



刘 凯, 刘国乾, 曹亚鸽, 等. 猪生殖细胞特异性基因 *Sohlh1* 及启动子的研究[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(6): 52-58.

猪生殖细胞特异性基因 *Sohlh1* 及启动子的研究

刘 凯¹, 刘国乾^{1,2}, 曹亚鸽¹, 卫恒习¹, 李 莉¹, 张守全¹
(1 华南农业大学 动物科学学院/国家生猪种业工程技术研究中心/广东省农业动物基因组学与
分子育种重点实验室, 广东 广州 510642; 2 广东科贸职业学院, 广东 广州 510640)

摘要:【目的】探究猪生殖细胞特异性基因 *Sohlh1* 在幼年和成年各组织中的表达情况, 分子遗传进化特点, 及其启动子的核心区域和特异性调控区间。【方法】通过 RT-PCR 验证猪不同时期不同组织 *Sohlh1* 基因的表达情况, 通过生物软件分析其分子遗传进化特点, 构建启动子验证载体, 通过双荧光素酶分析基因启动子的核心区域和特异性调控区间。【结果】*Sohlh1* 基因在仔猪与成年猪睾丸和仔猪卵巢中都有表达, 在成年猪卵巢不表达; 通过多个物种进化分析, *Sohlh1* 基因随着脊椎动物从低等到高等的演变也在进化; 通过双荧光素酶分析构建的启动子验证载体, 猪 *Sohlh1* 基因的启动子的核心区域在 78 bp 附近, 特异性调控区间在 771 ~ 2 981 bp 之间。【结论】基于 *Sohlh1* 基因的进化分析, 作为试验动物模型, 猪可能更优于啮齿类动物, 其组织特异性表达可能主要通过其启动子特异性调控区间调控。

关键词:猪; *Sohlh1*; 启动子; 遗传进化; 验证载体; 双荧光素酶
中图分类号:S828 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2016)06-0052-07

Analysis of pig germ-cell special gene *Sohlh1* and its promoter

LIU Kai¹, LIU Guoqian^{1,2}, CAO Yage¹, WEI Hengxi¹, LI Li¹, ZHANG Shouquan¹
(1 College of Animal Science, South China Agricultural University/ National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry/ Guangdong Provincial Key Lab of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding, Guangzhou 510642, China; 2 Guangdong Polytechnic of Science and Trade Guangzhou, Guangzhou 510640, China)

Abstract:【Objective】To study the expression of germ-cell special gene *Sohlh1* in different tissues of young and adult pigs, analyze the features of molecular genetic evolution of *Sohlh1* gene, and determine the core region and specific regulatory region of the promoter. 【Method】The expressions of *Sohlh1* gene in different pig tissues and different time were verified by RT-PCR. The features of molecular genetic evolution of *Sohlh1* gene was analyzed using biology software, the promoter was constructed and confirmed by a verification vector, and the core region and specific regulatory region of the promoter were analyzed by dual luciferase assay. 【Result】*Sohlh1* gene was expressed in testis of piglet and adult pig and ovary of piglet, and was not expressed in ovary of adult pig. *Sohlh1* gene had evolved along with the evolution of lower to higher vertebrates based on phylogenetic analysis of SOHLH1 proteins in multiple species. The core region of the promoter of pig *Sohlh1* gene was near 78 bp, and the specific regulatory region was between 771 and 2 981 bp based on dual luciferase assay of the promoter verification vector. 【Conclusion】Pig could be a superior animal model compared with rodent based on *Sohlh1* gene evolution analysis. The tissue specific expression of *Sohlh1* gene may be mainly controlled by the specific regulatory region of its promoter.

Key words:pig; *Sohlh1*; promoter; genetic evolution; verification vector; dual luciferase

原始生殖细胞(Primordial germ cells,PGCs)形成成熟配子过程中,生殖细胞特异性转录因子调控及表观遗传修饰是必需的^[1-2]。*Sohlh1* 是一种生殖器官特异表达基因,编码了1种bHLH转录调控因子,调控精子和卵子的发生。在雄性老鼠中SOHLH1蛋白集中于A型精原细胞分化的所有过程中,而在精母细胞和新生的小鼠中未检测到^[3]。对新生小鼠卵巢进行组织切片原位杂交或抗体染色观察发现SOHLH1主要分布在卵原细胞簇、原始卵泡和初级卵泡的卵细胞中,而在次级卵泡中不表达^[4]。

