

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

阮瑞霞^① 俞菊华^{①②*} 李红霞^② 李建林^② 唐永凯^② 魏可鹏^①

^① 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081;

^② 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室 无锡 214081

摘要: 实验分离了吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 两种生长激素受体基因 *GHR1* 和 *GHR2* 的全长 cDNA 以及 *GHR1* 阅读框中外显子 2~9、*GHR2* 阅读框外显子 2~8 的 DNA 序列。在 *GHR1* 和 *GHR2* 分别找到 6 个和 16 个 SNPs 位点, 其中只有 2 个位点在外显子部分。使用 PCR-RFLP 方法检测了 5 个家系共 120 尾吉富罗非鱼在 8 个 SNPs (*GHR1* 内含子 3_A612G、内含子 3_A989T、内含子 7_A599C; *GHR2* 内含子 3_C330T、内含子 3_A645G、内含子 3_G687T、内含子 3_A967G、内含子 7_C107T) 的基因型。不同基因型与雌、雄吉富罗非鱼增重的相关性分析显示, *GHR1* 内含子 3_A612G 及内含子 3_A989T 与雄鱼增重极显著 ($P < 0.01$) 和显著 ($P < 0.05$) 相关, 杂合型个体增重最大, 在雌鱼群体中有类似趋势, 但差异不显著; 内含子 7_A599C 与雄鱼、雌鱼增重分别呈现极显著 ($P < 0.01$) 和显著 ($P < 0.05$) 相关, CC 型雌雄鱼增重均大于 AA 型; *GHR2* 上只有内含子 3_G687T 与雌鱼增重显著相关 ($P < 0.05$), GT 型个体增重显著大于 GG 型。检测了 60 个家系共 356 尾吉富罗非鱼在 3_A612G、3_A989T、7_A599C 和 3_G687T 的基因型与增重性状的相关性, 结果具有相同趋势, 因样本少、遗传背景多样, 导致差异性显著降低。实时定量 PCR 结果显示, *GHR1* 在雄鱼肝的表达量是雌鱼的 1.36 倍; 除肾外, *GHR2* 在雄鱼各组织的表达量均低于雌鱼, 这部分解释了 *GHR1* 和 *GHR2* 基因上 SNP 位点对雌、雄吉富罗非鱼增重的不同影响。此外, *GHR1*、*GHR2* 对生长影响程度的不同, 导致只在 *GHR2* 上找到 1 个 SNP 位点对增重有影响。

关键词: 吉富罗非鱼; 生长激素受体; 单核苷酸多态性; 增重; 组织表达

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2011)03-37-10

Isolation of Two Growth Hormone Receptor Genes and SNPs Associated with Body Weight in GIFT Strain Tilapia *Oreochromis niloticus*

RUAN Rui-Xia^① YU Ju-Hua^{②*} LI Hong-Xia^② LI Jian-Lin^②

TANG Yong-Kai^② WEI Kei-Peng^①

^① Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081;

^② Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: Growth hormone receptors (GHR) which located on the cell membrane is the only pathway for growth

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (No. 2011JBFC03, 2009JBFB05), 农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室第七期开放课题 (No. LFBU0706), 公益性行业 (农业) 科研专项经费项目 (No. 200903046-02);

* 通讯作者, E-mail: yujh@ffrc.cn;

第一作者介绍 阮瑞霞, 女, 硕士研究生; 研究方向: 鱼类遗传育种; E-mail: rxlhb@163.com。

收稿日期: 2010-11-15, 修回日期: 2011-03-07

hormone (GH) to get into cells and affect the growth in animals, they play a vital important role on animal growth. Two cDNA sequences and DNA sequences of exon 2–9 of *GHR1*, exon 2–8 of *GHR2* were isolated from GIFT strain (Genetically Improved Farmed Tilapia strain, *Oreochromis niloticus*) using RT-PCR and PCR in this study. Six and sixteen SNPs were identified on *GHR1* and *GHR2* respectively, only two of which were located at exons. Genotypes were test in eight SNPs (*GHR1* intron 3_A612G, intron 3_A989T, intron 7_A599C; *GHR2* intron 3_C330T, intron 3_A645G, intron 3_G687T, intron 3_A967G, intron 7_C107T) of 120 individuals from five families of GIFT strain by PCR-RFLP. Correlation analysis between genotypes and weight gain showed that *GHR1* intron 3_A612G and intron 3_A989T associated with male fish weight gain ($P < 0.01$ and $P < 0.05$) significantly. Similar situation was found in the female population, but the difference was not significant ($P > 0.05$). Intron 7_A599C was significantly associated with both male ($P < 0.01$) and female ($P < 0.05$) fish weight gain. The CC type fish weight gain was significantly higher than AA type's. On the *GHR2*, only intron 3_G687T was found to correlate with female weight gain significantly ($P < 0.05$). The GT type female fish gain was significantly higher than GG type's. The correlation between genotypes of 3_A612G, 3_A989T, 7_A599C and 3_G687T and weight gain was detected in 356 individuals from 60 families of GIFT strain (6 individuals in average of each family). There were similar growth situation among different genotypes' fish, the decreased significance may result in the diverse genetic background and smaller number of samples. Real-time quantitative PCR results indicated that *GHR1* expression in liver of male fish was 1.36 times higher than that in female's liver, the male fish *GHR2* expression in the tissues (except kidney) was lower than that in the female, which can explain the different effects of *GHR1* and *GHR2* SNP loci on the weight gain of male and female GIFT. In addition, the different influences of *GHR1* and *GHR2* on the growth result in that only one SNP loci on *GHR2* could affect the weight gain.

