

李隐侠, 郭潇潇, 张俊, 等. 湖羊转录因子 CTCF 基因序列分析及其对 *NR5A1* 基因转录活性的调控[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(6): 1482-1488.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.06.018

湖羊转录因子 CTCF 基因序列分析及其对 *NR5A1* 基因转录活性的调控

李隐侠^{1,2}, 郭潇潇¹, 张俊^{1,2}, 孟春花^{1,2}, 钱勇^{1,2}, 仲跻峰^{1,2}, 曹少先^{1,2}

(1.江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏 南京 210014; 2.江苏省农业部种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014)

摘要: 转录因子 CTCF 在动物生长发育过程中发挥重要的调控作用, 但其在绵羊中的序列特征、组织器官表达及功能目前尚不清楚。本研究以湖羊 *CTCF* 基因为研究对象, 采用 PCR 方法克隆获得其编码区全序列, 发现其序列全长 2 187 bp, 编码 727 个氨基酸残基, 含有 11 个连续的锌指结构域。组织器官表达谱分析发现 *CTCF* 基因在湖羊各个组织器官中广泛表达, 在子宫中表达量相对较低, 在胃中表达量相对较高。JASPAR 在线软件预测发现核受体 *NR5A1* 基因内含子 (翻译起始位点 ATG 前 393 bp 片段) 含有 3 个 CTCF 结合位点, 双荧光素酶试验结果显示, CTCF 结合位点突变后 *NR5A1* 基因转录活性显著或极显著下降, 表明 CTCF 可能通过调控 *NR5A1* 基因转录参与调控湖羊繁殖性能。

关键词: 转录因子 CTCF; 表达特征; *NR5A1* 基因; 转录活性

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)06-1482-07

Sequence analysis of transcription factor CTCF and its regulation on transcription activity of *NR5A1* gene in Hu sheep

LI Yin-xia^{1,2}, GUO Xiao-xiao¹, ZHANG Jun^{1,2}, MENG Chun-hua^{1,2}, QIAN Yong^{1,2}, ZHONG Ji-feng^{1,2}, CAO Shao-xian^{1,2}

(1. Institute of Animal Sciences, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. The Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China)

Abstract: Transcription factor CTCF plays an important regulatory role in growth and development of animals, but its sequence characteristics, tissues and organs expression and function in sheep are still unclear. In this study, *CTCF* gene of Hu sheep was used as research object, the full coding sequence of *CTCF* was cloned by RT-PCR. The result showed that the full-length sequence of *CTCF* was 2 187 bp, encoding 727 amino acids and containing 11 consecutive zinc finger domains. *CTCF* gene was widely expressed in various tissues and organs of Hu sheep, with a relatively low expression in uterus and a relatively high expression in stomach. Predication results showed that the intron (the 393 bp fragment before translation initiation site ATG) of nuclear receptor *NR5A1* gene contained

three CTCF binding sites by the JASPAR online software. The results of dual luciferase assay showed that the transcription activity of *NR5A1* gene decreased significantly or extremely significantly when the CTCF binding sites were mutated, indicating that CTCF participated in the regulation of reproductive performance of Hu sheep by regulating *NR5A1* gene transcription.

收稿日期: 2020-02-24

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20140750); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(18)3004]; 江苏省现代农业重点项 (BE2019373)

作者简介: 李隐侠 (1979-), 女, 河南固始人, 博士, 副研究员, 主要从事动物遗传育种与繁殖方面的研究。 (E-mail) liyxmh@jaas.ac.cn

通讯作者: 曹少先, (E-mail) sxcao@jaas.ac.cn

Key words: transcription factor CTCF; expression characteristics; NR5A1 gene; transcription activity

CTCF(CCCTC binding factor)是一个重要的转录因子,由一个N末端结构域,一个包含11个C₂H₂ 锌指中心结构域和一个C末端结构域组成^[1]。哺乳动物基因组中大约含有30 000~70 000个CTCF结合位点^[2],调控多种功能,包括微调基因表达、X染色体失活、印记和三维染色质组织等^[3-4]。体内、外研究发现,CTCF结合位点完全破坏或缺失的纯合子在整个胚胎期都是致死的^[5],且在特定细胞如卵母细胞^[6]、淋巴细胞^[7]、神经元^[8]中特异性敲除CTCF后导致器官特异性功能失效、异常的增强子-启动子相互作用和转录失调。小鼠雄性生殖细胞中CTCF失活导致精子发生异常和不育^[9]。说明CTCF在动物生长发育过程中具有非常重要的作用。

