

脊尾白虾线粒体基因组应答饥饿的甲基化特征分析

高 焕^{1,2,3*}, 赵 莲¹, 薛 蓓¹, 朱国华¹, 赖晓芳^{1,2,3},
陈建华^{1,2,3}, 申 欣^{1,2,3}, 阎斌伦^{1,2,3}

(1. 江苏省海洋生物技术重点实验室, 淮海工学院, 江苏 连云港 222005;

2. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222001;

3. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014)

摘要: 为研究脊尾白虾应答饥饿的线粒体基因组表观遗传学特征, 本研究在筛选适宜脊尾白虾线粒体基因组甲基化位点分析的 BSP 引物基础上, 对不同饥饿期该虾线粒体基因组的甲基化特征进行了分析。共设计覆盖脊尾白虾线粒体全基因组序列的 BSP 引物 51 对, 经验证其中 10 对引物可用于脊尾白虾线粒体基因组的甲基化特征分析, 选用其中具有稳定扩增产物的 5 对引物分别对饥饿 10、20 和 30 d 的脊尾白虾线粒体基因组的甲基化特征进行了分析, 结果表明, 脊尾白虾耐受饥饿的平均死亡时间为 19.8 d, 最长耐受时间为 48 d, 在不同饥饿阶段线粒体基因组均可发生甲基化现象, 且在第 10 天时甲基化比例最高, 而第 20 和 30 天时甲基化比例反而降低; 甲基化主要发生在 ND 基因位点上, 据此推测这种甲基化可能用来调节能量代谢相关的电子传递链过程。本研究首次揭示了脊尾白虾线粒体基因组存在甲基化现象, 为展开虾类线粒体基因组表观遗传学研究奠定了理论基础。

关键词: 脊尾白虾; 线粒体基因组; 甲基化; 饥饿

中图分类号: Q 784; S 966.1

文献标志码: A

线粒体被称为“细胞的动力工厂”, 为机体的生命活动提供直接的能量; 除此之外, 线粒体也涉及细胞的其他重要功能, 如脂肪酸的代谢、细胞的程序性死亡、活性氧自由基的产生、三羧酸循环以及钙离子的转运等^[1]。因此, 线粒体对高等生物行使正常的生命活动是必不可少的。另外, 线粒体还拥有自身的遗传物质和遗传体系, 同时也与生物有机体的核基因组存在着一定的“互动”, 因而成为很好的遗传学研究对象。目前关于线粒体的遗传学研究主要集中在“线粒体 DNA 损伤与遗传疾病和细胞凋亡的关系”^[2]、“线粒体基因重排与进化分析”^[3]和“线粒体标记研究和应用”^[4]等方面, 而关于其表观遗传学特征的研究较少。究其原因, 一是受早期研究的误导^[5]和线粒体甲基化研究方法的限制, 长期以来很多人认为线粒体不存在甲基化修饰; 二是很多人认为线粒体表

观遗传学没有重要的遗传学研究价值, 而把更多的目光投在核基因组甲基化特征分析上。但近十年来, 随着对线粒体甲基化研究的展开, 人们开始意识到线粒体甲基化的一些重要生物学意义和研究价值, 因此在人类和其他哺乳类动物中开展了很多研究^[6-8]。但目前, 还未见甲壳类动物, 尤其是虾类中相关的研究报道。

脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 是分布于印度-西太平洋区、韩国和我国近海的一种广盐性白虾^[9], 是我国特有的一个养殖经济种类, 其产量在我国东部沿海地区的混合养殖模式中占据三分之一的比重^[10], 且养殖规模具有逐年增加的趋势。展开脊尾白虾生长发育相关的基础生物学和遗传学研究是培育新品种和保障该虾健康养殖的重要基础, 本研究拟对该虾线粒体基因组应答饥饿的调控机制进行研究, 以便阐释脊尾白虾线粒体基

收稿日期: 2014-12-10

修回日期: 2015-02-17

资助项目: 江苏省农业科技支撑计划 (BE2013363); 江苏省高校“青蓝工程”培养基金; 江苏省优势学科建设工程专项 (KYCX07)

