



四川农业大学

SICHUAN AGRICULTURAL UNIVERSITY

专业硕士学位论文

LPL 基因的增强子鉴定及其在 脂肪沉积中的功能研究

姓 名 _____ 李雪旻 _____

学 号 _____ 2020302165 _____

指 导 教 师 _____ 李明洲教授 _____

校 外 导 师 _____ 潘登科研究员 _____

_____ 四川省医学科学院 _____

专业学位类别 _____ 农业硕士 _____

领 域 名 称 _____ 畜牧 _____

研 究 方 向 _____ 动物生产 _____

院 所 名 称 _____ 动物科技学院 _____

2023 年 6 月

分类号 S828.8
UDC 636.4

密 级 公 开
学校代码 10626

四川农业大学 专业硕士学位论文

LPL 基因的增强子鉴定及其在
脂肪沉积中的功能研究

姓 名 李雪旻

学 号 2020302165

指 导 教 师 李明洲教授

校 外 导 师 潘登科研究员

四川省医学科学院

专业学位类别 农业硕士

领 域 名 称 畜牧

研 究 方 向 动物生产

院 所 名 称 动物科技学院

2023 年 6 月

A Dissertation Submitted to Sichuan Agricultural University
in Partial Fulfillment of the Requirements for
the Professional Degree of Master of Agriculture Extension

Identification of *LPL* Gene Enhancer and its Function in Fat Deposition

by

Xuemin Li

Supervised by

Professor Mingzhou Li

Researcher Dengke Pan

June, 2023

College of Animal Science and Technology,

Wenjiang, Sichuan

学位论文答辩委员会组成

姓名	职称	工作单位	备注
白林	教授	四川农业大学	主席
顾以韧	副研究员	四川省畜牧科学研究院	
赵叶	副教授	四川农业大学	
沈林園	副教授	四川农业大学	
陆路	副教授	四川农业大学	
甘麦邻	讲师	四川农业大学	秘书

本论文在“四川农业大学动物遗传育种重点学科实验室”
完成

摘要

脂肪组织是能量储存的主要来源，对全身代谢稳态等方面有重要影响，其主要通过甘油三酯的合成和分解维持动物体内的能量平衡。作为一种脂肪分解复合酶，脂蛋白脂肪酶（Lipoprotein lipase, LPL）对甘油三酯代谢和运输发挥重要作用。在农业动物中，LPL 与猪、羊等家畜动物的背膘厚、肉质等重要经济性状显著关联。因此，鉴定 LPL 的重要调控元件将为猪分子育种提供新的潜在靶点。本实验利用环状染色质构象捕获技术（Circular Chromosome Conformation Capture Sequencing, 4C-Seq）绘制了 LPL 基因在前体脂肪细胞成脂分化前后的互作图谱，结合染色质免疫共沉淀技术（Chromatin Immunoprecipitation, ChIP-seq）在与脂蛋白酯酶 LPL 基因启动子互作的 200 kb 的基因间区鉴定了 8 个候选增强子。鉴定了 LPL 基因的 2 个活性增强子 LPL-E1 与 LPL-E2，揭示了过氧化物酶体增殖物激活受体 γ （peroxisome proliferative activated receptor, gamma, PPARG）和类维生素 A 受体（ α retinoid X receptor, alpha, RXRA）分别对 LPL-E1 与 LPL-E2 活性的重要影响。主要结果如下：

（1）利用 4C-seq 技术构建了 LPL 基因在 3T3-L1 成脂分化前后的基因三维染色质互作图谱，4C-seq 文库技术性重复之间的 Pearson 相关系数大于 0.4。分化前文库中共鉴定 51 个互作位点，分化后文库中共鉴定 17 个互作位点。

（2）相较于分化前文库，分化后文库展现出更高的 trans 互作比例（分化前：58.4%；分化后：62.55%）。使用 DESeq2 软件比较了 LPL 基因互作位点在成脂分化前后的差异，相较于分化前样本，分化后样本显著上调的互作位点 34 个，显著下调的互作位点 2,280 个，表明 LPL 基因互作在分化前后具有显著变化。

（3）结合 3T3-L1 分化后的组蛋白 H3K4me1 和 H3K27me3 的 ChIP-seq 数据，鉴定出 LPL 基因的 8 个潜在活性增强子（LPL-E1~E8）位于 200 kb 的基因间区域（chr8: 68,840,513–69,040,028），该区域显示出 H3K27ac 组蛋白的显著富集。利用双荧光素酶报告系统评估了 8 个潜在增强子的活性，与对照载体相比，LPL-E1 与 LPL-E2 两个增强子显著增加荧光素酶活性。其中，LPL-E1 增强 1.74 倍（ $P < 0.01$ ），LPL-E2 增强 1.78 倍（ $P < 0.01$ ）。

（4）为了明确 LPL 基因增强子活性改变影响脂肪前体细胞成脂分化能力的影响，本研究设置了三个组别（CRISPRi-E1, CRISPRi-E2 和 CRISPRi-Control）。成脂分化后 7 天的结果表明，与对照组相比，3T3-L1 细胞中 LPL 基因的表达显著降低（ $P < 0.01$ ）、

甘油三酯含量显著降低 ($P < 0.01$)。RNA-Seq 结果表明, CRISPRi-E1 和 CRISPRi-E2 相较于 CRISPRi-Control 下调的基因主要富集在单羧酸代谢过程, 脂肪酸代谢过程, 脂肪细胞分化, 中性脂代谢过程以及甘油三酯代谢过程等功能条目中。

(5) 通过转录因子 (Transcription factor, TF) motif 富集分析发现, LPL-E1 和 LPL-E2 增强子展现出 PPARG 和 RXRA 的 motif 显著富集, 结合公开 ChIP-seq (PPARG、RXRA) 数据集, 结果显示 PPARG 和 RXRA 在 LPL-E1 和 LPL-E2 增强子区域显著富集。将构建的 LPL-E1 和 LPL-E2 双荧光素酶报告载体、PPARG 和 RXRA 过表达载体与 pRL-TK 质粒共转染到 H293T 细胞中测定荧光素酶活性, 荧光素酶报告上实验结果显示, PPARG 和 RXRA 过表达能显著增加 LPL-E1 和 LPL-E2 双荧光载体在后荧光素酶活性。

本研究绘制了 *LPL* 基因在成脂分化前后的高分辨率全基因组互作图谱; 鉴定并评估了 *LPL* 基因增强子的转录活性; 明确了 LPL-E1 和 LPL-E2 在成脂分化中的功能; 解析了两个重要成脂转录因子 (PPARG 和 RXRA) 对 LPL-E1、LPL-E2 活性的调控作用。综上, 本研究为明确染色质互作对成脂分化基因的转录调控作用提供了理论参考。

关键词: *LPL* 基因; 染色质互作; 4C-seq; 增强子; 转录因子

Abstract

Adipose tissue is the main source of energy storage and has a significant impact on overall metabolic homeostasis. It mainly maintains energy balance in animals through the synthesis and decomposition of triglycerides. It can maintain energy balance in animals through the synthesis and decomposition of triglycerides. As a complex enzyme for fat breakdown, lipoprotein lipase (LPL) plays an important role in the metabolism and transportation of triglycerides. In agricultural animals, LPL is significantly associated with important economic traits such as backfat thickness and meat quality in livestock such as pigs and sheep. *LPL* can regulate the levels of nutrients required during the development of adipose and muscle tissues, thereby affecting carcass traits such as eye muscle area, lean meat percentage, and fat ratio. Therefore, identifying the important regulatory elements of *LPL* will provide new targets for pig molecular breeding. In this experiment, the cyclic chromatin conformation capture sequencing (4C-Seq) technique was used to draw the interaction map of *LPL* gene before and after adipogenic differentiation of preadipocytes. Combined with chromatin immune coprecipitation (CHIP seq) technique, it was found that the 200 kb intergenic region interacting with the promoter of lipoprotein lipase *LPL* gene was related to the expression of lipoprotein lipase *LPL* gene. The two active enhancer LPL-E1 and LPL-E2 of *LPL* gene were identified, revealing that PPARG and RXRA have a significant impact on the activity of LPL-E1 and LPL-E2. The main results are as follows:

(1) The three-dimensional chromatin interaction map of *LPL* gene before and after 3T3-L1 lipogenic differentiation was constructed using 4C seq technology. Pearson correlation coefficient between technical repetitions of 4C seq library was greater than 0.4. A total of 51 interaction sites were identified in the pre differentiation library, while 17 interaction sites were identified in the post differentiation library.

(2) Compared to the pre differentiation library, the post differentiation library exhibited a higher proportion of trans interactions (pre differentiation: 58.4%; post differentiation: 62.55%). The differences in *LPL* gene interaction sites before and after adipogenic differentiation were compared using DESeq2 software. Compared to the pre

differentiation samples, there were 34 significantly upregulated interaction sites and 2280 significantly downregulated interaction sites in the post differentiation samples, indicating significant changes in *LPL* gene interaction before and after differentiation.

(3) Combining the ChiIP seq data of histones H3K4me1 and H3K27me3 after 3T3-L1 differentiation, eight potential active enhancer (LPL-E1-E8) of *LPL* gene were identified in the 200 kb intergenic region (chr8: 68840513 – 69040028), which showed significant enrichment of H3K27Ac histones. The activity of eight potential enhancer was evaluated using the dual Luciferase reporting system. Compared with the control vector, the two enhancer LPL-E1 and LPL-E2 significantly increased Luciferase activity. Among them, LPL-E1 increased by 1.74 times ($P < 0.01$), and LPL-E2 increased by 1.78 times ($P < 0.01$).

(4) In order to clarify the effect of *LPL* gene enhancer activity change on adipogenic differentiation ability of adipose precursor somatic cell cells, three groups (CRISPRi-E1, CRISPRi-E2 and CRISPRi Control) were set up in this study. The results at 7 days after adipogenic differentiation showed that compared with the control group, the expression of *LPL* gene and triglyceride content in 3T3-L1 cells were significantly reduced ($P < 0.01$). The RNA Seq results indicate that, the genes downregulated by CRISPRi-E1 and CRISPRi-E2 were mainly enriched in functional items such as monocarboxylic acid metabolism, fatty acid metabolism, adipocyte differentiation, neutral lipid metabolism, and triglyceride metabolism compared to CRISPRi-Control.

(5) The transcription factor (TF) motif enrichment analysis found that LPL-E1 and LPL-E2 enhancer showed significant enrichment of PPARG and RXRA motif. Combined with the public ChiIP seq (PPARG, RXRA) dataset, the results showed that PPARG and RXRA were significantly enriched in the LPL-E1 and LPL-E2 enhancer regions. The constructed LPL-E1 and LPL-E2 double Luciferase report vector, PPARG and RXRA overexpression vector and pRL-TK plasmid were co transfected into H293T cells to measure Luciferase activity. The experimental results on Luciferase report showed that PPARG and RXRA overexpression could significantly increase the post Luciferase activity of LPL-E1 and LPL-E2 double fluorescent vector.

This study drew a high-resolution whole genome interaction map of the *LPL* gene

before and after adipogenic differentiation; The transcriptional activity of *LPL* gene enhancer was identified and evaluated; Clarified the functions of LPL-E1 and LPL-E2 in adipogenic differentiation; Analyzed the regulatory effects of two important lipogenic transcription factors (PPARG and RXRA) on the activity of LPL-E1 and LPL-E2. In conclusion, this study provides a theoretical reference for clarifying the transcriptional regulation of chromatin interaction on adipogenic differentiation genes.

Keywords: *LPL* gene; Chromatin interaction; 4C-seq; Enhancer; Transcription factor.

缩略词表

List of Abbreviations

缩写 Abbreviation	英文全称 English terms	中文全称 Chinese terms
3T3-L1	Mouse embryonic fibroblast cells	小鼠胚胎成纤维细胞系
4C	Circle chromosome conformation capture	环形染色体构象捕获
H293T	Human Embryonic Kidney 293T cells	人胚肾细胞
H293FT	Human Embryonic Kidney Fast growing 293 cells	快速型人胚肾细胞系
LPL	Lipoprotein lipase	脂蛋白脂肪酶
PPARG	Peroxisome proliferative activated receptor, gamma	过氧化物酶体增殖物激活受体 γ
RXRA	α retinoid X receptor, alpha	类维生素A受体
SDIS	Significant differential interaction sites	显著差异相互作用位点
TFs	Transcription factors	转录因子
TG	Triglyceride	甘油三酯

目 录

第一章 文献综述	1
1.1 脂肪组织脂肪沉积与猪重要经济性状	1
1.1.1 脂肪组织概述	1
1.1.2 脂肪组织中的脂肪合成与分解	2
1.1.3 3T3-L1 前脂肪细胞系成脂分化模型	4
1.1.4 脂蛋白脂肪酶	6
1.2 增强子	8
1.2.1 增强子的一般特性	8
1.2.2 增强子-启动子互作	9
1.3 4C-Seq 鉴定活性增强子	9
1.4 研究增强子功能的方法	10
第二章 选题背景与目的意义	12
2.1 选题背景	12
2.2 主要研究内容	12
2.3 研究的目的意义	12
第三章 材料与方法	13
3.1 实验材料	13
3.1.1 实验细胞	13
3.1.2 菌株和载体	13
3.1.3 主要仪器设备	13
3.1.4 主要试剂	14
3.1.5 常用试剂配制	15
3.1.6 应用的分析软件和生物信息学网站	16
3.1.7 组织测序与数据分析	16
3.1.8 差异基因功能富集分析	17
3.2 实验方法	17
3.2.1 细胞 RNA 提取	17
3.2.2 反转录和定量	18
3.2.3 线性化质粒纯化	20
3.2.4 4C-seq 文库制备	20
3.2.5 启动子和潜在活性增强子双荧光载体构建	26
3.2.6 双荧光载体细胞转染及活性测定	30
3.2.7 慢病毒包装与细胞感染	31
3.2.8 过表转录因子载体构建与转染	37

3.2.9 甘油三酯含量测定.....	38
3.2.10 油红 O 染色.....	38
第四章 结果与分析	39
4.1 LPL 基因在成脂分化前后的表达及增强子鉴定	39
4.1.1 4C-seq 文库构建	39
4.1.2 LPL 基因全基因组互作图谱的绘制	40
4.1.3 LPL 基因全基因组互作位点的差异分析	41
4.2 200 kb 基因间区控制脂蛋白酯酶 LPL 基因的表达	42
4.2.1 潜在增强子的筛选及保守性评估.....	42
4.2.2 双荧光素酶报告系统评估 LPL 潜在增强子的活性	45
4.2.3 活性增强子 d Cas9-KRAB 系统慢病毒包装.....	46
4.2.4 慢病毒干扰增强子活性降低 LPL 基因表达,降低细胞成脂分 化能力	48
4.3 慢病毒干扰 LPL 增强子活性对转录组的影响	49
4.4 成脂相关转录因子 PPARG 和 RXRA 增强 LPL-E1 和 LPL- E2 活性.....	51
第五章 讨论.....	53
5.1 LPL 基因在脂肪沉积上的意义	53
5.2 发现了 LPL 的重要活性增强子	54
5.3 猪 LPL 基因增强子鉴定	55
第六章 结论与创新点	57
6.1 结论.....	57
6.2 本研究的创新点.....	57
参考文献.....	58

第一章 文献综述

随着人们生活水平的提高，猪肉的品质在消费者中日益受到重视。脂肪沉积和肌肉发育是控制猪肉品质和产肉量的重要基础。然而近年来，育种过程主要以提高瘦肉率和生长效率为目标，导致猪肉品质下降，亟待改进。猪是脂肪沉积能力较强的家畜，其脂肪沉积的质量对猪肉品质有重要影响。脂肪沉积主要与脂肪细胞增殖和肥大相关。因此，阐明调控脂肪细胞增殖和分化的分子机制对改善猪肉肌内脂肪（Intramuscular fat, IMF）含量具有重要意义。

1.1 脂肪组织脂肪沉积与猪重要经济性状

1.1.1 脂肪组织概述

脂肪组织具有高度动态的细胞组分和活跃的代谢能力，参与多种生理过程。作为能量代谢和储存的主要器官，脂肪组织通过甘油三酯的合成和分解维持动物体内的能量平衡^[1-4]。研究表明，除了在能量储存中发挥重要作用，脂肪细胞对全身代谢稳态的其他方面也有深远影响。

脂肪组织中，脂肪细胞占脂肪质量的 35%-70%^[5]。除脂肪细胞外，脂肪组织还包含免疫细胞，内皮细胞，前脂肪细胞和血管内皮细胞等位于基质血部分的细胞，这部分细胞占脂肪组织细胞群体数量的 75%^[6]。脂肪组织的增重主要通过两种方式：脂肪细胞肥大（现有脂肪细胞大小的增加）或增生（脂肪细胞数量的增加）。脂肪细胞数量在生命早期已经基本确定，并在成年期维持稳定^[7, 8]。分化的成熟脂肪细胞具有较强的脂质沉积能力，直径能够增加到几百微米。

然而，最近啮齿类动物的谱系追踪模型表明，在长时间热量过剩条件下，新的成熟脂肪细胞可以由前脂肪细胞分化产生，并有助于脂肪组织扩张^[9, 10]。此外，肥胖相关的心血管和代谢紊乱的易感性也与脂肪细胞肥大有关^[11]，而脂肪细胞的增生通常被认为是从代谢角度的保护机制^[12]。这些研究结果表明，成年人前脂肪细胞是成纤维细胞样细胞，并且位于血管周围，并且现有脂肪细胞的肥大性扩张和个体脂肪生成之间的平衡对代谢健康有着深远的影响。由于摄入和消耗能量之间的不平衡，多余的能量以甘油三酯的形式储存在脂肪细胞中。随着脂肪细胞体积的扩大，脂肪细胞与邻近细胞和细胞外基质成分的接触面积增加，相应的机械应力也随之增加。当脂肪细胞体积

增大至接近氧气扩散极限时，细胞会处于缺氧状态。机械应力和缺氧压力的增加会导致脂肪组织炎症^[13, 14]。许多实验观察表明，较大的脂肪细胞可能表现出与较小的脂肪细胞不同的生化特性。这些差异包括脂肪分解升高^[15]、炎性细胞因子分泌增加^[16]以及抗炎脂肪因子如瘦素和脂联素^[17]的分泌减少。因此，脂肪细胞的增殖、分化和脂肪合成过程对于脂肪组织的生理功能至关重要。

1.1.2 脂肪组织中的脂肪合成与分解

1.1.2.1 脂肪细胞甘油三酯储存与水解的动态过程

LPL 是从极低密度脂蛋白或乳糜微粒导入甘油三酯衍生脂肪酸以供脂肪组织储存的限速酶。游离脂肪酸（free fatty acids, FFAs）的摄取涉及有脂质双分子层或蛋白质介导的被动扩散。在脂肪细胞内，脂肪酸被激活成酰基辅酶 A，3 个酰基辅酶 A 被甘油酯化，形成甘油三酯（Triglyceride, TG），储存在脂滴中。此外，胰岛素触发葡萄糖和氨基酸（amino acid, AA）转运到脂肪细胞中，脂肪细胞代谢成乙酰辅酶 A。将乙酰辅酶 A 转化为丙二酰辅酶 A 的乙酰辅酶 A 羧化酶（Acetyl CoA carboxylase, ACC）是脂肪酸合成途径的关键步骤。

在脂肪细胞内，脂肪酸被酯化为甘油三酯，甘油三酯被包裹在脂滴中。在能量需求增加期间，脂肪组织能为其他器官的提供营养^[18]。瘦素拮抗脂肪生成并促进脂肪分解。在这种情况下，脂肪分解的诱导是触发存储在脂肪细胞中的甘油三酯分解并释放游离脂肪酸和甘油的基本机制（如图 1 所示）。脂肪生成和脂肪分解的平衡主要受胰岛素和瘦素的控制^[19-22]。胰岛素对脂肪细胞具有直接和间接的影响，而瘦素主要通过中枢神经系统介体对脂肪生成和分解进行调控。在下丘脑（ARH）的弧形核中，瘦素反应性的神经元下调食物摄入并促进脂解。刺激黑素皮质能系统触发 WAT 脂肪分解，独立于其对摄食行为的影响^[23]。在啮齿动物和人类中，脂解过程主要由交感神经系统刺激诱导。在没有瘦素信号传导的情况下，脂解会大大抑制，同时脂肪形成增强，有利于脂肪细胞内甘油三酸酯的储存^[24]。

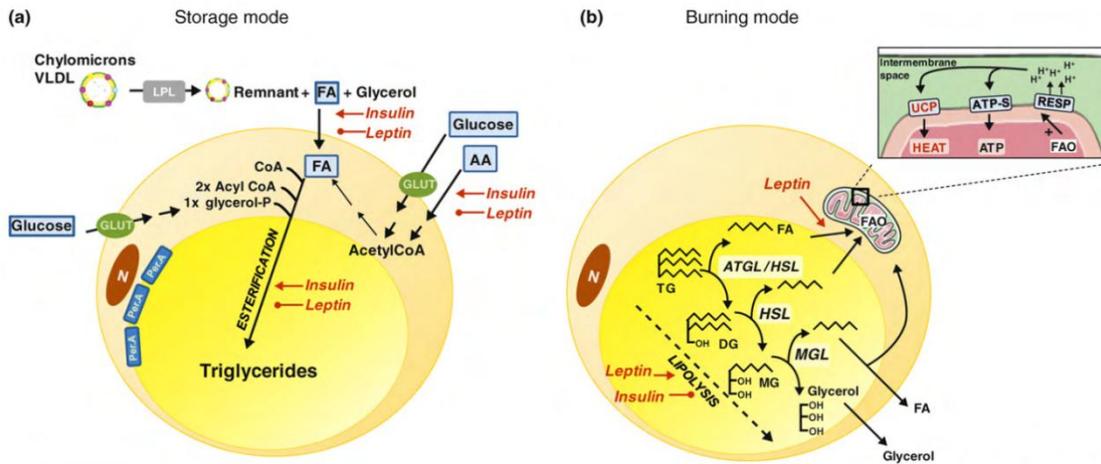


图 1 脂肪细胞甘油三酯储存与水解模式^[25]

Fig.1 Triglyceride storage and hydrolysis patterns in adipocytes

1.1.2.2 脂肪分解机制

白色脂肪细胞的特征是细胞内含有一个中央大脂滴，该结构主要由甘油三酯和胆固醇酯组成，周围环绕着涂有蛋白质的磷脂和胆固醇单层^[20]。脂滴涂层是一种动态结构，因为在脂质刺激下会发生一些重排和补充。脂肪细胞甘油三酯脂肪酶（ATGL）和激素敏感脂肪酶（HSL）在脂肪组织中承担甘油三酯水解酶的活性。脂肪分解通常通过儿茶酚胺刺激 β -肾上腺素能受体和随后的蛋白激酶 A（PKA）的激活发生。PKA 在脂肪细胞中的两个主要脂质分解靶点是 HSL 和 perilipin A。HSL 是唯一已知的由 PKA 介导的磷酸化调节的中性脂质脂肪酶。PKA 激活后，磷酸化的 HSL 易位到脂滴，HSL 在脂滴中水解甘油三酯。此外，脂解的激活也严格依赖于 PKA 介导的 perilipin A^[26]磷酸化。研究表明，perilipin A 作为一层保护膜，包围着脂滴，直到被 PKA 磷酸化，然后发生构象变化，使脂滴成为 HSL^[26]的开放靶标。脂滴相关蛋白也是脂解的重要调节因子。例如，小窝蛋白 1（CAV-1）选择性地与受刺激细胞中的液滴结合，并可能作为外围磷脂 a 和 PKA 催化位点之间的桥梁，促进外围磷脂 a 磷酸化^[27]。关于 ATGL，无论是 PKA 还是其他酶修饰都尚未被证明可以调节其活性。表达水平和与 CGI-58 的结合是 ATGL 活性^[28]的主要决定因素。最近，G0S2 被证明可以减弱 ATGLTG 水解酶^[29]的活性。在小鼠中，HSL 的缺失不会改变基础（即未刺激）脂肪细胞的脂解^[30, 31]，这表明 HSL 对基础 TG 水解不是至关重要的。同时，ATGL 功能缺失仅影响受刺激的脂解^[28, 32]，ATGL 过表达^[33]同时增加基础和受刺激的脂解。

