

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00229

鲫鱼 *Dnmt1* 基因 cDNA 的克隆及表达分析

张 蕾¹ 谢冰花¹ 张琼宇¹ 马姗姗² 罗 琛²

(1. 湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081; 2. 浙江大学生命科学学院, 杭州 310058)

摘要: 研究克隆了编码鲫鱼 DNMT1 蛋白的 cDNA 序列, 并对 *Dnmt1* 基因的时空表达模式和表达丰度差异进行了分析。该 cDNA 全长 4912 bp, 编码 1503 个氨基酸。鲫鱼 DNMT1 蛋白与其他物种 DNMT1 蛋白的同源性分析表明, N 端调节区的保守性较低, 但 C 端的催化区是高度保守的。整胚原位杂交显示, *Dnmt1* mRNA 在胚胎发育早期是广泛分布的, 随着胚胎的发育, *Dnmt1* mRNA 在眼睛、脑部和已成熟体节的信号较强烈, 显示了明显的区域性差异。实时定量 PCR 结果显示在鲫鱼胚胎发育早期有丰富的母源 *Dnmt1* mRNA 存在, 在早期发育过程中其丰度逐渐降低, 在胚胎发育至 2d 后, *Dnmt1* mRNA 丰度又升到较高水平。RT-PCR 检测表明在肝、心、脾、肾、脑、肌肉、视网膜等成体组织中都有 *Dnmt1* 的表达, 但实时定量 PCR 结果显示在细胞分裂增殖旺盛的组织中表达水平明显较高。上述结果提示鲫鱼 *Dnmt1* 可能参与了胚胎基因组 DNA 甲基化的重编程, 甲基化表观遗传学式样的确立和合子核基因正确时空表达模式形成的调节控制。

关键词: *Dnmt1*; 鲫鱼; 整胚原位杂交; 实时定量

中图分类号: Q343 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)02-0229-07

在脊椎动物中, 发生在 CpG 二核苷酸胞嘧啶第五位碳原子的甲基化是一种非常重要的表观遗传学修饰。这种 DNA 甲基化与染色质的稳定、基因的表达调节^[1]、细胞的分化和发育^[2, 3]、亲本印记^[4]和 X 染色体失活^[5]都有关, 并在免疫系统发育调节^[6]、沉默内源性反转录病毒和抑制同源重组^[7]中发挥着重要作用。DNA 的甲基化修饰是由 DNA 甲基化转移酶催化甲基基团和胞嘧啶的第五位碳原子共价结合形成的^[8]。目前在脊椎动物中已经发现了至少 3 类甲基化转移酶, 即 DNMT1、DNMT2、DNMT3a 和 DNMT3b。

DNMT1 是由 Bestor, *et al.* 于 1988 年克隆到的第一个真核生物的 DNA 甲基化转移酶^[9], 该酶对于半甲基化的 DNA 具有偏爱性^[10], 因此又称其为 DNA 甲基化维持酶。对于 DNMT1 重要性的认识来自于 *Dnmt1* 纯合突变体小鼠(*Mus musculus*)的研究, 这些小鼠在发育至 8 体节之前就死亡^[11]。抑制爪蟾(*Xenopus laevis*)受精卵中 *Dnmt1* 的翻译, 可导致

Otx2 以及中胚层标记基因 *Xbra*、*Cerberus* 的提前表达^[12]。斑马鱼(*Danio rerio*)*Dnmt1* 敲除实验显示, 约有 40% 的胚胎死亡, 存活的胚胎表现出肠、胰腺的外分泌部和视网膜等器官的终末分化缺陷^[13]。这都表明无论在高等脊椎动物还是在低等脊椎动物中, 甲基化转移酶 DNMT1 都是胚胎生长发育所必需的。DNMT1 可以和甲基化结合蛋白 MBD2、MBD3 和 Mecp2 等形成复合体, 通过这种复合体作用于半甲基化 DNA 来维持 DNA 的正常甲基化状态^[14, 15]。另外, DNMT1 也可以与组蛋白去乙酰化酶 HDAC2 以及转录抑制因子 DMAP1 在 DNA 的复制叉处形成复合体而抑制基因的转录^[16]。因此, DNMT1 在表观遗传信息的传递和基因的表达调控中起了非常重要的作用。

相对于哺乳动物, 在低等脊椎动物中甲基化表观遗传学修饰的研究还很少。Martin 和 McGowan 在 1995 年进行转基因斑马鱼甲基化的研究显示, 在斑马鱼中外源的基因出现了类似于哺乳动物中的双

