

# 刺参(*Apostichopus japonicus*)不同组织 基因组甲基化状态 MSAP 分析\*

郭婷婷<sup>1,2</sup> 孙国华<sup>2</sup> 杨建敏<sup>2</sup> 赵强<sup>3</sup> 李雪燕<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 山东省海洋水产研究所 烟台 264006;  
3. 烟台市水产研究所 烟台 264000)

**摘要** 利用 MSAP 技术分析成体刺参的呼吸树、肠、肌肉和体壁等组织的基因组 DNA 甲基化水平, 获得了四个组织基因组甲基化率。甲基化水平由高到低依次是呼吸树、体壁、肌肉和肠, 分别是 35.77%、33.51%、32.72%和 28.0%, 其中全甲基化位点各占 19.46%、18.39%、19.18%和 15.97%。统计学分析结果显示肠组织的甲基化水平与其它组织的差异显著( $P < 0.05$ ), 其余三个组织间差异不显著( $P > 0.05$ ), 但呼吸树与肌肉的半甲基化水平差异显著( $P < 0.05$ )。由 MSAP 分析差异位点克隆得到四个甲基化特异性片段, 经测序分析功能未知, 推测为刺参基因足非编码区或新功能基因序列。

**关键词** 刺参, 基因组, 甲基化, MSAP

**中图分类号** Q346

刺参(*Apostichopus japonicus*)隶属于棘皮动物门(Echinodermata)、海参纲(Holothuroidea)、楯手目(Aspidochirotida)、刺参科(Stichopodidae)、仿刺参属(*Apostichopus*), 富含胶原、粘多糖和多种微量元素, 具有很高的营养价值和药用价值, 是我国北方海域重要的增养殖对象。随着刺参养殖规模的日益扩大, 出现的种质退化、病害频发等问题引起了业内学者的广泛关注, 因此围绕着提高刺参产量与质量的一系列研究陆续展开。

甲基化是指甲基转移酶从活性甲基化合物(如 S-腺苷基甲硫氨酸)上将甲基催化转移到其它化合物形成各种甲基化合物的过程, 最常见的甲基化修饰为 DNA 甲基化和组蛋白甲基化。DNA 甲基化是指甲基转移到 DNA 特定核苷酸的碱基上的过程, 作为表观遗传学的重要机制, 可以在不改变 DNA 一级结构的情况下调控基因的表达(Wu *et al*, 2001), 而且这种调控作用可以随着细胞分裂遗传下去, 或受 DNA 甲基转移酶、组蛋白甲基化、饮食等其它环境因素、RNA

干扰或病毒的影响而发生改变(陈瑞琳等, 2007)。DNA 甲基化能够引起染色质结构、DNA 构象、DNA 稳定性和 DNA 与蛋白质相互作用方式的改变, 从而可以关闭某些基因的活性。发生在 CpG 位点的甲基化修饰作为甲基化的主要模式, 与胚胎发育、组织衰老、X 染色体失活、基因印记、肿瘤等疾病的发生以及组织的发育与分化密切相关(Kurkjian *et al*, 2008; Bird, 2002; Messeguer *et al*, 1991)。甲基化在动植物的遗传育种研究中引起了人们的广泛关注, 相关研究主要集中在动植物基因组的甲基化状态、DNA 甲基化与基因的表达调控、DNA 甲基化与杂种优势、DNA 甲基化与分子标记等, 此外甲基化还被用于环境监测(单存海等, 2011)以及微生物的修复(吴佳等, 2011)。

甲基化敏感扩增片段多态性(Methylation-sensitive Amplified Polymorphism, MSAP), 是目前检测基因组中胞嘧啶甲基化的主要方法之一(Xiong *et al*, 1999), 它操作相对简单、敏感性强, 可以将分析结果与基因

\* 山东省自然科学基金项目, ZR2011CM036 号; 山东省良种工程项目“速生抗病耐高温刺参良种选育”, 2008—2011; 山东现代农业产业技术体系刺参创新团队刺参育种岗位, 2012—2014。郭婷婷, E-mail: guot.t@163.com

通讯作者: 杨建敏, 博士, 研究员, E-mail: ladderup@126.com

收稿日期: 2012-04-13, 收修改稿日期: 2012-07-15

序列直接联系起来。MSAP 方法主要包括四个步骤: 酶切反应、连接反应、扩增反应以及产物检测, 通过两个对 DNA 甲基化敏感程度不同的内切酶(*HpaII* 和 *MspI*), 分别与 *EcoR I* 一起对基因组 DNA 进行双酶切, 然后再接上相应的限制性内切酶的接头, 利用接头序列设计引物进行分析, 通过特异扩增不同的图谱, 以辨别哪些位点存在甲基化。*HpaII* 和 *MspI* 都能识别并切割 CCGG 序列, 但对该位点胞嘧啶甲基化的敏感性不同(McClelland *et al*, 1994), *HpaII* 不能酶切该位点双链内外侧胞嘧啶甲基化序列, 即不能酶切含 mCCGG、CmCGG 和 mCmCGG 的位点, 但可以识别单链上胞嘧啶甲基化位点; 而 *MspI* 可以识别单链或双链上该位点内侧甲基化的胞嘧啶, 不能识别外侧甲基化胞嘧啶, 即不能酶切 mCCGG 的位点(Waalwijk *et al*, 1978)。由于动物 DNA 的大部分甲基化只发生在 CG 位点, 所以可以用该方法得到相对精确的甲基化水平。

近年来, 关于刺参分子生物学水平的研究取得了很大进展, 分子标记与数量遗传的研究也逐渐增多, 但与表观遗传 DNA 甲基化方面的研究却鲜见报道。从全基因组水平深入研究 DNA 甲基化在水产动物生命活动中的作用具有重要的生物学意义。本研究采用 MSAP 技术在整个基因组水平上研究刺参不同组织基因组 DNA 甲基化的差异, 为刺参基因组的甲基化研究积累数据, 并以期获得特异甲基化位点, 为刺参基因功能调控的表观遗传学研究奠定基础, 进

而为刺参的遗传育种及高效养殖起到推动作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验用刺参取自蓬莱刺参养殖场, 成体平均体长(7.5±0.5)cm。实验室驯养 2d, 清肠, 取活性良好刺参 5 头, 分别取其等量呼吸树、肠、肌肉、体壁四部分组织, 用液氮研磨, 加入 700μl 65℃预热的 CTAB 提取缓冲液(100mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 20mmol/L EDTA-Na<sub>2</sub>, 1.4mol/L NaCl, 2% CTAB, 0.1% β-巯基乙醇)和 7μl 终浓度为 100g/ml 蛋白酶 K, 55℃消化 3—5h, 等体积酚氯仿(酚 氯仿 = 1 1)、氯仿抽提, 二倍体积乙醇沉淀, TE 溶解, 4℃保存。

### 1.2 引物和接头

接头和引物序列(表 1)的设计参照 Xu 等(2000)的方法。所有引物与接头由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.3 方法

本实验给出的是部分优化后的条件, 其余参考 Xu 等(2000)的方法。

**1.3.1 酶切反应** 反应体系: 10×BufferT 2μl, *EcoR I* 8U, *MspI/HpaII* 酶 5U, 0.1% BSA 2μl, 基因组 DNA 60ng, 水补足至 20μl。将该体系至于 37℃金属浴中酶切 5h, 然后于 85℃ 10min, 灭活内切酶。

**1.3.2 连接反应** 接头的制备: *EcoR I*-A 浓度为 10μmol/L, M-H-A 为 100μmol/L, 各取等量体积的单

表 1 PCR 引物和接头序列  
Tab.1 The sequences of PCR primers and adapters

名称	接头与引物命名	接头及引物序列
接头	<i>EcoR I</i> -A	5'-CTC <b>GTAGACTGCGTACC</b> -3' 3'-CCATCTGACGCATGG <u>TTAA</u> -5'
	M-H-A	5'-GAC <b>GATGAGTCTAGAA</b> -3' 3'-CCTACTCAGATCTT <u>GC</u> -5'
预扩增引物	E00-A	5'-GACTGCGTACC <u>AATTC</u> A-3'
	MH00-A	5'-GATGAGTCTAGAA <u>CGG</u> T-3'
选择性扩增引物	<i>EcoR I</i>	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'
		5'-FAMGATGAGTCTAGAA <u>CGG</u> TAC-3'
	M-H	5'-FAMGATGAGTCTAGAA <u>CGG</u> TAG-3' 5'-GATGAGTCTAGAA <u>CGG</u> TTC-3'

注: 斜体表示选择性碱基, 加粗为核心序列, 下划线表示酶切位点

链混合后置于 94℃ 变性 5min, 于室温约 10min 待其慢慢冷却。制备好的接头不宜长时间保存, 需现场制备。连接反应体系: 上述酶切产物 15μl, 接头各 0.5μl, T4 连接酶 175 U, T4 10×Buffer 2.5μl, 水补足至 25μl, 于 16℃ 水浴过夜。

**1.3.3 预扩增** 连接产物 2.5μl, 10×Buffer 2.5μl, dNTP (各 2.5mmol/L) 1μl, E00-A (10μmol/L) 0.5μl, MH00-T (10μmol/L) 0.5μl, *Taq* 酶 1U, 水补足至 25μl。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 2min; 94℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 延长 8min; 最后 4℃ 保存。

**1.3.4 选择性扩增** 预扩增产物 2μl, 10×Buffer 2μl, dNTP (各 2.5mmol/L) 1μl, 引物(10 μ mol/L)各 0.5μl, *Taq* 酶 1U, 水补足至 20μl。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 2min; 94℃ 30s, 65℃ (每个循环递减 0.7℃) 30s, 72℃ 1min, 共进行 13 个递减循环; 然后 94℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 1min, 23 个循环; 72℃ 保温延长 8min; 最后于 4℃ 保存。

#### 1.4 电泳检测与数据统计

将 PCR 产物混合 6×Loading buffer 通过 12% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分型, 经 E.B 染色统计各种模式的片段条带。统计方法为: 经 *MspI* 酶切有扩增片段而 *HpaII* 酶切后没有扩增片段的情况为全甲基化位点(A 型); *MspI* 酶切无扩增而 *HpaII* 酶有扩增的情况为半甲基化位点(B 型); 两种酶切后扩增产物均有的条带为未发生甲基化的位点(C 型)。

#### 1.5 甲基化特异片段的克隆与测序

将有特异性的甲基化片段切胶回收, 回收的片段加入 50μl 的灭菌超纯水放入沸水中煮沸约 5min, 以所得的水做模板, 用相对应的引物扩增特异性片段。

扩增体系: 模板 2μl, 10×buffer 2.5μl, dNTP (各 2.5mmol/L) 1μl, 引物(100mmol/L) 0.5μl, *Taq* 酶 1U, 水补足至 25μl。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 2min; 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 延长 8min; 4℃ 保存。用所得的产物做连接、转化、克隆测序。

连接: solution-I 5μl, pMD-18T 0.5μl, 上述 PCR 产物 4.5μl。体系共 10μl 于 16℃ 水浴 12h。

转化: 感受态细胞 top 10 (100μl/支)置于冰上融化, 分别加入 10μl 连接产物后于冰上静置 30min, 期间小心不要晃动。42℃ 精确热敷 60s, 再放回冰里 2min。

克隆: 每支加入 200μl LB 培养基, 37℃, 200r/min 培养 60min。将培养后的菌液接种 20μl 于涂有氨苄青霉素的 LB 平板上, 正面向上 37℃ 培养 1h 后倒置培

养 12h。在培养皿中挑选单个菌落以 M13 为引物做菌落 PCR, 并做好标记, 筛选出目的菌落扩大培养至浓度较高时送测序。

#### 1.6 数据统计与分析

将各个带型的条带统计(Xu *et al*, 2000)后通过 Spss Statistics 17.0 软件进行方差分析和 Duncan 多重比较获得不同组织之间不同带型的差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 刺参不同组织的甲基化状态分析

选用 15 对引物, 通过 MSAP 电泳后得到清晰的扩增条带(图 1)。条带在 M 泳道为全甲基化, 在 H 泳道为半甲基化, 两个泳道都存在的条带为非甲基化位点。扩增片段多在 100—1000bp 之间, 其中大部分集中在 100—750bp; 1000bp 以上的条带较少。

利用 15 对引物分别对 5 个刺参个体的 4 个组织呼吸树(H)、肠(C)、肌肉(J)和体壁(T)进行甲基化扩增, 获得的甲基化多态性片段统计结果如表 2。

一个组织甲基化的水平为(A+B)/(A+B+C); 全甲基化水平为 A/(A+B+C); 半甲基化水平为 B/(A+B+C); 非甲基化的水平为 C/(A+B+C)。在刺参的四个组织中, 不同组织的甲基化状态不同, 呼吸树的甲基化率为 35.77%, 是四个组织中最高的, 最低的是肠的 28.70%, 肌肉和体壁的甲基化概率分别为 32.71%和 33.51%。但各个带型所占的比例具有一致性, 即没有发生甲基化的 C 型条带占大多数, 全甲基化的 A 型条带次之, 发生半甲基化的 B 型条带最少。

### 2.2 刺参不同组织间甲基化程度的比较

分别对 5 个刺参个体的不同组织基因组 DNA 进行扩增, 将得到的 MASP 条带进行统计, 方差分析结果显示(表 3), 被检测刺参的四个组织中的甲基化程度存在差异, 同一组织发生全甲基化与半甲基化的比例也存在差异。

进一步对结果进行 Duncan 多重比较发现, 四个组织中肠的总甲基化概率显著低于其它三个组织, 全甲基化水平也最低。整体来看, 刺参四部分组织的甲基化水平由高到低依次是: 呼吸树>体壁>肌肉>肠, 肠和其它三个组织的总甲基化水平差异显著( $P<0.05$ ), 呼吸树、肌肉和体壁之间的差异不显著( $P>0.05$ ), 但肌肉和呼吸树的半甲基化水平差异显著( $P<0.05$ ), 肌肉和肠的半甲基化水平不显著( $P>0.05$ )。

### 2.3 刺参特异性甲基化位点的克隆分析

在 MSAP 图谱上找出特异的甲基化位点, 即每

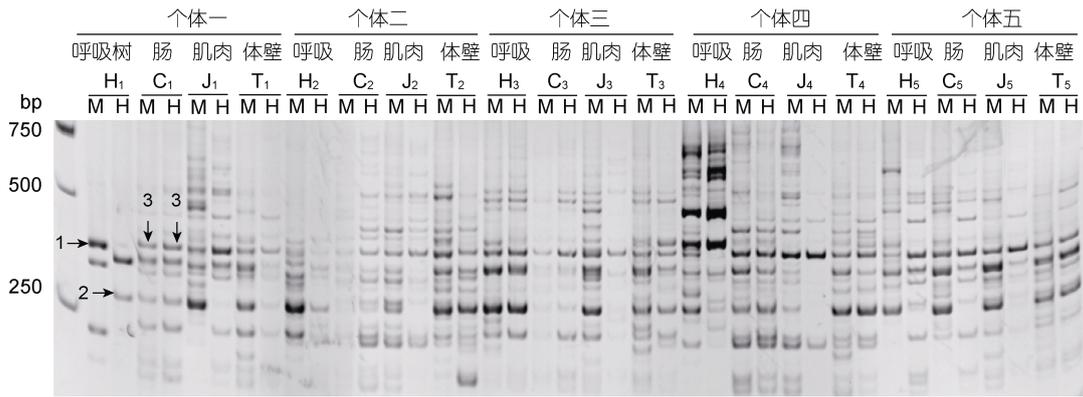


图 1 刺参基因组 MSAP 电泳结果

Fig.1 Electrophoresis of MSAP of genome DNA in *A. japonicus*

注: 第一个泳道为 Maker; M 表示 *EcoRI*/*MspI* 酶切; H 表示 *EcoRI*/*HpaII* 酶切; 每一组 M/H 为同一组织的不同酶切带型。1 为全甲基化带型; 2 为半甲基化带型; 3 为没有发生甲基化的位点

表 2 不同个体不同组织的甲基化条带

Tab.2 Methylation stripes of different tissues in different samples

不同个体 不同组织	A 型	B 型	C 型	不同个体 不同组织	A 型	B 型	C 型
H1	38	34	125	J1	65	42	191
H2	28	21	87	J2	48	36	193
H3	51	40	185	J3	68	46	192
H4	67	53	239	J4	56	41	230
H5	58	56	172	J5	52	39	208
C1	45	38	213	T1	49	41	199
C2	39	29	152	T2	68	58	253
C3	38	31	210	T3	68	52	217
C4	57	43	258	T4	67	58	236
C5	62	50	245	T5	59	47	216

表 3 不同组织全、半甲基化程度比较

Tab.3 Full and hemi-methylation level comparisons of different tissues

甲基化类型	呼吸树	肠	肌肉	体壁	平均
A%	19.46±0.95 <sup>b</sup>	15.97±1.67 <sup>a</sup>	19.18±2.60 <sup>b</sup>	18.39±1.17 <sup>b</sup>	18.25
B%	16.31±2.12 <sup>c</sup>	12.63±1.11 <sup>a</sup>	13.54±1.01 <sup>ab</sup>	15.12±0.74 <sup>bc</sup>	14.40
C%	64.23±2.77 <sup>a</sup>	71.40±2.68 <sup>b</sup>	67.28±3.57 <sup>a</sup>	66.49±1.71 <sup>a</sup>	67.35
(A+B)%	35.77±2.77 <sup>b</sup>	28.60±2.68 <sup>a</sup>	32.72±1.01 <sup>b</sup>	33.51±1.71 <sup>b</sup>	32.65

注: 数值表示 5 个个体的平均值 ± 标准差。上标的小写字母表示 Duncan 多重比较的结果: 相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

个个体的四个组织在两种酶切的作用下对应着 8 条泳道。由于甲基化位点不同, 许多条带只在某个组织的某个条带出现, 这种条带就是由于 GGCC 位点胞嘧啶甲基化特异性的条带。本实验筛选 15 对引物中的特异性条带, 通过胶回收共得到 4 条较理想的甲基化特异性扩增条带, 编号分别为 cs1、cs2、cs3、cs4, 每个条带通过转化实验克隆测序得到条带长度分别为 244bp、143bp、199bp、328bp。扩增得到的序列由上

海生工测序, 经 NCBI 中 Blast 比对, 没有发现同源序列, 推测该序列为刺参基因组非编码区抑或新发现的刺参功能基因序列。

### 3 讨论

本研究利用甲基化敏感扩增多态性技术对刺参的四个组织甲基化水平进行了分析, 结果表明刺参基因组存在甲基化现象, 而且不同组织的甲基化程

度存在差异。不同组织行使着不同的生理功能, 而甲基化在功能基因调控中起着一定的作用, 推测甲基化的组织特异性与此相关。DNA 甲基化在不同时期、不同组织的差异表达是动植物生长发育所必须的, DNA 的去甲基化能引起表型表达的巨大变异(单存海等, 2011)。甲基化现象在自然界中是普遍存在的, 据研究发现, 许多物种的甲基化水平在组织之间都存在显著的差异, 如鸡、鸭、猪、羊、小鼠还有一些水产动物、植物等(唐韶青等, 2006; 徐青等, 2011; 郭广平等, 2011)。本实验选取的刺参组织为呼吸树、肠、纵肌、体壁四部分, 甲基化水平为 28.60%—35.77%, 这个数据在水产动物中属于中等地位。甲基化在组织分化和器官发育中起着重要的作用(Holliday *et al.*, 1975), 体壁与肌肉的差异不显著可能是由于肌肉依附在体壁上功能分化不显著, 而肠和呼吸树是相互分离存在的组织, 受彼此的干扰都不强烈所以与其它组织有显著的差异。

不同物种的甲基化水平存在一定的差异, 可能是甲基化作为一种调控作用在真核生物中所占的重要性不同造成的。有研究表明水产无脊椎动物一般集中在 20%—50%之间不等(于涛等, 2010; 曹哲明等, 2009), 本研究获得的刺参数据为 28.60%—35.77%, 也处于这一范围内; 被子植物一般在 20%—40%之间(Portis *et al.*, 2004); 哺乳动物及鸟类的甲基化水平集中在 40%—50%之间(唐韶青等, 2006)。这些研究数据表明刺参的甲基化水平在自然界中属于中等偏低的程度, 甲基化水平的高低跟物种的关系也没有绝对的规律可循, 虽然存在甲基化水平较高或较低的现象(曹哲明等, 2007; 洪柳等, 2005), 但是通过研究发现由植物到动物由低等到高等甲基化水平有一定的上升趋势。

目前关于甲基化的研究主要集中在三个方面: 基因组整体水平的甲基化、特异甲基化位点的检测和新甲基化位点的寻找。研究甲基化的方法也有很多种: 基于 PCR 的甲基化分析方法; 基于重亚硫酸盐的甲基化分析方法; 基于限制性内切酶的甲基化分析方法和柱层法等。本实验基于限制性内切酶的分析方法, 除了检测刺参基因组整体的甲基化水平外还对特异的甲基化位点进行了分析, 通过 MSAP 方法回收特异性的甲基化片段, 经过克隆测序得出特异片段, 但是在 NCBI 中未发现同源序列, 推测为刺参新功能基因或位于调控序列区。

甲基化作为表观遗传学的重要组成部分, 是基

因表达的调控手段之一, 广泛存在于自然界中, 大部分物种的甲基化水平处于 20%—50%之间。有研究表明, 高等生物的复杂性在于基因表达调控机制更为复杂而不是有更多的结构蛋白基因编码, 这在一定程度上解释了甲基化率随生物的进化有上升的趋势。包括人类在内的哺乳动物以及脊椎动物的甲基化谱形成过程基本是一致的(Grunau *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2005), 完全去甲基化的两套基因组, 在胚胎的发育过程中, 在不同的发育阶段分期再进行重新的甲基化过程(Walsh *et al.*, 1999), 使得胚胎正常的发育和分化, 最后形成组织个体特异的甲基化谱。目前对于无脊椎动物的甲基化过程研究较少, 更多集中在成体组织间的甲基化差异方面, 很少有研究关注在个体生长发育过程中发生的甲基化现象。可以推测刺参在胚胎的发育过程中应该也进行着不同程度的甲基化, 甲基化在刺参表观遗传学中的研究还有很大的发展空间。本研究旨在发现刺参不同组织间的甲基化差异, 为进一步研究甲基化的调控作用奠定基础。

## 参 考 文 献

- 于涛, 杨爱国, 吴彪等, 2010. 栉孔扇贝虹膜扇贝及其杂交子代的 MSAP 分析. 水产学报, 34(9): 1336—1342
- 吴佳, 谢明吉, 杨倩等, 2011. 砷污染微生物修复的进展研究. 环境科学, 32(3): 817—824
- 陈瑞琳, 蔺淑梅, 陈天艳等, 2007. DNA 甲基化及其影响因素. 国际流行病学传染病学杂志, 34(4): 252—255
- 单存海, 钟鸣, 刘宛等, 2011. 镉胁迫对拟南芥 MLH1 基因启动子甲基化的影响. 植物生理学报, 47(3): 298—304
- 洪柳, 邓秀新, 2005. 应用 MSAP 技术对脐橙品种进行 DNA 甲基化分析. 中国农业科学, 38(11): 2301—2307
- 徐青, 张沅, 孙晓东等, 2011. 应用 MSAP 方法检测鸡不同组织基因组的甲基化状态. 遗传, 33(6): 620—626
- 郭广平, 袁金玲, 吴晓丽等, 2011. DNA 甲基化在植物研究中的应用现状与前景. 植物遗传资源学报, 12(3): 425—430
- 唐韶青, 张沅, 徐青等, 2006. 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, 14(4): 507—511
- 曹哲明, 丁炜东, 俞菊华, 2007. 个体甲基化位点的差异. 动物学报, 53(6): 1083—1088
- 曹哲明, 杨健, 2009. 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, 18(6): 2011—2016
- Bird A, 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16(1): 6—21
- Grunau C, Hindermann W, Rosenthal A, 2000. Large-scale methylation analysis of human genomic DNA reveals tissue-specific differences between the methylation profiles of genes and pseudogenes. *Hum Mol Genet*, 9(18): 2651—2663

- Holliday R, Pugh J E, 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187(4173): 226—232
- Kurkjian C, Kummar S, Murgo A J, 2008. DNA methylation: its role in cancer development and therapy. *Curr Probl Cancer*, 32(5): 187—235
- McClelland M, Nelson M, Raschke E, 1994. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res*, 22(17): 3640—3659
- Messeguer R, Ganal M W, Steffens J C *et al*, 1991. Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation in tomato nuclear DNA. *Plant Mol Biol*, 16: 753—770
- Portis E, Acquadro A, Comino C *et al*, 2004. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive-amplification polymorphism (MSAP). *Plant Science*, 166: 169—178
- Song F, Smith J F, Kimura M T *et al*, 2005. Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(9): 3336—3341
- Waalwijk C, Flavell R A, 1978. DNA methylation at a CCGG sequence in the large intron of the rabbit  $\gamma$ -globin gene: tissue-specific variations. *Nucleic Acids Res*, 5(12): 4631—4634
- Walsh C P, Bestor T H, 1999. Cytosine methylation and mammalian development. *Genes Dev*, 13(1): 26—34
- Wu C T, Morris J R, 2001. Genes, genetics and epigenetics: a correspondence. *Science*, 293: 1103—1105
- Xiong L Z, Xu C G, Maroof M A *et al*, 1999. Patterns of cytosine methylation in an elite hybrid and parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol Gen Genet*, 261( 3): 439—446
- Xu M L, Li X Q, Korban S S, 2000. AFLP-based detection of DNA methylation. *Plant Mol Biol Rep*, 18(4): 361—368

## MSAP ANALYSIS OF GENOME DNA METHYLATION IN DIFFERENT TISSUES OF *APOSTICHOPUS JAPONICUS*

GUO Ting-Ting<sup>1,2</sup>, SUN Guo-Hua<sup>2</sup>, YANG Jian-Min<sup>2</sup>, ZHAO Qiang<sup>3</sup>, LI Xue-Yan<sup>1,2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 2. Shandong Marine Fisheries Research Institute, Yantai, 264006; 3. Yantai Fisheries Research Institute, Yantai, 264000)

**Abstract** Genomes of respiratory tree, intestine, muscle, body wall of sea cucumber *Apostichopus japonicus* were compared for the methylation level adopting methylation-sensitive amplification polymorphism technique (MSAP). Results show that the methylation probability of the four tissues from high to low were respiratory tree > body wall > muscle > intestine, as 35.77%, 33.51%, 32.72% and 28.0% in sequence, among which the full methylation took up 19.46%, 18.39%, 19.18% and 15.97% orderly. The statistic results showed that the intestine had significant difference with the other three tissues ( $P < 0.05$ ); and the difference of methylation between muscle, respiratory tree and body wall was not obvious ( $P > 0.05$ ), while there was significant difference between muscle and respiration tree in hemi-methylation ( $P < 0.05$ ). Four specific fragments were got through analysis of difference site in MSAP strips, and the functions of those fragments were unknown after sequencing and blasting. It was supposed that those sequences were Non-coding region or new functional genes of *A. japonicus*.

**Key words** *Apostichopus japonicus*, Whole genome, Methylation, Methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP)