

# *H1c* 基因在水牛早期胚胎不同发育阶段的表达水平

黄高波<sup>1</sup>, 权利<sup>2</sup>, 刘予娴<sup>2</sup>, 卢晟盛<sup>2</sup>

(1. 岳阳市第一人民医院生殖医学科, 湖南岳阳 414500;  
2. 广西大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530005)

**摘要:** 水牛是中国南方地区非常重要的家畜, 但水牛的繁育能力低, 近年来数量急剧下降。*H1c* 基因表达已经在一些物种中被证实影响早期胚胎发育, 但是在水牛方面的研究报道很少。研究主要通过实时定量-PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 技术检测 *H1c* 基因 mRNA 在水牛早期胚胎发育中的表达情况。结果表明: *H1c* mRNA 在水牛的早期胚胎发育过程中呈现表达递增的趋势, 推测 *H1c* 在水牛早期体外受精 (*in vitro* fertilization, IVF) 胚胎中有重要作用。

**关键词:** 家畜繁殖学; 水牛; 早期胚胎; 连接组蛋白; *H1c* 基因

中图分类号: S813.1 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2015)05-0488-07

## *H1c* gene expression during early embryonic development stages of water buffalo

HUANG Gaobo<sup>1</sup>, QUAN Li<sup>2</sup>, LIU Yuxian<sup>2</sup>, LU Shengsheng<sup>2</sup>

(1. Department of Reproductive Medicine, The First People's Hospital of Yueyang, Yueyang, Hunan 414500, China;

2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, Guangxi University, Nanning 530005, China)

**Abstract:** Water buffalo is an important livestock in south China. However, the reproductive ability of buffalo is low. The *H1c* gene has been shown to affect the early embryonic development in some species, but little is known about its function in early embryonic development of buffalos. In this study, real-time quantitative-PCR (qRT-PCR) was used to profile the expression of *H1c* mRNA in early embryonic development of buffalo. Our results showed that the expression of *H1c* mRNA increased at the early stages of buffalo embryos. Therefore, we suggest that *H1c* may play an important role in *in vitro* fertilization (IVF) embryonic development of buffalo.

**Key words:** animal reproduction; water buffalo; early embryo; linker histone; *H1c* gene

## 0 引言

*H1c* 蛋白是一个体细胞型连接组蛋白 (linker histone, LH), 首先在分化细胞中发现, 被归于体细胞型 LH. BHAN 等<sup>[1]</sup>指出, *H1c* 蛋白影响很多基因表达, 在体细胞中结合在染色质上, 直接抑制多种基因表达。虽然 *H1c* 是一种体细胞型 LH, 在小鼠卵母细胞中不表达, 但早期胚胎存在一定表达量, 说明 *H1c* 在小鼠早期胚胎发育中起有一定作用<sup>[2]</sup>。

基金项目: 国家自然科学基金 (31260553)

作者简介: 黄高波 (1988—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 细胞生物学

通信联系人: 卢晟盛, 研究员, 主要研究方向: 动物细胞工程学. E-mail: shengshenglu@qq.com

早在 1984 年, SCHLISSEL 等<sup>[3]</sup>研究了蟾蜍中期胚胎 H1 的表达, 发现 20 000 个拷贝的卵母细胞基因被沉默, 而 400 个拷贝的体细胞基因并未发生变化。令人感兴趣的是, 这 2 种基因编码区域起始序列均相同。然而, 这个序列在 5' 端区域显著差异; 在卵母细胞基因包含 AT 丰富区段, 体细胞型基因却包含 GC 丰富序列。CUI 等<sup>[4]</sup>的研究表明, 在连接 DNA 富含 AT 序列部位, 非常易于与 LH 结合。PACHOV 等<sup>[5]</sup>也发现, DNA 序列含 AT 序列越多, 越易与 LH 结合。这些结果表明, LH 通过高亲和性特异结合卵母细胞表达基因, 从而抑制其他因子(如转录因子)结合, 最终抑制卵母细胞基因表达。由于它们在不同类型细胞中被发现, 目前被分为卵母细胞 LH (H1foo 等) 和体细胞 LH (H1a, H1b, H1c, H1d, H1e, H1<sup>0</sup> 等), 以及在精子中发现的 LH (H1t 等)。目前, 仍有很多 LH 亚型存在于哺乳动物中未被发现, 而 LH 亚型表达与体细胞重编程有密切联系。在蟾蜍核移植中发现, 核质能够选择性移除原核上的体细胞特异 LH<sup>[6-8]</sup>。BURNS 等<sup>[9]</sup>在哺乳动物核移植中发现同样现象, LH 在细胞重编程过程中, 活动非常活跃。

