



中华绒螯蟹肌肉抑制素基因 (*MSTN*) 同义突变对 基因转录和翻译效率的影响

岳武成, 杨鹤, 侯鑫, 王静安,
陈晓雯, 王军, 王成辉*

(上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 水产科学国家级实验教学示范中心,
上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 为分析同义突变对基因转录和翻译的影响, 实验应用定点突变、体外转录和过表达等技术对中华绒螯蟹肌肉抑制素基因 (*Es-MSTN*) 中发现的 5 个 SNP 同义突变位点即 SNP1(C/T)、SNP2(C/T)、SNP3(C/T)、SNP4(A/G) 和 SNP5(T/G), 及其对应的 12 种基因型组合 (CG、TA、1T、2T、3T、4A、5T、1C、2C、3C、4G 和 5G) 进行了转录和翻译水平的研究。结果显示, 12 种基因型在体外转录中存在转录效率差异, 1C 基因型的转录水平最高, 而 CG 和 TA 基因型的转录水平最低, 差异显著; 且 TA 基因型转录水平显著高于 CG 基因型。对上述基因型在 293T 细胞中进行过表达研究发现, 不同突变基因型在转染后的不同时间 (24、36、48、60、72、84、96 和 108 h) 的表达强度存在显著差异, 且 TA 突变基因型的表达强度显著高于 CG 突变基因型。研究表明, 5 个同义突变位点对中华绒螯蟹 *Es-MSTN* 的转录和翻译具有重要影响, 同义突变也可能具有较为重要的生物学意义。

关键词: 中华绒螯蟹; 肌肉抑制素基因; 同义突变; 基因功能

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是指在基因组水平上由单个核苷酸变异所引起的脱氧核糖核酸序列多态性^[1]。在人类 (*Homo sapiens*) 基因组计划的研究中发现, SNP 是最常见的人类可遗传变异, 平均每 100~300 个碱基对中有 1 个变异位点, 占人类基因多态性 90% 以上^[2]。在 SNP 的多种突变类型中, 同义突变最为广泛, 该类突变由于密码子的简并性规律, 位点变异并不改变基因编码的氨基酸序列,

进而在蛋白质的一级结构上不产生影响^[3]。因此, 在研究 SNP 的很长一段时间内, 同义突变位点未受到学者们的重视。然而, 当前越来越多的研究发现, 同义突变并非是沉默突变, 它可以通过影响基因的可变剪接体形成或丢失、mRNA 二级结构的稳定性、翻译效率、蛋白折叠等对表型产生影响^[4-6]。

同义突变主要通过核酸和蛋白两个层面来影响基因功能的正常发挥。在核酸层面, 同义

收稿日期: 2020-05-16 修回日期: 2020-10-16

资助项目: 上海市科技兴农重点攻关项目 (2017-02-0800-10-F00076, 沪农科创字 (2019) 第 3-4 号); 上海市中华绒螯蟹产业技术体系项目 (沪农科 (产) 2020 第 4 号); 上海农业领军人才计划 (D-8004-16-0217); 上海市工程技术中心建设项目 (13DZ2251800)