收稿日期: 2008-11-10; 修订日期: 2009-08-26

基金项目: 国家基金重点项目(编号: 30430370); 国家 973 项目(编号: 2004CB117401)资助

作者简介: 张蕾(1984—), 男, 江苏徐州人; 硕士; 主要从事发育生物学研究。E-mail: zhangyuyue2006@126.com

通讯作者: 罗琛, E-mail: luoc@zju.edu.cn

亲特异性甲基化印记现象^[17]。最近在斑马鱼中发现了类似于哺乳动物胚胎早期发育过程中基因组 DNA 甲基化重编程的过程^[18], 揭示了 DNA 甲基化这种表观遗传学修饰可能在低等脊椎动物的发育过程中起了相似的作用。由于鱼类是体外受精和体外发育的最低等的脊椎动物, 而且其排卵量大, 便于进行遗传操作和容易获得大量的实验材料, 因此, 开展鱼类 DNA 甲基化的表观遗传学修饰机制及其对基因表达调节作用的研究, 将为深入了解 DNA 甲基化的生物学功能, 表观遗传修饰机制在脊椎动物中的进化以及表观遗传修饰在脊椎动物进化过程中的作用提供新的重要信息。

鲫鱼(*Carassius auratus*)具有两性生殖的二倍体亚种和天然雌核发育的多倍体亚种^[19-22]。我们发现一个发育调节的关键基因在两性生殖的二倍体鲫鱼亚种中是双亲特异性甲基化印记基因, 其在雌核发育的多倍体亚种中则完全不发生甲基化(待发表的结果), 提示基因组的甲基化印记与基因组倍性的变化和生殖方式的变化可能存在密切的关联性。为了进一步研究这种双亲特异性 DNA 甲基化的表观遗传学修饰机制, 我们克隆并分析了催化胞嘧啶甲基化的 DNA 甲基化转移酶 DNMT1 的 cDNA 序列, 并且利用整胚原位杂交和实时定量 PCR 等技术对鲫鱼 *Dnmt1* 在胚胎和成体中的表达图式作了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本试验所选的鲫鱼品系为本实验室饲养的正常两性生殖二倍体“红帽子金鱼”近交系。在每年的 3—5 月份进行人工繁殖, 将受精后的胚胎放置于 22℃±1℃ 进行发育, 并选取不同发育时期的胚胎进行实验。各种成体组织: 心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑、肌肉、视网膜都取自饲养的鲫鱼。

1.2 总 RNA 的抽提和 cDNA 第一条链的获得

使用总 RNA 抽提试剂盒(SV Total RNA Isola-

tion System, Promega)提取鲫鱼不同发育时期的胚胎以及各种成体组织的 RNA。将溶于无核酸酶水中的 RNA 放置于-80℃冰箱中备用。以提取的总 RNA 为模板, 利用 PrimeScript RT reagent Kit (Takara)合成 cDNA 的第一条链。具体操作按照试剂盒说明书进行。

1.3 鲫鱼 *Dnmt1* 编码区的克隆

根据斑马鱼 *Dnmt1* mRNA (GenBank 序列号: NM_131189)的序列, 设计并在上海生工合成了扩增鲫鱼 *Dnmt1* 一段编码区的一对引物(图 1): *Dnmt1*-1(+): 5'GGGAGAAGGCTTTGATTGGCT3', *Dnmt1*-1(-): 5'ACGGTTCGTGCCTGGATTGTT3'; 使用此对引物和 1.2 中的 2 μL 逆转录产物进行 PCR 扩增, 循环条件为: 94℃, 5min; 94℃, 50s, 58℃, 50s, 72℃, 2min, 30 个循环; 72℃, 5min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后割取目的片段, 用 E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (OMEGA)纯化回收此片段, 并将其克隆于 pEGM-T Easy Vector (Promega)中, 菌液 PCR 检测到的阳性克隆送至上海生工测序。测序结果经比对分析确认其是否为 *Dnmt1* 的同源片段, 然后根据正确的测序结果和斑马鱼 *Dnmt1* mRNA 的序列, 设计并在上海生工合成了扩增鲫鱼 *Dnmt1* 编码区 5'端的一对引物(图 1): *Dnmt1*-2(+): 5'GAAGGTGGAGACAGTTTGTTCAGAT3', *Dnmt1*-2(-): 5'CTGGGGTCCATTAA GATGTAGTCA3', 并用上述方法进行克隆测序和序列结果分析。

