

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)不同种群酪氨酸酶(TYR)基因的克隆及其多态性分析*

张永正¹ 张海琪² 黄利英³ 丁诗华³

(1. 浙江海洋学院萧山科技学院 杭州 311258; 2. 浙江省水产引种育种中心 杭州 310012;
3. 西南大学水产生物技术实验室 重庆 400716)

提要 以中华鳖 4 个种群 80 个个体(太湖种群、日本品系种群、台湾引进种群和“清溪乌鳖”种群)肌肉基因组 DNA 为模板, 利用已知酪氨酸酶(Tyrosinase, TYR)基因部分序列设计合成特异引物进行 PCR 扩增, 克隆并测定了 TYR 基因的核苷酸序列。扩增所得的 696bp 序列中共有 13 个多态性核苷酸位点。中华鳖体色变异种群的 3 个个体均在第 186 核苷酸位点出现相同的变异。以此设计酶切位点, 选用 *Sma*I 内切酶进行 RFLP, 结果显示 80 个中华鳖个体的 TYR 基因存在多态性。AA 型基因除在中华鳖体色变异种群内未发现外, 其余三个种群内的频率大小顺序为日本品系种群(60%)>台湾引进种群(30%)>太湖种群(20%), 以省外品种为丰富; AB 基因型频率大小顺序为“清溪乌鳖”种群(70%)>台湾引进种群(50%)>太湖种群(40%)>日本品系种群(30%)。

关键词 中华鳖, 酪氨酸酶基因, RFLP

中图分类号 Q751, Q951.3

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)俗称团鱼、甲鱼、“王八”, 隶属于爬行纲(Reptilia)、龟鳖目(Testudiformes)、鳖科(Trionychidae)。在我国除西藏、青海及新疆外的各个地区均有分布, 以长江流域和华南地区为多见。在国外主要分布于朝鲜、日本和越南(王培潮, 2000)。中华鳖味道鲜美, 富含高蛋白、低脂肪, 而且含有多种维生素和微量元素, 历来被视为滋补的营养保健品, 深受广大消费者青睐, 其养殖业也越来越受到人们的重视。随着中华鳖养殖业的发展, 其种质资源保护与合理利用已成为产业健康持续发展的首要制约因素。目前浙江省内有着丰富的中华鳖资源, 如太湖种群、日本品系种群、台湾引进种群和“清溪乌鳖”种群等。现代医学证明, 乌骨鸡的食用价值和药用价值主要在于其体内含有丰富的黑色素(伍革民等, 2005)。清溪乌鳖作为浙江省新审定的水产新品种, 富含具有食用价值和药用价值的黑色素, 主要特征是腹部体色乌黑(张永正等, 2008; 张海琪等, 2008), 在外形上就

可与其它种群区分开来, 且黑色能稳定遗传, 因此清溪乌鳖的体色是很好的遗传标记, 且开发前景广阔。

酪氨酸酶(Tyrosinase, 简称 TYR)是黑色素合成的关键酶, 由白化位点的酪氨酸基因编码(Ponnazhagan *et al*, 1994)。目前这一基因克隆测序工作已在小鼠(Porter *et al*, 1991)、人(Giebel *et al*, 1991)、鸡(Boissy *et al*, 1987)、猪(Giuffra *et al*, 2000)等许多物种上展开, GenBank 中已拥有大量的酪氨酸酶基因序列, 且其序列变异与白化病、毛色、肤色的相关性研究已成为一个热点。本研究对中华鳖 4 个不同种群的 TYR 基因进行克隆测序及其 PCR-RFLP 分析, 以了解其多态性信息, 掌握其基因变异与乌黑性状之间的关系, 为今后中华鳖的分子育种奠定必要基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)4 个不同地理

* 浙江省重大科技招标项目《有机蔬菜、水产品安全生产技术集成与标准制定及检测技术研究》, 2007C02002-2 号; 财政部现代农业生产发展资金项目(淡水主导品种选育、推广示范与配套设施建设)。张永正, 硕士, 副教授, E-mail: zyz36@163.com

通讯作者: 张海琪, 硕士, 高级工程师, E-mail: nbzhhq1977@163.com

收稿日期: 2008-03-17, 收修改稿日期: 2008-05-12

种群于2004年3月—2005年8月采集,采集地点及样本数量见表1。活体运回实验室后进行常规生物学测定后拍照、解剖取其腿部肌肉,置于1.5ml灭菌的离心管中,于-75℃超低温冰箱冷冻保存备用。

1.2 方法

1.2.1 总DNA的提取 每个样品取肌肉组织约0.1g,采用传统的方法进行总DNA的提取,即采用SDS/蛋白酶K消化,酚-氯仿抽提和乙醇沉淀法,测定浓度后于-20℃冰箱中保存备用。

1.2.2 PCR扩增 用于TYR基因外显子1扩增的两个引物为:HSF(5'-ATG TGT CTG TTG GCA CTG-3')和HSR(5'-GGT GAA GTT CTC ATC TCC-3'),由上海Sangon公司合成。利用PTC-200热循环仪进行PCR扩增。PCR反应体系为50μl,含5μl 10×PCR缓冲液,5μl 25mmol/L MgCl₂, 10pmol/μl引物各1μl, 1μl 10mmol/L dNTP, 3U *Taq* DNA聚合酶, 1μl模板DNA(约100ng)。PCR的循环参数为:94℃预变性5min, 94℃变性30s, 55℃退火30s, 72℃延伸60s,共35个循环;循环结束后72℃再延伸8min。

1.2.3 PCR产物的纯化和测序 PCR产物经1.4%

琼脂糖凝胶电泳后,用Quantity EQ凝胶成像分析系统进行检测。回收琼脂糖凝胶中的PCR产物,用UNIQ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit(上海Sangon产品)进一步纯化,分别取2.5—5.0μl产物用PCR的引物做测序反应。采用ABI Prism 377 DNA sequencer直接对PCR产物进行双向测序。

1.2.4 PCR-RFLP分析 对测序结果进行校对,通过Mega2.1分析软件比较中华鳖TYR基因序列,找出变异位点。根据序列的变异位点寻找合适的核酸内切酶,根据酶切条带分析4个种群TYR基因的多态性。本研究选用的是*Sma*I内切酶。酶解反应体系总体积20μl,含2μl缓冲液,10μl PCR反应产物,1μl 10 U/μl内切酶,7μl灭菌水,30℃保温4h。酶切片段在2.5%琼脂糖凝胶上电泳分离。电泳结束后用Quantity EQ型生物凝胶成像分析系统进行观察、拍照。

2 结果

2.1 PCR扩增结果

利用设计的引物成功克隆了中华鳖TYR基因片段,PCR产物长度为696bp。电泳检测结果见图1。由

表1 中华鳖样品来源
Tab.1 The origins of *P. sinensis*

种群名称	主要特性	采集地	样本数量
太湖种群(THP)	腹部有规则块状黑斑,背部青灰色有小黑点,体宽且厚,稍圆	浙江德清省级中华鳖良种场	20
日本品系种群(JNP)	腹部白底有黑斑,中间有明显的三角形黑斑;背部光滑,无疣状物,裙边特别宽大,有凹痕	浙江萧山省级中华鳖良种场	20
台湾种群(TWP)	腹部白底或有点状黑斑,背甲粗糙,背甲后部疣状物特别多	浙江德清某养殖基地	20
清溪乌鳖种群(WBP)	腹部全为乌黑色	浙江德清省级中华鳖良种场	20

