9 号、11 号、20 号间的 DNA 甲基化水平



柱子上方的不同小写字母表示克隆团间甲基化水平差异显著 ( $P < 0.05$ , LSD 法)

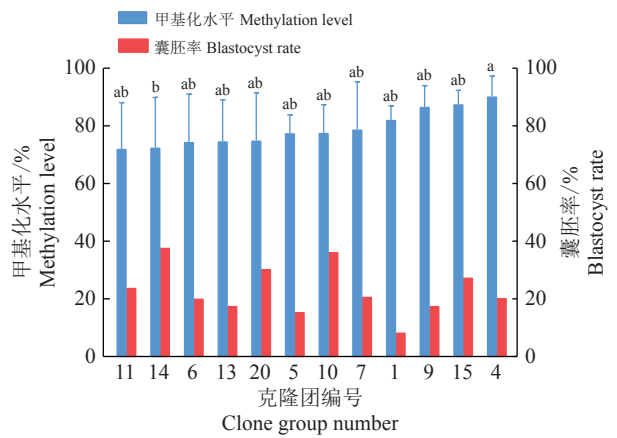
Different lowercase letters on bars indicate significant differences in methylation levels among clone groups ( $P < 0.05$ , LSD method)

图 6 不同单细胞克隆团制备的囊胚的 *H19* 基因 A 侧等位基因的 DNA 甲基化水平和囊胚率

Fig. 6 The DNA methylation levels and blastocyst rates on the A allele sides of *H19* genes of blastocysts prepared from different single-cell cloning groups

有显著差异 ( $P < 0.05$ )。对 *H19* 基因 G 侧等位基因 DNA 甲基化水平进行多重比较, 图 7 的结果表明在 12 个克隆团中只有 4 号和 14 号克隆团间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

对 *H19* 基因 A 侧和 G 侧等位基因 DNA 甲基化水平与囊胚率 2 组数据进行 Pearson 相关性分析, *H19* 基因 A 侧的相关系数  $r = -0.1647$ ,  $|r| < 0.3$ ,  $R^2 = 0.0271$ (图 8); *H19* 基因 G 侧的相关系数  $r = -0.3098$ ,  $0.3 < |r| < 0.5$ ,  $R^2 = 0.096$ (图 9)。表明 *H19* 基因 A 侧等位基因 DNA 甲基化水平与囊胚率间相关性极低, *H19* 基因 G 侧等位基因 DNA 甲基化水平与囊胚率间有低度的负相关性。



柱子上方的不同小写字母表示克隆团间甲基化水平差异显著 ( $P < 0.05$ , LSD 法)

Different lowercase letters on bars indicate significant differences in methylation levels among clone groups ( $P < 0.05$ , LSD method)

图 7 不同单细胞克隆团制备的囊胚的 *H19* 基因 G 侧等位基因的 DNA 甲基化水平和囊胚率

Fig. 7 The DNA methylation levels and blastocyst rates on the G allele sides of *H19* genes of blastocysts prepared from different single-cell cloning groups

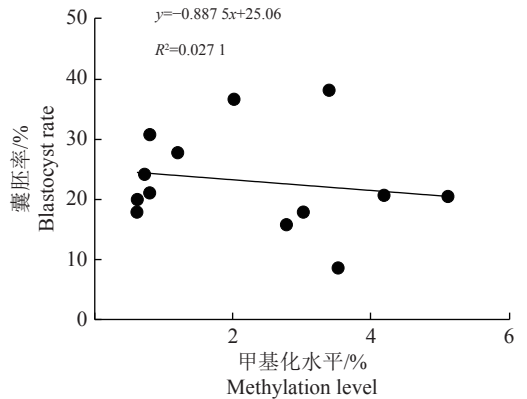


图 8 不同单细胞克隆团制备的囊胚的 *H19* 基因 A 侧等位基因侧 DNA 甲基化水平与囊胚率的关联分析

Fig. 8 The correlation analysis between the DNA methylation level on the A allele sides of *H19* genes and the blastocyst rates of blastocysts prepared from different single-cell cloning groups

