

文章编号: 1000-0615(2018)02-0196-08

DOI: 10.11964/jfc.20161210645

三疣梭子蟹线粒体基因组单核苷酸多态性

赵莲^{1,2,3}, 李志辉^{1,2,3}, 张培^{1,2,3}, 薛蓓^{1,2,3},
赖晓芳^{1,2,3}, 高焕^{1,2,3}, 阎斌伦^{1,2,3*}

(1. 淮海工学院海洋生命与水学院, 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏连云港 222005;

2. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏连云港 222001;

3. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏南京 210014)

摘要: 为获得三疣梭子蟹线粒体全基因组(mtDNA)SNP突变位点, 本研究针对其mtDNA全序列设计了179对引物, 采用高分辨率溶解曲线(HRM)检测技术对SNP进行了筛查。在179对引物中, 有89对引物具有特异性扩增结果; 进一步研究表明, 89对引物中共有22对引物的扩增区域含有SNP突变位点, 共包含24个SNPs。统计结果显示, 三疣梭子蟹线粒体基因组中的SNP分布频率为0.15/100 bp, 其中转换突变比例为79.1%、颠换突变比例为16.6%; C/T(G/A)突变比率为79.1%、G/T(C/A)突变比率为8.3%、A/T突变与G/C突变的比率均各占4.16%。本研究中所获得的SNP位点分布于三疣梭子蟹线粒体基因组的11个区域, 且分布不均。其中COX1基因区域的SNP数目最多, 其次在D-LOOP、ND1基因区域分别为3和4个SNP位点; 而tRNA、12S rRNA等其他区域尚未发现突变位点。本研究所建立的三疣梭子蟹线粒体全基因组SNP的快速筛查方法及发现的SNPs, 为进一步开展三疣梭子蟹种质遗传资源多样性、增殖放流标记等方面的研究提供了分析工具。

关键词: 三疣梭子蟹; 线粒体基因组; SNP; 高分辨率溶解曲线

中图分类号: Q 781; S 968.25

文献标志码: A

与随机扩增多态性DNA(randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)(第一代分子标记技术代表)、简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)(第二代分子标记技术代表)等分子标记技术相比, 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)具有分布广、遗传稳定性强、易于高通量分型等独特优点, 因此成为第三代分子标记的典型代表^[1]。目前, SNP标记技术已广泛应用于遗传多样性分析^[2]、种质鉴别^[3]、性状关联分析^[4]等领域中。SNP标记在高密度遗传连锁图谱的构建方面也被广泛应用^[5-6], 但仅限于核基因组, 目前尚无线粒体基因组SNP图谱构建的研究报道。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是我国

主要海洋捕捞及养殖经济蟹类之一, 对其生化、生理和遗传育种等方面的研究一直广受关注^[7-8]。随着三疣梭子蟹线粒体全基因组的公布^[9], 关于线粒体基因组序列多态性标记(D-LOOP、COX1、16S rRNA)已经被广泛用于三疣梭子蟹遗传多样性研究和种群遗传结构分析等方面^[10-13], 但其线粒体基因组完整的序列突变图谱一直未见详细阐述。本研究在构建三疣梭子蟹mtDNA SNP高分辨率溶解曲线(HRM)检测技术的基础上, 对三疣梭子蟹线粒体全基因组SNP突变位点进行了筛查, 并以此为基础构建了三疣梭子蟹线粒体基因组SNP突变图谱, 以期为加强三疣梭子蟹种质资源的保护和利用等研究工作提供技术支持。

收稿日期: 2016-12-15 修回日期: 2017-02-25

资助项目: 国家自然科学基金(31472282); 江苏省高校自然科学研究重大项目(13KJA240001); 江苏省“六大人才高峰”创新人才团队专项(2016-HYGC-CXTD-004)

通信作者: 阎斌伦, E-mail: yanbl@hhit.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

本实验所用的44只三疣梭子蟹均为野生成体, 2015年11月随机采集于山东莱州湾地区(LZ)(22只)、连云港海州湾地区(HZ)(22只), 其体质量分别为(182±17.5) g、(223.1±21.0) g。采集的三疣梭子蟹活体运回实验室, -80 °C超低温保存。

1.2 样品DNA的提取

取新鲜肌肉组织, 使用生工生物工程(上海)股份有限公司生产的Ezup柱式动物基因组DNA抽提试剂盒提取三疣梭子蟹总基因组DNA(其中包含线粒体基因组DNA), 经Gene Quant Pro核酸定量仪(通用公司, 美国)测定基因组DNA浓度, 并均一化为20 ng/μL, -20 °C保存备用。

