

吴秀林,丁炜东,曹哲明,等. 环境因子对黄鳝 *DMRT* 基因甲基化的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):60-63.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.014

# 环境因子对黄鳝 *DMRT* 基因甲基化的影响

吴秀林<sup>1</sup>, 丁炜东<sup>1,2</sup>, 曹哲明<sup>1,2</sup>, 刘旭<sup>1,2</sup>, 邴旭文<sup>1,2</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214182; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏无锡 214081)

**摘要:** DNA 甲基化是一种重要的 DNA 修饰方式, 它能在不改变 DNA 一级结构的情况下调控基因的表达, 能够维持正常的细胞功能, 在胚胎发育、遗传印记中起重要作用。以黄鳝为对象, 采用限制性内切酶-PCR 检测特定 DNA 片段是否发生甲基化的方法, 研究不同温度、pH 值、光照周期条件下 *DMRT* 基因在各组织中的甲基化差异。用甲基化敏感的限制性内切酶 *Hpa* II 酶切黄鳝的性腺、肾、脾、肝、肠等 5 个组织, 根据已知的 *DMRT2*、*DMRT3*、*DMRT4* 基因序列设计特异的引物扩增酶切产物, 并设置未酶切对照组, 用 1% 琼脂糖检测, 分析差异条带, 若未酶切组泳道出现条带, 酶切组泳道也出现条带则判定为阳性结果, 否则判定为阴性结果。结果表明: 不同生态因子条件下, 在 5 个组织中 *DMRT2* - FR2 扩增序列中的位点均表现为阳性结果; *DMRT3* - FR2、*DMRT4* - FR2、*DMRT4* - FR3 扩增序列中的位点均表现为阴性结果, 说明这 4 个序列中位点的甲基化状态非常稳定, 环境因子的小幅变化对其影响不大。

**关键词:** 黄鳝; 温度; 光照; 甲基化

**中图分类号:** S966.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0060-04

黄鳝 (*Monopterus albus*) 是重要的淡水经济鱼类, 隶属硬骨鱼纲辐鳍亚纲合鳃目合鳃科黄鳝属, 其肉质细嫩、营养丰富, 具有较高的食用价值、药用价值。黄鳝多生活在河道、湖

泊、沟塘等水体中, 我国的珠江流域、长江流域盛产黄鳝。泰国、印度尼西亚等国也有黄鳝分布<sup>[1]</sup>。研究发现, 黄鳝繁殖比较特殊, 具性逆转现象, 一般经历雌性发育阶段—间性发育阶段—雄性发育阶段, 这种独特的生理现象使得黄鳝成为研究探讨鱼类性别控制机理的极好材料<sup>[2]</sup>。*DMRT* 基因家族成员的典型特征是具有一个保守的 DM 结构域, DM 是一个靠特殊的锌指结构连接 DNA 的结构域, 通过调节目的基因转录参与发育调节过程<sup>[3]</sup>。目前, 已在多种鱼类体内检测到 *DMRT* 家族基因<sup>[4]</sup>。*DMRT* 基因普遍被认为与性别分化有关, 如 *DMRT1*、*DMRT2*、*DMRT3* 与雄性性别分化密切相关, 对精巢正常发育有重要作用。Kim 等研究发现, 小鼠 *DMRT3* 参

收稿日期: 2015-04-30

基金项目: 江苏省科技支撑计划 (编号: BE2013315); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (编号: 2015JBFM06); 江苏省自然科学基金 (编号: BK2011184)。

作者简介: 吴秀林 (1990—), 女, 重庆人, 硕士研究生, 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: 764859546@qq.com。

通信作者: 邴旭文, 研究员, 主要从事特种水产养殖与育种研究。E-mail: bingxw@ffrc.cn。

一结论。

本研究采用 DNA 条形码技术分析鸡血藤及其混伪品的 *rbcl* 基因, 序列中存在着多处鉴别位点, 基于 *rbcl* 基因构建的系统发生树可直观地鉴别鸡血藤及 4 种混伪品, 为其资源保护和临床用药安全提供了一定的保障。

**参考文献:**

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 134.
- [2] Hebert P, Gregory T R. The promise of DNA barcoding for taxonomy [J]. Systematic Biology, 2005, 54(5): 852.
- [3] Blaxter M, Floyd R. Molecular taxonomics for biodiversity surveys: already a reality[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2003, 18(6): 268-269.
- [4] Chase M W, Salamin N, Wilkinson M, et al. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1889.
- [5] Newmaster S G, Fazekas A J, Ragupathy S. DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcl* in a multigene tiered approach [J].

Canadian Journal of Botany, 2006, 84(3): 335-341.

- [6] 黄琼林, 梁凌玲, 何瑞, 等. 青天葵及其混伪品的 *rbcl* 基因序列鉴定研究[J]. 热带作物学报, 2012, 33(9): 1630-1634.
- [7] 谭丽盈, 郑婕. 基于 *rbcl* 序列鉴别十大功劳叶及其伪品[J]. 北方药学, 2012, 9(4): 1-2.
- [8] 张慧哗, 刘锋, 王德勤, 等. 溪黄草 DNA 条形码鉴定研究[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2014, 16(7): 1487-1490.
- [9] 胡旻. 鸡血藤与常用混淆品的真伪鉴别[J]. 浙江中西医结合杂志, 2013, 23(5): 419.
- [10] 林君清, 洪侃, 吴敏. 鸡血藤药材与易混品的鉴别[J]. 海峡药学, 2010, 22(5): 47-48.
- [11] 翟明, 刘军民. 鸡血藤与其常见混淆品的薄层色谱鉴别研究[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(3): 305-307, 340.
- [12] 翟明, 刘军民, 安冉, 等. 鸡血藤类药材种质资源的 RAPD 分析[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(4): 413-415.
- [13] 陈士林, 庞晓慧, 姚辉, 等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2011, 13(5): 747-754.
- [14] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(31): 12794-12797.

与性腺、脑与脊髓等的发育,且在雄性中比雌性的表达量高<sup>[3]</sup>。Kondo 等在青鳉(*O. latipes*)成体精巢中检测到有 *DM-RT3* 的表达,并且在其成体精巢、卵巢等器官中发现有 *DM-RT2* 和 *DMRT4* 的表达,推测 *DMRT2*、*DMRT3* 和 *DMRT4* 可能参与青鳉精子的发生<sup>[5]</sup>。王佳等通过对鲫 *DMRT3* 基因的克隆和表达分析,发现 *DMRT3* 可能在早期器官发生和雄性性腺发育调控中起作用<sup>[6]</sup>。环境因子对鱼类的生长、摄食、代谢、生殖以及内分泌等产生间接而广泛的影响<sup>[7]</sup>。阮国良等以雌性幼鳊为对象,研究不同光照周期对其生长和性腺发育的影响,结果表明,黄鳊在黑暗状态下其生长和性腺发育均得到改善<sup>[8]</sup>。Navarro - Martín 等研究发现,温度可刺激欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)性别转化并可影响性别比例,但影响机制尚不明确<sup>[9]</sup>。表观遗传学是指在不改变 DNA 序列的情况下,基因的表达产生可遗传变异。DNA 甲基化是一种与基因抑制相关的表观遗传机制,是表观遗传学的重要组成部分<sup>[10]</sup>。DNA 甲基化由 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNA Mtase)催化, S - 腺苷甲硫氨酸提供甲基供体,在胞嘧啶的第 5 位碳原子上加上一甲基基团形成甲基化脱氧胞嘧啶的共价修饰过程<sup>[11]</sup>,是最常见的复制及转录后修饰方式之一,在基因表达调控、发育调节等方面发挥重要作用<sup>[12]</sup>。Jabbari 等通过比较 42 种脊椎动物体内 5 - 甲基胞嘧啶的甲基化程度,得出鱼类和两栖动物机体甲基化是鸟类和哺乳动物的 2 倍,且 CPG 比例前者较高<sup>[13]</sup>。Varriale 等研究对比了南极与热带鱼类机体甲基化程度,结果表明,南极鱼类甲基化程度明显高于热带鱼类,由此推断动物机体甲基化程度与其体温相关<sup>[14]</sup>。本研究探讨了不同温度、pH 值、光照周期条件下, *DMRT* 基因在黄鳊各组织中的甲基化差异,旨在为黄鳊性别调控研究提供一种分子学角度的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 试验所用黄鳊来自南京农业大学无锡渔业学院南泉试验基地,对养殖环境进行单因素控制,分别控制养殖水体温度、pH 值、光照时间 3 个生态因子。每个生态因子设置 3 个梯度试验组,每个梯度试验组设置 2 个平行,每个平行养殖 4 条黄鳊;设置 1 个空白对照组,空白对照组设置 2 个平行,每个平行养殖 4 条黄鳊。水体温度分别为 25、28、31℃; pH 值分别为 6.5、7.5、8.5;光照时间分别为 8、10、12 h。总样本数为 80 条黄鳊,雌雄各半。

