

# 山羊卵巢维持基因 *FOXL2* 启动子活性及调控区域分析

耿立英<sup>1,2</sup>, 张宇<sup>1,2</sup>, 李祥龙<sup>1,2\*</sup>, 周荣艳<sup>2</sup>, 李兰会<sup>2</sup>, 王志刚<sup>2</sup>

(1. 河北科技师范学院, 秦皇岛 066600; 2. 河北农业大学动物科技学院, 保定 071000)

**摘要:** 旨在研究山羊卵巢维持基因 *FOXL2* 启动子活性以及探究该基因的调控机理。从 NCBI 数据库调取 *FOXL2* 基因启动子序列, 用生物信息学软件对其核心启动子和转录因子进行预测分析。使用 PCR 技术克隆 *FOXL2* 基因启动子序列, 并构建一系列缺失载体, 瞬时转染 293T 和 A375 细胞, 利用双荧光素酶基因检测仪测定相对荧光素酶活性值。结果表明, 该基因启动子区域存在两个典型的 CpG 岛, 分别位于 (-920/+51(972 bp)) 和 (+125/+555(430 bp)) 区域; 经 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定表明, 重组载体质粒构建正确; 在细胞中插入不同长度的 *FOXL2* 基因启动子片段, 随着启动子 5' 端截短, 荧光素酶转录活性先升高再逐渐降低。(-934/+324) 区域存在转录活性, (-32/+324) 区段包含了转录的基本元件; (-934/-456) 区域在转录过程中对 *FOXL2* 基因起负调控作用, (-456/-192) 区域为正调控区域。

**关键词:** 山羊; *FOXL2* 基因; 启动子; 活性

中图分类号: S827; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)12-2153-08

## Activity and Regulation Region Analysis of Promoter of Goat *FOXL2* Gene

GENG Li-ying<sup>1,2</sup>, ZHANG Yu<sup>1,2</sup>, LI Xiang-long<sup>1,2\*</sup>, ZHOU Rong-yan<sup>2</sup>, LI Lan-hui<sup>2</sup>, WANG Zhi-gang<sup>2</sup>

(1. Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao 066600, China;

2. College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

**Abstract:** The research was designed to study the activity of goat ovarian maintenance gene *FOXL2* promoter and explore the gene's regulation mechanism. *FOXL2* promoter sequence was retrieved from the NCBI database, bioinformatics software was adopted to predict its core promoter and transcription factors. PCR technology was used to clone *FOXL2* gene promoter sequence and construct a series of deletion vectors, 293T and A375 cells were transiently transfected, dual luciferase gene detector was used to measure the relative luciferase activity value. The results indicated that there were 2 typical CpG islands in the gene promoter region, which were located at (-920/+51(972 bp)) and (+125/+555(430 bp)) regions; the result of *Kpn* I and *Hind* III dual enzyme digestion test suggested that the recombinant plasmid was constructed correctly; *FOXL2* gene promoter fragments with different lengths were inserted into the cells. When the promoter 5' was truncated, luciferase transcriptional activity firstly increased and then decreased. The result indicate that (-934/+324) region has transcriptional activity, (-32/+324) region contain the basic elements of transcription; (-934/-456) region negatively regulates *FOXL2* gene during the transcription process, (-456/-192) region is a positive regulatory region.

**Key words:** goat; *FOXL2* gene; promoter; activity

收稿日期: 2015-01-06

基金项目: 河北省高校创新团队领军人才培育计划(LJRC004)

作者简介: 耿立英(1974-), 女, 山东平原人, 副教授, 博士生, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: rosegenly@126.com

\* 通信作者: 李祥龙, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: lixianglongcn@yahoo.com