在人体中，使用 HSL 特异性抑制剂来确定 HSL 和 ATGL 在脂肪细胞脂肪分解中的相对贡献。HSL 抑制降低了基础甘油的释放，但不影响基础脂肪酸的释放。此外，

在儿茶酚胺诱导的脂肪分解中,在存在 HSL 抑制剂的情况下,甘油几乎完全不释放,FFA 的释放减弱^[34, 35]。因此, ATGL 和 HSL 似乎在基础脂肪分解中具有互补作用。此外,在基础和刺激条件下, ATGL 水解酶活性对于向 HSL 提供甘油三酯至关重要,因为 HSL 不能有效地水解甘油三酯。

1.1.3 3T3-L1 前脂肪细胞系成脂分化模型

作为被广泛使用的肥胖研究模型,3T3-L1 前体脂肪细胞系良好地表征了脂肪形成的分子和细胞过程,且该模型的分化程序已得到很好的验证^[36]。如图 2 所示,3T3-L1 前脂肪细胞的成脂分化是由地塞米松 (DEX)、异丁基甲基黄嘌呤 (IBMX) 和胰岛素的激素刺激诱导的。该模型的脂肪生成过程主要包括生长阻滞、有丝分裂克隆扩增 (MCE) 和终末分化这几个步骤^[37, 38]。

生长阻滞是 3T3-L1 前脂肪细胞成脂分化的前提条件,细胞周期及其调控在有丝分裂克隆扩增的完成中起着关键作用。3T3-L1 前脂肪细胞在分化前两天 (第 2 天) 过度融合增殖,细胞与邻近细胞的物理接触抑制了细胞的生长。在细胞融合后,前脂肪细胞在细胞周期的间隙 1 (G1) 期被抑制,同时细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 抑制蛋白 (CIPs)、p21CIP 和 p27KIP1 以及过度磷酸化的肿瘤抑制视网膜母细胞瘤 (Rb) 蛋白水平升高^[39]。

随后,在分化早期,细胞周期受阻的细胞重新进入细胞周期,再次经历一到两轮细胞周期,这一过程称为有丝分裂克隆扩增^[40]。细胞周期蛋白 D 活化并组装到 CDK4 和 CDK6 上,细胞周期蛋白 E 与 CDK2 组装在一起,并降解 CDK 抑制剂。cyclinD 和 CDK4/CDK6 复合物是细胞周期 G1 期早期的调节因子,而 cyclinE 和 CDK2 复合物对于 G1 和合成 (S) 相转变至关重要,这些都有助于细胞周期停滞的细胞重新进入细胞周期,使它们能够进展到 G1/S 期^[41, 42]。S 期进入发生在激素鸡尾酒法处理后约 14 小时,在激素刺激后约 18 小时观察到最高的 DNA 合成^[43]。

完全生长停滞的细胞在含有胎牛血清 (FBS) 的培养基中受到由 DEX、IBMX 和胰岛素组成的激素混合物的刺激。DEX 是一种合成糖皮质激素,可刺激糖皮质激素受体通路并上调 C/EBP β 表达,但不会上调 C/EBP δ 表达^[44]。还已知 DEX 会降解 Pref-1^[45]。另一方面,IBMX 是一种磷酸二酯酶抑制剂,可激活依赖于 cAMP 的蛋白激酶通路并诱导 C/EBP δ 表达^[46]。同时,胰岛素通过胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 受体发挥作用^[47]。C/EBP 转录因子家族的这些成员,以及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ

(PPAR γ), 在脂肪形成中起着关键作用。转录因子 PPAR γ 和 C/EBP α 激活脂质代谢相关基因的表达并终止 MCE^[48]。随着转录因子级联的顺序诱导, 脂肪生成的第一个标志涉及细胞内脂质积累和细胞形状的变化。

作为脂肪生成程序的主要调节器, PPAR γ 表达最初受 C/EBP β 调节。C/EBP β 活性的阻断随后导致 PPAR γ 的抑制, 从而抑制脂肪生成^[49]。由于它不仅对脂肪生成至关重要, 而且对维持分化状态也是必不可少的, 因此 PPAR γ 是必不可少的。

终末分化是指细胞从细胞周期^[50]中退出的状态。在这个时间点观察到脂质合成升高和成熟脂肪细胞充满脂滴的球形形态。由于脂肪生成酶和脂肪酶(包括脂肪酸合成酶、SREBP-1 和 LPL)的表达和活性增强, 细胞的脂质代谢增加。脂肪细胞脂质结合蛋白(aP2)的表达水平也较高^[51]。此外, 脂肪因子如瘦素、脂联素和抵抗素在成熟脂肪细胞中高度表达和分泌^[52]。在脂肪形成过程中, C/EBP活性不仅调控脂源 SREBP1c 的诱导, 还调控炎症脂肪因子 TNF- α ^[53, 54]。此外, C/EBP β 激活 TNF- α 基因启动子, 证实其促炎作用。此外, C/EBP α 和 PPAR γ 通过正反馈环相互交叉调控, 并使下游靶基因如 aP2、LPL 和 SREBP-1 转激活^[55, 56]。

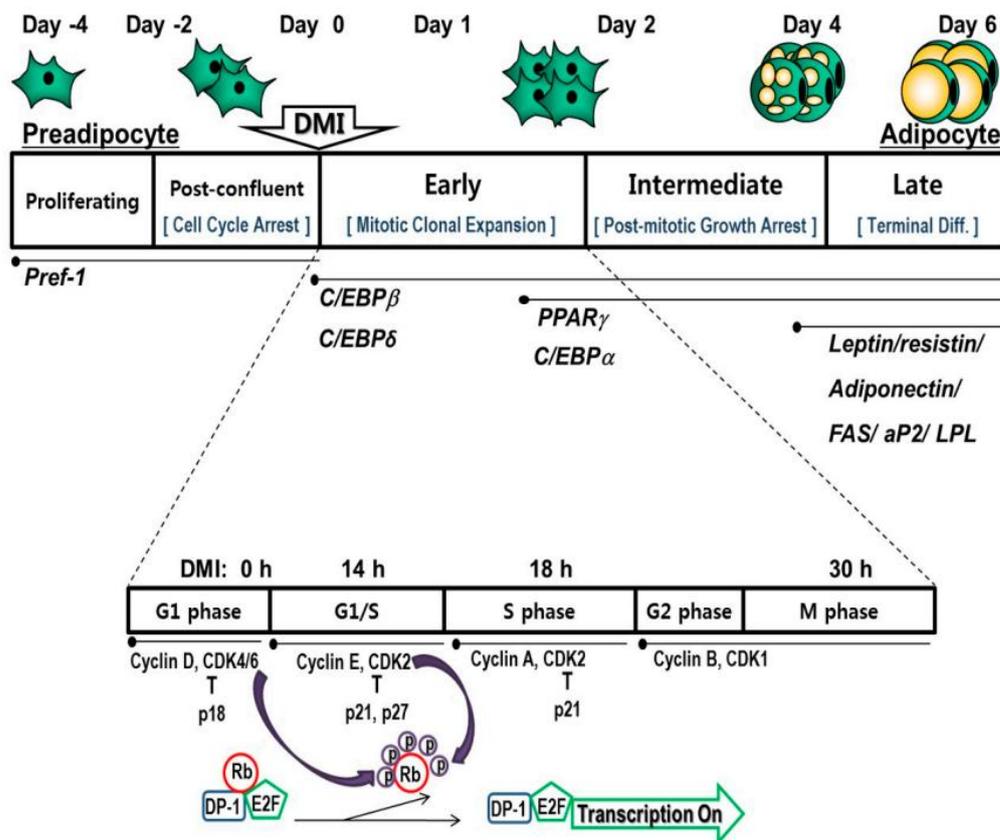


图 2 3T3-L1 前脂肪细胞分化示意图^[36]

Fig.2 A scheme of chronological 3T3-L1 preadipocyte differentiation

1.1.4 脂蛋白脂肪酶

脂肪酶是催化 TG 水解的酶，存在于不同的环境中，胃脂肪酶和胰脂肪酶作为消化液的组成部分以外分泌的方式起作用。激素敏感脂肪酶和脂肪 TG 脂肪酶位于细胞内，从脂肪组织中中性 TG 沉积中释放 FFAs 和甘油进入循环^[57]。相比之下，脂蛋白脂肪酶（LPL）和肝脂肪酶位于血管内皮细胞的细胞外（图 3）。

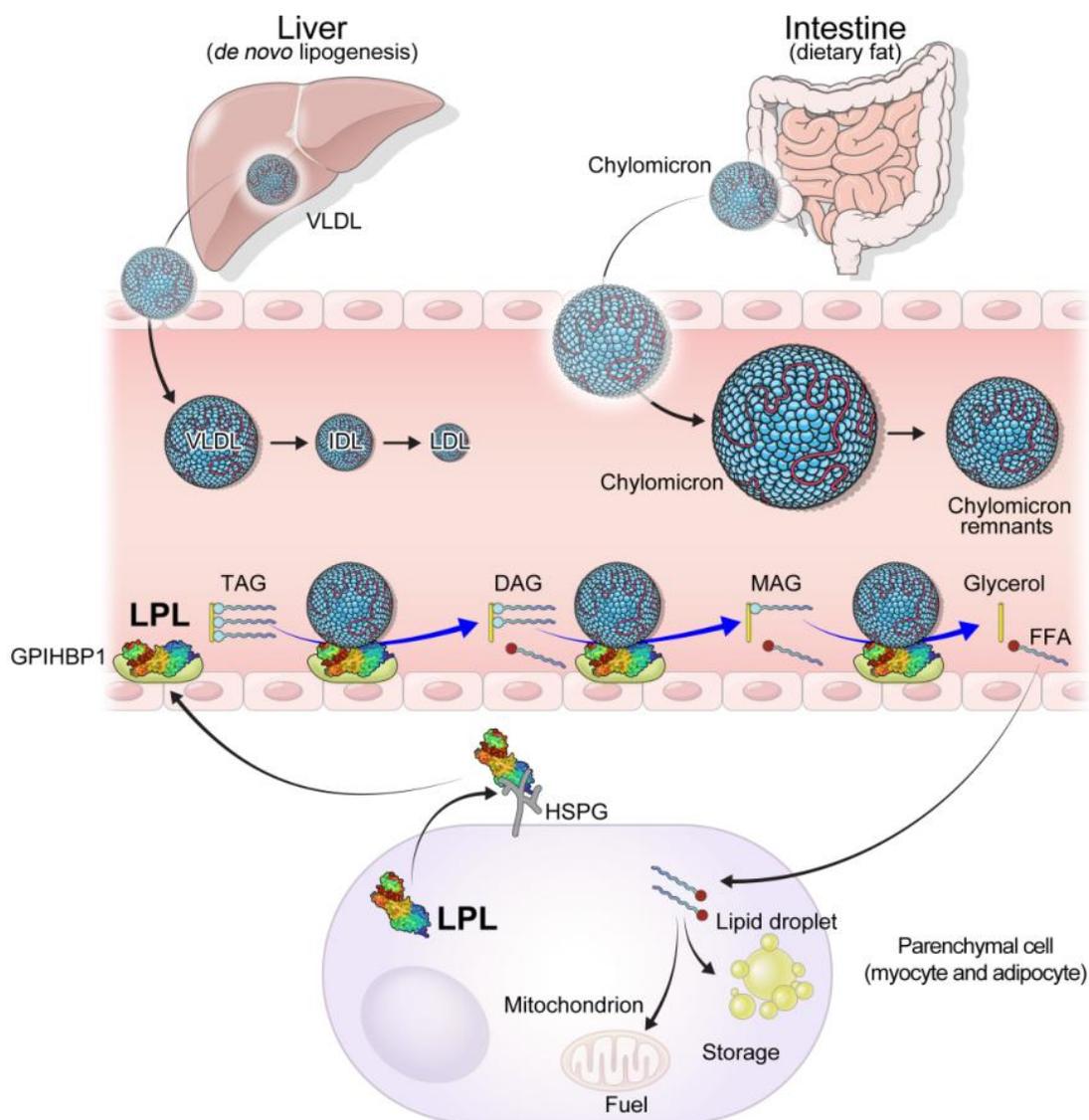


图 3 脂蛋白脂肪酶在甘油三酯代谢中的作用概述^[57]

Fig.3 Overview of the role of lipoprotein lipase in triglyceride metabolism

LPL 的存在首次被注意到是在 1943 年，Paul 等人^[58]观察到静脉注射肝素可以迅速清除与脂肪餐吸收相关的消化道脂血症。随后，一系列研究发现，这种被肝素激活的所谓“清除因子脂肪酶”是一种脂解酶，具有“抗乳糜微粒血症”的特性^[59]。此后，许多研究集中在 LPL 在脂类代谢和转运中的作用，并逐渐确定了该酶的基因结构、

合成、调控和功能。

LPL 基因位于人类 8p22 染色体区域，与肝和胰腺脂肪酶的序列同源。*LPL* 在许多外周组织中合成，脂肪和肌肉组织中含量最高。人类、小鼠、牛、豚鼠和鸡 *LPL* 的部分 cDNA 克隆已被分离和测序，编码区在物种间具有很强的保守性^[60]。

LPL 基因由 9 个内含子（跨度为 6 kb）与 10 个外显子（跨越约 30 kb）组成^[61, 62]。第一个外显子编码 188 个核苷酸和整个信号肽的长 5'非翻译区，以及成熟蛋白的前两个氨基酸残基。第十个外显子编码 1948 个核苷酸的长 3'非翻译区域，中间八个外显子编码剩余的 446 个氨基酸^[63]。第二个外显子编码与脂蛋白底物结合的蛋白质结构域。第四个外显子编码含有丝氨酸和侧翼氨基酸残基的结构域，这些结构域先前被鉴定为界面脂质结合区域。第五外显子编码成熟蛋白的序列 Gly154–Gly231，该蛋白与催化过程有关。第六和第九个外显子编码的序列相对富含碱性氨基酸，因此很可能通过与硫酸乙酰肝素的酸性结构域相互作用^[64, 65]，可能参与将酶锚定在毛细血管内皮上。

LPL 是甘油三酯分解代谢的关键酶和必需酶。*LPL* 由外周器官的实质细胞产生，分泌并固定在细胞表面的硫酸肝素蛋白聚糖上，糖基磷脂酰肌醇锚定的高密度脂蛋白结合蛋白 1 (GPIHBP1) 将 *LPL* 从细胞表面运输到毛细血管内皮细胞^[66]。*LPL* 转运到血管内皮，在循环中水解 CMs 和 VLDL 中的 TG，产生 FFAs 和甘油。胰岛素诱导 *LPL* 表达和活性，导致 FFAs 吸收到外周器官进行能量储存和消耗。因此，*LPL* 是外周器官储存和消耗脂质所必需的 TG 水平的关键调节因子^[67]。

LPL 蛋白单体包含一个较大的氨基末端结构域，该结构域包含催化残基和羧基末端结构域，以及连接这两个结构域的柔性肽^[68]。氨基末端结构域包含催化脂解的三联体 (SER132, ASP156 和 HIS241) 和覆盖催化位点的 22 个氨基酸环，这些结构在脂质底物结合水解过程中必不可少^[69-71]。羧基末端区域包含主要的肝素结合结构域，该结构域在结合脂蛋白的过程中发挥重要作用。活性 *LPL* 是两个相同亚基的二聚体分子，*LPL* 仅在形成同型二聚体时才活跃。从同二聚体到单体的解离将导致催化功能的丧失^[72, 73]。

LPL 主要在心肌细胞，脂肪细胞，骨骼肌细胞，巨噬细胞和乳腺细胞的粗面内质网中合成并分泌。*LPL* 在这些细胞中具有不同的生理功能。在粗面内质网中，*LPL* 是无活性的单体，脂肪酶成熟因子 1 (LMF1) 是一种位于内质网中的膜结合蛋白，在该蛋白的参与下，*LPL* 的翻译后成熟首先进行三级折叠，然后组装成同型二聚体^[74]。

LPL 在乳糜微粒和 VLDL 的脂肪分解过程中是必不可少的，所以 LPL 主要表达在需要大量脂肪酸作为燃料或负责 TG 存储的组织中，包括心脏、骨骼肌和脂肪组织。在底层实质细胞产生 LPL 后，LPL 被释放到内皮下空间，并由 gpi 锚定蛋白 GPIHBP1 运输到毛细血管内皮的管腔侧，运输后 GPIHBP1 继续将 LPL 锚定在毛细血管内皮上 [75, 76]。随后，LPL 分解乳糜微粒和 VLDL 成为游离脂肪酸，并被周围的细胞摄取。在清除血浆 TG 中的重要作用在携带 LPL 基因纯合突变的患者的严重高甘油三酯血症中得到了很好的证明。同样，小鼠 LPL 的普遍缺失会导致严重的高甘油三酯血症，导致幼崽在出生后 24 小时内过早死亡 [77]。与 LPL 的缺失类似，由于 GPIHBP1 缺失或错误折叠导致 LPL 在内皮下间隙的错误定位也会导致严重的乳糜少血症和高甘油三酯血症。此外，LPL 基因的表达受到一些调节因素的高度控制 [78]（表 1）。

表 1 LPL 的调节因子 [78]

Table 1 Regulatory factors of LPL

调节因子	名称	LPL 活性	LPL mRNA
Apolipoproteins	APOC2	↑ ↓	
Apolipoproteins	APOC1	↓	
Apolipoproteins	APOC3	↓	
Apolipoproteins	APOA5	↑	
Angiotensin	Angptl3	↓	
Angiotensin	Angptl4	↓	
Angiotensin	Angptl8	↓	↓
Hormones	Dexamethasone		↑
Hormones	PGE2		↓
Hormones	Cortisol	↓	↓
Hormones	Insulin	↑	↑

1.2 增强子

1.2.1 增强子的一般特性

蛋白质编码和调控信息在真核基因组中基本上是不耦合的。蛋白质编码序列仅占哺乳动物基因组的一小部分 (< 2%)，其余部分充满了大量的顺式调控 DNA 元件。这些调节序列和与其结合的反式作用因子相一致，控制基因组蛋白质编码信息何时以及如何表达，以调节细胞在发育和分化过程中的命运决定过程。顺式调控 DNA 元件包括启动子、增强子、沉默子和绝缘子；本文着重关注增强子和启动子在转录控制中的作用。转录起始位点上游的启动子序列募集转录因子和 RNA 聚合酶 II (RNAPII) 以指导转录的方向和转录的准确启动，而转录增强子激活或增加其靶基因的转录。增

增强子可以位于靶基因或无关基因的上游、下游或内含子中，并受组织特异性转录因子和辅助因子的约束，例如 p300、Mediator 和 BRG1^[79-82]。根据它们的翻译后组蛋白修饰，增强子可以细分为各种状态：中性/中间（以组蛋白 H3 上的 K4 甲基化（H3K4me1）为标志），平衡（以组蛋白 H3 上的 H3K4me1 和 K27 的三甲基化（H3K27me3）为标志）和活性（以组蛋白 H3 上的 H3K4me1 和 K27 的乙酰化（H3K27ac）为标志）^[83-85]。辅助因子结合和组蛋白标记已被用于在广泛的细胞类型中绘制全基因组增强子图谱，人类或小鼠基因组中的增强子总数估计约为 100 万^[86]。

1.2.2 增强子-启动子互作

许多研究已经观察到增强子-启动子相互作用是与基因表达同时建立的，但无法弄清楚增强子-启动子接触是基因激活的原因还是结果。已有充分的证据证明，转录的调控信息是通过增强子和启动子之间的物理接触传递的^[87]。Blobel 实验室^[88]表明，实验诱导小鼠 β -珠蛋白（Hbb）启动子与其位点控制区增强子之间的接触导致 Hbb 基因的强烈转录激活，即使在不存在关键转录激活因子 GATA1 的情况下也是如此，这项研究首次证明了增强子与其目标启动子的诱导并置可以诱导基因转录。最近两种强制染色质环化的变体将 dCas9 融合蛋白靶向到定义的基因组位点上，可以通过小分子^[89]或光诱导^[90]二聚体使其在空间上接近，以可逆的方式设计染色质环并诱导基因激活。强制染色质环最终可能实现精确的 3D 基因组环化，以研究增强子和启动子之间的转录调控信息。

1.3 4C-seq 鉴定活性增强子

基于染色体构象捕获（3C）的方法^[91, 92]是研究基因组三维组织的关键技术，有助于揭示基因组结构与转录^[93]之间的复杂关系。主要基于这些方法，本研究了解了增强子在拓扑相关结构域（TADs）的基因组背景下通过远程调控染色质环调控远端靶基因的表达^[94]。基于 3C 的技术依赖于甲醛介导的在细胞核中空间近端的 DNA 序列交联，然后使用限制性内切酶进行 DNA 裂解和交联片段的原位连接（“3C 模板”）。随后，对结扎片段进行去交联和纯化，并检测和定量结扎连接。连接频率作为细胞群中接触频率的测量。在 4C-Seq 中，使用二级限制性内切酶修整 3C 模板，然后在第二个连接步骤中进行环化。接下来，用引物杂交到所选的限制性内切片段（“观点”）进行反向 PCR，以扩增其连接伙伴（“捕获”）。4C-seq 引物携带悬垂序列，这样在 PCR 后扩增产物（而不是 3C 模板本身）配备了 Illumina 上游和下游（P5/P7）测序适

配器，因此不需要进一步的文库制备测序。在 Illumina 测序后，对捕获物进行鉴定和定量。通过这种方式，4C-seq 可以在分析不到 100 万个测序 reads 的基础上生成高分辨率的接触剖面。4C-seq 技术应用广泛，已成功用于识别调控和结构染色质环^[95, 96]，以及具有相似染色质性质的基因组区域的聚类，如核空间中的超级增强子^[97-99]。

1.4 研究增强子功能的方法

增强子功能的经典研究方法是在驱动报告基因（如 lacZ、GFP 或荧光素酶）表达的最小启动子上游克隆候选增强子序列，并在体外或体内监测报告基因的表达。例如，VISTA Enhancer Browser^[100]包含大量小鼠和人类调控序列，这些序列在小鼠发育的胚胎第 11.5 天驱动各种组织中的 lacZ 表达。经典报告基因方法的局限性在于，它们在原生环境之外测试增强子功能（因为它们通常是基于质粒的测定或依赖于随机整合到基因组中）并且大多数通量相对较低。

在表观基因组编辑类别中，核酸酶失活的 Cas9（dCas9）和抑制性（CRISPRi）或激活（CRISPRa）蛋白结构域之间的融合是改变增强子功能而不扰乱增强子序列的首选方法。例如，将 dCas9 和抑制性 Krüppel 相关框（KraB）结构域之间的融合蛋白靶向人类基因座控制区增强子导致增强子 H3K9me3 甲基化，并降低β-珠蛋白（HBB）基因表达^[101]。CRISPR 将组蛋白去甲基化酶 LSD1（dCas9-LsD1）靶向小鼠 esCs 中的四种多能性特异性增强子导致多能性丧失，表明在关键调控元件处调节组蛋白特征会干扰细胞身份的保持^[102]。dCas9-KraBCrisPri 方法已被修改为扫描更大的基因组区域以获得基因调控潜力，通过靶向 DNaseI 超敏感位点^[103]或通过兆碱基大小的区域中无偏地平铺所有可能的 dCas9 识别位点^[103]。

例如，将 dCas9-KRAB 靶向人类 K562 细胞中的 MYC 基因座，发现了七种推定的 MYC 增强子，其中在 dCas9-KRAB 靶向时 H3K27ac 的占用率降低伴随着 MYC 表达的降低。基于 Hi-C 和 Chia-Pet 数据（两个桥接距离 > 1.8Mb），所有七个候选增强子都与 MYC 启动子相互作用，在基于质粒的报告基因测定中激活转录，并且它们的内源性缺失导致 MYC 表达减少^[104]。dCas9-KRAB 增强子靶向还与功能读数相结合，这些读数足够灵敏以捕获对目标基因表达的细微影响，例如 RNA-FISH209 或单细胞转录组分析^[105]。相反，已证明将 p300 乙酰转移酶活性募集到增强子可激活靶基因^[106]。目的基因组区域平铺的 CRISPRa 将转录激活因子 VP64 招募到围绕两个关键自身免疫风险位点的大型基因组区域（超过 100kb），发现增强子在前体细胞中处于

休眠状态，但在分化的 T 细胞中变得活跃^[107]。基于 CRISPR 的方法无疑很有希望揭示非编码基因组的调控潜力，尽管与其他调控元件冗余作用的调控元件可能逃避检测，除非实施组合策略同时针对两个或多个调控元件^[108]。

第二章 选题背景与目的意义

2.1 选题背景

我国是猪肉生产和消费第一大国，猪遗传育种改良对于我国生猪产业的健康发展至关重要。脂肪沉积是猪最重要的经济性状之一，属典型复杂数量性状，影响肉质和生产效率。目前，利用基因编辑技术敲除或过表达编码基因是实现猪脂肪性状快速改良的主要手段之一。尽管此方式能够改变猪脂肪沉积，但由于其影响的终身性、全身性和彻底性，常伴随胚胎致死、组织病变等负面效应。通过靶向成脂相关重要基因的增强子有望“微调”基因的表达进而精准改良猪脂肪性状。

脂肪组织具有高度动态的细胞组分变化和活跃的代谢能力，参与多种生理过程。它是能量代谢和储存的主要器官，通过甘油三酯的合成和分解维持动物体内的能量平衡。LPL 是脂蛋白代谢调控过程中的关键酶之一，在甘油三酯代谢中起着至关重要的作用。明确增强子对 *LPL* 基因的转录调控，并进一步进行功能验证、明确其生物学效应，将有助于进一步了解成脂分化的转录调控机制，能为深入研究功能基因调控机制及相关应用提供研究基础。

2.2 主要研究内容

- (1) 绘制分化前后的 3T3-L1 前脂肪细胞中 *LPL* 的全基因组互作图谱；
- (2) 分析分化后的 3T3-L 前脂肪细胞中 *LPL* 基因互作位点的差异；
- (3) 筛选并评估潜在增强子的相对活性；
- (4) 利用 CRISPRi 技术进行活性增强子的功能验证；
- (5) 探讨功能增强子调节靶基因的分子机制。

2.3 研究的目的意义

本研究选取 3T3-L1 前脂肪细胞为实验对象，从三维基因组层面分析 *LPL* 基因的调节区域及其互作图谱，全基因组染色质空间构象变化规律及对 *LPL* 基因表达调控的影响，鉴定 *LPL* 基因表达的重要调控元件，深入揭示 *LPL* 基因的分子机制；有助于揭示 *LPL* 基因对脂肪代谢的影响，进而为农业动物体脂沉积提供可行性参考。

第三章 材料与方法

3.1 实验材料

3.1.1 实验细胞

H293T 和 3T3-L1 细胞系由中国科学院细胞库友情提供，用于后续双荧光素酶报告实验和慢病毒感染实验。293FT 细胞购自 ATCC 公司，用于后续慢病毒包装实验。

3.1.2 菌株和载体

以下是本研究涉及的菌株和载体及其来源：

(1) TransStbl3 Chemically Competent Cell 购自全式金生物公司，后续用于慢病毒转移质粒克隆。

(2) DH5 α Chemically Competent Cell 购自擎科生物公司，后续用于双荧光质粒和过表达质粒的克隆。

(3) 目的基因启动子和潜在活性增强子活性检测所使用的双荧光素报告载体系统 pGL3-Basic 和 pRL-TK 购自 Promega 公司。

(4) 用于包装慢病毒的载体 pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro、psPAX2 和 pVSV-G 由四川农业大学动物科技学院猪研究室提供。

(5) 用于过表达转录因子的载体 pEGFP-N1 由四川农业大学动物科技学院猪研究室保存。

3.1.3 主要仪器设备

(1) 微量移液器：2.5~10 μ L、20~200 μ L、100~1000 μ L, Eppendorf 公司, Germany;

(2) 电子天平：ISO9001; BL610, Sartorius 公司, Germany;

(3) 低温高速离心机：Legend Micro21R centrifuge, Thermo 公司, USA;

(4) PCR 扩增仪：Bio-Rad 公司, USA;

(5) 超纯水系统：Milli-Q, Millipore 公司, USA;

(6) 荧光定量 PCR 仪：CFX96, USA;

(7) 凝胶成像分析系统：Universal Hood III, 酶标仪, Bio-Rad 公司, USA;

(8) 核酸蛋白分析仪：Healthcare Bio-Science, USA;

(9) NanoDrop2000 超微量分光光度计：Thermo Fisher Scientific 公司, USA;

- (10) 液氮罐: Thermo 公司, USA;
- (11) CO₂ 培养箱: 371 型 Thermo 公司, USA;
- (12) 荧光显微镜: IX53, Olympus 公司, Japan;
- (13) -80°C 冰箱: Thermo 公司, USA;
- (14) 制冰机、-20°C 冰箱、细胞冻存盒、37°C 电热恒温干燥箱、压力蒸汽灭菌锅、涡旋仪、超净工作台、电泳仪、水平电泳槽、恒温水浴锅等均为国产。

3.1.4 主要试剂

- (1) 胎牛血清、DMEM 高糖、PBS、双抗和胰蛋白酶-EDTA 购自 Gibco 公司;
- (2) PCR 引物由生工生物工程有限公司合成;
- (3) 2×Phanta Max Master Mix Dye Plus、HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) 反转录试剂盒、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 荧光定量试剂、FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 凝胶回收试剂盒、VAHTS DNA Clean Beads 购自诺唯赞公司;
- (4) 普通质粒小提试剂盒、血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 购自天根公司;
- (5) 限制性内切酶 (DpnII、KpnI - HF、HindIII-HF 和 BsmBI-v2)、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 连接酶缓冲液 (10×) 购自 NEB 公司;
- (6) 液体样本甘油三酯 (TG) 酶法测定试剂盒购自普利莱公司;
- (7) E.Z.N.A.® Endo-Free Plasmid Mini Kit II 无内毒素小量质粒提取试剂盒、E.Z.N.A.® Endo-Free Plasmid Midi Kit 无内毒素中量质粒提取试剂盒、E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit 切胶回收试剂盒和 E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit 纯化回收试剂盒购自 Omega Bio-tek 公司;
- (8) Trelief® SoSoo Cloning Kit Ver.2 同源重组试剂盒和 2×T5 Super PCR Mix (Colony) 购自擎科生物公司;
- (9) DNA 纯化和浓缩试剂盒购自天漠科技公司;
- (10) 磷酸钙细胞转染试剂盒、DAPI 染色液 (DAPI Staining Solution)、DEPC 水 (DNase、RNase free)、4%多聚甲醛固定液购自碧云天公司;
- (11) 细胞转染试剂 Lipofectamine 3000 购自 Invitrogen 公司;
- (12) 油红 O 染色试剂盒、Nile Red 尼罗红购自索莱宝生物公司;

- (13) 超滤管、0.22 μm 滤器和 0.45 μm 滤器购自默克生命科学公司；
- (14) 胰岛素、地塞米松 (DEX)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、嘌呤霉素均购自 Sigma 公司；
- (15) 慢病毒滴度荧光快速检测卡购自博奥龙公司；
- (16) 12 孔培养板、6 孔培养板、10 cm 培养皿、6 cm 培养皿、3.5 cm 培养皿、T25 培养瓶、T75 培养瓶、T175 培养瓶购自 Corning 公司；
- (17) 96 孔透明板、96 孔白色板、Dual-Glo Luciferase assay system 双荧光检测试剂盒购自 Promega 公司。

3.1.5 常用试剂配制

- (1) 细胞裂解液 (10 mL) : 500 μL 的 1M Tris pH 7.5 (50 mM Tris)、300 μL 的 5 M NaCl (150 mM NaCl)、100 μL 的 0.5M EDTA (5mM EDTA)、250 μL 的 20% NP-40 (0.5% NP-40)、100 μL 的 Triton X-100 (1% TX-100)、200 μL 的 50 \times 蛋白酶抑制剂。
- (2) 10 mg/mL 蛋白酶 K 储存液: 100 mg 蛋白酶 K 溶于 10 mL MilliQ 水, 1.5 mL 分装, -20°C 保存;
- (3) 氨苄青霉素溶液: 10 mg 的 Amp 溶解于 10 mL MilliQ 水中, 使用一次性过滤器除菌, 分装到 1.5 mL 的 EP 管中, -20°C 保存;
- (4) 75%乙醇: 75 mL 的无水乙醇加入 25 mL 的双蒸水;
- (5) LB 液体培养基 (300 mL) : 称取 3 g NaCl, 3 g 胰蛋白胍和 1.5 g 酵母浸出物溶于超纯水中, 定容至 300 mL, 121°C 20 min 高压灭菌, 待温度降至室温后 4°C 保存。
- (6) LB 固体培养基 (100 mL) : 称取 1g NaCl, 1 g 胰蛋白胍, 0.5 g 酵母浸出物和 1.5 g 琼脂粉溶于超纯水中, 定容至 100 mL, 121°C 20 min 高压灭菌, 加 100 μL 抗生素后倒入平板, 琼脂冷却凝固后用封口膜封口, 置于 4°C 保存。
- (7) 细胞增殖培养基: DMEM (高糖) +10%FBS (胎牛血清), 4°C 保存;
- (8) 3T3-L1 分化培养基: DMEM (高糖) +10%FBS (胎牛血清) +insulin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 4°C 保存;
- (9) 细胞冻存液: 70%DMEM (高糖) +20%FBS (胎牛血清) +10%的 DMSO (二甲亚砜);

(10) 油红 O 储存液: 0.5 g 油红 O 粉末+100 mL 异丙醇, 60°C 溶解过滤, 4°C 保存。

3.1.6 应用的分析软件和生物信息学网站

(1) NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 获取目的基因序列、序列比对和引物设计;

(2) UCSC Genome Browser: <http://genome.ucsc.edu>, 潜在活性增强子保守性分析和序列定位;

(3) GeneCards: <http://www.genecards.org/>, 基因功能和相关生物学信息的注释;

(4) <http://www.addgene.org/vector-database/>, 获取载体相关信息;

(5) Cistrome Data Browser: <http://cistrome.org/db/#/>, 查找不同类型公开数据;

(6) EBI: <https://www.ebi.ac.uk/>, 公开数据下载链接;

(7) <https://primer3.ut.ee/>, 设计扩增目的片段的特异性引物;

(8) AnimalTFDB: <http://bioinfo.life.hust.edu.cn/AnimalTFDB/>, 和 JASPAR: <http://jaspar.genereg.net/>, 预测转录因子结合位点;

(9) Tefor: <http://crispor.tefor.net/>, 设计 sgRNA;

(10) <https://wge.stemcell.sanger.ac.uk/>, 预测 sgRNA 脱靶效率。

3.1.7 组织测序与数据分析

(1) 从 3T3-L1 细胞中提取总 RNA, 每个时间点设置三个生物学重复, 质检合格的高质量 RNA 样品送至安诺公司进行测序, 构建普通转录组文库。文库质检合格后, 使用 MGI 测序平台进行高通量测序, 测序读长为 PE150。

(2) 高通量测序结果最初以原始图像数据文件存在, 经软件 WriteFQ 进行序列碱基识别后转化为原始测序序列 Raw Data, 对原始序列进行过滤, 去除接头污染的 Reads (Reads 中接头污染的碱基数大于 5bp。对于双端测序, 若一端受到接头污染, 则去掉两端的 Reads); 去除低质量的 Reads (Reads 中质量值 $Q \leq 19$ 的碱基占总碱基的 50%以上, 对于双端测序, 若一端为低质量 Reads, 则会去掉两端 Reads); 去除含 N 比例大于 5%的 Reads (对于双端测序, 若一端含 N 比例大于 5%, 则会去掉两端 Reads)。最终得到高质量的 Clean Reads, 再进行后续分析。

(3) 高质量 reads 通过 TopHat v.2.1.0 被比对到小鼠参考基因组 (<http://genome-asia.ucsc.edu/GRCm38/mm10>), 参数为 library-type=fr-firststrand(其余参数为默认值)。

比对过程中容许有 2 个碱基的错配。通过这一步骤，本研究可以将测序得到的 reads 对应到基因及基因组上，后续分析都是基于上述比对结果。mRNA 的 TPM 值通过 Kallisto (version 0.43.0) 进行定量，至少有两个生物学重复中具有 TPM > 0.5 的 mRNA 被认为是正常表达。

(4) 差异基因的鉴定:不同基因型分组的同一组织中的差异基因通过 Cuffdiff (part of Cufflinks) 鉴定。Cufflinks/Cuffquant/Cuffdiff 的参数为 library-type=fr-firststrand,-u,-b/-G。为了评估两组间 mRNA 的整体表达变化, p_{adj} 小于 0.05 且 $|\text{fold change}| > 2$ 作为差异表达基因筛选的条件。

3.1.8 差异基因功能富集分析

(1) GO 功能富集分析: 功能显著性富集分析给出与基因组背景相比, 在差异表达基因中显著富集的 GO 功能条目, 从而给出差异表达基因与哪些生物学功能显著相关。采用在线 MetaScape (<http://metascape.org/gp/index.html>) 对差异表达的蛋白质编码基因进行功能富集分析, 基于基因本体论 (gene ontology, GO) 中的功能富集, 包括分子功能 (molecular function)、细胞成分 (cellular components) 和生物过程 (biological processes); 对于这些功能富集分析, 以 $FDR \leq 0.05$ 为阈值, 满足此条件的 GO term 定义为在差异表达基因中显著富集的 GO term。通过 GO 功能显著性富集分析能确定差异表达基因行使的主要生物学功能。

(2) KEGG Pathway 分析: 使用京都基因和基因组百科全书富集信号通路 (<https://www.genome.jp/kegg/>)。在生物体内, 不同基因相互协调行使其生物学功能, 基于 Pathway 的分析有助于进一步了解基因的生物学功能。 $FDR \leq 0.05$ 的 Pathway 定义为在差异表达基因中显著富集的 Pathway。

3.2 实验方法

3.2.1 细胞 RNA 提取

本研究按照以下步骤对细胞 RNA 进行提取:

- (1) 巴氏吸管移除细胞培养液。
- (2) 加入 3 mL PBS 洗一遍并移除。
- (3) 加入 1 mL Trizol 裂解液, 吹打混匀, 保证细胞裂解充分, 室温静置 5 min。
- (4) 加入 200 μ L 氯仿/mL Trizol, 上下剧烈颠倒 15 s, 室温静置 5 min。
- (5) 4 $^{\circ}$ C 下 12,000 g 离心 15 min, 溶液分为三层, 吸取上层水相。

(6) 将上清液转移至新的 1.5 mL 离心管中，加入 500 μ L 异丙醇/mL Trizol，轻微混匀后，室温静置 10 min。

(7) 4 $^{\circ}$ C 下 12,000 g 离心 10 min，可见管底白色 RNA 沉淀。弃上清，加入 1 mL 预冷的新鲜 75%乙醇/mL Trizol，4 $^{\circ}$ C 下 12,000 g 离心 5 min，洗涤沉淀。

(8) 弃上清，4 $^{\circ}$ C 下瞬时离心，尽量吸干残留乙醇。

在超净工作台干燥 RNA 沉淀约 3 min，加入适量 RNase-free 水吹打溶解 RNA 沉淀。

(9) 取少量 RNA 溶液分别用于 Nanodrop 浓度测定及琼脂糖凝胶电泳检 RNA 质量，剩余 RNA 溶液于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

3.2.2 反转录和定量

3.2.2.1 基因组 DNA 去除

按表 2 在 RNase Free 的 200 μ L 离心管中配制去除基因组 DNA 的混合液，用移液器轻轻吹打混匀。42 $^{\circ}$ C 反应 2 min。

表2 去除基因组 DNA 反应体系
Table 2 gDNA wiper reaction system

组分	使用量
Rnase-free ddH ₂ O	8 μ L
5 \times gDNA wiper MIX	2 μ L
Total RNA	1 μ L (1000 ng)

3.2.2.2 配制第一链 cDNA 合成

往以上反应体系中加入表 3 组分，配制第一链 cDNA 合成反应液，用移液器轻轻吹打混匀。37 $^{\circ}$ C 反应 15 min，85 $^{\circ}$ C 反应 5 sec，进行第一链 cDNA 合成反应。产物可立即用于 qPCR 反应，或在 -20 $^{\circ}$ C 保存。

表 3 第一链 cDNA 合成反应体系
Table 3 First-strand synthesis reaction system

组分	使用量
上一步的混合液	10 μ L
10 \times RT Mix	2 μ L
HiScript III Enzyme Mix	2 μ L
Oligo (dT) 20VN	1 μ L
Random hexamers	1 μ L
RNase - free ddH ₂ O	4 μ L

3.2.2.3 荧光定量

往第一链 cDNA 合成液中加入 20 μL RNase-free ddH₂O，按表 4 在荧光定量板中配制如下混合液，短暂瞬离。

表 4 RT-qPCR 反应体系
Table 4 RT-qPCR reaction system

组分	使用量
2× ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix	10 μL
Primer1 (10 μM)	0.4 μL
Primer2 (10 μM)	0.4 μL
TemplateDNA/cDNA	1 μL
ddH ₂ O	8.2 μL

RT-qPCR 反应程序如下：

Stage	反应类型	Reps	温度	时间
Stage1	预变性 ^a	1	95°C	30 sec
Stage2	循环反应	40	95°C	3-10 sec
			60°C	10-30 sec
			95°C	15 sec
Stage2	融解曲线	1	60°C	60 sec
			95°C	15 sec

3.2.2.4 定量数据分析

参照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法，以 *Gapdh* 作为内参基因，以各个待检测基因的特异性引物检测其表达的差异。计算各样品的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 、标准误差以及实验组与对照之间的差异性。*LPL* 基因在 3T3-L1 分化前后表达是否具有显著性差异， $P < 0.05$ 为差异显著， $P < 0.01$ 为差异极显著。

3.2.2.5 荧光定量引物的设计及合成

荧光定量引物基于 NCBI 数据库中获取的基因序列进行在线设计，并使用 NCBI Primer Blast 进行特异性比对，合格的引物送往生工生物公司合成，相关信息见表 5。

表 5 RT-qPCR 引物
Table 5 The primer for RT-qPCR

引物	序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
<i>LPL</i>	F: GGGAGTTTGGCTCCAGAGTTT	115
	R: TGTGTCTTCAGGGGTCCTTAG	
<i>Gapdh</i>	F: CAGGTTGTCTCCTGCGACTT	133
	R: CCCTGTTGCTGTAGCCGTAT	

注：F 为上游引物，R 为下游引物。

3.2.3 线性化质粒纯化

经酶切的骨架载体，根据 Omega Bio-tek 公司 E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit 纯化回收试剂盒操作说明书，对线性化 pGL3-basic 进行纯化回收。采用分光光度计测定质粒 OD 值和浓度，为下一步同源重组反应定量。

3.2.4 4C-seq 文库制备

3.2.4.1 细胞交联

为了保证 DNA 产量，使用 500-1000 万细胞对 4C 模板进行制备。

(1) 室温条件下，PBS 重悬细胞使细胞密度为 2×10^6 个细胞/mL (5 mL 重悬 1×10^7 个细胞)。

(2) 室温条件下，加入等量 (5 mL) 4% 甲醛 (终浓度 2% 甲醛)，颠倒混匀，置于摇床孵育 10 min。

(3) 加入 1.5 mL 预冷的 1 M 甘氨酸 (最终浓度为 0.13 M)，将管子转移至冰上淬灭交联反应，冰上孵育 10 min。

(4) 4°C 500 g 离心 5 min，并去除所有上清。

(5) 用 1 mL 预冷的 PBS 重悬沉淀，并转移到 1.5 mL 的 EP 管中，4°C 500 g 离心 5 min，并去除所有上清。

3.2.4.2 细胞裂解

4C-Seq 文库制备中的细胞裂解步骤如下：

(1) 用 1 mL 新鲜制备的预冷的细胞裂解液轻轻重悬沉淀。在冰上孵育 20 min。

(2) 确定细胞裂解是否完成：将 3 μ L 细胞与 3 μ L 甲基绿-吡啶染色液混合在显微镜载玻片上，用盖玻片盖住。显微镜下观察染色情况，如果细胞被裂解，细胞质应该呈粉红色，细胞核/DNA 呈蓝色/绿色。

(3) 4°C 条件下 500 g 离心 5 min，并去除所有上清。

(4) 将细胞核重悬于 1 mL PBS 中，4°C 500 g 离心 5 min，并去除所有上清。

(5) 用 440 μ L 的 Milli-Q 水重悬沉淀。

(6) 加入 60 μ L 10 \times REbuffer。

(7) 将 EP 管置于 37°C，并加入 15 μ L 的 10% SDS。

(8) 在 900 r/min 金属浴 37°C，孵育 1 h。

(9) 加入 75 μ L 的 20% TritonX-100，900 r/min 金属浴 37°C，孵育 1 h。

(10) 取 5 μL 样品作为“未消化对照”。

3.2.4.3 第一次限制性内切酶酶切

4C-Seq 文库制备的第一次限制性内切酶酶切步骤如下：

- (1) 加入 200 URE (HindIII)，900 r/min 金属浴，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h。
- (2) 加入 200 URE (HindIII)，900 r/min 金属浴，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜 (12-16 h)。
- (3) 加入 200 URE (HindIII)，900 r/min 金属浴，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h。
- (4) 各取 5 μL 样品作为“消化对照”。
- (5) 判断消化效率：
 - a. 加入 5 μL ProtK (10 mg/mL)，金属浴 65 $^{\circ}\text{C}$ ，孵育 1 h。
 - b. 在 0.6% 的琼脂糖凝胶上样 20 μL 。

3.2.4.4 第一次酶连

4C 文库制备的第一次酶连步骤如下：

- (1) 金属浴 65 $^{\circ}\text{C}$ ，孵育 20 min，热灭活限制性核酸内切酶。
- (2) 将样本转移到一个 50 mL 离心管中。
- (3) 加入 700 μL 10 \times 连接 buffer。
- (4) Milli-Q 水加至 7 mL。
- (5) 加入 8.25 μL 连接酶 (NEB)，16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。
- (6) 取 100 μL 的样品作为“连接对照”。
- (7) 判断连接效率：
 - a. 加入 5 μL ProtK (10mg/mL)，金属浴 65 $^{\circ}\text{C}$ ，孵育 1 h。
 - b. 在 0.6% 的琼脂糖凝胶上样 20 μL 。
 - c. 如果连接质量良好，则进行下一步。如果连接质量不好，加入一些鲜的

ATP，重复步骤。

3.2.4.5 去交联

使用如下方法对样品进行去交联：

- (1) 加入 30 μL 的 Prot K (10mg/mL)，水浴锅 65 $^{\circ}\text{C}$ ，过夜去交联。
- (2) 加入 30 μL 的 RNase A (10mg/mL)，水浴锅 37 $^{\circ}\text{C}$ ，孵育 45 min。
- (3) 加入 7 mL 苯酚-氯仿，充分混匀。
- (4) 室温 370 r/min 离心 15 min。
- (5) 将水相转移到一个新的 50 mL 离心管，并添加：

- a. 35 mL 无水乙醇
 - b. 8 mL 的 Milli-Q 水
 - c. 1 mL 的 3M NaAc pH=5.3
 - d. 7 μ L 的 甘糖原 20 mg/mL
- (6) 混合并在-80 $^{\circ}$ C 孵育，直到样品完全冻住。
- (7) 4 $^{\circ}$ C 9000 r/min 离心 20 min。
- (8) 除去上清，加入 10 mL 冷的 70%乙醇。
- (9) 4 $^{\circ}$ C 3750 r/min 离心 15 min。
- (10) 除去上清，室温短暂干燥。
- (11) 水浴锅 37 $^{\circ}$ C，将沉淀溶于 150 μ L 的 10 mM Tris-HCl pH=7.5 中。
- (12) 继续进行下一步或将样品存储在-20 $^{\circ}$ C。

3.2.4.6 第二次限制性内切酶酶切

第二次限制性内切酶酶切步骤如下：

- (1) 在 150 μ L“3C”样品中，添加：
 - a. 50 μ L 10 \times Csp6I buffer。
 - b. 5 μ L (10U/ μ L) Csp6I
 - c. Milli-Q 水加至 500 μ L。
- (2) 金属浴 37 $^{\circ}$ C，过夜孵育。
- (3) 取 5 μ L 样品作为“消化对照”。
- (4) 判断消化效率：
 - a. 在步骤 3 的 5 μ L 样品中加入 95 μ L 10 mM Tris-HCl pH=7.5。
 - b. 在 0.6%的琼脂糖凝胶上样 20 μ L。
 - c. 如果消化质量好，继续进行下一步。如果消化不良，重复第 2.4.6 步。
- (5) 65 $^{\circ}$ C下孵育 25 min 灭活限制性核酸内切酶。

3.2.4.7 第二次酶连

第二次酶连步骤如下：

- (1) 将样品移至 50 mL 离心管中，加入：
 - a. 1.4 mL 10 \times 连接 buffer
 - b. 16.5 μ L 连接酶 (NEB)
 - c. Milli-Q 水加至 14 mL

(2) 16°C过夜孵育。

3.2.4.8 4C 样品的纯化

按照如下步骤对 4C 样品进行纯化：

(1) 酶连之后添加：

a. 加 460 μL 的 3M NaAc PH =5.3

b. 7 μL 的 甘糖原 1 mg/mL

c. 35 mL 无水乙醇

(2) 混合并在 -80°C 孵育，直到样品完全冻住。

(3) 4°C 条件下 9000 r/min 离心 20 min。

(4) 除去上清，加入 15 mL 冷的 70%乙醇。

(5) 20°C 3750 r/min 离心 15 min。

(6) 除去上清，室温短暂干燥。

(7) 浴锅 37°C，将沉淀溶于 150 μL 的 10 mM Tris-HCl pH=7.5 中。

(8) 用 QIAquick PCR 纯化试剂盒对样品进行纯化。每个样品使用三个柱，每个柱子最大结合 10 μL DNA。用 50 μL 的 10 mM Tris-HCl pH = 7.5 溶液洗脱柱子。

(9) 使用 NanoDrop 分光光度计确定样品的浓度。

(10) 将样品储存于 -20°C 或继续进行下一步。

3.2.4.9 测试引物

设计的 VP 特异性 PCR 引物应首先进行测试，以确定其效率并测试 4C 模板质量，测试反应体系见表 6。

表 6 4C 模板 PCR 反应体系
Table 6 The 4C template PCR reaction system

组分	使用量
10×PCR buffer I	2.5 μL
dNTP (10 mM)	0.5 μL
reading primer (10 μM)	2 μL
non-reading primer (10 μM)	2 μL
Expand Long Template Polymerase mix	0.35 μL
4C template	200 ng
ddH ₂ O	To 25 μL

PCR 反应程序如下：

步骤	循环数	温度	时间
预变性	1	94°C	2 min
变性	30	94°C	10 sec
退火		60°C	1 min
延伸		68°C	3 min
彻底延伸	1	72°C	5 min
保存		4°C	∞

在 1.5% 的琼脂糖凝胶上样 10 μ L PCR 产物。如果引物产生两条明显的主条带（“自连接”和“未消化”）和拖带说明 4C-seq 文库制备成功。

3.2.4.10 测序文库的准备

测序文库的准备步骤如下：

(1) 步骤 1，使用下面所示的反应组合和程序进行第一步 PCR 反应。

表 7 第一步 PCR 反应体系
Table 7 Step1 PCR reaction system

组分	使用量
10 \times PCR buffer I	5 μ L
dNTP (10 mM)	1 μ L
reading primer (10 μ M)	2 μ L
non-reading primer (10 μ M)	2 μ L
Expand Long Template Polymerase mix	0.7 μ L
4C templat	200 ng
ddH ₂ O	to 25 μ L

PCR 反应程序如下：

步骤	循环数	温度	时间
预变性	1	94°C	2 min
变性	16	94°C	10 sec
退火		60°C	1 min
延伸		68°C	3 min
彻底延伸	1	72°C	5 min
保存		4°C	∞

(2) 通常用 200 ng 4C 模板进行 4 次 PCR 反应，以增加 4C 文库的丰富度。然后合并 4 个 PCR 产物，取 50 μ L 进行纯化。

(3) 对第一步 50 μ L PCR 产物使用 8 \times AMPure XP 进行纯化：

a. 使用 AMPureXP 珠子前，RT 平衡和混匀。

- b. 添加 40 μL AMPureXP 磁珠到样品中，漩涡混匀并且顺离。
- c. 室温孵育 5 min。
- d. 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后，除去上清。
- e. 轻轻加入 200 μL 80%乙醇。
- f. 待溶液澄清后，除去上清。
- g. 轻轻地加入 200 μL 80%乙醇。
- h. 除去上清，将磁珠顺离下来。
- i. 把管子放回磁力架上。
- j. 当珠子从管底被吸起时，除去残留的乙醇。
- k. 风干样品 30 s。
- l. 将磁珠重悬于 50 μL 10mM Tris-HCl pH=7.5 中
- m. 室温 600 r/min，孵育 10 min。
- n. 短暂顺离，将样品放回磁力架上。
- o. 转移 45 μL 的上清到一个干净的 1.5 mL EP 管中。

(4) 对在第一步之后获得的纯化 PCR 产物进行第二步 PCR。在此第二步 PCR 中，使用通用引物。使用下面所示的反应组合和程序进行第二步 PCR 反应。

表 8 第二步 PCR 反应体系
Table 8 Step2 PCR reaction system

组分	使用量
10 \times PCR buffer I	5 μL
dNTP (10 mM)	1 μL
reading primer (10 μM)	2 μL
non-reading primer (10 μM)	2 μl
Expand Long Template Polymerase mix	0.7 μL
4C templat	200 ng
ddH ₂ O	to 50 μL

PCR 反应程序如下:

步骤	循环数	温度	时间
预变性	1	94°C	2 min
变性	30	94°C	10 sec
退火		60°C	1 min
延伸		68°C	3 min
彻底延伸	1	68°C	5 min
保存		4°C	∞

(5) 使用 Qiagen 试剂盒纯化 PCR 产物。

(6) 使用 NanoDrop 分光光度计确定样品的浓度。保证 A260/A280 的吸收比值在 1.8 和 2.0 之间, 并且 A260/230 的吸收比值 > 2.0。

(7) 4C-seq 文库可以存储在 -20°C, 或使用 Illumina 高通量测序设备直接测序。

3.2.5 启动子和潜在活性增强子双荧光载体构建

3.2.5.1 骨架载体酶切

用 KpnI-HF 内切酶对骨架载体 pGL3-basic 进行切割, 程序为 37°C 酶切, 酶切体系见表 9。

表 9 酶切反应体系
Table 9 Enzyme cleavage reaction system

组分	使用量
质粒DNA	20 μg
KpnI-HF	5 μL
10×CutSmart buffer	5 μL
H ₂ O	To 50 μL

3.2.5.2 线性化质粒纯化

经酶切的骨架载体, 根据诺唯赞公司 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 操作说明书, 对线性化 pGL3-basic 进行纯化回收。采用分光光度计测定质粒 OD 值和浓度, 为下一步同源重组反应定量。

3.2.5.3 提取 C57BL/6J 小鼠全基因组

根据福际公司动物组织基因组 DNA 提取试剂盒操作说明书, 提取 C57BL/6J 小鼠后肢肌肉组织基因组 DNA。采用分光光度计测定基因组 DNA 的 OD 值和浓度, 为下一步扩增潜在活性增强子序列定量。

3.2.5.4 扩增基因启动子和潜在活性增强子片段所用引物

根据 NCBI 数据库中 *LPL* 基因的序列和基因组位置, 获取其转录起始位点上游 2000bp 和转录起始位点下游 500 bp 共计 2500 bp 片段为其启动子区域。利用 NCBIPrimer-BLAST 设计一系列 5'缺失和 3'片段的启动子引物和潜在活性增强子引物, 用于扩增启动子不同缺失片段和潜在活性增强子片段, 引物序列见表 10。

表 10 不同片段启动子和潜在活性增强子扩增引物

Table 10 PCR primers for candidate active enhancers

引物	序列 (5'-3')	产物长度 (bp)
Lpl-E1-1	F: CAGCCCACAGAGCTTCCTTT R: GTATGAACTGTGCCCAGGCT	970
Lpl-E1-2	F: CGGGTCTCACATTGATGCCA R: ACAGTCCCTTTGATCCAGCG	1076
Lpl-E2-1	F: CTGCCTCCTTGCTACTGCAT R: AGGCCTATAACCACAAAGGTTGG	1003
Lpl-E2-2	F: AAAACCACCTCCTTCTGGGC R: GGTAGGTAGGCAAGGATTCCA	1151
Lpl-E3-1	F: CAGGTTACTGCAGGGCAGAT R: AAGCTTGCTCCATTCCCCAG	1543
Lpl-E3-2	F: GTTACTGCAGGGCAGATAGCA R: TGGGTTGGCCCTACATACAG	1178
Lpl-E4-1	F: CACCAGAGCTCTCCTGCAAA R: GACATGTTTGTGGGCGTGAG	778
Lpl-E4-2	F: CCAAGGCTCTTGCCTGAAAC R: TTCATGAGCCCTGAAAGGCA	807
Lpl-E5-1	F: CAGCAAAAGCTGTGCTCCTG R: ACATCATCAGCCTGCTTCCC	467
Lpl-E5-2	F: GCAAAAGCTGTGCTCCTGTC R: CCTGAGCACATCATCAGCCT	472
Lpl-E6-1	F: GCCCAACATACAGCAAGGACTA R: ACCAGCTGCCTGGTGCATAATAA	1017
Lpl-E6-2	F: CACGACTCTCCTTACAGACTGC R: TTACCAGCTGCCTGGTGCATAAT	1083
Lpl-E7-1	F: GACCTTCTCTTCTGGGCAGG R: ATTGGCAACCCTCTTGCCTT	976
Lpl-E7-2	F: TTTTGCCTCTCCCCATGTGC R: AACTCACTGTTGCCCAGGTG	943
Lpl-E8-1	F: AGCTCCGGTCTTGTTTTTCCA R: AACTCAGCGTTGGAAGGAGG	554
Lpl-E8-2	F: GCTCCGGTCTTGTTTTTCCAG R: GGCTGACATTCTTGGGCAGT	530

注: F 为上游引物, R 为下游引物。

3.2.5.5 扩增潜在活性增强子

采用普通 PCR, 用潜在活性增强子引物对目的区域进行扩增, 根据表 11 进行 PCR 反应。

表 11 PCR 反应体系
Table 11 The PCR reaction system

组分	使用量
2x Phanta Max Master Mix	25 μ L
上游引物 (10 μ M)	2 μ L
下游引物 (10 μ M)	2 μ L
模板 DNA	x μ l
ddH ₂ O	to 50 μ L

PCR 反应程序如下:

步骤	循环数	温度	时间
预变性	1	95°C	30 sec
变性		95°C	15 sec
退火	35	60°C	15 sec
延伸		72°C	30 sec/kb
彻底延伸	1	72°C	5 min
保存		4°C	∞

3.2.5.6 琼脂糖凝胶电泳与凝胶回收

PCR 扩增结束后, 产物使用 1.5% 琼脂糖, 在 120V 电压条件下, 电泳 30 min。

凝胶电泳后, 紫外灯下切取含有目的 DNA 片段的琼脂糖凝胶, 放入 1.5 mL EP 管中, 根据 Omega Bio-tek 公司 E.Z.N.A®Gel Extraction Kit 切胶回收试剂盒操作说明书, 对目的 DNA 片段进行回收纯化。采用分光光度计测定质粒 OD 值和浓度, 为下一步同源重组反应定量。

3.2.5.7 线性化载体与目的片段连接

利用同源重组将 5' 缺失的启动子片段连接到线性 pGL3-Basic 载体上:

表 12 同源重组反应体系
Table 12 The Homologous recombination reaction system

组分	使用量
线性化载体	1 μ L
目的片段	1 μ L
2×SoSoo Mix	2 μ L
ddH ₂ O	to 10 μ L

3.2.5.8 连接产物转化

将连接产物转化至感受态细胞中，步骤如下：

(1) 连接结束前 5 min，取 100 μL 感受态细胞冰浴融化，加入目的 DNA，轻弹后，冰上静置 15-25 min。

(2) 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴热激 45 s，迅速转移至冰浴中，静置 2 min。

(3) 向离心管中加入 1 mL 不含抗生素的无菌 LB 液体培养基，混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ ，220 r/min 复苏 30-60 min。

(4) 室温 1500 r/min，离心 3 min，移除 600 μL 上清，吹打混匀，吸取 100 μL 菌液均匀涂布到含氨苄抗生素的固体 LB 培养基上，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱正置 30 min 后，将平板倒置放于培养箱过夜培养。

3.2.5.9 单克隆位点鉴定

用 10 μL 小枪头挑取 LB 固体培养板上形态正常的单克隆点，一个培养板挑取五个单克隆点，10 μL ddH₂O 稀释作为菌液 PCR 的模板，根据表 13 进行 PCR 反应体系配制。

表 13 菌落 PCR 反应体系
Table 13 The clony PCR reaction system

组分	使用量
2 \times T5 Super PCR Mix (Colony)	10 μL
上游引物 (10 μM)	1 μL
下游引物 (10 μM)	1 μL
模板 DNA	1 μl
ddH ₂ O	to 20 μL

PCR 反应程序如下：

步骤	循环数	温度	时间
预变性	1	98 $^{\circ}\text{C}$	2 min
变性		98 $^{\circ}\text{C}$	15 sec
退火	35	60 $^{\circ}\text{C}$	15 sec
延伸		72 $^{\circ}\text{C}$	30 sec/kb
彻底延伸	1	72 $^{\circ}\text{C}$	5 min
保存		4 $^{\circ}\text{C}$	∞

PCR 扩增结束后，产物经 1.5% 琼脂糖，120 V 电压，30 min 进行电泳。凝胶电泳后在凝胶成像系统中拍照记录。将扩增出目的条带的剩余菌液模板接种于含 10 mL 液体培养基（含 100 mg/L Amp）的 15 mL 离心管中，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床（220 r/min）

培养 12 h。取 1 mL 菌液送生工生物工程公司进行 sanger 测序，测序结果无误的菌液用于质粒提取。

3.2.5.10 无内毒素小量质粒提取

经测序结果分析后，挑选符合实验要求的阳性克隆菌液，根据 OMEGA 公司 Endo-free Plasmid Mini Kit II 操作手册，进行重组质粒去内毒素中量抽提。采用分光光度计测定质粒 OD 值和浓度，为下一步转染复合物配置定量。

3.2.6 双荧光载体细胞转染及活性测定

3.2.6.1 H293T 细胞复苏、培养和铺板

H293T 细胞的复苏、培养和铺板步骤如下：

(1) 从液氮罐中取出 293T 细胞冻存管装入 PE 手套中，置于 37°C 水浴锅中快速晃动，使之迅速融解。

(2) 将冻存管内细胞悬液转移至含 3 mL DMEM 完全培养液的 15 mL 离心管内，轻柔吹打混匀，1200 r/min，离心 3 min。

(3) 弃上清，加入 2 mL DMEM 完全培养液，反复吹打制成细胞悬液，尽量避免产生气泡。

(4) 将重悬后的细胞转至 60 mm 细胞培养皿，加入完全培养液补至 5 mL，放入 37°C 培养箱内培养。

(5) 复苏第二天观察细胞生长情况，若死细胞较多，更换新鲜的 DMEM 完全培养液。

(6) 待细胞长到 60-70% 时，传代至底部不透明的 96 孔白板，置于 37°C 培养箱内培养，24 h 后转染。

3.2.6.2 Lipo3000 转染 H293T 细胞

使用购自 Promega 公司的 Lipo3000 细胞转染试剂盒转染 H293T 细胞，步骤如下：

(1) 当细胞长至 70~80% 汇合度时准备转染；

(2) 提前 1 h 取出 96 孔细胞培养板，更换 90 μ L 新鲜完全培养液；

(3) 提前 30 min 配制转染 A 液和 B 液体系；

(4) 按照 LipofectamineTM3000 试剂说明书进行转染。

3.2.6.3 Dual-Glo® 荧光素酶检测系统操作步骤

使用购自 Promega 公司的 Dual-Glo® Luciferase assay system 双荧光检测试剂盒测

量细胞荧光亮度，步骤如下：

(1) 从恒温孵箱中取出培养有哺乳动物细胞的 96 孔板。平板必须和所用的荧光发光仪 (luminometer) 兼容 (如不透光的白板)。为获取最佳结果，在进行第 2 步前将培养的细胞平衡到室温。

(2) 向 96 孔板每孔中加入与孔内培养基体积相等的 Dual-Glo® Luciferase Reagent，混匀，将 75 μL 试剂加入到培养在 75 μL 培养基的细胞中。

(3) 至少等待 10 min，让细胞充分裂解，然后在荧光发光仪中测量萤火虫荧光。

(4) 向每孔中加入与初始培养基体积相等的 Dual-Glo® Stop & Glo® Reagent，混匀。如第 2 步所述，加入的试剂体积一般为 96 孔板加 75 μL 。

(5) 至少等待 10 min，然后测量海肾荧光。海肾荧光的平板测量顺序应该与萤火虫荧光相同。

(6) 导出数据进行数据统计分析。

3.2.7 慢病毒包装与细胞感染

3.2.7.1 转移质粒酶切

用 BsmBI-v2 内切酶对骨架载体 pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro 进行切割，程序为 55°C 酶切，酶切体系见表 14。

表 14 酶切反应体系

Table 14 Enzyme cleavage reaction system

组分	使用量
质粒 DNA	30 μg
BsmBI-v2	4 μL (10U/ μL)
10 \times 3.1 buffer	10 μL
ddH ₂ O	to 100 μL

3.2.7.2 线性化质粒纯化

经酶切的慢病毒转移质粒，根据 Omega Bio-tek 公司 E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit 试剂盒操作手册，进行线性化质粒的纯化。采用分光光度计测定质粒 OD 值和浓度，为下一步酶连定量。

3.2.7.3 Oligo sgRNA 设计

根据 sgRNA 设计网站，设计特异性靶向活性增强子的 sgRNA 见表 15。

表 15 靶向增强子的 sgRNA 序列
Table 15 primer sequence for optimal sgRNA

引物	序列 (5'-3')
Lpl-E1-g1	F: CACCGTATCTACCTACAAAGCAGAG R: AAACCTCTGCTTTGTAGGTAGATAC
Lpl-E1-g2	F: CACCGAGATATTTAATGTCCCGTA R: AAACCTACGGGACATTAATATCTC
Lpl-E1-g3	F: CACCGTGGATAGAGTCAGAAGACC R: AAACGGTCTTCTGACTCTATCCAC
Lpl-E2-g1	F: CACCGTCTCCAAACACCATCACGT R: AAACACGTGATGGTGTGGAGAC
Lpl-E2-g2	F: CACCGAGTGCTGAAGCCCAACGTGA R: AAACCTCACGTTGGGCTTCAGCACTC
Lpl-E2-g3	F: CACCGATAGGCCTATAAATCCCAGT R: AAACACTGGGATTTATAGGCCTATC

注：F为上游引物，R为下游引物。

3.2.7.4 Oligo sgRNA 退火

根据表 16 进行 Oligo sgRNA 退火反应体系配制。

表 16 引物退火反应体系
Table 16 Oligonucleotides annealing reaction system

组分	使用量
Nuclease-Free Water	3 μ L
Annealing Buffer for DNA Oligos (5 \times)	2 μ L
DNA oligo A (10 μ M)	2.5 μ L
DNA oligo B (10 μ M)	2.5 μ L

PCR 反应程序如下：

步骤	温度	时间
变性	95 $^{\circ}$ C	2 min
退火	每8 s下降0.1 $^{\circ}$ C，降至25 $^{\circ}$ C	90 min
保存	4 $^{\circ}$ C	∞

3.2.7.5 gRNA 和 dCas9-KRAB-T2a-Puro 线性化载体酶连

表 17 连接反应体系

Table 17 Ligation reaction system

组分	使用量
Solution I	5 μ L
Oligo sgRNA	4 μ L (10U/ μ L)
线性 dCas9-KRAB-T2a-Puro 载体	290 ng
ddH ₂ O	to 10 μ L

酶连步骤如下:

- (1) 将质粒载体 DNA 与插入 DNA 片段混合制备成体积为 10 μ L 的 DNA 溶液。
- (2) 向上述 DNA 溶液中加入等体积 (10 μ L) 的 Solution I, 充分混匀。
- (3) 16 $^{\circ}$ C 反应 30 min。
- (4) 在转化之前向反应液中加入 1 μ L 的 Solution III。
- (5) 反应液可直接用于细菌转化。将 10 μ L 的反应液加入到 100 μ L stb13 感受态细胞中。

3.2.7.6 重构载体

stb13 感受态细胞转化和涂板步骤如下:

- (1) 把 100 μ L stb13 感受态细胞置于冰中解冻。
- (2) 连产物中加入 1 μ L 的 Solution III。
- (3) 将酶连产物加入到 stb13 感受到细胞中, 轻弹管壁。
- (4) 冰中放置 30 min。
- (5) 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 45 s。
- (6) 立即转移至冰中放置 2 min。
- (7) 加入 500 μ L 37 $^{\circ}$ C 预温好的无抗性液体 LB 培养液。
- (8) 37 $^{\circ}$ C 220 r/min 复苏 1 h。
- (9) 5000 r/min 离心 1 min, 吸除 300 μ L 上清, 留 300 μ L 上清轻轻吹打重悬菌块并吸取 100 μ L 涂布到含氨苄抗生素的固体 LB 培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养箱正置 30 min 后, 将平板倒置放于培养箱过夜培养。

3.2.7.7 单克隆位点鉴定

用白色小枪头挑取 LB 固体培养板上形态正常的单克隆点, 一个板子挑取五个单

克隆点，10 μL ddH₂O 稀释作为菌液 PCR 的模板，根据表 13 进行 PCR 反应体系和程序进行。PCR 扩增结束后，产物经 1.5% 琼脂糖，120 V 电压，30 min 进行电泳。凝胶电泳后在凝胶成像系统中拍照记录。将扩增出目的条带的剩余菌液模板接种于含 100 mL 液体培养基（含 100 mg/L Amp）的 300 mL 锥形瓶中，于 37°C 恒温摇床（220 r/min）培养 12 h。取 1 mL 菌液送生工生物工程公司进行 sanger 测序，测序结果无误的菌液用于质粒提取。

3.2.7.8 无内毒素中量质粒提取

经测序结果分析后，挑选符合实验要求的阳性克隆菌液，根据 OMEGA 公司 Endo-Free Plasmid Midi Kit 操作手册，进行重组质粒去内毒素中量抽提。采用分光光度计测定质粒 OD 值和浓度，为下一步转染复合物配置定量。

3.2.7.9 磷酸钙转染转染

使用购自碧云天公司的磷酸钙细胞转染试剂盒转染 293FT 细胞，步骤如下：

（1）复苏一管 293FT 细胞于 T25 细胞培养瓶，当细胞汇合度达到 80% 左右时，接种到 10 cm 细胞培养皿中；当细胞汇合度达到 80% 左右时，消化并接种于 T175 细胞培养瓶，加 25 mL 无双抗的完全培养基。37°C 培养过夜，50-60% 汇合度时进行转染。

（2）转染前（2 h 之内），更换新鲜不含抗生素的 15 mL 完全培养液。

（3）取 95 μg 待转染质粒 DNA（3 种质粒共 95 μg ，总体积不宜超过 200 μL ），加入到 1.6 mL CaCl₂ 溶液中，吹打混匀。

（4）将 1.6 mL BBS 溶液置于震荡涡旋仪，使其处于涡旋状态，将 DNA-CaCl₂ 溶液逐滴加入 BBS 溶液中。

（5）将 DNA-CaCl₂-BBS 混合物，涡旋 30 s，室温孵育 20-30 min，此时不会产生可见的沉淀。室温孵育结束后，涡旋 15 s，然后均匀逐滴滴加到 T175 培养瓶不同位置，随后放入培养箱培养。

（6）根据实验要求和磷酸钙对于不同细胞的毒性不同，转染后 6-12 h（不小于 4 h）轻轻晃动培养瓶使磷酸钙沉淀悬浮，更换 15 mL 新鲜无双抗培养液，继续培养。

（7）换液后 24 h，收集 15 mL 上清液至 50 mL 离心管，4°C 保存；并添加 30 mL 无双抗培养液继续培养。

（8）换液后 48 h，收集 30 mL 上清液至 50 mL 离心管，4°C 保存；并添加 30 mL 无双抗培养液继续培养。

(9) 换液后 72 h, 收集 30 mL 上清液至 50 mL 离心管, 4°C 保存或用超滤浓缩。

3.2.7.10 慢病毒浓缩

密理博超滤管操作使用步骤:

(1) 超滤管到货时是干燥状态, 使用前加入 MilliQ 水 (预冷 PBS), 水量完全过膜, 4°C 4000 g 离心 10 min。然后将收集管液体倒出, 即可加入液体, 加入液体前, 超滤管需要插在冰上预冷。

(2) 准备液体。根据细胞状态, 分别收集换液后 24 h (15 mL)、48 h (30 mL)、72 h (30 mL) 细胞上清液。收集病毒上清, 使用 0.45 μm 滤器过滤至新 50 mL 离心管备用。

(3) 单次上样量不超过 14 mL。

(4) 将过滤后的病毒液用 100 kD (100000 NMWL) 超滤管进行超滤离心, 4°C, 4000 g 离心 25 min。

(5) 浓缩后, 不需要水溶。直接取出浓缩液, 整个操作过程尽可能在冰上操作。轻轻顺着边缘将移液管 (黄色枪头) 插入超滤离心管内管, 吹打混匀液体后取走, 最后剩余贴近超滤膜的液体可以不要吸取, 极易损伤超滤膜。要想达到理想回收率, 离心后请立即取走浓缩后样本。

(6) 使用慢病毒滴度荧光快速检测卡测定滴度, 然后分装, -80°C 保存, 短期内使用的可放 4°C 保存;

(7) 最后向超滤膜中加入 MilliQ 水, 水量完全过膜, 防止膜变干, 4°C 保存。

3.2.7.11 检测慢病毒滴度

使用购自博奥龙公司的慢病毒滴度荧光快速检测卡对慢病毒滴度进行检测, 步骤如下:

(1) 打开包装取出检测卡, 平放在生物安全柜台面上。

(2) 用微量移液器吸取 20 μL 纯化后的病毒, 滴加到样品窗中; 再加入 50 μl 缓冲液;

(3) 静止 10-15 min 后即可判读结果。

3.2.7.12 嘌呤霉素杀灭曲线的确定

由于存在抗生素的耐药性, 不同细胞系对同种抗生素的耐受性不同, 嘌呤霉素的筛选浓度存在差异。抗生素的选择能力也可能因不同抗生素制造商和同一制造商生产方法之间的批量差异而略有不同。抗生素浓度过低或过高都会影响实验结果。如果抗

生素浓度过低，不能充分杀死阴性转染细胞，造成假阳性现象。如果抗生素浓度过高，将过分抑制甚至杀死阳性转染细胞，使实验效率低下。为了保证实验结果的准确性，本研究测定不同梯度浓度嘌呤霉素对 3T3-L1 细胞生长抑制情况，以期确定最佳筛选浓度，为后续筛选阳性转化株提供可靠依据。

具体实验步骤如下：

(1) Day1: 将 60 mm 细胞培养皿中汇合度达到 70-80% 的 3T3-L1 细胞，接种到 6 孔板中，37°C 细胞孵育过夜。

(2) Day2: 在培养过夜后的细胞中更换含不同浓度嘌呤霉素 (0、1、1.5、2、2.5、3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的新鲜筛选培养基，更换培养基后在细胞培养箱中继续培养。

(3) Day3: 由于嘌呤霉素可以快速作用于细胞，一般 2 d 内可以杀死 99% 未表达 pac 基因的细胞，所以在加嘌呤霉素后的 1-2 d 就可以进行观察细胞存活率，从而确定有效杀死正常细胞的药物最低浓度。

(4) Day4: 更换新鲜的筛选培养基，并观察细胞存活率。根据细胞的生长状态，约 2-3 d 更换新鲜的筛选培养基。每日监测细胞，观察存活细胞率，从而确定抗生素筛选开始 4-6 d 内有效杀死非转染或者所有非转导细胞的药物最低浓度。当空白细胞刚好能全部死亡时，该浓度的抗生素可作为最适药筛浓度。

3.2.7.13 慢病毒感染 3T3-L1 细胞

使用浓缩后的慢病毒感染 3T3-L1 细胞，步骤如下：

(1) 慢病毒过滤：

a. 感染细胞前，从 -80°C 冰箱中取出慢病毒置于冰盒上解冻。

b. 使用 5 mL 注射器吸取慢病毒，用 0.45 μm 过滤器（低蛋白吸附）过滤慢病毒至 15 mL 离心管，放置于 4°C 冰箱中备用。

(2) 慢病毒感染细胞：

a. 将状态良好的目的细胞接种到 12 孔板，保证第二天病毒感染时细胞汇合率介于 30%-50% 之间。放入 37°C，CO₂ 浓度 5% 的培养箱中培养过夜。

b. 培养箱中拿出细胞，于显微镜下观察细胞生长状态及细胞融合度；如细胞状态较好，则开始实验。消化 1 孔细胞进行细胞计数，根据细胞数目，感染细胞的 MOI 值和病毒滴度计算使用病毒体积。

c. 感染 12 h 后，吸去一半含有病毒颗粒的培养液，并补加一半新鲜的完全培养液，继续 37°C 培养。

- d. 感染 24 h 后，移除所有培养液，更换新鲜的完全培养液，继续 37°C 培养。
- e. 感染后 48 h，对于带 Puromycin 抗性基因的病毒，换上 2 μg/mL 浓度嘌呤霉素的新鲜完全培养液，筛选稳定转导 3T3-L1 细胞株。

(3) 稳定表达细胞株的筛选：

- a. 3T3-L1 细胞感染 48 h 后，将 2 μg/mL 浓度嘌呤霉素的新鲜完全培养液，此为处理组，并设置未感染慢病毒的 3T3-L1 细胞对照实验组，加入等量浓度的嘌呤霉素。
- b. 每隔 2-3 d，更换含有嘌呤霉素的新鲜培养基。
- c. 筛选 4 d 后，对照组 3T3-L1 细胞应该 100%死亡，处理组中存活的细胞为表达抗嘌呤霉素基因的细胞。然后根据实验目的进行多克隆或单克隆细胞的筛选。
- d. 待细胞可以稳定生长后，嘌呤霉素的浓度减半用于后续的培养。在得到稳定表达细胞株后，2-3 d 更换含有嘌呤霉素的新鲜培养液。

3.2.8 过表转录因子载体构建与转染

3.2.8.1 过表达载体酶切

用 HindIII-HF 内切酶对骨架载体 pEGFP-N1 进行切割，程序为 37°C 酶切，酶切体系见表 18。

表 18 酶切反应体系
Table 18 Enzyme cleavage reaction system

组分	使用量
质粒 DNA	20 μg
HindIII - HF	5 μL
10×CutSmart buffer	5 μL
ddH ₂ O	to 50 μL

3.2.8.2 线性化质粒纯化

经酶切的骨架载体，根据诺唯赞公司 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 操作说明书，对线性化 pEGFP-N1 进行纯化回收。采用分光光度计测定质粒 OD 值和浓度，为下一步同源重组反应定量。

3.2.8.3 按照上述材料与方法提取 C57BL/6J 小鼠肌肉组织 RNA 并反转录

3.2.8.4 扩增转录因子 CDS

根据 Ensemble 数据库中脂肪分化沉积相关转录因子 CDS 区的序列和基因组位置，

利用 NCBI Primer-BLAST 设计引物扩增转录因子 CDS 区，引物序列见表 19。

表 19 转录因子 CDS 区扩增引物

Table 19 PCR primers for transcription factors CDS regions

引物	序列 (5'-3')
Pparg-Clone	F: CAAAACACCAGTGTGAATTACAGC
	R: CGGGTGGGACTTTCCTGCTA
RXRA-Clone	F: TTGACGCAAATGGGCGGTAG
	R: GAACTTCAGGGTCAGCTTGC

注：F 为上游引物，R 为下游引物。

3.2.9 甘油三酯含量测定

本研究使用购自普利莱公司的甘油三酯检测试剂盒对细胞甘油三酯含量进行测定：

(1) 使用移液器吸走所有培养液，PBS 冲洗细胞两次，用胰酶将细胞从皿底消化下来；

(2) 按比例每 1×10^6 个细胞加入 0.1 ml 裂解液，混匀后室温静置 10 分钟。

(3) 取适量上清液转移到 1.5 ml 离心管中，70°C 加热 10 分钟；

(4) 取 4 ml 试剂 R1 与 1 ml 试剂 R2 混合，得到工作液，现配现用避光保存，若颜色发生改变则弃去；

(5) 将 4 mM 甘油标准品倍比稀释为 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625、7.8125 $\mu\text{mol/L}$ ；

(6) 取 10 μL 待测样品与 90 μL 工作液混合，加入 96 孔板中，每个样品 3 个重复，避光条件下 37°C 反应 15 分钟。

(7) 使用酶标仪在最佳工作波长 550 nm 下测定样品 OD 值。

3.2.10 油红 O 染色

本研究使用购自索莱宝生物公司的油红 O 试剂盒对细胞进行染色：

(1) 用移液器从培养皿边缘吸出培养液，PBS 洗 2-3 次后。12 孔板每个孔中加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定液，在室温下固定 15 min。

(2) 将细胞固定液吸走，用 60% 异丙醇冲洗 2 次，每孔加入 800 μL 油红 O 染料工作液，室温下染色 15 min。

(3) 用 PBS 洗去染液，置于显微镜下观察拍照。

第四章 结果与分析

4.1 *LPL* 基因在成脂分化前后的表达及增强子鉴定

前人研究表明,在人及小鼠中,*LPL* 主要表达在需要大量脂肪酸作为燃料或负责 TG 存储的组织中,包括心脏、骨骼肌和脂肪组织。本研究分析了 3T3-L1 分化 1-7 天的 RT-qPCR 数据进行绘图,明确了 *LPL* 在分化前后的 3T3-L1 细胞系中 mRNA 的相对表达量较高,且随着分化进程的推移,表达量逐步上升,在第七天达到峰值(图 4)。

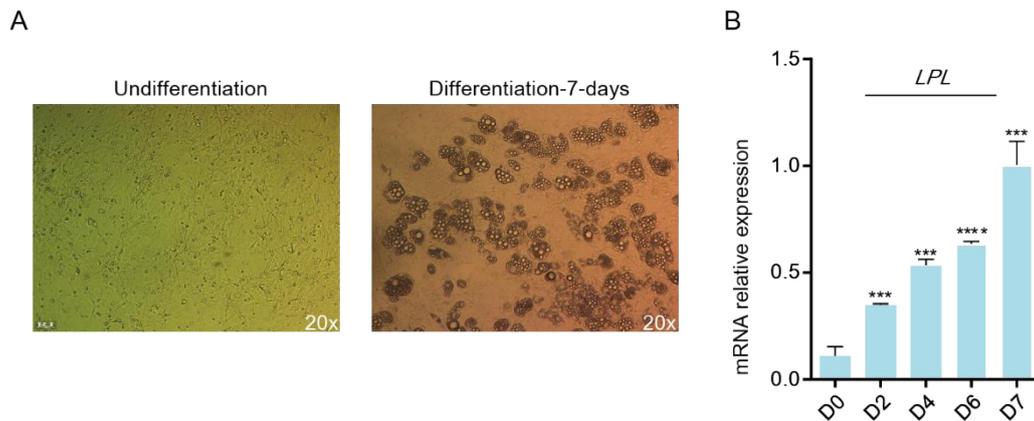


图 4 (A) 3T3-L1 细胞系成脂分化前后图片; (B) 3T3-L1 分化前后 *LPL* 基因的 mRNA 表达水平。

Fig.4 (A) 3T3-L1 cell line before and after adipogenic differentiation; (B) Relative mRNA expression of *LPL* gene before and after 3T3-L1 differentiation.

4.1.1 4C-seq 文库构建

为了确定在脂肪沉积过程中起到重要作用的 *LPL* 基因的全基因组互作模式,本研究了使用 *LPL* 基因启动子作为感兴趣特定基因组位点 (Viewpoint, VP), 在 3T3-L1 细胞上进行 4C-seq 实验。每个样本两个生物学重复, 本研究对 3T3-L1 细胞的 *LPL* 基因共构建了 4 个 4C-seq 文库。本研究的文库一共获得了大约 0.6 兆条比对到基因组上的 reads, 平均每个文库有 1500 条 reads, 其中共 1040 万条有效 reads, 平均每个文库有 260 万条有效 reads。大约 18%–68% 的 total reads 分布在 VP 染色体上。“*cis/all* > 40%”是评估 4C-seq 数据质量的一个重要指标, 本研究的 4 个 4C-seq 数据集符合“*cis/all* > 40%”这一标准(表 20)。接下来, 本研究统计了 *cis* 染色体中每 1Mb bin 之内的互作位点个数, 以此评估生物学重复之间的相关性。计算生物学重复之间的

Pearson 相关性系数, 结果显示所有 4 个 4C-seq 实验组的 Pearson 相关系数均大于 0.4 (图 5), 这表明 4C-seq 实验制备的所有文库符合要求, 可用于后续分析。

表 20 每个 4C-seq 文库的质控

Table 20 Detailed quality metrics of each 4C data

vpname	nReads	nMapped	nMapped Cis	cis/over all ratio	capt100 Kb
Lpl_3T3-L1_1	21,391,146	17,482,160	13,512,823	0.751328746	94.11
Lpl_3T3-L1_2	19,697,641	16,363,479	12,944,997	0.750062156	94.48
Lpl_3T3-L1-AD_1	13,115,671	12,404,620	11,877,591	0.648875231	23.8
Lpl_3T3-L1-AD_2	14,224,592	13,607,034	13,066,592	0.627740428	37.42

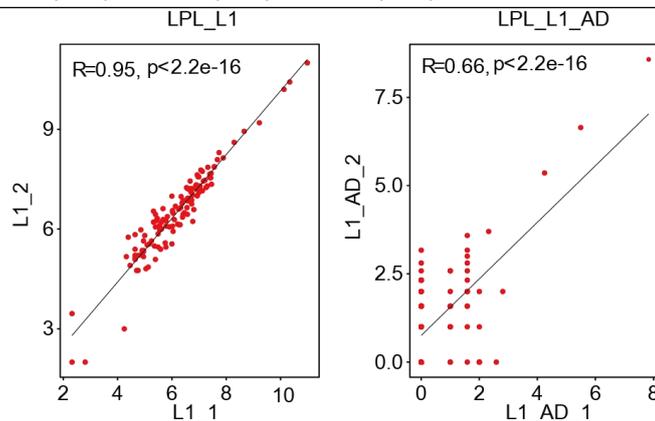


图 5 生物学重复之间的皮尔逊相关性。左图为 3T3-L1 分化前, 右图是为 3T3-L1 分化后。

Fig.5 Pearson correlation between biological replicates. The left image shows undifferentiated 3T3-L1 cell, the right image shows differentiated 3T3-L1 cell.

4.1.2 LPL 基因全基因组互作图谱的绘制

为了绘制 3T3-L1 中 *LPL* 基因的全基因组互作图谱, 本研究进行 r3Cseq 分析鉴定全基因组互作位点 (图 6)。为了最大限度地减少细胞核内随机碰撞产生的噪音并确定可靠的互作位点, 本研究只保留了那些能在生物学之间重复被鉴定的互作位点。在两个生物学重复中, 只有 8%–42% 的互作位点被可重复鉴定, 这反映了细胞核内染色体空间构象互作的复杂性 (表 21)。值得注意的是, 生物学之间重复被鉴定的互作位点大部分都在 VP 的 1 Mb 以内, 这表明尽管 4C-seq 有大量的背景噪声, 它可以有效地量化和评估邻近顺式区域中启动子和增强子的平均捕获频率, 并且在 VP 附近存在高密度的重复被鉴定的互作位点。因此, 本研究后续主要关注 *cis* 染色体内的互作位点, 这些位点被认为是高保真互作位点。

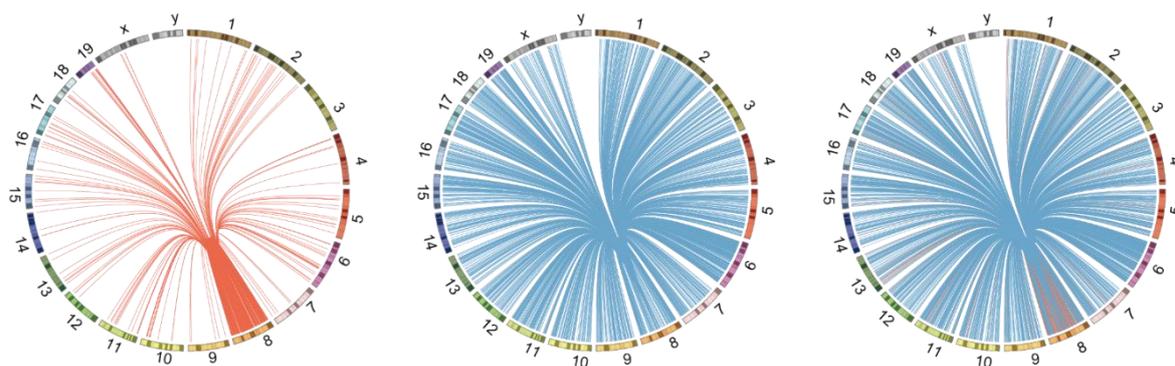


图6 *LPL* 基因全基因组互作图谱

环状图显示了 *LPL* 在 3T3-L1 中的全基因组相互作用。染色体呈圆形排列，圆圈上方的数字和字母表示染色体编号。左：分化后；中：分化前；右：合并。

Fig.6 Genome-wide interaction profiles of *LPL*

Circos plots showing genome-wide interaction of *LPL* gene during 3T3-L1 differentiation. Chromosomes are shown in a circular orientation. The numbers and letters above the circle indicate the chromosomes' names. Results are expressed as mean \pm SD (n = 3). * $p < 0.05$.

表 21 3T3-L1 分化前后 4C-seq 分析结果

Table 21 Summary of metrics in 4C-seq analysis in 3T3-L1

细胞系	重复	互作位点	重叠互作位点	顺式互作位点	重叠顺式互作位点	反式互作位点	重叠反式互作位点
分化前	1	16,592	2,653	707 (42.6%)	2437(91.9%)	9,519 (57.4%)	216(8.1%)
	2	21,021		8,54 (40.6%)		12,481 (59.4%)	
分化后	1	496	229	199 (40.1%)	131(57.2%)	297 (59.9%)	98(42.8%)
	2	1,173		408 (34.8%)		765 (65.2%)	

4.1.3 *LPL* 基因全基因组互作位点的差异分析

为了研究 *LPL* 基因在 3T3-L1 分化前后染色质构象的差异，我们根据 *cis* 染色体每 1 Mb bin 之内的互作位点个数，对分化前后的 3T3-L1 进行了层级聚类分析。聚类分析结果很好地将 *LPL* 在 3T3-L1 分化前后分开(图 7A)，表明了 *LPL* 在 3T3-L1 分化前后的互作位点密度存在显著差异。此外，从全基因组互作位点的韦恩图可以看出，*LPL* 在 3T3-L1 分化前后仅有 6%的全基因组互作位点是共有的(图 7B)，而更多存在的是分化前后差异的互作位点，表明了 3T3-L1 分化前后的互作位点分布高度差异。为了明确分化过程中相互作用的详细变化，本研究使用 DESeq2 分析方法确定了 3T3-L1 的显著差异相互作用位点 (Significant differential interaction sites, SDIS)，其 q 值 ≤ 0.01 。在分化前后的 3T3-L1 细胞间，共鉴定到 2314 个 SDISs (图 7C、D)，*LPL* 的 SDISs 占总相互作用位点的比例大于 40%。

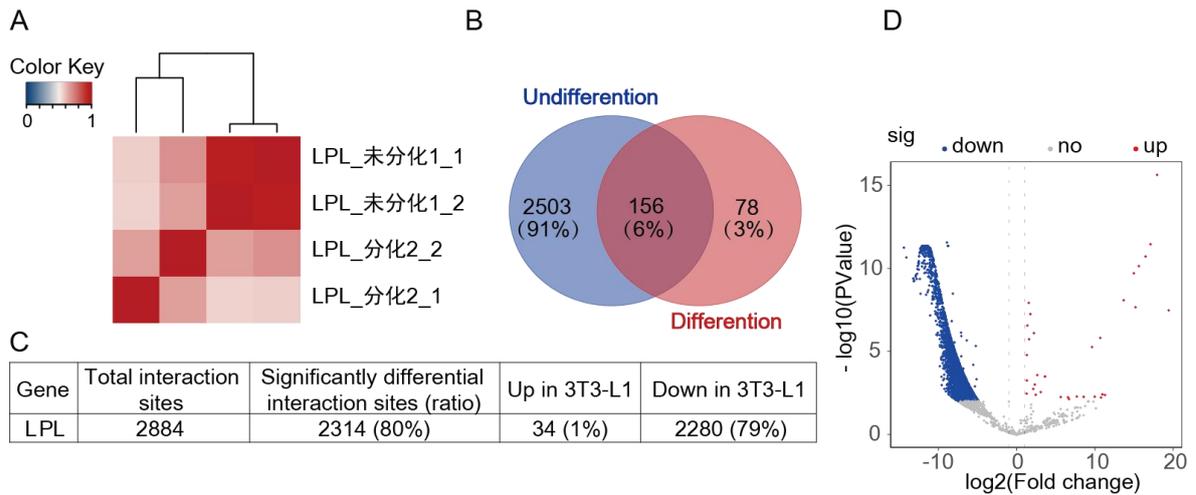


图 7 *LPL* 全基因组互作位点差异分析

(A) 3T3-L1 分化前后 *LPL* 基因互作聚类的热图。使用 *cis* 染色体中每 1 Mb bin 之内的互作位点个数进行聚类，色标表示皮尔逊相关系数。(B) 维恩图显示了 *LPL* 基因在 3T3-L1 分化前后共有和特异的全基因组互作位点数量；(C) 对两个生物学重复中可重复鉴定的互作位点进行差异分析；(D) *LPL* 基因显著差异互作位点的火山图。火山图中 SDIS 的阈值为绝对 $\log_2\text{Fold Change} > 1$ 和 $\text{padj} < 0.05$ 。红色和蓝色表示显著不同的互作位点。

Fig.7 Differential analysis of *LPL* genome-wide interaction sites

(A) Heatmap of *LPL* gene interaction clustering before and after 3T3-L1 differentiation. The color code indicates the degree of correlation (blue, low correlation; red, high correlation). Generate clustering using the Pearson correlation coefficient of the number of interaction sites per 1 Mb bin in the *cis* chromosome; (B) Venn diagram shows the number of common and specific genome wide interaction sites of *LPL* gene before and after 3T3-L1 differentiation; (C) Perform differential analysis on the interaction sites that can be repeatedly identified in two biological replicates; (D) Volcano map of *LPL* gene significant differential interaction sites. The thresholds for SDIS in the volcanic map are absolute $\log_2\text{Fold Change} > 1$ and $\text{padj} < 0.05$. Red and blue indicate significantly different interaction sites.

