

大口黑鲈肌肉生长抑制素基因单核苷酸多态性位点的筛选及其与生长性状关联性分析

于凌云, 白俊杰*, 樊佳佳, 李小慧, 叶星

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东广州 510380)

摘要: 采用 PCR-SSCP 和 PCR-RFLP 技术对大口黑鲈肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN) 基因全序列进行了 SNPs 位点筛选和分型, 共筛选到 2 个单核苷酸多态性(SNPs) 位点(C-1453T 和 T+33C), 其中 C-1453T 位于启动子 E8 box 和 Octamer(+) 调控元件之间的区域, T+33C 的突变位于第一外显子区域, 属于同义突变, 氨基酸没有发生变化; 利用一般线性模型分析单标记位点与大口黑鲈生长性状(体重、体长、体高、体宽和眼间距) 相关性, 均未达到显著水平($P > 0.05$)。将 2 个 SNPs 位点不同基因型组合成 6 种双倍型(去掉频率小于 3% 的组合), 关联分析表明, 双倍型 D2 在体重、体长、体高、体宽和眼间距的均值均高于其它双倍型, 而双倍型 D5 在体重、体长、体高、体宽和眼间距的均值均低于其它双倍型, 双倍型 D2 与 D5 之间在 5 个主要生长性状均存在差异显著($P < 0.05$), 推测双倍型 D2 对生长性状起正相关, 而双倍型 D5 与大口黑鲈的生长性状呈负相关, 因此推断 MSTN 基因突变位点双倍型 D2 与 D5 可作为大口黑鲈生长性状的两个标记位点, 用其分子标记位点来辅助大口黑鲈育种工作以期加快育种进程。

关键词: 大口黑鲈; 肌肉生长抑制素; 单核苷酸多态性位点; 双倍型; 关联分析

中图分类号: S 917

文献标识码: A

肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN), 属于转化生长因子超家族(transforming growth factor- β , TGF- β), 该家族具有共同的蛋白水解加工信号位点(RXXR)和 C 端生物活性区。MSTN 基因是一类分泌型的多肽, 通过二聚体与细胞膜上的受体结合, 再经过 3 种 Smad 蛋白的介导, 信号传入细胞核, 抑制生肌决定因子(Myod) 家族成员转录活性, 负向调节肌肉的生长发育^[1]。该基因是美国 John Hopkins 大学医学院的 McPherron 等^[2] 在研究转化生长因子 p(TGF-p) 时发现的, 并首次扩增出该基因的 cDNA, 其功能是抑制肌肉细胞的增生和分化^[3-5]。该结果一发表, 立刻引起了广大研究者的高度重视, 对该基因的研究也迅速

地开展起来。目前在人、猪、牛、羊、鸡等动物方面对 MSTN 基因的功能及调控机理做了大量的研究^[6-10]。在水产动物方面, 已克隆了斑马鱼(*Danio rerio*)^[11-12]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[13]、大马哈鱼(*Salmo salar*)^[14]、金头鲷(*Sparus aurata*)^[15]、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[16]、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[17]、石首鱼(*Umbrina cirrosa*)^[18]、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[19] 等鱼类的 MSTN 基因; 并对鱼类 MSTN 基因在各个组织的表达进行了相关研究, MSTN 除在骨骼肌表达外, 还可在鱼类多个组织如肝、胃、心、腮、肌肉、眼、脑、卵巢、精巢等中表达^[11-19]。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymor-

收稿日期:2010-02-05 修回日期:2010-03-20

资助项目:农业部公益性行业科研专项(200903045); 国家自然科学基金项目(3090112); 广东省科技计划项目(2007B020708008); 广东省自然科学基金(9151038001000005); 广东省海洋渔业科技推广专项(A200899F01); 广东省科技兴渔项目(B200701A06, B200601G09)

