

袁晓航,高剑峰,岳远瑞,等. 绵羊基因组 DNA 甲基化与传染性胸膜肺炎的关联性分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):24-27.

绵羊基因组 DNA 甲基化与传染性胸膜肺炎的关联性分析

袁晓航,高剑峰,岳远瑞,周 路,陈月娥,苟亚峰

(石河子大学生命科学学院,新疆石河子 832003)

摘要:为了从自身的角度提高绵羊对传染性胸膜肺炎的抗感染能力,采用 MSAP(甲基敏感扩增多态性)的方法对 20 只患病绵羊和 20 只正常绵羊基因组 DNA 甲基化与传染性胸膜肺炎关联性进行了分析。以绵羊在患传染性胸膜肺炎前后的全基因组 DNA 为研究对象,经过同裂酶 *Hpa* II 和 *Msp* I 对其进行双酶切,最后通过测序胶的聚丙烯酰胺电泳处理从 16 对 MSAP 选择性引物组合中挑选出 4 对引物的扩增结果,进行绵羊患病前后甲基化变化的评估。分析结果,传染性胸膜肺炎的患病与否,与绵羊的甲基化程度有一定的关联,通过统计学分析得出患病绵羊甲基化水平普遍高于非患病绵羊,同时甲基化多态性也随之升高。结果对研究动物疾病与动物自身表观遗传之间关联起到一定的参考意义,也为今后的研究提供了理论依据。

关键词:湖羊;小尾寒羊;全基因组;甲基敏感扩增多态性(MSAP);DNA 甲基化

中图分类号:Q78 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)10-0024-04

绵羊支原体性肺炎是由绵羊肺炎支原体引发的,是一种高度接触性传染性疾病,临床特征表现为高热、咳嗽、喘气、渐进性消瘦和肺间质增生性炎症。病羊是主要的传染源,肺病组织和胸腔渗出液中含有大量病原体,主要经呼吸道分泌物排菌。不同品种羊对支原体性肺炎的易感性差异较大,国外肉用羊易感性最高,本地绵羊易感性略高于山羊,杂交羊的易感性介于两者之间。支原体性肺炎常体现出地方流行性,一年四季均可发生,冬夏两季多发,羊只机体抵抗力降低,寒冷潮湿、羊群密集等因素都有利于该疾病的发展。新疫区暴发该病,几乎都是由引进或迁入病羊或带菌羊引起的。发病后,在羊群中传播迅速,20 d 左右可以波及全群。李颖等对石河子地区湖羊支原体肺炎进行了流行病学调查,结果表明,湖羊的发病率是 20.4%,同群细毛羊发病较湖羊少^[1]。

DNA 甲基化是在 DNA 甲基转移酶的催化下,将甲基转移到胞嘧啶的 5' 位置上,使 DNA 分子中碱基结合甲基的过程^[2]。众多研究表明,DNA 甲基化在基因表达、细胞分化、染色质失活、基因印记等方面起了重要的作用^[3-4]。随着甲基化研究的深入,检测甲基化的方法也不断改进,根据其原理这

些方法可分为两大类:(1)是以亚硫酸盐为基础,未甲基化的胞嘧啶经亚硫酸盐处理后转变为胸腺嘧啶,而甲基化的胞嘧啶残基保持不变^[5]。(2)甲基敏感性内切酶。甲基敏感扩增多态性(methylation-sensitive amplification polymorphism, MSAP)是扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术经过改进而用于甲基化研究的方法。许多研究证实,MSAP 是检测基因组甲基化水平较为理想的方法^[6]。目前研究 DNA 甲基化与病原感染后疾病关系的报道很少,李遇梅等对系统性红斑狼疮患者进行了研究,通过甲基化特异 PCR(MSP)方法检测 NDA 甲基化状态与趋化因子受体表达水平,结果表明 *p16* 基因在患者血浆 DNA 中启动子呈现高甲基化状态。本研究就采用 MSAP 的技术对绵羊基因组 DNA 甲基化与传染性胸膜肺炎关联性分析进行了研究,以期能从自身的角度来提高绵羊对传染性胸膜肺炎的抗感染能力提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

