

基于 RNA-Seq 技术的犏牛囊胚冷冻前后 单核苷酸多态性和可变剪切分析

郑杰¹, 张国忠¹, 胡艳梅¹, 伍学一¹, 杨宗富¹, 字向东²

(1. 攀枝花市妇幼保健院生殖医学中心, 攀枝花 617000;

2. 西南民族大学动物科学国家民委重点实验室, 成都 610041)

[摘要] 目的 对犏牛囊胚玻璃化冷冻前后的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)和可变剪切(alternative splicing, AS)进行比较分析。方法 采用普通娟珊牛精子和牦牛卵母细胞, 以体外授精(*in vitro fertilization*, IVF)的方式获得犏牛囊胚。提取犏牛新鲜囊胚和经玻璃化冷冻复苏后的犏牛冻融囊胚总 RNA, 构建文库并进行高通量测序。采用 SAMtools-0.1.19 和 ASprofile 软件分别进行 SNP 和 AS 分析。结果 犏牛新鲜囊胚和冻融囊胚样本通过去低质量序列、去接头污染等过程后, 分别得到 51 099 116 和 54 192 358 条待分析数据(Clean Reads)。新鲜囊胚和冻融囊胚分别检测到 116 681 和 224 750 个 SNP 位点。在新鲜囊胚转换型 SNP 中, C/T 类型数量略多于 A/G 类型; 但在冻融囊胚中, A/G 类型数量略多于 C/T 类型; 两样本颠换型 SNP 中, A/T 所占比例最少。新鲜囊胚和冻融囊胚转换和颠换型 SNP 的比例分别为 2.57 和 2.45。新鲜囊胚和冻融囊胚分别检测出 49 388 和 65 241 个 AS 事件, 主要有 5 种 AS 类型, 其中转录起始区域和转录结束区域 AS 所占比例最大。结论 利用 RNA-Seq 技术对玻璃化冷冻前后犏牛囊胚 SNP 和 AS 进行比较分析, 可为后续人类胚胎冷冻前后相关基因功能分析和挖掘提供有效数据和理论基础。

[关键词] 犏牛; 囊胚; 玻璃化冷冻; 转录组测序; 单核苷酸多态性; 可变剪切

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)04-0279-10

随着人类辅助生殖技术的飞速发展, 胚胎超低温保存已成为体外受精(*in vitro fertilization*, IVF)临床治疗中广泛应用的方法^[1]。同时, 胚胎超低温保存技术在女性生育力保存、供卵、降低多胎妊娠和卵巢刺激的风险等方面具有重要意义, 是目前唯一被美国生殖医学会认可的临床开展生育力保存的方法^[2-3]。玻璃化冷冻法(vitrification)因

具有冷冻效率高、操作简便、能有效避免冰晶的形成等优点, 成为目前应用最广泛、冷冻效率最高的胚胎超低温保存方法^[4]。然而即便选用玻璃化冷冻法对胚胎进行超低温冷冻, 胚胎也会不可避免地遭受一定程度的冷冻损伤^[1]。Zheng 等^[5]研究了 571 个冷冻囊胚移植周期后发现, 经两次冷冻后的囊胚相比新鲜囊胚, 移植后的流产率较高, 二者存在显著差异。另外还有研究表明, 玻璃化冷冻会在一定程度上影响生物细胞增殖、分化和凋亡等相关基因表达, 从而间接影响胚胎的发育能力^[4-6]。目前, 临床上一般都用胚胎发育情况、临床妊娠率和活产率等指标评估冻融胚胎质量, 但不能从分子水平上对胚胎进行评估, 不能有效地阐述胚胎的冷冻损伤机制。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,

[收稿日期] 2019-12-18

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFD0502303)

[作者简介] 郑杰(1992—), 男, 动物遗传育种与繁殖学硕士, 研究方向: 人类辅助生殖和动物繁殖生物学与胚胎工程研究。E-mail: 1067672953@qq.com

[通信作者] 字向东(1963—), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 动物繁殖生物学与胚胎工程研究。

E-mail: zixd@sina.com

SNP)指在DNA或RNA水平上,等位基因发生突变而引起DNA序列多态性的现象,包括颠换、置换、缺失和插入。SNP是转录组中十分常见的变异类型,其特点是数量多、分布广、可稳定遗传^[7]。可变剪切(alternative splicing, AS)则是指采用不同剪切方式使得mRNA前体产生多种mRNA剪切异构体的过程。AS普遍存在于真核生物中,具有调节基因表达和蛋白质多样性的重要作用,人类AS的基因已达到总基因的95%^[8]。对SNP和AS的研究能使人们更便捷、准确地从分子水平来探究冻融囊胚的损伤机制。近年来,RNA转录组测序(RNA transcriptome sequencing, RNA-Seq)技术快速发展,除了可以准确分析基因的表达水平外,还可用于发掘相关的功能基因,预测新转录本,以及分析基因的SNP和AS等^[9]。

哺乳动物如牛、羊、猪等的胚胎形态、大小、结构和功能与人类胚胎相似,哺乳动物胚胎的研究结果能对人类胚胎研究提供一定的理论基础和技术支持。目前,研究者已成功利用RNA-Seq技术在牦牛和犏牛胚胎发育调控^[10-11],以及牦牛和犏牛胚胎冷冻损伤^[12-13]方面做了初步研究,结果提示新鲜胚胎经玻璃化冷冻后SNP和AS发生了相应变化,但这些研究并未对冷冻前后的SNP和AS进行比较分析。因此,本研究选用牦牛卵母细胞和娟姗牛精子进行胚胎体外培养,再对杂交二代犏牛囊胚进行玻璃化冷冻实验,利用RNA-Seq技术对玻璃化冷冻前后犏牛囊胚SNP的数目和分布特征,以及AS的数目、事件类型和重要差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)进行比较分析,以期为后续人类胚胎冷冻前后相关基因功能分析和挖掘提供有效数据和理论基础,为完善人类胚胎的玻璃化冷冻技术提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 卵巢与冻精来源 牦牛卵巢来源于四川省广汉市向阳屠宰场,娟姗牛冷冻精子购自四川省家畜改良站。

