



# 基于母猪 *VBP1*, *CpG\_280* 和 *CpG\_1360* 靶标 DNA 甲基化的妊娠检测技术建立

顾兰英, 李世义, 张秦川, 孙延鸣\*, 张彦兵\*

(石河子大学动物科技学院, 石河子 832003)

**摘要:** 旨在筛选母猪妊娠相关差异甲基化基因, 建立基于甲基化荧光探针早孕检测技术。本研究重点关注基因启动子和 CpG 岛差异甲基化区域, 筛选潜在的猪妊娠靶标。首先利用甲基化特异性 PCR (methylation-specific PCR, MSP) 对基因差异甲基化区域进行初步验证, 进一步设计靶标荧光探针, 建立基于甲基化荧光探针 (quantitative methylation-specific PCR, qMSP) 早孕检测技术方法并进行验证。试验数据显示, 发现相比于空怀母猪, 妊娠 25~30 天母猪血液中 *VBP1* 和 *CpG\_280* 呈现高甲基化状态, 而 *CpG\_1360* 表现为低甲基化, 表明这些位点可能参与妊娠调控。以猪  $\beta$ -actin 为内参探针, 设计 *VBP1*, *CpG\_280* 和 *CpG\_1360* 甲基化探针, 建立 qMSP 检测方法并初步应用。对靶标基因甲基化探针检测技术与 B 超检测符合率进行分析, *VBP1*, *CpG\_280* 和 *CpG\_1360* 的受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 下的面积 (area under curve, AUC) 分别为 0.713 8、0.608 0 和 0.746 6, 均大于 0.5, 基于 *VBP1*, *CpG\_280* 和 *CpG\_1360* 的 qMSP 检测技术符合率分别为 85.0%、78.75% 和 85.0%, AUC 值大于 0.5 说明该检测技术具有诊断价值。本研究证实在母猪妊娠早期其血液中 *VBP1* 和 *CpG\_280* 为高甲基化而 *CpG\_1360* 为低甲基化, 基于靶标基因的甲基化荧光探针检测技术可作为一种早期诊断猪妊娠的新方法。

**关键词:** DNA 甲基化; 妊娠诊断; 荧光探针; 猪; 早孕

中图分类号: S828.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)03-1458-12

## Establishment of A Pregnancy Detection Technique Based on DNA Methylation of *VBP1*, *CpG\_280*, and *CpG\_1360* Genes in Sows

GU Lanying, LI Shiyi, ZHANG Qinchuan, SUN Yanming\*, ZHANG Yanbing\*

(College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

**Abstract:** This study aimed to identify pregnancy-associated differentially methylated genes and develop an early pregnancy detection technology utilizing methylation-specific fluorescent probes. This study focused on differentially methylated regions in gene promoters and CpG islands to identify potential biomarkers for swine pregnancy. Initially, methylation-specific PCR (MSP) was employed for preliminary validation of these differentially methylated regions. Subsequently, target-specific fluorescent probes were designed to establish an early pregnancy detection method based on

收稿日期: 2025-08-13

基金项目: 国家自然科学基金 (32360901; 32060133); 兵团指导性科技计划项目 (2023ZD042); 新疆维吾尔自治区青年科学基金项目 (2022D01B197); 动物生物医药兵团重点实验室开放性课题 (FMOF2023002)

作者简介: 顾兰英, 硕士生, 主要从事临床兽医方向研究, E-mail: 2937285697@qq.com; 李世义, 硕士生, 主要从事临床兽医方向研究, E-mail: lishiyi@stu.shzu.edu.cn; 顾兰英和李世义为同等贡献作者

\* 通信作者: 孙延鸣, 主要从事临床兽医学方向研究, E-mail: 342173876@qq.com; 张彦兵, 主要从事临床兽医学方向研究, E-mail: zhangyanbing@shzu.edu.cn

quantitative methylation-specific PCR (qMSP), followed by methodological verification. Compared with empty pregnant sows, the blood of pregnant sows at 25-30 days of gestation showed high methylation of *VBPI* and *CpG*\_280, while *CpG*\_1360 showed low methylation, indicating that these sites may be involved in pregnancy regulation. Using  $\beta$ -actin as an internal reference probe, methylation probes for *VBPI*, *CpG*\_280, and *CpG*\_1360 were designed to establish a qMSP detection method for preliminary application. Concordance analysis between this methylation probe-based detection and ultrasound (B-ultrasound) showed ROC curve AUC values of 0.713 8, 0.608 0, and 0.746 6 (all > 0.5), with qMSP concordance rates of 85.0%, 78.75%, and 85.0%, respectively. This study is the first to confirm that *VBPI* and *CpG*\_280 are hypermethylated while *CpG*\_1360 is hypomethylated during early sow pregnancy. The fluorescence probe-based methylation detection technology targeting these genes offers a novel method for early pregnancy diagnosis in swine.

**Keywords:** DNA methylation; pregnancy diagnosis; fluorescence probe; swine; early pregnancy

\* **Corresponding authors:** SUN Yanming, E-mail: 342173876@qq.com; ZHANG Yanbing, E-mail: zhangyanbing@shzu.edu.cn

中国作为全球最大的生猪养殖大国,每年消耗生猪约 7 亿头,其中猪肉产量持续保持世界第一。在生猪养殖集约化进程不断推进的背景下,母猪早期妊娠检测技术的应用显得尤为关键。通过及时准确地判断配种后母猪的妊娠状态,可以有效降低空怀母猪的饲养成本,显著提升繁殖效率,从而为养殖企业创造更大的经济价值<sup>[1]</sup>。在现有规模化养殖场中,B 型超声检测技术应用较为广泛<sup>[2]</sup>。根据最新研究数据,采用经腹部实时超声(real-time ultrasound, RTU)技术可在受精后 30 d 内实现妊娠诊断,其检测准确率能够达到 81% 的水平<sup>[3]</sup>。这一技术的推广应用为养殖场妊娠管理提供了可靠的技术支持,但其对于检测仪器和操作人员要求严格,例如需要较丰富的经验<sup>[4]</sup>,故需要开发一种相对简易的早孕诊断方法。

表观遗传学调控涉及了从胚胎发生<sup>[5]</sup>、干细胞的多能性和细胞分化到生长、成熟和衰老等所有生物过程<sup>[6-8]</sup>。表观遗传修饰包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)以及 RNA 的修饰<sup>[9]</sup>。DNA 甲基化对哺乳动物的发育非常重要,它是大多数哺乳动物基因组中最稳定和特征最明显的表观遗传修饰<sup>[10]</sup>。目前, DNA 甲基化的常用检测方法包括甲基化特异性 PCR(methylation specific PCR, MSP)<sup>[11]</sup>、亚硫酸盐的测序法(bisulfite sequencing PCR, BSP)<sup>[12]</sup>、甲基化敏感限制性内切酶法(methylation sensitive restriction endonuclease, MSRE)<sup>[13]</sup>和定量甲基化特异性 PCR

