

全基因组 DNA 甲基化图谱及其在动物遗传育种中的研究进展

赵敬贤 张路培 高会江 李俊雅 许尚忠 高雪

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: DNA 甲基化是真核生物表观遗传学重要的机制之一。近年来, 全基因组 DNA 甲基化在动植物遗传育种领域的研究引起了人们广泛的关注。访问大量基因或整个基因组的甲基化状态的能力将会大大促进对细胞中基因调控性质, 以及细胞和环境间相互作用的表观遗传机制的理解。从 DNA 甲基化图谱、DNA 甲基化图谱的构建、DNA 甲基化图谱及在动物上的研究进展等方面进行简要综述, 并对 DNA 甲基化图谱的前景进行简要探讨。

关键词: DNA 甲基化 图谱构建 全基因组 畜禽

Genome-wide DNA Methylation Profiles and Its Progresses in Genetics and Breeding of Animal

Zhao Jingxian Zhang Lupei Gao Huijiang Li Junya Xu Shangzhong Gao Xue

(Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

Abstract: DNA methylation is one of the important epigenetic mechanisms in eukaryotes. In recent years, more attention was paid upon genome-wide DNA methylation in plant and animal genetics and breeding. The ability to access the methylation status for a large number of genes or the entire genome should greatly facilitate the understanding of the nature of gene regulation in cells, and epigenetic mechanism of interactions between cells and environment. This paper summarized some important aspects of DNA methylation profiles, DNA methylation profiling technologies and the progresses of DNA methylation profiles including animal. Finally, prospect of DNA methylation profiles is given a brief discussion.

Key words: DNA methylation DNA methylation profiling Genome-wide Livestock and poultry

近年来, 表观遗传学已经成为分子生物学领域的研究热点之一。表观遗传行为是染色体区域(包括 DNA 序列和染色体)发生结构适应性改变, 从而记录、维持其不同的活性状态, 并将这种适应性改变作为信号进行传递, 进而调控不同的生理过程^[1]。DNA 甲基化作为表观遗传学的重要组成部分, 对其研究已深入到生物、医学及农业等各领域。但目前关于 DNA 甲基化的研究主要集中在医学领域, 尤其是癌症领域, 而在动物方面的研究较少。此外, 人们现多关注单基因 DNA 甲基化的研究, 而在全基因

组水平上的研究较少。因此, 研究全基因组 DNA 甲基化, 对于了解动物生命活动具有重要的生物学意义。我们主要从 DNA 甲基化图谱、DNA 甲基化图谱的构建技术、DNA 甲基化图谱在动物上的研究等方面, 简述近年来国内外关于全基因组 DNA 甲基化模式的相关研究与应用, DNA 甲基化图谱在动物遗传育种中的研究进展。

1 DNA 甲基化图谱

1.1 DNA 甲基化及特点

当前对表观遗传的研究主要集中在 DNA 甲基

收稿日期: 2013-03-01

基金项目: 农业部专项 (CARS-38), 转基因生物新品种重大专项 (2011ZX08007-2), 山东省农业良种工程农业生物资源创新利用研究

作者简介: 赵敬贤, 男, 硕士研究生, 研究方向: 动物分子遗传育种; E-mail: wulinzjx@sina.com

通讯作者: 高雪, 女, 副研究员, 研究方向: 动物分子遗传育种; E-mail: Gaoxue76@126.com

化。DNA 甲基化作为一种重要的表观遗传修饰^[2], 在细胞分化、胚胎发育、基因表达调节、染色质结构维持、X 染色体失活^[3] 和基因组印迹^[4] 等方面发挥着重要的作用。

DNA 甲基化是指在 DNA 甲基化转移酶(DNMT)作用下, 将 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)上的甲基基团共价结合到 DNA 分子胞嘧啶 C5 位, 形成 5-甲基胞嘧啶(5meC)的生化过程。DNMT 通过催化作用使 SAM 上的甲基转移到 CpG 胞嘧啶上^[5]。

大约 80% 的 CpG 发生甲基化, 并且发生甲基化的部位主要集中在染色体着丝粒重复区域和重复序列中^[6], 一般这些 CpG 位于一些小序列(0.5–5 kb 左右)中, 每 100 kb 出现一个^[7], 这些区域被称为 CpG 岛, 且通过进化来维持。从目前的研究来看, 在人类基因组中大约 50%–60% 基因与 CpG 岛相关^[8, 9]。脊椎动物的 DNA 甲基化通常有以下特点: 基因组内甲基化多数发生在胞嘧啶上, 形成 5mCpG^[10]; CpG 中 70% 的 C 是甲基化的, 而基因组中仅有 3% 的 C 发生甲基化; 理论上基因组内 G+C 含量约为 42%, 那么相邻的二核苷酸 CpG 含量应为 20%, 但实际上 CpG 含量只占该预测值的 1/5, 这是由于甲基化 C 容易脱氨基形成 U, 导致 CpG 含量越来越低^[11]; 大多数的 CpG 岛处于非甲基化状态^[12], 脊椎动物的组织特异性基因缺乏 CpG 岛, 而持家基因的启动子多含有处于非甲基化状态的 CpG 岛^[13]; 启动子区 CpG 异常甲基化会抑制基因转录, 而且基因转录活性与 CpG 甲基化一般呈负相关, 高密度 CpG 甲基化会完全抑制启动子转录。

1.2 DNA 甲基化图谱时代来临

虽然, 关于 DNA 甲基化的研究正快速发展, 但大部分资料都集中在对单基因甲基化的研究, 对于全基因组水平上 DNA 甲基化的研究尚处于初级阶段。DNA 甲基化图谱, 是指在不同的组织、疾病状态下, 5-甲基胞嘧啶出现及分布频率的图谱, 以系统研究 DNA 甲基化在胚胎发育、基因组印记、疾病发生及表观遗传中的重要作用^[14]。在真核生物中, 通常基因组中只有一小部分的潜在靶序列会发生甲基化, 标记的甲基分布可以通过标定的转录沉默或潜在转录的区域来表达表观遗传信息。划定区域

的 DNA 甲基化模式, 以及更广泛的 DNA 甲基化图谱, 对于理解基因组一些确定区域在特定背景下的表达和通过表观改变可能产生异常表达和疾病等问题原因, 具有重要的意义^[15]。2006 年年初公布的一项研究估计, 低于 0.1% 的人类基因组的 DNA 甲基化已经被详细分析^[16], 这项研究成果可进一步完善人类基因组注释, 能够进一步了解人类发育机制的本质, 因此具有重要而深远的实用价值。2006 年通过以免疫沉淀试验为基础的技术做出的第一个高分辨率的全基因组 DNA 甲基化图谱——拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)被报道^[17, 18]。虽然, 拟南芥只有约 20% 的哺乳动物基因组的大小, 但这一具有里程碑意义的事件证明了人类和几乎同样大的基因组的甲基化组现在触手可及。因此, DNA 甲基化图谱时代已经来临, 构建动植物 DNA 甲基化图谱已经具有非常重要的意义, 有助于人们更加深入地了解表观遗传。

2 DNA 甲基化图谱的构建方法

随着研究的深入不断出现新的 DNA 甲基化分析方法, 对于构建 DNA 甲基化图谱是从全基因组或接近全基因组甲基化入手, 主要可以分为基于限制性内切酶技术的凝胶方法、基于芯片平台和基于二代测序技术等 3 种方法。

2.1 以限制性内切酶为基础的凝胶技术

2.1.1 限制性标记染色组扫描(RLGS) 1991 年, Hatada 等^[19]应用 RLGS 方法用于印记基因的鉴定, 随后该方法被应用于检测全基因组 CpG 岛甲基化状态, 提供甲基化 C 的整体内容。这种方法是基于使用限制性内切酶的二维凝胶电泳技术。其技术过程是: (1) 用甲基敏感限制性内切酶 *Not* I 消化 DNA, 由于 *Not* I 识别 GCGGCCGC 序列, 并且消化过程中可以被重叠的 CpG 甲基化阻断, 因此保留了 CpG 岛的甲基化位点; (2) 用同位素进行末端标记后经甲基化不敏感酶, 如 *Eco*R V 切割, 进行一维电泳; (3) 用更高频的甲基化不敏感内切酶, 如 *Hinf* I 切割后进行二维电泳。得到的 RLGS 图谱与正常图谱进行比较, 得出的缺失条带即为可能发生甲基化的部位^[20], 因为甲基化部位被酶切割开, 在电泳时显示出条带。

这种方法的优势在于它不考虑 CpG 岛所结合的未知基因,该方法已经被应用分析不同类型肿瘤中甲基化模式的异同和寻找肿瘤内 DNA 甲基化新的印记基因。RLGS 方法的缺陷在于,它很难识别多态位点且只能在 CpG 岛分析甲基化。此外,RLGS 图谱分析时容易出现误读,不能完全确认是由于甲基还是由于序列中酶识别位点的缺失或 DNA 本身缺失导致片段的缺失,不易进行解释。

2.1.2 甲基敏感扩增片段多态性方法 (MSAP) MSAP 是动植物遗传育种中进行基因组 DNA 甲基化研究最为常用的一种方法。MSAP 技术是在扩增片段长度多态性 (AFLP) 技术基础上改进的^[21],是根据同裂酶 *HPa* II 和 *Msp* I 对 CCGG 序列甲基化程序敏感性的不同进行双酶切,可产生不同的 DNA 切割片段,扩增产物具有多态性。*HPa* II 酶不能识别两条链上 CCGG 位点胞嘧啶全部甲基化的酶切位点,而能识别一条链上胞嘧啶甲基化的酶切位点进行酶切;*Msp* I 酶可识别单双链上内部胞嘧啶甲基化,不识别外部胞嘧啶甲基化。通过比较电泳图谱中的条带差异,可以揭示出 CCGG 位点甲基化状态。

MSAP 法与其他检测方法相比敏感性强,操作简单,甲基位点明确,适用于没有任何信息的全基因组甲基化分析^[22]。现在 MSAP 法广泛应用于研究植物表型变异^[23]、克隆动物异常^[24]、杂种表现与甲基化的关系等^[25]。但 MSAP 法的局限性在于不能完成非 CCGG 位点的胞嘧啶甲基化。

2.2 基于芯片平台的DNA甲基化图谱构建技术

以限制性内切酶为基础的凝胶技术通量较小,难以达到全基因组高通量水平。而高通量筛选技术是研究全基因组水平 DNA 甲基化谱系的关键因素^[26]。芯片技术为 DNA 甲基化的高通量研究提供了一种新的方法。

2.2.1 珠阵列 (Illumina 公司) Illumina 公司开发的以珠阵列为基础的 DNA 甲基化分析是一个较显著的基因分型方法^[27],其目的是提供单碱基分辨率,虽然两个或两个以上密切隔开的胞嘧啶可能不得不得一起进行分析。Illumina 芯片前期处理采用的是亚硫酸盐处理,将甲基化的差异转变成碱基上的差异,然后利用两个位点特异的探针检测这些化学上

差异的位点,一个探针是为甲基化位点 (M 磁珠类型) 设计的,而另一个是为未甲基化位点 (U 磁珠类型) 设计的,结合后通过单碱基延伸掺入一个标记了的 ddNTP,通过计算甲基化位点和未甲基化位点掺入的荧光信号强度检测 DNA 甲基化程度。该项技术被称为 Infinium 技术,即单碱基延伸技术,包括 InfiniumI 和 InfiniumII。这种方法提供了比其他阵列更小的覆盖面,而且使一个大的选择性引物的开发和评估成为必需,从而限制了它用于从头基因组分析的实用性。这种技术的优点是它提供了对具体胞嘧啶的定量评估,可以并行处理许多样品。因此,这种方法较适合通过比较大量的细胞系或个体之间一组已知的甲基化位点以确定甲基化多态性^[15]。使用这种方法,通过一组甲基化标志物,可以从被诊断的正常组织中来区分肺癌样本^[28]。

