



牛胎盘 *DLK1-DIO3* 区域的印记及甲基化状态研究

郑云畅¹, 侯睿霖¹, 梁晓贺¹, 魏子露¹, 杨利丹¹, 霍浩楠¹, 苏硕青², 张 萃¹, 李树静^{2*},
李世杰^{1*}

(1. 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001; 2. 河北天和肉牛种业有限公司, 石家庄 050200)

摘 要: 旨在研究牛 *DLK1-DIO3* 区域的印记状态和DNA差异甲基化区(differentially methylated regions, DMRs)。对3个牛的胎盘、及其亲本进行全基因组测序(whole genome sequencing, WGS), 挖掘单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism, SNP)信息; 联合转录组测序(RNA-sequencing, RNA-seq)数据, 确定基因的印记状态; 联合全基因组亚硫酸盐测序(whole genome bisulfite sequencing, WGBS)数据, 确定DNA的差异甲基化区。WGS与RNA-seq测序结果联合分析表明, 牛 *MEG3*、*MEG8* 和 *MEG9* 基因为母源等位基因表达的印记基因, *DLK1*、*RTL1* 和 *DIO3* 基因为父源等位基因表达的印记基因。WGBS数据分析发现, 除与人和小鼠保守的 *Dlk1*-DMR、*IG*-DMR、*Gtl2*-DMR 和 *Meg8*-DMR 外, 还发现5个新的DMRs, 分别为位于 *DLK1* 基因上游的 *DLK1*-DMR0 和 *DLK1*-DMR1、*MEG9* 启动子区域的 *MEG9*-DMR 及 *DIO3* 上游的 *DIO3*-DMR1 和 *DIO3*-DMR2。上述结果表明, *DLK1-DIO3* 印记区域的印记状态和差异甲基化区在牛、人和小鼠中高度保守, 此外, 新发现了5个DMRs, 其对 *DLK1-DIO3* 区域的调控机制有待于进一步研究。

关键词: *DLK1-DIO3* 印记区域; 转录组; 甲基化组; 牛; 胎盘

中图分类号: S823.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-0789-12

Analysis of Imprinting and DNA Methylation Status of *DLK1-DIO3* Domain in Bovine Placenta

ZHENG Yunchang¹, HOU Ruilin¹, LIANG Xiaohe¹, WEI Zilu¹, YANG Lidan¹, HUO Haonan¹,
SU Shuoqing², ZHANG Cui¹, LI Shujing^{2*}, LI Shijie^{1*}

(1. College of Life Science, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China;

2. Hebei Tianhe Beef Cattle Seed Industry Co., Ltd., Shijiazhuang 050200, China)

Abstract: The objective of this study was to investigate the imprinting status and to search for potential DNA differentially methylated regions (DMRs) of the *DLK1-DIO3* domain in bovine placentas. In this study, whole genome sequencing (WGS) was performed on 3 bovine placentas and their parents to mining the informative single nucleotide polymorphisms (SNPs). The imprinting status of genes in the *DLK1-DIO3* domain were determined by the combined analysis of WGS and transcriptome sequencing (RNA-seq) results. The DMRs were identified by combination of WGS

收稿日期: 2025-06-16

基金项目: 河北省自然科学基金(C2023204145); 河北省现代农业产业技术体系建设专项(HBCT2024240206; HBCT2024240101); 中央引导地方科技发展资金项目(246Z2914G)

作者简介: 郑云畅, 硕士, 主要从事动物分子遗传与表观遗传学研究, E-mail: zyc15831601852@163.com; 侯睿霖, 硕士, 主要从事动物分子遗传与表观遗传学研究, E-mail: 13780586712@163.com; 郑云畅和侯睿霖为同等贡献作者

* 通信作者: 李树静, 主要从事胚胎生物技术研发和推广, E-mail: embryochina@163.com; 李世杰, 主要从事动物分子遗传与表观遗传学研究, E-mail: lishijie20005@163.com

and whole genome bisulfite sequencing (WGBS) data. WGS and RNA-seq results showed that *MEG3*, *MEG8* and *MEG9* genes were maternally expressed imprinted genes and *DLK1*, *RTL1* and *DIO3* genes were paternally expressed imprinted genes. The WGBS data analysis showed that 4 DMRs, *Dlk1*-DMR, IG-DMR, *Gtl2*-DMR and *Meg8*-DMR were conserved in human and mouse, and 5 new DMRs were identified, *DLK1*-DMR0 and *DLK1*-DMR1 located upstream of the *DLK1* gene, *MEG9*-DMR in *MEG9* promoter region, and *DIO3*-DMR1 and *DIO3*-DMR2 located upstream of *DIO3* genes, respectively. The results indicate that the imprinted status and differentially methylated regions of bovine *DLK1-DIO3* imprinted region are highly conserved to human and mouse. In addition, 5 potential DMRs were identified in bovine *DLK1-DIO3* region, and their regulating mechanism on the *DLK1-DIO3* imprinted region needs to be further investigated.

Keywords: *DLK1-DIO3* imprinted domain; transcriptome; methylome; bovine; placenta

* **Corresponding authors:** LI Shijie, E-mail: lishijie20005@163.com; LI Shujing, E-mail: embryochina@163.com

基因组印记(genomic imprinting)是发生在哺乳动物中的一种表观遗传学机制,是指在子代中仅表达来源于亲本一方的等位基因,而另一方不表达或很少表达的现象^[1]。这种亲本特异性单等位表达的基因被称为印记基因,是哺乳动物表观遗传学研究的核心内容之一。大多数印记基因成簇存在,受印记控制中心(imprinting control center, ICR)调控, ICR通常含有DNA修饰在亲本等位基因之间存在显著差异的区域,称为DNA差异甲基化区(DNA differentially methylated regions, DMRs)^[2]。哺乳动物在配子生成和早期胚胎发育阶段经历2次基因组范围的去甲基化和从头甲基化过程^[3],其中在配子形成期获得的差异甲基化区被称为种系DMR(germline DMR, gDMR), gDMR在维持基因组印记中起重要作用,而在受精后形成的体细胞DMR(somatic DMR, sDMR)通常受gDMR的调控^[4-5]。此外,组蛋白修饰和长非编码RNA等也参与调控基因组印记^[6-7]。基因组印记在物种间高度保守,目前发现约70个印记基因在人(*Homo sapiens*)和小鼠(*Mus musculus*)间保守^[8-10]。

*Dlk1-Dio3*区域是哺乳动物基因组中最大的印记簇之一,长约1.2 Mb,物种间高度保守^[11]。在小鼠中,*Dlk1-Dio3*区域在胚胎和胎盘发育、出生后生存及细胞分化过程中发挥重要作用^[12]。该域存在3个编码蛋白的父源等位基因(*Dlk1*、*Rtl1/Peg11*和*Dio3*),3个父源等位基因甲基化DMRs(*Dlk1*-DMR、IG-DMR和*Gtl2*-DMR),其中,位于*Dlk1*和*Gtl2*基因间的IG-DMR(intergenic DMR)是*Dlk1*-

*Dio3*印记区域的ICR^[11];此外,还含有多个母源单等位表达的长非编码RNA(包括*Meg3/Gtl2*、*Meg8/Rian*、*Meg9/Mirg*、*anti-Rtl1/Peg11as*)及多个microRNA和snoRNA^[11],在*Meg8*基因的内元2上存在一个母源等位基因甲基化的*Meg8*-DMR^[13]。

