

急性温度胁迫对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*) 基因组 DNA 甲基化的影响*

吴 彪¹ 杨爱国^{1①} 孙秀俊¹ 刘志鸿¹ 周丽青¹ 宫一震²

(1. 农业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;

2. 山东省垦利县海洋与渔业局 垦利 257500)

摘要 为探讨急性温度胁迫对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)基因组 DNA 甲基化水平的影响,本研究从表观遗传学角度,运用甲基化敏感扩增多态性(Methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP)技术比较分析了升温海水(17℃和 24℃)急性胁迫虾夷扇贝(原暂养于 9℃的海水中)9 h 和 24 h 后基因组 DNA 甲基化的变化情况。结果显示,9 对引物在各组的总扩增位点数为 314–337,总甲基化位点为 79–94,所占比例为 23.45%–28.51%;所有处理组基因组 DNA 总甲基化率低于对照组,急性升温胁迫使虾夷扇贝基因组 DNA 发生去甲基化,而且去甲基化程度随胁迫温差增大和胁迫时间增长而增强,说明急性升温胁迫能够改变 DNA 甲基化水平和模式。本研究为进行虾夷扇贝抗逆基因的筛查提供了新思路和研究基础,丰富了表观遗传学在扇贝中的研究资料。

关键词 虾夷扇贝;急性温度胁迫;DNA 甲基化;甲基化敏感扩增多态性(MSAP)

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)05-0140-07

虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)是一种冷水性贝类,原产于日本北海道、俄罗斯千岛群岛南部等水域,是品质优良的增养殖扇贝品种之一。自 20 世纪 80 年代引入我国后,经过 30 多年的发展,虾夷扇贝已经成为我国重要的海水经济养殖贝类,在黄海北部以及山东长岛等地形成了规模化的繁育及增养殖产业,与海湾扇贝(*Argopecten irradians*)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)共同构成了我国北方沿海主要的扇贝养殖品种(王庆成, 1984; Li *et al.*, 2007; 常亚青等, 2007; 李成林等, 2011)。然而,近些年,虾夷扇贝大规模死亡在其主产区时常发生,尤其在夏季高温季节,死亡率有时甚至超过 80%,给虾夷扇贝产业的健康发展带来了巨大威胁(张明明等, 2008; 徐东等, 2010)。养殖密度大、种质下降、病原侵染等都可能是造成大规模死亡的重要原因,但毋庸置疑,夏季水温的升高是虾夷扇贝死亡事件发生的直接诱因之一

(蓝淑芳, 1990; 周玮等, 1992)。虾夷扇贝属于冷水性的变温动物,其最适宜生长温度为 10–20℃,低于 0℃或超过 23℃时,活力便减弱,生理状态受到影响(刘世禄等, 2005),其适应温度骤然变化的能力不强。因此,海水温度不仅显著影响其生长、繁殖等生理特性,还限制了养殖地域范围。为提高虾夷扇贝耐高温抗逆能力,减少夏季死亡率,已有针对其耐热性状进行相关筛选、高温对机体生理影响等方面的研究报道(徐东等, 2010; 王庆志等, 2014),这将有助于新品种(系)的开发,对虾夷扇贝产业的健康发展具有重要意义。

DNA 甲基化作为表观遗传学的重要研究内容,具有调控基因的表达、维持基因组遗传物质的稳定性、建立表观遗传模式等重要功能。在逆境胁迫下,甲基基团能够迅速、可逆地对 DNA 进行修饰,避免了不必要的基因重组,从而更加快速地响应环境的变化(Boyko *et al.*, 2008)。研究表明,生物和非生物胁迫

* 黄海水产研究所基本科研业务费(20603022013012)和山东省自主创新专项(2013CXC80202)共同资助。吴 彪, E-mail: wubiao@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 杨爱国, 研究员, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-08-26, 收修改稿日期: 2015-09-24

