

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00390

建鲤生长激素促泌素受体 1 基因的特性及其与增重相关 SNP 位点的筛选

俞菊华, 李红霞, 李建林, 唐永凯, 董在杰

中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室 江苏 无锡 214081

摘要: *GHS-R* 基因在哺乳类为候选的肥胖和生长数量性状位点。本实验使用 RT-PCR 及 PCR 的方法, 从建鲤 (*Cyprinus carpio* var. *jian*) 分离到 2 个 *jlGHS-R1s*, 称为 *jlGHS-R1a* 和 *jlGHS-R1b* (分别简称 *1a* 和 *1b*)。 *jlGHS-R1s* 的阅读框编码 360 个氨基酸, 两者间相似性高达 96%; 另外还存在 2 个 *jlGHS-R1s* 的转录变体 (分别简称 *1a'* 和 *1b'*)。选择性切割了翻译起始碱基后第 490–680 nt 的 191 bp 片段, 该片段两端碱基分别为 gt-ag, 这种选择性切割导致翻译提前终止, 仅翻译 184 个氨基酸, 包括前面 3 个半跨膜区, 这与已报道的罗非鱼等的保留内含子的转录变体不同。 *jlGHS-R1s* 的阅读框被 1 个内含子分隔, 该内含子位于第 260 个氨基酸密码子的第 1 和第 2 个碱基之间, *1a* 和 *1b* 的内含子长度分别为 676 bp 和 885 bp。使用分段 PCR 在建鲤群体的 *1a* 和 *1b* 基因上共找到 32 个 SNP 位点, 构建 PCR-RFLP 法对其中 9 个 SNPs 进行基因型检测, 结果发现各种基因型在 322 尾建鲤中均有出现, 但存在着明显的偏分布。与增重的相关分析表明, 位点 *1a-I_C386T* 和 *1b-EI_G159T* 与雌雄鱼鱼种和成鱼阶段增重分别呈极显著 ($P<0.01$) 和显著 ($P<0.05$) 相关, CC 型和 GG 型个体增重最快, 另外有 5 个位点则与其中的某阶段或者某性别的增重相关, 为了确定上述所得标记的适用性, 选取其中 4 个标记在另外 7 个家系共 610 尾鱼中检测, 结果 *C386T* 和 *G159T* 还是与增重呈极显著 ($P<0.01$) 和显著 ($P<0.05$) 相关, 可用于建鲤分子育种。

关键词: 建鲤; 生长激素促泌素受体; 单核苷酸多态位点; 生长相关分子标记

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)03-0390-09

生长激素促泌素受体 (growth hormone secretagogue-receptor, GHS-R) 是 G-蛋白偶联受体, 主要在垂体和下丘脑表达, 也在一些周边组织如脂肪细胞、胰岛和单核细胞中表达^[1]。GHS-R 在生长、保持能量稳态等方面具有重要的调节作用。模型动物研究表明, GHS-R 是能量消耗和体温调节的候选数量性状位点 (quantitative trait loci)^[6]。对美国家庭和德国人群的研究表明 GHS-R 是与肥胖和生长相连锁的数量性状位点^[7-8]。Li 等^[9]报道 *GHS-R* 启动子上的 *SNP_s2922126* 位点的 AA 基因型与中国妇女腰围和空腹血糖的增加有关, 内含子中的 *rs509030* 位点的 AA 基因型则与

血浆高密度脂蛋白的降低相关联。另外也有研究表明鸡 (*Gallus domestica*) 和鸭 (*Anas Platyrhynchos* var. *domestica*) 的 GHS-R 与脂肪沉积也有关^[10]。在鱼类中, 人们已经陆续从河豚 (*Spheroideus nephe-lus*)^[11]、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*)^[12]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[13]、斜纹石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)^[14]、鲆 (*Ictalurus punctatus*)^[15]、莫桑比克罗非鱼 (*Tilapia Mossambica*)^[16]、虹鳉 (*Oncorhynchus mykiss*)^[17]、金鱼 (*Carassius auratus*)^[18] 等鱼类中分离得到了 *GHS-R* 基因, 此外, 在黑鲷^[12]、鲆^[15]、莫桑比克罗非鱼^[16] 和虹鳉^[17] 还发现类似哺乳类的因保留内含子导致提前终止的 *GHS-R1* β 转录

收稿日期: 2011-10-31; 修订日期: 2011-12-06。

基金项目: 国家 863 计划项目 (2011AA100401); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目 (nycytx-49); 农业部公益性行业科研专项 (200903045)。

作者简介: 俞菊华 (1966-), 女, 研究员, 博士, 主要从事水生生物技术研究。E-mail: yujh@ffrc.cn

变体^[19-20]。

本研究首先分离了建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)的 2 个 *GHS-R1s*(*jlGHS-R1a* 和 *jlGHS-R1b*, 简称 *1a*、*1b*) cDNA 序列, 然后使用分段 PCR 分离不同个体建鲤的 *GHS-R1s* DNA 序列, 发现了与其他鱼类不同的选择性切割产生的转录变体, 然后使用分段 PCR 分离不同个体的 *GHS-R1s* 序列, 经序列比对寻找 SNP 位点, 再使用 PCR-RFLP 方法检测 9 个 SNP 位点在建鲤群体中的基因型, 通过分析各位点的基因型与增重的相关性, 筛选到了 2 个纯合的与增重相关的 SNP 位点, 为今后的建鲤分子育种工作开展提供了依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

