

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20191205003

http://www.yykxjz.cn/

韩旭, 何玉英, 李健, 张海恩, 周雨欣. 中国对虾 *NAGase* 基因 SNP 标记的筛选及与耐高 pH 性状的关联分析. 渔业科学进展, 2021, 42(1): 124–133

Han X, He YY, Li J, Zhang HE, Zhou YX. Correlation between the SNP of *NAGase* gene and susceptibility to high pH stress in *Fenneropenaeus chinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(1): 124–133

中国对虾 *NAGase* 基因 SNP 标记的筛选及与耐高 pH 性状的关联分析*

韩旭^{1,3} 何玉英^{2,3①} 李健^{2,3} 张海恩³ 周雨欣^{1,3}

(1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛 266071)

摘要 为探究 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶基因(*NAGase*)对中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)耐高 pH 性状的影响,本研究采用直接测序法及实时荧光定量 PCR 法检测 *FcNAGase* 的多态性,并分析其与中国对虾耐高 pH 性状的相关性。通过直接测序,在 *FcNAGase* 上共检测到 29 个潜在的 SNP 位点,分布频率为 1.13/100 bp,其中,内含子的突变频率为 0.35/100 bp,外显子的突变发生频率为 0.78/100 bp。通过荧光定量 PCR 方法在中国对虾耐高 pH 性状分离群体中共检测到 14 个具有多态性的 SNP 位点,其中,观测杂合度(H_o)为 0.2581~0.9390,期望杂合度(H_e)为 0.0595~0.4490,多态信息含量(PIC)为 0.0574~0.3731;利用卡方检验进行关联性分析,发现 2 个与中国对虾耐高 pH 性状显著相关的位点($P < 0.05$),分别为 P12 ($P=0.036$)和 P27 ($P=0.018$),本研究结果可为中国对虾分子标记辅助育种研究提供基础数据和方法。

关键词 中国对虾; *NAGase* 基因; 耐高 pH 性状; SNP 位点

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)01-0124-10

pH 是反映水体水质状况的一个重要指标,正常海水 pH 值一般维持在 7.8~8.5,养殖过程产生的残饵及粪便会增加水体的氮磷营养盐含量,使养殖水体富营养化,藻类随之会产生过度的光合作用,水污染、极端天气等都会造成海水 pH 值升高(Herbeck *et al.*, 2013; 李瑞萍等, 2015; Li *et al.*, 2019)。pH 是养殖过程中主要的非生物胁迫因子之一,当水体 pH 偏离水生生物生存的适宜范围,会引起水生生物的应激反应,

特别是持续较高 pH 刺激会增加水生生物的抗氧化酶活性(王芸等, 2011),引起严重的细胞凋亡(Li *et al.*, 2019)和生物 DNA 损伤(Wang *et al.*, 2009),生物体内的 Na^+/H^+ 交换体(NHE) (李政道等, 2018)、质子泵(H^+ -ATPase) (胡硕等, 2019)、碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CA) (Liu *et al.*, 2015)等相关离子调控酶的活性发生改变,进而导致对虾生长缓慢、免疫力降低,感染疾病的几率增加(Li *et al.*, 2008)。

* 现代农业产业技术体系(CARS-48)、山东省泰山产业领军人才工程项目(LJNY2015002)、国家自然科学基金(31772842)和山东省重点研发计划项目(2019QYTPY022)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System (CARS-48), Program of Shandong Leading Talent (LJNY2015002), National Natural Science Foundation of China (31772842), and Key Research and Development Program of Shandong Province (2019QYTPY022)]. 韩旭, E-mail: 137363489@qq.com

① 通讯作者: 何玉英, 研究员, Email: heyy@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2019-12-05, 收修改稿日期: 2019-12-29

N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶(*NAGase*)又称壳二糖酶,是几丁质酶系的一种(Broadway *et al.*, 1995),在免疫、蜕皮和消化几丁质食物中发挥重要作用(Xie *et al.*, 2010),经常作为氧化应激反应的指示酶(Gabai *et al.*, 2004; Corsi *et al.*, 2010)。吕艳杰等(2018)研究表明,1-苯甲基-5-[(E)-2,6-二甲基-1,5-庚二烯](KK-42)处理会加速日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) *NAGase* 酶活力的表达,加快旧表皮的降解,从而缩短对虾蜕皮周期;Sun 等(2018)研究发现,脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) *NAGase* 主要在表皮和肝胰腺中表达,且在蜕皮期表达量最高。在高 pH 环境下,水体中的金属离子的溶解会受到影响(Tucker *et al.*, 2008)。Xie 等(2009)研究发现, Zn^{2+} 通过与组氨酸或半胱氨酸残基结合,会改变凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) *NAGase* 酶的活性和构象。Mesquita 等(2015)研究镉处理的青蟹(*Carcinus maenas*),其能够通过 *NAGase* 酶的螯合作用增强其耐受性。Latif 等(1994)和刘金生等(2016)研究表明,在高碱环境下,甲壳动物蜕皮更频繁。由此推测,在高 pH 胁迫下,中国对虾 *NAGase* 也参与一定的免疫调控作用。

单核苷酸多态性位点(Single nucleotide polymorphisms, SNPs)是指在基因组水平上由于单个核苷酸突变使得 DNA 序列的多态性增加(Wang *et al.*, 1998)。SNPs 作为遗传标记有位点数量多、多态性丰富(Kwok *et al.*, 1996)、能稳定遗传、能联合 GWAS 进行分析及检测方法简单、快速的优势(Yang *et al.*, 2012)。SNP 作为 DNA 分子标记在很多水产动物研究中得到应用,如海湾扇贝(*Argopecten irradians*) (Meng *et al.*, 2017)和文蛤(*Meretrix meretrix*) (Dai *et al.*, 2017)的生长性状,斑马鱼(*Danio rerio*)的低温耐受性(王倩等, 2015)、凡纳滨对虾的繁育性状(王冉等, 2018)、罗氏沼虾的免疫力(唐修阳等, 2019)、中国对虾抗 WSSV 能力(逢锦菲等, 2013)等性状相关 SNP 标记的筛选,但有关中国对虾耐高 pH 胁迫的 SNP 标记筛选未见报道。

