



长牡蛎 *Htati2* 的表达及其在不育三倍体雌性中的 DNA 甲基化

孙东方¹, 于红^{1,2}, 李琪^{1,2*}

(1. 中国海洋大学, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 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 266237)

摘要: 为探究 DNA 甲基化在长牡蛎性腺发育中的表观遗传调控机制, 对长牡蛎 *Htati2* 的同源性、系统进化、组织表达以及三倍体性腺可育型和不育型不同发育时期的基因表达和 DNA 甲基化谱进行了研究。结果显示, 长牡蛎 *Htati2* 的保守结构域与美洲牡蛎的 *Htati2-like* 的保守结构域同源性最高。qPCR 分析显示, *Htati2* 在各个组织中均有表达, 其中在雌性性腺中的表达量最高。此外, 该基因的表达量在可育型三倍体牡蛎性腺中随着性腺发育成熟而升高, 在不育型三倍体牡蛎性腺中表达量变化不显著。BS-PCR 分析显示, 该基因的甲基化水平随着性腺发育成熟而降低, 与基因表达水平成负相关性。双荧光素酶报告结果显示, 甲基化的 *Htati2* 启动子片段与未甲基化的片段相比, 显著抑制了荧光素酶的活性。研究表明, 长牡蛎 *Htati2* 的 DNA 甲基化可能通过抑制基因表达参与了性腺成熟调控。本研究为表观遗传调控机制参与牡蛎性腺发育提供了重要参考依据。

关键词: 长牡蛎; 三倍体不育; DNA 甲基化; 基因表达

中图分类号: S 968.31

文献标志码: A

长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 是世界性的养殖种类, 也是我国海水养殖主导品种, 具有重要的经济价值。2021 年我国牡蛎产量为 582 万 t^[1], 居世界首位。尽管牡蛎产量位居第一, 但是夏季高温及配子排放引起牡蛎抗逆性降低、能量耗竭导致牡蛎死亡率升高等问题仍然存在。因此, 抗逆性育种和育性控制育种是解决牡蛎夏季大规模死亡、提高产量以及改善繁殖季节肉质的有效手段。目前, 利用长牡蛎四倍体和二倍体杂交获得的三倍体有效解决了这一问题。三倍体牡蛎为牡蛎行业带来了诸多优势, 例如生长快速、部分不育等^[2-3]。长牡蛎三倍体的性能增强与其部分不育有关, 尤其在能量重新分配、倍性和杂合度增加导致的快

速生长方面^[4]。一旦牡蛎开始性成熟, 能量重新分配显得尤为明显, 三倍体将用于配子发生的能量重新分配用于体细胞生长^[3]。与长牡蛎二倍体相比, 大多数三倍体的性腺发育受阻、繁殖力低, 少数三倍体能够产生非整倍体的配子并发育为有活力的后代^[5]。Jouaux 等^[6] 将能产生大量配子的长牡蛎三倍体称为可育型 (3n α), 相应的不产生配子或者产生少量配子的三倍体称为不育型 (3n β)。目前, 三倍体不育分子机制的解释主要有以下几个方面: ①在染色体水平上, 配子减数分裂染色体联会过程中配对紊乱, 导致减数分裂失败^[7-8]; ②不育三倍体中性腺发育迟缓与细胞周期检查点以及性别发育相关基因表达水平的改变有关^[9-10]; ③内

收稿日期: 2022-10-19 修回日期: 2022-11-21

资助项目: 国家贝类产业技术体系专项 (CARS-49); 山东省农业良种工程项目 (2021LZGC027)

第一作者: 孙东方 (照片), 从事贝类遗传育种研究, E-mail: 961012207@qq.com

通信作者: 李琪, 从事贝类遗传育种研究, E-mail: qili66@ouc.edu.cn



源性的 miRNA 对长牡蛎能量分配和配子发生相关基因的调节导致三倍体不育^[11]; ④DNA 甲基化对基因表达水平的调控与三倍体不育有关^[12]。

长牡蛎三倍体的性成熟在个体间差异很大, 除了遗传因素外, 环境对其性腺发育的影响至关重要^[2]。表观遗传是环境和遗传之间的桥梁, 在牡蛎环境适应性方面起着重要作用。迄今为止, 研究人员描述了四种表观遗传调控因子, 即组蛋白修饰、DNA 甲基化、RNA 修饰和非编码 RNA 调控, 其中 DNA 甲基化研究的最为深入^[13]。DNA 甲基化在 X 染色体失活、转录调控、基因印记的维持及抑制转座子等方面具有重要作用。在长牡蛎中, DNA 甲基化为镶嵌型分布, 整体甲基化水平约为 2%, CG 位点甲基化水平为 12%~16%^[14-15]。在之前的研究中, 从不育型雌性三倍体 3n β 和可育型雌性三倍体 3n α 比较组中筛选了一些差异甲基化区域 (DMR), 其中 *Htati2* (HIV-1 tat interactive protein 2, 一种编码氧化还原酶的基因) 的启动子区域在可育三倍体中的甲基化水平显著高于不育三倍体的甲基化水平^[12]。此外, *Htati2* 的表达水平在可育和不育三倍体间也存在差异, 暗示 DNA 甲基化可能通过调控基因表达水平影响三倍体性腺发育。

Htati2 是一种进化上保守的基因, 在细胞凋亡和肿瘤抑制中具有重要作用, 特别是在控制参与细胞凋亡和肿瘤转移抑制基因的表达方面^[16]。*Htati2* 协同雌激素受体 α (Era) 相互作用的共激活因子 CIA (coactivator independent of AF-2 function) 调节 Era 介导的 *c-Myc* 转录^[17]。此外, 肝细胞中 *Htati2* 的过表达或低表达影响了脂肪酸的存储和氧化^[18]。在敲除 *Htati2* 的 HeLa 细胞中, 线粒体呼吸维持在高水平, HeLa 细胞显示出对低葡萄糖代谢的适应能力^[19]。

本研究分析了长牡蛎 *Htati2* (LOC105325288) 蛋白保守结构域的同源性和系统演化, 探讨了 *Htati2* 基因在不同组织和三倍体性腺不同发育时期的表达模式, 进一步分析了该基因启动子的 DNA 甲基化水平在不同性腺发育时期的变化并与表达水平关联, 最后利用双荧光素酶报告实验验证了 DNA 甲基化对基因表达的调控作用。本研究旨在查清 *Htati2* 在不同育性三倍体各发育时期的 DNA 甲基化谱及 DNA 甲基化的作用, 研究结果将为探究表观遗传对长牡蛎三倍体不育的调控机理提供重要信息。

1 材料与方法

1.1 实验对象

本研究所用牡蛎采集于荣成市桑沟湾海区。三倍体牡蛎由雌性二倍体和雄性四倍体牡蛎杂交产生。2021 年 1—6 月, 每月取 30 颗二倍体和三倍体牡蛎的性腺组织用于性腺不同发育时期的基因表达和 DNA 甲基化模式分析。随机选择 6 颗成熟期二倍体长牡蛎, 取其全组织 (鳃、外套膜、闭壳肌、消化腺、血淋巴唇瓣、雌性性腺和雄性性腺) 进行组织表达分析。所有性腺组织均取两份, 一份用波恩氏液固定, 另一份用液氮冷冻后保存在 -80°C 冰箱中。取鳃组织在流式细胞仪 (Beckman Coulter, USA) 上检测倍性^[10]。

1.2 生物信息学分析

在 NCBI 数据库中使用 Blast 程序对 *Htati2* 的氨基酸序列进行搜索。利用保守序列分别在 DNAMAN 9.0 和 MEGA 7.0 软件上进行同源性分析和系统发育树构建。使用已发表的数据分析 *Htati2* 在不同育性长牡蛎中的 DNA 甲基化模式, 并用 IGV 浏览器展示^[12]。

1.3 DNA 和 RNA 提取

根据组织学分析, 将二倍体和三倍体雌性牡蛎分为休止期、增殖期和成熟期, 三倍体的成熟期又被分为可育型 (3n α) 和不育型 (3n β)。用 DNA 提取试剂盒 (Tiangen) 从不同发育时期的性腺中提取基因组 DNA。用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 提取 RNA, 取 30 mg 组织加 1 mL TRIzol, 然后用氯仿抽提, 异丙醇沉淀, 75% 乙醇洗涤, 最后用 DEPC 水溶解。DNA 和 RNA 的浓度和完整性分别用 Thermo nanodrop 2000 微量紫外分光光度计和 1% 的凝胶电泳检测。

1.4 *Htati2* 在长牡蛎不同组织和性腺不同发育时期的表达分析

使用反转录试剂盒 HiScript[®] II Q Select RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (Vazyme) 将 1 μg RNA 反转录为 cDNA。使用 ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (Vazyme) 在 LightCycler 480 II 检测系统 (Roche) 上进行实时定量 PCR。定量 PCR 的反应体系为 20 μL , 包括 10 μL 混合液、0.4 μL 引物和 10 ng cDNA (表 1)。反应程序为 95°C 5 min; 95°C 15 s, 56°C 15 s, 72°C 30 s, 40 个

循环。使用长牡蛎 *EfI α* (LOC105338957) 作为内参基因。每个样品进行 3 个生物学重复和 2 个

技术重复, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因的相对表达水平。

表 1 本研究所用引物

Tab. 1 Primers used in this research

引物名称 names	序列 sequence (5'-3')	用途 purpose
qHtatip2 F	AACATTTTCTACATACCTCGTCC	qPCR
qHtatip2 R	CTGTACACAATAAGATTCTGG	
BS-Htatip2 F	TGTTGGAAGGATTTTATAATTTTG	BS-PCR
BS-Htatip2 R	TTATTTTTTACAATCCTATCCTAT	
promoter_Htatip2 F	GGGGTACCATGCTTACAGATATGATTACATG	bifluorescence
promoter_Htatip2 R	CCCTCGAGACATTTTGAACGTTGTGGTG	

1.5 *Htatip2* 在长牡蛎性腺不同发育时期的甲基化分析

使用亚硫酸氢盐转化试剂盒 (天根生化科技有限公司) 将 1 μg 不同发育时期的性腺 DNA 转化为甲基化 PCR 模板。2 \times Taq Plus Master Mix II (Dye Plus) 酶 (Vazyme) 用于 PCR 扩增。使用甲基引物扩增 *Htatip2* 上游-1 328~-1 019 bp 的片段, 每个时期设置 3 个生物学重复 (表 1)。扩增目标片段使用 20 μL 反应体系, 包括 10 μL 混合液、0.8 μL 正反引物和 30 ng 模板。PCR 程序设置为 95 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s, 56 $^{\circ}\text{C}$, 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。通过切胶回收目标片段, 将回收产物与 pMD19-T (TaKaRa) 载体在 16 $^{\circ}\text{C}$ 下连接 5 h, 然后转化至 DH5 α 感受态细胞。随机选择 10 个单克隆进行 Sanger 测序。利用 BiQ_Analyzer 软件进行亚硫酸氢盐的转化效率和 DNA 甲基化水平计算以及数据可视化展示。

1.6 双荧光素酶报告验证甲基化对基因表达的调控作用

在 *Htatip2* 差异甲基化区段设计引物并在正向引物的 5' 端添加 *Kpn* I 酶切位点, 在反向引物的 5' 端添加 *Xho* I 酶切位点 (表 1)。通过 PCR 技术从基因组 DNA 中扩增该片段并纯化目的片段。目的片段和 pGL3.0 载体使用 *Kpn* I 酶和 *Xho* I 酶消化, 然后用 T₄ DNA 连接酶连接构建 pGL3.0-*Htatip2* 质粒。

利用 *Sss* I 甲基化酶 (NEB) 甲基化 pGL3-*Htatip2* 质粒的胞嘧啶。*Sss* I 甲基化酶能够识别双链二核苷酸序列 (5'-CG-3') 中的胞嘧啶, 并将胞嘧啶残基甲基化。最后用 *Mcr*BC 酶 (NEB) 消化检验甲基化的质粒。甲基化的质粒被用于瞬时转染实验。

