

胡新宇,邢凯,李征,等. 小鼠孵化囊胚及其休眠胚胎程序化冷冻-解冻前后 *Mgst1* 基因的差异表达 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 175-179.

Hu XY, Xing K, Li Z, et al. Investigation on the differential expression of *Mgst1* gene on mouse normal hatched blastocysts and dormant embryos before and after cryopreservation [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 175-179.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2020. 02. 004

小鼠孵化囊胚及其休眠胚胎程序化冷冻-解冻
前后 *Mgst1* 基因的差异表达

胡新宇¹,邢凯¹,李征²,赵志显¹,常雪蕊¹,齐晓龙¹,盛熙晖¹,王相国¹,
倪和民¹,郭勇^{1*}

(1. 北京农学院动物科学技术学院,北京 102206; 2. 北京市饲料监察所,北京 100107)

【摘要】 目的 通过对比小鼠孵化囊胚以及其休眠胚胎程序化冷冻并解冻处理前后 *Mgst1* 基因的相对表达情况,以及 *Mgst1* 蛋白的差异表达分布情况,分析 *Mgst1* 基因在小鼠胚胎程序化冷冻过程中发挥的作用,为胚胎抗冻机理研究提供新的理论基础。**方法** 使用激光共聚焦扫描显微镜采集 *Mgst1* 蛋白在胚胎中表达分布的免疫荧光图像;使用 qRT-PCR 技术鉴定 *Mgst1* 基因在胚胎中的相对表达量。**结果** 通过免疫荧光图像发现,*Mgst1* 蛋白在小鼠冷冻前后的孵化囊胚与休眠胚胎中均有表达;通过 qRT-PCR 发现,冷冻前的孵化囊胚与休眠胚胎的 *Mgst1* 基因相对表达无显著差异($P > 0.05$);冷冻后的孵化囊胚 *Mgst1* 基因相对表达量较冷冻之前显著上调($P < 0.05$);冷冻后的休眠胚胎 *Mgst1* 基因相对表达量较冷冻之前极显著上调($P < 0.01$);冷冻后的休眠胚胎 *Mgst1* 基因相对表达量较冷冻后的孵化囊胚显著上调($P < 0.05$)。**结论** *Mgst1* 基因可能在小鼠胚胎抗冻机制中发挥着重要的正调控作用。

【关键词】 孵化囊胚;休眠胚胎;程序化冷冻;*Mgst1*

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 02-0175-05

Investigation on the differential expression of *Mgst1* gene on mouse
normal hatched blastocysts and dormant embryos before and after
cryopreservation

HU Xinyu¹, XING Kai¹, LI Zheng², ZHAO Zhixian¹, CHANG Xuerui¹, QI Xiaolong¹, SHENG Xihui¹,
WANG Xiangguo¹, NI Hemin¹, GUO Yong^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China.
2. Beijing Institute of Feed Control, Beijing 100107)
Corresponding author: GUO Yong. E-mail: y63guo@126.com

【Abstract】 Objective To compare the relative expression of the *Mgst1* gene and the expression distribution of *Mgst1* protein in mouse hatching blastocysts and dormant embryos before and after cryopreservation. The role of the *Mgst1* gene during the programmed freezing of mouse embryos was analyzed to provide a new theoretical basis for the study of embryo-related antifreeze mechanisms. **Methods** Immunofluorescence images of the expression distribution of *Mgst1*

[基金项目] 2016 年度科技创新服务能力建设-科技计划重点项目(KZ201610020018)。
Funded by 2016 Technology Innovation Service Capacity Building-Key Projects of ScienceTechnology Plan (KZ201610020018)。
[作者简介] 胡新宇(1993—)男,硕士研究生,研究方向:产科与胚胎工程。Email:hu00hu000@163.com
[通信作者] 郭勇(1963—)男,教授,博导,研究方向:动物生殖生理与生物技术。Email:y63guo@126.com

protein in embryos were detected by confocal microscopy. By qRT-PCR, the relative gene expression of *Mgst1* was determined. **Results** *Mgst1* protein was expressed in mouse normal hatched blastocysts and dormant embryos before and after cryopreservation. There was no significant difference in the relative expressions of *Mgst1* gene between hatched blastocysts and dormant embryos before cryopreservation ($P > 0.05$). Compared with the normal hatched blastocysts before and after cryopreservation, the relative gene expression of *Mgst1* in normal hatched blastocysts was significantly upregulated after cryopreservation ($P < 0.05$), and its relative expression in dormant embryos was markedly upregulated after cryopreservation ($P < 0.01$). Compared with the normal hatched blastocysts after cryopreservation, the relative gene expression of *Mgst1* in dormant embryos was significantly upregulated ($P < 0.05$). **Conclusions** The *Mgst1* gene may play an important role in the antifreeze mechanism of mouse embryos.

