

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.16077

## 马氏珠母贝外套膜不同区域基因组 DNA 甲基化 MSAP 分析

罗少杰<sup>1</sup>, 邓岳文<sup>1,2</sup>, 郑哲<sup>1</sup>, 焦钰<sup>1,2</sup>, 王庆恒<sup>1,2</sup>

1. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025;
2. 广东省珍珠养殖与加工工程技术研究中心, 广东 湛江 524025

**摘要:** 通过甲基化敏感多态性扩增(methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP)技术, 检测马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)外套膜的边缘膜区(mantle edge, Me)、套膜区(mantle pallial, Mp)和中央膜区(mantle central, Mc)的基因组 DNA 甲基化修饰水平; 回收具特异性的清晰甲基化修饰片段进行测序、比对分析并筛选基因; 利用荧光定量 PCR 对筛选基因进行定量分析。结果显示: (1) 利用 15 对引物进行扩增实验, 平均每个个体外套膜 3 个区域能够产生(1163.25±124.34)条清晰可辨的条带, 其中 Me、Mp 和 Mc 分别得到(401.00±40.37)条、(380.63±52.39)条和(381.63±53.57)条扩增条带, 各组织甲基化总条数差异不显著( $P>0.05$ ); Me、Mp 和 Mc 的基因组甲基化水平分别为(17.07±2.19)%、(15.48±2.34)%和(19.61±2.88)%, Mc 和 Mp 具有显著性差异( $P<0.05$ ); 组织间的基因组甲基化水平由高到低排列依次是 Mc > Me > Mp。(2) 对特异性片段进行回收、测序后, 经在线及本地 Blast 比对, 得到 8 条存在甲基化修饰的基因序列, 其中 3 条有同源序列, 基因注释为 40S 核糖体蛋白 SA (40S ribosomal protein SA)、*iHog* (interference hedgehog)、锌指蛋白(zinc finger protein castor)。*iHog* 仅在中央膜上具有全甲基化修饰, 且 *E* 值较低, 为筛选的目的基因。(3) 荧光定量结果表明 *iHog* 在 Me、Mp 和 Mc 中均有表达, 以 Me 表达量最高, Mc 表达量最低, 差异显著( $P<0.05$ )。我们推测 *iHog* 的 DNA 序列的甲基化修饰抑制了该基因在 Mc 组织中的表达。综上研究结果表明, 马氏珠母贝外套膜 3 个区域的甲基化修饰水平不一, 且 DNA 甲基化在基因表达调控中具有作用, 这对深入研究珍珠贝生物矿化和免疫反应机制具有一定的参考意义。

**关键词:** 马氏珠母贝; 外套膜; MSAP 技术; DNA 甲基化; 表达调控

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)06-1227-09

表观遗传是指通过修饰基因、蛋白质以及改变基因与蛋白、蛋白与蛋白、DNA 与其他分子之间的相互作用而实现 DNA 序列不发生变化, 但基因表达发生变化的现象<sup>[1]</sup>。甲基化修饰作为基因组 DNA 主要的表观遗传修饰方式之一, 能够引起 DNA 稳定性、构象以及染色体结构改变, 进而在调控基因表达<sup>[2]</sup>、维持染色体结构<sup>[3]</sup>和基因印记<sup>[4]</sup>等过程中发挥重要作用。

一般来说, DNA 甲基化是由甲基转移酶介导, 并利用 S-腺苷甲硫氨酸提供甲基, 将胞嘧啶(C)转变为 5-甲基胞嘧啶(<sup>5mC</sup>)<sup>[5]</sup>, 其水平会受到环

境、组织和疾病等因素的影响, 因此即便是同一个细胞, 甚至是机体的不同发育阶段, 其甲基化水平也可能有差异<sup>[6]</sup>。研究认为, 在无脊椎动物中, DNA 甲基化多发生于转录区域, 并且与基因表达水平呈负相关<sup>[7]</sup>。牡蛎<sup>[8]</sup>基因组的 DNA 甲基化与基因表达水平呈正相关; 但在对海兔(*Aplysia*)的研究表明, CREB2 基因启动子区发生甲基化将会抑制基因的表达, 最终影响突触的可塑性调控<sup>[9]</sup>, 可见不同物种中 DNA 甲基化对基因表达的调控机制存在差异。

为深入了解 DNA 甲基化在生物体中的调控

收稿日期: 2016-03-11; 修订日期: 2016-04-27.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41206141, 31372526); 广东省科技计划项目(2013B020201002).

作者简介: 罗少杰(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 海洋生物学. E-mail: rogerjoke1@hotmail.com

通信作者: 王庆恒, 副教授, 研究方向: 海产无脊椎动物生物学与增养殖. E-mail: wangqingheng@163.com

机制和作用,对甲基化模式的深入研究就显得十分必要。如今,检测 DNA 甲基化的方法有很多,甲基化敏感扩增多态性技术(methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP)以多态性高,无需预先分析 DNA 的序列等优点,而成为检测基因组 DNA 甲基化水平和模式的有效手段。MSAP 是在扩增片段多态性技术(amplified fragment length polymorphism, AFLP)的基础上建立起来,将 *Mse* I 替换为对 CCGG 位点胞嘧啶甲基化敏感性不同的同裂酶 *Msp* I 和 *Hpa* II,从而在全基因组水平对 CCGG 位点的 DNA 甲基化状态进行检测。栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)<sup>[10]</sup>、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)<sup>[11]</sup>、背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)<sup>[12]</sup>、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)<sup>[13]</sup>、水稻(*Oryza sativa*)<sup>[14]</sup>、毛竹(*Phyllostachys*)<sup>[15]</sup>、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)<sup>[16]</sup>等多种经济动植物的 DNA 甲基化水平已被检测,其甲基化水平不一,具有较大差异。

马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)又称合浦珠母贝,是中国重要的海水珍珠培育贝类之一,其矿化和免疫防御机制一直都是研究者的关注重点。外套膜是贝壳矿化的主要器官,其部位不同,结构特征和功能亦不同。研究发现贝壳珍珠层形成的相关基因在外套膜中央膜区和套膜区高表达,而棱柱层形成相关基因在边缘膜区高表达<sup>[17]</sup>,但基因表达差异的具体调控机制尚不清楚。本研究利用 MSAP 技术重点分析外套膜不同区域的甲基化水平,并将具特异性的清晰甲基化修饰片段回收、比对、定量分析,为探究 DNA 甲基化在马氏珠母贝贝壳形成及免疫反应中的作用提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验用马氏珠母贝“海选 1 号”养殖于湛江市徐闻县大井村海域,选用规格基本一致的 2 龄贝 8 只。实验贝活体运回实验室后,在清静的水中暂养 2 d 后取样。取样区域为马氏珠母贝外套膜的边缘膜(Me)、套膜(Mp)、中央膜(Mc)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 DNA 甲基化的引物设计 参照 Xiong 等<sup>[18]</sup>

的方法分别设计接头引物、预扩增引物、选扩增引物以及筛选后目的基因的荧光定量引物,引物序列见表 1。

**1.2.2 DNA 提取** 参照基因组 DNA 提取试剂盒说明书,分别提取马氏珠母贝 Me、Mp 和 Mc 的 DNA。值得注意的是用于 MSAP 分析的 DNA 质量要求比较高,提取后的 DNA 应为单一明亮条带。

**1.2.3 MSAP 分析** MSAP 分析分 4 个部分进行,分别是双酶切反应、T4 连接反应、扩增反应、聚丙烯酰胺凝胶检测和分析。

双酶切反应包括 *Eco*R I+*Hpa* II 和 *Eco*R I+*Msp* I 两组。*Eco*R I+*Hpa* II 组的酶切体系为 25  $\mu$ L,包括 2.5  $\mu$ L 的 CutSmart, 0.5  $\mu$ g 的 DNA, 1  $\mu$ L *Hpa* II, 1  $\mu$ L *Eco*R I, 37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h, 65 $^{\circ}$ C 变性; *Eco*R I+*Msp* I 组只需将 *Hpa* II 替换为 *Msp* I 即可。

T4 连接反应的总体系 20  $\mu$ L,包括 5  $\mu$ L 酶切产物, 1  $\mu$ L MH 接头, 1  $\mu$ L *Eco*R I 接头, 0.5  $\mu$ L T4 DNA Ligase, 4  $\mu$ L T4 Buffer, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。将 T4 连接反应后的产物稀释 10 倍用于预扩增。

扩增反应可分为预扩增和选择性扩增。其中,预扩增体系 20  $\mu$ L,包括 0.8  $\mu$ L 模板 DNA, 0.8  $\mu$ L Pre-*Eco*R I, 0.8  $\mu$ L pre-MH, 10  $\mu$ L rTaq。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 51.9 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 合计 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。预扩增之后,用 1% 琼脂糖凝胶检测 PCR 产物,若产物呈现弥散状则说明酶切、连接以及预扩增效果好,符合进一步实验的要求。预扩增产物稀释 20 倍后用于进行选择扩增。

选择性扩增体系 20  $\mu$ L,包括 0.8  $\mu$ L 模板 DNA, 0.8  $\mu$ L *Eco*R I<sub>n</sub>, 0.8  $\mu$ L MH<sub>n</sub>, 10  $\mu$ L rTaq。选择性扩增使用降落 PCR,具体程序为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 合计 15 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 合计 27 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

使用 6%聚丙烯酰胺凝胶分离选择性扩增产物,而后银染法染色。对不同组织的选择性扩增产物在泳道上的情况进行分类,最终分为三型<sup>[19]</sup>。I 型为 *Hpa* II 和 *Msp* I 二者均有带,说明 CCGG 的胞嘧啶甲基化是发生在单链内侧(C<sup>m</sup>CCGG/GG-CC)(备注为 A); II 型为 *Hpa* II 无带, *Msp* I 有带,说明

表 1 MSAP 分析的接头和引物序列  
Tab. 1 Sequence of adapters and primers used for MSAP analysis

接头和引物 adaptor and primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	碱基数 bases	用途 function
<i>EcoR</i> I-A-F	CTCGTAGACTGCGTACC	17	
<i>EcoR</i> I-A-R	AATTGGTACGCACTCTAC	18	接头
MH-A-F	GACGATGAGTCTAGAA	16	adapter
MH-A-R	CGTTCTAGACTCATC	15	
Pre- <i>EcoR</i> I	GACTGCGTACCAATTCA	17	预扩增引物
Pre-MH	GATGAGTCTAGAACGG	16	pre-amplification primer
<i>EcoR</i> I -1	GACTGCGTACCAATTCAAC	19	
<i>EcoR</i> I -2	GACTGCGTACCAATTCAAG	19	
<i>EcoR</i> I -3	GACTGCGTACCAATTCACA	19	
<i>EcoR</i> I -4	GACTGCGTACCAATTCAGT	19	选扩增引物
<i>EcoR</i> I -5	GACTGCGTACCAATTCATC	19	selected amplification primer
MH-1	GATGAGTCTAGAACGGTAC	19	
MH-2	GATGAGTCTAGAACGGTAG	19	
MH-3	GATGAGTCTAGAACGGTTC	19	
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	24	菌落 PCR
M13-R	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	24	colony PCR
<i>iHog</i> -F	GTAACGGCTAATCCTGGCG	19	荧光定量
<i>iHog</i> -R	CATTGTTGACTGGTTGACCTTG	23	real time PCR
<i>GAPDH</i> -F	CACTCGCCAAGATAATCAACG	21	内参基因
<i>GAPDH</i> -R	CCATTCCTGTCAACTTCCCAT	21	reference gene

