向玉梅,苏君晓,曾燏,等.泥鳅DNA甲基转移酶基因家族结构及时空表达[J].华中农业大学学报,2026,45(1):255-265.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2026.01.023

泥鳅DNA甲基转移酶基因家族结构及时空表达

向玉梅[1,2],苏君晓[1],曾燏[3,4],周小云[1]

1.华中农业大学水产学院,武汉 430070; 2.广西壮族自治区水产引育种中心,南宁 530001;
3.西华师范大学生命科学学院/西南野生动植物资源保护教育部重点实验室,南充 637009;
4.成都师范学院化学与生命科学学院,成都 611130

摘要 为深入解析DNA甲基化对泥鳅等硬骨鱼类基因表达调控的作用机制,基于转录组测序数据,用hi-TAIL-PCR技术克隆获得泥鳅DNA甲基转移酶基因家族*dnmts*的启动子序列,并用qRT-PCR和原位杂交技术分析*dnmts*的时空表达特征。结果显示,维持甲基化酶*dnmt1*与从头甲基化酶*dnmt3s*的亚细胞定位、N端调控结构域存在较大的差异,*dnmt1*的调控域包含DMAP、PBD、CXXC和BAH保守结构域,而*dnmt3s*包含PWWP、ADD或CH结构域,提示*dnmt1*和*dnmt3s*间存在较大的功能分化。在4个*dnmts*的启动子序列上,均预测到典型元件TATA-box,以及CREB、Egr-1、Pit-1等与胚胎发育、生长、繁殖等相关的转录因子结合位点。4个*dnmts*的表达量均与发育阶段相关、呈动态变化,在卵裂期到囊胚期的快速卵裂阶段,*dnmt1*高表达,而在胚胎后期的器官分化阶段,*dnmt3aa*和*dnmt3ab*高表达。在成鱼阶段,*dnmt1*在性腺中高表达,*dnmt3aa*和*dnmt3ab*在脑中高表达,而*dnmt3b*在性腺、脑和肌肉中均有较高的表达水平。*Dnmts*的表达呈明显的性别二态性,*dnmt1*和*dnmt3b*在卵巢中高表达,而*dnmt3aa*和*dnmt3ab*则在精巢中高表达。原位杂交结果显示,*dnmt3aa*在卵巢的生殖细胞和体细胞中均有表达,而*dnmt3ab*仅在卵巢的体细胞中表达。以上结果表明,泥鳅*dnmts*各成员之间存在功能分化,并在特定的发育阶段和组织中发挥重要功能。

关键词 泥鳅; DNA甲基化; DNA甲基转移酶; 基因结构和功能; 基因表达调控
中图分类号 S917.4; Q959.46^{+}8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2026)01-0255-11

表观遗传调控是指基因的DNA序列未发生变化、但其表达却发生了可遗传性改变的基因表达调控方式[1]。DNA甲基化(DNA methylation)是目前研究最透彻、也是最重要的表观遗传调控机制之一。DNA甲基化广泛存在于各种生物体内,对生物体正常发育至关重要,并且与许多重要生物学过程密切相关,如基因组印记[2]、X染色体失活[3]、疾病发生[4]、细胞分化以及组织发育[5-6]等。DNA甲基化的发生和维持是由DNA甲基转移酶(DNA methyltransferases, Dnmts)催化实现的。Dnmts将S-腺苷甲硫氨酸(SAM)的甲基基团转移至CpG结构中胞嘧啶(C)的5号碳位上,形成5-甲基胞嘧啶(5^{m}C),这个过程的发生会影响DNA及其构象的稳定性,并使得DNA与蛋白质相互作用方式发生变化,从而调控基因表达[7]。

在哺乳动物中,DNA甲基转移酶主要包括负责维持甲基化的*dnmt1*和负责从头甲基化的*dnmt3s*。硬骨鱼类由于经历了一次特有的第三轮全基因组复制,使得其编码从头甲基转移酶的基因数量显著增加,如,在罗非鱼中鉴定到5种*dnmt3s*[8],在斑马鱼中鉴定到6种*dnmt3s*[9]。DNA甲基转移酶的表达决定着DNA甲基化的水平和模式,因此受到越来越多研究人员的关注,如,在罗非鱼[10]、蓝头濑鱼[11]、黄鳝[12]等的研究中发现,鱼类卵巢和精巢的DNA甲基化水平存在巨大差异,并且在鱼类性逆转的过程中常伴随着性别决定关键基因甲基化模式的重编程以及特定DNA甲基转移酶的差异表达,这表明DNA甲基化是鱼类性别分化的重要调控机制[10]。此外,Wang等[13]用CRISPR/Cas9技术构建了尼罗罗非鱼*dnmt3aa*$^{-/-}$和*dnmt3ab*$^{-/-}$突变体,发现*dnmt3aa*的

收稿日期: 2024-03-04
基金项目:西南野生动植物资源保护教育部重点实验室开放基金(XNYB17-1)
向玉梅,E-mail: 1353859613@qq.com
通信作者: 曾燏,E-mail: zengyu_cwnu@163.com;周小云,E-mail: zhouxy@mail.hzau.edu.cn

缺失会导致生殖细胞凋亡、精子质量降低，而 *dnmt3ab* 的缺失未导致明显的生殖性能变化，这表明 *dnmt3aa* 和 *dnmt3ab* 在尼罗罗非鱼性腺发育中的功能并不相同，*dnmt3aa* 在驱动鱼类性腺分化相关基因的从头甲基化以及保障正常的生殖功能中发挥着重要的作用。

已有的研究表明，DNA甲基转移酶家族广泛参与鱼类的性别决定和性腺发育过程，其中 *dnmt3aa* 和 *dnmt3ab* 的功能尤为突出[10]，但目前对于 *dnmts* 的研究主要集中在哺乳动物以及斑马鱼、罗非鱼等模式鱼类中，而在经济鱼类中的研究还非常有限。并且已有的研究结果也存在一些差异，比如，*dnmt3a* 突变小鼠出生后4周死亡[14]，而 *dnmt3aa* 和 *dnmt3ab* 突变斑马鱼正常存活[15]。因此，有必要在其他物种中继续开展 *dnmts* 的相关研究。本研究以我国常见的小型经济鱼类泥鳅（*Misgurnus anguillicaudatus*）为研究对象，分析 *dnmts* 家族成员的基因结构特征及 *dnmts* 在泥鳅胚胎、仔鱼以及成鱼各组织中的表达模式，旨在为进一步探索DNA甲基化对泥鳅等硬骨鱼类基因表达调控的作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

研究所用泥鳅亲本为笔者所在实验室养殖的2龄个体，选择体质健壮、无病无伤的雌雄亲本人工催产[16]。受精卵置于室温下孵化，收集成熟卵、精子、各发育阶段的胚胎以及孵化后1～17 d的仔鱼用于本研究。此外，取12月龄雌雄泥鳅各9尾，经MS-222麻醉后，解剖取性腺、脾脏、肝脏、脑、肌肉等组织。所有样品在液氮中速冻30 min后，－80 ℃保存备用。

1.2 总RNA的提取、检测和cDNA合成

用Trizol法提取各样品的总RNA，用1%琼脂糖电泳检测RNA的完整性，用Nano Drop 2000分光光度计检测RNA的浓度和纯度。选择高质量的RNA，将同类型、同批次的每3个个体的RNA等量混合作为1个样品，然后用PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser试剂盒（TaKaRa, Japan）反转录为cDNA，用于后续研究。

1.3 泥鳅 *dnmts* 启动子序列克隆

基于笔者所在课题组前期测序获得的泥鳅全长转录组提取 *dnmts* 的CDS序列，采用hiTAIL-PCR（high-efficient thermal asymmetric interlaced PCR）技术[17]扩增各 *dnmts* 的启动子序列。PCR产物经胶回收、纯化、连接、转化、阳性克隆鉴定后送公司测序。测序结果经比对确认无误后，用DNA Star拼接得到 *dnmts* 启动子序列。各步骤见曹文怡等[18]所述。