研究表明,*Sohlh1* 基因调控生殖细胞分化是通过与 *Sohlh2* 基因一起调节 Kit 信号通路来实现,同时SOHLH1与SOHLH2共同或单独作用于其他基因的启动子上,主要是E-box位点实现基因的转录激活或抑制^[5-9]。*Sohlh1* 基因的自我调控是通过 *Sohlh2*/*Sohlh1*/Sp1复合物作用 *Sohlh1* 基因的启动子的E-box位点实现的^[3-4, 6, 8, 10]。Suzuki等^[7]研究表明,小鼠 *Sohlh1* 基因敲除后精原细胞能够继续增殖但不能进行正常分化,从而导致雄性小鼠不育,Pangas等^[4]研究表明在 *Sohlh1* 基因敲除雌性鼠卵巢中主要是通过下调2个与卵泡形成相关的基因 *Nobox* 和 *Figla*的表达来阻碍卵泡的形成,最终造成不育。

Sohlh1 基因调控生殖细胞生成过程在小鼠上已被深入研究,随着各种动物基因组公布,很多物种 *Sohlh1* 基因被验证或预测,目前国内外主要集中在 *Sohlh1* 基因的调控等方面的研究,但对该基因的启动子的功能和调控方面的研究还太少。通过分析已报道的小鼠 *Sohlh1* 基因的启动子和预测的猪 *Sohlh1* 基因的启动子,发现猪 *Sohlh1* 基因的启动子GC含量远高于小鼠,同时发现小鼠 *Sohlh1* 基因的启动子与猪 *Sohlh1* 基因的启动子有很大的差异性。因此,本研究首先通过RT-PCR方法检测猪生殖细胞特异性基因 *Sohlh1* 在仔猪及成年猪各组织表达情况,进而扩增猪 *Sohlh1* 基因并对其进行分子遗传进化分析,最后探究猪 *Sohlh1* 基因的启动子的核心区域和特异性调控区间,为后续利用猪 *Sohlh1* 基因的启动子制备生殖细胞特异性表达目的基因克隆猪奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 试验动物 1日龄长白仔猪,购于广东省广三保原种猪场,成年猪各组织采自广州附近屠宰场。
- 1.1.2 质粒和细胞株 pGL3-basic启动子验证载体为Promega公司产品,小鼠精原干细胞株GC-1为ATCC公司产品。

1.2 方法

- 1.2.1 猪组织样品采集 1日龄仔猪组织样品采集:仔猪全身用φ为70%乙醇棉球擦拭,确保全身消毒,将仔猪固定于清洁手术盘中,割破仔猪颈动脉处死仔猪,依次采取皮肤、肌肉、心、肝、脾、肺、肾、脑、睾丸(公猪)及卵巢(母猪)分装2份,一份置于2 mL RNase-free离心管中立即置于液氮中保存,另一份放于RNA样品保存液中于-20℃条件保存。
- 成年猪组织样品采集:在屠宰场依次采取皮肤、肌肉、心、肝、脾、肺、肾、脑及卵巢,睾丸采自广三保淘汰种公猪,分2份,保存方法同仔猪组织样品。
- 1.2.2 猪各组织样品RNA抽提及反转录 根据OMEGA公司的动物组织总RNA抽提试剂盒说明书抽提猪各组织RNA,RNA抽提出来后,一部分立即进行反转录,另一部分分装后立即保存于-80℃冰箱中,以防RNA降解。以抽提的RNA为模板,按Transgene反转录试剂盒说明书合成cDNA,反应在PCR仪进行,反转录程序为25℃,10 min,50℃,30 min,85℃,5 min。
- 1.2.3 RT-PCR检测 以上述合成cDNA为模板,用 *Sohlh1* 基因检测引物和启动子扩增引物序列(表1),RT-PCR检测猪 *Sohlh1* 基因在各组织中表达情况。1 g·mL⁻¹琼脂糖凝胶电泳检测RT-PCR产物。
- 1.2.4 猪 *Sohlh1* 基因遗传进化分析 从NCBI数据库下载已报道的动物 *Sohlh1* 基因,包括猩猩、猴子、猪、小鼠、大鼠、牛、大象等27个品种或亚种,将这些动物 *Sohlh1* 基因序列的编码区翻译为对应的SOHLH1蛋白,应用Lasergene和MEGA4等生物软件,采用自动填缺口的clustalW方法比对,使用临近比较法作图(1 000个bootstrap重复)^[11-12]。
- 1.2.5 猪 *Sohlh1* 基因启动子扩增及验证载体构建 根据扩增出的猪 *Sohlh1* 基因,在NCBI中GENE数据库选取 *Sohlh1* 基因起始密码子前10 000 bp,进行生物信息学分析(同源比对:<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>,启动子预测:http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html,<http://gpmminer.mbc.nctu.edu.tw/index.php>; CpG岛预测:<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>),结合几个启动子预测软件,设计1对引物FW PS和FW2943R(表1)扩增出起始密码子前5 102 bp核酸序列,克隆到pGL3-basic载体,标记为pGL3-Sohlh1-5102。通过在线转录因子预测软件,以pGL3-Sohlh1-5102为模板,再次设计8对不同长度引物(表1)扩增出不同长度启动子,并克隆到pGL3-basic载体,送生工测序部测序。

