

牙鲆 *GH* 基因第 1 外显子区微卫星标记与幼鱼生长性状的相关分析

倪静^① 尤锋^{①*} 刘思思^② 吴志昊^① 徐冬冬^①
文爱韵^① 徐永立^① 张培军^①

① 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室 青岛 266071;

② 青岛易邦生物工程有限公司 青岛 266032

摘要: 以牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 一个养殖群体中的 100 个个体为研究材料, 分析了其 *GH* 基因第 1 外显子区域中微卫星座位的多态性, 同时对各基因型与其体重、体长等生长性状进行了关联性分析。结果表明, 该外显子微卫星座位具有一定的多态性, 共检测到 3 个等位基因 (A、B、C), 5 种基因型, 这 3 个等位基因的频率分别为 0.339、0.609 和 0.517; 该座位的观测杂合度及预期杂合度分别是 0.540 3 和 0.511 2, 多态信息含量及有效等位基因数分别是 0.423 8 和 2.045 8。One-way ANOVA 统计结果显示, 基因型为 AC 的个体体重、头长和体高明显大于其他基因型个体 ($P < 0.05$), C 是一个对体重、头长和体高有利的等位基因。

关键词: 牙鲆幼鱼; *GH* 基因第 1 外显子; 微卫星; 遗传多态性; 生长性状相关

中图分类号: Q347 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2011)05-108-06

Correlation Analysis of Microsatellite DNA Marker in the *GH* Exon 1 Region with Growth Traits of Juvenile Olive Flounder *Paralichthys olivaceus*

NI Jing^① YOU Feng^{①*} LIU Si-Si^② WU Zhi-Hao^① XU Dong-Dong^①
WEN Ai-Yun^① XU Yong-Li^① ZHANG Pei-Jun^①

① Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071; ② Yebio Bioengineering Co. Ltd. of Qingdao, Qingdao 266032, China

Abstract: In the *GH* exon 1 region, a microsatellite locus was detected in 100 juvenile samples from a cultured stock of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. The polymorphism of this locus and the genetic effect of genotypes on economic traits in this stock were analyzed. The results indicated that this microsatellite locus was polymorphic. Five genotypes and three allele were tested. The frequency values of A, B and C alleles were 0.339, 0.609 and 0.517, respectively. The observed heterozygosity and expected heterozygosity of this locus were 0.540 3 and 0.511 2. And the polymorphism information content and the effective allele number were 0.423 8 and 2.045 8, respectively. One-way ANOVA result showed that fish with genotype AC were heavier

基金项目 国家 973 项目 (No. 2010CB126304), 公益性行业 (农业) 科研专项经费项目 (No. 200903046), 鲆鲽类产业技术体系: 苗种繁育项目科学家课题 (No. nycytx-50);

* 通讯作者, E-mail: youfeng@qdio.ac.cn;

第一作者介绍 倪静, 女, 博士; 研究方向: 鱼类群体遗传学; E-mail: nijing@qdio.ac.cn.

收稿日期: 2011-01-07, 修回日期: 2011-04-26

than those with other genotypes and C was an effective allele in flounder weight.

Key words: Juvenile flounder; Exon 1 in *GH* gene; SSR; Genetic diversity; Association with growth traits

生长激素 (growth hormone, GH) 是脊椎动物脑垂体细胞合成和分泌的一种单链多肽激素,具有广泛的生理功能,能促进肌肉中的蛋白质合成,加速鱼类骨骼的纵向生长^[1];同时生长激素还具有提高饵料转化效率,促进鱼类性成熟,增强鱼体对高盐环境的适应能力等重要作用^[2]。因而,生长激素基因与鱼类生长应该是密切相关的。多种动物中检测到 *GH* 基因具有多态性,发现这些等位基因的存在,可以影响到这些动物的泌乳^[3]、生长^[4]等生产性状。同样,*GH* 基因的多态性在许多鱼类中也有报道,如 Almuly 等^[5]发现金头鲷 (*Sparus aurata*) *GH* 基因非编码区内有许多小卫星和微卫星的重复序列,正是这些序列重复数目和长度的不同导致金头鲷 *GH* 基因出现了复杂的多态性。刘峰等^[6]也在具有较近的亲缘关系和相似的生活习性,但生长性状差异较大的鳊 (*Siniperca chuatsi*)、大眼鳊 (*S. kneri*)、斑鳊 (*S. schezeri*) 3 种经济鱼类的生长激素基因的 3 个内含子中检测到多态性位点。但有关其多态性与鱼类生长性状连锁的研究还相对较少。

