

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18089

低温压力对 ZF4 细胞组蛋白修饰的影响

姜蓬垒^{1, 2, 3}, 时应娣^{1, 2, 3}, 侯艳雯^{1, 2, 3}, 韩兵社^{1, 2, 3}, 张俊芳^{1, 2, 3}

1. 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海海洋大学, 上海 201306;
2. 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海海洋大学, 上海 201306;
3. 海洋生物科学国际联合研究中心, 中国科学技术部, 上海海洋大学, 上海 201306

摘要: 为探索低温压力对斑马鱼细胞组蛋白修饰的影响, 建立并优化使用斑马鱼(*Danio rerio*)成纤维细胞 ZF4 进行染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)的条件。本研究分别优化了 ChIP 过程中裂解细胞所使用的 NP-40 浓度、超声破碎的时间, 确定了最佳 NP-40 浓度为 0.2%, 超声时间为 20 min。利用针对 β -actin 启动子区域的引物, 通过常规 PCR 初步验证 ChIP 实验是否成功。琼脂糖凝胶电泳结果显示, IgG 组常规 PCR 产物基本无条带, H3K27me3 组条带较暗, H3K4me3 和 H3K27ac 组有较亮条带, 初步说明实验可靠。使用正常培养(28℃)与长期低温驯化(18℃, 30 d)的斑马鱼成纤维细胞 ZF4 作为实验材料, 通过优化之后的 ChIP 技术进行实验。分别使用 qPCR 和 ChIP-qPCR 检测低温驯化对肿瘤坏死因子 b (tumor necrosis factor b, *tnfb*)基因表达以及其启动子区域 H3K4me3、H3K27ac、H3K27me3 的影响。qPCR 结果显示 *tnfb* 基因经过低温驯化后上调, 而 ChIP-qPCR 结果显示, *tnfb* 基因启动子区域的 H3K4me3、H3K27ac 富集度也出现升高, H3K27me3 没有明显变化, 提示低温压力可能通过影响 *tnfb* 基因启动子区域的 H3K4me3、H3K27ac 水平来调控 *tnfb* 基因的表达。本研究建立并优化的 ChIP 实验条件可以用来研究 ZF4 细胞组蛋白修饰变化, 为下一步探索低温压力对斑马鱼细胞全基因组组蛋白修饰的影响奠定基础。

关键词: 染色质免疫共沉淀; 低温; 斑马鱼细胞; 组蛋白修饰

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)02-0280-07

鱼类作为水生生物, 在其生命周期中会面临大幅度的温度变化。而低温压力会对鱼类生理、行为造成显著影响, 甚至导致死亡^[1-3]。因此研究低温压力对鱼类生理的影响及其调控机制具有重要的意义。斑马鱼作为一种常用的模式生物, 可以适应大幅度的温度变化(16.5~38.6℃)^[3], 因此斑马鱼也常用来研究温度对鱼类的影响^[4-8]。已经有研究显示, 随着温度的改变, 斑马鱼细胞内的 mRNA^[5-7]、miRNA^[8]、DNA 甲基化^[4]等都会发生明显变化。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[9-10]、小麦(*Triticum aestivum* L.)^[11]等植物以及黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[12]、红耳滑龟(*Trachemys*

scripta)^[13]等动物中都显示组蛋白修饰参与了温度对生理功能的调控。但是有关低温压力对鱼类组蛋白修饰影响的研究非常少, 例如, 有研究者发现鲤适应季节性寒冷的过程中, macroH2A 整体出现升高^[14]; 本课题组在前期研究中也发现低温压力导致斑马鱼细胞中 *tp53* 基因启动子区域的激活型组蛋白修饰 H3K4me3 升高^[4]。但是目前尚没有研究从全基因组层面来揭示组蛋白修饰如何参与鱼类低温响应。

染色质免疫共沉淀技术已经出现 30 多年^[15], 它被广泛用来检测转录因子、染色质相关蛋白或者具有特定修饰的组蛋白与基因组 DNA 互作^[16-17]。

收稿日期: 2018-03-13; 修订日期: 2018-04-19.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372516, 81770165); 上海市自然科学基金项目(13ZR1419500); 上海市教育委员会“东方学者”计划支持项目。

作者简介: 姜蓬垒(1988-), 男, 博士研究生, 研究方向为表观遗传学. E-mail: 770163089@qq.com

通信作者: 张俊芳, 教授, 研究方向为表观遗传学. E-mail: jfzhang@shou.edu.cn

ChIP 主要包括以下步骤: 1) 交联-稳定 DNA 与蛋白的互作状态; 2) 裂解细胞后利用超声或者微小球核酸酶等核酸酶断裂 DNA; 3) 利用特异性抗体进行免疫共沉淀; 4) 利用 qPCR、芯片或者高通量测序等方法检测目的蛋白与 DNA 的互作。随着高通量测序技术的发展, ChIP-seq 的使用越来越广泛, 它可以方便快速地使研究者了解某种蛋白在全基因组上的分布情况, 从而了解目的蛋白的下游基因和调控机制。虽然 ChIP-seq、ChIP-qPCR 技术的应用已经非常广泛, 但是在斑马鱼中进行的 ChIP 实验还是相对较少。

建立一个适应于斑马鱼细胞的 ChIP 实验流程是下一步验证低温压力对斑马鱼细胞组蛋白修饰影响的前提。为此本研究建立并优化了利用斑马鱼细胞 ZF4 进行 ChIP 实验的流程, 而且发现低温驯化升高了 *tnfb* 基因启动子区域的 H3K27ac 水平和 *tnfb* 基因表达量。该研究为进一步阐明表观遗传在鱼类低温适应过程中的调控机理建立基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

胎牛血清购于 Gibco 公司; DMEM/F-12 液体培养基购于 Hyclone 公司; 磁珠 protein A、RNA 酶、TRIzol 购于 Thermo Fisher 公司; H3K4me3 抗体(ab8580)、H3K27ac 抗体(ab4729)购于 Abcam 公司; H3K27me3 抗体(#07-449)购于 Millipore 公司; ECL 显影液购于 Bio-Rad; PCR 纯化试剂盒(QIAquick PCR Purification Kit)购于 QIAGEN 公司; 蛋白酶 K、蛋白酶抑制剂(Protease Inhibitor Cocktail, PI)、荧光定量 PCR 试剂(FastStart Universal SYBR Green Master)购于罗氏公司; 反转录试剂盒(PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser)购于 TaKaRa 公司。

1.2 仪器设备

细胞培养箱(Galaxy170R, eppendorf), 水平电泳仪(北京六一仪器厂), 垂直电泳仪(Bio-Rad), 倒置荧光显微镜(Zeiss), 超声细胞破碎仪(Covaris S220), 荧光定量 PCR 仪(罗氏 PCR480)。

1.3 细胞培养及处理

购于 American Type Culture Collection (ATCC) 的斑马鱼细胞 ZF4 用含 10%胎牛血清、100 U/mL

青霉素和 100 mg/mL 链霉素的 DMEM/F-12 培养基, 置于 28℃、5% CO₂ 的培养箱中进行培养。将生长良好的 ZF4 细胞放置在 18℃培养箱中培养 30 d 进行低温驯化。

1.4 染色质免疫共沉淀

1.4.1 细胞固定 选择生长良好的约 5×10^7 个 ZF4 细胞进行固定(每个免疫共沉淀大约用 1×10^7 个细胞)。调整完全培养基体积至 8 mL (10 cm 培养皿), 加入 222 μ L 37%甲醛(终浓度为 1%), 室温摇床上孵育 10 min。加入 913 μ L 1.25 mmol/L 甘氨酸室温孵育 5 min 终止交联, 弃去培养基, 用 PBS 清洗 2 遍。用细胞刮将细胞收集到 50 mL 离心管中, 2300 r/min 4℃离心 5 min。弃上清, 用 PBS 重悬后相同条件离心。细胞沉淀可以冻存在 -80℃或直接进行后续实验。

1.4.2 细胞裂解与超声破碎染色质 将含 5 mmol/L PIPES (pH 8)、85 mmol/L KCl、0.2% NP-40、1 mmol/L PMSF、1×PI 的 10 mL 细胞裂解液加入细胞沉淀中, 冰上孵育 10 min。然后 1000 r/min 4℃, 离心 10 min。弃上清, 加入含 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8)、10 mmol/L EDTA、1% SDS、1 mmol/L PMSF、1×PI 的细胞核裂解液 1 mL, 冰上孵育 10 min。转移至 1 mL milliTUBE 中。使用 Covaris S220 进行超声破碎, 运行参数为工作周期 5%、入射功率峰值 140 W、爆裂循环数 200。转移超声样品至 1.5 mL 离心管中。放置冰上 5 min。然后 14000 r/min 4℃离心 10 min。转移上清至新的离心管中, 冻存在 -80℃或直接进行后续实验。

1.4.3 免疫共沉淀 取 50 μ L 磁珠至 1.5 mL 离心管中, 放置在磁极上, 弃去上清。取上述超声后的样品 200 μ L(大约对应 1×10^7 个细胞)与 2 倍体积含 0.01% SDS、1.1% Triton X-100、1.2 mmol/L EDTA、16.7 mmol/L Tris-HCl (pH 8)、167 mmol/L NaCl、1 mmol/L PMSF、1×PI 的稀释液一起加入含磁珠的离心管中。加入 5 μ g 特异性抗体, 4℃旋转混匀器上孵育过夜。

将过夜孵育的磁珠放置在磁极上, 弃上清, 用磁珠试剂盒中的 washing buffer 清洗 3 遍, 每次 200 μ L。用 100 μ L washing buffer 重悬后转移至新管中, 然后放置在磁极上弃上清。用含 10 mmol/L

Tris-HCl (pH 8)、5 mmol/L EDTA、300 mmol/L NaCl、0.5% SDS 的洗脱液 58 μ L 重悬磁珠。取超声后的样品 20 μ L 作为 10% Input, 补充上述洗脱液至 58 μ L。各样品加入 1 μ g RNase 后 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。然后加入 20 μ g 蛋白酶 K 37 $^{\circ}$ C 2 h, 65 $^{\circ}$ C 6 h (每 0.5 h 重悬一次可以更加有效洗脱)。

1.4.4 纯化回收 DNA 将含磁珠的离心管放置在磁极上, 转移上清至新管中。根据 QIAGEN PCR 纯化试剂盒说明书进行 DNA 纯化。纯化得到的 DNA 即为最终的目的 DNA 片段。

1.5 不同浓度 NP-40 裂解效果检测

分别选用含 0.0%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 浓度 NP-40 的细胞裂解液裂解细胞, 裂解完成后分别取少量细胞悬液滴加在载玻片上, 在显微镜下观察裂解效果。

1.6 超声后 DNA 纯化与片段大小检测

在超声 12 min、16 min、20 min、25 min 等几个时间点, 各取超声样品 10 μ L, 加入 40 μ L 含 50 mmol/L NaHCO₃、1% SDS 的溶液, 再加入 2 μ L 5 mol/L NaCl, 95 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 进行解交联。冷却至室温后加入 1 μ g RNase, 然后按照 QIAGEN PCR 纯化试剂盒说明书进行 DNA 纯化。将纯化后的约 300 ng DNA 样品用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳。

1.7 Western blotting 检测超声对抗原完整性影响

在超声 12 min、16 min、20 min、25 min 等几个时间点, 各取超声样品 20 μ L, 14000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。转移上清至新的离心管中。加入适量 SDS-PAGE 上样缓冲液, 沸水浴 5 min。将样品点样于 12% SDS-PAGE 凝胶上进行电泳, 电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂牛奶的封闭液, 室温封闭 2 h, 一抗(H3K4me3) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。再用含以辣根过氧化物酶标记的二抗的封闭液室温孵育 2 h, ECL 显影拍照。

1.8 常规 PCR

分别选用空白对照、Input DNA、阴性对照 IgG 组 ChIP DNA、H3K4me3 组 ChIP DNA、H3K27ac 组 ChIP DNA、H3K27me3 组 ChIP DNA 作为 PCR 模板。引物是针对 β -actin 启动子区域设计的引物, 上游引物: 5'-CCTAGCCTATCAGTGTACATTAC-3', 下游引物: 5'-TCAGCCTACATACCCTGTTACT-3'。

扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 5 μ L PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳。

1.9 实时定量 PCR

TRIzol 法分别提取正常培养和低温驯化之后细胞的总 RNA, 并按照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书进行反转录。PCR 反应条件: 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。根据 C_t 值计算相对表达量。选用 β -actin 作为内参基因进行标准化。*tnfb* 上游引物: 5'-GCACCTGTACC GGTTAATTCT-3', 下游引物: 5'-CTTCTTCGTTT GGCTTCATCAC-3'。 β -actin 上游引物: 5'-TCATCT GCTTGTAACCCATTCT-3', 下游引物: 5'-AGC ATCATCTCCAGCGAATC-3'。

1.10 ChIP-qPCR

分别选用正常培养和低温驯化之后的细胞, 使用 H3K4me3、H3K27ac、H3K27me3 抗体进行 ChIP 实验。ChIP 实验得到的 Input DNA 和免疫共沉淀下来的 DNA 作为模板, 使用针对 *tnfb* 基因启动子区域设计的引物进行定量 PCR。上游引物: 5'-GCACCTGTACCGGTTAATTCT-3', 下游引物: 5'-TCAGTCTTACCATCACATGCC-3'。反应条件与检测基因表达的 qPCR 条件相同。按照下面的公式计算出相对 Input 的富集水平:

$$\%Input = 100 \times 2^{[C_t(\text{Input}) - \log_2(\text{Input 稀释倍数}) - C_t(\text{IP})]}$$

1.11 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析。所有 qPCR 结果用均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。两样本均值比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 细胞裂解液中 NP-40 浓度的确定

在使用细胞裂解液裂解细胞之后, 可以将细胞膜、细胞质等组分去除, 只留下细胞核进行下面的实验。这样有利于减小胞质蛋白对后续实验的影响。不同的细胞类型需要不同强度的裂解液进行裂解, 在裂解细胞这一步骤, 研究者大都选用 0.2%~0.5% 的 NP-40 或者 IGEPAL CA-630 作为去污成分。本研究中选用含 0.0%、0.2%、0.3%、

0.4%、0.5%五个浓度 NP-40 的细胞裂解液裂解 ZF4 细胞, 然后在倒置显微镜下观察裂解效果。结果如图 1 所示, 0.2% NP-40 浓度下的裂解产物基本上已全部变为球形或卵形, 呈低透光度的细胞核, 说明此浓度足以充分裂解细胞。

2.2 超声条件的确定

细胞核裂解之后, 需将 DNA 切断再进行后续的免疫共沉淀。本研究选用 Covaris S220 超声仪, 根据仪器使用说明选用固定的超声强度, 然后确定合适的超声时间。超声对染色质的切割效果受到不同细胞、组织类型, 不同细胞交联强度的影响。因此在本实验中选择了一个比较通用的细胞交联条件: 1%甲醛, 10 min。DNA 片段集中在 200~700 bp 时, 被认为是比较理想 ChIP DNA 片段大小^[17]。如图 2A 所示, 在超声 20 min 时, DNA 片段大小基本已经集中在 200~700 bp, 25 min 时 DNA 片段进一步缩小。由于超声时间过长会导致

抗原完整性降低, 而通过 Western blotting 检测不同超声时间点抗体抗原结合量的变化可以反映抗原完整性的变化, 从而进一步确定合适的超声时间。如图 2B 所示, 随着超声时间的延长, 条带颜色逐渐变浅, 而 25 min 的条带明显比 20 min 浅。综合以上实验结果, 选择 20 min 为最适的超声时间。

2.3 常规 PCR 初步验证 ChIP 实验是否成功

ChIP DNA 产物一般都比较少, 可以通过 Qubit 检测 DNA 浓度、常规 PCR 等方法初步判断实验是否成功。本实验选择在 β -actin 的启动子区域设计了一对引物。由于 β -actin 属于组成性表达的蛋白, 所以它的启动子区域应该富集激活型而缺乏抑制型的组蛋白修饰。如图 3 中所示, H3K4me3 与 H3K27ac 两种激活型标记物都呈现出明亮的条带, 而抑制型的 H3K27me3 则较暗, 结果符合预期。阴性对照 IgG 产物条带不明显, 说明该实验背景噪音很低。

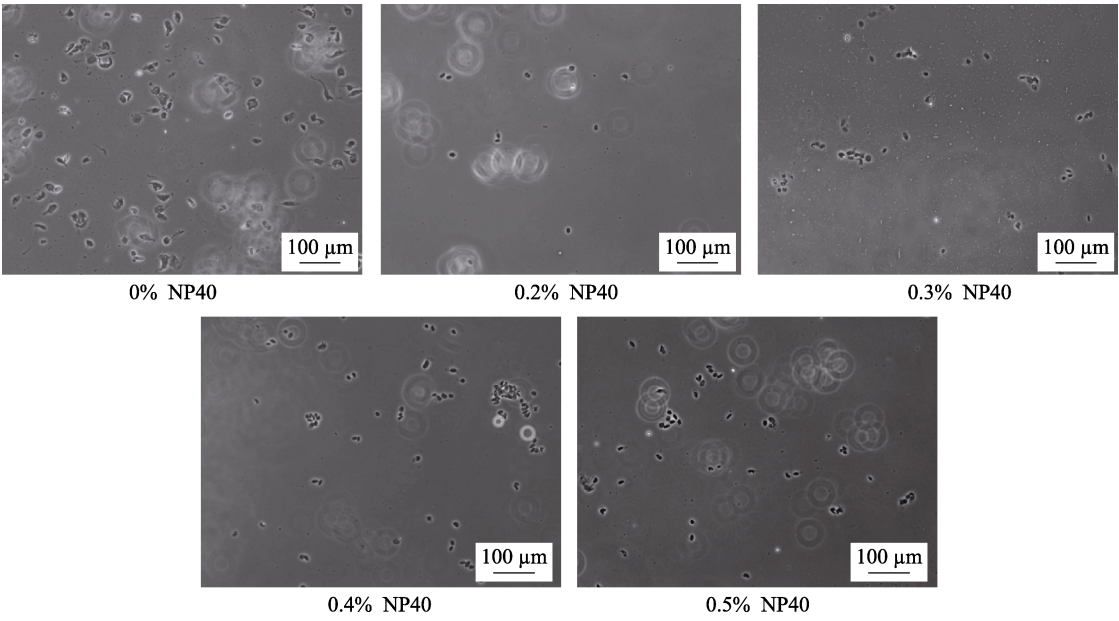


图 1 含不同浓度 NP-40 的细胞裂解液裂解 ZF4 细胞后的细胞核形态
Fig. 1 Morphology of nuclei from ZF4 cell lysated with different concentrations of NP-40

2.4 低温压力对 *tnfb* 基因表达以及 *tnfb* 基因启动子区域组蛋白修饰的影响

为进一步确定实验是否成功, 以及检验低温驯化对组蛋白修饰的影响, 分别设计了检验 *tnfb* 基因表达水平的 qPCR 引物和验证 *tnfb* 基因启动

子区域组蛋白修饰变化的引物。如图 4 所示, 低温驯化导致 *tnfb* 基因表达水平升高, 与此相吻合的是 *tnfb* 基因启动子区域的激活型标记 H3K4me3、H3K27ac 富集度出现升高, 而抑制型标记 H3K27me3 的富集度没有明显的变化。

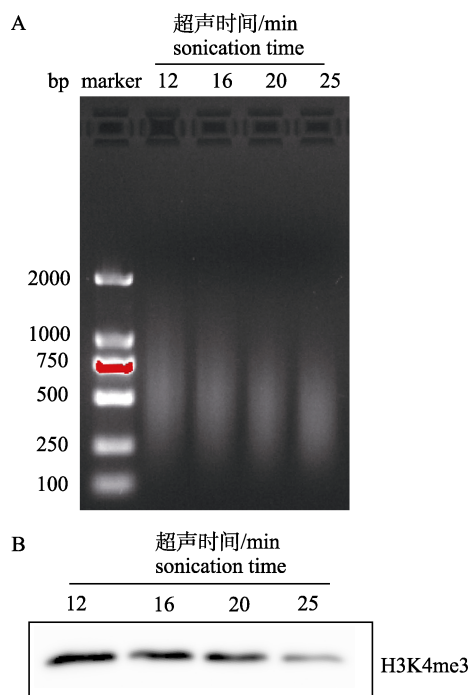


图 2 不同超声时间点 DNA 片段大小和抗原完整性的检测

A. 取不同超声时间点的样品纯化出 DNA 后, 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳; B. 通过 Western blotting 检测不同超声时间点样品中抗原完整性。

Fig. 2 Effect of sonication time on DNA fragment size and epitope integrity of histones

A. Samples with different sonication times were purified and electrophoresed on 1% agarose gel; B. Western blotting was used to detect the epitope integrity of samples with different sonication times.