目前,新一代测序技术飞速发展,全基因组测序(whole-genome sequencing, WGS)、转录组测序(RNA-sequencing, RNA-seq)及全基因组重亚硫酸盐测序(whole genome bisulfite sequencing, WGBS)广泛应用于印记基因研究。WGS与RNA-seq联合分析可高效精准筛选印记基因,确定基因表达状态^[14]。WGS与WGBS联合分析可确定亲本甲基化状态及潜在的差异甲基化区^[15]。牛(*Bos taurus*)胚胎发育过程与人类高度相似^[16],是研究人类胚胎发育的理想模式生物。胎盘是胚胎发育的第一个器官,负责母体与胎儿间的营养物质交换^[17],也是印记基因发生数量最多的器官之一^[18]。胎盘发育异常会导致胎儿发育异常、妊娠疾病,甚至妊娠失败^[19]。牛胎盘*DLK1-DIO3*区域印记状态及DNA甲基化调控机制的研究具有重要意义。前期研究了牛*DLK1-DIO3*区域的*GTL2*、*DIO3*、*MEG3*、*MEG8*、*MEG9*、*PEG11*和多个长非编码RNA基因^[20-22]的等位基因表达状态,但牛胎盘*DLK1-DIO3*区域的印记和甲基化状态未被揭示,本研究通过WGS、RNA-seq与WGBS联合分析牛胎盘中*DLK1-DIO3*区域的印记状态和DMRs,丰富牛基因组印记的研究,并为牛作为模式生物研究人类胚胎和胎盘发育提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

3个足月且自然娩出的胎盘(胎盘1、2、3)、对应母牛外周血液(血液1、2、3)及用于人工授精的公牛精液(精子1、2、3)采集于保定市某养殖场。样品采集后运回实验室-80℃冰箱保存备用。本研究中涉及的动物试验符合河北农业大学农业研究动物保护委员会的相关法规(编号14021)。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA的提取及全基因组测序 使用DNA提取试剂盒(翌圣生物,上海)提取牛胎盘、精子和血液的DNA,1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测样品完整性,超微量分光光度计检测样品浓度和质量。

Covaris 破碎仪(Covaris,美国)将DNA切割为长度约350 bp的片段,将DNA片段末端修复为平末端,最后通过T4 DNA连接酶将Illumina测序接头连接至DNA文库的两端。Agencourt SPRIselect 核酸片段筛选试剂盒(Beckman Coulter,美国)筛选原始DNA文库,通过PCR富集DNA文库,qPCR和Agilent 5400系统(Agilent,美国)检测DNA文库质量。在Illumina平台(美国)PE 150(Pair end 150 bp)测序PCR产物,BWA软件(参数:mem-t 4-k 32-M)^[23]对比牛参考基因组,SAMTOOLS软件去除重复数据,检测单个SNP^[24]。统计的SNP读数数量在3~1 000个,且质量值(Mapping Quality, MQ)不低于20。

1.2.2 RNA的提取及转录组测序 使用RNA提取试剂盒(翌圣生物,上海)提取牛胎盘总RNA,琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计检测样品的质量和浓度。Oligo dT 磁珠富集mRNA,随机六聚体引物合成cDNA链,建立cDNA文库。cDNA文库稀释至1.5 ng·μL⁻¹,Agilent 2100 bioanalyzer和qRT-PCR筛选长度合格的片段进行测序。fastp软件(fastp 0.23.1)筛选raw reads,HISAT2(版本v2.0.5)软件对比牛参考基因组。每个胎盘进行3次平行的RNA-seq。

1.2.3 牛胎盘中 *DLK1-DIO3* 区域印记状态分析 用WGS和RNA-seq结果联合分析*DLK1-DIO3*区域内基因的印记状态。通过胎盘、精子和卵母细胞WGS结果中SNP区分等位基因,通过RNA-seq结果中SNP位点处reads确定基因印记状态,RNA-seq结果中SNP位点处reads应大于20个。

将基因的父本reads和母本reads分别合并统计,通过二项式检验和BH校正($P < 0.05$)分析等位基因表达差异。父源表达的基因为平均母源表达的reads数量低于总reads数量的35%,与之相反为母源表达的基因。最后通过IGV软件查看所有测序结果,并进行分析。

1.2.4 牛胎盘全基因组亚硫酸盐测序及DMR的确定 Covaris 超声破碎仪将基因组DNA打断为长度约300 bp的片段,DNA重亚硫酸盐转化试剂盒(天根,北京)处理DNA。Agilent 5400系统评估文库质量,qPCR进行文库定量,对浓度大于1.5 nmol·L⁻¹的文库在Illumina测序平台上双端测序。FastQC(fastqc_v 0.11.8)和fastp软件评估、检测和过滤raw reads,Bismark软件(0.24.0版)^[25]将reads对比到参考基因组(-X 700-dovetail),经FDR校正($P < 0.05$)。DSS软件(2.12.0版)^[26]分析DMR,DMR标准是:300 bp片段中CpGs大于10个,且组间甲基化差异大于0.5。对牛胎盘进行3次平行WGBS试验。

本试验中的组学测序均由诺禾致源(北京)完成。

2 结果

2.1 *DLK1-DIO3* 区域基因的印记状态

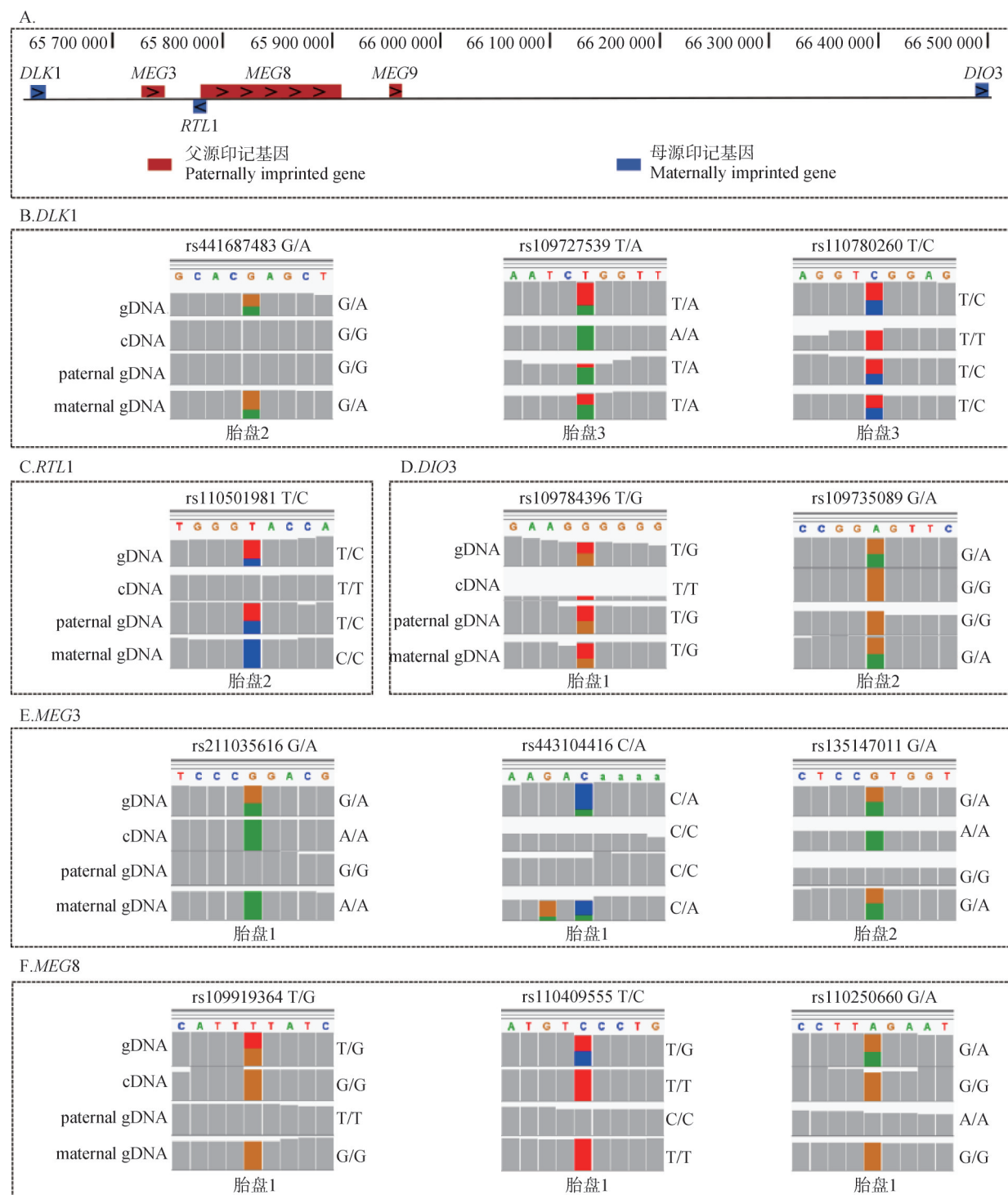
通过WGS和RNA-seq联合分析了*DLK1-DIO3*区域内6个基因(*DLK1*、*RTL1*、*DIO3*、*MEG3*、*MEG8*和*MEG9*)在牛胎盘中的印记状态(图1A)。在牛胎盘WGS测序结果中,*DLK1*、*RTL1*和*DIO3*基因编码序列上分别有3、1和2个SNPs位点,在RNA-seq数据中,3个基因均呈现单等位基因表达,亲本基因型确定*DLK1*、*RTL1*和*DIO3*基因为父源等位基因表达(图1B、C、D)。

*MEG3*基因中有7个SNPs位点,其中3个SNPs位点(rs211035616、rs443104416和rs135147011)根据亲本的基因型确定*MEG3*为母源等位基因表达(图1E)。*MEG8*基因存在55个SNPs位点,胎盘1、2和3中分别具有33、16、和6个,根据SNP的亲本基因型,确定*MEG8*基因为母源等位基因表达,图1F中仅列出3个SNPs的测序结果。*MEG9*基因仅在胎盘1中有1个SNP位点(rs454917639,A/G),其父母亲本基因型分别为G/A和A/A,确定*MEG9*基因为母源等位基因表达(图1G)。6个基因上SNPs位点的序列号、亲本基因型及等位基因表达状态见表1,*MEG8*基因的55个SNPs位点仅列出8个。

2.2 牛胎盘中 IG-DMR 和 MEG3-DMR 的确定

在 UCSC(<https://genome.ucsc.edu>) 数据库中, 牛 *DLK1* 与 *MEG3* 基因间存在 8 个 CpG 岛(图 2A), 分析其 WGBS 数据, 发现 1 个长度为 5 860 bp 的 DMR 位于 *DLK1* 和 *MEG3* 基因之间, 覆盖 CpG: 23

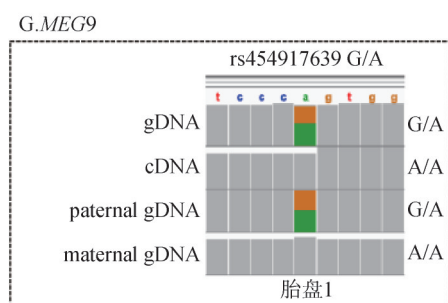
(chr21: 65 709 569-65 709 831) 和 CpG: 16(chr21: 65 713 651-65 713 868), 包含 215 个 CG 位点(图 2B)。在人、小鼠、猪和羊中, IG-DMR 均具有典型重复序列。分析该 DMR 序列, 发现包括 20 个核心序列为 GCCAGTTGCCCGCGGTCC 的重复序列(图 2C),



(图 1 Fig.1)

(转下页 Carried forward)

(续图1 Continued)



A. *DLK1-DIO3* 印记区域内的印记基因, 箭头表示基因转录方向, 红色方框表示父源印记基因, 蓝色方框表示母源印记基因; B-D. *DLK1*、*RTL1* 和 *DIO3* 为父源等位基因表达; E-G. *MEG3*、*MEG8* 和 *MEG9* 为母源等位基因表达, *MEG3* 和 *MEG8* 基因仅展示部分 SNP 位点处的印记状态

A. Imprinted genes within the *DLK1-DIO3* imprinted region, arrows represent direction of transcription, red boxes represent paternally imprinted genes, blue boxes represent maternally imprinted genes; B-D. *DLK1*, *RTL1* and *DIO3* genes exhibit paternal allele expression; E-G. *MEG3*, *MEG8* and *MEG9* genes exhibit maternal allele expression, demonstration of imprinting status at only some of the SNP loci regarding the *MEG3* and *MEG8* genes

图1 *DLK1-DIO3* 区域的位置和印记状态Fig. 1 Location and imprinting status of *DLK1-DIO3* domain表1 胎盘中 *DLK1-DIO3* 区域内基因的印记状态Table1 Imprinting status of genes within the *DLK1-DIO3* region in the placenta

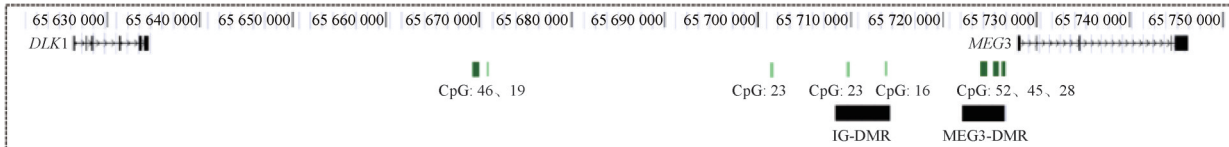
基因 Gene	SNP	cDNA	父本基因型 Paternal genotype	母本基因型 Maternal genotype	等位基因表达状态 Allelic expression status	胎盘 Placenta
<i>DLK1</i>	rs441687483(G/A)	G	G/G	G/A	父源等位基因表达	胎盘2
	rs109727539(T/A)	A	T/A	T/A	单等位基因表达	胎盘3
	rs110780260(T/C)	T	T/C	T/C	单等位基因表达	胎盘3
<i>MEG3</i>	rs211035616(G/A)	A	G/G	A/A	母源等位基因表达	胎盘1
	rs443104416(C/A)	C	C/C	C/A	母源等位基因表达	胎盘1
	rs135147011(G/A)	A	G/G	G/A	母源等位基因表达	胎盘2
	rs209955636(T/C)	T	T/C	T/C	单等位基因表达	胎盘3
	rs41585323(T/C)	T	T/C	T/C	单等位基因表达	胎盘3
	rs41986828(T/C)	C	T/C	T/C	单等位基因表达	胎盘3
	rs110532849(T/G)	T	T/G	T/G	单等位基因表达	胎盘3
	rs110501981(T/C)	T	T/C	C/C	单等位基因表达	胎盘2
<i>RTL1</i>	rs135792171(T/C)	C	T/C	C/C	母源等位基因表达	胎盘1
	rs110809274(C/A)	C	A/A	C/C	母源等位基因表达	胎盘1
	rs109919364(T/G)	G	T/T	G/G	母源等位基因表达	胎盘1
	rs110409555(T/C)	T	C/C	T/T	母源等位基因表达	胎盘1
	rs110250660(A/G)	G	A/A	G/G	母源等位基因表达	胎盘1
	rs109610722(T/C)	C	T/T	C/C	母源等位基因表达	胎盘1
	rs110138805(G/A)	A	G/G	A/A	母源等位基因表达	胎盘1
	rs109253505(T/C)	T	C/C	T/T	母源等位基因表达	胎盘1
<i>MEG9</i>	rs454917639(A/G)	A	G/A	A/A	母源等位基因表达	胎盘1
<i>DIO3</i>	rs109784396(T/G)	T	T/G	T/G	单等位基因表达	胎盘1
	rs109735089(G/A)	G	G/G	G/A	父源等位基因表达	胎盘2

其与羊和猪的核心序列相似性最高(63.64%),与人和鼠的相似性分别为54.55%和50.00%(图2D),提示该差异甲基化区为牛的IG-DMR。

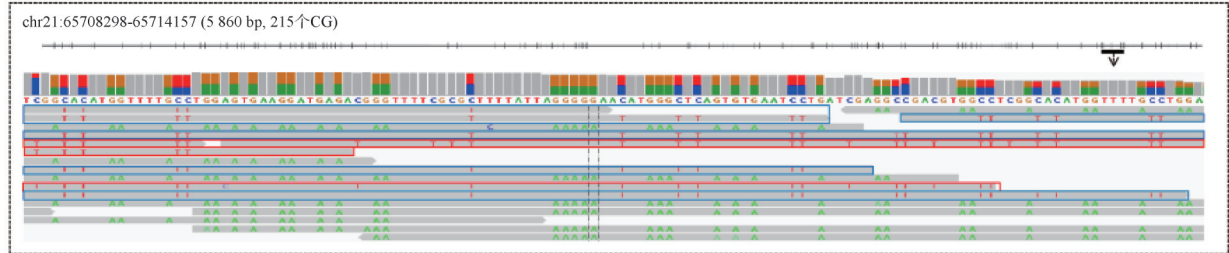
在人和小鼠中,MEG3-DMR位于MEG3基因上游的启动子区,在WGBS数据中,MEG3基因上

游1234 bp处,有一个长度为4591 bp(chr21: 65 721 981-65 726 571),包含253个CG位点的DMR(图2E),其包含了CpG: 52(chr21: 65 723 879-65 724 532)、CpG: 45(chr21: 65 725 257-65 725 843)和CpG: 28(chr21: 65 726 242-65 726 578)(图2A),

A. IG-DMR和MEG3-DMR0的相对位置



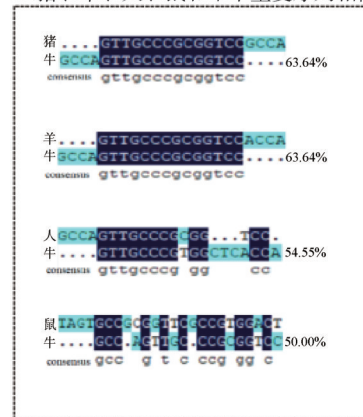
B. IG-DMR



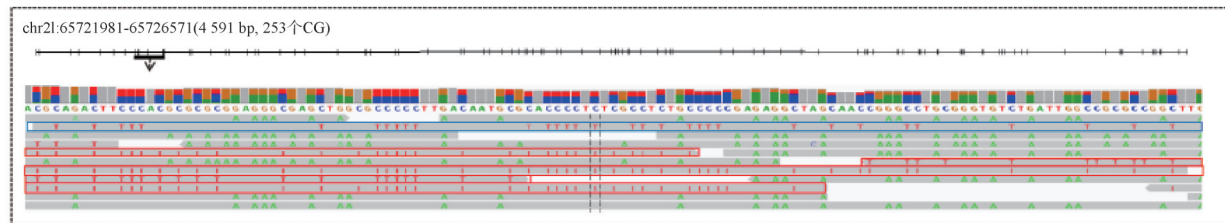
C. 牛IG-DMR内重复序列



D. 猪、羊、人、鼠和牛中重复序列相似比



E. MEG3-DMR



A. 牛胎盘中IG-DMR、MEG3-DMR及相关CpG岛的位置,绿色方框表示CpG岛,黑色方框表示潜在的差异甲基化区;B. IG-DMR代表性甲基化图谱;C. 牛中IG-DMR内重复序列;D. 猪、羊、人、鼠和牛中IG-DMR内重复序列相似比;E. MEG3-DMR代表性甲基化图谱,蓝色框为高甲基化链,红色框为低甲基化链

A. The location of IG-DMR, MEG3-DMR and associated CpG islands in bovine placenta, green boxes indicate the location of CpG islands and black boxes indicate potential differentially methylated regions; B. Representative methylation profiles of IG-DMR; C. Repeat sequences of IG-DMR in cattle; D. Similarity of repetitive sequences within the IG-DMR in pig, sheep, human, mouse and cattle; E. Representative methylation profiles of MEG3-DMR, blue and red boxes are hypermethylated and hypomethylated strands

图2 牛胎盘中的IG-DMR和MEG3-DMR

Fig. 2 IG-DMR and MEG3-DMR in bovine placenta

提示该差异甲基化区为牛的 *MEG3*-DMR。IG-DMR 与 *MEG3*-DMR 存在甲基化率为 100% 的高甲基化链以及甲基化率为 0% 的低甲基化链,两条

链的甲基化水平差异率为 100% (表 2)。另外的 3 个 CpG 岛 (CpG: 46、CpG: 19 和 CpG: 23) 在牛胎盘中均为高甲基化状态 (表 3)。

表 2 胎盘中 *DLK1-DIO3* 印记区域内的 DMRs

Table 2 DMRs within the *DLK1-DIO3* imprinted domain in bovine placenta

DMRs 名称 Name of DMRs	染色体上位置 The position on chromosome	基因上位置 The position on genes	高甲基化链 甲基化率/% Methylation rate of hypermethylated chains	低甲基化链 甲基化率/% Methylation rate of hypomethylated chains	甲基化 差异率/% Methylation difference rate
IG-DMR	chr21:65 708 298-65 714 157	<i>DLK1</i> 基因与 <i>MEG3</i> 基因间	100	0	100
<i>MEG3</i> -DMR	chr21:65 721 981-65 726 571	<i>MEG3</i> 基因启动子区	100	0	100
<i>DLK1</i> -DMR	chr21:65 633 118-65 634 647	<i>DLK1</i> 基因 3' 末端	100	0	100
<i>DLK1</i> -DMR0	chr21:65 609 912-65 610 655	<i>DLK1</i> 基因启动子区	100	0	100
<i>DLK1</i> -DMR1	chr21:65 621 774-65 622 939	<i>DLK1</i> 基因启动子区	100	0	100
<i>MEG8</i> -DMR	chr21:65 799 513-65 800 104	<i>MEG8</i> 基因内源 6	93.3	0	93.3
<i>MEG9</i> -DMR	chr21:65 955 048-65 955 286	<i>MEG9</i> 基因启动子区	100	8.3	91.7
<i>DIO3</i> -DMR1	chr21:66 464 165-66 464 578	<i>MEG9</i> 基因与 <i>DIO3</i> 基因间	100	0	100
<i>DIO3</i> -DMR2	chr21:66 485 972-66 486 308	<i>MEG9</i> 基因与 <i>DIO3</i> 基因间	81.8	0	81.8

2.3 *DLK1* 基因位置相关的 DMRs

在 UCSC 数据库中, *DLK1* 基因内部及上下游存在 5 个 CpG 岛, 其中 CpG: 19 (chr21: 65 608 823-65 609 056) 和 CpG: 47 (chr21: 65 609 728-65 610 458) 位于 *DLK1* 基因上游的 17 306 bp 和 15 904 bp 处; CpG: 110 (chr21: 65 625 869-65 627 121) 和 CpG: 51 (chr21: 65 633 383-65 633 937) 位于 *DLK1* 基因 5' 端和 3' 末端; CpG: 16 (chr21: 65 634 588-65 634 803) 位于 *DLK1* 基因下游 117 bp 处。此外, MethPrimer 软件预测到 1 个长度为 108 bp, 包括 6 个 CpGs 的 CpG 岛 (CpG: 6), 位于 *DLK1* 基因启动子区 chr21: 65 621 980-65 622 087 处 (图 3A)。

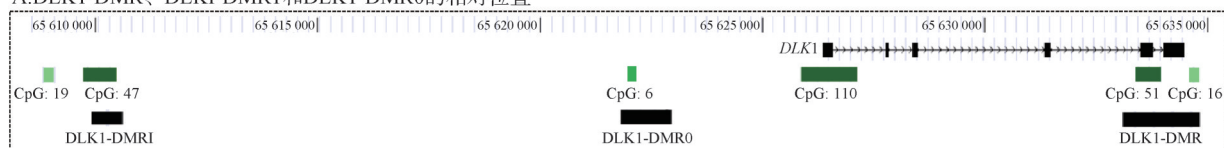
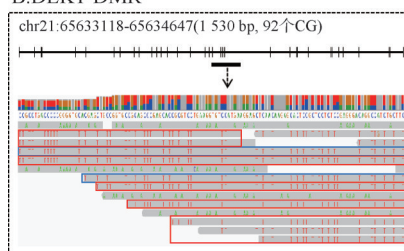
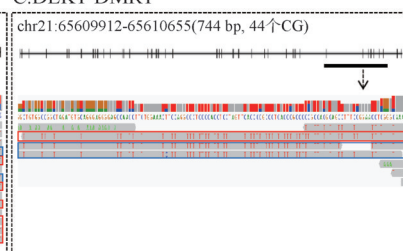
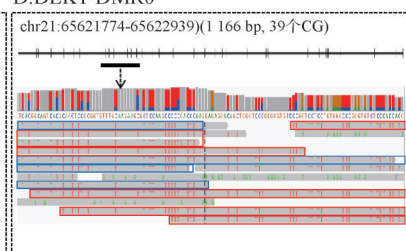
WGBS 数据发现, 位于 *DLK1* 基因 3' 末端的 CpG: 51 和基因下游的 CpG: 16 亲本间存在差异甲基化链, 且差异甲基化率高于 50% (图 3B), 其位置与人和小鼠的 *DLK1*-DMR 一致, 提示该 DMR 为牛的 *DLK1*-DMR, 长度为 1 530 bp, 包括 92 个 CpG 位点。

CpG: 47 和 CpG: 6 存在甲基化水平有显著差异的两条链, 命名为 *DLK1*-DMR1 和 *DLK1*-DMR0, 其中 *DLK1*-DMR1 长度为 744 bp, 包含 44 个 CG, *DLK1*-DMR0 长度为 1 166 bp, 包含 39 个 CG, 分别位于 *DLK1* 基因上游 15 707 bp (图 3C)

和 3 423 bp 处 (图 3D)。*DLK1*-DMR、*DLK1*-DMR1 和 *DLK1*-DMR0 等位基因间的差异甲基化率列于表 2。CpG: 19 和 CpG: 110 分别呈现高和低甲基化状态 (表 3)。

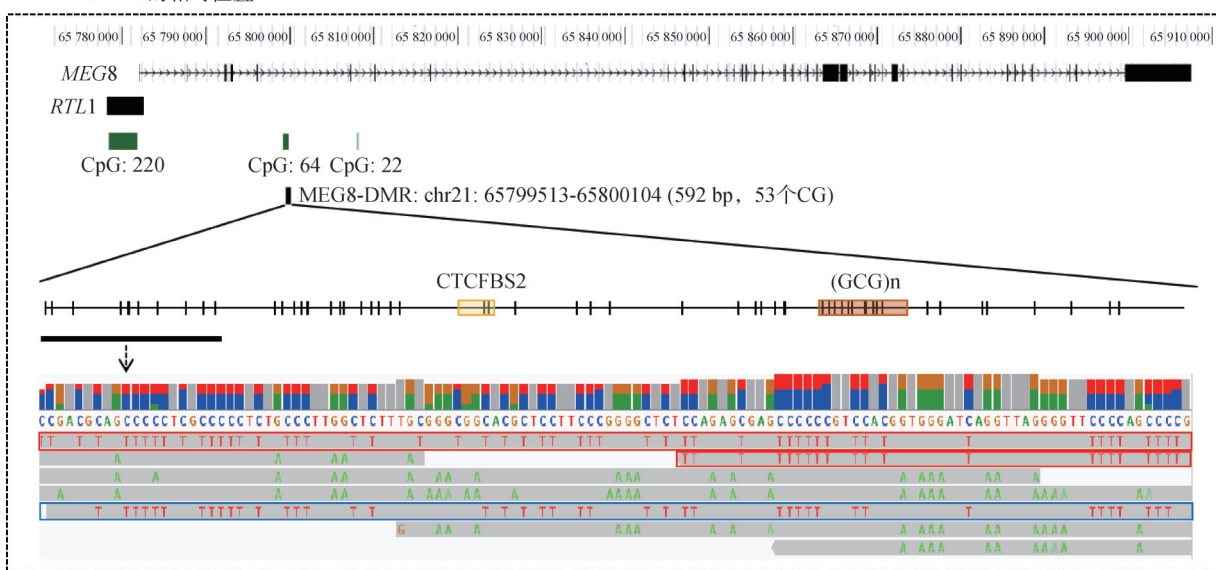
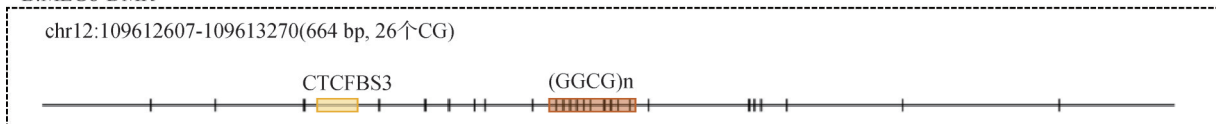
2.4 *MEG8* 基因内部的 *MEG8*-DMR