1.1.2 试验仪器 22331 Hamburg PCR 仪( Eppendorf 公司),低温离心机( Sopvall 公司),紫外分光光度计( Eppendorf 公司),无菌操作台,琼脂糖凝胶成像系统,高压湿热灭菌锅,水浴锅,电热恒温干燥箱,电子天平,电泳仪及电泳槽,各种型号加样枪,微波炉,烘箱,恒温振荡器, - 70℃超低温冰箱, 4℃冰箱。

1.1.3 试验试剂 去离子水、70%乙醇、STE 缓冲液、Tris - Cl 饱和酚、蛋白酶 K、三氯甲烷、异丙醇、TaKaRa LA *Taq*<sup>TM</sup>、*Hpa* II、Marker DL2000、10 × Loading Buffer、EB、50 × TAE Buffer、琼脂糖。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取 取黄鳊各组织迅速将其磨碎,加入

500 μL STE 缓冲液和 10 μL 蛋白酶 K 于 55℃下 3 ~ 4 h,用 Tris - Cl 饱和酚、三氯甲烷各抽提 1 次,取上清液并加入等体积的异丙醇,混匀后放于 4℃冰箱过夜,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 300 μL 70%乙醇洗沉淀 2 次,加入 100 μL ddH<sub>2</sub>O 溶解,用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的完整性,将样品储存在 - 70℃下保存备用。

1.2.2 引物设计 笔者所在实验室前期工作中,根据已知的 *DMRT2*、*DMRT3*、*DMRT4* 基因启动子区富含 CpG 的序列,分别设计 5 对引物: *DMRT* - F1、*DMRT* - R1、*DMRT* - F2、*DMRT* - R2、*DMRT* - F3、*DMRT* - R3、*DMRT* - F4、*DMRT* - R4 以及 *DMRT* - F5、*DMRT* - R5,经过筛选比较,发现用 *DMRT2* - FR2、*DMRT3* - FR2、*DMRT4* - FR2、*DMRT4* - FR3 引物能扩增出较好的条带。所以本试验采用 *DMRT2* - FR2、*DMRT3* - FR2、*DMRT4* - FR2、*DMRT4* - FR3 引物(表 1)。

表 1 黄鳊 *DMRT* 基因引物

引物	序列(5'→3')	退火温度(℃)
<i>DMRT2</i> - F2	TGGTGGTGGAGAGGCAGCGGTGAT	60
<i>DMRT2</i> - R2	GGGGGTTTGGGATCAGCACGGTCAG	62
<i>DMRT3</i> - F2	GCCCTTCAGCCTTCGAGCCAACC	63
<i>DMRT3</i> - R2	GTGGATGAGTTCAGGATCGCGGAGT	60
<i>DMRT4</i> - F2	TCCCTCCGAGTGACAAGTTGCC	58
<i>DMRT4</i> - R2	GAATGCAACACTTTAACCGATCTGAG	60
<i>DMRT4</i> - F3	ACGCAGAGAGGACCGCATCATTTG	60
<i>DMRT4</i> - R3	GGGTTTTTCCGACTCGCTTCCTGA	60

1.2.3 黄鳊基因组 DNA 的酶切 将提取的 DNA 产物中加入 10 U/μL *Hpa* II 酶 0.5 μL,于 37℃水浴中酶切 4 h(表 2)。

表 2 黄鳊基因组酶切反应体系

反应组分	含量(μL)
DNA 模板	2.0
10 × <i>Hpa</i> II Buffer	1.0
10 U/μL <i>Hpa</i> II	0.5
ddH <sub>2</sub> O	16.5

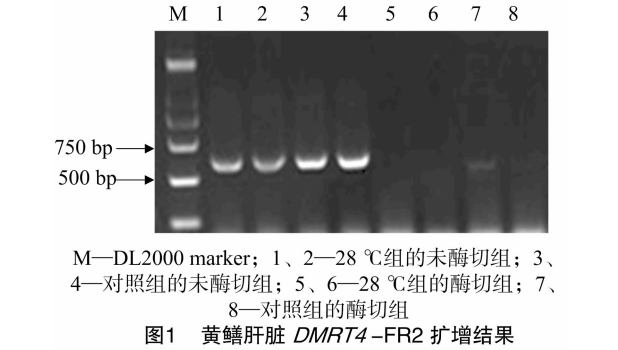
1.2.4 黄鳊 *DMRT* 基因酶切产物的扩增及检测 酶切产物 PCR 体系:10 × PCR buffer(Mg<sup>2+</sup> plus) 2.5 μL, dNTP Mixture 2 μL, *Taq* 酶 0.25 μL,正反引物各 0.5 μL, DNA 模板 1 μL,用 ddH<sub>2</sub>O 补足 25 μL。扩增程序为:94℃4 min;94℃30 s, 59℃(60℃)45 s,72℃1 min,34 个循环;最后 4℃保存。上述 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,置于紫外分光光度计下观察,拍照记录结果并对结果进行甲基化位点分析。

2 结果与分析

2.1 不同温度下 *DMRT* 基因的酶切结果

水温分别控制为 25、28、31℃,取黄鳊性腺、肾脏、肝脏、脾脏、肠等 5 个组织的基因组 DNA 用 *DMRT2* - FR2 引物扩增后,酶切组和未酶切组均有条带,表明 *DMRT2* - FR2 扩增序列中的位点均是甲基化的;用 *DMRT3* - FR2、*DMRT4* - FR2、*DMRT4* - FR3 引物扩增后,未酶切组有条带,酶切组没有出现条带,说明这 3 个扩增片段中的位点均是阴性结果。图 1 表示,水温为 28℃下黄鳊肝基因组用 *DMRT4* - FR2 引

物扩增后的酶切结果。表 3 表示不同温度下黄鳝各组织的甲基化统计结果。



温度 (℃)		甲基化结果			
		<i>DMRT2</i> - FR2	<i>DMRT3</i> - FR2	<i>DMRT4</i> - FR2	<i>DMRT4</i> - FR3
25	性腺	+	-	-	-
	肾	+	-	-	-
	肝	+	-	-	-
	脾	+	-	-	-
	肠	+	-	-	-
28	性腺	+	-	-	-
	肾	+	-	-	-
	肝	+	-	-	-
	脾	+	-	-	-
	肠	+	-	-	-
31	性腺	+	-	-	-
	肾	+	-	-	-
	肝	+	-	-	-
	脾	+	-	-	-
	肠	+	-	-	-

注：“+”表示甲基化，“-”表示去甲基化。下表同。

2.2 不同 pH 值下黄鳝各组织 *DMRT* 基因的酶切结果

水体 pH 值分别控制为 6.5、7.5、8.5 环境下,黄鳝性腺、肾脏、肝脏、脾脏、肠等 5 个组织的基因组 DNA 用 *DMRT3* - FR2 引物扩增后,酶切组和未酶切组均有条带,表明 *DMRT3* - FR2 扩增序列中的位点均出现阳性结果;用 *DMRT3* - FR2、*DMRT4* - FR2、*DMRT4* - FR3 引物扩增后,未酶切组有条带,而酶切组没有出现条带,说明这 3 个扩增片段中的位点均出现阴性结果。图 2 表示 pH 值为 6.5 条件下黄鳝性腺基因组用 *DMRT3* - FR2 引物扩增后的酶切结果。表 4 表示不同 pH 值下黄鳝各组织的甲基化统计结果。

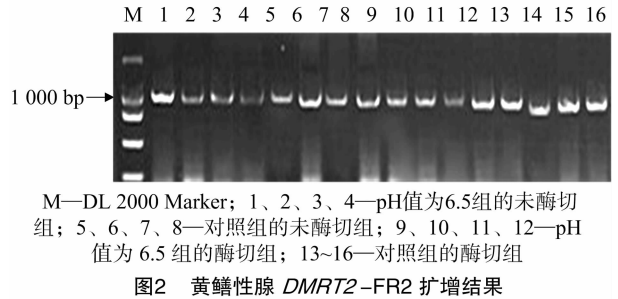
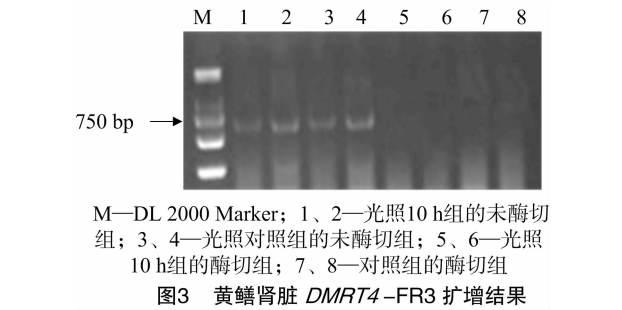


表 4 不同 pH 值下黄鳝各组织的甲基化分析

pH 值	组织	甲基化结果			
		<i>DMRT3</i> - FR2	<i>DMRT3</i> - FR2	<i>DMRT4</i> - FR2	<i>DMRT4</i> - FR3
6.5	性腺	+	-	-	-
	肾	+	-	-	-
	肝	+	-	-	-
	脾	+	-	-	-
	肠	+	-	-	-
7.5	性腺	+	-	-	-
	肾	+	-	-	-
	肝	+	-	-	-
	脾	+	-	-	-
	肠	+	-	-	-
8.5	性腺	+	-	-	-
	肾	+	-	-	-
	肝	+	-	-	-
	脾	+	-	-	-
	肠	+	-	-	-

2.3 不同光照周期下 *DMRT* 基因的酶切结果

养殖网箱每天光照时间控制在 8、10、12 h 环境下,黄鳝性腺、肾脏、肝脏、脾脏、肠等 5 个组织的基因组 DNA 用 *DMRT3* - FR2 引物扩增后,酶切组和未酶切组均有条带,表明 *DMRT3* - FR2 扩增序列中的位点均表现为阳性结果;用 *DMRT3* - FR2、*DMRT4* - FR2、*DMRT4* - FR3 引物扩增后,未酶切组有条带,酶切组没有出现条带,说明这 3 个扩增片段中的位点均变现为阴性结果。图 3 表示光照时间为 10 h 下黄鳝肾脏基因组用 *DMRT4* - FR3 引物扩增后的酶切结果,表 5 表示不同光照时间下黄鳝各组织的甲基化统计结果。



对比表 3、表 4、表 5 可以得出,不同生态因子条件下黄鳝各组织的 *DMRT* 基因酶切后的扩增结果是一致的, *DMRT3* - FR2 扩增序列中的位点均是甲基化的; *DMRT3* - FR2、*DMRT4* - FR2、*DMRT4* - FR3 的扩增序列中的位点均是去甲基化的。

3 结论与讨论

本试验将 PCR 引物设计在酶切位点的两侧, DNA 被酶切后,只有发生甲基化不被切割的 DNA 才能被 PCR 扩增,检测有条带,反之则无条带。结果表明,黄鳝性腺、肾、脾、肝、肠等 5 个组织在不同的光照周期、pH 值、温度下的甲基化状态是一致的, *DMRT3* - FR2 扩增序列中的位点均是甲基化的; *DMRT3* - FR2、*DMRT4* - FR2、*DMRT4* - FR3 扩增序列中的位点均是去甲基化的。本研究采用限制性内切酶结合 PCR 的方

表 5 不同光照时间下黄鳝各组织的甲基化分析

光照时间 (h)	组织	甲基化结果			
		DMRT3 - FR2	DMRT3 - FR2	DMRT4 - FR2	DMRT4 - FR3
8	性腺	+	-	-	-
	肾	+	-	-	-
	肝	+	-	-	-
	脾	+	-	-	-
	肠	+	-	-	-
10	性腺	+	-	-	-
	肾	+	-	-	-
	肝	+	-	-	-
	脾	+	-	-	-
	肠	+	-	-	-
12	性腺	+	-	-	-
	肾	+	-	-	-
	肝	+	-	-	-
	脾	+	-	-	-
	肠	+	-	-	-

法进行甲基化位点研究,具有简单、快捷的特点。覃扬等建立甲基化敏感的限制性内切酶结合半巢式降落 PCR 方法,研究 *PI6* 基因启动子区甲基化状态。结果表明,所采用的 *Hpa* II 酶切后半巢式 PCR 方法的特异性强,灵敏度达 100 fg,说明该试验方法简便、成本低廉,并且有高度的特异性与灵敏度,实际应用价值高<sup>[15]</sup>。

体细胞中大多数常染色体基因的 CpG 岛保持非甲基化状态,只有一小部分在正常组织和细胞中发生甲基化,表明甲基化位点在生物体内存在广泛,同时对基因的表达存在着一定的调节功能。Navarro - Martin 等研究发现,1 龄欧洲鲈鱼 (*Dicentrarchus labrax*) 的脑组织中, *cyp19a* 启动子甲基化程度不受性别和温度的调控;在性腺中, *cyp19a* 启动子甲基化程度雄鱼是雌鱼的 2 倍,但在高温下雌鱼 *cyp19a* 启动子甲基化程度有所增加;在脑和性腺中,管家基因  $\beta$  - *actin* 启动子的甲基化程度也与性别和温度无明显关系<sup>[9]</sup>。本试验结果与其相似。欧洲鲈鱼的性别受基因型和温度的双重控制,由于这种特殊的性控制机制,若在其性腺形成前改变温度,则可以影响其性别比例。 *cyp19a* 基因编码 *cyp19a* 芳香化酶,该酶的活性影响性激素比值。更重要的是在大多数变温脊椎动物中,环境温度控制性别比例均是通过调控 *cyp19a* 基因的表达量而实现的。Varriale 等研究对比了南极与热带鱼类机体甲基化程度,结果表明,南极鱼类甲基化程度明显高于热带鱼类,推测动物机体甲基化程度与体温呈负相关,但是,他们发现属于鰕虎鱼科鲂科和丽鲷科的鱼类机体甲基化程度与其体温呈正相关,即使是相同体温的鱼类,其机体甲基化程度也有明显差异,所以他们认为其他因子如水深、产地、驯化时间及新陈代谢率等都会对鱼类机体甲基化程度产生影响<sup>[14]</sup>。Jabbari 等研究也证明,除了体温外,存在甲基化的序列数量和基因片段长度也会影响动物机体甲基化程度<sup>[13]</sup>。Varriale 等研究结果表明,热带鱼类水温控制范围为 20 ~ 30 ℃,极地鱼类水温控制范围为 0 ~ 10 ℃,温差较本试验设置的温度梯度(25、28、31 ℃)差异大很多,可能导致结果<sup>[14]</sup>不一致。

甲基化作为 DNA 修饰的重要途径,是表观遗传学的重要组成部分,也成为目前的研究热点<sup>[16]</sup>。本试验所用方法可以快速检测多个基因的启动子甲基化状态,是其他方法无法达到的。但在试验过程中需要特别注意 *Hpa* II 酶切时要确保酶切完全,否则残余的微量未被 *Hpa* II 切开的未甲基化 5' - CCGG - 3' 就可能作为 PCR 反应的模版导致假阳性的出现。为了验证本试验建立的 *Hpa* II 限制性内切酶方法是否具有广泛的适用性,将进一步在更多的其他鱼类中进行确证应用,为该方法的推广应用提供丰富的科学依据。

参考文献:

[1] 赵庆凯, 邴旭文, 丁炜东. 中草药在促进黄鳝性腺发育中的应用前景[J]. 淮海工学院学报, 2014, 23(1): 86 - 91.

[2] Chan S T H, Phillips J G. The structure of the gonad during natural sex reversal in *Monopterus albus* [J]. Journal of Zoology, 1967, 151: 129 - 141.

[3] Kim S, Kettlwell J R, Anderson R C, et al. Sexually dimorphic expression of multiple double - sex - related genes in the embryonic mouse gonad[J]. Gene Expression Patterns, 2003, 3(1): 77 - 82.

[4] 周荣家. 参与发育的基因家族[J]. 遗传, 2001, 23(1): 86 - 88.

[5] Kondo M, Froschauer A, Kitano A. Molecular cloning and characterization of DMRT genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus* [J]. Gene, 2002, 295(2): 213 - 220.

[6] 王 佳, 罗 琛. 鲫 *DMRT3* 基因的克隆和表达分析[J]. 水生生物学报, 2014, 38(3): 549 - 555.

[7] 温海深, 林浩然. 环境因子对硬骨鱼类性腺发育成熟及其排卵和产卵的调控[J]. 应用生态学报, 2001, 12(1): 151 - 155.

[8] 阮国良, 龚道兰, 柯玉清, 等. 光照时间对黄鳝生长及性腺发育的影响[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(3): 656 - 658.

[9] Navarro - Martín L, Viñas J, Ribas L, et al. DNA methylation of the gonadal aromatase (*cyp19a*) promoter is involved in temperature - dependent sex ratio shifts in the European sea bass[J]. PLoS Genetics, 2011, 7(12): e1002447.

[10] Wolffe A P, Guschin D. Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription[J]. Struct Biol, 2000, 129(2/3): 102 - 122.

[11] Tycko B. Epigenetic gene silencing in cancer[J]. J Clin Invest, 2000, 105(4): 401 - 407.

[12] Monk M. Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution[J]. Developmental Genetics, 1995, 17(3): 188 - 197.

[13] Jabbari K, Cacciò S, Pais D P, et al. Evolutionary changes in *CpG* and methylation levels in the genome of vertebrates [J]. Gene, 1998, 205(1/2): 109 - 118.

[14] Varriale A, Bernardi G. DNA methylation and body temperature in fishes[J]. Gene, 2006, 385: 111 - 121.

[15] 蒋 磊, 覃 扬, 孙芝琳, 等. 限制性内切酶结合半巢式 PCR 法检测人肝癌 P16 抑癌基因启动子区甲基化研究[J]. 四川大学学报: 医学版, 2007, 38(1): 53 - 56.

[16] 罗国静, 郭 芳, 鞠志花, 等. 奶牛 *COL1A2* 基因启动子区甲基化与其基因表达及乳腺炎的相关性分析[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(3): 574 - 580.