网络出版时间:2026-04-08 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.10.001

基于全基因组DNA甲基化的蒙古系绵羊尾脂沉积差异分析

徐煜,杨飏,张悦,韦应实,牛瑞来,侯倩茹,朱才业
(甘肃农业大学 动物科学技术学院,甘肃 兰州 730070)

[摘 要] 【目的】从表观遗传层面解析湖羊与乌珠穆沁羊两品种蒙古系绵羊尾脂沉积差异的分子机制,为绵羊肉质改良及品种选育提供理论依据。【方法】以(12±1)月龄健康母羊为研究对象,其中湖羊(H组)来源于甘肃省兰州市临夏县桥寺乡,乌珠穆沁羊(W组)来源于内蒙古自治区锡林郭勒盟白音锡勒牧场,每组采集颈部新鲜血液样本,经液氮速冻保存;采用全基因组亚硫酸氢盐测序(WGBS)技术对样本进行分析,最后采用甲基化特异性PCR(MSP)技术,对筛选出的*ITSN1*、*NCEH1*和*CRTC3*等关键基因的甲基化差异进行验证。【结果】测序数据质量优异,其中Q20、Q30均值分别为98.25%和95.01%,唯一比对率>83%,lambda DNA转化率>99.2%;CpG位点甲基化水平显著高于CHG和CHH,符合哺乳动物甲基化特征。共鉴定出大量差异甲基化区域(DMRs),其中CpG类型DMRs数量差异显著,且主要分布于远端基因间区(64.97%)和内含子区域(30.84%)。DMR关联基因富集于脂质代谢、细胞黏附及信号转导相关通路,如细胞外基质-受体相互作用(ECM-receptor interaction)、黏着斑(focal adhesion)。PPI网络分析筛选出脂质分解代谢核心基因,包括磷脂酶家族基因(*PLCH1*、*PLCE1*、*PLCG2*、*PLCB4*和*PLCL2*)、信号转导相关基因(*ITSN2*和*ITSN1*)、代谢酶类基因(*PAFAH1B1*)、受体蛋白基因(*LRP5*)及信号通路调控基因(*FRZB*)等核心调控基因。MSP验证证实*ITSN1*、*NCEH1*和*CRTC3*基因的甲基化差异与测序结果一致。【结论】揭示了两品种蒙古系绵羊尾部脂肪沉积差异的表观遗传特征,结果可用于绵羊肉质改良及品种选育。

[关键词] 蒙古系绵羊;脂肪沉积;全基因组亚硫酸氢盐测序;甲基化特异性PCR;DNA甲基化;表观遗传调控
[中图分类号] S826.82 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)10-0001-11

Analysis of tail fat deposition differences in Mongolian sheep based on whole genome DNA methylation

XU Yu, YANG Yang, ZHANG Yue, WEI Yingshi, NIU Ruilai,
HOU Qianruo, ZHU Caiye
(*College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu* 730070, *China*)

Abstract: 【Objective】 This research aims to analyze the molecular mechanism of tail fat deposition difference between Hu sheep and Ujimqin sheep from an epigenetic perspective, to provide a theoretical basis for sheep meat quality improvement and breed selection. 【Method】 Healthy ewes aged (12±1) months were selected as the research subjects, including Hu sheep (H group) sourced from Qiaosi Township, Linxia County, Lanzhou City, Gansu Province, and Ujimqin sheep (W group) sourced from Baiyin Xile Ranch, Xilingol League, Inner Mongolia Autonomous Region. Fresh blood samples were collected from the neck of the sheep in each group and rapidly frozen in liquid nitrogen for storage. The samples were analyzed using whole genome bi-

[收稿日期] 2025-09-19 [修回日期] 2026-01-20
[基金项目] 国家自然科学基金项目(32460825);甘肃省高校青年博士支持项目(2025QB-047)
[作者简介] 徐煜(1999—),男,宁夏惠农人,在读硕士,主要从事绵羊尾脂沉积研究。E-mail:1261877571@qq.com
[通信作者] 朱才业(1986—),男,甘肃民乐人,副教授,博士,硕士生导师,主要从事基于多组学技术和分子数量遗传学解析绵羊重要功能经济性状形成机制研究。E-mail:zhucy@gsau.edu.cn

sulfite sequencing (WGBS) technology. And methylation specific PCR (MSP) technology was used to verify the methylation differences of key genes selected including *ITSN1*, *NCEH1*, and *CRTC3*.【Result】The sequencing data showed high quality, with a mean value of Q20 and Q30 being 98.25% and 95.01%, respectively, a unique alignment rate>83%, and lambda DNA conversion rate>99.2%. The methylation level of CpG sites was significantly higher than those of CHG and CHH, which was consistent with mammalian methylation characteristics. A large number of differentially methylated regions (DMRs) were identified, among which CpG-type DMRs showed significant differences in quantity and were mainly distributed in the distal intergenic region (64.97%) and intronic region (30.84%). DMR-related genes were enriched in pathways related to lipid metabolism, cell adhesion, and signal transduction, including extracellular matrix receptor interaction (ECM receptor interaction) and focal adhesion. PPI network analysis identified core regulatory genes for lipid breakdown metabolism, including phospholipase family genes (*PLCH1*, *PLCE1*, *PLCG2*, *PLCB4*, and *PLCL2*), genes related to signal transduction (*ITSN2* and *ITSN1*), metabolic enzyme genes (*PAFAH1B1*), receptor protein genes (*LRP5*), and signal pathway regulatory genes (*FRZB*). MSP validation confirmed that the methylation differences of *ITSN1*, *NCEH1*, and *CRTC3* genes were consistent with the sequencing results.【Conclusion】The epigenetic characteristics of the differences in tail fat deposition between two breeds were revealed, which can be used for sheep meat quality improvement and variety breeding.

Key words: Mongolian sheep; fat deposition; whole genome bisulfite sequencing; methylation specific PCR; DNA methylation; epigenetic regulation

脂肪沉积是哺乳动物重要的生物学性状,直接影响畜禽肉质品质与能量代谢平衡。脂肪组织对反刍家畜肉品质产生影响,不同绵羊品种脂肪沉积能力差异显著[1]。湖羊作为我国南方重要肉用绵羊品种,也属于蒙古系绵羊,具有生长快、繁殖力强等特点,其肉中灰分含量、脂肪含量高于同属蒙古系绵羊的乌珠穆沁羊($P<0.01$)[2]。乌珠穆沁羊以耐粗饲、肉质紧实闻名,肌纤维类型以Ⅰ型和Ⅱa型为主,这类肌纤维代谢效率高、脂肪含量低,是其低脂高蛋白特性的重要成因[3]。兰州大学王维民教授团队研究发现,尾脂组织特异性启动子和增强子与脂肪沉积相关,并通过多维组学策略定位了影响尾脂重的因果变异[4]。湖羊与乌珠穆沁羊之间的显著表型差异为解析哺乳动物脂肪沉积的表观遗传机制提供了理想模型。

在哺乳动物体内,DNA甲基化大多发生于胞嘧啶(C)与鸟嘌呤(G)通过磷酸二酯键连接形成的CpG序列中[5]。DNA甲基化动态变化受性别、年龄和环境等多种因素调控,并可通过DNA复制传递给下一代,在生长发育、基因组印迹等诸多生物过程中发挥重要作用[6]。近年来,DNA甲基化对脂肪代谢的调控机制逐渐成为研究焦点。在绵羊上,研究发现其尾脂组织的甲基化程度明显高于肌肉组织[7],差异甲基化区域(DMRs)的功能多与脂肪代谢过程及肉质特性密切相关[8]。在以鸡为模型的研究中,研究团队结合全基因组亚硫酸氢盐测序(WGBS)与RNA测序(RNA-seq)技术展开联合分析,发现*EBF1*基因的甲基化水平与其表达量呈负相关,*EBF1*基因通过*PPARγ*通路对脂肪细胞的分化产生影响,同时研究还证实了甲基化抑制剂(如5-氮杂胞苷)具有促进脂肪生成的作用[9]。针对绵羊品种的研究中,通过戴瑞羊(DairyMeade)和蒙古绵羊的肌肉与尾部脂肪组织全基因组DNA甲基化模式分析,从表观遗传学角度揭示了不同品种在脂肪沉积和肌肉发育等性状上的差异机制[7]。这些研究均揭示了甲基化在脂肪代谢中所发挥的作用,为绵羊等家畜的相关研究提供了机制上的参考。

有研究采用高脂饮食诱导构建肥胖小鼠模型,结果显示,当棕色脂肪组织(BAT)中甲基转移酶METTL14缺失时,会导致m^6A甲基化水平下降,进而促进前列腺素PGE2和PGF2α的合成,这两种前列腺素可通过血液循环作用于肝脏与肌肉,能显著提升胰岛素敏感性;同时发现,血液中PGE2和PGF2α的水平与脂肪组织的甲基化状态存在显著正相关[10]。另有研究团队以猪为模型,构建了跨物种(人-猪)的表观遗传时钟,研究发现血液中与脂肪代谢相关的甲基化位点(如ADCY3、TFAP2B)在肥胖猪体内呈现显著的低甲基化状态,这些位点与人类肥胖的GWAS位点高度重合,且血液中的低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和胆固醇水平与脂肪组

织中*HMGCR*基因的甲基化状态呈负相关。在大型动物研究中证实，血液甲基化可作为反映脂肪组织代谢状态的生物标志物[11]。上述研究均表明，血液样本与脂肪组织的甲基化状态存在相关性。

本研究选取湖羊与乌珠穆沁羊作为对象，运用全基因组DNA甲基化测序技术，解析两者在脂肪沉积方面存在差异的表观遗传机制，为阐明DNA甲基化在绵羊脂肪沉积调控中的作用路径，以及绵羊品种改良及肉质提升提供理论支持。

1　材料与方法

1.1　动物和样本采集

所有试验均按照国家试验动物福利指导（《关于善待实验动物的指导性意见》（发文字号：国科发财字〔2006〕398号））进行，并获得甘肃农业大学伦理委员会批准（GSAU-Eth-ASF-2022-010）。

本次试验所采用无疾病的湖羊（H组，（12±1）月龄，母羊），由甘肃省兰州市临夏县桥寺乡（临夏州陇昇源农牧科技有限责任公司）提供，无疾病的乌珠穆沁羊（W组，（12±1）月龄，母羊）由内蒙古自治区锡林郭勒盟白音锡勒牧场提供。从供试羊颈静脉抽取新鲜血液，置于EDTA静脉真空采血管中，迅速放入液氮瓶中保存。使用天根血液基因组DNA提取试剂盒（DP348，购自北京天根生化科技有限公司），从个体的血液样本中提取基因组DNA，随后通过超微量分光光度计和凝胶电泳检测，合格后备用。

1.2　DNA文库构建及测序数据质控

使用SDS法提取血液DNA，具体步骤参照QAMAR等[12]的方法。机械打断、Bisulfite处理、加接头、PCR扩增处理步骤参照LI等[13]的方法。高通量测序得到的原始图像数据文件经CASAVA碱基识别（base calling）分析转化为测序读段（sequenced reads），原始数据（raw data）结果以FASTQ文件格式存储（测序结果数据由武汉贝纳科技有限公司提供）。

原始测序数据经CASAVA处理生成FASTQ文件，使用fastp v0.23.2（参数：-q 20和-l 36）过滤低质量序列及接头，保留平均质量值≥20且长度≥36 bp的clean reads。通过FastQC v0.11.2（默认参数）可视化评估碱基质量、接头污染等指标。

质量参数：Q20/Q30分别为错误率≤1%/0.1%的碱基占比，原始测序碱基的ASCII字符值经Phred 33编码体系转换（字符值－33）后，筛选质量值≥Q20或≥Q30的高质量碱基用于后续分析；N50为累计长度达总长度50%时的最短序列长度。

序列比对与转化率分析：采用Bismark v0.23.1（底层Bowtie2，参数：－q-X 500 -p 8-N 1 - non_directional）进行甲基化序列比对，经deduplicate_bismark-paired去除PCR重复。比对前将基因组与reads进行C→T/G→A转换，通过四向比对选择最优结果。

比对率计算：唯一比对率＝唯一比对reads数/clean reads数×100%；总比对率＝总比对reads数/clean reads数×100%。转化率，以lambda DNA为阴性对照，计算未转换为T的C占总C比例。

覆盖度分析：基于Bismark比对结果，统计参考基因组碱基覆盖情况，覆盖度为被1条read覆盖的碱基数占基因组总碱基数的比例。覆盖深度：单个碱基平均覆盖reads数，通过均匀选取的100 000个位点，绘制密度图及逆累积分布曲线评估测序深度分布，以染色体覆盖深度图可视化覆盖均匀性。

1.3　甲基化水平估计和区域甲基化分布

采用Bismark v0.23.1（参数：-no_overlap-cutoff 5）进行甲基化位点检测。基于Bisulfite转换原理，比对参考基因组的C位点，若为C则判定为甲基化，若为T则判定为非甲基化，过滤低深度及偏倚位点以保证准确性。

通过Bismark v0.23.1检测结果计算甲基化水平（ML）。ML＝mC＋umC×mC，其中，mC为支持甲基化C的reads数，umC为支持非甲基化C（转换为T）的reads数，按序列环境（CpG、CHG和CHH）分类统计。

全基因组甲基化水平分析。利用Bismark v0.23.1检测数据，将染色体划分为特定大小窗口，计算窗口内平均甲基化水平（位点甲基化均值）和甲基化密度（甲基化位点/总位点）。采用circlize R包绘制圈图，外层展示染色体，内层映射基因密度与甲基化密度，可视化全基因组分布。

不同注释区域甲基化分析采用TaJoCGI注释CpG岛、RepeatMasker注释重复序列，通过deeptools v3.5.1将注释区域及其上下游2 kb划分为50个窗口，统计各窗口平均甲基化水平，比较基因区、CpG岛及重复序列的甲基化差异。

不同基因区域甲基化均值分析：基于参考基因组注释，将基因功能区域（启动子区域Promoter 0～

2 kb、外显子exon、内含子intron等)标准化为2 kb,利用deeptools v3.5.1分50个窗口统计甲基化均值,分析启动子、外显子等区域的甲基化模式差异。

