

猪血液和肌肉组织 DNA 甲基化含量的测定

梁秋菊^{1,2}, 刘丽娜¹, 彭健¹, 孙智达², 蒋思文¹

(¹华中农业大学农业部猪遗传育种重点开放实验室, 武汉 430070; ²华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070)

摘要: 【目的】测定纯种大白猪(LW)、长白猪(L)、梅山猪(M)及其 LW×L、L×LW、LW×M 和 M×LW 等杂种猪血液和肌肉组织 DNA 甲基化含量, 比较亲本与杂种 DNA 甲基化含量的差异, 为揭示杂种优势的分子机制提供依据。【方法】采用高效液相色谱法测定血液和肌肉组织中甲基化含量。【结果】163 份肌肉组织 DNA 样平均甲基化含量为 16.92%, 182 份血液样平均甲基化含量为 6.49%, 两者之间差异达到了极显著水平 ($P < 0.01$), 血液中 DNA 甲基化含量均低于 10%, L×LW 杂交猪最高, 达到了 9.93%, 而长白猪最低, 仅为 2.97%; 大白猪和长白猪之间差异极显著 ($P < 0.01$), 而大白猪和梅山猪之间差异不显著 ($P > 0.05$); LW×L 与 L×LW 杂种猪, LW×M 与 M×LW 杂种猪之间均存在显著性差异 ($P < 0.05$)。肌肉组织中 DNA 甲基化含量 3 个纯种亲本之间无显著性差异 ($P > 0.05$); LW×L 与 L×LW 杂种猪、LW×M 与 M×LW 杂种猪之间差异均不显著, 但是两个不同杂交组合, 即 LW×L、L×LW 与 LW×M、M×LW 杂种猪之间差异显著 ($P < 0.05$)。【结论】本研究建立了测定猪血液和肌肉组织中 DNA 甲基化含量的高效液相色谱测定方法; DNA 甲基化含量在血液和肌肉组织中差异显著, 且具有组织特异性。

关键词: 高效液相色谱; DNA 甲基化; 猪

Determination of DNA Methylation Contents Both in the Blood and Muscle Tissue of Pigs and Significant Difference Analysis

LIANG Qiu-ju^{1,2}, LIU Li-na¹, PENG Jian¹, SUN Zhi-da², JIANG Si-wen¹

(¹Key Laboratory of Swine Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070;

²College of Food Science and Technology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070)

Abstract: 【Objective】In order to provide evidences for molecular mechanisms of heterosis in pigs, significant differences of DNA methylation contents between parental lines and their hybrids were analyzed both in blood and muscle tissues of pigs in parental lines of Large White (LW), Landrace (L) and Meishan (M) and their hybrids LW×L, L×LW, LW×M and M×LW. 【Method】High performance liquid chromatography(HPLC) was used in this study. 【Result】The average DNA methylation content is 16.92% in 163 DNA samples of muscle tissue and 6.49% in 182 samples of blood, where the difference is especially prominent ($P < 0.01$). The DNA methylation content is lower than 10% in all blood samples, varying from the highest 9.93% in L×LW hybrids to the lowest 2.97% in L parental lines. In parental lines, there is a very significant difference between LW and L ($P < 0.01$), but no significant difference between LW and Meishan pigs ($P > 0.05$); in hybrids, the differences are significant between LW×L and L×LW ($P < 0.05$), as well as LW×M and M×LW ($P < 0.05$). As for the DNA methylation content in muscle tissues, there is no significant difference among the three parental lines ($P > 0.05$); in hybrids, though there are no significant differences between LW×L and L×LW, as well as in LW×M and M×LW, there is a significant difference between the two different hybrid systems LW×L, L×LW and LW×M, M×LW ($P < 0.05$). 【Conclusion】A method of HPLC is developed for detecting DNA methylation contents in blood and muscle tissues of pigs. There are significant differences in average methylation contents and tissue specificity between blood and muscle tissue.