Key words: GIFT; GHRs; SNP; Weight gain; Tissues expression

动物的生长主要由生长激素 (growth hormone, GH)-胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF-1) 生长内分泌轴调控。生长激素受体 (growth hormone receptor, GHR) 是该轴上重要因子之一, 它以二聚体形式与 GH 结合, 启动细胞内的信号传导机制, 促进 IGF-1 的表达和分泌, 进而促进组织细胞的生长、分化^[1-2]。硬骨鱼类存在 2 个 *GHR* 基因^[3], 迄今已克隆到南方鲇 (*Silurus meridionalis*)^[4]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[5]、金头鲷 (*Sparus aurata*)^[6]、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*)^[3]、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)^[7] 等鱼类的 *GHR1* 和 *GHR2* cDNA 序列。分析金头鲷 (AY699980、AY699981) 和东方鲀 (CAAB0101386、CAAB01001701) 等鱼的 GHRs DNA 序列, 可知这些鱼 *GHR1* 基因阅读框包含 9 个外显子, 而 *GHR2* 基因含有 8 个外显子。现有研究表明, GHR 在鱼类脑、肾、胃、肠、性腺、肌肉、脂肪等许多组织中均有表达, 其

中以肌肉和肝中的表达量最高^[8-10]。鱼类 GHR 的表达受日龄、营养状况、生长环境和激素水平等因素的调节, Ma 等^[11] 研究发现, 雄性尼罗罗非鱼肝 *GHR1* mRNA 表达与生长率显著正相关 ($P < 0.01$), 而 *GHR2* mRNA 表达与生长率无显著相关性 ($P > 0.05$); Fukada 等^[12] 发现大麻哈鱼 (*Oncorhynchus masou*) 禁食 3 周后肝 *GHR* mRNA 表达下降; Caldach-Giner 等^[9] 发现真鲷 (*Sparus aurata*) 肝 *GHR* mRNA 在夏季的表达量比春季高; Zhang 等^[4] 用 17 β -雌二醇 (estradiol, E2)、17 α -甲基睾酮 (methyltestosterone, MT) 和可的松 (cortisol) 对南方鲇进行药物处理, 结果表明 E2 能够显著下调肝 sc*GHR1* 和 sc*GHR2* mRNA 水平, 而 MT 显著上调 sc*GHR1* 和 sc*GHR2* mRNA 水平, 经 cortisol 处理后 sc*GHR1* mRNA 表达水平显著上升, 而 sc*GHR2* mRNA 表达水平没有显著变化。这些均说明鱼类 GHR 与许多生理功能密切相关。

利用生长相关基因包括 *GHR* 基因的多态

性研究筛选与生长相关的分子标记在畜禽等均有报道。Blott 等^[13]在牛 (*Bos taurus*) 的 *GHR* 基因中发现 A/T 替代,这一突变对荷斯坦奶牛和娟姗乳牛牛乳年产量及乳成分有显著影响。赵高峰等^[14]在秦川牛 *GHR* 基因 SNPs 研究中发现,AB 基因效应在部分生长性状上高于其他基因型。Deng 等^[15]对兔 (*Oryctolagus cuniculus*) *GHR* 基因 SNPs 研究中发现,外显子 10_T705C 和 C810T 均与活重、全净膛重、屠宰率等性状相关。在鱼类方面,倪静等^[16]在研究牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) *GHR* 基因 Promoter 区微卫星序列多态性与生长性状关系中发现,部分基因型与牙鲆的全重、全长、体长等生长性状显著相关。本实验室在建鲤 (*Cyprinus carpio* var. *jian*) *GHR* 基因上筛选到 5 个与增重相关的 SNPs^[17]。

吉富罗非鱼是通过家系选育的优良品系^[18],其生长速度高于其他类养殖罗非鱼,具有重要的经济价值。本研究旨在通过克隆吉富罗非鱼 *GHR1*、*GHR2* DNA 序列,筛选其 SNPs 位点,进而分析 *GHR* 基因 SNPs 位点与吉富罗非鱼生长性状的相关性,为开展罗非鱼分子标记辅助育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验鱼 实验鱼均取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴养殖基地。为从马来西亚世界渔业中心引进的吉富罗非鱼 60 个家系共 1 831 尾鱼苗,分池养至体重 100 g 左右时进行 PIT 标记,然后在同一池塘养殖 300 d 后,测定增重。

标记筛选用鱼取自 5 个家系,每家系 23 ~ 25 尾,共 120 尾(♀ 66, ♂ 54)。为验证所选标记在其他家系的表现,于 60 个家系中,每家系选取 2 ~ 11 尾,共 356 尾(♀ 241, ♂ 115)进行相关位点与鱼体增重的相关分析。使用吉富罗非鱼肝组织分离 *GHR1*、*GHR2* cDNA 序列。取 6 尾吉富罗非鱼成鱼(♀ 3, ♂ 3)肝、肌肉、心、性腺、脑以及肾的新鲜组织,作为实时定量 RT-

PCR 的实验材料。

1.1.2 引物 根据尼罗罗非鱼 *GHR1* (EF052861) 和 *GHR2* (AY973233) cDNA 序列设计 F1、R1 和 F2、R2 引物,分离吉富罗非鱼 *GHR1* 和 *GHR2* 全长 cDNA。根据已获得的吉富罗非鱼 *GHR1*、*GHR2* cDNA 序列和 GenBank 登录的金头鲷 *GHR1* (AY699980、AY699981) 和 *GHR2* (AY699982、AY699983、AY699984、AY699985) DNA 序列,确定内含子位置,设计分段分离 *GHR1* 外显子 2 ~ 9 和 *GHR2* 外显子 2 ~ 8 的引物(表 1)。所有引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 cDNA 的分离 取新鲜肝组织,使用 Trizol Reagen (TaKaRa, 中国大连)抽提总 RNA 5 μg,使用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 一般为 1.9 ~ 2.0。根据 M-MLV (TaKaRa, 中国大连)说明进行 RT 反应,以 RT 反应液为模板,使用 F1、R1 和 F2、R2 引物对分别分离 *GHR1*、*GHR2* cDNA。PCR 产物用 1% 琼脂糖进行电泳,切下目的条带,用 DNA 回收试剂盒(上海申能博彩生物有限公司)纯化,并与 pMD18-T 载体 (TaKaRa, 中国大连)连接,16℃ 过夜,转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 感受态细胞中,采用蓝白斑挑选阳性克隆, *Eco* R I、*Hin* d III (TaKaRa, 中国大连)双酶切验证阳性克隆后送至上海博尚生物技术有限公司测序。

