

Xist 敲降可以改善孤雄单倍体囊胚质量

陈墨^① 寇晓晨^② 何文腾^② 刘忠华^{①*}

① 东北农业大学动物医学学院 哈尔滨 150030; ② 同济大学生命科学与技术学院 上海 200092

摘要: 单倍体胚胎干细胞研究一直以来吸引着研究者的注意, 它可以用作基因修饰的工具或是用于药物筛选。随着孤雄胚胎干细胞系的成功建立, 更扩展了单倍体胚胎干细胞的应用前景。但单倍体孤雄胚胎发育率低, 胚胎质量差, 制约着孤雄单倍体胚胎干细胞的建系。为改善孤雄单倍体胚胎发育潜能及胚胎干细胞建系效率低的问题, 我们检测了小鼠 (*Mus musculus domesticus*) 孤雄单倍体胚胎的体外发育过程和该过程中 *Xist* 基因表达情况。结果发现, 孤雄单倍体胚胎囊胚发育率只有 10% ~ 14%, 发育至囊胚所需时间差异较大, 从 3.5 ~ 5.5 d 不等。通过核糖核酸荧光原位杂交实验 (RNA-FISH) 跟踪 *Xist* 基因表达情况, 发现其在发育至囊胚阶段的胚胎中呈抑制状态, 而在早期胚胎中多呈表达状态。通过 siRNA 扰低 *Xist* 表达, 虽然没有改变孤雄单倍体胚胎发育到囊胚的比例, 但显著提高了囊胚质量, 并提高了接种胚胎内细胞团 (ICM) 后建立细胞系的效率。结果说明, *Xist* 基因的表达可能是导致小鼠孤雄单倍体胚胎质量差、干细胞建系率低的原因之一。

关键词: 孤雄单倍体胚胎; *Xist* 基因; 囊胚发育

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2017) 05-835-07

Improving the Quality of Androgenetic Haploid Blastocyst by *Xist* Knockdown

CHEN Mo^① KOU Xiao-Chen^② HE Wen-Teng^② LIU Zhong-Hua^{①*}

① *College of Life Science, North-east Agricultural University, Harbin 150030;* ② *School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China*

Abstract: In mammals, haploidy is normally restricted to the post-meiotic stages of germ line cells and represents the end of cell proliferation, which means that physiological haploidy is incompatible with self-renewal. The successful establishment of androgenetic haploid embryonic stem cell broadened the practical prospect of haploid stem cells, which means, pluripotency, self-renewal, and haploidy can be incorporated together in a single cell line. These haploid ESCs contained only the paternal set of chromosomes and shown pluripotency as well as self-renewal capabilities. Haploid embryonic stem cell had drawn great interest of researchers because of its potential in genetic modification and drug screening.

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31325019);

* 通讯作者, E-mail: liuzhonghua@neau.edu.cn;