MEG8 基因内部和上游存在 3 个 CpG 岛, 分别是位于 *MEG8* 基因启动子区的 CpG: 220 (chr21: 65 778 434-65 781 946)、内含子 6 中的 CpG: 64 (chr21: 65 799 107-65 799 898) 和内含子 7 中的 CpG: 22 (chr21: 65 807 941-65 808 170) (图 4A)。WGBS 数据显示, CpG: 220 和 CpG: 22 均为高甲基化状态 (表 3), CpG: 64 内部及其下游 chr21: 65 799 513-65 800 104 位置存在差异甲基化链, 其中高甲基化链的甲基化率为 93.3%, 低甲基化链的甲基化率为 0% (表 2), 推断该区域为 *MEG8*-DMR, 全长 592 bp, 包含 53 个 CG。在鼠中, *Meg8*-DMR 全长 664 bp, 包含 26 个 CG, 存在 1 个 CTCF 结合位点 (CTCF-BSs) CTCFBS3 (GTGCCACAAGGGGGCTGCCT) 及 (GGCG)_n 重复序列 (图 4B), 牛的 *MEG8*-DMR 亦存在 1 个 CTCFBS2 (AGCCAGGGGAGGGCGCGGG) 和 (GCG)_n 的重复序列 (图 4A), 与小鼠的 *MEG8*-DMR 具有保守的特征。

A. *DLK1*-DMR、*DLK1*-DMR1和*DLK1*-DMR0的相对位置B. *DLK1*-DMRC. *DLK1*-DMR1D. *DLK1*-DMR0

A. 牛胎盘中 *DLK1* 基因 DMRs 及相关 CpG 岛的位置; B. *DLK1*-DMR 代表性甲基化图谱; C. *DLK1*-DMR1 代表性甲基化图谱; D. *DLK1*-DMR0 代表性甲基化图谱

A. The location of DMRs and associated CpG islands of the *DLK1* gene in bovine placenta; B. Representative methylation profiles of *DLK1*-DMR; C. Representative methylation profiles of *DLK1*-DMR1; D. Representative methylation profiles of *DLK1*-DMR0

图3 *DLK1*-DMR、*DLK1*-DMR0 和 *DLK1*-DMR1 的位置和甲基化状态Fig. 3 Location and methylation status of *DLK1*-DMR, *DLK1*-DMR0 and *DLK1*-DMR1A. *MEG8*-DMR 的相对位置B. *MEG8*-DMR

A. 牛胎盘中 *MEG8*-DMR 及相关 CpG 岛的位置; B. 小鼠中的 *MEG8*-DMR, 黄色框为 CTCFBS, 棕色框为重复序列

A. The location of *MEG8*-DMR and associated CpG islands in bovine placenta; B. *MEG8*-DMR in the mouse, the yellow boxes are CTCFBS, the brown boxes are repetitive sequences

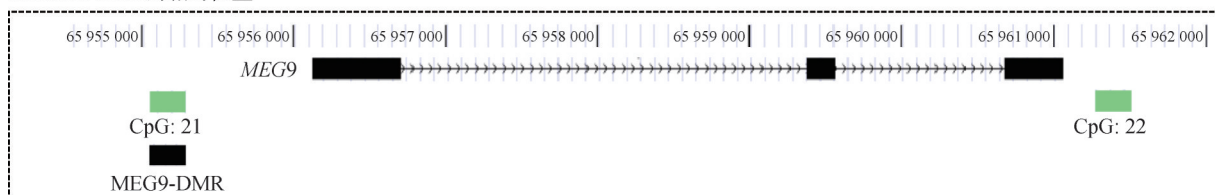
图4 牛胎盘中 *MEG8*-DMR 的位置、甲基化状态和小鼠中的 *MEG8*-DMRFig. 4 Location and methylation status of *MEG8*-DMR in bovine placenta and *MEG8*-DMR in the mouse

2.5 *MEG9* 基因上游的 *MEG9*-DMR

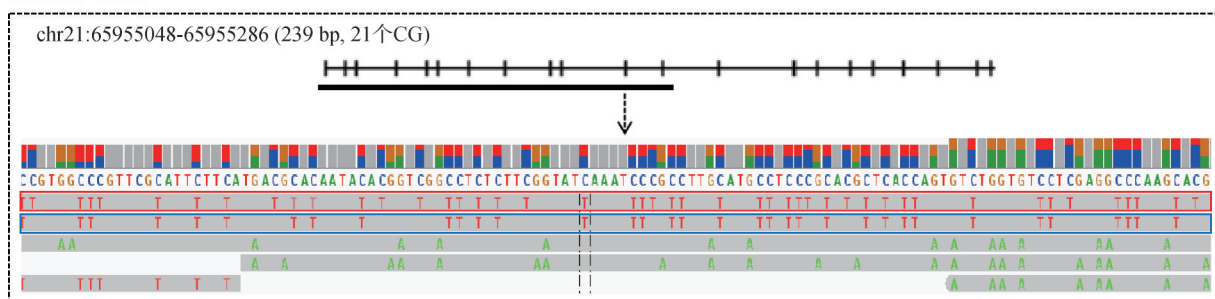
CpG: 21 (chr21: 65 955 048-65 955 286) 和 CpG: 22(chr21:65 961 272-65 961 510)位于 *MEG9* 基因上游及下游(图 5A)。CpG: 21 等位基因间存

在差异甲基化链,甲基化率差异为 91.7%(表 2),命名为 *MEG9*-DMR,其长度为 239 bp,包含 21 个 CG(图 5B)。CpG: 22 为低甲基化状态(表 3)。

A. *MEG9*-DMR 的相对位置



B. *MEG9*-DMR



A. 牛胎盘中 *MEG9*-DMR 及相关 CpG 岛的位置; B. *MEG9*-DMR 代表性甲基化图谱

A. The location of *MEG9*-DMR and associated CpG islands in bovine placenta; B. Representative methylation profiles of *MEG9*-DMR

图 5 牛胎盘中 *MEG9*-DMR 的位置和甲基化状态

Fig. 5 Location and methylation status of *MEG9*-DMR in bovine placenta

2.6 *DIO3* 基因上游的 DMRs

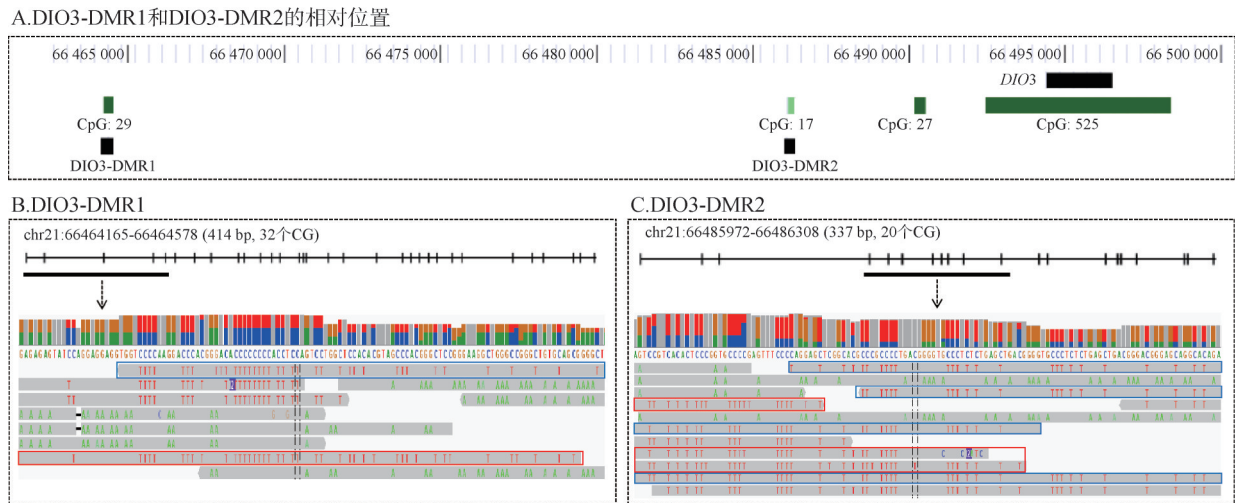
DIO3 基因内部及上游有 4 个 CpG 岛,位于基因上游的 CpG: 29(chr21: 66 464 257-66 464 578)和 CpG: 17 (chr21: 66 486 106-66 486 308) 存在 DMRs, 命名为 *DIO3*-DMR1 和 *DIO3*-DMR2(图 6A)。*DIO3*-DMR1 位于 *DIO3* 基因上游 29 819 bp 处,长度为 414 bp,包含 32 个 CG(图 6B)。*DIO3*-DMR2 位于 *DIO3* 基因上游 8 089 bp 处,长度为 337 bp,包含 20 个 CG(图 6C)。此外,*DIO3* 上游的 CpG: 27 和 *DIO3* 基因内部的 CpG: 525 为低甲基化状态(表 3)。

3 讨 论

印记基因在胎盘发育、胚胎生长以及多种疾病发生中发挥关键作用,母源印记基因表达异常会导致胎儿发育异常,妊娠女性发生高血压、蛋白尿、子痫等妊娠疾病^[27];父源印记基因表达异常会导致癌症和肿瘤等疾病的发生^[28]。比较不同物种间的基因组印记有助于理解基因组印记的进化理论和生

物学意义。*Dlk1-Dio3* 区域是哺乳动物中最大的印记区域之一,位于人 14 号染色体、鼠 12 号染色体,*Dlk1-Dio3* 印记区域不仅在胚胎和胎盘发育中起重要作用,还与诱导多能干细胞及克隆胚胎的发育密切相关^[12]。在人和小鼠中该区域内 *Dlk1*、*Rtl1* 和 *Dio3* 为母源印记基因,*Meg3*、*Meg8* 和 *Meg9* 等为父源印记基因^[11]。本研究通过 WGS 和 RNA-seq 联合分析,确定了 *DLK1*、*RTL1* 和 *DIO3* 基因在牛中为父源等位基因表达,而 *MEG3*、*MEG8* 和 *MEG9* 基因为母源等位基因表达,与人和鼠中的印记状态一致,说明 *DLK1-DIO3* 印记区域在进化过程中高度保守。

SNP 是基因组中最常见的遗传变异类型,基于 SNP 的 RT-PCR 直接测序法鉴定印记基因技术简单便捷,但效率较低,无法满足从基因组范围寻找更多的印记基因。全基因组测序可获得大量的 SNP 信息^[29]。本研究通过对胎盘进行全基因组测序,在 *DLK1-DIO3* 区域的 *DLK1*、*RTL1*、*DIO3*、*MEG3*、*MEG8* 和 *MEG9* 基因中发现了有效的 SNP



A. 牛胎盘中 *DIO3* 基因处 DMRs 及相关 CpG 岛的位置; B、C. *DIO3*-DMR1 和 *DIO3*-DMR2 代表性甲基化图谱
A. The location of DMRs and associated CpG islands at the *DIO3* gene in bovine placenta; B, C. Representative methylation profiles of *DIO3*-DMR1 and *DIO3*-DMR2

图 6 牛胎盘中 *DIO3*-DMR1 和 *DIO3*-DMR2 的位置和甲基化状态
Fig. 6 Location and methylation status of *DIO3*-DMR1 and *DIO3*-DMR2 in bovine placenta

表 3 *DLK1-DIO3* 印记区域内无差异甲基化区的 CpG 岛甲基化状态
Table3 The methylation status of CpG islands without DMRs in the *DLK1-DIO3* imprinted region

染色体上位置 The position on chromosome	CpG 岛 CpG islands	基因上位置 The position on genes	甲基化状态 Methylation status
chr21: 65 608 823-65 609 056	CpG: 19	<i>DLK1</i> 基因上游	高
chr21: 65 625 869-65 627 121	CpG: 110	<i>DLK1</i> 基因 5'端	低
chr21: 65 669 308-65 669 954	CpG: 46	<i>DLK1</i> 和 <i>MEG3</i> 基因间	高
chr21: 65 670 829-65 671 044	CpG: 19	<i>DLK1</i> 和 <i>MEG3</i> 基因间	高
chr21: 65 701 370-65 701 641	CpG: 23	<i>DLK1</i> 和 <i>MEG3</i> 基因间	高
chr21: 65 778 434-65 781 946	CpG: 220	<i>RTL1</i> 和 <i>MEG8</i> 基因上	高
chr21: 65 807 941-65 808 170	CpG: 22	<i>MEG8</i> 基因间上	高
chr21: 65 961 272-65 961 510	CpG: 22	<i>MEG9</i> 基因下游	低
chr21: 66 490 150-66 490 492	CpG: 27	<i>DIO3</i> 基因上游	低
chr21: 6 692 442-66 498 353	CpG: 525	<i>DIO3</i> 基因上	低

位点,为鉴定基因的印记状态奠定了基础。

在人和小鼠中,存在 3 个父源等位基因甲基化的 DMRs, *Dlk1*-DMR、*IG*-DMR 和 *Gtl2*-DMR^[11]。本研究通过牛胎盘 WGBS 数据分析,确定了牛中 *DLK1*-DMR、*IG*-DMR 和 *GTL2*-DMR 的位置和长度, *DLK1*-DMR、*IG*-DMR 和 *GTL2*-DMR 分别位于 *DLK1* 基因 3' 末端及其下游、*DLK1* 与 *MEG3* 基因间和 *MEG3* 基因启动子区,与人和小鼠中一致。*IG*-DMR 是 *DLK1-DIO3* 印记区域的印记调控区^[30-31],人、小鼠、羊和猪的 *IG*-DMR 内分别存在 9、7、16 个和 13 个重复序列^[21]。本研究中鉴定的牛 *IG*-DMR 区域内存在 20 个重复序列,重复序列与人、小鼠、羊和猪的重复序列相似性大于 50%,说明 *DLK1-DIO3* 区域的印记调控区在物种间高度保守。

在小鼠的 *Dlk1-Dio3* 印记区域, *Meg8*-DMR 为第 1 个鉴定的母源等位基因发生甲基化的 DMR,位于 *MEG8* 基因内含子 2 中^[13,32],包含 CTCF 结合位点及重复序列。*Meg8*-DMR 与 CTCF 结合位点的缺失会增加细胞迁移和侵袭,并抑制细胞的增殖^[33]。*Meg8*-DMR 作为一个远程调控元件,缺失导致 microRNAs 表达上调^[13]。在人大脑中, *Meg8*-

DMR 甲基化水平随年龄增长而升高,且与 Temple 综合征患者智力的发展有关^[13]。本研究确定了牛 *MEG8*-DMR 位于 *MEG8* 基因的内含子 6,存在 CTCF 结合位点及 (GCG)_n 重复序列,其特征与人和小鼠高度保守。