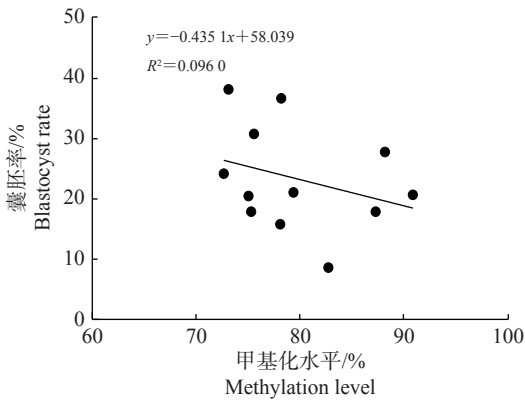


图9 不同单细胞克隆团制备的囊胚的 *H19* 基因 G 侧等位基因 DNA 甲基化水平与囊胚率的关联分析

Fig. 9 The correlation analysis between the DNA methylation levels on the G allele sides of *H19* genes and the blastocyst rates of blastocysts prepared from different single-cell cloning groups

### 3 讨论与结论

本研究选取的 *XIST* 基因差异甲基化区域 (DMR) 来自 Xu 等<sup>[25]</sup> 对猪的 *XIST* 基因的研究, 该研究证明了精子和卵母细胞的 *XIST* 基因区域出现典型的差异甲基化现象, 并且研究了该 DMR 甲基化程度和表达量的关系以及药物处理对不同阶段克隆胚胎的 *XIST* 基因甲基化程度的影响<sup>[25]</sup>。 *H19* 基因的 DMR 的选择是参考了相应的文献<sup>[24]</sup>, 在 *H19* 基因的启动子区域设计甲基化引物合成的。本试验利用亚硫酸盐测序检测了囊胚 *XIST* 基因和 *H19* 基因的 DNA 甲基化状态。研究结果表明各单细胞克隆团生产的囊胚 *XIST* 基因的 DNA 甲基化水平为 16.68%~65.04%, 各囊胚 *XIST* 基因 DNA 甲基化水平间是存在差异的, 尤其是 14 号克隆团的基因甲基化水平显著低于多个克隆团; 而各单细胞克隆团生产的囊胚 *H19* 基因 A 侧的 DNA 甲基化水平为 0.61%~5.12%, 接近 0, *H19* 基因的 G 侧 DNA 甲基化水平为 72.69%~90.92%, 各克隆团间 *H19* 基因 DNA 甲基化水平的差异不明显。

同时本研究也统计了以各个克隆团为核供体细胞的囊胚率, 并利用 Pearson 法分析了 *XIST* 基因 DNA 甲基化水平与囊胚率间的相关性。结果表明单细胞克隆团囊胚 *XIST* 基因 DNA 甲基化水平与囊胚率间存在极强的负相关关系 ( $r=-0.8125$ ), 即克隆团囊胚的 *XIST* 基因 DNA 甲基化水平越低, 克隆团囊胚率就相应地越高。与此同时, Mao 等<sup>[27]</sup> 通过 4 个生物学重复中收集统计了第 7 天 IVF 雌性和雄性的混合胚胎 (囊胚), 发现其所研究的区域的 *XIST* 基因 DNA 甲基化水平为  $(0.6 \pm 2.4)\%$ , 与克隆胚胎相比 IVF 得到的囊胚的 *XIST* 基因 DNA 甲基化水

平远低于克隆胚胎。因此我们提出一个猜想, 在克隆动物囊胚期我们所研究的 *XIST* 基因 DMR 甲基化程度越低则越有利胚胎的存活。该结果可为, 研究表观修饰小分子辅助药物 DNA 甲基化转移酶抑制剂 (DNMTi) 如 5-杂胞苷 (5-azaC)、RG108<sup>[28-30]</sup> 等通过降低 DNA 甲基化水平来提高克隆效率提供基础。