1.3 SNP引物设计及筛选优化

小片段引物的设计与验证 针对三疣梭子蟹线粒体基因组全序列, 利用Primer Premier 5.0(Premier biosoft international, USA)以步移的方式设计覆盖mtDNA的引物, 各引物预期扩增片段长度为60~120 bp, 退火温度控制在53~60 °C, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

随机挑取3个DNA样品且等量混合, PCR体系总体积为10 μL: 7.0 μL ddH₂O, 1.0 μL 10×PCR缓冲液, 0.6 μL MgCl₂(25 mmol/L), 0.2 μL dNTPs (10 μmol/L), 0.2 μL Taq DNA聚合酶(5 U/μL), 各0.4 μL上、下游引物(10 μmol/L), 0.2 μL mix-DNA (20 ng/μL)。用Touch-down PCR程序: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性30 s, 68 °C退火30 s, 72 °C延伸45 s, 其中退火温度每循环一次降低1 °C, 循环17次; 95 °C变性30 s, 50 °C退火30 s, 72 °C延伸45 s, 循环16次; 72 °C延伸5 min。用2% 琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物, 并根据产物的有无及长度确定引物是否可用。

引物优化 为减少对后续HRM分析的干扰, 对初筛引物的反应条件进行优化并确定其退火温度。PCR反应总体积为10 μL (方法同“小片段引物的设计与验证”), 采用温度梯度PCR程序: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性30 s, 62~52 °C退火30 s, 72 °C延伸45 s, 循环32次; 72 °C延伸5 min; 4 °C保存。用2% 琼脂糖凝胶电泳进行引物验证。

1.4 HRM检测技术的建立

将来自2个地区的44个三疣梭子蟹的DNA样

品分别进行编号(LZ1-22, HZ1-22), 并随机分成4组, 每组由11个DNA样品组成; 另外将每组11个DNA样品取等量混合, 分成4组混合DNA样组, 编号分别为M1、M2、M3、M4。本研究采用小片段法进行SNP引物的初筛, 其校准内标分别为5'-GCGGTCAGTCGGCCTAGCGGTAGC-CAGCTGCGGCACTGCGTGACGCTCAG-3', 5'-ATCGTGATTTCTATAGTTATCTAAGTAGT-TGGCATTAAATTTCAATTTT-3'及各自的反向互补序列, 且3'端进行磷酸化封闭, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

将初筛引物分别在4组混合DNA样品中进行第1次HRM检测, 将出现差异峰的引物分别在对应不同组的单个个体中进行扩增及第2次HRM检测。扩增体系为35 μL: 25.3 μL ddH₂O, 3.5 μL 10×PCR缓冲液, 2 μL MgCl₂(25 mmol/L), 0.6 μL dNTPs (10 μmol/L), 0.6 μL Taq DNA聚合酶(5 U/μL), 各1.2 μL上、下游引物(10 μmol/L), 0.6 μL DNA混合模板(20 ng/μL)。PCR程序: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性30 s, T_m退火30 s, 72 °C延伸45 s, 循环32次; 72 °C延伸5 min; 4 °C保存。

反应结束后, 向PCR产物中各加入3.5 μL高、低温内标(10 μmol/L), 加盖并进行变性处理: 95 °C变性3 min, 25 °C复性2 min, 4 °C保存。变性处理后, 将含内标的扩增样加入96孔板的反应孔中, 每孔10 μL, 每个扩增样重复加入3个反应孔中。并分别加入1 μL LC Green, 15~20 μL矿物油。利用LightScanner 96 系统进行SNP检测, 分析并判断同一引物所对应的不同个体间是否出现差异峰, 记录并统计峰型的种类及对应的个体数。

1.5 线粒体基因组SNP分析

将每种熔解峰所对应的扩增样品(2~3个)进行克隆测序[生工生物工程(上海)股份有限公司], 经过序列对比分析, 统计三疣梭子蟹线粒体基因组中SNP位点的数目、类型及对应的样品来源, 并定位分析SNP在三疣梭子蟹mtDNA中的位置, 以便确定SNP突变的类型(同义、非同义突变和非蛋白质编码区突变)。