第一作者介绍 陈墨, 女, 硕士研究生; 研究方向: 胚胎干细胞; E-mail: chenmo-lab217@foxmail.com。

收稿日期: 2017-01-05, 修回日期: 2017-04-30 DOI: 10.13859/j.cjz.201705012

Continuous technological progress in mammalian genetics depended on the availability of mouse embryonic stem cells. Some reverse genetic approaches had taken advantage of the pluripotency of genetically engineered mouse haploid embryonic stem cell to produce animals with germline-transmitted mutations. To generate androgenetic haploid mouse embryos, we performed nuclear transfer (NT) technology, in which a single sperm head from C57/BL6 × DBA/2 F1 mice, instead of a somatic nucleus, was injected into an enucleated oocyte from C57/BL6 × DBA/2 F1 mice. The androgenetic haploid embryo underwent development from 1-cell stage to blastocyst stage (Fig. 1). Among the 206 haploid embryos that were reconstructed, 30 (14.5%) developed into blastocysts *in vitro*. After removal of the zona pellucida, blastocysts were cultured in a standard embryonic stem cell (ESC) culture system supplemented with 2i. As the result shown, the unsatisfied blastocyst rate and blastocyst quality is still an obstacle to the derivation of androgenetic haploid stem cells. To improve the quality of androgenetic haploid blastocyst and the efficiency of the androgenetic haploid stem cells derivation, we assessed the expression of *Xist* gene in the androgenetic haploid embryos during the preimplantation development of mice *in vitro*. The result showed that the blastocyst rate of androgenetic haploid embryo was 10% - 14% (Table 1), the time for the development to blastocyst stage varied from 3.5 day to 5.5 day. RNA-FISH results indicated that *Xist* gene was actively expressed in the early developmental stage, but was silenced in these embryos which developed to blastocyst stage (Fig. 2). *Xist* Knockdown by siRNA improved the quality of the blastocyst and the rate of outgrowth when seeded on the feeders, but did not improved the blastocyst rate. These results indicated that the expression of *Xist* gene is one of the factors for the unsatisfied quality of the androgenetic haploid blastocyst and the low efficiency of androgenetic haploid stem cell derivation.

Key words: Androgenetic haploid embryo; *Xist*; Blastocyst

在无脊椎动物中，例如蜜蜂，是自然存在着单倍体动物；在脊椎动物中，例如鱼和小鼠 (*Mus musculus domesticus*)，它们的单倍体细胞则是从实验室中人工获得的。在小鼠中，单倍体胚胎发育到囊胚阶段后，其发育潜能就迅速降低了，虽然它们可以着床，但其发育过程会被严重推迟 (Wutz 2014)。在哺乳动物中，单倍体胚胎干细胞的建立一方面具有“配子库”的功能，另一方面也增加了一种获得转基因动物的手段。

在早期研究中，Latham 等 (2000, 2002) 对单倍体胚胎和双倍体胚胎在胚胎发育过程中的基因表达情况进行了比较。在其实验中，发现含有 Y 染色体的孤雄单倍体胚胎无法发育到囊胚阶段，并且与孤雌单倍体胚胎发育相比，孤雄单倍体胚胎的发育潜能呈现严重不足的情况。在另一个实验当中，Okamoto 等 (2000)

对孤雄二倍体胚胎中 X 染色体的状态进行了探究，发现在包含两条 X 染色体的孤雄胚胎中，其中一条 X 染色体的失活，可以使胚胎发育到着床阶段，但其未能获得孤雄单倍体发育过程中 X 染色体变化情况的结果。

单倍体胚胎干细胞作为胚胎干细胞的一种，同样具有自我更新和分化为三胚层细胞的能力，其独特之处在于，它只含有一套染色体，对小鼠来说，即 20 条染色体，并且单倍体胚胎干细胞会在培养过程中自动双倍化，以恢复其二倍性。利用这一特点，可以通过基因编辑技术获得某一特定隐性性状基因的纯合子，另外也可以利用该细胞系开展启动子捕获或增强子捕获实验。然而，由于自动双倍化现象的存在，想要维持单倍体胚胎干细胞的单倍性，就需要定期利用流式细胞分选技术，对体外传代培养的细胞系进行纯化。

在 2011 年, Leeb 等成功建立了孤雌单倍体胚胎干细胞系, 在这一实验当中, 科研工作者们发现孤雌胚胎发育到囊胚的效率很高, 他们在建立孤雌胚胎干细胞系的过程中处理孤雌胚胎的方式是: 先利用蛋白酶消化掉最外层的透明带, 再消化掉滋养外胚层细胞, 最后只将内细胞团 (inner cell mass, ICM) 部分接种到铺有饲养层细胞 (feeder) 的培养板中。通过这种方式获得体外培养的初代细胞团 (outgrowth) 的效率接近 100%。2012 年, 中国科研工作者通过显微操作技术, 先后成功建立了孤雄单倍体胚胎干细胞, 并利用更为便捷的 CRISPR-Cas9 基因编辑技术获得了转基因动物 (Li et al. 2012, Yang et al. 2012)。但是, 与孤雌单倍体胚胎干细胞的建立相比, 建立孤雄单倍体胚胎干细胞的效率低很多。在此过程中, 孤雄胚胎能发育到囊胚的效率仅有 15% 左右, 接种孤雄囊胚获得初代细胞团的效率不超过 20%。这种低建系效率使孤雄单倍体胚胎干细胞的广泛应用受到了极大限制。为了改善小鼠孤雄单倍体胚胎的发育潜能, 解决孤雄胚胎干细胞建系效率低的问题, 我们跟踪了孤雄单倍体胚胎的体外发育过程, 检测了该过程中 *Xist* 基因的表达情况。最后利用 siRNA 技术干扰孤雌胚胎发育中 *Xist* 基因的表达, 观察是否能达到改善孤雌胚胎质量的目的。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验中使用到的实验动物 ICR、C57/BL6 和 DBA/2 3 个品系的小鼠均购买于北京维通利华公司和上海斯莱克公司。实验动物饲养于无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级小鼠房, 维持要求的室温、湿度以及光周期。

对 8 ~ 10 周龄 C57/BL6 × DBA/2 杂交 F1 代 (BDF1) 雌性小鼠采用腹腔注射孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) 和人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 进行超数排卵,

注射 hCG 促排卵 14 h 后取卵。利用透明质酸酶去掉卵丘细胞后, 于 CZB (Chatot C. Z., Ziomek C. A and Bavister B. D.) 培养液中培养。从附睾尾处取雄性小鼠精液, 于缓冲-CZB (Hepes-Chatot C. Z., Ziomek C. A and Bavister B. D., HCZB) 培养液中获能 30 ~ 40 min 后, 即可取精子。利用显微操作方法, 将 1 枚精子头注入去核的第二次减数分裂中期 (MII) 卵母细胞中, 于 37°C 5% CO₂ 培养箱中, 奎因优化卵裂培养液 (Quinn's advantage cleavage medium, Q1) 中将孤雄单倍体胚胎培养至囊胚阶段。

1.2 RNA 荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 实验

首先将体外培养至 2-细胞、4-细胞和 8-细胞阶段的胚胎的透明带去除, 之后立即移入含牛血清白蛋白 (albumin from bovine serum, BSA) 的磷酸缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 滴中, 待细胞间连接变弱后用口吸管适度吹吸至卵裂球分离出单卵裂球, 进行全基因组扩增, 鉴定 *sry* 基因。同时将同一枚胚胎剩余部分及桑葚期和囊胚期胚胎移至盖玻片上, 吸走多余 BSA-PBS, 室温风干后固定及透膜。利用 QuantiGene ViewRNA ISH Cell Assay 试剂盒进行 RNA 荧光原位杂交 (RNA-FISH) 实验, 结果用 Nikon A1 荧光共聚焦显微镜进行层扫拍照。

1.3 *Xist*-siRNA 干扰实验

在完成孤雄单倍体胚胎构建 6 ~ 7 h 后, 观察到雄原核的形成, 并于该时期注入 5 μmol/L *Xist*-siRNA (序列为 "AUAACAGUAAGUCUG AUAGAGGACA"), 于 37°C 5% CO₂ 培养箱中, 在 Q1 培养液中将孤雄单倍体胚胎培养至囊胚阶段。每组实验均设无操作对照组。