通信作者: 高 焕, E-mail: huanmr@163.com

因组的表观遗传学特征,引起更多研究者对虾类表观遗传学研究的兴趣。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

脊尾白虾取自一个养殖池塘自繁而来的成体,选取大小相似[体长:(5.39 ± 0.49) cm;体质量:(2.07 ± 0.53) g]、健康无病的个体放入约 200 L 长方形塑料养殖池(82 cm × 60 cm × 59 cm)中,不间断充气,在实验室先暂养 2 周以适应环境,期间每天换水(温度 18 ~ 25 °C,盐度 28)1 次,每次换水量为总水体的 1/3,每天早晚各投喂饵料(虾类专用配合饲料,浙江粤海饲料有限公司)1 次,每天早晚投喂前利用虹吸法吸底层排泄物各 1 次。

1.2 饥饿实验

选取 160 尾白虾,平均分为两组,即对照组和饥饿组,每组 80 尾。对照组中的白虾继续按照上述日常管理方法进行养殖;为防止因个体间残食而导致的实验误差,利用网格把养殖池分成 80 个独立的隔间,每个隔间放入 1 尾虾;除不投饵外,日常管理方法与对照组相同。分别在第 10、20 和 30 天在对照组和实验组中各选取 20 尾脊尾白虾进行后续甲基化特征分析,其中实验组中各个时间节点选取的虾为死亡后个体,且为各时间节点 ± 2 d 的虾,对照组各时间点选取的虾也为死亡后的个体,不足部分用活虾补充。

1.3 基因组处理、BSP (bisulfite sequencing PCR) 引物设计及验证

利用 Ezup 柱式动物基因组抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]分别提取各脊尾白虾总基因组 DNA(其中含有线粒体基因组 DNA),利用甲基化检测试剂盒(EpiMark™, New England Biolabs Inc.)对提取的基因组进行处理,获得处理后的基因组 DNA,并以处理后的基因组 DNA 为 PCR 模板进行 BSP 引物的验证和后续各不同饥饿期个体的甲基化特征分析。

根据脊尾白虾线粒体基因组序列(Genbank 号:NC_012566.1),利用在线软件 Methprimer (www.urogene.org/methprimer)设计 51 对可以覆盖脊尾白虾线粒体全基因组的 BSP 引物(表 1),采用如下 PCR 程序验证引物是否可以扩增出预期长度的产物:扩增体系为 25 μL, DNA 聚合酶为热启动酶(EpiMark, New England Biolabs Inc.),采用

Touch-down PCR 程序进行扩增,具体为 95 °C 起始变性 30 s, 95 °C 变性 15 s, 55 °C 复性 30 s, 68 °C 延伸 45 s 的循环,其中退火温度每个循环降低 0.5 °C,进行 14 个循环后再以 48 °C 固定退火温度进行 20 个循环,循环结束后以 68 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳验证有无,对有扩增条带的片段进行胶回收,经过克隆和测序获得引物扩增序列,与脊尾白虾线粒体基因组原序列对比确认是否为线粒体基因组的扩增产物。

1.4 数据采集与分析

利用筛选的 BSP 引物对各个饥饿期脊尾白虾处理后的基因组进行扩增,扩增产物经克隆转化后送交公司测序[生工生物工程(上海)股份有限公司],采用 QUMA 软件(http://quma.cdb.riken.jp)把测序序列与原线粒体基因组序列进行对比,以确认甲基化的有无及特征,并计算相应的甲基化率。利用 Geneious 软件(version 4.8.2)对 BSP 引物扩增区序列在基因组中的位置进行定位和标注,用 Excel 中的数据分析功能实现相关的数据分析。

2 结果

2.1 脊尾白虾耐饥饿死亡特征

以累积 6 d 的死亡个体数为 1 个单元(即横坐标每一个单位代表 6 d),对不同饥饿时间脊尾白虾的死亡情况进行了比较(图 1)。在饥饿第 5 天时,脊尾白虾开始出现死亡,至饥饿 15 d 左右出现死亡高峰,至第 48 天时,最后一只脊尾白虾死亡。利用加权平均数,求得饥饿组中脊尾白虾平均死亡时间为 19.8 d。统计假设 *t* 检验表明,饥饿组与对照组的死亡数存在极显著性差异($P < 0.01$),说明饥饿组中的死亡个体是由饥饿原因引起的。

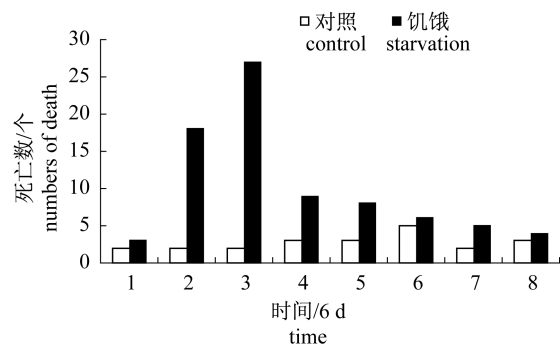


图 1 脊尾白虾饥饿状态下的死亡情况

Fig. 1 The death profile after starvation stress in *E. carinicauda*

表 1 脊尾白虾线粒体基因组 BSP 引物
 Tab. 1 Primers for bisulfite sequencing PCR in mitochondrial genome of *E. carinicauda*

编号 no.	引物名称 primer name	序列 sequences	长度/bp size	扩增产物 PCR production	编号 no.	引物名称 primer name	序列 sequences	长度/bp size	扩增产物 PCR production
1	64-311-F	GTTGGGTAGGATAGTAGGAATTT	248	无	27	7351-7558-F	GAATTAGTTATAGGGGTTTTTATATG	208	无
	64-311-R	AATAAAAAATCAAAAATCTTATATTTATTTAT				7351-7558-R	AATCTCTCCCTTTATTAATTTCTTTTT		
2	356-605-F	GAGTTGGAATAGGTTGGATTGTATATT	250	无	28	7532-7631-F	AAAAAGAAAATTAATAAGGAAGAGATT	100	无
	356-605-R	CCAACTAAAACTAAAAATAAAAAATAAAT				7532-7631-R	TTAATCCTAAAACTAAAACTATCAACCC		
3	584-788-F	TATTTTTTTAGTTTGTAGTTGGATTATTA	205	有	29	7690-7887-F	TATGAAAAAGTTAAAAATTAAGGATAATAAT	198	无
	584-788-R	TTTTTACCTACTTCTTATCTTACAATATAT				7690-7887-R	AAAAAAAATTAATAAAAAATTTCAATAC		
4	760-945-F	TATATTGTAAGATAAGAAAGTAGGTAAAAA	186	无	30	8015-8252-F	ATTGAAATTATTTTTTTTATIGTTTA	238	无
	760-945-R	TCCTATAAAAAACAACAATAATCATC				8015-8252-R	AAAAATTAATTAATAAAAACTAACATTTAT		
5	939-1230-F	TATAGGAAATAAAAATTTTTAGATGAATAGT	292	无	31	8826-9033-F	TTAAATTTAAATTAATAAGTATGTATAATTT	208	无
	939-1230-R	AATTTTTAATAATATAAAAAATAAAAAAAA				8826-9033-R	AAATAAAAAAATCAAACTAAAACTCC		
6	1268-1485-F	TTTTTTTATAATATTTTTTAGGTTTTAAA	218	无	32	9035-9225-F	AGTTAATATTTTTTATAATTTTGAATTT	191	无
	1268-1485-R	ATTATATATCACTCAATAAAAAATAAACAT				9035-9225-R	AACTCCATTTACATAAAATAACTC		
7	1537-1719-F	TTAAAAATGGTGAATTAATTTGATPAGGATTTA	183	无	33	9229-9456-F	TTTTTTTTATTTGGTTTATATAGGTTATAT	228	有
	1537-1719-R	CTTACTAAAAATAAATTAATAAAAAATTAACCT				9229-9456-R	AAATCCACTAAACAAAATCAATCC		
8	1772-1993-F	GAATATTAATAATTAITGAAAATTAITTTGAA	222	有	34	9427-9589-F	TTTTAGGGATTTGATTTTTTGTAGTG	163	无
	1772-1993-R	ATTATCAACCTCTACCTCTAAAACTATATA				9427-9589-R	AAAAAATTAATAAACCCCAATTAATAAAAA		
9	1962-2190-F	TTTATATAGTTTTTGTAGGTTAGAGGTTGATA	229	无	35	9695-9844-F	TTAAAAATTTTATTTTATAGGAGATTAGA	150	无
	1962-2190-R	CATTAAACCATAAAAAATAATCCAAACC				9695-9844-R	AAAAACAATTAATCTCCCCCAAACTTAT		
10	2578-2764-F	TTTGAAAAATGATAATAAAAAATTTTTTT	187	无	36	9819-10010-F	AATAAGTTTGGGGAGTAAITTTGTTT	192	无
	2578-2764-R	AATTTTTAACTCCTTATATAATAITTAAC				9819-10010-R	AAAAATATAAAAAATCTTCTACTTTTC		
11	2737-2978-F	GTTAATAATATATAAGGAGTTAAAAATTTT	242	有	37	9960-10255-F	GTTTTTTTTAATATGAATTTGGAGTA	296	无
	2737-2978-R	AAAAAACTAAATATACAAAACATATATTTT				9960-10255-R	TTTCTTTAAATTAATTAATTTTTTCAAAA		
12	3002-3212-F	TTTTTAATGGTTTTAAATTTGAAAATTTGAAGA	211	有	38	10347-10587-F	AGAGATTATTTTTAAGTAAAAATTTAAT	241	无
	3002-3212-R	AAAAATTAATAATAACAACAACCTAATTTCTA				10347-10587-R	TAAACCTTTAAAAATTTCTCTAATTC		
13	3271-3477-F	GGGTTTTTTGTATATTAATTTTAGTAGA	207	有	39	10584-10789-F	TTTAGTTAATTAATATGAATTAGGAGTAT	206	无
	3271-3477-R	AATATAITTAACCTTAATAAAAAITACTTCTC				10584-10789-R	CTAAAAATTTTACTTACCATAAAAAAC		

