

香港牡蛎糖原合酶与糖原磷酸化酶基因多态性研究及糖原含量性状相关分子标记挖掘

贾真, 彭业韶, 孔令鑫, 秦越, 黎林杰, 梁柳, 朱鹏, 余智彩

(北部湾大学海洋学院, 广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室, 广西 钦州 535011)

摘要: 香港牡蛎是我国南方沿海地区的主要经济贝类, 糖原含量是衡量其品质高低的重要指标之一。本研究在转录组测序基础上, 以三墩群体(SD, 60 只个体)和大风江群体(DFJ, 90 只个体)为研究对象, 采用 ELISA 方法检测每个香港牡蛎糖原含量, 并利用片段长度差异等位基因特异性 PCR(Fragment length discrepant allele specific PCR, FLDAS-PCR)技术开展糖原合酶和糖原磷酸化酶基因多态性研究, 开发单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)标记。结果共开发 25 个 SNPs, 其中 4 个 SNPs(*Ch_GS680*, *Ch_GS1248*, *Ch_GP992* 和 *Ch_GP1962*) 在实验群体中分型成功, SPSS 关联分析显示 SNP 位点 *Ch_GS680* 与糖原含量显著关联($P < 0.05$), 暗示其可作为香港牡蛎糖原含量性状的潜在分子标记, 研究结果为高糖原含量香港牡蛎新品种的分子标记辅助选育奠定了基础。

关键词: 香港牡蛎; 糖原合酶; 糖原磷酸化酶; SNP; FLDAS-PCR

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2023)7-0035-09

DOI: 10.11759/hyxx20220627003

香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*), 俗称大蚝, 主要分布于中国的广东、广西等地, 是华南沿海地区的主要经济贝类之一^[1]。香港牡蛎曾以个大肥满, 肉质脆嫩, 肉味鲜美闻名全国。糖原是牡蛎体内的一种重要的营养物质, 与牡蛎的肉味鲜美^[2]、繁殖、生长、能量代谢和抗逆性等密切相关^[3-4]。其含量可达牡蛎干重的 20%~40%^[5], 是牡蛎品质性状的重要组成部分, 对牡蛎的口感和鲜味具有重要影响^[6]。糖原是牡蛎进行正常生命活动的基础和保障, 尤其是繁殖季节, 香港牡蛎体内糖原快速消耗^[7], 引起品质急剧下降。因此, 提高香港牡蛎糖原含量, 培育高糖原含量新品系对提高香港牡蛎的品质及其经济价值具有重要意义^[8]。

使用传统的育种方式进行选育, 不仅周期长, 而且精度低。随着分子生物学的发展和分子标记辅助选择(Marker-assisted Selection, MAS)的出现, 人们可以在生物学性状和遗传物质之间直接建立联系, 从而显著提高选育的精准度, 缩短育种进程, 提高选育的效率^[9]。而性状关联关键分子标记的筛选和鉴定是分子标记辅助选择工作的前提和基础^[10]。候选基因是对目标性状具有明确的关键作用, 且功能已得到鉴定的基因。候选基因关联分析成本较低, 多态位点选择简单, 操作简便, 是鉴定性状关联分子标记的经济且有效的手段^[11-12]。

因此, 本研究在转录组测序基础上, 利用 FLDAS-

PCR 技术对香港牡蛎糖原代谢关键基因糖原合酶和糖原磷酸化酶进行基因多态性研究, 开发单核苷酸多态性(SNP)标记, 并使用三墩群体(SD)和大风江群体(DFJ)对 SNP 标记与糖原含量进行关联分析, 以挖掘糖原含量性状相关的 SNP 分子标记, 为选育高糖原含量香港牡蛎新品系奠定基础。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

本实验共用到 2 个香港牡蛎群体, 一个是用于

收稿日期: 2022-06-27; 修回日期: 2022-09-03

基金项目: 北部湾大学海洋科学广西一流学科(DRC002); 广西自然科学基金(2023GXNSFAA026503, 2018GXNSFBA281201, 2019GXNSFBA245081); 钦州市科学研究与技术开发计划项目(202014842); 广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室项目(2020ZB09, 2020ZB04)

[Foundation: Marine Science Guangxi First-Class Subject, Beibu Gulf University, No. DRC002; Natural Science Foundation of Guangxi, Nos. 2023GXNSFAA026503, 2018GXNSFBA281201, 2019GXNSFBA245081; Scientific Research and Technology Development Plan Project of Qinzhou, No. 202014842; Project of Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation, Nos. 2020ZB09, 2020ZB04]

作者简介: 贾真(1987—), 男, 辽宁朝阳人, 硕士研究生, 工程师, 主要从事贝类增殖及遗传育种研究, E-mail: jiazhen@bbgu.edu.cn; 余智彩(1986—), 通信作者, 女, 河南新乡人, 博士, 副教授, 主要从事贝类增殖及遗传育种研究, E-mail: zcshe0306@163.com; 朱鹏(1986—), 通信作者, 男, 江西高安人, 博士, 副研究员, 主要从事水产动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: yijianrudi@163.com

SNP 标记开发及关键 SNP 筛选的群体, 来源于广西钦州市三墩海域(N21°62'98", E108°68'46"), 记为 SD 群体, 共 60 只个体, 群体内的个体均在同一时间附苗, 同一自然环境下养殖。另一个是用于对筛选出的 SNP 进行验证的群体, 来源于广西钦州市大风江入海口(E108°86'16", N21°67'77"), 记为 DFJ 群体, 共 90 只个体, 群体内的个体也是在同一时间附苗, 且在同一自然环境下养殖。上述两个群体均为繁殖前的 2 龄个体, 在 2020 年 6 月 24 日将其运至实验室, 分离闭壳肌、鳃组织, 投入液氮中速冻后于-80℃冷冻保存, 用于后续的糖原含量检测与总 RNA 提取。

