

姬改革, 束婧婷, 单艳菊, 等. 鸭骨骼肌 *TNNI1* 基因 CpG 岛区甲基化与 mRNA 差异表达[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(6): 1312-1318.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.06.016

鸭骨骼肌 *TNNI1* 基因 CpG 岛区甲基化与 mRNA 差异表达

姬改革, 束婧婷, 单艳菊, 章明, 屠云洁, 巨晓军, 刘一帆
(江苏省家禽科学研究所, 江苏 扬州 225125)

摘要: 本研究旨在通过克隆鸭慢速骨骼肌肌钙蛋白 I 1 (Slow skeletal muscle troponin I 1, *TNNI1*) 基因 5' 侧翼区序列, 检测鸭骨骼肌组织 *TNNI1* 基因的 mRNA 表达水平和启动子 CpG 岛区甲基化状态, 初步探索 *TNNI1* 基因转录调控机制。采用染色体步移方法克隆测序获得鸭 *TNNI1* 基因 5' 侧翼区序列, 进行生物信息学分析, 采用荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, RT-PCR) 检测鸭胸肌和腿肌 *TNNI1* 基因 mRNA 表达水平, 采用亚硫酸氢盐测序法 (Bisulfite sequencing PCR, BSP) 检测核心启动子区 CpG 岛在鸭肌肉组织中的甲基化水平。结果表明, 克隆获得鸭 *TNNI1* 基因 5' 侧翼区序列 2 078 bp, 预测存在 2 个 CpG 岛, 其中 CpG 岛 (-2 032~-1 833 bp) 位于预测的核心启动子区内, 并存在多个真核生物结构元件和转录因子结合位点; 甲基化检测发现, 其总体甲基化水平在胸肌和腿肌组织中分别为 52.66%、57.04%, 差异不显著 ($P>0.05$); 荧光定量检测结果表明, 鸭胸肌和腿肌 *TNNI1* 基因表达量差异显著 ($P<0.05$); 相关性分析结果表明, CpG4 位点甲基化程度与胸肌 *TNNI1* 基因表达量呈极显著负相关 ($P<0.01$)。鸭胸肌和腿肌 *TNNI1* 基因的 mRNA 表达量存在显著差异, 其总体甲基化水平无显著差异。在胸肌中, 启动子区 CpG4 位点可能通过甲基化修饰影响 *TNNI1* 基因的转录调控。

关键词: 鸭; *TNNI1* 基因; 启动子; mRNA 表达; 甲基化

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)06-1312-07

Difference of CpG island methylation status and mRNA expression level of *TNNI1* gene in duck skeletal muscle

Ji Gai-ge, Shu Jing-ting, Shan Yan-ju, Zhang Ming, Tu Yun-jie, Ju Xiao-jun, Liu Yi-fan
(*Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225125, China*)

Abstract: The experiment aims to clone the 5' flanking sequences of duck slow skeletal muscle troponin I 1 (*TNNI1*) gene, investigate the mRNA expression levels and promoter CpG island methylation status of *TNNI1* gene in the skeletal muscle of duck, and explore the mechanism of *TNNI1* gene transcriptional regulation. The 5' flanking sequence of duck *TNNI1* gene was cloned by genome walking method, and analyzed using online bioinformatics software. The mRNA expression levels of *TNNI1* gene in duck breast muscle and leg muscle were detected by real-time quantitative PCR (RT-PCR), and the methylation level of CpG island in duck muscle tissue was detected by bisulfite sequencing PCR (BSP).

The 5' flanking sequence of 2 078 bp duck *TNNI1* gene was obtained and existed two CpG islands. The CpG island (-2 032— -1 833 bp) located in the deduced core promoter region, and existed multiple eukaryotic structural elements and transcription factor binding sites. The overall methylation level showed that no differences existed between breast muscles (52.66%) and leg muscles (57.04%), but there were significant differences between breast muscles and leg muscles on *TNNI1* mRNA expression levels. The correlation analysis results showed that the

收稿日期: 2018-02-23

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20151316); 江苏省六大人才高峰项目 (NY-026), 扬州市现代农业项目 (YZ2015039)

作者简介: 姬改革 (1985-), 女, 河南洛阳人, 硕士, 助理研究员, 主要从事家禽遗传育种与资源保护研究。(E-mail) jigaige@126.com

通讯作者: 束婧婷, (E-mail) shujingting@163.com

methylation degree of CpG4 site was significantly negatively correlated with the expression of the *TNNI* gene in the breast muscle ($P < 0.01$). The expression of *TNNI* gene was significantly different in duck breast muscle and leg muscle, but there was no significant difference on total methylation level. The CpG4 locus in the promoter region might affect the transcriptional regulation of the *TNNI* gene in the pectoral muscles by methylation modification.

