



翘嘴鲌两种生长激素受体基因结构及微卫星多态性与生长性状的相关性

刘士力^{1,2,3}, 贾永义¹, 刘加林^{1,4}, 郑建波¹, 迟美丽¹,
程 顺¹, 蒋文枰¹, 顾志敏^{1*}, 赵金良^{2,3*}

- (1. 浙江省淡水水产研究所, 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省淡水水产遗传育种重点实验室, 浙江 湖州 313001;
2. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;
3. 上海海洋大学, 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306;
4. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210000)

摘要: 为了更好地研究翘嘴鲌两种生长激素受体(GHR)的结构和功能, 实验以翘嘴鲌转录组中获得的mRNA为基础, 对其DNA序列进行了克隆。在进行生物信息学分析的同时, 对其中的多态性微卫星位点在120尾同批繁殖、同塘养殖的翘嘴鲌个体中进行了分析。*GHR1*的cDNA序列长度为3 498 bp, 开放阅读框(ORF)为1 818 bp, 编码605个氨基酸; *GHR2*的cDNA序列长度为1 743 bp, ORF为1 743 bp, 编码580个氨基酸; *GHR1*和*GHR2*氨基酸序列均由信号肽、胞外区、跨膜区、胞内区组成, 相似度为37.2%。二者在结构上存在较大的差异: *GHR1*胞外区有7个半胱氨酸残基, 而*GHR2*只有5个, 且*GHR1*比*GHR2*多3个N-糖基化位点; 在胞内区, *GHR1*存在10个酪氨酸残基而*GHR2*只有5个, 这些差异表明二者可能具有不同的生物学功能。同源氨基酸序列比对发现, *GHR*与其他鲤科鱼类的同源基因保守性较高。翘嘴鲌2个*GHR*各包含9个内含子, 其中*GHR1*内含子1和2序列在10 kb以上, 本实验没有对其进行扩增。所获得的序列中共发现了6个微卫星位点: *GHR1*中微卫星位点(CT)₆位于第2外显子中, 为信号肽编码序列的一部分, 位于第8内含子中的(AC)₅经检测没有多态性; *GHR2*中具有4个微卫星位点, 位于第1内含子中的(TG)₅及第7个内含子中的(TATC)₅(AT)₁₅(AC)₁₁(AT)₁₄(TG)₆和(TA)₁₅属于高度多态性位点(PIC>0.5), 第6个内含子中的(GAAG)₅属中度多态性位点(PIC=0.463)。第7内含子中的2个微卫星位点检测到基因型数目分别为50和61, 具有良好的个体识别潜力。关联分析结果表明这4个多态性微卫星位点与生长性状具有一定相关性。翘嘴鲌*GHR*基因的克隆以及序列中微卫星的特征分析为深入研究其生物学功能及分子标记辅助育种提供助力与参考。

关键词: 翘嘴鲌; 生长激素受体; 序列分析; 微卫星; 生长性状

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

生长激素(growth hormone, GH)是与动物生长性状密切相关的主效基因。GH首先与靶细胞膜表面的生长激素受体(growth hormone receptor,

GHR)结合, 通过GHR介导将信号传入细胞内, 发生一系列的生理反应, 从而达到在组织和细胞水平发挥其生理作用的功能。*GHR*基因最早是

收稿日期: 2019-02-22 修回日期: 2019-04-11

资助项目: 浙江省农业新品种选育重大科技专项(2016C02055-1)

通信作者: 顾志敏, E-mail: guzhimin2006@163.com; 赵金良, E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

由Tsushima^[1]于1976年在兔的肝细胞膜上发现,它是细胞因子/造血因子(cytokine/hemopoietin)受体超家族成员之一^[2],胞外氨基酸具有较高的同源性,全序列同源性较低。目前,在金头鲷(*Sparus aurata*)^[3]、黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)^[4]、南方鲇(*Silurus meridionalis*)^[5]、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)^[6]、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[7]、黄鳍鲷(*Sparus latus*)^[8]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[9]、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)^[10]等鱼类基因组中已成功获得GHR基因序列。在哺乳动物中仅发现一种编码GHR的基因^[11],但在很多鱼类基因组中却发现了另外一个基因编码的生长激素受体GHR2,推测鱼类包含2种GHR可能是基因复制的结果。

微卫星(microsatellite)或简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)是一种多态性信息容量高的共显性标记,具有重复性好、易于检测等优点,被广泛应用于鱼类遗传育种研究。功能基因中的微卫星更有可能与生长性状相关。对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)GHR基因5'端启动子区的微卫星在两个群体中进行分析,发现均与生长具有一定的相关性^[12]。翘嘴鲌(*Culter alburnus*)是鲌亚科(Cultrinae)中体型最大的一种鱼类,隶属于鲤科(Cyprinidae)、鲌亚科、鲌属(*Culter*),广泛分布于中国各大水系^[13]。其肉质细腻鲜美,口感较佳。平时多生活在流水及大水体的中上层,是一种凶猛肉食性鱼类。目前已开发了一些翘嘴鲌的微卫星标记^[14-15],并获得了翘嘴鲌GH^[16]和IGF-1^[17]基因全序列信息。本实验从翘嘴鲌中获得了GHR1和GHR2的部分基因序列,分析了鱼类GHR1和GHR2氨基酸之间的结构差异,并将其核苷酸序列及编码的氨基酸进行比较,对从DNA序列中发现的微卫星标记在同批繁殖、同塘养殖的120个样本中进行了性状相关分析。拟为翘嘴鲌GHR基因的功能研究和品种选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验生物 2017年6月采用经过强化培育的3龄翘嘴鲌雌鱼40尾,雄鱼68尾,人工催产后放入圆形产卵池产卵。获得受精卵后在孵化缸中流水孵化,待育苗卵黄囊基本消失、鳔充气能平游后,移入池塘中继续培育。早期泼洒豆浆,后期投喂人工配合饲料,养殖密度按照常规进行调整^[18]。于2018年6月,随机采集120尾样

本,测定体长和体质量,并取少量尾鳍置于无水乙醇中,4℃保存。

实验主要试剂 Ex Taq DNA聚合酶、LA Taq DNA聚合酶、Premix TaqTM和pMD18-T载体购自宝日医生物技术(北京)有限公司,胶回收试剂盒、大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、氨苄和异丙基硫代半乳糖苷购自天根生化科技(北京)有限公司,用于DNA提取的试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 翘嘴鲌GHR1和GHR2基因的克隆

采用苯酚—氯仿法提取样本DNA。用1%琼脂糖凝胶电泳检测提取DNA的完整性,DNA原液于-20℃保存备用。利用本实验室翘嘴鲌转录组中获得的GHR1和GHR2的mRNA序列与团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[19]、鳊浪白鱼(*Anabarrilius grahami*)(GenBank登录号:RJVU01000000)和鲤(*Cyprinus carpio*)(GenBank登录号:GCF_000951615)基因组进行比较分析。确定翘嘴鲌GHR均包含8个内含子,且外显子2序列较短。其中GHR1基因内含子1和2序列均在10 kb以上,本实验没有对其进行扩增。GHR2基因内含子1、2和外显子2采用LA Taq共同扩增,GHR其余片段采用Ex Taq进行PCR。扩增所用12对特异性引物如表1所示,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR反应体系参照产品说明书,反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s;58℃退火30 s,72℃延伸3 min(GHR2-1扩增片段较长,延伸时间为6 min),共32个循环;72℃延伸10 min;PCR扩增产物经1%的琼脂糖凝胶电泳检测合格后送生工生物工程(上海)股份有限公司采用Sanger法双向测序。如序列中包含微卫星或Poly结构导致测序信号衰减或杂峰,长度小于2 kb的PCR产物直接进行克隆。GHR2-1扩增长度在5 kb以上,测序初步结果表明该序列包含Poly T和(GT)_n。重新设计包含这个区域的引物GHR2-1',在翘嘴鲌DNA中扩增得到约600 bp的产物后再进行克隆。每个克隆样品挑取3个单克隆,摇菌培养后送样测序。

