

鸭 *MyoG* 基因启动子的生物信息学分析及其 甲基化频率对基因表达的影响

吴乾锋, 刘贺贺*, 张涛, 罗俊, 胡博, 王继文

(四川农业大学动物遗传育种研究所, 四川 温江 611130)

摘 要: 采用 RT-PCR 技术扩增和克隆鸭 *MyoG* 基因启动子, 并对其启动子序列进行生物信息学分析, 采用 Sequenom MassArray 技术检测 CpG 岛在鸭肌肉组织中的甲基化水平, 用 qRT-PCR 检测 *MyoG* 基因的表达量。结果表明, 扩增得到鸭 *MyoG* 基因启动子序列 2 730 bp, 对启动子序列预测后, 发现存在 2 个 CpG 岛, 其中 CpG 岛(–2 536 ~ –1 997 bp)存在 5 个转录因子结合位点和多个真核生物结构元件。甲基化检测结果表明: 在鸭的个体和组织水平上, 启动子甲基化率均未聚类在一起; CpG 位点甲基化频率存在个体差异, 22% CpG 位点的甲基化频率与 *MyoG* 的 mRNA 表达量呈负相关($P>0.05$), 78% CpG 位点的甲基化频率呈正相关($P>0.05$), 其中, 腿肌甲基化位点 CpG_1、CpG_26.27.28.29 的甲基化频率与 *MyoG* 基因表达水平均呈显著相关($P<0.05$)。 *MyoG* 基因在鸭与在哺乳动物中的转录调控机制存在差异。试验中发现多个影响鸭 *MyoG* 基因转录的潜在甲基化位点, 其中 CpG_1 与 CpG_26.27.28.29 能通过 DNA 甲基化修饰影响 *MyoG* 基因在鸭腿肌中的转录。本研究结果可为鸭 *MyoG* 基因转录调控提供参考依据。

关 键 词: 鸭; 肌细胞生成素; 启动子; DNA 甲基化

中图分类号: S834.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2017)02-0187-08

Bioinformatics analysis on cloned promoter *MyoG* in duck, and the influence of its methylation levels on gene transcription

WU Qianfeng, LIU Hehe*, ZHANG Tao, LUO Jun, HU Bo, WANG Jiwen

(Institute of Animal Genetics and Breeding, Sichuan Agricultural University, Wenjiang, Sichuan 611130)

Abstract: Promoter sequence of gene *MyoG* in duck was amplified and cloned using RT-PCR, and its bioinformatic info was analyzed as well; the methylation level in CpG island (from –2 536 to –1 997 bp) of promoter *MyoG* in muscle tissues was detected using the Sequenom MassArray technique, meanwhile, its expression level was detected using qRT-PCR. The results showed that the amplified *MyoG* promoter sequences was 2 730 bp which contained 2 CpG islands in promoter region. The CpG island (from –2 536 to –1 997 bp) included 5 binding sites of transcription factor and several eukaryotes structure components. The methylation data showed that methylation status from different individuals and tissues did not clustered together. Methylation frequency in CpG loci varied with individuals, and the methylation frequency on 22% of locus were negatively correlated with *MyoG* expression levels ($P>0.05$), whereas, on 78% of locus were positively correlated ($P>0.05$) with that, among of them, they reached significant difference level on locus of CpG 1, CpG 26.27.28.29 from leg muscles ($P<0.05$). The mechanism of regulating transcription for *MyoG* was different from mammals. Among the potential locus influencing *MyoG* transcription, CpG_1 and CpG_26.27.28.29 might affect *MyoG* transcription in skeletal muscle tissues of duck leg through DNA methylation. This study might list foundation data for studying the regulatory mechanisms of *MyoG* transcription in duck.

Keywords: duck; myogenin (*MyoG*); promoter sequence; DNA methylation

肌纤维的生成及分化过程受生肌调节因子家族(myogenesis regulatory factors, MRFs)的调控。肌细胞生成素(myogenin)在肌细胞生成过程中起中心调控作用,如 MyoG 可促进成肌细胞增殖和融合为多核肌细胞^[1-4];单独敲除 MyoG 基因的小鼠会由于严重的骨骼肌发育缺陷而死亡^[5]。启动子通过控制基因转录来影响基因功能。关于哺乳动物 MyoG 转录调控机制的研究已经取得了一些进展^[6]。转录因子(Myod、MEF2、MEF3、MTBF、TEF1、PRDF、Sp1、SRF、ERE、GRE 和 Oct-1)可能对牛 MyoG 基因启动子活性有着重要的调控作用^[7];牛 MyoG 基因启动子还是一种肌肉细胞特异性启动子,体外试验表明,牛 MyoG 基因启动子可以在绵羊骨骼肌卫星细胞中驱动外源基因高表达^[8]。WANG 等^[9]使用双荧光素酶基因报告系统筛选了牛 MyoG 基因启动子的核心区域,为牛 MyoG 基因转录调控机制研究打下了基础^[9]。近年来,MyoG 基因启动子片段在羊、猪和马、鹿上也相继被成功克隆^[10-12]。有关家禽 MyoG 基因转录调控机制研究的报道尚少。