CTCF作为转录因子发挥重要的调控作用。作为转录抑制因子负调控*c-myc*和溶菌酶基因转录^[10-12],作为转录激活因子与Cohesin蛋白参与调控人*UGT1*基因簇的转录^[13],驱动端粒重复编码RNA的转录进而促进端粒DNA复制的完成^[14]。

孤儿核受体NR5A1基因参与调控湖羊的繁殖性能^[15-17],JASPAR在线软件预测发现,在NR5A1基因内含子(翻译起始位点“ATG”前393 bp内)含有3个CTCF结合位点,但CTCF是否参与调控湖羊NR5A1基因转录尚未知道。本研究以湖羊为研究对象,扩增卵巢组织中CTCF基因编码区序列,进行序列特征分析,同时鉴定其在湖羊各组织中的表达模式,最后构建CTCF结合位点野生型/突变型NR5A1序列的荧光素酶报告载体,研究CTCF对NR5A1活性的影响,解析CTCF对湖羊NR5A1基因的调控作用。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验湖羊母羊(来自西来生态农业有限公司)屠宰后,立即采集各个组织器官样(包括心、肝、脾、肺、肾、子宫、卵巢、大肠、小肠和肌肉等)于液氮中保存备用。采用传统的酚-氯仿方法提取DNA,用RNA提取试剂盒(百迈客生物科技有限公司产品)提取RNA,并使用HiScript II Q RT SuperMix(诺唯赞生物科技股份有限公司产品)完成cDNA第一链的合成。

1.2 引物的合成和扩增

用Primer Premier 5.0软件先设计2对CTCF基因(序列号:XM_027978089.1)特异性引物P-CTCF1和P-CTCF2,用于扩增湖羊CTCF编码区;再设计P-CTCF3引物,以 β -actin为内参(表1)进行湖羊CTCF基因组织表达谱的鉴定。引物由南京擎科生物有限公司合成,引物序列的相关信息见表1。

以湖羊卵巢组织为模板,扩增湖羊CTCF基因编码区序列;以湖羊各组织逆转录的cDNA为模板,以 β -actin为内参,扩增不同组织中CTCF基因及对应 β -actin,分析湖羊CTCF基因组织表达谱。RT-PCR反应体系为20 μ l,含模板DNA或者cDNA 60 ng、1.5 TM2X High-Fidelity Master Mix(南京擎科生物科技有限公司产品)10 μ l、引物(100 μ mol/L)1 μ l,加灭菌双蒸水至20 μ l。PCR扩增程序:98 $^{\circ}$ C预变性2 min;98 $^{\circ}$ C变性10 s,53~58 $^{\circ}$ C(表1)退火10 s,72 $^{\circ}$ C延伸2 min,35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min。

1.3 序列分析和转录因子结合位点预测

克隆测序获得的序列在NCBI的ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)中进行开放阅读框预测,并用DNAMAN6.0软件进行编码区序列翻译。用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)软件预测CTCF蛋白功能域。用JASPAR在线预测数据库(<http://jaspar.bin.ku.dk>)预测转录因子结合位点。

1.4 荧光素酶载体构建

以湖羊DNA为模板扩增NR5A1基因自翻译起始位点ATG前393 bp至ATG后85 bp的片段(片段长481 bp),连接到pMD-19T载体上,由南京擎科生物科技有限公司测序鉴定后获得pMD-19T-NR5A1载体。用内切酶Nhe I和Hind III双酶切荧光素酶报告载体(pGL3-basic)和pMD19T-NR5A1,目的片段切胶回收后T4连接酶连接过夜,转化DH α 感受态细胞,测序鉴定后获得pGL3-NR5A1载体。