第一作者: 岳武成 (照片), 从事水产动物种质资源与种苗工程研究, E-mail: 547203691@qq.com

通信作者: 王成辉, E-mail: wangch@shou.edu.cn



突变主要通过剪接位点的形成或丢失以及改变核酸序列的GC含量来影响基因转录后转录本的种类和mRNA的稳定性。如Yamaguchi等^[7]在遗传性非息肉病性结直肠癌中的研究发现,错配修复基因(*MLH1*)的编码区同义突变(543 C>T)产生了新的可变剪接位点,使该基因第6外显子的最后4个碱基在mRNA前体加工时被删除,导致该基因在翻译过程中发生移码阅读;同时也有报道血管假性血友病因子基因(*VWF*)编码区的第44外显子中的同义突变(7464C>T)导致第44个内含子在mRNA前体加工过程中发生了滞留^[8];而Duan等^[9]在人类多巴胺受体基因(*DDR2*)中发现了6个同义突变位点(C132T、G423A、T765C、C939T、C957T和G1101A),其中C957T突变位点对基因的mRNA结构稳定性产生了负面影响,该突变型在CHO-K1细胞中的半衰期显著降低,进而降低了mRNA的丰度。此外,Chamary等^[10]对小鼠(*Mus musculus*)中已报道的70个基因的mRNA二级结构以及同义突变进行了分子结构预测和选择压力分析,发现同义突变会影响成熟mRNA分子的二级结构形成,进而影响其在体内的稳定性,并且这些突变在进化过程中也并非是中性的选择位点,同样受到选择压力。在蛋白层面,虽然同义突变并不改变其编码的氨基酸序列,但在不同物种之间,编码氨基酸的密码子使用频率具有差异,都有各自的密码子使用偏好性,即使同一物种,不同组织/细胞对密码子的使用有差异,同一物种的不同基因对密码子使用偏好也存在差异^[11-12]。当位点突变后对应密码子变为稀有密码子时,mRNA的翻译速率则会受到限制,当位点突变后对应密码子的tRNA丰度较高时,mRNA翻译速率则会显著提高^[4,13]。此外,同义突变还会对蛋白质的折叠产生影响,如Cortazzo等^[14]将细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*)的脂肪酸结合蛋白1基因(*EgFABP1*)进行原核表达研究时发现,将第22、23和24位密码子末位碱基进行同义突变(T66G、G69T和G72T)会显著降低表达蛋白的可溶性。因此,同义突变在分子功能层面并不是沉默突变,其可以通过基因表达调控的各个进程对基因功能产生影响。

近几年,本实验室对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)肌肉抑制素基因(*Es-MSTN*)的研究中发现,该基因在中华绒螯蟹不同群体中存在一定的SNP

多态性,其中部分同义SNP位点与表型性状存在关联^[15-16]。为研究这些相关同义突变位点对*Es-MSTN*的表达调控影响,本实验应用定点突变、体外转录和基因过表达等技术分析了这些位点对*Es-MSTN*转录和翻译的影响,探讨了各位点在*Es-MSTN*功能中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

根据本实验室对中华绒螯蟹2873个样本的分析,发现*Es-MSTN*的第一外显子共有5个同义SNP位点:C/T(C712T)、C/T(C714T)、C/T(C717T)、A/G(A729G)和T/G(T753G)分别命名为SNP1(C/T)、SNP2(C/T)、SNP3(C/T)、SNP4(A/G)和SNP5(T/G),5个位点组合的纯合基因型为CC/CC/CC/GG/GG和TT/TT/TT/AA/TT,杂合基因型为CT/CT/CT/AG/TG。

1.2 过表达载体构建

设计包含酶切位点*EcoR* I和*BamH* I的正反向引物(表1)扩增*Es-MSTN*编码区序列,对扩增得到的产物纯化后进行双酶切,并与上述酶切位点线性化的pEGFP-N1载体进行连接、转化、涂板,将获得的阳性克隆送生物公司测序鉴定得到*Es-MSTN*-pEGFP-N1过表达载体(图1)。

1.3 不同基因型过表达载体获取

使用Fast Site-Directed Mutagenesis Kit试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]设计定点突变引物,对上述构建的*Es-MSTN*-pEGFP-N1基础载体进行定点突变。根据5个SNP位点信息,本实验共获得12种位点突变的*Es-MSTN*-pEGFP-N1过表达载体,CG基因型(C/C/C/G/G)、TA基因型(T/T/T/A/T)、1T基因型(T/C/C/G/G)、2T基因型(C/T/C/G/G)、3T基因型(C/C/T/G/G)、4A基因型(C/C/C/A/G)、5T基因型(C/C/C/G/T)、1C基因型(C/T/T/A/T)、2C基因型(T/C/T/A/T)、3C基因型(T/T/C/A/T)、4G基因型(T/T/T/G/T)和5G基因型(T/T/T/A/G)。