1.4 鲫鱼 *Dnmt1* cDNA 末端的克隆

根据已经克隆得到的鲫鱼 *Dnmt1* cDNA 部分序列, 设计并在上海生工合成了 3'RACE 引物(图 1): *Dnmt1*-3'RACE1: 5'AGGAATCGCAGGATAAGGAG C3'和 *Dnmt1*-3'RACE2: 5'TGG TGGTCTGTCCGAG GGTTC3'; 5'RACE 引物(图 1): *Dnmt1*-5'RACE1: 5'TCAGACTTGCG CTTTGGGACTC3'和 *Dnmt1*-5'RACE2: 5'CCCTCCTGCTCGCCTTCATCT3'。用 Takara 公司的 3'-Full RACE Core Set 和 5'-Full RACE Kit 完成了鲫鱼 *Dnmt1* cDNA 3'和 5'末端的分离。具

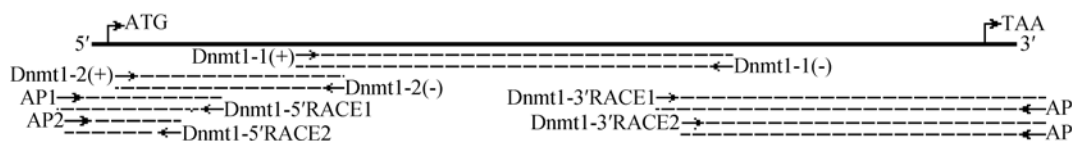


图 1 鲫鱼 *Dnmt1* cDNA 全长克隆引物位置示意图(AP: 接头引物)

Fig. 1 Primer positions for cloning the full length of *Dnmt1* cDNA (AP: adaptor primer)

体操作依据试剂盒说明书进行。

1.5 整胚原位杂交

将引物 *Dnmt1*-1(+): 5'GGGAGAAGGCTTTGAT TGGCT3', *Dnmt1*-1(-): 5'ACGGTCGTGC CTGGATT GTT3'; 扩增出的序列克隆至 pEGM-T Easy Vector (Promega) 中, 以测序后的两个连接方向相反的重组质粒为模板, 都用 *Sal* I (Takara) 进行酶切处理, 使重组质粒线性化。用 T7 RNA 聚合酶(Roche)和含有地高辛标记 UTP 的 NTP (Promega) 进行体外转录得到鲫鱼 *Dnmt1* 的正义和反义 RNA 探针。整胚原位杂交的方法参考文献[23]。

1.6 荧光实时定量 PCR

使用荧光实时定量 PCR 的方法来检测鲫鱼在胚胎发育不同时期和成体不同组织中的转录水平。根据克隆得到的鲫鱼 *Dnmt1* cDNA 的序列, 设计并在上海生工合成了实时定量 PCR 引物: *Dnmt1*-R(+): 5'CAGACCCTCTTGAGCTCTTCCTT3'和 *Dnmt1*-R(-): 5'GGAGCCTTGACAGGACGTTGA3'。依据鲫鱼 β -actin 基因 cDNA 序列(GenBank 序列号: AB039726) 设计并在上海生工合成了作为内参的实时定量引物: β (+): 5'CAAGATGATGGTGTGCCAAGTG3'和 β (-): 5'TCTGTCTCCGGCACGAAGTA3'。用 1.2 中的方法进行逆转录, 在此过程中结合使用无 RNA 酶的 DNA 酶排除可能存在于总 RNA 中 DNA 的干扰。实时定量 PCR 反应体系为: 0.5 μ L 2 mmol/ μ L 的引物、1 μ L 逆转录产物、5 μ L 2 $\times$ SYBR Premix *ExTaq* (Takara)、3 μ L 灭菌水。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C, 10s; 95 $^{\circ}$ C, 5s, 60 $^{\circ}$ C, 20s, 40 个循环。实时定量 RT-PCR 反应及信息的收集都在 Roche 公司的 LightCycler 480 System 上进行。程序运行完成后进行溶解曲线分析以确定 PCR 产物是否专一, 为保证结果的可靠性, 对每一样品的分析都重复了三次。同时使用 β -actin 作为内参对照, 用以校正所有样品中 RNA 的量。目标基因的相对表达量按 Livak 和 Schmittgen 的方法计算[24]。根据扩增曲线得到的 CT 值(荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数), 计算出目标基因 *Dnmt1* 和对照基因 β -actin CT 值的差异 Δ CT; 进而以差异最大的样本作为参照样本, 计算出不同样品相对于参照样本基因表达倍数 $2^{-\Delta\Delta CT}$, 从而制作出相对定量的图表。

2 结 果

2.1 鲫鱼 *Dnmt1* cDNA 的克隆及序列分析

以 *Dnmt1*-1(+)和 *Dnmt1*-1(-)为引物, 用 1.3 中的方法进行 PCR 扩增后得到一片段, 经测序其长度为 2155 bp。用 NCBI 中的 BLAST 功能对此序列进行同源性分析, 证明其为斑马鱼、爪蟾和小鼠 *Dnmt1* 的同源片段, 因而可确定此片段为鲫鱼 *Dnmt1* 基因的一段 cDNA 序列。

