

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16238

干露胁迫对长牡蛎基因组 DNA 甲基化的影响

张鑫, 李琪, 于红, 孔令锋

中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003

摘要: 为探讨干露胁迫对海产贝类基因组 DNA 甲基化的影响, 应用荧光标记甲基化敏感扩增多态性(fluorescence-labeled methylation sensitive amplified polymorphism, F-MSAP)技术, 比较了不同干露条件下(0 d、0.5 d、1 d、3 d、5 d、7 d、9 d 和 11 d)长牡蛎(*Crassostrea gigas*)基因组 DNA 甲基化的变化。结果表明, 对照组(干露处理 0 d)闭壳肌与鳃组织的总体甲基化水平分别为 29.76%和 29.82%; 干露处理 0.5 d、1 d、3 d、5 d、7 d、9 d 和 11 d 的长牡蛎全基因组甲基化水平呈现先增高后降低的趋势, 其中, 闭壳肌组织的总体甲基化水平分别为 36.59%、38.86%、43.02%、39.30%、51.13%、46.79%和 35.06%, 鳃组织总体甲基化水平分别为 39.39%、42.13%、39.36%、43.54%、56.19%、38.57%和 28.99%; 干露处理 7 d 的长牡蛎甲基化水平明显高于其他时期($P<0.05$), 11 d 时甲基化水平基本恢复至初始状态。甲基化变异模式分析发现, 闭壳肌与鳃组织 DNA 甲基化变异位点存在差异, 甲基化升高位点变化程度较大($P<0.05$)。以上结果表明, 长牡蛎通过改变 DNA 甲基化模式来应答干露胁迫, 发生了不同程度的甲基化与去甲基化反应, DNA 甲基化与长牡蛎的抗逆性状密切相关。

关键词: 长牡蛎; 干露胁迫; DNA 甲基化; 荧光标记甲基化敏感扩增多态性(F-MSAP)

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)04-0690-08

干露胁迫一直是影响水产动物生存的重要因素, 也是影响水产养殖行业经济利益的关键因素。动植物在逆境胁迫中会表现出诸多生理生化反应, 表观遗传信息改变, 同时利用表观遗传调控来应答和适应胁迫环境^[1]。DNA 甲基化是表观遗传研究的重要组成部分, 同时也是表观遗传研究中最广泛、最透彻的一种调控模式, 指在 DNA 序列不发生改变的情况下产生能够遗传的基因表达, 从而在维持基因组稳定、调控生命体机能等方面发挥重要作用^[2]。目前, 关于 DNA 甲基化方面的研究主要集中在医学领域, 且已在脊椎动物和高等植物上取得了重大突破, 无脊椎动物方面的研究较少, 主要集中在昆虫和海洋无脊椎动物等方面^[3-6]。

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)又称太平洋牡蛎,

主要分布在亚洲东部沿海地区, 是世界上养殖最广泛、产量最高的海洋经济贝类^[7]。长牡蛎生活在环境多变的潮间带, 具有较强的生物适应性, 能够耐受温度、盐度、干露等环境条件的变动。长牡蛎两壳闭合程度高, 对干露胁迫具备较强的适应能力。在潮间带海水退潮后, 长牡蛎仍能依靠体内残留水分维持正常生活, 干露条件下可生存 11 d 以上^[8]。

Gavery 等^[9]研究了长牡蛎鳃组织 DNA 甲基化, 发现 DNA 甲基化在长牡蛎应激和环境适应方面发挥了重要的调控作用。Jiang 等^[10-11]采用甲基化敏感性扩增多态性(MSAP)及荧光标记的甲基化敏感性扩增多态性(F-MSAP)方法分析了 DNA 甲基化在长牡蛎不同组织中的特异性, 以及在二倍体和三倍体长牡蛎间的表观差异。Riviere

收稿日期: 2016-08-04; 修订日期: 2017-02-08.

基金项目: 农业科技成果转化资金项目(2014GB2B020029); 泰山学者种业计划专家项目; 山东省科技发展计划项目(2014GHY115002)

作者简介: 张鑫(1993-), 女, 硕士研究生, 专业方向为贝类遗传育种. E-mail: xinzhang0104@qq.com

通信作者: 李琪, 教授, 博士生导师, 研究方向为贝类遗传育种. Tel: 0532-82031622; E-mail: qili66@ouc.edu.cn

等^[12]采用 5-氮胞苷诱导长牡蛎幼虫去甲基化, 阐明 DNA 甲基化对长牡蛎早期发育的重要性。Wang 等^[13]利用单碱基检测方法, 发现 DNA 甲基化对生物进化的作用。然而, 关于 DNA 甲基化在长牡蛎干露以及环境胁迫条件下发挥的作用还有待进一步探索。

F-MSAP 技术是在 MSAP 的基础上, 对选扩引物进行 FAM 荧光标记, 通过荧光信号来检测 DNA 甲基化状态^[14]。本研究采用 F-MSAP 技术, 对不同时间干露胁迫处理的长牡蛎的闭壳肌和鳃组织全基因组 CCGG 位点甲基化水平进行检测, 探讨干露胁迫对长牡蛎基因组 DNA 甲基化的影响, 旨在为环境胁迫下长牡蛎表观遗传研究提供相关数据, 探讨其抗逆机制。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料为采集于山东青岛的 2 龄养殖长牡蛎。挑选出 100 个健康个体, 在室温(8~20℃)条件下进行干露胁迫。干露后, 分别于 0 d、0.5 d、1 d、3 d、5 d、7 d、9 d 和 11 d 随机挑选 8 个存活个体, 取其闭壳肌和鳃组织, 保存在-20℃备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用苯酚-氯仿法^[15]提取闭壳肌和鳃组织基因组 DNA, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品质量, 并且使用 NanoDrop

2000 (Thermo)检测 DNA 的浓度和纯度, 各组挑选 4 份条带清晰纯度高的样品稀释成 100 ng/μL 的工作液备用。

1.2.2 F-MSAP 分析 用 2U 的 *EcoR* I 和 *Hpa* II/*Msp* I 对基因组 DNA(100 ng)进行组合酶切。接头与引物设计参考在 Xu 等^[16]的方法上稍作改进, 将 *Hpa* II/*Msp* I 单链接头稀释为 100 μmol/L, *EcoR* I 单链接头稀释为 10 μmol/L, 各取等体积的单链接头混合后 94℃变性 5 min, 缓慢冷却至室温使单链结合, 形成双链接头(表 1)。酶切产物分别与接头连接, 连接体系为 20 μL, 16℃连接过夜, 连接产物稀释 10 倍以备预扩增使用。

预扩增体系为 10 μL, 稀释后的连接产物 2 μL, 10× buffer 1μL, *EcoR* I 预扩引物(5 μmol/L)0.5 μL, *Hpa* II/*Msp* I 预扩引物(5 μmol/L) 0.5 μL, dNTP 0.8 μL (2.5 μmol/L), *rTaq* 聚合酶 0.05 μL (2.5 U/μL), ddH₂O 5.15 μL。PCR 反应条件为: 72℃变性 2 min; 94℃ 20 s, 56℃ 30 s, 72℃ 2 min, 20 个循环; 60℃延伸 30 min。预扩引物序列见表 1, 预扩增产物稀释 20 倍后进行选择性扩增。

选用扩增条带清楚并且效率高的 8 对引物进行选择选择性扩增(表 1), 其中 *EcoR* I 选扩引物进行 FAM 荧光标记, 选择性扩增体系为 10 μL, 预扩增产物 1.5 μL, 10×buffer 1 μL, *EcoR* I 选扩引物 (5 μmol/L) 0.5 μL, *Hpa* II/*Msp* I 选扩引物 (5 μmol/L)0.5 μL, dNTP 0.8 μL (2.5 μmol/L), *rTaq*

表 1 F-MSAP 分析所用接头与引物组合序列
Tab. 1 Primers and adapters used in F-MSAP analysis

	<i>EcoR</i> I (5'-3')	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I (5'-3')
接头 adapters	EA1: CTCGTAGACTGCGTACC EA2: AATTGGTACGCAGTCTAC	H/MA1: GACGATGAGTCTAGAA H/MA2: CGTTCTAGACTCATC
预扩引物 preamplification primers	E0: GACTGCGTACCAATTCA	H/M0: GATGAGTCTAGAACGGT
选扩引物 selective amplification primers	E1: GACTGCGTACCAATTCACA E2: GACTGCGTACCAATTCATC E3: GACTGCGTACCAATTCACG E4: GACTGCGTACCAATTCACT E5: GACTGCGTACCAATTCAAG	H/M1: GATGAGTCTAGAACGGTAG H/M2: GATGAGTCTAGAACGGTCA H/M3: GATGAGTCTAGAACGGTAT H/M4: GATGAGTCTAGAACGGTGC H/M5: GATGAGTCTAGAACGGTGT H/M6: GATGAGTCTAGAACGGTAC H/M7: GATGAGTCTAGAACGGTAT H/M8: GATGAGTCTAGAACGGTAA

聚合酶 2.5 U, ddH₂O 5.65 μL。PCR 反应条件为: 94℃变性 2 min; 94℃ 20 s, 66℃ (每个循环递减 1℃), 30 s, 72℃ 2 min, 10 个循环; 94℃ 20 s, 56℃ 30 s, 72℃ 2 min, 20 个循环; 60℃延伸 30 min。

