

水牛 YY1 基因克隆及其 shRNA 片段的筛选

龚云, 乔树叶, 林浪, 王梦, 石德顺, 李湘萍*

(亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西大学, 南宁 530004)

摘要: 本试验旨在克隆水牛阴阳因子 1 (YY1) 基因, 并筛选获得可有效抑制水牛 YY1 基因表达的 shRNA 干扰片段。以水牛成纤维细胞 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 方法, 扩增水牛 YY1 基因 CDS 序列, 将其连接插入到 pMD18-T 载体中, 进行序列测序并分析。采用 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切, 将水牛 YY1 基因编码区定向克隆至 pEGFP-N1 载体中, 构建其真核表达载体 pYY1-EGFP-N1。设计 2 条靶向水牛 YY1 基因的 shRNA 序列并构建其慢病毒表达载体, 命名为 pSicoR-GFP-YY1 shRNA1/2。以 pSicoR-GFP 和 pSicoR-GFP-1864 分别为空白对照和阴性对照质粒, 采用脂质体转染方法, 将 YY1 真核表达载体分别与 2 条 shRNA 慢病毒表达载体共转染 293T 细胞, 48 h 后观察绿色荧光蛋白 EGFP 表达情况; 72 h 收集共转染细胞样品, 采用 qRT-PCR 和 Western-blot 方法分析 YY1 基因的表达水平。结果表明, 克隆得到 1 248 bp 的水牛 YY1 基因 CDS 序列, 其与牛 YY1 基因的同源性达 99%。构建的水牛 YY1 基因真核表达载体 pYY1-EGFP-N1 能在水牛胎儿成纤维细胞 (BFF) 中瞬时表达。酶切分析及序列测定结果表明, 所构建的 shRNA 慢病毒表达载体 pSicoR-GFP-YY1 shRNA1/2 为阳性克隆。质粒共转染 293T 细胞 48 h 后, 可观察到绿色荧光蛋白 EGFP 的表达。qRT-PCR 结果显示, 设计合成的 2 条 shRNA 对水牛 YY1 基因的表达均有抑制效果, 其中 YY1 shRNA2 的抑制效果 (93.64%) 显著高于 YY1 shRNA1 (50.77%) ($P < 0.05$), Western-blot 分析结果显示, 2 条 shRNA 对 YY1 蛋白表达均有抑制效果。以上结果说明克隆得到水牛 YY1 基因编码区序列, 并获得 2 条有效抑制其表达的 shRNA 片段, 为进一步阐明 YY1 基因在水牛早期胚胎发育过程中的作用奠定了基础。

关键词: 水牛 YY1 基因; shRNA; 慢病毒表达载体; 基因表达

中图分类号: 823.8⁺3.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)01-0062-07

Cloning of Buffalo YY1 Gene and Screening Its shRNA Fragments

GONG Yun, QIAO Shu-ye, LIN Lang, WANG Meng, SHI De-shun, LI Xiang-ping*

(State Key Laboratory of Subtropical Bio-resource Conservation and Utilization, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: The aim of present study was to clone the CDS sequences of buffalo YY1 gene, and screen its effective shRNA fragments. The cDNA of buffalo fetal fibroblast (BFF) was used as the PCR template, the CDS full-length sequence of buffalo YY1 gene was amplified by using touch down RT-PCR methods. The purified CDS fragment was inserted into pMD18-T vector, and the positive plasmid was identified and sequenced. Fusion expression vector of buffalo YY1 gene was constructed by inserting the YY1 CDS fragment into pEGFP-N1 vector, named as pYY1-EGFP-N1. The pYY1-EGFP-N1 plasmid was transfected into BFF cells by Lipofectamine[®] LTX reagent. Two shRNA fragments targeting buffalo YY1 gene were designed and synthesized, their lentiviral expression vectors were constructed, named as pSicoR-GFP-YY1 shRNA1/2 respectively. YY1

收稿日期: 2013-07-18

基金项目: 科技部“863”计划项目 (2011AA100607); 广西自然科学基金回国基金重点项目 (2012GXNSFCB053002); 国家留学回国基金项目 (BLH120499)

作者简介: 龚云 (1988-), 女, 湖南长沙人, 硕士, 主要从事细胞与胚胎工程的研究, E-mail: 283148675@qq.com

* 通信作者: 李湘萍, 研究员, E-mail: xiangpingli@163.com

recombinant plasmid (pYY1-EGFP-N1) and shRNA lentiviral expression plasmid (pSicoR-GFP-YY1 shRNA1/2) were co-transfected into 293T cells by using Lipo-LTX reagent at the ratio of 1:1 or 1:6, pSicoR-GFP and pSicoR-GFP-1864 plasmid were used as blank and negative control respectively. At 72 h after transfection, the cells were harvested, and the total RNA was extracted. The expression of YY1 gene in each transfected cells was detected by qRT-PCR and Western-blot methods. The results showed that the CDS sequence of cloned buffalo YY1 was 1 248 bp, the nucleotide homology of YY1 gene between bovine and buffalo was 99%. The constructed pYY1-EGFP-N1 plasmid could transiently express in BFF cells. The results of qRT-PCR showed that the two designed shRNAs could inhibit the expression of buffalo YY1 mRNA, the shRNA2 fragment had significantly higher inhibition effect than shRNA1 (93.64% v 50.77%) ($P < 0.05$). The results of Western-blot analysis confirmed that the two shRNAs had inhibition effect on gene expression of buffalo YY1. The above results indicated that the CDS sequence of buffalo YY1 was obtained, two effective shRNA fragments targeting buffalo YY1 gene were selected, which laid foundation for further study the role of YY1 gene in buffalo embryo development.

Key words: buffalo YY1 gene; shRNA; lentiviral expression vector; gene expression

阴阳因子 1 (Yin Yang 1, YY1) 是一种广泛存在于生物体中并在进化上高度保守的转录因子, 它既可以作为基因表达过程中的激活因子, 又可以作为抑制因子参与许多基因的转录调控。研究发现, 哺乳动物生长发育和维持内环境稳定都需要依赖一定量的 YY1 基因表达^[1], 其参与了包括胚胎发育、细胞周期增殖、肿瘤生成、基因组印迹和 X 染色体失活等重要生命活动。YY1 基因敲除小鼠在着床前期发生胚胎致死现象^[2], YY1 基因的高表达会促进细胞的增殖并调控细胞周期。YY1 基因 mRNA 在卵母细胞成熟和胚胎早期发育过程中都有表达^[3]。有关人、黄牛、小鼠和猪的 YY1 基因 CDS 序列已成功克隆, 对水牛 YY1 基因仅知其部分 5' 上游序列。为此, 本研究首先对水牛 YY1 基因编码区序列进行了克隆, 同时构建 YY1 基因真核表达载体及其 shRNA 干扰载体, 筛选得到有效抑制水牛 YY1 基因表达的 shRNA 序列。以上研究结果为进一步采用“get or loss”模式研究 YY1 基因在水牛植入前胚胎中的表达规律及其功能打下了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料和试剂

真核表达载体 pEGFP-N1、慢病毒表达载体 pSicoR-GFP、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、293T 细胞和水牛胎儿成纤维细胞系为课题组保存; 引物合成及序列测定均由上海生工生物工程有限公司完成; pMD18-T 载体、Taq 酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接

酶、反转录酶 (AMV) 等购自大连 TaKaRa 公司; 普通质粒提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 去内毒素质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司; DMEM 和胎牛血清购自 Sigma 公司; Trizol 试剂、脂质体 LipofectamineTM LTX 购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 水牛 YY1 基因克隆、真核表达载体构建

收集水牛胎儿成纤维细胞 BFF, 采用 Trizol 试剂提取总 RNA, 在逆转录酶 (AMV) 作用下将其逆转录为 cDNA。根据 GenBank 中黄牛 YY1 基因序列 [NM_001098081.1] 设计扩增水牛 YY1 基因 CDS 引物, 序列: Fr: 5'-CTCGAGCTCCCTCAGCCTTCCTTC-3'; Rv: 5'-GAATTCGCTGGTTGTTTTGGCCTTA-3', 上下游引物两端分别加上 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切位点。通过降落 PCR 扩增 YY1 基因 CDS 全长序列, 反应总体积为 20 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60、58、56、54 $^{\circ}$ C 温度退火 30 s, 其循环数分别为 3、3、17、14, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 共 37 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 采用胶回收试剂盒回收目的片段, 将目的片段与 pMD18-T 载体连接。转化 DH5 α 细胞, LB 培养板上培养过夜。对质粒进行酶切鉴定并测序分析。*Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切 pMD18-T-YY1 和 pEGFP-N1 载体, 胶回收目的片段和线性化载体骨架, T4 DNA 连接酶连接后, 挑取克隆进行 Cracking 粗筛, 而后进行双酶切鉴定, 阳性克隆命名为 pYY1-EGFP-N1。

1.2.2 pYY1-EGFP-N1 载体在 BFF 中的表达

按照 OMEGA 公司去内毒素质粒提取试剂盒说明提取并纯化 pYY1-EGFP-N1 质粒,采用脂质体 Lipo-LTX 将表达质粒转染 BFF 细胞,以未转染组和空载体(pEGFP-N1)转染组为对照组。48 h 观察绿色荧光蛋白表达情况,72 h 后收集 BFF 细胞,采用 qRT-PCR 方法分析 YY1 基因的表达水平。

1.2.3 水牛 YY1 基因 shRNA 慢病毒载体构建及筛选

以黄牛 YY1 基因 CDS 序列为模板,设计并合成 2 条 shRNA 片段,分别为 shRNA1: 5'-CTCGAGCCGGGAGAGAACTCACCTCCTGAT-TCAAGAGATCAGGAGGTGAGTTCTCTCTTT-TTTGCGGCCGC-3', shRNA2: 5'-CTCGAGCCG-GCGACGGTTGTAATAAGAAGTTCTCGAGA-ACTTCTTATTACAACCGTCGTTTTTGGCGG-CCGC-3'。将 2 个 shRNA 片段分别连接到 pSicoR-GFP 载体中,命名为 pSicoR-GFP-YY1 shRNA1/2,同时构建了阴性对照质粒 pSicoR-GFP/-1864。采用酶切和测序鉴定重组质粒。采用脂质体转染,将构建的靶质粒(pYY1-EGFP-N1)与干扰质粒(pSicoR-GFP-YY1 shRNA1/2, pSicoR-GFP/-1864)以 1:1 比例进行共转染 293 细胞。48 h 后观察绿色荧光蛋白 EGFP 表达情况。72 h 收集转染细胞样品。采用 Trizol 裂解法提取总 RNA, DNase I 充分消化残留的 DNA 后,将其逆转录为 cDNA。稀释 cDNA 模板至终浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 备用于 qRT-PCR 分析。定量 PCR 引物: YY1 Forward: 5'-ATCGACCATGAGACGGTGGTT-3', Reverse: 5'-AGCAAATTCTGCTAGTTGT-3'; β -actin Forward: 5'-GCCCTGGCACCCAGCACAAAT-3', Reverse: 5'-GGAGGGGCCGACTCATCGT-3'。qRT-PCR 体系: $1 \mu\text{L}$ cDNA ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), $10 \mu\text{L}$ FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) ($2 \times$), $0.3 \mu\text{L}$ Primer Forward ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $0.3 \mu\text{L}$ Primer Reverse ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), RNase-Free ddH₂O 补足至 $20 \mu\text{L}$ 。扩增条件为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 40 个循环。以 β actin 基因为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 YY1 基因的相对表达量。各组试验至少重复 3 次,采用 SPSS 软件进行分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

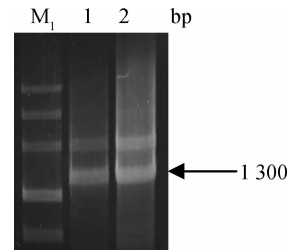
采用靶质粒与干扰质粒 1:6 共转染细胞样品用于 Western-blot 分析。采用 RIPA 裂解缓冲液及 PMSF 蛋白酶抑制剂处理提取细胞蛋白, SDS-

PAGE 凝胶电泳,蛋白上样总量调整为 $50 \mu\text{g}$ 。经转膜及一抗孵育过夜后(一抗稀释比: YY1 1:2 000, β -actin 1:1 000), HRP 标记山羊抗兔 IgG。使用 SYNGENE 凝胶成像分析仪进行显色并拍照。将各样品 YY1 蛋白和 β -actin 内参的 Western-blot 条带分别进行灰度值计算(Image J 2.1.4.7),并进行 YY1/ β -actin 灰度值比值计算,半定量分析目的蛋白的表达。

2 结果与分析

2.1 水牛 YY1 基因克隆及其真核表达载体构建

从水牛胎儿成纤维细胞提取总 RNA,逆转录成 cDNA 后,采用降落 PCR 方法扩增得到约 1300 bp 的片段(图 1),与预期相符。胶回收目的片段后,将其连接插入到 pMD18-T 载体中。采用 *Pst* I 酶切质粒,得到大小约为 3 900 和 400 bp 2 条带,与预期结果一致,说明获得 pMD18T-YY1 阳性克隆质粒(图 2)。阳性质粒测序结果显示,克隆得到水牛 YY1 基因 CDS 长度为 1 248 bp。BLAST 比对分析发现水牛 YY1 基因编码区序列与牛的同源性达 99%,分子进化树分析结果发现,水牛 YY1 基因与牛、人、小鼠和大鼠的亲源关系较近(图 3)。

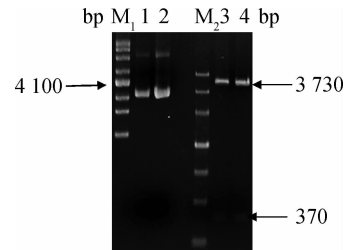


M₁. Marker III; 1, 2. PCR 扩增产物

M₁. Marker III; 1, 2. PCR products

图 1 水牛 YY1 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of buffalo YY1 gene



M₁. Super marker; 1, 2. pMD18T-YY1 质粒; M₂. Marker III; 3, 4. *Pst*I

M₁. Super marker; 1, 2. pMD18T-YY1 plasmid; M₂. Marker III; 3, 4. Plasmid digested by *Pst*I

图 2 pMD18T-YY1 酶切鉴定结果

Fig. 2 Restriction enzyme analysis of pMD18T-YY1 plasmid

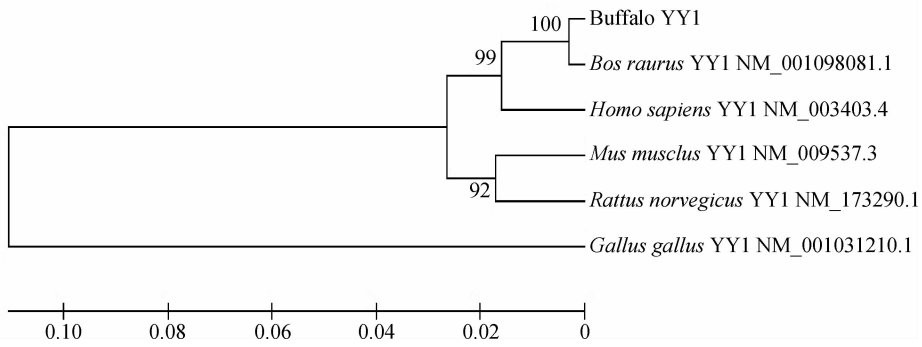
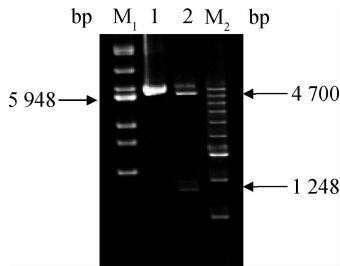


图 3 YY1 基因核苷酸序列进化树分析结果(NJ 法)

Fig. 3 Phylogenetic tree of YY1 gene nucleotide sequences

采用 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切 pMD18T-YY1 和 pEGFP-N1 载体质粒,分别回收 YY1 基因目的片段和载体骨架,将水牛 YY1 基因 CDS 片段定向插入 pEGFP-N1 载体,构建 pYY1-EGFP-N1 真核表达载体。经 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切得到约 4 700 bp 和 1 248 bp 的 2 条带,与预期相符,说明获得 pYY1-EGFP-N1 阳性克隆质粒(图 4)。



M₁. Super marker;1. pYY1-EGFP-N1 质粒;2. pYY1-EGFP-N1 质粒 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切;M₂. 500 bp DNA ladder marker

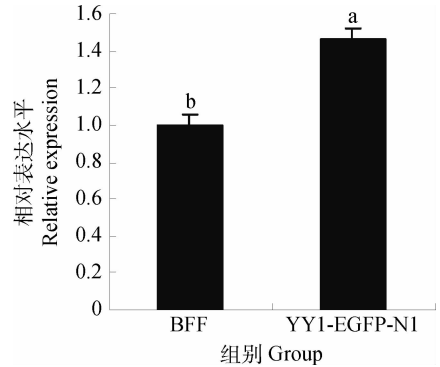
M₁. Super marker;1. pYY1-EGFP-N1;2. pYY1-EGFP-N1 digested by *Xho* I and *Eco*R I;M₂. 500 bp DNA ladder marker

图 4 pYY1-EGFP-N1 重组质粒酶切鉴定结果

Fig. 4 Restriction enzyme analysis of pYY1-EGFP-N1 plasmid

2.2 pYY1-EGFP-N1 载体在 BFF 中的表达

采用脂质体 (Lipofectamine[®] LTX and PLUS[™]) 转染试剂,将空载体 (pEGFP-N1) 和水牛 YY1 重组质粒 (pYY1-EGFP-N1) 转染 BFF 细胞,48 h 后荧光显微镜下观察均有 EGFP 绿色荧光蛋白的表达。72 h 后收集转染的 BFF 细胞,提取总 RNA,消化处理后反转录成 cDNA。qRT-PCR 结果显示,空转染组和 pYY1-EGFP-N1 重组质粒转染组细胞均表达内参基因 β actin;pYY1-EGFP-N1 重组质粒转染组细胞中 YY1 基因表达水平显著高于未转染组 ($P < 0.05$) (图 5)。以上结果表明,水牛体细胞表



BFF. 空载体转染组;YY1-EGFP-N1. YY1 重组质粒组。不同上标值表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同
BFF. Noplasmid; YY1-EGFP-N1. YY1-EGFP-N1 plasmid. Different letters mean significant difference between the samples ($P < 0.05$). The same as below

图 5 qRT-PCR 检测结果

Fig. 5 The qRT-PCR results of YY1 gene in transfected BFFs

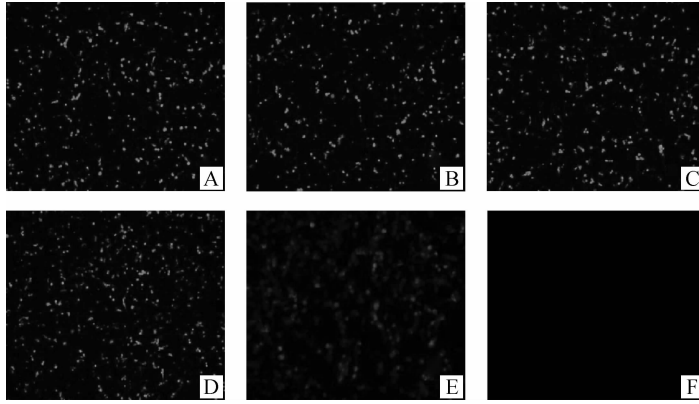
达 YY1 基因,构建的 pYY1-EGFP-N1 重组质粒可在 BFF 中瞬时表达。

2.3 水牛 YY1 基因 shRNA 慢病毒表达载体构建

将设计合成的 2 条水牛 YY 基因 shRNA 序列 (shRNA-1/2) 和 1 个阴性对照序列 (shRNA-1864 N. C) 分别连接插入慢病毒表达载体 pSicoR-GFP 中。采用 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切 pSicoR-GFP-YY1 shRNA1/2、pSicoR-GFP-1864 重组质粒,电泳结果显示,均得到约 70 bp (shRNA) 条带(图略),与预期大小一致,表明合成的 shRNA 片段已插入到 pSicoR-GFP 载体中。测序结果也显示,合成的 shRNA 片段与预期相符(图略)。

2.4 共转染 293T 细胞结果

将靶质粒 (pYY1-EGFP-N1) 与干扰质粒 (pSicoR-GFP-YY1 shRNA1/2, pSicoR-GFP/-1864) 以 1:1 的比例进行脂质体共转染 293T 细胞,48 h 后观察绿色荧光蛋白 EGFP 表达情况(图 6)。结果显



A. pYY1-EGFP-N1 和 pSicoR-GFP 转染组; B. pYY1-EGFP-N1 和 pSicoR-GFP-1864 转染组; C. pYY1-EGFP-N1 和 pSicoR-GFP-YY1shRNA1 转染组; D. pYY1-EGFP-N1 和 pSicoR-GFP-YY1shRNA2 转染组; E. pYY1-EGFP-N1 转染组; F. 未转染组(空白对照)

A. pYY1-EGFP-N1 and pSicoR-GFP transfected group; B. pYY1-EGFP-N1 and pSicoR-GFP-1864 transfected group; C. pYY1-EGFP-N1 and pSicoR-GFP-YY1shRNA1 transfected group; D. pYY1-EGFP-N1 and pSicoR-GFP-YY1shRNA2 transfected group; E. pYY1-EGFP-N1 transfected group; F. No-plasmid control

图 6 靶质粒与干扰质粒共转染 293T 细胞荧光观察结果 (1 : 1, 48 h)10×

Fig. 6 Results of the co-transfected 293T cells under fluorescence microscopy (target plasmid : interfered plasmid = 1 : 1, 48 h)10×

示,质粒共转染组以及载体骨架转染组 293T 细胞中均有绿色荧光;空白对照组细胞中没有荧光,与预期相符。结果表明构建的 2 条水牛 YY1 基因 shRNA 表达载体质粒均能在 293T 细胞表达。

2.5 共转染细胞 qRT-PCR 分析

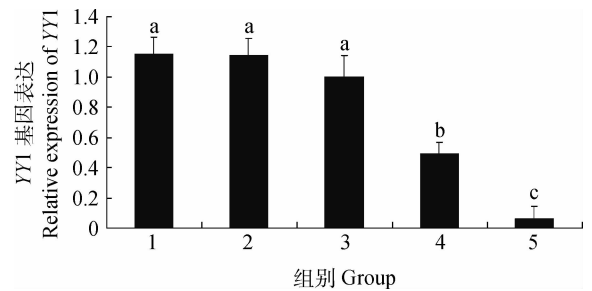
以 1 : 1 质量比共转染 293T 细胞,72 h 后收集细胞样品并提取总 RNA,反转录后进行 qRT-PCR 分析。结果表明,相对于 shRNA 1864 阴性对照组,YY1 基因 shRNA1、2 对水牛 YY1 基因的表达均有显著抑制效果,分别为 50.77%、93.64%;shRNA2 的抑制效果显著高于 shRNA1 ($P < 0.05$) (图 7)。

2.6 共转染细胞 Western-blot 分析

收集 1 : 6 质量比共转染 72 h 的细胞,提取总蛋白进行 Western-blot 分析,以 β -actin 为内参蛋白。Western-blot 结果如图 8A 所示;将各样品 YY1 蛋白和 β -actin 内参的条带分别进行灰度值计算,并进行 YY1/ β -actin 灰度值比值计算。灰度值半定量分析结果发现,与对照组 (3、5、6) 相比,shRNA1、2 对共转染细胞中 YY1 蛋白的表达均有抑制效果(图 8B)。

3 讨论

阴阳因子 1 (YY1, 也称 NF-E1、UCRBP) 是一种可通过多种机制改变基因表达的多功能蛋白。YY1 基因的 C 末端包含 GLI-Krüppel 锌指区可与



1. pYY1-EGFP-N1 质粒转染组; 2. pSicoR-GFP 质粒转染组; 3. pYY1-EGFP-N1 和 pSicoR-GFP-1864 共转染组; 4. pYY1-EGFP-N1 和 pSicoR-GFP-shRNA1 共转染组; 5. pYY1-EGFP-N1 和 pSicoR-GFP-shRNA2 共转染组

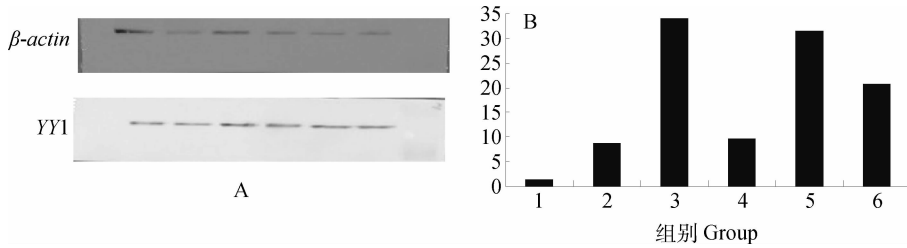
1. pYY1-EGFP-N1 plasmid; 2. pSicoR-GFP plasmid; 3. pYY1-EGFP-N1 and pSicoR-GFP-1864 plasmid; 4. pYY1-EGFP-N1 and pSicoR-GFP-shRNA1 plasmid; 5. pYY1-EGFP-N1 and pSicoR-GFP-shRNA2 plasmid

图 7 共转染细胞 YY1 基因表达分析

Fig. 7 Relative expression of YY1 gene in co-transfection cells

靶基因直接结合^[4],其功能结合序列能远程增强许多基因的表达,其中包括 *Snail* 和 *Otx2* 基因^[5-6]。YY1 基因结合位点在许多物种上是高度保守的,仅次于在特定细胞类型中会与 YY1 相结合作用的 SP1 保守蛋白^[7]。YY1 通过抑制或强化靶位点与其他转录激活因子的相互作用影响基因活性,例如 SP1 和 E2F 基因^[8-9];YY1 也可通过染色质修饰复合物(PRMT1 和多梳蛋白抑制复合物 PRC1/2)的相互作用参与基因表达的表观调控^[10]。

YY1 基因在雌雄性生殖系统发育过程中具有



A. Western-blot 分析结果; B. 灰度值计算比对结果 (YY1/β-actin)。1. pYY1-EGFP-N1 和 pSicoR-GFP-YY1shRNA2 共转染组; 2. pYY1-EGFP-N1 和 pSicoR-GFP-YY1 shRNA1 共转染组; 3. pYY1-EGFP-N1 和 pSicoR-GFP-1864 共转染组; 4. pYY1-EGFP-N1 和 pSicoR-GFP 共转染组; 5. pYY1-EGFP-N1 转染组; 6. 未转染组

A. Results of Western-blot analysis; B. Results of gray value ratio of YY1/β-actin. 1. pYY1-EGFP-N1 and pSicoR-GFP-YY1shRNA2; 2. pYY1-EGFP-N1 and pSicoR-GFP-YY1 shRNA1; 3. pYY1-EGFP-N1 and pSicoR-GFP-1864; 4. pYY1-EGFP-N1 and pSicoR-GFP; 5. pYY1-EGFP-N1; 6. No-plasmid control

图 8 共转染细胞样品 Western-blot 分析结果

Fig. 8 The Western-blot analysis of co-transfection cell samples

重要重要。研究发现缺失 YY1 基因的小鼠胚胎在胚胎植入前发生死亡^[2]。YY1 基因敲除会导致 GDF9 和 BMP15 不表达,并使得卵母细胞不对周围颗粒细胞发送增殖信号,卵泡的生长停滞在初级阶段。在生长的卵母细胞中,敲除 YY1 会导致卵泡扩展的衰竭和卵巢旁分泌信号缺乏。此外,YY1 可调节 Dnmt1 的表达,并且作用于成熟卵母细胞的 DNA 甲基化^[11]。在卵子发生过程中,适当的 YY1 蛋白水平可能是 Peg3 和 Xist DMRs 重新 DNA 甲基化所必需的^[12]。在雄性生殖细胞中,YY1 对 DNA 双链断裂修复和异染色质的形成起作用^[13]。

为了深入研究 YY1 基因在水牛早期胚胎发育过程中的功能作用,本研究首先克隆了水牛 YY1 基因,发现克隆的水牛 YY1 基因编码区为 1 248 bp,可编码 414 个氨基酸。水牛 YY1 基因核苷酸序列与牛、人、小鼠、大鼠、鸡的同源性都在 90% 以上,与牛的同源性达 99%,表明 YY1 基因在生物进化上的高度保守。构建的其真核表达载体 pYY1-EGFP-N1 可在水牛成纤维细胞中表达,说明载体构建成功并可用于后续筛选试验。设计合成了 2 条水牛 YY1 基因 shRNA 片段,通过核苷酸序列同源比对发现,设计合成的 2 条片段在黄牛、水牛以及人 YY1 基因上的同源性为 100%,预示设计的 shRNA 片段可用于相关物种 YY1 基因功能的研究。细胞共转染样品 qRT-PCR 分析结果表明,靶质粒与干扰质粒以 1:1 比例进行共转染时,2 条 YY1 基因 shRNA 片段均能有效抑制 YY1 基因的表达。在采用 Western-blot 方法分析 shRNA 抑制效率时,当靶质粒与干扰质粒以 1:1 比例共转染时,2 条 shRNA 片段的抑制效果不显著(结果未显示)。当以 1:6 比例

共转染细胞进行分析时,发现 shRNA1/2 对 YY1 蛋白的表达均有抑制效果。本研究结果为进一步阐明 YY1 基因表达与早期胚胎发育能力、与 DNA 甲基化关系奠定了基础。

参考文献:

- [1] AFFAR E, GAY F, SHI Y J, et al. Essential dosage-dependent functions of the transcription factor Yin Yang 1 in late embryonic development and cell cycle progression [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26 (9): 3565-3581.
- [2] DONOHOE M E, ZHANG X, MCGINNIS L, et al. Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(10): 7237-7244.
- [3] ZHENG P, PATEL B, MCMENAMIN M, et al. Expression of genes encoding chromatin regulatory factors in developing rhesus monkey oocytes and preimplantation stage embryos; possible roles in genome activation [J]. *Biol Reprod*, 2004, 70(5): 1419-1427.
- [4] GALVIN K M, SHI Y. Multiple mechanisms of transcriptional repression by YY1 [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(7): 3723-3732.
- [5] PALMER M B, MAJUMDER P, COOPER J C, et al. Yin Yang 1 regulates the expression of snail through a distal enhancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(2): 221-229.
- [6] TAKASAKI N, KUROKAWA D, NAKAYAMA R, et al. Acetylated YY1 regulates Otx2 expression in anterior neuroectoderm at two cis-sites 90 kb apart [J]. *EMBO J*, 2007, 26(6): 1649-1659.
- [7] LEE J S, GALVIN K M, SHI Y. Evidence for physi-

- cal interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993,90(13):6145-6149.
- [8] DONG X P, PFISTER H. Overlapping YY1- and aberrant SP1-binding sites proximal to the early promoter of human papillomavirus type 16 [J]. *J Gen Virol*, 1999,80(Pt 8):2097-2101.
- [9] YAKOVLEVA T, KOLESNIKOVA L, VUKOJEVIC V, et al. YY1 binding to a subset of p53 DNA-target sites regulates p53-dependent transcription [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004,318(2):615-624.
- [10] REZAI-ZADEH N, ZHANG X, NAMOUR F, et al. Targeted recruitment of a histone H4-specific methyltransferase by the transcription factor YY1 [J]. *Genes Dev*, 2003,17(8):1019-1029.
- [11] GRIFFITH G J, TRASK M C, HILLER J, et al. Yin-Yang1 is required in the mammalian oocyte for follicle expansion [J]. *Biol Reprod*, 2011,84(4):654-663.
- [12] KIM J D, KANG K, KIM J. YY1's role in DNA methylation of Peg3 and Xist [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009,37(17):5656-5664.
- [13] WU S, HU Y C, LIU H, et al. Loss of YY1 impacts the heterochromatic state and meiotic double-strand breaks during mouse spermatogenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 2009,29(23):6245-6256.

(编辑 程金华)