

文章编号: 1674-5566(2025)03-0467-09

DOI: 10. 12024/jsou. 20240704588

半滑舌鳎 *dnmt3a* 基因的分子鉴定和功能

孙衍旭^{1,2,3}, 龚小玲^{1,2}, 邵长伟^{3,4}

(1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 海水养殖生物育种与可持续产出国家重点实验室, 山东 青岛 266071; 4. 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237)

摘 要: 为探究 *dnmt3a* 基因在半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)性逆转过程中的调控作用, 开发适用于半滑舌鳎的 DNA 甲基化编辑系统, 克隆了半滑舌鳎 *dnmt3a* 基因的 CDS 区序列, 并通过生物信息学分析其结构域特点以及进化过程中的保守性, 利用 qPCR 分析了其在全滑舌鳎不同性别中的表达模式, 探究了 DNA 甲基化酶抑制剂 5-Aza-dC 处理对 *dnmt3a* 基因表达的影响。结果表明, *dnmt3a* 基因全长 3 063 bp, 编码 1 020 个氨基酸, 包括 3 个核心结构域(PWWP 结构域、ADDz 结构域和 AdoMet_MTases 超家族), *dnmt3a* 基因结合结构域(PWWP 结构域、ADDz 结构域)相对保守, 催化活性结构域(AdoMet_MTases 超家族)与哺乳动物和爬行动物有较大差异。基因表达模式分析表明, 雌性半滑舌鳎性腺组织 *dnmt3a* 基因表达量显著高于雄性和伪雄性。5-Aza-dC 处理后, *dnmt3a* 基因表达显著升高。研究表明: *dnmt3a* 基因在 DNA 甲基化调控半滑舌鳎性别决定与分化过程中发挥重要作用, 为阐明半滑舌鳎性逆转机制和实现半滑舌鳎单基因靶向 DNA 甲基化编辑提供参考。

关键词: 半滑舌鳎; *dnmt3a* 基因; DNA 甲基化; 性别调控; 5-Aza-dC

中图分类号: S 917

文献标志码: A

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是一种环境敏感鱼类, 其性别决定系统为 ZW 型(即雄性基因型为 ZZ, 雌性基因型为 ZW)^[1], 是一种广泛分布在中国近海的经济比目鱼类。已有研究表明半滑舌鳎在高温影响下可以发生性别逆转^[2], 并且该现象及其造成的体型变化等特征与基因组甲基化水平有关^[3]。因此, 半滑舌鳎是研究表观遗传调控的理想材料。

DNA 甲基化是由一系列 DNA 甲基转移酶(DNMTs)催化和维持的, 最常见的 DNA 甲基化形式为发生在胞嘧啶 C-5 上的甲基化修饰。*dnmt1*、*dnmt3a*、*dnmt3b* 是 DNA 甲基转移酶家族的 3 种经典亚型。其中, *dnmt3a*、*dnmt3b* 通过将 S-腺苷蛋氨酸(SAM)的甲基转移到胞嘧啶残基的 C-5 位置, 实现半修饰或未修饰的 DNA 新的甲基化模式建立, 因此被称为从头甲基化酶(*de novo dnmt*)^[4-5]。*dnmt3a* 基因广泛调节生物体内

的 DNA 甲基化水平, 与生物生长、发育、衰老以及人类各种癌症相关。已有大量研究表明, *dnmt3a* 基因的缺失或突变, 会引起人类白血病^[6]、乳腺肿瘤^[7]等疾病发生, 是许多疾病早期诊断的重要指标, 并为人类治愈相关疾病提供潜在的治疗靶标。此外, 在水产育种中, 有研究表明乌鳢(*Channa argus*)和斑鳢(*Channa maculata*)杂交子代乌斑鳢(乌鳢♀×斑鳢♂)所具有的杂种优势, 也与 *dnmt3a* 基因介导的 DNA 甲基化变化有关^[8]。

近年来, 表观基因编辑领域取得了显著的进展, CRISPR/dCas9 技术成为实现精准表观基因编辑的强大工具。*dnmt3a* 基因作为关键的效应基因, 通过 CRISPR/dCas9 技术的应用, 成功实现了单基因靶向编辑 DNA 甲基化。在阿尔茨海默病的治疗研究中, 利用 CRISPR/dCas9-*dnmt3a* 系统靶向淀粉样前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)的启动子, 并改变其 DNA 甲基化水平, 提供

收稿日期: 2024-07-01

修回日期: 2024-07-07

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFD2400100); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2024XT0103, 2023TD19)

作者简介: 孙衍旭(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为表观基因编辑。E-mail: 18854807173@163.com

通信作者: 邵长伟, E-mail: shaocw@ysfri.ac.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4. 0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4. 0)