Key words: duck; *TNNI* gene; promoter; mRNA expression; methylation

在肌肉的收缩过程中,肌钙蛋白(Troponin I, TnI)是重要的调节因子,定位于横纹肌,能够和肌动蛋白结合,抑制肌球蛋白 ATP 酶的活性,使肌肉保持松弛的状态。*TnI* 基因包含 3 种亚型^[1],分别为慢速骨骼肌型肌钙蛋白或肌钙蛋白 I 1 基因(*TNNI1*);快速骨骼肌型肌钙蛋白 I(Fast skeletal muscle troponin I)或肌钙蛋白 I 2 基因(*TNNI2*)和心肌型肌钙蛋白 I(Cardiac troponin I)或肌钙蛋白 I 3 基因(*TNNI3*)。*TNNI1* 和 *TNNI2* 在发育的早期,肌肉生成过程中可以相互转换,共同表达,之后分别被限制在慢和快肌纤维中表达^[2-3]。*TNNI3* 在心肌的表达具有特异性^[4-5]。

骨骼肌肌纤维类型是影响肌肉品质的重要因素,通常认为慢肌比例较高的肉品质相对较好。在哺乳动物上的研究表明^[6],*TNNI1* 基因在成年动物慢肌纤维中特异性的表达,在肉品质和脂肪沉积方面具有重要的作用。在鸡上^[7],有研究者发现 *TNNI1* 基因在蛋鸡肌肉中的表达量显著高于肉鸡。关于 *TNNI1* 的研究多集中在哺乳动物,家禽方面相关的研究较少。课题组前期研究发现,*TNNI1* 基因可能在鸭肌肉发育中具有重要的作用。在人上的研究发现^[8],与肌纤维类型相关的 *MYH7B*、*MYH7*、*MYH8*、*MYH3* 等基因的 CpG 位点的甲基化程度在快收缩型肌纤维和慢收缩性肌纤维上具有显著差异。DNA 甲基化是指在 DNA 序列没有发生改变的情况下,相应的基因表达发生改变,导致可遗传的表型变化。通常由 DNA 甲基化转移酶催化,将 S-腺苷甲硫氨酸提供的甲基转移到胞嘧啶第 5 位 C 上,形成 5-甲基胞嘧啶(5-mC)。基因启动子区在基因转录调控中具有重要作用,因此了解基因启动子区 CpG 位点在不同组织中的甲基化程度,有助于揭示基因在不同组织差异表达的调控机理。本研究拟采用染色体步移技术克隆鸭 *TNNI1* 基因启动子区序列,采用生物信息学方法分析其序列特征,采用荧光定量 PCR 技术检测 *TNNI1* 基因在不同类型肌肉(胸肌和腿肌)组织中的差异表达情况,采用 BSP 技术检测

基因启动子区 DNA 甲基化水平差异,以期为进一步探讨鸭 *TNNI1* 基因在肌肉发育中的转录调控机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

所用试验动物高邮鸭来自江苏省高邮鸭集团种鸭群,随机选取健康的处于上市日龄(70 日龄)的高邮鸭公母各 5 只。放血屠宰后,分离胸肌和腿肌组织,立即放入液氮速冻,然后转入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。用于核酸的提取。

1.2 试剂

DNA 提取试剂盒、pGM-T 克隆试剂盒、SuperReal 荧光定量试剂盒、QuantScript RT Kit 购自天根生化科技有限公司,染色体步移试剂盒 Genome Walking kit、*Taq* Max、DL2000 Marker 均购自 TaKaRa 公司,EpiTect[®] Bisulfite kit 购自 Qiagen 公司,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 Gel Extraction kit、质粒小提试剂盒 plasmid Mini Kit 购自中美泰和公司。DH5 α 感受态细胞为本实验室保存。

