

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00620

应用 MSAP 方法检测鸡不同组织基因组的甲基化状态

徐青¹, 张沅², 孙东晓², 王雅春², 唐绍青², 赵萌¹

1. 北京交通大学生命科学与生物工程研究院, 北京 100044;

2. 中国农业大学动物科技学院, 农业部畜禽遗传育种重点实验室, 畜禽育种国家工程实验室, 北京 100193

摘要: 以白洛克肉鸡和白来航蛋鸡及其杂交 F₁ 代基因组为实验材料, 应用甲基敏感扩增片段多态性方法 (Methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP) 检测了鸡肌肉、心脏、肝脏和肾脏 4 个不同组织基因组在 CCGG 位点的甲基化状态, 分析了不同组织的 DNA 甲基化水平及组织特异性甲基化模式。研究发现: 肌肉组织的甲基化水平约为 29.7%, 肝脏组织约为 27.5%, 心脏组织约为 27.5%, 肾脏组织约为 26.1%; 在鸡 3 个不同群体及其中 3 个不同组织间, 基因组甲基化程度差异显著 ($P < 0.05$); 在检测的 4 个组织中, CCGG 序列的全甲基化位点少于半甲基化位点, 与植物的相关研究不一致; 分离及鉴定了 2 个组织特异的甲基化片段。结果表明: 鸡不同组织基因组的甲基化状态是不同的, 同一组织的甲基化水平在不同的群体是不同的, 而不同组织甲基化水平的排序在不同的群体是不一致的。这些结果揭示遗传效应可能影响个体的组织甲基化水平。

关键词: 鸡; 基因组; 甲基化; MSAP; 群体

Analysis of DNA methylation in different chicken tissues with MSAP

XU Qing¹, ZHANG Yuan², SUN Dong-Xiao², WANG Ya-Chun², TANG Shao-Qing², ZHAO Meng¹

1. Institute of Life Science and Biotechnology, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China;

2. Key Laboratory of Animal Genetics and Breeding of Ministry of Agriculture, National Engineering Laboratory for Animal Breeding, College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: With methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP), the DNA methylation levels and patterns of CCGG sites in genomes was analyzed among four different tissues and between parents and offsprings from three groups of adult chicken, White Leghorn, White Plymouth Rock, and their F₁ hybrids. The results indicated that the degree of methylation was approximate 29.7% in muscle, 27.5% in liver, 27.5% in heart, and 26.1% in kidney. There was significantly different in the level of methylation in the 3 different groups and in 4 different tissues ($P < 0.05$). The fully-methylated sites were less than the hemi-methylated sites among the 4 tissues, which was different from that of plants. The two tissue-specific MSAP fragments were isolated, sequenced, and characterized, both of which were located in the coding regions. These results clearly demonstrated that there was difference in the methylation level among various tissues and different groups, which suggested that the genetic factor may have effect on the individual methylation level.

Keywords: chicken; genome; methylation; MSAP; group

收稿日期: 2010-10-14; 修回日期: 2010-12-08

基金项目: 北京市自然科学基金资助(通过 F-MSAP 分析鸡基因组甲基化与生长性状杂种优势的关系), 中央高校基本科研业务费专项资金(编号: 209JBM107)和转基因生物新品种培育重大专项(编号: 2009ZX08009-156B)资助

作者简介: 徐青, 博士, 讲师, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: qingxu@bjtu.edu.cn

通讯作者: 孙东晓, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: sundx@cau.edu.cn

发生在 CpG 位点的甲基化修饰, 是 DNA 甲基化的一种主要模式, 与胚胎发育、X 染色体失活、基因印记、某些疾病和肿瘤的发生都有着密切的联系^[1, 2]。DNA 甲基化同样对组织的发育和分化也有着重要的作用, 组织的发育分化是一个复杂的过程, 涉及多种因素, 其中 DNA 甲基化是正常发育和分化所必需的。有研究报导动物不同组织甚至相同组织在不同生理状态下, 基因组的 DNA 甲基化模式存在差异^[3-5]。唐绍青等^[6]检测和分析了 4 种哺乳动物和 2 种家禽基因组不同组织的 DNA 甲基化水平和模式, 发现同种动物不同组织基因组的甲基化状态不同, 一般组织基因组的甲基化程度都高于血液基因组。最近班谦等^[7]发现在不同发育阶段的鸡胚中, DNA 甲基化水平是有变化的, 随着鸡胚的发育, DNA 甲基化水平呈增高的趋势。而 Lu 等^[8]发现玉米穗位叶、雌穗苞叶、雄穗 3 个组织器官基因组 CCGG 位点胞嘧啶甲基化水平存在一定差异, 雌穗苞叶的甲基化水平最高, 穗位叶次之, 雄穗最低。由此可见, DNA 甲基化状态的差异在动植物的不同组织中是普遍存在的, 而这种差异可能调控组织基因的特异表达, 从而在组织的发育分化中发挥重要作用。