都能够引起植物 DNA 甲基化的改变, 而且某些甲基化的改变能够遗传给后代。如, 烟草(*Nicotiana tabacum*) 基因组大约 10% 的位点非生物胁迫下发生低甲基化, 人工接种烟草花叶病毒(TMV)后, 随着过敏反应(HR)的发展, 病原菌应答基因 *NtA lix 1* 和 *NtGP DL* 的 DNA 甲基化迅速响应(1–24 h), 且呈现动态变化的特点, 基因表达量也发生改变(Wada *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2007), 表明研究环境胁迫对基因组 DNA 甲基化的影响对于挖掘抗逆基因、开展抗逆新品种(系)培育具有重要意义。然而, 相对于植物, 水产动物 DNA 甲基化对胁迫响应的报道相对较少, 主要集中于尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 耐寒品系(朱华平等, 2013)、鲫鱼(*Carassius auratus*)(周新文等, 2001)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)(王丙莲等, 2006)等为数不多的一些物种, 研究内容也尚处于研究基因组 DNA 甲基化水平上。虽然在海洋贝类中已有基因组 DNA 甲基化的相关报道, 但其对环境胁迫的响应研究十分匮乏。

本研究运用甲基化敏感扩增多态性(MSAP)技术分析急性温度胁迫对虾夷扇贝基因组 DNA 甲基化水平和模式的影响, 初步探讨其机体应对胁迫的表观响应, 研究能够为培育虾夷扇贝抗逆新品种(系)提供参考数据, 将丰富海洋贝类表观遗传学研究资料。

1 材料与方法

1.1 材料来源及胁迫实验

实验用虾夷扇贝取自山东长岛海区, 平均壳长为(6.7±0.2) cm。扇贝运回实验室后, 在 9℃ 的海水中充气暂养, 期间投喂硅藻、金藻等单胞藻。暂养 7 d, 待扇贝完全适应实验室环境后, 进行温度胁迫实验。胁迫温度设置 2 个梯度, 即 17℃ 和 24℃, 分别胁迫 9 h、24 h 后, 取鳃组织, 置于液氮速冻后, 保存于-80℃ 中备用。将 17℃ 处理 9 h 的组别记为 A₁ 组, 17℃ 处理 24 h 记为 A₂ 组, 24℃ 处理 9 h 记为 B₁ 组, 24℃ 处理 24 h 记为 B₂ 组, 正常 9℃ 为对照组, 记为 C 组。

1.2 基因组 DNA 的提取

以上述所取的扇贝鳃丝为材料, 采用传统的酚-氯仿法进行基因组 DNA 提取, 具体步骤如下: 取组织约 100 mg, 用剪刀剪碎后置于 475 μl 的 TE 裂解液中加入 40 μl 10% SDS 和 5 μl 蛋白酶 K(20 mg/ml), 在 56℃ 水浴中处理 3 h 左右使组织充分消化, 然后依次用 25:24:1 的酚-氯仿-异戊醇混合液抽提 2 次, 1/10 体积的 NaCl (3 mol/L) 及 2 倍体积的无水乙醇沉

淀 30 min, 70% 乙醇洗涤后在生物安全柜中风干, TE 溶解沉淀。所提取的基因组 DNA 经 1.5% 琼脂糖电泳检测其完整性, OD_{260 nm/280 nm} 检测纯度, 调整 DNA 浓度至 300 ng/μl, 存于-20℃ 中备用。

1.3 MSAP 实验

每组选择 6 个个体进行 MSAP 实验, 具体参照吴彪等(2012)的方法。其原理是基于 *Msp I* 和 *Hpa II* 均能识别 CCGG 位点, 但由于敏感性不同而产生差异条带。首先, 运用 *EcoR I/Msp I* (M 组) 和 *EcoR I/Hpa II* (H 组) 分别对每个个体基因组 DNA 进行双酶切, 体系: 1 μl DNA(300 ng/μl), 5 U *EcoR I* (TaKaRa), 5 U *Hpa II/Msp I* (TaKaRa), 2 μl 10×Buffer (TaKaRa), 灭菌 ddH₂O 加至 20 μl。依次在 37℃ 水浴中酶切 4 h、65℃ 变性 10 min 后, 储存于-20℃ 中。之后进行连接, 体系: 5 μl 酶切产物, 50 pmol HM 接头, 10 pmol E 接头, 5 U T₄ DNA Ligase (TaKaRa), 4 μl 5× T₄ DNA Ligase Buffer, 补水至 20 μl, 16℃ 连接过夜, 产物稀释 10 倍后用于预扩增。

预扩增反应体系: 2 μl 连接产物, 2 μl 预扩引物 E₀ 和 HM₀, 0.5 U *Taq* 酶, 2 μl 10× *Taq* buffer(含 Mg²⁺), 1.6 μl dNTPs(各 2.5 mmol/L), 补水至 20 μl。PCR 扩增反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 20 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。预扩增产物稀释 20 倍后作为选择扩增的模板。

选扩体系: 3 μl 预扩增产物, 2 μl HM_n 引物, 0.5 μl E_n 引物, 其他反应组分与预扩体系相同。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 3 min; 第 1 轮扩增 13 个循环, 94℃ 变性 30 s, 65℃ 退火 1 min(每循环降低 0.7℃), 72℃ 延伸 1 min; 第 2 轮扩增 25 个循环, 包括 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 最后 72℃ 延伸 10 min。运用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳对 PCR 产物进行电泳, 银染检测。本研究所用的引物信息见表 1。

1.4 数据统计和分析

对 HM_n 和 E_n 引物组合进行筛选后, 选择扩增条带清晰、多态性好的引物用于实验分析。统计 PAGE 电泳图上每个个体 M 组和 H 组中 50–200 bp 的扩增条带, 有带记为 1, 无带记为 0。计算各群体的平均总甲基化率:

$$\text{平均总甲基化率} = \frac{(\text{全甲基化位点} + \text{半甲基化位点})}{(\text{未甲基化位点} + \text{全甲基化位点} + \text{半甲基化位点})} \times 100\%$$

运用 SPSS 软件对各群体总甲基化率进行多重比较。

表 1 本研究所用的接头以及引物序列
Tab.1 Sequences of adapters and primers used in this study

	<i>EcoR</i> I	<i>Msp</i> I / <i>Hpa</i> II
接头 Adapters (5'-3')	EA ₁ : CTCGTAGACTGCGTACC EA ₂ : AATTGGTACGCACTCTAC	HMA ₁ : GATCATGAGTCCTGCT HMA ₂ : CGA GCA GGA CTC AGA A
预扩引物 Pre-amplification primers(5'-3')	E ₀ : GACTGCGTACCAATTC	HM ₀ : ATCATGAGTCCTGCTCGGG
选扩引物 Selective amplification primers(5'-3')	E ₁ : GACTGCGTACCAATTCACA E ₂ : GACTGCGTACCAATTCAGT E ₃ : GACTGCGTACCAATTCAAC E ₄ : GACTGCGTACCAATTCGTC E ₅ : GACTGCGTACCAATTCAGCT	HM ₁ : ATCATGAGTCCTGCTCGGGCTGA HM ₂ : ATCATGAGTCCTGCTCGGGCTGT HM ₃ : ATCATGAGTCCTGCTCGGGCTAT HM ₄ : ATCATGAGTCCTGCTCGGGCTAC HM ₅ : ATCATGAGTCCTGCTCGGGCTCA HM ₆ : ATCATGAGTCCTGCTCGGGCTCT HM ₇ : ATCATGAGTCCTGCTCGGGCTTC HM ₈ : ATCATGAGTCCTGCTCGGGCTTA

2 结果

2.1 引物筛选

以对照组扇贝群体的混合基因组 DNA 为模板, 通过酶切、连接反应后, 用表 1 中的预扩和选扩引物依次进行 PCR 扩增, 扩增产物通过 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 在 E₁₋₅ 和 HM₁₋₈ 的 40 对引物组合中筛选获得引物, 选用 E₁HM₄、E₁HM₅、E₃HM₅、E₃HM₆、E₄HM₅、E₄HM₈、E₅HM₆、E₅HM₇、E₅HM₈ 等 9 对引物用于分析急性温度胁迫对虾夷扇贝基因组 DNA 甲基化的影响。

2.2 甲基化模式

根据 MSAP 原理, 由于 *Msp* I 和 *Hpa* II 对 CCGG 位点甲基化的敏感性差异, 从而 H 组和 M 组对同一 CCGG 位点会产生不同的酶切效果, 其扩增产物在聚丙烯酰胺电泳图上会出现不同的条带类型。*Hpa* II 对双链内部 C 碱基的全甲基化敏感, 不能切开双链内部 C 碱基全甲基化的位点, 但对任意一条单链外部 C 碱基甲基化不敏感, 所以能够有效切开外部 C 碱基的半甲基化位点; 而 *Msp* I 能够切开内部甲基化位点(^{HMe}CG 或 ^{Me}CG); 2 种酶均不能有效切开外部 C 碱基的全甲基化(^{Me}CCG)或内外 C 碱基的全甲基化(^{Me}C^{Me}CG)、全半甲基化(^{HMe}C^{HMe}CG)的位点。所以, 每个样品 H 组和 M 组在同一个 CCGG 位点上的扩增产物不同, 根据 MSAP 凝胶电泳图谱上条带的有无, 2 个泳道上的同一位点会出现 3 种模式: (I) H 组和 M 组的泳道中均有条带(1, 1), 表示该位点去甲基化; (II) 2 泳道中 H 组中有条带, M 组中没有条带(1, 0), 表示该位点半甲基化; (III) 2 泳道中 H 组中没有条带, M 组

中有条带(0, 1), 表示该位点全甲基化。结果显示, 各组虾夷扇贝基因组 DNA 均具有上述 3 种甲基化模式。不同 DNA 甲基化模式的扩增条带如图 1 所示。

2.3 急性温度胁迫处理下 DNA 甲基化水平差异

对各组虾夷扇贝基因组 DNA 在 MSAP 电泳图上的扩增条带进行统计并对各组总甲基化率进行了多重比较, 结果见表 2 和表 3。结果显示, 对照组 C 和 A₁、A₂、B₁、B₂ 的扩增位点分别为 326 和 337、314、331、337, 各组均以非甲基化位点为主, 总甲基化位点分别为 93 和 94、83、84、79, 每个群体的平均总甲基化率分别约为 28.51%和 28.2%、26.43%、25.38%、23.45%。与对照组相比, 只有 B₂ 组的总甲基化率存在显著差异($P < 0.05$), 其他组差异均未达到显著水平($P > 0.05$)。但虾夷扇贝基因组 DNA 甲基化水平在温度胁迫下有明显的规律性变化。可以看出, 急性升温胁迫能够使虾夷扇贝基因组 DNA 总甲基化率下降, 所有处理组均小于对照组, 有明显的去甲基化趋势。而且, 在相同的处理时间下, 温差增加总甲基化率降低(A₁ > B₁, A₂ > B₂), 而在相同温差刺激条件下, 处理时间增长, 总甲基化下降(A₁ > A₂, B₁ > B₂)。

3 讨论

DNA 甲基化是指甲基化基团在甲基转移酶的催化作用下被添加到 DNA 分子中的胞嘧啶上形成 5-甲基胞嘧啶, 是一种重要的表观修饰方式。目前, 进行 DNA 甲基化检测主要有检测基因组整体水平的甲基化、特异位点甲基化以及寻找新甲基化位点 3 个主要目的, 所用的检测方法主要有甲基化敏感扩增多态性 (MSAP)、重亚硫酸盐测序法和芯片技术等。其中,

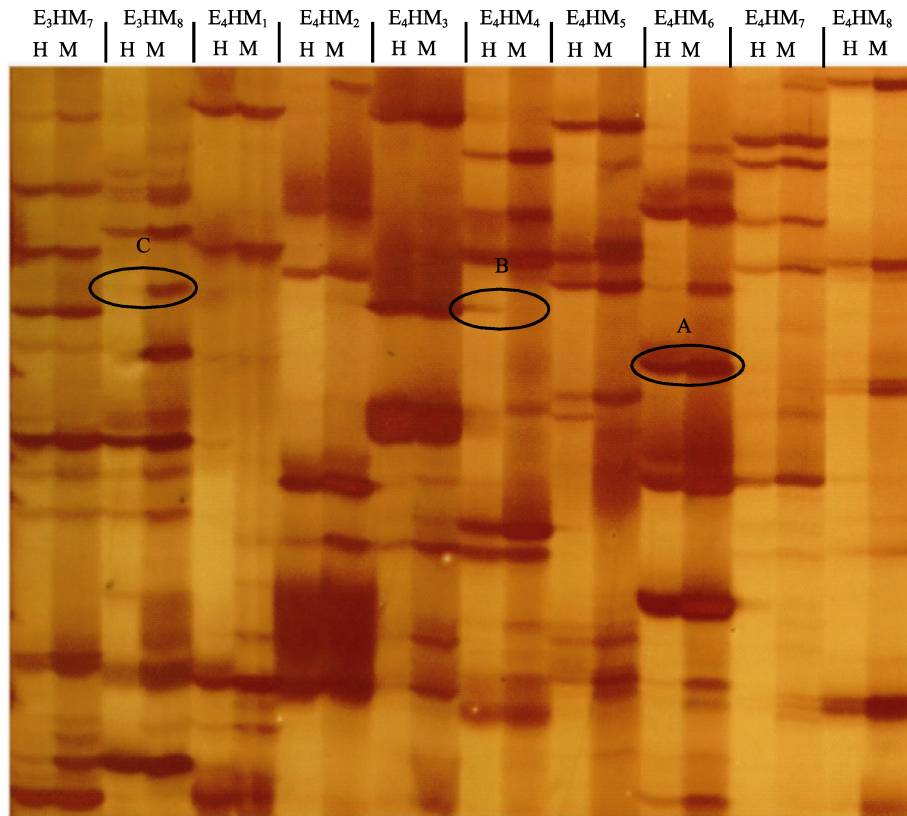


图 1 不同引物组合在虾夷扇贝基因组 DNA 中的 MSAP 扩增图谱
Fig.1 DNA methylation profile of *P. yessoensis* using different primer pairs

H: *EcoR* I /*Hpa* II 酶切产物泳道; M: *EcoR* I /*Msp* I 酶切产物泳道
A: 去甲基化位点; B: 半甲基化位点; C: 全甲基化位点

H: PCR products of enzymatic digestion by *EcoR* I and *Hpa* II, M: PCR products of enzymatic digestion by *EcoR* I and *Msp* I;
A: Unmethylated, B: Hemi-methylated, C: Fully-methylated

表 2 不同温度处理条件下的虾夷扇贝基因组 DNA 甲基化水平
Tab.2 The genomic DNA methylation of *P. yessoensis* under different temperatures

组别 Groups	总扩增位点 Total amplified sites	非甲基化位点 Non-methylated sites	甲基化位点 Methylated sites			总甲基化率 Total methylation rate(%) (Mean±SD)
			总甲基化位点 Total methylated sites	全甲基化位点 Fully-methylated sites	半甲基化位点 Hemi-methylated sites	
A ₁	337	243	94	46	48	28.20±2.10
A ₂	314	231	83	55	28	26.43±1.41
B ₁	331	247	84	30	54	25.38±0.92
B ₂	337	258	79	43	36	23.45±0.88
C	326	233	93	28	65	28.51±1.80

MSAP 是在扩增片段长度多态性(AFLP)技术上发展而来的, 具有较好的有效性和可靠性, 是目前研究基因组 DNA 甲基化整体水平的成熟方法之一(Xiong *et al*, 1999; Yaish *et al*, 2014)。相对而言, MSAP 具有操作简单、敏感性强、成本低等优点, 已广泛应用在动植物育种、杂交优势分析等方面的研究中, 但在水产领域中的应用起步较晚。已有的报道表明, MSAP 也能

够较好地应用于鱼(周新文等, 2001; Fang *et al*, 2013)、虾(杜盈等, 2013)、贝(于涛等, 2010; 吴彪等, 2012; Sun *et al*, 2014; 姜群等, 2014)、海参(郭婷婷等, 2013)等多种重要水产经济动物的基因组 DNA 甲基化的分析中。目前, 研究主要集中在对水产动物不同群体和不同组织 DNA 甲基化水平的研究上。随着技术的不断发展, MSAP 在贝类上的研究报道也越来越

表3 不同组别虾夷扇贝基因组DNA总甲基化率的多重比较
Tab.3 Multiple comparisons of total methylation rate among different groups of *P. yessoensis*

	组别 Groups				
	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	C
A ₁	—	0.0177	0.0282	0.0475*	-0.0031
A ₂		—	0.0105	0.0298	-0.0208
B ₁			—	0.0193	-0.0313
B ₂				—	-0.0506*
C					—

*: 差异显著($P < 0.05$) *: significant difference

多,在栉孔扇贝、杂交扇贝、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)等相关研究中都证实了MSAP应用在贝类上的可行性和可靠性。本研究通过筛选引物组合,选用了扩增稳定、多态性好的9对引物组合,证实MSAP能够较好地应用于虾夷扇贝基因组DNA甲基化的研究中。姜群等(2014)对MASP技术进行了改进,在原技术基础上对选择性引物进行荧光标记,采用测序仪检测荧光信号后利用软件将峰图转化为数据,大大提高了检测灵敏度,高效地完成了太平洋牡蛎不同组织DNA甲基化的检测,充分显示了该技术在贝类分析中的广阔应用前景。

本研究选用虾夷扇贝鳃丝组织作为研究对象,统计获得各组基因组DNA总甲基化率的范围为23.45%–28.51%,与已报道的栉孔扇贝(20.9%–21.7%、32.08%) (吕佳等, 2013; Sun *et al.*, 2014)、海湾扇贝(25.99%) (吕佳等, 2013)、太平洋牡蛎(26.4%) (Jiang *et al.*, 2013)、虾夷扇贝(32.88%–32.97%) (吕佳等, 2013)、杂交扇贝(18.7%–22.7%) (吴彪等, 2012)等多种贝类的数据相近。取样部位、材料来源、检测方法、统计所选用的引物及统计范围等都可能造成总体甲基化率的差异,如使用灵敏度更高的手段检测太平洋牡蛎MSAP分析结果时,总甲基化率提高了8% (Jiang *et al.*, 2013; 姜群等, 2014)。虽然不同学者的研究结果存在一定的差异,但这些数据为初步了解贝类基因组DNA甲基化状况和进一步深入相关研究奠定了基础。

DNA甲基化与基因表达密切相关,大量的研究表明,外界环境的变化能够引起基因组DNA甲基化状态的改变(Steward *et al.*, 2002; 王丙莲等, 2006; 钟兰等, 2007; 潘雅姣等, 2009),从而调控基因表达以快速适应环境。虾夷扇贝是一种冷水性的贝类,对高温耐受能力差,最高正常成活水温为23.8℃(陈舜等, 2007), 15–22℃之间温度升高能够显著改变T-AOC、MDA和CAT的活力(贲月等, 2013),而且温度剧烈和缓慢

变化都能够引起虾夷扇贝耗氧率和排氨率变化(徐东等, 2010),更高的水温甚至可能会引起虾夷扇贝的大量死亡。可见,温度变化对虾夷扇贝机体生理状态变化具有显著影响,但目前有关温度对贝类基因组DNA甲基化影响的研究尚未有报道。本研究发现,所有处理组总甲基化率均低于对照组,说明急性温度胁迫使虾夷扇贝基因组DNA总甲基化下降,去甲基化现象明显。而且,在本实验条件下,总甲基化水平随温差、处理时间的增加而下降,甲基化模式变化也具有一定的规律性。朱华平等(2013)分析了罗非鱼耐寒品系与正常组基因组DNA甲基化的差别,也发现连续多代的低温胁迫使尼罗罗非鱼DNA发生了去甲基化反应,基因组甲基化程度降低。低温处理后,水稻(华扬等, 2005)、玉米(Steward *et al.*, 2002)等基因组甲基化也都发生了变化。这说明,外界环境变化影响了某些基因的甲基化状态,从而基因的表达状态发生改变以更加适应逆境。Gavery等(2010)已经证实,太平洋牡蛎不同基因家族的DNA甲基化状态是不同的,甲基化能够有效调控太平洋牡蛎的基因表达,尤其是抗逆和环境响应相关的基因。因此,通过对不同性状群体基因组甲基化状态进行比较分析,筛查特异性片段进而与性状关联分析,是获得目的性状相关候选基因的有效途径之一,在一些种类中已有相关报道(Hu *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2013)。与太平洋牡蛎(姜群等, 2014)的研究结果相似,本研究也没有发现在所有个体中都稳定出现的差异片段,差异片段仅存在于部分的个体当中,这可能是由于贝类较高杂合度及所用引物少、个体对逆境反应程度不同等原因造成的。总之,通过研究急性温度胁迫对虾夷扇贝基因组DNA甲基化水平的影响,对于阐明DNA甲基化在虾夷扇贝抗逆反应中的作用,筛选重要的相关基因提供了新思路 and 理论参考。

参 考 文 献

- 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. 水产学报, 2010, 34(9): 1335–1342
- 王丙莲, 张迎梅, 谭玉凤, 等. 镉铅对泥鳅DNA甲基化水平的影响. 毒理学杂志, 2006, 20(2): 78–80
- 王庆成. 虾夷扇贝的引进及其在我国北方增养殖的前景. 水产科学, 1984(4): 24–27
- 王庆志, 李石磊, 付成东, 等. 虾夷扇贝耐高温育种家系的建立与早期筛查. 水产学报, 2014, 38(3): 371–377
- 刘世祿, 杨爱国. 中国主要海产贝类健康养殖技术. 北京: 海洋出版社, 2005
- 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

- 李成林, 宋爱环, 胡炜, 等. 山东省扇贝养殖产业现状分析与
发展对策. 海洋科学, 2011, 35(3): 92–98
- 华扬, 陈学峰, 熊建华, 等. 水稻冷胁迫诱导的甲基化差异片
段 CIDM7 的分离和分析. 遗传, 2005, 27(4): 595–600
- 吕佳, 侯睿, 李宁, 等. 应用 MSAP 技术研究扇贝全基因组
DNA 甲基化水平. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2013,
43(8): 48–53
- 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,
20(3): 536–543
- 张明明, 赵文. 我国虾夷扇贝死亡原因的探讨及控制对策.
中国水产, 2008(2): 65–66
- 吴彪, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 两种扇贝杂交和自交家系早期生
长及甲基化的比较分析. 海洋科学, 2012, 36(2): 1–6
- 陈舜, 肖云朴, 伍德瀛. 虾夷扇贝在浙江南麂列岛生长与生
存的适温性研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2007,
26(2): 160–164
- 周玮, 薛真福, 王有君, 等. 海洋岛海域水温异常波动与养殖
栉孔扇贝死亡的关系. 海洋湖沼通报, 1992(4): 56–62
- 周新文, 朱国念, Mwalilino J, 等. Cu、Zn、Pb、Cd 及其混合
重金属离子对鲫鱼 (*Carassius auratus*) DNA 甲基化水平的
影响. 中国环境科学, 2001, 21(6): 549–552
- 贲月, 郝振林, 丁君, 等. 高温对虾夷扇贝体腔液免疫酶活力
的影响. 水产学报, 2013, 31(7): 858–863
- 钟兰, 王建波. DNA 超甲基化在小麦耐盐胁迫中的作用. 武
汉植物学研究, 2007, 25(1): 102–104
- 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. 海洋与湖沼, 2013,
44(1): 77–82
- 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. 中国水产科学, 2014, 21(4): 676–683
- 徐东, 张继红, 王文琪, 等. 温度变化对虾夷扇贝耗氧率和排
氨率的影响. 中国水产科学, 2010, 17(5): 1101–1106
- 常亚青, 陈晓霞, 丁君, 等. 虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*)
5 个群体的遗传多样性. 生态学报, 2007, 27(3):
1145–1152
- 蓝淑芳. 长山岛海区夏季扇贝大批死亡的水文原因分析. 海
洋科学, 1990(2): 60–61
- 潘雅姣, 傅彬英, 王迪, 等. 水稻干旱胁迫诱导 DNA 甲基化
时空变化特征分析. 中国农业科学, 2009, 42(9): 3009–3018
- Boyko A, Kovalchuk I. Epigenetic control of plant stress
response. Environ Mol Mutagen, 2008, 49(1): 61–72
- Choi CS, Sano H. Abiotic-stress induces demethylation and
transcriptional activation of a gene encoding a glycerophos-
phodiesterase-like protein in tobacco plants. Mol Genet
Genomics, 2007, 277(5): 589–600
- Fang X, Thornton C, Scheffler BE, et al. Benzo[a]pyrene
decreases global and gene specific DNA methylation during
zebrafish development. Environ Toxicol Pharmacol, 2013,
36(1): 40–50
- Gavery MR, Roberts SB. DNA methylation patterns provide
insight into epigenetic regulation in the Pacific oyster
(*Crassostrea gigas*). BMC Genomics, 2010, 11(2): 483
- Hu Y, Xu H, Li Z, et al. Comparison of the genome-wide DNA
methylation profiles between fast-growing and slow-growing
broilers. PLoS One, 2013, 8: e56411
- Jiang Q, Li Q, Yu H, et al. Genetic and epigenetic variation in
mass selection populations of Pacific oyster *Crassostrea
gigas*. Genes Genomics, 2013, 35(5): 641–647
- Li Q, Xu K, Yu R. Genetic variation in Chinese hatchery
populations of the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*)
inferred from microsatellite data. Aquaculture, 2007, 269
(1–4): 211–219
- Steward N, Ito M, Yamaguchi Y, et al. Periodic DNA
methylation in maize nucleosomes and demethylation by
environmental stress. J Biol Chem, 2002, 277(40): 37741–
37746
- Sun Y, Hou R, Fu X, et al. Genome-wide analysis of DNA
methylation in five tissues of zhikong scallop, *Chlamys
farreri*. PLoS One, 2014, 9: e86232
- Wada Y, Miyamoto K, Kusano T, et al. Association between
up-regulation of stress-responsive genes and hypomethylation
of genomic DNA in tobacco plants. Mol Genet Genomics,
2004, 271(6): 658–666
- Xiao J, Song C, Liu S, et al. DNA methylation analysis of
allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus
red var.*) and common carp (*Cyprinus carpio L.*). PLoS One,
2013, 8: e56409
- Xiong LZ, Xu CG, Saghai MM, et al. Patterns of cytosine
methylation in an elite rice hybrid and its parental lines,
detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism
technique. Mol Gen Genet, 1999, 261(3): 439–446
- Yaish MW, Peng M, Rothstein SJ. Global DNA methylation
analysis using methyl-sensitive amplification polymorphism
(MSAP). Methods Mol Biol, 2014, 1062: 285–298

Effects of Acute Temperature Stress on Genome-Wide DNA Methylation Profiles in *Patinopecten yessoensis*

WU Biao¹, YANG Aiguo^{1①}, SUN Xiujun¹, LIU Zhihong¹, ZHOU Liqing¹, GONG Yizhen²

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Kenli Prefecture Ocean and Fisheries Bureau of Shandong Province, Kenli 257500)

Abstract DNA methylation plays important roles in many biological processes such as gene expression regulation and genomic imprinting. Up to date, studies have mostly focused on the status of DNA methylation in different tissues of aquatic animals. Stress-inducing alteration in DNA methylation in shellfish remains elusive. Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*, an economically valuable bivalve species, are only cultured in northern areas of Shandong Province and Liaoning Province in China due to their specific temperature requirement. In the present study, methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) was employed to investigate the profiles of genome-wide DNA methylation of *P. yessoensis* after acute temperature stress. *P. yessoensis* was challenged at 17°C and 24°C for 9 hours and 24 hours respectively. Then DNA in the gill was extracted with traditional phenol/chloroform method. Next, each DNA sample was digested by the combination of *EcoR* I, *Hpa* II, *EcoR* I, and *Msp* I, followed by the connection to adapters with T₄ ligase. Nine pairs of E/HM primers were selected to study the change in genome-wide DNA methylation. Totally 314–337 amplified sites were obtained in all subjects, of which 79–94 were methylated sites, accounting for 23.45%–28.51% of all sites. The total methylation rates of all experimental groups, except for that of 24°C/24 hours, were insignificantly lower than the control level. Moreover, the reduction in methylation was positively correlated with the temperature difference and exposure time. These data implied that the level and pattern of DNA methylation could be altered by acute temperature stress. Our findings provided insight into gene screening for important traits and better understand of epigenetic dynamic in bivalves.

Key words *Patinopecten yessoensis*; Acute temperature stress; DNA methylation; Methylation-sensitive amplification polymorphism

① Corresponding author: YANG Aiguo, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn