

二斑叶螨不同发育时期基因组 DNA 甲基化的 F-MSAP 分析*

徐 敏 杨思霞 赵婧妤 孙荆涛 洪晓月**

(南京农业大学昆虫学系 南京 210095)

摘 要 DNA 甲基化是表观遗传调控的重要机制,在真核生物基因表达调控中发挥重要作用。本研究通过荧光标记的甲基化敏感扩增多态性技术(F-MSAP, fluorescence-labeled methylation-sensitive amplified polymorphism)对二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 4 个龄期(卵、幼螨、若螨、成螨)基因组 DNA 中 CCGG 位点的胞嘧啶甲基化水平和模式进行分析。研究结果显示 3 种甲基化模式:无甲基化(Type I),半甲基化(Type II),全甲基化(Type III)在 4 个龄期均有出现,扩增的总甲基化位点共有 641 个,其中半甲基化率(Type II)均高于全甲基化率(Type III),各个龄期的平均总甲基化率(Type II + Type III)为 16.01%,平均半甲基化率为 10.24%,平均全甲基化率为 5.77%。F-MSAP 分析结果表明不同发育时期的二斑叶螨基因组 DNA 的甲基化水平和模式存在差异。

关键词 DNA 甲基化, 二斑叶螨, F-MSAP

Using F-MSAP to investigate genomic DNA methylation in the different developmental stages of *Tetranychus urticae*

XU Min YANG Si-Xia ZHAO Jing-Yu SUN Jing-Tao HONG Xiao-Yue**

(Department of Entomology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract DNA methylation is a key mechanism underlying epigenetic regulation and plays a very important role in regulating gene expression. The level and pattern of cytosine methylation in genomic DNA CCGG sites of the four stages (egg, larva, nymph, adult) of *Tetranychus urticae* Koch were assessed using the Fluorescence-Labeled methylation-sensitive amplified polymorphism (F-MSAP) technique. The results indicate that all three types of methylation patterns (Type I: unmethylated, Type II: hemi-methylated, Type III: full methylated) were observed in all four stages. The total number of amplification methylation sites was 641, in which the hemi-methylated ratio was higher than the full methylation ratio across all four stages. The average total methylated ratio (Type II + Type III), hemi-methylated methylated ratio (Type II), and full methylation ratio (Type III) were 16.01%, 10.24% and 5.77%, respectively. The results of F-MSAP analysis demonstrate that the genomic DNA methylation level and pattern were different across the four different developmental stages of *T. urticae*.

Key words DNA methylation, *Tetranychus urticae*, F-MSAP

基因组 DNA 含有 2 类遗传信息:第 1 类是传统意义上的遗传信息,即 DNA 序列所提供的遗传信息;第 2 类是表观遗传学信息,即提供了何时、何地、以何种方式去应用遗传信息的指令。表观遗传学(epigenetics)是指在 DNA 序列没有发生变

异的情况下,通过 DNA 和组蛋白的修饰来调控基因表达(Wu and Morris, 2001)。表观遗传学的机制包括 DNA 甲基化(DNA methylation)、组蛋白修饰、microRNA 调控状态等,其中 DNA 甲基化是表观遗传功能调控最主要的修饰之一(邢世岩等,

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项“作物叶螨综合防控技术研究与示范推广(201103020)”和国家自然科学基金项目(31172131)。

** 通讯作者, E-mail: xyhong@njau.edu.cn

收稿日期:2012-12-06, 接受日期:2012-12-30

2009)。DNA 甲基化在维持细胞正常功能、基因表达、胚胎发育等方面起着重要的作用,是近年来表观遗传学的研究热点之一 (Weinhold *et al.*, 2006)。

现已开发了多种检测 DNA 甲基化状态的技术方案:高效液相色谱法 (HPLC) (Fraga *et al.*, 2002)、甲基化免疫共沉淀技术 (MeDIP-seq) (Yoshinao *et al.*, 2010)、高通量测序与亚硫酸盐处理技术结合法 (BS-Seq) (Xiang *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012) 等,其中 BS-Seq 实现了全基因组 DNA 甲基化高精度作图,分辨率提高到单碱基水平,虽然这些技术在基因组 DNA 甲基化分析方面实现了质的突破,但成本很高,普通实验难以应用。甲基化敏感扩增多态性 (MSAP, methylation-sensitive amplification polymorphism) 是在扩增片段长度多态性 (AFLP, amplified fragment length polymorphism) 基础上改良的用于检测 DNA 甲基化程度的方法 (Vos *et al.*, 1995)。该方法多态性高,可对全基因组范围内 CCGG 位点上胞嘧啶的甲基化程度进行分析。现已广泛应用于拟南芥、鸡、果蝇、白蚁等多种动植物 DNA 甲基化的研究 (Cervera *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2005; 郭欣欣等, 2011; Lo *et al.*, 2012)。随着荧光标记在 AFLP 技术中的成熟应用 (Terefework *et al.*, 2001), MSAP 技术得到了相应的发展,荧光标记的甲基化敏感扩增多态性技术 (F-MSAP, fluorescence-labeled methylation-sensitive amplified polymorphism) (Zhao *et al.*, 2000) 应运而生。F-MSAP 利用荧光标记的引物对 DNA 进行选择性的扩增,结合 GeneScan 3.1 software 分析使结果更准确可靠,更适用于实验室操作。

朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) 和二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch 是 1971 年正式废除原复合种名-*Tetranychus telarius* L. 之后单独建立的两个近似种。但是如何正确地区别这两个近似种,在国内外一直存在很大的争议。前人为鉴别这两种叶螨进行了大量的研究:在形态学方面,主要以雌成螨的外部形态及雄螨生殖器官形状为依据鉴别两种叶螨 (Boudreaux, 1956; Brandenburg and Kennedy, 1981),但由于这些形态特征变异大、稳定性低,所以很难从形态学方面准确鉴别;在杂交试验方面,由于研究人员来自不同国家,采用的叶螨地理种群不同,导致各杂交结果

不一致 (Saba, 1975; Gotoh *et al.*, 1993; Suhasawa *et al.*, 2002),因此学者对二斑叶螨和朱砂叶螨的分类地位仍各执己见;在分子标记方面,应用 mtDNA、ITS 和微卫星等分子标记技术对二斑叶螨和朱砂叶螨的进化关系做了初步研究 (Navajas *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2009, 2010),但通过分子标记技术仍然不能明确阐述这两种叶螨的分类进化关系。因此,形态学的证据、杂交试验的结果和分子标记技术均不能给二斑叶螨和朱砂叶螨的分类地位给出很好的定论。

前人的研究结果暗示了二斑叶螨和朱砂叶螨的基因组水平没有差异,成螨体色上的显著差异可能源自转录水平的差异,即由表观遗传调控造成的。研究表明,基因组 DNA 甲基化在对昆虫表型的改变中可能起着非常重要的作用 (Kucharski *et al.*, 2008),而在二斑叶螨和朱砂叶螨内基因组 DNA 甲基化水平怎么样? 成螨体色的变化是由于体色相关基因的突变造成的还是 DNA 甲基化水平的不同造成的? 这些科学问题均为空白,有待于探索。本研究首先以二斑叶螨为材料,以 DNA 甲基化研究为切入点,采用 F-MSAP 技术对二斑叶螨不同发育时期 (卵、幼螨、若螨、成螨) 基因组 DNA 甲基化水平及模式进行检测分析,初步建立叶螨基因组 DNA 甲基化水平的检测体系,为进一步比较二斑叶螨和朱砂叶螨的基因组 DNA 甲基化水平,探索基因组 DNA 甲基化对叶螨生长发育的作用及与体色差异的相关性奠定基础,为区分近似物种提供新的科研思路,有助于推动表观遗传学在昆虫学和螨类学上的发展。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料于 2011 年采自中国福建,依据形态学和 ITS-RFLP 方法鉴定为二斑叶螨。用隔水法在菜豆叶上进行隔离饲养,饲养条件 (25 ± 1) °C,相对湿度 50%。挑取 4 个龄期,即卵、幼螨、若螨、成螨,各 400 头,分别放于不同编号的离心管中, -20 °C 保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 本实验用 Wizard[®] SV Genomic DNA purification System (Promega USA) 基因组 DNA 提取试剂盒提取各龄期样本的

基因组 DNA 并用琼脂糖凝胶电泳检测,DNA 主带清晰,无拖尾现象,说明 DNA 降解少,无 RNA 污染(图 1);通过蛋白核酸测定仪对总 DNA 样品的

OD 值进行检测,OD_{260/280} 平均值在 2.0 ~ 2.2 之间,说明蛋白质、有机物污染少;浓度约为 100 ng/ μ L。提取的 DNA 满足酶切、接头连接及 PCR 扩增等后续实验的要求,-20℃ 保存备用。