1.4 差异甲基化区域(DMR)鉴定

在组合间比较分析中,采用DSS.v2.38.0软件(基于贝叶斯框架模型,适配不同样本量的甲基化数据)鉴定差异甲基化区域(DMR):设置参数smoothing=TRUE以平滑单个CpG位点随机波动;限定每个CpG位点测序深度≥5X,并设定DMR的生物学筛选条件为"CpG位点甲基化差异≥0.2、区域内差异CpG位点≥5个、相邻差异位点间距≤300 bp"。

为控制多重检验假阳性,采用Benjamini-Hochberg(BH)法对原始*P*值进行假发现率(FDR)校正(通过调控假阳性在显著结果中的占比降低全基因组检验误差),最终以校正后的FDR<0.05并结合上述生物学条件,确定显著DMR。利用cgmaptools.0.1.1软件统计基因组中CpG、CHG和CHH(H代表A/T/C)3种C碱基类型的甲基化水平比例,以呈现全基因组甲基化修饰特征。采用ChIPseeker.v1.26.2软件(默认参数)对DMR进行基因组注释:将DMR与基因组区域比对,若DMR注释至非基因间区(含基因体、启动子等),则对应基因为DMR关联基因,其中启动子区域定义为转录起始位点(TSS)上游2 kb范围。

1.5 功能注释及富集

为探究差异甲基化区域(DMR)关联基因的生物学功能,首先将原始数据中DMR所关联的基因导入DAVID网站(https://davidbioinformatics.nih.gov/),对注释得到的候选基因重新开展基因GO与KEGG富集分析。

在GO富集分析中,从生物学过程、分子功能和细胞组成3个维度出发,挖掘DMR关联基因显著富集的功能条目;而KEGG富集分析则聚焦于信号通路层面,明确受甲基化差异影响的代谢或信号传导途径,尤其关注是否有基因参与KEGG富集通路,进而揭示两个绵羊品种在脂肪沉积差异方面的潜在生物学机制。

1.6 PPI交互网络分析

甲基化测序结果展示了两种蒙古羊甲基化差异基因区域,这些区域为找到关键基因提供了范围。采用STRING-DB v12.构建KEGG和GO富集相关基因的交互网络。提取KEGG和GO富集分析中显著关联的基因集($P<0.05$),作为PPI网络构建的核心节点。

将基因导入STRING-DB平台,设置物种为绵羊(*Ovis aries*),相互作用评分阈值设为"高置信度"(置信度分数≥0.7),筛选出具有直接或间接相互作用的蛋白质对;保留网络中连接度(degree)排名前20%的核心基因,通过Cytoscape.v3.9.1软件,可视化网络拓扑结构。通过该网络可识别脂肪沉积调控的核心基因模块,揭示差异甲基化基因间的协同作用模式,为筛选脂肪沉积相关的关键调控基因提供依据。

1.7 甲基化特异性PCR(MSP)验证

对每组样本(湖羊、乌珠穆沁羊,$n=3$),使用天根生化血液DNA提取试剂盒提取羊血液DNA,使用天根生化DNA重亚硫酸盐转化试剂盒转化,目的是将DNA中的未甲基化胞嘧啶(C)转化为尿嘧啶(U),而甲基化胞嘧啶(5mC)保持不变,是甲基化检测的关键步骤;收集DNA溶液,使用天根生化甲基化特异性PCR试剂盒,检测经重亚硫酸盐转化后的DNA中特定CpG位点的甲基化状态,从测序结果中GO富集的脂质分解代谢过程(lipid catabolic process)通路筛选出脂质代谢相关基因(*ITSN1*、*NCEH1*和*CRTC3*),设计特异性引物。引物设计遵循长度适中、GC含量控制在40%~60%、避免形成引物二聚体及发夹结构等原则,并借助MethPrimer工具辅助完成设计。

采用MSP方法验证其甲基化水平。设计针对甲基化和非甲基化序列的特异性引物进行PCR扩增(引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成,具体引物序列见表1),判断目标区域的甲基化情况。PCR反应体系为20 μL:2×MSP PCR Mix(含*Taq*酶、dNTP等)10 μL,甲基化引物(10 μmol/L)各1 μL,模板DNA 2 μL,超纯水补足至20 μL,需同时设置阳性对照(已知甲基化/非甲基化DNA)和阴性对照(无模板)。PCR扩增程序:95 ℃预变性5 min;94 ℃变性20 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸20 s,35个循环;72 ℃延伸5 min;4 ℃保存。取5~10 μL PCR产物,经2%琼脂糖凝胶电泳(含核酸染料)检测,紫外灯下观察条带。对MSP电泳条带采用ImageJ软件进行灰度定量,以"甲基化条带灰度值/(甲基化条带灰度值+非甲基化条带灰度值)"计算每个样本的相对甲基化水平;通过独立样本*t*检验对两组的甲基化水平进行统计学分析。

表 1　甲基化特异性PCR引物

Table 1　Methylation-specific PCR primers

基因 Gene	引物序列(5′→3′) Primer sequence (5′→3′)	产物长度/bp Product length
ITSN1	M-L：ATTTGTTTGTTAGTATAGGAGACGT M-R：ATAAATTTTAACCCACCAAACTCG	142
	U-L：ATTTGTTTGTTAGTATAGGAGATGT U-R：TAAATTTTAACCCACCAAACTCATC	141
NCEH1	M-L：ATTGAAGTGATTTAAAGAAGTACGT M-R：AATCTAACCCTTATACTCATACGCT	169
	U-L：AATTGAAGTGATTTAAAGAAGTATGT U-R：AATCTAACCCTTATACTCATACACT	170
CRTC3	M-L：GTGTTTTAAGTGTAATTCGGGAGAC M-R：CCTCGATCTATATCGCTAACGAT	105
	U-L：GGTGTTTTAAGTGTAATTTGGGAGAT U-R：CTCCCTCAATCTATATCACTAACAAT	109

2　结果与分析

2.1　DNA甲基化概述

由图1可见，湖羊(H10-2)和乌珠穆沁羊(W1-1)的测序覆盖深度均值分别为11.6和12.1，覆盖深度分布集中且曲线趋势平稳，表明基因组各区域测序深度均一性良好。结合表2数据，湖羊和乌珠穆沁羊的唯一比对率＞83%、总比对率＞85%及lambda DNA转化率＞99.2%，均处于较高水平，且Q20、Q30平均值分别达98.25%和95.01%，说明测序数据中低质量序列占比极低。证明本研究WGBS测序数据质量高，结果可靠，为后续所有基于测序数据的分析(如DMR鉴定、功能富集等)提供数据质控层面的支撑。