1.2.2 *GHR1*、*GHR2* 部分 DNA 序列的克隆及 SNPs 查找 从尾静脉采血,使用传统的蛋白酶 K 消化过夜,酚-氯仿法提取基因组 DNA^[19]。提取的 DNA 用 TE 溶解后,1% 琼脂糖电泳检测完整性,紫外分光光度计测定浓度, -4℃ 保存备用。使用分段 PCR,对 6 尾吉富罗非鱼 *GHR1* 外显子 2 ~ 9 和 *GHR2* 外显子 2 ~ 8 进行扩增。PCR 总反应体系为 25 μl,其中模板 DNA 2 μl (100 ~ 200 ng),引物各 0.5 μl (10 μmol/L),其他组分根据 *Taq* 酶(申能博彩)说明书要求。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 45 s (根据引物

表 1 实验所使用的引物
Table 1 Primers used in this experiment

引物 Primers	序列 (5'-3') Sequence	退火温度 (°C) Temperature	产物及片段大小 (bp) Product and size
F1	ATGGCTCTCTCGCCCTCTCTAAT	58.0	<i>GHR1</i> cDNA
R1	TGTCATTTCATTGTGAGAGGTTCCC		1 918
F2	CCATGCTCCTCTTCGTGCTTCAC	58.0	<i>GHR2</i> cDNA
R2	GAATTACGGCGTGATACTTCCCAG		1 710
F3	ACATCATCAGCTCTCATTGAGCCTC	56.0	<i>GHR1</i> 外显子 2 ~ 外显子 3
R3	CCCTTCTCATCATAGAGGATGGTCTC		430
F4	TACCAGCCAGTGAAGGAGTGTC	56.0	<i>GHR1</i> 外显子 3 ~ 外显子 5
R4	TCTCAGTCACTTGAATGAAGACGG		2 188
F5	CAGACAATCTACGGTCTGCGCTTAG	56.0	<i>GHR1</i> 外显子 5 ~ 外显子 8
R5	CGGTATCCTTCTTCTCTCCATTATC		1 477
F6	GGAGGTCGATGAGACAGAGGATG	57.0	<i>GHR1</i> 外显子 8 ~ 外显子 9
R1	同前		997
F7	GAGACGTCCACACCTCACTAGCTG	56.0	<i>GHR2</i> 外显子 2 ~ 外显子 3
R7	CCCTTCTCATCATAGAGGATGGTCTC		1 689
F8	CACTACAGCACTGAGACGCCAAAC	56.0	<i>GHR2</i> 外显子 3 ~ 外显子 5
R8	TTGATGGGATGTGAATGAAGACAG		2 747
F9	CAGTGCTCCCTTTACGGGCTTC	56.0	<i>GHR2</i> 外显子 5 ~ 外显子 6
R9	ATCAGGATGCCCACTAAACACAAG		381
F10	CCGTGTGGCTTTGCTCATCT	55.6	<i>GHR2</i> 外显子 6 ~ 外显子 7
R10	GGTCCTAACTACAGCTGAGGATTCT		724
F11	TGCAATGATCGCCTCTAAGTGC	57.0	<i>GHR2</i> 外显子 7 ~ 外显子 8
R2	同前		895
P1	ACTTCGAGCAGGAGAT	60.0	β -actin
P2	ACAGTGTGGCATAACAG		213

退火温度及扩增片段调整), 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min; 4°C 保存。扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 切胶纯化、连接、转化, 每个个体挑选两个阳性克隆测序 (使用方法及试剂同 1.2.1)。使用 Clustal W^[20] 比对 6 个个体共 12 条序列, 同一位点不同碱基比例大于 1/3 的认定为潜在的 SNP 位点。

1.2.3 SNP 位点检测 使用 PCR-RFLP 检测 120 尾吉富罗非鱼在 8 个 SNPs 位点的基因型。检测所使用的 PCR 引物 (上海捷瑞)、限制性内切酶 (上海捷瑞) 以及不同基因型酶切片段信息见表 2。PCR 扩增总体积为 12.5 μ l, 其中模板 DNA 1.0 μ l, 引物各 0.25 μ l (10 μ mol/L)。取 5 μ l PCR 产物, 加限制性内切酶 5 U, 适宜温度下消化 4 ~ 6 h, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 确定基因型。

1.2.4 *GHR1*、*GHR2* 组织表达 将 6 尾吉富罗非鱼 (♀3, ♂3) 的肝、肌肉、心、性腺、脑和肾组织, 分别在液氮条件下研磨, 取 0.2 g 抽提总 RNA, 使用 SYBR Premix Ex TaqTM II RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa, 中国大连) 于 Mini Opticon 定量 PCR 仪上测定 *GHR1*、*GHR2* 在不同组织的相对表达量。使用 β -actin 为内参, 对所加 cDNA 模板量进行均一化。在同一条件下, 将 cDNA 稀释 1、5、25、125、625 及 3 125 倍, 及以空白对照为模板分别制出 *GHR1*、*GHR2* 和 β -actin 的标准曲线。将 *GHR1*、*GHR2* 在各组织的表达量与 β -actin 的比值进行比较, 选其最小值为 1, 计算 *GHR1*、*GHR2* 在各个组织的相对表达量。

