

吉富罗非鱼 *MSTN* 基因结构及其多态性与生长性状的相关性

唐永凯¹, 李建林¹, 俞菊华¹, 陈雪峰², 李红霞¹

(1. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081; 2. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘要: 通过 PCR 和基因组步移法, 从吉富罗非鱼 DNA 中扩增出肌细胞生长抑制素(MSTN)基因及其 5' 调控区。该序列全长 2 413 bp, 含有 3 个外显子, 2 个内含子。5' 调控区 462 bp, 外显子 I 379 bp, 外显子 II 371 bp, 部分外显子 III 145 bp, 内含子 I 305 bp, 内含子 II 751 bp, 编码区共编码 298 个氨基酸。5' 调控区含有与肌肉特异性基因转录密切相关的转录调控元件 E-box 以及其他一些转录调控元件, 如 TATA box, OCT1, AP1, AP4。通过随机测序法寻找 SNPs (Signal nucleotide polymorphisms), 获得了 3 个 SNPs, 但在群体筛选中, 只有内含子 II 内的 1 个 SNPs 表现多态性。同时测量了 96 尾(45♂, 51♀)吉富罗非鱼的体质量、体长、体高、体厚, 并将这些数据与 *MSTN* 基因的 SNPs 多态性进行相关性分析, 研究发现 *MSTN* 基因内含子 II 的 728 nt 处 G/T 多态与吉富罗非鱼体型(体厚/体长、体高/体长)存在显著相关($P < 0.05$)。这些研究结果表明, *MSTN* 基因的 SNPs 可作为吉富罗非鱼育种的候选分子标记。[中国水产科学, 2010, 17(1): 44-51]

关键词: 吉富罗非鱼; *MSTN* 基因; SNPs; 生长性状

中图分类号: S91

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)01-0044-08

肌细胞生长抑制素(Myostatin, MSTN)又称 GDF-8 (Growth differentiation factor 8), 是近年来发现的一类重要的肌细胞生长负向调控因子, 属于转化生长因子超家族(Transforming growth factor- β superfamily, TGF- β), 通过抑制生肌决定因子(Myogenic determination gene, MyoD)家族成员转录活性来控制肌细胞的生长发育, 它的表达量与肌肉质量的变化呈负相关^[1-2]。通过基因打靶技术敲除小鼠体内 *MSTN* 使其不能发挥作用, 结果发现突变型小鼠的体型显著大于野生型^[3-4]。在比利时蓝牛(Belgian Blue)和皮尔蒙特牛(Piedmontese)上, *MSTN* 的突变导致蛋白活性区的移码突变, 不能形成成熟的 MSTN 蛋白, 结果引起动物肌肉的过度发育, 表现为肌纤维直径变大或肌纤维数增加, 动物出现“双肌”症状^[5]。鱼类 *MSTN* 基因的研究也较多, 目前已克隆出了虹鳟

(*Salmo gairdneri*)、斑马鱼(*Brahydanio rerio*)、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)、金头鲷(*Sparus aurata*)、鲈(*Morone chrysops*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax* L.)、真鲷(*Pagrosomus major*)等鱼类的 *MSTN*^[6-11]。与其他动物类似, 鱼类 *MSTN* 氨基酸序列都有信号肽序列、保守的半胱氨酸残基和 RXXR 蛋白水解位点等特征, 但其表达不仅仅局限于骨骼肌上, 在脑、肠、鳃、舌、眼、卵巢、皮肤等部位都有较强的表达^[6-7, 12-13]。仅对少数几种鱼的 *MSTN* 基因结构进行了分析^[7, 11]。鱼类的 *MSTN* 和哺乳动物 *MSTN* 结构相似, 都是由 3 个外显子和 2 个内含子所组成, 但目前还未见有关吉富罗非鱼 *MSTN* 基因结构及其 5' 调控区的研究报道。

单核苷酸多态 (Signal nucleotide polymorphisms, SNPs) 是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所

收稿日期: 2009-06-08; 修订日期: 2009-11-26.

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项目(2009JBFB05, 2009JBFC02); 国家科技基础条件平台项目(2007DKA30470_003)。

作者简介: 唐永凯(1978-), 男, 助理研究员, 主要从事鱼类遗传育种研究. E-mail: tangyk@ffrc.cn

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

引起的一种 DNA 序列多态性,是继限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)、简单串联重复序列(Simple tandem repeat, STR)之后的第三代分子遗传标记,在人类遗传性疾病的病因诊断、治疗和防治方面已受到广泛的重视^[14]。在动物育种方面,SNPs 作为一种分子标记在分子标记辅助育种中也得到了广泛的应用,将 SNPs 与经济性状进行相关性分析,寻找影响性状的主效基因或与主效基因紧密连锁的候选基因,然后将其运用于后续的育种实践中^[15-16]。在畜禽上,*MSTN* 基因的 SNPs 普遍存在,而且有些位点和动物经济性状存在着显著性的相关^[17-18]。而在水产动物中,*MSTN* 的 SNPs 与生长性状是否存在相关性还未见报道。吉富罗非鱼(Genetically improved farmed tilapia, GIFT)是通过家系选育获得的优良品系,其生长速度高于其他类养殖罗非鱼,具有重要的经济价值^[19-20]。本研究旨在通过克隆吉富罗非鱼的 *MSTN* 基因、分析其基因结构,寻找 SNPs;通过四引物扩增受阻突变体系 PCR 法(Tetra-primer PCR method and the amplification refractory mutation system, tetra-primers ARMS)^[21]检测其 SNPs;同时将生长相关性状和 SNPs 进行关联分析,确立成熟的分子标记辅助选择方案,这无疑将对吉富罗非鱼的育种工作做出较大贡献。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 2006 年 8 月,60 个家系的吉富罗非鱼鱼苗由世界渔业中心运送到中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴实验基地,分池养至 100 g 左右再用 PIT 标记,然后放入同一池塘养殖。2007 年 6 月测量鱼体长、体质量、体高等生长参数,随机取 96 尾(45♂,51♀)用于实验分析。

1.1.2 试剂 LA PCRTM *in vitro* cloning kit、限制性内切酶、pMD18-T 载体、胶回收试剂盒等购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒抽提试剂盒、*Taq* 酶购自上海捷瑞生物工程有限公司;大肠杆菌 JM109 为本实验室保存。

1.1.3 引物 用于实验的所有引物见表 1,碱基位

置以序列(GenBank accession number: FJ972683) 5'端第 1 个碱基为“1”计算。根据莫桑比克罗非鱼 *MSTN* 的 cDNA (GenBank accession number: AF197193)以及其他鱼类 *MSTN* 的 cDNA 和 DNA 序列设计引物,分段扩增吉富罗非鱼 *MSTN* 序列,共获得 3 个外显子,2 个内含子。其中引物 F1 和 R1 扩增 exon I-intron I 片段,引物 F2 和 R2 扩增 exon II 片段,引物 F3 和 R3 扩增 intron II 片段。根据获得的序列设计扩增 5'调控区的引物 R4 和 R5。根据获得的 SNPs,设计 Tetra-primers ARMS 引物 FIP、RIP、FOP、ROP,所有引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 从鱼尾静脉抽血 0.2~0.5 mL,用经典的酚-氯仿法抽提 DNA,并溶解于 1×TE 中。电泳检测 DNA 质量,在紫外分光光度计(Eppendorf)上测定 DNA 浓度, DNA 使用液浓度为 50 ng/μL。

1.2.2 *MSTN* 基因的分离 根据设计的引物分别扩增出吉富罗非鱼 *MSTN* 内含子、外显子序列,然后将其拼接。反应条件为: 94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 55~58℃ 1 min, 72℃ 1~2 min, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。5'调控区序列扩增方法按 LA PCRTM *in vitro* cloning kit 使用说明进行。扩增液用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离,切下含有目的条带的胶,用胶回收试剂盒回收产物,将产物和 pMD18-T 载体连接,然后转化到大肠杆菌感受态细胞中,蓝白斑法筛选阳性克隆,酶切鉴定目的产物,送南京博亚生物有限公司测序。

1.2.3 SNPs 位点的查找及检测 将上述扩增 *MSTN* 内显子、外显子的引物在 10 个随机选取的个体中扩增,经克隆、测序比对,寻找 SNPs 位点。根据找到的 SNPs 位点,设计 Tetra-primers ARMS 引物,检测吉富罗非鱼群体内 SNPs。

1.2.4 序列分析和数据处理 序列拼接以及分析使用 DnaStar 软件,序列比对使用 ClustalW 软件。启动子预测使用 TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 以及 TESS (<http://>

表 1 克隆吉富罗非鱼 *MSTN* 基因以及检测其 SNPs 的引物
Tab. 1 Primers used for *MSTN* cloning and SNPs detection in genetically improved farmed tilapia (GIFT)

引物 Primer	序列 Sequence	位置/nt Position	产物 Product
F1	GAGACAATGCATCTGTCTCAGATCG	457-481	exon I-intron I 767 bp
R1	GCGACTGGCTTGAAACTTCTGC	1202-1223	
F2	ATTTTCTTTTCCCATGTCTCCG	1122-1143	exon II 477 bp
R2	AAACGATGAACAATAGGTGGAGC	1576-1598	
F3	CACATACGAATCCGCTCCTTGA	1326-1347	intron II 1088 bp
R3	GAGGACTTTGGCTGGGACTGGA	2392-2413	
R4	TCGCGTTTAATCGCATGGTTTAAATCTGC	606-634	5' -flanking region 506 bp
R5	GCAGTCAGCAAGCTCAGATACAGCAGCATC	477-506	
FIP	CCTCCTGCAAAGCTGTTATTTCAAATCGT	2216-2245	SNPs in intron II
RIP	CGGTTGCTGAAACAAGAGAGTGTGTGTAAAC	2245-2274	
FOP	AGCTCTAATAATGGCACCCGGGCACTG	2301-2327	
ROP	CCACAGTGAGTGGGTAGCGACAGCAC	2358-2386	

www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess) 数据库。使用 SPSS 软件分析基因型与吉富罗非鱼增重和体型(体厚 / 体长, 体高 / 体长) 相关性。

2 结果与分析

2.1 吉富罗非鱼 *MSTN* 基因的分离和分析

使用引物 F1-R1、F2-R2、F3-R3、R4 和 R5 分别扩增吉富罗非鱼 exon I-intron I、exon II、intron II 和 5' 调控区序列, 获得 DNA 序列片段分别为 767 bp, 477 bp, 1 088 bp 和 506 bp, 经过拼接获得吉富罗非鱼 *MSTN* 基因, 全长 2 413 bp, 含有 3 个外显子和 2 个内含子。其子 5' 调控区 462 bp, exon I 379 bp, intron I 305 bp, exon II 371 bp, intron II 751 bp, 部分 exon III 145 bp。阅读框长 895 bp, 编码 298 个氨基酸, 内含子均符合 GT-AG 原则(图 1)。与奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) *MSTN* (GenBank accession number: AF197193)、莫桑比克罗非鱼 (*O. mossambicus orange*) *MSTN* (GenBank accession number: AH006117) 比对显示, 阅读框核苷酸序列长度一致, 相似性分别为 99.3%、98.9%, 编码的氨基酸序列相似性分别为 99%、97%。

使用 TFSEARCH 以及 TESS 在线分析吉富罗非鱼 *MSTN* 基因 5' 调控区序列的潜在调控位点, 结果显示 5' 调控区域存在 2 个与肌肉特异性基因转录密

切相关的转录调控元件 E-box, 还有其他多个转录调控元件如八聚体结合因子 1 (Octamer-binding factor 1, OCT1)、激动蛋白 1 (Activator protein 1, AP1)、AP4, 垂体特异性转录因子 (Pituitary-specific transcription factor 1, PIT1) 以及转录反应起始框 TATA box。

2.2 多态位点的查找及检测

使用扩增外显子、内含子的不同引物对, 分别在随机选取的 10 尾吉富罗非鱼基因组中扩增相应片段, 测序后使用 ClustalW 进行序列比对, 确定 SNPs 位点。结果显示, F2-R2 引物对扩增序列中存在 1 个 SNPs 位点 (41 nt T/C), 位于 exon II 中; F3-R3 引物对扩增序列中存在 2 个 SNPs 位点 (1 nt G/A, 728 nt G/T), 均位于 intron II 中; F1-R1 引物对扩增序列中不存在 SNPs 位点。

根据测序得到的 SNPs, 分别设计 Tetra-primers ARMS 引物, 检测吉富罗非鱼群体内 SNPs 位点。结果显示测序得到的部分 SNPs 为假阳性, 41 nt T/C 和 1 nt G/T 位点无多态性, 只有 intron II 的 728 nt G/T 位点显示多态性。当该位点为 G 时, 扩增产物为 247 bp, 当该位点为 T 时, 扩增产物为 176 bp, 2 个外引物扩增产物为 360 bp, 图 2 为部分个体的检测结果。

在检测的 96 尾吉富罗非鱼中, 基因型为 TT 型的有 53 尾, 其中雄鱼 29 尾; GT 型的有 43 尾, 其中雄鱼 24 尾; 未检测到 GG 型的个体 (表 2)。

ctgcagaaagacatgcgagcaagata**gactga**ctat**ggatatt**tttagagaagatacgcattgtaaagttaaga**aaatgaaga**atgcaacttt
 API OCT1 PIT1
 attcaagactgcattaaattattgttttgggtgatataaaacattgtctgagtgagattatcccgtcaag**cacatg**cccacagcctccgttccttatgg
 E-box
gttgacagcgaaaaaaagtttcatgtcagtcggttaaaattcattgttgcctgtccagccaatcatagattttgacgacacaaaaagaggctaaagt
 E-box
 ggag**tataaa**aaggcgcgctataaaactatgatgcctatcagtggtggacattaatccaacccagttcagtcgcat**cagctc**cgacacagt
 TATA box AP4
 gcaaaggatttttttaacaaacgtatttttaaccacactt cacacctaagagaca ATG CAT CTG TCT CAG ATC GTG CTG 24
 1 M H L S Q I V L 8
 25 TAT CTG AGC TTG CTG ATT GCG TTG GGT CCA GTA GTT CTG AGT GAC CAA GAG GCG CAC CAG 84
 9 Y L S L L I A L G P V V L S D Q E A H Q 28
 85 CAG CCT TCC GTC AGC ACC CCA GTA GAC ACG GAT CAA TGC GCT ACC TGC GAG GTC CGG CAG 144
 29 Q P S V S T P V D T D Q C A T C E V R Q 48
 145 CAG ATT AAA ACC ATG CGA TTA AAC GCG ATA AAG TCT CAG ATT CTG AGC AAG CTG CGA ATG 204
 49 Q I K T M R L N A I K S Q I L S K L R M 68
 205 AAG GGA GCT CCC AAC ATT AGC AGA GAG ATC GTG AAG CAG CTC CTG CCC AAA GCG CCG CCG 264
 69 K G A P N I S R E I V K Q L L P K A P P 88
 265 CTG CAG CAG CTT CTG GAT CAG TAC GAC GTG CTG GGA GAT GAC GAC AGG GAA GAA GTC CTG 324
 89 L Q Q L L D Q Y D V L G D D D R E E V L 108
 325 GAG GAC GAC GAC GAG CAC GCA ACC ACG GAG ACA ATT GTA ATG ATG GCA ACT GAA CCT GAT 384
 109 E D D D E H A T T E T I V M M A T E P D 128
 gtaagtgtgaattttctttttgtgtctctgctgagcgactcgaacgtctccaaaataagttttacgcacgtgtagagcgacagagagagtt
 tttagagagcactcagttttccaccaaggtttgtgtaaaatgttcatgtaaaagattcaaacactttatgagacatggtgtttggcgagagagtg
 gccgagtgattacgcatgattttacgcaatcatgcgcaaacgcgccactttattctcagcgatcatggaattaatttttccatgtctccgcag
 385 TCC GCT GTC CAG GTG GAC GGG CAA CCA AAG TGC TGC TTT TTC TCA ATT ACG CAG AAG TTT 444
 129 S A V Q V D G Q P K C C F F S I T Q K F 148
 445 CAA GCC AGT CGC GTA GTT CGA GCG CAG CTT TGG GTG CAT CTG CGT CCA TCG GAA GAA GTG 504
 149 Q A S R V V R A Q L W V H L R P S E E V 168
 505 ACC ACC GTG TTC CTG CAA ATC TCC CGG CTT ATA CCG GTC ACA GAC GGG AAC AGA CAC ATA 564
 169 T T V F L Q I S R L I P V T D G N R H I 188
 565 CGA ATC CGC TCC TTG AAG ATC GAC GTG AAT GCC GGG GCC AGC TCT TGG CAA AGT ATA GAC 624
 189 R I R S L K I D V N A G A S S W Q S I D 208
 625 GTC AAG CAA GTG TTG ACT GTG TGG CTG CGG CAG CCG GAG ACC AAC TGG GGC ATC GAG ATC 684
 209 V K Q V L T V W L R Q P E T N W G I E I 228
 685 AAC GCT TTC GAT TCG AGG GGA AAT GAC TTA GCT GTG ACC TTC GCA GAG CCG GGA GAG GAG 744
 229 N A F D S R G N D L A V T F A E P G E E 248
 745 GGT CTGgtgagctcaactttactgaaatttaacaggagctgtgtgtaagtcttcaacttgaacgatgaacaataggtgagcttggtctcata
 tgtgcagagcagttattgtcgttctgtcacaatcggtgcatacttagccatttccaaagcgctaaagttcagaaaaactgttaatgcgtctctgtacaga
 ggggtgagactttaacttacagtggtgcagagaggtgtgagcagcaggcggttaaacattcctgcatttcactgctggaagaagggaattgggat
 ataaaaagactttgaaagctgttaatacacacagactccatgtaggcgacacactgcatttggacaagcgccgggtccacaataacctcaaatcttat
 tgccttgattacataaaagtccactgctccacattcctttaagtattcagtggtgtgcaaatcagagtaattgccggcacatacacacacagagcta
 ctatcaatgacaaacatacatcacagagctctaataatggcaccggcactggggcaattagaataactagacagctgtggctaaccaaccatcag
 atttaattctgcataactcaagtttcataatattatcgtgccatgtttgaaaactgactcccagggcgagggattaaaagatgaaaagctgaatga
 tgcgtgcaccggcctcctcctgcaaaagctgtttatttcaattggtcacacacactctctgtttcagCAA CCG TTC ATG GAG GTG AAG771
 249 G L Q P F M E V K 257
 772 ATT TCA GAG GGC CCC AGG CGT GCC CGG AGA GAC TCG GGC CTG GAC TGC GAT GAG AAC TCT 831
 258 I S E G P R R A R R D S G L D C D E N S 277
 832 CCA GAG TCC CGG TGC TGT CGC TAC CCA CTC ACT GTG GAC TTC GAG GAC TTT GGC TGG GAC 891
 278 P E S R C C R Y P L T V D F E D F G W D 297
 892 TGG A 895
 298 W 298

图1 吉富罗非鱼 *MSTN* 基因及推导的氨基酸序列

5' 调控区及内含子用小写字母表示,外显子用大写字母表示,转录因子结合位点用方框表示,SNP 位点以阴影表示。

Fig. 1 Genomic and deduced amino acid sequences of *MSTN* in genetically improved farmed tilapia (GIFT)

The introns and 5'-flanking region were shown with small letters, and the exons were shown with capital letters. The putative transcription factor binding sites in 5'-flanking region are in frames. SNP was shown in shade.

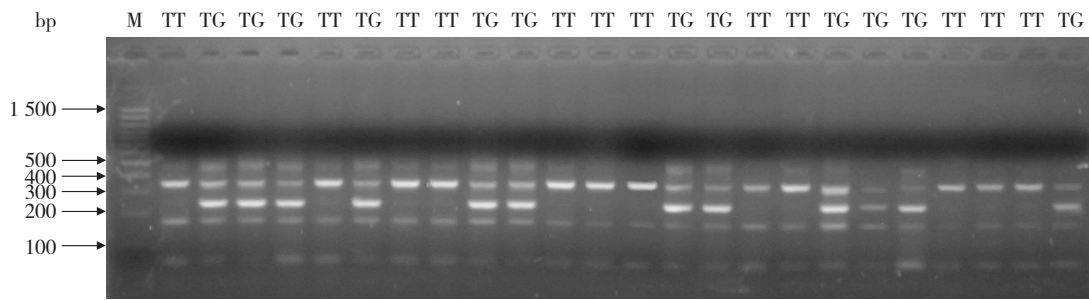


图2 吉富罗非鱼 *MSTN* intron II Tetra-primers ARMS 检测结果
Fig.2 SNPs analysis of *MSTN* intron II through Tera-priemrs ARMS in GIFT

表2 吉富罗非鱼 *MSTN* 基因型频率和基因频率
Tab.2 Genotype and allele frequencies of *MSTN* gene in GIFT

基因型 Genotype	样本数 Sum of samples	基因型频率 Genotype frequency	等位基因 Allele	基因频率 Allele frequency
TT	53	0.552	T	0.776
GT	43	0.448	G	0.224

2.3 多态位点与生长性状的相关性

由于 *MSTN* 的 intron II 只存在 2 种基因型,故采用独立样本 T 检验,结果显示基因型为 TT 的雄鱼体厚 / 体长值显著高于 GT 型的个体 ($P<0.05$),基因型为 GT 的雌鱼体高 / 体长值显著高于 TT 型的个体 ($P<0.05$)。

表3 不同基因型的吉富罗非鱼体质量和体型
Tab.3 The value of body weight and body shape with different genotype in GIFT

性别 Sex	性状 Traits	基因型 Genotype	
		TT	GT
雄 Male	体质量 (Weight)	519.88 ± 131.25	458.81 ± 127.66
	体高 / 体长 (Height/Length)	0.37 ± 0.058	0.38 ± 0.014
	体厚 / 体长 (Thickness/Length)	0.21 ± 0.020*	0.19 ± 0.019
	体质量 / 体长 (Weight/Length)	21.23 ± 4.09	19.02 ± 3.7
雌 Female	体质量 (Weight)	345.83 ± 68.05	353.55 ± 65.85
	体高 / 体长 (Thickness/Length)	0.37 ± 0.018*	0.38 ± 0.017
	体厚 / 体长 (Thickness/Length)	0.19 ± 0.035	0.19 ± 0.012
	体质量 / 体长 (Weight/Length)	15.16 ± 3.52	16.13 ± 2.01

注: 同行中 * 表示 2 种基因型间差异显著 ($P<0.05$)。
Note: * in the same line represents significant difference between two genotypes ($P<0.05$) .

3 讨论

本研究首次分离了吉富罗非鱼 *MSTN* 基因,结果表明该基因具有 3 个外显子,2 个内含子,基因结构与虹鳟^[6]、斑马鱼^[7]、真鲷^[11]等一致。与莫桑比克罗非鱼、奥利亚罗非鱼 *MSTN* 序列比较发现,编码区核苷酸序列相似性分别高达 96.6%、96.3%,这表明 *MSTN* 在种间高度保守,这也与叶寒青等^[11]对真鲷的分析结果相一致。根据这一特性,本研究设计的 3 对引物可以直接从吉富罗非鱼的基因组 DNA 中扩增出 *MSTN* 的编码区,而无需从 mRNA 中扩增。由此可见,对于同源性较高的基因,完全可以利用同

源克隆的策略来获得目的基因。

吉富罗非鱼 *MSTN* 基因 5' 调控区分析显示, 该区除了存在肌肉调控特有的 E-box 外, 还含有 AP1、AP4 以及 Oct1 等其他转录因子结合位点。在斑马鱼、牛、羊等脊椎动物的 *MSTN* 基因 5' 调控区中均存在多个 E-box 以及其他一些转录因子。如斑马鱼 *MSTN* 基因 5' 调控区 1.2 kb 的区域含有 7 个 E-box^[7]; 牛 *MSTN* 基因 5' 调控区 1.6 kb 的区域含有 10 个 E-box, 1 个 MEF2 位点, 4 个 AP1 结合位点^[22]; 绵羊 *MSTN* 基因 5' 调控区 1.5 kb 的区域有 8 个 E-box, 以及 OCT1、AP1、MEF2、MTBF 和 GRE 等一些肌肉生长应答元件^[23]。这表明不同物种的 *MSTN* 具有许多相同转录因子的结合基序。杜荣等^[24]研究绵羊 *MSTN* 启动子功能时发现, 肌肉调控因子 MyoD 可能是通过 E-box 引起 *MSTN* 基因在 C2C12 细胞分化和生长状态时转录和表达差异的原因, 而 MyoD 能通过和 E-box 结合而调控其下游靶基因 *MSTN* 的转录。推测吉富罗非鱼 *MSTN* 基因可能也通过 MyoD 结合 E-box 进行转录调节。

在 SNPs 的查找中, 通过随机克隆、测序比较, 本研究获得了 3 个 SNPs, 但在群体筛选中, 只发现 intron II 中有 1 个 SNPs, 另外 2 个 SNPs 可能是由于 PCR 扩增、克隆、测序等过程中的碱基错配造成的, 这表明在 SNPs 的发掘中, 通过测序获得的 SNPs 可能会出现假阳性。然而检测到的 1 个 SNPs 也是位于内含子内, 这与于凌云等^[25]的研究结果相似, 也只是在 *MyoD* 的内含子中发现 SNPs, 可能是由于内含子不参与功能基因的编码, 所受的选择压力小, 因而比外显子更容易积累较大的变异^[26]。另外, 在吉富罗非鱼 *MSTN* 内含子 II 中只检测到 2 种基因型, 这可能由于本研究选择的吉富罗非鱼样本遗传多样性不高, 应该扩大样本数进一步研究。

本研究通过 Tetra-ARMS 法, 找到了 1 个与吉富罗非鱼体型显著相关的分子标记。在对猪、羊及牛 *MSTN* 基因 SNPs 的研究中, 均发现其与脂肪沉积、背膘厚、体质量、体型等指标存在显著的相关性, 可作为分子标记辅助选育^[27-22]。因此, 本研究获得的与生长及体型相关的这个 SNP 标记应该也能用于

吉富罗非鱼的辅助育种中。但数量性状往往是受多基因控制的, 所以还应该寻找更多的与生长性状相关的分子标记, 进一步确定更为成熟的吉富罗非鱼分子标记辅助育种方案。

参考文献:

- [1] Oldham J M, Martyn J A K, 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: R1488-R1493.
- [2] Langley B, Thomas M, Bishop A, et al. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (51): 49831-49840.
- [3] Szabo G, Dallmann G, Muller G, et al. A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice [J]. *Mamm Genome*, 1998, 9: 671- 672.
- [4] McPherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member [J]. *Nature*, 1997, 387 (6628): 83-90.
- [5] Kambadur R, Sharma M, Smith T P, et al. Mutations in myostatin (GDF-8) in double-muscled belgian Blue and Piedmontese cattle [J]. *Genome Res*, 1997, 7: 910-916.
- [6] Dilip K G, Scott A G, Buel D R. Identification, characterization and quantitative expression analysis of rainbow trout myostatin-1a and -1b genes [J]. *J Endocrinol*, 2006, 190: 879-888.
- [7] Xu C, Wu G, Zohar, Y, et al. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish [J]. *J Exp Biol*, 2003, 206: 4067-4079.
- [8] Rodgers B D, Weber G M, Sullivan C V, et al. Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops* [J]. *Endocrinology*, 2001, 142 (4): 1412-1428.
- [9] Weber T E, Small B C, Bosworth B G. Lipopolysaccharide regulates myostatin and MyoD independently of an increase in plasma cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2005, 28 (1): 64-73.
- [10] Terova G, Bernardini G, Binelli G, et al. cDNA encoding sequences for myostatin and FGF6 in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and the effect of fasting and refeeding on their abundance levels [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2006, 30 (4): 304-319.

- [11] 叶寒青,陈松林. 真鲷肌肉生长抑素 MSTN 基因的克隆及表达分析 [J]. 高技术通讯, 2006, 16 (7): 718-724.
- [12] Ostbye T K, Galloway T F, Nielsen C, et al. The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues [J]. Eur J Biochem, 2001, 268 (20): 5249-5257.
- [13] Radaelli G, Rowleson A, Mascarello F, et al. Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a comparative immunolocalization study [J]. Cell Tissue Res, 2003, 311 (2): 239-250.
- [14] Wang D Q, Fan J B, Siao C J, et al. Large-scale identification mapping and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome [J]. Science, 1998, 280: 1077-1082.
- [15] 王宝维,魏笑笑,贾晓晖,等. 鲁西斗鸡 IGF-I 基因多态性与体型指标关系的研究 [J]. 中国家禽, 2008, 30 (12): 20-24.
- [16] 黄丹丽,陈仁金,杨章平,等. 4 个绵羊品种 Leptin 基因部分片段的 SNPs 多态性与生长发育性状的相关性分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39 (12): 1640-1646.
- [17] 顾志良,张海峰,朱大海,等. 鸡 myostatin 基因单核苷酸多态性的群体遗传学分析 [J]. 遗传学报, 2002, 29: 599-606.
- [18] 郭丹,曹阳,张嘉保,等. 草原红牛 MSTN 基因第一外显子 SNPs 多态性分析 [J]. 试验研究, 2007, 11: 12-14.
- [19] WorldFish Center. GIFT Technology Manual: An aid to tilapia selective breeding [R]. Penang, Malaysia: WorldFish Center, 2004.
- [20] 董在杰,何杰,朱健,等. 60 个家系吉富品系罗非鱼初期阶段的生长比较 [J]. 淡水渔业, 2008, 38 (3): 32-34.
- [21] Shu Y, Sahar D, Xiayi K, et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms [J]. Nucl Acids Res, 2001, 29 (17): e88.
- [22] Spiller M P, Kambadur R, Jeanplong F, et al. The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22: 7066-7082.
- [23] Du R, Chen Y F, An X R, et al. Cloning and sequence analysis of myostatin promoter in sheep [J]. DNA Seq, 2005, 16 (6): 412-417.
- [24] 杜荣,安晓荣,陈永福,等. 绵羊 *Myostatin* 基因启动子的功能分析 [J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2007, 37 (5): 551-557.
- [25] 于凌云,白俊杰,叶星,等. 大口黑鲈 *MyoD* 基因结构和单核苷酸多态性位点的筛选 [J]. 水产学报, 2009, 33 (1): 1-8.
- [26] Zhao Z, Fu Y X, 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: 207-213.
- [27] Jiang Y L, Li N, Plastow G, et al. Identification of three SNPs in the porcine myostatin gene (MSTN) [J]. Anim Biotechnol, 2002, 13 (1): 173-178.
- [28] 孟详人,郭军,赵倩君,等. 11 个绵羊品种 MSTN 基因非翻译区的变异 [J]. 遗传, 2008, 30 (12): 1585-1590.
- [29] Esmailzadeh A K, Bottema C D, Sellick G S, et al. Effects of the myostatin F94L substitution on beef traits [J]. J Anim Sci, 2008, 86 (5): 1038-1046.

Genetic structure of *MSTN* and association between its polymorphisms and growth traits in genetically improved farmed tilapia (GIFT)

TANG Yongkai¹, LI Jianlin¹, YU Juhua¹, CHEN Xuefeng², LI Hongxia¹

(1. Key Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 214081, China)

Abstract: In the present research, sequence of myostatin (*MSTN*) gene and its 5'-flanking region was amplified from genome DNA isolated from genetically improved farmed tilapia (GIFT) with PCR and genome walking technique. The whole sequence with the length of 2 413 bp included 5'-flanking region (462 bp), three exons and two introns. The sequence length of exon I, exon II, and partial exon III was 379 bp, 371 bp, and 145 bp, respectively. And the sequence length of intron I and intron II was 305 bp and 751 bp respectively. The open reading frame encoded 298 amino acids. Sequence analysis of the 5'-flanking region revealed that it contained putative muscle growth response elements (E-box) and other transcription regulation elements such as TATA box, OCT1, AP1 and AP4. Three SNPs were obtained through sequencing *MSTN* gene from 10 random GIFTs. However only one SNP in intron II showed polymorphism through testing from total samples. Meanwhile, growth traits of body weight, length, height and thick of GIFT (45♂, 51♀) were measured, and the association between growth traits and SNPs polymorphism in *MSTN* gene was analyzed. The results showed that GIFT's body shape parameters (including body width/body length and body height/body length) had a significant correlation with the SNP locating in *MSTN* intron II 728 nt ($P<0.05$). In short, the SNPs (T/G) of *MSTN* could be used as a candidate molecular marker in GIFT breeding. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (1) : 44–51]

Key words: GIFT; *MSTN*; SNPs; growth traits

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