实验主要通过 qRT-PCR 研究 *H1c* 基因在水牛生发泡 (germinal vesicle, GV) 期和体外成熟 (*in vitro* mature, IVM) 24 h 卵母细胞以及 IVF 后早期胚胎发育各个时期的表达情况, 观察 *H1c* 在早期胚胎发育不同阶段中的表达水平。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

除非特别标明, 所用试剂均来自 Sigma 公司。

### 1.2 水牛卵母细胞 IVM

从当地屠宰场收集水牛卵巢, 在 5 h 内于 30~37°C 含双抗的生理盐水中运到实验室。用带 12 号针头的 10 mL 注射器从水牛卵巢上抽取卵丘-卵母细胞复合体 (cumulus-oocyte complexes, COCs), 挑选带有多层卵丘细胞的 COCs, 在改良 TCM-199 培养基中于 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 下体外成熟培养 24 h。另外, GV 期卵母细胞在抽取 COCs 后用透明质酸酶消化外层卵丘细胞收集, IVM 24 h 卵母细胞在去除卵丘细胞后收集, 每组 20 个胚胎, 收集后在液氮中速冻, 置于 -80°C。

### 1.3 颗粒细胞单层制作

用带 12 号针头的 10 mL 注射器抽取水牛卵巢 COCs, 在挑取 COCs 后, 收集洗卵液上层液体, 在 1 000 r/min 下离心 5 min, 去上清, 加入平衡好的约 2 mL 胚胎培养液, 轻轻吹打使其均匀, 然后以 1 000 r/min 离心, 重复 2 次。之后加入 1 mL 平衡好的胚胎培养液, 轻轻吹打均匀, 然后将其转入小培养皿中, 用捡卵针去除液体中大颗粒细胞。然后用 20  $\mu$ L 移液器做成 20  $\mu$ L 液滴, 覆盖石蜡油, 放入培养箱中培养, 每 2 d 换液。

### 1.4 水牛 IVF

将 IVM 的水牛卵母细胞用移液器反复吹打, 去除卵母细胞外层的卵丘细胞, 然后挑选状态好的卵母细胞进行 IVF。将挑选好的卵母细胞放入 100  $\mu$ L 受精液滴中, 每滴大约 20~25 个卵母细胞。从液氮中取出水牛冷冻精液, 放入 37°C 水浴中 15 s, 之后迅速取出, 放入含有受精液的离心管中, 洗涤并稀释至浓度为 10<sup>6</sup> 个/mL。之后将 10~12  $\mu$ L 的稀释精液加入含水牛卵母细胞的受精液滴中, 然后放入 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中受精 9 h, 之后换入水牛颗粒细胞单层中继续培养, 每 2 d 换一次液。在受精后 16~18 h, 收集 1 细胞胚胎, 在不同日期分别在受精后 1, 2, 3, 7 d 收集 2 细胞、4~8 细胞、16 细胞、囊胚。每组 20 个胚胎, 保存方法同 GV 期和 IVM 24 h 卵母细胞的保存方法。之后进行 RNA 提取。

## 1.5 引物设计与合成

从 NCBI 上查找牛、人、小鼠等动物 *Hlc* 基因序列, 利用 Vector NTI 11.0 软件分析同源性关系, 最终确定以牛的 *Hlc* 基因序列为基础, 设计引物, 从水牛体细胞 cDNA 扩增出目标基因, 设计好的引物送上海生工合成, 引物序列如表 1 所示。

表 1 引物序列  
Tab. 1 Sequences of the primers

基因名称	引物序列	序列大小/ bp	退火温度/°C
<i>Hlc</i>	5'-TTAAGCCGAAGGCCGCTAA-3' 5'-GAGATCAGTGGTGGCTCTGAA-3'	126	54~56

引物合成后, 按产品说明将粉末溶于 ddH<sub>2</sub>O, 制成储存液浓度 100 μmol/L, 工作浓度为 10 μmol/L.