【**Keywords**】 blastocysts; dormant embryo; cryopreservation; *Mgst1*

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

在实验用小鼠中,随着 1972 年 Whittingham 等^[1]将小鼠胚胎成功冷冻并复苏之后,即开启了动物源胚胎程序化冷冻的序章。经前期研究所示,小鼠休眠胚胎的抗冻能力要优于其正常孵化胚胎^[2]。通过 Affymetrix 表达谱芯片对四组胚胎(孵化囊胚、冷冻后孵化囊胚、休眠胚胎、冷冻后休眠胚胎)扫描时发现 *Mgst1* (microsomal glutathione S-transferase 1, 微粒体谷胱甘肽 S 转移酶 1) 基因在休眠胚胎冷冻前后具有显著差异^[3]。*Mgst1* 在肝脏,肿瘤及癌细胞中表达量较高,主要分布于内质网、微粒体和线粒体外膜,能够被氧化应激活化^[4-5]。在胚胎干细胞以及其体外诱导分化后都具有较高的表达量^[6]。Bräutigam 等^[7]通过 *Mgst1* KO/WT 小鼠研究发现其后代中没有 KO/KO 型小鼠的存在,且 KO/KO 型胚胎无法继续至 10 d 之后。因此,*Mgst1* 在胚胎前期乃至着床后发育中均具有至关重要的作用。由此,本实验将以 *Mgst1* 对于孵化及休眠胚胎抗冻性方面切入,通过对于胚胎中 *Mgst1* 的 mRNA 转录水平的差异表达显著性以及该蛋白在胚胎中表达分布情况,分析休眠胚胎抗冻性优于正常孵化囊胚的原因,为阐明哺乳动物胚胎在相关抗冻机理研究中提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本实验用 SPF 级 ICR 7 ~ 8 周龄雌雄鼠均购自北京市维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2016-0006】,饲养于北京农学院 SPF 级实验动物房【SYXK(京)2015-0004】,光照 7:00 ~ 19:00,自由采食饮水饲喂普通维持饲料由北京市维通利华实验动物有限公司提供,饲养环境:

昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22 ~ 25℃,所有操作均符合实验动物伦理学要求。饲养两周至性成熟(9 ~ 10 周龄),体重约 28 g 后,即可用于实验。

1.1.2 主要仪器试剂

胚胎冷冻保护剂(货号:101129)购自 ICP Bio Reproduction 公司;重组 Anti-Mgst1 抗体(货号:ab131059)购自 Abcam 公司;Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (FITC) (货号:ab6798)购自 Abcam 公司;TRIzol™ Reagent (货号:15596-018)购自 Thermo Fisher 公司;qRT-PCR 专用 UltraSYBR Mixture (High ROX)染料试剂盒(货号:CW2602M)购自北京康为世纪生物科技有限公司。

CO₂ 培养箱:Thermo Scientific Forma 371;普通光学显微镜(Nikon YS2-H);胚胎程序化冷冻仪(Cryobath-FREEZ CONTROL CL-8800i);电子天平(Sartorius, BSA124S);荧光定量 PCR 仪(安捷伦 AriaMx Real-Time PCR System G8830A);移液器[Eppendorf(1 mL, 200 μL, 100 μL, 10 μL)];掌心离心机(百晶, Qspin);单孔水浴锅(北京长安科学仪器厂);贝克曼高速离心机(Allegra 64R Centrifuge);载玻片;盖玻片;计时器。

1.2 方法

1.2.1 超排处理及胚胎获取

选择发情期或发情间期的 ICR 雌鼠,实验当晚 20:00,每只腹腔注射 10 IU 的 PMSG,48 h 后,每只小鼠再腹腔注射 10 IU hCG,然后与公鼠按 1:1 合笼,次日早 8:00 挑选出见栓小鼠用于后续实验^[8]。正常孵化囊胚于小鼠见栓第 5 天的早 8:00,通过用 PBS 液正、反双向冲洗其双侧子宫获取。休眠胚胎则在小鼠见栓后的第 4 天早 8:00,在彻底摘除小鼠双侧卵巢后,连续 3 d 颈部皮下注射 0.2 mg/mL 孕

酮(每只 0.1 mL),术后第 4 天早 8:00,用 PBS 液正、反双向冲洗其双侧子宫获取。回收的胚胎用 PBS 液充分洗涤后,进行常规程序化冷冻处理:将胚胎在 15℃ 中平衡 15 min 之后,以 1℃/min 降低至 -5℃,平衡 30 min,再以 0.33℃/min 降低至 -36℃。进行 37℃ 解冻复苏 2 h 后,移入 1.5 mL 无菌离心管中,放入 -80℃ 冰箱保存。

1.2.2 激光共聚焦检测 *Mgst1* 蛋白在胚胎上的分布

当日回收经由 PBS 工作液清洗的胚胎后,立即放入 4% 多聚甲醛中固定 30 min, PBS 清洗 3 min × 5 次后用 0.2% TritonX-100, PBS 通透 5 min。胚胎充分清洗后转移至 *Mgst1* 一抗中 4℃ 过夜。胚胎结

合一抗后用 0.05% Tween-20, PBS 洗涤后置于带有 FITC 标签的二抗中, 37℃ 孵育 1 h, 随后用 0.05% Tween-20, PBS 清洗胚胎并放入 PI(碘化丙啶)溶液中 37℃ 浸染 3 min, 浸染完成后将胚胎用 0.05% Tween-20, PBS 彻底清洗干净后, 胚胎置于带有微量 PBS 的载玻片上, 盖玻片四角点入微量凡士林压片, 中性树胶封片, 随后于激光共聚焦扫描显微镜中成像检测。

1.2.3 引物设计

根据 NCBI 基因数据库中小鼠 *Mgst1* (NM_001347489.2) 和 *GADPH* (NM_008084.3) 基因序列, 用 Primer3.0 软件网上在线设计实时荧光定量 PCR 引物, 引物序列见表 1。

表 1 荧光定量引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences			
基因	引物序列	产物长度 (bp)	退火温度 (℃)
Genes	Primer sequences/(5'→3')	Product length (bp)	Annealing temperature (℃)
<i>GAPDH</i>	Forward ATGGAAGCTTGTCAACG	115	59
	Reverse AAGACACCACTAGACTCCACG		
<i>Mgst1</i>	Forward TGATGTTTCATGAGCTCTGCC	114	59
	Reverse TGCGAACAACTTCTTGCGA		

1.2.4 qRT-PCR 检测胚胎冷冻前后 *Mgst1* mRNA 的表达变化

程序化冷冻前后胚胎通过 TRIzol 法提取其总 RNA, 随后放入 1 μg 反转体系中反转为 cDNA, 体系见表 2。使用荧光定量 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR 反应, 其反应体系为: 12.5 μL UltraSYBR Mixture (High ROX), 10.5 μL dd H₂O, 1 μL 上下游引物 1:1 混合物, 1 μL 反转体系后所得 cDNA。PCR 扩增程序: 预变性, 95℃, 30 s; 变性, 95℃, 5 s, 退火, 59℃, 30 s, 延伸, 72℃, 30 s, 40 个循环, 实验重复 3 次。

表 2 mRNA 反转录体系

Table 2 mRNA reverse transcription system	
试剂 Reagent	用量 Dosage
RNA	1 μg 体积
Oligo d(T) 18 primer	1 μL
M-MLV RT 5× buffer	4 μL
dNTP mixture	2 μL
M-MLV reverse transcriptase	1 μL
Recombinant mase Inhibitor(RRI)	1 μL
DEPC treated water	加至 20 μL

注: 加入 oligo dT 后, 70℃ 孵育 3 min, 随后置于冰上 3 min。随后依次加入其它物质并在 39℃ 条件下孵育 1 h 即可得到 cDNA。
Note. After adding oligo dT, incubate at 70℃ for 3 min, and then place on ice for 3 min. Subsequently, other materials were added sequentially and incubated at 39℃ for 1 h to obtain cDNA.