表 1 *Sohlhl1* 基因检测和启动子扩增引物

Tab.1 Primers for *Sohlhl1* gene detection and promoter amplification

引物名称	引物序列(5'→3')	长度/bp
<i>Sohlhl1</i>	F:ACCTCGACGTGGAATAGCC R:GCCAGGGATCTGAGAAGTGG	400
FW PS	ATTTCTCTATCGATAGGTACCATGGAGCCCAGAAGAGCAGAAGC	5 102
FW2943R	CAGTACCGGAATGCCAAGCTTACGCAGCTCCGCGAGGCGGCGG	
FW4984F	ATTTCTCTATCGATAGGTACCATGCGTGGGGGGCGGGCC	78
FW2902R	CAGTACCGGAATGCCAAGCTTGGCCCCCACGCGCGCCC	
FW4984F	ATTTCTCTATCGATAGGTACCATGCGTGGGGGGCGGGCC	119
FW2943R	CAGTACCGGAATGCCAAGCTTACGCAGCTCCGCGAGGCGGCGG	
FW4924F	ATTTCTCTATCGATAGGTACCCGGAACTTTCTGGCAACGTC	138
FW2902R	CAGTACCGGAATGCCAAGCTTGGCCCCCACGCGCGCCC	
FW4874F	ATTTCTCTATCGATAGGTACCGGGCGCCCGCAGCCGTGAG	169
FW2943R	CAGTACCGGAATGCCAAGCTTACGCAGCTCCGCGAGGCGGCGG	
FW4824F	ATTTCTCTATCGATAGGTACCCTTACATCTGAGATCTTGC	219
FW2943R	CAGTACCGGAATGCCAAGCTTACGCAGCTCCGCGAGGCGGCGG	
FW4702F	ATTTCTCTATCGATAGGTACCGCCCGTACTGGTGCTG	771
FW2943R	CAGTACCGGAATGCCAAGCTTACGCAGCTCCGCGAGGCGGCGG	
FW4291F	ATTTCTCTATCGATAGGTACCGACCAGGAGGCAGGGCCG	1 978
FW2943R	CAGTACCGGAATGCCAAGCTTACGCAGCTCCGCGAGGCGGCGG	
FW2081F	ATTTCTCTATCGATAGGTACCCTACCCAGGGTTTGC GC	2 981
FW2943R	CAGTACCGGAATGCCAAGCTTACGCAGCTCCGCGAGGCGGCGG	

1.2.6 双荧光素酶测定 将测序正确的重组质粒转染 GC-1 细胞,48 h 后去除细胞培养基,PBS 小心洗涤 2 次,加上适量细胞裂解液 1 × Cell Lysis Buffer 室温裂解细胞 10 min,细胞刷刮取至 1.5 mL 离心管中,4 ℃ 10 000 r · min⁻¹离心 10 min,取上清液备用。将 100 μL 平衡至室温的 Luciferase Reaction Reagent 加入试管中,再小心吸取 20 μL 细胞裂解物至试管中,混匀,于化学发光仪中检测萤火虫荧光素酶报告基因的活性。检测完后,吸取 100 μL 平衡至室温的 Luciferase Reaction Reagent II 加入上述反应试管中,涡旋混匀,于化学发光仪中检测海肾荧光素酶报告基因的活性。

2 结果与分析

2.1 生殖细胞特异性基因 *Sohlhl1* 在成年猪及仔猪各组织表达情况

1 d 仔猪和成年猪心、肾、肝、脾、肺、脑、胃、肌肉、睾丸及卵巢等组织通过 RT-PCR 检测 *Sohlhl1* 基因表达。结果显示,在仔猪与成年猪睾丸里 *Sohlhl1* 基因都有表达,在仔猪卵巢中可以检测到 *Sohlhl1* 基因的表达,而在成年猪卵巢里及仔猪、成年猪其他组织未检测到 *Sohlhl1* 基因的表达(图 1A、图 1B)。

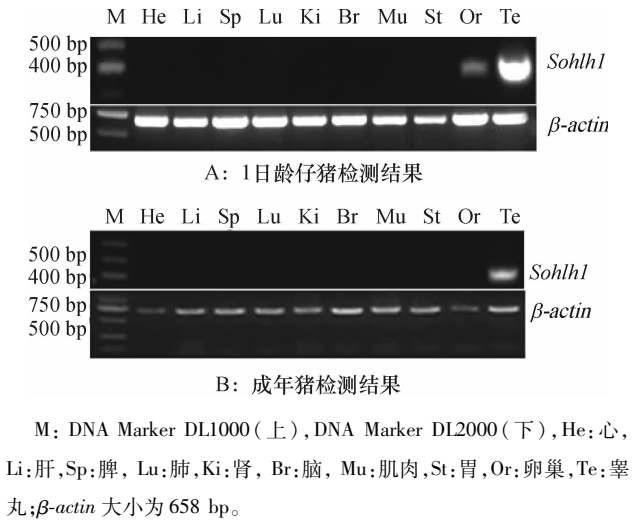


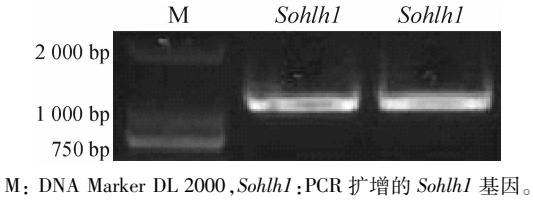
图 1 猪各组织 *Sohlhl1* 基因 mRNA 表达情况

Fig. 1 Expression of *Sohlhl1* gene mRNA in different pig tissues

2.2 猪 *Sohlhl1* 基因分子遗传进化特点

首先,用高保真 DNA 聚合酶,以仔猪睾丸中获得的 cDNA 为模板,扩增出猪 *Sohlhl1* 基因(图 2),并将其克隆到平末端载体,经测序及比对,所获得的猪 *Sohlhl1* 基因序列与 NCBI 数据库报道的基本一致。将猪 *Sohlhl1* 基因编码的蛋白与已报道的脊椎动物

SOHLH1 蛋白进行氨基酸序列比对发现,SOHLH1 蛋白在脊椎动物上相对不保守;进一步将 *Sohlh1* 基因所编码蛋白进行分子遗传进化分析(图 3),图 3 显示,*Sohlh1* 基因在脊椎动物上具有从低等到高等进化特性,猪处在灵长类动物与啮齿动物之间。结果表明猪作为动物试验模型,比如人类疾病模型,可能更优于啮齿类动物。



M: DNA Marker DL 2000,*Sohlh1*;PCR 扩增的 *Sohlh1* 基因。
图 2 RT-PCR 扩增猪 *Sohlh1* 基因
Fig. 2 RT-PCR amplification of pig *Sohlh1* gene