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 作为我国重要养殖鲆鲽鱼类之一,对其遗传育种的研究一直倍受关注。故需要筛选更多的与其生长性状相关的遗传标记用于育种。有关牙鲆生长激素基因多态性的研究最早见于日本学者 Kang 等^[7]对牙鲆 *GH* 基因的 RFLP 分析,他们发现第 1 内含子到第 2 内含子区域存在多态性,这些 DNA 序列的变化与其体重具有一定相关性。我们实验室利用 PCR-SSCP 也检测到牙鲆 *GH* 基因外显子部分存在序列遗传多态性,且该多态性与其体重和头长具有一定的连锁关系^[8]。本文以牙鲆 *GH* 基因第 1 外显子区域发现的重复序列 (TGAACC)₃ 为基础,应用微卫星检测技术,进行其遗传多态性与牙鲆体长、体重等生长性状的相关分析,以期筛选与这些性状相关的标记,为加速牙鲆品质改良和标记辅助选育提供

候选标记。

1 材料与方法

1.1 实验样品 实验所用牙鲆均为活样本,2005 年取自山东青岛胶南养鱼场,随机抽取当年一批牙鲆苗种 100 尾,其形态学测量数据分别为:体重 (13.41 ± 8.97) g,全长 (10.59 ± 2.20) cm,体长 (8.71 ± 1.85) cm,头长 (2.52 ± 0.47) cm,体高 (3.77 ± 0.82) cm,眼径 (0.42 ± 0.09) cm。然后,取其肌肉组织样品,置于液氮中,带回实验室, -80°C 保存备用。

1.2 基因组 DNA 的提取及检测 牙鲆基因组 DNA 的提取及检测见倪静等^[8]。

1.3 PCR 扩增 根据 Tanaka 等^[9]在 GenBank 中登载的牙鲆 *GH* 基因第 1 外显子微卫星部分序列,利用 Primer premier 5 软件设计引物。引物序列为, GHFE11: 5' ACC ATC ACA GCA CAC TGA AGA AC 3', GHFE12: 5' TTC AAT GGG ACA AGA AAA ATA AT 3',由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 扩增在本实验室 EppendorfTM Mastercycler PCR 扩增仪上进行。

PCR 反应体系为 25 μl ,扩增体系包括:1 \times PCR 反应缓冲液,100 $\mu\text{mol/L}$ 的 dNTPs,2.0 mmol/L 的 Mg^{2+} ,引物各 0.032 $\mu\text{mol/L}$,1 U 的 *Taq* DNA 聚合酶和 200 ng 的模板 DNA。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;之后 30 个循环,每个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

PCR 扩增完成后,扩增产物以溴酚蓝为指示剂用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离和 EB 染色,在紫外光下观察并拍照记录实验结果,每次电泳都有标准分子标记。

1.4 微卫星分析 取 3 μl PCR 产物与等体积加样缓冲液混合,上样于 10% 非变性的聚丙烯酰胺凝胶中(丙烯酰胺与 N,N'-亚甲双丙烯酰胺的质量比为 29:1),300 V 电压,电泳 1.5 h。

电泳结束后,先将凝胶用超纯水洗一遍,加

入 10% 乙醇溶液固定 5 min, 超纯水再洗一遍, 0.1% 硝酸银溶液染色 10 min, 超纯水洗第三遍, 最后加入显色液, 直至出现清晰的条带。以上过程均在脱色摇床上进行。银染后, 照相。

1.5 数据分析 在群体遗传变异的数据分析中, 利用 POPGENE 软件分别计算等位基因数 (A)、有效等位基因数 (a_e)、该座位杂合度的观察值 (H_o) 与无偏倚预期值 (H_e), 同时计算了其多态信息含量 (PIC) 和 Hardy-Weinberg 遗传偏离指数 (d)。

利用 MANOVA 方法, 进行该位点的不同基因型对养殖群体鱼类各表型性状影响的多变量方差分析, 并利用 SPSS 软件分析实验得到的基因型和各种形态学数据之间的相关性。

2 结果

2.1 牙鲆 GH 基因第 1 外显子微卫星分析

在 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶的电泳条件下, 对该牙鲆养殖群体的 PCR 产物进行微卫星分析, 结果显示其为多态座位, 检测到 5 种基因型, 含有 3 种等位基因, 分别定义为 A、B 和 C, 其相应的基因型为 AA、AB、BB、AC 和 BC (图 1)。

2.2 牙鲆 GH 基因第 1 外显子微卫星座位遗传多态性分析 各基因型个体的数量、基因型频率、等位基因及其频率、有效等位基因数 (a_e)、观测杂合度 (H_o)、预期杂合度 (H_e)、多态信息含量 (PIC) 以及 Hardy-Weinberg 平衡遗传偏离指数 (d) 等各数值见表 1。该多态座位

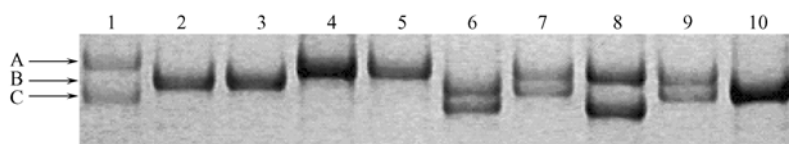


图 1 胶南牙鲆养殖群体中 GH 基因第 1 外显子微卫星座位电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic patterns of microsatellite locus amplified of GH gene exon 1 in Jiaonan cultured stock of *Paralichthys olivaceus*

1, 8: AC 型; 2, 3, 10: BB 型; 4, 5: AA 型; 6: BC 型; 7, 9: AB 型。

1, 8: AC genotype; 2, 3, 10: BB genotype; 4, 5: AA genotype; 6: BC genotype; 7, 9: AB genotype.

表 1 胶南牙鲆养殖群体 GH 基因第 1 外显子微卫星座位各基因型频率及等位基因频率

Table 1 Allele and genotype frequencies of microsatellite locus of GH gene exon 1 in *Paralichthys olivaceus* Jiaonan cultured stock

基因型 Genotype	基因型频率 (%) (个体数) Genotype frequency (ind)	等位基因 Allele	等位基因频率 Allele frequency (%)
AA	10.34 (9)	A	33.91
AB	43.68 (38)	B	60.92
BB	35.63 (31)	C	5.17
BC	6.90 (6)		
AC	3.45 (3)		
有效等位基因数 a_e Number of effective alleles	2.045 8		
观测杂合度 H_o Observed heterozygosity	0.540 3		
期望杂合度 H_e Unbiased expected heterozygosity	0.511 2		
多态信息含量 PIC Polymorphism information content	0.423 8		
遗传偏离指数 d Deviation index	0.056 9		

偏离 Hardy-Weinberg 平衡的 χ^2 显著性检验 P 值大于 0.05, 说明该群体基本符合 Hardy-Weinberg 平衡。

2.3 基因型及等位基因与各性状的相关分析结果 将测量的各形态学数据作为牙鲆的表型性状进行 MANOVA 分析, 其 Wilks' Lambda 值、Den df 和 F 值分别为 0.56、269.83 和 2.03, *GH* 基因第 1 外显子该微卫星座位不同基因型个体的表型性状之间具有极其显著的差异 ($P < 0.01$), 即不同基因型牙鲆个体的表型形态差异显著。

对该微卫星座位的 5 种基因型所对应取样个体的各种形态学数据进行 One way ANOVA 分析, 结果显示, 不同基因型个体在体重、头长和体高这 3 个性状中表现出显著的差异 ($P \leq 0.05$) (表 2), 其中, AC 基因型的个体体重、头长和体高在不同基因型中是最大的 ($P \leq 0.05$), 与体重、头长和体高呈正相关 (表 3)。对各基因型牙鲆体重的 LSD 多重比较结果: $AC > AA > BC > BB > AB$; 对各基因型牙鲆头长的

