

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17382

三疣梭子蟹甲基转移酶 2 基因克隆及在胚胎、幼体和性腺发育过程中的表达分析

蔡影^{1,3}, 孟宪亮^{2,3}, 刘萍^{2,3}, 李健^{2,3}, 环朋朋^{1,3}, 孙东方^{1,3}

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266235;

3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 本研究采用 SMART RACE 方法克隆了三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) *Dnmt2* (*PtDnmt2*) 基因。该基因 cDNA 全长为 1291 bp, 开放阅读框为 1203 bp, 编码 400 个氨基酸。结构域分析显示, *PtDnmt2* 基因有典型的 C5-DNA 甲基化酶结构域。同源分析表明, *PtDnmt2* 氨基酸序列与其他物种有较高的同源性。系统进化分析显示, 三疣梭子蟹 *PtDnmt2* 氨基酸序列与罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) *Dnmt2* 关系最近。qRT-PCR 结果显示, *PtDnmt2* 基因在三疣梭子蟹所有组织中均有表达, 在卵巢中表达量显著高于其他组织($P < 0.05$)。 *PtDnmt2* 基因在胚胎和幼体发育过程中的表达量随发育时期而变化, 其在受精卵和多细胞时期无表达, 从囊胚期开始出现, 随着胚胎的发育表达量逐渐上升。在性腺发育不同时期 *PtDnmt2* 基因表达量存在显著差异, 其在卵巢 II 期表达量最高, 之后逐渐下降; 在精巢中该基因的表达量随着精巢的发育逐渐上升, 在 IV 期达到峰值。本研究结果表明, *PtDnmt2* 基因参与了三疣梭子蟹胚胎、幼体和性腺发育调控。

关键词: 三疣梭子蟹; *PtDnmt2*; DNA 甲基化; 发育调控

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)05-0928-08

DNA 甲基化是一种重要且常见的表观遗传修饰, 其功能包括调节组织特异性基因的表达^[1]、细胞的分化^[2]、基因组印记和雌性动物 X-染色体的失活^[3], 并参与对染色质的修饰^[4]等, 在真核生物的发育中发挥着重要的调控作用。维持正常的 DNA 甲基化水平, 是细胞分化和组织发育所必需的。DNA 甲基化需要 DNA 甲基转移酶介导, 在基因组 CpG 二核苷酸中的胞嘧啶 5' 碳原子上添加一个甲基基团, 从而完成共价修饰过程^[5]。真核生物中 DNA 甲基转移酶分为 3 类, 包括 *Dnmt1*、*Dnmt2* 和 *Dnmt3*。其中 *Dnmt2* 被认为是真核生物进化过程中最原始的甲基转移酶^[6], 广泛分布于

酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、昆虫、甲壳动物、哺乳动物等各类真核生物中。已有研究表明, 该蛋白在真核生物的发育中发挥着重要的功能, 敲除斑马鱼(*Danio rerio*) 胚胎中 *Dnmt2*, 能够导致斑马鱼视网膜、脑和肝脏出现分化上的缺陷^[7], 该实验还发现, *Dnmt2* 表达的蛋白主要存在于细胞质中, 能够将 tRNA^{asp} 反密码子环 38C 甲基化, 表明其还具有 tRNA 甲基化酶活性。

在脊椎动物的研究中发现, 敲除果蝇(*Drosophila melanogaster*) *Dnmt2* 基因会导致其 DNA 甲基化缺失, 果蝇中 *Dnmt2* 过量表达能够导致整体 DNA 甲基化水平显著上升^[8]。此外, *Dnmt2*

收稿日期: 2017-10-17; 修订日期: 2017-12-25.

基金项目: 国家虾产业技术体系项目(CARS-8); 国家自然科学基金面上项目(41576147); 山东省泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划项目(LJNY2015002); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022017011).

