

doi: 10.7541/2018.035

文蛤*Smad1/5*基因克隆、时空表达及生长相关SNP位点筛查

池秋蝶^{1,2} 董迎辉² 姚韩韩² 林志华²

(1. 宁波大学海洋学院, 宁波 315211; 2. 浙江万里学院, 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室, 宁波 315100)

摘要: 为探讨*Smad1/5*基因在贝类生长发育中的调控作用, 利用RACE技术克隆获得文蛤*Smad1/5*(*Mm-Smad1/5*)基因的cDNA全长序列, 对其生物信息学、不同组织和不同发育时期时空表达特征进行分析, 并利用直接测序法分析了外显子区域SNP位点与生长性状的相关性。结果表明: *Mm-Smad1/5*的cDNA全长序列为1832 bp, 开放阅读框1380 bp, 编码459个氨基酸; 氨基酸多序列比对显示, *Mm-Smad1/5*蛋白与太平洋牡蛎*Smad5*、大西洋舟螺*Smad1*的一致性分别为83.7%和80.2%, 与人、鸡、非洲爪蟾等脊椎动物*Smad1*、*Smad5*氨基酸序列的一致性达到70.5%以上, 说明该基因具有较高的保守性; 结构域预测发现, *Mm-Smad1/5*含有*Smads*蛋白家族特有MH1、MH2两个高度保守结构域。荧光定量PCR(qRT-PCR)结果表明, *Mm-Smad1/5*基因在成体6个组织均有表达, 尤其在斧足、外套膜中表达量显著高于其他组织($P < 0.05$); *Mm-Smad1/5*基因在各发育时期广泛表达, 从原肠胚期开始大量表达, 一直持续到壳顶幼虫期, 而从眼点幼虫大量下降, 稚贝时期又有所上升。*Mm-Smad1/5*基因外显子区域SNP位点相关分析表明, 共发现了9个SNP位点, 其中936 G>T位点与文蛤的生长性状显著相关($P < 0.05$)。*Mm-Smad1/5*基因在文蛤生长发育中发挥重要调控作用, 可作为高产良种选育的候选基因, 而生长关联SNP位点分析将为文蛤分子标记辅助育种研究奠定重要基础。

关键词: 文蛤; *Smad1/5*; 基因克隆; 生长相关; SNP

中图分类号: S968.3; Q785

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2018)02-0277-07

*Smad*家族蛋白是细胞内重要信号转导蛋白, 直接参与转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β)超家族中成员如TGF- β 、骨形成蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMPs)、生长分化因子(Growth differentiation factor, GDF)、激活素(Activins)等多个信号的转导, 进而参与多种细胞的增殖、分化、迁移及凋亡等过程^[1]。*Smad*家族蛋白主要负责将细胞膜上TGF- β 信号从细胞外传递到细胞核内, 调控核内靶基因转录^[2]。*Smad*蛋白最初从果蝇(*Drosophila melanogaster*)^[3,4]中发现, 目前在哺乳动物中已发现至少有8个成员, 即*Smad1-8*^[5]。*Smad1*、*Smad5*蛋白主要被BMP/GDF受体磷酸化, 参与BMP/GDF信号通路的传导^[6]。目前, 有关*Smad1*、*Smad5*的功能研究已经很多, 如人(*Homo*

sapiens)^[7]、小鼠(*Mus musculus*)^[8]、家兔(*Oryctolagus cuniculus*)^[9]等, 诱导软骨和骨的形成及骨的修复, 在胚胎发育中中胚层的形成和发育、各种其他器官系统的发育和成型方面是必需的。关于*Smad1*和*Smad5*基因在软体动物的研究较少, 现有的研究表明: 贝类*Smad1/5*蛋白为高等动物*Smad1*和*Smad5*的同源蛋白, 具有脊椎动物*Smad1*和*Smad5*蛋白类似的功能^[10,11]; 如Liu等^[10]发现*Smad1/5*基因参与太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的背部化、胚层分层、贝壳发生等早期胚胎发育过程; 钱雪骏等^[11]发现*Smad1/5*基因与泥蚶(*Tegillarca granosa*)的肌肉生长和幼虫变态发育有关; 郭慧慧^[12]对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)*Smad*家族基因的研究中发现了一个同源基因*Smad1*, 参与成体肌肉的生长过程及幼

收稿日期: 2016-11-24; 修订日期: 2017-06-20

基金项目: 国家自然科学基金(31372527); 国家现代贝类产业技术体系项目(CARS-48); 国家水产种质资源平台项目(2018DKA30470); 江苏省苏北科技专项(BN2015059)资助 [Supported by National Natural Science Foundation of China (31372527); Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-48); National Infrastructure of Fishery Germplasm Resource Program (2018DKA30470); Science and Technology Project of Jiangsu Province (BN2015059)]