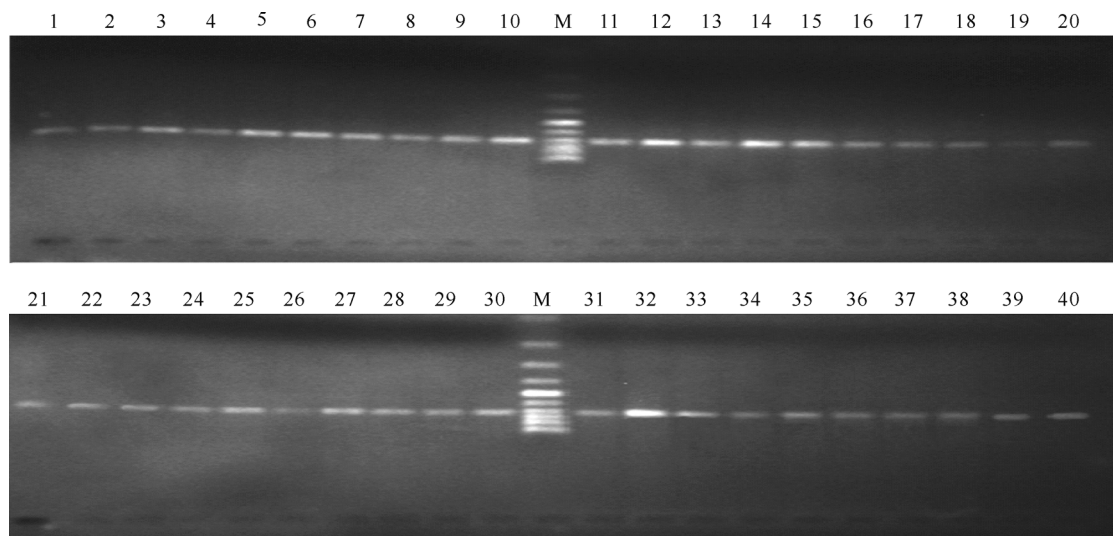


图1 中华鳖不同种群TYR基因片段的扩增产物

Fig.1 PCR amplification products of TYR gene fragments in different *P. sinensis* populations
1—10: 日本品系种群; 11—20: 太湖种群; 21—30: 清溪乌鳖种群; 31—40: 台湾引进种群; M: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder

#1	ATGTGTCTGT TGGCACTGGG TTCCTTTTG GGGATTCTGC AGCCTGCATC CGGGCAGTTC CCTCGAGCCT GTGCATCTTC	[80]
#2	[80]
#3	[80]
#4	[80]
#5	[80]
#6	[80]
#7	[80]
#1	AGAGAGCCTG CTGAGGAAGG AATGCTGCCC ACTGTGGCT GGGATGGGT CTCCTGTGG AGAACTCTCT GGCAGGGCT	[160]
#2	[160]
#3	[160]
#4 G.....	[160]
#5	[160]
#6	[160]
#7	[160]
#1	CCTGCCAGGA GATCCTTCTG TCCCGTGCCC CTCTTGACC ACAGTTCCTC TTCACAGGG TGGACGACAG GGAGACTGG	[240]
#2 A.....	[240]
#3	[240]
#4	[240]
#5 G.....	[240]
#6 G... T.....	[240]
#7 A.....	[240]
#1	CCTGCTGTGT TTTATAACAG GACGTGCCAG TGCAACAGCA ACTTTATGGG ATTCAACTGC GGGAGTGCA GGTTTGGCTT	[320]
#2	[320]
#3	[320]
#4	[320]
#5	[320]
#6	[320]
#7	[320]
#1	CTCAGGGCCC AACTGTGCTG AGAGAAGGAT GCGCATGAGA AGAAGCATCT TCCAGCTTAG TACCAGAGAG AAGAATAAGT	[400]
#2	[400]
#3	[400]
#4 G.....	[400]
#5	[400]
#6	[400]
#7	[400]
#1	TCCTGGCCTA CCTCAACTTG GCAAAGCACA CCCCAGCCA GGAATATGTC ATCGCCACTG GCACCTATGC TCAGATGAAT	[480]
#2	[480]
#3 T.....	[480]
#4 T.....	[480]
#5	[480]
#6 T... G... T.....	[480]
#7 T.....	[480]
#1	AATGCTTGA CCCCATGTT TAGGAACATC AGTGTTTACG ACCTGTTTGT ATGGATGCAT TACTATGTCT CTCGTGATAC	[560]
#2 C.....	[560]
#3 C.....	[560]
#4 C..... T.....	[560]
#5 C.....	[560]
#6 C..... A... C..... C.....	[560]
#7 C.....	[560]
#1	CTTACTGGGT GATGCAAGTG TGTGGCGGGA TATAGATTTT GCCCATGAAG CCCAGGTTT CCTGCCTTGG CATCGACTGT	[640]
#2	[640]
#3	[640]
#4	[640]
#5	[640]
#6	[640]
#7	[640]
#1	TTTTGGTGCT GTGGGAACAC GAGATCCAGA AGATCACAGG AGATGAGAAC TTCACC	[696]
#2	[696]
#3	[696]
#4	[696]
#5	[696]
#6	[696]
#7	[696]

图 2 中华鳖不同种群的 TYR 基因部分序列

Fig.2 Sequence of TYR gene fragments in different *P. sinensis* populations

#1 和#2 : 太湖种群; #3 和#4 : 日本品系种群; #5 和#6 : 清溪乌鳖种群; #7 : 台湾引进种群

图1可知扩增产物条带清晰,且无杂带。

2.2 TYR 基因的序列测定结果

根据测定的 TYR 基因序列,利用 Mega2.1 软件对序列进行比较,并列出发生变异的位置(图2)。结果发现有 13 个多态性位点,其中 8 个位点为碱基转换,5 个为碱基颠换。这些序列变异大多发生在密码子的第 3 位,其次是第 1 位,第 2 位则很少发生。这主要是由于密码子 3 个位点受到的选择压力明显不同,造成突变过程偏向于密码子第 3 位点。

2.3 RFLP 结果分析

根据序列差异特性,选用 *Sma*I 内切酶对 696bp 片段进行 RFLP 检测分析种群的多态性。结果见图 3。

2.4 统计分析结果

根据 PCR-RFLP 电泳结果带型分析,发现 80 个中华鳖样本中共有 3 种基因型。AB 型最多,占 38 个,AA 型和 BB 型分别为 22 个和 20 个。各种群基因频

率统计结果见表 2。

由表 2 可知,清溪乌鳖种群只检测到 AB 型和 BB 两种基因型,没有 AA 型,以 AB 型居多。日本品系种群则以 AA 型为主,其次是 AB 型,最少为 BB 型。在 4 个中华鳖种群中,AA 型基因除在中华鳖体色变异种群内未发现外,其余三个种群内的频率大小顺序为日本品系种群(60%)>台湾引进种群(30%)>太湖种群(20%);AB 基因型频率大小顺序为清溪乌鳖种群(70%)>台湾引进种群(50%)>太湖种群(40%)>日本品系种群(30%)。

3 讨论

酪氨酸酶是黑色素合成的关键酶,编码酪氨酸酶的 TYR 基因也就成了研究乌质性状的重要候选基因。Brumbaugh 等(1983)用正常鼠的酪氨酸酶 cDNA 对 *ca/ca* 鸡黑色素细胞进行体外治疗,结果能产生正

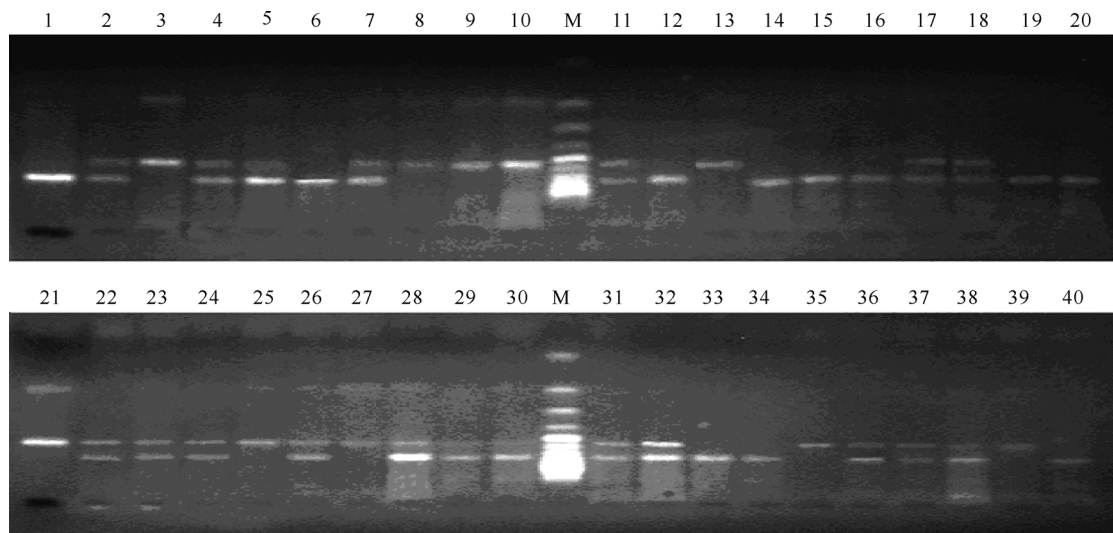


图3 中华鳖不同种群的 TYR 基因扩增产物的 RFLP 分析

Fig.3 RFLP analysis of TYR gene fragments in different *P. sinensis* populations

1—10: 太湖种群; 11—20: 日本品系种群; 21—30: 清溪乌鳖种群; 31—40: 台湾引进种群; M 为 100bp DNA Ladder

表 2 中华鳖不同种群 TYR 基因片段 RFLP 分析

Tab.2 RFLP analysis of TYR gene fragments in different *P. sinensis* populations

种群	基因型个体数			基因型频率			基因频率	
	AA	AB	BB	AA	AB	BB	A	B
太湖种群	4	8	8	0.20	0.40	0.40	0.40	0.60
日本品系种群	12	6	2	0.60	0.30	0.10	0.75	0.25
台湾引进种群	6	10	4	0.30	0.50	0.20	0.55	0.45
清溪乌鳖种群	0	14	6	0	0.70	0.30	0.35	0.65

常的黑色素, 证明 *ca/ca* 是酪氨酸酶突变产生的。Aigner 等(1996)证实了鼠科野生型酪氨酸酶基因不仅能在转基因兔子中表达, 而且可使有白化病的兔子恢复正常。这些研究都表明酪氨酸酶是黑色素合成过程中一个很重要的关键酶, 如果酪氨酸酶基因突变或酶活性丧失, 都将引起黑色素代谢紊乱, 导致机体黑色素表达异常。本实验结果表明中华鳖 TYR 基因片段 RFLP 检测存在 3 个基因型(AA、AB 和 BB)。从基因频率来看, 日本品系种群等位基因 A 出现的频率要明显高于等位基因 B; 而清溪乌鳖种群则相反, 等位基因 B 出现的频率要明显高于等位基因 A。这个基因位点是由 TYR 基因的第 186bp 变异引起的, 虽然此位点是同义突变, 对黑色素相关性状无直接影响, 但此位点可作为与中华鳖乌质性状有关的一个 SNP 标记。当然也不排除可能存在其他黑色素相关基因与该标记紧密连锁。因此下一步还需通过对中华鳖全基因序列进行检测, 以获得与黑色素相关性状相关的分子标记。由于黑色素合成机制极为复杂, 许多研究认为, 黑色素的形成可能是多个基因位点的编码产物共同参与和调控的一个复杂级联过程(Jimbow, 1999; 杨舒黎等, 2006), 因此清溪乌鳖腹部乌黑性状的分子机理还有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- 王培潮, 2000. 中国的龟鳖. 上海: 华东师范大学出版社, 55—56
- 伍革民, 柳小春, 娄义洲等, 2005. 差异显示筛选武定乌骨鸡“乌色”性状相关基因. 遗传学报, 32(1): 30—37
- 杨舒黎, 毛华明, 舒文等, 2006. 云南乌骨绵羊乌质性状与 TYR 基因多态性的相关分析. 遗传, 28(3): 291—298
- 张永正, 张海琪, 何中央等, 2008. 中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)5 个不同地理种群细胞色素 *b* 基因序列变异及种群遗传结构分析. 海洋与湖沼, 39(3): 234—239
- 张海琪, 何中央, 徐晓林等, 2008. 中华乌鳖的营养成分研究. 中国水产, 2008(6): 76, 78
- Aigner B, Besenfelder U, Seregi J *et al*, 1996. Expression of the murine wild-type tyrosinase gene in transgenic rabbits. Transgenic Research, 5(6): 405—411
- Boissy R E, Moellmann G E, Halaban R, 1987. Tyrosinase and acid phosphatase activities in melanocytes from avian albinos. J Invest Dermatol, 88(3): 292—300
- Brumbaugh J A, Bargar T W, Oetting W S, 1983. A new allele at the C pigment locus in the fowl. Hereditas, 74(5): 331—336
- Giebel L B, Strunk K M, Spritz R A, 1991. Organization and nucleotide sequences of the human tyrosinase gene and a truncated tyrosinase-related segment. Genomics, 9(3): 435—445
- Giuffra E, Kijas J M, Amarger V *et al*, 2000. The origin of the domestic pigs: independent domestication and subsequent introgression. Genetics, 154(4): 1785—1791
- Jimbow K, 1999. Biological role of tyrosinase-related protein and its relevance to pigmentary disorders (*Vitiligo vulgaris*). Journal of Dermatology, 26(11): 734—737
- Ponnazhagan S, Hou L, Kwon B S, 1994. Structural organization of the human tyrosinase gene and sequence analysis and characterization of its promoter region. J Invest Dermatol, 102(5): 744—748
- Porter S, Mintz B, 1991. Multiple alternatively spliced transcripts of the mouse tyrosinase-encoding gene. Gene, 97(2): 277—282

CLONE OF TYR GENE AND POLYMORPHISM IN POPULATIONS OF *PELODISCUS SINENSIS*

ZHANG Yong-Zheng¹, ZHANG Hai-Qi², HUANG Li-Ying³, DING Shi-Hua³

(1. Xiaoshan College of Science & Technology, Zhejiang Ocean University, Hangzhou, 311258; 2. Zhejiang Fisheries Introduction and Breeding Center, Hangzhou, 310012; 3. Lab of Aquatic Bioengineering, Southwest University, Chongqing, 400716)

Abstract Tyrosinase (TYR) is an essential enzyme in melanogenesis. Genetic DNAs of four *Pelodiscus sinensis* populations: Taihu Lake population, Japanese breed population, Taiwan-introduced population and Qingxi black mutant population, were prepared as templates from muscle tissue. TYR gene was amplified by PCR with a pair of specific primers designed on the known TYR sequences. 13 nucleotide polymorphisms were detected in the PCR-amplified 696bp fragments. Only one mutation site at nucleotide 186 was identified in three individuals of black mutant of *P. sinensis*. TYR gene polymorphisms were detected in 80 individuals of *P. sinensis* using RFLP-PCR analysis with *Sma*I enzyme. AA haplotype did not appear in the black mutant population but was rich in the Taiwan and Japanese populations. The percentage of AA haplotype was: Japanese breed population (60%) > Taiwan-introduced population (30%) > Taihu Lake population (20%). The percentage of AB haplotype was: Qingxi black mutant population (70%) > Taiwan-introduced population (50%) > Taihu Lake population (40%) > Japanese breed population (30%). These data may provide basic information for molecular breeding of *P. sinensis* in the future.

Key words *Pelodiscus sinensis*, Tyrosinase gene, RFLP