

# 猪 MKRN3 基因启动子区 CpG 岛在胚胎心脏组织 甲基化模式分析

汪龙梅<sup>1</sup> 朱哲坤<sup>1</sup> 王 栋<sup>1</sup> 刘玉兰<sup>1</sup> 付书林<sup>1</sup> 邓昌彦<sup>2</sup> 郭 玲<sup>1</sup>

1. 武汉轻工大学动物营养与饲料科学湖北省重点实验室, 武汉 430023;

2. 华中农业大学动物科学技术学院/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 以梅山猪-大白猪正反交为模型, 以 65 日龄和 100 日龄的胚胎心脏组织为研究材料, 对 MKRN3 基因启动子区 CpG 岛进行预测, 根据预测的 CpG 岛设计引物, 采用重亚硫酸盐测序法 (BSP 法), 分析 MKRN3 基因启动子区 CpG 岛在胚胎心脏组织的甲基化程度。结果显示: 对于 65 日龄胚胎, 猪 MKRN3 基因启动子区 CpG 岛在大白×梅山和梅山×大白杂交后代的胚胎心脏组织中均表现高度甲基化(75.6%、76.4%); 对于 100 日龄的胚胎, 大白×梅山杂交后代的胚胎心脏组织表现高度甲基化(80%), 而梅山×大白杂交后代的胚胎心脏组织呈现低甲基化(35.6%)。由此可见, 猪 MKRN3 基因启动子区 CpG 岛的甲基化模式随着正反交、胚胎发育时期不同而呈现出一定变化, 即在胚胎发育 65 日龄时, 正反交子代均具有高度甲基化; 而在胚胎发育至 100 日龄, 正交子代呈现高度甲基化, 反交子代呈现低甲基化, 说明在胚胎发育晚期父本或母本等位基因可能会发生明显的去甲基化。

**关键词** 猪胚胎; MKRN3; CpG 岛; DNA 甲基化; 重亚硫酸盐测序法

**中图分类号** S 828.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)06-0075-07

近几十年来人们对猪胚胎和器官发育的研究越来越重视。在早期胚胎发育过程中, 许多因素会促进或抑制早期胚胎的生长分化, 如母体自身健康、营养条件和基因的表达调控等, 尤其是基因表达调控对早期胚胎发育具有重要作用<sup>[1]</sup>。基因表达的调控包括甲基化、乙酰化修饰等。其中, 甲基化是指在脱氧核糖核酸的胞嘧啶第五位碳原子上加上一个甲基基团, 这种甲基化现象是脊椎类动物重要的基因表达调控方式<sup>[2]</sup>。最常见的方式就是通过使基因启动子区 CpG 岛甲基化, 阻碍启动子序列被转录因子及 RNA 聚合酶识别, 从而降低甚至关闭基因的表达<sup>[3]</sup>。在甲基化研究方面, 重亚硫酸盐测序法 (bisulfite sequencing, BSP) 是最常用且非常可靠的研究方法<sup>[4]</sup>。MKRN3 (makorin ring finger protein 3) 为哺乳动物中母系印记父系表达的印记基因, 研究发现猪 MKRN3 仅含一个外显子, 位于染色体 15q11.2 位置, 也是 Prader-Will 综合征 (表现为生长缓慢、行为异常、智力低下等症状) 的关键位置, 与发育时序性有着密切的关系<sup>[5]</sup>。研究发现, MKRN3

对细胞周期调控、分化和形态发生起到指示的作用<sup>[6]</sup>。唐家彦等<sup>[7]</sup>发现 MKRN3 基因与人中枢性早熟 (central precocious puberty, CPP) 有关。此外, 我们前期对 MKRN3 基因进行了 SNP 筛选及猪胴体性状关联分析, 结果显示 MKRN3 基因与猪臀部膘厚和内脂率显著相关<sup>[8]</sup>。本研究首先预测猪 MKRN3 基因启动子区 CpG 岛, 以梅山猪-大白猪正反交胚胎 (65 日龄、100 日龄) 的心脏组织为研究材料, 通过重亚硫酸盐测序法检测猪 MKRN3 基因启动子 CpG 岛在胚胎心脏中的甲基化状态, 探讨猪 MKRN3 基因启动子区甲基化在不同发育时期、不同杂交方式胚胎中的变化情况, 从而为阐明 DNA 甲基化如何调控基因表达的机制提供一定研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

用于克隆目标基因 MKRN3 启动子区的 DNA 模板来源于胚胎 (65 日龄、100 日龄) 心脏组织, 胚胎

收稿日期: 2018-05-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31601922); 湖北省自然科学基金项目 (2017CFB446); 武汉轻工大学校立科研项目 (2013d17, 2017d41)

汪龙梅, 硕士研究生。研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: 819902568@qq.com

通信作者: 郭 玲, 博士, 讲师。研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: guoling1101@163.com

分别由大白猪、梅山猪正反杂交产生,组织采集后 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存。

## 1.2 主要试剂

Quick-DNA Universal 试剂盒和 EZ DNA Methylation-God 试剂盒 (Zymo Research), PCR  $2\times$  Taq Mix (北京全式金生物); DNA 凝胶回收试剂盒 (北京庄盟国际生物基因科技有限公司); pMD-18 T 载体 (Takata Bio Inc); 2 000 bp DNA marker (TaKaRa Bio Inc); 大肠杆菌感受态细胞 Trans5 $\alpha$  (北京全式金生物)。

## 1.3 生物信息学预测

从 NCBI 数据库获取猪 MKRN3 基因的 gDNA 序列,利用在线软件 NNPP ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) 预测基因的核心启动子区,运用 CpG 岛预测网站 (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 对猪 MKRN3 基因启动子区 CpG 岛进行预测。

## 1.4 DNA 的提取及纯化

采集大白 $\times$ 梅山和梅山 $\times$ 大白正反杂交的胚胎 (65 日龄和 100 日龄) 心脏作为试验材料,在液氮条件下研磨成粉状,取 0.1 g 组织粉末用 Quick-DNA Universal 试剂盒 (美国 Zymo Research 公司) 抽提 DNA,用 DNA 纯化试剂盒纯化基因组 DNA,计算 DNA 含量及纯度,于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

## 1.5 重亚硫酸盐处理 DNA

准备上述纯化的 DNA 样品 (1 ng $\sim$ 2  $\mu\text{g}$ ),前期准备:一管 CT 转换试剂加入 900  $\mu\text{L}$  蒸馏水,300  $\mu\text{L}$  M-Dilution Buffer 和 500  $\mu\text{L}$  M-Dissolving Buffer,上下颠倒混合均匀以备用。在 PCR 管中加入 130  $\mu\text{L}$  配好的 CT 转换试剂工作液至 20  $\mu\text{L}$  DNA 样品中 (如果 DNA 样品不足 20  $\mu\text{L}$ ,则加水至 20  $\mu\text{L}$ ),混合均匀。利用热循环仪进行亚硫酸氢钠 DNA 转化,热循环程序:98  $^{\circ}\text{C}$ ,10 min;64  $^{\circ}\text{C}$ ,2.5 h;4  $^{\circ}\text{C}$  保存。提前将 600  $\mu\text{L}$  的 M-Binding Buffer 加入 Zymo-Spin IC 色谱柱,色谱柱放入试剂盒提供的收集管中,离心去除多余液体。将热循环处理过的样品加入处理过的吸附柱中,于 10 200 r/min 离心去废液,加入 100  $\mu\text{L}$  M-Wash Buffer,10 200 r/min 离心 30 s 弃废液,再加入 200  $\mu\text{L}$  的 M-Desulphonation Buffer,在室温下静置 15 $\sim$ 20 min,离心 30 s。向柱中加入 200  $\mu\text{L}$  M-Wash Buffer,10 200 r/min 离心 30 s,然后再加入 200  $\mu\text{L}$  M-Wash Buffer 离心

30 s 换收集管,最后悬空滴加 10  $\mu\text{L}$  M-Elutlon 缓冲液,室温静置 5 min,10 200 r/min 离心 30 s,收集液体置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。经重亚硫酸盐处理后,未发生甲基化的胞嘧啶转变为尿嘧啶,甲基化的胞嘧啶保持不变。