1.5 点突变载体构建

以获得的pMD19T-NR5A1质粒为模板,根据TaKaRa MutanBEST Kit引物设计原理设计3对5'端邻接、3'端方向相反的引物用以导入变异点,同时使用高保真DNA聚合酶(Pyrobest DNA Polymerase)进行PCR扩增、连接和质粒DNA转化,构建3个

NR5A1 基因 CTCF 结合位点突变型 pMD19T-*NR5A1*-TU1、pMD19T-*NR5A1*-TU2 和 pMD19T-*NR5A1*-TU3 载体,用内切酶 *Nhe* I 和 *Hind* III 分别双酶切荧光素酶报告载体 (pGL3-basic) 和 pMD19T-*NR5A1*-TU1、pMD19T-*NR5A1*-TU2 和 pMD19T-*NR5A1*-TU3 载体,

目的片段切胶回收后 T4 连接酶连接过夜,转化 DH α 感受态细胞,测序鉴定后获得 pGL3-*NR5A1*-TU1、pGL3-*NR5A1*-TU2 和 pGL3-*NR5A1*-TU3 载体,引物见表 1。

表 1 本研究中的基因扩增引物

Table 1 Primers used for amplification in this study

引物	引物序列(5'→3')	退火温度 T_m (°C)	产物长度 (bp)	目的
P-CTCF1	F:GAGGCTTGAGAGCTGACTTC R:GCACTTGTGAGGACGACTAC	55	1 151	CDS 扩增
P-CTCF2	F:GGGCAAAGATGTGGATGT R:ACACAGCCCAGAGCAGTC	53	1 576	CDS 扩增
P-CTCF3	F:AGAAAGACTTACCAGAGACG R:CCTCCATATTTACAACCTGC	56	250	RT-PCR
P- β -actin	F:ACTTTGGCATCGTGGAGG R:GAAGACTGAGTGTCTGCTGTTG	58	379	RT-PCR
P-NR5A1	F:ATAGCTAGCCTTAAATGAACGAATCCG R:CTAAAGCTTATGTGAGCAGCCCGTAGTGG	58	481	荧光素酶载体构建
P-NR5A1-CTCF TU1	F:GAGCCCCTGGGAGGGTGGGAGCGGGCGCGCGGG R:CTCCTGAGTGGCCCCCTGAAGCGGCCGACCTGGGA	55	481	荧光素酶载体构建
P-NR5A1-CTCF TU2	F:GGGGAGCGGGCGCGCTTTGCTGCCGGGACAGGGC R:ACCCTCCCAGGGGCTCCTCTGAGTGGCCCCCAC	55	481	荧光素酶载体构建
P-NR5A1-CTCF TU3	F:GCCCAGGTCCCCTGCATTGCCAGCGGCCGTCCGG R:GCGGTGGTCTCGCTCCGCGGCCGCGCGGCCCT	55	481	荧光素酶载体构建

下划线表示插入的酶切位点。

1.6 细胞转染和荧光素酶活性测定

293T 细胞传代到含有 10%胎牛血清[赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品]、100 U/L 氨苄/四环素[赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品]的 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's media) 培养基的 12 孔板中,在 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养到细胞汇合度 85%~90% 时,使用 Lipofectamine 3000[赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品]分别转染空载 pGL3-basic、*NR5A1* 野生型载体 pGL3-*NR5A1* 和 3 个 CTCF 结合位点突变型 *NR5A1* 载体 pGL3-*NR5A1*-TU1、pGL3-*NR5A1*-TU2、pGL3-*NR5A1*-TU3 于细胞中,转染后 48 h 搜集细胞进行荧光素酶活性测定。

