

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00533

转基因克隆牛胎盘中印迹基因 *PEG10* 的 DNA 甲基化水平

苏建民, 许文兵, 李艳艳, 王丽君, 王勇胜, 张涌

西北农林科技大学动物医学院, 农业部动物生殖生理和胚胎工程重点实验室, 杨凌 712100

摘要: 低效率的体细胞核移植技术显著制约着该技术在转基因动物生产上的广泛应用。目前认为供体细胞核不能被受体卵母细胞胞质完全的表现重编程是其效率低下的最主要原因, 而DNA甲基化是基因表现修饰的主要方式之一。为了探求转基因克隆牛的死亡是否与其胎盘中印迹基因的甲基化的重编程程度相关, 文章通过亚硫酸氢盐测序法(Bisulfite sequencing PCR, BSP)和亚硫酸氢盐联合限制性内切酶分析法(Combined bisulfite restriction analysis, COBRA), 对印迹基因PEG10 在围产期死亡且存在发育缺陷的转基因克隆牛的胎盘(死亡组)和存活的转基因克隆牛的胎盘(存活组)与正常对照牛胎盘(对照组)的DNA甲基化水平进行了详细的比较。结果发现, 与对照组相比, PEG10 基因在死亡组上表现出异常的超甲基化水平, 而存活组与对照组相比无显著性差异。研究结果显示, 胎盘中印迹基因的DNA甲基化表现重编程不彻底可能是导致转基因克隆牛发育异常进而死亡的主要原因之一。

关键词: DNA 甲基化; *PEG10*; 体细胞核移植; 转基因克隆牛

The methylation status of *PEG10* in placentas of cloned transgenic calves

SU Jian-Min, XU Wen-Bing, LI Yan-Yan, WANG Li-Jun, WANG Yong-Sheng, ZHANG Yong

College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology & Embryo Biotechnology, Ministry of Agriculture, Yangling 712100, China

Abstract: The low efficiency of somatic cell nuclear transfer (SCNT) is a significant barrier to the production of highly valuable transgenic livestock. It is generally believed that the principal cause of the low SCNT efficiency is the aberrant nuclear epigenetic reprogramming of donor somatic cell. DNA methylation is a major epigenetic modification of the genome and plays a crucial role in nuclear reprogramming during SCNT. In order to assess whether the abnormal epigenetic modifications of the imprinted gene in placenta are correlated with the development abnormality and death of the cloned transgenic calves, the DNA methylation patterns of *PEG10* were compared in the placentas from different kinds of cattle. This comparison included transgenic cloned calves died during perinatal stage and showed developmental defects (Death group), transgenic cloned calves survived and lived on healthily (Live group) and the normal reproduced calves (N group) used as the control group analyzed by Bisulfite Sequencing PCR (BSP) method and Combined Bisulfite Restriction Analy-

收稿日期: 2010-10-14; 修回日期: 2010-12-09

基金项目: 国家转基因生物新品种培育科技重大专项(编号: 2008ZX08007-004)资助

作者简介: 苏建民, 博士研究生, 研究方向: 克隆与转基因技术。Tel: 029-87080092; E-mail: sujianmin@gmail.com

通讯作者: 张涌, 教授, 博士生导师, 研究方向: 克隆与转基因技术。E-mail: zhy1956@263.net

致谢: 感谢苗兴军博士对本文数据分析的帮助, 感谢中国科学院动物研究所的梁兴伟博士和东北农业大学的魏延昌博士在甲基化分析方法上的无私帮助。

网络出版时间: 2011-04-02 10:12:49

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110402.1012.003.html>

sis (COBRA). Comparing to the control group, *PEG10* gene in the Death group showed abnormal hypermethylation, but was not significant different in methylation level from the Live group. It can be postulated from the results that the incomplete or abnormal DNA methylation epigenetic reprogramming of imprinting gene in placenta may be one of the main causes of the abnormal development and death of the transgenic cloned cattle.

Keywords: DNA methylation; *PEG10*; SCNT; cloned transgenic cow

1985 年, Hammer 等^[1]用显微注射法首次生产出转基因家畜, 但其低的效率显著制约着转基因技术的发展。1996 年随着 Dolly 的诞生^[2], 体细胞核移植技术给转基因动物的高效生产带来新的希望。但至今体细胞核移植的效率仍然较低, 表现为胚胎着床率低、胎儿流产率高以及新生犊牛成活率不高。存活的克隆动物很大比例存在各种表型异常, 例如心、肝、肺和胎盘等器官发育异常、畸形, 一般表现为过度增长。这种克隆动物体型过大并伴随各种器官发育缺陷的症状, 称为 Large Offspring Syndrome (LOS)。很多克隆动物的发育异常都与胎盘相关^[3]。在体细胞克隆牛上, 胎盘的子叶数量减少但直径变大, 另外胎盘脉管系统发育不全^[4-6]。多项研究发现在克隆动物上, 胎盘比克隆胎儿更容易表现发育异常。一些与胚胎和胎盘发育相关的基因在克隆牛^[7]、小鼠^[8]和猪^[9]的胎盘上表达异常, 但在克隆胎儿上表达正常。由此推断低的克隆效率与胎盘发育异常密切相关。

目前认为, 克隆效率低下的主要原因是供体体细胞核没有被受体卵胞质完全的重编程, 包括该去除的原有体细胞表达模式没有去除, 以及该建立的胚胎表达模式没有建立, 即体细胞的去分化不彻底、重编程不完全。在供体体细胞的重编程过程中没有涉及基因序列的变化, 主要是表观遗传修饰的变化。而 DNA 甲基化是其最主要的方面。基因的甲基化状况(特别是启动子区域)有调控基因表达的作用, 异常的 DNA 甲基化表观修饰引起的基因表达异常有可能是克隆动物表型异常和缺陷的原因^[10, 11]。

印迹基因是根据亲源性的不同, 只表达来源父本或母本的一个拷贝的一类基因。这种单等位基因 (Monoallelic expression) 表达模式是通过印迹控制区 (Imprinting control region, ICR) 的 DNA 甲基化水平调控的^[12]。印迹基因对哺乳动物早期胚胎、胎儿和胎盘的生长发育起着重要的作用。通常情况下, 父源表达 (母源印迹) 的印迹基因促进营养的摄取和胚胎发育; 而母源表达 (父源印迹) 的印迹基因减少营

养的开支和削弱胚胎发育^[4]。*PEG10* (Paternally expressed gene 10) 是母源印迹、父源表达的印迹基因。该基因在调控胎盘形成以及滋养层分化过程中起着至关重要的作用。另外参与调控脂肪细胞的早期分化以及多类肿瘤的发生、发展和转移^[13-17]。Smallwood 等^[16]研究发现敲除 *PEG10* 基因可使小鼠胎盘发育缺陷并最终导致小鼠在胚胎早期死亡。*PEG10* 基因在哺乳动物中高度保守, 与相邻的母源印迹基因 *Sgce* 以头对头的形式共用一个甲基化差异区 (DMR)。DMR 位于 *Sgce* 基因的转录起始位点上游的 0.87 kb 以及覆盖 *PEG10* 外显子 1 和部分内含子 1。本研究以 *PEG10* 基因 DMR 的一段序列作为甲基化分析区域。Liu 等^[17]发现 *PEG10* 基因在早期流产克隆牛胎儿的皮肤组织中表现异常的 DNA 甲基化水平。

亚硫酸氢盐测序法 (Bisulfite-sequencing PCR, BSP) 是检测 DNA 甲基化水平的金标准, 可以明确目的片段的每一个 CpG 位点的甲基化情况。为了验证上述方法中有限的测序结果是否反映了该区整体的 DNA 甲基化水平, 本研究还用亚硫酸氢盐联合限制性内切酶分析法 (Combined bisulfite restriction analysis, COBRA) 进行了验证。COBRA 是一种依赖限制性内切酶定量检测特定酶切位点的 DNA 甲基化水平的技术。

1 材料和方法

1.1 材料

用于收集卵母细胞的黄牛卵巢采于西安屠宰场, 5 h 内于 20~25 °C 生理盐水中送回实验室。用于对照组的荷斯坦母奶牛胎盘以及胚胎受体安格斯母牛来自杨凌科元克隆有限公司。本研究中的转基因牛的供体细胞都来自此公司的一头 46 日龄的荷斯坦雌性胎儿。

1.2 方法

1.2.1 转基因克隆牛的生产

人 β -防御素-3 (Human β -defensin-3, HBD-3) 载体

的构建、转染及阳性细胞的筛选见参考文献[18, 19]。卵母细胞的采集与体外成熟培养、卵母细胞的去核、注核、重构胚的融合、重构胚的激活、克隆胚胎的培养、胚胎移植以及妊娠检测见参考文献[20]。2009年, 本研究组共获得21头转HBD-3转基因克隆牛。其中4头在围产期流产死亡, 17头经剖腹产成功降生, 分别命名为GT09001-GT09017。选取死亡的4头转基因牛的胎盘作为死亡组(D1、D2、D3和D4)。该组牛都表现有不同程度的发育异常。D1(68.54 kg)和D3(64.28 kg)体重显著大于对照组牛和存活组牛。D2全身性水肿且表现肺膨胀不全; D4为死胎, 其心脏较对照组大, 肺脏壁厚呈分叶状同时也表现肺脏发育不全。随机选取9头存活的转基因牛的胎盘为存活组(L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8和L9)。另外采集4头正常健康的荷斯坦母牛犊的胎盘作为对照组(N1、N2、N3和N4)。转基因牛通过PCR、Southern blotting和FISH鉴定(未发表)。

1.2.2 组织采集、基因组DNA的提取及基因组DNA的亚硫酸氢盐处理

将采集的各組胎盘样品用生理盐水冲洗掉血液, 剪成小块后放入陶瓷研钵中, 用液氮彻底研磨成粉末, 每个样品取30 mg于1.5 mL离心管, 用动物组织基因组DNA提取试剂盒(TianGen, China)提取基因组DNA。提取后用Epoch Multi-Volume Spectrophotometer System (BioTek, USA)分析基因组DNA的浓度和质量。每个样品取500~900 ng基因组DNA, 用EZ-Gold DNA甲基化试剂盒(ZYMO RESEARCH, USA)进行亚硫酸氢盐处理, 处理过程中离心管用铝箔纸包裹, 避光快速操作。由于亚硫酸氢盐转化后的基因组DNA失去了维持稳定作用的甲基化结构, 且含有大量的poly 结构, 故很不稳定, 应该立即用于PCR反应或存于-80℃冰箱, 应避免反复冻融。

1.2.3 *PEG10* 基因 CpG 岛的预测与引物的设计

将牛*PEG10*基因序列(NW_931245)导入软件Methprimer^[21]预测CpG岛, 该基因片段有3个CpG岛, 结合文献[17], 本研究选择第2个CpG岛作为研究区域。用软件Methprimer和Methyl Primer Express® Software v1.0 (Applied Biosystems)对*PEG10*基因经亚硫酸氢盐转化后的DNA序列为第2个CpG岛设计特异性引物。引物设计要求: ① 为了区别甲基化的DNA

和非甲基化的DNA, 引物内不能有CpG; ② 引物应该尽可能多地包括非CpG位点的C, 以验证转化彻底; ③ 扩增产物应该包括尽可能多的CpG位点。

1.2.4 PCR 扩增基因片段及胶回收

PCR反应体系为50 μL, 包括25 μL *Taq* DNA聚合酶(ZYMO RESEARCH, USA), 21 μL ddH₂O, 2 μL 亚硫酸氢盐处理后的基因组DNA以及上下游引物各1 μL。引物序列为: Primer F: 5'-TG TAGATGTGTT GTAAAGTGATATT-3', Primer R: 5'-CTCATCAATC TATAATTCATAAATC-3'。扩增程序为: 94℃ 预变性4 min; 94℃ 30 s, 50.5℃ 40 s, 72℃ 30 s, 共45个循环; 72℃ 7 min; 4℃ 保存。*PEG10*的扩增目的片段为313 bp。在各个胎盘组织上重复扩增3次。将扩增产物通过2%的琼脂糖凝胶电泳后, 用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(TianGen, China)回收目的片段。将回收的DNA分为两份, 一份用于测序的BSP研究, 一份用于COBRA分析。

1.2.5 BSP 测序

胶回收产物与pMD18-T载体(TaKaRa, Japan)连接过夜, 转化涂板后每个胶回收产物挑取4~5个阳性单克隆送华大基因测序。即在各个胎盘组织上都有12~15个BSP测序结果。

1.2.6 COBRA 分析

将上述每个样品的3次重复PCR回收产物放入一个PCR离心管中, 混匀, 分别取适量用限制性内切酶*Bst*UI(NEW ENGLAND BioLabs, UK)60℃消化2 h。将酶切产物通过2.5%的琼脂糖凝胶电泳后照相。如果目的片段的3个酶切位点CGCG处的C都为甲基化状态, 313 bp的目的片段将被切成210 bp+60 bp+17 bp+26 bp。由于非甲基化的C能被亚硫酸氢盐转化为T, 所以酶切位点如果切不开说明该位点的C为非甲基化的C。具体分析方法见文献[22]。

1.2.7 数据分析

用BiQ Analyzer软件^[23]分析亚硫酸氢盐的转化率(亚硫酸氢盐处理后非甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶的效率)并将BSP测序结果以圆圈图输出。测序数据的分析方法依据文献^[24, 25], 首先将测序结果分为两类: 将mCpGs>50%的链归为甲基化链, mCpGs<50%的归为非甲基化链, 统计前者占总链数的百分比。各组间

的甲基化差异显著性通过 SPSS 统计分析软件 (version13.0; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) 分析, 结果以平均值 \pm 标准误表示, 组间比较采用 LSD 法。

2 结果与分析

2.1 牛胎盘 *PEG10* 基因的 BSP 分析

各组中 *PEG10* 基因的亚硫酸氢盐测序结果见图 1。转基因组中的存活组的甲基化水平($71.07 \pm 3.88\%$)低于对照组($75.00 \pm 4.19\%$), 但差异不显著($P >$

0.05); 死亡组呈现超高的甲基化水平($95.00 \pm 3.19\%$), 与对照组差异显著($P < 0.05$)。

2.2 牛胎盘 *PEG10* 基因的 COBRA 分析

亚硫酸氢盐联合限制性内切酶分析法的检测结果见图 1。由电泳图可见, 酶切电泳样品分别在 60 bp、210 bp、271 bp 和 313 bp 有条带。D1 和 D2 的电泳图只有 210 bp 和 60 bp 条带, 说明这两个样品在该酶切位点的胞嘧啶都为甲基化的, 此结果与亚硫酸氢盐测序结果相吻合, 证明 BSP 的分析结果可信。

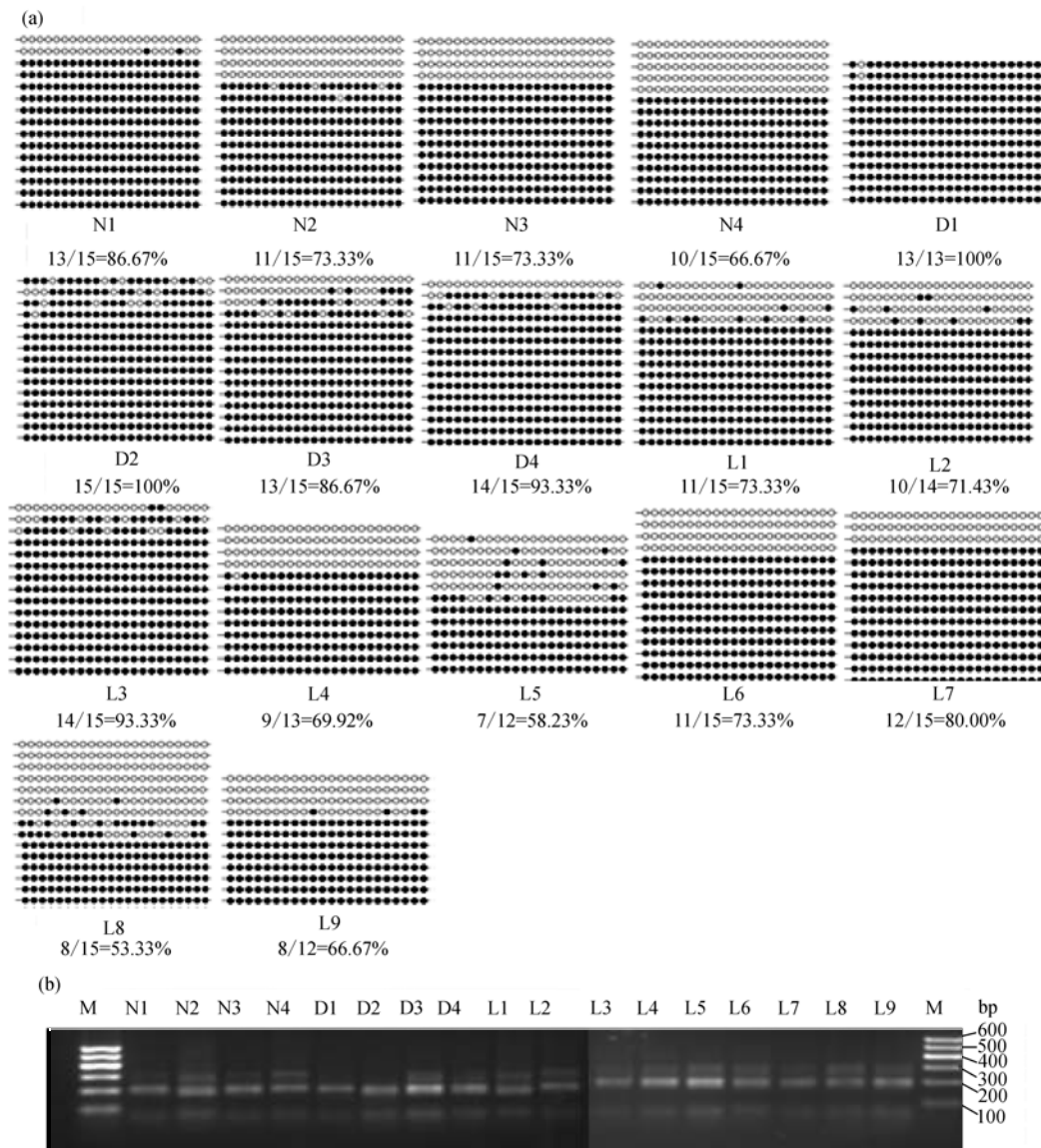


图 1 牛 *PEG10* 基因 DMR 区的 DNA 甲基化水平

(a): 牛 *PEG10* 在各组胎盘上的 BSP 测序结果图。每个横向的圆圈串代表一个单克隆测序结果(每个胎盘样品都有 12~15 个); 每个圆圈串上的 22 个圆圈代表扩增的目的片段上的 22 个 CpG 位点, 其中实心的圆圈代表该 CpG 位点上的 C 是甲基化的; 空心的圆圈代表该 CpG 位点上的 C 是非甲基化的。(b): COBRA 酶切电泳图。当原始序列中的酶切位点的 C 是甲基化的时候, *Bst*UI 可以在此位点将其切开; 当原始序列中的酶切位点中的 C 是非甲基化的时候, 亚硫酸盐会把非甲基化的 C 转化为 T, 故 *Bst*UI 切不可。

