

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.12.044

· 专论与综述 ·

表观遗传学及其研究方法*

朱 锋 王 旭 刘倩莹 陆启荣 黄德玉 刘振利 戴梦红[△] 袁宗辉[△]

(华中农业大学, 国家兽药残留基准实验室(HZAU)/ 农业部食品安全评价重点开放实验室 湖北 武汉 430070)

摘要:表观遗传学是一门重要的生命学科, 主要包括 DNA 的甲基化、组蛋白修饰以及非编码 RNA 等内容, 其中任何一方面的表观遗传学变化对生物体的生命过程都有重要的影响。近年来随着生命科学的快速发展, 表观遗传学越来越受到人们的关注, 各种先进科技的应用也使得表观遗传学实验技术得到快速的发展。本文对 DNA 甲基化、组蛋白修饰及非编码 RNA 的基本内容及实验方法进行了综述, 并对不同的研究方法进行分析, 有利于表观遗传学的深入研究。

关键词:表观遗传学; DNA 甲基化; 组蛋白修饰; 非编码 RNA

中图分类号:Q34 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)12-2371-06

Epigenetics and Its Research Methods*

ZHU Feng, WANG Xu, LIU Qian-ying, LU Qi-rong, HUANG De-yu, LIU Zhen-li, DAI Meng-hong[△], YUAN Zong-hui[△]

(National Reference Laboratory of Veterinary Drug Residues (HZAU) and MAO Key Laboratory for Detection of Veterinary Drug Residues, MOA Laboratory for Risk Assessment of Quality and Safety of Livestock and Poultry Products, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, 430070, China)

ABSTRACT: Epigenetics is an important discipline of life, mainly including DNA methylation, histone modification, non-coding RNA and some other changes. Any changes of epigenetics will have an important impact on the development of body. With the rapid development of life science, epigenetics has got more and more attention and epigenetics has a rapid development with the various applications of advanced technologies in recent years. Methods of experiment and the basic content of DNA methylation, histone modification and non-coding RNA are summarized, and different ways of study on epigenetics are analyzed in this paper. And it is good for the deep research of epigenetics.

Key words: Epigenetics; DNA methylation; Histone modification; Non-coding RNA

Chinese Library Classification(CLC): Q34 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)12-2371-06

前言

蛋白质是生命的物质基础, 人们一直都认为基因决定生命过程中所需要的各种蛋白质, 最后影响机体表现型的变化。近年来的研究表明, 基因可以在 DNA 序列不变的条件下游发生可稳定遗传的变化, 这种变化称为表观遗传变异^[1], 这一变化主要是指 DNA 甲基化, 组蛋白修饰及非编码 RNA 等遗传物质的修饰, 如一对同卵双胞胎, 具有相同的遗传物质, 但是机体后天的表现却仍然有不相同的地方, 其主要原因是后天的环境引起了表观遗传信息的变化。1939 年生物学家 Waddington 首先提出表观遗传学这一术语, 并把其描述为从基因型到表型的一种调控机制^[2]。经过多年的研究发现, DNA 可以编码遗传信息并为其提供必要的模板, 而表观遗传学信息则决定在适当的时间、地点和方式去应用遗传信息的指令^[3]。由此可见, 生物体是由遗传信息和表观遗传学信息共同作用的结果。

目前对于表观遗传学方面的研究主要集中于 DNA 甲基化、组蛋白修饰和非编码 RNA。如图 1 所示, DNA 甲基化和组蛋白修饰主要影响染色质的结构进而影响基因的转录功能, 而非编码 RNA 的变化则会对 mRNA 翻译成蛋白质产生重要的影响, 由 mRNA 翻译成的蛋白质又会反过来调节 DNA 甲基化, 组蛋白修饰及非编码 RNA 的形成过程, 最终引起生物体表型的变化。这些表观遗传学变化之间相互关联, 任何一方面发生异常都将对基因的表达及生物体的性状产生重要影响。此外, 本文还总结了主要的表观遗传学研究方法, 并对不同的方法进行了简要分析, 以期对表观遗传学的深入研究提供参考。

1 DNA 甲基化及其研究方法

1.1 DNA 甲基化

如图 2 所示, DNA 甲基化是指脊椎动物在 DNA 甲基转移酶(DNMTs)的催化作用下, 将 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)中的甲

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31272614)

作者简介: 朱锋, 硕士研究生, 研究方向: 兽医药理与毒理, 电话: 13237129912, E-mail: zhufeng1991@webmail.hzau.edu.cn

[△] 通讯作者: 袁宗辉, 博士, 教授, 研究方向: 兽医药理与毒理, E-mail: yuan5802@mail.hzau.edu.cn;

戴梦红, 博士, 副教授, 研究方向: 兽医药理与毒理, E-mail: daimenghong@aliyun.com

(收稿日期: 2016-07-13 接受日期: 2016-08-05)

基转移到胞嘧啶的五位,形成 5-甲基胞嘧啶^[4]。研究发现,DNA 甲基化绝大多数位于对称的 CpG 二核苷酸,其中人类基因组中 70%~80%的 CpG 二核苷酸中的胞嘧啶处于甲基化状态^[5]。而非甲基化的 CpG 则呈现局部聚集,形成 C、G 含量较高的区域,即 CpG 岛^[6],并且 CpG 岛多位于启动子区。一般来说,胞嘧啶的甲基化能抑制基因的表达,位于启动子区的胞嘧啶的高甲基化能使基因沉默,位于基因内部的胞嘧啶甲基化则与基因的

表达存在着弱的负相关。目前研究发现催化 DNA 链上的胞嘧啶甲基化反应的酶主要有四种:DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 和 DNMT3L(如图 2 所示)。其中 DNMT1 主要是催化甲基转移到胞嘧啶的五位, DNMT3A 和 DNMT3B 主要是催化这一反应的发生, DNMT3L 主要是负责调节其他甲基转移酶的活性^[7]。DNA 甲基化的发生是一个复杂的过程, 每一个环节都有可能对 DNA 甲基化的形成产生影响。

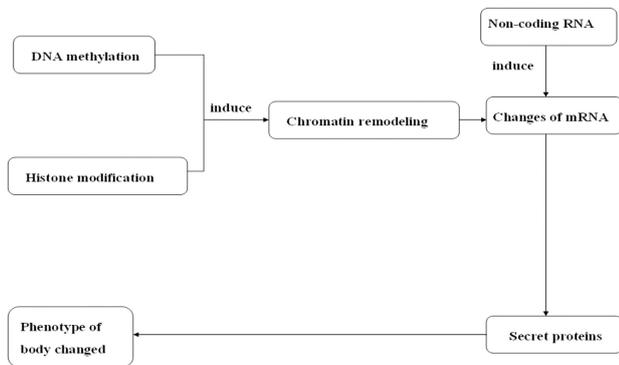


图 1 表观遗传学变化与机体生长发育的关系

Fig. 1 Relationship between changes of epigenetics and development of body

随着研究的深入,人们发现 DNA 甲基化在调控基因表达的同时也受外源化合物的影响。2014 年, Breton 等发现孕妇吸烟会影响幼年时期孩子 DNA 中的 CpG 岛 (DNA 链上一段富含 C、G 的区域)的甲基化水平^[8]。同一年, Broberg 等发现早期的孕妇经常暴露在有毒的环境中会改变脐带血全基因组范围的 DNA 甲基化水平,特别是男孩^[9]。还有研究发现将小鼠胚胎暴露于咖啡因的环境下,可以通过 A1 腺苷酸受体改变成年小鼠的心脏功能和 DNA 甲基化水平^[10],将小鼠暴露于苯并芘可以引起血液和肝脏中基因组甲基化水平的降低^[11]。研究 DNA 甲基化发生的原因,了解其形成过程,尝试使用外源物质对其形成过程进行调节,将会对机体的生长发育产生重要的影响,也可为药物及其他产品的研究开发提供帮助。

1.2 DNA 甲基化研究方法

关于 DNA 甲基化的研究方法主要分为两类:一类是基因组整体水平的甲基化分析方法,主要包括高效液相色谱及其相关方法、MSAP (甲基化敏感扩增多态性) 检测方法、MeDIP (DNA 甲基化免疫共沉淀) 实验及甲基化芯片技术;另一类是特异位点的 DNA 甲基化分析方法,主要包括用重亚硫酸氢盐处理并测序的方法、结合亚硫酸氢钠处理和酶解分析法、甲基化敏感性单核苷酸扩增、甲基化敏感性高分辨率扩增及甲基化荧光 PCR 等方法。这些方法一般都是基于胞嘧啶在重亚硫酸盐的处理下变为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶则不发生这一变化这一原理,这一原理也被称之为 DNA 甲基化分析的金标准。