1.3 试验方法

1.3.1 基因 5'侧翼区的克隆 按照 DNA 提取试剂盒的说明书,提取高邮鸭胸肌肌肉组织 DNA。因鸭 *TNNI1* 基因 DNA 序列(NCBI 登录号: NW_004676592.1)信息尚不完善,存在多个 GAP 区域,采用染色体步移的方法进行 *TNNI1* 基因 5'侧翼区的克隆。染色体步移采用 TaKaRa 公司的染色体步移试剂盒,按照试剂盒的说明书进行。

首先需要已知序列进行验证。根据鸭 *TNNI1* 基因序列(NCBI 登录号: NW_004676592.1),在 *TNNI1* 基因的 CDS 区设计引物 P1,以基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。用 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测,并将扩增片段连接到 pGM-T 载体,鉴定为阳性的克隆送上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定。获得的序列比对正确后,设计 2 条特异性引物 SP1、SP2,进行下一步的延

伸。以设计的 2 条特异性引物 SP1、SP2 和试剂盒提供的通用引物进行热不对称 PCR 反应。反应体系和条件参照说明书。以鸭基因组 DNA 为模板进行第一轮 PCR 反应,引物为 SP1 和试剂盒中的通用引物 AP1~AP4,试验特异性反应的温度为 65 ℃,延伸时间为 3 min。第一轮反应的 PCR 产物稀释 10 倍后,作为第二轮 PCR 反应的模板进行第二轮 PCR 反应,引物为 SP2 和试剂盒中的通用引物 AP1~AP4。分别取 2 轮 PCR 反应的产物 5 μl,用 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测,选择清晰的电泳条带进行胶回收纯化,将回收纯化的 DNA 连接至 pGEM-T 载体,转化 DH5α 感受态细胞,挑取阳性克隆于含氨苄抗性的 LB 液体培养基中,振荡培养过夜,进行 PCR 鉴定。将鉴定正确的质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定。本试验所用的引物见表 1。

表 1 鸭基因 PCR 扩增引物

Table 1 Primers for duck *TNNI1* gene PCR

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段长度 (bp)	用途
P1-F	CGAAGCCACGATGCCAGAG	1 094	染色体步移
P1-R	GAGCTGGCTCAGGGAC		
SP1	CTCACCCACACCTCCCTGC	2 239	染色体步移
SP2	ACAGGGGTCTCGAGCACT	2 192	染色体步移
<i>TNNI1</i> -F	CTGCACGAGAAGGTTGAG	109	荧光定量检测
<i>TNNI1</i> -R	GCAGGTC AAGCACTTTTGAT		
<i>β-actin</i> -F	CAAATGCTTCTAAACCGGAC	151	荧光定量检测
<i>β-actin</i> -R	AACCTTCACCATTCAGTTTT		
BSP-F	TGTATATAAGAGGGGATTTGTGT	324	甲基化引物
BSP-R	ACTTCTCCCAAACCTCTCT		

1.3.2 序列分析 采用在线软件 BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 预测核心启动子区;利用在线软件 AliBaba (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>?) 进行启动子区转录因子结合位点分析;利用在线软件 MethPrimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 预测基因启动子区 CpG 岛。

1.3.3 CpG 岛甲基化水平检测 提取高邮鸭胸肌和腿肌组织 DNA,测定浓度后,取 500 ng DNA,用亚硫

酸盐对 DNA 进行处理,样本 DNA 未发生甲基化的胞嘧啶(C)被转化为尿嘧啶(U),经 PCR 扩增最终变为胸腺嘧啶(T),而甲基化的胞嘧啶则不变。处理的 DNA 纯化后,以此 DNA 为模板,进行 BSP-PCR 扩增反应。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带,鉴定正确后,将 BSP-PCR 产物与 T 载体连接,转化感受态细胞 DH5α 后,涂板,随机挑取单克隆,用 PCR 法进行鉴定,鉴定为阳性菌的进行测序,每个转化板至少挑 10 个阳性克隆,用 BiQ_Analyzer 分析软件对 DNA 序列和测序序列进行比对,判断 CpG 位点是否发生甲基化,统计分析各个位点的甲基化程度。