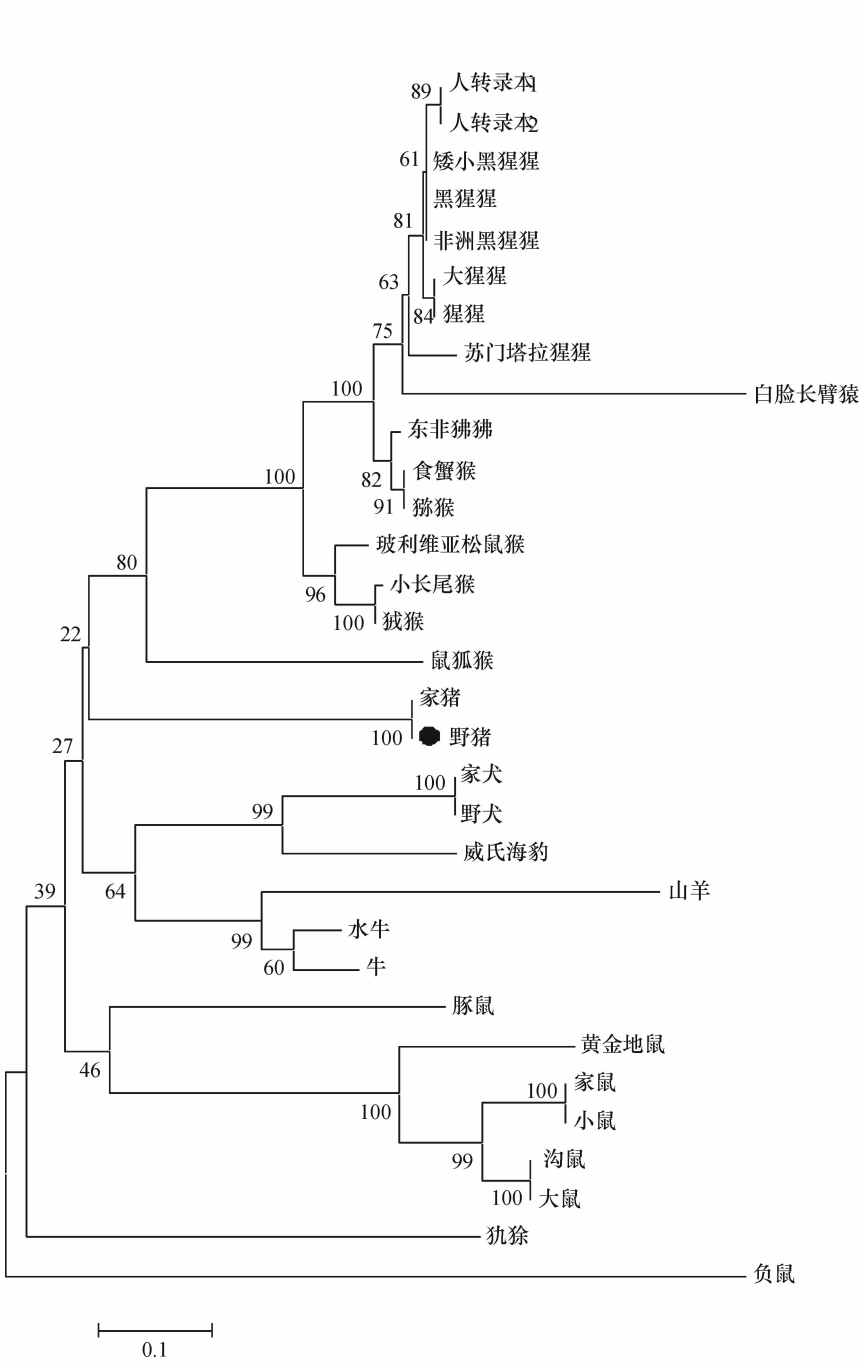
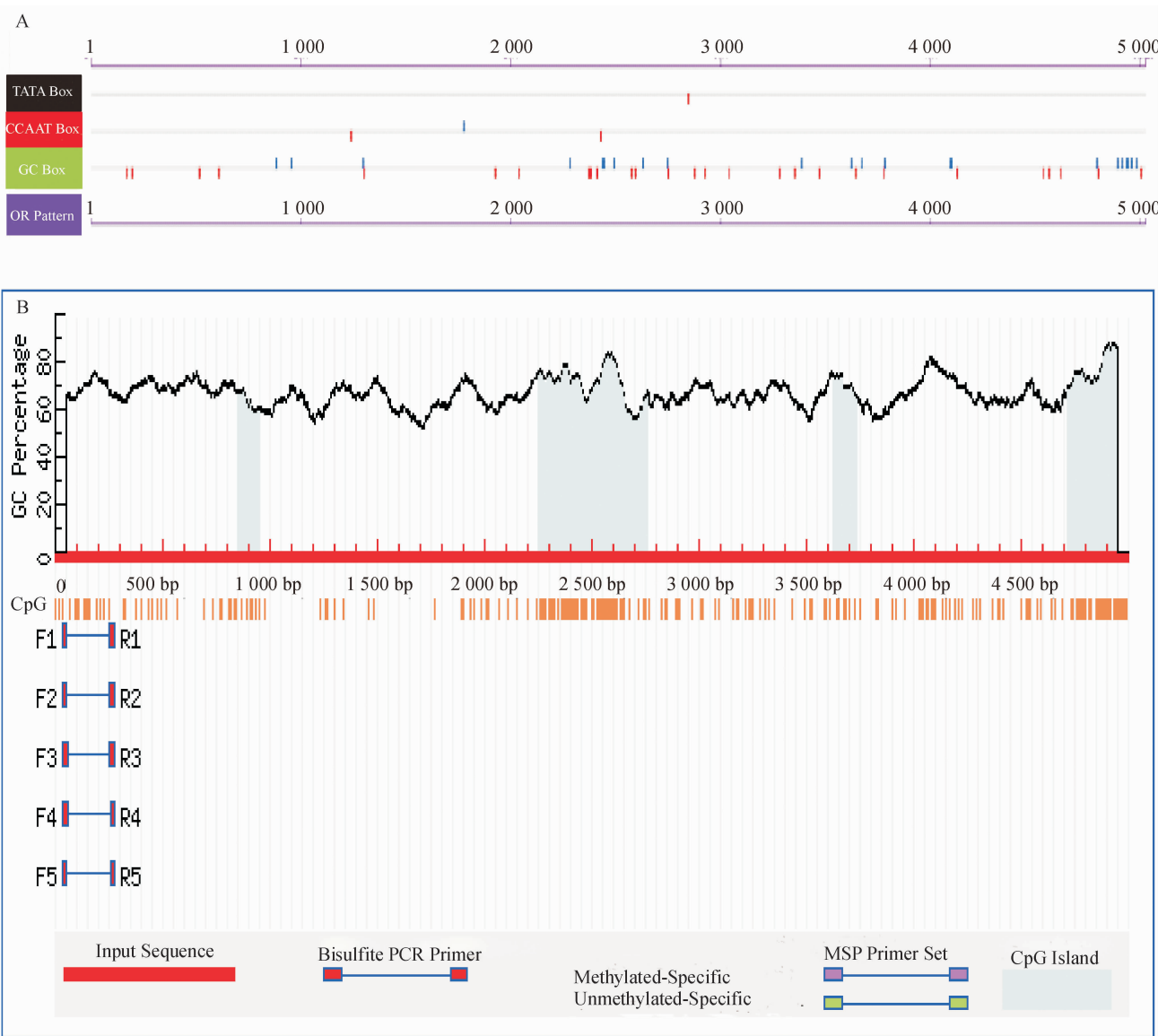


图 3 *Sohlh1* 基因编码蛋白在脊椎动物的遗传进化
Fig. 3 Genetic evolution of protein coded by *Sohlh1* gene

2.3 猪 *Sohlh1* 基因的启动子构建

为了探讨猪 *Sohlh1* 启动子活性及特异性,结合对其的生物信息学分析(图 4),构建了不同长度猪

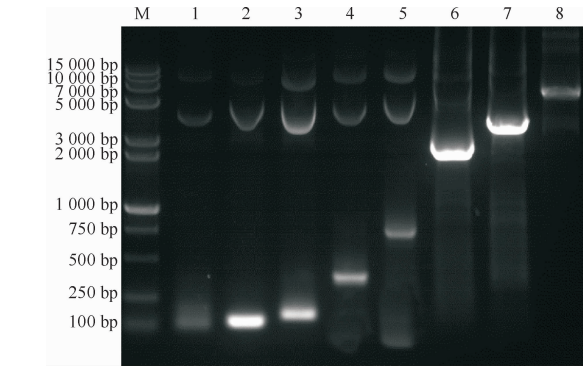
Sohlh1 启动子,克隆到 pGL3-basic 的启动子验证载体上,PCR 鉴定(图 5)测序结果表明不同长度猪 *Sohlh1* 基因的启动子构建成功。



A:猪 *Sohlh1* 基因启动子的预测;B:猪 *Sohlh1* 基因 CpG 的预测。

图 4 猪 *Sohlh1* 基因结构预测

Fig. 4 The structural prediction of pig *Sohlh1* gene



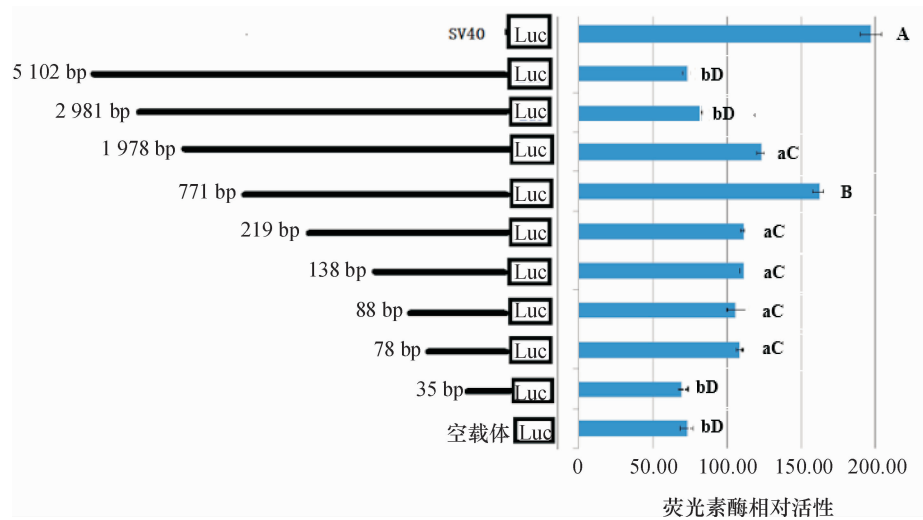
M:15 000 + 2 000 DNA Marker,1 ~ 8 分别代表 pGL3-Sohlh1-78、pGL3-Sohlh1-88、pGL3-Sohlh1-138、pGL3-Sohlh1-360、pGL3-Sohlh1-771、pGL3-Sohlh1-1978、pGL3-Sohlh1-2981 及 pGL3-Sohlh1-5102。

图 5 pGL3-Sohlh1 启动子 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR identification of pGL3-Sohlh1 promoter

2.4 猪 *Sohlh1* 启动子作用机制的研究

将上述构建好的不同长度启动子,转染 293 FT 细胞,48 h 后收集细胞,进行双荧光素酶活性检测,进一步统计出猪 *Sohlh1* 基因的启动子不同长度的活性。结果显示,起始密码子上游 78 bp 长度的 *Sohlh1* 基因的启动子便能够启动荧光素酶的表达,在 771 bp 时,*Sohlh1* 启动子的活性达到最大。随着启动子的长度增加,其活性开始下降,在 2 981 bp 长度时表现较低活性,并且与阴性对照组相比差异不显著(图 6)。启动子长度在 219 bp 以下时,不同长度 *Sohlh1* 基因的启动子活性差异不显著,35 bp 长度启动子与 78 bp 长度的启动子相比活性极显著下降,与空白对照组差异不显著(图 6)。



图中荧光素酶相对活性柱旁凡是有一个相同小写字母者,表示在 0.05 水平差异不显著;凡是有一个相同大写字母者,表示在 0.001 水平差异不显著(Tukey HSD 多重比较)。

图 6 双荧光素酶检测不同长度 *Sohlh1* 基因的启动子活性结果

Fig. 6 The activities of *Sohlh1* promoters of different lengths detected by dual luciferase assay

3 讨论与结论

SOHLH1 是一种生殖特异性 bHLH 转录调节因子,基因敲除试验证明 *Sohlh1* 基因在生殖细胞成熟过程中起着重要的作用^[3-4]。本研究通过 RT-PCR 方法验证了 *Sohlh1* 基因只在猪生殖器官中特异性表达,且在成年猪卵巢中不表达;获得了猪 *Sohlh1* 基因 mRNA,与 NCBI 数据库预测序列基本一致,通过对比多物种之间 *Sohlh1* 基因分子遗传进化特点,发现 *Sohlh1* 基因在脊椎动物上相对不保守,猪 *Sohlh1* 基因与灵长类动物遗传关系较近,侧面印证了猪是人类较好的动物试验模型,比如人类疾病模型。

生殖细胞特异性基因能够在生殖细胞中特异性表达,是通过转录调控因子及其他多种因素共同调节的结果,生殖细胞特异性基因由于只在生殖细胞中表达,对于遗传学分析的研究显得十分重要。目前,Hammond 等^[13]根据已有的生殖细胞特异性基因对生殖细胞进行遗传学分析来研究老鼠的生殖细胞。本研究通过克隆生殖细胞特异性转录因子 *Sohlh1* 基因的启动子,并构建了不同长度的猪 *Sohlh1* 基因的启动子,对其功能进行初步分析,验证了猪 *Sohlh1* 基因的启动子的核心区域在 78 bp 附近,特异性调控区间在 771 ~ 2 981 bp 之间。对于 bHLH 转录调节因子研究表明,E-box 这一位点主要是由碱性螺旋-环-螺旋蛋白家族成员识别^[14-17],bHLH 转录调控因子主要是通过形成同源或异源二聚体结合到 DNA 的 E-box 位点来调节基因的表达^[5, 8-9, 16]。Toyoda 等^[10]的研究表明 SOHLH1 和 SOHLH2 可以形成异源二聚体,绑定到 *Sohlh1* 启动

子上游 3 个 E-box 位点,上调 *Sohlh1* 基因的表达。本研究对猪 *Sohlh1* 启动子进行生物信息学分析发现,其起始密码子上游 219 ~ 771 bp 之间也含有 3 个 E-box 位点,而双荧光素酶试验结果表明猪 *Sohlh1* 启动子在长度为 219 与 771 bp 的启动子活性差异显著,因此推测其活性与这些 E-box 位点相关。对 771 ~ 2 981 bp 这段启动子序列分析发现,其含有第 1 个 CpG 岛,因此推测这段区间内启动子活性显著下降可能与 CpG 岛甲基化有关。GC-box 是重要的转录因子 SP1 的结合位点^[18],对本研究中的起始密码子前 78 bp 启动子长度进行生物信息学分析发现,仅有一个确定的 SP1 转录因子结合位点,敲除这个位点后,启动子相比活性极显著下降,因此推测 *Sohlh1* 基因的核心启动子活性可能与 SP1 转录因子有关。

目前,关于 *Sohlh1* 基因的研究不多,最新的研究表明,*Sohlh1* 基因可能被视为原发性卵巢功能不全 (POI) 的候选基因^[19],非梗阻性无精子症也与 *Sohlh1* 基因的突变有关^[20]。在人体上的研究也表明,*Sohlh1* 基因的突变会导致非综合性促性腺激素分泌过多性腺机能衰退^[21]。同时还有许多生殖基因、miRNAs 与 *Sohlh1* 基因之间的关系^[19]、*Sohlh1* 基因在生殖调控中的具体作用,以及启动子之间的作用等都还不清楚,有待于我们进一步的研究。通过猪 *Sohlh1* 基因及其启动子的初步研究,为后续课题研究奠定理论基础。

参考文献:

[1] BETTEGOWDA A, WILKINSON M F. Transcription and post-transcriptional regulation of spermatogenesis[J]. <http://xuebao.scau.edu.cn>

- los Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010, 365 (1546): 1637-1651.
- [2] EUN S H, GAN Q, CHEN X. Epigenetic regulation of germ cell differentiation[J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(6): 737-743.
- [3] BALLOW D, MEISTRICH M L, MATZUK M, et al. *Sohlh1* is essential for spermatogonial differentiation[J]. Dev Biol, 2006, 294(1): 161-167.
- [4] PANGAS S A, CHOI Y, BALLOW D J, et al. Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(21): 8090-8095.
- [5] CHOI Y, YUAN D, RAJKOVIC A. Germ cell-specific transcriptional regulator *Sohlh2* is essential for early mouse folliculogenesis and oocyte-specific gene expression[J]. Biol Reprod, 2008, 79(6): 1176-1182.
- [6] BARRIOS F, FILIPPONI D, CAMPOLO F, et al. SOHLH1 and SOHLH2 control *Kit* expression during post-natal male germ cell development[J]. J Cell Sci, 2012, 125(Pt 6): 1455-1464.
- [7] SUZUKI H, AHN H W, CHU T, et al. SOHLH1 and SOHLH2 coordinate spermatogonial differentiation[J]. Dev Biol, 2012, 361(2): 301-312.
- [8] DESIMIO M G, CAMPOLO F, DOLCI S, et al. SOHLH1 and SOHLH2 directly down-regulate STIMULATED BY RETINOIC ACID 8 (STRA8) expression[J]. Cell Cycle, 2015, 14(7): 1036-1045.
- [9] SWANSON H I, YANG J H. Specificity of DNA binding of the c-Myc/Max and ARNT/ARNT dimers at the CACGTG recognition site[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(15): 3205-3212.
- [10] TOYODA S, YOSHIMURA T, MIZUTA J, et al. Auto-regulation of the *Sohlh1* gene by the SOHLH2/SOHLH1/SP1 complex; Implications for early spermatogenesis and oogenesis[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101681.
- [11] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406-425.
- [12] ZHANG W, SUN Z. Random local neighbor joining: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Phylogenet Evol, 2008, 47(1): 117-128.
- [13] HAMMOND S S, MATIN A. Tools for the genetic analysis of germ cells[J]. Genesis, 2009, 47(9): 617-627.
- [14] LUO Y, LIN L, BOLUND L, et al. Genetically modified pigs for biomedical research[J]. J Inherit Metab Dis, 2012, 35(4): 695-713.
- [15] APONE S, HAUSCHKA S D. Muscle gene E-box control elements: Evidence for quantitatively different transcriptional activities and the binding of distinct regulatory factors[J]. J Biol Chem, 1995, 270(36): 21420-21427.
- [16] CATALA F, WANNER R, BARTON P, et al. A skeletal muscle-specific enhancer regulated by factors binding to E and CArG boxes is present in the promoter of the mouse myosin light-chain 1A gene[J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(8): 4585-4596.
- [17] CECCARELLI E, MCGREW M J, NGUYEN T, et al. An E box comprises a positional sensor for regional differences in skeletal muscle gene expression and methylation[J]. Dev Biol, 1999, 213(1): 217-229.
- [18] SAFFER J D, JACKSON S P, ANNARELLA M B. Developmental expression of Sp1 in the mouse[J]. Mol Cell Biol, 1991, 11(4): 2189-2199.
- [19] ZHAO S, LI G, DALGLEISH R, et al. Transcription factor SOHLH1 potentially associated with primary ovarian insufficiency[J]. Fertil Steril, 2015, 103(2): 548-553.
- [20] CHOI Y, JEON S, CHOI M, et al. Mutations in *Sohlh1* gene associate with nonobstructive azoospermia[J]. Hum Mutat, 2010, 31(7): 788-793.
- [21] BAYRAM Y, GULSUNER S, GURAN T, et al. Homozygous loss-of-function mutations in SOHLH1 in patients with nonsyndromic hypergonadotropic hypogonadism[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(5): E808-E814.

【责任编辑 柴 焰】