1.2 糖原含量检测

样品糖原含量委托上海酶联生物科技有限公司采用双抗体夹心法酶联免疫吸附 ELISA 试剂盒进行测定。使用预冷后的 PBS 冲洗牡蛎闭壳肌, 称重剪碎后与一定量的 PBS 混匀, 使用匀浆机进行破碎匀浆, 收集上清液。设置空白孔、标准孔和样品孔, 标准孔各加不同浓度的标准品, 样品孔预先加样品稀释液, 后加入样品。向各孔加入酶标试剂(空白孔除外), 用封板膜封板后置 37℃温育 60 min, 温育后弃去液体, 用洗涤液重复洗涤 5 次, 加入显色剂, 轻轻振荡混匀, 37℃避光显色 15 min 后加终止液终止反应。以空白孔调零, 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值), 依据标准样品的吸光度计算待测样品的糖原含量。

1.3 SNP 多态标记开发

1.3.1 引物设计

选取糖原代谢关键基因糖原合酶和糖原磷酸化酶基因作为研究对象, 以香港牡蛎转录组测序预测的 SNP 位点作为候选 SNPs。利用比对软件 STAR 对每个样本的 Reads 与 Unigene 序列进行比对, 然后通过 GATK 软件进行 SNP 识别。根据 FLDAS-PCR 原理, 使用 Oligo7 软件进行引物设计。针对候选 SNP 位点设计 2 条 3'末端分别与突变类型的 2 个等位基因配对的上游(若上游不适合设计则改换设计下游)引物, 同时为增加 2 条引物的特异性在 3'端的第 3 或第 4 位碱基引入人为错配, 在其中 1 条或 2 条引物的 5'末端添加不同长度的核苷酸序列, 使 2 条引物长度有 4~8 bp 的差异。下游引物则按照普通引物设计的方法进行设计, 扩增的 DNA 片段的长度在 100~200 bp。引物委托生工生物工程(广州)股份有限公司合成。

1.3.2 候选 SNPs 的验证

使用 FLDAS-PCR 及聚丙烯酰胺凝胶电泳相结合的方法进行候选 SNPs 的验证。在 SD 群体中随机抽取 4 个个体的鳃组织, 用 Transzol 法提取总 RNA 并反转录成 cDNA, 作为 FLDAS-PCR 的模板。使用 PCR 试剂盒(CWBIO) 25 μL 反应体系进行 DNA 扩增: 2×ES Taq Master Mix 12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL, 3 种引物各 0.7 μL, DNA 模板 1 μL。PCR 循环参数设置如下: 94℃预变性 3 min, 94℃ 30 s, 最适 T_m 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环, 72℃延伸 5 min。PCR 产物经 12%非变性聚丙烯酰胺凝胶在 300 V 电压下电泳 35 min 进行检测验证。使用 GeneGreen 核酸染料和凝胶成像系统对扩增结果进行观察, 其中扩增结果较好, 目标条带清晰且单一的候选 SNP 位点即为验证的 SNPs。

1.4 SNP 标记分型检测

取 SD 群体及 DFJ 群体所有个体的鳃组织, 用 Transzol 法提取总 RNA 并反转录成 cDNA。以反转录的 cDNA 为模板, 使用上述 FLDAS-PCR 的反应体系和循环参数进行 PCR 扩增, 扩增后的产物使用 12%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测, 根据电泳结果读取基因型。

1.5 FLDAS-PCR 分型结果准确性检验

从分型成功的 SNP 位点中, 随机挑选几只个体的 PCR 产物, 然后进行 PCR 产物回收, 连接 T 载体, 转化入大肠杆菌, 培养后将菌液送至生工生物工程(广州)股份有限公司进行测序。

1.6 关联分析

对于在 SD 群体中分型成功的 SNP 位点, 使用 IBM SPSS Statistics 24 软件, 对糖原含量数据和基因型数据利用单因素方差分析或 T 检验的方法进行关联分析, 同一位点不同基因型之间, 糖原含量存在显著差异的被认为是与糖原含量关联的 SNP 标记。针对筛选出的 SNP 标记, 使用 IBM SPSS Statistics 24 软件在 DFJ 群体中再次进行关联分析。

2 实验结果

2.1 实验群体糖原含量

SD 群体糖原含量分布如图 1a 所示, 最高值 Max=1.85 mg/g, 最低值 Min=1.51 mg/g, 糖原含量平均值 Mean=1.68±0.10 mg/g, 变异系数 CV=5.95%。正态分布检验显示实验群体糖原含量符合正态分布($P>0.05$)。DFJ