PCR 产物稀释后使用 ABI 3130 Genetic Analyzer 进行 DNA 甲基化多态性检测。使用 Gene Mapper V4.0 软件对峰值进行扫描分析和分子量内标的校正及数据的收集。为确保数据分析可靠性, 选取重复性高且清晰的条带用于后续数据分析。

1.3 数据处理和分析

分析样品中有条带记为“1”, 无条带记为“0”, 得到样本在所有位点 “0, 1”的 2 维矩阵, 然后进行统计处理。“0, 1”二维矩阵的数据采集、数据分析、表格生成和数据图的产生等采用 Excel 软件完成, 并进一步对 F-MSAP 数据进行相关分析。

2 结果与分析

2.1 干露胁迫下长牡蛎 DNA 甲基化分析

不同引物组合最终的扩增结果存在差异, 大多数片段分布在 50 ~ 500 bp, 8 对选扩引物在长牡蛎闭壳肌和鳃组织的各干露处理组中均记录 483 条扩增条带(表 2)。

2.2 干露胁迫下长牡蛎 DNA 甲基化模式分析

根据 *Hpa* II 和 *Msp* I 双酶切后的基因组 DNA

扩增产生条带的不同, 可将 DNA 甲基化分为 3 种模式(图 1): Type I 为非甲基化位点, 在 H(*Hpa* II/*EcoR* I)和 M(*Msp* I/*EcoR* I)组合酶切下均有条带出现, 表明 CCGG 位点未出现甲基化; Type II 为半甲基化位点, 在 H 酶切后出现条带而 M 酶切条带消失, 表明在 CCGG 位点只有一条 DNA 单链出现甲基化; Type III 为全甲基化位点, 在 H 酶切后未出现相应条带而 M 酶切出现条带, 表明 CCGG 位点 DNA 双链均发生甲基化变化。此外还存在组合酶切后均无条带模式出现, 可能存在超甲基化或遗传信息突变, 不用于甲基化水平分析。干露状态下各时间点长牡蛎甲基化模式见表 2, 对照组 0 d 的闭壳肌和鳃的总体 DNA 甲基化水平分别为 29.76%和 29.82%, 干露处理 7 d 后, 甲基化水平分别增加到 51.13%和 56.19%, 显著高于其他处理时间($P<0.05$), 干露 11 d 分别降至 35.06%和 28.99%, 其中鳃组织 DNA 甲基化基本恢复至对照组水平。两种组织干露时间内半甲基化、全甲基化以及总甲基化水平均存在显著差异($P<0.05$)。

2.3 不同组织干露胁迫甲基化模式比较

干露胁迫下 DNA 甲基化模式发生多态性变化如图 2 所示, 甲基化变化可分为甲基化程度发生改变和甲基化程度不发生改变两种模式。其中甲基化程度发生改变又可分为胁迫前后甲基化水

表 2 干露胁迫对长牡蛎 DNA 甲基化水平
Tab. 2 The effect of air exposure treatment on the genomic DNA methylation state of *Crassostrea gigas*

DNA 甲基化模式 DNA methylation patterns	闭壳肌 adductor								鳃 gill							
	0 d	0.5 d	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	0 d	0.5 d	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d
I	118	104	107	98	122	108	116	113	120	100	114	114	118	99	129	120
II	29	30	34	31	46	53	44	36	27	34	43	35	37	69	34	25
III	21	30	34	43	33	60	58	25	24	31	40	39	54	58	47	24
甲基化条带数 total methylated bands	50	60	68	74	79	113	102	61	51	65	83	74	91	127	81	49
半甲基化水平/% hemi-methylated level	17.26	18.29	19.43	18.02	22.89	23.98	20.18	20.69	15.79	20.61	21.83	18.62	17.70	30.53	16.19	14.79
全甲基化水平/% fully methylated level	12.50	18.29	19.43	25.00	16.42	27.15	26.61	14.37	14.04	18.79	20.30	20.74	25.84	25.66	22.38	14.20
总甲基化水平/% total methylated level	29.76	36.59	38.86	43.02	39.30	51.13	46.79	35.06	29.82	39.39	42.13	39.36	43.54	56.19	38.57	28.99

注: 甲基化条带数=II+III; 半甲基化水平(%)=II/(I+II+III); 全甲基化水平(%)=III/(I+II+III); 总甲基化水(%)=(II+III)/(I+II+III).
Note: total methylated bands = II+III; hemi-methylated level (%) = II / (I+ II+ III); fully methylated level (%) = III / (I+ II+ III); total methylation level (%) = (II+ III) / (I+ II+ III).

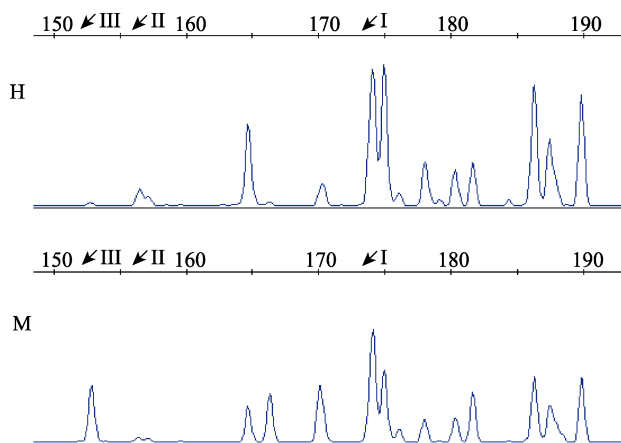


图 1 长牡蛎 4 种 DNA 甲基化模式

H 表示 *EcoR* I/*Hpa* II 酶切; M 表示 *EcoR* I/*Msp* I 酶切; I 表示非甲基化条带, II 表示半甲基化条带, III 表示全甲基化条带.

Fig. 1 Four DNA methylation types in *Crassostrea gigas*. H means digested by *EcoR* I/*Hpa* II; M means digested by *EcoR* I/*Msp* I; I means non-methylated sites; II means full-methylated sites; III means hemi-methylated sites.

平不变、胁迫后甲基化水平上升、胁迫后甲基化水平下降 3 种模式。长牡蛎 DNA 甲基化水平变化(上升、下降)分别有 4 种状态, a: 超甲基化或变异位点变为半甲基化位点, b: 非甲基化位点变为半甲基化位点, c: 非甲基化位点变为全甲基化位点, d: 超甲基化或变异位点变为全甲基化位点, e: 半甲基化位点变为超甲基化或变异位点, f: 半甲基化位点变为非甲基化位点, g: 全甲基化位点变为非甲基化位点, h: 全甲基化位点变为超甲基化或突变位点。相比于对照组, 各实验组的条带变化见表 3。甲基化变异位点总数在两种组织中的变化情况也与总甲基化水平呈现一致的变化趋势, 在总共 483 个可读位点中, 实验时间内, 闭壳肌与鳃组织 DNA 甲基化位点变化情况存在差异, 甲基化升高位点显著高于甲基化下降位点($P <$

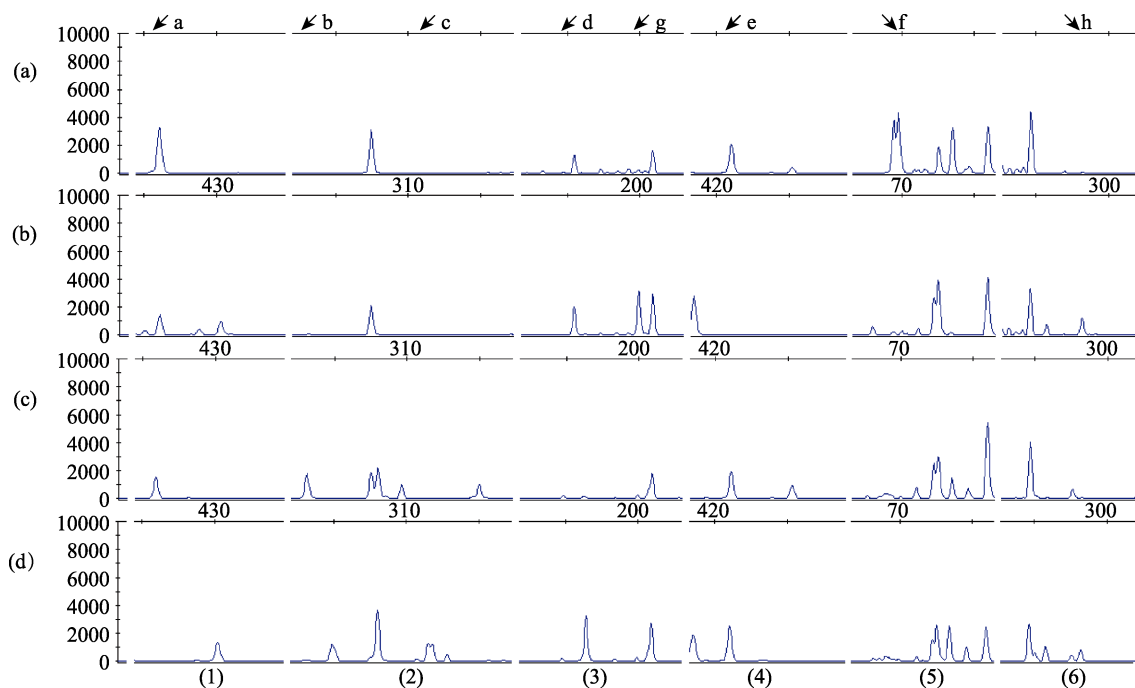


图 2 DNA 甲基化模式发生多态性变化图谱

(a) 对照组样品 *EcoR* I/*Hpa* II 酶切, (b) 对照组样品 *EcoR* I/*Msp* I 酶切, (c) 实验组样品 *EcoR* I/*Hpa* II 酶切, (d) 实验组样品 *EcoR* I/*Msp* I 酶切; 箭头及小写字母 a-h 分别表示不同露胁迫下 DNA 甲基化模式发生多态性变化位点; (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)表示不同处理和引物组合: (1) E-ACG+H/M+TCA(11 d), (2) E-ACA+H/M+TCA(1d), (3) E-ACA+H/M+TCA(5 d),

(4) E-AAG+H/M+TAC(5 d), (5) E-ACA+H/M+TCA(1 d), (6) E-ACA+H/M+TCA(5 d).

Fig. 2 Mutation patterns of genomic DNA methylation in different air exposure stages

(a) Digestion of control DNA with *EcoR* I + *Hpa* II; (b) Digestion of control DNA with *EcoR* I + *Msp* I; (c) Digestion of DNA under salt stress with *EcoR* I + *Hpa* II; (d) Digestion of DNA under salt stress with *EcoR* I + *Msp* I; arrows and lowercases mean the peaks of variation sites under air exposure; (1), (2), (3), (4), (5), (6) respectively means primer combinations under different treatments:

(1) E-ACG+H/M+TCA(11 d), (2) E-ACA+H/M+TCA(1 d), (3) E-ACA+H/M+TCA(5 d), (4) E-AAG+H/M+TAC(5 d), (5) E-ACA+H/M+TCA(1 d), (6) E-ACA+H/M+TCA(5 d).

表 3 不同干露时间长牡蛎基因组 DNA 甲基化变异
Tab. 3 Mutation patterns of genomic DNA methylation in different air exposure stages

甲基化变异类型 methylation variation type	酶切类型 enzyme diestion type				条带变异位点 number of variation site													
	对照 control		样本 sample		闭壳肌 adductor							鳃 gill						
	H	M	H	M	0.5 d	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	0.5 d	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d
甲基化上升位点 methylation site in- creased	a	+	+	+	12	10	7	14	11	17	8	10	13	9	10	11	6	6
	b	-	-	+	13	19	22	27	35	22	26	16	21	18	22	50	24	18
	c	-	-	+	10	18	22	19	42	42	15	11	15	22	29	35	28	18
	d	+	+	-	12	7	12	10	14	11	5	13	15	9	12	20	13	5
甲基化位点上升位点总数 total methylation site increased					47	54	63	70	102	92	54	50	64	58	73	116	71	47
甲基化下降位点 methylation decline site	e	+	-	+	8	6	7	9	7	6	3	8	5	5	10	4	7	8
	f	+	-	-	13	16	15	10	13	13	19	10	10	12	12	13	15	17
	g	-	+	-	7	7	12	12	17	15	14	14	9	7	6	14	13	13
	h	-	+	+	3	3	3	3	0	4	5	6	8	8	6	5	5	7
甲基化位点下降位点总数 total methylation decline site					31	32	37	34	37	38	41	38	32	32	34	36	40	45
甲基化位点变化位点总数 total methylation variation site					78	86	100	104	139	130	95	88	96	90	107	152	111	92

0.05)。甲基化总变异位点在 7 d 时达到最大值, 闭壳肌和鳃组织的总数分别为 139 和 152, 此后至 11 d, 下降至 95 和 92。相比于甲基化上升变异位点的变化, 去甲基化变异位点总数的较为平稳, 变异位点数稳定在 31~45, 而甲基化升高变异位点的变化在 47~116, 在引物组合中, 甲基化降低和升高位点数均不存在显著差异($P > 0.05$)。7 d 时闭壳肌和鳃的甲基化升高变异位点总数分别达到了 102 和 116, 此后急剧下降, 11 d 时分别降至 54 和 47。实验结果表明在干露胁迫期间与去甲基化位点相比甲基化增加位点变化更加明显。

3 讨论

海产贝类在市场上流通往往要经历不同程度的干露胁迫。贝类离水后, 能够在露空时间内维持它的生命力, 由于不能从周围环境中进行充分的呼吸作用, 会造成血液的 pH 失去恒定性而窒息死亡。贝类干露时间的长短, 与种类、大小有差异, 同时又与时间长、温度高成反比, 同种贝类中, 成贝比稚贝更耐干露。成贝软体部较大, 体内所含的水分相对较多, 抗干露能力强, 成活率较高^[8]。

无脊椎动物存在不同程度的甲基化, 例如, 黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*, 11.95%~28.44%)^[17]、

刺参(*Apostichopus japonicas*, 28.0%~35.77%)^[18]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*, 32.79%)和虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*, 24.13%)^[19]、背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*, 35.5%~56%)^[20]、长牡蛎(*Crassostrea gigas*, 31.77%~37.92%)^[10]、玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*, 27%)^[21], 且甲基化水平往往低于脊椎动物, 例如, 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*, 86%)^[22]、鸡(*Gallus gallus*, 40%)^[14]、猪(*Sus scrofa*, 47.97%~56.98%)^[23]。本研究分析对照组长牡蛎闭壳肌全基因组 DNA 甲基化水平为 29.76%, 鳃组织甲基化水平为 29.82%, 这一结果与姜群等^[10]对长牡蛎不同组织 DNA 甲基化分析结果基本吻合(鳃为 31.77%), 但闭壳肌甲基化水平(36.41%)偏低, 可能是由于样品保存方式、选扩引物等不同所致。随干露时间增加, 长牡蛎甲基化水平在 0~7 d 逐渐增加, 而 7 d 之后迅速下降。这一变化趋势有别于一些植物环境胁迫的表观遗传研究结果, 植物在干燥胁迫下 DNA 甲基化呈下降趋势^[1, 24-25]。其原因可能有以下几点, 一是研究对象不同, 无脊椎动物与植物体内环境差异较大, 基因表达情况也不相同; 二是甲基化统计方式的差别; 三是胁迫时间点的选择, 不同的时间处理会反映出动态的甲基化水平变化。干露期间内,

长牡蛎闭壳肌和鳃两种组织的半甲基化和全甲基化水平变化趋势与总体甲基化水平基本一致, 但全甲基化模式变化更能反应总体甲基化水平的变化。从统计方式上来说, 全甲基化与半甲基化虽均属于 DNA 甲基化, 但是干露胁迫下全甲基化与半甲基化的作用方式存在差别, 且体现在全甲基化模式更能反映总体甲基化的变化。

长牡蛎是营潮间带生活的海洋贝类, 潮水变动时经常暴露于空气中, 因此能够适应诸如温度、盐度、氧气浓度等环境的变化^[26-28]。而牡蛎作为能够较长时间离水生存的海洋无脊椎动物, 拥有完善的抗逆机制^[29]。鳃是海洋无脊椎动物主要的呼吸器官, 同时也是双壳贝类最重要的摄食器官^[30]。长牡蛎干露胁迫之后, 不但体内水分丧失, 鳃的呼吸作用和摄食活动也同时受到抑制。此时长牡蛎通过无氧环境下的糖酵解反应提供能量, 此时一些糖酵解酶表达水平上升维持一种厌氧条件, 使机体具备优良的耐缺氧能力^[31]。海洋无脊椎动物生活环境多变, 生命过程通常伴随着变态发育、性逆转等复杂行为。与遗传信息相对稳定相比, 表观遗传变异更能反应机体对环境胁迫的响应, 在适应性进化中起到至关重要的作用^[32-33]。Roberts 等^[34]提出 DNA 甲基化的缺失可增加转录机会, 有利于生物表型可塑性, 增加机体适应性潜能。Rajasethupathy 等^[35]研究发现海兔 (*Aplysia*) 启动子 CpG 岛甲基化能够抑制 CREB2 的转录; Riviere 等^[12]检测得到长牡蛎 *hox* 基因的非编码片段及第一外显子的甲基化水平与基因表达负相关。随干露时间延长, 长牡蛎呼吸作用受到抑制, 机体含水量逐渐下降, 双壳的闭合能力也受到抑制, 机体活力逐渐下降, 能够引起氧化胁迫, ATP 合成相关基因表达受到抑制, 形成含有对细胞成分具有破坏性的活性基因^[36], 综上所述推断, 长牡蛎能量相关基因表达与 DNA 甲基化水平成负相关。而甲基化水平升高的现象也能够反映闭壳肌与鳃组织相关的基因表达情况出现了变化, 其中机制目前还不明确。经对比分析, 长牡蛎干露胁迫期间甲基化变异比例高于去甲基化变异比例, 在闭壳肌和鳃组织中差值均呈现先增加后下降的趋势, 说明整个干露期间, 闭壳肌和

鳃组织甲基化水平升高占据变异情况的主导地位。干露 7 d 时, 长牡蛎甲基化水平达到最高, 但是干露 9 d、11 d 时甲基化水平基本下降至初始水平, DNA 发生了大规模去甲基化。目前关于无脊椎动物 DNA 去甲基化的研究相对较少, 研究较为清楚的是在哺乳动物胚胎发育早期和配子发生过程中存在基因组范围的大规模主动去甲基化反应^[37-38]。正常生物体内 DNA 甲基化和去甲基化处于动态平衡, 一旦平衡被打破就会导致 DNA 甲基化模式改变, 影响生物体的正常生长发育, 长牡蛎经历长时间干露, 则会发生衰弱甚至死亡。

本研究反映了在干露情况下长牡蛎 DNA 甲基化的相关变化。经历长时间干露仍然存活的长牡蛎相较于正常生存的个体表观遗传结构发生改变, 使得相关基因表达或抑制其表达, 进而增强长牡蛎抗干露能力。此外, 在不同干露时间长牡蛎相关组织 DNA 中发生不同的甲基化与去甲基化现象, 这些特异位点可能与呼吸和肌肉收缩表达调控相关。另一方面, 存在处理前后保持一致的甲基化与非甲基化水平的位点, 则可以说明长牡蛎应对干露胁迫时, 机体发生了复杂的表观调控, 使其一定程度适应环境变化。但具体机理需通过分子生物学手段如基因克隆、原位杂交、免疫印迹检测等技术进行进一步探索。

参考文献:

- [1] Wang W S, Pan Y J, Zhao X Q, et al. Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. J Exp Bot, 2011, 62(6): 1951-1960.
- [2] Bird A. The essentials of DNA methylation[J]. Cell, 1992, 70(70): 5-8.
- [3] Varrault A, Bilanges B, Mackay D J G, et al. Characterization of the methylation-sensitive promoter of the imprinted ZAC gene supports its role in transient neonatal diabetes mellitus[J]. J Biol Chem, 2001, 276(22): 18653-18656.
- [4] Weinstock G M, Robinson G E, Gibbs R A, et al. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*[J]. Nature, 2006, 443(7114): 931-949.
- [5] Elango N, Hunt B G, Goodisman M A D, et al. DNA methylation is widespread and associated with differential gene expression in castes of the honeybee, *Apis mellifera*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(27): 11206-11211.

- [6] Zhang Q L, Su L D, Qiang L Z. Expression of DNA methylation and histone acetylation related genes in response to bacterial infection in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Acta Entomol Sin, 2015, 58(9): 941–949.
- [7] Wang R C, Wang Z P, Zhang J Z. Science of Marine Shellfish Culture[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2008. [王如才, 王昭萍, 张建中. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2008.]
- [8] Yu R H, Wang Z P, Kong L F. A study on the survival rate of pacific oysters in different exposure states at different development stages[J]. Periodical of Ocean University of China, 2006, 36(4): 617–620. [于瑞海, 王昭萍, 孔令锋, 等. 不同发育期的太平洋牡蛎在不同干露状态下的成活率研究[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(4): 617–620.]
- [9] Gavary M R, Roberts S B. DNA methylation patterns provide insight into epigenetic regulation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. BMC Genomics, 2010, 11(2): 483.
- [10] 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.]
- [11] Jiang Q, Li Q, Yu H, et al. Inheritance and variation of genomic DNA methylation in diploid and triploid Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. Mar Biotechnol, 2015, 18(1): 1–9.
- [12] Riviere G, Wu G C, Fellous A, et al. DNA methylation is crucial for the early development in the oyster *C. gigas*[J]. Mar Biotechnol, 2013, 15(6): 739–753.
- [13] Wang X, Li Q, Lian J, 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 Genomics, 2014, 15(1): 1–12.
- [14] Xu Q, Sun D, Zhang Y. F-MSAP: A practical system to detect methylation in chicken genome[J]. Chin Sci Bull, 2005, 50(18): 2039–2044.
- [15] Li Q, Yu H, Yu R. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China[J]. Aquaculture, 2006, 259(1): 95–102.
- [16] Xu M, Li X, Korban S S. AFLP-based detection of DNA methylation[J]. Plant Mol Biol Rep, 2000, 18(4): 361–368.
- [17] Guo X X, Mao X, Zhang M, et al. Effect of zinc on DNA methylation diversity at different developmental stages of filial generation in *Drosophila*[J]. Biodiversity Science, 2012, 20(6): 710–715. [郭欣欣, 毛雪, 张敏. 锌对不同发育时期子代果蝇基因组 DNA 甲基化的影响[J]. 生物多样性, 2012, 20(6): 710–715.]
- [18] Guo T T, Sun G H, Yang J M, et al. MSAP analysis of genome dna methylation in different tissues of *Apostichopus japonicus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(1): 77–82. [郭婷婷, 孙国华, 杨建敏, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus*)不同组织基因组甲基化状态 MSAP 分析[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(1): 77–82.]
- [19] 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.]
- [20] Cao Z M, Yang J. Analysis of the methylation in genome DNA from different tissues of *Anodonta woodiana*[J]. Ecology and Environment, 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.]
- [21] Zemach A, Mcdaniel I E, Silva P, et al. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation[J]. Science, 2010, 328(5980): 916–919.
- [22] Coyne K S, Sexton C, Kopp Z S, et al. Epigenetic modification and inheritance in sexual reversal of fish[J]. Genome Res, 2014, 24(4): 604–615.
- [23] Yang C, Zhang M, Niu W, et al. Analysis of DNA methylation in various swine tissues[J]. PLoS ONE, 2011, 6(1): e16229.
- [24] Aina R, Sgorbati S, Santagostino A, et al. Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp[J]. Physiol Plant, 2004, 121(3): 472–480.
- [25] Choi C S, Sano H. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants[J]. Mol Genet Genomics, 2007, 277(5): 589–600.
- [26] Widdows J, Bayne B L, Livingstone D R, et al. Physiological and biochemical responses of bivalve molluscs to exposure to air[J]. Comp Biochem Physiol A, 1979, 62(2): 301–308.
- [27] Hosoi M, Kubota S, Toyohara M, et al. Effect of salinity change on free amino acid content in Pacific oyster[J]. Fisheries Sci, 2003, 69(2): 395–400.
- [28] Boutet I, Tanguy A, Moraga D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, to hydrocarbon contamination under experimental conditions[J]. Gene, 2004, 329: 147–157.
- [29] Kawabe S, Yokoyama Y. cDNA cloning and expression of grp94, in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Comp Biochem Physiol B, 2009, 154(3): 290–297.

- [30] Kong L F, Wang Z P, Yu R H, et al. Comparative Observation of the Gills of Diploid and Triploid Pacific Oyster Using Scanning Electron Microscopy[J]. Chinese Journal of Zoology, 2003, 38(4): 2–4. [孔令锋, 王昭萍, 于瑞海, 等. 二倍体和三倍体太平洋牡蛎鳃扫描电镜的比较[J]. 动物学杂志, 2003, 38(4): 2–4.]
- [31] Ballantyne J S. Mitochondria: aerobic and anaerobic design-lessons from molluscs and fishes[J]. Comp Biochem Physiol B, 2004, 139(3): 461–467.
- [32] Turner B M. Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009, 364(1534): 3403–3418.
- [33] Díaz-Freije E, Gestal C, Castellanos-Martínez S, et al. The role of DNA methylation on *Octopus vulgaris* development and their perspectives[J]. Front Physiol, 2014(5): 62.
- [34] Roberts S B, Gavary M R. Is there a relationship between DNA methylation and phenotypic plasticity in invertebrates[J]. Front Physiol, 2011(2): 116.
- [35] 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.
- [36] Wada Y, Miyamoto K, Kusano T, et al. Association between up-regulation of stress-responsive genes and hypomethylation of genomic DNA in tobacco plants[J]. Mol Genet Genomics, 2004, 271(6): 658–666.
- [37] Jiang L, Zhang J, Wang J J, et al. Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos[J]. Cell, 2013, 153(4): 773–784.
- [38] Riviere G. Epigenetic features in the oyster *Crassostrea gigas* suggestive of functionally relevant promoter DNA methylation in invertebrates[J]. Front Physiol, 2014(5): 129.

Effects of air exposure on genomic DNA methylation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)

ZHANG Xin, LI Qi, YU Hong, KONG Lingfeng

Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: The Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) inhabits the intertidal zone and shows tolerance to air exposure conditions. Most marine invertebrates have been demonstrated to suffer large-scale mortality following sudden changes in osmolality, causing huge economic losses to commercial aquaculture. To explore the effect of air exposure on the genomic DNA methylation of marine shellfish, methylation polymorphisms in genomic DNA in the Pacific oyster were analyzed using the fluorescence-labeled methylation sensitive amplified polymorphism (F-MSAP) technique. The oysters were exposed to air individually for 0 d, 0.5 d, 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 9 d, and 11 d. The incidence of DNA methylation in adductor and gill tissue was 29.76% and 29.82%, respectively, in the control group (day 0). Compared with the control group, the level of total methylation in various groups under air exposure increased initially, after which it decreased. The total level of methylation on days 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, and 11 was 36.59%, 38.86%, 43.02%, 39.30%, 51.13%, 46.79%, and 35.06%, respectively, in adductor tissues and 39.3%, 42.13%, 39.36%, 43.54%, 56.19%, 38.57%, and 28.99%, respectively, in gill tissues. The methylation level on day 7 was higher than that following other air exposure durations ($P < 0.05$); at the end of the experiment (11 d), the methylation level nearly returned to that of the control. Moreover, data regarding genomic DNA methylation mutation patterns at CCGG sites were not consistent with cytosine methylation patterns and patterns of variation between adductor and gill tissue; hypermethylation sites were more numerous than demethylation sites ($P < 0.05$), indicating that remarkable changes occurred in the hypermethylation sites of the Pacific oyster. The results of the present study implied that the alteration of methylation patterns in *C. gigas* in response to air exposure might be strongly linked to stress resistance. These studies are fundamental to direct further research regarding DNA methylation in the aquatic shellfish epigenome, specific gene expression, and stress tolerance.

Key words: *Crassostrea gigas*; air exposure; DNA methylation; fluorescence-labeled methylation sensitive amplified polymorphism (F-MSAP)

Corresponding author: LI Qi. E-mail: qili66@ouc.edu.cn