

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201204002

http://www.yykxjz.cn/

温争争, 左闪, 陈梦, 周红学, 孙国华, 冯艳微, 王卫军, 杨建敏. 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

Wen ZZ, Zuo S, Chen M, Zhou HX, Sun GH, Feng YW, Wang WJ, Yang JM. DNA methylation level of genomic DNA of *Apostichopus japonicus* at different temperatures. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(3): 46–54

刺参基因组 DNA 甲基化水平及模式 对温度变化的响应*

温争争^{1,2,3} 左 闪^{1,2,3} 陈 梦^{1,2,3} 周红学⁴ 孙国华^{3,5}①
冯艳微³ 王卫军³ 杨建敏³

(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. 上海海洋大学
上海水产养殖工程技术研究中心 上海 201306; 3. 鲁东大学农学院 烟台 264025;
4. 山东省农业农村厅 济南 250013; 5. 烟台海育海洋科技有限公司 烟台 264001)

摘要 本研究为了探讨刺参(*Apostichopus japonicus*)在不同温度胁迫下的 DNA 甲基化水平与甲基化模式变化,利用全基因组重亚硫酸盐测序技术(WGBS)和酶联免疫吸附法(ELISA)对刺参在 3 个温度下(20℃、26℃和 32℃)的纵肌、呼吸树、消化道和体壁 4 个组织进行分析。WGBS 测序结果显示,在消化道组织中,20℃、26℃和 32℃温度组全基因组总甲基化水平分别为(1.70±0.01)%、(1.79±0.11)%和(1.59±0.04)%,26℃组处于休眠状态,刺参消化道基因组甲基化水平升高,而 32℃组高温胁迫下,甲基化水平下降;在总甲基化位点中,CG 类型是主要的甲基化修饰(96%以上),CHH 和 CHG 位点占比较低;30%甲基化水平的甲基化位点中,CHG 和 CHH 为本类型甲基化的最高点,且显著高于 CG 类型。ELISA 检测结果显示,3 种不同温度下,刺参呼吸树和消化道组织的甲基化水平范围为 2.68%~3.29%,均高于纵肌和体壁组织;温度变化后,刺参呼吸树和消化道组织的总甲基化水平均有显著变化,而纵肌和体壁的总甲基化水平基本不变,表明 DNA 甲基化可能参与刺参的高温胁迫调控机制。刺参应对温度变化过程中 DNA 甲基化水平的研究,从表观遗传学视角解析温度升高对刺参不同组织的影响,可为丰富刺参甲基化研究内容和无脊椎动物的甲基化发生规律提供参考。

关键词 刺参; DNA 甲基化水平及模式; 休眠; 高温胁迫; 全基因组重亚硫酸盐测序技术; 酶联免疫吸附

中图分类号 S968.9 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2021)03-0046-09

刺参(*Apostichopus japonicus*)是我国重要的水产养殖物种之一,自然分布在 35~44°N 的西北太平洋沿岸,包括中国黄渤海海域、俄罗斯东部沿岸、日本和韩国沿岸。刺参是典型的温带种类,水温变化对刺参

* 国家重点研发计划课题(2018YFD0901602)、山东省现代农业产业技术体系(SDAIT-22-02)、泰山产业领军人才(tscy20190114)和国家自然科学基金项目(31602144)共同资助 [This work was supported by Key Research and Development Project of Science and Technology Ministry (2018YFD0901602), Modern Agricultural Technology System of Shandong Province (SDAIT-22-02), Taishan Industry Leading Talent (tscy20190114), and National Natural Science Foundation of China (31602144)].
温争争, E-mail: wenzheng96@126.com

① 通讯作者: 孙国华, 研究员, E-mail: sgh_smile@163.com

收稿日期: 2020-12-04, 收修改稿日期: 2020-12-18

的摄食、代谢和生殖发育等各种生理活动有重要影响(曹学顺, 2014)。温度过高或过低都不适宜刺参的生长, 尤其是在高温逆境环境中, 刺参的活动和摄食降低, 甚至体内自由基代谢紊乱、病变死亡(谢兆文等, 2016; 高杨, 2017)。温度变化对刺参生理变化、生长发育和遗传变化的影响研究一直受到广泛关注。

表观遗传学是一种不改变 DNA 序列的可遗传变异, 它的调节机制主要包括 DNA 甲基化修饰、组蛋白修饰、染色体重塑、非编码 RNA 调控等, 这些修饰方式之间相互作用、共同调节基因组的功能(Crabtree, 2020; Kulis *et al.*, 2010), 且这些表观遗传修饰极易受到环境的诱导(康静婷等, 2013)。DNA 甲基化是基因组 DNA 的一种重要修饰方式, 通过影响核酸空间构象、稳定性及其与蛋白质相互作用方式参与基因表达调控, 进而参与细胞的生长发育、逆境胁迫应答等过程(钟焱等, 2019)。在水产动物中, 环境通过影响 DNA 甲基化水平进而影响基因表达, 从而使生物的生理活动及表型发生变化以适应环境(McGhee *et al.*, 2014)。Navarro-Martin 等(2011)研究发现, DNA 甲基化介导了温度影响欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)性别变化的生物学过程; 吴彪等(2016)研究表明, 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)受到急性升温胁迫处理后, 基因组 DNA 总甲基化率下降; Li 等(2017)发现, 盐胁迫处理半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)肝脏后, 生长相关基因 *igfl* 的外显子甲基化水平与其表达水平呈负相关。在刺参应对逆境响应方面, 也有研究发现, DNA 甲基化在其中发挥重要的调控作用。高杉等(2017)采用甲基化敏感扩增多态性技术(MSAP)分析了健康和“化皮病”刺参体壁组织的甲基化水平差异。李尚俊等(2017)研究发现, 在高温环境下, 刺参的表观修饰相关基因(*DNMT1*、*HDAC3* 和 *MLL5*)的表达量发生显著变化。赵业(2015)研究发现, 刺参夏眠期的甲基化水平高于非夏眠期。邹荣婕等(2014)发现, 经喹类药物处理的刺参组织 DNA 甲基化水平低于对照组, 说明 DNA 甲基化在刺参应对外界刺激的重要作用。

