DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00992

鳜胃蛋白酶基因外显子 7 上 SNP 检测及其与食性驯化相关分析

方荣¹,梁旭方¹,杨宇晖¹,杜嵇华¹,曹亮¹,叶卫²,符云²

1. 暨南大学 生命科学技术学院, 广东 广州 510632;

2. 广东省淡水名优鱼类种苗繁育中心, 广东 广州 511453

摘要:本研究旨在探寻胃蛋白酶(pepsinogen, *PEP*)基因的等位基因及其基因型在不同食性驯化表型鳜(*Siniperca chuatsi*)群体中的分布情况。通过 2 周食性驯化,挑选出最易驯化和最不易驯化的 2 组,提取各组鳜鳍条组织 DNA,采用 PCR 产物直接测序法(direct sequencing, DS)、限制性片段长度多态性技术(restriction fragment length polymorphism, RFLP)和创造限制酶切位点 PCR 法(created restriction site PCR, CRS-PCR)对鳜胃蛋白酶基因 5、6、7、8 内含子和 6、7、8 外显子进行 SNPs 遗传多态性检测和分析。结果共检测到 2 个 SNPs 位点(*C1T* 和 *C52 T*),均为同 义突变,利用卡方检验分析,结果表明 *PEP* 基因的这 2 个 SNPs 位点分别与鳜的食性驯化不具显著相关性(P>0.05)。将 2 个 SNPs 位点的不同基因型组合成 5 种双倍型,卡方检验表明双倍型 Dip1 与 Dip5 在两组中存在显著差异 (P<0.05)。本研究成功完成鳜 *PEP* 基因组多态性分析,因而可以考虑将 *PEP* 基因作为影响鳜食性驯化的候选基因。

关键词: 鳜; 胃蛋白酶; SNP; 食性驯化

中图分类号: S917 文献标志码: A

জ(Siniperca chuatsi)是淡水名贵鱼类,隶属 于鲈形目鲈亚目,俗称桂花鱼、胖鳜、季花鱼等。 由于其具有生长速度快等特性,已成为中国淡水 鱼类养殖中的主养品种,但这种鱼食性奇特,终 生以活鱼虾为食,通常情况下绝对拒食死饵或配 合饲料^[1]。鳜养殖历来以活饵投喂,鳜苗出膜即 以其他种鱼苗为食,苗种成活率低,因此生产过 程中,苗种培育及其活饵料供应成为养殖规模迅 速发展的两大制约因素。而使鳜通过人工驯化, 转为摄食非活饵,已成为解决上述问题的关键。 近年来,中国的鳜人工饲料研究取得了突破性进 展,吴遵霖等^[2]在1 m³网箱中用配合饲料驯饲鳜 幼鱼获得成功,共驯化幼鳜4 642 尾,存活率达到 89.6%,饲料系数 1.68~1.78。梁旭方等^[3-4]在幼鳜 食性驯化取得成功的基础上,又在水库网箱中开

文章编号:1005-8737-(2011)05-0992-08

展了鲜鱼、鱼块和配合饲料驯饲鳜 2 龄鱼种(体长 17~21 cm)的实验, 驯化率分别达到 100%、100% 和 88.4%, 饲料系数分别为 1.6、1.4 和 2.7, 共驯 化出鳜 2 龄鱼种 4 047 尾。配合饲料驯饲成功, 只 是提供整个养殖过程一个良好的基础和开端。在 长期的养殖过程中, 笔者发现, 通过驯养能逐步 诱导部分鳜开始以非活饵为食, 即为易驯化鳜; 而另一部分鳜则至死都只以新鲜活饵为食, 即不 易驯化鳜。因此开展鳜食性驯化相关基因的研究 对于鳜的食性选育具有积极意义。

胃蛋白酶(pepsinogen, PEP)是一种酸性胃消 化蛋白水解酶,其前体胃蛋白酶原在成年脊椎动 物胃黏膜中合成,由胃主细胞分泌,在胃液的酸 性条件下转换成胃蛋白酶,在酸性条件下水解蛋 白质^[5]。这类酸性蛋白酶用作动物饲料添加剂,可

收稿日期: 2010-08-12; 修订日期: 2010-11-01.