1.3.4 荧光定量 PCR 检测 Trizol 法提取高邮鸭胸肌和腿肌组织总 RNA,琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测质量和浓度。检测合格后,取 2 μg 总 RNA,反转录为 cDNA。以管家基因 β -肌动蛋白基因(*β-actin*)为内参,检测 *TNNI1* 基因的相对表达量。荧光定量 PCR 扩增采用 SYBR Green I 法,反应总体积 20.0 μl,反应体系如下:2×SYBR Green Real-time PCR Master Mix 10.0 μl,上下游引物各 0.4 μl (10 μmol/L),cDNA 模板 2.0 μl,50×Rox Reference Dye 0.4 μl,加 ddH₂O 6.8 μl 补足 20.0 μl。反应条件为:95 ℃ 2 min;95 ℃ 20 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 60 s,共 35 个循环;95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s。每次反应均设空白样品为阴性对照,每个样品设置 3 个重复。相对定量的结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行处理。

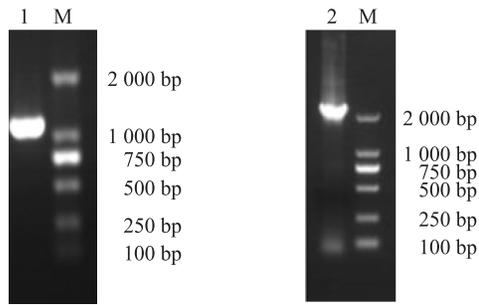
1.4 数据分析

运用 SPSS 20.0 软件中的 *t* 检验和 Bivariate Correlation 进行差异显著性检验和相关性分析。所有数据均以“均值±标准差”表示。

2 结果

2.1 鸭基因 5'侧翼区扩增

根据染色体步移试剂盒的说明,首先要对编码区已知序列进行验证。以鸭基因组 DNA 为模板,以 P1 为引物,进行 PCR 扩增,扩增得到 1 条特异性条带,如图 1,结果与预测片段大小相一致,与引物源序列(NW_004676592.1)一致性为 99%,说明验证的已知序列正确,可以据此已知序列设计特异性引物进行侧翼序列的扩增。分别以根据已知序列设计的特异性引物 SP1 和 SP2 和试剂盒中的通用引物 AP1~AP4 进行 2 轮热不对称 PCR 反应,第二轮 PCR 有清晰的条带(图 1),切胶回收,并进行测序。



M: DNA 分子量标准, DL2000; 1: CDS 区已知序列扩增结果; 2: 5' 侧翼区序列扩增结果。

图 1 鸭基因 5' 侧翼区 PCR 扩增

Fig.1 PCR products of duck *TNNII* gene 5' flanking sequence

表 2 鸭基因核心启动子区域预测

Table 2 Prediction of core promoter region of duck *TNNII* gene

核心区	起始位点	终止位点	分值	启动子序列(5'→3')
1	-1 916	-1 866	0.99	GCCTGTGGTTTAATACTCCCCCTCCGCCGCGGGCCCGCAGTGC GCGGC
2	-1 890	-1 840	0.80	CCGCCGGGCCCCGCAGTGC GCGGCTCCGCTGACACCAGGCACCACCGAGG
3	-1 858	-1 808	0.83	CACCAGGCACCACCGAGGTAAGAGGGGGCCCGGCCCGGCTGTGCTGCGG
4	-529	-479	0.90	TTGGGGTGTGTTAAAATGTTTCCCAAATTCGTGGGGATGCAAAAGGTGA

斜体的碱基代表转录起始位点。

使用在线 AliBaba 2.1 程序, 搜索 TRANSFAC 4.0 数据库, 对获得的 *TNNII* 基因 5' 侧翼区序列进行分析, 发现多个 Sp1 (Specificity Protein 1) 结合位点, CCAAT 增强子结合蛋白 (CCAAT/enhancer binding proteins, C/EBPs) 结合位点。还预测到了 E-box、SP1、八聚体结合蛋白-1 (Octamer binding protein-1, Oct-1)、核因子 KB (Nuclear Factor-kB, NF-KB)、GATA1 (GATA binding protein 1)、生肌调节因子 MRF4 (Myogenic regulatory factor 4) 等转录因子结合位点。经在线软件 Methprimer 对启动子区 CpG 进行预测 (Criteria used: Island size>100, GC Percent>50.0, Obs/Exp>0.6), 结果显示,

2.2 生物信息学分析

经 NCBI BLAST 比对, 获得的 5' 侧翼区序列片段长度为 2 078 bp, 与鸭 (NW-004676592.1) *TNNII* 基因启动子序列同源性达 97%, 表明所扩增序列来源正确。使用在线软件 BDGP 对启动子核心区域进行预测, 结果发现该序列存在 4 处的核心区域 (表 2), 其中最有可能的核心启动子区是核心区 1, 而核心区 1 和核心区 2, 核心区 2 和核心区 3 之间存在区域重叠现象, 灰色背景的碱基代表转录起始位点。