随后用 PCR 的方法结合 3'-RACE 和 5'-RACE 技术获得了鲫鱼 *Dnmt1* cDNA 的全序列, 长度为 4912 bp, 序列已提交至 GenBank(序列号: FJ361761)。其中 5'非编码区(5'-UTR) 113 bp, 3'非编码区(3'-UTR) 291 bp, 开放阅读框(ORF) 4512 bp, 编码 1503 个氨基酸。在 3'非编码区有一段为多聚腺苷酸 poly(A)化提供信号的专一序列 AATAAA, 位于多聚腺苷酸前 21 bp 处。另外, 在 poly(A)前 257 bp 处有一与 mRNA 不稳定相关的序列 ATTTA。

2.2 鲫鱼 DNMT1 蛋白结构的预测

使用 Jellyfish 软件和 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中的 Blast, 将推译出的鲫鱼 DNMT1 蛋白氨基酸序列与其他物种的 DNMT1 蛋白氨基酸序列进行了同源性分析。结果表明鲫鱼与斑马鱼、爪蟾、鸡(*Gallus gallus*)、人(*Homo sapiens*) DNMT1 蛋白氨基酸序列的相似性分别为 91%、73.7%、72.2%、66.1%; 但它们在羧基端保守的催化区的相似性非常高, 分别为: 93.9%、88.4%、88.5%、85.4%。根据这几个物种的氨基酸序列, 用 DNASTAR 软件中 MegAlign 程序的 Jotun Hein 方式构建出系统进化树(图 2)表明鲫鱼首先和斑马鱼类聚, 再与爪蟾类聚, 最后与与鸡、人类类聚。

使用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)Blast 中的 Find Conserved Domains 功能, 并根据鲫鱼

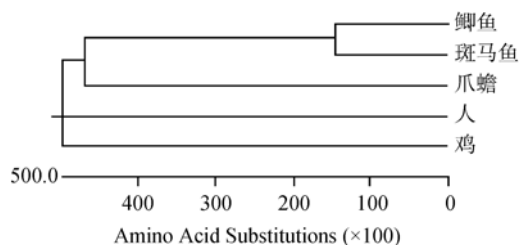


图2 根据鲫鱼、斑马鱼、爪蟾、鸡、人的 DNMT1 蛋白氨基酸序列所建立的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of DNMT1 amino acid sequences

DNMT1 蛋白的氨基酸序列与斑马鱼、爪蟾、鸡、人的 DNMT1 蛋白的氨基酸序列的相似性, 参照它们的蛋白质结构, 预测得到了鲫鱼 DNMT1 蛋白结构(图 3)。鲫鱼 DNMT1 蛋白也可分为 N 端的调节区和 C 端的催化区。其 N 端调节区可区分为 DAMP1 结合结构域、DNA 复制位点靶向序列、锌指结构域和两个 BAP 结构域。催化区包含 6 个非常保守的功能基序, 它们参与甲基转移反应。N 端的调节区和 C 端的催化区由赖氨酸-甘氨酸重复序列相连。

2.3 鲫鱼 *Dnmt1* 在胚胎发育过程中的时空表达模式和表达水平差异

为了研究 *Dnmt1* 在鲫鱼早期胚胎发育过程中的时空表达模式, 以体外转录并用地高辛标记的 *Dnmt1* RNA 片段为探针, 对鲫鱼不同发育时期的胚

胎进行了整胚原位杂交实验。鲫鱼胚胎不同发育时期的原位杂交实验结果表明: 在尾芽期以前 *Dnmt1* mRNA 在所有胚胎细胞中广泛表达, 但表达水平较低; 在发育到 10 体节时期以后, 可以看到 *Dnmt1* 的转录出现明显的组织特异性差异, 在胚胎的眼睛、脑部以及已形成的前部体节中表达逐渐增强, 表达水平较高, 而在胚胎的后部区域, 其表达水平很低(图 4)。用实时定量 PCR 方法对未受精卵, 以及不同发育阶段胚胎进行 *Dnmt1* mRNA 表达水平的相对定量分析结果显示, 卵子中具有高丰度的母源 *Dnmt1* mRNA; 在卵裂和囊胚期胚胎细胞中 *Dnmt1* mRNA 的丰度逐渐降低, 至原肠期降到最低水平并维持这种低水平状态到尾芽期, 然后其丰度又逐渐上升, 胚胎发育至 2d 时又升到较高水平(图 5a)。



图 3 推测的鲫鱼 DNMT1 蛋白质结构域示意图

Fig. 3 Diagram of the putative conserved domains of *Carassius auratus* DNMT1 enzyme