基金项目: 广东省海洋渔业科技推广专项项目(A200899D02); 广州市番禺区科技计划项目(2009-Z-73-1); 广州市科技计划项目 (2009Z1-E711).

作者简介: 方荣(1987-), 女, 硕士研究生, 主要从事鱼类分子生物学研究. E-mail: fangrong0729@sina.cn

通信作者:梁旭方,教授.Tel: 020-85221497; E-mail: tliangxf@jnu.edu.cn

促进鱼类对营养物质的消化吸收,提高饲料利用 率,进而促进鱼类生长^[6-7]。鱼类胃蛋白酶与食性 关系一直是研究的热点、胃蛋白酶活性与食物适 应性关系已有不少报道^[8-11],在鱼类中,鳜、美洲拟 鲽 (Pseudopleuronectes americanus, AF156787.1)、 红鳍东方鲀(Takifugu rubripes, AB179547.1)等的胃 蛋白酶基因已经成功克隆。胃蛋白酶基因多态性在 人类医学上研究较多^[12-13],但目前国内外有关鱼 类胃蛋白酶基因的研究不多见、关于鳜PEP多态 性方面研究尚未见报道。本研究应用直接测序法 和CRS-PCR法首次对鳜PEP基因部分区段遗传多 态性进行初步检验、并且进一步研究PEP基因外 显子 7 上 2 个SNP位点在鳜群体中的遗传多态性、 为今后鳜PEP基因多态性的进一步研究和鳜的食 性驯化育种提供理论和技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及管理 苗种通过广东佛山新荣 鱼苗繁殖场繁育购买、幼苗平均规格 5~6 cm、全 部系人工繁育苗种,其亲鱼均源自长江水系。之 后在广东淡水种苗繁育中心对其进行喂食驯化。 以鲮苗作为饵料鱼。投喂的鱼保持鳜和饵料鱼的 比例为1 10~12、饵料鱼大小适口。

1.1.2 主要试剂 TIANGEN DNA提取试剂盒为 合达公司(广州)产品, Tag[™] DNA聚合酶为宝生物 工程(大连)有限公司产品,限制性内切酶购自大 连宝生物公司 (TAKARA), 其他试剂均为进口分 装或者国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 驯化方法 鳜驯食操作在圆形大桶(直径 2 m、深 1.5 m)中进行。鳜以伏击式捕食、采取特定 的投食技术后、鳜由伏击式转变为伏击追击式、 最后形成集群抢食活饵。苗种投放当天即投喂饵 料、前3天投喂过量的全活饵料鱼、从第4天开始、 逐渐减少活饵投喂量, 以驯化鳜形成快速准确的 摄食反应,此过程约需7d时间。建立起良好的摄 食反应后 可在投喂的活饵料鱼中搭配一些死饵 料鱼投喂。投喂前、先少量试投、待鳜浮上水面吃 食时,再大量投喂。且投喂死鱼时要慢慢地投,以 便延长死鱼落下的时间、使鳜能充分饱食死饵料 或鱼块。之后逐渐增加死饵料或鲜鱼块的比例、 最后过渡到全部投喂死鱼和鲜鱼块。驯食程序在 15~16 d 内完成。具体程序见表 1。

鳜食性驯化过程结束后(一般在开始驯食后 第 16 天), 可凭鳜外观饱满或消瘦区分易驯化和 不易驯化鳜。易驯化鳜在喂食 0.5 h 后达到饱食, 腹部鼓胀;不易驯化鳜在喂食 0.5 h,腹部扁平。 从 1 200 尾喂养鱼苗中挑选出最易驯化和最不易 驯化的2组、每组均为120尾。

1.2.2 基因组 DNA 提取 分离各组鱼的鳍条组 织、总 DNA 的提取与纯化按 TIANGEN DNA 提 取试剂盒推荐方法进行。所有 DNA 样本于--20℃ 保存。

1.2.3 引物设计 根据本实验室克隆得到的鳜 PEP 基因 DNA 核苷酸序列、用 Primer Premier 5 软件、对鳜 PEP 基因部分片段第 5 内含子到第 8 内含子试探性设计合成 1 对特异引物: PEP01F,

Tab.1 Operating procedures of feed habit domestication for Siniperca chuatsi							
时间	食物及其投喂法	鱖摄食反应	_				
time	food and feeding method	feeding response of Siniperca chuatsi					
第 1-3 天	黄昏投喂过量活饵料鱼	主要在投喂后的夜间以偷袭方式捕食活饵料鱼					
第 4-6 天	每天逐步减少活饵料鱼投喂量	活饵料鱼在投喂后很快被捕食					
第7天	仅饱食投喂活饵料鱼	投喂时立即以抢食方式从水面下摄食活饵料鱼					
第 8-10 天	每天逐步用死饵料鱼替代活饵料鱼	接受摄食越来越多的死饵料鱼					
第11天	仅投喂死饵料鱼	投喂时立即以抢食方式从水面下摄食死饵料鱼					
第 12-14 天	每天逐步用鲜鱼块替代死饵料鱼	接受摄食越来越多的鲜鱼块					
第15天	仅投喂鲜鱼块	投喂时立即以抢食方式从水面下摄食鲜鱼块					

表1 鳜食性驯化操作程序

5'-TGCGTGCTGATGGTATTC-3'; *PEP*02R, 5'-CT GCTGAAGATGGAATAG-3'。片段长度为1070 bp 左右。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.4 PCR扩增 以鳜DNA为模板,以 *PEP*01F和 *PEP*02R为引物进行PCR扩增,PCR反应体系: PCR反应总体积为 50 µL,其中 10×buffer缓冲液 5 µL,dNTP 4 µL,*Taq*酶 0.25 µL,*PEP*01F和*PEP*02R 均为1 µL,模板 2 µL,最后补充灭菌双蒸(ddH₂O) 水至 50 µL。*PEP*01F和 *PEP*02R引物扩增条件为: 94℃下预变性 3 min;94℃下变性 1 min,55℃下退 火 60 s,72℃下延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72℃下延伸 5 min。每组各随机挑 30 个样本进行 测序。

1.2.5 产物纯化测序及 SNP 筛查分析 PCR 产物 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,由英骏公司进行 纯化测序。测得序列采用 Chromaslite200、 DNAstar 等软件进行序列结构分析,包括序列峰 图校正,序列比对及突变位点筛查。

1.2.6 CRS-PCR法确定基因型 对于以上用直 接测序法检测到的SNP变异位点,采用创造限制 酶切位点PCR(CRS- PCR)法来设计错配引物确定 基因型。错配碱基与SNP位点其中 1 个等位基因 能构成 1 个限制性内切酶酶切位点,则被切成 2 个片段;而另外 1 个等位基因不能与错配碱基构 成酶切位点,从而不能被切开。最后通过PCR-RFLP方法检测出不同的基因型。引物设计参考李 小慧等^[14]的方法。PCR产物经 1.5%的琼脂糖凝胶 电泳检测后,用限制性内切酶酶切,酶切体系: PCR产物 10 μ L, Buffer 2 μ L,酶 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。酶切产物用 10%的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (V_{Are} V_{Bis}=29 1), 140 V衡压电泳 3 h后,银染 显色。

1.2.7 数据统计

(1)基因型和基因频率 统计不同 SNP 位点 基因型样本的数量,计算它们的基因型频率和等 位基因频率,卡方分析进行独立性检验。

(2)遗传多态性分析 多态信息含量、有效等 位基因数、位点杂合度、香农指数计算公式分别 如下: 多态信息含量(PIC)按照 Botstein 等^[15]的公 式计算,对标记基因多态性进行估计。PIC>0.5 为高度多态; 0.25<PIC<0.5 为中度多态; PIC<0.25 为低度多态。

PIC =
$$1 - \left(\sum_{i=1}^{n} p_i^2\right) - \left(\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} 2p_i^2 p_j^2\right)$$

式中: *i*, *j*分别为第 *i*, *j*个等位基因; *p*_i 和*p*_j分 别为第*i*和第*j*个等位基因的频率; *n*为等位基因数。

有效等位基因数(*N*_e)是基因纯合度的倒数, 反映了等位基因间的相互影响,用来测定群体的 遗传变异。

$$N_{\rm e} = \frac{1}{\sum_{i=1}^{n} p_i^2}$$

式中: *p*_i为等位基因的频率; *n*为等位基因数。 位点杂合度(heterozygosity, *H*)是用来度量某 一群体中特定位点上等位基因杂合程度的指标。

$$H = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2$$

式中: p_i为基因频率; n为等位基因数。

香农信息指数(Shannon's information index, S) 是用来测量基因变异的一个指标。

$$S = \sum_{i=1}^{n} p_i \ln p_i$$

式中: p_i 为基因频率;n为等位基因数。

(3)基因频率和基因型频率的差异显著性检验 根据 CRS-PCR 方法检测到的基因型利用 SPSS 软 件进行数据处理,卡方检验用于基因型与食性驯 化的显著性分析。并计算其 OR 值和 95%置信区间。

2 结果与分析

2.1 鳜 PEP 基因 SNPs 位点筛选

将纯化的 PCR 产物进行直接测序,将得到 的序列逐条校正后得到截取可靠区域,利用 DNAstar 软件进行多重比对分析寻找突变位点。 分析发现在 PEP 基因外显子 7 中存在 2 个单核苷 酸多态位点,其中在外显子 7 的 1 位(位点 A)发生 了 T→C 的点突变,共有 2 种基因型,分别为 A1A1、A1A2(图 1), 未发现 A2A2 基因型。其次 发现外显子 7 的 52 位(位点 B)碱基处发生 T→C 的点突变, 共有 3 种基因型, 分别为 B1B1、 B1B2、B2B2 (图 2)。将各位点突变后的核苷酸序 列转换成氨基酸序列后, 发现位于外显子 7 的位 点 A 和 B 分别编码丝氨酸和异亮氨酸, 两位点 突变变异均没有引起编码氨基酸的改变, 为同义 突变。



图 1 鱖 PEP 基因外显子 7A 位点不同基因型的测序峰 图(反向)

箭头表示突变发生的位置.

Fig. 1 Sequency map of different genotypes of locus A in the exon 7 of *PEP* gene (reverse) Arrow denotes the site of base mutation.



图 2 鳜 PEP 基因外显子 7 B 位点不同基因型的测序峰 图(反向)

箭头表示突变发生的位置.

Fig. 2 Sequency map of different genotypes of locus B in the exon 7 of *PEP* gene (reverse) Arrow denotes the site of base mutation.

2 个位点都不能直接形成任何酶切位点,因 此采用创造限制酶切法,设计错配引物 P1F 和 P2F, 分别构成相应的酶切位点 *Hha*I 和 *Eco*RV。 设计引物如表 2 所示。

2.2 酶切及电泳分型结果

A 位点经 *Hha*I 酶切后, T 等位基因不能被 *Hha*I 酶切断, 为 1条 129 bp 的片段, C 等位基因 经 *Hha*I 酶切后, 为 108 bp 和 21 bp 的 2条片段, 但 21 bp 片段在电泳图中未显示。CC 基因型仍为 108 bp 条带, CT 基因型为 129 bp 和 108 bp 的 2 条带, TT 基因型为 1个 129 bp 条带(图 3)。

B 位点经 *Eco*RV 酶切后, T 等位基因不能被 *Eco*RV 酶切断,为 1条 122 bp 的片段, C 等位基 因经 *Eco*RV 酶切后,为 103 bp 和 19 bp 2条片段, 但 19 bp 片段在电泳图中未显示。CC 基因型仍为 103 bp 条带,CT 基因型为 122 bp 和 103 bp 2条 带,TT 基因型为 1个 122 bp 条带(图 4)。 2.3 不同位点基因型和基因的频率统计

对 2 个 SNPs 位点进行基因型和基因频率的 统计,结果见表 3、4。在 A 位点 TT 基因型和 T 等位基因占绝对优势,而 B 位点 CC 基因型和 C 等位基因占绝对优势。卡方分析表明,鳜 2 个群 体 *PEP* 基因不同 SNPs 位点的基因型频率均符合 Hardy-Weinberg 定律(*P*>0.05)。对每个位点进行独 立性卡方分析检验后发现,两种表型间不同基因 型分布差异未达到显著性水平(*P*>0.05,表5)。将 2 个 SNPs 位点不同基因型组合成 5 种双倍型(去 掉频率小于 3%的组合,表 6),卡方检验表明,双 倍型 Dip1(OR=10.21, CI=5.509~18.925, *P*<0.05)与 Dip5(OR=7.40, CI=3.408~16.054, *P*<0.05)在食性不 同的两组中的分布存在显著性差异(*P*<0.05,表 7)。这说明双倍型 Dip1 和 Dip5 可能对鳜食性驯 化特性具有影响、食性驯化可能与基因型间有关

		8 I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	
引物	序列(5′-3′)	产物长度/bp	退火温度/℃
primer	sequence(5'-3')	product size	$T_{ m m}$
P1	F: CGGATACAGCATCACAGGTT R: ACCTGACCATTGACAGTAGC	129	55

表 2 PCR 扩增所用引物序列、产物长度以及退火温度 Tab.2 Primer sequences, PCR product sizes and annealing temperature(*T*_m)



	tion and refusing feed population
Tab.3	Genotype and allele frequencies of SNPA locus in the exon 7 of Siniperca chuatsi PEP gene in accepting feed population
-	表 3 鳜 PEP 基因外显子 7 上 A 位点在最易喂食驯化和最不易喂食驯化群体中的等位基因和基因型频率

群体	样本数	基因型频 frequent	页率 (个体数 cy(individua	() genotype Il number)	基因 gene fre	频率 equency	H-W 平衡 Hardy-Weinberg	多态信 息含量	有效等 位基因	杂合度	香农信 息指数
group	number	CC	CT	TT	С	Т	eguiliberum	PIC	数N _e	Н	S
最易驯化 accepting feed	120	0(0)	0.22(26)	0.78(94)	0.11	0.89	X ² =1.697 (<i>P</i> =0.192)	0.1745	1.2395	0.1932	0.3430
最不易驯化 refusing feed	120	0(0)	0.30(35)	0.70(85)	0.15	0.85	$X^2 = 3.386(P=0.065)$	0.2653	1.3318	0.2491	0.4154

表 4 *鱖 PEP* 基因外显子 7 上 B 位点在最易喂食驯化和最不易喂食驯化群体中的等位基因和基因型频率 Tab.4 Genotype and allele frequencies of SNP B locus in the exon 7 of *Siniperca chuatsi PEP* gene in accepting feed population and refusing feed population

0 1 1 1 1 1											
群体	样本数	基因型频 frequency	率 (个体数 y (individua) genotype l number)	基因频 frequ	率 gene iency	H-W 平衡 Hardy-Weinberg	多态信 息含量	有效等 位基因	杂合度	香农信 息指数
group nui	number	CC	СТ	TT	С	Т	eguiliberum	PIC	数 $N_{\rm e}$	Н	S
最易驯化 accepting feed	120	0.67(80)	0.27(33)	0.06(7)	0.80	0.20	X ² =2.082 (P=0.149)	0.2181	1.4598	0.3150	0.4946
最不易驯化 refusing feed	120	0.56(67)	0.34(41)	0.10(12)	0.73	0.27	X ² =2.333 (P=0.126)	0.3169	1.6528	0.3950	0.5841

表 5 鳜 A、B 位点 PEP 基因型在最易喂食驯化和最不易喂食驯化群体中的分布

Tab.5 Distribution of PEP genotype among accepting feed population and refusing feed population on SNP locus of A and B

基因 genoty	型 /pe	最易驯化群体 accepting feed group	最不易驯化群体 refusing feed group	Р	优势比(95%置信区间) OR(95%CI)
位点 A	TT	94	85	0.182	1 48(0 828-2 657)
locus A	СТ	26	35	0.102	1.40(0.020-2.007)
位点 B	CC	80	67	0.168 0.149	1.48(0.846-2.601) 2.04(0.763-5.492)
locus D	TT	33	41		(((((((((((((((((((((((((((((((((((

CT	7	12

表 6 鳜 PEP 基因不同双倍型在最易喂食驯化和最不易喂食驯化群体中的分布 1. 1 4 .. 1 ... 1 ...

Table Distribution of <i>PET</i> gene ulplotypes among accepting recu population and retusing recu population of <i>Simpercu chauss</i>

	SNP 位点	SNPs site	频率 frequency		
双倍型 diplotype -	位点 A	位点 B	最易驯化群体	最不易驯化群体	
	locus A	locus B	accepting feed group	refusing feed group	
Dip1	СТ	CC	0.15254	0.17094	
Dip2	СТ	СТ	0.05084	0.10256	
Dip3	TT	CC	0.52542	0.40171	
Dip4	TT	СТ	0.22882	0.24786	
Dip5	TT	TT	0.04237	0.07692	

表7 PEP 双倍型和鳜食性驯化关联分析

Tab.7 Association analysis between PEP gene diplotypes and feed habit domestication of Siniperca chuatsi								
	双倍型 diplotype	最易驯化群体 accepting feed group	最不易驯化群体 refusing feed group	优势比(95%置信区间) OR(95%CI)				
	Dip1	80	20	10 21(5 500 18 025)				
	Non—Dip1	38	97	10.21(5.509—18.925)				
	Dip2	6	12	0.47(0.170 1.204)				
	Non—Dip2	112	105	0.47(0.170—1.294)				
	Dip3	62	47	1 (5(0.092 - 2.7(5))				
	Non—Dip3	56	70	1.65(0.983-2.765)				
	Dip4	27	29	0.00(0.404 1.641)				
	Non—Dip4	91	88	0.90(0.494—1.041)				
	Dip5	45	9	7 40(2 408 16 054)				
	Non—Dip1	73	108	/.40(3.408—16.054)				

联。从育种角度来看,应该选择保留这种有利基 因型个体、以加快育种进程。

3 讨论

本研究以胃蛋白酶基因作为影响鳜食性性状 的候选基因、通过PCR产物直接测序法和 CRS-PCR法在鳜PEP基因外显子 7 的 1 位发现 T→C转换(A位点), 在外显子 7 发现 52 位C→T转 换(B位点)。在位点A只发现 2 种基因型A1A1 和 A1A2; 在位点B发现 3 种基因型B1B1、B2B2 和 B1B2。PEP 基因外显子 7 的 2 个SNPs位点均属 于同义突变。同义突变虽然不引起氨基酸一级结 构改变,但有可能通过改变编码蛋白质的高级结 构,使得mRNA合成、运输和翻译发生变化,导致 最终功能表型的改变^[16]。这还需要作进一步的研 究和探索。

通常可以用多态性信息含量和各位点的平均 杂合度来衡量一个群体的遗传多样性^[17]。其数值 的大小反映群体中基因变异水平的高低、数值越 大、表明群体的遗传多样性丰富、具有较高的选 择潜力。根据各位点不同等位基因的基因频率计 算得到各位点PIC值、结果表明、在这2个位点上、 最易喂食驯化组都属于低度多态,而最不易喂食 驯化组的 2 个位点属于中度多态。相比较多态信 息含量、香农信息指数具有区分度高、适用范围广 的特点^[17]。用香农信息指数衡量群体多态信息含 量、结果表明、在这2个位点上、最不易喂食驯化 组的香农信息指数高于最易喂食驯化组。说明两 个群体中、最不易喂食驯化组所面临的选择压力 最小、遗传多样性高于最易喂食驯化组、可进一 步加以选育。综合多态信息含量和香农信息指数 的比较结果,可以看出,在试验中检测到的 2 个

6 0 .

PEP基因多态位点中,多数还未经过强的人工选择,可选育的空间很大。考虑到 2 个位点都位于 PEP基因的外显子,而外显子参与编码表达,会 直接影响着蛋白的合成表达,所以产生的变异较 容易反映在生产性状上,因此也促使了变异更容 易被人工选择、固定。

分别对PEP基因外显子 7 上的 2 个突变点的 不同基因型与食性表型进行卡方检验分析、结果 表明、PEP基因 2 个SNPs位点对翘嘴鳜的食性驯 化不具显著相关性(P>0.05)。单个SNP位点分析作 为一种传统分析方法、有着统计位点信息不完整 和模糊等问题^[18-19],单倍型为同一条染色体上的 多个基因座上的等位基因组合、比单个SNP位点 分析更有效^[20]。虽然一个候选基因内通常存在多 个SNPs位点,采用不同多态位点与表型关联分析 可能会得到不同结论、而实际上对不同SNPs位点 进行整体研究、更利于发现基因与某种表型的相 关性^[21]。因为不同SNP位点之间有相互作用、所以 分析由单倍型构成的双倍型得到的信息比分析单 个SNP位点更加全面和准确^[22]。Taggart等^[23]发现 胃蛋白酶原 3 种家族基因通过不同组合形成的 3 种单倍型导致了其表型的差异。刘铮铮等^[24]用直 接测序法进行绵羊MSTN基因内含子2和外显子3 的多态性检测和单倍型分析,结果表明单倍型\1 可能与绵羊的产肉性能有关。对PEP基因不同双 倍型与鳜食性驯化性状进行关联分析,结果显示, 双倍型Dip1与Dip5在2个食性驯化组中存在显著 差异(P<0.05)。

通过分子标记定向选育易驯化鳜并使用人工 饲料大规模养殖,可以有效解决鳜养殖中存在的 成本高、污染严重、病害严重等问题,具有广泛 的应用前景。本实验发现部分双倍型和基因的频 率在易驯化和不易驯化群体间差异显著,初步推 断*PEP*基因是影响鳜食性的主效基因或者与主效 基因连锁,具有作为鳜食性驯化分析的候选遗传 标记的可能,可通过进一步扩大样本量及在 *PEP*mRNA 和蛋白表达水平做一步的研究与验 证。另外,由于其他区段扩增较困难,本实验只扩 增 PEP 部分区段, 今后可以对 PEP 基因启动子以 及内含子做进一步研究。

参考文献:

- [1] 梁旭方.国内外鳜类研究及养殖概况[J].水产科技情报, 1996,23(1):13-17.
- [2] 吴遵霖,李蓓,李桂云,等. 鳜人工饲料网箱养殖的生产 性试验[J]. 水产养殖, 1996 (5): 24–26.
- [3] 梁旭方,俞伏虎,黄永川,等.配合饲料网箱养殖商品鳜 的初步研究[J].水利渔业,1995(2):3-5.
- [4] 梁旭方, 贺锡勤. 鲜饲料网箱养殖商品鳜的初步研究[J].水利渔业, 1994(1): 3-4, 11.
- [5] 陈亮,梁旭方,王琳,等. 鱖胰蛋白酶和淀粉酶与胃蛋白 酶原基因的克隆与序列分析[J]. 中国生物化学与分子生 物学报,2009,25 (12): 1115–1123.
- [6] 祝国强,林冬梅.酸性蛋白酶饲喂早期断奶仔猪的应用试验[J].饲料博览,1998,10(3):23-26.
- [7] 黄键,魏述芳,邓红,等. 酶制剂对早期断奶仔猪生产性能的影响[J]. 四川畜牧兽医学院学报,1997,11 (1):17-22.
- [8] 董志国,李家乐,李晓英,等. 温度、pH 和摄食作用对西施舌胃蛋白酶活力的影响[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(4): 397-400.
- [9] 王立波,刘伟,潘志伟,等.温度、pH 对怀头鲇幼鱼胃和 肠道蛋白酶、淀粉酶活力的影响[J].大连水产学院学报, 2005,14(4):311-314.
- [10] 张海宾. pH 对乌鳢胃、肠、肝胰脏蛋白酶活性的影响[J].水利渔业, 2006, 22(2): 4-5.
- [11] 王联珠, 谭乐义, 李晓川, 等. 影响鱼粉胃蛋白酶消化率的因素之探讨[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 50-54.
- [12] Correia A P, Pinto D, Pereira D, et al. 362 POSTER pepsinogen C gene polymorphism and breast cancer: Influence on the overall survival [J]. Eur J Cancer Supp, 2007, 5 (4): 74– 75.
- [13] Venkateshwari A, Vidyasagar A, Prasad R, et al. Pepsinogen polymorphism in the Indian population and its association with duodenal ulcer [J]. Human Genet, 1997,101: 201–204.
- [14] 李小慧,白俊杰,胡隐昌,等.大口黑鲈内含子1上 SNPG208A的CRS-PCR检测方法[J].水生态学杂志,2009, 2(5):144–148.
- [15] 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.
- [16] Shen L X, Basilion J P, Stanton Jr V P, et al. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of

mRNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 7871-7876.

- [17] Nei M. Molecular evolutionary genetics [M]. New York: Columbia University Press, 1987: 121–134.
- [18] Daly M J, Rioux J D, Schaffner S F. High-resolution haplotype structure in the human genome [J]. Nat Genet, 2001, 29: 229–232.
- [19] Bader J S. The relative power of SNPs and haplotype as genetic markers for association tests [J]. Pharmacogenomics, 2001, 2 (1): 11–24.
- [20] Clark A G. The role of haplotypes in candidate gene studies[J].Genet Epidemiol, 2004, 27(4): 321–333.
- [21] 刘福平, 白俊杰, 叶星, 等. 罗非鱼 MC4R 基因克隆及与

其生长相关的 SNPs 位点[J]. 中国水产科学, 2009, 16 (6): 816--823.

- [22] Stephens M, Smith N, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data [J]. Am J Hum Genet, 2001, 68: 978–989.
- [23] Taggart R, Samloff I M, Raffel L J, et al. Relationships between the human pepsinogen DNA and protein polymorphisms. [J]. Am J Hum Genet, 1986, 38: 848–854.
- [24] 刘铮铸,李祥龙, 巩元芳, 等. 绵羊 MSTN 基因内含子 2
 和外显子 3 部分序列的 SNP 检测和单倍型分析 [J]. 遗传
 育种, 2010, 46(7): 9–12.

Association of polymorphism detection of SNPs in exon 7 of pepsinogen (*PEP*) and feeding behavior domestication in *Siniperca chuatsi*

FANG Rong¹, LIANG Xufang¹, YANG Yuhui¹, DU Jihua¹, CAO Liang¹, YE Wei², FU Yun²

1. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Guangdong National Tilapia Farm, Guangzhou 511453, China

Abstract: *Sinperca chuatsi* refuse to eat dead prey or man-made feed. However, experiments with long-term cultivation suggest that *S. chuatsi* can be domesticated to feed on inert baits. Selective breeding of *S. chuatsi* using molecular markers and mass cultivation with artificial feed reduces the problems associated with cost, contamination, and disease. Pepsinogen is an acid gaster-digestion hydrolase which digests proteins under acidic conditions. Acidic proleases are sometimes used as additives in animal feed as they promote digestion and absorption of nutrients in fish. In order to search the distribution of the alleles and genotypes of pepsin gene (*PEP*) gene between domesticated and undomesticated populations, we identified SNPs in introns 5, 6, 7, and 8 and exons 6, 7, and 8 of the *PEP* in *S. chuatsi* using DS, PCR-RFLP, and CRS-PCR. Two SNP sites (T1C, C52T) was identified in exon 7 of the *PEP* gene, both of which were synonymous mutations. There was not significant difference in the occurrence of the SNPs between domesticated and undomesticated and undomesticated population. There was a significant association between diplotype1 and diplotype5 in the two populations (P<0.05). Our results provide a foundation for marker assisted selective breeding. The *PEP* gene offers considerable potential as a candidate marker for the domesticated feeding phenotype in *S. chuatsi*.

Key words: *Siniperca chuatsi*; pepsinogen; single nucleotide polymorphism; feeding behavior domestication Corresponding author: LIANG Xufang. Tel: 86-20-85221497; E-mail: tliangxf@jnu.edu.cn