(quantitative methylation specific PCR, qMSP)<sup>[14]</sup>等。其中, MSP 操作简便、灵敏度高、特异性强,可快速评估 CpG 岛中散在 CpG 位点的甲基化状态,且不依赖甲基化敏感限制酶<sup>[15]</sup>。然而,该方法仅能定性分析,无法实现定量检测。BSP 方法通过亚硫酸氢钠处理基因组 DNA,使未甲基化的胞嘧啶(C)转化为尿嘧啶(U),而甲基化的胞嘧啶保持不变,目前被视为 DNA 甲基化分析的金标准<sup>[16]</sup>。BSP 能够提供每个 CpG 位点可靠且详细的甲基化模式信息,既可定性也可定量,还可揭示不同 CpG 位点之间的甲基化相关性<sup>[17]</sup>;但其流程耗时、成本较高,不利于大规模样本检测<sup>[18]</sup>。qMSP 则结合了 MSP 的高灵敏度和特异性,以及实时荧光定量 PCR 快速、准确、动态范围宽等优势<sup>[19]</sup>,是一种标准化、高通量的检测方法,结果更为可靠,适用于常规大样本分析<sup>[20]</sup>。DNA 甲基化还被广泛运用于猪的繁殖育种、肌肉以及骨骼肌发育<sup>[21-23]</sup>等研究方面。但是,目前母猪妊娠相关甲基化调控网络尚未被系统解析。

本课题组选择猪核糖体蛋白 L10(ribosomal protein L10, RPL10)基因甲基化为靶标成功建立了早孕检测技术,并初步应用于猪早孕检测,符合率为 87.5%,初步证实妊娠相关基因甲基化水平可以指示母猪妊娠状态<sup>[24]</sup>。前期研究采用简化表观亚硫酸氢盐测序(reduced representation bisulfite sequencing, RRBS)对妊娠母猪与非妊娠母猪外周血样本进行分析,结果显示妊娠组与空怀组基因组

DNA 甲基化存在显著差异,主要集中在基因启动子及 CpG 岛周围。本研究对前期 DNA 甲基化数据库差异基因筛选,利用妊娠与非妊娠猪血液样本,基于 MSP 和 qMSP 方法进行验证,进一步证实 *VBP1*、*CpG\_280*、*CpG\_1360* 关键甲基化靶标,建立基于关键靶标的核酸检测方法并初步进行运用。该方法的建立不仅为揭示动物妊娠早期的表观遗传调控机制提供了有效研究手段,同时也为猪妊娠早期诊断技术的开发提供了新的技术路径。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

以杜洛克与长白猪的二元杂交母猪作为试验对象,采集新疆某猪场妊娠 25~30 天和非妊娠猪血液,血液样本在运输过程中冷冻保存。妊娠母猪均为同期发情后人工授精,试验中采样猪只为 8~9 月龄之间。

### 1.2 主要试剂

血液基因组 DNA 提取试剂盒、DL2000 DNA Marker、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、Bisulfite Conversion Kit 购自上海翊圣生物有限公司。

### 1.3 主要仪器

Micro21 低温高速离心机及购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司的 *NanoDrop* ND2000 超微量分光光度计和 ABI-2720 PCR 扩增仪;PowerPac 基础型核酸电泳仪、凝胶成像仪器为美国 BioRad 公司产品;恒温培养箱为 Thermo Fisher 生物科技有限公司产品;LightCycler 96 荧光定量仪为 Roche Diagnostics 公司产品。

### 1.4 血液 DNA 提取及甲基化修饰

采集猪血液冷冻保存,使用血液 DNA 提取试剂盒提取猪血液 DNA,用 *NanoDrop* ND2000 微量分光光度计测定 DNA 浓度。将测好浓度的 DNA 使用 Bisulfite Conversion Kit 试剂盒进行甲基化修饰,亚硫酸氢盐转化效率大于 99%。并于 -20 °C 保存,用于后续试验。

### 1.5 MSP 方法分析验证差异甲基化基因

根据前期 RRBS 测序结果,*VBP1*、*CpG\_280* 和 *CpG\_1360* 靶标在猪妊娠组和非妊娠组的甲基化变化显著;DNA 甲基化差异区域:*VBP1* 定位于 X 染色体正链:125485112~125485470;*CpG\_280* 定位于 9 号染色体正链:3339467~3339549;*CpG\_1360* 定

位于 1 号染色体正链:2004239~2004375。*VBP1*、*CpG\_280* 和 *CpG\_1360* 基因的 MSP 引物通过 MethPrimer 网站 (<https://34.199.9.227/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 进行设计并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,具体引物序列信息见表 1。使用 Bisulfite Conversion Kit 试剂盒对提取的猪血液 DNA 进行甲基化修饰。DNA 甲基化修饰后的样品进行 PCR 扩增,PCR 体系为 20  $\mu$ L: BioGold 2 $\times$  SuperPCR Master Mix 10  $\mu$ L,上、下游引物(浓度为 10  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>)各 1  $\mu$ L, DNA 1.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6.5  $\mu$ L;PCR 反应程序:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 10 s, T<sub>m</sub> 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 45 个循环;72 °C 延伸 3 min;4 °C 保存。扩增后的样品进行 2% 的琼脂糖凝胶电泳,使用 Image J 软件分析 *VBP1*、*CpG\_280* 和 *CpG\_1360* 基因的甲基化水平,使用公式:甲基化指数 Methylation index =  $\frac{M}{M+U} \times 100\%$  [19] 分别计算 *VBP1*、*CpG\_280* 和 *CpG\_1360* 靶标在妊娠组与非妊娠组的甲基化比例,其中,M 是指甲基化,U 是指未甲基化。

### 1.6 荧光探针甲基化特异性 PCR(qMSP)方法验证差异甲基化基因

查阅相关文献,根据探针引物设计原则 [25], 使用 Beacon Designer 软件设计 *VBP1*、*CpG\_280* 和 *CpG\_1360* 靶标的引物、探针及猪  $\beta$ -actin 内参的引物和探针,具体引物序列见表 2。以使用 Bisulfite Conversion Kit 试剂盒对提取的猪血液 DNA 进行甲基化修饰后的血液 DNA 作为模板,使用 LightCycler 96 系统测定各靶标的甲基化水平。反应体系为 20  $\mu$ L: TaqProbe 2 $\times$  qPCR-Multiplex Mastermix 10  $\mu$ L,靶标因子上、下游引物各 0.4  $\mu$ L, 探针 0.2  $\mu$ L,猪  $\beta$ -actin 上下游引物各 0.4  $\mu$ L, 探针 0.2  $\mu$ L,亚硫酸氢盐转化的 DNA 模板 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。反应程序为:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 30 s, 45 个循环。使用  $\Delta$ Ct 值:  $\Delta$ Ct(靶标基因) = Ct(靶标因子) - Ct( $\beta$ -actin) [26], 反映 *VBP1*、*CpG\_280* 和 *CpG\_1360* 基因在妊娠与非妊娠组的 DNA 甲基化水平。