通讯作者:白俊杰, Tel:020-81616129, E-mail:baijj2005@21cn.com

phisms, SNPs)是指在染色体基因组水平上单个核苷酸的变异引起的DNA序列多态性,它包括单碱基的转换、颠换、插入及缺失等形式^[20]。SNPs作为一类遗传标记以其信息含量丰富、遗传稳定等特性得以广泛应用^[21]。候选基因法是一种常用的从DNA水平寻找与数量性状相连锁的方法。从1997年Grobet等^[22], McPherron等^[23]分别在比利时蓝牛(Belgian Blue)和皮尔蒙特牛(Piedmontese)中发现了MSTN基因的自然缺失与变异造成这两种牛的双臀性状现象之后,许多学者都相继把马、猪、鸡、羊等畜禽的MSTN基因作为候选基因对其进行了单核苷酸多态性研究,研究表明MSTN基因的突变与动物的肌肉产量成相关^[24-30]。在水产动物方面把MSTN基因作为候选基因进行单核苷酸多态性研究相对薄弱,国外只有Christian De Santis等^[31]对尖吻鲈(*Lates calcarifer*)MSTN基因进行了研究,在启动子上发现了4个SNPs位点;国内仅见薛良义等^[32]对大黄鱼(*Larimichthys crocea*)的MSTN基因外显子I进行了遗传多态性研究,结果表明突变均与体长和体质量呈显著性相关,但与肌肉脂肪含量无显著相关。本研究以大口黑鲈为研究对象,将MSTN基因作为大口黑鲈生长性状的候选基因,寻找MSTN基因全基因上的遗传多态位点,为寻找大口黑鲈生长性状的分子标记、开展标记辅助育种

(marker associated selection, MAS)工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

实验生物 用来进行SNPs位点筛选的24尾大口黑鲈及用于生长性状关联性分析的127尾大口黑鲈均采自广东省大口黑鲈良种场,筛选SNPs的样品从良种场随机采集,关联分析样本为同一批繁殖和同池养殖10月龄的大口黑鲈。所有样品鱼尾鳍静脉取血,抗凝剂(ACD)与血液体积比为6:1,采用北京时代天跟生化公司(TIANGEN)血液基因组提取试剂盒提取血液DNA,所有DNA样本均放于-20℃保存。

主要试剂 Taq DNA聚合酶体系购自上海申能博彩生物科技有限公司;pMD-18T vector system购自大连宝生物工程有限公司;胶回收(E. Z. N. A Gel Extraction Kit)试剂盒为美国OMEGA公司产品;DNA提取试剂盒购自北京天跟时代科技有限公司;丙稀酰胺和N,N-亚甲基双丙稀酰胺和甘油购自广州威佳科技有限公司。大肠杆菌DH5 α 由本实验室保存。

引物合成 根据GenBank上登录的大口黑鲈MSTN基因的序列(GenBank序列号:EF071854)设计10对引物用来扩增MSTN基因及进行相关酶切(表1)。

表1 大口黑鲈MSTN基因引物信息
Tab.1 Primers of MSTN gene of largemouth bass

引物 primer	碱基组成(5'-3') nucleotide constitutes	产物长度(bp) length of products	最适合退火温度(℃) annealing temperature	用处 purpose
P1	F:CAAAGGAATAGTCTGCCTCATATC R:TTGTCATCTCCCAGCACGTCGTA	1 842	57.4	启动子序列扩增 promoter amplification
P2	F:GCCTATCAGTGTGGGACATTAA R:GTTTCTATTGGGCTGGTGGCGG	220	57.0	Alu I 酶切 Alu I digestion
P3	F:AGCCCAATAGAAAACGGAGCAGT R:TCATCTCCCAGCACGTCGTA	206	58.0	筛选 SNPs 位点 filter SNPs site
P4	F:CCTCGACCAGTACGACGTGC R:GCGTAATAACGGTCTGAGCG	177	58.0	筛选 SNPs 位点 filter SNPs site
P5	F:TGTACACTTCAATCGCGCATG R:TGCGTATGTGCCTGTCCCGT	252	58.0	筛选 SNPs 位点 filter SNPs site
P6	F:ATACGCATCCGCTCCCTGAAG R:ACCATAAGGGTTCAAGTTAGTGTA	230	58.0	筛选 SNPs 位点 filter SNPs site
P7	F:TATTCACACACTCTGTTCATT R:ACTCCCCGGAGCAATAGTTG	216	50.0	筛选 SNPs 位点 filter SNPs site
P8	F:GCCAACTATTGCTCCGGGGA R:CCGTCCCAACTCAAGAGCATC	223	57.0	筛选 SNPs 位点 filter SNPs site
P9	F:TGCTCTTGAGTTGGGACGG R:CTGGAGGAAAGAAAAGTAAGAGC	229	56.0	筛选 SNPs 位点 filter SNPs site
P10	F:CAAAGGAATAGTCTGCCTCATATC R:GGCAGGCGAAAGAAATGAGTA	207	57.4	Taq I 酶切 Taq I digestion

注:F.正向引物;R.反向引物。

Notes:F. forward primer; R. reverse primer.

1.2 方法

大口黑鲈基因组 DNA 的提取 采用 ACD 抗凝剂,实验鱼尾静脉活体取血,按天根离心柱型基因组 DNA 提取试剂盒的使用方法提取样品基因组 DNA,取 100 μL 双蒸灭菌水溶解,0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量和浓度。检测完毕后取 20 μL 基因组 DNA 保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 供使用,余 80 μL 基因组 DNA 保存 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

SSCP 分析 将 5 μL PCR 产物与 9 μL 上样缓冲液 (95% 甲酰胺, 10 mmol/L EDTA, 0.09% 二甲苯青, 0.09% 溴酚蓝, pH 8.0) 混匀后, 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min 后迅速置于冰上冷却 5 min, 160 V 电压, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 16 ~ 22 h, 银染显色。

克隆测序 对所获得的目的片断, 经低熔点琼脂糖凝胶电泳回收后连接到 pMD-18T 载体上, 筛选阳性转化子进行序列测定, 测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

酶切反应、体系及检测 根据预扩增的大口黑鲈 MSTN 基因目标碱基序列和测序结果进行比对, 利用网络酶切软件 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>) 进行突变点的酶切位点查询, 结果限制性内切酶 *Taq* I 及 *Alu* I 分别识别 -1453 处和 +33 处的突变位点, 然后分别参照 *Taq* I 及 *Alu* I 酶切反应体系和反应条件对所扩增目的片断的 PCR 产物进行酶切。酶切产物用 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

统计分析 由于样本是同一批繁育且同池养殖、采样时间一致, 不存在时间、环境及人工饲养水平的差别, 所以在建立模型时不考虑年季、环境及人工饲养技术差别。利用 SPSS 15.0 软件一般线性模型 (general linear model, GLM), 对 SNPs 位点基因型与大口黑鲈主要生长性状之间的相关性进行最小二乘分析。统计分析模型采用 $Y_{ij} = u + B_i + e_{ij}$, 其中: Y_{ij} 为某个性状第 i 个标记第 j 个个体观测值; u 为实验观测所有个体的平均值 (总

体平均值); B_i 为第 i 个标记的效应值; e_{ij} 为对应于观察值的随机残差效应。

2 结果与分析

2.1 PCR-SSCP 结果

根据表 1 中各引物的条件和用处对 MSTN 基因进行 PCR 扩增, 扩增片断大小与预期扩增大小相一致, 扩增效果良好, 没有非特异性条带。对这些片断进行 SSCP 分析后发现, 启动子和第一外显子上 DNA 序列存在单核苷酸多态性, 第二外显子和第三外显子均无多态性。挑取表现多态性的不同个体的 PCR 产物分别进行纯化, 连接到 pMD-18T 载体上, 筛选阳性转化子进行双向序列测定。将所测序列进行同源性比较发现, 启动子上 -1453 处存在 C \rightarrow T 突变; 外显子 +33 处存在 T \rightarrow C 突变, 编码的氨基酸没有发生改变, 仍然是丝氨酸。

2.2 酶切结果

采用限制性内切酶 *Taq* I 对大口黑鲈 MSTN 基因 -1453 处突变点扩增产物进行酶切, 结果出现了 3 种基因型, 分别命名: AA (78 bp, 333 bp), AB (78 bp, 333 bp, 412 bp), BB (412 bp), 由 A、B 两个共显性基因控制。限制性内切酶 *Alu* I 对大口黑鲈 MSTN 基因外显子 +33 处扩增产物进行酶切, 结果出现了 3 种基因型, 分别命名: AA (220 bp), AB (83 bp, 137 bp, 220 bp), BB (83 bp, 137 bp), 由 A、B 两个共显性基因控制。

2.3 基因型及其基因频率分布

MSTN 基因 -1453 处和 +33 处突变点表现的 3 种基因型及其等位基因频率在大口黑鲈样品中的统计结果在表 2 中。MSTN 基因 -1453 处突变点在大口黑鲈中以 AB 型居多, A、B 基因频率基本相当; 该基因外显子 +33 处突变点在大口黑鲈中的基因型以 AA 和 AB 型居多, A 基因频率为 0.604, 这表明在大口黑鲈中 A 等位基因为优势基因。

表 2 大口黑鲈 MSTN 基因突变点基因型及其基因频率

Tab. 2 Genotype and gene frequency of SNPs sites of the largemouth bass MSTN gene

位点 locus	样品数 number	基因型频率 (个体数) genotype frequency (number)			等位基因频率 gene frequency	
		AA	AB	BB	A	B
C - 1453T	127	0.24 (31)	0.51 (64)	0.25 (32)	0.496	0.504
T + 33C	125	0.41 (51)	0.39 (49)	0.2 (25)	0.604	0.396

2.4 MSTN 基因多态性与大口黑鲈生长性状关联分析

把筛选的 2 个 SNPs 位点不同基因型与大口黑鲈体重、体长、体高、体宽和眼间距这 5 个主要生长性状进行一般线性模型 (GLM) 分析表明, 2 个 SNPs 位点不同基因型与体重、体长、体高、体宽和眼间距均未达到显著性水平 ($P > 0.05$) (表

3)。将 2 个突变点不同基因型组合成 6 种双倍型 (去掉频率小于 3% 的组合), 关联分析表明, 双倍型 D2 在体重、体长、体高、体宽和眼间距的均值均高于其它双倍型, 而双倍型 D5 在体重、体长、体高、体宽和眼间距的均值均低于其它双倍型, 双倍型 D2 与 D5 之间在 5 个主要生长性状均存在差异显著 ($P < 0.05$) (表 4)。

表 3 MSTN 基因 SNPs 不同基因型与大口黑鲈生长性状的关联分析
Tab. 3 Association of MSTN gene polymorphisms with growth traits in largemouth bass

SNPs 位点 SNPs site	基因型(样本量) genotype(n)	体重(g) body weight	体长(cm) body length	体高(cm) body height	体宽(cm) body width	眼间距(cm) interorbital width
C-1453T	AA	497.27 ± 34.90	26.00 ± 0.57	8.53 ± 0.26	4.50 ± 0.14	2.22 ± 0.06
	AB	474.91 ± 24.87	25.52 ± 0.41	8.39 ± 0.18	4.41 ± 0.10	2.17 ± 0.04
	BB	441.42 ± 35.46	24.91 ± 0.58	8.24 ± 0.26	4.31 ± 0.14	2.13 ± 0.06
T+33C	AA	467.65 ± 27.93	25.70 ± 0.46	8.36 ± 0.20	4.40 ± 0.11	2.19 ± 0.04
	AB	483.97 ± 28.22	25.40 ± 0.46	8.45 ± 0.21	4.43 ± 0.11	2.15 ± 0.02
	BB	457.29 ± 40.33	25.47 ± 0.66	8.33 ± 0.29	4.35 ± 0.16	2.16 ± 0.06

表 4 MSTN 基因不同双倍型与大口黑鲈生长性状的关联分析
Tab. 4 Association of MSTN gene diplotype with growth traits in largemouth bass

双倍型 diplotype	SNPs 位点 C-1453T	SNPs 位点 T+33C	频率(%) frequency	体重(g) body weight	体长(cm) body length	体高(cm) body height	体宽(cm) body width	眼间距(cm) interorbital width
D1	AA	AA	24.39	482.65 ± 35.43 ^{abc}	25.73 ± 0.58 ^{ab}	8.40 ± 0.26 ^b	4.43 ± 0.14 ^{ab}	2.21 ± 0.06 ^{ac}
D2	AA	AB	3.25	716.50 ± 37.21 ^a	30.12 ± 1.24 ^a	10.64 ± 1.00 ^a	5.50 ± 0.53 ^a	2.40 ± 0.02 ^a
D3	AB	AA	16.26	445.15 ± 43.39 ^{abc}	25.66 ± 0.71 ^{ab}	8.30 ± 0.32 ^b	4.36 ± 0.17 ^b	2.17 ± 0.07 ^a
D4	AB	AB	31.70	495.55 ± 30.31 ^{ac}	25.60 ± 0.49 ^{ab}	8.49 ± 0.22 ^b	4.46 ± 0.12 ^{ab}	2.18 ± 0.05 ^{ac}
D5	BB	AB	4.88	327.33 ± 39.22 ^b	22.49 ± 1.29 ^c	7.47 ± 0.58 ^b	3.90 ± 0.31 ^b	1.90 ± 0.13 ^b
D6	BB	BB	19.51	457.29 ± 39.61 ^{abc}	25.47 ± 0.65 ^{bd}	8.33 ± 0.29 ^b	4.35 ± 0.15 ^b	2.16 ± 0.06 ^a

注:同一列字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Notes: Values with different superscript letters within a column indicates significant difference at $P < 0.05$.

3 讨论

MSTN 基因与动物骨骼肌总量的调节有关, 其功能的缺失会造成骨骼肌的异常肥大, 该基因的突变能使动物骨骼肌肌群分布广泛, 肉质性状优良, 所以 MSTN 基因是提高畜禽产肉数量和质量的理想基因^[33-34]。Li 等^[35]通过大口黑鲈 MSTN 基因启动子调控元件的研究发现, MSTN 基因启动子有 2 个 TATA 盒和 9 个 E-box, 其中 E6 box 是调控大口黑鲈 MSTN 基因表达的重要因子; 对该基因编码区功能研究方面, 王全喜等^[29]认为 MSTN 基因表达产物的功能区主要由 109 个氨基酸组成, 编码这一段氨基酸的核苷酸主要集中在外显子 3, 其中 9 个半胱氨酸对该因子的发挥起重要的功能, 属保守性氨基酸。本研究采用常规 PCR-SSCP 技术对大口黑鲈 MSTN

基因进行 SNPs 筛选, 发现了 2 个 SNPs 位点, 其中 C-1453T 位于启动子 E8 box 和 Octamer (+) 调控元件之间的区域; 外显子 T+33C 的突变处于第一外显子区域, 属于同义突变且氨基酸没有发生变化, 仍为丝氨酸; 突变点单标记不同基因型与大口黑鲈生长性状关联分析, 均未达到显著水平 ($P > 0.05$)。说明该基因两个突变位点并未直接影响该基因的转录及功能, 这与基因突变位点所处位置与其所起功能相一致。

作为一种关联分析和连锁不平衡分析方法, 单倍型 (haplotype) 分析方法的出现很好地解决了单标记分析存在的位点信息模糊、检测和统计效率低等问题^[36]。由于不同的 SNPs 之间存在相互作用, 因而由单倍型构成的双倍型比单个 SNPs 能够提供更多的基因型频率信息。本研究对 MSTN 基因不同双倍型与大口黑鲈生长性状进行

关联分析,结果显示:双倍型 D2 在体重、体长、体高、体宽和眼间距的均值均高于其它双倍型,而双倍型 D5 在体重、体长、体高、体宽和眼间距的均值均低于其它双倍型,双倍型 D2 与 D5 之间在 5 个主要生长性状均存在差异显著($P < 0.05$),推测双倍型 D2 对生长性状起正相关,可作为分子标记辅助育种应用的首选标记,而双倍型 D5 与大口黑鲈的生长性状呈负相关,从育种角度来看,应该选择优势基因型个体,淘汰不利基因型个体,以期加快育种进程。

生长性状属于数量性状,是由多基因控制的,存在主效基因,这些基因可能在不同世代中分离或整合,因此,对于本研究与大口黑鲈生长性状相关联 MSTN 基因突变点的 D2、D5 双倍型标记,不仅要证明其在不同群体中的可重复性,还要验证其在不同世代中也具有相关性,进一步确保研究结果的准确性和可用性,因此本研究所获得的与大口黑鲈生长性状存在相关的 D2、D5 双倍型标记还需要在不同群体中及不同世代中进行相关可重复性及准确性做进一步验证。另外,体重作为鱼类选育中重要的目标性状之一,体重与形态性状存在着不同程度的相关性。根据何小燕等^[37]对大口黑鲈 9 个形态性状对体重的影响效果分析结果,体宽、体长、眼间距等形态性状是直接或间接影响大口黑鲈体重的主要形态性状,因此本研究选择了体重、体宽、体长、眼间距及体高等部分生长性状作为标记—关联分析的形态学性状,对大口黑鲈选育和育种参数评估具有较好的参考价值和意义。

参考文献:

- [1] Joulia D, Bernardi H, Garandel V, *et al.* Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin [J]. *Exp Cell Res*, 2003, 286(2): 263–275.
- [2] McPherron A C, Lawler A M, Lee S J, *et al.* Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member [J]. *Nature*, 1997, 387(6228): 83–90.
- [3] Thomas M, Langley B, Berry C, *et al.* Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(51): 40235–40243.
- [4] 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.
- [5] Taylor W E, Bhasin S, Artaza J. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 280(2): 221–228.
- [6] 姜运良, 李宁, 吴常信, 等. 不同品种猪肌肉生长抑制素基因单核苷酸多态性分析 [J]. *遗传学报*, 2001, 28(9): 840–845.
- [7] 姜运良, 李宁, 杜立新, 等. 猪肌肉生长抑制素基因 5'调控 T—A 突变与生长性状的关系分析 [J]. *遗传学报*, 2002, 29(5): 413–416.
- [8] Marcq F. Investigating the role of Myostatin in the determinism of double muscling characterizing Belgian texel sheep [J]. *Animal Genetics*, 1998, 29 (Suppl. 1): 52.
- [9] Oblap R V, Zvfzhkhov S K, Evanchenkovanchenko E V. *et al.* Comparative analysis of the genetic structure of red polish cattle in Poland and the Ukraine [J]. *Tsitol Genet*, 2002, 36(2): 35–43.
- [10] Dunner S, Miranda M E, Amigues Y, *et al.* Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds [J]. *Genet Sel Evol*, 2003, 35(1): 103–118.
- [11] Amlı A A, Lin C J, Chen Y, *et al.* Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish by knock-down of myostation-1 [J]. *Dev Dyn*, 2003, 229(4): 847–856.
- [12] Biga P R, Robets S B, Iliev D B, *et al.* The isolation, characterization, and expression of a novel GDF11 gene and a second myostatin form in zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Comp Biochem Physiol, Part B, Biochem Mol Biol*, 2005, 141(1): 218–230.
- [13] Rescan P Y, Jutel L, Ralliere C. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *J Exp Biol*, 2001, 204(120): 3523–3529.
- [14] Ostbye T, 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.
- [15] Maccatrozzo L, Bargelloni L, Radaelli G, *et al.* Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure, and expression pattern [J]. *Mar Biotechnol*, 2001, 3(3): 224–230.
- [16] 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(2): 1412 - 1418.
- [17] Kocabas A M, Kucuktas H, Dunham R A, *et al.* Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 575(1-3): 99 - 107.
- [18] Maccatrozzo L, Bargellini L, Patarnello P, *et al.* Characterization of the myostatin gene and a linked microsatellite marker in shi drum (*Umbrina cirrosa*, Sciaenidae) [J]. *Aquaculture*, 2002, 205(1-2): 49 - 60.
- [19] 李胜杰, 白俊杰, 叶星, 等. 加州鲈肌肉生长抑制素 (MSTN) cDNA 的克隆和序列分析 [J]. *海洋渔业*, 2007, 29(1): 13 - 19.
- [20] 吴昕彦, 张庆华, 陈竺, 等. 单核苷酸多态性研究及应用 [J]. *中华遗传学杂志*, 2000, 17(1): 57 - 60.
- [21] Rafalski J A. Application of single nucleotide polymorphisms in crop genetics [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(1): 94 - 100.
- [22] Grobet L, Martin L J R, Poncelet D, *et al.* A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle [J]. *Nature Genetics*, 1997, 17(1): 71 - 74.
- [23] McPherron A C, Lawler A M, Lee S J, *et al.* Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member [J]. *Nature*, 1997, 387(6628): 83 - 90.
- [24] 李绍华, 熊远著, 郑蝶, 等. 猪 MSTN 基因多态性及其 SNPs 的研究 [J]. *遗传学报*, 2002, 29(4): 326 - 331.
- [25] 顾志良, 朱大海, 李宁, 等. 鸡 Myostatin 基因单核苷酸多态性与骨骼肌和脂肪生长的关系 [J]. *中国科学*, 2003, 33(3): 273 - 280.
- [26] 朱智, 吴登俊, 徐宁迎. 鸡 Myostatin 基因单核苷酸多态性及其对屠体性状的遗传效应分析 [J]. *遗传*, 2007, 29(5): 593 - 598.
- [27] 张慧玲, 史洪才, 罗淑萍, 等. 绵羊肌肉生长抑制素基因外显子 I 单核苷酸多态性分析 [J]. *新疆农业大学学报*, 2007, 30(4): 21 - 24.
- [28] 任磊, 帅素容, 杨显彬, 等. 藏猪肌肉生长抑制素基因外显子 I 的 PCR-SSCP 分析 [J]. *湖北农业科学*, 2007, 26(4): 517 - 519.
- [29] 王全喜, 红海, 张焱如, 等. 蒙古马 MSTN 基因第三外显子的克隆及其 SSCP 研究 [J]. *华北农学报*, 2005, 20(3): 14 - 16.
- [30] Stratil A, Kopecny M. Genomic organization sequence and polymorphism of the porcine myostatin (GDF-8; MSTN) gene [J]. *Animal Genetics*. 1999, 30(6): 468 - 470.
- [31] De Santis, Evans B S, Smith-keune C, *et al.* Molecular characterization, tissue expression and sequence variability of the barramundi (*Lates calcarifer*) myostatin gene [J]. *BioMed Genomics*, 2008, 19(1): 1471 - 2164.
- [32] 薛良义, 李婷, 孙升, 等. 大黄鱼肌肉生长抑制素外显子 I 遗传多态性分析 [J]. *水产科学*, 2008, 27(10): 503 - 506.
- [33] Lee S J, McPherron A C. Myostatin and the control of skeletal muscle mass [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1999, 9(5): 604 - 607.
- [34] 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.
- [35] Li S J, Bai J J, Wang L. Cloning and characterization of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) myostatin encoding gene and its promoter [J]. *J Ocean Univ Chin*, 2008, 7(3): 304 - 310.
- [36] Stephens M, Smith N, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data [J]. *An J Hum Genet*, 2001, 68(1): 978 - 989.
- [37] 何小燕, 刘小林, 白俊杰, 等. 大口黑鲈形态性状对体重的影响效果分析 [J]. *水产科学*, 2009, 33(4): 597 - 603.

SNPs detection in largemouth bass myostatin gene and its association with growth traits

YU Ling-yun, BAI Jun-jie*, FAN Jia-jia, LI Xiao-hui, YE Xing
(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences;
Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Myostatin or GDF-8, a member of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, has been demonstrated to be a negative regulator of myogenesis and inhibited myoblast proliferation during cell cycle and myogenic differentiation in animals. In present research, two SNPs sites (C-1453T and T+33C) were identified from total MSTN gene in largemouth bass by using PCR-SSCP technique and sequencing; The mutational site of C-1453 was between the regions of E8 box and Octamer(+). The mutation of T+33C was situated in the first exon of the MSTN gene, however the mutation of the first exon has not changed the encoded amino which belonged to the synonymy mutation. The three kinds of genotypes per mutation site were obtained by PCR-RFLP method and the genotype frequency of the mutation was calculated in the population of 128 individuals. A general linear model was used to statistically analyze associations of MSTN gene polymorphisms with major growth traits respectively, and the results indicated that there was no significant difference ($P > 0.05$) by all genotypes of single mutation site. Six diplotypes, with the minor allelic frequencies of above 3%, were constructed based on two SNPs in the experiment population. The means of diplotype D2 were over other diplotypes and the means of diplotype D5 were lower other diplotypes in terms of body width, body height, body length, body weight, and snout length therefore associations analysis indicated that there were significant associations between diplotype D2 and D5 in the five growth traits of largemouth bass. The study implies that diplotypes D2 and D5 of MSTN gene could be used as the molecular genetic marker for selection breeding.

Key words: largemouth bass (*Micropterus salmoides*); myostatin; single nucleotide polymorphisms (SNPs); diplotype; association analysis

Corresponding author: BAI Jun-jie. E-mail: baijj2005@21cn.com