1.1.2 试剂 促卵泡生成素(follicle-stimulating hormone, FSH)(Folltropin®-V)和促黄体素(luteinizing

hormone, LH)(Lutropin®-V)均购自加拿大Bioniche公司;青霉素-链霉素双抗和胎牛血清均购自美国Gibco公司;雌二醇(β -estradiol)、动物细胞培养液Medium 199(10×)和丙酮酸钠均购自美国Sigma公司;透明质酸酶(HYASE, 10×)、洗精液(SpermRinse™)、洗精受精液(G-IVF™ PLUS)、卵裂胚培养液(G-1™ PLUS)和囊胚培养液(G-2™ PLUS)均购自瑞士Vitrolife公司;玻璃化冷冻试剂盒(VT101)和玻璃化解冻试剂盒(VT102)为日本Kitazato公司产品。

1.2 方法

1.2.1 犏牛囊胚的体外生产 将屠宰场采集的牦牛卵巢放于35℃盛有DPBS缓冲液的恒温保温壶内,确保壶内温度恒定,2h内送回实验室,继续后续实验。挑选直径为3~8mm的卵泡,抽取其卵泡液,挑选外周至少被3层颗粒细胞包裹且细胞质均匀的卵丘卵母细胞,置于38.5℃、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养24h,使牦牛卵母细胞体外成熟(*in vitro* maturation, IVM)^[14]。

选取质量好的成熟卵母细胞,以20枚/滴的量转入G-IVF™微滴中,然后加入已获能的娟姗牛精子,置于38.5℃、含5% CO₂和90% N₂且饱和湿度的三气培养箱内培养22~24h以完成IVF。用0.2%透明质酸酶去除受精卵上的颗粒细胞,转移至G-1™微滴并置于三气培养箱中培养72h,最后转移至G-2™微滴并置于三气培养箱中培养48h,得到犏牛囊胚。

1.2.2 样品的收集 选取经IVF发育良好且未孵化的3枚犏牛新鲜囊胚作为新鲜组,使用玻璃化冷冻试剂盒对其余犏牛新鲜囊胚进行玻璃化冷冻操作。将囊胚在液氮中储存3d后,再使用玻璃化解冻试剂盒解冻囊胚,选取解冻后完全复苏、未孵化的3枚犏牛冻融囊胚作为冻融组。用PBS缓冲液清洗两组囊胚,再分别移至内含细胞裂解液的两个单细胞采集管中,超低温保存。

1.2.3 文库的构建及测序 在相同实验条件下,采用TRIzol法^[15]分别提取新鲜组和冻融组犏牛囊胚的总RNA,然后由安诺优达基因科技(北京)有限公司采用Smart-Seq2方法^[16]进行反转录扩增。检测扩增产物的分布情况,判定其质量,以20ng cDNA为模板进行后续文库的构建。用Bioruptor

超声系统(比利时 Diagenode 公司产品)将 cDNA 打断成 200 bp 左右的小片段, 然后进行 cDNA 末端修复、加碱基 A、测序接头拼接等后续步骤。选取接头产物, 进行 PCR 扩增。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用 CWBIO 凝胶回收试剂盒回收 DNA, 完成最终文库的构建。最后在 HiSeq™ 2500 测序平台上运行双端测序程序(PE100), 对犏牛新鲜囊胚和冻融囊胚两个文库进行高通量测序。

1.2.4 转录组数据分析 经过转录组文库质检、成簇与测序, 运用 CASAVA 软件^[17]对 Illumina 测序所得的原始数据图像进行分析, 得到原始序列数据, 即 Raw Reads。为保证信息分析数据的质量, 需要对原始数据进行一系列数据过滤步骤, 最终得到 Clean Reads, 再进行后续分析。采用测序饱和度分析和测序随机性分析, 对测序数据进行评估。运用 TopHat 软件^[18]将测序过滤后得到的 Clean Reads 与牦牛参考基因组(BosGru-v2.0)^[19]进行比对分析。采用 DEGseq v1.18.0 软件^[20]进行基因差异表达分析, 界定牦牛新鲜囊胚和冻融囊胚二者文库间的 DEGs。将 DEGs 向 GO(Gene Ontology)数据库(<http://www.geneontology.org/>)各个条目进行映射, 以校正后 $P < 0.05$ 为阈值, 找出 DEGs 中显著富集的 GO 条目。然后通过 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库进行比对, 分析 DEGs 涉及的信号通路(Pathways)。采用 SAMtools-0.1.19^[21]和 ASprofile v1.0.4 软件^[22]分别对两样本数据进行 SNP 和 AS 分析。

1.2.5 测序结果的实时荧光定量 PCR 验证 为验证测序结果的准确性, 采用实时荧光定量 PCR 方法验证基因的表达情况, 其中随机选取 4 个 DEGs, 并以 H2A 作为内参基因。用 Primer Premier 5 软件进行引物设计, 引物序列和产物长度如表 1 所示。PCR 总反应体系为 10 μ L, 包括上下游引物各 0.8 μ L、cDNA 模板 0.5 μ L、ddH₂O 2.9 μ L 和 Sso Advanced™ SYBR® Green Super mix 5 μ L。PCR 扩增程序: 首先 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 并 4 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物信息

Table 1 Primers for real-time fluorescence quantitative PCR

基因	引物序列 (5' $\rightarrow$ 3')	产物长度 / bp
HSP110	F: AGAAAACCCAGATGCCGAGA R: TCCCTAACTGCCAGACCAAG	257
RPL31	F: GGGCACTCAAAGAAATCCGG R: CATTCTGTATCCCTTTGGCC	108
REX1	F: TCAGGCCAGACAACGAGATT R: CGGTGTCTGAGCTGAACATG	132
BAD	F: AAGAGACGGAGGAGGAGGAT R: GTGAAACTCGTCGCTCATCC	119
H2A	F: GCCGTATTTCATCGACACCTG R: TGCAAGTGACGAGGGGTAAT	172

注: HSP110 为热休克蛋白 110; RPL31 为核糖体蛋白 L31; REX1 (reduced expression 1) 又称 Zfp-42, 是一种酸性锌指结构蛋白; BAD 是 B 淋巴细胞瘤因子 -2(Bcl-2) 相关启动子; H2A 为内参基因。

2 结果

2.1 测序产量统计

新鲜囊胚组和冻融囊胚组分别获得 52 641 524 条和 56 521 104 条 Raw Reads, 过滤后分别获得 51 099 116 条和 54 192 358 条 Clean Reads, 分别占 Raw Reads 的 97.07% 和 95.88%。Q30 可用于反映测序的碱基质量水平, 质量值(Q)越高代表碱基被测错的概率越小。本次新鲜囊胚组和冻融囊胚组测序的 Q30 百分比分别为 92.02% 和 91.91%, 表明此次测序质量水平高, 文库构建完整, 可进行后续数据分析。

2.2 测序饱和度分析和随机性分析

如图 1A 和图 1B 所示, 将数据按照 10%、20%.....100% 比例进行测序, 并统计在每个测序数据量下获得的基因的表达量。根据基因的表达量不同, 将基因分为 4 个等级, 统计不同数据量下基因定量的准确性。横坐标为不同深度的数据量, 纵坐标为在该深度下准确估计表达量的基因百分比。牦牛新鲜囊胚和冻融囊胚两样本检测到的基因数随着测序数据量的增多而升高, 当测序量比例达到 30% 时, 可明显看出测序数据量已达平台期, 增长速度已基本趋于平缓, 表明在此时

检测到的基因数已基本达到饱和值,两样本的测序量已经基本覆盖到细胞中表达的全部基因,测序结果准确可靠。

测序结果随机性(均一性)则是通过检测统计每个基因在不同位置的深度来衡量确定的。因为基因长度各不相同,所以将基因外显子区域平均划分成 100 个窗口,统计所有基因在该窗口的深度平均值。如图 1C 和图 1D 所示,两样本的打断随机性(即均一性)良好,Reads 在基因各等分的分布较为均匀,不偏向于基因的特定区域,说明数据可靠,可用于后续数据分析。

2.3 测序结果比对分析

运用 TopHat 软件将犏牛新鲜囊胚和冻融囊胚两样本的 Clean Reads 与牦牛参考基因组的 Reads 进行比对,发现其匹配总数比例分别为 80.00% 和 80.19%,说明该样品无外源物种污染。

2.4 DEGs 的 GO 功能分析

GO 注释分类后显示,犏牛新鲜囊胚和冻融囊胚中共有 10 532 个 DEGs,被归类于 23 个生物

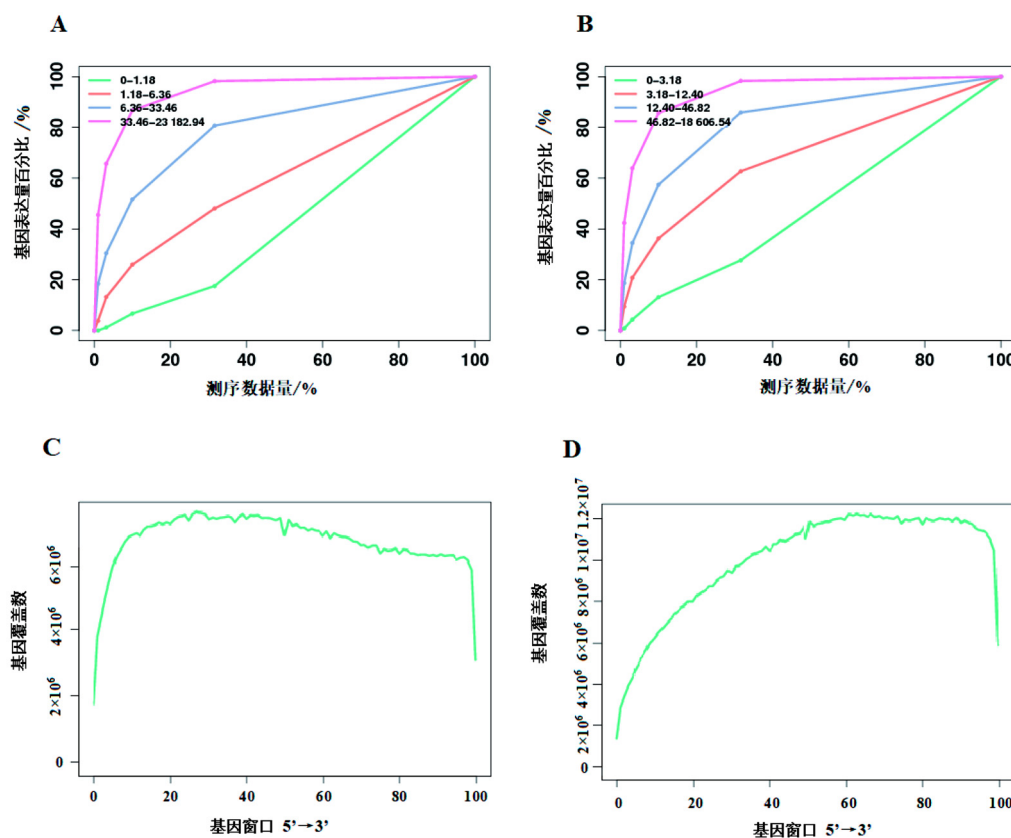
过程(biological process, BP)、22 个细胞组成(cellular component, CC)和 22 个分子功能(molecular function, MF)为主的 3 个 GO 分类条目中(图 2)。在 BP 分类中,细胞过程类别的富集最显著;在 CC 分类中,细胞组成类别的富集最显著;在 MF 分类中,整合类别的富集最显著。

