

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180323001

http://www.yykxjz.cn/

何暮春, 张金勇, 刘长琳, 项子龙, 柳淑芳, 庄志猛, 薛同明. 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

He MC, Zhang JY, Liu CL, Xiang ZL, Liu SF, Zhuang ZM, Xue TM. DNA methylation level and pattern in growing *Sepia esculenta* Hoyle. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(4): 46-55

金乌贼生长期 DNA 甲基化水平和模式*

何暮春^{1,2,3} 张金勇^{2,3,4} 刘长琳² 项子龙^{2,3,5}
柳淑芳^{2,3①} 庄志猛² 薛同明⁶

(1. 浙江海洋大学水产学院 舟山 316003; 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; 4. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; 5. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 6. 青岛金沙滩水产开发有限公司 青岛 266000)

摘要 DNA 甲基化在基因表达、细胞衰老、性状分化中发挥重要调控作用, 为探讨生长期金乌贼(*Sepia esculenta* Hoyle)不同性别、不同组织 DNA 甲基化水平和模式的差异, 本研究采用荧光标记的甲基化敏感扩增多态性(Fluorescence-labeled Methylation Sensitive Amplified Polymorphism, F-MSAP)技术, 选取 12 对特异性引物, 检测分析了雌、雄金乌贼肌肉、心脏、胰脏和性腺 4 种组织的基因组 DNA 甲基化。结果显示, 生长期金乌贼基因组 DNA 总甲基化水平为 23.97%~39.70%, 在水产无脊椎动物中处于较高水平; 金乌贼 4 种组织中, 肌肉的总甲基化水平最高, 这可能与金乌贼存在异速生长现象且在生长期运动器官优先发育有关; 金乌贼甲基化水平和模式存在性别差异, 雌性金乌贼肌肉组织 DNA 总甲基化水平显著低于雄性, 心脏和胰脏组织 DNA 总甲基化水平却显著高于雄性; 此外, 雌性金乌贼肌肉组织全甲基化水平对总甲基化水平贡献最大, 与之不同的是, 雌性其他组织、雄性金乌贼各组织中半甲基化水平和全甲基化水平差异不大, 说明金乌贼 DNA 甲基化的水平和模式具有性别和组织差异。上述结果可为深入研究金乌贼生长发育、组织分化和衰老死亡等生命过程的表现遗传学调控提供基础数据。

关键词 金乌贼; 生长期; DNA 甲基化; F-MSAP; 组织差异性; 性别差异性

中图分类号 Q959.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)04-0046-10

DNA 甲基化为表观遗传学的重要组成部分, DNA 甲基化能引起染色质结构、DNA 构象、DNA 稳定性及 DNA 与蛋白质相互作用方式的改变, 从而控制基因表达。脊椎动物 DNA 甲基化最常见的是 CpG 二核苷酸中胞嘧啶的甲基化修饰, 即由 S-腺苷甲硫氨

酸提供甲基, 在 DNA 甲基转移酶的催化下, 将甲基基团以共价键形式结合到基因组 CpG 岛的二核苷酸胞嘧啶 5'碳位上, 并可在细胞分裂过程中传递给子细胞的表现遗传现象; 植物和真菌的甲基化还会发生在非 CpG 岛区域, 如 CG、CHH、CHG 位点(H 为除 G

* 国家自然科学基金项目(31672645)、中国水产科学研究院基本科研业务费专项(20603022016001)和山东省泰山学者建设工程专项共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31672645), Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016001), and Taishan Scholar Project, Shandong Province]. 何暮春, E-mail: hmc20160105@126.com

① 通讯作者: 柳淑芳, 研究员, E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-03-23, 收修改稿日期: 2018-04-10

外的其他碱基)(李艳等, 2017; 王玉龙, 2016)。这种在不改变基因序列条件下产生可遗传的基因表达, 已成为当前的研究热点。诸多研究表明, DNA 甲基化与基因表达调控(De *et al*, 2015; Rhee *et al*, 2002)、基因组印迹(Hata *et al*, 2002)、X 染色体失活(Zhang *et al*, 2010; Mohandas *et al*, 1981; Bird *et al*, 2002)、细胞功能丧失(Golbus *et al*, 1990)、细胞衰老(Berdyshev *et al*, 1967)、肿瘤发生(魏绍峰等, 2016)等有着密不可分的关系。

近年来, 水产动物的 DNA 甲基化研究也不断深入。左之良等(2016)研究发现, 刺参(*Apostichopus japonicus*)的自然群体与白化群体相同组织间甲基化水平和模式存在差异, 同一群体不同组织间的 DNA 甲基化水平和模式也不同; 杜盈等(2013)对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的自然群体和人工选育品种“黄海 1 号”不同组织基因组 DNA 甲基化的研究表明, DNA 甲基化水平和模式因群体和组织的不同而存在差异; 李思平等(2015)发现, 在面对相同的胁迫环境, 雌、雄半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther)的不同组织 DNA 甲基化水平变化并不完全相同。DNA 甲基化具组织差异性已在多个物种中证实, 但关于头足类 DNA 甲基化组织差异性研究鲜见报道。

金乌贼(*Sepia esculenta* Hoyle, 1885)是我国沿海重要的经济头足类品种, 属软体动物门(Mollusca)、头足纲(Cephalopoda)、鞘亚纲(Coleoidea)、乌贼目(Sepiida)、乌贼科(Sepiidae)、乌贼属(*Sepia*), 具有生命周期短、世代更新快、生长迅速、食性广、肉质鲜美、蛋白质含量高、综合利用范围广等优点, 曾是我国海洋渔业重要的捕捞对象(董正之等, 1991; 郝振林等, 2007)。但自 20 世纪 80 年代以来, 由于过度捕捞和海洋环境的破坏等, 其资源量明显衰退, 产量急剧下降, 目前, 金乌贼在许多海域已绝迹。近年来, 为了恢复和开发利用金乌贼资源, 金乌贼资源增殖等研究工作已引起科研工作者的的高度重视, 陆续从遗传育种学、胚胎发育学、生理学等多方面展开相关研究(刘长琳等, 2009、2016)。为探讨生长期金乌贼不同性别、不同组织 DNA 甲基化水平和模式的差异, 本研究利用荧光标记的甲基化敏感扩增多态性(Fluorescence-labeled Methylation Sensitive Amplified Polymorphism, F-MSAP)技术对生长期金乌贼雌雄个体肌肉、心脏、胰脏和性腺组织基因组 DNA 甲基化水平和模式进行检测, 在分子水平上探讨金乌贼不同组织间 DNA 甲基化水平差异, 认识处于快速生长阶段的金乌贼基因组 DNA 甲基化水平和模式, 分析生长发育、组织分化与 DNA 甲基化之间的关系, 以