1.4 泥鳅 *dnmts* 的定量表达分析

基于 *dnmts* 的cDNA序列设计qRT-PCR引物（表1），分别以各样品的cDNA为模板，用LightCycler®480实时荧光定量PCR系统分析 *dnmts* 在泥鳅胚胎、仔鱼各阶段以及成鱼各组织中的表达水平。其中，胚胎阶段以泥鳅的 *TUBA* 为内参基因，仔鱼、成鱼阶段以 *β-actin* 为内参基因[19]。反应体系为20 μL，包括2×SYBR Green Mix（TaKaRa）10 μL，上下游引物（10 μmol/L）各0.8 μL，cDNA 1 μL，ddH_2O 7.4 μL。程序为：95 ℃ 30 s；95 ℃ 5 s，58～60 ℃ 15 s，72 ℃ 15 s，循环40次。每个样品设置3个重复，表达水平用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法进行分析。

表1 泥鳅 *dnmts* 表达和原位杂交分析所用引物

Table 1 Primers for *dnmts* expression and in situ hybridization analysis of *M. anguillicaudatus*

反应 Reaction	引物 Primers	引物序列 Sequence (5′ to 3′)	反应 Reaction	引物 Primers	引物序列 Sequence (5′ to 3′)
qRT-PCR	*dnmt1*-F	AAGTGCTCCGCCTGTAA	ISH	*dnmt1*-ISH-F	GGACCAAAAGGTGCCTACCA
	dnmt1-R	TGGTCTGGGACGTTTTC		*dnmt1*-ISH-R	GGGTGTGCGAGAGTTAAAGCGGT
	dnmt3ab-F	GTCGGAGTATGAGGATGG		*dnmt3ab*-ISH-F	AAAGCTCCACAGTTACCGTCC
	dnmt3ab-R	TGTAGGTTGGCTGGTGAA		*dnmt3ab*-ISH-R	GGGATCACCAAACCAACTGACCCA
	dnmt3aa-F	TGTCTGGAACATGGACGC		*dnmt3aa*-ISH-F	TCGGAGTCTGGGAAGAGTGT
	dnmt3aa-R	TGTAATGGACGGGGAAGC		*dnmt3aa*-ISH-R	GGGCAGCAGATGGTGCAGTACGA
	dnmt3b-F	GGGGAGTATACGGTTGG		*dnmt3b*-ISH-F	GGGGCCATCTCCAAACCACTCCA
	dnmt3b-R	GGTTTGGGGCTTGATGT		*dnmt3b*-ISH-R	TCAAGCTGCACGTAGGGTTT

1.5 泥鳅 *dnmts* 的表达定位分析

取30尾初孵仔鱼于4 ℃多聚甲醛中固定过夜，经PBST/甲醇梯度脱水后置于甲醇中－20 ℃保存，用于整体原位杂交。取12月龄雌雄泥鳅各6尾，解剖取精巢和卵巢于多聚甲醛中固定过夜，然后用30%蔗糖通透，经梯度乙醇脱水后浸蜡、包埋和切

片，用于切片原位杂交。按照 Schulte-Merker 等[20]和 Feng 等[21]的方法分别进行整体原位杂交和切片原位杂交，引物如表 1 所示。用正义探针进行的原位杂交结果作为阴性对照。用 Olympus SZX16 体视显微镜抓拍图像，用 cellSens 标准软件处理图像。每个原位杂交实验重复 3 次以上。

1.6　泥鳅 *dnmts* 的基因结构分析

在 NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）中获取其他鱼类的 *dnmts* 序列。用 Promoter 2.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/）预测泥鳅 *dnmts* 的启动子核心区域，用 AliBaba 2.1（http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html）预测转录因子结合位点。用 ProtParam（https://web.expasy. org/protparam/）、PROSITE（https: //prosite.expasy.org/）、InterPro（http://www.ebi.ac.uk/interpro/和 UniProt（https://www.uniprot.org/）等在线蛋白质分析软件预测 *dnmts* 基因编码氨基酸的理化性质、结构域和亚细胞定位。

1.7　数据分析

统计数据以至少 3 次独立重复试验的平均值±标准差（mean±SD）表示，用 Student's *t*-test 比较组间差异，$P<0.05$ 视为统计差异显著。用 Graph Pad Prism 8.0 软件作图。

2　结果与分析

2.1　泥鳅 *dnmts* 基因的结构特征

本研究克隆获得了泥鳅 4 个 DNA 甲基转移酶家族成员：*dnmt1*、*dnmt3aa*、*dnmt3ab* 和 *dnmt3b*，CDS 序列长度分别为 4 503、2 700、2 193 和 4 572 bp；分别编码 1 500、899、730 和 1 523 个氨基酸的蛋白质。4 种蛋白均属于亲水性蛋白，其中 *dnmt3aa* 的等电点最高，而 *dnmt3ab* 最低（表 2）。亚细胞定位结果显示，*dnmt1* 定位于细胞核，其余 3 个同时定位于细胞核和细胞质中，说明 4 种酶执行功能的方式并不相同。4 种酶的结构均可分成 3 个部分，即 N 端的调控结构域、C 端的催化结构域和中间的连接区域（图 1）。进一步分析发现，4 种酶的 C 端有相似的催化结构域，但 N 端调控结构域的差异性较大，如，*dnmt1* 包含 DMAP、PBD、CXXC 和 2 个 BAH 结构域；*dnmt3aa* 和 *dnmt3ab* 相似，均包含 PWWP 和 ADD 结构域；而 *dnmt3b* 较特殊，除含有与 *dnmt3aa* 和 *dnmt3ab* 相同的 PWWP 结构域外，还有 1 个 CH 结构域。

表 2　泥鳅 Dnmts 的理化性质和亚细胞定位

Table 2　Physicochemical properties and subcellular localization of Dnmts in *M. anguillicaudatus*

基因 Gene	基因 ID Gene ID	分子式 Formula	分子质量/ku Molecular weight	等电点 Isoelectric point	蛋白亲水性 Hydrophilic	亚细胞定位 Subcellular localization
dnmt1	NC_073338.1	$C_{7429}H_{11673}N_{2079}O_{2303}S_{73}$	60 389.49	5.47	亲水性 Hydrophilic	细胞核 Cell nucleus
dnmt3aa	NC_073351.1	$C_{4434}H_{6941}N_{1297}O_{1351}S_{55}$	101 798.07	6.66	亲水性 Hydrophilic	细胞质、细胞核 Cytoplasm，cell nucleus
dnmt3ab	NC_073358.1	$C_{6463}H_{10735}N_{2193}O_{2668}S_{553}$	179 579.60	4.88	亲水性 Hydrophilic	细胞质、细胞核 Cytoplasm，cell nucleus
dnmt3b	NC_073349.1	$C_{7650}H_{11901}N_{2025}O_{2269}S_{83}$	171 206.84	6.18	亲水性 Hydrophilic	细胞质、细胞核 Cytoplasm，cell nucleus