## 1.6 目的片段的克隆测序

根据 NCBI 已知的猪 MKRN3 基因序列 (100155343),运用 BLAST 搜索到该基因 5' 端上游核苷酸序列,围绕所预测的 MKRN3 基因启动子区 CpG 岛,利用 Primer premier 5.0 设计引物扩增目的基因启动子区 CpG 岛,引物设计时避免引物中出现 CG 序列,引物对命名为 MKRN3-CG F/R (MKRN3-CG F 序列为 5'-TGAATTTAAAATTT-TAAAAGTTGGG-3',MKRN3-CG R 序列为 5'-CAACTTCTACTCCCCAAAATAATAC-3',引物退火温度 58  $^{\circ}\text{C}$ ,扩增产物大小 396 bp)。PCR 扩增目的片段,扩增模板为重亚硫酸盐处理后的不同时期胚胎心脏 DNA,扩增体系为:DNA 1  $\mu\text{L}$ ,PCR  $2\times$  Taq Mix 10  $\mu\text{L}$ ,5 mmol/L 引物 MKRN3-CG F/R 各 2  $\mu\text{L}$ ,ddH $_2$ O 补足至 20  $\mu\text{L}$ 。扩增条件如下:94  $^{\circ}\text{C}$  4 min,40 个循环 (94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,58  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min),72  $^{\circ}\text{C}$  5 min,4  $^{\circ}\text{C}$  保存。1.5% (m/V) 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物,接着进行 PCR 产物凝胶回收,回收产物进行 TA 克隆,每个待测样品挑选 10 个阳性克隆子送测序公司 (武汉擎科生物) 测序。

## 1.7 CpG 甲基化模式分析

将克隆测序得到的转化后序列与原 DNA 序列进行比对 (BiQ Analyzer),获得 MKRN3 基因启动子区 CpG 岛的甲基化情况,并绘制出黑白圈点图。在黑白点图中,每 1 行代表 1 个克隆序列,共 10 个克隆序列,符合重亚硫酸盐测序的精确度要求。每 1 列代表 1 个 CpG 位点,黑色圈代表试验中 CG 未被重亚硫酸盐改变碱基即原序列中发生甲基化的位点,白色圈代表经重亚硫酸盐处理后发生碱基变化即原序列未发生甲基化的位点。

## 2 结果与分析

### 2.1 猪 MKRN3 基因启动子区 CpG 岛的预测

运用 NNPP ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) 对 MKRN3 基因 5' 端上游序列进行分析,发现上游 49 bp 处是一处得分较高的

核心启动区,运用 CpG 岛预测网站对猪 *MKRN3* 基因启动子区 CpG 岛进行预测,结果发现在 *MKRN3* 基因上游存在 1 个 CpG 岛,该 CpG 岛由

2 个长度分别为 239 bp(即转录起始位点上游 67~305)和 102 bp(即转录起始位点上游 49 bp~下游 53 bp)的片段组成,结果见图 1。

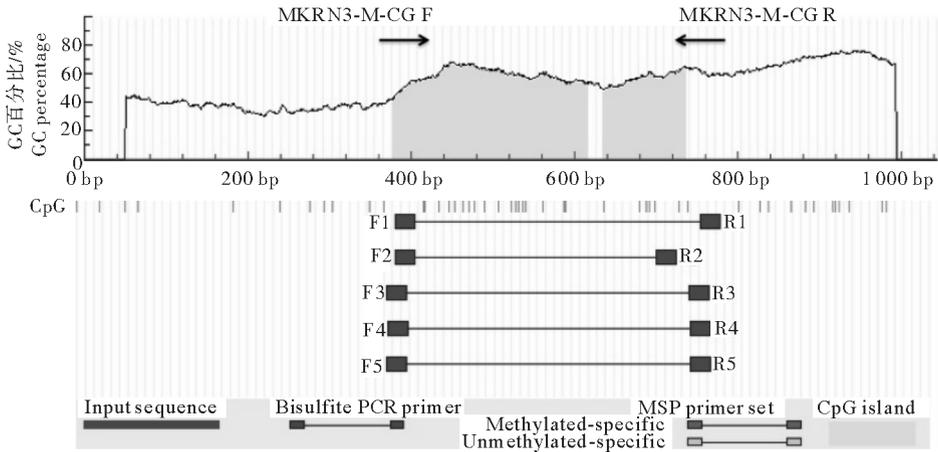


图 1 猪 *MKRN3* 基因启动子区 CpG 岛预测结果

Fig.1 Prediction of CpG island in the promoter region of porcine *MKRN3*

### 2.2 猪 *MKRN3* 基因启动子区 CpG 岛的分离

根据对猪 *MKRN3* 基因启动子区 CpG 岛的预测结果,即预测的 2 个 CpG 岛片段设计扩增引物(图 1),以甲基化的 DNA 为模板扩增目的片段,扩增产物长度为 396 bp,包括 25 个 CpG。扩增后的产物电泳图见图 2。

化概率为 76.4%,在大白×梅山 100 日龄胚胎心脏组织中的平均甲基化概率为 80%,在梅山×大白 100 日龄胚胎心脏组织中的平均甲基化概率为 35.6%。

大白×梅山 65 日龄胚胎,目的 CpG 岛在胚胎心脏组织中表现高度甲基化,平均甲基化频率为 75.6%;第 9、10、12、23、24、25 个 CG 位点呈现完全甲基化(100%);随机挑选的 10 个克隆子中,每个克隆子的甲基化水平均在 60%以上,其中,克隆子 1、3、6、8、10 的甲基化水平达 80%以上(图 3)。由结果推测,在大白×梅山 65 日龄胚胎心脏组织中,父、母本等位基因可能不存在明显的 DNA 甲基化差异。

梅山×大白 65 日龄胚胎,目的 CpG 岛在胚胎心脏组织中表现出高度甲基化水平,平均甲基化频率为 76.4%。在随机 10 个阳性克隆子中,仅克隆子 6 呈现了低甲基化水平(4%),其他克隆子均发生高度甲基化,甲基化频率在 70%以上(图 4)。由结果推测,在梅山×大白 65 日龄胚胎心脏组织中,父、母本等位基因可能不存在明显的 DNA 甲基化差异。

大白×梅山 100 日龄胚胎,目的 CpG 岛在胚胎心脏组织中表现出高度甲基化水平,平均甲基化频率为 80%;第 9、10、12、14、23、24、25 个 CG 位点呈现完全甲基化(100%)(图 5),与大白×梅山 65 日龄胚胎心脏组织的完全甲基化 CG 位点基本一致,

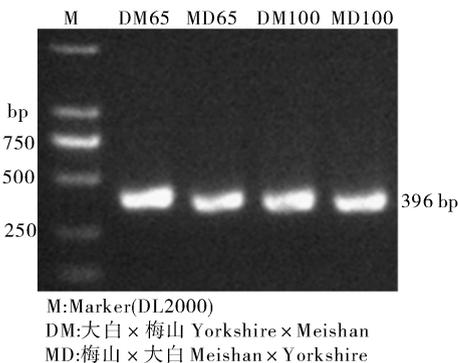
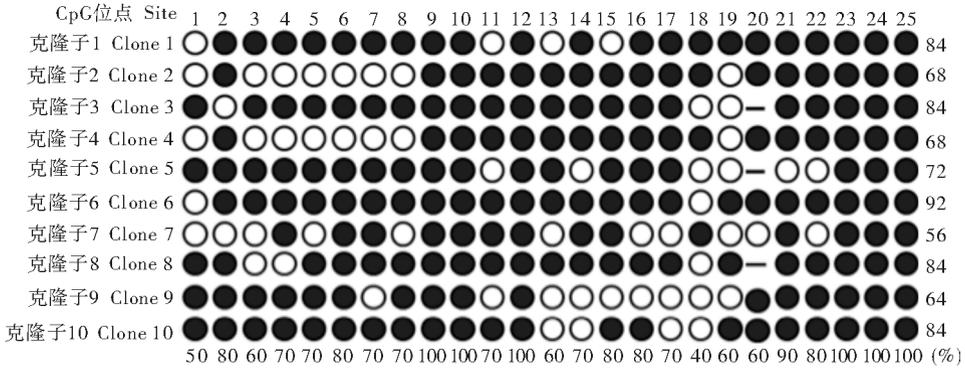


图 2 猪 *MKRN3* 基因启动子区 CpG 岛扩增电泳图

Fig.2 Amplification of CpG island in the promoter of porcine *MKRN3*

### 2.3 猪 *MKRN3* 基因启动子区 CpG 岛的甲基化模式

对每个位点甲基化频率进行计算,得到每个位点的甲基化频率,计算平均值,得到该组织 *MKRN3* 基因启动子区的平均甲基化概率。结果显示,*MKRN3* 基因启动子区在大白×梅山 65 日龄胚胎心脏组织中的平均甲基化概率为 75.6%,在梅山×大白 65 日龄胚胎心脏组织中的平均甲基



注：●：示发生甲基化的 CpG 位点；○：示未发生甲基化的 CpG 位点；—：代表 AG。下同。Note：●：Methylated CpG site；○：Un-methylated site；—：AG site.The same as follow.

图 3 MKRN3 基因启动子 CpG 岛在大白 x 梅山 65 日龄 (DM65) 胚胎心脏的甲基化模式

Fig.3 Methylation model of MKRN3 promoter CpG island in Yorkshire x Meishan 65 day embryo's heart

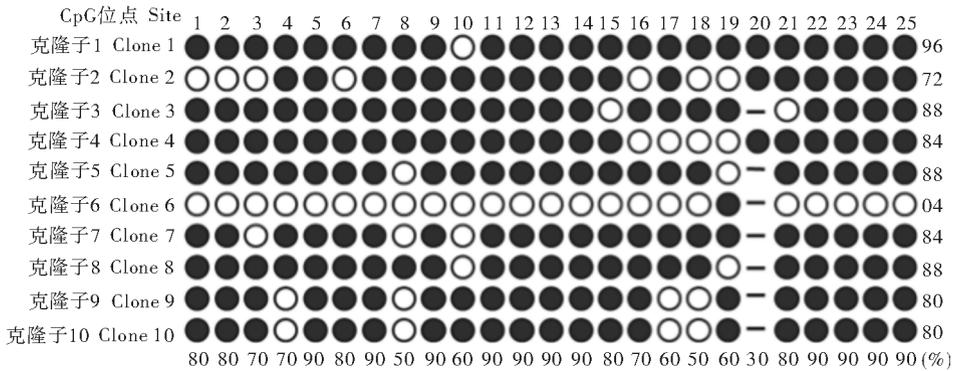


图 4 MKRN3 基因启动子 CpG 岛在梅山 x 大白 65 日龄 (MD65) 胚胎心脏的甲基化模式

Fig.4 Methylation model of MKRN3 promoter CpG island in Meishan x Yorkshire 65 day embryo's heart

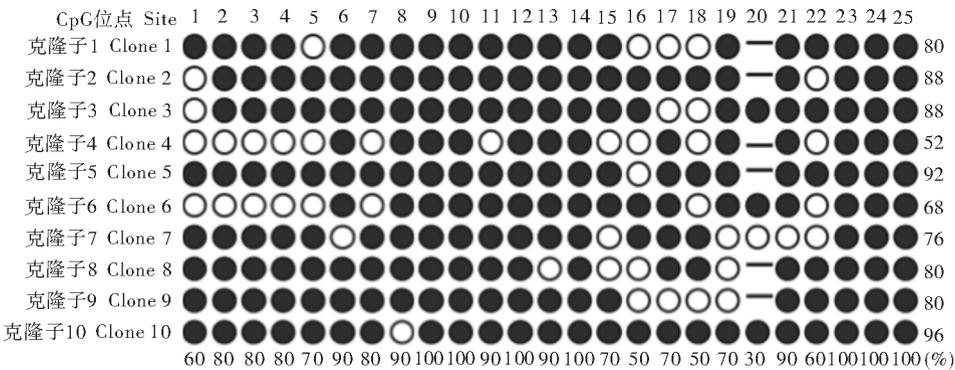


图 5 MKRN3 基因启动子 CpG 岛在大白 x 梅山 100 日龄 (DM100) 胚胎心脏的甲基化模式

Fig.5 Methylation model of MKRN3 promoter CpG island in Yorkshire x Meishan 100 day embryo's heart

结果表明发育程度可能对大白 x 梅山杂交猪的 MKRN3 基因启动子区 CG 位点的影响不大。

梅山 x 大白 100 日龄胚胎,目的 CpG 岛在胚胎心脏组织中表现出中等水平的甲基化(图 6),平均甲基化频率为 35.6%,但是相对于 65 日龄正反杂交

胚胎心脏组织和大白 x 梅山 100 日龄胚胎心脏组织来说,总体甲基化频率偏低。克隆子 4、5、10 未发生甲基化,而克隆子 2、6、7、9 呈现高度甲基化,这可能是因为这些克隆子来源于不同父母本染色体造成的,并且初步说明在梅山 x 大白 100 日龄胚胎心脏

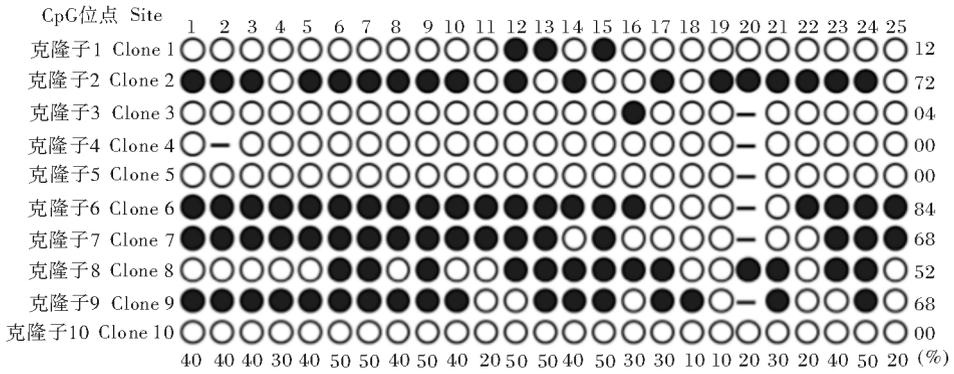


图 6 *MKRN3* 基因启动子 CpG 岛在梅山×大白 100 日龄(MD100)胚胎心脏的甲基化模式

Fig.6 Methylation model of *MKRN3* promoter CpG island in Meishan×Yorkshire 100 day embryo's heart

中,DNA 甲基化具有染色体偏好性。

### 3 讨 论

心脏是各器官、组织和细胞获得营养以及排除废物的重要功能器官,所以遗传学上对猪胚胎心脏的研究也越来越多,丰富了猪的生产繁殖性能相关基因的研究。有研究发现,猪、鼠、人等哺乳动物在早期的发育过程中(合子形成前后)基因组 DNA 发生重编程,父源 DNA 在受精后被活化且进行去甲基化过程,而母源 DNA 则被动地进行去甲基化过程<sup>[9-11]</sup>。胚胎中的 DNA 在二细胞和囊胚阶段发生大量的重新甲基化,这与胚胎基因组中物种特异性基因转录的起始有关<sup>[12]</sup>。启动子区是 RNA 聚合酶的结合区,参与特定基因转录及其调控,其结构直接关系到转录的效率,因为启动子不仅控制着基因的转录起始,而且还决定基因的表达强度<sup>[13-16]</sup>。CpG 岛常位于转录调控区附近,尤其是基因的启动子区,DNA 甲基化指的就是 CpG 位点的胞嘧啶上添加了甲基基团形成五甲基胞嘧啶,从而阻碍转录因子和 RNA 聚合酶识别启动子,因此,CpG 岛的甲基化水平对基因的转录具有调控作用。

本试验所研究的 *MKRN3* 基因是母系印记父本表达<sup>[7]</sup>,属于 M 蛋白家族,其物种间保守性及在发育神经系统中的高表达表明,它在发育中扮演着至关重要的角色<sup>[17]</sup>。*MKRN3* 能引起人 Prader-Willi 综合症,影响机体的生长发育<sup>[5]</sup>。*MKRN3* 基因在猪和兔中已被证实具有印记的保守性<sup>[18-19]</sup>,且猪 *MKRN3* 基因的启动子在骨骼肌中趋于高度甲基化状态<sup>[19]</sup>,但是其在猪心脏组织中的甲基化状态尚未见报道。研究表明,启动子区 CpG 发生甲基化后,转录因子与 RNA 聚合酶无法有效识别基因启

动子,导致基因转录水平下降甚至基因关闭,且该作用是可逆的,在去甲基化后又能恢复此基因的表达<sup>[20]</sup>。因此,启动子区甲基化水平对印记基因等位基因的表达具有调控作用。本研究以梅山猪-大白猪正反交胚胎(65 日龄、100 日龄)的心脏组织为研究材料,通过重亚硫酸盐测序法检测猪 *MKRN3* 基因启动子 CpG 岛在胚胎心脏中的甲基化状态,探讨猪 *MKRN3* 基因启动子区甲基化在不同发育时期、不同杂交方式胚胎中的变化情况。

通过重亚硫酸盐测序,本研究发现目的 CpG 岛的甲基化水平随着杂交方式的不同、发育时期的不同,在胚胎心脏组织中具有差异。甲基化频率分析显示,同一组织的每个克隆子之间存在差异,如梅山×大白 100 日龄胚胎心脏组织中某些克隆子未发生甲基化,而其他呈现低甲基化,由于目的基因为母本印记,推测这些非甲基化克隆子很可能来自父本等位基因而甲基化克隆子可能来自母本等位基因。在对 100 日龄正反交胚胎心脏进行甲基化分析时,发现正交与反交胚胎甲基化水平差异明显,甲基化频率分别为 80%和 35.6%,说明父母本等位基因的来源可能对等位基因的甲基化水平有一定影响,这与我们前期在猪胚胎小肠中获得的结果一致<sup>[21]</sup>。在对比分析 65 日龄和 100 日龄胚胎心脏甲基化水平时,发现在不同杂交方式下,胚胎心脏 CpG 岛甲基化水平随着发育日龄不同变化情况不一致,以大白猪为父本、梅山猪为母本在不同日龄均表现出高甲基化(75.6%,80%),这与之之前报道的 *MKRN3* 基因在猪骨骼肌高度甲基化保持一致<sup>[19]</sup>。而以梅山猪为父本、大白猪为母本时,65 日龄和 100 日龄甲基化水平具有差异性(76.4%,35.6%)。说明在胚胎发育不同时期,印记基因 *MKRN3* 会发生不同

程度的 DNA 甲基化或去甲基化过程。在第 20 个 CG 位点存在 AG 突变位点,可能与此处存在 SNP 位点有关。同时,前期研究发现 *MKRN3* 基因与猪的内脂率和臀部膘厚具有一定的关系,而且在大白猪和梅山猪的 *MKRN3* 位点存在差异,导致基因频率不同<sup>[8]</sup>,这可能就导致了正反交群体的 *MKRN3* 基因启动子区 CpG 岛的甲基化的差异。

综上所述,猪 *MKRN3* 基因启动子区 CpG 岛在大白-梅山猪正反交 65 日龄胚胎心脏中均呈现高度甲基化(75.6%,76.4%),但是胚胎发育到 100 日龄时,大白-梅山猪正反交胚胎心脏具有高度甲基化(80%),而其反交胚胎心脏组织则具有中等水平甲基化(35.6%),说明父母本等位基因的来源可能对等位基因的甲基化水平有一定影响,但具体如何影响还需进一步的等位基因特异性甲基化分析。

### 参 考 文 献

- [1] 李艳红.早期胚胎中的基因表达[J].国外医学(妇产科学分册),2000(6):322-325.
- [2] 凡时财,张学工.DNA 甲基化的生物信息学研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2009(2):143-150.
- [3] MADAN-BABU M, TEICHMANN S A, ARAVIND L. Evolutionary dynamics of prokaryotic transcriptional regulatory networks[J].Journal of molecular biology,2006,358(2):614-633.
- [4] 晏建国,付海英,沈建箴,等.重亚硫酸氢盐测序法检测 Wnt 信号通路抑制基因在急性早幼粒细胞白血病细胞中甲基化变化[J].中国实验血液学杂志,2016(5):1299-1304.
- [5] ELKS C E, PERRY J R, SULEM P, et al. Thirty new loci for age at menarche identified by a meta-analysis of genome-wide association studies[J].Nature genetics,2010,42(12):1077-1085.
- [6] ABREU A P, DAUBER A, MACEDO D B, et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene *MKRN3*[J].The New England journal of medicine,2013,368(26):2467-2475.
- [7] 唐家彦,黄娟.血清 makorin 环指蛋白 3 基因在中枢性性早熟女童诊断中的意义[J].广东医学,2016,37(11):1648-1650.
- [8] 汪龙梅,郭玲,刘玉兰,等.猪印记基因 *MKRN3* 的 SNPs 筛选及胴体性状关联分析[J].华中农业大学学报,2017,36(6):77-82.
- [9] OSWALD J, ENGEMANN S J, ANE N, et al. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote[J].Current biology,2000,10:475-478.
- [10] BEAUJEAN N, TAYLOR J, GARDNER J, et al. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer[J].Biology of reproduction,2004,71:185-193.
- [11] XU Y, ZHANG J, GRIFO J A, et al. DNA methylation patterns in human tripronucleate zygotes[J].Molecular human reproduction,2005,11:167-171.
- [12] REIK W, WALTER J. Genomic imprinting: parental influence on the genome[J].Nature reviews genetics,2001,2:21-32.
- [13] MAMRUT S, HARONY H, SOOD R, et al. DNA methylation of specific CpG sites in the promoter region regulates the transcription of the mouse oxytocin receptor[J].PLoS One,2013,8(2):e56869.
- [14] SMITH Z D, MEISSNER A. DNA methylation roles in mammalian development[J].Nature reviews genetics,2013,14(3):204-220.
- [15] GIELEN G H, GESSI M, HAMMES J, et al. H3F3A K27M mutation in pediatric CNS tumors: a marker for diffuse high-grade astrocytomas[J].American journal of clinical pathology,2013,139(3):345-349.
- [16] JUVEN-GERSHON T, HSU J Y, THEISEN J W, et al. The RNA polymerase II core promoter—the gateway to transcription[J].Current opinion in cell biology,2008,20(2):253-259.
- [17] GRAY T A, HERNANDEZ L, CAREY A H, et al. The ancient source of a distinct gene family encoding proteins featuring RUNG and C(3)H zinc-finger motifs with abundant expression in developing brain and nervous system[J].Genomics,2000,66(1):76-86.
- [18] 段菲菲.兔 *Nnat*, *Mkfn3* 和 *Nap115* 印记基因表达模式分析[D].长春:吉林大学,2015.
- [19] 王猛.猪骨骼肌中印记基因分析[D].泰安:山东农业大学,2012.
- [20] DARIO L S, ROSA M A, MARIELA E, et al. Chromatin remodeling agents for cancer therapy[J].Reviews on recent clinical trials,2008,3(3):192-203.
- [21] 张阳,汪龙梅,郭玲,等.猪胚胎期小肠组织 *MKRN3* 基因启动子区 CpG 岛的甲基化模式分析[J].中国畜牧杂志,2018,54(6):38-42.

## Methylation patterns of *MKRN3* promoter CpG island in porcine embryo heart

WANG Longmei<sup>1</sup> ZHU Zhekun<sup>1</sup> WANG Dong<sup>1</sup>  
LIU Yulan<sup>1</sup> FU Shulin<sup>1</sup> DENG Changyan<sup>2</sup> GUO Ling<sup>1</sup>

1. *Hubei Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;*

2. *College of Animal Sciences and Technology, Huazhong Agricultural University/ Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education, Wuhan 430070, China*

**Abstract** To identify the methylation pattern of the porcine *MKRN3* promoter CpG island in the embryo heart, embryos of days 65 and 100 of gestation from the reciprocal crosses of Yorkshire-Meishan pig were collected. Firstly, CpG island in the promoter region of *MKRN3* was predicted by utilizing bioinformatics method, and primers was designed based on this predicted CpG island. Bisulfite sequencing (BSP) was utilized to detect methylation level in the embryo heart from Yorkshire-Meishan reciprocal crosses. Results showed that, in the heart from embryo of days 65, the CpG island of porcine *MKRN3* showed high level of methylation, with 75.6% from Yorkshire × Meishan and 76.4% from Meishan × Yorkshire. In the heart from embryo of 100 days, the CpG island of target gene showed high level of methylation (80%) from Yorkshire × Meishan, while low level of methylation (35.6%) from Meishan × Yorkshire crosses. Results above indicated that the methylation pattern of the porcine *MKRN3* promoter CpG island would change according to the change of reciprocal crosses and developmental stages. For embryo of 65 days, reciprocal crosses of Yorkshire-Meishan represented high methylation level, but for embryos of 100 days, high methylation from Yorkshire × Meishan but low methylation from Meishan × Yorkshire were observed, indicating that de-methylation might take place in the paternal or maternal allele, during the late stage of embryonic development.

**Keywords** porcine embryo; *MKRN3*; CpG island; DNA methylation; bisulfite sequencing

(责任编辑:边书京)