

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.07.008

SMYD3 对克隆猪早期胚胎发育的影响研究

恽雪丹, 张 艳, 黄时海, 曹丽华,
杨 婷, 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: 目的: 检测并分析 SMYD3 基因在猪卵母细胞体外成熟、孤雌激活胚胎与体细胞核移植早期胚胎中的表达模式, 研究 SMYD3 基因表达对猪核移植早期胚胎发育及多能性基因表达的影响. 方法: 通过在猪体细胞核移植胚胎中过表达和干扰 SMYD3 基因, 观察卵裂率、四细胞率和囊胚率, 并采用 RT-qPCR 检测不同处理组各时期 SMYD3 的表达情况以及多能性基因 *Nanog* 和 *Oct4* 的表达量. 结果: qRT-PCR 结果显示, SMYD3 基因在猪卵母细胞体外成熟过程中表达较低; 在孤雌激活和核移植早期胚胎发育过程中均呈现先升高后降低的表达规律, 其中在 4 细胞和 8 细胞期胚胎中表达较高. 过表达 SMYD3 基因显著提高猪核移植胚胎的囊胚率(14.63% vs 9.68%, $p < 0.05$), 下调 SMYD3 基因表达显著降低囊胚率(6.74% vs 9.68%, $p < 0.05$). 上调 SMYD3 组猪核移植囊胚 *Nanog* 和 *Oct4* 基因表达水平显著提高($p < 0.05$); 下调组囊胚中 *Nanog* 基因检测不出, *Oct4* 基因表达无显著差异. 结论: 上调 SMYD3 基因表达可提高猪体细胞克隆的囊胚发育率, 提高核移植胚胎体外发育能力.

关键词: SMYD3; shRNA; 体细胞核移植; 猪卵母细胞体外成熟

中图分类号: S828 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-9868(2021)07-0061-07

1997 年, Wilmut 等^[1]通过利用体细胞核移植技术成功地克隆出了世界上第一只体细胞克隆绵羊多利(Dolly), 它的诞生证明了高度分化的体细胞仍然具有全能性. 自此以来, 许多哺乳动物物种已经被成功克隆^[2]. 目前, 体细胞核移植技术虽然已取得了明显进展, 但还存在克隆效率比较低、克隆动物体型偏大、出生的克隆动物体不易存活等问题.

猪作为一种良好的经济动物, 也是最接近人的模式生物, 其 SCNT(Somatic Cell Nuclear Transfer)的低效率和后代异常限制了其在实践中的应用^[3]. 这些问题是由许多原因造成的, 目前人们主要的关注点是体细胞重编程不完全对体细胞核移植胚胎发育的影响^[4]. 为了提高 SCNT 的效率, 包括使用不同类型的供体细胞^[5]改善去核程序^[6], 延长从融合到激活的间隔^[7-8]等多种方法被用来调节供体细胞或克隆胚胎的表观遗传修饰.

包含 SET 和 MYND 域的蛋白质 3(SMYD3)是一种组蛋白 H3 赖氨酸 4 甲基转移酶, 在转录调控中起重要作用. 多年来研究者在某些癌细胞系中研究了 SMYD3 的表达, 在卵母细胞^[9]和胚胎中的作用也逐渐被揭示. Bai 等^[10]发现 SMYD3 基因能够提高牛成纤维细胞 iPSCs 诱导效率, 具有体细胞重编程作用. 而在早期胚胎发育中, SMYD3 也具有重要的作用^[10-12]. 本研究采用 RNA 干扰(RNAi)和过表达等技术方法, 通过调控德保猪耳成纤维细胞 SMYD3 基因的表达, 探讨其在猪体细胞核移植过程中的重编程作用,

收稿日期: 2021-03-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060754); 广西自然科学基金项目(2020GXNSFAA238039, 2019GXNSFDA185005, 2019GXNSFDA185005); 广西创新驱动发展专项(AA17204051).

作者简介: 恽雪丹, 硕士研究生, 主要从事动物遗传与繁殖研究.

通信作者: 李湘萍, 研究员, 博士研究生导师.

为提高猪体细胞克隆效率奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材 料

细胞: 德保猪耳缘成纤维细胞来自广西壮族自治区畜牧研究所, 293T 细胞和猪颗粒细胞来自于本实验室, 卵母细胞抽取自南宁屠宰场提供的猪卵巢.

