

## 背角无齿蚌不同组织的基因组 DNA 甲基化分析

曹哲明<sup>1, 2</sup>, 杨健<sup>1, 2\*</sup>

1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/中国水产科学研究院内陆渔业环境与资源重点开放实验室, 江苏 无锡 214081

**摘要:** 用甲基化敏感扩增多态性 (MSAP) 对背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*) 腮、唇瓣、闭壳肌、外套膜和斧足五个组织基因组 DNACCGG 区域的甲基化水平进行了分析。结果表明, 背角无齿蚌腮基因组 DNA 甲基化比例为 47.9%, 唇瓣甲基化比例为 35.5%, 闭壳肌甲基化比例为 50%, 外套膜甲基化比例为 46.3%, 斧足甲基化比例为 56%; 基因组中 CCGG 区域存在甲基化现象。不同组合甲基化比例不同说明该区域甲基化可能参与到基因的调控中。通过比较不同地点的采集的背角无齿蚌, 发现污染严重地区(太湖三山岛水域)采集到的样品和非污染地区(南泉养殖水域)采集的蚌样甲基化区域略有变化。其中的相关性有待进一步的研究。

**关键词:** 背角无齿蚌; 甲基化; 甲基化敏感扩增多态性

**中图分类号:** 171.5

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1674-5906 (2009) 06-2011-06

背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*) 属软体动物门, 瓣鳃纲, 蚌科, 为我国常见的种类, 广泛分布于各省的江河、湖泊、水库、沟渠及池塘中。前苏联、日本、朝鲜、泰国、柬埔寨、印度境内也有分布。肉可食, 也可以作为鱼类、禽类、家畜的饲料; 有的地区用为淡水育珠蚌。目前国内关于背角无齿蚌的研究报道主要集中在重金属或有机农药的积累和毒理学<sup>[1-5]</sup>、及其免疫学<sup>[6-7]</sup>、形态学<sup>[8-9]</sup>、饲养驯化<sup>[10-12]</sup>等方面。国外对该种的研究相对较少, 更多的是对相同属中其它种重金属和有机污染物的积累方面<sup>[13-14]</sup>。背角无齿蚌在重金属及其他污染物监测和毒理研究方面具有很大的优势, 已被笔者的研究室用做“淡水贝类观察”的生物指示贝种。然而, 有关该种类种群遗传, 基因表达调控等方面却鲜见研究。这些背景知识的不足可能会阻碍对该种类在污染物生物积累和毒理学方面机理的解释, 也可能限制它在相关领域进一步的应用前景。

前述的研究显示, 背角无齿蚌及相关种类可以积累和残留较高浓度的重金属等污染物, 而这种积累和残留有可能对其基因表达产生一定的影响。重金属污染和基因组的相互作用会涉及到基因组表观修饰, 其中甲基化是基因组DNA的一种主要表观遗传修饰形式, 是调节基因组功能的重要手段。有关重金属对水生动物基因组DNA甲基化的影响, 国内、国外已有一些相关研究报道。如周新文<sup>[15]</sup>等分析了铜、锌、铅、镉等重金属离子对鲫鱼 (*Carassius*

*auratus*) 基因组DNA甲基化水平的影响; 王丙莲<sup>[16]</sup>等用高效液相色谱分析了镉、铅等对泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 基因组DNA甲基化水平的影响; Vandegehuchte<sup>[17]</sup>等分析了镉对大圣虱 (*Daphnia magna*) 基因组DNA甲基化的影响。结果一致认为重金属离子可以对这些动物的基因组DNA甲基化产生影响。现已表明从细菌到植物和真菌、从无脊椎动物到脊椎动物等几乎所有生物体内都存在DNA启动子CpG岛甲基化, 只是不同物种甲基化方式和作用不尽相同而已。由于大部分甲基化研究报道集中在脊椎动物上, 无脊椎动物这方面的研究比较少, 所以甲基化在无脊椎动物基因调控中的作用仍需进一步深入研究。