1.3 翘嘴鲌GHR1和GHR2基因的生物分析

利用软件ContigExpress将所获得的DNA片段和已知的mRNA序列进行拼接,利用NCBI中Blast功能进行序列比对分析,确定翘嘴鲌GHR1和GHR2基因正确性。基因的mRNA及编码的氨基酸序列按照谢淑媚等^[20]的方法进行分析。氨基酸

表1 翘嘴鲌GHR1和GHR2基因克隆所用引物

Tab. 1 Primers used for GHR1 and GHR2 gene cloning of *C. alburnus*

引物 primer	序列 (5' - 3') sequence (5' - 3')	长度/bp length	用途 usage
GHR1-1	F: ACGGGCTGCCCTCCAGAG R: TCGTGAAGGTCTTGTGAA	2 212	GHR1内 含子3
GHR1-2	F: TACTTCAACAAGACCTCAC R: ACATTCAGTAGAGTCCAGTT	252	GHR1内 含子4
GHR1-3	F: CTGAAGTGGACTCTACTGAA R: CAATGATGCTGCTCACTGAAT	1 257	GHR1内 含子5
GHR1-4	F: TTCAGTGACAGCATCATTGT R: GGAGCAGGAATAGGTGGTAA	1 507	GHR1内 含子6, 7
GHR1-5	F: CCACCTATTCCTGCTCTCTAA R: TTCTTCTTCTCGTTCTCTTCC	1 701	GHR1内 含子8
GHR2-1	F: GAAGTCAAGATTCCCAGAGG R: GGAACGACATGAGGGTAAAC	5 217	GHR2内 含子1, 2
GHR2-1'	F: GCATGGCATAAAATTCTGT R: TCCAGCCAGGAGTGGCTG	634	GHR2内 含子1
GHR2-2	F: CTTACACAACACCACAGAAC R: GGCTTACCAATGTCCTCTAC	1 786	GHR2内 含子3
GHR2-3	F: GGAGTGAATGTCCAAGTTAC R: ACAGATTAAGCCAGTTGAAC	695	GHR2内 含子4
GHR2-4	F: GTTCAACTGGCTTAATCTGT R: CCTGACTCTGACTTCATATTC	474	GHR2内 含子5
GHR2-5	F: ATATGAAGTCAGAGTCAGGTC R: TAATTGCGATACCAACAGTG	242	GHR2内 含子6
GHR2-6	F: TCTCATTCCTAACAAAGGTCTG R: TGTCACCTCTATGAACTCTAC	1 808	GHR2内 含子7, 8

序列的相似度通过GenBank的Blast功能计算。微卫星通过SSRhunter 1.3软件进行查找。

1.4 翘嘴鲌GHR1和GHR2基因中微卫星的多态性检测及与生长性状的关联分析

采用“三引物PCR法”对内含子中的6个微卫星位点在24尾翘嘴鲌中进行多态性检测, 随后将多态性位点在剩余96个样本中进行PCR。用Primer 6.0软件设计引物, 上游引物的5'端加上Tail A碱基序列^[21], 通用引物Tail A 5'端用FAM进行修饰。其中GHR2中的4个微卫星位点具有多态性, 具体引物序列见表2, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR反应体系为20 μ L: 2 \times Pre-mix TaqTM 10 μ L, 模板DNA (10 ng/ μ L) 1 μ L, 通用引物Tail A、上游和下游引物(10 μ mol/L)使用量分别为0.2、0.2和0.4 μ L, 灭菌超纯水补足体系。PCR反应程序: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s; 60 $^{\circ}$ C退火90 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 共35个循环; 60 $^{\circ}$ C延伸30 min; 4 $^{\circ}$ C保存。PCR产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行微卫星分型。采用POPGENE 1.3.1软件计算微卫星位点在群体内的等位基因频率、观察杂合度(observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)和多态性信息含量(polymorphism information content, PIC)。运用SPSS 16.0软件的一般线

<http://www.sxuebao.cn>

性模型(general linear model, GLM)中的方差分析和独立样本t检验分析各SSR位点不同基因型与体长和体质量的相关性。

表2 翘嘴鲌GHR2基因内含子中微卫星引物序列

Tab. 2 Primer sequences used for microsatellite amplification in the introns of *C. alburnus* GHR2 gene

引物 primer	序列 (5' - 3') sequence (5' - 3')	重复核心 repeat motifs
Tail A	FAM-GCCTCCCTCGCGCCA	
Cal-GHR2-1	F: GCCTCCCTCGCGCCAATAGC ACGTCATATTATGTCCA R: CACAAGTGCTCCAGTCCG	(TG) ₅
Cal-GHR2-2	F: GCCTCCCTCGCGCCACAGT GACTCTATCTTCATTCTC R: TAATTGCGATACCAACAGTG	(GAAG) ₅
Cal-GHR2-3	F: GCCTCCCTCGCGCCAGTCT TCTGAGGTCAATCTTACT R: TGCTGTATCGTGAACAAAGTC	(TATC) ₅ (AT) ₁₅ (AC) ₁₁ (AT) ₁₄ (TG) ₆
Cal-GHR2-4	F: GCCTCCCTCGCGCCAAATCT CGCTCACTCAATCTT R: CACCATTAGCTACAACAGA	(TA) ₁₅

2 结果

2.1 翘嘴鲌GHR1和GHR2基因序列

对获得的翘嘴鲌GHR1和GHR2片段进行拼接和组装, 并设计引物实验验证后, 将GHR1和GHR2提交至GenBank数据库, 获得的登录号分别为MF774179和MF774180。分析表明, 翘嘴鲌GHR1基因内含子1和2序列较长, 除去这两个内含子后的长度为9 044bp, 内含子3~8的长度分别为2 018、97、974、125、1 209和1 123 bp, 9个外显子长度分别为449、110、133、170、179、154、91、70和2 142 bp; 在第2外显子的蛋白编码序列中含有(CT)₆的微卫星, 第8内含子中包含(AC)₅的微卫星序列(图1)。

翘嘴鲌GHR2基因序列全长为11 757 bp, 含有8个内含子(长度分别为1 832、3 019、1 549、477、262、99、1 347和81 bp)和9个外显子(长度分别为438、86、136、176、185、142、91、70和1 767 bp); 第一内含子中存在(TG)₅的微卫星, 第6内含子中存在(GAAG)₅的微卫星, 第7内含子中存在(TATC)₅(AT)₁₅(AC)₁₁(AT)₁₄(TG)₆和(TA)₁₅的微卫星(图1)。

2.2 翘嘴鲌GHR1和GHR2氨基酸序列

通过生物信息学分析, 翘嘴鲌GHR1基因cDNA全长为3 498 bp, 其中5'-非编码区(5' UTR)为465 bp, 3'-非编码区(3' UTR)为1 215 bp, 开放阅读框(ORF)为1 818 bp, 编码605个氨基酸。其

