

小鼠孤雌胚与体内正常胚 H3K27 三甲基化模式的差异

王彩红^① 黄继昌^① 刘勇^{②③} 吴凤瑞^{②③} 丁彪^{②③} 王荣^③ 张远^② 李文雍^{②③*}

① 安徽大学生命科学学院 合肥 230039; ② 胚胎发育与生殖调节安徽省重点实验室 阜阳 236041;

③ 阜阳师范学院生命科学学院 阜阳 236041

摘要: 为了考察小鼠 (*Mus musculus*) 孤雌激活胚胎 H3K27 三甲基化模式与体内正常胚胎之间的差异, 以及曲古抑菌素 A (TSA) 对孤雌胚 H3K27 三甲基化水平的影响, 探究表观遗传修饰对孤雌胚胎发育的作用。首先, 用 H3K27me3 特异性抗体对 MII 期卵母细胞染色, 利用激光共聚焦对其荧光强度进行检测, 结果发现该时期的甲基化荧光强度相对较低。接着, 采用同样的方法对小鼠孤雌胚胎和体内正常胚胎植入前各时期的 H3K27me3 模式进行比较, 结果显示, 从 2-细胞到囊胚期孤雌组呈现逐渐升高的趋势, 与体内组变化趋势完全相反, 且总体平均荧光强度较体内组普遍偏低。孤雌胚胎经 TSA 处理后, 处理组和未处理组在前三个时期虽然没有显著性差异 ($P > 0.05$), 但是处理之后的 H3K27 三甲基化水平有所提高, 囊胚期与未处理组相比有显著性差异 ($P < 0.05$)。以上结果表明, 小鼠孤雌胚胎的 H3K27 三甲基化模式与体内胚胎之间存在着巨大的差异, 这可能是造成孤雌胚胎发育能力差的重要原因之一。TSA 处理对 H3K27me3 模式造成了一定的影响, 使体外培养环境有所改善, 这可能对提高孤雌胚胎发育能力具有一定的意义。

关键词: 小鼠; 卵母细胞; 孤雌胚胎; H3K27 三甲基化; 曲古抑菌素 A

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2014)01-103-07

Different H3K27 Trimethylation Patterns in Parthenogenetic and *In vivo* Mouse Embryos

WANG Cai-Hong^① HUANG Ji-Chang^① LIU Yong^{②③} WU Feng-Rui^{②③} DING Biao^{②③}
WANG Rong^③ ZHANG Yuan^② LI Wen-Yong^{②③*}

① College of Life Science, Anhui University, Hefei 230039; ② Key Laboratory of Embryo Development and Reproductive Regulation, Anhui Province, Fuyang 236041; ③ College of Life Science, Fuyang Normal University, Fuyang 236041, China

Abstract: The purpose of this study is to investigate the differences of H3K27 trimethylation pattern between parthenogenetic and *in vivo* mouse (*Mus musculus*) embryos. The effect of trichostatin (TSA) on the level of H3K27me3 in parthenogenetic embryos, and the impact of TSA on parthenogenetic embryonic development were also studied. Firstly, we used the indirect immunofluorescence with specific antibody against H3K27me3 and showed that there was a mild intensity staining in the metaphase oocyte. We activated the metaphase oocytes by

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31201789, 31071310), 安徽大学研究生学术创新研究项目 (No. 01001770-10117700125, 01001770-10117700136), 安徽省教育厅自然科学基金项目 (No. KJ2013A202, KJ2012B132), 阜阳师范学院省级科研机构校级委托项目 (No. 2013PTFY01ZD, 2013PTFY05ZD);

* 通讯作者, E-mail: liwenyong@aliyun.com;

第一作者介绍 王彩红, 女, 硕士研究生; 研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: wch1989@aliyun.com。

收稿日期: 2013-07-28, 修回日期: 2013-10-01

strontium chloride and then collected the embryos at different developmental stages. The *in vivo* embryos were collected by flushing the uterus at different times after injecting pregnant mare serum gonadotrophin and human chorionic gonadotropin. Different patterns of H3K27me3 staining were detected in normal fertilized embryos and parthenogenetic embryos. The relative fluorescence intensities of the different stage embryos were determined by laser scanning confocal microscopy. Moreover, the pronuclear embryos which were activated by strontium chloride were treated with TSA for 20 hours. The un-treated parthenogenetic embryos were cultured in a medium containing dimethyl sulfoxide (0.05%) as a control. The results showed that there was a trend of increasing fluorescence intensity in parthenogenetic embryos, reaching the highest in blastocysts, while it was opposite in the *in vivo* embryos from 2-cell to the blastocyst stage. However, the mean fluorescence intensity of the parthenogenetic embryos was generally lower than that of normal embryos. After the treatment with TSA, though there was no significant difference in early embryo development ($P > 0.05$) between the treated and the non-treated groups, the level of H3K27me3 in parthenogenetic embryos increased. There was significant difference (0.015 ± 0.002 vs. 0.004 ± 0.0005 , $P < 0.05$) in blastocyst formation. These results indicated that the pattern of the H3K27me3 in parthenogenetic embryos differ significantly from that of the *in vivo* embryos, which may be one of the reasons causing the low development ability of the parthenogenetic embryos. The TSA treatment of parthenogenetic activation embryos causes a certain effect on the H3K27me3 pattern, improving the *in vitro* embryo development.

Key words: Mouse; Oocyte; Parthenogenetic embryos; H3K27 trimethylation; Trichostatin

组蛋白氨基末端可以发生多种共价修饰,如甲基化、乙酰化、磷酸化等。作为表观遗传重要的一种修饰,它改变了染色体的结构和功能,调控着基因的转录表达和沉默。组蛋白肽链氨基末端的赖氨酸位点的共价修饰是核小体上一种主要的修饰位点,其中以赖氨酸的甲基化尤为常见。自组蛋白赖氨酸的甲基化被报道之后 (Murray 1964),对赖氨酸甲基化修饰种类及功能的研究不断深入。Lachner 等 (2002) 研究表明,组蛋白赖氨酸位点的甲基化在真核生物基因组的表观修饰中处于核心地位。组蛋白核小体 H3 的 4、9、27、36、79 位点的赖氨酸甲基化在哺乳动物中比较常见,而且对不同物种的机体发育都有着重要的作用 (Kouzarides 2007)。不同位点的甲基化分别由不同的酶来催化,而且对基因的调控作用也各不相同。

Cao 等 (2002) 用染色质免疫沉淀实验证明 H3K27 甲基化与基因的沉默相关。H3K27 三甲基化 (H3K27me3) 作为 H3K27 甲基化的一种重要形式,与特定基因的转录抑制密切相关。成熟卵母细胞孤雌激活对体细胞核移植以及胞质显微注射是一项基本技术,也是一个关键的环节 (Kishigami et al. 2007, 刘京威等

2009)。由小鼠 (*Mus musculus*) 卵母细胞孤雌激活得到孤雌激活胚后发育到囊胚期的内细胞团细胞是胚胎干细胞的一个主要来源,也可以用于核移植的供体细胞,但是孤雌激活胚胎发育能力有限,很难发育至足月出生,最好的也只能到 25 体节期 (Surani et al. 1983)。外界环境的变化可能是导致孤雌胚不能正常发育的一个重要原因,作为组蛋白乙酰化酶抑制剂,曲古抑菌素 A (trichostatin, TSA) 能够把组蛋白的乙酰化水平提高到正常水平并且能明显提高核移植囊胚率 (Wang et al. 2007, Yamanaka et al. 2009), 刘晓等 (2008) 在培养基中添加 50 nmol/L TSA 处理 24 h 后,结果发现 TSA 对猪 (*Sus domesticus*) 孤雌胚胎的发育能力有显著提高。组蛋白核小体的乙酰化能够促进基因的转录 (Sterner et al. 2000), 它与转录激活相关的 H3K4me3 能够协同调控使基因转录水平提高 (Guenther et al. 2007)。作为对基因转录有抑制作用的 H3K27me3 与组蛋白赖氨酸的乙酰化之间是否存在着一一定的联系, TSA 处理对孤雌激活胚胎 H3K27 三甲基化水平是否有影响及孤雌胚胎各时期 H3K27me3 模式与正常胚胎之间有何差异,相关报道尚少。本实验旨在以昆

明小白鼠孤雌激活胚胎为研究对象,以植入前体内各时期正常胚胎为对照,研究孤雌胚胎与体内正常胚胎植入前各时期 H3K27me3 模式的差异以及 TSA 对孤雌胚胎 H3K27 三甲基化水平的影响,改善孤雌胚体外发育条件。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 实验动物为昆明小白鼠,购自安徽医科大学实验动物饲养中心,4~6 周龄,体重 30 g 左右。购回后饲养温度和湿度分别控制为(24±1)℃,50%~60%;黑暗(22:00 时至次日 8:00 时)和光照(8:00~22:00 时)相互交替。新购得的小鼠在新的控光条件下调节 2 周后投入使用。

1.2 主要试剂药品及耗材 孕马血清激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)购自宁波第二激素厂;H3K27 三甲基化抗体(A-4039, Epigentek Group Inc); Goat Anti-Rabbit IgG/FITC 二抗(ab6717, Abcam);实验所用培养皿购于 Corning 公司;曲古抑菌素 A 及胚胎培养试剂均购自 Sigma 公司。

1.3 主要实验仪器 激光扫描共聚焦显微镜(TCS-SP5, Leica, Germany), 体视显微镜(SMZ1500, Nikon, Japan), CO₂ 培养箱(3121, Thermo, USA)。

1.4 实验方法

1.4.1 雌鼠超排处理 挑选健康状态良好的雌鼠于当天下午 17:00~17:30 时腹腔注射 PMSG,48 h 之后注射 hCG。

1.4.2 M II 期卵母细胞的收集 雌鼠注射 hCG 后 17 h 左右脱颈处死,扎破壶腹部,透明质酸酶处理之后获得 M II 期卵母细胞。

1.4.3 体内各时期胚胎的收集 注射 hCG 后的雌鼠与成年的健壮雄鼠按照 1:1 合笼(每笼 1 雌 1 雄),次日早检查阴道栓情况。若见栓则假定雌鼠怀孕,分别于胚胎发育的不同阶段在输卵管和子宫的不同部位收集 2-细胞、4-细胞、8~16-细胞和囊胚。

1.4.4 孤雌激活各期胚胎的收集 450 μl 无钙

CZB 培养基与 0.25 μl 细胞松弛素 B (cytochalasin B, CB)混合后置于 37℃,饱和湿度的 CO₂ 培养箱中平衡 20~30 min,加入 50 μl 10 mmol/L SrCl₂,吹打混匀后做滴,50 μl/滴,放入培养箱中平衡 2 h。2 h 后脱颈处死注射 hCG 且未与雄鼠合笼的雌鼠(此时注射 hCG 后 17 h 左右),剖开腹部取出卵巢和输卵管,扎破壶腹部,透明质酸酶消化卵丘卵母细胞复合体后,将获得的 MII 期卵母细胞移入上述激活滴中激活处理 6 h,移入无糖 CZB 中培养,发育至 4-细胞时移入含糖 CZB (CZBG)中培养。分别在不同发育时期收集 2-细胞、4-细胞、8~16 细胞和囊胚。

1.4.5 TSA 处理孤雌激活胚胎 将 TSA 溶解在二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中,加入到无糖 CZB 培养基中,终浓度为 50 nmol/L,放置 4 h 后使用。将 SrCl₂ 激活处理 6 h 后的原核胚移入含有 TSA 的无糖 CZB 中培养。20 h 后移入正常的无糖 CZB 培养基中继续培养。为了控制条件,对照组的孤雌激活胚胎都在含有 0.05% DMSO 的 CZB 培养基中培养。各时期胚胎的收集与孤雌激活胚胎收集方法相同。

1.4.6 各期各类胚胎间接免疫荧光检测 H3K27 三甲基化模式 各期各类胚胎 4% 多聚甲醛固定 30 min,用 0.1% PVA 的 PBS 充分清洗后,在 0.2% TritonX-100 的 PBS 中 37℃ 通透 1.5 h,1% BSA 封闭 1 h 后直接移入 1% BSA 的 PBS 1:100 稀释的 H3K27 三甲基化抗体(A-4039, Epigentek Group Inc)中孵育过夜。孵育后的胚胎用含有 0.1% Tween 20 和 0.01% Triton X-100 的 PBS 充分清洗后,移入二抗(ab6717, Abcam)中避光染色 3 h。10 mg/L PI(碘化丙啶)复染后制片激光共聚焦检测。

1.5 统计分析 实验至少重复 3 次且每组胚胎不少于 20 枚。所得到的图片用共聚焦自带软件 LAS AF Lite 转换后用 Image Pro-Plus 软件对不同区域的荧光强度进行分析并做数值转换,具体的荧光强度数值采集方法参照以下 <http://rsb.info.nih.gov/ij/>(USA)网站提供的方法,相对荧光强度分析方法参照文献(Kim et al. 2002)。SPSS 单因素方差分析处理数据,

$P < 0.05$ 认为具有显著性差异。

2 结果

2.1 小鼠 M II 期卵母细胞的 H3K27 三甲基化水平

为了检测小鼠成熟 M II 期卵母细胞 H3K27 三甲基化荧光强度,用间接免疫荧光检测法对 M II 期卵母细胞的 H3K27me3 模式进行

了检测(图 1)。

2.2 孤雌激活胚胎与体内正常胚胎植入前各时期 H3K27me3 模式

利用激光扫描共聚焦显微镜检测植入前各时期 H3K27me3 模式的差异,结果见图 2~3。绿色代表 H3K27me3 特异性位点,红色为 PI 复染的细胞核位置。在体内正常组中,从 2-细胞到囊胚期 H3K27me3 荧光

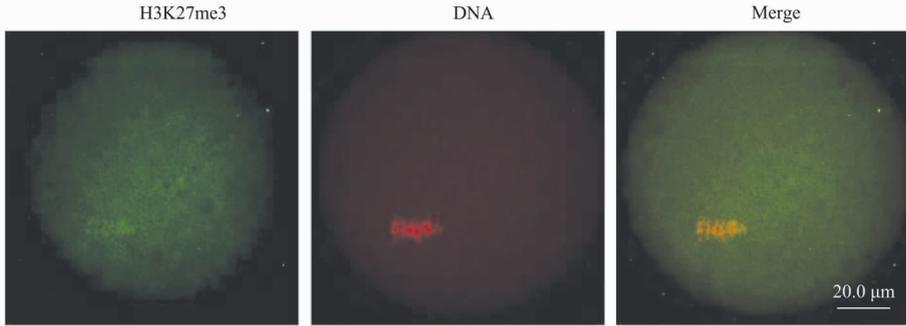


图 1 小鼠 M II 期卵母细胞组蛋白 H3K27 三甲基化水平

Fig.1 Level of H3K27me3 in M II mouse oocyte

绿色代表 H3K27 三甲基化特异性位点,红色代表 PI 复染的细胞核位置。标尺 = 20 μm。

Green indicates the staining of H3K27me3. Red indicates the nucleus stained by propidium iodide. Bar = 20 μm.

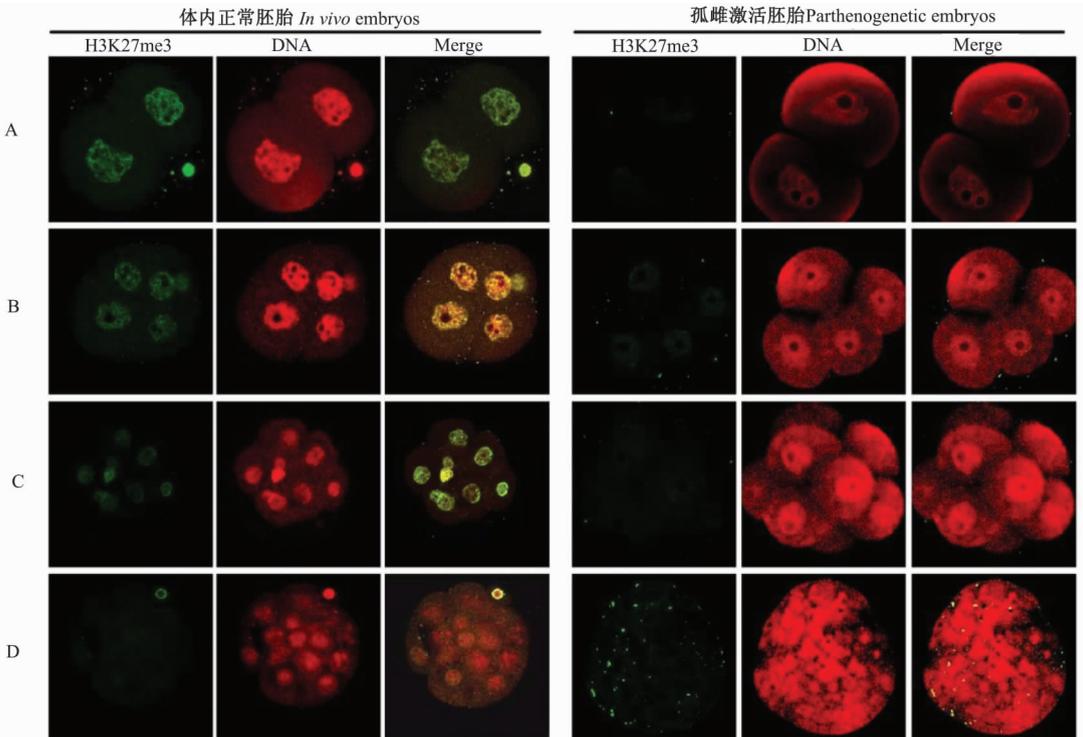


图 2 小鼠植入前各时期体内正常胚胎和孤雌激活胚胎组蛋白 H3K27 三甲基化模式

Fig.2 Different patterns of H3K27me3 in *in vivo* and parthenogenetic mouse preimplantation embryos

A、B、C、D 分别代表 2-细胞、4-细胞、8~16 细胞和囊胚四个时期。标尺 = 20 μm。

The four stages of 2-cell, 4-cell, 8- to 16-cell and blastocyst are respectively shown by A, B, C, and D. Bar = 20 μm.

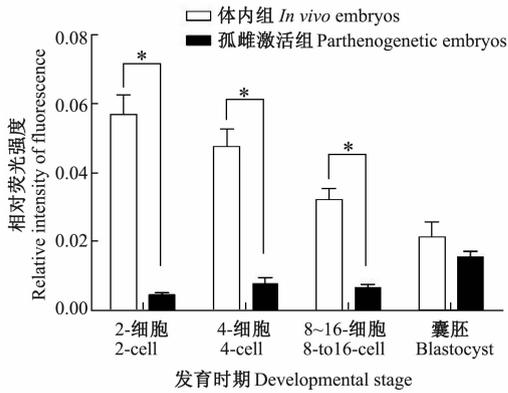


图3 小鼠植入前各时期体内正常胚胎和孤雌激活胚胎组蛋白 H3K27 三甲基化水平相对荧光强度定量分析(平均值 ± 标准误)

Fig.3 Quantitative analysis of H3K27 trimethylation levels of fertilization embryos and parthenogenetic embryos in mouse (Mean ± SE)

* 代表同一时期体内组与孤雌激活组差异显著, $P < 0.05$ 。

* indicates statistical significance between *in vivo* and parthenogenetic group during the same period, $P < 0.05$.

强度逐渐降低,囊胚期荧光强度降到最低 (0.021 ± 0.004);与体内组相比,孤雌组的荧光强度变化趋势完全相反,从2-细胞时期到囊胚期荧光强度逐渐升高,在囊胚期有最强荧光值 (0.015 ± 0.002)。孤雌组的 H3K27 三甲基化水平与对照组相比普遍较低,且整体的平均荧光值比对照组要低得多,除了囊胚期外其他各时期均有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.3 TSA 处理组与未处理组孤雌激活胚胎植入前各时期 H3K27me3 模式 为了研究组蛋白乙酰化对 H3K27 三甲基化水平的影响,我们用组蛋白乙酰化酶抑制剂 TSA 处理孤雌激活胚胎,结果如图 4~5 所示。TSA 处理组的前三个时期 H3K27me3 表达水平比未处理组都要高一些,但没有显著性差异 ($P > 0.05$)。在囊胚期,未处理组比处理组高且具有显著性差异 (0.015 ± 0.002 vs. 0.004 ± 0.0005) ($P < 0.05$)。

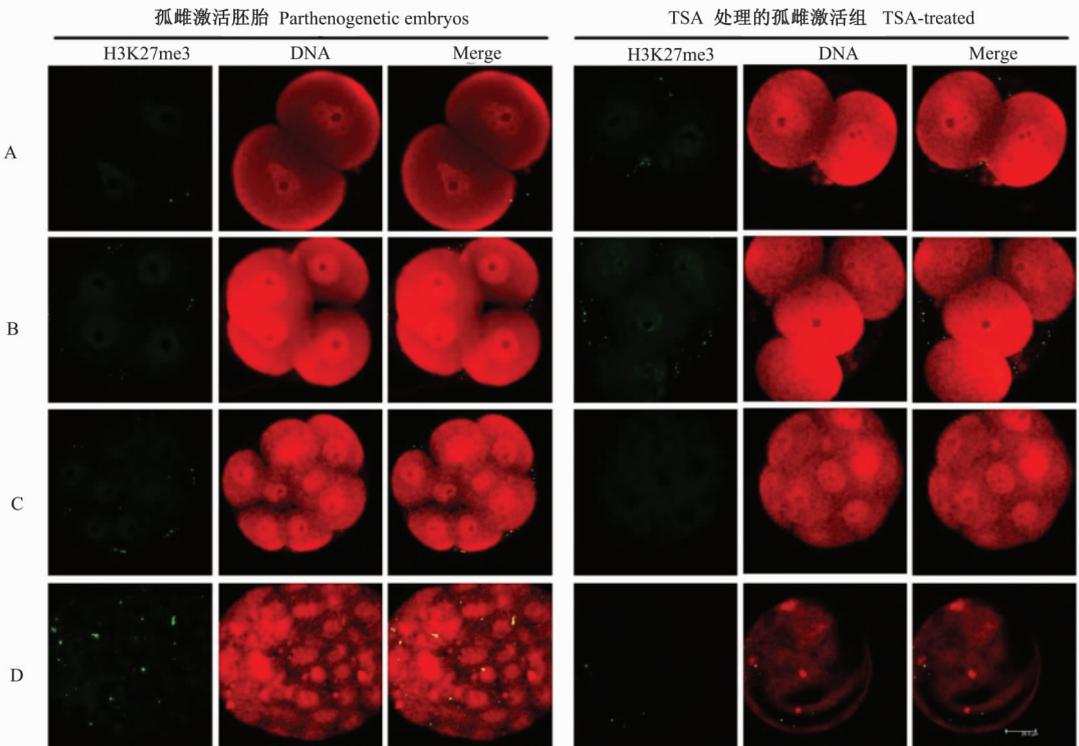


图4 TSA 对小鼠孤雌激活胚胎植入前各时期组蛋白 H3K27 三甲基化模式的影响

Fig.4 Effect of TSA on the modifications of H3K27me3 in mouse parthenogenetic embryos

A、B、C、D 为 2-细胞、4-细胞、8~16-细胞和囊胚 4 个时期。标尺 = 20 μm 。

The four stages of 2-cell, 4-cell, 8- to 16-cell and blastocyst are respectively shown by A, B, C, and D. Bar = 20 μm .

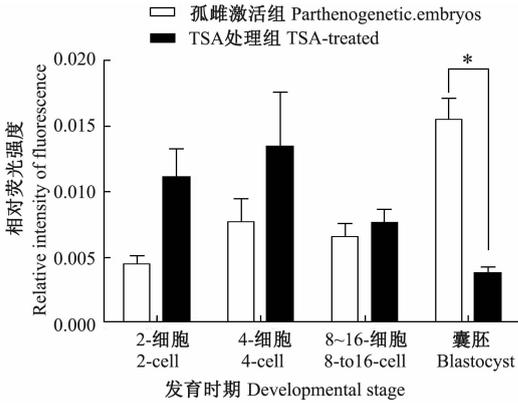


图5 TSA处理后小鼠孤雌激活胚胎植入前各时期组蛋白H3K27三甲基化水平相对荧光强度定量分析 (平均值 ± 标准误)

Fig. 5 Quantitative analysis of H3K27 trimethylation levels of mouse parthenogenetic embryos treated by TSA or not (Mean ± SE)

* 代表同一时期孤雌激活组和TSA处理组差异显著, $P < 0.05$ 。

* indicates statistical significance between parthenogenetic and TSA-treated groups during the same period, $P < 0.05$.

3 讨论

本实验采用免疫荧光检测的方法对小鼠孤雌激活胚胎和体内正常胚胎的H3K27me3模式进行了比较,并对孤雌激活胚胎用TSA处理后检测其H3K27me3表达模式是否有变化。除此之外,对小鼠M II期卵母细胞的H3K27me3水平也进行了检测。

在完全分化的体细胞中,H3K27me3表达很低或者很难被检测到(Bao et al. 2005),即分化程度越高H3K27me3程度越低。有研究表明(Canovas et al. 2012),与H3K27me3去甲基化相关的JMJD3 (Jumonji domain-containing protein 3)在卵母细胞时期具有高转录水平,在受精后mRNA水平开始降低。我们的实验结果中小鼠M II期卵母细胞的H3K27三甲基化水平较低,这一点与上述实验结果是一致的。

受精卵由分别来自母方的卵母细胞和来自父方的精子结合而来,体内各时期的胚胎则是由受精卵发育而来,在整个发育过程中表观修饰不断发生着变化,合子的全能性最高,到囊胚

期逐渐分化为滋养层和内细胞团,分化程度增高,因此该时期H3K27me3水平可能处于较低状态。EZH2是PcG (polycomb group genes)的成分之一,与H3K27me3相关,在胚胎发育的早期阶段表达水平相对较高,这在一定程度上说明H3K27me3在胚胎发育的前期阶段转录水平相对较高(Ross et al. 2008),这与Zhang等(2009)得到的H3K27me3在体内植入前各时期逐渐降低的研究结果是吻合的。在其研究中,以卵丘细胞为供体的核移植胚胎植入前各时期的H3K27me3水平较体内正常组低,尤其是囊胚期,并且实验证明可能是由于与H3K27me3酶相关的PRC2 (polycomb repressive complex 2)组件的不正确表达,尤其是作为重要成分之一的EZH2的低表达,从而导致了核移植胚胎中H3K27me3修饰的异常。在我们的实验结果中,孤雌激活胚胎在2-细胞和囊胚期分别有最低和最高荧光强度值,与体内对照组总体变化趋势截然相反,前三个时期具有极显著差异,并且每个时期的荧光强度值比体内正常组都要低,这可能是M II期卵母细胞在外界激活条件下未能完全恢复全能性状态,EZH2的不充分表达,使激活胚胎仍然保持着之前M II期卵母细胞相对较低的三甲基化水平。H3K27me3是评价克隆胚胎发育能力的一个重要表观遗传标志,也是导致核移植胚胎提前发育和死亡的主要原因,孤雌胚胎和核移植胚胎类似,都是由体细胞核发育而来,具有共同点,由此推测H3K27me3表达模式的异常可能是导致孤雌胚胎发育能力差的重要原因。因此,改变孤雌激活胚胎三甲基化表达模式可能对于提高孤雌胚胎的发育能力具有重要作用。

与转录抑制相关的组蛋白赖氨酸甲基化位点主要有三种:H3K9、H3K27和H4K20,抑制作用主要是通过招募相关甲基化酶和HP1与基因的启动子结合,从而使转录沉默。HP1蛋白能与H3K9me结合并且与去乙酰化酶和甲基化转移酶的活性紧密相关(Kouzarides 2007)。由此推测通过去乙酰化酶抑制剂的作用可能会对组蛋白赖氨酸位点甲基化的抑制作用产生一

定的影响。本实验结果显示,在前三个时期,虽然 TSA 处理组的 H3K27me3 水平与未处理组差异并不显著,但是荧光强度值要稍高一些;囊胚期处理组比未处理组低很多,具有显著性差异。这在一定程度上说明 TSA 抑制了组蛋白去乙酰化酶的活性之后可能对 H3K27me3 的转录抑制产生一定的影响,致使 H3K27 三甲基化水平发生了改变,这与上述的推测是吻合的,而且尚明保(2012)研究 TSA 对表观遗传影响的结果也说明培养条件和环境的改变也可能是导致组蛋白修饰改变的重要原之一,表明 TSA 在一定程度上对外界的培养条件有一定的改善,但是 TSA 影响甲基化表达的具体分子机制还不太清楚(Bui et al. 2010),还需要进一步深入研究。

从实验结果我们可以看到孤雌激活胚胎在植入前各时期中 H3K27me3 表达模式与体内正常胚胎存在着较大的差异,这可能是导致孤雌激活胚胎发育能力差的一个重要原因。通过 TSA 处理改变培养条件和环境后, H3K27me3 表达模式得到了一定的纠正,这对提高孤雌胚胎的发育能力具有一定的意义。

参 考 文 献

- Bao S Q, Miyoshi N, Okamoto I, et al. 2005. Initiation of epigenetic reprogramming of the X chromosome in somatic nuclei transplanted to a mouse oocyte. *EMBO Reports*, 6 (8): 748 - 754.
- Bui H T, Wakayama S, Kishigami S, et al. 2010. Effect of trichostatin A on chromatin remodeling, histone modifications, DNA replication, and transcriptional activity in cloned mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 83(3): 454 - 463.
- Canovas S, Cibelli J B, Ross P J. 2012. Jumonji domain-containing protein 3 regulates histone 3 lysine 27 methylation during bovine preimplantation development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7): 2400 - 2405.
- Cao R, Wang L J, Wang H B, et al. 2002. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*, 298(5595): 1039 - 1043.
- Guenther M G, Levine S S, Boyer L A, et al. 2007. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell*, 130(1): 77 - 88.
- Kim J M, Ogura A, Nagata M, et al. 2002. Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in embryos reconstructed by somatic nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, 67 (3): 760 - 766.
- Kishigami S, Wakayama T. 2007. Efficient strontium-induced activation of mouse oocytes in standard culture media by chelating calcium. *The Journal of Reproduction and Development*, 53(6): 1207 - 1215.
- Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4): 693 - 705.
- Lachner M, Jenuwein T. 2002. The many faces of histone lysine methylation. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(3): 286 - 298.
- Murray K. 1964. The occurrence of ig-N-methyl lysine in histones. *Biochemistry*, 3(1): 10 - 15.
- Ross P J, Ragina N P, Rodriguez R M, et al. 2008. Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27 trimethylation changes during bovine preimplantation development. *Reproduction*, 136(6): 777 - 785.
- Sterner D E, Berger S L. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(2): 435 - 459.
- Surani M A, Barton S C. 1983. Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos. *Science*, 222(4627): 1034 - 1036.
- Wang F C, Kou Z H, Zhang Y, et al. 2007. Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 77(6): 1007 - 1016.
- Yamanaka K, Sugimura S, Wakai T, et al. 2009. Acetylation level of histone H3 in early embryonic stages affects subsequent development of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 55(6): 638 - 644.
- Zhang M, Wang F C, Kou Z H, et al. 2009. Defective chromatin structure in somatic cell cloned mouse embryos. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37): 24981 - 24987.
- 刘京威, 倪和民, 郭勇, 等. 2009. 化学联合激活可明显提高小鼠孤雌胚胎发育率. *动物学杂志*, 44(4): 135 - 141.
- 刘晓, 潘登科, 陈扣扣, 等. 2008. 曲古抑菌素(Trichostatin A)对猪卵母细胞体外成熟及孤雌胚胎发育能力的影响. *畜牧兽医学报*, 39(11): 1493 - 1498.
- 尚明保. 2012. 小鼠植入前胚胎 H3k4 三甲基化模式比较及甲基化酶启动子分析. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 8 - 13.