1.7 数据分析

试验结果用平均数 \pm 标准差表示,用 SPSS16.0 软件中 *t* 检验进行独立样本统计分析,用 One-way 中的 ANOVA 进行多重比较分析。

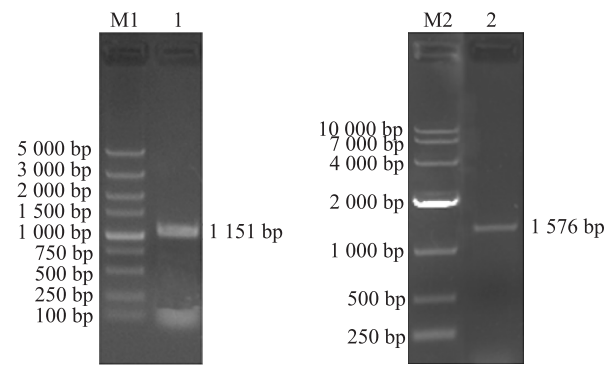
2 结果与分析

2.1 湖羊 CTCF 基因编码区序列扩增

以湖羊卵巢组织 cDNA 为模板,2 对特异性引物扩增湖羊 CTCF 编码区序列,1%琼脂糖凝胶电泳检测发现 2 对引物在湖羊中均有特异性扩增(图 1),切胶回收测序后进行序列比对和拼接,得到湖羊 CTCF 基因的整个编码区 CDS 序列。

2.2 湖羊 CTCF 基因序列特征分析

测序获得的 CTCF 序列用在线软件(ORF Finder)预测发现,完整的开放阅读框长度为 2 187 bp,编码 727 个氨基酸残基。SMART 在线预测发现湖羊 CTCF 编码的蛋白质与其他哺乳动物一样,含有 11 个连续的锌指结构域,11 个锌指结构域在编码区的起始位点见表 2,说明 CTCF 基因在哺乳动物中高度保守。



1、2 表示 2 对引物特异性扩增片段; M1 和 M2 分别代表 5 000 bp 和 10 000 bp marker。

图 1 湖羊 CTCF 基因外显子扩增电泳图

Fig.1 Amplification and electrophoresis of CTCF gene in Hu sheep

表 2 湖羊 CTCF 蛋白 ZnF-C₂H₂ 结构域位置

Table 2 The location of ZnF-C₂H₂ domain in CTCF protein

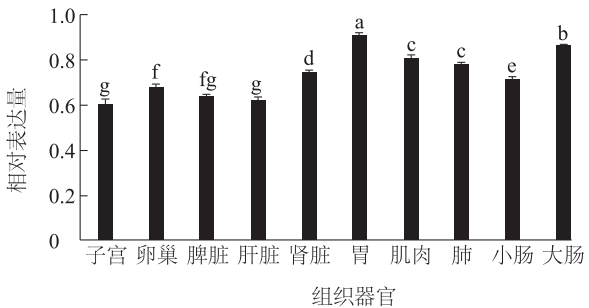
起始位点 (nt)	结束位点 (nt)	E 值
266	288	0.000 122
294	316	0.007 260
322	345	0.000 688
351	373	0.005 140
379	401	0.002 090
407	430	0.202 000
437	460	0.094 400
467	489	0.076 700
495	517	0.033 400
523	546	0.025 300
555	575	12.300 000

2.3 CTCF 基因在湖羊组织器官中的表达

RT-PCR 方法检测 CTCF 基因在湖羊子宫、卵巢、脾脏、肝脏、肾脏、胃、肌肉、肺脏、小肠和大肠等 10 个组织器官中的表达模式,结果发现 CTCF 基因在检测的 10 个湖羊组织器官中广泛表达 (图 2),在子宫中表达量相对较低,胃中表达量相对最高。统计分析发现子宫、卵巢、脾脏和肝脏中 CTCF 表达量显著低于肾脏、胃、肌肉、肠等组织 ($P<0.05$) (图 2)。

2.4 转录因子 CTCF 调控湖羊 NR5A1 基因活性

2.4.1 湖羊 NR5A1 基因翻译起始位点 ATG 前 393 bp 序列扩增 以湖羊 DNA 为模板,扩增湖羊



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

图 2 湖羊 CTCF 基因组织器官表达

Fig.2 Tissue and organ expression of CTCF gene in Hu sheep

NR5A1 基因翻译起始位点 ATG 前 393 bp 至 ATG 后 85 bp (共计 481 bp) 的片段,测序后比对分析发现其与引物源序列高度一致。JASPAR 软件预测发现在翻译起始位点 ATG 前的 393 bp 片段内存在 3 个转录因子 CTCF 结合位点 (图 3)。