群体糖原含量分布如图 1b 所示, 最高值 Max=1.82 mg/g, 最低值 Min=1.48 mg/g, 糖原含量平均值 Mean=1.66±

0.10 mg/g, 变异系数 CV =6.02%。正态分布检验显示实验群体糖原含量符合正态分布($P>0.05$)。

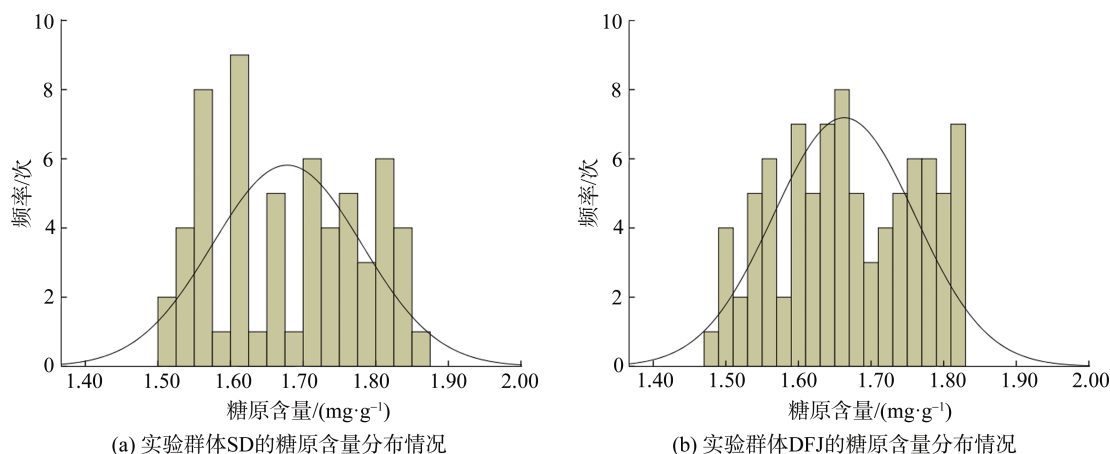


图 1 实验群体糖原含量分布图

Fig. 1 Distribution of glycogen content in the experimental population

2.2 SNP 多态标记开发

根据香港牡蛎转录组测序结果, 糖原合酶基因共预测出候选 SNP 位点 9 个, 共设计 FLDAS-PCR 引物 9 组, 最终 9 个 SNP 位点全部得到验证, 成功开发出 SNP 标记 9 个。糖原合酶基因 SNP 标记及其引

物信息如表 1 所示。糖原磷酸化酶基因共预测出候选 SNP 位点 38 个, 共设计 FLDAS-PCR 引物 30 组, 最终 16 个 SNP 位点得到验证, 成功开发出 SNP 标记 16 个。糖原磷酸化酶基因 SNP 标记及其引物信息如表 2 所示。

表 1 糖原合酶基因 SNP 标记及其引物信息

Tab. 1 Information on SNPs and the primers of glycogen synthase

SNP 名称	突变类型	引物名称	引物序列(5'—3')
<i>Ch_GS25</i>	A/G	GS25_A	AACAGCATACTAGAATGCACGA
		GS25_G	ATATAACAGCATACTAGAATGCGCAG
		GS25_R	AGTGCTATTTACAAATGTTAAACCT
<i>Ch_GS97</i>	A/C	GS97_A	CCCAGTTATTCATGAAAGTCGCAA
		GS97_C	GCTATCCCAGTTATTCATGAAAGTCTTAC
		GS97_R	GTTGGACATGAATGATCCTGATTAGA
<i>Ch_GS233</i>	G/A	GS233_C	CCTGATTAGATGATTATAGTGTGTC
		GS233_T	ATATCCTGATTAGATGATTATAGTGTGTT
		GS233_R	ACCCAGTTATTCATGAAAGTCTC
<i>Ch_GS1166</i>	C/T	GS1166_A	TCCTAGGTGTATGAATGGTTAGAGACA
		GS1166_G	AGGTGTATGAATGGTTAGACTCG
		GS1166_R	ATGGGCAAATGGGATATGATAA
<i>Ch_GS1206</i>	G/A	GS1206_C	GCTCTAGGATTAAGAAGTGTACC
		GS1206_T	TTAAGCTCTAGGATTAAGAAGTGTATCT
		GS1206_R	GGAGATTCAGGCAGTACATTG
<i>Ch_GS1211</i>	C/T	GS1211_G	TCTGCTCTAGGATTAAGATGTG
		GS1211_A	GGGATCTGCTCTAGGATTAAGAAGTACTA
		GS1211_R	GGAGATTCAGGCAGTACATTG
<i>Ch_GS1248</i>	G/A	GS1248_G	CCTTCAGAATGCTACTTTTCGAG
		GS1248_A	ATTAACCTTCAGAATGCTACTTTTCCTA
		GS1248_R	AGAATCATTATCTGCTACATACAAGG

续表

SNP 名称	突变类型	引物名称	引物序列(5'—3')
<i>Ch_GS688</i>	G/T	GS688_G	GCCCATCCAAGTTAATAAATCCTG
		GS688_T	TAGCGCCCATCCAAGTTAATAAATGCCT
		GS688_R	TATACAACAAAAGGTCAGCTAGAAGG
<i>Ch_GS680</i>	C/T	GS680_T	CGGGCCAAGTTAATAAATGCTGATTGCTAT
		GS680_C	CAAGTTAATAAATGCTGATTGTGAC
		GS680_R	TATACAACAAAAGGTCAGCTAGAAGG