本研究基于高 pH 胁迫中国对虾的转录组数据库筛选出响应高 pH 胁迫的基因——*NAGase*, 对该基因预测的 52 个 SNP 位点进行筛选、验证及与耐高 pH 性状的关联分析,以期获得与耐高 pH 性状相关的 SNP 标记,为中国对虾耐高 pH 性状新品种(系)的培育提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用中国对虾“黄海 3 号”来自山东省潍坊

昌邑市海丰水产养殖有限责任公司,体长为(7.25 \pm 1.32) cm,体重为(4.75 \pm 2.42) g,约 400 尾,置于室内养殖池暂养 7 d,暂养期间连续充气,每天按时换水清污,换水量约为总体积的 1/3;每天按照中国对虾体重的 5%投喂配合饲料,定时投喂 2 次。实验期间,海水温度为 27 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C,盐度为 32~35, pH 8.14~8.22。

在 4 m \times 2 m 的水泥池中,使用 1 mol/L 的 NaOH 调节海水 pH。整个实验期间,每日定时采用 YSI 水质分析仪测定并及时校正海水 pH 至 9.3,变化幅度不超过 0.05。当海水的 pH 相对稳定时开始实验。实验期间,将 400 尾对虾放入实验池中,观测对虾存活、摄食及活动情况,发现身体侧躺、对外界刺激没有反应时,及时捞出。胁迫实验早期死亡的 48 尾和后期死亡的 48 尾对虾分别作为敏感组和抗性组。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用传统的酚-氯仿法提取中国对虾肌肉基因组 DNA,用超微量紫外可见分光分析仪与 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,稀释至 30 ng/ μ l,置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.2.2 直接测序法筛选中国对虾 *NAGase* 基因 SNP 位点 在 NCBI 库中查找中国对虾 *NAGase* 基因登录号为 DQ280379.1,总长为 2197 bp,其中,ORF 为 1902 bp,5'非编码区(5'-UTR)为 70 bp,3'非编码区(3'-UTR)为 225 bp,编码 633 个氨基酸。利用 Primer 5.0 软件设计扩增 *FcNAGase* 序列全长的引物,要求扩增的相邻 PCR 产物有重叠的部分,以确保内含子部分的有效扩增,进而筛选到 *FcNAGase* 上全部的 SNP 位点。共设计 11 对引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,扩增成功引物信息见表 1。

1.2.3 PCR 扩增和产物检测 随机选取高 pH 胁迫敏感组和抗性组各 6 个样品 DNA 进行混合,作为 PCR 反应的模板,用 2 \times Taq Plus Master Mix II (Dye Plus)酶(南京诺唯赞)进行扩增。PCR 体系总体积 20 μ l,酶 10 μ l,上下游引物各 1 μ l (10 μ mol/L),混合模板 2 μ l,去离子水 6 μ l。反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,挑选明亮且单一的条带送生工生物工程(上海)测序。

1.2.4 测序结果及 SNP 位点的初步确定 测序结果使用软件 ContigExpress 进行拼接,确定是否有内含子存在,是否符合 GT-AG 原则;根据测序结果的峰图,清晰且有明显双峰的位点,即为潜在的 SNP 位点。

1.2.5 荧光定量 PCR 法(qPCR)验证及位点分型

通过 qPCR 生长曲线和熔解曲线的结果进行 SNP

表1 普通 PCR 引物设计
Tab.1 List of common PCR primers

编号 No.	引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	退火温度 Annealing temperature	设计长度 Design length (bp)	产物长度 Product length (bp)
1	1F	GCCAGCGTTCCTGTAGTCAT	61	158	486
	1R	CACTGGTTCAGGGAGGTCG			
2	2F	GCCACGACCTCCCTGAACCA	58	632	632
	2R	TGGGAGTCGGTGATGTGCC			
3	5F	CATCGTCTCTCACACTCTCG	54	992	1128
	5R	GATCTGGATGATGTACTTAGTGG			
4	6F	TGTGTAGAGCCTCCTTGCG	57	566	694
	6R	TCAGGTCAGTGGCGATGT			
5	8F	TGAATCTCAACTGCTGGAAC	54	712	846
	8R	ATCCTTGGTGAACGCCTT			
6	9F	GTACCTCGACCCCACTAAGT	56	502	634
	9R	GTGAACGCCTTTGAGGTAAC			

分型,参考单志新等(2005)基于荧光定量 PCR 扩增反应的 SNP 测定方法,在 2 条特异性引物的 3'端倒数第 3 位引入错配的碱基。根据潜在的 SNP 位点设计特异性引物,随机抽取的 12 个 DNA 样品作为模板进行定量 PCR 反应,验证特异性引物是否有效扩增,可以用于分型的特异性引物见表 2。

PCR 体系总体积 10 μ l: 酶 5 μ l, Dye2 为 0.2 μ l, 模板 DNA 4 μ l (30 ng/ μ l), 上下游引物各 0.4 μ l (10 μ mol/L)。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 35 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 min, 60 $^{\circ}$ C 1 h, 95 $^{\circ}$ C 15 min。qPCR 引物验证,以 P2 (T206G)点为例,由熔解曲线(图 1)可知峰图单一,没有其他杂峰,可判定 P2 的特异性引物组可以进行有效扩增。用此标准验证其余组特异性引物。由产物的 C_t 值大小(图 2)来判断位点的基因型,当二者 C_t 差值大时, C_t 小的即为 SNP 特异性引物对应碱基的纯合,当二者 C_t 接近或差值小于 3 时即为杂合子。红色和黄色的生长曲线分别为特异性引物 P2m、P2w 分别与 P2r 组合的结果见图 2,对应基因型分别为 TT、GG 和 GT。成功分型的特异性引物组信息见表 2。用敏感组和抗性组各 48 个样品进行 SNP 位点的定量分型。

1.2.6 SNPs 位点的多样性分析及与耐高 pH 性状的关联分析 根据 SNPs 位点的分型结果,统计各基因型频率和基因频率,以 PopGene 32(Ver 1.31)和 PIC-Calc 0.6 软件计算观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、最小等位基因频率(MAF)、有效等位基因数(N_e)和哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)等遗传多样性的指标,根据 Botstein 等(1980)

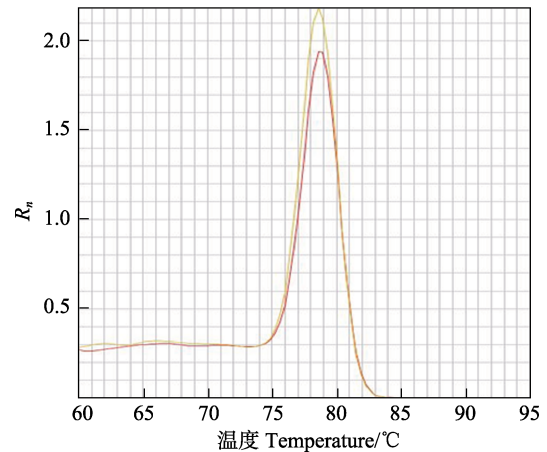


图1 *FcNAGase* 的 P2(T206G)位点的熔解曲线
Fig.1 Melting curve plots of *FcNAGase* P2(T206G)

划分的原则,低度多态性 $PIC < 0.25$, 中度多态性 $0.25 < PIC < 0.50$, 高度多态性 $PIC > 0.50$ 。利用 SPSS 17.0 对分型结果进行卡方检验, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 基因组 DNA 提取结果

敏感组和抗性组各 48 个样品提取 DNA,电泳结果如图 3 所示,主带清晰、完整,无杂带及拖带现象,满足后续实验要求。

2.2 SNP 位点的初步筛选

利用混合模板进行普通 PCR 扩增,共扩增出 6 条条带(图 4),条带明亮,其中,条带 2 与预期产物

表 2 荧光定量 PCR 引物设计(特异性引物)
Tab.2 Primers for real-time PCR (specific primer)

位点 Position	引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	位点 Position	引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
P2	P2m	TCGTGTGGCCTCACCgCT	P17	P17m	ATATAATGAACCGTTGGTGAAACtGT
	P2w	TCGTGTGGCCTCACCgCG		P17w	ATATAATGAACCGTTGGTGAAACtGA
	P2r	CAGGAGGGGACACACCGC		P17r	CCGCAAGGAGGCTCTACACA
P5	P5m	AGTACGAGGAGGGCGTgAC	P18	P18m	CGTTGRTGAAACAGWAGCCAcAC
	P5w	AGTACGAGGAGGGCGTgAT		P18w	CGTTGRTGAAACAGWAGCCAcAT
	P5r	CTCGAGGTGTCCAGGAGGGT		P18r	TTAGTGGGGTCGAGGTACTG
P6	P6m	TGCTGTCATCAGCCACCcTA	P20	P20m	TGTAGGAGCCTTGGCAGaCT
	P6w	TGCTGTCATCAGCCACCcTG		P20w	TGTAGGAGCCTTGGCAGaCC
	P6r	GGAGTCGGTGATGTGCCAGT		P20r	TTAGTGGGGTCGAGGTACTG
P9	P9rm	GAATATCGGCAGTGAATAGtTG	P21	P21m	CAACCCCAATATGTACGACcTT
	P9rw	GAATATCGGCAGTGAATAGtTT		P21w	CAACCCCAATATGTACGACcTC
	P9f	ACTGGCACATCACCGACTCC		P21r	GCTTACTCTACCTCATCTCCTCCGT
P12	P12m	TATGAAATGGTCCAATAATTCATgCA	P24	P24m	CAGCTGGATGGACGAGtAC
	P12w	TATGAAATGGTCCAATAATTCATgCC		P24w	CAGCTGGATGGACGAGtAT
	P12r	CCAAGGCTCCTACAAGGCAAAG		P24r	GGAAGATGCTCCACTGGTTGT
P13	P13rm	GCTTCAGTGTATAGATTCATTAGCAGtGG	P27	P27m	ACTTGACCGAGGAAGGCgGT
	P13rw	GCTTCAGTGTATAGATTCATTAGCAGtGA		P27w	ACTTGACCGAGGAAGGCgGC
	P13f	GTGGCGGTGGGGAGAGG		P27r	TCAGGTCAGTGGCGATGT
P14	P14m	TGTCAACCTCTGCTAATGAATCaAT	P29	P29m	ACTTCCGCGTCATCTTCaCT
	P14w	TGTCAACCTCTGCTAATGAATCaAA		P29w	ACTTCCGCGTCATCTTCaCC
	P14r	CGCAAGGAGGCTCTACACAGT		P29r	TCAGGTCAGTGGCGATGT

注: 表格中的小写字母是人为错配的碱基

Note: The lowercase letters in the table are mismatched bases

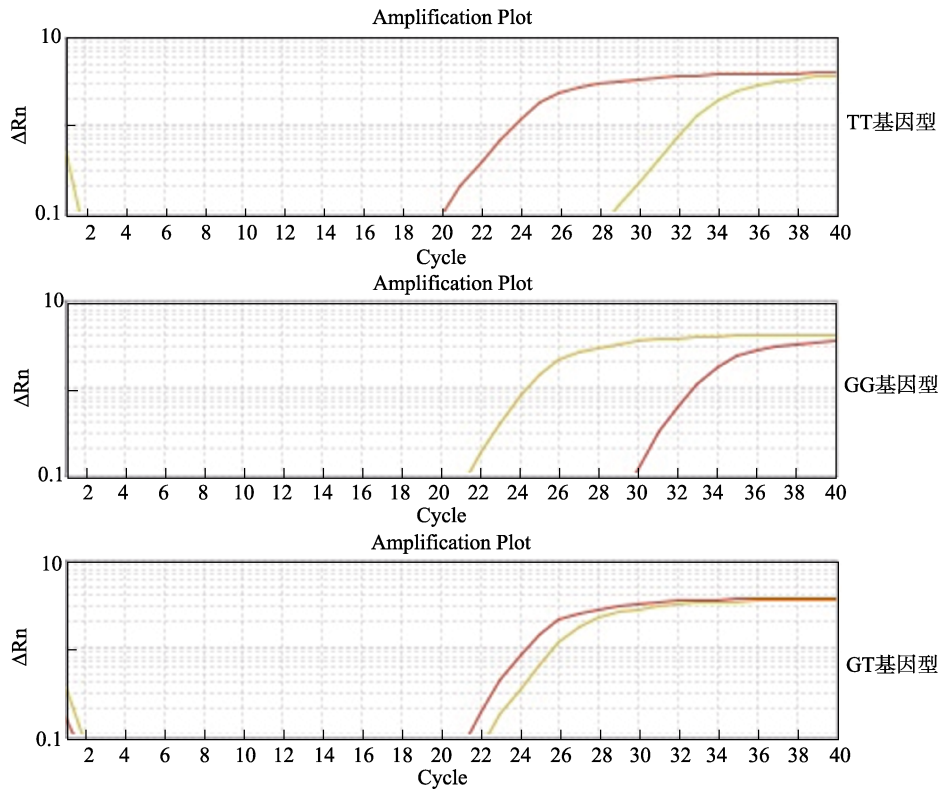


图 2 荧光定量 PCR 生长曲线超过阈值(C_t)表明特定产物的形成

Fig.2 PCR growth curves that exceed the threshold fluorescence (C_t) indicate specific product formation

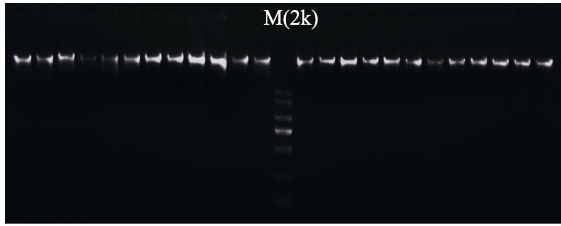


图 3 中国对虾基因组 DNA 电泳图谱
Fig.3 Gel electrophoresis of *F. chinensis* genome DNA

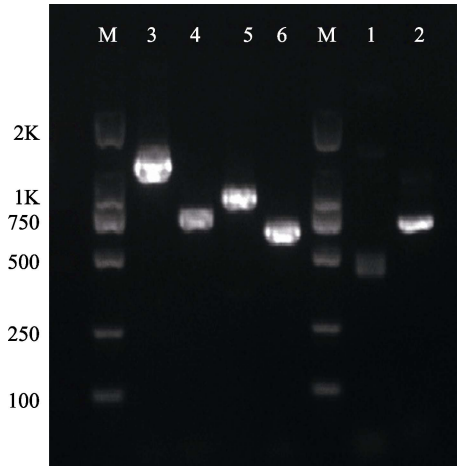


图 4 PCR 产物的电泳图谱
Fig.4 Gel electrophoresis of PCR products

1~6 代表 6 对普通 PCR 引物, M 为 Marker
1~6 represents 6 pairs of common PCR primers;
M: Marker

长度相同, 其余 5 个扩增产物均超出预期的产物长度。将 PCR 产物及所对应的引物送生工生物工程(上海)测序。

将测序结果利用 ContigExpress 软件进行拼接, *FcNAGase* 的开放阅读框(ORF)的 DNA 序列全长为

2544 bp, 包含 5 个外显子和 4 个内含子。且外显子和内含子边界都符合 GT-AG 原则。由 Gene Structure Display Server 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)绘制关于外显子-内含子的具体位置(图 5)。

根据测序结果的峰图, 将出现双峰的位点作为初步筛选 SNP 位点的依据, 共筛到 29 个潜在的 SNP 位点。以 No.2 引物的产物为例, 截取反向测序结果的峰图, 图中箭头标出的对应位点是 P2, 从测序结果看出, 峰图清晰, 无杂峰(图 6)。

根据测序峰图及拼接结果可知, 共筛选到 29 个潜在的 SNP 位点, 其中, 20 个为外显子突变, 9 个为内含子突变, SNP 位点分布频率为 1.13/100 bp, 其中, 内含子的突变频率为 0.35/100 bp, 外显子的突变频率为 0.78/100 bp。

2.3 qPCR 分型结果

对 29 个潜在的 SNP 位点用特异性引物进行荧光定量 PCR 分型, 有 14 个 SNP 位点分型成功, 具体信息见表 3。外显子区域中的突变存在 2 个错义突变, 分别为 P2 位点由 Ser(丝氨酸)突变为 Ala(丙氨酸), P9 位点由 Phe(苯丙氨酸)突变为 Leu(亮氨酸), 其余外显子上的位点均为同义突变。

2.4 *FcNAGase* 的 SNP 位点多态性分析

FcNAGase 的 14 个 SNP 标记的多态性分析结果见表 4。观测杂合度(H_o)为 0.1981~0.939, 期望杂合度(H_e)为 0.0595~0.499, 多态信息含量(PIC)为 0.0574~0.3731; 哈迪-温伯格平衡检验(HWE)结果表明, P21、P27 和 P29 位点极显著($P<0.01$)偏离哈迪-温伯格平衡, 其余 11 个 SNP 位点均符合哈迪-温伯