2.2　鱼类 *dnmts* 的系统进化分析

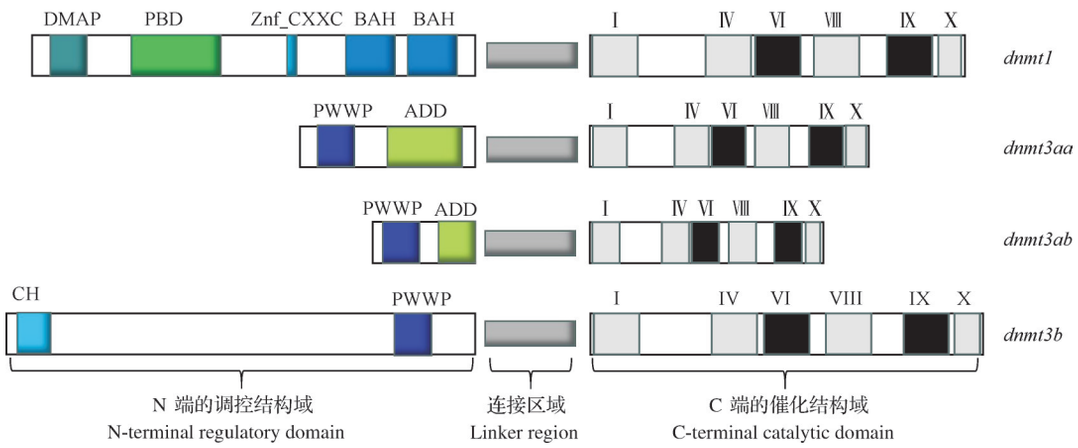
泥鳅与其他鱼类 *dnmts* 氨基酸序列系统进化树（图 2）显示，整个 DNA 甲基转移酶家族包含 *dnmt1* 和 *dnmt3* 两大支；*dnmt1* 比较保守，而 *dnmt3* 亚家族发生了分歧，形成 *dnmt3a* 和 *dnmt3b* 两支；*dnmt3a* 簇进一步分化为 *dnmt3aa* 和 *dnmt3ab* 两支。此外，泥鳅的 4 个 *dnmt*s 成员均分别与斑马鱼（*Danio rerio*）和鲤（*Cyprinus carpio*）有较高的亲缘关系。

2.4　泥鳅 *dnmts* 启动子序列特征

用 hiTAIL-PCR 技术扩增得到泥鳅 *dnmts* 的启动子序列，分别选择各基因的翻译起始密码子上游 2 000 bp 的序列，用在线软件对这些启动子的核心元件进行预测，包括转录起始位点（TSS）和典型元件 TATA-box 等，并对各基因的转录因子结合位点进行预测，结果显示，*dnmts* 启动子上除了存在 NF-1、NF-kappaB、C/EBPalp、Oct-1、Sp-1、GATA-1 等典型的转录因子结合位点外，还存在与生长繁殖相关的转录因子，如 GR、CREB、ER、SRY、Sox-2、egr-1、WT-1、GR-α、Pit-1 等（见网络版，附图 1）。

2.5　泥鳅 *dnmts* 在胚胎发育阶段的表达变化

在胚胎发育阶段，4 个 *dnmts* 的表达水平均呈动态变化。*Dnmt1* 和 *dnmt3b* 在胚胎早期高表达，但 *dn-*



图中的罗马数字表示酶结构中的保守结构域。Roman numbers in the figures indicate the conserved catalytic domains of the enzyme structure.

图1 泥鳅DNA甲基转移酶家族成员及其结构

Fig.1 Family members of DNA methyltransferase of *M. anguillicaudatus* and their structure

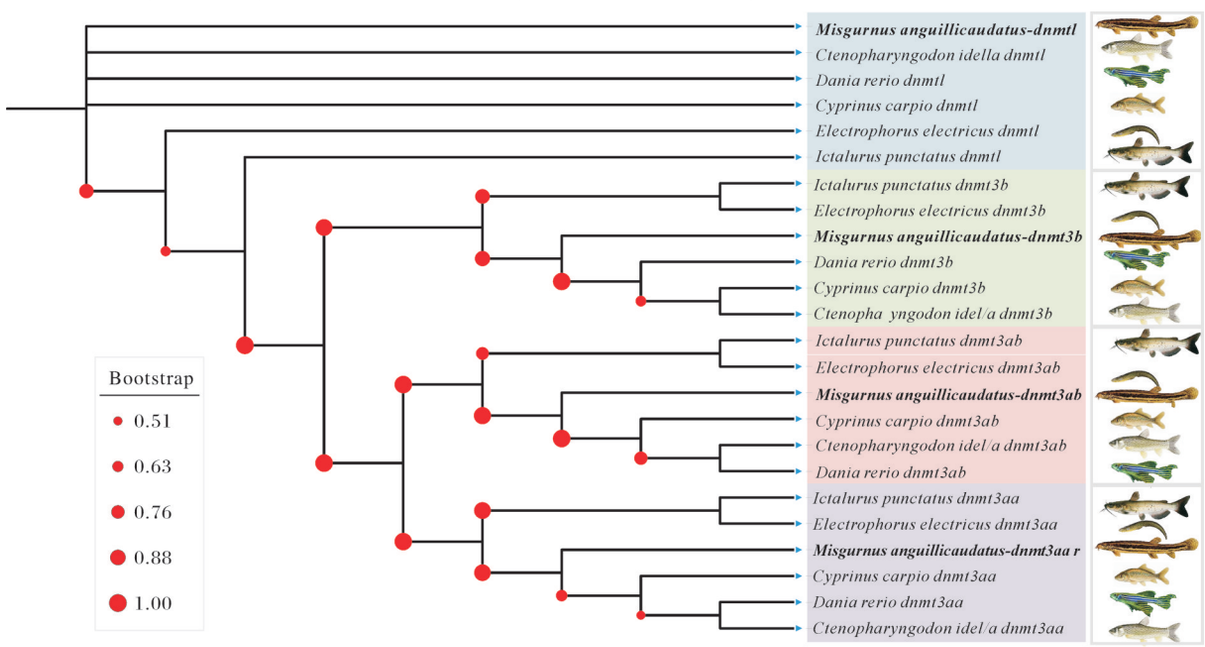


图2 基于氨基酸序列构建的鱼类*dnmts*系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of fish *dnmts* based on their amino acid sequences

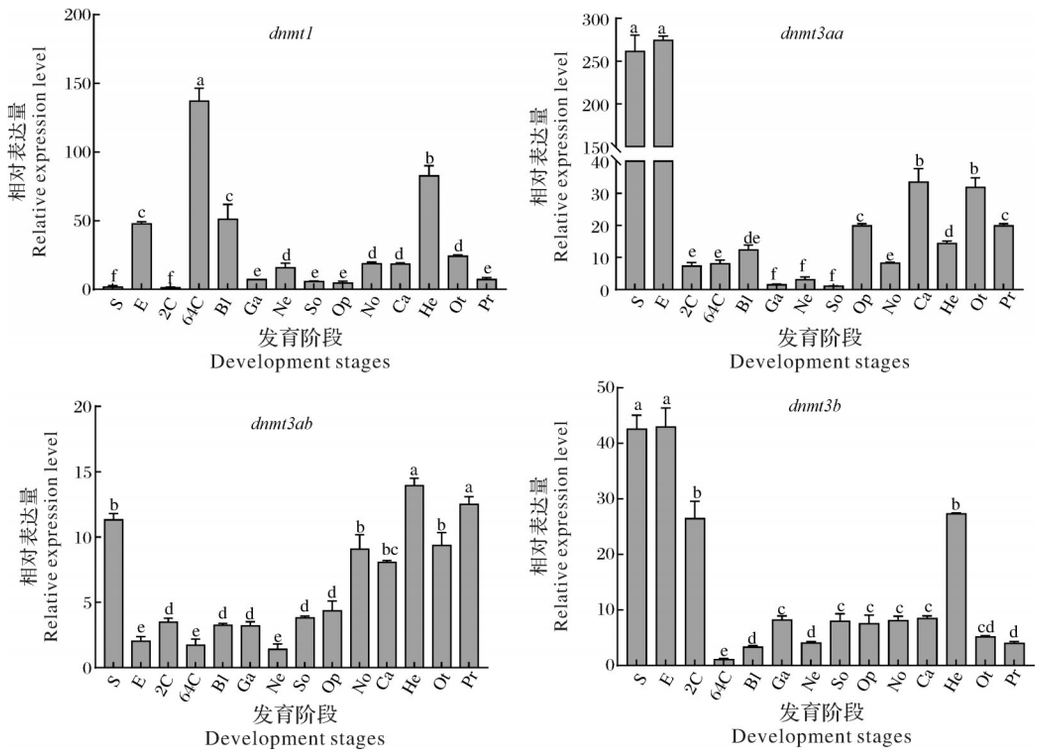
*mt1*在囊胚期之后表达水平显著下降,并维持在较低水平直至出膜;*dnmt3b*在成熟精子、卵子以及受精初期(2细胞期前)高表达,在卵裂后期表达水平快速下降。尽管*dnmt3aa*在成熟精子和卵子中的表达水平高、且精卵之间没有显著差异($P>0.05$),但在受精卵的早期阶段表达水平极低,在视泡期之后,其表达水平呈动态上升趋势。*Dnmt3ab*在胚胎发育阶段的表达变化与*dnmt3aa*类似,即胚胎早期表达水平低,体节期之后显著升高($P<0.01$)(图3)。