### 1.7 数据分析

使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行独立样本 *t* 检验并绘制图表,  $P < 0.05$  (\*) 表示差异显著;  $P < 0.01$  (\*\*) 表示差异极显著;  $P < 0.0001$  (\*\*\*) 表明差异具有极高的统计学意义。

表 1 MSP 引物信息

Table 1 MSP primers information

| 基因<br>Gene       | 引物序列(5'→3')<br>Sequence           | 退火温度/℃<br>T <sub>m</sub> | 产物长度/bp<br>Product length |
|------------------|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>VBP1</i>      | M-F: TTAGGTTTCGTTTTAGTTGTTTTTTC   | 56                       | 135                       |
|                  | M-R: TATAAATCTACGCATTCATTAACGC    |                          |                           |
|                  | U-F: GATTTAGGTTTGTTTTAGTTGTTTTTTT | 54                       | 137                       |
|                  | U-R: ATAAATCTACACATTCATTAACACA    |                          |                           |
| <i>CpG</i> _280  | M-F: GGTTTGTGTCGTTAGAATAAAGGC     | 56                       | 100                       |
|                  | M-R: GCTAAAAAACATATCCACAATAACGAT  |                          |                           |
|                  | U-F: GGTTTGTGTTGTTAGAATAAAGGTGG   | 55                       | 101                       |
|                  | U-R: GTCTAAAAAACATATCCACAATAACAAT |                          |                           |
| <i>CpG</i> _1360 | M-F: GGTAGTAGTTTAGGATCGAATTGCGT   | 57                       | 152                       |
|                  | M-R: GAAACAACCCTACTAATAAACTCGAA   |                          |                           |
|                  | U-F: GGTAGTAGTTTAGGATTGAATTGTGT   | 55                       | 151                       |
|                  | U-R: GAACAACCCTACTAATAAACTCAAA    |                          |                           |

表 2 qMSP-Taq Probe 引物信息

Table 2 qMSP-Taq Probe primers information

| 基因<br>Gene       | 引物序列(5'→3')<br>Sequence                         | 产物长度/bp<br>Product length |
|------------------|-------------------------------------------------|---------------------------|
| <i>VBP1</i>      | F: CGTAGATTTATACGCGAGGGGCG                      | 88                        |
|                  | R: ACAAACTACCTCTCGAACTACCAACCG                  |                           |
|                  | Probe: FAM ACTATAATTAACCCGCTCACACCCG TAMRA-N    |                           |
|                  |                                                 |                           |
| <i>CpG</i> _280  | F: GGTTTGTGTCGTTAGAATAAAGGC                     | 100                       |
|                  | R: GCTAAAAAACATATCCACAATAACGAT                  |                           |
|                  | Probe: FAM CAAAATATAAAACAAAAATCCTCCCCCG TAMRA-N |                           |
|                  |                                                 |                           |
| <i>CpG</i> _1360 | F: GGTAGTAGTTTAGGATCGAATTGCGT                   | 152                       |
|                  | R: GAAACAACCCTACTAATAAACTCGAA                   |                           |
|                  | Probe: FAM CGCGCTACAAACCCGACAAAAACG TAMRA-N     |                           |
|                  |                                                 |                           |
| <i>β-actin</i>   | F: GGTGTTATTTATTTTATGTTTGTG                     | 89                        |
|                  | R: CCTCTCCAACAAATACCA                           |                           |
|                  | Probe: Cy5 ACCACTTCTACCACCCAACACC BHQ3          |                           |
|                  |                                                 |                           |

## 2 结 果

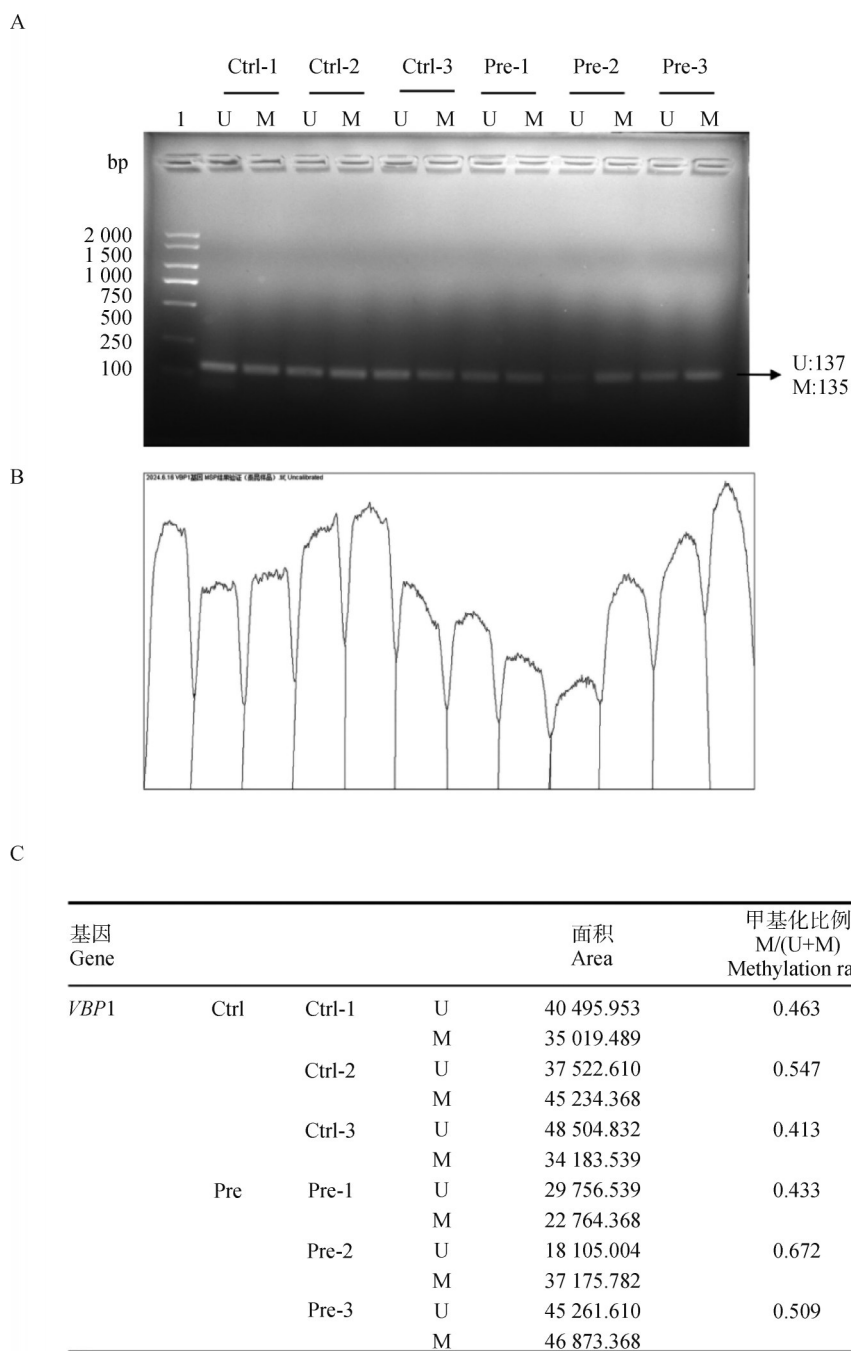
### 2.1 MSP 验证靶标基因甲基化结果

MSP 结果显示,靶标基因 *VBP1*、*CpG*\_280 和 *CpG*\_1360 在妊娠组与非妊娠组中均发生了甲基化,通过 ImageJ 软件来分析计算其在妊娠组与非妊娠组的甲基化比例,并计算各个靶标因子的甲基化比例。*VBP1* 妊娠组甲基化比例为 53.8%,非妊娠组为 47.5%(图 1A-C)。*CpG*\_280 妊娠组甲基化比例为 40.3%,非妊娠组甲基化比例为 36.2%(图 2A-C)。综合结果表明 *VBP1*、*CpG*\_280 为高甲

基化基因。*CpG*\_1360 妊娠组综合甲基化比例为 47.8%,非妊娠组甲基化比例为 60.9%(图 3A-C)。综合结果表明 *CpG*\_1360 为低甲基化基因。PCR 扩增的条带均为各目的基因的特异性条带,部分基因出现引物二聚体,这可能与引物设计相关。

### 2.2 荧光探针甲基化特异性 PCR(qMSP)方法检测结果

2.2.1 靶标基因甲基化水平差异 *VBP1* 共检测了 40 头妊娠 25 天与 40 头非妊娠猪血液样品,*CpG*\_280 共检测了 44 个妊娠 25 天与 36 个非妊娠样品,*CpG*\_1360 共检测了 40 头妊娠 25 天和 40 头非妊



A. 妊娠与非妊娠血液样本中 *VBP1* 基因 MSP 扩增图 ( $n=3$ )；B. Image J 分析的 *VBP1* 各个扩增产物的相对荧光强度直方图；C. 直方图表示凝胶图上 MSP 扩增产物各个条带的相对荧光强度。1. DL2000 DNA Marker；U. 未甲基化；M. 甲基化；Ctrl-1,2,3. 未妊娠组 1,2,3；Pre-1,2,3. 妊娠组 1,2,3

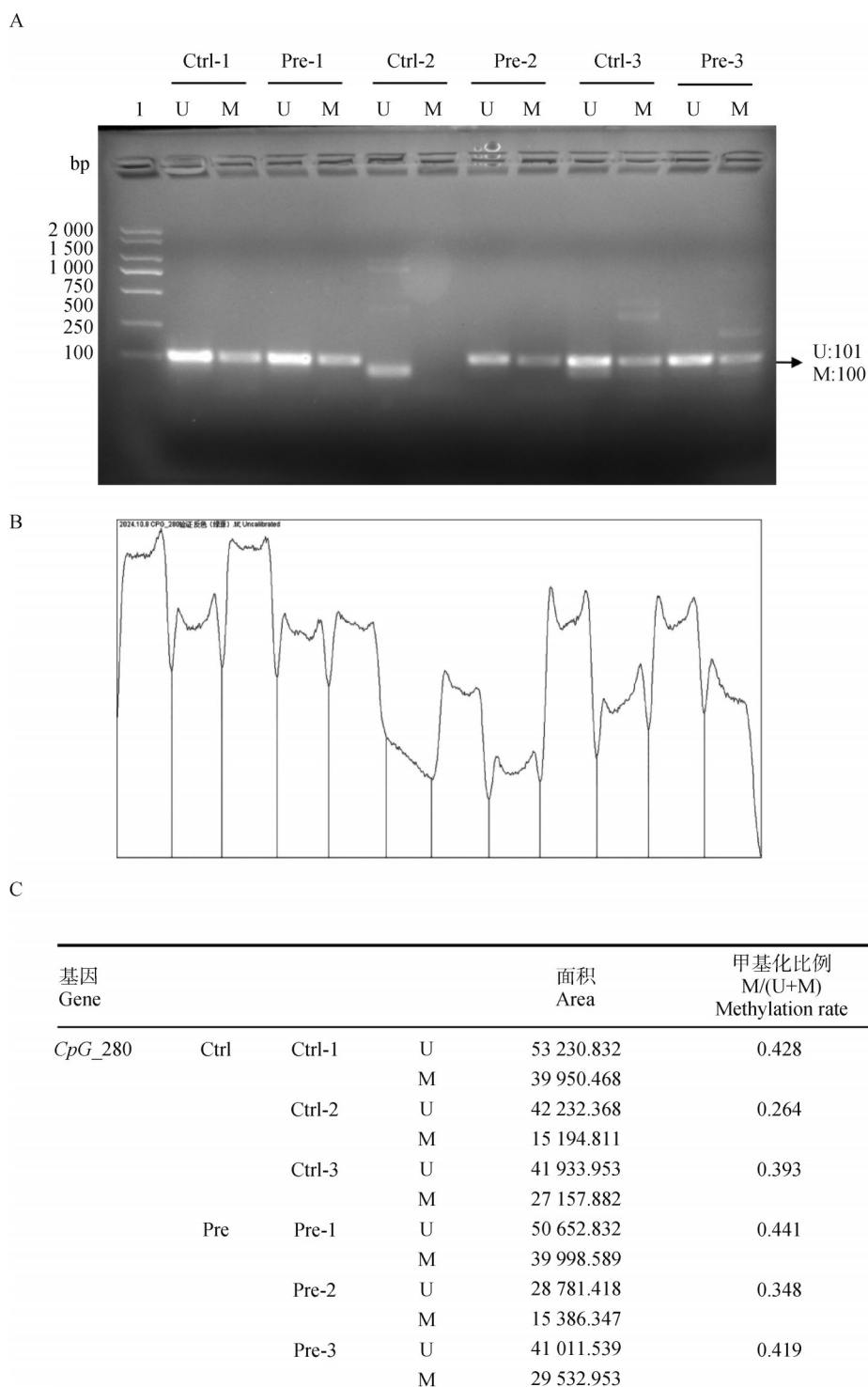
A. MSP amplification patterns of the *VBP1* gene in pregnancy and non-pregnancy blood samples ( $n=3$ )；B. Relative fluorescence intensity histograms of *VBP1* amplification products analyzed by Image J；C. Histograms showing relative fluorescence intensities of MSP amplification bands on gel electrophoresis. 1. DL2000 DNA Marker；U. Unmethylated；M. Methylated；Ctrl-1,2,3. Non-pregnancy groups (1,2,3)；Pre-1,2,3. Pregnancy groups (1,2,3)

图1 *VBP1* 甲基化特异性 PCR 结果 ( $n=3$ )

Fig. 1 *VBP1* MSP results ( $n=3$ )

妊娠猪样品,上述样品均经 B 超检查明确妊娠的猪只血液样本。用  $\Delta C_t$  值表示甲基化水平, $\Delta C_t$  值越低

甲基化水平越高<sup>[27]</sup>。结果显示 *VBP1* 在妊娠组中甲基化水平显著高于非妊娠组 ( $P<0.0001$ ) (图 4A),

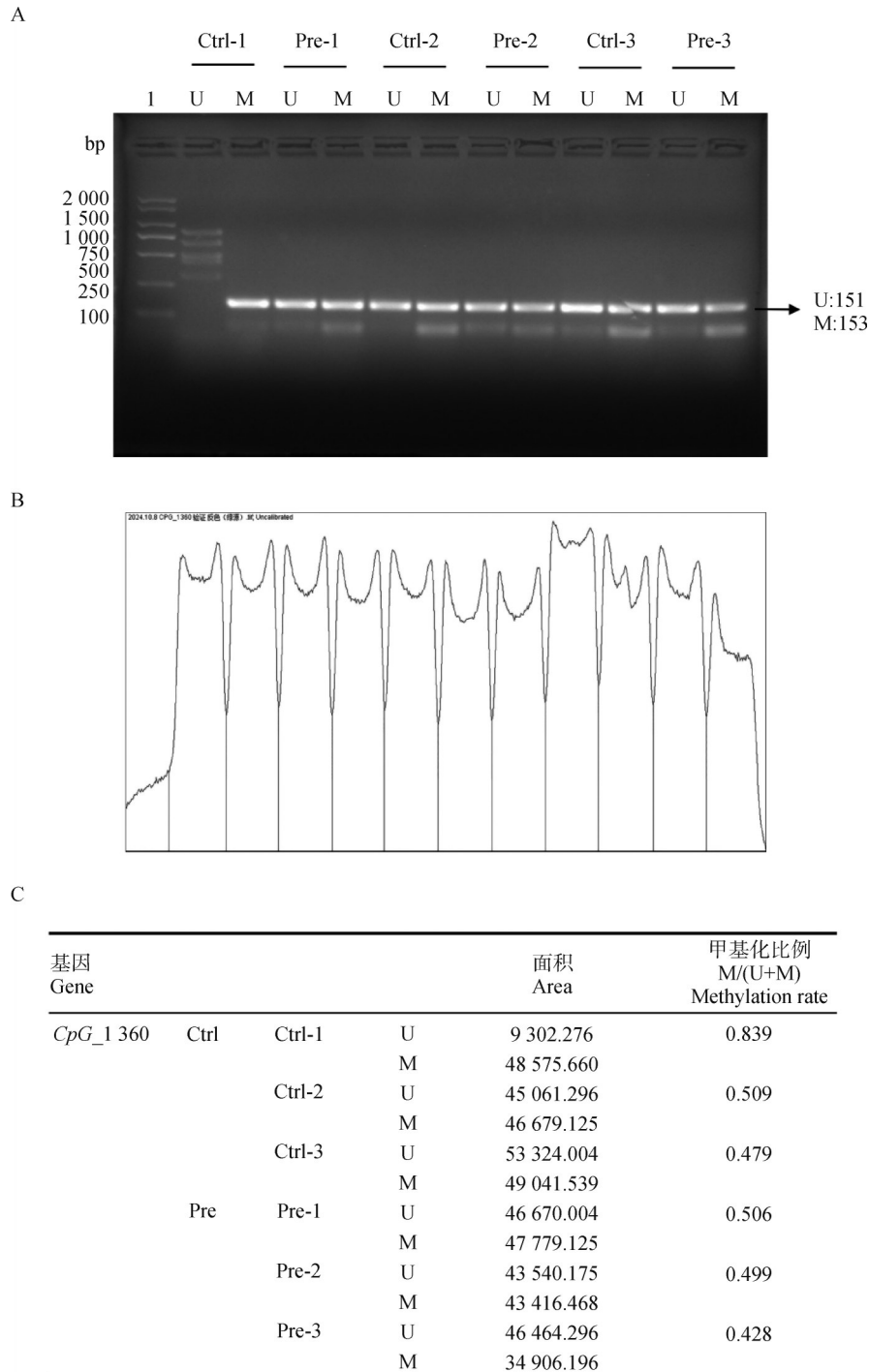


A. 妊娠与非妊娠血液样本中 *CpG*\_280 基因 MSP 扩增图 (n=3); B. Image J 分析的 *CpG*\_280 各个扩增产物的相对荧光强度直方图; C. 直方图表示凝胶图上 MSP 扩增产物各个条带的相对荧光强度。1. DL2000 DNA Marker; U. 未甲基化; M. 甲基化; Ctrl-1,2,3. 未妊娠组 1,2,3; Pre-1,2,3. 妊娠组 1,2,3

A. MSP amplification patterns of *CpG*\_280 gene in pregnancy and non-pregnancy blood samples (n=3); B. Relative fluorescence intensity histograms of *CpG*\_280 amplification products analyzed by Image J; C. Histograms showing relative fluorescence intensities of MSP amplification bands on gel electrophoresis. 1. DL2000 DNA Marker; U. Unmethylated; M. Methylated; Ctrl-1,2,3. Non-pregnancy groups (1,2,3); Pre-1,2,3. Pregnancy groups (1,2,3)

图2 *CpG*\_280 甲基化特异性 PCR 结果 (n=3)

Fig. 2 *CpG*\_280 MSP results (n=3)



A. 妊娠与非妊娠血液样本中 *CpG\_1360* 基因 MSP 扩增图 ( $n=3$ ); B. Image J 分析的 *CpG\_1360* 各个扩增产物的相对荧光强度直方图; C. 直方图表示凝胶图上 MSP 扩增产物各个条带的相对荧光强度。1. DL2000 DNA Marker; U. 未甲基化; M. 甲基化; Ctrl-1, 2, 3. 未妊娠组 1, 2, 3; Pre-1, 2, 3. 妊娠组 1, 2, 3

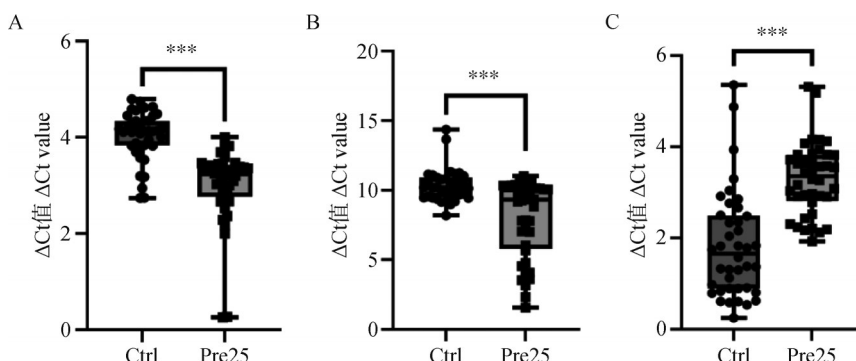
A. MSP amplification patterns of the *CpG\_1360* gene in pregnancy and non-pregnancy blood samples ( $n=3$ ); B. Relative fluorescence intensity histograms of *CpG\_1360* amplification products analyzed by Image J; C. Histograms showing relative fluorescence intensities of MSP amplification bands on the gel electrophoresis. 1. DL2000 DNA Marker; U. Unmethylated; M. Methylated; Ctrl-1, 2, 3. Non-pregnancy groups (1, 2, 3); Pre-1, 2, 3. Pregnancy groups (1, 2, 3)

图3 *CpG\_1360* 甲基化特异性 PCR 结果 ( $n=3$ )

Fig. 3 *CpG\_1360* MSP results ( $n=3$ )

*CpG*\_280 在妊娠组中甲基化水平显著高于非妊娠组 ( $P < 0.0001$ ) (图 4B), *CpG*\_1360 在妊娠组中甲

基化水平显著低于非妊娠组 ( $P < 0.0001$ ) (图 4C)。



A. *VBPI* 甲基化水平; B. *CpG*\_280 甲基化水平; C. *CpG*\_1360 甲基化水平。Ctrl. 未妊娠组; Pre25. 妊娠 25 天组。\*\*\*表示差异极显著 ( $P < 0.0001$ )

A. *VBPI* methylation level; B. *CpG*\_280 methylation level; C. *CpG*\_1360 methylation level. Ctrl. Non-pregnancy group; Pre25. 25-day pregnancy group. \*\*\* indicates highly significant difference ( $P < 0.0001$ )

图 4 基于荧光探针法测定妊娠及空怀组 *VBPI*, *CpG*\_280 和 *CpG*\_1360 甲基化水平

Fig. 4 Methylation levels of *VBPI*, *CpG*\_280, and *CpG*\_1360 in pregnant and non-pregnant groups determined by fluorescence probe method

2.2.2 诊断阈值确定与符合率分析 *VBPI*、*CpG*\_280 和 *CpG*\_1360 甲基化水平在妊娠诊断中的具体判断为: *VBPI*  $\Delta Ct \leq 3.0$  时判断为妊娠,  $\Delta Ct > 4.0$  判断为非妊娠, 探针法甲基化检测符合率为

85.0% (68/80); *CpG*\_280  $\Delta Ct \leq 8.0$  时判断为妊娠,  $\Delta Ct > 10.3$  判断为非妊娠, 符合率为 78.75% (63/80); *CpG*\_1360 当  $\Delta Ct < 1.8$  判断为非妊娠,  $\Delta Ct \geq 3.2$  判断为妊娠, 符合率为 85.0% (68/80), 具体见表 3。

表 3 靶标基因临界值判断

Table 3 Threshold value of target genes

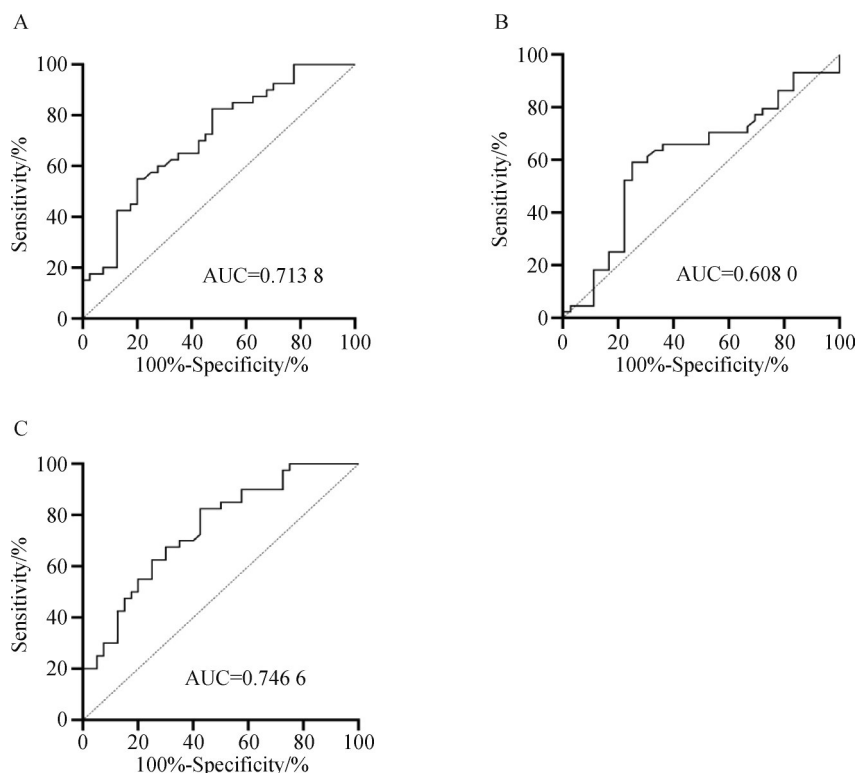
| 靶标因子<br>Targeting factors | 判断 Judgement       |                      | 符合率/%<br>Conformity rate |
|---------------------------|--------------------|----------------------|--------------------------|
|                           | 非妊娠 Non-pregnancy  | 妊娠 Pregnancy         |                          |
| <i>VBPI</i>               | $\Delta Ct > 4.0$  | $\Delta Ct \leq 3.0$ | 85.0                     |
| <i>CpG</i> _280           | $\Delta Ct > 10.3$ | $\Delta Ct \leq 8.0$ | 78.75                    |
| <i>CpG</i> _1360          | $\Delta Ct < 1.8$  | $\Delta Ct \geq 3.2$ | 85.0                     |

2.2.3 ROC 曲线分析 根据各样本 Ct 值绘制 ROC 曲线, AUC 是评估诊断效能的核心指标<sup>[27]</sup>。AUC 值的取值范围为 0.5~1.0, AUC 越大, 表明诊断效能越好。AUC 在 0.5~0.7 之间为诊断价值较低, 0.7~0.9 之间为中等诊断价值, 0.9 以上为诊断效能较高<sup>[27]</sup>。图 5 结果显示, *VBPI*, *CpG*\_280 和 *CpG*\_1360 的 AUC 值分别为 0.713 8, 0.608 0 和 0.746 6, 均大于 0.5, 具有诊断学价值, 其中 *CpG*\_1360 诊断效能最优, *CpG*\_280 相对较低。

### 3 讨论

DNA 甲基化是一种动态、可逆且可遗传的表现

遗传修饰。在哺乳动物原始生殖细胞与早期胚胎发育阶段, 这一修饰过程尤为活跃。它能通过高度动态协调的核酶网络, 特异性地附着于 DNA 的 CpG 区域, 进而改变基因组调控区域的功能状态, 在不影响 DNA 序列的前提下精密调控基因表达<sup>[28]</sup>。此外, DNA 甲基化广泛应用于各种疾病的诊断, 现主要运用于癌症早期诊断, 这凸显了 DNA 甲基化在疾病诊断中的优势<sup>[29]</sup>。前期研究数据显示, 猪妊娠早期全基因组甲基化发生明显变化, 主要在基因启动子区域及 CpG 岛等区域。因此, 本研究对甲基化差异区域相关基因及 CpG 岛进行验证, 成功建立基于高甲基化 *VBPI*、*CpG*\_280 和低甲基化



