

猪耳成纤维细胞转录组异质性及对核移植胚胎发育的潜在影响

周俊¹, 赵成成¹, 吴霄¹, 石俊松², 周荣², 吴珍芳¹, 李紫聪¹

1. 华南农业大学动物科学院, 国家生猪种业工程技术研究中心, 广州 510642

2. 广东温氏种猪科技有限公司, 新兴 527400

摘要: 同一来源的供体细胞之间存在异质性。许多研究已经表明体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)效率与供体细胞有关。然而, 鲜有在单细胞水平分析供体细胞异质性对核移植效率的潜在影响。本研究利用单细胞转录组测序技术对同一来源且随机挑选的 52 个猪耳组织成纤维细胞进行测序分析。结果表明有 48 个单细胞的基因表达模式相似, 4 个单细胞(编号为 D11_1、D12_1、DW61_2 和 DW99_2)的基因表达模式与其他单细胞存在较大的差异, 并且不存在基因表达模式完全相同的两个单细胞。以基因表达模式相似的 48 个单细胞作为对照, 进一步分析了单细胞 D11_1、D12_1、DW61_2 和 DW99_2 的差异基因表达模式: 首先利用 R 语言筛选 4 个单细胞的差异表达基因, 并对前 50 差异表达基因进行汇总; 然后对差异表达基因进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析。富集分析发现差异表达基因的主要分子功能包括能量代谢、蛋白质代谢和细胞对刺激的反应等; 主要通路包括 KEGG 中富集的与细胞周期、细胞代谢、DNA 复制相关的通路。根据以上研究结果并结合 SCNT 研究进展讨论了 4 个单细胞的差异基因表达模式对核移植胚胎发育效率的潜在影响。本研究揭示了猪耳组织成纤维细胞的转录组异质性, 并提供了分析精英供体细胞的一种有效方法, 为提高克隆效率带来新的思路。

关键词: 猪; 体细胞核移植; 供体细胞; 异质性; 单细胞测序

Transcriptome heterogeneity of porcine ear fibroblast and its potential influence on embryo development in nuclear transplantation

Jun Zhou¹, Chengcheng Zhao¹, Xiao Wu¹, Junsong Shi², Rong Zhou², Zhenfang Wu¹, Zicong Li¹

1. National Engineering Research Center for Swine Breeding Industry, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

2. Guangdong Wenshi breeding pig Technology Co., Ltd, Xinxing 527400, China

Abstract: There is heterogeneity among donor cells of the same source. Many studies have shown that donor cell affects

收稿日期: 2020-06-22; 修回日期: 2020-08-11

基金项目: 广东省乡村振兴战略专项(2018 年)资助[Supported by Guangdong Provincial Promotion Project on Preservation and Utilization of Local Breed of Livestock and Poultry (2018)]

作者简介: 周俊, 在读硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: 374949357@qq.com

通讯作者: 李紫聪, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: lizicongcong@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.20-190

网络出版时间: 2020/9/2 16:08:53

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.r.20200831.1604.002.html>

the efficiency of somatic cell nuclear transfer (SCNT). However, the potential influence of donor cell heterogeneity on the efficiency of nuclear transplantation were rarely analyzed at the single-cell level. In this study, single-cell transcriptome sequencing was performed on 52 porcine ear fibroblasts randomly selected from the same source to compare their gene expression patterns. The results showed that 48 cells had similar gene expression patterns, whereas 4 cells (D11_1, D12_1, DW61_2, DW99_2) had significantly different gene expression patterns from those of other cells. There were no two cells with identical gene expression patterns. The gene expression patterns of D11_1, D12_1, DW61_2 and DW99_2 were analyzed, using the 48 cells with similar gene expression patterns as controls. Firstly, we used the R language statistics to select the differentially expressed genes in the 4 single cells, and identified the top 50 most significant differentially expressed genes. Then GO enrichment analysis and KEGG pathway analysis were performed on the differentially expressed genes. Enrichment analysis revealed that the main molecular functions of the differentially expressed genes included energy metabolism, protein metabolism and cell response to stimulation. The main pathways from KEGG enrichment were related to cell cycle, cell metabolism, and DNA replication. Finally, based on the above results and in consideration with the SCNT research progress, we discussed the potential effects of differential gene expression patterns of the 4 single cells on the embryonic development efficiency of nuclear transplantation. This study revealed transcriptional heterogeneity of porcine ear tissue fibroblasts and provided an effective method to analyze elite donor cells, thereby providing new ideas on improving the cloning efficiency of SCNT.

Keywords: pigs; SCNT; donor cell; heterogeneity; single-cell sequencing

体细胞核移植技术(somatic cell nuclear transfer, SCNT)又称为体细胞克隆技术。1997年,英国胚胎学家 Wilmut 利用 SCNT 技术成功克隆出第一只哺乳动物—克隆羊“多莉”^[1],随后,通过该技术先后诞生了牛(*Bos taurus*)^[2]、猪(*Sus scrofa*)^[3]、猴(*Macaca mulatta*)^[4]等 20 余种哺乳动物。SCNT 技术在保护濒危物种^[5]、优秀种繁扩繁^[6]以及再生医学^[7]等领域表现出巨大的应用价值,是生命科学研究的重要成果。但是,SCNT 技术同样面临很多问题:以猪为例,体外培养条件下,囊胚率仅为 20%左右,在不同品种或者卵母细胞质量差的情况下可能更低。即便胚胎成功附植,相较于体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)胚胎,SCNT 胚胎发育能力差、在受孕母猪体内发育异常的现象也十分普遍^[8]。除此之外,大多数实验条件下,克隆猪的出生率只有 1%左右,远低于人工授精(artificial insemination, AI)猪的出生效率(80%)^[9],严重限制了 SCNT 技术的应用和普及。SCNT 技术基础是将供体细胞移入去核的成熟卵母细胞中,最终发育成和供体细胞基因型相同的后代。因此供体细胞是影响体细胞核移植效率的关键因素。已有研究表明供体细胞会对 SCNT 效率产生影响:

供体细胞的细胞周期^[10]、传代数^[11]以及性别^[12]的不同都会导致克隆胚胎发育效率出现差异。因此,选择合适的供体细胞对提高 SCNT 胚胎发育效率十分重要。

供体细胞核在成熟的去核卵母细胞中异常的表现遗传重编程被认为是阻碍 SCNT 发育的主要原因^[13,14]。而更容易被正确重编程的核供体细胞很可能是具有更大发育潜力的精英供体细胞。Zhai 等^[15]分别以猪骨髓间充质干细胞和猪胎儿成纤维细胞作为供体细胞进行核移植实验,发现发育效率较高的骨髓间充质干细胞含有更多的有利于重编程的表观遗传标记和较少的抑制重编程的表观遗传标记,暗示容易被正确重编程的供体细胞在 SCNT 过程中会有更好的发育潜能。同时,Yamanaka 等^[16]在鼠源诱导多能干细胞研究中就已经提出精英供体细胞的概念:同一来源的细胞中会存在一些更容易被正确重编程、发育潜力更大的精英供体细胞;同样,在克隆小鼠(*Mus musculus*)的研究中也发现,与其他品系的小鼠相比,129 小鼠的基因组状态更不稳定,更容易被激活或抑制。用野生基因型和 129 小鼠基因型杂交得到的重组细胞做供体,可显著提高克隆动

物的出生率^[17],说明精英供体细胞具有独特的基因表达模式,只是其分子特征尚未探索清楚。另有研究显示,从供体细胞遗传而来的一些转录记忆可以导致克隆胚胎的发育缺陷^[18],表明供体细胞在一定程度上决定了重构胚胎的发育命运。供体细胞的异质性是指供体细胞在基因组或表型水平上具有的不同特征。同时,因为细胞之间异质性的存在,不同的供体细胞发育潜力是有差异的。即便同一起来源的供体细胞也存在更有利于胚胎发育的精英供体细胞。但是在实际研究中,同一起来源的供体细胞之间表型特征差异不明显,分子层面的特征信息丢失严重,缺乏对常见供体细胞异质性的深入研究。

近年来,随着测序技术的发展,特别是低输入测序技术为体细胞核移植的研究提供了更多可能。而单细胞测序技术的诞生及发展^[19-21]为人们进一步探究供体细胞之间的分子事件提供了便利。应用单细胞测序技术,可以更精准的分辨率揭示供体细胞的异质性。基于此,本研究对来源相同的 52 个猪耳组织成纤维细胞进行单细胞转录组测序分析,发现了 48 个基因表达模式相似的“普通”细胞,4 个基因表达模式互不相似且都与“普通”细胞的基因表达模式存在显著差异的“另类”细胞,揭示了猪耳组织成纤维细胞的转录组异质性,并结合已有研究结果讨论了供体细胞转录组异质性对核移植效率的潜在影响,为后续通过深入研究寻找精英供体细胞来提高猪体细胞核移植效率提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

杜洛克公猪(373 日龄)耳组织样品由广东温氏食品集团华农温氏股份有限公司提供;总 RNA 提取试剂盒 SMART-SeqTM v4 UltraTM Low Input RNA Kit for Sequencing 购于北京诺禾致源生物信息科技有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、氨基酸葡萄糖培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、0.25%胰蛋白酶和乙二胺四乙酸均购自美国 Gibco 公司。单细胞转录组测序由北京诺禾致源生物信息科技有限公司在 illumina 平台完成。图片

处理使用 Photoshop 7.0/ACDSee 9.0 软件;spliced reads 比对使用 HISAT 软件^[22];聚类分析、基因差异表达分析、GO 富集分析和主成分分析(principal component analysis, PCA)均采用 R 语言,其中聚类分析使用软件包 pheatmap,基因差异表达分析使用软件包 DESeq (1.12.0)^[23],富集分析采用软件包 Goseq^[24];KEGG 富集使用软件 KOBAS (2.0)。

1.2 供体细胞单细胞培养与分离

将成年优良杜洛克种公猪的耳组织样品剪碎,用 PBS 洗涤两次之后,在 100 mm 的培养皿上用手术刀和剪子切碎,先用 DMEM 重悬,再用胰蛋白酶和乙二胺四乙酸消化 1~2 h。将胰蛋白酶消化的细胞洗涤一次后,以 300 g 的离心率离心 10 min,并将其接种于 100 mm 的细胞培养皿中,放入 15% FBS 和 10 mg/L 的青霉素-链霉素溶液的 DMEM。在 39℃、5%CO₂ 饱和湿度的恒温培养箱中培养 6~8 d。然后移除未附着的组织块,再将附着的细胞培养直至汇合,期间每隔 3~7 d 更换 DMEM。最后利用显微操作法,在体视显微镜下吸取单个细胞,放于盛有裂解液的去 DNase-RNase 的离心管中,用于单细胞转录组测序。

1.3 单细胞转录组数据获得

1.3.1 总 RNA 提取

每个细胞样品保存在 6 μL SMART-SeqTM v4 kit 裂解液(北京诺禾致源生物信息科技有限公司)中。细胞样品经过体积测量后,使用 SMART-SeqTM v4 UltraTM Low Input RNA Kit for Sequencing 试剂盒(美国 Clontech 公司)进行细胞裂解,提取总 RNA,并保存在 RNase-Free 水中。

1.3.2 单细胞 cDNA 文库构建及测序

对提取的总 RNA 直接进行 First-stand cDNA 的合成,然后对 First-stand cDNA 进行全长 LD-PCR 的扩增,利用 AMPure XP beads 纯化扩增后的双链 cDNA (double-standed DNA, ds cDNA),使用 Qubit 进行 ds cDNA 定量检测;使用 Covaris 系统对 ds cDNA 进行超声打断,打断后的双链短片段进行

末端修复、加 A 尾并连接测序接头,然后用 AMPure XP beads 纯化并选择片段大小在 200 bp 左右的文库;最后进行 PCR 富集得到最终的 cDNA 文库。使用 Qubit2.0 对文库进行初步定量,稀释文库至 1 ng/ μ L,使用 Agilent 2100 对文库的插入片段长度进行检测。插入片段符合预期后,使用 qPCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量,以保证文库质量。库检合格后,将不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求合并后进行 HiSeq 测序。本研究最后扩增成功且完成单细胞测序的样品为 52 个,细胞样品编号见表 1。

1.4 单细胞转录组数据分析

1.4.1 测序数据质量控制

fastq 格式的原始数据先通过内部 perl 脚本进行处理。在此步骤中,删除包含适配器的 reads、包含 ploy-N 的低质量的原始数据来获得干净的数据(clean reads),同时对 Q20、Q30 和 GC 内容进行计算,所有的下游分析都是基于高质量的清洁数据。

表 1 扩增成功并测序的单细胞样品
Table 1 The single cell samples which were successfully amplified and sequenced

序号	样品编号	序号	样品编号	序号	样品编号
1	D1_1	19	D31_1	37	DW22_2
2	D1_3	20	D32_3	38	DW24_1
3	D8_2	21	D33_1	39	DW31_1
4	D9_2	22	D36_3	40	DW36_1
5	D11_1	23	D37_3	41	DW36_2
6	D12_1	24	D40_2	42	DW41_2
7	D12_2	25	D40_3	43	DW45_1
8	D13_1	26	D43_3	44	DW45_2
9	D18_3	27	D44_1	45	DW58_2
10	D20_1	28	D45_3	46	DW61_1
11	D21_1	29	D48_1	47	DW61_2
12	D22_1	30	D52_3	48	DW69_1
13	D23_3	31	D63_1	49	DW69_2
14	D25_1	32	D63_2	50	DW73-1
15	D26_1	33	D64_1	51	DW99_1
16	D27_1	34	D66_1	52	DW99_2
17	D28_1	35	DW16_1		
18	D28_2	36	DW22_1		

1.4.2 差异基因表达分析

参考基因组和基因模型注释文件直接从基因组网(<http://www.ensembl.org/>)下载。选取 HISAT 软件将过滤后的测序序列进行基因组定位分析。HISAT 能够有效的比对到 RNA-Seq 测序数据中的 spliced reads,是目前比对率最高且最准确的比对软件。先使用 Hisat2 v2.0.4 作为映射工具,它可以基于基因模型注释文件生成一个拼接连接的数据库,因此比其他非拼接映射工具具有更好的映射结果。然后使用软件 HTSeq v0.9.1 计算映射到每个基因的读取数字。然后根据基因的长度计算出每个基因的 FPKM,并读取到该基因的计数。在进行差异基因表达分析之前,通过 edgeR 程序包^[25]对每一个序列库标准化。利用 R 语言中的 DEGSeq (1.20.0)软件包进行微分表达式分析并绘制 4 个“另类”细胞差异基因火山图、聚类软件包 pheatmap 绘制 4 个“另类”细胞差异基因聚类图。*P* 值用 Benjamini 和 Hochberg 法进行调整,修正的 *P* 值为 0.005 和 $\log_2(\text{fold change})$ 为 1,为显著差异表达的阈值。

1.4.3 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

通过 R 语言中的 Goseq 软件包对筛选得到的差异基因进行 GO 富集,展示差异基因在 Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>)中的分布状况,阐明本研究中不同细胞基因功能上的差异。

利用 KOBAS(2.0)软件对差异表达基因进行 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)通路统计,得到差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。其原理是应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比,在差异表达基因中显著性富集的通路。

2 结果与分析

2.1 单细胞转录组测序揭示猪耳组织成纤维细胞间的异质性

按照 PCA 的前 3 个主要影响因素两两组合,对成功扩增且最终完成测序的 52 个单细胞进行主成分分析(图 1),其中 Dim1、Dim2、Dim3 分别代表影

响单细胞样本在图中相对位置的 3 个主要因素, 相对位置较近的细胞表示基因表达模式相似。结果表明, D11_1、D12_1、DW61_2 和 DW99_2 在图 1 中的位置与其他单细胞相比较“离群”, 说明这 4 个细胞的基因表达模式与其他单细胞存在较大差异。同时将 52 个耳组织成纤维细胞的基因表达总体情况绘制成热图(图 2), 结果表明, 在同一样本的猪耳成纤维细胞中, 同一基因在不同细胞间的表达情况并不相同, 并不存在基因表达模式完全一致的两个细胞, 不同供体细胞之间存在转录组异质性。

2.2 D11_1、D12_1、DW61_2 和 DW99_2 基因表达模式分析

将基因表达模式差异不明显的“普通”细胞作为对照组, 使用 R 语言中的软件包 DESeq (1.12.0) 对 D11_1、D12_1、DW61_2 和 DW99_2 进行差异基因表达分析。D11_1 与对照组比较, 有 1860 个差异表达显著的基因, 其中上调表达的基因有 458 个, 下调表达的基因有 1402 个; D12_1 与对照组比较, 有 376 个差异表达显著的基因, 其中上调表达的基因有 109 个, 下调表达的基因有 267 个; DW61_2 与对照组比较, 有 330 个差异表达显著的基因, 其中上调表达的基因有 277 个, 下调表达的基因有 53 个; DW99_2 与对照组比较, 有 2225 个差异表达显

著的基因, 其中上调表达的基因有 316 个, 下调表达的基因有 1909 个。使用 R 语言中软件包 DESeq (1.12.0) 将 4 个“另类”细胞的差异基因的整体分布情况可视化(图 3), 使用 R 语言中的聚类软件包 pheatmap 将 4 个“另类”细胞的差异基因整体表达情况可视化(图 4)。同时, 将用软件包 DESeq (1.12.0) 筛选出的 D11_1、D12_1、DW61_1 和 DW99_2 前 50 个差异最显著的基因进行汇总: D11_1 前 50 个差异最显著的基因功能主要集中于细胞增殖分化过程中一些有机物质的合成与能量代谢过程(表 2); D12_1 前 50 个差异最显著的基因功能主要集中于蛋白质及葡萄糖转运等过程(表 3); DW61_2 前 50 个差异最显著的基因功能比较多样, 但有个别基因涉及转移酶活性(表 4); DW99_2 前 50 个差异最显著的基因功能主要集中于蛋白质编码、核酸修复与能量代谢方面(表 5)。

2.3 D11_1、D12_1、DW61_2 和 DW99_2 差异基因 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

对 D11_1、D12_1、DW61_2 和 DW99_2 测序得到的差异基因进行 GO 富集分析, 这些差异基因在生物过程、细胞组分和分子功能方面的分布情况见图 5。D11_1 上调的差异表达基因主要集中于与细胞代谢有关的线粒体等细胞器和细胞器膜, 下调的差

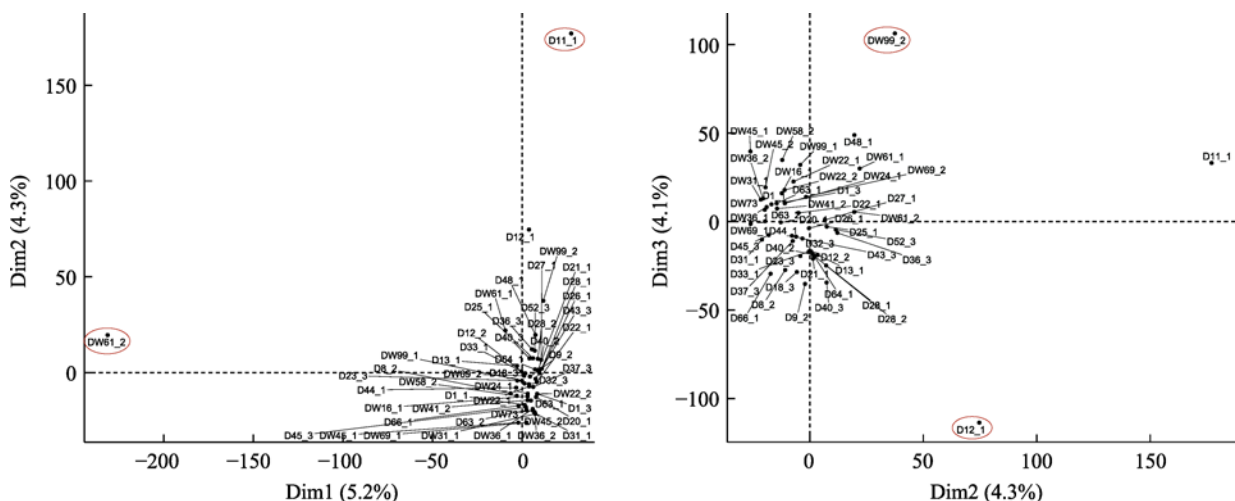


图 1 52 个单细胞转录组主成分分析

Fig. 1 Principal component analysis of 52 single cell transcriptomes

每个点代表一个单细胞样品; 横、纵坐标轴的刻度是相对距离, 无实际意义; Dim1、Dim2、Dim3 后的百分比代表横、纵的差异可以解释全面分析结果的百分比。红色圈出部分分别为单细胞 D11_1、DW61_2、D12_1 和 DW99_2。

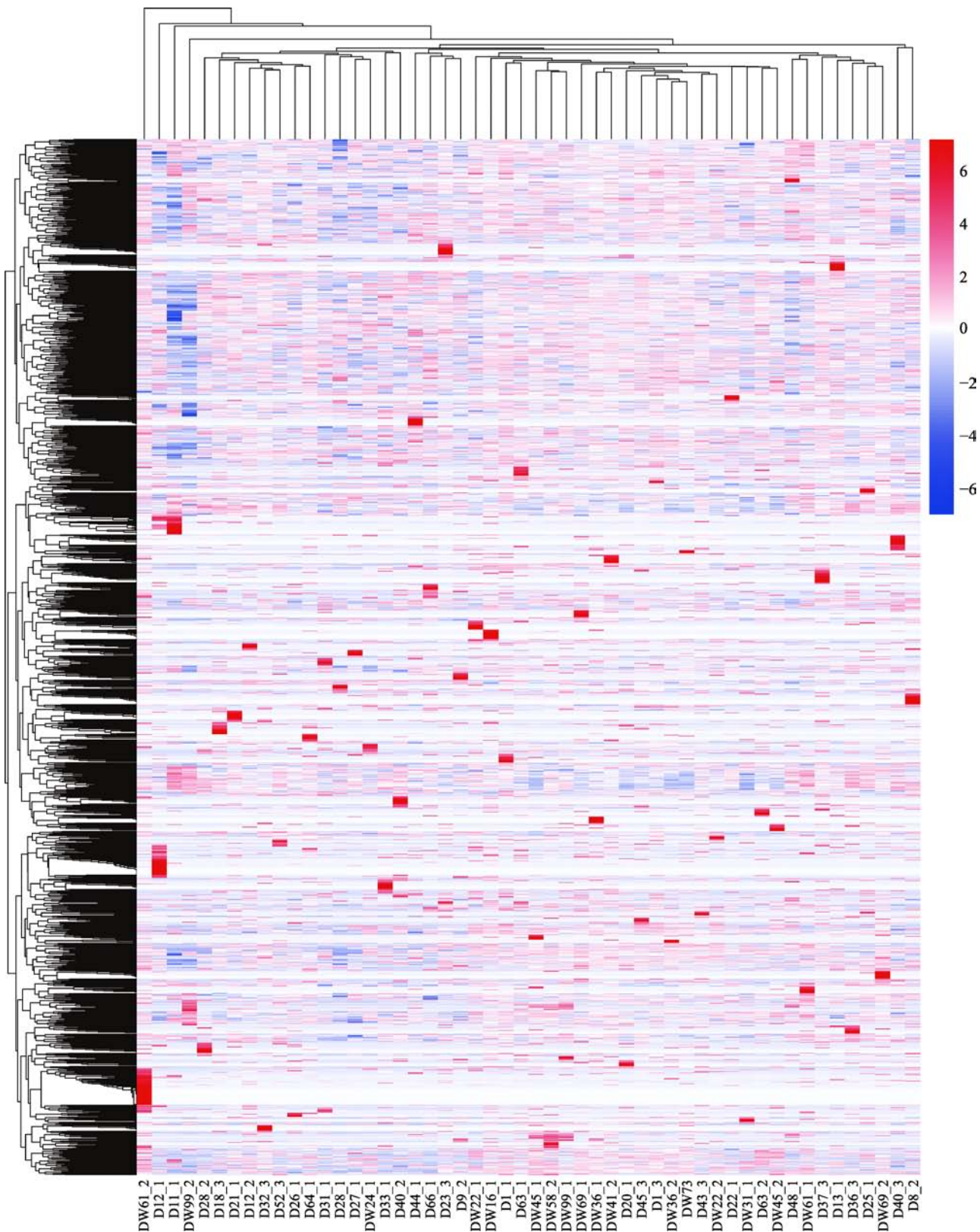


图 2 52 个单细胞基因表达量热图
Fig. 2 Heat map of 52 single cell transcriptomes
红色代表基因高表达, 蓝色代表基因低表达。

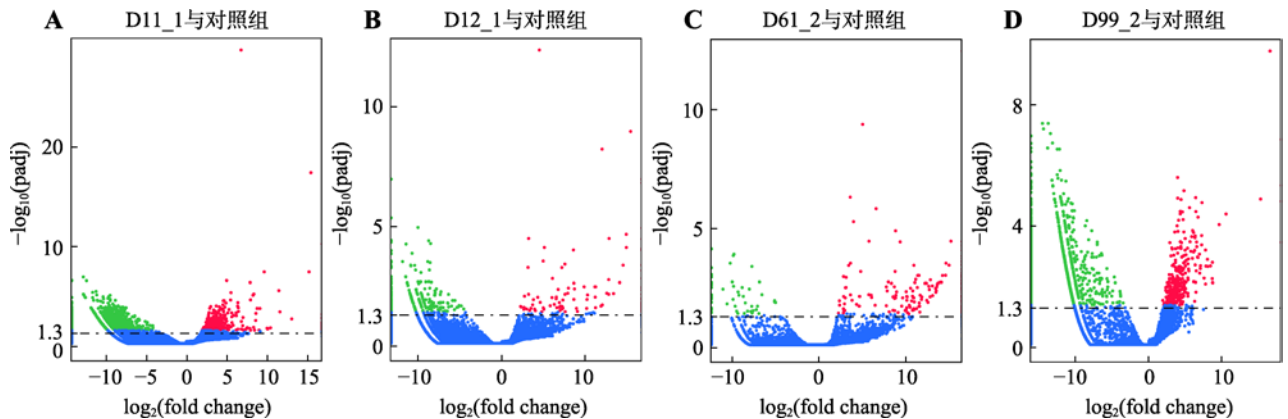


图 3 D11_1、D12_1、DW61_2 和 DW99_2 差异基因火山图

Fig. 3 D11_1, D12_1, DW61_2 and DW99_2 differential genes expression volcano map

A~D 分别为 D11_1、D12_1、DW61_2 和 DW99_2 的差异基因火山图；有显著性差异表达的基因用红色点(上调)和绿色点(下调)表示，无显著性差异表达的基因用蓝色点表示；横坐标代表基因在不同样本中表达倍数变化；纵坐标代表基因表达量变化差异的统计学显著性；筛选标准 $\text{padj} < 0.05$ 。

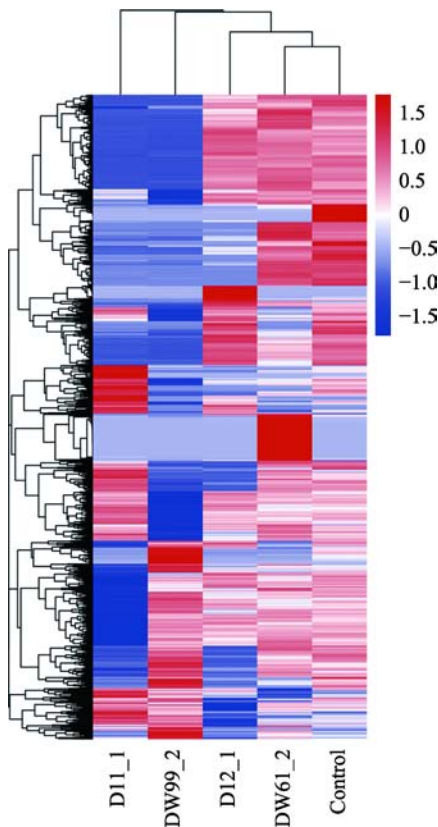


图 4 D11_1、D12_1、DW61_2 和 DW99_2 差异基因聚类热图

Fig. 4 D11_1, D12_1, DW61_2 and DW99_2 differential gene clustering heat map

整体 FPKM 层次聚类图，将 $\log_{10}(\text{FPKM}+1)$ 值进行归一化转换 (scale number) 并进行聚类，红色表示高表达基因，蓝色表示低表达基因。颜色从红到蓝，表示 $\log_{10}(\text{FPKM}+1)$ 从大到小。

异表达基因主要涉及与细胞代谢有关的蛋白代谢和物质运输生物过程。D12_1 上调的差异表达基因无显著富集，而下调的差异表达基因主要富集于细胞对刺激的反应与蛋白代谢的细胞过程与应对刺激信号传导的膜的变化。DW61_2 上调和下调的差异表达基因均无显著富集。DW99_2 上调的差异表达基因主要富集于细胞有丝分裂有关的 DNA 复制、染色体分离、核酸代谢等生物过程和与之相关的一些胞内有机物质的变化，而下调的差异表达基因则主要涉及蛋白代谢和蛋白修饰等一些高分子修饰过程。结果显示 D11_1 和 DW99_2 的差异基因功能富集趋势更为明显，基因表达模式也更为“另类”。

利用 KEGG 注释系统对 D11_1、D12_1、DW61_2 和 DW99_2 进行差异基因代谢通路富集分析。结果显示(图 6)，D11_1 上调的基因主要作用于细胞代谢，而下调的基因主要作用于细胞凋亡；D12_1 与 DW61_2 KEGG 均无显著通路富集；DW99_2 KEGG 通路中上调的差异基因最显著的富集于调节 DNA 复制、细胞周期通路。

3 讨论

单细胞转录组测序技术能够揭示单个细胞的基因表达动态，反映细胞间的异质性。在猪耳成纤维细胞异质性研究过程中，将单个细胞从耳组织块中

表 2 D11_1 前 50 个差异最显著的基因信息

Table 2 Profiles of the top 50 genes with the most significant differences in D11_1

基因	基因全称	表达情况
<i>TMEM198</i>	Transmembrane protein 198	↑
<i>ALDOB</i>	Aldolase, fructose-bisphosphate B	↑
<i>UMOD</i>	Uromodulin	↑
<i>ASS1</i>	Argininosuccinate synthase 1	↑
<i>SLC5A12</i>	Solute carrier family 5 member 12	↑
<i>SLC34A1</i>	<i>Sus scrofa</i> solute carrier family 34 member 1 (SLC34A1), mRNA	↑
<i>AGR2</i>	Anterior gradient protein 2 homolog precursor	↑
<i>U6</i>	U6 spliceosomal RNA	↑
<i>BHMT</i>	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1	↑
<i>DDC</i>	Dopa decarboxylase	↑
<i>DAO</i>	D-amino-acid oxidase	↑
<i>SLC13A3</i>	Solute carrier family 13 member 3	↑
<i>CDH16</i>	Cadherin 16	↑
<i>CYP2D25</i>	Vitamin D(3) 25-hydroxylase	↑
<i>PPARGC1B</i>	PPARG coactivator 1 beta	↑
<i>FBP1</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	↑
<i>G6PC</i>	Glucose-6-phosphatase	↑
<i>CLDN2</i>	Claudin-2	↑
<i>DMGDH</i>	Dimethylglycine dehydrogenase	↑
<i>FMO1</i>	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 1	↑
<i>UPP2</i>	Uridine phosphorylase 2	↑
<i>CYP4A24</i>	<i>Sus scrofa</i> cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 21 (CYP4A21), mRNA	↑
<i>HNF4A</i>	Hepatocyte nuclear factor 4-alpha	↑
<i>ADSL</i>	Adenylosuccinate lyase	↓
<i>IGFBP6</i>	Insulin-like growth factor-binding protein 6 precursor	↓
<i>ORMDL2</i>	ORMDL sphingolipid biosynthesis regulator 2	↓
<i>MRPS35</i>	Mitochondrial ribosomal protein S35	↓
<i>TM7SF3</i>	Transmembrane 7 superfamily member 3	↓
<i>DERA</i>	Deoxyribose-phosphate aldolase	↓
<i>LTBR</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 3 precursor	↓
<i>TULP3</i>	Tubby like protein 3	↓
<i>PPHLN1</i>	Periphrin 1	↓
<i>PUS7L</i>	Pseudouridylate synthase 7 like	↓
<i>SLC38A1</i>	Solute carrier family 38 member 1	↓
<i>NEDD1</i>	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1	↓
<i>SELENOO</i>	<i>Sus scrofa</i> selenoprotein O (SELENOO), mRNA	↓
<i>SLC35B3</i>	Solute carrier family 35 member B3	↓
<i>FAM8A1</i>	Family with sequence similarity 8 member A1	↓
<i>MBOAT1</i>	Membrane bound O-acyltransferase domain containing 1	↓
<i>novel gene</i>	Lysosomal thioesterase PPT2 precursor	↓
<i>MAN2A2</i>	Mannosidase alpha class 2A member 2	↓
<i>HMG20A</i>	High mobility group 20A	↓
<i>CSPG4</i>	Chondroitin sulfate proteoglycan 4	↓
<i>SRP54</i>	Signal recognition particle 54	↓
<i>FOS</i>	Proto-oncogene c-Fos	↓
<i>SPTLC2</i>	Serine palmitoyltransferase long chain base subunit 2	↓
<i>ATXN3</i>	Ataxin-3	↓

表 3 D12_1 前 50 个差异最显著的基因概况

Table 3 Profiles of the top 50 genes with the most significant differences in D12_1

基因	基因全称	表达情况
<i>PARVG</i>	Gamma-parvin	↑
<i>POU3F1</i>	POU class 3 homeobox 1	↑
<i>ASS1</i>	Argininosuccinate synthase 1	↑
<i>UMOD</i>	Uromodulin	↑
<i>PNMA2</i>	Paraneoplastic Ma antigen 2	↑
<i>ADGRG7</i>	Adhesion G protein-coupled receptor G7	↑
<i>KRT28</i>	Keratin 28	↑
<i>GSDMB</i>	Gasdermin B	↑
<i>U6</i>	U6 spliceosomal RNA	↑
<i>RNF223</i>	Ring finger protein 223	↑
<i>TBX10</i>	T-box 10	↑
<i>TMPRSS2</i>	Transmembrane protease, serine 12	↑
<i>HTR1E</i>	5-hydroxytryptamine receptor 1E	↑
<i>HIC2</i>	HIC ZBTB transcriptional repressor 2	↑
<i>SLC34A1</i>	<i>Sus scrofa</i> solute carrier family 34 member 1 (SLC34A1), mRNA.	↑
<i>ALDOB</i>	Aldolase, fructose-bisphosphate B	↑
<i>CSN1S1</i>	<i>Sus scrofa</i> casein alpha s1 (CSN1S1), mRNA.	↑
<i>SLC2A12</i>	Solute carrier family 2 member 12	↑
<i>CD53</i>	CD53 molecule	↑
<i>NAGA</i>	Alpha-N-acetylgalactosaminidase precursor	↓
<i>ADSL</i>	Adenylosuccinate lyase	↓
<i>C12orf4</i>	Homolog isoform 2	↓
<i>SLC35B3</i>	Solute carrier family 35 member B3	↓
<i>LEMD2</i>	LEM domain containing 2	↓
<i>GOLGA5</i>	Golgin A5	↓
<i>GSTA4</i>	Glutathione S-transferase A4	↓
<i>FAM98C</i>	Family with sequence similarity 98 member C	↓
<i>LDLRAP1</i>	Low density lipoprotein receptor adaptor protein 1	↓
<i>PLK3</i>	Polo like kinase 3	↓
<i>SMOC2</i>	SPARC related modular calcium binding 2	↓
<i>SPG21</i>	<i>Sus scrofa</i> spastic paraplegia 21 (autosomal recessive, Mast syndrome) (SPG21), mRNA	↓
<i>PCLAF</i>	<i>Sus scrofa</i> PCNA-associated factor (LOC100514810), mRNA	↓
<i>SERPIN2</i>	Serpin family B member 2	↓
<i>AEN</i>	Apoptosis enhancing nuclease	↓
<i>GCNT1</i>	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2	↓
<i>PPP6C</i>	Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit	↓
<i>PCSK6</i>	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	↓
<i>BOP1</i>	Block of proliferation 1	↓
<i>FAM49B</i>	Protein FAM49B	↓
<i>PLAT</i>	Tissue-type plasminogen activator precursor	↓
<i>SMOX</i>	Spermine oxidase	↓
<i>ASPN</i>	Asporin precursor	↓
<i>IL1R1</i>	Interleukin 1 receptor type 1	↓

表 4 DW61_2 前 50 个差异最显著的基因概况

Table 4 Profiles of the top 50 genes with the most significant differences in D61_2

基因	基因全称	表达情况
<i>NPPB</i>	Natriuretic peptides B Brain natriuretic peptide 32 Brain natriuretic peptide 26	↑
<i>GRIK2</i>	Glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 2	↑
<i>PAX1</i>	Paired box 1	↑
<i>DOK5</i>	Docking protein 5	↑
<i>ANKR2</i>	Ankyrin repeat domain 2	↑
<i>SLC114</i>	Solute carrier family 16 member 14	↑
<i>GPR37</i>	G protein-coupled receptor 37	↑
<i>TRPV2</i>	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 2	↑
<i>RHCE</i>	<i>Sus scrofa</i> Rh blood group CcEe antigens (RHCE), mRNA.	↑
<i>MFNG</i>	MFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	↑
<i>UBAPL</i>	Ubiquitin associated protein 1 like	↑
<i>ASPG</i>	Asparaginase	↑
<i>CRYBA1</i>	Crystallin beta A1	↑
<i>RECQL</i>	ATP-dependent DNA helicase Q1	↓
<i>RIMKLB</i>	Ribosomal modification protein rimK like family member B	↓
<i>C1R</i>	Complement C1r	↓
<i>WASHC4</i>	WASH complex subunit 4	↓
<i>GNPTAB</i>	N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase alpha and beta subunits	↓
<i>SELENOO</i>	<i>Sus scrofa</i> selenoprotein O (SELENOO), mRNA.	↓
<i>MAN2A2</i>	Mannosidase alpha class 2A member 2	↓
<i>STRA6</i>	Stimulated by retinoic acid 6	↓
<i>ISLR</i>	Immunoglobulin superfamily containing leucine rich repeat	↓
<i>HECTD1</i>	HECT domain E3 ubiquitin protein ligase 1	↓
<i>C14orf119</i>	Chromosome 14 open reading frame 119	↓
<i>NFAT5</i>	Nuclear factor of activated T-cells 5	↓
<i>E2F4</i>	E2F transcription factor 4	↓
<i>INPP5B</i>	Inositol polyphosphate-5-phosphatase B	↓
<i>SMOC2</i>	SPARC related modular calcium binding 2	↓
<i>MTHFD1L</i>	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1 like	↓
<i>LATS1</i>	Large tumor suppressor kinase 1	↓
<i>ME2</i>	Malic enzyme 2	↓
<i>TRIP4</i>	Thyroid hormone receptor interactor 4	↓
<i>LEO1</i>	LEO1 homolog, Paf1/RNA polymerase II complex component	↓
<i>VPS39</i>	VPS39, HOPS complex subunit	↓
<i>DPP8</i>	Dipeptidyl peptidase 8	↓
<i>HACD3</i>	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 3	↓
<i>PRPF39</i>	Pre-mRNA processing factor 39	↓

表 5 DW99_2 前 50 个差异最显著的基因概况

Table 5 Profiles of the top 50 genes with the most significant differences in D99_2

基因	基因全称	表达情况
<i>GBX2</i>	Gastrulation brain homeobox 2	↑
<i>PCDH12</i>	Protocadherin 12	↑
<i>ARHGEF9</i>	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor 9	↑
<i>TRAM1L1</i>	Translocation associated membrane protein 1-like 1	↑
<i>U6</i>	U6 spliceosomal RNA	↑
<i>DMTN</i>	Dematin actin binding protein	↑
<i>CEP72</i>	Centrosomal protein 72	↑
<i>YBX2</i>	Y-box binding protein 2	↑
<i>ZNF768</i>	Zinc finger protein 768	↑
<i>NOTCH4</i>	Neurogenic locus notch homolog protein 4 precursor	↑
<i>GARNL3</i>	GTPase activating Rap/RanGAP domain like 3	↑
<i>MTBP</i>	MDM2 binding protein	↑
<i>UHRF1</i>	Ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1	↑
<i>PACSIN2</i>	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2	↑
<i>EP300</i>	E1A binding protein p300	↓
<i>ADSL</i>	Adenylosuccinate lyase	↓
<i>PWP1</i>	PWP1 homolog, endonuclein	↓
<i>IGFBP6</i>	Insulin-like growth factor-binding protein 6 precursor	↓
<i>MMP19</i>	Matrix metalloproteinase 19	↓
<i>ESYT1</i>	Extended synaptotagmin 1	↓
<i>SMARCC2</i>	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin subfamily c member 2	↓
<i>PTGES3</i>	Prostaglandin E synthase 3	↓
<i>MON2</i>	MON2 homolog, regulator of endosome-to-Golgi trafficking	↓
<i>XPOT</i>	Exportin for tRNA	↓
<i>TMEM19</i>	Transmembrane protein 19	↓
<i>TBC1D15</i>	TBC1 domain family member 15	↓
<i>DNM1L</i>	Dynamin 1 like	↓
<i>FAR2</i>	Fatty acyl-CoA reductase 2	↓
<i>ARNTL2</i>	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like 2	↓
<i>TM7SF3</i>	Transmembrane 7 superfamily member 3	↓
<i>FGFR1OP2</i>	FGFR1 oncogene partner 2	↓
<i>AEBP2</i>	AE binding protein 2	↓
<i>LRP6</i>	LDL receptor related protein 6	↓
<i>C1R</i>	Complement C1r	↓
<i>NOP2</i>	Sus scrofa NOP2 nucleolar protein (NOP2), mRNA	↓

分离出来是单细胞转录组测序的第一个关键步骤。为准确获得成纤维细胞，排除其他类型细胞对细胞异质性结果的干扰，本研究最终采用显微操作法进行单细胞分离。该方法适用于样本数量少的单细胞

样品制备，能够在显微镜下观察成纤维细胞的形态，精准控制单个细胞的吸入与排出^[26]，确保 52 个单细胞样品均为成纤维细胞。

在生物界异质性通常被解释为 3 个层面：(1)不

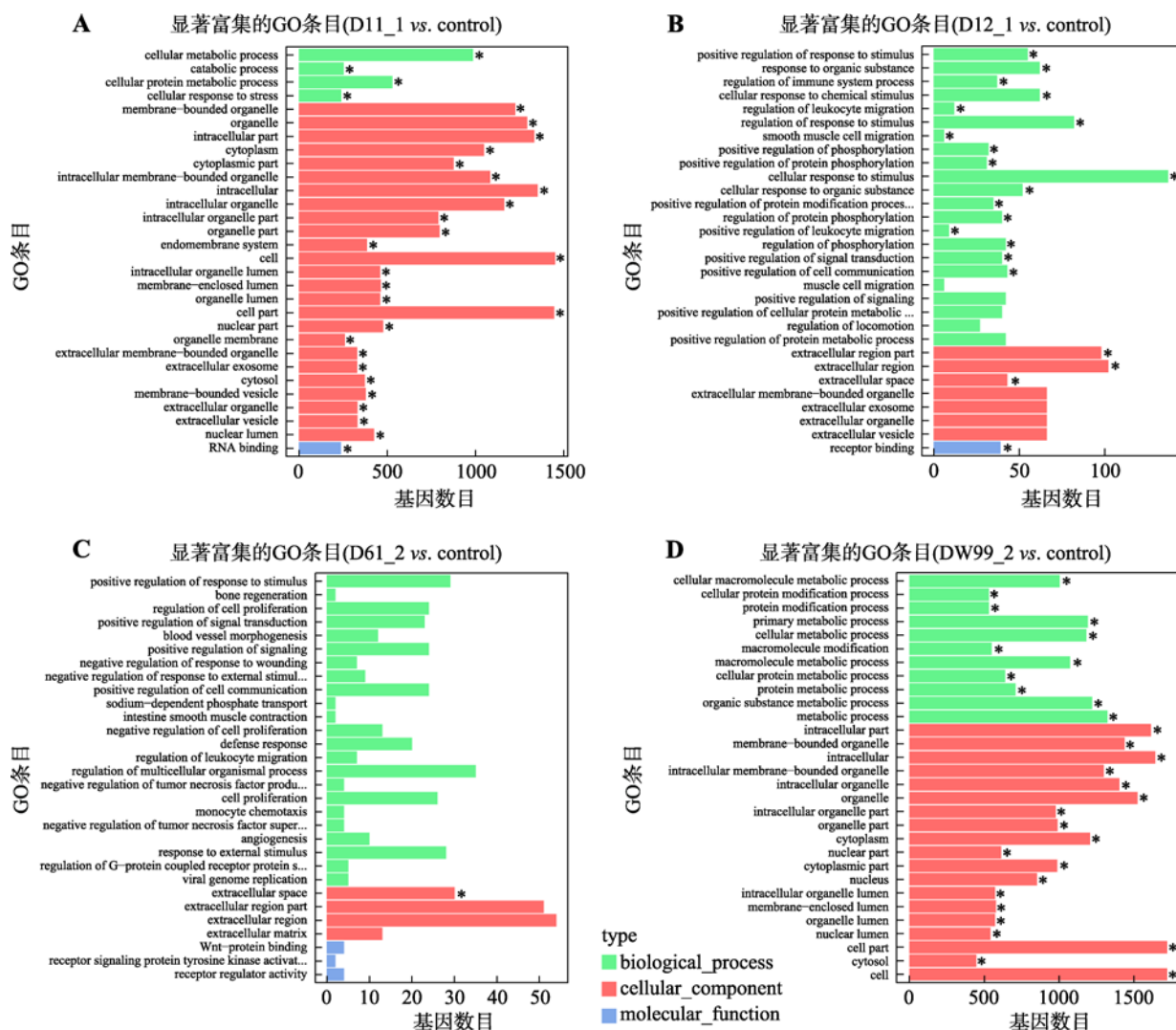


图 5 D11_1、D12_1、DW61_2 和 DW99_2 差异表达基因的 GO 富集分析图

Fig. 5 GO enrichment histogram of D11_1, D12_1, DW61_2 and DW99_2 differentially expressed genes

A~D 分别为 D11_1、D12_1、DW61_2 和 DW99_2 与对照组差异表达基因的 GO 富集柱状图。纵坐标为富集的 GO term, 横坐标为该 term 中差异基因个数。不同颜色用来区分生物过程、细胞组分和分子功能, 带“*”为显著富集的 GO term, 对富集最显著的 30 个 GO term 在图中展示, 如果不足 30 条, 则全部展示。

同物种或生物体之间具有异质性; (2)同一生物体的不同器官或组织具有异质性; (3)同一器官或组织中的不同细胞具有异质性。事实上, 早在 1957 年 Novick 等^[27]就提出了细胞异质性的概念, 最初是根据形态和功能上的差异将细胞群分化成不同的细胞亚群。单细胞测序技术的出现为细胞异质性的研究提供了全新的见解: 每一个细胞都是独特的个体, 被独一无二的 DNA、RNA 以及蛋白质所编码^[28]。在医学领域, 已有研究利用单细胞测序技术构建人类器官、组织的基因表达图谱^[29]。这为 SCNT 研究

提供一个可能: 应用单细胞测序技术描述供体细胞核和卵母细胞质相互作用的动态过程, 以更高的分辨率解析阻碍胚胎发育的分子原因。在体细胞核移植研究中, 由于供体细胞异质性的存在, 不同的供体核和卵母细胞质相互作用表现出不同应答模式, 包括不同的染色质重构和表观遗传修饰重编程^[15]。同样, 在诱导多能干细胞的研究中, 来自不同组织的供体细胞在重编程过程中表现出不同的敏感性^[30,31], 由不同供体细胞获得的多能干细胞拥有不同的转录模式^[32]。先前大多数研究讨论了不同类型的供体细

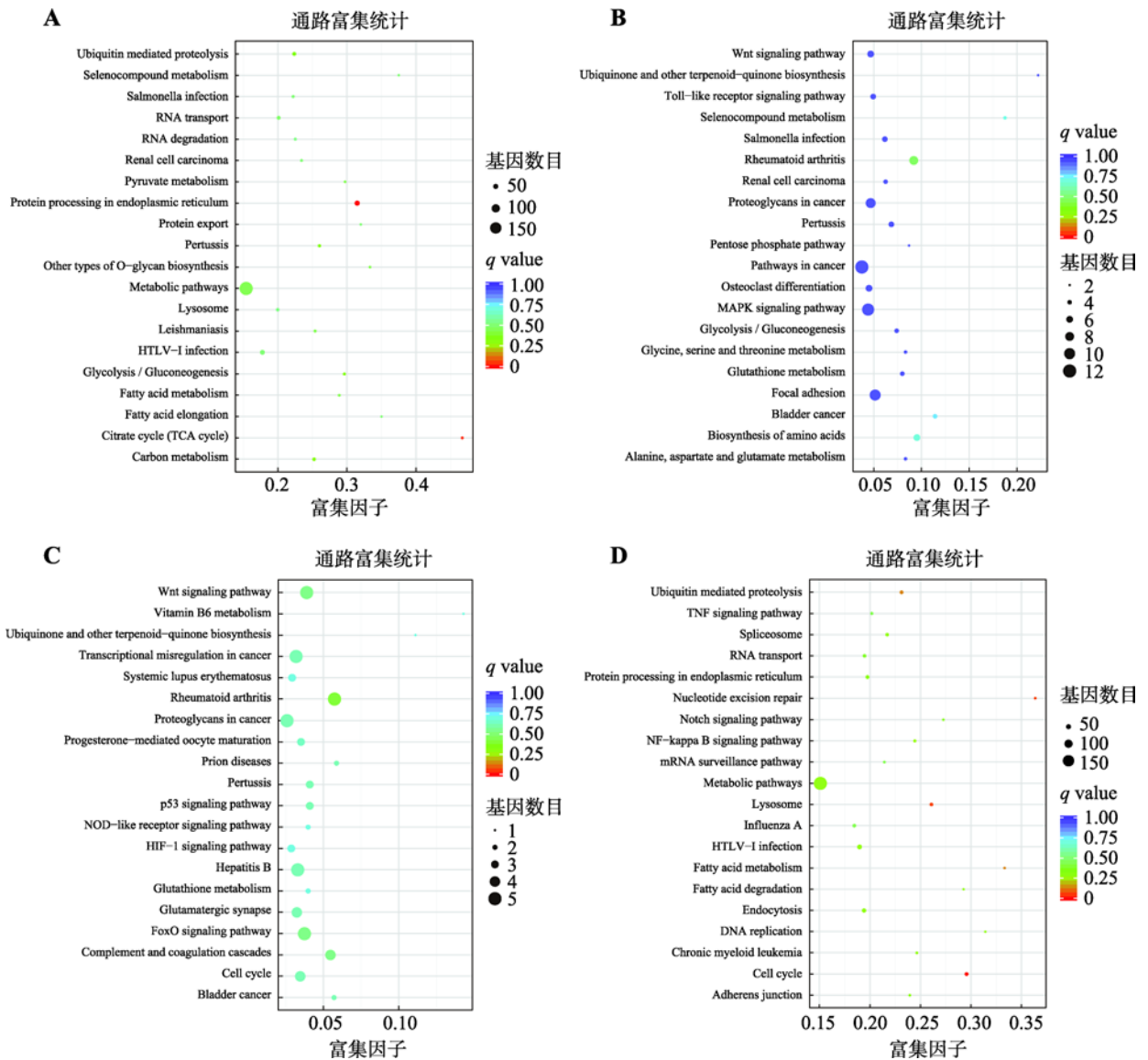


图 6 D11_1、D12_1、DW61_2 和 DW99_2 差异表达基因的 KEGG 富集散点图

Fig. 6 KEGG enrichment scatter plot of D11_1, D12_1, DW61_2 and DW99_2

A~D 分别代表 D11_1、D12_1、DW61_2 和 DW99_2 与对照组的差异表达基因 KEGG 富集散点图。纵轴表示 pathway 名称，横轴表示 Rich factor，点的大小表示此 pathway 中差异表达基因个数多少，而点的颜色对应于不同的 q value 范围。

胞对克隆胚胎发育效率的影响^[33,34]，而尚不清楚来源相同的供体细胞异质性对核移植效率的影响。在实际研究中，往往把来源相同的供体细胞看成同质的，导致细胞内关键分子事件大量丢失。

本研究将精度对准细胞水平，用单细胞转录组数据反映不同供体细胞的基因表达模式：52 个成功测序的猪耳成纤维细胞转录组热图反映同一组织供体细胞间的基因表达模式差异；通过对上述 52 个细胞进行主成分分析，发现 4 个基因表达模式明显不

同的“另类”细胞，证实了供体细胞间异质性的存在。同时，推测“另类”细胞的基因表达模式和精英供体细胞存在联系。D11_1 与“普通”细胞相比，其上调基因 GO 富集于与细胞代谢相关的细胞器、细胞膜，尤其是线粒体，主要功能为促进细胞代谢。其下调基因在 KEGG 分析中主要集中在细胞凋亡通路。在正常受精胚胎中，精子来源的 mtDNA 在受精不久后被全部破坏，其 mtRNA 全部来源于卵母细胞^[35]。但是在 SCNT 胚胎中却存在供体来源的

mtDNA^[36]。因此, 这些供体来源的线粒体 DNA 可能是影响克隆效率的关键线索。同时, D11_1 差异基因表达结果也暗示了通过研究线粒体相关基因寻找精英供体细胞的可能。在 D11_1 表达上调的差异基因中, *ASS1* 基因^[37,38]可以调节精氨酸合成, 而 L-精氨酸又是细胞信号传导、代谢功能分子(NO、多胺和肌酸)的主要合成前体^[39], 对胚胎发育十分重要。*UMOD* 基因的表达能加快蛋白质代谢和高尔基体转运, 增加胚胎发育能力^[40,41]。在 D11_1 表达下调的差异基因中, *ORM* 基因家族蛋白负向调节鞘脂代谢^[42], 其下调表达会促进细胞生长分化; *LTBR* 基因的表达可促进细胞凋亡^[43,44], 其下调表达起到抑制细胞凋亡的作用; *PPhLN1* 是一种介导表观遗传抑制修饰的多蛋白复合物^[45], 可以推动细胞重编程障碍 H3K9me3^[46]的表观抑制修饰, 其下调表达有利于克隆胚胎正确重编程。因此, D11_1 的基因表达模式可作为精英供体细胞的潜在参考。

DW61_2 和 D12_1 与“普通”细胞比较, GO 富集与 KEGG 富集均无显著趋势, 其差异表达基因的功能多为抑制蛋白活性和糖代谢、阻遏细胞生长。如 D12_1 中 *LEMD2* 基因^[47]的显著下调会抑制结合蛋白 mRNA 的转运, 进而抑制细胞分裂; *GOLGA5* 基因^[48]的下调会影响高尔基体内部囊泡介导物质运输, 抑制高尔基体和微管间的相互作用, 抑制细胞有丝分裂; 在 DW61_2 中表达下调的基因中, *PYROXD1* 基因^[49]编码二硫化物还原酶, 其下调会抑制细胞生长, 降低细胞活力; *SMOC2* 基因^[50,51]在胚胎发生和伤口愈合过程中高度表达。该基因产物是一种基质细胞蛋白, 能促进基质组装, 并能刺激内皮细胞的增殖和迁移, 以及血管生成活性, 其表达下调不利于胚胎发生和后续克隆动物的生长发育。因此, DW61_2、DW12_1 的基因表达模式呈现抑制细胞活力, 促进细胞凋亡的趋势, 同时根据已有研究证据无法将这两个“另类”细胞与精英供体细胞相关联, 其基因表达模式并不具备代表性。

DW99_2 与对照组相比, GO 富集上调的差异表达基因主要和 DNA 复制、染色体分离、核酸代谢等生物过程相关, KEGG 分析结果显示显著富集于 DNA 复制、细胞周期更迭等通路, 基因组处于活跃状态, 明显区别于其他供体细胞。在显著表达上调

基因中, *GBX2* 基因和胚胎干细胞转录调控网络相关, 其转录因子 P52951 可作为胚胎多能性因子^[52,53], 而多能性因子是影响克隆胚胎发育潜力的重要因素。*ARHGEF9* 基因是一种蛋白质编码基因, 其功能主要是调控外胚层分化, 在细胞重编程中发挥关键作用^[54,55]。*PACSIN12* 基因的相关途径中有网格蛋白介导的内吞作用, 值得注意的是, 在小鼠克隆胚 2 细胞期停滞胚胎单细胞转录组测序研究中, 也报道了与内吞作用相关的基因激活不足的现象^[56], 说明与内吞途径相关基因可能影响 SCNT 胚胎的发育效率。在体细胞重编程过程中, 大量基因能否被成功激活直接影响克隆胚胎的发育命运。同时, 已有研究表明供体细胞基因表达模式影响克隆效率^[57]。因此, 在供体细胞基因表达、核重编程、胚胎关键基因激活之间一定存在微妙的联系。DW99_2 活跃基因组状态, 可能有利细胞重编程, 但是需要在不同情况下进行区分: 先前关于 SCNT 胚胎重编程异常原因的报道主要集中于抑制性的表观遗传修饰^[58,59], 表现为协调胚胎发育所需基因失败, 部分基因表达受到抑制, 基因组不活跃。但是在克隆牛的研究中, 供体细胞基因组的异常激活状态会阻碍克隆胚胎发育^[18]。在克隆小鼠中, 供体细胞异常激活的基因却会在胚胎发育中被成功重编程^[60], 说明供体细胞的基因组状态不完全决定 SCNT 胚胎的发育命运, 不同物种之间是存在差异的, 需要进一步研究猪供体细胞基因组状态与克隆胚胎发育命运的联系。

目前, 关于供体细胞异质性及对核移植胚胎发育效率的影响还有很多问题亟待解决。就研究广泛性而言, 类似研究鲜有报道, 同时, 供体细胞异质性受物种、遗传变异、环境差异和物理刺激等多因素影响, 需要更全面的研究来阐述造成这种差异的分子机制以及对核移植胚胎发育的影响。就研究深度而言, 一方面需要有参考价值的精英供体细胞、克隆胚胎的遗传信息, 另一方面, 需要建立一种体系或技术, 辅助研究人员根据供体细胞的分子特征筛选潜在精英供体细胞, 并进行核移植实验来验证。在未来, 可利用猪克隆胚胎活检技术(在 2 细胞、4 细胞期对每个胚胎抽取一个卵裂球用于单细胞测序, 每个胚胎剩余的部分继续培养观察其能否发育至囊胚, 从而把抽取的卵裂球分成发育正常和异常两组

样本)结合单细胞测序技术确定发育正常及异常的克隆胚胎的基因表达模式,通过分析本研究所获得的 4 个“另类”供体细胞与发育正常的克隆胚胎的基因表达模式的关联,从 4 个“另类”细胞中筛选出潜在的精英供体细胞,根据该精英供体细胞的基因表达特征设计可识别该精英供体细胞的探针或抗体,然后通过流式细胞仪分选等技术在供体细胞中筛选和富集精英供体细胞进行核移植,验证利用该精英供体细胞制备的克隆胚胎的发育是否高于普通供体细胞。最近, Li 等^[56]利用单细胞测序技术,通过比较核移植 2 细胞期正常发育胚胎、停滞发育胚胎, 4 细胞期正常发育胚胎、停滞发育胚胎的转录组数据,找出影响小鼠克隆胚胎重编程的潜在通路和关键基因,为在细胞水平研究克隆胚胎异常发育的原因提供了参考。相信随着单细胞测序技术的不断成熟,该技术在克隆研究中的应用有望取得进一步突破:一方面,单细胞多组学联合分析的发展有助于建立“基因组-转录组-代谢组-表型”的系统研究网路;另一方面,更多种类、更多数量的供体细胞命运将通过单细胞测序技术被追踪,形成“供体细胞-2 细胞-4 细胞-8 细胞-囊胚-移植后胚胎”的完整研究体系,描绘供体细胞核和卵母细胞质相互作用的动态过程,综合分析影响克隆胚胎核移植效率的分子机制,进而提高克隆效率。

参考文献(References):

- [1] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385(6619): 810–813. [DOI]
- [2] Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, de León FAP, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 280(5367): 1256–1258. [DOI]
- [3] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, 289(5482): 1188–1190. [DOI]
- [4] Liu Z, Cai YJ, Wang Y, Nie YH, Zhang CC, Xu YT, Zhang XT, Lu Y, Wang ZY, Poo M, Sun Q. Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 2018, 172(4): 881–887. [DOI]
- [5] Beyhan Z, Iager AE, Cibelli JB. Interspecies nuclear transfer: implications for embryonic stem cell biology. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(5): 502–512. [DOI]
- [6] Niemann H, Lucas-Hahn A. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. *Reprod Domest Anim*, 2012, 47(Suppl. 5): 2–10. [DOI]
- [7] Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez N M, Tippner-Hedges R, Ma H, Kang E, Fulati A, Lee H S, Sritanadomchai H, Masterson K, Larson J, Eaton D, Sadler-Fredd K, Battaglia D, Lee D, Wu D, Jensen J, Patton P, Gokhale S, Stouffer RL, Wolf D, Mitalipov S. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 2013, 153(6): 1228–1238. [DOI]
- [8] Ao Z, Wu X, Zhou J, Gu T, Wang XW, Shi JS, Zhao CF, Cai GY, Zheng EQ, Liu DW, Wu ZF, Li ZC. Cloned pig fetuses exhibit fatty acid deficiency from impaired placental transport. *Mol Reprod Dev*, 2019, 86(11): 1569–1581. [DOI]
- [9] Liu Y, Li J, Løvendahl P, Schmidt M, Larsen K, Callesen H. In vitro manipulation techniques of porcine embryos: a meta-analysis related to transfers, pregnancies and piglets. *Reprod Fertil Dev*, 2015, 27(3): 429–439. [DOI]
- [10] Jang G, Park ES, Cho JK, Bhuiyan MM, Lee BC, Kang SK, Hwang WS. Preimplantational embryo development and incidence of blastomere apoptosis in bovine somatic cell nuclear transfer embryos reconstructed with long-term cultured donor cells. *Theriogenology*, 2004, 62(3–4): 512–521. [DOI]
- [11] Zhang DF, Liu D, Tang LL, Wang Y, Chen Y, Wang K, Wang GL, Schellander K, Cailu L. Effects of different donor cells on the development of nuclear-transferred porcine embryos. *Hereditas(Beijing)*, 2007, 29(2): 211–217. 张德福, 刘东, 汤琳琳, 王英, 陈茵, 王凯, 王根林, KARL Schellander, LIN Cailu. 不同供体细胞及其处理对猪核移植重构胚体外发育的影响. *遗传*, 2007, 29(2): 211–217. [DOI]
- [12] Ruan ZY, Zhao X, Li ZD, Qin XL, Shao QM, Ruan QY, Deng YF, Jiang JR, Huang B, Lu FH, Shi DS. Effect of sex differences in donor foetal fibroblast on the early development and DNA methylation status of buffalo (*Bubalus bubalis*) nuclear transfer embryos. *Reprod Domest Anim*, 2019, 54(1): 11–22. [DOI]
- [13] Rideout WR, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*, 2001, 293(5532): 1093–1098. [DOI]
- [14] Yang XQ, Wu ZF, Li ZC. Advances in epigenetic

- reprogramming of somatic cells nuclear transfer in mammals. *Hereditas(Beijing)*, 2019, 41(12): 1099–1109.
- 杨旭琼, 吴珍芳, 李紫聪. 哺乳动物体细胞核移植表观遗传重编程研究进展. *遗传*, 2019, 41(12): 1099–1109. [DOI]
- [15] Zhai YH, Li W, Zhang ZR, Cao YQ, Wang ZZ, Zhang S, Li ZY. Epigenetic states of donor cells significantly affect the development of somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos in pigs. *Mol Reprod Dev*, 2018, 85(1): 26–37. [DOI]
- [16] Yamanaka S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature*, 2009, 460(7251): 49–52. [DOI]
- [17] Inoue K, Ogonuki N, Mochida K, Yamamoto Y, Takano K, Kohda T, Ishino F, Ogura A. Effects of donor cell type and genotype on the efficiency of mouse somatic cell cloning. *Biol Reprod*, 2003, 69(4): 1394–1400. [DOI]
- [18] Zhou C, Zhang JC, Zhang M, Wang DB, Ma Y, Wang Y, Wang YZ, Huang YM, Zhang Y. Transcriptional memory inherited from donor cells is a developmental defect of bovine cloned embryos. *Faseb J*, 2020, 34(1): 1637–1651. [DOI]
- [19] Picelli S, Faridani OR, Björklund AK, Winberg G, Sagasser S, Sandberg R. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc*, 2014, 9(1): 171–181. [DOI]
- [20] Grubman A, Chew G, Ouyang JF, Sun GZ, Choo XY, Mclean C, Simmons RK, Buckberry S, Vargas-Landin DB, Poppe D, Pflueger J, Lister R, Rackham O, Petretto E, Polo JM. A single-cell atlas of entorhinal cortex from individuals with Alzheimer's disease reveals cell-type-specific gene expression regulation. *Nat Neurosci*, 2019, 22(12): 2087–2097. [DOI]
- [21] Tang FC, Barbacioru C, Wang YZ, Nordman E, Lee C, Xu NN, Wang XH, Bodeau J, Tuch BB, Siddiqui A, Lao K, Surani MA. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*, 2009, 6(5): 377–382. [DOI]
- [22] Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 357–360. [DOI]
- [23] Wang LK, Feng ZX, Wang X, Wang XW, Zhang XG. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 136–138. [DOI]
- [24] Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol*, 2010, 11(2): R14. [DOI]
- [25] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139–140. [DOI]
- [26] Navin N, Hicks J. Future medical applications of single-cell sequencing in cancer. *Genome Med*, 2011, 3(5): 31. [DOI]
- [27] Novick A, Weiner M. Enzyme induction as an all-or-none phenomenon. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1957, 43(7): 553–566. [DOI]
- [28] Coskun AF, Eser U, Islam S. Cellular identity at the single-cell level. *Mol Biosyst*, 2016, 12(10): 2965–2979. [DOI]
- [29] Menon M, Mohammadi S, Davila-Velderrain J, Goods BA, Cadwell TD, Xing Y, Stemmer-Rachamimov A, Shalek AK, Love JC, Kellis M, Hafler BP. Single-cell transcriptomic atlas of the human retina identifies cell types associated with age-related macular degeneration. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4902. [DOI]
- [30] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861–872. [DOI]
- [31] Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, Clark AT, Plath K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(8): 2883–2888. [DOI]
- [32] Polo JM, Liu S, Figueroa M E, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, Apostolou E, Stadtfeld M, Li YS, Shioda T, Natesan S, Wagers AJ, Melnick A, Evans T, Hochedlinger K. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(8): 848–855. [DOI]
- [33] Lai L, Tao T, Macháty Z, Kühholzer B, Sun QY, Park KW, Day BN, Prather RS. Feasibility of producing porcine nuclear transfer embryos by using G2/M-stage fetal fibroblasts as donors. *Biol Reprod*, 2001, 65(5): 1558–1564. [DOI]
- [34] Chesné P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(4): 366–369. [DOI]
- [35] Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, 1999, 402(6760): 371–372. [DOI]
- [36] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC. Pig cloning by

- microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, 289(5482): 1188–1190. [DOI]
- [37] Gupta S, Sahu D, Bomalaski JS, Frank I, Boorjian SA, Thapa P, Chevillat J C, Hansel DE. Argininosuccinate Synthetase-1 (ASS1) loss in high-grade neuroendocrine carcinomas of the urinary bladder: implications for targeted therapy with ADI-PEG 20. *Endocr Pathol*, 2018, 29(3): 236–241. [DOI]
- [38] Moren L, Perryman R, Crook T, Langer JK, O'Neill K, Syed N, Antti H. Metabolomic profiling identifies distinct phenotypes for ASS1 positive and negative GBM. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 167. [DOI]
- [39] Bang J, Lee E, Lee AR, Il Lee J, Choi SH, Seol D, Park C, Lee DR. The effect of cell penetrating peptide-conjugated coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CPP-CARM1) on the cloned mouse embryonic development. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16721. [DOI]
- [40] Abdel-Hady AE, Beige J, Kreutz R, Bolbrinker J. Effect of UMOD genotype on long-term graft survival after kidney transplantation in patients treated with cyclosporine-based therapy. *Pharmacogenomics J*, 2018, 18(2): 227–231. [DOI]
- [41] Bailie C, Kilner J, Maxwell AP, Mcknight AJ. Development of next generation sequencing panel for UMOD and association with kidney disease. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178321. [DOI]
- [42] Davis D, Kannan M, Wattenberg B. Orm/ORMDL proteins: Gate guardians and master regulators. *Adv Biol Regul*, 2018, 70: 3–18. [DOI]
- [43] Fava RA, Browning JL, Gatumu M, Skarstein K, Bolstad AI. LTBR-pathway in Sjogren's syndrome: CXCL13 levels and B-cell-enriched ectopic lymphoid aggregates in NOD mouse lacrimal glands are dependent on LTBR. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 691: 383–390. [DOI]
- [44] Zhu QQ, Li N, Li F, Sang J, Deng H, Han QY, Lv Y, Li CY, Liu ZW. Association of LTBR polymorphisms with chronic hepatitis B virus infection and hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Int Immunopharmacol*, 2017, 49: 126–131. [DOI]
- [45] Sia D, Losic B, Moeini A, Cabellos L, Hao K, Revill K, Bonal D, Miltiadous O, Zhang ZY, Hoshida Y, Cornella H, Castillo-Martin M, Pinyol R, Kasai Y, Roayaie S, Thung S N, Fuster J, Schwartz ME, Waxman S, Cordon-Cardo C, Schadt E, Mazzaferro V, Llovet JM. Massive parallel sequencing uncovers actionable FGFR2-PHFN1 fusion and ARAF mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun*, 2015, 6: 6087. [DOI]
- [46] Chung YG, Matoba S, Liu YT, Eum JH, Lu FL, Jiang W, Lee JE, Sepilian V, Cha KY, Lee DR, Zhang Y. Histone demethylase expression enhances human somatic cell nuclear transfer efficiency and promotes derivation of pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(6): 758–766. [DOI]
- [47] Boone PM, Yuan B, Gu S, Ma ZW, Gambin T, Gonzaga-Jauregui C, Jain M, Murdock TJ, White JJ, Jhangiani SN, Walker K, Wang QY, Muzny DM, Gibbs RA, Hejtmancik JF, Lupski JR, Posey JE, Lewis RA. Hutterite-type cataract maps to chromosome 6p21.32-p21.31, cosegregates with a homozygous mutation in LEMD2, and is associated with sudden cardiac death. *Mol Genet Genomic Med*, 2016, 4(1): 77–94. [DOI]
- [48] Mcgee LJ, Jiang AL, Lan Y. Golga5 is dispensable for mouse embryonic development and postnatal survival. *Genesis*, 2017, 55(7): 10.1002/dvg.23039. [DOI]
- [49] O'Grady GL, Best HA, Sztal TE, Schartner V, Sanjuan-Vazquez M, Donkervoort S, Abath NO, Sutton RB, Ilkovski B, Romero NB, Stojkovic T, Dastgir J, Waddell L B, Boland A, Hu Y, Williams C, Ruparel AA, Maisonneuve T, Peduto AJ, Reddel SW, Lek M, Tukiainen T, Cummings BB, Joshi H, Nectoux J, Brammah S, Deleuze JF, Ing VO, Ramm G, Ardicli D, Nowak KJ, Talim B, Topaloglu H, Laing NG, North K N, Macarthur DG, Friant S, Clarke NF, Bryson-Richardson RJ, Bönnemann CG, Laporte J, Cooper ST. Variants in the oxidoreductase PYROXD1 cause early-onset myopathy with internalized nuclei and myofibrillar disorganization. *Am J Hum Genet*, 2016, 99(5): 1086–1105. [DOI]
- [50] Al-Dabbagh N, Al-Shahrani H, Al-Dohayan N, Mustafa M, Arfin M, Al-Asmari AK. The SPARC-related modular calcium binding protein 2 (SMOC2) gene polymorphism in primary glaucoma: a case-control study. *Clin Ophthalmol*, 2017, 11: 549–555. [DOI]
- [51] Huang XQ, Zhou ZQ, Zhang XF, Chen CL, Tang Y, Zhu Q, Zhang JH, Xia JC. Overexpression of SMOC2 attenuates the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells and is associated with a positive postoperative prognosis in human hepatocellular carcinoma. *J Cancer*, 2017, 8(18): 3812–3827. [DOI]
- [52] Hagan N, Guarente J, Ellis D, Zervas M. The temporal contribution of the Gbx2 lineage to cerebellar neurons. *Front Neuroanat*, 2017, 11: 50. [DOI]
- [53] Mallika C, Guo QX, Li JYH. Gbx2 is essential for maintaining thalamic neuron identity and repressing habenular characters in the developing thalamus. *Dev Biol*,

- 2015, 407(1): 26–39. [\[DOI\]](#)
- [54] Alber M, Kalscheuer VM, Marco E, Sherr E, Lesca G, Till M, Gradek G, Wiesener A, Korenke C, Mercier S, Becker F, Yamamoto T, Scherer SW, Marshall CR, Walker S, Dutta UR, Dalal A B, Suckow V, Jamali P, Kahrizi K, Najmabadi H, Minassian BA. ARHGEF9 disease: Phenotype clarification and genotype-phenotype correlation. *Neurol Genet*, 2017, 3(3): e148. [\[DOI\]](#)
- [55] Klein KM, Pendziwiat M, Eilam A, Gilad R, Blatt I, Rosenow F, Kanaan M, Helbig I, Afawi Z. The phenotypic spectrum of ARHGEF9 includes intellectual disability, focal epilepsy and febrile seizures. *J Neurol*, 2017, 264(7): 1421–1425. [\[DOI\]](#)
- [56] Li HS, Song MM, Yang W, Cao P, Zheng L, Zuo YC. A Comparative analysis of single-cell transcriptome identifies reprogramming driver factors for efficiency improvement. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2020, 19: 1053–1064. [\[DOI\]](#)
- [57] Inoue K, Ogonuki N, Mochida K, Yamamoto Y, Takano K, Kohda T, Ishino F, Ogura A. Effects of donor cell type and genotype on the efficiency of mouse somatic cell cloning. *Biol Reprod*, 2003, 69(4): 1394–1400. [\[DOI\]](#)
- [58] Xie BT, Zhang H, Wei RY, Li QN, Weng XG, Kong QR, Liu ZH. Histone H3 lysine 27 trimethylation acts as an epigenetic barrier in porcine nuclear reprogramming. *Reproduction*, 2016, 151(1): 9–16. [\[DOI\]](#)
- [59] Matoba S, Liu YT, Lu FL, Iwabuchi KA, Shen L, Inoue A, Zhang Y. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell*, 2014, 159(4): 884–895. [\[DOI\]](#)
- [60] Liu Y, Wu FR, Zhang L, Wu XQ, Li DK, Xin J, Xie J, Kong F, Wang WY, Wu QQ, Zhang D, Wang R, Gao SR, Li WY. Transcriptional defects and reprogramming barriers in somatic cell nuclear reprogramming as revealed by single-embryo RNA sequencing. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 734. [\[DOI\]](#)

(责任编辑: 赵要风)