2.6 泥鳅*dnmts*在仔鱼阶段的表达变化

比较泥鳅仔鱼阶段(1~17日龄)*dnmts*的表达水平变化,结果如图4所示,*dnmt1*和*dnmt3b*的表达模式相似,在3日龄仔鱼中的表达水平较高,而在5日龄之后显著下降,并维持在较低水平($P<0.01$)。*Dnmt3aa*和*dnmt3ab*的表达模式相似,在1日龄的仔鱼中表达水平较高,在3日龄之后的表达水平虽有变化,但变化幅度不大。

2.7 泥鳅*dnmts*在成鱼组织间的表达差异

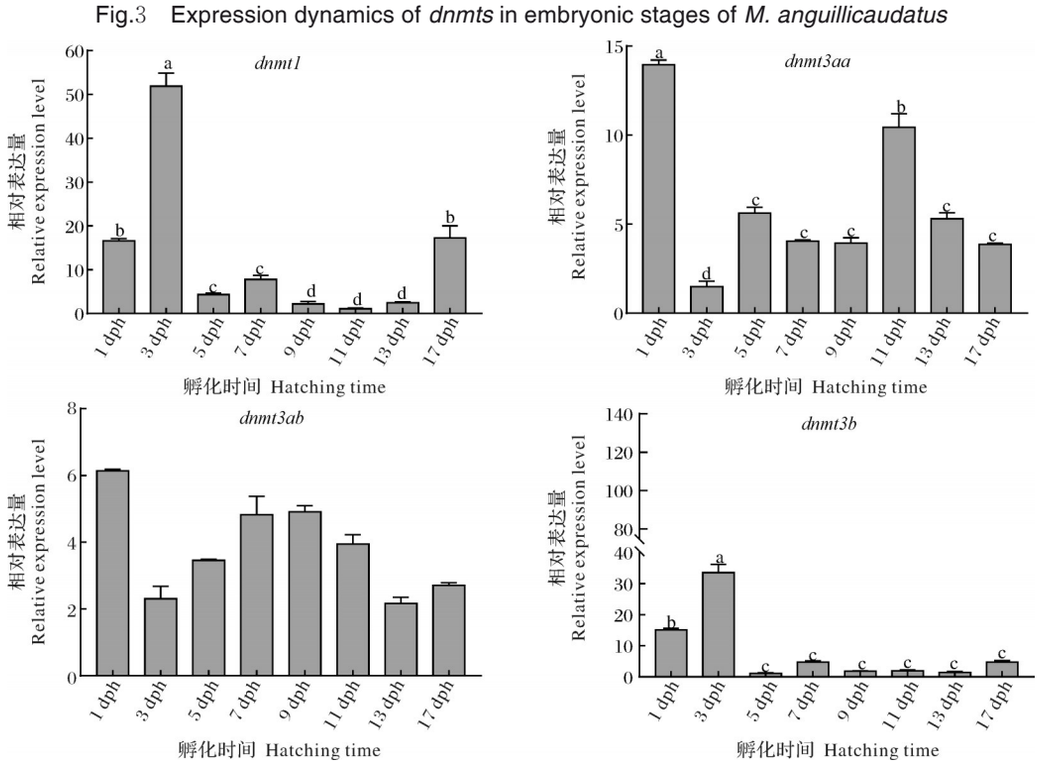
比较*dnmts*在雌雄成鱼各组织间的表达差异,结果显示,*dnmt1*在性腺中表达量最高,并且在其主要表达组织(性腺、脑、肌肉)中,*dnmt1*在雌性中的表达量均高于雄性。*Dnmt3aa*和*dnmt3ab*均在大脑中的



S：精子 Semen；E：卵 Egg；2C：2 细胞期 2-cell stage；64C：64 细胞期 64-cell stage；Bl：囊胚期 Blastula stage；Ga：原肠胚期 Gastrula stage；Ne：神经胚期 Neurula stage；So：体节期 Somite stage；Op：视泡期 Optic vesicle stage；No：脊索期 Notochordal stage；Ca：尾牙期 Caudal stage；He：心跳期 Heartbeat stage；Ot：耳石期 Otolith stage；Pr：出膜前期 Pre-hatching stage.

图 3　泥鳅 *dnmts* 在胚胎发育阶段的表达特征

Fig.3　Expression dynamics of *dnmts* in embryonic stages of *M. anguillicaudatus*

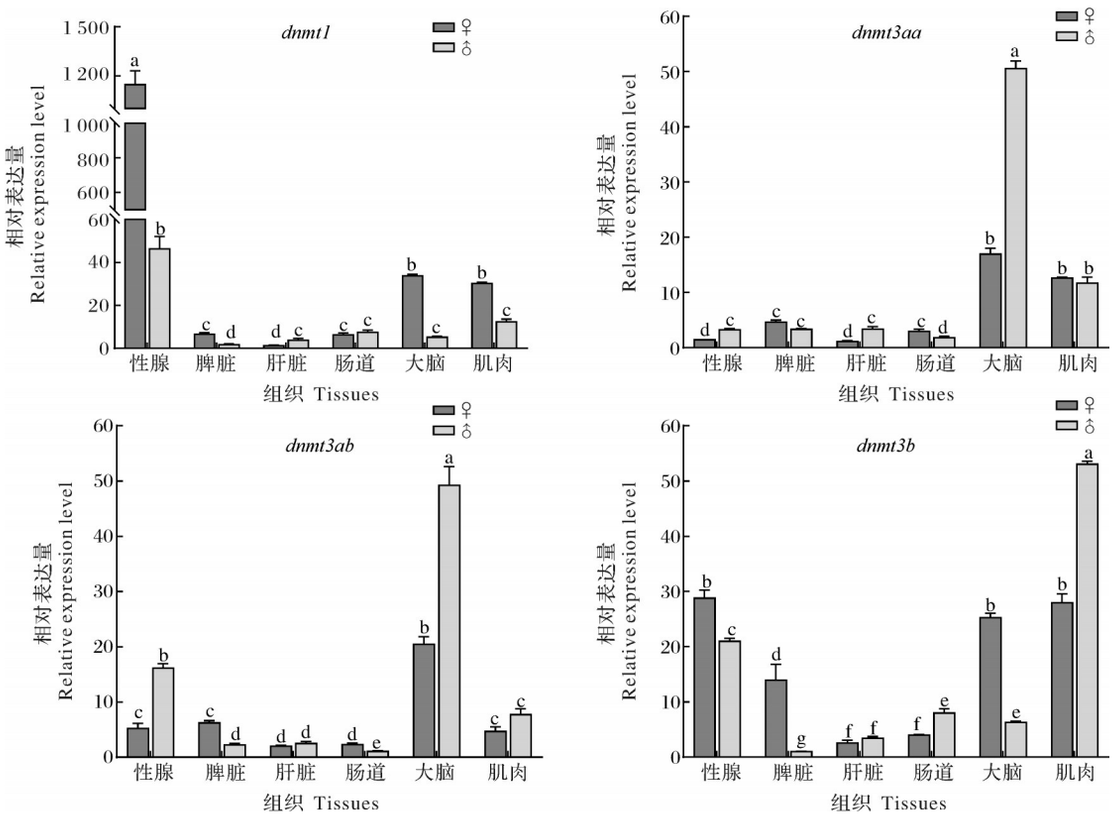


1dph：孵化后第 1 天 1 day post-hatch；3dph：孵化后第 3 天 3 days post-hatch；以此类推 And so on.

图 4　泥鳅 *dnmts* 在其仔鱼阶段表达水平变化

Fig.4　Expression level variations of *dnmts* during fry stages of *M. anguillicaudatus*

表达量最高，且在雄性中的表达水平显著高于雌性（$P<0.01$）。此外，*dnmt3aa*在肌肉中也有较高的表达水平，但雌雄间无显著性差异（$P>0.05$）；*dnmt3ab*在性腺，尤其是精巢中也有较高的表达量。*Dnmt3b*在肌肉中的表达量最高，在性腺和大脑中也有一定的表达，并呈性别二态性表达（图5）。



性腺 Gonad；脾脏 Spleen；肝脏 Liver；肠道 Intestines；大脑 Brain；肌肉 Muscle.

图5 泥鳅*dnmts*在成鱼各组织中的表达

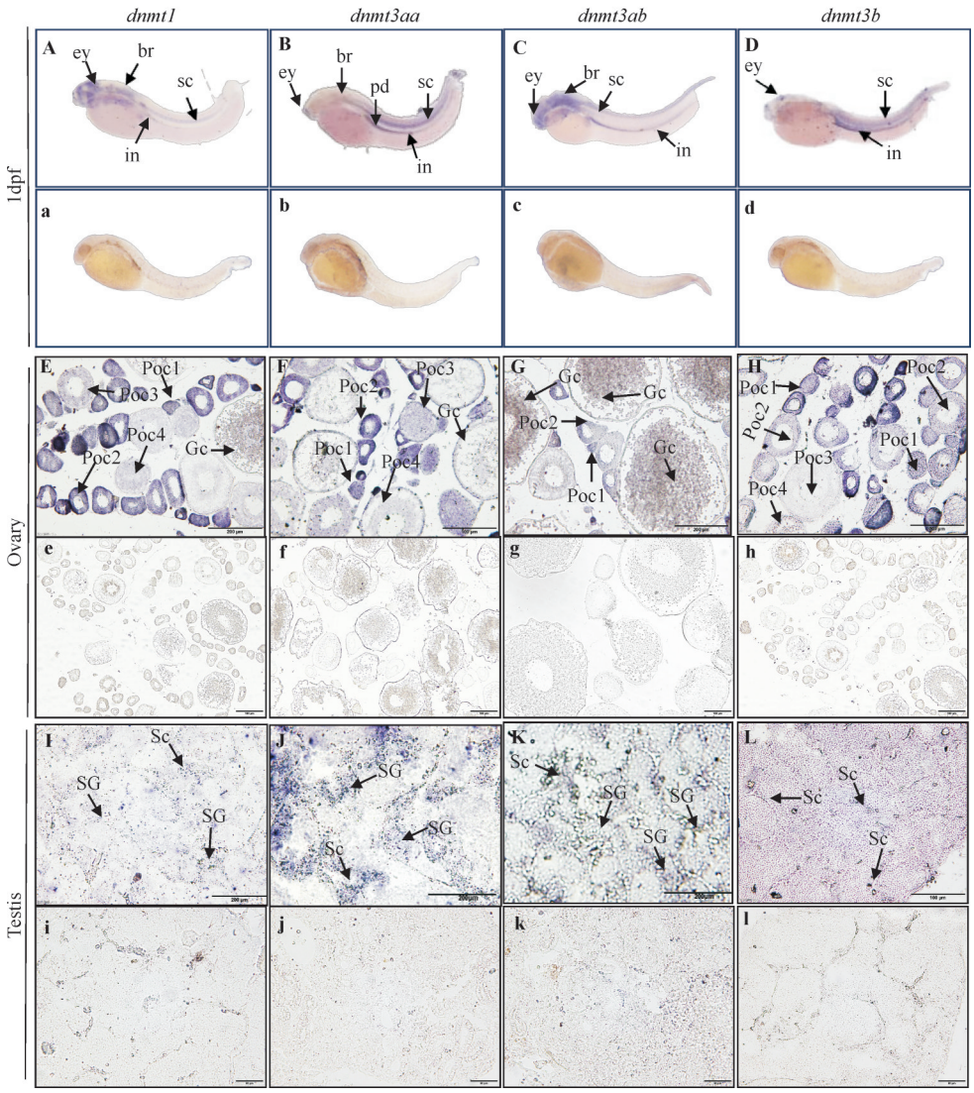
Fig.5 Expression profiles of *dnmts* in tissues of adult *M. anguillicaudatus*

2.8 泥鳅*dnmts*在仔鱼和性腺中的表达定位

初孵仔鱼整体原位杂交结果（图6）显示，*dnmt1*主要在泥鳅的头部和肠道中表达（图6A）；*dnmt3aa*主要在眼睛、肠道中表达，并且在前肾管中特异性表达（图6B）；*dnmt3ab*主要在头部、肠道和脊柱中表达（图6C）；而*dnmt3b*在头部表达微弱，在肠道中检测到较强表达信号（图6D）。成鱼性腺切片原位杂交结果显示，*dnmt1*在卵巢的卵原细胞、卵母细胞、颗粒细胞（图6E）以及精巢的精原细胞和精母细胞（图6I）中均有表达；*dnmt3aa*在卵原细胞、卵母细胞和颗粒细胞中呈高表达（图6F），而*dnmt3ab*则主要在颗粒细胞中表达（图6G）；此外，*dnmt3aa*和*dnmt3ab*在精原细胞和精母细胞中的表达量也较高（图6J～K）。*Dnmt3b*在卵母细胞和颗粒细胞中表达（图6H），在精巢的精母细胞中也有表达（图6I）。此外，用正义探针重复上述原位杂交实验，结果为阴性，均未出现假阳性信号（图a～l）。

3 讨 论

本研究在泥鳅基因组中克隆得到4个与DNA甲基化过程密切相关的甲基转移酶，分别为*dnmt1*、*dnmt3aa*、*dnmt3ab*和*dnmt3b*。基因结构分析发现，这4个酶的C端催化结构域相似，但N端调控结构域存在明显差异。酶的调控结构域决定了其功能，如，*dnmt1*上的增殖细胞核抗原结合结构域（PBD）有助于甲基化转移酶与DNA复制叉结合，PBD缺失会造成复制后DNA甲基化滞后[22]。半胱氨酸富集区域（CXXC）能识别未甲基化的CpG二核苷酸位点，并抑制从头甲基化的发生[23]。*Dnmt3aa/ab*共有的ADD（ATRX-Dnmt3-Dnmt3l）结构域能特异性结合未甲基化的H3K4，调节酶的催化活性[24]。3个从头甲基化转移酶*dnmt3aa/ab/b*共有“脯氨酸-色氨酸-色氨酸-脯氨酸”结构域（PWWP），该结构域是*dnmt3aa/ab/b*与染色质结合的重要结构，缺乏PWWP会减弱酶与染色质的结合能力[25]。4种酶在调控结



大写编号 A～L 为原位杂交结果，小写编号 a～l 为阴性对照；Uppercase numbers A-I are in situ hybridization results, while lowercase numbers a-l are negative controls. ey：眼睛 Eyes；br：大脑 Brain；sc：脊柱 Spine；in：肠道 Intestine；pd：前肾管 Pronephric duct；poc 1：卵原细胞 Oogonium；poc 2：初级卵母细胞 2 Primary oocyte 2；poc 3：卵母细胞 Oocyte 3；poc 4：带卵黄的卵母细胞 Oocyte with yolk；Gc：颗粒细胞 Granular cells；SG：精原细胞 Spermatogonia；Sc：精母细胞 Spermatocyte.

图 6　*dnmts* 在泥鳅胚胎和性腺中的表达定位

Fig.6　Expression localization of *dnmts* in embryo and gonad of *M. anguillicaudatus*

构域上的差异，表明这 4 种酶存在较高的功能分化。系统发育分析显示，鱼类的 *dnmt1* 比较保守，而 *dnmt3a* 由于硬骨鱼类特有的基因组复制产生了 *dnmt3aa* 和 *dnmt3ab*，并且 *dnmt3s* 亚家族在进化过程中发生分歧，形成了 3 个相对独立的分支，这与在罗非鱼[8]、斑马鱼[9]和塞内加尔鳎[26]等的研究结果一致。

基因表达受多种机制调控，其中启动子至关重要。通常转录因子结合启动子上的特定序列（转录因子结合位点），将细胞信号传递至细胞核内，从而激活或抑制相关基因的转录[27]。因此，分析启动子的元件组成与功能，对于阐明基因功能及其在生长发育中的作用意义重大。本研究在泥鳅 *dnmts* 基因的启动子区域预测出 GR、CREB、ER、SRY、Sox-2、Egr-1、WT-1、GR-α、Pit-1 等转录因子结合位点。其中，GR、Egr-1、Pit-1 结合位点广泛存在于 DNA 甲基转移酶家族各成员中。GR 是一种配体激活的转录因子，在鱼类的生长、繁殖和发育等多种生理过程中发挥重要作用，在斑马鱼中的研究发现，GR 参与皮质醇介导的生长抑制，GR 的缺失导致肌肉葡萄糖供应增加和生长加快[28]。Egr-1 参与鱼类胚胎的早期发育[29]。Pit-1 是哺乳动物中垂体特异性转录因子，通过控制多种基因的表达，包括参与促性腺激素合

成和分泌的基因，在调节生长、发育和繁殖中发挥关键作用[30]。此外，在*dnmt1*的启动子区还发现多个SRY转录因子结合位点，由于SRY是启动雄性发育的关键因子[31]，因此推测*dnmt1*可能参与了泥鳅精巢的分化和发育。在*dnmt1*和*dnm3b*的启动子区发现有CREB转录因子结合位点，CREB是一种胞内转录因子，在精子发生过程中周期性高水平表达，它能通过与效应因子cAMP结合而调节*dnmt1*和*dnm3b*的表达，从而影响精子发生[32]。在*dnmt3aa*和*dnmt3ab*上发现有ER转录因子结合位点，ER是一种激素调节因子，在控制卵巢、乳腺和子宫等多种组织的细胞分裂和分化中起着重要作用[33]。以上转录因子结合位点的存在，表明*dnmts*可能参与了泥鳅早期胚胎发育、性别分化和性腺发育等过程。

研究基因的时空表达模式是解析基因调控和功能的重要方面。本研究发现，泥鳅*dnmts*基因的表达水平与发育阶段相关，*dnmt1*和*dnmt3b*在胚胎发育前期高表达，而*dnmt3aa*和*dnmt3ab*在胚胎发育后期高度表达。*Dnmt1*的主要功能是维持DNA甲基化状态，故其常在分裂活跃的细胞中高表达[34]。在斑马鱼[35]、鲫[36]、塞内加尔鳎[26]等鱼类中的研究发现，*dnmt1*的表达量在胚胎早期（卵裂期到囊胚中期）较高，随后快速下降并维持在较低水平直至孵化，本研究中泥鳅*dnmt1*在胚胎发育阶段的表达变化与之相似。Wang等[37]认为，在囊胚期之前，DNA快速复制、细胞周期较短，因此，*dnmt1*高表达与此阶段快速的卵裂状态密切相关；而在囊胚期以后，*dnmt1*的表达水平迅速下降，说明快速卵裂阶段已经结束[37]。受到合子基因组激活和母体转录本消耗的双重影响，原肠期之后，4个*dnmts*的表达水平均出现显著变化。以*dnmt3aa*为例，其在囊胚期之前表达水平较高，但从原肠胚期到体节期，其表达水平急剧下降至极低水平，相似的现象在斑马鱼中也有报道[37]。在胚胎发育后期，*dnmt3aa*和*dnmt3ab*均维持较高的表达水平，Firmino等[26]在塞内加尔鳎的研究中报道了相似的结果，并通过原位杂交技术证实*dnmt3aa*和*dnmt3ab*能定位于胚胎的体节中，推测可能对肌肉分化有直接作用。因此，*dnmt3aa*和*dnmt3ab*在胚胎发育后期的高表达特征可能与胚胎细胞功能分化和鱼体器官形成有关。

比较*dnmts*在成鱼各组织中的表达发现，*dnmt1*在性腺中高表达，*dnmt3aa*和*dnmt3ab*在脑中高表达，而*dnmt3b*在性腺、脑和肌肉中均有较高的表达水平，这提示DNA甲基转移酶家族成员之间存在功能分化，并在相应的组织中发挥着重要的功能。同时，*dnmts*在各组织中的表达水平呈明显的性别二态性，比如，*dnmt1*和*dnmt3b*在卵巢中的表达水平显著高于精巢，而*dnmt3aa*和*dnmt3ab*在精巢中的表达水平显著高于卵巢，该结果与在尼罗罗非鱼[10]、塞内加尔鳎[26]和鳜[38]中的一致。La Salle等[39]在对小鼠生殖细胞*dnmts*表达谱的研究中发现，*dnmts*表达模式的不同是导致雌雄性腺基因组甲基化差异的直接原因。本研究中*dnmt3aa*和*dnmt3ab*在泥鳅脑中的表达量显著高于其他组织，这与在黄鳝[12]、斑马鱼[40]和塞内加尔鳎[26]中研究结果相一致，Bshary等[41]指出，虽然鱼类缺乏发达的大脑皮层来进行高级思维，但大脑在协调身体基本功能方面起着至关重要的作用，并且在斑马鱼*dnmt3aa*$^{-/-}$和*dnmt3ab*$^{-/-}$敲除体出现焦虑和行为异常，这表明*dnmt3aa*和*dnmt3ab*可能在鱼类的情绪控制、社会互动和认知方面发挥作用[15]。值得注意的是，虽然*dnmt3b*在精巢中的表达水平比卵巢低，但相对于其他组织而言仍具有显著的表达；同样，在斑马鱼[9]、黄鳝[12]和哺乳动物[14]中也发现，*dnmt3b*在精巢的精母细胞中表达信号较强，而在精原细胞和体细胞中的表达信号较弱；Kaneda等[42]和Bourchis等[43]对小鼠生殖细胞形成过程进行研究后指出，DNA甲基化在精子发生及成熟过程中的配子完整性保持和表观遗传信息的世代传递中扮演了重要的角色，而DNA甲基转移酶显然参与了这些重要过程。