*FOXL2* (Forkhead box L2) 属于 FOX 叉头框转录因子家族, 在体细胞中广泛表达。该基因在人类、鼠和山羊等物种中高度保守, 人同源序列缺失则导致眼裂狭小综合症 (BPES)<sup>[1]</sup>, 突变后 *FOXL2* 生物学结构与功能的改变, 可能是小睑裂综合症的致病原因<sup>[2]</sup>。*FOXL2* 被认为在性别分化中起到重要作用<sup>[3-5]</sup>, 是雌性的性别决定基因<sup>[6-7]</sup>, 对卵巢发育调控起关键作用<sup>[8-11]</sup>, 在小鼠和山羊的早期卵巢分化中, 均发现了 *FOXL2* 基因的表达<sup>[12]</sup>, 其功能缺失会导致性别反转<sup>[13-14]</sup>。*FOXL2* 基因从正常山羊胚胎发育的初期开始表达, 并且 36 dpc 表达呈上升趋势, 成年后表达消失<sup>[15]</sup>。山羊 *FOXL2* 基因受无角间性综合症 (Polled intersex syndrome, PIS) 区域调控表达, 并与山羊间性形成具有紧密联系<sup>[16]</sup>。山羊 *FOXL2* 基因上游长度为 1 055 bp 的启动子区域曾被作为 PIS 区域调控重要元件被首度克隆, 并插入到荧光素酶 Luc 报告基因载体, 细胞转染试验验证了该启动子活性<sup>[17]</sup>。据报道 *FOXL2* 基因启动子为典型的 GC-rich 启动子, 并且包含 Sp1 结合位点<sup>[17]</sup>。通常来说, 这种类型的启动子应该含有多个转录起始位点, 且转录起始元件分布在 100 bp 范围内<sup>[18]</sup>。除受启动子元件的转录调控外, 山羊基因接受位于 1q23 无角综合症 (PIS) 区域的调控。到目前为止, 虽然已验证了山羊 *FOXL2* 基因的启动子区域, 但对于山羊 *FOXL2* 基因的转录调控的正负调控区域尚不明确。

本试验克隆了山羊 *FOXL2* 基因启动子序列, 并通过生物信息学分析构建了启动子系列缺失报告基因载体, 分析并探讨该基因的转录活性区域, 为进一步研究 *FOXL2* 基因表达调控奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品及试剂

健康、体况良好的唐山奶山羊血液样品 (正常 64 个, 间性 34 个); DH5 $\alpha$  菌种和绿色荧光蛋白质粒由实验室保存; pMD $\text{\textcircled{R}}$ 19-T 载体为宝生物工程有限公司产品; pGL3-Basic、pGL3-Control 和 PRL-TK 载体均由北京原平皓生物技术有限公司赠送。TransStart *Taq* DNA Polymerase、dNTPs 和 T4 DNA 连接酶为全式金 (北京) 生物技术有限公司产品; 限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 购自 Thermo 公司; 质粒 DNA 小量提取试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒为上海生工生物工程有限公司产品; 双荧

光素酶 Luc 报告基因检测试剂盒为北京原平皓生物技术有限公司产品; 脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品; 1640 固体培养基、0.25% 胰蛋白酶和小牛血清购自 GIBCO 公司。

### 1.2 启动子序列分析

利用 NCBI 数据库调取山羊 *FOXL2* 基因启动子序列 (AY112725.2), 使用软件 Primer 5.0 设计引物扩增该区域序列并送至测序公司测序。利用在线 Methprimer 程序对山羊 *FOXL2* 基因启动子序列进行 CpG 岛预测 (<http://www.urogene.org/methprimer/>); 使用在线程序 Neural Network Promoter Prediction (NNPP) (<http://promotor.biosino.org/>) 和 Promoter Scan (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>) 进行核心启动子预测及转录因子分析<sup>[19]</sup>。

### 1.3 引物设计及载体构建

根据生物信息学分析结果, 以 *FOXL2* 基因 -1 000~+350 区域 (AY112725.2) 为模板, 对其 5' 端进行不同长度的缺失, 并命名为 P1 (-934/+324)、P2 (-456/+324)、P3 (-192/+324)、P4 (-104/+324) 和 P5 (-32/+324) (图 1), 引物序列设计了 *Kpn* I 和 *Hind* III 两种酶切位点 (表 1)。PCR 扩增 5 个启动子缺失片段并切胶纯化回收, 连接到 pMD $\text{\textcircled{R}}$ 19-T 载体, 利用引物两端酶切位点, 再将目的片段从克隆载体上切割下来, 并连接到表达载体 pGL3-Basic 上。酶切鉴定筛选的阳性克隆送至测序公司测序。

### 1.4 山羊 *FOXL2* 基因启动子转录活性的检测

293T 和 A375 细胞均使用添加 10% 小牛血清的 1640 培养基培养。转染前 1 d 以  $1.5 \times 10^5$  个  $\cdot$  孔<sup>-1</sup> 的密度接种于 24 孔培养板过夜培养, 用于转染。293T 和 A375 细胞脂质体与质粒总量比分别为 1:0.5 和 1:0.25。设计阳性对照组为 pGL3-promoter 质粒与 pRL-TK 质粒共转染, 阴性对照组为 pGL3-Basic 质粒与 pRL-TK 质粒共转染, 试验组为 pGL3-Basic/Px 质粒与 pRL-TK 质粒共转染, 具体转染与双荧光素酶检测荧光值步骤参照荧光素酶检测试剂盒操作说明进行。试验重复 3 次, 每次 3 个平行。