本研究采用全基因组重亚硫酸盐测序技术(WGBS), 对不同温度处理的刺参的消化道组织的全基因组 C 位点甲基化水平进行检测, 探讨温度变化对刺参基因组 DNA 甲基化的影响。同时, 以刺参的体壁、消化道、纵肌和呼吸树为实验材料, 通过甲基化酶联免疫吸附法(ELISA)检测, 分析温度对刺参不同组织的甲基化程度的影响, 探究刺参 DNA 甲基化调控与组织特异性的相关性, 以期从 DNA 甲基化水平解释刺参响应温度变化的生理过程, 为深入研究环境

与表观遗传变异的关系及逆境响应机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用 2 龄刺参由山东省东营市华春渔业有限公司提供, 体质量为(130.3±5.5) g, 从养殖池塘养殖群体中随机采集, 定时投喂饲料, 每日换水量为 1/3, 养殖期间持续充气。

1.2 养殖实验与样品采集

实验用刺参在水温为(20.0±0.5)℃的实验室条件下暂养 5 d, 暂养结束后, 分组进行不同温度养殖实验, 对照组(T20)刺参在(20.0±0.5)℃水温下持续养殖至取样; 实验 A 组(T26)从水温(20.0±0.5)℃以 0.6℃/d 的速度在 10 d 内提高至(26.0±0.5)℃后, 维持养殖至取样; 实验 B 组(T32)从水温(20.0±0.5)℃以 0.6℃/d 的速度 10 d 内提高至(26.0±0.5)℃后, 再以 2℃/d 的速度在 3 d 内提高至(32.0±0.5)℃, 保持 2 d。每个实验组设置 3 个平行, 所有实验组刺参样品 15 d 养殖实验后取样, 每个平行组取 10 个刺参, 分别剖取呼吸树、纵肌、消化道和体壁组织, 并用灭菌生理盐水(1.5% NaCl)冲洗, 置于 2 ml 冻存管后迅速放入液氮罐中, 送回实验室, 保存于-80℃。

1.3 基因组 DNA 的提取

DNA 提取采用天根生化科技(北京)有限公司的海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性, 使用紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度, 将各组样品的浓度调整为 100~200 ng/μl, 于-20℃保存备用。

1.4 高温处理后消化道的全基因组 DNA 甲基化测序

重亚硫酸盐 WGBS 实验步骤参考郭添福等(2018)的高分辨率甲基化分析方法, 进一步对样品进行 DNA 甲基化定量。主要构建流程包括: 检测合格的刺参消化道基因组 DNA 样品, 首先, 用超声波打成平均大小为 200~300 bp 的片段, 对打断后的 DNA 片段进行末端修复、腺苷酸化, 并添加接头; 随后, 进行 Bisulfite 处理(EZ DNA Methylation Gold™ Kit, Zymo Research), 经处理后, 未发生甲基化的 C 变成 U, 而甲基化的 C 保持不变; 最后, 对单链 DNA 片段进行 PCR 扩增(KAPA HiFi HotStart Uracil + ReadyMix)得到 DNA 文库, 库检合格后, 利用 Illumina HiSeq 进行高通量测序, 测序读长 PE150, 构建 Bisulfite 全基因组甲基化图谱, 测序在北京诺禾致源有限公司完成。

1.5 ELISA 测定不同组织 DNA 甲基化水平

提取刺参纵肌、呼吸树、消化道和体壁 4 个组织的基因组 DNA, 利用 Zymo Research 公司的 5-mC DNA ELISA 试剂盒检测相应样品基因组 DNA 甲基化水平。具体实验步骤: 待测样品基因组 DNA 和标准品(100 ng)均稀释成 100 μ l 反应液, 于 PCR 仪 98 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冰浴 10 min, 移至 96 孔板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 缓冲液洗板 3 次, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。最后, 加入甲基化胞嘧啶抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 洗板同上, 并进行显色反应, 酶标仪检测样品吸光度。

1.6 数据统计与分析

测序结果的甲基化水平计算: $ML = mC / (mC + umC)$ 。其中, ML 为甲基化水平, mC 和 umC 分别代表覆盖区域甲基化 C 位点和未甲基化 C 位点的 read 数目。所有实验结果均来自至少 3 次独立实验, 结果为均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm SD$)。运用 SPSS 19.0 软件对各个组的甲基化水平进行 ANOVA 分析和 Duncan 多重比较, 获得两两之间的统计学差异($P < 0.05$)。

ELISA 测定 DNA 甲基化水平, 通过制备阴性对照(100 ng/ μ l)和阳性对照(100 ng/ μ l)的混合物来制备已知 5-mC 不同百分比的(5%、10%、25%、50%、75%和 100%)标准品, 根据标准品吸光度值所绘制的标准曲线, 即可得到各个样品的整体甲基化水平。

2 结果

2.1 不同处理下刺参消化道 DNA 甲基化模式分析

由全基因组 DNA 甲基化测序(WGBS)结果(表 1)可知, 刺参消化道组织的常温对照组 T20 基因组的甲基化位点数为 5050974 个, T26 组的基因组甲基化位点数为 5315261, T32 组基因组的甲基化位点数为 4714193 个。在所有的处理组和对照组中, CpG(简写 CG)类型甲基化位点数目为 4563209~5134931, 也有一定数量的甲基化胞嘧啶发生在 CHH 位点(116612~141870), 而 CHG 类型甲基化位点相对较少(34372~42059)。

T20、T26 和 T32 温度组的全基因组总甲基化水平分别为(1.70 \pm 0.01)%、(1.79 \pm 0.11)%和(1.59 \pm 0.04%) (表 2), T26 组基因组的总甲基化水平表现为上升, T32 组基因组的总甲基化水平表现为下降, 且低于 T20 组, 方差分析表明, T26 组的总甲基化水平和 T32 组存在显著差异($P < 0.05$)。对不同类型的甲基化来说, C 碱基甲基化水平表现出与总甲基化水平一致的趋势, T26 组 CG 类型 C 碱基甲基化水平较 T20 升高,

而 T32 组较 T26 组降低, 且差异显著($P < 0.05$)。在 2 种非 CG 类型的甲基化模式中, CHG 类型 T20 组与

表 1 甲基化位点数目及类型

样品 Sample	CpG 型 CpG type	CHG 型 CHG type	CHH 型 CHH type	合计 Total
T20_1	4860511	40641	141181	5042333
T20_2	4889681	41815	141808	5073304
T20_3	4853369	41295	142621	5037285
Average	4867854	41250	141870	5050974
T26_1	4954152	37951	124093	5116196
T26_2	5493328	48629	157290	5699247
T26_3	4957312	39598	133429	5130339
Average	5134931	42059	138271	5315261
T32_1	4458106	32955	118511	4609572
T32_2	4665866	36517	119951	4822334
T32_3	4565654	33643	111375	4710672
Average	4563209	34372	116612	4714193

表 2 不同温度下刺参全基因组甲基化水平

Tab.2 The methylation levels of C bases of *Apostichopus japonicus* at different temperature (%)

样品 Sample	mC	mCpG	mCHG	mCHH
T20_1	1.70	14.19	0.08	0.06
T20_2	1.71	14.27	0.08	0.06
T20_3	1.70	14.17	0.08	0.06
Average	1.70 \pm 0.01 ^{ab}	14.21 \pm 0.05 ^{ab}	0.08 \pm 0.00 ^b	0.06 \pm 0.00 ^a
T26_1	1.72	14.46	0.07	0.05
T26_2	1.92	16.04	0.09	0.07
T26_3	1.73	14.47	0.07	0.06
Average	1.79 \pm 0.11 ^b	14.99 \pm 0.91 ^b	0.077 \pm 0.01 ^{ab}	0.06 \pm 0.01 ^a
T32_1	1.55	13.01	0.06	0.05
T32_2	1.63	13.62	0.07	0.05
T32_3	1.59	13.33	0.06	0.05
Average	1.59 \pm 0.04 ^a	13.32 \pm 0.31 ^a	0.063 \pm 0.006 ^a	0.05 \pm 0.00 ^a

注: mC: 全基因组上甲基化 C 位点占全部 C 位点个数的百分比; mCpG: CpG context 区域的甲基化 C 位点占该区域 C 位点总数的百分比; mCHG: CHG context 区域的甲基化 C 位点占该区域 C 位点总数的百分比; mCHH: CHH context 区域的甲基化 C 位点占该区域 C 位点总数的百分比。数据来自至少 3 次独立的生物学重复。不同小写字母为差异显著($P < 0.05$)

Note: mC: Percentage of methylated C cites in the whole genome; mCpG: Percentage of methylated C cites in CpG context region to the total number of C sites; mCHG: Percentage of methylated C cites in CHG context region to the total number of C sites; mCHH: Percentage of methylated C cites in CHH context region to the total number of C sites. Data were at least three independent biological replicates. Different letters represent significant difference ($P < 0.05$)

T32 组存在显著差异($P<0.05$), CHH 类型中 3 组差异不大, 且都呈现低甲基化的变异模式。大部分 DNA 甲基化发生在 CG 类型的 C 碱基上, CG 类型的 C 碱基 DNA 甲基化程度为 13.32%~14.99%, 显示中等的 DNA 甲基化水平。

对 3 个温度下 CG、CHH 和 CHG 位点甲基化与总体甲基化占比情况进行统计, 结果见图 1。mCG 类型甲基化百分比均在 96% 以上, mCHH 类型甲基化百分比在 T20、T26 和 T26 组样品分别为 2.79%、2.42% 和 2.57%, mCHG 类型甲基化百分比最少, 均在 1%