此外,在牛 *DLK1-DIO3* 印记区域还发现了 5 个新的 DMRs, *DLK1*-DMR0、*DLK1*-DMR1、*MEG9*-DMR、*DIO3*-DMR1 和 *DIO3*-DMR2。在小鼠中, *Dlk1* 基因启动子区也存在 1 个差异甲基化区 (*Dlk1*-DMR0),位于 *Dlk1* 基因上游 7.4 kb 处^[34],牛 *DLK1*-DMR0 与小鼠 *Dlk1*-DMR0 物理位置相似,其余 DMRs 在其他物种中尚未见报道。这 5 个 DMRs 如何调控 *DLK1-DIO3* 区域印记基因的表达还需进一步研究。

4 结 论

牛 *MEG3*、*MEG8* 和 *MEG9* 为父源印记基因, *DLK1*、*RTL1* 和 *DIO3* 为母源印记基因;4 个 DMRs (*DLK1*-DMR、*IG*-DMR、*MEG3*-DMR 和 *MEG8*-DMR) 与人和小鼠中高度保守,此外还包括 5 个新发现的 DMRs。

参考文献 (References):

- [1] TUCCI V, ISLES AR, KELSEY G, et al. Genomic imprinting and physiological processes in mammals [J]. *Cell*, 2019, 176(5): 952-965.
- [2] PHAM A, SELENOU C, GIABICANI E, et al. Maintenance of methylation profile in imprinting control regions in human induced pluripotent stem cells [J]. *Clin Epigenet*, 2022, 14(1): 190.
- [3] MONTGOMERY T, UH K, LEE K. TET enzyme driven epigenetic reprogramming in early embryos and its implication on long-term health [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2024, 12: 1358649.
- [4] SANMIGUEL J M, BARTOLOMEI M S. DNA methylation dynamics of genomic imprinting in mouse development [J]. *Biol Reprod*, 2018, 99(1): 252-262.
- [5] AKBARI V, GARANT J M, O'NEILL K, et al. Genome-wide detection of imprinted differentially methylated regions using nanopore sequencing [J]. *Elife*, 2022, 11: e77898.
- [6] INOUE A, JIANG L, LU F L, et al. Maternal H3K27me3 controls DNA methylation-independent imprinting [J]. *Nature*, 2017, 547(7664): 419-424.
- [7] WANG T X, LI J J, YANG L Y, et al. The role of long non-coding RNAs in human imprinting disorders: Prospective therapeutic targets [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 730014.
- [8] LU X K, ZHANG Y, WANG L J, et al. Evolutionary epigenomic analyses in mammalian early embryos reveal species-specific innovations and conserved principles of imprinting [J]. *Sci Adv*, 2021, 7(48): eabi6178.
- [9] RICHARD A J, KOBAYASHI T, INOUE A, et al. Conservation and divergence of canonical and non-canonical imprinting in murids [J]. *Genome Biol*, 2023, 24(1): 48.
- [10] WU J J, ZHENG E Q, LIU L Q, et al. Cell-cell communication-mediated cell-type-specific parent-of-origin effects in mammals [J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 5106.
- [11] WEINBERG-SHUKRON A, YOUNGSON N A, FERGUSON-SMITH A C, et al. Epigenetic control and genomic imprinting dynamics of the *Dlk1-Dio3* domain [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1328806.
- [12] ZHANG X M J, HE H J, YU H R, et al. Maternal RNA transcription in *Dlk1-Dio3* domain is critical for proper development of the mouse placental vasculature [J]. *Commun Biol*, 2024, 7(1): 363.
- [13] ZHANG L, HAN Z B, HE H J, et al. Meg8-DMR as the secondary regulatory region regulates the expression of microRNAs while it does not affect embryonic development in mice [J]. *Genes (Basel)*, 2023, 14(6): 1264.
- [14] WANG R, LI J Y, ZHOU X, et al. Single-cell genomic and transcriptomic landscapes of primary and metastatic colorectal cancer tumors [J]. *Genome Med*, 2022, 14(1): 93.
- [15] XU G, LYU J, LI Q, et al. Evolutionary and functional genomics of DNA methylation in maize domestication and improvement [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5539.
- [16] LIU S L, YU Y, ZHANG S L, et al. Epigenomics and genotype-phenotype association analyses reveal conserved genetic architecture of complex traits in cattle and human [J]. *BMC Biol*, 2020, 18(1): 80.
- [17] COVARRUBIAS A, AGUILERA-OLGUIN M, CARRASCO-WONG I, et al. Feto-placental unit: From development to function [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2023, 1428: 1-29.
- [18] KOBAYASHI E H, SHIBATA S, OIKE A, et al. Genomic imprinting in human placentation [J]. *Reprod*

- Med Biol*, 2022, 21(1): e12490.
- [19] HARAM K, MORTENSEN JH, MYKING O, et al. Early development of the human placenta and pregnancy complications[J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2020, 33(20): 3538-3545.
- [20] YANG W Z, LI D J, WANG G N, et al. Expression and imprinting of *DIO3* and *DIO3OS* genes in Holstein cattle[J]. *J Genet*, 2017, 96(2): 333-339.
- [21] LI J L, YU D W, WANG J, et al. Identification of the porcine IG-DMR and abnormal imprinting of *DLK1-DIO3* in cloned pigs[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 964045.
- [22] 张 萃, 陈玮娜, 李俊良, 等. *LINC24065* 在体细胞核移植牛中的异常表达[J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(1): 44-51.
- ZHANG C, CHEN W N, LI J L, et al. Abnormal expression of *LINC24065* in somatic cell nuclear transfer cattle [J]. *Avta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2019, 50(1): 44-51. (in Chinese)
- [23] LI H, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [24] LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools[J]. *Bioinformatics*. 2009, 25(16): 2078-2079.
- [25] KRUEGER F, ANDREWS S R. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(11): 1571-1572.
- [26] PARK Y, WU H. Differential methylation analysis for BS-seq data under general experimental design [J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(10): 1446-1453.
- [27] DEYSSENROTH M A, LI Q, ESCUDERO C, et al. Differences in placental imprinted gene expression across preeclamptic and non-preeclamptic pregnancies [J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(10): 1146.
- [28] XIE G J, SI Q, ZHANG G J, et al. The role of imprinting genes' loss of imprints in cancers and their clinical implications [J]. *Front Oncol*, 2024, 14: 1365474.
- [29] ZHANG Y Q, HE H, YU Q W, et al. Genetic diversity and reproductive trait selection signal analysis of Bohuai goats based on whole genome sequencing [J]. *BMC Genomics*, 2025, 26(1): 693.
- [30] MATSUZAKI H, SUGIHARA S, TANIMOTO K. The transgenic IG-DMR sequence of the mouse *Dlk1-Dio3* domain acquired imprinted DNA methylation during the post-fertilization period [J]. *Epigenetics Chromatin*, 2023, 16(1): 7.
- [31] KAGAMI M, O'SULLIVAN M J, GREEN A J, et al. The IG-DMR and the MEG3-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers[J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(6): e1000992.
- [32] BEYGO J, KUHLER A, GILLESSEN-KAESBACH G, et al. New insights into the imprinted MEG8-DMR in 14q32 and clinical and molecular description of novel patients with Temple syndrome [J]. *Eur J Hum Genet*, 2017, 25(8): 935-945.
- [33] HAN X, HE H J, SHAO L, et al. Deletion of Meg8-DMR enhances migration and invasion of MLTC-1 depending on the CTCF binding sites [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8828.
- [34] ENTERINA J R, ENFIELD K S S, ANDERSON C, et al. *DLK1-DIO3* imprinted locus deregulation in development, respiratory disease, and cancer [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2017, 11(9): 749-761.

(编辑 郭云雁)