Key words: HPLC; DNA methylation; Pig

收稿日期: 2006-05-08; 接受日期: 2006-11-07

基金项目: 国家自然科学基金 (30371028)

作者简介: 梁秋菊 (1981-), 女, 山西阳城人, 研究方向为分子遗传学与猪的育种。通讯作者蒋思文 (1963-), 男, 湖北天门人, 教授, 研究方向为分子遗传学与动物育种。Tel: 027-87284241; E-mail: jiangsiwen@mail.hzau.edu.cn

0 引言

【研究意义】利用杂种优势是提高动物生产性能的重要途径之一,但是由于杂种优势遗传基础的复杂性以及研究方法与手段的局限性,杂种优势的遗传机理及有效的预测方法尚未获得突破性的进展。近年来大量的研究表明,杂种优势本质上源于基因表达的变化,而基因表达是基因调控的结果^[1,2]。最近,由于在调控基因表达、基因组印记等方面发挥的重要作用^[3,4],DNA 甲基化越来越受到人们的关注。不少学者推测,由于 DNA 甲基化参与基因表达调控,就有希望通过研究 DNA 甲基化来进一步揭示杂种优势的遗传机理^[5,6]。【前人研究进展】Cedar 等^[7]的研究结果表明,基因组 DNA 甲基化程度及分布与基因表达率显著相关。Hepburn^[8]对植物 DNA 甲基化进行了研究,特别对 DNA 甲基化与基因的转录抑制表达进行了分析,认为自交能导致甲基化程度的逐渐积累,而杂交能使甲基化程度得以解除或重新编排。Tsaftaris^[9]分析了一个玉米杂交种及其亲本 DNA 甲基化胞嘧啶占总胞嘧啶的比例,发现两个亲本胞嘧啶甲基化比例分别为 31.4%和 28.3%,杂种则为 27.4%,基因组表达活性与 DNA 甲基化存在显著负相关,由此他认为,杂交种 DNA 甲基化降低与基因表达增强有关,可能与杂种优势表现有关。Xiong 等^[10]研究了水稻杂交种及其双亲的 DNA 甲基化,结果表明两个亲本具有相同的甲基化含量(均为 16.3%),而在杂交种中甲基化比

例为 18%,结论与 Tsaftaris 恰恰相反,他认为在水稻杂种中虽然总体上甲基化程度与杂种优势不相关,但某些特异位点上甲基化程度的改变却对杂种优势有显著效应,有的位点上甲基化降低对杂种优势有利,而有的位点甲基化增强对杂种优势有利。同时,其研究组以一套双列杂交组合的剑叶为材料进行研究也得出了相同的结论^[11]。【本研究切入点】本研究以猪为研究对象,采用基因组甲基化含量测定更为有效的高效液相色谱法,测定了 3 个纯种及 4 个杂交种血液和肌肉 DNA 甲基化含量,获得了大量数据并进行了统计分析,从 DNA 甲基化调控基因表达角度去揭示哺乳动物中杂种优势的机理。【拟解决的关键问题】本研究旨在通过分析纯种和杂种甲基化的含量差异,为揭示猪杂种优势的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

纯种大白猪(LW)、长白猪(L)和梅山猪(M),以及正反交大白猪×长白猪、长白猪×大白猪、大白猪×梅山猪和梅山猪×大白猪等杂种猪血液和肌肉组织均来自于华中农业大学精品猪场,在六月龄屠宰时采样。5-甲基胞嘧啶和胞嘧啶标准样购自 Sigma 公司,所有实验用水均为娃哈哈纯净水。BDS Hypersil C18 色谱柱(200×4.6 mm, 5 μm)购于北京康林公司。各纯种以及杂种的采样数见表 1,肌肉样取自股二头肌。

表 1 DNA 样品数

Table 1 Number of DNA samples

组织 Tissue	大白猪 LW	长白猪 L	梅山猪 M	大长猪 LW×L	长大猪 L×LW	大梅猪 LW×M	梅大猪 M×LW
肌肉 Muscle	11	13	43	11	22	38	25
血液 Blood	27	24	13	18	19	48	33

1.2 高效液相色谱法测定基因组 DNA 甲基化水平

DNA 提取参照文献^[12]方法进行,DNA 水解参照 Demeulemeester^[13]等的方法,并进行适当修改^[14,15]:在 50 μl 的 DNA 溶液中加入 70%的高氯酸 25 μl,80℃水解 5 h,然后用 KOH(2 mol·L⁻¹)将 pH 值调整到 3~5,同时会形成 KClO₄沉淀,放置-20℃冰箱过夜沉淀后 12 000 r/min 离心 30 min,吸取上清液后再次放入冰箱过夜沉淀,同上次离心后再吸取上清液,-20℃保存备用,或低温条件下通过微量进样器加到 LC-6A 高效液相色谱仪(RID-6A 紫外吸收检测器,日本

Shimadzu 公司)的 BDS Hypersil C18 柱(200×4.6 mm, 5 μm),在柱温 10℃的条件下,以 10%甲醇、5mmol·L⁻¹的戊烷磺酸钠、0.2%三乙胺混和液为流动相进行洗脱,流速为 1.0 ml·min⁻¹,紫外波长 273 nm,灵敏度 0.01 AUFS。以胞嘧啶(C)和 5-甲基胞嘧啶(5-mC)标样作对照,分别对 163 份肌肉组织 DNA 样和 182 份血液 DNA 样的甲基化含量进行测定,每个样品重复处理 3 次,取平均值。

1.3 数据处理

通过计算积分面积 5-mC/(5-mC+C)的百分数来

测定基因组 DNA 中 5-mC 的含量, 即 DNA 甲基化水平。数据整理和统计分析应用 Excel 2003 和 SAS 软件 8.0。

2 结果与分析

2.1 标样和样品色谱图

建立了 5-甲基胞嘧啶和胞嘧啶标准, 以及血液和组织样品的高效液相色谱法测定方法 (图 1~图 4)。从图中可以看出, 在本试验条件下, C 的保留时间为 3.15 min 左右, 而 5-mC 的保留时间为 3.82 min 左右。

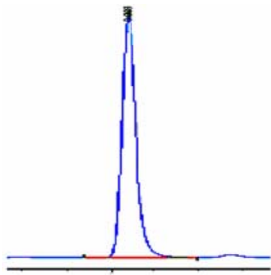


图 1 C 标样色谱图

Fig. 1 Chromatogram of cytosine standard

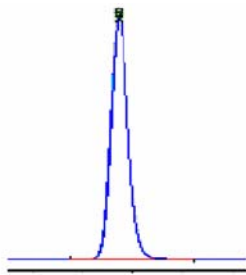


图 2 5-mC 标样色谱图

Fig. 2 Chromatogram of 5-methylcytosine standard

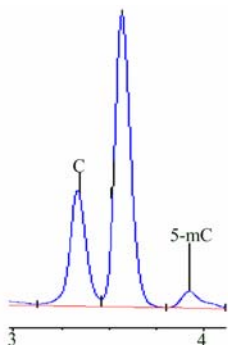


图 3 梅大肌肉组织色谱图

Fig. 3 Chromatogram of muscle tissue of Meishan x Large White

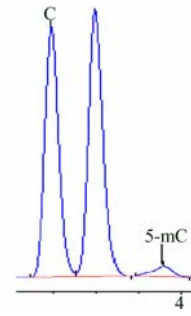


图 4 长白猪血液色谱图

Fig. 4 Chromatogram of blood of Landrace

2.2 血液和肌肉组织中 DNA 甲基化平均含量的比较

从表 2 可以看出, 在测定的 3 个亲本品种及 4 个杂种猪中, 163 份肌肉组织 DNA 样平均甲基化含量为 16.92%, 182 份血液 DNA 样平均甲基化含量为 6.49%, 两者之间差异达到了极显著水平 ($P < 0.01$)。血液 DNA 甲基化含量均低于 10%, L x LW 杂交猪最高, 达到了 9.93%, 而长白猪最低, 仅为 2.97%。大白猪和长白猪之间差异极显著 ($P < 0.01$), 而大白猪和梅山猪之间差异不显著 ($P > 0.05$), LW x L 与 L x LW 杂种猪, LW x M 与 M x LW 杂种猪之间均存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

在肌肉组织中, DNA 甲基化含量在 10%~20%之间, 3 个纯种亲本之间无显著性差异 ($P > 0.05$); LW x L 与 L x LW 杂种猪、LW x M 与 M x LW 杂种猪之间差异均不显著 ($P > 0.05$); 但是两个不同杂交组合, 即 LW x L、L x LW 与 LW x M、M x LW 杂种猪之间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 血液组织中不同杂交组合 DNA 甲基化含量的多重比较

从表 3 可以看出, 血液中 DNA 甲基化含量除 LW x L 杂种猪与 LW 之间差异不显著外, 其它两两之间均差异极显著 ($P < 0.01$); 杂种猪血液 DNA 甲基化含量极显著高于纯种猪, 表现为正的杂种优势。