2 结果

2.1 SNP引物筛选结果

本研究针对三疣梭子蟹线粒体全基因组,

覆盖设计的179对引物中共有89对引物具有特异性扩增结果。

将89对初筛引物在4组混合DNA样品中进行HRM筛查,其中55对引物出现了不同熔解曲线和熔解峰。进一步将这55对SNP引物分别进行单个个体扩增及HRM的SNP检测,同一引物扩增片段在不同个体间出现了明显的差异峰($T_m > 0.3^\circ\text{C}$) (图1)。由此可见不同个体间的同一段序列具有差异性,可能发生了碱基突变。

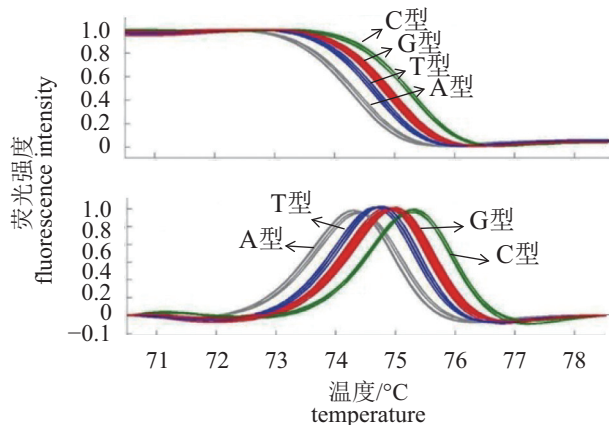


图1 同一引物扩增PCR产物在具有SNP突变型个体中的高分辨率熔解曲线

图中A型、T型、C型和G型分别代表不同的差异峰

Fig. 1 HRM melting curves of PCR products amplified by the single primer pairs in different individuals with SNP mutations

The curves for different genotypes were denoted by the types of A, T, C, and G

2.2 SNP分析

三疣梭子蟹线粒体基因组SNP分析 经过测序比对分析,55对SNP引物中,有22对引物的扩增位点含有SNP突变,共计24个突变位点,其中19个转换、4个颠换、1个插入。结果显示,C/T (G/A)突变形式最常见,SNP的分布频率为0.15/100 bp,转换和颠换突变形式的比例分别为79.1%、16.6%; C/T (G/A)所占突变比率为79.1%、G/T (C/A)突变占8.3%, A/T与G/C各占4.16%(表1)。

进一步将含有SNP的22对引物扩增序列与三疣梭子蟹线粒体全基因组原始序列^[9]进行比对及定位分析(表1)。结果显示,24个SNP位点分布于线粒体基因组11个不同区域且突变位点数量存在分布不均的现象:其中COX1基因区域的SNP数目最多,共计6个(3号、6号、10号、15号、

17号、178号),占整个基因组突变量的25%;其次ND1、D-LOOP的突变数目分别4个(104号、105号、108号、109号)和2个(13号、135号),其突变数量分别占整个线粒体基因组突变量的17%和13%;在ATP8(157号)、COX3(47号)、ND5(159号)等其他8个区域,发现1~2个数量不等的SNP位点;目前COX2、tRNA、12S rRNA等区域尚未发现SNP位点(表1)。

另外,进一步将获得的24个SNPs与NCBI数据库所公布的三疣梭子蟹mtDNA序列进行了相应的定位分析,并比对SNP突变前后所对应的密码子编码的氨基酸种类是否发生改变,最终统计各SNP突变类型的数目及所占的比例。结果显示24个突变位点中,位于蛋白基因编码区的SNP位点共有18个,其中未改变氨基酸种类的突变,即同义SNP有14个,占已获得的整个线粒体基因组SNP数目的58.3%;另外,致使氨基酸种类发生改变的突变,即非同义SNP有4个,占已获得的整个线粒体基因组突变量的16.7%;其他6个突变位点位于线粒体基因组的非蛋白质编码区域,占已获得的整个线粒体基因组SNP数目的25%(表1)。

不同来源三疣梭子蟹群体SNP分析 在莱州湾地区群体中,筛选出的SNPs共计8个,其中突变位点出现在6个个体中,占整个模板样品数目(44个样品)的13.6%,SNP在莱州湾群体的mtDNA分布区域为COX1、ATP8、ND2、ND4、D-LOOP;其他16个突变位点均出现在海州湾地区群体中的10个个体,突变个体数目占整个样本群体的比例为22.7%,这16个SNPs分布于海州湾地区群体线粒体基因组的COX1、COX3、ND1、ND2、ND4L、ND5、Cytb、16S rRNA、D-LOOP、间隔区中(表2)。