### 1.5 数据处理

将所测得萤火虫荧光素酶蛋白表达量检测值 F 除以内参海参荧光素酶蛋白表达量检测值 R, 所得

即为萤火虫荧光素表达量的相对值  $F/R$ ,再除以阴性对照 pGL3-Basic 的相对荧光素酶检测的背景值,

以消除不同转染批次的系统误差。试验数据使用 SPSS17.0 进行统计学分析。

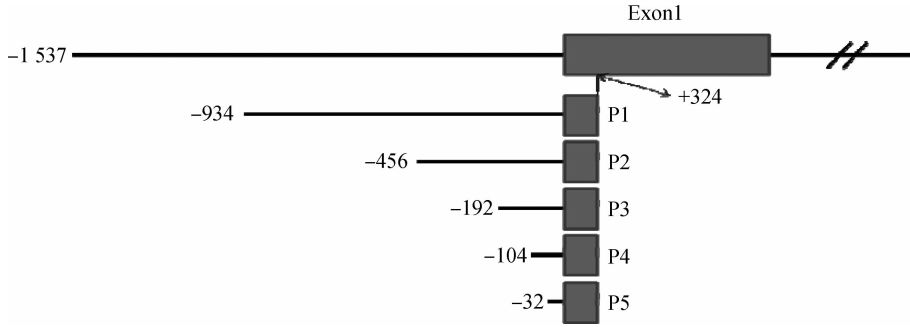


图 1 山羊 *FOXL2* 基因启动子不同长度片段扩增示意图

Fig. 1 Amplifying schematic diagram of different length fragments in goat *FOXL2* promoter region

表 1 山羊 *FOXL2* 基因启动子扩增引物

Table 1 Primers for promoter amplification of goat *FOXL2* gene

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence	产物长度/bp Products size
FOXL2-S1	( <i>Kpn</i> I) GGGGTACCTATCATAGGTCCAGGAGCAGCG	1 039
FOXL2-S2	( <i>Kpn</i> I) GGGTACCCAAAGGGCAGAGCAAAGGAG	780
FOXL2-S3	( <i>Kpn</i> I) GGGTACCCTTGAGATGAACTCTCCCGTG	514
FOXL2-S4	( <i>Kpn</i> I) GGGTACCGAATCAGAACAGAGCGAGGCTC	425
FOXL2-S5	( <i>Kpn</i> I) GGGTACCGTCTCGGGAAACCGAAGGGT	353
FOXL2-A5	( <i>Hind</i> III) CCCAAGCTTAGCTGGCCATCATGACAAAGC	

## 2 结果

### 2.1 *FOXL2* 基因启动子全长片段的获得

以正常唐山奶山羊基因组为模板,进行 PCR 扩增测序后,克隆得到的目的片段与 NCBI 提交的山羊 *FOXL2* 基因序列 (AY112725.2) 相似性为 99% (图 2),说明扩增片段来源正确,可用于后续试验。

### 2.2 *FOXL2* 基因启动子生物信息学分析

将测序得到的 *FOXL2*-SA 序列 2 149 bp (-1 537/+612) 提交到 Methprimer 程序进行预测分析 (图 3)。该区段存在两个典型的大小分别为

972 和 430 bp 的 CpG 岛,分别位于 616~1 588 bp (-920,+51) 区段和 1 662~2 092 bp (+125,+555) 区段。因此可以确定,*FOXL2* 基因启动区域通过 CpG 岛招募重要转录因子发挥启动转录作用,而高甲基化状态的 CpG 岛反过来影响其对转录因子的招募,从而降低下游基因转录活性,即影响基因表达。

NNPP 启动子程序的预测结果显示了 3 个阈值超过 0.85 的候选核心启动子区段,分别为 -978~-929 bp、+257~+307 bp、+294~+444 bp,预测得分分别为 0.85、0.86 和 0.86 (表 2)。

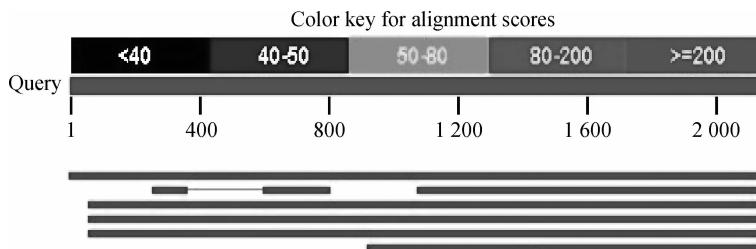


图 2 *FOXL2* 基因在 NCBI 中的比对结果

Fig. 2 Result of blast in NCBI of *FOXL2* gene

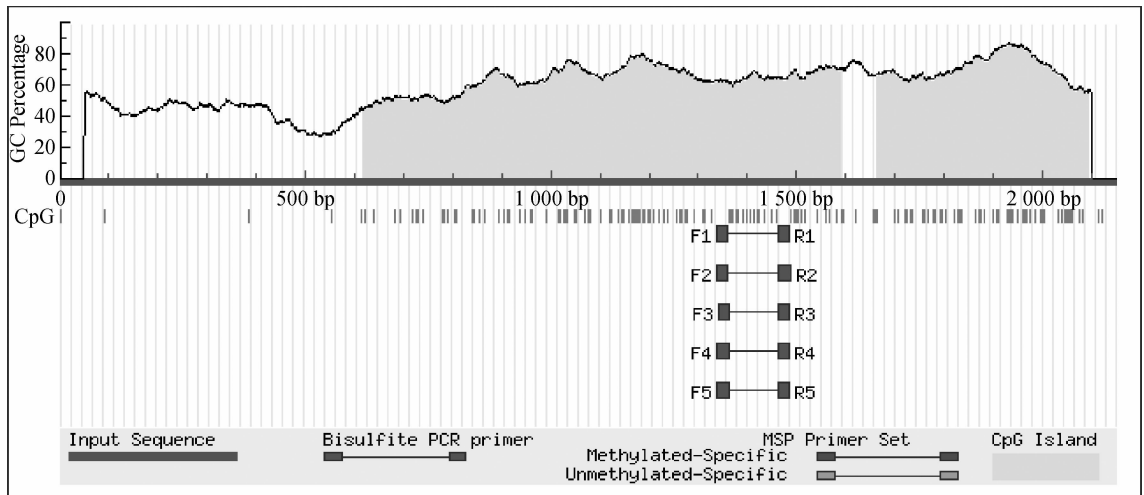
图3 *FOXL2* 基因 CpG 岛预测结果Fig. 3 Result of predicting for CpG island of *FOXL2* gene

表2 Neural Network Promoter Prediction 启动子预测结果

Table 2 The promoter prediction result by neural network promoter prediction

起始位置 Starting position	终止位置 End position	得分 Score	启动子序列 Promoter sequence
560(-978)	610(-929)	0.85	TTACCCATAAAATATAAAATCTCACATCTTATATCTGTGCATACCTGTTTC
1 794(+257)	1 844(+307)	0.86	CGGCGCCAGCGGAAAAGAGCAGGGACTGCCCGGCCGCGGCCGCGCCGGCTT
1 931(+294)	1 981(+444)	0.86	GGCGCCGCGCCGCCAGCCCGGGCAAGGGCGGCGGCCGCGGTGCGGGGG

使用 Promoter Scan 程序预测 *FOXL2*-SA 启动子结合位点,结果显示,+43~+293 bp 区段的启动子分值最高达到了 61.71(预测阈值为 53.0),并且在此区域预测出 Sp1、EARLY-SEQ1、T-Ag、AP-2、UCE. 2、KROX24、EGR-1、UCE. 1、MT-I. 6 和 GCF 转录因子,其中 Sp1 和 AP-2 出现频数最高,分别为 7 和 4 次。-276~-526 bp 区段预测分值为 54.06,也超出了阈值 53.0 分。此段区域中包括了 GCF、UCE. 2、AP-2、Sp1、T-Ag、H4TF1、JCV、EARLY-SEQ1、PuF 和 SIF 转录因子,其中 Sp1 出现 6 次,AP-2 出现 5 次(表 3)。这些转录因子分布集中的区域,预示着对 *FOXL2* 基因表达起着重要调控作用,+43~+293 bp 区域可能为 *FOXL2* 基因核心启动子区。

### 2.3 缺失启动子基因载体的构建

依据上述生物信息学分析结果,选取 -934/+324 区间作为最长克隆片段,其他片段分别为对其 5' 端进行不同长度的缺失,构建命名如下质粒: pGL3-Basic/P1(-934/+324)、pGL3-Basic/P2