1.2.1 基因整体水平的甲基化分析方法 在基因整体水平的甲基化分析中,2011 年 Armstrong 等^[12]用少量的 DNA 样品通过 HPLC 进行全基因组甲基化检测,主要过程是将 DNA 样品水解成单个碱基,然后将水解产物通过色谱柱,将此结果和用标准品得到的结果进行比较,测紫外光吸收值,计算 5 mC 与(5

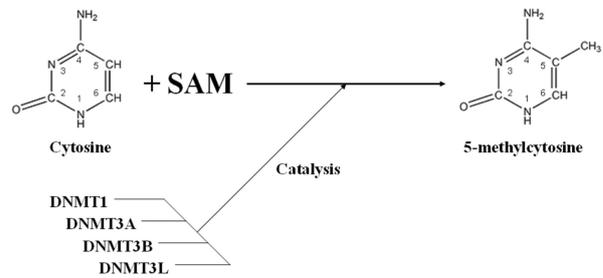


图 2 5-甲基胞嘧啶的形成过程

Fig. 2 The process of producing 5-mC

mC+5C)比值的积分面积得到整体基因组的甲基化水平。随着一种结合二代测序,具有覆盖范围广、分辨率高、经济及快速的 MeDIP 实验^[13]的出现,基因整体水平甲基化的研究变得更加方便,其主要过程是富集 DNA、进行纯化、与 5mC 进行结合、然后进行高通量测序,如今通过 nano-MeDIP-seq 法可以检测纳克级别浓度的 DNA^[14],提高了检测 DNA 甲基化的灵敏度。

Butcher 等在 MeDIP 的基础上进行改进,发明出了 AutoMeDIP-seq 法,使结果更加可靠^[15]。利用芯片技术进行检测是目前最可靠也是应用最为广泛的一种检测手段,目前有甲基化特异寡核苷酸芯片法(MSO)和差异甲基化杂交法(DMH)两种甲基化芯片分析法。MSO 是一种用亚硫酸氢钠处理后直接杂交的方法,这种方法主要是针对已知的个别基因,DMH 法是基于 CpG 岛文库建立的,和表达谱芯片类似,为 CpG 岛甲基化检测提供了高通量的技术平台。在基因芯片的基础上又衍生出了一些方法,如用甲基化依赖性限制性内切酶、对甲基化敏感性不同的同裂酶处理 DNA 样品,使用甲基化敏感性内切酶结合芯片技术^[16],及用 5mC 抗体或甲基化结合蛋白免疫沉淀并富集甲基化片段的方法^[17]。随着新技术的不断发展,研究全基因组 DNA 甲基化的技术将越来越多,在表 1 中对目前研究全基因组 DNA 甲基化常用方法的利与弊进行了总结。

1.2.2 特异位点的甲基化分析方法 特异位点的甲基化分析也是基于亚硫酸氢盐处理的一类方法,如甲基化特异性 PCR 法:用亚硫酸氢盐处理目的 DNA 片段,设计特异性引物进行 PCR 扩增,然后通过琼脂糖凝胶电泳确定 DNA 序列的甲基化状态^[18];甲基化荧光 PCR 检测:DNA 经亚硫酸盐处理后,设计与待测 DNA 片段互补的探针,在探针的 5' 末端、3' 末端分别标记上荧光报告基因和荧光淬灭基因,对于能与探针杂交的 DNA 片段,在 PCR 引物延伸时 Taq 酶发挥 5'~3' 外切酶的活性,将探针切碎,标记基团分离,释放可被检测的荧光信号,荧光强度代表甲基化水平^[19];甲基化敏感的单核苷酸的扩增法:把基因组的 DNA 经重亚硫酸氢盐处理后进行 PCR,设计引物并在反应体系中加入引物和用同位素标记的 dCTP 或 dTTP 及

表 1 常用的基因组 DNA 甲基化研究方法的优缺点

Table 1 Advantages and disadvantages of commonly used research methods on study DNA methylation in genome

Methods	Advantages	Disadvantages
HPLC	High sensitive, fast and cost properly	It will loss some C and 5mC in the process of hydrolyzing DNA and influence the accuracy of assay and need a large amount of DNA with good quality
MSAP	We needn't know information of DNA sequence, it can be commonly used in different species and easy to operate	It Just can predict DNA methylation in sites of CCGG and has some limitations
MeDIP assay	Results are accurate	It needs antibody and high-throughput sequencing, and cost expensive
DNA methylation microassays	Genes of DNA methylation can be found	Cost expensive and can not find all genes of DNA methylation in genome, and we can also not find all sites of DNA methylation in genome

