

3 种鳊属鱼生长激素基因差异的检测与分析

刘峰^{1,2,3}, 刘臻¹, 鲁双庆¹, 张建社¹, 谢新民³, 唐建洲¹, 匡刚桥¹

(1. 长沙大学生物工程与环境科学系, 湖南长沙 410003; 2. 上海海洋大学生命科学与技术学院, 上海 20090; 3. 湖南农业大学动物科技学院, 湖南长沙 410128)

摘要: 为探索鳊 (*Siniperca chuatsi*)、大眼鳊 (*S. kneri*)、斑鳊 (*S. scherzeri*) 生长性状差异与基因差异间的联系, 以 3 种鳊野生群体为材料, 采用 PCR-SSCP 分析及测序方法, 对 3 种鳊野生群体的生长发育相关基因——生长激素 (GH) 基因的差异进行了检测。结果表明, 在生长激素基因 5' 侧翼区至第 2 外显子区域检测到 4 种多态型, 均为群体特有多态型; 在第 2 内含子 3' 段至第 3 内含子 5' 段区域检测到 5 种多态型, 其中 3 种为群体特有多态型; 在第 4 外显子至第 5 外显子 5' 段区域及第 5 外显子 3' 段至 3' 侧翼区均检测到 4 种多态型, 均有 3 种为群体特有多态型。对各多态型编码区的分析表明, 斑鳊与鳊、大眼鳊在 GH 第 150 位氨基酸位点存在差异。在该位点, 斑鳊编码蛋氨酸 (M), 鳊、大眼鳊均编码亮氨酸 (L)。各区域多态型共组合成 9 种 GH 基因型, 3 种鳊间无共有基因型。GH 基因遗传分化指数 (F_{st}) 为 0.859 8, 分化程度较高。遗传多样性分析显示, 斑鳊 GH 基因遗传多样性高于鳊和大眼鳊。3 种鳊属鱼 GH 基因相似度比较结果显示, 鳊与大眼鳊的相似度最高, 鳊与斑鳊的相似度最低。研究结果可为进一步利用 GH 基因差异进行鳊分子育种研究提供依据。[中国水产科学, 2008, 15(5): 745-754]

关键词: 鳊; GH 基因; 遗传分化; PCR-SSCP

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)05-0745-10

鳊 (*Siniperca chuatsi*)、大眼鳊 (*S. kneri*) 及斑鳊 (*S. scherzeri*) 为东亚鳊类中 3 种主要经济鱼类。它们同属鲈形目、鲴科、鳊属, 具有相似的生活习性 & 形态特征, 但生长性状差异较大。其中, 鳊生长速度最快, 大眼鳊次之, 斑鳊最慢^[1]。3 种鳊鱼均有一定养殖产量, 其中鳊养殖最为广泛, 而斑鳊则由于病害较少、肉质好, 其养殖近年来也得到迅速发展^[1]。尽管鳊鱼养殖得到大力发展, 但至今没有人工选育良种可供生产中应用, 影响了养殖效益的提高。从现有养殖鳊的种类中选育生长快速的良种, 已成为鳊养殖健康发展的迫切需求。

生长激素 (GH) 基因是影响动物生长性状的重要功能基因^[2]。畜禽中, 生长激素基因的多态性常与生长性状差异相关^[3-5]。鱼类生长激素基因的突变也可影响体质量及体长的增长^[6]。由于 GH 基因与动物生长性状的相关性, 其已成为重要候选基因, 被广泛用于畜禽生产性状相关分子标记筛选及辅助育种研究^[5, 7-11]。对鱼类 GH 基因的研究

迄今为止主要是对其 cDNA 进行克隆和表达^[12], 对 DNA 序列及其多态性研究的报道较少。本研究中, 在前期克隆鳊、大眼鳊、斑鳊 3 种鳊属鱼 GH 基因全长 DNA 序列 (GenBank 登录号 EF205280、EF205281、EF441623) 基础上, 以 3 种鳊鱼的野生群体为材料, 对该基因进行了分区扩增及差异检测, 旨在筛查 3 种鳊鱼 GH 基因种内及种间的多态位点, 预测 GH 基因序列差异对生长性状可能产生的影响, 为研究基因差异与生长性状间差异的联系, 以及利用 GH 基因这一重要功能基因进行鳊属鱼分子育种研究奠定基础。

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, 经形态检测, 均分类特征明显, 活体抽取血样, 加入 ACD 抗凝剂, 20℃ 保存备用。

Ex Taq 酶、dNTP 购自大连宝生物公司;

收稿日期: 2007 11 08; 修订日期: 2008 04 23.

基金项目: 国家自然科学基金 (30571414); 湖南省自然科学基金 (06JJ20056); 湖南省教育厅重点项目 (08A015).

作者简介: 刘峰 (1975-), 男, 博士研究生, 主要从事水产动物种质资源与种苗工程研究. E-mail: lf6475@sina.com

通讯作者: 鲁双庆 (1963-), 男, 博士生导师, 博士. E-mail: lsq4250440@yahoo.com.cn

pGEM-T 载体试剂盒购自 Promega 公司; 凝胶回收试剂盒购自安比奥公司; 常规试剂购自上海生工。DH5 α 菌株为本实验室保存。引物由上海 invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 基因组 DNA 提取采用改良苯酚-氯仿法^[13]。每一样品取全血 5 μ L, 加入 500 μ L 裂解液, 52 $^{\circ}$ C 水浴 2~3 h, 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 引物设计及 PCR 扩增 使用 Primer 5.0 软