作者简介: 蔡影(1992-), 男, 硕士研究生, 主要从事海水养殖生物种质资源与遗传育种研究. E-mail: 657059008@qq.com

通信作者: 刘萍, 研究员. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

具有沉默果蝇早期胚胎中的转座子和维持端粒酶的完整性功能^[9]。在对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的研究中发现, *Dnmt2* 在胚胎时期表达量最高, 随着生长发育, *Dnmt2* 的表达量呈现逐渐下降的趋势。曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*)体内只含有一种 DNA 甲基转移酶基因 *Dnmt2*, 采用去甲基化试剂(5-AzaC)降低曼氏血吸虫整体甲基化水平后, 曼氏血吸虫产卵量和孵化率均显著下降, 表明 *Dnmt2* 在曼氏血吸虫卵子发育过程中具有重要作用^[10]。*Dnmt2* 在卤虫(*Artemia franciscana*)休眠囊胚孵化过程中表达量显著上升, 到无节幼体表达量则显著下降, 暗示 *Dnmt2* 参与调节休眠囊胚的发育^[11]。过量表达 *Dnmt2* 的果蝇比正常果蝇有更长的寿命, 并且表现出更强的抗氧化、抗饥饿等方面的能力^[12]。以上结果表明, *Dnmt2* 在无脊椎动物生长发育中有重要的作用。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是我国重要的大型海水经济蟹类。为探讨甲基转移酶 2(*Dnmt2*)基因在三疣梭子蟹生长和发育过程中的作用, 本实验采用 SMART RACE 方法克隆了三疣梭子蟹甲基转移酶 2(*PtDnmt2*)基因的 cDNA 全长, 并分析了氨基酸序列特征, 采用实时定量 PCR 检测了 *PtDnmt2* 基因在三疣梭子蟹胚胎时期、幼体时期和性腺发育时期的表达情况, 为从甲基化的角度解析三疣梭子蟹的发育调控机制提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验所用的三疣梭子蟹取自昌邑海丰水产养殖有限责任公司。体重为 25~250 g, 甲宽为 42.51~90.94 mm, 全甲宽 84~170 mm。室内水泥池中暂养 7 d, 水温(21±2)℃、盐度 33, 每天定时换海水 1/3、清理池底、投喂鱼肉, 不间断充氧气。

SMART RACE Amplification Kit、SYBR Primer ExTaq II 荧光定量试剂盒、Primer Script RT reagent Kit、PMD18-T、LA Taq 酶均购自 TaKaRa 公司, DH5α 感受态和 DNA 回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司, Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司。

1.2 三疣梭子蟹组织样品的采集

在做性腺发育不同时期基因表达分析时, 每个时期的个体重复数为 3 个。胚胎、溞状幼体和大眼幼体由于个体较小, 每个个体提取的 RNA 量太少, 因此将取自不同亲本的多胎或幼体分别混合, 提取 RNA, 每个时期设置 3 个重复。样品两份, 一份保存于液氮中, 一份卵巢和精巢样品采用 4%多聚甲醛固定。参照管卫兵等^[13]、吴旭干等^[14]对三疣梭子蟹精巢、卵巢分期的方法, 对采集的精巢和卵巢样品初步分期, 从分期的每组样品中选取 5 个样品切片、HE 染色, 在显微镜下观察精巢和卵巢的组织学特征, 根据叶海辉等^[15]和吴旭干等^[14]对精巢、卵巢的分期方法最终确定精巢、卵巢的发育时期。

1.3 实验方法

1.3.1 三疣梭子蟹总 RNA 的提取和 RACE 模板的合成 利用 Trizol 试剂提取卵巢、精巢、肝胰腺、鳃、肌肉、胸神经等组织总 RNA, 用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测提取的 RNA 质量以及完整性。选取其中质量和完整性好的卵巢总 RNA, 按照 SMART RACE Amplification Kit 说明书的方法合成 3'和 5' RACE cDNA 第一链。

1.3.2 三疣梭子蟹 *PtDnmt2* 基因 cDNA 全长克隆

根据三疣梭子蟹性腺转录组数据中 *Dnmt2* 基因片段序列, 使用 Primer5 引物设计软件设计 *Dnmt2* 的 3'和 5'UTR 特异性引物, 在上海生工生物工程有限公司合成合成(表 1)。使用 TaKaRa LA Taq 酶和 RACE 通用引物 UPM、NUP 进行巢式扩增, 第一轮 PCR 使用 DT2-3F、DT2-5F 以及 UPM, 30 个循环。第二轮以第一轮 PCR 产物为模板, 使用 DT2-3S、DT2-5S 以及 NU。PCR 扩增程序: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保存, 扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳、DNA 回收试剂盒回收得到扩增的目的片段, 检测回收 DNA 浓度, 用 PMD18-T 载体连接目的片段, 10 μL 体系程序为 16℃, 2 h。连接液转入 DH5α, 冰上放置 30 min 后热激 45 s, 加入 1 mL LB, 37℃ 摇床培养 40 min, 150 μL 涂于氨苄抗性的平板, 37℃ 过夜, 挑菌摇床培养, M13

引物检测菌液 PCR, 琼脂糖电泳检测并送电泳条带大小合适的测序。

表 1 本实验所用引物序列
Tab. 1 Primers used in this study

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	功能 purpose
UPM(short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	3'RACE
UPM(long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGC AGTGGATCAACGCAGAGT	3'RACE
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	3'RACE
DT2-3F	GTGCTTTCCATCCTGGTTCA	3'RACE
DT2-3S	AAGTTGTATGTTACGCCTGCCC	5'RACE
DT2-5F	GCAGGAAGGACGAGGAGCG	5'RACE
DT2-5S	CCAGTAAGCCCCGCAACAT	5'RACE
β -actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG	qRT-PCR
β -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC	qRT-PCR
DT2-F1	GCATCAACACGCTCATCAAC	qRT-PCR
DT2-R1	GATGAGTGGGTCCGTTGTCT	qRT-PCR