Taq 酶等,若待测位点发生甲基化,则被同位素标记的 dCTP 会在反应中连接至引物末端,若待测位点未发生甲基化,则被同位素标记的 dCTP 可参与反应,在经电泳分离和放射活性测定可得出 C/T 值,即为甲基化与非甲基化的比值,然后据此可分析甲基化情况^[20];甲基化敏感性高分辨率溶解:DNA 模板在重亚硫酸氢盐处理后进行 PCR,由于甲基化的 CpG 岛中 GC 含量发生变化,从而导致溶解曲线 Tm 值出现差异,CpG 位点的相对位置也会对溶解峰的形状产生影响,据此可以检测出甲基化位点和甲基化程度^[21];结合亚硫酸氢钠处理和酶解分析法:经亚硫酸氢钠处理的 DNA,若胞嘧啶发生甲基化,则 PCR 扩

增后得到 TGTG,BstUI 不识别此位点,不能进行切割,若胞嘧啶发生甲基化,则 BstUI 能识别此位点并进行切割,然后将酶切产物进行分离、杂交、定量并分析甲基化比例^[22]。

对目前常用的特异位点 DNA 甲基化研究方法进行总结,见表 2。目前多数研究者都倾向于对特定位点的 DNA 片段用重亚硫酸盐处理,然后进行 PCR,测序,最后分析结果,如 Mishima C 等通过这一方法发现基因 TRIM9 启动子区域的甲基化可以作为检测乳腺癌病人体内循环肿瘤 DNA 的标志^[23]。这一方法虽然价格昂贵,但得到的结果准确、可靠。当然也有研究者会选择使用 Chip-Seq 等结合二代测序的新技术、新方法。

表 2 常用的特异位点 DNA 甲基化研究方法的优缺点

Table 2 Advantages and disadvantages of commonly used research methods on study DNA methylation in specifical sites

Methods	Advantages	Disadvantages
MSP (Methylation-specific PCR)	It's easy to operate the experiment and can analyse any DNA methylation loci in CpG	It's difficult to get proper primers and easy to get results with false positive, and we also need to know the sequence of DNA
Methylight PCR	Highly sensitive, and we can do a quick analysis of the diverse species and multi-gene loci	High cost, and need to use probes labeled with fluorescein in two ends of gene and a pair of primers, and vulnerable to other factors
Ms-SNuPE (Methylation-sensitive single-nucleotide primer extension)	We can detect uneven distribution of methylation sites with only a small amount of the sample	It's complex to operate the experiment and need to design more primers for detecting different methylation loci
MS-HRM (Methylation-sensitive High Resolution Melt)	High sensitivity, and it can be used to distinguish a single base	Resolution of temperature is demanded
COBRA (Combined bisulfite restriction analysis)	It can get a quantitative analysis of DNA methylation	It's no sensitive as MSP to analyse DNA methylation in samples with a small amount of DNA methylation
Bisulfite sequencing	High reliability and precision	It requires a lot sequencing and has a tedious process
Pyrosequencing	It can do a quick quantitative analysis of DNA methylation in one or more loci and it's gold standard for studying DNA methylation in specifical sites	It's easy to get results with false positive if you can not deal with samples well

2 组蛋白修饰及其研究方法

2.1 组蛋白修饰

组蛋白是真核生物染色质的重要组成成分,是由两分子 H2A、H2B、H3 和 H4 组成的一个八聚体的球状结构,组蛋白亚

基的氨基端游离出来。游离出来的氨基端尾巴上的许多残基能够发生共价修饰,不同的修饰有可能发生在不同的位点,形成许多不同的信号,类似于密码,修饰后的组蛋白与其他蛋白相互作用进而影响基因表达,被称之为“组蛋白密码”学说^[24]。常见的组蛋白修饰类型有组蛋白甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化

等。其中组蛋白乙酰化比较重要,主要发生于赖氨酸,用来激活基因转录;组蛋白甲基化主要发生于赖氨酸及精氨酸,能够调节染色质结构及细胞生长和增值;组蛋白磷酸化主要发生于丝氨酸,在 DNA 损伤修复及细胞分裂和细胞凋亡中起作用;组蛋白泛素化在赖氨酸上较为常见,主要是引起基因沉默^[25]。组蛋白修饰主要是引起染色体结构的改变,如 Cantone 等^[26]发现长期暴露于一定量的砷和镍后会引引起组蛋白 H3K9 乙酰化和 H3K4 去甲基化的增加,影响染色体的结构,进而影响基因的表达。也有研究发现,DNA 甲基化可以通过调控 H3K4 和 H3K9 的三甲基化来影响脂肪细胞的分化^[27]。这些不同的修饰带有不同的电荷,破坏了组蛋白原有结构的电荷平衡,引起染色质结构的改变,使转录起始位点暴露程度不同,基因转录难易情况发生变化。

2.2 组蛋白修饰的研究方法

表 3 给出了主要的组蛋白修饰研究方法,传统的组蛋白修饰研究方法主要有 Edman 降解法和免疫测序法。Edman 降解法需要耗费大量的时间,而且需要提供大量的高纯度样品,并且不能检测 N 端封闭的序列;免疫测序法中的抗体难以制备,不能单独用于鉴定新的未知的修饰位点。目前大部分研究者在组蛋白修饰研究中都会选择使用基于质谱的技术和 ELISA 等方法。

质谱分析组蛋白及组蛋白翻译后修饰主要有 "bottom-up" 和 "top-down" 两种策略。2002 年,Zhang 等^[28]发表了第一篇用

"bottom-up" 策略进行组蛋白分析的文章,他们将组蛋白提纯,然后进行酶解,将酶解的多肽用液相色谱串联质谱技术进行分析,最后利用生物信息检索等方法对多肽及其修饰位点进行分析。但这一方法有一定的局限性,因为可能会漏掉太短的肽段,而且酶解后多种修饰的信息会随之丢失。"top-down" 策略则是将直接用质谱对组蛋白进行分析,结合生物信息检索推测氨基酸序列和修饰位点。然而,表达丰度较低的蛋白难以检测,大分子蛋白在质谱中进行离子化时效率较低^[29],因此,此策略仍需进一步改进。

在质谱技术的基础上,为了得到多肽序列的结构,我们可以使用碰撞诱导解离技术 (CID/CAD)、电子捕获解离技术 (ECD)、电子转移解离技术 (ETD) 等。CID 对低电荷、长度短的肽段离子的分析效果较好^[30]。ETD 则能用于分析分子量较大的肽段,而且可以同时检测多个翻译后蛋白修饰产物^[30]。ECD 技术在对组蛋白修饰进行检测时,由于裂解覆盖范围广、翻译后修饰基团仍然保留等优点而越来越重要。有研究者发现,通过 LC-MS/MS 也可对蛋白结构进行鉴定,通过得到的质谱信息与数据库的比对,便可找到对应蛋白的信息^[31]。

目前,随着生物技术的发展,有研究者会选择 ELISA 的方法,用相应的抗体检测相应的修饰氨基酸,但是这一方法需要多个抗体,每次只能检测一种氨基酸的一种修饰,而且对抗体的效价要求较高。但相对来说,用 ELISA 的方法检测组蛋白修饰更加方便、快捷。

表 3 常见的组蛋白研究方法策略

Table 3 Commonly used research methods and strategies on study histone modification

Methods	Advantages	Disadvantages
Edman degradation	N-terminal amino acid can be repeating detected and can get an accurate results	It needs more time and require a lot of samples with high purity, and closed sequence of N-terminal can not be detected
Immune sequencing	High sensitive	It's difficult to prepare antibodies and a new unknown modification sites can not be identified alone
bottom-up strategy	Convenient and rapid	It may miss short peptides and will easily lead to loss information of modification by enzymolysis
Top-down strategy	Direct and convenient	Expression of low abundance protein is difficult to detect
ELISA	It's easy to operate the experiment	It needs high titer of antibody

3 非编码 RNA 及其检测技术

3.1 非编码 RNA

不编码蛋白质的 RNA 被称为非编码 RNA,从长度上可以将非编码 RNA 划分为 3 类:小于 50 nt 的 RNA,包括 microRNA, siRNA, piRNA; 从 50 nt 到 500 nt 的非编码 RNA,包括 tRNA, rRNA, snoRNA, snRNA, SLRNA, SRPRNA 等; 大于 500 nt 的非编码 RNA,包括类似于 mRNA 的非编码 RNA,不带 poly A 尾巴的长链非编码 RNA 等^[32,33]。在生命活动的不同环节,不同长度的非编码 RNA 具有不同的功能,主要通过调控 mRNA 翻译成蛋白质的过程来参与调控生物体的生长、发育和凋亡,而且与人类癌症的发生密切相关。

3.2 非编码 RNA 检测技术

目前,非编码 RNA 已经成为一个研究热点,用于检测非编

码 RNA 的技术也得到了飞速发展。主要有 Northern blot、荧光定量 PCR 和表达文库克隆,以及后来出现的芯片技术、表面增强拉曼光谱法和高通量测序技术。而现在比较常用的就是芯片技术及高通量测序。