A. *VBP1* ROC 曲线和 AUC; B. *CpG*\_280 ROC 曲线和 AUC; C. *CpG*\_1360 ROC 曲线和 AUC

A. ROC curve and AUC of *VBP1*; B. ROC curve and AUC of *CpG*\_280; C. ROC curve and AUC of *CpG*\_1360

图 5 妊娠猪血液样本中 *VBP1*、*CpG*\_280 和 *CpG*\_1360 的 ROC 曲线和 AUC

Fig. 5 ROC curves and AUC of *VBP1*, *CpG*\_280 and *CpG*\_1360 in pregnant sows blood samples

*CpG*\_1360 的早孕检测技术,为猪妊娠诊断提供新方法。

Von Hippel-Lindau 结合蛋白 1 (Von Hippel-Lindau binding protein 1, *VBP1*) 作为 VHL 结合蛋白,参与伴侣蛋白 CCT 介导的 VBC 复合体形成<sup>[30]</sup>。VHL 通过调控 p53、NF- $\kappa$ B 和 E2F1 影响细胞增殖与凋亡<sup>[31]</sup>。其中, p53 参与细胞周期调控<sup>[32]</sup>, 而 VHL 缺失导致的 NF- $\kappa$ B 活化可促进肿瘤发生<sup>[33]</sup>。此外, *VBP1* 可能参与 VHL 介导的泛素化降解途径, 通过与 MSH4 结合促进其蛋白酶体或自噬依赖性降解<sup>[34]</sup>。值得注意的是, *VBP1* 还可调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, 影响胚胎发育<sup>[35-36]</sup>。本研究发现, 妊娠母猪血液中 *VBP1* 呈现高甲基化状态, 提示其可能参与妊娠调控, 但具体机制仍需进一步研究。

动物基因组中富含 CpG 岛, 其特点为一段长度不小于 200 bp、GC 含量不小于 50%; 有研究基于 CpG 位点相对甲基化顺序成功筛选到黑色素瘤定性预后生物标志<sup>[37]</sup>。本研究选择的 *CpG*\_280 定位于 9 号染色体正链, *CpG*\_1360 定位于 1 号染色体正链, 初步建立基于 *CpG*\_280 和 *CpG*\_1360 甲基化

区域的荧光探针检测技术。这暗示着猪 CpG 岛甲基化可能参与猪妊娠生命活动。

在本研究中, MSP 结果表明猪妊娠后血液中 *VBP1*、*CpG*\_280 靶标的 DNA 甲基化水平显著增加, 而 *CpG*\_1360 靶标的甲基化水平显著下降。本研究建立了基于 *VBP1*、*CpG*\_280 和 *CpG*\_1360 甲基化的单靶标核酸探针检测技术, 并且首次将  $\Delta$ Ct 值定量体系应用于猪早期妊娠诊断, ROC 曲线分析结果表明 *VBP1*、*CpG*\_280 和 *CpG*\_1360 的 AUC 值分别为 0.7138, 0.6080 和 0.7466, 均大于 0.5, 所建立的妊娠诊断模型均具有诊断价值 ( $AUC > 0.5$ )<sup>[27]</sup>。该检测方法可以做到高通量快速检测, 适合集约化猪场早期妊娠诊断。但基于单个靶标甲基化水平检测动物妊娠状态的方法仍存在一定局限性, 未来将 *VBP1* 和 *CpG*\_280 构建双重荧光早孕检测技术, 将 *RPL10*<sup>[24]</sup> 和 *CpG*\_1360 构建双重荧光早孕检测技术, 可进一步提高猪早孕检测的准确率。所以后续将继续构建多靶标联合的核酸检测技术以提高诊断符合率, 提高动物繁殖效率。此外, DNA 甲基化是调控哺乳动物卵母细胞与胚胎发

育的关键表观遗传机制,其异常会严重损害胚胎存活。探究此过程中的甲基化动态,不仅能深化表观遗传认知,也为优化体外生殖技术、提高繁殖效率及加强疾病防控提供了关键理论依据<sup>[38-40]</sup>。

## 4 结 论

本研究通过甲基化特异性 PCR 和荧光探针甲基化特异性 PCR 方法,证实母猪妊娠早期, VBP1、CpG\_280 靶标甲基化水平显著增加,而 CpG\_1360 靶标甲基化水平显著下降,建立了基于 VBP1、CpG\_280 和 CpG\_1360 靶标的甲基化水平荧光探针检测技术,该检测方法在母猪早期妊娠诊断领域具有良好的应用前景。

## 参考文献(References):

- [1] GUAN R, GAO W C, LI P, et al. Utilization and reproductive performance of gilts in large-scale pig farming system with different production levels in China: a descriptive study[J]. *Porcine Health Manag*, 2021, 7(1): 62.
- [2] KAUFFOLD J, PELTONIEMI O, WEHREND A, ALTHOUSEI G C. Principles and clinical uses of real-time ultrasonography in female swine reproduction[J]. *Animals (Basel)*, 2019, 9(11): 950.
- [3] GOKULDAS P P, SHINDE K, NAIK S, et al. Assessment of diagnostic accuracy and effectiveness of trans-abdominal real-time ultrasound imaging for pregnancy diagnosis in breeding sows under intensive management[J]. *Trop Anim Health Prod*, 2023, 55(4): 239.
- [4] 张凤仁. 母猪早期妊娠诊断的方法[J]. *江西饲料*, 2017, (5): 36-38.  
ZHANG F R. Methods for early pregnancy diagnosis in sows[J]. *Jiangxi Feed*, 2017, (5): 36-38. (in Chinese)
- [5] 张宸艺博, 余 彤, 任斌斌, 等. 动物早期胚胎发育中表观重编程的机制[J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(12): 4898-4909.  
ZHANG C Y B, YU T, REN B B, et al. Mechanism of epigenetic reprogramming of early animal embryos[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(12): 4898-4909. (in Chinese)
- [6] SCHULZ M, TEISSANDIER A, SANTAELLA E D L M, et al. DNA methylation restricts coordinated germline and neural fates in embryonic stem cell differentiation[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2024, 31(1): 102-114.
- [7] GEIMAN T, MUEGGE K. DNA methylation in early development[J]. *Mol Reprod Dev*, 2010, 77(2): 105-113.
- [8] IVANOVA E, KELSEY G. Roles and regulation of DNA methylation in early mammalian development[J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2026, 14(1): 137-160.
- [9] LUO D Z, LI X H, TANG S M, et al. Epigenetic modifications in neuropathic pain[J]. *Mol Pain*, 2021, 17: 17448069211056767.
- [10] WANG M, IBEAGHA-AWEMU E. Impacts of epigenetic processes on the health and productivity of livestock[J]. *Front Genet*, 2020, 11: 613636.
- [11] HATTORI N, LIU Y Y, USHIJIMA T. DNA Methylation Analysis[J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2691: 165-183.
- [12] HUANG Z Q, BASSIL C F, MURPHY S K. Bisulfite sequencing of cloned alleles[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1049: 83-94.
- [13] CEDAR H, SOLAGE A, GLASER G, RAZIN A. Direct detection of methylated cytosine in DNA by use of the restriction enzyme MspI[J]. *Nucleic Acids Res*, 1979, 6(6): 2125-2132.
- [14] LOBO J, GILLIS A J M, LOOIJENGA L H J. Targeted methylation analyses: From bisulfite treatment to quantification[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2195: 167-180.
- [15] HERMAN J G, GRAFF J R, MYÖHÄNEN S, et al. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(18): 9821-9826.
- [16] PATTERSON K, MOLLOY L, QU W J, CLARK S. DNA methylation: Bisulphite modification and analysis[J]. *J Vis Exp*, 2011, (56): 3170.
- [17] ZHANG Y Y, ROHDE C, TIERLING S, et al. DNA methylation analysis by bisulfite conversion, cloning, and sequencing of individual clones[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 507: 177-187.
- [18] MARTISOVA A, HOLCAKOVA J, IZADI N, et al. DNA methylation in solid tumors: Functions and methods of detection[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8):