1.2.2 F-MSAP 技术检测分析 (1)限制性酶切 限制性内切酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 能够识别并酶切相同的 CCGG 位点,但是对甲基化胞嘧啶的敏感度不同。*Hpa* II 不能识别两条链上内外两侧的胞嘧啶被甲基化,即不能酶切在双链上含有 ^mCCGG, C^mCGG, ^mC^mCGG 的位点,但它能识别仅一条链上的胞嘧啶被甲基化的位点;*Msp* I 可以识别单链或双链上的内部胞嘧啶被甲基化,但不能识别外部胞嘧啶被甲基化,即不能酶切含^m CCGG 的位点 (McClelland *et al.* ,1994) (表 1)。用限制性内切酶 *EcoR* I (20 U/ μ L)/*Hpa* II (10 U/ μ L) 和 *EcoR* I /*Msp* I (20 U/ μ L) (New England Biolabs) 对基因组 DNA 进行双酶切。酶切体系:共 25 μ L 体系,基因组 DNA 500 ng,*EcoR* I 0.5 μ L,*Hpa* II 0.5 μ L,NEB Buffer I 4 μ L,ddH₂O 补充至 25 μ L。将反应混匀,37℃ 孵育 3 h。*EcoR* I /*Msp* I 酶切反应中用 *Msp* I 代替 *Hpa* II ,其他条件与 *EcoR* I /*Hpa* II 的酶切反应条件完全一致。

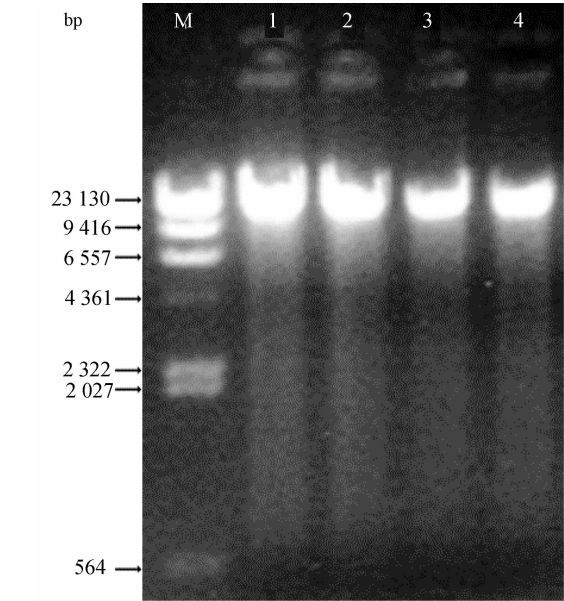


图 1 二斑叶螨基因组 DNA 电泳检测
Fig.1 Electrophoresis results of *Tetranychus urticae* genome DNA
M: marker; 1:卵 egg;2:幼螨 larva;
3:若螨 nymph;4:成虫 adult.

表 1 甲基化敏感的限制性内切酶的活性
Table 1 Methylation sensitivity and restriction pattern of isoschizomers

甲基化模式 Types	^m C 位点 Methylation status	限制性酶活性 Digestibility of enzyme restriction pattern			
		<i>Hpa</i> II	<i>Msp</i> I	H	M
Type I	CCGG <u>C</u> CGGGGCCGCC	有活性	有活性	+	+
Type II	<u>C</u> CGGGGCC	有活性	无活性	+	-
Type III	C <u>C</u> CGGG <u>C</u> C	无活性	有活性	-	+

注: + 扩增有条带, - 扩增无条带;加下划线的 C 指甲基化的胞嘧啶。
+ means band present, - means band absent;underlined cytosine is methylated cytosine.

(2)接头连接 酶切反应后进行连接反应。连接前将 *EcoR* I 和 *Hpa* II /*Msp* I (表 2)单链的接头复性为双链结构,即 95℃ 变性 3 min,自然冷却至室温,-20℃ 保存备用。接头与引物序列参照 Xiong 等(1999)的方法。连接前将酶切产物在 65℃ 孵育 10 min,使限制性内切酶失活。连接体系:共 25 μ L 体系。酶切产物 10 μ L,*EcoR* I (5 μ mol/L)接头 1.5 μ L,*Hpa* II /*Msp* I (50 μ mol/L)

接头 1.5 μ L, NEB T4 Ligase (400 U/ μ L) (New England Biolabs) 0.3 μ L, T4 10 $\times$ Buffer 4 μ L, ddH₂O 补充至 25 μ L。将反应混匀,16℃ 孵育 5 h。
(3)预扩增 反应体系:共 25 μ L 体系。酶切连接产物 5 μ L,TaKaRa Ex Taq(5 U/ μ L)0.1 μ L, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 1.6 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L)1.2 μ L,10 $\times$ Ex Taq Buffer (Mg²⁺ Free) 2 μ L,*EcoR* I + A (10 μ mol/L) 0.6 μ L, *Hpa* II /

表 2 F-MSAP 分析所用的接头与引物序列

Table 2 Sequences of adapters and primers used for F-MSAP analysis

接头及引物名称	名 称	接头及引物序列
Adapters and primers	Name	Adapters and primers sequences
接头 Adapters	<i>EcoR</i> I -Adapter I	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	<i>EcoR</i> I -Adapter II	5'-Phosphate ¹ -AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I -Adapter I	5'-GATCATGAGTCTCTGCT-3'
	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I -Adapter II	5'- Phosphate ¹ -CGAGCAGGACTCATGA-3'
预扩增引物 Pre-amplification primers	<i>EcoR</i> I + A	5'-GACTGCGTACCAATTC + A-3'
	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I + T	5'-ATCATGAGTCTCTGCTCGG + T-3'
选择性扩增 Selective-amplification primers	<i>EcoR</i> I + AAC	5'-GACTGCGTACCAATTC + AAC-3'
	<i>EcoR</i> I + AAG	5'-GACTGCGTACCAATTC + AAG-3'
	<i>EcoR</i> I + ACA	5'-GACTGCGTACCAATTC + ACA-3'
	<i>EcoR</i> I + ACT	5'-GACTGCGTACCAATTC + ACT-3'
	<i>EcoR</i> I + AGA	5'-GACTGCGTACCAATTC + AGA-3'
	<i>EcoR</i> I + AGT	5'-GACTGCGTACCAATTC + AGT-3'
	<i>EcoR</i> I + ATC	5'-GACTGCGTACCAATTC + ATC-3'
	<i>EcoR</i> I + ATG	5'-GACTGCGTACCAATTC + ATG-3'
	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I + TG	5'-FAM ² -ATCATGAGTCTCTGCTCGG + TG-3'
	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I + TC	5'-FAM ² -ATCATGAGTCTCTGCTCGG + TC-3'

注:1;5'端进行磷酸化修饰;2;5'端进行 FAM 修饰。
1: primer with 5'Phosphorylation;2: primer was labeled with 5'FAM.

Msp I + T(10 μmol/L)0.6 μL,ddH₂O 补充至 25 μL。反应程序:94℃ 5 min;30 个循环(94℃ 30 s, 56℃ 1 min,72℃ 1 min);最后再用 72℃ 延伸 10 min。预扩增产物在-20℃保存备用。

(4)选择性扩增 反应体系:共 25 μL 体系。将预扩增产物用 ddH₂O 稀释 10 倍(V:V)用作选择性扩增模板。稀释后的预扩增产物 5 μL, TaKaRa Ex Taq(5 U/μL)0.1 μL,dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)1.6 μL,MgCl₂(25 mmol/L)1.2 μL, 10×Ex Taq Buffer(Mg²⁺ Free)2 μL,*EcoR* I + 3(10 μmol/L)0.6 μL,*Hpa* II /*Msp* I + 2(10 μmol/L)0.6 μL,ddH₂O 补充至 25 μL。反应程序:94℃ 5 min;降落 PCR,13 touch-down PCR 94℃ 30 s, 65℃(每个循环下降 0.7℃)30 s,72℃ 1 min;35 个循环(94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min);最后再用 72℃ 延伸 10 min。选择性扩增产物在-20℃保存备用。

1.2.3 检测体系 取 0.5 μL 选择性 PCR 产物,按 1:1(V:V)于 loading buffer(65% deionized formamide,10% blue dextran,25 mmol/L EDTA loading solution,25% GeneScanTM-500ROXTM size standard),95℃加热 5 min,冰上冷却,然后将整个

混合物加在 4% Long Ranger gel 变性胶上,在 ABI PRISM 377 DNA 测序仪上进行电泳,最后用 GeneScan 3.1 software 分析各种引物扩增后的甲基化多态性片段(Yang *et al.* ,2011)。

2 结果与分析

2.1 二斑叶螨不同龄期的 DNA 甲基化水平概况

本实验共采用了 16 对引物组合,即 8 条 *EcoR* I 引物,与 2 条 5'端 FAM 修饰的 *Hpa* II /*Msp* I 引物一一组合(表 1)。通过 GeneScan 3.1 software (Applied Biosystems)对各引物扩增片段进行分析,可以检测基因组 DNA 在 CCGG 位点的甲基化水平和模式,结果显示这 16 对带有荧光修饰的引物组合一共扩增出 4 004 个片段,每对引物能扩增出的片段数量大约在 30~85 之间,大多数片段分布在 100~300 bp 之间。用 GeneScan 3.1 software 分析的 F-MSAP 结果见图 2。

2.2 二斑叶螨不同龄期的基因组 DNA 甲基化模式分析

实验中,根据 *Hpa* II 和 *Msp* I 酶切后的基因组 DNA 扩增的 F-MSAP 条带的不同,可将 DNA 甲基

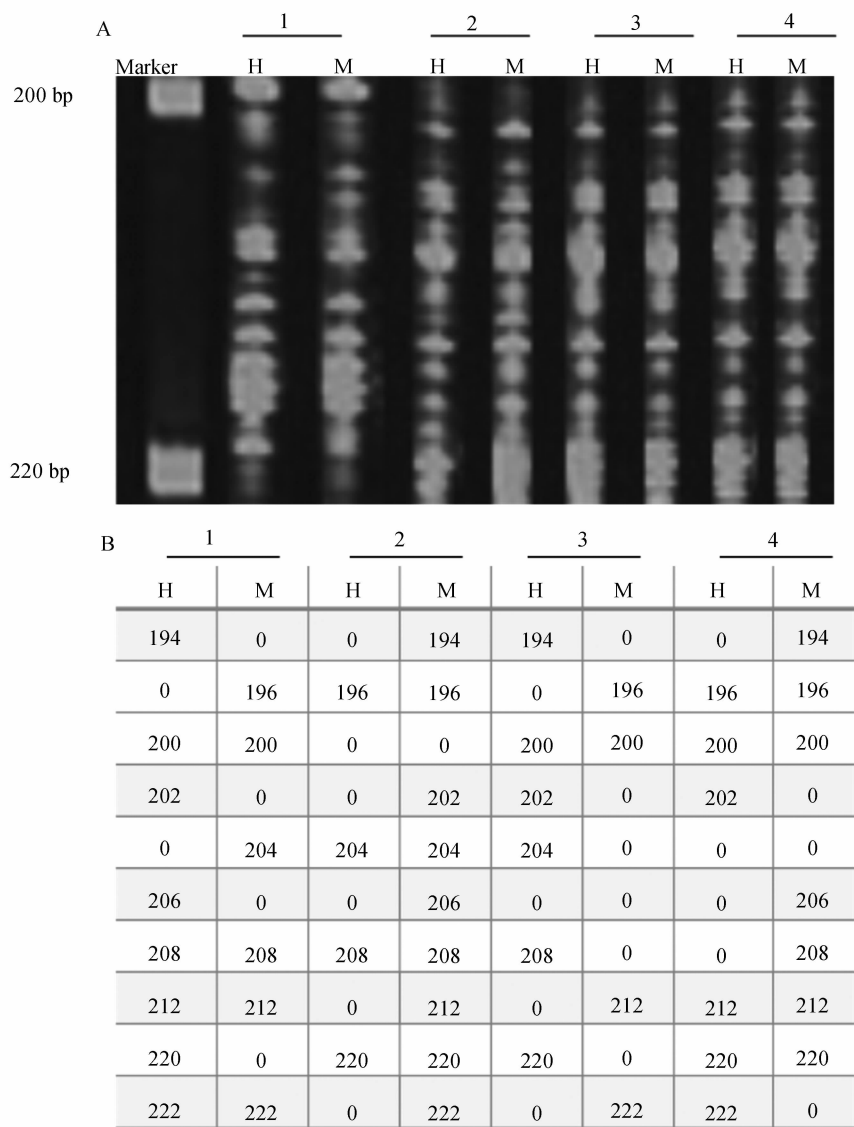


图 2 中国福建二斑叶螨 4 个龄期 DNA 用 *EcoR* I + AAC/*Hpa* II -*Msp* I + TG 引物扩增的电泳统计部分图示

Fig. 2 Methylation profiles of *Tetranychus urticae* (Fujian, China) with the primer combinations *EcoR* I + AAC/*Hpa* II/*Msp* I + TG

A: F-MSAP 电泳图; B: 用 GeneScan Analysis Software 对 A 电泳的结果进行分析的部分数据; H 和 M 指 *EcoR* I /*Hpa* II 和 *EcoR* I /*Msp* I 酶切的 DNA; 1 ~ 4 指 4 个龄期 (卵、幼螨、若螨、成螨); Marker: GeneScanTM-500ROXTM size standard (200 bp 至 220 bp)。

A: the profile from F-MSAP; B: part data from (A) quantitated using GeneScan Analysis Software; H and M refer to digestion with *EcoR* I /*Hpa* II and *EcoR* I /*Msp* I; 1-4 represent four stages (egg, larva, nymphs, adult); Marker: GeneScanTM-500ROXTM size standard (represent 200 bp to 220 bp).

化分为 3 种模式 (图 3): 模式 (Type I), *Hpa* II 和 *Msp* I 酶切后均能扩增出条带, 表明 DNA 无甲基化; 模式 II (Type II), *Hpa* II 酶切后的 DNA 能扩增出条带, 但 *Msp* I 酶切后的 DNA 的相同位置没

有扩增出条带, 表明 DNA 单链外侧甲基化, 即半甲基化; 模式 III (Type III), *Hpa* II 酶切的 DNA 没有扩增出条带, 但 *Msp* I 酶切后的 DNA 的相同位置扩增出条带, 表明 DNA 双链内侧甲基化, 即全

甲基化。通过对获得的条带进行统计分析得到福建二斑叶螨各个龄期的平均甲基化敏感扩增多态性 (MSAP) 比率即平均总扩增位点甲基化率 (Type II + Type III) 为 16.01%, 平均半甲基化率 (Type II) 为 10.24%, 平均全甲基化 (Type III) 率为 5.77% (表 3)。

表 3 中国福建二斑叶螨 4 个龄期的 DNA 胞嘧啶甲基化水平
Table 3 DNA cytosine methylation level of four stages in *Tetranychus urticae*, Fujian, China

类型 Types	卵 Egg	幼螨 Larva	若螨 Nymphs	成螨 Adult
Type I	798	816	835	914
Type II	111	121	91	87
Type III	73	57	53	48
总扩增条带数 Total amplified bands ¹	982	994	979	1 049
扩增的总甲基化带数 Total methylated bands ²	175	186	144	135
半甲基化率 Hemimethylation ratio ³ (%)	11.31	12.17	9.29	8.29
全甲基化率 Full methylation ratio ⁴ (%)	7.43	5.74	5.41	4.57
总的甲基化率 Methylation ratio ⁵ (%)	18.74	17.91	14.70	12.86

注:1:总扩增条带数 total amplified bands = I + II + III;2:扩增的总甲基化带数 total methylated bands = II + III;3:半甲基化率 hemi-methylation ratio = II / I + II + III;4:全甲基化率 full methylation ratio = III / I + II + III;5:总的甲基化率 total methylation ratio = II + III / I + II + III.

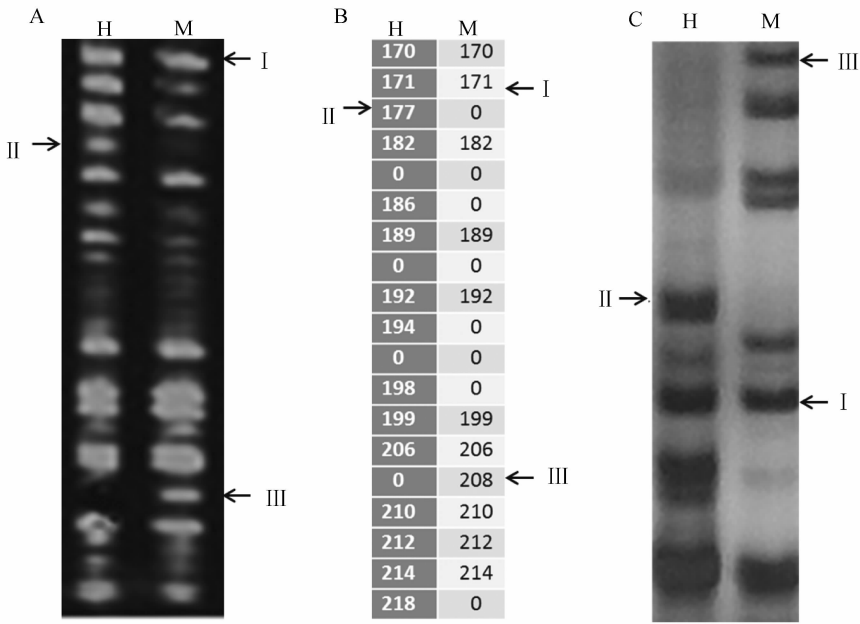


图 3 用 *EcoR* I + AAC/*Hpa* II-*Msp* I + TG 引物扩增的胞嘧啶甲基化模式

Fig.3 Cytosine methylation patterns with the primer combination *EcoR* I + AAC and *Hpa*II/*Msp*I + TG

A: F-MSAP 的电泳图; B: 用 GeneScan Analysis Software 对 A 电泳的结果进行分析的部分数据; C: MSAP 用银染的电泳图; H 和 M 指 *EcoR* I /*Hpa* II 和 *EcoR* I /*Msp* I 双酶切的 DNA; I、II、III 分别指未甲基化、半甲基化、全甲基化 3 种模式。

A: the profile from F-MSAP; B: the data from (A) quantitated using GeneScan Analysis Software; C: the profile from MSAP using silver stain; H and M refer to digestion with *EcoR* I /*Hpa* II and *EcoR* I /*Msp* I; I, II and III refer to unmethylated, hemi-methylated and full methylated sites, respectively.

2.3 二斑叶螨不同龄期的 DNA 甲基化水平和模式的比较分析

本实验共用了 16 对带有荧光标记的引物对中国福建二斑叶螨的基因组 DNA 进行扩增,采用 F-MSAP 方法检测分析了 CCGG 位点上胞嘧啶的甲基化情况。这 16 对引物共扩增出 4 004 个片段,其中,Type I 位点共有 3 363 个,Type II 位点共有 410 个,Type III 位点共有 231 个。4 个龄期(卵、幼螨、若螨、成螨)的总扩增位点甲基化率分别为 18.74%,17.91%,14.70%,12.86%;半甲基化率(Type II)分别为 11.31%,12.17%,9.29%,8.29%;全甲基化(Type III)率分别为 7.43%,5.74%,5.41%,4.57%。各龄期二斑叶螨的胞嘧啶甲基化水平及各种甲基化模式所占比例不同,每个龄期的半甲基化率均高于全甲基化率;二斑叶螨卵中总扩增位点甲基化率(Type II + Type III)最高(18.74%),成螨中最低(12.86%);幼螨中半甲基化率(Type II)最高(12.17%),成螨中最低(8.29%);卵中全甲基化率(Type III)最高(7.43%),成螨中最低(4.57%)(表 3)。

3 讨论

F-MSAP 技术是基于 AFLP 技术发展起来的,是一种高效快捷的检测物种整个基因组 DNA 中 CCGG 位点上胞嘧啶甲基化水平的方法。F-MSAP 具有以下优点:1)多态性高,引物设计简单,无需预先获知所分析 DNA 的序列,可对全基因组范围内 CCGG 位点上胞嘧啶甲基化程度进行分析;2)采用荧光标记引物,摒弃了传统的放射标记及减少了银染等过程,使实验更加安全,快捷;3)用荧光标记的选择性扩增引物进行扩增,结合 ABI PRISM 377 DNA 测序仪和 GeneScan3.1 software 分析,使扩增的条带更清晰,结果更准确可靠,可实现高通量实验快速准确地进行(Yang *et al.*, 2011)。该技术也存在一些缺点:1)对基因组 DNA 的质量要求很高,基因组 DNA 的酶切质量是决定实验成功与否的关键;2)只能有效检测大小位于 50~500 bp 范围内的片段,分子量过大或过小都无法显示而使结果产生误差;3)因为 *Hpa* II 和 *Msp* I 只能识别 CCGG 位点(Xiong *et al.*, 1999),所以这种方法只能检测基因组 DNA 部分甲基化水平。因此,在应用 F-MSAP 技术时,要尽量避开其不足,发挥其优势,使研究结果更科学、更准确。

目前,在果蝇、蜜蜂等模式生物中已经开展了较多的 DNA 甲基化方面的研究,如 Salzberg 等(2004)利用 5-甲基胞嘧啶抗体来检测黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen 基因中的甲基序列;Kucharski 等(2008)的研究证明在蜜蜂生长发育过程中,DNA 甲基化是调控工蜂和蜂王级型分化的关键因素。另外,DNA 甲基化也与农业害虫紧密相关,如 Field 等(1989)发现马铃薯桃蚜抗性品系的解毒酯酶抗性升高是由 DNA 甲基化造成的。本研究通过 F-MSAP 技术,初步建立了中国福建二斑叶螨 4 个不同龄期(卵、幼螨、若螨、成螨)基因组 DNA 甲基化的检测体系,分析了二斑叶螨基因组 DNA 中 CCGG 位点上胞嘧啶甲基化水平及模式。通过 F-MSAP 技术获得福建二斑叶螨各个龄期基因组 DNA 条带数分别为 982、994、979、1 049。统计分析结果显示,二斑叶螨不同发育时期中总甲基化率和全甲基化率均是卵中最高,成螨中最低;半甲基化率的则是幼螨中最高,成螨中最低,这种现象与以生物不同发育时期 DNA 甲基化的研究结果相符。例如,在果蝇基因组中胞嘧啶有发生甲基化现象,但多在胚胎发育早期发生 DNA 甲基化,成虫期很难检测到甲基化胞嘧啶(Lyko *et al.*, 2000);在鳞翅目昆虫基因组 DNA 甲基化的研究中,发现在甘蓝夜蛾 *Mamestra brasscae* 不同发育阶段的基因组中胞嘧啶甲基化的含量不同(Mandrioli and Volpi, 2003)。此外,通过对二斑叶螨基因组 DNA 甲基化模式的分析显示,各个龄期 CCGG 位点上胞嘧啶的甲基化模式所占比例不同,每个龄期的半甲基化率均高于全甲基化率,即发生 DNA 单链外部胞嘧啶甲基化现象比发生双链 DNA 内部胞嘧啶甲基化现象多,这与家蚕 *Bombyx mori* 基因组 DNA 中 CCGG 的甲基化(翁宏飏等, 2008)的研究结果相似。不同龄期出现不同的甲基化模式可能有两个原因:一,可能为了适应环境的压力,CCGG 外部的胞嘧啶更容易发生甲基化;二,可能为了适应二斑叶螨生长发育过程中基因的选择性表达,DNA 适时地出现重新甲基化或者去甲基化现象(Matsuo *et al.*, 1998; Hsieh, 1999)。

本研究通过 F-MSAP 技术对二斑叶螨不同龄期基因组 DNA 中 CCGG 位点上胞嘧啶甲基化水平和模式进行检测分析,初步建立了叶螨基因组 DNA 甲基化水平检测体系。研究结果表明,二斑

叶螨不同龄期 DNA 甲基化水平及模式存在差异,并表现出随着龄期的增长,甲基化水平呈逐渐降低的趋势。此趋势暗示着 DNA 甲基化与二斑叶螨生长发育可能存在着密切的关系。而二斑叶螨和朱砂叶螨内 DNA 甲基化水平是否存在差异,对两种叶螨体色的差异是否具有调控作用及如何进行调控还需要进一步的实验验证。首先,可以利用 F-MSAP 技术检测朱砂叶螨体内 DNA 甲基化水平,比较二斑叶螨和朱砂叶螨体内 DNA 甲基化水平的差异性,分析 DNA 甲基化与两种叶螨体色差异的相关性;其次,通过对朱二斑叶螨和朱砂叶螨 DNA 甲基化差异片段进行回收、测序,从而确定与两者体色差异相关的甲基化基因;最后,可以利用高通量测序与亚硫酸盐处理技术(BS-Seq)绘制二斑叶螨和朱砂叶螨基因组 DNA 甲基化图谱,结合不同发育阶段转录本,进行两种叶螨表达谱差异分析,探讨基因组 DNA 甲基化对两种叶螨成螨体色差异的影响,最终从表观遗传学方面来解决朱砂叶螨和二斑叶螨的分类学地位的问题。

参考文献 (References)

- Boudreaux HB, 1956. Revision of the two-spotted spider mite (Acarina: Tetranychidae) complex *Tetranychus telarius* (Linnaeus). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 75:595–603.
- Brandenburg RL, Kennedy GG, 1981. Differences in doreal integumentary lobe densities between *Tetranychus urticae* Koch and *T. cinnabarinus* (Boisduval) (Acarina: Tetranychidae) from Northeastern Carolina. *Int. J. Acarol.*, 7:231–235.
- Cervera MT, Ruiz-García L, Martínez-Zapater JM, 2002. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation sensitive AFLP markers. *Mol. Genet. Genomics*, 268(4):543–552.
- Field LM, Devonshire AL, French-Constant RH, Forde BG, 1989. Changes in DNA methylation are associated with loss of insecticide resistance in the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.). *FEBS. Letters*, 243(2):323–327.
- Fraga MF, Uriol E, Borja DL, Berdasco M, Esteller M, Cañal MJ, Rodríguez R, 2002. High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of 5-methyl 2'-deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues. *Electrophoresis*, 23(11):1677–1681.
- Gotoh T, Bruin J, Sabelis MW, Menken SBJ, 1993. Host race formation in *Tetranychus urticae*: genetic differentiation, host plant preference, and mate choice in a tomato and a cucumber strain. *Entomol. Exp. Appl.*, 68(2):171–178.
- Hsieh CL, 1999. In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol. Cell. Biol.*, 19(12):8211–8218.
- Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R, 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science*, 319(5871):1827–1830.
- Li GQ, Xue XF, Zhang KJ, Hong XY, 2010. Identification and molecular phylogeny of agriculturally important spider mites (Acarina: Tetranychidae) based on mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences, with an emphasis on *Tetranychus*. *Zootaxa*, 2647:1–15.
- Li T, Chen XL, Hong XY, 2009. Population genetic structure of *Tetranychus urticae* and its sibling species *Tetranychus cinnabarinus* (Acarina: Tetranychidae) in China as inferred from microsatellite data. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 102(4):674–683.
- Liu SY, Lin JQ, Wu HL, Wang CC, Huang SJ, Luo YF, Sun JH, Zhou JX, Yan SJ, He JG, Wang J, He ZM, 2012. Bisulfite sequencing reveals that *Aspergillus flavus* holds a hollow in DNA methylation. *PLoS ONE*, 7(1):e30349.
- Lo N, Li B, Ujvari B, 2012. DNA methylation in the termite *Coptotermes lacteus*. *Insect. Soc.*, 59(2):257–261.
- Lyko F, Ramsahoye BH, Rudolf J, 2000. DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 408(30):538–550.
- Mandrioli M, Volpi N, 2003. The genome of the lepidopteran *Mamestra brassicae* has a vertebrate-like content of methylcytosine. *Genetica*, 119(2):187–191.
- Matsuo K, Silke J, Georgiev O, Marti P, Giovannini N, Rungger D, 1998. An embryonic demethylation mechanism involving binding of transcription factors to replication DNA. *EMBO J.*, 17(5):1446–1453.
- 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.
- Navajas M, Fournier D, Lagnel J, Gutierrez J, Boursot P, 1996. Mitochondrial COI sequences in mites: evidence for variation in base composition. *Insect. Mol. Biol.*, 5:1–5.
- Saba F, 1975. Comparative studies of species forming two tetranychid complexes in Morocco. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 68(5):797–800.
- Salzberg A, Fisher O, Siman-Tov R, Ankri S, 2004.