从表 4 可以看出, 血液 DNA 甲基化含量 M x LW 杂种猪与 LW、M、LW x M 之间均存在极显著差异 ($P < 0.01$), 而 LW x M 杂种猪与 LW、M, 以及 M 与 LW 之间均差异不显著 ($P > 0.05$), 即正反交结果不一致。LW x M、M x LW 与亲本纯种相比表现为正的杂种优势。

2.4 肌肉组织中不同杂交组合 DNA 甲基化含量的多重比较

表 2 DNA 平均甲基化含量的差异显著性分析

Table 2 Significance test for the average DNA methylation content both in the blood and muscle tissue among pure breeds and cross-breeds

	肌肉 Skeletal muscle	血液 Blood
大白猪 LW	0.1816±0.0293a	0.0593±0.0019cd
长白猪 L	0.2026±0.0211a	0.0297±0.0034e
大白猪×长白猪 LW×L	0.1145±0.0170b	0.0709±0.0047bc
长白猪×大白猪 L×LW	0.1417±0.0152ab	0.0993±0.0124a
梅山猪 M	0.1558±0.0154ab	0.0537±0.0027d
大白猪×梅山猪 LW×M	0.1920±0.0119a	0.0633±0.0019cd
梅山猪×大白猪 M×LW	0.1832±0.0195a	0.0788±0.0043b

表中数据为平均值±标准误; 同列字母不同表示差异显著($P<0.05$)

All the data in the table are means ± standard error. Means in the same line with different letters significantly differ at $P<0.05$

表 3 LW、L 以及 LW×L、L×LW 杂种猪血液中 DNA 甲基化含量的多重比较

Table 3 Significance test for DNA methylation content in the blood among Large White, Landrace and Large White × Landrace, Landrace × Large White pigs

	大白猪 LW	长白猪 L	大白猪×长白猪 LW×L
长白猪 L	-0.0296**		
大白猪×长白猪 LW×L	0.0116	0.0412**	
长白猪×大白猪 L×LW	0.0399**	0.0696**	0.0283**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, 下同。The same as below

表 4 LW、M 以及 LW×M、M×LW 杂种猪血液中 DNA 甲基化含量的多重比较

Table 4 Significance Test for DNA methylation content in the blood among Large White, Meishan and Large White × Meishan, Meishan × Large White pigs

	大白猪 LW	梅山猪 M	大白猪×梅山猪 LW×M
梅山猪 M	-0.0056		
大白猪×梅山猪 LW×M	0.0039	0.0096	
梅山猪×大白猪 M×LW	0.0195**	0.0251**	0.0155**

从表 5 可以看出, 肌肉组织 DNA 甲基化含量两亲本纯种之间和两杂种猪之间无显著差异($P>0.05$); LW×L 杂种猪显著低于两纯种猪($P<0.05$); 而 L×LW 杂种猪仅显著低于 L ($P<0.05$)。正反交结果

一致, 表现为负的杂种优势。

从表 6 可以看出, 纯种 LW 和 M, 以及 LW×M 和 M×LW 杂种猪肌肉组织 DNA 甲基含量两两之间均无显著性差异($P>0.05$), 正反交结果一致。

表 5 LW、L 以及 LW×L、L×LW 肌肉组织中 DNA 甲基化含量的多重比较

Table 5 Significance test for DNA methylation content in the muscle tissue among Large White, Landrace and Large White × Landrace, Landrace × Large White pigs

	大白猪 LW	长白猪 L	大白猪×长白猪 LW×L
长白猪 L	0.021		
大白猪×长白猪 LW×L	-0.0671*	-0.0881**	
长白猪×大白猪 L×LW	-0.0399	-0.0609*	0.0272

表 6 LW、M 以及 LW×M、M×LW 肌肉组织中 DNA 甲基化含量的多重比较

Table 6 Significance test for DNA methylation content in the muscle tissue among Large White, Meishan and Large White×Meishan, Meishan×Large White pigs

	大白猪 LW	梅山猪 M	大白猪×梅山猪 LW×M
梅山猪 M	-0.0258		
大白猪×梅山猪 LW×M	0.0104	0.0362	
梅山猪×大白猪 M×LW	0.0016	0.0274	-0.0089

3 讨论

在目前诸多的基因组甲基化测定方法中, 简洁的酶切法能够精确定位, 但是能用的限制性内切酶很少, 无法分析非酶切位点上的 CpG 甲基化状态。毛泽斌等^[16]采用 *Msp* I /*Hpa* II 酶解电泳法和高效液相色谱两种方法研究了不同年龄大鼠肝、脑细胞基因组 DNA 甲基化程度, 结果显示, 用常规的酶解电泳法所分析的 DNA 甲基化结果并不能反映整个基因组 DNA 甲基化的水平。目前对整个基因组进行甲基化检测的方法以 H³-SAM 掺入法和 HPLC 法为主, 而后者是目前测定 DNA 中 5-甲基胞嘧啶含量标准的方法^[17], 其原理是将提取的 DNA 以强酸或酶裂解为碱基或单脱氧核苷, 通过色谱柱以一定离子强度和 pH 值的洗脱液平衡并洗脱, 分离出各种碱基, 由一定波长的紫外光测定其吸收峰并定量^[18]。本研究采用强酸 HClO₄ 水解 DNA, 并通过降低裂解温度和延长裂解时间以避免 5-甲基胞嘧啶脱氨基, 进一步证实了 HPLC 是一种稳定的测定基因组 DNA 甲基化含量有效的方法。

在本研究中, 163 份肌肉组织 DNA 样平均甲基化含量为 16.92%, 182 份血液 DNA 样平均甲基化含量为 6.49%, 两者之间相差 10.43%, 差异达到了极显著水平 ($P < 0.01$)。与 Weiss 等^[19]的观点相符, 他们认为甲基化模式建立于配子形成期, 并在发展过程中发生变化, 任何特定细胞 DNA 甲基化模式的建立都是甲基化和去甲基化动态变化的过程, 在相同类型同一种类的细胞个体之间存在高度保守的甲基化模式, 而在不同器官或不同类型的细胞中甲基化模式是不同的。Xiong^[10]等对水稻杂交种汕优 63 及其亲本幼苗和旗叶 DNA 甲基化研究发现, 有一部分位点 DNA 甲基化存在差异, 幼苗组织 DNA 甲基化程度要高于叶片组织。在玉米中编码胚乳特异性表达的 B-Zip 蛋白的基因, 启动子 DNA 序列在叶片组织 (非表达组织) 中高度甲基化^[20], 在大麦中 *B-hordein* 基因也有类似的情况^[21]。本研究与这些结果基本相符。血液是机体内环境最重要的组成部分, 能沟通体内各组织之间的

联系, 运输养分与代谢废物, 血液内所含的物质及其功能非常复杂。这也就表明血液中基因的表达处于很活跃的状态, 特别是一些看家基因的表达, 而大部分看家基因的启动子中有 CpG 岛, 只有这些 CpG 岛处于低甲基化状态基因才可以表达。但在具有组织特异性的肌肉中, 由于其特定的生理条件, 许多基因可能就需要关闭, 而甲基化是关闭基因表达的最经济有效的措施。

4 结论

本研究建立了测定猪血液和肌肉组织中 DNA 甲基化含量的高效液相色谱测定方法。DNA 甲基化含量在血液和肌肉组织中差异显著, 具有组织特异性。杂种甲基化含量的变化表现具有杂交组合特异性, 推测杂交种 F₁ 代甲基化是 F₁ 代相对于亲本甲基化模式经过重新调整的结果, 杂种优势的产生与杂交种 F₁ 代基因组 DNA 甲基化模式的改变和重新调整有关。

References

- [1] Taniguchi T, Sullivan M J, Ogawa O, Reeve A E. Epigenetic changes encompassing the *IGF2/H19* locus associated with relaxation of *IGF2* imprinting and silencing of *H19* in Wilms tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92: 2159-2163.
- [2] Martienssen R. Epigenetic phenomena: paramutation and gene silencing in plants. *Current Biology*, 1996, 6: 810-813.
- [3] 侯雷平, 李梅兰. DNA 甲基化与植物的生长发育. *植物生理学通讯*, 2001, 37: 584-588.
Hou L P, Li M L. DNA methylation and plant growth and development. *Plant Physiology and Molecular Biology*, 2001, 37: 584-588. (in Chinese)
- [4] 吴 萍. 基因组印记的研究进展. *中国畜牧兽医*, 2002, 29(3): 32-35.
Wu P. The research progress in genome imprinting. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2002, 29(3): 32-35. (in Chinese)
- [5] 郭予琦, 陈明灿. 基因表达与杂种优势遗传机理. *河南职业技术学院学*

- 报, 2001, 29(2): 7-11.
- Guo Y Q, Chen M C. Gene expression and the mechanism of heterosis. *Journal of Henan Vocation-Technical Teachers College*, 2001, 29(2): 7-11. (in Chinese)
- [6] Jiang C D, Deng C Y, Xiong Y Z. Patterns of cytosine methylation in parental lines and their hybrids of Large White and Meishan reciprocal crosses. *Agricultural Sciences in China*, 2004, 3(1): 57-63.
- [7] Cedar H, Razin A. DNA methylation and gene expression. *Microbiological Reviews*, 1991, 55: 451-458.
- [8] Hepburn P A, Margison G P, Tisdale M J. Enzymatic methylation of cytosine in DNA is prevented by adjacent O6-methylguanine residues. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266: 7985-7987.
- [9] Tsafaris A S, Kafka M. Mechanism of heterosis in crop plants. *Journal of Crop Production*, 1998, 1: 95-111.
- [10] Xiong L Z, Xu C G, Saghai Maroof M A, Zhang Q F. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Molecular & General Genetics*, 1999, 261: 439-446.
- [11] 熊立仲. 基因表达水平上水稻杂种优势的分子生物学基础研究. 华中农业大学博士学位论文, 1999.
- Xiong L Z. Studies on molecular basis of rice heterosis at gene expression level. Huazhong Agricultural University Doctor's Degree Dissertation, 1999. (in Chinese)
- [12] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南, 北京: 科学出版社, 1995: 464-469.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Beijing: Science Press, 1995: 464-469. (in Chinese)
- [13] Demeulemeester M A C, Van Stallen N, De Proft M P. Degree of DNA methylation in chicory (*Ci-chorium intybus* L.): influence of plant age and vernalization. *Plant Science*, 1999, 142: 101-108.
- [14] 李梅兰, 汪俏梅, 朱祝军, 曾广文. 春化对白菜 DNA 甲基化、GA 含量及蛋白质的影响. *园艺学报*, 2002, 29: 353-357.
- Li M L, Wang Q M, Zhu Z J, Zeng G W. Studies on the changes of DNA methylation level, GA content and protein in non-heading Chinese cabbage during vernalization. *Acta Horticulturae Sinica*, 2002, 29: 353-357. (in Chinese)
- [15] Ramsahoye B H. Measurement of genome wide DNA methylation by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Methods*, 2002, 27: 156-161.
- [16] 毛泽斌, 张宗玉, 吴跃南, 程之华. 大鼠衰老过程中脑细胞 DNA 与 *c-Ha-ras* 原癌基因的甲基化. *生物化学杂志*, 1994, 10: 570-574.
- Mao Z B, Zhang Z Y, Wu Y N, Chen Z H. Methylation of genomic DNA and proto-oncogene *c-Ha-ras* in brain nuclei of ageing rats. *Chinese Biochemical Journal*, 1994, 10: 570-574. (in Chinese)
- [17] 邓大君, 邓国仁, 吕有勇, 周 静, 辛慧君. 变性高效液相色谱法检测 CpG 岛胞嘧啶甲基化. *中华医学杂志*, 2001, 81: 158-161.
- Deng D J, Deng G R, Lü Y Y, Zhou J, Xin H J. Analysis of the methylation in CpG island by denaturing high-performance liquid chromatography. *National Medical Journal of China*, 2001, 81: 158-161. (in Chinese)
- [18] Oakeley E J. DNA Methylation analysis: a review of current methodologies. *Pharmacology & Therapeutics*, 1999, 84: 389-400.
- [19] Weiss A, Keshet I, Razin A, Cedar H. DNA demethylation *in vitro*: involvement of RNA. *Cell*, 1996, 86: 709-718.
- [20] Rossi V, Motto M, Pellegrini L. Analysis of the methylation pattern of the maize *Opague 2* (O2) promoter and *in vitro* binding studies indicate that the O2 B-Zip protein and other endosperm factors can bind to methylated target sequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 13758-13771.
- [21] Sorensen M B. Methylation of *B-hordein* genes in barley endosperm is inversely correlated with gene activity and affected by the regulatory gene *Lvs3*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89: 4119-4123.

(责任编辑 高 雨)