作者简介: 池秋蝶(1992—), 女, 河南周口人; 硕士研究生; 主要从事海洋贝类分子遗传学育种研究。E-mail: chiqiudie2013@163.com

通信作者: 林志华(1965—), 研究员; 博士; 主要从事贝类遗传育种研究。E-mail: zhihua9988@126.com

虫发育、变态过程。

单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphisms, SNP)是指在生物的基因组水平上,由于单个核苷酸碱基发生变异引起DNA序列产生的多态性^[13]。SNPs标记主要通过与经济性状紧密连锁的标记对经济性状进行分子标记辅助选择,能够有效对复合性状进行改良,作为克服生长性状衰退的有效方法之一^[14]。文蛤(*Meretrix meretrix*)是我国沿海重要经济滩涂贝类之一,开展文蛤生长相关功能基因的分子标记研究,对其基因资源的挖掘利用和分子辅助选择育种具有重要意义。目前有关其功能基因与生长性状相关的SNP位点的研究已有一些报道,在长链酯酰辅酶A合成酶(ACSL1)^[15]、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK10)^[15]、果糖-1,6-二磷酸醛缩酶(FBA)^[16]、生长因子受体结合蛋白2(GRB2)^[17]、转硫酶样基因(SULT)^[18]、组蛋白去乙酰化酶1(HDAC1)^[19]等基因中筛选出与生长相关的SNPs位点,而文蛤*Smad1/5*(*Mm-Smad1/5*)基因相关研究尚未见报道。本研究利用RACE技术克隆获得*Mm-Smad1/5*基因的cDNA全长序列,利用qRT-PCR技术对不同组织和发育时期表达差异分析,初步探讨其在文蛤生长发育过程中调控作用,也为研究*Smad1/5*基因在其它贝类生长、发育过程中的调控作用提供参考;采用直接测序法筛查了*Mm-Smad1/5*基因外显子区域SNP位点,并进行其与生长相关性分析,为文蛤生长性状相关标记的开发和分子标记辅助育种提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用文蛤取自浙江省宁波甬盛水产种业有限公司,随机取4颗文蛤,分别取闭壳肌、水管、外套膜、斧足、鳃、内脏团6个组织样品,液氮速冻后,−80℃冻存备用。于2014年7—8月,选取贝壳完整、健康有力和性腺饱满的2龄文蛤作为亲贝,采用阴干-流水刺激法进行人工催产,通过隔离产卵和人工授精技术获得同步发育的文蛤幼体,经镜检后取卵子、受精卵、2—4细胞、囊胚期、原肠胚、担轮幼虫、D形幼虫、壳顶幼虫、眼点幼虫和稚贝10个发育时期样品,液氮速冻后,−80℃冻存备用。用于SNP分析的样品,是从山东东营文蛤群体移养到浙江繁殖第六代的群体,同批同塘养殖至2龄,随机取样100颗,测量壳长、壳宽、壳高、总重生长性状指标,解剖取其斧足肌肉,液氮速冻后,−80℃冻存备用。

1.2 总RNA提取与cDNA第一链合成

分别取文蛤不同组织和发育时期的样品,采用Trizol法提取RNA,用1%琼脂糖凝胶电泳和NanoVue超微量分光光度计检测其浓度和完整性;选择 A_{260}/A_{280} 在1.8—2.0、电泳检测条带完整性较好的RNA,分别按照SMARTer RACE 5'/3' Kit (Clontech)、Reverse Transcription System (Promega)反转录试剂盒说明反转录出cDNA第一链,−20℃保存备用,用于后续RACE克隆、cDNA全长验证和荧光定量PCR实验。

1.3 cDNA全长克隆及其验证

基于文蛤454转录组文库,利用NCBI的Blastx工具与其他物种比对分析,获得*Mm-Smad1/5*基因的EST序列,用Primer Premier 5软件设计5'端、3'端RACE引物GSP1和GSP2(表1),上述用于RACE克隆的cDNA为模板,依照Advantage 2 Polymerase试剂盒(Clontech)说明进行5'端、3'端RACE克隆。PCR反应产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,选择单一性、亮度高的条带利用胶回收试剂盒进行纯化后,根据pEASY-T1 Cloning Kit试剂盒(Trans)说明进行连接转化,挑选阳性克隆送往华大基因公司测序确认。依据获得*Mm-Smad1/5*基因的cDNA全长序列,设计验证特异性引物F1和R1(表1)对其cDNA全长进行验证,以消除不确定的碱基来确保获得cDNA序列的正确性。

1.4 序列分析

用BlastX、DNASTar中的SeqMan程序对测序结果进行与其他物种比对、删除载体序列及拼接

表1 本实验所用引物及其序列

Tab. 1 Primers and their sequences

引物 Primers	引物序列 Sequences (5'—3')	引物信息 Information of primers
GSP1	AGTTGTGGACGGTTTACAGACCC CTCG	RACE克隆
GSP2	GCGTGGAATGCCTCGCCTACCT	
F1	AGAAGTGGGCGGAGAAAGC	全长验证
R1	GCCCATCTGAGTGAGAACTTTAT	
qRT-F	ATGGGCTTCCTGGACCTGA	qRT-PCR引物
qRT-R	AGTCCCACGATACAGCGAGTT	
18s-F	CTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACT	qRT-PCR引物
18s-R	TCCCGTATTGTTATTTTCGTCCT	
F2	AGGGATGTCCTCCACTATATCTAG	SNP位点筛选
R2	GCATACTGTGTCCATCGGCT	
F3	GTCCACGATACAGCGAGTT	SNP位点筛选
R3	GCAAACACTTCACCACCCAC	
F4	GACCCCTCAAACAACGCT	SNP位点筛选
R4	TTTATGACAAATGTTCACTGCTT	

分析, ORF Finder查找ORF区, DNAMAN软件预测编码氨基酸序列。利用ExPASy软件预测蛋白的理化性质参数, SignalP 4.0 Server和TMHMM Server v2.0预测蛋白质信号肽和跨膜区域, NetNGlyc 4.0 Server、NetOGlyc 1.0 Server程序预测N-糖基化、O-糖基化位点。用ExPASy、Swiss Model在线预测蛋白质的结构域、二级结构。从GenBank数据库下载其他物种的同源氨基酸序列, 用MEGA 6.0软件进行同源氨基酸多序列比对, 采用邻位连接法(Neighbor-joining method)构建系统进化树(Bootstrap=1000)。

1.5 不同组织、不同发育时期差异表达分析

采用实时荧光定量PCR技术(qRT-PCR)对*Mm-Smad1/5*基因在不同组织和不同发育时期中表达量进行研究, 依据获得的cDNA全长序列设计引物qRT-F和qRT-R(表1), 以18S rRNA基因为内参, 以不同组织和不同发育时期的cDNA为模板, 每个样品做4个平行, 用7500 Fast Real-Time PCR仪进行实时荧光定量PCR反应。PCR反应体系为SYBR® Green Supermix (Bio-rad) 10 μ L、DEPC-H₂O 7.2 μ L、F 1 μ L、R 1 μ L、cDNA 0.8 μ L, 共20 μ L。PCR反应程序为95℃ 20s; 95℃ 3s, 60℃ 15s, 72℃ 10s, 共40个循环。实时荧光定量数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算, 数据以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示, SPSS19.0软件进行ANOVA单因素方差分析, $P<0.05$ 为显著性差异水平。

1.6 外显子区域SNP位点筛查

根据获得的*Smad1/5*基因cDNA全长设计筛选外显子区域SNP位点3对特异性引物F2和R2、F3和R3、F4和R4(表1), 提取备用100颗文蛤RNA反转录成cDNA, 作为外显子区域SNP位点筛选模板, PCR反应体系为Taq MasterMix 25 μ L、DEPC-H₂O 17 μ L、F 2 μ L、R 2 μ L、cDNA 2 μ L, 共50 μ L。PCR反应程序为94℃ 5min; 94℃ 30s, Tm 30s, 72℃ 1min, 共35个循环; 72℃ 10min。在扩增产物经电泳检测后, 将目的片段大小的PCR产物直接送往华大基因公司测序。利用MEGA软件对测序结果比对来查找SNP位点, 利用Chromas软件查看测序图谱来进行人工校对, 用SPSS19.0软件对壳长、壳高、壳宽和总重等生长性状与SNP位点基因型进行相关性分析。

2 结果

2.1 *Mm-Smad1/5*的cDNA全长及其序列分析

*Mm-Smad1/5*基因的cDNA全长为1832 bp

(GenBank登录号: KX257418), 包括5'端非编码区162 bp, 开放阅读框1380 bp, 编码459个氨基酸, 3'端非编码区290 bp。*Mm-Smad1/5*蛋白分子量为51.17 kD, 理论等电点pI是6.34, 其极性氨基酸所占比例为59.0%, 表现为亲水性。SignalP、TMHMM在线预测显示无明显的信号肽序列和无明显的跨膜区。NetNGlyc 4.1 Server、NetOGlyc 1.0 Server软件预测有2个N-糖基化、19个O-糖基化的位点。

2.2 *Mm-Smad1/5*基因编码的蛋白结构预测

ExPASy PROSITE结构域软件预测结果显示, *Mm-Smad1/5*蛋白包括MH1结构域(17—141 aa)和MH2结构域(265—459 aa)。Swiss Model二级结构预测显示, *Mm-Smad1/5*蛋白的二级结构由15个 α -螺旋、19个 β -折叠、58个转角和238个氢键组成。