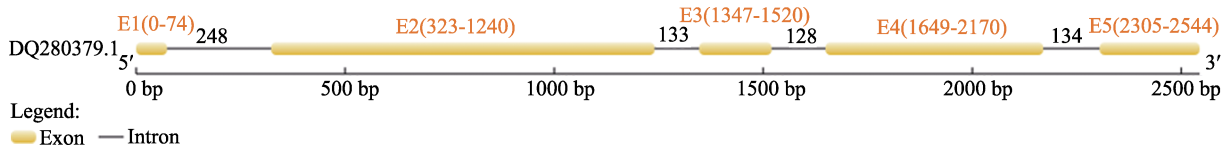


图 5 *FcNAGase* 基因全长
Fig.5 Nucleotide sequence of *FcNAGase*

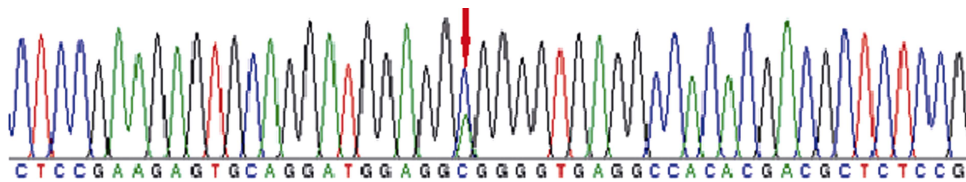


图 6 引物 No.2 反向测序结果(部分)
Fig.6 Primer No.2 reverse sequencing results (partial)

表 3 SNP 位点的具体信息
Tab.3 SNP site specific information

位点 Position	位置 Location	碱基类型 Type of base	突变类型 Type of mutation	
P2	外显子 1(453 bp)	T/G	Mm	Ser→Ala
P5	外显子 1(845 bp)	C/T	Sm	
P6	外显子 1(875 bp)	A/G	Sm	
P9	外显子 1(1085 bp)	C/A	Mm	Phe→Leu
P12	内含子 1(1268 bp)	A/C	N	
P13	内含子 1(1279 bp)	C/T	N	
P14	内含子 1(1297 bp)	T/A	N	
P17	内含子 1(1341 bp)	T/A	N	
P18	内含子 1(1349 bp)	C/T	N	
P20	外显子 2(1389 bp)	T/C	Sm	
P21	外显子 2(1449 bp)	T/C	Sm	
P24	外显子 3(1706 bp)	C/T	Sm	
P27	外显子 3(1847 bp)	T/C	Sm	
P29	外显子 3(1955 bp)	T/C	Sm	

注: Mm: 错义突变; Sm: 同义突变

Note: Mm: Missense mutation; Sm: Synonymous mutation

格平衡。其中, P9、P14 和 P18 位点为低度多态性, 其余 11 个 SNP 位点为中度多态性, 从多态性参数上能够看出, 选用的中国对虾人工选育群体“黄海 3 号”的遗传多样性较为丰富, 可进行后续的关联性分析。

2.5 *FcNAGase* 的 SNP 位点与耐高 pH 性状的关联分析

利用 SPSS 进行卡方检验, 分析 14 个 SNP 位点的基因分型结果与耐高 pH 性状之间的关联性, 结果见表 5。有的样品数少于 48 个, 由实验误差引起, 在众多样品中所占比例较小, 不影响数据分析。卡方检验结果表明, P12 和 P27 位点与中国对虾耐高 pH 性状相关($P < 0.05$); P21 和 P29 位点与中国对虾耐高 pH 性状无显著关系, 但这 2 个位点偏离哈迪-温伯格平衡, 表明在中国对虾“黄海 3 号”选育群体中受到了选择。

3 讨论

本研究基于高 pH 胁迫的中国对虾的转录组数据库, 筛选出响应高 pH 胁迫的 *NAGase* 基因, 通过直接测序法获得了 *FcNAGase* 的开放阅读框(ORF), 全长为 2544 bp, 由 5 个外显子和 4 个内含子组成, 与脊尾白虾 *EcNAG* (Sun *et al.*, 2018) 5 个外显子和 4 个内含子的结果一致。本研究首次在中国对虾中应用荧光定量法进行位点分型的方法, 成功得到 14 个 SNP

表 4 SNP 位点基因多态性分析
Tab.4 The analysis of gene polymorphism of SNPs

位点 Position	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	有效等位基因数 N_e	MAF	PIC	哈德-温伯格平衡 HWE
P2	0.4947	0.4932	1.9632	0.4316	0.3703	0.8111
P5	0.5217	0.4170	1.7085	0.2935	0.3287	0.1553
P6	0.5000	0.4862	1.9367	0.4096	0.3667	0.7825
P9	0.8191	0.2159	1.2735	0.1223	0.1916	0.1084
P12	0.5000	0.4821	1.9215	0.3989	0.3646	0.7179
P13	0.4615	0.4734	1.8896	0.3791	0.3600	0.1870
P14	0.8764	0.1362	1.1566	0.0730	0.1262	0.3660
P17	0.5312	0.4432	1.7886	0.3281	0.3437	0.5700
P18	0.9390	0.0595	1.0628	0.0305	0.0574	0.7995
P20	0.4737	0.4825	1.9231	0.4000	0.3648	0.3738
P21	0.3587	0.4813	1.9182	0.3967	0.3641	0.0013
P24	0.5579	0.4179	1.7115	0.2947	0.3293	0.5701
P27	0.2581	0.4990	1.9853	0.4570	0.3731	0.0000
P29	0.3626	0.4648	1.8596	0.3626	0.3554	0.0004
Mean	0.5468	0.3966	1.7213	0.3127	0.3068	
St. Dev	0.1981	0.1461	0.3162	0.1330	0.0992	

表 5 SNP 位点与耐高 pH 性状的关联分析
Tab.5 The correlation analysis of SNP loci with anti-high pH traits

位点 Position	基因型 Gene type	个体数		卡方检验		位点 Position	基因型 Gene type	个体数		卡方检验	
		Number of samples		Chi-square test				Number of samples		Chi-square test	
		敏感 Sensitivity	抗性 Resistance	χ^2	<i>P</i>			敏感 Sensitivity	抗性 Resistance	χ^2	<i>P</i>
P2	GG	17	13	0.633	0.915	P17	AA	5	4	0.406	0.816
	GT	22	26				AT	21	24		
	TT	8	9				TT	22	20		
P5	CC	25	18	2.794	0.247	P18	CC	35	42	2.247	0.134
	CT	18	26				CT	4	1		
	TT	3	2				P20	CC	9		
P6	AA	17	15	3.474	0.176	P21	CT	20	30	0.677	0.713
	AG	19	28				TT	18	14		
	GG	10	5				CC	14	12		
P9	AA	1	2	0.392	0.822	P24	CT	27	32	4.182	0.124
	AC	9	8				TT	4	3		
	CC	37	37				CC	25	20		
P12	AA	20	14	6.630	0.036*	P27	CT	16	26	7.994	0.018*
	AC	18	30				TT	5	2		
	CC	10	4				CC	13	3		
P13	CC	19	13	4.368	0.113	P29	CT	29	40	1.315	0.518
	CT	20	29				TT	4	4		
	TT	7	3				CT	13	16		
P14	AA	1	0	1.451	0.484	P29	CT	27	31		
	AT	6	5				TT	3	1		
	TT	35	42								

注: *表示显著相关($P < 0.05$)

Note: * denotes significant correlation ($P < 0.05$)

位点的基因型, 约占潜在位点的 50%, 推测剩余位点未分型成功的原因: 一是相邻 2 个 SNP 位点位置距离近, 影响特异性引物的设计; 二是人为引入的错配碱基, 提高了引物的特异性, 可降低 SNP 位点分型的假阳性, 但也会因为特异性太高, 使得引物不能成功扩增出特异条带, 导致位点不能成功分型, 所以该方法并不是对所有的 SNP 位点都能适用。但是, 该方法简单快速, 约 1 h 即可完成 48 个 DNA 样品的分型, 仅需要根据 C_t 值的大小即可判断分型结果。

分型成功的 14 个 SNP 位点与耐高 pH 性状的关联性分析显示, 位点 P12 与 P27 存在显著相关性 ($P < 0.05$)。P21 和 P29 极显著偏离哈迪-温伯格平衡 ($P < 0.01$)。可能的原因, 一是中国对虾“黄海 3 号”是经过人工多代选育的品种, 会影响碱基频率; 二是进行高 pH 胁迫实验的 400 尾对虾, 根据死亡时间划分敏感组和抗性组, 提取 DNA 的样品是分层的, 因此不符合哈迪-温伯格平衡。P21 位于外显子 2, P27 和

P29 位于外显子 3, 均属于同义突变。同义突变并没有在翻译过程中改变氨基酸的种类, 但会以其他方式影响蛋白质的翻译过程, 如: 在 mRNA 的水平上影响增强子的功能, 引起周边外显子剪切出现跳跃或者移码, 使得蛋白质序列缩短(杨军等, 2017), 以及蛋白质二级结构的改变(Shen *et al.*, 1999), mRNA 翻译速度的调整(Komar, 2007)等。P2 位点是丝氨酸(Ser)与丙氨酸(Ala) 2 种氨基酸的改变, Ser 是极性不带电荷的氨基酸, Ala 是非极性氨基酸, 会影响亲水性, 导致蛋白质水溶性发生改变, 具体对中国对虾耐高 pH 性状的影响还需要进一步研究; P9 位点是苯丙氨酸(Phe)与亮氨酸(Leu) 2 种氨基酸的改变, Phe 与 Leu 均为非极性氨基酸, 对 NAGase 蛋白的三维构造不会产生很大影响, 从而不会对蛋白相应功能产生很大改变。

pH 作为影响对虾生长的重要非生物因子之一, pH 值异常会严重影响对虾的体内细胞及整体水平上的 pH 平衡和相关离子的稳态(胡硕等, 2019), 培育高

pH 耐受性的对虾新品种是解决这一问题最直接的手段。陈华增等(2011)筛选得到中国对虾耐高 pH 负相关 2 个 SRAP 标记, 正相关 5 个 SRAP 标记。SRAP 是将序列特征性片段进行扩增, SNP 标记与 SRAP 标记相比, 出现频率高, 多态性丰富, 操作流程简单, 可进行大批量样品的筛选。可以利用 SNP 位点的多态性, 筛选与抗逆性状关联的 SNP 标记: 李西雷等(2012)研究三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)的 GPX 基因筛选得到 8 个 SNP 位点与抗病性状存在显著性差异; 薛宝宝等(2019)研究缢蛏(*Sinonovacula constricta*)的 HSP70 基因, 3 个 SNP 位点可作为耐高温遗传育种的候选分子标记。本研究获得 2 个耐高 pH 性状的分子标记。

耐高 pH 性状是由多基因调控的数量性状, 可以结合中国对虾高 pH 转录组中其余组分的数据结果, 如: 差异表达量、GO 分类、COG 分类注释和代谢通路注释(KEGG pathway)等(周贺等, 2014), 继续进行耐高 pH 性状的 SNP 位点标记的筛选工作。本研究中, 与中国对虾耐高 pH 的显著相关的 P12 和 P27 标记需要在不同遗传背景群体中验证; 有关 *FcNAGase* 的启动子区也可以再进一步扩增加以研究, 例如甲基化、SNP 位点的筛选等, 以期作为重要的分子标记在中国对虾耐高 pH 性状分子标记辅助育种中发挥作用, 结果有助于中国对虾耐高 pH 育种提供理论依据和资料。

参 考 文 献

- Botstein D, White RL, Skolnick M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314
- Broadway RM, Williams DL, Kain WC, *et al.* Partial characterization of chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidoflavus*. *Letters in Applied Microbiology*, 1995, 20(5): 271–276
- Chen HZ, Li J, Wang QY, *et al.* Sequence-related amplified polymorphism markers related to stress resistance traits in “Huanghai No.1” *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(6): 1243–1249 [陈华增, 李健, 王清印, 等. “黄海 1 号”中国明对虾抗逆性状 SRAP 标记. *中国水产科学*, 2011, 18(6): 1243–1249]
- Corsi MM, Massaccesi L, Dogliotti G, *et al.* O-β-N-acetyl-D-glucosaminidase in erythrocytes of Italian air force acrobatic pilots. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2010, 48(2): 213–216
- Dai P, Wang HX, Liu BZ. Mining and identification of SNP markers associated with growth traits in the clam *Meretrix meretrix*. *Aquaculture International*, 2017, 25(3): 1185–1196
- Gabai G, Testoni S, Piccinini R, *et al.* Oxidative stress in primiparous cows in relation to dietary starch and the progress of lactation. *Animal Science*, 2004, 79(1): 99–108
- Herbeck LS, Unger D, Wu Y, *et al.* Effluent, nutrient and organic matter export from shrimp and fish ponds causing eutrophication in coastal and back-reef waters of NE Hainan, tropical China. *Continental Shelf Research*, 2013, 57: 92–104
- Hu S, He YY, Li J, *et al.* Expression analysis of V-ATPase subunit c under high pH stress in *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(6): 1064–1074 [胡硕, 何玉英, 李健, 等. 中国对虾 V-ATPase 亚基基因的克隆及其在高 pH 胁迫下的表达分析. *中国水产科学*, 2019, 26(6): 1064–1074]
- Komar AA. SNPs, silent but not invisible. *Science*, 2007, 315(5811): 466–467
- Kwok PY, Deng Q, Zaker H, *et al.* Increasing the information content of STS-based genome maps: Identifying polymorphisms in mapped STSs. *Genomics*, 1996, 31(1): 123–126
- Latif MA, Brown JH, Wickins JF. Effects of environmental alkalinity on calcium-stimulated dephosphorylating enzyme activity in the gills of postmoult and intermoult giant freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1994, 107(4): 597–601
- Li CC, Chen JC. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 25(6): 701–709
- Li RP, Zhang XX, Liu CY, *et al.* Distribution characteristics and relationships of pH, nutrients, chlorophyll *a* and three sulfonamides in pond aquaculture water. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2015, 9(6): 2852–2588 [李瑞萍, 张欣欣, 刘卓杨, 等. 池塘养殖水体 pH、营养盐、叶绿素 *a* 及 3 种磺胺类抗生素分布特征及其相关性分析. *环境工程学报*, 2015, 9(6): 2852–2588]
- Li XL, Wang GL, Li JL. Identification of genomic structure and resistance trait associated SNP loci in glutathione peroxidase gene of *Hyriopsis cumingii*. *Hereditas*, 2012, 34(11): 1456–1464 [李西雷, 汪桂玲, 李家乐. 三角帆蚌 GPX 基因结构特征及抗性相关 SNP 的筛选. *遗传*, 2012, 34(11): 1456–1464]
- Li ZD, Li J, Ge QQ, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of Na⁺/H⁺-exchanger isoform 3 in *Fenneropenaeus chinensis* and its expression in response to pH stress. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(5): 46–54 [李政道, 李健, 葛倩倩, 等. 中国明对虾 NHE3 基因克隆及其在 pH 胁迫下的表达. *中国水产科学*, 2018, 25(5): 46–54]
- Li ZX, Wang JY, He, YY, *et al.* Comprehensive identification and profiling of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) microRNAs in response to high pH stress using Hiseq2000 sequencing. *Aquaculture Research*, 2019, 50(11): 3154–3162
- Liu JS, Wang J, Yue WC, *et al.* The effect of pH on the molting, growth and related gene expression in juvenile mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Freshwater Fisheries*, 2016, 46(4): 96–100 [刘金生, 王军, 岳武成, 等. 水体 pH 对中华绒螯蟹

- 幼蟹蜕壳生长及其相关基因表达的影响. 淡水渔业, 2016, 46(4): 96–100]
- Liu MQ, Liu SN, Hu YY, *et al.* Cloning and expression analysis of two carbonic anhydrase genes in white shrimp *Litopenaeus vannamei*, induced by pH and salinity stresses. *Aquaculture*, 2015, 448: 391–400
- Lv YJ, Guan JY, Du J, *et al.* Molecular cloning of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) gene and the effect of KK-42 on NAGase gene in *Macrobrachium nipponense*. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(5): 646–652 [吕艳杰, 关建议, 杜娟, 等. 日本沼虾N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶基因克隆及KK-42对其表达的影响. 水产学报, 2018, 42(5): 646–652]
- Meng XY, Wang HY, Qiu XM, *et al.* SNP s of myostatin (MSTN) gene and their association with growth traits in three bay scallop (*Argopecten irradians*) populations. *Aquaculture Research*, 2017, 48(2): 531–536
- Mesquita SR, Ergen ŞF, Rodrigues AP, *et al.* N-acetyl- β -d-glucosaminidase activity in feral *Carcinus maenas* exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology*, 2015, 159: 225–232
- Pang JF. High-throughout screening of SNP and its association with WSSV-resistance traits in *Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai No.2”. Master’s Thesis of Shanghai Ocean University, 2013 [逢锦菲. “黄海 2 号”中国对虾高通量 SNP 筛选及其与抗 WSSV 性状的关联分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013]
- Shan ZX, Tan HH, Yu XY, *et al.* A novel SNP typing based on real-time polymerase chain reaction amplification. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 21(6): 110–113 [单志新, 谭红红, 余细勇, 等. 基于荧光定量 PCR 扩增反应的 SNP 测定法. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(6): 110–113]
- Shen LX, Basilion JP, Stanton VP. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(14): 7871–7876
- Sun YY, Zhang JQ, Xiang JH, *et al.* Molecular characterization and function of β -N-acetylglucosaminidase from ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Gene*, 2018, 648: 12–20
- Tucker CS, D’Abramo LR. Managing high pH in freshwater ponds. Southern Regional Aquaculture Center, 2008
- Tang XY, Wang CC, Xiang J, *et al.* Mining and analysis of immune-related SNPs in transcriptome of *Macrobrachium rosenbergii*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(04): 153–156 [唐修阳, 王传聪, 项杰, 等. 罗氏沼虾转录组免疫相关 SNP 的挖掘与分析. 江苏农业科学, 2019, 47(04): 153–156]
- Wang DG, Fan JB, Siao CJ, *et al.* Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 1998, 280(5366): 1077–1082
- Wang R, Liu H. Preliminary study of SNP marker on spawning traits in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2018, 27(6): 825–832 [王冉, 刘红. 凡纳滨对虾繁殖性状的 SNP 分子标记筛选的初步研究. 上海海洋大学学报, 2018, 27(6): 825–832]
- Wang Q, You F, Xin MJ, *et al.* Correlation analysis between polymorphisms of *GSTM* gene and cold-tolerance trait in zebrafish, *Danio rerio*. *Marine Science*, 2015, 39(1): 1–7 [王倩, 尤锋, 辛梦娇, 等. 斑马鱼 *GSTM* 单核苷酸多态性与低温耐受性的相关分析. 海洋科学, 2015, 39(1): 1–7]
- Wang WN, Zhou J, Wang P, *et al.* Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2009, 150(4): 428–435
- Wang Y, Li J, Li JT, *et al.* Effects of pH stress on antioxidant system enzyme activities and gene expression of *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(3): 556–564 [王芸, 李健, 李吉涛, 等. pH 胁迫对中国明对虾抗氧化系统酶活力及基因表达的影响. 中国水产科学, 2011, 18(3): 556–564]
- Xie XL, Huang QS, Gong M, *et al.* Inhibitory kinetics of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Litopenaeus vannamei*) by zinc ion. *IUBMB Life*, 2009, 61(2): 163–170
- Xie XL, Hu YH, Wang LL, *et al.* Inhibitory kinetics of citric acid on β -N-acetyl-d-glucosaminidase from prawn (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(4): 674–678
- Xue BB, Meng DL, Ren HY, *et al.* *ScHsc70* gene SNP markers screening and correlation analysis for high temperature resistance of *Sinonovacula constricta* new variety “Shenzhen No.1”. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(12): 2439–2448 [薛宝宝, 孟德龙, 任泓好, 等. 缢蛏新品种“申浙 1 号”*ScHsc70* 基因 SNPs 筛查与耐高温性状的关联性分析. 水产学报, 2019, 43(12): 2439–2448]
- Yang J, Ferreira T, Morris AP, *et al.* Conditional and joint multiple-SNP analysis of GWAS summary statistics identifies additional variants influencing complex traits. *Nature Genetics*, 2012, 44(4): 369–375
- Yang J, Liu WQ, Li WL, *et al.* Study on analysis of synonymous mutation SNPs of APC gene in pathogenesis of familial adenomatous polyposis by bioinformatics technology. *Chongqing Yixue*, 2017, 46(2): 218–222 [杨军, 刘为青, 李文亮, 等. 利用生物信息学技术分析 APC 基因同义突变 SNP 在家族性腺瘤性息肉病发病机制的研究. 重庆医学, 2017, 46(2): 218–222]
- Zhou H, Li HN, Cai BH, *et al.* SNP mining and functional annotation in transcriptome of sand pear. *Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science)*, 2014, 31(2): 105–111 [周贺, 李浩男, 蔡斌华, 等. 砂梨果皮转录组 SNP 位点发掘及其功能注释分析. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2014, 31(2): 105–111]

Correlation between the SNP of *NAGase* Gene and Susceptibility to High pH Stress in *Fenneropenaeus chinensis*

HAN Xu^{1,3}, HE Yuying^{2,3}①, LI Jian^{2,3}, ZHANG Haien³, ZHOU Yuxin^{1,3}

(1. National Experimental Teaching Demonstration Center of Aquatic Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 3. Key Laboratory for Disease Control of Mariculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract To explore the effect of the beta-N-acetylglucosaminidase (*NAGase*) gene on the high pH tolerance of *Fenneropenaeus chinensis*, the single nucleotide polymorphism (SNP) of *FcNAGase* and its correlation with the high pH tolerance of *F. chinensis* were determined by direct sequencing and real-time fluorescent quantitative PCR. The results showed that 29 potential SNP loci were detected on the *FcNAGase* gene by direct sequencing, the distribution frequency was 1.13/100 bp, in which the mutation frequency of introns was 0.35/100 bp, and that of exons was 0.78/100 bp. Fourteen SNP loci were detected in the high pH tolerance population of *F. chinensis* using fluorescence quantitative PCR. The observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.2581 to 0.9390, the expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.0595 to 0.4490, and the polymorphism information content (PIC) ranged from 0.0574 to 0.3731. The chi-square test result revealed that two SNP loci were related to high pH tolerance traits ($P < 0.05$), namely P12 ($P = 0.036$) and P27 ($P = 0.018$). The results of this experiment provided basic data and methods for molecular marker assisted breeding of *F. chinensis*.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*; *NAGase* gene; High pH resistance; SNP site

① Corresponding author: HE Yuying, E-mail: heyy@ysfri.ac.cn