甲基化是发生在 DNA 双链内侧( $C^mCGG/GG^mCC$ ), 代表一个全甲基化位点(备注为 B); III 型则是 *Hpa* II 有带, *Msp* I 无带, 说明只在单链上发生 CCGG 的胞嘧啶甲基化( $^mCCGG/GGCC$  或  $^mC^mCGG/GGCC$ ), 代表一个半甲基化位点(备注为 C)。A、B 和 C 3 种类型如图 1 所示。

计算公式分别为: 组织扩增条带总条数(备注为 D):  $D=A+B+C$ ; 非甲基化位点百分比= $A/D \times 100\%$ ; 全甲基化位点百分比= $B/D \times 100\%$ ; 半甲基化位点百分比= $C/D \times 100\%$ ; 组织甲基化水平= $(B+C)/D \times 100\%$ 。

**1.2.4 甲基化修饰片段的回收、克隆及测序** 收集聚丙烯酰胺凝胶上具有特异性(全甲基化位点和半甲基化位点)的清晰甲基化修饰位点片段, 捣碎分装, 分别加入 20  $\mu$ L 的双蒸水, 37 $^{\circ}$ C 过夜后用相应的引物组合及扩增条件进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后为单一明亮条带, 切胶回收并纯化, 将回收产物与 pMD18-T 载体连接, 经转化挑取阳性克隆样品后送往上海生工生物工程技术有限公司测序。

**1.2.5 序列分析及筛选** 测序结果分别通过在线及本地 Blast 程序(马氏珠母贝基因组数据, 暂未发表)进行同源性分析。结合聚丙烯酰胺凝胶图谱, 分析其在 Me、Mp 和 Mc 上的甲基化修饰情况, 而后选取仅在 Me 或 Mp 或 Mc 上具特异性甲基化修饰的片段进行本地 Blast 比对, 且 *E* 值较低的基因为目的基因。

**1.2.6 荧光定量检测组织表达差异** 通过荧光定量 PCR 检测目的基因在正常贝体的 Me、Mp 和 Mc 中的表达情况。荧光定量 PCR 体系为 10  $\mu$ L, 体系组分包括 cDNA 模板 0.5  $\mu$ L, 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, 双蒸水 3.5  $\mu$ L, SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 5  $\mu$ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 35 s, 40 个循环, 内参基因为 GAPDH。

组织荧光定量的计算公式为: 相对表达量= $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , 使用 SPSS17.0 进行显著性分析。

## 2 结果与分析

**2.1 MSAP 扩增结果及 DNA 甲基化修饰水平分析** 本次实验共设计 15 对引物, 经聚丙烯酰胺凝

胶电泳后, 获得了谱带清晰, 甲基化多态性好, 重复性高的扩增图谱(图 1)。

平均每个个体的外套膜 3 个区域能够产生  $(1163.25 \pm 124.34)$  条条带, 其中 Me 有  $(401.00 \pm 40.37)$  条条带, Mp 有  $(380.63 \pm 52.39)$  条条带, Mc 有  $(381.63 \pm 53.57)$  条条带(表 2), 区域间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

计算多种甲基化类型位点在马氏珠母贝外套膜不同区域水平, 结果表明 3 个区域的甲基化水平由高到低依次是  $Mc(19.61 \pm 2.88)\% > Me(17.07 \pm 2.19)\% > Mp(15.48 \pm 2.34)\%$ , Mp 和 Mc 之间的半甲基化位点比例、非甲基化位点比例和组织甲基化比例具有显著性差异(表 3) ( $P < 0.05$ )。

## 2.2 DNA 甲基化修饰片段序列分析

将回收得到的甲基化修饰片段进行克隆、测序分析, 最终得到 8 条甲基化修饰 DNA 序列。经在线及本地 Blast 比对(表 4), 共有 4 条片段位于基因编码区, 其中 3 条具有同源序列, 基因注释分别为: 为 40S 核糖体蛋白 SA(40S ribosomal protein SA)、*iHog* (interference hedgehog)、锌指蛋白(zinc finger protein castor)。

## 2.3 筛选片段的定量分析

经过筛选, sequence II 符合 2.2.6 筛选条件, 而后对 sequence II 比对上的 *iHog* 基因(interference hedgehog)作进一步分析。定量分析结果表明 *iHog* 基因在 Me、Mp 和 Mc 上均有表达, 在 Me 中的表达量显著高于 Mc(图 2) ( $P < 0.05$ )。