利用 Pearson 法分析 *H19* 基因 A 侧和 G 侧等位基因 DNA 甲基化水平与囊胚率间的相关性, 结果表明 *H19* 基因 A 侧等位基因 DNA 甲基化水平与囊胚率间只有低度的负相关性 ( $r=-0.1647$ ), *H19* 基因 G 侧等位基因 DNA 甲基化水平与囊胚率间只有极低的负相关性 ( $r=-0.3098$ )。因此根据已有的试验数据得出一个初步的结论, 克隆胚胎 *H19* 基因的 DNA 甲基化水平对克隆胚胎的发育效率没有显著影响。但是胚胎的样本量太少, 其中 1 号、5 号、15 号克隆团 *H19* 基因 G 侧等位基因只有 2 个甲基化水平的结果, 所以本试验研究 *H19* 基因的差异甲基化区域对克隆胚胎发育效率的影响结论只是一个初步探索的结论。

本试验的研究结果可以为在体细胞核移植中的精英细胞理论猜想提供一个初步的探索结果。在诱导多功能干细胞 (Induced pluripotent stem cell, iPSC) 的研究中提出了精英细胞的猜想, 而且提出了精英模型、诱导精英模型、随机模型<sup>[31]</sup>。李美蓉<sup>[32]</sup> 的研究将 iPSC 重编程中表达多潜能转录分子的细胞称为精英细胞, 同时也将在初始细胞群中能表达目的细胞表征性表面标记的细胞定义为精英细胞。Ogura<sup>[33]</sup> 通过了 10 年的努力对不同细胞类型和基因型的供体细胞进行评估和筛选, 最终利用小鼠的 129 株细胞株作为供体细胞显著提高了克隆效率。本试验从公猪的体细胞中培养得到了 14 个克隆团, 其中 14 号、10 号克隆团的囊胚率是所有克隆团中最高的, 分别为 38.2% 和 36.7%。利用亚硫酸盐测序得到 14 号、10 号克隆团 *XIST* 基因的 DNA 甲基化水平为 16.68% 和 23.50%, 是所有克隆团最低的, 也是最接近 IVF 胚胎的甲基化水平 (0.6%)。14 号和 10 号克隆团是一种低甲基化高克隆效率的供体细胞, 符合我们理想中的供体细胞即精英细胞。然而上述的结论和结果需要统计验证更多的不同类型的供体细胞的囊胚的甲基化水平与囊胚率, 最终得到一种能显著提高克隆胚的发育效率的供体细胞。