芯片技术是把大量探针分子固定在高密度阵列上,将提取的样品与微阵列探针进行杂交,通过信息技术检测杂交信号的强弱,强度不同代表样品中基因表达水平的不同。2008 年 Liu 等使用这一技术建立了一种用于人类疾病相关的 miRNA 表达检测方法^[34]。这一方法费用合适,结果可靠。在高通量测序中 Solexa 测序法使用较为广泛,这一方法可一次性检测上亿个核苷酸片段,所需样品少,精确性好,且减少了因二级结构造成的结果缺失,这一方法可以精确鉴定 miRNA,但也会由于 miRNA 中的特殊修饰而对结果产生影响^[35]。

关于非编码 RNA 的研究方法有很多,其中 RNA-seq 在长

链非编码 RNA 的研究中使用较为广泛。这一技术主要是应用新一代高通量测序技术,对 RNA 反转录得到的 cDNA 文库进行测序。在研究非编码 RNA 与蛋白相互作用中,RNA-pull-down、RIP-seq 及 CHIRP 等技术得到广泛的应用^[6],如 Huarte 等^[7]通过 RNA-pulldown 实验发现 hnRNP-K 调节 lincRNA-p21 的表达;Zhao 等^[8]通过 RIP-seq 法发现在胚胎干细胞中有超过 9000 种 RNA 与 PRC2 相关。这些新技术的应用让我们对不同的非编码 RNA 的功能有了进一步的认识,为揭示非编码 RNA 的神秘面纱提供帮助。

4 结语

表观遗传学的发展让人们深刻认识到环境对基因表达的重要性,生物体是由环境和基因共同作用的结果。目前,人们对表观遗传学的研究主要集中于 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色体重塑和非编码 RNA,DNA 甲基化和组蛋白修饰会引起染色质结构的变化,它们可以影响基因的启动,进而对基因的转录产生影响,而非编码 RNA 主要是对 mRNA 翻译成蛋白质的过程产生影响,进而对蛋白质的合成产生影响。现在人们正逐渐意识到表观遗传过程对组织发育、细胞分化及疾病的治疗等生命活动过程的重要性,越来越多的表观遗传学作用机制也将被发现。而且越来越多的研究发现,很多癌症或其他疾病的发生都与表观遗传学的异常修饰相关,这些异常的表观遗传学修饰通过基因表达的变化使机体产生异常的变化。

而且有些药物也是通过调控表观遗传学过程达到治疗疾病的目的,一些研究者已经开始研究部分药物对 DNA 甲基化、组蛋白修饰及非编码 RNA 的形成过程产生的影响,发现有些药物可以通过调控 DNA 甲基化或者组蛋白修饰的酶,对 DNA 甲基化、组蛋白修饰产生重要影响,有些药物可以调控非编码 RNA,影响 mRNA 的翻译成蛋白质的过程,最终影响基因表达,对生物体的表现性状产生重要影响。那么,是否可以通过调控 DNA 甲基化或者组蛋白修饰的酶使某一个或某几个我们需要的基因的表达情况发生改变呢?是否可以通过改变一些因素来使某一特定的基因的 DNA 甲基化变化情况及这一基因附近的组蛋白修饰情况发生改变,最后调控这一基因的表达呢?是否可以通过刺激某一非编码 RNA 的产生及人为的加入或者减少某一非编码 RNA 的量,来调控基因表达呢?这些也许都会是将来我们研究时需要面对的问题。

随着生物信息技术在生物领域的广泛应用,表观遗传学研究技术也在飞速的发展。目前,一些表观遗传学研究受到限制,主要原因是:第一,表观遗传学是一门新兴学科,开始时并未引起研究者的重视,发展缓慢;第二,目前进行表观遗传学研究的物种主要集中于人和鼠,对其他物种的表观遗传学研究较少,对其他物种进行研究时很难找到参照;第三,一些用于表观遗传学研究的试剂种类较少而且昂贵,有时为了得到精确的结果,还要涉及到高通量技术,费用较高;第四,不同物种之间以及同一物种不同组织中的表观遗传学变化都有可能不同,比较复杂。但是,随着科技的发展,越来越多的新技术将会应用于表观遗传学研究,表观遗传学将越来越受到重视,更加系统、深入的表观遗传学研究将能更好的揭示生物的生长、发育及疾病等许多生命现象的本质。

参考文献(References)

- [1] Bird A. Perceptions of epigenetics [J]. Nature, 2007, 447 (7143): 396-398
- [2] Holliday R. Epigenetics: a historical overview[J]. Epigenetics, 2006, 1 (2): 76-80
- [3] 陆嵘,房静远.表观遗传修饰与肿瘤 [J]. 生命科学, 2006, 18(1): 10-14
Lu Rong, Fang Jing-Yuan. Epigenetic modification and cancer [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2006, 18(1): 10-14
- [4] 毛媛,杜芳腾,杜瑶,等.表观遗传修饰在调控寿命中的作用 [J]. 生命的化学, 2013, 33(6): 648-652
Mao Yuan, Du Fang-teng, Du Yao, et al. Epigenetic modification in the role of regulate lifespan [J]. Chemistry of Life, 2013, 33 (6): 648-652
- [5] 谢景,李丽娟,晏咏朗,等.地西他滨对体外培养大鼠的血管平滑肌细胞 ER α 基因启动子甲基化状态及 mRNA 表达的影响 [J]. 华西药学杂志, 2009, 24(3): 235-237
Xie Jing, Li Li-juan, Yan Yong-lang, et al. Effects of Decitabine on the methylation status and mRNA expression of ER α gene in cultured rat vascular smooth muscle cells [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, 24(3): 235-237
- [6] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory [J]. Genes Dev, 2002, 16(01): 6-21
- [7] Nelissen E C, van Montfoort A P, Dumoulin J C, et al. Epigenetics and the placenta[J]. Hum Rep Upd, 2011, 17(3): 397-417
- [8] Breton C V, Siegmund K D, Joubert B R, et al. Prenatal tobacco smoke exposure is associated with childhood DNA CpG methylation [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99716
- [9] Broberg K, Ahmed S, Engstrom K, et al. Arsenic exposure in early pregnancy alters genome-wide DNA methylation in cord blood, particularly in boys[J]. J Dev Orig Health Dis, 2014, 5(4): 288-298
- [10] Buscariollo D L, Fang X, Greenwood V, et al. Embryonic caffeine exposure acts via A1 adenosine receptors to alter adult cardiac function and DNA methylation in mice [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87547
- [11] Zhao L, Zhang S, An X, et al. Toxicological effects of benzo[a]pyrene on DNA methylation of whole genome in ICR mice [J]. Cellular and molecular biology, 2015, 61(5): 115-119
- [12] Armstrong K M, Bermingham E N, Bassett S A, et al. Global DNA methylation measurement by HPLC using low amounts of DNA [J]. Biotechnology Journal, 2011, 6(1): 113-117
- [13] Down T A, Rakyan V K, Turner D J, et al. A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis[J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(7): 779-785
- [14] Butcher L M, Beck S. AutoMeDIP-seq: A high-throughput, whole genome, DNA methylation assay[J]. Methods, 2010, 52(3): 223-231
- [15] Butcher L M, Beck S. Nano-MeDIP-seq Methylome Analysis Using Low DNA Concentrations[J]. Methods Mol Biol, 2015, [Epub ahead of print]
- [16] Yan P S, Chen C M, Shi H D, et al. Applications of CpG island microarrays for high-throughput analysis of DNA methylation [J]. Journal of Nutrition, 2002, 2430S-2434S
- [17] Schilling E, Rehli M. Global comparative analysis of tissue-specific

- promoter CpG methylation [J]. *Genomics*, 2007, (03): 314-323
- [18] Gebhard C, Schwarzfischer L, Pham T H, et al. Genome-wide profiling of CpG methylation identifies novel targets of aberrant hy-permethylation in myeloid leukemia [J]. *Cancer Research*, 2006, (12): 6118-6128
- [19] Konishi Y, Hayashi H, Suzuki H, et al. Comparative analysis of methods to determine DNA methylation levels of a tumor-related microRNA gene[J]. *Anal Biochem*, 2015, 484: 66-71
- [20] Begemann M, Leisten I, Soellner L, et al. Use of multilocus methylation-specific single nucleotide primer extension (MS-SNuPE) technology in diagnostic testing for human imprinted loci [J]. *Epigenetics*, 2012, 7(5): 473-481
- [21] Putnik M, Wojdacz T K, Pournara A, et al. MS-HRM assay identifies high levels of epigenetic heterogeneity in human immortalized cell lines[J]. *Gene*, 2015, 560(2): 165-172
- [22] Kaehler K C, Politz O, Henderson D, et al. Novel DNA methylation markers with potential prognostic relevance in advanced malignant melanoma identified using COBRA assays [J]. *Melanoma Research*, 2015, 25(3): 225-231
- [23] Mishima C, Kagara N, Matsui S, et al. Promoter methylation of TRIM9 as a marker for detection of circulating tumor DNA in breast cancer patients[J]. *Springerplus*, 2015, 4: 635
- [24] Hake S B, Xiao A, Allis C D. The language of covalent histone modifications[J]. *Nature*, 2000, 403(6765): 41-45
- [25] 王维, 孟智启, 石放雄. 组蛋白修饰及其生物学效应[J]. *遗传*, 2012, 07: 19-27
Wang Wei, Meng Zhi-Qi, Shi Fang-Xiong. Modification and biological role of histone[J]. *Hereditas*, 2012, 07: 19-27
- [26] Cantone L, Nordio F, Hou L F, et al. Inhalable Metal-Rich Air Particles and Histone H3K4 Dimethylation and H3K9 Acetylation in a Cross-sectional Study of Steel Workers [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2011, 119(7): 964-969
- [27] Matsumura Y, Nakaki R, Inagaki T, et al. H3K4/H3K9me3 Bivalent Chromatin Domains Targeted by Lineage-Specific DNA Methylation Pauses Adipocyte Differentiation[J]. *Mol Cell*, 2015. 60(4): 584-596
- [28] Zhang K L, Tang H, Huang L, et al. Identification of acetylation and methylation sites of histone H3 from chicken erythrocytes by high-accuracy matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight, matrix-assisted laser desorption ionization-postsource decay, and nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Analytical Biochemistry*, 2002, 306(2): 259-269
- [29] Chait BT, Chemistry. Mass spectrometry: bottom-up or top-down? [J]. *Science*, 2006, 314(5796): 65-66
- [30] Mikesh L M, Ueberheide B, Chi A, et al. The utility of ETD mass spectrometry in proteomic analysis [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 2006, 1764(12): 1811-1822
- [31] Shen J L, Xu Y H, She T T. LC-MS/MS: a rapid and simple new method for the determination of carbapenem beta-lactamases [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 14457-14468
- [32] He H S, Wang J, Liu T, et al. Mapping the *C. elegans* non-coding transcriptome with a whole genome tiling microarray [J]. *Genome Res*, 2007, 17: 1471-1477
- [33] Deng W, Zhu X P, Skogerbo G, et al. Organisation of the *Caenorhabditis elegans* small non-coding transcriptome: genomic features, biogenesis and expression[J]. *Genome Res*, 2006, 16: 20-29
- [34] Liu C G, Spizzo R, Calin G A. Expression profiling of microRNA using oligo DNA arrays[J]. *Methods*, 2008, 44(1): 22-30
- [35] 李艳, 丁先锋, 苗杰. 非编码 RNA 检测技术的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2010, 11: 5546-5548
Li Yan, Ding Xian-feng, Mao Jie. Detection Technologies of Non-coding RNA [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 11: 5546-5548
- [36] Zhu J J, Fu H J, Wu Y G. Function of lncRNAs and approaches to lncRNA-protein interactions [J]. *Science China-Life Sciences*, 2013, 56(10): 876-885
- [37] Huarte M, Guttman M, Feldser D, et al. A Large Intergenic Noncoding RNA Induced by p53 Mediates Global Gene Repression in the p53 Response[J]. *Cell*, 2010, 142(3): 409-419
- [38] Zhao J, Ohsumi T K, Kung J T, et al. Genome-wide Identification of Polycomb-Associated RNAs by RIP-seq[J]. *Molecular Cell*, 2010, 40 (6): 939-953

(上接第 2226 页)

- [11] Wang Dong, Zhen Can-bin, Wang Hong-gang, et al. The application of microvascular anastomotic device in microvascular anastomosis with diameter discrepancy[J]. *Chin J Microsurg*, 2014, 37(2): 106-109
- [12] Slattery P, Leung M, Slattery D. Microsurgical arterialization of degloving injuries of the upper limb [J]. *J Hand Surg Am*, 2012, 37: 825-831
- [13] Daenens K, Schepers S, Fourneau I, et al. Heparin-bonded ePTFE grafts compared with vein grafts in femoropopliteal and femorocrural bypasses: 1- and 2-year results[J]. *J Vasc Surg*, 2009, 49: 1210-1216
- [14] Walluscheck KP, Bierkandt S, Brandt M, et al. Intrainguinal ePTFE vascular graft with bioactive surface heparin bonding[J]. First clinical results. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 2005, 46: 425-430