<http://www.shhydx.com>

了一种全新的治疗策略^[9]。该系统在植物上也得以应用并实现靶向 DNA 甲基化编辑^[10]。然而,在海洋生物中,以 *dnmt3a* 基因为 DNA 甲基化编辑效应酶的靶向编辑系统亟待开发,为了更好地了解 *dnmt3a* 基因在半滑舌鲷 DNA 甲基化调控中的作用,实现海洋生物单基因靶向 DNA 甲基化编辑,本研究克隆了半滑舌鲷的 *dnmt3a* 基因,并分析了其结构域特点,探究其在不同性别半滑舌鲷各组织中的表达模式。并通过 DNA 甲基化酶抑制剂 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC)^[11] 处理半滑舌鲷细胞,探究其对 *dnmt3a* 的表达影响。研究结果为半滑舌鲷 DNA 甲基化调控机制的深入研究及靶向单基因 DNA 甲基化编辑系统的建立提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验所用 1 龄半滑舌鲷购自中国青岛当地市场,于实验室海水饲养箱(提前使用高锰酸钾消毒)中饲养大于 48 h 使其状态稳定,饲养海水盐度为 16.0 ± 0.5 ,饲养温度为 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$,每个饲养箱中放置 2 枚气石,使饲养箱中保持溶解氧充足。每日早晚 2 次喂食,每日 21:00 换水,及时清理饲养箱中食物残渣与排泄废物。实验方案遵守中国科学技术部制定的《实验动物伦理待遇指南》。

1.2 半滑舌鲷性别鉴定

配置 DNA 裂解缓冲液[1 mL 1 mol/L Tris (pH=8)、2 mL 5 mol/L EDTA、1 mL Triton X-100,加 ddH₂O 补足至 500 mL],在使用前加入蛋白酶 K,使其终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。捞取在实验室饲养箱中稳定饲养的健康 1 龄半滑舌鲷并编号,使用 MS-222 将其麻醉后剪取约 10 mg 尾鳍鳍条放置于 200 μL 离心管中并加入 30 μL DNA 裂解缓冲液,将剪取尾鳍后的半滑舌鲷放回至饲养箱中,观察约 30 min 确保半滑舌鲷恢复至正常状态。鳍条 60 $^\circ\text{C}$ 裂解 15~30 min,95 $^\circ\text{C}$ 加热 5 min 后离心取上清通过 PCR 扩增法扩增半滑舌鲷基因组 DNA 鉴定半滑舌鲷遗传性别。进行性别鉴定的 PCR 引物为 CS-sex-F/R,引物序列见表 1。PCR 扩增体系(20 μL):2 \times Rapid Taq Master Mix 10 μL 、引物 CS-sex-F/R 0.5 μL /0.5 μL 、基因组 DNA 1 μL 、ddH₂O 8 μL 。反应程序:95 $^\circ\text{C}$ 5 min;95 $^\circ\text{C}$ 15 s、55 $^\circ\text{C}$ 15 s、72 $^\circ\text{C}$ 15 s,设置 35 个循环;

72 $^\circ\text{C}$ 5 min。使用 4% 的琼脂糖凝胶进行凝胶电泳,电压 150 V,20 min。使用化学发光凝胶成像仪(Vilber,法国)观察电泳结果,只存在 169 bp 处单一条带为遗传雄鱼,存在 134 bp 和 169 bp 双条带为遗传雌鱼。取遗传雌鱼的部分性腺,进行镜检观察,判断其生理性别,其中性腺发育为精巢的半滑舌鲷为伪雄鱼(ZWm)。

1.3 总 RNA 的提取和 cDNA 合成

分别选取健康 1 龄半滑舌鲷雌、雄、伪雄各 3 条,分别对其 10 个组织进行采样:性腺、肝、鳃丝、肾、心、肠、胃、肌肉、脾、脑。使用 Trizol 法进行总 RNA 提取,并使用 NanoDropTM OneC (ThermoFisher Scientific,美国)和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量与完整性。将 RNA 稀释至 1 000 ng/ μL 备用。

使用 HiScript[®] III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)试剂盒(Vazyme,中国南京)进行全长 cDNA 合成,用于后续基因克隆;使用 Primescript RT Reagent kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa,日本)进行短链 cDNA 合成,用于后续 qPCR。将 cDNA 稀释 5 倍,于 -20 $^\circ\text{C}$ 储存备用。

1.4 半滑舌鲷 *dnmt3a* 基因 CDS 区克隆及鉴定

根据 NCBI 数据库中半滑舌鲷 DNA 甲基化转移酶 *dnmt3a* X1 的序列信息,采用 Primer Premier 5.0 软件进行 CDS 区分段克隆引物设计,引物序列见表 1。使用 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 高保真酶进行分段扩增,体系(50 μL): PrimeSTAR Max Premix (2 \times) 25 μL 、Primer-F/R 1 μL /1 μL 、cDNA 2 μL 、ddH₂O 21 μL 。反应程序:98 $^\circ\text{C}$ 3 min;98 $^\circ\text{C}$ 10 s, Tm ($^\circ\text{C}$) 5 s, 72 $^\circ\text{C}$ 30 s,设置 35 个循环。将分段 PCR 产物稀释 100 倍后混匀,作为模板再次进行 PCR 扩增,扩增引物分别使用 *dnmt3a*-1F 和 *dnmt3a*-3R,扩增体系与分段扩增时相同,扩增程序中延伸时间改为 1 min。纯化的 PCR 产物与 pEASY[®]-T1 载体[天根生化科技(北京)有限公司]连接,并转化至大肠杆菌感受态中,经蓝白斑筛选后送南京诺唯赞生物科技有限公司测序。