## 1.6 mRNA 提取与逆转录

胚胎 mRNA 提取和逆转录分别用 Qiagen RNeasy micro kit, 按说明操作进行 mRNA 提取。提取后的全部 mRNA 用 Qiagen Sensiscript Reverse transcription kit 按操作进行逆转录成 cDNA, 逆转录后进行水牛  $\beta$ -actin 验证。

## 1.7 qRT-PCR

将提取验证后的 cDNA, 对 *Hlc* 基因 qRT-PCR 反应来检测其在卵母细胞和 IVF 各时期胚胎的表达情况。其操作如下所述。

标准品的制作: 根据部分测序的 *Hlc* 基因序列, 设计好 qRT-PCR 引物 (如表 1 所示), 之后用此引物对水牛体细胞 cDNA 进行 PCR 扩增, 纯化后, 将扩增的目的片段连入 PMD18-T 载体, 之后转入到 *E.coli* DH5 $\alpha$  菌体中, 挑斑测序, 测序验证正确后进行扩大培养, 质粒提取, 之后用 NanoDrop 2000 分光光度计进行浓度测定。计算质粒拷贝数, 然后进行 10 倍稀释, 将计算好拷贝数的含有 *Hlc* 基因的标准品质粒做系列浓度 ( $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ) 稀释。

qRT-PCR 反应如下: 将准备好的样品及反应物按如下操作体系加入超纯水 12.3 μL, 10×PCR buffer 2 μL, 镁离子 (25 mmol/L) 2 μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL, 上下游引物各 0.5 μL, Sybrgreen (20×) 1 μL, Taq 酶 (5 U/μL) 0.2 μL, 模板 1 μL. 反应条件如下: 95°C 2 min; 95°C 10 s, 60°C 30 s, 70°C 45 s, 此处进行 40 个循环; 之后 70~95°C 溶解。qRT-PCR 在 Applied biosystems (USA) 7500 fast 上进行。

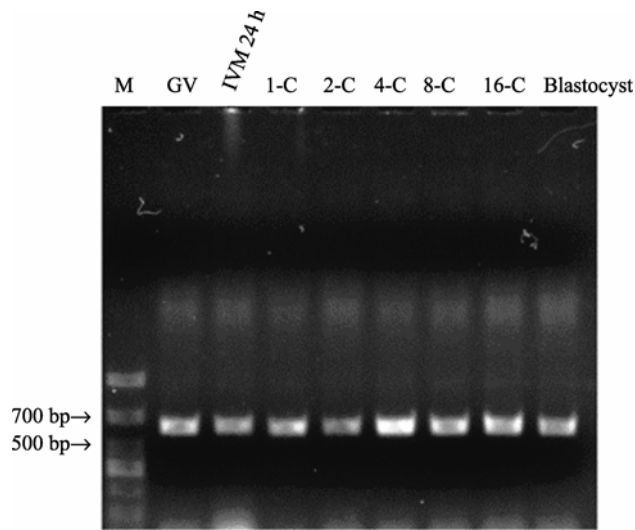
## 1.8 统计分析

实验数据均采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 所有实验相关数据、均用卡方检验 ( $\chi^2$ ) 进行分析。 $P < 0.05$  表示差异性显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 cDNA 提取

对 GV 期、IVM 24 h 卵母细胞和 IVF 各时期胚胎进行 qRT-PCR 检测 *Hlc* 的表达量时, 最重要的一步就是提取的 RNA 要保证有非常好的质量, 另外还需要其高保真地逆转录成 cDNA. 由于所收集的材料量非常少, 实验采取 QIAGEN 的微量提取试剂盒和逆转录试剂盒进行实验。逆转录完成之后, 用水牛  $\beta$ -actin 基因进行验证, 验证结果如图 1 所示。由图 1 可以看出: 利用试剂盒对各个材料进行的 RNA 提取和逆转录成 cDNA 成功, 可进行下一步定量检测实验。