1.2.5 数据处理 使用 SPSS 软件单因素方差分析和独立样本 *t*-检验对不同基因型与吉富罗非鱼增重进行相关性分析。

表 2 8 个 SNP 位点的检测引物、限制性内切酶和酶切产物条带
Table 2 Primers, restriction enzymes and restriction fragments

基因 Genes	SNP 位点 Loci	引物 Primer (5' - 3')	内切酶 Restriction enzyme	酶切位点及温度 Restriction site and temperature (°C)	酶切片段 Length of restriction fragments (bp)
<i>GHR1</i>	内含子 3_A612G	F:CTTGACCTGTAGTAGGGTCAGGC	<i>Mph</i> 1103 I	ATGCA^T (37)	AA:189,520
	Intron 3_A612G	R:GGTCCAGTTTAAATTCAGTGGC			GG:709
	内含子 3_A989T	F:CTTGCGTTTGCACCACTCTCA	<i>Ssp</i> I	AAT^ATT (37)	AA:30,80,331
	Intron 3_A989T	R:GGTCCAGTTTAAATTCAGTGGC			TT:441
	内含子 7_A599C	F:CGGCTCATTTGGTAGGGATATG	<i>Taq</i> I	T^CGA (37)	AA:222,365
Intron 7_A599C	R:CGGTTATCCTTCTCTCCATTATC	CC:587			
<i>GHR2</i>	内含子 3_C330T	F:GGGTTTCTTTGTTAATGACATGG	<i>Pag</i> I	T^CATGA (37)	TT:111,355
	Intron 3_C330T	R:CTGCAGGACACTAGAAACCACTG			CC:466
	内含子 3_A645G	F:GTCACCTTACATTATCCTCCACTCC	<i>Bse</i> L I	CCNNNNN^NNGG (55)	GG:93,125,340
	Intron 3_A645G	R:ACATTCGGCCCGAGAGAATTAGG			AA:218,340
	内含子 3_G687T	F:GTCACCTTACATTATCCTCCACTCC	<i>Tas</i> I	^AATF (65)	TT:138,370
	Intron 3-G687T	R:ACATTCGGCCCGAGAGAATTAG			GG:508
	内含子 3_A967G	F:GTCACCTTACATTATCCTCCACTCC	<i>Pvu</i> II	CAG^CTG (37)	GG:106,452
	Intron 3_A967G	R:ACATTCGGCCCGAGAGAATTAG			AA:558
	内含子 7_C107T	F:GGTTATCCTTTTGCCTCCTGTTC	<i>Hin</i> 1 II	CATG^ (37)	CC:171,361
	Intron 7_C107T	R:CCAGGATTGATGTCGACTCCCTAAG			TT:532

2 结 果

2.1 吉富罗非鱼 *GHR1*、*GHR2* 基因结构 实验分离到的吉富罗非鱼 *GHR1*、*GHR2* cDNA 序列与尼罗罗非鱼 (EF052861, AY973233) 相似性较高,分别为 98.84%, 99.65%, 仅个别碱基

存在差异。分段 PCR 分离得到的 *GHR1* 和 *GHR2* 部分 DNA 拼接后共 4 832 bp 和 6 032 bp。吉富罗非鱼 *GHR1* DNA 序列阅读框有 9 个外显子,8 个内含子;*GHR2* 阅读框有 8 个外显子,7 个内含子。其序列特征详见表 3。

表 3 *GHR1*、*GHR2* 的序列特征
Table 3 Characters of *GHR1*, *GHR2* sequences

区域 Region	<i>GHR1</i>		<i>GHR2</i>	
	长度 Length (bp)	GC (%)	长度 Length (bp)	GC (%)
内含子 2 Intron 2	195	32.82	1 268	33.60
外显子 3 Exon 3	170	42.35	179	46.93
内含子 3 Intron 3	1 094	31.54	1 380	38.84
外显子 4 Exon 4	179	48.04	179	51.40
内含子 4 Intron 4	604	39.90	1006	40.66
外显子 5 Exon 5	154	44.81	145	45.52
内含子 5 Intron 5	168	36.31	200	35.00
外显子 6 Exon 6	86	45.35	84	44.05
内含子 6 Intron 6	160	40.62	167	32.93
外显子 7 Exon 7	70	44.29	70	42.86
内含子 7 Intron 7	707	35.50	374	31.28
外显子 8 Exon 8	241	47.92	847	51.77
内含子 8 Intron 8	101	32.30	—	—
外显子 9 Exon 9	760	52.70	—	—

“—”表示基因中不存在此段序列。“—” indicate the gene sequence does exist in this section.

2.2 SNPs 查找及检测 本实验在 *GHR1* 外显子 2~9 和 *GHR2* 外显子 2~8 分别查找到 6 个和 16 个 SNPs 位点, SNPs 位置及不同碱基出现比例见表 4。用 PCR-RFLP 的方法检测了 120 尾吉富罗非鱼在 *GHR1* 3 个 SNPs (内含子 3_ A612G、内含子 3_ A989T 和内含子 7_ A599C)

和 *GHR2* 5 个 SNPs (内含子 3_ C330T、内含子 3_ A645G、内含子 3_ G687T、内含子 3_ A967G 和内含子 7_ C107T) 的基因型。结果表明, *GHR1* 的 3 个 SNP 位点均有 3 种基因型 (图 1), *GHR2* 内含子 3_ A967G 只有 AA 和 AG 2 种基因型, 其他 4 个位点均有 3 种基因型 (图 2)。

表 4 *GHR1* 和 *GHR2* SNPs 位点
Table 4 The SNPs in *GHR1* and *GHR2*

基因 Genes	区域 Region	SNPs 位点及比例 SNPs and ratio
<i>GHR1</i>	内含子 3 Intron 3	G258C (1/2), A612G (1/2), T989 A (1/2)
	内含子 4 Intron 4	G83C (1/1)
	内含子 7 Intron 7	A599C (1/1)
	外显子 8 Exon 8	C164T (2/1)
<i>GHR2</i>	内含子 2 Intron 2	A996T (2/1), G1186A (2/1), C1193A (2/1), A1231C (2/1)
	内含子 3 Intron 3	C10T (2/1), C330T (2/1), A645G (2/1), G687T (1/1), A967G (1/2), A1253C (1/1)
	内含子 4 Intron 4	T858G (2/1)
	外显子 5 Exon 5	A88G (1/2)
	内含子 5 Intron 5	T146G (1/1)
	内含子 6 Intron 6	A153T(2/2)
	内含子 7 Intron 7	C95T(1/2), C107T(1/2)

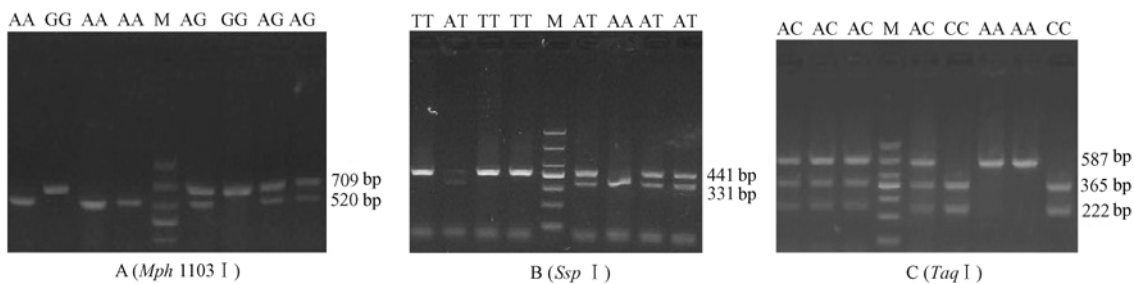


图 1 *GHR1* 3 个 SNPs 位点酶切电泳图

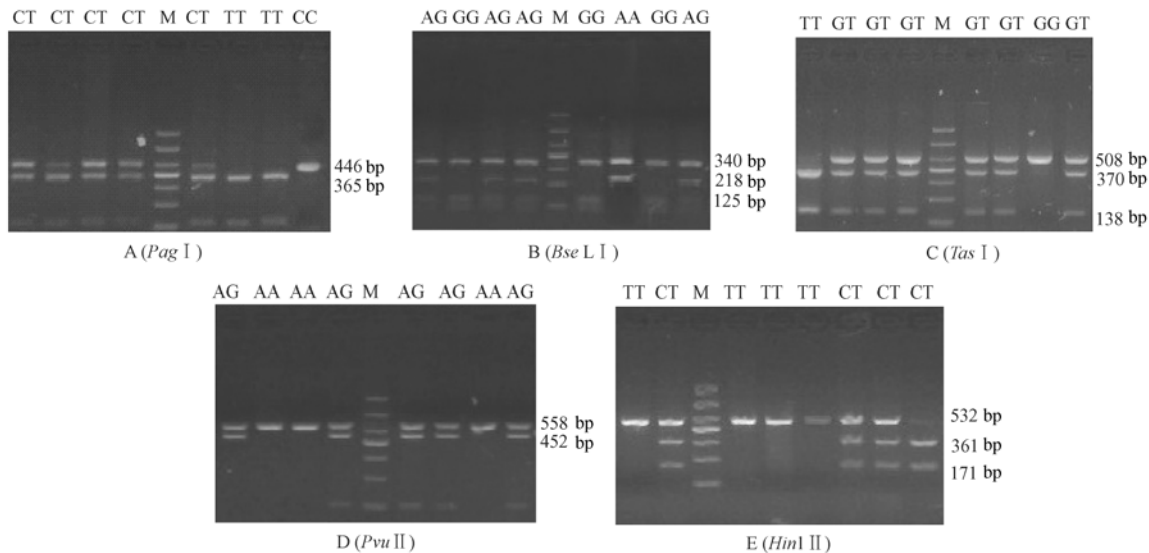
Fig. 1 Electrophoresis patterns of the 3 SNPs sites with *GHR1*

M: DL 1 000 DNA 分子量标准; A: 内含子 3_ A612G; B: 内含子 3_ A989T; C: 内含子 7_ A599C。括号内为使用的限制性内切酶。
M: DL 1 000 DNA marker; A: Intron 3_ A612G; B: Intron 3_ A989T; C: Intron 7_ A599C. The brackets are the restriction enzymes used.