3 讨论

Wilmut等^[26]认为胎盘发育失败是克隆胎儿死亡的主要原因。近期的多项研究也显示克隆动物的胎盘表现发育异常^[6,9,27]。但至今尚无在转基因克隆动物上的详细研究。因此,为了探究印迹基因在胎盘中异常的DNA甲基化水平是否与转基因克隆牛发育异常以及转基因克隆效率低下相关,本研究挑选对胎盘发育有重要调控作用的印迹基因*PEG10*为研究基因,以正常荷斯坦奶牛的胎盘为对照,利用亚硫酸氢盐测序法和亚硫酸氢盐联合限制性内切酶法详细分析了印迹基因*PEG10*的DMR在转基因克隆牛胎盘上的DNA甲基化水平。

Liu等^[17]研究发现*PEG10*基因在3个早期流产死亡的克隆牛胎儿的皮肤组织上表现与对照组相似的DNA甲基化水平,但在另一个早期流产克隆牛胎儿皮肤组织上呈现较低的DNA甲基化水平(35.7%)。结合本研究在转基因克隆牛胎盘上的数据,说明DNA甲基化程度在克隆动物上存在种间和个体差异,并且这种差异也可能存在于同一克隆动物各个组织上^[28,29]。目前,调控胎盘发育的印迹基因*PEG10*的甲基化水平在转基因克隆动物上尚无报道。本研究结果显示,*PEG10*在存活的转基因克隆牛的胎盘上的甲基化水平与对照组的差异不显著。但*PEG10*基因在围产期死亡且有发育缺陷的转基因克隆牛的胎盘上表现超甲基化水平。其中在D1和D2两头牛的胎盘上表现完全的DNA甲基化状态。此结果说明*PEG10*基因在胎盘中可能重编程紊乱,该去除的印迹没有去除,导致胎盘发育异常,后者可能进而导致转基因克隆牛发育异常而死亡。Wei等^[9]在克隆猪胎盘上的研究得到相类似的结果。他们发现数个印迹基因在死亡克隆猪的胎盘中表达异常,且表现超高的DNA甲基化水平,但在存活健康的克隆猪胎盘上的表达以及DNA甲基化水平都与对照组差异不显著。Liu等^[30]在流产的克隆牛胎儿上的研究发现,DNA甲基化转移酶基因的5'端区域呈现异常的DNA甲基化水平,显示DNA甲基化转移酶基因在重编程过程中没有完全的重编程。本研究组近期的研究发现^[31],与牛早期体外受精胚胎相比,体细胞克隆胚胎上的全能性基因(*Oct*, *Sox2*, *Nanog*, *Rex1*和*Fgf4*)的5'端区域呈现异常的DNA甲基化水平,说明这些基因在重编程过程中也没有完全的重编程。2002年

日本科学家Inoue等^[8]在克隆小鼠上的研究显示印迹基因*H19*和*Igf2*在克隆小鼠胎儿上表达正常,但在克隆小鼠胎盘中表达异常。杨向忠等^[7]在克隆牛上的研究上也发现,印迹基因*IGF2R*在克隆牛胎盘中表现出异常的单等位基因表达模式,却在克隆牛内脏上表达正常。这些结果表明转基因克隆过程可能会引起胎盘中印迹基因的DNA甲基化的不完全重编程使胎盘发育失败,进而可能导致了克隆动物器官发育异常以及死亡。