目前, 检测 DNA 甲基化的方法主要有酶切法、亚硫酸盐测序法、甲基化特异性 PCR、基因组限制性酶切扫描法等。相比较而言, 以酶切和 PCR 为基础的甲基敏感扩增片段多态性(Methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP)不但敏感性强, 而且只需要常规的仪器, 操作比较简单, 适用于没有任何信息的全基因组水平的甲基化分析^[9]。MSAP 方法使用 *Hpa* 和 *Msp* 检测基因组 CCGG 位点中 DNA 甲基化的多态性。*Hpa* 和 *Msp* 为一对同裂酶, 它们识别相同的 CCGG 位点, 但是它们对胞嘧啶的甲基化敏感性不同^[10], 用它们处理基因组 DNA, 就会产生甲基化敏感多态性片段。目前, MSAP 方法已广泛应用于各种诱导条件下植物的表型变异与甲基化的关系^[11, 12], 组培植物、克隆动物异常与甲基化的关系^[13, 14]以及杂种表现与甲基化的关系^[15, 16]等研究中。

本研究以白洛克肉鸡和白来航蛋鸡及其杂交 F₁ 代基因组为实验材料, 采用甲基敏感扩增片段多态性方法对鸡的肌肉、肝脏、肾脏和心脏 4 个组织进

行全基因组 CCGG 位点的 DNA 甲基化检测, 分析了不同组织间的 DNA 甲基化水平及模式的差异, 获得了组织特异的 DNA 甲基化分子标记, 探讨 DNA 甲基化在鸡发育过程中的作用机制, 为鸡基因组的甲基化研究积累数据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

14 周龄纯种白来航蛋鸡(AA)10 只、白洛克肉鸡(EE)10 只以及白来航蛋鸡和白洛克肉鸡杂交 F₁ 代(AE)代 10 只, 酚仿抽提法提取每个群体肌肉、肝脏、心脏及肾脏组织的基因组 DNA。

1.1.2 引物与接头

接头与引物(表 1)的设计参考 Mingliang 等^[9]所用的方法, 略有改动。接头与引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 实验中所用引物与接头

名称	接头及引物命名	接头及引物序列
接头	<i>Eco</i> R I -A	5'-CTC GTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGG <u>TTAA</u> -5'
	M-H-A	5'-GAC GATGAGTCTAGAA-3' 3'-CTACTCAGATCTT <u>GC</u> -5'
预扩增引物	<i>Eco</i> R I	5'-GACTGCGTACC <u>AATTC</u> A-3'
	M-H	5'-GATGAGTCTAGAA <u>CGG</u> T-3' 5'-GACTGCGTACC <u>AATTC</u> AAC-3' 5'-GACTGCGTACC <u>AATTC</u> AAG-3' 5'-GACTGCGTACC <u>AATTC</u> ACA-3' 5'-GACTGCGTACC <u>AATTC</u> AGT-3' 5'-GACTGCGTACC <u>AATTC</u> ATC-3'
选择性引物	<i>Eco</i> R I	5'-GACTGCGTACC <u>AATTC</u> A-3'
	M-H	5'-FAM-GATGAGTCTAGAA <u>CGG</u> TAC-3' 5'-FAM-GATGAGTCTAGAA <u>CGG</u> TAG-3'

注: 加粗表示核心序列; 表示酶切位点; 斜体表示选择性碱基。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 甲基化状态的 MSAP 分析

MSAP 分析包括 4 个主要部分: 酶切反应、连接反应、扩增反应和产物检测。本文给出的是各部分优化后的反应条件, 其他参考 Mingliang 等^[9]所用的方法。

酶切反应: 反应总体积 50 μ L: 鸡基因组 DNA 5

μg , *EcoR* I 16 U, *Hpa* II / *Msp* I 16 U, 37 °C 水浴 6 h。酶 *EcoR*、*Msp*、*Hpa* 及 BSA、B buffer 购自 Promega 公司。

连接反应: 反应总体积 50 μL : 酶切产物 12.5 μL , H-M 接头 50 pmol, E 接头 5 pmol, T4 连接酶 3 μL , 10 \times 连接 buffer 5 μL , 去离子水 24 μL 。反应混合物 16 °C 过夜, -20 °C 保存。T4 连接酶及 10 \times 连接 buffer 购自宝生物工程(大连)有限公司。

预扩增反应: 反应总体积 20 μL : 连接产物 0.5 μL , H-M + 1 引物 30 ng, E+1 引物 30 ng, *Ex Taq* 酶 0.1 μL , dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 1.6 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 1.2 μL , 10 \times *Ex Taq* 酶 buffer 2 μL , H_2O 14.1 μL 。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 保温 7 min。

选择性扩增反应: 反应总体积 20 μL : 预扩增产物 0.2 μL , H-M 选择性引物 30 ng, *EcoR* I 选择性引物 5 ng, *Taq* 酶 1 U。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 65 °C (每个循环递减 0.7 °C) 30 s, 72 °C 1 min, 共进行 13 个递减循环; 然后 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 23 个循环; 最后 72 °C 保温 7 min。

扩增反应中 *Taq* 酶、dNTP Mixture、 MgCl_2 和 *Taq* 酶 buffer 购自宝生物工程(大连)有限公司。

PCR 产物电泳及银染: PCR 扩增后的产物经 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳及硝酸银染色后, 统计凝胶上各种模式的片段, 详细的过程参考 Mingliang 等^[9]所用的方法。

1.2.2 甲基化差异片段的克隆和测序

在 MSAP 电泳图谱上切下组织特异性的甲基化片段, 放入开水中煮 5 min, 然后将回收的微量差异片段作为模板, 用相对应的引物组合和 PCR 扩增条件进行二次 PCR 扩增、回收、连接、转化、克隆测序, 最后经 BLAST 系统进行序列相似性分析。

1.2.3 Southern 杂交分析

Southern 杂交选用地高辛标记-杂交试剂盒 (Roche 公司) 进行, 每种组织基因组 50 μg 分别用 *EcoR* / *Msp* 和 *EcoR* / *Hpa* 两组酶消化。消化后的产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 转移至尼龙膜上 (Promega)。探针的标记、转膜及固定、杂交分析及免疫检测等操作方法依照试剂盒说明书进行。

探针是以上述甲基化差异片段的阳性克隆为模板, 通过 PCR 扩增获得, PCR 的反应条件与预扩增反应条件相同。

2 结果与分析

2.1 鸡不同组织基因组 DNA 甲基化模式分析

选用 10 对引物通过 MSAP 方法对鸡不同组织的基因组甲基化状态进行检测, 每个个体不同组织都获得了清晰的扩增谱带, 每对引物组合扩增片段 10~20 条, 长度在 50 到 2 000 bp 之间, 在 100~500 bp 之间扩增片段较多, 大于 1 000 bp 的片段比较少 (见图 1)。在 MSAP 电泳图谱上, 每个组织基因组对应两个泳道, 其中 H 泳道是指使用 *Hpa* / *EcoR* 处理的组织 DNA 样品, M 泳道是指用 *Msp* / *EcoR* 处理的组织 DNA 样品。根据扩增产物在两个泳道出现的情况, 在不同组织的 MSAP 电泳图谱上, 每个组织基因组甲基化带型可分为 3 种模式: Type (非甲基化), 条带在 H (*Hpa* / *EcoR*) 和 M (*Msp* / *EcoR*) 两个泳道同时出现, 这类片段最常见, 占扩增产物总数的 60% 以上, 这种情况 CCGG 位点一般没有甲基化; Type (全甲基化), 条带在 M 泳道出现而在 H 泳道缺失, 这类片段占扩增产物总数的 10% 左右, 这种情况 CCGG 位点全甲基化; Type (半甲基化), 条带在 H 泳道出现而在 M 泳道缺失, 此类片段占扩增产物总数的 30% 左右, 这种情况 CCGG 位点半甲基化。一个组织基因组的甲基化程度计算为 Type + Type 与 Type + Type + Type 的比值。

2.2 鸡不同组织基因组 DNA 甲基化状态分析

选用扩增效果稳定且扩增片段多态丰富的 10 对引物组合, 通过对 14 周龄肌肉、肝脏、心脏和肾脏组织的基因组 DNA 进行扩增。根据 Type、Type 和 Type 3 种类型扩增条带的数量计算, 鸡的肌肉组织的甲基化水平为 29.7%, 肝脏组织约为 27.5%, 心脏组织约为 27.5%, 肾脏组织约为 26.1%。由于 *Hpa* 对内部胞嘧啶的甲基化 (C^mCGG) 敏感, 而 *Msp* 仅对外部胞嘧啶的甲基化 (C^mCCGG) 敏感, 因此内部胞嘧啶的甲基化将导致 MSAP 图谱中 Type 扩增条带出现, 相对的外部胞嘧啶的甲基化将导致 MSAP 图谱 Type 扩增条带。本研究发现在鸡的 4 个

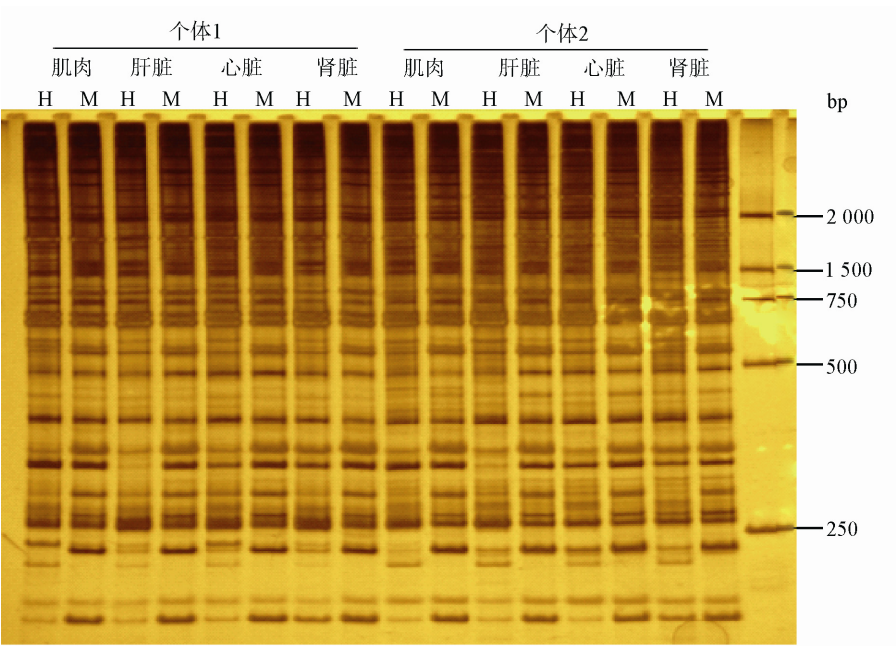




图 1 鸡不同组织基因组的 MSAP 图谱
1: H 为 *EcoR* I / *Hpa* II 酶切; 2: M 为 *EcoR* I / *Msp* I 酶切。

中被检测的组织中, Type 型扩增带较多, Type 扩增条带较少。其中在肌肉组织 13.2%为全甲基化位点, 16.2%为半甲基化位点; 肝脏组织 12.1%为全甲基化位点, 14.6%为半甲基化位点; 心脏组织 12.4%为全甲基化位点, 14.8%为半甲基化位点; 肾脏组织约 10.7%为全甲基化位点, 15.4%为半甲基化位点(表 2)。

表 2 不同组织 CCGG 位点的全半甲基化位点比率

甲基化状态 ¹	MSAP 带型 ²		全半甲基化位点比率			
	<i>Hpa</i>	<i>Msp</i>	肌肉	肝脏	心脏	肾脏
	+	-	16.2%	14.6%	14.8%	15.4%
	-	+	13.2%	12.1%	12.4%	10.7%