注: M 为分子 marker DL 1 000; 1-C, 2-C, 4-C, 8-C, 16-C 分别为体细胞核移植 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 胚胎 1, 2, 4, 8, 16 细胞胚胎; Blastocyst 为囊胚

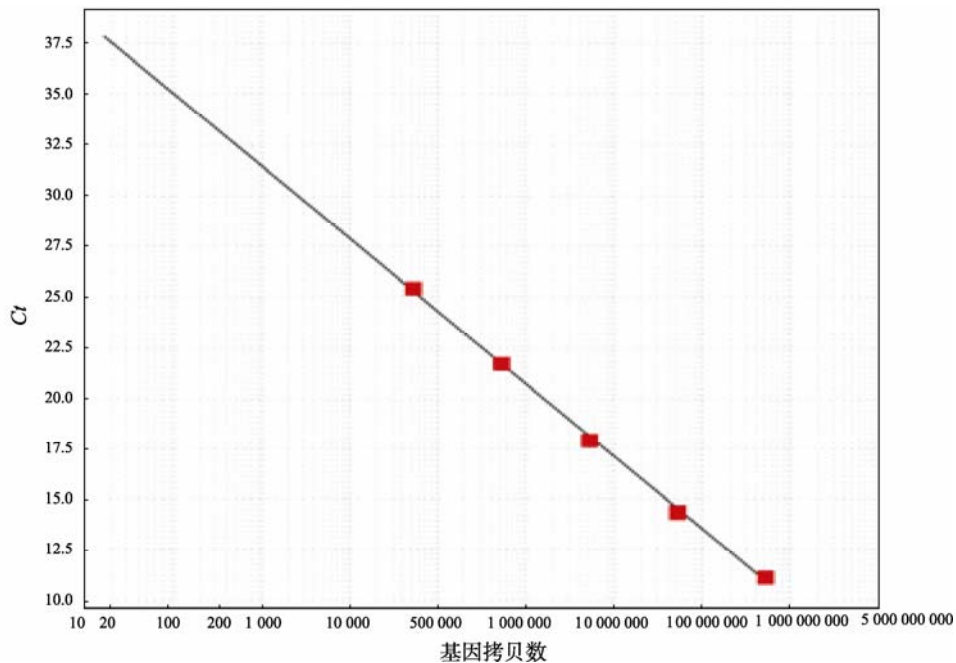
图 1 水牛 GV 期、IVM 24 h 及各时期早期胚胎 cDNA 的  $\beta$ -actin 验证

Fig. 1  $\beta$ -actin validation on cDNA from GV stage, IVM 24 h and early stages of embryos of buffalo