2.4.2 CTCF 调控湖羊 NR5A1 基因转录活性 构建湖羊 NR5A1 基因 ATG 前 393 bp 至 ATG 后 85 bp 的片段野生型荧光素酶报告载体 pGL3-NR5A1 和 3 个突变型荧光素酶报告载体 pGL3-NR5A1 TU1、pGL3-NR5A1 TU2、pGL3-NR5A1 TU3 (图 4A)。将 4 个荧光素酶报告载体转染 293T 细胞,双荧光素酶检测试剂盒检测荧光素酶活性,结果 (图 4 B) 发现第一个 CTCF 转录因子结合位点突变后荧光活性下降,但是与野生型相比差异不显著;第二个 CTCF 转录因子结合位点突变后,荧光活性与野生型相比显著下降 ($P=0.042$);第三个 CTCF 转录因子结合位点突变后,荧光活性与野生型相比极显著下降 ($P=0.001$)。说明转录因子 CTCF 参与调控湖羊 NR5A1 基因的转录活性。

3 讨论

转录因子 CTCF 在调控动物生长发育过程中发挥重要作用^[18-19]。CTCF 通过抑制 S100A1 上调 RYR2,从而抑制心肌细胞的内质网应激和凋亡^[20],CTCF 缺失胚胎无法植入^[21-22],CTCF 在人类胚胎发生过程中的 3D 染色质结构建立中具有关键作用,CTCF 缺失导致小鼠早期大脑发育中 PUMA (受 P53 上调表达的凋亡调控基因) 上调和随后大量凋亡^[23]。

研究发现 CTCF 可调控脊椎动物大脑、心血管、四肢和肌肉发育等^[24],而本研究组织器官表达谱显

GCGCATTT

AATCTGACAG TCCCAGGTCG GCCGCGGTGG GGGGCGACTC AGGAGGAGCC CCTGGGAGGG

CTCF

TGGGGAGCGG GCGCGGCGGG AGTGCCGGGA CAGGGCCAGC AAGGGCCCCG CGCGCACGGG

CTCF

AGCTGCTCCG GACACATGTG CTGCTGTGCG CTGCTCAGGG CTCTCACATA GGGGGCCTGC

AACAGGCGTC CTTGACCACC GCGCTGCGG TGGGGCCCAG GGGCCTGCCC GTTAGCAGGG

CGCCGAGGGC CGCGCGGCCG CGGAGCGCAG GACCCACCGC GCCCAGGTCC CCCTGCACCA

CCAGCGGCCG TCCGGCTCTG CCATGAACCT CTCCTCCCTC CACAGGCGGA CGCCGTGGGC

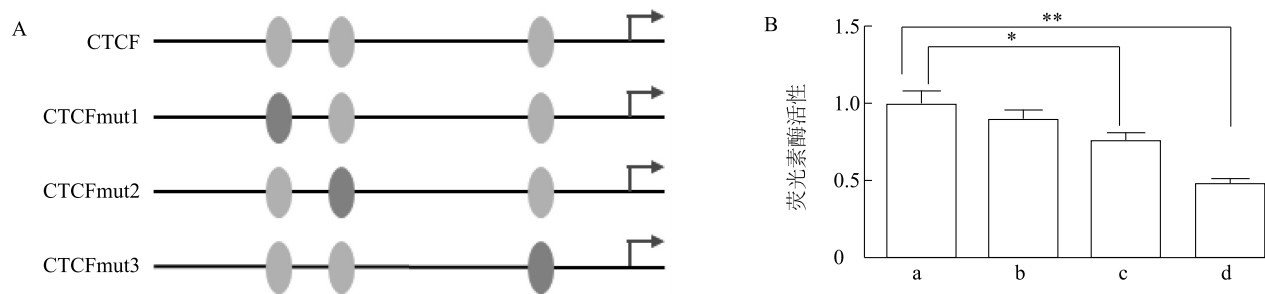
CTCF

+1 ATG

下划线表示转录因子 CTCF 结合位点,+1 表示翻译起始位点。

图 3 *NR5A1* 基因 ATG 前 393 bp 序列扩增及转录因子 CTCF 结合位点预测

Fig.3 The 393 bp sequence amplification before ATG of *NR5A1* gene and prediction of CTCF binding sites



A:CTCF 转录因子突变位点位置示意图;B:CTCF 转录因子对湖羊 *NR5A1* 基因荧光酶活性的影响。图 B 中,a;*NR5A1*-CTCF;b;*NR5A1*-CTCFmut1;c;*NR5A1*-CTCFmut2;d;*NR5A1*-CTCFmut3。* 和 ** 分别表示差异显著和差异极显著。

图 4 转录因子 CTCF 调控湖羊 *NR5A1* 基因转录活性

Fig.4 Regulation of CTCF on transcription activity of *NR5A1* gene in Hu sheep

示 *CTCF* 基因在湖羊各个组织器官中广泛表达,是一种组成型表达基因,提示可能在湖羊各个组织中均发挥重要的调控作用,与前人的研究结果一致^[24-25]。

人^[26]、牛^[27]、猪^[28]、小鼠^[29]和斑马鱼^[30]等的 *CTCF* 基因均已被克隆,本研究首次克隆获得湖羊 *CTCF* 编码区全序列,比对发现 *CTCF* 编码的蛋白质含有连续的 11 个锌指结构域,与其他哺乳动物一致。*CTCF* 转录因子一般通过其第 3 到第 7 结构域结合 DNA 的 15 bp 核心基序调控靶基因表达^[31],但 *CTCF* 中的 11 个锌指结构域在不同物种中参与调控靶基因的功能也时有不同,转录因子 *CTCF* 调控靶基因 *c-myc* 基因时,第 2 至第 7 锌指结构域对于鸡 *c-myc* 基因 V 位点的结合是必需的,而第 3 至第 7 锌指结构域对特异性结合人 *c-myc* 基因 A 位点是必需的^[32],说明转录因子 *CTCF* 通过不同锌指结构域与不同 DNA 靶序列结合参与调控多种生物学功能^[33-35],是一个多价转录因子。

进一步研究发现 *CTCF* 主要与基因间区域和内含子相关联,像增强子一样作为调控元件调控基因表达^[36]。*CTCF* 通过与 *FMR1* 基因启动子区、外显子区和内含子 2 相结合参与调控 *FMR1* 基因转录调控^[37],通过与 *BCL6* 基因第一内含子结合参与调控基因转录和表观遗传学修饰^[38],*CTCF* 与巨细胞病毒(CMV) *MIE* 基因的内含子 A 结合并具有抑制 *MIE* 基因表达和病毒复制的功能^[34]。*NR5A1* 是核受体 *NR5A* 家族重要成员之一,与哺乳动物雌性生殖、卵泡发育、类固醇生成等关系密切^[39-40],是维持雌性卵巢功能和繁殖力必需的因子^[41-43]。在湖羊中发现 *NR5A1* 基因在卵巢组织中高表达,是调控湖羊产羔数的重要候选基因之一^[15-17],5' RACE 方法鉴定其转录起始位点与翻译起始位点(ATG)间有一个长度为 1 424 的内含子存在^[16],可能对 *NR5A1* 的转录发挥调控作用。本研究发现的 *NR5A1* 基因 ATG 前 393 bp 片段位于此内含子中,此 393 bp 片段存在 3 个 *CTCF* 转录因子结合位点,荧光素酶活

性分析结果显示 CTCF 转录因子参与调控湖羊 *NR5A1* 基因的转录活性,该结果初步说明转录因子 CTCF 可能通过调控 *NR5A1* 基因转录进而参与调控湖羊繁殖性能。

参考文献:

- [1] FILIPPOVA G N. Genetics and epigenetics of the multifunctional protein CTCF[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2008, 80:337-360.
- [2] ARZATE-MEJÍA R G, RECILLAS-TARGA F, CORCES V G. Developing in 3D: the role of CTCF in cell differentiation[J]. *Development*, 2018, 145(6):137729.
- [3] FEDORIW A M, STEIN P, SVOBODA P, et al. Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in *H19* gene imprinting[J]. *Science*, 2004, 303(5655): 238-240.
- [4] MERKENSCHLAGER M, NORA E P. CTCF and cohesin in genome folding and transcriptional gene regulation[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2016, 17: 17-43.
- [5] CARMONA-ALDANA F, ZAMPEDRI C, SUASTE-OLMOS F, et al. CTCF knockout reveals an essential role for this protein during the zebrafish development[J]. *Mech Dev*, 2018, 154: 51-59.
- [6] WAN L B, PAN H, HANNENHALLI S, et al. Maternal depletion of CTCF reveals multiple functions during oocyte and preimplantation embryo development[J]. *Development*, 2008, 135(16): 2729-2738.
- [7] RIBEIRO D E ALMEIDA C, STADHOUDERS R, DE BRUIJN M J W, et al. The DNA-binding protein CTCF limits proximal V κ recombination and restricts κ enhancer interactions to the immunoglobulin κ light chain locus[J]. *Immunity*, 2011, 35(4): 501-513.
- [8] HIRAYAMA T, TARUSAWA E, YOSHIMURA Y, et al. CTCF is required for neural development and stochastic expression of clustered *Pcdh* genes in neurons[J]. *Cell Rep*, 2012, 2(2): 345-357.
- [9] HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ A, LILIENTHAL I, FUKUDA N, et al. CTCF contributes in a critical way to spermatogenesis and male fertility[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28355.
- [10] LOBANENKOV V V, NICOLAS R H, ADLER V V, et al. A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene[J]. *Oncogene*, 1990, 5: 1743-1753.
- [11] BANIAHMAD A, STEINER C, KÖHNE A C, et al. Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site[J]. *Cell*, 1990, 61: 505-514.
- [12] OUBOUSSAD L, KREUZ S, LEFEVRE P F. CTCF depletion alters chromatin structure and transcription of myeloid-specific factors[J]. *J Mol Cell Biol*, 2013, 5: 308-322.
- [13] 郑晓飞,黄海燕,吴强. 染色质构架蛋白 CTCF 调控 *UGT1* 基因簇的表达[J]. *遗传*, 2019, 41(6): 509-523.
- [14] BEISHLINE K, VLADIMIROVA O, TUTTON S, et al. CTCF driven TERRA transcription facilitates completion of telomere DNA replication[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 2114.
- [15] 李隐侠,张俊,钱勇,等. 湖羊 *NR5A1* 基因全序列克隆和表达特征分析[J]. *江苏农业学报*, 2019, 35(1): 114-121.
- [16] LI Y, ZHANG J, QIAN Y, et al. Mutation -388 C>G of *NR5A1* gene affects litter size and promoter activity in sheep[J]. *Anim Reprod Sci*, 2018, 196: 19-27.
- [17] 李隐侠,张俊,钱勇,等. 湖羊 *NR5A1* 基因 SNPs 筛选及其与产羔数的关联分析[J]. *江苏农业学报*, 2017, 33(1): 124-132.
- [18] SEITAN VC, KRANGEL MS, MERKENSCHLAGER M. Cohesin, CTCF and lymphocyte antigen receptor locus rearrangement[J]. *Trends Immunol*, 2012, 33: 153-159.
- [19] OHLSSON R, BARTKUHN M, RENKAWITZ R. CTCF shapes chromatin by multiple mechanisms: the impact of 20 years of CTCF research on understanding the workings of chromatin[J]. *Chromosoma*, 2010, 119: 351-360.
- [20] ZENG Z, HUANG N, ZHANG Y, et al. CTCF inhibits endoplasmic reticulum stress and apoptosis in cardiomyocytes by upregulating RYR2 via inhibiting S100A1[J]. *Life Sci*, 2020, 242: 117158.
- [21] CHEN X, KE Y, WU K, et al. Key role for CTCF in establishing chromatin structure in human embryos[J]. *Nature*, 2019, 576(7786): 306-310.
- [22] MOORE J M, RABAIA N A, SMITH L E, et al. Loss of maternal CTCF is associated with peri-implantation lethality of *Ctcf* null embryos[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e34915.
- [23] WATSON LA, WANG X, ELBERT A, et al. Dual effect of CTCF loss on neuroprogenitor differentiation and survival[J]. *J Neurosci*, 2014, 34: 2860-2870.
- [24] ARZATE-MEJÍA R G, RECILLAS-TARGA F, CORCES V G. Developing in 3D: the role of CTCF in cell differentiation[J]. *Development*, 2018, 145(6): 137729.
- [25] PHILLIPS J E, CORCES V G. CTCF: master weaver of the genome[J]. *Cell*, 2009, 137(7): 1194-1211.
- [26] VOSTROV A A, QUITSCHKE W W. The zinc finger protein CTCF binds to the APB beta domain of the amyloid beta-protein precursor promoter. Evidence for a role in transcriptional activation[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(52): 33353-33359.
- [27] 苏节,朱鹏,刘庆友,等. 水牛转录抑制因子 *CTCF* 基因克隆分析及不同组织中的表达研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(3): 1-6.
- [28] UENISHI H, EGUCHI T, SUZUKI K, et al. PEDE (pig EST data explorer): construction of a database for ESTs derived from porcine full-length cDNA libraries[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(Suppl): D484-D488.
- [29] LUTZ M, BURKE LJ, BARRETO G, et al. Transcription repression by the insulator protein CTCF involves histone deacetylases