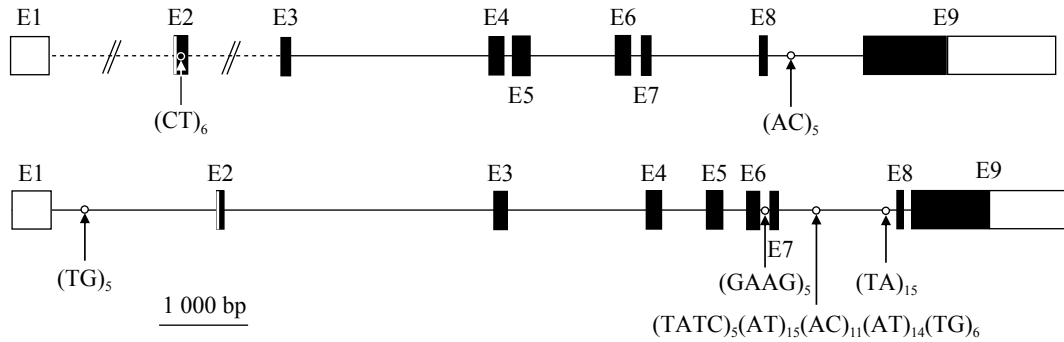


图1 翘嘴鲌GHR1和GHR2基因示意图

外显子和内含子分别用方框和直线表示, 其中黑框部分表示编码区, 虚线表示未扩增区域, 双斜线表示非比例的内含子长度; E1~9表示外显子1~9; 微卫星位置用圆圈标示

Fig. 1 Schematic diagram of *C. alburnus* GHR1 and GHR2 gene

The boxes and lines represent the exons and introns respectively, the coding region is denoted by the filled boxes, and the dotted line represents the non-amplified region, double slashes indicate non-proportional representation of the introns; E1-9 represents exons 1-9; the location of the microsatellites is denoted by circle

相对分子质量为66.33 ku, 理论等电点为4.79。翘嘴鲌GHR2基因cDNA全长为1 743bp, 其中5'-非编码区(5' UTR)为448 bp, 3'-非编码区(3' UTR)为900 bp, 开放阅读框(ORF)为1 743 bp, 编码580个氨基酸残基。其相对分子质量为65.17 ku, 理论等电点为5.03。

GHR1和GHR2均具有脊椎动物GHR的基本结构特征, 但二者在结构上存在一定差异。GHR1和GHR2均由信号肽、胞外区、跨膜区、胞内区组成。GHR1这4个区域氨基酸残基数分别为23、223、23和336, GHR2这4个区域氨基酸残基数分别为19、222、23和316。邻近跨膜区位置具有GHR的特征基序FGZFS(Z为任意氨基酸); 在胞内区存在2个保守的Box, 即Box1、Box2; 翘嘴鲌GHR1和GHR2氨基酸相似度仅为37.2%, GHR1胞外区半胱氨酸(C)残基的数量为7, 可以形成3个二硫键, 但GHR2只有5个, 只能形成2个二硫键, 缺少了C5、C6、C7, 多了一个C*; 另外, GHR1具有6个N-糖基化位点, 比GHR2多3个; 在胞内区GHR1存在10个酪氨酸(Y)残基, GHR2只有5个, 缺少了Y1、Y3、Y6、Y7和Y8(图2)。

2.3 翘嘴鲌GHR1和GHR2编码氨基酸序列和其他物种的比较

将翘嘴鲌GHR1和GHR2氨基酸序列分别与GenBank数据库中获得的其他鱼类编码氨基酸序列进行比对。5种鱼的序列比对结果表明, GHR中YGZFS基序、Box1和Box2等有着重要生物功能的区域要保守一些。其中GHR1中除了南方鲇

中的Z为天冬氨酸(D)外, 其余均为谷氨酸(E); GHR2中翘嘴鲌和鲤的Z为E, 斑马鱼和南方鲇为D, 日本鳗鲡和其他4种鱼之间存在较大差异。GHR1中5种鱼除了南方鲇外, Box1序列完全一致, Box2中翘嘴鲌与鲤一致, 与斑马鱼只有1个氨基酸的差异(图3); GHR2中翘嘴鲌Box1与鲤完全一致, 与斑马鱼有1个氨基酸的差异。Box2中翘嘴鲌与鲤和斑马鱼完全一致(图4)。

GHR1中胞外半胱氨酸残基在所分析的5种鱼类中高度保守, 大部分鱼类具有7个半胱氨酸, 除了日本鳗鲡缺少C7外, 其他鱼类的胞外半胱氨酸残基数量和位置完全一致; 胞外区10个酪氨酸残基中有6个位点完全保守。GHR2中斑马鱼和翘嘴鲌一样, 具有5个胞外半胱氨酸残基, 但鲤和日本鳗鲡缺少C5; 胞内区5个酪氨酸残基中有2个完全保守。

翘嘴鲌GHR1和GHR2编码氨基酸序列均与鲤的相似性最高, GHR1与鲤2个亚型的相似性分别为90.9%和89.8%, GHR2与鲤2个亚型的相似性分别为81.8%和82.4%。与半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)的相似性最低, 均不到50%。通过N-J系统进化树发现(图5), 除了日本鳗鲡外, 其他鱼类可以按GHR1和GHR2分为两大支。在各分支中, 翘嘴鲌首先与鲤科鱼类聚类, 该结果基本符合一般的进化规律。

2.4 翘嘴鲌GHR1和GHR2中微卫星的多态性检测及与生长性状的关联分析

将5个微卫星位点在24个样本中进行多态性检测, 结果表明除了Cal-GHR1中(AC)₅微卫星位



图 2 翘嘴鲌GHR1和GHR2氨基酸序列结构比较

下划线上氨基酸序列表示信号肽；粗下划线上粗体氨基酸序列表示跨膜区域；双下划线上为N-糖基化位点；波浪线上斜体氨基酸序列为FGZFS基序；方框内为Box1、Box2区；阴影处为胞外区半胱氨酸和胞内区酪氨酸

Fig. 2 Comparison of amino acid sequence structure between GHR1 and GHR2 of *C. alburnus*

The amino acid sequence on the underline indicates the signal peptide; the bold amino acid sequence on the underline indicates the transmembrane region; the N-glycosylation site is marked on the double underline; the italic acid sequence on the wave line is FGZFS motifs. Boxes are for Box1, Box2 area; the shaded areas are the extracellular cysteine and intracellular tyrosine

点外，Cal- *GHR2*中4个位点均具有多态性。将这4个微卫星位点在120尾同批繁殖、同塘养殖的翘嘴鲌中进行分析。等位基因大小及频率见图6，位于第一内含子中的位点Cal-*GHR2*-1检测到6个等位基因，具有7种基因型。第6内含子中的Cal-*GHR2*-2具有193、201、205和209 bp 4种等位基因，其百分比分别为0.4%、11.6%、77.6%和10.3%。位于第7内含子中的Cal-*GHR2*-3和Cal-*GHR2*-4均具有非常高的多态性。Cal-*GHR2*-3中检测到18种等位基因，具有50种基因型。频率超过10%的等位