续表 1

编号 no.	引物名称 primer name	序列 sequences	长度/bp size	扩增产物 PCR production	编号 no.	引物名称 primer name	序列 sequences	长度/bp size	扩增产物 PCR production
14	3410-3629-F	TTTTATTGATTA TAGTTTAGTGATGG	220	无	40	10813-11003-F	AAGATTTTAAATTTAAATTTAAAAA	191	无
	3410-3629-R	AATTAATCCCAACTAAAAACCAAC				10813-11003-R	ATAAATACATAAAAACTATTACAACC		
15	3695-3917-F	TTTGAATTTAATATGTTTTAAATAGATTTA	223	无	41	10994-11262-F	TGTAATTTAATTTAATAGGTTTTTTTT	269	无
	3695-3917-R	AAAACTACTATCAAAAAACCAACC				10994-11262-R	ATTAACCTTTTAAAAATTTCTTTTT		
16	3897-4114-F	TGGTTTTTTGATAGTGATTTTTATAT	218	有	42	11283-11404-F	ATTAATTAATAAAAAAGATAGAAAATTAATTT	122	无
	3897-4114-R	CTATCCTAAAAATACCAAACTTATTAATTA				11283-11404-R	AATTAATAATTCATACAAAATATAACC		
17	4080-4264-F	ATTTTTAATTAATAAGTTTGGTATTTTTAG	185	无	43	11562-11839-F	TTTTAATAAAAAATAAAAAAGAGAAATTTTATAA	278	无
	4080-4264-R	AACAAAATCCTTTAAAAATCAAAATCC				11562-11839-R	TATTAATAATAAAAACTAACCTACCCACTAA		
18	4409-4596-F	TTGATTTTTTTAGTAGGTTTTTTAATA	187	无	44	11847-12146-F	TAGTTATGTTTTTGGATAAAATAGGTAAGAAT	300	无
	4409-4596-R	AACAACCTATTACCAAAAATTTAAATC				11847-12146-R	AAAAATAAAAACTTCTTAATTTCCC		
19	5250-5490-F	AATAAGTAGGAAAAAATTAGTTAAGAAAGAG	241	有	45	12509-12731-F	TTTTTTTTTAAGAAGTATTTATTAGGTAA	223	无
	5250-5490-R	AAAAATAACATTCATAAAAAACCAITTAATATA				12509-12731-R	TATACTTTAAAAATTAATTTAATATATTC		
20	5501-5759-F	TTTTTAGAGTAAAAATTTAGTTAAAAA	259	无	46	12817-13042-F	GAAGTTTTTTAATTTAGAAAAATATTTAAAAA	226	无
	5501-5759-R	TAAAAACAATTAATAATAATAATAAAAAATTC				12817-13042-R	TAAACCAAAAATTAATAACCCATTATTAATA		
21	5865-5978-F	AAGTGTAGTTAATTTAGGTTTAAAT	114	有	47	13970-14197-F	TTTTTTAATTTGTAAGAGAAATAGAGAAATAT	228	无
	5865-5978-R	TACCAACTACAATAACAACCTCCTAC				13970-14197-R	TCTTTTAAAAATCCTTTTAAAAACC		
22	6044-6232-F	AAATTAITTTTTAAAAAGTTTTTTTTT	189	无	48	14492-14776-F	AAGTTAAAGTTTTATGGGTTTTATATTT	285	有
	6044-6232-R	TCTTAATTTAATATCTTTATACCCTAATAAT				14492-14776-R	ATAATAACACTTACAAAAAAAATAATAC		
23	6260-6367-F	ATTAGGGTATAAGATAITTAATAATTAAGAT	108	无	49	14866-15125-F	TAATTTATATATAAGGAAATGTTATGGTTAA	260	无
	6260-6367-R	ATATTATAAAAAAAATATATAAAAAAAA				14866-15125-R	CACTCATAAAATTAATACTAAAAAATAAACC		
24	6696-6900-F	AATATTTAAGGGTAATTTAGTGAAGTATTA	205	无	50	15365-15486-F	AATAATTTGTTTTAATTTAATTTTTTTTT	122	无
	6696-6900-R	AATTAATCTAAATTAITAAAAATCAATTC				15365-15486-R	ACCTAAATTTAACTAAATCCTTAAATC		
25	6894-7181-F	ATTAATTTTTTTTAAATAAAATTTAAAGT	288	无	51	15619-131	TTATAATTTTAGGATTTGTAGTTTGA	244	无
	6894-7181-R	TTAATTAATTAATTTCTTCTTATTAATCAATATA				15619-131	ATACCTAAATTAACCTAAATTCACACTC		
26	7176-7402-F	AATTAAGATTTTATATTTTTTTTGA	227	无					
	7176-7402-R	TAATTCATCTATAAATCTCCCAAAAAAC							

AAGTGCCAGTTAATCTAGGCCTAAACCGAATCAATAAATATACCCCGCCG
 CTACTAAAGTAGAAGAATGCACTAAAGCTGATACAGGCGTAGGAGCTGCC
 ATTGCAGCTGGTA

图 4 21#引物扩增区的甲基化模式

Fig. 4 The methylation pattern of the amplification zone of primers 21#

3 讨论

3.1 脊尾白虾耐饥饿的能力分析

不同生物对饥饿的耐受性程度不同,如倒刺鲃(*Spinibarbus denticulatus*)仔鱼只能存活 1~2 周^[11],而太平洋鲑(*Oncorhynchus* sp.)则可耐受饥饿 1 个月以上^[12],同时不同生理生长阶段和不同外界环境条件也影响生物对饥饿的耐受程度^[11-12],一般而言成体相较于未成年个体具有更强的耐饥饿能力。本研究中采用的脊尾白虾个体均为成体或大规格个体,图 1 显示了这些个体耐受饥饿的能力,其平均耐饥饿死亡时间为 19.8 d,即 20 d 左右,饥饿死亡时间范围为 5~48 d。由于目前还缺少其他虾类耐饥饿极限的相关研究报道,因此还不能确定脊尾白虾耐饥饿能力的水平如何。

3.2 饥饿对线粒体基因组 DNA 甲基化的影响

已有的研究表明,影响基因组 DNA 甲基化的因素很多,如不同发育阶段^[13]、重金属离子^[14]、有机物^[15]和温度^[16]。Dzitoyeva 等^[17]的研究表明,在小鼠(*Mus musculus*)不同年龄阶段其脑组织中线粒体基因组的甲基化水平也会发生变化。本研究则进一步揭示饥饿状态也能促使脊尾白虾线粒体基因组 DNA 产生甲基化,其意义在于,一是目前大多数的研究都集中在核基因组的研究上而对线粒体基因组的甲基化现象研究比较少,本研究的结果进一步证实了线粒体基因组本身也积极参与甲基化调控,尽管其自身基因的表达调控受到多达 1 500 个核基因组基因的调控^[18];二是目前在陆生哺乳类和植物中研究甲基化现象的较多,而在水产养殖经济生物尤其是虾类中还鲜见报道,实验的结果对于展开虾类甲基化的相关研究提供了借鉴。

因为线粒体是细胞的“动力工厂”,实验原设想其基因组中负责能量代谢有关的 ATP 合成酶基因(图 2 中 12#引物所在基因)可能会在不同饥饿期显示出一定程度的甲基化状态变化,但事实

上是 16#和 21#引物所在的 *ND* (NADH dehydrogenase,还原型辅酶 I 脱氢酶)基因(图 2)。基因组水平甲基化的主要功能是进行基因表达的调控,由于 *ND* 基因的表达产物在能量代谢的电子传递链中起到关键性作用,因此这也说明饥饿会影响细胞内能量代谢的过程,在线粒体基因组水平表现为负责能量代谢的电子传递链相关基因受到甲基化的调控。最新对人类线粒体基因组甲基化的相关研究表明,神经障碍症患者的 *ND* 基因也发生了甲基化现象^[19],因此线粒体基因组 *ND* 基因序列区可能是甲基化的热点区。

另外,本研究还揭示了不同饥饿期线粒体基因组甲基化个体的比例存在差异,在饥饿第 10 天时比例最高,而后有降低的趋势,其原因有待进一步探讨。

3.3 线粒体基因组 DNA 甲基化模式

表观遗传学研究基因和环境间的互作现象,目前已知的主要表观基因修饰有 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化、染色质重塑基因印记和非编码 RNA 等^[20-21]。其中,DNA 甲基化是最重要的一种基因修饰类型,因此也是被研究最多的一种类型。已知基因组水平的甲基化现象在自然界是普遍存在的,甚至在具有很小基因组长度的线虫(*Trichinella spiralis*)中也存在着甲基化现象^[22],在高等动植物的核基因组中更是普遍存在,但是这些生物基因组中甲基化的类型并不一样。

目前在哺乳动物基因组水平发现的 DNA 甲基化类型主要是 CpG,而植物中除了 CpG 甲基化外,还有 CHG 和 CHH 甲基化(H = A, C 或 T)^[23]。本研究的结果表明,脊尾白虾线粒体基因组的甲基化类型除了 CpG 外,也存在类似植物中的甲基化类型,如 CHG 和 CHH。虽然还没有明确的报道指出哪种 DNA 甲基化类型更“高等”,但从植物基因组和本研究中脊尾白虾线粒体基因组在生物进化中的地位比哺乳动物基因组较低等而言,应该把 CHG 和 CHH 的类型归于较原始的甲基化类型。这也引出两个需要进一步探

讨的研究方向:一是不同种甲基化类型在稳定性、可逆性和跨代遗传上存在的差异有待进一步探讨;二是有研究证实拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中 CpG 和 CHG 位点的甲基化是分别由不同的甲基化酶完成的^[24],因此负责脊尾白虾线粒体基因组甲基化的酶是否存在多种有待进一步的研究。这些研究的开展将进一步阐明脊尾白虾线粒体基因组的甲基化机制,也是未来的研究方向。

另外值得一提的是,基于线粒体全基因组模式的甲基化研究还有待开发新的技术方法,本研究中设计了 51 对覆盖全基因组的 BSP 引物,但只有 5 对获得了稳定的扩增效果。其原因在于:线粒体基因组富含 AT 序列,甲基化所在 CpG 序列的位置区很少,造成了根据 CpG 富集区设计的 BSP 引物可以扩增出 PCR 产物的区域也少;另外,富含 AT 的序列经过重亚硫酸氢盐处理后,很容易断裂,完整性被破坏,因此针对这部分序列区设计的引物也很难扩增出相应的产物。

参考文献:

- [1] Xiong W, Zhang H Y, Yang H J, *et al.* Research advances in transcription and regulation mechanism of mammalian mitochondrial genome [J]. Journal of Dali University, 2014, 13 (8) : 26 - 30. [熊伟, 张海洋, 杨红娟, 等. 哺乳动物细胞线粒体基因组的转录及调控机制研究进展. 大理学院学报, 2014, 13 (8) : 26 - 30.]
- [2] Yang L, Yu S C. Mitochondrial DNA damage and apoptosis [J]. Labeled Immunoassays & Clin Med, 2013, 20 (5) : 325 - 328. [杨栎, 余时沧. 线粒体 DNA 损伤与细胞凋亡. 标记免疫分析与临床, 2013, 20 (5) : 325 - 328.]
- [3] Gong L, Shi W, Si L Z, *et al.* Rearrangement of mitochondrial genome in fishes [J]. Zoological Research, 2013, 34 (6) : 666 - 673. [龚理, 时伟, 司李真, 等. 鱼类线粒体 DNA 重排研究进展. 动物学研究, 2013, 34 (6) : 666 - 673.]
- [4] Xu J M. Study and application of mitochondrial DNA in crabs [J]. Periodical of Ocean University of China, 2006, 36 (6) : 879 - 884. [徐敬明. 蟹类线粒体 DNA 的研究与应用. 中国海洋大学学报, 2006, 36 (6) : 879 - 884.]
- [5] Dawid I B. 5-methylcytidylic acid: Absence from mitochondrial DNA of frogs and Hela cells [J]. Science, 1974, 184 (4132) : 80 - 81.
- [6] Feng S, Xiong L, Ji A, *et al.* Correlation between increased ND2 expression and demethylated displacement loop of mt DNA in colorectal cancer [J]. Molecular Medicine Reports, 2012, 6 (1) : 125 - 130.
- [7] Strong N, Lambertini L, Ma Y, *et al.* 441: Differential mitochondrial DNA methylation in growth restricted placentas [J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2013, 208 (1) : s192.
- [8] Dzitoyeva S, Chen H, Manev H. Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in brain mitochondria [J]. Neurobiology of Aging, 2012, 33 (12) : 2881 - 2891.
- [9] Holthuis L B. FAO species catalogue. Shrimps and prawns of the world: An annotated catalogue of species of interest to fisheries [M]. Leiden: Food And Agriculture Organization of the United Nations, 1980.
- [10] Xu W, Xie J, Shi H, *et al.* Hematodinium infections in cultured ridgetail white prawns, *Exopalaemon carinicauda*, in eastern China [J]. Aquaculture, 2010, 300 (1 - 4) : 25 - 31.
- [11] Huang H G. The starvation endurance of *Spinibarbus denticulatus* larvae [J]. Journal of Dalian Fisheries University. 2010, 25 (2) : 137 - 142. [黄洪贵. 倒刺鲃仔鱼饥饿耐力的研究. 大连水产学院学报, 2010, 25 (2) : 137 - 142.]
- [12] Luo B, Feng J, Jiang B G, *et al.* The effects of starvation on growth, proximate composition and biochemical index of plasma of Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.) [J]. ACTA Hydrobiologica Sinica, 2010, 34 (3) : 541 - 546. [罗波, 冯健, 蒋步国, 等. 饥饿对太平洋鲑生长、机体组成及血浆相关生化指标变化研究. 水生生物学报, 2010, 34 (3) : 541 - 546.]
- [13] Mhanni A A, McGowan R A. Variations in DNA (cytosine-5)-methyltransferase-1 expression during oogenesis and early development of the zebrafish [J]. Development Genes And Evolution, 2002, 212 (11) : 530 - 633.
- [14] Zhang J, Mu X L, Wang X X, *et al.* Adverse effects of arsenic exposure on DNA methylation: A review of recent studies [J]. Journal of Environment and Health, 2014, 31 (3) : 269 - 276. [张洁, 木晓丽, 王晓雪, 等. 砷对 DNA 甲基化影响的研究进展. 环境与健康杂志, 2014, 31 (3) : 269 - 276.]
- [15] Zama A M, Uzumcu M. Fetal and neonatal exposure to the endocrine disruptor methoxychlor causes epigenetic alterations in adult ovarian genes [J]. Endocrinology, 2009, 150 (10) : 4681 - 4691.

- [16] Zhu H P, Lu M X, Huang Z H, *et al.* Effect of low temperature on genomic DNA methylation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *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.]
- [17] Dzitoyeva S, Chen H, Manev H. Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in brain mitochondria [J]. *Neurobiology of Aging*, 2012, 33(12): 2881 - 2891.
- [18] Milone M, Wong L J. Diagnosis of mitochondrial myopathies [J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2013, 110(1-2): 35 - 41.
- [19] Ghosh S, Sengupta S, Scaria V. Comparative analysis of human mitochondrial methylome show distinct patterns of epigenetic regulation in mitochondria [J]. *Mitochondrion*, 2014, 18: 58 - 62.
- [20] Gibney E R, Nolan C M. Epigenetics and gene expression [J]. *Heredity*, 2010, 105: 4 - 13.
- [21] Goldberg A D, Allis C D, Bernstein E. Epigenetics: A landscape takes shape [J]. *Cell*, 2007, 128(4): 635 - 638.
- [22] Gao F, Liu X, Wu X P, *et al.* Differential DNA methylation in discrete developmental stages of the parasitic nematode *Trichinella spiralis* [J]. *Genome Biology*, 2012, 13(10): R100.
- [23] Wang R X, Xu J H. Genomic DNA methylation and histone methylation [J]. *Hereditas*, 2012, 36(3): 191 - 199. [王瑞娴, 徐建红. 基因组 DNA 甲基化及组蛋白甲基化. *遗传*, 2012, 36(3): 191 - 199.]
- [24] Chan S W, Henderson I R, Jacobsen S E. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(5): 351 - 360.

Analysis of methylation profile in mitochondrial genome of *Exopalaemon carinicauda* in response to starvation

GAO Huan^{1,2,3*}, ZHAO Lian¹, XUE Bei¹, ZHU Guohua, LAI Xiaofang^{1,2,3},
CHEN Jianhua^{1,2,3}, SHEN Xin^{1,2,3}, YAN Binlun^{1,2,3}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Lianyungang 222001, China;

3. The Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China)

Abstract: As the “energy factory”, the mitochondria play an important role in the metabolism of cells. However, it is little known whether or not the mitochondria in shrimps mediate the energy metabolism-related gene expressions by methylating the mitochondrial genome DNA sequences. In this study, in order to analyze the methylation profile of the mitochondria in response to starvation in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*, we designed 51 BSP (bisulfite sequencing PCR) primer pairs where PCR amplification zones covered the whole mitochondrial genome. Of the 51 primer pairs, 10 primer pairs could get the predicted PCR products, but only 5 primer pairs were selected for further studies because of their repeatable PCR amplification merits. The methylation profile of different individuals at 10 d, 20 d and 30 d after starvation stress were analyzed, using the above 5 primer pairs. Our results showed that the average death time of tolerating starvation for the *E. carinicauda* was 19.8 days, and the longest tolerating time was 48 days. The DNA methylation in mitochondria genome was found at each starvation stress stage. But, to our surprise, the methylation ratio decreased following the elongation of starvation time. The individuals with DNA methylation were the highest on 10th d, second on 20th d, and the least on 30th d. The DNA methylation was mainly found in the ND genes (NADH dehydrogenase gene) whose expression production was responsible for maintaining the respiratory electron-transport chain in mitochondria. So, we speculated that the function of methylation is to control the energy transfer in mitochondria.

Key words: *Exopalaemon carinicauda*; mitochondrial genome; methylation; starvation

Corresponding author: GAO Huan. E-mail: huanmr@163.com