3 讨论

HRM是近年来新兴起的一种SNP检测技术,可检测包括SNP、插入/缺失,以及SSR多态性在内的多种DNA遗传变异^[14-15],另外还可检测相同序列的甲基化差异^[16]。本研究利用小片段扩增HRM检测技术对未知片段进行检测,在针对三疣梭子蟹线粒体基因组设计的89对引物中筛查出了55对可能存在碱基突变的引物,经测序发现其中22对引物扩增序列存在SNP位点,HRM的突变检出率为40%。虽然与已知序列片段相比,

表 1 三疣梭子蟹线粒体基因组SNP位点信息(方框部分为突变位点)

Tab. 1 Detailed information of the SNP loci of *P. trituberculatus* (the mutation sites were showed in box)

编号 no.	突变区序列 sequences containing mutation	SNP位置 (数字为突变位点在线粒体 全基因组中的位置) SNP loci (the numbers showed the mutation positions in the mtDNA)	突变碱基 type of mutation	突变类型 mutation type
3	...CAAATTTA C CAATGTTGT..	COX1(156 bp)	C/T	同义 synonymous mutation
6ACTCTT C TTCTTATAAG....	COX1(336 bp)	C/T	非同义 missense mutation
10	...TTGTATGATC C GTATT....	COX1(555 bp)	C/G	同义 synonymous mutation
15	...TGCTACTAT G ATTATTGC...	COX1(924 bp)	G/A	非同义 missense mutation
17	...TCACGATAC A TTACACC...	COX1(11 044 bp)	A/C	同义 synonymous mutation
178	...TAATTGT A ATCTGA...	COX1(14 074 bp)	A/G	同义 synonymous mutation
153	...TTAATGCC T CAAA....	ATP8(2451 bp)	T/C	同义 synonymous mutation
47ATTTT T GCTATTTT....	COX3(3427 bp)	T/C	同义 synonymous mutation
159	...AAAGAAC A GCTAC....	ND5(4991 bp)	A/G	同义 synonymous mutation
61	...AAAAGATA A TAATCT...	ND4(6907 bp)	A/G	同义 synonymous mutation
174	...AACTAATGG T AAAT....	ND4L (8319 bp)	T/C	同义 synonymous mutation
100	...ATAAACTAG G TGG....	Cytb (9872 bp)	G/A	同义 synonymous mutation
104	...GCCTTCTCC C AA....	ND1(10 441 bp)	C/T	同义 synonymous mutation
105	...TGTT C GTTAGTT.....	ND1(10 587 bp)	G/A	同义 synonymous mutation
108	...GGATGAGCTT C T A	ND1(10 801 bp)	T/A	同义 synonymous mutation
109	...AAAGAACA A ATA....	ND1(10 864 bp)	A/G	非同义 missense mutation
123	...AGCTCGTATGAC A TC...	16S rRNA (12 304 bp)	A/G	非编码区突变 noncoding region mutation
135AACTATA A ATATAAA...	D-LOOP (13 709 bp)	A/G	非编码区突变 noncoding region mutation
143GAGGTACCA C TCTC....	ND2(14 878 bp)	C/T	非同义 missense mutation
146	...ATTCTCAC G TAATA...	ND2(14 878 bp)	G/A	同义 synonymous mutation
167	.. T AGAATTTCCAAATCA T T.	Spacer (1602 bp, 1610 bp)	+T, T/C	非同义突变 noncoding region mutation
133	..TATAGCC A ATT G ATT...	D-LOOP (13 583 bp, 13 587 bp)	A/C, G/A	非同义突变 noncoding region mutation

HRM检测技术对于未知片段SNP的检出率相对较低^[17-18], 但研究结果也显示出该技术在线粒体基因组SNP突变检测上具有良好的应用前景。

据NCBI数据库公布的三疣梭子蟹线粒体全基因组序列长度为16 026 bp^[9], 实验在含有突变的22对引物扩增区域实际检测出了24个SNP位点, 因此SNP的分布频率为0.15/100 bp。目前, 已知不同物种中SNP的分布频率存在一定差异, 例如人类基因组中SNP的分布频率为0.1/100 bp^[19-21]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[22]中为1/100 bp、江豚

(*Neophocaena phocaenoides*)^[23]中为0.18/100 bp。这些研究所统计的SNP突变频率都是基于核基因组的。而本研究结果显示三疣梭子蟹线粒体基因组中的SNP突变频率和以上物种的核基因组SNP突变频率虽然具有一定差异, 但应该看作是同一个数量级上的线粒体SNP突变频率。在本实验中, 除了22个*tRNA*、*COX2*、12S *rRNA*等区域尚未发现SNP位点, 在*COX1*、*COX3*、*Cytb*以及16S *rRNA*等区域均发现了突变位点的存在, 且各基因区域间的SNP位点数目及所占的比例均有所

表2 个体间的SNP分布信息

Tab. 2 The information of SNPs distribution among the individuals

来源 origin	SNP分布情况(数字为SNP所在mtDNA中位置) the distribution of SNP(the numbers showed the SNP position in the mtDNA)	突变个数 number of mutation	碱基突变类型 type of mutation
LZ1	COX1(1104 bp), D-LOOP (13 587 bp), ND1(10 441 bp)	3	G/A, G/A, C/T
LZ3	ND4(6907 bp)	1	A/G
LZ6	ND2(15 081 bp)	1	G/A
LZ10	ND1(10 587 bp)	1	G/A
LZ11	COX1(1407 bp)	1	A/C
LZ16	ATP8(2451 bp)	1	T/C
HZ1	COX3(3427 bp), ND2(14 878 bp), COX1(331 bp)	3	T/C, C/T, C/T
HZ3	16SrRNA (12 304 bp)	1	A/G
HZ4	COX1(2451 bp), Cytb (9872 bp), ND1(10 864 bp), COX1(555 bp), Spacer (1602 bp)	5	A/G, G/A, A/G, C/G, +T
HZ7	ND1(10 801 bp)	1	T/A
HZ8	ND4L (8319 bp)	1	T/C
HZ9	D-LOOP (13 709 bp)	1	A/G
HZ11	D-LOOP (13 583 bp)	1	A/C
HZ15	COX1(156 bp)	1	C/T
HZ16	ND5(4991 bp)	1	A/G
HZ19	序列间隔区 Spacer (1610 bp)	1	T/C

差异。分析其原因,一方面可能与DNA样品的选择有关,来源差异越大,个体间基因水平差异性越强;另一方面与不同部位所承担的功能有关,王敏强等^[24]在比较2个三疣梭子蟹群体线粒体基因组的Cytb及16S rRNA区域时,发现2个基因组片段的SNP数目存在差异,即前者的突变数目高于后者,前者的突变比例也相对较高。经分析一方面是因为16S rRNA具有很高的保守性及特异性,且cytb基因的进化速率比16S rRNA快4倍左右^[24-25];另一方面这种区域间SNP的差异性,还可能与线粒体基因组中不同基因区域的选择性压力有关^[26]。而本研究在三疣梭子蟹线粒体DNA的cytb和16S rRNA区域所发现的SNP差异性也与王敏强等^[24]的研究结果相符,因此也佐证了SNP数目及比例的不同确实与各区域所承担的功能有关。此外,表2显示:不同地区来源的三疣梭子蟹线粒体全基因组之间SNP突变也存在差异,SNP的数量及其分布的位置在2个群体中都有所不同,其中海州湾群体的SNP数量明显多于莱州湾群体,且在mtDNA中的分布也相对较广。SNP在不同地区群体中出现的差异性,其原

因在于线粒体DNA具有严格的地区变异的特性,即不同地理环境对基因组序列有直接的选择性^[27]。

另外,在三疣梭子蟹线粒体基因组中SNP置换的比例为79%,颠换的比例为16.6%,SNP置换类型的比例远大于颠换类型的比例,这与王家丰等^[28]在筛选长牡蛎(*Crassostrea gigas*)核基因SNP标记的分型规律一致,均符合“transition bias”原理^[29],说明在核基因组与线粒体基因组中SNP分型规律是一致的,不存在差异性。本研究中心C/T(G/A)所占比例为79%、G/T(C/A)所占比例为8.3%、A/T突变占4.16%、G/C突变占4.16%、其中C/T(G/A)突变所占的比例最大。在长牡蛎^[28]、中华绒螯蟹(*Eriocheir chinensis*)^[30]等其他物种中也发现了同样的规律。出现这种规律的原因:一是C碱基转换为T碱基的突变频率是其他碱基突变的10倍左右,这与胞嘧啶的分子结构有关,易发生5-甲基化作用;二是与CpG岛5-甲基胞嘧啶易发生脱氨基作用有关^[18, 31]。此外,根据实验结果显示(表1),位于蛋白基因编码区的SNP位点共有18个,其中同义SNP有14个,占已获得的整

个线粒体基因组SNP数目的58.3%, 非同义SNP有4个, 占已获得的整个线粒体基因组突变量的16.7%; 其他6个突变位点位于线粒体基因组的非蛋白编码区域, 占已获得的整个线粒体基因组SNP数目的25%。目前, 根据以往的研究报道显示, 约20%的非同义突变会导致蛋白质变性^[19, 32], 而本研究结果显示, 三疣梭子蟹线粒体基因组中的非同义SNP的比例约占16.7%, 因此本研究发现的非同义SNP尚不足以最终改变蛋白质的性质。而非同义突变相比, 同义突变对生物性状的改变机制要相对复杂, 例如使原先的密码子转变为稀有密码子, 导致多肽链合成速率的改变^[33]; 通过改变mRNA的翻译速率最终改变mRNA稳定性及定位等^[34]。对于本研究在线粒体基因组蛋白质编码区所发现的非同义SNP突变是否会导致三疣梭子蟹线粒体基因组编码产物的改变, 还有待进一步的研究。

总之, 本研究首次在三疣梭子蟹线粒体全基因组中对其单核苷酸多态性作出了较为全面的分析, 为后续三疣梭子蟹种质遗传多样性分析及遗传结构研究工作的开展奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Vignal A, Milan D, SanCristobal M, *et al.* A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics[J]. *Genetics Selection Evolution*, 2002, 34(3): 275-305.
- [2] Batta-Lona P G, Bucklin A, Wiebe P H, *et al.* Population genetic variation of the Southern Ocean krill, *Euphausia superba*, in the Western Antarctic Peninsula region based on mitochondrial single nucleotide polymorphisms (SNPs)[J]. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2011, 58(13-16): 1652-1661.
- [3] Zhang D Z, Tang B P, Ding G, *et al.* Molecular authentication of the fashionable dainty *Eriocheir japonica sinensis* based on mitochondrial DNA bar coding[J]. *European Food Research and Technology*, 2009, 230(1): 173-178.
- [4] 高俊娜. 三疣梭子蟹和日本扇的线粒体DNA序列比较分析及三疣梭子蟹蜕皮抑制激素基因的SNP位点筛选[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
- Gao J N. Mitochondrial DNA sequence analysis of *Portunus trituberculatus* and *Charybdis japonica* and identification of single nucleotide polymorphisms of MIH in *Portunus trituberculatus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011 (in Chinese).
- [5] Du Z Q, Ciobanu D C, Onteru S K, *et al.* A gene-based SNP linkage map for pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Animal Genetics*, 2010, 41(3): 286-294.
- [6] Foley B R, Rose C G, Rundle D E, *et al.* A gene-based SNP resource and linkage map for the copepod *Tigriopus californicus*[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 568.
- [7] 王丽, 韩艳楠, 金珊, 等. 水体Cu²⁺对三疣梭子蟹主要组织ROS含量和抗氧化能力的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2015, 34(7): 1261-1268.
- Wang L, Han Y N, Jin S, *et al.* Effects of aqueous copper on reactive oxygen species content and anti-oxidation capacity of major tissues in *Portunus trituberculatus*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(7): 1261-1268(in Chinese).
- [8] 刘海映, 吕海波, 崔帆, 等. 放流三疣梭子蟹遗传多样性和贡献率初步研究[J]. *水产科学*, 2016, 35(6): 613-619.
- Liu H Y, Lv H B, Cui F, *et al.* Parental contribution and genetic diversity between broodstock and offsprings in swimming crab (*Portunus trituberculatus*) releasing into natural waters[J]. *Fisheries Science*, 2016, 35(6): 613-619(in Chinese).
- [9] Yamauchi M M, Miya M U, Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequence of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura)[J]. *Gene*, 2003, 311: 129-135.
- [10] 戴艳菊, 刘萍, 高保全, 等. 三疣梭子蟹4个野生群体线粒体16S rRNA和CO I 基因片段的比较分析[J]. *中国海洋大学学报*, 2010, 40(3): 54-60.
- Dai Y J, Liu P, Gao B Q, *et al.* Sequence analysis of mitochondrial 16S rRNA and COI gene fragments of four wild populations of *Portunus trituberculatus*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2010, 40(3): 54-60(in Chinese).
- [11] 王景, 张凤英, 蒋科技, 等. 基于线粒体CO I 基因序列的三疣梭子蟹东海区群体遗传多样性分析[J]. *海洋渔业*, 2015, 37(2): 114-121.
- Wang J, Zhang F Y, Jiang K J, *et al.* Genetic diversity of *Portunus trituberculatus* based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I sequence from the East China Sea[J]. *Marine Fisheries*, 2015, 37(2): 114-121(in Chinese).
- [12] 高保全, 刘萍, 李健, 等. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)4个地理群体体色差异分析[J]. *渔业科学进展*, 2015, 36(3): 79-84.
- Gao B Q, Liu P, Li J, *et al.* Analysis of body color vari-