在 -2 032 至 -1 833 处存在 1 个 200 bp 的 CpG 岛, 在 -206 至 -87 处存在 1 个 120 bp 的 CpG 岛 (图 2)。预测的启动子核心区 1、核心区 2、核心区 3 位于 -2 032 至 -1 833 处的 CpG 岛内, 其中部分 CpG 位点正好位于预测的核心启动子区内。对 CpG 岛 (-2 032~-1 833 bp) 进行分析 (图 3), 发现其存在 3 个 Sp1 结合位点, 1 个 CCAAT 增强子结合蛋白 (C/EBPs) 结合位点, 同时发现转录因子如维甲类 X 受体 β (Retinoid X receptor beta, RXR-beta)、叉头框转录因子 M1 (forkhead box M1, HNF-3)、NF-KB、c-Myc (Transcriptional regulator Myc-like) 等的结合位点。

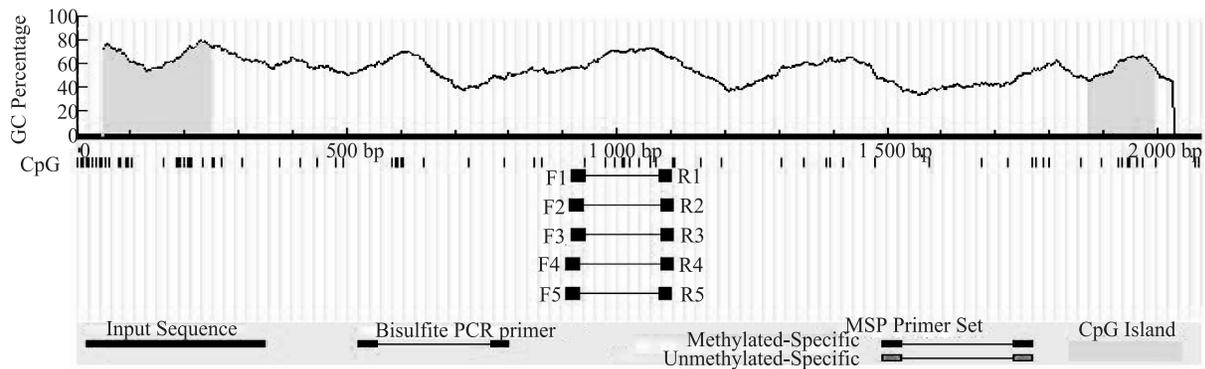
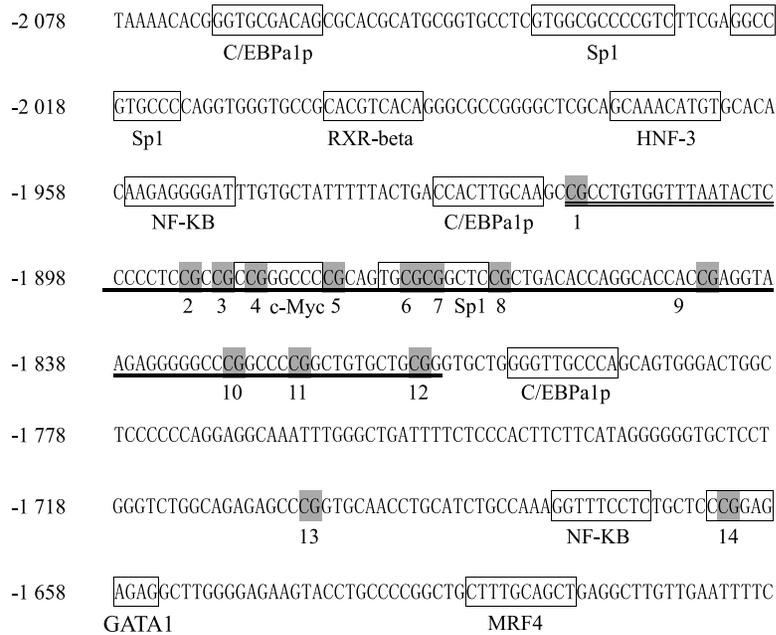