以下。

根据测得的甲基化比例, 统计不同甲基化水平的甲基化位点中 3 种类型占各自类型的百分比可以看出(图 2), 在甲基化水平为 30% 时, 处于这一水平的 CHG 和 CHH 甲基化位点分别占本类型的 30% 左右, 为最高点, 且显著高于 CG 类型, 之后随着位点甲基化水平的增高, 其所占百分比下降; 而随着甲基化位点甲基化水平的增高, CG 类型的百分比总体呈明显的增高趋势, 在甲基化水平为 100% 时, 占比达到该类型的最高点。

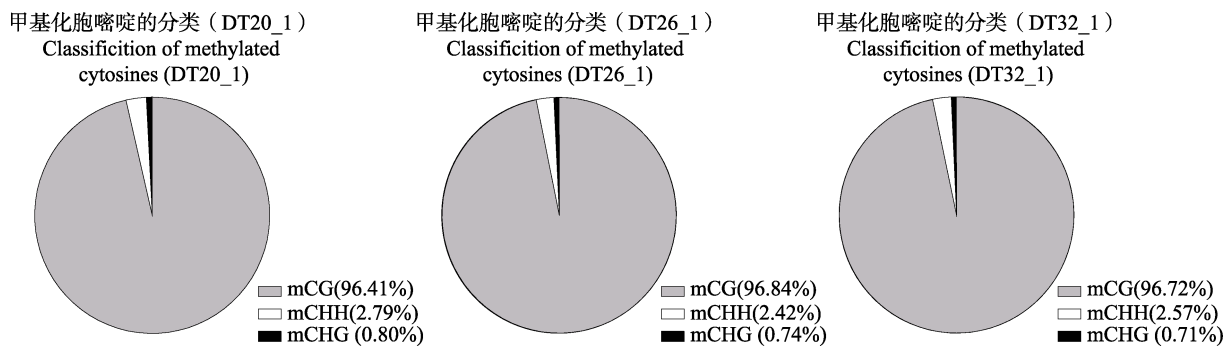


图 1 不同温度条件下甲基化 C 位点的数量及其占总甲基化 C 位点的比例

Fig.1 The number of methylated C sites and their proportion to the total methylated C sites in different sequence environments

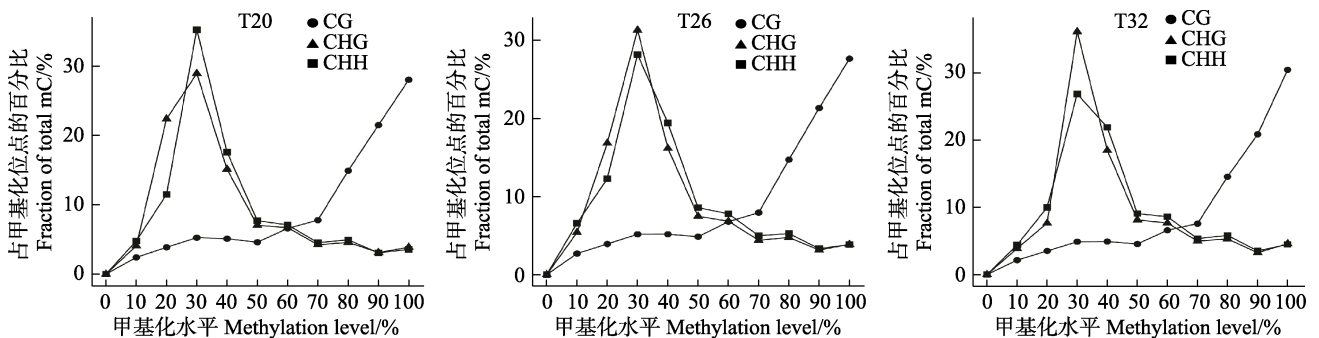


图 2 所有样本甲基化位点水平分布

Fig.2 The level distribution of methylation sites in all samples

图中每个数据来自 3 个生物学重复

Each data in the figure comes from 3 biological replicates

2.2 不同温度下刺参组织间甲基化水平比较

采用 5-mC DNA ELISA Kit 试剂盒检测不同温度条件下刺参的呼吸树、消化道、纵肌和体壁 4 种组织的基因组的甲基化水平, 并进行不同组间方差分析。数据显示, 在 3 种不同温度下, 刺参呼吸树和消化道组织的甲基化水平范围为(2.68±0.10)%~(3.29±0.06)%, 均高于纵肌和体壁组织, 其中, 体壁的甲基化水平在(2.05±0.15)%~(2.11±0.11)%之间, 纵肌的甲基化水平最低, 为(1.68±0.07)%~(1.76±0.03)%。各组织的总甲

基化水平从高到低依次为呼吸树>消化道>体壁>纵肌(图 3)。不同温度对刺参组织的甲基化水平有所改变, T26 组刺参样品消化道和呼吸树组织的甲基化水平显著高于 T20 对照组($P<0.05$), T32 组刺参样品消化道和呼吸树组织的甲基化水平又显著低于 T26 对照组($P<0.05$)。呼吸树和消化道组织的甲基化水平总体呈一致趋势, 在温度从 20℃ 升至 26℃ 时, 甲基化水平升高, 而温度继续升至 32℃ 时, 甲基化水平下降; 而纵肌和体壁组在 3 个温度下的甲基化水平各组间均无显著差异。

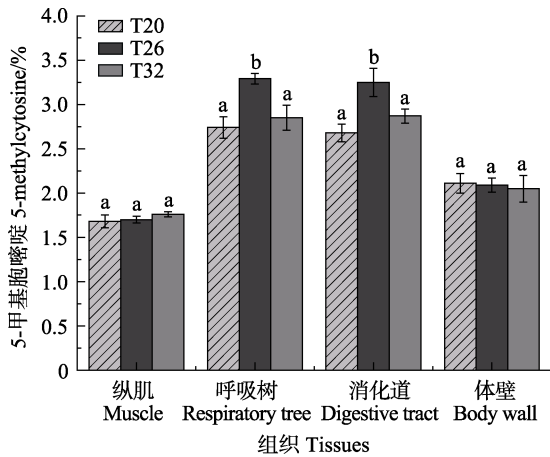


图3 不同温度下 5-mC 甲基化试剂盒检测各组织 DNA 甲基化水平变化

Fig.3 Using 5-mC methylation kit to detect tissues DNA methylation levels under different experimental conditions

不同小写字母为差异显著 ($P < 0.05$)

Different letters represent significant difference ($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 不同温度对刺参基因组 DNA 甲基化的影响

研究结果表明, DNA 甲基化参与了海洋动物环境胁迫适应性机制, 诸如盐度(环朋朋, 2018)、重金属(周新文等, 2001)、温度(侯艳雯等, 2019; 王艺雅, 2015)等环境因子的逆境胁迫下, 甲基化会有明显差异。Flores 等(2013)提出, 环境诱导影响 DNA 甲基化的变异, 可能通过增加基因组被标记区域的突变性, 改变生物的表型, 使其适应自然选择。温度一直是影响水产动物生存的重要因素, 在不同温度条件下, 基因组内的甲基化变异能够通过改变某些特定功能基因 DNA 甲基化状态来影响基因的转录, 进而调节生物体内胁迫响应机制等来提高动物的耐寒性或耐热性。朱华平等(2013)分析了耐寒罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)与正常组基因组 DNA 甲基化的差别, 结果表明, 低温诱导 DNA 总甲基化下降, 同时主要发生去甲基化过程。吴彪等(2016)研究发现, 虾夷扇贝受到急性升温胁迫处理后, 基因组 DNA 总甲基化率下降。王翠丽(2019)研究发现, 高温胁迫过程中, 近江牡蛎(*Ostrea rivularis*)的核心启动子甲基化水平与 *Hsp90* 基因的表达呈负相关。孔宁(2016)研究发现, 在温度、盐度胁迫下, 皱纹盘鲍(*Haliotis discus*)的表观遗传结构发生改变, 调控相关抗逆基因表达。这些研究结果均表明, 温度变化可诱导水产动物基因或组织的甲基化状态发生改变。

本研究通过 WGBS 和 ELISA 对刺参消化道等组织甲基化水平进行检测发现, 不同温度下刺参组织中的甲基化水平有所改变, 刺参消化道组织和呼吸树组织的 T26 组甲基化水平最高。刺参在 26℃ 养殖环境下处于夏眠或生理代谢活动较弱的状态, 这期间刺参消化、呼吸等生理代谢活动调节减弱(Gao *et al.*, 2008)。处于休眠状态的 T26 组刺参基因组甲基化水平的增高, 一定程度上说明刺参这些组织中的一些功能基因受到甲基化调节而表达水平下降, 相应地, 减弱其参与调控的生理代谢活动来维持刺参的休眠状态。刺参消化道组织和呼吸树组织的 T32 组甲基化水平较 T26 组降低。32℃ 是对刺参生命活动产生危害的胁迫温度, 在这个温度下, 刺参会发生系列应激反应以自我保护, 生理反应和活动变化意味着刺参体内需要启动一系列转录表达和调控, 而甲基化水平的降低调节可能起重要作用。

3.2 刺参基因组甲基化模式

DNA 甲基化作为一种重要的表观遗传修饰, 主要有 3 种类型: CG、CHG 和 CHH。在动物中, 胞嘧啶的甲基化多发生于 CpG 二核苷酸序列中, CG 是主要甲基化修饰类型, 非 CG 类型的序列(CHH 和 CHG)在基因中十分少见(Cokus *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2015)。脊椎动物通常存在于基因间区和富含重复序列的区域, 而在无脊椎动物中, DNA 甲基化主要发生于基因内部, 基因间区大部分未被甲基化(Schaefer *et al.*, 2010)。在胚胎干细胞研究(Lister *et al.*, 2009)中, CHG 和 CHH 型的甲基化位点分别占 17.3% 和 7.2%, Sun 等(2014)检测到栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)基因组中, 分别有 14.9%~16.5% 的 CpG 类型和 5.1%~6.3% 的 CHG 类型的甲基化位点。不同温度条件下的刺参消化道 DNA 样品经过重亚硫酸盐处理后, 进行 WGBS 测序分析, 甲基化位点类型分析显示, 在所有甲基化胞嘧啶(mCs)中, 有超过 96% 的 CpGs, 且 CG 类型的 C 碱基呈现中等甲基化水平(24.11%~24.48%), CHG 和 CHH 类型的 C 碱基呈现低甲基化水平(0.49%~0.56%)。

在不同温度刺参甲基化模式的对比分析中, 3 个温度组消化道的总甲基化率和 CG 类型 C 碱基甲基化水平之间存在显著差异 ($P < 0.05$), T26 组消化道高于 T20 和 T32 组, CHG 和 CHH 类型的 C 碱基甲基化水平在 2 组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。已研究的大多数无脊椎动物表现出镶嵌式的甲基化模式, 无论是在无脊椎动物, 还是脊椎动物, 基因内 CpG 甲基化的功能都是保守的, 它能够抑制基因内部异常转录的起始(Suzuki *et al.*, 2007)。目前, 非 CG 类型的甲基化与基

因表达的关系尚不清楚, 值得更深入的研究。

3.3 组织间的甲基化差异分析

不同组织间的基因组甲基化水平的差异是生物界普遍存在的现象。在水产动物的不同组织间甲基化研究中, 杜盈等(2013)利用 MSAP 技术分析野生组中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)和选育品种“黄海 1 号”的甲基化水平时发现, 野生组中国明对虾的纵肌和鳃组织甲基化水平差异极显著($P < 0.05$), 而二者与血液组织的甲基化水平差异极显著($P < 0.01$); “黄海 1 号”的鳃组织和血液组织甲基化水平相近, 都极显著低于纵肌组织($P < 0.01$)。罗少杰(2017)运用甲基化检测技术对马氏珠母贝(*Phyllostachys mollissima*)的边缘膜区、套膜区和中央膜区的基因组甲基化水平进行了研究, 发现各组织甲基化水平具有显著性差异, 其中, 中央膜区的甲基化水平最高[(19.04±2.55)%]。这些结果显示, 无脊椎动物不同组织间甲基化水平存在差异, 可能是由于 DNA 甲基化在细胞分化以及生长发育调控中发挥重要作用(Sun *et al.*, 2014; 何暮春等, 2018)。

果蝇(*Drosophilid*)、水蚤(*Daphnia magna*)、牡蛎(*C. gigas*)等部分无脊椎动物的甲基化研究发现, 其基因组甲基化处于较低水平(Regev *et al.*, 1998; Riviere *et al.*, 2013; Hearn *et al.*, 2019)。本研究结果表明, 刺参在不同温度水体中, 不同组织 DNA 总甲基化水平在 1%~4%之间, 并呈现呼吸树、消化道、体壁、纵肌的甲基化程度依次降低的趋势。由于技术原因, 通过 WGBS 和 ELISA 方法测得的消化道甲基化水平存在差异, 但总体属于基因组甲基化水平较低的无脊椎动物类型。在同一温度下, 刺参的不同组织间甲基化水平存在明显差异, 且随着温度的升高, 纵肌和体壁组织甲基化水平基本不变, 而呼吸树和消化道组织的甲基化水平总体趋势一致, 在温度从 20℃升至 26℃时, 甲基化水平显著升高, 而在温度继续升至 32℃时, 甲基化水平显著下降。曹哲明等(2009)认为, DNA 甲基化是基因表达调控的方式, 甲基化程度高的组织相对来说基因表达水平较低。在升温过程中, 消化道的基因表达程度最低, 说明不同组织对温度变化的敏感性不同, 这与之前的研究结果相符。刺参经历高温休眠时期, 呼吸代谢和摄食效率发生改变, 作为这一过程主要的功能器官——消化道和呼吸树受到的影响最大, 同时会发生不同程度的退化和萎缩(Zhao *et al.*, 2015)。

4 总结

本研究对高温胁迫下刺参基因组 DNA 甲基化的变化情况进行了探究。相较于生活在正常水温的个

体, 经历不同温度处理的刺参的表观基因组发生显著性改变, 使得相关基因表达或抑制。目前, 动物在环境温度胁迫下, 全基因组范围内的去甲基化过程和甲基化的协调机制, 以及动物表型的形成和环境适应性的表观遗传机制, 都值得关注。未来研究应该更多关注全基因组表观变化启动的分子机制, 例如, DNA 甲基化对基因表达抑制的调控作用; 以及关注动物中表观遗传变异与物种表型差异、环境适应如何相互联系。表观遗传学在环境胁迫中的作用和机制尚有诸多问题需进一步探讨。

参 考 文 献

- Cao XS. Study on the effect of temperature on the growth, physiology and nutritional components of *Apostichopus japonicus*. Master's Thesis of Dalian Ocean University, 2014 [曹学顺. 温度对刺参的生长、生理及营养成分的影响研究. 大连海洋大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Cao ZM, Yang J. Analysis of the methylation in genome DNA from different tissues of *Anodonta woodiana*. Ecology and Environment, 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]
- Crabtree JS. Fundamentals of epigenetics. Clinical Precision Medicine. Academic Press, 2020: 27–37
- Cokus SJ, Feng SH, Zhang XY, *et al.* Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. Nature, 2008, 452(7184):215–219
- Du Y, He YY, Li J, *et al.* MSAP analysis of genomic DNA in different tissues of wild and “Yellow Sea 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]
- Flores KB, Wolschin F, Amdam GV. The role of methylation of DNA in environmental adaptation. Integrative and Comparative Biology, 2013, 53(2): 359–372
- Gao F, Yang H, Xu Q, *et al.* Phenotypic plasticity of gut structure and function during periods of inactivity in *Apostichopus japonicus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 150(3): 255–262
- Gao S, Yang AF, Dong Y, *et al.* MSAP analysis of DNA methylation in the body wall of *Apostichopus japonicus*. 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]
- Gao Y. Effects of variable temperature on immunity and disease

- resistance of *Apostichopus japonicus*. Hebei Fisheries, 2017(9): 1–4, 41 [高杨. 变温对仿刺参(*Apostichopus japonicus*)免疫力及抗病力的影响. 河北渔业, 2017(9): 1–4, 41]
- Guo TF, Zhang ZY, Chen D, *et al.* Difference analysis of high resolution single base methylation in muscle genome of large white pigs of different genders. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(11): 2326–2339 [郭添福, 张志燕, 陈冬, 等. 不同性别大白猪纵肌全基因组高分辨率单碱基甲基化差异分析. 畜牧兽医学报, 2018, 49(11): 2326–2339]
- He MC, Zhang JY, Liu CL, *et al.* DNA methylation level and pattern in growing *Sepia esculenta* Hoyle. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 46–55 [何暮春, 张金勇, 刘长琳, 等. 金乌贼生长期 DNA 甲基化水平和模式. 渔业科学进展, 2018, 39(4): 46–55]
- Hearn J, Pearson M, Blaxter M, *et al.* Genome-wide methylation is modified by caloric restriction in *Daphnia magna*. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 197
- Hou YW, Liu W, Jiang PL, *et al.* Effects of low temperature on DNA methylation of 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 PP. Function of DNA methylation in salinity adaptation of *Portunus trituberculatus*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [环朋朋. DNA 甲基化在三疣梭子蟹盐度适应中的功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- Kang JT, Liang QJ, Liang C, *et al.* Overview on epigenetics and its progress. *Science and Technology Review*, 2013, 31(19): 66–74 [康静婷, 梁前进, 梁辰, 等. 表观遗传学研究进展. 科技导报, 2013, 31(19): 66–74]
- Kong N. Effects of temperature and salinity on growth and development of *Haliotis discus hannai* “97” population. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2016 [孔宁. 温度、盐度对皱纹盘鲍“97”选群生长发育的影响. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2016]
- Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Advances in genetics*. Academic Press, 2010, 70: 27–56
- Li S, He F, Wen H, *et al.* Low salinity affects cellularity, DNA methylation, and mRNA expression of *igf1* in the liver of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(6): 1587–1602
- Li SJ, Sun GH, Li XY, *et al.* Expression characteristics of epigenetic regulation related genes in *Apostichopus japonicus* under high temperature stress. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(3): 470–476 [李尚俊, 孙国华, 李雪燕, 等. 高温胁迫下仿刺参表观遗传调控相关基因的表达特征. 中国水产科学, 2017, 24(3): 470–476]
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 2009, 462(7271): 315
- Luo SJ. Study on DNA methylation difference and function in different regions of mantle of *Phyllostachys mollissima*. Master's Thesis of Guangdong Ocean University, 2017 [罗少杰. 马氏珠母贝外套膜不同区域的 DNA 甲基化差异及功能研究. 广东海洋大学硕士研究生学位论文, 2017]
- McGhee KE, Bell AM. Paternal care in a fish: Epigenetics and fitness enhancing effects on off spring anxiety. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2014, 281(1794): 20141146
- Navarro-Martin L, Viñas J, Ribas L, *et al.* DNA methylation of the gonadal aromatase (*cyp19a*) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. *PLoS Genetics*, 2011, 7: e1002447
- Regev A, Lamb MJ, Jablonka E. The role of DNA methylation in invertebrates: Developmental regulation or genome defense? *Molecular Biology and Evolution*, 1998, 15(7): 880
- Riviere G, Wu GC, Fellous A, *et al.* DNA methylation is crucial for the early development in the oyster *C. gigas*. *Marine Biotechnology*, 2013, 15: 739–753
- Schaefer M, Lyko F. Lack of evidence for DNA methylation of *Invader4* retroelements in *Drosophila* and implications for *Dnmt2*-mediated epigenetic regulation. *Nature Genetics*, 2010, 42(11): 920–921
- 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(1): e86232
- Suzuki MM, Kerr ARW, de Sousa D, *et al.* CpG methylation is targeted to transcription units in an invertebrate genome. *Genome Research*, 2007, 17(5): 625–631
- Wang CL. Effects of high temperature stress on Hsp90 expression and CpG methylation in *Ostrea rivularis* Gould. *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 YY. Effects of high temperature on the methylation level of *Oreochromis mossambicus* genome. Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2015 [王艺雅. 高温诱导对罗非鱼全基因组甲基化水平的影响研究. 山东农业大学硕士研究生学位论文, 2015]
- Wu B, Yang AG, Sun XJ, *et al.* Effects of acute temperature stress on genomic DNA methylation of *Patinopecten 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(*Patinopecten yessoensis*)基因组 DNA 甲基化的影

- 响. 渔业科学进展, 2016, 37(5): 140–146]
- Xie ZW, Wang SK, Lin X, *et al.* Effects of high temperature stress on antioxidant enzymes of *Apostichopus japonicus*. Fisheries Science, 2016, 35(4): 327–333 [谢兆文, 王寿昆, 林旋, 等. 高温胁迫对仿刺参抗氧化酶等指标的影响. 水产科学, 2016, 35(4): 327–333]
- Zhang Z, Liu G, Zhou Y, *et al.* Genome-wide and single-base resolution DNA methylomes of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) reveal gradual transition of the genomic methylation pattern in early vertebrates. BioRxiv, 2015: 033233
- Zhao Y. Study on gene expression patterns and basic characteristics of DNA methylation in *Apostichopus japonicus* (Selenka) during aestivation. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2015 [赵业. 刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka) 夏眠期间基因表达模式及 DNA 甲基化基础特征研究. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2015]
- Zhao Y, Chen MY, Storey KB, *et al.* DNA methylation levels analysis in four tissues of sea cucumber *Apostichopus japonicus* based on fluorescence-labeled methylation-sensitive amplified polymorphism (F-MSAP) during aestivation. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2015, 181: 26–32
- Zhong Y, Xu H, Peng FL. Significance and research progress of DNA methylation in gene expression regulation. China Medical Herald, 2019, 16(14): 33–36 [钟焱, 徐慧, 彭凤兰. DNA 甲基化在基因表达调控中的意义及研究进展. 中国医药导报, 2019, 16(14): 33–36]
- Zhou XW, Zhu GN, Jilisa M, *et al.* Influence of Cu, Zn, Pb, Cd and their heavy metal ion mixture on the DNA methylation level of *Carassius auratus*. China Environmental Science, 2001, 21(6): 549–552 [周新文, 朱国念, Jilisa M, 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]
- Zhu HP, Lu MX, Huang ZH, *et al.* Effects of low temperature on DNA methylation of *Oreochromis mossambicus*. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(10): 1460–1467 [朱华平, 卢迈新, 黄樟翰, 等. 低温对罗非鱼基因组 DNA 甲基化的影响. 水产学报, 2013, 37(10): 1460–1467]
- Zou RJ, Jiang XY, Xu YJ, *et al.* Analysis of global DNA methylation impacted by quinoxaline in *Apostichopus japonicus* tissue using high performance liquid chromatography. Journal of Instrumental Analysis, 2014, 33(7): 780–785 [邹荣婕, 姜向阳, 徐英江, 等. 基于高效液相色谱的喹(噁)啉类药物对刺参 DNA 甲基化水平的影响研究. 分析测试学报, 2014, 33(7): 780–785]

(编辑 冯小花)

DNA Methylation Level of Genomic DNA of *Apostichopus japonicus* at Different Temperatures

WEN Zhengzheng^{1,2,3}, ZUO Shan^{1,2,3}, CHEN Meng^{1,2,3}, ZHOU Hongxue⁴, SUN Guohua^{3,5}①,
FENG Yanwei³, WANG Weijun³, YANG Jianmin³

(1. Shanghai Ocean University, National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai 201306;
2. Shanghai Ocean University, Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai 201306;
3. Ludong University, College of Agriculture, Yantai 264025; 4. Department of Agriculture and Rural Affairs of Shandong Province, Jinan 250013; 5. Yantai Haiyu Ocean Technology Co., Ltd, Yantai 264001)

Abstract The sea cucumber *Apostichopus japonicus* requires its own defense mechanism to resist and adapt to high temperature stress. Epigenetic modification plays an important role in this regulation process. To investigate the changes of DNA methylation level and methylation pattern in *A. japonicus* (2-year-old) under different temperature stress, whole genomic bisulfite sequencing (WGBS) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect whole genome methylation levels of the muscle, respiratory tree, digestive tract, and body wall. Three temperature gradients of 20°C, 26°C, and 32°C were set up in this experiment. The results of WGBS showed that the total genome wide methylation levels of 20°C, 26°C, and 32°C groups were (1.70±0.01)%, (1.79±0.11)%, and (1.59±0.04)%, respectively. The methylation level of the digestive tract genome of *A. japonicus* in the 26°C group increased, while the methylation level of the 32°C group decreased under high temperature stress. Among the total methylation sites, CG type was the main site of methylation modification (more than 96%), and CHH and CHG sites showed relatively low levels of modification. Among the methylation sites at 30% methylation level, CHG and CHH methylation sites showed the highest methylation, and were significantly higher than that of the CG type. The results of ELISA showed that the methylation levels of respiratory tree and digestive tract tissue ranged from 2.68% to 3.29% at three different temperatures, which were higher than those in muscle and body wall tissue. After temperature change, the total methylation level of respiratory tree and digestive tract tissue of sea cucumber changed significantly, while the total methylation level of muscle and body wall remained unchanged, indicating that DNA methylation may be involved in the regulation mechanism of high temperature stress in *A. japonicus*. The study on DNA methylation level of *A. japonicus* in response to temperature change can be used to analyze the effect of temperature rise on different tissues of sea cucumber from the perspective of epigenetics. This research can provide reliable basis for enriching the research content on methylation in *A. japonicus* and the occurrence of methylation in invertebrates.

Key words *Apostichopus japonicus*; DNA methylation and mode; Dormancy; High temperature stress; Whole genome bisulfite sequencing; Enzyme linked immunosorbent assay

① Corresponding author: SUN Guohua, E-mail: sgh_smile@163.com