2.3 *GHR1* SNPs 位点与增重相关性分析
GHR1 SNPs 基因型与增重相关性分析表明, 内含子 3_ A612G 基因型与雄鱼增重差异极显著 ($P < 0.01$), AG 型个体增重极显著大于 GG 型, 在雌鱼群体也有相同趋势, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 内含子 3_ A989T 基因型与雄鱼增重呈现显著相关 ($P < 0.05$), AT 基因型个体增重显著高于 AA 型, 在雌鱼群体也有相同趋势, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 内含子 7_

A599C 基因型与雄鱼和雌鱼增重呈现极显著 ($P < 0.01$) 和显著 ($P < 0.05$) 相关, CC 型、AC 型雄鱼增重极显著大于 AA 型, CC 型雌鱼增重显著大于 AA 型 (表 5)。

2.4 *GHR2* SNPs 位点与增重相关性分析
GHR2 5 个 SNPs 位点基因型与增重相关性分析表明, 内含子 3_ G687T 基因型与雌鱼增重差异显著 ($P < 0.05$), GT 型个体增重显著大于 GG 型。内含子 3_ C330T、内含子 3_ A645G、内含子

图 2 *GHR2* 5 个 SNPs 位点酶切电泳图Fig. 2 Electrophoresis patterns of the 5 SNPs sites with *GHR2*

M: DL 1 000 DNA 分子量标准; A: 内含子 3_C330T; B: 内含子 3_A645; C: 内含子 3_G687T; D: 内含子 3_A967G; E: 内含子 7_C107T。括号内为使用的限制性内切酶。
M: DL 1 000 DNA marker; A: Intron 3_C330T; B: Intron 3_A645G; C: Intron 3_G687T; D: Intron 3_A967G; E: Intron 7_C107T. The brackets are the restriction enzymes used.

表 5 *GHR1* 基因型与增重的相关性Table 5 The correlation between genotype of *GHR1* and weight gain from GIFT

SNP 位点 Loci	基因型 Genotype	雄鱼 Male		雌鱼 Female	
		增重 (Mean ± SD) Weight gain	样本数 Numbers	增重 (Mean ± SD) Weight gain	样本数 Numbers
内含子 3_A612G	AA	493.0 ± 109.9 ^{AB}	5	366.0 ± 18.4	2
内含子 3_A612G (<i>Mph</i> 1103 I)	AG	601.0 ± 57.5 ^A	11	387.7 ± 10.8	10
	GG	478.2 ± 133.2 ^B	38	351.6 ± 72.3	54
内含子 3_A989T	AA	476.4 ± 142.1 ^a	30	354.0 ± 73.8	50
内含子 3_A989T (<i>Ssp</i> I)	AT	559.1 ± 90.6 ^b	20	368.9 ± 91.3	14
	TT	443.9 ± 93.8 ^{ab}	4	366.0 ± 18.4	2
内含子 7_A599C	AA	396.1 ± 115.3 ^A	10	318.7 ± 80.8 ^a	11
内含子 7_A599C (<i>Taq</i> I)	AC	513.6 ± 117.2 ^B	23	356.0 ± 74.9 ^{ab}	33
	CC	546.6 ± 101.3 ^B	21	379.2 ± 71.7 ^b	22

同列中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Lowercase letters indicate significantly difference at $P < 0.05$ level; capital letters indicate significantly difference at $P < 0.01$ level.

3_A967G 和内含子 7_C107T 基因型与雌鱼和雄鱼增重差异均不显著 ($P > 0.05$) (表 6)。

2.5 SNPs 位点与其他家系吉富罗非鱼增重的相关性 为验证所选标记在其他家系的表现, 选取与增重相关位点 *GHR1* 内含子 3_A612G、内含子 3_A989T、内含子 7_A599C, *GHR2* 内含

子 3_G687T, 每家系平均检测 6 尾共 356 尾吉富罗非鱼在这些位点的基因型, 并与增重进行关联分析 (表 7)。结果表明, 内含子 3_A612G 的 AG 型雄鱼和雌鱼增重高于 GG 型和 AA 型, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 内含子 3_A989T 的 AT 型雄鱼增重高于 AA 型, 但差异不显著 ($P >$

0.05); 内含子 7_A599C 的 CC 型雄鱼和雌鱼增重 G687T 的 GT 型雌鱼增重高于 GG 型, 但差异不显著高于 AA 型 ($P < 0.05$)。内含子 3_ 显著 ($P > 0.05$)。

表 6 *GHR2* 基因型与增重的相关性

Table 6 The correlation between genotype of *GHR2* and weight gain from GIFT

SNP 位点 Loci	基因型 Genotype	雄鱼 Male		雌鱼 Female	
		平均增重 (Mean ± SD)	样本数	平均增重 (Mean ± SD)	样本数
		Weight gain	Numbers	Weight gain	Numbers
内含子 3_C330T	CC	—	0	386.7 ± 158.0	3
Intron 3_C330T (<i>Pag</i> I)	CT	509.0 ± 131.1	35	362.3 ± 78.9	40
	TT	494.7 ± 124.7	19	345.5 ± 60.5	23
内含子 3_A645G	AA	594.0 ± 52.3	2	332.8 ± 86.1	4
Intron 3_A645G (<i>Bse</i> L I)	AG	537.9 ± 198.5	17	345.0 ± 87.8	25
	GG	483.3 ± 135.6	35	368.7 ± 66.9	37
内含子 3_G687T	GG	547.1 ± 108.7	14	331.1 ± 79.8 ^a	25
Intron 3_G687T (<i>Tas</i> I)	GT	487.1 ± 124.7	32	380.8 ± 74.8 ^b	32
	TT	500.0 ± 167.3	8	348.0 ± 47.8 ^{ab}	9
内含子 3_A967G	AA	476.4 ± 129.2	37	353.9 ± 75.1	55
Intron 3_A967G (<i>Pvu</i> II)	AG	566.1 ± 103.5	17	375.5 ± 84.2	11
	TT	557.0 ± 95.5	9	368.7 ± 90.8	7
内含子 7_C107T	CC	557.0 ± 95.5	9	368.7 ± 90.8	7
Intron 7_C107T (<i>Hin</i> I II)	CT	472.3 ± 141.1	14	360.0 ± 80.8	23
	TT	503.9 ± 128.6	31	353.7 ± 72.7	36

同列中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Lowercase letters indicate significantly difference at $P < 0.05$ level.

表 7 3_A612G, 3_A989T, 3_A599C, 3_G687T 不同基因型与增重的相关性

Table 7 The correlation between genotype of 3_A612G, 3_A989T, 3_A599C, 3_G687T and weight gain

SNP 位点 Loci	基因型 Genotype	雄鱼 Male		雌鱼 Female	
		增重 (Mean ± SD)	样本数	增重 (Mean ± SD)	样本数
		Weight gain	Numbers	Weight gain	Number
内含子 3_A612G	AA	438.3 ± 37.6	3	326.2 ± 122.4	5
Intron 3_A612G	AG	543.3 ± 129.3	58	356.5 ± 106.5	103
	GG	492.6 ± 138.7	54	337.1 ± 81.1	133
内含子 3_A989T	AA	490.6 ± 140.2	53	368.4 ± 77.3	152
Intron 3_A989T	AT	531.7 ± 110.9	54	339.9 ± 95.7	86
	TT	479.3 ± 132.9	8	249.0 ± 94.3	3
内含子 7_A599C	AA	451.9 ± 139.4 ^a	12	324.3 ± 78.9 ^a	45
Intron 7_A599C	AC	517.5 ± 137.5 ^{ab}	85	343.2 ± 91.9 ^{ab}	134
	CC	556.7 ± 104.6 ^b	18	364.6 ± 194.6 ^b	62
内含子 3_G687T	GG	543.0 ± 113.5	28	344.4 ± 93.5	90
Intron 3_G687T	GT	489.6 ± 120.6	72	367.7 ± 84.2	116
	TT	541.8 ± 170.6	15	354.3 ± 86.7	35

同列中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Lowercase letters indicate significantly difference at $P < 0.05$ level.

2.6 *GHR1*、*GHR2* 表达量分析 取 RT 反应液 7 种不同稀释倍数的模板, 分别制备 *GHR1*、*GHR2* 和 β -*actin* 的标准曲线。设原液中目的基因的拷贝数为 100 000, 则得到 *GHR1* 的标准曲

线方程: $y = -0.279 3x + 11.188, R^2 = 0.996$; *GHR2* 的标准曲线方程: $y = -0.301 7x + 11.805, R^2 = 0.997 6$; β -*actin* 的标准曲线方程: $y = -3.988 7x + 38.224, R^2 = 0.997$ 。其中 y 为

模板浓度以 10 为底的对数, x 代表 Ct 值, R^2 代表相关系数。

实时荧光定量 RT-PCR 检测雌雄吉富罗非鱼 *GHR1*、*GHR2* 在各个组织的表达量 (表 8), 结果表明, *GHR1* 在雌鱼和雄鱼肝表达量均最高, 分别是肌肉表达量的 7 倍和 2 倍, 其次是肌肉、心等, 在肾的表达量较少, *GHR1* 在雄鱼肝

的表达量是雌鱼的 1.36 倍。*GHR2* 在肝的表达量少于心、肌肉等, 并且在脑的表达量较少, 除肾外, *GHR2* 在雄鱼各组织的表达量均低于雌鱼。*GHR1* 除在雄鱼肝的表达量略高于 *GHR2* 肝的表达量外, 在其他组织中, 均低于 *GHR2* 的表达量。

表 8 *GHR1*、*GHR2* 在雌雄吉富罗非鱼中不同组织的相对表达量 (Mean \pm SE, $n=3$)

Table 8 The relative expression levels of *GHR1* and *GHR2* in different tissues of female and male GIFT

基因	性别	肝	肌肉	心	性腺	脑	肾
Genes	Sex	Liver	Muscle	Heart	Goand	Brain	Kidney
<i>GHR1</i>	♂	80.639 \pm 6.701	11.212 \pm 2.201	9.567 \pm 2.193	5.258 \pm 1.831	2.063 \pm 1.022	2.735 \pm 1.264
	♀	59.108 \pm 5.661	27.026 \pm 4.746	7.556 \pm 2.178	8.466 \pm 2.777	18.037 \pm 2.302	1.000
<i>GHR2</i>	♂	76.142 \pm 5.368	148.232 \pm 6.980	148.232 \pm 3.887	9.220 \pm 1.953	3.912 \pm 1.242	46.731 \pm 4.349
	♀	80.100 \pm 5.839	181.015 \pm 11.784	433.434 \pm 17.623	353.823 \pm 13.628	24.283 \pm 2.236	18.497 \pm 2.935

3 讨 论

GHR 是生长轴上重要因子之一, 对动物的生长起着非常重要的作用。本实验在吉富罗非鱼 *GHR1* 和 *GHR2* 分别查找到 6 个和 16 个 SNPs 位点, 其中只有 2 个 SNPs 位于外显子中且是无义突变, 这与外显子所受进化压力大有关^[21]。*GHR2* 上的 SNP 位点个数明显多于 *GHR1*, 暗示着 *GHR2* 所受的选择压力低于 *GHR1*。*GHR2* 是鱼类中独有的, 在哺乳类、禽类等动物中至今没有发现^[3], 已有研究表明鱼类 *GHR1* 与哺乳类等的 GHR 的同源性高于 *GHR2*^[4]。鱼类 *GHR1* 和 *GHR2* 在功能上也存在着差异, 较多的研究表明对于生长, *GHR1* 发挥着更为重要的作用^[3], 这表明鱼类 *GHR1* 和 *GHR2* 在进化过程中功能有了一定程度的分化^[4]。实验中 *GHR1* 上的 3 个位点均与增重相关, 而 *GHR2* 上 5 个 SNP 位点中只有 1 个与雌鱼的增重相关, 也说明了吉富罗非鱼 *GHR2* 对生长的影响低于 *GHR1*。