DNA 甲基化通过改变基因启动子区域的 DNA 甲基化频率来影响基因转录水平,进而影响基因功能,例如组蛋白的甲基化修饰会导致表型的改变。目前关于 MyoG 基因启动子区 DNA 甲基化修饰调控的报道尚少。鸭 MyoG 基因存在多处单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism, SNP)位点,并与骨骼肌发育程度密切相关,说明 MyoG 是影响鸭肌肉发育的重要候选基因^[13]。笔者拟探讨鸭 MyoG 基

因启动子区域特点,分析启动子 DNA 甲基化对鸭骨骼肌 MyoG 表达的影响,旨在探明 MyoG 基因转录调控在骨骼肌发育中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

农华肉鸭 P 系(NH-P)雏鸭 5 只,由四川农业大学家禽育种场提供。取静脉血 500 μ L 于 EP 管,放置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。将鸭放血致死,分离腿肌和胸肌组织,用液氮研磨成粉后置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存,用于后期核酸的提取。

1.2 方法

1.2.1 鸭 MyoG 基因启动子的克隆测序

试验于 2015 年在畜禽遗传资源发掘与创新利用四川省重点实验室内进行。

采用氯仿抽提法提取鸭全血总 DNA^[14]。将质检合格的 DNA 统一稀释到 100 ng/ μ L 备用。根据 GenBank 中鸭 MyoG 基因序列(NW_004676592.1),用 Premier 5.0 设计 4 条特异性引物(表 1)克隆 MyoG 基因启动子序列。PCR 反应体系:模板 cDNA 1 μ L,上、下游引物各 0.4 μ L (10 μ mol/L), 2 $\times$ PCR Master Mix 5 μ L,加 ddH₂O 3.2 μ L,补足体系至 10 μ L。PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。

表 1 鸭 MyoG 基因启动子扩增、定量检测、甲基化测序的引物序列和退火温度及产物大小

Table 1 Sequence information, annealing temperature and product length of primers used for duck MyoG promoter clone, qRT-PCR detection and DNA methylation sequencing

引物名称	引物序列(5'-3')	退火温度/ $^{\circ}$ C	产物大小/bp
A1	F: GGGTAATTCGAGCTGTCGG R: CCGCAGGAAGGGAATCG	58.1	685
A2	F: TAAGCTGCTTCCTCGCATCAA R: CTGTGCCCATCAGCAGGTG	59.8	1 035
A3	F: CAGGAGCCCTGAAACATCC R: CGACAGCTCCGAATTACCC	58.6	1 095
A4	F: AGTAAGGGTTGGTCTCGAAGAG R: CCCCCAAATGACTAGAAATGAA	57.8	920
MyoG	F: CGGATCACCTCCTGCCTGA R: CGTCCTCTACGGCGATGCT	63.0	87
GAPDH	F: AAGGCTGAGAATGGGAAAC R: TTCAGGACTTGTCATACTTC	50.0	254
β -actin	F: GCTATGTCGCCCTGGATTTC R: CACAGGACTCCATACCCAAGAA	55.0	168
甲基化引物	F: aggaagagagGGGGGTTTAGGGTTTTGTGT R: cagtaatacgactcactataggagaaggctACCAAAAAACCTTTTCTACCTATTCC	60.0	442

F 上游引物, R 下游引物。甲基化引物中, 大写字母部分为基因互补序列, 小写字母部分为 T7RNA 聚合酶的启动子序列。

1.2.2 *MyoG* 基因启动子结构预测

用表 2 中软件对已获得的鸭 *MyoG* 基因启动子

序列的启动子核心区、转录因子结合位点和开放阅读框等进行生物信息学分析。

表 2 对鸭 *MyoG* 基因启动子进行生物信息学分析的在线软件的网址及用途

Table 2 Websites and purposes of online software used for bioinformatic analysis on <i>MyoG</i> promoter in duck		
软件名称	网址	用途
BDGP	http://www.fruitfly.org/	核心启动子区预测
NNPP	http://www.fruitfly.org/seq/tools/promoter.html	
Search for CARE	http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/searchCARE.html	核心转录因子预测
Alibaba2	http://www.gene.regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html	转录因子结合位点分析
ClustalW2	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/	序列同源性比对
CpGISland Searcher	http://www.uscnorris.com/cpgisland/cpg.aspx	CpG 岛分析
CpG finder	http://cpgislands.usc.edu/	

