

MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN CỦA GENE *Igf2* TRONG CHUỘT HOANG ĐẠI VÀ CÁC DÒNG ĐỘT BIẾN

Trần Văn Giang^{1*}, Guy Cathala²

¹ Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

² Viện Di truyền Phân tử - Cộng hòa Pháp

TÓM TẮT

Hiện tượng in dấu hệ gene (*Genome imprinting*) là quá trình biểu hiện gene mà chỉ một *allele* bố mẹ được biểu hiện ở đời con tùy thuộc vào nguồn gốc *allele* đó. Gene in dấu *Igf2* (Insulin-like growth factor 2) có vai trò quan trọng trong sự phát triển phôi và hình thành nhau thai. Sự biểu hiện và điều hòa biểu hiện của gene *Igf2* được thực hiện bởi các promoter khác nhau. Cơ chế điều hòa biểu hiện ở mức độ các promoter này cực kỳ phức tạp và thay đổi theo từng giai đoạn, từng mô khác nhau, và khác nhau trên chuột hoang đại và chuột đột biến. Nghiên cứu này tiến hành trên các dòng chuột hoang đại và đột biến, ARN từ mô nhau thai 17 ngày được sử dụng khi định lượng promoter P0 (Promoter này chỉ biểu hiện đặc hiệu trong nhau thai), đối với tất cả các promoter còn lại thì sử dụng ARN tách chiết từ mô gan 7,5 ngày. Các ARN này được sử dụng để tạo cDNA trước khi thực hiện các phản ứng định lượng mức độ biểu hiện của các promoter. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sự phiên mã của *Igf2* mạnh nhất là promoter P3 và P2 ở các loại chuột (trừ thể $\Delta U3/$ Dom). Đối với promoter P1 và P0 chỉ biểu hiện cao trong chuột $\Delta U2/$ Dom, còn lại thấp trong tất cả các loại chuột khác. Các promoter có mức biểu hiện ổn định trong thể hoang đại và thể đột biến $\Delta U2/$ Dom và biểu hiện thấp trong thể đột biến $\Delta 3/$ Dom.

Từ khóa: Biểu hiện gen, dòng chuột hoang đại và đột biến, in dấu hệ gene, *Igf2*, promoter.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Một tế bào điển hình ở người chỉ biểu hiện khoảng 20% tổng số gene trong bộ gene vào một thời điểm nhất định, trong đó chỉ 1,5% mã hóa cho các protein (Biressi *et al.*, 2007). Quá trình biểu hiện của mỗi gene được kiểm soát, điều khiển một cách chặt chẽ và nghiêm ngặt theo nhiều cơ chế khác nhau trong tế bào. Trong đó, yếu tố trực tiếp thực hiện quá trình biểu hiện đó là các promoter. Một gene có thể được điều khiển bởi một hoặc nhiều promoter khác nhau. Nghiên cứu cơ chế biểu hiện và điều hòa biểu hiện gene ở sinh vật nhân chuẩn nói chung và chuột nói riêng hết sức phức tạp, đặc biệt là các gene in dấu (*Imprinting gene*). Quá trình biểu hiện của gene *Igf2* khá phức tạp và được thực hiện từ nhiều promoter. Trong đó, mức độ biểu hiện của các promoter lại hoàn toàn khác nhau ở các mô, ở các loại động vật khác nhau. Sự sinh trưởng và phát triển phôi được điều khiển bởi một số gene, trong đó quan trọng nhất là in dấu *Igf2* (*Insuline-like growth factor 2*) (DeChiara *et al.*, 1990). Gene in dấu này nằm trên nhiễm sắc thể số 7 ở chuột và số 11 ở người, nó có quá trình biểu hiện và điều hòa biểu hiện cực kỳ phức tạp (Joanne *et al.*, 1998). Sự biểu hiện bất bình thường hoặc mất in dấu, hoặc siêu methyl hóa của chúng dẫn đến hội chứng Beckwith - Wiedeman, In Russell - Silver, khối u Wilms cũng như liên quan đến một số con đường phát sinh ung thư (Bhusari *et al.*, 2011). Tuy nhiên, làm sáng tỏ mức độ biểu hiện của các promoter đặc hiệu trong chuột hoang đại và chuột đột biến thì chưa được đề cập đầy đủ. Do đó, nghiên cứu mức độ biểu hiện các promoter đặc hiệu ở chuột hoang đại và các dòng chuột đột biến là cơ sở để làm sáng tỏ cơ chế điều hòa biểu hiện của gene *Igf2* trên chuột và từ đó có cơ sở để nghiên cứu sâu biểu hiện của gene này trên người.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chuột nhắt hoang đại (*Mus musculus*) được nuôi tại Viện Di truyền Phân tử - Montpellier - Cộng hòa Pháp, sau đó tiến hành lai tạo để tạo ra hai dòng chuột được ký hiệu Dom/SD7 và SD7/Dom, khác nhau bởi hoán đổi nhiễm sắc thể bố và mẹ của 2 dòng hoang đại ban đầu. Các loại chuột đột biến ($\Delta 3/$ Dom, $\Delta U2/$ Dom) được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Luisa Dandolo, INSERM Paris, Cộng hòa Pháp. $\Delta 3/$ Dom là ký hiệu của dòng chuột đột biến đã loại bỏ gene *H19*, một gene in dấu trên *allele* có nguồn gốc từ cá thể mẹ (nằm cùng locus với *Igf2* sản phẩm của gene này là 1 ARN không mã hóa, tham gia điều hòa biểu hiện *Igf2*) có quá trình biểu hiện thuận nghịch đối với gene *Igf2*. $\Delta U2/$ Dom là ký hiệu dòng chuột đột biến loại bỏ exon U2 trên *allele* có nguồn gốc từ cá thể mẹ.

Các chất giàu dinh dưỡng, muối khoáng và đệm: Agar (invitrogen); cao nấm men, peptone (Biobasic ICN, Mỹ); NaCl, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 , SDS (Merck, Đức); Đệm TE: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0. Đệm

1,5 M Tris-HCl; pH 8,8. Đệm 0,5 M Tris-HCl; pH 6,8. Dung dịch gồm 30% acrylamide; 0,8% bis-acrylamide; Kít tinh sạch ADN (Merck, Đức). Thông tin các mồi được sử dụng trong thí nghiệm thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Các cặp mồi được sử dụng trong thí nghiệm

Primer	Mồi xuôi (5'-3')	Mồi ngược (5'-3')	Kích thước (bp)
P0	ATTGACCCAGCCAGCGGATC	CTGTACTCTAGTCGCTTCGTAG	120
P1	CTCGTCACTTCTCCTACGGTG	5'-CCCAGTCGTTTTCTGGACAC-3'	98
P2	GTTCTGTCCCCTCGCACATT	5'-GGTATGCAAACCGAACAGCG-3'	135
P3	CTGGACATTAGCTTCTCCTG	5'-CTGAAGTTGGGTAAGGAGGC-3'	132
<i>Igf2</i> tổng số	CATCGTCCCCTGATCGTGTAC	5'-GGAAGTGCCTGCTCAAGA-3'	201

Chú thích: Trình tự mồi tự thiết kế dựa trên trình tự gene *Igf2* công bố trên GenBank.

Phương pháp nghiên cứu

Các phương pháp sinh học phân tử chính được tham khảo theo Sambrook và Ruesel (2001) có cải tiến.

Tách chiết ADN tổng số

2 mL dịch mô tế bào được giải đông ở nhiệt độ phòng. Thêm 40 µL proteinase(20 µg/mL) đã được hòa tan trong đệm pK (Proteinase K) 2X. Sau 4 giờ ủ ở nhiệt độ 50°C, dịch tế bào được chiết với 4 mL phenol/chloroform (1:1). Ly tâm dịch chiết trong 30 phút ở 20°C với tốc độ 6.000 g/1 phút. Dịch nổi được rửa bằng 8 mL (EtOH) 70% và 300 µL NaCl 5M ở nhiệt độ -20°C trong 12 giờ hoặc qua đêm. Ly tâm thu lấy rửa, rửa rửa bằng 500 µL (EtOH) 70%. Ly tâm, làm khô ADN ở nhiệt độ phòng.

Tách chiết ARN tổng số

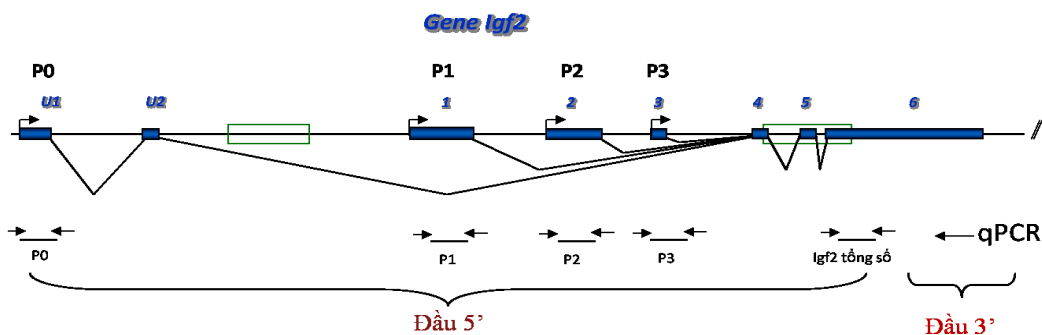
Quá trình tách chiết ARN mô tế bào cũng thực hiện tương tự, nhưng có một số sai khác đó là sau khi thêm pK, tiếp tục thêm DNase để loại bỏ ADN. Trong quá trình tách chiết đều thực hiện ly tâm ở nhiệt độ thấp (4°C). Sau khi thu được ARN tổng số, tiến hành chiết ARN tổng số qua cột có chứa oligo T (tên thương mại cột tách chiết để tách mARN ra khỏi hỗn hợp. Sau đó thu hồi mARN bằng dung dịch thôi giải.

Tạo dòng cDNA

Chuẩn bị 2 µg ARN sau khi xác định bằng máy định lượng ARN và đã xử lý với DNase. Cho vào ống Eppendorf 1,5 mL đã khử trùng 1 µL Random primer hoặc mồi đặc hiệu và 10 µL H₂O cất khử trùng), ủ ở 70°C/10 phút, sau đó đặt trong đá tuyết 5 phút. Thêm 4 µL Buffer 5x (FS), 2 µL DTT 0,1 M, 1 µL dNTP 2,5 mM, 0,7 µL enzyme sao chép ngược (Invitrogene). Ôn định hỗn hợp khoảng 10 phút ở nhiệt độ phòng trước khi ủ 42°C trong 1 giờ. cDNA được tinh sạch bằng các viên bi thủy tinh (Invitrogene) và dung dịch rửa. Pha loãng cDNA 10 lần để thực hiện PCR định lượng hoặc bảo quản ở -20°C.

Phương pháp RT- PCR

Trong phương pháp này, gene tham chiếu *Gapdh* được sử dụng để tính toán hàm lượng mARN từ gene đích được biểu hiện trong mẫu thử. Hỗn hợp phản ứng (9,5 µL) gồm: 1 µL cDNA (5 ng/1 µL), 1 µL mix qPCR (dNTP, MgCl₂, đệm qPCR 10X đã được pha theo tỷ lệ thích hợp), 0,5 µL (10 µM) mỗi loại mồi, 7 µL nước khử trùng. Vị trí các cặp mồi được sử dụng trong thí nghiệm thể hiện qua hình 1.



Hình 1. Vị trí các promoter và các cặp mồi được sử dụng trong thí nghiệm. Cặp mồi *Igf2* tổng số được thiết kế trên exon chung (exon 6) cho tất cả các promoter

Chu kỳ nhiệt: 95°C; 2 phút; 41 chu kỳ: (95°C/5 giây; 52°C/15 giây; 72°C/30 giây)

Phương pháp định lượng biểu hiện dựa vào gene tham chiếu

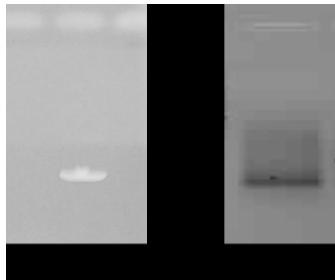
Phương pháp định lượng dựa vào gene tham chiếu GAPDH vì gene này biểu hiện khá ổn định trên các loại tế bào ở động vật nghiên cứu.

Trong phương pháp này, sẽ định lượng không chỉ gene cần nghiên cứu (Target = Tg) mà cả một gene tham chiếu (reference = Ref) tức là gene mà các nghiên cứu trước đó đã xác định là có biểu hiện như nhau giữa hai mẫu tế bào. Như vậy, ứng với mẫu T và mẫu C sẽ có các kết quả định lượng cho cả gene Tg và gene Ref qua các thông số: Ct(T/Tg): là chu kỳ ngưỡng của gene đích (Tg) trong mẫu thử (T), Ct(T/Ref): là chu kỳ ngưỡng của gene tham chiếu (Ref) trong mẫu thử (T), Ct(C/Tg): là chu kỳ ngưỡng của gene đích (Tg) trong mẫu chứng (C), và Ct(C/Ref): là chu kỳ ngưỡng của gene tham chiếu (Ref) trong mẫu chứng (C). Dựa trên các thông số này, sẽ thường hóa (normalized) chu kỳ ngưỡng của gene đích trên mẫu thử (T) và mẫu chứng (C) bằng cách tính hiệu số chênh lệch Ct của gene đích với gene tham chiếu trên các mẫu: Mẫu thử: $DCT(T) = Ct(T/Tg) - Ct(T/Ref)$ Mẫu chứng: $DCT(C) = Ct(C/Tg) - Ct(C/Ref)$ Sau đó sẽ thường hóa DCT mẫu thử bằng hiệu số chênh lệch DCT(T) với DCT(C) $DDCT = DCT(T) - DCT(C)$ Từ đó tính ra tỷ lệ biểu hiện của gene đích trên mẫu thử so với mẫu chứng, nếu hiệu quả PCR của cả hai đều đạt 100%, là $R = 2^{-DDCT}$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tách chiết ADN và ARN tổng số

ADN và ARN tổng số được tách chiết theo phương pháp mô tả ở trên. Độ tinh sạch của ADN được đánh giá tương đối qua điện di trên gel agarose (Hình 2A). Điện di đồ cho thấy ADN tổng số không bị gãy và tương đối sạch, sản phẩm tốt để thực hiện các phản ứng tiếp theo. Đối với ARN, được điện di kiểm tra (Hình 2B) trước khi định lượng bằng máy quang phổ ở bước sóng 260 nm. Nồng độ được xác định là 25 µg/mL. Các sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và gửi đi giải trình tự.

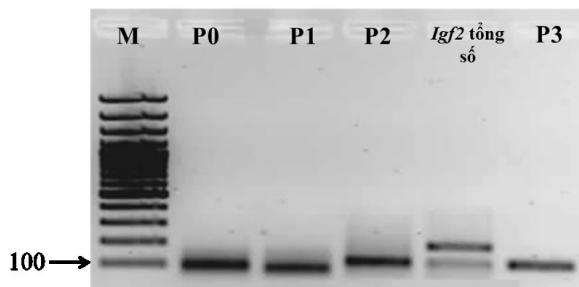


Hình 2. Điện di đồ ADN tổng số (A), ARN tổng số (B)

Kích thước đoạn khuếch đại từ các bản sao phiên mã của Igf2

Gene *Igf2* nằm trên nhiễm sắc thể số 7 của chuột và có cấu trúc phức tạp gồm 8 exon (U1, U2, 1,2,3,4,5,6) và 4 promoter (P0, P1, P2, P3), trong đó có 3 exon chung (4,5,6) và điểm khởi đầu phiên mã nằm trên exon chung đầu tiên, từ mỗi promoter tạo ra một bản sao có kích thước khác nhau tùy theo độ dài đặc hiệu của mỗi promoter (Meinsma *et al.*, 1991).

Với cặp mồi được thiết kế cho mỗi promoter, các vùng đặc hiệu này được khuếch đại từ cDNA của chuột hoang đại Dom/SD7, với kích thước đoạn khuếch đại tương ứng theo lý thuyết đã tính toán (P0: 120 bp, P1: 98 bp, P2: 135 bp, *Igf2* tổng số: 201 bp, P3: 132 bp) (Hình 3). Điều đó chứng tỏ các cặp mồi được thiết kế đặc hiệu đối với các promoter và các cDNA. (cần sử dụng câu từ cho chính xác, vì kết quả điện di chỉ thể hiện kích thước ước đoán (tương đối) của đoạn gen cần nhân lên, chứ ko thể gọi là chính xác được).

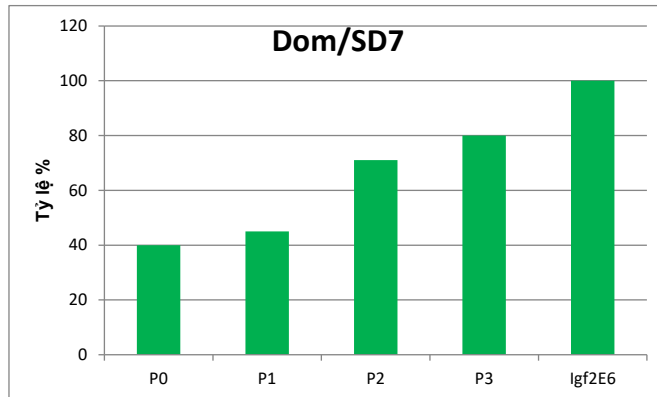


Hình 3. Điện di đồ khuếch đại các promoter đặc hiệu của *Igf2* từ chuột hoang đại, M (Marker 100bp)

Các cặp môì này tiếp tục được sử dụng để định lượng mức độ biểu hiện của các promoter khác nhau, ở các dòng chuột đột biến.

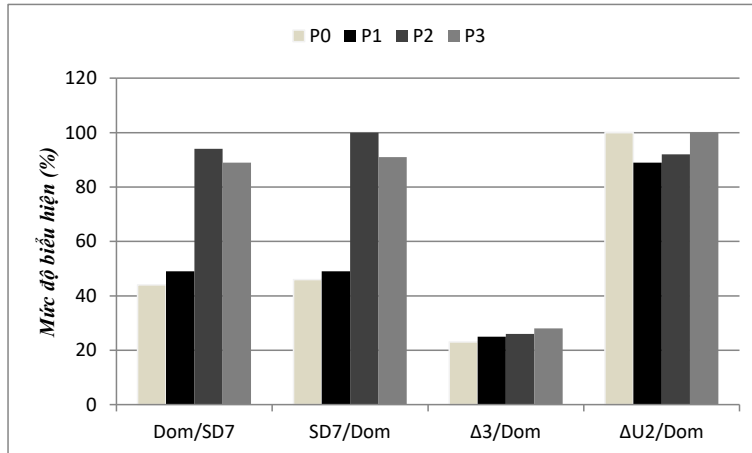
Mức độ biểu hiện các promoter đặc hiệu của gene *Igf2*

Từ các dòng chuột hoang dại và đột biến, ARN từ mô nhau thai 17 ngày được dùng khi định lượng promoter P0 (promoter này chỉ biểu hiện đặc hiệu trong nhau thai) (Constância *et al.*, 2002), ARN từ mô gan 7,5 ngày đối với tất cả các promoter còn lại. Mức độ biểu hiện các promoter khác nhau khi so sánh tương quan với biểu hiện của ARN *Igf2* tổng số, kết quả cho thấy: P3 biểu hiện cao nhất (80%), đến P2 (70%), tiếp đến P1 (45%) và thấp nhất là P0 (40%) (Hình 4).



Hình 4. Mức độ biểu hiện các promoter P0, P1, P2, P3, ở chuột hoang dại trong sự tương quan với sự biểu hiện của *Igf2* tổng số

Gene *Igf2* là một gene in dấu, vì vậy, chỉ biểu hiện trên các *allele* có nguồn gốc từ nhiễm sắc thể của cá thể bố. Do đó, việc loại bỏ exon trên *allele* từ mẹ (exon U2 trong $\Delta U2/Dom$), hầu như không có ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của gene này.



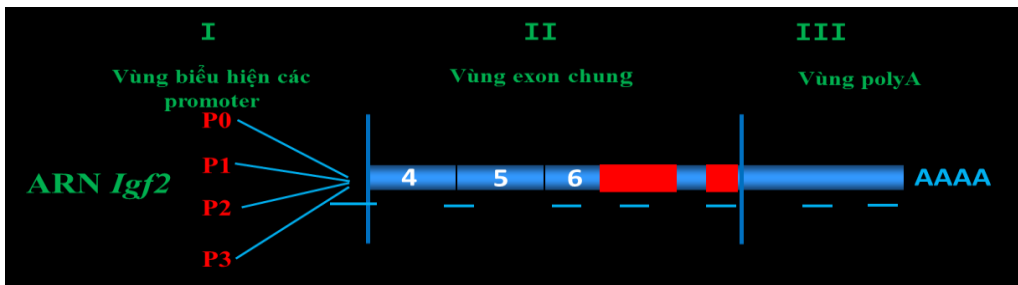
Hình 5. Mức độ biểu hiện các promoter P0, P1, P2, P3, trong chuột hoang dại và các dòng chuột đột biến (sử dụng gene tham chiếu *Gapdh*)

Ngược lại, trong 2 thể hoang dại, P0 và P1 biểu hiện ổn định nhưng với mức độ không cao (dưới 50%) (Hình 5). Chúng ta có thể thấy, các promoter biểu hiện ổn định trong 2 thể hoang dại có *allele* từ cá thể bố và cá thể mẹ khác nhau, nhưng mức biểu hiện giảm mạnh khi đột biến xảy ra khi loại bỏ gene cùng điều hòa trên 1 locus (gene *H19* trong $\Delta 3/Dom$).

Thảo luận

Khi nghiên cứu biểu hiện ARN *Igf2* không chỉ nghiên cứu trên nhiều mô khác nhau, nhiều thời điểm khác nhau, mà còn nghiên cứu biểu hiện tại vùng nào trên phân tử đó, phân tử này được chia thành 3 vùng chính khi nghiên cứu biểu hiện đó là vùng các promoter, vùng chứa các exon chung và vùng đầu 3' chứa đuôi polyA (Hình 6). Trong nghiên cứu này, mức độ biểu hiện mới chỉ được thực hiện trên các promoter khác nhau của *Igf2* và chỉ trong hai mô là gan và nhau thai. Để nghiên cứu mức độ biểu hiện thì ngoài phương pháp qPCR còn có thể sử

dụng phương pháp Northern blot, tuy nhiên phương pháp Northern blot thường được sử dụng khi nghiên cứu biểu hiện đầy đủ toàn phân tử ARN.



Hình 6. Các vùng chính khi nghiên cứu biểu hiện ARN *Igf2*

Theo Wolfgang và cộng sự (2011), trong các promoter thì P3 và P4 của *IGF2* trên người (tương đương với P2 và P3 trên chuột) đóng góp lớn vào tổng số các bản sao của *Igf2*, nghĩa là chúng biểu hiện mạnh nhất trong tương quan các promoter khác (St-Pierre *et al.*, 2012). Giải thích hiện tượng này, tác giả đã chỉ ra rằng, do enhancer đã kích hoạt vùng phân hóa methyl DMR2 (Differentially Methylated Region), và chính vùng này được xem như là yếu tố hoạt hóa 2 promoter gần kề (Wolfgang *et al.*, 2011).

Khi định lượng mức độ biểu hiện của các promoter trong các loại chuột khác nhau, kết quả cho thấy rằng: tất cả các promoter đều biểu hiện thấp trong thể đột biến $\Delta 3/ Dom$, nguyên nhân khi loại bỏ gene *H19*, yếu tố điều hòa biểu hiện của *Igf2* thông qua cơ chế methyl hóa [8], giờ không còn tác động nữa, vì vậy, làm giảm mức độ phiên mã của *Igf2*. Trong các thể đột biến khác ($\Delta U2/ Dom$) cũng như hoang dại, mức độ biểu hiện các promoter đều đạt mức khá cao so với thể $\Delta 3/ Dom$, đặc biệt P2 và P3 cao nhất và khá ổn định. Đối với promoter P0 và P1, chỉ biểu hiện cao trong thể đột biến $\Delta U2/ Dom$.

KẾT LUẬN

Mỗi đặc hiệu cho mỗi promoter được thiết và đã khuếch đại chính xác kích thước của mỗi promoter từ cDNA (P0: 120 bp, P1: 98 bp, P2: 135 bp, P3: 132 bp, *Igf2* tổng số: 201 bp). Đối với thể hoang dại, promoter P3 biểu hiện cao nhất (80%), tiếp đến P2 (70%), và 2 promoter còn lại biểu hiện thấp so với *Igf2* tổng số là P1 và P0 (dưới 50%). Có sự biểu hiện khác nhau của các promoter trong thể đột biến và thể hoang dại. Các promoter biểu hiện thấp trong thể đột biến $\Delta 3/ Dom$. P2 và P3 biểu hiện cao và ổn định trong 2 thể hoang dại và thể đột biến $\Delta U2/ Dom$. P0 và P1 chỉ biểu hiện cao trong thể đột biến $\Delta U2/ Dom$.

Lời cảm ơn: Xin chân thành cảm ơn nguồn kinh phí từ đề tài DHH-2016-03-81 thuộc Đại học Huế, cảm ơn Phòng Thí nghiệm Sinh học Phân tử - Viện Di truyền Phân tử Montpellier, Phòng Thí nghiệm Luisa Dandolo, INSERM Paris - Cộng hòa Pháp đã cung cấp các dòng chuột đột biến, gene tham chiếu *Gapdh* khi định lượng ARN và một số hoá chất khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Biressi S, Molinaro M, Cossu G (2007). Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Devel Bio*: 308: 281 - 293.
- Bhusari S, Yang B, Kueck J, Huang W, Jarrard DF (2011) Insulin-like growth factor - 2 (IGF2) loss of imprinting marks a field defect within human prostates containing cancer prostate. *Prostate*: 71(15): 1621 - 1630.
- Constância M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, Stewart F, Kelsey G, Fowden A, Sibley C, Reik W (2002) Placental - specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*: 417 (6892): 945 - 948.
- DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ (1990) A growth - deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin - like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature*: 345(6270): 78 - 80.
- Joanne L, Thorvaldsen, Kristen L, Duran, Marisa S, Bartolomei (1998) Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and *Igf2*. *Gene Dev* 12(23): 3693 - 3702.
- Meisma D, Holthuisen PE, Van den Brande JL, Sussenbach JS (1991) Specific endonucleolytic cleavage of IGF-II mRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 179(3): 1509 - 1516.
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. Cold spring harbor laboratory, cold spring harbor, NY.
- St-Pierre J, Hivert MF, Perron P, Poirier P, Guay SP, Brisson D, Bouchard L (2012) IGF2 DNA methylation is a modulator of newborn's fetal growth and development. *Epigenetics* 7(10): 1125 - 1132.
- Wolfgang H, Andreas W, Arend K, Steffen A, Steven G, Gray TJ, Torsten P (2011) Promoter - specific transcription of the IGF2 gene: a novel rapid, non-radioactive and highly sensitive protocol for mRNA analysis. *Virchows Arch* 439: 803 - 807.

PROMOTERS EXPRESSION LEVEL OF *Igf2* GENE IN THE WILD-TYPE AND IN MUTANT CLONES

Tran Van Giang^{1*}, Guy Cathala²

¹ Hue University of Education, Hue University - VietNam

² IGMM - France

SUMMARY

Genomic imprinting that only one parental allele is expressed depending on allele specific origin. Imprinted *Igf2* genes (Insulin-like growth factor 2) encoded a growth factor regulator, which play an important role in embryonic development and formation of the placenta. The gene expression and regulate gene expression of *Igf2* genes were carried out of different promoters. The promoter expression was extremely complex and varies by stage, each of different size and different in wild-type mice and mutant mice. From the wild-type and mutant mice, RNA in placental tissue (17 days) to be used for analyse P0 promoter (this promoter is specific expression in the placenta), for all the other promoters using RNA extracted from the liver tissue (7.5 days). All this RNA was used to transfer to cDNA before carrying out study quantitative expression level of the promoters. Results showed that the transcription of *Igf2* P3 and P2 promoter were the highest in all the mice (except $\Delta U3/Dom$). P0 and P1 promoter were high expression in only $\Delta U2/Dom$, remaining cases showed the low expression in all the other mice. All promoters expressed with stable level and high level in wild-type and $\Delta U2/Dom$ mutation; low level in $\Delta 3/Dom$ mutation.

Keywords: Expression, genomic imprinting, *Igf2*, mutant clones, promoter.

* Author for correspondence: Tel: +84-2343822132, Email: vtran.giang@gmail.com