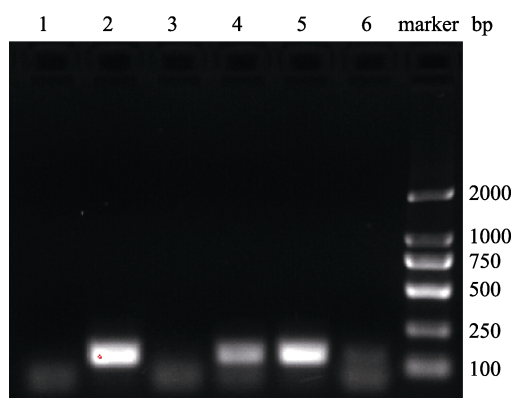


图 3 常规 PCR 检测 H3K4me3、H3K27ac 与 H3K27me3 在 β -actin 启动子区域的富集情况

1: 水; 2: Input; 3: IgG; 4: H3K4me3;
5: H3K27ac; 6: H3K27me3.

Fig. 3 Analysis of enrichment of H3K4me3, H3K27ac and H3K27me3 at the β -actin promoter by routine PCR

1: H_2O ; 2: Input; 3: IgG; 4: H3K4me3;
5: H3K27ac; 6: H3K27me3.

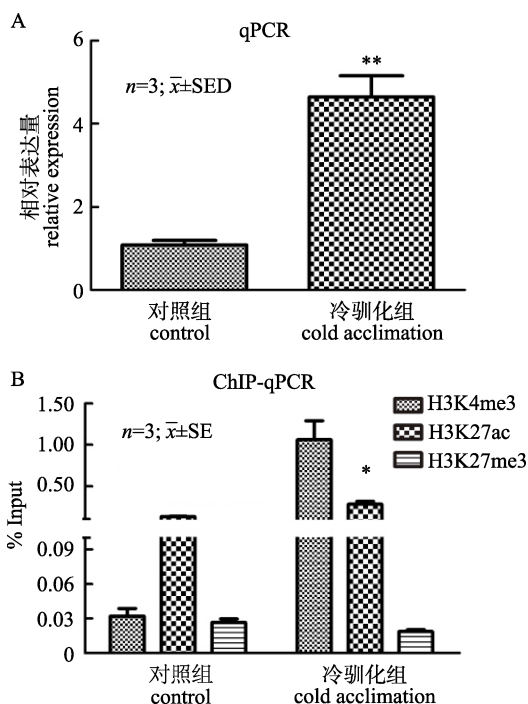


图 4 qPCR 和 ChIP-qPCR 分别检测低温驯化前后 *tnfb* 基因的表达水平和启动子区域 H3K4me3、H3K27ac、H3K27me3 富集度变化

图中数据来自至少 3 次独立的生物学重复, *或**表示冷驯化组与对照组间差异的显著性, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$.

Fig. 4 Changes of *tnfb* expression and H3K4me3, H3K27ac, H3K27me3 enrichment at the *tnfb* promoter during cold acclimation in ZF4 cells were detected by qPCR and ChIP-qPCR

The data in the figure were from at least 3 independent biological replicates; * or ** indicates statistically significant difference between the cold acclimation group and the control group; * means $P<0.05$; ** means $P<0.01$.

3 讨论

染色质免疫共沉淀是最常用的检测蛋白与 DNA 互作的一种技术。研究者使用它针对不同的细胞或者组织类型进行实验时, 实验条件也应该做出相应改变。为探索低温压力对斑马鱼细胞组蛋白修饰的影响, 本研究首先优化了以 ZF4 细胞为实验材料进行染色质免疫共沉淀的流程。本研究起始使用 5×10^7 个细胞(一个免疫共沉淀约使用 1×10^7 个细胞)进行细胞固定。通过优化 NP-40 浓度, 发现 0.2% NP-40 已经可以有效裂解细胞膜, 低浓度的 NP-40 可以降低细胞核损伤, 减少材料丢失。裂解细胞核之后要断裂基因组 DNA, 常使用的方法包括酶切法和超声法。两种方法各有利弊: 酶切法相对比较温和, 对靶蛋白损伤较

小,但是被认为有一定的偏见性^[17]。本研究使用 Covaris S220 以工作周期 5%、入射功率峰值 140 W、爆裂循环数 200 的条件超声 20 min,可以使 DNA 片段集中在 200~700 bp。按照这一超声条件,之后进行的多次实验都显示相同的超声结果,说明该实验条件是稳定可重复的。后续经过免疫共沉淀拉下的 DNA 纯化之后就是最终的目的 DNA 片段。根据 β -actin 启动子区域组蛋白修饰差异富集的特点,针对 β -actin 启动子区域设计引物以 ChIP DNA 为模板进行常规 PCR,可以来验证 ChIP 实验是否成功。PCR 结果也恰恰符合了预期,初步表明实验过程是可靠的。

肿瘤坏死因子家族在免疫、发育、细胞凋亡坏死等方面都发挥着重要的作用^[18-20]。*tnfb* 作为肿瘤坏死因子家族的成员,在斑马鱼中参与了免疫、肝发育等过程^[19, 21],但是没有关于其在低温压力下作用的报道。Long 等^[7]发现在斑马鱼幼鱼经受低温处理后与免疫相关通路激活, Hu 等^[5]也发现低温压力下斑马鱼成鱼中有一些差异表达基因与免疫反应相关,而且这些与免疫反应相关基因在肾中最多而脑中相对较少。本研究发现,低温驯化后的细胞中, *tnfb* 的表达量明显升高,而且通过 ChIP-qPCR 发现 *tnfb* 启动子区域 H3K4me3、H3K27ac 升高,而 H3K27me3 没有明显变化。启动子附近的 H3K4me3 有利于转录因子的结合,有利于转录的发生。而如果启动子附近的出现 H3K27me3 则会抑制转录发生,并且可能招募 DNA 甲基化酶促进 DNA 甲基化,进而长期的阻断基因表达。H3K27ac 修饰是一种染色质活化的标记物,它可以促使染色质更加开放从而促进转录起始复合物的形成,增强基因表达^[22]。这提示低温压力有可能通过改变 *tnfb* 启动子区域 H3K4me3、H3K27ac 修饰从而增高 *tnfb* 基因的表达,而 *tnfb* 的高表达可能参与了低温诱导细胞凋亡的调控。但是究竟什么因素导致组蛋白修饰 H3K4me3、H3K27ac 增加, *tnfb* 又是通过什么信号通路发挥作用,还有待进一步研究。

综合以上结果,本研究建立并优化了针对斑马鱼细胞 ZF4 的染色质免疫共沉淀实验流程,可以获得足量特异性的目的 DNA。这将为下一步通

过高通量测序检测低温驯化对斑马鱼细胞全基因组组蛋白修饰影响奠定基础。

参考文献:

- [1] Donaldson M R, Cooke S J, Patterson D A, et al. Cold shock and fish[J]. *Journal of Fish Biology*, 2008, 73(7): 1491-1530.
- [2] Beitingner T L, Bennett W A, Mccauley R W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2000, 58(3): 237-275.
- [3] López-Olmeda J F, Sánchez-Vázquez F J. Thermal biology of zebrafish (*Danio Rerio*)[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2011, 36(2): 91-104.
- [4] Han B S, Li W H, Chen Z Z, et al. Variation of DNA methylome of zebrafish cells under cold pressure[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(8): e0160358.
- [5] Hu P, Liu M L, Zhang D, et al. Global Identification of the Genetic Networks and Cis-Regulatory Elements of the Cold Response in Zebrafish[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(19): 9198-9213.
- [6] Long Y, Song G L, Yan J J, et al. Transcriptomic characterization of cold acclimation in larval zebrafish[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 612.
- [7] Long Y, Li L C, Li Q, et al. Transcriptomic characterization of temperature stress responses in larval zebrafish[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e37209.
- [8] Yang R L, Dai Z H, Chen S E, et al. MicroRNA-mediated gene regulation plays a minor role in the transcriptomic plasticity of cold-acclimated zebrafish brain tissue[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 605.
- [9] Coustham V, Li P J, Strange A, et al. Quantitative modulation of polycomb silencing underlies natural variation in vernalization[J]. *Science*, 2012, 337(6094): 584-587.
- [10] Sheldon C C, Finnegan E J, Peacock W J, et al. Mechanisms of gene repression by vernalization in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2009, 59(3): 488-498.
- [11] Diallo A O, Ali-Benali M A, Badawi M, et al. Expression of vernalization responsive genes in wheat is associated with histone H3 trimethylation[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2012, 287(7): 575-590.
- [12] Gibert J M, Mouchel-Vielh E, De Castro S, et al. Phenotypic plasticity through transcriptional regulation of the evolutionary hotspot gene *tan* in *Drosophila melanogaster*[J]. *PLoS Genetics*, 2016, 12(8): e1006218.
- [13] Matsumoto Y, Hannigan B, Crews D. Temperature shift alters DNA methylation and histone modification patterns in gonadal aromatase (*cyp19a1*) gene in species with temperature-dependent sex determination[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(11): e0167362.
- [14] Pinto R, Ivaldi C, Reyes M, et al. Seasonal environmental

- changes regulate the expression of the histone variant macroH2A in an eurythermal fish[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(25): 5553-5558.
- [15] Solomon M J, Varshavsky A. Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, 82(19): 6470-6474.
- [16] Bernstein B E, Meissner A, Lander E S. The mammalian epigenome[J]. *Cell*, 2007, 128(4): 669-681.
- [17] Blecher-Gonen R, Barnett-Itzhaki Z, Jaitin D, et al. High-throughput chromatin immunoprecipitation for genome-wide mapping of *in vivo* protein-DNA interactions and epigenomic states[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(3): 539-554.
- [18] Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2003, 10(1): 45-65.
- [19] Qi F, Song J B, Yang H S, et al. *Mmp23b* promotes liver development and hepatocyte proliferation through the tumor necrosis factor pathway in zebrafish[J]. *Hepatology*, 2010, 52(6): 2158-2166.
- [20] Hayden M S, Ghosh S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines[J]. *Seminars in Immunology*, 2014, 26(3): 253-266.
- [21] Wang W L, Liu W T, Gong H Y, et al. Activation of cytokine expression occurs through the TNF α /NF- κ B-mediated pathway in birnavirus-infected cells[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(1): 10-21.
- [22] Musselman C A, Lalonde M E, Côté J, et al. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers[J]. *Nature Structural Molecular Biology*, 2012, 19(12): 1218-1227.

Effects of low-temperature stress on histone modification in ZF4 cells

JIANG Penglei^{1, 2, 3}, SHI Yingdi^{1, 2, 3}, HOU Yanwen^{1, 2, 3}, HAN Bingshe^{1, 2, 3}, ZHANG Junfang^{1, 2, 3}

1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. International Research Center for Marine Biosciences at Shanghai Ocean University, Ministry of Science and Technology, Shanghai 201306, China

Abstract: Environmental stresses can regulate gene expression patterns by modulating histone activity. However, the effect of low-temperature stress on whole-genome histone modification in fish has not been reported. To explore the effect of low-temperature stress on histone modification in zebrafish (*Danio rerio*) cells, the experimental conditions for chromatin immunoprecipitation (ChIP) were established and optimized. The optimum NP-40 concentration for lysing cells was 0.2%. The optimal time of sonication with a Covaris S220 to break the chromatin was 20 min. Primers targeting the β -actin promoter region were used to perform routine PCR to verify the preliminary ChIP experiment results. Optimized experimental conditions resulted in a very low background, with nearly no IgG band in the agarose gel. Moreover, the lack of H3K27me3 in the β -actin promoter region, accompanied by enriched H3K4me3 and H3K27ac, was observed as predicted. Zebrafish embryonic ZF4 fibroblasts cultured under normal condition (28°C) and cold-acclimated ZF4 cells under long-term cold exposure (18°C for 30 days) were evaluated with the optimized ChIP protocol. The effect of cold acclimation on the expression of tumor necrosis factor β (*tnfb*) and enrichment of H3K4me3, H3K27ac, and H3K27me3 at the *tnfb* promoter was detected by qPCR and ChIP-qPCR, respectively. The qPCR and ChIP-qPCR results showed that *tnfb* was upregulated after cold acclimation and that H3K4me3 and H3K27ac were enriched in the promoter region of *tnfb*, while enrichment of H3K27me3 showed no significant change. This suggests that cold pressure regulates *tnfb* expression by affecting H3K4me3 and H3K27ac levels in the promoter region of *tnfb*. In conclusion, the established and optimized ChIP method can be used to study histone modification in ZF4 cells and provides a foundation for further analysis of the effect of low-temperature stress on whole-genome histone modification in zebrafish cells.

Key words: chromatin immunoprecipitation; low temperature; zebrafish cell; histone modification

Corresponding author: ZHANG Junfang. E-mail: jfzhang@shou.edu.cn