- ations among four wild populations of *Portunus trituberculatus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(3): 79-84(in Chinese).
- [13] 杨爽, 宋娜, 张秀梅, 等. 基于线粒体控制区序列的三疣梭子蟹增殖放流亲蟹遗传多样性研究[J]. 水产学报, 2014, 38(8): 1089-1096.
Yang S, Song N, Zhang X M, *et al.* Genetic diversity of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) from four broodstock populations in stock enhancement inferred from mitochondrial control region[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(8): 1089-1096(in Chinese).
- [14] Ganopoulos L, Argiriou A, Tsaftaris A. Microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for authenticity testing of protected designation of origin (PDO) sweet cherry products[J]. Food Control, 2011, 22(3-4): 532-541.
- [15] 吴波, 杨润婷, 朱世平, 等. 宽皮柑橘单核苷酸多态性的高分辨率熔解曲线分型[J]. 园艺学报, 2012, 39(4): 777-782.
Wu B, Yang R T, Zhu S P, *et al.* Genotyping single nucleotide polymorphisms in mandarin cultivars using high resolution melting analysis[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(4): 777-782(in Chinese).
- [16] White H E, Hall V J, Cross N C P. Methylation-sensitive high-resolution melting-curve analysis of the *SNRPN* gene as a diagnostic screen for Prader-Willi and Angelman syndromes[J]. Clinical Chemistry, 2007, 53(11): 1960-1962.
- [17] 张超, 张海琪, 许晓军, 等. 中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)不同品系线粒体SNP的分型与鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(2): 376-381.
Zhang C, Zhang H Q, Xu X J, *et al.* Identification of different strains of *Pelodiscus sinensis* by using high resolution melting (HRM) analysis of SNPs in mitochondrial DNA[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2014, 45(2): 376-381(in Chinese).
- [18] 张德宁, 吕建建, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹生长相关SNP位点的鉴定[J]. 中国水产科学, 2015, 22(3): 393-401.
Zhang D N, Lü J J, Liu P, *et al.* Identifying SNP markers correlated with growth of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) based on a comparative transcriptome[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(3): 393-401(in Chinese).
- [19] Nickerson D A, Taylor S L, Weiss K M, *et al.* DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene[J]. Nature Genetics, 1998, 19(3): 233-240.
- [20] Harding R M, Fullerton S M, Griffiths R C, *et al.* Archaic African and Asian lineages in the genetic ancestry of modern humans[J]. American Journal of Human Genetics, 1997, 60(4): 772-789.
- [21] Taillon-Miller P, Gu Z J, Li Q, *et al.* Overlapping genomic sequences: a treasure trove of single-nucleotide polymorphisms[J]. Genome Research, 1998, 8(7): 748-754.
- [22] Arias A, Freire R, Boudry P, *et al.* Single nucleotide polymorphism for population studies in the scallops *Aequipecten opercularis* and *Mimachlamys varia*[J]. Conservation Genetics, 2009, 10(5): 1491-1495.
- [23] Li S Z, Wan H R, Ji H Y, *et al.* SNP discovery based on CATS and genotyping in the finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides*)[J]. Conservation Genetics, 2009, 10(6): 2013-2019.
- [24] 王敏强, 崔志峰, 刘晓玲, 等. 2种三疣梭子蟹居群线粒体Cyt b和S-rRNA基因片段序列变异研究[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2008, 21(3): 191-196.
Wang M Q, Cui Z F, Liu X L, *et al.* Sequence variations of mitochondrial Cyt b and S-rRNA gene fragments in two Chinese *Portunus trituberculatus* populations[J]. Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition), 2008, 21(3): 191-196(in Chinese).
- [25] 高天翔, 陈省平, 韩志强, 等. 大银鱼和小齿日本银鱼线粒体细胞色素b和16S rRNA基因部分序列分析[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(5): 791-794.
Gao T X, Chen S P, Han Z Q, *et al.* Partial sequence analysis of mitochondrial cytochrome b and 16S rRNA genes of *Protosalanx hyalocranius* and *Salangichthys microdon*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2004, 34(5): 791-794(in Chinese).
- [26] 薛泰强, 杜宁, 高天翔. 基于线粒体COI及Cyt b基因的4种鳢科鱼类系统发育研究[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(S1): 91-98.
Xue T Q, Du N, Gao T X. Phylogenetic relationships of 4 Sillaginidae species based on partial sequences of COI and cytochrome b gene[J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(S1): 91-98(in Chinese).
- [27] 顾明亮. 藏汉民族及3个不同地域的藏族群体线粒体基因组的比较研究: 探查自然选择在基因组的印记[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2008.
Gu M L. Comparative study on mitochondrial genome between Tibetan and Han populations, and Tibetans in three different zones: interrogating mitochondrial genes for signature of natural selection[D]. Beijing: Chinese Peking Union Medical College, 2008 (in Chinese).
- [28] 王家丰. 长牡蛎基因区SNP标记规模开发及其在遗传育种研究中的应用[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海

- 洋研究所), 2012.
- Wang J F. Large-scale development of SNP marker and its potential application in genetic breeding of *Crassostrea gigas*[D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2012 (in Chinese).
- [29] Xia X H, Hafner M S, Sudman P D. On transition bias in mitochondrial genes of pocket gophers[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1996, 43(1): 32-40.
- [30] Li X P, Meng X H, Kong J, *et al.* Molecular cloning and characterization of a cathepsin B gene from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(5): 1604-1612.
- [31] Holliday R, Grigg G W. DNA methylation and mutation[J]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1993, 285(1): 61-67.
- [32] Li W H, Sadler L A. Low nucleotide diversity in man[J]. *Genetics*, 1991, 129(2): 513-523.
- [33] Shen L X, Basilion J P, Stanton J V P. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(14): 7871-7876.
- [34] Komar A A. SNPs, silent but not invisible[J]. *Science*, 2007, 315(5811): 466-467.

Analysis of single nucleotide polymorphism (SNP) in mitochondrial genome of *Portunus trituberculatus*

ZHAO Lian^{1,2,3}, LI Zhihui^{1,2,3}, ZHANG Pei^{1,2,3}, XUE Bei^{1,2,3},
LAI Xiaofang^{1,2,3}, GAO Huan^{1,2,3}, YAN Binlun^{1,2,3*}

(1. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, College of Fisheries and Life Science, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;
2. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Lianyungang 222001, China;
3. The Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China)

Abstract: To obtain SNP mutations of mitochondrial genome in *Portunus trituberculatus*, a total of 179 primer pairs were designed, nearly covering the whole mitochondrial genome in this study. Of the 179 primer pairs, 89 got the expected specific amplification fragments by regular PCR. Then, 22 of 89 amplification fragments were found to contain the SNPs, by testing of HRM technology (High resolution melting curve). Though sequencing, 24 SNPs were obtained in the 22 amplification fragments. The results by statistical analyzing demonstrated that SNP frequency in mitochondrial genome of *P. trituberculatus* was 0.15/100 bp, in which the conversion mutation rate was 79.1%, 16.6% for transvesion mutation rate, 79.1% for mutation rate of C to T (or G to A), 8.3% for the mutation rate of G to T (or C to A), and 4.16 % for the mutation rate of G to C and A to T, respectively. Thus, the mutation of C to T (containing the type of G to A) is the most common mutation type. Additionally, the distribution of 24 SNP mutation loci was not even in the whole mitochondrial genome. The number of SNPs was the greatest in *COX1* gene region, and the second is in D-LOOP and *ND1* genes. However, no SNPs were found in some regions, such as *tRNA*, *12S rRNA*. Our findings will provide an analysis tool that may help further researches in genetic diversity of germplasm resources and enhancement in *P. trituberculatus*.

Key words: *Portunus trituberculatus*; mitochondrial genome; SNP; HRM

Corresponding author: YAN Binlun. E-mail: yanbl@hhit.edu.cn

Funding projects: National Science Foundation of China(31472282); Key University Science Research Project of Jiangsu Province (13KJA240001); Projects of "Six Talent Summit" Innovative Talent Team of Jiangsu (2016-HY-GC-CXTD-004)