

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)MSTN 基因 SNP 位点与体重的相关性分析*

陈校辉¹ 刘朋朋^{1,2} 王明华¹ 陈友明¹ 钟立强¹ 潘建林¹

(1. 江苏省淡水水产研究所 南京 210017; 2. 南京师范大学生命科学学院 南京 210046)

摘要 为研究黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)MSTN 基因的多态性与体重之间的相关性,对 100 条六月龄黄颡鱼肌肉生长抑制素基因(MSTN)的全序列进行测序,获得了 8 个多态性较高的 SNP 位点。结果表明,其中有 7 个位点分布于非编码区,1 个位点位于编码区,但位于编码区的核苷酸突变为同一突变。得出这 8 个 SNP 位点中有 3 个位点的基因型与黄颡鱼的体重有显著的相关性:IJ 与体重呈正相关性,而 NN 和 OP 与黄颡鱼体重呈负相关性。在黄颡鱼育种过程中,可以尝试利用这三个位点进行分子标记辅助选育。

关键词 黄颡鱼;肌肉生长抑制基因;体重;相关性

中图分类号 Q959.499

肌肉生长抑制基因是控制动物骨骼肌生长发育的重要细胞因子,首先从小鼠骨骼肌 cDNA 文库中筛选得到。Pherron 等(1997)通过敲除小鼠的 MSTN 基因发现,小鼠骨骼肌的生长快速,这说明 MSTN 是骨骼肌生长的负调控因子,所以才称之为肌肉生长抑制素基因(myostatin)。它的突变会影响到很多生物体的生长性状,如皮埃蒙特牛的 MSTN 基因外显子 I 中 C 突变成 A 和比利时蓝牛中 MSTN 基因缺失 11bp 都会导致双肌牛的形成(Pherron *et al.*, 2002);鸡 MSTN 基因外显子 I 的两个点突变,造成 Bsh1236I 和 Msp I 酶切位点的消失,导致其胸重肌和胸肌率显著提高(朱智等, 2007);敲除 MSTN 基因的斑马鱼的肌肉比对照组的明显发达(Xu *et al.*, 2003; Acosta *et al.*, 2005);此外还有人、绵羊、猪、蒙古马等均发现突变位点与生长性状之间存在着相关性(Wagner *et al.*, 2004; 王全喜等, 2005; 任磊等, 2007; 张慧玲等, 2007)。

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*),属鲇形目(Siluriformes)、鲿科(Bagridae)、黄颡鱼属(*Pelteobagrus*),是我国一种重要的淡水名优经济鱼类,广泛

分布于黑龙江、黄河、长江及珠江各水域(褚新洛等, 1999)。近年来,随着黄颡鱼养殖技术和繁育技术的推广,黄颡鱼养殖规模迅速扩大。因此开展黄颡鱼优良品系的选育将是推动黄颡鱼产业进一步发展的关键环节。国内学者对黄颡鱼群体遗传结构以及黄颡鱼的育种已有一些研究,但有关黄颡鱼新品系选育的工作尚未开展,本次研究在黄颡鱼分子辅助育种的项目基础上开展 MSTN 基因 SNP 位点的筛选,希望找到可以辅助育种的分子标记。所以本次实验利用 PCR 产物直接测序技术对生产上同一批次孵化的 100 条 6 月龄黄颡鱼的 MSTN 全基因进行测序,并结合黄颡鱼的体重分析 MSTN 的 SNP 位点与体重的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

本次研究所用样本均来自于江苏省淡水水产研究所禄口基地的同一时间人工繁殖的黄颡鱼。为了减小环境对黄颡鱼生长的影响,黄颡鱼的苗种培育标准化。具体为均一的换水速率、投喂量、养殖密度、

* 江苏省科技支撑计划项目, BE2010376 号, BE2012469 号; 江苏省农业科技自主创新基金, CX(11)1036 号。陈校辉, 硕士, 副研究员, E-mail: cxiaohui416@hotmail.com

通讯作者: 潘建林, 研究员, E-mail: Jianlinpan2006@126.com

收稿日期: 2013-04-19, 收修改稿日期: 2013-07-21

充氧量以及水温。水温保持在 24—26℃, 氧气含量为 5.0mg/L, pH 7.0—7.8, 换水量保持一致并随着鱼体的生长增加。在黄颡鱼两星期内投喂开口饵料, 等到两个星期之后把黄颡鱼移至水泥池开始投食人工饵料进行人工驯化, 待黄颡鱼达到 2 个月时移至网箱养殖。

1.2 体重的测量

待黄颡鱼生长 6 个月时, 随机选取 100 条鱼, 对其体重采用精度为 0.1g 的电子天平称量。

1.3 DNA 模板制备

采用常规的酚-氯仿法提取尾鳍基因组 DNA, 提取的基因组 DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并用紫外分光光度计检测样品 DNA 浓度及纯度。然后根据测定的浓度取 3—5μL 稀释至 100ng/μL 用于 PCR,

放置在 -20℃ 中可长期保存。

1.4 PCR 扩增及序列测定

应用 Primer 5 设计了 5 对引物来进行 PCR, PCR 反应体系为 50μL, 含 2×PCR MIX 25μL (含 1.25U *Taq* 酶)、正反向引物各 2μL (10μmol/L)、DNA 模板 2μL (100ng/μL)、ddH₂O 14μL。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 45s, 退火 60s, 72℃ 延伸 60s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10min (引物和退火温度见表 1)。PCR 产物直接送去华大基因进行测序, 得到的结果通过观察峰图来判断 SNP 位点的碱基类型。

1.5 数据分析

运用 SPSS16.0 进行单因素 ANOVA(one-way ANOVA)分析。

表 1 PCR 引物的退火温度以及扩增条带特征
Tab.1 Annealing temperature of PCR primers and product features

引物名称	序列(5'—3')	序列起/止(bp)	产物长度(bp)	退火温度(℃)
F1	TCCTGTTCCCTGCTGCCACAC	46	628	53
R1	TATATTAGTGTTTAAATGTC	673		
F2	CAGGAATAGCCTCTAAACTG	616	712	55
R2	GCAGATTAAAGGTTTGTAGT	1327		
F3	TGATGAAGGAACAACGGACT	1223	943	55
R3	AGCCATTGAGTGTAACAGC	2165		
F4	AGATCGACGTGGATGCGGGT	1919	480	54
R4	CACCGTAAGGGGGTAGCGGC	2399		
F5	GATAGACCGAACTGTTATTT	2242	795	55
R5	AACAGAACTAAACGGATATT	3036		

2 结果与分析

2.1 多态性位点特征

本次研究共得到 8 个 SNP 位点, 如表 2 所示, 其中转换和颠换的突变位点各 4 个。其中有 7 个位点分布于非编码区, 1 个位点位于编码区, 但位于编码区的核苷酸突变为同一突变, 由 TTT 突变为 TTC, 编码的都是亮氨酸(Phe)。突变位点的基因单倍型频率最小的为 B 型, 占总数的 1.5%; 基因频率最大的是 N 型, 占总数的 40%。

2.2 MSTN 基因多态性与黄颡鱼体重相关性分析

如表 2, 利用 SPSS 与筛选得到的 8 个 SNP 位点与测量的黄颡鱼体重进行单因素 ANOVA 分析, 得出这 8 个 SNP 位点中有三个位点的基因型与黄颡鱼的体重有显著的相关性。IJ 基因型占总体比例的 36%, IJ 基因型个体的体重与 JJ 基因型存在着显著性差异 ($P < 0.05$), IJ 基因型个体的体重虽然比 JJ 个体的体重

大 17.2%, 但差异性不显著 ($P = 0.224$), 这说明 IJ 基因型是黄颡鱼体重的有利基因型。NN 基因型个体的体重分别比 MM、MN 基因型个体的体重小 26.8%、24.1%, 且差异性显著 ($P < 0.05$), 这说明 NN 基因型为不利基因型。OP 基因型个体的体重比 OO 基因型个体的体重小 14.4%, 且差异性显著, 说明 OP 基因型也为不利基因型。

3 讨论

3.1 鱼类 MSTN 基因的多态性研究

随着 MSTN 基因的研究受到重视, 多个鱼类物种的 MSTN 基因被克隆出来, 有罗非鱼、条纹鲈、斑马鱼、加州鲈、大黄鱼、虹鳟鱼、斑点叉尾鮰和真鲷肌等(Rodgers *et al*, 2001; Xu *et al*, 2003; Weber *et al*, 2005; Dilip *et al*, 2006; Terova *et al*, 2006; 李胜杰等, 2007), 对 MSTN 遗传多态性的研究也随之展开。杨斌等(2010)在大黄鱼 MSTN 外显子 1 中发现 10 个多

表 2 黄颡鱼 SNP 位点的特征
Tab.2 Characteristics of yellow catfish SNP sites

序列位置	功能区部位	碱基情况	基因型命名	个体个数	体重(g)
67	5'-UTR	C/C	AA	91	14.98 ± 0.39
		C/T	AB	9	15.43 ± 0.80
112	5'-UTR	T/T	CC	97	15.10 ± 0.36
		T/C	CD	3	13.40 ± 1.91
1550	intro-1	T/T	EE	95	15.07 ± 0.36
		T/C	EF	5	14.10 ± 2.21
1517	intro-1	G/G	GG	61	15.44 ± 0.45
		G/A	GH	33	14.34 ± 0.67
		A/A	HH	6	14.54 ± 1.22
1612	intro-1	T/T	II	58	14.00 ± 0.45
		T/G	IJ	36	16.79 ± 0.53*
		G/G	JJ	6	14.32 ± 1.49
2110	intro-2	A/A	KK	53	14.86 ± 0.45
		A/T	KL	37	15.35 ± 0.63
		T/T	LL	10	15.02 ± 0.36
2433	exon-3	T/T	MM	35	15.95 ± 0.62
		T/C	MN	50	15.38 ± 0.45
		C/C	NN	15	11.68 ± 0.71*
2834	3'-UTR	A/A	OO	93	15.18 ± 0.37
		A/C	OP	7	12.99 ± 1.13*

态位点, 其中 8 个引起了氨基酸的改变, 这些位点的多态信息含量中等, 平均为 0.37。薛良义等(2008a, b) 对大黄鱼外显子 1 进行遗传多态性分析, 结果显示, 外显子 1 的多态信息含量较高, 为 0.709, 然而这比大黄鱼肌肉生长抑制素基因 3'-UTR 的微卫星序列多态性(PIC=0.929)要低(薛良义等, 2008a, b)。由此可以看出, 在 MSTN 基因的非编码区多态性还是比较高, 这对分析 MSTN 全序列的 SNP 位点与生长性状连锁提供大量的有意义的统计位点。Li 等(2008)发现在大口黑鲈的启动子区有 9 个 E-box 和 2 个 TATA 框, 并发现 E6 框对基因的表达调控具有重要的影响。唐永凯等(2010)发现一个与吉富罗非鱼体型相关的 SNP 位点($P < 0.05$), 这个位点位于内含子 1 的 728nt 处。于凌云等(2010)对大口黑鲈 MSTN 基因全序列进行筛选, 发现 2 个单核苷酸多态性(SNPs)位点(C-1453T 和 T+33C), 双倍型 D2 对生长性状起正相关, 而双倍型 D5 与大口黑鲈的生长性状呈负相关。黄颡鱼 MSTN 遗传多态性虽然已有研究, 朱媛媛等(2012)采用 PCR-SSCP 技术对黄颡鱼 MSTN 基因进行单核苷酸多态性检测和分型, 并与其生长性状进行关联分析, 检测到 3 个突变位点, 并发现了一个影响雌性黄颡鱼生长性

状的有利基因型。

3.2 黄颡鱼 MSTN 基因 SNP 位点与体重的相关性分析

本次研究共得到 8 个 SNP 位点, 其中转换和颠换的突变位点都是 4 个。基因频率最大的是 N, 占总数的 40%; 突变位点的基因单倍型频率最小的为 B 型, 占总数的 1.5%。7 个位点分布于非编码区(2 个位于 5'-UTR, 3 个位于内含子 1, 1 个位于内含子 2, 1 个位于 3'-UTR), 1 个位点位于编码区, 但位于编码区的核苷酸突变为同一突变, 由 TTT 突变为 TTC, 编码的都是亮氨酸(Phe)。本次发现的第一内含子内的 SNP 位点分别为 T1550C、G1571A、T1612G(中间数据为在 GenBank 上黄颡鱼 MSTN 全序列的位置, 序列号: DQ767967), 通过与朱媛媛等(2012)利用 PCR-SSCP 方法在黄颡鱼 MSTN 基因在第一内含子部分发现 1 个缺失位点和 2 个突变位点(T1003del、G1022A 和 T1063G)发现并没有重叠位点, 全是新的 SNP 位点, 原因有可能是之前的研究没有对此区进行测序分析。第三外显子的突变位点是 T2433C, 这与之前研究的 T132 为同一位点。

利用单因素 ANOVA 分析方法对筛选得到的 8 个 SNP 位点与黄颡鱼体重进行相关性分析, 得出了 3 个位点与体重具有显著相关性的基因型, 分别是 IJ、NN 和 OP。IJ 基因型个体的体重与 NN 基因型存在着显著性差异($P < 0.05$), IJ 基因型个体的体重虽然比 NN 个体的体重大 19.9%。这说明 IJ 基因型是黄颡鱼体重的有利基因型, 在黄颡鱼分子辅助选育过程中可利用 IJ 基因型的富集来提高子代的体重。同时, 作者发现了两个不利的基因型 NN 和 OP。NN 基因型个体的体重比 MM、MN 基因型个体的体重小 26.8%、24.1%, 且差异性显著($P < 0.05$); OP 基因型个体的体重比 OO 基因型个体的体重小 14.4%, 且差异性显著($P < 0.05$)。IJ 与体重呈正相关性, 而 NN 和 OP 与黄颡鱼体重呈负相关性。在黄颡鱼育种过程中, 可以尝试利用这三个位点进行分子标记辅助选育。

由于本次试验所涉及的个体较少且没有重复对照, 所以在往后的育种过程中加大样本量, 利用构建家系来进一步验证本次实验结果会更具意义。

致谢 感谢南京大学赵庆顺老师在实验过程中给予的指导, 感谢项目组成员在实验过程中的帮助, 谨致谢忱。

参 考 文 献

于凌云, 白俊杰, 樊佳佳等, 2010. 大口黑鲈肌肉生长抑制素

- 基因单核苷酸多态性位点的筛选及其与生长性状关联性分析. 水产学报, 34(6): 845—851
- 王全喜, 红海, 张焱如等, 2005. 蒙古马 MSTN 基因第三外显子的克隆及其 SSCP 研究. 华北农学报, 20(3): 14—16
- 朱智, 吴登俊, 徐宁迎等, 2007. 鸡 Myostatin 基因单核苷酸多态性及其对屠体性状的遗传效应分析. 遗传, 29(5): 593—598
- 朱媛媛, 梁宏伟, 李忠等, 2012. 黄颡鱼 MSTN 基因多态性及其与生长性状的相关性分析. 遗传, 34(1): 72—78
- 任磊, 帅素容, 杨显彬等, 2007. 藏猪肌肉生长抑制素基因外显子的 PCR-SSCP 分析. 湖北农业科学, 26(4): 517—519
- 李胜杰, 白俊杰, 叶星等, 2007. 加州鲈肌肉生长抑制素(MSTN)cDNA 的克隆和序列分析. 海洋渔业, 29(1): 13—19
- 杨斌, 薛良义, 叶秀丽等, 2010. 大黄鱼肌肉生长抑制素基因外显子 I 遗传多态性分析. 海洋通报, 29(5): 554—559
- 张慧玲, 史洪才, 罗淑萍等, 2007. 绵羊肌肉生长抑制素基因外显子单核苷酸多态性分析. 新疆农业大学学报, 30(4): 21—24
- 唐永凯, 李建林, 俞菊华等, 2010. 吉富罗非鱼 MSTN 基因结构及其多态性与生长性状的相关性. 中国水产科学, 17(1): 44—51
- 褚新洛, 莫天培主编, 1999. 中国动物志. 北京: 科学出版社: 152—156
- 薛良义, 孙升, 肖章奎等, 2008a. 大黄鱼肌肉生长抑制素基因微卫星序列多态性分析. 中国生物化学与分子生物学报, 24(10): 980—985
- 薛良义, 李婷, 叶秀丽等, 2008b. 大黄鱼肌肉生长抑制素基因外显子 I 遗传多态性分析. 水产科学, 27(10): 503—506
- Acosta J, Carpio Y, Borroto I *et al*, 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. J Biotechnol, 119(4): 324—331
- Dilip K G, Scott A G, Buel D R *et al*, 2006. Identification, characterization and quantitative expression analysis of rainbow trout myostatin 1a and 1b genes. J Endocrinol, 190: 879—888
- Li S J, Bai J J, Wang L *et al*, 2008. Cloning and characterization of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) myostatin encoding gene and its promoter. J Ocean Univ Chin, 7(3): 304—310
- Pherron A C, Lawler A M, Lee S J, 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. Nature, 387(6628): 83—90
- Pherron A C, Lee Se-Jin, 2002. Suppression of body fat accumulation in myostatin deficient mice. J Clin Invest, 109(5): 595—601
- Rodgers B D, Weber G M, Sullivan C V *et al*, 2001. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. Endocrinology, 142(4): 1412—1428
- Terova G, Bernardini G, Binelli G *et al*, 2006. cDNA encoding sequences for myostatin and FGF6 in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and the effect of fasting and refeeding on their abundance levels. Domest Anim Endocrinol, 30(4): 304—319
- Wagner K R M, Stolz L E, Thomas Riebel *et al*, 2004. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. Engl Med, 350: 2682—2688
- Weber T E, Small B C, Bosworth B G *et al*, 2005. Lipopolysaccharide regulates myostatin and MyoD independently of an increase in plasma cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Domest Anim Endocrinol, 28(1): 64—73
- Xu C, Wu G, Zohar Y *et al*, 2003. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. J Exp Biol, 206(22): 4067—4079

SNP SITES OF MSTN GENE AND ITS ASSOCIATION WITH BODY WEIGHT IN YELLOW CATFISH (*PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*)

CHEN Xiao-Hui¹, LIU Peng-Peng^{1,2}, WANG Ming-Hua¹, CHEN You-Ming¹,
ZHONG Li-Qiang¹, PAN Jian-Lin¹

(1. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing, 210017;
2. Nanjing Normal University, School of Life Science, Nanjing, 210046)

Abstract To understand the relationship between body weight and SNP sites of myostatin, myostatin of 100 six-month-old yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* were sequenced. Eight SNP loci in high polymorphism were tested, of which seven were in uncode area and one in code area. However, the nucleotide mutation that located in code area, was synonymous mutation. Among eight SNP loci, three had genotype distinctly correlated with the weight of *P. fulvidraco*: IJ is in positive correlation and NN and OP in negative. Therefore, we could apply the three loci for molecular-marker-assisted breeding programs in *P. fulvidraco*.

Key words yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*; MSTN; body weight; association