网络出版时间:2026-03-13 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.09.011

产蛋高峰期和后期莆田黑鸭肝脏差异表达基因及全基因组差异甲基化分析

潘成福[1,2],林蔚龙[2],刘长涛[1,2],李丽[1],章琳俐[1],刘晓盼[1],黄靓[1],缪中纬[1],辛清武[1],黄种彬[3],郑嫩珠[1],林瑞意[2],朱志明[1]

(1 福建省农业科学院 畜牧兽医研究所 福建省畜禽遗传育种重点实验室,福建 福州 350013;
2 福建农林大学 动物科学学院,福建 福州 350002;3 石狮市种业发展中心,福建 石狮 362700)

[摘 要] 【目的】对产蛋高峰期和产蛋后期的莆田黑鸭肝脏组织差异表达基因和全基因组差异甲基化基因进行分析,筛选不同产蛋阶段肝脏组织的差异甲基化和差异表达基因,为莆田黑鸭产蛋后期产蛋率下降的分子机制研究提供新的见解。【方法】选取产蛋高峰期(300 日龄)和产蛋后期(500 日龄)的莆田黑鸭各 3 只,屠宰采集肝脏组织,提取 DNA 和 RNA,构建 DNA 文库和 cDNA 文库,然后分别进行转录组测序(RNA-seq)和全基因组甲基化测序,筛选差异表达基因和差异甲基化基因。对差异表达和差异甲基化基因进行 GO 和 KEGG 富集分析,筛选既差异表达又差异甲基化的基因。选取 5 个差异表达基因,进行转录组测序结果的实时荧光定量 PCR 验证。【结果】从产蛋高峰期到产蛋后期,发现 105 个基因表达量显著上调,50 个基因表达量显著下调。GO 和 KEGG 富集分析显示,差异表达基因主要参与异种代谢、细胞对外来刺激的反应、长链脂肪酸代谢、不饱和脂肪酸代谢等过程,在代谢途径、细胞色素 P450 对外源性药物的代谢作用等通路起着重要作用。通过 CpG 位点分析鉴定差异甲基化区域(differentially methylated region,DMR),得到不同产蛋阶段肝脏组织的 DMR 共 16 700 个,其中高甲基化区域有 12 014 个,低甲基化区域有 4 686 个。对差异甲基化与差异表达基因进行关联分析,发现了 2 个甲基化水平下降而表达量上升的基因:LOC113840537 和 LOC119715140(基因 ID)。对选取的上调基因 *ETNPPL*、*CETP*、*ENPP*1 和下调基因 *NPC*2、*PTGR*1 进行实时荧光定量 PCR 验证,结果与转录组测序结果一致,说明转录组测序结果是可靠的。【结论】从差异表达基因中筛选出 *CETP*、*ENPP*1、*ETNPPL*、*NPC*2、*PTGR*1 等 5 个脂质代谢相关基因,关联分析得到 2 个既差异甲基化又差异表达的基因 LOC113840537 和 LOC119715140。

[关键词] 莆田黑鸭;产蛋性状;转录组;全基因组甲基化;分子调控

[中图分类号] S834.89 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)09-0110-09

Analysis of differentially expressed genes and whole genome differential methylation in the liver of Putian black ducks during the peak and late laying periods

PAN Chengfu[1,2], LIN Weilong[2], LIU Changtao[1,2], LI Li[1], ZHANG Linli[1], LIU Xiaopan[1], HUANG Liang[1], MIAO Zhongwei[1], XIN Qingwu[1], HUANG Zhongbin[3], ZHENG Nenzhu[1], LIN Ruiyi[2], ZHU Zhiming[1]

(1 *Fujian Key Laboratory of Animal Genetics and Breeding, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian* 350013, *China*; 2 *College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry*

[收稿日期] 2025-07-18 [修回日期] 2025-08-19
[基金项目] 国家重点研发计划项目(2024YFD1300902);福建省科技重大专项(2024NZ029028);福建省种业创新项目(Zycxny2021014);福建省 5511 协同创新工程项目(XTCXGC2021008)
[作者简介] 潘成福(1998—),男,贵州丹寨人,在读硕士,主要从事家禽遗传育种研究。E-mail:3103286845@qq.com
[通信作者] 朱志明(1979—),男,江西东乡人,副研究员,硕士,主要从事家禽遗传育种研究。E-mail:zhuzm10203@163.com

University, *Fuzhou*, *Fujian* 350002, *China*; 3 *Seed Industry Development Center of Shishi*, *Shishi*, *Fujian* 362700, *China*）

Abstract:【Objecitve】To explore the molecular mechanism underlying the decline in egg production rate of Putian black ducks during the late laying period, analysis of the differentially expressed genes and whole genome methylation differences in their liver tissues at the peak and late laying stages was conducted, and the key diffe-rentially methylated and differentially expressed genes associated with egg production were screened.【Method】In the experiment, three Putian black ducks at the peak laying period (300 days of age) and three at the late laying period (500 days of age) were selected respectively. After slaughter, liver tissue samples were collected, and DNA and RNA were extracted to construct DNA libraries and cDNA libraries. Then transcriptome sequencing (RNA-seq) and whole genome bisulfite sequencing (WGBS) were performed respectively for analysis. GO and KEGG enrichment analysis was performed on the differentially expressed genes (DEGs) and differentially methylated genes (DMGs), and genes both differentially expressed and differentially methylated were screened out. Five DEGs were selected for reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) to validate the transcriptome sequencing results.【Result】From the peak to late laying period, 105 genes with significantly upregulated expression and 50 genes with significantly downregulated expression were identified. GO and KEGG enrichment analysis showed that the DEGs were mainly involved in biological processes including xenobiotic metabolism, cellular response to external stimuli, long-chain fatty acid metabolism, and unsaturated fatty acid metabolism, and played important roles in pathways including metabolic pathways, and xenobiotic drug metabolism mediated by cytochrome P450. CpG site analysis revealed 16 700 differentially methylated regions (DMRs), including 12 014 hypermethylated regions and 4 686 hypomethylated regions. Correlation analysis found two genes (LOC113840537 and LOC119715140) with decreased methylation level and increased expression level. RT-qPCR result of selected upregulated genes (*ETNPPL*, *CETP*, *ENPP*1) and downregulated genes (*NPC*2, *PTGR*1) was consistent with the results of RNA-seq, indicating that the transcriptome sequencing results were reliable.【Conclusion】Five DEGs related to lipid metabolism were screened out, namely *CETP*, *ENPP*1, *ETNPPL*, *NPC*2, and *PTGR*1. Through correlation analysis, two genes (LOC113840537 and LOC119715140) that were both differentially methylated and differentially expressed were identified.

Key words: Putian black duck; egg-laying traits; transcriptome; whole genome methylation; molecular regulation

表观遗传学是研究基因表达调控机制的一个重要领域，DNA甲基化是主要的表观遗传修饰，通常发生在胞嘧啶（C）与鸟嘌呤（G）相邻的位置（即CpG二核苷酸），通过将甲基基团（—CH3）加到胞嘧啶上形成5-甲基胞嘧啶（5-mC）[1-3]。转录组是指一个细胞、组织或生物体在特定条件下或特定时间点所有转录产物（即所有mRNA、rRNA、tRNA以及其他非编码RNA）的集合。转录组研究的是基因表达的动态过程，即基因从DNA序列转录成RNA的过程[4]。产蛋性状是禽类育种中最重要的经济性状之一，主要包括产蛋量、蛋质量、蛋壳质量、蛋黄比例和蛋成分等，这些性状直接决定着禽类的生产效率和经济效益。蛋的形成涉及复杂的生物学过程，包括脂质代谢、营养物质转运以及基因表达的精细调控，肝脏是脂质代谢及营养物质转运的主要场所[5-6]。肝脏不仅参与糖类、脂类和蛋白质的代谢与储存，还负责多种血浆蛋白、胆汁的合成以及维生素和矿物质的转化与储存，同时承担着解毒、免疫和激素代谢等重要功能[7-11]，对于维持机体的代谢平衡和健康状态至关重要。

莆田黑鸭是福建省特有的地方蛋鸭品种，属于小型蛋用鸭种。莆田黑鸭不仅具有较高的抗病能力，还表现出优异的产蛋性能，是当地重要的经济禽类。随着现代化养殖业的快速发展，莆田黑鸭的遗传资源面临一定的威胁，其种群数量逐渐减少。目前，对于莆田黑鸭肝脏影响产蛋性状的研究较少。本研究对产蛋高峰期和产蛋后期莆田黑鸭肝脏进行了全基因组甲基化测序和转录组测序分析，揭示不同产蛋阶段肝脏中基因表达和甲基化水平变化，以探究其对产蛋性状的影响，为理解家禽产

蛋性状的分子调控机制提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

莆田黑鸭,由国家水禽基因库(石狮)提供。选取3只产蛋高峰期(300日龄)和3只产蛋后期(500日龄)莆田黑鸭进行屠宰,迅速剪取适量(1~2 g)肝脏组织装入无菌2 mL冻存管中,投入液氮速冻后置于-80 ℃超低温冰箱中保存,备用。

1.2 试验方法

1.2.1 文库构建和质检 将-80 ℃超低温水箱中保存的肝脏组织解冻后,采用DNA提取试剂盒和RNA提取试剂盒(天根生化,北京)分别提取DNA和RNA,送往武汉影子基因科技有限公司构建DNA文库和cDNA文库。文库质检合格后,在华大测序平台上进行全基因组甲基化测序和转录组测序(RNA-seq)。

1.2.2 产蛋高峰期和产蛋后期差异表达基因筛选 对转录组测序原始数据进行质控,使用质控后的读段(clean reads)进行下游分析。将通过质控的读段与鸭参考基因组(GenBank登录号:GCA_015476345.1)进行比对,以确定其在基因组或基因上的位置信息以及样品的特异性序列特征。使用DESeq2软件[12]R包对转录组测序数据进行分析,筛选莆田黑鸭产蛋高峰期和产蛋后期差异表达基因,并进行功能富集分析(GO分析和KEGG分析),以确定与特定生物功能相关的基因。差异基因的筛选条件为 $|\log_2FC|\geqslant 1$,错误发现率(false discovery rate,FDR)小于0.05。

1.2.3 产蛋高峰期和产蛋后期差异甲基化基因筛选 对全基因组甲基化测序原始数据进行质控,使用质控后的读段进行下游分析。对鸭参考基因组序列(GenBank登录号为:GCA_015476345.1)进行C>T和G>A转换;随后,将测序获得的每条读段同步进行相同的碱基转换操作。这种方式处理后,每个读段上会产生4种不同的比对组合,筛选出最佳比对为最终比对结果。唯一比对上的读段将用于下游甲基化信息的提取和分析,完成比对去重之后进行甲基化位点检测,计算甲基化位点的甲基化水平(对于在不同基因组区域CG、CHG和CHH中的C,统计其平均甲基化水平,平均甲基化水平=100×该区域内C位点甲基化水平累加之和/该区域甲基化C位点个数),然后对不同类型甲基化(mCG、mCHG和mCHH)中C的数量及比例进行统计。用循环二元分隔算法(circular binary segmentation algorithm)与二维KS统计检验(2D-KS test)相结合的方法,完成配对样本或组间比较的差异甲基化区域(differentially methylated region,DMR)从头预测分析。最后,对差异甲基化区域进行多重检验校正,要求每个CpG位点测序深度≥3×、CpG位点的甲基化差异≥0.1、差异甲基化CpG位点个数≥3、相邻差异甲基化CpG位点的距离≤300 bp、$P<0.05$。

1.2.4 全基因组甲基化测序与转录组测序联合分析 为了更好地了解DNA甲基化水平差异对基因表达的直接调控效应,利用韦恩图对肝脏组织中的差异甲基化基因(q-value<0.05)与差异表达基因进行联合分析,筛选既差异表达又差异甲基化的基因。

1.2.5 转录组数据的可靠性检验 为了验证转录组数据的可靠性,对3个上调基因(乙醇胺磷酸磷酸酶(ethanolamine-phosphate phospho-lyase,ETNPPL)、胆固醇酯转移蛋白(cholesteryl ester transfer protein,CETP)和胞外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶1(ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1,ENPP1)基因)和2个下调基因(尼曼-皮克病C2型(niemann-pick type C2,NPC2)和前列腺素还原酶1(prostaglandin reductase 1,PTGR1)基因)进行实时荧光定量PCR(RT-qPCR)验证,选取的内参基因为*ACTB*。根据NCBI数据库中鸭目标基因及*ACTB*内参基因的参考序列信息,利用Primer Premier 6.0和Beacon designer 7.8软件设计RT-qPCR引物(表1),所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

RT-qPCR反应体系为20 μL,基中包括Power SYBR®Green Master Mix 10 μL(Applied Biosystems,USA),ddH_2O 8.0 μL,Forward Primer 0.5 μL,Reverse Primer 0.5 μL,cDNA 1.0 μL。RT-qPCR反应条件:95 ℃ 1 min;95 ℃ 15 s,63 ℃ 25 s,40个循环,收集荧光信号;最后将反应温度从55 ℃升至95 ℃,获得熔解曲线。试验重复3次。RT-qPCR试验数据采用Excel软件进行整理,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算mRNA相对表达量。使用GraphPad Prism 9软件(GraphPad software,CA,USA)绘制结果图片。

表 1　差异表达基因 RT-qPCR 验证试验引物信息

Table 1　Primer information for RT-qPCR validation of differentially expressed genes

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	产物长度/bp Length	退火温度/℃ Tm
CETP	F:TTCAAGGCACCTCCTATAATGATTCTG,R:CTGCTACCAAGGACTTCACAACTG	54	60
*ENPP*1	F:GCTGTCGCTGGTACTTTGTG,R:ACCTTTCAAAGCATCGGCCT	76	60
ETNPPL	F:TGCCTCTGGCCTGGAGTATT,R:AAACAATCCAACGCCCCTGAT	158	60
*NPC*2	F:CTTCGTGGATTGCGGTTCCA,R:CGCCGTACACCTTTGCTTTG	121	60
*PTGR*1	F:CCAACCGTTGCAAGGAAGTG,R:TGGCAACCTGTGTGCCTATC	136	60
ACTB	F:CCAGCACGATGAAAATCAAGATCA,R:TTGTCACAAGGGTGTGGGTG	156	60

2　结果与分析

2.1　产蛋高峰期和产蛋后期莆田黑鸭肝脏差异表达基因分析

试验筛选出产蛋高峰期与产蛋后期表达存在差异的基因共 155 个，其中上调基因 105 个、下调基因 50 个，对这些基因进行聚类分析，结果如图 1 所示。进一步对 155 个差异基因进行 GO 功能注释，在生物过程（biological process，BP）、细胞组成（cellular component，CC）和分子功能（molecular function，MF）分类中分别挑选显著富集的条目绘制柱状图，结果如图 2 所示。由图 2 可知，与生物过程相关的差异表达基因主要富集在异种代谢过程、细胞对外来刺激的反应、毒素代谢过程和长链脂肪酸代谢过程等；与细胞组成相关的差异表达基因主要富集在膜的跨膜组分；与分子功能相关的差异表达基因主要富集在类固醇羟化酶活性、花生四烯酸环氧化酶活性、花生四烯酸单加氧酶活性和氧化还原酶活性，作用于供体的 CH-NH 基团。

基于 KEGG 数据库，对鉴定到的肝脏组织差异表达基因进行通路富集分析，选取 KEGG 富集结果中最显著的 20 个 KEGG 通路绘制气泡图，结果如图 3 所示。由图 3 可知，在 KEGG 富集结果中，不同产蛋阶段莆田黑鸭肝脏差异表达基因主要富集在代谢途径、细胞色素 P450 对外源物质的代谢作用、肝细胞癌和药物代谢-细胞色素 P450 等信号通路。

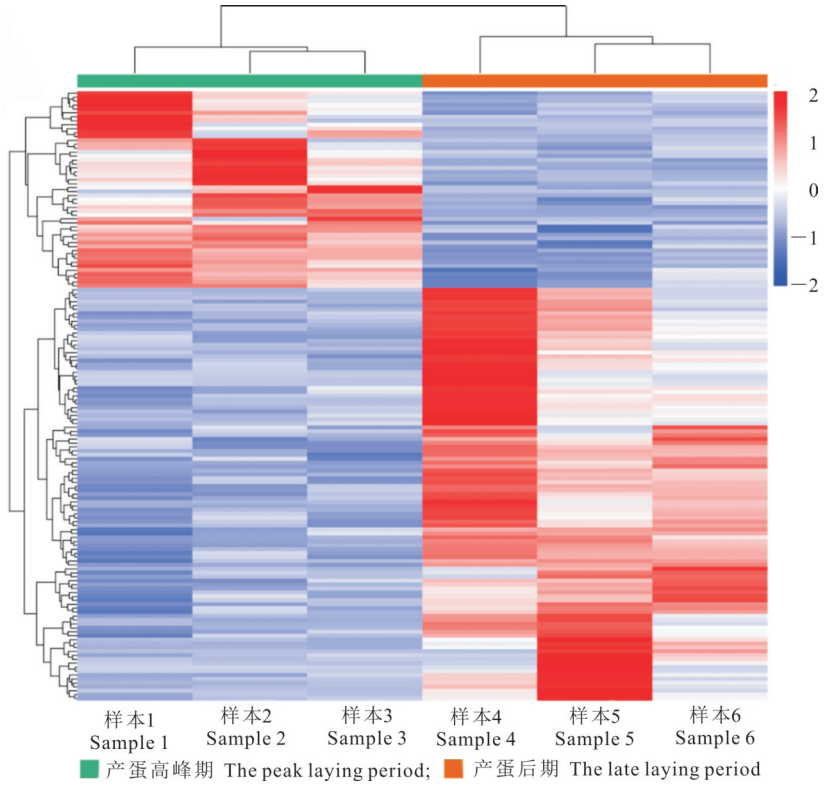
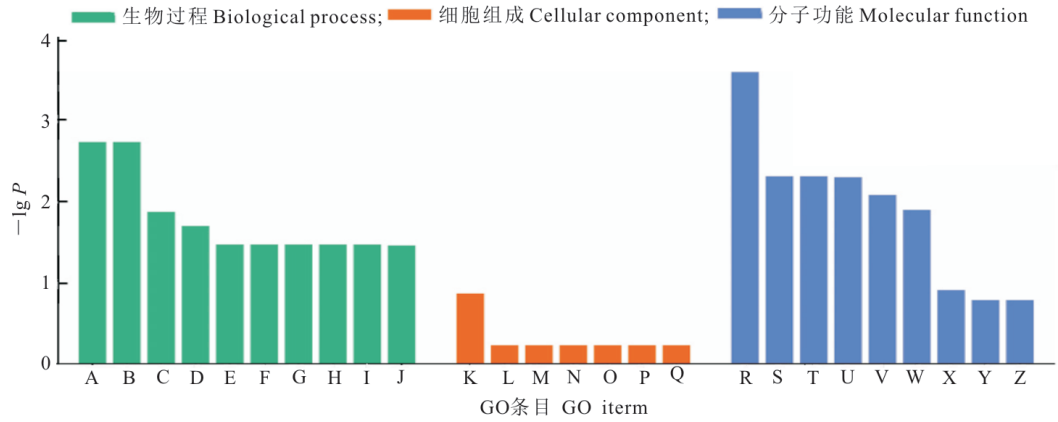