1.4 *PtDnmt2* 基因的组织表达分析

采用 Trizol 提取三疣梭子蟹的卵巢、精巢、脑神经、肝胰腺、肌肉、肠、胸神经、鳃、各时期的卵巢和精巢以及胚胎时期和蚤状幼体、大眼幼体时期的总 RNA, 参照 PrimeScript^{RT} reagent Kit 说明书反转录合成 20 μ L 体系 cDNA。

根据三疣梭子蟹 *Dnmt2* 基因的开放阅读框(ORF)设计 1 对荧光定量引物(DT2-F1、DT2-R1)以及 1 对内参引物(β -actin-F、 β -actin-R), 使用 ABI 7500 Real Time PCR 仪和 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq II 试剂分析 *Dnmt2* 基因在三疣梭子蟹不同组织和精巢、卵巢以及幼体不同发育时期的表达情况。反应体系参照 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq II 说明书, 10 μ L 反应体系包括: 5 μ LSYBR Premix Ex Taq II (2 $\times$)、0.4 μ L 的正反向引物、3.0 μ LDPEPC 水、0.2 μ LROX Reference Dye II (50 $\times$)、1.0 μ L 的 cDNA。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。*PtDnmt2* 基因的相对表达分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 用 SPSS19.0 进行单因素方差分析, Origin2016 作图。

1.5 *PtDnmt2* 基因的生物信息学分析

利用 ContigExpress 拼接软件将测序得到的目

的序列和三疣梭子蟹 *PtDnmt2* 基因的 EST 序列拼接得到 *PtDnmt2* 基因的序列全长。用 DNASTAR 中的 EditSeq 或在线软件 ORFfinder 预测 *PtDnmt2* 基因的开放阅读框(ORF)并进行氨基酸翻译, 用 NCBI Blastx 软件分析 *PtDnmt2* 基因和其他物种相似性, 用 SignalP4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ExPASy、NCBI Conserved domain (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 等在线软件预测 *PtDnmt2* 基因的信号肽序列、分子量和等电点以及分析其蛋白质功能结构域。将其他物种的 *Dnmt2* 氨基酸序列同三疣梭子蟹 *PtDnmt2* 氨基酸序列用 DNAMAN 软件进行同源性比较, 采用 MEGA4.0 软件构建 *PtDnmt2* 氨基酸 NJ 系统进化树。

2 结果与分析

2.1 *PtDnmt2* 基因的 cDNA 全长及序列同源性分析

三疣梭子蟹 *PtDnmt2* 基因全长为 1291 bp, GenBank 登录号为 MF360014, 3'和 5'UTR 分别为 45 bp 和 43 bp, 开放阅读框(ORF)长 1203 bp, ORF 编码 400 个氨基酸。预测 *PtDnmt2* 表达蛋白的分子量 45.627 kD, 理论等电点是 6.67, 具有 C5-甲基化酶结构域, 无信号肽序列, *PtDnmt2* 基因如图 2 所示。通过在线 Blastp 对不同物种 *Dnmt2* 氨基酸序列比较, 结果显示, *PtDnmt2* 氨基酸序列保守性相对较高, 三疣梭子蟹编码的氨基酸序列和罗氏沼虾的一致性为 56%。利用 MEGA 4.0 软件采用邻接法构建三疣梭子蟹 *PtDnmt2* 的系统进化树, 结果显示三疣梭子蟹 *PtDnmt2* 同罗氏沼虾进化上关系最近, 聚为一支, 再和黑腹果蝇等昆虫纲物种聚为一支, 与脊椎动物关系较远(图 1)。

2.2 *PtDnmt2* 基因在三疣梭子蟹胚胎和幼体时期的表达分析

在早期胚胎发育中, *PtDnmt2* 在受精卵和多细胞期没有表达, 从囊胚期开始表达, 且表达量逐渐上升, 在无节幼体时期表达量最高(图 3)。在大眼幼体时期, *PtDnmt2* 的表达量较蚤状幼体 IV 期有所上升, 但在大眼幼体末期第 5 天, 其表达量明显下降(图 4)。