基因有218(10.9%)、230(12.2%)、232(16.0%)、236(14.7%)和238(11.3%)，占有等位基因频率的65.1%。Cal-*GHR2*-4中检测到17种等位基因，具有61种基因型。这4对引物的 H_o 为0.233~0.899(平均0.589)， H_e 为0.375~0.898(平均0.724)，香农指数(I)为0.705~2.410(平均1.750)， PIC 为0.344~0.885(平均0.699)，Cal-*GHR2*-2位点 PIC 为0.344(0.250< PIC <0.500)，属低度多态性位点。其余3个微卫星位点 PIC 值均大于0.5，属于高度多态性位点(表3)。

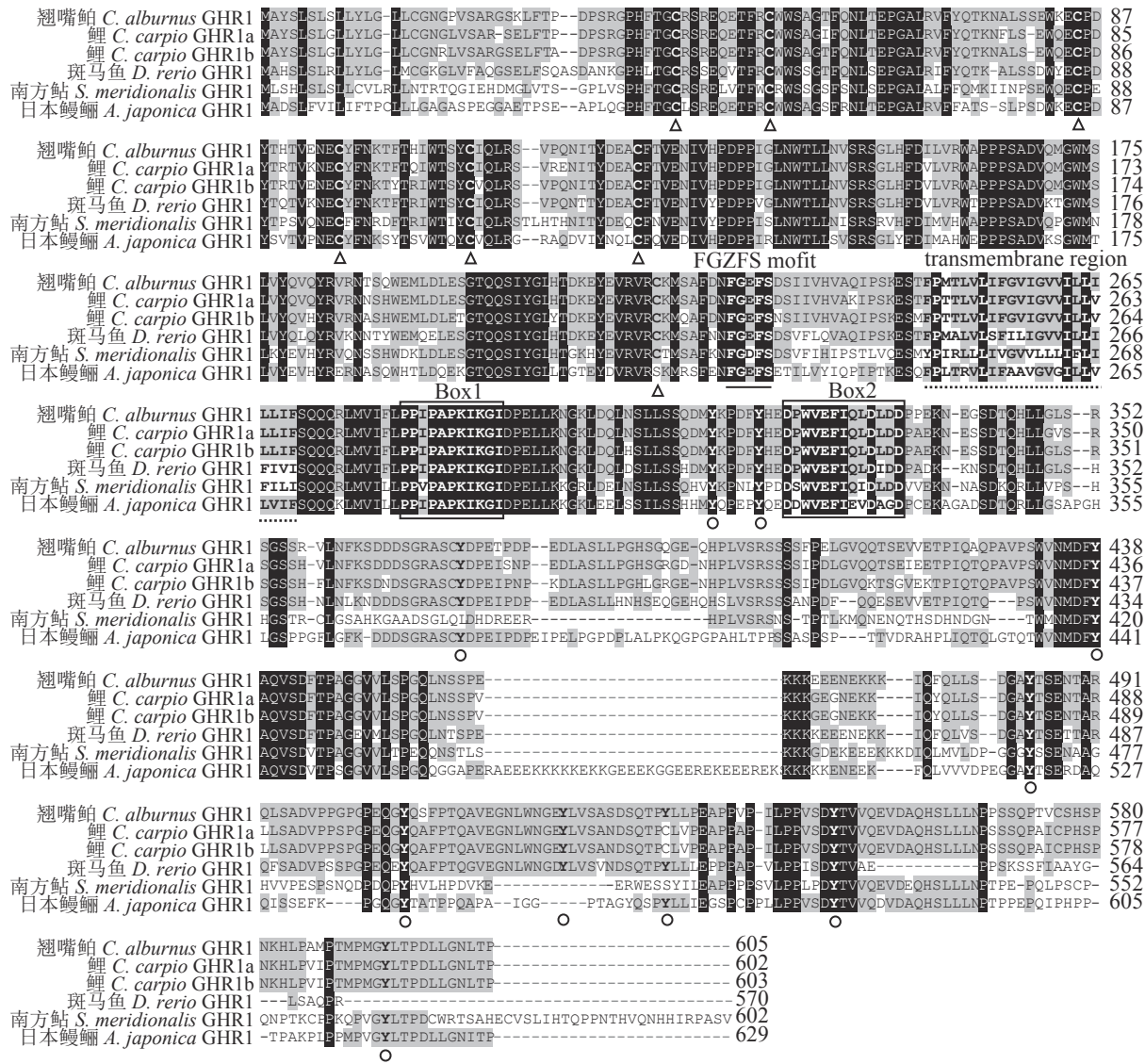


图3 翘嘴鲌GHR1基因编码氨基酸序列和其他鱼类比较

“△”表示胞外区半胱氨酸位点; “○”表示胞内区酪氨酸位点; 实线上方氨基酸序列表示FGZFS基序; 虚线上方氨基酸序列表示跨膜区域; 下同

Fig. 3 Amino acid sequences encoded by *C. alburnus* *GHR1* gene are compared to other fish species

"△" denotes the cysteine site; "○" denotes the tyrosine locus; the FGZFS motifs are underlined with solid line; the transmembrane domains are underlined with dotted line; the same below

舍弃突变个体数低于样本量5%的基因型, 剩下的数据用于性状关联分析(表4)。微卫星位点Cal-*GHR2*-1对于体长和体质量的分析结果表明, 341/349型个体占样本数的10.8%, 其平均体长和体质量最低, 345/345型平均体长和体质量最高, 341/349型的体长要显著低于345/345型 ($P<0.05$); 在微卫星位点Cal-*GHR2*-2中, 201/205型个体占样本数的11.7%, 其体长和体质量均显著高于205/205型个体 ($P<0.05$)。在微卫星位点Cal-*GHR2*-3中, 232/236型个体占样本数的9.2%, 其体长显

著低于236/238型个体 ($P<0.05$); 同时232/236型体质量最低, 236/238型体质量最高, 但差异达不到显著性水平 ($P>0.05$)。在微卫星位点Cal-*GHR2*-4中, 超过样本量5%的基因型只有391/391和391/393, *t*检验结果表明391/391型体质量显著高于391/393型 ($P<0.05$)。

3 讨论

GH对动物的生长、发育、生殖有着重要的

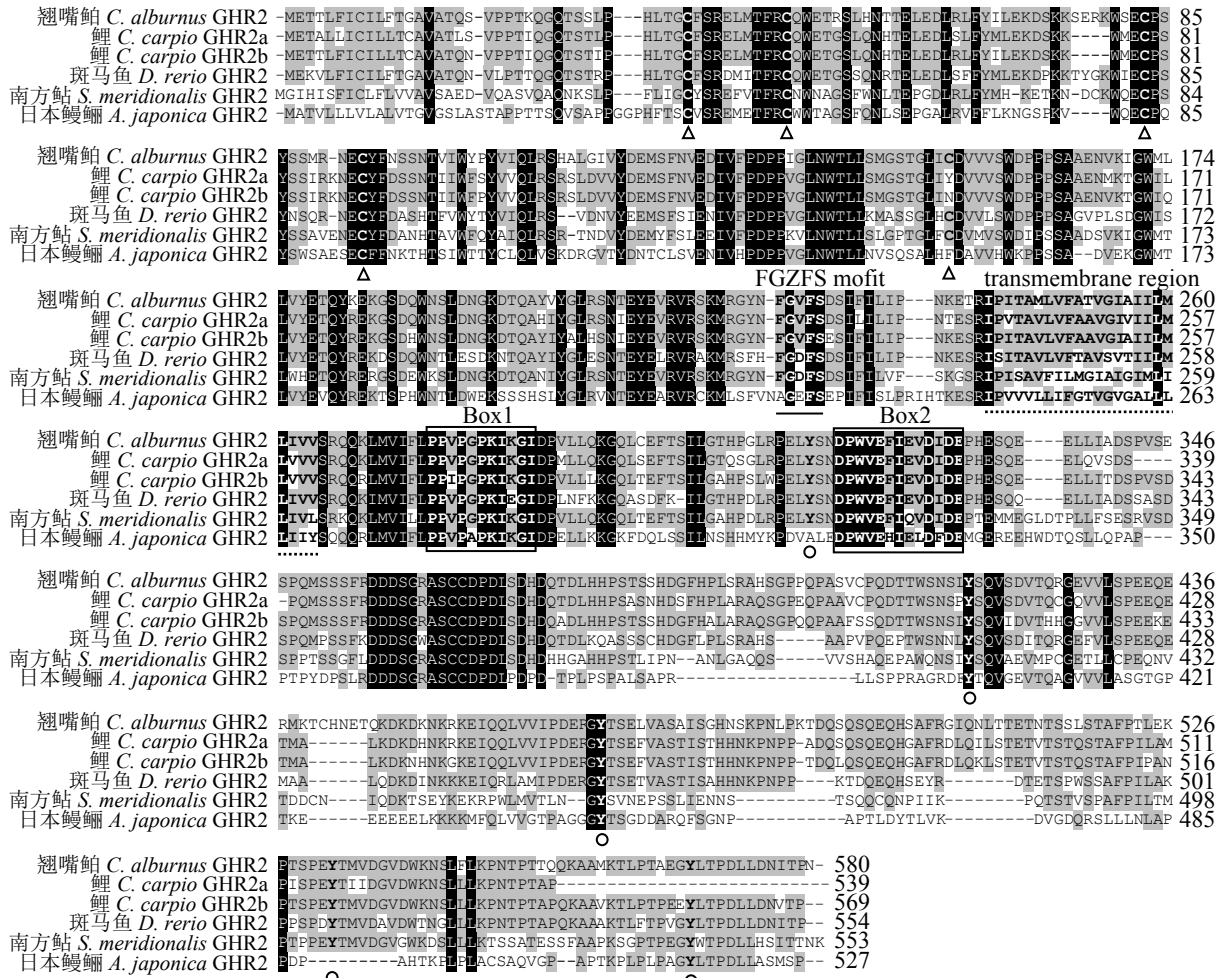


图4 翘嘴鲌GHR2基因编码氨基酸序列和其他鱼类比较

Fig. 4 Amino acid sequences encoded by *C. alburnus* GHR2 gene are compared to other fish species

作用，GHR通过二聚体的形式与GH相结合，启动细胞内的信号传导机制，刺激胰岛素样生长因子1(IGF-1)的表达和分泌，并促进组织细胞的生长与分化^[22]。由于结构上的保守性，目前发现不同物种GH和GHR相互间都具有亲合性。相对GH和IGF1，GHR结构和功能要复杂一些。序列分析结果表明鱼类中明显存在两类GHR：GHR1和GHR2，其中GHR2仅在鱼类中被发现^[11]。鲤中还存在旁基因^[23]，其GHR1和GHR2各具有2种类型。这可能与其染色体数目为其他鲤科鱼类的2倍有关^[24]。人类GHR基因由10个外显子和9个内含子组成，其中外显子1是非编码区。翘嘴鲌GHR1和GHR2翻译起始位置与其相同，均位于外显子2上，但外显子数量比其少1个。不同鱼类GHR内含子数量和长度有所差异，还可通过不同剪接方式产生不同的转录产物。

经研究，翘嘴鲌GHR1和GHR2氨基酸序列具有鱼类GHR的共同特性：跨膜区将成熟肽

分为胞外区和胞内区。胞外区中接近跨膜区的部分具有FGZFS(Z为任意氨基酸)模块序列，这一结构具有稳定空间构象，可保证配体正常结合和受体信号转导^[25]。在本研究比对分析采用的10种鱼中，GHR1中的FGZFS模块要保守一些，除日本鳊为FGDFS外，其他鱼类都为FGEFS。但在GHR2中，FGEFS中的E常变为V或者D。日本鳊和半滑舌鲷甚至分别变为AGEFS和FGGFG。胞内区中具有保守的对整个信号传导起关键作用的Box1和与受体内化作用相关的Box2。大多数鱼类Box1中具有4个保守的脯氨酸，其中后面2个脯氨酸被认为具有关键作用^[26]。

功能基因中经常包含一些和生长性状相关的SNP位点^[27-28]。在鱼类中，相继发现了GHR基因中SNP与生长性状关联。吉富罗非鱼(*GIFT O. niloticus*)GHR1中发现的3个位点均与增重相关，而GHR2中的5个SNP位点中只有1个与雌鱼的增

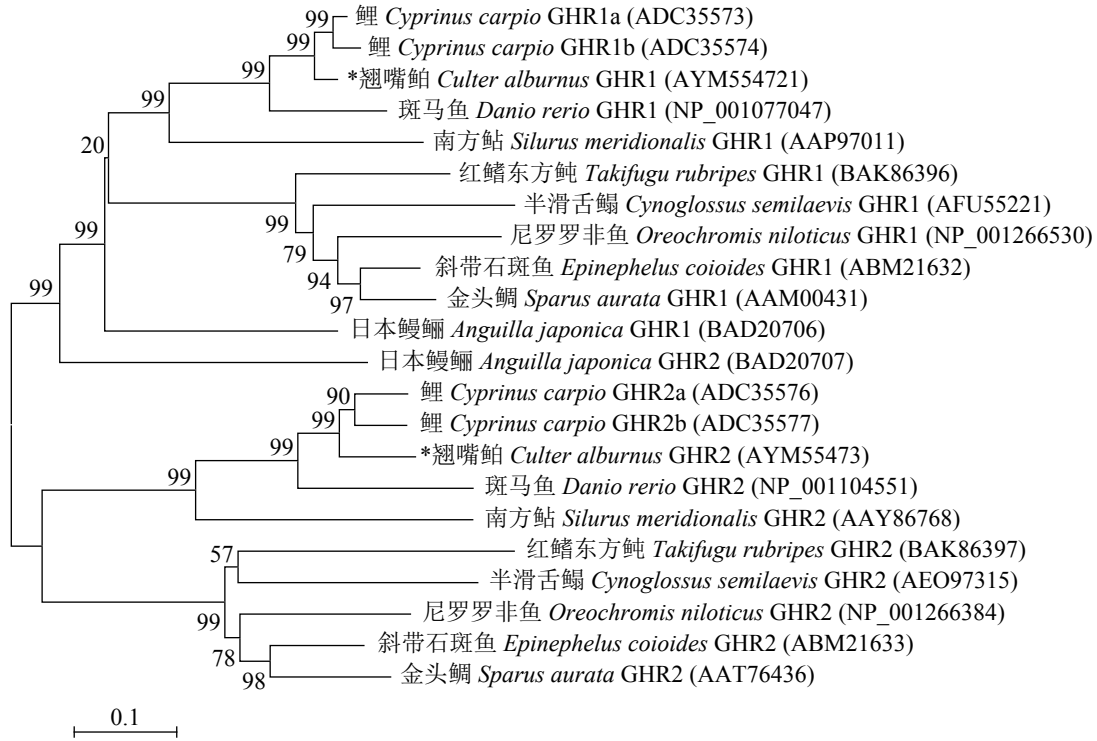


图 5 基于GHR1及GHR2氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of GHR1 and GHR2

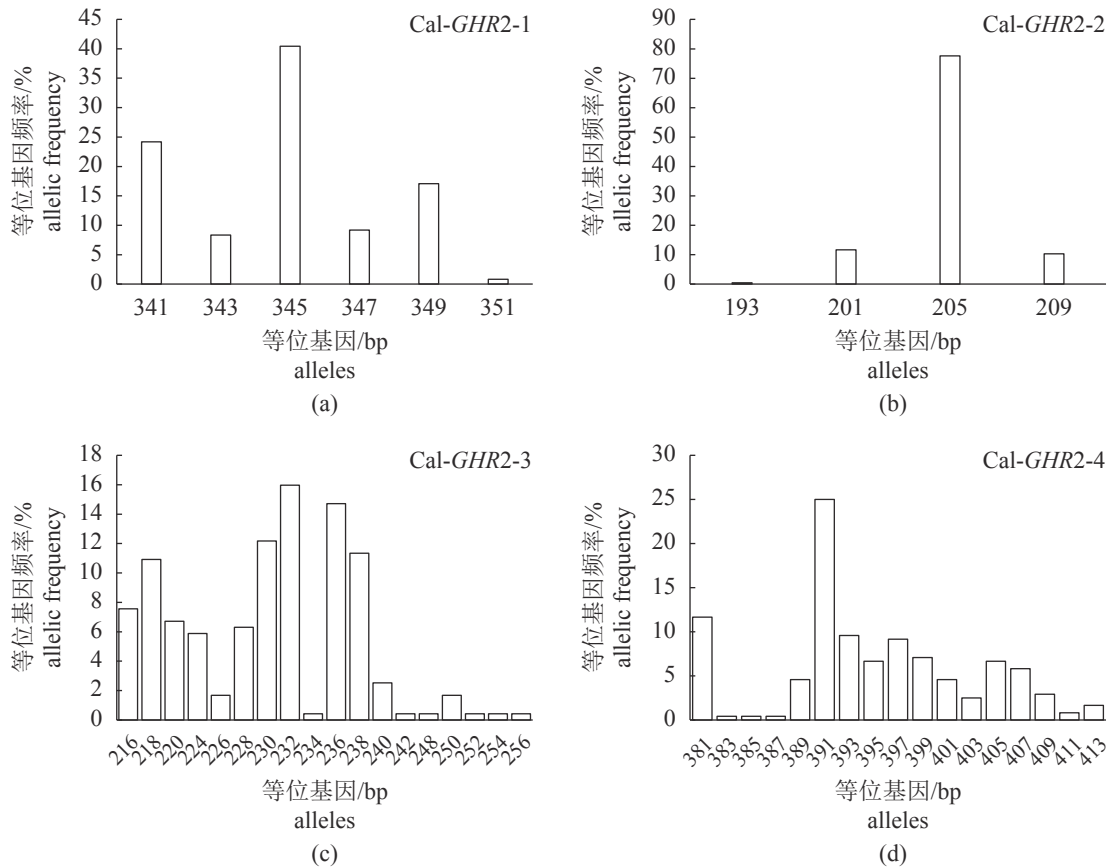


图 6 翘嘴鲌GHR2中4个多态性位点的等位基因频率

Fig. 6 Allele frequencies of 4 microsatellite loci in GHR2 gene of C. alburnus

表3 4个微卫星位点在120尾翘嘴鲌中的多态性信息

Tab. 3 Polymorphism information for four microsatellite loci in 120 individuals of *C. alburnus*

位点 loci	观测等位基因数 N_a	有效等位基因数 N_e	多态性信息含量 PI_C	观测杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	香农指数 I
Cal- <i>GHR2</i> -1	6	3.754	0.694	0.483	0.737	1.477
Cal- <i>GHR2</i> -2	4	1.597	0.344	0.233	0.375	0.705
Cal- <i>GHR2</i> -3	18	9.456	0.885	0.899	0.898	2.406
Cal- <i>GHR2</i> -4	17	8.541	0.874	0.742	0.887	2.410
平均 average	11.25	5.837	0.699	0.589	0.724	1.750

表4 翘嘴鲌*GHR2*基因中4个微卫星位点不同基因型与生长性状的关联分析Tab. 4 Association analysis between growth traits and different genotypes of 4 microsatellite loci in *GHR2* of *C. alburnus*

位点 loci	基因型 genotype	频率/% frequency	体长/cm body length	体质量/g body weight
Cal- <i>GHR2</i> -1	341/341	10.0	17.800±0.496 ^{ab}	65.400±5.539
	341/345	7.5	16.859±0.793 ^{ab}	58.833±8.619
	341/347	8.3	17.071±0.634 ^{ab}	56.300±7.109
	341/349	10.8	15.510±1.426 ^a	54.677±9.138
	343/343	5.8	16.477±1.379 ^{ab}	58.371±15.889
	345/345	30.0	18.035±0.499 ^b	70.528±6.203
	345/349	9.2	16.951±1.014 ^{ab}	60.809±9.464
Cal- <i>GHR2</i> -2	201/205	11.7	18.561±0.848 ^a	76.343±9.141 ^a
	205/205	65.0	16.698±0.355 ^b	57.276±3.125 ^b
	205/209	8.3	18.132±1.192 ^{ab}	76.230±15.305 ^{ab}
	209/209	5.0	18.652±0.959 ^{ab}	81.833±14.554 ^{ab}
Cal- <i>GHR2</i> -3	220/232	5.0	16.600±1.172 ^{ab}	56.533±12.416
	230/232	10.8	16.837±0.634 ^{ab}	56.877±7.539
	232/236	9.2	14.388±1.398 ^a	43.064±4.822
	236/238	8.3	17.584±0.927 ^b	63.650±9.340
Cal- <i>GHR2</i> -4	391/391	13.3	17.029±1.278	71.581±8.816 ^a
	391/393	5.0	15.573±0.927	44.333±8.076 ^b

注：同列中上标字母不同表示差异显著($P<0.05$)

Notes: different superscripts within the same column denote significant differences ($P<0.05$)

重相关。*GHR2*和*GHR1*长度相差不大，但其SNP位点数目明显多于*GHR1*，表明*GHR1*在吉富罗非鱼体内发挥着更重要的作用。陶文静等^[29]对5尾鲤的4个*GHR*基因进行检测，共找到38处SNPs位点，其中5个SNP位点可使用PCR-RFLP方法检测。而其余SNP位点由于附近GC含量不合适，加上鲤基因组存在2套基因^[23]，采用4引物方法检测另外的SNP位点效果也不理想。仅对这5个位点进行了检测，发现均与增重显著相关。在这5个位

点中，增重快的基因型除了1个位点为杂合型外，其余均为纯合型，说明不一定越杂合越有生长优势^[29]。半滑舌鲷*GHR1*外显子8和9中各存在1个SNP位点。位于外显子8的(G1357A)SNP位点，GG型个体由于产生了新的CpG位点，提高了甲基化水平，与另外2个基因型的*GHR1*表达和生长性状均具有显著区别^[30]。除了SNP位点外，功能基因序列中的SSR也有可能与生长性状相关联，翘嘴鲌^[31]和尼罗罗非鱼^[32]的*GH*侧翼均发现了与

生长相关的微卫星位点。倪静等^[12]在牙鲆GHR基因5'端启动子区发现一个微卫星标记,该标记在2个群体不同基因型中的生长性状有显著差别。本实验在翘嘴鲌GHR1和GHR2中都发现了微卫星序列,但GHR1基因中的2个微卫星位点在所研究的群体中均没有多态性。其中GHR1第1外显子编码序列中的(CT)₆微卫星位点在团头鲂对应位置也存在。GHR2基因中的4个微卫星位点均具有多态性,经初步研究,发现均与生长性状相关。

虽然候选基因关联性分析在水产动物中发展较快,但与人类医学上的关联分析相比还不够深入。其中较为关键的是对于样本群体的质量控制没有形成共识。奠基者效应、交配方式和选择作用等因素都会对关联分析造成影响^[33]。关联分析所采用的样本往往需要具有相同的遗传背景,如果存在群体层化(population stratification)即存在亚群,得到的多态性位点与性状间的相关性可能并非由功能性等位基因引起。因此在关联分析前,需要采用一定数量与目的基因座不连锁的标记进行遗传结构分析,如果在群体内存在亚群,可以进行分层矫正,从而提高结果的准确性^[34]。样本数量对统计结果有很大的影响,较少的样本量会忽视群体中稀有基因对于性状的影响。本实验由于样本量较少,Cal-GHR2-4位点中有很多稀有基因型低于5%而被排除在统计分析之外。数量性状往往受多个微效基因组成的复杂分子网络控制,因此同时针对多个基因进行分析更为科学。随着全基因组测序技术的发展,对于基因调控通路的研究变得更为容易,这使候选基因关联法更便于开展^[35]。本实验在获得翘嘴鲌2个GHR基因序列的基础上,对其中的微卫星进行了初步分析。这些微卫星在用于个体识别的同时,也可与性状关联进行分析,为翘嘴鲌的选育提供基础数据。

参考文献:

- [1] Tsushima T. Technics of growth hormone receptor assay[J]. Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine, 1976, 34(3): 461-465.
- [2] Argetsinger L S, Carter-Su C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor[J]. *Physiological Reviews*, 1996, 76(4): 1089-1107.
- [3] Caldach-Giner J A, Mingarro M, de Celis S V R, et al. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 136(1): 1-13.
- [4] Tse D L Y, Tse M C L, Chan C B, et al. Seabream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full-length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2003, 1625(1): 64-76.
- [5] 章力, 黄希贵, 焦保卫, 等. 南方鲇两种生长激素受体的结构分析及其组织分布和激素调节[J]. *动物学报*, 2006, 52(6): 1096-1106.
- Zhang L, Huang X G, Jiao B W, et al. The structure analysis, tissue distribution and hormonal regulation of two distinct growth hormone receptors in southern catfish *Silurus meridionalis*[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2006, 52(6): 1096-1106(in Chinese).
- [6] Ozaki Y, Fukada H, Kazeto Y, et al. Molecular cloning and characterization of growth hormone receptor and its homologue in the Japanese eel (*Anguilla japonica*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 143(4): 422-431.
- [7] Li Y, Liu X C, Zhang Y, et al. Molecular cloning, characterization and distribution of two types of growth hormone receptor in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 152(1): 111-122.
- [8] 马细兰, 冷婷婷, 刘启智, 等. 黄鳍鲷(*Sparus latus*)两种生长激素受体的cDNA克隆及组织表达分析[J]. *海洋与湖沼*, 2011, 42(6): 830-838.
- Ma X L, Leng T T, Liu Q Z, et al. cDNAs cloning and tissues expression of two growth hormone receptors in yellow-fin bream *Sparus latus*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(6): 830-838(in Chinese).
- [9] Walock C N, Kittilson J D, Sheridan M A. Characterization of a novel growth hormone receptor-encoding cDNA in rainbow trout and regulation of its expression by nutritional state[J]. *Gene*, 2014, 533(1): 286-294.
- [10] Hirano Y, Kaneko G, Koyama H, et al. cDNA cloning of two types of growth hormone receptor in torafugu *Taki-fugu rubripes*: tissue distribution is possibly correlated to lipid accumulation patterns[J]. *Fisheries Science*, 2011, 77(5): 855-865.

- [11] Jiao B W, Huang X G, Chan C B, *et al.* The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2006, 36(1): 23-40.
- [12] 倪静, 尤锋, 于深辉, 等. 牙鲆*GHR*基因Promoter区微卫星序列多态性与生长性状关系的初步研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2008, 38(5): 719-725.
- Ni J, You F, Yu S H, *et al.* Microsatellite polymorphism analysis of *GHR* Gene Promoter Region in *Paralichthys olivaceus* hatchery stocks and its association with growth traits[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2008, 38(5): 719-725(in Chinese).
- [13] 乐佩琦, 罗云林. 鲇亚科类系统发育初探(鲤形目: 鲤科)[J]. *水生生物学报*, 1996, 20(2): 182-185.
- Yue P Q, Luo Y L. Preliminary studies on phylogeny of subfamily Cultrinae (Cypriniformes: Cyprinidae)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, 20(2): 182-185(in Chinese).
- [14] Liu S L, Gu Z M, Jia Y Y, *et al.* Isolation and characterization of 32 microsatellite loci for topmouth culter (*Culter alburnus* Basilewsky)[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(3): 7480-7483.
- [15] Liu S L, Gu Z M, Zhao J L, *et al.* Characterization of microsatellites and repetitive flanking sequences (ReFS) from the topmouth culter (*Culter alburnus* Basilewsky)[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015, 63: 127-135.
- [16] 刘士力, 贾永义, 蒋文枰, 等. 翘嘴鲈生长激素(*GH*)基因与侧翼区的克隆及分析[J]. *浙江农业学报*, 2017, 29(8): 1281-1289.
- Liu S L, Jia Y Y, Jiang W P, *et al.* Cloning and sequence analysis of growth hormone gene and its flanking region in topmouth culter (*Culter alburnus* Basilewsky)[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2017, 29(8): 1281-1289(in Chinese).
- [17] 刘士力, 程顺, 蒋文枰, 等. 翘嘴鲈胰岛素样生长因子-I的克隆及序列分析[J]. *水生生物学报*, 2019, 43(2): 272-281.
- Liu S L, Cheng S, Jiang W P, *et al.* Cloning and sequence analysis of insulin-like growth factor- I gene in topmouth culter (*Culter alburnus* Basilewsky)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(2): 272-281(in Chinese).
- [18] 马达文, 王卫民. 翘嘴鲈高效生态养殖新技术[M]. 北京: 海洋出版社, 2012.
- Ma D W, Wang W M. The new and highly efficient ecological culture technology of *Culter alburnus*[M]. Beijing: Ocean Press, 2012 (in Chinese).
- [19] Liu H, Chen C H, Gao Z X, *et al.* The draft genome of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) reveals the development of intermuscular bone and adaptation to herbivorous diet[J]. *Gigascience*, 2017, 6(7): gix039.
- [20] 谢淑娟, 牛东红, 阮海灯, 等. 鳊鱼*IGFBP*基因结构及生长性状相关SNP筛选[J]. *水产学报*, 2015, 39(6): 799-809.
- Xie S M, Niu D H, Ruan H D, *et al.* Molecular characterization of IGFBP and association analysis with growth traits in the razor clam *Sinonovacula constricta*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(6): 799-809(in Chinese).
- [21] Blacket M J, Robin C, Good R T, *et al.* Universal Primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2012, 12(3): 456-463.
- [22] 阮瑞霞, 俞菊华, 李红霞, 等. 吉富罗非鱼两种生长激素受体基因的分离及与增重相关的SNPs位点[J]. *动物学杂志*, 2011, 46(3): 37-46.
- Ruan R X, Yu J H, Li H X, *et al.* Isolation of two growth hormone receptor genes and SNPs associated with body weight in GIFT strain tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2011, 46(3): 37-46(in Chinese).
- [23] 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): 218-228.
- Yu J H, Li H X, Tang Y K, *et al.* Isolation, transcripts polymorphism and tissues expression of growth hormone receptor genes in *Cyprinus carpio* var. *jian*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(2): 218-228(in Chinese).
- [24] Larhammar D, Risinger C. Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp *Cyprinus carpio*[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1994, 3(1): 59-68.
- [25] Lee L T O, Nong G, Chan Y H, *et al.* Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone[J]. *Gene*, 2001, 270(1-2): 121-129.

- [26] Dinerstein H, Lago F, Goujon L, *et al.* The proline-rich region of the GH receptor is essential for JAK2 phosphorylation, activation of cell proliferation, and gene transcription[J]. *Molecular Endocrinology*, 1995, 9(12): 1701-1707.
- [27] 卫侃韵, 谢淑媚, 王沈同, 等. 缙蛭 *EGFR* 基因内含子1内 SNP 位点多态性与生长性状相关性分析[J]. *水产学报*, 2019, 43(2): 483-491.
- Wei K Y, Xie S M, Wang S T, *et al.* Polymorphism of SNPs in *EGFR* intron 1 and its association with growth traits in *Sinonovacula constricta*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(2): 483-491(in Chinese).
- [28] 李胜杰, 姜鹏, 樊佳佳, 等. 大口黑鲈肌球蛋白重链基因 SNPs 的筛选及与生长性状的关联[J]. *水产学报*, 2018, 42(3): 305-313.
- Li S J, Jiang P, Fan J J, *et al.* SNPs detection of *MYH* gene and its association with growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(3): 305-313(in Chinese).
- [29] 陶文静, 马龙俊, 阮瑞霞, 等. 建鲤 *GHR* 基因多态性及与增重相关的 SNP 位点的筛选[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(4): 622-629.
- Tao W J, Ma L J, Ruan R X, *et al.* SNP loci associated with weight gain on growth hormone receptor genes in *Cyprinus carpio* var. *jian*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(4): 622-629(in Chinese).
- [30] Zhao J L, Si Y F, He F, *et al.* Polymorphisms and DNA methylation level in the CpG site of the *GHR1* gene associated with mRNA expression, growth traits and hormone level of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(4): 853-865.
- [31] 刘士力, 蒋文枰, 程顺, 等. 翘嘴鲌生长激素基因侧翼2个微卫星位点与生长性状的关联分析[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(1): 62-68.
- Liu S L, Jiang W P, Cheng S, *et al.* Correlation analysis of growth traits and two microsatellite polymorphisms in flanking region of growth hormone gene in topmouth culter (*Culter alburnus* Basilewsky)[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2019, 31(1): 62-68(in Chinese).
- [32] Dias M A D, Neto R V R, de Sousa Bueno Filho J S, *et al.* Growth hormone gene polymorphism associated with grow-out performance of *Oreochromis niloticus* strains[J]. *Aquaculture*, 2019, 503: 105-110.
- [33] Rafalski A, Morgante M. Corn and humans: recombination and linkage disequilibrium in two genomes of similar size[J]. *Trends in Genetics*, 2004, 20(2): 103-111.
- [34] Pritchard J K, Rosenberg N A. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies[J]. *The American Journal of Human Genetics*, 1999, 65(1): 220-228.
- [35] Pers T H, Karjalainen J M, Chan Y, *et al.* Biological interpretation of genome-wide association studies using predicted gene functions[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 5890.

Molecular characterization of two growth hormone receptor genes, and association analysis between microsatellite polymorphism and growth traits in the topmouth culter (*Culter alburnus*)

LIU Shili^{1,2,3}, JIA Yongyi¹, LIU Jialin^{1,4}, ZHENG Jianbo¹, CHI Meili¹,
CHENG Shun¹, JIANG Wenping¹, GU Zhimin^{1*}, ZHAO Jinliang^{2,3*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Animal Genetic and Breeding of Zhejiang Province,
Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture,

Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China;

2. Laboratory of Freshwater Fisheries Germplasm Resources,

Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

4. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210000, China)

Abstract: To better study the structure and function of the growth hormone receptor (GHR) of the topmouth culter, *Culter alburnus*, the DNA sequences of *GHR1* and *GHR2* were cloned based on mRNA data from the transcriptome of *C. alburnus*. Bioinformatics analysis was performed and the polymorphic microsatellite loci in the *GHRs* were tested in 120 samples which were bred in the same batch and cultured in the same pond. The full length of *GHR1* cDNA is 3 498 bp, with an open reading frame (ORF) of 1 818 bp, and a 605 amino acid residue encoded protein. The full length of *GHR2* cDNA is 1 743 bp, and with an ORF of 1 743 bp, and a 580 amino acid residue encoded protein, the amino acid sequences of *GHR1* and *GHR2* both comprised a signal peptide, extracellular region, transmembrane region, and intracellular region, and are 37.2% similar. There were marked differences in their structures. *GHR1* has seven cysteine residues in its extracellular region of *GHR1*, but *GHR2* has only five. *GHR1* has three N-glycosylation sites more than *GHR2*. In the intracellular domain, there are 10 tyrosine residues in *GHR1*, but only 5 in *GHR2*, indicating that the two proteins may have different biological functions. Homologous amino acid sequence alignment showed that the *GHRs* are highly conserved with *GHRs* from other Cyprinidae. There were both 9 introns in the *GHRs* of *C. alburnus*, the length of intron 1 and 2 in *GHR1* is over 10 kb so that they were not amplified in this experiment. Six microsatellite loci were found in the obtained sequence: the microsatellite locus (CT)₆ in the exon 2 of *GHR1* was located in the signal sequence coding region, and no polymorphism of the (AC)₅ in intron 8 was detected; there were four microsatellite loci in *GHR2*, including (TG)₅ in intron 1, (TATC)₅(AT)₁₅(AC)₁₁(AT)₁₄(TG)₆ and (TA)₁₅ in intron 7, which belonged to highly polymorphic loci (*PIC* > 0.5). The (GAAG)₅ microsatellite loci in intron 6 was moderately polymorphic (*PIC* = 0.463). The number of genotypes detected using two microsatellite loci in intron 7 was 50 and 61, respectively, which had good potential for individual identification. Correlation analysis indicated that the four polymorphic microsatellite loci were all closely related to the growth traits. The cloning and the characterization of microsatellites of *GHR* gene may provide a reference for further study of its biological function and molecular marker assisted breeding in *C. alburnus*.

Key words: *Culter alburnus*; growth hormone receptor; sequence analysis; microsatellite; growth trait

Corresponding authors: GU Zhimin. E-mail: guzhimin2006@163.com;

ZHAO Jinliang. E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

Funding projects: Major Science and Technology Programs for Agriculture New Variety Selection of Zhejiang Province (2016C02055-1)