2.3 *Mm-Smad1/5*基因的氨基酸比对及进化树分析

氨基酸序列比对结果显示, 文蛤*Smad1/5*蛋白与太平洋牡蛎*Smad5*、大西洋舟螺*Smad1*的同源性最高, 其一致性分别为83.7%和80.2%; 与果蝇*Mad*的一致性为69.3%, 同源性最低; 与非洲爪蟾、鸡、猪、人等脊椎动物*Smad1*、*Smad5*基因的同源性也较高, 达到70.3%以上。构建系统进化树结果显示, 用于分析的*Smad*成员分为BMP激活R-*Smad*、TGF- β 激活R-*Smad*、Co-*Smad*和I-*Smad*四支, 与*Smad*蛋白家族的分类相同。文蛤*Smad1/5*属于BMP激活R-*Smad*支, 先与进化关系最近的大西洋舟螺的*Smad1*、栉孔扇贝*Smad5*、泥蚶*Smad1/5*、太平洋牡蛎*Smad5*和合浦珠母贝*Smad5*聚成一类, 再与人、鼠、鸡、非洲鸵鸟、扬子鳄、中华鳖、大西洋鲑、斑马鱼*Smad5*聚成的亚支和人、鼠、鸡、绒啄木鸟、非洲爪蟾、热带爪蟾、斑马鱼*Smad1*聚成的亚支聚在一起(图1)。

2.4 *Mm-Smad1/5*基因在不同组织、发育时期的表达差异分析

*Mm-Smad1/5*基因在不同组织中表达分析显示, 在鳃、水管、内脏团、闭壳肌、外套膜和斧足六个组织中均有表达, 其中鳃、水管、内脏团和闭壳肌的相对表达量较低, 而外套膜和斧足的表达量显著高于其他组织($P<0.05$), 其中斧足的表达量最高(图2)。对*Mm-Smad1/5*基因在不同发育时期的表达进行分析, 发现从卵子、受精卵、2—4细胞期到囊胚期仅有微量表达, 从原肠胚期开始大量表达, 到壳顶幼虫期的表达量达到最高, 显著高于其他发育时期($P<0.05$), 眼点幼虫期表达量大量下降, 稚贝期又有所上升(图3)。

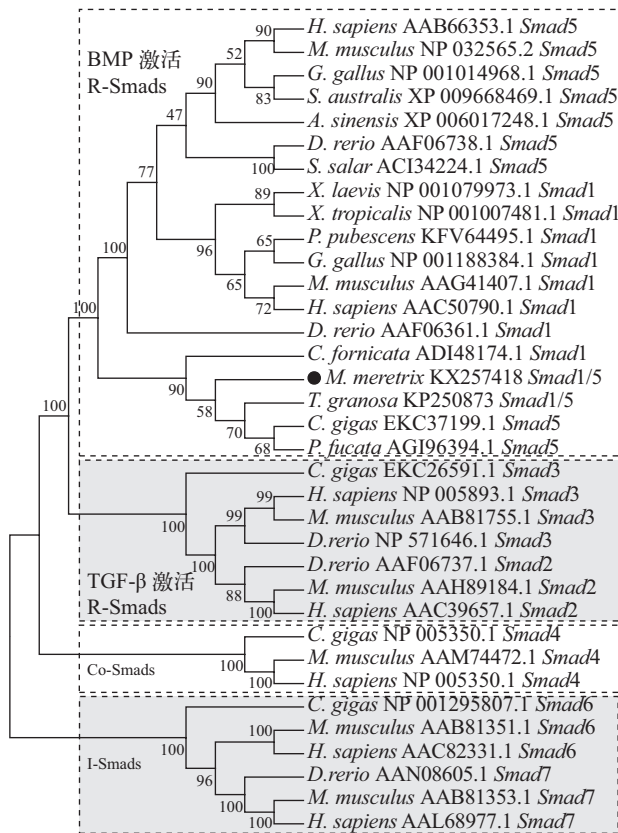


图1 采用MEGA6.0软件NJ法构建的进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree, constructed by MEGA6.0 software using the NJ method

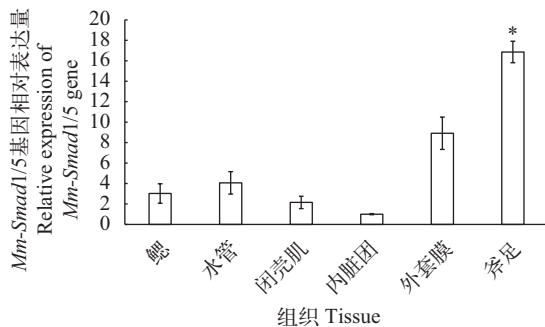


图2 *Mm-Smad1/5*在文蛤不同组织中表达差异分析($n=4$)

Fig. 2 Analysis of *Mm-Smad1/5* gene expression in different tissues ($n=4$)

*代表显著性差异, $P<0.05$

* represented the significant differences at $P<0.05$

2.5 *Mm-Smad1/5*外显子区中SNP位点筛选与生长相关性分析

从100颗文蛤中剔除测序失败的个体后,将剩余个体经序列比对分析,发现在*Mm-Smad1/5*基因外显子区域共筛选出9个SNP位点,根据相对于起始密码子(ATG)位置分别命名为123 A>G、262 C>T、551 C>T、919 C>T、936 G>T、996 G>T、999 C>

T、1281 A>G和1403 G>T(表2),其中位点936 G>T的GG型的壳长、壳高、壳宽和总重生长指标均显著高于GT型($P<0.05$),而其他8个位点的不同基因型之间与生长性状的相关性均无显著性差异($P>0.05$)。在9个SNP位点中,其中7个(123 A>G、262 C>T、919 C>T、936 G>T、996 G>T、999 C>T和1281 A>G)属于外显子上的同义突变,1403 G>T位点属于3'UTR区的突变,这些突变并未导致编码氨基酸的改变;551 C>T为外显子上的非同义突变位点,其编码的氨基酸由亮氨酸(GCC)变成缬氨酸(GTC),虽然该位点与生长相关性没有达到显著性水平($P>0.05$),但其CC型个体在壳长、壳高、壳宽和总重总体上要高于其他基因型。

3 讨论

*Mm-Smad1/5*基因在文蛤斧足、外套膜、鳃、闭壳肌等成体6个组织中均有表达,这说明其参与多种组织细胞的生物学活性。Eva等^[20]发现Smad1、Smad5蛋白介导BMP2信号通路能够激活生肌负调控因子*Id1*、*Id3*、*Dlx2*和*Hey1*的表达,来抑制C2C12细胞系的成肌分化;Ono等^[21]发现通过敲除*Smad4*、*Smad5*基因或Dorsomorphin阻断Smad1和Smad5磷酸化后,都能导致肌卫星细胞的过早向成肌方向分化,由此推断Smad1、Smad5蛋白在肌肉生长、分化过程中起到抑制作用。*Mm-Smad1/5*基因在斧足中表达最高,这与泥蚶^[11]、栉孔扇贝^[12]的同源基因在肌肉组织中高表达具有一致性,文蛤的斧足为重要运动器官,主要由肌肉组织组成^[22],推测其在文蛤肌肉生长过程中起到重要作用。*Mm-Smad1/5*基因在外套膜的表达量显著高

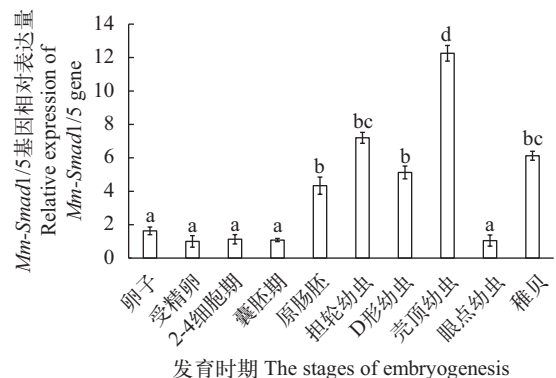


图3 *Mm-Smad1/5*在文蛤不同发育时期中表达差异分析($n>500$)

Fig. 3 Analysis of *Mm-Smad1/5* gene expression in different developmental stages ($n>500$)

不同字母代表显著性差异, $P<0.05$

Different letters represented the significant differences at $P<0.05$

于除足之外的其他组织,可能由于外套膜为软体动物贝壳形成的重要组织^[23],作为BMP-Smad信号通路下游效应分子,发挥类似高等动物骨、软骨等硬组织形成的功能,可能参与贝壳形成、矿化过程^[23]。

在文蛤卵子中检测到*Mm-Smad1/5*微量水平的表达,可能为母源效应基因。在脊椎动物的胚胎发育早期,*Smad1*、*Smad5*蛋白参与了胚胎的背侧化和决定胚胎形态模式^[24],*Mm-Smad1/5*基因可能在文蛤胚胎发育早期发挥着类似功能。在原肠胚期中的表达量显著上升($P<0.05$),这与太平洋牡蛎^[10]、栉孔扇贝^[12]相似,可能也参与了原肠胚期中三胚层的形成与分化。*Smad1*、*Smad5*作为BMP信号通路下游转导蛋白,二者在贝类贝壳形成、矿化时期发挥重要作用,如欧洲帽贝(*Patella vulgata*) *BMP2/4*基因在贝壳形成组织的边缘高水平表达,参与壳原基的形态构建、贝壳形成及壳发生速度的调控^[25];静水锥实螺(*Lymnaea stagnalis*) *BMP2/4*参与贝壳螺旋形成、外套膜的生长、贝壳矿化的过程^[26,27]。在本研究中,*Mm-Smad1/5*基因在文蛤担轮幼虫至

壳顶幼虫期中高水平表达,推测其在贝壳形成和矿化中发挥重要调控作用。

目前有关*Smad1*、*Smad5*基因与生长相关SNP位点的报道很少,在栉孔扇贝*Smad1*基因中并未发现与生长性状相关的SNP位点^[12],而泥蚶的*Smad1/5*编码区发现了6个突变频率较低的SNP位点^[11]。本研究在*Mm-Smad1/5*基因的外显子区域共筛查出9个候选SNP位点,其突变频率高于泥蚶,提示*Mm-Smad1/5*基因多态性更丰富。在文蛤的外显子筛查出的9个SNP位点,大多数的SNP位点为同义突变,未导致编码氨基酸的改变;只有551 C>T为非同义突变,与生长相关性并未达到显著性水平($P>0.05$);与文蛤生长显著性相关的位点936 G>T($P<0.05$)虽未导致氨基酸的改变,可能通过影响mRNA二级结构的稳定性或影响核糖体通过mRNA的速度来影响蛋白翻译^[28],进而影响*Mm-Smad1/5*调控核内靶基因转录,可能使得在文蛤壳长、壳高、壳宽和总重等生长性状上,纯合GG型个体显著高于杂合GT型个体。本研究仅在编码区

表2 *Mm-Smad1/5*基因外显子区中SNPs的不同基因型与生长性状相关性分析

Tab. 2 Correlation analysis of the different genotypes of SNPs in the exon of *Mm-Smad1/5* with growth traits

位点 Locus	基因型 Genotype	样本数 Sample	所占比例 Percent (%)	壳长 Shell length (mm)	壳高 Shell height (mm)	壳宽 Shell width (mm)	总重 Total weight (g)
123 A>G	AA	42	56.00	38.01±4.03	32.09±2.42	19.25±1.69	15.41±3.73
	AG	26	34.67	38.73±3.74	32.40±2.95	19.46±2.10	15.49±4.42
	GG	7	9.33	37.33±2.47	31.62±2.17	19.03±1.66	14.38±2.97
262 C>T	TT	48	64.00	38.81±4.03	32.14±2.48	19.35±1.65	15.55±3.58
	TC	15	20.00	38.17±3.42	31.99±2.74	19.02±2.03	15.07±4.26
	CC	12	16.00	38.78±0.84	33.52±0.32	20.32±0.90	17.02±0.07
551 C>T	CC	52	69.33	37.97±3.71	32.01±2.41	19.24±1.64	15.22±3.60
	TC	23	30.67	38.24±3.96	32.10±3.30	19.08±2.41	15.14±5.17
	CC	10	13.33	38.55±1.00	32.42±1.01	19.62±0.94	16.04±1.01
919 C>T	TT	38	50.67	37.67±3.98	31.81±2.76	19.01±1.87	15.10±4.03
	TC	27	36.00	39.05±1.43	32.89±1.39	19.95±1.28	15.51±2.87
936 G>T	GG	49	65.33	37.99±3.74 ^a	32.05±1.57 ^a	19.22±0.77 ^a	15.35±1.81 ^a
	GT	26	34.67	33.80±1.46 ^b	28.01±0.29 ^b	16.33±0.15 ^b	9.87±0.08 ^b
996 G>T	GG	55	73.33	37.74±3.84	31.83±2.57	19.10±1.74	15.10±3.77
	GT	17	22.67	38.94±2.08	32.96±1.49	19.59±1.55	15.92±2.42
	TT	3	4.00	36.64±2.51	30.56±3.15	18.22±2.18	13.39±4.58
999 C>T	CC	53	70.67	37.81±3.72	31.89±2.52	19.10±1.73	15.09±3.65
	TC	22	29.33	37.86±2.60	31.79±3.49	19.17±2.69	15.70±5.91
1281 A>G	AA	10	13.33	38.38±0.71	32.86±1.07	19.97±0.94	16.32±0.98
	AG	18	24.00	36.7±6.00	31.99±2.90	19.20±1.95	15.83±4.62
	GG	47	62.67	37.95±3.09	31.70±2.60	18.92±1.77	14.69±3.58
1403 G>T	TT	53	70.67	37.92±3.93	32.04±2.69	19.21±1.89	15.47±3.94
	TG	22	29.33	38.37±1.45	32.23±1.14	19.07±0.85	15.04±1.44

注: 同一位点组合中同列的不同小写字母表示生长性状显著性差异, $P<0.05$

Note: Different superscript letters in a column of each locus indicated the significant difference at $P<0.05$

发现了1个与生长性状相关的SNP位点, 需要进一步对*Mm-Smad1/5*基因的内含子和启动子生长相关的SNP位点进行筛查, 以期为文蛤的良种选育提供更多有用的分子标记。

参考文献:

- [1] Wan M, Li C, Zhen G, *et al.* Injury-activated transforming growth factor β controls mobilization of mesenchymal stem cells for tissue remodeling [J]. *Stem Cells*, 2012, **30**(11): 2498—2511
- [2] Chen B, Yi B, Lu K Z. Advances in researches on Smad proteins in cell differentiation [J]. *Bulletin of Medical Postgraduate*, 2013, **26**(5): 544—547 [陈兵, 易斌, 鲁开智. Smad蛋白家族调控细胞分化的研究进展. 医学研究生学报, 2013, **26**(5): 544—547]
- [3] Sekelsky J J, Newfeld S J, Reftery L A, *et al.* Genetic characterization and cloning of mothers against *dpp*, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster* [J]. *Genetics*, 1995, **139**(3): 1347—1358
- [4] Raftery L A, Twombly V, Wharton K, *et al.* Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila* [J]. *Genetics*, 1995, **139**(1): 241—254
- [5] Groneberg D A, Witt H, Adcock I M, *et al.* Smads as intracellular mediators of airway inflammation [J]. *Experimental Lung Research*, 2004, **30**(3): 223—250
- [6] Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors [J]. *Genes & Development*, 2005, **19**(23): 2783—2810
- [7] Hellingman C A, Davidson E N, Koevoet W, *et al.* Smad signaling determines chondrogenic differentiation of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: inhibition of *Smad 1/5/8* prevents terminal differentiation and calcification [J]. *Tissue Engineering Part A*, 2011, **17**(7-8): 1157—1167
- [8] Arnold S J, Maretto S, Islam A, *et al.* Dose-dependent Smad 1, Smad 5 and Smad 8 signaling in the early mouse embryo [J]. *Developmental Biology*, 2006, **296**(1): 104—118
- [9] Liu Y L, Zhang Z C. The expression and role of *BMP-2* and *Smad1* in the regenerative bone of rabbits during vertical mandibular distraction osteogenesis [J]. *Chinese Journal of Prosthodontics*, 2009, **10**(4): 204—209 [刘玉玲, 张志纯. *BMP-2*及*Smad1*在兔下颌骨垂直牵张中的表达和意义. 口腔颌面修复学杂志, 2009, **10**(4): 204—209]
- [10] Liu G, Pin H, Liu B Z. Cloning and expression patterns of two *Smad* genes during embryonic development and shell formation of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Chinese Journal of Oceanology & Limnology*, 2014, **32**(6): 1224—1231
- [11] Qian X J, Dong Y H, Yao H H, *et al.* Cloning and spatiotemporal expression analysis of *Smad1/5* gene in the blood clam *Tegillarca granosa* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, **39**(9): 1302—1312 [钱雪骏, 董迎辉, 姚韩韩, 等. 泥蚶*Smad1/5*基因cDNA全长克隆及时空表达特征分析. 水产学报, 2015, **39**(9): 1302—1312]
- [12] Guo H H. TGF- β /Smad signaling pathway genes: molecular cloning, expression analysis and SNPs associated with growth traits in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) [D]. Thesis for Doctor of Science. Ocean University of China, Qingdao. 2012 [郭慧慧. 栉孔扇贝TGF- β /Smad信号通路基因的克隆、表达分析及生长性状相关SNP位点筛查. 博士学位论文, 中国海洋大学, 青岛. 2012]
- [13] 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—306
- [14] Nichols K M, Broman K W, Sundin K, *et al.* Quantitative trait loci x maternal cytoplasmic environment inter-action for development rate in *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Genetics*, 2007, **175**(1): 335—347
- [15] Dai P. Genetic test of breeding populations and identification of growth-associated SNPs in the clam *Meretrix meretrix* [D]. Thesis for Doctor of Science. Chinese Academy of Sciences, Institute of Oceanology, Qingdao. 2014 [代平. 文蛤(*Meretrix meretrix*)选育群体的遗传测定及生长相关SNP鉴定. 博士学位论文, 中国科学院海洋研究所, 青岛. 2014]
- [16] Wang C, You Y, Wang H, *et al.* Genetic diversity of the sulfotransferase-like gene and one nonsynonymous SNP associated with growth traits of clam, *Meretrix meretrix* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, **39**(2): 1323—1331
- [17] Gao X Y, Dong Y H, Shi S J, *et al.* Cloning, spatiotemporal expression and SNPs identification of *GRB2* gene in hard clam *Meretrix meretrix* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, **39**(9): 1324—1332 [高晓艳, 董迎辉, 施沈佳, 等. 文蛤生长因子受体结合蛋白2(*GRB2*)基因克隆、时空表达及SNP位点筛查. 水产学报, 2015, **39**(9): 1324—1332]
- [18] Wang C. Preliminary analysis of growth and resistance differences among selected *Meretrix meretrix* populations [D]. Thesis for Master of Science. Chinese Academy of Sciences, Institute of Oceanology, Qingdao. 2011 [王超. 文蛤(*Meretrix meretrix*)选择群体生长、抗性差异的初步解析. 硕士学位论文, 中国科学院海洋研究所, 青岛. 2011]
- [19] Gao X Y, Dong Y H, Yao H H, *et al.* Cloning, spatiotemporal expression and SNPs identification of *HDAC1* gene in hard clam *Meretrix Meretrix* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(3): 601—608 [高晓艳, 董迎辉, 姚韩韩, 等. 文蛤*HDAC1*基因克隆、时空表达及生长相关SNP位点筛查. 水生生物学报, 2016, **40**(3): 601—608]
- [20] Eva H, Raghu B, Pia P, *et al.* Spatial segregation of BMP/Smad signaling affects osteoblast differentiation in

- C2C12 cells [J]. *First World War Studies*, 2011, **6**(10): 262—263
- [21] Ono Y, Calhabeu F, Morgan J E, *et al.* BMP signaling permits population expansion by preventing premature myogenic differentiation in muscle satellite cells [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2011, **18**(2): 222—234
- [22] Li X. Histology and embryology of aquatic animal [M]. Beijing: China Agriculture Press. 2005, 67—68 [李霞. 水产动物组织胚胎学. 北京: 中国农业出版社. 2005, 67—68]
- [23] Zhou Y J. Cloning and functional studies on genes related to TGF- β signal pathways of *Pinctada fucata* [D]. Thesis for Doctor of Science. Tsinghua University, Beijing. 2010 [周玉娟. 合浦珠母贝TGF- β 信号通路相关基因的克隆及功能研究. 博士学位论文. 清华大学, 北京. 2010]
- [24] Kishigami S, Mishina Y. BMP signaling and early embryonic patterning [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2005, **16**(3): 265—278
- [25] Kin K, Kakoi S, Wada H. A novel role for *dpp* in the shaping of bivalve shells revealed in a conserved molluscan developmental program [J]. *Developmental Biology*, 2009, **329**(1): 152—166
- [26] Shimizu K, Sarashina I, Kagi H, *et al.* Possible functions of *Dpp* in gastropod shell formation and shell coiling [J]. *Development Genes and Evolution*, 2011, **221**(2): 59—68
- [27] Shimizu K, Iijima M, Setiamarga D H, *et al.* Left-right asymmetric expression of *dpp* in the mantle of gastropods correlates with asymmetric shell coiling [J]. *Evodevo*, 2013, **4**(1): 1—7
- [28] Komar A A. SNPs, silent but not invisible [J]. *Science*, 2007, **315**(5811): 466—467

CLONING, SPATIOTEMPORAL EXPRESSION AND SNPS DETECTION OF *SMAD1/5* GENE IN HARD CLAM *MERETRIX MERETRIX*

CHI Qiu-Die^{1,2}, DONG Ying-Hui², YAO Han-Han² and LIN Zhi-Hua²

(1. College of Ocean, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resource of Zhejiang, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract: To study the biological function of *Smad1/5* in the growth and development of molluscs, the full-length cDNA of *Smad1/5* in *Meretrix meretrix* (*Mm-Smad1/5*) was cloned via SMART RACE techniques. The entire cDNA of *Mm-Smad1/5* was 1832 bp long, containing a 1380-bp open reading frame (ORF) that encoded a 459-amino acid protein. According to the amino acid sequence alignment, *Mm-Smad1/5* shared 83.7% identity with *Smad5* of *C. gigas*, 80.2% with *Smad1* of *P. fucata*, and more than 70.5% identity with vertebrates. Protein functional domain predictions revealed that *Mm-Smad1/5* contained both of the highly conserved functional domains MH1 and MH2. Together, these data indicate that *Smad1/5* is highly conserved across evolution. The qRT-PCR results showed that *Mm-Smad1/5* were expressed in all six tissues of adult clams and were expressed significantly more in the foot and mantle than other tissues ($P < 0.05$). Furthermore, the *Mm-Smad1/5* gene was widely expressed in 10 developmental stages, it was first highly expressed in the gastrulae until the eyobol larva, largely decreased in the eyobol larva, and slightly increased in juvenile clams. Additionally, we identified 9 potential SNPs in the exons of *Mm-Smad1/5* by DNA sequencing, of which the 936 G>T locus was significantly with the growth traits of *M. meretrix* ($P < 0.05$). The study indicated that *Mm-Smad1/5* gene could be used as the growth candidate function gene, and its SNPs provided useful information for the reliable molecular markers for *M. meretrix* breeding.

Key words: *Meretrix meretrix*; *Smad1/5*; Gene cloning; Growth-related; SNP