1.3 统计学分析

所得实验数据用 SPSS 22.0 软件进行 ANOVA

单因素方差分析, 使用 GraphPad Prism 7 软件制作数据分析图^[8]。

2 结果

2.1 *Mgst1* 蛋白在程序化冷冻前后小鼠正常孵化囊胚和休眠胚胎中表达分布

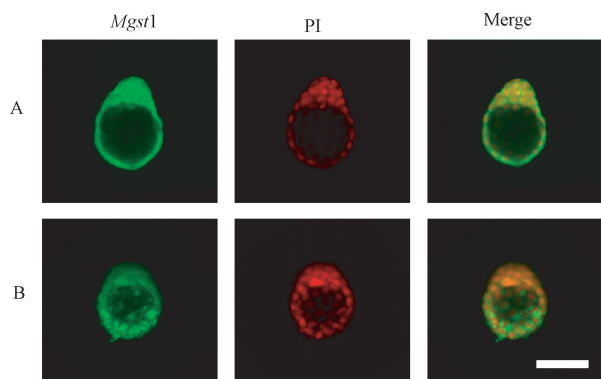
如图 1、图 2 所示, 通过共聚焦图像可以发现, *Mgst1* 蛋白在冷冻前后的正常与休眠胚胎中均有表达, 其表达区域位于细胞核外, 且主要分布于胚胎滋养层中。

2.2 qRT-PCR 检测结果

如图 3 所示, 经过程序化冷冻后的囊胚与休眠胚胎分别与其冷冻前的正常囊胚与休眠胚胎相比, *Mgst1* 基因的 mRNA 的相对表达量均显著性升高 ($P < 0.05$), 且经程序化冷冻后休眠胚胎与休眠胚胎相比, *Mgst1* 基因的 mRNA 的相对表达量极显著性升高 ($P < 0.01$); 与此同时, 经程序化冷冻后休眠胚胎与经过程序化冷冻后的正常孵化囊胚相比, *Mgst1* 基因的 mRNA 的相对表达量同样具有显著性升高趋势 ($P < 0.05$)。

3 讨论

超低温冷冻保存虽然能够长时间储存优质胚胎。到目前为止, 任何发育时期(原核时期、分裂时

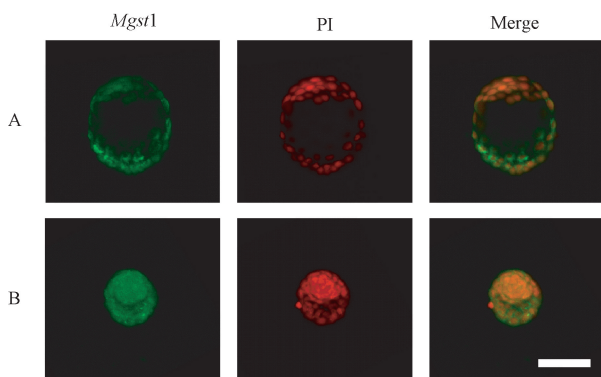


注:A:孵化囊胚;B:冷冻后孵化囊胚。绿色荧光代表 *Mgst1* 蛋白分布区域;红色荧光代表细胞核位置($\times 60$, 标尺=100 μm)。

图 1 *Mgst1* 蛋白在孵化囊胚冷冻前、后蛋白表达定位

Note. A, Hatched blastocysts. B, Blastocysts hatched after cryopreservation. Green fluorescent signal represents the distribution region of *Mgst1* protein. Red fluorescent signal indicates the nuclear location($\times 60$, Bar=100 μm).

Figure 1 Localization of *Mgst1* protein expression before and after cryopreservation in hatched blastocysts



注:A:休眠胚胎;B:冷冻后休眠胚胎。绿色荧光代表 *Mgst1* 蛋白分布区域;红色荧光代表细胞核位置($\times 60$, 标尺=100 μm)

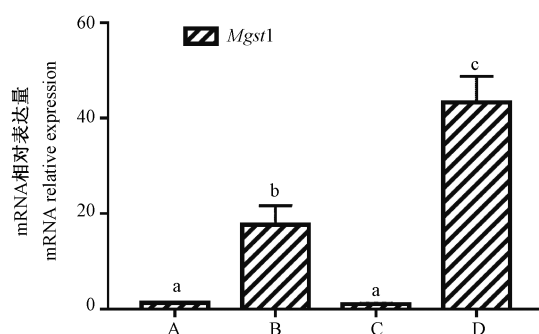
图 2 *Mgst1* 蛋白在休眠胚胎冷冻前、后蛋白表达定位

Note. A, Dormant embryos. B, Dormant embryos after cryopreservation. Green fluorescent signal represents the distribution region of *Mgst1* protein. Red fluorescent signal indicates the nuclear location($\times 60$, Bar=100 μm).

