

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2011.00622

建鲤 *GHR* 基因多态性及与增重相关的 SNP 位点的筛选

陶文静¹ 马龙俊¹ 阮瑞霞¹ 俞菊华^{1,2}

(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: 生长激素是调控动物生长的关键因子, 它通过与膜蛋白生长激素受体结合后发挥作用, 因此生长激素受体基因的变异对动物生长有着重要的影响。实验根据已分离的 4 个建鲤 *jIGHRs* 基因, 通过测定来自 6 尾建鲤的序列, 共找到 38 个 SNP 位点。使用 PCR-RFLP 方法检测了 353 尾建鲤在其中 5 个 SNP 位点 (1a 内含子 3 A43G、1a 外显子 8 A361G、1b 外显子 8 C12T、2a 外显子 8 A555G 和 2b 外显子 8 A315G) 的基因型, 分析了不同基因型与生长性状的相关性。结果表明 5 个位点均与增重显性相关; 1a 内含子 3 A43G 还与体高/体长和体厚/体长显性相关; 1b 外显子 8 C12T 与体高/体长和尾柄高/尾柄长显性相关; 1a 外显子 8 A361G 和 2a 外显子 8 A555G 也与尾柄高/尾柄长显性相关。数据分析还显示增重标记个数富集 4 个以上的个体明显比标记少的个体生长快, 在选育群中增重标记数有 2 个的个体最多占 30%, 而增重标记数 4 个以上的只占 14%, 说明存在着较大的选育空间。实验筛选的 5 个位点可以作为建鲤分子育种的有效标记。

关键词: 建鲤; *GHR*; 多态性; 增重; 体型; 相关性

中图分类号: Q346⁺.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2011)04-0622-08

生长激素(GH)在促进动物生长、发育和生殖过程中起着重要的作用, 它通过与生长激素受体(GHR)结合后产生胰岛素样生长因子 1 (IGF-1)来发挥调节生长的重要作用。生长激素受体 (Growth hormone receptor, GHR)是细胞因子受体超家族成员之一, 它通过二聚体的形式与生长激素相结合, 影响生长激素正常功能的发挥, 其信号传导途径主要有三条, 即 Janus 蛋白酪氨酸激酶 2 (JAK2)、信号传递及激活转录因子 (STAT)、丝裂素原活化蛋白激酶, 其中以 JAK2 酪氨酸磷酸化占主导地位^[1, 2]。

至今, 已有 10 种以上鱼类的 *GHR* cDNA 被分离, 如黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*)^[3]、真鲷 (*Sparus aurata*)^[4]、南方鲇 (*Silurus meridionalis*)^[5]、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)^[6]及尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[7]等。通过序列比对清楚地显

示鱼类中明显存在两类 *GHR*, 称 *GHR1* 和 *GHR2*, 其中 *GHR2* 仅在鱼类中发现, Taylor, *et al.*认为这是约 350 亿年前硬骨鱼类起源时发生的一次全基因组复制的结果^[8]。*GHR* 在鱼类脑、肾、胃、肠、性腺、肌肉、脂肪等许多组织中均有表达, 其中以肌肉和肝脏中的表达量最高^[9-12]。鱼类 *GHR* 基因的表达受日龄、营养状况、生长环境和激素水平等因素的调节, 马细兰等研究发现, 雄性尼罗罗非鱼肝脏 *GHR1* mRNA 表达与其特定生长率显著正相关 ($P < 0.01$), 而 *GHR2* mRNA 表达与特定生长率无显著相关性 ($P > 0.05$)^[13]; Fukada, *et al.*发现大麻哈鱼 (*Oncorhynchus masou*) 禁食 3 周后肝脏 *GHR* mRNA 表达下降^[14]; Caldach-Giner, *et al.*发现真鲷肝脏 *GHR* mRNA 在夏季的表达量比春季高^[10]; 章力等用 17 β 2 雌二醇 (E2)、17 α 2 甲基睾酮 (MT)和可的松 (cortisol)

收稿日期: 2010-05-25; 修订日期: 2011-01-26

基金项目: 水产基因资源发掘与种质评价利用研究 (2006BAD13B09); 水产分子育种共性技术的建立与应用 (200903045); 现代农业产业技术体系建设专项资金(nycytx-49) 资助

作者简介: 陶文静 (1987—), 女, 湖北武汉人; 本科; 主要从事水产养殖学研究。E-mail: taowenjing1127@163.com; 马龙俊 (1988—), 男, 安徽桐城人; 本科; 主要从事水产养殖学研究。E-mail: mlj20061988@163.com

通讯作者: 俞菊华 (1966—), 女, 研究员; 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: yujh@ffrc.cn