#### 参考文献:

- [1] GURDON J B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding

- tadpoles[J]. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 1962, 10: 622-640.
- [2] WILMUT I, SCHNIEKE A E, MCWHIR J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *Nature*, 1997, 385(6619): 810-813.
- [3] KATO Y, TANI T, SOTOMARU Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult[J]. *Science*, 1998, 282(5396): 2095-2098.
- [4] WAKAYAMA T, PERRY A C, ZUCCOTTI M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei[J]. *Nature*, 1998, 394(6691): 369-374.
- [5] BAGUISI A, BEHBOODI E, MELICAN D T, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(5): 456-461.
- [6] ONISHI A, IWAMOTO M, AKITAT, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei[J]. *Science*, 2000, 289(5482): 1188-1190.
- [7] LCC B C, KIM M K, JANG G, et al. Dogs cloned from adult somatic cells[J]. *Nature*, 2005, 436(7051): 641.
- [8] SHI D, LU F, WEI Y, et al. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells[J]. *Biology of Reproduction*, 2007, 77(2): 285-291.
- [9] WANI N A, WERNERY U, HASSANF A, et al. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer[J]. *Biology of Reproduction*, 2010, 82(2): 373-379.
- [10] LIU Z, CAI Y, WANG Y, et al. Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer[J]. *Cell*, 2018, 172(4): 881-887.
- [11] YANG X, SMITH S L, TIAN X C, et al. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning[J]. *Nature Genetics*, 2007, 39(3): 295-302.
- [12] 邢宝松. 体细胞克隆山羊表观遗传修饰与基因表达特征研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [13] JI H, LU S, PAN D. Epigenetic reprogramming by somatic cell nuclear transfer: Questions and potential solutions[J]. *Yi Chuan*, 2014, 36(12): 1211-1218.
- [14] BERGMAN Y, CEDAR H. DNA methylation dynamics in health and disease[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013, 20(3): 274-281.
- [15] 魏延昌. 克隆猪印迹基因表达及其甲基化状态研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010.
- [16] JIANG L, LAI L, SAMUEL M, et al. Expression of X-linked genes in deceased neonates and surviving cloned female piglets[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2008, 75(2): 265-273.
- [17] WIANNY F, BLACHERE T, GODET M, et al. Epigenetic status of *H19/IGF2* and *SNRPN* imprinted genes in aborted and successfully derived embryonic stem cell lines in non-human primates[J]. *Stem Cell Research*, 2016, 16(3): 557-567.
- [18] BAO S, MIYOSHI N, OKAMOTO I, et al. Initiation of epigenetic reprogramming of the X chromosome in somatic nuclei transplanted to a mouse oocyte[J]. *Embo Reports*, 2005, 6(8): 748-754.
- [19] NOLEN L D, GAO S, HAN Z, et al. X chromosome reactivation and regulation in cloned embryos[J]. *Developmental Biology*, 2005, 279(2): 525-540.
- [20] INOUE K, KOHDA T, SUGIMOTO M, et al. Impeding *Xist* expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer[J]. *Science*, 2010, 330(6003): 496-499.
- [21] MATOBA S, INOUE K, KOHDA T, et al. RNAi-mediated knockdown of *Xist* can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(51): 20621-20626.
- [22] 杨利华, 姜杰, 赵秀芝, 等. 颗粒细胞瘤中 Lnc H19 与雌二醇及细胞因子 IGF1R 相关性研究[J]. *免疫学杂志*, 2015, 31(5): 400-403.
- [23] THORVALDSEN J L, DURAN K L, BARTOLOMEI M S. Deletion of the *H19* differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of *H19* and *Igf2*[J]. *Genes Development*, 1998, 12(23): 3693-3702.
- [24] HAN D W, IM Y B, DO J T, et al. Methylation status of putative differentially methylated regions of porcine *IGF2* and *H19*[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2008, 75(5): 777-784.
- [25] XU W, LI Z, YU B, et al. Effects of DNMT1 and HDAC inhibitors on gene-specific methylation reprogramming during porcine somatic cell nuclear transfer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64705.
- [26] 赵静. 青钱柳多糖对大鼠脂代谢相关基因 DNA 甲基化及表达影响的研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2016.
- [27] MAO J, ZHAO M T, WHITWORTH K M, et al. Oxamflatin treatment enhances cloned porcine embryo development and nuclear reprogramming[J]. *Cell Reprogramming*, 2015, 17(1): 28-40.
- [28] BRUECKNER B, GARCIA B R, SIEDLECKI P, et al. Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(14): 6305-6311.
- [29] SCHIRRMACHER E, BECK C, BRUECKNER B, et al. Synthesis and in vitro evaluation of biotinylated RG108: A high affinity compound for studying binding interactions with human DNA methyltransferases[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2006, 17(2): 261-266.
- [30] 黄永业. 猪体细胞核移植重编程和胚胎发育影响因素研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [31] YAMANAKA S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation[J]. *Nature*, 2009, 460(7251): 49-52.
- [32] 李美蓉. 表皮干细胞多向分化潜能特征的发现及其相关研究[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2011.
- [33] OGURA A. How to improve mouse cloning[J]. *Theriogenology*, 2020, 150: 215-220.