

山羊PHLDA2启动子克隆和甲基化分析

苏鲁方^{1*}, 刘小云¹, 郑瑜¹, 包纯¹, 蒋曹德^{2*}

¹江汉大学生命科学学院, 湖北 武汉

²西南大学动物科技学院, 重庆

收稿日期: 2022年4月27日; 录用日期: 2022年5月24日; 发布日期: 2022年5月31日

摘要

为了研究山羊血小板白细胞C激酶底物同源样结构域蛋白家族A成员2 (pleckstrin homology-like domain family A member 2, PHLDA2)基因表达水平与其启动子甲基化状态相关性, 试验采用RT-PCR方法检测PHLDA2在各组织间的表达水平(心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉、脂肪、舌、大脑、胎盘), 以及扩增了山羊PHLDA2基因启动子区域序列, 并利用Methylation specific PCR技术检测CpG岛在山羊各组织间的甲基化水平。结果表明: 克隆得到的山羊PHLDA2 1842 bp的启动子序列与绵羊、牛PHLDA2启动子同源性分别达93.2%和87.9%; 启动区CpG岛内第三位点CpG的甲基化频率和胎盘第一外显子区域甲基化水平显著低于其他组织($P < 0.05$)。说明PHLDA2的mRNA相对表达量水平与启动子区CpG岛(-302~-88 bp)内第三个CpG位点甲基化频率和第一外显子CpG岛(49~333 bp)甲基化水平呈负相关。

关键词

山羊, 胎盘, PHLDA2, 启动子, CpG岛, 甲基化分析, 甲基化水平

Cloning and Methylation Analysis of PHLDA2 Promoter in Goat

Lufang Su^{1*}, Xiaoyun Liu¹, Yu Zheng¹, Chun Bao¹, Caode Jiang^{2*}

¹School of Life Science, Jiangnan University, Wuhan Hubei

²College of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing

Received: Apr. 27th, 2022; accepted: May 24th, 2022; published: May 31st, 2022

Abstract

In order to investigate the correlation between gene expression level of pleckstrin homology-like

*通讯作者。

文章引用: 苏鲁方, 刘小云, 郑瑜, 包纯, 蒋曹德. 山羊 PHLDA2 启动子克隆和甲基化分析[J]. 自然科学, 2022, 10(3): 386-396. DOI: 10.12677/ojns.2022.103047

domain family A member 2 (PHLDA2) and its promoter methylation status of goat, RT-PCR was applied to detect the expression level of PHLDA2 in various tissues (heart, liver, spleen, lung, kidney, muscle, fat, tongue, brain and placenta) and clone the sequence of PHLDA2 gene promoter region of goat. Methylation specific PCR was used to detect the methylation level of CpG island in goat tissues. The results showed that the cloned goat PHLDA2 1842 bp promoter sequence had 93.2% homology with sheep and 87.9% homology with cattle PHLDA2 promoter, respectively, and the methylation frequency of CpG at the third site of CpG in the promoter region and the methylation level of the first exon of placenta were significantly lower than those of other tissues ($P < 0.05$). These results suggest that the mRNA relative expression level of PHLDA2 was negatively correlated with the methylation frequency of the third CpG site and the methylation level of the first exon CpG island (49~333 bp) in the promoter region CpG island (-302~-88 bp).

Keywords

Goat, Placenta, PHLDA2, Promoter, CpG Island, Methylation Analysis, Methylation Level

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

胎盘对哺乳动物胚胎的存活和发育有着重要的作用，子宫内胎儿独特的生长潜能是由怀孕期的胎盘决定的，胎盘是母体与胎儿营养物质和代谢物质交换的重要场所，具有免疫学和内分泌的功能[1]。研究共识高效率胎盘被认为是较小的胎盘能维持相对较大的胎儿正常生长，益于子宫容量和幼崽大小，相反，低效率胎盘导致胚胎流产、死亡、出生胎儿低重和胎儿断奶前死亡[2]。因此，胎盘功能遗传机制的揭示，将更好地调控宫内胎儿的生长发育，为提高哺乳动物繁殖率奠定理论基础。

大量的印记基因以剂量敏感的方式调节胎儿生长和胎盘发育，这种调控方式至关重要[3]。印记基因特点是源于亲本等位基因的单一表达，它能影响母体与胎儿之间营养的分配和胎盘响应外界环境改变时营养供给的变化[4]。营养假说认为父本等位基因的表达促进胎儿的生长，确保父本基因组成功的遗传到下一代，反之，母本等位基因的表达抑制胎儿的生长，有利于自身的生存和繁殖[3] [4]。另外，发现印记基因还参与其它的过程途径调控，包括温度调控、哺乳行为、糖和脂肪代谢调控，对出生后幼崽的生存和发育起到相当重要的作用[3]。

研究报道，PHLDA2 (pleckstrin homology-like domain, family A, member 2)在人和鼠中被证实为胎盘生长和分化的变阻器，属于母本表达印记基因，分别位于人、小鼠的 11p15 和 7 号染色体，大量表达于胎盘滋养细胞层细胞，维持胎盘功能的稳定和胎儿的生长发育[5] [6]。大量研究人胎儿生长受限(Fetal growth restriction, FGR)的胎盘中，发现 PHLDA2 异常的升高表达和出生后体重急剧增加的现象，表明 PHLDA2 异常表达影响胎盘功能[7] [8]。同样，过表达 Phlda2 的小鼠，表现明显的胎盘萎缩和 FGR，相反，敲除 phlda2 的小鼠，胎盘过度生长[9] [10]。尤为重要的是 Phlda2 能刺激小鼠胎盘糖原的储存，其功能的丢失和获得导致海绵体滋养层发育异常[6] [11]。PHLDA2 母源等位基因表达方式在人、鼠、牛、猪、山羊中也得到证实[5] [12] [13] [14]。

DNA 甲基化是 DNA 复制后调控方式之一，是一种表观遗传修饰，通过改变基因启动子区域的 DNA 甲基化频率来影响染色质结构，DNA 稳定性以及转录因子与 DNA 相互作用等，从而导致基因转录水平的变

化。DNA 甲基化在甲基转移酶作用下,使 DNA 序列中 CpG 位点的胞嘧啶变为 5-甲基胞嘧啶[15] [16] [17] [18]。如果一个特定的序列中含有大量的 CpG 二核苷酸重复序列,这个地区被称为 CpG 岛,CpG 岛为约 100~200 bp 或几千个碱基,将近 60%的基因通过 DNA 的甲基化来改变基因的染色质结构调控表达和转录[16]。如果特定的基因启动子区域 CpG 岛被甲基化,该基因的表达可能被下调或转录沉默。相反,如果启动子区域 CpG 的岛未被甲基化,该基因通常高度表达,这也是基因组印记表达方式的调控机制之一[19] [20]。

近年来,PHLDA2 基因启动子片段相继在人、牛中被克隆[21] [22]。有关山羊 PHLDA2 基因转录调控机制研究的报道尚少。本研究旨在克隆山羊 PHLDA2 启动子,分析山羊胎盘、心脏、脾脏和肺脏等各组织中的 PHLDA2 启动子区域甲基化频率对其转录水平的影响,为探明 PHLDA2 基因对山羊胎盘、心脏和脾脏等组织发育的调控机制提供分子依据。

2. 材料

2.1. 样品

山羊来自西南大学实验羊场。分别采集出生 3 d 仔黑山羊的 9 种组织:心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉、脂肪、舌、大脑,另采集孕产期胎盘组织,屠宰后迅速采集样品并放置于液氮中暂存,后转移至-80℃保存备用。

2.2. 主要试剂

RNAiso™ Plus、PrimeScript®RT reagent Kit with gDNA Eraser、DL-2000 Marker、TaKaRa Ex Taq® DNA Polymerase、PMD19-T Vector Cloning Kit,均购自宝生物工程(大连)有限公司;琼脂糖、Gold view,均购自北京鼎国生物有限公司; *E. coli* DH5α 感受态细胞,购自北京擎科生物科技有限公司; Gel Extraction Kit (100) D2500-01, 购自 OMEGA bio-tex 公司; EZ DNA methylation gold Kit, 购自北京 Zymo 公司。

2.3. 主要仪器

PCR 仪(型号为 T100 BIO-RAD)、凝胶成像系统(型号为 ChemiDoc XRS+),均购自 Bio-Rad 公司;核酸蛋白检测仪(型号为 Thermo Scientific NanoDrop 2000),购自美国 Thermo Fisher 公司;高速台式离心机(型号为 5418R),购自德国 Eppendorf AG 公司;核酸电泳仪(型号为 DYY-6B),购自北京六一生物科技有限公司。

3. 方法

3.1. 引物设计和合成

利用生物信息学方法,在 GenBank 检索同源性相近的牛 PHLDA2 基因启动子区域(登录号为 NC_007330),根据保守性较高区域设计引物,上游引物为 PHF1 和 PHF2,下游引物设计在已克隆山羊 PHLDA2 基因(登录号为 KF994922.1)区域内,为 PHR1 和 PHR2,其组织间表达引物为 F3 和 R3,内参基因 GAPDH 引物为 F4 和 R4,所有引物用 Primer Preimer 5.0 软件设计。根据已扩增得到的 PHLDA2 启动子序列和其基因序列,利用 Methylation Primer Express v1.0 软件设计启动子 CpG 岛引物 MSPF1/MSPR1、USPF1/USPR1 和第一外显子内的引物 CpG 岛引物 MSPF2/MSPR2、MSPF2/MSPR2。引物委托北京华大基因公司合成,引物序列信息见表 1。

3.2. 组织表达检测

取山羊心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉、脂肪、舌、大脑和胎盘的各组织各 100 mg。

利用 RNAiso™ Plus 试剂盒提取 RNA, 使用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计检测 RNA 浓度和纯度, 参照反转录试剂盒(PrimeScript®RT reagent Kit with gDNA Eraser)说明书对总 RNA 进行反转录合成 cDNA, 置于-20℃保存, 备用。以山羊 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 扩增体系: 上下游引物各 1 μL, 模板 cDNA 1 μL, 10 × Ex buffer (Mg²⁺) 2.5 μL, dNTP Mixture (2.5 mM each) 2.5 μL, Ex Taq 0.25 μL, 补充灭菌双蒸水至 25 μL。PCR 扩增程序: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 30 s, 60.0℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 35 个循环; 72℃再延伸 2 min。PCR 扩增产物通过 1.5%琼脂糖凝胶电泳并凝胶成像系统拍照。

3.3. 启动子 PCR 扩增及测序分析

取山羊心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉、脂肪、舌、大脑和胎盘的的组织各 100 mg 采用常规的苯酚-氯仿抽提法各组织基因组 DNA。使用核酸蛋白测定仪测定 DNA 样品浓度及纯度并进行凝胶电泳, 最后将样品置-20℃冰箱中保存。采用巢氏 PCR 进行启动子扩增。PCR 扩增体系: 上下游引物各 1 μL, 模板 DNA (25 ng) 1 μL, 10 × Ex buffer (Mg²⁺) 2.5 μL, dNTP Mixture (2.5 mM each) 1.0 μL, Ex Taq 0.25 μL, 补充灭菌双蒸水至 25 μL。PCR 扩增程序: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 30 s, 退火温度 30 s (各退火温度见表 1), 72℃延伸 2 min, 共 35 个循环; 72℃再延伸 2 min。将第一次扩增 PCR 产物稀释 50 倍为模板, 进行第二次 PCR 扩增, PCR 扩增体系和扩增程序同第一次相同。第二次 PCR 扩增产物经 1%琼脂糖电泳检测, 拍照, 并回收纯化以及连接转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 将阳性克隆菌液送至北京华大基因公司测序。

3.4. PHLDA2 启动子序列分析

对获得的启动子序列进行生物信息学分析, 所用软件及其在线网址见表 2。

3.5. 亚硫酸氢盐修饰基因组 DNA 及 PCR 扩增

严格按照 DNA 甲基化转化试剂盒说明书对样品各组织 DNA 进行亚硫酸氢盐修饰处理, 再用核酸蛋白测定仪测定修饰处理后样品的浓度及纯度, 最后置-80℃冰箱中保存, 备用。PCR 扩增体系: 上下游引物各 2 μL, 模板 DNA 2 μL, 10 × Epi buffer (Mg²⁺) 5 μL, dNTP Mixture (2.5 mM each) 6 μL, Epi HS Taq 0.25 μL, 补充灭菌双蒸水至 50 μL。PCR 扩增程序: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 30 s, 50.0℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 35 个循环; 72℃再延伸 10 min。PCR 扩增产物经 2%琼脂糖电泳检测, 拍照, 并回收纯化以及连接转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 分别挑取阳性菌落 30 组送至华大基因检测。甲基化频率: $F = \text{CpG 位点胞嘧啶甲基化数} \times 100\% / \text{CpG 位点胞嘧啶总数}$ 。

3.6. 统计分析

运用 Origin 8.0 软件绘图, 用 SPSS16.0 软件分析所得数据, 当 $P < 0.05$ 认为差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

4. 结果与分析

4.1. 山羊 PHLDA2 基因组织表达分析

PCR 扩增得到 PHLDA2 和 GAPDH 基因片段分别为 159 bp 和 119 bp 片段(见图 1), 表明 PHLDA2 基因在山羊的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、大脑、肌肉、脂肪、舌和胎盘组织中均表达, 其中在胎盘中表达量最高, 心脏、肾脏、大脑、肌肉、舌、脂肪、肝脏、肺脏和表 1 引物序列信息。

Table 1. Primer sequence information
表 1. 引物序列信息

基因名称	引物名称	引物序列	预扩增片段大小/bp	退火温度/℃
PHLDA2	PHF1	5'-CGCTTTGTCCTCACATTCCA-3'	2000	51.7
	PHR1	5'-GGTGACGATGGTGAAGTA-3'		
	PHF2	5'-GACGCTGAGTGTCTGTGGTGT-3'		
	PHR2	5'-CGGATGGCAGAGTGAGGGAT-3'		
	F3	5'-CAGGTGTGGAAGAAGAAG-3'	159	60.0
	R3	5'-GGTGACGATGGTGAAGTA-3'		
	MSPF1	5'-CTTTCTGTGGGTGCCAAATCT-3'	215	50.0
	MSPR1	5'-AATCCACATATCTACAACATACACC-3'		
	USPF1	5'-TATTATTTTTTTAGGGTTGGTTTGG-3'	213	50.0
	USPR1	5'-AATCCACATATCTACAACATACACC-3'		
	MSPF2	5'-TTAAGTTGGCGAATATGAGGAGTTC-3'	285	50.0
	MSPR2	5'-GTAAATAACTCTACCCGCGCAAC-3'		
	USPF2	5'-TTAAGTTGGTGAATATGAGGAGTTT-3'	285	50.0
	USPR2	5'-ATTAAATAACTCTACCCACACAAC-3'		
GAPDH	F4	5'-GTGAAGGTCGGAGTGAAC-3'	119	60.0
	R4	5'-ATGTAGTGGAGGTCAATGAAG-3'		

Table 2. Analysis software and its online address
表 2. 分析软件及其在线网址

软件名称	网址	用途
BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome	序列同源性比对
PROMO	http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3	转录顺式作用元件预测
FPROM	http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=fprom&group=programs&subgroup=promoter	转录顺式作用元件预测
NNPP	http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html	核心启动子区域预测
Promoter Scan	https://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/	启动子预测
MethPrimer	http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer2/MethPrimer.cgi	CpG 岛预测
Methylation Primer Express v1.0	/	甲基化引物设计
Primer Preimer 5.0	/	引物设计
Phylogeny	/	进化树构建