图 2 鸭基因 5' 侧翼序列 CpG 岛预测结果

Fig.2 Prediction of CpG island in duck *TNNII* gene 5' flanking sequence



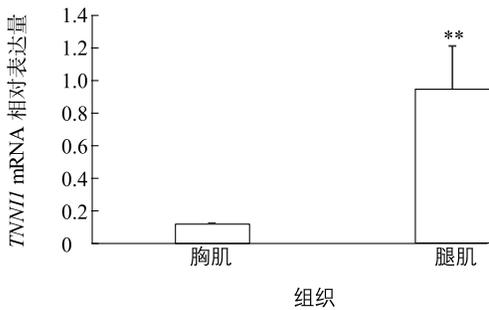
数字代表核苷酸位置(以 ATG 为+1),加粗字体和加方框的序列代表预测的转录因子及其结合位点,下划线代表预测的核心启动子位置,灰色背景序列为 BSP 检测的 CpG 位点,顺序依次为 1~14。

图 3 鸭基因 5'侧翼区 CpG 岛转录因子结合位点预测结果

Fig.3 Prediction of transcription factor binding sites in duck *TNNT1* gene 5' flanking sequence CpG island

2.3 高邮鸭基因表达水平

高邮鸭胸肌和腿肌组织 *TNNT1* 基因 mRNA 表达水平如图 4 所示,腿肌组织 *TNNT1* 基因表达量显著高于胸肌近 9 倍,二者差异极显著($P < 0.01$)。



** 表示胸肌和腿肌组织基因表达差异极显著($P < 0.01$)。

图 4 鸭胸肌和腿肌组织 *TNNT1* mRNA 表达情况

Fig.4 The mRNA expression of *TNNT1* in the breast and leg muscles of ducks

2.4 DNA 甲基化分析

鸭 *TNNT1* 基因启动子区 BSP 扩增序列位于 -1 964 bp至-1 641 bp区域内,全长序列为 324 bp,包含整个预测的核心启动子区,共有 14 个 CpG 位点。从图 5A 中可以看出,总体上,胸肌的甲基化水

平为 52.66%,腿肌的甲基化水平为 57.04%,二者差异不显著($P > 0.05$)。比较各 CpG 位点的甲基化水平,从图 5B 中可以看出,胸肌和腿肌各个 CpG 位点的甲基化水平在胸肌和腿肌中均无显著差异($P > 0.05$)。启动子区各 CpG 位点的甲基化水平与 *TNNT1* 基因的 mRNA 表达量进行相关性分析,结果如表 3 所示,胸肌中 CpG2、CpG6、CpG7、CpG11、CpG12、CpG13、CpG14 与腿肌中 CpG4、CpG5、CpG6、CpG7、CpG8、CpG10、CpG11、CpG12 位点的甲基化水平与 mRNA 表达量均呈正相关($P > 0.05$),其余各位点甲基化水平与 mRNA 表达量呈负相关($P > 0.05$);其中,胸肌 CpG4 甲基化程度与 mRNA 表达量呈显著负相关($P < 0.05$)。

3 讨论

课题组前期通过 RNA-Seq 技术对不同品种不同日龄的鸭胸肌组织进行了差异表达基因的筛选,通过 GO 和 KEGG 分析发现 *TNNT1* 基因在品种间各个时间点都具有显著差异,推测 *TNNT1* 基因可能在鸭早期骨骼肌生长发育中具有重要作用。

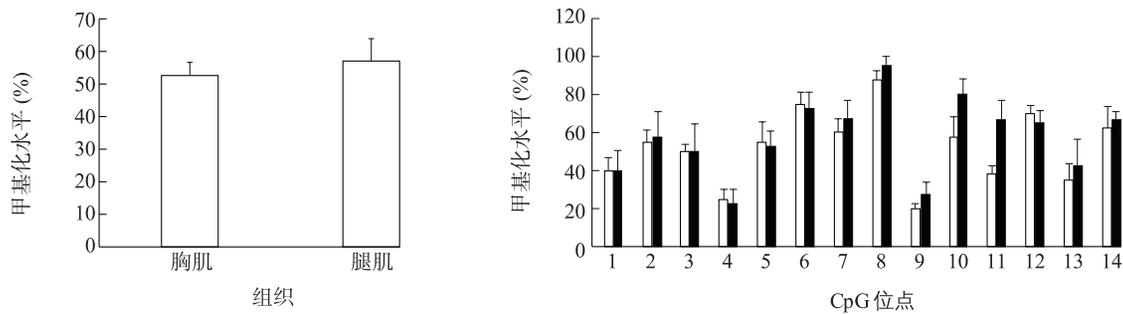


图5 鸭基因启动子区 CpG 岛的总体甲基化水平 (A) 和单个位点的甲基化水平 (B)

Fig.5 Overall methylation level (A) and single locus methylation level (B) of CpG island in the promoter region of duck *TNNI1* gene

表3 鸭基因 mRNA 表达量与启动子区 CpG 岛单个位点的甲基化水平的相关性

Table 3 Correlation analysis between *TNNI1* gene mRNA expression and methylation level of the single site of CpG island in the promoter region

CpG 位点	相关系数		P 值	
	胸肌	腿肌	胸肌	腿肌
1	-0.066	-0.106	0.934	0.894
2	0.207	-0.105	0.793	0.895
3	-0.042	-0.148	0.958	0.852
4	-0.997	0.278	0.003**	0.722
5	-0.194	0.470	0.806	0.530
6	0.207	0.477	0.793	0.523
7	0.444	0.063	0.756	0.937
8	-0.582	0.278	0.418	0.722
9	-0.395	-0.055	0.605	0.945
10	-0.864	0.705	0.136	0.295
11	0.759	0.419	0.452	0.724
12	0.042	0.515	0.958	0.485
13	0.944	-0.693	0.077	0.307
14	0.156	-0.700	0.844	0.300

为进一步深入研究其表达调控机制,本研究成功克隆了鸭 *TNNI1* 基因上游 5' 侧翼区序列 2 078 bp。已有的研究表明^[9],在人 *TNNI1* 基因启动子的上游并未发现 TATA-box 和 CAAT-box;在猪上^[10],研究发现 *TNNI1* 基因启动子上游同时存在 TATA-box 和 CAAT-box 调控元件,另外还预测到了 E-box、SP1、Oct-1、NF-KB、GATA1/2/3、AP1 等转录因子结合位点。本研究采用生物信息学技术,分析鸭 *TNNI1* 基因启动子上游序列发现,与猪上的研究

结果一致,该序列存在多个 C/EBP 结合位点,另外还发现了 SP1、RXR-beta、MRF4、GATA1、NF-KB、c-Myc 等多个转录因子的结合位点。在人和猪的启动子区均未发现 CpG 岛(转录起始位点前 3 000 bp)的存在。在鸭 *TNNI1* 基因启动子区 -2 032~-1 833 和 -206~-87 处各发现了 1 个 200 bp 和 120 bp 的 CpG 岛,推测鸭 *TNNI1* 基因的转录调控方式可能与哺乳动物存在差异。

通过软件预测分析,*TNNI1* 基因启动子区包含了 4 个核心区,其中 -1 916~-1 808 区域内含 3 个候选核心启动子区。预测的核心启动子区正好位于 CpG 岛(-2 032~-1 833)内。CpG 岛是易于发生甲基化的区域,启动子区 DNA 甲基化能够影响转录因子与 DNA 的结合,改变染色质的结构,调控基因表达。分析发现 CpG 岛所在的区域有 1 个 C/EBP 和 3 个 SP1 结合位点,另外还包含了 RXR-beta、HNF-3、NF-KB、c-Myc 等转录因子的结合位点。C/EBP-Palp 与基因转录效率关系密切^[11]。SP1 能和 GC 盒相结合,也能与转录因子如 YY1、TBP 结合,参与基因表达的转录调控^[12]。目前还没有 *TNNI1* 基因启动子区 DNA 序列甲基化影响基因转录调控方面的报道。

与胸肌相比,腿肌因为承担更多的运动功能,肌肉中慢肌纤维的比例高于胸肌。定量检测的结果表明,*TNNI1* 基因 mRNA 表达量在胸肌和腿肌中呈显著差异,与哺乳动物中 *TNNI1* 基因在慢肌纤维中特异性表达^[6]是一致的。采用亚硫酸氢盐测序法检测 CpG 岛中各 CpG 位点的甲基化程度,发现胸肌和腿肌的 CpG 岛的总体甲基化水平无显著差异。推测,预测的核心启动子区 CpG 岛的甲基化修饰可能不是影响鸭 *TNNI1* 基因在不同类型肌肉组织差异