对基因组甲基化进行整体研究的技术最常用的是甲基敏感扩增多态性技术 (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism, MSAP), 该方法是 AFLP 技术的延伸, 利用具有相同识别位点 (CCGG) 的不同限制性内切酶 (*Hpa* II 和 *Msp* I) 对目标位点甲基化与否的敏感性不同, 对基因组消化的结果有差异, 在连接上设计好的接头, 通过特异扩增不同的图谱, 以辨别哪些位点存在甲基化。该技术有效地检测出了猪 (*Sus scrofa domestica*)、牛 (*Bos taurus*)<sup>[18-19]</sup>、水稻 (*Oryza sativa* L.)<sup>[20]</sup>等基因组DNA甲基化状态。然而相关方法是否在贝类研究上完全适用, 尚待进一步确认。

本研究利用甲基敏感扩增多态性技术对背角

**基金项目:** 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2009JBF02); 江苏省自然科学基金项目(BK2006030)

**作者简介:** 曹哲明 (1972年生), 男, 副研究员, 博士, 从事渔业种质资源保护以及水产动物遗传育种研究。E-mail: caozm@ffrc.cn

\*通讯作者: 杨健, E-mail: jiany@ffrc.cn

**收稿日期:** 2009-10-20

无齿蚌不同组织的基因组DNA甲基化差异进行研究,以期在优化技术条件的基础上初步了解背角无齿蚌的基因组DNA甲基化及其和环境背景的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品来源

本实验样品来自中国水产科学研究院内陆渔业生态环境与资源重点开放实验室历年采集的太湖“背角无齿蚌观察”标本库。其中2006年样品采集自无锡三山岛,2008年样品采集自无锡南泉。采集到的样品,放置于-20℃保存。

### 1.2 基因组DNA提取

背角无齿蚌基因组DNA提取采用宝生物工程股份有限公司生产的Universal Genomic DNA Extraction Kit (TaKaRa Code: DV811A)。取方法参照说明书,抽提结果在0.8%的琼脂糖凝胶上检测DNA的质量和浓度。

### 1.3 甲基化敏感扩增多态性(MSAP)分析

参考Xiong et al.<sup>[20]</sup>的方法略做改进。用对甲基化敏感性不同的同位限制性内切酶Hpa II和Msp I代替AFLP技术中的高频内切酶,低频限制性内切酶EcoR I省略。其接头序列、预扩引物序列和选择性引物序列同Xiong et al.<sup>[20]</sup>(表1)。所有引物和接头均由上海申能博彩生物有限公司合成。

表1 MSAP分析用接头序列、预扩引物序列和选扩引物序列  
Table 1 Sequences of adaptors and primers used for MSAP

名称	编号	序列
接头序列		5'-CGAGCAGGACTCATGA-3' 5'-GATCATGAGTCCTGCT-3'
预扩引物	HM	5'-ATCCATGAGTCCTGCTCGG-3'
选扩引物	HM1	5'ATCCATGAGTCCTGCTCGGCTGA-3'
	HM2	5'-ATCCATGAGTCCTGCTCGGCTGT-3'
	HM3	5'-ATCCATGAGTCCTGCTCGGCTAT-3'
	HM4	5'-ATCCATGAGTCCTGCTCGGCTAC-3'
	HM5	5'-ATCCATGAGTCCTGCTCGGCTCA-3'
	HM6	5'-ATCCATGAGTCCTGCTCGGCTCT-3'

对于每份DNA,同时设置Msp I和Hpa II两种酶切反应。反应体系为:40 μL反应总体积中含2 μg模板DNA、7.5U Hpa II或Msp I、4 μL 10×Tango buffer。37℃酶切8 h后加入10 μL的连接混合物:5×linkage buffer、50 pmol Hpa II-Msp I接头和2.5 UT4连接酶,16℃连接过夜。连接反应物用双蒸水稀释10倍,-20℃保存。

预扩增和选择性扩增反应条件与普通AFLP方法见Vos et al.<sup>[21]</sup>。预扩增反应总体积为25 μL,包括1.5 μL稀释连接产物,1.5 μL 10×PCR buffer,45 pmol Hpa II-Msp I预扩引物,1.5 μL dNTPs (2.5 mmol),2U Taq酶,加水至25 μL。选择性扩增体积

为25 μL,包括1.5 μL预扩增产物,1.5 μL 10×PCR buffer,45 pmol Hpa II-Msp I选扩引物,1.5 μL dNTPs (2.5 mmol),2U Taq酶,加水至25 μL。

预扩增反应的程序为:首先进行94℃变性5 min;然后94℃变性20 s,56℃复性30 s,72℃延伸2 min,反应进行20个循环,72℃延伸10 min,60℃保温30 min。选择性扩增反应条件:首先进行94℃变性5 min;然后94℃变性20 s,66℃复性30 s,72℃延伸2 min,反应进行10个循环,每个循环复性温度降低1℃,然后进行20个循环94℃变性20 s,56℃复性30 s,72℃延伸2 min,最后72℃延伸10 min,60℃保温30 min。

PCR产物取6 μL,在8%或10%的非变性聚丙烯酰胺胶电泳4~6 h,银染显带,具体方法和具体操作见Promaga公司的产品说明书。

### 1.4 统计方法

在扩增结果中,同一个体有两组数据(Msp I组和Hpa II组),某个个体在某一位点有带,则计为1,无带计为0。单独在Msp I组或Hpa II组出现的扩增条带表示一个甲基化位点;不同的甲基化位点如果在不同个体之间出现有或无,记为一个甲基化多态位点。为了方便统计,对于两组都有扩增条带但颜色深浅差别比较大的不记入甲基化位点。

## 2 结果与分析

### 2.1 甲基化敏感扩增多态性(MSAP)的改进

前文所述,本研究甲基化敏感扩增多态性的方法参照Xiong et al.<sup>[20]</sup>。该法是由Vos<sup>[21]</sup>发明的AFLP技术衍生而来。用对甲基化敏感性不同的同位限制性内切酶Hpa II和Msp I代替AFLP技术中的高频内切酶,低频限制性内切酶EcoR I保持不变。用限制性内切酶Hpa II和Msp I加低频限制性内切酶EcoR I对背角无齿蚌不同组织提取的基因组DNA酶切以后发现,片段大部分分布于200 bp以下,选扩结果片段都偏小,基本集中于150 bp以下。针对相关问题,本研究放弃了低频限制性内切酶EcoR I,而改为直接用限制性内切酶Hpa II和Msp I分组酶切。结果的比较表明,选扩结果条带分布比较均匀,基本分布于500 bp-150 bp这个范围。

### 2.2 背角无齿蚌不同组织甲基化比例比较

选择背角无齿蚌五个组织斧足、闭壳肌、腮、外套膜和唇瓣分别提取基因组DNA,用甲基化敏感扩增多态性方法分析了它们各自基因组的甲基化状态。表2是6个选扩引物扩增结果的分析。甲基化水平从高到低分别是斧足、闭壳肌、腮、外套膜和唇瓣,范围从35.5%到56%。脊椎动物很多基因的表达调控对该基因某些区域的甲基化起很重要的作用,而对于低等动物是否有相类似的作用尚不得而

表2 背角无齿蚌不同组织的基因组DNA甲基化比较  
Table 2 Comparison of methylation of genome DNA from the different tissues of *Anodonta woodiana*

组织	扩增条带数	非甲基化位点数	甲基化位点数	甲基化比例
腮	48	25	23	47.9%
唇瓣	31	20	11	35.5%
闭壳肌	60	30	30	50%
外套膜	41	22	19	46.3%
斧足	50	22	28	56%

知。由于背角无齿蚌不同组织基因组DNA具有不同甲基化水平,由此推断其基因组DNA甲基化对不同组织的基因表达应该有一定影响。

### 2.3 不同地点采集的背角无齿蚌甲基化差异比较

本研究比较了不同生境下该种类不同组织基因组 DNA 甲基化的差异。2006 年的样品在无锡三山岛自然水域下采集得到,该地区是太湖地区污染比较重的区域;2008 年样品来自淡水渔业研究中心南泉养殖基地,样品完全是在人工饲养条件下生长,基本没有受到环境污染。

图 1 所示的是两个样品腮的甲基化比较图谱。它们主扩增条带基本相似,差异主要来自一些次要的扩增条带。说明尽管在低温保存了两年,样品总 DNA 还是部分保留完好。也有有一些差异扩增条带的出现。图 1 中 a 区在南泉的样品中两个泳道都有扩增条带,表明该扩增区域在南泉样品中是非甲基化的,而在三山岛中只有 *Msp* I 酶切泳道有扩增产

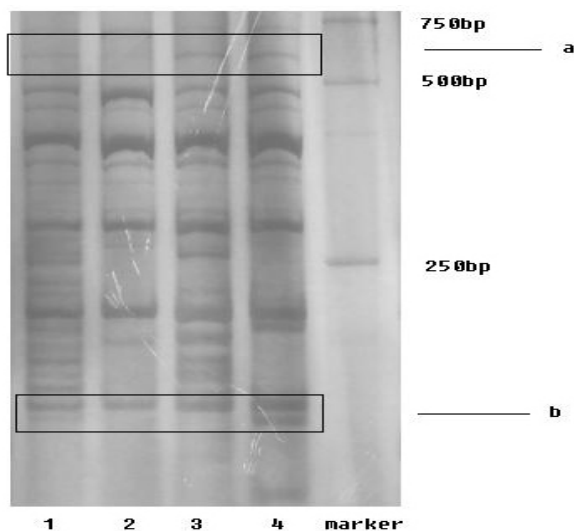


图1 引物组合HM1选扩电泳图谱

Fig.1 Electrophoretic pattern of selective amplification result with primer combination of HM1

泳道1: 样品来自2006三山岛, *Msp* I 酶切, 选扩结果; 泳道2: 样品来自2006三山岛, *Hpa* II 酶切, 选扩结果; 泳道3: 样品来自2008南泉, *Msp* I 酶切, 选扩结果; 泳道4 样品来自2008南泉, *Hpa* II 酶切, 选扩结果; 取样组织是腮,方框a、b都是有甲基化差异的区域。

物,说明该位点在三山岛样品中发生了甲基化。b 区在南泉的样品中 *Hpa* II 酶切泳道有扩增条带,而 *Msp* I 酶切泳道没有;而在三山岛样品中只有 *Msp* I 酶切泳道有扩增产物,说明该位点在两个样品中发生了甲基化位置而发生了改变。因此该结果产生原因可能是 1.个体间的差异;2.环境污染造成。同时我们比较其他引物的扩增结果,两年的样品基本没有明显区别。

同时我们还比较了 2006 年和 2008 年样品的其他组织,两者的甲基化模式基本相似。这一现象结果说明:1 低温保存了两年的样品不同组织总 DNA 还是部分保留完好;2 环境污染对于这些组织的基因表达没有太大的影响。与之相对照,腮由于是呼吸过滤器官,接触污染物最为频繁,所以该组织基因组 DNA 甲基化对污染物反应相对于其它组织可能较为明显。

