

哺乳动物印记基因的研究进展^{*}

张守全^{1,2 **} 冯定远¹ 田秀春² 杨向中²

(1 华南农业大学动物科学学院 广州 510642

2 Center for Regenerative Biology, University of Connecticut, Storrs, CT06269, USA)

摘要 哺乳动物印记基因是指只表达亲本一方的遗传信息,而另一方处于关闭状态的一类基因。约 80 % 的印记基因呈串出现在染色体上;在哺乳动物品种之间,印记基因具有较高的保守性;印记基因的复制通常表现为不同时性;一些印记基因具有印记遗传的时空性;少数印记基因只转录为 mRNA 而不翻译成蛋白质;印记基因的反意链通常表达,表达产生具有调节印记基因的作用。哺乳动物印记基因的调控序列的 DNA 甲基化、组蛋白乙酰酸化和组蛋白甲基化等引起其印记表达,其中 DNA 分子的甲基化是关键,它在生命周期中可被清除,也可被标记。印记基因之间的调控表达通常是相互作用的。克隆动物作为印记基因研究的实验动物模型,已获得许多有意义的研究结果。

关键词 哺乳动物 印记基因 印记机理

印记基因(imprinted genes)是一类基因,尽管具有父母双方来源的等位基因,但是后代只转录或表达来自一方(父方或母方)的遗传信息(monoallelic expression),而另一方处于关闭状态(silence)。只表达父方(paternal)、母方关闭的基因称为母方印记基因,如 IGF2 (insulin-like growth factor 2)^[1];只表达母方(maternal)、父方关闭的基因称为父方印记基因,如 H19^[2]。印记基因已成为“表观遗传”(epigenetic)理论的重要组成部分。

1 印记基因的发现

哺乳动物印记基因是在 20 世纪 80 年代对小鼠进行细胞核移植时发现的。McGrath 等(1984)进行细胞核移植实验,发现两原核分别来自父方和母方是必需的;如果两原核同时来自父方,或者同时来自母方,这种组合胚初始阶段可以发育,但是后期死亡,不能获得一个正常个体^[3]。这些早期胚胎发育的现象可能是由于印记基因引起的^[4]。1991 年三个实验室分别发现父方表达的印记基因 IGF2^[1]、母方表达的印记基因 IGF2R (insulin-like growth factor 2 receptor)^[5]和 H19^[2]。

印记基因的识别主要有几个方法:(1)随机发现。通常是由于基因敲除后,发现某一基因只表达父母中的一方;(2)根据基因的位置。例如靠近某个印记基因的基因或者在基因组某个区域表现为印记表达的基因;(3)利用两种自动扫描方法。即根据后代只表达来自父母一方基因、根据父母的基因组某一区域甲基化程度不同^[6]。哺乳动物印记基因研究工作主要集中在人和小鼠的印记基因,到目前为止,已有 51 个小鼠印记基因被发现^[7],超过 100 个基因预测为印记基因。所有这些基因被证明在人类也有类似的印记现象(www.mgu.har.mrc.ac.uk/imprinting)。印记基因主要存在于人类、真兽类哺乳动物(eutherian mammals)、有袋类动物(marsupials)^[8]和种子植物^[9];鸟类的印记基因的研究出现矛盾的现象,Koski 等(2000)发现鸡的 IGF2 在胚胎期表现印记,而 O'Neil 等(2000)报道 IGF2 在鸡的胚胎期应是双亲同时表达,鸡的 M6P/IGF2R 也没有出现印记现象^[10]。一般认为鱼类、爬行类和两栖类动物(尽管某些鲨鱼也有胎盘)不存在印记基因^[11]。

2 印记基因特点

2.1 印记基因呈串出现于基因组 DNA

印记基因有 80 % 是在基因组上呈串(cluster)

收稿日期:2003-07-02 修回日期:2003-10-14

^{*}美国农业部资助项目(2001-02402)

^{**}电子信箱:sqzhang@scau.edu.cn

存在于常染色体(例如位于人的染色体 1、5、6、7、11、12、13、14、15、18、19、20)和性染色体(染色体 X)上(<http://www.geneimprint.com>)(见图 1),例如小鼠的 7 号染色体、人的 11 号染色体上在 1.5mb 的 DNA 区域有 6 个印记基因被发现,位于一端的分别是母方表达的 $P57^{KIP2}$ 、 $KvLQT1$ 和 $Mash2$,中间是父方表达的 $Ins2$ 、 $IGF2$,另一端是母方表达的 $H19$ ^[12~14];另一个较集中的印记基因串位于人的 15 号染色体,这一区域至少有 3 个父方表达的印记基因,它们分别为 $SNRPN$ 、 IPW 和 $ZNF127$,由于该区域与 Prader-Willi 综合征和 Angelman 综合征有关,因此研究较多^[15];最大的印记基因串是 X 染色体自身,真兽类哺乳动物雌性要求一条 X 染色体失活,尽管失活的这条 X 染色体是随机来自父方或母方,但如果失活是母方可能导致胚胎死亡,因此 X 染色体的失活通常选择父方来源^[16]。 $Xist$ 基因

位于性染色体 X 上,其功能是控制其中的一条 X 染色体(父方来源)失活,它与 $H19$ 类似,只转录为 mRNA 而不翻译成蛋白质^[17]。这种印记基因的串出现反映出印记基因的协调控制,它们经常存在印记中心(imprinting centres, ICs)或者印记控制单元(imprinting control elements)^[17]。

2.2 印记基因 DNA 复制的不同时性

复制的不同时性首先从失活的 X 染色体被发现,在细胞周期中失活的 X 染色体复制慢于有活性的 X 染色体。Kitsberg 等(1993)在印记基因的复制中也发现类似的现象。在研究 Prader-Willi 综合征时发现父方染色体复制早于母方^[18],但是 LaSalle 等(1995)却发现与此不一致的结果。无论是在 Prader-Willi/Angelman 区域,或者是 $IGF2$ - $H19$ 区域,父方来源的 DNA 的减数分裂重组的比例显著高于母方的,而其它区域的则两者相当^[19]。实

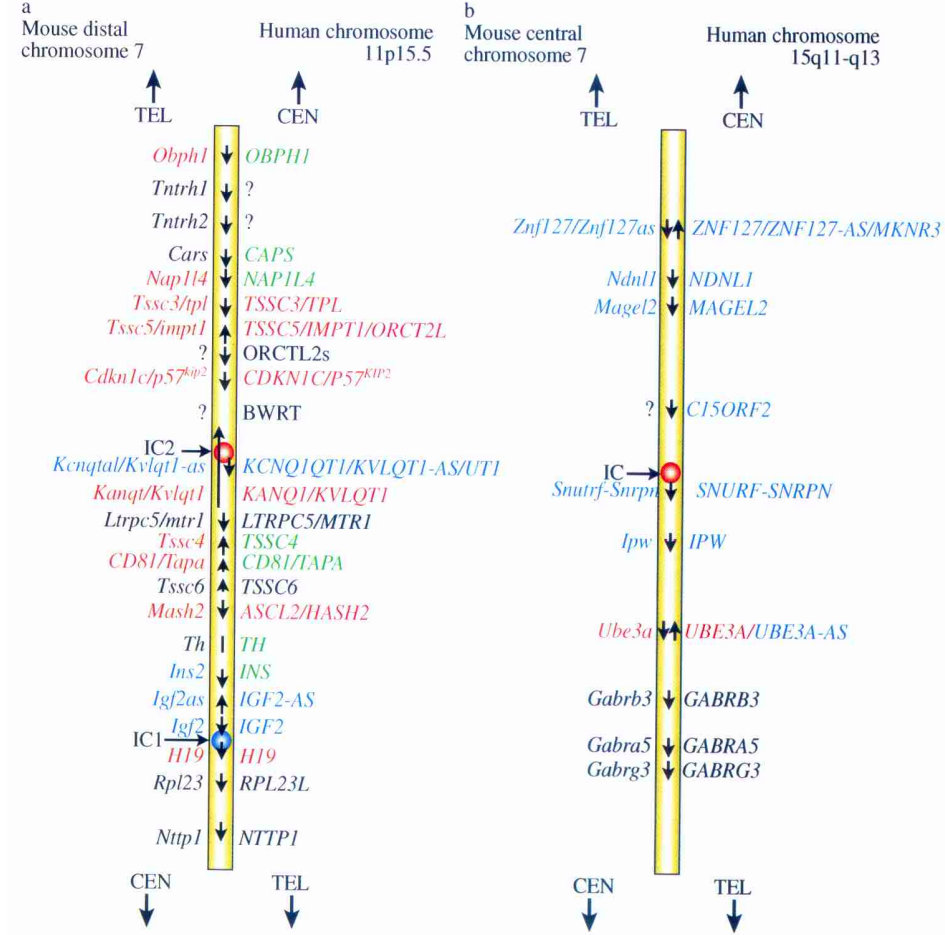


图 1 印记基因在人、小鼠基因组中的串状分布^[17]

(红色)表示母方表达印记基因、(蓝色)表示父方表达印记基因、(黑色)表示父母双方表达的基因、(绿色)表示尚未确定是否印记的基因; ? 表示人和小鼠的定向同源进化基因是否存在尚不清楚

际上,某一等位基因的特异性失活主要与 DNA 甲基化有关,而与复制推迟无关;在某一组织内特异性失活则与 DNA 的甲基化和 DNA 的复制推迟有关^[20]。

2.3 印记基因遗传印记的时空性

印记基因具有遗传印记的组织特异性,即这些基因可能在某些组织器官表现印记,而在另一些组织器官表现为表达父母双方。例如,IGF2 在多数组织器官表现为只表达父方的印记基因,而在脉络膜丛(choroid plexus)和柔脑脊膜(leptomeninges)表现为表达父母双方的基因^[21]。人的 K14QT1 基因在多数组织表现为遗传印记,而心脏则不是^[13]。

印记基因具有发育阶段性的遗传印记特异性,即这些基因在某一动物的一定的发育阶段是表现印记,而在另一个发育阶段则表现为表达父母双方的基因。例如,IGF2R、Mash2 在胚胎阶段表现为表达双亲的遗传信息,而之后则表现为母方表达的遗传印记特性^[12]。有些印记基因则在所有的阶段和所有的器官表现为遗传印记。例如人类、小鼠的 H19 和 SNRPN 即是,尽管有些器官可能有点“渗漏”(leakage)^[22]。

2.4 印记基因在真兽类哺乳动物的保守性

印记基因的研究工作主要集中在小鼠和人类,表现为动物品种之间明显的保守性。已发现的多数印记基因在人和小鼠两个品种之间是一致的,例如 H19、IGF2、P57^{KIP2} 和 SNRPN。而 U2afbp-rs 基因在小鼠表现为遗传印记,但在人类却不是^[23]。

2.5 印记基因少数不翻译成蛋白质

一些印记基因只稳定地转录为 RNA,而不翻译成蛋白质。H19 是最早被发现的这一类型的基因^[2]。控制父方来源的 X 染色体的失活的 Xist 基因,也是不翻译成蛋白质的印记基因^[17,24]。这两个基因有些共同点,如它们所编码的基因第一个和最后一个外显子都很长,这两个外显子中间有多个很短的外显子;两个基因在真兽哺乳动物具有很高的种间保守性;转录的 RNA 形成较复杂的 2 级结构,显示可能具有一定的生理功能^[25]。第三个不翻译成蛋白质的印记基因是 IPW,该基因是父方表达的印记基因,与 Prader-Willi 综合征有关^[15]。Wevrick 等(1997)发现 IPW 与 H19、Xist 基因不同,它在人和小鼠之间的保守性很低。

2.6 印记基因反意链的转录

相当数量(15%)的印记基因反意链(antisense)

可转录为 RNA,这些反意链的转录通常也为遗传印记,且为父方表达(Tsix 除外,它的反意链转录为 Xist)^[7,26]。多数反意链只转录为 RNA,而不翻译成蛋白质,它们可能具有调节功能^[27]。母方表达的印记基因 IGF2R 的反意链转录产物是 Air,Air 基因转录的起点在 IGF2R 的内含子^[28]。

3 印记基因的生理功能

科学家试图解释印记基因为何存在。有两种假说解释其存在的价值。一是认为印记基因的生理功能主要是调节动物两性之间的矛盾冲突^[29]。父方表达的印记基因,如 IGF2、PEG1/MEST(paternal expression gene 1/mesoderm specific transcript)等,如果缺失或基因敲除(knock-out),将表现为胎儿在子宫内生长受限(intrauterine growth restriction);母方表达的印记基因,如 IGF2R、H19 等,如果缺失或基因敲除,表现为 IGF2 表达过量,导致胎儿生长过大^[30]。由此可见,两性冲突的遗传假说(genetic conflict hypothesis)是,父方表达的印记基因,为了自己的这个后代健康成长和具备较强的生存能力,促进胎儿迅速生长、促进胎盘的发育并为胎儿提供更多的营养,以期获得强壮的个体;而母方表达的印记基因,为了自己的终生的繁殖能力,限制胎儿的生长速度和体重,节省和平均分配各胎次的繁殖资源^[29]。另一种理论认为调节胚胎发育所必需。雌核胚和孤雌胚发育后缺少胎盘组织,即胎盘的发育需要父方表达的印记基因表达;而雄核胚可发育成较好的滋养层细胞,但胚胎本身发育不良,即胎儿的发育要求母方表达的印记基因表达^[31]。在反刍动物的胚胎移植后,容易出现大胎症(large offspring

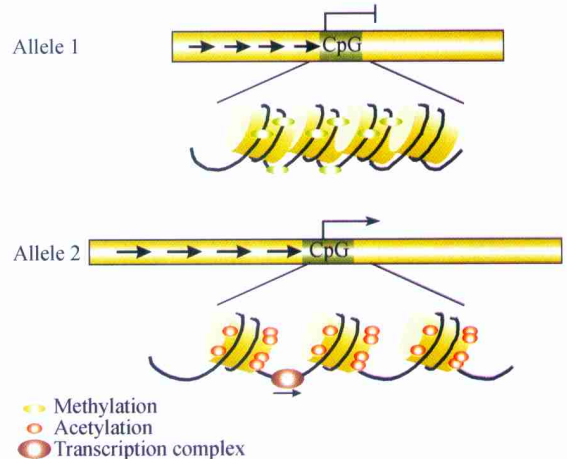


图 2 印记基因的特点^[7]

syndrome ,LOS) ,这与印记基因有密切关系^[32]。因此 ,遗传印记是平衡胎儿和胎盘发育的重要调节因素^[33]。但是 ,并不是所有的印记基因都参与了胚胎的发育。一些印记基因也与遗传疾病有关。如人的第 15 条染色体上一个区域有三个印记基因 ,分别为 SNRPN、IPW、ZNF127 ,它们都是只表达父方。这些基因与人类的 Prader-Willi、Beckwith-Wiedemann 和 Angelman 综合征有密切关系^[15,34]。

4 印记基因的印记机理

来自父母双方的基因组 DNA 若形成遗传印记 ,至少需要 3 个条件 : (1) 在雌雄配子阶段来自父母双方的基因组 DNA 应开始不同的修饰 ,因为这时来自父母双方的等位基因是分开的 ; (2) 在控制基因是否表达的基因组 DNA 的修饰应相对稳定 ,即经过受精后 ,这种印记的标记应在各组织器官被识别 ; (3) 在生命周期中 ,这种修饰应容易被清除和再标记^[35]。

4.1 印记基因的甲基化

印记基因的“印记”机理是呈印记一方的基因调控序列 DNA (一般为启动子) 被甲基化 (methylation)、组蛋白被乙酰基化 (histone acetylation) 和组蛋白被甲基化 ,其中 DNA 甲基化是其关键。研究过的印记基因 ,来源于父母双方的等位基因甲基化的程度不同 ,这一区域称为 DMRs (differentially methylated regions) ,该区域出现大量的

CG 重复序列 (大于 500bp) ,形成所谓的 CpG 岛 (CpG islands) ,通常为基因的启动子。超过 70 % 脊椎动物的 CpG 岛甲基化 ,但是在体细胞和性细胞之间甲基化程度不同是较为常见的。88 % 小鼠印记基因存在 CpG 岛 ,而普通基因只有 47 %^[7]。胞嘧啶 (cytosine) 被甲基化成为 5-甲基胞苷 (5-methylcytosine)。该等位基因将被关闭 ,不再表达。另一方等位基因的调控序列未被甲基化、其组蛋白乙酰基化 ,在转录复合体的作用下可正常地进行 mRNA 转录^[7] ,见图 2。

在哺乳动物生命周期中 ,在性原细胞 (精原细胞和卵原细胞) 阶段 ,DNA 分子的甲基化被清除。在配子 (精子和卵子) 阶段 ,DNA 甲基化重新开始

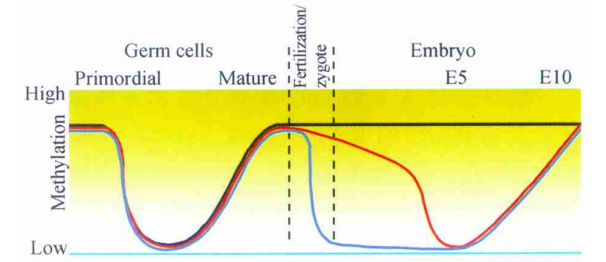


图 3 生殖细胞和胚胎的 DNA 甲基化模型^[35]

黑色曲线代表甲基化印记基因 ,灰色代表非甲基化印记基因 ,蓝色代表父方来源的非印记基因 ,红色代表母方来源的非印记基因 ;受精后 ,甲基化的印记基因和一些重复序列不进行去甲基化 (黑色曲线) ,非甲基化的印记基因不进行甲基化 (灰色曲线) ,E 为胚胎天龄

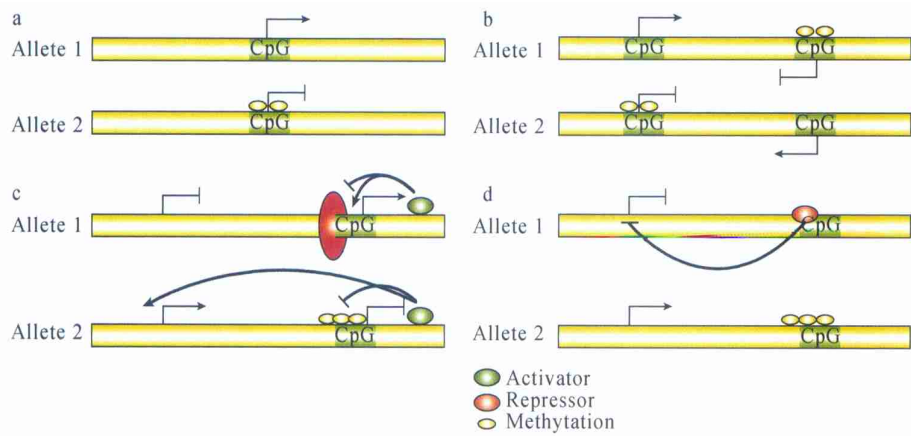


图 4 印记基因表达的机理^[7]

(1) CpG 岛或启动子区域甲基化 ,导致印记基因表达或关闭 ; (2) 在 CpG 岛或启动子联接区域甲基化 ,通过反意链的转录调控印记基因的表达 ; (3) 通过在 CpG 岛内的边界元件不同的甲基化 ,调节邻近特定等位基因的表达。某些因子如 CCCCTC 结合因子 (CTCF) (红色圆盘) 结合到没有甲基化的等位基因上 ,阻止进入上游的启动子途径 ,提高下游的增强子 (绿色) ,导致上游基因的转录抑制 ; (4) 不同的甲基化导致失活因子 (silencing factors) (红色 ,在这种情况下为甲基化敏感) 不同结合 ,从而抑制启动子

建立;对于非印记基因来说,随后出现去甲基化,在受精后的几小时,双亲的染色体尚处于分离状态,父方基因组 DNA 的去甲基化过程主要是主动的^[36]。而这个阶段的印记基因的甲基化却继续维持^[35]。由于染色体在复制过程中维持甲基化失败,母方去甲基化过程主要是被动的。重新甲基化是开始于囊胚的内细胞团(inner cell mass, ICM)^[37]。印记基因在受精时及之后,甲基化的等位基因将维持甲基化状态,非甲基化的等位基因也将维持非甲基化状态,遗传印记在囊胚期正式建立^[17]。胚胎期后遗传印记在身体的各组织器官充分表达,但是性原细胞中印记标记再被清除。这种以基因组 DNA 分子甲基化为形式的遗传印记标记是在动物的整个生命周期中可被清除(erasure)和再建立(reestablishment),见图 3^[35]。

基因组 DNA 上的 CpG 岛的甲基化主要由 2 类酶来完成的,它们分别为 Dnmt 1 (DNA methyltransferase 1) 和 Dnmt 3a、Dnmt 3b。Dnmt 1 功能是将复制后半甲基化的双链完全甲基化;Dnmt 3a、Dnmt 3b 则是将双链都没有甲基化的 DNA 链重新甲基化。Dnmt1 基因的突变将导致基因组甲基化的紊乱,进而引起胎儿发育的死亡。Dnmt1 基因过度表达,将引起基因组 DNA 超甲基化,印记丢失而导致胚胎死

(a) *Igf2-H19* locus

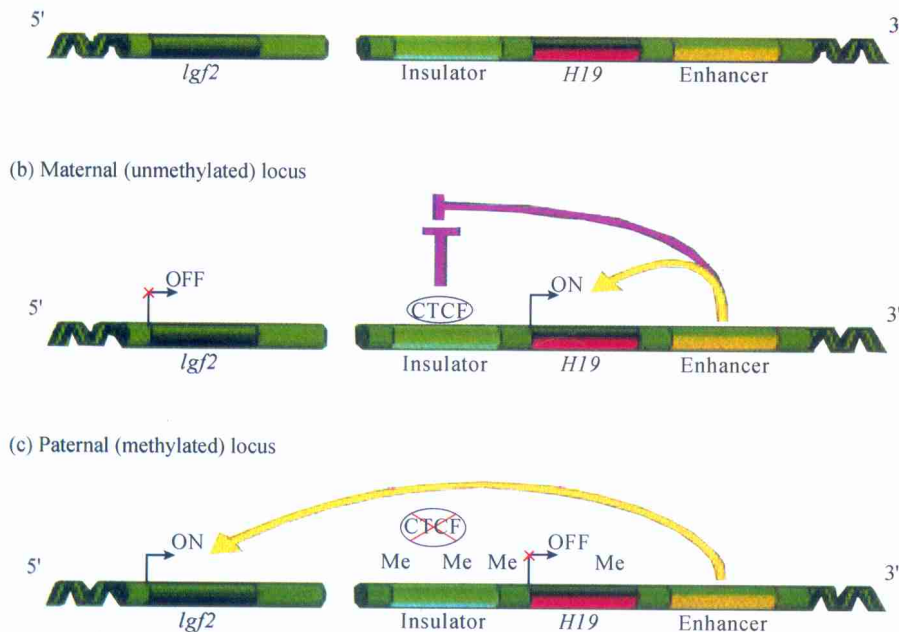


图 6 IGF2 和 H19 表达的调控^[37]

亡^[38]。以亚硫酸盐基因组测序的方法(bisulfite genomic sequencing)可以测定基因组 DNA 上被关闭一方的控制区域某一部分 CpG 岛被甲基化水平^[39]。

4.2 印记基因的表达机理

印记基因的印记表达可分为 6 种类型,见图 4^[7]。

4.3 印记基因表达的互动调节

由于印记基因多数呈串出现,它们的调节通常是相互的、表达是相互抑制的,典型的这类调控模式印记基因有两对,即 *Igf2r/Igf2ras*^[40] 和 *Igf2/H19*^[41],见图 5、图 6。

@ *Igf2r/Igf2ras*

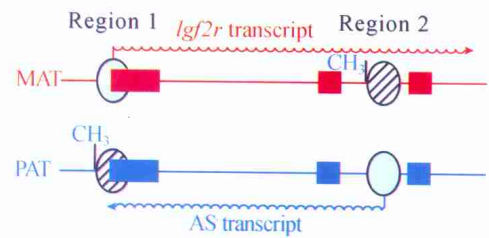


图 5 印记基因 *Igf2r/Igf2ras* 竞争表达的机理^[40]

Igf2r 外显子为实心的长方形,箭头表示转录的等位基因;Region 1、2 表示不同甲基化的区域,示以圆形阴影(-CH₃);当反意链(*Igf2ras*)转录时,有意链(*Igf2r*)将关闭,反之亦然

从图 6 可知,对于母方来源的 DNA,在 IGF2 和 H19 之间的 ICR 内的 CTCF 结合位点(绝缘子)没有被甲基化,CTCF 结合至该位点,增强子转录产物结合至 H19 启动子,并激活之,引起 H19 的表达,同时阻止增强子结合至 IGF2 启动子区域,导致 IGF2 处于关闭状态(silence);对于父方来源的 DNA,绝缘子区域和 H19 启动子区域皆被甲基化,CTCF 不能结合至该位点,H19 转录关闭,增强子结合至 IGF2 启动子区域,导致 IGF2 的表达^[37]。当父母双方来源的 DNA 分子 H19 上游的 CTCF 结合位点皆没有甲基化时,IGF2 和 H19 都会失去遗传印记(loss of imprinting, LOI)的特性^[42]。在 IGF2 上游区域存在一个 DMR,作为 IGF2 表达的抑制因子(repressor),协作调节 IGF2 的表达。但一些 IGF2 的表达与增强子没有关系^[43]。

5 印记基因在克隆动物中的表达

动物克隆是将高度分化的体细胞移入去核的卵母细胞构成组合胚,并发育成为一个个体。该过程中去分化和恢复全能性是关键,尽管多个动物品种的多数组织细胞作为供体核可获得克隆动物,但它们共同特点是成功的低效率、胚胎的高死亡率^[44]。克隆胚胎需完成供体核转录的失活、分化细胞记忆的失去、重构 1 细胞胚胎的激活和随后胚胎基因的适当表达等过程,这里的每一步都包括复杂的表观遗传(epigenetic)的改变。供体细胞核重编码首先表现在 DNA 的甲基化和组蛋白的修饰^[6]。

体细胞克隆时供体核不适当的表观遗传重编码,如 DNA 甲基化、染色质错误(chromatin errors),可能是导致体细胞克隆效率低的原因^[35]。在发育不良或死亡的 4~8 细胞阶段的克隆胚胎中,DNA 被动甲基化的缺失和过早的不适当的 DNA 重新甲基化的现象发生^[45]。在牛的 8~16 细胞克隆胚胎中,细胞核的甲基化类型具有较高的一致性(homogeneous),而普通对照却不一致(heterogeneous),这可能与供体核的 DNA 甲基化类型有关;普通囊胚内细胞团细胞核 DNA 甲基化程度高、滋养层细胞核 DNA 甲基化程度低,而克隆囊胚内细胞团和滋养层细胞核 DNA 甲基化程度均一,显示滋养层细胞核 DNA 异常地超甲基化,多数克隆胚胎存在表观遗传重编码异常。基因正常表达受到干扰也是导致克隆胚胎发育失败的原因^[46,47]。

克隆小鼠的胎盘 IGF2 和 H19 基因表达异常,多数克隆小鼠的胎盘出现 H19 不表达,而 IGF2 表达过

量,显示这两印记基因的互作^[48]。杨向中教授实验室发现出生后死亡的克隆牛的 X 染色体失活出现异常^[49];克隆牛的印记基因 IGF2R 在胎盘表达异常,即克隆牛胎盘的 IGF2R 随机表达父母双方,而正常对照只表达母方(nature genetics, in press),其原因在研究之中。

参考文献

- [1] DeChiara T M, Robertson E J, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, 1991, 64: 849 ~ 859
- [2] Bartolomei M S, Zemel S, Tilghman S M. Parental imprinting of mouse H19 gene. *Nature*, 1991, 351: 153 ~ 155
- [3] Barton S C, Surani M A H, Norris M L. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature*, 1984, 311: 374 ~ 376
- [4] Surani M A H, Barton S C, Norris M L. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, 1984, 308: 548 ~ 550
- [5] Barlow D P, Stoger R, Hermann B G, et al. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature*, 1991, 349: 84 ~ 87
- [6] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 2001, 293: 1089 ~ 1093
- [7] Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature Reviews (Genetics)*, 2001, 2: 21 ~ 32
- [8] Killian J K, Byrd J C, Jirtle J V, et al. M6P/IGF2R imprinting evolution in mammals. *Mol Cell*, 2000, 5: 707 ~ 716
- [9] Alleman M, Doctor J. Genomic imprinting in plants: observation and evolutionary implications. *Plant Mol Biol*, 2000, 43: 147 ~ 161
- [10] Nolan M C, Killian J K, Petitte J N, et al. Imprint status of M6P/IGF2R and IGF2 in chickens. *Dev Genes Evol*, 2001, 211: 179 ~ 183
- [11] Reik W, Snatos F, Dean W. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology*, 2003, 59: 21 ~ 32
- [12] Guillemot F, Caspary T, Tilghman S M, et al. Genomic imprinting of Mash2, a mouse gene required for trophoblast development. *Nat Genet*, 1995, 9: 235 ~ 241
- [13] Lee M P, Hu R, Johnson L A, et al. Human KILQTI gene shows tissue specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat Genet*, 1997, 15: 181 ~ 185
- [14] Zemel S, Bartolomei M S, Tilghman S M. Physical linkage of two mammalian imprinted genes. *Nature Genet*, 1992, 2: 61 ~ 65
- [15] Wevrick R, Kerns J A, Francke U. Identification of a novel paternally expressed gene in the Prader-Willi syndrome region. *Hum Mol Genet*, 1994, 3: 1877 ~ 1882
- [16] Takagi N, Sasaki M. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature*, 1975, 256: 640 ~ 642

- [17] Brockdorff N, Ashworth A, Kay G F, et al. Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome. *Nature*, 1991, 351: 329 ~ 331
- [18] Knoll J H, Cheng S D, Lalande M. Allele specificity of DNA replication timing in the Angelman/Prader-Willi syndrome imprinted chromosomal region. *Nat genet*, 1994, 6: 41 ~ 46
- [19] Paldi A, Gyapay G, Jami J. Imprinted chromosomal regions of the human genome display sex-specific meiotic recombination frequencies. *Curr Biol*, 1995, 5: 1030 ~ 1035
- [20] Drouin R, Boutouil M, Fetni R, et al. DNA replication asynchrony between the paternal and maternal alleles of imprinted genes does not straddle the R/G transition. *Chromosoma*, 1997, 106(6): 405 ~ 411
- [21] Ohlsson R, Hedborg F, Halmgren L, et al. Overlapping patterns of IGF2 and H19 expression during human development: biallelic IGF2 expression correlates with a lack of H19 expression. *Development*, 1994, 120: 361 ~ 368
- [22] Tremblay K D, Saam J R, Ingram R S, et al. A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse H19 gene. *Nat Genet*, 1995, 9: 407 ~ 413
- [23] Pearsall R S, Shibata H, Brozowska A, et al. Absence of imprinting in U2AFB1L, a human homologue of the imprinted mouse gene U2afbp-rs. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 222(1): 171 ~ 177
- [24] Brockdorff N, Ashworth A, Kay G F, et al. The product of the mouse Xist gene is a 15kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell*, 1992, 71: 515 ~ 526
- [25] Pfeifer K, Tilghman S M. Allelespecific gene expression in mammals: the curious case of the imprinted RNAs. *Genes Dev*, 1994, 8: 1867 ~ 1874
- [26] Lee J T. Disruption of imprinted X inactivation by parent-of-origin effects at Tsix. *Cell*, 2000, 103: 17 ~ 27
- [27] Neumann B, Kubicka P, Barlow D P. Characteristics of imprinted genes. *Nature Genet*, 1995, 9: 12 ~ 13
- [28] Lyle R, Watanabe D, Le te Vuchte D, et al. The imprinted antisense RNA at the igf2r locus overlaps but does not imprint Mas1. *Nature Genet*, 2000, 25: 19 ~ 21
- [29] Partidge L, Hurst L D. Sex and Conflict. *Science*, 1998, 281: 2003 ~ 2008
- [30] Constancia M, Hemberger M, Hughes J, et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*, 2002, 417: 945 ~ 948
- [31] Hagemann L J, Peterson A J, Weilert L L, et al. *In vitro* and early *in vivo* development of sheep gynogenones and putative androgenones. *Mbl Reprod Dev*, 1998, 50(2): 154 ~ 162
- [32] Lazzari G, Wrenzycki C, Hermann D, et al. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro* produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of Reproduction*, 2002, 67: 767 ~ 775
- [33] Barlow D P. Genetic imprinting in mammals. *Science*, 1995, 270: 1610 ~ 1613
- [34] Reed M L, Left S E. Maternal imprinting of human SNRPN, a gene deleted in Prader-Willi syndrome. *Nat Genet*, 1994, 6: 163 ~ 167
- [35] Dean W, Santos F, Reik W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2003, 14: 93 ~ 100
- [36] Mayer W, Niveleau A, Walter J, et al. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 2000, 403: 501 ~ 502
- [37] Wolffe A P. Imprinting insulation. *Current Biology*, 2000, 10: R463 ~ R465
- [38] Hbwell C Y, Bestor T H, Ding F, et al. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell*, 2001, 104: 829 ~ 838
- [39] Grunau C, Clark S J, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(13): e65(1 ~ 7)
- [40] Barlow D P. Competition: a common motif for the imprinting mechanism? *EMBO J*, 1997, 16: 6899 ~ 6905
- [41] Webber A L, Ingram R S, Levors J M, et al. Location of enhancers is essential for the imprinting of H19 and Igf2 genes. *Nature*, 1998, 391: 711 ~ 715
- [42] Ulaner G A, Vu T H, Li T, et al. Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site. *Human Molecular Genetics*, 2003, 12(5): 535 ~ 549
- [43] Onyango P, Jiang S, Uejima H, et al. Monoallelic expression and methylation of imprinted genes in human and mouse embryonic germ cell lineages. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 2002, 99: 10599 ~ 10604
- [44] Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 2000, 97: 990 ~ 995
- [45] Dean W, Santos F, Stojkovic M, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 13734 ~ 13738
- [46] Byrne J A, Simonsson S, Curdon J B. From intestine to muscle: nuclear reprogramming through defective cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 6059 ~ 6063
- [47] Inoue K, Kohda T, Lee J, et al. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science*, 2002, 295: 297
- [48] Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, et al. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*, 2001, 293: 95 ~ 97
- [49] Xue F, Tian X C, Du F, et al. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nature Genetics*, 2002, 31: 216 ~ 220

(下转第61页)

Talking about the Technology of Embryo In Vitro Production

Li Yong Dou Zhongying Yang Chunrong Ma Xiaofei

(Shaanxi Center of Stem Cell Research & Technology Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry Yangling Shaanxi 712100)

Abstract Technology of embryo *in vitro* production is the basis of the embryo technology ,which involved three areas including the oocytes *in vitro* maturation ,the capacitation and *in vitro* fertilization ,the embryo *in vitro* culture. This article reviewed the influence factors of the oocytes *in vitro* maturation ,the methods of the separation and capacitation ,the developing "blocks "phenomenon and culture system of the early embryo *in vitro* culture ,and at the same time visioned the development prospect of this technology.

Key words *In Vitro* maturation *In Vitro* fertilization Embryo culture

(上接第 54 页)

Progress on Imprinted Genes in Mammals

Zhang Shouquan^{1,2} Feng Dingyuan¹ Tian X Cindy² Yang Xiangzhong (Jerry)²

(1 College of Animal Science South China Agricultural University Guangzhou 510642)

(2 Center for Regenerative Biology University of Connecticut Storrs CT06269 ,USA)

Abstract Imprinted genes are only expressed from one parental allele in eutherian mammals (monoallelic expression). The common features of imprinted genes are ,clustering of multiple imprinted genes in one chromosomal region (around 80 %) ,conservation of imprinting among eutherian mammals ,asynchrony of DNA replication of imprinted genes ,temporal and spatial regulation of expression of imprinted genes ,coding for untranslated RNAs as well as proteins ,antisense transcripts may regulate expression of imprinted genes. Once established ,the imprinting pattern is stably transmitted through cell division but reset in germ cells of the fetal gonads. Therefore ,imprinting is not inherited across generations (epigenetics). DNA methylation and histone acetylation are important regulatory mechanisms of expression of the imprinted genes in mammals. Both mechanisms can be erased and reestablished in the life cycle. There are expression competitions in some imprinted genes. Somatic cloning by nuclear transfer bypasses the gonads and therefore is a good model to study imprinting regulations.

Key words Mammal Imprinted gene Mechanism of Imprinting