

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)不同品系线粒体 SNP 的分型与鉴定*

张超^{1,2} 张海琪^{1,3} 许晓军¹ 何中央¹ 王春琳² 邵建忠³

(1. 浙江省水产引种育种中心 杭州 310012; 2. 宁波大学海洋学院 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211;
3. 浙江大学生命科学学院 杭州 310058)

提要 通过对四个中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)养殖品系(太湖品系、台湾品系、日本品系、黄河品系)的线粒体部分序列进行测序对比,筛选出不同品系中华鳖的品系特异性 SNP 位点,并设计特异性引物,利用高分辨率熔解曲线法进行 SNP 分型与鉴定。结果表明,所设计的 7 对引物组均可扩增出 80—150bp 大小不等的中华鳖线粒体序列,并成功用于中华鳖的 SNP 分型。在这 7 个位点中,其中可鉴定中华鳖日本品系和太湖品系的各 1 个,可鉴定台湾品系的有 2 个,可鉴定黄河品系的有 3 个。此方法能够快速、简便地鉴别以上四个中华鳖品系,为鉴别市场中出现的假冒鳖,并指导品种选育工作提供技术支持。

关键词 中华鳖; 线粒体; SNP; 种质鉴别

中图分类号 S941 doi: 10.11693/hyhz20140100026

单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)是指基因组上由于单个碱基的突变引起的核苷酸序列的多态性,突变形式包括转换、颠换和插入(缺失),是基因组中最常见的变异形式(Brookes *et al.*, 1998)。SNP 往往与一些特定的疾病、性状和群体相关联,因此其可作为一种有效的分子标记,常用于疾病的相关性分析(Polonikov *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2008; Downey *et al.*, 2009)、育种群体的筛选(Brunner *et al.*, 2000; Jeong *et al.*, 2004)以及相近物种的鉴定(Mabru *et al.*, 2004)等。目前常用于 SNP 分型的技术有单链构象多态性分析(SSCP)(Gonen *et al.*, 1999)、聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)(Fukuen *et al.*, 2002)、变性高效液相色谱法(DHPLC)(Wolford *et al.*, 2000)、单碱基延伸法(SBE)(Steemers *et al.*, 2006)、测序法(Griffin *et al.*, 2000)和高分辨率熔解曲线(High-resolution melting curve analysis, HRM)(Liew *et al.*, 2004)等。其中 HRM 法的原理是通过设计引物对变异位点序列进行 PCR 扩增,并在高分辨率

荧光染料饱和浓度下对 PCR 产物进行熔解曲线分析,根据扩增产物 T_m 值和熔解曲线的形状进行分析确定突变位点的基因型(Wittwer, 2009)。因此,HRM 法是近年来兴起的一种低成本、操作简单、并且高通量的 SNP 分型技术,已逐渐在水产中得到应用。

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)是我国的一种重要的水产养殖品种,目前已形成若干中华鳖养殖群体,且不同群体有其各自的养殖特性。由于缺乏有效的中华鳖分子遗传标记,中华鳖的种质资源开发与保护工作受到制约。目前不同中华鳖品系群体分子遗传差异的相关研究主要基于以 RFLP(李思发等, 1997; 张永正等, 2009)为主的第一代分子标记,以及以 RAPD(刘至治等, 2004)和 SSR(Zhu *et al.*, 2012)为主的第二代分子标记,但没有区分多种品系中华鳖的有效标记,也未见有第三代分子标记 SNP 的相关研究方面的报道。本研究通过 HRM 法对线粒体 DNA 上不同中华鳖品系的特异性 SNP 进行分型,以达到快速、准确鉴别中华鳖种质的目的,为中华鳖原良种

*浙江省水产重大科技专项, 2012C12907 号。张超, 硕士研究生, E-mail: chao_zhang_nbu@163.com

通讯作者: 张海琪, 博士, 教授级高工, E-mail: zmk407@126.com

收稿日期: 2012-05-27, 收修改稿日期: 2012-08-03

场建设和管理等提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 样品采集及 DNA 的提取

中华鳖日本品系群体: 采自浙江萧山省级中华鳖日本品系良种场, 2 龄, 规格为(750 ± 53)g 的健康个体;

太湖品系群体: 采自浙江德清省级中华鳖良种场, 2 龄, 规格为(475 ± 32)g 的健康个体;