DAMP1. DAMP1 结合结构域; TS. DNA 复制位点靶向序列; ZnF. 锌指结构域; BAH. Bromo-Adjacent 同源结构域; *. 甘氨酸—赖氨酸重复序列; I, IV, VI, VIII, IX, X 代表 6 个保守的催化结构域

DAMP1. DAMP1-binding Domain; TS. Targeting to DNA replication foci Sequence; ZnF. Zinc Finger domain; BAH. Bromo-Adjacent Homology domain; *. Glycine-Lysine repeats; I, IV, VI, VIII, IX, X represent the six most conserved motifs in nearly all DNA methyltransferases

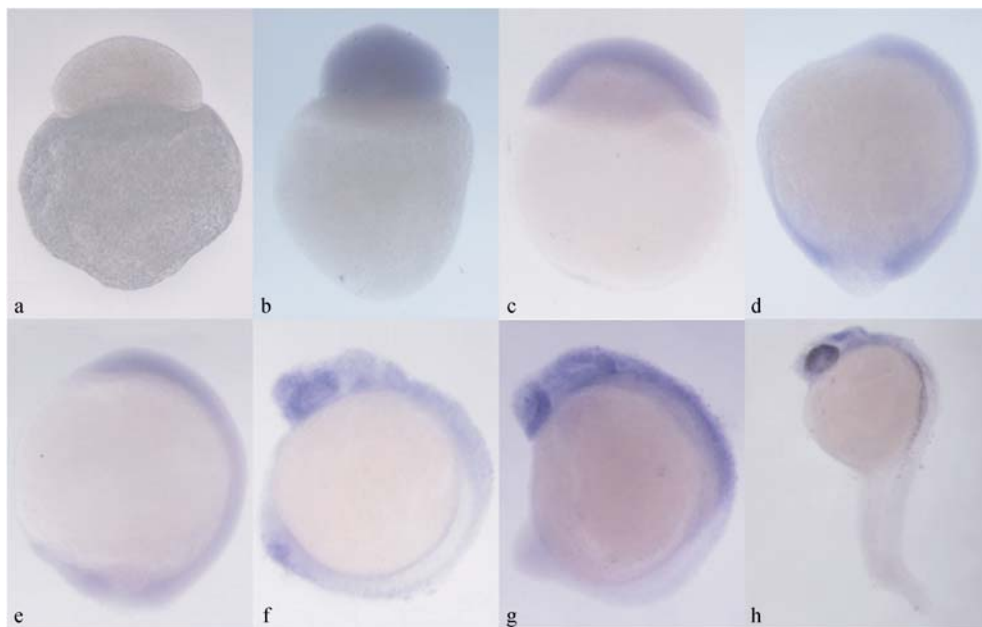


图 4 鲫鱼早期胚胎发育不同时期 *Dnmt1* 的原位杂交图

Fig. 4 *In situ* hybridization of *Carassius auratus* embryos

a. 作为对照的正义链探针, 囊胚期; b-h. 反义链探针。b. 囊胚期; c. 原肠早期; d. 原肠晚期; e. 神经胚期; f. 10—12 体节; g. 15—18 体节; h. 22—25 体节

a. the comparison with sense probe, blastula stage; b-h. *In situ* hybridization with antisense-probe. b. blastula stage; c. early gastrula stage; d. late gastrula stage; e. neurula stage; f. 10—12 somites; g. 15—18 somites; h. 22—25 somites

2.4 鲫鱼 *Dnmt1* 在不同组织的表达分析

在鲫鱼的不同成体组织中进行的 RT-PCR 检测结果表明: *Dnmt1* mRNA 在所有被检测过的组织如肝脏、心脏、脾脏、肾脏、脑、肌肉、视网膜都有表达(图 5b)。但实时定量 PCR 的相对定量分析结果表明, *Dnmt1* mRNA 在鲫鱼不同组织的表达水平存在明显差异: 在肝脏、脾脏、肾脏中的表达水平比较高; 在脑、视网膜中次之; 心脏和肌肉中最低(图 5c)。

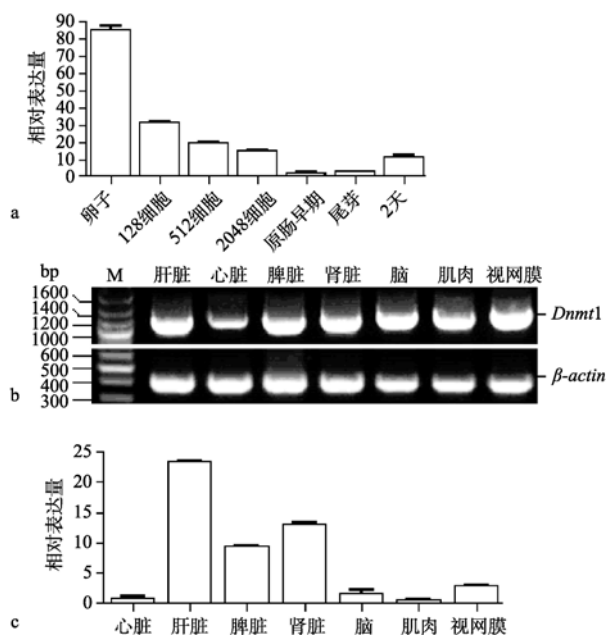


图 5 鲫鱼 *Dnmt1* 基因的 RT-PCR 以及实时定量 PCR

Fig. 5 RT-PCR and Real-Time PCR detection of *Carassius auratus Dnmt1* gene

a. *Dnmt1* 基因在早期胚胎中的实时定量 PCR 检测; b. 鲫鱼 *Dnmt1* 基因在成体组织中的 RT-PCR 检测; c. *Dnmt1* 基因在不同组织中的实时定量 PCR 检测(纵坐标为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值)

a. Real-Time PCR result of *Dnmt1* gene in different stage embryos; b. Tissue expression of *Dnmt1* gene in *Carassius auratus*; c. Real-Time PCR result of *Dnmt1* gene in tissues(vertical axis represents the value of $2^{-\Delta\Delta CT}$)

3 讨 论

3.1 鲫鱼 DNMT1 蛋白的结构

蛋白质氨基酸序列的同源性分析表明, 鲫鱼 DNMT1 蛋白和其他已知的脊椎动物 DNMT1 蛋白一样, 也可分为 C 端的催化区和 N 端的调节区。不同物种的比较分析表明, 从人类、鸟类、两栖类到最低等的脊椎动物鱼类, DNMT1 蛋白 C 端催化区都是高度保守的, 而调节区的变异很明显。不同脊椎动物 DNMT1 的 C 端催化区都包含了 6 个非常保守

的功能基序, 司转甲基反应的功能。催化区氨基酸序列的高度保守性说明 DNMT1 的转甲基功能对物种的生存至关重要。N 端调节区是 DNMT1 与 DNA 结合以及与其他相关蛋白质的相互作用所必需的, 只具有羧基端的 DNMT1 不表现酶活性^[25]。已有的研究表明, N 端调节区可能通过对局部 DNA 双螺旋构像改变的应答以及与其他调节蛋白的相互作用影响 C 端催化区的活性^[26]。DAMP1 结合结构域与转录抑制因子 DAMP1 所形成的复合体可结合到 DNA 复制叉位置上, DNA 复制位点靶向序列能够指导 DNMT1 与 DNA 复制复合物结合, 锌指结构域能够使 DNMT1 插入到 DNA 的大沟中而改变其构像, BAH 结构域与转录抑制和染色质重建这一重要功能相关。不同物种 DNMT1 蛋白氨基酸序列在 N 端的调节区虽然在整体上的变异较大, 但在这些重要结构域内存在的差异相对较小。在这些区域之间存在的较大差异可能与不同物种之间染色质的结构存在差异相关, 反映了该酶与物种的染色质结构进化相协调的一种物种特异的适应性进化。

3.2 鲫鱼 *Dnmt1* 表达的时空模式与发育调控的关系

DNMT1 能够维持基因组 DNA 甲基化的正常状态, 这对于表观遗传信息的传递和基因表达调节起非常重要的作用。在斑马鱼中存在基因组 DNA 甲基化的重编程过程^[18], 此过程是个体基因组 DNA 正确的甲基化表观遗传学式样的确立和正确的合子核基因时空表达模式形成所必需的。本实验中鲫鱼 *Dnmt1* 表达图式和实时定量 PCR 结果表明, 鲫鱼早期胚胎中具有大量母源 *Dnmt1* mRNA 的存在, 在卵裂和囊胚期 *Dnmt1* mRNA 的丰度逐渐下降, 在原肠期降到最低水平并维持这种低水平状态到尾芽期, 然后其丰度又逐渐上升。这种趋势和斑马鱼中基因组 DNA 甲基化的重编程过程相一致^[18], 提示鲫鱼 DNMT1 蛋白在重编程过程中对于维持基因组 DNA 甲基化式样也是必要的。最近在爪蟾中的研究表明, xDNMT1 蛋白在囊胚中期转换之前具有抑制转录激活因子活性的功能, 并能够特异地与靶基因的非甲基化启动子结合。因此它可能作为一个直接的转录抑制因子在爪蟾胚胎发育早期抑制基因的表达^[27]。鱼类中早期存在的大量母源性 *Dnmt1* mRNA 也可能具有在囊胚中期转换前通过所编码的 DNMT1 蛋白与转录因子在 DNA 上的竞争结合而抑制合子核基因转录的功能。原位杂交结果显示在鲫鱼胚胎发育