建鲤, 12 个家系, 每家系 40~91 尾, 均取自中国水产科学研究院无锡淡水渔业研究中心宜兴养殖基地。试验鱼为同一天繁殖, 在同一池塘中分家系养殖于不同的网箱(面积 1 m²)内, 每一网箱放养 200 尾, 养殖 60 d, 鱼体长 5~6 cm 时进行 PIT 标记, 同时测量体质量、体长与体高, 然后放入同一池塘混合养殖, 养殖 90 d 捕捞称重、测量, 获得鱼种阶段增重; 继续养殖 13 个月称重、测量, 获成鱼阶段增重。取每尾鱼的尾静脉血, 抽提血

细胞基因组 DNA。

1.2 *jlGHS-R1s* 的分离

首先参考金鱼 *GHS-R1* cDNA (AB504275、AB504276)及其他鱼类 *GHS-R* 序列, 设计引物 F 和 R, 在建鲤脑 cDNA 中扩增分离部分序列。再根据所得序列, 设计 3'RACE 引物 3F1 和 3F2, 参照俞菊华等^[21]的方法分离 cDNA 3'端序列; 设计 5'RACE 引物 5R1 和 5R2, 使用 5'Full RACE 试剂盒 (Takara, 中国大连)分离 5'端序列, 完成拼接后寻找阅读框。然后设计引物 TF 和 TR 分离全长 cDNA 序列。使用 3F1 和 R 在 DNA 中分离 *1a* 内含子, 在 2 个 cDNA 序列的差异处设计分离 *1b* 内含子引物 1b-F 和 1b-R。在 5'端设计正向引物 1a-U1 和 1b-U1, 分别与在 *1a*、*1b* 内含子区域设计的反向引物 1a-IR 和 1b-IR 配对, 扩增分离 2 个基因的外显子 1。TR 与 *1a*、*1b* 内含子区域设计的正向引物 IF 分离外显子 2。本实验所用引物序列及分离的目的片段详见表 1。

1.3 SNP 位点的查找和基因型检测

使用分离外显子 1、内含子和外显子 2 的引物在随机挑选的 8 尾建鲤 DNA 中分离 2 个 *jlGHS-R1* 基因序列, 克隆后从每个个体中挑选 2 个阳性克隆, 送上海博尚生物有限公司测序, 共获 16 条拼接好的 *1a* 和 *1b* 全序列, 使用 Clustal W^[22]

表 1 本研究用于分离 *jlGHS-R1s* 基因的引物
Tab. 1 Primers used in isolation of *jlGHS-R1s* gene

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	退火温度 /℃ <i>T_m</i>	目的片段 target fragment	
F	CAARGACATGCGAACCACCAC	55	部分 cDNA	partial cDNA
R	TCCTGTACTTCTTKGACATGATGTTG			
3F1	TGGTTTGGGTCTCCAGCATCTTT	55	3'端序列	3' end
3F2	GTGCTCTGCTGGCTTCCCTTTC	58		
5R1	GGTCACGACTACCTTTGCCCTA	55	5'端序列	5' end
5R2	TGCAACACTCGCTCACAAACTG	56		
TF	ATGCCTACCTGGACGAACCAGTC	58	全长 cDNA	full length cDNA
TR	TCACAGGCTGGCAGTGGAATC			
1b-F	CTTGCTGTGTTCTGCTTAACTGTAT	55	<i>1b</i> 内含子	<i>1b</i> intron
1b-R	ATTACAGTAATGGCTGATGACGGAC			
1a-U1	CAATTGCGATCCTGCTATATATTCTG	56	<i>1a</i> 外显子 1	<i>1a</i> exon 1
1a-IR	TGTGGTGAAACCGGGCACTTAC			
1b-U1	TCAGACCTTCCAAAGCTGCCAT	57	<i>1b</i> 外显子 1	<i>1b</i> exon 1
1b-IR1	TGTTCTGTGCCAAGCGCATG			
1a-IF	TCACCACTCAGTTACTTTCACCTCCCTC	58	<i>1a</i> 外显子 2	<i>1a</i> exon 2
1b-IF	GATGTTCACCCATTAAGGAGGCTC	58	<i>1b</i> 外显子 2	<i>1b</i> exon 2

比对, 同一位点不同碱基出现比例大于 1/3 的判定为 SNP 位点。使用 http://insilico.ehu.es/restriction/two_seq/ 在线软件分析不同基因型间的酶切位点差异, 结果在其中的 9 个 SNP 位点找到合适的限制性内切酶, 包括 *la* 外显子的 *I_EI_A450C*、内含子的 *I_C226T*、*I_C386T* 和 *I_A510C*; *lb* 的 *EI_G159T*、*EI_C300T*、*I_C37T*、*I_A522C* 和 *I_C729T*, 检测这些位点基因型的 PCR 引物、限制性内切酶以及各基因型的酶切片段见表 2。

1.4 PCR、克隆及 PCR-RFLP 方法

基因分离 PCR 反应体系为 25 μ L, 内含基因组 DNA 50~100 ng, 其余组份按照 *Taq* 酶 (上海申能博彩生物有限公司) 说明书添加, 反应退火温度和延伸时间分别根据引物和扩增片段长度调整。反应结束后 PCR 液经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶回收 (Takara 胶回收试剂盒), 与 pMD18-T 载体连接 (Takara, 中国大连), 转入 *E.coli* DH5 α 敏感态细胞中, 挑取单菌落扩增培养, 抽提质粒后 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切检测, 送阳性克隆到上海博尚生物有限公司测序。

PCR-RFLP 中 PCR 反应体系总体积 12.5 μ L, 内含基因组 DNA 25~50 ng, 其余组份按照 *Taq* 酶说明书添加。反应结束取 3~5 μ L PCR 液在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其浓度和条带单一性, 然后取 5 μ L PCR 液在总体积 10 μ L 中进行酶切, 内含