脾脏中均有表达(见图 1)。

4.2. 山羊 PHLDA2 基因启动子序列获得及生物信息学分析

PCR 扩增及测序结果显示获得长 1842 bp 片段,包括 5' UTR 区域 20 bp 和启动子区域序列 1822 bp。

通过 NCBI, 与山羊基因组数据库比对, 发现该序列存在山羊 29 号染色体。

同源性分析发现山羊 PHLDA2 基因启动子与绵羊、牛的启动子同源性较高, 分别为 93.2%和 87.9%, 与人、猪和鼠 PHLDA2 启动子同源性较低。

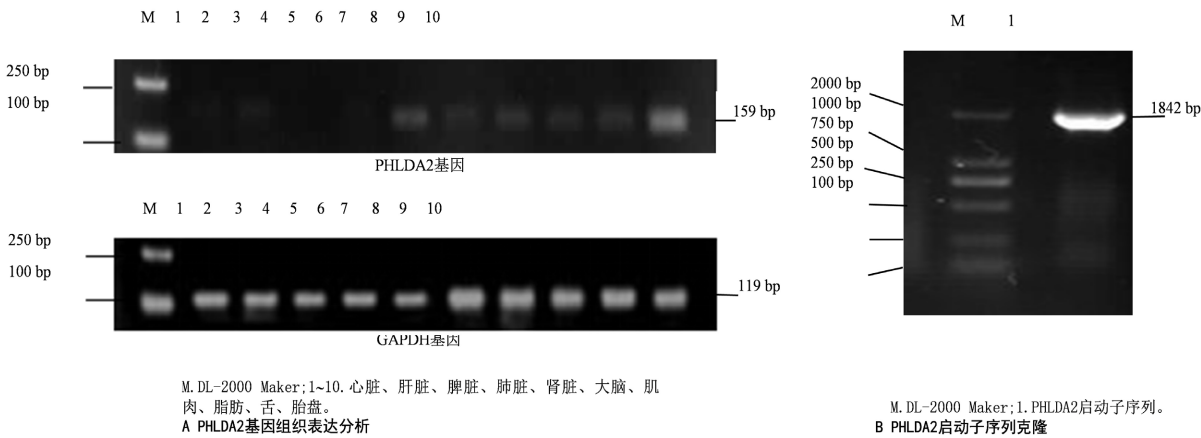


Figure 1. Expression analysis of PHLDA2 gene in goat tissues and amplification of its promoter sequence
图 1. 山羊 PHLDA2 基因组织表达分析和其启动子序列扩增

为了充分了解不同物种 PHLDA2 基因启动子结构特征及物种间的同源关系, 对 NCBI 数据库上可以搜索到其它物种 PHLDA2 基因启动子进行聚类分析, 包括人(*Homo sapiens*)、牛(*Bos taurus*)、家犬(*Canis lupus familiaris*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、鸡(*Gallus gallus*)、家鼠(*Mus musculus*)、绵羊(*Ovis aries*)、黑猩猩(*Pan troglodytes*)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)和猪(*Sus scrofa*)共搜索到 10 条进行分析。将筛选出来的序列用 phylogeny (Bootstrap = 1000)构建 PHLDA2 启动子进化树。结果表明山羊与绵羊、牛 PHLDA2 启动子亲缘关系最近(见图 2)。

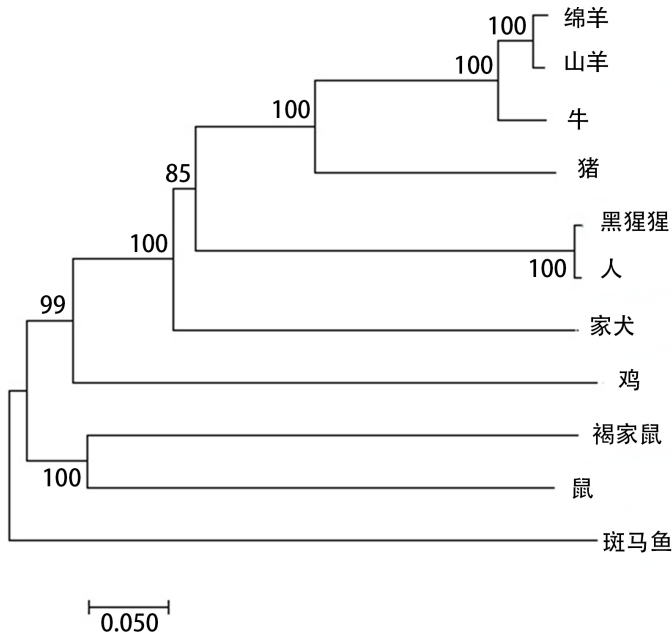


Figure 2. Phylogenetic tree construction of goat PHLDA2 promoter sequence
图 2. 山羊 PHLDA2 启动子序列系统进化树构建

4.3. PHLDA2 启动子预测和结合位点分析

对山羊 PHLDA2 基因起始密码子上游 2000 bp 的序列进行 3 种不同的在线软件预测, 分析启动子结构。FPROM 软件分析得到启动子可能位于-52 bp 附近, -30 bp 附近存在 TATA 框(TATAAA), -75 bp 附近存在 GC 框(GGGCGGG)。Neural Net Work Promoter Prediction (NNPP)软件预测出启动子可能位于-51~-2 bp。用 Promoter Scan 在线软件分析, 且 cut-off 值设置为 0.8, 预测 PHLDA2 启动子, 结果显示在启动子区-51~-2 bp, Promoter Score 为 80.47, Promoter Cutoff 为 53.0, 综合 3 个软件的预测结果, PHLDA2 基因启动子可能位于-2~-51 bp 区域内(见表 3)。利用 PROMO 在线软件预测山羊 PHLDA2 基因启动子转录因子结合位点时, 发现 CpG 岛内存在 YY1 转录因子结合位点(见图 3)。

Table 3. Prediction of core activity areas of gene promoter PHLDA2 in goat
表 3. 山羊 PHLDA2 基因启动子的核心活性区域预测

活性区	起始位点	终止位点	分值	启动子序列
1	-1069	-1015	0.97	5'-TAGGCTGTTTTGAAAGTGGGGGCCCTGGAGCAGGTGGGGCCCCACAGATC-3'
2	-110	-47	0.87	5'-GGGGGCGGGGCCGGGGGCGTGCCCGGGGCGGGGGGGCGGAGCGCGCCAG-3'
3	-88	-48	0.86	5'-GGCCGGGGGCGTGCCCGGGGCGGGGGGGCGGAGCGCGCCAGCGCGGCCA-3'
4	-51	-2	0.99	5'-GCCAGCGCGGCCACTATAAAGGCGGCTCCCACGCCGCCGAGTGCATCCC-3'

4.4. CpG 岛的分析

利用 CpG Island Searcher 软件, 以 $(G + C)s/Total\ bases > 55\%$ 、 $CpG\ observed/CpG\ expected > 0.65$ 、 $CpG\ length = 200\sim 2000\ bp$ 作为检测依据, 发现山羊 PHLDA2 基因启动子区和第一外显子区存在一段典型的 CpG 岛(-631~379 bp) (见图 3), 分别选取启动子和外显子 CpG 位点密集区域-302~-88 bp 和 49~333 bp, 依次包含 23 个和 29 个 CpG 位点。

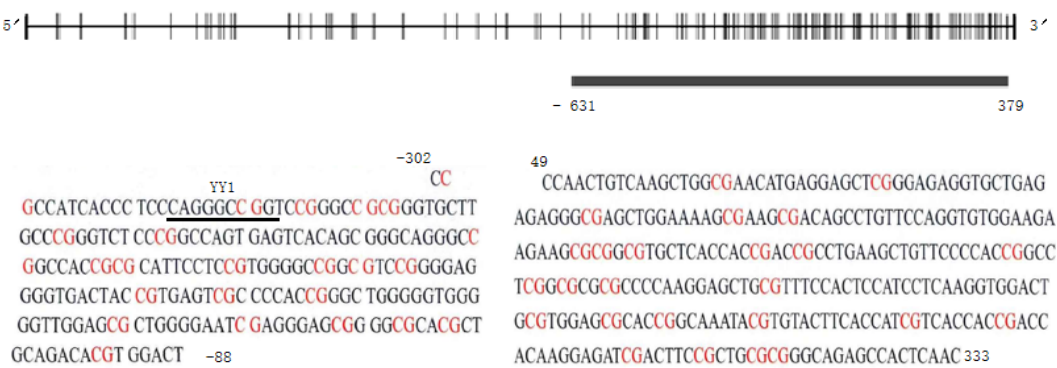
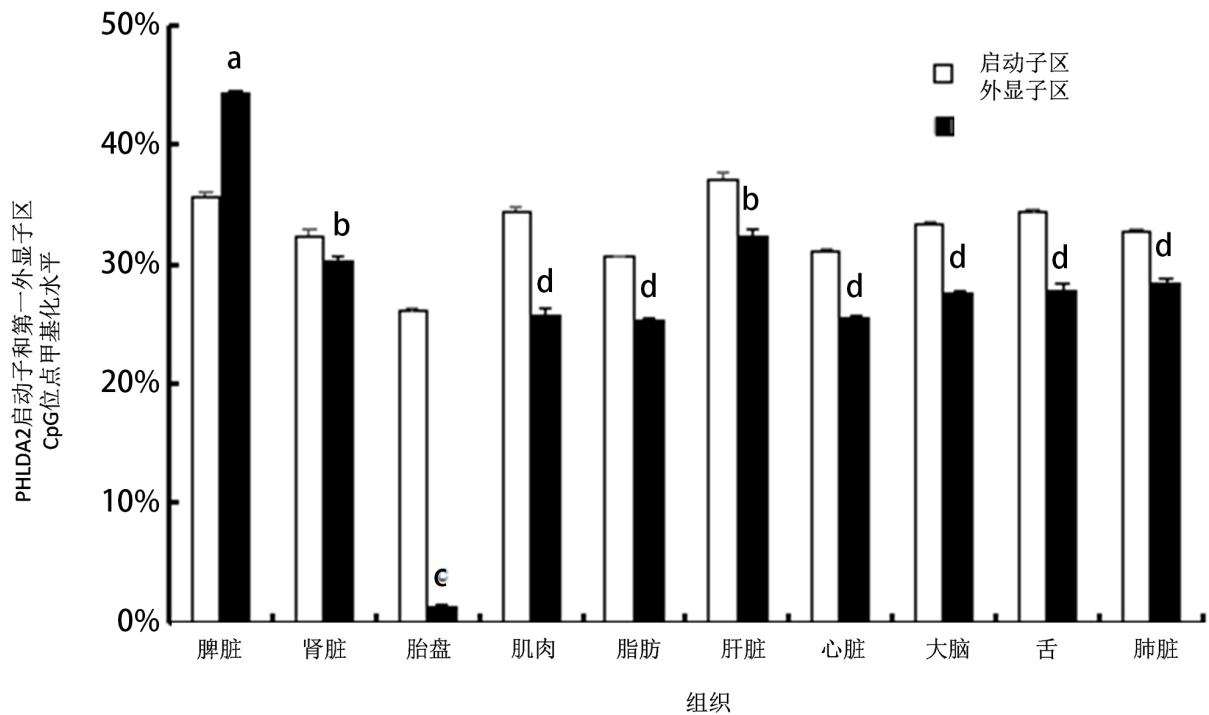


Figure 3. CpG island prediction of goat PHLDA2 gene promoter and its first exon
图 3. 山羊 PHLDA2 基因启动子和其第一外显子 CpG 岛预测

4.5. 甲基化位点分析

通过亚硫酸盐处理技术检测 CpG 岛内 CpG 位点胞嘧啶的甲基化水平, 包括 PHLDA2 启动子区(-302~-88 bp)和其第一外显子区(49~333 bp)。结果分析发现: 胎盘 PHLDA2 第一外显子区域甲基化率 1.28%, 显著低于其他组织第一外显子甲基化水平($P < 0.05$), 其启动子区的甲基化水平为 22.6%, 同其他组织甲基化水平无明显差异($P > 0.05$) (见图 4), 但其启动区 CpG 岛内第三位点 CpG 的甲基化频率为 0.03%,

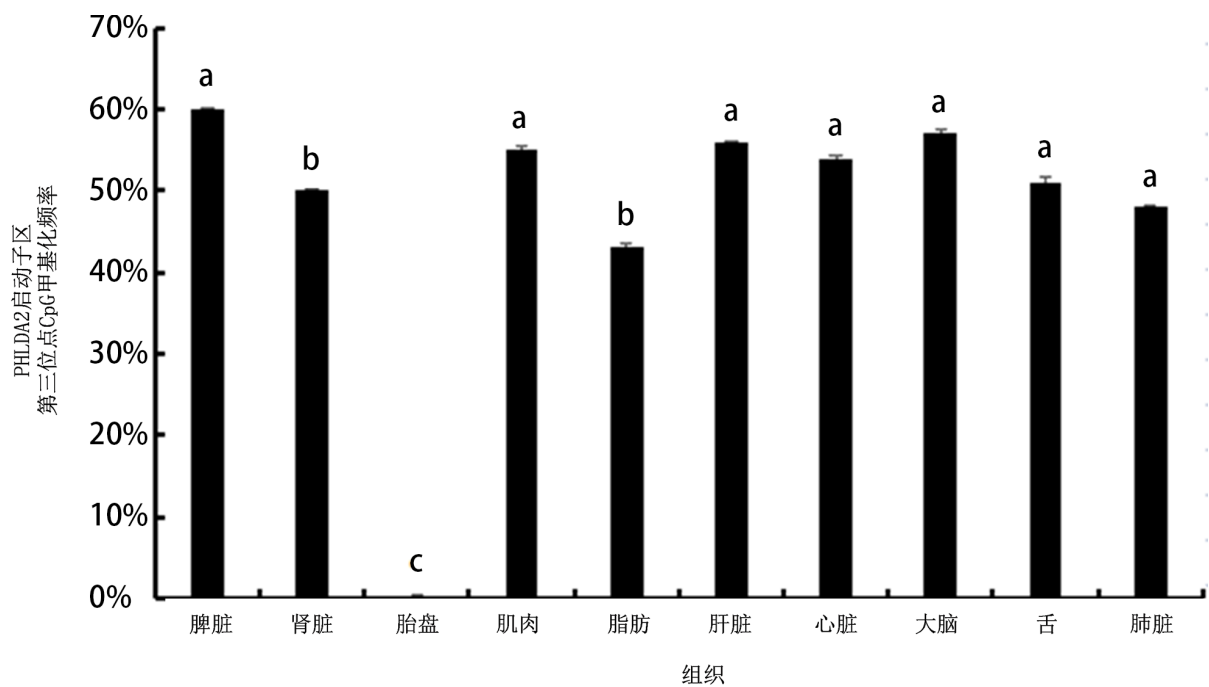
显著低于其它组织该位点的甲基化频率($P < 0.05$) (见图 5)。



注：字母完全不同表示差异显著($P < 0.05$)；无标注表示差异不显著($P > 0.05$)。

Figure 4. Methylation analysis of goat PHLDA2 promoter region and its first exon region

图 4. 山羊 PHLDA2 启动子区域和其第一外显子区域甲基化分析



注：字母完全不同表示差异显著($P < 0.05$)。

Figure 5. Methylation analysis of PHLDA2 promoter region in the third CpG site

图 5. 山羊 PHLDA2 启动子区第三位点 CpG 甲基化分析

5. 讨论

本研究根据 PHLDA2 启动子在人、鼠、牛和猪等物种间的保守性,利用比较基因组的方法,首次克隆了山羊 PHLDA2 启动子。核苷酸序列分析表明山羊 PHLDA2 启动子与绵羊、牛的序列相似性较高,同源性分别为 93.2 和 87.9%,进一步证明山羊 PHLDA2 启动子在物种间具有一定的保守性。

PHLDA2 基因在山羊的心脏、肝脏、肺脏、脾脏中表达量较少,大脑、肌肉、脂肪、肾脏、舌和胎盘组织中均表达,其中胎盘中表达量最高。

基因的启动子序列和启动子转录因子的预测,为了解基因功能和调节机制提供强有力的重要基础,预测软件发现启动子 TATA 框位于-30 bp 区域,基因启动子位置可能位于起始密码子上游 48~97 bp 区域内,预测启动子 CpG 岛存在 YY1 转录因子结合位点(见图 3)。YY1 是一种锌指蛋白,泛表达在哺乳动物细胞,而且进化相当保守,调控一系列基因的表达,包括印记基因[23] [24] [25]。因此,组织间转录因子表达量的差异变化可能影响山羊 PHLDA2 基因的表达,影响山羊胚胎的发育。

同时发现 PHLDA2 基因的启动子附近存在 CpG 岛,DNA 甲基化常常发生在哺乳动物 CpG 岛胞嘧啶的第 5 个碳原子上,研究证明这种修饰能阻碍转录复合体与 DNA 相互结合和改变染色体的构型,从而基因的转录受到抑制[26]。YY1 转录因子结合位点刚好位于 CpG 岛内第三个 CpG 位置,所以认为此 CpG 位点胞嘧啶的甲基化抑制了 YY1 转录因子的结合,导致山羊 PHLDA2 基因的表达减少,同时,间接证明 YY1 转录因子对 PHLDA2 基因的表达可能起促进作用。另外,也有报道发现基因内部的 CpG 胞嘧啶甲基化与基因表达存在着负相关性[27]。本研究脾脏等其它组织启动子和第一外显子区域 CpG 甲基化程度明显高于胎盘组织,RT-PCR 结果显示 PHLDA2 在胎盘中大量表达,但在脾中几乎不表达,推测山羊 PHLDA2 基因启动子和第一外显子的高甲基化抑制其转录。此外,CpG 岛胞嘧啶的甲基化与基因组印记密不可分,印记基因是指亲本等位基因在下一代细胞中差异表达或不表达,这种差异表达的机制之一是基因启动子区 CpG 岛内存在差异甲基化区域(Different methylation regions, DMRs)。前期研究推断山羊 PHLDA2 基因在胎盘中表达母本等位基因,在其它组织双等位表达,但是这种表达的机制仍不清楚。本研究发现 PHLDA2 基因在山羊胎盘显著高于其它组织,在脾脏组织中甚至不表达,可能是由于 PHLDA2 基因启动子或第一外显子 CpG 岛甲基化的影响,结果表明胎盘 PHLDA2 基因启动子区第三 CpG 位点和第一外显子区的甲基化率显著低于脾脏等其它组织($P < 0.05$)。

本文成功的克隆了山羊 PHLDA2 基因启动子序列,并预测了潜在的转录因子结合位点,进一步分析其启动子和第一外显子甲基化状态,可为了解山羊 PHLDA2 基因的功能和调节机制提供了重要依据。

6. 结论

PHLDA2 的 mRNA 相对表达量水平与启动子区 CpG 岛(-302~-88 bp)内第三个 CpG 位点甲基化频率和第一外显子 CpG 岛(49~333 bp)甲基化水平呈负相关。

基金项目

江汉大学科研机构培育基金;江汉大学学科特色方向协同创新团队项目(03100074);重庆市科委自然科学基金项目(2009BA1052);中央高校基本科研业务费专项(XDJK2011C022)。

参考文献

- [1] Moore, G.E., Ishida, M., Demetriou, C., *et al.* (2015) The Role and Interaction of Imprinted Genes in Human Fetal Growth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **370**, Article ID: 20140074. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0074>
- [2] Vallet, J.L., Miles, J.R. and Freking, B.A. (2009) Development of the Pig Placenta. *Society of Reproduction and Fertil-*

- ity Supplement, **66**, 265-279.
- [3] Millership, S.J., Van de Pette, M. and Withers, D.J. (2019) Genomic Imprinting and Its Effects on Postnatal Growth and Adult Metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **76**, 4009-4021. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03197-z>
 - [4] Tunster, S.J., Jensen, A.B. and John, R.M. (2013) Imprinted Genes in Mouse Placental Development and the Regulation of Fetal Energy Stores. *Reproduction*, **145**, R117-R137. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0511>
 - [5] Qian, N., Frank, D., O'keefe, D., et al. (1997) The IPL Gene on Chromosome 11p15.5 Is Imprinted in Humans and Mice and Is Similar to TDAG51, Implicated in Fas Expression and Apoptosis. *Human Molecular Genetics*, **6**, 2021-2029. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.12.2021>
 - [6] Tunster, S.J., Tycko, B. and John, R.M. (2010) The Imprinted Phlda2 Gene Regulates Extraembryonic Energy Stores. *Molecular and Cellular Biology*, **30**, 295-306. <https://doi.org/10.1128/MCB.00662-09>
 - [7] Janssen, A.B., Tunster, S.J., Heazell, A.E., et al. (2016) Placental PHLDA2 Expression Is Increased in Cases of Fetal Growth Restriction Following Reduced Fetal Movements. *BMC Medical Genetics*, **17**, 17-21. <https://doi.org/10.1186/s12881-016-0279-1>
 - [8] Xing, Y., Liu, H., Cui, Y., Wang, X., et al. (2019) Abundances of Placental Imprinted Genes CDKN1C, PHLDA2 and IGF-2 Are Related to Low Birth Weight and Early Catch-Up Growth in Full-Term Infants Born Small for Gestational Age. *PLoS ONE*, **14**, e0218278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218278>
 - [9] Tunster, S.J., Van de Pette, M. and John, R.M. (2014) Isolating the Role of Elevated Phlda2 in Asymmetric Late Fetal Growth Restriction in Mice. *Disease Models & Mechanisms*, **7**, 1185-1191. <https://doi.org/10.1242/dmm.017079>
 - [10] Tunster, S.J., Cretth, H.D.J. and John, R.M. (2016) The Imprinted Phlda2 Gene Modulates a Major Endocrine Compartment of the Placenta to Regulate Placental Demands for Maternal Resources. *Developmental Biology*, **409**, 251-260. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.10.015>
 - [11] Sunamura, N., Ohira, T., Kataoka, M., et al. (2016) Regulation of Functional KCNQ1OT1 lncRNA by β -Catenin. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 20690. <https://doi.org/10.1038/srep20690>
 - [12] Sikore, K.M., Magee, D.A., Berkowicz, E.W., et al. (2012) PHLDA2 Is an Imprinted Gene in Cattle. *Animal Genetics*, **43**, 587-590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02292.x>
 - [13] Hou, S., Chen, Y., Liang, J., et al. (2010) Developmental Stage-Specific Imprinting of IPL in Domestic Pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2010**, Article ID: 527539. <https://doi.org/10.1155/2010/527539>
 - [14] 苏鲁方, 彭学强, 蒋曹德. 大足黑山羊 PHLDA2 基因的克隆、组织表达与印记状况分析[J]. 中国农业科学, 2015, 48(2): 343-351.
 - [15] Guo, S.W. (2009) Epigenetics of Endometriosis. *Molecular Human Reproduction*, **15**, 587-607. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap064>
 - [16] Nasu, K., Kawano, Y., Tsukamoto, Y., et al. (2011) Aberrant DNA Methylation Status of Endometriosis: Epigenetics as the Pathogenesis, Biomarker and Therapeutic Target. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, **37**, 683-695. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2011.01663.x>
 - [17] Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R.H., et al. (2009) Human DNA Methylomes at Base Resolution Show Widespread Epigenomic Differences. *Nature*, **462**, 315-322. <https://doi.org/10.1038/nature08514>
 - [18] Bestor, T.H. (2000) The DNA Methyltransferases of Mammals. *Human Molecular Genetics*, **9**, 2395-2402. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.16.2395>
 - [19] Ishida, M., Monk, D., Duncan, A.J., et al. (2012) Maternal Inheritance of a Promoter Variant in the Imprinted PHLDA2 Gene Significantly Increases Birth Weight. *The American Journal of Human Genetics*, **90**, 715-719. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.02.021>
 - [20] Ng, H.H. and Bird, A. (1999) DNA Methylation and Chromatin Modification. *Current Opinion in Genetics and Development*, **9**, 158-163. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(99\)80024-0](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(99)80024-0)
 - [21] Robertson, K.D. (2002) DNA Methylation and Chromatin-Unraveling the Tangled Web. *Oncogene*, **21**, 5361-5379. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205609>
 - [22] Bamidele, O., Omitogun, O.G. and Mumolin, I.G. (2015) DNA Sequence Characteristics and Phylogenetics of Putative Imprinted Genes on Bovine Chromosome 29. *The Journal of Agricultural Science*, **7**, 131-142. <https://doi.org/10.5539/jas.v7n8p131>
 - [23] Thiaville, M.M. and Kim, J. (2011) Oncogenic Potential of Yin Yang 1 Mediated through Control of Imprinted Genes. *Critical Reviews in Oncogenesis*, **16**, 199-209. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.v16.i3.4-40>
 - [24] Mele, M., Ferreira, P.G., Reverter, F., et al. (2015) Human Genomics. The Human Transcriptome across Tissues and Individuals. *Science*, **348**, 660-665. <https://doi.org/10.1126/science.aaa0355>

-
- [25] Weintraub, A., Li, C.H., Zamudio, A.V., *et al.* (2017) YY1 Is a Structural Regulator of Enhancer Promoter Loops. *Cell*, **171**, 1573-1588. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.008>
 - [26] Ohki, I., Shimotake, N., Fujita, N., *et al.* (2001) Solution Structure of the Methyl-CpG Binding Domain of Human MBD1 in Complex with Methylated DNA. *Cell*, **105**, 487-497. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00324-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00324-5)
 - [27] Anastasiadi, D., Esteve-Codina, A. and Piferrer, F. (2018) Consistent Inverse Correlation between DNA Methylation of the First Intron and Gene Expression across Tissues and Species. *Epigenetics & Chromatin*, **11**, 37. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0205-1>