(-456/+324)、pGL3-Basic/P3(-192/+324)、pGL3-Basic/P4(-104/+324) 和 pGL3-Basic/P5(-32/+324)。最长片段 pGL3-Basic/P1 覆盖了两个 CpG 岛和所有转录因子富集区域;pGL3-Basic/P2 为第一个 CpG 岛部分缺失片段,但包含 Promoter Scan 程序预测的两个核心启动子区域;pGL3-Basic/P3(-192/+324) 缺失了 Promoter Scan 程序预测的一个核心启动子区域;pGL3-Basic/P4(-104/+324) 保留了转录起始位点前 100 bp 区域;pGL3-Basic/P5(-32/+324) 缺失了转录起始位点前所有片段。

将构建完成的 Luc 报告基因载体使用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定,如图 4 所示,所有正常长度的目的基因片段均被切割下来,因此所构建的重组载体质粒含有所克隆目的片段。

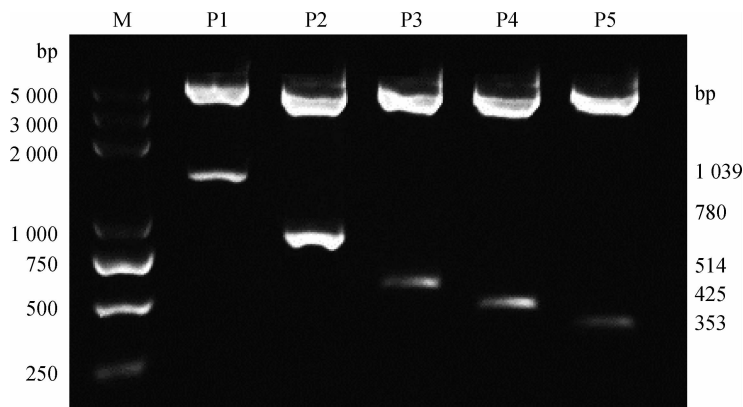
### 2.4 细胞转染及活性分析

使用 Luc 报告基因载体瞬时转染 293T 和 A375 细胞,转染 48 h 后裂解并收获细胞,细胞裂解液用于测定双荧光素酶活性并且计算 Luc 报告基因

表 3 Promoter Scan 预测启动子结果

Table 3 Promoter prediction by Promoter Scan

转录因子 Transcription factor	正/反义链 Sense/Antisense strand	位置/bp Position	权重 Weight	转录因子 Transcription factor	正/反义链 Sense/Antisense strand	位置/bp Position	权重 Weight
Sp1	+	43	3.013	GCF	+	-276	2.284
Sp1	-	48	3.061	UCE. 2	-	-315	1.278
EARLY-SEQ1	-	50	5.795	AP-2	-	-334	1.108
Sp1	-	50	6.819	Sp1	-	-350	3.292
T-Ag	+	52	1.086	AP-2	-	-350	1.355
AP-2	+	90	1.355	Sp1	+	-355	3.361
AP-2	+	92	1.108	UCE. 2	+	-361	1.216
Sp1	+	118	2.755	GCF	+	-364	2.284
Sp1	-	123	2.772	T-Ag	-	-470	1.086
UCE. 2	+	124	1.278	H4TF1	-	-492	1.679
UCE. 2	-	127	1.216	JCV	-	-494	1.427
AP-2	-	138	1.091	AP-2	+	-495	1.091
AP-2	-	140	1.672	AP-2	+	-495	1.064
KROX24	+	183	2.151	AP-2	+	-497	1.672
Sp1	+	187	3.013	Sp1	-	-498	6.661
EGR-1	-	191	2.294	Sp1	-	-498	10.681
Sp1	-	192	3.061	Sp1	-	-499	3.013
UCE. 2	+	223	1.278	Sp1	+	-504	3.061
UCE. 2	-	226	1.216	EARLY-SEQ1	+	-506	5.795
UCE. 1	-	236	1.700	UCE. 2	-	-516	1.278
MT-I. 6	+	240	8.606	PuF	-	-526	1.082
GCF	+	256	2.361	SIF	+	-526	1.161
GCF	-	262	2.284				



P1~P5. Luc 报告基因载体双酶切产物; M. DNA 相对分子质量标准 DL5000  
 P1-P5. Luc reporter gene vector double enzyme products; M. DL5000 DNA marker

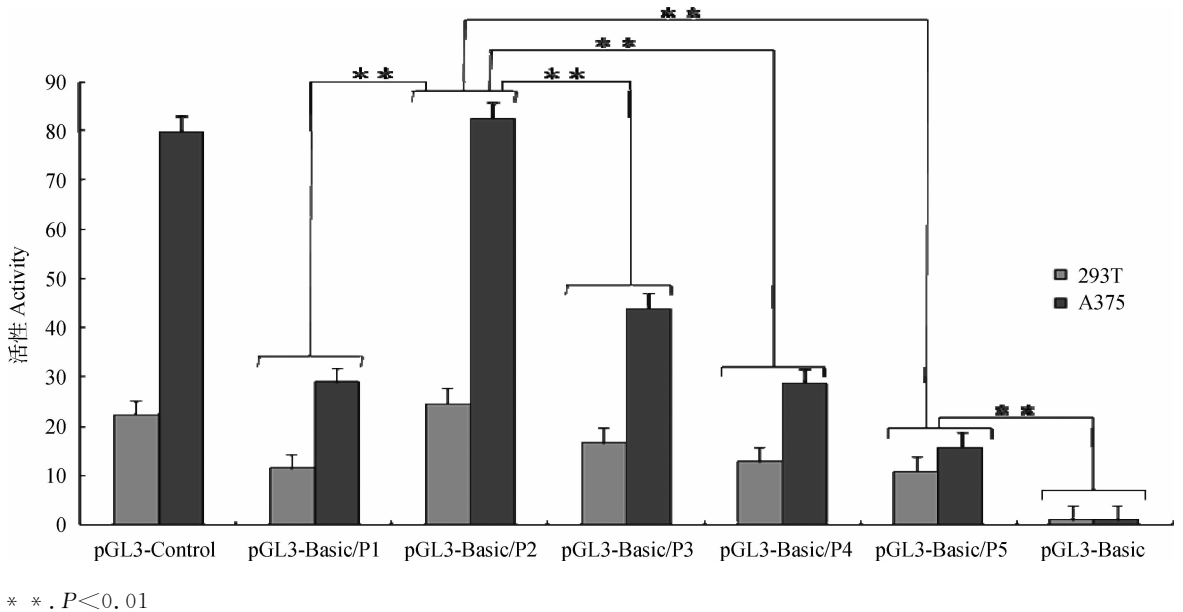
图 4 重组质粒酶切检测结果

Fig. 4 Result of recombinant plasmid by digestion

相对活性值。经过数据校正后,综合多次测定结果,用 SPSS17.0 软件分析缺失启动子片段启动子活性。试验结果表明,本试验所构建的各个缺失启动子片段的载体与 pGL3-Basic 空载体相比都具有明显的启动活性( $P < 0.01$ )。

由图 5 可以看出, *FOXL2* 基因启动子随 5' 端截短, 荧光素酶转录活性先升高再逐渐降低, 并且在 293T 和 A375 细胞中的变化趋势几乎相同, 说明试验结果具有可信度。缺失启动子片段在两种细胞中表达的共同特点是: pGL3-Basic/P5 区段的启动子活性均为 5 个区段中活性最低的片段, 但是这个缺失片段在两种细胞中与阴性对照相比仍然具有启动

子活性, 且统计学差异极显著( $P < 0.01$ ); 同时 pGL3-Basic/P2 与 pGL3-Basic/P1 片段相比, 启动子活性极显著升高( $P < 0.01$ ), 其余缺失片段与 pGL3-Basic/P2 片段相比, 启动子活性极显著降低( $P < 0.01$ )。结果表明, pGL3-Basic/P5 缺失片段具备转录的基本元件; pGL3-Basic/P1 片段中的(-934/-456)区域在转录过程中可能起了负调控的作用; pGL3-Basic/P2 片段中的(-456/-192)区域为山羊 *FOXL2* 基因正调控区域。在 A375 细胞中各个缺失启动子片段荧光素酶的表达量均相应高于 293T 细胞, 因此与 293T 细胞相比, A375 细胞的内环境更适合于 *FOXL2* 基因启动子的转录。



\*\* .  $P < 0.01$

图 5 *FOXL2* 启动子缺失片段在 293T 和 A375 细胞中的活性比较

Fig. 5 Comparative activity of different promoters of *FOXL2* in 293T and A375 cells

### 3 讨论

本试验通过 5' RACE 从 1 个月的山羊卵巢中成功克隆了 *FOXL2* 基因启动子序列, 并确定翻译起始密码子。对所得序列进行生物信息学分析发现, 该基因启动子区域存在两个典型的大小分别为 972 和 430 bp 的 CpG 岛, 分别位于(-920/+51)区段和(+125/+555)区段。该启动子为典型的 GC-rich 启动子, 并且包含 Sp1 结合位点, 与 M. Pannetier 等人研究结果一致<sup>[17]</sup>。 *FOXL2* 基因启动子是通过 CpG 岛招募重要转录因子发挥启动转录作用<sup>[20]</sup>。 CpG 岛通常存在于基因启动子区域, 基因末端常存在一些富含“CG”双核苷酸区域。 CpG 岛不仅是基因的一种标志, 可通过 CpG 岛甲基化来参与

基因表达调控和影响染色质结构<sup>[21]</sup>。 *FOXL2* 基因 CpG 岛的范围几乎包含了转录起始位点上游 1 000 bp 和下游 500 bp, 暗示该区域存在较为广泛的调控作用。

使用 Promoter Scan 程序预测 *FOXL2*-SA 启动子结合位点, 结果给出了 2 个候选核心启动子区域, 并且(+43/+293)区段预测分值高于(-276/-526)区段。 其中两个区段中 Sp1 和 AP-2 转录因子出现频率最高, 预示着这两种转录因子对 *FOXL2* 基因表达起着重要调控作用。 +43 ~ +293 区域可能成为 *FOXL2* 基因核心启动子区。

综合对核心启动子及转录因子预测结果, 推测出 3 个候选核心启动子区域分别是(+40/+300)区段、(-500/-200)区段和(-950/-900)区段。 依

据 CpG 岛位置、核心启动子预测位置和转录因子预测位置设计不同的启动子缺失片段,并连接至荧光素酶 Luc 报告基因载体,所构建的 Luc 报告基因载体分别为 pGL3-Basic/P1(-934/+324)、pGL3-Basic/P2(-456/+324)、pGL3-Basic/P3(-192/+324)、pGL3-Basic/P4(-104/+324)和 pGL3-Basic/P5(-32/+324),利用绿色荧光蛋白报告基因载体分别瞬时转染 293T 和 A375 细胞,发现所构建的缺失启动子片段均具备启动子活性,该结论与 CpG 岛存在范围相一致。其中在细胞中插入 *FOXL2* 基因不同长度的启动子片段,荧光素酶的转录活性有显著差异:随着 5' 端的截短,荧光素酶的转录活性先升高再逐渐降低。pGL3-Basic/P2 片段与其他片段相比,启动子活性极显著升高,说明 pGL3-Basic/P2 片段中的(-456/-192)区域为山羊 *FOXL2* 基因正调控区域;pGL3-Basic/P5 区段的启动子活性为 5 个区段中活性最低的片段,说明缺失了转录起始位点前所有片段的 pGL3-Basic/P5 片段为仍具备转录活性的基本元件,并且该结果与 Promoter Scan 程序的预测结果相一致。(-934/-456)区域的缺失使启动子转录活性显著上升,在转录过程中起了负调控的作用,(-456/-192)区域的缺失使启动子活性显著下降,可知该区域为 *FOXL2* 基因正调控区域<sup>[22]</sup>。

本研究克隆了山羊 *FOXL2* 基因的启动子片段,并通过生物信息学分析构建了启动子缺失报告基因载体,通过瞬时转染 293T 和 A375 细胞的体外尝试分析并探讨了该基因的转录活性区域,为进一步研究 *FOXL2* 基因表达调控奠定基础。有关 *FOXL2* 基因启动子的活性功能验证还有待于在更多种类细胞中进行试验。

#### 4 结 论

山羊 *FOXL2* 基因(-934/+324)区域存在转录活性,(-934/-456)区域缺失使启动子转录活性显著上升,在转录过程中起负调控作用,(-456/-192)区域缺失使启动子活性显著下降,为 *FOXL2* 基因正调控区域。

#### 参考文献(References):

[1] BEYSEN D, RAES J, LEROY B P, et al. Deletions involving long-range conserved nongenic sequences upstream and downstream of *FOXL2* as a novel disease-

causing mechanism in blepharophimosis syndrome [J]. *Am J Hum Genet*, 2005, 77(2): 205-218.