表 2 糖原磷酸化酶基因 SNP 标记及其引物信息

Tab. 2 Information on SNPs and the primers of glycogen phosphorylase

SNP 名称	突变类型	引物名称	引物序列(5'—3')
<i>Ch_GP25</i>	A/G	GP25_A	AACAGCATACTAGAAATGCACGA
		GP25_G	ATATAACAGCATACTAGAAATGCGCAG
		GP25_R	AGTGCTATTTACAAATGTTAAACCT
<i>Ch_GP53</i>	A/G	GP53_A	GGGCCACATTTAGTTGATGGTTACAATGCA
		GP53_G	ACATTTAGTTGATGGTTACAATGGG
		GP53_R	GAAACGTACACCAAAGTAGGA
<i>Ch_GP233</i>	C/T	GP233_C	CCTGATTAGATGATTATAGTGTGTC
		GP233_T	ATATCCTGATTAGATGATTATAGTGTGTT
		GP233_R	ACCCAGTTATTCATGAAAGTCTC
<i>Ch_GP461</i>	A/G	GP461_A	ATATATATCTTTGGCATGAGGCTGA
		GP461_G	ATCTTTGGCATGAGGGAGG
		GP461_R	CAGCTCCGGAAGATTCTCA
<i>Ch_GP579</i>	A/G	GP579_A	TATAGGGCGAATTTTCATGTTTTCA
		GP579_G	GGGGGAATTTTCATGTTTGCG
		GP579_R	TCCTGTGATTGGACGTAAGT
<i>Ch_GP623</i>	G/T	GP623_G	CTTCTTTCACTCATTATACAGTAAG
		GP623_T	GGGGCCTTCTTTCACTCATTATACAGCAGT
		GP623_R	CAAGCCGTAAAGAACAATCCG
<i>Ch_GP944</i>	G/T	GP944_G	TCAATATTCAAAAAGGCGTTTAATCGCTAG
		GP944_T	TTCAAAAAGGCGTTTAATCGGCAT
		GP944_R	CTCTCTTTGGGTCCTTCTCATAGT
<i>Ch_GP992</i>	G/A	GP992_G	TGGGCAAGAGAGAGGTAGAAG
		GP992_A	TATCCGTGGGCAAGAGAGAGGTAATAA
		GP992_R	TCAGTATTCGCGGTATTGCTC
<i>Ch_GP1013</i>	A/C	GP1013_A	ATATACTACTACCTCTCTTTGCCGAA
		GP1013_C	CTACTACCTCTCTTTGCTCAC
		GP1013_R	GTCTGCCCATGTAAAAGTCC
<i>Ch_GP1253</i>	G/T	GP1253_G	AATAATCTGGGTAATGGAGGACTTGGG
		GP1253_T	TCTGGGTAATGGAGGACTTGGT
		GP1253_R	TTTCTGGGCAAAGATTCCATAGT
<i>Ch_GP1598</i>	G/A	GP1598_G	ATTCCGGGTTGAAGAAGTGCAGGCTG
		GP1598_A	GCGTTGAAGAAGTGCAGGATA
		GP1598_R	CAGGGGTCAAGTGGGTGGA
<i>Ch_GP1604</i>	A/G	GP1604_A	CGGTATCCCAACAGCTTCAACTTA
		GP1604_G	TCCCAACAGCTTCAACCCG
		GP1604_R	AGAAAAGAAGTTATCGTTGGGGT

SNP 名称	突变类型	引物名称	引物序列(5'—3')
<i>Ch_GP1773</i>	C/G	GP1773_C	AACTTAGCAGAAAACATTCCC
		GP1773_G	AGGCAACTTAGCAGAAAACATTACG
		GP1773_R	GCTGCCACCACGAAATATTCC
<i>Ch_GP1962</i>	A/G	GP1962_A	TTATTAGAAGAGGAGGGAAAGGAACCA
		GP1962_G	GAAGAGGAGGGAAAGGAGCCG
		GP1962_R	GTCCAAAACCTGCCTGAATGTAA
<i>Ch_GP2286</i>	C/T	GP2286_C	ATCAATCTGGGTCTGCATAAC
		GP2286_T	CGTAATCAATCTGGGTCTGCAAAT
		GP2286_R	CCTAATCCAGCATCTTCTTCCA
<i>Ch_GP2291</i>	G/A	GP2291_G	ACCAATGAGCGCTTCCAAAACAAATCG
		GP2291_A	GTGAGCGCTTCCAAAACAAAATA
		GP2291_R	CCCATTCTCCCCGATTTTC

2.3 SNP 标记分型检测

经 SNP 标记分型检测, 糖原合酶最终有 2 个 SNP 位点在 SD 群体中分型成功, 分别为 SNP *Ch_GS680* 和 SNP *Ch_GS1248*。其中 SNP *Ch_GS680* 在 DFJ 群体中也分型成功。糖原磷酸化酶最终也有 2 个 SNP 位点在 SD 群体中分型成功, 分别为 SNP *Ch_GP992* 和 SNP *Ch_GP1962*。上述 4 个 SNP 位点各基因型在实验群体中的分布统计结果见表 3 和图 2。

2.4 FLDAS-PCR 分型结果准确性检验

测序结果显示, 使用 FLDAS-PCR 方法的分型结果与测序的完全一致, 表明 FLDAS-PCR 分型结果是准确可靠的(图 3)。

表 3 SNP 位点各基因型在实验群体中的分布统计
Tab. 3 Distribution statistics of each genotype of SNPs in the experimental population

SNP 位点	实验群体	基因型	个体数
<i>Ch_GS680</i>	SD	TT	53
		TC	6
		CC	1
<i>Ch_GS1248</i>	SD	AA	2
		AG	7
		GG	51
<i>Ch_GP992</i>	SD	AG	6
		AA	54
<i>Ch_GP1962</i>	SD	AG	1
		GG	59
<i>Ch_GS680</i>	DFJ	TT	85
		TC	5