## 3 讨论

### 3.1 甲基化敏感扩增多态性(MSAP)的改进

*Hpa* II 与 *Msp* I 识别相同的CCGG序列,但它们对基因组DNA中甲基化的敏感性不同, *Hpa* II 对任一个胞嘧啶的全甲基化都敏感,但对半甲基化序列具有活性, *Msp* I 对内甲基化序列 ( $C^{5m}CGG$ ) 具有活性,而对外甲基化序列 ( $^{5m}CCGG$ ) 敏感<sup>[20]</sup>,用它们处理基因组DNA,就会产生甲基化敏感多态性片段。因此个体基因组经 *Eco*R I 和 *Hpa* II/*Msp* I 酶切后,会产生 *Eco*R I -*Eco*R I, *Eco*R I -*Hpa* II/*Eco*R I -*Msp* I 和 *Msp* I -*Msp* I/*Hpa* II -*Hpa* II 3 类片段,其中 *Msp* I -*Msp* I/*Hpa* II -*Hpa* II 片段含量最高, *Eco*R I -*Hpa* II/*Eco*R I -*Msp* I 片段次之, *Eco*R I -*Eco*R I 最少。*Eco*R I 酶切位点为6个碱基组成, *Hpa* II/*Msp* I 酶切位点由四个碱基组成。迄今尚没有背角无齿蚌基因组大小的报道。笔者注意到其相近种类长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的基因组大约是834M<sup>[22-23]</sup>。参照这个数值,如果用 *Eco*R I 和 *Hpa* II/*Msp* I 双酶切,一个基因组DNA酶切后产生  $3.47 \times 10^8$  个片断,每个片断大约241 bp,其中 *Msp* I -*Msp* I/*Hpa* II -*Hpa* II 片段占大约 15/17, *Eco*R I -*Hpa* II/*Eco*R I -*Msp* I 片段占 2/17, *Eco*R I -*Eco*R I 片段可以忽略不计;如果用 *Hpa* II/*Msp* I 单酶切,大约产生  $3.27 \times 10^8$  个片断,每个片断大约256 bp,本人认为差别不大,所以本研究简化该方法,只用 *Hpa* II/*Msp* I 单酶切。本研究证实该技术可以应用于背角无齿蚌基因组DNA甲基化的研究。该技术的改进也是切实可行的。

### 3.2 背角无齿蚌基因组甲基化与其它种类的比较

甲基化敏感扩增多态性的方法在植物中的应

用非常广泛,占据了大部分的研究报道。2009年在高粱(*Sorghum bicolor*)<sup>[24]</sup>、蛇麻草(*Humulus lupulus*)<sup>[25]</sup>、小麦(*Triticum turgidum*)<sup>[26]</sup>、画眉草(*Eragrostis curvula*)<sup>[27]</sup>、油菜(*Brassica napus*)<sup>[28]</sup>等都有研究报道。在动物方面报道较少。和牛、猪等很多高等动物(平均每个泳道40~50个扩增条带)<sup>[18-19]</sup>和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)(平均每个泳道15个扩增条带)的扩增条带相比,背角无齿蚌的(每个泳道平均8-10个扩增条带)比较少。扩增片段数目相对偏小可能是因为背角无齿蚌是无脊椎动物,基因组相对较小的原因。

背角无齿蚌基因组DNA甲基化位点占总扩增位点的35.5%~56%(表2)。和唐韶青等<sup>[18]</sup>和蒋曹德等<sup>[19]</sup>研究结果相比(40%~50%)类似。但和曹哲明等<sup>[29]</sup>研究结果相比(75.9%),明显偏低。出现这样结果的具体原因现在并不清楚,由于真核生物基因调控手段的多样性,甲基化作为其中的一种方法,其不同生物种所占的重要性可能不一样,所以基因组DNA甲基化作为一个基因表达调控手段可能与在草鱼和背角无齿蚌以及一些其他动物所占的重要性不相同有关。

### 3.3 背角无齿蚌基因组不同组织甲基化的比较

本研究选择了背角无齿蚌五个组织进行基因组DNA甲基化比较研究。由于不同组织的功能不同,它们之间基因表达应该有差异。如果甲基化在不同组织表现出相同的特点,很可能甲基化在该种类的基因调控中就没有作用。本研究的结果表明背角无齿蚌五个组织的甲基化图谱有明显的差异,因此甲基化在背角无齿蚌的基因调控中具有一定的作用。甲基化水平从低到高分别是斧足、闭壳肌、腮、外套膜和唇瓣。范围从35.5%到56%(表2)。由于甲基化可以抑制基因表达,甲基化程度高的组织相对来说基因表达的活跃程度就较低。所以基因表达活跃程度由高到低顺序是斧足、闭壳肌、腮、外套膜和唇瓣。

### 3.4 背角无齿蚌甲基化的环境污染指示作用

为了研究环境污染对背角无齿蚌基因表达的影响,我们比较了来自太湖不同地区的样品的不同组织甲基化图谱,为今后相关环境表观遗传学研究提供相应的基础。

2006年的样品来自太湖三山岛自然水域,它位于太湖梅梁湖系的北部,而梅梁湖是太湖中污染最重、污染发展最快、危害最大的湖湾,与五里湖同属劣V类水质。据刘洪波等<sup>[1]</sup>比较了太湖无锡三山岛、常州雪堰、宜兴大浦、浙江湖州和无锡华庄的背角无齿蚌的汞的残留浓度,发现三山岛中汞残留最高。而本研究结果显示来自三山岛的背角无齿蚌

五个组织中四个组织的甲基化没有明显的改变,腮大部分引物扩增结果也没有明显差异,但也发生了一些轻微的变化(一些次要扩增条带的变化)(图1)。上述结果和本研究结果基本相似,可能是三山岛的重金属残留对背角无齿蚌只有慢性毒理作用。今后的研究中我们将进一步研究在饲养环境和野生重金属污染环境,背角无齿蚌不同群体基因组DNA的甲基化修饰的变化,寻找合适的甲基化位点,发展出一套分子标记,可以利用它们直接鉴定其产地是否已经有一定程度的污染,为直接利用分子手段鉴定具有积累效应的重金属残留提供一个可靠的标准。

## 4 结论

本研究首次将甲基化敏感扩增多态性应用于背角无齿蚌的基因组DNA甲基化的研究中,并进行了一些方法的优化。结果表明背角无齿蚌基因组DNA存在甲基化现象,且不同组织甲基化水平并不相同,说明甲基化参与到了背角无齿蚌的不同组织的基因调控中。同时,通过比较来自太湖三山岛自然水域和南泉养殖基地的背角无齿蚌样品不同组织的甲基化图谱,发现环境污染对背角无齿蚌的基因表达有一定的影响。笔者拟进一步开展背角无齿蚌及其他水生动物在污染环境下甲基化图谱变化的研究工作,寻找与环境污染相关的甲基化位点,进一步阐述环境污染对背角无齿蚌的表观遗传学影响和可能的机制。

## 参考文献:

- [1] 刘洪波,杨健,甘居利.太湖重点水域背角无齿蚌中汞的残留[J].上海环境科学,2009,28(3):106-109.  
LIU Hongbo, YANG Jian, GAN Juli. Mercury residues from Taihu Lake in tissues of bivalve mussels *Anodonta woodiana*[J]. Shanghai Environmental Sciences, 2009, 28(3): 106-109.
- [2] 夏天翔,刘雪华,赵孟彬.2种淡水蚌类对水环境中Cu、Zn和Cd的去除与累积[J].水产科学,2009,28(4):183-187.  
XIA Tianxiang, LIU Xuehua, ZHAO Mengbin. The Clearance and accumulation of Cu, Zn and Cd from water by the freshwater mussels (*Anodonta woodiana* and *Hyriopsis cumingii*)[J]. Fisheries Science, 2009, 28(4): 183-187.
- [3] 边学森,刘洪波,甘居利,等.太湖背角无齿蚌中多氯联苯的残留[J].农业环境科学学报,2008,27(2):767-772.  
BIAN Xuesen, LIU Hongbo, GAN Juli, et al. Residues of PCBs in *Anodonta woodiana* from the Taihu Lake, China[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2008, 27(2): 767-772.
- [4] 周侃,欧阳珊,吴小平,等. SCGE技术检测镉对背角无齿蚌血细胞DNA的损伤[J].生态科学,2008,27(2):90-94.  
ZHOU Kan, OUYANG Shan, WU Xiaoping, et al. Detection of DNA damages in hemocytes of *Anodonta woodiana woodiana* induced by cadmium with single Cell Gel electrophoresis Assay[J]. Ecological Science, 2008, 27(2): 90-94.

- [5] 刘洪波, 杨健, 甘居利. 太湖五里湖水域背角无齿蚌中汞的残留[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(2): 411-415.  
LIU Hongbo, YANG Jian, GAN Juli. Residues of mercury in the bivalve mussels *Anodonta woodiana* from the Wulihu area of the Taihu, China[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(2): 411-415.
- [6] 饶玉才, 胡宝庆, 文春根. 嗜水气单胞菌感染对背角无齿蚌5种免疫相关酶活力的影响[J]. 水生生物学报, 2009, 33(3): 406-421.  
RAO Yucui, HU Baoqing, WEN Chungen. The Changes of five immune enzymes from *Anodonta Woodiana* infected with *Aeromonas Hydrophila*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(3): 406-421.
- [7] 文春根, 张丽红, 胡宝庆, 等. pH对背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*) 5种免疫因子的影响[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2009, 33(2): 172-176.  
WEN Chungen, ZHANG Lihong, HU Baoqing, et al. Effect of pH on the five immune factors of *Anodonta woodiana*[J]. Journal of Nanchang University: Natural Science, 2009, 33(2): 172-176.
- [8] 闻海波, 徐钢春, 华丹. 圆背角无齿蚌寄生变态发育的初步观察[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(2): 252-255.  
WEN Haibo, XU Gangchun, HUA Dan. Preliminary observation on parasitic metamorphosis development of *Anodonta woodiana pacifica*[J]. Journal Of Shanghai Fisheries University, 2006, 15(2): 252-255.
- [9] 刘士力, 李家乐, 张根芳, 等. 背角无齿蚌稚蚌形态发育与生长特性[J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(3): 297-274.  
LIU Shili, LI Jiale, ZHANG Genfang, et al. Morphological development and growth characteristics of the juvenile of *Anodonta woodiana*[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2009, 18(3): 297-274.
- [10] 吴庆龙, 陈宇炜, 刘正文. 背角无齿蚌对浮游藻类的滤食选择性与滤水率研究[J]. 应用生态学报, 2005, 16(12): 2423-2427.  
WU Qinglong, CHEN Yuwei, LIU Zhengwen. Filtering capacity of *Anodonta woodiana* and its feeding selectivity on phytoplankton[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2005, 16(12): 2423-2427.
- [11] 闻海波, 徐钢春, 华丹. 圆背角无齿蚌幼蚌在特定条件下的选择滤食与生长的初步研究[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(4): 464-467.  
WEN Haibo, XU Gangchun, HUA Dan. Preliminary study on the selective feeding and growth of *Anodonta woodiana pacifica* juveniles under the particular conditions[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2005, 14(4): 464-467.
- [12] 华丹, 徐钢春, 闻海波, 等. 三种寄生鱼对圆背角无齿蚌寄生效果的研究[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2005, 24(3): 213-226.  
HUA Dan, XU Gangchun, WEN Haibo, et al. Study on the host efficiency of the three kinds of fish for the *Anodonta woodiana pacifica*[J]. Journal of Zhejiang Ocean University: Natural Science, 2005, 24(3): 213-226.
- [13] YOKOYAMA A, PARK H D. Mechanism and prediction for contamination of freshwater bivalves (Unionidae) with the cyanobacterial toxin microcystin in hypereutrophic Lake Suwa, Japan[J]. Environmental Toxicology, 2002, 17(5): 424-433.
- [14] UNO S, SHIRAISHI H, HATAKEYAMA S, et al. Accumulative characteristics of pesticide residues in organs of bivalves (*Anodonta woodiana* and *Corbicula leana*) under natural conditions[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2001, 40(1): 35-47.
- [15] 周新文, 朱国念, JILISA M. Cu、Zn、Pb、Cd及其混合重金属离子对鲫鱼(*Carassius auratus*)DNA甲基化水平的影响[J]. 中国环境科学, 2001, 21: 549-552.  
ZHOU Xinwen, ZHU Guonian, JILISA M. Influence of Cu, Zn, Pb, Cd and their heavy metal ion mixture on the DNA methylation level of the fish (*Carassius auratus*)[J]. China Environmental Science, 2001, 21: 549-552.
- [16] 王丙莲, 张迎梅, 谭玉凤, 等. 镉铅对泥鳅DNA甲基化水平的影响[J]. 毒理学杂志, 2006, 20(2): 28-80.  
WANG Binglian, ZHANG Yingmei, TAN Yufeng, et al. Influence of cadmium and lead on the DNA methylation level of loach *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Journal of Health Toxicology, 2006, 20(2): 28-80.
- [17] VANDEGEHUCHTE M B, KYNDT T, VANHOLME B, et al. Occurrence of DNA methylation in *Daphnia magna* and influence of multi-generation Cd exposure[J]. Environment International, 2009, 35(4): 700-706.
- [18] 唐韶青, 张沅, 徐青, 等. 不同动物部分组织基因组甲基化程度的差异分析[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(4): 507-510.  
TANG Shaoqing, ZHANG Yuan, XU Qing, et al. Analysis of methylation level of genome in various tissues of different animal species[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2006, 14(4): 507-510.
- [19] 蒋曹德, 邓昌彦, 熊远著. 猪个体DNA甲基化百分差异与胴体性状的关系[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(2): 179-185.  
JIANG Caode, DENG Changyan, XIONG Yuanzhu. Relationship between individual DNA methylation percentage difference and carcass traits in pig[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2005, 13(2): 179-185.
- [20] XIONG L Z, XU C G, SAGHAI M, et al. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique[J]. Molecular and General Genetics, 1999, 261: 439-446.
- [21] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(4): 407-414.
- [22] CUNNINGHAM C, HIKIMA J, JENNY M J, et al. New resources for marine genomics: Bacterial artificial chromosome libraries for the eastern and pacific oysters (*Crassostrea virginica* and *C. gigas*)[J]. Marine Biotechnology, 2006, 8: 521-533.
- [23] HUBERT S, HEDGECOCK D. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Genetics, 2003, 168: 351-362.
- [24] DUAN Y, QIAN J, SUN Y, et al. Construction of methylation linkage map based on MSAP and SSR markers in *Sorghum bicolor*[J]. IUBMB Life, 2009, 61(6): 663-669.
- [25] PEREDO E L, ARROYO-GARCIA R, REVILLA M A. Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants[J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166(10): 1101-1111.
- [26] 付胜杰, 王晖, 冯丽娜, 等. 叶锈菌胁迫下的小麦基因组MSAP分析[J]. 遗传, 2009, 31(3): 297-304.  
FU Shengjie, WANG Hui, FENG Lina, et al. Analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism in wheat genome under the wheat leaf rust stress[J]. Heredita. 2009, 31(3): 297-304.
- [27] OCHOGAVIA A C, CERVIGNI G, SELVA J P, et al. Variation in cytosine methylation patterns during ploidy level conversion in *Eragrostis curvula*[J]. Plant Molecular Biology, 2009, 70(1-2): 17-29.
- [28] XU Y, ZHONG L, WU X, et al. Rapid alterations of gene expression

- and cytosine methylation in newly synthesized *Brassica napus* allopolyploids[J]. *Planta*. 2009, 229(3): 471-483.
- [29] 曹哲明, 丁炜东, 俞菊华, 等. 草鱼全同胞鱼苗不同个体甲基化位点的差异[J]. *动物学报*, 2007, 53(6): 1083-1088.

- CAO Zheming, DING Weidong, YU Juhua, et al. Differences in methylated loci among different grass carp individuals from one pair of parents[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2007, 53(6): 1083-1088.

## Analysis of the methylation in genome DNA from different tissues of *Anodonta woodiana*

CAO Zheming<sup>1,2</sup>, YANG Jian<sup>1,2</sup>

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Ecological Environment and Resources of Inland Fisheries//

Freshwater Fisheries Research Centre, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 21408, China

**Abstract:** In this study, methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP) was applied to analyze the methylation pattern in CCGG sites of the genome in five tissues (gill, labial palp, adductor muscle, mantle and foot) of swan mussels (*Anodonta woodiana*). The results showed that methylation ratios of the gills, labial palps, adductor muscle, mantle, and foot were 47.9%, 35.5%, 50%, 46.3% and 56%, respectively. Such differences among tissues suggested that methylation may be involved in the regulation of the gene in *Anodonta woodiana*. The comparison of the swan mussels from different habitats suggested there were some variations in methylated gene loci between those from polluted environment (Sanshandao area of the Taihu Lake) and aquacultural water (Nanquan aquaculture base of Freshwater Fisheries Research Centre, Chinese Academy of Fishery Sciences). Further studies are needed to investigate the possible mechanism for the aforementioned methylation variations.

**Key words:** *Anodonta woodiana*; methylation; methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP)