

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171201001

http://www.yykxjz.cn/

环朋朋, 吕建建, 孙东方, 高保全, 刘萍. 三疣梭子蟹 *PtDNMT1* 基因的克隆及其在低盐适应中的表达分析. 渔业科学进展, 2019, 40(1): 92-100

Huan PP, Lü JJ, Sun DF, Gao BQ, Liu P. The cloning of the *PtDNMT1* gene of *Portunus trituberculatus* and its expression analysis in low salinity adaptation. Progress in Fishery Sciences, 2019, 40(1): 92-100

三疣梭子蟹 *PtDNMT1* 基因的克隆及其在低盐适应中的表达分析*

环朋朋^{1,2} 吕建建^{2,3} 孙东方^{1,2} 高保全^{2,3} 刘萍^{2,3①}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071)

摘要 甲基转移酶是维持基因组甲基化状态的重要基因, 本研究利用 SMART-RACE 技术克隆了三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)甲基转移酶基因(*PtDNMT1*)。 *PtDNMT1* 基因 cDNA 序列全长 5919 bp, 包括 4832 bp 的开放阅读框, 编码 1610 个氨基酸, 预测分子量为 148.15 kDa, 理论等电点为 4.68。结构预测发现, *PtDNMT1* 有 2 个特殊的结构域, 分别是锌指结构域(zf-CXXC)和甲基转移酶家族特有的 Dcm 结构域。进化树分析显示, *PtDNMT1* 基因与昆虫类的 *DNMT* 基因聚为一支。组织表达分析发现, *PtDNMT1* 基因在肝胰腺、鳃、卵巢、肌肉、胃、心脏、血液中均有表达, 其中在肝胰腺中表达最高, 卵巢和鳃次之。进一步研究了低盐胁迫后 *PtDNMT1* 基因在鳃、肝胰腺和肌肉组织中的表达变化规律为胁迫 6 h 时鳃组织中 *PtDNMT1* 基因的表达即达到峰值(5.3 倍), 并一直持续到 12 h (4 倍), 随后逐步下降, 在 72 h 时仍显著高于对照组(2.3 倍); *PtDNMT1* 基因在肝胰腺中的表达规律类似于鳃, 然而其达到峰值的时间稍晚于鳃(24 h), 且上调倍数高于鳃(8 倍); 低盐胁迫后 *PtDNMT1* 基因在肌肉中的表达最初呈现下调趋势, 之后(24 h)上调表达至峰值(2.2 倍), 且一直上调表达至 72 h。本研究首次克隆了 *PtDNMT1* 基因, 根据其在各组织中的表达分布特征以及盐度胁迫后的表达变化情况, 推测 DNA 甲基化在三疣梭子蟹低盐适应中发挥了重要作用。

关键词 三疣梭子蟹; *PtDNMT1*; 盐度胁迫; 基因克隆; 基因表达

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2019)01-0092-09

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是我国海水养殖的主导品种之一, 具有重要的经济价值。盐度是

三疣梭子蟹养殖中的重要环境因子, 直接影响其生长、发育和存活(隋延鸣等, 2012; 路允良等, 2012;

* 国家虾蟹产业技术体系(CARS-48)、泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划(LJNY2015002)、国家自然科学基金面上项目(41576147; 41506186)、海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室开放课题(2016LMFS-A12)和江苏省现代农业面上项目(BE2017325)共同资助 [This work was supported by the National Shrimp and Crab Industry Technology System (CARS-48), the Project of Taishan Scholars Leading Talent (LJNY2015002), the National Natural Science Foundation of China (41576147, 41506186), Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, China (2016LMFS-A12), and the key research and development plan of Jiangsu Province (BE2017325)]. 环朋朋, E-mail: 1553480939@qq.com

① 通讯作者: 刘萍, 研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-12-01, 收修改稿日期: 2017-12-29

江山等, 2011; 郑萍萍等, 2010; 王冲等, 2010; 吕富等, 2010)。

三疣梭子蟹最适的生长盐度为 28.7(隋延鸣等, 2012), 我们在实际生产和实验研究中发现, 由于暴雨或换水等因素导致养殖水盐度骤降后, 不同家系间因耐低盐性状差异导致成活率参差不齐。这一特性为三疣梭子蟹养殖业带来巨大隐患, 有可能造成重大的经济损失。另外, 我国有广袤的低盐海域, 如大江、大河入海口, 其海水盐度并不适合三疣梭子蟹的正常生长。因此, 耐低盐性状是重要的育种性状, 解析低盐适应机理对于培育三疣梭子蟹耐低盐良种具有重要意义。

甲基转移酶基因(*DNMT1*)是维持基因组甲基化状态的重要基因, 该基因具有特异性的 N 末端结构域和保守的 C 末端催化结构域, DNA 甲基化由 DNA 甲基转移酶催化而成, DNA 甲基化整体水平在一定程度上与甲基转移酶的表达呈现正相关(杨晓丹等, 2012)。本实验室通过三疣梭子蟹转录组测序得到 *PtDNMT1* 基因片段, 发现该基因在低盐胁迫后的鳃组织中显著差异表达, 暗示其在盐度适应发挥重要作用。本研究利用 RACE 技术, 首次克隆了 *PtDNMT1* 基因, 通过 qRT-PCR 分析了其在三疣梭子蟹不同组织中的表达水平, 并对其在盐度胁迫下的表达变化规律进行了研究, 以此探讨 DNA 甲基化在三疣梭子蟹低盐适应中的功能。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验所需三疣梭子蟹均取自中国水产科学研究院黄海水产研究所实验基地昌邑海丰水产有限公司。实验所用个体为 120 日龄蟹, 所选取三疣梭子蟹均健康有活力, 平均体重为(120±10.5) g, 在室内养殖池塘(5 m×3 m×2 m)中暂养, 暂养期间持续充氧, 控制水温为(20±2)°C, pH 为 7.5。

1.2 盐 度 胁 迫 实 验

随机挑取暂养 7 d 的三疣梭子蟹分为 2 组: 对照组(正常海水 30)、低盐组(12), 每个处理组设 3 个平行, 每个平行 30 只个体。利用自然海水和淡水配制各盐度实验用水, 使用 YSI 盐度仪进行盐度校准(隋延鸣等, 2012)。每天少量投喂饵料, 实验期间定时测量海水盐度, 每天少量换水, 以维持海水盐度的稳定。在低盐胁迫过程中分别取 0、3、6、12、24、48 和 72 h 的肝胰腺、鳃和肌肉等组织, 每个时间点选取 3 个

体。样品置于液氮中保存, 用于 RNA 的提取。

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

利用 TRIzol 试剂提取三疣梭子蟹各组织总 RNA, 通过核酸定量仪检测 RNA 浓度, 用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 检测完成后将其放置于超低温冰箱中保存。利用 SMART RACE Amplification Kit 合成 3'和 5' RACE 模板。

1.4 cDNA 全长的克隆及测序

根据本实验室转录组测序所得的 *PtDNMT1* 基因的片段, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计出 2 对 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物, 所有引物均由青岛擎科生物有限公司合成, 序列等信息见表 1。利用 Trizol 法提取健康三疣梭子蟹肌肉、鳃、肝胰腺组织的 RNA, 利用 RACE 模板合成试剂盒合成三疣梭子蟹 RACE 模板。3'和 5'末端使用 Advantage2 PCR Kit 扩增, 运用巢式 PCR 方法, 第一轮反应使用引物 Dt-3'-F, Dt-5'-F, 分别与 UPM 配对, 反应程序: 95°C 5 min, 95°C 30 s, 63°C 30 s, 75°C 2 min, 30 个循环。第二轮反应以第一轮 PCR 扩增产物为模板, 使用引物 Dt-3'-R 和 Dt-5'-R, 分别与 NUP 配对, 反应程序: 95°C 5 min, 95°C 30 s, 63°C 30 s, 75°C 2 min, 30 个循环。利用 pMD18-T 载体连接目的片段, 然后利用 DH5 α 感受态细胞, 将连接液转入感受态细胞中, 经过 37°C 活化 1 h, 然后进行涂板, 经过 12 h 培养, 挑菌摇床培养, M13 引物检测菌液 PCR, 挑选所需的阳性单克隆, 经过菌落 PCR 鉴定后, 送青岛擎科生物有限公司测序。

表 1 本研究用到的引物
Tab.1 The primers used in this study

| 引物 Primer | 序列 Sequence |
|--------------------|---|
| UPM-long | CTAATACGACTCACTATAGGGCAA GCAGTGGTATCAACGCAGAGT |
| UPM-short | CTAATACGAC TCACTATAGGGC |
| NUP | AAGCAGTGGT AACAACGCAGAGT |
| <i>PtDNMT1</i> -5F | AGCCAATCAAAGCCTTCTCACCAC |
| <i>PtDNMT1</i> -5R | TCGGTTGACAATCCACTTCTGT |
| <i>PtDNMT1</i> -3F | CACCGATGACTGTAATGGCTTGCT |
| <i>PtDNMT1</i> -3R | GCTATGGAGCCGAGCCTGT |
| β -actin-F | GTAGGTGATGAAGCCAGAGCA |
| β -actin-R | CTGGGTCATCATCTTCTCCCTGT |
| <i>PtDNMT1</i> -DF | GGTCCCACCAGAAGAACGC |
| <i>PtDNMT1</i> -DR | TTGTCAATCGTCGTCTGCCTC |

1.5 生物学序列分析

利用 ORF Finder 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>)预测其开放阅读框,利用 EditSeq 软件预测其氨基酸序列,利用 ExPASy 软件(http://web.expasy.org/compute_pi/)预测其分子量和等电点,利用 NCBI Blastx 软件(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列同源性比对,利用 NCBI Conserved domain 软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析该基因的蛋白质功能结构域,从 GenBank(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中下载其他物种的 *DNMT1* 基因蛋白质序列,利用 MAGE 6.0 软件构建该基因的 NJ 系统进化树。

1.6 *PtDNMT1* 组织表达分析

挑选出三疣梭子蟹的肌肉、鳃、肝胰腺、血液、卵巢、心脏、胃并提取总 RNA(每个组织选取 3 个个体)。使用 PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa)将上述组织的 RNA 反转录成 cDNA,放置于 -20℃ 保存。取出不同组织 cDNA,根据该基因的开放阅读框(ORF)设计 1 对荧光定量引物(*PtDNMT1*-DF、*PtDNMT1*-DR)以及内参引物(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 *DNMT1* 在三疣梭子蟹不同组织中的表达情况。反应体系为 10 μ l,包括 5 μ l SYBR Premix Ex Taq II (2 \times)、0.4 μ l 正向引物(10 μ mol/L)、0.4 μ l 反向引物(10 μ mol/L)、0.2 μ l ROX Reference Dye II (50 \times)、1.0 μ l cDNA、另加 3.0 μ l DEPC 水补足 10 μ l。反应程序:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 34 s,35 个循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。

2 结果与分析

2.1 三疣梭子蟹 *PtDNMT1* 基因 cDNA 全长的获得和序列分析

采用 RACE 技术扩增获得 *PtDNMT1* 基因的全长 cDNA,GenBank 登录号:MF770486。分析显示,*PtDNMT1* cDNA 序列全长 5919 bp。氨基酸序列分析发现,*PtDNMT1* 包括 4832 bp 的开放阅读框(ORFL),编码 1610 个氨基酸,理论等电点为 4.68,预测蛋白质的分子量为 148.15 kDa。*PtDNMT1* 有 2 个特殊的结构域,分别是 zf-CXXC 锌指结构域和甲基转移酶家族特有的 Dcm 结构域。*PtDNMT1* 基因的 cDNA 序列全长以及其编码的氨基酸序列见图 1。

2.2 同源性及系统进化树分析

利用 DNAMAN 软件进行同源性分析,结果显示,*PtDNMT1* 与合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)的 *DNMT1* 最为相似,同源性为 59%,与斑马鱼(*Danio rerio*)的同源性为 56%,与欧洲熊蜂(*Bombus terrestris*)的同源性为 57%。利用 MEGA5.0 以邻接法(Neighbor-joining)构建三疣梭子蟹 *PtDNMT1* 系统进化树,结果显示,三疣梭子蟹与欧洲熊蜂、芜菁叶蜂进化上关系聚为一支,与昆虫类亲缘关系最近(图 2)。

2.3 三疣梭子蟹 *PtDNMT1* 基因组织表达分析

利用 qRT-PCR 技术分析三疣梭子蟹 *PtDNMT1* 基因在肝胰腺、鳃、卵巢、肌肉、胃、心脏和血液组织中的相对表达量(图 3),结果显示,*PtDNMT1* 基因在各种组织中广泛表达,但表达量存在显著差异。其中,在肝胰腺中表达量最高($P < 0.05$),鳃和卵巢次之,在血液中表达量最低。

2.4 盐度胁迫后 *PtDNMT1* 基因的在鳃、肝胰腺和肌肉组织中的表达分析

盐度胁迫后鳃组织中 *PtDNMT1* 基因呈现显著上调表达趋势,在低盐胁迫后的 6 h 出现峰值(5.3 倍),并极显著高于对照组($P < 0.01$)(图 4)。在肝胰腺组织中(图 5),低盐胁迫后 6~72 h 间一直呈极显著的上调表达,并在低盐胁迫 24 h 达到最大值(8 倍)。在肌肉组织中(图 6),低盐胁迫后 *PtDNMT1* 基因表达开始出现降低趋势,但降低趋势较为缓慢,在低盐胁迫 24 h 出现上升趋势,并在 24 h 表达量达到峰值(2.2 倍)。

3 讨论

甲基转移酶基因(*DNMT1*)是维持基因组甲基化状态的重要基因,DNA 甲基化水平在一定程度上与甲基转移酶表达呈现正相关(杨晓丹等,2012)。本研究克隆获得了三疣梭子蟹 *PtDNMT1* 基因 cDNA 全长序列,发现 *PtDNMT1* 有 2 个特殊的结构域,分别是 zf-CXXC 锌指结构域和甲基转移酶家族特有的 Dcm 结构域。

有关三疣梭子蟹盐度适应研究主要集中于国内,目前已查明了盐度耐受范围以及最适生长盐度范围,明确盐度胁迫对胚胎、幼体发育、摄食、免疫等的影响(隋延鸣等,2012;路允良等,2012;江山等,2011;郑萍萍等,2010;王冲等,2010;吕富等,2010)。由于研究基础相对薄弱和缺少基因组信息,其盐度适应机制研究开展较晚,一些学者通过候选基因法筛选具代

1 taatacctgatatccacacagcactacactcttaaggtcatcacagtggtccggatgggtttttctttgggttgggttcagttccaacagcccaaaccttcaccattgccaagca
121 tgaagccaagagagtgtatgtaagatcagactcaatgcagaccttgctgattgtctatcatcagggatagtaaaggttactgtgtgaatggatcattgtagttcattccaagaagctc
241 tccctccctcatctctatccacacttgaacccttggatgatagtttggccctccactgctagttttatagtaatttttogaactgttccctccactgctccattttgtgtattt
361 gtcgagccaagtcttcagctctccgaaaggtccaatccaggtggacttcatcaaggtgatctcatcattttctcctctacagcgaaggtgacacaccagacactgtaccgggagt
481 gggcgggtggcactattgggtggcgaaggtcagggtgacgtgctgaatcagctgtgtccactatcaagtatcaactgatactgatcttgatcttgatgttgcaggtgacgcaagaattt
601 cttctgctcaggcctttgaatcgccagcgcctacacgccagttcgcaatcaggatgtaagtcacagacggaacagcgaattttgccccaactctgaggccttgccgtggaggaggac

M V A V A E N C T I P E D V W K K V

721 aggagaggaggacacttagcacttctgcgccctgctggagagg ATG GTG GCT GTA GCT GAG AAC TGC ACG ATC CCC GAA GAT GTG TGG AAG AAG GTT
E E L Q A E Y K E E I T L K G Y V K R L R S L L D S H L M
821 GAA GAG CTT CAG GCA GAA TAC AAG GAG GAG GAG ATC ACT CTG AAG GGC TAT GTG AAA CGG CTG CGG TCC CTG CTT GAC TCT CAT CTC ATG
E T H R Q D I A Q L D K G L K D A E F T E G T Y F K K L E K
910 GAA ACA CAC CGT CAA GAC ATT GCT CAA CTA GAT AAG GGA CTC AAA GAT GCT GAA TTT ACT GAG GGC ACA TAC TTC AAG AAG TTG GAG AAA
L L E S N L K L A A N N D K V T G N K K K S Q S S V A S G K
1000 TTG CTG GAA TCA AAT TTG AAA TTA GCA GCA AAT AAT GAC AAA GTC ACA GGA AAC AAG AAA AAG TCA CAA AGC AGC GTT GCC TCA GGA AAA
Q K L S M F A Y K E N S K N G S N A S T D I G M V M L P V Q
1090 CAA AAA CTT TCT ATG TTT GCC TAC AAA GAG AAC AGC AAG AAT GGT AGC AAT GCC AGT ACA GAT ATA GGA ATG GTA ATG TTA CCA GTA CAG
V K L E E I C E S N G H Q N N E K M N G Q E S N R D M K E Y
1180 GTA AAG CTA GAG GAG ATA TGT GAA AGC AAT GGT CAC CAA AAC AAT GAG AAG ATG AAT GGT CAA GAA AGT AAT AGA GAT ATG AAA GAA TAT
E R N G Q K I K E E I N T D V E E H E D N E E E M K E C E S
1270 GAA AGG AAT GGT CAA AAG ATT AAG GAA GAG ATA AAT ACA GAT GTG GAG GAA CAT GAA GAT AAT GAA GAA GAT AAA GAA TGT GAA AGC
N G Q E F K E E T N I D E E E H E N N G Q E N N E E E M T E
1360 AAT GGT CAA GAA TTT AAG GAA GAG ACA AAT ATA GAT GAG GAA GAA CAT GAA AAC AAT GGT CAG GAA AAT AAT GAA GAA GAA ATG ACA GAA
C E S N G E K P I E T N S T M T E E E K E M D T E D A A P S
1450 TGT GAA AGT AAT GGA GAA AAA CCA ATT GAA ACC AAT AGC ACA ATG ACA GAA GAG GAG AAA GAA ATG GAC ACA GAA GAT GCT GCT CCC TCA
S P P P Q K K Q T K G R T A R R R Q P Q A G Q R S I T D L F
1540 TCA CCA CCA CCA CAA AAG AAG CAG ACA AAA GGT CGA ACA GCG CGC CGA AGG CAG CCT CAG GCT GGG CAG AGA TCC ATA ACA GAT TTA TTC
S P S S K Q R T E K N E E K E E E D T D K V H E P D E K R Q
1630 TCA CCA TCA TCC AAG CAG AGG ACT GAG AAG AAT GAA GAG AAA GAA GAG GAA GAC ACA GAC AAA GTT CAC GAA CCT GAT GAG AAG AGG CAA
K L E E D T K E P A K D T T P R E K P E S Q K W I V N R C E
1720 AAA CTT GAG GAA GAT ACA AAG GAA CCT GCA AAA GAC ACT ACA CCA AGA GAG AAG CCT GAG TCA CAG AAG TGG ATT GTC AAC CGA TGT GAG
I C R Q H L S S P D L L L Y P G H P E G S V E E F I A L T D
1810 ATA TGT CGA CAG CAC CTC TCC AGT CCA GAC CTG TTG CTG TAC CCT GGC CAT CCT GAG GGC TCT GTG GAG GAG TTC ATT GCC CTC ACA GAC
Q R L S L F T G N E E F I H E Y D E R P Q H K I T E F N V Y
1900 CAA AGA CTC TCT CTT TTC ACT GGC AAT GAA GAA TTT ATT CAT GAG TAT GAT GAG AGA CCA CAA CAT AAG ATC ACA GAG TTC AAT GTG TAT
D T E G H L C P F D G G L I E R N V L L Y F S G F L K P I Y
1990 GAC ACG GAG GGT CAC CTT TGC CCA TTT GAT GGC GGT CTT ATA GAG CGC AAT GTT CTG CTG TAT TTC TCT GGC TTC CTC AAA CCC ATC TAT
E E D P S A E G G I A T K D I G P I N E W W I S G F D G G E
2080 GAG GAA GAT CCG AGT GCA GAG GGT GGC ATT GCC ACT AAG GAC ATC GGC CCC ATC AAT GAG TGG TGG ATA TCT GGT TTT GAT GGT GGT GAG
K A L I G F S T S Y A E Y I L M S A S E M Y S P F V E A V K
2170 AAG GCT TTG AIT GGC TTC TCT ACT TCA TAT GCT GAG TAC ATC CTG ATG TCA GCT AGT GAG ATG TAT TCT CCT TTT GTG GAG GCT GTG AAA
E K I Y L S K L V I E F L L N D A H A S Y E D L L N K L E T
2260 GAA AAA ATA TAT CTC AGT AAG CTG GTG ATA GAG TTC TTG CTG AAT GAT GCT CAT GCA TCC TAT GAA GAC TTG TTG AAC AAG CTG GAG ACA
A V P P S G L R T I T E D S L L R H A Q F V C D Q V H N F D
2350 GCA GTG CCC CCC AGT GGC CTG CGG ACC ATA ACA GAA GAC TCC TTG TTG AGA CAT GCA CAG TTT GTG TGT GAC CAG GTT CAC AAC TTC GAC
L A G E E N E D M L I T A P C I R D V I R L A G I T L G K R
2440 TTG GCT GGA GAG GAG AAT GAG GAC ATG CTC ATC ACT GCA CCA TGT ATC CGG GAC GTC ATC AGA CTA GCA GGC ATC ACT CTG GGC AAG CGT
R A L R R V G P K V K V V K T P K W T K A T T T P L V R N M
2530 CGT GCA CTG AGG CGT GTT GGT CCC AAG GTC AAG GTT GTC AAG ACA CCC AAG TGG ACC AAG GCA ACC ACA ACT CCA CTT GTC AGA AAC ATG
F E S F F P E Q I D T D K E F G P T R R T R C G V C D A C Q
2620 TTT GAG TCT TTC TTC CCT GAG CAG ATA GAC ACT GAC AAA GAA TTT GGT CCC ACC AGA AGA ACG CGC TGT GGG GTG TGT GAT GCT TGT CAG
R N D C G Q C K H C K D M V K F G G S G R S K Q C C I D R R
2710 AGG AAT GAT TGT GGG CAG TGT AAG CAT TGC AAA GAC ATG GTC AAG TTT GGA GGC TCC GGC AGA TCC AAG CAG TGT TGC ATC GAT CGC CGG
C P N M V V A E A D D D D N E E L V G I P L E D G T A K P K
2800 TGT CCC AAC ATG GTG GTA GCT GAG GCA GAC GAC GAT GAC AAT GAG GAG CTG GTA GGC ATT CCA CTG GAA GAC GGC ACT GCC AAG CCA AAA
L H R I R R H T H H V A W S G K P T I T E G K R T Y Y N C V
2890 CTT CAC CGC ATC CGA AGA CAC ACC CAC CAC GTT GCC TGG AGT GGA AAA CCA ACC ATC ACT GAG GGG AAG AGG ACC TAC TAT AAC TGT GTC
L I N E E E Y F V N D C V M V E P D D P Q T P V Y I A R I N
2980 CTG ATC AAC GAG GAG GAT TTT GTG AAT GAC TGT GTG ATG GTG GAC CCT GAT GAC CCC CAG ACC CCA GTG TAC ATT GCC CGC ATC AAC
H M W E D G M G K H F H A D W F C R G T D T M L G E T A D
3070 CAC ATG TGG GAG GAT GGC ATG GGC AAG AAG CAC TTC CAC GCG GAT TGG TTC TGC CGA GGG ACT GAC ACA ATG CTG GGA AAG GCT GAT
P L E L F L I N D C E D T L I D A I M K K V T V Q Y V G P P
3160 CCA CTG GAA CTG TTT CTC ATC AAT GAC TGT GAA GAC ACG CTT ATT GAT GCT ATC ATG AAA AAG GTC ACG GTA CAG TAT GTT GGT CCA CCG
P N W K M L G G I P E K D E D Y P V K E K D G T T Y W Y K M

3250 CCA AAC TGG AAG ATG CTT GGT GGT ATC CCA GAG AAA GAT GAA GAT TAC CCT GTC AAG GAG AAG GAT GGC ACC ACC TAC TGG TAC AAG ATG
M Y T P E Y G R F E D I P E D Y N T K V T G E Q K S H R Y C

3340 ATG TAC ACG CCT GAG TAT GGG CGC TTT GAA GAC ATT CCT GAA GAT TAT AAC ACA AAG GTC ACA GGT GAA CAG AAA AGT CAC AGG TAC TGT
S S C A N L E K A E K R E L C V L G K K L E E S T Q S Q N R

3430 TCC TCA TGT GCT AAT CTT GAA AAA GCT GAA AAG AGA GAG CTG TGT GTG CTG GGC AAG AAA CTT GAG GAG TCC ACT CAG TCA CAA AAC AGG
Y A S V T Y L D D D F A M A D C V F V N P D A F H F Q I K P

3520 TAT GCA TCA GTC ACA TAC TTG GAT GAT GAC TTT GCC ATG GCA GAT TGT GTG TTT GTG AAC CCA GAT GCT TTC CAC TTT CAG ATT AAA CCT
A P A P E K E E R M K N V D E E M Y P E Y Y R K S S D H I K

3610 GCT CCT GCC CCA GAG AAG GAA GAG AGG ATG AAA AAT GTG GAT GAA GAA ATG TAT CCA GAG TAT TAC AGG AAG TCT TCA GAC CAC ATC AAA
G S N E M T P E P F R I A R I L Y I T S R S T E S A Q S P S

3700 GGA TCT AAT GAA ATG ACA CCT GAA CCC TTC AGA ATT GCA AGA ATC CTG TAC ATC ACA AGC AGG AGT ACA GAG TCA GCC CAG AGT CCC AGT
D V S V R V A K F Y R P E N T H R G A V A S H Q A D M N R L

3790 GAT GTG TCG GTG AGA GTG GCC AAA TTT TAC CGT CCA GAG AAC ACT CAC AGA GGT GCT GTA GCC TCC CAT CAG GCA GAT ATG AAC CGC CTC
Y W S E E E T W I T F R D I T G K C F V T F Q D N L F D K T

3880 TAC TGG AGT GAA GAA GAG ACC TGG ATA ACC TTC AGA GAT ATC ACT GGG AAG TGT TTC GTG ACT TTT CAA GAT AAT CTG TTT GAC AAA ACC
N D D L M K E L P H H F Y F A E A Y D A S R K A F V E P P L

3970 AAC GAT GAT CTC ATG AAG GAA CTG CCG CAT CAT TTC TAT TTT GCC GAG GCT TAT GAT GCG TCA CGG AAA GCC TTT GTA GAG CCC CCT CTC
K A Q N M G R L G K G K G K G K K G K G K C F P D D N E E

4060 AAG GCA CAG AAC ATG GGC AGA CTG GGA AAA GGC AAG GGA AAA GGA AAG AAA AAA GGC AAG GGC AAG TGC TTC CCT GAT GAC AAT GAG GAA
A N F Q G F K E S P E V K H K L R T M D V F A G V G G L S E

4150 GCC AAT TTC CAA GGT TTC AAG GAG AGC CCA GAG GTG AAG CAC AAG CTG CGC ACG ATG GAT GTT TTT GCC GGT GTG GGA GGT CTG TCT GAG
G F H Q A G V S E S K W A I E A F E P A A L A Y R L N F P S

4240 GGA TTC CAC CAG GCT GGG GTG AGT GAG TCA AAG TGG GCA ATT GAG GCA TTT GAG CCA GCA GCC TTG GCC TAC AGA CTC AAC TTT CCC AGT
A T V F T D D C N G L L R L V M D G N N M N H K G Q R L P Q

4330 GCA ACA GTG TTC ACC GAT GAC TGT AAT GGC TTG CTG AGA CTG GTC ATG GAT GGC AAC AAC ATG AAC CAC AAC GGC CAG CGT CTG CCT CAG
K G D V E M L C G G P P C Q G F S G M N R F N S R Q Y S L F

4420 AAA GGT GAT GTT GAG ATG CTG TGT GGA GGT CCC CCA TGC CAA GGA TTC TCA GGA ATG AAC AGA TTC AAC AGT CGG CAA TAT TCT CTA TTC
K N S L V A S Y L S Y C D Y Y R P R F F L L E N V R N F V S

4510 AAG AAT TCT TTA GTG GCC TCT TAT CTA TCG TAC TGC GAT TAC TAC CGT CCA CGA TTC TTT CTG CTT GAA AAT GTA CGC AAC TTT GTG TCA
Y K C G L V L K L T L R V L V K L G Y Q C T F G I L Q A G N

4600 TAC AAG TGT GGC CTG GTG CTG AAA CTA ACC CTG CGA GTG CTG GTC AAG CTG GGC TAT CAG TGT ACC TTT GGC ATC CTT CAG GCA GGA AAC
Y G V S Q T R R R A I I L A A A P G E K L P K Y P E S T H A

4690 TAT GGC GTT TCA CAG ACT CGT AGA AGG GCA ATC ATC TTA GCA GCT GCT CCA GGA GAA AAA TTG CCC AAG TAT CCA GAA TCT ACT CAT GCC
F S R R S S N L S V V I D G K K Y V T N C Q W T E S A P L R

4780 TTC TCC CGA AGG TCA AGC AAT TTG TCT GTT GTG ATT GAT GGC AAG AAG TAT GTA ACC AAC TGC CAG TGG ACA GAG TCT GCC CCA TTG CGT
T V T V R D T M S D L P E I P N G H R K E E M S Y G A E P V

4870 ACA GTA ACA GTG CGA GAC ACC ATG TCA GAC CTG CCA GAG ATA CCC AAT GGC CAC CGC AAG GAA GAA ATG AGC TAT GGA GCC GAG CCT GTC
S H L Q R L I R G N Q Y Q P I L R D H I C K E M A P L V A A

4960 TCT CAC CTC CAG CGC TTG ATT CGT GGC AAC CAG TAC CAG CCA ATC TTG AGA GAC CAC ATT TGC AAG GAG ATG GCT CCC TTG GTG GCT GCT
R I E H I P T A P G S D W R D L P N I V V T L S D G K E T K

5050 CGT ATT GAG CAC ATC CCT ACA GCG CCA GGT TCA GAC TGG CGA GAC TTG CCG AAC ATT GTG GTC ACC TTG TCT GAT GGA AAG GAA ACC AAG
K L L Y L H P D K K Q G K S S K G A M R G V C P C A A G R A

5140 AAA CTC TTG TAT CTT CAC CCT GAC AAG AAG CAA GGC AAG TCC TCA AAA GGA GCA ATG CGT GGC GTG TGC CCC TGT GCT GCT GGG CGT GCA
C H P M D R Q Y N T L I P W C L P H T G N R H N H W A G L Y

5230 TGC CAC CCA ATG GAC CGA CAG TAC AAC ACC CTC ATC CCC TGG TGT CTG CCA CAC ACA GGC AAT CGC CAC AAT CAC TGG GCT GGT CTT TAC
G R L E W D G F F S T T V T N P E P M G K Q G R V L H P E Q

5320 GGG AGA CTG GAG TGG GAT GGA TTC TTC TCC ACC ACT GTC ACT AAC CCT GAA CCT ATG GGC AAG CAG GGC CGA GTG TTG CAC CCA GAA CAG
T R V V S V R E C A R S Q G F P D T F R F F G T I L E K H R

5410 ACA CGG GTG GTC AGT GTT CGG GAG TGT GCT CGT TCC CAG GGC TTT CCA GAC ACA TTC CGC TTC TTT GGA ACC ATC TTG GAG AAA CAC AGA
Q V G N A V P P P M A R A L G L E I K K C I L Q R E Y E M E

5500 CAG GTT GGT AAT GCT GTG CCG CCT CCA ATG GCC CGT GCT TTA GGA TTG GAA ATA AAA AAA TGT ATA CTT CAA AGA GAA TAT GAA ATG GAG
K S *

5590 AAG TCA TAA gagaacagtaaggttggaactgattttagtaacaacactgtttttatgttagaagaattttatgcttttttgaacattttatagatgctatttaa
5707 ttattactattttaagtgatagatattgtaagtaaatattttgtaaaagttttcaaaactacatactgtggaatttttcggtatgatagtaaatagattttttataaaatgcct
5827 cagactttgctctgtgcaacatttataactattatgttatagcaaaatattttcatgaacctagctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

图 1 三疣梭子蟹 *PtDNMT1* 基因 cDNA 序列全长及其编码的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence and the deduced amino acids sequence of *P. trituberculatus PtDNMT1* gene

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 均用粗线方框标出, zf-CXXC 锌指结构域和 Dcm 结构域分别用细线方框和阴影标出
Start codon (ATG) and stop codon (TAA) are marked with thick boxes, and the zf-CXXC and Dcm domain are separately marked with filament box and shadow

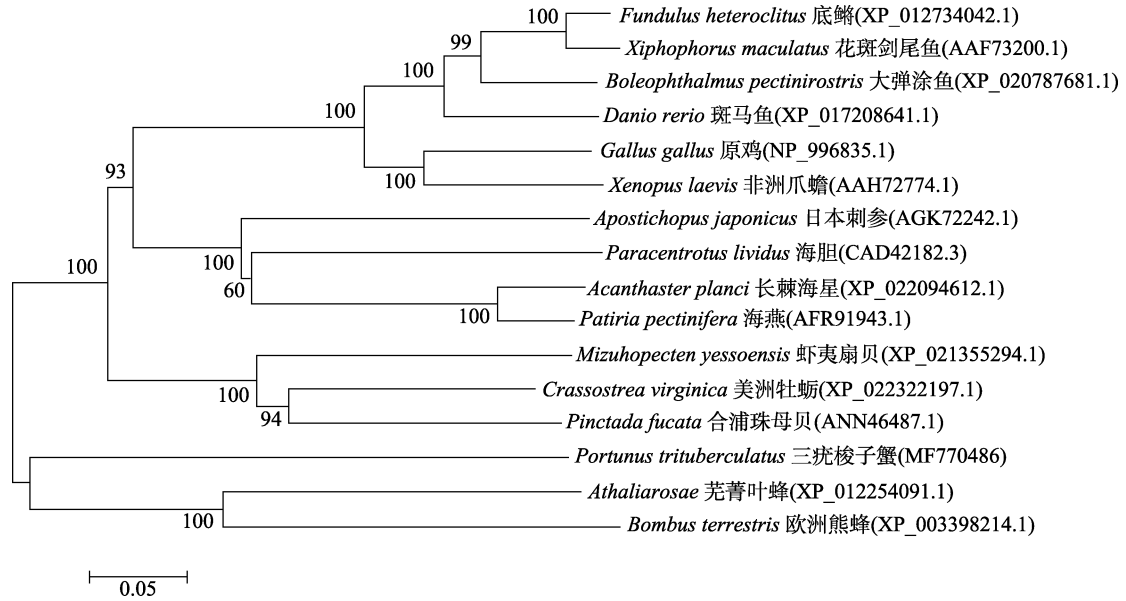


图 2 基于 *PtDNMT1* 氨基酸序列的 NJ 进化树
Fig.2 NJ tree based on *PtDNMT1* amino acid sequences

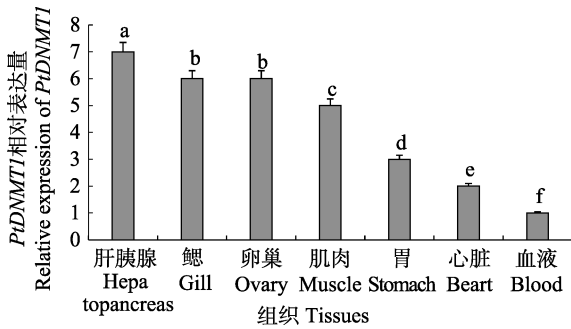


图 3 *PtDNMT1* 基因在三疣梭子蟹不同组织中的表达
Fig.3 The expression of *PtDNMT1* gene in different tissues of *P. trituberculatus*

相同字母代表差异不显著($P > 0.05$),
不同字母代表差异极显著($P < 0.05$)

Same letters indicated no significant difference ($P > 0.05$);
different letters indicated significant difference ($P < 0.05$)

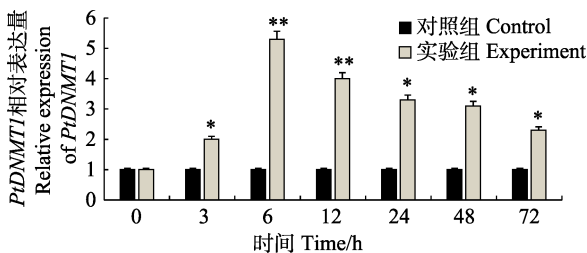


图 4 低盐胁迫后三疣梭子蟹 *PtDNMT1* 基因在鳃组织中的表达

Fig.4 The expression of *PtDNMT1* in gills of *P. trituberculatus* during low salinity stress

*代表同一时间实验组与对照组差异显著($P < 0.05$); **代表同一时间实验组与对照组差异极显著($P < 0.01$), 下同
* indicated significant difference ($P < 0.05$); ** indicated highly significant difference ($P < 0.01$). The same as below

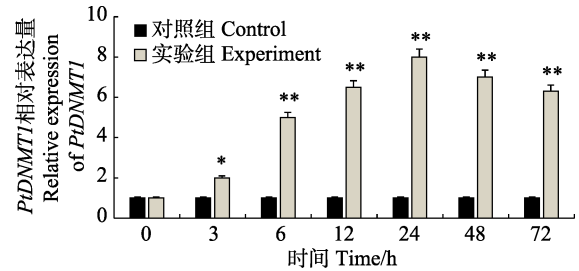


图 5 低盐胁迫后三疣梭子蟹 *PtDNMT1* 基因在肝胰腺组织中的表达

Fig.5 The expression of *PtDNMT1* in the hepatopancreas of *P. trituberculatus* during low salinity stress

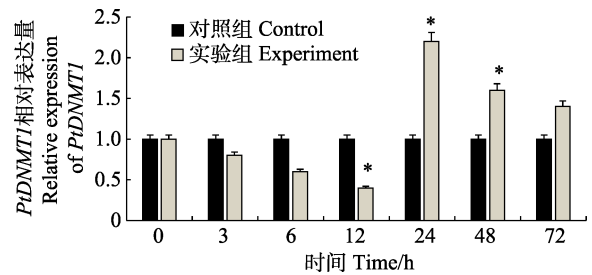


图 6 低盐胁迫后三疣梭子蟹 *PtDNMT1* 基因在肌肉组织中的表达

Fig.6 The expression of *PtDNMT1* in the muscle of *P. trituberculatus* during low salinity stress

表性的离子转运酶基因并分析其在盐度适应中的功能(马金武等, 2016); 覃焯等(2012)利用芯片技术发掘 417 条盐度胁迫差异基因; 吕建建等(2013)通过高通量转录组研究发掘了 1705 条盐度胁迫后差异表达的基因。并在此基础上克隆了水通道蛋白、氯离子通道蛋白等重要离子转运基因(王瑜等, 2014)。然而, 总

体而言,三疣梭子蟹盐度适应机制的研究仍处于起始阶段,盐度适应相关基因的发掘及验证均主要在转录水平上开展。

DNA 甲基化是表观遗传学最为重要的一种调控方式,相关研究在脊椎动物和植物中广泛开展(李娜等, 2012; 周翠兰等, 2005; 黄韞宇等, 2013),而在甲壳动物中少有报道。DNA 甲基化在水产动物生长、发育、性逆转以及环境适应中发挥举足轻重的作用(何暮春等, 2018)。研究发现, 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)生长和耐热性状的累代选育会导致 DNA 甲基化水平和模式的改变(吴彪等, 2015); 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)耐寒品系的总甲基化水平、全甲基化和半甲基化水平较对照组均存在一定差异(朱华平等, 2013); 尤为值得注意的是, 经氨氮和 pH 胁迫后的中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)体内整体甲基化水平呈显著上升趋势(杜盈等, 2013), 且随着胁迫时间的延长, 体内甲基化水平会相应出现持续升高的现象, 暗示甲基化修饰在甲壳动物逆境胁迫中具有重要作用。然而, DNA 甲基化修饰在甲壳动物盐度适应中是否也具有一定功能, 尚未见相关研究报道。

本研究发现, *PtDNMT1* 基因在所检测的 7 个组织中均有表达,但在不同的组织中相对表达量存在差异,其中,在肝胰腺中表达量最高,在鳃、卵巢和肌肉组织中表达次之,这与张蕾等(2010)在鲫鱼(*Carassius auratus*)中的研究结果基本一致。鳃、肝胰腺和肌肉是三疣梭子蟹体进行盐度适应的主要器官(Rosa *et al.*, 2014),而 *PtDNMT1* 基因在以上 3 个组织中均有较高表达,暗示 DNA 甲基化可能在三疣梭子蟹盐度适应中发挥一定的作用。

为了继续探索 DNA 甲基化在三疣梭子蟹盐度适应中的作用机制,我们分析了低盐胁迫过程中 *PtDNMT1* 基因在鳃、肝胰腺和肌肉组织中的表达变化规律。鳃是三疣梭子蟹最重要的渗透压调节器官之一,位于鳃上皮细胞的离子转运基因具有维持体内外渗透压和离子平衡的重要作用(马金武等, 2016)。本研究发现,低盐胁迫 6 h 时鳃组织中 *PtDNMT1* 基因的表达即达到峰值(8 倍),并一直持续到 12 h (6 倍),随后逐步下降,在 72 h 时仍显著高于对照组(3 倍)。马金武等(2016)研究发现,盐度胁迫 12 h 后其血液渗透压和主要离子浓度均达到了相对稳定的水平,暗示盐度胁迫后的 0~12 h 是三疣梭子蟹进行体内外渗透压和离子平衡的重要时期。*PtDNMT1* 基因在盐度胁迫后 6~12 h 间极显著上调表达,暗示 DNA 甲基化修饰在三疣梭子蟹平衡体内外渗透压的关键时期发挥

重要的功能。

甲壳动物进行主动的渗透压调节需要消耗大量能量,而肝胰腺是重要的消化和能量供给器官(Wang *et al.*, 2014)。本研究发现,盐度胁迫后 *PtDNMT1* 基因在肝胰腺中的表达规律非常类似于在鳃中的表达,只是其达到峰值的时间稍晚于鳃(24 h),且上调倍数相对高于鳃,在胁迫后 6~72 h 间一直极显著的上调表达。推测低盐胁迫过程需要肝胰腺提供大量能量用于鳃器官进行渗透压调节,而 DNA 甲基化在调控肝胰腺能量供给过程中发挥重要功能。

自由氨基酸(FAA)途径也是甲壳动物进行渗透压调节的重要方式,甲壳动物的肌肉组织是 FAA 发挥渗透压调节的主要场所(付萍等, 2017)。低盐胁迫后, *PtDNMT1* 基因在肌肉中的表达最初呈现下调趋势,但降低趋势并不明显且较为缓慢。在低盐胁迫 24 h 后,该基因上调表达达至峰值(2.2 倍),且上调趋势一直持续至 72 h。相对于鳃中的表达情况,其在肌肉中的表达峰值相对滞后,且上调表达倍数亦相对较低。研究结果显示, DNA 甲基化在 FAA 中具有一定功能,然而根据上调幅度推测,其发挥的调控功能相对弱于在鳃和肝胰腺中所发挥的功能。

本研究首次克隆了三疣梭子蟹 *PtDNMT1* 基因 cDNA 全长序列,分析了其在三疣梭子蟹不同组织、低盐胁迫不同时期的表达情况,暗示 *PtDNMT1* 基因可能在三疣梭子蟹盐度适应中发挥重要作用,为进一步深入解析 DNA 甲基化在三疣梭子蟹盐度适应中的分子机制提供了依据。

参 考 文 献

- Du Y, He YY, Li J, *et al.* MSAP analysis of genomic DNA in the tissues of wild and "Huanghai No.1" *Fenneropenaeus chinensis*. *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. *中国水产科学*, 2013, 8(3): 536-543]
- Fu P, Lü JJ, Liu P, *et al.* Effects of different salinity level on free amino acid composition in muscle and hemolymph of the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(3): 374-381 [付萍, 吕建建, 刘萍, 等. 盐度胁迫对三疣梭子蟹肌肉和血淋巴中游离氨基酸含量的影响. *水产学报*, 2017, 41(3): 374-381]
- He MC, Zhang JY, Liu CL, *et al.* DNA methylation level and pattern in growing *sepia esculenta* hoyle. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 46-55 [何暮春, 张金勇, 刘长琳, 等. 金乌贼生长期 DNA 甲基化水平和模式. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 46-55]
- Huang WY, Zhang HJ, Xing YX, *et al.* Effects of NaCl stress on

- seed germination and DNA methylation status detected by MSAP analysis in cucumber. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(8): 1646–1656 [黄韞宇, 张海军, 邢燕霞, 等. NaCl 胁迫对黄瓜种子萌发的影响及 DNA 甲基化的 MSAP 分析. *中国农业科学*, 2013, 46(8): 1646–1656]
- Jiang S, Xu QH. Influence of salinity stress on the activity of gill Na^+/K^+ -ATPase in swimming crab (*Portunus trituberculatus*). *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(10): 1475–1480 [江山, 许强华. 盐度胁迫对三疣梭子蟹鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活力的影响. *水产学报*, 2011, 35(10): 1475–1480]
- Li N, Zhang Y, Xie LN, *et al.* Research progress in DNA methylation in plants. *Plant Physiology Journal*, 2012, 48(11): 1027–1036 [李娜, 张珣, 解莉楠, 等. 植物 DNA 甲基化研究进展. *植物生理学报*, 2012, 48(11): 1027–1036]
- Lu YL, Wang F, Zhao ZY, *et al.* Effects of salinity on growth, molt and energy utilization of juvenile swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(2): 237–245 [路允良, 王芳, 赵卓英, 等. 盐度对三疣梭子蟹生长、蜕壳及能量利用的影响. *中国水产科学*, 2012; 19(2): 237–245]
- Lü F, Huang JT, Yu YB, *et al.* Effects of salinity on growth, muscle composition, and protease activity of *Portunus trituberculatus*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2010(4): 137–142 [吕富, 黄金田, 於叶兵, 等. 盐度对三疣梭子蟹生长、肌肉组成及蛋白酶活性的影响. *海洋湖沼通报*, 2010(4): 137–142]
- Lü J, Liu P, Wang Y, *et al.* Transcriptome analysis of *Portunus trituberculatus* in response to salinity stress provides insights into the molecular basis of osmoregulation. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82155
- Ma JW, Lü JJ, Liu P, *et al.* Na^+/H^+ -exchanger in swimming crab (*Portunus trituberculatus*): Cloning, characterization and mRNA expression under salinity stress. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(5): 902–906 [马金武, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹 Na^+/H^+ -exchanger 基因克隆鉴定及在盐度胁迫下的表达分析. *水生生物学报*, 2016, 40(5): 902–907]
- Rosa R, Nunes M. Biochemical changes during the reproductive cycle of the deep-sea decapod *Nephrops norvegicus* on the south coast of Portugal. *Marine Biology*, 2002, 141(6): 1001–1009
- Sui YM, Gao BQ, Liu P, *et al.* The tolerance to and optimal salinity for growth in swimming crab *Portunus trituberculatus* “Huangxuan No.1”. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2012, 27(5): 398–401 [隋延鸣, 高保全, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹“黄选 1 号”盐度耐受性及适宜生长盐度分析. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(5): 398–401]
- Sui YM, Gao BQ, Liu P, *et al.* Preliminary studies on the salinity tolerance of “Huangxuan No.1” *Portunus trituberculatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(2): 63–68 [隋延鸣, 高保全, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹“黄选 1 号”盐度耐受性分析. *渔业科学进展*, 2012, 33(2): 63–68]
- Tan Y, Xu QH. The prokaryotic expression of recombinant heat shock protein HSP90a of *Portunus trituberculatus* under salinity stress. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(5): 681–684 [覃焜, 许强华. 盐度胁迫下三疣梭子蟹热休克蛋白 HSP90a 的原核表达. *水产学报*, 2012, 36(5): 681–684]
- Wang C, Jiang LX, Wang RJ, *et al.* Effect of abrupt and gradual changes in salinity on development and feeding in juvenile swimming crab (*Portunus trituberculatus*). *Fisheries Science*, 2010, 29(9): 510–514 [王冲, 姜令绪, 王仁杰, 等. 盐度骤变和渐变对三疣梭子蟹幼蟹发育和摄食的影响. *水产科学*, 2010, 29(9): 510–514]
- Wang Y, Lü JJ, Liu P, *et al.* Cloning and characterization of aquaporins 1 and its expression analysis under salinity stress in *Portunus trituberculatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(5): 893–901 [王渝, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹水通道蛋白 1 cDNA 及其盐度胁迫下的表达分析. *中国水产科学*, 2014, 21(5): 893–901]
- Wang Y, Lü JJ, Liu P, *et al.* Cloning and characterization of chloride intracellular channel gene and its expression under low salinity stress in *Portunus trituberculatus*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(6): 1359–1366 [王瑜, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹胞内氯离子通道蛋白基因克隆及其表达分析. *海洋与湖沼*, 2014, 45(6): 1359–1366]
- Wu B, Yang AG. MSAP analysis on genome-wide DNA methylation in selected and wild Japanese scallop *Patinoptecten yessoensis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(4): 976–981 [吴彪, 杨爱国. 虾夷扇贝选育群体与野生群体基因组 DNA 甲基化的 MSAP 分析. *海洋与湖沼*, 2015, 46(4): 976–982]
- Yang XD, Han W, Liu F, *et al.* DNA methylation in vertebrate embryogenesis. *Hereditas*, 2012, 34(9): 1108–1113 [杨晓丹, 韩威, 刘峰, 等. DNA 甲基化与脊椎动物胚胎发育. *遗传*, 2012, 34(9): 1108–1113]
- Zhang L, Xie BH, Zhang QY, *et al.* The cloning and expression analysis of the DNMT1 gene cDNA of *Crucian carp*. *Acta Hydrobiologica Sinica*. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(2): 230–234 [张蕾, 谢冰花, 张琼宇, 等. 鲫鱼 DNMT1 基因 cDNA 的克隆及表达分析. *水产学报*, 2010, 34(2): 229–235]
- Zheng PP, Wang CL, Song WW, *et al.* Effect of salinity stress on serum non-specific immune factors in swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Fisheries Science*, 2010, 29(11): 634–638 [郑萍萍, 王春琳, 宋微微, 等. 盐度胁迫对三疣梭子蟹血清非特异性免疫因子的影响. *水产科学*, 2010, 29(11): 634–638]
- Zhou CL, Yin YF, Zhang J, *et al.* Biological implications of DNA methylation and DNA methylation assays. *Journal of Nanhua University (Medical Edition)*, 2005, 33(2): 148–152 [周翠兰, 殷宇芳, 张佳, 等. DNA 甲基化的生物学意义及其检测方法. *南华大学学报(医学版)*, 2005, 33(2): 148–153]
- Zhu HP, Lu MX, Huang ZH, *et al.* Effect of low temperature on genomic DNA methylation in Nile tilapia (*Oreochromis*

niloticus). Journal of Fisheries of China, 2013, 31(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. 水产学报, 2013, 37(10): 1460–1467]

(编辑 江润林)

The Cloning of the *PtDNMT1* Gene of *Portunus trituberculatus* and Its Expression Analysis in Low Salinity Adaptation

HUAN Pengpeng^{1,2}, LÜ Jianjian^{2,3}, SUN Dongfang^{1,2}, GAO Baoquan^{2,3}, LIU Ping^{2,3}^①

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

Abstract Methyltransferase (*DNMT1*) is an important gene that maintains the methylation state of the genome. This study uses the SMART-RACE technique to clone the *DNMT1* gene of *Portunus trituberculatus* (*PtDNMT1*). The cDNA sequence of *PtDNMT1* gene is 5919 bp, including the open reading frame of 4832 bp, and 1610 amino acids are encoded. The predicted molecular weight is 148.15 kDa, and the theoretical isoelectric point is 4.68. The structure prediction found that there are two special *PtDNMT1* domain structures: the zf-CXXC zinc finger domain and the methyltransferase familial Dcm structure domain. The analysis of the evolutionary tree showed that *PtDNMT1* gene and insects *DNMT* gather into one. *PtDNMT1* was expressed in the hepatopancreas, gill, ovary, muscle, stomach, heart, and blood. The highest expression was found in the hepatopancreas, followed by the ovaries and gills. Then we get a further research about the *PtDNMT1* gene expression during low salinity stress in gill, hepatopancreas and muscle tissue. In gill tissue, we found that *PtDNMT1* gene expression peaked (5 folds) after 6 h, and continued to 12 h (6 folds), then declined gradually, but was still significantly higher than the control group (3 folds). The expression of *PtDNMT1* in the hepatopancreas was similar to the gills, however the peak time was later than in gill tissue (24 h), and the peak was higher than in the gills (8 folds). After low salinity stress, the expression of the *PtDNMT1* gene in muscle was firstly reduced, then (24 h) increased to a peak (2.2 times), and the expression was raised to 72 h. This study is the first to clone the *PtDNMT1* gene. According to its distribution characteristics and occurrence in various organizations, expression changes under salinity stress. We speculate that low salinity adaptations in DNA methylation in *P. trituberculatus* played an important role.

Key words *Portunus trituberculatus*; Methyltransferase 1; Salinity stress; Gene cloning; Gene expression

① Corresponding author: LIU Ping, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn