

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15275

草鱼 *PRL* 基因多态性与幼鱼生长性状和肌肉成分的关联分析

傅建军^{1,2}, 张猛¹, 沈玉帮¹, 陈勇³, 徐晓雁¹, 李家乐¹

1. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业与种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;
3. 通威股份有限公司 水产工程技术研究中心, 四川 成都 610093

摘要: 为了探索草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)*PRL* (prolactin)基因多态性与草鱼生长性状和肌肉成分的关联性, 通过测序法从 10 尾草鱼的 *PRL* 基因中筛选到 6 个突变率高于 30% 的变异位点, 包括 5 个单核苷酸变异位点和 1 个插入型突变(-CACTCACTA), 分别命名为 2551G>A、2639G>C、3247A>G、5197T>G、5897G>A 和 3391->+。利用 AS-PCR(allele-specific PCR)和基因分型技术对 192 尾 4 月龄草鱼的 *PRL* 基因变异位点进行检测; 基于一般线性模型对变异位点多态性与草鱼生长性状和肌肉成分进行相关性分析。研究发现, 2639G>C、3391->+ 和 5197T>G 对体长和体重具有显著影响($P<0.05$), 2639G>C 对肌肉粗蛋白含量具有显著影响($P<0.05$)。单个位点基因型比较发现, 3391->+ 的突变型(-+和++)个体的体长和体重均显著高于野生型(--)个体($P<0.05$); 2639G>C 的 GC 及 5197T>G 的突变型(TG 和 GG)个体的体长和体重分别显著低于 2639G>C 的 GG 和 5197T>G 的 TT 野生型($P<0.05$); 2639G>C 突变型(CC)个体的粗蛋白含量显著高于 2639G>C 其他基因型(GG 和 GC)个体($P<0.05$)。两位点组合比较发现, 含 3391->+ 突变型(-+和++)的组合对应体长和体重普遍高于其他组, 含 2639G>C 的 CC 突变型的组合对应粗脂肪含量和粗蛋白含量普遍较高, 其中粗蛋白含量显著高于其他组($P<0.05$)。研究表明, 草鱼 *PRL* 基因多态性与草鱼生长性状和肌肉成分间存在显著关联, 推测相关变异位点可作为草鱼生长和肉质改良的候选辅助标记。

关键词: 草鱼; *PRL* 基因; 多态性; 生长性状; 肌肉成分; 相关性

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)03-0491-09

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国重要的大宗淡水鱼养殖品种, 目前其产值产量在世界淡水养殖鱼类中位居前列^[1]。然而随着消费需求的不断提升和草鱼种质资源逐渐衰退等问题的出现, 培育具有生长快、肉质好等优良性状的草鱼新品系成为现实需要。草鱼多数经济性状为数量性状, 由许多微效基因共同控制, 可以借助候选基因的研究方法, 筛选与主要经济性状相关的分子标记进而辅助育种^[2]。目前, 科研人员已在草鱼羧肽酶 A1^[3]、醛缩酶 B^[4]、柠檬酸合酶^[5]和谷胱甘肽硫转移酶^[6]等基因中筛选到与生长性状呈正相关的一

些 SNP (single nucleotide polymorphism)位点, 不断丰富的草鱼生长性状相关的候选辅助标记, 可为草鱼 QTL (quantitative trait locus)定位和分子辅助育种等提供便利。

催乳素(prolactin, PRL)是一种主要由垂体前叶合成和分泌的蛋白激素, 为动物生长发育必不可少的生长因子, 对体细胞的分裂和增殖有直接作用^[7]。*PRL* 基因通常被视为与畜禽动物生产性状相关的重要候选基因。在奶牛相关研究方面, Brym 等^[8]和 Lv 等^[9]研究发现 *PRL* 基因位点变异对奶牛产奶量和乳脂含量有显著影响; Dybus^[10]

收稿日期: 2015-07-09; 修订日期: 2015-09-20.

基金项目: 现代农业产业技术体系建设项目(CARS-46-04); 上海市种业发展项目(2012NY10); 通威股份有限公司产学研项目(TW2014F003); 上海高校水产学一流学科建设项目。

作者简介: 傅建军(1986-), 男, 博士, 研究方向为水产动物种质资源与遗传育种. E-mail: fjj5d20@163.com

通信作者: 李家乐, 教授. E-mail: jlli2009@126.com

研究还发现 *PRL* 基因位点变异对奶牛乳蛋白含量也有显著影响。在家禽相关研究方面, 赵文明^[11]研究发现鹅 *PRL* 基因调控区的多态性对其早期增重和屠宰性状有显著影响。在鱼类相关研究中, Streelman 等^[12]研究发现罗非鱼 *PRL I* 启动子区微卫星位点变异对不同盐度下的生长性状有显著影响。He 等^[13]研究发现亚洲鲈 *PRL* 基因不同 SNP 位点基因型及单倍型对应的生长性状存在显著差异。本研究通过直接测序筛选草鱼 *PRL* 基因多态性位点, 利用等位基因特异性 PCR (allele-specific PCR, AS-PCR)^[14]和基因分型技术检测 *PRL* 基因多态性, 并开展与草鱼幼鱼生长性状和肌肉成分的关联性分析, 以期筛选与草鱼生长和肉质相关的变异位点, 为草鱼遗传改良和选育提供候选辅助标记。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

2014 年 5 月, 于江苏吴江国家级四大家鱼良种场(苏州市吴江水产养殖有限公司)对长江水系野生草鱼群体^[15]进行人工繁殖, 实验选取了 24 尾亲本(12 尾雌鱼、12 尾雄鱼)。繁殖过程采取人工激素结合水流刺激进行催产, 在约 20 m³ 圆形水泥池中随机自然交配。受精卵置于孵化桶(约 1 m³ 容积铁皮桶), 经过 2 天连续的流水孵化(22~24℃)。水花鱼苗在富含浮游生物的土池培育, 饲养密度为 10 万/亩(1 亩 666.67 m²), 早期通过泼洒豆浆肥水和饲喂, 然后转食人工配合饲料。2014 年 6 月, 将夏花鱼苗(40 日龄)运往上海海洋大学南汇滨海基地进行培育。

1.2 数据采集及基因组 DNA 提取

2014 年 9 月, 随机收集 192 尾 4 月龄草鱼, 测量体长(standard length, SL, 单位 cm)和体重(body weight, BW, 单位 g)数据, 并计算肥满度(condition factor, CF, %), 公式为: CF=BW/SL³×100; 测量工具分别为游标卡尺(精确到 0.002 cm)和电子天平(精确到 0.01 g)。取背部肌肉用于肌肉成分检测, 并剪取尾鳍固定于无水乙醇, 于 4℃ 保存。

取收集的 192 尾草鱼的背部肌肉, 使用凯氏

定氮法和索氏抽提法分别测定粗蛋白含量(protein content, PC)和粗脂肪含量(fat content, FC)^[16], 相关检测由青岛科标化工分析检测有限公司完成。

对收集的 192 尾草鱼尾鳍采用改良的高盐法^[17]提取基因组 DNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 用 NanoDrop 2000 紫外分光光度计检测纯度和浓度, 并稀释至 50 ng/μL, 于-20℃ 冰箱保存备用。

1.3 草鱼 *PRL* 基因变异位点筛选及验证

草鱼 *PRL* 基因的 mRNA (GenBank 登录号: EU074210.1) 和 DNA (GenBank 登录号: EU311637.1) 序列从 NCBI 上获取, 使用 NCBI 在线软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)比对获得草鱼 *PRL* 基因内含子和外显子等区域。随机选取 10 尾草鱼的基因组 DNA 作为反应模板, 利用 Primer Premier 5 软件^[18]设计的 7 对引物(表 1)分段扩增 *PRL* 基因。

PCR 反应体系(25 μL): Taq PCR Mastermix (KT201-12) 12.5 μL, 上下游引物各 0.5 μL (10 μmol/L), 模板 2 μL (50 ng/μL), ddH₂O 9.5 μL。反应程序为: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s, 退火温度(表 1) 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带准确清晰的送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果在 BioEdit 软件^[19]上直接观测峰图, 并进行拼接比对, 筛选变异位点。

针对 6 个变异位点(突变率高于 30%), 设计 5 组等位基因特异性引物(表 2), 其中相邻的 2 个不同变异类型位点(点突变和片段插入突变)共用 1 组引物(F3a、F3b 和 R3)。每组包括 3 条引物, 1 条荧光修饰(FAM 或 FAM)的共用下游引物, 及 2 条与变异位点特异性互补的上游引物; 2 条特异性上游引物相差 4 bp, 并根据突变类型确定是否在 3'端第 3 bp 或第 4 bp 引入错配碱基^[20]。

利用 192 尾个体基因组 DNA 为模板进行 AS-PCR 扩增, 以获取各变异位点的基因型。PCR 反应体系(20 μL): Taq PCR Mastermix (KT201-12) 10 μL, 上下游引物各 0.5 μL (10 μmol/L), DNA 模

表 1 草鱼 *PRL* 基因分段扩增引物
Tab. 1 Primers for segment of *PRL* gene in *Ctenopharyngodon idella*

引物 primer	序列(5'-3') sequence of primer (5'-3')	起止位置/bp initiation & termination position	产物长度/bp product length	退火温度/°C Tm
PRL-F1	CAAGGGGGTAACAGAAGAAT	573-1626	1054	51.5
PRL-R1	ATCATTGAGACCGACACCGT			
PRL-F2	GTTACATCCCTTTCGGTTTC	1439-2767	1329	54.4
PRL-R2	GAGAAAGCCGAGTCTGTCCA			
PRL-F3	GGACGAATGTGGGACCG	2719-3471	753	55.1
PRL-R3	TCACTGGAGATTGTGCTGCG			
PRL-F4	GGTTCACAGTGTGGTAGGT	3199-3912	714	50.3
PRL-R4	TACCTAGCATCCCTCACG			
PRL-F5	ATCGTGAGGGATGCTAGGT	3893-5103	1211	48.6
PRL-R5	CTTTGCAGCAGTCGCTAT			
PRL-F6	TGTCACCCCAGCCTTCAC	4897-5491	595	50.5
PRL-R6	CTCACCTTGTGAACGACAT			
PRL-F7	GGTCTGGAGCATGTCGTT	5463-6006	544	51.1
PRL-R7	CCCGTTGGTCCAGTTATT			

板 2 μL ($50 \text{ ng}/\mu\text{L}$), ddH₂O 7 μL 。反应程序为: 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 30 s, 退火温度(表 2) 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。每一个体分别用 5 组等位基因特异性引物进行 PCR 扩增。实验所需试剂均购置于天根生化科技(北京)有限公司, 引物合成及 PCR 产物测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。各组引物的 PCR 产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并根据浓度高低以适当比例混合, 送上海迈浦生物科技有限公司进行基因分型, 利用 GeneMapper V4.0 软件对分型结果进行读取。

1.4 数据处理

基因型数据用 Excel 整理后, 利用 Cervus 3.0 软件^[21]计算各变异位点的多态性信息含量 (polymorphism information content, PIC)。整理实验鱼生长性状、肌肉成分及各变异位点基因型数据, 使用 SPSS 16.0 软件^[22]基于一般线性模型 (general linear model, GLM) 对草鱼生长性状和肌肉成分进行统计分析, 多重比较显著性检验采用 Duncan 法。统计模型如下:

$$Y_{ij} = \mu + B_i + e_{ij}$$

其中, Y_{ij} 为某性状第 i 个变异位点(或位点组合)第 j 尾个体观测值; μ 为某性状实验观测所有个体的平均值; B_i 为第 i 个变异位点(或位点组合)的

效应值; e_{ij} 为对应于观测值的随机残差效应。

2 结果与分析

2.1 草鱼 *PRL* 基因变异位点筛选及验证结果

通过直接测序, 从 10 尾草鱼的 *PRL* 基因中共发现 11 个变异位点(第 2 内含子 5 个, 第 3 内含子 4 个, 3' 非编码区 2 个), 其中 6 个位点突变率高于 30%, 分别是 5 个 SNP 位点和 1 个插入型突变, 均被用于后续研究(表 2)。根据位点在基因中的位置和突变类型, 分别命名为 $2551G>A$ 、 $2639G>C$ 、 $3247A>G$ 、 $339I>+$ 、 $5197T>G$ 和 $5897G>A$ 。针对这 6 个变异位点, 共设计 5 组等位基因特异性引物(表 2), 并依据 AS-PCR 产物的分型结果确定各位点的基因型。其中, $3247A>G$ 和 $339I>+$ 共用 1 组引物, 其 AS-PCR 产物的分型结果如图 1 所示。

2.2 草鱼 *PRL* 基因多态性

使用 192 尾草鱼基因组 DNA 对预筛选较高多态性的变异位点进行验证, 剔除分型失败的个体, 共统计出 172 尾个体在以上 6 个草鱼 *PRL* 基因变异位点的碱基组成及各突变位点的基因型和基因频率等。结果如表 3 所示, $2551G>A$ 和 $3247A>G$ 仅存在杂合突变, 多态性较低($\text{PIC}<0.25$)^[23]; 其余 4 个位点既有杂合型突变, 又有纯合型突变;

表 2 草鱼 *PRL* 基因变异位点的 AS-PCR 引物
Tab. 2 Primers of AS-PCR for variable sites of *PRL* gene in *Ctenopharyngodon idella*

引物 primer	序列(5'-3') sequence of primer (5'-3')	位置及变异类型 position, mutation type	产物长度/bp product length	退火温度/°C Tm
F1a	tataGAGACTTGAGGCTGACAGCG			
F1b	GAGACTTGAGGCTGACeGCA	2551, G/A	234/230	60.0
R1	FAM-GCCGAGTCTGTCCAGGTGAGT			
F2a	tataaGAGGAGGCTAAGGACtGC			
F2b	GGAGGAGGCTAAGGACAGG	2639, C/G	146/142	58.0
R2	FAM-GCCGAGTCTGTCCAGGTGAGT			
F3a	tacaTCTGTAACATTGACGCAGACAA			
F3b	TCTGTAACATTGACGCAGgCAG	3247, A/G 3391, CACTCACTA/-	327/323, 318/314 327/318, 323/314	60.0
R3	FAM-CTGTCGGATGAAGCAGGCCAC			
F5a	taaaTGACCAAACAACACCAGAaGT			
F5b	TGACCAAACAACACCAGACGG	5197, T/G	254/250	58.0
R5	HEX-AATGGTGTGCGTTCTGGATG			
F6a	tataTGGCAGAGCAGTGAGTGAGTTA			
F6b	TGGCAGAGCAGTGAGTGAGTTG	5897, A/G	135/131	58.0
R6	HEX-CCCGTTGGTCCAGTTATTATTTC			

注: 小写字母为人为引入的错配碱基。

Note: The deliberate introduction mismatch is shown with the lowercase.

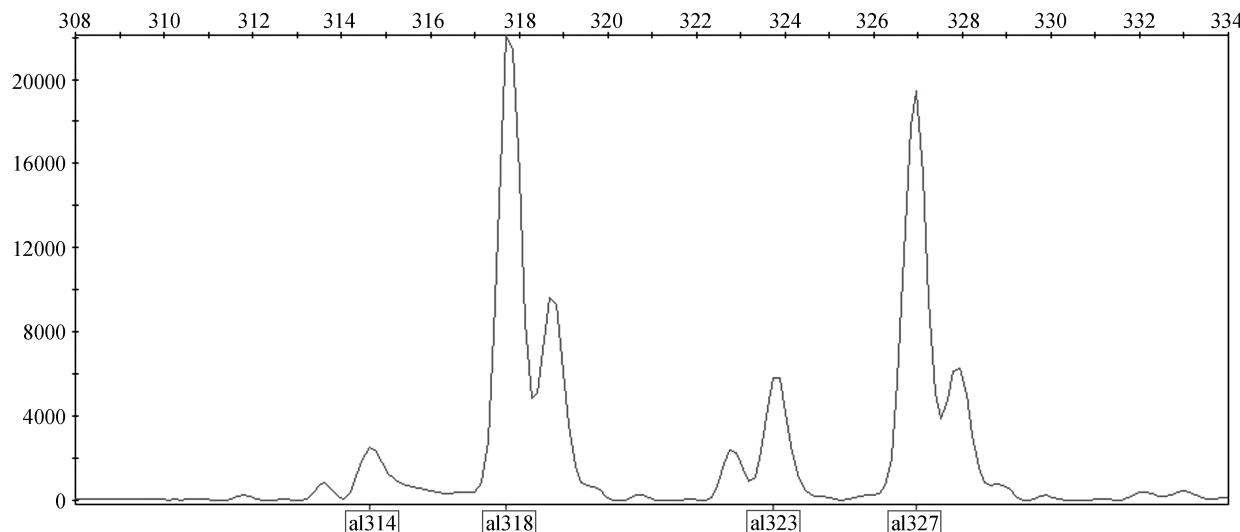


图 1 草鱼 *PRL* 基因 3247A>G 和 3391->+位点的基因分型图

Fig. 1 Genotyping map of sites 3247A>G & 3391->+ of *PRL* gene in *Ctenopharyngodon idella*

其中 3 个变异位点($2639G>C$ 、 $3391->+$ 和 $5197T>G$)具有中等水平多态性($0.25 < \text{PIC} < 0.5$)^[23]，而 $5897G>A$ 多态性较低($\text{PIC} < 0.25$)。

2.3 草鱼 *PRL* 基因变异位点与生长性状和肌肉成分的相关性

统计分析中，舍弃突变个体数低于样本量

5% 的 2 个 *PRL* 基因变异位点($2551G>A$ 和 $5897G>A$)；其余 4 个变异位点与草鱼生长性状和肌肉成分的 GLM 统计分析及多重比较结果如表 4 所示。研究发现，4 个变异位点不同基因型在肥满度和肌肉粗脂肪性状上均无显著差异($P > 0.05$)， $3247A>G$ 的基因型对生长性状和肌肉成分

表 3 草鱼 PRL 基因变异位点多态性信息
Tab. 3 Polymorphism information for variable sites of PRL gene in *Ctenopharyngodon idella*

位点 variable site	基因型 genotype	样本数/频率 number/frequency	等位基因/频率 allele/frequency	多态性信息含量 PIC
2551G>A	GG	168/0.98	G/0.99	0.02
	GA	4/0.02	A/0.01	
2639G>C	GG	107/0.62	G/0.76 C/0.24	0.30
	GC	46/0.27		
	CC	19/0.11		
3247A>G	AA	157/0.91	A/0.96	0.08
	AG	15/0.09	G/0.04	
339I->+	--	58/0.34	-/0.59 +/0.41	0.37
	-+	88/0.51		
	++	26/0.15		
5197T>G	TT	104/0.60	T/0.65 G/0.34	0.35
	TG	14/0.08		
	GG	54/0.31		
5897G>A	GG	169/0.98	G/0.99 A/0.01	0.02
	GA	2/0.01		
	AA	1/0.01		

表 4 草鱼 PRL 基因变异位点基因型与生长性状及肌肉成分相关分析
Tab. 4 Association of PRL gene polymorphism with growth traits and flesh components in *Ctenopharyngodon idella*

位点 locus	基因型 genotype	体长/cm standard length	体重/g body weight	肥满度/% condition factor	粗脂肪含量/% fat content	粗蛋白含量/% protein content
2639G>C	GG	8.90±0.16 ^a	16.21±1.26 ^a	2.02±0.02	1.77±0.08	15.07±0.23 ^b
	GC	8.04±0.16 ^b	10.87±0.74 ^b	1.96±0.03	1.61±0.11	15.43±0.36 ^b
	CC	8.56±0.17 ^{ab}	13.26±0.87 ^{ab}	2.06±0.03	1.98±0.23	17.01±0.62 ^a
3247A>G	AA	8.60±0.12	14.42±0.90	2.01±0.02	1.74±0.07	15.46±0.19
	AG	8.92±0.31	14.84±1.75	1.97±0.05	1.84±0.21	14.53±0.78
339I->+	--	8.15±0.13 ^b	11.34±0.63 ^c	1.98±0.03	1.71±0.11	15.89±0.35
	-+	8.75±0.16 ^a	14.93±1.08 ^b	2.02±0.02	1.75±0.09	15.18±0.24
	++	9.30±0.40 ^a	19.81±3.67 ^a	2.04±0.04	1.82±0.14	14.89±0.55
5197T>G	TT	8.95±0.17 ^a	16.59±1.29 ^a	2.03±0.02	1.76±0.08 ^{ab}	15.02±0.23
	TG	7.94±0.18 ^b	10.20±0.79 ^b	2.00±0.02	2.12±0.30 ^a	16.12±0.80
	GG	8.19±0.13 ^b	11.45±0.62 ^b	1.98±0.03	1.63±0.11 ^b	15.87±0.34

注: 同一位点中同列的不同小写字母表示差异显著($P<0.05$).

Note: Different superscript letters in the column of each locus indicate significant difference ($P<0.05$).

均无显著影响($P>0.05$); 2639G>C、339I->+和5197T>G 的基因型对草鱼的体长和体重性状存在显著性影响($P<0.05$); 2639G>C 的基因型对草鱼肌肉粗蛋白含量存在显著影响($P<0.05$)。多重比较显示, 2639G>C 和 5197T>G 突变型个体的体长和体重不同程度低于野生型个体, 而 339I->+突变型(-+和++)个体的体长和体重显著高于野生型

(--)个体($P<0.05$); 2639G>C 纯合突变型(CC)个体的肌肉粗蛋白含量显著高于其他基因型(GC 和 GG)个体($P<0.05$); 5197T>G 突变型(TG 和 GG)个体的肌肉粗脂肪含量与野生型(TT)个体差异均不显著($P>0.05$), 而杂合突变型(TG)个体的肌肉粗脂肪含量显著高于纯合突变型(GG)个体($P<0.05$)。

将对生长性状和肌肉成分有显著影响的 3 个变异位点两两组合, 舍弃个体数低于样本量 5% 的组合, 并与草鱼生长性状和肌肉成分开展相关性分析, 结果如表 5 所示。研究发现, 含 339I->+& 2639G>C 的 CC 突变型的组合对应粗脂肪含量和粗蛋白含量普遍较高, 其中粗蛋白含量显著高于其他组($P<0.05$)。

表 5 草鱼 *PRL* 基因变异位点组合基因型与生长性状及肌肉成分相关分析

Tab. 5 Association of *PRL* gene pairwise loci genotypes with growth traits and flesh components in *Ctenopharyngodon idella*

位点组合 pairwise loci	基因型 genotype	体长/cm standard length	体重/g body weight	肥满度/% condition factor	粗脂肪含量/% fat content	粗蛋白含量/% protein content
& 339I->+ 2639G>C	GG&-+	8.77±0.16 ^a	15.05±1.14 ^b	2.02±0.02	1.73±0.09 ^{ab}	15.08±0.25 ^b
	GG&++	9.30±0.45 ^a	20.28±4.14 ^a	2.05±0.04	1.88±0.16 ^{ab}	15.11±0.60 ^b
	GC&- -	7.94±0.16 ^b	10.48±0.74 ^c	1.97±0.04	1.55±0.11 ^b	15.49±0.39 ^b
	CC&- -	8.58±0.20 ^{ab}	13.22±1.00 ^{bc}	2.03±0.04	2.11±0.28 ^a	17.23±0.70 ^a
2639G>C & 5197T>G	GG&TT	8.92±0.17 ^a	16.46±1.34 ^a	2.03±0.02	1.75±0.08 ^{ab}	14.97±0.23 ^b
	GC&GG	7.98±0.17 ^b	10.48±0.78 ^b	1.94±0.04	1.46±0.09 ^b	15.28±0.37 ^b
	CC&TT	8.55±0.18 ^{ab}	13.17±0.91 ^{ab}	2.05±0.04	2.04±0.25 ^a	17.27±0.63 ^a
339I->+ & 5197T>G	-&GG	8.12±0.14 ^b	11.11±0.63 ^b	1.97±0.03	1.63±0.11	15.84±0.36
	-+&TT	8.78±0.18 ^a	15.26±1.23 ^a	2.02±0.02	1.70±0.09	14.97±0.25
	++&TT	9.35±0.42 ^a	20.19±3.80 ^a	2.04±0.04	1.85±0.15	14.91±0.57

注: 相同两位点组合中同列的不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different superscript letters in the column of the same two locus indicate significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 AS-PCR 在草鱼 *PRL* 基因多态性检测中的应用

目前 SNP 的检测方法有很多^[24], 较常用的有直接测序法、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和单链构象多态性(single-strand conformational polymorphism, SSCP)检测法等。其中, 直接测序法结果准确, 能确定变异类型及位置, 但测序成本高, 而且杂合型不易分辨; RFLP 和 SSCP 检测成本相对较低, 但都无法确定具体突变类型及位置, 而且前者只适用于对酶切位点处的 SNP 检测, 检出效率相对较低。AS-PCR 又称扩增阻碍突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)^[14], 在对 SNP 位点的检测中具有简便快捷和成本低廉等优点, 目前在农业领域的相关研究中已有应用^[25-26]。

AS-PCR 的核心技术是 2 条与突变位点特异性结合引物的设计。本研究根据变异位点位置及突变类型, 在 2 条特异性引物 3'末端设计互补配对碱基, 以保证 3'末端分别与突变型和野生型完全结合; 为提高扩增特异性, 在特异性引物 3'端

第 3 bp 或第 4 bp 引入错配碱基^[20]; 为区分突变型和野生型扩增产物的长度, 在其中 1 条特异性引物 5'端添加类似“TATA”的 4 bp 碱基^[27], 为了确保同一反应体系中引物的退火温度差异较小, 设计中还引入了错配碱基。共用引物设计在与特异引物距离 100~350 bp 的位置, 并在 5'端进行 HEX 或 FAM 荧光修饰, 且各组 AS-PCR 扩增的目的片段存在长度差异。本研究基于 AS-PCR 和基因分型技术将草鱼 *PRL* 基因 6 个变异位点(5 个 SNP 和 1 个插入/缺失变异位点)均以长度差异条带呈现, 根据扩增片段大小和荧光颜色, 通过 1 次基因分型便可获得各位点的基因型信息。相比直接测序等方法, AS-PCR 结合基因分型技术, 适用于对已知突变位点的验证和基因型分析, 易于实现批量化操作, 从而提高检测效率并降低实验成本。

3.2 草鱼 *PRL* 基因多态性与生长性状和肌肉成分的关联性

本研究通过直接测序法在草鱼 *PRL* 基因中预筛选到 11 个潜在变异位点, 均位于内含子区域或非编码区。这可能是因为这些区域不参与氨基酸编码, 与外显子相比受到的选择压力较小, 变异

更容易积累^[28]。本研究发现部分变异位点多态性与草鱼生长性状和肌肉成分存在显著关联, 推测这些变异位点尽管均位于非编码区, 不影响基因的蛋白编码, 但可能在基因转录及 mRNA 剪切时发挥一定作用^[29], 从而影响催乳素的表达水平。从催乳素作为重要生长因子的生物学功能^[7]来看, 推测其含量的变化可能造成生长表型的差异, 这可能就是诸多研究发现 PRL 基因多态性与动物生长性状相关联^[11–13]的原因。尽管, 如 Udina 等^[30]的研究也发现牛的肉质与催乳素基因多态性存在一定关联, 但其中相关机制尚不明确, 有待进一步研究。

本研究与 Streelman 等^[12]和 He 等^[13]的研究结果相似, 均发现 PRL 基因多态性与鱼体生长性状存在显著关联。研究发现, 草鱼 PRL 基因 3 个变异位点(2639G>C、339I->+ 和 5197T>G)对幼鱼生长性状存在显著影响, 其中 2639G>C 和 5197T>G 突变型个体在体长和体重上均不同程度低于野生组, 为生长性状的不利突变; 339I->+ 处突变型个体在体长和体重上均显著高于野生型, 为生长性状的有利突变。目前, 功能基因多态性与鱼体肌肉成分的关联性研究相对较少。本研究中草鱼 PRL 基因 2639G>C 多态性对幼鱼肌肉的蛋白含量有显著影响, 其纯合突变型个体显著高于野生型个体, 推测为蛋白积累的有利基因型。基于位点两两组合的关联分析发现类似结果, 含 339I->+ 纯合突变的组合在生长性状上存在优势; 含 2639G>C 纯合突变的组合的肌肉粗脂肪和粗蛋白含量较高; 此外, 不同位点组合基因型对粗脂肪含量差异存在显著影响, 推测位点间可能存在协同或颉颃效应^[31]。综上所述, 本研究发现草鱼 PRL 基因多态性与幼鱼某些生长性状及肌肉成分存在显著关联, 为进一步对相关变异位点的功能验证奠定了研究基础, 有望为草鱼生长和肉质改良等研究提供候选辅助标记。

参考文献:

- [1] FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2012[M]. Rome: FAO, 2012.
- [2] Gui J F, Zhu Z Y. Molecular basis and genetic improvement of economically important traits in aquaculture animals[J]. Chin Sci Bull, 2012, 57(15): 1751–1760.
- [3] Cao T T, Bai J J, Yu L Y, et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of carboxypeptidase A1 gene (*CPA1*) segments and their association with the growth traits of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2012, 20(3): 301–307. [曹婷婷, 白俊杰, 于凌云, 等. 草鱼羧肽酶 A1 基因(*CPA1*)部分片段的单核苷酸多态性(SNP)多态性及其与生长性状的关联分析[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(3): 301–307.]
- [4] Cao T T, Bai J J, Yu L Y, et al. Polymorphisms of SNPs in *ALDO B* gene and association analysis with growth traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(4): 481–488. [曹婷婷, 白俊杰, 于凌云, 等. 草鱼醛缩酶 B 基因部分序列的 SNP 多态性及其与生长性状的关联分析[J]. 水产学报, 2012, 36(4): 481–488.]
- [5] Fan J J, Liu X X, Bai J J, et al. Detection of SNP incite synthase gene and association analysis with growth traits in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2014, 33(3): 84–89. [樊佳佳, 刘小献, 白俊杰, 等. 草鱼柠檬酸合酶基因 SNP 筛选及与生长性状的关联分析[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(3): 84–89.]
- [6] Liu X X, Bai J J, Xu L, et al. SNPs in exon 1, exon 2 of *GSTR* gene and its relationship with growth traits in grass carp[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2011, 30(6): 753–758. [刘小献, 白俊杰, 徐磊, 等. 草鱼 *GSTR* 基因外显子 1、外显子 2 的 SNPs 筛选及其与生长性状的关联分析[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(6): 753–758.]
- [7] Zhang Y, Guo D Z. Progress on structure and function of prolactin[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2007, 28(5): 49–52. [张耀, 郭定宗. 催乳素结构与功能研究进展[J]. 动物医学进展, 2007, 28(5): 49–52.]
- [8] Brym P, Kamiński S, Wójcik E. Nucleotide sequence polymorphism within exon 4 of the bovine prolactin gene and its associations with milk performance traits[J]. J Appl Genet, 2005, 46(2): 179–185.
- [9] Lv A, Hu X, Chen H, et al. Single nucleotide polymorphisms in bovine *PRL* gene and their associations with milk production traits in Chinese Holsteins[J]. Mol Biol Rep, 2010, 37(1): 547–551.
- [10] Dybus A. Associations of growth hormone (*GH*) and prolactin (*PRL*) genes polymorphisms with milk production traits in polish Black-and-White cattle[J]. Anim Sci Pap Rep, 2002, 20: 203–212.
- [11] Zhao W M. Analysis on sequence and polymorphism of *GH*

- and *PRL* gene and its relationship with body weight and carcass traits in goose[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2008. [赵文明. 鹅 *GH*、*PRL* 基因序列及其多态性与早期生长发育及屠宰性状的关联分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2008.]
- [12] Streelman J T, Kocher T D. Microsatellite variation associated with prolactin expression and growth of salt-challenged tilapia[J]. *Physiol Genomics*, 2002, 9(1): 1–4.
- [13] He X P, Xia J H, Wang C M, et al. Significant associations of polymorphisms in the *prolactin* gene with growth traits in Asian seabass (*Lates calcarifer*)[J]. *Anim Genet*, 2012, 43(2): 233–236.
- [14] Newton C R, Graham A, Heptinstall L E, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)[J]. *Nucl Acids Res*, 1989, 17(7): 2503–2516.
- [15] Fu J J, Wang R Q, Shen Y B, et al. Genetic variation analysis based on D-Loop sequences of wild populations of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) in China[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(2): 349–357. [傅建军, 王荣泉, 沈玉帮, 等. 我国草鱼野生群体D-Loop序列遗传变异分析[J]. 水生生物学报, 2015, 39(2): 349–357.]
- [16] Cheng H L, Jiang F, Peng Y X, et al. Comparison of nutrient composition of muscles of wild and farmed grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Food Science*, 2013, 34(13): 266–270. [程汉良, 蒋飞, 彭永兴, 等. 野生与养殖草鱼肌肉营养成分比较分析[J]. 食品科学, 2013, 34(13): 266–270.]
- [17] Rivero E R C, Neves A C, Silva M G. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues[J]. *Pathol Res Pract*, 2006, 202(7): 523–529.
- [18] Lalitha S. Primer premier 5[J]. Biotech Softw Internet Rep, 2000, 1(6): 270–272.
- [19] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucl Acids Symp Ser*, 1999, 41: 95–98.
- [20] Wang R H, Liu L M, Zhao J L, et al. A new method for SNP typing based on allele specific PCR[J]. *Journal of Forensic Medicine*, 2008, 24(3): 189–193. [王瑞恒, 刘利民, 赵金玲, 等. 基于等位基因特异性PCR原理建立的SNP分型新方法[J]. 法医学杂志, 2008, 24(3): 189–193.]
- [21] Kalinowski S T, Taper M L, Marshall T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. *Mol Ecol*, 2007, 16(5): 1099–1106.
- [22] Cleophas T J, Zwinderman A H. SPSS for Starters[M]. Netherlands: Springer, 2010.
- [23] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314–331.
- [24] Liu F P, Bai J J. Single nucleotide polymorphisms and its application in genetic breeding of aquatic animals[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(4): 704–712. [刘福平, 白俊杰. 单核苷酸多态性及其在水产动物遗传育种中的应用[J]. 中国水产科学, 2008, 15(4): 704–712.]
- [25] Wei B, Jing R L, Wang C S, et al. Assaying single nucleotide polymorphism in wheat (*Triticum aestivum* L.) with allele-specific PCR[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(7): 1313–1320. [卫波, 景蕊莲, 王成社, 等. 用等位基因特异PCR检测普通小麦(*Triticum aestivum* L.)的单核苷酸多态性[J]. 中国农业科学, 2006, 39(7): 1313–1320.]
- [26] Zhang J Y, Wang Q Y, Wang W J, et al. Tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction in SNP genotyping of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(4): 751–759. [张建勇, 王清印, 王伟继, 等. 四引物扩增受阻突变体系PCR技术在中国明对虾SNP基因分型中的研究[J]. 中国水产科学, 2011, 18(4): 751–759.]
- [27] Rust S, Funke H, Assmann G. Mutagenically separated PCR (MS-PCR): a highly specific one step procedure for easy mutation detection[J]. *Nucl Acids Res*, 1993, 21(16): 3623–3629.
- [28] Zhao Z, Fu Y, Hewett-Emmett D, et al. Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution[J]. *Gene*, 2003, 312(30): 207–213.
- [29] Brookes A. The essence of SNPs[J]. *Gene*, 1999, 234(2): 177–186.
- [30] Udina I G, Turkova S O, Kostiuchenko M V, et al. Polymorphism of cattle *prolactin* gene: microsatellites, PCR-RFLP[J]. *Genetika*, 2001, 37(4): 511–516.
- [31] Li H X, Li J L, Tang Y K, et al. Correlation analysis between body weight gain and *ODC1* genotypes in *Cyprinus carpio* var. Jian[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(3): 414–421. [李红霞, 李建林, 唐永凯, 等. 建鲤 *ODC1* 基因型与增重的相关性分析[J]. 水生生物学报, 2014, 38(3): 414–421.]

Polymorphisms of the *PRL* gene and their associations with growth traits and flesh components in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idella*

FU Jianjun^{1,2}, ZHANG Meng¹, SHEN Yubang¹, CHEN Yong³, XU Xiaoyan¹, LI Jiale¹

1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

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

3. Aquatic Engineering Technology Research Center, Tongwei Group Co., Ltd., Chengdu 610093, China

Abstract: We analyzed the associations between the polymorphisms of the *PRL* (prolactin) gene and the growth traits and flesh components of the grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Six variable sites with mutation rates exceeding 30% were detected in 10 individuals by sequencing the full length of the *PRL* gene. These included five single-nucleotide polymorphic loci and one insert mutation (-CACTCACTA), designated 2551G>A, 2639G/C, 3247A>G, 5197T>G, 5897G>A, and 3391->+, respectively. The polymorphisms at the variable sites were examined in 192 juvenile *C. idella* using allele-specific PCR and genotyping. The associations between the polymorphisms at these loci and the growth traits and flesh components of the fish were analyzed with general linear models. The polymorphisms at three loci (2639G>C, 3391->+, and 5197T>G) and one locus (2639G>C) were significantly associated with growth traits and the flesh protein content ($P<0.05$), respectively. Multiple comparisons of the traits were made with the genotypes at each locus. The standard length and bodyweight of individuals with the mutant genotypes (-+ and ++) at 3391->+ were significantly higher than those of individuals with the wild-type genotype (--) ($P<0.05$). In contrast, the standard length and bodyweight of individuals with the mutant genotypes at 2639G>C (GC) and 5197T>G (TG and GG) were significantly lower than those of individuals with the wild-type genotypes at 2639G>C (GG) and 5197T>G (TT) ($P<0.05$). For the, Individuals with the mutant genotype CC at 2639G>C had significantly higher flesh protein content than individuals with the other genotypes (GG and GC) ($P<0.05$). Similar results were found in multiple comparisons for the traits of two loci groups. The standard length and bodyweight of individuals that contained mutant genotypes (-+ and++) at 3391->+ were generally higher than those of individuals with the wild-type genotype (--) . The fat and protein contents of individuals that contained the mutant genotype CC at 2639G>C were generally higher than those of individuals with the other genotypes (GG or GC), and the protein contents were significantly different ($P<0.05$). Overall, there were significant associations between the polymorphisms of the *PRL* gene and the growth traits and flesh components of *C. idella*. Therefore, the different variable sites in the *PRL* gene might have utility as markers for practical breeding programs for growth traits and flesh components in *C. idella*.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *PRL* gene; polymorphism; growth trait; flesh component; association

Corresponding author: LI Jiale. E-mail: jlli2009@126.com