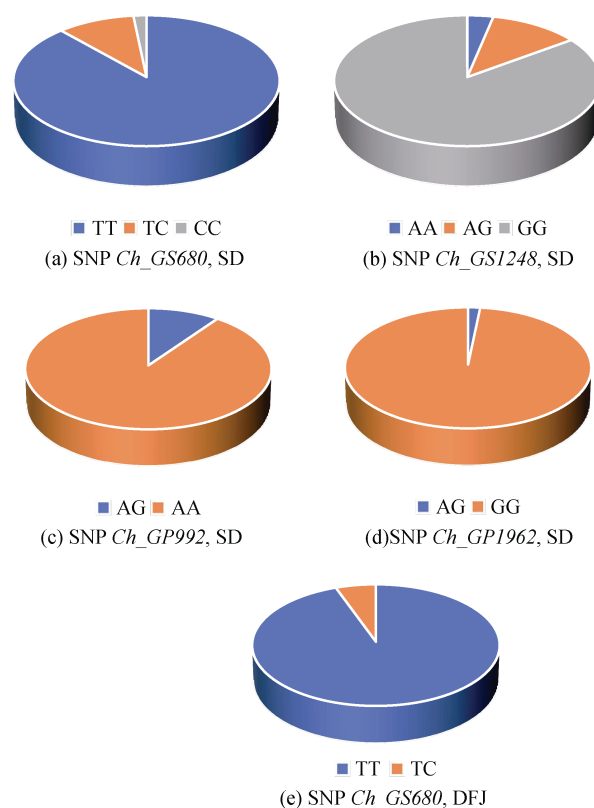


图 2 SNP 位点基因型在实验群体中的分布图
Fig. 2 Distribution of genotypes of SNPs in the experimental population

2.5 关联分析

经单因素方差分析, 发现 SNP *Ch_GS680* 在 SD 群体中不同基因型之间的糖原含量存在显著差异 ($P < 0.05$), 说明 SNP *Ch_GS680* 是与糖原含量关联的 SNP 位点。对该 SNP 位点在 DFJ 群体中再次进行

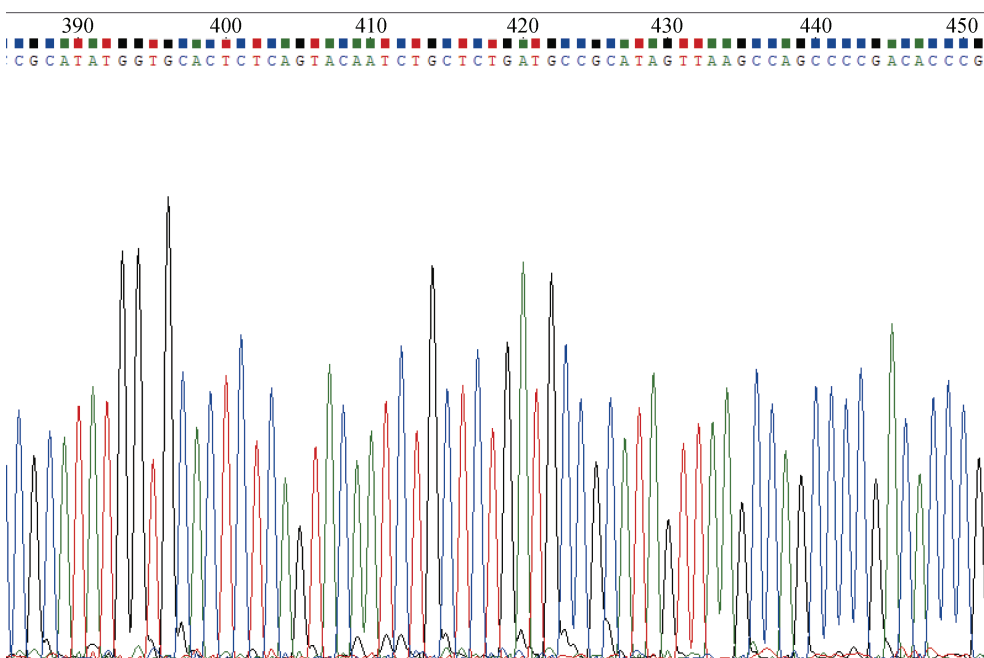


图3 GS1248_G引物 PCR 扩增产物的测序结果

Fig. 3 Sequencing results of PCR amplification products of primer GS1248_G

关联分析以对该 SNP 进行验证, 分型结果显示 SNP *Ch_GS680* 在 DFJ 群体中只有 TT 和 TC 两种基因型 (图 2), 所以使用独立样本 T-检验进行关联分析, 但结果显示 TT 和 TC 两种基因型之间的糖原含量并无显著差异 ($P > 0.05$)。SNP *Ch_GS680* 在 SD 群体中不同基因型之间的两两比较结果见表 4。

表 4 SNP *Ch_GS680* 不同基因型之间的两两比较结果
Tab. 4 Pairwise comparison among different genotypes of SNP *Ch_GS680*

基因型 I	基因型 II	平均值差值 (I - II)	P 值
CC	TC	-0.25*	0.03
	TT	-0.16	0.11
TC	CC	0.25*	0.03
	TT	0.08	0.05
TT	CC	0.16	0.11
	TC	-0.08	0.05

注: *, 平均值差值的显著性水平为 0.05。

SNP *Ch_GS1248* 在 SD 群体不同基因型之间的糖原含量不存在显著差异 ($P > 0.05$), 说明 SNP *Ch_GS1248* 与糖原含量之间无关联关系。经独立样本 T-检验, 发现 SNP *Ch_GP992* 和 SNP *Ch_GP1962* 在 SD 群体中不同基因型之间的糖原含量均不存在显著差异 ($P > 0.05$), 说明 SNP *Ch_GP992* 和 SNP *Ch_GP1962*