件, 对 GenBank 数据库中大眼鳊 GH 基因的 cDNA 序列及本实验室已克隆获得的鳊、大眼鳊和斑鳊 GH 基因 DNA 序列进行比较, 在较保守位点设计引物, 分段扩增 5' 端非翻译区至第 2 外显子、第 2 内含子 3' 段至第 3 内含子 5' 段、第 4 外显子至第 5 外显子 5' 段、第 5 外显子 3' 段至 3' 端非翻译区共 4 个区域 (表 1)。PCR 反应体系为: ddH₂O 16.8 μ L, PCR Buffer 2.5 μ L, Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.5 μ L, 引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 1 μ L, 模板 DNA (100 ng/ μ L) 1 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 共 25 μ L。

表 1 本实验所用引物序列及其扩增区域

Tab.1 Primer sequences used in the experiment and their amplifying regions

引物 Primer	引物序列 (5'→3') Primer sequence	退火温度 / $^{\circ}$ C Annealing temperature	扩增区域 Amplifying region
F1	ACCAGACCTGAATCCAAACC	60	5'侧翼区至第 2 外显子
R1	ACGCTGGCTGTCTGTGATT		From the 5' -flanking region to exon II
F2	GAGTCAAAAGTGTCCTATTC	60	第 2 内含子 3' 段至第 3 内含子 5' 段
R2	TCTGGTGAATACTGATGCAA		From the 3' part of intron II to the 5' part of intron III
F3	GGAGTTTCCCAGTCGTTT	58	第 4 外显子至第 5 外显子 5' 段
R3	GGCCAGCAGTTCGTATGT		From exon IV to the 5' part of exon V
F4	GGCTCCTATGGGAAGTAT	58	第 5 外显子 3' 段至 3' 侧翼区
R4	CATCACTTCTGTTCATAGC		From the 3' part of exon V to the 3' -flanking region

1.2.3 多态性检测 对 PCR 扩增产物进行单链构象多态性 (SSCP) 分析及银染, 方法参照文献 [13-14], 略作修改。每一样品取 3 μ L PCR 产物, 加入 10 μ L 变性缓冲液混匀, 98 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 冰浴 10 min, 上样于非变性聚丙烯酰胺凝胶, 电泳并银染显色。经对电泳温度、电压及胶浓度等条件进行优化, 对各区域扩增产物分别采用其最佳电泳条件进行检测, 以达到清晰鉴别各基因型的目的。第 4 外显子至第 5 外显子 5' 段采用 20 $^{\circ}$ C 电泳温度, 其余区域采用 4 $^{\circ}$ C 电泳温度。各区域检测均采用 10% 非变性胶 (丙烯酰胺与 N, N' - 亚甲基双丙烯酰胺体积比为 29:1), 8 V/cm 恒压电泳 13~15 h。

经 SSCP 分析, 对每一带型随机取 3 个样品测序。条带较难分辨的个体也一并测序。5' 端侧翼区至第 2 外显子、第 2 内含子 3' 段至第 3 内含子 5' 段 2 个区域差异碱基较多, 均采用克隆测序, 每 1 个体随机挑取 4 个克隆。其余区域直接测序。

PCR 产物切胶回收、与载体连接均参照试剂盒说明进行。连接产物热激转化 CaCl₂ 法制备感受态细胞, 涂布含氨苄青霉素 LB 平板, 获得克隆经蓝白斑筛选、菌落 PCR 鉴定后测序。菌落 PCR 扩增反应条件同 1.2.2。

序列测定由上海 Invitrogen 公司采用 ABI 3730 自动测序仪完成。

1.2.4 数据分析 对测得序列应用 Clustalw 1.83 软件进行序列比较。

采用 POPGENE 1.32 软件进行遗传杂合度、基因频率、基因型频率、香农多样性指数及遗传距离等分析^[15-18]。采用 Arlequin 3.11 软件进行 F_{st} (遗传分化指数) 及分子方差 (AMOVA) 分析^[19-20]。根据 Nei's 遗传距离公式^[16] 计算得到的 3 种鳊属鱼间遗传距离, 使用 PHILIP 3.66 软件构建 UPGMA 系统发育树^[21]。

2 结果与分析

2.1 各区域检测结果

2.1.1 5' 端侧翼区至第 2 外显子 该区域共发现 4 种多态型, 分属 3 种长度类型: 557 bp (A1、A4), 596 bp (A2), 592 bp (A3)。其中鳊为 A1 型; 大眼鳊为 A4 型; 斑鳊为 A2、A3 型, 主要为 A2 型 (图 1)。

各多态型间共具有 23 处碱基差异 (表 2)。与 A1、A4 相比, A2、A3 型均在第 467~503 位具有 1 个源自邻近序列重复的 37 bp 多余序列。A2、A3 的长度差异在于 A3 型在第 303~306 位缺少 1 个 4 bp 片段。长度差异区域均位于第一内含子中。各多态型间的差异未形成所编码氨基酸的序列差异。

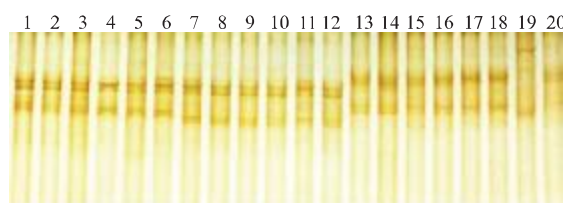


图 1 GH 基因 5' 侧翼区至第 2 外显子区域的 PCR-SSCP 检测

1 6: 鳊; 7 12: 大眼鳊; 13 20: 斑鳊. 泳道 1 6 为 A1A1 多态型; 7 12 为 A4A4 多态型; 13-18、20 为 A2A2 多态型; 19 为 A3A3 多态型

Fig.1 PCR-SSCP analysis of the region from the 5' -flanking region to exon II of GH gene

1-6: *Siniperca chuatsi*; 7-12: *S. kneri*; 13-20: *S. scherzeri*. Lanes 1-6: A1A1; lanes 7-12: A4A4; lanes 13-18, 20: A2A2; lane 19: A3A3.

表 2 GH 基因 5' 端侧翼区至第 2 外显子多态型表
Tab.2 Polymorphic types in the region from 5' -flanking region to exon II of GH gene

多态型	碱基位置 /bp Nucleotide locus													
Polymorphic type	67	70	91	95	104	105	107	117	143	161	170	179	197	269 270
A1	A	C	T	G	TT	T	A	C	A	G	T	C	TT	
A2	G	C	T	G	CC	T	T	A	G	A	A	C	AC	
A3	A	T	C	A	TT	T	T	A	A	G	A	C	AC	
A4	A	C	T	G	TT	A	A	C	A	G	T	A	TT	

多态型	碱基位置 /bp Nucleotide locus										总长 /bp
Polymorphic type	278	285-286	303-306	322	340	342	396	432	467-503	540	Total length
A1	C	-	TAGT	G	A	T	C	C	-	T	557
A2	C	AA	TAGT	T	G	G	C	C	CTCTATCACCTGT CTTTCACCTGACT CTTAACTGTCT	C	596
A3	T	AA	-	T	G	G	G	T	CTCTATCACCTGT CTTTCACCTGACT CTTAACTGTCT	C	592
A4	C	-	TAGT	G	A	G	C	C	-	C	557

注: 该区域第 1 位碱基对应于鳊全长序列 (GenBank 登录号 EF205280) 第 1 位。

Note: The 1st nucleotide in this region is counterpart of the 1st one of complete sequence (GenBank access No. EF205280).

2.1.2 第 2 内含子 3' 段至第 3 内含子 5' 段 在该区域共发现 5 种多态型, 分属 3 种长度类型: 468 bp (B1、B2、B3)、493 bp (B4)、483 bp (B5)。其中鳊为 B1、B3 型, 主要为 B1 型; 大眼鳊为 B1、B2、B3 型, 主要为 B2 型; 斑鳊为 B4、B5 型, 主要为 B4 型 (图 2)。

5 种多态型共具有 12 处碱基差异 (表 3)。鳊主要多态型 B1 和大眼鳊主要多态型 B2 间仅有 2

处碱基差异。斑鳊独有的 2 种多态型 B4、B5 与其他多态型相比, 在第 3 内含子起点附近分别具有 1 个 25 bp 或 15 bp 的多余序列, 造成斑鳊与其他 2 种鳊属鱼在该区域扩增产物大小的种间差异。分析其序列来源, 可能来自于邻近序列的重复。各差异碱基中, 仅第 357 位差异位于第 3 外显子中, 但其不形成所编码氨基酸的序列差异。

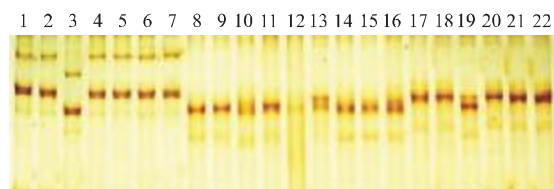


图2 GH基因第2内含子3'段至第3内含子5'段区域的PCR-SSCP检测

1-7: 斑鳊; 8-16: 大眼鳊; 17-22: 鳊. 泳道1-2、4-7为B4B4多态型; 3为B5B5多态型; 8-9、11-12、14-15为B2B2多态型; 10、16为B2B3多态型; 13为B1B2多态型; 17 18、20 22为B1B1多态型; 19为B1B3多态型.

Fig.2 PCR-SSCP analysis of the region from the 3' part of intron II to the 5' part of intron III of GH gene

1-7: *Siniperca scherzeri*; 8-16: *S. kneri*; 17-22: *S. chuatsi*; Lane 1-2, 4-7: B4B4; lane 3: B5B5; lane 8-9, 11-12, 14-15: B2B2; lane 10, 16: B2B3; lane 13: B1B2; lane 17-18, 20-22: B1B1; lane 19: B1B3.

表3 GH基因第2内含子3'段至第3内含子5'段多态型表

Tab.3 Polymorphic types in the region from 3' part of intron II to 5' part of intron III of GH gene

多态型 Polymorphic type	碱基位置/bp Nucleotide locus												总长/bp Total length
	74	101-102	138	231	357	376-400	414	416	419	428	443	473	
B1	C	AG	G	T	C	—	G	A	G	T	A	C	468
B2	C	AG	C	C	C		G	A	G	T	A	C	468
B3	C	AG	C	T	C		G	G	G	T	A	C	468
B4	T	G	G	C	C	CACAAAATACTACAA AATACTACAC	G	A	A	T	T	T	493
B5	C	AA	G	T	T	CACAAAATACTACAC	A	A	G	A	T	C	483

注: 该区域第1位碱基对应于鳊全序列(EF205280)第3371位.

Note: The 1st nucleotide in this region is counterpart of the 3371st one of complete sequence (EF205280).

2.1.3 第4外显子至第5外显子5'段 在该区域检测到4种多态型。其中, 鳊为C1型; 斑鳊检出了C2、C3 2种多态型, 以C2型为主; 大眼鳊检出了C1、C4 2种多态型, 以C4型为主(图3)。

各多态型间共有5处碱基差异(表4)。各差异碱基中, 第83位碱基位于第4外显子中, 碱基差异形成“ATC”和“CTC”2种密码子, 分别编码异亮氨酸(I)和亮氨酸(L); 第229位碱基位于第5外显子编码区, 其差异形成“CTG”和“ATG”2种密码子, 分别编码亮氨酸(L)和蛋氨酸(M)。这2处氨基酸差异分别位于GH氨基酸序列第130位及150位。其余碱基差异不造成编码氨基酸序列差异。

第130位编码氨基酸差异为斑鳊种内差异, 在该区域, 斑鳊多态型A3编码亮氨酸(L), 其余多态型均编码异亮氨酸(I)。第150位编码氨基酸差异为种间差异, 在该氨基酸位点, 斑鳊所有多态型(C2、C3)均编码蛋氨酸(M), 鳊、大眼鳊所有多态型(C1、C4)均编码亮氨酸(L), 详见图4。

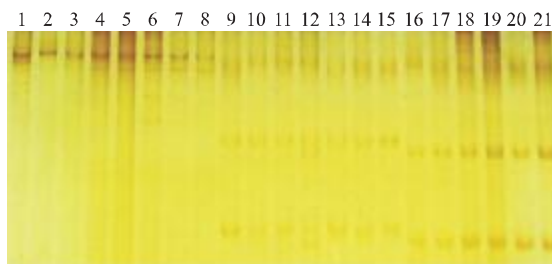


图3 GH基因第4外显子至第5外显子5'段区域的PCR-SSCP检测

1-8: 斑鳊; 9-17: 大眼鳊; 18-23: 鳊. 泳道1、4-8为C2C2多态型; 2-3为C3C3多态型; 9-11、13-15为C4C4多态型; 12为C1C4多态型; 16-21为C1C1多态型.

Fig.3 PCR-SSCP analysis of the region from exon IV to 5' part of exon V of GH gene

1-8: *Siniperca scherzeri*; 9-17: *S. kneri*; 18-23: *S. chuatsi*. Lane 1, 4-8: C2C2; lane 2-3: C3C3; lane 9-11, 13-15: C4C4; lane 12: C1C4; lane 16-21: C1C1.

表 4 GH 基因第 4 外显子至第 5 外显子 5' 段多态型表
Tab.4 Polymorphic types in the region from exon IV to 5' part of exon V of GH gene

多态型 Polymorphic type	碱基位置 /bp Nucleotide locus					总长 /bp Total length
	83	114	122	219	229	
C1	A	A	A	T	C	309
C2	A	C	A	T	A	309
C3	C	C	A	T	A	309
C4	A	C	T	C	C	309

注: 该区域第 1 位碱基对应于鳊全长序列 (EF205280) 第 4 921 位碱基。

Note: The 1st nucleotide in this region is counterpart of the 4 921st one of complete sequence (EF205280).

2.1.4 第 5 外显子 3' 段至 3' 侧翼区 该区域共检出 4 种多态型, 分属 2 种长度类型: 486 bp (D1、D2、D3) 和 483 bp (D4)。其中, 鳊为 D1、D2 型, 以 D1 型为主; 大眼鳊为 D2、D4 型, 以 D2 型为主; 斑

鳊为 D2、D3 型, 以 D3 型为主 (图 5)。

各多态型间共具有 6 处碱基差异 (表 5)。该 6 处差异均不位于编码区, 各多态型编码氨基酸序列间无差异。

```

C1/C4  ISPKLSELKTGILLIRANQDGAEIFPDSSAMQLAPYGNYYQSLGADESLRRTYELLA
C2     ISPKLSELKTGILLIRANQDGAEIFPDSSAMQLAPYGNYYQSLGADESLRRTYELLA
C3     ISPKLSELKTGILLIRANQDGAEIFPDSSAMQLAPYGNYYQSLGADESLRRTYELLA
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

图 4 GH 基因第 4 外显子至第 5 外显子 5' 段多态型氨基酸序列比较

阴影处为差异氨基酸。

Fig.4 Comparison of coded amino acid sequences of polymorphic types in the region from exon IV to 5' part of exon V

Differentiated amino acids are shaded.

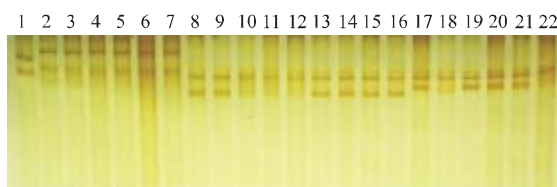


图 5 GH 基因第 5 外显子 3' 段至 3' 侧翼区 PCR-SSCP 检测

1-7: 斑鳊; 8-16: 鳊; 17-22: 大眼鳊。泳道 1、17、19-21 为 D2D2 多态型; 2-7 为 D3D3 多态型; 8-9、13-16 为 D1D1 多态型; 10-12 为 D1D2 多态型; 18、22 为 D2D4 多态型。

Fig.5 PCR-SSCP analysis of the region from the 3' part of exon V to the 3' -flanking region of GH gene

1 7: *Siniperca scherzeri*; 8 16: *S.chuatsi*; 17 22: *S.kneri*. Lane 1, 17, 19 21: D2D2; lane 2 7: D3D3; lane 8 9, 13 16: D1D1; lane 10-12: D1D2; lane 18, 22: D2D4.

表 5 GH 基因第 5 外显子 3' 段至 3' 侧翼区多态型表
Tab.5 Polymorphic types in the region from the 3' part of exon V to the 3' -flanking region of GH gene

多态型 Polymorphic type	碱基位置 /bp Nucleotide locus					总长 /bp Total length
	109-112	172	178	305-306	320 325	
D1	GAGG	T	G	CA	C T	486
D2	GAGG	G	G	CA	C T	486
D3	GAGG	G	G	CG	C C	486
D4	A	G	A	GA	T C	483

注: 该区域第 1 位碱基对应于鳊全长序列 (EF205280) 第 5 085 位碱基。

Note: The 1st nucleotide in this region is counterpart of the 5 085th one of complete sequence (EF205280).

2.2 检测结果的群体遗传学分析

2.2.1 GH 基因遗传多样性及其比较 在 GH 基因的 4 个分段扩增区域共检测到 17 种多态型。各区域中, 鳊群体的优势多态型分别是 A1、B1、C1、D1, 多态型频率均在 0.83 以上; 斑鳊群体的优势多态型分别是 A2、B4、C2、D3, 多态型频率均在 0.85 以上; 大眼鳊群体的优势多态型分别是 A4、B2、C4、D2, 多态型频率均在 0.86 以上 (表 6)。

将各区域多态型共同组合成基因型, 共检出代

号为 G1~G9 的 9 种基因型。其中, 鳊检出 2 种基因型, 以 G1 型为主; 斑鳊检出 3 种基因型, 以 G3 型为主; 大眼鳊检出 4 种基因型, 以 G6 型为主 (表 7)。

在 4 个区域中, 鳊、斑鳊、大眼鳊检出的多态位点数分别为 2、4、3 个, 多态型数分别为 6、8、8 个。斑鳊和大眼鳊的位点平均多态型数大于鳊, 斑鳊和鳊的位点平均有效等位基因数、期望杂合度和香农多样性指数均高于大眼鳊 (表 8)。

表 6 3 种鳊属鱼 GH 基因的多态型频率

Tab.6 Polymorphic type frequency of GH gene in three *Siniperca* fishes

多态型 Polymorphic type	鳊 <i>S.chuatsi</i>	斑鳊 <i>S.scherzeri</i>	大眼鳊 <i>S.kneri</i>	多态型 Polymorphic type	鳊 <i>S.chuatsi</i>	斑鳊 <i>S.scherzeri</i>	大眼鳊 <i>S.kneri</i>
A1	1.0000			C1	1.0000		0.0333
A2	—	0.9286	—	C2	—	0.8571	—
A3	—	0.0714	—	C3		0.1429	
A4			1.0000	C4	—	—	0.9667
B1	0.8333	—	0.0333	D1	0.8333		
B2	—	—	0.8667	D2	0.1667	0.0714	0.9333
B3	0.1667		0.1000	D3	—	0.9286	—
B4	—	0.9286	—	D4			0.0667
B5	—	0.0714	—				

表 7 3 种鳊属鱼 GH 基因的基因型频率

Tab.7 Genotype frequency of GH gene in three *Siniperca* fishes

基因型代号 Genotype code	基因型 Genotype	鳊 <i>S.chuatsi</i>	斑鳊 <i>S.scherzeri</i>	大眼鳊 <i>S.kneri</i>
G1	A1A1B1B1C1C1D1D1	0.6663	—	—
G2	A1A1B1B3C1C1D1D2	0.3337	—	—
G3	A2A2B4B4C2C2D3D3		0.8570	
G4	A3A3B5B5C3C3D2D2	—	0.0715	—
G5	A2A2B4B4C3C3D3D3		0.0715	
G6	A4A4B2B2C4C4D2D2	—	—	0.8000
G7	A4A4B2B3 C4C4D2D2	—		0.0667
G8	A4A4B1B2C1C1D4D4	—	—	0.0667
G9	A4A4B3B3C4C4D2D2	—	—	0.0667

表 8 3 种鳊属鱼 GH 基因遗传多样性比较

Tab.8 Comparison of genetic diversities of GH gene in three *Siniperca* fishes

指标 Indicators	鳊 <i>S.chuatsi</i>	斑鳊 <i>S.scherzeri</i>	大眼鳊 <i>S.kneri</i>
多态位点数 Number of polymorphic loci	2	4	3
等位基因数 Number of alleles	6	8	8
基因型数 Number of genotypes	2	3	4
位点平均等位基因数 Average number of alleles per locus	1.5000	2.0000	2.0000
位点平均有效等位基因数 Average number of effective alleles per locus	1.1923	1.1958	1.1307
Nei's 期望杂合度 Nei's expected heterozygosity	0.1389	0.1607	0.1067
香农多样性指数 Shannon diversity index	0.2253	0.2955	0.2147

2.2.2 GH 基因遗传分化程度分析 在 GH 基因 4 个区域检出的 17 种多态型中, 仅 4 种为 2 种或 3 种鳊共有多态型, 其余 13 种为单个物种特有多态型, 共有多态型比率为 23.53%。3 种鳊间无共有基因型。多态型及基因型的分布具有种间特异性。

分子变异 (AMOVA) 分析显示, 种内变异

(0.272 8) 占总体变异 (1.946 0) 的 14.02%, 种间变异占总体变异的 85.98% (表 9)。种间总体遗传分化指数 (F_{st}) 值为 0.859 8。3 种鳊间配对 F_{st} 值均在 0.8 以上 (表 10)。3 种鳊 GH 基因变异主要表现为种间变异, 种间分化较为明显。

表 9 3 种鳊属鱼种间及种内分子变异分析 (AMOVA) 结果

Tab.9 Analysis of molecular variance (AMOVA) between and within species in three *Siniperca* fishes

变异来源 Sources of variation	自由度 df	方差总和 Sum of squares	变异组分 Variance components	总变异百分率 / % Percentage of variation
种间 Interspecies	2	294.8680	1.6732	85.98
种内 Intraspecies	261	71.2000	0.2728	14.02
总和 Total	263	366.0680	1.9460	100.00

表 10 3 种鳊属鱼 GH 基因间 F_{st} 值
Tab.10 F_{st} values between GH genes in three *Siniperca* fishes

种名 Species	鳊 <i>S.chuatsi</i>	斑鳊 <i>S.scherzeri</i>	大眼鳊 <i>S.kneri</i>
鳊 <i>S.chuatsi</i>		0.0000±0.000	0.0000±0.000
斑鳊 <i>S.scherzeri</i>	0.8483	—	0.0000±0.000
大眼鳊 <i>S.kneri</i>	0.8682	0.8633	—

注: 对角线上方为 P 值, 下方为 F_{st} 值。

Note: P value above diagonal and F_{st} value below diagonal.

2.2.3 GH 基因间遗传距离及聚类分析 根据 Nei 方法^[15] 及 Nei 校正方法^[16], 计算得到各 GH 基因间遗传距离及遗传相似性系数 (表 11、12)。2 种计算方法得到的结果基本相同, 3 种鳊 GH 基因间, 鳊与大眼鳊相似度最高, 鳊与斑鳊相似度最低。

应用 PHYLIP 软件构建的系统发育树中, 鳊与大眼鳊最先聚为 1 枝, 再与斑鳊聚在一起 (图 6)。

表 11 3 种鳊属鱼遗传距离及遗传相似性系数

Tab.11 Genetic distance and genetic similarity between three *Siniperca* fishes

种名 Species	鳊 <i>S.chuatsi</i>	斑鳊 <i>S.scherzeri</i>	大眼鳊 <i>S.kneri</i>
鳊 <i>S.chuatsi</i>		0.0035	0.0665
斑鳊 <i>S.scherzeri</i>	5.6547	—	0.0192
大眼鳊 <i>S.kneri</i>	2.7104	3.9503	—

注: 对角线上方为遗传相似性系数, 下方为遗传距离。

Note: Genetic similarity above diagonal and genetic distance below diagonal.

表 12 3 种鳊属鱼遗传距离及遗传相似性系数 (校正)
Tab.12 Genetic distance and genetic similarity between three *Siniperca* fishes (adjusted)

种名 Species	鳊 <i>S.chuatsi</i>	斑鳊 <i>S.scherzeri</i>	大眼鳊 <i>S.kneri</i>
鳊 <i>S.chuatsi</i>		0.0035	0.0666
斑鳊 <i>S.scherzeri</i>	5.6537	—	0.0193
大眼鳊 <i>S.kneri</i>	2.7096	3.9494	—

注: 对角线上方为遗传相似性系数, 下方为遗传距离。

Note: Genetic similarity above diagonal and genetic distance below diagonal.

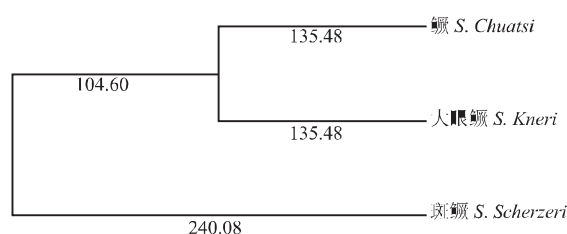


图 6 3 种鳊属鱼 UPGMA 树

各分枝下方数字表示枝长。

Fig.6 UPGMA tree of three *Siniperca* fishes

Numbers under each branch indicate length of the branch.

3 讨论

3.1 GH 基因差异及对生长性状的影响

在 GH 基因第 4 外显子发现 1 处碱基差异, 导致斑鳊与鳊、大眼鳊生长激素第 150 位编码氨基酸出现差异。在该位点, 斑鳊编码蛋氨酸 (M), 而鳊、大眼鳊编码亮氨酸 (L)。该氨基酸位点位于生长激素第 4 结构域与第 5 结构域之间^[22]。这一差异是否

导致生长激素生物活性的改变,以及是否导致斑鳊与其他2种鳊生长性状间的差异,有待进一步研究。

在斑鳊生长激素第130位氨基酸位点处,存在2种基因型。1种基因型编码与鳊、大眼鳊相同的异亮氨酸(I);另1种编码亮氨酸(L)。该氨基酸位点位于第4结构域内,保守性较高。在Watahiki等^[22]研究的包括人(*Homo sapiens*)及小鼠(*Mus musculus*)在内的10种脊椎动物GH序列中,以及贡良成等^[23]比较的21种鱼类GH序列中,仅有牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)在该位点编码亮氨酸(L),其余脊椎动物均编码异亮氨酸(I)。应用Protparam对这2种基因型编码的氨基酸序列进行理化分析,发现两者在亲水性等理化性质上有一定差异。该氨基酸差异对生长激素二级结构也有一定影响,有可能对生长激素活性产生一定影响,并可能进一步影响生长性状,值得进一步研究。

在GH基因中还发现多处碱基差异及序列长度差异。在畜禽中,GH基因多态性常与生长性状差异相关^[3-5]。Cheng等^[5]发现桃源猪(*Sus scrofa*)日增重和饲料利用率与GH基因Taq I酶切位点差异显著相关。Rocha^[4]在杂交肉牛(*Bos taurus*)研究中发现,GH基因差异与出生体质量、出生肩宽相关。宋成义等^[3]的研究结果表明,姜曲海猪GH基因Apa I酶切的不同基因型个体70日龄体质量和0~70日龄日增重有显著差异。Foutouhi^[24]发现GH基因2个酶切位点的差异与肉鸡(*Gallus gallus*)腹脂性状相关。在对鱼类的研究中,倪静等^[6]对牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)GH基因外显子应用PCR-SSCP技术进行了多态性检测,发现不同基因型个体在体质量及头长上存在显著差异。本研究检测到的这些GH基因上的差异与生长性状差异间的联系也值得深入研究。

本研究中检测到的3种鳊属鱼GH基因多态型部分属于种内差异,其余则为种间差异。由于鳊、大眼鳊及斑鳊间存在一定的遗传分化,3种鳊GH基因间的差异可能与生长性状相关,也可能仅由物种间分化形成。在这一物种分化过程中,生长激素基因的分化是否是导致种间生长性状差异的原因之一,还需要进一步研究。

3.2 鳊GH基因多样性及遗传分化

莫赛军等^[25]对鲫(*Carassius auratus*)GH基

因第2内含子进行多态性检测,在10个鲫群体中共检测到7种长度类型及15种多态型。倪静等^[6]在牙鲈养殖群体中检测到GH基因的2种基因型。本研究中,在鳊GH基因第2内含子中发现的长度类型及多态型数少于鲫。3种鳊属鱼第2内含子长度达到3 000 bp左右,大于鲫(约为200 bp)。为便于引物设计及SSCP分析,本研究仅扩增了第2内含子末端约200 bp片段,长度虽与鲫第2内含子相当,但扩增区域可能相对保守,多态型数较少。

3种鳊属鱼中,斑鳊多态位点数、等位基因数、有效等位基因数、期望杂合度、香农多样性指数均高于或等于鳊及大眼鳊,仅基因型数小于大眼鳊。从总体来看,斑鳊的GH基因多态性最高。大眼鳊的多态位点数、等位基因数、基因型数大于鳊,但其有效等位基因数、期望杂合度、香农多样性指数值均小于鳊,这可能是由于鳊的各等位基因频率差异相对较小所导致。大眼鳊等位基因数虽然较多,但部分等位基因的频率较低(其中2个仅为0.033 3)。而在有效等位基因数、期望杂合度等的计算中,低频率等位基因的贡献较小^[18, 26]。

鳊、大眼鳊及斑鳊的自然分布区域重叠较大,长江中下游的广大区域如洞庭湖区均为3种鳊属鱼的共同分布区^[1]。3种鳊属鱼尤其是鳊与大眼鳊间是否在天然水体杂交产生杂种,已引起人们关注。本研究在GH基因4个区域共检测到的17种多态型中,仅4种为种间共享单倍型,其中3种为鳊与大眼鳊共享,1种为鳊、大眼鳊及斑鳊共享;3种鳊属鱼间无共享基因型;3种鳊属鱼种间遗传分化指数(F_{st})值均在0.8以上。这些均表明,3种鳊GH基因间分化较大,在天然水域发生种间基因交流的可能性较小,但不能排除个别个体携带近缘物种基因的可能。

3.3 鳊GH基因系统发育分析

Zhao等^[27]根据线粒体控制区序列进行了东亚鳊类系统发育研究。结果显示,鳊与大眼鳊的遗传相似度最高,为姊妹种,而与斑鳊的亲缘关系则较远。在本研究中,利用位于染色体上的GH基因进行了3种鳊属鱼类的系统发育分析,所得结果与根据线粒体序列的研究结果一致,进一步验证了鳊属物种间系统发育关系。

参考文献:

- [1] 梁旭方. 国内外鳊类研究及养殖概况 [J]. 水产科技情报, 1996, 23(1): 13-17.
- [2] Moller N, Copeland K C, Nair K S. Growth hormone effects on protein metabolism[J]. Endocrinol Metab Clin N Am, 2007, 36(1): 89-100.
- [3] 宋成义, 经荣斌, 陶勇, 等. 猪 GH 基因部分突变位点对生产性能的影响 [J]. 遗传, 2001, 23(5): 427-430.
- [4] Rocha J L. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle[J]. J Anim Sci, 1992, 70(11): 3 360-3 370.
- [5] Cheng W T K, Lee C H, Hung C M, et al. Growth hormone gene polymorphisms and growth performance traits in Duroc, Landrace and Tao-yuan pigs[J]. Theriogenology, 2000, 54(8): 1 225-1 237.
- [6] 倪静, 尤锋, 张培军, 等. 牙鲈 GH 基因外显子多态性与生长性状关系的初步研究 [J]. 高技术通讯, 2006, 16(3): 307-312.
- [7] Falaki M. Taq 1 growth hormone gene polymorphism and milk production traits in Holstein-Friesian cattle[J]. J Anim Sci, 1996, 63: 175-181.
- [8] Casas-Carrillo E, Prill-Adams A, Price S G. Relation ship of growth hormone and insulin-like growth factor-I genotypes with growth and carcass traits in swine[J]. Anim Genet, 1997, 28(2): 88-93.
- [9] Du Z H, Bai X J. Association analysis between SNPs of the growth hormone gene and antler production in spotted deer[J]. Hereditas, 2007, 29(3): 337-342.
- [10] Pierzchala M, Korwin-Kossakowska A, Zwierzchowski L, et al. HaeII and MspI polymorphism of growth hormone gene in pigs and its association with production traits[J]. Anim Sci, 1999, 44: 441-445.
- [11] Knorr C, Moser G, Müller E, et al. Associations of GH gene variants with performance traits in F2 generations of European wild boar, Pietrain and Meishan pigs[J]. Anim Genet, 1997, 28(2): 124-128.
- [12] Zhang J N, Song P, Hu J R, et al. Molecular cloning and sequence analysis of full-length growth hormone cDNAs from six important economic fishes[J]. Acta Genet Sinica, 2005, 32(1): 19-29.
- [13] 刘峰, 鲁双庆, 谢新民, 等. 鳊鱼基因组 DNA 的提取及 PCR-SSCP 条件的探讨 [J]. 长沙大学学报, 2007, 21(2): 23-25.
- [14] Jiang Y L, Li N, Hu X X, et al. Analysis of PCR-SSCP detection for unknown single nucleotide polymorphisms (SNPs) in small DNA fragment[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2002, 18(6): 674-678.
- [15] Nei M. Genetic distance between populations[J]. Am Natl, 1972, 106: 283-292.
- [16] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 1978, 89(3): 583-590.
- [17] Nei M. Molecular evolutionary genetics[M]. New York: Columbia University Press, 1987: 176-187.
- [18] Kimura M, Crow J F. The number of alleles that can be maintained in a finite population[J]. Genetics, 1964, 49: 725-738.
- [19] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data[J]. Genetics, 1992, 131(2): 479-491.
- [20] Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population[J]. Mol Biol Evol, 1995, 12(5): 921-927.
- [21] Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) [CP/DK]. Version 3.66. Seattle, University of Washington, 2006.
- [22] Watahiki M, Yamamoto M, Yamakawa M, et al. Conserved and unique amino acid residues in the domains of the growth hormones [J]. J Biol Chem, 1989, 264(1): 312-316.
- [23] 贡良成, 曹广力, 薛仁宇, 等. 编码鳊鱼生长激素基因的序列与结构 [J]. 水产学报, 2002, 26(4): 295-300.
- [24] Foutouhi N. Identification of growth hormone DNA polymorphisms which respond to divergent selection for abdominal fat content in chickens[J]. Theor Appl Genet, 1993, 85(8): 931-936.
- [25] 莫赛军, 宋平, 罗大极, 等. 鲫鱼生长激素 I 基因内含子 2 的多态性分析 [J]. 遗传学报, 2004, 31(6): 582-590.
- [26] 闫路娜, 张德兴. 种群微卫星 DNA 分析中样本量对各种遗传多样性度量指标的影响 [J]. 动物学报, 2004, 50(2): 279-290.
- [27] Zhao J L, Wang W W, Li S F, et al. Structure of the mitochondrial DNA control region of the *Siniperca* fishes and their phylogenetic relationship[J]. Acta Genet Sinica, 2006, 33(9): 793-799.

Diversity of growth hormone gene in three *Siniperca* fishes

LIU Feng^{1,2,3}, LIU Zhen¹, LU Shuang-qing¹, ZHANG Jian-she¹, XIE Xin-min³, TANG Jian-zhou¹, KUANG Gang-qiao¹

(1.Department of Biotechnology and Environment Science, Changsha University, Changsha 410003, China; 2.College of Aquaculture Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 20090, China; 3.College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: *Siniperca chuatsi*, *Siniperca kneri* and *Siniperca scherzeri* are three specific *Siniperca* fishes in East Asia. They are cultured as edible fishes in China and have similar habits and body configuration. They can intercross, but there are significant differences on growth traits among them. *S. chuatsi* grows the fastest while *S. scherzeri* the slowest. GH gene as one of the most important functional genes that determine animal growth trait, is generally related to growth trait in live stocks and fowls and mutation of GH gene often leads to variation of growth traits. To find out the relationship between growth trait difference and diversity of genes, genetic diversity detection of GH gene was performed in wild populations of *S. chuatsi*, *S. scherzeri* and *S. kneri* by PCR-SSCP analysis and sequencing method. 45, 45 and 42 individuals were sampled respectively from *S. chuatsi*, *S. kneri* and *S. scherzeri* population for DNA extracting. Four fragments of GH gene were amplified by PCR. PCR products were then detected by SSCP and sequencing. Sequence comparison was performed by Clustalw 1.83 software. POPGENE1.32 software was adopted to calculate heterozygosity, polymorphic type frequency, genotype frequency, Shannon diversity index and genetic distance. Arlequin 3.11 software was adopted to analyze genetic differentiation index (F_{st}) and AMOVA; and PHILIP 3.66 software was adopted to construct UPGAM phyletic evolution tree based on genetic distance. Four polymorphic types are identified in the region from 5' -flanking region to exon II, which are all species-specific. Five polymorphic types are identified in the region from 3' part of intron II to 5' part of intron III, among which 3 polymorphic types are species-specific. Four polymorphic types are identified in both the region from 3' part of intron V to 3' -flanking region V and the region from exon IV to 5' part of exon V respectively, both of which have 3 species-specific polymorphic types. Analysis of the coding region indicates diversity of the 150th coded amino acid, on which is methionine in *S. scherzeri*, but leucine in *S. chuatsi* and *S. kneri*. All polymorphic types form 9 GH genotypes without one shared between the three fish species. F_{st} is found to be 0.859 8, which indicates a high level of differentiation. Analysis of genetic diversity indicates that diversity in *S. scherzeri* is higher than those in *S. chuatsi* and *S. kneri*. Among the three *Siniperca* fishes, genetic similarity between *S. chuatsi* and *S. kneri* is the highest, while that between *S. chuatsi* and *S. scherzeri* is the lowest. The result of phyletic evolution analysis according to GH gene on chromosome is identical to that according to mitochondrion sequences, which confirms the phyletic evolution relationship between these fishes at population level. Abundant diversity in GH gene is also found in the three fishes. Many polymorphic types are species-specific, which can be of use in identifying hybrids when it is difficult to distinguish them from their parents by phenotype. Though it is still unclear if these diversities lead to growth trait differences, these findings have laid foundation for further study of the relationship between gene diversity and trait difference as well as further utilization of the diversity of GH gene in molecular breeding of *Siniperca* fishes. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (5): 745–754]

Key words: *Siniperca* fishes; GH gene; Genetic diversity; PCR-SSCP

Corresponding author: LU Shuang-qing. E-mail: lsq4250440@yahoo.com.cn