¹ 所对应方格示意双链 *Hpa* / *Msp* 识别位点(CCGG), 黑色方格表示甲基化的 C。² +, MSAP 片段出现; -, MSAP 片段缺失。

2.3 鸡不同组织基因组 DNA 甲基化程度比较

所检测的 4 个不同组织, 其基因组的甲基化程度是不同的, 并且每个组织的内甲基化位点与外甲基化位点的比例也是不同的。方差分析显示(表 3): 对于总的甲基化水平, 4 个组织间的甲基化程度差异显著($P<0.05$), 3 个群体间的甲基化程度差异也显著($P<0.05$), 而组织和群体间的甲基化水平没有互作效

应($P>0.05$); 对于甲基化模式中的全甲基化位点, 4 个组织间和 3 个群体间的甲基化水平差异显著($P<0.01$), 同样组织和群体间的全甲基化位点水平没有互作效应($P>0.05$); 对于甲基化模式中的半甲基化位点, 4 个组织间的甲基化水平差异显著($P<0.01$), 而 3 个群体间及组织和群体间的甲基化水平互作效应差异不显著($P>0.05$)。

进一步对甲基化水平存在显著差异的组织进行 Duncan 多重比较: 对于总的甲基化水平, 肌肉组织的甲基化程度显著高于其他 3 个组织为 29.7%($P<0.05$), 而肝脏、心脏和肾脏 3 个组织之间的甲基化程度没有显著差异($P>0.05$); 对于全甲基化位点, 肌肉组织的甲基化程度最高于, 肾脏组织的甲基化程度显著低于其他 3 个组织($P<0.05$), 肝脏和心脏的甲基化程度相近($P>0.05$); 对于半甲基化位点, 4 个组织间的甲基化程度接近($P>0.05$)。

另外, 作者分析发现遗传背景影响-组织的甲基化水平, 同一组织的甲基化水平在不同的群体是不同的, 而不同组织甲基化水平在不同的群体是不一致的。例如在白洛克肉鸡中, 心脏组织的甲基化水平(25.7%)高于肝脏组织(24.7%), 而在白菜航蛋鸡和白洛克肉鸡杂交 F_1 代中心脏组织的甲基化水平(29.1%)低于肝脏组织(30.8%)。

表 3 不同组织基因组 DNA 甲基化程度比较

群体	组织			
	肌肉 ¹	肝脏 ¹	心脏 ¹	肾脏 ¹
Type II (%) ³				
白菜航	13.1 ± 2.23	12.9 ± 0.79	12.5 ± 1.03b	11.3 ± 0.72
白洛克	12.4 ± 2.03	9.4 ± 1.29	10.9 ± 1.36	9.0 ± 1.27
F ₁ 子代	14.6 ± 0.88	13.9 ± 2.13	14.0 ± 1.21	11.9 ± 1.89
群体平均水平 ²	13.4 ± 1.96 ^a	12.1 ± 2.08 ^b	12.5 ± 1.78 ^{ab}	10.7 ± 2.09 ^c
Type III (%) ⁴				
白菜航	15.7 ± 2.96	14.1 ± 2.22	15.3 ± 2.16	15.4 ± 2.13
白洛克	15.5 ± 1.66	15.3 ± 2.05	14.8 ± 2.38	13.8 ± 2.33
F ₁ 子代	17.5 ± 1.79	16.9 ± 2.22	15.1 ± 1.22	17.1 ± 2.14
群体平均水平	16.3 ± 2.58	15.4 ± 2.51	15.1 ± 1.83	15.4 ± 2.51
总的甲基化水平 (%) ⁵				
白菜航	28.8 ± 2.44	27.0 ± 3.14	27.9 ± 2.91	26.7 ± 2.54
白洛克	27.9 ± 2.56	24.7 ± 2.56	25.7 ± 3.26	22.8 ± 2.43
F ₁ 子代	32.2 ± 2.44	30.8 ± 1.73	29.1 ± 1.85	28.9 ± 3.16
群体平均水平 ²	29.7 ± 3.27 ^a	27.5 ± 3.64 ^b	27.5 ± 3.17 ^b	26.1 ± 3.88 ^b

¹ 每个值为平均数±标准差; ² 小写字母表示 Duncan 多重比较的结果, 相同的字母表示差异不显著, 相同的字母表示差异显著 ($P < 0.05$); ³ Type II (%) = type II / (type I + type II + type III); ⁴ Type III (%) = type III / (type I + type II + type III); ⁵ 甲基化程度 (%) = (type II + type III) / (type I + type II + type III);

2.4 鸡组织特异性甲基化位点克隆分析

在 MSAP 图谱上, 每个个体的 4 种组织对应 8 个

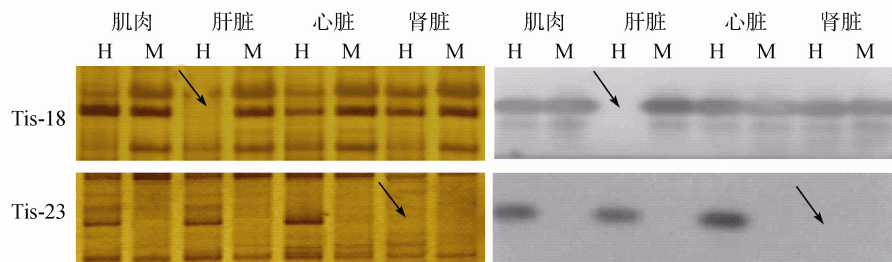


图 2 2 个组织特异性甲基化片段

A: 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后银染结果; B: Southern blot 结果。H: *EcoR* / *Hpa* 酶切; M: *EcoR* / *Msp* 酶切; 获得 Tis-18 的引物组合是 H-M + TAC / E + ATG; 获得 Tis-23 的引物组合是 H-M + TAC / E + AGA; 箭头指示 2 个组织特异性甲基化片段的位置。

表 4 2 个组织特异性甲基化片段在不同组织中的状态

名称	MSAP 带型 ¹								CCGG 位点的甲基化状态 ²			
	肌肉		肝脏		心脏		肾脏		肌肉	肝脏	心脏	肾脏
	H	M	H	M	H	M	H	M				
Tis-18	1	1	0	1	1	1	1	1	CCGG GGCC	C ^m CGG G GC ^m C	CCGG GGCC	CCGG GGCC
Tis-23	1	0	1	0	1	0	0	0	^m CCGG GGCC	^m CCGG GGCC	^m CCGG GGCC	^m CCG G GGC ^m C

¹ 1: MSAP 片段出现; 0: MSAP 片段不出现; H、M 分别为 *EcoR* / *Hpa* 和 *EcoR* / *Msp* 酶切组合; ² m 示意甲基化的胞嘧啶。

泳道, 许多扩增片段只在某个组织对应的泳道出现或不出现, 这种由于 CCGG 位点的胞嘧啶组织特异的甲基化而产生的特异扩增片段定义为组织特异性甲基化片段。绝大多数组织特异性甲基化片段只在一个或一部分个体或某些群体中出现, 这充分反应了在特定位点的甲基化个体或群体差异。只有 2 个组织特异性甲基化片段在检测的所有个体里都出现, 其中一个片段命名为 Tis-18, 长度为 308 bp, 除了肝脏组织以外, 这个片段在其他 3 个组织中都出现。另外一个为 Tis-23, 长度为 177 bp, 除了肾脏以外, 在其他 3 个组织中都出现(图 2A)。

Southern blot 结果表明, MSAP 所获得的 2 个片段在各对应的组织中都为组织特异阳性, 与 MSAP 图谱完全一致, 表明这些 DNA 片段是组织特异性的(图 2B)。通过 BLAST 软件将 2 个片段的测序结果与 GenBank 中鸡的基因组序列进行比对, 发现 2 个差异片段的序列与 GenBank 中的鸡基因组序列的同源性高度一致。其中 Tis-18 和鸡的假基因 AJ851491 及 La ribonucleoprotein domain family member 4 (NM_001012700) 具有 99% 的同源性, 而 Tis-23 和鸡的 neuron navigator 3、pore membrane and/or filament interacting like protein 1 及 steerin 3 基因(XM_425444)具有 100% 的同源性, 这 2 个片段的甲基化模式和序列见表 4 和图 3。Gardiner-Garden 等^[17]认为, 在脊椎动物某段基因组序列中, 任一个长为 200 个碱基的区域内, 如果 G+C

Tis-18
 1 GAATTCATGC TAACAGTTAA GTATTTATTG TGTCTGTTT AAATGCCAGT TTTCTCCAGT
 61 GACTATTTAC AGACATGCCC ATTGTGCCAA TGGTTGGCTC AGCATCATTT GAACCTCCAG
 121 CACACTGTTG CATTACCTGC CCCTGCCAAT GCCGTAATCT CCGTTCTGCT CCATCTGCAT
 181 GGTAGG*AGAA TCCTTCTGGG AATAGCCTTG CTCTTGGTGC CCCGTTAGC*G TGCTGTTATG
 241 TCGCTCCATA ACAAATTC TTAGTTGGT TCTGCTCAGT GGTCCGTCCT CGAGTGACAC
 301 AGTAC^mCGG

Tis-23
 1 ^mCCGGTACGCA GCACTACTCA CCAAAGTCCT TGGAGCTTAC GGGGGCAGAG AGCTCGATGC
 61 TGTCTTGTC GCTCACCTTA AAGTCAACCT GTGATTTTGG AGAGAGGAGA GCGCTTCAAG
 121 GGAAAACCCA GGAGCTGGAA GATAGCAAGG TTAGTTGGAA ACTTTACCTC CACATCTGAA
 181 TTC

图 3 2 个组织特异性甲基化片段的序列

*表示与 GenBank 中的序列相比较发生突变的碱基; ^m 表示甲基化; GAATTC 示 *EcoR* I 酶切位点; CCGG 示 *Hpa* / *Msp* I 酶切位点。

百分含量大于 50%, 并且实际 CpG 数与理论上预期的 CpG 数之比大于 0.6, 则这个序列含有 CpG 岛, 其附近可能存在某个功能基因。Tis-18 和 Tis-23 位于所在基因编码区, 符合这一 CpG 岛标准。因此这 2 个组织特异性甲基化状态的变化可能与受 CpG 岛甲基化调控的基因的组织特异性表达有关。

3 讨论

本研究采用 MSAP 方法对鸡 4 个组织基因组甲基化程度进行了检测与分析, 实验结果表明: 首先, 鸡的不同组织甲基化程度不同, 而且相同的组织在不同的群体里基因组的甲基化程度也存在差异。与之相类似的实验结果在人与其他动物上^[18-20]也有报道。另外, 在番茄^[21]、水稻^[15]等植物中, 不同组织间的甲基化水平同样存在显著差异, 这些研究结果表明了甲基化在细胞分化和器官发育过程中可能发挥着重要的作用^[22], 但是组织间甲基化程度的差异是组织分化的结果还是导致组织形成的原因, 以及甲基化在调控相关基因表达中的作用及机制现在还不清楚, 有待于更为深入的研究; 其次, 在本实验中鸡的不同组织甲基化水平的差异比较复杂。相同组织的甲基化水平在不同的实验群体中不同, 而一个群体中不同的组织甲基化水平的排队与另一个群体对应组织的排队也不一致。因此组织基因组的甲基化水平与个体及群体遗传背景可能具有某种联系。研究表明人类等脊椎动物甲基化谱的形成经历着相似的过程, 在胚胎发育早期来自双亲的两套基因组完全去甲基化, 然后在从头甲基化酶 DNMT3a 和 DNMT3b 的催化下, 基因组开始重新甲基化, 从而保证胚胎能够正常地发育和分化^[23], 最后形成的

甲基化谱具有个体特异性及组织特异性, 甲基化谱不同的细胞其功能也不同, 而且体细胞的甲基化谱可以遗传给子细胞。这样可以理解组织基因组甲基化水平存在个体差异是正常的。最后本研究发现, 在鸡的 4 个组织基因组中, 全甲基化位点水平差异显著, 而半甲基化位点水平在所检测的各组织中差异均不显著, 这为我们提供了比较组织基因组甲基化水平的一个较为简单的方法, 我们只需要测定基因组的全甲基化位点的比例就可以预测不同组织整个基因组甲基化水平是否存在差异。另外, 全甲基化位点和半甲基化位点的比例与 Xu 等^[9]的报道不同, 可能是由于实验材料不同造成的。

对于组织特异性的甲基化差异, 我们认为应该是指在特定的发育阶段, 所有个体的组织都存在的差异, 本文所提到的 2 个差异片段就是属于这一类。然而实验中我们观察到的还有其他的差异形式, 有的组织特异性差异只在某一个或某几个个体中出现, 称之为个体甲基化差异。这种个体差异类型可能是由于个体 CCGG 位点发生甲基化或去甲基化变异形成的, 这种变异对个体组织的发育不会有太大的影响, 因为本实验中所检测的样本都是发育正常的健康个体。而对全体甲基化, 如果发生这种非正常的甲基化突变, 则将会对组织正常的生物活动产生致命的破坏。本文的实验结果并不能证明以上这种推测, 但源于肿瘤的研究可以侧面解释这个问题, 因为研究表明非正常的甲基化突变常常导致肿瘤的发生。目前, 我们正在对初步获得的可能与鸡的组织发育和器官分化有关的 2 个特异性的甲基化片段, 进行相关的功能分析, 以期发现可能与鸡组织分化相关的重要作用因子, 为进一步研究鸡的生长发育

与基因特异性表达调控的关系奠定基础。

参考文献(References):

- [1] Kurkjian C, Kummar S, Murgo AJ. DNA methylation: its role in cancer development and therapy. *Curr Probl Cancer*, 2008, 32(5): 187–235.
- [2] Gopalakrishnan S, van Emburgh BO, Robertson KD. DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res*, 2008, 647(1–2): 30–38.
- [3] Vanyushin BF. Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 70(5): 488–499.
- [4] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 2002, 16(1): 6–21.
- [5] Mandel JL, Chambon P. DNA methylation: organ specific variations in the methylation pattern within and around ovalbumin and other chicken genes. *Nucleic Acids Res*, 1979, 7(8): 2081–2103.
- [6] 唐韶青, 张沅, 徐青, 孙东晓, 俞英. 不同动物部分组织基因组甲基化程度的差异分析. *农业生物技术学报*, 2006, 14(4): 507–511.
- [7] 班谦, 赵宗胜, 曹体婷. 家鸡胚胎发育过程 DNA 甲基化的 MSAP 检测. *安徽农业科学*, 2009, 37(21): 9902–9904.
- [8] Lu YL, Rong TZ, Cao MJ. Analysis of DNA methylation in different maize tissues. *J Genet Genomics*, 2008, 35(1): 41–48.
- [9] Xu ML, Li XQ, Korban SS. AFLP-based detection of DNA methylation. *Plant Mol Biol Rep*, 2000, 18(4): 361–368.
- [10] McClelland M, Nelson M, Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(17): 3640–3659.
- [11] Labra M, Grassi F, Imazio S, Di Fabio T, Citterio S, Sgorbati S, Agradi E. Genetic and DNA-methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L. *Chemosphere*, 2004, 54(8): 1049–1058.
- [12] Aina R, Sgorbati S, Santagostino A, Labra M, Ghiani A, Citterio S. Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp. *Physiol Plant*, 2004, 121(3): 472–480.
- [13] Li XQ, Xu ML, Korban SS. DNA methylation profiles differ between field-and *in vitro*-grown leaves of apple. *J Plant Physiol*, 2002, 159(11): 1229–1234.
- [14] de Montera B, Boulanger L, Taourit S, Renard JP, Eggen A. Genetic identity of clones and methods to explore DNA. *Cloning Stem Cells*, 2004, 6(2): 133–139.
- [15] Xiong LZ, Xu CG, Saghai Maroof MA, Zhang QF. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet*, 1999, 261(3): 439–446.
- [16] Shaked H, Kashkush K, Ozkan H, Feldman M, Levy AA. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell*, 2001, 13(8): 1749–1759.
- [17] Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*, 1987, 196(2): 261–282.
- [18] Waalwijk C, Flavell RA. DNA methylation at a CCGG sequence in the large intron of the rabbit β -globin gene: tissue-specific variations. *Nucleic Acids Res*, 1978, 5(12): 4631–4634.
- [19] Grunau C, Hindermann W, Rosenthal A. Large-scale methylation analysis of human genomic DNA reveals tissue-specific differences between the methylation profiles of genes and pseudogenes. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(18): 2651–2663.
- [20] Song F, Smith JF, Kimura MT, Morrow AD, Matsuyama T, Nagase H, Held WA. Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(9): 3336–3341.
- [21] Messegueur R, Ganai MW, Steffens JC, Tanksley SD. Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation in tomato nuclear DNA. *Plant Mol Biol*, 1991, 16(5): 753–770.
- [22] Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 1975, 187(4173): 226–232.
- [23] Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and mammalian development. *Genes Dev*, 1999, 13(1): 26–34.