1.2.3 DNA 甲基化频率检测

采用 DNA 提取试剂盒(TIANamp Genomic DNA Kit, 天根生化科技(北京)有限公司)提取各个体胸肌、腿肌组织的 DNA, 提取的 DNA 用亚硫酸盐处理, 将样本 DNA 中未甲基化的 C 全部转化为 U(相当于 DNA 中的 T); 用 Sequenom Epidesigner 软件设计 1 对引物(表 1)扩增样本, 得到带有 T₇ RNA 聚合酶启动子序列的扩增产物; 在体外转录体系中, 用 T7 RNA 聚合酶将扩增产物转录为 RNA 片段; 用 RNase A 能够特异性识别并切割 RNA 中 U 3'端的特性, 将 RNA 片段切割成携带有 CpG 位点的小片段; 在相同的片段中, 用 Sequenom MassArray 飞行质谱分析系统检测产物。

1.2.4 基因表达量检测

分别提取鸭胸肌和腿肌的 RNA, 并反转录成 cDNA, 用于 qRT-PCR 分析。鸭 *MyoG* 定量引物和内参基因引物均参考文献[15]进行设计(表 1)。反应体系: SYBR Premix Ex TaqTM 荧光定量 Mix(Takara, 大连) 6.25 μL, 上下游引物各 1 μL(5 μmol/L), 稀释后的模板 cDNA 4.25 μL。

定量 PCR 反应程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 10 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 39 个循环。溶解曲线反应程序: 95 °C 变性 10 s; 65 °C 退火 5 s; 95 °C 终延伸。

1.3 数据分析

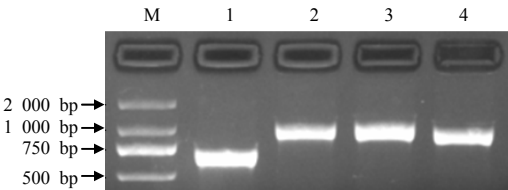
用 SPSS 19 软件进行数据处理。用 Cluster 3.0

软件和 MultiExperiment Viewer(MeV)软件对所有样本中启动子各位点的甲基化频率进行聚类分析。在 $P<0.05$ 水平上对试验数据进行 t 检验。

2 结果与分析

2.1 鸭 *MyoG* 基因启动子的序列扩增结果及生物信息学分析

由图 1 可知, 4 段扩增产物长度分别与预期产物大小相符。用 DNASTar 软件拼接 4 段扩增序列, 得到共 2 730 bp 的鸭 *MyoG* 基因启动子序列。将扩增获得的鸭 *MyoG* 基因启动子序列提交到 NCBI(KX981598)。扩增得到的序列与预测的鸭 *MyoG* 基因启动子序列(NW_004676592.1)的相似性为 99%。序列分析结果表明, 鸭 *MyoG* 基因启动子序列存在 7 处潜在的核心活性区域, 其中核心启动子区域最有可能是活性区 2 和 5, G 和 C(灰色背景)为该基因的转录起始位点(表 3)。



M DNA Marker DL 2 000; 1、2、3、4 分别为引物 A1、A2、A3、A4 扩增的 PCR 产物。

图 1 鸭 *MyoG* 基因启动子区分段扩增产物的电泳结果
Fig.1 Electrophoretogram from amplification products of gene promoter *MyoG* in duck

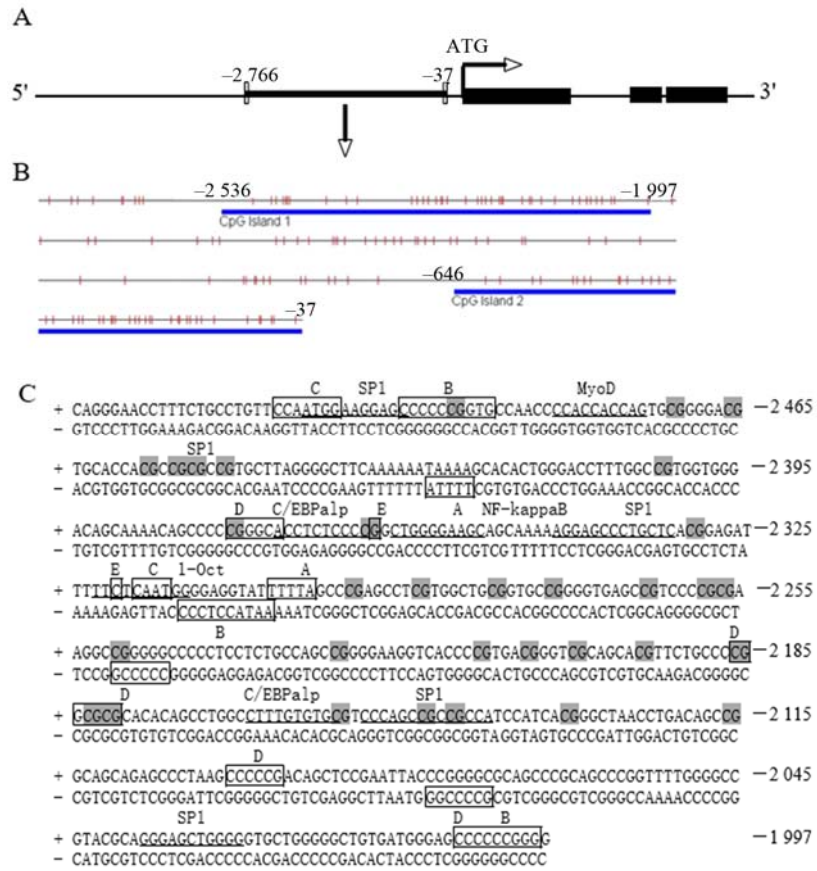
表 3 鸭 MyoG 基因启动子的核心活性区域分布及序列信息

Table 3 Distribution of core activity areas and sequence information of gene promoter MyoG in duck				
活性区	起始位点/bp	终止位点/bp	分值	启动子序列(5'—3')
1	-2 407	-2 356	0.89	CGTGGTGGGACAGCAAAACAGCCCCGGGCACCTCTCCCCGGCTGGGGAA
2	-1 807	-1 756	0.99	ATGGGGGGCCCTAAAAGAGCTGGGGTGAATGTGGGTGCTCGGGCTGACCCC
3	-2 364	-2 313	0.86	TGGGGAAGCAGCAAAAAGGAGCCCTGCTCACAGAGATTTTCTCAATGGGG
4	-1 504	-1 453	0.89	CTCTGGCAATTAACAAAACGTAGACTCGGGCTGGTCCCTTTGGTGTCCCTC
5	-748	-697	0.99	ATTTCTAGGTAAAAATGTGGGGACAGCAATTTCCAGTGCTGAGAGCCC
6	-339	-288	0.96	CGCGGCGGGGCAACAAAGCCCCGTTTGCCGAGCCGCCCTCCCGTCCCG
7	-115	-64	0.93	TTAGGTCCGCTATATTTATCTCCGCGATTAATGCCAGCGCCGGGGTTTAA

2.2 鸭 MyoG 基因启动子序列中 CpG 岛的预测及分析结果

用 CpG Island Searcher 对扩增序列进行 CpG 岛预测,发现鸭 MyoG 基因启动子存在 2 段典型的 CpG 岛(图 2-B),分别是 CpG 岛(-2 536 ~ -1 997 bp)和 CpG 岛(-646 ~ -37 bp)。对 CpG 岛(-2 536 ~ -1 997 bp)进行生物信息学分析(图 2-C),结果表明:在这个 CpG 岛中发现了 5 个 Sp1、1 个 1-Oct、1 个 C/EBPalp、1 个 NF-κB 与 1 个 MyoD 转录因子结合

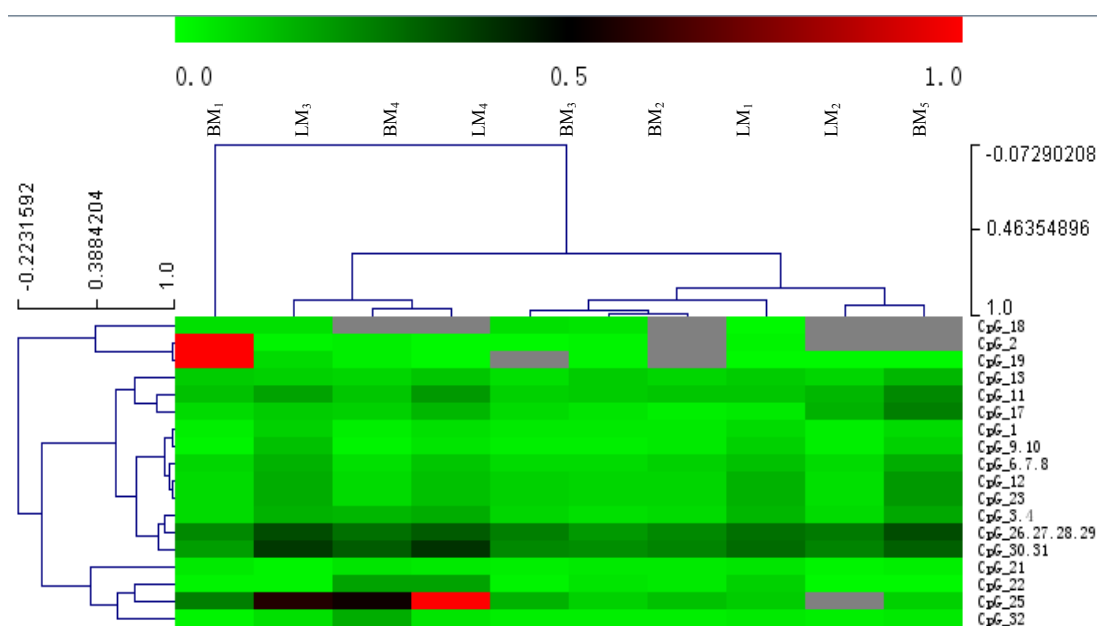
位点;另外还包括 TATA-box、GC-box、CAAT-box 和转录起始位点。其中,CpG_32 落于转录因子 Sp1(CCCCCCGGTG)结合位点中,CpG_26.27.28.29 落于 Sp1(CGCCGCGCCGTGC)结合位点中,CpG_24 落于 GC-motif(CGGGCA)结合位点中,CpG_23 落于转录起始位点 E 中,CpG_3.4 落于 SP1(CCCAGCCGCCGCCA)结合位点中。这些甲基化位点可能是影响 MyoG 基因转录调控的潜在位点。



A 为克隆序列在 MyoG 基因组的位置;B 为预测的 CpG 岛;C 为 CpG 岛生物信息学分析结果,其中,A 为 TATA-box,B 为 Sp1,C 为 CAAT-box,D 为 GC-motif,E 为转录起始位点,灰色背景序列为甲基化位点(1 个 GC 为 1 个甲基化位点,其顺序依次为 32,31,30,...,2,1),下划线序列为转录因子结合位点。

图 2 鸭 MyoG 基因启动子区 CpG 岛位置、调控元件和转录因子结合位点分布

Fig.2 CpG island locations, regulatory elements, and binding sites of transcription factor in promoter MyoG region of duck



BM 为胸肌；LM 为腿肌；LM 和 BM 的下标 1、2、3、4、5 均为个体编号；图中灰色区域代表该位点甲基化率为 0。

图 4 CpG 岛(-2 536~-1 997 bp)位点甲基化频率在鸭个体和鸭组织间的双向聚类分析结果

Fig.4 Two-dimensional cluster analysis on methylation level in each individual and CpG island locus (from -2 536 to -1 997 bp)

通过比较各 CpG 位点的甲基化频率,发现只有 CpG_2、CpG_18 和 CpG_32 在胸肌中的甲基化频率高于在腿肌中的,其余位点的甲基化频率均低于在腿肌中的(图 5)。整体水平上,胸肌中 *MyoG* 基因启动子的甲基化频率(0.086 ± 0.025)低于腿肌中的

(0.124 ± 0.039)($P > 0.05$)。采用 qRT-PCR 技术检测 *MyoG* 基因 mRNA 的表达量,结果显示:胸肌组的 *MyoG* 表达量(29.94 ± 0.45)略低于腿肌组的(30.94 ± 0.78),但其差异无统计学意义($P > 0.05$)。

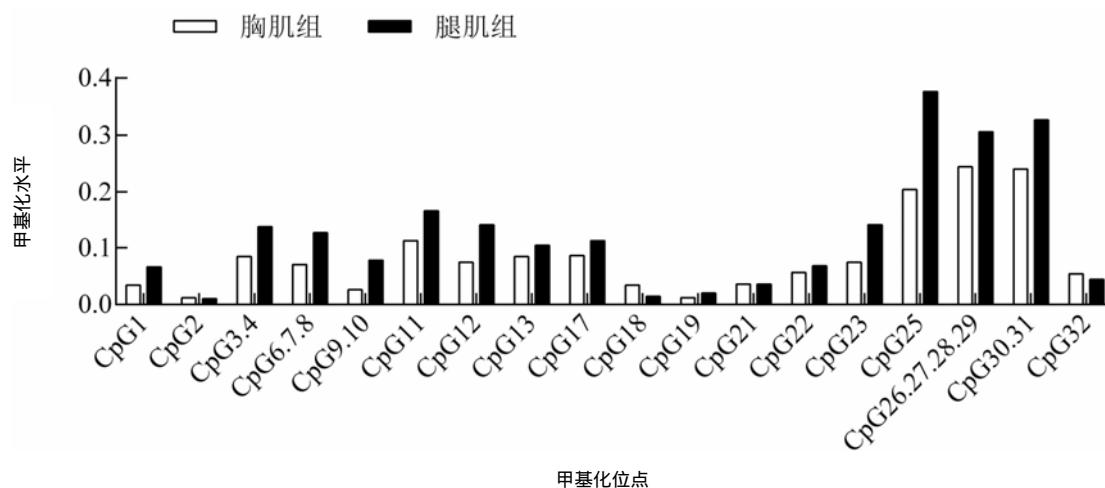


图 5 鸭 *MyoG* 基因启动子各 CpG 位点在胸肌、腿肌中的甲基化频率

Fig.5 Methylation level in each CpG locus of *MyoG* promoter derived from breast and leg muscle tissues

对鸭 *MyoG* 基因启动子区 CpG 岛各甲基化单位的甲基化频率与 *MyoG* 基因的 mRNA 相对表达量进行相关分析,结果(表 4)显示:胸肌中 CpG_1、CpG_6、CpG_7、CpG_8、CpG_9、CpG_10、CpG_12、CpG_18、CpG_23 和腿肌中 CpG_21、CpG_22 的甲

基化频率与 mRNA 表达量均呈负相关($P > 0.05$);其余甲基化位点的甲基化频率与 mRNA 表达量呈正相关($P > 0.05$),其中,腿肌组中 CpG_1 和 CpG_26.27.28.29 的甲基化频率与 mRNA 表达量呈显著正相关($P < 0.05$)。

表 4 鸭 *MyoG* 基因启动子区 CpG 岛甲基化单位的甲基化频率与 mRNA 表达量的相关性分析结果

Table 4 Correlation analysis between methylation frequency on each CpG loci and mRNA expression level

CpG 位点	相关系数		P 值	
	胸肌	腿肌	胸肌	腿肌
CpG_1	-0.753	0.928	0.142	0.023 [*]
CpG_2	0.202	0.458	0.744	0.437
CpG_3.4	0.358	0.695	0.554	0.193
CpG_6.7.8	-0.890	0.846	0.887	0.071
CpG_9.10	-0.704	0.847	0.185	0.071
CpG_11	0.556	0.626	0.330	0.259
CpG_12	-0.750	0.694	0.145	0.193
CpG_13	0.690	0.267	0.193	0.664
CpG_17	0.170	0.468	0.785	0.426
CpG_18	-0.482	0.787	0.411	0.114
CpG_19	0.542	0.875	0.345	0.052
CpG_21	0.515	-0.819	0.375	0.090
CpG_22	0.504	-0.297	0.387	0.628
CpG_23	-0.750	0.694	0.145	0.193
CpG_25	0.477	0.326	0.417	0.593
CpG_26.27.28.29	0.117	0.901	0.851	0.030 [*]
CpG_30.31	0.288	0.731	0.639	0.161
CpG_32	0.463	0.874	0.432	0.052

n=5; ^{*}为 $P<0.05$ 水平上显著。

3 结论与讨论

TATA-box 可与转录激活因子结合形成共激活因子, 激活 RNA 转录起始复合物的形成^[16], 一旦发生突变就会导致转录效率降低, 甚至转录过程被阻止^[17]。本研究获得了鸭 *MyoG* 基因启动子序列, 长度为-2 730 bp, 介于-2 766 ~ -37 bp 之间, 并发现该启动子序列存在 2 处 CpG 岛和 7 处具有活性的启动子核心区域, 还发现了 TATA-box、GC-box、CAAT-box 等典型的真核生物转录调控元件。在哺乳动物(人和小鼠)启动子区(转录起始位点前 3 000 bp)未发现 CpG 岛, 在鸭 *MyoG* 基因启动子 CpG 岛 -2 536 ~ -1 997 bp 区域内, 人、小鼠的 *MyoG* 基因启动子中 99.4% 的甲基化位点和所有核心转录因子与鸭的匹配不上, 推测鸭的 *MyoG* 基因转录调控可能与哺乳动物的存在差异。