Figure 2 Localization of *Mgst1* protein expression before and after cryopreservation in dormant blastocysts

期、孵化囊胚)的胚胎,与其冷冻前相比,在移植后的存活率较之前仍有着较大差距。

Mgst1(微粒体谷胱甘肽 S-转移酶 1)是一种膜结合型谷胱甘肽转移酶,主要位于肝脏中,且在内质网以及线粒体内膜中表达量较高^[9]。由于其通过谷胱甘肽依赖性转移酶和过氧化物酶的活性,可对于活性中间体(其中包括代谢所产生的亲电中间体和亲脂性氢过氧化物)进行解毒,因此能够降低活性氧对于细胞膜的损伤程度^[10]。



注:A:孵化囊胚;B:冷冻后孵化囊胚;C:休眠胚胎;D:冷冻后休眠胚胎。上标相同字母表示差异无显著性, $P>0.05$;不同字母表示差异有显著性, $P<0.05$ 。

图 3 *Mgst1* 基因相对表达量分析图

Note. A, Normal hatched blastocysts. B, Blastocysts hatched after freezing. C, Dormant blastocysts. D, Dormant blastocysts after freezing. The same letter indicates that the difference is not significant, $P>0.05$. The different letters indicate that the difference is significant, $P<0.05$.

Figure 3 Relative expression of *Mgst1* gene

通过本实验已经证明,*Mgst1* 蛋白在小鼠的孵化囊胚、休眠胚胎以及经由程序化冷冻后的孵化囊胚和休眠胚胎中均有表达,其说明 *Mgst1* 蛋白在胚胎的早期发育及着床过程中有着重要的作用。先前的研究已经证实,*Mgst1* 能够减少氧化应激所产生的细胞凋亡现象^[11]。而在细胞冷冻之后,脱水所引起的渗透压剧烈变化以及低温保护剂毒性对细胞膜的损伤均可导致细胞膜功能丧失^[12]。因此冷冻后的细胞会产生氧化应激并导致线粒体膜通透性发生变化,其中的线粒体膜间细胞色素释放到细胞质中,进一步激活 caspase-9 活性,最终导致细胞凋亡^[13]。

qRT-PCR 结果显示,小鼠的孵化囊胚与休眠胚胎在经程序化冷冻后,其 *Mgst1* 基因的表达量均较冷冻之前显著上升。在胚胎着床时,*Mgst1* 在着床位点上表达量较高的胚胎有着较高的生物学活性^[14],且在其表达量下降人类患者中,胚胎将不能够正常着床^[15]。同时,程序化冷冻会对于细胞的生物膜系统构成损害^[16],以至于线粒体内膜在程序化冷冻过程中会遭到破坏,进而降低其线粒体本身功能^[17],使得细胞抗氧化应激能力大幅度下降^[18]。由于细胞自身具有抗氧化机制^[19],且 *Mgst1* 在氧化应激中有着重要的作用^[20]。因此,解冻后的胚胎此时很有可能在处于着床时期的同时经受氧化应激,进而使得胚胎 *Mgst1* 基因在短时间之内显著上调。

休眠胚胎,即胚胎滞育现象是动物为了能够更好地在环境中生存而进化出的一种能够保证物种繁育

的策略^[21-22]。且其与正常孵化囊胚之间有着大量表达差异的基因^[23]。在本实验中, *Mgst1* 的 mRNA 在冷冻后的休眠胚胎中的相对表达量极显著高于冷冻前的正常孵化囊胚与休眠胚胎。这可能是胚胎在经受冷冻氧化应激之后所采取的抗氧化措施。因此, 可以推测, *Mgst1* 很可能在胚胎的程序化冷冻过程中起到非常重要的作用。但其在抗冻过程中能否起到决定性的作用, 需进行进一步具体探究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to 196 degrees and 269 degrees [J]. Science, 1972, 178 (4059): 411-414.
- [2] 顾美超, 卢天罡, 刘云海, 等. 冻融后小鼠休眠胚胎超微结构的变化 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 53-56+61. Gu MC, Lu TG, Liu YH, et al. Ultrastructural observation of dormant mouse embryos cultured in vitro after freezing-thawing [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(3): 53-56+61.
- [3] 张劭侯, 刘云海, 倪和民, 等. 经程序化冷冻的小鼠休眠胚胎的基因表达谱差异分析 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20 (5): 15-20. Zhang SY, Liu TH, Ni HM, et al. Gene expression profile analysis of dormant mouse embryos preserved by controlled slow freezing [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2012, 20(5): 15-20.
- [4] 何涓. *MGST1* 在 NSCLC 中促进增殖、抑制凋亡及降低顺铂敏感性的初步研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2016. He J. Preliminary study on *MGST1* promotes proliferation, inhibits apoptosis and reduces cisplatin sensitivity in NSCLC [D]. Kunming: Kunming Medical University, 2016.
- [5] 曾宝真. *MGST1* 抑制肺腺癌细胞的凋亡及其机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2017. Zeng BZ. The mechanism of *MGST1* inhibits apoptosis of human lung adenocarcinoma cell [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2017.
- [6] 许玲莉. 小鼠胚胎干细胞不同分化阶段 *UGT1a1*、*UGT1a6* 和 *Mgst1* 的表达特征 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(28): 4130-4135. Xu LL. Characterization of *UGT1a1*, *UGT1a6* and *Mgst1* at different stages of differentiation of mouse embryonic stem cells [J]. J Clin Rehabil Tissue Eng, 2016, 20(28): 4130-4135.
- [7] Bräutigam L, Zhang J, Dreij K, et al. *MGST1*, a GSH transferase/ peroxidase essential for development and hematopoietic stem cell differentiation [J]. Redox Biol, 2018, 17: 171-179.
- [8] 崔榕东, 顾美超, 刘迪, 等. 通过优化超排后合笼时间高效获取小鼠孵化囊胚 [J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(5): 1253-1258. Zhai CD, Gu MC, Liu D, et al. Study on time period model for efficiently collecting hatched blastocysts flushed from murine uterus [J]. Chin Anim Husbandry Vet Med, 2015, 42(5): 1253-1258.
- [9] Shimoji M, Figueroa RA, Neve E, et al. Molecular basis for the dual subcellular distribution of microsomal glutathione transferase 1 [J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2017, 1859(2): 238-244.
- [10] Tan BL, Norhaizan ME, Liew WP, et al. Antioxidant and oxidative stress: A mutual interplay in age-related diseases [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1162.
- [11] Maeda A, Crabb JW, Palczewski K. Microsomal glutathione S-transferase 1 in the retinal pigment epithelium: protection against oxidative stress and a potential role in aging [J]. Biochemistry, 2005, 44(2): 480-489.
- [12] Lane M, Maybach JM, Gardner DK. Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development [J]. Human Reprod, 2002, 17(10): 2686-2693.
- [13] Xu X, Cowley S, Flaim CJ, et al. Enhancement of cell recovery for dissociated human embryonic stem cells after cryopreservation [J]. Biotechnol Prog, 2010, 26(3): 781-788.
- [14] Zhu D, Du Y, Huang X, et al. MAPEG expression in mouse embryonic stem cell-derived hepatic tissue system [J]. Stem Cells Dev, 2008, 17(4): 775-784.
- [15] Herington JL, Guo Y, Reese J, et al. Gene profiling the window of implantation: Microarray analyses from human and rodent models [J]. J Reprod Health Med, 2016, 2(1): S19-S25.
- [16] Giraud MN, Motta C, Boucher D et al. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa [J]. Human Reprod, 2000, 15(10): 2160-2164.
- [17] Kuznetsov AV, Kunz WS, Saks V, et al. Cryopreservation of mitochondria and mitochondrial function in cardiac and skeletal muscle fibers [J]. Anal Biochem, 2003, 319(2): 296-303.
- [18] Santini SJ, Cordone V, Falone S, et al. Role of mitochondria in the oxidative stress induced by electromagnetic fields: focus on reproductive systems [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 5076271.
- [19] 张世倡, 陈丽霁, 温露, 等. 氧化应激的抗氧化机制及靶向应用 [J]. 按摩与康复医学, 2019, 10(20): 65-67. Zhang SC, Chen LF, Wen L, et al. Antioxidant mechanism and targeted application of oxidative stress [J]. Chin Manipul Rehabil Med, 2019, 10(20): 65-67.
- [20] Kelner MJ, Bagnell RD, Montoya MA, et al. Structural organization of the microsomal glutathione S-transferase gene (*MGST1*) on chromosome 12p13.1-13.2. Identification of the correct promoter region and demonstration of transcriptional regulation in response to oxidative stress [J]. J Biol Chem, 2000, 275(17): 13000-13006.
- [21] Menke TM, McLaren A. Carbon dioxide production by mouse blastocysts during lactational delay of implantation or after ovariectomy [J]. J Endocrinol, 1970, 47(3): 287-294.
- [22] Lopes FL, Desmarais JA, Murphy BD. Embryonic diapause and its regulation [J]. Reproduction, 2004, 128(6): 669-678.
- [23] Paria BC, Das SK, Andrews GK, et al. Expression of the epidermal growth factor receptor gene is regulated in mouse blastocysts during delayed implantation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(1): 55-59.