2.5 DEGs 的 KEGG 通路分析

对犏牛新鲜囊胚和冻融囊胚的 DEGs 进行 KEGG 信号通路分析,结果表明,共有 12 315 个 DEGs 注释到 318 条信号通路。显著富集的前 5 条通路(Top 5 pathways)如表 2 所示,其中剪接体通路的富集程度最高,且犏牛冻融囊胚相比新鲜囊胚的大部分 DEGs 表达水平上调。

2.6 基因变异分析

采用 SAMtools-0.1.19 软件进行基因变异检测结果分析,结果显示,犏牛新鲜囊胚和冻融囊胚两样本分别检测到 116 681 和 224 750 个 SNP 位点,6 668 和 10 729 个插入/缺失(InDel)位点,总变异个数为 123 349 和 235 479 个。犏牛冻融囊



A 和 C: 犏牛新鲜囊胚; B 和 D: 犏牛冻融囊胚。A、B 图中左上角数据表示基因表达量。

图 1 测序饱和度(A 和 B)和随机性(C 和 D)分析

Figure 1 Sequencing saturation (A and B) and randomness (C and D) analysis

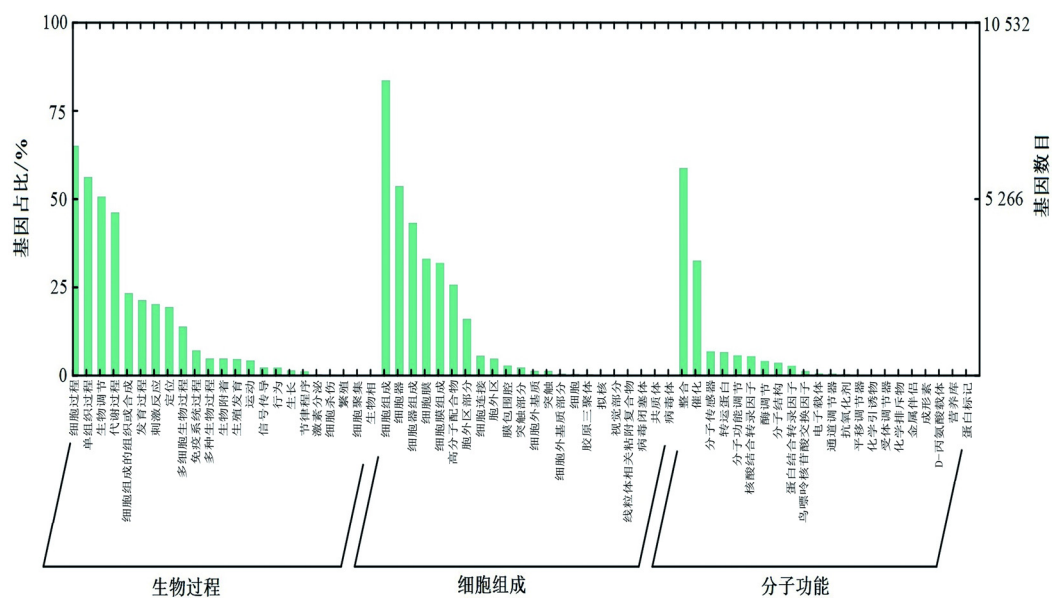


图 2 差异表达基因(DEGs)的 GO 功能分类

Figure 2 GO functional classifications of differentially expressed genes (DEGs)

表 2 差异表达基因(DEGs)富集前 5 位的 KEGG 通路

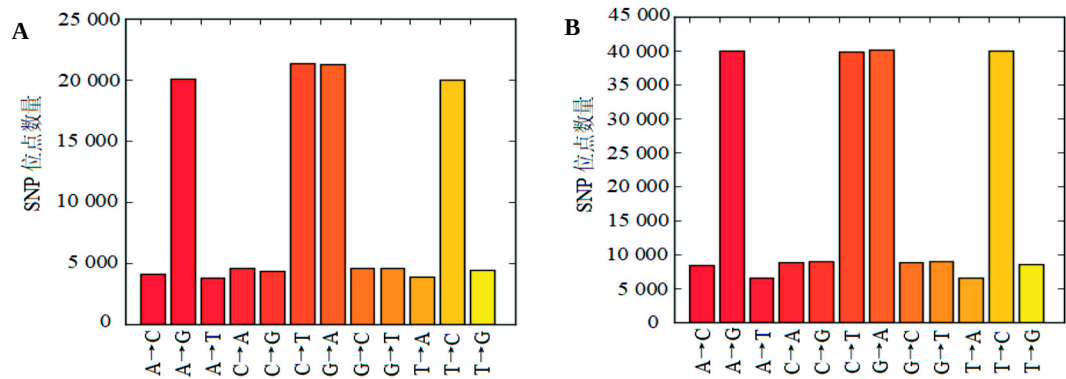
Table 2 Top 5 of enriched KEGG pathways of differentially expressed genes (DEGs)

KEGG 信号通路	上调基因	下调基因	重要 DEGs	Q 值
剪接体	52	14	Prp4, Prp19	3.56×10^{-7}
泛素介导蛋白水解	51	23	UBE1, UBLE1A, UBE2A, UBE2F	5.71×10^{-5}
嗅觉传导	97	17	CaM (CAMK2), PKA	5.71×10^{-5}
内质网蛋白加工	59	38	HSP70, HSP40, HSP90, Bax	3.21×10^{-4}
酵母细胞周期	23	14	CCL2, CCL3, CCR2	5.57×10^{-5}

胚样本中 SNP 位点数和 InDel 位点数均明显多于新鲜囊胚样本。

根据碱基替换方式不同, SNP 位点可分为转换型(transition)和颠换型(transversion)。根据犏牛

新鲜囊胚和冻融囊胚两样本检测到的 SNP 位点, 统计每个突变类型的频率(图 3)。在新鲜囊胚样本中, 发生频率最高的是转换型 SNP(A/G、C/T)位点, 约占总位点数的 72%, 而颠换型 SNP(A/C、



A: 犏牛新鲜囊胚; B: 犏牛冻融囊胚

图 3 单核苷酸多态性(SNP)突变频率分布

Figure 3 Mutation frequency of single nucleotide polymorphism (SNP)

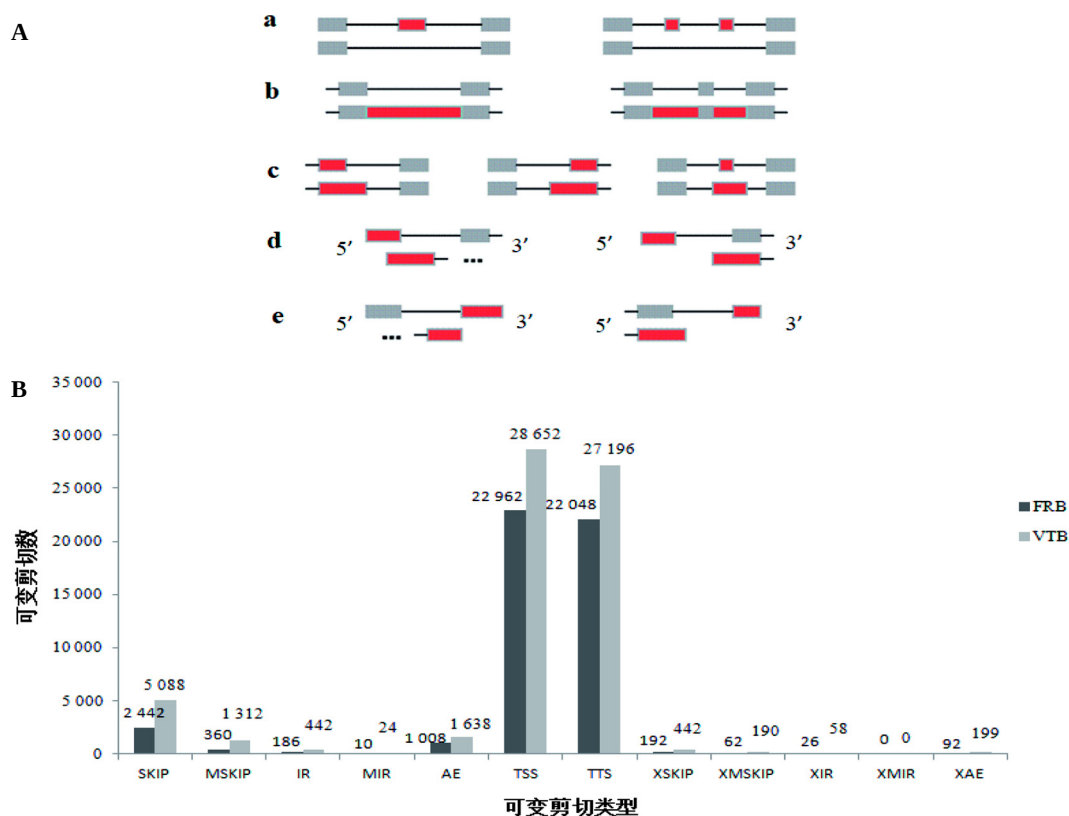
A/T、C/G、G/T)位点约占 28%，转换和颠换的比例(T_s/T_v)为 2.57。在冻融囊胚中，发生频率最高的是转换型 SNP 位点，约占总位点数的 71%，颠换型 SNP 位点约占 29%，转换和颠换的比例为 2.45。在新鲜囊胚样本的转换型 SNP 中，C/T 类型数量略多于 A/G 类型数量；但在冻融囊胚样本中，A/G 类型数量略多于 C/T 类型数量。两样本中 C/T 类型与 A/G 类型所占比例都无较大差异，且颠换型 SNP 中 A/T 所占比例最少。

2.7 基因的 AS 分析

AS 广泛存在于真核生物中，是调节基因表达和蛋白质多样性的重要机制。AS 事件主要分为外显子跳跃和盒式外显子跳跃、内含子滞留和多重内含子滞留、可变 5' 端或 3' 端剪切、转

录起始区域可变剪切(alternative splicing of transcription start sites, TSS)、转录结束区域可变剪切(alternative splicing of transcription termination sites, TTS)共 5 种类型^[22](图 4A)。

用 ASprofile 软件分析各样本基因的 AS 事件(图 4B)。从犏牛新鲜囊胚和冻融囊胚中分别检测出 49 388 和 65 241 个 AS 事件。在两个样本检测到的 AS 事件类型中，TSS 是最普遍的类型，新鲜囊胚中 TSS 数量为 22 962 个，占总 AS 事件的 46.5%；冻融囊胚中 TSS 数量为 28 652 个，占总 AS 事件的 43.9%。其次是 TTS 类型，新鲜囊胚中 TTS 数量为 22 048 个，占总 AS 事件的 44.6%；冻融囊胚中 TTS 数量为 27 196 个，占总 AS 事件的 41.7%。无论从总数还是各类型来看，犏牛冻融囊胚的 AS 事件均多于犏牛新鲜囊胚。



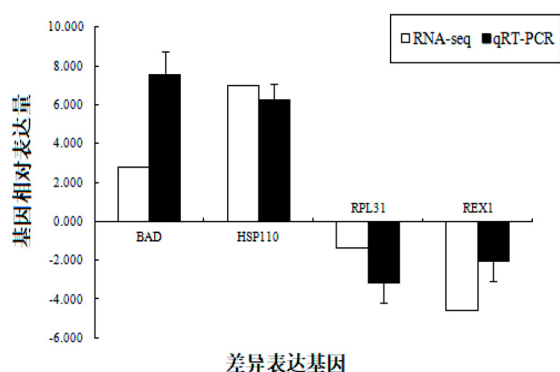
a: 外显子跳跃(左)和盒式外显子跳跃(右); b: 内含子滞留(左)和多重内含子滞留(右); c: 可变 5' 端或 3' 端剪切; d: 转录起始区域可变剪切(TSS); e: 转录结束区域可变剪切(TTS)。FRB: 犏牛新鲜囊胚; VTB: 犏牛冻融囊胚; SKIP: 单外显子跳跃; MSKIP: 多外显子跳跃; IR: 单内含子保留; MIR: 多内含子保留; AE: 可变 5' 或 3' 端剪切; TSS: 转录起始区域可变剪切; TTS: 转录结束区域可变剪切; XSKIP: 边界模糊型单外显子跳跃; XMSKIP: 边界模糊型多外显子跳跃; XIR: 边界模糊型单内含子保留; XMIR: 边界模糊型多内含子保留; XAE: 边界模糊型 5' 或 3' 端剪切。

图 4 可变剪切事件类型(A)和分析统计图(B)

Figure 4 The types (A) and analysis statistics (B) of the alternative splicing (AS)

2.8 测序结果的实时荧光定量 PCR 验证

随机选取 HSP110、RPL31、REX1 和 BAD 共 4 个 DEGs, 采用实时荧光定量 PCR 方法验证这些基因的表达情况, 并采用 Pfaffl 法^[23]分析 4 个基因在两样本中的相对表达量。结果表明, 实时荧光定量 PCR 和 RNA-Seq 两种方法计算得到的差异倍数基本一致(图 5)。PCR 验证说明此次 RNA-Seq 结果准确可靠。



RNA-Seq: RNA 转录组测序; qRT-PCR: 实时荧光定量 PCR。BAD 是 B 淋巴细胞瘤因子 -2(Bcl-2)相关启动子。HSP110 为热休克蛋白 110; RPL31 为核糖体蛋白 L31; REX1 (reduced expression 1) 又称 Zfp-42, 是一种酸性锌指结构蛋白。

图 5 实时荧光定量 PCR 验证 RNA-Seq 检测出的差异表达基因(DEGs)

Figure 5 qRT-PCR to verify the differentially expressed genes (DEGs) detected by RNA-Seq

3 讨论

本研究采用 SAMtools-0.1.19 对犏牛新鲜囊胚和冻融囊胚两样本测序数据进行 SNP 检测分析, 结果显示犏牛冻融囊胚样本中 SNP 位点数和 InDel 位点数都明显多于犏牛新鲜囊胚样本, 说明胚胎经玻璃化冷冻后, 其基因突变的概率明显增大。犏牛新鲜囊胚和冻融囊胚两样本中转换型 SNP 比例都明显高于颠换型, Ts/Tv 比值分别为 2.57 和 2.45。Ts/Tv 理论比值是 0.5, 而本研究中 Ts/Tv 比值要远大于理论值, 这与 Kraus 等^[24]和 Aslam 等^[25]在其他哺乳动物中的研究结果相似; 这一现象称之为“转换偏差”。转换偏差这种现象的产生, 可能是因为物种长期自然进化的选择, 有利于保持编码蛋白原有结构, 以减少有害突变形成的

概率^[26-27]。也有人认为, 嘌呤和嘧啶的结构和代谢等内在特征决定, 才导致转换偏差的产生^[28]。本研究中, 犏牛新鲜囊胚样本中 C/T 类型数量略多于 A/G 类型。这是因为 DNA 中的 5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)有较高的频率突变成胸腺嘧啶(thymine, T), 所以一般在 SNP 中 C/T 类型所占比例最高^[29-30]。然而犏牛冻融囊胚样本中 A/G 类型数量略多于 C/T 类型, 这与张得芳等^[31]利用高通量测序技术对不同海拔下花叶海棠叶片进行转录组测序研究的结果相似, 推测可能是样本自身 GC 含量较高所致。犏牛囊胚经冷冻操作后, 不管是 SNP 和 InDel 位点数明显增多, 还是发生转换偏差, 都提示哺乳动物胚胎经超低温冷冻保存后突变概率明显增大, 为有效降低冷冻程序带来的损伤, SNP 在胚胎玻璃化冷冻过程中起重要的调控作用。

本研究从犏牛新鲜囊胚和冻融囊胚两样本中分别检测出 49 388 和 65 241 个 AS 事件, 说明二者含有大量的 AS 基因。此外, 犏牛新鲜囊胚和冻融囊胚发生 AS 的数量存在差异, 表明新鲜囊胚经历胚胎冷冻和复苏等外界环境的变化后, AS 基因的表达存在特异性。研究表明, 除了不同环境下 AS 存在基因特异性外, 生物不同发育时期^[32]及不同组织^[33]中均可发现 AS 基因特异性。Montelli 等^[34]研究发现, 当生物处于不同发育时期或不同组织结构中, AS 能有效调控基因表达产物的功能及结构。这些基因的 AS 类型非常丰富, 目前共鉴别出 12 种类型, 其中以 TSS、TTS、外显子跳跃和盒式外显子跳跃、内含子滞留和多重内含子滞留、可变 5' 端或 3' 端剪切类型为主。本研究检测到的 AS 类型中, TSS 比例最高, 在犏牛新鲜囊胚中发生率为 46.5%, 犏牛冻融囊胚中发生率为 44.6%; 其次是 TTS, 犏牛新鲜囊胚和冻融囊胚中的发生率分别为 43.9% 和 41.7%。这与字向东等^[10]利用 RNA-Seq 技术对牦牛 IVF 胚胎发育转录组的检测结果一致。但是, 另有学者通过高通量测序技术分析犏牛睾丸转录组时发现, 内含子滞留事件发生率最高 (40%), 其次是外显子跳跃事件 (23%)^[35]。也有文献表明, 猪^[36]和京海鸡卵巢^[37]中内含子滞留事件发生率最低。有研究者认为, 内含子滞留事件

在动物中发生率低,而在植物中最常见^[38]。这些研究表明,在不同生物、不同发育时期^[32]、不同组织^[33]间所发生的AS类型均存在差异性,这可能是由在不同生物、不同组织和不同生长发育时期真核生物的基因和蛋白质数量差异较大所导致。

对犏牛新鲜囊胚和冻融囊胚两样本的DEGs进行KEGG通路分析发现,剪接体通路富集程度最高,也进一步证明了胚胎经超低温冷冻保存后发生了大量AS事件。在剪接体通路中犏牛冻融囊胚上调表达最为显著的DEGs是以mRNA前体剪接因子(pre-mRNA processing factor, Prp)4和Prp19为代表的大部分mRNA前体剪接因子。李昂等^[39]研究发现,Prp19会对HeLa等细胞产生不良反应,导致细胞凋亡,并可能会激活前体RNA剪接体,从而引发DNA损伤效应^[40]。Prp4可通过影响一些基因的表达,间接使其内含子剪切效率明显降低,从而可能发生DNA突变^[41]。而内含子剪切效率的降低,还会引起mRNA降解,降低蛋白质的表达水平,从而影响蛋白质的功能。所以,从犏牛新鲜囊胚和冻融囊胚两样本检测出大量AS事件,以及通过KEGG通路分析发现剪接体通路的显著富集,这些结果都表明,胚胎经超低温冷冻保存后发生了大量AS事件,而一些Prp的上调可能会对胚胎产生不利影响。

有关人类胚胎的临床研究表明,冻融胚胎的发育情况、临床妊娠率及活产率与新鲜胚胎相比无明显差异,甚至更优于新鲜胚胎^[42-43]。临床上大多数是以形态学为基础判断冻融胚胎发育情况是否良好,并在临床妊娠率、活产率等临床指标上判断冻融胚胎和新鲜胚胎的差异是否显著。从临床指标上一般分析认为冻融胚胎和新鲜胚胎并未存在显著差异,但这并不能证明新鲜胚胎经超低温冷冻保存后不会造成一定程度的冷冻损伤。有研究指出,冻融胚胎和新鲜胚胎的临床妊娠率和活产率无明显差异,甚至冻融胚胎更优于新鲜胚胎,这可能是由于在新鲜周期和过度刺激周期中子宫内膜的容受性受损,而并非冻融胚胎质量优于新鲜胚胎^[44],这也从另一面与本研究相契合,证明胚胎经超低温冷冻保存后,并不会改善新鲜胚胎的质量,反而会不可避免地造成一定程度的冷冻损伤。

参考文献:

- [1] Schiewe M, Anderson R. Vitrification: the pioneering past to current trends and perspectives of cryopreserving human embryos, gametes and reproductive tissue[J]. J Biorepository Sci Appl Med, 2017, 5:57-68.
- [2] 严杰, 乔杰. 保存女性生育力技术研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(5):140-144.
- [3] 韩晓敏. 胚胎玻璃化冷冻在女性生育力保存中的意义[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(19):4016-4018.
- [4] Monzo C, Haouzi D, Roman K, et al. Slow freezing and vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes[J]. Hum Reprod, 2012, 27(7):2160-2168.
- [5] Zheng XY, Chen Y, Yan J, et al. Effect of repeated cryopreservation on human embryo developmental potential[J]. Reprod Biomed Online, 2017, 35(6):627-632.
- [6] Moussa M, Shu J, Zhang XH, et al. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives[J]. Sci China Life Sci, 2014, 57(9): 903-914.
- [7] Gray IC, Campbell DA, Spurr NK. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics[J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(16):2403-2408.
- [8] Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics[J]. Trends Genet, 2008, 24(3):133-141.
- [9] Lan DL, Xiong XR, Wei YL, et al. RNA-Seq analysis of yak ovary: improving yak gene structure information and mining reproduction-related genes[J]. Sci China Life Sci, 2014, 57(9):925-935.
- [10] 字向东, 罗斌, 夏威, 等. 基于RNA-Seq技术的牦牛体外受精胚胎发育转录组分析[J]. 中国农业科学, 2018, 51(8):1577-1589.
- [11] 字向东, 刘霜, 夏威, 等. 犏牛体外受精胚胎的发育转录组分析[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(1):92-101.
- [12] 郑杰, 蒲思颖, 杨远潇, 等. 基于高通量测序的犏牛囊胚玻璃化冷冻损伤机制研究[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(10):1871-1881.
- [13] 蒲思颖, 郑杰, 杨远潇, 等. 牦牛新鲜囊胚与玻璃化冻融囊胚转录组的比较分析[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(4): 709-717.
- [14] Xiao X, Zi XD, Niu HR, et al. Effect of addition of FSH, LH and proteasome inhibitor MG132 to *in vitro* maturation medium on the developmental competence of yak (*Bos grunniens*) oocytes[J]. Reprod Biol Endocrin, 2014, 12(1): 30.
- [15] Villa-Rodríguez E, Ibarra-Gómez C, de Los Santos-Villalobos S,

- et al. Extraction of high-quality RNA from *Bacillus subtilis* with a lysozyme pre-treatment followed by the Trizol method[J]. J Microbiol Methods, 2018, 147:14-16.
- [16] Picelli S, Björklund Å K, Faridani OR, et al. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells [J]. Nat Methods, 2013, 10(11):1096-1098.
- [17] Mockus SM, Potter CS, Stafford GA, et al. Abstract 73: Targeting KDR mutations in lung adenocarcinoma[J]. Cancer Res, 2015, 75(15 Suppl):73-73.
- [18] Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq[J]. Bioinformatics, 2009, 25(9):1105-1111.
- [19] Qiu Q, Zhang J, Ma T, et al. The yak genome and adaption to life at high altitude[J]. Nat Genet, 2012, 44(8):946-949.
- [20] Wang L, Feng Z, Wang X, et al. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data[J]. Bioinformatics, 2010, 26(1):136-138.
- [21] Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools[J]. Bioinformatics, 2009, 26(16):2078-2079.
- [22] Florea L, Song L, Salzberg SL. Thousands of exon skipping events differentiate among splicing patterns in sixteen human tissues[J]. F1000Res, 2013, 2:188.
- [23] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(9):e45.
- [24] Kraus RH, Kerstens HH, Hooft PV, et al. Genome wide SNP discovery, analysis and evaluation in mallard (*Anas platyrhynchos*)[J]. BMC Genomics, 2011, 12(1):150.
- [25] Aslam ML, Bastiaansen JW, Elferink MG, et al. Whole genome SNP discovery and analysis of genetic diversity in Turkey (*Meleagris gallopavo*)[J]. BMC Genomics, 2012, 13(1):391.
- [26] Collins DW, Jukes TH. Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence[J]. Genomics, 1994, 20(3):386-396.
- [27] Wakeley J. The excess of transitions among nucleotide substitutions: new methods of estimating transition bias underscore its significance[J]. Trends Ecol Evol, 1996, 11(4):158-162.
- [28] Tang P, Wang Q, Chen JQ. The patterns and influences of insertions, deletions and nucleotide substitutions in Solanaceae chloroplast genome[J]. Hereditas, 2008, 30(11):1506-1511.
- [29] Gruenbaum Y, Naveh-many T, Cedar H, et al. Sequence specificity of methylation in higher plant DNA[J]. Nature, 1981, 292(5826):860-862.
- [30] Chao S, Zhang W, Akhunov E, et al. Analysis of gene-derived SNP marker polymorphism in US wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars[J]. Mol Breeding, 2009, 23(1):23-33.
- [31] 张得芳, 夏涛, 文怀秀, 等. 不同海拔下花叶海棠叶片转录组核苷酸变异分析和比较[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(10):4351-4356.
- [32] 冉茂良, 陈斌, 李智, 等. 基于RNA-Seq测序数据鉴定和分析猪基因组可变剪接事件[J]. 中国科学: 生命科学, 2016, 46(3):274-284.
- [33] 徐铁山, 顾丽红, 侯水生, 等. 应用RNA-seq数据开展鸭基因组可变剪接的鉴定与分析[J]. 中国家禽, 2016, 38(17):10-16.
- [34] Montelli S, Mazzotta G, Vanin S, et al. period and timeless mRNA splicing profiles under natural conditions in drosophila melanogaster[J]. J Biol Rhythm, 2015, 30(3): 217-227.
- [35] 杨芳. 基于RNA-Seq对牦牛和犏牛睾丸转录组的比较分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2017.
- [36] Chen C, Ai H, Ren J, et al. A global view of porcine transcriptome in three tissues from a full-sib pair with extreme phenotypes in growth and fat deposition by paired-end RNA sequencing[J]. BMC Genomics, 2011, 12(1): 448.
- [37] 韩昆鹏, 段炼, 李婷婷, 等. 京海黄鸡卵巢转录组研究: 基因结构分析与新基因发掘注释[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(4):854-861.
- [38] Zhang G, Guo G, Hu X, et al. Deep RNA sequencing at single base-pair resolution reveals high complexity of the rice transcriptome[J]. Genome Res, 2010, 20(5):646-654.
- [39] 李昂, 孙兴, 范克科. Prp19 干涉导致细胞染色体错误排列及有丝分裂前中期阻滞[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(5):1552-1557.
- [40] Yin J, Zhang YA, Liu TT, et al. DNA damage induces down-regulation of Prp19 via impairing Prp19 stability in hepatocellular carcinoma cells[J]. PLoS One, 2014, 9(2):e89976.
- [41] 高旭利. 禾谷镰刀菌蛋白激酶 Prp4 调控 mRNA 剪切机制研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2016.
- [42] Roy TK, Bradley CK, Bowman MC, et al. Single-embryo transfer of vitrified-warmed blastocysts yields equivalent live birth rates and improved neonatal outcomes compared with fresh transfers[J]. Fertil Steril, 2014, 101(5):1294-1301.
- [43] 陈海燕, 张婉菁, 郭水兴, 等. 新鲜与冷冻胚胎移植的多胎妊娠随访结局比较[J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(2):58-59.
- [44] Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, et al. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for *in vitro* fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders[J]. Fertil Steril, 2011, 96(2):344-348.

Single Nucleotide Polymorphism and Alternative Splicing Analysis between Fresh and Vitrified-thawed Crossbred Blastocysts of Yak via RNA-Seq

ZHENG Jie¹, ZHANG Guozhong¹, HU Yanmei¹, WU Xueyi¹, YANG Zongfu¹, ZI Xiangdong²

(1. Center for Reproductive Medicine, Panzhihua Maternity and Child Health Care Hospital, Panzhihua 617000, China; 2. Key Laboratory of Animal Science of State Ethnic Affairs Commission, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To compare and analyze single nucleotide polymorphism (SNP) and alternative splicing (AS) between the fresh and vitrified-thawed crossbred blastocysts of the yak.

Methods The crossbred blastocysts were derived from yak oocytes *in vitro* fertilized with Jersey cattle spermatozoa. Total RNA was extracted from these fresh blastocysts (FRB) and vitrified-thawed blastocysts (VTB), and then amplified and sequenced via the Smart-Seq2 method to construct RNA libraries. SNP and AS were analyzed by SAMtools-0.1.19 and ASprofile software, respectively.

Results A total of 51 099 116 and 54 192 358 clean reads were obtained from the FRB and VTB, respectively. The SNP numbers of FRB and VTB were 116 681 and 224 750, the number of C/T type was slightly higher than that of A/G type for the FRB transition types of SNP (Ts). However, the number of A/G type was slightly higher than that of C/T type for the VTB Ts, and the number of A/T type was the least for all transversion types of SNP (Tv). The value of Ts/Tv in FRB and VTB were 2.57 and 2.45, respectively. The AS events in FRB and VTB were 49 388 and 65 241, respectively. It mainly had five patterns of AS, of which the two largest proportions were transcription start site and transcription terminal site. **Conclusion** The results of comparison and analysis of SNP and AS between the fresh and vitrified-thawed crossbred blastocysts of the yak provide valid data and theoretical basis for the following related gene function analysis and mining.

[Key words] Crossbred yak; Blastocyst; Vitrification; RNA-Seq; Single nucleotide polymorphism; Alternative splicing