质粒: pSicoR-GFP-SMYD3 shRNA 来自南京金斯瑞生物科技有限公司, 其他所用质粒均来自本实验室. 猪 SMYD3 基因 shRNA 序列为(5'-CTCGAGCCGGCCACAAGCGAGAATGCAAATTCAAGAGATT TGCATTCTCGCTTGTGGTTTTTTGGCGGCCGC-3').

试剂: X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent(Roche 公司); Trizol Reagent(Invitrogen 公司); DNA 聚合酶、qRT-PCR 试剂盒(Takara 公司); 普通质粒提取试剂盒、DNA Markers(天根生化科技有限公司); TransIntre™ EL Transfection(全式金生物技术有限公司). 无特殊说明的其余实验试剂均来自于 SIGMA 公司.

引物: 克隆及定量引物由上海生工公司合成(表 1).

表 1 实时荧光定量 qRT-PCR 引物

引物名称	引物序列	退火温度/℃
<i>Oct4 F</i>	5'-CTGAGGTGAGAGAGTCCGGC-3'	59
<i>Oct4 R</i>	5'-GGATGTTGGCGTCACATTCTT-3'	
<i>SMYD3 F</i>	5'-GGGACCAGTACTTCGAG-3'	58.5
<i>SMYD3 R</i>	5'-GCTGCTTATGATCGTCTGGC-3'	
<i>Nanog F</i>	5'-TCCTCTTCCTTCCTCCAT-3'	58.5
<i>Nanog R</i>	5'-TCCTTCTCTGTGCTCTTC-3'	
18S F	5'-GGACCTGACCGACTACCTCA-3'	58
18S R	5'-CCATCTCCTGCTCGAAGTCC-3'	

1.2 细胞转染

在前期实验中我们已分别将 pSicoR-GFP-1864 和 pSicoR-GFP-SMYD3 shRNA 表达载体转染细胞, 转染 48 h 后观察发现空白组细胞无绿色荧光蛋白表达, pSicoR-GFP-1864 阴性对照组和 pSicoR-GFP-SMYD3 shRNA 处理组细胞均有绿色荧光表达. 72 h 后收集细胞, 提取总 RNA, qRT-PCR 结果显示与空白组和阴性对照组相比, SMYD3 基因在处理组细胞中表达显著降低($p<0.05$), SMYD3 基因 shRNA 干扰效率为 54%.

利用转染试剂将本实验室预先构建好并经酶切鉴定的过表达重组质粒 pLVX-IRES-ZsGreen1-SMYD3 以及干扰重组质粒 SMYD3-GFP-shRNA 分别与包装质粒 NRF、包膜质粒 VSVG 以 5 : 3 : 2 的比例转染 293T 细胞, 转染培养 72 h 后收集病毒.

将猪成纤维细胞以相同的细胞数接种到 24 孔板中, 当 24 孔板内的细胞汇合度达到 70%时, 向每孔 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)培养基里加入病毒以及终质量浓度为 8 $\mu\text{g/mL}$ 的助感染剂 polybrene. 加入 MOI(Multiplicity of Infection)值为 5 的过表达 SMYD3 基因病毒细胞作为上调 SMYD3 组, 加入 MOI 值为 0.8 的 shRNA 病毒作为下调 SMYD3 组, 未处理的细胞作为空白对照组.

1.3 猪卵母细胞体外成熟

用 75%酒精对保温取回的卵巢进行消毒, 再用 33 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水清洗 2~3 遍, 用 10 mL 无菌注射器抽取直径为 3~6 mm 的卵泡, 在体式显微镜下用捡卵针检出有 3 层以上卵丘细胞的卵丘—卵母细胞复合物(Cumulus oocyte complexes, COCs). 把检出的 COCs 转移到提前预热的 PM(Pericyte Medium)成熟培养盘, 放入 38 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 100%湿度的培养箱中培养.

1.4 卵母细胞孤雌激活

将培养 44 h 的 COCs 吸出, 放到提前预热含 0.1%透明质酸酶的 CCM(Cell Culture Medium)中轻轻吹打, 挑选出含极体的成熟裸卵, 将裸卵放入电融合槽融合和激活, 激活参数为 100 V(以每 1 mm 电激槽宽计)、80 μ s、3 次电脉冲. 激活后的裸卵移到胚胎培养液 PZM-3 中, 在 38 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 100%湿度的培养箱中培养, 收集 2 细胞、4 细胞、8 细胞、16 细胞和囊胚.

1.5 核移植

分别培养未处理、过表达 SMYD3 基因和抑制 SMYD3 基因表达的 5~7 代猪成纤维细胞作为供体. 成熟的卵母细胞如 1.3 相同方法去除颗粒细胞后, 在镜下采用盲吸法去核. 吸取表面圆滑、形态规则的供体, 然后注入卵母细胞卵周隙内(对于上调和下调 SMYD3 基因表达的成纤维细胞需在荧光显微镜下挑选绿色荧光蛋白表达的细胞作为供体). 将重构卵进行电激活, 融合/激活参数为 83 V(以每 1 mm 电激槽宽计), 100 μ s, 1 次直流脉冲. 将融合/激活完的重构卵转移到 PZM-3(Porcine Zygote Medium-3)中, 放到 38 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 100%湿度的培养箱中进行培养. 以不同供体进行的核移植, 分为对照组、过表达 SMYD3 组、抑制 SMYD3 组.

1.6 微量反转录和 qRT-PCR

按试剂盒说明提取各组细胞 RNA 后, 在 PCR 仪中进行反转录, 反转录条件为 25 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 90 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min. 以微量反转的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 试验, 定量引物序列见表 1, 反应体系见表 2, 反应条件参照说明书. 内参基因是 18S, 依据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 SMYD3, *Nanog* 和 *Oct4* 基因的表达情况.

表 2 qRT-PCR 反应体系

反应体系成分	添加量/ μ L	反应体系成分	添加量/ μ L
SYBR Premix Ex Taq	10	Reverse Primer	0.5
cDNA	1	ddH2O	8
Forward Primer	0.5		

2 结 果

2.1 SMYD3 基因在体外成熟猪卵母细胞和早期胚胎中的表达模式

qRT-PCR 结果显示, SMYD3 基因在猪卵母细胞体外成熟过程中表达较低, 显著低于孤雌激活(囊胚除外)和核移植早期胚胎表达水平($p<0.05$). SMYD3 基因在 MII 期和 GV(Germinal Vesicle)期表达水平差异不具有统计学意义($p>0.05$); 在孤雌激活早期胚胎中, SMYD3 基因表达从 2 细胞期开始升高, 4 细胞期最高, 随后降低, 呈现出先升高再降低的表达趋势(图 1). SMYD3 基因在猪核移植早期胚胎中也呈现出先升高再降低的趋势, 4 细胞期表达量低于 2 细胞期, 但差异不显著($p>0.05$), 随后在 8 细胞期达到最高, 然后降低(图 2).

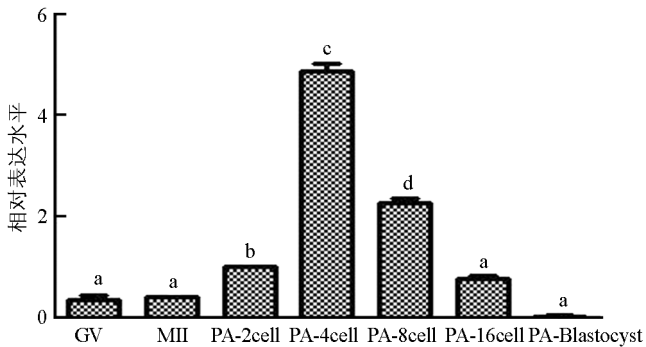


图 1 SMYD3 基因在猪卵母细胞成熟和孤雌早期胚胎发育中的表达

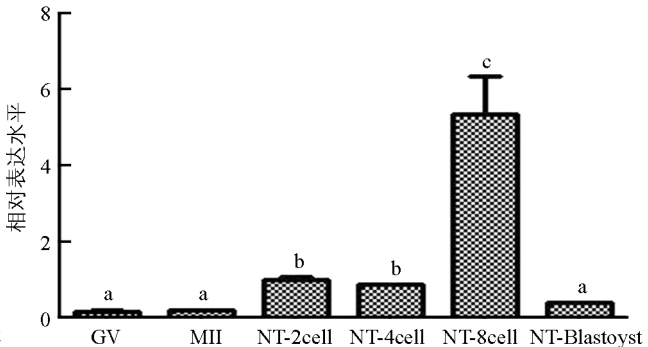


图 2 SMYD3 基因在体细胞核移植早期胚胎发育中的表达

上标不同字母表示相同时期各组之间差异具有统计学意义($p<0.05$). 上标不同字母表示相同时期各组之间差异具有统计学意义($p<0.05$).

2.2 调控猪成纤维细胞 *SMYD3* 基因表达对体细胞核移植早期胚胎发育的影响

统计结果显示,核移植胚胎的 2 细胞分裂率在各实验中差异不具有统计学意义($p>0.05$). 上调 *SMYD3* 组核移植胚胎的 4 细胞率显著高于对照组[(45.6%±1.65%) vs (42%±0.56%), $p<0.05$], 下调组 4 细胞率与对照组差异不具有统计学意义($p>0.05$). 与对照组相比,上调 *SMYD3* 组核移植胚胎的囊胚率显著提高[(14.6%±0.96%) vs (9.6%±0.19%), $p<0.05$], 下调组囊胚率显著降低[(6.7%±0.71%) vs (9.6%±0.19%), $p<0.05$](表 3).

表 3 调控 *SMYD3* 基因表达对猪体细胞核移植胚胎发育的影响

处理组	培养胚胎数(重复数)	分裂胚胎数(%, ≥2-cell)	4 细胞数(%, 4-cell)	囊胚数(%)
Blank	176(3)	99(56.63±1.97) ^a	74(42.04±0.56) ^a	17(9.68±0.19) ^a
shRNA	131(3)	67(51.14±0.83) ^a	54(39.35±2.14) ^a	9(6.74±0.71) ^b
<i>SMYD3</i>	146(3)	85(59.19±0.91) ^a	66(45.60±1.65) ^b	22(14.63±0.96) ^c

注:同一列上标的值不同表示差异具有统计学意义($p<0.05$).

qRT-PCR 结果显示,与对照组相比,上调组 *SMYD3* 基因表达水平在 2 细胞和 4 细胞期胚胎中显著提高($p<0.05$), 下调组 *SMYD3* 基因检测不出. 上调组 2 细胞期胚胎的 *SMYD3* 基因表达显著高于 4 细胞期($p<0.05$)(图 3).

2.3 调控 *SMYD3* 基因表达对猪核移植囊胚多能性基因表达的影响

与对照组相比,上调 *SMYD3* 组囊胚的 *Nanog* 和 *Oct4* 基因表达水平显著提高($p<0.05$). 下调组囊胚中 *Nanog* 基因检测不出, *Oct4* 基因表达低于对照组,但差异不具有统计学意义($p>0.05$)(图 4).

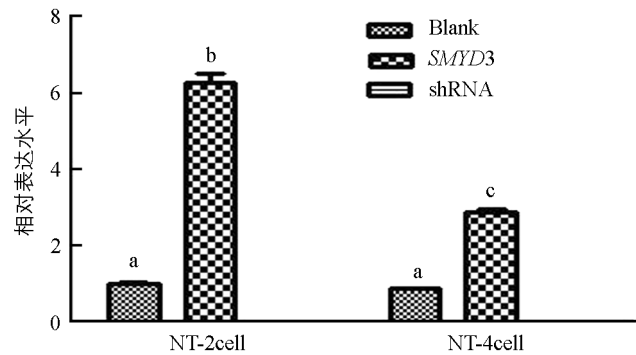


图 3 *SMYD3* 基因在体细胞核移植 2 细胞和 4 细胞期中的表达水平

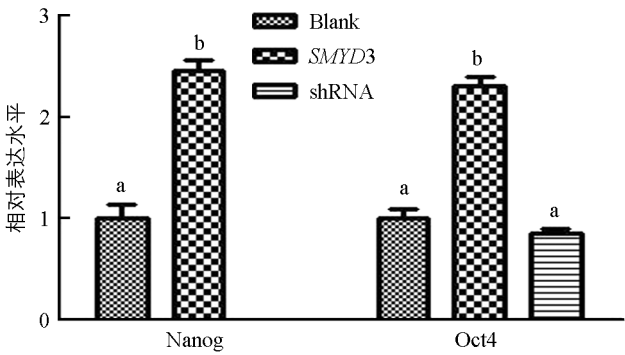


图 4 猪体细胞核移植囊胚 *Oct4* 和 *Nanog* 基因表达水平

3 分析讨论

近年来,体细胞核移植产生的动物克隆效率低,胚胎表型异常和生存能力低被认为是供体核的重编程不完全所致. 起初 Bourc'his 等^[13]通过免疫荧光来跟踪染色体上的整体基因组甲基化变化,结果显示在受精的牛体细胞核移植胚胎中植入前甲基化具有与自然繁殖的哺乳动物胚胎相似的模式,但其甲基化动力学过程有着不同程度的紊乱. 而 Dean 等^[14]对小鼠、猪和牛的比较研究中进一步印证了哺乳动物中甲基化的保守性与体细胞移植胚胎甲基化的异常. 之后研究者利用亚硫酸氢盐分析法对这种异常的甲基化进一步分析表明,在牛核移植桑葚胚和囊胚与牛体外受精胚胎相比 DNA 甲基化水平较高,水平与供体细胞 DNA 甲基化类似^[15]. 同样在身为大动物的猪中,研究者也发现与 IVF(In Vitro Fertilization)

早期胚胎相比,发现组蛋白甲基化水平在核移植早期胚胎中异常^[16],H3K36me3 在猪体细胞核移植早期,即胚胎 1 细胞时期不能被完全去甲基化^[17].在核移植早期胚胎中 DNA 和组蛋白甲基化水平异常,而体细胞重编程不完全造成了这些异常的甲基化水平.

多年研究表明,SMYD3 能通过使染色体组蛋白 H3K4 发生二甲基化、三甲基化或抑制 H4K5/H4K20 的甲基化,来改变染色质的可及性以及影响下游多种功能基因,从而参与抑制肿瘤细胞凋亡、促进细胞增殖等生命活动过程. Bai 等^[10]发现过表达 SMYD3 基因可提高牛胎儿成纤维细胞 iPSCs 诱导效率,证实其具有促进牛体细胞重编程的作用.而下调 SMYD3 基因表达对斑马鱼、小鼠和牛胚胎发育具有不利影响,证明 SMYD3 基因对胚胎发育有重要作用^[9-12].因此,本文先分析了 SMYD3 基因在猪卵母细胞体外成熟和早期胚胎发育过程中的表达模式,发现在猪卵母细胞体外成熟过程中 SMYD3 基因表达无显著性差异,这与前人对多数哺乳动物的研究相符合.而体外成熟过程中 SMYD3 基因表达低于孤雌激活(囊胚除外)和核移植早期胚胎发育过程,这种表达模式不同于牛来源细胞中的研究,本文推测这种差异性来自于获得早期胚胎的方式不同,或存在物种差异. SMYD3 基因在孤雌激活和核移植早期胚胎发育中均呈现出先升高后降低的表达趋势,却分别在 4 细胞期和 8 细胞期达到峰值,说明 SMYD3 基因参与两者发育过程中的时间存在差异.早期胚胎发育到 4 细胞至 8 细胞期,正处于大批合子型基因转录时期,这种状态将一直持续到早期囊胚;而 8 细胞期阶段胚胎正处于母型调控向合子型调控转变的时期,也是在离体培养过程中需要克服发育阻断现象的时期,涉及早期胚胎发育基因的适时激活,瞬时表达、定位或消失等基因调控机制. Li 等^[18]对猪孤雌胚胎与体外受精胚胎发育过程中的染色质重编程进行比较,发现孤雌胚胎在合子基因组激活的 4 细胞时期存在特殊的染色质区室解体过程. SMYD3 在上述阶段的表达差异,提示其在调控胚胎重编程的过程中应有重要作用.

Oct4 基因在 4~8 细胞期被激活,被认为是在早期发育过程中参与第 1 次细胞命运决定,使细胞发育为滋养层或保留一部分全能细胞的关键因子.第 2 次命运决定出现在囊胚期,内细胞团部分保持亚全能性,部分分化为原始胚层, *Nanog* 在这时期起决定作用^[19].两者作为多能性标志因子,其表达水平对早期胚胎重编程具有重要作用.前人研究表明,下调 SMYD3 基因表达在小鼠 IVF 囊胚中抑制 *Nanog* 和 *Oct4* 等多能性基因表达^[9]. Bai 等^[10]在牛 IVF 胚胎中下调 SMYD3 基因表达会出现发育阻滞的现象,能显著促进 8 细胞期胚胎 *Nanog* 基因表达,对 *OCT4* 基因无显著影响.本实验检测了猪核移植囊胚 *Nanog* 和 *Oct4* 基因表达情况,其中下调 SMYD3 组囊胚 *Nanog* 基因检测不出,证明下调 SMYD3 基因可以抑制 *Nanog* 基因表达. *Nanog* 基因表达水平较低难以检出,与小鼠研究结果相符,与牛研究结果不同,推测原因可能是胚胎时期或来源不同所造成的结果差异;与对照组相比,下调 SMYD3 组囊胚 *OCT4* 基因无显著差异,与小鼠研究结果不同,推测存在物种差异.上调 SMYD3 基因表达促进囊胚中 *Nanog* 和 *Oct4* 基因表达,初步说明 SMYD3 基因促进了猪核移植早期胚胎的重编程,具有促进猪体细胞重编程的作用.

4 结 论

1) SMYD3 基因在猪卵母细胞体外成熟过程中表达较低,在孤雌激活和核移植早期胚胎发育过程中均呈现出先升高后降低的表达模式.

2) 上调 SMYD3 基因表达可提高猪体细胞克隆的囊胚发育率,促进 *Nanog* 和 *Oct4* 基因表达提高核移植胚胎体外发育能力.

参考文献:

- [1] WILMUT I, SCHNIEKE A E, MCWHIR J, et al. Viable Offspring Derived from Fetal and Adult Mammalian Cells [J]. Cloning and Stem Cells, 2007, 9(1): 3-7.
- [2] CIBELLI J B. Cloned Transgenic Calves Produced from Nonquiescent Fetal Fibroblasts [J]. Science, 1998, 280(5367): 1256-1258.
- [3] YANG X, SMITHS L, TIAN X C, et al. Nuclear Reprogramming of Cloned Embryos and Its Implications for Therapeutic Cloning [J]. Nature Genetics, 2007, 39(3): 295-302.
- [4] 曹 慧, 苏文龙, 倪俊卿, 等. 哺乳动物体细胞核移植重编程研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(1): 100-106.
- [5] ENRIGHT B P, JEONG B S, YANG X, et al. Epigenetic Characteristics of Bovine Donor Cells for Nuclear Transfer: Levels of Histone Acetylation [J]. Biology of Reproduction, 2003, 69(5): 1525-1530.
- [6] KÜHHOLZER B, BAGUISI A, OVERSTRÖME W. Long-Term Culture and Characterization of Goat Primordial Germ Cells [J]. Theriogenology, 2000, 53(5): 1071-1079.
- [7] WAKAYAMA S, CIBELLI J B, WAKAYAMA T. Effect of Timing of the Removal of Oocyte Chromosomes before or after Injection of Somatic Nucleus on Development of NT Embryos [J]. Cloning and Stem Cells, 2003, 5(3): 181-189.
- [8] WANG H L, CHANG Z L, LI K L, et al. Caffeine can be Used for Oocyte Enucleation [J]. Cellular Reprogramming, 2011, 13(3): 225-232.
- [9] PHILLIPS T C, WILDT D E, COMIZZOLI P. Incidence of Methylated Histones H3K4 and H3K79 in Cat Germinal Vesicles is Regulated by Specific Nuclear Factors at the Acquisition of Developmental Competence during the Folliculogenesis [J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2016, 33(6): 783-794.
- [10] BAI H, LI Y, GAO H, et al. Histone Methyltransferase SMYD3 Regulates the Expression of Transcriptional Factors during Bovine Oocyte Maturation and Early Embryonic Development [J]. Cytotechnology, 2016, 68(4): 849-859.
- [11] FUJII T, TSUNESUMI S, YAMAGUCHI K, et al. Smyd3 is Required for the Development of Cardiac and Skeletal Muscle in Zebrafish [J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23491.
- [12] SUZUKI S, NOZAWA Y, TSUKAMOTO S, et al. Histone Methyltransferase Smyd3 Regulates Early Embryonic Lineage Commitment in Mice [J]. Reproduction (Cambridge, England), 2015, 150(1): 21-30.
- [13] BOURC'HIS D, LE BOURHIS D, PATIN D, et al. Delayed and Incomplete Reprogramming of Chromosome Methylation Patterns in Bovine Cloned Embryos [J]. Current Biology, 2001, 11(19): 1542-1546.
- [14] DEAN W, SANTOS F, STOJKOVIC M, et al. Conservation of Methylation Reprogramming in Mammalian Development: Aberrant Reprogramming in Cloned Embryos [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(24): 13734-13738.
- [15] KANG Y K, KOO D B, PARK J S, et al. Aberrant Methylation of Donor Genome in Cloned Bovine Embryos [J]. Nature Genetics, 2001, 28(2): 173-177.
- [16] CAO Z, LI Y, CHEN Z, et al. Genome-Wide Dynamic Profiling of Histone Methylation during Nuclear Transfer-Mediated Porcine Somatic Cell Reprogramming [J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144897.
- [17] DIAO Y F, OQANI R K, LI X X, et al. Changes in Histone H3 Lysine 36 Methylation in Porcine Oocytes and Preimplantation Embryos [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e100205.
- [18] LI F, WANG D, SONG R, et al. The Asynchronous Establishment of Chromatin 3D Architecture between in Vitro Fertilized and Uniparental Preimplantation Pig Embryos [J]. Genome Biology, 2020, 21(1): 203-224.
- [19] MITSUI K, TOKUZAWA Y, ITOH H, et al. The Homeoprotein Nanog is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells [J]. Cell, 2003, 113(5): 631-642.

Study on the Effect of SMYD3 on the Early Embryonic Development of Cloned Pigs

YUN Xue-dan, ZHANG Yan, HUANG Shi-hai,
CAO Li-hua, YANG Ting, SHI De-shun, LI Xiang-ping

*State Key Laboratory of Agro-biological Resources Protection and Utilization in
Subtropical Region, Guangxi University, Nanning 530004, China*

Abstract: Objective: To detect the expression pattern of SMYD3 gene in porcine oocytes in vitro maturation, parthenogenetic activation of embryos and somatic cell nuclear transfer early embryos, and to study the effect of regulating SMYD3 gene expression on porcine nuclear transfer early embryo development and pluripotency gene expression. Methods: Through overexpression and interference of SMYD3 gene in pig somatic cell nuclear transfer embryos, the lysis rate, four-cell rate and blastocyst rate were observed, and RT-qPCR was used to detect the expression of SMYD3 and pluripotency genes in different treatment groups. Results: The results of qRT-PCR showed that the expression of the SMYD3 was comparatively low during the in vitro maturation of pig oocytes. In the early embryonic development process of parthenogenetic activation and nuclear transfer, the expression of the SMYD3 gene first increased and then decreased, and the expression of the SMYD3 gene was higher in embryos at the 4-cell and 8-cell stages. Overexpression of the SMYD3 gene significantly increased the blastocyst rate of the pig nuclear transfer embryos (14.63% vs 9.68%, $p < 0.05$), while down-regulation of SMYD3 gene expression significantly reduced the blastocyst rate (6.74% vs 9.68%, $p < 0.05$). The expression levels of *Nanog* and *Oct4* genes in pig nuclear transfer blastocysts in the up-regulated SMYD3 group were significantly increased ($p < 0.05$); *Nanog* was not detected in down-regulated blastocyst, and the expression of *Oct4* showed no significant difference. Conclusion: Up-regulation of SMYD3 gene expression can increase the blastocyst rate and improve the in vitro development of pig nuclear transfer embryos.

Key words: SMYD3 (SET and MYND containing protein 3); shRNA; somatic cell nuclear transfer; in vitro maturation of porcine oocyte

责任编辑 夏娟