DNA 甲基化作为表观遗传修饰的一种调节方式, 能够直接阻止转录因子结合, 使染色质结构发生变化, 进而限制转录因子对基因的调控^[18-19], 在基因表达^[20-21]和染色质结构^[22]方面起着重要的作用。目前还没有关于 *MyoG* 表观遗传修饰影响基因转录方面的相关报道。本研究中预测到鸭 *MyoG* 基因启动子区存在 CpG 岛, 并测序获得 CpG 岛中 CpG

位点的甲基化频率, 其中 CpG_32、CpG_26.27.28.29、CpG_3.4 均落在转录因子 Sp1 中, CpG_24 落于转录因子 GC-motif 中, CpG_23 落于转录起始位点 E 中。CpG_32、CpG_26.27.28.29、CpG_3.4、CpG_24 和 CpG_23 可能参与了鸭 *MyoG* 基因的转录调控过程。

b-Boule 基因启动子 CpG 位点在黄牛和犏牛的不同个体间存在差异^[23]。本研究中对鸭 *MyoG* 基因启动子有甲基化信息的 18 个 CpG 位点甲基化频率进行双向聚类分析的结果表明, CpG 甲基化频率在个体水平上可能存在差异, 同一基因启动子 CpG 位点在不同个体中的差异和不同的组织中的差异较大。

一般认为, 基因启动子甲基化影响转录因子与启动子区域结合, 从而抑制基因表达。羊 *H19* 基因第 5 个 CpG 岛的甲基化频率越高, 基因表达量越低^[24]。DNA 甲基化修饰会促进基因转录。肖剑等^[19]研究猪皮下和内脏脂肪组织中 G 蛋白偶联受体 120(GPR120)DNA 的甲基化, 发现第 2 内含子 CpG 岛的甲基化促进其 mRNA 的转录; 康倩^[25]在小鼠中也得到了类似的结果, 发现基因 *U2af1-rs1* 在精子及卵子中的甲基化率与其表达量呈正相关。本试验中通过 qRT-PCR 技术检测 *MyoG* 基因在鸭腿肌和胸肌中的相对表达量, 然后将 mRNA 表达量与 CpG 岛中各位点甲基化频率的相关性分析结果表明, *MyoG* 基因启动子甲基化频率在整体水平上与 mRNA 表达量成正相关, 且整体甲基化频率与各个甲基化位点甲基化频率的大致趋势保持一致。据此可推测, 启动子的甲基化修饰有可能促进基因转录, 这一过程可能与甲基化修饰和转录因子的共同作用有关。本研究中鸭 *MyoG* 基因启动子各位点甲基化频率对 mRNA 表达有不同程度的影响, 其中腿肌组甲基化位点 CpG_1、CpG_26.27.28.29 的甲基化频率与基因表达量呈显著相关($P<0.05$), 提示 CpG_1 与 CpG_26.27.28.29 能通过甲基化修饰影响 *MyoG* 基因在鸭腿肌中的转录。

本研究中克隆了鸭 *MyoG* 基因启动子序列 2 730 bp, 预测其含有 2 个 CpG 岛, 其中 CpG 岛(-2 536 ~ -1 997 bp)存在 5 个转录因子结合位点和多个调控元件, 与在哺乳动物中的差异较大, 提示 *MyoG* 基因在鸭中的转录调控与在哺乳动物中的可能存在差异。本研究中发现 5 个影响鸭 *MyoG* 基因转录的潜

在甲基化位点, 其中 CpG₁ 与 CpG_{26.27.28.29} 能通过甲基化修饰影响 MyoG 基因在鸭腿肌中的转录。

参考文献:

- [1] HASTY P, BRADLEY A, MORRIS J H, et al. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene[J]. *Nature*, 1993, 364(6437): 501–506. DOI:10.1038/364501a0.
- [2] WYSZYŃSKA-KOKO J, PIERZCHAŁA M, FLISIKOWSKI K, et al. Polymorphisms in coding and regulatory regions of the porcine MYF6 and MyoG genes and expression of the MYF6 gene in m. longissimus dorsi versus productive traits in pigs[J]. *J Appl Genet*, 2006, 47(2): 131–138. DOI:10.1007/BF03194612.
- [3] BECKER C, HAGMANN J, MÜLLER J, et al. Spontaneous epigenetic variation in the *Arabidopsis thaliana* methylome[J]. *Nature*, 2011, 480(7376): 245–249. DOI:10.1038/nature10555.
- [4] NABESHIMA Y, HANAOKA K, HAYASAKA M, et al. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect[J]. *Nature*, 1993, 364(6437): 532–535. DOI:10.1038/364532a0.
- [5] WEINTRAUB H, DAVIS R, TAPSCOTT S, et al. The MyoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage[J]. *Science*, 1991, 251(4995): 761–766. DOI:10.1126/science.1846704.
- [6] 王珊, 陈宏, 蔡欣. 牛 MyoG 基因启动子的克隆与序列分析[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2006, 34(8): 12–16. DOI:10.3321/j.issn:1671-9387.2006.08.003.
- [7] 王秋华, 曹允考, 李树峰, 等. 牛 MyoG 基因启动子的克隆及功能的初步分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(1): 37–43.
- [8] 李硕, 郝斐, 梁浩, 等. 牛肌细胞生成素基因(Myog)启动子的活性及组织特异性分析[J]. *农业生物技术学报*, 2014, 22(1): 87–93. DOI:10.3969/j.issn.1674-7968.2014.01.011.
- [9] WANG X, LU M, FENG L H, et al. Effects of CMV enhancer on activity and specificity of bovine MyoG Gene Promoter[J]. *Journal of Northeast Agricultural University(English Edition)*, 2013, 20(4): 34–38.
- [10] 刘铮铸, 巩元芳, 张文香, 等. 山羊 MyoG 基因启动子区序列分析与结构预测[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(1): 29–36.
- [11] 张晓卉. 民猪 MyoG 基因的克隆、表达与启动子核心区的定位[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
- [12] 宋兴超, 荣敏, 邢秀梅, 等. 甘肃马鹿肌细胞生成素(Myog)基因启动子区序列克隆与分析[J]. *特产研究*, 2009, 31(2): 12–16. DOI:10.3969/j.issn.1001-4721.2009.02.004.
- [13] 赵忠海, 李辉, 易恒洁, 等. MyoG 基因多态性对鸭屠宰性状的影响[J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(6): 1189–1194.
- [14] 孙朕, 孙英民, 郑素月, 等. 家禽血液基因组 DNA 的快速提取[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(16): 8449–8452. DOI:10.3969/j.issn.0517-6611.2010.16.063.
- [15] 刘贺贺. IGF-1 对鸭胚肌肉发育影响及其分子机理研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2012.
- [16] NELSON B H. IL-2, regulatory T cells, and tolerance[J]. *J Immunol*, 2004, 172(7): 3983–3988. DOI:10.4049/jimmunol.172.7.3983.
- [17] 张小辉, 祁艳霞. 真核生物启动子 TATA-box·GC-box 和 CAAT-box 的分析[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(4): 1380–1381.
- [18] KIM J. Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, *Peg3*[J]. *Human Molecular Genetics*, 2003, 12(3): 233–245. DOI:10.1093/hmg/12.3.233.
- [19] 肖剑, 王红梅, 马继登, 等. 猪皮下和内脏脂肪组织中 G 蛋白偶联受体 120(GPR120)第 2 内含子 CpG 岛甲基化促进其 mRNA 的转录[J]. *农业生物技术学报*, 2014, 22(8): 992–1000.
- [20] EL-OSTA A, KANTHARIDIS P, ZALCBERG J R, et al. Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (*MDR1*) on activation[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(6): 1844–1857. DOI:10.1128/mcb.22.6.1844-1857.2002.
- [21] FRAGA M F, BALLESTAR E, MONTROYA G, et al. The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(6): 1765–1774. DOI:10.1093/nar/gkg249.
- [22] 张广华. 子宫内膜癌细胞孕激素受体基因表现遗传学调控的研究—DNA 甲基化及表达沉默相关的染色质成分变化[D]. 天津: 天津医科大学, 2010.10.7666/d.y1749766.
- [23] 李明桂. 牛睾丸组织 *b-Boule* 基因表达的甲基化调控研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.10.7666/d.Y2361886.
- [24] 李长雷, 郑聪颖, 刘军, 等. 山羊克隆胎儿不同组织中 *H19* 基因 CpG 岛甲基化模式及表达量检测[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(5): 582–587.
- [25] 康倩. Aroclor1254 对小鼠生殖细胞印记基因表达与甲基化的影响[D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库