

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220310001

http://www.yykxjz.cn/

秦桢, 李吉涛, 李明栋, 王佳佳, 葛倩倩, 刘萍, 李健. 盐碱水环境对脊尾白虾基因组 DNA 甲基化的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 33–50
QIN Z, LI J T, LI M D, WANG J J, GE Q Q, LIU P, LI J. Effects of saline-alkaline water environment on DNA methylation of *Exopalaemon carinicauda*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 33–50

盐碱水环境对脊尾白虾基因组 DNA 甲基化的影响*

秦桢^{1,2} 李吉涛^{2①} 李明栋² 王佳佳² 葛倩倩² 刘萍² 李健²

(1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 2. 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 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 山东 青岛 266071)

摘要 为探讨盐碱水环境对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)基因组 DNA 甲基化的影响,本研究利用 MethylRAD-Seq 技术探究了长期盐碱水养殖组(SAS)和正常海水养殖对照组(SW)脊尾白虾鳃组织中的 DNA 甲基化水平,并对关键通路和基因进行了差异表达分析。结果显示,脊尾白虾鳃组织基因组中 CG 和 CWG 位点(W=A 或 T)分别检测到 2 347 003 和 416 176 处甲基化,甲基化普遍存在于基因组的基因间区和内含子区域,共筛选到 8805 个(8189 个 CG-DMSs 和 616 个 CWG-DMSs)差异甲基化位点,盐碱水环境下 DNA 甲基化水平略有增强。通过 KEGG 富集分析发现, DMS 所在差异表达基因显著富集在 HIF-1 信号通路和剪接体通路,通路中 *hif-p*、*hk* 和 *sf3b1* 等关键基因在脊尾白虾盐碱水环境适应中可能发挥着重要作用;对 SW 和 SAS 组差异甲基化基因(DMG)进行筛选,得到 158 个 CG-DMGs 和 94 个 CWG-DMGs,其中,富集到脂质代谢和囊泡介导的转运通路中的 DMG 最多;此外,有一些 DNA 甲基化位点与基因表达呈负相关,表明 DNA 甲基化与基因调控之间存在复杂的联系,大部分基因组 DNA 甲基化对基因表达有正调控效应。本研究结果首次分析了在盐碱水环境下脊尾白虾鳃组织的 DNA 甲基化水平特征,为解析甲壳类盐碱水环境适应机制提供了基础信息。

关键词 脊尾白虾; 盐碱水环境; DNA 甲基化; 差异表达基因

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0033-18

受气候、地形等自然和人为因素的影响,全球土壤和水的盐渍化程度正在增加(常玉梅等, 2021)。据研究推测,这些地区在未来将日趋扩大,严重威胁水产养殖的发展空间(张建峰, 2008)。目前,已有大量研究集中在盐碱地管理和盐碱水对水生动物(包括甲

壳类)的毒性影响(Arooj *et al*, 2021; Chen *et al*, 2020; Conrado *et al*, 2017; 杨富亿等, 2004)。为促进盐碱地水产养殖的发展,对一些适应性较强的品种开展了盐碱池塘养殖,例如耐盐碱鱼类、广盐性鱼类和虾蟹类等,目前应用于盐碱水规模化养殖的品种包括罗非

* 国家重点研发计划课题(2019YFD0900404-03)、国家自然科学基金项目(32072974)、财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系和中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD46)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2019YFD0900404-03), National Natural Science Foundation of China (32072974), China Agriculture Research System of MOF and MARA, and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD46)]. 秦桢, E-mail: 1285946211@qq.com

① 通信作者: 李吉涛, 研究员, E-mail: lijt@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-03-10, 收修改稿日期: 2022-04-07

鱼(*Oreochromis mossambicus*)、梭鲈(*Sander lucioperca*)和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)等(徐文龙等, 2021; 来琦芳等, 2021)。对鱼类耐盐碱机制的研究主要集中在生理和分子调控机制(渗透压调节、氨氮代谢、激素调节等)方面, 而对甲壳动物耐盐碱的研究则主要集中在对碱度胁迫的耐受能力及其生理变化(常玉梅等, 2021)。然而, 目前对甲壳类动物耐盐碱的分子机制尚不清楚。

越来越多的证据表明, 表观遗传学调控机制在生物对环境胁迫后的适应性调控过程中占据着至关重要的地位(Xu *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2021)。研究发现, 生物体可以通过 DNA 甲基化调节当代和后代的环境适应能力, 比如对低氧、低盐、盐碱等环境胁迫的适应(Wang *et al.*, 2021; 王会等, 2017; 环朋朋等, 2019; Su *et al.*, 2020)。在甲壳动物中, 有学者开展关于 DNA 甲基化对其生长发育、防御生物和非生物胁迫(包括热应激、盐度、重金属等)的影响。例如, 薛蓓等(2017)研究了脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) 4 个生长发育阶段线粒体基因组的甲基化水平, 发现脊尾白虾通过甲基化调节能量代谢影响机体的生长发育进程。热应激下, 卤虫(*Artemia*)和海鞘(*Didemnum vexillum*)的胞嘧啶甲基化导致基因的差异表达(Norouzitallab *et al.*, 2014; Hawes *et al.*, 2018)。Lovett 等(2001)研究发现, 甲基法尼酯(methyl farnesoate)能够调节岸蟹(*Carcinus maenas*)机体渗透压, 使其适应盐度变化很大的河口环境。年龄、取样地点、水温、禁食和镉暴露均能显著影响淡水钩虾(*Gammarus fossarum*)基因组胞嘧啶的甲基化水平(Cribiu *et al.*, 2018)。

脊尾白虾俗称海水小白虾、白米虾, 是我国东部沿海广温广盐的重要中小型经济虾类, 以黄、渤海产量最高, 年产量数千吨(Ge *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2020)。近年来, 脊尾白虾养殖业迅速扩大, 成为促进我国沿海渔业经济发展的重要品种(柳飞等, 2016; 李明栋等, 2021)。在滨海盐碱水试养脊尾白虾过程中, 发现脊尾白虾虽然能够正常生存, 但其生长及繁殖能力在高碳酸盐碱度下明显降低(Ge *et al.*, 2019; 柳飞等, 2016)。开展脊尾白虾盐碱适应机制解析, 对耐盐碱良种培育和盐碱水养殖具有重要意义。本研究利用河北沧州养殖基地脊尾白虾耐盐碱品系和山东日照试验基地脊尾白虾“黄育 1 号”作为研究对象, 利用高效、低成本全基因组 DNA 甲基化检测技术(MethylRAD-Seq)对脊尾白虾鳃组织 DNA 甲基化水平进行分析, 筛选与盐碱胁迫相关的关键基因和重要甲基化位点, 旨在为解析脊尾白虾适应盐碱水环境的分

子机制提供基础数据, 为甲壳类盐碱适应机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究用脊尾白虾“黄育 1 号”养殖于山东省日照海辰水产有限公司正常海水中(盐度 25、pH 8.2、碳酸盐碱度 2.0~3.0 mmol/L), 脊尾白虾耐盐碱品系养殖于河北沧州滨海型盐碱水中(盐度 15~20、pH 8.3~9.2、碳酸盐碱度 3.5~8.0 mmol/L)。根据实验目的, 正常海水养殖对照组(SW)取自日照养殖的“黄育 1 号”健康成虾, 长期盐碱水养殖组(SAS)为 2019 年“黄育 1 号”引入河北沧州滨海型盐碱水选育 3 代的成虾个体。实验用脊尾白虾体长为(5.65±0.50) cm, 体重为(1.52±0.38) g, 随机选取体质健康、活力良好的个体。进行实验前 3 d 停止喂食, 待虾状态稳定后解剖其鳃组织于-80℃下保存。SW 和 SAS 组分别取 6 个生物平行, 每个平行 3 份鳃组织, 各组织样品分别标记为 SW1~3 和 SAS1~3, 用于后期 DNA 和总 RNA 提取。

1.2 DNA 提取和文库构建

采用 TIANamp Marine Animals DNA Kit (TIANGEN)提取 DNA, 利用核酸定量仪(Thermo, NanoDrop 2000)和 1%琼脂糖检测 DNA 质量、浓度和完整性。利用修饰依赖性内切酶 *FspEI* 5U 于 37℃酶切 4 h 消化基因组 DNA, 按照 10 μL 酶切产物与 0.80 μL 特异性接头、1 μL 10×T₄ ligase buffer、1 μL 10 mmol/L ATP 和 2 μL T₄ DNA ligase (400 U/μL)的比例混合, 加超纯水使总体积为 20 μL。4℃连接 6~8 h, 连接产物经特异性引物反应扩增, 反应条件: 98℃初始变性 30 s, 98℃20 个循环变性 5 s, 60℃退火 20 s, 72℃片段延伸 10 s。每个样品平行扩增 3 管, 用于后续回收目的片段。取 3 μL PCR 产物用 8%聚丙烯酰胺凝胶进行非变性电泳检查。然后按照制造商说明将 PCR 产物用 SteadyPure Agarose Gel DNA Purification Kit (Accurate Biotechnology Co., Ltd)进行切胶回收。利用 QIAquick PCR Purification Kit 和 Qubit 对 PCR 产物进行纯化和定量, 基于 MethylRAD 技术构建标签文库, 由上海欧易生物医学科技有限公司采用 Illumina SE sequencing (50 bp)测序平台进行文库测序。

1.3 数据处理与统计分析

1.3.1 原始数据的质控 利用 Illumina 测序平台

得到的原始图像数据文件经碱基识别转化为原始测序序列(raw reads)。在组装之前,通过预处理(随机截取 103%的数据,去除距 5'或 3'端 13~17 bp 的片段、有待检测酶切位点的片段和低质量片段)对原始数据进行过滤与质控,得到各样品的高质量的有效数据(clean reads),进行后续的数据分析。

1.3.2 甲基化位点水平的定量 以本课题组前期组装的脊尾白虾全基因组序列为参考基因组(数据尚未发表),使用 Bowtie 2 软件(V2.3.4.1)对 clean reads 进行比对,参数设置为: --no-unal。比对完成后,去除能够同时比对到参考序列的多个位置的 reads,采用 RPM (reads per million)为单位对甲基化位点水平进行定量,计算公式为位点甲基化水平定量值=位点覆盖 reads 数/文库高质量 reads \times 1 000 000。根据比对结果,统计 CG 位点(C^m CGG、 G^m CGG、 C^m CGA、 A^m CGG、 C^m CGC、 C^m CGT、 T^m CGG 和 G^m CGC)和 CWG 位点(m CAG 和 m CTG)的数目、电子酶切位点数目及 reads 深度,从而描绘整条染色体上 2 种位点的分布情况。

通过修饰依赖型核酸内切酶(*Fsp*EI 酶和 *Lpn*PI 酶)进行电子酶切,识别 C5-甲基化胞嘧啶(5-mC)和 C5-羟甲基化胞嘧啶(5-hmC),得到一个 30 bp (28~37 bp)左右的酶切片段。图 1 为 *Fsp*EI 酶和 *Lpn*PI 酶的酶切位点示意图。对于 m CG 位点,只选择 *Fsp*EI 酶的 C^m CGG 位点和 *Lpn*PI 酶的 8 种比较稳定的 CG 位点进行下游数据分析(Boers *et al.*, 2018); 对于 m CHG (H 代表简并碱基 A、C、T)位点, *Fsp*EI 酶和 *Lpn*PI 酶都采用 m CAG 和 m CTG 结果,用 CWG 表示(W 代表简并碱基 A、T)。

