

吉富罗非鱼 *GH* 基因的分离及其 SNPs 与增重的相关性

唐永凯^{1,2}, 俞菊华^{1,2*}, 徐跑^{1,2}, 李建林¹, 李红霞¹, 任洪涛²

(1.农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081; 2.南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘要: 采用同源克隆法从吉富罗非鱼血液 DNA 中分离出 *GH* 基因。*GH* 含有 5 个内含子, 阅读框长 615 bp, 编码 204 个氨基酸。通过随机测序法, 在 *GH* 的外显子 6 处找到 1 个 SNPs 位点(A/G)。通过 PCR-RFLP 检测吉富罗非鱼群体内 *GH* 的 SNPs, 同时将其增重性状与 SNPs 进行相关分析, 结果显示, 在雌鱼中, GG 型和 GA 型个体增重高于 AA 型个体, 但差异不显著; 在雄鱼中, AA 型个体增重显著高于 GG 型个体($P<0.05$)。

关键词: 吉富罗非鱼; 生长激素; 多态位点; 增重

中图分类号: Q781

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2012)04-0422-04

Cloning of growth hormone (*GH*) gene of genetically improved farmed tilapia(GIFT) and association of the single nucleotide polymorphisms(SNPs) of *GH* gene with the weight gain

TANG Yong-kai^{1,2}, YU Ju-hua^{1,2*}, XU Pao^{1,2}, LI Jian-lin¹, LI Hong-xia¹, REN Hong-tao²

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Wuxi, Jiangsu 214081, China; 2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi, Jiangsu 214081, China)

Abstract: *GH* gene of GIFT (genetically improved farmed tilapia) was isolated from blood DNA by homology-based cloning. *GH* gene included five introns and an open reading frame of 615 bp which encoded 204 amino acid residues. A site in exon 6 of *GH* gene showed SNPs (A/G) through random sequencing. PCR-RFLP method was used to detect SNPs in GIFT population and the correlation between weight gain and SNPs was analyzed. The results showed that the weight gain of female individuals with GG and GA genotypes was higher than that of which with AA genotype, but there was no significant difference. The weight gain of male individuals with AA genotype was significantly higher than that of which with the GG genotype ($P<0.05$).

Key words: tilapia; growth hormone; SNPs; weight gain

生长激素(growth hormone, GH)是由动物垂体前叶分泌的一种蛋白类激素, 由190~191个氨基酸残基组成^[1]。在神经内分泌生长轴上, GH通过与生长激素结合蛋白(growth hormone binding protein, GHBP)结合而运输, 与靶器官上的生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)结合, 促使类胰岛素生长因子(insulin-like growth factors, IGFs)产生, 并进入血液循环, 再通过IGFs结合蛋白(insulin-like

growth factor binding protein, IGFBP)转运到全身组织细胞, 促进动物生长和碳水化合物代谢、葡萄糖吸收、脂肪分解以及核酸、蛋白质合成^[2-3]。

在育种领域, SNPs 常作为一种分子标记辅助育种工具。研究者们对与生长性状相关基因的启动子、外显子、内含子进行多态性检测, 并对不同基因型与可测性状进行相关性分析, 确定各基因型和性状间的关联度, 寻找影响性状的 SNPs, 然后将

收稿日期: 2012-05-17

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(200903046-02); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2011JBFC03)

作者简介: 唐永凯(1978—), 男, 湖北黄冈人, 博士研究生, 主要从事鱼类遗传育种研究, tangyk@ffrc.cn; *通信作者, yujh@ffrc.cn

其运用于后续的育种实践中^[4-6]。在畜禽上, *GH* 的 SNPs 普遍存在, 而且有些位点与动物经济性状显著相关^[7-9]。在水产动物上, 尚未见 *GH* 的 SNPs 与生长性状相关性的报道。吉富罗非鱼(genetically improved farmed tilapia, GIFT)是通过家系选育获得的优良品系, 其生长速率高于养殖类罗非鱼, 具有重要的经济价值^[10]。笔者克隆吉富罗非鱼的 *GH* 基因, 测序查找 *GH* 的 SNPs, 并通过 PCR-RFLP 检测 *GH* 的 SNPs, 同时对吉富罗非鱼的增重性状与其 SNPs 进行相关性分析, 找寻与增重相关的 SNPs, 旨在为后续分子标记育种提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

供试鱼取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴实验基地, 为同一批繁殖的苗种。在供试鱼体质量为 20 g 左右时进行 PIT 标记, 在同一池塘养殖 300 d 后测定每尾鱼体质量、体长、体高、体厚等。标记筛选用鱼共 294 尾, 其中雌鱼 188 尾, 雄鱼 106 尾。

1.2 基因组 DNA 的提取

从鱼尾静脉抽血 0.2~0.3 mL, 用蛋白酶 *K* 消化过夜, 用酚-仿法抽提 DNA, 用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 在紫外分光光度计(Eppendorf)上测定 DNA 浓度, 用 TE 将 DNA 样品稀释成 50~100 ng/ μ L。

1.3 吉富罗非鱼 *GH* 的克隆

根据莫桑比克罗非鱼 *GH* 的 DNA 序列(GenBank 登录号: AF033806), 设计 1 对能扩增翻译区的引物(P_1 , P_2), 分别靠近 *GH* 的 5'端和 3'端, 其序列见表 1。反应程序为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性

1 min, 57 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 8 min, 4 °C 保存。PCR 产物用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶回收, 连接转化, 蓝白斑挑选阳性克隆, 酶切鉴定, 送上海博尚生物有限公司测序。

1.4 SNPs 的查找

根据获得的吉富罗非鱼序列, 随机挑选 8 尾吉富罗非鱼的 DNA, 用引物 P_1 和 P_2 重新扩增 *GH* 序列。根据获得的 9 条 *GH* 序列, 经 ClustalX 比对, 找出 SNPs。当同一位点不同碱基出现的比例约为 1/8 时, 即认定该位点为 SNPs 位点。应用在线软件 (http://insilico.ehu.es/restriction/two_seq/) 查找适合检测 SNPs 的限制性内切酶。

1.5 多态位点的检测

根据获得的 SNPs 位点, 设计检测引物 P_3 和 P_4 , 其中反向引物 P_4 根据莫桑比克罗非鱼 *GH* 序列设计(表 1)。PCR 反应总体积为 12.5 μ L, 其中模板 DNA 1.0 μ L, 10 μ mol/L 引物各 0.25 μ L。取 5 μ L PCR 产物, 加限制性内切酶(*RsaI*)0.15 μ L, 反应总体积为 10 μ L, 37 °C 下消化 2 h 以上, 使之完全酶切, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物, 确定基因型。

1.6 统计分析

利用 SPSS 软件对吉富罗非鱼 *GH* 的 SNPs 与增重性状进行相关性分析; 用 Little Programme 分析多态信息含量。

2 结果与分析

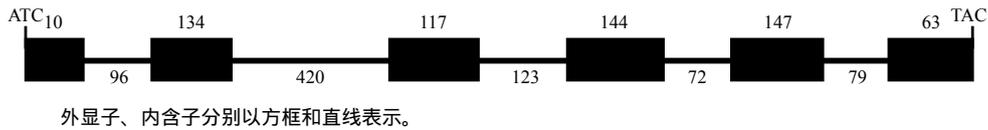
2.1 吉富罗非鱼 *GH* 基因的分离

从吉富罗非鱼 DNA 中扩增 *GH* 基因的长度为 1 494 bp, 提交到 GenBank(登录号为 HM565014), 参照莫桑比克罗非鱼的 *GH*, 经序列比对, 发现吉富罗非鱼 *GH* 含有 5 个内含子, 阅读框长 615 bp, 编码 204 个氨基酸, 内含子均符合 GT-AG 原则(图 1)。与莫桑比克罗非鱼 *GH* 比对, DNA 序列的相似性为 98.9%, 阅读框核苷酸序列长度一致, 编码氨基酸序列的相似性为 99.3%。

表 1 克隆吉富罗非鱼 *GH* 及检测其 SNPs 的引物

Table 1 Primers for *GH* gene cloning and SNPs detecting in GIFT

引物	序列(5'—3')	长度/ bp	GC 含量/%	融解 温度/°C
P_1	CCAGAGCCCTGAACTGATGCC	21	61.9	61.0
P_2	AGCAGAGTTTGCCAACATGAGG	22	50.0	59.4
P_3	GCTCCTTACGGAACTATTATCA	23	39.1	57.8
P_4	AACATTATTCCCGTTCACACCT	22	40.9	57.8



外显子、内含子分别以方框和直线表示。

图1 GH基因的结构

Fig.1 Gene structure of GH gene

2.2 SNPs 的查找及检测结果

通过双向测序, 比对 9 尾吉富罗非鱼 GH 的 DNA 序列, 发现只有外显子 6 上 1 个位点不同碱基出现的比例为 3/6, 其他位点均为 1/8。根据以往查找 SNP 的经验, 不同碱基出现比例为 1/8 的

为假阳性, 故不进行检测。用在线软件查到该 SNPs 的适合限制性内切酶为 *RsaI*。酶切后, AA 型片段长度分别为 142、265 bp; GG 型片段长度为 407 bp; GA 型片段长度分别为 142、265、407 bp。图 2 为部分检测个体的酶切结果。

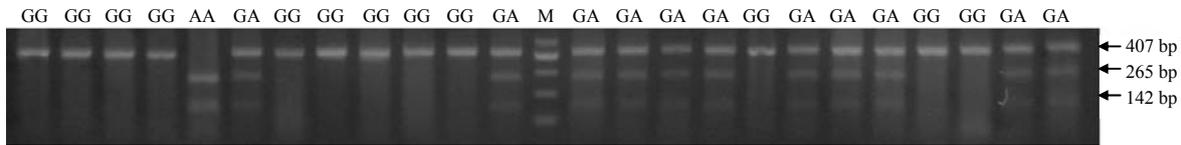


图2 GH基因 SNPs 位点的酶切电泳图

Fig.1 Electrophoresis of SNPs sites of GH gene digested by restriction enzyme

2.3 多态位点与增重的相关性

在被检测的 294 尾吉富罗非鱼中, GG 型的有 193 尾, 其中雄鱼 73 尾; GA 型的有 94 尾, 其中雄鱼为 29 尾; AA 型的有 7 尾, 其中雄鱼为 4 尾(表 2)。GG、GA、AA 基因型频率分别为 65.6%、32.0%、2.4%。等位基因 G、A 的频率分别为 81.63%、18.37%, 表现为低度多态($P < 0.25$)。

似性高达 99.3%, 表明 GH 序列非常保守。用随机测序法查找 SNPs, 发现只有 1 个位点存在 SNPs, 表明 SNPs 在吉富罗非鱼 GH 中分布较少, 而同为神经内分泌生长轴上的 *GHR1* 和 *GHR2* 分别存在 6 个和 16 个 SNPs^[11], 这表明 GH 受到的选择压力可能大于 *GHRs*。GH 等位基因 G、A 的基因频率分别为 81.63%、18.37%, 表现为低度多态($P < 0.25$), 这与甘南牦牛 GH 基因的 SNPs 分析结果^[12]相似。甘南牦牛 GH 基因存在 2 个 SNPs, 但基因位点均表现为低度多态, 这可能与 SNPs 的标记特性有关, 通常只有 3 种类型, 而且有些位点只有 3 种类型^[13-14]。

表 2 GH 基因的基因型个体的增重和样本数

Table 2 Weight gain of individuals with different GH genotypes and the sample number

基因型	增重/g		样本数/个	
	雄鱼	雌鱼	雄鱼	雌鱼
GG	(501.6±114.7)b	344.4±58.7	73	120
GA	(538.7±140.1)ab	346.6±72.5	29	65
AA	(627.5±21.0)a	279.3±21.5	4	3

由表 2 可见, 在雌鱼中, GG 型和 GA 型个体的增重高于 AA 型个体, 但差异不显著; 在雄鱼中, AA 型个体的增重显著高于 GG 型个体($P < 0.05$)。