黄河品系群体: 采自浙江绍兴国家级中华鳖原种场, 2 龄, 规格为(332 ± 37)g 的健康个体;

台湾品系: 采自浙江省德清县某养殖基地, 2 龄, 规格为(436 ± 44)g 的健康个体。

每个品系取 25 个个体, 其中 5 个用于引物设计研究, 20 个用于结果应用分析。分别取腿部肌肉组织, 用 Takara 基因组总 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, 将提取的 DNA 稀释至 100ng/μL, 并用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 保存于 -20°C 备用。

1.2 位点筛选和引物设计

采用彭巧玲等(2005)的方法对每个品系各 5 个个体的线粒体基因组部分序列进行 PCR 扩增测序, 用 Clustal X 2.0 (Larkin *et al*, 2007)软件进行序列对比分析, 用 BioEdit 软件分析品系特异性 SNP 位点并记录。用 Primer5.0 软件设计引物用于扩增 SNP 位点, 引物长度控制在 19—25bp, 扩增片段长控制在 80—150bp, 退火温度控制在 59—65°C。

1.3 HRM 分析和 SNP 分型

对每个品系的中华鳖选择 5 个个体进行分析, PCR 反应在 ABI 7500 Fast Real-Time System 仪器中进行。反应体系为 20 μL, 包含 2 × HRM MeltDoctor Master Mix 10 μL, 10 μmol/L 的引物各 0.4 μL, 模板 DNA 50ng, ddH₂O 补足至 20 μL。反应程序为 95°C 预变性 15min; 95°C 变性 15s, 60°C 退火/延伸 30s, 40 个循环。扩增产物以 0.05°C/s 的升温速率由 60°C 升

温至 95°C。反应结束后用 HRM 2.0 软件对熔解曲线进行分析并记录 T_m 值。

2 结果

2.1 候选 SNP 的筛选和引物设计

通过对 4 个品系共 20 只中华鳖的线粒体基因组序列进行比对, 共筛选出 22 个候选特异性位点。用 Primer5.0 引物设计软件设计出 7 对能够成功扩增出目的产物的引物(表 1)。

表 1 引物设计结果
Tab.1 The results of designed primers

引物组 序号	引物组序列信息(5'—3')	SNP 位点在线粒 体基因组 (AY687385)位置
1	F: GCCCCTCCACCAAACCTGTCATAC R: GGGTATCTAATCCAGTTTGTGTCT	486
2	F: GGGGCAAGTCGTAACAAGGTAAG R: GCTCAAAATCAAATAACCCCTGG	1064
3	F: TAAGTAGAGGTGAAAAGCCTAACGA R: CTGTTTCAATTTGGCTGTACCCTAA	1559
4	F: AAGCATTCTCATCAAACGAAAAGT R: AATCCTTCCTTTCTTGTGTTTGTGA	6879
5	F: CACATTCACACCAACTACACAACCTCT R: GTAGTCCTGTGAGTACGGTGGCT	8330
6	F: CGAAGCCACACTAATCCCAACA R: GAAGTAGGTCCAGCATTAGTCGT	10668
7	F: TATACTTCAACACCTTAATCCACCG R: CGTATCAAATTAGGTGCGTTAGGTG	13454

2.2 SNP 的 HRM 分型

通过对不同变异类型的序列的扩增产物进行 HRM 分析, 发现表 1 中所列 7 对引物的扩增片段均能成功进行 SNP 分型。对相同序列的 5 个个体的扩增产物的 T_m 值取平均值, 得出不同变异类型的位点相应扩增产物的 T_m 值(表 2)。不同变异类型的扩增片段 T_m 值差异均在 0.3°C 以上, 说明分型效果较明显。

表 2 七对引物的扩增变异类型及扩增产物 T_m 值
Tab.2 Types of variation and T_m values of the products amplified by seven pairs of primers

引物组序号	产物长度(bp)	变异类型	扩增产物 T_m 值(°C)			
			太湖品系	台湾品系	日本品系	黄河品系
1	118	T/C	75.80	75.43	75.43	75.43
2	126	C/T	77.54	77.54	77.54	77.08
3	149	C/A	75.33	74.93	75.33	75.33
4	136	C/T	78.39	78.39	78.39	77.92
5	83	T/C	74.30	74.78	74.30	74.30
6	82	A/G	73.00	73.00	73.00	73.46
7	96	T/C	76.33	76.33	76.93	76.33

通过比较 SNP 分型后 T_m 值差异, 均可用于中华鳖种质鉴定。其中: 引物 1 可用于鉴别太湖品系(图 1); 引物 2、引物 4 和引物 6 可用于鉴别黄河品系, 图 2 显

示了引物 2 的分型结果; 引物 3 和引物 5 可用于鉴别台湾品系, 图 3 显示了引物 3 的分型结果; 引物 7 可用于鉴别日本品系(图 4)。

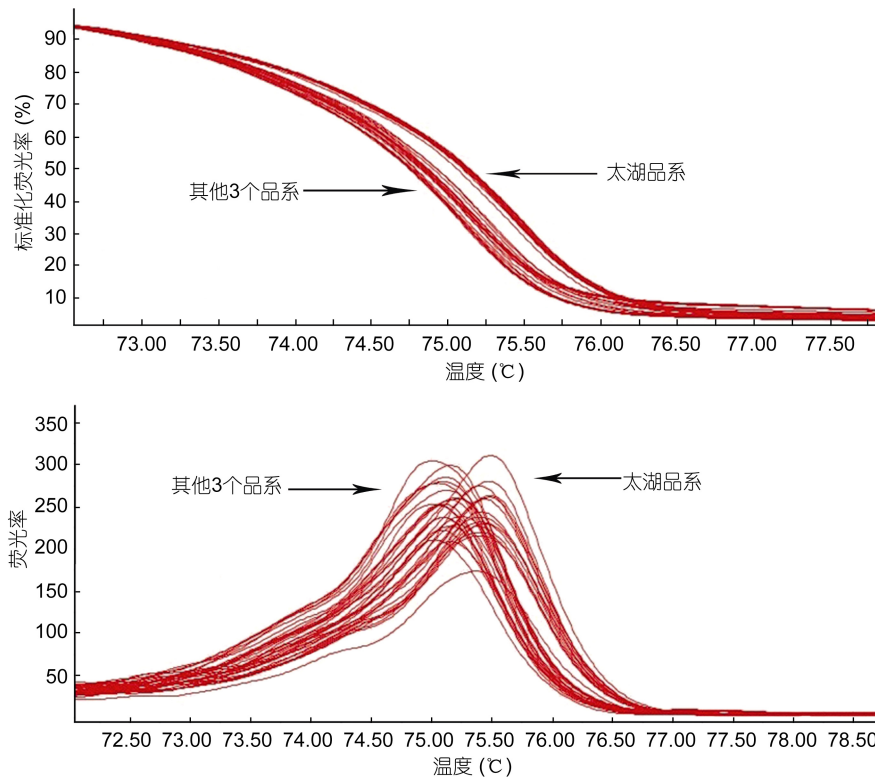


图 1 引物 1 中华鳖线粒体 486 位点的 SNP 分型结果

Fig.1 SNP typing result in the locus 486 of mitochondrial DNA of *P. sinensis* using primer 1

2.3 中华鳖的种质鉴别应用

根据本研究建立的 HRM 方法, 在不告知样本信息来源的情况下对上述 4 种不同原良种场来源的 80 只中华鳖进行种质鉴定, 结果准确度达 100%。

3 讨论

3.1 SNP 分型技术

目前, 用于 SNP 分型的方法较多(张必弦等, 2012), 但传统方法通量较低, 并且大多都要基于凝胶电泳或过柱的方法进行分辨, 操作繁琐, 不利于大量样品的 SNP 检测。双脱氧核苷酸测序法(Sanger 法)是最直观、最准确的方法, 是 SNP 检测的金标准, 但此方法需先进行 PCR 扩增之后对扩增产物进行测序, 检测所需时间长, 工作量大, 成本高。因此, 先通过测序方法发现未知 SNP 位点, 然后运用更快速的 SNP 分型方法检测未知样本中的这些 SNP, 是降低成本、提高效率的有效途径。与其它 SNP 分型技术相比, HRM 技术可一步完成对 SNP 的分型, 具有通量大、成本低、检测简便、省时的优点, 在检测的过程中通过加

入阳性标准对照进行对比, 可大大提高准确性, 因而其可作为检测已知 SNP 的良好选择。目前该技术广泛用于突变筛查(Nomoto *et al.*, 2006)和基因分型(Lochlainn *et al.*, 2011), 甚至被用于甲基化分析(Maat *et al.*, 2007)和基因拷贝数分析(Aten *et al.*, 2008)。本文通过设计特异性引物对 SNP 位点所在序列进行两步法 PCR 扩增, 随后进行 HRM 分析, 如图 1—图 4 所示, 不同碱基类型的序列 T_m 值差异明显, 分型效果直观明了。

3.2 中华鳖的线粒体遗传标记和种质鉴定

线粒体 DNA 具有母系遗传的特性, 能够反映出群体遗传特征、种群分化和种属关系等特点(Cano *et al.*, 1984), 并且由于其具有较高的突变率(Stoneking *et al.*, 1996), 因而常常被用于遗传分化等方面的研究。在中华鳖线粒体标记方面的研究主要集中于 Cyt *b* 和 12S rRNA 方面。陈合格等(2005, 2006)曾对中华鳖、砂鳖(*Pelodiscus axenaria*)和山瑞鳖(*Palea steindachneri*)的 Cyt *b* 和 12S rRNA 序列进行比较分析, 发现此三个物种可通过 PCR-RFLP 方法有效鉴别。在中华鳖种内

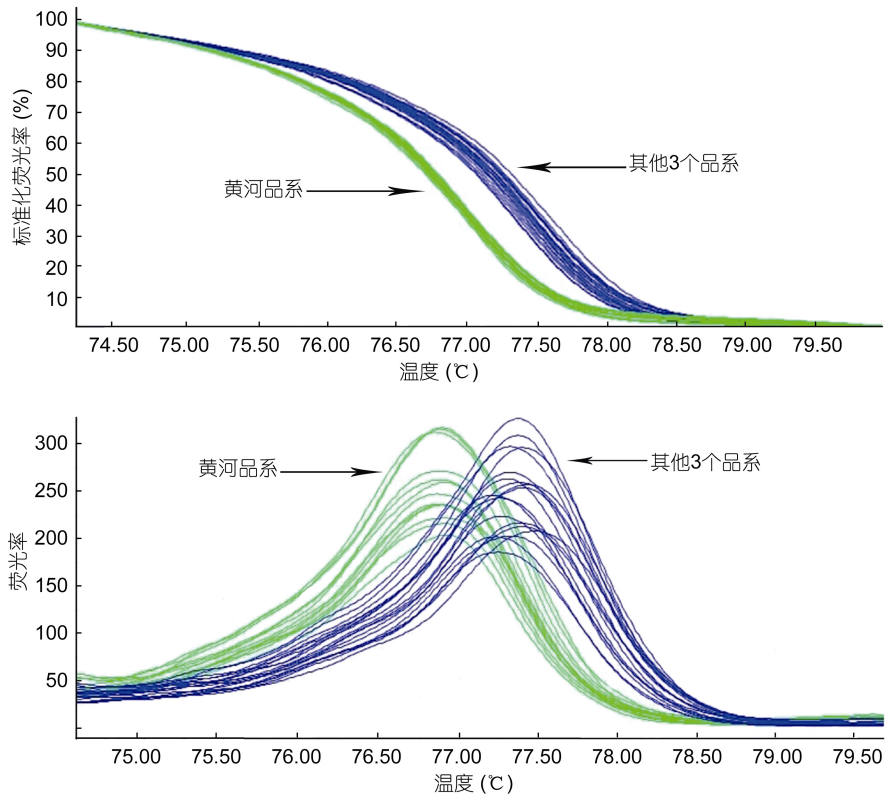


图 2 引物 2 中华鳖线粒体 1064 位点的 SNP 分型结果

Fig.2 SNP typing result in the locus 1064 of mitochondrial DNA of *P. sinensis* using primer 2