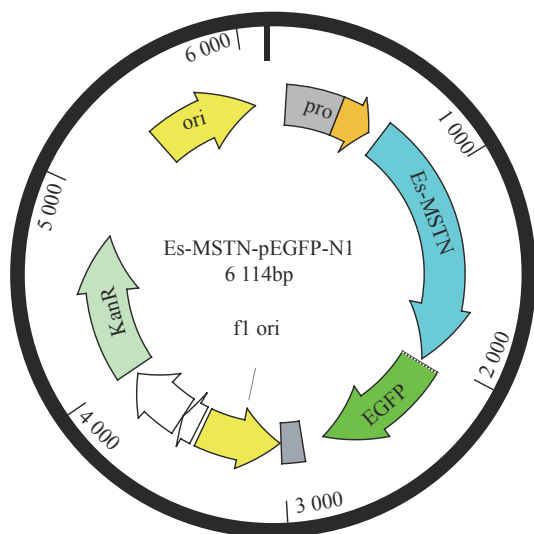
1.4 不同基因型体外转录模板获取

设计扩增*Es-MSTN*和pEGFP编码区且在5'端含T7启动子的引物(表1),对获得的不同基因型*Es-MSTN*-pEGFP-N1的过表达载体进行直接扩

表 1 本研究中使用的引物

Tab. 1 Primers information used in this study

引物 primers	序列 (5'-3') sequences (5'-3')	用途 usage
T7- <i>MSTN</i> -F	taatacgactcactatagggATGCCGTGGAAGCGTCTGGC	<i>Es-MSTN</i> 体外转录模板合成
T7- <i>MSTN</i> -R	TTAGGTGCAGCCGAGTGATCCAC	
T7- <i>GFP</i> -F	taatacgactcactatagggATGGTGTAGCAAGGGCGAG	pEGFP-N1体外转录模板合成
T7- <i>GFP</i> -R	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	
<i>MSTN</i> -F	AATGGCGAGTGTCCCTTCCTG	<i>Es-MSTN</i> qRT-PCR
<i>MSTN</i> -R	GTGGTCGTGGTCGTAGTAGAGC	
<i>GFP</i> -F	CATCCTGGTCGAGCTGGACG	pEGFP qRT-PCR
<i>GFP</i> -R	ACTGAAGAAGTCGTGCTCTCA	
<i>MSTN</i> -F1	ccggaattcATGCCGTGGAAGCGTCTGGC	过表达载体构建
<i>MSTN</i> -R1	gcgggatccgcGGTGCAGCCGAGTGATCCAC	

图 1 *Es-MSTN*-pEGFP-N1 质粒图谱Fig. 1 Map of *Es-MSTN*-pEGFP-N1 plasmid

增, 得到含 T7 启动子的 *T7-Es-MSTN* 和 *T7-pEGFP-N1* 模板。

1.5 不同基因型体外转录

不同基因型 *Es-MSTN* 的模板用量为 300 ng, 同时以 150 ng pEGFP-N1 模板作为反应体系的内对照加入到每个反应体系中, 设计 3 个实验重复, 反应体系及程序: T7 Buffer Mix 4 μ L、NTPs 6 μ L (ATP、GTP、UTP、CTP 各 1.5 μ L)、T7-*Es-MSTN* 模板 1 μ L (300 ng)、T7-pEGFP-N1 模板 1 μ L (150 ng)、T7 RNA Polymerase 2 μ L, 双蒸水补足 20 μ L。配置好的反应体系于 37 $^{\circ}$ C 反应 3 h, 反应完成后

加入 1 μ L DNase 于 37 $^{\circ}$ C 消化残留 DNA 模板 30 min, 消化完成后对得到的产物进行逆转录、qRT-PCR 定量检测。

1.6 不同基因型 293T 细胞过表达

将上述不同基因型的 *Es-MSTN*-pEGFP-N1 过表达载体进行 293T 细胞转染, 以 pEGFP-N1 空载体作为参照。具体步骤: 将稳定传代且细胞汇合度达到 70% 左右的 293T 细胞消化铺板 (铺板密度: 4×10^5 个/mL), 隔夜贴壁完全后使用 LipoFiter™ 转染试剂 [汉恒生物科技 (上海) 有限公司] 于 24 孔板进行转染实验。实验中每个基因型质粒设计 3 个生物学重复, 不同基因型过表达载体与 pEGFP-N1 空载体的转染量相等 (1 μ g/孔), 转染后 24、36、48、60、72、84、96 和 108 h 显微观察荧光强度并拍照计数, 拍照时每个生物学重复随机选取 5 个视野, 每个不同基因型质粒共计 15 个视野。