4.2 200 kb 基因间区控制脂蛋白酯酶 *LPL* 基因的表达

4.2.1 潜在增强子的筛选及保守性评估

为了进一步鉴定和比较调节 *LPL* 基因的潜在增强子，本研究将 4C-seq 与已发表的公共 ChIP-seq 和 capture Hi-C 数据相结合。筛选同时具有 4C-seq 峰且富集 H3K27ac 峰的位点，并手动选择 capture Hi-C 峰最大信号（评分高于 5）位置为 *LPL* 基因潜在的活性增强子，同时排除已经注释启动子和染色体间区域。本研究在分化后的 3T3-L1

细胞中鉴定出 8 个 *LPL* 基因的潜在增强子（图 8A）。非编码元件通常在物种之间表现出高度的保守性，并在个体发育过程中调节基因表达。因此本研究通过 UCSC 基因组（<http://genome-asia.ucsc.edu/>）评估了潜在活性增强子序列在 60 种脊椎动物之间的保守性。结果发现，*LPL* 基因的 8 个潜在活性增强子都含有至少一种保守元件（表 22），表明了筛选的潜在活性增强子是高度可信的。

表 22 潜在活性增强子的基因组坐标和保守元素分析

Table 22 The genomic ordinates and conserved element analysis of candidate active enhancers.

增强子	基因组	起始位置	结束位置	片段大小	保守元件
Lpl-E1	chr8	69,010,131	69,012,406	2,275	Yes
Lpl-E2	chr8	69,011,606	69,013,880	2,274	Yes
Lpl-E3	chr8	68,848,570	68,850,220	1,650	Yes
Lpl-E4	chr8	68,852,042	68,853,854	1,812	Yes
Lpl-E5	chr8	68,993,260	68,993,620	360	Yes
Lpl-E6	chr8	68,995,080	68,996,030	950	Yes
Lpl-E7	chr8	68,997,380	68,997,818	438	Yes
Lpl-E8	chr8	69,023,005	69,024,883	1,878	Yes

先前的研究表明，增强子通常在进化上是保守的，这使得它们可以用于识别基因组中的功能元件^[100, 109-112]，本研究使用 UCSC 基因组浏览器在 60 种脊椎动物中进行保守元素分析（图 8B），这些结果表明假定的活性增强子具有较高的可信度。有趣的是，3T3-L1 细胞中 *LPL* 基因的潜在活性增强子都位于 200 kb 的基因间区域（chr8:68,840,513–69,040,028）。该区域显示出 H3K27ac 和 H3K4me1 组蛋白修饰峰的密集富集，并与 *LPL* 基因启动子同时发生互作（图 8A）。本研究观察到 *LPL* 启动子与 3T3-L1 细胞系分化后 200 kb 基因间区域之间存在更高强度的互作。

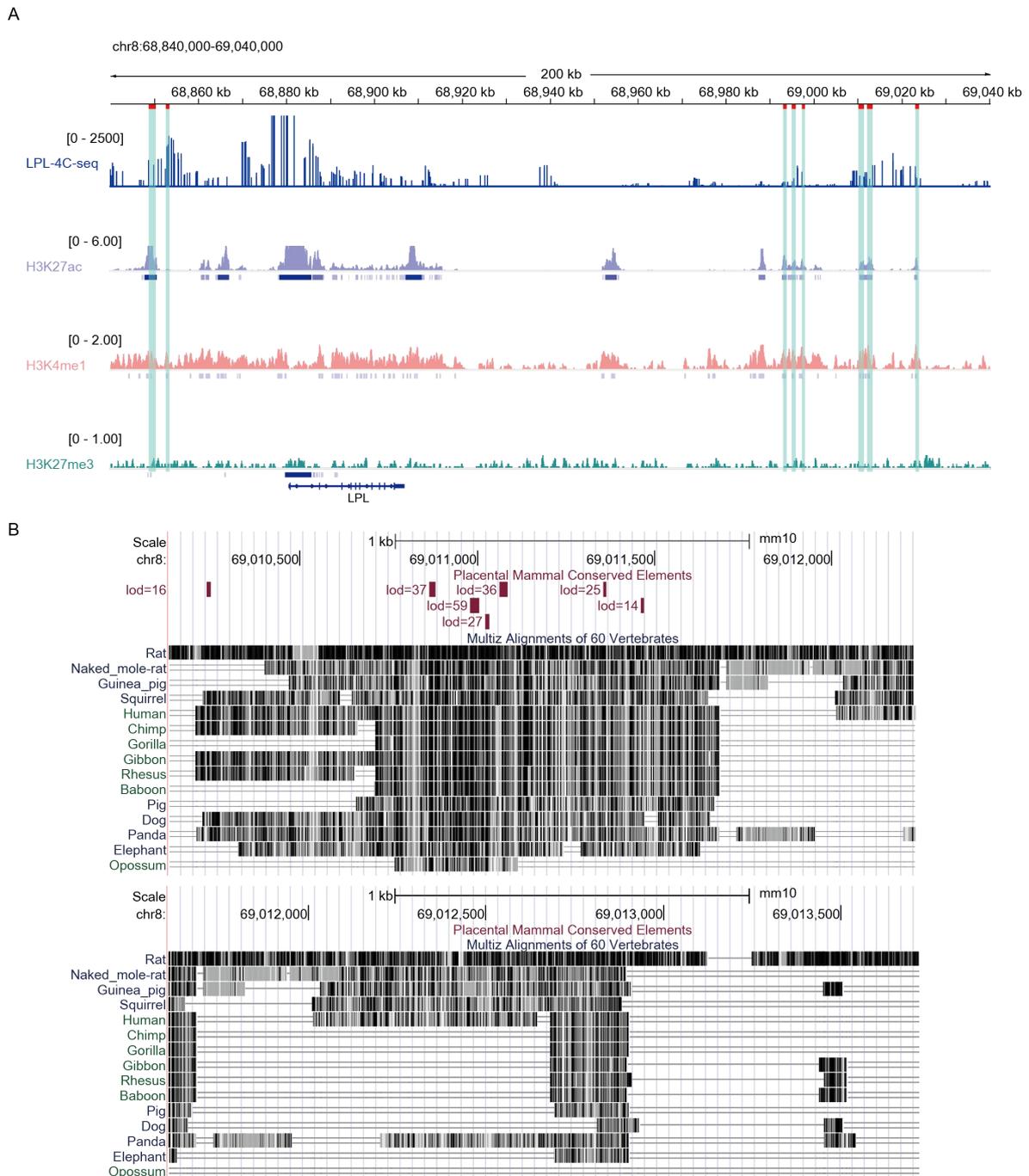


图 8 结合 ChIP-seq 和组蛋白标记注释 *LPL* 潜在增强子。

(A) 手动选择 3T3-L1 中 *LPL* 的潜在活性增强子。*LPL* 周围的基因组区域视图，富集了 H3K27ac (灰色)、H3K4me1 (粉色) 和 H3K27me3 (绿色) 与 4C 相互作用谱 (蓝色) 的 ChIP-seq 图谱，从左到右依次为 LPL-E3、LPL-E4、LPL-E5、LPL-E6、LPL-E7、LPL-E1、LPL-E2、LPL-E8；

(B) LPL-E1 与 LPL-E2 潜在活性增强子的保守性分析。UCSC 基因组浏览器 (<http://genome-asia.ucsc.edu/GRCm38/mm10>) 显示了所选物种中假定活性增强子的保守区域 (黑色条带)。水平的红色条表示 60 种脊椎动物的保守元素。保守性通过 phastCons 元素的 LOD 分数来评估。

Fig.8 Combining ChIP-seq and Histone modification to annotate *LPL* genes candidate enhancer.

(A) Manual selection of putative active enhancers of *LPL* in 3T3-L1. View of a genomic region around *LPL* integrating ChIP-seq profiles for H3K27ac (gray), H3K4me1 (pink) and H3K27me3 (green) with 4C interaction profile (blue), from left to right, it is LPL-E3, LPL-E4, LPL-E5, LPL-E6, LPL-E7, LPL-E1, LPL-E2, and LPL-E8 in sequence; (B) Conservation analysis of putative active enhancers of LPL-E1、LPL-E2. UCSC genome browser (<http://genome-asia.ucsc.edu/>; GRCm38/mm10) shows conserved regions (black boxes) of putative active enhancers in selected species. Horizontal red bars indicate conservative elements in 60 vertebrates. Elements conservation is measured as the LOD score of phastCons elements.

4.2.2 双荧光素酶报告系统评估 *LPL* 潜在增强子的活性

增强子最显著的特征是增加基因转录。核心基因启动子是启动子活性和基因表达的主要决定因素。为了进一步证实 *LPL* 基因间 200 kb 区域的内的潜在增强子活性，本研究选择评估 3T3-L1 细胞分化后 *LPL* 基因的潜在增强子活性。本研究在 3T3-L1 的 200 kb 基因间区共选择了 8 个潜在活性增强子用于后续的双荧光素酶报告实验评估增强子活性。

在此基础上，在评估潜在增强子之前，本研究先确定了 *LPL* 基因转录激活的核心启动子区域。使用 KpnI-HF 高保真限制性内切酶，线性化 pGL3-sv40 载体(图 9A)，然后将 200 kb 基因间区选择的 8 个潜在活性增强子分别克隆到 pGL3-sv40 报告载体中并进行 sanger 测序验证(图 9B)。将构建的潜在活性增强子双荧光素酶报告载体，与 pRL-TK 质粒共转染到 H293T 细胞中以评估潜在增强子的活性。*LPL* 主要在成脂分化后期高表达，而在 3T3-L1 分化后期由于脂滴的沉积，质粒转染效率极大降低，因此本研究选用了双荧光素酶通用的细胞系 H293T 细胞系作为实验对象^[113]。

双荧光报告实验结果显示，与对照载体相比，LPL-E1 和 LPL-E2 展示出显著增加荧光素酶活性 ($P < 0.01$)，且强度相近(图 9C)。其中，LPL-E1 增强 1.74 倍，LPL-E2 增强 1.78 倍。

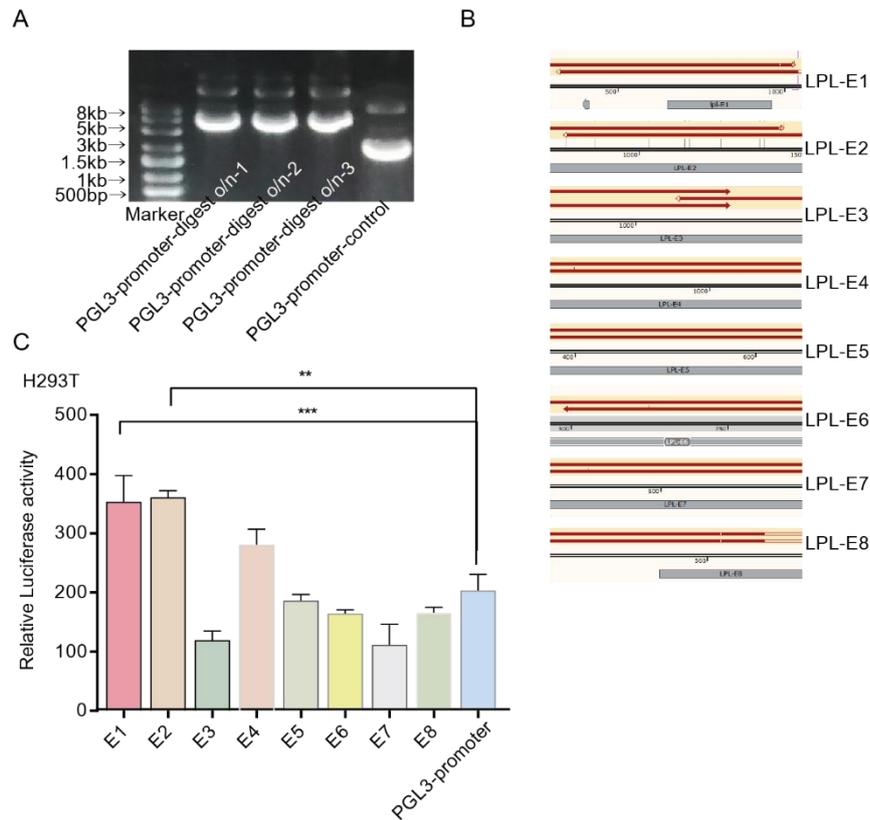


图 9 *LPL* 基因增强子双荧光活性评估

(A) pGL3-sv40 载体酶切鉴定；(B) *LPL* 基因 8 个不同增强子片段连接载体 sanger 测序比对结果；(C) 通过 H293T 细胞中的荧光素酶报告基因，评估不同 *LPL* 增强子片段的双荧光酶相对活性。pGL3-promoter 用作对照；图中数据为 Mean ± SD，检验方法为，t-检验，*表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$ ，***表示 $P < 0.001$ 。

Fig.9 Luciferase activity of *LPL* enhancer reconstruct

(A) pGL3-basic vector digest overnight; (B) *LPL* promoter fragments sanger sequencing and sequence alignment analysis results; (C) The relative promoter activity of different *LPL* enhancer regions was evaluated by luciferase reporter assay in 293T cells. The pGL3-promoter was used as a control; Values are shown as means ± s.d. of three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4.2.3 活性增强子 dCas9-KRAB 系统慢病毒包装

本研究使用 BsmBI-v2 限制性内切酶，线性化 pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-Puro 慢病毒转移载体（图 10A）。*LPL* 基因每个活性增强子设计 3 个 sgRNA，保证增强子活性的有效沉默，然后进行 OligosgRNA 退火（图 10B）。接着，退火的 OligosgRNA 片段构建到线性化慢病毒转移载体上并进行 sanger 测序验证。

证(图 10C)。将验证无误的慢病毒质粒利用磷酸钙转染 293FT 细胞,分别收集换液后 24 h (15 mL)、48 h (30 mL)、72 h (30 mL) 细胞上清液进行浓缩并测定慢病毒滴度,结果显示每个慢病毒样本的平均滴度在 T3 ($6.25 \times 10^{5-6}$ TU/ml) 左右。

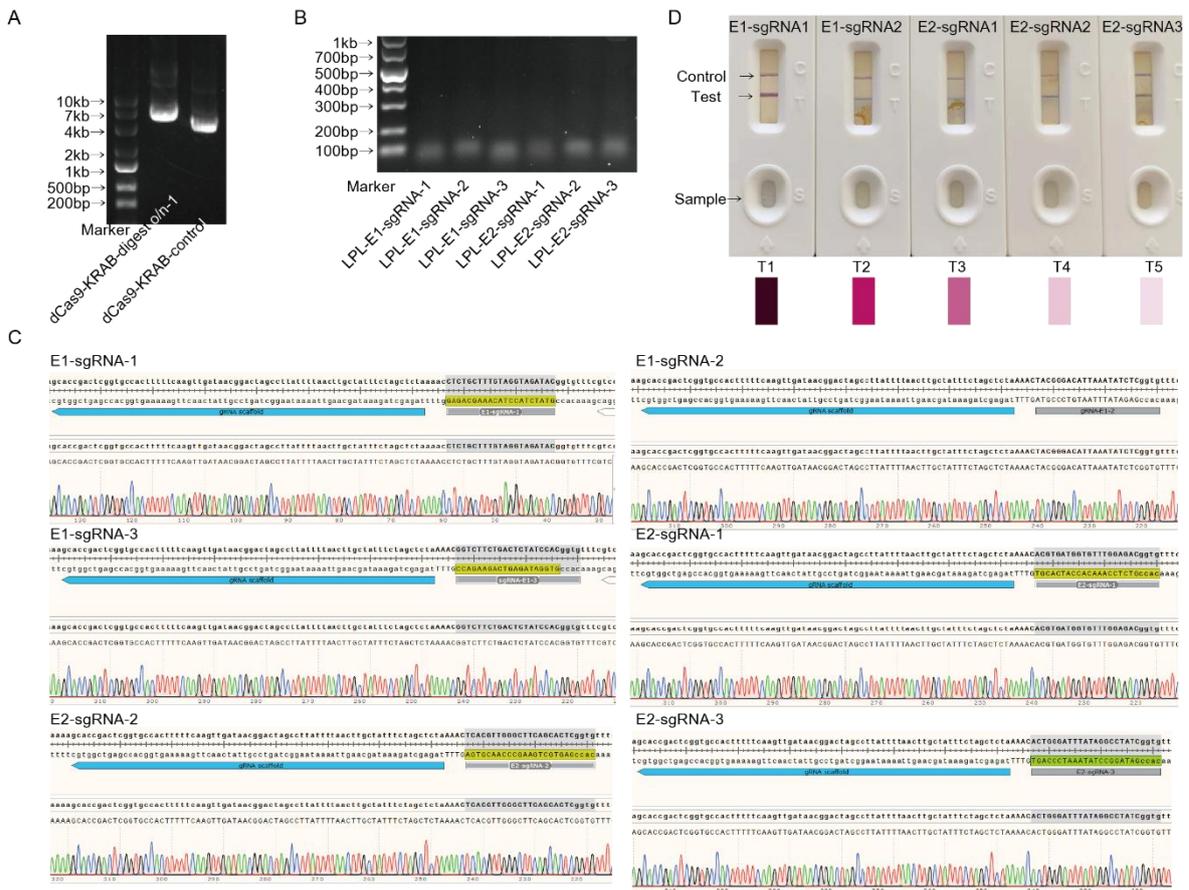


图 10 *LPL* 活性增强子 dCas9-KRAB 系统慢病毒包装

(A) pLV hU6-sgRNA hUbc-dCas9-KRAB-T2a-Puro 慢病毒转移载体酶切鉴定; (B) 靶向 *LPL* 活性增强子的 sgRNA Oligo 退火鉴定; (C) 靶向 *LPL* 活性增强子 sgRNA 连接载体 sanger 测序比对结果; (D) 测定每个增强子慢病毒的滴度。其中, T1: $6.25 \times 10^{6-7}$ TU/mL; T2: $1.25 \times 10^{6-7}$ TU/mL; T3: $6.25 \times 10^{5-6}$ TU/mL; T4: $1.25 \times 10^{5-6}$ TU/mL; T5: $1.25 \times 10^{4-5}$ TU/mL。

Fig.10 dCas9-KRAB system lentiviral packaging of the *LPL* activity enhancer

(A) pLV hU6-sgRNA hUbc-dCas9-KRAB-T2a-Puro 慢病毒转移载体酶切鉴定; (B) Annealing for sgRNA oligos. (C) *LPL* sgRNA oligos constructs sanger sequencing and sequence alignment analysis results; (D) Determine the concentration titer of each lentivirus. T1: $6.25 \times 10^{6-7}$ TU/mL; T2: $1.25 \times 10^{6-7}$ TU/mL; T3: $6.25 \times 10^{5-6}$ TU/mL; T4: $1.25 \times 10^{5-6}$ TU/mL; T5: $1.25 \times 10^{4-5}$ TU/mL.

4.2.4 慢病毒干扰增强子活性降低 *LPL* 基因表达, 降低细胞成脂分化能力

12 孔细胞培养板中, 汇合度达到 100%后两天的 3T3-L1, 根据细胞数目 (2×10^4 左右)、已知的 3T3-L1 感染复数 (感染复数: 100) 和病毒滴度 (6.25×10^5 TU/ml 左右) 计算使用病毒体积 (500 μ L)。采用 1/2 小体积感染法, 感染后 48 h, 换上含 2 μ g/mL 嘌呤霉素的新鲜完全培养液, 筛选带 Puromycin 抗性基因稳定转导 3T3-L1 的细胞株。使用 A 液诱导 3 d, B 液诱导 1 d 为一个循环。对分化 7 天稳定转导的 3T3-L1 进行定量分析, 结果显示, 与空载相比感染靶向活性增强子的慢病毒使 *LPL* 基因表达量显著下调 (图 11A)。观察成脂效果 (图 11B), 与对照组相比, 实验组的脂肪沉积能力有所下降。本研究对分化 0-14 天的 3T3-L1 细胞株进行了甘油三酯含量测定, 与空载相比, 在第十四天, 感染靶向活性增强子后的细胞株甘油三酯含量显著降低 (图 11C)。

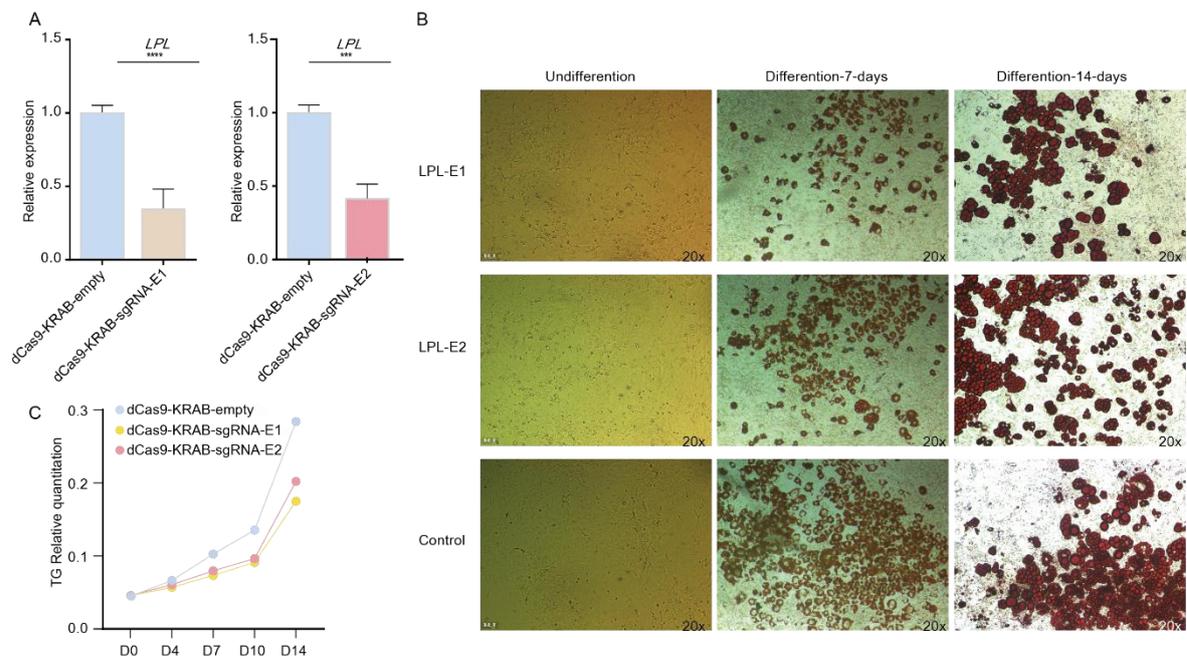


图 11 3T3-L1 感染慢病毒

(A) 分化 7 天稳定转导的 3T3-L1 细胞 *LPL* 基因表达水平分析; (B) 慢病毒干扰增强子活性降低 3T3-L1 脂肪沉积能力; (C) 分化 14 天后细胞甘油三酯的含量测定。

Fig.11 3T3-L1 infection with lentivirus

(A) Analysis of *LPL* gene expression levels in 3T3-L1 cells stably transduced after 7 days of differentiation; (B) Lentivirus interferes with enhancer activity and reduces 3T3-L1 fat deposition capacity; (C) Determination of triglyceride content in cells after 14 days of differentiation.

4.3 慢病毒干扰 *LPL* 增强子活性对转录组的影响

为了探讨 *LPL* 基因增强子活性改变影响成脂分化能力降低的作用机制，本研究对成脂分化后 7 天三个组别（CRISPRi-Enh1、CRISPRi-Enh2 和 CRISPRi-Control）的 3T3-L1 细胞进行了 RNA-Seq，每组设置 3 个技术重复，3 组细胞共计 9 个文库。在 9 个 RNA-seq 文库中，共计获得 117.22 G 数据量（表 23）。后续对测序数据进行了 PCA 主成分分析（图 12A），第一主成分能将两个处理组（CRISPRi-Enh1, CRISPRi-Enh2）与对照组区分，第二主成分将 CRISPRi-Enh1 和 CRISPRi-Enh2 两个处理组区分，表明增强子活性的降低显著改变了细胞的基因表达。随后，本研究通过严格的条件（TPM > 0.5，组织间差异倍数的 log₂ 绝对值 ≥ 1，且显著水平 FDR < 0.05）进行了差异基因的鉴定。与前期定量结果一致，在 CRISPRi-Enh1 细胞中，*LPL* 基因的表达量为 CRISPRi-Control 组的 23.3%，CRISPRi-Enh2 组中，*LPL* 基因的表达量为 CRISPRi-Control 组的 26%，该结果表明 CRISPR 干扰 *LPL* 增强子极显著（ $P < 0.01$ ）且大幅降低了 *LPL* 基因的表达量（图 12B）。随后本研究对不同组之间差异表达的基因进行鉴定，结果如表 24 所示。CRISPRi-Enh1 中共有 1188 个基因的表达量与 CRISPRi-Control 之间存在显著差异，其中 652 个基因在 CRISPRi-Control 中高表达，536 个基因在 CRISPRi-Enh1 中高表达。CRISPRi-Enh2 中共有 1079 个基因的表达量与 CRISPRi-Control 之间存在显著差异，其中 625 个基因在 CRISPRi-Control 中高表达，454 个基因在 CRISPRi-Enh1 中高表达（图 12C）。在 CRISPRi-Enh1 与 CRISPRi-Enh2 相较于 CRISPRi-Control 下调的基因中，均包含典型的脂肪合成相关基因，譬如 *Fabp5*, *Lep*, *Plin1*, *PPAR γ* , *Pnpla2*。（图 12D）。

对 CRISPR 干扰的 3T3-L1 细胞诱导成脂分化并染色的结果显示，干扰 *LPL* 增强子后，细胞的成脂分化能力显著下降。本研究进一步在转录组层面进行了表征。本研究分别对 CRISPRi-Enh1 和 CRISPRi-Enh2 相较于 CRISPRi-Control 下调的基因进行了功能富集分析，结果表明，CRISPRi-Enh1 和 CRISPRi-Enh2 相较于 CRISPRi-Control 下调的基因主要富集在单羧酸代谢过程，脂肪酸代谢过程，脂肪细胞分化，中性脂代谢过程以及甘油三酯代谢过程等功能条目中（图 18E）。这些功能条目均为脂肪细胞

重要的脂肪合成相关的功能，且与 *LPL* 基因的功能相关。基因集合富集分析 (Gene set enrichment analysis, GSEA) 结果也证实了上述 GO 与 KEGG 功能富集分析的结果，单羧酸代谢过程，脂肪酸代谢过程，脂肪细胞分化，中性脂代谢过程均显著在 CRISPRi-Enh1 和 CRISPRi-Enh2 细胞中下调。

表 23 测序数据概述

Table 23 Summary of sequencing data

Sample	ReadSum	BaseSum (G)	Q30 (%)
3T3-L1_enh1_1	91,549,552	13.73	92.08
3T3-L1_enh1_2	81,517,868	12.23	92.22
3T3-L1_enh2_1	83,472,006	12.52	92.39
3T3-L1_enh2_2	115,378,822	17.31	92.17
3T3-L1_empty_1	208,492,456	31.27	94.62
3T3-L1_empty_2	201,087,782	30.16	94.4

表 24 不同细胞样品间差异表达的基因

Table 24 Differentially expressed genes (DEGs) between different types of cell

DEG	差异表达基因数目	
	Up-regulated	Down-regulated
CT Vs E1	652	536
CT Vs E2	625	454

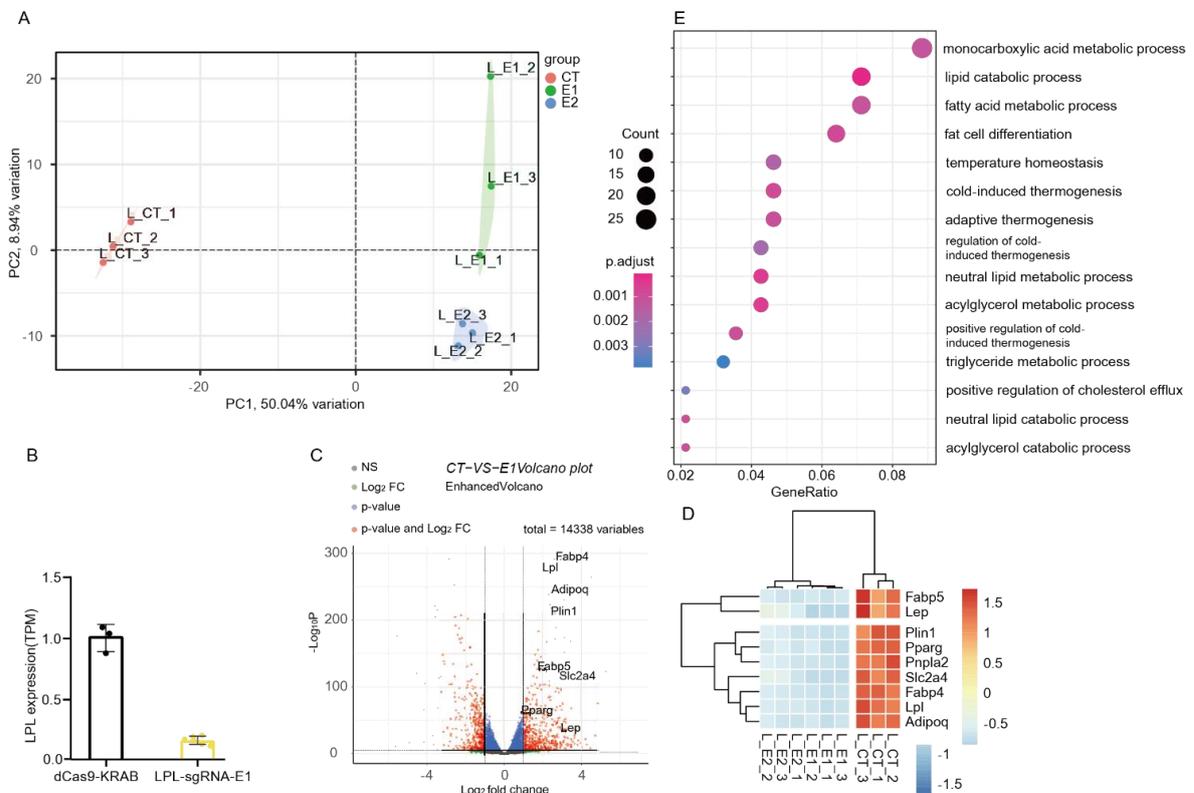


图 12 CRISPR 干扰 *LPL* 增强子对 3T3-L1 细胞系成脂分化的转录组影响

(A) PCA 主成分分析图; (B) *LPL* 相对表达量图; (C) 差异基因火山图; (D) CRISPRi-Enh1,

CRISPRi-Enh2 以及 CRISPRi-Control 细胞中脂肪合成基因表达水平 (z-score) 的热图; (E) CRISPRi-Enh1 与 CRISPRi-Enh2 细胞中下调的 DEGs 的功能富集分析。

Fig.12. Transcriptome effects of CRISPR interference with *LPL* enhancer on lipogenic differentiation of 3T3-L1 cell lines

(A) PCA principal component analysis diagram; (B) *LPL* relative expression level (TPM) chart; (C) Differential gene volcano map; (D) Heat maps of CRISPRi-Enh1, CRISPRi-Enh2 and CRISPRi-Control adipose-synthesis gene expression levels (z-score) in cells; (E) Functional enrichment analysis of down-regulated DEGs in CRISPRi-Enh1 and CRISPRi-Enh2 cells.

4.4 成脂相关转录因子 PPARG 和 RXRA 增强 LPL-E1 和 LPL-E2 活性

在脂肪细胞发育过程中, 转录因子是脊椎动物脂肪分化与沉积基因中至关重要的调控因子^[114, 115]。最近研究报道, 转录因子被招募到特定的增强子上以调节基因表达^[116]。增强子以阶段特异性的方式充当平台, 为特定 TFs 提供足够的结合位点^[117]。为了进一步阐明 *LPL* 基因功能增强子调控目的基因的机理, 本研究使用转录因子结合位点的在线预测工具 JASPAR 和 Animal TF DB 3.0 预测可能与功能增强子 LPL-E1 和 LPL-E2 结合的 TFs。

正如预期的那样, 本研究发现 LPL-E1 和 LPL-E2 增强子中 PPARG 和 RXRA 基序显著富集 (图 13A)。为了验证 PPARG 和 RXRA 与上述功能增强子区域的结合, 本研究分析了公开可用的 3T3-L1 分化前后 (PPARG 和 RXRA) 的 ChIP-seq 数据集。结果发现 PPARG 和 RXRA 在 3T3-L1 分化前后的 LPL-E1 和 LPL-E2 增强子区域强烈富集 (图 19B)。这些发现表明 PPARG 和 RXRA 与 LPL-E1 和 LPL-E2 增强子区域结合, 可能是为了调节 *LPL* 的表达。

为了评估 PPARG 和 RXRA 对上述功能增强子活性的影响, 本研究过表达 TFs (PPARG 和 RXRA) 到 H293T 细胞中。使用 HindIII-HF 限制性内切酶, 线性化 pEGFP-N1 载体 (图 13C), 然后将切胶回收 PPARG 和 RXRA 的 CDS 片段 (图 13D) 分别构建到线性化 pEGFP-N1 载体上并进行 sanger 测序验证。将构建的 LPL-E1 和 LPL-E2 双荧光素酶报告载体、PPARG 和 RXRA 过表达载体与 pRL-TK 质粒共转染到 H293T 细胞中测定荧光素酶活性。荧光素酶报告上实验结果显示, LPL-E1 和 LPL-E2 双荧光载体在 PPARG 或 RXRA 过表达后荧光素酶活性显著增加 (图 13E), 这就表

明PPARG或RXRA促进了LPL-E1和LPL-E2的活性。总之,本研究的数据表明PPARG和RXRA与LPL-E1和LPL-E2增强子元件的结合在调节靶基因表达中起关键作用。

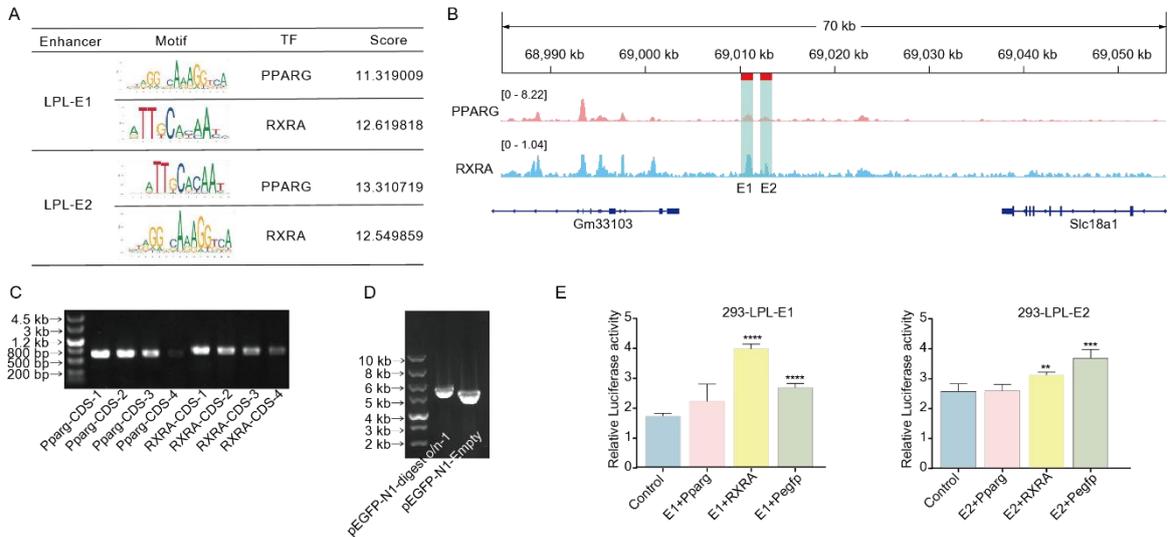


图 13 转录因子增加 *LPL* 基因增强子活性

(A) 活性功能增强子 LPL-E1 和 LPL-E2 转录因子结合位点的预测分析; (B) 3T3-L1 细胞系分化前后细胞转录因子 (PPARG 和 RXRA) ChIP-seq 图谱; (C) 扩增 PPARG 和 RXRA 的 CDS 片段; (D) pEGFP-N1 过表达载体酶切鉴定; (E) 将 LPL-E1 或 LPL-E2 活性增强子和分别过表达 PPARG 和 RXRA 的 CDS 区域的载体共同转染 H293T 细胞, 其中, 对照组为 LPL-E1 或 LPL-E2 活性增强子与 pEGFP-N1 过表达载体共同转染。图中数据为 Mean±SD, 检验方法为, t-检验, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.01$ 。

Fig.13 TFs increase *LPL* enhancer activity

(A) TF binding to the LPL-E1, LPL-E2 were predicted by JASPAR and AnimalTFDB3.0 website; (B) Public differential and undifferential 3T3-L1 cell line ChIP-seq data were analyzed to show profiles of transcription factors in the LPL-E1 and LPL-E2 region. Light red bars indicate *LPL* active enhancer regions; (C) Amplify the PPARG and RXRA CDS regions; (D) pEGFP-N1 vector digest overnight; (E) pGL3-SV40 reporter constructs containing the LPL-E1 and LPL-E2 region were transfected into 293T cells with control or TF overexpression, then luciferase activity was determined. Values are shown as means ± s.d. of three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

第五章 讨论

5.1 *LPL* 基因在脂肪沉积上的意义

LPL 可以通过调控脂肪组织和肌肉组织发育过程中所需营养物质的水平,进而影响瘦肉率和脂比率等胴体性状^[118],且在人、小鼠以及猪中具有保守性,对于农业动物猪生产中该基因具有潜在的利用价值。研究表明,肌内脂肪(IMF)增加可以提高肉的嫩度和风味^[119],作为调控脂肪和脂蛋白代谢的关键酶,*LPL* 基因表达量与肉质性状紧密相关^[120]。*LPL* 在不同组织中的表达存在组织特异性,在一定程度上影响肌内脂肪含量,且在背肌及肌内脂肪中表达量越高,肉品质相对较好^[121-123]。

LPL 是负责循环甘油三酯水解的关键酶,主要表达于脂肪组织和肌肉等。本研究绘制了*LPL* 基因在成脂分化前后的高分辨率全基因组互作图谱,证实了*LPL* 基因对于脂肪沉积具有重要的作用。结合 4C-seq 与组蛋白标记,鉴定了*LPL* 基因多个增强子,利用 CRISPRi 系统分别干扰增强子 1 与增强子 2,并对干扰后的 3T3-L1 进行了成脂诱导,对分化后的脂肪细胞进行了 RNA-Seq,最后通过过表达 PPARG 与 RXRA 两个转录因子探究了脂肪转录因子对*LPL* 增强子的调控作用。

3T3-L1 前脂肪细胞的成脂分化过程主要包括生长阻滞、有丝分裂克隆扩增(MCE)和末端分化这几个步骤。生长阻滞是 3T3-L1 前脂肪细胞成脂分化的前提条件,在分化早期,细胞周期受阻的细胞重新进入细胞周期,再次经历一到两轮细胞周期,这一过程称为 MCE。在成脂诱导 2 d 后,C/EBP 转录因子家族与 PPAR γ 形成转录级联,激活脂质代谢相关的基因表达。

前人的研究表明,C/EBP α 在脂肪细胞终末分化过程中起关键作用。C/EBP α 基因在近端启动子中含有 C/EBP 调控元件,其表达受 C/EBP β 诱导。随着 C/EBP β 激活后的转录激活,C/EBP α 可激活众多下游靶基因的表达,如 PPAR γ 和脂肪细胞脂肪酸结合蛋白 2(aP2)^[62]。这些基因可促进细胞中甘油三酯的积累,并促使细胞结束 MCE,向细胞发生不可逆的分化过程。此前对*LPL* 基因进行的研究均聚焦在*LPL* 在脂质沉积中的功能,并未有研究关注该基因在终止 MCE 过程中发挥的作用。

在本研究中,GO 功能富集的结果表明,CRISPR 干扰 *LPL*-E1 与 CRISPR 干扰 *LPL*-E2 的前脂肪细胞群体在诱导分化 7 天时上调的基因均富集在细胞器裂变、核染色体分离及染色体组织等代谢通路,表明 CRISPR 干扰后细胞仍处于 MCE 阶段。这

一结果表明 *LPL* 基因的表达对脂肪细胞的终末分化具有重要的作用，但具体的作用机制有待后续的研究。

5.2 发现了 *LPL* 的重要活性增强子

近年来增强子在基因表达调控中的作用日益凸显，增强子等基因调控元件在基因组中非常丰富^[124]，并且通常位于距离其靶基因启动子很远的地方。已知基因调控区域高度富集与疾病相关的遗传变异^[125]，这强调了理解增强子驱动基因调控和准确地将增强子与其靶基因连接起来的重要性。本研究使用了 4C 的试验方法，评估染色质的可及性，据此鉴定出了成脂分化后的 3T3-L1 脂肪细胞中 *LPL* 基因的 8 个增强子。并通过双荧光素酶报告系统证明其中增强子 1 和 2 具备可增强 *LPL* 基因转录的能力。CRISPRi 实验证明干扰增强子 1 或增强子 2 均可抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的成脂分化过程。对成脂分化后的 CRISPRi-E1、CRISPRi-E2 以及 CRISPRi-Control 的 3T3-L1 细胞进行的 RNA-Seq 表明干扰 LPL-E1 或 LPL-E2 均能极显著地降低 *LPL* 基因的表达。据此推断，本研究成功鉴定出两个在脂肪细胞中具有活性的 *LPL* 基因的增强子。确定这样的增强子区域对牲畜群落来说是十分重要的，因为将增强子与基因、snp、SVs 或其他感兴趣的区域联系起来，将了解复杂的生产和适应性性状是如何被调控提供有价值的见解。

前人的研究表明，成脂分化过程中伴随着染色质构象的变化，脂质沉积重要基因的启动子和增强子处有组蛋白修饰的改变和大量转录因子和辅因子的富集，形成了 PEI 互作。转录因子通常结合到包含不同转录因子结合位点簇的增强子区域，这一特性已被用于定义和识别调控元件^[126]。在脂肪细胞分化过程中，PPARG 的染色质互作有显著增强，而这与启动子和增强子活性的变化有关。环的形成涉及平衡增强子的激活，并与协同激活子和协同抑制子的广泛募集有关^[127]。

在本实验中，在未分化的 3T3-L1 前脂肪细胞与 293T 细胞系中均使用了双荧光素酶报告系统验证 *LPL* 潜在增强子的活性，其中 LPL-E1 和 LPL-E2 在两种细胞中均表现出较高荧光活性，但 LPL-E1 在 293T 细胞系中活性更高，在 3T3-L1 细胞系中略低于 LPL-E2，由此可以表明使用不同的细胞系可以对双荧光素酶报告系统的结果造成影响，与前人研究的结论相一致^[128]。但是有研究表明，由于单个基因受多个增强子调控，而这两个增强子对基因表达调控的具体作用方式尚不明确。单个增强子的活性是由许多可以在不同时间尺度上起作用的转录因子的组合活性调节的，基因的表达

通常需要多个增强子元件、不同的“可用”启动子元件和刚刚开始探索的三维排列之间的相互作用。基因的时空表达通常需要特定的基因组结构，这可能涉及调控元件之间的分层相互作用，以确保精确和稳健的表达^[126]。近年的增强子功能研究报告了多个增强子成分之间的协同作用，以及增强子之间的加性效应^[129, 130]。不同的增强子具有非冗余的功能，在基因激活的发育过程中依次起作用，如在肢体发育过程中调控 *HoxD* 基因簇^[131]。因此本研究中发现的增强子的具体作用方式还有待后续实验的验证。

此外，虽然本研究中筛选出的片段 LPL-E3~E8 在 4C-Seq、组蛋白标记和保守性分析中都显示出顺式调控元件的特性，但在双荧光素酶报告系统中并未显示出预期中的活性。根据前人的报告，本研究中为显示出活性的片段存在一种可能性，它们确实具有微弱的增强功能，但在目前的体外试验中不容易被证明，或者说它们可以在不同的发展阶段具有更实质性的作用^[130]，这些可能性尚未在本研究中得到验证。

5.3 猪 *LPL* 基因增强子鉴定

家畜脂肪过多已被认为不利于降低生产成本，并对人类消费者构成健康风险，而目前的肉用动物尤其是猪的生产系统会使其在胴体积累大量脂肪^[132]。

在猪等家畜的生产中，寻找有效的方法来抑制过度脂肪沉积是至关重要的。

目前，利用基因编辑技术敲除或过表达编码基因是实现猪脂肪性状快速改良的主要手段之一。尽管此方式能够改变猪脂肪沉积，但由于其影响的终身性、全身性和彻底性，常伴随严重的副作用，如胚胎致死、组织病变等负面效应。而通过靶向成脂相关重要基因的增强子有望“微调”基因的表达进而精准改良猪脂肪性状。

近年来，人、鼠和果蝇等多个物种对增强子有了系统研究，然而猪增强子研究相关的报道很少。原代脂肪细胞分离和培养难度较大，加之猪脂肪细胞系的缺乏，因此导致猪脂肪细胞中重要基因的增强子鉴定和功能研究止步不前。前人的研究试图利用比较基因组学在研究较少的哺乳动物中识别增强子，但收效甚微。

本研究在 3T3-L1 上的实验表明，通过抑制 *LPL* 活性增强子 E1 和 E2，可以抑制 *LPL* 基因的表达从而使细胞脂质积累下降（主要是甘油三酯）、分化良好的细胞数量有所减少、脂滴大小缩小。在进化过程中，保守的非编码 DNA 元件很少在进化过程中丢失^[133]，本研究通过 UCSC 基因组评估了潜在活性增强子序列在 60 种脊椎动物之间的保守性，其中 LPL-E1、LPL-E2、LPL-E4、LPL-E5 四个 *LPL* 增强子在多个物种包括猪的基因组上具有较高的保守性（图 14）。随着技术的发展，机器学习(ML)技

术在预测增强子区域方面显示出有研究潜力的结果。Callum 等人使用来自 VISTA 和公开可用的 ChIP-seq 的人类和小鼠增强子数据，研究了机器学习方法在三种非模型哺乳动物物种（牛、猪和狗）中识别增强子的能力^[134]。这或许是一种提示，利用小鼠增强子对同一特征进行跨物种预测，将提高我们对牲畜物种中这一重要调控元件的理解。

在未来，研究猪基因组的顺式调控元件是提高对猪全基因组关联研究相关研究成果理解的有效途径。本研究绘制了小鼠 *LPL* 基因全基因组的高清互作图谱，并确定了这一脂肪沉积重要基因的两个增强子。猪 *LPL* 基因增强子的研究能为猪功能基因组研究提供参考数据、为鉴定与猪经济性状相关的关键基因提供参考数据、同时也会为提高生产效率、改善肉质提供分子育种理论基础。

第六章 结论与创新点

6.1 结论

- (1) 绘制了 *LPL* 基因在成脂分化前后的高分辨率全基因组互作图谱。
- (2) 鉴定并评估了 *LPL* 基因增强子的转录活性。
- (3) 明确了 LPL-E1 和 LPL-E2 在成脂分化中的功能。
- (4) 探讨了两个重要成脂转录因子 (PPARG 和 RXRA) 对 LPL-E1、LPL-E2 活性的调控作用。

6.2 本研究的创新点

- (1) 本研究绘制了 *LPL* 基因在成脂分化前后的高分辨率全基因组互作图谱，证实了 *LPL* 基因对于脂肪沉积具有重要的作用。
- (2) 本研究预测并评估了 8 个 *LPL* 潜在增强子的活性，并进一步验证了其中两个具有显著转录活性的增强子。
- (3) 本研究结合了转录组学的分析，在分子水平上探究了 *LPL* 增强子 LPL-E1 和 LPL-E2 对脂肪细胞系造成的影响，为后续研究提供更多分子依据。

参考文献

- [1] Smith RL, Soeters MR, Wüst RCI *et al.* Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease[J]. *Endocr Rev.* 2018, 39(4): 489-517.
- [2] Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation[J]. *J Allergy Clin Immunol.* 2005, 115(5): 911-919; quiz 920.
- [3] Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ[J]. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89(6): 2548-2556.
- [4] Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ *et al.* The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001, 280(6): E827-847.
- [5] Wang X, Hai C. Redox modulation of adipocyte differentiation: hypothesis of "Redox Chain" and novel insights into intervention of adipogenesis and obesity[J]. *Free Radic Biol Med.* 2015, 89: 99-125.
- [6] Li G, Yao W, Jiang H. Short-chain fatty acids enhance adipocyte differentiation in the stromal vascular fraction of porcine adipose tissue[J]. *J Nutr.* 2014, 144(12): 1887-1895.
- [7] Spalding KL, Arner E, Westermark PO *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans[J]. *Nature.* 2008, 453(7196): 783-787.
- [8] Hirsch J, Han PW. Cellularity of rat adipose tissue: effects of growth, starvation, and obesity[J]. *J Lipid Res.* 1969, 10(1): 77-82.
- [9] Vishvanath L, MacPherson KA, Hepler C *et al.* Pdgfr β + Mural Preadipocytes Contribute to Adipocyte Hyperplasia Induced by High-Fat-Diet Feeding and Prolonged Cold Exposure in Adult Mice[J]. *Cell Metab.* 2016, 23(2): 350-359.
- [10] Wang QA, Tao C, Gupta RK *et al.* Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration[J]. *Nat Med.* 2013, 19(10): 1338-1344.
- [11] Laforest S, Labrecque J, Michaud A *et al.* Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2015, 52(6): 301-313.
- [12] Denis GV, Obin MS. 'Metabolically healthy obesity': origins and implications[J]. *Mol Aspects Med.* 2013, 34(1): 59-70.
- [13] Khan T, Muise ES, Iyengar P *et al.* Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI[J]. *Mol Cell Biol.* 2009, 29(6): 1575-1591.
- [14] Halberg N, Khan T, Trujillo ME *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 α induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue[J]. *Mol Cell Biol.* 2009, 29(16): 4467-4483.
- [15] Laurencikiene J, Skurk T, Kulyté A *et al.* Regulation of lipolysis in small and large fat cells of the same subject[J]. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011, 96(12): E2045-2049.
- [16] Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C *et al.* Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion[J]. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007, 92(3): 1023-1033.
- [17] Meyer LK, Ciaraldi TP, Henry RR *et al.* Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity[J]. *Adipocyte.* 2013, 2(4): 217-226.
- [18] Lafontan M, Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue[J]. *Prog Lipid Res.* 2009, 48(5): 275-297.
- [19] Ahmed K, Tunaru S, Tang C *et al.* An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent inhibition of lipolysis through GPR81[J]. *Cell Metab.* 2010, 11(4): 311-319.

- [20] Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K *et al.* Regulation of lipolysis in adipocytes[J]. *Annu Rev Nutr.* 2007, 27: 79-101.
- [21] Choi YH, Park S, Hockman S *et al.* Alterations in regulation of energy homeostasis in cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B-null mice[J]. *J Clin Invest.* 2006, 116(12): 3240-3251.
- [22] Buettner C, Muse ED, Cheng A *et al.* Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms[J]. *Nat Med.* 2008, 14(6): 667-675.
- [23] Nogueiras R, Wiedmer P, Perez-Tilve D *et al.* The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism[J]. *J Clin Invest.* 2007, 117(11): 3475-3488.
- [24] Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE *et al.* Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue[J]. *J Clin Invest.* 1997, 100(11): 2858-2864.
- [25] Marcelin G, Chua S, Jr. Contributions of adipocyte lipid metabolism to body fat content and implications for the treatment of obesity[J]. *Curr Opin Pharmacol.* 2010, 10(5): 588-593.
- [26] Brasaemle DL, Subramanian V, Garcia A *et al.* Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism[J]. *Mol Cell Biochem.* 2009, 326(1-2): 15-21.
- [27] Cohen AW, Razani B, Schubert W *et al.* Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation[J]. *Diabetes.* 2004, 53(5): 1261-1270.
- [28] Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G *et al.* Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome[J]. *Cell Metab.* 2006, 3(5): 309-319.
- [29] Yang X, Lu X, Lombès M *et al.* The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase[J]. *Cell Metab.* 2010, 11(3): 194-205.
- [30] Osuga J, Ishibashi S, Oka T *et al.* Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, 97(2): 787-792.
- [31] Wang SP, Laurin N, Himms-Hagen J *et al.* The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice[J]. *Obes Res.* 2001, 9(2): 119-128.
- [32] Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G *et al.* Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase[J]. *Science.* 2004, 306(5700): 1383-1386.
- [33] Ahmadian M, Duncan RE, Varady KA *et al.* Adipose overexpression of desnutrin promotes fatty acid use and attenuates diet-induced obesity[J]. *Diabetes.* 2009, 58(4): 855-866.
- [34] Bezaire V, Mairal A, Ribet C *et al.* Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes[J]. *J Biol Chem.* 2009, 284(27): 18282-18291.
- [35] Langin D, Dicker A, Tavernier G *et al.* Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity[J]. *Diabetes.* 2005, 54(11): 3190-3197.
- [36] Chang E, Kim CY. Natural Products and Obesity: A Focus on the Regulation of Mitotic Clonal Expansion during Adipogenesis[J]. *Molecules.* 2019, 24(6).
- [37] Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006, 7(12): 885-896.
- [38] Otto TC, Lane MD. Adipose development: from stem cell to adipocyte[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2005, 40(4): 229-242.
- [39] Reichert M, Eick D. Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation[J]. *Oncogene.* 1999, 18(2): 459-466.
- [40] Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for

- adipogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003, 100(1): 44-49.
- [41] Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation[J]. Cell Metab. 2006, 4(4): 263-273.
- [42] Morrison RF, Farmer SR. Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis[J]. J Biol Chem. 1999, 274(24): 17088-17097.
- [43] Qiu Z, Wei Y, Chen N *et al.* DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes[J]. J Biol Chem. 2001, 276(15): 11988-11995.
- [44] Wu Z, Bucher NL, Farmer SR. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids[J]. Mol Cell Biol. 1996, 16(8): 4128-4136.
- [45] Smas CM, Chen L, Zhao L *et al.* Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation[J]. J Biol Chem. 1999, 274(18): 12632-12641.
- [46] Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells[J]. Genes Dev. 1991, 5(9): 1538-1552.
- [47] Jin S, Zhai B, Qiu Z *et al.* c-Crk, a substrate of the insulin-like growth factor-1 receptor tyrosine kinase, functions as an early signal mediator in the adipocyte differentiation process[J]. J Biol Chem. 2000, 275(44): 34344-34352.
- [48] Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor[J]. Cell. 1994, 79(7): 1147-1156.
- [49] Christy RJ, Kaestner KH, Geiman DE *et al.* CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991, 88(6): 2593-2597.
- [50] Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis[J]. Trends Endocrinol Metab. 2009, 20(3): 107-114.
- [51] Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ *et al.* Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells[J]. Semin Cell Dev Biol. 1999, 10(1): 51-58.
- [52] Koerner A, Kratzsch J, Kiess W. Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2005, 19(4): 525-546.
- [53] Payne VA, Au WS, Lowe CE *et al.* C/EBP transcription factors regulate SREBP1c gene expression during adipogenesis[J]. Biochem J. 2009, 425(1): 215-223.
- [54] Zagariya A, Mungre S, Lovis R *et al.* Tumor necrosis factor alpha gene regulation: enhancement of C/EBPbeta-induced activation by c-Jun[J]. Mol Cell Biol. 1998, 18(5): 2815-2824.
- [55] Wu Z, Rosen ED, Brun R *et al.* Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity[J]. Mol Cell. 1999, 3(2): 151-158.
- [56] Rosen ED, Hsu CH, Wang X *et al.* C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway[J]. Genes Dev. 2002, 16(1): 22-26.
- [57] Moon JH, Kim K, Choi SH. Lipoprotein Lipase: Is It a Magic Target for the Treatment of Hypertriglyceridemia[J]. Endocrinol Metab (Seoul). 2022, 37(4): 575-586.
- [58] Hahn PF. ABOLISHMENT OF ALIMENTARY LIPEMIA FOLLOWING INJECTION OF HEPARIN[J]. Science. 1943, 98(2531): 19-20.
- [59] Anfinsen CB. [Role of heparin in lipoprotein metabolism][J]. Rend Ist Sup Sanit. 1956, 19(Suppl): 181-196.

- [60] Harbitz I, Kristensen T, Kran S *et al.* Isolation and sequencing of porcine lipoprotein lipase cDNA and its use in multiallelic restriction fragment length polymorphism detection[J]. *Animal Genetics*. 1992, 23(6): 517-522.
- [61] Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009, 297(2): E271-288.
- [62] Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease[J]. *J Mol Med (Berl)*. 2002, 80(12): 753-769.
- [63] Kirchgessner TG, Chuat JC, Heinzmann C *et al.* Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989, 86(24): 9647-9651.
- [64] Deeb SS, Peng RL. Structure of the human lipoprotein lipase gene[J]. *Biochemistry*. 1989, 28(10): 4131-4135.
- [65] Raisonnier A, Etienne J, Arnault F *et al.* Comparison of the cDNA and amino acid sequences of lipoprotein lipase in eight species[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1995, 111(3): 385-398.
- [66] Wen Y, Chen YQ, Konrad RJ. The Regulation of Triacylglycerol Metabolism and Lipoprotein Lipase Activity[J]. *Adv Biol (Weinh)*. 2022, 6(10): e2200093.
- [67] Ameis D, Kobayashi J, Davis RC *et al.* Familial chylomicronemia (type I hyperlipoproteinemia) due to a single missense mutation in the lipoprotein lipase gene[J]. *J Clin Invest*. 1991, 87(4): 1165-1170.
- [68] Wong H, Davis RC, Thuren T *et al.* Lipoprotein lipase domain function[J]. *J Biol Chem*. 1994, 269(14): 10319-10323.
- [69] Dugi KA, Dichek HL, Talley GD *et al.* Human lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates[J]. *J Biol Chem*. 1992, 267(35): 25086-25091.
- [70] Griffon N, Budreck EC, Long CJ *et al.* Substrate specificity of lipoprotein lipase and endothelial lipase: studies of lid chimeras[J]. *J Lipid Res*. 2006, 47(8): 1803-1811.
- [71] Dugi KA, Dichek HL, Santamarina-Fojo S. Human hepatic and lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity[J]. *J Biol Chem*. 1995, 270(43): 25396-25401.
- [72] Kobayashi Y, Nakajima T, Inoue I. Molecular modeling of the dimeric structure of human lipoprotein lipase and functional studies of the carboxyl-terminal domain[J]. *Eur J Biochem*. 2002, 269(18): 4701-4710.
- [73] Lookene A, Zhang L, Hultin M *et al.* Rapid subunit exchange in dimeric lipoprotein lipase and properties of the inactive monomer[J]. *J Biol Chem*. 2004, 279(48): 49964-49972.
- [74] Doolittle MH, Ehrhardt N, Péterfy M. Lipase maturation factor 1: structure and role in lipase folding and assembly[J]. *Curr Opin Lipidol*. 2010, 21(3): 198-203.
- [75] Beigneux AP, Davies BS, Gin P *et al.* Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons[J]. *Cell Metab*. 2007, 5(4): 279-291.
- [76] Davies BS, Beigneux AP, Barnes RH, 2nd *et al.* GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries[J]. *Cell Metab*. 2010, 12(1): 42-52.
- [77] Weinstock P, Bisgaier C, Aalto-Setälä K *et al.* Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. Mild hypertriglyceridemia with impaired very low density lipoprotein clearance in heterozygotes[J]. 1995, 96(6):

- 2555-2568.
- [78] He PP, Jiang T, OuYang XP *et al.* Lipoprotein lipase: Biosynthesis, regulatory factors, and its role in atherosclerosis and other diseases[J]. *Clin Chim Acta.* 2018, 480: 126-137.
- [79] Furlong EEM, Levine M. Developmental enhancers and chromosome topology[J]. *Science.* 2018, 361(6409): 1341-1345.
- [80] Long HK, Prescott SL, Wysocka J. Ever-Changing Landscapes: Transcriptional Enhancers in Development and Evolution[J]. *Cell.* 2016, 167(5): 1170-1187.
- [81] Pombo A, Dillon N. Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015, 16(4): 245-257.
- [82] Plank JL, Dean A. Enhancer function: mechanistic and genome-wide insights come together[J]. *Mol Cell.* 2014, 55(1): 5-14.
- [83] Zentner GE, Tesar PJ, Scacheri PC. Epigenetic signatures distinguish multiple classes of enhancers with distinct cellular functions[J]. *Genome Res.* 2011, 21(8): 1273-1283.
- [84] Rada-Iglesias A, Bajpai R, Swigut T *et al.* A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans[J]. *Nature.* 2011, 470(7333): 279-283.
- [85] Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG *et al.* Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107(50): 21931-21936.
- [86] Shen Y, Yue F, McCleary DF *et al.* A map of the cis-regulatory sequences in the mouse genome[J]. *Nature.* 2012, 488(7409): 116-120.
- [87] Carter D, Chakalova L, Osborne CS *et al.* Long-range chromatin regulatory interactions in vivo[J]. *Nat Genet.* 2002, 32(4): 623-626.
- [88] Deng W, Lee J, Wang H *et al.* Controlling long-range genomic interactions at a native locus by targeted tethering of a looping factor[J]. *Cell.* 2012, 149(6): 1233-1244.
- [89] Morgan SL, Mariano NC, Bermudez A *et al.* Manipulation of nuclear architecture through CRISPR-mediated chromosomal looping[J]. *Nat Commun.* 2017, 8: 15993.
- [90] Kim JH, Rege M, Valeri J *et al.* LADL: light-activated dynamic looping for endogenous gene expression control[J]. *Nat Methods.* 2019, 16(7): 633-639.
- [91] Denker A, de Laat W. The second decade of 3C technologies: detailed insights into nuclear organization[J]. *Genes Dev.* 2016, 30(12): 1357-1382.
- [92] Dekker J, Rippe K, Dekker M *et al.* Capturing chromosome conformation[J]. *Science.* 2002, 295(5558): 1306-1311.
- [93] Vermunt MW, Zhang D, Blobel GA. The interdependence of gene-regulatory elements and the 3D genome[J]. *J Cell Biol.* 2019, 218(1): 12-26.
- [94] Dixon JR, Gorkin DU, Ren B. Chromatin Domains: The Unit of Chromosome Organization[J]. *Mol Cell.* 2016, 62(5): 668-680.
- [95] van de Werken HJ, Landan G, Holwerda SJ *et al.* Robust 4C-seq data analysis to screen for regulatory DNA interactions[J]. *Nat Methods.* 2012, 9(10): 969-972.
- [96] de Wit E, Vos ES, Holwerda SJ *et al.* CTCF Binding Polarity Determines Chromatin Looping[J]. *Mol Cell.* 2015, 60(4): 676-684.
- [97] Simonis M, Klous P, Splinter E *et al.* Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C)[J]. *Nat Genet.* 2006, 38(11): 1348-1354.
- [98] Rao SS, Huntley MH, Durand NC *et al.* A 3D map of the human genome at kilobase resolution

- reveals principles of chromatin looping[J]. *Cell*. 2014, 159(7): 1665-1680.
- [99] Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L *et al*. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome[J]. *Science*. 2009, 326(5950): 289-293.
- [100] Visel A, Minovitsky S, Dubchak I *et al*. VISTA Enhancer Browser--a database of tissue-specific human enhancers[J]. *Nucleic Acids Res*. 2007, 35(Database issue): D88-92.
- [101] Thakore PI, D'Ippolito AM, Song L *et al*. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements[J]. *Nat Methods*. 2015, 12(12): 1143-1149.
- [102] Kearns NA, Pham H, Tabak B *et al*. Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion[J]. *Nat Methods*. 2015, 12(5): 401-403.
- [103] Klann TS, Black JB, Chellappan M *et al*. CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome[J]. *Nat Biotechnol*. 2017, 35(6): 561-568.
- [104] Fulco CP, Munschauer M, Anyoha R *et al*. Systematic mapping of functional enhancer-promoter connections with CRISPR interference[J]. 2016, 354(6313): 769-773.
- [105] Gasperini M, Hill AJ, McFaline-Figueroa JL *et al*. A Genome-wide Framework for Mapping Gene Regulation via Cellular Genetic Screens[J]. *Cell*. 2019, 176(1-2): 377-390.e319.
- [106] Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM *et al*. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers[J]. *Nat Biotechnol*. 2015, 33(5): 510-517.
- [107] Simeonov DR, Gowen BG, Boontanrart M *et al*. Discovery of stimulation-responsive immune enhancers with CRISPR activation[J]. *Nature*. 2017, 549(7670): 111-115.
- [108] Osterwalder M, Barozzi I, Tissières V *et al*. Enhancer redundancy provides phenotypic robustness in mammalian development[J]. *Nature*. 2018, 554(7691): 239-243.
- [109] Nardone J, Lee DU, Ansel KM *et al*. Bioinformatics for the 'bench biologist': how to find regulatory regions in genomic DNA[J]. *Nat Immunol*. 2004, 5(8): 768-774.
- [110] Bonello GB, Pham MH, Begum K *et al*. An evolutionarily conserved TNF-alpha-responsive enhancer in the far upstream region of human CCL2 locus influences its gene expression[J]. *J Immunol*. 2011, 186(12): 7025-7038.
- [111] Chen L, Fish AE, Capra JA. Prediction of gene regulatory enhancers across species reveals evolutionarily conserved sequence properties[J]. *PLoS Comput Biol*. 2018, 14(10): e1006484.
- [112] Odaka YS, Tohmonda T, Toyoda A *et al*. An Evolutionarily Conserved Mesodermal Enhancer in Vertebrate Zic3[J]. *Sci Rep*. 2018, 8(1): 14954.
- [113] Li M, Jiang P, Cheng K *et al*. Regulation of MYB by distal enhancer elements in human myeloid leukemia[J]. *Cell Death Dis*. 2021, 12(2): 223.
- [114] Zammit PS. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis[J]. *Semin Cell Dev Biol*. 2017, 72: 19-32.
- [115] Hernández-Hernández JM, García-González EG, Brun CE *et al*. The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration[J]. *Semin Cell Dev Biol*. 2017, 72: 10-18.
- [116] Stampfel G, Kazmar T, Frank O *et al*. Transcriptional regulators form diverse groups with context-dependent regulatory functions[J]. *Nature*. 2015, 528(7580): 147-151.

- [117] Visel A, Rubin EM, Pennacchio LA. Genomic views of distant-acting enhancers[J]. *Nature*. 2009, 461(7261): 199-205.
- [118] Hocquette JF, Graulet B, Olivecrona T. Lipoprotein lipase activity and mRNA levels in bovine tissues[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1998, 121(2): 201-212.
- [119] Gerbens F, Jansen A, van Erp AJ *et al*. The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs[J]. *Mamm Genome*. 1998, 9(12): 1022-1026.
- [120] 廉红霞, 卢德勋, 高民. 饲料营养水平对猪血液生化指标、背最长肌 IMF 含量及 LPLmRNA 表达量的影响[J]. *中国饲料*. 2008, (5): 5.
- [121] 柳明正, 徐志强, 豆腾飞 *et al*. 12 周龄大围山微型鸡与艾维茵肉鸡肌肉营养成分及 LPL 基因表达差异研究[J]. *中国家禽*. 2019, 41(13): 4.
- [122] 曲桂娟, 杨连玉, 秦贵信 *et al*. 不同杂交品种肉牛背最长肌 LPL 基因表达的发育性变化及其对 IMF 的影响[J]. *中国兽医学报*. 2011, 31(002): 272-274.
- [123] 绵羊肌肉 LPL 基因表达的发育性变化及其对肌内脂肪含量的影响[J]. *中国农业科学*. 2007, 40(10): 8.
- [124] Thurman JM. Factor friction: protective and pathogenic roles for complement factors in immune complex glomerulonephritis[J]. *Kidney Int*. 2012, 82(9): 945-947.
- [125] Maurano MT, Humbert R, Rynes E *et al*. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA[J]. *Science*. 2012, 337(6099): 1190-1195.
- [126] Spitz F, Furlong EE. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control[J]. *Nat Rev Genet*. 2012, 13(9): 613-626.
- [127] Siersbæk R, Madsen JGS, Javierre BM *et al*. Dynamic Rewiring of Promoter-Anchored Chromatin Loops during Adipocyte Differentiation[J]. *Mol Cell*. 2017, 66(3): 420-435.e425.
- [128] Joo JY, Schaukowitch K, Farbiak L *et al*. Stimulus-specific combinatorial functionality of neuronal c-fos enhancers[J]. *Nature Neuroscience*. 2016.
- [129] Downen JM, Fan ZP, Hnisz D *et al*. Control of cell identity genes occurs in insulated neighborhoods in mammalian chromosomes[J]. *Cell*. 2014, 159(2): 374-387.
- [130] Hay D, Hughes JR, Babbs C *et al*. Genetic dissection of the α -globin super-enhancer in vivo[J]. *Nat Genet*. 2016, 48(8): 895-903.
- [131] Andrey G, Montavon T, Mascrez B *et al*. A switch between topological domains underlies HoxD genes collinearity in mouse limbs[J]. *Science*. 2013, 340(6137): 1234167.
- [132] Gao S, Ge C, Zhang X *et al*. Effects of the monoclonal antibody against porcine 40 kDa adipocyte-specific plasma membrane protein on adipocytes and carcass composition[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2007, 39(7): 490-498.
- [133] Hiller M, Schaar BT, Bejerano G. Hundreds of conserved non-coding genomic regions are independently lost in mammals[J]. *Nucleic Acids Res*. 2012, 40(22): 11463-11476.
- [134] MacPhillamy C, Alinejad-Rokny H, Pitchford WS *et al*. Cross-species enhancer prediction using machine learning[J]. *Genomics*. 2022, 114(5): 110454.