本研究利用亚硫酸氢盐测序法和亚硫酸氢盐联合限制性内切酶法对印迹基因*PEG10*在转基因克隆牛胎盘上的甲基化状况进行了研究。结果显示*PEG10*在围产期死亡且有发育缺陷的转基因克隆牛的胎盘上的DNA甲基化程度异常高,而存活组表现出较为正常的DNA甲基化程度。本研究显示,调控胎盘发育的印迹基因在胎盘中重编程不彻底导致其表达紊乱可能是克隆动物发育异常以及死亡的主要原因之一。但本研究只对*PEG10*一个基因进行了研究,后续需要选取更多的与胚胎和胎盘发育相关的基因进行详细研究。为了提高应用体细胞核移植技术生产具有重要价值的转基因动物的效率,后续有待对表观重编程事件作进一步深入的研究认识。

参考文献(References):

- [1] Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE Jr, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 1985, 315(6021): 680–683. DOI
- [2] Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, 380(6569): 64–66. DOI
- [3] Cibelli JB, Campbell KH, Seidel GE, West MD, Lanza RP. The health profile of cloned animals. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(1): 13–14.
- [4] Constant F, Guillomot M, Heyman Y, Vignon X, Laigre P, Servely JL, Renard JP, Chavatte-Palmer P. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biol Reprod*, 2006, 75(1): 122–130.
- [5] Chavatte-Palmer P, Heyman Y, Richard C, Monget P, Le-Bourhis D, Kann G, Chilliard Y, Vignon X, Renard JP. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol Reprod*, 2002, 66(6): 1596–1603. DOI