- [2] 朱建莹,李艳艳,孙岩,等.突变前后 *FOXL2* 基因的生物信息学分析研究[J].中华临床医师杂志(电子版),2013,7(8):3351-3356.  
ZHU J Y, LI Y Y, SUN Y, et al. The bioinformatics study of normal and mutational human *FOXL2* gene [J]. *Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition)*, 2013, 7(8): 3351-3356. (in Chinese)
- [3] LI M H, YANG H H, LI M R, et al. Antagonistic roles of *Dmrt1* and *Foxl2* in sex differentiation via estrogen production in tilapia as demonstrated by TALENs[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(12): 4814-4825.
- [4] GENNOTTE V, MÉLARD C, D' COTTA H, et al. The sensitive period for male-to-female sex reversal begins at the embryonic stage in the Nile tilapia and is associated with the sexual genotype[J]. *Mol Reprod Dev*, 2014, 81(12): 1146-1158.
- [5] BAHAMONDE P A, MCMASTER M E, SERVOS M R, et al. Molecular pathways associated with the intersex condition in rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) following exposures to municipal wastewater in the Grand River basin, ON, Canada. Part B [J]. *Aquat Toxicol*, 2015, 159: 302-316.
- [6] PISARSKA M D, BARLOW G, KUO F T. Minireview: roles of the forkhead transcription factor *FOXL2* in granulosa cell biology and pathology[J]. *Endocrinology*, 2011, 152(4): 1199-1208.
- [7] BOULANGER L, PANNETIER M, GALL L, et al. *FOXL2* is a female sex-determining gene in the goat [J]. *Curr Biol*, 2014, 24(4): 404-408.
- [8] GEORGES A, L' HÔTE D, TODESCHINI A L, et al. The transcription factor *FOXL2* mobilizes estrogen signaling to maintain the identity of ovarian granulosa cells[J]. *Elife*, 2014, 3: e04207. doi: 10. 7554/eLife. 04207.
- [9] GEORGES A, AUGUSTE A, BESSIÈRE L, et al. *FOXL2*: a central transcription factor of the ovary [J]. *J Mol Endocrinol*, 2014, 52(1): R17-R33.
- [10] LI G L, ZHANG M Z, DENG S P, et al. Effects of temperature and fish oil supplementation on ovarian development and *foxl2* mRNA expression in spotted scat *Scatophagus argus* [J]. *J Fish Biol*, 2015, 86(1): 248-260.
- [11] QIN N, LIU Q, ZHANG Y Y, et al. Association of novel polymorphisms of forkhead box L2 and growth

- differentiation factor-9 genes with egg production traits in local Chinese Dagu hens[J]. *Poult Sci*, 2015, 94(1):88-95.
- [12] ELZAIAT M, JOUNEAU L, THÉPOT D, et al. High-throughput sequencing analyses of XX genital ridges lacking FOXL2 reveal DMRT1 up-regulation before SOX9 expression during the sex-reversal process in goats[J]. *Biol Reprod*, 2014, 91(6):1-14, 153.
- [13] AUGUSTE A, CHASSOT A A, GRÉGOIRE E P, et al. Loss of R-spondin1 and Foxl2 amplifies female-to-male sex reversal in XX mice[J]. *Sex Dev*, 2011, 5(6):304-317.
- [14] PANNETIER M, ELZAIAT M, THÉPOT D, et al. Telling the story of XX sex reversal in the goat: highlighting the sex-crossroad in domestic mammals[J]. *Sex Dev*, 2012, 6(1-3):33-45.
- [15] PAILHOUX E, VIGIER B, CHAFFAUX S, et al. A 11, 7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats[J]. *Nat Genet*, 2001, 29(4):453-458.
- [16] 张晶晶. 无角间性奶山羊 FOXL2 基因及 PIS 区域变异研究[D]. 保定:河北农业大学, 2010.
- ZHANG J J. Variation of PIS region and FOXL2 gene in the polled intersex dairy goat[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2010. (in Chinese)
- [17] PANNETIER M, RENAULT L, JOLIVET G, et al. Ovarian-specific expression of a new gene regulated by the goat PIS region and transcribed by a FOXL2 bidirectional promoter[J]. *Genomics*, 2005, 85(6):715-726.
- [18] 夏江东, 程在全, 吴渝生, 等. 高等植物启动子功能和结构研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(1):7-14.
- XIA J D, CHENG Z Q, WU Y S, et al. Advances of the studies on function and composition of plant promoter[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2006, 21(1):7-14. (in Chinese)
- [19] ZHONG S, HE X, BAR-JOSEPH Z. Predicting tissue specific transcription factor binding sites[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14:796. doi:10.1186/1471-2164-14-796.
- [20] TRAN S, WANG Y, LAMBA P, et al. The CpG island in the murine foxl2 proximal promoter is differentially methylated in primary and immortalized cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10):e76642.
- [21] ZHOU X Y, SUN J F, HE Y H, et al. Correlation of the methylation status of CpG islands in the promoter region of 10 genes with the 5-Fu chemosensitivity in 3 breast cancer cell lines[J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2010, 32(5):328-333.
- [22] MCLNTOSH A L, ATSHAVES B P, HOSTETLER H A, et al. Liver type fatty acid binding protein(L-FABP) gene ablation reduces nuclear ligand distribution and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activity in cultured primary hepatocytes[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 485(2):160-173.

(编辑 郭云雁)