

奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼 *MyoD1* 和 *MyoD2* 基因特征及差异

卢中华¹, 俞菊华², 李红霞², 李建林², 唐永凯², 阮瑞霞¹, 杨光³

(1. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 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, 江苏 无锡 214081; 3. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 采用 RT-PCR 和 RACE 法, 分离了奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*)、尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*) *MyoD1* 和 *MyoD2* 基因全长 cDNA。结果显示, 2 种罗非鱼 *MyoD1* 全长均为 1 090 bp, 包括 5' 非翻译区 (UTR) 137 bp, 3' UTR 50 bp, 开放阅读框 (ORF) 903 bp, 编码 300 个氨基酸, 其中第 110 ~ 161 个氨基酸为 bHLH 结构, 第 233 ~ 249 个氨基酸为 helix III 结构; *MyoD2* 全长均为 1 478 bp, 包括 5' UTR 215 bp, 3' UTR 471 bp, ORF 792 bp, 编码 263 个氨基酸, 其中第 91 ~ 142 个氨基酸为 bHLH 结构, 第 212 ~ 228 个氨基酸为 helix III 结构。2 种罗非鱼 *MyoD1* 与其他鱼类 *MyoD1* 的相似性为 73% ~ 92%; *MyoD2* 与其他鱼类 *MyoD2* 的相似性为 74% ~ 79%。系统发育树显示, *MyoD1* 和 *MyoD2* 分属两支, *MyoD1* 所反映的不同鱼类间的亲缘关系符合传统分类。2 种罗非鱼的 *MyoD1*、*MyoD2* cDNA 序列之间只存在个别碱基的差别, 而氨基酸序列一致; 奥利亚罗非鱼 *MyoD1* 的 2 个内含子均比尼罗罗非鱼的长。根据 *MyoD1* 内含子 2 的差异构建鉴别奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼基因混杂的标记, 对形态上典型的 15 尾奥利亚罗非鱼、18 尾尼罗罗非鱼及 15 尾奥尼罗非鱼 [*Oreochromis aureus* (♂) × *Oreochromis niloticus* (♀)] 进行鉴定。结果其中 1 尾奥利亚罗非鱼中在 *MyoD1* 位点混杂了尼罗罗非鱼的基因, 尼罗罗非鱼和奥尼罗非鱼则与预期的一致。该研究为选择基因纯合的奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼提供了新的分子手段。[中国水产科学, 2010, 17(5): 903-912]

关键词: 奥利亚罗非鱼; 尼罗罗非鱼; *MyoD1* 基因; *MyoD2* 基因; 基因特征; 基因差异

中图分类号: Q959.483

文献标识码: A

文章编号: 1005-8727-(2010)05-0903-10

MyoD 属于生肌调节因子 (Myogenic regulatory factors, MRFs) 家族, 该家族包括 *MyoD* (*Myf-3*)、*MyoG* (*Myogenin*)、*Myf-5* 和 *MRF-4* (*Myf-6*) 4 种调节因子, 碱性螺旋-环-螺旋结构 (bHLH) 为该家族的特征^[1]。*MyoD* 是脊椎动物胚胎期肌肉发育的主导调控因子之一, 主要在成肌过程中起作用, 可通过多个途径激活肌肉基因的转录, 从而促进成肌细胞的分化, *MyoD* 缺失可导致成肌细胞的增殖和分化无法进行^[2-4]。自从 1987 年 Devis 等^[5]首次发现并获得人的 *MyoD* cDNA 以来, 迄今已克隆获得包括牛 (*Bos taurus*)^[6]、鸡 (*Gallus domestica*)^[7]、绵羊 (*Ovis*

aries)^[8]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[9]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[10]、金头鲷 (*Sparus aurata*)^[11]、鳕 (*Gadus macrocephalus*)^[12]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[13]、文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*)^[14] 等多种脊椎动物的 *MyoD* 基因。近期在金头鲷^[11]、大西洋庸鲽 (*Hippoglossus hippoglossus*)^[15]、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)^[16] 等部分刺鳍总目鱼类中发现 *MyoD2* 基因, Chen 等^[17]分离了奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) *MyoD* cDNA, 并认为不存在 *MyoD2*。本研究获得了奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*) *MyoD1* 和 *MyoD2* 基因, 并分析其特征, 为进一步研究罗非鱼 *MyoD1* 和

收稿日期: 2009-10-29; 修订日期: 2010-01-06.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2009JBFC02, 2009JBFB05); 公益性行业 (农业) 科研专项经费项目 (200903046-02); 农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室第七期开放课题 (LFBU0706).

作者简介: 卢中华 (1983-), 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类遗传育种研究. E-mail: luzhh1023@126.com

通讯作者: 俞菊华 (1966-), 女, 研究员, 专业方向为鱼类遗传育种研究. E-mail: yujh@ffrc.cn

*MyoD2*的表达和功能奠定基础。生产实践表明,亲本的纯度直接影响奥尼罗非鱼 [*Oreochromis aureus* (♂) × *Oreochromis niloticus* (♀)] F₁的雄性率和生长速度等性状^[18],而罗非鱼生产中容易出现亲本种质混杂。因此,确定罗非鱼亲本是否混杂,筛选可靠、便捷的种质鉴定方法具有重要意义。本研究根据奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼*MyoD1*内含子之间的差异,构建了鉴别奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼基因混杂的标记,旨在为选择基因纯合的奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼提供有效的分子手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 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。奥利亚罗非鱼为1983年从美国引进的38尾繁殖选育的后代;尼罗罗非鱼1999年引自埃及;奥尼罗非鱼为奥利亚罗非鱼(♂)和尼罗罗非鱼(♀)杂交F₁。奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼和奥尼罗非鱼均为形态上典型的个体。

1.1.2 试剂 RNAiso Reagent、Reverse Transcriptase XL (AMV)、3' RACE试剂盒、5' RACE试剂盒、pMD18-T载体、Competent Cell Preparation Kit等购自宝生物工程(大连)有限公司;胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、*Taq* DNA聚合酶、*EcoR* I、*Hind* III等购自上海申能博彩生物科技有限公司; *Sna* I购自上海捷瑞生物工程有限公司。

1.1.3 引物 所有引物信息见表1。P₁、P₂、P₃、P₄和P₅是根据GenBank已登录的奥利亚罗非鱼*MyoD* (GenBank登录号AF270790)设计的特异引物,其中P₁和P₂用于扩增*MyoD1*部分片段;P₁、P₃用于*MyoD1* 3' RACE;P₂、P₄用于*MyoD1* 5' RACE;*MyoD1*内含子1、内含子2的分离分别使用引物对P₁和P₂、P₃和P₅。P₆和P₇是根据*MyoD2*的保守序列,使用CodeHop软件设计的兼并引物,用于分离*MyoD2*部分序列;P₈、P₉是根据分离到的部分序列设计用于*MyoD2* 3' RACE的引物,P₁₀、P₁₁为*MyoD2* 5' RACE引物;引物对P₉和P₁₂用于分离*MyoD2*内含子。所有引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成,其中B=(G/C/T)、D=(A/G/T)、K=(G/T)、R=(A/G)。

表1 实验中使用的引物
Tab. 1 Information of primers used in the experiment

引物 Primer	序列(5' - 3') Sequence (5' - 3')	退火温度/°C <i>T_m</i>	位置/nt* Position*
P ₁	CTCATCCTCCCCTTCCTCTTCTTC	57.6	293-316
P ₂	TAGCTTCCTCTTCTGGTTGTCTGA	54.1	772-749
P ₃	ATTTTAAACGGCCCCACCTGTCAGA	61.5	730-753
P ₄	GGCGTCGTTGACCTTGCTG	56.4	521-503
P ₅	AACTGCGTTCGCTCTTCAGACC	57.3	836-810
P ₆	TGGGCCTGCAARGCBTGBAAG	48.1	444-464
P ₇	CCATGCTBTCDGAGCAGCTKGA	47.5	747-725
P ₈	CAGAGGAAAGCGGCGACCA	58.4	485-504
P ₉	ACTACAGGCGCTGCTCAGGAAC	57.4	635-656
P ₁₀	CAGTCTCTGGTTTGGATTGGATGCT	59.4	590-566
P ₁₁	ATCGTTGACTTTACTGAGTCGTCGCCT	61.4	539-513
P ₁₂	CTGGACTCGGCAGACAGATTGG	58.3	997-976

注:*表示引物P₁-P₁₂位于*MyoD1*和*MyoD2* cDNA序列。

Note: * shows primers P₁-P₁₂ are located at cDNA of *MyoD1* and *MyoD2*.

1.2 方法

1.2.1 总RNA和基因组DNA的抽提 取奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼新鲜肌肉0.1 g左右,用RNAiso Reagent抽提总RNA,用变性琼脂糖凝胶电泳和溴化乙啶显色显示28S和18S检测RNA的完整性。从鱼尾静脉抽血0.2~0.5 mL,加入1/6体积的ACD抗凝剂,置于4℃冰箱中沉淀2 h,吸取30 μL血细胞,酚-氯仿法抽提基因组DNA^[19]。

1.2.2 *MyoD1* cDNA分离 取奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼肌肉总RNA 5 μg,根据AMV第1链cDNA合成试剂盒使用说明进行RT反应,然后用10%的RT液,使用引物P₁和P₂扩增*MyoD1*部分片段;使用3' RACE引物P₁、P₃,根据3' RACE试剂盒使用说明,扩增*MyoD1* 3'端cDNA序列;使用5' RACE引物P₂、P₄,根据5' RACE试剂盒使用说明,扩增*MyoD1* 5'端cDNA序列。PCR反应总体积25 μL,其中含模板2 μL,其他组分根据Taq DNA聚合酶说明书要求,反应程序:94℃ 2 min;94℃ 30 s,50~60℃ 45 s,72℃ 1~1.5 min,共35个循环;72℃ 8 min,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。

1.2.3 *MyoD2* cDNA分离 实验方法同1.2.2,使用兼并引物P₆和P₇扩增*MyoD2*的部分保守片段,根据分离的序列设计3' RACE特异引物P₈、P₉和5' RACE的特异引物P₁₀、P₁₁,根据试剂盒使用说明进行3' RACE及5' RACE片段扩增,反应条件同1.2.2。

1.2.4 *MyoD1* 内含子1、2及*MyoD2* 内含子分离 分别以奥利亚罗非和尼罗罗非鱼的基因组DNA为模板,使用引物对P₁和P₂扩增奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼*MyoD1*内含子1,引物对P₃和P₅分别扩增奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼*MyoD1*内含子2,引物对P₉和P₁₂分别扩增奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼*MyoD2*内含子,反应条件同1.2.2。

1.2.5 扩增产物克隆测序 PCR扩增液经1%琼脂糖凝胶(含0.5 μg/μL EB)电泳分离,切割目的条带,使用胶回收试剂盒回收,后与pMD18-T载体16℃连接2 h以上,转化到DH5α感受态细胞中,于LB Amp⁺

平板上培养过夜,挑选白色菌落于LB Amp⁺液体培养基中扩大培养,使用质粒抽提试剂盒抽提质粒,*EcoR* I + *Hind* III双酶切验证阳性克隆,每个平板至少送2~3个阳性克隆到南京博亚生物技术有限公司测序。

1.2.6 序列分析 使用DNASTAR、Clustal W1.83分析罗非鱼*MyoD1*和*MyoD2*序列及进行氨基酸同源性比较。用MEGA 4计算系统发育关系,采用Neighbor-Joining法,重复1 000次, gap处理为缺失。用Bootstrap计算各个分支的支持度。

1.2.7 奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼的鉴别 基于奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼的*MyoD1*内含子2序列差异,构建了鉴别奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼基因混杂的分子标记。选取形态上典型的奥利亚罗非鱼15尾,尼罗罗非鱼18尾及奥尼罗非鱼15尾进行鉴别,使用引物对P₃和P₅扩增包含*MyoD1*内含子2的片段,然后使用*Sna* I酶切。酶切反应总体积10 μL,含PCR反应液5 μL, *Sna* I 5 U,37℃酶切5 h,酶切反应液于1%的琼脂糖凝胶电泳分离,紫外仪观察拍照。

2 结果与分析

2.1 奥利亚罗非鱼及尼罗罗非鱼的*MyoD1*和*MyoD2* cDNA序列

通过RT-PCR及RACE法,得到奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼*MyoD1*部分序列均为480 bp,3' RACE均为361 bp,5' RACE均为521 bp。经过序列拼接后获得奥利亚罗非和尼罗罗非鱼*MyoD1* cDNA序列(GenBank登录号GU246721, GU246722),全长均为1 090 bp,包括5'非翻译区(UTR)137 bp,3' UTR 50 bp,开放阅读框(ORF)903 bp,编码300个氨基酸。比较奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼的序列,发现在5' UTR、3' UTR、ORF各有1个碱基的差别,但氨基酸序列完全一致。预测的蛋白质分子量为32.5 kD,理论等电点(pI)为5.37,含碱性氨基酸28个,酸性氨基酸39个,疏水氨基酸78个,极性氨基酸104个。氨基酸序列中第110~161个氨基酸为bHLH结构,第199~213个氨基酸为周期蛋白依赖

性蛋白激酶4 (CDK4) 结合区域, 第233 ~ 249个氨基酸为羧基端富含丝氨酸的helix III结构, 以及有3个富含丝氨酸的磷酸化位点(图1)。

同时得到奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼*MyoD2*部分保守序列均为304 bp, 3' RACE均为866 bp, 5' RACE均为539 bp。经过序列拼接后获得奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼*MyoD2* cDNA序列(GenBank登录号GU246723, GU246724), 全长均为1 478 bp, 包括5' UTR 215 bp, 3' UTR 471 bp, ORF 792 bp, 编码263个氨基酸。比较奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼的序列发现5' UTR有2个碱基、ORF有1个碱基的差别, 但氨基酸序列完全一致。预测的蛋白质分子量为28.7 kD, 理论等电点(pI)为5.32, 含碱性氨基酸24个, 酸性氨基酸36个, 疏水氨基酸73个, 极性氨基酸91个。氨基酸序列中第91 ~ 142个氨基酸为bHLH结构域, 第212 ~ 228个氨基酸为羧基端富含丝氨酸的helix III结构, 以及仅有1个富含丝氨酸的磷酸化位点(图1)。

2.2 MyoD1与MyoD2的同源性比较

使用ClustalW1.83软件分析MyoD1和MyoD2同源性, 结果显示, 罗非鱼的MyoD1和MyoD2之间相似性为62%; 罗非鱼MyoD1与金头鲷、大西洋庸鲽、红鳍东方鲀、斑马鱼、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、大西洋鲑(*Salmo salar*) MyoD1的相似性分别为92%、89%、84%、76%、75%、73% ~ 74%, 与其他鱼类MyoD2的相似性较低, 为62% ~ 65%, 与哺乳动物MyoD的相似性为63% ~ 65%, 与文昌鱼MyoD1a、MyoD1b和MyoD2的相似性仅为36% ~ 45%。罗非鱼MyoD2与金头鲷、大西洋庸鲽、红鳍东方鲀MyoD2的相似性分别为78%、79%、74%, 与其他鱼类MyoD1的相似性为59% ~ 62%, 与哺乳动物MyoD的相似性为58% ~ 59%, 与文昌鱼MyoD1a、MyoD1b和MyoD2的相似性仅为32% ~ 42%(表2)。结果同时表明罗非鱼MyoD1与其他鱼类MyoD1之间的相似性为73% ~ 92%, 高于罗非鱼与其他鱼类MyoD2之间的相似性(74% ~ 79%)及罗非鱼MyoD1和MyoD2之间的相似性(59% ~ 65%)。

2.3 基于MyoD序列构建的系统发育树

根据分离的罗非鱼MyoD1、MyoD2的氨基酸序列以及在基因库中已报道的相关序列, 使用MEGA4构建NJ系统发育树(图2)。由系统发育树可见, MyoD1和MyoD2分属两支, MyoD1中罗非鱼与金头鲷先聚在一起, 再与大西洋庸鲽和牙鲆(*Daralichthys oliraceus*)聚在一起, 后与红鳍东方鲀聚在一起, 然后与斑马鱼、鲤、刀鱼(*Sternopygus macrurus*)、斑点叉尾鲷、蓝鲷(*Ictalunus furcatus*)和大西洋鲑聚在一起, 最后与人、小鼠等哺乳动物归为一支; MyoD2中罗非鱼与大西洋庸鲽先聚为一支, 再与金头鲷聚在一起, 最后与红鳍东方鲀归为另一支; 文昌鱼与所有脊椎动物的关系最远, 单独为一支。

2.4 奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼MyoD1、MyoD2基因内含子序列分离及差异

基因结构分析表明, 奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼*MyoD1*、*MyoD2*均具有2个内含子。*MyoD1*内含子1位于编码196M和197T的2个密码子之间, 内含子2位于编码223N的密码子第2和第3个碱基之间; *MyoD2*内含子1位于177L和178V之间, 内含子2位于201E第2和第3碱基之间(图1)。

分别以奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼基因组DNA为模板, 得到奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼*MyoD1*的内含子(GenBank登录号GU246719, GU246715), 其中内含子1分别为601 bp和565 bp, 内含子2分别为683 bp和669 bp。2种罗非鱼*MyoD1*内含子的GC含量差异不明显, 但长度有差异, 其中奥利亚罗非鱼在内含子1的62 ~ 98 nt处插入36个碱基, 在内含子2的203 ~ 212 nt处插入13个碱基, 并存在*Sna* I (GTATAC) 酶切位点。同时得到奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼*MyoD2*的内含子(GenBank登录号GU246720, GU246716), 其中内含子1均为414 bp, 内含子2序列长度分别为2 403 bp和2 404 bp, 2种罗非鱼*MyoD2*的内含子GC含量和长度相似性都很高, 只有个别碱基的差别(表3)。

2.5 奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼和奥尼罗非鱼鉴别

使用引物对P₃和P₅扩增包含*MyoD1*内含子2的约800 bp片段, 使用*Sna* I酶切, 结果奥利亚罗非鱼

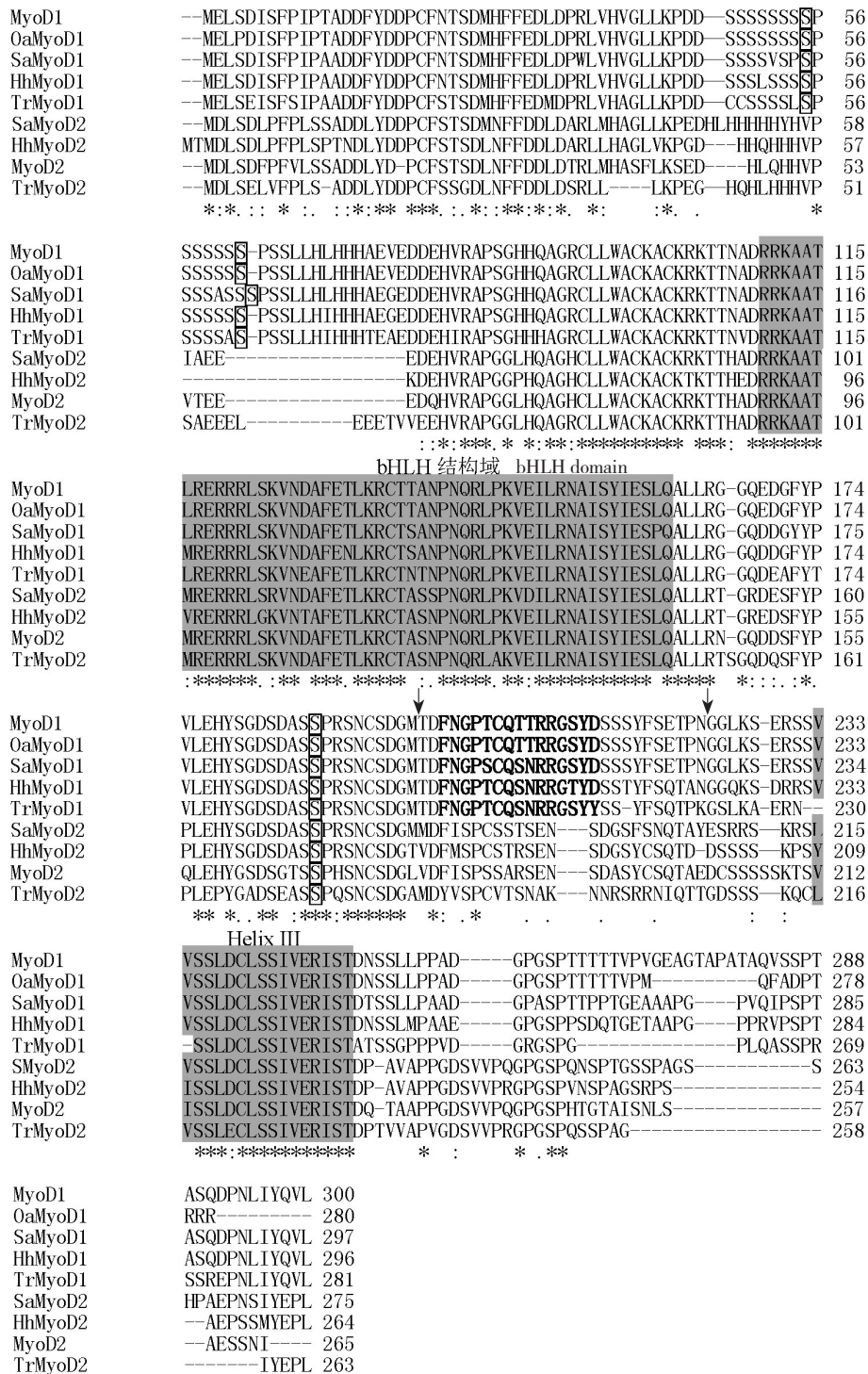


图1 罗非鱼与部分硬骨鱼MyoD1和MyoD2氨基酸序列的比较

bHLH结构域和羧基端的Helix III结构用阴影表示, CDK4结合区域用加粗表示, 箭头表示内含子插入区, 磷酸化位点用方框标示; OaMyoD1: 奥利亚罗非鱼MyoD1 (AF270790); SaMyoD1: 金头鲷MyoD1 (AF478568); HhMyoD1: 大西洋庸鲈MyoD1 (AY999688); TrMyoD1: 红鳍东方鲀MyoD1 (AY445315); SaMyoD2: 金头鲷MyoD2 (AF478569); HhMyoD2: 大西洋庸鲈MyoD2 (AJ630127); TrMyoD2: 红鳍东方鲀MyoD2 (NM_001040062)。

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of MyoD1 and MyoD2 between tilapia and partial teleostean

The conserved bHLH domain and Helix III at the C-terminus are shaded. A potential binding domain for cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) is shown in bold. Intron positions are presented by arrows. Phosphorylation sites are shown in frame. OaMyoD1: *Oreochromis aureus* MyoD1 (AF270790); SaMyoD1: *Sparus aurata* MyoD1 (AF478568); HhMyoD1: *Hippoglossus hippoglossus* MyoD1 (AY999688); TrMyoD1: *Takifugu rubripes* MyoD1 (AY445315); SaMyoD2: *S. aurata* MyoD2 (AF478569); HhMyoD2: *H. hippoglossus* MyoD2 (AJ630127); TrMyoD2: *T. rubripes* MyoD2 (NM_001040062)。

表2 罗非鱼 MyoD1 和 MyoD2 与其他动物 MyoD1 和 MyoD2 的同源性比较
 Tab. 2 Homology comparison between MyoD1 and MyoD2 in tilapia and those in other animals %

物种 Species	罗非鱼 MyoD1 Tilapia MyoD1	罗非鱼 MyoD2 Tilapia MyoD2
金头鲷 (<i>Sparus aurata</i>) MyoD1 (AF478568)	92	62
大西洋庸鲽 (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>) MyoD1 (AY999688)	89	62
红鳍东方鲀 (<i>Takifugu rubripes</i>) MyoD1 (AY445315)	84	62
斑马鱼 (<i>Danio rerio</i>) MyoD1 (NM_131262)	76	63
斑点叉尾鲷 (<i>Ictalurus punctatus</i>) MyoD1 (AY534328)	75	63
大西洋鲑 (<i>Salmo salar</i>) MyoD1a (AJ557148)	73	59
大西洋鲑 (<i>S. salar</i>) MyoD1b (AJ557149)	73	60
大西洋鲑 (<i>S. salar</i>) MyoD1c (DQ317527)	74	62
鼠 (<i>Mus musculus</i>) MyoD (NM_010866)	65	59
人 (<i>Homo sapiens</i>) MyoD (NM_002478)	63	58
金头鲷 (<i>S. aurata</i>) MyoD2 (AF478569)	65	78
大西洋庸鲽 (<i>H. hippoglossus</i>) MyoD2 (AJ630127)	65	79
红鳍东方鲀 (<i>T. rubripes</i>) MyoD2 (NM_001040062)	62	74
文昌鱼 (<i>Branchiostoma belcheri</i>) MyoD1a (AY313170)	42	42
文昌鱼 (<i>B. belcheri</i>) MyoD1b (AB092415)	45	42
文昌鱼 (<i>B. belcheri</i>) MyoD2 (AB092416)	36	32

表3 奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼 MyoD1 和 MyoD2 内含子的长度及 GC 含量
 Tab. 3 Length and GC content of MyoD1 and MyoD2 introns in *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*

基因 Gene	内含子 Intron	奥利亚罗非鱼 <i>O. aureus</i>		尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	
		长度 /bp Length	GC 含量 /% GC content	长度 /bp Length	GC 含量 /% GC content
<i>MyoD1</i>	内含子 1 Intron1	601	35.94	565	35.75
	内含子 2 Intron2	682	26.65	669	27.06
<i>MyoD2</i>	内含子 1 Intron1	414	33.33	414	33.33
	内含子 2 Intron2	2403	36.83	2404	36.90

出现 285 bp 和 499 bp 2 条带, 尼罗罗非鱼则为 771 bp 1 条带, 奥尼罗非鱼包含奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼基因, 为 285 bp、499 bp 和 771 bp 3 条带, 以此可准确区分 3 种罗非鱼。鉴定结果显示, 15 尾奥利亚罗非鱼中有 1 尾与奥尼罗非鱼一样, 表明这尾奥利亚罗非鱼在 *MyoD1* 基因位点混杂了尼罗罗非鱼的基因, 18 尾尼罗罗非鱼和 15 尾奥尼罗非鱼则与预期的结果一致 (图 3、图 4)。该方法能明显鉴别奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼是否存在基因混杂, 为选择基因纯合的奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼提供了分子手段。

3 讨论

本研究分离的尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼 *MyoD1* 和 *MyoD2* 全长 cDNA 序列分析表明, 分离到

的 *MyoD1* 和 *MyoD2* 具有 MRFs 家族保守的 bHLH 结构, 与其他鱼类的相应序列的相似性均大于 73%, 因此, 认为这 2 个序列是罗非鱼的 *MyoD1* 和 *MyoD2* 基因。奥利亚罗非鱼 *MyoD1* cDNA 序列与 Chen 等^[17] 分离的序列在 5' 端和 3' 端存在较大的差异, 氨基酸序列的羧基端差异也比较明显; 而与其他鱼类相比则具有更高的相似性, 如羧基端氨基酸序列与金头鲷、大西洋庸鲽和红鳍东方鲀等鱼类的完全一致 (图 1)。出现这 2 种奥利亚罗非鱼 *MyoD1* 序列, 可能是因为不同地理种群的差异造成的, 两者在功能上是否存在差异尚有待进一步研究。

通过同源性比较和系统树可以看出, 罗非鱼 *MyoD1* 和 *MyoD2* 氨基酸序列相似性为 62%, 这与金头鲷、大西洋庸鲽和红鳍东方鲀等的结果一致^[11, 15-16]。

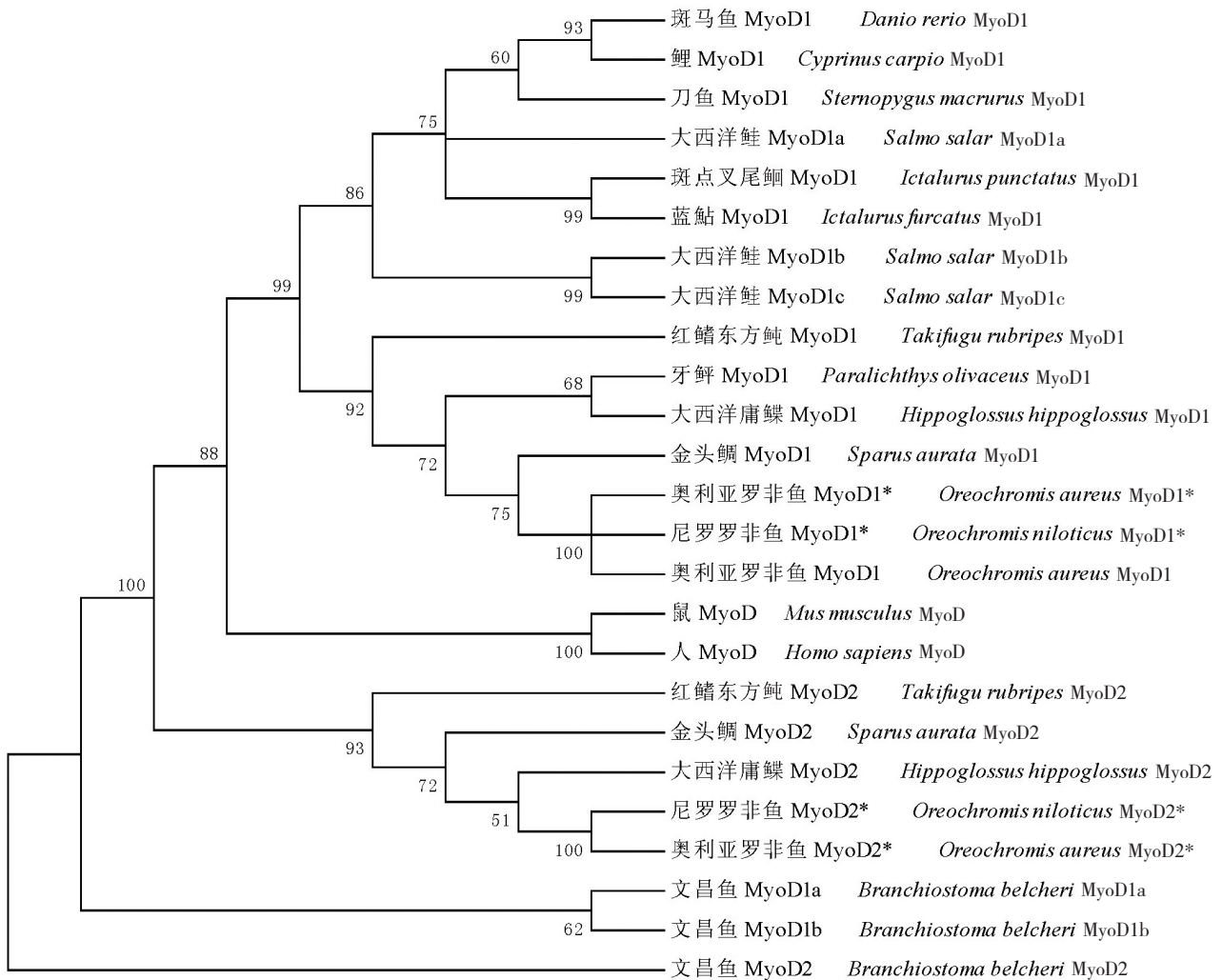


图2 基于MyoD氨基酸序列的系统发育树

*表示本研究分离; 金头鲷MyoD1 (AF478568)和MyoD2 (AF478569); 大西洋庸鲽MyoD1 (AY999688)和MyoD2 (AJ630127); 红鳍东方鲀MyoD1 (AY445315)和MyoD2 (NM_001040062); 大西洋鲑MyoD1a (AJ557148), MyoD1b (AJ557149)和MyoD1c (DQ317527); 文昌鱼MyoD1a (AY313170)、MyoD1b (AB092415)和MyoD2 (AB092416); 奥利亚罗非鱼MyoD1 (AF270790); 斑点叉尾鲷MyoD1、(AY534328); 牙鲆MyoD1 (DQ184914); 蓝鲈MyoD1 (AY562555); 刀鱼MyoD1 (AY396566); 斑马鱼MyoD1 (NM_131262); 鲤MyoD1 (AB012882); 鼠MyoD (NM_010866); 人MyoD (NM_002478)。

Fig. 2 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of MyoD

Isolation sequences of this paper are indicated by asterisk; *S. aurata* MyoD1 (AF478568) and MyoD2 (AF478569); *H. hippoglossus* MyoD1 (AY999688) and MyoD2 (AJ630127); *T. rubripes* MyoD1 (AY445315) and MyoD2 (AF478569); *S. salar* MyoD1a (AJ557148), MyoD1b (AJ557149) and MyoD1c (DQ317527); *B. belcheri* MyoD1a (AY313170), MyoD1b (AB092415) and MyoD2 (AB092416); *O. aureus* MyoD1 (AF270790); *I. punctatus* MyoD1 (AY534328); *P. olivaceus* MyoD1 (DQ184914); *I. furcatus* MyoD1 (AY562555); *S. macrurus* MyoD1 (AY396566); *D. rerio* MyoD1 (NM_131262); *C. carpio* MyoD1 (AB012882); *M. musculus* MyoD1 (NM_010866); *H. sapiens* MyoD1 (NM_002478)。

MyoD1 所反映的不同鱼类之间的亲缘关系基本符合传统分类^[20],如罗非鱼与金头鲷、大西洋庸鲽、牙鲆、红鳍东方鲀关系较近,聚在鱼类的1个分支,而斑马鱼、鲤、刀鱼、斑点叉尾鲷、蓝鲈和大西洋鲑另聚1支。*MyoD2* 至今只在刺鳍总目部分鱼类中发现,在其他鱼类里均未见报道,因此系统树反映的系统发育关系

尚不够全面,但由 *MyoD1* 和 *MyoD2* 反映的罗非鱼、金头鲷、大西洋庸鲽以及红鳍东方鲀之间的关系基本一致。

目前在生产中常常利用形态学^[21]、同工酶^[22]等技术进行罗非鱼的种质鉴定,但形态学方法不够准确,同工酶技术存在遗传变异信息不足、实验操作

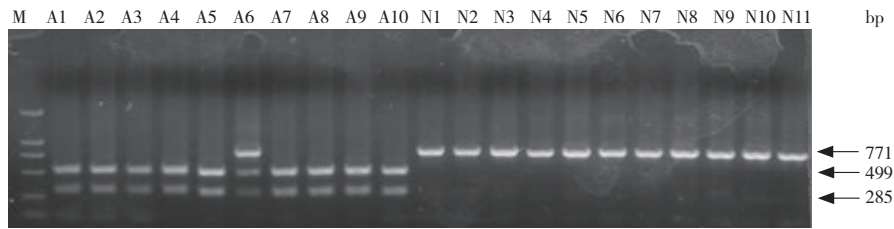


图3 奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼的部分 *Sna* I 酶切电泳图

A: 奥利亚罗非鱼; N: 尼罗罗非鱼; M: DL2000 marker.

Fig. 3 Partial restriction enzyme *Sna* I digestion fragment electrophoresis of *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*

A: *O. aureus*; N: *O. niloticus*; M: DL2000 marker.

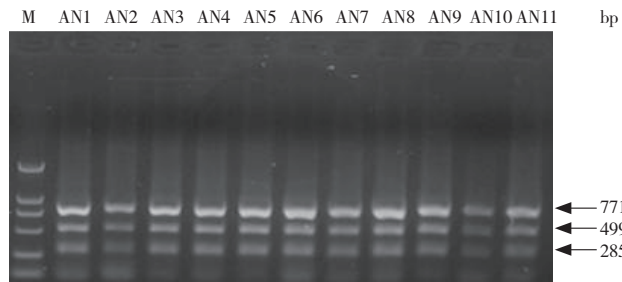


图4 奥尼罗非鱼的部分 *Sna* I 酶切电泳图

AN: 奥尼罗非鱼; M: DL2000 marker.

Fig. 4 Partial restriction enzyme *Sna* I digestion fragment electrophoresis of hybrid tilapia *Oreochromis aureus* (♂) × *O. niloticus* (♀)

AN: *O. aureus* (♂) × *O. niloticus* (♀); M: DL2000 marker.

繁琐和需杀死实验鱼等问题。分子遗传标记可以弥补和克服二者的不足。Bardakci等^[23]、Naish等^[24]利用RAPD技术,对不同罗非鱼种群进行相关研究。夏德全等^[25]、杜诚等^[26]用RAPD方法找到了鉴别尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼的分子标记。陈雪峰等^[27]利用不同罗非鱼rDNA内转录间隔区(ITS)中ITS1存在的差异,来鉴定奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼是否存在基因混杂。本研究根据奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼 *MyoD1* 内含子2的差异,构建了PCR-RFLP法,可以快速鉴别奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼基因混杂,整个过程对检验鱼无伤害、简单易操作,为选择基因纯合的奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼提供了分子手段,具有重要的生产实践意义。

在生产实践中,虽然使用雄性奥利亚罗非鱼与雌性尼罗罗非鱼杂交可以生产高雄性率的F₁奥尼罗非鱼,但由于父、母本基因间的差异,导致杂交F₁奥尼罗非鱼的成活率比同种鱼苗低很多,如本次研究

中所得尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼 *MyoD1* 和 *MyoD2* 内含子的差异即是父母本基因间差异的一个例子。此外,罗非鱼养殖过程中常常发生遗传渗透现象^[28],长期的基因混杂必将导致遗传物质相混性不断提高,如本次实验中所选15尾奥利亚罗非鱼中即有1尾混杂了尼罗罗非鱼基因。基因混杂会使两亲本相似性增加,或许能够提高杂交后代的成活率;而雄性率又与两亲本的纯度相关,若奥利亚罗非鱼和尼罗罗非鱼亲本的纯度下降,将会造成F₁奥尼罗非鱼雄性率大大降低,养殖性能变差^[18]。如何在保证F₁奥尼罗非鱼高雄性率的前提下最大程度提高其成活率,就必须分析亲本基因间不同的位点是否与高雄性率相关:若父母本基因间不同的位点与雄性率无关,甚至可以考虑鼓励该位点混杂以提高F₁的成活率;但若为与雄性率紧密相关的位点,则一定要避免混杂。至于本次研究中位点的基因混杂是否会影影响雄性率有待今后繁殖实验进一步的确认。

参考文献:

- [1] Rawls A, Valdez M R, Zhang W, et al. Overlapping functions of myogenic bHLH genes MRF4 and *MyoD* revealed in double mutant mice [J]. *Development*, 1998, 125 (13): 2349–2358.
- [2] Hansol L, Raymond H, Cory A S. Msx1 Cooperates with histone H1b for inhibition of transcription and myogenesis [J]. *Science*, 2004, 304: 1675–1678.
- [3] Sabourin L A, Rudnicki M A. The molecular regulation of myogenesis [J]. *Clin Genet*, 2000, 57 (1): 16–25.
- [4] Alves H J, Alvares L E, Gabriel J E, et al. Influence of the neural tube/notochord complex on *MyoD* expression and cellular proliferation in chicken embryos [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2003, 36 (2): 191–197.
- [5] Davis R L, Weintraub H, Lassar A B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts [J]. *Cell*, 1987, 51: 987–1000.
- [6] Oldham J M, Martyn J A, Sharma M, et al. Molecular expression of myostatin and *MyoD* is greater in double-muscled than normal-muscled cattle fetuses [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001, 280 (5): R1488–R1493.
- [7] Lin Z Y, Dechesne C A, Eldridge J, et al. An avian muscle factor related to *MyoD1* activates muscle-specific promoters in nonmuscle cells of different germ-layer origin and in BrdU-treated myoblasts [J]. *Genes Dev*, 1989, 3 (7): 986–996.
- [8] Huynen L, Bass J, Gardner R C, et al. Nucleotide sequence of the sheep *MyoD1* gene [J]. *Nucl Acids Res*, 1992, 20 (2): 374.
- [9] Obiyama A, Nihe Y, Hirayama Y, et al. Molecular cloning and developmental expression patterns of the *MyoD* and MEF2 families of muscle transcription factors in the carp [J]. *J Exp Biol*, 1998, 201: 2801–2813.
- [10] Rescan P Y, Gauvry L, Paboeuf G, et al. Identification of a muscle factor related to *MyoD* in a fish species [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1218 (2): 202–204.
- [11] Tan X, Du S J. Differential expression of two *MyoD* genes in fast and slow muscles of gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. *Dev Genes Evol*, 2002, 212 (8): 207–217.
- [12] Hall T E, Cole N J, Johnston I A. Temperature and the expression of seven muscle-specific protein genes during embryogenesis in the Atlantic cod *Gadus morhua* L [J]. *J Exp Biol*, 2003, 206 (18): 3187–3200.
- [13] Solnica K L, Stemple D L, Mountcastle S E, et al. Mutations affecting cell fates and cellular rearrangements during gastrulation in zebrafish [J]. *Development*, 1996, 123: 67–80.
- [14] Urano A, Suzuki M M, Zhang P, et al. Expression of muscle-related genes and two *MyoD* genes during amphioxus notochord development [J]. *Evol Dev*, 2003, 5 (5): 447–458.
- [15] Galloway T F, Bardal T, Kvam S N, et al. Somite formation and expression of *MyoD*, myogenin and myosin in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) embryos incubated at different temperatures; transient asymmetric expression of *MyoD* [J]. *J Exp Biol*, 2006, 209 (13): 2432–2441.
- [16] Fernandes J M, Kinghorn J R, Johnston I A. Differential regulation of multiple alternatively spliced transcripts of *MyoD* [J]. *Gene*, 2007, 391 (1–2): 178–185.
- [17] Chen Y H, Liang C T, Tsai H J. Expression, purification and DNA-binding activity of tilapia muscle-specific Transcription factor, *MyoD*, produced in *Escherichia coli* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2002, 131 (4)B: 795–805.
- [18] 李思发, 蔡完其. 我国尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼养殖群体的遗传渗透 [J]. *水产学报*, 1995, 19 (2): 105–111.
- [19] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning—A laboratory manual* [M]. New York: Cold Springs Harbor Laboratory Press, 1989.
- [20] Andersen Ø, Dahle S W, Nes S V, et al. Differential spatio-temporal expression and functional diversification of the myogenin regulatory *MyoD1* and *MyoD2* in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. *Comp Biochem Physiol Part*, 2009, 154B: 93–101.
- [21] 李家乐, 李思发. 尼罗罗非鱼 (♀) × 奥利亚罗非鱼 (♂) 同其亲本的形态和判别 [J]. *水产学报*, 1999, 23 (3): 261–265.
- [22] 曹莹, 夏德全. 尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼线粒体DNA遗传差异的研究 [J]. *水产学报*, 1997, 21 (4): 360–365.
- [23] Bardakci F, Skibinski D. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification [J]. *Heredity*, 1993, 73: 117–123.
- [24] Naish k A, Warren M, Bardakci F, et al. Multilocus DNA fingerprinting and RAPD reveal similar genetic relationships between strains of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) [J]. *Mol Ecol*, 1995, 4 (2): 271–274.

- [25] 夏德全, 曹莹, 吴婷婷, 等. 用RAPD分析罗非鱼遗传变异的研究及其对杂种优势的应用[J]. 水产学报, 1999, 23(1): 27-32.
- [26] 杜诚, 卢迈新, 叶星, 等. 五个罗非鱼群体的遗传分析与分子标记[J]. 大连水产学院学报, 2005, 20(1): 25-28.
- [27] 陈雪峰, 李红霞, 俞菊华, 等. 奥利亚罗非鱼与尼罗罗非鱼 rDNA 内转录间隔区序列特征[J]. 动物学杂志, 2009, 44(2): 92-96.
- [28] Maearanas J M, Taniguchi N, Pante M J R, et al. Electrophoretic evidence for extensive hybrid gene introgression into commercial *Oreochromis niloticus* L. stocks in the Philippines[J]. Aquac Fish Manag, 1986, 17: 248-258.

Characterization and difference analysis of *MyoD1* and *MyoD2* gene in *Oreochromis aureus* and *Oreochromis niloticus*

LU Zhonghua¹, YU Juhua², LI Hongxia², LI Jianlin², TANG Yongkai², RUAN Ruixia¹, YANG Guang³

(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; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Myogenic Differentiation Antigen (*MyoD*) is a key member of myogenic regulatory factors (MRFs) protein family, which has a conserved basic helix-loop-helix (bHLH) domain. By using RT-PCR and RACE, *MyoD1* and *MyoD2* cDNA from *Oreochromis aureus* and *O. niloticus* were isolated. The results showed that *MyoD1* cDNA (1 090 bp) of the two tilapias had the same 137 bp 5' -untranslated region (UTR), 50 bp 3' UTR and 903 bp open reading frame (ORF), which encoded a 350-amino-acid protein with a conserved bHLH domain (110-161 aa) and helix III (233-249 aa). *MyoD2* cDNA (1 478 bp) of the two tilapias had the same 215 bp 5' UTR, 471 bp 3' UTR and 792 bp ORF, which encoded a 263-amino-acid protein with a conserved bHLH domain (91-142 aa) and helix III (212-228 aa). The similarity was 73%-92% between two kinds of tilapia's *MyoD1* and the similarity was 74%-79% between tilapia's *MyoD2* and other fishes' *MyoD2*. The NJ phylogenetic tree of *MyoD1* and *MyoD2* indicated that all vertebrates' *MyoD1* and *MyoD2* were clustered into two main branches, and fishes' *MyoD1* were basically consistent with the traditional classification. There was only some individual base differences in *MyoD1* and *MyoD2* cDNA between the two tilapias, and the amino acid sequence was identical to each other. The two introns of *O. aureus MyoD1* were significant longer than those of *O. niloticus MyoD1*, while there was no obvious difference in two introns of *MyoD2* between two tilapias. According to the differences of *MyoD1* intron 2, one molecular marker to distinguish *O. aureus* and *O. niloticus* were established, and this marker was used to analyze the typical pure-blood 15 *O. aureus*, 18 *O. niloticus* and 15 *O. aureus* (♂) × *O. niloticus* (♀) selected by configuration. As a result, one in fifteen *O. aureus* was genetically mixed with *O. niloticus* at *MyoD1* loci, and the result of 18 *O. niloticus* and 15 *O. aureus* (♂) × *O. niloticus* (♀) was the same as expected. The marker could serve as a molecular technique to select pure-blood individuals. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(5): 903-912]

Key word: *Oreochromis aureus*; *Oreochromis niloticus*; *MyoD1* gene; *MyoD2* gene; characterization; difference

Corresponding author: YU Juhua; E-mail: yujh@ffrc.cn