- [6] Miglino MA, Pereira FT, Visintin JA, Garcia JM, Meirelles FV, Rumpf R, Ambrósio CE, Papa PC, Santos TC, Carvalho AF, Leiser R, Carter AM. Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture. *Theriogenology*, 2007, 68(4): 604–617. DOI
- [7] Yang L, Chavatte-Palmer P, Kubota C, O'Neill M, Hoagland T, Renard JP, Taneja M, Yang X, Tian XC. Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. *Mol Reprod Dev*, 2005, 71(4): 431–438. DOI
- [8] Inoue K, Kohda T, Lee J, Ogonuki N, Mochida K, Noguchi Y, Tanemura K, Kaneko-Ishino T, Ishino F, Ogura A. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science*, 2002, 295(5553):297–297. DOI
- [9] Wei Y, Zhu J, Huan Y, Liu Z, Yang C, Zhang X, Mu Y, Xia P, Liu Z. Aberrant expression and methylation status of putatively imprinted genes in placenta of cloned piglets. *Cell Reprogram*, 2010, 12(2): 213–222.
- [10] 郭磊, 李慧, 韩之明. DNA 甲基化和组蛋白修饰在克隆动物发育过程中的作用. *遗传*, 2010, 32(8): 762–768.
- [11] 杨荣荣, 李相运. DNA 甲基化与克隆动物的发育异常. *遗传*, 2007, 29(9): 1043–1048.
- [12] 苏建民, 华松, 张涌. 基因组印迹的调控机制及其对动物克隆的影响. *自然科学进展*, 2009, 19(8): 798–805.
- [13] Tsou AP, Chuang YC, Su JY, Yang CW, Liao YL, Liu WK, Chiu JH, Chou CK. Overexpression of a novel imprinted gene, *PEG10*, in human hepatocellular carcinoma and in regenerating mouse livers. *J Biomed Sci*, 2003, 10(6): 625–635.
- [14] 张琼, 叶达伟, 常莹, 宋宇虎, 谢娜, 王晓燕, 林菊生. *PEG10* 基因在不同转移潜能肝癌细胞中表达的定量分析. *华中科技大学学报(医学版)*, 2006, 35(6): 758–759.
- [15] Kainz B, Shehata M, Bilban M, Kienle D, Heintzel D, Krömer-Holzinger E, Le T, Kröber A, Heller G, Schwarzenberger I, Demirtas D, Chott A, Döhner H, Zöchbauer-Müller S, Fonatsch C, Zielinski C, Stilgenbauer S, Gaiger A, Wagner O, Jäger U. Overexpression of the paternally expressed gene 10 (*PEG10*) from the imprinted locus on chromosome 7q21 in high-risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer*, 2007, 121(9): 1984–1993. DOI
- [16] Smallwood A, Papageorgiou A, Nicolaides K, Alley MK, Alice J, Nargund G, Ojha K, Campbell S, Banerjee S. Temporal regulation of the expression of syncytin (HERV-W), maternally imprinted *PEG10*, and SGCE in human placenta. *Biol Reprod*, 2003, 69 (1): 286–293.
- [17] Liu JH, Yin S, Xiong B, Hou Y, Chen DY, Sun QY. Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(4): 598–607. DOI
- [18] 彭巍, 兰志刚, 马晶晶, 王保垒, 张涌. HBD-3 基因的乳腺特异性表达载体的构建及真核表达. *生物工程学报*, 2009, 25(7): 968–974.
- [19] 马晶晶, 王勇胜, 何小宁, 郑月茂, 张涌. 牛胎儿成纤维细胞 β 防御素(hBD3)基因转染及转基因克隆胚制备. *农业生物技术学报*, 2010, 18(4): 707–712.
- [20] Wang YS, Xiong XR, An ZX, Wang LJ, Liu J, Quan FS, Hua S, Zhang Y. Production of cloned calves by combination treatment of both donor cells and early cloned embryos with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. *Theriogenology*, 2011, 75(5): 819–825. DOI
- [21] Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 2002, 18(11): 1427–1431. DOI
- [22] Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(12): 2532–2534. DOI
- [23] Bock C, Reither S, Mikeska T, Paulsen M, Walter J, Lengauer T. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics*, 2005, 21(21): 4067–4068. DOI
- [24] Lucifero D, Suzuki J, Bordignon V, Martel J, Vigneault C, Therrien J, Filion F, Smith LC, Trasler JM. Bovine Snrpn methylation imprint in oocytes and day 17 *in vitro*-produced and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biol Reprod*, 2006, 75(4): 531–538. DOI
- [25] Imamura T, Kerjean A, Heams T, Kupiec JJ, Thenevin C, Paldi A. Dynamic CpG and non-CpG methylation of the *Peg1/Mest* gene in the mouse oocyte and preimplantation embryo. *J Biol Chem*, 2005, 280(20): 20171–20175. DOI
- [26] Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE. Somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 2002, 419(6907): 583–586.
- [27] Lee SY, Park JY, Choi YJ, Cho SK, Ahn JD, Kwon DN, Hwang KC, Kang SJ, Paik SS, Seo HG, Lee HT, Kim JH. Comparative proteomic analysis associated with term placental insufficiency in cloned pig. *Proteomics*, 2007, 7(8): 1303–1315. DOI
- [28] Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Kim HN, Chang WK, Lee KK, Han YM. 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. DOI
- [29] Ohgane J, Wakayama T, Kogo Y, Senda S, Hattori N, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K. DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis*, 2001, 30(2): 45–50. DOI
- [30] Liu J, Liang X, Zhu J, Wei L, Hou Y, Chen DY, Sun QY. Aberrant DNA methylation in 5' regions of DNA methyltransferase genes in aborted bovine clones. *J Genet Genomics*, 2008, 35(9): 559–568. DOI
- [31] Lan J, Hua S, Zhang H, Song Y, Liu J, Zhang Y. Methylation patterns in 5' terminal regions of pluripotency-related genes in bovine *in vitro* fertilized and cloned embryos. *J Genet Genomics*, 2010, 37(5): 297–304. DOI