吉富罗非鱼雌、雄鱼的生长速率差异较大, 在雌鱼中, GG 型和 GA 型个体的增重高于 AA 型个体, 但差异不显著; 在雄鱼中, AA 型个体的增重显著高于 GG 型个体($P < 0.05$)。这一标记可应用于吉富罗非鱼的分子标记育种中, 但增重属于数量性状, 受微效多基因控制。具有多个与生长性状相关 SNPs 个体的生长速率明显较快^[15], 标记越多的个体, 增重越大, 富集 4 个标记以上的增重比 2 个标记的约快 44%。本研究得到的与增重相关的 SNPs 和生长相关基因的 SNPs 可共同应用于吉富罗非鱼的分子标记育种中。

3 结论与讨论

通过同源克隆法得到吉富罗非鱼的 GH 基因。吉富罗非鱼与莫桑比克罗非鱼 GH 氨基酸序列的相

参考文献:

- [1] 林浩然. 鱼类生理学[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1999: 205-220.
- [2] Antoni B G, Cheryl A C, Robert S S. The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis[J]. *Circulation Research*, 2000, 86: 125-130.
- [3] Eva C, Ignacio T A. Serum insulin-like growth factor I in brain function[J]. *Med*, 2006, 55(2): 59-63.
- [4] 王卓, 咎林森. 秦川牛 *H-FABP* 基因第 1 外显子 SNPs 及其与部分肉用性状相关性的研究[J]. *西北农林科技大学学报*, 2008, 36(11): 11-15.
- [5] Fontanesi L, Scotti E, Buttazzoni L, et al. A single nucleotide polymorphism in the porcine cathepsin K (CTSK) gene is associated with back fat thickness and production traits in Italian Duroc pigs[J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(1): 491-495.
- [6] 于凌云, 白俊杰, 叶星, 等. 大口黑鲈 *MyoD* 基因结构和单核苷酸多态性位点的筛选[J]. *水产学报*, 2009, 33(1): 1-8.
- [7] Lan X Y, Chen H, Pan C Y, et al. Polymorphism in growth hormone gene and its association with production traits in goats[J]. *Journal of Applied Animal Research*, 2007, 32(1): 55-60.
- [8] 束婧婷, 张莹, 尹平安, 等. 清远麻鸡生长激素基因 (*GH*) 的 SNPs 检测及其对生长及繁殖性状的遗传效应[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(2): 308-313.
- [9] Hou G Y, Wang D J, Guan S, et al. Associated analysis of single nucleotide polymorphisms of *IGF2* gene's exon 8 with growth traits in Wuzhishan pig[J]. *Mo1 Bio1 Rep*, 2010, 37(1): 497-500.
- [10] 董在杰, 何杰, 朱健, 等. 60 个家系吉富品系罗非鱼初期阶段的生长比较[J]. *淡水渔业*, 2008, 38(3): 32-34.
- [11] 阮瑞霞, 俞菊华, 李红霞, 等. 吉富罗非鱼两种生长激素受体基因的分离及与增重相关的 SNPs 位点[J]. *动物学杂志*, 2011, 46(3): 52-61.
- [12] 白晶晶, 王继卿, 胡江, 等. 甘南牦牛 *GH* 基因的 SNPs 分析[J]. *中国牛业科学*, 2009, 35(2): 1-5.
- [13] 唐永凯, 李建林, 俞菊华, 等. 吉富罗非鱼 *MSTN* 基因结构及其多态性与生长性状的相关性[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(1): 44-51.
- [14] 陈雪峰, 杨国梁, 俞菊华, 等. 吉富罗非鱼 *IGF2* 基因分离及其单核苷酸多态性与体型、增重相关性[J]. *动物学杂志*, 2010, 45(2): 107-114.
- [15] 陶文静, 马龙俊, 阮瑞霞, 等. 建鲤 *GHR* 基因多态性及与增重相关的 SNP 位点的筛选[J]. 2011, 35(4): 622-629.

责任编辑: 王赛群