到大约 10 体节时 *Dnmt1* mRNA 的表达出现了一定的区域性或者组织特异性差异, 在细胞分裂增殖旺盛并已经在进行分化的眼睛、脑部和新形成的体节处有较强的信号, 这与斑马鱼中的研究结果相一致^[28]。不同成体组织的实时定量 PCR 实验结果也显示在细胞分裂增殖旺盛的组织中 *Dnmt1* mRNA 的丰度较高, 这与 Chuang, *et al.* 的研究结果一致^[29]。这种差异显然与即将形成的细胞中基因组 DNA 需要复制和维持组织特异性甲基化式样而需要高水平 *Dnmt1* 的表达相关。

参考文献:

- [1] Meehan R R, Stancheva I. DNA methylation and control of gene expression in vertebrate development [J]. *Essays in Biochemistry*, 2001, **37**: 59—70
- [2] Ehrlich M. Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2003, **88**(5): 899—910
- [3] Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2002, **3**(9): 662—673
- [4] Murphy S K, Jirtle R L. Imprinting evolution and the price of silence [J]. *Bioessays*, 2003, **25**(6): 577—588
- [5] Okamoto I, Otte A P, Allis C D, *et al.* Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development [J]. *Science*, 2004, **303**(5658): 644—649
- [6] Fitzpatrick D R, Wilson C B. Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system [J]. *Clinical Immunology*, 2003, **109**(1): 37—45
- [7] Yoder J A, Soman N S, Verdine G L, *et al.* DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1997, **270**(3): 385—395
- [8] Santi D V, Norment A, Garrett C E. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, 1984, **81**(22): 6993—6997
- [9] Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, *et al.* Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1988, **203**(4): 971—983
- [10] Pradhan S, Bacolla A, Wells R D, *et al.* Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**(46): 33002—33010
- [11] Li E, Bestor T H, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality [J]. *Cell*, 1992, **69**(6): 915—926
- [12] Stancheva I, Meehan R R. Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in *Xenopus* embryos [J]. *Genes and Development*, 2000, **14**(3): 313—327
- [13] Rai K, Nadauld L D, Chidester S, *et al.* Zebra fish *Dnmt1* and *Suv39h1* regulate organ-specific terminal differentiation during development [J]. *Molecular and Cell Biology*, 2006, **26**(19): 7077—7085
- [14] Kimura H and K Shiota. Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, *Dnmt1* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**(7): 4806—4812
- [15] Tatematsu K I, Yamazaki T, Ishikawa F. MBD2-MBD3 complex binds to hemi-methylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase [J]. *Genes to Cells*, 2000, **5**(8): 677—688
- [16] Rountree M R, Bachman K E, Baylin S B. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci [J]. *Nature Genetics*, 2000, **25**(3): 269—277
- [17] Martin C C, McGowan R. Genotype-specific modifiers of transgene methylation and expression in the zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Genetics Research*, 1995, **65**(1): 21—28
- [18] MacKay A B, Mhanni A A, McGowan R A, *et al.* Immunological detection of changes in genomic DNA methylation during early zebrafish development [J]. *Genome*, 2007, **50**(8): 778—785
- [19] Ge W, Jiang Y G. The natural gynogenesis of fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1989, **13**(3): 274—286 [葛伟, 蒋一珪. 鱼类的天然雌核发育. 水生生物学报, 1989, **13**(3): 274—286]
- [20] Ye Y Z, Zhou J F, Wang Z W, *et al.* Comparative studies on the DNA content from three strains of crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(1): 13—16 [叶玉珍, 周建峰, 王忠卫, 等. 三个鲫品系 DNA 含量的比较研究. 水生生物学报, 2004, **28**(1): 13—16]
- [21] Kobayashi H, Kawashima Y, Takeuchi N. Comparative chromosome studies in the genus *Carassius*, especially with a finding of polyploidy in the ginbuna (*Carassius auratus langsdorffii*) [J]. *Japanese Journal of Ichthyology*, 1970, **17**(4): 153—160
- [22] Yang R J, Li B X, Feng H, *et al.* Cytogenetic analysis of chromosome number and ploidy of *Carassius auratus* variety pengze [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2003, **49**(1): 104—109 [杨睿姣, 李冰霞, 冯浩, 等. 彭泽鲫染色体数目及倍性的细胞遗传学分析. 动物学报, 2003, **49**(1): 104—109]
- [23] Etsuro Y T M, Ken M, Yutaka H. Developmental staging in goldfish during the pre-gastrula stage [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1999, **65**(4): 709—717
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402—408
- [25] Zimmermann C, Guhl E, Graessmann A. Mouse DNA methyltransferase (MTase) deletion mutants that retain the