取 20 只患有传染性胸膜肺炎和 20 只正常的绵羊肌肉组织为试验样本。采自乌鲁木齐畜牧研究基地羊场和石河子西部牧业屠宰场。

1.2 方法

1.2.1 传染性胸膜肺炎的检测 通过临床症状、物理变化、实验室诊断(PCR 检测)3 方面检测羊是否患有传染性胸膜肺炎。

收稿日期:2013-03-27

基金项目:国家重点基础研究发展计划(国家“973”计划)(编号:2010CB530200)。

作者简介:袁晓航(1986—),男,山西人,硕士研究生,研究方向为功能基因组与分子免疫学。E-mail:yuanxiaohang2006@126.com。

通信作者:高剑峰,教授。E-mail:13519931689@163.com。

[16] 林凡云,王士强,胡银岗,等. 糜子 *SAMS* 基因的克隆及其在干旱复水中的表达模式分析[J]. 作物学报,2008,34(5):777-782.

[17] Ma X L, Wang Z L, Qi Y C, et al. Isolation of *S*-adenosylmethionine synthetase gene from *Suaeda salsa* and its differential expression under NaCl stress[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(11): 1359-1365.

[18] 杨广容,倪金卫. 秋冬季茶树种抗寒性对光合呼吸作用的影响[J]. 福建茶叶,2002(4):14-15.

[19] Maluf M P, da Silva C C, de Oliveira M de P A, et al. Altered expression of the caffeine synthase gene in a naturally caffeine-free mutant of *Coffea arabica* [J]. Genetics and Molecular Biology, 2009, 32(4): 802-810.

[20] Bottiglieri T. *S*-adenosyl-*L*-methionine (SAME): from the bench to the bedside-molecular basis of a pleiotrophic molecule[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2002, 76(5): 1151S-1157S.

1.2.2 基因组 DNA 的提取与定量 采用常规的苯酚氯仿法共提取 11 组试验动物组织的 DNA。20 ℃ 保存处理。

1.2.3 DNA 浓度和纯度的检测 琼脂糖平板法:将 DNA 样与不同浓度的标准 DNA 置于紫外线 254 nm 下拍照,与对照比较,估计样品浓度。分光光度法:在 260 nm 和 280 nm 分别读出吸光度,计算 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 的比值。

接头的准备:*EcoR* I 和 *Msp* I/*Hpa* II 接头浓度分别是 5 pmol/L 和 50 pmol/L。单链接头合成双链的程序为:65 ℃, 10 min;37 ℃, 10 min;25 ℃, 10 min。

1.2.4 酶切与连接 将基因组 DNA,分别用 *Hpa* II/*EcoR* I 和 *Msp* I/*EcoR* I 2 种限制性内切酶组合进行酶切,37 ℃, 8 h。反应结束后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

酶切体系:DNA 700 ng、*Hpa* II/*Msp* I 20 U、*EcoR* I 10 U、Buffer 4 μL、加 ddH₂O 至 20 μL。*Hpa* II, *Msp* I 和 *EcoR* I 购自 Promega 公司。72 ℃ 孵化 8 min,使内切酶失活。连接:接头设计参照 Mingliang 的方法^[7]。*Hpa* II/*Msp* I (H/M) 接头:5'-GACGATGCTCTAGAA-3';3'-CTACTCAGATCTTGC-5'。*EcoR* I (E) 接头:5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3';3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'。连接体系(40 μL):20 nmol ATP,40 U T₄ DNA 连接酶,12.5 μL DNA 酶切产物。16 ℃ 恒温水浴过夜,65 ℃ 灭活 8 min,冷却至室温,连接产物-20 ℃ 保存。T₄ DNAligase 购自宝生物工程有限公司。

1.2.5 预扩增和选扩增 预扩增所用引物核心序列与接头序列互补。预扩增所用两侧引物分别为(E+00)引物:AGACTGCGTACCAATTC,(H/M+00)引物:TCATGAGTCCTGCTCGG;选扩增引物序列是在预扩增引物序列基础上再加选择性碱基组成,所加选择性碱基分别为 E+01 引物:(E+00)+AGT;E+02 引物:(E+00)+AGA;E+03 引物:(E+00)+AAG;E+04 引物:(E+00)+ATG;H/M+01 引物:(H/M+00)+TAG。

上述连接产物 10 倍稀释后取 2.5 μL 作为预扩增模板。20 μL 预扩增体系含有 10 × PCR buffer,0.2 mmol/L dNTP,1.5 mmol/L Mg²⁺,14 pmol 的 E+00,13 pmol H/M+00,2.5 U *rTaq*。PCR 反应程序为:94 ℃ 30 s,56 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃,10 min。

预扩增产物 20 倍稀释后取 0.2 μL 作为选扩增模板,25 μL 选扩增体系其中包括 1 × PCR buffer,0.1 mmol/L dNTP,1.5 mmol/L Mg²⁺,1.5 pmol 的 *EcoR* I 选扩增引物,1.5 pmol *Hpa* II/*Msp* I 选扩增引物,1 U *rTaq*。选扩增采用 touchdown PCR 程序进行扩增:94 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min;然后每个循环退火温度降低 0.7 ℃,进行 13 个循环;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,24 个循环;72 ℃ 10 min。选扩增共有 4 对引物组合:(1)E+01 与 H/M+01;(2)E+02 与 H/M+01;(3)E+03 与 H/M+01;(4)E+04 与 H/M+01。

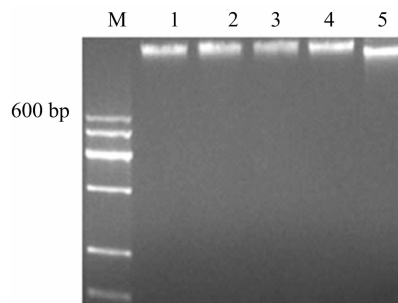
1.2.6 电泳 琼脂糖凝胶电泳后,采用 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染,扫描成像。

2 结果与分析

2.1 琼脂糖电泳检测

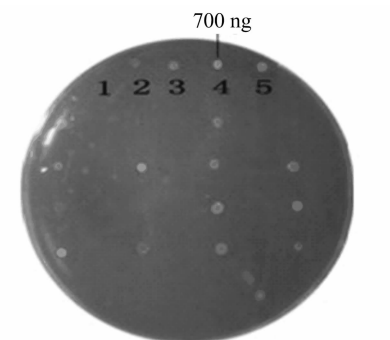
DNA 条带致密整齐,无拖尾,所得基因组无降解;琼脂糖平板检测结果总 DNA 分子量大小在 700 ng 以上(图 1);分光光度

检测样品 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.8 左右(图 2),说明蛋白质和其他残留物都比较少。DNA 的浓度和纯度都符合后续试验要求。