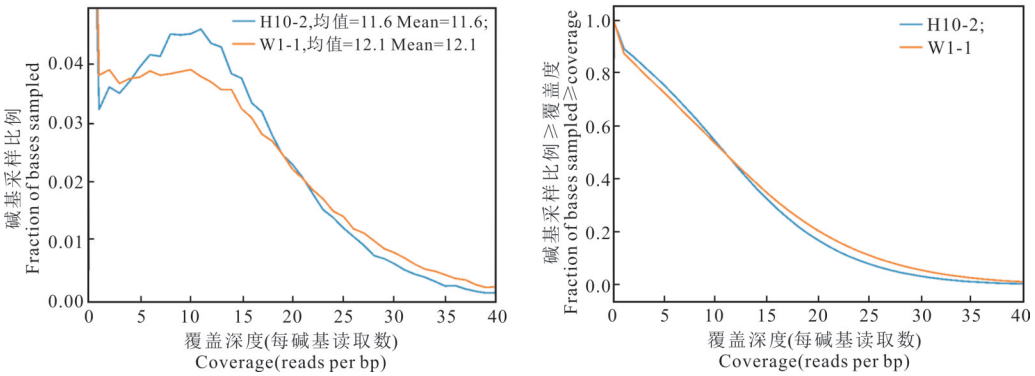


图1　覆盖深度密度和逆累积分布曲线图

Fig. 1　Coverage depth, density and inverse accumulation curve

表 2　过滤后数据统计表

Table 2　Clean reads data statistics

样品名 Sample	唯一比对率/% Unique alignmenat rate	总比对率/% Total mapping rate	lambda DNA转化率/% Lambda DNA conversion rate
H	83.06	85.32	99.27
W	84.03	86.14	99.22

2.2　甲基化分布和区域的表征

图2结果显示，CpG位点的甲基化水平明显高于CHG和CHH类型，这与哺乳动物DNA甲基化主要发生在CpG二核苷酸上的特征相吻合，印证了本研究中甲基化检测体系具有生物学合理性。

图3结果显示，chr13、chr14等染色体的平均甲基化水平较高(80～85)，而部分染色体如chr28的甲基化密度较低，这表明表观遗传调控可能存在染色体区域上的偏好性。

图4结果显示，启动子区域(promoter)的甲基化均值显著低于外显子(exon)和内含子(intron)，这与“启动子低甲基化可促进基因转录”的普遍规律相符。CpG岛(CGI)区域的甲基化水平与基因功能区域呈现出互补性分布特征，这说明甲基化可能通过调控基因表达进而影响表型，为其潜在作用机制研究提供了线索。

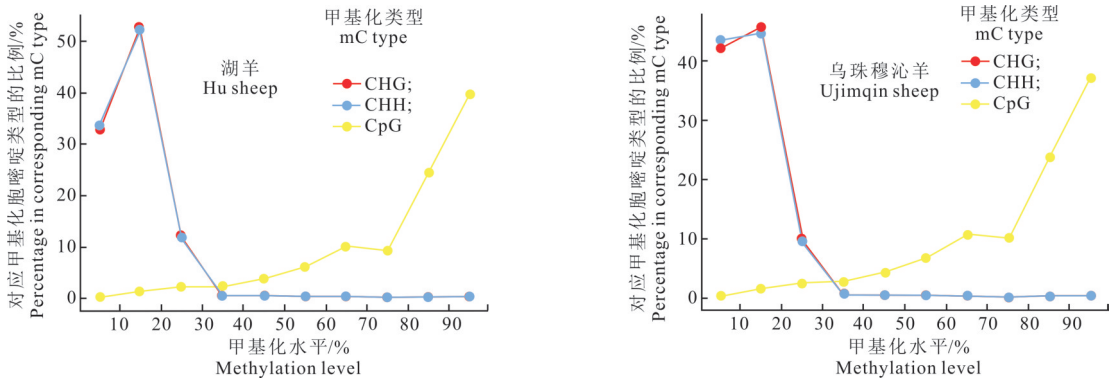


图 2　甲基化位点水平分布图

Fig. 2　Horizontal distribution of methylation sites

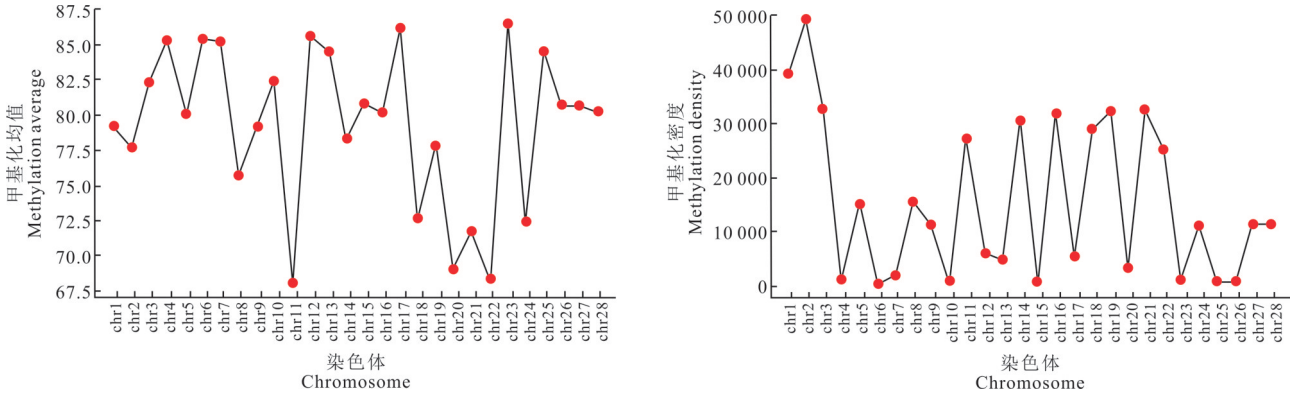


图 3　全基因组甲基化水平和甲基化密度分布

Fig. 3　Whole genome methylation levels and methylation density distribution

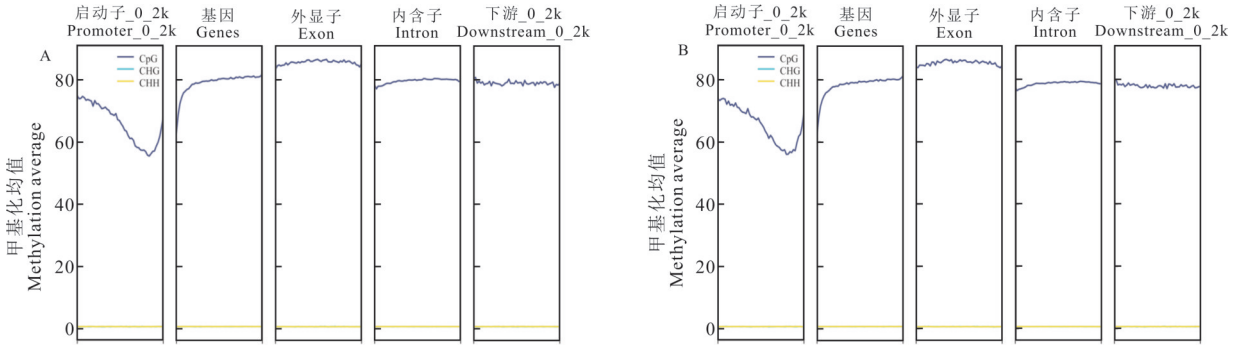


图 4　不同基因区域甲基化均值

Fig. 4　Mean value of methylation of different gene regions

2.3　鉴定差异甲基化区域(DMR)和 DMR 关联基因

DMR 结果显示,CHG、CHH 和 CpG 类型的差异甲基化区域(DMRs)数量存在显著分化。CHG 组的高甲基化区域(4 个)、低甲基化区域(8 个)及总 DMR 数量(12 个)均为 3 组中最少,CHH 组的高甲基化区域(15 个)、低甲基化区域(9 个)及总 DMR 数量(24 个)均显著低于 CpG 组,而 CpG 组的高甲基化区域(17 273 个)、低甲基化区域(11 718 个)及总 DMR 数量(28 991 个)均显著高于 CHG 和 CHH 组,且高甲基化区域数量高于低甲基化区域。这种差异说明,在湖羊与乌珠穆沁羊的脂肪沉积表型分化中,CpG 位点的甲基化动态可能发挥更关键作用。

差异甲基化区域(DMR)的位置分布情况如图 5 所示:64.97% 的 DMR 位于远端基因间区(distal intergenic),为占比最高的区域;内含子区域(含第 1 内含子和其他内含子)总计占 30.84%;启动子区域(≤1 kb、1~2 kb、2~3 kb)的 DMR 占比极低,合计仅 1.80%;下游区域(≤300 bp)占比 0.77%,其他外显子区域占比 1.63%。这一分布特征表明,两品

种蒙古羊的甲基化差异主要出现在非编码区域，其中远端基因间区的DMR可能通过调控增强子等顺式作用元件的活性影响靶基因表达，内含子区域的DMR则可能参与基因转录后加工过程的调控。而启动子区域DMR占比低的结果提示，两品种蒙古羊中与脂肪沉积相关的基因表达差异，或许更多依赖于精细的表观调控机制，而非启动子介导的转录起始开关效应。

图6结果显示，差异甲基化区域在各注释基因（CP162240.1至CP162267.1）中的分布长度主要集中在2 000～6 000 bp，且不同基因间的DMR长度未呈现显著差异。这一结果说明，DMR的功能与其在基因中的具体位置（如外显子、内含子等）关联紧密，而与区域的物理长度并无直接联系。同时，DMR在多个注释基因中的均匀分布特征提示，脂肪沉积的表观遗传调控是多基因协同作用的结果，并非单一基因的独立效应。

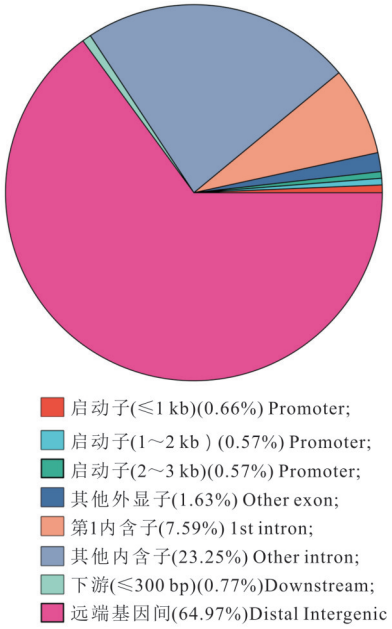


图5　差异甲基化区域位置分布图

Fig. 5　Distribution of DMR positions

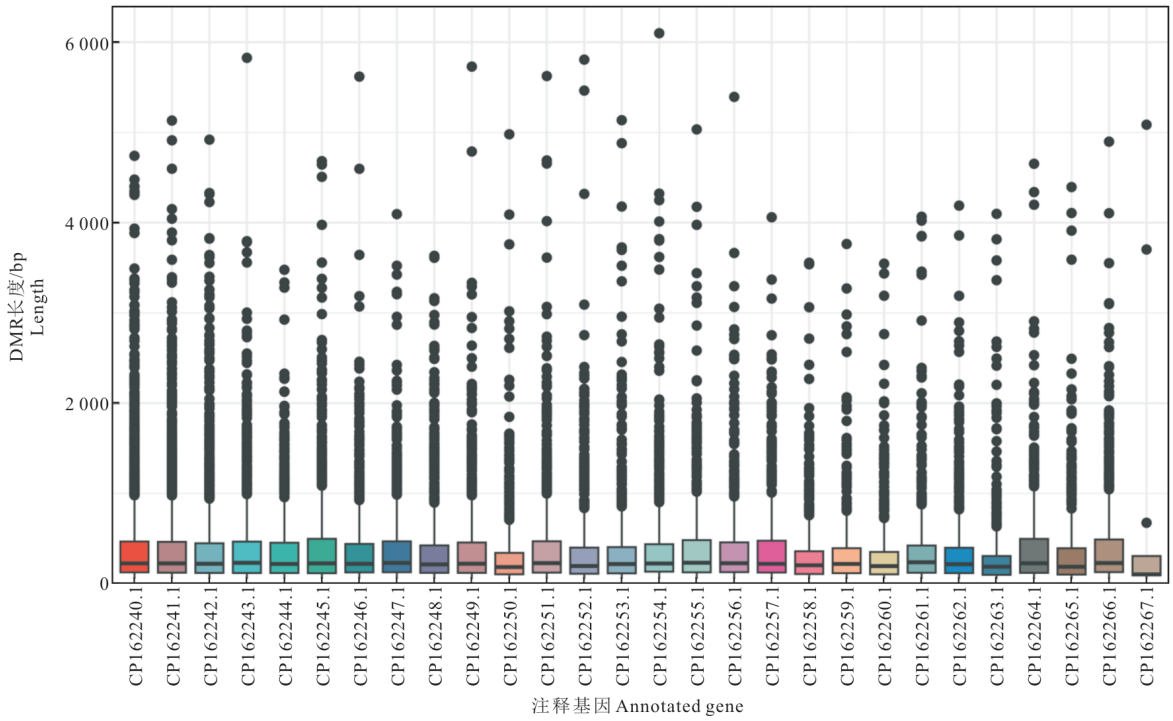


图6　差异甲基化基因区域注释分类图

Fig. 6　Annotation classification map of differentially methylated gene regions

2.4　DMR关联基因的功能注释及富集

GO富集结果（图7-A）显示，差异基因主要涉及细胞黏附、信号转导、脂质代谢等生物学过程，与湖羊高脂肪含量、乌珠穆沁羊低脂高蛋白的表型差异直接关联，表明DMR关联基因的功能富集结果与研究目标相契合。

KEGG富集图（图7-B）表明，细胞外基质-受体相互作用（ECM-receptor interaction）、黏着斑（focal adhesion）、磷脂酰肌醇信号系统（phosphatidylinositol signaling system）等通路被显著富集（$P<0.05$），这些通路已在猪背脂甲基化研究中被证实与脂肪层功能分化相关[14]，说明磷脂酰肌醇信号通路可能通过调控脂肪细胞分化信号传递，参与两品种蒙古羊脂肪沉积差异的形成。