限制性内切酶 2 U (Fermentas), 根据使用说明在 37 $^{\circ}$ C 或者 65 $^{\circ}$ C 酶切 3~5 h, 然后终止酶切反应, 于 1.2~2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切条带, 进行基因型判定。

1.5 数据分析

序列比对采用 ClustalW^[22] 在线软件分析, 使用 SPSS 13.0 中 GLM 模型分析 SNP 位点不同基因型与增重的相关性。

2 结果与分析

2.1 *jIGHS-R1s* 序列

引物对 F 与 R 分离到 2 个 *GHS-R1* cDNA 的中间序列, *la* 为 785 bp, *lb* 为 783 bp, 编码氨基酸有 6 个不同, *la* 3'RACE 的非翻译区长 734 bp, *lb* 的为 787 bp; *la* 5'RACE 非翻译区为 207 bp, *lb* 为 559 bp。拼接后设计公用的 TF 和 TR 引物在脑 cDNA 中分离全长 cDNA, 10 个克隆中 6 个与 *la* 序列高度一致, 4 个与 *lb* 一致。*la* 的 4 个克隆长 1 083 bp, 编码 360 个氨基酸, 另外 2 个 *la'* 克隆缺失翻译起始后第 490~680 nt 共 191 bp, 该片段符合 GT-AG 规则, 缺失后导致提前终止, 只翻译 184 个氨基酸, 只有前面 3 个半跨膜区; *lb* 的 3 个克隆为 1 083 bp, 编码 360 个氨基酸, 另外 1 个克隆 *lb'* 同 *la'* 中的缺失一样导致提前终止。*la*、*lb* cDNA 在基因库中的登录号为 HM191491、HM191493。

表 2 SNP 检测 PCR 引物、内切酶及酶切片段
Tab. 2 Primers, length of PCR product and restriction fragments, and restriction enzymes

检测位点 locus	引物序列 (5'-3') primer sequence (5'-3')	内切酶(反应温度/ $^{\circ}$ C) restriction enzyme(temperature)	酶切片段 restricted fragment
<i>jIGHS-R1a</i> <i>EI-A450C</i>	F: CAATTCGCATCCTGCTATATATTCG R: TTAGTATCCACGAGTTTGTCCCA	<i>MvaI</i> (37)	C: 163,441,119 A: 163, 560
<i>I-C226T</i>	F: TGGTTTGGGTCTCCAGCATCTTT R: TGTGGATTTGGAGATCAGGTAACG	<i>Bsp1407I</i> (37)	C: 384, 525, T: 909
<i>I-C386T</i>	F: TGGTTTGGGTCTCCAGCATCTTT R: TGTGGATTTGGAGATCAGGTAACG	<i>HindII</i> (37)	C: 544,365 T: 909
<i>I-A510C</i>	F: TGGTTTGGGTCTCCAGCATCTTT R: TGTGGATTTGGAGATCAGGTAACG	<i>TaiI</i> (65)	A: 577, 322 C: 577,109,215
<i>jIGHS-R1b</i> <i>EI-G159T</i>	F: TCAGACCTTCCAAAGCTGCCAT R: CACACTGAGAGCAGTGATGTTTCAGA	<i>BseNI</i> (65)	G: 236, 333 T: 236, 93,241
<i>EI-C300T</i>	F: TCAGACCTTCCAAAGCTGCCAT R: CACACTGAGAGCAGTGATGTTTCAGA	<i>TaqI</i> (65)	T: 470,67,31 C: 547,31
<i>I-C37T</i>	F: CTTGCCTGTGTTCTGCTTAAGTGTAT R: TGTCTGTGCGCAAGCGCATG	<i>Bsh1236I</i> (37)	C: 167, 77 T: 244
<i>I-A522C</i>	F: ATCGTATGAAATCAAGGTAACAGGG R: ATTACAGTAATGGCTGATGACGGAC	<i>AfaI</i> (37)	C: 105, 484 A: 589
<i>I-C729T</i>	F: ATCGTATGAAATCAAGGTAACAGGG R: ATTACAGTAATGGCTGATGACGGAC	<i>TaqI</i> (65)	T: 589 C: 312, 277

jlGHS-R1a 的内含子长 676 bp, *1b* 的内含子长 885 bp, 位于 A260 的第 1 和第 2 个碱基之间。*1a*、*1b* DNA 序列的登录号为 HM191495、JN392468。图 1 为 *jlGHS-R1s* 的基因结构。

建鲤 GHS-R1s 氨基酸序列与其他鱼类 GHS-R 的相似性分析结果表明, 与金鱼 (*Carassius auratus*)^[18]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[13] 的 GHS-R1 同源性高达 95% 以上, 与鲇的同源性为 73% 左右, 与鲑鳟类的同源性为 65%~71%, 与金鱼、斑马鱼 GHS-R2 的同源性为 73% 左右, 与鲇 GHS-R2 的同源性为 70% 左右, 与鸡、人 GHS-R1 的同源性分别为 73% 和 67% (表 3)。

2.2 *jlGHS-R1s* 上的 SNP 位点

比对 8 尾建鲤的 *jlGHS-R1s* 序列, 分别在

jlGHS-R1a 和 *1b* 上找到 12 个和 20 个 SNP 位点, 其中内含子中分别为 10 和 12 个。*jlGHS-R1a*、*1b* 外显子 1 中的 5 个 SNPs 均为无义突变; *1b* 外显子 2 中 5 个 SNPs, 其中 C96T 使脯氨酸 CCC 突变为丝氨酸 TCC, A198G 则使甲硫氨酸 ATG 突变为缬氨酸 GTG。表 4 为本实验找到的 SNPs 及不同碱基在 16 条序列中出现的比例。

2.3 基因型检测及其与增重的相关性分析

使用 PCR-RFLP 法构建了上述 SNPs 中 9 个位点基因型的检测方法, 图 2 为其中 4 个 SNPs 的基因型检测电泳图。在 5 个家系共 322 尾 (♂160, ♀162) 建鲤中的基因型分布特征为: 每个位点的 3 种基因型均存在, 但基因型频率存在较大差异, 有的基因型个体数明显偏少, 如 *1a-IC226T* 和 *1b-*

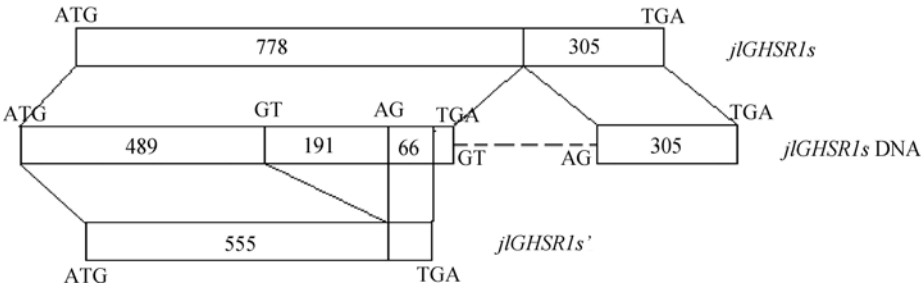


图 1 *jlGHS-R1s* 基因结构

方框内数据表示碱基数, GT 和 AG 为内含子的 5'和 3'端碱基。ATG 和 TGA 分别表示翻译起始和终止密码子。

Fig. 1 Gene structures of *jlGHS-R1s*

Figures in the frame are nucleotide numbers. Nucleotide bases of 5' and 3' end in intron are GT and AG, respectively. ATG and TGA represent initial and end codons of translation, respectively.

表 3 建鲤 GHS-R1s 与其他动物 GHSRs 之间的相似性
Tab. 3 Similarities between *jlGHS-R1s* and other GHSRs

其他种类 GHSRs other GHSRs	GenBank 登录号 access. no.	<i>jlGHSR1a</i> (360)	<i>jlGHSR1b</i> (360)	%
金鱼 <i>Carassius auratus</i> 1a-1(360)	AB555555	96	95	
金鱼 <i>Carassius auratus</i> 1a-2(360)	AB555556	96	98	
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> 1(360)	XM_001335981	95	96	
鲇 <i>Ictalurus punctatus</i> 1a(348)	ACS36605	74	72	
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> 1a(387)	AB362479	70	71	
黑鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i> 1a(385)	AAN77875	68	68	
罗非鱼 <i>Tilapia Mossambica</i> 1a(384)	AB361053	65	66	
金鱼 <i>Carassius auratus</i> 2a-1(367)	AB555557	74	73	
金鱼 <i>Carassius auratus</i> 2a-2(366)	AB555558	74	74	
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> 2(365)	XM_001340372	73	73	
鲇 <i>Ictalurus punctatus</i> 2a(362)	ACS36607	70	69	
鸡 <i>Gallus domestica</i> 1a(331)	NP_989725	73	74	
人 <i>homo sapiens</i> 1a(366)	AAK71539	67	67	

注: 括号内数字为氨基酸个数, 表内数字为相似性。
Note: Figures in parentheses are the number of amino acids, and figures in the table are similarity.

E1C300T 位点的 TT 型鱼均只有 6 尾, 只有 1a-IA510C 基因型分布比较平均, 杂合子个体数为纯合子个体数的 2 倍左右 (表 5)。分析结果显示与雄鱼鱼种阶段增重相关的位点最多, 有 7 个; 与雌鱼鱼种阶段增重相关的只有 4 个; 与雄鱼和雌鱼成鱼阶段增重相关的位点均为 3 个。与雌雄成

表 4 *jIGHS-R1s* 基因上的 SNP 位点
Tab. 4 SNP loci on *jIGHS-R1s* gene

区域 region	SNPs 位点(出现比例) SNPs loci(ratio)	
<i>jIGHS-R1a</i>	外显子 1 exon1	<i>A197G</i> (1/3), <i>A450C</i> (1/3)
	内含子 intron	<i>C80T</i> (1/3), <i>A199G</i> (5/11), <i>C226T</i> (3/1), <i>C242T</i> (3/5), <i>A257G</i> (5/11), <i>C386T</i> (5/3), <i>A412C</i> (11/5), <i>G441T</i> (1/3), <i>A510C</i> (1/1), <i>A516G</i> (4/1)
<i>jIGHS-R1b</i>	外显子 1 exon1	<i>G159T</i> (5/3), <i>C300T</i> (3/1), <i>C775T</i> (5/11)
	内含子* intron	<i>A28G</i> (3/5), <i>C37T</i> (5/11), <i>C52T</i> (5/11), <i>C107T</i> (5/3), <i>C406T</i> (3/1), <i>A456C</i> (1/4), <i>A522C</i> (1/3), <i>C573G</i> (1/2), <i>A603G</i> (5/11), <i>C729T</i> (9/7), <i>A736C</i> (5/11), <i>C874T</i> (3/5)
	外显子 2 exon2	<i>G59T</i> (3/5), <i>C96T</i> (11/5), <i>C152T</i> (7/9), <i>A198G</i> (3/5), <i>C218T</i> (1/3)

注: *表示由于 *Ib* 内含子中存在 1 个 AT 微卫星, 并且有 polyT 和 A 位点, 因此不同个体间存在着长度的小差异, 表内数字以本实验室递交到 GenBank 中的序列为准。
Note:* donate there is one AT microsatellite, poly T and A loci in *Ib* intron, so some difference exists between different individuals. Figures in the table are subject to sequences submitted to GenBank by our lab.

表 5 9 个 SNPs 位点的基因型分布及其与增重的相关性
Tab. 5 Genotypes distribution of nine SNPs and its correlation with weight gain

		雄鱼增重/g male weight gain			雌鱼增重/g female weight gain			$\bar{x} \pm SE$
位点 site	基因型 genotype	鱼种 juvenile	成鱼 adult	样本数 <i>n</i>	鱼种 juvenile	成鱼 adult	样本数 <i>n</i>	
<i>1a-I_A510C</i>	AA	100.99±27.71 ^{AB}	621.49±130.34	40	117.92±39.06	782.56±175.12	45	
	AC	97.70±31.12 ^B	608.23±124.31	81	111.97±40.89	731.99±195.80	89	
	CC	114.78±32.67 ^A	639.16±94.36	39	121.48±47.33	780.90±168.63	28	
<i>1a-I_C226T</i>	CC	102.15±29.57	613.69±108.64	112	111.13±40.67	735.55±176.29	107	
	TC	103.69±35.89	628.46±141.63	46	124.49±42.77	801.69±204.28	51	
	TT	109.70±24.04	673.23±160.04	2	108.08±35.93	681.55±118.57	4	
<i>1a-I_C386T</i>	CC	113.51±30.21 ^A	648.86±119.77 ^A	74	124.98±39.50 ^A	794.30±181.94 ^A	68	
	TC	95.82±30.45 ^B	601.28±110.59 ^a	65	113.46±44.22 ^{AB}	746.16±205.17 ^{AB}	64	
	TT	85.80±24.62 ^B	569.27±123.22 ^B	21	97.09±33.64 ^B	680.72±122.27 ^B	30	
<i>1a-E1_A450C</i>	AA	85.75±9.69 ^B	583.10±178.16	2	102.15±32.60	645.11±59.63 ^b	11	
	AC	120.77±41.86 ^A	620.89±133.10	35	121.17±49.22	763.84±236.57 ^{ab}	40	
	CC	97.82±25.80 ^B	619.39±115.08	123	114.44±39.15	762.05±171.68 ^a	111	
<i>1b-E1_G159T</i>	GG	106.04±31.72 ^a	635.76±123.18 ^a	110	113.19±38.25 ^{ab}	749.97±181.09 ^a	115	
	GT	98.24±31.72 ^{ab}	583.73±105.58 ^b	39	126.01±51.41 ^a	788.05±211.60 ^a	39	
	TT	84.95±15.57 ^b	586.76±103.20 ^b	11	92.78±10.66 ^b	661.60±72.31 ^b	8	
<i>1b-E1_C300T</i>	CC	108.74±31.76 ^A	628.06±107.44 ^B	93	114.83±37.58	771.88±192.78	97	
	CT	93.90±28.03 ^B	594.57±126.08 ^B	63	116.50±47.63	731.58±176.17	63	
	TT	100.28±44.60 ^{AB}	804.95±110.03 ^A	4	97.55±8.42	642.9±67.88	2	
<i>1b-I_C37T</i>	CC	91.34±24.19	583.45±100.81	12	114.21±55.19	709.26±171.22	10	
	CT	99.12±31.13	611.19±122.48	64	122.36±43.52	768.22±195.60	67	
	TT	107.03±31.89	630.18±119.30	84	109.79±37.60	749.54±181.50	85	
<i>1b-I_A522C</i>	AA	85.99±15.86 ^b	581.37±93.99	14	100.15±17.33 ^b	726.82±162.84	11	
	AC	102.66±33.47 ^{ab}	620.54±126.60	75	124.72±45.87 ^a	770.28±186.82	73	
	CC	106.00±30.46 ^a	624.77±116.09	71	108.54±37.79 ^{ab}	744.41±189.65	78	
<i>1b-I_C729T</i>	CC	110.37±30.74 ^a	639.29±104.15	56	106.73±32.57 ^{ab}	741.95±164.39	66	
	TC	99.59±31.94 ^{ab}	606.35±128.00	89	124.9±47.91 ^a	775.84±210.86	83	
	TT	92.34±24.24 ^b	621.34±115.50	15	97.06±16.04 ^b	684.63±80.05	13	

注: 不同大写字母表示同一位点不同基因型间差异极显著($P<0.01$); 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。
Note: Different capital and lowercase letters indicate significant difference between different genotypes of one same SNP site at 0.01 and 0.05 level, respectively.

鱼阶段增重均相关的位点只有 *1a-I_C386T* 和 *1b-EI_G159T*。

为了调查以上所选标记在其他家系的分布情况, 选择 *C386T*、*G159T* 这2个与增重显著相关的位点和 *A450C*、*C729T* 这2个在雌雄鱼种和成鱼阶段增重表现较一致的位点, 检测了它们在同池养殖的另外7个家系 610(♂323, ♀287)尾建鲤中的基因型。4个位点和增重的相关性分析结果显示, *C386T* 和 *G159T* 在7个家系中仍与雌雄成鱼阶段增重有极显著相关性($P<0.01$), 可作为建鲤分子育种的标记, 而另外2个标记则与5个家系中一样只与某性别的某阶段相关(表6)。

3 讨论

GHS-R 基因座为哺乳类肥胖和生长数量性状的候选位点。本实验分离了建鲤的2个阅读框非

常相似的 *GHS-R1* 基因, 对应斑马鱼的 *GHS-R1* (XM 001335981), 这与鲤染色体($2n=100$)是大部分鲤科鱼类($2n=48-50$)的两倍相对应。在建鲤 *MSTNs*^[23]、*GHRs*^[21]等基因分离时均发现了鲤基因数为斑马鱼的2倍。在分离全长建鲤 *GHS-R1s* cDNA 时分离到了选择性切割转录子, 但其切割模式与现有报道的其他动物或人类的不同, 在人等哺乳类、鸡^[19-20]以及黑鲷^[12]、斜纹石斑鱼^[14]、鲆^[15]、莫桑比克罗非鱼^[16]和虹鳟^[17] *GHS-R* 中的 *GHS-R* β 转录变体为保留内含子而导致提前终止, 但鲤中则是选择性切割了外显子1中的191 bp 导致提前终止并只保留了前面3个半跨膜区, 而保留内含子的则有前5个跨膜区, 缺失后面2个跨膜区。这类转录变体在其他鱼类中还未被发现, 是否为鲤或者鲤科鱼类特有还需进一步研究。不同鱼之间的这些差异体现了鱼类的遗传多样性。

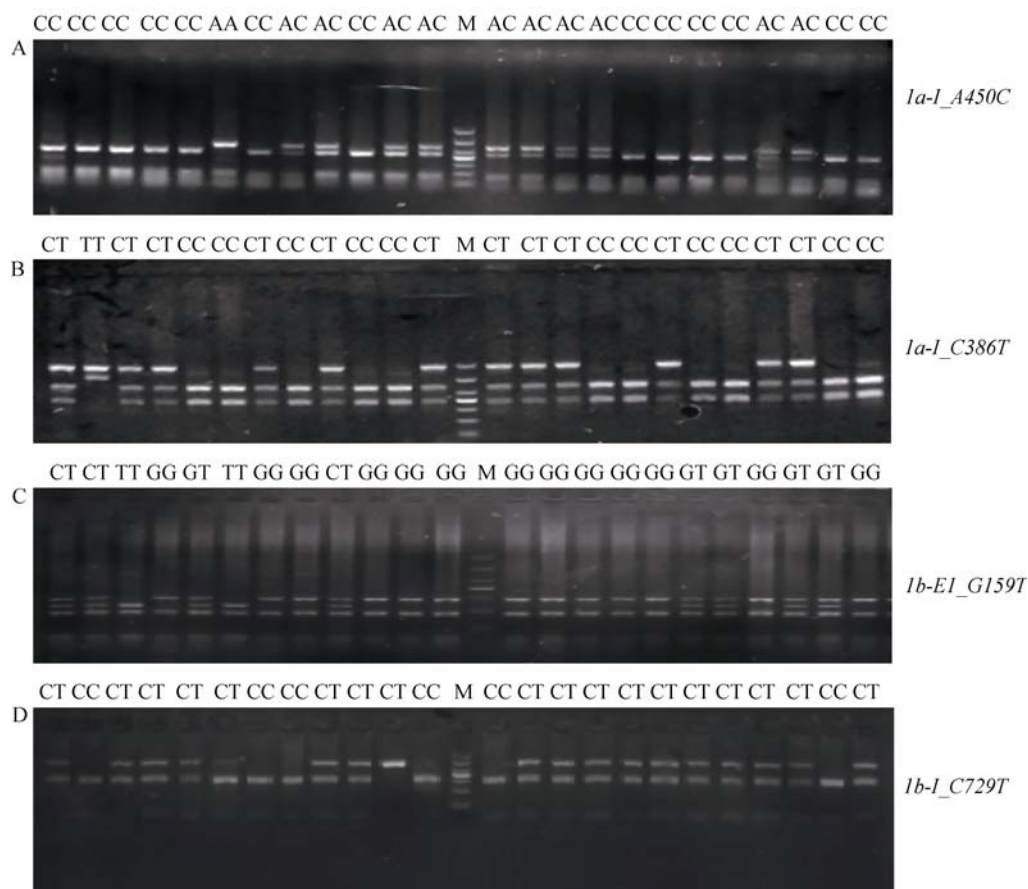


图2 4个与增重相关SNP位点不同基因型的电泳结果

M: DNA 分子标记(DL1000)。

Fig. 2 Electrophoresis patterns of different genotypes in 4 SNP loci
M: DNA marker (DL1000).

表 6 4 个 SNPs 位点在 7 个家系中的基因型分布以及与增重的相关性
Tab. 6 Genotype distribution among seven families of four SNPs and correlation with weight gain

位点 site	基因型 genotype	雄鱼增重/g male weight gain			雌鱼增重/g female weight gain		
		鱼种 juvenile	成鱼 adult	样本数 <i>n</i>	鱼种 juvenile	成鱼 adult	样本数 <i>n</i>
<i>1a-E1_A450C</i>	AC	110.42±158.86	678.74±131.20	37	85.64±35.42 ^B	800.73±154.04	37
	CC	95.66±29.06	663.39±128.77	286	103.14±33.98 ^A	806.30±158.09	250
	CC	103.51±28.39	698.69±138.66 ^A	170	112.36±29.42 ^A	841.82±146.78 ^A	137
<i>1a-I_C386T</i>	TC	92.13±87.27	628.31±107.60 ^B	127	90.40±38.67 ^B	785.79±163.71 ^B	123
	TT	84.17±41.41	636.5±109.01 ^b	28	90.37±17.34 ^B	711.93±126.11 ^C	27
	GG	97.85±64.54	677.06±131.78 ^A	267	101.02±35.10	816.97±152.75 ^A	234
<i>1b-E1_G159T</i>	GT	98.78±31.52	624.62±109.19 ^b	46	101.08±33.92	752.94±169.09 ^B	52
	TT	81.85±10.31	573.91±64.85 ^B	12	111.20±26.45	916.00±81.03 ^{AB}	2
	CC	96.52±84.41	655.97±124.21	139	93.64±33.19 ^B	792.10±148.43	142
<i>1b-I_C729T</i>	TC	98.92±31.66	673.45±131.49	135	108.10±36.05 ^A	815.69±168.40	109
	TT	95.73±27.81	672.54±137.57	51	108.69±29.99 ^a	833.37±155.24	35

注: 不同大写字母表示同一位点不同基因型间差异极显著($P<0.01$); 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$).
Note: Different capital and lowercase letters indicate significant difference of different genotypes of one same SNP site at $P<0.01$ and $P<0.05$ level, respectively.

对于鱼类 β 型转录变体是否有生理功能, 至今只在黑鲷有研究, 其结果类似哺乳类, 具有弱化 GHS-R1 的作用^[12], 而 jIGHS-R1s' 是否也具有弱化 jIGHS-R1s 的功能还有待继续研究。

鲤两套相似基因的存在增加了 SNPs 查找与检测的难度, 因为要确保 SNPs 位点来自同一个基因。由于内含子比外显子的变异大, 因此最好(有时也只能)在内含子差异区域设计引物以保证只扩增一个基因。在进行鲤 SNP 位点筛选工作时, 建议在获得相似基因的基础上设计特异引物, 以避免干扰, 保证实验的准确性。虽然鲤具有斑马鱼等鲤科鱼类双倍的基因数, SNPs 数可能会多, 但由于要避免 2 套基因间的干扰, 一些 SNPs 因为没有合适的差异区用于设计引物而不能检测, 特别是四引物等需要设计多个引物的检测方法的应用会受到影响。本实验在 *jIGHS-R1s* 上共找到了 32 个 SNP, 但大部分因为找不到合适的引物设计区而未能构建检测方法, 因此最好能开发不需要使用引物同时灵敏度够高的杂交或者其他方法检测 SNPs 的基因型。

本实验在建鲤 *jIGHS-R1s* 基因上筛选了与雌雄鱼种和成鱼阶段增重相关的 SNPs, 结果发现在

鱼种阶段的标记明显比成鱼阶段多, 一方面可能与机体在不同生长阶段基因表达水平不同有关; 另一方面更有可能是由于遗传、营养、环境等因子对生长的影响力发生了变化, 推测鱼种阶段的生长受到遗传因子的影响较大, 而成鱼阶段可能营养、环境等其他因子的累积作用更显著。另外有的位点杂合子增重较快, 而有的位点则纯合子生长快, 这些位点对应于杂种优势和杂种劣势两种情况。暗示了生长快的个体应该是在某些位点纯合的情况下, 同时保证存在一定杂合度。分子育种标记最好选择在纯合位点, 然后通过遗传距离保证一定的杂合度。本实验在 2 个基因 9 个位点中筛选到 2 个纯合标记即 *C386T* 的 CC 型和 *G159T* 的 GG 型, 与各阶段的增重均有显著相关性的位点, 并且这两个位点在 12 个家系共 932 尾得到了验证, 因此能应用于建鲤分子育种。由于生长是数量性状, 受很多因子的影响, 要筛选能适合所有鲤群体的标记比较困难, 如建鲤中存在体长与体质量呈正相关的现象^[24], 但荷包红鲤或其他种类鲤是否也存在类似关系未见报道。总之标记存在一定的适用范围, 但如果筛选到的标记仅适用 1 个或 2 个家系, 其并不具有较高的应用

价值。笔者认为筛选的标记应能适用在相同养殖模式即环境条件基本一致的条件下的同一养殖群体,使标记的使用面尽可能广。另外,由于影响生长的因素很多,如摄食量增减、抢食行为、消化吸收率等等,而在某个基因上筛选到的标记可能只影响一种因子,如GHS-R可能主要通过调节摄食量而影响生长,因此除了与增重进行关联分析外,如能同时与摄食量或者饲料利用率联系的话可能更精准,筛选到的标记适用范围也应该更广。

参考文献:

- [1] Smith R G, Van der ploeg L H, Howard A D, et al. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion [J]. *Endocr Rev*, 1997, 18(5): 621-645.
- [2] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, 402: 656-660.
- [3] Nakazato M, Murakami N, Date Y, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding [J]. *Nature*, 2001, 409: 194-198.
- [4] Chen H Y, Trumbauer M E, Chen A S, et al. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein [J]. *Endocrinology*, 2004, 145: 2607-2612.
- [5] Baessler A, Hasinoff M J, Fischer M, et al. Genetic linkage and association of the growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) gene in human obesity [J]. *Diabetes*, 2005, 54(1): 259-267.
- [6] Ueda H, Ikegami H, Kawaguchi Y, et al. Genetic analysis of late-onset type 2 diabetes in a mouse model of human complex trait[J]. *Diabetes*, 1999, 48(5): 1168-1174.
- [7] Rice T, Chagnon Y C, Perusse L, et al. A genome wide linkage scan for abdominal subcutaneous and visceral fat in black and white families: the heritage family study [J]. *Diabetes*, 2002, 51(3): 848-855.
- [8] Vionnet N, Hani E H, Dupont S, et al. Genome wide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24 [J]. *Am J Human Genet*, 2000, 67(6): 1470-1480.
- [9] Li W J, Zhen Y S, Sun K, et al. Ghrelin receptor gene polymorphisms are associated with female metabolic syndrome in Chinese population [J]. *Chin Med J*, 2008, 121(17): 1666-1669.
- [10] Nie Q, Fang M, Xie L, et al. Molecular characterization of the ghrelin and ghrelin receptor genes and effects on fat deposition in chicken and duck[J]. *J Biomed Biotechnol*, Article ID 567120, 12 pages, doi:10.1155/2009/567120. 2009 (2009): 1-12.
- [11] Palyha O C, Feighner S D, Tan C P, et al. Ligand activation domain of human orphan growth hormone (GH) secretagogue receptor (GHS-R) conserved from pufferfish to humans [J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 14(1): 160-169.
- [12] Chan C B, Cheng C H. Identification and functional characterization of two alternatively spliced growth hormone secretagogue receptor transcripts from the pituitary of black seabream *Acanthopagrus schlegelii* [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 214(1-2): 81-95.
- [13] Olsson C, Holbrook J D, Bompader G, et al. Identification of genes for the ghrelin and motilin receptors and a novel related gene in fish, and stimulation of intestinal motility in zebrafish (*Danio rerio*) by ghrelin and motilin[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, 155(1): 217-226.
- [14] Chen T, Tang Z, Yan A, et al. Molecular cloning and mRNA expression analysis of two GH secretagogue receptor transcripts in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *J Endocrinol*, 2008, 199(2): 253-265.
- [15] Small B C, Quiniou S M A, Kaiya H. Sequence, genomic organization and expression of two channel catfish, *Ictalurus punctatus*, ghrelin receptors [J]. *Comp Biochem Physiol: Part A*, 2009, 154(4): 451-464.
- [16] Kaiya H, Riley L G, Janzen W, et al. Identification and genomic sequence of ghrelin receptor (GHS-R)-like receptor in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*)[J]. *Zool Sci*, 2009, 26(5): 330-337.
- [17] Kaiya H, Mori T, Miyazato M, et al. Ghrelin receptor (GHS-R)-like receptor and its genomic organization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Comp Biochem Physiol*, 2009, 153(4A): 438-450.
- [18] Kaiya H, Miura T, Matsuda K, et al. Two functional growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) type 1a and 2a in goldfish, *Carassius auratus*[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 327(1-2): 25-39.
- [19] Tanaka M, Miyazaki T, Yamamoto I, et al. Molecular characterization of chicken growth hormone secretagogue receptor gene [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, 134 (2): 198-202.

- [20] Geelissen S M, Beck I M, Darras V M, et al. Distribution and regulation of chicken growth hormone secretagogue receptor isoforms [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, 134 (2): 167–174.
- [21] 俞菊华, 李红霞, 唐永凯, 等. 建鲤生长激素受体基因分离、转录子多态性以及组织表达特性[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(2): 218–229.
- [22] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucl Acids Res*, 1994, 22(22): 4673–4680.
- [23] 俞菊华, 李红霞, 唐永凯, 等. 建鲤生长抑制素基因 MSTN 的分离、表达及多态性与体型、平均日增重相关性研究[J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(6): 1062–1072.
- [24] 张建森, 孙小异. 建鲤新品系的选育[J]. *水产学报*, 2007, 31(3): 287–292.

Characterization of growth hormone secretagogue receptor 1 (GHS-R1) genes and weight gain associated SNP loci in *Cyprinus carpio* var. *jian*

YU Juhua, LI Hongxia, LI Jianlin, TANG Yongkai, DONG Zaijie

Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: Growth hormone secretagogue receptors (GHS-Rs) are endogenous receptors for growth hormone secretion (ghrelin) that belong to the G-protein-coupled receptor family. GHS-Rs play a role in regulating animal growth and energy homeostasis. GHS-R is a candidate quantitative trait loci related to obesity and growth in mammals. We used RT-PCR and PCR to isolate two *jIGHs-R1s*, *jIGHs-R1a* and *1b*. The open reading frames of *jIGHs-R1s* encode 360 amino acids that share 96% identity. In addition, there are two *jIGHs-R1s* transcription variants, an alternatively spliced 191 bp fragment from 490 nt to 680 nt in ORF with GT-AG at both ends. These transcripts led to a premature termination of translation, encoding 184 aa, and only contained three and a half transmembrane regions, which differs from the reported intron retaining variants among tilapia. The ORF of *jIGHs-R1s* was separated by one intron, locating between the first and second base of A260 codon. The introns of *1a* and *1b* were 676 bp and 885 bp in length, respectively. We found 32 SNPs on two *jIGHs-R1s* in the *Cyprinus carpio* var. *jian* population using alignment sequences from different individuals. We then genotyped 9 SNPs using PCR-RFLP. We encountered each genotype in 322 individuals, but there was an obvious bias in the distribution. The *1a-I_C386T* and *1b-E1_G159T* sites were significantly associated with juvenile and adult fish weight gain ($P<0.01$ and $P<0.05$, respectively). Individuals with CC and GG genotypes grew faster than other individuals. In addition, a further five sites were correlated with weight gain at certain stages or sex. To determine the applicability of the markers obtained in this experiment, we tested 610 individuals from seven additional families using four markers. The *C386T* and *G159T* sites remained significantly correlated with weight gain. Therefore, these two sites can be used as references for the molecular breeding of *Cyprinus carpio* var. *jian*.

Key words: *Cyprinus carpio* var. *jian*; growth hormone secretagogue (GHS)-receptor (GHS-R); single nucleotide polymorphism; molecular markers associated growth