吉富罗非鱼 *GHR1* 和 *GHR2* 组织表达结果显示, *GHR2* 除了在雄鱼肝低于 *GHR1* 外, 在其他组织均高于 *GHR1*。这和南方鲂^[4]、建鲤^[22] *GHRs* 在各组织的表达情况基本一致, 只是吉富

罗非鱼 *GHR2* 在脑中的表达量高于 *GHR1*, 而在南方鲂和建鲤中两者表达量基本一致^[10,22], 推测可能与鱼的种类有关。此外, *GHR1* 在雄性吉富罗非鱼肝中的表达量为雌鱼的 1.36 倍, 这可以部分解释 *GHR1* 中与雄鱼增重相关的位点有 3 个, 但与雌鱼增重相关的只有 1 个, 并且此位点与雄鱼增重差异的显著性程度高于雌鱼。*GHR2* 除肾外, 在其他组织中的表达量均为雌鱼高于雄鱼, 这也可能是 *GHR2* 中只有 1 个位点与雌鱼增重相关而不存在与雄鱼增重相关位点的部分原因。

生长是由多基因控制的数量性状, 因此筛选 SNP 位点时应尽量保证样本遗传背景一致, 从而减少对生长有影响的遗传位点。样本量遗传背景越杂, 则要求样本量越多。本实验用于筛选与增重相关的 SNPs 标记的 120 尾吉富罗非鱼来自 5 个家系, 每个家系样本数大于 22 尾, 而用于验证的 356 尾吉富罗非鱼来自 60 个家系, 平均每家系 6 尾, 样本量少而遗传背景多样, 虽然导致 A599C 和位点 A612G 在筛选标记的 120 尾鱼中与雄鱼增重差异极显著相关, 而在验证组分别为差异显著和不显著, A989T 和 G687T 与个体增重显著相关在验证组降低为不显著, 但不同基因型与增重的相关性仍然具有

相同趋势。由此认为本实验筛选到的 4 个分子标记可用于吉富罗非鱼分子育种。

参 考 文 献

- [1] Jiang J, Wang X, He K, et al. A conformationally sensitive GHR [growth hormone (GH) receptor] antibody: impact on GH signaling and GHR proteolysis. *Molecular Endocrinology*, 2004, 18(12): 2981 - 2996.
- [2] Cowan J W, Wang X, Guan R, et al. Growth hormone receptor is a target for presenilin-dependent gamma-secretase cleavage. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(19): 19331 - 19342.
- [3] Jiao B W, Huang X G, Chan C B, et al. The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in sea bream. *J Molecular Endocrinology*, 2006, 36(1): 23 - 40.
- [4] Zhang L, Huang X G, Jiao B W, et al. The structure analysis, tissue distribution and hormonal regulation of two distinct growth hormone receptors in southern catfish *Silurus meridionalis*. *Acta Zoologica Sinica*, 2006, 52(6): 1096 - 1106.
- [5] Eknath A E, Tayamen M M, Vera M S P, et al. Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. *Aquaculture*, 1993, 111: 177 - 188.
- [6] Saera-Vila A, Calduch-Giner J A, Perez-Sanchez J. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *General Comp Endocrinol*, 2005, 142: 193 - 203.
- [7] Li Y, Liu X C, Zhang Y, et al. Molecular cloning, characterization distribution of two types of growth hormone receptor in orange spotted (*Epinephelus coioides*). *General and Comparative Endocrinol*, 2007, 152: 111 - 122.
- [8] Tse D L Y, Tse M C L, Chan C B, et al. Seabream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full-length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1625: 64 - 76.
- [9] Calduch-Giner J A, Mingarro M, de Celis S V-R, et al. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comp Biochem Physiol B*, 2003, 136(1): 1 - 13.
- [10] Ozaki Y, Fukada H, Kazeto Y, et al. Molecular cloning and characterization of growth hormone receptor and its homologue in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 2006, 143(4): 422 - 431.
- [11] Ma X L, Zhang Y, Liu X C, et al. Developmental changes of two hepatic growth hormone receptors mRNA expression in male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(1): 1 - 7.
- [12] Fukada H, Ozaki Y, Pierce A L, et al. Salmon growth hormone receptor: molecular cloning, ligand specificity, and response to fasting. *General and Comparative Endocrinol*, 2004, 139: 61 - 71.
- [13] Blott S, Kim J J, Moio S, et al. Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics*, 2003, 163: 253 - 266.
- [14] 赵高峰, 陈宏, 雷初朝, 等. 秦川牛 GHR 基因 SNPs 及其与生长性状关系的研究. *遗传*, 2007, 29(3): 319 - 323.
- [15] Deng X S, Wan J, Chen S Y, et al. The correlations between polymorphism of growth hormone receptor gene and butcher traits in rabbit. *Hereditas*, 2008, 30(11): 1427 - 1432.
- [16] 倪静, 尤锋, 于深辉. 牙鲆 GHR 基因 Promoter 区微卫星序列多态性与生长性关系的初步研究. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2008, 38(5): 719 - 725.
- [17] 陶文静, 马龙骏, 俞菊华. 建鲤 GHR 基因多态性及与增重相关的 SNP 位点的筛选. *水生生物学报*. (待刊登).
- [18] 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. *淡水渔业*, 2008, 38(3): 32 - 34.
- [19] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. New York: Cold Springs Harbor Laboratory Press, 1989.
- [20] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22: 4673 - 4680.
- [21] 卢泳全, 汪旭升, 黄伟素, 等. 基于水稻内含子长度多态性开发禾本科扩增共有序列遗传标记. *中国农业科学*, 2006, 39(3): 433 - 439.
- [22] 俞菊华, 唐永凯, 李红霞, 等. 建鲤生长激素受体基因分离、转录子多态性以及组织表达. *水生生物学报*, 2011, 35(2): 218 - 229.