- [J]. Nucl Acids Res, 2000, 28(8): 1707-1713.
- [30] PUGACHEVA E M, KWON Y W, HUKRIEDE N A, et al. Cloning and characterization of zebrafish CTCF: developmental expression patterns, regulation of the promoter region, and evolutionary aspects of gene organization[J]. Gene, 2006, 375: 26-36.
- [31] HASHIMOTO H, WANG D, HORTON J R, et al. Structural basis for the versatile and methylation-dependent binding of CTCF to DNA[J]. Mol Cell, 2017, 66: 711-720.
- [32] FILIPPOVA G N, FAGERLIE S, KLENOVA E M, et al. An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(6): 2802-2813.
- [33] KUZMIN I, GEIL L, GIBSON L, et al. Transcriptional regulator CTCF controls human interleukin 1 receptor-associated kinase 2 promoter[J]. J Mol Biol, 2005, 346(2): 411-422.
- [34] AWAD T A, BIGLER J, ULMER J E, et al. Negative transcriptional regulation mediated by thyroid hormone response element 144 requires binding of the multivalent factor CTCF to a novel target DNA sequence[J]. J Biol Chem, 1999, 274(38): 27092-27098.
- [35] TORRANO V, CHERNUKHIN I, DOCQUIER F, et al. CTCF regulates growth and erythroid differentiation of human myeloid leukemia cells[J]. J Biol Chem, 2005, 280(30): 28152-28161.
- [36] RUIZ-VELASCO M, KUMAR M, LAI M C, et al. CTCF-mediated chromatin loops between promoter and gene body regulate alternative splicing across individuals[J]. Cell Syst, 2017, 5(6): 628-637.
- [37] LANNI S, GORACCI M, BORRELLI L, et al. Role of CTCF protein in regulating FMR1 locus transcription[J]. PLoS Genet, 2013, 9(7): e1003601.
- [38] BATLLE-LÓPEZ A, CORTIGUERA M G, ROSA-GARRIDO M, et al. Novel CTCF binding at a site in exon1A of BCL6 is associated with active histone marks and a transcriptionally active locus[J]. Oncogene, 2015, 34(2): 246-256.
- [39] MARTÍNEZ F P, CRUZ R, LU F, et al. CTCF binding to the first intron of the major immediate early (*MIE*) gene of human cytomegalovirus (HCMV) negatively regulates *MIE* gene expression and HCMV replication[J]. J Virol, 2014, 88(13): 7389-7401.
- [40] KIM K W, LI S, ZHAO H, et al. CNS-specific ablation of steroidogenic factor 1 results in impaired female reproductive function[J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(6): 1240-1250.
- [41] YIN M, LÜ M, YAO G, et al. Transactivation of microRNA-383 by steroidogenic factor-1 promotes estradiol release from mouse ovarian granulosa cells by targeting RBMS1[J]. Mol Endocrinol, 2012, 26(7): 1129-1143.
- [42] JEYASURIA P, IKEDA Y, JAMIN S P, et al. Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function[J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(7): 1610-1619.
- [43] BUAAS F W, GARDINER J R, CLAYTON S, et al. *In vivo* evidence for the crucial role of SF1 in steroid-producing cells of the testis, ovary and adrenal gland[J]. Development, 2012, 139(24): 4561-4570.

(责任编辑:陈海霞)