对南方鲇进行药物处理, 结果表明 E2 能够显著下调肝脏 *scGHR1* 和 *scGHR2* mRNA 水平, 而 MT 显著上调 *scGHR1* 和 *scGHR2* mRNA 水平, 经 cortisol 处理后 *scGHR1* mRNA 表达水平显著上升, 而 *scGHR2* mRNA 表达水平没有显著变化^[5]。这些均说明鱼类 GHR 与许多生理功能密切相关。

GHR 基因碱基序列发生突变可能影响 *GHR* 基因的表达水平, 影响 GH 结合力, 或者影响 GH 结合后的构象等, 最终导致动物的生长性状发生改变。目前, 将 *GHR* 基因作为候选基因, 研究其多态性与动物生长性状相关性的报道主要集中在畜禽上。Andrzej, *et al.* 对 *GHR* 5'UTR 的 4 个 SNPs 与波兰黑白花牛产肉性能的相关性进行了单个和合并基因型的分析, 结果发现, 单个基因型对生产性状没有影响, 不过 RFLP-AluI (-/-) 基因型具有较高的屠体重和瘦肉率, RFLP-NsiI (+/+) 基因型具有较好的屠体参数; 采用合并基因型分析发现其多态性对饲料利用率、屠体重影响很大, 差异显著^[15]。马妍等采用 PIRA (Primer-introduced restriction analysis)-PCR 和 RFLP 方法检测了 1145 头中国荷斯坦牛 *GHR* 外显子 8 的 F279Y 多态位点及其与产奶性状的关联性, 分析结果表明该突变位点与 305 天产奶量 ($P<0.01$)、乳脂率 ($P<0.05$) 和乳蛋白率 ($P<0.01$) 关联显著, T 等位基因是提高乳成份的优势等位基因, A 等位基因是提高产奶量的优势等位基因^[16]。葛洪伟等研究发现文昌鸡 *GHR* 基因内含子 2 多态性与双黄蛋产量相关显著^[17]。邓小松等研究发现兔 *GHR* 基因的变异与活重、全净膛、屠宰率显著相关^[18]。但目前尚没有以 *GHR* 基因作为候选基因研究其多态性与鱼类生长性状相关性的报道。

本实验在已获得建鲤 4 个生长激素受体基因 (*jlGHR1a*、*1b* 和 *jlGHR2a*、*2b*) 的基础上, 通过测定 6 个个体基因序列, 查找建鲤 4 个 *GHR* 基因上的 SNPs, 使用 PCR-RFLP 法检测了其中 5 个位点在建鲤群体中的分布, 分析不同基因型与体型、增重的相关关系, 筛选与生长性状相关的分子标记, 为分子辅助育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验鱼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, 为建鲤选育群体。采用 PIT 标

记后, 混合养殖, 在生长过程中测定其体重、体长、体高、体厚、尾柄高、尾柄长。

1.2 基因组 DNA 的抽提

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], DNA 完整性和浓度使用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检验和测定, $A_{260/280}$ 一般为 1.8 左右。用 TE 溶液将 DNA 样品稀释成 50—100 ng/ μ L 备用。

1.3 引物、PCR 扩增和克隆

根据本实验室已分离的 4 个建鲤 *jlGHRs* 基因 (GenBank No.: GU296683、GU296682、GU296684 和 GU296685)^[20], 设计引物分段寻找建鲤群体中这些基因上的 SNP 位点。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 详细信息(表 1)。PCR 总反应体系为 50 μ L, 其中含模板 DNA 2 μ L (100—200 ng), 引物各 1 μ L (10 μ mol/L), 其他组分根据 *Taq* 酶说明书要求, 反应程序: 94 预变性 2min; 94 变性 30s, 50—65 退火 45s, 72 延伸 1—2min, 30 个循环, 72 延伸 5min, 4 保存, 其中退火温度根据引物确定, 延伸时间根据扩增片段大小确定。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收后 (DNA 胶回收试剂盒购自上海申能博彩生物有限公司) 与 pMD18-T 载体连接, 转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 敏感态细胞中, 挑选阳性克隆 (每个平板至少挑 3 个阳性克隆), 送至上海博尚生物技术有限公司测序。

1.4 多态位点筛选和检测

测定 6 尾建鲤 *GHRs* 序列, 使用 ClustalW^[21] 软件比对, 以同一位点不同碱基出现比例大于 1/3 认定为查找 SNPs 位点。4 个 *jlGHRs* 上均存在 SNPs 位点, 共 38 个, 其中外显子上 16 个, 其位置及比例(表 2)。通过分析 SNP 位点, 确定其中 5 个 SNP 位点可使用 PCR-RFLP 方法检测, 分别是 1a 内含子 3 A43G、1a 外显子 8 A361G、1b 外显子 8 C12T、2a 外显子 8 A555G 和 2b 外显子 8 A315G, 检测所使用的 PCR 引物、限制性内切酶以及不同基因型酶切片段信息(表 3)。所检测的 5 个位点中, 4 个位于外显子上, 仅 *jlGHR1a* 外显子 8 A361G 处突变改变氨基酸 (I $\rightarrow$ V)。PCR 扩增体系为 12.5 μ L, 其中含模板 DNA 1.0 μ L, 引物 0.25 μ L (10 μ mol/L)。反应结束取 6 μ L PCR 产物至 10 μ L 酶切体系, 其中含内切酶 0.2 μ L, 在不同酶推荐的温度下反应 3h, 然后用 2% 琼

表 1 实验中所用引物
Tab. 1 Primers used in this experiment

引物 Primers	序列 (5'-3') Sequence	退火温度 T _m ()	产物 Product (bp)
F1	ACAGCAGTATTCTTTTACATAGTAGCAG	54.6	1a intron2—4
R1	CACAATACTGTTACTTTAATAGCTGCCTAG	54.5	645
F2	CGATTGTCTGTCTGAGTAAATGTTATGGC	60.4	1a intron4-exon7
R2	CTTCAGCAGCTCTGGGTCGATG	58.6	820
F3	CGTCTACACAACCTCTGAAACAACAC	55.9	1a intron 6-exon 8
R3	GGTGGTTATCTCCCCGTCCAG	56.9	1164
F4	TCACGTCCTTAATTTCAAAAGCGATG	59.5	1a exon8
R4	CTTCATGGGGTCAGGTTTCCAG	60.4	750
F5	CATTATAAGTATTTCAAGCCAACTTCCC	57.3	1b intron2—4
R5	TCTCTCCAGCATGAGGTGCTAGC	57.4	602
F6	CCATTCGTCTCTCTGAGTAAACGTAATTAG	57.6	1b intron47
R6	GGTACATGTTTCATGTAATAATGCACATG	57.6	873
F7	GTTTTGTGGGTCTCTCTAATAACAGCA	57.5	1b intron7-exon8
R7	CTTCATGGGGTCAGGTTTCCAG	60.4	977
F8	TTCTAATGTGTTAATGTGCAAAATATTTGC	57.3	2a intron3—6
R8	CCGAGGAACTAATGAGAGGTTATGTAG	56.3	946
F9	GTCTTCGCTGCCGTTGGTATCGT	61.7	2a exon6-exon8
R9	CGACTGGGTGCCTAAGATTGACG	59.5	595
F10	CGTCAATCTTAGGCACCCAGTCG	59.5	2a exon8
R10	CCTTCTATGGGGCAGTTGGTGTATTA	58.5	735
F11	TCCATTGCATTAATGTGCAGAATTGG	60.7	2b intron3—6
R11	GGAAAGGACAGAGGAACTAATGAGAGGT	59.7	925
F12	GTCTTTGCTGCCGTTGGTATTGC	59.5	2b exon6—8
R12	GCTGGGGTGAGCGCCTAAGAT	59.3	775
F13	AATCAAAGGAATTGACCCCGTA	54.2	2b exon7—8
R13	GTTAAGGTGTAATGTTGTCGAGTAGGTC	55.0	960

脂糖凝胶电泳进行检测，确定基因型。

1.5 统计分析

利用 SPSS 软件包的 GLM 模型进行 GHR 基因 SNP 位点不同基因型与体型 (体高/体长、体厚/体长、尾柄高/尾柄长)、增重等 4 个生长性状的关联分析。

2 结果

2.1 不同基因型与体型、增重性状关联分析

本文检测了 353 尾建鲤在 5 个 SNP 位点的基因型 (*jlGHR2a* 外显子 8 A555G 位点检测 351 尾), 图 1 为各位点的基因分型图。结果表明各位点三种不同基因型均存在, 但基因型频率存在较大差异, 有的基因型个体数明显偏少, 如 *jlGHR1b* C12T 位点的 TT 型鱼在 353 尾中只有 11 尾 (表 4)。

运行 SPSS 软件 GLM 程序, 对 353 尾建鲤

(*jlGHR2a* 外显子 8 A555G 位点检测 351 尾) SNP 位点的不同基因型与生长性状进行关联分析, 所分析的性状包括体型 (体高/体长、体厚/体长、尾柄高/尾柄长)和增重, 结果表明检测的 5 个 SNP 位点与增重均极显著相关 ($P<0.01$), 除了 1b 外显子 8 C12T 的杂合子个体比纯合子增重快外, 其余 4 个位点均是其中 1 个纯合子增重最快。和鱼体型的相关性分析结果显示: 与体高/体长相关的位点有 1a 内含子 3 A43G ($P<0.01$)和 1b 外显子 8C12T ($P<0.01$), 其中增重快的 AA 型个体体高/体长值极显著大于 AG 和 GG 型个体, 而增重快的 CT 型个体与增重慢的 CC 型个体体高/体长值差异显著, TT 型个体该值却极显著大。与体厚/体长相关的位点只有 1a 内含子 3 A43G ($P<0.01$), 增重快的 AA 型个体该值极显著大。与尾柄高/尾柄长相关的位点有 1a 外显子