使用 Lipofectamine 3000 试剂盒 (Invitrogen) 将 500 ng 的 pGL3-*Htatip2* 甲基化和未甲基化的质粒分别转染到 500 μL 的人胚肾 293T (HEK 293T) 细胞中, 同时转染 50 ng 的报告基因质粒 pRL-TK 以监测转染效率并作为内部对照。所有的转染实验进行 3 次, 每次 3 个技术重复。转染 24 h 后更换培养基, 48 h 后用 1 \times PBS 缓冲液清洗细胞, 并在 100 μL 细胞裂解液中裂解。在 Synergy NEO2 仪器中使用荧光素酶检测试剂盒 (Promega) 检测裂解产物的荧光素酶活性, 采用 Renilla 荧光素酶的活性标准化检测结果。

1.7 数据分析

采用平均值 \pm 标准误 (SE) 表示 qRT-PCR 数据, 方差分析两组数据间的差异。甲基化水平为发生甲基化的 C (胞嘧啶) 位点数量除以 C 位点总数。使用 Pearson 相关系数评估 DNA 甲基化和基因表达之间的相关性, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 长牡蛎 *Htatip2* 同源性和进化树分析

使用 NCBI 保守结构域分析显示, *Htatip2* 包含 CC3_like_SDR_a 结构域。对该结构域进行同源序列比对分析表明, 长牡蛎 *Htatip2* 氨基酸保守结构域与美洲牡蛎 (*C. virginica*) 的 *Htatip2-like* 氨基酸保守结构域同源性最高 (88.73%); 与紫贻贝 (*Mytilus edulis*)、厚壳贻贝 (*M. coruscus*)、虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*)、地中海贻贝 (*M. galloprovincialis*) 的同源性较高, 分别为 67.61%、67.14%、61.32% 和 56.25%; 与节肢动物三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 和凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的 *Htatip2* 同源性氨基酸保守结构

域分别为 49.54% 和 43.06%; 与鱼类虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和黄河鲤 (*Cyprinus carpio haematopterus*) 的同源性均为 51.64% (图 1-a)。系统进化树显示, 长牡蛎 *Htati2* 与巨蛎属中美洲牡蛎的 *Htati2* 聚为一支, 然后与虾夷扇贝聚在一起 (图 1-b)。长牡蛎 *Htati2* 与其他无脊椎动物的 *Htati2* 形成了一个有别于脊椎动物同源物的主要群体 (图 1-b)。

2.2 *Htati2* 在长牡蛎不同组织和性腺不同发育时期的表达模式

Htati2 在 8 个组织中的 qPCR 结果显示, 该基因在各组织中广泛表达且在雌性生殖腺中表达量最高 (图 2-a)。*Htati2* 在性腺不同发育时期的表达水平结果显示, 在二倍体中, *Htati2* 在休止期和增殖期的表达水平较低, 在成熟期的表达量最高, 分别为休止期和增殖期的 11.3 倍和 11.8 倍。在三倍体中, *Htati2* 在休止期、增殖期和成熟期可育型 (3n α) 呈现与二倍体相似的表达模式, 但

在三倍体成熟期不育型 (3n β) 中, *Htati2* 表达水平显著低于成熟期 α , 约为成熟期 α 的 0.26 倍, 表明 *Htati2* 在不育型牡蛎性腺的低表达可能与 3n β 的不育有关 (图 2-b)。

2.3 二倍体和三倍体长牡蛎成熟期 *Htati2* 的 DNA 甲基化模式

用 IGV 软件展示了该基因在二倍体成熟期、三倍体成熟期可育型 3n α 和成熟期不育型 β 的甲基化谱。*Htati2* 的甲基化主要发生在外显子区域, 在内含子区域几乎不发生 DNA 甲基化。比较可育和不育型三倍体牡蛎的甲基化模式发现, 在 *Htati2* 上游 2 kb 范围内存在差异甲基化区域, 该差异甲基化区域在可育三倍体牡蛎中为低甲基化, 在不育型三倍体牡蛎中为高甲基化 (图 3)。

2.4 *Htati2* 在不同性腺发育时期的 DNA 甲基化水平

根据差异甲基化区域, 在 *Htati2* 转录起始

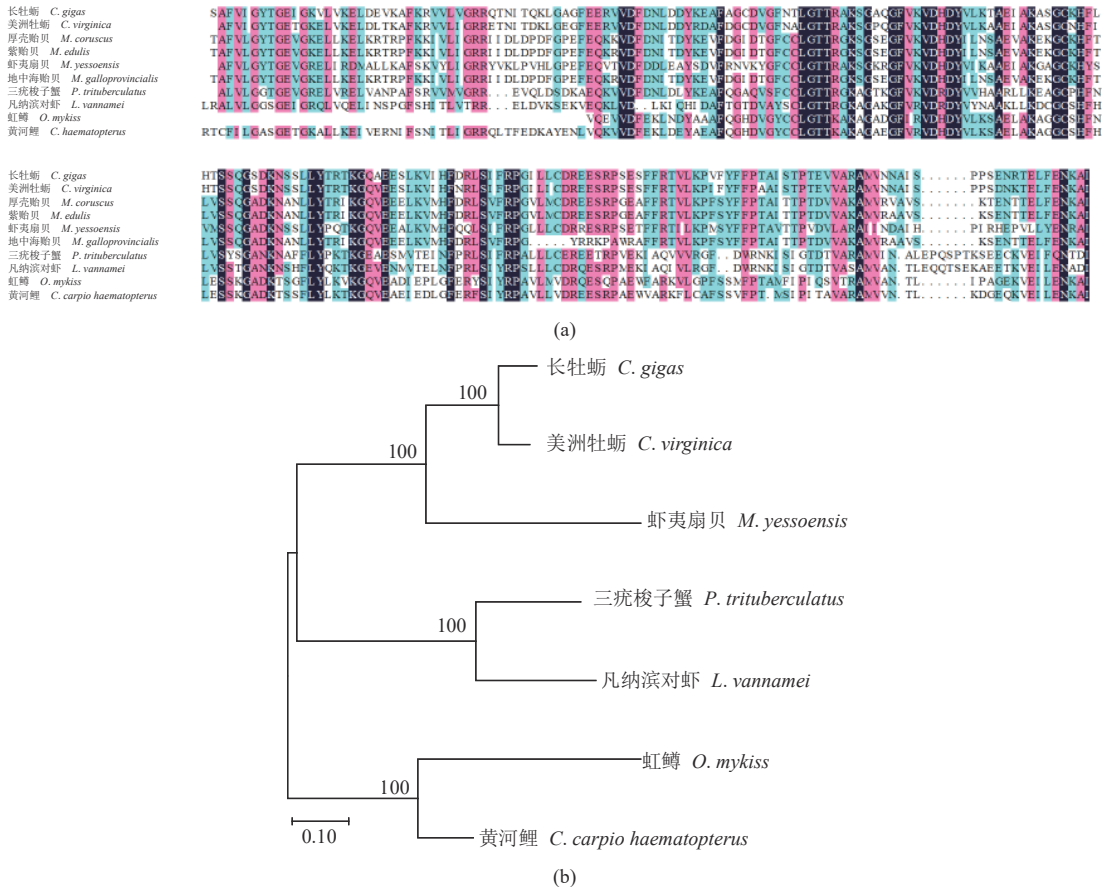


图 1 长牡蛎与其他物种 *Htati2* CC3_like_SDR_a 结构域的氨基酸序列比对及进化树分析

Fig. 1 Multiple sequence alignment and NJ phylogenetic tree analysis of CC3_like_SDR_a of *Htati2* in *C. gigas* and other species

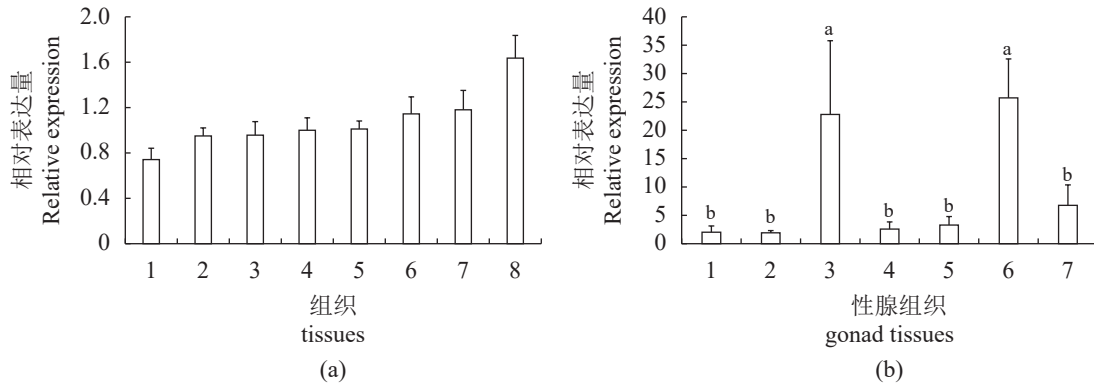


图 2 长牡蛎 *Htatip2* 的表达情况

(a) 各组织, 1.肌肉, 2.雄性性腺, 3.消化腺, 4.外套膜, 5.唇瓣, 6.血细胞, 7.鳃, 8.雌性性腺。(b) 雌性性腺不同发育时期, 1. Res-2n, 二倍体休止期; 2. Pro-2n, 二倍体增殖期; 3. Mat-2n, 二倍体成熟期; 4. Res-3n, 三倍体休止期; 5. Pro-3n, 三倍体增殖期; 6. Mat-3n α , 三倍体成熟期 α ; 7. Mat-3n β , 三倍体成熟期 β , 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 2 Relative expression of *Htatip2* in *C. gigas*

(a) different tissues, 1. muscle, 2. male gonad, 3. digestive gland, 4. mantle, 5. labial palp, 6. hemocyte, 7. gill, 8. female gonad. (b) different gonad development stages of females, 1. Res-2n, diploid resting stage; 2. Pro-2n, diploid proliferating stage; 3. Mat-2n, diploid mature stage; 3. Res-3n, triploid resting stage; 4. Pro-3n, triploid proliferating stage; 5. Mat-3n α , triploid mature stage α ; 6. Mat-3n β , triploid mature stage β ; different letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

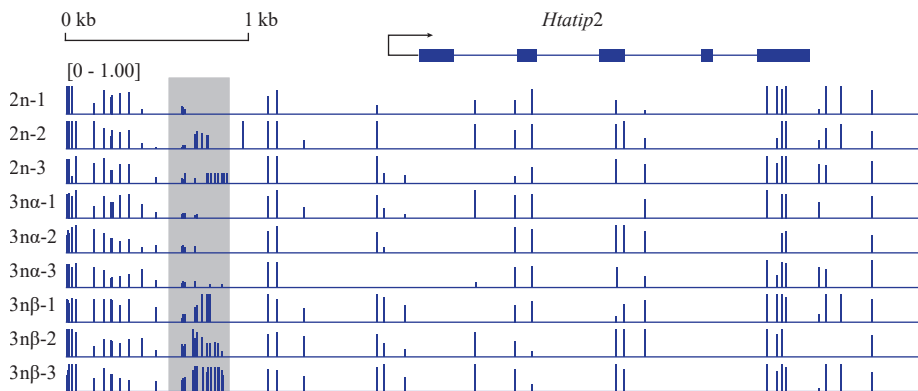


图 3 长牡蛎 *Htatip2* 在二倍体和三倍体雌性性腺中的 DNA 甲基化谱

2n-1、2n-2、2n-3、3n α -1、3n α -2、3n α -3、3n β -1、3n β -2 和 3n β -3 分别表示二倍体、三倍体 α 和三倍体 β 的 3 个生物学重复, 线的高度为 DNA 甲基化水平 (0~1.00), 灰色框表示差异甲基化区域, *Htatip2* 表示基因结构, 箭头表示转录方向

Fig. 3 DNA methylation profiles of *C. gigas Htatip2* in diploid and triploid female gonads

2n-1, 2n-2, 2n-3, 3n α -1, 3n α -2, 3n α -3, 3n β -1, 3n β -2 and 3n β -3 represent three biological replicates of diploid, triploid α and triploid β , respectively, the height of the line represents the level of DNA methylation (0-1.00), the gray box indicates differentially methylated regions, *Htatip2* represents the gene structure, and the arrow indicates the direction of transcription

位点上游 2 kb 区域内选择 310 bp (包含 21 个 CpG 位点) 进行甲基化检测。利用亚硫酸氢盐测序检测了 21 个 CpG 位点在二倍体雌性长牡蛎性腺的休止期、增殖期和成熟期, 以及三倍体长牡蛎可育型 (3n α) 和不育型 (3n β) 成熟期的 DNA 甲基化水平。对 21 个 CpG 位点的启动子的甲基化水平分析发现, 在二倍体成熟期的甲基化水平最低, 为 65.24% \pm 0.62%, 而三倍体成熟期 β 的甲基化水平最高, 为 82.38% \pm 2.86%。方差分析显示, *Htatip2*

的甲基化水平在不同时期的性腺中无显著差异。在 12~14 CpG 位点的甲基化模式分析表明, 三倍体成熟期 β 的甲基化水平最高, 为 80.10% \pm 3.12%, 二倍体成熟期甲基化水平最低, 为 45.10% \pm 2.44%。方差分析表明, 在 12~14 CpG 位点间, 二倍体休止期、增殖期和三倍体成熟期 β 的甲基化水平显著高于二倍体成熟期和三倍体成熟期 α 。二倍体的 DNA 甲基化水平伴随着性腺的发育而降低 (图 4)。

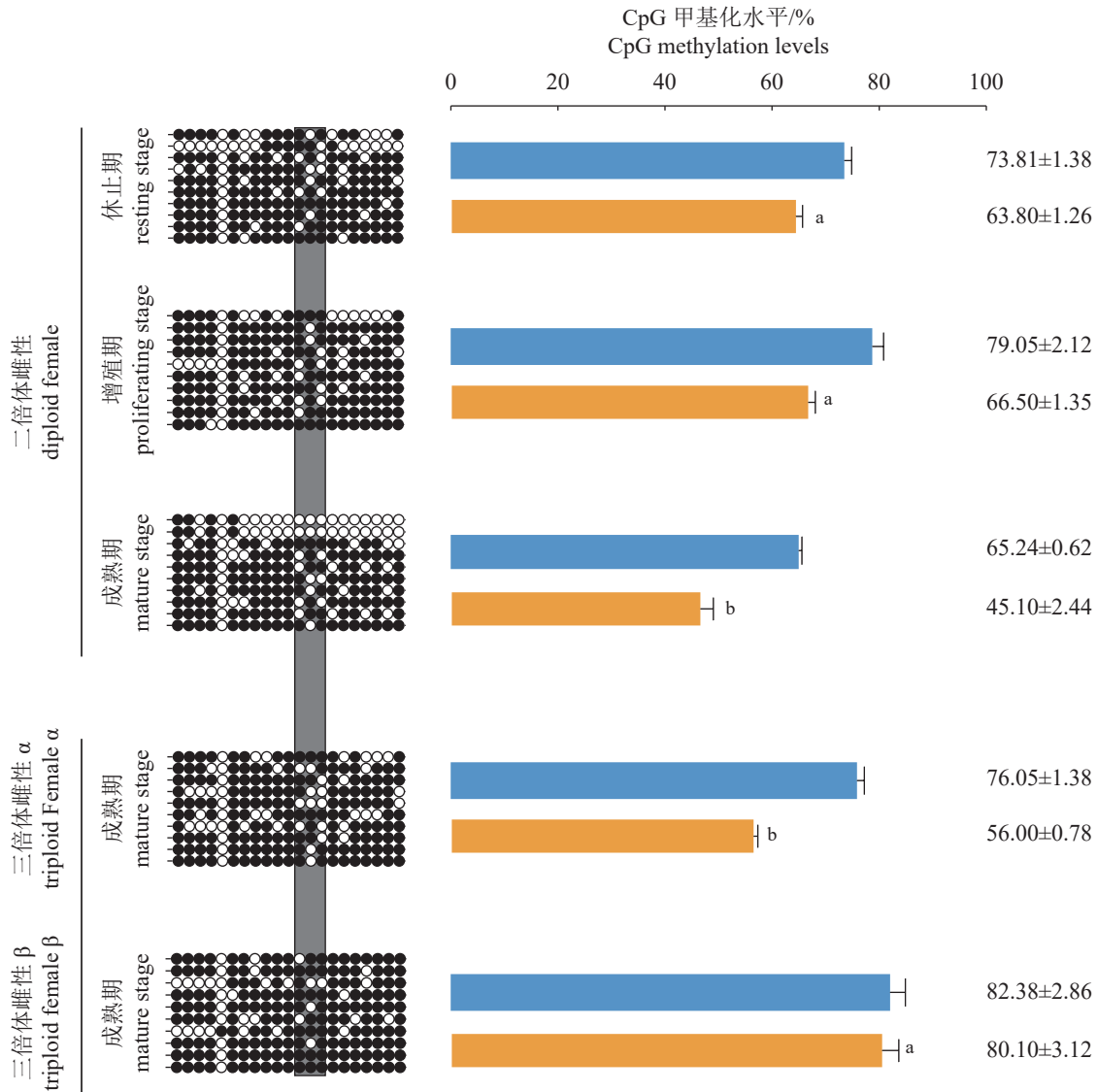


图 4 雌性长牡蛎 *Htip2* 在不同性腺发育时期的 DNA 甲基化谱

黑点表示发生甲基化的 CpG 位点, 白点表示未发生甲基化的 CpG 位点, 灰色框表示 12~14 CpG 位点, 蓝色条形图表示所有 CpG 位点的甲基化水平, 黄色条形图表示 12~14 CpG 位点的甲基化水平, 不同字母表示组间差异显著 ($P<0.05$)

Fig. 4 DNA methylation profiles of *C. gigas Htip2* at different stages of female gonadal development

Black dots indicate methylated CpG sites, white dots indicate unmethylated CpG sites, and gray boxes indicate 12-14 CpG sites, blue bars represent methylation levels at all CpG sites and yellow bars represent methylation levels at 12-14 CpG sites, different letters indicate significant difference between groups ($P<0.05$)

2.5 *Htip2* 的 DNA 甲基化与基因表达的相关性

使用 Pearson 相关系数分析 *Htip2* 在性腺中的相对表达水平与 *Htip2* 启动子区域甲基化水平的相关性。Pearson 相关分析表明, 21 个 CpG 位点的甲基化水平与基因表达呈负相关, 相关系数为 -0.52 (图 5-a)。12~14 CpG 位点的甲基化水平与基因表达的相关系数为 -0.71, 表明 *Htip2* 的启动子甲基化与基因表达之间存在明显的负相关性。双荧光素酶报告实验验证了甲基化和基因表达的

负相关性。值得注意的是, 甲基化的启动子显著抑制了荧光素酶的活性, 荧光素酶的相对活性下降了约 70% (图 5-b)。因此, DNA 甲基化对该区域的启动子活性具有调控作用。

3 讨论

氨基酸同源性分析表明, 长牡蛎 *Htip2* 与其他物种一样含有一个保守的 CC3-like-SDR-a 结构域。SDR 是一个多功能的氧化还原酶家族, 具

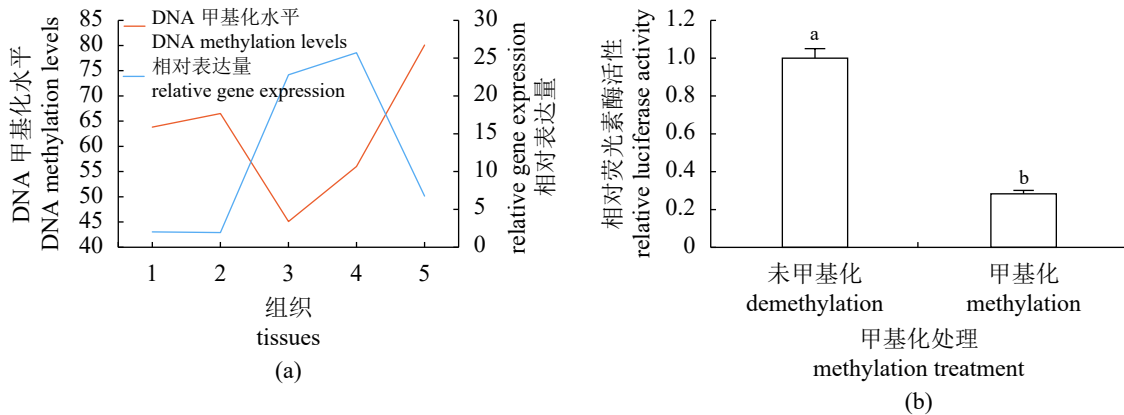


图5 长牡蛎 *Htatip2* DNA 甲基化抑制基因表达

(a) 基因表达水平和 12~14 CpG 位点的 DNA 甲基化水平趋势, 1. Res-2n, 2. Pro-2n, 3. Mat-2n, 4. Mat-3 α , 5. Mat-3n β 。(b) 双荧光素酶报告实验验证 DNA 甲基化对基因表达的抑制作用, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 5 *C. gigas Htatip2* DNA methylation inhibits gene expression

(a) trend of gene expression levels and DNA methylation levels at 12-14 CpG sites, 1. Res-2n, 2. Pro-2n, 3. Mat-2n, 4. Mat-3 α , 5. Mat-3n β . (b) double fluorescence reporter assay verification of inhibitory effect of DNA methylation on gene expression, different letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

有一个保守的 Rossmann 折叠结构域、一个 NADPH 结合区和一个多样性的 C 末端区域, 它们具有广泛的催化作用, 如参与类固醇、碳水化合物、脂质和氨基酸的代谢^[20-21]。系统进化树分析发现, 长牡蛎 *Htatip2* 与无脊椎动物聚为一支, 另一支为脊椎动物, 这符合传统动物系统发生和分类次序。

长牡蛎 *Htatip2* 在所有组织中均有表达, 这与在小鼠和人类中的研究结果一致^[22-23], 进一步说明 *Htatip2* 功能具有保守性。在长牡蛎中, *Htatip2* 在雌性性腺组织中的表达水平最高, 这可能主要与性腺-内脏团作为糖原和脂肪的主要储存器官有关^[24]。糖原是海洋贝类能量的主要来源, 不仅为配子发生提供能量来源, 而且可以转化为甘油三酯, 形成卵黄的主要成分^[25-26]。*Htatip2* 表达水平降低可以增加细胞代谢的灵活性, 减少葡萄糖的消耗并增加对脂肪酸和氨基酸的代谢^[18], 同时减少脂肪酸和甘油三酯的结合^[18]。在二倍体和三倍体 3n α 长牡蛎的性腺发育过程中, 长牡蛎性腺中的糖原含量逐渐减少, 而三倍体不育型 (3n β) 长牡蛎性腺的糖原含量基本不变^[27]。长牡蛎 *Htatip2* 表达水平在二倍体和三倍体可育型中逐渐升高, 说明该基因参与了糖原代谢。在三倍体不育型中, *Htatip2* 表达水平与休止期和增殖期相比并没有发生显著变化, 且糖原消耗并未明显增加^[27], 从而使卵黄形成减少, 导致卵细胞无法正常发育。

长牡蛎与鱼类表现出截然不同的甲基化模式。鱼类呈现出全基因组均匀的甲基化模式^[28], 而长牡蛎的 DNA 甲基化片段镶嵌在未甲基化的区域,

表现出“马赛克”式的甲基化模式^[29]。长牡蛎全基因组 CpG 位点的甲基化水平约为 15%, 而在鱼类中则为 60%~80%^[28, 30]。与其他无脊椎动物一样, 长牡蛎的甲基化主要发生在基因体区域, 在其他基因组区域则发生较少的甲基化^[29]。此外, 基因组的高甲基化与基因表达成正相关, 但也有研究表明, 启动子的甲基化与基因表达成负相关^[31]。值得注意的是, 牡蛎中甲基化水平有限的基因在不同组织中表现出外显子的特异性表达, 表明低甲基化与表型可塑性有关, 这可能与长牡蛎的生存环境有关^[29]。长牡蛎主要在潮间带营固着生活, 环境因子对其具有较大的影响, 其表型可塑性与 DNA 甲基化的改变有关^[29]。个体发育往往伴随着 DNA 甲基化水平的变化^[32], 同样, 在性腺发育或者植物果实成熟的过程中亦是如此^[33-37]。长牡蛎三倍体的性成熟在个体间差异较大, 其中约 75% 为不育型, 因此环境因子对其发育的影响不可忽视。本研究比较了可育型和不育型长牡蛎三倍体中 *Htatip2* 的甲基化水平。成熟期二倍体和三倍体可育型 (3n α) 中的 DNA 甲基化水平显著低于三倍体不育型 (3n β) 中的 DNA 甲基化水平, 这种差异可能与三倍体不育型 (3n β) 的不育有关。长牡蛎 *Htatip2* 的甲基化水平随着性腺发育成熟而增加, 说明在长牡蛎的性腺发育中同样伴随着 DNA 甲基化水平的调控, 这与 DNA 甲基化酶的变化一致^[12]。

对长牡蛎 *Htatip2* 启动子区域进行分析, 发现在三倍体不育型 (3n β) 中仅 12~14 CG 位点的 DNA 甲基化水平显著高于三倍体可育型 (3n α),

提示该位置可能是一些转录因子的结合位点。在长牡蛎中, 基因组中的 DNA 甲基化水平与基因表达成正相关, 启动子区的 DNA 甲基化水平与基因表达成负相关, 但也存在正相关性^[15, 31]。长牡蛎 *Htati2* 的表达水平与 DNA 甲基化成负相关, 这与癌症中的研究一致^[38], 同时也说明高保守性的基因 DNA 甲基化的调控机制也比较保守。体外实验证明 *Htati2* 启动子区发生甲基化抑制基因的表达。以上研究结果表明, 三倍体不育型 (3n β) 中 DNA 甲基化可能抑制 *Htati2* 的启动子活性, 导致 *Htati2* 表达水平降低, 引起性腺发育过程中能量代谢障碍, 最终导致卵子发生受阻。

综上所述, 本研究分析了长牡蛎 *Htati2* 的组织表达以及不同性腺发育时期的基因表达模式, 分析了不同发育时期该基因的甲基化模式, 并利用双荧光素酶报告验证了 DNA 甲基化对基因启动子活性的抑制作用。研究结果为深入细致地解析表观遗传对三倍体牡蛎不育机制奠定了基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴-2022[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022: 23-24.
Fisheries and Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Aquatic Technology Promotion Station, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook-2022[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022: 23-24 (in Chinese).
- [2] Wadsworth P, Wilson A E, Walton W C. A meta-analysis of growth rate in diploid and triploid oysters[J]. *Aquaculture*, 2019, 499: 9-16.
- [3] Dégremont L, Garcia C, Allen S K Jr. Genetic improvement for disease resistance in oysters: a review[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 131: 226-241.
- [4] Allen S K Jr, Downing S L. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1986, 102(2-3): 197-208.
- [5] Guo X, Allen S K Jr. Reproductive potential and genetics of triploid pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg)[J]. *The Biological Bulletin*, 1994, 187(3): 309-318.
- [6] Jouaux A, Heude-Berthelin C, Sourdain P, et al. Gametogenic stages in triploid oysters *Crassostrea gigas*: irregular locking of gonial proliferation and subsequent reproductive effort[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2010, 395(1-2): 162-170.
- [7] Piferrer F, Beaumont A, Falguière J C, et al. Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment[J]. *Aquaculture*, 2009, 293(3-4): 125-156.
- [8] Spangenberg V, Arakelyan M, Galoyan E, et al. Reticulate evolution of the rock lizards: meiotic chromosome dynamics and spermatogenesis in diploid and triploid males of the genus *Darevskia*[J]. *Genes*, 2017, 8(6): 149.
- [9] Dheilly N M, Jouaux A, Boudry P, et al. Transcriptomic profiling of gametogenesis in triploid Pacific Oysters *Crassostrea gigas*: towards an understanding of partial sterility associated with triploidy[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112094.
- [10] Yang Q, Yu H, Li Q. Disruption of cell division prevents gametogenesis in triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*)[J]. *Aquaculture*, 2022, 560: 738477.
- [11] Chen C, Yu H, Li Q. Investigation of the role of endogenous miRNAs in determining sterility in triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*)[J]. *Aquaculture*, 2022, 561: 738606.
- [12] Sun D F, Yu H, Li Q. Genome-wide differential DNA methylomes provide insights into the infertility of triploid oysters[J]. *Marine Biotechnology*, 2022, 24(1): 18-31.
- [13] Gavary M R, Roberts S B. Epigenetic considerations in aquaculture[J]. *PeerJ*, 2017, 5: e4147.
- [14] Sun D F, Li Q, Yu H. DNA methylation differences between male and female gonads of the oyster reveal the role of epigenetics in sex determination[J]. *Gene*, 2022, 820: 146260.
- [15] Wang X T, Li Q Y, Lian J M, et al. Genome-wide and single-base resolution DNA methylomes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* provide insight into the evolution of invertebrate CpG methylation[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1119.
- [16] Xiao H, Palhan V, Yang Y L, et al. TIP30 has an intrinsic kinase activity required for up-regulation of a subset of apoptotic genes[J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19(5): 956-963.
- [17] Jiang C, Ito M, Piening V, et al. TIP30 interacts with an estrogen receptor α -interacting coactivator CIA and regulates *c-myc* transcription[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(26): 27781-27789.

- [18] Liao B M, Raddatz K, Zhong L, *et al.* Proteomic analysis of livers from fat-fed mice deficient in either PKC δ or PKC ϵ identifies *Httip2* as a regulator of lipid metabolism[J]. *Proteomics*, 2014, 14(21-22): 2578-2587.
- [19] Chen V, Shtivelman E. CC3/TIP30 regulates metabolic adaptation of tumor cells to glucose limitation[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(24): 4941-4953.
- [20] El Omari K, Bird L E, Nichols C E, *et al.* Crystal structure of CC3 (TIP30): implications for its role as a tumor suppressor[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(18): 18229-18236.
- [21] Baker M E, Yan L, Pear M R. Three-dimensional model of human TIP30, a coactivator for HIV-1 Tat-activated transcription, and CC3, a protein associated with metastasis suppression[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2000, 57(5): 851-858.
- [22] Huang L, Tepasamordech S, Kirschke C P, *et al.* Subcongenic analysis of a quantitative trait locus affecting body weight and glucose metabolism in *zinc transporter 7 (znt7)*-knockout mice[J]. *BMC Genetics*, 2019, 20(1): 19.
- [23] Shi M, Zhang X, Wang P, *et al.* TIP30 regulates apoptosis-related genes in its apoptotic signal transduction pathway[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2005, 11(2): 221-227.
- [24] 朱怡静, 李琪, 张景晓, 等. 5种壳色长牡蛎不同组织常规营养成分分析与评价[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(2): 354-360.
Zhu Y J, Li Q, Zhang J X, *et al.* Analysis and evaluation of nutrient composition in different tissues of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) with five shell colors[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(2): 354-360 (in Chinese).
- [25] Ke Q Z, Li Q. Annual dynamics of glycogen, lipids, and proteins during the reproductive cycle of the surf clam *Macra veneriformis* from the north coast of Shandong Peninsular, China[J]. *Invertebrate Reproduction & Development*, 2013, 57(1): 49-60.
- [26] Li Q, Liu W G, Shirasu K, *et al.* Reproductive cycle and biochemical composition of the Zhe oyster *Crassostrea plicatula* Gmelin in an eastern coastal bay of China[J]. *Aquaculture*, 2006, 261(2): 752-759.
- [27] 王朔, 薛茗元, 杨琼, 等. 不同育性三倍体长牡蛎性腺发育过程中的营养成分比较[J]. *水产学报*, 2021, 45(1): 88-97.
Wang S, Xue M Y, Yang Q, *et al.* Comparison of nutritional components of different fertility triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) during gonadal development[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(1): 88-97 (in Chinese).
- [28] Granada L, Lemos M F L, Cabral H N, *et al.* Epigenetics in aquaculture - the last frontier[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2018, 10(4): 994-1013.
- [29] Roberts S B, Gavery M R. Is there a relationship between DNA methylation and phenotypic plasticity in invertebrates?[J] *Frontiers in Physiology*, 2012, 2: 116.
- [30] Shao C W, Li Q Y, Chen S L, *et al.* Epigenetic modification and inheritance in sexual reversal of fish[J]. *Genome Research*, 2014, 24(4): 604-615.
- [31] Rivière G. Epigenetic features in the oyster *Crassostrea gigas* suggestive of functionally relevant promoter DNA methylation in invertebrates[J]. *Frontiers in Physiology*, 2014, 5: 129.
- [32] Riviere G, He Y, Tecchio S, *et al.* Dynamics of DNA methylomes underlie oyster development[J]. *PLoS Genetics*, 2017, 13(6): e1006807.
- [33] Huang H, Liu R E, Niu Q F, *et al.* Global increase in DNA methylation during orange fruit development and ripening[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(4): 1430-1436.
- [34] Lang Z B, Wang Y H, Tang K, *et al.* Critical roles of DNA demethylation in the activation of ripening-induced genes and inhibition of ripening-repressed genes in tomato fruit[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(22): E4511-E4519.
- [35] Wang F L, Yan L X, Shi H J, *et al.* Genome-wide identification, evolution of DNA methyltransferases and their expression during gonadal development in Nile tilapia[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 226: 73-84.
- [36] Todd E V, Ortega-Recalde O, Liu H, *et al.* Stress, novel sex genes, and epigenetic reprogramming orchestrate socially controlled sex change[J]. *Science Advances*, 2019, 5(7): eaaw7006.
- [37] Saenz-de-Juano M D, Ivanova E, Billooye K, *et al.* Genome-wide assessment of DNA methylation in mouse oocytes reveals effects associated with *in vitro* growth, superovulation, and sexual maturity[J]. *Clinical Epigenetics*, 2019, 11(1): 197.
- [38] Dong X Y, Deng Q S, Nie X H, *et al.* Downregulation of HTATIP2 expression is associated with promoter methylation and poor prognosis in glioma[J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 2015, 98(2): 192-199.
<https://www.china-fishery.cn>

Expression analysis of *Htati2* and its DNA methylation in sterile triploid females of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)

SUN Dongfang¹, YU Hong^{1,2}, LI Qi^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes,

Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China)

Abstract: Sexual maturation in triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) varies widely among individuals. In addition to genetic factors, the influence of the environment on their gonadal development is also crucial. To investigate the epigenetic regulation mechanism of *Htati2* DNA methylation in gonadal development in the Pacific oyster, the homology, phylogeny, gene expression and DNA methylation profiles at different developmental stages of fertile and sterile gonads in the oyster were investigated. The results showed that the conserved structural domain of *Htati2* in the Pacific oyster had the highest homology with the *Htati2*-like conserved structural domain in the Eastern oyster (*C. virginica*). qPCR analysis showed that *Htati2* was expressed in various tissues, with the highest expression in the female gonads. In addition, the expression of *Htati2* increased with gonadal maturation in fertile oysters and did not change significantly in sterile oysters. BS-PCR analysis showed that the DNA methylation level of *Htati2* in oysters decreased with gonadal maturation and was negatively correlated with the gene's expression level. Finally, the results of dual luciferase reporter assay indicated that the methylated *Htati2* promoter fragment significantly inhibited luciferase activity compared to the unmethylated fragment. This study suggests that DNA methylation of *Htati2* may be involved in the gonadal maturation through inhibition of gene expression. This study provides an important reference for the involvement of epigenetic regulatory mechanisms in gonadal development.

Key words: *Crassostrea gigas*; triploid sterility; DNA methylation; gene expression

Corresponding author: LI Qi. E-mail: qili66@ouc.edu.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-49); Agriculture Seed Improvement Project of Shandong Province (2021LZGC027)