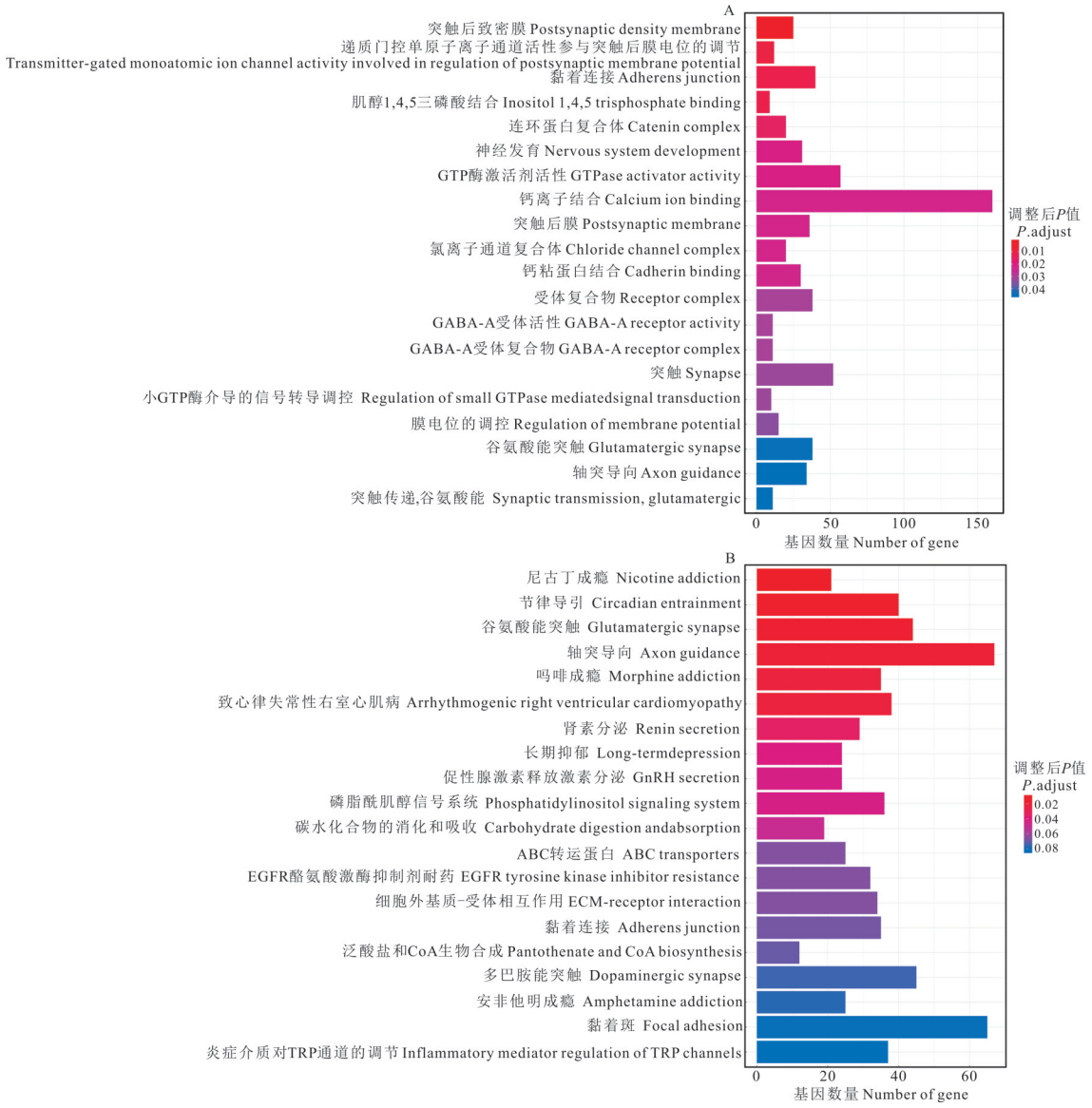


图 7 湖羊和乌珠穆沁羊差异基因 GO(A)和 KEGG(B)富集图

Fig. 7 GO (A) and KEGG (B) enrichment map of differential genes between Hu sheep and Ujimqin sheep

2.5 DMR 关联基因的互作网络

如图 8 所示,脂质分解代谢关键基因涵盖多类功能家族,包括磷脂酶家族基因(*PLCH1*、*PLCE1*、*PLCG2*、*PLCB4*、*PLCL2*)、信号转导相关基因(*ITSN2*、*ITSN1*)、代谢酶类基因(*PAFAH1B1*)、受体蛋白基因(*LRP5*)及信号通路调控基因(*FRZB*)。进一步的互作网络分析显示,*PLCH1*、*PLCE1* 和 *PLCG2* 等磷脂酶家族基因与 *ITSN1*、*LRP5* 等基因形成核心互作模块,且所有模块成员均被注释为脂质分解代谢通路的关键调控因子。功能机制分析表明,*PLC* 家族基因可通过调控细胞内脂质信号分子(如三磷酸肌醇 IP3)的生成,参与脂肪细胞分化进程;而 *ITSN1* 作为信号转导衔接蛋白基因,可能通过介导细胞骨架重构影响脂肪细胞形态建成与功能成熟。上述结果说明,这些功能互补的基因可能通过协同调控脂质信号传导、细胞骨架动态及脂肪细胞分化等生物学过程,共同参与两品种绵羊脂肪沉积表型差异的分子调控。

2.6 甲基化水平验证

图 9 为湖羊(A)、乌珠穆沁羊(B)中 *ITSN1*、*NCEH1* 和 *CRTC3* 基因的 MSP 扩增图谱,从条带分布可见,两组在目标 CpG 位点的甲基化(M 条带)与非甲基化(U 条带)信号强度存在明显分群,进一步直观印证了甲基化差异的真实性。

对 MSP 电泳条带采用 ImageJ 软件进行灰度定量,结果显示:*ITSN1*(t=4.21,P<0.05)、*NCEH1*(t=3.97,P<0.05)、*CRTC3*(t=5.03,P<0.05)的甲基化水平在湖羊与乌珠穆沁羊间均存在显著差