与糖原含量之间也无关联关系。各 SNP 位点在 SD 群体中与糖原含量的关联分析结果见表 5。

表 5 各 SNP 位点与糖原含量的关联分析结果
Tab. 5 Association analysis results between each SNP and glycogen content

SNP 位点	P 值	是否和性状关联
<i>Ch_GS680</i>	0.039	是
<i>Ch_GS1248</i>	0.273	否
<i>Ch_GP992</i>	0.17	否
<i>Ch_GP1962</i>	0.76	否

3 讨论

3.1 香港牡蛎糖原含量的特点

本研究所用香港牡蛎糖原含量为 1.48~1.85 mg/g, 平均值(1.68±0.10)~(1.66±0.10) mg/g, 变异系数达到 6.02%。这与长牡蛎相比, 糖原含量及变异系数均较低。She 等^[13]检测长牡蛎(*Crassostrea gigas*)糖原含量为 2.1~10.4 mg/g, 平均为(5.3±1.7) mg/g, 这可能是由物种间的差异造成的。王卫军等^[14]在我国多个长牡蛎产地选取不同发育阶段、不同养殖方式和不同年龄的 77 份长牡蛎样品, 测得长牡蛎糖原含量为 0.13~10.57 mg/g, 平均为(4.14±1.99) mg/g, 变异系数高达 48.07%, 这可能与长牡蛎的糖原含量测量方法、所用

组织及样品来源不同有关。本实验所用糖原检测方法为 ELISA 试剂盒(上海酶联, 中国), 而王卫军等^[14]所用方法为 EnzyChrom™糖原试剂盒(BioAssay Systems, USA), 不同方法检测结果可能不同; 本实验所用组织为闭壳肌, 而王卫军等^[14]所用组织为整个软体部, 不同组织糖原含量不同, 会造成测量结果的差异; 本实验所用香港牡蛎均来自广西茅尾海, 而王卫军等^[14]所用长牡蛎来自我国多个不同产区, 可能牡蛎间差异较大, 因此糖原含量变异系数较大。刘思玮等依据蒽酮比色法, 将长牡蛎性腺组织经过冷冻干燥后研磨成粉末, 测得糖原含量为(30.59%±2.10%)~(35.24%±2.22%), 这种方法所测糖原含量为样品干重的糖原含量, 因此, 远远高于本实验所测样品湿重的糖原含量^[15-16]。香港牡蛎与其他贝类如菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)、缢蛏(*Sinonovacula constricta*)、褶牡蛎(*Ostrea plicatula*)相比, 糖原含量也处于较低水平, 而和皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)的糖原含量水平相当^[17]。

3.2 SNP 标记开发及分型效率

本研究通过转录组测序预测出香港牡蛎糖原合酶基因编码区 2 210 bp, 包含 9 个候选 SNP 位点, 针对这 9 个候选 SNP 位点, 我们共设计了 9 组特异性引物, 利用 FLDAS-PCR 和聚丙烯酰胺凝胶技术成功开发出 SNP 标记 9 个, SNP 开发成功率为 100%(9/9), 远远大于使用高分辨率溶解曲线(high resolution melting curve, HRM)技术对长牡蛎糖原合酶进行 SNP 开发的成功率 40.9%(9/22)^[13]。通过转录组测序预测出糖原磷酸化酶基因编码区 7 488 bp, 包含 38 个候选 SNP 位点, 针对这 38 个候选 SNP 位点, 我们共设计了 30 组特异性引物, 成功开发出 SNP 标记 16 个, SNP 开发成功率为 53.3%(16/30)。使用 HRM 技术对长牡蛎糖原磷酸化酶进行 SNP 开发的成功率 33.3%(14/42)^[13], 使用 HRM 技术对长牡蛎转录组进行 SNP 开发的成功率 43.9%(1 301/2 962)^[18], 说明 FLDAS-PCR 技术进行 SNP 开发的成功率比较高。但 FLDAS-PCR 技术通量较低, 不适合进行大规模 SNP 的开发检测。

本研究所得香港牡蛎糖原合酶基因编码区 SNPs 的平均密度为 1/246(9/2 210), 香港牡蛎糖原磷酸化酶基因编码区 SNPs 的平均密度为 1/468(16/7 488), 这远远低于通过测序验证的长牡蛎糖原合酶基因编码区的 SNPs 平均密度为 1/35 bp 与长牡蛎糖原磷酸化酶基因编码区 SNPs 平均密度为 1/25 bp^[15-16], 这可

能是因为本研究转录组预测的 SNP 位点密度较低所致。在群体分型中, 香港牡蛎糖原合酶与糖原磷酸化酶分别有 2 个 SNPs 分型成功, 分型效率分别为 22.2%(2/9)和 12.5%(2/16), 使用 HRM 技术对长牡蛎糖原合酶与糖原磷酸化酶 SNP 的分型效率分别为 55.6%(5/9)和 7.1%(1/14)^[13], 说明 FLDAS-PCR 技术的分型效率较低且不稳定。

3.3 关键 SNP 标记挖掘

本研究在香港牡蛎糖原合酶基因编码区开发出 9 个 SNP 位点, 通过关联分析在 SD 群体检测到 1 个 SNP 可能与香港牡蛎糖原含量显著相关($P < 0.05$), 但在 DFJ 群体未检测到该相关性, 这可能与本研究分型成功的用于关联分析的 SNPs 较少有关, 也可能是因为本研究所鉴定的 SNP 位点具有较强的群体特异性。在香港牡蛎糖原磷酸化酶基因编码区开发出 16 个 SNP 位点, 但未检测到与糖原含量显著相关的 SNP 位点, 这也可能是因为分型成功的 SNP 较少所致。