整体原位杂交结果显示，*dnmts*在泥鳅的脑、肠和眼睛中均具有普遍表达模式，而*dnmt3aa*在前肾管呈特异性表达，该结果与斑马鱼[40]、塞内加尔鳎[26]和尼罗罗非鱼[10]的研究一致，因此我们推测*dnmt3aa*可能在鱼类肾脏形成中发挥重要作用。大量的研究表明，DNA甲基化和DNA甲基转移酶在鱼类的性别分化和性腺发育中发挥着重要的调控作用[8,12-13]，因此，本研究进一步分析了*dnmts*在泥鳅性腺组织中的表达定位。结果显示，在泥鳅卵巢的卵原细胞、卵母细胞、颗粒细胞，以及精巢的精原细胞和精母细胞中均检测到*dnmt1*的表达，该结果与牙鲆[44]、罗非鱼[8]以及哺乳动物小鼠[45]和人[46]中观察到的结果一致，这表明，*dnmt1*在整个脊椎动物中的功能是保守的[10]。有趣的是，泥鳅的*dnmt3aa*在卵巢的生殖细胞（卵原细胞和卵母细胞）和体细胞（颗粒细胞）中均有表达，而*dnmt3ab*仅在卵巢的体细胞（颗粒细胞）中表达，这与Wang等[13]在罗非鱼、Liu等[44]在牙鲆中的研究结果相似，表明*dnmt3aa*和*dn-*

*mt3ab*在鱼类性腺中的功能并不相同。此外，在尼罗罗非鱼中，*dnmt3aa*$^{-/-}$突变体精巢和卵巢生殖细胞凋亡增加，精子质量降低，而*dnmt3ab*$^{-/-}$没有明显的性腺表型变化，因此，Wang 等[13]指出对性腺基因的从头甲基化、性别分化和性腺发育有重要作用的是*dnmt3aa*而非*dnmt3ab*。

综上，本研究克隆获得了泥鳅的 4 个 DNA 甲基转移酶基因家族成员 *dnmt1*、*dnmt3aa*、*dnmt3ab* 和 *dnmt3b*。4 个酶的催化结构域相似，但调控结构域存在明显差异。4 个 *dnmts* 的启动子上除 NF-1、C/EBP-alp 和 Sp-1 等典型的转录因子结合位点外，还存在 GR、CREB 和 ER 等与生长繁殖相关的转录因子结合位点。4 个 *dnmts* 的基因表达均随发育阶段呈动态变化，并表现出明显的性别二态性。基因结构和表达分析结果均表明，*dnmts* 各成员之间存在显著的功能分化，并在特定的发育阶段和组织中发挥重要功能。

本文的附加材料见网络版（增强出版）



参考文献 References

[1] REIK W, KELSEY G. Cellular memory erased in human embryos[J]. Nature, 2014, 511: 540-541.

[2] KIM M J, CHOI H W, JANG H J, et al. Conversion of genomic imprinting by reprogramming and redifferentiation[J]. Journal of cell science, 2013, 126(11): 2516-2524.

[3] CARREL L, WILLARD H F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females[J]. Nature, 2005, 434: 400-404.

[4] YOU J S, JONES P A. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin [J]. Cancer cell, 2012, 22(1): 9-20.

[5] MALYSHEV I Y. Epigenetic, post-transcriptional and metabolic mechanisms of macrophage reprogramming [J]. Patologicheskaia fiziologiia i eksperimental'naia terapiia, 2015(3): 118-127.

[6] CHOI M, LEE J, LE M T, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation in pigs using reduced representation bisulfite sequencing[J]. DNA research, 2015, 22(5): 343-355.

[7] PROKHORTCHOUK E, HENDRICH B. Methyl-CpG binding proteins and cancer: are MeCpGs more important than MBDs? [J]. Oncogene, 2002, 21(35): 5394-5399.

[8] WANG F L, YAN L X, SHI H J, et al. Genome-wide identification, evolution of DNA methyltransferases and their expression during gonadal development in Nile tilapia[J]. Comparative biochemistry and physiology: Part B, Biochemistry & molecular biology, 2018, 226: 73-84.

[9] CAMPOS C, VALENTE L M P, FERNANDES J M O. Molecular evolution of zebrafish dnmt3 genes and thermal plasticity of their expression during embryonic development[J]. Gene, 2012, 500(1): 93-100.

[10] 王飞龙. DNA 甲基化酶在尼罗罗非鱼性别分化和性腺发育中的功能研究[D]. 重庆：西南大学，2022. WANG F L. Roles of DNA methyltransferases in sex differentiation and gonadal development in Nile tilapia[D]. Chongqing: Southwest University, 2022 (in Chinese with English abstract).

[11] TODD E V, ORTEGA-RECALDE O, LIU H, et al. Stress, novel sex genes, and epigenetic reprogramming orchestrate socially controlled sex change[J/OL]. Science advances, 2019, 5(7): eaaw7006 [2024-03-04]. https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw7006.

[12] ZHANG Y Z, SUN X, ZHANG L H, et al. Testicular Dnmt3 expression and global DNA methylation are down-regulated by gonadotropin releasing hormones in the ricefield eel *Monopterus albus*[J/OL]. Scientific reports, 2017, 7: 43158[2024-03-04]. https://doi.org/10.1038/srep43158.

[13] WANG F L, QIN Z L, LI Z Q, et al. Dnmt3aa but not Dnmt3ab is required for maintenance of gametogenesis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J/OL]. International journal of molecular sciences, 2021, 22(18): 10170 [2024-03-04]. https://doi.org/10.3390/ijms221810170.

[14] OKANO M, XIE S, LI E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases[J]. Nature genetics, 1998, 19(3): 219-220.

[15] LAI Y H, AUDIRA G, LIANG S T, et al. Duplicated *dnmt3aa* and *dnmt3ab* DNA methyltransferase genes play essential and non-overlapped functions on modulating behavioral control in zebrafish[J/OL]. Genes, 2020, 11(11): 1322[2024-03-04]. https://doi.org/10.3390/genes11111322.

[16] ZHOU X Y, ABBAS K, LI M Y, et al. Comparative studies on survival and growth performance among diploid, triploid and tetraploid dojo loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Aquaculture international, 2010, 18(3): 349-359.

[17] LIU Y G, CHEN Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. BioTechniques, 2007, 43(5): 649-650.

[18] 曹文怡，易少奎，杨楠，等. 泥鳅 cyp19a1 基因克隆及其在倍性间的表达差异[J]. 华中农业大学学报，2021，40(4)：166-176. CAO W Y, YI S K, YANG N, et al. Molecular cloning and differential expression of cyp19a1 in tetraploid and diploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2021, 40(4): 166-176 (in Chinese with English abstract).

[19] 罗双双，高泽霞，冯兵，等. 二倍体和四倍体泥鳅 qRT-PCR 分析中内参基因优选[J]. 华中农业大学学报，2019，38(5)：1-8. LUO S S, GAO Z X, FENG B, et al. Screening of optimal in-

ternal reference genes for qRT-PCR in diploid and tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2019, 38(5): 1-8 (in Chinese with English abstract).

[20] SCHULTE-MERKER S,HAMMERSCHMIDT M,BEUCHLE D, et al.Expression of zebrafish goosecoid and no tail gene products in wild-type and mutant no tail embryos[J].Development,1994,120(4):843-852.

[21] FENG Z F, ZHANG Z F, SHAO M Y, et al.Developmental expression pattern of the Fc-vasa-like gene, gonadogenesis and development of germ cell in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Aquaculture, 2011, 314 (1/2/3/4): 202-209.

[22] EASWARAN H P,SCHERMELLEH L,LEONHARDT H, et al.Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases[J].EMBO reports,2004,5(12):1181-1186.

[23] GRAYSON D R, GUIDOTTI A. The dynamics of DNA methylation in schizophrenia and related psychiatric disorders [J]. Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology,2013,38(1): 138-166.

[24] OTANI J, NANKUMO T, ARITA K, et al.Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain[J].EMBO reports,2009,10(11):1235-1241.

[25] UYSAL F, AKKOYUNLU G, OZTURK S.Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos[J].Biochimie,2015,116:103-113.

[26] FIRMINO J, CARBALLO C, ARMESTO P, et al.Phylogeny, expression patterns and regulation of DNA Methyltransferases in early development of the flatfish, *Solea senegalensis*[J/OL].BMC developmental biology,2017,17(1):11[2024-03-04]. https://doi.org/10.1186/s12861-017-0154-0.

[27] 宋崇阳,张思勉,李永闯,等.脊尾白虾Dnmt2启动子克隆及其转录调控分析[J].海洋科学,2022,46(5):95-103.SONG C Y, ZHANG S M, LI Y C, et al.Cloning and transcriptional regulation of Dnmt2 promoter in *Exopalaemon carinicauda* [J]. Marine sciences, 2022, 46(5): 95-103 (in Chinese with English abstract).

[28] FAUGHT E, VIJAYAN M M.Loss of the glucocorticoid receptor in zebrafish improves muscle glucose availability and increases growth[J].American journal of physiology, endocrinology and metabolism,2019,316(6):E1093-E1104.

[29] YANG H, LEE J H, NOH J K, et al.Expression pattern of early growth response gene 1 during olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryonic development[J].Development & reproduction,2014,18(4):233-240.

[30] WANG S H, ZHU Y H, MELAMED P.The molecular regulation of Chinook salmon gonadotropin beta-subunit gene transcription [J]. General and comparative endocrinology, 2009, 161(1):34-41.

[31] KOOPMAN P.The molecular biology of SRY and its role in sex determination in mammals[J].Reproduction, fertility, and development,1995,7(4):713-722.

[32] WALKER W H, HABENER J F.Role of transcription factors CREB and CREM in cAMP-regulated transcription during spermatogenesis[J].Trends in endocrinology and metabolism: TEM,1996,7(4):133-138.

[33] FIORITO E, KATIKA M R, HURTADO A. Cooperating transcription factors mediate the function of estrogen receptor [J].Chromosoma,2013,122(1):1-12.

[34] KISHIKAWA S, MURATA T, UGAI H, et al.Control elements of Dnmt1 gene are regulated in cell-cycle dependent manner [J]. Nucleic acids symposium series, 2003, 3 (1): 307-308.

[35] ALURU N, KUO E, HELFRICH L W, et al.Developmental exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters DNA methyltransferase (Dnmt) expression in zebrafish (*Danio rerio*)[J].Toxicology and applied pharmacology,2015,284(2): 142-151.

[36] ZHANG L, XIE B H, ZHANG Q Y, et al.Molecular cloning and expression analysis of *dnmt*1 in goldfish, *Carassius auratus* [J].Acta hydrobiologica sinica,2012,36(2):229-235.

[37] WANG X G, BHANDARI R K.The dynamics of DNA methylation during epigenetic reprogramming of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Epigenetics, 2020, 15(5):483-498.

[38] 赵紫维.鳜DNA甲基化酶的表达和功能分析[D].上海:上海海洋大学, 2021. ZHAO Z W. The expression and function analysis of the DNA methylase from *Siniperca chuatsi* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021 (in Chinese with English abstract).

[39] LA SALLE S, MERTINEIT C, TAKETO T, et al. Windows for sex-specific methylation marked by DNA methyltransferase expression profiles in mouse germ cells[J].Developmental biology,2004,268(2):403-415.

[40] TAKAYAMA K, SHIMODA N, TAKANAGA S, et al.Expression patterns of dnmt3aa, dnmt3ab, and dnmt4 during development and fin regeneration in zebrafish[J].Gene expression patterns:GEP,2014,14(2):105-110.

[41] BSHARY R, BROWN C. Fish cognition[J]. Current biology,2014,24(19):R947-R950.

[42] KANEDA M, OKANO M, HATA K, et al.Essential role for *de novo* DNA methyltransferase *Dnmt3a* in paternal and maternal imprinting[J].Nature,2004,429:900-903.

[43] BOURCHIS D, BESTOR T H.Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L [J].Nature,2004,431:96-99.

[44] LIU Y, WANG W X, LIANG S S, et al.Sexual dimorphism of DNA and histone methylation profiles in the gonads of the olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J].Fish physiology and biochemistry,2021,47(5):1341-1352.

[45] UYSAL F, SUKUR G, CINAR O.DNMT enzymes differen-

tially alter global DNA methylation in a stage-dependent manner during spermatogenesis[J/OL].Andrologia,2022,54(4):e14357[2024-03-04]. https://doi.org/10.1111/and.14357.

[46] TAKADA Y,YAMAN-DEVECI R,SHIRAKAWA T,et al. Maintenance DNA methylation in pre-meiotic germ cells regulates meiotic prophase by facilitating homologous chromosome pairing [J/OL]. Development, 2021, 148 (10) : dev194605 [2024-03-04]. https://doi.org/10.1242/dev.194605.

Structure and spatiotemporal expression analysis of DNA methyltransferase gene family of loach *Misgurnus anguillicaudatus*

XIANG Yumei[1,2],SU Junxiao[1],ZENG Yu[3,4],ZHOU Xiaoyun[1]

1.*College of Fisheries*, *Huazhong Agricultural University*, *Wuhan 430070*, *China*;
2.*Guangxi Introduction and Breeding Center of Aquaculture*, *Nanning 530001*, *China*;
3.*Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation*, *Ministry of Education/College of Life Science*, *China West Normal University*, *Nanchong 637009*, *China*;
4.*College of Chemistry and Life Science*, *Chengdu Normal University*, *Chengdu 611130*, *China*

Abstract To analyze the mechanism of DNA methylation in regulating gene expression in teleost such as the loach *Misgurnus anguillicaudatus*, the promoter sequences of DNA methyltransferase gene family (*dnmts*) of *M. anguillicaudatus* were cloned using the hiTAIL-PCR method based on transcriptome sequencing data, and the spatiotemporal expression patterns of *dnmts* were then analyzed using qRT-PCR and in situ hybridization techniques. The results showed significant differences in the subcellular localization and the N-terminal regulatory domain. The regulatory domain of *dnmt1* includes the conserved domains DMAP, PBD, CXXC, and BAH, while *dnmt3s* contain the domains PWWP, ADD, or CH, indicating a notable functional differentiation between *dnmt1* and *dnmt3s*. Such functional differentiation was further confirmed by the phylogenetic tree constructed based on amino acid sequences. In the promoter sequences of the 4 *dnmts*, besides the typical functional element TATA-box, several transcription factor binding sites related to embryonic development, growth, and reproduction were also predicted, such as CREB, Egr-1 and Pit-1. The expression levels of the 4 *dnmts* were all associated with the developmental stages and exhibited dynamic changes. During the rapid cleavage stage, from the cleavage stage to the blastocyst stage, *dnmt1* was highly expressed, while during the organ differentiation stage in later embryonic development, *dnmt3aa* and *dnmt3ab* were highly expressed. In adult fish, *dnmt1* was highly expressed in the gonads; *dnmt3aa* and *dnmt3ab* were highly expressed in the brain, while *dnmt3b* showed high expression in the gonads and muscles. Additionally, the expression of *dnmts* exhibited obvious sex dimorphism: the expression levels of *dnmt1* and *dnmt3b* were significantly higher in the ovaries than in the testis, while *dnmt3aa* and *dnmt3ab* showed the opposite pattern. The results of *in situ* hybridization showed that *dnmt3aa* was expressed in both germ cells and somatic cells of the ovary, whereas *dnmt3ab* was expressed only in the somatic cells of the ovary. These findings indicate functional differentiation among the members of the *dnmts* family in *M. anguillicaudatus*, suggesting that they play important roles in specific developmental stages and tissues.

Keywords *Misgurnus anguillicaudatus*; DNA methylation; DNA methyltransferases; gene structure and function; regulation of gene expression

(责任编辑:边书京)