异，且差异趋势与WGBS测序结果完全一致。

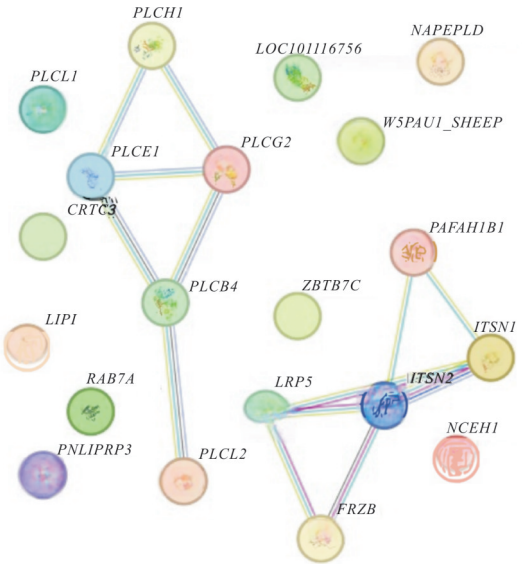


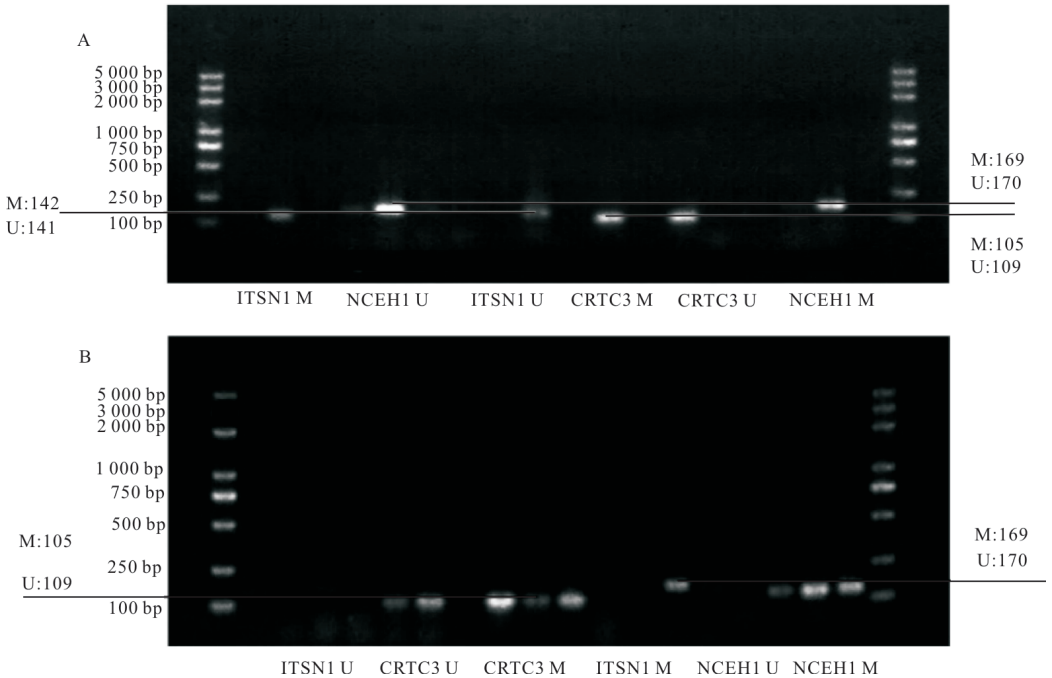
图8　基因交互网络图

Fig. 8　Gene interaction network diagram

综上可知，MSP验证结果不仅证实了WGBS高通量测序数据的准确性，也明确了*ITSN1*、*NCEH1*和*CRTC3*在两组绵羊中的甲基化差异是真实存在的；同时表明MSP技术可作为靶向验证表观遗传差异的有效手段，为后续解析这些基因对绵羊尾脂沉积的功能调控机制提供了精准的候选靶点。

3　讨　论

本研究借助全基因组亚硫酸氢盐测序（WGBS）技术，对湖羊与乌珠穆沁羊脂肪沉积差异背后的表观遗传特征展开了系统解析。测序数据经过严格的质量评估，结果显示Q20、Q30的均值分别达到98.25%和95.01%，唯一比对率超过83%，lambda DNA转化率高于99.2%，各项指标均符合高质量测序标准[15]。对甲基化位点特征的分析显示，CpG位点的甲基化水平明显高于CHG和CHH，这与哺乳动物DNA甲基化主要发生在CpG二核苷酸上的普遍特性高度吻合[16]。已有大量研究表明，这种甲基化模式（CpG位点的甲基化水平显著高于CHG和CHH位点）在生物发育、疾病发生等过程中扮演着关键角色[17-19]，在人类肿瘤研究中，CpG岛的甲基化异常与肿瘤抑制基因的沉默存在密切关联[20-21]。而在绵羊尾部脂肪沉积的研究领域，这一发现为进一步深入探究其表观遗传调控机制提供了重要线索。



M. 甲基化条带；U. 非甲基化条带。M. Methylated band；U. Non methylated band.

图9　湖羊（A）和乌珠穆沁羊（B）*ITSN1*、*NCEH1*和*CRTC3*基因MSP扩增图（n=3）

Fig. 9　MSP amplification maps of *ITSN1*, *NCEH1*, and *CRTC3* genes in Hu sheep (A) and Ujimqin sheep (B) (n=3)

差异甲基化区域（DMRs）的分布特征对于解析两个品种绵羊尾部脂肪沉积差异的调控机制具有重要意义。本研究结果显示，64.97%的DMRs位于远端基因间区，30.84%位于内含子区域，而启动

子区域的占比仅为1.8%。这一分布情况与绵羊尾脂组织甲基化的相关研究结论一致,即非编码区的DMRs可能通过顺式调控元件对基因表达产生影响[22]。远端基因间区富含增强子等调控元件,该区域甲基化状态的改变可通过影响染色质的开放程度来调控靶基因的转录过程[23];启动子区域DMRs占比低的现象表明,两个蒙古系绵羊品种中与脂肪沉积相关的基因表达差异,或许并非依赖"启动子甲基化抑制转录起始"这一经典机制[24],而是通过非编码区的精细表观调控来实现。在猪的脂肪沉积研究中,也观察到了类似的非编码区甲基化调控现象,这进一步印证了本研究结果的合理性。

DMR关联基因的功能富集结果进一步揭示了表观遗传调控脂肪沉积的分子通路[25]。KEGG分析显示,细胞外基质-受体相互作用(ECM-receptor interaction)、黏着斑等通路显著富集,与猪背脂甲基化研究中"细胞外基质(ECM)重构参与脂肪层功能分化"的发现契合[26]。细胞外基质(ECM)不仅为脂肪细胞提供结构支撑,其与受体的相互作用还可通过整合素(为细胞外基质ECM的特异性受体)信号传导调控细胞增殖与分化[27];黏着斑通路通过连接细胞骨架与细胞外基质(ECM),可能参与脂肪细胞形态建成与脂滴融合过程,这与湖羊肌内脂肪含量高、乌珠穆沁羊肌纤维紧实的表型差异紧密相关。

通过蛋白质相互作用(PPI)网络分析筛选出的*PLCH1*、*ITSN1*等核心基因,为深入解析脂肪沉积的表观调控网络提供了关键作用靶点。PLCH1作为磷脂酶家族成员,能够催化磷脂酰肌醇水解生成IP3,而IP3可通过激活内质网Ca^{2+}通道调控脂肪细胞分化,其甲基化状态的差异可能直接影响湖羊和乌珠穆沁羊的脂肪合成效率。ITSN1作为一种细胞骨架调控蛋白,参与网格蛋白介导的内吞作用,其甲基化差异或许会通过影响脂肪细胞表面受体的内化过程,对胰岛素等促脂信号的传导起到调控作用[28]。甲基化特异性PCR(MSP)验证结果证实,*ITSN1*、*NCEH1*和*CRTC3*基因的甲基化差异与测序结果一致。*NCEH1*参与鞘脂代谢[29],*CRTC3*通过调控CREB信号影响脂解相关基因的表达[30],这些基因的协同作用可能是两个绵羊品种在脂肪沉积表型上出现分化的重要分子基础。在牛脂肪细胞的相关研究中,也发现了类似核心基因对脂肪代谢的关键调控作用[31],这进一步凸显了本研究筛选出的核心基因在脂肪沉积调控中的重要地位。

本研究选择血液样本进行甲基化分析具有一定合理性。跨物种表观遗传研究证实,血液中与脂肪代谢相关的甲基化位点(如*ADCY3*、*TFAP2B*)可作为脂肪组织代谢状态的生物标志物,绵羊多组织表观基因组图谱显示血液与脂肪组织的甲基化模式存在显著相关性[4],这为利用血液样本研究脂肪沉积相关的表观遗传特征提供了理论依据。在人类疾病研究中,也曾利用血液样本的甲基化特征作为疾病诊断的潜在标志物[32-33],为这种研究思路提供了实践参考。

本研究通过全基因组甲基化分析,揭示了湖羊与乌珠穆沁羊在脂肪沉积差异上的表观遗传特征,不仅丰富了哺乳动物脂肪代谢的表观调控理论,也为绵羊品种选育过程中分子标记的开发提供了重要参考依据。

4 结 论

本研究成功构建了湖羊与乌珠穆沁羊的全基因组DNA甲基化图谱。通过对差异甲基化区域(DMR)关联基因的功能注释与富集分析,发现*ITSN1*、*NCEH1*和*CRTC3*基因主要参与脂肪代谢、细胞分化及信号转导等关键生物学过程。此外,MSP验证结果也进一步证实了测序数据的可靠性。

[参考文献]

[1] 蒋宗佑,玉金燕,唐高建,等. 肉用牛、绵羊脂肪组织特性、发育规律及其评鉴方法[J]. 中国科学:生命科学,2023,53(7):945-963.
JIANG Z Y, YU J Y, TANG G J, et al. Characteristics, development, and evaluation of adipose tissues of beef cattle and mutton sheep[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2023, 53(7): 945-963.