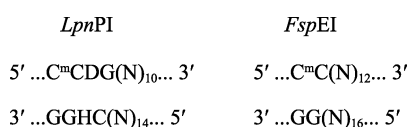


图 1 *Lpn*PI 酶和 *Fsp*EI 酶的酶切位点

Fig.1 Cleavage sites of *Lpn*PI and *Fsp*EI enzyme

1.3.3 甲基化位点注释及分布 根据甲基化位点的位置信息,使用 SnpEff 软件(V 4.1g)位点进行注释,给出每个位点所在的基因元件以及位点注释的详细信息,利用 bedtools 软件(V 2.25.0)统计各个样品中不同基因元件中甲基化位点的分布情况,进一步选取基因转录起始位置(TSS)上下游各 2 kb 区段,转录终止位置(TTS)上下游各 2 kb 区段及基因体(genebody),将分布在不同区域的每个基因的序列均分为多个窗口,统计每个窗口的 RPM 值,将所有基因相同窗口的 RPM 值取平均,作为该窗口的 RPM 值,描述测序 reads 在上述区段的分布趋势。

1.3.4 甲基化位点的差异分析 将各个样本的 base mean 值作为测序深度的表达量估算值,利用 DESeq 包(V 1.36.0)对测序深度进行标准化处理,计算差异倍数,并采用负二项分布检验对 reads 数进行差异显著性检验,以此来筛选差异甲基化位点(DMS)。默认 $P < 0.05$ 且差异倍数(fold change)大于 2 为筛选差异的条件。使用 bedtools 软件对各个比较组中不同基因元件中甲基化位点的分布情况进行统计。记录 DMS 的分布,并统计 DMS 在不同基因功能元件上的分布。统计 DMS 的甲基化水平,用以描述 DMS 所在基因的甲基化水平,获得 DMS 所在差异表达基因(DEG)。根据 GO (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>)和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>)数据库进行 GO 和 KEGG pathway 功能和富集分析。 $P < 0.05$ 的 GO term 被认为是显著富集, Benjamini-Hochberg 多重检验校正所有 P 值以获得 FDR。

1.3.5 基因水平的甲基化差异分析 以某一基因内的所有甲基化位点水平之和代表该基因的甲基化水平,对 SW 和 SAS 两组样品进行组间比较。同样计算差异倍数,利用负二项分布检验的方式对基因进行差异显著性检验,最终根据差异倍数及差异显著性检验结果来筛选差异甲基化基因(DMG)。由 DMG 组成基因集,根据 GO 和 KEGG 数据库进行 GO 和 KEGG pathway 功能和富集分析。

1.3.6 通过 qRT-PCR 验证差异甲基化基因和差异表达基因 利用 TRIzol 试剂(Invitrogen)提取鳃组织样本的总 RNA,经核酸定量仪(Thermo, NanoDrop 2000)和 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度和质量。按照 HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR (Vazyme)说明书进行 RNA 反转录,合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行引物的验证和后续 2 组脊尾白虾鳃组织的甲基化特征分析。为了验证由 MethylRAD-seq 确定的脊尾白虾鳃组织中 DMS 相关的 DEG,选取显著富集的 KEGG 通路相关的 12 个 DEGs 进行了 qRT-PCR 分析。用于 qRT-PCR 分析的 mRNAs 引物见表 1。以 18S 为内参,引物序列如下: 5'-TATACGCTA GTGGAGCTGGAA-3'和 3'-GGGGAGGTAGTGACGA AAAAT-5' (李美玉等, 2012; Wang *et al.*, 2015)。在 7500 fast Real-Time PCR 系统(Applied Biosystems)中,使用 SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies)进行 qRT-PCR。取每个时间点的 3 个转录组样本进行 qRT-PCR,每个生物重复进行 3 个技术重复。使用 CT 方法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)计算目的基因的相对表达量(Tapia *et al.*, 2017)。

表1 用于 qRT-PCR 分析的 mRNA 引物

Tab.1 Primers of mRNAs used for the qRT-PCR analysis

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')
HIF-P-F	GCTGCGAGTGTGAATCTGAAGGAG
HIF-P-R	AAACCCGTCAAACCGACCGAATC
HK-F	CGATACCACAGGCACGCTCATG
HK-R	CCAATTGCGCGTCCCACAGTTC
mTOR-F	CTCCACAGCGAAGACTCCACAAC
mTOR-R	AACCGTCTCAGCCACTCTAGCC
SLC2A1-F	GGTGAGATGAGAAACGAGGCAGAAG
SLC2A1-R	ACAAGAGGGATGCGAAGAGTAGGG
PLK1-F	GCGTCTTCTACTTCTTGCCTCAC
PLK1-R	TCACTGCCTCCTTGTCTTTCATTGG
CPEB2-F	TACCTGTGCGTGTCTCTCTCTAC
CPEB2-R	CCAATGGAAGCGAGGCATCAAGG
STAG2-F	ACAGCAGTCACAGCAGCAACAG
STAG2-R	TCTGGTTCTGGCTCTGGCTCTG
CDC5-F	TGGACGAGGACGAGTTGGAGATG
CDC5-R	CCTTCCGCTTCGCCTTCTTTCC
SNRP70-F	CTCGGAGGTTAGGAGGAGGATTGG
SNRP70-R	CGTTCTTCTTCTCGCCACTTCC
PRP19-F	ACGCCACAGTCTTCAACAAGGATAC
PRP19-R	ATGCCGTGATGATCGTGTCTTCTG
SF3B1-F	ATCGCAGAGCCAGTTTAGCAAGAC
SF3B1-R	CGTAGTATCCACCGCCATCCAATC
WBP11L-F	CCTCCCTCATCCTCCAGGTGTTC
WBP11L-R	AGGCATACGCATATTTGGCAGTCTC

2 结果与分析

2.1 DNA 甲基化测序结果统计

对 SAS 和 SW 的 6 个样本进行 MethyRAD 测序和数据统计, 测序结果显示, 平均每个样本获得 184 868 782 条原始数据。对完成过滤质控的 CG 和 CWG 位点进行酶切, 共获得 55 642 471 条有效数据, 占总 reads 的 35.04%~37.49%。统计每条 scaffold 上各种酶切位点的数目, 每组有效数据平均 88.71% 可比对到脊尾白虾的参考基因组, 共有 22 633 946 条有效数据在参考基因组上有唯一比对位置, 具体测序信息见表 2。

2.2 组间甲基化位点的分布统计

根据参考基因组比对结果, 统计 6 个样品筛选到的甲基化位点数目及平均测序深度, 在 SW 组的 3 个样品中平均发现 377 441 和 64 655 个 CG 和 CWG 型 DNA 甲基化位点, 平均甲基化位点覆盖深度分别为 7.990 和 5.203 (表 3)。在 SAS 中共发现 404 893 个和 74 071 个 CG 和 CWG 型 DNA 甲基化位点, 平均甲基化覆盖率分别为 7.986 和 5.183, 每个样本 DNA 甲基化位点(CG 位点和 CWG 位点)的测序覆盖深度见表 3。此外, 与 SW 相比, SAS 中 CG 处的 DNA 甲基化水平增加了 0.05%, CWG 处的 DNA 甲基化也增加了 0.38%。这些结果表明, 对于脊尾白虾鳃组织来说, ¹⁸CG 二核苷酸的胞嘧啶上发生突变是甲基化的主要表现形式, 同时盐碱胁迫下, 脊尾白虾鳃组织基因组的甲基化水平有所升高。

表2 MethyRAD 文库测序数据统计

Tab.2 Statistics of sequencing data of MethyRAD library

组别 Group	样品 Sample	原始数据 Raw read	有效数据 Clean read				
			序列数 Reads	比例 Percent /%	有唯一比对位置的 有效数据 Uniquely mapped	发生多处比对的 有效数据 Multiple mapped	总比对率 Total mapped ratio /%
SAS	SAS-1	258013252	56 801 958	37.31	3 965 172	48 917 135	93.10
	SAS-2	202778144	55 726 626	36.77	3 906 407	47 987 465	93.12
	SAS-3	167325972	53 840 219	35.04	3 774 226	46 421 647	93.23
SW	SW-1	171218800	56 649 706	36.95	4 073 188	48 718 005	93.19
	SW-2	159829202	54 588 993	35.48	2 986 379	33 270 835	66.42
	SW-3	150047320	56 247 324	37.49	3 928 574	48 500 524	93.21

根据甲基化位点的位置信息, 对位点进行注释, 发现这些 DNA 甲基化位点主要分布在 5'端的核酸区、外显子、基因区、基因间区、内含子、剪接位点、3'端的核酸区域, CG 型甲基化位点在不同功能元件

上的分布数量均显著多于 CWG 型, 但 CG 和 CWG 两种类型位点的分布趋势基本一致, 基因间区中分布的甲基化位点比例最高, 其次是内含子区。总之, 盐碱胁迫导致基因组功能组成元件中 CG 和 CWG 位点

分布具有重叠变化(图 2)。统计 reads 在转录起始位置(TSS)上下游各 2 kb 区段, 转录终止位置(TTS)上下游各 2 kb 区段和基因体的分布趋势, 结果发现各个样品之间的 DNA 甲基化水平趋势是相似的, DNA 甲基化位点多分布在基因体, DNA 甲基化位点分布曲线在 TSS 的下游序列和 TTS 的上游序列甲基化标签频率明显高于其他序列(图 3)。

2.3 差异甲基化位点表达分析

测序深度信息进行标准化处理后, 分别筛选到 8189 个和 616 个 CG 型差异甲基化位点(CG-DMSs) 和 CWG 型差异甲基化位点(CWG-DMSs) (图 4)。CG-DMS 和 CWG-DMS 大多数分布在基因间区和内

含子区, DMS 在不同功能元件上的分布详情见图 5A 和 B。可以看出 CG-DMS 的数目显著多于 CWG-DMS, 基因间区和内含子区筛选到的 DMS 占较大比例。

2.4 位点水平的甲基化差异分析

对 DMS 所在的差异表达基因(DEG)进行 GO 功能富集分析, 分析了 CG 和 CWG 甲基化水平中 DEG 最显著丰富的前 30 条 GO terms。分析基于筛选 3 个类别中具有 2 个以上不同表达位点相关基因的 GO 条目, 根据每个条目对应的 $-\lg_{10}P$ 从大到小排序 10 个, 分为生物过程、细胞成分和分子功能。在 CG-DEG 中, 最显著富集的 GO term 包括 RNA 剪接(RNA splicing)、剪接体复合体(spliceosomal complex)和 ATP

表 3 甲基化位点数据及其深度统计
Tab.3 Statistics of methylation site data and depth

组别 Group	样品 Sample	CG site		CWG site	
		CG 位点数目 CG site number	CG 位点深度 CG site depth	CWG 位点数目 CWG site number	CWG 位点深度 CWG site depth
SAS	SAS-1	407 998	8.110	73 021	5.390
	SAS-2	398 533	8.160	72 723	5.350
	SAS-3	408 149	7.700	76 468	4.870
	Average	404 893	7.990	74 071	5.203
SW	SW-1	405 236	8.430	70 612	5.370
	SW-2	322 023	7.410	54 962	4.890
	SW-3	405 064	8.120	68 390	5.290
	平均 Average	377 441	7.986	64 655	5.183
总和 Total		2 347 003		416 176	

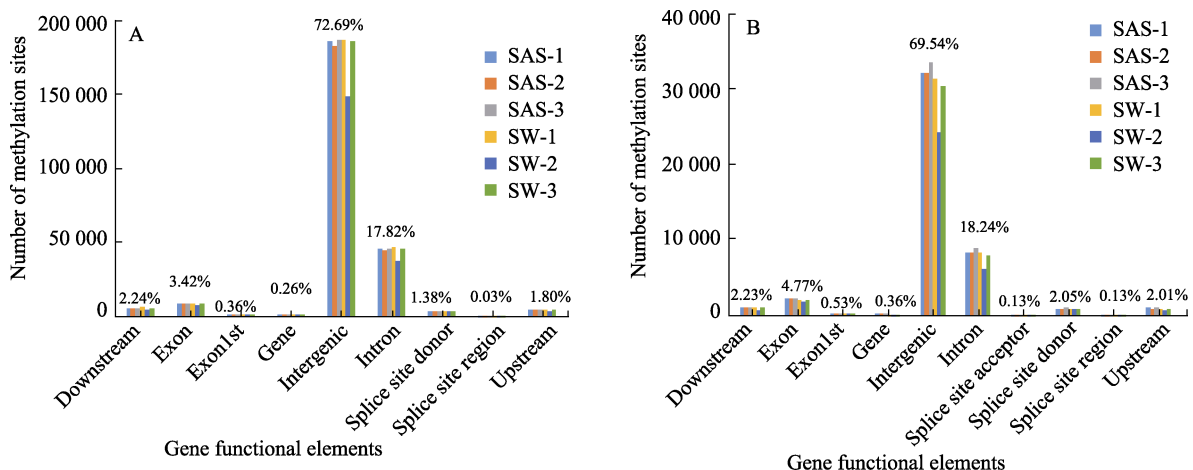


图 2 甲基化位点在不同基因功能元件上的分布
Fig.2 Distribution of methylation sites on different gene functional elements

A: CG 位点的分布; B: CWG 位点的分布
A: Distribution of CG methylation site; B: Distribution of CWG methylation site

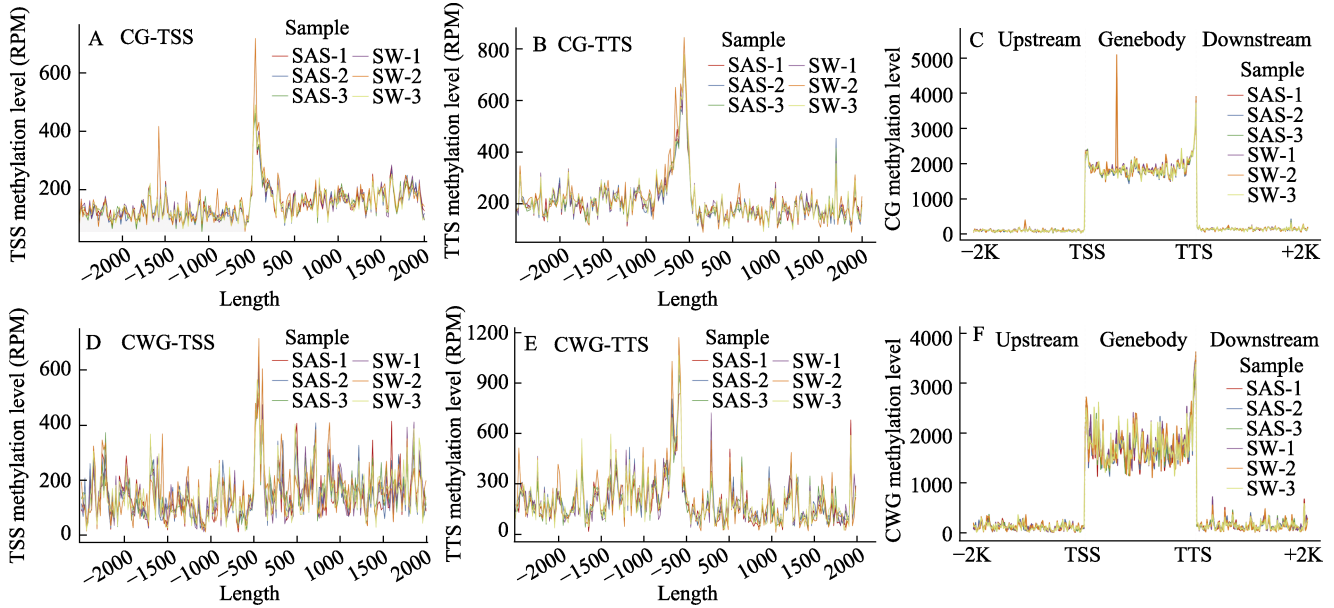


图3 甲基化位点在 TSS、TTS 和 Genebody 的分布
 Fig.3 Distribution of methylation sites in TSS, TTS, and Genebody regions

A: CG 位点在 TSS 的分布; B: CG 位点在 TTS 的分布; C: CG 位点在 TSS、TTS 和 Genebody 的分布;

D: CWG 位点在 TSS 的分布; E: CWG 位点在 TTS 的分布; F: CWG 位点在 TSS、TTS 和 Genebody 的分布

A: Distribution of CG sites in TSS; B: Distribution of CG sites in TTS; C: Distribution of CG sites in TSS, TTS, and Genebody;
 D: Distribution of CWG sites in TSS; E: Distribution of CWG sites in TTS; F: Distribution of CG sites in TSS, TTS, and Genebody

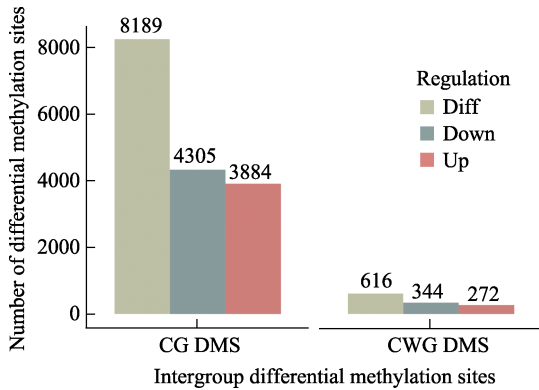


图4 差异甲基化位点统计

Fig.4 Statistical of differential methylation sites

依赖的 5'-3'DNA 解旋酶活性(ATP-dependent 5'-3' DNA helicase activity) (图 6A)。CWG-DEG 的 GO 富集分析结果表明,生物过程、细胞成分和分子功能中最显著富集的 GO term 分别是上皮细胞迁移,开放性气管系统(epithelial cell migration, open tracheal system)、中心体(centrosome)和蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性(protein serine/threonine kinase activity)(图 6B)。

KEGG 通路分析用于筛查 DEG 在 CG 和 CWG 甲基化水平上的生物学通路和信号转导。图 7 显示了 CG-DMG 富集到的前 20 个 KEGG 通路。结果显示,CG-DMG 在 HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)、剪接体(spliceosome)、孕酮介导的卵母细胞成熟

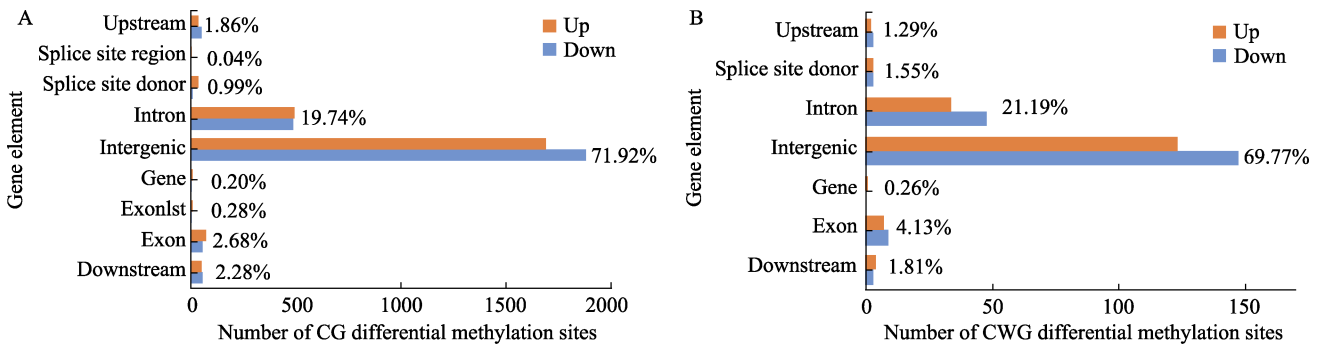


图5 差异甲基化位点在不同基因功能元件上的分布

Fig.5 Distribution of differential methylation sites on different gene functional elements

A: CG 位点的分布; B: CWG 位点的分布

A: Distribution of CG methylation site; B: Distribution of CWG methylation site

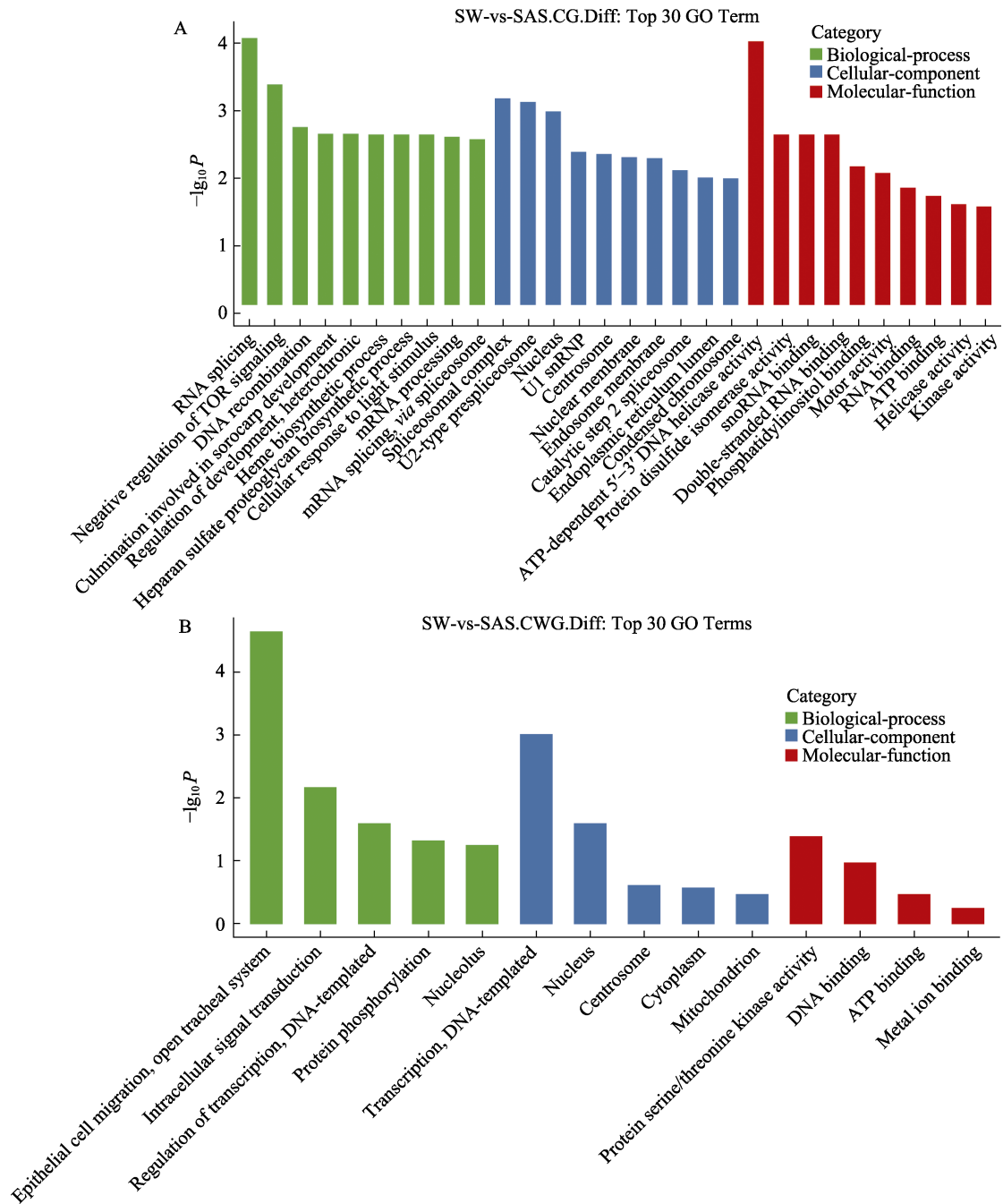


图 6 CG 和 CWG 以及上调和下调差异甲基化位点所在基因的前 30 个 GO 功能条形图
 Fig.6 Bar chart of the top 30 GO functions of the gene where CG and CWG up and downregulated differential methylation sites are located

A: CG 位点 DEG 的 GO 分类前 30; B: CWG 位点 DEG 的 GO 分类前 30

A: The top 30 GO classification of the DEGs at the CG site; B: The top 30 GO classification of the DEGs at the CWG site

(progesterone-mediated oocyte maturation)、卵母细胞减数分裂(oocyte meiosis)和细胞周期(cell cycle)通路显著富集(图 7A)。下调 DEG 在富集剪接体通路,而上调 DEG 在 HIF-1 信号通路、孕酮介导的卵母细胞成熟、卵母细胞减数分裂、细胞周期和 cAMP 信号通路(cAMP signaling pathway)显著富集(图 7B, C)。HIF 脯氨酰羟化酶(*hif-p*)、己糖激酶(*hk*)、丝氨酸/苏氨酸

蛋白激酶 mTOR 样(*mTOR*)和溶质载体家族 2 (促进葡萄糖转运蛋白)成员 1 (*slc2a1*)在 HIF-1 信号通路中显著富集上调表达(表 4)。细胞分裂周期 5 样蛋白(*cdc5*)、U1 小核核糖核蛋白(*snrp70*)、前 mRNA 处理因子(*prp19*)、剪接因子(*sf3b1*)、WW 结构域结合蛋白(*wbp11l*)基因参与剪接体途径且显著下调表达(表 4)。

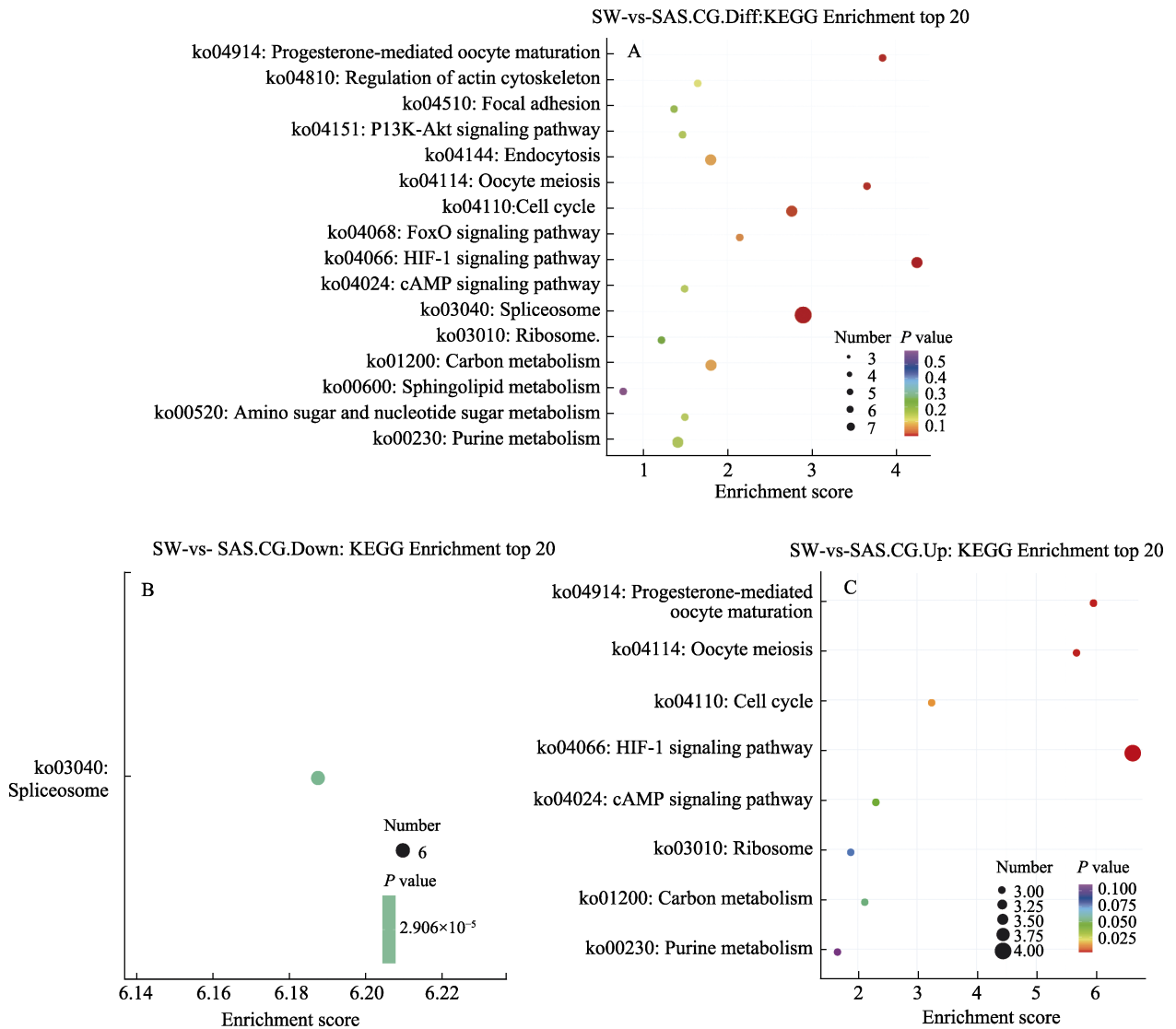


图 7 CG 差异甲基化位点所在基因的前 20 条 KEGG 富集分析

Fig.7 Top 20 KEGG enrichment analyses of the genes where the CG differential methylation sites are located

A: CG 差异甲基化位点的 KEGG 富集分析 top 20; B: 下调表达 CG 差异甲基化位点的 KEGG 富集分析 top 20; C: 上调表达 CG 差异甲基化位点的 KEGG 富集分析 top 20

A: The top 20 KEGG enrichment analyses of the CG-DEG; B: The top 20 KEGG enrichment analyses of down-regulated expression of CG-DEG; C: The top 20 KEGG enrichment analyses of up-regulated expression of CG-DEG

表 4 HIF-1 信号通路和剪切体通路中差异表达基因

Tab.4 Differentially expressed genes of HIF-1 signaling pathway and spliceosome

ID	KEGG 通路	P	DEG 差异表达基因	log ₂ Fold Change
ko04066	HIF-1 信号通路 HIF-1 signaling pathway	0.001 95	HIF 脯氨酰羟化酶(<i>hif-p</i>)	1.438
			己糖激酶(<i>hk</i>)	1.054
			丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 mTOR 样(<i>mTOR</i>)	1.157
			溶质载体家族 2(促进葡萄糖转运蛋白)成员 1-样(<i>slc2a1</i>)	1.855
ko03040	剪切体 Spliceosome	0.002 39	细胞分裂周期 5 样蛋白(<i>cdc5</i>)	-4.385
			U1 小核糖核蛋白 70kDa 样(<i>snrp70</i>)	-2.386
			前 mRNA 处理因子 19 样(<i>prp19</i>)	-5.462
			剪接因子 3B 亚单位 1 样亚型 X1(<i>sf3b1</i>)	-3.760
			WW 结构域结合蛋白 11 样(<i>wbp11</i>)	-4.831

2.5 基因水平的甲基化差异分析

对不同比较组间的差异表达甲基化位点所在基因进行统计, 差异甲基化基因数目见图 8。CG 位点共注释到 12 892 个表达甲基化基因, 其中筛选到

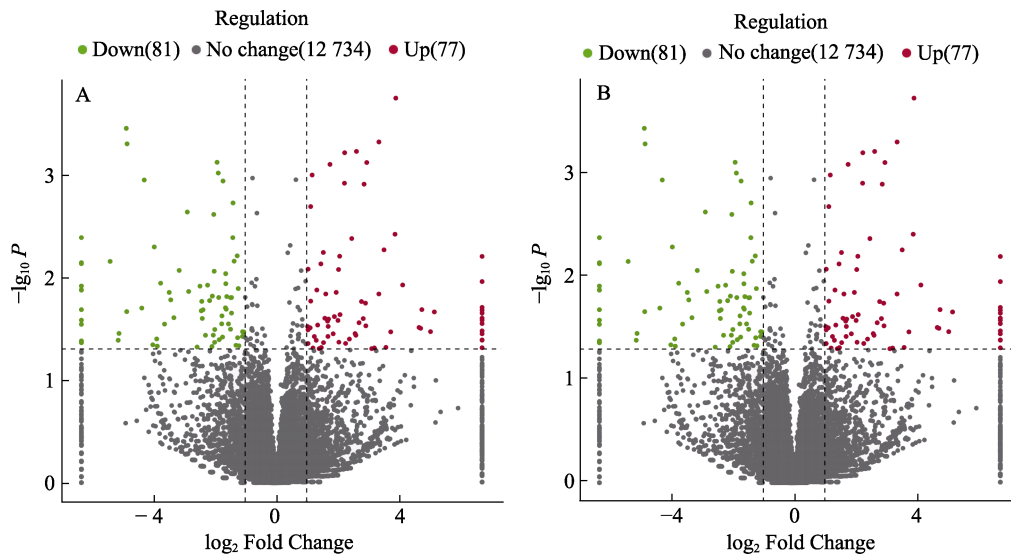


图 8 组间差异甲基化基因火山图

Fig.8 Volcano map of differentially methylated genes between groups

A: CG 型差异甲基化基因分布; B: CWG 型差异甲基化基因分布
A: Distribution of CG-DMG; B: Distribution of CWG-DMG

通过对差异甲基化基因进行 GO 功能富集, 对基因的功能进行描述。GO 富集分析前 30 如图 9 所示: CG-DMG 在肌肉组织发育(muscle organ development)过程显著富集(图 9A); CWG-DMG 在囊泡介导的转运(vesicle-mediated transport)、细胞膜(membrane)和铁离子结合(zinc ion binding)等离子转运过程中显著富集(图 9B)。

CG-DMG 共富集到 39 条显著富集 KEGG 通路 ($P < 0.05$), 可分为 5 类, 包括 cellular processes (4 条)、environmental information processing (6 条)、genetic information processing (2 条)、metabolism (16 条)和 organismal systems (11 条)(图 9C)。发现 41% 的相关基因与代谢过程(16 条)相关, 其中脂质代谢通路(6 个)中富集到的基因数目最多(图 9C)。CWG-DMG 富集到 21 条 KEGG 通路, 与 CG 型不同的是, CWG 型缺少 genetic information processing 条目, 大部分基因与生物过程(6 条)相关, 但信号转导通路(4 个)中富集到的基因数目最多(图 9D)。

2.6 组间差异甲基化位点在差异甲基化基因上的分布

对 2 组 DMS 和 DMG 进行比对分析, 196 个 CG-

158 个 CG 型差异甲基化基因(CG-DMGs), 包括 77 个(48.73%)上调表达和 81 个(51.27%)下调表达; CWG 位点注释到 8666 个甲基化基因, 其中 94 个显著差异表达, 上调基因 33 个(35.11%), 下调基因 61 个(64.89%)。与 DMS 表达相同, 下调表达基因多于上调表达。

DMSs 对应到 125 个 CG-DMGs 上, 36 个 CWG-DMSs 比对到 34 个 CWG-DMGs (表 5)。基因和甲基化位点表达大部分呈正相关, 但有一少部分位点与基因呈负相关。共 13 个 CG-DMSs 与对应的 9 个 CG-DMGs 呈负相关, 其中, 有 8 个 CG-DMSs 高甲基化而基因表达下调, 5 个 CG-DMSs 低甲基化而基因表达上调, 只有 2 个 CWG-DMSs 与对应的 2 个 CWG-DMGs 呈负相关, 均是高甲基化而基因下调表达(表 6)。对所筛选到的负相关的甲基化位点所在功能元件进行统计, 发现 CG-DMS 和 CWG-DMS 绝大部分分布在基因间区, 仅有 1 个 CG-DMS 分布在内含子区, 具体详情见表 6。

2.7 qRT-PCR 验证

为了验证 MethylRAD-seq 检测到的 DMS 所在 DEG 的甲基化水平变化及其在盐碱环境下基因表达水平之间的相关性, 利用 qRT-PCR 分析评估了与 HIF-1 信号通路、剪接体、孕酮介导的卵母细胞成熟、卵母细胞减数分裂和细胞周期通路相关的 12 个 DEGs。结果显示, 这些基因存在显著差异表达: *slc2a1*、*hif-p*、*mTOR*、*hk*、*cpeb2* 和 *plk1* 上调表

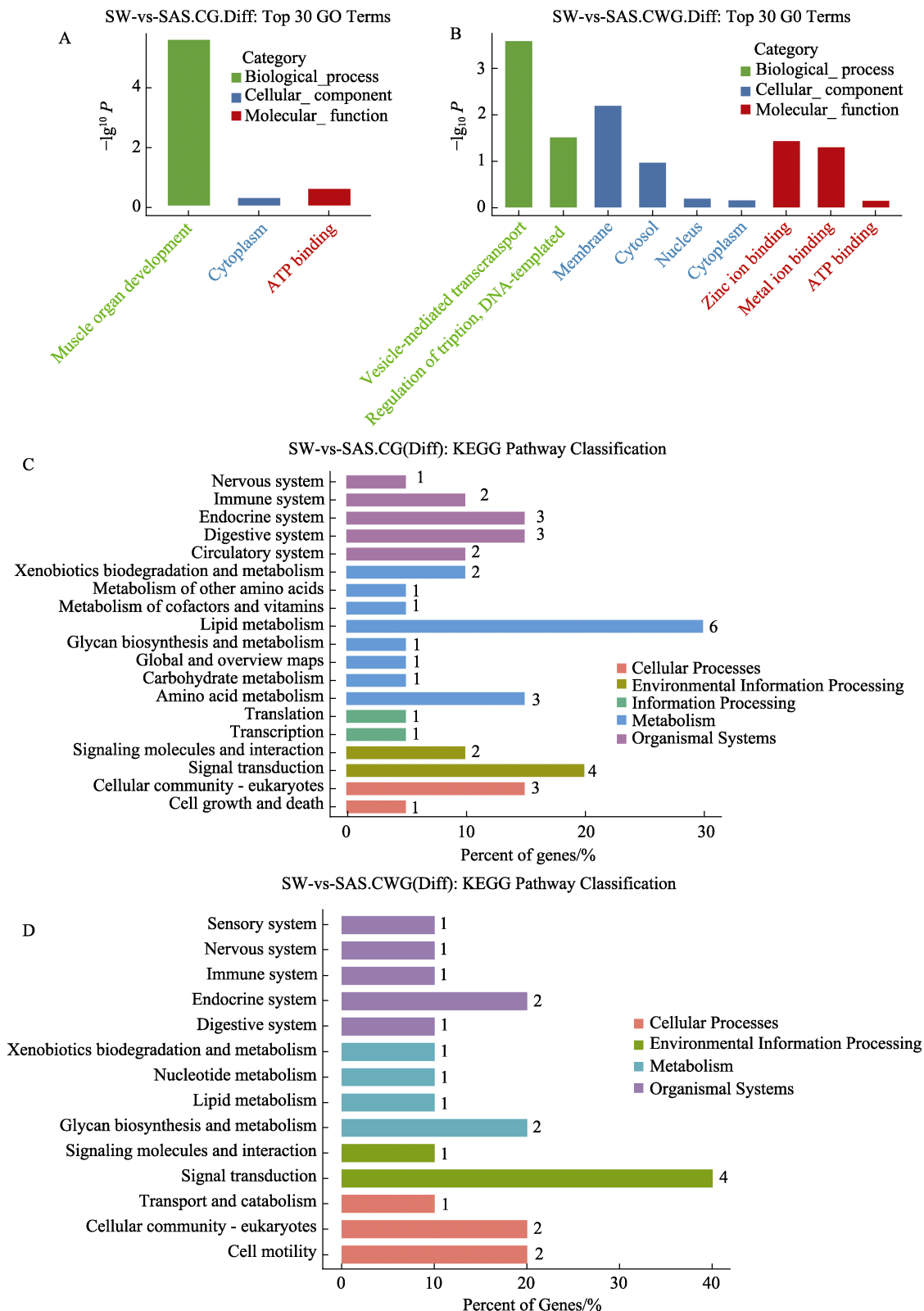


图 9 差异甲基化基因的 GO 功能和 KEGG 通路富集

Fig.9 KEGG pathway enrichment of differentially methylated genes

- A: CG 型差异甲基化基因的 GO 分类; B: CWG 型差异甲基化基因的 GO 分类;
 C: CG 型差异甲基化基因的 KEGG 富集通路; D: CWG 型差异甲基化基因的 KEGG 富集通路
 A: GO functional classification of CG-DMG; B: GO functional classification of CWG-DMG;
 C: KEGG pathway enrichment of CG-DMG; D: KEGG pathway enrichment of CWG-DMG

表 5 差异甲基化位点映射到差异甲基化基因的数量统计
Tab.5 Quantitative statistics of differential methylation sites mapped to differential methylation genes

项目 Project	CG 位点 CG site		CWG 位点 CWG site	
	总数	有对应比对位置的数量	总数	有对应比对位置的数量
	Total number	Number of mapped	Total number	Number of mapped
差异甲基化位点 Differential methylation genes	8189	196	616	36
差异甲基化基因 Differential methylation sites	158	125	94	34

表 6 差异甲基化位点与差异甲基化基因呈负相关的基因
Tab.6 Genes with negative correlation between differential methylation sites and differential methylation genes

描述 Description	DMG		DMS		
	Gene ID	表达 Regulation	Site ID	表达 Regulation	区域 Region
CG 解整合素金属蛋白酶 17 ADAM17 protein	000381Fc001671	up	000381F-936652	down	内含子区 Intron
类纤维囊蛋白 Fibrocystin-L-like	000395Fc001730	up	000395F-166381	down	基因间区 Intergenic
细胞色素 P450 Cytochrome P450 2L1-like	002552Fc007693	up	002552F-62412	down	基因间区 Intergenic
预测蛋白 C7M84_002415 Hypothetical protein C7M84_002415	000573Fc002374	up	000573F-136638	down	基因间区 Intergenic
预测蛋白 Hypothetical protein	000936Fc003579	up	000936F-434665	down	基因间区 Intergenic
Fem-1c 蛋白 Fem-1-like C protein	000598Fc002505	down	000598F-317610	up	基因间区 Intergenic
			000598F-450009	up	基因间区 Intergenic
膜金属内肽酶样 1 X2 亚型 Membrane metallo-endopeptidase-like 1 isoform X2	000946Fc003607	down	000946F-237291	up	基因间区 Intergenic
			000946F-238732	up	基因间区 Intergenic
			000946F-543189	up	基因间区 Intergenic
			000946F-545343	up	基因间区 Intergenic
预测非特征蛋白 LOC108670558 Predicted: Uncharacterized protein LOC108670558	001956Fc006376	down	001956F-434970	up	基因间区 Intergenic
钾通道亚家族 K 成员 18 Potassium channel subfamily K member 18-like	004352Fc010744	down	004352F-241655	up	基因间区 Intergenic
CWG 非特征蛋白 LOC113800830 Uncharacterized protein LOC113800830	002598Fc007765	down	002598F-151320	up	基因间区 Intergenic
非特征蛋白 LOC113811415 Uncharacterized protein LOC113811415	005861Fc012964	down	005861F-30651	up	基因间区 Intergenic

达; *stag2*、*snrp70*、*sf3b1*、*wbp11l*、*cdc5* 和 *prp19* 下调表达。长期盐碱水养殖环境使脊尾白虾鳃组织

中这些基因的 DNA 甲基化状态发生显著变化 (图 10)。

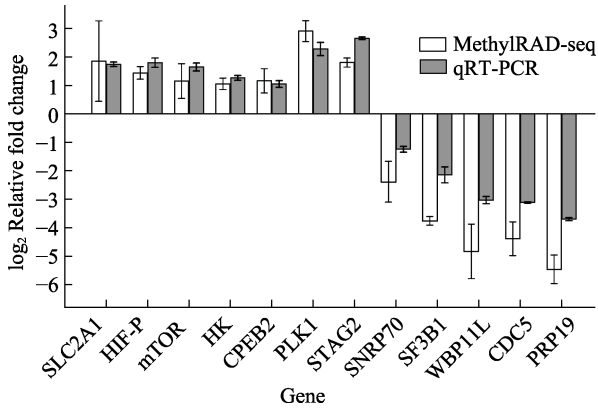


图 10 KEGG 富集途径中差异表达基因的 qRT-PCR 结果
Fig.10 qRT-PCR results of DEGs in the KEGG enrichment pathways

3 讨论

DNA 甲基化对真核生物生长发育至关重要,包括调节配子的形成、早期胚胎发育、细胞分化、衰老和致癌等关键过程(Varriale *et al.*, 2006; 蔡影等, 2018)。无脊椎动物的整体基因组胞嘧啶甲基化水平较低,甲壳类动物和昆虫相比其他无脊椎动物如软体动物的胞嘧啶甲基化水平更低(Gavery *et al.*, 2013)。本研究中,通过对正常海水养殖和长期盐碱水养殖的脊尾白虾鳃组织构建 DNA 甲基化文库,利用 MethylRAD 测序,发现了一些可能与脊尾白虾鳃组织响应盐碱胁迫的差异甲基化位点及其相关基因和差异甲基化基因。结果显示, SAS 组鳃组织基因组中 CG 和 CWG 位点略有增加,表明盐碱水环境诱导脊尾白虾鳃组织基因组中 DNA 甲基化升高,通过激活或抑制某些通路的表达来适应盐碱环境,在脊尾白虾适应外界环境的变化中发挥着非常重要的作用。环境变化总能引起水生生物 DNA 甲基化的变化,研究发现,水环境中化合物和温度等外界环境变化能够引起斑马鱼(*Danio rerio*)和仿刺参(*Apostichopus japonicus*) DNA 甲基化水平升高(陈宏姍等, 2016; Yang *et al.*, 2020)。随着环境条件的变化,水生生物 DNA 甲基化的水平可能出现趋势性变化,例如,随着干露胁迫时间的增长,太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)基因组甲基化水平呈现先增高后降低的趋势;斑马鱼 ZF4 细胞在短期低温培养时基因组 DNA 甲基化水平明显增高,但长期低温培养后 DNA 甲基化水平反而下降(张鑫等, 2017; 侯艳雯等, 2019)。也有研究表明,高温胁迫使得仿刺参、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)和近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*) CG 平均甲基化水平显著降低(温争争等, 2021; 吴彪等, 2016; 王翠丽等,

2019)。之前的研究发现,CG 位点在各种物种中显示出较高水平,范围从虾夷扇贝约 89.5%到仿刺参约 91%(吕佳, 2013; 李玉强等, 2018)。除 CG 外, CWG 甲基化在基因内并不常见,但在基因组的基因间和内含子区域中更为丰富(Lister *et al.*, 2009)。本研究中,甲基化位点水平相对定量结果显示,脊尾白虾 CG 型甲基化与其他海洋无脊椎动物类似,是甲基化主要的表现形式。

DNA 甲基化水平根据基因组功能元件的不同而变化,且在基因组的基因间区和内含子区域中更为丰富。研究表明, DNA 甲基化的分布主要分布在基因间、外显子、内含子、下游和上游区域(Saha *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021)。此外,大量研究发现,脊椎动物甲基化位点主要在启动子区(promoter)分布,启动子区 CG 型甲基化水平决定转录水平结果(Xu *et al.*, 1999; Yoder *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2019; 齐云峰等, 2019)。但海洋无脊椎动物香港巨牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)、仿刺参等甲基化位点在基因间区和内含子区中更丰富(Rajan *et al.*, 2021; 李玉强等, 2018; 李欣容, 2022)。这与本研究中 CG 和 CWG 位点在不同功能元件中的分布结果相一致。同样,本研究中,基因体的甲基化水平高于 TSS 和 TTS。DNA 甲基化会形成不易去除的局部异染色质化状态,表明基因体具有相对稳定的染色体结构,抑制转录水平的进行。基因启动子区通常位于 TSS 的上游,负责基因的表达调控(Jiang *et al.*, 2019)。在人(*Homo sapiens*)体组织中的研究表明, TSS 下游区域的甲基化是基因表达的高度信息。本研究中,甲基化水平高峰期明显处于 TSS 区下游,进一步推测脊尾白虾基因间区 CG 型甲基化水平的高低可能影响基因在转录水平的表达,并且对转录水平抑制表达有着重要作用。在位点水平上对 DEG 进行 GO 分析发现,这些基因主要分为 3 类 GO terms,包括生物过程、细胞成分和分子功能。这些功能包括 RNA 剪接、DNA 重组转录调控和 DNA 模板,表明盐碱胁迫诱导的甲基化变异抗性基因(Ackah *et al.*, 2022)。进一步对 DEG 进行 KEGG 途径富集分析表明, HIF-1 信号通路、孕酮介导的卵母细胞成熟、卵母细胞减数分裂、细胞周期和剪接体途径在脊尾白虾鳃组织的盐碱胁迫响应中起关键作用。

鳃是水生动物氧气运输、渗透压调节、离子转运、酸碱调节等的主要组织,环境因子如盐度、pH、低氧等均可能造成鳃组织损伤,从而影响呼吸和离子转运等功能(Nikinm, 2014)。缺氧诱导因子 1(HIF-1)是一种碱性螺旋-环-螺旋-PAS 结构域转录因子,能够调控机体对环境适应性应答(杨梦思等, 2016)。另外,

HIF-1 可增强氧气供给并介导低氧适应性反应。以往的研究发现, 脊尾白虾在低溶氧环境下易诱导 HIF 产生, 从而刺激血液氧的供应能力(曹梅等, 2021)。高盐碱胁迫会改变机体的渗透压和酸碱平衡, 机体不仅能通过离子调控、应激蛋白合成等维持, 也会产生自我调节机制适应环境胁迫(王楠等, 2015)。在高盐胁迫下, 水生生物同样易产生氧化应激及渗透压失衡, Bal 等(2021)观察到高盐水环境中印度囊鳃鲶(*Heteropneustes fossilis*)血红蛋白含量显著下降, 耗氧率升高。在高碱度下, 水环境无法维持罗非鱼机体中足够的溶解氧水平, 最终导致死亡, 若能保持水中充足氧含量, 在高碱度下生物死亡率不会增加(Colt *et al.*, 2013)。本研究发现, *hif-p*、*hk*、*mTOR* 和 *slc2a1* 在 HIF-1 信号通路中显著富集上调表达。*hk* 作为一种转移酶, 能够催化葡萄糖的磷酸化, 这是葡萄糖代谢的第一步, 并能抑制 ADP (Majewski *et al.*, 2004)。*mTOR* 属于磷脂酰肌醇 3-激酶相关激酶蛋白家族, 能够促进物质代谢, 参与细胞凋亡、生长、增殖和运动, 调节蛋白质合成和转录(Sarbassov *et al.*, 2005)。同时, qRT-PCR 结果显示, 基因的表达水平同甲基化水平均显著上调, 这意味着 *hif-p*、*hk*、*mTOR* 和 *slc2a1* 可通过保持高甲基化水平促进其相应靶基因表达以响应盐碱胁迫。

剪接体是由大量蛋白质和小核 RNA 组成的大型核糖核蛋白复合物, 主要存在于真核细胞的细胞核中, 是一种在转录后的初级转录物(Marondedze *et al.*, 2020)。本研究中, *cdc*、*snrp70*、*prp19*、*sf3b1* 和 *wbp111* 参与剪接体途径并且显著下调表达, 这意味着盐碱胁迫减少了 RNA 过程和蛋白质合成通路。进一步表明, 盐碱胁迫可能通过减少 RNA 的合成, 降低鳃组织的代谢速率以及参与 RNA 剪接的基因的甲基化状态来抑制 RNA 剪接。总之, 这些结果表明, DNA 甲基化可能调节了以上基因以响应盐碱胁迫。我们推测脊尾白虾由于长期生活在盐碱环境, DNA 甲基化水平变化在响应盐碱胁迫中发挥重要作用, 盐碱胁迫致使 HIF-1 信号途径增强, 同时抑制了剪接体的表达, 从而进化出独特的生存机制。

基因水平的 GO 和 KEGG 富集结果表明, 盐碱胁迫不仅影响细胞的生长发育, 还与离子转运有关, 表明脊尾白虾对盐碱有较强的适应性。同时, 本研究发现一些差异甲基化基因在一些信号通路中富集。离子转运相关基因在许多生理功能和细胞过程中影响不同的渗透调节(Cao *et al.*, 2019; Si *et al.*, 2019; Zimmer *et al.*, 2021)。另外, 水生动物对外部非生物环

境的适应不仅有内在的调节, 而且取决于能量的支持(Song *et al.*, 2021; Su *et al.*, 2020; Root *et al.*, 2021)。脊尾白虾因长期盐碱胁迫而导致脂质过氧化和生理代谢的变化, 本研究中能量代谢通路和脂质代谢通路显著富集, 推测脊尾白虾通过调节鳃组织 DNA 甲基化水平对能量代谢通路和脂质代谢通路的影响适应盐碱水环境。

解整合素金属蛋白酶 17 (ADAM17 protein, ADAM17)是一种跨膜金属蛋白酶, 能够参与多种蛋白质胞外域脱落, 具有黏附和蛋白水解特性, 参与细胞分子、生长因子受体及表皮生长因子受体过程, 在膜结合型蛋白的翻译后修饰中发挥关键作用(王超男等, 2016; Li *et al.*, 2015)。盐碱胁迫后 ADAM17 可能通过低甲基化促进膜结合型蛋白的翻译后修饰, 促进质膜对胞内环境的维持。类纤维囊蛋白(fibrocystin-L-like, FPC-L)是一个单次跨膜的受体样蛋白, 含有一个潜在蛋白激酶 C 磷酸化位点, 胞外区存在被高度糖基化的可能(连培文等, 2011)。盐碱胁迫下脊尾白虾鳃组织中 FPC-L 可能发生糖基化, 对翻译后蛋白进行了修饰, 从而适应盐碱环境。细胞色素 P450 (cytochrome P450 2L1-like, CYP450)主要分布在内质网和线粒体内膜上, 能够参与环境化合物在内的外源性物质(在类固醇/甾醇)的代谢(Ventura *et al.*, 2017)。盐碱水环境中, CYP450 可能诱导脊尾白虾鳃组织细胞凋亡, 内质网和线粒体相关的凋亡途径可能发挥了重要的作用。本研究中, 我们发现 ADAM17、FPC-L 和 CYP450 呈现出低甲基化状态。然而, 对应的差异甲基化基因却显示表达水平在盐碱环境下显著升高, 这表明 DNA 甲基化可能通过激活蛋白激酶和防御化合物来诱导脊尾白虾中 ADAM17、FPC-L 和 CYP450 的调节以适应盐碱水环境。

4 结论

本研究通过对正常海水养殖和长期盐碱水养殖脊尾白虾的甲基化水平比对分析发现, 盐碱水环境下 DNA 甲基化水平略有增强, 甲基化位点丰富呈现在基因间区和内含子区域并且在 TSS 区下游出现甲基化水平高峰期。分析了脊尾白虾鳃组织在 2 种养殖水环境中位点和基因水平的富集通路及组间 DMS 和 DMG 的表达情况, 提示 *hif-p*、*hk*、*mTOR* 和 *slc2a1* 基因共同参与的 HIF-1 信号通路和 *cdc*、*snrp70*、*prp19*、*sf3b1* 和 *wbp111* 基因共同参与的剪接体通路可能在脊尾白虾盐碱水环境适应中发挥重要作用。进一步研究参与 HIF-1 信号通路和剪接体通路的基因

表达情况,为揭示脊尾白虾盐碱水环境适应机制提供新的见解。位点水平和基因表达呈负相关的 ADAM17、FPC-L 和 CYP450 可作为后期解析脊尾白虾盐碱水环境下表观调控的重点研究对象。因此,该研究将为揭示盐碱水环境对脊尾白虾的影响提供新的理论依据。

参 考 文 献

- ACKAH M, GUO L, LI S, *et al.* DNA methylation changes and its associated genes in mulberry (*Morus alba* L.) Yu-711 response to drought stress using MethylRAD sequencing. *Plants* (Basel), 2022, 11(2): 190
- AROOJ F, SADDAM H, SADAM H, *et al.* Differential morphophysiological, biochemical, and molecular responses of maize hybrids to salinity and alkalinity stresses. *Agronomy*, 2021, 11(6): 1150
- BAL A, PATI S G, PANDA F, *et al.* Low salinity induced challenges in the hardy fish *Heteropneustes fossilis*: Future prospective of aquaculture in near coastal zones. *Aquaculture*, 2021, 543(8): 737007
- BOERS R, BOERS J, HOON B D, *et al.* Genome-wide DNA methylation profiling using the methylation-dependent restriction enzyme *LpnPI*. *Genome Research*, 2018, 28(1): 88–99
- CAI Y, MENG X L, LIU P, *et al.* Molecular cloning of the DNA methyltransferase-2 gene and its expression during embryonic, larval, and gonadal development in the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(5): 928–935 [蔡影, 孟宪亮, 刘萍, 等. 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. *中国水产科学*, 2018, 25(5): 928–935]
- CAO J, SHI F. Comparative analysis of the aquaporin gene family in 12 fish species. *Animals* (Basel), 2019, 9(5): 233
- CAO M, WANG X Q, QIN C X, *et al.* Transcriptome analysis of *Palaemon carinicauda* subjected to hypoxic stress. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(2): 112–123 [曹梅, 王兴强, 秦传新, 等. 脊尾白虾对低氧响应的转录组学分析. *渔业科学进展*, 2021, 42(2): 112–123]
- CHANG Y M, LIANG L Q. Advances of research of physiological and molecular mechanisms related to alkali-saline adaptation for fish species inhabiting alkali-saline water. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(5): 798–812 [常玉梅, 梁利群. 耐盐碱鱼类的生理和分子机制研究进展. *水产学报*, 2021, 45(5): 798–812]
- CHEN H S, SHENG L X, BIAN H F. Investigation of the effects of developmental toxicity and genomic DNA methylation upon naphthalene exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Northeast Normal University (Natural Science)*, 2016, 48(3): 167–173 [陈宏姗, 盛连喜, 边红枫. 化合物萘对斑马鱼发育毒性及基因组 DNA 甲基化影响的研究. *东北师大学报(自然科学版)*, 2016, 48(3): 167–173]
- CHEN M M, ZHANG S R, WU L P, *et al.* Organic fertilization improves the availability and adsorptive capacity of phosphorus in saline-alkaline soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2020, 21(1): 487–496
- COLT J, KROEGER E. Impact of aeration and alkalinity on the water quality and product quality of transported tilapia: A simulation study. *Aquacultural Engineering*, 2013, 55(1): 46–58
- CONRADO G V, JANET H B. Effects of alkalinity and total hardness on growth and survival of postlarvae freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879). *Aquaculture*, 2017, 473: 521–527
- CRIBIU P, CHAUMOT A, GEFFARD O, *et al.* Natural variability and modulation by environmental stressors of global genomic cytosine methylation levels in a freshwater crustacean, *Gammarus fossarum*. *Aquatic Toxicology*, 2018, 205: 11–18
- FAN Z, PENG F, LI J, *et al.* Effects of α -ketoglutarate on growth performance, antioxidant capacity and ammonia metabolism against chronic carbonate alkalinity stress in Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio* Songpu). *Aquaculture Research*, 2020, 51(5): 29–40
- GAVERY M R, ROBERTS S B. Predominant intragenic methylation is associated with gene expression characteristics in a bivalve mollusc. *PeerJ*, 2013, 1: e215
- GE Q Q, LI J T, WANG J J, *et al.* Characterization, functional analysis, and expression levels of three carbonic anhydrases in response to pH and saline-alkaline stresses in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Cell Stress Chaperones*, 2019, 24(3): 503–515
- GE Q Q, LIANG J P, LI J T, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of Relish gene from the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Fisheries Science*, 2015, 81(4): 699–711
- HAN J, HU Y, QI Y, *et al.* High temperature induced masculinization of zebrafish by down-regulation of *sox9b* and *esr1* via DNA methylation. *Journal of Environmental Sciences*, 2021, 107(9): 160–170
- HAWES N A, TREMBLAY L A, POCHON X, *et al.* Effects of temperature and salinity stress on DNA methylation in a highly invasive marine invertebrate, the colonial ascidian *Didemnum vexillum*. *PeerJ*, 2018, 6: e5003
- HOU Y W, LIU W, JIANG P L, *et al.* Effect of cold stress on genomic DNA methylation in zebrafish ZF4 cells. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(2): 271–279 [侯艳雯, 刘玮, 姜蓬垒, 等. 低温对斑马鱼 ZF4 细胞基因组 DNA 甲基化水平的影响. *中国水产科学*, 2019, 26(2): 271–279]
- HUAN P P, LÜ J J, SUN D F, *et al.* 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 [环朋朋, 吕建建, 孙东方, 等. 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]
- JIANG Y, LI J, REN F, *et al.* PM2.5-induced extensive DNA methylation changes in the heart of zebrafish embryos and the protective effect of folic acid. *Environmental Pollution*, 2019, 255(3): 113331
- LAI Q F, YAO Z L, GAO P C, *et al.* Saline-alkaline water environment and suitable culture species. Beijing: China Agriculture Press, 2021 [来琦芳, 么宗利, 高鹏程, 等. 盐碱水环境与增养殖种类. 北京: 中国农业出版社, 2021]
- LI M D, LI J T, SHI K P, *et al.* Estimation of heritability and genetic correlation of saline-alkali tolerance in *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 117–123 [李明栋, 李吉涛, 史鲲鹏, 等. 脊尾白虾耐盐碱性状遗传力和遗传相关的估计. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 117–123]
- LI M Y, LI J, LIU P, *et al.* Cloning and expression analysis of ferritin gene in *Exopalaemon carinicauda*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(2): 306–312 [李美玉, 李健, 刘萍, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) ferritin 基因克隆及表达分析. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 306–312]
- LI Q, XIE J, HE L, *et al.* Identification of ADAM10 and ADAM17 with potential roles in the spermatogenesis of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Gene*, 2015, 562(1): 117–127
- LI X R, LIAO M J, LI B, *et al.* Genomic DNA methylation levels and transcriptome differences of *Apostichopus japonicus* in response to *Vibrio splendidus* infection and their association analysis. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(3): 176–185 [李欣容, 廖梅杰, 李彬, 等. 刺参响应灿烂弧菌侵染的基因组 DNA 甲基化水平和转录组差异及其关联分析. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 176–185]
- LI Y Q, WANG R J, LI Y L, *et al.* Genome-wide profiling of DNA methylation in *Apostichopus japonicus* based on MethylRAD-Seq. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2018, 48(9): 41–50 [李玉强, 王睿甲, 李语丽, 等. 基于 MethylRAD-Seq 技术对仿刺参 DNA 甲基化图谱的研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(9): 41–50]
- LI Z Q, TANG M Q, LUO D J, *et al.* Integrated methylome and transcriptome analyses reveal the molecular mechanism by which DNA methylation regulates kenaf flowering. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 709030
- LIAN P W, FU Y L, LI A, *et al.* Preparation and characterization of a polyclonal antibody against human Fibrocystin-L. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2011, 27(1): 78–81 [连培文, 付玉龙, 李奥, 等. 新基因 PKHDL71 产物 Fibrocystin-L 的抗体制备及其亚细胞定位的初步研究. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(1): 78–81]
- LISTER R, PELIZZOLA M, DOWEN R H, *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 2009, 462(7271): 315–322
- LIU F, LI J, LI J T, *et al.* Effects of carbonate alkalinity stress on the survival, growth, reproduction, and immune enzyme activities of *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 1137–1147 [柳飞, 李健, 李吉涛, 等. 碳酸盐碱度对脊尾白虾生存、生长、繁殖及免疫酶活性的影响. 中国水产科学, 2016, 23(5): 1137–1147]
- LOVETT D L, VERZI M P, CLIFFORD P D, *et al.* Hemolymph levels of methyl farnesoate increase in response to osmotic stress in the green crab, *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology*, 2001, 128(2): 299–306
- LÜ J. Establishment of an efficient and cost-effective method for genome-wide DNA methylation profiling (MethylRAD-Seq) and its application in marine bivalves. Master's Thesis of Ocean University of China, 2013 [吕佳. 高效低成本全基因组 DNA 甲基化检测技术(MethylRAD-Seq)的建立及其在海洋贝类中的应用. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]
- MAJEWSKI N, NOGUEIRA V, ROBEY R B, *et al.* Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(2): 730–740
- MARONDEDZE C, THOMAS L, LILLEY K S, *et al.* Drought stress causes specific changes to the spliceosome and stress granule components. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2020, 6: 163
- NIKINM A M. Chapter 15 – Interactions between natural environmental factors and toxicity. *An Introduction to Aquatic Toxicology*, 2014: 173–184
- NOROUZITALLAB P, BARUAH K, VANDEGEHUCHTE M, *et al.* Environmental heat stress induces epigenetic transgenerational inheritance of robustness in parthenogenetic *Artemia* model. *FASEB Journal*, 2014, 28(8): 3552–3563
- QI Y F, WANG R J, JIN T C, *et al.* Analyzing distribution patterns of epigenetic factor among different genome regions. *Journal of Northeast Normal University (Natural Science)*, 2019, 51(1): 108–112 [齐云峰, 王仁俊, 金太成, 等. 表观遗传因子在不同基因组区域的分布模式研究. 东北师大学报(自然科学版), 2019, 51(1): 108–112]
- RAJAN K C, YUAN M, YU Z, *et al.* Oyster biomineralisation under ocean acidification: From genes to shell. *Global Change Biology*, 2021, 27(16): 3779–3797
- ROOT L, CAMPO A, MACNIVEN L, *et al.* Nonlinear effects of environmental salinity on the gill transcriptome versus proteome of *Oreochromis niloticus* modulate epithelial cell turnover. *Genomics*, 2021, 113(5): 3235–3249
- SAHA D, NORVIL A B, LANMAN N A, *et al.* Simplified MethylRAD sequencing to detect changes in DNA methylation at enhancer elements in differentiating embryonic stem cells. *Epigenomes*, 2020, 4(4): 24

- SARBASSOV D D, ALI S M, SABATINI D M. Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 2005, 17(6): 596–603
- SI L J, PAN L Q, ZHANG X, *et al.* Evidence that dopamine is involved in neuroendocrine regulation, gill intracellular signaling pathways and ion regulation in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Experimental Biology*, 2019, 222(15): jeb204073
- SONG L, ZHAO Y, SONG Y *et al.* Effects of saline-alkaline water on growth performance, nutritional processing, and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 2021, 544: 737036
- SU H H, MA D M, ZHU H W, *et al.* Transcriptomic response to three osmotic stresses in gills of hybrid tilapia (*Oreochromis mossambicus* female × *O. urolepis hornorum* male). *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 110
- TAPIA D, EISSLER Y, ESPINOZA J C, *et al.* Inter-laboratory ring trial to evaluate real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods used for detection of infectious pancreatic necrosis virus in Chile. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2017, 28: 20–26
- VARRIALE A, BERNARDI G. DNA methylation and body temperature in fishes. *Gene*, 2006, 385: 111–121
- VENTURA T, BOSE U, FITZGIBBON Q P, *et al.* CYP450s analysis across spiny lobster metamorphosis identifies a long sought missing link in crustacean development. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 171: 262–269
- WANG C L. Influence of high temperature stress on Hsp90 expression and CpG methylation in *Crassostrea rivularis*. *Guangxi Sciences*, 2019, 26(4): 424–429 [王翠丽. 高温胁迫对近江牡蛎 Hsp90 表达及 CpG 甲基化的影响. *广西科学*, 2019, 26(4): 424–429]
- WANG C N, DONG J, SHAO N S. Role of ADAM17 in transmembrane protein shedding. *Journal of Medical Molecular Biology*, 2016, 13(6): 345–349 [王超男, 董洁, 邵宁生. ADAM17 在膜蛋白胞外结构域剪切机制中的作用. *医学分子生物学杂志*, 2016, 13(6): 345–349]
- WANG H, ZHONG J C, CHAI Z X, *et al.* Advances of research on interactions between hypoxia and epigenetics. *Journal of Southwest Minzu University*, 2017, 43(6): 557–561 [王会, 钟金城, 柴志欣, 等. 低氧与表观遗传学互作的研究进展. *西南民族大学学报*, 2017, 43(6): 557–561]
- WANG N, CHANG Y M, TANG R, *et al.* Screening microsatellite markers associated with alkaline tolerance in *Leuciscus waleckii*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(6): 1105–1114 [王楠, 常玉梅, 唐然, 等. 瓦氏雅罗鱼耐碱性状相关分子标记的筛选. *中国水产科学*, 2015, 22(6): 1105–1114]
- WANG S, LV J, ZHANG L L, *et al.* MethylRAD: A simple and scalable method for genome-wide DNA methylation profiling using methylation-dependent restriction enzymes. *Open Biology*, 2015, 5: 150130
- WANG X X, LI A, WANG W, *et al.* Direct and heritable effects of natural tidal environments on DNA methylation in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Environmental Research*, 2021, 197: 111058
- WEN Z Z, ZUO S, CHEN M, *et al.* DNA methylation level of genomic DNA of *Apostichopus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(3): 46–54 [温争争, 左闪, 陈梦, 等. 刺参基因组 DNA 甲基化水平及模式对温度变化的响应. *渔业科学进展*, 2021, 42(3): 46–54]
- WU B, YANG A G, SUN X J, *et al.* Effects of acute temperature stress on genome-wide DNA methylation profiles in *Patinoptecten yessoensis*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 140–146 [吴彪, 杨爱国, 孙秀俊, 等. 急性温度胁迫对虾夷扇贝基因组 DNA 甲基化的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5): 140–146]
- XU G L, BESTOR T H, BOURCHIS D, *et al.* Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*, 1999, 402(6758): 187–191
- XU W L, WANG H Q, LI Y H. Distribution and aquaculture application of saline alkali water at home and abroad. *China Fisheries*, 2021(7): 50–53 [徐文龙, 汪惠庆, 李月红. 国内外盐碱水域分布及水产养殖应用. *中国水产*, 2021(7): 50–53]
- XU Y H, XU Y C, HOGSTRAND C, *et al.* Waterborne copper exposure up-regulated lipid deposition through the methylation of GRP78 and PGC1alpha of grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 205: 111089
- XUE B, ZHANG B, LI Z H, *et al.* Methylation profile in mitochondrial genome of ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* in response to different developmental stages. *Fisheries Science*, 2017, 36(5): 628–633 [薛蓓, 张培, 李志辉, 等. 脊尾白虾不同发育期线粒体基因组甲基化特征分析. *水产科学*, 2017, 36(5): 628–633]
- YANG F Y, SUN L M, YANG X Q. Toxicity of carbonate alkalinity to *Penaeus vannamei* juveniles. *Fisheries Science*, 2004, 23(9): 3–6 [杨富亿, 孙丽敏, 杨欣乔. 碳酸盐碱度对南美白对虾幼虾的毒性作用. *水产科学*, 2004, 23(9): 3–6]
- YANG M S, ZHOU N, WANG Z G, *et al.* Research progress on the role of transcription factor HIF-1 α and its signal pathway in the pathogenesis. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(8): 8–13 [杨梦思, 周娜, 王志钢, 等. 转录因子 HIF-1 α 及其信号通路在疾病发生中的作用研究进展. *生物技术通报*, 2016, 32(8): 8–13]
- YANG Y, ZHENG Y, SUN L, *et al.* Genome-wide DNA methylation signatures of sea cucumber *Apostichopus japonicus* during environmental induced aestivation. *Genes*, 2020, 11(9): 1020
- YODER J A, WALSH C P, BESTOR T H. Cytosine methylation

- and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics*, 1997, 13(8): 335–340
- ZHANG J F. Discussion on ecological rehabilitation of salt-affected soils. *Research of Soil and Water Conservation*, 2008, 4: 74–78 [张建锋. 盐碱地的生态修复研究. 水土保持研究, 2008, 4: 74–78]
- 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. 干露胁迫对太平洋牡蛎基因组 DNA 甲基化的影响. 中国水产科学, 2017, 24(4): 690–697]
- ZIMMER A M, MANDIC M, HONG M Y, *et al.* Use of a carbonic anhydrase Ca17a knockout to investigate mechanisms of ion uptake in zebrafish (*Danio rerio*). *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2021, 320(1): R55–R68

(编辑 冯小花)

Effects of Saline-Alkaline Water Environment on DNA Methylation of *Exopalaemon carinicauda*

QIN Zhen^{1,2}, LI Jitao^{2①}, LI Mingdong², WANG Jiajia², GE Qianqian², LIU Ping², LI Jian²

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

Abstract The global levels of soil and water salinization and alkalization are increasing with the influence of climate and topography changes, as well as other natural and human factors. Saline-alkaline water (SAW) all over the world has specific characteristics such as high alkalinity, high pH, and complex water quality types, which inhibits the survival and culture of common aquatic animals. The ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* is an economically important marine shrimp with many advantages, such as widely environmental adaptability, rapid growth, and good reproductive capability. It is potentially suitable for large-scale culture in SAW; however, its adaptability to this environment remains unclear. Exploring the *E. carinicauda* adaptability mechanism to SAW will help to guide culture management for marine crustaceans. In this study, the DNA methylomes of the *E. carinicauda* gill tissue cultured in SAW and normal seawater (SW) were analyzed and the impact on gene regulation was investigated by MethylRAD sequencing. The results showed 2 347 003 and 416 176 methylations at the CG and CWG sites (W = A or T), respectively. Comparing the SAW and SW groups, the CG and CWG loci in the SAW group increased slightly, indicating that SAW induced more DNA methylation in the gill cells that activated or inhibited pathways and played a crucial role in the environmental changes adaption. Methylation was prevalent in the exon, intron, splice site, and upstream and downstream regions of the *E. carinicauda* gill genes, as well as in the intergenic regions. DNA methylation sites were mostly distributed in the Genebody. The DNA methylation distribution curve peaked in the downstream sequence of the transcription start site and upstream sequence of the transcription termination site. The methylation label frequency was significantly higher in these regions in relation to other sequences. A total of 8805 differential methylation sites (DMSs) were screened, including 8189 CG DMSs and 616 CWG DMSs. Obviously, the CG DMS was significantly higher than the CWG DMS. The intergenic and intron regions accounted for a large proportion of the DMS observed. Overall, the DMS showed a higher trend in the genic downstream regions of the gene relative to upstream regions. The Gene Ontology (GO) enrichment

① Corresponding author: LI Jitao, E-mail: lijtao@ysfri.ac.cn

analysis of the differentially expressed genes (DEGs) based on the DMS showed enrichment of genes involved in the "development, heterochrony, and protein disulfide isomerase activity," which played a role in the CG level down-regulation. In addition, "incubation involved in sorocarp development" and "nucleus and double-stranded RNA binding" were molecular functions up-regulated by the CG methylations. The down-regulated genes with CWG methylation were enriched for the "regulation of transcription and DNA template" process, while the up-regulated genes were enriched for the "epithelial cell migration and open trail" system. These two processes were induced in *E. carinicauda* cultured in saline-alkali water. The key genes in the HIF-1 signal and spliceosome pathways, such as *hif-p*, *hk*, and *sf3b1*, play an important role in response to saline-alkaline stress; therefore, the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis based on DMS of the DEG was performed. In addition, 158 CG methylated genes (MGs) were detected in DEGs from shrimps exposed to SAW, among which 77 and 81 were up- and down-regulated, respectively. Moreover, 94 CWG MGs were differentially expressed, from which 33 and 61 were up- and down-regulated, respectively. GO enrichment analysis of the CG MGs showed significant enrichment of the "muscle organ development" process; CWG MGs were significantly enriched for the "vesicle-m transport" and "membrane mediated zinc binding plasma transport" processes. This indicated that *E. carinicauda* was damaged by the saline-alkaline environment, but the shrimp may adapt to this stress by adjusting the ion balance. The KEGG enrichment analysis indicated that lipid metabolism and signal transduction pathways may play crucial roles in the *E. carinicauda* gill tissue response to saline-alkaline stress. Moreover, changes in lipid peroxidation and physiological metabolism may be caused by long-term saline-alkaline stress. The energy metabolism pathway was significantly enriched and many different genes in the lipid metabolism pathway were expressed in the stressed *E. carinicauda*. Therefore, it was speculated that the changes in DNA methylation level might play an important role in response to saline-alkaline stress. Overall, the results showed that a series of *E. carinicauda* physiological activities related to environmental adaptation was activated by SAW. In addition, a small number of methylated loci were negatively correlated with gene expressions, which indicated a complex relationship between DNA methylation and gene regulation. Although *ADAM17*, *FPC-1*, and *CYP450* showed hypomethylation, the corresponding differentially MGs showed a significantly increased expression level in a saline-alkaline environment. Therefore, genomic DNA methylation may promote gene expression under saline-alkaline stress, including the *ADAM17*, *FPC-1*, and *CYP450* genes. This study analyzed the DNA methylation levels in gill tissue of *E. carinicauda* cultured with SAW and provided information that will further elucidate the molecular mechanisms involved in crustacean adaptation to saline-alkaline environment.

Key words *Exopalaemon carinicauda*; Saline-alkaline water environment; DNA methylation; Differentially expressed gene