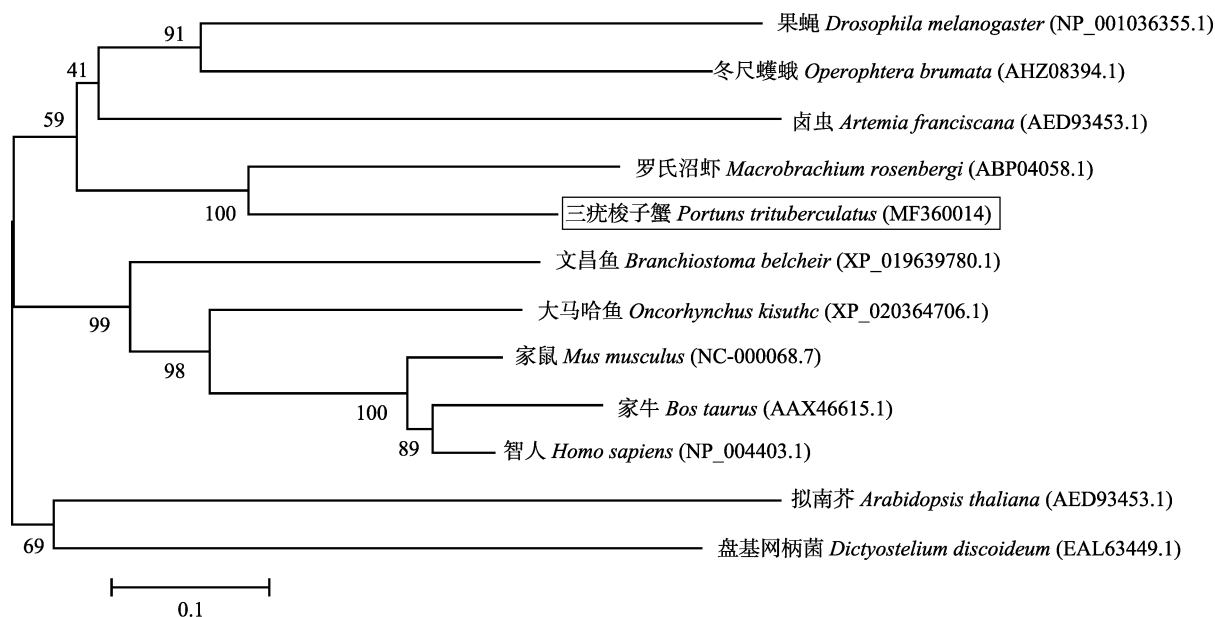


图 1 基于 Dnmt2 氨基酸序列构建的 NJ 进化树

Fig. 1 NJ tree based on Dnmt2 amino acid sequences

2.3 *PtDnmt2* 基因在三疣梭子蟹中的组织分布以及在性腺不同时期的表达

利用 Real-time PCR 分析了 *PtDnmt2* 基因在三疣梭子蟹各组织中的表达情况, 结果显示 *PtDnmt2* 基因在卵巢、精巢、鳃、脑神经、肠、肝胰腺、肌肉、胸神经中均有表达(图 5)。*PtDnmt2* 基因在卵巢中的表达量最高并显著高于其他组织 ($P<0.05$), 精巢和肌肉次之, 之后依次是脑神经、肠、胸神经、肝胰腺以及鳃。对三疣梭子蟹 *PtDnmt2* 基因卵巢组织不同时期的表达情况分析后表明, *PtDnmt2* 基因在卵巢 II 期的表达量最高并显著高于其他时期 ($P<0.05$), III 期次之, IV 期最低, VE~VI 期表达量有所上升, 仍显著低于前 3 期(图 6)。对精巢组织不同时期的表达情况进行分析发现, I~IV 期表达量逐渐上升, 在 IV 期表达量达到峰值并显著高于其他时期 ($P<0.05$), V 期表达量则下降(图 7)。

3 讨论

目前, 对 *Dnmt2* 功能的研究主要集中在脊椎动物如大鼠^[16]、斑马鱼^[7]以及无脊椎动物中的果蝇^[9]。在甲壳动物中的研究还较少, 仅在罗氏沼虾、卤虫(*Artemia franciscana*)等少数物种中有相

关研究^[11, 17]。已有研究表明, *Dnmt2* 不仅能催化 DNA 甲基化, 还能够催化 tRNA 甲基化^[7]。与其他 *Dnmts* 相比, *Dnmt2* 在结构上缺少调节作用的 N 端, 但具有催化功能的 C 端, 其 C 端包含一个目标分子识别区(TRD), 能够识别特定的目标分子^[18]。本实验克隆的甲壳动物三疣梭子蟹 *PtDnmt2* 基因, 其 cDNA 序列全长 1203 bp, 编码 400 个氨基酸。通过氨基酸序列同源性比较, 发现该基因同其他物种同源性较高, 同罗氏沼虾的一致性为 56%。通过 BLAST 和 SMART 等在线分析软件发现, *PtDnmt2* 氨基酸序列包含 C5-DNA 甲基化酶结构域, 因此推测其具有 DNA 甲基转移酶活性。

对罗氏沼虾胚胎发育研究发现, *Dnmt2* 基因表达量从受精卵开始呈现下降的趋势^[17]。本研究通过实时定量 PCR 发现, 胚胎发育阶段, *PtDnmt2* 在受精卵和多细胞时期无表达, 其表达量从囊胚期开始出现并且逐渐增加。*PtDnmt2* 的表达趋势表明该基因 mRNA 转录激活始于囊胚期。囊胚期细胞分裂加速, 胚胎细胞的分化始于原肠胚期, *PtDnmt2* 表达从囊胚期开始出现并且在原肠胚期显著上调, 我们推测其在这些胚胎发育时期的细胞分化中具有重要功能, 与已有实验验证的 *Dnmt2* 基因在早期胚胎的细胞分化、特异性基因

```

1  CATGGGGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGACATATAGCTATA ATG GAG GAG AGC GGC CCT 63
                                     M E E S G P
64  TCT TCC CCG ACC ATC AGG CGG TTG GAG AAA TCA GAA AAA ATG TTG CAA ATC CTG 117
    S S P T I R R L E K S E K M L Q I L
118 GAA CTG TAC AGT GGA ATT GGC GGA ATG CAA GCT GCA GCC AAG GAG AGT GGG CTA 171
    E L Y S G I G G M Q A A A K E S G L
172 CCT TTC AAT GTA GTG GCC TCC TAT GAA ATC AAT CCA GTG GCT GTA GAT GTG TAC 225
    P F N V V A S Y E I N P V A V D V Y
226 TGT AGC AAC TTC CCA GGC ACC AGT AAG CCC CGC AAC ATT CTG GGG CTC ACC ATG 279
    C S N F P G T S K P R N I L G L T M
280 GAA GAG CTG ACT AGA CTC TCT CCA GAT ATT ATC ATG ATG AGT CCG CCT TGC CAG 333
    E E L T R L S P D I I M M S P P C Q
334 CCA TTT ACA AGA CAG GGT CTA AAG CGA GAT GCA GAA GAT GCA CGC TCC TCG TCC 387
    P F T R Q G L K R D A E D A R S S S
388 TTC CTG CAT TTG GTG GAT TTG CTG CGA AGG GTC CCA CAC CCT CCA AGA ATG ATC 441
    F L H L V D L L R R V P H P P R M I
442 CTG CTG GAG AAT GTA GCT GGA TAT GAG ACT TCC CAG ACC AGA GAG CAT CTA GTG 495
    L L E N V A G Y E T S Q T R E H L V
496 GAT ATG CTC TTC CAC AGA GGA TAC ACA TGG CAG GAG TTC CTG TTA TCC CCC ACC 549
    D M L F H R G Y T W Q E F L L S P T
550 CAG TTT GGA GTT CCC AAC TCT CGT CTG CGA TAT TAC TTG CTG GCA AGG CTG TCA 603
    Q F G V P N S R L R Y Y L L A R L S
604 ATG GAA TCT TTT CCG TTC ACT ACT TCC CAG GAG GTG TGG ACT GAT TTT CCA TTC 657
    M E S F P F T T S Q E V W T D F P F
658 TGC TTG TGT CTC CTG AGT GAA GCC TCT TGT GTG TCC TAT AGT AAG ATC TGC TGC 711
    G L C L L S E A S C V S Y S K I C C
712 AAG TGC TCA AAA TCT ATT AAA CCA TCT CTC CAT TCA CTA TTG CAG AAG TTT CAC 765
    K C S K S I K P S L H S L L Q K F H
766 TCC AGT CAT CAG GAT AGT CTA CAG AAT AAC TCA CCA CTA ATG TCA CTA TCA CTT 819
    S H Y L I D E V N L K D F L L P D K
820 TCT CAT TAC CTT ATT GAT GAG GTA AAC TTA AAA GAC TTT TTA TTA CCA GAT AAG 873
    V L K K Y H M L L D I V N H Q S Q R
874 GTG TTA AAA AAA TAT CAT ATG TTA TTA GAC ATT GTT AAT CAT CAG TCA CAA AGA 927
    S C C F T K G Y A H Y V E G T G S V
928 TCA TGT TGT TTT ACA AAG GGA TAT GCA CAC TAT GTT GAA GGA ACA GGA TCT GTT 981
    S C C F T K G Y A H Y V E G T G S V
982 GTG CAA CAC AAC AGT CAA GTT GAT ATG TCA GAG ATT TAC TCA AAA GTA CAG GCT 1035
    V Q H N S Q V D M S E I Y S K V Q A
1036 CTA AGT GAT GAT GAT CAA CTC AAA GTA GAA TTG CTG CAT CAA CTG GAA TTG AGA 1089
    L S D D D Q L K V E L L H Q L E L R
1090 TAT TTC ACT CCT GAG GAA GTG GCT CGA TTA ATG TGC TTT CCA TCC TGG TTC ACC 1143
    Y F T P E E V A R L M C F P S W F T
1144 TTT CCT TCC ACA ACA ACA AGA AAG CAG AGA TAC AAG CTG CTA GGG AAT AGC ATA 1197
    F P S T T T R K Q R Y K L L G N S I
1198 AAT GTC TTG GTT GTA ACT TGT CTG TTA TTG GTT TTA GTT GAA AAT CAA TAA 1248
    N V L V V T C L L L V L V E N Q *
1249 ACATATACCACTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1291

```

图 2 *PtDnmt2* 基因 cDNA 序列全长以及其推导编码的氨基酸序列

方框标记的为起始密码子和终止密码子, 阴影部分为 C5-甲基化酶结构域。

Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acids sequence of the *PtDnmt2* gene in *Portunus trituberculatus*. Initiation codon and stop codon are marked with shadow, underline and black box, respectively. C5-Cyt-DNA-methylase is marked with shadow.

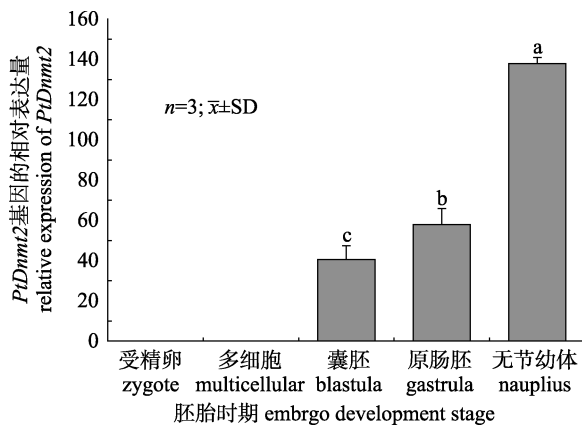


图 3 *PtDnmt2* 基因在三疣梭子蟹胚胎时期的表达
不同的小写字母表示不同时期差异显著($P<0.05$)。

Fig. 3 Expression of *PtDnmt2* gene in embryonic development of *Portunus trituberculatus*
Different small letters indicate significant difference in different stages ($P<0.05$).

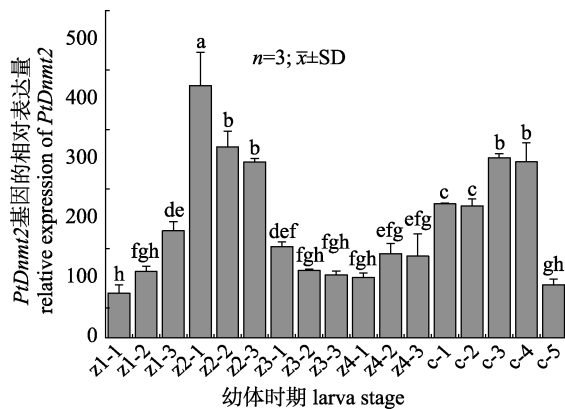


图 4 *PtDnmt2* 基因在三疣梭子蟹溞状幼体和
大眼幼体时期的表达

不同的小写字母表示不同时期差异显著($P<0.05$). Z1-1:
溞状幼体 1 期第 1 天; C-1: 大眼幼体第 1 天。

Fig. 4 Expression of *PtDnmt2* gene in zoea and megalops larva of *Portunus trituberculatus*
Different small letters indicate significant difference in different stages ($P<0.05$). Z1-1: the first day in the stage one of zoea larva; C-1: the first day of megalopa larva, by parity of reasoning.

表达中发挥重要功能相一致^[7, 9]。*Dnmt2* 基因在甲壳动物幼体阶段相关研究较少, 本研究发现, *PtDnmt2* 的表达量在幼体发育不同时期存在显著差异, 表明 *PtDnmt2* 参与了三疣梭子蟹幼体发育调控过程。

对三疣梭子蟹 *PtDnmt2* 基因组织分布和性腺差异性表达分析发现, *PtDnmt2* 基因在三疣梭子蟹所有组织中均有表达, 但表达的差异较大, 在

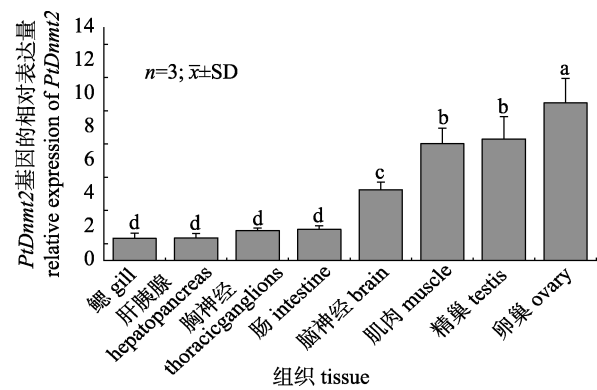


图 5 *PtDnmt2* 基因在三疣梭子蟹不同
组织中的表达分布

不同小写字母表示组织间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 5 Expression of *PtDnmt2* gene in different tissues of *Portunus trituberculatus*
Different small letters indicate significant difference in different tissues ($P<0.05$).

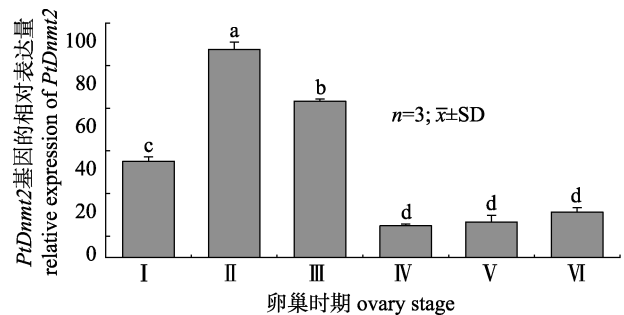


图 6 *PtDnmt2* 基因在三疣梭子蟹卵巢发育
不同时期的表达

不同的小写字母表示不同时期差异显著($P<0.05$)。

Fig. 6 Expression of *PtDnmt2* gene in ovary of *Portunus trituberculatus* in different gonadal stages
Different small letters indicate significant difference in different stages ($P<0.05$).

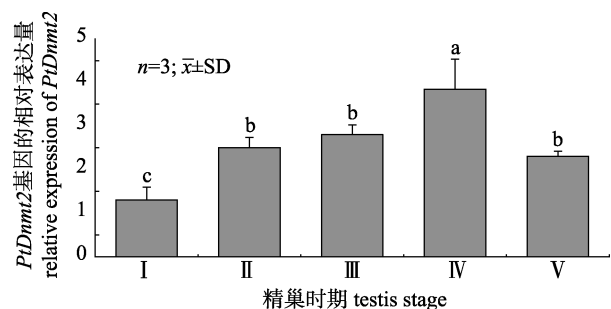


图 7 *PtDnmt2* 基因在三疣梭子蟹精巢发育
不同时期的表达

不同的小写字母表示不同时期差异显著($P<0.05$)。

Fig. 7 Expression of *PtDnmt2* gene in testis of *Portunus trituberculatus* in different gonadal stages
Different small letters indicate significant difference in different stages ($P<0.05$).

卵巢、精巢和肌肉组织中表达量显著高于其他组织($P<0.05$)。对卵巢组织发育不同时期的表达分析发现, *PtDnmt2* 基因在卵巢组织发育 I 期和 II 期表达量最高并显著高于其他时期($P<0.05$), 与 *Dnmt2* 基因在罗氏沼虾卵巢不同发育时期中的表达规律相似。根据以上结果推测, *PtDnmt2* 基因在三疣梭子蟹卵巢早期发育调控中有重要作用。已有研究表明, *Dnmt2* 参与了精子发生和成熟调控。Kiani 等^[20]通过敲除小鼠(*Mus musculus*) *Dnmt2* 基因发现, 小鼠精子中 tRNA 甲基化水平显著下降。徐丹丹^[21]通过免疫组化等方法发现, 小鼠精子成熟过程甲基化水平呈下降趋势, *Dnmt2* 的表达量与 tRNA 的含量也逐渐递减, 认为 *Dnmt2* 通过对 tRNA 的甲基化修饰参与了小鼠精子成熟发育过程。本研究对 *PtDnmt2* 基因在精巢不同时期的表达分析发现, *PtDnmt2* 的表达量从 I 期到 IV 期显著上升, 由此推测 *PtDnmt2* 基因参与调节三疣梭子蟹精子成熟调控。

本实验首次克隆获得三疣梭子蟹 *PtDnmt2* 基因 cDNA 全长, 初步分析了 *PtDnmt2* 在三疣梭子蟹不同组织、胚胎、幼体、和性腺发育不同时期表达差异, 推测其参与了三疣梭子蟹胚胎、幼体发育和性腺成熟发育的调控, 该结果为进一步了解甲基化对三疣梭子蟹和其他甲壳动物生长发育的作用提供参考。

参考文献:

- [1] Sachan M, Raman R. Developmental methylation of the regulatory region of *HoxB5* gene in mouse correlates with its tissue-specific expression[J]. *Gene*, 2006, 380(2): 151-158.
- [2] Shiota K. DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals[J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2004, 105(2-4): 325-334.
- [3] Goto T, Monk M. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(2): 362-378.
- [4] Geiman T M, Robertson K D. Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together?[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2002, 87(2): 117-129.
- [5] Geiman T M, Muegge K. DNA methylation in early development[J]. *Molecular Reproduction Development*, 2010, 77(2): 105-113.
- [6] Ponger L, Li W H. Evolutionary diversification of DNA methyltransferases in eukaryotic genomes[J]. *Molecular Biology Evolution*, 2005, 22(4): 1119-1128.
- [7] Rai K, Chidester S, Zavala C V, et al. Dnmt2 functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish[J]. *Genes and Development*, 2007, 21(3): 261-266.
- [8] Kunert N, Marhold J, Stanke J, et al. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*[J]. *Development*, 2003, 130: 5083-5090.
- [9] Phalke S, Nickel O, Walluscheck D, et al. Retrotransposon silencing and telomere integrity in somatic cells of *Drosophila* depends on the cytosine-5 methyltransferase DNMT2 [J]. *Nature Genetics*, 2009, 41: 696-702.
- [10] Geyer K K, López C M R, Chalmers I W, et al. Cytosine methylation regulates oviposition in the pathogenic blood fluke *Schistosoma mansoni*[J]. *Nature Communications*, 2011, 2: 424.
- [11] Feng C Z. Molecular characterization and expression pattern of Dnmt2 gene and DNA methylation detection in crustacean[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007. [冯琛卓. 甲壳动物 DNA 甲基转移酶 2(Dnmt2)基因的分子特征、表达分析及 DNA 甲基化水平的检测[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.]
- [12] Lin M J, Tang L Y, Reddy M N, et al. DNA methyltransferase gene *dDnmt2* and longevity of *Drosophila*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 861-864.
- [13] Guan W B, Xuan F J, Chen H H, et al. Reproductive characteristics and condition status of adult swimming crab *Portunus trituberculatus* (Brachyura: Portunidae) in East China Sea[J]. *Marine Fisheries*, 2009, 31(2): 120-127. [管卫兵, 宣富君, 陈辉辉, 等. 东海三疣梭子蟹成熟群体生殖特征和条件状况[J]. 海洋渔业, 2009, 31(2): 120-127.]
- [14] Wu X G, Yao G G, Yang X Z, et al. A study on the ovarian development of *Portunus trituberculatus* in East China Sea during the first reproductive cycle[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, 29(4): 120-127. [吴旭干, 姚桂桂, 杨筱珍, 等. 东海三疣梭子蟹第一次卵巢发育规律的研究[J]. 海洋学报, 2007, 29(4): 120-127.]
- [15] Ye H H, Li S J, Huang H Y, et al. Histological studies on testes development of the mud crab, *Scylla serrata*[J]. *Zoological Research*, 2002, 23(2): 141-144. [叶海辉, 李少菁, 黄辉洋, 等. 锯缘青蟹精巢发育的组织学观察[J]. 动物学研究, 2002, 23(2): 141-144.]
- [16] Vassena R, Dee Schramm R, Latham K E. Species—dependent expression patterns of DNA methyltransferase genes in mammalian oocytes and preimplantation embryos[J]. *Molecular Reproduction & Development*, 2005, 72(4): 430-436.
- [17] Feng C Z, Ding X. The DNA methyltransferase-2 gene in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Characteristics and ex-

- pression patterns during ovarian and embryonic development[J]. Zoological Science, 2007, 24(11): 1059-1065.
- [18] Dong A, Zhang X, Zhou L, et al. Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(2): 439-448.
- [19] Lyko F, Whit J, Jaenisch R. The putative *Drosophila* methyltransferase gene dDnmt2 is contained in a transposon-like element and is expressed specially in ovaries[J]. Mechanisms of Development, 2000, 95(1-2): 215-217.
- [20] Kiani J, Grandjean V, Liebers R, et al. RNA-mediated epigenetic heredity requires the cytosine methyltransferase Dnmt2[J]. PLoS Genetics, 2013, 9(5): e1003498.
- [21] Xu D D. The relationship between tRNA cleavage and DNMT2 in mature mouse sperms[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016. [徐丹丹. 小鼠成熟精子中 tRNA 裂解与 DNMT2 的关系[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.]

Molecular cloning of the DNA methyltransferase-2 gene and its expression during embryonic, larval, and gonadal development in the swimming crab *Portunus trituberculatus*

CAI Ying^{1,3}, MENG Xianliang^{2,3}, LIU Ping^{2,3}, LI Jian^{2,3}, HUAN Pengpeng^{1,3}, SUN Dongfang^{1,3}

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Qingdao National Laboratory of Marine Science and Technology, Functional Laboratory of Marine Fishery Science and Food Production Process, Qingdao 266235, China;
3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China

Abstract: DNA Methyltransferase-2 (*Dnmt2*) is one of the most widely distributed DNA methyltransferases in eukaryotes and plays important roles in eukaryotic development. In this study, the full-length cDNA of the *Dnmt2* gene is first cloned from the swimming crab (*Portunus trituberculatus*) using rapid amplification of cDNA ends (RACE). The length of *Dnmt2* cDNA is 1291 bp, and contains a 1203 bp open reading frame that is predicted to encode 400 amino acids. Structural domain analysis revealed that the protein of *PtDnmt2* contains a typical methyltransferase structural domain. Homology analysis revealed that the *PtDnmt2* in *P. trituberculatus* exhibits high identity with those in other species. Phylogenetic analysis showed that the amino acids of *PtDnmt2* are in the same branch as those of *Macrobrachium rosenbergii*. *PtDnmt2* was found to be expressed in all tested tissues, and highly expressed in ovary and heart tissues ($P < 0.05$). *PtDnmt2* showed stage-specific expression during embryonic and larval development. No expression was detected in the zygote and multicellular stages. It was, however, detected from the blastula stage, after which expression increased gradually with embryonic development. Expression of *PtDnmt2* changed significantly during gonadal development. During ovarian development, the highest expression occurred in stage II after which the level dramatically decreased. During testis development, the expression of *PtDnmt2* increased gradually and reached its peak in stage IV. The results suggest that *PtDnmt2* is important in the regulation of embryonic, larval, and gonadal development, and will provide useful information for further research on the roles of DNA methylation in developmental regulation in *P. trituberculatus*.

Key words: *Portunus trituberculatus*; *PtDnmt2*; DNA methylation; developmental regulation

Corresponding author: LIU Ping. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn