

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00749

# TSA 促进转基因猪体细胞核移植胚胎发育和外源基因表达

孔庆然, 朱江, 黄波, 郇延军, 王峰, 石永乾, 刘仲凤, 武美玲, 刘忠华

东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030

**摘要:** 不完全的表观遗传重编程是造成转基因克隆动物效率低下的主要原因, 组蛋白修饰作为表观遗传修饰的一个重要部分, 可以直接影响克隆胚胎的发育和外源基因的表达情况。TSA(Trichostatin A)作为一种组蛋白去乙酰化抑制剂, 可以改变组蛋白的乙酰化水平, 促进表观遗传重编程, 提高克隆动物的效率。同时 TSA 能改变染色质结构, 使转录因子易于与 DNA 序列结合, 促进外源基因的表达。文章确定了 TSA 处理转基因猪成纤维细胞和核移植胚胎的最佳条件, 分别为 250 nmol/L、24 h 和 40 nmol/L、24 h, 通过进一步正交实验发现, TSA 同时处理供体细胞和克隆胚胎可以显著的促进核移植胚胎的体外发育。此外, 无论 TSA 处理转基因猪成纤维细胞或核移植胚胎, 都可以提高外源基因的表达水平。

**关键词:** TSA; 体细胞核移植; 胚胎发育; 外源基因表达; 猪

## TSA improve transgenic porcine cloned embryo development and transgene expression

KONG Qing-Ran, ZHU Jiang, HUANG Bo, HUAN Yan-Jun, WANG Feng, SHI Yong-Qian, LIU Zhong-Feng, WU Mei-Ling, LIU Zhong-Hua

College of Life Science, Northeast Agricultural University of China, Harbin 150030, China

**Abstract:** Uncompleted epigenetic reprogramming is attributed to the low efficiency of producing transgenic cloned animals. Histone modification associated with epigenetics can directly influence the embryo development and transgene expression. Trichostatin A (TSA), as an inhibitor of histone deacetylase, can change the status of histone acetylation, improve somatic cell reprogramming, and enhance cloning efficiency. TSA prevents the chromatin structure from being condensed, so that transcription factor could binds to DNA sequence easily and enhance transgene expression. Our study established the optimal TSA treatment on porcine donor cells and cloned embryos, 250 nmol/L, 24 h and 40 nmol/L, 24 h, respectively. Furthermore, we found that both the cloned embryo and the donor cell treated by TSA resulted in the highest development efficiency. Meanwhile, TSA can improve transgene expression in donor cell and cloned embryo. In summary, TSA can significantly improve porcine reconstructed embryo development and transgene expression.

**Keywords:** TSA; somatic cell nuclear transfer; embryo development; transgene expression; pig

收稿日期: 2010-10-15; 修回日期: 2010-12-21

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(编号: 2008ZX08006-002, 2009ZX08006-001B)和东北农业大学“创新团队”发展计划项目资助

作者简介: 孔庆然, 博士, 讲师, 研究方向: 胚胎工程与转基因动物。Tel: 0451-55191747; E-mail: kqr1982@yahoo.com.cn

朱江, 硕士, 研究方向: 胚胎工程。Tel: 0451-55191747; E-mail: zhujiang1021@yahoo.cn

孔庆然和朱江同为第一作者。

通讯作者: 刘忠华, 博士, 教授, 研究方向: 胚胎工程与转基因动物。E-mail: liu086@yahoo.com

网络出版时间: 2011-5-23 16:48:25

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110523.1648.002.html>

转基因技术经过近半个世纪的发展,已成为当今生物技术研究的热点。近 10 多年来,与核移植技术的结合,转基因效率大大提高,携带有不同外源基因的不同种类的转基因动物迅速增加<sup>[1]</sup>。近年来,体细胞克隆猪、转基因细胞克隆猪相继诞生<sup>[2~5]</sup>,这些突破极大的促进了基础研究的发展,推动了生物医学和畜牧业生产的进步<sup>[6]</sup>。

虽然我们已经能够得到体细胞克隆猪,但是克隆猪的效率依然较低。造成克隆猪效率低下的一个重要原因是不彻底的表观遗传重编程<sup>[7]</sup>。研究表明,体细胞不彻底的表观遗传重编程,会严重影响核移植胚胎的发育<sup>[8]</sup>,卵母细胞胞质对体细胞核彻底的重编程,是决定核移植胚胎发育,产生克隆动物的一个重要条件<sup>[9]</sup>。组蛋白乙酰化作为表观遗传修饰的一个重要部分,在核移植胚胎发育过程中起着重要的作用<sup>[10]</sup>。组蛋白乙酰化可以使染色质的结构松散,促进转录因子与 DNA 结合,进而促进相关发育基因的正常表达。研究表明, H3K9 的乙酰化与染色质的活性构象相关<sup>[11]</sup>, H4K16 的乙酰化则直接影响染色质高级结构的包装<sup>[12]</sup>。曲古抑菌素 A (Trichostatin A, TSA) 是一种去乙酰化酶抑制剂,其通过抑制去乙酰化酶的活性来提高组蛋白的乙酰化程度。TSA 处理供体细胞和克隆胚胎,可以促进胚胎发育相关基因 *Oct4*、*Sox2*、*FGF4*、*c-Myc*、*Klf4*、*Enomes* 和 *Cdx2* 的表达<sup>[13]</sup>,从而显著促进小鼠、牛等动物克隆胚胎的发育<sup>[14,15]</sup>。在猪上,已有实验表明用 TSA 处理核移植胚胎可以显著提高其体外发育率<sup>[16]</sup>与克隆猪的出生率<sup>[17]</sup>。但是用 TSA 处理后,出生克隆猪的死亡率较高<sup>[16]</sup>,这使得我们担心 TSA 对胚胎是否有负面作用。因此我们需要进一步探索 TSA 处理供体细胞和核移植胚胎的最适浓度和时间,得到最佳的处理方式。转基因动物中,普遍存在着外源基因沉默的现象,外源基因的沉默与表观遗传修饰密切相关<sup>[18]</sup>, TSA 作为组蛋白乙酰化修饰的调节药物,能否促进转基因细胞或转基因重构胚中外源基因的表达,至今尚无相关研究报道。探索 TSA 对转基因细胞及其核移植胚胎中外源基因表达的影响,可使我们进一步了解外源基因在转基因动物中的表达情况及其调节机制,为转基因动物的培育奠定理论与技术基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

胎儿成纤维细胞取自妊娠 32 d 长白猪胎儿, eGFP 转基因细胞取自体细胞核移植技术产生的 eGFP 转基因克隆猪;猪卵巢取自哈尔滨呼兰屠宰场。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 成纤维细胞的分离和培养

在猪场采集妊娠母猪的子宫或成猪耳部组织,置于 37℃ 添加双抗的生理盐水中,迅速运回实验室。从猪子宫中取出胎儿,用 PBS 清洗干净,去除四肢、头部,眼科剪充分剪碎;耳部组织用 PBS 清洗干净后直接剪碎。加入 3 mL 1 mg/mL 胶原酶,置于 37.5℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中消化 2~3 h。消化后 2 000 r/min 离心 10 min,去上清液,用 4 mL 培养液(高糖 DMEM+10% FBS)重悬,1 000 r/min 离心 5 min,去上清,再用细胞培养液重悬细胞/细胞团块液,取 2~3 mL 移入  $\phi=7$  cm 培养皿中并加入 4 mL 培养液,置于 38.5℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。待细胞贴壁 50%~60% 时,半量更换培养液,以后每 2 d 全量换液一次,并观察细胞生长情况;待细胞长满培养皿底 80%~90% 时,吸去培养液,用 DPBS 清洗 2~3 次,加入 0.5 mL 0.25% 胰酶消化 2~4 min,用等量细胞培养液终止消化,轻轻吹打成单细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min,细胞培养液将所得细胞沉淀制成悬液,以  $1\sim2\times10^6$  个/mL 细胞浓度接种在 9 cm 培养皿中,置于培养箱中培养,每 2 d 全量换液一次。3~5 代后可用于后续实验。

#### 1.2.2 核移植胚胎的构建

1.2.2.1 卵母细胞的采集和成熟培养 将屠宰场收集的卵巢置于 37℃ 添加双抗的生理盐水中,运送回实验室。用注射器抽取卵巢表面直径为 3~6 cm 的卵泡,收集含有卵丘卵母细胞复合体的液体,用 TL-HEPES 洗 2 次后,在显微镜下挑选具有 3 层以上卵丘细胞的卵丘卵母细胞复合体进行培养。培养液为改进的 TCM199 加 10% 卵泡液,培养条件为 39℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的二氧化碳培养箱。成熟培养 42 h 后,用 0.1% 的透明质酸酶消化卵丘卵母细胞复合体,去除卵丘细胞,在显微镜下挑选带有极体的卵母细胞,

作为成熟卵母细胞,用于核移植实验。

1.2.2.2 体细胞核移植 将成熟的卵母细胞置于 7.5 mg/mL 细胞松弛素 B 的操作液中,采用盲吸法,在显微镜下吸出第一极体及其周围的部分胞质,以吸出 1/4 左右的胞质认为完全去核。选取外表光滑、发亮的细胞,注入透明带和质膜之间,使供核细胞与质膜紧密接触。

1.2.2.3 融合与激活 采用电击的方法,一步实现融合与激活。将胚胎置于融合液中,使两细胞的接触面与两电极的连线垂直,1.2 kv/cm、30  $\mu$ s 直流电电击 2 次。在猪胚胎培养液静置 30 min 后,选取融合的胚胎,进行胚胎培养。

1.2.2.4 核移植胚胎的体外培养 融合的胚胎置于 PZM-3 培养液中培养,培养条件为 39  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度。培养至 36 h 检测卵裂率,156 h 检测囊胚率及囊胚细胞数。

### 1.2.3 成纤维细胞与核移植胚胎的药物处理

在细胞培养液中添加相应质量的 TSA,使其到达指定的浓度,用此培养液培养细胞,达到处理时间后,更换正常的培养液进行培养。

在 PZM-3 中添加相应质量的 TSA,使其到达指定的浓度,将重构胚置此培养液中,达到处理时间后,清洗,再移入正常的 PZM-3 中培养。

### 1.2.4 细胞形态观察与活率分析

收集各不同处理条件下的成纤维细胞,在光镜下观察细胞形态,采用 Computer-assisted cell analysis system (CASY) I cell-analyzing unit (Schärfe Systems, Reutlingen, Germany)细胞分析仪检测细胞活率。

### 1.2.5 流式细胞仪分析

将 GFP 转基因猪成纤维细胞用胰酶消化,PBS 清洗后悬浮,进行流式细胞仪检测。细胞检测时,激发波长设为 488 nm,接受波长设为 525 nm,并通过野生型猪成纤维细胞(对照)的检测,确定测量点(排除阴性细胞的自发荧光)、检测门(排除细胞碎片和死细胞)和检测速度(保证细胞的生物活性)。

### 1.2.6 实时定量 PCR 分析

提取核移植胚胎的总 RNA(RNeasy Mini Kit,

Qiagen),将提取的 RNA 反转为 cDNA (PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit, TaKaRa),然后用 Real-time PCR 检测 GFP 基因的表达情况(SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>, TaKaRa)。GFP 的上游引物为 5'-TGAACCGCATCGA GCTGAAGGG-3',下游引物为 5'-ACCTTGATGCC GTTCTTCTGCTTG-3',18S rRNA 作为内参,其上游引物为 5'-TCCAATGGATCCTCGCGGAA-3',下游引物为 5'-GGCTACCACATCCAAGGAAG-3'。

### 1.2.7 荧光分析

收集不同时期的 GFP 转基因细胞核移植胚胎,使用蛋白酶 K 去掉透明带,固定、透膜后,用 10 mg/L Hoechst 33342 染色,压片后于荧光镜(Nikon 70i)下观察细胞核及 GFP 的分布与表达情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 TSA 处理对猪胎儿成纤维的影响

用 0  $\mu$ mol/L、0.25  $\mu$ mol/L、0.5  $\mu$ mol/L、1.0  $\mu$ mol/L、2.0  $\mu$ mol/L 的 TSA 分别处理第 3 代胎儿成纤维细胞 12 h、24 h、48 h、72 h、96 h,取样检测细胞活率。结果如图 1 所示。随着 TSA 处理浓度的增大和处理时间的增长,细胞活率都会出现显著的下降。0.25  $\mu$ mol/L TSA 处理细胞 24 h,细胞活率不会出现显著下降,与对照组基本保持一致。

对不同浓度和时间 TSA 处理的细胞进行形态学观察,结果如图 2 所示。0.25  $\mu$ mol/L TSA 处理成纤维细胞 24 h 后,细胞形态与正常细胞相同,没有出现异常形态的细胞,但是随着处理浓度的增加和处理时间的增长,细胞会出现变长、膨胀和贴壁力下降等现象。

### 2.2 TSA 处理对转基因猪成纤维细胞中外源基因表达的影响

TSA 处理对转基因猪成纤维细胞中外源基因表达的影响如图 3 所示。与对照组相比,0.25  $\mu$ mol/L TSA 处理 GFP 转基因细胞 24 h 后,GFP 表达明显增强,GFP 阳性细胞数也显著增加。为了更精确的确定 GFP 阳性细胞的比例,用流式细胞仪对处理和未处理组进行了检测,结果如图 4 所示,经 TSA 处理后,GFP 阳性细胞数较未处理组增加近一倍。

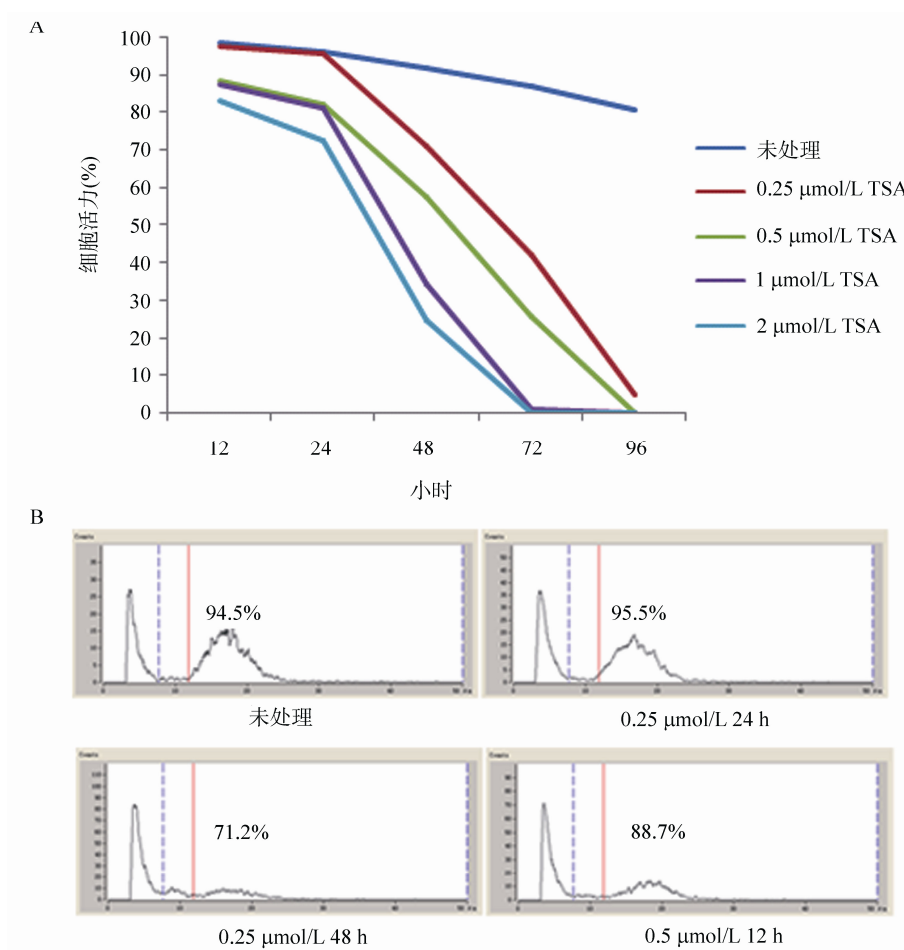


图 1 TSA 对猪成纤维细胞活率的影响

A: 不同处理浓度和处理时间的 TSA 对猪成纤维细胞活率的影响; B: CASY I 细胞活率分析仪检测图例。

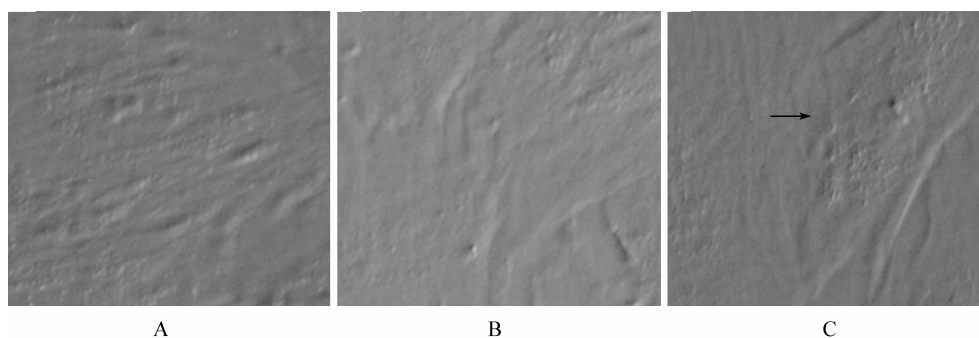


图 2 TSA 对猪成纤维细胞形态的影响( $\times 400$ )

A: 0  $\mu\text{mol/L}$  (对照) TSA 处理对猪成纤维细胞形态的影响; B: 0.25  $\mu\text{mol/L}$  24h TSA 处理对猪成纤维细胞形态的影响; C: 0.5  $\mu\text{mol/L}$  12h TSA 处理对猪成纤维细胞形态的影响; 箭头所指为形态异常的细胞。

### 2.3 不同浓度 TSA 处理对克隆胚胎体外发育的影响

采用猪胎儿成纤维细胞作为供体细胞, 在核移植胚胎激活后, 分别用 0 nmol/L、20 nmol/L、40 nmol/L、60 nmol/L、80 nmol/L 的 TSA 处理 24 h, 检测胚胎的卵裂率、囊胚率及囊胚细胞数, 结果如

表 1 所示。随着处理浓度的升高, 卵裂率并没有显著的变化; 囊胚率则随着处理浓度的升高, 呈现出先升高后降低的趋势, 最适的处理浓度为 40 nmol/L, 此时的囊胚率显著高于其他处理组和对照组 ( $P < 0.05$ ), 囊胚细胞数也显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

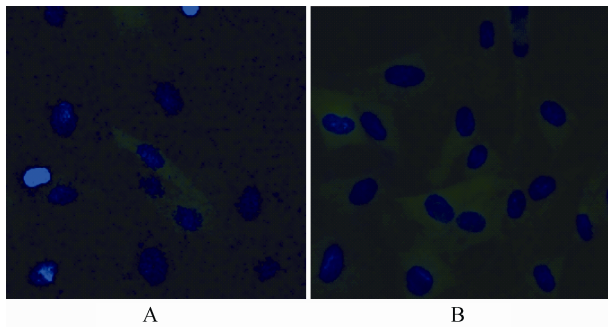


图 3 TSA 对转基因猪成纤维细胞中外源基因表达的影响 ( $\times 200$ )

A: 未处理组; B: 处理组; 绿色: GFP; 蓝色: DNA。

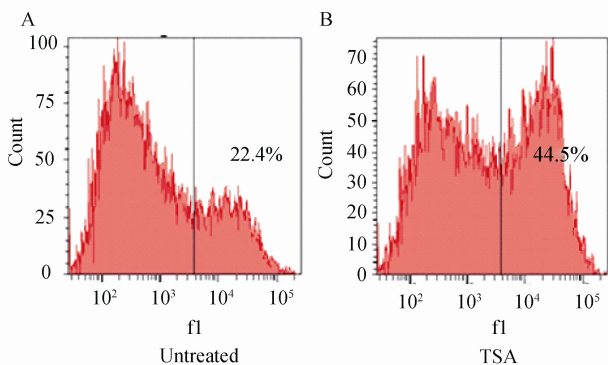


图 4 流式细胞仪检测 TSA 处理转基因猪成纤维细胞对 GFP 阳性细胞比率的影响

表 1 不同浓度 TSA 处理对核移植胚胎发育的影响

TSA 浓度 (nmol/L)	胚胎数	卵裂数(%)	囊胚数(%)	囊胚细胞数
0	115	96(83.46 $\pm$ 3.49)	15 (13.00 $\pm$ 3.02) <sup>a</sup>	28.47 $\pm$ 8.28 <sup>a</sup>
20	124	100(80.26 $\pm$ 4.18)	29 (22.81 $\pm$ 10.58) <sup>a</sup>	30.74 $\pm$ 8.24 <sup>ab</sup>
40	121	103(85.09 $\pm$ 1.23)	43 (35.65 $\pm$ 9.58) <sup>b</sup>	32.67 $\pm$ 8.75 <sup>b</sup>
60	123	105(85.25 $\pm$ 7.75)	26 (21.04 $\pm$ 11.21) <sup>a</sup>	30.80 $\pm$ 4.86 <sup>ab</sup>
80	120	106(88.47 $\pm$ 10.76)	20 (24.28 $\pm$ 9.08) <sup>a</sup>	34.21 $\pm$ 7.02 <sup>b</sup>

注: 不同上标代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。

## 2.4 不同 TSA 处理方式对转基因胚胎体外发育的影响

用 250 nmol/L 的 TSA 处理转基因猪成纤维细胞 24 h, 用 40 nmol/L 的 TSA 处理克隆胚胎 24 h, 进行正交实验, 检测胚胎的囊胚率、囊胚细胞数, 并计算 GFP 阳性囊胚的比例, 结果如表 2 所示。用 TSA 同时处理细胞和胚胎可显著提高核移植胚胎的发育能力, 与对照组相比囊胚率提高约 3 倍, 用 TSA 单独处理核移植胚胎也对其发育能力有较大的促进作用, 但是 TSA 单独处理细胞则会造成核移植胚胎发育能力的下降。

表 2 不同 TSA 处理方式对 eGFP 转基因细胞核移植胚胎发育的影响

组别	胚胎数	囊胚数 (%)	囊胚细胞数	GFP 阳性囊胚数 (%)
G1	174	21 (12.33 $\pm$ 6.42)	24.16 $\pm$ 6.54 <sup>a</sup>	6 (28.57)
G2	180	60 (33.54 $\pm$ 9.26)	25.82 $\pm$ 11.43 <sup>a</sup>	6 (20.00)
G3	196	21 (7.84 $\pm$ 5.31)	16.38 $\pm$ 7.07 <sup>b</sup>	7 (33.33)
G4	182	89 (48.96 $\pm$ 10.17)	33.85 $\pm$ 11.97 <sup>c</sup>	4 (16.67)

注: 不同上标代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。G1: 供体细胞和胚胎均不处理; G2: 只处理胚胎; G3: 只处理体细胞; G4: 供体细胞和胚胎均处理。

## 2.5 TSA 处理对外源基因表达的影响

收集转基因细胞和 G1(细胞和胚胎均不处理)、G2(只处理胚胎)、G3(只处理细胞)、G4(细胞胚胎均处理)组不同时期的胚胎, 分别进行 Real-time PCR 检测 *eGFP* 基因在 mRNA 水平的表达情况, 实验结果如图 5 所示。细胞经 TSA 处理后, 其 GFP 的表达水平有显著的升高; 对照组(G1)在不同胚胎发育时期, GFP 表达基本稳定, TSA 单独处理核移植胚胎后, 其 GFP 在各个时期的表达水平稳定, 且略低于对照组; TSA 单独处理供体细胞的核移植胚胎, 其 GFP 在各个时期的表达水平稳定, 但显著高于对照组, 约为对照组的两倍; TSA 同时处理供体细胞和核移植胚胎的胚胎, GFP 的表达水平随着发育的进行逐渐降低, 激活后 12 h 约为对照组的 2 倍, 到 4 细胞时则降低到与对照组相同的程度, 囊胚时则略低于对照组。

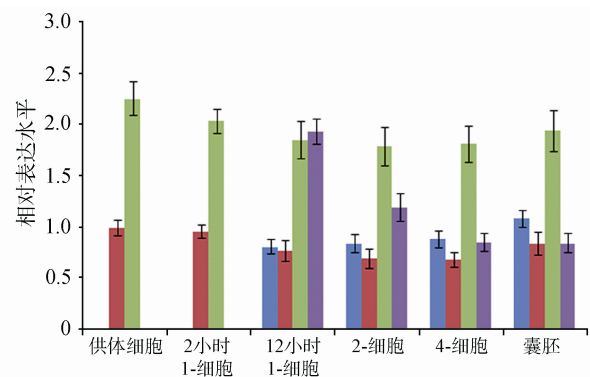


图 5 外源 *GFP* 基因 mRNA 在核移植胚胎中的表达  
蓝色: G1; 红色: G2; 绿色: G3; 紫色: G4。

在蛋白水平进一步确定 GFP 的表达情况, G4 组免疫荧光的结果如图 6 所示。在胚胎发育的各个时期, 均有 GFP 蛋白的表达, 随着胚胎的发育, GFP 的表达水平逐渐降低, 且由靠近核的胞质部分逐渐向外周胞质分散。

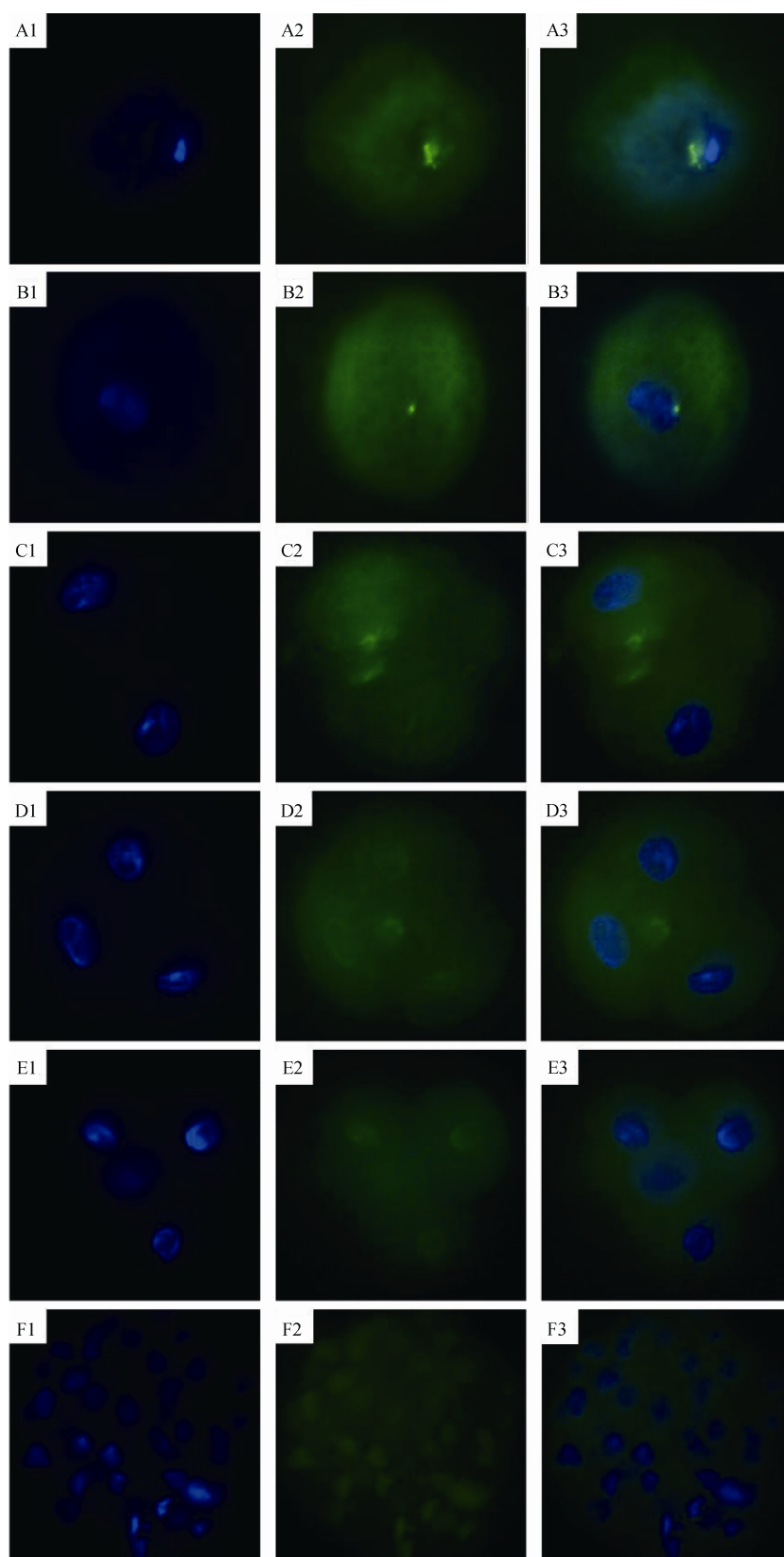


图 6 GFP 在核移植胚胎中的表达情况( $\times 200$ )

A1~F1: Hoechst 33342 染色后, 核移植胚胎在紫外下的照片; A2~F2: 核移植胚胎在蓝色荧光下的照片; A3~F3: 第一列和第二列的合成照片。  
A1~A3: 2 h 1-细胞; B1~B3: 12 h 1-细胞; C1~C3: 2-细胞; D1~D3: 3-细胞; E1~E3: 4-细胞; F1~F3: 囊胚。蓝色: DNA; 绿色: GFP。



### 3 讨论

TSA 能够显著促进核移植胚胎的发育,这一点已经在小鼠<sup>[14]</sup>、牛<sup>[19]</sup>、兔<sup>[20]</sup>、猪<sup>[17]</sup>等多种动物上得到了证实,但是不同物种、不同培养体系所要求的 TSA 处理浓度和处理时间是不同的,同时 TSA 对细胞和胚胎的处理条件和处理效果也不尽相同,因此本实验首先探讨了猪体细胞核移植中 TSA 处理供体细胞和核移植胚胎的最适条件。

用不同浓度的 TSA 分别处理供体细胞不同时间,过高的浓度和过长的时间,都会对供体细胞产生较大的伤害,使细胞的形态发生异常,出现衰老死亡的迹象。实验结果表明, TSA 处理猪供体细胞的最适条件是 0.25  $\mu\text{mol/L}$ 、24 h。

用 TSA 处理核移植胚胎,可以显著促进胚胎的发育,这点在猪上已经得到了明确的证实<sup>[17]</sup>,但是对于不同的培养体系和克隆方法, TSA 的处理条件会存在一定差异,因此有必要确定本实验室体系下 TSA 处理核移植胚胎的最适处理条件。40 nmol/L 的 TSA 处理核移植胚胎 24 h,可以显著促进胚胎的体外发育,过高的浓度会对胚胎产生毒害作用,使胚胎死亡,发育率下降。

基于以上得到的处理供体细胞和核移植胚胎的最适条件,综合考虑 TSA 对供体细胞和核移植胚胎的影响,我们进行了不同处理方式的正交实验,希望得到最佳的处理方法。实验结果表明, TSA 同时处理供体细胞和胚胎具有最显著增长的发育率,这说明 TSA 较好的促进了体细胞核的重编程过程,有力的激活了胚胎发育相关基因的表达;仅对胚胎的处理也有较好的发育效果,也与先前的研究结果相一致;令我们感兴趣的是,仅对供体细胞进行处理,胚胎的发育效果显著低于对照组,我们认为可能的原因是, TSA 处理供体细胞后,激活胚胎发育相关基因的同时,也提高了一些组织特异性基因的表达水平,阻碍供体细胞的重编程,降低了克隆胚胎的体外发育比率。但是,在重构胚胎中,由于卵胞质中存在大量的重编程因子,启动与胚胎发育相关基因的表达,从而抑制组织特异性基因的表达,这更有利于 TSA 激活胚胎发育相关基因,提高克隆胚胎体外发育能力。

TSA 可以促进内源基因的表达。目前研究表明,在小鼠中,可以促进多个胚胎发育相关基因的表达<sup>[21]</sup>,另外,在猪中, TSA 能促进 *Oct4*、*Nanog* 等多能性基因及一些印记基因的表达<sup>[22]</sup>,从而提高胚胎发育能力。我们的实验结果表明,用 TSA 处理供体细胞,能够显著提高细胞中外源基因的表达水平,转基因阳性细胞数显著增加; TSA 处理供体细胞后进行核移植,核移植胚胎中外源基因的表达量显著提高,大约可以提高一倍; TSA 单独处理核移植胚胎对外源基因的表达没有显著的影响;另外,有趣的是,我们发现用 TSA 同时处理供体细胞和核移植胚胎,虽然克隆胚胎的体外发育能力显著提高,但是 GFP 的表达水平随着胚胎的发育逐渐降低,这可能与介导外源基因表达的 CMV 启动子有关,有研究表明, CMV 启动子只能介导外源基因在胚胎发育后期表达,而在胚胎发育早期,其活性较低<sup>[23]</sup>。综上所述我们认为, TSA 可以广泛的改变表观遗传状态,激活基因表达,其中包括外源基因,不具有显著的特异性。但在卵胞质中,重编程因子能促进胚胎发育相关基因的表达, TSA 的适当处理可使胚胎更有利于促进发育相关基因的表达,抑制分化基因和组织特异性基因的表达,从而提高克隆胚胎的体外发育能力。

在体细胞核移植技术日趋成熟的今天,如何把该项技术更好的应用到生产领域,更好的生产转基因动物,促进畜牧业生产,具有重要的意义。本实验确定了 TSA 处理核移植胚胎的最佳条件,可以显著的提高核移植胚胎的体外发育能力,同时我们还研究了 TSA 对外源基因表达的影响,得到了可以促进外源基因表达的处理方式。本研究将为高效的转基因克隆动物生产奠定基础。

### 参考文献(References):

- [1] Vajta G. Somatic cell nuclear transfer in its first and second decades: successes, setbacks, paradoxes and perspectives. *Reprod Biomed*, 2007, 15(5): 582–590.
- [2] Lee GS, Kim HS, Hyun SH, Lee SH, Jeon HY, Nam DH, Jeong YW, Kim S, Kim JH, Han JY, Ahn C, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein. *Theriogenology*, 2005, 63(4): 973–991.
- [3] Watanabe S, Iwamoto M, Suzuki SI, Fuchimoto D, Honma

- D, Nagai T, Hashimoto M, Yazaki S, Sato M, Onishi A. A novel method for the production of transgenic cloned pigs: electroporation-mediated gene transfer to non-cultured cells and subsequent selection with puromycin. *Biol Reprod*, 2005, 72(2): 309–315.
- [4] Lai LX, Kang JX, Li RF, Wang JD, Witt WT, Yong HY, Hao YH, Wax DM, Murphy CN, Rieke A, Samuel M, Linville ML, Korte SW, Evans RW, Starzl TE, Prather RS, Dai Y. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(4): 435–436.
- [5] Li RF, Lai LX, Wax D, Hao YH, Murphy CN, Rieke A, Samuel M, Linville ML, Korte SW, Evans RW, Turk JR, Kang JX, Witt WT, Dai YF, Prather RS. Cloned transgenic swine via in vitro production and cryopreservation. *Biol Reprod*, 2006, 75(2): 226–230.
- [6] Vajta G, Zhang YH, Macháty Z. Somatic cell nuclear transfer in pigs: recent achievements and future possibilities. *Reprod Fertil Dev*, 2007, 19(2): 403–423.
- [7] Pratt SL, Sherrer ES, Reeves DE, Stice SL. Factors influencing the commercialisation of cloning in the pork industry. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 2006, 62(1): 303–315.
- [8] Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK, Han YM. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet*, 2001, 28(2): 173–177.
- [9] Kang YK, Yeo S, Kim SH, Koo DB, Park JS, Wee G, Han JS, Oh KB, Lee KK, Han YM. Precise recapitulation of methylation change in early cloned embryos. *Mol Reprod Dev*, 2003, 66(1): 32–37.
- [10] Turner BM. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*, 2000, 22(9): 836–845.
- [11] Rice JC, Allis CD. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13(3): 263–273.
- [12] Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, 2006, 311(5762): 844–847.
- [13] Li XP, Kato Y, Tsuji Y, Tsunoda Y. The effects of trichostatin A on mRNA expression of chromatin structure-, DNA methylation-, and development-related genes in cloned mouse blastocysts. *Cloning Stem Cells*, 2008, 10(1): 133–142.
- [14] Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, van Thuan N, Wakayama S, Bui HT, Wakayama T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(1): 183–189.
- [15] Iager AE, Ragina NP, Ross PJ, Beyhan Z, Cunniff K, Rodriguez RM, Cibelli JB. Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. *Cloning Stem Cells*, 2008, 10(3): 371–380.
- [16] Zhang YH, Li J, Villemoes K, Pedersen AM, Purup S, Vajta G. An epigenetic modifier results in improved *in vitro* blastocyst production after somatic cell nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9(3): 357–363.
- [17] Li J, Svarcova O, Villemoes K, Kragh PM, Schmidt M, Bøgh IB, Zhang Y, Du Y, Lin L, Purup S, Xue Q, Bolund L, Yang H, Maddox-Hyttel P, Vajta G. High in vitro development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. *Theriogenology*, 2008, 70(5): 800–808.
- [18] Kong QR, Wu ML, Huan YJ, Zhang L, Liu HY, Bou G, Luo YB, Mu YS, Liu ZH. Transgene expression is associated with copy number and cytomegalovirus promoter methylation in transgenic pigs. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6679.
- [19] Lee MJ, Kim SW, Lee HG, Im GS, Yang BC, Kim NH, Kim DH. Trichostatin A promotes the development of bovine somatic cell nuclear transfer embryos. *J Reprod Dev*, 2011, 57(1): 34–42.
- [20] Shi LH, Ai JS, Ouyang YC, Huang JC, Lei ZL, Wang Q, Yin S, Han ZM, Sun QY, Chen DY. Trichostatin A and nuclear reprogramming of cloned rabbit embryos. *J Anim Sci*, 2008, 86(5): 1106–1113.
- [21] Shao GB, Ding HM, Gao WL, Li SH, Wu CF, Xu YX, Liu HL. Effect of trichostatin A treatment on gene expression in cloned mouse embryos. *Theriogenology*, 2009, 71(8): 1245–1252.
- [22] Cervera RP, Martí-Gutiérrez N, Escorihuela E, Moreno R, Stojkovic M. Trichostatin A affects histone acetylation and gene expression in porcine somatic cell nucleus transfer embryos. *Theriogenology*, 2009, 72(8): 1097–1110.
- [23] Hong SH, Hwang DY, Yoon S, Isacson O, Ramezani A, Hawley RG, Kim KS. Functional analysis of various promoters in lentiviral vectors at different stages of *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells. *Mol Ther*, 2007, 15(9): 1630–1639.