LSD 多重比较结果: $AC > AA > BB > AB > BC$; 对各基因型牙鲆体高的 LSD 多重比较结果: $AC > AA > BB > BC > AB$ 。等位基因 C 是对体重、头长和体高性状有利的等位基因。而其他数据在不同基因型之间没有显示出差异。

表 2 胶南牙鲆养殖群体 *GH* 基因第 1 外显子微卫星座位不同基因型对应个体形态学数据的 One way ANOVA 分析结果

Table 2 One way ANOVA results of morphologic data associated with microsatellite genotypes in *GH* gene exon 1 of Jiaonan cultured stock of *Paralichthys olivaceus*

性状 Trait	自由度 f	F 值 F value	P 值 P value
体重 Weight(g)	4	3.59	0.01
全长 Total length(cm)	4	1.60	0.18
体长 Body length(cm)	4	1.56	0.19
头长 Head length(cm)	4	2.52	0.05
体高 Body height(cm)	4	2.83	0.04
眼径 Eye diameter(cm)	4	0.96	0.44

表 3 胶南牙鲆养殖群体 *GH* 基因第 1 外显子微卫星座位 5 种基因型对应取样个体的形态学数据均差分析结果 (Mean \pm SD)

Table 3 Mean difference in weight associated with 5 different microsatellite genotypes of *GH* gene exon 1 in Jiaonan cultured stock of *Paralichthys olivaceus*

基因型 Genotype	个体数 Ind.	体重(g) Weight	全长(cm) Total length	体长(cm) Body length	头长(cm) Head length	体高(cm) Body height	眼径(cm) Eye diameter
AC	3	29.29 \pm 9.68 ^a	13.07 \pm 0.72	10.73 \pm 0.68	3.27 \pm 0.25 ^a	4.87 \pm 0.40 ^a	0.53 \pm 0.06
AA	9	15.45 \pm 10.35 ^b	11.10 \pm 2.36	9.19 \pm 1.99	2.61 \pm 0.51 ^b	3.89 \pm 0.74 ^{ab}	0.43 \pm 0.07
BC	6	13.88 \pm 11.07 ^b	10.80 \pm 2.63	10.80 \pm 2.63	2.20 \pm 1.20 ^b	3.65 \pm 0.86 ^b	0.43 \pm 0.12
BB	31	12.29 \pm 7.32 ^b	10.44 \pm 1.86	8.55 \pm 1.62	2.48 \pm 0.44 ^b	3.73 \pm 0.76 ^b	0.45 \pm 0.21
AB	38	11.68 \pm 7.52 ^b	10.16 \pm 2.18	8.39 \pm 1.76	2.45 \pm 0.42 ^b	3.64 \pm 0.77 ^b	0.40 \pm 0.08

上标字母不同的表示差异显著 ($P < 0.05$), 上标字母相同的表示差异不显著。

Different superscripts mean significant difference ($P < 0.05$). Same superscript means no difference.

3 讨 论

生长激素基因是与动物生长直接相关的基因, 其突变将影响到动物体重及体长的增长。故其被选为动物分子育种研究中的首选基因, 世界第一例转基因动物及第一例转基因鱼的构建中均采用生长激素基因, 该基因在受体动物

中的表达表现出极显著的促生长作用^[10-11]。鱼类 *GH* 基因与其他脊椎动物相比, 具有较高的多态性^[12], 这在鲑 (*Salmo salar*)^[13]、欧白鱼 (*Alburnus alburnus*)^[14] 和红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)^[15] 等鱼中得到普遍证实。牙鲆 *GH* 基因的研究中, Kang 等^[7] 利用 *Sau3A I* 酶切其 *GH* 基因, 发现 1 145 bp 的 *Sau3A I* 酶切片段存

在多态性,这个片段包括了第1内含子、第1外显子和第2内含子,同时,这些DNA序列的变化与其体重具有一定相关性。我们也通过SSCP分析技术在1个牙鲆养殖群体中发现GH基因的第4个外显子存在多态性,且该多态性与体重和头长具有一定的相关关系^[8]。本文进一步以该群体为样本,对牙鲆GH基因第1外显子序列中发现的微卫星座位进行分析,结果显示为一多态座位。其平均杂合度为0.5112和0.5403,处于较高水平。多态信息含量(PIC)是等位基因频率和等位基因数的变化函数,一般用来衡量一个基因片段在一个群体中的多态性,当 $PIC > 0.50$ 时,表明该遗传标记具有高度的可提供遗传信息性;当 $0.25 \leq PIC \leq 0.50$ 时,表明该遗传标记能够较为合理的提供遗传信息,而当 $PIC < 0.25$ 时,表明该遗传标记可提供的遗传信息较差^[16]。本试验中GH基因微卫星座位在该群体中的PIC为0.4238,故可以提供合理的遗传信息,其具有一定水平的遗传多样性,具有较高的选择潜力,通过进一步选育,可以提高群体整齐度。

微卫星DNA标记由于呈共显性的孟德尔式遗传,数量大、分布广且均匀、多态信息含量高、适合进行全基因组扫描等优点,已经成为研究QTL及其定位的最佳分子标记之一。以此为标记进行生长速度、肉质、抗逆性等数量性状的相关研究在畜牧中有很多报道。如微卫星标记与白来航蛋鸡(*Gallus gallus domesticus*)对马立克病抗性的相关性分析^[17],等等。但鱼类中的相关研究还相对较少,国内鱼类中微卫星标记与生长性状相关分析的研究报道有鲤(*Cyprinus carpio*)^[18]、鲇鱼(*Ictalurus punctatus*和*I. frucatus*)^[19]等。在牙鲆中,王桂兴等^[20]利用30对微卫星标记对1个雌核发育家系进行了检测,发现有8个标记分别与体重、体长、体高显著相关,将基因型与生长性状进行Duncan多重比较,找到4种与生长性状相关的基因型。

鱼类的生长激素基因的微卫星序列已经在金头鲷^[5]、尖吻鲈(*Lates calcarifer*)^[21]和鳊鱼^[6]

等鱼类中有相关报道。Kang等^[7]也发现牙鲆GH基因的第1内含子中含有微卫星序列。本文对牙鲆胶南群体第1外显子的这个微卫星座位进行了多态性分析,共发现5种基因型:AA、AB、BB、AC和BC。其中,等位基因A、B所占的比例较高,合起来为94.83%,等位基因C所占的比例较低,仅为5.17%,而且仅检测到AC、BC两种含有等位基因C的基因型,CC型根本没有被检测到。类似的情况在我们分析该群体GH基因第4外显子SNP中也有发现,共检测到两种基因型,其中AA型个体占88%,AB型个体占12%,另一种纯合的基因型BB型没有被检测到^[8]。根据对群体中该微卫星座位平衡性的检测,可以证明该群体处于Hardy-Weinberg平衡状态,所以,CC型个体在该群体中应该是存在的。也许所检测的样本数目还比较少,特别是那些体重和头长较大的牙鲆在取样过程中没有得到,可能导致了CC型个体没有被检测到。另一方面,这也许与所选试验群体有关,各种等位基因频率在不同的群体间存在明显的群体特征,这在猪(*Sus domestica*)的IGF-1基因调控区微卫星标记分析中也有类似报道^[22]。当然,这个结果还有待于在更多的牙鲆群体中,特别是遗传背景较为简单的群体或品系中进行验证。在这里,AC基因型的个体体重、头长和体高在不同基因型中是最大的,显著大于AA基因型的个体($P \leq 0.05$),初步说明等位基因C是与体重、头长和体高呈正相关的等位基因。

参 考 文 献

- [1] Forsyth I A, Wallis M. Growth hormone and prolactin-molecular and functional evolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2002, 7(3): 291-312.
- [2] Cavari B, Funkenstein B, Chen T T, et al. Effect of growth hormone on the growth rate of gilthead seabream (*Sparus aurata*), and the use of different constructs for production of transgenic fish. *Aquaculture*, 1993, 111(1/4): 189-197.
- [3] Falaki M, Snevers M, Prandi A, et al. *TaqI* growth hormone gene polymorphism and milk production traits in Holstein-Friesian cattle. *Animal Science*, 1996, 63(2):

- 175 - 181.
- [4] 闵令江, 李美玉, 孙国强, 等. 生长激素基因多态性与山羊体重性状的关系. 遗传学报, 2005, 32(6): 650 - 654.
- [5] Almuly R, Cavari B, Ferstman H, et al. Genomic structure and sequence of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone-encoding gene: identification of minisatellite polymorphism in intron I. Genome, 2000, 43(5): 836 - 845.
- [6] 刘峰, 鲁双庆, 刘臻, 等. 三种鳊鱼(*Siniperca*)生长激素基因内含子多态性的比较研究. 海洋与湖沼, 2009, 40(4): 470 - 478.
- [7] Kang J H, Lee S J, Park S R, et al. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Science, 2002, 68(3): 494 - 498.
- [8] 倪静, 尤锋, 张培军, 等. 牙鲆 *GH* 基因外显子多态性与生长性状关系的初步研究. 高技术通讯, 2006, 16(3): 307 - 312.
- [9] Tanaka M, Toma Y, Ohkubo T, et al. Sequence of the flounder (*Paralichthys olivaceus*) growth hormone-encoding gene and its promoter region. Gene, 1995, 165(2): 321 - 322.
- [10] Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. Nature, 1982, 300(5893): 611 - 615.
- [11] Zhu Z, Li G, He L, et al. Novel gene transfer into the fertilized eggs for goldfish (*Carassius auratus* L. 1758). Z Angew Ichthyol, 1985, 1(1): 31 - 34.
- [12] Ryyänänen H J, Primmer C R. Varying signals of the effects of natural selection during teleost growth hormone gene evolution. Genome, 2006, 49(1): 42 - 53.
- [13] Gross R, Nilsson J. Restriction fragment length polymorphism at the growth hormone 1 gene in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and its association with weight among the offspring of a hatchery stock. Aquaculture, 1999, 173(1/4): 73 - 80.
- [14] Schlee P, Fuchs H, Blusch J, et al. Genetic polymorphism in the intron of the growth hormone gene of the bleak. J Fish Biol, 1996, 48(6): 1275 - 1277.
- [15] 黄军, 严美娇, 陈国宏, 等. 东方鲀生长激素基因内含子 2 的克隆与多态性分析. 遗传, 2007, 29(11): 1378 - 1384.
- [16] 李瑞生, 赵爽, 曾林, 等. 国内实验动物微卫星 DNA 标记的研究进展. 传染病信息, 2008, 21(5): 278 - 279.
- [17] Yonash N, Cheng H H, Hillel J, et al. DNA microsatellite linked to quantitative trait loci affecting antibody response and survival rate in meat-type chickens. Poul Sci, 2001, 80(1): 22 - 28.
- [18] 张义凤, 张研, 鲁翠云, 等. 鲤鱼微卫星标记与体重、体长和体高性状的相关分析. 遗传, 2008, 30(5): 613 - 619.
- [19] Liu Z, Nichols A, Li P, et al. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. frucatus*), and their F1, F2, and backcross hybrids. Molecular and General Genetics, 1998, 258(3): 260 - 268.
- [20] 王桂兴, 刘永新, 孙效文, 等. 牙鲆微卫星分子标记与生长性状的相关性分析. 东北农业大学学报, 2009, 40(7): 77 - 84.
- [21] Yowe D L, Epping R J. Cloning of the barramundi growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of higher and lower vertebrate *GH* genes. Gene, 1995, 162(2): 255 - 259.
- [22] 刘畅, 张金玉, 廉传江, 等. IGF-1 调控区微卫星座位遗传多态性对松辽黑猪肉质性状的影响. 中国兽医学报, 2010, 30(1): 199 - 122.