[2] 王芳,王宏博,席斌,等. 不同品种绵羊肉品质比较与分析[J]. 食品与发酵工业,2021,47(1):229-235.
WANG F, WANG H B, XI B, et al. Comparison and analysis of meat quality of different breeds of sheep[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(1): 229-235.

[3] 薛宝玲. 乌珠穆沁羊生长过程中肌纤维类型和MyHC基因变化分析[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2014.
XUE B L. Analysis of muscle fibers type and MyHC gene changes during the growth of ujumqin sheep[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014.

[4] ZHANG D Y, CHENG J B, LI X L, et al. Comprehensive multi-tissue epigenome atlas in sheep: a resource for complex traits, domestication, and breeding[J]. iMeta, 2024, 3(6): e254.

[5] 徐彦辉. 哺乳动物DNA甲基化修饰的动态调控机制[J]. 生命科学,2017,29(10):934-938.
XU Y H. Dynamic regulation of mammalian DNA methylation

[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences，2017，29(10)：934-938.

[6] VANYUSHIN B F. Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell [J]. Biochemistry (Moscow)，2005，70(5)：488-499.

[7] LUO R S，DAI X L，ZHANG L，et al. Genome-wide DNA methylation patterns of muscle and tail-fat in DairyMeade sheep and Mongolian sheep[J]. Animals，2022，12(11)：1399.

[8] ZHANG S H，SHEN L Y，XIA Y D，et al. DNA methylation landscape of fat deposits and fatty acid composition in obese and lean pigs [J]. Scientific Reports，2016，6：35063.

[9] CHAO X H，GUO L J，HU M L，et al. Abnormal DNA methylation of EBF1 regulates adipogenesis in chicken[J]. BMC Genomics，2025，26(1)：275.

[10] XIAO L，DE JESUS D F，JU C W，et al. 7624 m6A mRNA methylation in brown adipose tissue regulates systemic insulin sensitivity *via* an inter-organ prostaglandin signaling axis[J]. Journal of the Endocrine Society，2024，8(S1)：bvae163. 003.

[11] SCHACHTSCHNEIDER K M，SCHOOK L B，MEUDT J J，et al. Epigenetic clock and DNA methylation analysis of porcine models of aging and obesity[J]. Gero Science，2021，43(5)：2467-2483.

[12] QAMAR W，KHAN M R，ARAFAH A. Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method[J]. Saudi Journal of Biological Sciences，2017，24(7)：1465-1469.

[13] LI Q，HERMANSON P J，SPRINGER N M. Detection of DNA methylation by whole-genome bisulfite sequencing[J]. Methods in Molecular Biology，2018，1676：185-196.

[14] 石翰豪. 脂肪型和瘦肉型猪背脂蛋白质组学比较分析[D]. 合肥：安徽农业大学，2023.
SHI H H. Comparative analysis of protein omics of fat and lean pig back fat[D]. Hefei：Anhui Agricultural University，2023.

[15] LIU X，PANG Y，SHAN J Q，et al. Beyond the base pairs：comparative genome-wide DNA methylation profiling across sequencing technologies[J]. Briefings in Bioinformatics，2024，25(5)：bbae440.

[16] XIE S Q，HAGEN D，BECKER G M，et al. Analyzing the relationship of RNA and DNA methylation with gene expression [J]. Genome Biology，2025，26(1)：140.

[17] LI Q，LU J S，YIN X D，et al. Base editing-mediated one-step inactivation of the Dnmt gene family reveals critical roles of DNA methylation during mouse gastrulation[J]. Nature Communications，2023，14：2922.

[18] SIEBERT-KUSS L M，DIETRICH V，DI PERSIO S，et al. Genome-wide DNA methylation changes in human spermatogenesis[J]. The American Journal of Human Genetics，2024，111(6)：1125-1139.

[19] LONG P P，SI J H，ZHU Z W，et al. Genome-wide DNA methylation profiling in blood reveals epigenetic signature of incident acute coronary syndrome[J]. Nature Communications，2024，15：7431.

[20] LEE S，HWANG K S，LEE H J，et al. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia[J]. Laboratory Investigation，2004，84(7)：884-893.

[21] LUJAMBIO A. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer[J]. Cell Cycle，2007，6(12)：1454-1458.

[22] TIAN W，ZHOU J T，BARTLETT A，et al. Single-cell DNA methylation and 3D genome architecture in the human brain [J]. Science，2023，382(6667)：eadf5357.

[23] SONG Y L，VAN DEN BERG P R，MARKOULAKI S，et al. Dynamic enhancer DNA methylation as basis for transcriptional and cellular heterogeneity of ESCs[J]. Molecular Cell，2019，75(5)：905-920. e6.

[24] LEVINE A，CANTONI G L，RAZIN A. Inhibition of promoter activity by methylation：possible involvement of protein mediators [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America，1991，88(15)：6515-6518.

[25] WANG S R，ZHA L，CUI X，et al. Epigenetic regulation of hepatic lipid metabolism by DNA methylation[J]. Advanced Science，2023，10(20)：2206068.

[26] HAUSMAN G J，THOMAS G B. The development of the inner layer of backfat in fetal and young pigs[J]. Journal of Animal Science，1984，58(6)：1550-1560.

[27] SUN K，LI X，SCHERER P E. Extracellular matrix (ECM) and fibrosis in adipose tissue：overview and perspectives[J]. Comprehensive Physiology，2023，13(1)：4387-4407.

[28] MINTOO M，RAJAGOPALAN V，O'BRYAN J P. Intersectin-many facets of a scaffold protein[J]. Biochemical Society Transactions，2024，52(1)：1-13.

[29] LU Y，ZHANG L Y，CHEN X Y，et al. NCEH1 may be a prognostic biomarker for pancreatic cancer [J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology，2020，13(11)：2746-2752.

[30] SONG Y，ALTAREJOS J，GOODARZI M O，et al. CRTC3 links catecholamine signalling to energy balance [J]. Nature，2010，468(7326)：933-939.

[31] HUANG W L，GUO Y T，DU W H，et al. Global transcriptome analysis identifies differentially expressed genes related to lipid metabolism in Wagyu and Holstein cattle[J]. Scientific Reports，2017，7：5278.

[32] CHEMI F，PEARCE S P，CLIPSON A，et al. cfDNA methylome profiling for detection and subtyping of small cell lung cancers[J]. Nature Cancer，2022，3(10)：1260-1270.

[33] ZHAO F Q，BAI P，XU J F，et al. Efficacy of cell-free DNA methylation-based blood test for colorectal cancer screening in high-risk population：a prospective cohort study[J]. Molecular Cancer，2023，22(1)：157.

（责任编辑：屈李纯）