表 2 建鲤 *GHR1s* 和 *GHR2s* SNPs 位点
Tab. 2 The SNPs on *jlGHR1s* and *jlGHR2s*

基因 Gene	区域 Region	SNPs 位点及比例 SNPs and ratio
<i>jlGHR1s</i>	内含子 3 intron3	A43G (2/4)
	外显子 4 exon4	A176G (2/4)
	1a 内含子 6 intron6	C110T (3/3), A141T (3/3), C189T (2/4), A249C (4/2), A251T (2/4), A252G (4/2), C258T (2/4)
	内含子 7 intron7	A35C (2/4), A39T (2/4), A62G (4/2), A67G (4/2), A284G (4/2)
	外显子 8 exon8	C279T (2/4), A361G (2/4)
	1b 内含子 6 intron6	C120T (2/4)
	外显子 8 exon8	C12T (2/4), A649G (3/3)
	内含子 3 intron3	C280T (4/2)
	内含子 4 intron4	C248T (2/4)
	2a 外显子 5 exon5	C140T (2/4)
<i>jlGHR2s</i>	外显子 6 exon6	A81C (2/4)
	内含子 6 intron6	C264T (3/3), C294T (3/3), C317T (4/2)
	外显子 8 exon8	A330T (4/2), A432G (4/2), A544C (3/3), A555G (2/4), C671T (4/2)
	外显子 4 exon4	G176T (2/4)
	内含子 4 intron4	A7C (2/4), G13C (2/4)
	2b 外显子 5 exon5	A27G (3/3)
	内含子 5 intron5	G4T (2/4)
	外显子 8 exon8	G292C (2/4), A315G (2/4)

表 3 五个 SNP 位点的检测引物、限制性内切酶和酶切产物条带
Tab. 3 Primers, restriction enzymes and restriction fragments of the five SNPs loci

检测的 SNP 位点 Loci	引物 Primers	内切酶及反应温度 Restriction enzyme and temperature ()	酶切片段 Length of restriction fragments (bp)
<i>jlGHR1a</i> 内含子 3 A43G	F1: ACAGCAGTATTCCTTTACATAGTAGCAG R1: CACAATACTGTTACTTTAATAGCTGCCTAG	<i>Tas</i> I (65)	AA: 72、79、202、286 GG: 79、202、360
<i>jlGHR1a</i> 外显子 8 A361G	F4: TCACGTCCTTAATTTCAAAAGCGATG R4: CTTTCATGGGGTCAGGTTTCCAG	<i>Tas</i> I (65)	AA: 187、563 GG: 750
<i>jlGHR1b</i> 外显子 8 C12T	P1: AAACAACCCTCGTACTCTGTTTITAGAGCA P2: AGCTAGCACGACCCGAATCGTTGTC	<i>Hind</i> III (37)	CC: 456 TT: 211、244
<i>jlGHR2a</i> 外显子 8 A555G	F10: CGTCAATCTTAGGCACCCAGTCG R10: CCTTCTATGGGGCAGTTGGTGTATTA	<i>Msp</i> I (37)	AA: 735 GG: 204、531
<i>jlGHR2b</i> 外显子 8 A315G	F13: AATCAAAGGAATTGACCCCGTA P3: AGGAGAAAGTACAACCTCCACCATGA	<i>Bsu</i> R I (37)	AA: 171、366 GG: 105、171、261

8 A361G ($P<0.05$)、1b 外显子 8 C12T ($P<0.01$)和 2a 外显子 8 A555G ($P<0.01$)，该值高低与增重没有明显的对应关系 (表 4)。

2.2 标记富集对建鲤增重的影响

本实验获得了 5 个与增重正相关标记，即 1a 内含子 3 AA、1a 外显子 8 GG、1b 外显子 8 CT、2a 外显子 8 GG 和 2b 外显子 8 GG。分析富集标记个数对建鲤增重的影响，结果：有 5 个标记和 4 个标记的个体间增重差异不显著 ($P>0.05$)，但 5 个和 4 个标记的个体增重极显著高于 3 个标记的个体 ($P<0.01$)，3 个标记个体增重值极显著高于 2 个标记的个体增

重值 ($P<0.01$)，2 个标记个体增重值显著高于 1 个标记和无标记的个体增重值 ($P<0.05$) (表 5)。此外，在所检测的建鲤群体中具有两个标记的鱼有 106 尾，约占 30%，但具有 4 个及 5 个标记的鱼只占 14%。

3 讨论

GHR 在 GH 发挥生理效应的过程中起着十分重要的作用，由于 GH 为生物大分子，不能直接穿透细胞膜，其发挥作用的第一步必须与靶细胞膜表面的受体 GHR 结合，由 GHR 介导将信号传入细胞内从而产生一系列生理效应。GHR 基因突变可导致空

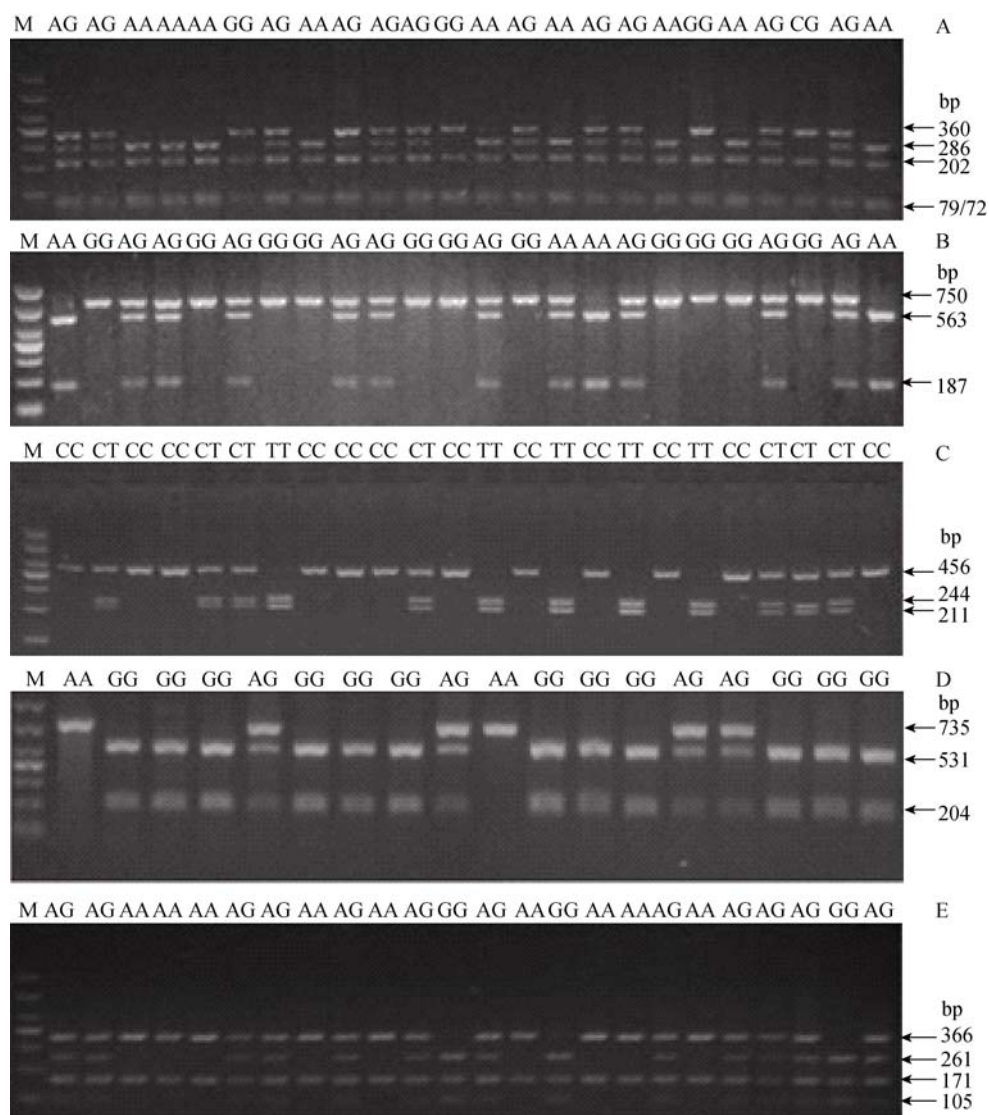


图 1 五个 SNP 位点不同基因型的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis patterns of different genotypes in five SNP loci

A. *jIGHR1a* 内含子 3 A43G; B. *jIGHR1a* 外显子 8 A361G; C. *jIGHR1b* 外显子 8 C12T; D. *jIGHR2a* 外显子 8 A555G; E. *jIGHR2b* 外显子 8 A315G; 其中 M 为 DNA 分子标记 (DL1000)

A. *jIGHR1a* intron 3 A43G; B. *jIGHR1a* exon 8 A361G; C. *jIGHR1b* exon 8 C12T; D. *jIGHR2a* exon 8 A555G; E. *jIGHR2b* exon 8 A315G; M. DNA marker (DL1000)

间构象, 从而影响其功能, 使信号不能正常转导, 进而影响 GH 生理作用的发挥。

本实验研究了 *GHR* 基因在建鲤选育群中的多态性及其与鱼类生长性状相关性。结果在建鲤 4 个 *GHR* 基因中共找到 38 处 SNPs 位点, 其中外显子上 16 个, 内含子上 22 个, 内含子 SNPs 的突变频率高于外显子, 这与外显子所受选择压力大有关。使用 PCR-RFLP 法检测了 353 尾建鲤在其中 5 个 SNP 位点 (包括 1 个内含子和 4 个外显子) 的基因型, 结果 PCR-RFLP 法能准确检测不同的基因型, 结果可靠、

稳定, 实验所用设备也简单, 但由于该方法只适用于在 SNP 位点存在限制性内切酶的情况, 所以并不是所有位点均能适用。本实验也尝试使用四引物方法检测另外的 SNP 位点, 但结果不理想, 究其原因主要是 SNP 位点附近 GC 含量不合适。另外由于鲤鱼基因组存在两套基因^[22, 23], 设计引物的过程中需要考虑能区分两个相似性很高的基因, 如本实验中的 1a 和 1b, 2a 和 2b, 引物设计要求更高, 给检测带来一定困难, 因此还有待于开发灵敏度高的其他手段检测这些位点。

表 4 *GHR* 不同基因型与体型、增重的相关性
Tab. 4 Correlation of different genotypes with body form and weight gain

座位 Loci	基因型 Genotype	样本数 Numbers	性状 Traits			
			体型 Body form			增重 Weight gain
			体高/体长 Height/Length	体厚/体长 Thickness/Length	尾柄高/尾柄长 Caudal peduncle height/Length	
<i>jlGHR1a</i> intron3 A43G	AA	88	0.322±0.016 ^A	0.190±0.047 ^A	1.021±0.126	137.705±40.015 ^A
	AG	133	0.316±0.016 ^B	0.178±0.012 ^B	1.013±0.125	106.827±35.933 ^B
	GG	132	0.314±0.014 ^B	0.179±0.012 ^B	0.997±0.108	92.768±26.789 ^C
<i>jlGHR1a</i> exon8 A361G	AA	25	0.315±0.014	0.179±0.016	1.045±0.119 ^a	96.956±26.146 ^B
	AG	120	0.315±0.014	0.180±0.030	0.985±0.118 ^b	95.758±30.236 ^B
	GG	208	0.318±0.017	0.183±0.025	1.019±0.118 ^a	118.541±40.698 ^A
<i>jlGHR1b</i> exon8 C12T	CC	182	0.314±0.014 ^{Bb}	0.180±0.025	0.999±0.123 ^{Bc}	101.253±31.717 ^B
	CT	160	0.319±0.017 ^{Ba}	0.183±0.028	1.013±0.109 ^{ABb}	118.607±43.532 ^A
	TT	11	0.331±0.014 ^A	0.186±0.012	1.101±0.162 ^{Aa}	106.027±15.757 ^{AB}
<i>jlGHR2a</i> exon8 A555G	AA	19	0.317±0.014	0.172±0.014	0.940±0.096 ^{Bc}	91.516±23.557 ^B
	AG	153	0.318±0.016	0.180±0.012	0.998±0.127 ^{ABb}	104.083±36.370 ^B
	GG	179	0.316±0.016	0.184±0.035	1.026±0.111 ^{Aa}	115.929±39.703 ^A
<i>jlGHR2b</i> exon8 A315G	AA	43	0.316±0.014	0.181±0.012	1.007±0.137	95.035±23.882 ^{Bb}
	AG	227	0.316±0.016	0.182±0.031	1.009±0.116	107.693±41.461 ^{Ba}
	GG	83	0.319±0.017	0.181±0.013	1.009±0.119	129.267±38.125 ^A

注：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 ($P<0.01$)
Note: Lowercase letters indicate significantly difference at $P<0.05$ level; and capital letters indicate significantly difference at $P<0.01$ level

表 5 标记富集对建鲤增重的影响
Tab. 5 Effects of markers enrichment on weight gain

标记个数 No. of markers	样本数 <i>n</i>	增重 Weight gain
0	37	88.51±26.19 ^b
1	87	92.14±25.53 ^b
2	106	103.11±32.91 ^{Ca}
3	70	125.89±42.09 ^B
4	47	143.76±36.84 ^A
5	4	155.75±19.82 ^A

注：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 ($P<0.01$)
Note: Lowercase letters indicate significantly difference at $P<0.05$ level; and capital letters indicate significantly difference at $P<0.01$ level

本实验检测了 353 尾建鲤在 *jlGHRs* 基因的 5 个 SNP 位点的基因型，分析表明 5 个 SNP 位点均与增重显性相关，反映了 *GHR* 对生长的重要影响。5 个 SNP 位点中，1a 内含子 3 A43G 和 1b 外显子 8 C12T 与体高/体长显性相关，体高/体长值大的个体增重快，这和以前体高/体长与增重的相关分析结果不一致，在以前建鲤群体中，体型长的增重较快^[24]，其原因有可能是本实验所用建鲤是以前的建鲤与黄河

鲤繁殖的后代，因此体型等特点有所改变，另外，本实验数据分析表明体高/体长与增重没有相关性。此外，虽然研究表明鱼类 *GHR2* 和 *GHR1* 在功能上不完全一致，表达水平也存在差异，但本实验检测的不同基因上的 SNP 均与增重显性相关，说明可能尽管两者存在差异，但多少与生长相关，并且本实验检测的 2a 和 2b 上的 SNP 位点均在外显子 8 中，虽然不改变氨基酸，但作用可能比在内含子中的要明显。5 个位点中增重快的基因型除了 2a 中的 CT 为杂合型外，其余均为纯合型，说明不一定越杂生长越有优势。

早期对 SNP 的认识是对于能改变氨基酸的碱基突变，但随着对基因组研究的深入，特别是人类基因组测序后发现基因组中大部分 DNA 是不翻译成蛋白质的，因此对内含子的作用已经得到广泛的关注。近期的研究表明，内含子序列特别是与外显子交界处的序列与基因正确加工关系密切，有的内含子中含有基因表达的增强子，有的内含子则可以作为反义 RNA 调控基因表达和翻译^[25-27]。近几年在内含子部分也筛选到了与人类疾病相关的 SNP 位点，如细胞色素 P450 1A2 基因第 1 个内含子中的 C/A

多态性与一种高诱导性密切相关, 当有吸烟习惯或者 N-乙酰基转移酶活性较低 (slow NAT2) 的个体具有这种高诱导性时, 该基因会在膀胱癌中过度表达^[28]。这与本实验中 1a 内含子 3 A43G 也与增重极显著相关结果一致。

本实验共筛选到与增重相关的标记 5 个, 考虑到生长本身是数量性状, 对富集标记数与增重的关系进行分析, 结果表明标记越多的个体, 增重值越大, 富集 4 个标记以上的增重比 2 个标记的快约 44%, 而且在现有建鲤选育群体中富集 4 个标记以上的鱼所占比例只有约 14%。一方面说明存在较大的选育空间, 另外一方面预示着采用分子辅助育种手段经过 1 代使标记都富集 2 个以上, 则增重将提高 30%以上, 比传统的育种手段明显有优势。

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 [J]. *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 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**(19): 19331—19342
- [3] Jiao B, Huang X, 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]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2006, **36**(1): 23—40
- [4] Saera-Vila A, Caldutch-Giner J A, Perez-Sanchez J. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type and in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, **142**: 193—203
- [5] 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* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2006, **52**(6): 1096—1106 [章力, 黄希贵, 焦保卫, 等. 南方鲇两种生长激素受体的结构分析及其组织分布和激素调节. 动物学报, 2006, **52**(6): 1096—1106]
- [6] 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*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, **152**: 111—122
- [7] Ma X L, Liu X C, Zhang Y, *et al.* Two growth hormone receptors in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): molecular characterization, tissue distribution and expression profiles during different gonad developing stages [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2007, **147**(2) B: 325—339
- [8] Taylor J S, Braasch I, Frickey T, *et al.* Genome duplication, a trait shared by 22 000 species of ray-finned fish [J]. *Genome Research*, 2003, **13**: 382—390
- [9] Tse D L, Tse M C, 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 [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, **1625**(1): 64—76
- [10] Caldutch-Giner J A, Mingarro M, Vega-Rubin de Celis S, *et al.* Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2003, **136**(1) B: 1—13
- [11] 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*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2006, **143**(4): 422—431
- [12] Lu Y J, Hu W, Zhu Z Y. Gene expression profiles of growth and reproduction related genes during the early development of common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(6): 1126—1131 [卢月娇, 胡炜, 朱作言. 鲤鱼发育早期 HPG 轴和 GH/IGF 轴相关因子的转录起始分析. 水生生物学报, 2009, **33**(6): 1126—1131]
- [13] 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*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, **16**(1): 1—7 [马细兰, 张勇, 刘晓春, 等. 雄尼罗罗非鱼肝脏 2 种生长激素受体基因表达的发育性变化. 中国水产科学, 2009, **16**(1): 1—7]
- [14] Fukada H, Ozaki Y, Pierce A L, *et al.* Salmon growth hormone receptor: molecular cloning, ligand specificity, and response to fasting [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2004, **139**: 61—71
- [15] Maj A, Oprzadek J, Dymhicki E, *et al.* Association of the polymorphism in the 5'-noncoding region of the bovine growth hormone receptor gene with meat production traits in Polish Black-white cattle [J]. *Meat Science*, 2006, **72**: 539—544
- [16] Ma Y, Jia J, Zhang Y, *et al.* Association between the polymorphism of GHR and milk production traits in Chinese Holstein cows [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2009, **40**(8): 1186—1190 [马妍, 贾晋, 张毅, 等. 荷斯坦牛 GHR 基因多态与产奶性状关联分析. 畜牧兽医学报, 2009, **40**(8): 1186—1190]
- [17] Ge H W, Li B C, Li H F, *et al.* Effect of the polymorphisms of intron 2 and 5 of GHR gene on reproductive performance in Wenchang chickens [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2007, **43**(19): 8—10 [葛洪伟, 李碧春, 李慧芳, 等. 文昌鸡 GHR 基因内含子 2 和 5 位点对文昌鸡繁殖性能的

- 遗传效应研究. 中国畜牧杂志, 2007, 43(19): 8—10]
- [18] Deng X S, Wan J, Chen S Y, *et al.* The correlations between polymorphism of growth hormone receptor gene and butcher traits in rabbit [J]. *Hereditas*, 2008, 30(11): 1427—1432 [邓小松, 万洁, 陈仕毅, 等. 兔 *GHR* 基因单核苷酸多态性及其与屠宰性状的相关性. 遗传, 2008, 30(11): 1427—1432]
- [19] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T (Eds.), Huang P T, trans. Molecular Cloning-A Laboratory Manual [M]. Beijing: Science Press. 2002, 463—465 [萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 主编. 黄培堂, 主译. 分子克隆实验指南第 3 版. 北京: 科学出版社. 2002, 463—465]
- [20] Yu J H, Li H X, Tang Y K, *et al.* Growth hormone receptor genes in *Cyprinus carpio* var. jian: isolation, transcripts polymorphism and tissues expression [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(2): 218—229 [俞菊华, 李红霞, 唐永凯, 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特性. 水生生物学报, 2011, 35(2): 218—229]
- [21] 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 [J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22: 4673—4680
- [22] Larhammar D, Risinger C. Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1994, 3: 59—68
- [23] Crooijmans R P M A, Bierbooms V A F, Komen J, *et al.* Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Animal Genetics*, 1997, 28: 129—134
- [24] Zhang J S, Sun X Y. Study on selective breeding in new strain of *Cyprinus carpio* var. jian [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(3): 287—292 [张建森, 孙小异. 建鲤新品系的选育. 水产学报, 2007, 31(3): 287—292]
- [25] Gibbs W W. The unseen genome: gems among the junk [J]. *Scientific American Magazine*, 2003a, 289: 46—53
- [26] Gibbs W W. The unseen genome: beyond DNA [J]. *Scientific American Magazine*, 2003b, 289: 106—113
- [27] Lopez A J. Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation [J]. *Annual Review of Genetics*, 1998, 32: 279—305
- [28] Brockmoller J, Cascorbi I, Kerb R, *et al.* Polymorphisms in xenobiotic conjugation and disease predisposition [J]. *Toxicology Letters*, 1998, 102—103: 173—183

SNP LOCI ASSOCIATED WITH WEIGHT GAIN ON GROWTH HORMONE RECEPTOR GENES IN *CYPRINUS CARPIO* VAR. JIAN

TAO Wen-Jing¹, MA Long-Jun¹, RUAN Rui-Xia¹ and YU Ju-Hua^{1, 2}

(1. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 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 is one of the key regulators in animal growth, and combines with growth hormone receptors of membrane protein to function, so the mutations on growth hormone receptor gene have an important influence on animal growth. We identified 38 SNPs on four *jlGHRs*, by sequencing the genes from 6 individuals of *Cyprinus carpio* var. Jian. PCR-RFLP was applied to detect the genotypes of 5 SNPs loci (1a intron 3 A43G, 1a exon 8 A361G, 1b exon 8C12T, 2a exon 8 A555G and 2b exon 8 A315G) among 353 individuals and the relationship between the different genotypes and growth characteristics was also analyzed in this study. Results showed that all the five sites were associated with weight gain significantly. SNP locus 1a intron 3 A43G has a significant correlation with height/length and thickness/length as well, 1b exon 8 C12T has a significant correlation with height/length and caudal peduncle height/length, 1a exon 8 A361G and 2a exon 8 A555G also have a significant correlation with caudal peduncle depth/caudal length. Data analysis also showed that the individuals with more than four markers grew faster obviously than those with few markers. The number of the individuals with 2 markers is the most, with 30 percent in the investigated population. But the number of the individuals with more than four markers only has a percentage of 14, indicating the presence of large selection space. The 5 SNPs detected in this experiment can be used in molecular breeding.

Key words: *Cyprinus carpio* var. Jian; Growth hormone receptor; Single nucleotide polymorphism; Weight gain; Body form; Correlation