1.7 数据处理

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对体外转录产物的定量数据进行处理, FCSnap 软件的分割计数工具对荧光细胞进行计数, 计数算法选择天津算法 [亮 OTSU(B)]。12 种基因型载体的计数结果用 pEGFP-N1 空质粒计数均值进行比值校正, 定义为 $FI_{\text{荧光强度}} = \frac{MSTN\text{-}pEGFP\text{-}N1 \text{ 荧光计数}}{pEGFP\text{-}N1 \text{ 荧光计数}}$, 当比值大于 1 时, 位点突变对基因表达相比于 pEGFP-N1 空质粒具有上调作用, 当比值小于 1 时, 位点突变对基因表达相比于 pEGFP-N1 空质粒具有下调作用。

用。数据采用单因素方差 (One-Way ANOVA) 分析进行显著性检验。

2 结果

2.1 *Es-MSTN* 不同基因型体外转录效率差异

通过 T7 体外转录系统的研究发现, *Es-MSTN* 不同突变位点基因型在 T7 转录系统中的相对转录表现出明显差异, 其中 CG 基因型 (C/C/C/G/G) 的单位点依次突变对基因的转录具有明显的递进式增强作用, 即 1T 基因型 (T/C/C/G/G) < 2T 基因型 (C/T/C/G/G) < 3T 基因型 (C/C/T/G/G) < 4A 基因型 (C/C/C/A/G) < 5T 基因型 (C/C/C/G/T); 而 TA 基因型 (T/T/T/A/T) 的单位点依次突变对基因的转录表现出无规则的减弱作用, 即 3C 基因型 (T/T/C/A/T) < 4G 基因型 (T/T/T/G/T) < 5G 基因型 (T/T/T/A/G) < 2C 基因型 (T/C/T/A/T) < 1C 基因型 (C/T/T/A/T); 进一步比较发现, TA 基因型比 CG 基因型具有更高的转录水平(图 2)。

2.2 *Es-MSTN*-pEGFP-N1 不同基因型载体的过表达差异

将构建的 12 种基因型 *Es-MSTN*-pEGFP-N1 过表达载体在 293T 细胞中进行表达检测, 发现不同基因型载体之间的荧光细胞数量在转染后 84 h 具有肉眼可观察到的差异 (图版)。进一步对

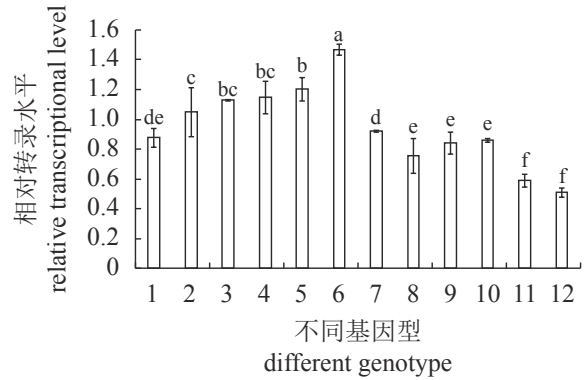


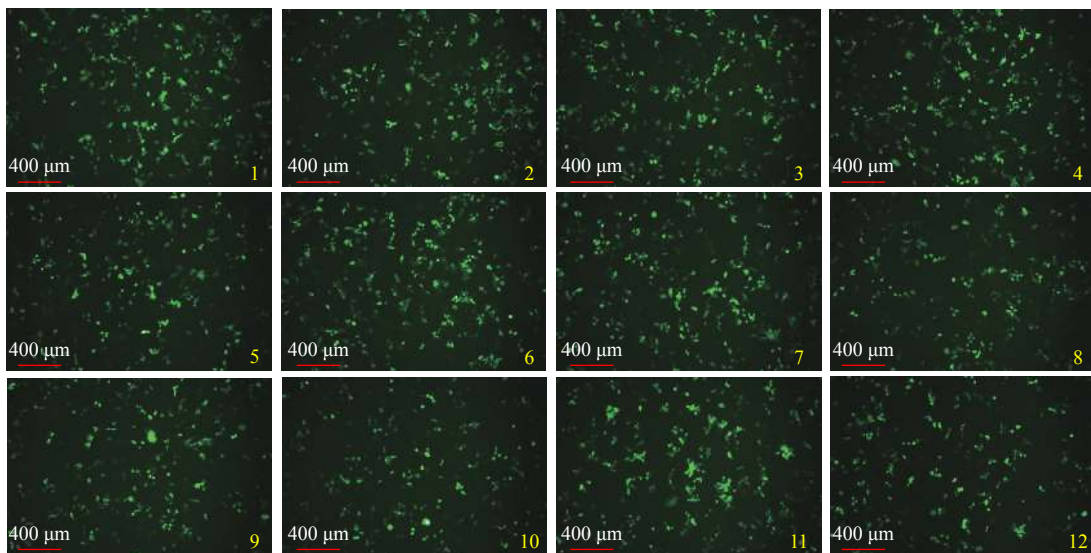
图 2 *Es-MSTN* 不同基因型体外转录差异

1. 1T 基因型, 2. 2T 基因型, 3. 3T 基因型, 4. 4A 基因型, 5. 5T 基因型, 6. 1C 基因型, 7. 2C 基因型, 8. 3C 基因型, 9. 4G 基因型, 10. 5G 基因型, 11. TA 基因型, 12. CG 基因型; 下同

Fig. 2 Transcription differences *in vitro* among the different genotypes of *Es-MSTN*

1. 1T genotype, 2. 2T genotype, 3. 3T genotype, 4. 4A genotype, 5. 5T genotype, 6. 1C genotype, 7. 2C genotype, 8. 3C genotype, 9. 4G genotype, 10. 5G genotype, 11. TA genotype, 12. CG genotype; the same below

转染后不同时间 (24、36、48、60、72、84、96 和 108 h) 的荧光强度差异进行统计分析, 发现不同基因型过表达载体的荧光强度相对值 (FI) 具有显著差异 ($P < 0.05$) (图 3-a)。在 12 种基因型中, 有 3 种 (3C、4G、5G) 突变基因型载体的表达下调 ($FI < 1$), 而另外 9 种发生了表达上调 ($FI > 1$) (图 3-a)。此外, TA 基因型 (T/T/T/A/T) 中的 5 个



图版 *Es-MSTN*-pEGFP-N1 不同基因型过表达载体在 293T 细胞中的荧光观察

Plate Fluorescence observation of the different genotypes of *Es-MSTN*-pEGFP-N1 overexpression vectors transfected in 293T cells

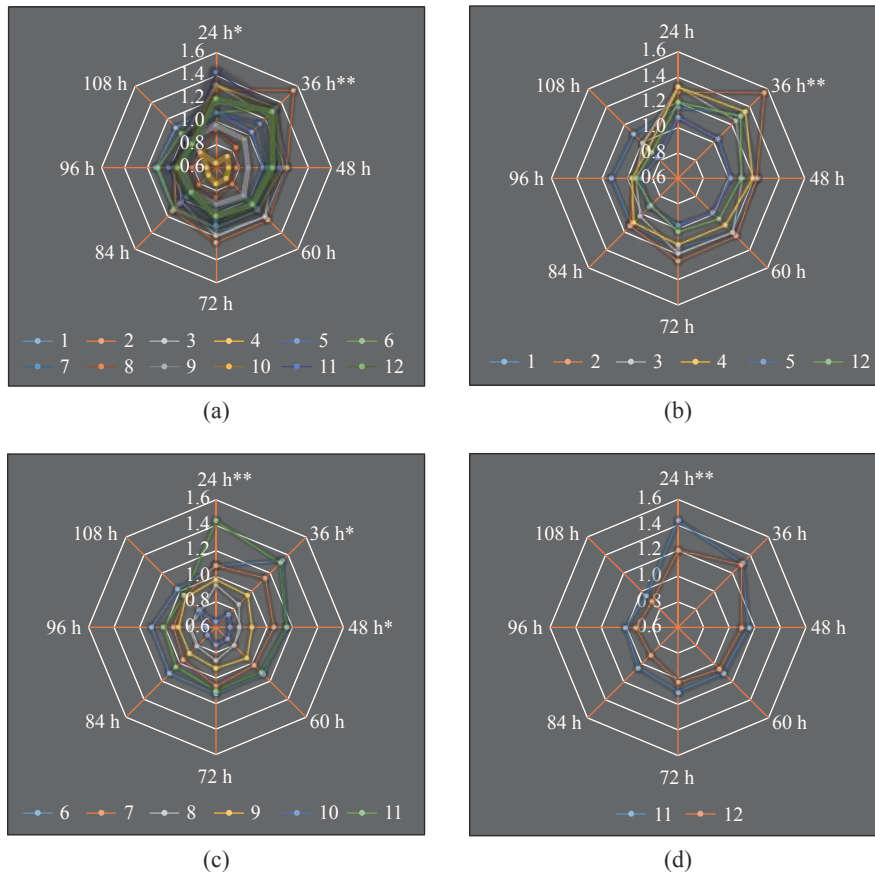


图 3 Es-MSTN-pEGFP-N1 不同基因型过表达载体在 293T 细胞中的相对荧光强度 (FI) 差异

(a) 为 12 种基因型; (b) 为 GC 型的 5 种单位点突变型; (c) 为 TA 型的 5 种单位点突变型; (d) 为 CG 和 TA 基因型

Fig. 3 Relative fluorescence intensity (FI) difference of different genotypes of Es-MSTN-pEGFP-N1 overexpression vectors transfected in 293T cells

(a) the 12 genotypes; (b) represents 5 single point mutation from the GC genotype; (c) represents 5 single point mutation from the TA genotype; (d) represents CG and TA genotypes

位点依次单独突变均对基因的表达产生显著影响, 且影响逐步增大, 其中以第 5 个位点突变对载体的表达产生最大的下调作用; CG 基因型中 5 个位点单独突变也对基因的表达产生了显著的影响, 但以第 2 个位点突变对基因的表达产生了最明显的上调作用 ($P < 0.05$) (图 3-a)。

对各基因型的荧光强度 (FI) 值进行雷达图分析, 发现 Es-MSTN-pEGFP-N1 各基因型的过表达载体在 293T 细胞中转染后的表达强度以 24 和 36 h 最高, 并且出现明显分化, 在 24 h 表达强度达到峰值的有 3C、4G、3T、5T 和 TA 共 5 种基因型; 在 36 h 表达强度达到峰值的有 1C、2C、1T、2T、4A 和 CG 共 6 种基因型; 而 5G 基因型载体的表达强度的最高点延迟至 108 h, 且在其他时间点也极显著低于其他基因型 ($P < 0.01$) (图 3-a)。对荧光强度进一步分类对比, 发现以

CG 型 (C/C/C/G/G) 为参照的单位点依次突变型 (1T、2T、3T、4A、5T) 中既有上调也有下调, 其中上调最强的位点为 2T, 下调最强的位点为 5T (图 3-b); 而以 TA 型 (T/T/T/A/T) 为参照的单位点依次突变型 (1C、2C、3C、4G、5G), 各位点突变总体产生了下调效应 (图 3-c); 而 CG 型和 TA 型对比分析发现, TA 型的表达强度显著高于 CG 型 ($P < 0.05$), 并且在转染后 24 h 差异最大 ($P < 0.05$) (图 3-d)。

3 讨论

基因的核苷酸组成不仅决定了 mRNA 的稳定性, 也会影响 mRNA 的转录效率^[17-18]。如 Duan 等^[9]对人类多巴胺受体基因 (*DRD2*) 的研究证实, C957T 的位点变异对该基因的 mRNA 二级结构稳定性产生负面影响, 该突变型在 CHO-K1 细胞中的半衰期显著降低, 进而降低了 mRNA 的丰

度。然而 Kudla 等^[19]应用相同启动子对蛋白序列相似度达 85% 的热休克蛋白 HSPA1A 和 HSPA8 进行体外表达,发现高 GC3[密码子第 3 位碱基为 G/C(GC3)]含量 HSPA1A(92%)的表达丰度是低 GC3 含量 HSPA8(46%)的 10 倍,即 GC3 含量相差 1 倍,而表达丰富却相差 10 倍,但该实验也进一步阐明,高 GC3 含量和 mRNA 稳定性无关。另一方面,由于 G 与 C 以及 A 与 T 之间分子结合氢键的差异,高 GC 含量的 DNA 和 RNA 分子的一级结构与次级结构会更加稳定,分子在进行热变性时需要的能量则会更高^[20-23]。在本实验中,5 个变异位点对 *Es-MSTN* 编码区全长的 GC 含量改变最大不超过 0.35%,改变相对有限,但 TA 型的体外转录和过表达水平平均高于 CG 型。这说明个别位点改变对基因转录效率的影响可能是通过改变分子内局部结构的稳定性来发挥效应。

基因表达的终产物是蛋白质,然而,基因从 DNA 到蛋白的过程涉及到转录、转录后、翻译、翻译后多个层面的调控,在加工成熟的 mRNA 进行翻译时,mRNA 的核苷酸构成也可以对翻译效率进行调控。如 Kudla 等^[24]在人工合成的编码相同 GFP 蛋白的 154 个随机同义突变基因的研究中发现,同义突变对 mRNA 次级结构打开的自由能和位于翻译起始区域的翻译速率决定了不同核苷酸构成 GFP 蛋白的翻译速率。此外,当同义突变位点改变了密码子的使用偏好时,基因的翻译效率就会被改变,其蛋白质的正确折叠也会受到影响^[11,25-26]。如 Komar 等^[27]在对氯霉素乙酰转移酶基因(*CAT*)的体外研究中,将 16 个稀有密码子突变为高频密码子时,提升了蛋白翻译速率。本研究中的 5 个位点均不在翻译起始位置,5G 型突变体的 *MSTN*-GFP 融合蛋白表达水平最低,但转录水平并不是最低,说明 *Es-MSTN* 同义突变的第 5 个位点对基因的表达除了影响 mRNA 的转录效率外,也有可能改变了该位点的密码子偏好性。

综上,本研究通过 T7 体外转录系统对中华绒螯蟹 *Es-MSTN* 的 5 个同义突变位点依次进行转录效率分析,发现这 5 个同义突变位点对基因转录具有重要影响,同时融合载体过表达系统也从蛋白质表达丰度上反映了不同位点突变影响了基因的表达。由于本实验应用的工具仅能观察到不同位点突变对基因转录以及基因表达影响的综合效应,还未能将转录后、翻译以及

翻译后这 3 个影响基因表达的调控过程进行单独研究和分析。因此,还需要进一步研究和探讨。

参考文献 (References):

- [1] Rimoin D, Pyeritz R, Korf B. Emery and rimoin's principles and practice of medical genetics[M]. Oxford: Academic Press, 2013: 1-12.
- [2] Kruglyak L. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies[J]. *Nature Genetics*, 1997, 17(1): 21-24.
- [3] Hunt R C, Simhadri V L, Iandoli M, et al. Exposing synonymous mutations[J]. *Trends in Genetics*, 2014, 30(7): 308-321.
- [4] Sauna Z E, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12(10): 683-691.
- [5] Zheng S Y, Kim H, Verhaak R G W. Silent mutations make some noise[J]. *Cell*, 2014, 156(6): 1129-1131.
- [6] Cartegni L, Chew S L, Krainer A R. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2002, 3(4): 285-298.
- [7] Yamaguchi T, Wakatsuki T, Kikuchi M, et al. The silent mutation *MLH1* c.543C>T resulting in aberrant splicing can cause Lynch syndrome: a case report[J]. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 2017, 47(6): 576-580.
- [8] Yadegari H, Biswas A, Akhter M S, et al. Intron retention resulting from a silent mutation in the VWF gene that structurally influences the 5' splice site[J]. *Blood*, 2016, 128(17): 2144-2152.
- [9] Duan J B, Wainwright M S, Comeron J M, et al. Synonymous mutations in the human *dopamine receptor D2(DRD2)* affect mRNA stability and synthesis of the receptor[J]. *Human Molecular Genetics*, 2003, 12(3): 205-216.
- [10] Chamary J V, Hurst L D. Evidence for selection on synonymous mutations affecting stability of mRNA secondary structure in mammals[J]. *Genome Biology*, 2005, 6(9): R75.
- [11] Hanson G, Collier J. Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay[J]. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19(1): 20-30.
- [12] Zhou Z P, Dang Y K, Zhou M, et al. Codon usage is an