### 2.2 标准品构建

在 qRT-PCR 绝对定量中, 利用构建标准品得到的标准曲线如图 2 所示, 然后计算出未知样品中目的基因的拷贝数。

将扩增的目的片段进行 TA 克隆, 载体为 pMD18-T, 如图 3 所示。



注: 样本的斜率为-3.586; Y-Inter 为 42.178;  $R^2$  为 0.999; Eff% 为 90.065

图 2 目的基因标准曲线

Fig. 2 Standard curve of the purpose gene

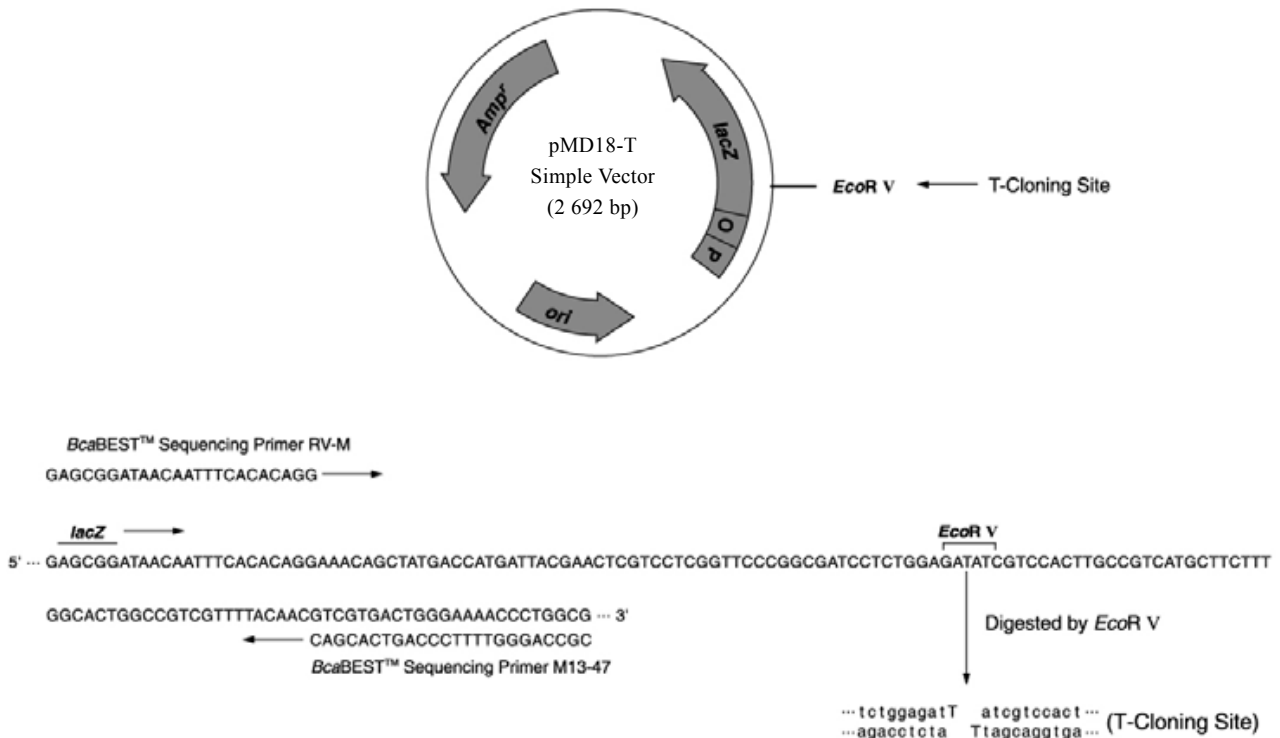


图3 pMD18-T载体  
Fig. 3 pMD18-T vector

测定标准品浓度后，将稀释标准品与待测 *Hlc* 表达量样本放入 PCR 仪中同时进行反应。根据稀释倍数标准品得到的扩增曲线如图 4 所示，得到 *Hlc* 基因标准曲线方程： $y = -3.586x + 42.178$  ( $R^2 = 0.999$ )。然后将各个样品反应的  $C_t$  值代入方程，即可得到目标基因的拷贝数。

### 2.3 各时期 *Hlc* 基因 qRT-PCR 检测结果

通过标准品得到标准曲线，根据 PCR 仪得到的原始数据，分别计算出 GV 期、IVM 24 h 卵母细胞和 IVF 各时期胚胎 *Hlc* 基因的表达量（如表 2 所示）。并计算出各个样本 *Hlc* 基因的拷贝数，如图 5 所示。

由图 5 可知：*Hlc* 基因在 GV 期和 IVM 24 h 卵母细胞的表达量非常低，几乎不表达。而在 IVF 各时期胚胎，从 1 细胞胚胎开始，呈现递增状态，在 1 细胞和 2 细胞期胚胎表达量相对较低，在 4 细胞期表达量开始增高，而在囊胚期表达量最大。

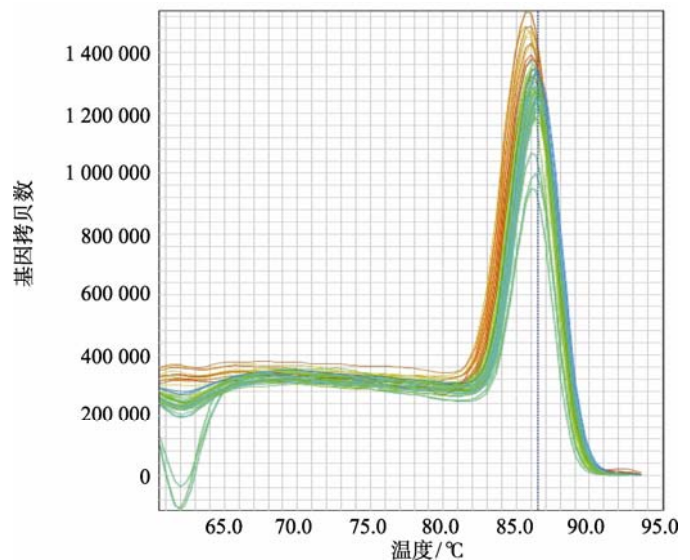
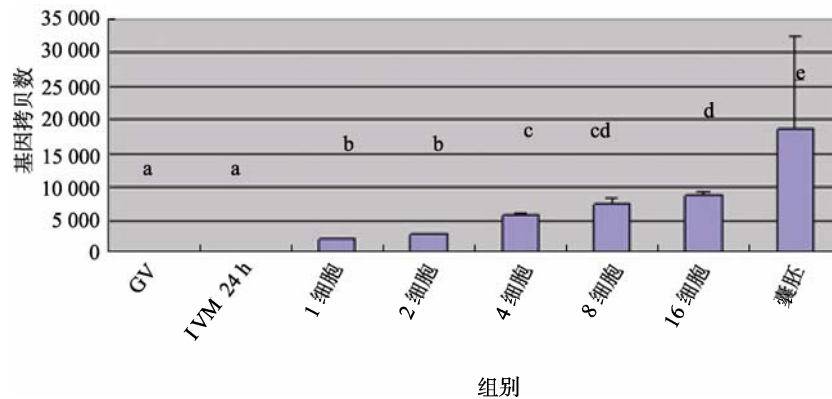


图4 *Hlc* 基因扩增曲线  
Fig. 4 Amplification curves of the *Hlc* gene

表 2 *H1c* 基因在卵母细胞 GV 期和 IVM 24 h 以及 IVF 各时期绝对定量结果Tab. 2 Absolute quantitative results of *H1c* gene in GV/IVM 24 h oocyte and IVF early embryos

组别	重复数/个	<i>H1c</i> 表达量
GV	3	147.80±38.33 <sup>a</sup>
IVM 24 h	3	18.60±1.59 <sup>a</sup>
1 细胞	3	2 346.67±105.25 <sup>b</sup>
2 细胞	3	3 063.33±133.21 <sup>b</sup>
4 细胞	3	5 966.67±69.60 <sup>c</sup>
8 细胞	3	7 523.33±1009.03 <sup>cd</sup>
16 细胞	3	8 986.67±339.43 <sup>d</sup>
囊胚	3	18 700.00±13657.75 <sup>e</sup>

注: 其中相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著



注: 其中相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著

图 5 水牛卵母细胞 GV 期和 IVM 24 h 及 IVF 胚胎各时期 *H1c* 基因表达情况Fig. 5 *H1c* gene expression in GV/IVM 24 h stage and different periods of IVF embryo of buffalo oocytes

### 3 讨论

染色质空间结构的形成和装配依赖于核小体之间的相互作用, 其中也受到一些其他因子影响, 其中一种因子就叫 LH. LH 和核小体之间的连接 DNA 相互作用. *H1c* 蛋白隶属于 LH 的一种, 首先在分化细胞中被发现, 被归于体细胞型 LH. BHAN 等<sup>[1]</sup>指出, *H1c* 蛋白影响很多基因表达, 在体细胞中结合在染色质上, 直接抑制多种基因表达. 虽然 *H1c* 是一种体细胞性 LH, 但是 FU 等<sup>[2]</sup>发现其在小鼠卵母细胞中不表达, 而是在早期胚胎存在一定表达量, 这也说明 *H1c* 对小鼠早期胚胎发育有一定作用. 而在蟾蜍体细胞核移植 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 研究中, 细胞核内 *H1c* 迅速被卵母细胞特异 LH B4 替换<sup>[10]</sup>. 后来在小鼠核移植研究中发现, 体细胞核染色质上特异 LH *H1c* 被迅速移除<sup>[11]</sup>. 虽然核移植后染色质发生了 LH *H1* 连续和快速交换, 但是核心组蛋白在这些交换过程中非常稳定. YUN 等<sup>[12]</sup>在牛 SCNT 研究中也发现了卵母细胞特异 LH 和体细胞型 LH 快速交换, 但是观察到体细胞型 LH 为 *H1e*, 而 *H1c* 是否也参与此过程并没有报道. 综上 SCNT 研究, 发现在核移植后, 体细胞核上大量 LH *H1c* 被替代移除, 而正常的 IVF 胚胎中又存在一定量的表达. 因此本研究以水牛卵母细胞和 IVF 早期胚胎为基础, 定量检测 *H1c* 在其各时期的表达情况, 结果表明 *H1c* 在水牛 IVF 胚胎中存在一定量的表达, 并且随着胚胎的分裂发育, 其表达量逐渐增加. 这对于后续的研究有重要的意义.

## 4 结论

实验研究 LH *H1c* 基因在水牛卵母细胞 GV 期、IVM 24 h 以及 IVF 后各时期的表达情况。结果表明：*H1c* 基因在水牛卵母细胞 GV 和 IVM 24 h 不表达，在 IVF 胚胎 1 细胞阶段有少量表达，随着早期胚胎分裂，*H1c* 表达量逐步升高，囊胚期表达量最高。

### [参考文献] (References)

- [1] BHAN S, MAY W, STEPHANIE L, et al. Global gene expression analysis reveals specific and redundant roles for H1 variants, H1c and H1<sup>0</sup>, in gene expression regulation[J]. *Gene*, 2008, 414: 10-18.
- [2] FU G, GHADAM P, SIROTKIN A, et al. Mouse oocytes and early embryos express multiple histone H1 subtypes1[J]. *Biol. Reprod.*, 2003, 68(5): 1569-1576.
- [3] SCHLISSEL M S, BROWN D D. The transcriptional regulation of *Xenopus* 5s RNA genes in chromatin: the roles of active stable transcription complexes and histone H1[J]. *Cell*, 1984, 37: 903-913.
- [4] CUI F, ZHURKIN V B. Distinctive sequence patterns in metazoan and yeast nucleosomes: implications for linker histone binding to AT-rich and methylated DNA[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37: 2818-2829.
- [5] PACHOV G V, GABDOULLINE R R, WADE R C. On the structure and dynamics of the complex of the nucleosome and the linker histone[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2011, 39(12): 5255-5263.
- [6] DIMITROV S, ALMOUZNI G, DASSO M, et al. Chromatin transitions during early *Xenopus embryogenesis*: changes in histone H4 acetylation and in linker histone type[J]. *Dev. Biol.*, 1993, 160: 214-227.
- [7] DIMITROV S, WOLFFE A P. Remodeling somatic nuclei in *Xenopus laevis* egg extracts: molecular mechanisms for the selective release of histones H1 and H1(0) from chromatin and the acquisition of transcriptional competence[J]. *EMBO*, 1996, 15: 5897-5906.
- [8] STEINBACH O C, WOLFFE A P, RUPP R A. Somatic linker histones cause loss of mesodermal competence in *Xenopus*[J]. *Nature*, 1997, 389: 395-399.
- [9] BURNS K H, VIVEIROS M M, REN Y, et al. Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos[J]. *Science*, 2003, 300: 633-636.
- [10] JULLIEN J, ASTRAND C, HALLEY-STOTT R P, et al. Characterization of somatic cell nuclear reprogramming by oocytes in which a linker histone is required for pluripotency gene reactivation[J]. *PNAS*, 2010, 121: 5483-5488.
- [11] GAO S, CHUNG Y G, PARSEGHIAN M H, et al. Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice[J]. *Dev. Biol.*, 2004, 266: 62-75.
- [12] YUN Y, ZHAO G M, WU S J, et al. Replacement of H1 linker histone during bovine somatic cell nuclear transfer[J]. *Theriogenology*, 2012, 78(6): 1371-1380.