

# 5-Aza-CdR 联合 TSA 对牛核移植胚胎体外发育及表观遗传状态的影响

胡广卫, 苏建民, 曹泽磊, 丁向彬, 王勇胜, 张 涌

(西北农林科技大学 动物医学院 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

**【摘要】** 【目的】探讨 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-Deoxycytidine, 5-Aza-CdR)联合曲古抑菌素 A(Trichostatin A, TSA)对牛核移植胚胎体外发育及其表观遗传状态的影响。【方法】以体外受精胚胎作为对照组,将部分体细胞、核移植胚胎以及体细胞联合核移植胚胎用 5-Aza-CdR+TSA(5-Aza-CdR:20 nmol/L,72 h;TSA:50 nmol/L,12 h)进行处理,统计核移植胚胎体外发育率,并对 2-细胞、8-细胞和囊胚阶段胚胎进行 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化检测,研究 5-Aza-CdR+TSA 处理对核移植胚胎体外发育及其表观遗传状态的影响。【结果】与对照组相比,5-Aza-CdR+TSA 单独处理供体细胞和核移植胚胎均可以显著提高克隆胚胎的囊胚发育率和囊胚细胞数( $P<0.05$ );供体细胞和核移植胚胎均用 5-Aza-CdR + TSA 处理后,核移植胚胎体外发育能力进一步提高,囊胚发育率显著高于单独处理供体细胞或核移植胚胎组( $P<0.05$ )。免疫荧光检测发现,体细胞和核移植胚胎均用 5-Aza-CdR + TSA 处理,不但显著降低了 2-细胞和 8-细胞阶段 DNA 甲基化水平,而且也显著增加了组蛋白乙酰化水平( $P<0.05$ ),使核移植胚胎附植前各发育阶段的表观遗传状态更接近于体外受精胚胎。【结论】5-Aza-CdR 联合 TSA 处理供体细胞和核移植胚胎可以更明显地提高克隆胚胎的体外发育能力,改变核移植胚胎的 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化水平,使它们的表观遗传状态及体外发育率更接近于体外受精胚胎。

**【关键词】** 体细胞核移植;克隆胚胎;5-氮杂-2'-脱氧胞苷;曲古抑菌素 A;牛;体外发育;表观遗传状态

**【中图分类号】** S823.3<sup>+</sup>6

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2009)12-0001-05

## Effect of 5-Aza-CdR and TSA on the *in vitro* development of bovine cloned embryos and epigenetic status

HU Guang-wei, SU Jian-min, CAO Ze-lei, DING Xiang-bin,

WANG Yong-sheng, ZHANG Yong

(Institute of Biotechnology, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Objective】The objective was to study the effect of 5-Aza-2'-Deoxycytidine (5-Aza-CdR) and Trichostatin A (TSA) on the development of bovine cloned embryos and epigenetic status. 【Method】Relative to untreated controls, treatment of donor cells, cloned embryos, and continuous treatment of both donor cells and cloned embryos were performed with 5-Aza-CdR and TSA (5-Aza-CdR:20 nmol/L,72 h; TSA:50 nmol/L,12 h), *in vitro* developmental rates of nuclear transfer embryos calculated, DNA methylation and Histone acetylation status of 2-cell stage, 8-cell stage and blastocyst stage embryos detected, effect of 5-Aza-CdR and TSA on the development of bovine cloned embryos and epigenetic status studied. 【Result】Relative to untreated controls, sole treatment of donor cells, cloned embryos significantly increased the blastocyst rate and cell number of blastocyst of cloned embryos ( $P<0.05$ ); after continuous treatment

\* [收稿日期] 2009-03-30

[基金项目] 国家高技术研究发展计划“863”计划项目(2001AA213081)

[作者简介] 胡广卫(1982—),男,河南漯河人,在读硕士,主要从事动物胚胎工程研究。E-mail:dawei198123@163.com

[通信作者] 张 涌(1956—),男,内蒙古和林格尔人,教授,博士生导师,主要从事体细胞核移植和转基因动物研究。

E-mail:zhy1956@263.net

of both donor cells and cloned embryos, *in vitro* developmental ability of cloned embryos further increased, and the blastocyst rate was significantly higher than the sole treated donor cells group and the sole treated embryos group ( $P < 0.05$ ). Immunofluorescence assay found that donor cells and cloned embryos both treated by 5-Aza-CdR and TSA not only significantly decreased DNA methylation status of 2-cell and 8-cell stage embryos, but also significantly increased their Histone acetylation status ( $P < 0.05$ ). **【Conclusion】** The development of cloned bovine embryos was enhanced by 5-Aza-CdR and TSA; furthermore, the combination was more effective than either one alone, combined treatment could change DNA methylation and Histone acetylation status of nuclear transfer embryos, make their epigenetic status and *in vitro* developmental rates closer to IVF embryos.

**Key words:** somatic cell nuclear transfer; cloned embryo; 5-Aza-2'-Deoxycytidine; Trichostatin A; bovine; *in vitro* development; epigenetic status

1996 年克隆羊“多莉”的诞生<sup>[1]</sup>,掀起了哺乳动物体细胞核移植研究的热潮,继“多莉”之后,许多哺乳动物相继被成功克隆<sup>[2-7]</sup>。体细胞核移植的成功说明高度分化的体细胞仍具有发育的全能性,卵母细胞胞质中存在将分化体细胞重编程至多能胚胎细胞状态的全部因子。但是,至今体细胞核移植的效率仍然很低,表现为克隆囊胚率低、胚胎着床率低、胎儿流产率高以及新生犊牛成活率低,而且存在大量表型异常,如克隆胎儿心、肝、肺和胎盘等器官发育异常、畸形,一般表现为过度增长。目前普遍认为,体细胞核移植的成功率低及发育异常的原因与供体细胞核的不完全表观遗传重编程有关<sup>[8]</sup>。

DNA 甲基化和组蛋白乙酰化既是哺乳动物主要的表观遗传修饰形式,又是调节基因组功能的重要手段,在胚胎的正常发育过程中具有显著的调控作用<sup>[9]</sup>。DNA 甲基化可以诱导局部组蛋白脱乙酰化,使染色质乙酰化水平降低,从而抑制基因的表达。特异染色质位点的组蛋白乙酰化水平与 DNA 甲基化水平通常是相对的,二者存在某种内在联系<sup>[10-11]</sup>,已有研究表明,克隆动物普遍存在 DNA 甲基化水平过高<sup>[12-14]</sup>,而组蛋白乙酰化水平不足<sup>[15-16]</sup>等表观重编程缺陷。5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-Deoxycytidine, 5-Aza-CdR)作为 DNA 甲基转移酶抑制剂,可以降低基因组的甲基化水平,而曲古抑菌素 A (Trichostatin A, TSA)作为去乙酰化酶抑制剂,可以增加组蛋白的乙酰化水平。虽然 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化是相互联系的,但前期研究表明,低浓度的 TSA 和 5-Aza-CdR 并不能改变克隆胚胎的乙酰化水平和甲基化水平,而高浓度处理显著抑制了胚胎的体外发育;5-Aza-CdR 和 TSA 处理可以分别使克隆胚的 DNA 甲基化水平和组蛋白乙酰化水平趋于正常,以提高克隆胚的发育率,但 5-

Aza-CdR 和 TSA 共同作用对胚胎发育的影响尚未见报道。本研究联合应用 5-Aza-CdR 和 TSA 处理牛供体细胞和核移植胚胎,研究 2 种试剂联合处理对核移植胚胎发育,以及克隆胚胎甲基化水平和乙酰化水平的影响,以期优化牛体细胞核移植程序。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

其他试剂除特别指明外,均为 Sigma 公司生产;TCM199、DMEM 培养基和胎牛血清为 Gibco 公司生产;一次性塑料培养皿为 Nunclon 公司生产。

### 1.2 供体细胞的准备

以传 3~5 代的牛胎儿成纤维细胞作为核供体,于核移植前在含体积分数 0.5% FCS 培养液中饥饿处理 3~5 d,诱导细胞进入 G0 期。然后将一部分细胞用 5-Aza-CdR+TSA 进行处理,处理方法见试验设计部分,处理后的细胞用体积分数 0.25%胰酶-EDTA 消化,离心(1 500 r/min、5 min)洗涤 3 次,然后将 100~200 个细胞悬浮于注核液微滴中备用。

### 1.3 牛卵巢的采集、运输以及卵母细胞的采集

牛卵巢采自西安市清真屠宰场,将卵巢置于含体积分数 0.5%青、链霉素的 20~25 ℃生理盐水中,5 h 以内运回实验室。卵巢运回实验室后,去除卵巢附着的系膜和输卵管,用无菌生理盐水清洗 3 次,用连接有 12 号针头的 5 mL 注射器抽取卵巢表面 2~8 mm 卵泡中的卵母细胞,在实体显微镜下选择形态正常的 A、B 级卵母细胞用于体外成熟培养。卵母细胞的分级标准为实验室自定,共分 5 级:A 级卵母细胞表现为胞质均匀、卵丘细胞致密,最少有 5 层卵丘细胞完全包裹;B 级卵母细胞的卵丘细胞为 2~4 层,基本上包裹卵母细胞;C 级卵母细胞大部分被 1~2 层卵丘细胞包被;D 级卵母细胞外有少量卵丘细胞存在,

胞质均匀无颗粒;E 级卵母细胞为裸卵,胞质内无颗粒但有空泡存在,无任何卵丘细胞包被。

#### 1.4 卵母细胞的成熟培养

将选取的 A、B 级卵母细胞置于 Hepes 缓冲的 TCM199 中洗涤 3 次,转入成熟培养微滴(50  $\mu\text{L}$ )中培养 22 h,每个微滴中放 10~20 个卵母细胞,培养条件为 38.5  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$ 、相对饱和湿度(以下体外受精、受精卵的体外培养条件与此相同)。

#### 1.5 体细胞核移植

将成熟卵母细胞用内径为 20  $\mu\text{m}$  的去核针去核,去核时将卵母细胞置于含 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  细胞松弛素 B (Cytochalasin B, CB)和体积分数 10%FCS 的 PBS 中平衡 10 min,在显微镜下吸出第 1 极体及其周围部分胞质。用 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hoechst 33342 染色后,在荧光显微镜下挑出完全去核的卵母细胞。然后用同一根去核针在含体积分数 5% FCS 的 M199-Hepes 微滴中(30  $\mu\text{L}$ ),将圆形细胞膜光滑的供体细胞沿去核时留下的针口注射到去核卵母细胞的卵周隙内。

注核后的重组体采用微电极的方法<sup>[17]</sup>进行融合,融合前,重组体在电融合液中预平衡 4~6 min,电融合在 150 倍的倒置显微镜下进行。用于融合操作的 2 根“Z”字形微电极顶端直径为 15  $\mu\text{m}$ ,后端连于显微操作仪上,使重组体两细胞膜接触面与两电极的连线垂直,融合参数为电压 32 V、脉冲时长 20  $\mu\text{s}$ 、2 次脉冲间隔 10 ms。融合后 0.5~1 h 在显微镜下观察融合情况。

#### 1.6 核移植胚胎的激活

融合后的克隆胚在含体积分数 10% FCS 的 M199 中平衡 4 h 后,融合胚用含 5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  Ionomycin 的 mSOFaa 培养液处理 4 min,然后在含 2 mmol/L 6-DMAP 的 mSOFaa 培养液内培养 4 h。

#### 1.7 核移植胚胎的体外培养

将激活后的重组胚用培养液洗 3 次后,移入 mSOFaa 培养液(含体积分数 8%BSA)中培养 48 h,检查卵裂率,然后将卵裂的克隆胚转入含体积分数 10% FCS 的 mSOFaa 培养液中再培养 5~6 d,每 48 h 半量换液,统计发育到囊胚的胚胎数量。胚胎培养条件为 38.5  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$ 、相对饱和湿度。

#### 1.8 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化的免疫荧光检测

免疫荧光染色步骤参考 Beaujean 等<sup>[18]</sup>的方法并适当修改。将细胞或胚胎在固定液中固定 30 min(室温),然后在室温下用体积分数 0.5% Triton X-100 透化处理 30 min。透化好的细胞或胚胎用 4

mol/L 盐酸、37  $^{\circ}\text{C}$  下处理 1 h,然后将细胞或胚胎分别与抗 5-甲基胞嘧啶单克隆抗体和抗组蛋白 H3(acetyl K18)多克隆抗体孵育(4  $^{\circ}\text{C}$  过夜),细胞或胚胎用 PBS 洗涤 3 次(10 min/次)后,再用异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的二抗于 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 1 h, PBS 洗涤后 DNA 用 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)染色 30 min, PBS 洗涤后加封片剂封片。

荧光信号采用 Carl Zeiss 510 激光共聚焦显微镜进行检测,为了准确进行荧光亮度的相对定量分析,每组细胞或胚胎均采用相同的参数。以单个细胞或胚胎细胞核染色区域的平均荧光强度代表各发育阶段胚胎单核全基因组 DNA 甲基化水平,2-细胞到 16-细胞胚胎统计全部细胞核,桑椹胚检测 20 个以上细胞核,囊胚检测 25 个以上细胞核。试验共分体外受精组、5-Aza-CdR+TSA 处理的核移植组与未处理的核移植组 3 组。体外受精胚胎 2-细胞期单核基因组荧光亮度设定为 100%,其他各组荧光亮度以此为基础计算相对荧光亮度。

#### 1.9 试验设计与统计分析

将部分体细胞、核移植胚胎以及体细胞联合核移植胚胎用 20 nmol/L 5-Aza-CdR 处理 72 h,再加 50 nmol/L TSA 处理 12 h 后培养,统计核移植胚胎体外发育率。并以体外受精胚胎作为对照组,对 2-细胞、8-细胞和囊胚阶段的体外受精胚胎、5-Aza-CdR 和 TSA 处理的核移植胚胎、未处理的核移植胚胎进行 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化检测,研究 5-Aza-CdR+TSA 处理对核移植胚胎体外发育及其表观遗传状态的影响。

所有试验重复 4 次,所得试验数据采用 SPSS11.0 软件进行统计分析,各胚胎发育阶段平均荧光亮度采用  $t$  检验进行分析处理,  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

#### 2.1 抗 5-甲基胞嘧啶抗体和抗组蛋白 H3(acetyl K18)抗体特异性的检测

在使用一抗对胚胎进行免疫染色之前,先对抗体的特异性进行检测。采用常规染色程序染色后可见,抗 5-甲基胞嘧啶单克隆抗体和抗组蛋白 H3 多克隆抗体均可形成清晰的免疫荧光图片,适当调整染色步骤并未改变荧光信号的强度。然后将抗 5-甲基胞嘧啶单克隆抗体用足量的 5-甲基胞嘧啶进行预处理,抗组蛋白 H3 多克隆抗体用免疫原蛋白预处理后,荧光

信号消失,说明一抗可以特异性结合待测抗原。

2.2 5-Aza-CdR+TSA 处理对核移植胚胎体外发育的影响

由表 1 可知,与对照组相比,5-Aza-CdR+TSA 单独处理供体细胞或核移植胚胎均可以显著提高克

隆胚胎的囊胚发育率和囊胚细胞数( $P<0.05$ );供体细胞和核移植胚胎均用 5-Aza-CdR+TSA 处理后,核移植胚胎体外发育能力获得了进一步提高,囊胚发育率显著高于单独处理供体细胞或核移植胚胎组( $P<0.05$ )。

表 1 5-Aza-CdR+TSA 处理对核移植胚胎体外发育的影响

Table 1 Development of cloned bovine embryos after treatment with both 5-Aza-CdR and TSA

| 组别<br>Group                                                     | 核移植胚胎数<br>No. of couplet | 卵裂率/%<br>Cleavage rate | 囊胚发育率/%<br>Blastocyst rate | 囊胚细胞数<br>Cell number |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------|
| 对照组 CK                                                          | 128                      | 79.7(102/128) a        | 12.5(16/128) a             | 74.1±16.8 a          |
| 供体细胞处理组<br>Donor cell treatment group                           | 130                      | 80.8(105/130) a        | 24.6(32/130) b             | 89.6±17.5 b          |
| 核移植胚胎处理组<br>Embryo treatment group                              | 114                      | 83.3(95/114) a         | 26.3(30/114) b             | 93.2±16.6 b          |
| 供体细胞和核移植胚胎均处理组<br>Both donor cell and embryo<br>treatment group | 121                      | 85.1(103/121) a        | 38.8(47/121) c             | 99.5±18.2 b          |

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。  
Note: Within a column, different small letter means significant difference( $P<0.05$ ).

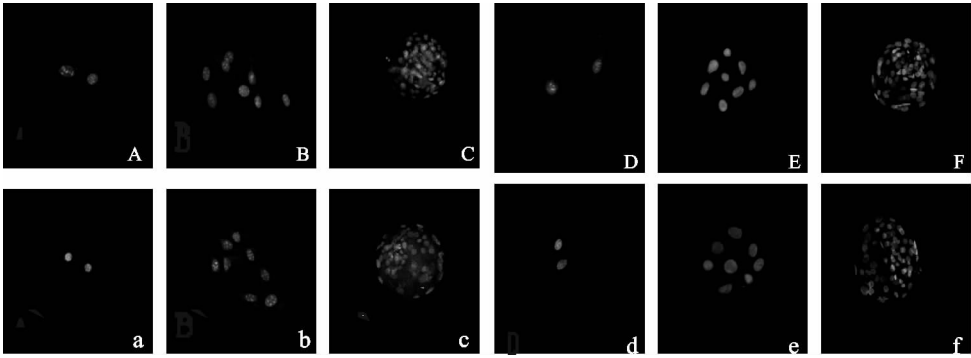
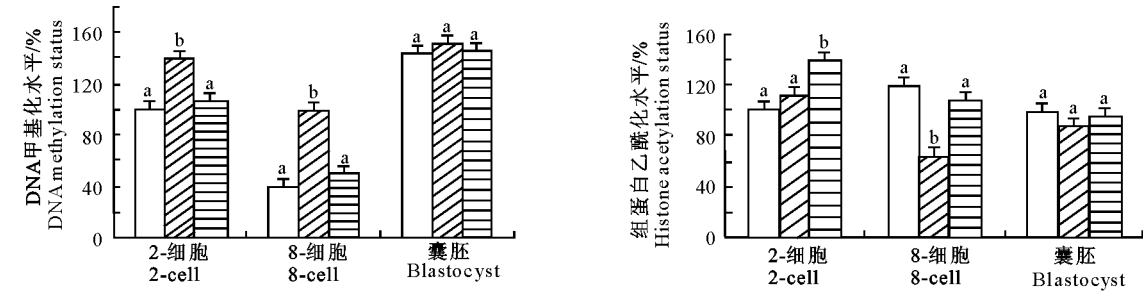


图 1 5-Aza-CdR+TSA 处理前后核移植胚胎的 DNA 甲基化及组蛋白乙酰化状态  
A—C. 未处理核移植胚胎的 DNA 甲基化状态;a—c. 处理后核移植胚胎的 DNA 甲基化状态;  
D—F. 未处理核移植胚胎的组蛋白乙酰化状态;d—f. 处理后核移植胚胎的组蛋白乙酰化状态

Fig. 1 DNA methylation and Histone acetylation status of nuclear transfer embryos treated by 5-Aza-CdR+TSA  
A—C. DNA methylation status of untreated nuclear transfer embryos;a—c. DNA methylation status of treaded nuclear transfer embryos;  
D—F. Histone acetylation status of untreaded nuclear transfer embryos;d—f. Histone acetylation status of treaded nuclear transfer embryos



□ 体外受精胚胎 IVF DNA methylation or Histone acetylation status; ▨ 未处理核移植胚胎 Untreated nuclear transfer embryos DNA methylation or Histone acetylation status; ▤ 5-Aza-CdR+TSA 处理后核移植胚胎 5-Aza-CdR+TSA treated nuclear transfer embryos DNA methylation or Histone acetylation Status; 同一胚胎发育阶段不同上标(a,b)表示差异显著( $P<0.05$ )  
Within some developmental stages, means without a common superscript differ significantly ( $P<0.05$ )

图 2 5-Aza-CdR+TSA 处理对核移植胚胎 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化水平的影响

Fig. 2 DNA methylation and Histone acetylation status of cloned embryos after both donor cells and cloned embryos treatment with 5-Aza-CdR and TSA

### 2.3 5-Aza-CdR+TSA 处理对核移植胚胎表观遗传状态的影响

免疫荧光检测发现,体细胞和核移植胚胎均用 5-Aza-CdR+TSA 处理不但显著降低了 2-细胞和 8-细胞阶段 DNA 甲基化水平,而且也显著增加了 2-细胞和 8-细胞阶段组蛋白乙酰化水平( $P<0.05$ ),从而使核移植胚胎附植前各发育阶段的表观遗传状态更接近于体外受精胚胎(图 1,2)。

## 3 讨 论

1998 年 Nan 等<sup>[19]</sup>和 Johes 等<sup>[20]</sup>发现,甲基化 CpG 结合蛋白(Mecp2)与组蛋白脱乙酰化酶(HDAC)在细胞中可存在于同一个复合物中,提示 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化存在某种关系。Fuks 等<sup>[21]</sup>发现,HDAC1 能够与 DNMT1 结合,提示 DNA 甲基化和组蛋白脱乙酰化之间存在更直接的联系。而 Selker<sup>[22]</sup>发现,TSA 处理可以选择性地使链孢霉中某些基因的甲基化水平下降,提示组蛋白乙酰化可能在一定程度上影响 DNA 甲基化。Shaker 等<sup>[23]</sup>研究发现,5-Aza-CdR 和 TSA 联合应用可以增强其在肿瘤治疗中的作用,Cameron 等<sup>[24]</sup>也发现,联合应用 5-Aza-CdR 和 TSA 可以有效地激活某些高度甲基化的抑癌基因,其作用机制可能是甲基化影响了甲基 CpG 结合蛋白在启动子区与组蛋白脱乙酰化酶的结合,同时 TSA 抑制了甲基化 CpG 结合蛋白-组蛋白脱乙酰化酶复合物的活性,从而使基因重新表达<sup>[25]</sup>。本研究联合应用 5-Aza-CdR 和 TSA 处理供体细胞和核移植胚胎,结果表明,5-Aza-CdR 联合 TSA 处理可以显著提高核移植胚胎的体外发育潜力,当供体细胞和核移植胚胎均处理时,核移植胚胎的囊胚发育率和囊胚细胞数获得了进一步提高,显著高于单独处理各组。联合处理后核移植胚胎 2-细胞阶段 DNA 甲基化水平显著下降,且与 IVF 胚胎相比差异不显著;8-细胞阶段 DNA 甲基化水平显著降低,而组蛋白乙酰化水平明显上升,与 IVF 胚胎差异不显著。说明 DNA 甲基化水平和组蛋白乙酰化水平对胚胎的早期发育都具有重要作用,正常的甲基化和乙酰化水平可以保证胚胎的顺利发育,提高体外发育率。本研究也发现,2-细胞阶段组蛋白乙酰化水平升高有利于克隆胚胎的体外发育,这可能与早期的高乙酰化状态有利于核重编程有关,这与 Rybouchkin 等<sup>[26]</sup>的发现一致。5-Aza-CdR 和 TSA 作为甲基化转移酶和去乙酰化酶的抑制剂,在一定浓度以及特定的处理时间下可

以提高克隆胚胎的发育率。

## 4 结 论

5-Aza-CdR (20 nmol/L, 72 h) + TSA (50 nmol/L, 12 h) 单独处理供体细胞或核移植胚胎,均可以显著提高克隆胚胎的囊胚发育率和囊胚细胞数( $P<0.05$ );供体细胞和核移植胚胎均用 5-Aza-CdR+TSA 处理后,克隆胚体外发育能力获得了进一步提高,囊胚发育率显著高于单独处理供体细胞或核移植胚胎组( $P<0.05$ )。联合处理不但显著降低了 2-细胞和 8-细胞阶段 DNA 甲基化水平,而且显著增加了组蛋白乙酰化水平,从而使牛克隆胚胎附植前各发育阶段的表观遗传状态更接近于体外受精胚胎。

### [参考文献]

- [1] Wilmut I, McWhir S J, Kind A J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cell [J]. *Nature*, 1997, 385: 810-813.
- [2] Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult [J]. *Science*, 1998, 282: 2095-2098.
- [3] Wakayama T, Perry A C F, Zuccotti M, et al. Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei [J]. *Nature*, 1998, 394: 369-374.
- [4] Baguisi A, Behboodi E, Melican D T. Production of goats by somatic cell nuclear transfer [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 456-461.
- [5] Polejaeva I A, Chen S, Vaught T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells [J]. *Nature*, 2000, 407(6800): 86-90.
- [6] Chesne P, Adenot P G, Viglietta C, et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 366-369.
- [7] Shin T, Kraemer D, Pryor J, et al. A cat cloned by nuclear transplantation [J]. *Nature*, 2002, 415: 859-872.
- [8] Daniels R, Hall V, Trounson A O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei [J]. *Biol Reprod*, 2006, 3(4): 1034-1040.
- [9] Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development [J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(9): 662-673.
- [10] Cervoni N, Szyf M. Demethylase activity is directed by histone acetylation [J]. *Biol Chem*, 2001, 276: 40778-40787.
- [11] German T M, Robertson K D. Chromatin remodeling, histone modifications and DNA methylation-how does it fall together [J]. *J Cell Biochem*, 2002, 87: 117-125.
- [12] Kang Y K, Koo D B, Park J S, et al. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos [J]. *Nat Genet*, 2001, 28: 173-177.