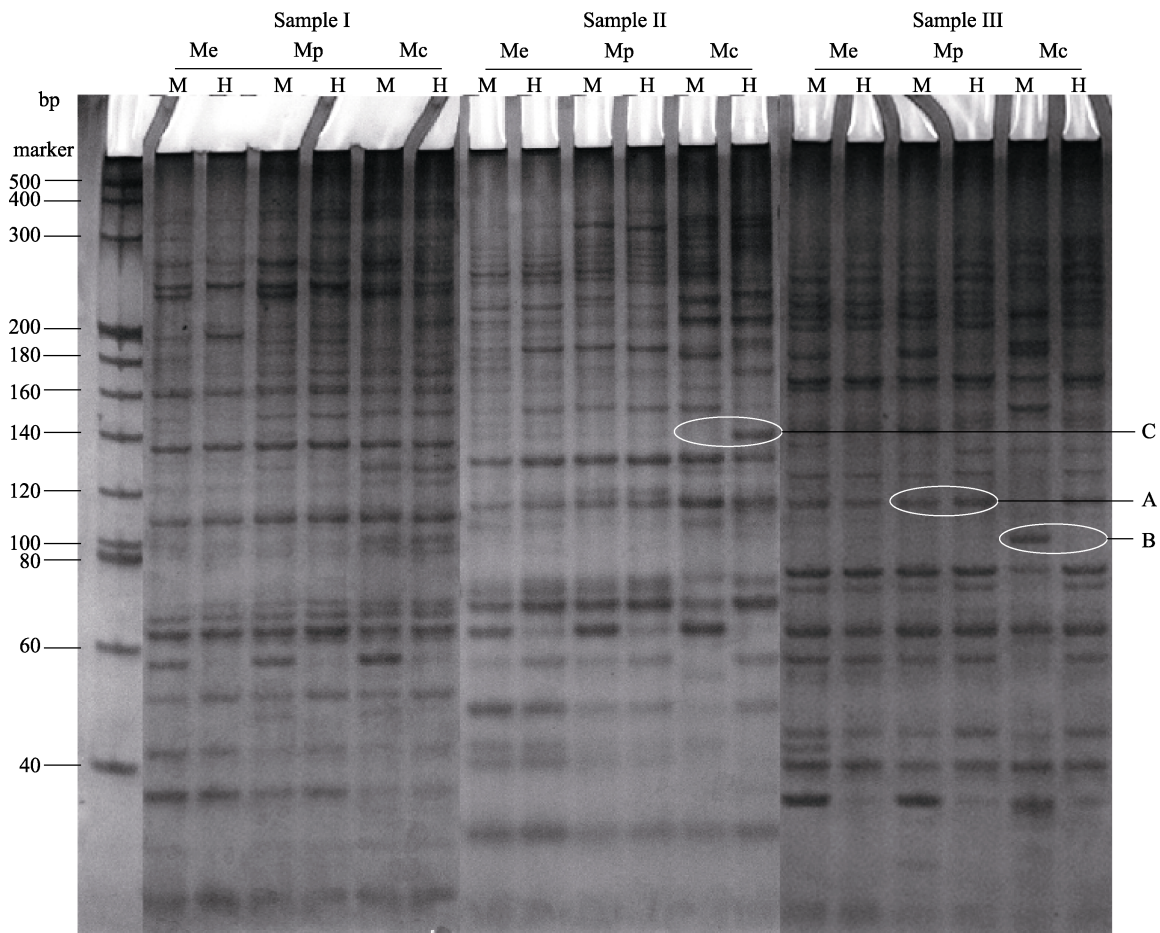


图 1 马氏珠母贝不同个体的选择性扩增产物聚丙烯酰胺凝胶检测

M: *Msp* I 和 *Eco*R I 双酶切; H: *Hpa* II 和 *Eco*R I 双酶切; A: 非甲基化位点; B: 全甲基化位点; C: 半甲基化位点; Mc: 中央膜; Me: 边缘膜; Mp: 套膜。

Fig. 1 Selective amplification products were detected by polyacrylamide gel with different individuals of *Pinctada martensii*

M: *Msp* I + *Eco*R I double digestion; H: *Hpa* II + *Eco*R I double digestion; A: non-methylated sites; B: full-methylated sites; C: hemi-methylated sites; Mc: mantle center; Me: mantle edge; Mp: mantle pallial.

表 2 马氏珠母贝外套膜不同区域甲基化条带数目  
Tab. 2 Data of DNA methylation of *Pinctada martensii*

条;  $\bar{x} \pm SD$ ;  $n=8$

组织 tissue	全甲基化位点 full-methylated site	半甲基化位点 hemi-methylated site	非甲基化位点 non-methylated site	组织甲基化总数 tissue methylated
Me	40.50±3.21 <sup>ab</sup>	27.50±4.75 <sup>ab</sup>	333.00±38.81 <sup>a</sup>	401.00±40.37 <sup>a</sup>
Mp	36.25±6.16 <sup>a</sup>	22.13±6.38 <sup>a</sup>	322.25±48.97 <sup>a</sup>	380.63±52.39 <sup>a</sup>
Mc	43.00±7.75 <sup>b</sup>	31.63±7.11 <sup>b</sup>	307.00±44.85 <sup>a</sup>	381.63±53.57 <sup>a</sup>

注: 每列内具不同上标字母表示数值差异显著( $P<0.05$ ). Mc: 中央膜; Me: 边缘膜; Mp: 套膜.

Note: Within the same line, values with the different letters were significantly different ( $P<0.05$ ). Mc: mantle center; Me: mantle edge; Mp: mantle pallial.

表 3 马氏珠母贝外套膜不同区域多种甲基化类型百分比及组织甲基化水平  
Tab. 3 Percentage of DNA methylation type in different tissues of *Pinctada martensii*

%;  $\bar{x} \pm SD$ ;  $n=8$

组织 tissue	全甲基化位点 full-methylated sites	半甲基化位点 hemi-methylated sites	非甲基化位点 non-methylated sites	组织甲基化水平 tissue methylated
Me	10.16±0.97 <sup>a</sup>	6.91±1.32 <sup>ab</sup>	82.93±2.19 <sup>ab</sup>	17.07±2.19 <sup>ab</sup>
Mp	9.72±2.44 <sup>a</sup>	5.76±1.20 <sup>a</sup>	84.52±2.34 <sup>b</sup>	15.48±2.34 <sup>a</sup>
Mc	11.31±1.65 <sup>a</sup>	8.30±1.52 <sup>b</sup>	80.39±2.88 <sup>a</sup>	19.61±2.88 <sup>b</sup>

注: 每列内具不同上标字母表示数值差异显著( $P<0.05$ ). Mc: 中央膜; Me: 边缘膜; Mp: 套膜.

Note: Within the same line, values with different letters were significantly different ( $P<0.05$ ). Mc: mantle center; Me: mantle edge; Mp: mantle pallial.

表 4 回收序列经基因组与在线 Blast 比对结果  
Tab. 4 Results of comparison by genome and online Blast

序列 sequence	长度/bp length	比对方式 method of comparison	比对结果 result of comparison	$E$	甲基化类型 methylation type
sequence I	80	与基因组比对 comparison by genome	10010533-40S ribosomal protein SA	$4 \times 10^{-8}$	全甲基化位点 full-methylated site
		在线 Blast comparison by Blast	ABO26619.1-Raminin receptor	4.1	
sequence II	116	与基因组比对 comparison by genome	10021657-interference hedgehog	$1 \times 10^{-18}$	全甲基化位点 full-methylated site
		在线 Blast comparison by Blast	no found	*	
sequence III	73	与基因组比对 comparison by genome	10012837-Zinc finger protein castor	0.009	全甲基化位点 full-methylated site
		在线 Blast comparison by Blast	no found	*	
sequence IV	98	与基因组比对 comparison by genome	10030390-none	0.16	半甲基化位点 hemi-methylated site
		在线 Blast comparison by Blast	no found	*	
Sequence V	65	与基因组比对 comparison by genome	no found	*	全甲基化位点 full-methylated site
		在线 Blast comparison by Blast	no found	*	
Sequence VI	164	与基因组比对 comparison by genome	no found	*	半甲基化位点 hemi-methylated site
		在线 Blast comparison by Blast	no found	*	
sequence VII	71	与基因组比对 comparison by genome	no found	*	全甲基化位点 full-methylated site
		在线 Blast comparison by Blast	no found	*	
sequence VIII	124	与基因组比对 comparison by genome	no found	*	全甲基化位点 full-methylated site
		在线 Blast comparison by Blast	no found	*	

注: “\*” 表示无.

Note: “\*” indicates no.

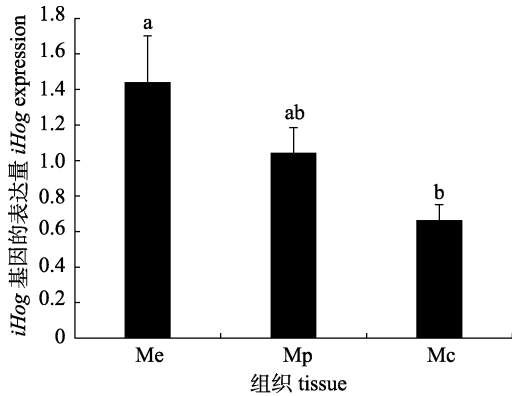


图 2 *iHog* 在马氏珠母贝外套膜不同区域的表达

Mc: 中央膜; Me: 边缘膜; Mp: 套膜。柱上不同字母数表示不同组织间数值差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 2 Expression of *iHog* in the mantle

Mc: mantle center; Me: mantle edge; Mp: mantle pallial. Values with different letters were significantly different ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

大量的研究表明, DNA 甲基化在许多方面具有重要的生物学功能, 如调控 DNA 复制的起始, 参与 DNA 错配修复; 减少转录噪音, 抑制转座子的活性; 引起特定基因沉默, 维持有机体正常发育等<sup>[1]</sup>。MSAP 技术以通用性高, 信息丰富, 定性分析可靠而被广泛应用于分析各种条件下的生物组织基因组 DNA 甲基化情况<sup>[20]</sup>。Xiong 等<sup>[18]</sup>最早利用 MSAP 技术分析水稻甲基化水平并验证其 DNA 甲基化多态性片段; Wang 等<sup>[21]</sup>和姜群等<sup>[13]</sup>分别利用全基因组甲基化测序法和 MSAP 技术检测太平洋牡蛎不同组织的甲基化水平, 证明了 MSAP 检测结果的有效性和可靠性。本研究采用 MSAP 技术分析外套膜 3 个不同区域的甲基化模式, 结果显示中央膜区域的甲基化修饰水平最高, 边缘膜居中, 套膜最低。一般认为外套膜边缘膜主要参与贝壳棱柱层的形成, 套膜和中央膜主要参与贝壳珍珠层的形成。尽管套膜与中央膜都参与珍珠层的形成, 但组成套膜与中央膜的上皮细胞在功能上仍存在差异。师尚丽等<sup>[22]</sup>对珍珠贝外套膜细胞的超微结构观察指出边缘膜突起以发育早期的柱状细胞居多, 套膜则是发育早期和中期柱状细胞数量相当, 中央膜大多是中期柱状细胞, 并且发育早期的柱状细胞生物合成能力最旺盛, 中期柱状细胞则增强了对来自结缔组织物质

的转运能力, 因此, 外套膜 3 个区域甲基化修饰水平的差异可能是导致外套膜结构与功能不同的原因之一。

结合图 2 及表 3, 可以发现马氏珠母贝个体的甲基化水平趋势是类似的, 由高到低均是中央膜、边缘膜、套膜, 这说明尽管有个体的差异, 但组织的甲基化水平并未因此而被掩盖; 结果还发现个体间的特异性甲基化修饰位点并不完全相同, 这可能与马氏珠母贝的杂合度、个体差异等有关。杜晓东等<sup>[23]</sup>对马氏珠母贝家系遗传结构的研究表明, 目前培育的珍珠贝家系杂合度适中, 家系间具有明显的遗传分化特点; 李毅丹<sup>[24]</sup>指出, 各个种群基于 DNA 甲基化的表观遗传多样性指标高于遗传多样性指标。可见 DNA 甲基化在表观遗传中扮演着重要角色。目前 DNA 甲基化与表观遗传性状的关联分析, 更多集中在高等植物中, 如毛竹<sup>[25]</sup>、香雪兰<sup>[26]</sup>、野生稻<sup>[27]</sup>等, 尚未在马氏珠母贝中有见报道。DNA 甲基化多样性作为标志遗传多样性的信息来源, 暗示了 DNA 甲基化在马氏珠母贝群体分化以及物种进化过程中的潜在应用价值。

研究还指出水产动物的 DNA 甲基化水平一般集中在 20%~50%<sup>[11-13]</sup>, 本实验结果略低于栉孔扇贝 (*Chlamy farreri*)<sup>[10]</sup>、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)<sup>[28]</sup> 的组织甲基化水平, 这与物种自身的甲基化修饰程度有关。结果还显示外套膜 3 个不同区域的全甲基化水平明显高于半甲基化水平, 这意味着在基因组 CCGG 位点处, DNA 双链甲基化占据优势, 同时推测马氏珠母贝基因组的甲基化模式主要是 CpG 型, 这和姜群等<sup>[13]</sup>对太平洋牡蛎外套膜的研究结果类似, 但与鸡 (white plymouth rock)<sup>[29]</sup> 的甲基化模式不同, 即在鸡的肌肉、心脏、肝和肾基因组 DNA 的 CCGG 序列中, 半甲基化位点比全甲基化位点多, 这表明半甲基化位点及全甲基化位点在物种的比例会因物种差异而改变。通常认为 DNA 复制过程中能够使得 DNA 发生半甲基化, 而后由甲基转移酶 (DNMT1) 再次修饰后转为全甲基化。在马氏珠母贝的基因组中发现有该酶的同源序列, 但尚未得到全序列, 故半甲基化水平与该酶的关联分析

还需要后续实验的补充。

近些年, 通过回收甲基化修饰片段来研究基因的甲基化修饰情况, 而后进一步分析的做法, 已在哺乳动物<sup>[30]</sup>、海洋无脊椎动物<sup>[31]</sup>上得到应用。本实验回收了 8 条具甲基化修饰片段, 但最终仅有 4 个片段可以与基因组数据相匹配, 推测原因可能是回收的 DNA 片段位于基因组非编码区导致。*iHog* 基因能够以共受体(co-receptor)形式与 Ptc(Patched)受体定位在细胞膜上, 再与 HH 蛋白结合, 最终促进 HH 蛋白与 Ptc 相互作用<sup>[32]</sup>。而 HH 信号通路是一个信号级联放大反应, 普遍存在于低等动物(果蝇, *Drosophila melanogaster*)到高等动物(人, *Homo sapiens*)中, 常与核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、转化生长因子  $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )<sup>[33]</sup>等信号通路因子, 通过不尽相同的机制相互作用, 在正常胚胎发育过程中控制着细胞的增殖和生长<sup>[34]</sup>。研究还认为, HH 通路和 EGFR 通路间存在协同作用<sup>[35]</sup>, 和 TGF- $\beta$  间存在正反馈作用<sup>[36]</sup>。陈伟耀<sup>[37]</sup>发现, EGFR 与马氏珠母贝壳长、壳高等 8 个生长性状均呈现正相关, 故推测 HH 通路参与了贝壳的形成。另外, 研究者对家蚕(*Bombyx mori*)<sup>[38]</sup>研究表明, 基因的表达产物 mRNA 水平会受到甲基化水平的影响, 呈现正相关关系。但在本研究中, *iHog* 仅在中央膜上具有全甲基化修饰, 但在中央膜上低表达, 故推测甲基化修饰与 *iHog* 的表达呈现负相关。值得注意的是 *iHog* 在套膜区没有甲基化修饰, 仍然呈现低表达, 这可能是 *iHog* 在套膜区中的表达受到了诸如组蛋白修饰, RNA 干扰等调控途径的影响, 但这需要我们更进一步的研究。

目前, 对于 DNA 甲基化对基因表达的调控机制, 我们已有初步的了解, 但就整个领域而言, 其依旧充满疑问, 这需要我们不断地发掘新思路和新技术, 这样才能更深入地探究 DNA 甲基化相关机制及其在基因表达调控中的作用。

#### 参考文献:

- [1] Zheng X M, Wu N F. Biological function of DNA methylation[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2009, 11(1): 33-39. [郑小梅, 伍宁丰. DNA 甲基化作用的生物学功能[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(1): 33-39.]
- [2] Meehan R R. DNA methylation in animal development[J]. Semi Cell Dev Biol, 2003, 14(1): 53-65.
- [3] Aharon R. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection[J]. EMBO J, 1998, 17: 4905-4908.
- [4] Autran D, Huanca-Mamani W, Vielle-Calzada J P. Genomic imprinting in plates: the epigenetic version of an Oedipus complex[J]. Curr Opin Plant Biol, 2005, 8(1): 19-25.
- [5] Zhang H Y, Zhao H B, Tian Y P, et al. DNA methylation detection technology and application prospects[J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2013, 20(5): 348-351. [张海燕, 赵洪斌, 田亚平, 等. DNA 甲基化检测技术与应用前景[J]. 标记免疫分析与临床, 2013, 20(5): 348-351.]
- [6] Shi Y J, Li Q H, Liu X H. Progress in studies of DNA methylation and gene expression regulation[J]. China Biotechnology, 2013, 33(7): 90-96. [史玉杰, 李庆贺, 刘晓辉. DNA 甲基化与基因表达调控研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(7): 90-96.]
- [7] Liu Y, Tang Y Z, Gao L. Research progress on invertebrates DNA methylation[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(8): 17-23. [柳莹, 唐永政, 高丽. 无脊椎动物 DNA 甲基化研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(8): 17-23.]
- [8] Roberts S B, Gavery M R. Is there a relationship between DNA methylation and phenotypic plasticity in invertebrates?[J]. Front Physiol, 2012(2): 116.
- [9] Rajasethupathy P, Antonov I, Sheridan R, et al. A role for neuronal piRNAs in the Epigenetic control of Memory-related synaptic plasticity[J]. Cell, 2012, 149(3): 693-707
- [10] Yu T, Yang A G, Wu B, et al. Analysis of *Chlamys farreri*, *Patinopecten yessoensis* and their offspring using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP)[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(9): 1335-1342. [于涛, 杨爱国, 吴彪, 等. 栉孔扇贝、虾夷扇贝及其杂交子代的 MSAP 分析[J]. 水产学报, 2010, 34(9): 1335-1342.]
- [11] Zhu H P, Lu M X, Huang Z H, et al. Effect of low temperature on genomic DNA methylation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(10): 1460-1467. [朱华平, 卢迈新, 黄樟翰, 等. 低温对罗非鱼基因组 DNA 甲基化的影响[J]. 水产学报, 2013, 37(10): 1460-1467.]
- [12] Cao Z M, Yang J. Analysis of the methylation in genome DNA from different tissues of *Anodonta woodiana*[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2009, 18(6): 2011-2016. [曹哲明, 杨健. 背角无齿蚌不同组织的基因组 DNA 甲基化分析[J]. 生态环境学报, 2009, 18(6): 2011-2016.]
- [13] Jiang Q, Yu H, Kong L F, et al. Analysis of DNA methylation in different tissues of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) with the fluorescence-labeled methylation-sensitive amplified polymorphism (F-MSAP)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(4): 676-683. [姜群, 于红, 孔令锋, 等. 太平洋牡蛎不同组织 DNA 甲基化的 F-MSAP

- 分析[J]. 中国水产科学, 2014, 21(4): 676–683.]
- [14] Zhang Y, Deng K J, Zhang T, et al. *Oryza sativa* genome MSAP fingerprint and DNA methylation modification sites Isolation and identification[J]. Chinese High Technology Letters, 2009, 19(9): 983–990. [张勇, 邓科君, 张韬, 等. 水稻基因组 MSAP 指纹图谱构建及 DNA 甲基化修饰位点分离与鉴定[J]. 高技术通讯, 2009, 19(9): 983–990.]
- [15] Sun H M, Ku X P, Yuan J L, et al. Analysis on DNA Methylation-sensitive amplified polymorphism in *Phyllostachys bambusoides* during flowering and rejuvenation[J]. Bulletin of Botanical Research, 2013, 33(6): 723–730. [孙慧敏, 顾小平, 袁金玲, 等. 五月季竹开花及复壮过程中 DNA 甲基化的 MSAP 分析(英文)[J]. 植物研究, 2013, 33(6): 723–730.]
- [16] Leslie S L, Barbara R H, Elliot M M. The DNA of *Arabidopsis thaliana*[J]. Mol Gen Genet, 1984, 194(1–2): 15–23.
- [17] Funabara D, Ohmori F, Kinoshita S, et al. Novel genes participating in the formation of prismatic and nacreous layers in the pearl oyster as revealed by their tissue distribution and RNA interference knockdown[J]. PLoS ONE, 2014, 9(1): 1–12.
- [18] Xiong L Z, Xu C G, Saghai M M A, et al. Patterns of cytosine methylation in an elite *rice hybrid* and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique[J]. Mol Gen Genet, 1999, 261(3): 439–446.
- [19] Li J H, Xing S Y, Wang C C, et al. Analysis on genomic DNA methylation modification of *Ginkgo biloba* by Methylation-sensitive amplification polymorphism[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2011, 38(8): 1429–1436. [李际红, 邢世岩, 王聪聪, 等. 银杏基因组 DNA 甲基化修饰位点的 MSAP 分析[J]. 园艺学报, 2011, 38(8): 1429–1436.]
- [20] Singer M, Boffelli D, Dhahbi J, et al. MetMap enables genome-scale Methylation typing for determining methylation states in populations[J]. PLoS Comput Biol, 2010, 6(8): e1000888.
- [21] Wang X T, Li Q Y, Lian J M, et al. Genome-wide and single-base resolution DNA methylomes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* provide insight into the evolution of invertebrate CpG methylation[J]. BMC Genom, 2014, 15(1): 1767–1791.
- [22] Shi S L, Jiao Y, Du X D, et al. Ultrastructure of mantle epithelial cells in *Pinctada martensii*[J]. Guangdong Agricultural Science, 2012(8): 135–137. [师尚丽, 焦钰, 杜晓东, 等. 马氏珠母贝外套膜细胞的超微结构观察[J]. 广东农业科学, 2012(8): 135–137.]
- [23] Du X D, Gao Y Z, Deng Y W, et al. Genetic structure and genealogical identification of four families of pearl oyster *Pinctada martensii*, as inferred by microsatellite markers[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(12): 1795–1804. [杜晓东, 高远镇, 邓岳文, 等. 利用微卫星标记进行马氏珠母贝家系遗传结构分析与系谱认证[J]. 水产学报, 2011, 35(12): 1795–1804.]
- [24] Li Y D. Molecular genetic and epigenetic diversity and genetic structure of wild barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link) artificial populations endemic to *Songnen prairie*, China[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2007. [李毅丹. 中国松嫩草原短芒野大麦(*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link)人工种群分子遗传与表观遗传多样性及其种群遗传结构的研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2007.]
- [25] Guo G P. Research on the features of DNA methylation in the process of growth and development in bamboo[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2011. [郭广平. 竹类植物生长发育过程中的 DNA 甲基化研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2011.]
- [26] Gao X. The assessment of genetic and epigenetic polymorphism in freesia regenerated plantlets and F1 progenies and the flower scent composition analysis[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2010. [高翔. 香雪兰体外再生植株和杂种后代遗传、表观遗传多态性及花香成分分析[D]. 长春: 东北师范大学, 2010.]
- [27] Cui Y Y, Zhang D M. Surveying DNA methylation diversity in the wild rice, *Oryza nivara* and *O. rufipogon*[J]. Biodiversity Science, 2010, 18(3): 227–232. [崔影影, 张大明. 野生稻 *Oryza nivara* 和 *O. rufipogon* DNA 甲基化多样性[J]. 生物多样性, 2010, 18(3): 227–232.]
- [28] Du Y, He Y Y, Li J, et al. MSAP analysis of genomic DNA in tissues of wild and “Huanghai No.1” *Fenneropenaenus chinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(3): 536–543. [杜盈, 何玉英, 李健, 等. 野生和“黄海 1 号”中国明对虾不同组织基因组 DNA 的 MSAP 分析[J]. 中国水产科学, 2013, 20(3): 536–543.]
- [29] Xu Q, Zhang Y, Sun D X, et al. Analysis of DNA methylation in different chicken tissues with MSAP[J]. Hereditas, 2011, 33(6): 620–626. [徐青, 张沅, 孙东晓, 等. 应用 MSAP 方法检测鸡不同组织基因组的甲基化状态[J]. 遗传, 2011, 33(6): 620–626.]
- [30] Xu Q, Zhang Y, Sun D X, et al. Analysis on DNA methylation of various tissues in Chicken[J]. Anim Biotechnol, 2007, 18(4): 231–241.
- [31] Guo T T. The method to assess genome DNA methylation of *Apostichopus japonicus* by HPLC and MSAP analysis in different tissues[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013. [郭婷婷. 刺参不同组织基因组 DNA 甲基化状态 MSAP 分析及 HPLC 方法的建立[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.]
- [32] Yao S Q, Lum L, Beachy P. The *ihog* cell-surface proteins bind hedgehog and mediate pathway activation[J]. Cell, 2006, 125(2): 343–357.
- [33] Wang Y Q, Gao J, Li Z S. Hedgehog pathway in pancreatic cancer and its cross-talk with other pathways[J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2015, 22(1): 112–115. [王玉



- 琼, 高军, 李兆申. 胰腺癌中 Hedgehog 通路与其他通路间相互作用的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2015, 22(1): 112–115.]
- [34] Li X W, Liu B Y. The proceeding of the hedgehog signaling pathway in tumor[J]. Chinese Bulletin of Life Science, 2009, 21(1): 116–121. [李晓伟, 刘炳亚. Hedgehog 信号通路在肿瘤中作用的研究进展[J]. 生命科学, 2009, 21(1): 116–121.]
- [35] Elizabeth B, Alexandra E, John D, et al. Inactivation of Akt by the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib is mediated by HER-3 in pancreatic and colorectal tumor cell lines and contributes to erlotinib sensitivity[J]. Mol Cancer Therap, 2006, 5(8): 2051–2059.
- [36] Xu X, Zhou Y, Xie C, et al. Genome-wide screening reveals an EMT molecular network mediated by sonic hedgehog-gli1 signaling in pancreatic cancer cells[J]. PLoS ONE, 2012, 7(8): e43119.
- [37] Chen W Y. Correlation analysis of pearl production and growth traits with the related genes from *Pinctada martensii*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2014. [陈伟耀. 马氏珠母贝育珠和生长性状与相关基因的关联分析[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2014.]
- [38] Xiang H, Zhu J D, Chen Q, et al. Single base-resolution methylome of the silkworm reveals a sparse epigenomic map[J]. Nat Biotechnol, 2010, 28(5): 516–520.

## Analysis of genomic DNA methylation on different regions of mantle tissue from *Pinctada martensii* by methylation-sensitive amplification polymorphism

LUO Shaojie<sup>1</sup>, DENG Yuewen<sup>1,2</sup>, ZHENG Zhe<sup>1</sup>, JIAO Yu<sup>1,2</sup>, WANG Qingheng<sup>1,2</sup>

1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Guangdong Technology Research Center for Pearl Aquaculture and Process, Zhanjiang 524025, China

**Abstract:** DNA methylation is closely linked to biological events, including chromatin inactivation, transgene silencing, genomic imprinting and control of parasitic DNA elements. Because of its efficiency and competence, the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) technique has been used increasingly in genomic DNA and individual functional gene studies to analyze DNA methylation levels. In this research, MSAP technology was used to analyze the methylation levels of mantle tissues from *Pinctada martensii*, including the mantle edge (Me), mantle pallium (Mp) and mantle central (Mc). Recycling the methylation of specific fragments to be sequenced, comparative analysis and selection the target gene, then used the Real time PCR to analyze the target gene. Results showed that (1163.25±124.34) DNA bands were clear and repetitive by using 15 pairs of primers. Among them, Me had (401.00±40.37) bands, Mp had (380.63±52.39) bands and Mc had (381.63±53.57) bands, and there was no significant difference ( $P>0.05$ ). The percentages of methylation levels were (17.07±2.19)% in Me, (15.48±2.34)% in Mp and (19.61±2.88)% in Mc ( $P<0.05$ ). The methylation levels from high to low were Mc>Me>Mp. Methylation patterns included fully methylated sites, hemi-methylated sites and non-methylated sites. The experiment results showed that the percentages of fully methylated sites were higher than hemi-methylated sites in all areas of the mantle, indicating that the methylation pattern in the *P. martensii* genome was mainly a CpG island. After recovering and sequencing the specific bands, we found eight gene sequences, which were methylated by Blast. Of these, there were three sequences with homologous sequences by Local Blast with genome, which were 40S ribosomal protein SA, interference hedgehog and Zinc finger protein castor by gene annotations. Interference hedgehog (*iHog*) was the target gene; real-time PCR showed that *iHog* was expressed in Me, Mp and Mc, with the highest expression level in Me and the lowest expression level in Mc ( $P<0.05$ ). This indicates that the expression of *iHog* in Mc was inhibited by DNA methylation. These results confirm that the mantle tissues Me, Mp and Mc have different methylation levels. DNA methylation could also play a role in the regulation of gene expression. The technique helps us to understand the relationship between methylation and expression regulation, and also provides a theoretical basis to elaborate the mechanisms underlying biomineralization and immune response in *P. martensii*.

**Key words:** *Pinctada martensii*; mantle; methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP); DNA methylation; expression regulation

**Corresponding author:** WANG Qingheng. E-mail: wangqingheng@163.com