2 结果

2.1 孤雄单倍体胚胎发育过程

将构建的孤雄单倍体胚胎体外培养至囊胚 (图 1a ~ f), 囊胚率为 10% ~ 14%, 大部分胚

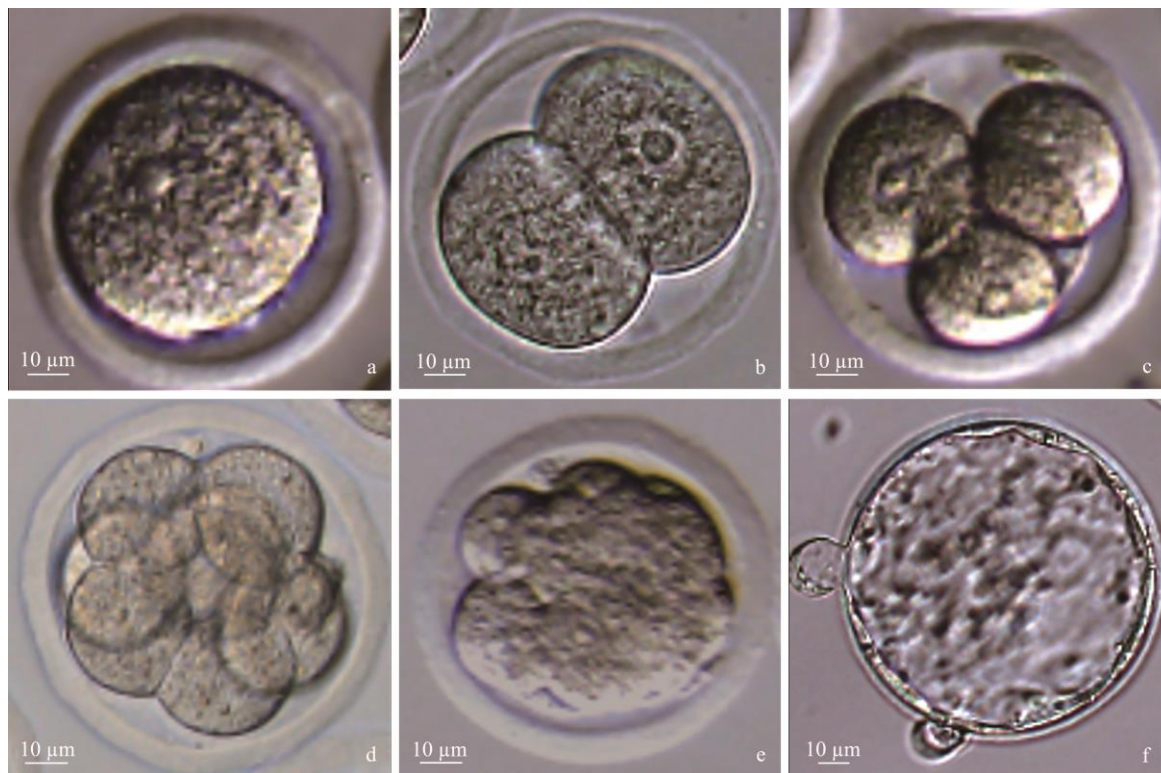


图 1 孤雄单倍体胚胎发育状况

Fig. 1 Development of androgenetic haploid embryo

a. 1-细胞期胚胎; b. 2-细胞期胚胎; c. 4-细胞期胚胎; d. 8-细胞期胚胎; e. 桑葚期胚胎; f. 囊胚期胚胎。

a. 1-cell stage embryo; b. 2-cell stage embryo; c. 4-cell stage embryo; d. 8-cell stage embryo; e. Morula embryo; f. Blastocyst.

胎停滞在桑葚胚阶段。对于发育到囊胚阶段的胚胎来说,囊胚细胞数少于对照组,囊胚腔也小于对照组。在发育时程上,孤雄单倍体胚胎发育到囊胚的时间从 3.5 ~ 5.5 d 不等,而对照二倍体胚胎在 3.5 d 全部发育至囊胚阶段。与利用氯化铯激活法获得的孤雌单倍体胚胎相比较,孤雄单倍体胚胎发育获得的囊胚明显小于孤雌单倍体胚胎发育获得的囊胚,细胞数量也较少。

2.2 孤雄单倍体胚胎发育过程中 *Xist* 基因表达情况

采用 RNA-FISH 法跟踪了单倍体孤雄胚胎中的 *Xist* 表达情况。2-细胞阶段,在全部被测的 13 个胚胎中,都没有观察到 *Xist* 信号的表达,我们将这种没有任何一个卵裂球表达 *Xist* 的胚胎称为“*Xist* 阴性胚胎”(图 2 a1 ~ a3)。4-细

胞阶段,在被测的 12 个胚胎中,有 8 个胚胎为 *Xist* 阴性胚胎(图 2 b1 ~ b3),而另外 4 个胚胎的部分卵裂球中观察到 *Xist* 表达,呈现斑点状形态,我们将这种部分卵裂球表达 *Xist* 的胚胎称为“*Xist* 嵌合表达胚胎”(图 2 c1 ~ c3)。8-细胞阶段,在被测的 12 个胚胎中,有 2 个 *Xist* 阴性胚胎(图 2 d1 ~ d3),5 个 *Xist* 嵌合表达胚胎(图 2 e1 ~ e3);余下 5 个胚胎的所有卵裂球中都有 *Xist* 表达,我们称这种胚胎为“*Xist* 阳性胚胎”(图 2 f1 ~ f3)。

在孤雄单倍体胚胎发育过程中,观察到胚胎致密化过程比普通二倍体胚胎提前发生的情况,在 8-细胞晚期,可以观察到少数开始致密化的胚胎。在这一阶段中 *Xist* 的形态呈现为比斑点面积更大的云状,位置总是紧贴在核膜内侧边缘,从 4-细胞阶段到 8-细胞阶段 *Xist* 信号

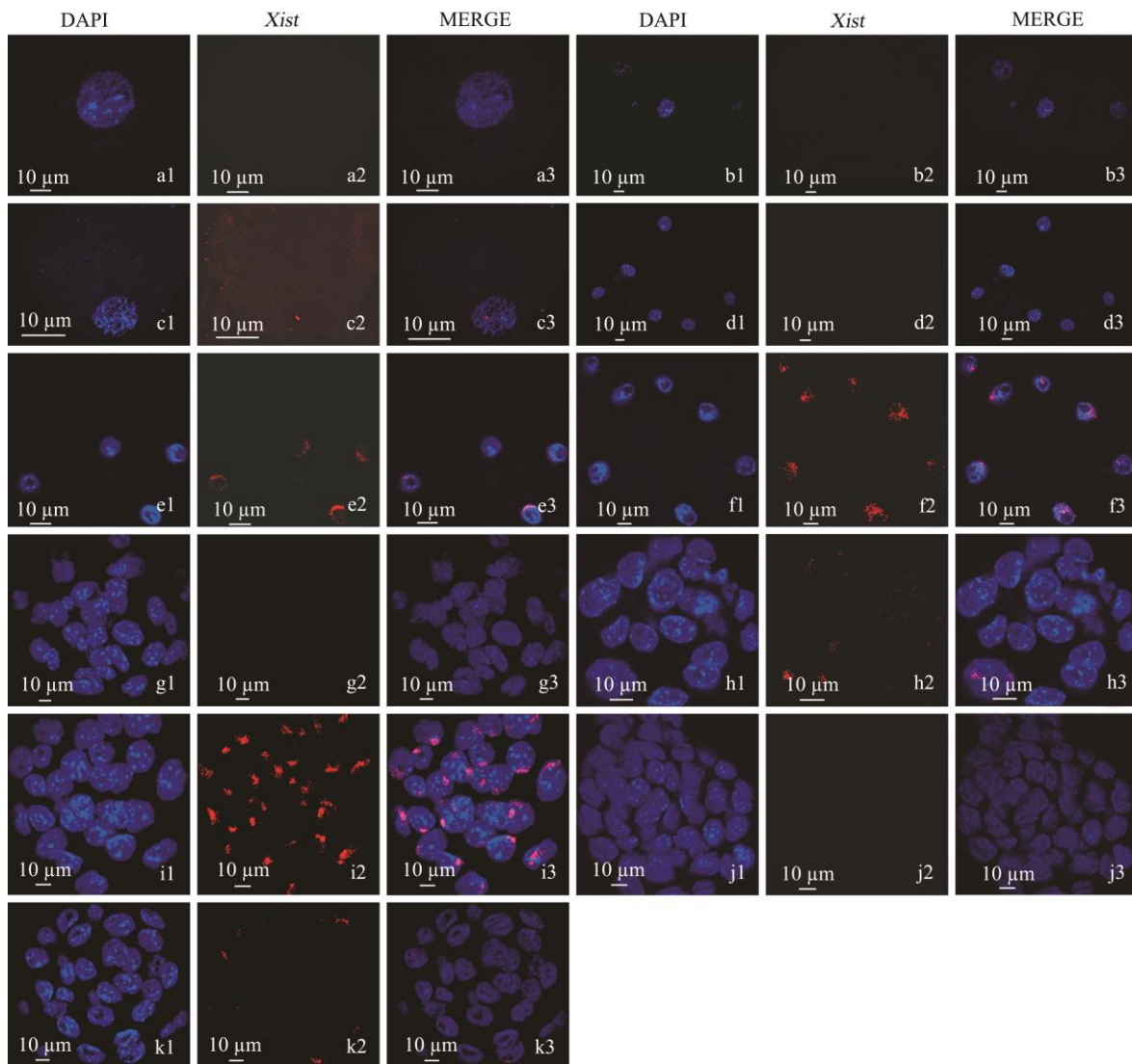


图 2 *Xist* 在孤雄单倍体胚胎发育过程中的表达情况

Fig. 2 *Xist* expression in androgenetic haploid embryos

a1 ~ a3. 2 细胞时期 *Xist* 阴性胚胎; b1 ~ b3. 4 细胞时期 *Xist* 阴性胚胎; c1 ~ c3. 4 细胞时期 *Xist* 嵌合表达胚胎; d1 ~ d3. 8 细胞时期 *Xist* 阴性胚胎; e1 ~ e3. 8 细胞时期 *Xist* 嵌合表达胚胎; f1 ~ f3. 8 细胞时期 *Xist* 阳性胚胎; g1 ~ g3. 桑葚期 *Xist* 阴性胚胎; h1 ~ h3. 桑葚期 *Xist* 嵌合表达胚胎; i1 ~ i3. 桑葚期 *Xist* 阳性胚胎; j1 ~ j3. 囊胚期 *Xist* 阴性胚胎; k1 ~ k3. 囊胚期 *Xist* 嵌合表达胚胎。

a1 - a3. 2-cell stage *Xist* negative embryo; b1 - b3. 4-cell stage *Xist* negative embryo; c1 - c3. 4-cell stage *Xist* mosaic embryo; d1 - d3. 8-cell stage *Xist* negative embryo; e1 - e3. 8-cell stage *Xist* mosaic embryo; f1 - f3. 8-cell stage *Xist* positive embryo; g1 - g3. Morula stage *Xist* negative embryo; h1 - h3. Morula stage *Xist* mosaic embryo; i1 - i3. Morula stage *Xist* positive embryo; j1 - j3. Blastocyst stage *Xist* negative embryo; k1 - k3. Blastocyst stage *Xist* mosaic embryo.

形态发生变化, 表明 *Xist* 在这个阶段开始扩展其分布区域。在 *Xist* 嵌合表达胚胎中, 可以观察到 *Xist* 阳性的细胞数量成大比例嵌合, 有着

向 *Xist* 阳性胚胎发展的趋势。

在桑葚胚阶段, 12 个被测胚胎中, 有 2 个 *Xist* 阴性胚胎 (图 2 g1 ~ g3), 7 个 *Xist* 嵌合表

达胚胎(图 2 h1 ~ h3)和 3 个 *Xist* 阳性胚胎(图 2 i1 ~ i3)。在这一阶段,我们可以观察到在嵌合型胚胎中, *Xist* 阳性细胞数所占比例有下降的趋势。孤雄单倍体胚胎发育到桑葚胚阶段的细胞数量比普通二倍体胚胎的细胞总数少近一半。同时,随着细胞数量增多,细胞与细胞之间的排列更加紧密,而出现了细胞间相互重叠的情况,为了捕捉到更准确的信号,对每一枚胚胎都用尼康 A1 荧光共聚焦显微镜进行了逐层扫描(扫描各阶段胚胎总计 74 枚)。由于每一个胚胎的厚度不完全一致,以一个厚度在 10 μm 左右的胚胎为例,按照 0.400 μm /层的标准进行扫描,捕获 25 张图像,以尽量完善地不漏每一个截面上有可能出现的信号。因此,可以通过重建出来的连续图像,判断重叠细胞之间边界的划分,见图 2 h3。由此我们观察到,在孤雄单倍体胚胎发育过程中, *Xist* 信号都是单个的,即每一个细胞内,如果有 *Xist* 信号,就只有一个,否则就没有 *Xist* 的信号。这说明在孤雄单倍体胚胎发育过程中,胚胎对单倍性具有较高的容忍度。

在囊胚阶段,检测的 25 个胚胎当中,有 4 个 *Xist* 阴性胚胎(图 2 j1 ~ j3); 21 个 *Xist* 嵌合表达胚胎(图 2 k1 ~ k3); 没有观察到 *Xist* 阳性胚胎。胚胎细胞总数约为正常二倍体胚胎细胞总数的 50%。

2.3 干扰孤雄胚胎发育过程中 *Xist* 的表达可提高孤雄单倍体胚胎干细胞建系效率

利用 *Xist*-siRNA 技术干扰 *Xist* 基因表达,

注射组(实验组)的囊胚率与对照组相比无差异(表 1)。但是注射组(*Xist* 干扰组)的囊胚细胞数增加,囊胚腔扩张更大。将所获得的囊胚采取不消化透明带直接接种到饲养层细胞培养皿的方式进行干细胞培养,结果显示,注射组(干扰组)获得初代干细胞系(outgrowth)的效率显著高于对照组(表 1)。

3 讨论

在本次工作中,我们发现小鼠孤雄单倍体胚胎发育特征有别于正常二倍体胚胎和孤雌单倍体胚胎。与正常二倍体囊胚相比,孤雄单倍体胚胎发生致密化的时间比较早,并且有较高比例的胚胎阻滞在桑葚胚阶段,孤雄单倍体囊胚细胞数目明显少于普通二倍体胚胎,也显著少于孤雌单倍体的囊胚细胞数目。孤雄单倍体囊胚直径仅在 70 ~ 80 μm 左右,囊胚腔不够膨大。通过 Hoechst 染色可以在孤雌单倍体胚胎中观察到比较明显的内细胞团,而在孤雄单倍体囊胚中却很难观察到清晰的内细胞团区域。由于都是单倍体胚胎,而孤雄单倍体胚胎呈现出的有别于孤雌单倍体胚胎的上述特征提示我们,单套染色体组并不是造成这些现象的原因,而很可能是由于染色体组的来源差异造成的。

孤雌单倍体胚胎与孤雄单倍体胚胎的差异主要体现在性染色体上。研究表明,正常二倍体 XX 核型胚胎中父源 X 染色体由于精子发生过程中的印记而优先失活(Yasunao et al. 2014)。而在含有两条父源 X 染色体的孤雄胚

表 1 注射 *Xist*-siRNA 的孤雄单倍体胚胎的发育率和初代干细胞系形成率比例

Table 1 Developemntal rate and outgrowth rate of *Xist*-siRNA injected androgenetic haploid embryos

组别 Group	2-细胞数 2-cell	囊胚 Blastocyst		初代干细胞系 Outgrowth	
		细胞数 Number	比例 Rate (%)	细胞数 Number	比例 Rate (%)
注射组 Injection group (n = 3)	129	18	14.0	7	38.9 ^a
对照组 Control (n = 3)	77	12	15.6	2	16.7 ^b

同一列中数据上标不同字母,表示数据间差异显著, $P < 0.05$ 。

Letters in the column represent that there's significant difference between two groups, $P < 0.05$.

胎发育过程中, *Xist* 的表达状态则呈现出较大的变化, 有两条父源 X 染色体都表达 *Xist* 的情况, 有仅一条父源 X 染色体表达 *Xist* 的情况, 也有两条父源 X 染色体均不表达 *Xist* 的情况 (Okamoto et al. 2000)。而孤雄单倍体胚胎研究表明, 含有 Y 染色体的孤雄单倍体胚胎无法发育到囊胚阶段 (Latham et al. 2000)。上述研究说明, 单倍体胚胎中 X 染色体的存在和处于激活状态是胚胎顺利完成早期胚胎发育的重要前提。利用 RNA-FISH 结合单细胞全基因组扩增技术, 我们的研究发现大部分孤雄单倍体胚胎中 X 染色体都与野生型二倍体胚胎中父源 X 染色体的失活情况接近, 即在 4-细胞时期开始表达 *Xist*, 而孤雄单倍体囊胚中则呈阴性或嵌合型 *Xist* 表达。

我们推测, 在单倍体胚胎中, 当细胞对 X 染色体进行“计数”时, 发现其为唯一的 X 染色体, 则需要使其处于激活状态, 于是成为“抑制”*Xist* 表达的力量; 然而, 由于这一条 X 染色体的父本来源性质, 它自身的印记需要这条 X 染色体发生失活, 于是成为“促进”*Xist* 表达的力量。当“促进”作用强于“抑制”作用时, *Xist* 基因表达, X 染色体处于失活状态, 反之则处于激活状态。由于 X 染色体的激活是胚胎发育至囊胚的重要条件, 因此孤雄单倍体囊胚发育率低并且 *Xist* 呈阴性或嵌合型表达就可以得到很好的解释。

基于上述分析, 如果抑制 *Xist* 的表达, 保持 X 染色体的激活应该有利于孤雄单倍体胚胎的发育。本次研究利用注射 siRNA 对孤雄单倍体 *Xist* 的表达进行扰低以后, 虽然没有显著提高囊胚效率, 却提高了囊胚质量, 胚胎发育至囊胚的时间缩短到 3.5 d 到 4.5 d, 接近正常胚胎发育时程, 囊胚直径有所增大, 细胞数增多。将孤雄单倍体囊胚去掉透明带后接种到饲养层细胞上, 在没有扰低 *Xist* 表达时, 初代干细胞

系 (outgrowth) 形成率为 16.7%, 与其他研究小组的结果基本一致 (Li et al. 2012, Yang et al. 2012); 而当扰低 *Xist* 表达时, 则初代干细胞系形成率显著提高。结合已建系孤雄单倍体干细胞中 *Xist* 表达均呈阴性, X 染色体处于激活状态的检测结果, 我们认为 *Xist* 的表达是导致小鼠孤雄单倍体胚胎质量差、初代干细胞系形成率低的重要原因。我们的研究结果为进一步开展孤雄单倍体胚胎发育潜能和孤雄单倍体胚胎干细胞建系效率的研究奠定了重要基础。

参 考 文 献

- Latham K E, Patel B, Bautista F D, et al. 2000. Effects of X chromosome number and parental origin on X-linked gene expression in preimplantation mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 63(1): 64–73.
- Latham K E, Akutsu H, Patel B, et al. 2002. Comparison of gene expression during preimplantation development between diploid and haploid mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 67(2): 386–392.
- Leeb M, Wutz A. 2011. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature*, 479(7371): 131–134.
- Li W, Shuai L, Wan H, et al. 2012. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature*, 490(7420): 407–411.
- Okamoto I, Tan S, Takagi N. 2000. X-chromosome inactivation in XX androgenetic mouse embryos surviving implantation. *Development*, 127(19): 4137–4145.
- Wutz A. 2014. Haploid animal cells. *Development*, 141(7): 1423–1426.
- Yang H, Shi L, Wang B A, et al. 2012. Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell*, 149(3): 605–617.
- Yasunao K, Mary E D. 2014. The dynamics of X-chromosome inactivation in mouse development. *Molecular Reproduction & Development*, 81(2): 141–147.