

三种鳊鱼(*Siniperca*)生长激素基因内含子 多态性的比较研究*

刘 峰^{1, 2, 3} 鲁双庆^{1①} 刘 臻¹ 谢新民³ 唐建洲¹ 匡刚桥^{1, 3}

(1. 长沙大学生物工程与环境科学系 长沙 410003; 2. 上海海洋大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室 上海 201306; 3. 湖南农业大学动物科技学院 长沙 410128)

提要 鳊(*Siniperca chuatsi*)、大眼鳊(*Siniperca kneri*)、斑鳊(*Siniperca scheszeri*)为鳊属中 3 种主要经济鱼类, 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。为探索 3 种鳊鱼生长差异与基因差异间联系, 以野生群体为材料, 采用 PCR 扩增、电泳及测序等方法, 对生长发育相关基因生长激素(GH)基因进行了多态性检测与分析。在第一内含子、第二内含子前段、第二内含子中段微卫星序列及第三内含子中均检测到多态性。各区域共检测到 25 种长度类型, 其中 4 种为鳊与大眼鳊共有长度类型, 3 种为鳊、大眼鳊与斑鳊共有长度类型, 其余 18 种为各物种特有长度类型。各区域长度类型共组成 14 种单倍型, 无种间共有单倍型。序列长度差异主要由重复序列及 DNA 片段的插入或缺失形成。在第 1 内含子 3'端-6 位与第 3 内含子 5'端+16 位各发现一处靠近剪接位点的序列差异。根据多态性检测结果构建系统发育树, 鳊与大眼鳊先聚为一枝。本研究可为进一步确认鳊鱼 GH 基因差异与生长性状间联系, 并利用基因差异进行鳊鱼种质资源保护及分子育种奠定基础。

关键词 鳊, 生长激素基因, 长度多态性, 单倍型

中图分类号 Q953

生长激素(GH)基因是影响脊椎动物生长发育的重要功能基因之一。生长激素基因的突变可导致生长激素缺乏, 在人类中表现为矮小症(Cogan *et al*, 1993; Kamijo *et al*, 1999; Olga *et al*, 2003)。畜禽中, 生长激素基因的多态性常与生长性状差异相关(Rocha, 1992; Cheng *et al*, 2000; 宋成义等, 2001)。鱼类生长激素基因的突变也可影响体重及体长的增长(倪静等, 2006)。生长激素基因的重要性使其成为动物分子育种中的重要候选基因, 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(Richard *et al*, 1982; Zhu *et al*, 1985)。转基因研究表明, 生长激素基因内含子对基因的表达有显著影响(Brinster *et al*, 1988); 对人类生长激素基因多态性与疾病、生长关系

的研究也表明, 内含子序列尤其是剪接位点邻近序列的突变, 直接影响到转录产物的剪接及基因的表达, 最终影响成年个体的体格(Cogan *et al*, 1997; Olga *et al*, 2003)。

鳊(*Siniperca chuatsi*)、大眼鳊(*Siniperca kneri*)、斑鳊(*Siniperca scheszeri*)为我国三种主要养殖鳊类(梁旭方, 1996)。它们同属鳊属, 具有较近的亲缘关系、相似的形态特征及生活习性, 但三者间生长性状差异较大。其中, 鳊生长速度最快, 大眼鳊次之。同池饲养条件下, 鳊的生长速度约为大眼鳊的 3—5 倍(陈军等, 2003)。鳊类生长性状相关基因的研究鲜有报道, 仅有 Zhang 等(2005)克隆了大眼鳊生长激素基因 cDNA, 但未见进一步研究的报道。为从基因水平研究三种鳊鱼间差异, 作者克隆了三种鳊鱼生长激素

* 国家自然科学基金项目, 30640015 号; 湖南省自然科学基金项目, 06JJ20056 号。刘 峰, 上海海洋大学博士研究生, E-mail: lf6475@sina.com

① 通讯作者: 鲁双庆, 教授, 博士生导师, E-mail: lsq4250440@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-04-15, 收修改稿日期: 2008-06-18

(GH)基因(GenBank 收录号 EF205280、EF205281、EF441623), 经比较发现, 该基因的编码区序列相对保守, 编码氨基酸序列基本相同。本文继续对三种鳊鱼 GH 基因内含子间差异进行了研究, 以野生群体为材料, 根据三者共有保守序列, 设计引物对 GH 基因内含子进行 PCR 扩增、电泳及测序检测、序列比较, 并进行了群体遗传学分析。

1 材料与方法

1.1 材料

鳊、大眼鳊各 45 尾, 斑鳊 42 尾, 捕捞自东洞庭湖君山附近水域。尾静脉抽取血样, 加入 ACD 抗凝剂, -20°C 保存备用。

Ex *Taq* 酶、dNTP 购自大连宝生物公司。凝胶回收试剂盒购自安比奥公司。引物由上海英骏公司合成。常规试剂购自上海生工。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用改良苯酚氯仿法。每一样品取全血 $5\mu\text{l}$, 加入 $500\mu\text{l}$ 裂解液, 52°C 水浴 2—3h, 经苯酚、苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1)及氯仿-异戊醇(24:1)共 3 次抽提, 无水乙醇沉淀, 70%乙醇洗涤, 干燥后溶于 TE 或无菌水备用。

1.2.2 引物设计 使用 Primer5.0 软件, 参照大眼鳊 GH 基因 cDNA 序列与本实验室已克隆获得的鳊、大眼鳊及斑鳊 GH 基因 DNA 序列的共有保守序列设计引物, 分段扩增第 1 内含子、第 2 内含子前段、第

2 内含子微卫星区域、第 3 内含子前段、第 3 内含子、第 4 内含子、第 5 内含子等共 7 个区域, 分别命名为 A、B、C、D、E、F、G 位点(表 1)。

1.2.3 PCR 反应 PCR 反应体系为: PCR Buffer $2.5\mu\text{l}$, Mg^{2+} (25mmol/L) $1.5\mu\text{l}$, 引物($10\mu\text{mol/L}$)各 $1\mu\text{l}$, dNTP Mixture(各 2.5mmol/L) $1\mu\text{l}$, 模板 DNA($100\text{ng}/\mu\text{l}$) $1\mu\text{l}$, *Taq* ($5\text{U}/\mu\text{l}$) $0.2\mu\text{l}$, 加 ddH_2O 至总体积 $25\mu\text{l}$ 。

反应条件为: 94°C 预变性 5min, 94°C 变性 1min, 退火 45s, 72°C 延伸 1min, 30 个循环, 终延伸 10min。

1.2.4 扩增产物检测 除微卫星位点外, 各位点 PCR 产物采用 3%琼脂糖凝胶水平电泳检测。

对片段长度较大的第三内含子, 扩增产物进一步采用 *Mse* I 酶切及聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 酶切反应按产品说明进行。微卫星位点扩增产物检测采用 8%聚丙烯酰胺凝胶, 电泳电压 150 伏, 电泳时间 5—6h, 银染色。

对各位点不同长度的扩增产物分别切胶回收, 送上海英骏公司双向测序。凝胶中 DNA 的回收按试剂盒说明进行。

1.2.5 数据统计分析 序列比较采用 Clustalx1.83 软件。应用 POPGENE1.32 软件进行基因频率、遗传距离等分析(Nei, 1972, 1978); 应用 Arlequin3.11 软件进行单倍型频率、遗传分化指数(F_{st})及分子方差(AMOVA)分析(Excoffier *et al*, 1992, 1995); 将计算得到的 Nei(1978)遗传距离编写成距阵格式文件, 输入 PHYLIP3.66 软件包中 Neighbor 程序, 构建 UPGMA

表 1 引物序列及扩增区域
Tab.1 Sequences and location of the primers

引物	引物序列	退火温度	扩增区域	位点名
F1	5'ACCAGACCTGAATCCAAACC 3'	60℃	第 1 内含子	A
R1	5'ACGCTGGCTGTCTGTGATT 3'			
F2	5'CAGCGTCTGTTCTCCATAGC 3'	60℃	第 2 内含子前段	B
R2	5'GGTGGGATTTGTTGGGTCT 3'			
F3	5'TGGAGCAGAACCAGAATCATTG 3'	61℃	第 2 内含子微卫星	C
R3	5'TGTTGGGTCTGTACAAGGGTT 3'			
F4	5'GAGTCAAAAAGTGTCCTTATTC 3'	60℃	第 3 内含子前段	D
R4	5'TCTGGTGAAAAGTATGCAA 3'			
F5	5'CATCGACAAGCACGAGACACA 3'	60℃	第 3 内含子	E
R5	5'CAGTCCGAGAGTTTGGGTGA 3'			
F6	5'GGAGTTTCCAGTCGTTC 3'	58℃	第 4 内含子	F
R6	5'GGCCAGCAGTTCGTATGT 3'			
F7	5'GGCTCCTTATGGGAATAT 3'	58℃	第 5 内含子	G
R7	5'CATCACTTCCTGTTCATAGC 3'			

系统发育树(Felsenstein, 2006¹⁾)。

2 结果与分析

2.1 各位点多态性检测结果

2.1.1 第 1 内含子多态性检测 该位点 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 1。在该位点共发现三种长度类型(A1—A3), 经测序验证, 长度分别为 557bp(A1)、596bp(A2)、592bp(A3)。其中鳊、大眼鳊均为 A1 型; 斑鳊具有 A2、A3 型, 主要为 A2 型。A2、A3 型均在第 467—503 位具有一个源自邻近序列重复的 37bp 多余序列, 两者长度差异在于 A3 型在第 303—306 位缺少一个 4bp 片段。长度差异区域均位于第一内含子中。

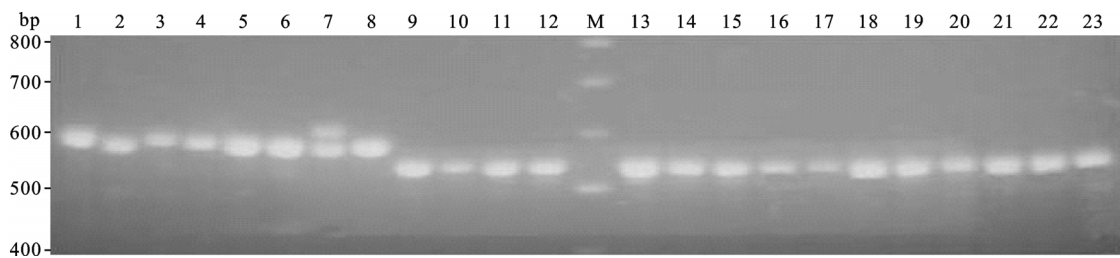


图 1 第 1 内含子 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig.1 The agarose electrophoresis map of PCR products of intron I
1—8: 斑鳊; 9—16: 大眼鳊; 17—23: 鳊; M: 100bp ladder

表 2 第 1 内含子长度类型比较表
Tab.2 The haplotypes of intron I

碱基位数	长度类型		
	A1	A2	A3
303—306	TAGT	TAGT	空
467—503	空	CTCTATCACCTGTCTTTTCACCTGACTCTT AACTGTCT	CTCTATCACCTGTCTTTTCACCTGAC TCTTAACTGTCT
总长	557bp	596bp	592bp

注: 该位点第 1 位碱基对应鳊 GH 基因 DNA 序列(GenBank 收录号 EF205280)第 1 位

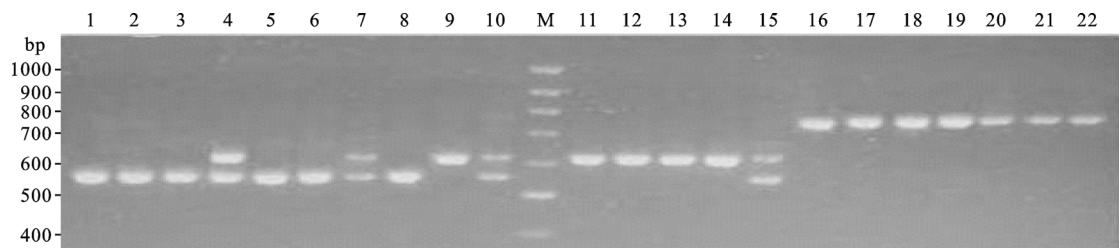


图 2 第二内含子前段 PCR 扩增产物电泳图

Fig.2 The electrophoresis map of PCR products of partial intron II
1—8: 鳊; 9—15: 大眼鳊; 16—22: 斑鳊; M: 100bp ladder

2.1.2 第二内含子前段多态性检测 该位点 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 如图 2。在该位点, 三种鳊鱼共检测到三种长度类型(B1—B3)。其中, 斑鳊具有 B2 型, 鳊与大眼鳊均具有 B1、B3 型, 鳊以 B1 型为主, 大眼鳊以 B3 型为主。

经测序及序列分析, B1、B2、B3 型扩增片段长度分别为 554bp、760bp 和 608bp。序列长度差异产生于位点内以 “ACAAAAACACA” 为基序的序列重复区域。该序列在 B1 中具有 14 个完全重复, 在 B2 中具有 23 个完全重复, 在 B3 中具有 16 个完全重复, 同时各长度类型中还具有数量不等的不完全重复。

2.1.3 第二内含子微卫星区域多态性检测 对第二内含子中微卫星位点进行 PCR 扩增及电泳检测,

1) Felsenstein J, 2006. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Version 3.66. University of Washington. Seattle

发现该位点具有多态性, 见图3。其中, 鳊具有三种长度类型, 斑鳊和大眼鳊各具有四种长度类型。测序结果显示, 鳊和斑鳊的微卫星序列为非完美型, 大眼鳊的微卫星序列为完美型。

2.1.4 第三内含子前段多态性检测 该位点扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测(图4), 共检出三种长度类型。其中, 鳊、大眼鳊共享一种长度类型(D1); 斑鳊具有两种长度类型(D2、D3), 主要为 D2 型。

经测序验证, 三种长度类型的差异位于 D2 序列第 328—352 位, 该区域序列在 D2 中为“CACAAAAT ACTACAAAATACTACAC”, 在 D3 中为“CACAAA TACTACAC”, 而在 D1 中缺少该段序列。经分析, 该片段末端的“ AATACTACAC”共 10 个碱基, 在该片段前具有一个完全相同的重复序列。该重复序列的存在,

可能通过同源重组导致鳊、大眼鳊中该片段的缺失。

2.1.5 第三内含子多态性检测 在琼脂糖凝胶中, 鳊和大眼鳊两物种扩增条带大小一致, 个体间无明显差异。斑鳊个体间表现出多态性, 其部分个体具有一条与鳊、大眼鳊相似的扩增条带(图 5 第 4、第 8 泳道)。

由于第三内含子扩增产物长度超过 1000bp, 直接采用水平或垂直电泳均难以分辨较小的长度差异, 进一步选用识别四碱基位点的 *Mse* I 酶, 对扩增产物进行酶切分析。经酶切及聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结果见图 6。从图 6 可分辨出 4 种基因型。其中大眼鳊和鳊共享一种基因型 E1E1; 斑鳊具有三种基因型: E2E2、E1E2(图 6 第 6 泳道, 对应图 5 第 4 泳道)、E3E3(图 6 第 1 泳道, 对应图 5 第 8 泳道), 主要为

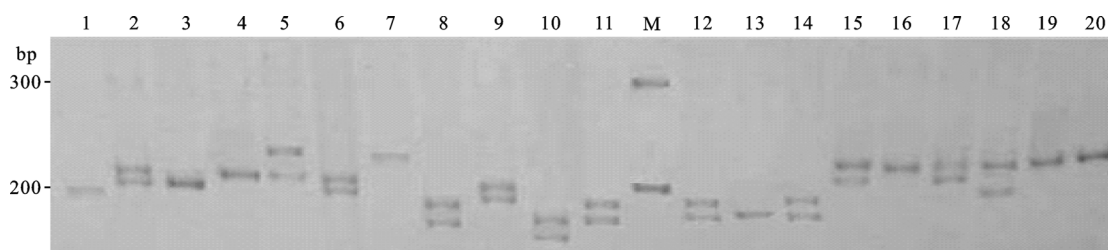


图3 第二内含子中微卫星扩增产物电泳图谱

Fig.3 The electrophoresis map of PCR products of microsatellite in intron II

1—7: 斑鳊; 8—14: 大眼鳊; 15—20: 鳊; M: 100bp ladder

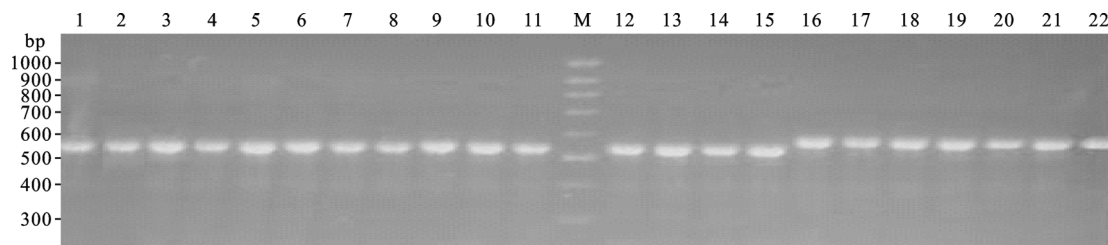


图4 第三内含子前段 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig.4 The electrophoresis map of PCR products of partial intron III

1—8: 鳊; 9—15: 大眼鳊; 16—22: 斑鳊; M: 100bp ladder

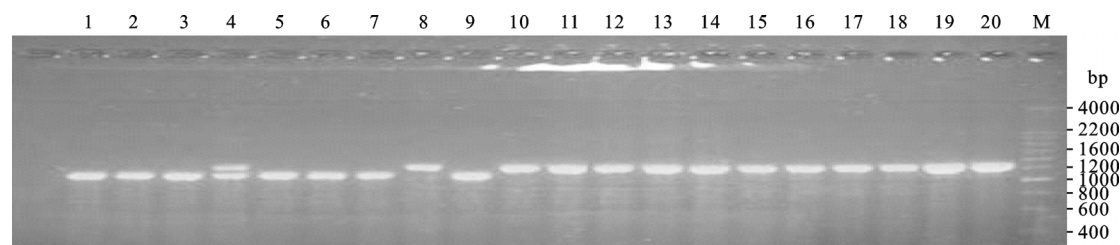


图5 第三内含子 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig.5 The electrophoresis map of PCR products of intron III

1—9: 斑鳊; 10—15: 鳊; 16—20: 大眼鳊; M: 200bp ladder

E2E2 型。在水平电泳中片段大小与大眼鳊、鳊个体很难区分的斑鳊图 5 第 8 泳道样品,经酶切及聚丙烯酰胺凝胶电泳后,发现具有与大眼鳊、鳊个体不同的 E3E3 型。

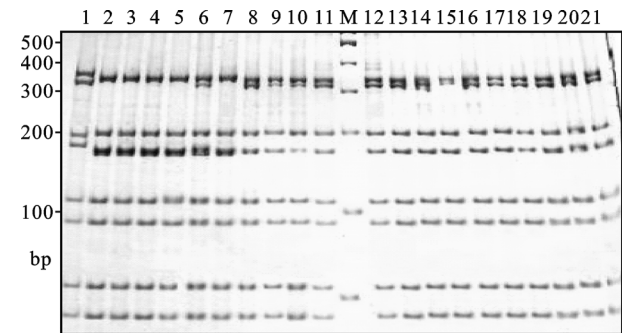


图 6 第三内含子 PCR-RFLP 电泳图谱

Fig.6 The PCR-RFLP electrophoresis map of intron III

1—7: 斑鳊; 8—14: 大眼鳊; 15—21: 鳊; M: 100bp ladder

经 PCR 产物回收测序及序列比较分析,证实该位点具有三种长度类型(E1、E2、E3)。三种长度类型的差异由六处插入或缺失形成,插入或缺失的长度从 3bp 至 128bp 不等。序列差异未造成酶切位点数的变化。所有三种单倍型均具有 8 个 *Mse* I 酶切位点,

经酶切后成为九个片段。各单倍型酶切位点及酶切后片段长度的比较结果见表 3。

2.1.6 第四及第五内含子多态性检测 经电泳检测,在该两个位点未发现扩增产物长度差异。

2.2 多态性检测结果的群体遗传学分析

2.2.1 长度类型及单倍型分布 见表 4。7 个位点共检测到 25 个长度类型,其中 4 个为鳊与大眼鳊共有长度类型,3 个为鳊、大眼鳊与斑鳊共有长度类型,其余 18 个为单个物种独有长度类型,共有长度类型比率为 28%。在 A、B、D、E 四个位点中,鳊群体的优势长度类型分别是 A1、B1、D1、E1,基因频率均在 0.83 以上;斑鳊群体的优势长度类型分别是 A2、B2、D2、E2,基因频率均在 0.85 以上;大眼鳊群体的优势长度类型分别是 A1、B3、D1、E1,基因频率均在 0.93 以上。在 C 位点,鳊的优势长度类型为 C1,其基因频率为 0.7;斑鳊主要为 C4、C5、C6 三种长度类型,其基因频率均在 0.25 以上;大眼鳊主要为 C8、C11 两种长度类型,其基因频率均在 0.4 以上。F、G 位点在三种物种中均不具有长度多态性,共享两种长度类型 F1、G1。总的来说,除 F、G 两位点外,其余各位点的长度类型及其频率分布具有显著种间特异性。

表 3 第三内含子酶切位点(*Mse* I, T/TAA, 位点 D)

Tab.3 The enzyme cut sites of intron III (*Mse* I, T/TAA, locus D)

长度类型	酶切位点数	酶切位点	片段总长	酶切后片段长
D1	8	323/352/459/549/711/999/1053/1094	1299	322/29/107/90/163/288/54/40/206
D2	8	305/334/441/531/697/857/911/951	1156	304/29/107/90/166/160/54/40/206
D3	8	338/367/474/564/734/1022/1076/1116	1316	337/29/107/90/170/288/54/40/201

表 4 长度类型频率表

Tab.4 The frequency of the length type

长度类型	鳊	斑鳊	大眼鳊	平均	长度类型	鳊	斑鳊	大眼鳊	平均
A1	1.0000		1.0000	0.6818	C8			0.4000	0.1364
A2		0.9286		0.2955	C9			0.1000	0.0341
A3		0.0714		0.0227	C10			0.0333	0.0114
B1	0.8333		0.0667	0.3068	C11			0.4667	0.1591
B2		1.0000		0.3182	D1	1.0000		1.0000	0.6818
B3	0.1667		0.9333	0.3750	D2		0.9286		0.2955
C1	0.7000			0.2386	D3		0.0714		0.0227
C2	0.1667			0.0568	E1	1.0000	0.0714	1.0000	0.7045
C3	0.1333			0.0455	E2		0.8571		0.2727
C4		0.3929		0.1250	E3		0.0714		0.2727
C5		0.2857		0.0909	F1	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
C6		0.2500		0.0795	G1	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
C7		0.0714		0.0227					

三个物种共检出 14 种单倍型, 见表 5。其中, 鳊具有 H1—3 型, 以 H1 型为主, 单倍型频率为 0.7000; 斑鳊具有 H4—9 型, 其中 H4、H6、H7 型的单倍型频率均在 0.21 以上; 大眼鳊具有 H10—14 型, 其中 H11、H14 型的单倍型频率均在 0.33 以上。各物种间无共有单倍型。

2.2.2 物种分化程度分析 见表 6。分子变异(AMOVA)分析显示, 种内变异(0.45)占总变异(1.91)

的 23.53%, 种间变异占总体变异的 76.47%。种间分化明显。

经使用 Arlequin 软件对衡量群体间分化程度的常用指标 F_{st} (遗传分化指数)值进行计算, 鳊与斑鳊及大眼鳊与斑鳊间的配对 F_{st} 值均在 0.8 以上, 鳊与大眼鳊间的配对 F_{st} 值为 0.5823, 见表 7。种间总体 F_{st} 值为 0.76469($P<0.01$)。鳊与大眼鳊间遗传分化程度相对较小。

表 5 单倍型频率表
Tab.5 The haplotype frequency

单倍型	单倍型	鳊	斑鳊	大眼鳊
H1	A1B1C1D1E1F1G1	0.7000	0.0000	0.0000
H2	A1B1C3D1E1F1G1	0.1333	0.0000	0.0000
H3	A1B3C2D1E1F1G1	0.1667	0.0000	0.0000
H4	A2B2C4D2E2F1G1	0.0000	0.3214	0.0000
H5	A2B2C5D2E1F1G1	0.0000	0.0714	0.0000
H6	A2B2C5D2E2F1G1	0.0000	0.2144	0.0000
H7	A2B2C6D2E2F1G1	0.0000	0.2500	0.0000
H8	A2B2C7 D2E2F1G1	0.0000	0.0714	0.0000
H9	A3B2C4D3E3F1G1	0.0000	0.0714	0.0000
H10	A1B1C8D1E1F1G1	0.0000	0.0000	0.0667
H11	A1B3C8D1E1F1G1	0.0000	0.0000	0.3333
H12	A1B3C9D1E1F1G1	0.0000	0.0000	0.1000
H13	A1B3C10D1E1F1G1	0.0000	0.0000	0.0333
H14	A1B3C11D1E1F1G1	0.0000	0.0000	0.4667

表 6 种间及种内分子变异(AMOVA)分析
Tab.6 The analysis of molecular variance (AMOVA) within and among species

变异来源	自由度	方差总和	变异组分	总变异百分率(%)
种 间	2	258.48	1.46	76.47
种 内	261	117.61	0.45	23.53
总 和	263	376.09	1.91	100.00

表 7 三种鳊鱼 GH 基因间 F_{st} 值表
Tab.7 F_{st} values among GH genes of three *Siniperca* fish species

物种名	鳊	斑鳊	大眼鳊
鳊	—	0.0000 + 0.000	0.0000 + 0.000
斑鳊	0.8003	—	0.0000 + 0.000
大眼鳊	0.5823	0.8010	—

注: 右上方数据为 P 值

2.2.3 三种鳊鱼间遗传距离及聚类分析 根据 Nei(1972)方法及 Nei(1978)校正方法, 计算得到三种鳊鱼间遗传距离及遗传相似性系数(表 8、表 9)。

根据 Nei(1978)方法计算的遗传距离, 采用

表 8 三种鳊鱼遗传距离(Nei, 1972)
Tab.8 Genetic distance among three *Siniperca* fish species (Nei, 1972)

物种名	鳊	斑鳊	大眼鳊
鳊	—	0.3443	0.8323
斑鳊	1.0661	—	0.3441
大眼鳊	0.1836	1.0667	—

注: 对角线以下为遗传距离, 对角线以上为遗传相似性系数

表 9 三种鳊鱼遗传距离(Nei, 1978)
Tab.9 Genetic distance among three *Siniperca* fish species (Nei, 1978)

物种名	鳊	斑鳊	大眼鳊
鳊	—	0.3447	0.8328
斑鳊	1.0652	—	0.3445
大眼鳊	0.1829	1.0657	—

注: 对角线以下为遗传距离, 对角线以上为遗传相似性系数

PHYLIP 软件构建 UPGMA 系统发育树(图 7)。由图 7 可知, 在该树中, 鳊与大眼鳊最先聚为一枝, 再与斑鳊聚在一起。

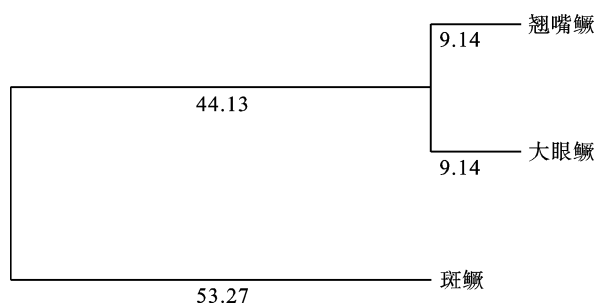


图 7 三种鲌鱼 UPGMA 系统发育树

Fig.7 The UPGMA phylogenetic tree of three *Siniperca* fish species

3 讨论

3.1 鲌鱼 GH 基因内重复序列及其意义

在鱼类中,迄今已在金头鲂(*Sparus aurata*)、牙鲮(*Paralichthys olivaceus*)、尖吻鲈(*Lates calcarifer*)等的 GH 基因内发现小卫星或微卫星序列。金头鲂 GH 基因第 1 内含子中具有一个 12 碱基核心序列的串联重复(Almuly *et al.*, 2000)。牙鲮第 1 内含子内具有一处 19 碱基核心序列的串联重复,该 19 个核苷酸中的 12 个与金头鲂中的完全相同(Kang *et al.*, 2002)。尖吻鲈 GH 基因启动子及 5'非翻译区中均具有微卫星序列(Yowe *et al.*, 1995)。Wang 等(2006)利用 GH 基因内微卫星位点成功地将该基因定位于尖吻鲈遗传图谱中。

本研究中发现的基因内多态性微卫星位点在实际应用中具有重要价值。通过检测该多态性位点在子代中的分离及与其他位点间的连锁关系,可将鲌鱼 GH 基因定位到遗传图谱中。同时,以往研究表明(Cheng *et al.*, 2000; Cogan *et al.*, 1997; Olga *et al.*, 2003),生长激素基因是影响动物生长发育和生产性状的重要功能基因,这使该标记成为一个潜在的 QTL 位点,可进一步应用于分子标记辅助选择(MAS)研究。

在鲌鱼 GH 基因第二内含子中,还具有一处 11 碱基串联重复序列。与在牙鲮及金头鲂 GH 基因第 1 内含子中发现的重复序列不同,该 11 碱基串联序列的重复次数在种内未发现多态性,但具有种间差异,可作为种间特异性位点应用于种质鉴定。

3.2 GH 基因差异对生长性状可能产生的影响

研究表明, GH 基因内含子对基因的表达及个体的生长发育具有重要影响。Brinster 等(1988)在进行小鼠转基因实验中发现,在转基因小鼠体内,含内含子

大鼠 GH 基因的转录活性是不含内含子大鼠 GH 基因的 10—100 倍。在人类中, GH 基因内含子的碱基突变可影响基因的表达,如在第 3 内含子 5'端第 6 位碱基的 T 突变为 C,可导致剪接位点失活,产生缺失第三外显子的 mRNA (Cogan *et al.*, 1993); 第 3 内含子 5'端第 28 位的 G 突变为 A,可干扰 mRNA 的剪接,导致 II 型生长激素缺乏症(Cogan *et al.*, 1997)。

本研究在鲌鱼内含子中共检测到 6 处 10bp 以上的长度差异,1 处位于第 1 内含子(A 位点),2 处位于第 2 内含子(B、C 位点各一处),3 处位于第 3 内含子(D 位点一处、E 位点两处)。其中,第 1 内含子 3'端-6 位存在一处 37bp 长度差异、第 3 内含子 5'端+16 位存在一处 15—25bp 长度差异,这两处均离剪接位点较近。这几处差异是否影响基因的表达,是否可形成种间或种内生长发育的差异,值得进一步研究。

3.3 GH 基因内含子长度差异检测在鲌鱼种质资源保护中的应用

本研究中,在 A、B、D、E 四个位点,翘嘴鲌、大眼鲌与斑鲌间均无共享基因型,检测任一位点均可准确地将两者区分开来;在 B、C 两个位点组合中,翘嘴鲌与大眼鲌间无共享基因型,检测该位点组合可有效区分翘嘴鲌与大眼鲌;在 A、B、C、D、E 五个位点组合中,三种鲌鱼间无共享单倍型,利用该五个位点组合可有效区分三种鲌鱼。

近年来,为获得生长快速且抗病力强的鲌鱼品种,已有鲌类种间杂交的报道(浙江渔业科技网, 2006¹⁾)。同时,在鲌鱼养殖初期,大眼鲌、鲌等的混养也可能导致鲌鱼养殖群体的种质混杂。如可育的杂交后代因逃逸等原因进入天然水域,极有可能导致鲌鱼种质资源的污染。本研究中开发的 GH 基因内含子长度多态性标记,检测方便快捷,在鲌鱼种质资源保护及种质鉴定中具有较强实用价值。

3.4 三种鲌鱼 GH 基因分化

根据三种鲌属鱼类 GH 基因内含子长度多态性检测结果,构建系统发育树,鲌与大眼鲌先聚为一枝,然后再与斑鲌聚为一枝。该聚类分析结果与赵金良等(2006a, b)根据线粒体细胞色素 *b* 基因及控制区序列进行的系统发育研究结果相同。在以往应用 GH 基因进行系统进化分析的研究中,主要根据开放阅读框或推导的氨基酸序列进行,如 Luis 等(2003)采用推导的 GH 氨基酸序列对 19 种鱼类进行了系统进化分析,

1) 浙江渔业科技网, 2006. “鲌鱼杂交育种技术的研究”项目通过评审. http://www.zjfish.org/article_detail.jsp?id=359

Zhang 等(2005)采用 GH 基因开放阅读框对 6 种经济鱼类进行了系统发育研究。三种鳊鱼 GH 基因外显子序列及推测氨基酸序列分化不明显(如大眼鳊与鳊间 GH 氨基酸序列完全相同), 不便于系统发育分析。与外显子相比, 内含子所受的选择压力较小, 进化速度较快, 可能更适于进行亲缘关系较近的鱼类的系统发育研究。

参 考 文 献

- 宋成义, 经荣斌, 陶 勇等, 2001. 猪 GH 基因部分突变位点对生产性能的影响. 遗传, 23(5): 427—430
- 陈 军, 郑文彪, 伍育源等, 2003. 鳊鱼和大眼鳊鱼年龄生长和繁殖力的比较研究. 华南师范大学学报(自然科学版), (1): 110—114
- 赵金良, 王伟伟, 李思发等, 2006a. 鳊类鱼类的线粒体 DNA 控制区结构及其系统发育分析. 遗传学报, 33(9): 793—799
- 赵金良, 李思发, 蔡完其等, 2006b. 基于细胞色素 *b* 基因序列的东亚鳊类系统发育关系. 动物学报, 52(4): 676—680
- 倪 静, 尤 锋, 张培军等, 2006. 牙鲈 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, 16(3): 307—312
- 梁旭方, 1996. 国内外鳊类研究及养殖概况. 水产科技情报, 23(1): 13—17
- Almuly R, Cavari B, Ferstman H *et al*, 2000. Genomic structure and sequence of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth hormone encoding gene: Identification of minisatellite polymorphism in intron I. Genome, 43: 836—845
- Brinster R L, Allen J M, Behringer R R *et al*, 1988. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. Developmental Biology, 85(5): 836—840
- Cheng W T K, Lee C H, Hung C M *et al*, 2000. Growth hormone gene polymorphisms and growth performance traits in Duroc, Landrace and Tao-yuan pigs. Theriogenology, 54: 1225—1237
- Cogan J D, Phillips III J A, Sakati N *et al*, 1993. Molecular basis of autosomal recessive and autosomal dominant inheritance in familial GH deficiency. the 75th Annual Meeting of the Endocrine Society. Las Vegas, 376
- Cogan J D, Prince M A, Lekhakula S *et al*, 1997. A novel mechanism of aberrant pre-mRNA splicing in humans. Hum Mol Genet, 6: 909—912
- Excoffier L, Slatkin M, 1995. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. Mol Biol Evol, 12(5): 921—927
- Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 131(2): 479—491
- Kamijo T, Hayashi Y, Shimatsu A *et al*, 1999. Mutations in intron 3 of GH-1 gene associated with isolated GH deficiency type II in three Japanese families. Clin Endocrinol, 51: 355—360
- Kang J H, Lee S J, Park S R *et al*, 2002. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Science, 68: 494—498
- Luis F Marins, Jose A Levy, Josep M Folch *et al*, 2003. A growth hormone-based phylogenetic analysis of euteleostean fishes including a representative species of the Atheriniformes Order, *Odontesthes argentinensis*. Genetics and Molecular Biology, 26(3): 295—300
- Nei M, 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist, 106: 283—292
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583—590
- Olga V Fofanova, Oleg V Evgrafov, Alexander V Polyakov *et al*, 2003. A Novel IVS2 _2A>T Splicing Mutation in the GH-1 Gene in Familial Isolated Growth Hormone Deficiency Type II in the Spectrum of Other Splicing Mutations in the Russian Population. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 88(2): 820—826
- Richard D Palmiter, Ralph L Brinster, Robert E Hammer *et al*, 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein growth hormone fusion genes. Nature, 300: 611—615
- Rocha J L, 1992. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. J Anim Sci, 70: 3360—3370
- Wang C M, Lo L C, Zhu Z Y *et al*, 2006. Genome-scan QTL for growth-related traits in an F₁ family from a breeding population of Asian seabass. BMC Genomics, 7: 274
- Yowe D L, Epping R J, 1995. Cloning of the barramundi growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of higher and lower vertebrate GH genes. Gene, 162(2): 255—259
- Zhang J N, Song P, Hu J R *et al*, 2005. Molecular cloning and sequence analysis of full-length growth hormone cDNAs from six important economic fishes. Acta Genetica Sinica, 32(1): 19—29
- Zhu Z, Li G, He L *et al*, 1985. Novel gene transfer into the fertilized eggs for goldfish (*Carassium auratus* L.). Z Angew Ichthyol, 1(1): 31—34

THE GH GENE DIVERSITY AMONG THREE *SINIPERCA* FISH SPECIES

LIU Feng^{1,2,3}, LU Shuang-Qing¹, LIU Zhen¹, XIE Xin-Min³, TANG Jian-Zhou¹, KUANG Gang-Qiao^{1,3}

(1. Department of Biotechnology and Environment Science, Changsha University, Changsha, 410003; 2. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306; 3. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, 410128)

Abstract *Siniperca chuatsi*, *S. kneri*, *S. schezeri* are three major commercial fish species in genus *Siniperca*; they have close relationships and similar life habits, but significantly different growth. To understand the reason, the diversity of GH genes of three members is studied using PCR amplification, electrophoresis, and sequencing. Sequence diversities were observed in Intron 1, forepart of Intron 2, and microsatellite sites in Intron 2 and Intron 3. Twenty-five length types have been observed in all regions, among them 4 types are shared by *S. chuatsi* and *S. kneri*, and 3 types shared by three fishes; others were species-specific. All the length types in different regions formed 14 haplotypes, being species-specific. The sequence diversities are mainly due to repeat sequences and inserts or deletions of DNA fragments. There were two diversity loci close to the 3'-acceptor splice site of Intron 1 and the 5'-donor splice site of Intron 3 respectively. Phylogenetic tree was constructed based on diversity detections. *S. chuatsi* and *S. kneri* cluster into one clade before join *S. schezeri*. All these findings have laid a foundation for further study on the relationship between gene diversity and trait difference, as well as for further utilization of the diversity of GH gene in molecular breeding and germplasm conservation of the *Siniperca* fishes.

Key words Mandarinfish, GH gene, Length polymorphism, Haplotype