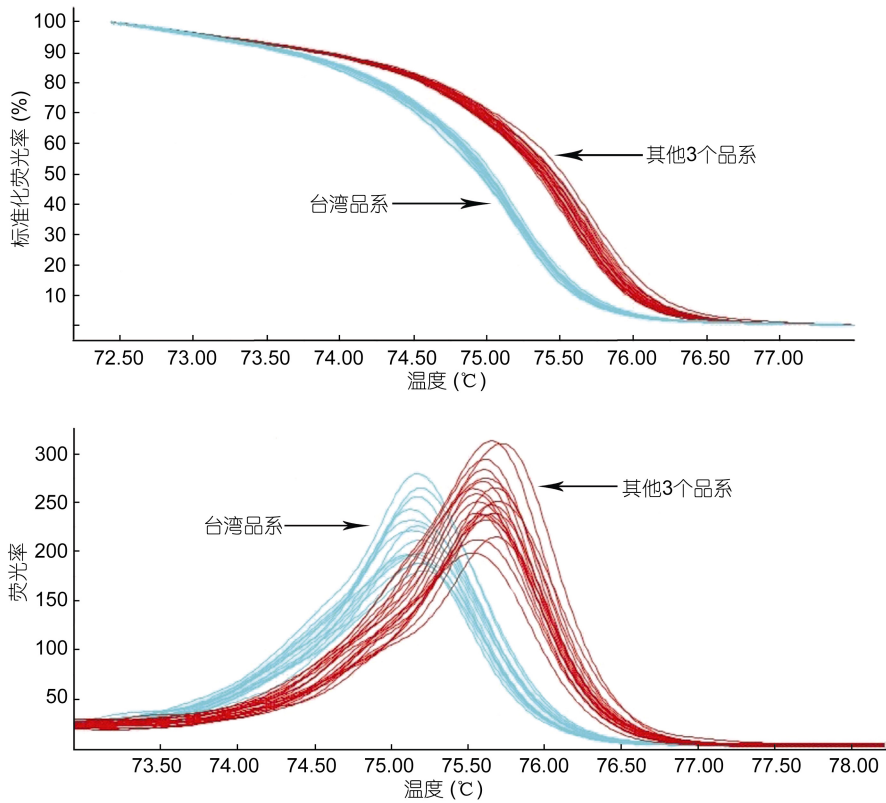


图 3 引物 3 中华鳖线粒体 1559 位点的 SNP 分型结果

Fig.3 SNP typing result in the locus 1559 of mitochondrial DNA of *P. sinensis* using primer 3

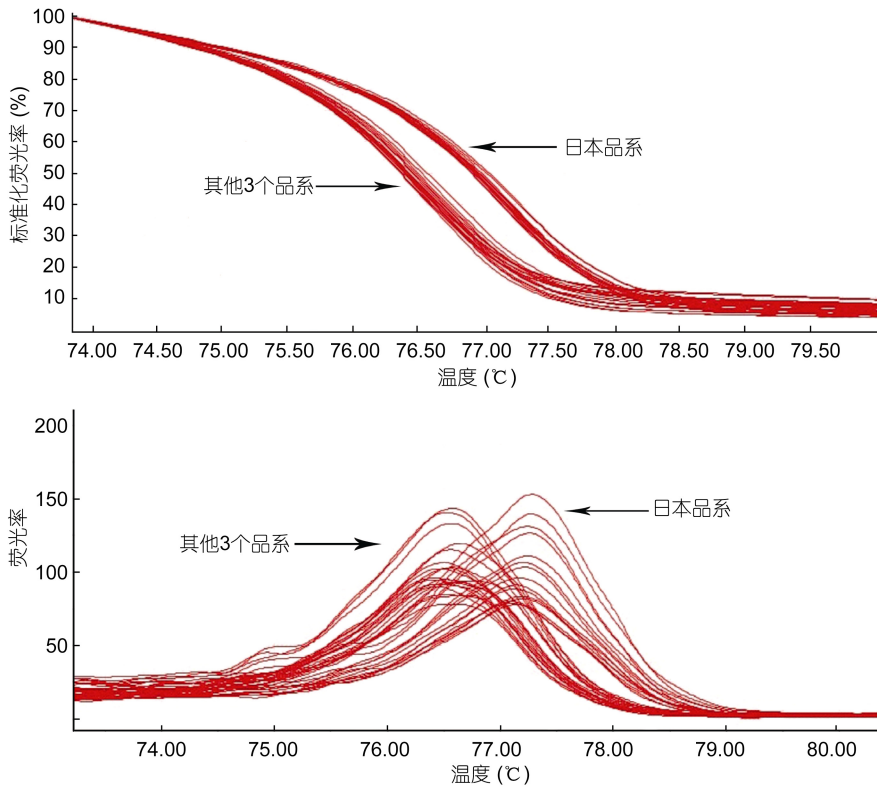


图4 引物7中华鳖线粒体13454位点的SNP分型结果

Fig.4 SNP typing result in the locus 13454 of mitochondrial DNA of *P. sinensis* using primer 7

研究方面,张永正等(2008)通过对五个养殖品系的中华鳖的 *Cyt b* 基因进行比较分析,表明日本品系和其它品系之间无共享单倍型,可作为日本品系鉴别标记,但是并未发现其它群体间的特异性分化标志;许晓军等(2012)通过对清溪乌鳖和日本品系两个中华鳖品系的12S rRNA 部分序列进行了比较分析,表明二者无共享单倍型,可作为二者区分的标记。但目前,系统地寻找不同品系中华鳖各自特异性标记的相关研究还未见报道。此外,在不同中华鳖品系间的SNP标记相关研究方面尚属空白。

以往的研究表明,线粒体SNP标记在用于种质鉴定方面具有可行性(Mabru *et al.*, 2004)。本研究对四个在形态上难以鉴别的中华鳖品系的线粒体进行了以寻找特异性SNP标记为目的的研究,对线粒体DNA进行了测序比对,找到了四个品系各自的特异性位点,并通过HRM的方法对这些SNP进行分型。如表2所示,位点468可用于鉴别太湖品系,1559和8330可用于鉴别台湾品系,13454可用于鉴别日本品系,1064、6879和10668可用于鉴别黄河品系。为了验证此鉴别方法的可信度,本研究用另外每个群体各20个个体进行了盲测验,检测准确率达100%,未

发现这些位点在品系内的分化,表明此方法用于中华鳖种质鉴定方面准确性高。此外,与细胞核DNA相比,线粒体DNA无重组杂合的现象,不会出现因杂合产生的熔解曲线的双峰,因此较核基因SNP相比,线粒体SNP的表现结果更直观明了。

总之,本研究建立的不同品系中华鳖的线粒体特异性SNP的HRM分型方法,可有效鉴别四种不同品系的中华鳖,此方法弥补了形态鉴别的不准确性,并为鉴别市场中出现的伪鳖,指导品种选育工作提供一定的技术支持。

参考文献

刘至治,蔡完其,李思发,2004.中华鳖五群体遗传变异的RAPD分析.水产学报,28(2):119—126
许晓军,张海琪,何中央,2012.中华鳖日本品系和清溪乌鳖线粒体12S rRNA基因部分序列分析.经济动物学报,16(3):163—167

- 李思发,吕国庆,李晨虹等,1997.华东地区中华鳖地方种群mtDNA多态分析.中国水产科学,4(3):1—6
张必弦,朱延明,来永才等,2012.单核苷酸多态性(SNP)的研究进展.安徽农业科学,40(21):10755—10756
张永正,张海琪,何中央等,2008.中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)5个不同地理种群细胞色素*b*基因序列变异及种群遗传结构分析.海洋与湖沼,39(3):235—239
张永正,张海琪,黄利英等,2009.中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)不同种群酪氨酸酶(TYR)基因的克隆及其多态性分析.海洋与湖沼,40(3):361—366
陈合格,刘文彬,李建中等,2006.三种鳖线粒体DNA细胞色素*b*基因序列的比较分析.水生生物学报,30(4):380—385
陈合格,刘文彬,张轩杰,2005.中华鳖与砂鳖线粒体DNA 12S rRNA基因序列的比较分析和分子鉴定标记.水产学报,29(3):318—322
彭巧玲,蒲友光,王志方等,2005.中华鳖线粒体基因组序列分析.中国生物化学与分子生物学报,21(5):591—596
Aten E, White S J, Kalf M E *et al.*, 2008. Methods to detect CNVs in the human genome. Cytogenetic and Genome Research, 123(1—4):313—321
Brookes A, Day I, 1998. SNP attack on complex traits. Nature Genetics, 20(3):217—218
Brunner S, Keller B, Feuillet C, 2000. Molecular mapping of the

- Rph7.g leaf rust resistance gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101(5—6): 783—788
- Cano R L, Brown W M, Wilson A C, 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics*, 106: 479—499
- Downey P M, Petro R, Simon S J *et al*, 2009. Identification of single nucleotide polymorphisms of the human metabotropic glutamate receptor 1 gene and pharmacological characterization of a P993S variant *Biochemical. Biochemical Pharmacology*, 77(7): 1246—1253
- Fukuen S, Fukuda T, Maune H *et al*, 2002. Novel detection assay by PCR-RFLP and frequency of the CYP3A5 SNPs, CYP3A5*3 and *6, in a Japanese population. *Pharmacogenetics*, 12(4): 331—334
- Gonen D, Veenstra-Vander Weele J, Yang Z *et al*, 1999. High throughput fluorescent CE-SSCP SNP genotyping. *Mol Psychiatry*, 4(4): 339—343
- Griffin T J, Smith L M, 2000. Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Trends Biotechnol*, 18(2): 77—84
- Jeong S C, Maroof M A S, 2004. Detection and genotyping of SNPs tightly linked to two disease resistance loci, Rsv1 and Rsv3, of soybean. *Plant Breeding*, 123(4): 305—310
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P *et al*, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947—2948
- Liew M, Pryor R, Palais R *et al*, 2004. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem*, 50(7): 1156—1164
- Lochlainn S O, Amoah S, Graham N S *et al*, 2011. High Resolution Melt (HRM) analysis is an efficient tool to genotype EMS mutants in complex crop genomes. *Plant Methods*, 7(1): 43
- Maat W, van der Velden P A, Out-Luiting C *et al*, 2007. Epigenetic inactivation of RASSF1a in uveal melanoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(2): 486—490
- Mabru D, Douet J P, Mouton A *et al*, 2004. PCR-RFLP using a SNP on the mitochondrial Lsu-rDNA as an easy method to differentiate *Tuber melanosporum* (Perigord truffle) and other truffle species in cans. *International Journal of Food Microbiology*, 94(1): 33—42
- Nomoto K, Tsuta K, Takano T *et al*, 2006. Detection of EGFR mutations in archived cytologic specimens of non-small cell lung cancer using high-resolution melting analysis. *American Society for Clinical Pathology*, 126(4): 608—615
- Polonikov A V, Ivanov V P, Solodilova M A *et al*, 2008. A common polymorphism G-50T in cytochrome P450 2J2 gene is associated with increased risk of essential hypertension in a Russian population. *Disease Markers*, 24(2): 119—26
- Steemers F J, Chang W H, Lee G *et al*, 2006. Whole-genome genotyping with the single-base extension assay. *Nat Methods*, 3(1): 31—33
- Stoneking M, Soodyall H, 1996. Human evolution and the mitochondrial genome. *Current Opinion in Genetics & Development*, 6(6): 731—736
- Wittwer C T, 2009. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat*, 30(6): 857—859
- Wolford J K, Blunt D, Ballecer C *et al*, 2000. High-throughput SNP detection by using DNA pooling and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). *Hum Genet*, 107(5): 483—487
- Wong C, Kanetsky P, Raj D, 2008. Genetic polymorphisms of the RAS-cytokine pathway and chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*, 23(7): 1037—1051
- Zhu L M, Li Z Q, Li J L *et al*, 2012. Genetic diversity of farmed Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) evaluated from microsatellite analysis. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(8): 1217—1222

IDENTIFICATION OF DIFFERENT STRAINS OF *PELODISCUS SINENSIS* BY USING HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) ANALYSIS OF SNPS IN MITOCHONDRIAL DNA

ZHANG Chao^{1,2}, ZHANG Hai-Qi^{1,3}, XU Xiao-Jun¹, HE Zhong-Yang¹, WANG Chun-Lin², SHAO Jian-Zhong³

(1. Zhejiang Fisheries Introduction and Breeding Center, Hangzhou 310012, China; 2. School of Marine Science, Ningbo University, Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 3. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Partial sequences of mitochondrial DNA from four *Pelodiscus sinensis* strains (Taihu Lake, Taiwan, Japanese, and Huanghe River strains) were amplified and sequenced to locate strain-specific SNPs. Corresponding primers were designed and high-resolution melting (HRM) technique employed for genotyping these SNPs. Seven SNPs were detected by HRM, whose length of amplified DNA sequence ranged from 80bp to 150bp, of which one was the Taihu Lake strain specific, two specific to the Taiwan strain, one to Japanese strain, and three to the Huanghe River strain. This method is fast and simple, and may offer a technical support to the strain identification and breeding of *P. sinensis* in practice.

Key words *Pelodiscus sinensis*; mitochondrial; SNP; germplasm identification