M—D2000; 1~5—DNA 样品

图1 DNA的1%琼脂糖检测

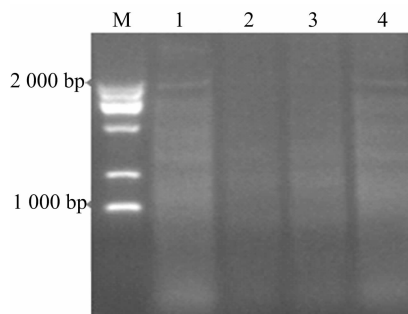


1~5—DNA 样品; 1—87.5 ng; 2—175 ng; 3—350 ng; 4—700 ng; 5—1 050 ng

图2 DNA的琼脂糖平板分析

2.2 酶切后条带

酶切后条带呈梯度模糊状,说明酶切充分,达到试验要求(图 3),预扩增和选择性扩增产物,无拖带,扩增产物效果好(图 4),达到后续试验要求。

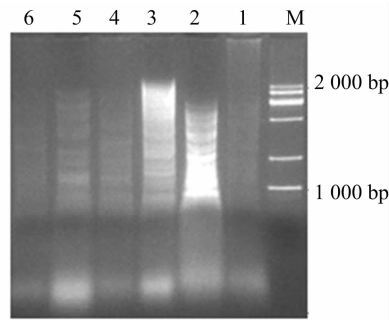


M—D2000; 1、4—*Hpa* II/*EcoR* I 双酶切; 2~3—*Msp* I/*EcoR* I 双酶切

图3 *Hpa* II/*EcoR* I 和 *Msp* I/*EcoR* I 双酶切

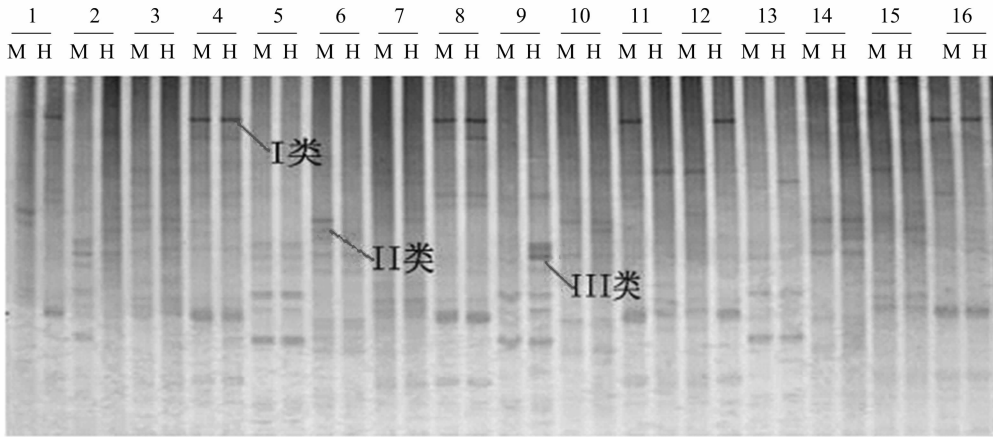
2.3 变性聚丙烯酰胺检测

16 对引物中筛选,有 4 对引物(表 1)扩增效果较好,正常和患病个体中共扩增出了 936 个条带,平均每对引物扩增出 117 个条带,其中 107 条为多态条带,平均多态率为 11.4%。图 5 显示了 16 对不同引物组合的扩增结果,绵羊基因组 DNA 甲基化存在 3 种不同模式,即 I 类:*EcoR* I/*Msp* I (M)、*EcoR* I/*Hpa* II (H) 具有相同的条带;II 类:M 有条带,H 无条带;III 类:M 无条带,H 有条带。其中 I 类为非甲基化条带,II 类为全甲基化条带,III 类为半甲基化条带。计算全甲基



M—D2000; 1~6—6个试验样品

图4 预扩增图



M—EcoR I /Msp I 双酶切; H—EcoR I /Hpa II 双酶切

图5 16对不同引物组合的选择性扩增变性聚丙烯酰胺

表1 不同引物下正常羊和患病羊的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱条带比较

羊的种类	引物	Hpa II / Msp I 引物	EcoR I 引物	总条 带数	I 类	II 类	III 类
正常羊	MSAP1	HM + TAG	E + AGT	117	65	22	30
	MSAP2		E + AGA	113	62	28	23
	MSAP3		E + AAG	156	75	33	48
	MSAP4		E + ATG	76	31	19	26
患病羊	MSAP1	HM + TAG	E + AGT	108	56	24	28
	MSAP2		E + AGA	125	65	31	29
	MSAP3		E + AAG	152	73	32	47
	MSAP4		E + ATG	89	52	13	24

注: I 类:在 EcoR I /Hpa II 和 EcoR I /Msp I 这 2 个泳道均出现的条带数; II 类:只出现在 EcoR I /Msp I 泳道中的条带数; III 类:只出现在 EcoR I /Hpa II 泳道中的条带数。

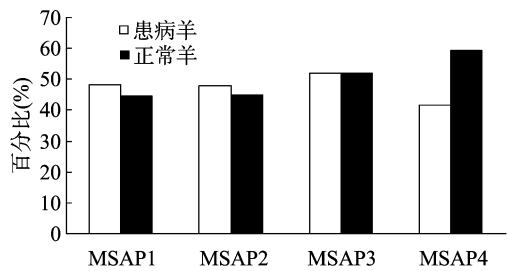


图6 4对选择性引物扩增正常羊和带病羊甲基化程度对比

化的位点数和半甲基化的位点数之和占总位点数的比例,即基因组 DNA 甲基化水平。

2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱的统计分析

分别读出每个泳道的条带数(表 1),再整理统计分析,得出传染性胸膜肺炎的患病与否对绵羊的甲基化程度有一定的关联,患病绵羊甲基化水平普遍高于非患病绵羊的甲基化水平(图 6)。

2.5 甲基化多态性分析

本研究对绵羊感染传染性胸膜肺炎的患病羊与正常羊进行 3 个方面的甲基化多态性分析。

整体甲基化水平(MSAP) = 甲基化总带数(II + III)/总扩增条带数(I + II + III) × 100% ;

全甲基化水平 = 全甲基化带数(II)/总扩增条带数(I + II + III) × 100% ;

半甲基化水平 = MSAP - 全甲基化水平。

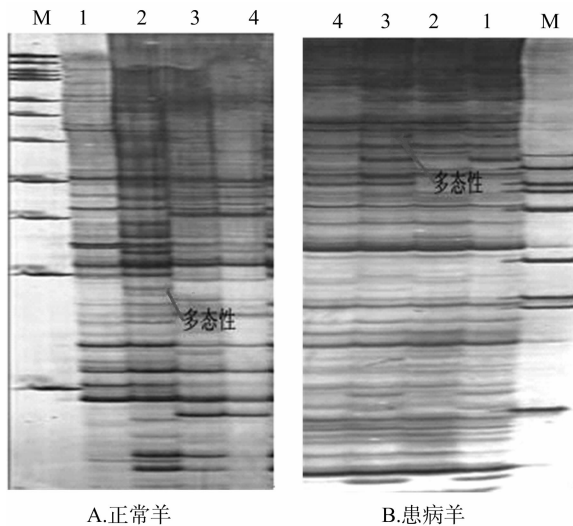
经过统计学分析,从 3 个方面比较正常羊和患病羊的甲基化多态性分析,可以得出绵羊在患病前后甲基化和全甲基化以及半甲基化都存在一定的差异(表 2)。

表2 不同引物下正常羊和患病羊的甲基化多态性分析

羊的种类	引物	甲基化水平(%)		
		MSAP	全甲基化水平	半甲基化水平
正常羊	MSAP1	44.4	18.8	25.6
	MSAP2	45.1	24.8	20.4
	MSAP3	51.9	21.2	30.8
	MSAP4	59.2	25.0	34.2
患病羊	MSAP1	48.1	22.2	25.9
	MSAP2	48.0	24.8	23.2
	MSAP3	52.0	21.1	30.9
	MSAP4	41.6	14.6	27.0

2.6 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

通过对正常绵羊和患病绵羊分别进行 4 对引物的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(图 7),分别观察其甲基化水平和多态性甲基化水平,通过对 2 个聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱的统计分析,分别读出每个泳道的条带数如表 3 所示,整理统计分析,



注: 4对引物为1—E+01与H/M+01; 2—E+02与H/M+01;
3—E+03与H/M+01; 4—E+04与H/M+01; M—100 bp maker

图7 正常和患病绵羊的选择性扩增变性聚丙烯酰胺

表3 不同引物下正常羊和患病羊的甲基化程度和多态性甲基化程度比较

引物	总条带数		甲基化的条带数		甲基化比例(%)		多态性甲基化条带数		多态性甲基化比例(%)	
	患病	正常	患病	正常	患病	正常	患病	正常	患病	正常
MSAP1	108	117	52	52	48.1	44.4	13	12	25.0	23.1
MSAP2	125	113	60	51	48.0	45.1	15	11	25.0	21.6
MSAP3	152	156	79	81	52.0	51.9	21	18	26.6	22.2
MSAP4	89	76	37	45	41.6	59.2	8	9	21.6	20.0

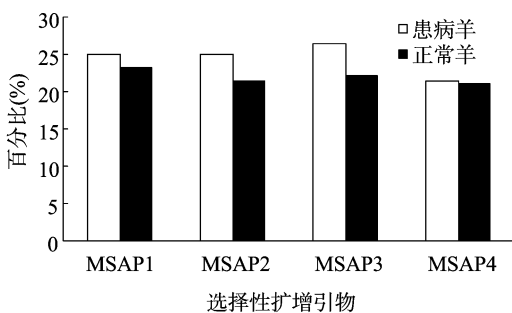


图8 4对选择性引物扩增正常羊和带病羊多态性甲基化程度对比

Msp I/*Eco*R I 2组酶酶切后,发现患病绵羊和正常绵羊的酶切产物是不同的。MSAP检测进一步验证了酶切的结果。

本研究中通过测序胶的聚丙烯酰胺凝胶电泳分别对正常和患病羊的扩增结果进行了甲基化检测,可以明显地发现多态性条带。证明该技术可以大大提高分辨率,尤其对100~1000 bp之间微小变化的观察是很有帮助。

4 结论

本研究首次采用MSAP方法,采用测序胶聚丙烯酰胺电泳的技术对新疆周边羊患病前后进行了全基因组的甲基化检测,明确了在患病后甲基化程度普遍加大,证明了疾病对动物基因组甲基化有一定影响,使我们有可能从甲基化的角度来

绵羊在传染性胸膜肺炎前后其多态性甲基化水平也发生了变化,在本试验中的4对引物的处理下患病绵羊多态性甲基化水平都高于非患病绵羊的多态性甲基化水平(图8)。

3 讨论

DNA甲基化广泛存在于各种不同生物基因组中。无论从生长发育还是从疾病发生机制,都具有十分重要的意义,也是当前研究热点之一。在基因组整体水平的甲基化检测上,甲基化敏感的扩增多态性方法即MSAP方法是在传统的AFLP方法基础上发展起来的高效甲基化研究方法,通过使用不同选扩增引物组合进行筛选性扩增,理论上当使用的引物组合数量足够多时即可覆盖整个基因组的甲基化差异位点。目前,这种方法在植物上应用较多,在动物上尤其是动物疾病方面则应用较少。

MSAP方法对基因组DNA的浓度要求比较高,本研究用常规的苯酚氯仿法提取样品的全基因组DNA,并用琼脂糖凝胶电泳,琼脂糖平板法、分光光度法检测其浓度和质量。

本研究中患病前后的绵羊DNA分别经*Hpa* II/*Eco*R I和

研究绵羊乃至其他动物疾病,研究结果为今后动物疾病的预防和控制提供了理论依据。

参考文献:

- [1]李颖,杨增岐,刻根强,等.新疆石河子地区绵羊支原体肺炎流行病学调查[J].动物医学进展,2005,26(12):109-110.
- [2]Singal R, Ginder G D. DNA methylation[J]. Blood, 1999, 93(12): 4059-4070.
- [3]Thorvaldsen J L, Duran K L, Bartolomei M S. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2[J]. Genes Development, 1998, 12(23): 3693-3702.
- [4]Zhang H. The role of mama laminas[J]. Chemistry of Life, 2002, 22(3): 218-222.
- [5]Gonzalzo M L, Liang G, Spruc k C H, et al. Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR[J]. Cancer Research, 1997, 57: 594-599.
- [6]Peraza-Echeverria S, Herrera-Valencia V A, James-Kay A. Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP)[J]. Plant Science, 2001, 161: 359-367.
- [7]Xu M L, Li X Q, Korban S S. AFLP-based detection of DNA methylation[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2000, 18: 361-368.