2.2.2 短寡核苷酸芯片 (Affymetrix 公司) Affymetrix 基因芯片阵列是使用光刻技术通过每块芯片上数以百万计的探针来达到较高的功能密度^[29]。每个功能由 25 个碱基的寡核苷酸组成。这些短探头提供了良好的特异性,但是会遇到敏感性下降,并且与较长探针相比会增加随机信号变化 (噪声) 的问题^[30]。每个芯片被设计为“单通道”杂交,它们是在一个时间与一个样品杂交。用来比较的样品。例如,两个细胞系,每个样品被杂交到一个单独的阵列,将所得到的信号进行比较。一般来说,每个样品杂交至少 3 倍,通过数据的统计处理来识别显著的差异。对于甲基化分析,通过基因组不同部分或整个基因组上等距分布的探针的平铺设计是最有用的。平铺阵列是可用于人类、小鼠和拟南芥的基因组中,以及人类和小鼠的启动子。人脑组织中限制性酶富集的未被甲基化的 DNA 已经通过使用 Affymetrix 平铺阵列覆盖 21 和 22 号染色体得出分析结果^[16]。

2.2.3 长寡核苷酸芯片 (NimbleGen 公司和 Agilent 公司) Agilent 公司的每个甲基化芯片上集成有约 244 000 个 60 mer 的寡聚核苷酸探针^[31],芯片探针设计是以 100–300 bp 的平均间隔覆盖所有 UCSC 注释的 CpG 岛和 RefSeq 数据库中研究清楚的 17 000 个转录本。NimbleGen 公司的 CpG 岛芯片密度更高,达 389 000 个探针^[32]。

这两种公司的芯片都是双通道。两个样本,例

如免疫沉淀测试 DNA 和对照 DNA, 被不同的荧光染料标记, 并在单个芯片上杂交。整个技术过程为: (1) 将 DNA 用超声波打断成 400–500 bp 片段; (2) 将加热变性后的单链 DNA 样品分成两份, 其中一份样品加入 5'-甲基胞嘧啶核苷的抗体, 富集 DNA 甲基化片段, 而样品中非甲基化片段被洗脱, 这样就得到了纯化的免疫共沉淀 DNA (MeDIP) 片段; (3) 可对 MeDIP 样品与 Input 样品进行扩增, 将 MeDIP (Cy5) 样品与 Input (Cy3) 样品分别进行荧光标记; (4) 将标记后的 MeDIP 样品与 Input 样品混合、变性, 然后与 DNA 微阵列芯片杂交, 通过高解析度芯片扫描仪检测杂交信号, 得到杂交结果, 对杂交结果进行数据提取、标准化、峰值分析, 得到高灵敏度、高特异性、高重复性的结果, 灵活进行甲基化研究。

2.3 基于二代测序的DNA甲基化图谱构建技术

2.3.1 全基因组重亚硫酸盐测序 (whole genome bisulfite sequencing) 提到基于二代测序平台的全基因组研究, 首先想到的必然是“金标准”BS-seq, 即全基因组重亚硫酸盐测序 (whole genome bisulfite sequencing)。Frommer 等^[33]提出了 BS-seq 方法。该方法的原理是前期用 Bisulfite 处理, 将基因组中未甲基化的 C 脱氨基转换成 U, 而甲基化的 C 保持不变; 然后设计引物 PCR 扩增后 U 变成 T, 与原本具有甲基化修饰的 C 区分开来, 再结合高通量测序技术, 与未经处理的序列进行比较, 判断 CpG 位点是否发生甲基化^[34]。该方法特别适用于绘制单碱基分辨率的全基因组 DNA 甲基化图谱, 能明确每一个 CpG 位点的甲基化状态, 精确度及可靠性很高, 但需要大量的克隆测序。因此, 有过程繁琐, 价格昂贵^[35]的缺陷。最近, 亚硫酸氢盐测序已被改编为焦磷酸测序, 这是基于定量、实时测序的合成^[36]。在这种方法中, 基因多态性, 如单核苷酸多态性 (SNPs) 和表观遗传多态性, 如甲基化变异位点 (MVP) 在一个单一的检测中进行分析。

2.3.2 减少表达的亚硫酸盐测序 (RRBS) 而 RRBS 则是基于酶切原理。2005 年, Meissner 等^[37]首次提出该方法。该方法前期用 *Msp* I 酶切, 通过大小选择和接头添加后, 非甲基化的 C 被亚硫酸盐转化为 U, 亚硫酸盐转化后的 DNA 两条单链不再互补,

转换接头序列的特异性引物被用于合成第二条链和 PCR 扩增, 钝端 PCR 产物克隆到质粒载体中并测序, 最终用较小的数据量得到包含最多 CpG 位点甲基化信息的单碱基精度的甲基化图谱。这种方法确保对多种细胞类型中一个大的基因组中确定的片段 (约 5 Mb) 的比较分析不需要再进行有针对性的扩增, 使其比定向 PCR 的方法更加有效。RRBS 已被成功地用来分析小鼠胚胎干细胞系 DNA 甲基转移酶 DNMT1, Dnmt3a 和 Dnmt3b 的基因敲除前和基因敲除后的状态, 并为这些关键酶催化 DNA 甲基化提供了新的见解。

2.3.3 甲基免疫共沉淀测序 (MeDIP-seq) MeDIP-seq 是基于抗体富集原理进行测序的全基因组甲基化检测技术。采用甲基免疫共沉淀技术, 通过 5'-甲基胞嘧啶抗体特异性富集基因组上的 DNA 甲基化片段, 可以利用高通量测序技术在全基因组水平上对 CpG 富集的高甲基化区域进行高精度的研究。其基本程序是: 提取全基因组 DNA, 用超声波打断成 400–500 bp 的片段; 将加热变性的单链 DNA 样品平均分为两份; 一份加入 DNA 甲基化特异性抗体; 另一份作为 Total input DNA 样品。使用亲和层析分离上一步样品中得到的富集的 DNA 甲基化片段的抗体复合物, 样品中的非甲基化片段被洗脱, 纯化得到的 DNA 甲基化片段, 然后进行高通量测序。该方法优点在于精度高, 覆盖广, 性价比高, 但是不足之处就是不能精确到单碱基分辨率, 只能知道一段区域的甲基化程度。

3 DNA 甲基化图谱在动物遗传育种中的研究

对于 DNA 甲基化图谱的研究显然正蓬勃发展。截至目前, 一些物种的全基因组 DNA 甲基化图谱已经被报道。Xu 等^[38]利用 MSAP 检测了鸡不同组织的甲基化图谱, 找到了 Tis-18 和 Tis-22 两个组织特异性甲基化片段。Li 等^[39]绘制了中国人外周血单核细胞的全基因组 DNA 甲基化图谱 (炎黄计划) 发现, 68.4% 的 CpG 位点甲基化, 而只有 <0.2% 非 CpG 位点发生甲基化; 找到了等位特异甲基化区和组织特异的 DMR。Xiang 等^[40]绘制了家蚕的全基因组甲基化图谱, 这是首张昆虫的甲基化图谱, 研究发现家蚕基因组 0.11% C 甲基化, 主要在 CpG 区;

甲基化 CG 富集在 gene 区,与表达正相关,昆虫甲基化水平较低。Li 等^[41]利用 MeDIP-seq 技术测定了鸡甲基化修饰状态,绘制了第一个鸟类的全基因组甲基化图谱,研究发现,大部分 CpG 岛表现出非甲基化状态,启动子区域的甲基化与基因表达水平密切相关。Li 等^[42]研究 DNA 甲基化与肥胖的关系,利用 3 个品种的猪绘制了猪的全基因组甲基化图谱,分析不同性别品种组织的甲基化分布及差异,同时研究发现不同甲基化区域能够抑制一些已知的肥胖基因和新基因的表达。

牛羊等动物 DNA 甲基化上的研究主要集中在克隆、胚胎方向上特定定位点、特定区域、特定基因等甲基化的研究。如 Joao 等^[43]研究发现体外培养和体细胞核移植,会通过改变 SNRPN 基因位点甲基化水平导致该基因印记异常重编程,增加了死亡率。Liu 等^[44]研究了牛 DNA 甲基转移酶 3B (DNMT3B)与牛肉品质间的关系,从 6 个新的 SNPs 中选择了 3 个进行基因分型和与 16 个肉质性状可能关联的分析表明, DNMT3B 是牛肉品质性状的一个决定因素。Liu 等^[45]通过探求转基因克隆牛的死亡是否与其胎盘中印迹基因的甲基化水平相关发现, PEG10 基因在早期流产克隆牛胎儿的皮肤组织中表现异常的 DNA 甲基化水平。Liu 等^[46]研究了 DAZL 基因 mRNA 表达水平和甲基化水平发现,其甲基化和 mRNA 表达水平呈显著负相关, DAZL 基因的甲基化对该基因的转录调控起着重要的作用,或许对牦牛精子生成和男性不育的严重的影响。Vanselow 等^[47]研究了羊中 DNA 甲基化对胎盘生长分化起重要作用的 CYP19 的调节,结果发现在绵羊和牛胎儿与母体胎盘组织中 CYP19 启动子表现出差异甲基化,同时 DNA 甲基化可能参与 CYP19 的表达调控。Colosimo 等^[48]研究了羊 5 个印迹基因 (H19、IGF2R、DLK1、DIO3 和 BEGAIN) 在成熟精子和卵泡不同生长阶段雌配子的甲基化状态发现,不同基因在不同配子不同时期表现出不同的甲基化水平,且只有 H19 和 IGF2R 可能表现出绵羊生殖细胞的 DMR。由此可见,如牛羊等一些物种在全基因组水平 DNA 甲基化的研究,暂时处于空白阶段。因此在全基因组表观遗传快速发展的时代,对动物开展全基因组 DNA 甲基化研究,结合高通量平台,构建

DNA 甲基化图谱,有助于我们更加全面深入地了解动物的甲基化模式和表观基因调控,对动物遗传育种工作具有十分深远的意义。

4 结语

作为表观遗传学的重要机制, DNA 甲基化不仅对基因的表达具有调控作用,而且这种调控作用可以在世代间稳定遗传。因此, DNA 甲基化是一条将表型和基因型联系起来的纽带,是一种高于基因组序列水平的表达调控机制。随着表观遗传的快速发展,全球 DNA 甲基化图谱时代已逐步来临,对甲基化组的研究正成为在新兴系统中探索和更好地理解基因功能的另一种重要的工具。许多研究已经提供了一些物种甲基化组和表观组的高度动态景象图,期望未来能够绘制出诸如牛羊等越来越多物种的 DNA 甲基化图谱,帮助人们进一步理解各物种的甲基化模式,从而促进表观遗传学全面深入的发展。

参考文献

- [1] Bird AP. Perceptions of epigenetics [J]. Nature, 2007, 447 (7143): 396-398.
- [2] Dahl C, Guldberg P. DNA methylation analysis techniques [J]. Biogerontology, 2003, 4 (4): 233-250.
- [3] Courtier B, Heard E, Avner P. Xce haplotypes show modified methylation in a region of the active X chromosome lying 3 to Xist [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92 (8): 3531-3535.
- [4] Thorvaldsen JL, Duran KL, Bartolomei MS. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2 [J]. Genes Dev, 1998, 12 (23): 3693-3702.
- [5] Clark SJ, Harrison J, Frommer M. CPNpG methylation in mammalian cells [J]. Nat Genet, 1995, 10 (1): 20-27.
- [6] Robert MF, Morin S, Beaulieu N, et al. DNMT1 is required to maintain CPG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells [J]. Nat Genet, 2003, 33 (1): 61-65.
- [7] Zinn RL, Pruitt K, Eguehi S, et al. hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site [J]. Cancer Research, 2007, 67 (1): 194-201.
- [8] Benhattar J, Clement G. Methylation-sensitive single-strand

- conformation analysis : a rapid method to screen for and analyze DNA methylation [J] . *Methods Mol Biol*, 2004, 287 : 181-193.
- [9] Ando Y, Hayashizaki Y. Restriction landmark genomic scanning [J] . *Nat Protoc*, 2006, 1 (6) : 2774-2783.
- [10] Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA [J] . *Nucleic Acids Res*, 1980, 8 (7) : 1499-1504.
- [11] 徐青, 余云舟, 赵萌, 孙东晓. DNA 甲基化在动植物遗传育种中的研究进展 [J] . *生物技术通讯*, 2011, 21 (1) : 113-117.
- [12] Bird A. Methylation talk between histones and DNA [J] . *Science*, 2001, 294 (5549) : 2113-2115.
- [13] 宫时玉, 蒋曹德, 邓昌彦. DNA 甲基化及其生物学功能 [J] . *华中农业大学学报*, 2005, 6 (24) : 651-657.
- [14] Brena RM, Huang TH, Plass C. Toward a human epigenome [J] . *Nat Genet*, 2006, 38 (12) : 1359-1360.
- [15] Laird PW. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis [J] . *Nat Genet*, 2010, 11 (3) : 191-203.
- [16] Schumacher A, Kapranov P, Kaminsky Z, et al. Microarray-based DNA methylation profiling : technology and applications [J] . *Nucleic Acids Res*, 2006, 34 (2) : 528-542.
- [17] Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis* [J] . *Cell*, 2006, 126 (6) : 1189-1201.
- [18] Zilberman D, Gehring M, Tran RK, et al. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription [J] . *Nat Genet*, 2006, 39 (1) : 61-69.
- [19] Hatada I, Hayashizaki Y, Hirotsune S, et al. A genomic scanning method for higher organisms using restriction sites as landmarks [J] . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88 (21) : 9523-9527.
- [20] 武立鹏, 朱卫国. DNA 甲基化的生物学应用及检测方法进展 [J] . *中国检验医学杂志*, 2004, 27 (7) : 468-474.
- [21] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting [J] . *Nucleic Acids Res*, 1995, 23 (21) : 4407-4414.
- [22] Xu M, Li X, Korban S. AFLP-based detection of DNA methylation [J] . *Plant Mol Biol Rep*, 2000, 18 (4) : 361-368.
- [23] Labra M, Grassi F, Imazio S, et al. Genetic and DNA-methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* [J] . *Chemosphere*, 2004, 54 (8) : 1049-1058.
- [24] de Montera B, Boulanger L, Taourit S, et al. Genetic identity of clones and methods to explore DNA [J] . *Cloning Stem Cells*, 2004, 6 (2) : 133-139.
- [25] Shaked H, Kashkush K, Ozkan H, et al. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat [J] . *Plant Cell*, 2001, 13 (8) : 1749-1759.
- [26] Hayashi H, Nagae G, Tsutsumi S, et al. High-resolution mapping of DNA methylation in human genome using oligonucleotide tiling array [J] . *Hum Genet*, 2007, 120 (5) : 701-711.
- [27] Bibikova M, Chudin E, Wu B, et al. Human embryonic stem cells have a unique epigenetic signature [J] . *Genome Res*, 2006, 16 (9) : 1075-1083.
- [28] Bibikova M, Lin Z, Zhou L, et al. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays [J] . *Genome Res*, 2006, 16 (3) : 383-393.
- [29] Dalma-Weiszhausz DD, Warrington J, Tanimoto EY, et al. The affymetrix GeneChip platform : an overview [J] . *Methods Enzymol*, 2006, 410 : 3-28.
- [30] Kreil DP, Russell RR, Russell S. Microarray oligonucleotide probes [J] . *Methods Enzymol*, 2006, 410 : 73-98.
- [31] Wolber PK, Collins PJ, Lucas AB, et al. The Agilent in situ-synthesized microarray platform [J] . *Methods Enzymol*, 2006, 410 : 28-57.
- [32] Lippman Z, Gendrel AV, Colot V, et al. Profiling DNA methylation patterns using genomic tiling microarrays [J] . *Nature Methods*, 2005, 2 (3) : 219-224.
- [33] Frommer M, McDonald LE, Millar DS, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands [J] . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89 (5) : 1827-1831.
- [34] Beck S, Rakyen VK. The methylome : approaches for global DNA methylation profiling [J] . *Trends Genet*, 2008, 24 (5) : 231-237.
- [35] 朱燕. DNA 的甲基化分析与状态检测 [J] . *现代预防医学*, 2005, 32 (9) : 1070-1073.
- [36] Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing [J] . *Nat Protoc*, 2007, 2 (9) : 2265-2275.

- [37] Meissner A, Gnirke A, Bell GW, et al. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis [J] . Nucleic Acids Res, 2005, 33 (18) : 5868-5877.
- [38] Xu Q, Zhang Y, Sun DX. Analysis of DNA methylation in different chicken tissues with MSAP [J] . Yi Chuan, 2011, 33 (6) : 620-626.
- [39] Li Y, Zhu J, Tian G, et al. The DNA methylome of human peripheral blood mononuclear cells [J] . PLoS Biol, 2010, 8 (11) : e1000533.
- [40] Xiang H, Zhu J, Chen Q, et al. Single base-resolution methylome of the silkworm reveals a sparse epigenomic map [J] . Nat Biotechnol, 2011, 28 (5) : 516-520.
- [41] Li Q, Li N, Hu X, et al. Genome-wide mapping of DNA methylation in chicken [J] . PLoS One, 2011, 6 (5) : e19428.
- [42] Li M, Wu H, Luo Z, et al. An atlas of DNA methylomes in porcine adipose and muscle tissues [J] . Nat Commun, 2012, 5 (3) : 850.
- [43] Suzuki J Jr, Therrien J, Filion F, et al. *In vitro* culture and somatic cell nuclear transfer affect imprinting of SNRPN gene in pre- and post-implantation stages of development in cattle [J] . BMC Dev Biol, 2009, 9 : 9.
- [44] Liu X, Guo XY, Xu XZ, et al. Novel single nucleotide polymorphisms of the bovine methyltransferase 3b gene and their association with meat quality traits in beef cattle [J] . Genet Mol Res, 2012, 11 (3) : 2569-2577.
- [45] Liu JH, Yin S, Xiong B, et al. Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones [J] . Mol Reprod Dev, 2008, 75 (4) : 598-607.
- [46] Liu Z, Li Q, Pan Z, et al. Comparative analysis on mRNA expression level and methylation status of DAZL gene between cattle-yaks and their parents [J] . Anim Reprod Sci, 2011, 126 (3-4) : 258-264.
- [47] Vanselow J, Selimyan R, Furbass R. DNA methylation of placenta-specific Cyp19 promoters of cattle and sheep [J] . Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2008, 116 (7) : 437-442.
- [48] Colosimo A, Di Rocco G, Curini V, et al. Characterization of the methylation status of five imprinted genes in sheep gametes [J] . Anim Genet, 2009, 40 (6) : 900-908.

(责任编辑 狄艳红)