图 1　产蛋高峰期和产蛋后期莆田黑鸭肝脏差异表达基因聚类分析热图

Fig. 1　Hierarchical clustering analysis heatmap of differentially expressed genes in the liver tissue of Putian black ducks during peak and late laying periods



A. 异种代谢过程;B. 细胞对外来刺激的反应;C. 毒素代谢过程;D. 长链脂肪酸代谢过程;E. 对酒精反应;F. 环氧合酶P450通路;G. 不饱和脂肪酸代谢过程;H. 对外源性刺激的反应;I. 次级代谢过程;J. 细胞酮代谢过程;K. 膜的跨膜组分;L. 质膜跨膜组分;M. 闰盘;N. 细胞间接触区;O. 内质网向高尔基转运囊泡膜;P. 染色体内膜循环;Q. 过氧化物酶基质;R. 类固醇羟化酶活性;S. 氧化还原酶活性,作用于供体的CH-NH基团;T. 花生烯酸环氧化酶活性;U. 花生四烯酸单加氧酶活性;V. 单氧酶活性;W. 作用于配对供体,结合或减少分子氧的氧化还原酶活性;X. 修饰氨基酸结合;Y. 作用于供体的CH-NH基团,NAD或NADP作为受体的氧化还原酶活性;Z. 作用于CH或CH_2基团的氧化还原酶活性。

A. Xenobiotic metabolic process;B. Cellular response to xenobiotic stimulus;C. Toxin metabolic process;D. Long-chain fatty acid metabolic process;E. Response to alcohol;F. Epoxygenase P450 pathway;G. Unsaturated fatty acid metabolic process;H. Response to xenobiotic stimulus;I. Secondary metabolic process;J. Cellular ketone metabolic process;K. Spanning component of membrane;L. Spanning component of plasma membrane;M. Intercalated disc;N. Cell-cell contact zone;O. ER to Golgi transport vesicle membrane;P. Recycling endosome membrane;Q. Peroxisomal matrix;R. Steroid hydroxylase activity;S. Oxidoreductase activity, acting on the CH-NH group of donors;T. Arachidonic acid epoxygenase activity;U. Arachidonic acid monooxygenase activity;V. Monoo xygenase activity;W. Oidoreductase activity,acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen;X. Modified amino acid binding;Y. Oxidoreductase activity,acting on the CH-NH group of donors,NAD or NADP as acceptor;Z. Oxidoreductase activity,acting on CH or CH_2 groups.

图2 产蛋高峰期和产蛋后期莆田黑鸭肝脏差异表达基因GO分析

Fig. 2 GO analysis of the liver tisse of Putian black ducks during the peak and late laying periods

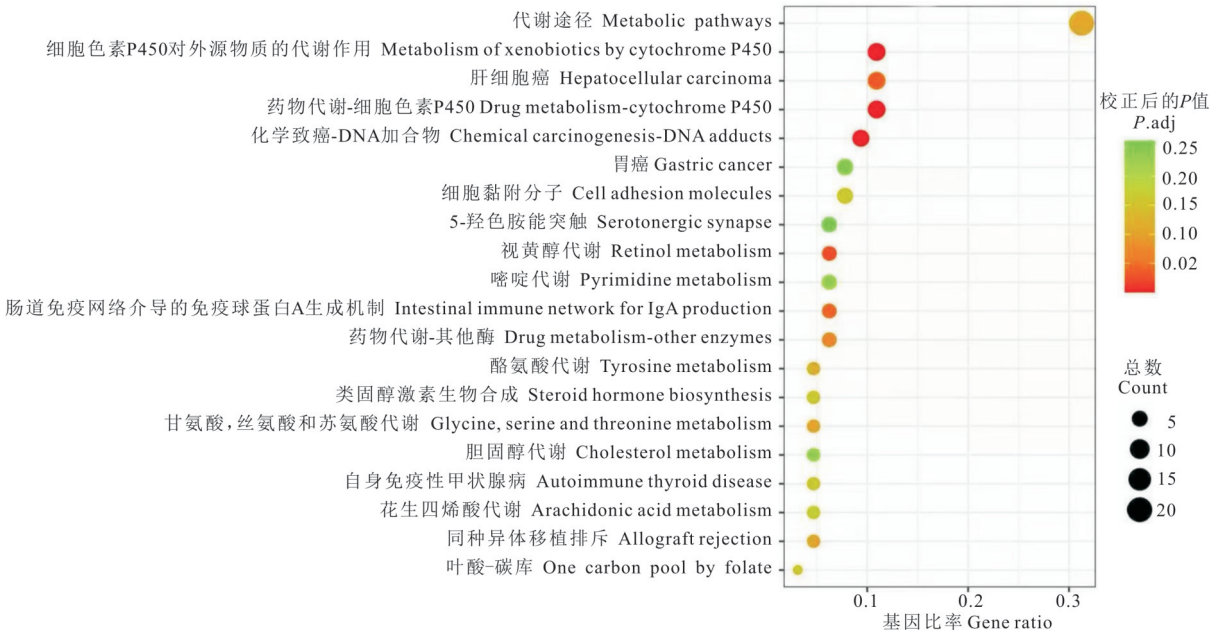


图3 产蛋高峰期和产蛋后期莆田黑鸭肝脏差异表达基因KEGG分析

Fig. 3 KEGG analysis of the liver tissue of Putian black ducks during the peak and late laying periods

结合GO、KEGG富集分析结果及目前禽类产蛋相关基因的研究成果[13-17],筛选出*CETP*、*ENPP1*、*ETNPPL*、*NPC2*、*PTGR1*等5个脂质代谢相关基因。

2.2 产蛋高峰期和产蛋后期莆田黑鸭全基因组差异甲基化基因分析

试验结果显示,产蛋高峰期莆田黑鸭肝脏的全基因组平均甲基化率为4.88%,产蛋后期为4.33%。

在 3 种 DNA 甲基化模式（mCG、mCHG、mCHH）中，mCG 为莆田黑鸭肝脏组织中最主要的甲基化类型，其甲基化水平明显高于 mCHG 和 mCHH 模式。具体而言，产蛋高峰期莆田黑鸭肝脏全基因组的 mCG 甲基化率为 89.91%，产蛋后期为 91.37%；而基因组不同区域 mCHG 和 mCHH 模式的甲基化率均处于较低水平，表明这 2 种甲基化模式在莆田黑鸭肝脏组织基因组甲基化中的参与度相对有限。

统计基因组不同区域的甲基化水平，结果（表 2）表明，产蛋高峰期和产蛋后期莆田黑鸭所有序列环境（CG、CHG、CHH）在外显子区域均具有较高的 DNA 甲基化水平。在 CG 序列环境下，外显子区甲基化水平最高，其次是内含子区和基因区间，启动子区域的 DNA 甲基化水平最低。在 CHG 和 CHH 序列环境下，基因组各功能区域的甲基化水平均较低。

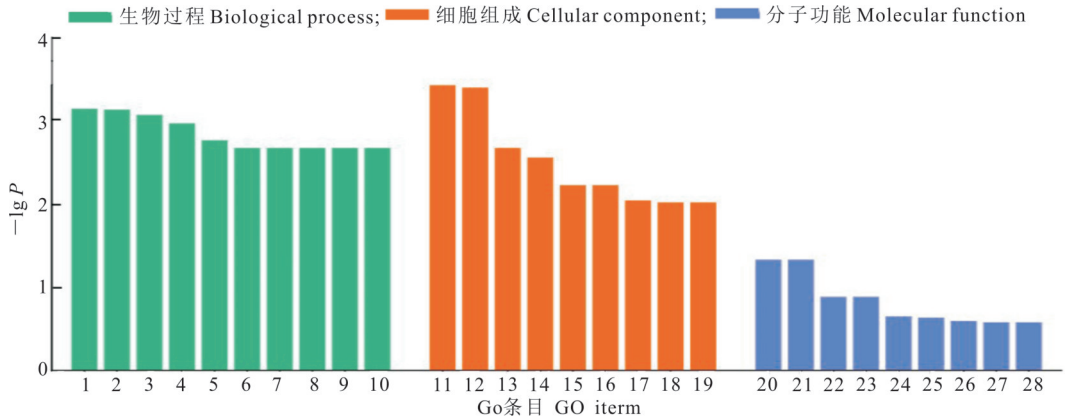
表 2　产蛋高峰期和产蛋后期莆田黑鸭肝脏全基因组的甲基化水平

Table 2　Liver methylation levels of whole genome of Putian black ducks in peak laying period and late laying period　%

区域 Region	产蛋高峰期 The peak laying period				产蛋后期 The late laying period			
	C	mCG	mCHG	mCHH	C	mCG	mCHG	mCHH
基因 Gene	9.32	67.41	0.69	0.64	8.52	64.41	0.53	0.49
外显子 Exon	13.83	72.73	0.81	0.71	12.83	69.97	0.52	0.49
内含子 Intron	8.60	69.76	0.93	0.72	8.00	66.92	0.68	0.53
基因区间 Intergenic	9.30	67.59	0.69	0.64	8.55	64.56	0.52	0.49
启动子 Promoter	10.46	59.71	0.52	0.54	8.84	50.48	0.36	0.51
5′非编码区 5′ UTR	9.83	62.78	0.90	0.65	8.45	55.24	0.51	0.41
3′非编码区 3′ UTR	9.83	62.78	0.90	0.65	8.45	55.24	0.51	0.41

通过 CpG 位点分析鉴定 DMR，得到的高 DMR 有 12 014 个，低 DMR 有 4 686 个，共 16 700 个；根据基因组信息注释文件，在 16 700 个 DMR 中，得到了 282 个差异甲基化基因，其中 197 个基因在产蛋高峰期呈高甲基化状态，85 个基因呈低甲基化状态。

对差异甲基化基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。对富集到的不同类别的 GO 条目进行统计，挑选富集显著的 28 个 GO 条目绘制柱状图，结果见图 4。



1. mRNA 运输；2. mRNA 从细胞核输出；3. 蛋白质脱脂；4. 核糖核蛋白复合体定位；5. RNA 从细胞核输出；6. 蛋白从细胞核输出；7. 核酸转运；8. RNA 转运；9. RNA 定位的建立；10. C 端蛋白质脂化；11. 核黏连蛋白复合物；12. 黏连蛋白复合体；13. 侧向元件；14. 雄性生殖细胞核；15. 环形片层；16. 核孔核篮；17. 核包涵体；18. 联会复合体；19. 联会结构；20. SUMO 转移酶活性；21. 半胱氨酸型肽酶活性；22. 组蛋白绑定；23. 调控 RNA 结合；24. 配体门控钠通道活性；25. 半胱氨酸型内肽酶活性；26. 钠离子通道活性；27. 赖氨酸-乙酰化组蛋白结合；28. 乙酰化依赖性蛋白结合。

1. mRNA transport; 2. mRNA export from nucleus; 3. Protein delipidation; 4. Ribonucleoprotein complex localization; 5. RNA export from nucleus; 6. Protein export from nucleus; 7. Nucleic acid transport; 8. RNA transport; 9. REstablishment of RNA localization; 10. C-terminal protein lipidation; 11. Nuclear cohesin complex; 12. Cohesin complex; 13. Lateral element; 14. Male germ cell nucleus; 15. Annulate lamellae; 16. Nuclear pore nuclear basket; 17. Nuclear inclusion body; 18. Synaptonemal complex; 19. Synaptonemal structure; 20. SUMO transferase activity; 21. Cysteine-type peptidase activity; 22. Histone binding; 23. Regulatory RNAbinding; 24. Ligand-gated sodium channel activity; 25. Cysteine-type endopeptidase activity; 26. Sodium channel activity; 27. Lysine-acetylated histone binding; 28. Acetylation-dependent protein binding.

图 4　产蛋高峰期和产蛋后期莆田黑鸭全基因组差异甲基化基因 GO 分析

Fig. 4　GO analysis of whole genome differentially methylated genes in Putian black ducks during the peak and late laying periods

图4显示,产蛋后期相较于产蛋高峰期,与生物过程相关的差异甲基化基因主要集中在mRNA运输、mRNA从细胞核输出、核糖核蛋白复合体定位、RNA从细胞核输出、蛋白从细胞核输出、RNA定位的建立等;与细胞组成相关的差异甲基化基因主要集中在核黏连蛋白复合物、黏连蛋白复合体、侧向元件、雄性生殖细胞核等;与分子功能相关的差异甲基化基因主要集中在SUMO转移酶活性、半胱氨酸型肽酶活性和组蛋白绑定等。KEGG分析按照富集到各个通路上基因数目从大到小排序,选取富集基因较多的前20个通路绘制气泡图,结果(图5)显示,产蛋后期相较于产蛋高峰期的差异甲基化基因主要集中在嗅觉传导和自噬-其他等信号通路上。

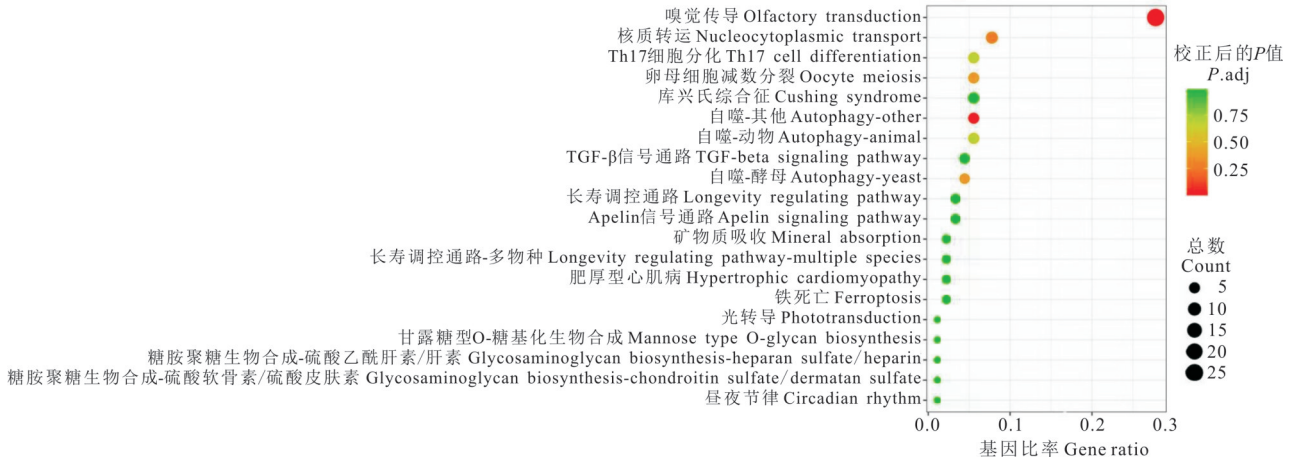


图5 产蛋高峰期和产蛋后期莆田黑鸭全基因组差异甲基化基因KEGG分析

Fig. 5 KEGG analysis of whole genome differentially methylated genes in Putian black ducks during the peak and late laying periods

2.3 莆田黑鸭肝脏全基因组甲基化测序与转录组测序联合分析

为了更好地了解DNA甲基化水平差异对基因表达的直接调控效应,研究针对肝脏组织中的差异甲基化基因(q-value<0.05)与差异表达基因进行联合关联分析。结果显示,在远端基因间区鉴定出2个既差异表达又差异甲基化的基因,分别是LOC113840537和LOC119715140(基因ID),这2个基因的甲基化水平呈下调趋势,而其转录表达则呈上调趋势,提示二者的DNA甲基化与基因表达呈负相关关系,推测其甲基化修饰可能通过反向调控模式参与基因转录过程的调控。

2.4 转录组测序结果的RT-qPCR验证

为了验证转录组测序数据的可靠性,本试验从差异表达的mRNA中挑选了与脂质代谢相关的5个基因(上调表达*ETNPPL*、*CETP*、*ENPP1*,下调表达*NPC2*、*PTGR1*)进行RT-qPCR验证。结果(图6)显示,*ETNPPL*、*CETP*、*ENPP1*、*NPC2*和*PTGR1*基因的表达趋势均与转录组测序结果一致。

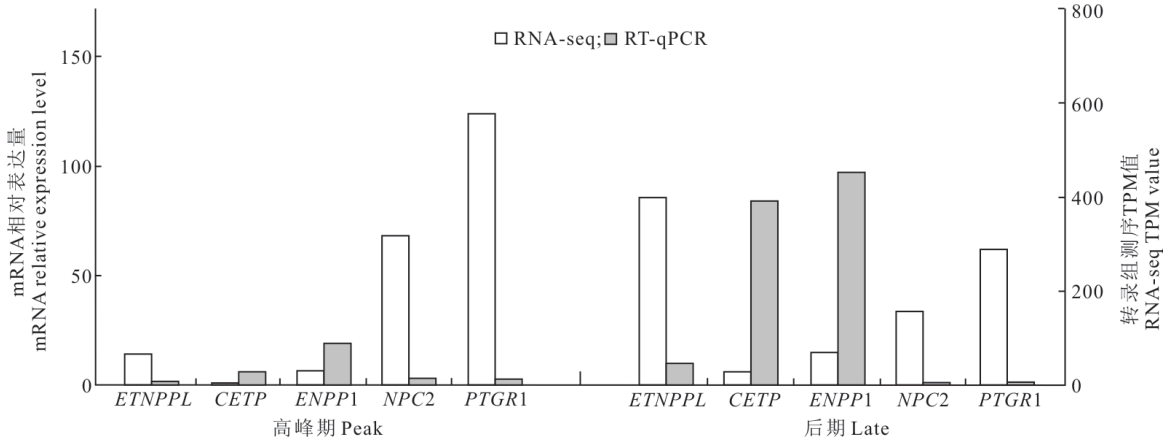


图6 产蛋高峰期和产蛋后期莆田黑鸭肝脏差异表达基因RT-qPCR验证

Fig. 6 RT-qPCR validation of DEGs in the liver of Putian black ducks during the peak and late laying periods

3　讨　论

蛋品质量是家禽生产中重要的经济性状，受到多种因素的综合影响。肝脏作为物质代谢的关键器官，在蛋的形成过程中发挥着重要作用，目前针对莆田黑鸭肝脏调控产蛋性状的研究较为匮乏。本研究以莆田黑鸭为研究对象，通过转录组测序和全基因组甲基化测序联合分析，探究肝脏组织对产蛋性状的影响。

通过转录组测序，在转录组范围内对产蛋高峰期和产蛋后期肝脏组织基因表达进行比较，发现差异表达基因主要富集在代谢途径、细胞色素P450对外源物质的代谢作用以及药物代谢-细胞色素P450等信号通路，这提示产蛋高峰期莆田黑鸭肝脏的代谢活动增强，尤其是对外源物质的代谢和解毒能力增强[18]。

脂质代谢是影响家禽产蛋性能的重要生理过程，肝脏作为脂质合成与转运的中心，通过调控卵黄特异性极低密度脂蛋白（VLDL）的组装、分泌及蛋黄前体物质的合成，影响家禽的产蛋性能[19]。本研究GO、KEGG富集分析结果发现，CETP、ENPP1、ETNPPL、NPC2和PTGR1在长链脂肪酸代谢、不饱和脂肪酸代谢、类固醇羟化酶活性、花生烯酸环氧化酶活性等生物学过程中富集，但其在脂质代谢过程中的作用机制和调控方式不同。CETP是一类存在于血液中的疏水性蛋白质，主要负责在不同脂蛋白颗粒间转运胆固醇酯与甘油三酯，能够与脂多糖相结合，调节脂肪转运，是高密度脂蛋白（high-density lipoprotein，HDL）的关键调控因子[20]。CETP的主要功能之一是将胆固醇酯从HDL转移至低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白，推动胆固醇的合成，在维持体内胆固醇平衡方面发挥着重要作用[21]。ENPP1是一种多功能跨膜糖蛋白，在肝脏、脂肪组织等器官中参与脂质合成、分解及转运，其功能异常会引起脂质代谢紊乱[22]。ETNPPL是一种磷酸乙醇胺（p-ETN）降解酶，p-ETN是磷脂酰乙醇胺（PE）生物合成Kennedy途径的中间体[23]，PE是哺乳动物细胞膜中含量第二高的磷脂。ETNPPL通过SIK1-ROS抑制PI3K/AKT信号通路活性，介导高胰岛素血症引起的人肝细胞胰岛素抵抗。NPC2是一种与胆固醇代谢和运输密切相关的蛋白质，主要在溶酶体中发挥作用[24-25]。PTGR1是一种烯醛/一氧化还原酶，主要参与类花生酸的分解代谢和脂质过氧化[26]。

DNA甲基化是影响肝脏脂质代谢的重要表观遗传修饰，对基因表达水平具有重要的调控作用[27]。有研究发现，动物组织的DNA甲基化是一个动态变化的过程[2]，但鸭DNA甲基化的相关研究仍鲜见报道。本研究对莆田黑鸭产蛋高峰期和产蛋后期的肝脏组织进行全基因组甲基化测序，分析DNA甲基化位点的分布特征，结果显示莆田黑鸭肝脏组织中有282个差异甲基化基因，其中197个基因在产蛋高峰期呈高甲基化状态，85个基因呈低甲基化状态。GO富集分析表明，DMR相关基因主要参与了mRNA运输、核酸转运、RNA转运等生物过程。在肝脏中，这些条目中差异显著的基因包括低密度脂蛋白受体相关蛋白1（low-density lipoprotein receptor related protein 1，LRP1），其属于低密度脂蛋白受体（low-density lipoprotein receptor，LDLR）家族的重要成员，是一种具有多重功能的细胞膜表面蛋白，在机体脂质代谢调控、细胞信号转导以及多种病理生理过程的演进中扮演着关键角色[28-29]。KEGG富集分析表明，DMR相关基因主要在嗅觉传导和自噬等信号通路中富集，这提示甲基化变化可能通过调控这些关键生物过程和信号通路，影响莆田黑鸭的产蛋性能和代谢调控，而自噬通路的富集或与产蛋高峰期高代谢压力下的细胞自我修复及能量稳态维持有关[30]。

本研究从莆田黑鸭肝脏组织中筛选出2个核心候选基因LOC113840537和LOC119715140，二者均表现为基因表达上调，而甲基化水平下调的遗传调控特征。截至目前，这2个基因在鸭肝脏组织中的遗传调控功能及分子机制尚未见报道，还需要进一步深入研究。

[参考文献]

[1] LI Y L，XU Y J，LIU T X，et al. The regulation mechanisms and the Lamarckian inheritance property of DNA methylation in animals [J]. Mammalian Genome，2021，32(3)：135-152.

[2] YANG Y L，FAN X H，YAN J Y，et al. A comprehensive epigenome atlas reveals DNA methylation regulating skeletal muscle development [J]. Nucleic Acids Research，2021，49(3)：1313-1329.

[3] LISTER R，PELIZZOLA M，DOWEN R H，et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences [J]. Nature，2009，462(7271)：315-322.

[4] 严丹. 转录组测序鉴定鸭肌肉生长性状的功能基因及关键基因MYOZ2的功能验证[D]. 江苏扬州：扬州大学，2022.
YAN D. Transcriptome sequencing identifies functional genes

of duck muscle growth traitsand and verify the function of MYOZ2[D]. Yangzhou, Jiangsu: Yangzhou University, 2022.

[5] 石磊,瞿华,郑宏庭,等. 肝脏糖脂代谢研究的趋势变化分析与展望[J]. 生理学报,2021,73(5):781-794.
SHI L, QU H, ZHENG H T, et al. Developmental trend analysis and perspectives on researches related to hepatic glucose and lipid metabolism[J]. Acta Physiologica Sinica, 2021, 73(5): 781-794.

[6] RAJAS F, GAUTIER-STEIN A, MITHIEUX G, et al. Glucose-6 phosphate, a central hub for liver carbohydrate metabolism[J]. Metabolites, 2019, 9(12): 282.

[7] 王来娣. 亚麻油调控鸭肝脏和胸肌多不饱和脂肪酸合成及代谢研究[D]. 江苏扬州:扬州大学,2022.
WANG L D. Research on linseed oil regulating synthesis and metabolism of polyunsaturated fatty acids in livers and breast muscles of ducks[D]. Yangzhou, Jiangsu: Yangzhou University, 2022.

[8] 王钟翊. 纳米硒对肉鸭日粮中黄曲霉毒素B1解毒效果的研究[D]. 重庆:西南大学,2009.
WANG Z Y. Effect of nano-selenium on dietary aflatoxin B1 detoxification in meat ducks[D]. Chongqing: Southwest University, 2009.

[9] PIOCHE T, SKIBA F, BERNADET M D, et al. Kinetic study of the expression of genes related to hepatic steatosis, glucose and lipid metabolism, and cellular stress during overfeeding in mule ducks[J]. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2020, 318(2): R453-R467.

[10] ZHANG Y, ZHANG A, WANG L D, et al. Metabolomics and proteomics characterizing hepatic reactions to dietary linseed oil in duck[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(24): 15690.

[11] MASSIMINO W, DAVAIL S, SECULA A, et al. Ontogeny of hepatic metabolism in mule ducks highlights different gene expression profiles between carbohydrate and lipid metabolic pathways[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 742.

[12] GILL N, DHILLON B. RNA-seq data analysis for differential expression[J]. Methods in Molecular Biology, 2022, 2391: 45-54.

[13] SATO K, OHUCHI A, SATO T, et al. Molecular characterization and expression of the cholesteryl ester transfer protein gene in chickens[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 148(2): 117-123.

[14] WANG Z, WANG D D, JIANG K R, et al. A comprehensive proteome and acetyl-proteome atlas reveals molecular mechanisms adapting to the physiological changes from pre-laying to peak-laying stage in liver of hens (*Gallus gallus*)[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 8: 700669.

[15] REN J X, TIAN W H, JIANG K R, et al. Global investigation of estrogen-responsive genes regulating lipid metabolism in the liver of laying hens[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 428.

[16] YU R H, WEI S, AMEVOR F K, et al. Niemann-Pick C2 regulates steroid hormone secretion and lipid deposition in chicken follicular granulosa cells[J]. Poultry Science, 2025, 104(8): 105340.

[17] MIAO X M, LIU J, GONG Q, et al. Transcriptomic and metabolomic analysis of the uterine tissue of Yaoshan chicken and its crossbreeds to reveal the molecular mechanism influencing eggshell quality[J]. Genes, 2025, 16(4): 383.

[18] 刘凡琪,李楠,王凤颖,等. 细胞色素P450酶介导的中药注射剂代谢性相互作用研究现状及思考[J]. 药物评价研究,2023,46(5):1116-1124.
LIU F Q, LI N, WANG F Y, et al. Research status and consideration on metabolic interaction of traditional Chinese medicine injection mediated by CYP450 enzyme[J]. Drug Evaluation Research, 2023, 46(5): 1116-1124.

[19] KAZEMIFARD M, REZAEI M, KARDEL A A, et al. Effect of monosodium glutamate supplementation in diet on fatty acid profiles, genes expression related to lipid metabolism and egg yolk cholesterol in late phase of production in laying hens[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2024, 108(5): 1578-1587.

[20] 张梦琦. 猪血脂性状与胴体品质候选基因表达、多态检测及其相关性分析[D]. 合肥:安徽农业大学,2016.
ZHANG M Q. The detection of polymorphisms and expression of the candidate genes for porcine serum lipids traits and their correlations with carcass and meat quality traits in pigs[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2016.

[21] 刘桂芬,王爱国,傅金恋. 猪CETP基因表达变化及其对胆固醇合成的影响研究[J]. 中国畜牧杂志,2008,44(19):12-15.
LIU G F, WANG A G, FU J L. The expression profiling and its effect on cholesterol synthesis of CETP gene in swine[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2008, 44(19): 12-15.

[22] LIU X H, CHEN S, LIU X, et al. Enpp1 ameliorates MAFLD by regulating hepatocyte lipid metabolism through the AMPK/PPARα signaling pathway[J]. Cell & Bioscience, 2025, 15(1): 22.

[23] A ELMIHI K, LEONARD K A, NELSON R, et al. The emerging role of ethanolamine phosphate phospholyase in regulating hepatic phosphatidylethanolamine and plasma lipoprotein metabolism in mice[J]. The FASEB Journal, 2024, 38(18): e70063.

[24] 党永龙. 四个中国黄牛品种NPC1与NPC2基因遗传变异及其表达规律研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2015.
DANG Y L. Genetic variation and expression pattern of NPC1 & NPC2 genes in four Chinese cattle breeds[D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2015.

[25] XU Y N, ZHANG Q, TAN L, et al. The characteristics and biological significance of NPC2: Mutation and disease[J]. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2019, 782: 108284.

(下转第150页)