- 4247.
- [19] LO Y M, WONG I H, ZHANG J, et al. Quantitative analysis of aberrant p16 methylation using real-time quantitative methylation-specific polymerase chain reaction[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(16):3899-3903.
- [20] LAZAREVIĆ M, JOVANOVIĆ N, CVETKOVIĆ V J, et al. A comparison of MGMT testing by MSP and qMSP in paired snap-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded Gliomas[J]. *Diagnostics (Basel)*, 2023, 13(3):360.
- [21] YU Y, CHEN S, LIU S, et al. 160 Studies of Sperm DNA methylation variations and their potential regulations on production and reproduction traits in cattle and pigs[J]. *J Anim Sci*, 2021, 99:88-89.
- [22] YANG A Q Y, YAN S N, CHEN C J, et al. Regulation of DNA methylation during the testicular development of Shaziling pigs[J]. *Genomics*, 2022, 114(5):110450.
- [23] ZHANG X, SUN W J, HE L J, et al. Global DNA methylation pattern involved in the modulation of differentiation potential of adipogenic and myogenic precursors in skeletal muscle of pigs[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):536.
- [24] 顾兰英, 范文雨, 李世义, 等. 母猪血液 RPL10 启动子甲基化水平分析及妊娠检测技术初探[J]. *中国畜牧杂志*, 2025, 61(10):380-386.
- GU L Y, FAN W Y, LI S Y, et al. Analysis of RPL10 promoter methylation level in sow blood and preliminary exploration of pregnancy detection technology [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2025, 61(10):380-386. (in Chinese)
- [25] SUZANNE S, LISE M A D S, ALBERTUS T H, et al. Development of a multiplex methylation-specific PCR as candidate triage test for women with an HPV-positive cervical scrape [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12:551.
- [26] SHEM Y G, WANG D Y, YUAN T L, et al. Novel DNA methylation biomarkers in stool and blood for early detection of colorectal cancer and precancerous lesions[J]. *Clin Epigenetics*, 2023, 15(1):26.
- [27] ÇORBACIOĞLU Ş K, AKSEL G. Receiver operating characteristic curve analysis in diagnostic accuracy studies: A guide to interpreting the area under the curve value [J]. *Turk J Emerg Med*, 2023, 23(4):195-198.
- [28] 甘建宇, 张 蕊, 蔡更元, 等. DNA 甲基化在猪胚胎发育过程中的研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(10):3287-3295.
- GAN J Y, ZHANG X, CAI G Y, et al. Research progress of DNA methylation during porcine embryonic development [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(10):3287-3295. (in Chinese)
- [29] BRITO-ROCHA T, CONSTÂNCIO V, LEITE-SILVA P, et al. Multi-cancer early detection via a DNA methylation multiplex ddPCR-based blood test [J]. *Int J Cancer*, 2025, 157(5):1006-1019.
- [30] ESSERS P B, KLASSON T D, PEREBOOM T C, et al. The von Hippel-Lindau tumor suppressor regulates programmed cell death 5-mediated degradation of Mdm2[J]. *Oncogene*, 2015, 34(6):771-779.
- [31] 张海峰, 周建峰. 肿瘤抑制因子 VHL 及其结合蛋白 VBP1 研究进展[J]. *齐鲁医学杂志*, 2015, 30(5):620-622+625.
- ZHANG H F, ZHOU J F. Research progress on tumor suppressor VHL and its binding protein VBP1 [J]. *Journal of Qilu Medical University*, 2015, 30(5):620-622+625. (in Chinese)
- [32] 袁林林, 王言奎, 王清娟. P53 和 iASPP 在子宫颈癌组织的表达及意义[J]. *齐鲁医学杂志*, 2012, 27(3):202-204.
- YUAN L L, WANG Y K, WANG Q J. Expression and significance of P53 and IASPP in cervical carcinoma tissues [J]. *Journal of Qilu Medical University*, 2012, 27(3):202-204. (in Chinese)
- [33] 兰文华, 匡 戮. NF-κB 对化疗后糖代谢紊乱的影响[J]. *青岛大学医学院学报*, 2015, 51(2):247-248+251.
- LAN W H, KUANG T. Effect of NF-κB on postchemotherapy glucose metabolism disorder [J]. *Journal of Qingdao University (Medical Sciences)*, 2015, 51(2):247-248+251. (in Chinese)
- [34] XU Y, HER C T. VBP1 facilitates proteasome and autophagy-mediated degradation of MutS homologue hMSH4[J]. *FASEB J*, 2013, 27(12):4799-4810.
- [35] ZHANG H F, RONG X Z, WANG C X, et al. VBP1 modulates Wnt/β-catenin signaling by mediating the stability of the transcription factors TCF/LEFs[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(49):16826-16839.

- [36] VAN CAMP J K, BECKERS S, ZEGERS D, et al. Wnt signaling and the control of human stem cell fate [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2014, 10(2):207-229.
- [37] HUO Y, GAO Y R, RUAN J Y, et al. A qualitative prognostic biomarker for melanoma based on the relative methylation orderings of CpG loci [J]. *Epigenetics*, 2025, 20(1):2487316.
- [38] 杨小耿, 张慧珠, 李 键, 等. DNA 甲基化在哺乳动物卵母细胞和早期胚胎发育中的研究进展 [J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(2):443-450.
- YANG X G, ZHANG H Z, LI J, et al. Research progress of the DNA methylation in mammalian oocyte and early embryo development [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(2):443-450. (in Chinese)
- [39] TOMIZAWA S I, NOWACKA-WOSZUK, KELSEY G. DNA methylation establishment during oocyte growth: mechanisms and significance [J]. *Int J Dev Biol*, 2012, 56(10-12):867-875.
- [40] 雒瑞瑞, 王彩莲, 郎 侠. DNA 甲基化在家畜繁殖中的研究进展 [J]. 农业生物技术学报, 2023, 31(10):2190-2199.
- LUO R R, WANG C L, LANG X. Research progress on DNA methylation in domestic animal reproduction [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2023, 31(10):2190-2199. (in Chinese)
- (编辑 郭云雁)