目前, 已有研究在长牡蛎糖原合酶基因外显子区检测到 41 个 SNP 位点, 其中 6 个 SNPs 与糖原含量显著相关($P < 0.01$), 且具有单倍型 H2(GAGGAT)的个体在糖原含量上达到极显著差异($P < 0.000 1$)^[15]。在长牡蛎糖原磷酸化酶基因中共检测到 82 个 SNPs 位点, 但未检测到与糖原含量相关的 SNPs^[16]。在长牡蛎糖原磷酸化酶基因 5'UTR 上游 2 773 bp 处检测到 1 个 SNP 与糖原含量显著相关, 说明糖原磷酸化酶基因中可能不存在与糖原含量显著关联的 SNP 位点^[13]。

另有研究发现位于长牡蛎基因组 scaffold1597 的 36 675 碱基处的 SNP 标记, GG 基因型个体相比较于 AA 基因型个体, 糖原含量显著提高 4.5%^[19]。蛋白磷酸酶 1 调节亚基 3B(糖原靶向亚基)启动子区有 3 个与糖原含量显著关联的 SNP, 同时拥有 3 个优势基因型个体糖原含量比劣势基因型组合个体显著提高 10%以上^[20]。在缢蛏(*S. constricta*)糖原合酶基因中共筛选出 2 个与糖原含量相关的 SNP 位点, 其优势基因型组合个体的糖原含量比群体均值高 11.8%^[21]。这些结果说明利用关联分析的方法鉴定糖原含量相关的关键 SNP 标记是比较准确的, 这些标记可以为标记辅助选育提供基础。

4 结论

本研究利用 FLDAS-PCR 技术共成功开发香港牡蛎糖原合酶基因 SNP 位点 9 个, 香港牡蛎糖原磷酸化

酶基因 SNP 位点 16 个。利用 ELISA 方法测得香港牡蛎糖原含量为 1.48~1.85 mg/g, 平均值(1.68±0.10)~(1.66±0.10) mg/g, 变异系数达到 6.02%。关联分析结果显示位于香港牡蛎糖原合酶基因的 SNP 位点 *Ch_GS680* 与糖原含量显著关联($P<0.05$), 可作为香港牡蛎分子标记辅助选育的潜在分子标记。

参考文献:

- [1] 潘英, 李坚明, 黄伟德. 广西贝类养殖现状及产业发展策略建议[J]. 海洋科学, 2015, 39(11): 132-137.
PAN Ying, LI Jianming, HUANG Weide. The perspectives of molluscan mariculture and its developmental suggestions in Guangxi[J]. Marine Sciences, 2015, 39(11): 132-137.
- [2] 刘文广, 李琪, 高凤祥, 等. 长牡蛎繁殖周期、生化成分的季节变化与环境因子的关系[J]. 热带海洋学报, 2011, 30(3): 88-93.
LIU Wenguang, LI Qi, GAO Fengxiang, et al. Seasonal variation in reproductive cycle and biochemical composition in relation to environmental factors in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2011, 30(3): 88-93.
- [3] ROACH P J, DEPAOLI-ROACH A A, HURLEY T D, et al. Glycogen and its metabolism: Some new developments and old themes[J]. Biochemical Journal, 2012, 44(3): 763-787.
- [4] LI B S, SONG K, MENG J, et al. Integrated application of transcriptomics and metabolomics provides insights into glycogen content regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. BMC Genomics, 2017, 18: 713.
- [5] 陈骞, 杨瑞金, 顾聆琳. 牡蛎糖原的研究(II)——牡蛎糖原的分子结构[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 43-46.
CHEN Qian, YANG Ruijin, GU Linglin. Studies on oyster glycogen (II)——the fine structure of oyster glycogen[J]. Food Science, 2005, 26(7): 43-46.
- [6] 陈骞, 杨瑞金, 顾聆琳. 牡蛎糖原的研究(I)——牡蛎糖原的分离提取和化学组成[J]. 食品科学, 2005, 26(6): 99-101.
CHEN Qian, YANG Ruijin, GU Linling. Studies on oyster glycogen part I: Extraction and purification and chemical composition of oyster glycogen[J]. Food Science, 2005, 26(6): 99-101.
- [7] SAMAIN J F. Review and perspectives of physiological mechanisms underlying genetically based resistance of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to summer mortality[J]. Aquatic Living Resources, 2011, 24(3): 227-236.
- [8] 张国范, 李莉, 阙华勇. 中国牡蛎产业的嬗变——新认知、新品种和新产品[J]. 海洋与湖沼, 2020, 51(4): 740-749.
ZHANG Guofan, LI Li, QUE Huayong. An evolution of oyster mariculture industry in China: New knowledge, variety and product[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2020, 51(4): 740-749.
- [9] 李春燕. 牡蛎营养品质等重要经济性状的遗传定位与基因解析[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所. 2017: 3-11.
LI Chunyan. Genetic mapping and gene dissection of nutritional and other important economic traits of the oyster[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences. 2017: 3-11.
- [10] 陈秀荔, 李咏梅, 陈晓汉. 分子标记技术在牡蛎遗传育种中应用研究进展[J]. 广西农业科学, 2008, 39(5): 691-695.
CHEN Xiuli, LI Yongmei, CHEN Xiaohan. Advance in applications of molecular marker technologies in genetics and breeding of oyster[J]. Journal of Southern Agriculture, 2008, 39(5): 691-695.
- [11] LI B S, LI L, MENG J, et al. Association and functional analyses revealed that PPP1R3B plays an important role in the regulation of glycogen content in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Frontiers in Genetics, 2019, 10: 106.
- [12] LIU S W, LI Q, YU H, et al. Relationship between single nucleotide polymorphism of glycogen synthase gene of Pacific oyster *Crassostrea gigas* and its glycogen content[J]. Journal of Ocean University of China, 2017, 16(1): 168-174.
- [13] SHE Z C, LI L, QI H G, et al. Candidate gene polymorphisms and their association with glycogen content in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. PloS One, 2015, 10(5): e0124401.
- [14] 王卫军, 杨建敏, 董迎辉, 等. 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)鲜样组织八种成分含量近红外(NIR)模型的建立[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(4): 845-852.
WANG Weijun, YANG Jianmin, DONG Yinghui, et al. Establishment of near infrared models of eight components on fresh tissue of Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(4): 845-852.
- [15] 刘思玮. 长牡蛎糖原代谢酶基因多态性与生长及糖原含量相关性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013, 24-31.
LIU Siwei. Polymorphisms of glycogen metabolism enzyme gene and their association with growth performance and glycogen content in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013, 24-31.
- [16] 刘思玮, 李琪, 于红, 等. 长牡蛎糖原磷酸化酶基因 SNPs 与生长性状和糖原含量的相关性分析[J]. 中国水产科学, 2013, 20(3): 481-489.
LIU Siwei, LI Qi, YU Hong, et al. Single nucleotide polymorphisms in glycogen phosphorylase gene and their

- association with growth performance and glycogen content in Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(3): 481-489.
- [17] 孙莎, 钟婵, 章骞, 等. 4种海产贝类中主要呈味物质含量与季节变化的关系[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2016, 21(6): 420-427.
- SUN Sha, ZHONG Chan, ZHANG Qian, et al. Seasonal variation of taste-active component contents in four species of marine shellfish[J]. Journal of Jimei University(Natural Science), 2016, 21(6): 420-427.
- [18] WANG Jiafeng, QI Haigang, LI Li, et al. Discovery and validation of genic single nucleotide polymorphisms in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Molecular Ecology Resources, 2014, 11: 123-135.
- [19] 张国范, 李莉, 孟杰, 等. 用于筛选长牡蛎高糖原含量亲贝的方法及其相关引物对[P]. 山东省: CN107354234B, 2020-12-25.
- ZHANG Guofan, LI Li, MENG Jie, et al. Methods for screening high glycogen content mollusk and related primer pairs of *Crassostrea gigas*[P]. Shandong: CN107354234B, 2020-12-25.
- [20] 刘圣, 李莉, 孟杰, 等. 长牡蛎糖原含量相关基因与 SNP 标记鉴定及高糖原个体筛选方法[P]. 山东省: CN109355400A, 2019-02-19.
- LIU Sheng, LI Li, MENG Jie, et al. Identification of genes and SNP markers related to glycogen content in *Crassostrea gigas* and screening of individuals with high glycogen[P]. Shandong: CN109355400A, 2019-02-19.
- [21] 陈燕园, 刘圣, 何京, 等. 浙江缙蛭群体糖原含量变化与 GYS 基因多态性的关联分析[J]. 水产学报, 2021, 45(3): 415-423.
- CHEN Yanyuan, LIU Sheng, HE Jing, et al. Glycogen content fluctuation and association analysis with polymorphism of gys gene of *Sinonovacula constricta* in the Zhejiang population[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(3): 415-423.

Polymorphisms of glycogen synthase and glycogen phosphorylase genes and identification of glycogen content-associated molecular markers in *Crassostrea hongkongensis*

JIA Zhen, PENG Ye-shao, KONG Ling-xin, QIN Yue, LI Lin-jie, LIANG Liu, ZHU Peng, SHE Zhi-cai

(Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation, College of Marine Sciences, Beibu Gulf University, Qinzhou 535011, China)

Received: Jun. 27, 2022

Key words: *Crassostrea hongkongensis*; glycogen synthase; glycogen phosphorylase; SNP; FLDAS-PCR

Abstract: *Crassostrea hongkongensis* is a primary economic shellfish in the coastal areas of southern China. Glycogen content is one of the crucial indicators used to measure its quality. Based on transcriptome sequencing, the glycogen content of each individual of *C. hongkongensis* collected from Sandun and Dafengjiang was assessed by enzyme linked immunosorbent assay—sandwich technique. The gene polymorphisms and single nucleotide polymorphisms (SNPs) of glycogen synthase and glycogen phosphorylase of *C. hongkongensis* were analyzed using the fragment length discrepant allele specific PCR technology. The results showed that a total of 25 SNPs were validated, of which 4 SNPs (*Ch_gs680*, *Ch_gs1248*, *Ch_gp992*, and *Ch_gp1962*) were successfully genotyped in the experimental population. However, only SNP locus *Ch_GS680* was significantly associated with glycogen content ($P < 0.05$), as shown by association analysis with SPSS software, indicating that SNP *Ch_GS680* may be a potential molecular marker for the glycogen content feature of *C. hongkongensis*. These findings provide a foundation for the selection of new *C. hongkongensis* varieties with high glycogen content using molecular markers.

(本文编辑: 赵卫红)