- important determinant of gene expression levels largely through its effects on transcription[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(41): E6117-E6125.
- [13] Chamary J V, Hurst L D. The price of silent mutations[J]. *Scientific American*, 2009, 300(6): 46-53.
- [14] Cortazzo P, Cerveñansky C, Marin M, *et al.* Silent mutations affect *in vivo* protein folding in *Escherichia coli*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 293(1): 537-541.
- [15] 吴廉. 中华绒螯蟹配套系育种群体的遗传与性别效应分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- Wu L. Genetic and sex-effect analysis in the breeding populations of complete set lines in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015(in Chinese).
- [16] 陈义培, 吴廉, 陈晓雯, 等. 中华绒螯蟹 *MSTN* 基因 SNPs 多态性及与生长性状的关联分析[J]. *水生生物学报*, 2018, 42(2): 293-299.
- Chen Y P, Wu L, Chen X W, *et al.* Polymorphism of *MSTN* gene and its association with growth traits in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(2): 293-299(in Chinese).
- [17] Sémon M, Mouchiroud D, Duret L. Relationship between gene expression and GC-content in mammals: statistical significance and biological relevance[J]. *Human Molecular Genetics*, 2005, 14(3): 421-427.
- [18] Courel M, Clément Y, Bossevain C, *et al.* GC content shapes mRNA storage and decay in human cells[J]. *eLife*, 2019, 8: e49708.
- [19] Kudla G, Lipinski L, Caffin F, *et al.* High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells[J]. *Plos Biology*, 2006, 4(6): e180.
- [20] Mamedov T G, Pienaar E, Whitney S E, *et al.* A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates[J]. *Computational Biology and Chemistry*, 2008, 32(6): 452-457.
- [21] Green M R, Sambrook J. Polymerase Chain reaction (PCR) amplification of GC-Rich templates[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2): 165-169.
- [22] Bochman M L, Paeschke K, Zakian V A. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13(11): 770-780.
- [23] Vinogradov A E. DNA helix: the importance of being GC-rich[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(7): 1838-1844.
- [24] Kudla G, Murray A W, Tollervey D, *et al.* Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*[J]. *Science*, 2009, 324(5924): 255-258.
- [25] Sharp P M. Codon Usage Bias. *Encyclopedia of genetics*[M]. New York: Academic Press, 2001: 402-406.
- [26] Tuller T, Waldman Y Y, Kupiec M, *et al.* Translation efficiency is determined by both codon bias and folding energy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(8): 3645-3650.
- [27] Komar A A, Lesnik T, Reiss C. Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during *in vivo* translation[J]. *FEBS Letters*, 1999, 462(3): 387-391.

Effects of synonymous mutation on transcription and translation efficiency of *Es-MSTN* gene in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

YUE Wucheng, YANG He, HOU Xin, WANG Jing'an,
CHEN Xiaowen, WANG Jun, WANG Chenghui*

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,
Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Synonymous mutation can induce phenotypic variation by altering gene transcription, translation and post-transcription process in recent studies on human disease. To study the effects of synonymous mutation on gene transcription and translation, the total of 12 genotypes (CG, TA, 1T, 2T, 3T, 4A, 5T, 1C, 2C, 3C, 4G and 5G) deduced from the five SNP synonymously mutated loci in *MSTN* genes of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) (*Es-MSTN*), such as SNP1(C/T), SNP2(C/T), SNP3(C/T), SNP4(A/G) and SNP5(T/G), were employed by the means of site-directed mutagenesis, *in vitro* transcription, and gene overexpression. The results showed that the 12 alleles displayed obviously different transcriptional efficiency *in vitro*, and the highest transcriptional level was found in the 1C allele and the lowest level in the CG and TA alleles, in which the TA allele exhibited significantly higher transcriptional level than the CG allele. The overexpression in 293T cells found that expression intensity of different mutant genotypes was significantly different at different time (24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 and 108 h) after transfection, and the TA allele exhibited significantly higher expression level than the CG allele. Generally, the present study indicated that these five synonymous mutations had important effects on transcription and translation of *Es-MSTN* gene, suggesting that synonymous mutations could play an important role in biological process. Further studies at post-transcriptional and post-translational levels may shed light on the intrinsic relationship between gene function and phenotypic variation in *E. sinensis*.

Key words: Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*); *MSTN*; synonymous mutation; gene function

Corresponding author: WANG Chenghui. E-mail: wangch@shou.edu.cn

Funding projects: Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (2017-02-0800-10-F00076; 2019-3-4); Agriculture Research System of Shanghai (202004); Leading Agricultural Talents in Shanghai Project, China (D-8004-16-0217); Shanghai Science and Technology Committee Programs, China (13DZ2251800)