

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00611

# 免疫荧光染色检测克隆牛 X 染色体组蛋白 H3 Lys 4 二甲基化修饰

曹更生<sup>1,2</sup>, 张洪<sup>1</sup>, 周文平<sup>1</sup>, 李宁<sup>2</sup>

1. 河南大学生命科学学院, 开封 475004;

2. 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193

**摘要:** 利用免疫荧光染色, 检测胎儿成纤维细胞(FFB)和输卵管上皮细胞(FOV)来源的克隆牛 X 中期染色体组蛋白 H3 K4m2 修饰状况。结果发现, 这两种细胞系来源的克隆牛耳组织细胞系 X 染色体 H3 K4m2 修饰与供体核 FFB 细胞系和常规繁殖牛耳组织细胞系的修饰基本一致, 而与供体核 FOV 细胞系有较大差异。

**关键词:** 免疫荧光染色; X 染色体; H3 K4m2; 表观遗传修饰; 克隆牛

## Immunofluorescence patterns of histone H3 lysine 4 dimethylation on X chromosomes of different cloned cattle

CAO Geng-Sheng<sup>1,2</sup>, ZHONG Hong<sup>1</sup>, ZHOU Wen-Ping<sup>1</sup>, LI Ning<sup>2</sup>

1. College of Life Science, Henan University, Kaifeng 475004, China;

2. State Key Laboratories of Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** Using immunofluorescence staining, the patterns of histone H3 K4m2 of metaphase X chromosomes were measured in cloned cattle derived from FFB and FOV donor cells. The results demonstrated that the modification pattern of H3 K4m2 in the ear tissue of all clones was largely consistent with that of the donor cell line FFB and conventionally produced cattle, but different from that of the donor cell line FOV.

**Keywords:** immunofluorescence staining; X chromosome; H3 K4m2; epigenetic modifications; cloned cattle

在动物体细胞克隆中, 供体细胞核来自高度分化的体细胞, 这些细胞在分化过程中, 获得了特异的表观遗传修饰, 而这种修饰不支持早期胚胎的发育, 它只有经过体细胞重编程(Reprogramming), 才能使重构胚获得发育的全能性<sup>[1~4]</sup>。但是, 到目前为止, 动物克隆效率低, 一个非常重要的原因是克隆动物的表观修饰异常。

在胚胎发育早期, 雌性哺乳动物有一条X染色

体以印记或随机失活的方式来满足胚胎生长发育的需要, 这是因为雌性动物有两条X染色体, 雄性动物只有一条X染色体, 虽还有Y染色体, 但它很小, 而且能够表达的基因也很少。这样, 哺乳动物为了保持雌性(XX)和雄性(XY)性染色体在基因表达剂量上的平衡, 雌性哺乳动物在其胚胎发育早期, 将有一条X染色体发生程序性失活, 并使该染色体上的大部分基因沉默, 研究认为X染色体这种失活机理

收稿日期: 2008-10-10; 修回日期: 2009-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30771216)资助

作者简介: 曹更生(1969-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 细胞遗传工程。Tel: 0378-3887799-3777; E-mail: gscsao@henu.edu.cn

通讯作者: 李宁(1962-), 男, 博士, 院士, 研究方向: 动物遗传育种。Tel: 010-62731146; E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

是由复杂的不同层次水平的表观遗传修饰控制的<sup>[5, 6]</sup>。因此, 哺乳动物X染色体失活机理是研究表观遗传修饰的良好模式。

组蛋白甲基化是重要的表观遗传修饰, 组蛋白H3 K4有3种甲基化状态, 即H3 K4m1、H3 K4m2和H3 K4m3, 其中H3 K4m2和H3 K4m3是基因表达的标记, 它们主要标记于染色质的常染色质区。组蛋白H3 K4m3位于表达基因的启动子区, 而K4m2则位于编码区<sup>[7, 8]</sup>。H3 K4甲基化象其他的组蛋白甲基化事件一样, 长期以来, 由于没有发现组蛋白去甲基化酶, 人们不得不认为组蛋白H3 K4甲基化是个不可逆事件, 直到2004年发现了一系列特异的赖氨酸去甲基化酶(Lysine-specific demethylase, LSD), 这一观点才发生实质性改变, 人们也才真正认识到组蛋白去甲基化和组蛋白甲基化一样在发育和分化中起着重要作用<sup>[9]</sup>。由于哺乳动物两条X染色体(Xa和Xi)上大多数基因表达不同, 我们推测其上表观遗传修饰必然有差异。对克隆牛来说, X染色体组蛋白甲基化修饰差异至今尚未见报道。因此, 本实验拟采用免疫荧光染色技术, 以胎儿成纤维细胞(FFB)和输卵管上皮细胞(FOV)来源的供体核克隆牛X染色体作为研究对象检测组蛋白H3 K4m2修饰, 观察不同供体核克隆牛X染色体上该修饰分布状况, 以期发现不同克隆牛X染色体组蛋白H3 K4m2表观修饰特征及差异。

## 1 材料和方法

组蛋白H3 K4m2修饰是基因表达的标记, 主要存在于表达基因的外显子区<sup>[7]</sup>。本实验采用绿色FITC标记的二抗来显色, 二抗为羊抗兔的FITC, 并用DAPI显示核DNA。用VideoTest-FISH和Karyo3.1软件对实验照片进行加工处理。所用材料均来自雌性荷斯坦奶牛。

### 1.1 克隆牛细胞系

取一月龄雌性克隆牛的耳组织样, 3~5 h内运回实验室。在超净工作台中将耳组织浸泡在70%酒精中30 s, 用DPBS漂洗几遍, 以无菌的手术剪和镊子取下耳部数块表皮组织置于DMEM(GIBCO BRL)+10% (V/V)FCS培养基中(DPBS和培养基都含有双抗)。在直径60 mm平皿中将胎儿组织切碎成1 mm<sup>3</sup>大小的组织块, 用DMEM(GIBCO BRL)/F12清洗2

次后分批植于含5 mL DMEM(GIBCO BRL)/F12 + 10%(V/V) FCS的T-25的培养瓶中, 于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养6~7 d, 每2 d换液1次, 待细胞生长汇合后, 以0.25% trypsin消化传代2~3次, 分批用DMEM/F12 + 20%(V/V)FCS + 10%DMSO冻存。

### 1.2 常规繁殖牛耳组织细胞系

取常规繁殖牛耳组织细胞系, 按实验方法先进行中期染色体涂片, 用多聚甲醛固定, Triton X-100打孔, 进行免疫荧光染色。

### 1.3 一抗和二抗

一抗: Upstate公司的组蛋白抗体, anti-H3 K4m2 Cat: 07-030, Lot: 26335, 稀释50倍; 二抗: 进口分装, 中杉金桥公司羊抗兔-FITC, 稀释100倍。一抗稀释液: 中杉金桥公司; DAPI: Invitrogen公司。

### 1.4 中期染色体细胞涂片

步骤大致如下: 克隆牛耳组织样品在T25培养瓶中长至70%~80%后, 加秋水仙素处理3 h, 用低渗液逐滴滴加, 重悬细胞, 置于37℃水浴中15 min, 离心弃上清, 再逐滴重悬细胞, 在离心涂片机(7620, 美国WESCOR公司)上1 900 r/min涂片10 min。

### 1.5 免疫荧光染色

4%多聚甲醛(PBS配制, 含0.05% Triton X-100)处理新鲜涂片10 min, PBS洗涤2次, 加2%牛血清白蛋白(BSA)封闭1 h, 加一抗37℃孵育2 h, PBS洗涤2次, 加FITC标记的二抗, 37℃孵育1 h, PBS洗涤3次, 自然晾干后, 加DAPI复染, 加上盖薄片, 即可在CCD荧光显微镜下(OLYMPUS BX51)观察<sup>[10, 11]</sup>

## 2 结果与分析

### 2.1 常规繁殖牛耳组织组蛋白H3 K4m2修饰免疫荧光染色

取常规繁殖牛耳组织细胞系, 按实验方法先进行中期染色体涂片, 用多聚甲醛固定, Triton X-100打孔, 进行免疫荧光染色。结果发现(图1), 两条X染色体中的一条染色, 另一条几乎不染色, 由于H3 K4m2处于表达基因的编码区, 因此, 染色的应为有活性的X染色体, 而几乎未染色的为失活的X染色体-巴氏小体。

## 2.2 供体核胎儿成纤维细胞(FFB)和输卵管上皮细胞(FOV)组蛋白 H3 K4m2 修饰免疫荧光染色

取 FFB 和 FOV 细胞系进行 H3 K4m2 免疫荧光染色, 结果如图 2, 供体核 FFB 的两条 X 染色体, 一条染色, 另一条不染色; 而 FOV 细胞系的 X 染色体, 两条均染色且差异不大。供体核 FFB 细胞 X 染色体的染色结果与常规繁殖牛耳组织相近, 而与 FOV 细胞系不同。

## 2.3 不同来源克隆牛耳组织 H3 K4m2 修饰免疫荧光染色

取 FFB 和 FOV 来源的克隆牛耳组织细胞系, 进行组蛋白 H3 K4m2 免疫荧光染色实验, 结果如图 3, FFB 和 FOV 来源的克隆牛的 X 染色体, 与常规繁殖牛耳组织的染色一致, 一条 X 染色体染色, 而另一条几乎不染色。

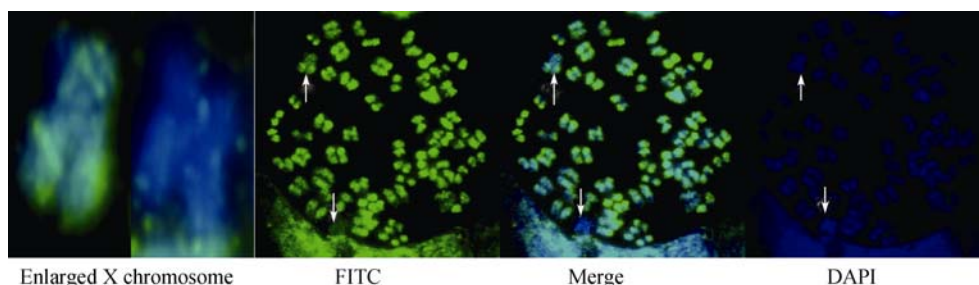


图 1 自然繁殖牛组蛋白 H3 K4m2 免疫荧光染色(箭头所指为 X 染色体)

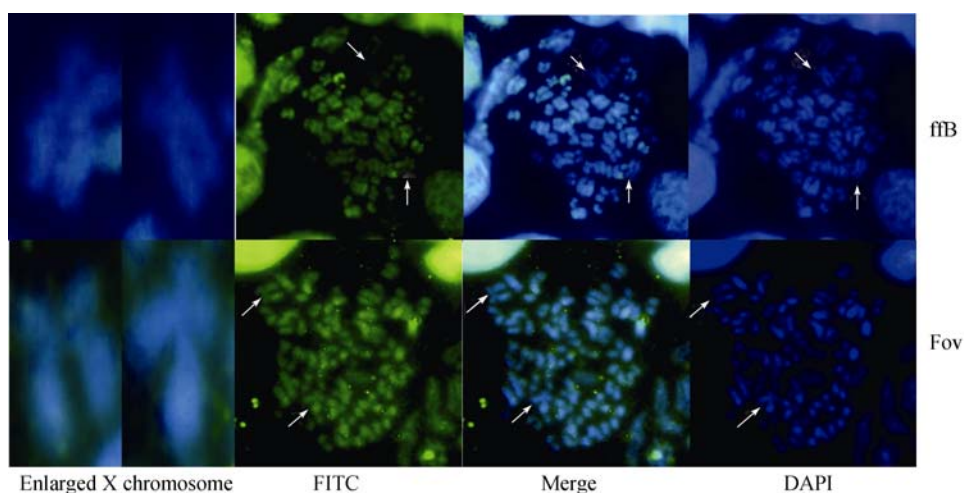


图 2 供体核 FFB 和 FOV 细胞系组蛋白 H3 K4m2 免疫荧光染色(箭头所指为 X 染色体)

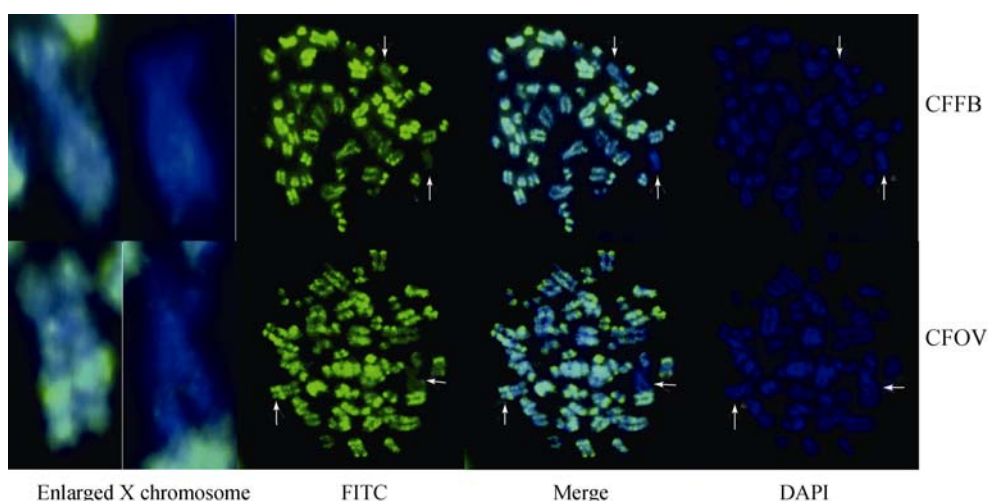


图 3 来源于 FFB 和 FOV 细胞系的克隆牛 CFFB、CFOV 组蛋白 H3 K4m2 免疫荧光染色(箭头所指为 X 染色体)

### 3 讨论

克隆动物X染色体是克隆机理研究的重要内容之一, Eggan等<sup>[12]</sup>将父源X染色体(Xp)转染绿色荧光蛋白(GFP), 来显示Xp在早期克隆小鼠胚胎中的失活变化, 结果发现, 发育成正常胚胎内细胞团的组织X染色体随机失活, 而发育成胚外组织细胞的X染色体, 是父源的Xp选择性印记失活。Xue等<sup>[13]</sup>通过研究MAOA及9个X-linked的基因在存活和死亡克隆牛中的表达, 发现10个基因中有9个异常表达, 而且XIST基因处于过低甲基化水平, 这表明不完全的重编程可能使X染色体上产生了异常的表现遗传学标记(Epigenetic mark), 影响了随机和印记X染色体的失活。

为了从整个染色体角度观察常规繁殖牛和不同核供体克隆牛组蛋白甲基化修饰的差异, 本试验采用了中期染色体免疫荧光染色方法, 由于牛X染色体为中着丝粒染色体, 而其它常染色体为端着丝粒染色体, 所以在DAPI显色的染色体DNA背景下, 比较容易辨别X染色体。从我们的免疫荧光实验结果可以看出, 不同细胞系的组蛋白H3 K4m2修饰有些差异, FOV细胞系两条X染色体均有染色, 而且差异不大; 而FFB细胞系和耳组织细胞系(包括FFB和FOV来源的克隆牛耳组织细胞系)免疫荧光染色结果比较一致, 即两条X染色体染色有明显差异, 一条X染色体染色, 另一条X染色体几乎不染色。更为有意义的是, 来源于FOV的克隆牛耳组织细胞系X染色体H3 K4m2修饰与常规繁殖牛耳组织相近, 而与其供体核细胞系(FOV)不同, 这说明组蛋白H3 K4m2修饰可能存在着组织特异性。由于特异的组蛋白去甲基化酶1(lysine-specific Demethylase1 LSD1)的发现, 证明了H3K4m2修饰是动态的可逆变化而不是不可逆事件, 所以, 我们推测H3K4m2修饰经过体细胞核移植能够重编程, 表现出相应耳组织而不是供体细胞(FOV)的特征。

### 参考文献(References):

- [1] Kishigami S, Wakayama S, Hosoi Y, Iritani A, Wakayama T. Somatic cell nuclear transfer: infinite reproduction of a unique diploid genome. *Exp Cell Res*, 2008, 314(9): 1945–1950. [\[DOI\]](#)
- [2] Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet*, 2007, 39(3): 295–302.
- [3] Kanka J. Nuclear transplantation: reprogramming of transplanted nuclei. *Reprod Nutr Dev*, 1999, 39(5–6): 545–554. [\[DOI\]](#)
- [4] Rideout WM, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*, 2001, 293(5532): 1093–1098. [\[DOI\]](#)
- [5] Ciccodicola A, D'Esposito M, Esposito T, Gianfrancesco F, Migliaccio C, Miano MG, Matarazzo MR, Vacca M, Franzè A, Cuccurese M, Cocchia M, Curci A, Terracciano A, Torino A, Cocchia S, Mercadante G, Pannone E, Archidiacono N, Rocchi M, Schlessinger D, D'Urso M. Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xq/Yq pseudoautosomal region. *Hum Mol Genet*, 2000, 12; 9(3): 395–401. [\[DOI\]](#)
- [6] Disteché CM, Filippova GN, Tsuchiya KD. Escape from X inactivation. *Cytogenet Genome Res*, 2002, 99(1–4): 36–43.
- [7] Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, McMahon S, Karlsson EK, Kulbokas EJ 3rd, Gingeras TR, Schreiber SL, Lander ES. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*, 2005, 120(2): 169–181. [\[DOI\]](#)
- [8] Rougeulle C, Navarro P, Avner P. Promoter-restricted H3 Lys 4 di-methylation is an epigenetic mark for monoallelic expression. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(24): 3343–3348. [\[DOI\]](#)
- [9] Benevolenskaya EV. Histone H3K4 demethylases are essential in development and differentiation. *Biochem Cell Biol*, 2007, 85(4): 435–443. [\[DOI\]](#)
- [10] Boggs BA, Cheung P, Heard E, Spector DL, Chinault AC, Allis CD. Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nat Genet*, 2002, 30(1): 73–76. [\[DOI\]](#)
- [11] Chadwick B P, Willard H F. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(50): 17450–17455. [\[DOI\]](#)
- [12] Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout W 3rd, Yanagimachi R, Jaenisch R. X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science*, 2000, 290(5496): 1578–1581. [\[DOI\]](#)
- [13] Xue F, Tian XC, Du F, Kubota C, Taneja M, Dinnyes A, Dai Y, Levine H, Pereira LV, Yang X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet*, 2002, 31(2): 216–220. [\[DOI\]](#)