- catalytic domain display neither de novo nor maintenance methylation activity *in vivo* [J]. *Biological Chemistry*, 1997, **378**(5): 393—405
- [26] Fatemi M, Hermann A, Pradhan S, *et al.* The activity of the murine DNA methyltransferase *Dnmt1* is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, **309**(5): 1189—1199
- [27] Donncha S D, Alexey R, Jamie A H, *et al.* *xDnmt1* regulates transcriptional silencing in pre-MBT *Xenopus* embryos independently of its catalytic function [J]. *Development*, 2008, **135**(7): 1295—1302
- [28] Martin C C, Lynda L, Marie A A, *et al.* A role for DNA methylation in gastrulation and somite patterning [J]. *Developmental Biology*, 1999, **206**(2): 189—205
- [29] Chuang L S, Lan H I, Koh T W, *et al.* Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1 [J]. *Science*, 1997, **277**(5334): 1996—2000

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF *DNMT1* IN GOLDFISH, *CARASSIUS AURATUS*

ZHANG Lei¹, XIE Bing-Hua¹, ZHANG Qiong-Yu¹, MA Shan-Shan² and LUO Chen²

(1. Institute of Biology, Hunan Normal University, Changsha 410081; 2. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

Abstract: Fish is the lowest vertebrate. Its external fertilization and development, large reproductive potential, and optically clear embryos give fish a number of distinct advantages over other vertebrates as an exploitable experimental system for the study of developmental processes as well as the mechanism and function of epigenetic modification in vertebrates. Studying the mechanism of epigenetic modification by DNA methylation and the function of epigenetic modification in regulating gene expression in fish will provide insights into the biological function of DNA methylation, the evolution of epigenetic modification mechanism in vertebrates and the role of epigenetic modification in the evolution of vertebrates. In vertebrates, DNA methyltransferase I (*DNMT1*) plays a pivotal role in maintaining the correct genome DNA methylation pattern. In low vertebrate including fish, however, *Dnmt1* has still been poorly investigated. Here, the full length cDNA of goldfish *Dnmt1*, *Carassius auratus*, was cloned by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)method. The temporal and spatial expression patterns of goldfish *Dnmt1* were examined by real-time PCR and whole mount in situ hybridization. The entire *Dnmt1* cDNA sequence was 4912bp long and the open read frame was 4512bp long, which encoded a protein with 1503 amino acids. Amino acid sequence alignment of *DNMT1*s (*Carcasses auratus*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Gallus gallus* and *Homo sapiens*) revealed that the structure of *DNMT1* protein also consisted of an N-terminal regulatory domain and a C-terminal catalytic domain. The conservation of N-terminal domain among *Carcasses auratus*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Gallus gallus* and *Homo sapiens* was very low, but C-terminal domain was highly conserved. Phylogenetic tree analysis showed that the homology of *DNMT1* protein between *Carassius auratus* and *Danio rerio* was the highest, *Xenopus laevis* was the second and *Gallus gallus* and *Homo sapiens* took the last. The high conservation of C-terminal domain implied that the catalytic function might be crucial for the survival of the species. The variation of N-terminal domain may reflect adaptive synergistic evolutions between the *DNMT1* structure and chromatin in different species.

Whole mount in situ hybridization and real-time PCR results reveled that *Dnmt1* mRNA was of abundantly maternal origin in *Carassius auratus*. During cleavage and blastula stages, the level of *Dnmt1* mRNA was gradually reduced. As a result, it hit the lowest during gastrula stage. But in 2-day old embryos, the transcription level of *Dnmt1* was gradually increased. No regional difference was detected in the pre-neurula stage embryos by in situ hybridization, but it was observed in the embryos after period of organogenesis. *Dnmt1* mRNA expression was significantly higher in eyes, brain and matured somites than in other tissues. RT-PCR and real-time PCR results demonstrated that *Dnmt1* expressed in all the examined adult tissues such as liver, heart, spleen, kidney, brain, muscle and retina. However, the transcription level of *Dnmt1* mRNA was higher in those tissues with vigorous cell proliferation. The difference is apparently in association with the copying and maintenance of cell lineage specific methylation patterns in the genome of the newly forming cells.

Key words: *Dnmt1*; *Carassius auratus*; Whole mount in situ hybridization; Real-time PCR