表达的主要调控因素,可能存在其他的如组蛋白修饰、miRNA 干扰等的调控方式。CpG 岛中各个位点的甲基化水平与 mRNA 表达量进行相关性分析,胸肌 CpG4 位点的甲基化程度与 mRNA 表达量呈显著负相关,这与通常认为的,甲基化程度越高,基因表达会被抑制的观点是一致的。CpG4 位点正好位于转录因子 c-Myc 的结合区域内。c-Myc 能够抑制肌肉细胞的终端分化,而 YY1 的持续表达能够促进 c-Myc 的表达^[13];NF-KB 能够通过调节 YY1 和肌纤维相关基因的转录沉默调节骨骼肌成肌细胞的分化。对启动子区序列进行分析,发现启动子区存在 3 个 NF-KB 和 2 个 YY1 的结合位点。CpG4 位点可能通过甲基化修饰,影响相关转录因子的结合,参与鸭 *TNNI1* 基因的转录调控过程。

本研究克隆获得鸭 *TNNI1* 基因 5'侧翼区序列 2 078 bp,预测分析发现其含有 2 个 CpG 岛,其中 1 个 CpG 岛(-2 078~-1 695)位于核心启动子区,存在多个调控元件和转录因子结合位点,其总体甲基化水平与 *TNNI1* 基因表达水平无显著相关,其中 CpG4 位点可能通过甲基化修饰,影响鸭 *TNNI1* 基因在胸肌中的转录调控。

参考文献:

- [1] SHENG J J, JIN J P. TNN1, TNN2 and TNN3: Evolution, regulation, and protein structure-function relationships [J]. *Gene*, 2015, 576(1): 385-394.
- [2] O'MAHONEY J V, GUVEN K L, LIN J, et al. Identification of a novel slow-muscle-fiber enhancer binding protein, MusTRD1 [J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2000, 18(11): 6641-6652.
- [3] MULLEN A, BARTON P. Structural characterization of the human fast skeletal muscle troponin I gene (*TNNI2*) [J]. *Gene*, 2000, 242(1/2): 313-320.
- [4] RITTOO D, JONES A, LECKY B, et al. Elevation of cardiac troponin T, but not cardiac troponin I, in patients with neuromuscular diseases: implications for the diagnosis of myocardial infarction [J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2014, 63(22): 2411-2420.
- [5] BODOR G S, PORTERFIELD D, VOSS E M, et al. Cardiac troponin-I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue. [J]. *Clinical Chemistry*, 1995, 41(1): 1710-1715.
- [6] LI M J, LI X W, ZHU L, et al. Differential expression analysis and regulatory network reconstruction for genes associated with muscle growth and adipose deposition in obese and lean pigs [J]. *Progress in Natural Science: Materials International*, 2008, 18(4): 387-399.
- [7] WANG X J, YANG N, CHEN Y, et al. Systematic identification of genes involved in divergent skeletal muscle growth rates of broiler and layer chickens [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(1): 87.
- [8] BEGUE G, RAUE U, JEMIOLO B, et al. DNA Methylation Assessment from Human Slow- and Fast-Twitch Skeletal Muscle Fibers [J]. *Journal of Applied Physiology*, 2017, 122(4): 952-967.
- [9] CORIN S J, JUHASZ O, ZHU L, et al. Structure and expression of the human slow twitch skeletal muscle troponin I gene [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(14): 10651-10659.
- [10] YANG H, XU Z Y, MA Z X, et al. Molecular cloning and comparative characterization of the porcine Troponin I family [J]. *Animal Biotechnology*, 2009, 21(1): 64-76.
- [11] MAITY S N, GOLUMBEK P T, KARSENTY G, et al. Selective activation of transcription by a novel CCAAT binding factor [J]. *Science*, 1988, 241(4865): 582-585.
- [12] JOKELA T A, MAKKONEN K M, OIKARI S, et al. Cellular content of UDP-N-acetylhexosamines controls hyaluronan synthase 2 expression and correlates with O-Linked N-acetylglucosamine modification of transcription factors YY1 and SP1 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(38): 33632-33640.
- [13] LEE T C, ZHANG Y, SCHWARTZ R J. Bifunctional transcriptional properties of YY1 in regulating muscle actin and c-myc gene expression during myogenesis. [J]. *Oncogene*, 1994, 9(4): 1047-1052.

(责任编辑:陈海霞)