期为深入研究金乌贼衰老死亡等提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

2015年9月在山东青岛近海捕捞金乌贼野生幼体, 经过1年人工培育, 于2016年8月性成熟并自然交配获得受精卵。受精卵经30 d 孵化后得到初孵仔鱼, 随机采集生长期(约90日龄)健康个体3雌3雄, 体重为181.02~231.40 g, 胴背长为105.67~124.51 mm。分别保存6个个体的外套膜肌肉、心脏、胰脏和性腺4种组织共24份样品, 液氮速冻后, 转至-80℃冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取各组织样品 50~100 mg, 用液氮研磨至粉末, 采用传统的酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 是否降解, 并且使用 NanoDrop2000(Thermo)检测 DNA 的浓度和纯度, 选择条带清晰且纯度高的样品稀释至 100 ng/μl, -20℃中保存备用。

1.2.2 F-MSAP 原理 F-MSAP 是无参考基因组物种 DNA 甲基化检测的常用技术。该技术是在 MSAP 技术(Xiong *et al*, 1999)上发展起来的, 与后者相比, 其结合荧光标记引物的可显性和 DNA 测序仪的自动化, 分辨率、准确性、安全性和检测通量均得到提升(杨春等, 2016)。F-MSAP 的工作原理: 使用 1 对甲基化敏感的限制性内切酶 *Hpa* II 和 *Msp* I, 识别基因组 CpG 岛的 CCGG 位点, 但 2 种酶对不同 DNA 甲基化模式的敏感程度不同, 酶切产生的条带不同。*Hpa* II 可以对非甲基化和半甲基化序列进行酶切, 而对胞嘧啶的全甲基化序列无酶切活性; *Msp* I 则可以对非甲基化和内侧胞嘧啶全甲基化序列进行酶切, 而对半甲基化和外侧胞嘧啶全甲基化序列无酶切活性。

1.2.3 酶切和连接体系 将限制性内切酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 分别与 *Eco*R I 组合成双酶切反应体系: *Eco*R I + *Hpa* II 和 *Eco*R I + *Msp* I。酶切反应体系 20 μl, 包括 2 μl DNA (100 ng/μl), 2 U 的 FastDigest *Eco*R I 和 FastDigest *Hpa* II / *Msp* I, 4 μl 10×Buffer (Thermo), 补 ddH₂O 至 20 μl。酶切体系 37℃水浴 0.5 h。

连接反应: 根据 Xu 等(2000)的方法进行接头引物设计(表 1), 将 *Eco*R I 对应的 E-A_{1,2} 单链接头分别稀释为 10 pmol/L, *Hpa* II / *Msp* I 对应的 HM-A_{1,2} 单链接头分别稀释为 100 pmol/L, 各取等体积的单链接头引物混合后, 94℃变性 5 min, 缓慢冷却到室温形成双链接头 E 和 HM。连接反应体系 20 μl, 包括 10 μl

酶切产物, 50 pmol 双接头 E 和 HM, 1U T4 DNA Ligase, 2 μ l 10 \times Buffer(TaKaRa), 补 ddH₂O 至 20 μ l。连接体系 16 $^{\circ}$ C 过夜。连接产物用 TE 缓冲液(Solarbio)稀释 10 倍后用于预扩增反应体系。

1.2.4 预扩增反应体系 预扩增反应体系 20 μ l, 包括 2 μ l 稀释后连接产物, 1 U *EasyTaq* DNA Polymerase, 2 μ l 10 \times Buffer(TransGen), 1 μ l dNTP (2.5 mmol/L) (TransGen), 5 pmol HM₀ Primer, 5 pmol E₀ Primer(表 1), 补灭菌 ddH₂O 至 20 μ l。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。预扩增产物用 TE 溶液稀释 20 倍后用于选择性扩增反应体系。

1.2.5 选择性扩增反应体系 参考太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) (姜群, 2015; 张鑫等, 2017)和大珠

母贝(*Pinctada fucata*)(Yao *et al*, 2015)DNA 甲基化检测的选择性扩增引物, 筛选出 4 条 *Hpa* II/*Msp* I 选择性扩增引物 HM₍₁₋₄₎和 7 条 FAM 荧光标记的 *EcoR* I 选择性扩增引物 E₍₁₋₇₎, 从这 28 对引物组合中筛选出 12 对扩增条带清晰且效率高的选择性扩增引物(表 1)。选择性扩增反应体系 20 μ l, 包括 2 μ l 稀释后预扩增产物, 1 U *EasyTaq* DNA Polymerase, 2 μ l 10 \times buffer, 1 μ l dNTP(2.5 mmol/L), 5 pmol *Hpa* II/*Msp* I 选择性扩增引物, 5 pmol *EcoR* I 选择性扩增引物, 补灭菌 ddH₂O 至 20 μ l。PCR 反应条件: 第一阶段为 13 个 Touch down 循环, 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65 $^{\circ}$ C 退火(每个循环递减 0.7 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。第二阶段为 27 个普通 PCR 循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 金乌贼 F-MSAP 甲基化分析所用接头和引物序列

Tab.1 Sequence of adapters and primers used for F-MSAP analysis of *S. esculenta*

接头/引物 Adapter/Primer	<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I (5'~3')	<i>EcoR</i> I (5'~3')
接头 Adapters	HM-A ₁ : GACGATGAGTCTAGAA HM-A ₂ : CGTTCCTAGACTCATC	E-A ₁ : CTCGTAGACTGCGTACC E-A ₂ : AATTGGTACGCAGTCTAC
预扩增引物 Preamplification primers	HM ₀ : GATGAGTCTAGAACGGT	E ₀ : GACTGCGTACCAATTC
选择性扩增引物 Selective amplification primers	HM ₁ : HM ₀ +AG HM ₂ : HM ₀ +AC HM ₃ : HM ₀ +GC HM ₄ : HM ₀ +GG	E ₁ : E ₀ +ACA E ₂ : E ₀ +AAC E ₃ : E ₀ +AAA E ₄ :E ₀ +AGA E ₆ : E ₀ +ACT E ₁ : E ₀ +ACA E ₃ : E ₀ +AAA E ₄ : E ₀ +AGA E ₅ : E ₀ +ACG E ₆ E ₀ +ACT E ₄ : E ₀ +AGA E ₅ : E ₀ +ACG

1.2.6 数据分析 使用 ABI 3130 Genetic Analyzer 检测选择性扩增产物的甲基化多态性, 获得峰值图, 使用 Gene Mapper V4.0 对所得峰值图进行扫描。同一 DNA 不同酶切组合的相同引物扩增互为一组, 分别记为 EH、EM(图 1)。根据上述酶切原则, 所得数值可分为 3 种条带形式, 分别代表 DNA 甲基化的 3 种模式(图 1): I 半甲基化位点, 甲基化修饰仅在 DNA 一条链, 经 EH 和 EM 分别处理后, EH 酶切有带而 EM 无带; II 全甲基化位点, DNA 双链发生甲基化修饰, EH 酶切无带而 EM 有带; III 非甲基化位点, EH 和 EM 酶切均出现条带。

整合统计数据(表 2), 采用 SPSS 16.0 软件单因素方差分析法(One-way ANOVA)对雌雄金乌贼的 4 种组织基因组 DNA 总甲基化水平、半甲基化水平和全甲基化水平进行显著性分析, 结果以平均值 \pm 标准误 (Mean \pm SE)在 GraphPad Prism 5 中绘制(图 4~图 8)。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取质量和酶切结果检测

基因组 DNA 提取与酶切反应是 F-MSAP 技术成功的关键, 提取的基因组 DNA 完整无断裂决定检测

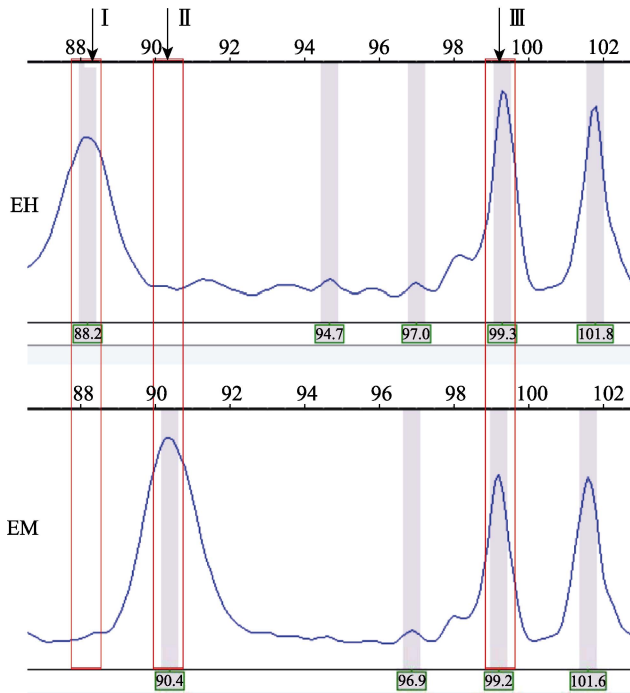


图 1 金乌贼的 3 种 DNA 甲基化模式

Fig.1 Three DNA methylation types of *S. esculenta*

EH 为 *EcoR* I + *Hpa* II 酶切; EM 为 *EcoR* I + *Msp* I 酶切;

I 表示半甲基化位点, II 表示全甲基化位点,

III 表示非甲基化位点

EH: Digested by *EcoR* I / *Hpa* II;

EM: Digested by *EcoR* I / *Msp* I;

I : Hemi-methylated sites; II : Full-methylated sites;

III : Non-methylated sites

结果是否可靠; 酶切是否完全直接决定能否完全检测 DNA 胞嘧啶甲基化位点。来自金乌贼肌肉、心脏、胰脏和性腺的 4 种组织基因组 DNA(图 2), DNA 带型整齐, 泳带无拖尾, 说明所提取的金乌贼基因组 DNA 质量好, 可用于后续酶切反应。对 4 种组织基因组 DNA, 采用快速酶切体系, 经 *EcoR* I + *Hpa* II 和 *EcoR* I + *Msp* I 两组双酶切反应后, 酶切反应产物经琼脂糖凝胶电泳, 呈弥散状, 无明显条带, 表明酶切反应比较充分(图 3)。

2.1 金乌贼甲基化水平和模式的性别差异

根据 DNA 甲基化模式的分类原则(图 1), 整合 24 个样品与 12 对引物组合的分析结果, 统计金乌贼生长期不同组织的基因组 DNA 甲基化各模式比例(表 2), 可见生长期金乌贼的非甲基化水平显著高于总甲基化水平($P < 0.05$), 表明金乌贼基因组 DNA 序列的 CCGG 位点虽发生了甲基化修饰, 仍以非甲基化位点居多。

在总甲基化水平上, 相同组织间的性别差异表现为雌性金乌贼心脏和胰脏的总甲基化水平显著高于雄性($P < 0.05$); 但雌性肌肉的总甲基化水平却显著低于雄性($P < 0.05$); 性腺的总甲基化水平不同性别差异不显著(图 4)。在半甲基化水平上, 相同组织间的性别差异与总甲基化水平的趋势基本一致(图 5)。在全甲基化水平上, 比较相同组织的性别差异, 仅有雌性金乌贼心脏的全甲基化水平显著高于雄性($P < 0.05$), 其他组织差异均不显著(图 6)。

表 2 金乌贼雌雄不同组织基因组 DNA 甲基化的检测结果

Tab.2 Methylation detection on various tissues of female and male *S. esculenta* (% , Mean±SE)

雌/雄 Female/male	组织 Tissue	DNA 甲基化水平 DNA methylation level			
		非甲基化水平 Non-methylation level	半甲基化水平 Hemi-methylation level	全甲基化水平 Fully methylation level	总甲基化水平 Total methylation level
雌 Female	肌肉 Muscle	65.03±1.91	14.99±1.26	19.99±1.52	34.97±1.90
	心脏 Heart	67.10±1.88	15.33±1.21	17.57±1.57	32.90±1.88
	胰脏 Pancreas	68.27±1.62	15.85±1.22	15.88±1.10	31.73±1.62
	卵巢 Ovary	70.98±1.23	13.96±0.88	15.06±0.76	29.02±1.23
雄 Male	肌肉 Muscle	60.30±2.11	19.89±0.99	19.80±1.55	39.70±2.11
	心脏 Heart	74.52±1.29	15.69±2.97	12.08±0.62	25.50±1.29
	胰脏 Pancreas	76.03±1.16	15.02±2.18	12.43±0.70	23.97±1.16
	精巢 Spermmary	72.81±1.26	14.23±0.90	13.07±0.61	27.19±1.26

注: 非甲基化水平、半甲基化水平和全甲基化水平是由脚本对经 Gene Mapper V4.0 处理后所得数值表进行计算机运算所得; 总甲基化水平=半甲基化水平 + 全甲基化水平

Note: Non-methylation level, hemi-methylation level and fully methylation level were obtained by a script, the numerical table of which derived from Gene Mapper V4.0; The total methylation level is equal to the sum of hemi-methylation and fully methylation level

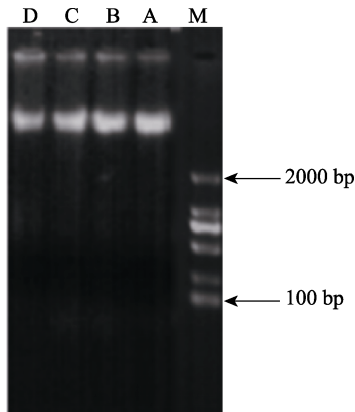


图 2 金乌贼基因组 DNA 电泳

Fig.2 Electropherograms of genomic DNA in *S. esculenta*

A: 肌肉; B: 心脏; C: 胰脏; D: 性腺;
M: DL2000 DNA marker
A: Muscle; B: Heart; C: Pancreas; D: Gonad

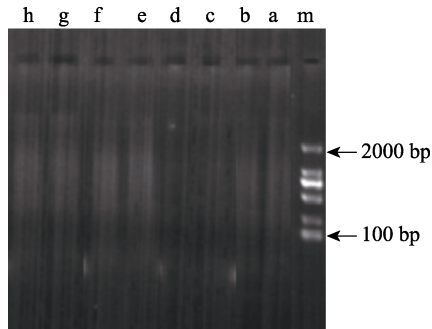


图 3 金乌贼基因组 DNA 酶切反应电泳

Fig.3 Electropherograms of enzyme cleavage in genomic DNA of *S. esculenta*

a, c, e, g 分别代表金乌贼肌肉、心脏、胰脏和性腺组织的 *EcoR* I + *Hpa* II 酶切条带;
b, d, f, h 分别代表金乌贼肌肉、心脏、胰脏和性腺组织的 *EcoR* I + *Msp* I 酶切条带
m: DL2000 DNA marker; a, c, e, g represent the *EcoR* I + *Hpa* II digestion of four tissues of *S. esculenta*;
b, d, f, h represent the *EcoR* I + *Msp* I digestion of four tissues of *S. esculenta*

2.3 金乌贼甲基化水平和甲基化模式的组织差异

2.3.1 雌性金乌贼不同组织间的 DNA 甲基化比较

雌性金乌贼生长期阶段不同组织基因组 DNA 甲基化程度不完全相同。各组织的总甲基化水平从高到低依次为肌肉>心脏>胰脏>卵巢(表 2 和图 7), 仅有肌肉与性腺组织存在显著差异($P<0.05$); 在半甲基化水平上, 各组织间差异均不显著($P>0.05$); 在全甲基化水平上, 肌肉与胰脏、肌肉与性腺均存在显著性差异($P<0.05$)。可见, 金乌贼基因组 DNA 的 CCGG 位点

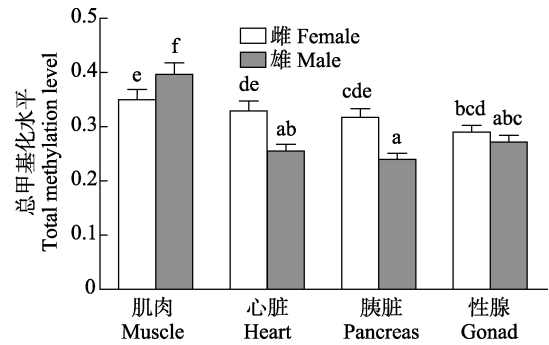


图 4 雌雄金乌贼不同组织基因组 DNA 总甲基化水平比较

Fig.4 Comparison of total methylation level of genomic DNA of female and male *S. esculenta*

柱上不同字母表示不同组织间差异显著($P<0.05$), 下同
Columns with different letters were significantly different ($P<0.05$). The same as below

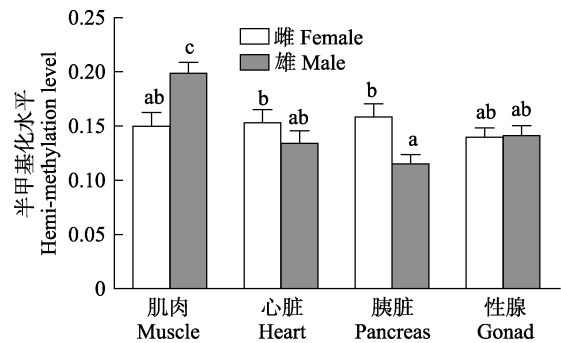


图 5 雌雄金乌贼不同组织基因组 DNA 半甲基化水平比较

Fig.5 Comparison of hemi-methylation level of genomic DNA of female and male *S. esculenta*

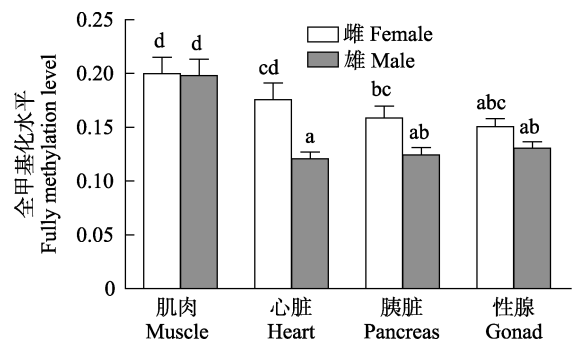


图 6 雌雄金乌贼不同组织基因组 DNA 全甲基化水平比较

Fig.6 Comparison of fully methylation level of genomic DNA of female and male *S. esculenta*

上全甲基化水平在不同组织中的高低趋势与总甲基化水平接近。通过比较分析还发现, 各组织的全甲基化水平均高于半甲基化水平, 但仅有肌肉组织的全甲基化与半甲基化水平差异显著($P<0.05$)。再次说明, 雌性金乌贼基因组 DNA 的全甲基化水平更能代表总甲基化水平, 且肌肉组织的甲基化程度更高。

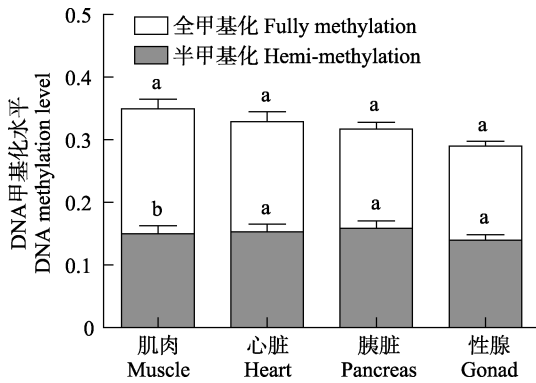


图 7 雌性金乌贼不同组织基因组 DNA 总甲基化、半甲基化、全甲基化水平对比

Fig. 7 Comparison of total/hemi-/fully methylation level of genomic DNA of female *S. esculenta*

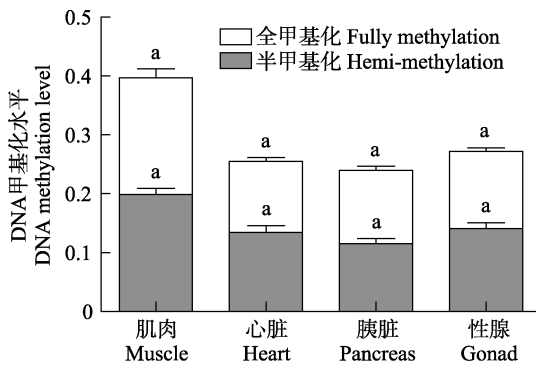


图 8 雄性金乌贼不同组织基因组 DNA 总甲基化、半甲基化、全甲基化水平对比

Fig. 8 Comparison of total/hemi-/fully methylation level of genomic DNA of male *S. esculenta*

2.3.2 雄性金乌贼不同组织间的 DNA 甲基化比较

雄性金乌贼生长期的基因组 DNA 甲基化水平同样存在组织差异,但各组织的总甲基化水平高低顺序却不同于雌性金乌贼,其顺序依次为肌肉>精巢>心脏>胰脏(表 2 和图 8),且肌肉组织与其他各组织间均存在显著差异($P < 0.05$)。雄性金乌贼半甲基化水平和全甲基化水平在组织间的差异性规律与总甲基化水平基本一致,但各组织的半甲基化和全甲基化水平间差异不显著($P > 0.05$),且半甲基化和全甲基化水平均不能代表雄性总甲基化水平。上述结果表明,金乌贼基因组 DNA 半甲基化和全甲基化的发生,在不同性别和组织间均存在差异。

3 讨论

3.1 金乌贼基因组 DNA 甲基化水平和模式与其他物种的比较

DNA 甲基化作为表观遗传修饰的重要方式,对

生长发育、环境适应具有重要意义。与脊椎动物相比,对无脊椎动物 DNA 甲基化发生和作用机制了解甚少,可能与无脊椎模式生物秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的 DNA 甲基化缺失及果蝇(*Drosophila melanogaster*)的 DNA 甲基化水平过低(0.1%~0.6%)有关(Yi *et al.*, 2009; Urieli-Shoval *et al.*, 1982)。统计已有研究报道发现,水产无脊椎动物的总甲基化水平变化范围(15%~40%)小于水产脊椎动物(20%~65%)(表 3)。本研究监测到金乌贼总甲基化水平为 23.97%~39.70%,在水产无脊椎动物中处于较高水平。此外,对比相同组织的总甲基化水平后发现,头足类(金乌贼、真蛸 *Octopus vulgaris*)的外套膜肌肉组织总 DNA 甲基化水平(34.97%和 66%),远高于双壳贝类(大珠母贝和马氏珠母贝 *Pinctada martensii*)的外套膜组织(15.48%~19.61%),金乌贼和真蛸 DNA 总甲基化水平如此之高可能与头足类动物属于软体动物门中发育最完善、最高级的一大类群密切相关。在检测 DNA 总甲基化水平时,不同物种的生长环境、生活方式以及发育阶段等的差别也会造成一定的影响。

DNA 的甲基化状态与生长发育调控密切相关,不同物种的全甲基化和半甲基化所发挥作用的大小不同。亲代母本橙色莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)、父本荷那龙罗非鱼(*Oreochromis hornorum*)以及子代荷那龙罗非鱼及其杂交种(尚慧文等, 2017)、太平洋牡蛎(姜群等, 2014)、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*) (吴彪等, 2015)等动物中半甲基化水平低于全甲基化水平;虾夷扇贝选育群体—玉贝(吴彪等, 2015)半甲基化和总甲基化水平相当;家禽动物中,鸡(*Gallina*)和鸭(*Anatinae*)(唐韶青等, 2006)则表现出半甲基化水平高于全甲基化水平。本研究结果显示,金乌贼基因组 DNA 半甲基化和全甲基化在不同性别和组织间均存在差异。其中,雌性金乌贼基因组 DNA 的全甲基化水平更能代表总甲基化水平,且肌肉组织的甲基化程度更高;雄性金乌贼半甲基化和全甲基化的组织间差异规律与总甲基化水平基本一致,但各组织的半甲基化和全甲基化间差异不显著($P > 0.05$)。