1.5 半滑舌鲷 *dnmt3a* 基因生信分析及系统发育树构建

使用 DNAMAN 比对测序序列和 NCBI 数据库中的 *dnmt3a* X1 基因的 CDS 序列,并分析

其序列信息,使用 NCBI 在线工具 (NCBI Conserved Domain Search) 借助 NCBI's Conserved Domain Database 数据库预测半滑舌鳎 *dnmt3a* 基因结构域^[12-14]。

选取半滑舌鳎近缘物种以及在进化过程中处于关键位置的 13 个物种的氨基酸序列进行多重序列比对、构建系统发育树。使用 IQ-TREE 2 (<http://www.iqtree.org>, last accessed July 6, 2024)工具进行系统发育树的构建,使用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 进行系统发育推断^[15]。使用工具 EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/>) 进行多序列比对^[16]。

1.6 5-Aza-dC 处理

将 5-Aza-dC (Macklin®, C10749023) 溶解于 100% 二甲基亚砜 (DMSO) 中,形成 $1\times 10^5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 原液,4℃ 保存。用 IL-15 培养基(北京索莱宝科技有限公司)稀释原液,分别获得终浓度为 20、40 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 的处理液。将本实验培养好的半滑舌鳎性腺细胞接种于 6 孔板中,并在完全培养基中过夜培养至密度为 70%~80%。随后,用不同浓度的 5-Aza-dC 处理液处理细胞 2 d,收集细胞进行后续检测。

1.7 qPCR 分析

使用 NCBI 的引物设计功能在半滑舌鳎 *dnmt3a* 基因开放阅读框 (ORF) 设计引物,以 β -actin 基因作为内参基因,引物序列见表 1。用 QuantiNova SYBR PCR Mix Kit (20 \times 500) 试剂盒 (Qiagen, 德国) 进行 qPCR 测定,在罗氏实时荧光定量 PCR 仪 (Roche, 瑞士) 上进行 qPCR。qPCR 反应体系: SYBR Green I 10 μL 、Primer Mix 1 μL 、cDNA 1 μL 、ddH₂O 8 μL 。反应程序: 95℃ 2 min; 95℃ 5 s、60℃ 10 s、95℃ 15 s, 循环数设定为 40; 65℃ 1 min。实验样品设 3 个生物学重复,每个实验样品设 3 个技术重复。使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法计算不同处理下基因的相对表达。使用 GraphPad Prism 9.0 (GraphPad, 美国) 进行数据分析,使用 *t* 检验或 One-way ANOVA 确定统计学差异。

2 结果

2.1 半滑舌鳎 *dnmt3a* 基因的序列分析

半滑舌鳎 *dnmt3a* 基因含有 3 063 bp 的开放

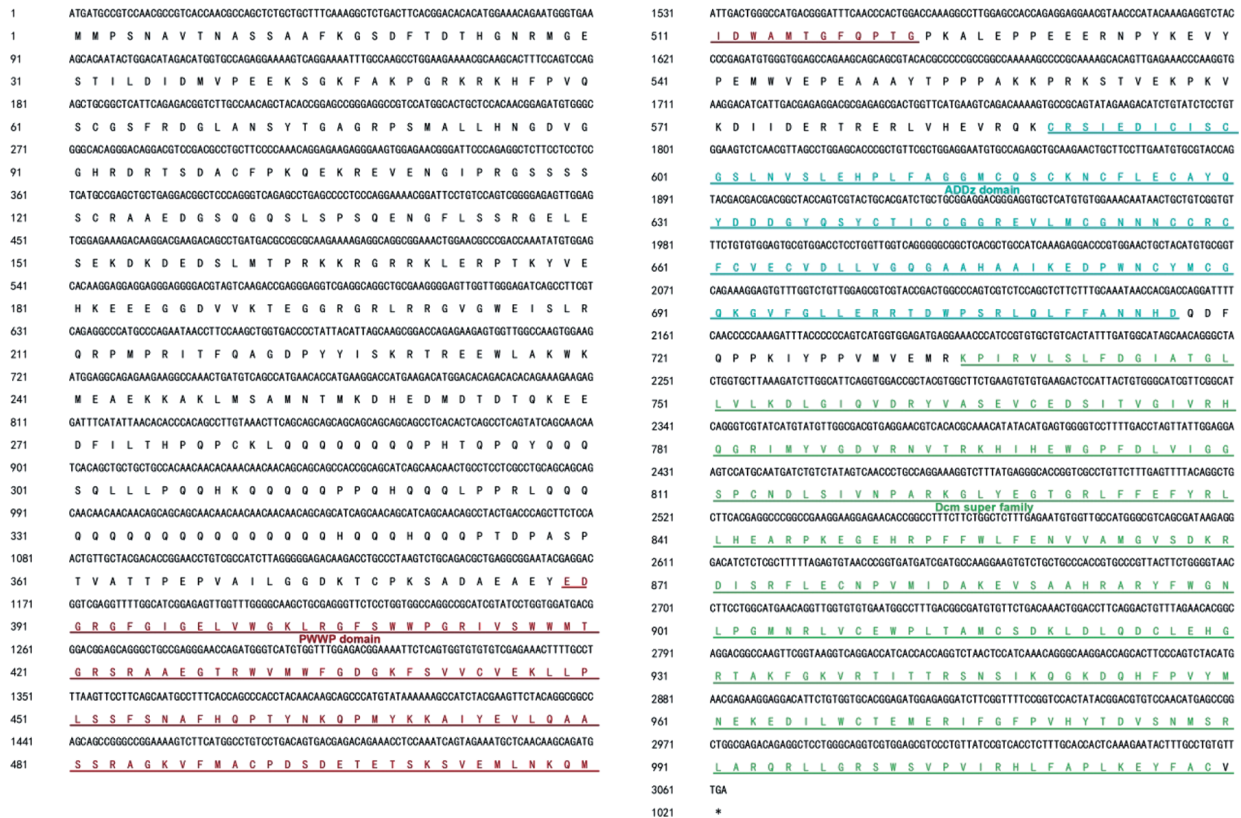
阅读框 (ORF), 共编码 1 020 个氨基酸, 共包含 3 个核心结构域, 分别为 PWWP 结构域 (含有 Pro-Trp-Trp-Pro 保守结构, 该结构域通常与 DNA 结合, 作为转录因子调节各种发育过程)、ADDz 结构域 (PHD 样锌指结构域, 主要功能为与多肽位点结合, 参与染色质介导的转录控制) 和 AdoMet_MTases 超家族 [催化活性结构域, 利用 S-腺苷-L-蛋氨酸 (SAM 或 AdoMet) 作为底物进行甲基转移, 生成 S-腺苷-L-高半胱氨酸] (图 1)。

表 1 引物名称和序列
Tab. 1 Primer names and sequences

引物名称 Primer name	序列 5'-3' Sequence (5'-3')	目的 Application
CS-sex-F	CCTAAATGATGGATGTAGATTCTGTC	性别鉴定
CS-sex-R	GATCCAGAGAAAATAAACCCAGG	
<i>dnmt3a</i> -1F	ATGATGCCGTCCAACGCCGT	基因扩增
<i>dnmt3a</i> -1R	ACTTAGGGCAGGTCTTGTCTCC	
<i>dnmt3a</i> -2F	GACAAGGACGAAGACAGCCTG	
<i>dnmt3a</i> -2R	CCACGTAGCGGTCCACCTGA	
<i>dnmt3a</i> -3F	AGGATTTTCAACCCCCAAAG	
<i>dnmt3a</i> -3R	TCAAACACAGGCAAAAGTATTCT	
β -actin-F	GCTGTGCTGTCCCTGTA	qPCR 验证
β -actin-R	GAGTAGCCACGCTCTGTC	
<i>dnmt3a</i> -F	CAGGTTGGTGTGTAATGGC	
<i>dnmt3a</i> -R	GGAAAACCGAAGATCCTCTCCA	

2.2 半滑舌鳎 *dnmt3a* 基因同源性和系统进化树分析

将半滑舌鳎的 *dnmt3a* 基因的氨基酸序列与其他硬骨鱼类、哺乳类、鸟类和爬行类等已知的 *dnmt3a* 序列进行比较分析发现, 中游和中下游氨基酸序列在物种中相对保守, 相对保守的区域对应的是 *dnmt3a* 的 PWWP 结构域和 ADDz 结构域, 而在其他位置相对保守性较低 (图 2)。随后, 将这些氨基酸序列进行建树分析与结构域分析, 如图 3 所示, 鱼类被单独聚在一支, 与其他物种相分离, 表明鱼类与哺乳类、鸟类和爬行类动物的 *dnmt3a* 基因在进化上关系相对较远。结构域预测同时印证了这一点, 并且能够直观地观察到不同物种间 *dnmt3a* 在结合结构域上的保守性以及催化结构域上的差异性。



红色代表 PWWP 结构域,蓝色代表 ADDz 结构域,绿色代表 AdoMet_MTases 超家族。

The PWWP domain is represented in red, the ADDz domain in blue, and the AdoMet_MTases superfamily in green.

图1 半滑舌鲷 *dnmt3a* 基因序列分析

Fig. 1 DNA Sequence analysis of *dnmt3a* in Chinese tongue sole

2.3 *dnmt3a* 基因在雌、雄半滑舌鲷各组织中的表达模式分析

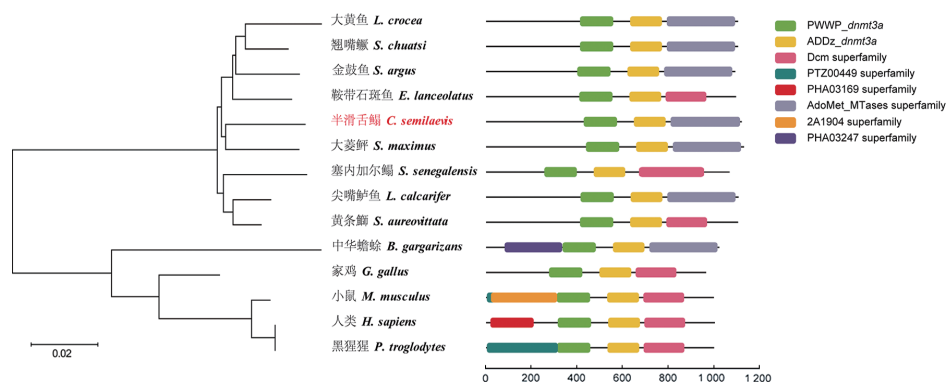
dnmt3a 基因在 1 龄雌、雄半滑舌鲷的 10 个组织中均有表达。其中, *dnmt3a* 基因在肝、肌肉、脾、胃、肾和脑中的表达在雌、雄间有显著差异 ($P < 0.05$), 在肠、鳃丝和心中的表达量无显著差异 ($P > 0.05$) (图 4)。对 1 龄雌、雄和伪雄半滑舌鲷性腺组织中 *dnmt3a* 的相对表达量进行比较分析, 结果表明, 雄鱼和伪雄鱼的性腺组织中 *dnmt3a* 基因的相对表达量没有显著差异 ($P > 0.05$), 而在雌鱼的性腺组织中, *dnmt3a* 基因的相对表达量显著 ($P < 0.01$) 高于雄鱼和伪雄鱼性腺组织 (图 5)。

2.4 不同浓度 5-Aza-dC 处理半滑舌鲷精巢细胞后 *dnmt3a* 基因的相对表达分析

对 1 龄半滑舌鲷精巢细胞进行不同浓度的 5-Aza-dC 处理, 结果显示, 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 处理 2 d 后, *dnmt3a* 的相对表达量显著高于 ($P < 0.01$) 未处理细胞, 而在 80 $\mu\text{mol/L}$ 处理 2 d 后, *dnmt3a* 基因相对表达量并没有发生显著变化 (图 6)。

3 讨论

DNA 甲基化转移酶 (DNMTs) 家族主要包括 *dnmt1*、*dnmt2*、*dnmt3a* 和 *dnmt3b* 等, 这些甲基转移酶都有着类似的催化机制, 其特点是在酶和底物碱基之间形成共价反应, 从而实现甲基转移^[17]。DNA 甲基化转移酶通过转录沉默^[18]、转录激活^[19]和 *dnmt2* 依赖性 tRNA 甲基化的转录后调控^[20], 进而调控生物生长、发育、衰老等生命进程。这种机制的多样性使 DNMTs 家族能够作为表观遗传调控的多功能工具包发挥作用^[21]。*dnmt3a* 作为靶向编辑 DNA 甲基化的效应酶, 通过 CRISPR/dCas9-*dnmt3a* DNA 甲基化编辑系统在小鼠、人类细胞中均已成功应用, 并实现如阿尔兹海默症相关神经细胞死亡挽救^[9]、胶质瘤治疗新方法开发^[22]和抑制黑色素瘤细胞增长^[23]等。然而, 该系统使用的 *dnmt3a* 基因多为人源的 *dnmt3a* 基因的催化结构域, 该系统能否直接应用于海水鱼类单基因靶向 DNA 甲基化、促进海水鱼类遗传育种还未可知。因此, 本研究克隆并分

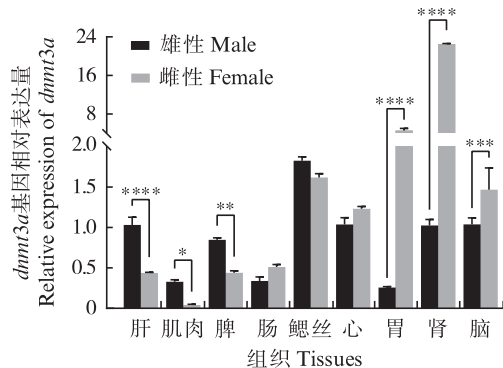
图2 *dnmt3a* 基因氨基酸序列的多序列比对分析Fig. 2 Sequencing analysis of *dnmt3a* amino acid sequenceFig. 3 Phylogenetic analysis of *dnmt3a* amino acid sequences and analysis of domains

左侧为系统发育树;右侧为结构域分析。

Left is the phylogenetic analysis; Right is analysis of domains.

图3 *dnmt3a* 的系统发育进化树及结构域分析

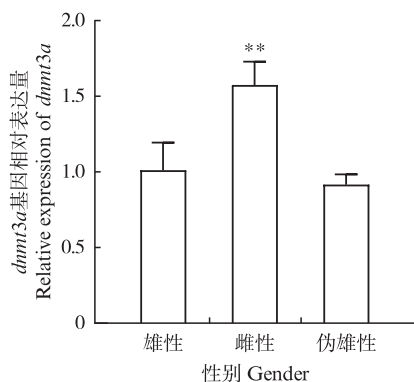
析了半滑舌鲷 *dnmt3a* 基因,根据多序列比对以及系统发育进化树的结果可知,*dnmt3a* 在不同物种中相对保守。然而,其催化活性结构域在不同物种间却有着极大的差异,这种差异使得其催化底物不同,这提示我们,在哺乳动物中技术相对成熟的 CRISPR/dCas9-*dnmt3a* 系统或许并不能直接应用于海水鱼类的 DNA 甲基化编辑。



* 表示雌、雄性间比较, *dnmt3a* 基因表达差异显著 ($P < 0.05$);
** 表示雌、雄性间比较, *dnmt3a* 基因表达差异显著 ($P < 0.01$);
*** 表示雌、雄性间比较, *dnmt3a* 基因表达差异极显著 ($P < 0.001$);
**** 表示雌、雄性间比较, *dnmt3a* 基因表达差异极显著 ($P < 0.0001$);
* indicates significant differences in *dnmt3a* expression when comparing between females and males ($P < 0.05$); ** indicates significant differences in *dnmt3a* expression when comparing between females and males ($P < 0.01$); *** indicates significant differences in *dnmt3a* expression when comparing between females and males ($P < 0.001$); **** indicates significant differences in *dnmt3a* expression when comparing between females and males ($P < 0.0001$).

图4 *dnmt3a* 基因在雌、雄半滑舌鲷各组织中的相对表达量

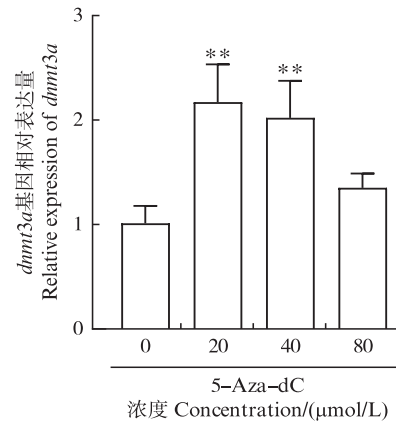
Fig. 4 Relative expression of *dnmt3a* in various tissues of male and female *Cynoglossus semilaevis*



**表示雌、雄、伪雄间差异较显著 ($P < 0.01$);
** indicates a significant difference between male, pseudo-male and female ($P < 0.01$).

图5 *dnmt3a* 基因在不同性别半滑舌鲷性腺中的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *dnmt3a* in different gonads of *Cynoglossus semilaevis*



**表示处理后差异较显著 ($P < 0.01$);

** indicates significant difference after treatment ($P < 0.01$).

图6 不同浓度 5-Aza-dC 处理下的半滑舌鲷精巢细胞 *dnmt3a* 基因的相对表达量

Fig. 6 Relative expression of *dnmt3a* in testis cells of Chinese tongue sole treated with different concentrations of 5-Aza-dC

半滑舌鲷作为我国重要的海水经济鱼类,其生命进程受到表观遗传学,尤其是 DNA 甲基化修饰的调控。已有研究^[3]表明,不同性别半滑舌鲷的全基因组 DNA 甲基化景观有着较大的差异。本研究猜测, *dnmt3a* 基因作为一种重要的 DNA 甲基化转移酶,在半滑舌鲷性别决定与分化中发挥着重要作用。本研究分析了不同性别半滑舌鲷各组织中 *dnmt3a* 基因的表达模式,结果表明,雄性(ZZ)和雌性(ZW)半滑舌鲷的肠、鳃丝和心等组织的表达模式相近。进一步比较了不同性别半滑舌鲷的性腺组织中 *dnmt3a* 的相对表达量,结果表明,雄鱼和伪雄鱼的 *dnmt3a* 基因表达量没有显著差异,而雌鱼的 *dnmt3a* 基因表达显著高于雄鱼和伪雄鱼。*dmrt1* 是半滑舌鲷的性别决定基因,其在伪雄鱼中的高表达,是半滑舌鲷发生型逆转现象的重要调控机制之一。在其他物种中,如锦龟 (*Chrysemys picta*)^[24]、盲曹鱼 (*Lates calcarifer*)^[25] 以及与半滑舌鲷近缘的牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[26] 等物种中,均有研究表明, *dmrt1* 基因的表达受到 DNA 甲基化的调控。本研究推测,雌性半滑舌鲷性腺组织中高表达的 *dnmt3a* 基因可能与 *dmrt1* 基因 DNA 甲基化水平升高相关,从而抑制基因表达;而在雄鱼中,性腺中的 *dnmt3a* 基因表达量降低,使 *dmrt1* 基因 DNA 甲基化水平下降,从而激活 *dmrt1* 基因表达,使性腺逐渐朝着精巢方向发展。

DNA 甲基化调控是一套复杂的调控机制,并

不能只靠单一的某种 DNA 甲基化转移酶实现生物学过程调控,通常认为, *dnmt1* 和 *dnmt3a*、*dnmt3b* 共同参与 DNA 甲基化调控过程。但是近年来在已完成的大量昆虫的全基因组和转录组中发现,部分昆虫在进化的过程中逐渐丢失某种 DNA 甲基化转移酶,但并不会影响其自身 DNA 甲基化的动态调控^[21, 27],这提示我们 DNMTs 家族各成员并不只是行使单一功能,可能在一些情况下互为补充,因此, DNA 甲基化转移酶间的补充关系亟待阐明。5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC) 是一种广谱的 DNA 甲基化抑制剂,其作用机制为与 *dnmt1* 特异性结合,从而降低全基因组 DNA 甲基化水平^[11]。低浓度的 5-Aza-dC 能够降低基因组的 DNA 甲基化,激活基因表达并且在细胞周期 S 期时改变细胞的分化状态^[28]。本研究使用不同浓度的 5-Aza-dC 溶液处理半滑舌鳎精巢细胞,并检测处理后半滑舌鳎精巢细胞 *dnmt3a* 的相对表达量,结果表明,在 20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时,处理后的半滑舌鳎精巢细胞 *dnmt3a* 基因的表达量显著升高,这可能由于 *dnmt1* 被抑制活性后, *dnmt3a* 替代 *dnmt1* 基因维持细胞的 DNA 甲基化状态,但是这种补救措施的效率仍待阐明。此外,高浓度 5-Aza-dC 可抑制 DNA 的合成,诱导细胞死亡^[11]。在本研究处理过程中,80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度处理造成大量细胞死亡,可能是 *dnmt3a* 表达量并未发生显著差异的原因之一。

综上所述,本研究克隆了半滑舌鳎 *dnmt3a* 基因,明确了其催化活性结构域与人类 *dnmt3a* 基因催化活性结构域的差异,为构建适用于半滑舌鳎等海水鱼类的 CRISPR/dCas9-*dnmt3a* 单基因靶向 DNA 甲基化编辑系统提供参考。本研究还发现雌鱼性腺组织的 *dnmt3a* 基因表达量显著高于雄鱼和伪雄鱼,推测 *dnmt3a* 在半滑舌鳎性逆转中起到重要作用。此外,探究了 5-Aza-dC 处理半滑舌鳎精巢细胞后 *dnmt3a* 基因的表达变化。本研究为探究半滑舌鳎性逆转的表观调控机制及开展半滑舌鳎单基因靶向 DNA 甲基化提供参考。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] CHEN S L, TIAN Y S, YANG J F, et al. Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Marine Biotechnology, 2009, 11(2): 243-251.
- [2] CHEN S L, ZHANG G J, SHAO C W, et al. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle [J]. Nature Genetics, 2014, 46(3): 253-260.
- [3] SHAO C W, LI Q Y, CHEN S L, et al. Epigenetic modification and inheritance in sexual reversal of fish [J]. Genome Research, 2014, 24(4): 604-615.
- [4] ZHANG Z M, LU R, WANG P C, et al. Structural basis for DNMT3A-mediated *de novo* DNA methylation [J]. Nature, 2018, 554(7692): 387-391.
- [5] GAO L F, EMPERLE M, GUO Y R, et al. Comprehensive structure-function characterization of DNMT3B and DNMT3A reveals distinctive *de novo* DNA methylation mechanisms [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 3355.
- [6] BRUNETTI L, GUNDRY M C, GOODELL M A. DNMT3A in leukemia [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2017, 7(2): a030320.
- [7] MAN X X, LI Q, WANG B G, et al. DNMT3A and DNMT3B in breast tumorigenesis and potential therapy [J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2022, 10: 916725.
- [8] OU M, MAO H, LUO Q, et al. The DNA methylation level is associated with the superior growth of the hybrid fry in snakehead fish (*Channa argus* × *Channa maculata*) [J]. Gene, 2019, 30, 703: 125-133.
- [9] PARK H, SHIN J, KIM Y, et al. CRISPR/dCas9-Dnmt3a-mediated targeted DNA methylation of *APP* rescues brain pathology in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Translational Neurodegeneration, 2022, 11(1): 41.
- [10] JOGAM P, SANDHYA D, ALOK A, et al. A review on CRISPR/Cas-based epigenetic regulation in plants [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 219: 1261-1271.
- [11] CHRISTMAN J K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy [J]. Oncogene, 2002, 21(35): 5483-5495.
- [12] LU S N, WANG J Y, CHITSAZ F, et al. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020 [J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(D1): D265-D268.
- [13] MARCHLER-BAUER A, BRYANT S H. CD-Search: protein domain annotations on the fly [J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(s2): W327-W331.
- [14] MARCHLER-BAUER A, LU S N, ANDERSON J B, et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins [J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(s1): D225-D229.
- [15] MINH B Q, SCHMIDT H A, CHERNOMOR O, et al.

- IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2020, 37(5): 1530-1534.
- [16] MADEIRA F, PEARCE M, TIVEY A R N, et al. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50 (W1) : W276-W279.
- [17] WU J C, SANTI D V. On the mechanism and inhibition of DNA cytosine methyltransferases [J]. *Progress in Clinical and Biological Research*, 1985, 198: 119-129.
- [18] MA Y T, BUDDE M W, ZHU J Q, et al. Tuning methylation-dependent silencing dynamics by synthetic modulation of CpG density[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(9): 2536-2545.
- [19] KUCHARSKI R, MALESZKA J, FORET S, et al. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation[J]. *Science*, 2008, 319(5871): 1827-1830.
- [20] DEV R R, GANJI R, SINGH S P, et al. Cytosine methylation by DNMT2 facilitates stability and survival of HIV-1 RNA in the host cell during infection [J]. *Biochemical Journal*, 2017, 474(12): 2009-2026.
- [21] LYKO F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2018, 19(2): 81-92.
- [22] TAGHAVI RAD F, GHORBIAN S, NAGHAVI GARGARI B, et al. *hTERT* gene modification using CRISPR-dCas9-dnmt3a system as a therapeutic approach against Glioma [J]. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2023, 22(1): e137226.
- [23] RAD F T, GARGARI B N, GHORBIAN S, et al. Inhibiting the growth of melanoma cells via *hTERT* gene editing using CRISPR-dCas9-dnmt3a system [J]. *Gene*, 2022, 828: 146477.
- [24] MIZOGUCHI B, TOPPING N E, LAVIN A M, et al. Cadmium ecotoxic effects on embryonic *Dmrt1* and *Aromatase* expression in *Chrysemys picta* turtles may implicate changes in DNA methylation[J]. *Genes*, 2022, 13(8): 1318.
- [25] DOMINGOS J A, BUDD A M, BANH Q Q, et al. Sex-specific *dmrt1* and *cyp19a1* methylation and alternative splicing in gonads of the protandrous hermaphrodite *barramundi*[J]. *PLoS One*, 2018, 13(9): e0204182.
- [26] WEN A Y, YOU F, SUN P, et al. CpG methylation of *dmrt1* and *cyp19a* promoters in relation to their sexual dimorphic expression in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Journal of Fish Biology*, 2014, 84(1): 193-205.
- [27] BEWICK A J, VOGEL K J, MOORE A J, et al. Evolution of DNA methylation across insects [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34 (3) : 654-665.
- [28] SEELAN R S, MUKHOPADHYAY P, PISANO M M, et al. Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) on gene expression [J]. *Drug Metabolism Reviews*, 2018, 50(2): 193-207.

Molecular identification and functional study of *dnmt3a* in *Cynoglossus semilaevis*

SUN Yanxu^{1,2,3}, GONG Xiaoling^{1,2}, SHAO Changwei^{3,4}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China; 4. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266237, Shandong, China)

Abstract: The purpose of this study is to investigate the regulatory role of *dnmt3a* in the sex reversal process of Chinese tongue sole, and to develop a DNA methylation editing system suitable for Chinese tongue sole. In this study, we cloned the CDS region of *dnmt3a* of Chinese tongue sole and analyzed structural domain features and sequence conservation between different species. We analyzed the expression pattern of *dnmt3a* in male, female and pseudomale Chinese tongue sole by qPCR. We also investigated the effect of a DNA methylase inhibitor 5-Aza-dC treatment on *dnmt3a* gene expression. The results showed that the full-length cDNA of *dnmt3a* was 3 063 bp, encoding 1 020 amino acids, including three core domains (PWWP domain, ADDz domain and AdoMet_MTases superfamily). The bound structural domain (PWWP domain, ADDz domain) of *dnmt3a* was relatively conservative, but the catalytically active domains (AdoMet_MTases superfamily) were quite different from those of mammals and reptiles. Gene expression pattern analysis showed that the expression of *dnmt3a* was significantly higher in female gonads than in male and pseudo-male gonads. The relative expression of *dnmt3a* increased significantly after 5-Aza-dC treatment. This study indicates that *dnmt3a* plays an important role in the sex regulation of Chinese tongue sole by DNA methylation, which provides a reference for elucidating the sex reversal mechanism and the implementing of DNA methylation editing to target single gene in Chinese tongue sole.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; *dnmt3a*; DNA methylation; gender regulation; 5-Aza-dC