3.2 性别间的甲基化差异分析

性别对 DNA 甲基化水平有影响,同时 DNA 甲基化在调控性别分化中起重要作用。Nugent(2015)研究表明,小鼠雌性全甲基化水平显著高于雄性,通过高 DNA 甲基化水平可维持脑部女性化,当 DNA Methyltransferase 活性降低,视前区和性行为男性化。林蛙(*Rana chensinensis*)显现出因组织差异而造成雌

表 3 主要经济水产动物基因组 DNA 总甲基化水平比较

Tab.3 Comparison of total methylation level of genomic DNA from major economic aquatic animals

分类 Type	种名 Species	组织 Tissue	总甲基化水平 Total methylation level(%)	参考文献 Reference
无脊椎动物 Invertebrate	大珠母贝 <i>Pinctada fucata</i>	外套膜 Mantle	12.98	Yao <i>et al</i> , 2015
	马氏珠母贝 <i>Pinctada martensii</i>	外套膜边缘 Mantle pallial	15.48	罗少杰等, 2016
		外套膜中央 Mantle central	19.61	
	太平洋牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	闭壳肌 Adductor muscle	26.40	Jiang <i>et al</i> , 2013
	海湾扇贝 <i>Argopecten irradians</i>	闭壳肌 Adductor muscle	25.99	吕佳等, 2013
	栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>		32.08	
	虾夷扇贝 <i>Mizuhopecten yessoensis</i>		32.88	
	“海大”金贝		34.97	
	背角无齿蚌 <i>Anodonta woodiana</i>	唇瓣 Labellum	35.50	曹哲明等, 2009
		斧足 Foot	56.00	
	刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	体壁 Body wall	18.60	高杉等, 2017
		肠 Intestines	28.00	
		呼吸树 Respiratory tree	35.77	郭婷婷等, 2013
	中国明对虾	血液 Blood	19.70	杜盈等, 2013
	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	肌肉 Muscle	23.10	
	真蛸 <i>Octopus vulgaris</i>	0 d 幼体 Larva	73.88	Pablo <i>et al</i> , 2017
		28 d 幼体 Larva	62.07	
		外套膜肌 Mantle	66.00	Eva <i>et al</i> , 2014
脊椎动物 Vertebrate	橙色莫桑比克罗非鱼	皮肤 Skin	30.63	尚慧文等, 2017
	<i>Oreochromis mossambicus</i>	肝 Liver	35.04	
	半滑舌鳎	鳃 Gill	34.96	李思平等, 2015
	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	性腺 Gonad	47.32	
	黄鳝 <i>Monopterus albus</i>	肌肉 Muscle	36.77	魏国华等, 2015
		肾 Kidney	64.93	

雄总甲基化水平高低的差异, 雄性林蛙肝脏和脑中 DNA 总甲基化水平高于雌性, 肌肉和皮肤雄性低于雌性(李雅芳等, 2014); 莆田黑猪的公猪心脏、肝脏、脂肪、耳和尾 DNA 甲基化水平高于母猪, 而肌肉低于母猪(张金耀, 2016); 但在荣昌仔猪耳组织中显示, 公猪总甲基化水平比母猪高, 但差异不显著(白小青等, 2010); 人类男性甲基化水平显著高于女性(Fuke *et al*, 2004)。本研究也发现, 金乌贼甲基化水平和模式的性别差异, 雌性金乌贼肌肉组织 DNA 总甲基化水平显著低于雄性, 心脏和胰脏组织 DNA 总甲基化水平却显著高于雄性。推测金乌贼的 DNA 甲基化水平可能受发育阶段、取样部位等多种因素共同作用, 从而造成不同组织的总甲基化水平在雌雄中的高低不相同。

3.3 组织间的甲基化差异分析

同一个体不同组织间存在基因组甲基化水平的

差异是生物界普遍存在的现象, 且组织 DNA 的甲基化程度与基因的功能关系密切。李金龙等(2014)对北京油鸡的研究显示, 肌肉甲基化程度与体重呈显著负相关, 体重越高, 肌肉组织的甲基化程度越低, 其推测可能与 DNA 甲基化参与体重相关基因的表达和物种特异性有关。本研究显示, 金乌贼不同组织间总甲基化水平变化差异达 15.73%, 且雌雄个体总甲基化水平最高的组织均是肌肉。生长期肌肉的主要功能是增加体重和增强运动, 肌肉组织中的基因组 DNA 甲基化水平较高, 则会导致相关基因的表达量较低。生长期金乌贼各组织的 DNA 甲基化水平与该阶段相应组织的生理功能是否存在相关性? 这一问题还有待于进一步研究探讨。

在总甲基化水平上, 除肌肉与性腺组织外, 金乌贼其他组织间差异均不显著($P>0.05$)。表明基因表达调控、性状分化等过程不仅有 DNA 甲基化参与, 这些过程还受多种其他调控机制的作用, 如 RNA 干扰、

组蛋白修饰等。并非全部组织特异性表达的基因都与甲基化有关(Song *et al.*, 2005; 姜群等, 2014)。

参 考 文 献

- Bai XQ, Wang JY, Chen Y, *et al.* Study on the difference of DNA methylation levels in Rongchang piglets. *Chinese Journal of Animal Science*, 2010, 46(13): 12–13 [白小青, 王金勇, 陈英, 等. 荣昌猪仔猪性别间 DNA 甲基化水平的差异研究. *中国畜牧杂志*, 2010, 46(13): 12–13]
- Berdyshev GD, Korotaev GK, Boiarskikh GV, *et al.* Nucleotide composition of DNA and RNA from somatic tissues of humpback and its changes during spawning. *Biokhimiia*, 1967, 32(5): 988–993
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 2002, 16(1): 6–21
- Cao ZM, Yang J. Analysis of the methylation in genome DNA from different tissues of *Anodonta woodiana*. *Ecology and Environmental Sciences*, 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. *生态环境学报*, 2009, 18(6): 2011–2016]
- De BL, Riedel L, Schmitt I, *et al.* DNA methylation levels of α -synuclein intron 1 in the aging brain. *Neurobiology of Aging*, 2015, 36(12): 3334.e7
- Dong ZZ. The biology of world ocean economic cephalopod. Jinan: Shandong Science and Technology Press, 1991, 197–207 [董正之. 世界大洋经济头足类生物学. 济南: 山东科学技术出版社, 1991: 197–207]
- 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, 20(3): 536–543]
- Eva DF, Camino G, Sheila CM, *et al.* The role of DNA methylation on *Octopus vulgaris* development and their perspectives. *Frontiers in Physiology*, 2014, 5: 62
- Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, *et al.* Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: An HPLC-based study. *Annals of Human Genetics*, 2004, 68(3): 196–204
- Gao S, Yang AF, Dong Y, *et al.* Analysis of DNA methylation in the body wall of sea cucumber *Apostichopus japonicus* with skin ulceration by the methylation-sensitive amplified polymorphism MSAP. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(3): 637–642 [高杉, 杨爱馥, 董颖, 等. 仿刺参“化皮病”体壁组织 DNA 甲基化的 MSAP 分析. *水生生物学报*, 2017, 41(3): 637–642]
- Golbus J, Palella TD, Richardson BC. Quantitative changes in T cell DNA methylation occur during differentiation and ageing. *European Journal of Immunology*, 1990, 20(8): 1869–1872
- Guo TT, Sun GH, Yang JM, *et al.* MSAP analysis of genome DNA methylation in different tissues of *Apostichopus japonicus*. *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. *海洋与湖沼*, 2013, 44(1): 77–82]
- Hao ZL, Zhang XM, Zhang PD. Biological characteristics and multiplication techniques of *Sepia esculenta*. *Chinese Journal of Ecology*, 2007, 26(4): 601–606 [郝振林, 张秀梅, 张沛东. 金乌贼的生物学特性及增殖技术. *生物学杂志*, 2007, 26(4): 601–606]
- Hata K, Okano M, Lei H, *et al.* Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, 2002, 129(8): 1983–1993
- 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
- Jiang Q, Yu H, Kong LF, *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). *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. *中国水产科学*, 2014, 21(4): 676–683]
- Jiang Q. DNA methylation studies on the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2015 [姜群. 长牡蛎 DNA 甲基化研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2015]
- Li JL, Tang SQ, Zhao M, *et al.* Detection of DNA methylation in whole genomes of muscle and ovary tissues of Beijing You chicken. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(11): 1784–1792 [李金龙, 唐韶青, 赵萌, 等. 北京油鸡肌肉和卵巢组织基因组 DNA 甲基化状态检测与分析. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(11): 1784–1792]
- Li SP, He F, Wen HS, *et al.* Analysis of DNA methylation levels by methylation-sensitive amplification polymorphism in half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* subjected to salinity stress. Annual Meeting of Chinese Society of Fisheries, 2015 [李思平, 何峰, 温海深, 等. 低盐胁迫下半滑舌鳎不同组织基因组甲基化状态 MSAP 分析. 中国水产学会学术年会, 2015]
- Li Y, Qian WQ. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in plants. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2017, 29(3): 302–309 [李艳, 钱伟强. 植物中 DNA 甲基化及去甲基化研究进展. *生命科学*, 2017, 29(3): 302–309]
- Li YF, Wang N, Bai JW, *et al.* In vivo DNA methylation levels of *Rana chensinensis* in gold mining area. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, 9(5): 956–963 [李雅芳, 王宁, 柏建雯, 等. 金矿区中国林蛙体内 DNA 甲基化水平. *生态毒理学报*, 2014, 9(5): 956–963]
- Liu CL, Ruan FT, Qin B, *et al.* Analysis and evaluation of

- nutritive composition of the muscle of wild adult *Sepia esculenta*. Marine Sciences, 2016, 40(8): 42–48 [刘长琳, 阮飞腾, 秦搏, 等. 野生金乌贼成体肌肉的营养成分分析及评价. 海洋科学, 2016, 40(8): 42–48]
- Liu CL, Zhuang ZM, Chen SQ, *et al.* Study on the brood stock domestication and propagation characteristics of *Sepia esculenta* Hoyle. Fishery Modernization, 2009, 36(2): 34–37 [刘长琳, 庄志猛, 陈四清, 等. 金乌贼亲体驯养与繁殖特性研究. 渔业现代化, 2009, 36(2): 34–37]
- Luo SJ, Deng YW, Zheng ZH, *et al.* Analysis of genomic DNA methylation on different regions of mantle tissue from *Pinctada martensii* by methylation-sensitive amplification polymorphism. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(6): 1227–1235 [罗少杰, 邓文, 郑哲, 等. 马氏珠母贝外套膜不同区域基因组 DNA 甲基化 MSAP 分析. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1227–1235]
- Lv J, Hou R, Li N, *et al.* Application of MSAP technique for investigation of genome-wide DNA methylation level in scallops. Periodical of Ocean University of China (Natural Science), 2013, 43(10): 48–53 [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(10): 48–53]
- Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ. Reactivation of an inactive human X chromosome: Evidence for X inactivation by DNA methylation. Science, 1981, 211(4480): 393–396
- Nugent BM, Wright CL, Shetty AC, *et al.* Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. Nature Neuroscience, 2015, 18(5): 690–697
- Pablo GF, Danie GS, Eduardo A, *et al.* Epigenetic DNA methylation mediating *Octopus vulgaris* early development: Effect of essential fatty acids enriched diet. Frontiers in Physiology, 2017, 8: 292
- Rhee I, Bachman KE, Park BH, *et al.* DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. Nature, 2002, 416(6880): 552–556
- Shang HW, Liu ZG, Zhu HP, *et al.* Analysis of DNA methylation difference between “Mohe” hybrid tilapia and its parents. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(11): 1699–1709 [尚慧文, 刘志刚, 朱华平, 等. 莫荷罗非鱼“广福 1 号”与其亲本间 DNA 甲基化的差异分析. 水产学报, 2017, 41(11): 1699–1709]
- Song F, Smith JF, Kimura MT, *et al.* Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. Proceeding of the National Academy of Sciences, 2005, 102(9): 3336–3341
- Tang SQ, Zhang Y, Xu Q, *et al.* Analysis of methylation level of genome in various tissues of different animal species. Journal of Agricultural Biotechnology, 2006, 14(4): 507–510 [唐绍青, 张沅, 徐青, 等. 不同动物部分组织基因组甲基化程度的差异分析. 农业生物技术学报, 2006, 14(4): 507–510]
- Urieli-Shoval S, Gruenbaum Y, Sedat J, *et al.* The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA. FEBS Letters, 1982, 146(1): 148–152
- Wang YL. DNA methylation in the sexual stage of *Cordyceps militaris* and functions of DNA methyltransferases in *Metarhizium robertsii*. Doctoral Dissertation of Anhui Agricultural University, 2016 [王玉龙. 蛹虫草有性阶段 DNA 甲基化及绿僵菌 DNA 甲基转移酶功能研究. 安徽农业大学博士研究生学位论文, 2016]
- Wei GH, Cao ZM, Ding WD, *et al.* Effects of light application time on genomic DNA methylation of different tissues in rice field eel (*Monopterus albus*) by MSAP analysis. Journal of Huazhong Agricultural University, 2015, 34(6): 101–107 [魏国华, 曹哲明, 丁炜东, 等. 不同光照周期下黄鳝不同组织 DNA 甲基化的 MSAP 分析. 华中农业大学学报, 2015, 34(6): 101–107]
- Wei SF, Zhang AH. Research progress on DNA hypomethylation and its relationship with tumor. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2016, 28(3): 243–245 [魏绍峰, 张爱华. DNA 低甲基化及其与肿瘤关系的研究进展. 癌变·畸变·突变, 2016, 28(3): 243–245]
- Wu B, Yang AG, Dong YH, *et al.* MSAP analysis on genome-wide DNA methylation in selected and wild Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(4): 976–982 [吴彪, 杨爱国, 董迎辉, 等. 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]
- Xiong LZ, Xu CG, Saghai Maroof MA, *et al.* Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. Molecular & General Genetics Mgg, 1999, 261(3): 439–446
- Xu M, Li X, Korban SS. AFLP-based detection of DNA methylation. Plant Molecular Biology Report, 2000, 18(4): 361–368
- Yang C, Chu WH, Lu X, *et al.* Comparison the methods using to detect genome-wide DNA methylation of Antler stem cell. Journal of Jilin Agricultural University, 2016, 38(1): 97–101 [杨春, 褚文辉, 路晓, 等. 鹿茸干细胞基因组 DNA 甲基化的检测方法. 吉林农业大学学报, 2016, 38(1): 97–101]
- Yao GL, Yun YG, Qin L, *et al.* Analysis of DNA methylation in tissues and development stages of pearl oyster *Pinctada fucata*. Genes & Genomics, 2015, 37: 263–270
- Yi SV, Goodisman MAD. Computational approaches for understanding the evolution of DNA methylation in animals. Epigenetics, 2009, 4(8): 551–556
- Zhang H, Zhang X, Clark E, *et al.* TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. Cell Research, 2010, 20(12): 1390–1393
- Zhang JY. Study of the difference on DNA methylation of Putian black pig. Master’s Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2016 [张金耀. 莆田黑猪 DNA 甲基化

差异研究. 福建农林大学硕士研究生学位论文, 2016]
Zhang X, Li Q, Yu H, *et al.* Effects of air exposure on genomic DNA methylation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(4): 690–697 [张鑫, 李琪, 于红, 等. 干露胁迫对长牡蛎基因组 DNA 甲基化的影响. *中国水产科学*, 2017, 24(4): 690–697]

Zuo ZL, Tan J, Wu B, *et al.* MSAP analysis of genomic DNA in the tissues of *Apostichopus japonicus* and white *A. japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(3): 93–100 [左之良, 谭杰, 吴彪, 等. 普通刺参(*Apostichopus japonicus*)和白刺参不同组织基因组 DNA 的 MSAP 研究. *渔业科学进展*, 2016, 37(3): 93–100]

(编辑 冯小花)

DNA Methylation Level and Pattern in Growing *Sepia esculenta* Hoyle

HE Muchun^{1,2,3}, ZHANG Jinyong^{2,3,4}, LIU Changlin², XIANG Zilong^{2,3,5},
LIU Shufang^{2,3}^①, ZHUANG Zhimeng², XUE Tongming⁶

(1. School of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316003; 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; 4. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081; 5. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 6. Qingdao Jinshatan Aquatic Product Development Co., Ltd., Qingdao 266000)

Abstract DNA methylation plays an important role in regulating gene expression, cell aging and trait differentiation. In order to investigate the differences of DNA methylation level and pattern in different genders and tissues of *Sepia esculenta* Hoyle, we applied Fluorescence-labeled Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (F-MSAP) technology and analyzed the level and pattern of methylation of genomic DNA in the muscle, the heart, the pancreas and the gonad of female and male *S. esculenta*. The total methylation rate of *S. esculenta* in the growing stage was 23.97%~39.70%, which was at a high level in aquatic invertebrates. Among the female and male's four tissues, the total methylation level in muscle was the highest, which may be related to the phenomenon of allometric growth and the preferential development of the muscle during the growing state. Moreover, both the methylation levels and patterns of *S. esculenta* were different in gender, the total methylation level of DNA in the muscle tissue of the female *S. esculenta* was significantly lower than that of the male, but that in the heart and pancreas tissue was significantly higher than that in the male. In addition, we also found that the fully methylation level in the muscle of female *S. esculenta* was the largest contributor to the total methylation level and was consistent with the level of total methylation in the other tissues of female *S. esculenta* and in the four tissues of male *S. esculenta*. The results showed that the level and pattern of DNA methylation of *S. esculenta* had gender and tissue differences. This study can provide basic data for epigenetic regulation of the life processes such as the growth, differentiation, and death of *S. esculenta*.

Key words *Sepia esculenta* Hoyle; Growing stage; DNA methylation; F-MSAP; Tissue differences; Gender differences

① Corresponding author: LIU Shufang, E-mail: liusf@ysfri.ac.cn