

大口黑鲈 *POU1F1* 启动子区域 SNPs 对生长的影响

杜芳芳^{1,2}, 白俊杰^{1*}, 李胜杰¹, 李小慧¹, 樊佳佳¹

(1. 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;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 采用基因组步移技术克隆了大口黑鲈垂体特异性转录因子 *POU1F1* 启动子序列, 该序列全长 1 629 bp, 预测存在 4 个八聚体转录因子 1 (Oct-1) 结合位点和 TATA 框等基本转录元件, 1 个 Homeobox 转录因子结合位点和 2 个 cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB) 结合位点。采用直接测序法研究发现, 大口黑鲈 *POU1F1* 启动子序列的 -18 和 -183 两个位点存在 SNPs, 该两个突变位点只检测到 A、B 两种单倍型。对养殖群体进行不同单倍型的基因频率和生长关联分析, 结果表明, 单倍型 A 的等位基因频率为 0.246, 单倍型 B 的等位基因频率为 0.754; 群体关联分析表明, 基因型为 AA 型和 AB 型的个体在体质量、体长、全长、体高和体宽等方面明显高于 BB 型个体, 但基因型为 AB 型和 AA 型的个体之间在体质量方面没有明显差异。该研究结果为下一步进行分子标记辅助选择提供了基础。

关键词: 大口黑鲈; 垂体特异性转录因子; 单核苷酸多态性 (SNPs); 关联分析

中图分类号: Q 753; S 917

文献标志码: A

垂体特异性转录因子 (pituitary specific transcription factor 1, *POU1F1*) 是 POU 家族成员之一, 由动物垂体前叶特异性表达。*POU1F1* 对垂体前叶分泌细胞分泌生长激素 (growth hormone, GH)、催乳素 (prolactin, PRL) 和促甲状腺素亚 β 单位 (thyroid-stimulating hormone β , TSH- β) 起决定性的正向调控作用^[1-2]。*POU1F1* 的突变可导致垂体发育异常, 阻碍 GH, PRL 和 TSH- β 的正常表达, 从而导致矮小个体出现^[3-5]。*POU1F1* 的突变也与生长激素、促甲状腺释放激素 β 因子和催乳素的缺乏以及垂体功能的衰退有关^[6-7]。俞沛初等^[8]发现猪 *POU1F1* 的突变与初生体质量和第一肋骨处、最后一条肋骨和最后一枚尾椎处的平均背膘厚都呈显著相关。RENAVILLE 等^[9]报道, 比利时蓝白肉牛的 *POU1F1* 第 6 外显子上的突变与其体质量和体型存在显著相关。JIANG 等^[10]检测到由于鸡 *POU1F1* 第 6 外显子的突变导致氨基酸的改变与

鸡 8 周龄体质量相关。

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*), 俗名加州鲈, 分类学上隶属鲈形目 (Perciformes)、鲈亚目 (Percoidae)、太阳鱼科 (Cettrachidae)、黑鲈属 (*Micropterus*), 属广温性鱼类, 且具有肉质鲜美、抗病力强、生长迅速、易起捕、适温较广的特点。自 1983 年引进后, 广泛在珠江三角洲地区开展养殖生产, 现已成为中国重要的淡水养殖品种之一。由于引种时奠基种群数量较少, 且没有定期从原产地引进亲本, 没注重亲本留种的操作规程, 导致养殖大口黑鲈的遗传多样性降低、生产性能下降。因此, 很有必要开展大口黑鲈的良种培育工作。

由于传统的育种方法时间长, 效率低, 而分子标记辅助育种是利用分子标记对个体遗传背景进行考察, 选择带有不同优良基因的个体作为亲本, 从而极大地提高了性状选择的效率和准确性, 减少了育种过程的盲目性和周期性。本研究以大口黑鲈 *POU1F1* 作为与生长相关的候选基因, 克隆

收稿日期: 2011-02-11 修回日期: 2011-04-01

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30901102); 国家“十一五”科技支撑计划 (2006BAD01A12-09); 农业部“948”项目 (2010-Z9); 农业部公益性行业科研专项 (200903045)

通讯作者: 白俊杰, E-mail: jibai@163.net

了 *POU1F1* 的启动子序列,并采用直接测序法检测基因上的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs),研究 *POU1F1* 启动子上的 SNPs 与大口黑鲈生长性状的关系,为下一步的分子标记辅助选育提供候选标记。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2007年11月,于广东省佛山南海大口黑鲈繁育基地采集随机群体样本126尾。

Trizol reagent 购自 Invitrogen 公司; pGEM-T Easy 购自 Promega 公司; Blood & Cell Culture DNA Kit 和 GenomeWalker Universal Kit 均购自 Clontech 公司; RNase Free DNase I 购自 Promega 公司; ReverTra Ace- α -[®] Kit 试剂盒购自 TOYOBO 公司; 限制性内切酶 *Dra* I, *Pvu* II, *Ssp* I, *Eco*R V, *Sca* I, *Stu* I, *Alu* I 和 *Bsr*B I 购自 Fermentas 公司; 琼脂糖、硝酸银、氢氧化钠、过硫酸胺、TEMED、丙烯酰胺和 N,N'-亚甲基甲叉丙烯酰胺等购自广州威佳生物技术有限公司; Marker pBR322 DNA/*Msp* I 购自 TIANGEN 公司; 大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。

1.2 DNA 的提取及基因组 DNA 文库构建

测量大口黑鲈的体质量、体长、全长、体高、体宽,同时以抗凝剂 (ACD) 与血液体积比为 6:1 的比例进行尾静脉活体取血,按 Blood & Cell Culture DNA Kit 试剂盒的操作提取鱼血液 DNA。

按照 GenomeWalker Universal Kit 试剂盒的操作,分别用限制性内切酶 *Dra* I、*Pvu* II、*Ssp* I、*Eco*R V、*Sca* I、*Stu* I 构建大口黑鲈基因组 DNA 文库。

1.3 *POU1F1* 启动子序列的扩增及测序

根据扩增到的大口黑鲈 cDNA 序列设计引物 P1, P2 (表 1)。按照 Genome Walker Universal Kit 试剂盒的操作,分别以 6 个基因组文库为模板,用试剂盒提供的引物 AP1 与 P1 引物进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 20 μ L, 含有 10 \times Buffer 2.0 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 0.8 μ L; dNTP (10 μ mol/L) 0.4 μ L; 上下游引物 (20 μ mol/L) 各 0.4 μ L; 基因组 DNA 40 ng, *Taq* 酶 (上海申能博彩生物科技有限公司) 1 U。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 32 个循环 (94 $^{\circ}$ C, 30 s; 46~56 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s); 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。取该 PCR 产物稀释 100 倍后利用 AP2 和 P2 在同样的程序下进行巢式 PCR 扩增,在 *Eco*R V 文库中检测到特异性片段。扩增产物经纯化、连接和转化,阳性克隆委托上海英骏生物技术有限公司进行测序。

1.4 *POU1F1* 启动子序列的转录元件分析

5'侧翼区域转录元件分析采用 Transcription Element Search System 软件 (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) 对启动子上的转录元件进行预测,所有参数设置均使用默认值,核心序列矩阵相似度与序列矩阵相似度比值均大于 0.8。

表 1 引物名称及序列

Tab. 1 Primer sequences applied in largemouth bass *POU1F1* promoter clone, genotyping

引物名称 primer	引物序列 5'→3' sequence	引物名称 primer	引物序列 5'→3' sequence
P1	5'-ATGAGGATTGGCAAGGGTGAGTCT-3'	P3	5'-GCAGAGCCCAAGACAAACAC-3'
P2	5'-TGGGGTGAAAGAGTCGGCACTGAACG-3'	P4	5'-ATGAGGATTGGCAAGGGTGAGTCT-3'
AP1	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	P5	5'-GATAAAGTAAGACTAAACACAAGC-3'
AP2	5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3'	P6	5'-CATTCTTCTCAGGCCCGCT-3'

1.5 突变位点筛选

从实验样品中随机取 10 尾大口黑鲈的基因组 DNA,利用引物 P3 和 P4 扩增 *POU1F1* 5'端长度为 1 473 bp 的侧翼序列,经纯化后委托上海英骏生物技术有限公司进行测序,用 Vector NIT Suite 11.0 比对分析测序结果并寻找 SNPs 位点。

1.6 不同个体的基因型检测

先用引物 P3, P4 扩增启动子部分序列,再以其 PCR 产物为模板,用酶切引物 P5, P6 进行包含两个 SNPs 位点在内的 210 bp 片段的 PCR 扩增,扩增产物分别用限制性内切酶 *Alu* I (-183 位点) 和 *Bsr*B I 进行酶切 (-18 位点),8% 聚丙烯酰胺凝胶检测突变个体。

1.7 SNPs 突变及单倍型生长相关性分析

等位基因频率分析利用 Popgene (Version 3.2) 处理。

利用 SPSS 17.0 软件一般线性模型 (general linear model, GLM), 采用最小二乘法分析 SNPs 与大口黑鲈生长性状之间的相关性。统计分析模型为

$$Y_{ij} = u + B_i + e_{ij}$$

式中, 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 (即总体平均值); B_i 为第 i 个标记的效应值; e_{ij} 为对应于观察值的随机误差效应。

2 结果

2.1 大口黑鲈 *POU1F1* 5' 侧翼序列克隆与转录因子作用位点预测

以 6 个大口黑鲈基因组 DNA 酶切连接文库

(*Dra* I、*Pvu* II、*Ssp* I、*Eco*R V、*Stu* I、*Sca* I) 为模板^[11], 利用基因组步移技术克隆获得 *POU1F1* 5' 侧翼序列 1 629 bp, 5'-UTR 620 bp。启动子区转录元件预测结果见图 1, 包含 TATA 框、CCAAT 框、GATA 框和 4 个八聚体转录因子 1 (Oct-1) 结合位点等启动子基本转录元件, 还有 Homeobox 转录因子结合位点 1 个, cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB) 结合位点 2 个。CREB 与 *POU1F1* 启动子两个 CREB 结合元件结合, 启动 *POU1F1* 的转录过程。人的垂体特异性转录因子 *POU1F1* 和生长激素 GH 启动子上存在两个 cAMP 反应元件序列 CGTCA^[12], 大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) *POU1F1*、GH 基因, 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的 GH 基因启动子上亦存在两个 CREB 结合位点^[13-14]。

```

-1629 ACTAT AGGGC ACGCG TGGTC GACGG CCCGG GCTGG TAAAA CAATT AACAT
                                     Homeobox
-1579 CTGAC CCTGC AACTG AGTGA ATCTA TAAAC TCAGC AACCA AAAAT CTGTT
-1529 TTGTG GAGAG ACATT GTCAA AAGTG CATCT AGTCC ATATT TACAC TGCAT
-1479 GCTTA AACGT GTCAA ATCGT GCCTG CCACC CACAA GCTAT TTCC ACCTG
-1429 CTGCC CACCT ACATC AACAA TAGCA AAGCA GAGCC CAAGA CAAAC AAAAA
-1379 CAGAC ACAAC AGAGC GCACA TGGTG GCCAC GCTCC TCAGA TTAAC CTTTA
-1329 TCCTC CCTGA TGAGA CCTGT TGTCT TTACC TGGAG CACTC TGCAC TCAAC
-1279 ACAAT ATGGA CTCCA AACCG AAACA ATGTT AACCT TTTCT TCCAC TCACT
                                     HNF
-1229 TTGAG ATAAG GCTAC ACAAG TTTTT GGTG TGGGC TAAAG GGATA GGGTT
                                     GATA                                     GATA
-1179 AAAGC GGTGC CCTGA CCTCC TGGTG ATCTA TCCAC CAAAA AACAT CCAAT
                                     ZNFP                                     Oct-1
-1129 TTACA CCTAA ACGCT CTTGC AAGAC AACTC AATGT CCGTG GTAAA ACAAG
-1079 TGTGA TTTTC CAAGT CAAGT TTAGC ATTGG TCGGG GGTAC ACATA TGCAA
                                     Oct-1
-1029 AACAA AGCAG AACAA TTGGT TTGAG ATTAT TTGTG GCAAC ACTTT ATGCC
                                     Oct-1
-979 AAACC ATGTT ATCTA TCAAA AGAAA CAAAG TCTTT GTTGC TTTAA TGAGC
-929 ATCCT AAATG TTCAC TTTAC TTTCC CATAG CAACT ACATC ACAAC CCTGC
-879 AATCA AGGAG AAGGA CAGAG AGATA GCGAG AGAGG GTGAG GAGAG GAAGG
                                     GATA
-829 GATCG GGTTC CTCAG TACCC TAATC CTGGA TTTGG AAACG GGATG AGGAG
-779 AACGC AGCTA AGGAC AAGCA CAAGT AATAA CAGCA CTGAC ATGGG TTTGG
-729 TAGGT GGGGG TGAGC AGCTT GATGG GAAAT AGGGG GCCTC ATAGG TCGAG
-679 AGAGG GGTGG TTAGT TGTAG GTGGG TGGGA TATAA ATACC TGCAG TAGAC
                                     HNF                                     TBP

```

```

-629 AAGGG CTGCA AATTG CTGAG GGTAT GACAG AACT GGTTA CCTGC ATCTA
-579 TAATA GAGAA AAAGA GACAG GGATA TGCAT TGCAG AGGCC CAGTA GTATA
                                Oct-1
-529 CCAAGT GGTAG TAACT TGAAC CTGAA GCTCA TCATT ATTCA TCTCT GGGAG
-479 TCTTG ACTGA GGGTG CAGAT GTGCC TAAAA ATGGG AGAAT TCTAG CTGAA
-429 GTGCT GACAG TCTTT TCTCT TTGAG AAAAA AGGTA ACTTA TCACA GTTTC
                                C/EBPα
-379 CTACC TGAAT ATTCC CAAGT GACTG AAGTG AGAAC TACGC TTGAC TGAGC
-329 CAGGG AAAAA AGGAC AAGAA AAGAA GACAA TACCA GAGGT GAAAG AAGAC
-279 AAGAC GCAGC AGGGA GAAAG ACAAG GCAGA ACAAG AGAAG GCCAA AGAAG
-229 ACGAG ACAGA GACAG AAGGC GAGAT AAAGT AAGAC TA (AAC ACAAG ATACA
                                GATA          CREB          EVI1
-179 AGAA) A GGAAG GCGAG GAAAC AGATA TCAAG AGGGC AAGC AAGAA AAGAC
                                GATA
-129 AGAGG ACAAG GAAAG CAACA ATGGG AGACA AGACCAAATA AAGCA AGAGA
-79  GGAAA GAAAA GGAAC CAGTT AAAGG ATCAC GTCAA CCTTC AGTGT ACGAT

```

图1 大口黑鲈 *POU1F1* 启动子序列

TATA 框、CCAAT 框、GATA 框和 Oct-1 结合位点用方框标出, CREB、HNF、ZNF 等用下划线表示。突变碱基用加粗字体标出, 突变碱基位置的转录因子 EVI1、HSF 结合位点用括号标出, 起始密码子设为“+1”。

Fig.1 Regulatory factor binding sites of largemouth bass promoter of *POU1F1*

TATA-box, CCAAT-box, GATA-box and Oct-1 binding sites are shown in box. CREB, HNF, ZNF, etc. are in underlined. The base mutation are shown in thick, the transcription factors binding sites lead to are shown in brackets. The start codon is designed as “+1”.

2.2 突变位点筛查结果

对 10 个个体 *POU1F1* 启动子序列经比对分析, 在其启动子 -183 和 -18 位置发现两个 SNPs, 且这两个突变只检测到 A 和 B (C-A 为 A, T-G 为 B) 两种单倍型。利用个体数为 126 的群体对两个突变进行检测, 结果表明, 两个 SNPs 在群体中广泛存在, 也只有两种单倍型 A (C-A) 和 B (T-G) (图 2)。单倍型的判断方法为: -183 位点用限制性内切酶 *Alu I* 酶切后有 210 bp 和 187 bp 两条带, 定为等位基因 a_1 和 b_1 ; -18 位点用限

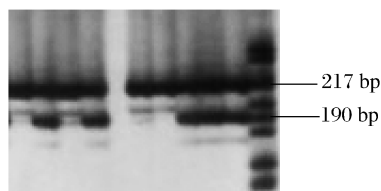


图2 *POU1F1* 启动子 -183 位点的 SNP 酶切电泳图
位于 Marker 217 bp 处的条带为不能被限制酶切开的 210 bp 的片段, 位于 Marker 190 bp 处的条带为被限制酶切后的 187 bp 的片段。

Fig.2 Electrophoretic patterns of SNPs in 5'-flanking sequence of largemouth bass *POU1F1*

The pattern approach to 217 bp means the PCR product cannot be cut by the restriction endonuclease, the pattern approach to 190 bp is 187 bp in size which means the PCR product has been cut by the restriction endonuclease.

制性内切酶 *BsrB I* 酶切后有 210 bp 和 192 bp 两条带, 定为等位基因 a_2 和 b_2 ; 且若 -183 位点检测到等位基因 a_1 , -18 位点也会检测出等位基因 a_2 , 若 -183 位点检测到等位基因 b_1 , -18 也会检出等位基因 b_2 , 反之亦然, 于是将 -183 和 -18 两个位点都出现的等位基因 a 定义为单倍型 A, 将两位点都检测到的等位基因 b 定义为单倍型 B。两种单倍型的等位基因频率和基因型见表 2。

表2 大口黑鲈 *POU1F1* 启动子区域 SNP 突变在随机群体中的基因频率分布

Tab.2 Frequencies of alleles and genotypes of the SNP mutation in promoter region of largemouth bass *POU1F1* in random population

基因型 genotypes	基因型频率/% (样本数) ratio of different genotypes	等位基因频率/% ratio of different alleles	
		A	B
AA	8.7(11)		
AB	31.7(40)	24.6	75.4
BB	59.5(75)		

2.3 不同单倍型与性状的关联分析

本实验用于关联分析的 126 尾鱼的平均体质量为 500 g, 为同一批繁殖、同池养殖, 且采样时间一致, 因此在建立模型时不考虑时间、环境及人工饲养条件的差异。不同基因型个体间生长性状的多重比较结果见表 3, 关联分析结果表明, 两个

SNPs 所构成的单倍型对体质量、体长、全长、体高、体宽有显著影响 ($P < 0.05$), 基因型 AA 和 AB 的个体的生长性状明显优于基因型为 BB 的个体。

表 3 不同基因型个体间生长性状的多重比较
Tab.3 Multiple comparisons of different genotype individuals

性状 trait	基因型 genotype			P 值 P value
	AA	AB	BB	
体质量/g	561.77 ± 54.98 ^a	542.71 ± 28.83 ^a	411.82 ± 21.05 ^b	0.000
体长/cm	27.04 ± 0.91 ^a	26.91 ± 0.48 ^a	24.48 ± 0.35 ^b	0.000
全长/cm	30.64 ± 0.96 ^a	30.66 ± 0.52 ^a	27.93 ± 0.38 ^b	0.000
体高/cm	8.96 ± 0.40 ^a	9.06 ± 0.21 ^a	7.92 ± 0.15 ^b	0.000
体宽/cm	4.79 ± 0.21 ^a	4.70 ± 0.11 ^a	4.16 ± 0.08 ^b	0.000

注:不同单倍型间的多重比较采用 LSD 法 5% 的显著性检验,差异显著性用上标 a, b 表示。

Notes: Multiple comparisons were made between genotypes using LSD method at the 5% significance level, and significant differences were shown using different superscripts (a, b) across the row.

3 讨论

3.1 大口黑鲈 *POU1F1* 启动子 SNPs 导致转录元件的改变

本研究在大口黑鲈 *POU1F1* 基因启动子区域筛选到两个 SNPs 位点, 分别位于 -183 和 -18 处。-183 位点处的 SNP 恰好是嗜亲性病毒整合位点 (ecotropic viral integration site, EVI) -1 转化蛋白的结合位点。EVI-1 转化蛋白结合位点的碱基序列为 AGAT, 突变后该碱基序列变为 AGAC, 即 -183 位点的突变会造成 EVI-1 转化蛋白结合位点的消失。EVI-1 转化蛋白能够抑制 TGF- β 细胞因子和骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 信号转导的进行^[15], 而骨形态发生蛋白 (BMP) 是一种分泌性多功能蛋白, 属于转化生长因子 (TGF) - β 细胞因子超家族, 具有调节细胞的增殖和分化以及促进骨、软骨生成的作用^[16], 即 EVI-1 转化蛋白可以间接影响骨和软骨的生长。-18 位点 SNP 的 A/G 突变亦造成热激因子 (heat shock factors, HSF) 结合位点的消失。而热激因子是热激蛋白的主要调控因子, 许多热激蛋白有组成型表达, 在正常生理条件下参与一些重要的生理活动, 如蛋白质的转运、折叠、引起细胞的不可逆损伤并导致死亡^[17-18]。-183 位点和 -18 位点的突变造成的 EVI-1 和 HSF 结合

位点的消失可能提高启动子的活性或转录效率, 推测该突变是导致 AA 型和 AB 型个体生长性状优于 BB 型个体的主要原因。

3.2 大口黑鲈 *POU1F1* 启动子 SNPs 影响 GH 基因的表达

人类和小鼠的生长激素 (GH) 基因的启动子含有两个 *POU1F1* 蛋白结合位点, 它们在 GH 基因启动子的激活过程中是必不可少的, 而 *POU1F1* 蛋白具有的 *POU1F1* 特有结构域和 POU 家族共有结构域两个结构域共同决定其与 GH 基因启动子的结合功能^[19-21]。此外, 马岗鹅催乳素 (PRL) 基因 5'-UTR 上也发现存在 1 个潜在 *POU1F1* 结合位点 (TGAATATGAA)^[22]。通过将研究得到的大口黑鲈 *POU1F1* 基因启动子与 NCBI 上的黑鲈 *POU1F1* 基因的 mRNA 序列 (序列号: EU279458) 进行比对, 发现其转录起始位点以 A 起始, 位于 -620 bp 处, 而直接测序法发现的大口黑鲈 *POU1F1* 基因的 5' 调控区上存在的两个 SNPs 位于 -183 和 -18 处, 说明本研究发现的 SNPs 位于大口黑鲈 *POU1F1* 基因的 5'-UTR 上。

因此, 推测本研究发现的 SNPs 可能会影响 *POU1F1* mRNA 的翻译效率, 造成不同机体内 *POU1F1* 蛋白表达量的差异, 进而影响 GH 基因、PRL 的启动子活性, 导致其表达水平的不同而出现基因型 AA 和 AB 的个体的生长性状优于基因型为 BB 的个体。

此外, 研究表明, 小鼠 *POU1F1* 的突变可导致垂体的发育不全, 进而干扰垂体前叶腺的正常发育, 导致相应的细胞分化被抑制^[23-24]。因此, 推测本研究发现的 SNPs 可能会干扰大口黑鲈垂体前叶的正常发育, 导致相应的细胞分化被抑制而影响垂体的分泌功能进而影响生长。

3.3 单倍型与表型性状相关

在 SNP 标记研究和应用中发现, 基因组上相邻 SNPs 的等位位点倾向以整体形式遗传给后代, 这种一组相关联的 SNPs 等位位点被称作单倍型 (haplotype)。单个研究 SNP 费时费力, 统计效率较低, 而且单个 SNP 与疾病或某种表型性状可能无相关性, 而几个 SNPs 的集合即单倍型与性状有良好的相关性。因为单倍型是位于同一条染色体上的多个 SNPs 位点上的一个等位基因, 它含有连锁不平衡的信息, 而且基于单倍型的关

联分析相当于利用多个 SNPs 位点去寻找和定位基因,并且还考虑到各个 SNP 位点之间的相关性,这当然比单个 SNP 的定位更精确,并且检验的功效也会随之增加。研究表明,基于单倍型的关联分析研究比基于单个 SNP 位点的关联分析研究更加有效^[25-32]。OSCARSON 等^[33]将药物代谢酶 *CYP2D6* 中的 3 个突变对酶功能活性影响进行了研究,结果表明,其中任何单一的 SNPs 对酶功能几乎没有影响,但是由这 3 个 SNPs 构成的单倍型 *CYP2D6**17 使酶活性丧失了将近 80%。本研究对大口黑鲈 *POU1F1* 启动子序列 -18 和 -183 两个 SNP 位点同时进行基因分型,只检测到 A 和 B 两种单倍型,基因型为 AA 型和 AB 型的个体在体质量、体长、全长、体高、体宽方面明显高于 BB 型个体 ($P < 0.05$),反映出单倍型中多个突变能够相互作用组成一个更优等位基因,从而显著影响表型性状。

通过直接测序法发现大口黑鲈 *POU1F1* 基因启动子上的两个 SNP 位点,且只组成两种单倍型 A 和 B,单倍型 A 为优势单倍型,在选育过程中可将其作为选择亲鱼的候选分子标记,加快大口黑鲈的选育。

参考文献:

- [1] ROSENFELD M G. POU-domain transcription factors: powerful developmental regulators [J]. *Genes Development*, 1991, 5(6): 897-907.
- [2] COHEN L E, WONDLSFORD F E, RADOVICK S. Role of Pit-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin, and thyrotropin [J]. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, 1996, 25(3): 523-540.
- [3] TAHA D, MULLIS P E, IBABEZ L, et al. Absent or delayed adrenarche in Pit-1/POU1F1 [J]. *Deficiency Horm Res*, 2005, 64(4): 175-179.
- [4] GAT-YABLONSKI G, LAZAR L, PERTZELAN A, et al. A novel mutation in PIT-1: phenotypic variability in familial combined pituitary hormone deficiencies [J]. *Journal of Pediatric Endocrinol and Metabolism*, 2002, 15(3): 325-330.
- [5] RODRIGUEZ R, ANDERSEN B. Cellular determination in the anterior pituitary gland: PIT-1 and PROP-1 mutations as causes of human combined pituitary hormone deficiency [J]. *Minerva Endocrinologica*, 2003, 28(2): 123-133.
- [6] STASIO L D, SARATORE S, ALBERA A. Lack of association of GH and *POU1F1* gene variants with meat production traits in Piemontese cattle [J]. *Animal Genetics*, 2002, 33(1): 61-64.
- [7] 高岩. 垂体特异性转录因子研究进展 [J]. *国外医学内分泌学分册*, 1995, 15(3): 116-120.
- [8] 俞沛初, 乔中东. 猪的垂体特异性转录因子基因多态性研究 [J]. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2007, 25(4): 333-336.
- [9] RENAUVILLE R, GENGELER N, PARMENTIER I, et al. Pit-1 gene *Hinf I* RFLP and growth traits in double-muscling Belgian blue cattle [J]. *Journal of Animal Science*, 1997, 75(1): 146-148.
- [10] JIANG R, LI J, QU L, et al. A new single nucleotide polymorphism in the chicken pituitary specific transcription factor (*POU1F1*) gene associated with growth rate [J]. *Animal Genetics*, 2004, 35(4): 344-346.
- [11] LI S J, BAI J J, WANG L. Cloning and characterization of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) myostatin encoding gene and its promoter [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2008, 7(3): 304-310.
- [12] LAURIE E C, YUKIKO H, KERSTIN Z, et al. CREB-independent regulation by CBP is a novel mechanism of human growth hormone gene expression [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1999, 104(8): 1123-1128.
- [13] WONG A O, DREAN Y L, LIU D, et al. Induction of chinook salmon growth hormone promoter activity by the adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP)-dependent pathway involves two cAMP-response elements with the CGTCA motif and the pituitary-specific transcription factor Pit-1 [J]. *Endocrinology*, 1996, 137(5): 1775-1784.
- [14] ARGENTON F, VIANELLO S, BERNARDINI S, et al. The transcriptional regulation of the growth hormone gene is conserved in vertebrate evolution [J]. *Biochemistry Biophysics Research Communication*, 1993, 192(3): 1360-1366.
- [15] DURAND S H, ROMEAS A, COUBLE M L, et al. Expression of the TGF-beta/BMP inhibitor *EVII* in human dental pulp cells [J]. *Archives of Oral Biology*, 2007, 52(8): 712-719.
- [16] 朱海燕, 林正梅. 骨形态发生蛋白信号通路的负向调节 [J]. *国际口腔医学杂志*, 2008, 35(6): 647-653.
- [17] LINDQUIST S, CRAIG E A. The heat shock

- proteins[J]. *Annual Review of Genetics*, 1988, 22: 631 – 677.
- [18] RUTHERFORD S L, ZUKER C S. Protein folding and the regulation of signaling pathways [J]. *Cell*, 1994, 79(7): 1129 – 1132.
- [19] NELSON C, ALBERT V R, ELSHOLTZ H P, *et al.* Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor [J]. *Science*, 1988, 239 (4846): 1400 – 1405.
- [20] BONDER M, CASTRILO JOSÉ-LUIS, THEILL L E, *et al.* The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein [J]. *Cell*, 1988, 55(3): 505 – 518.
- [21] FOX S R, JONG M TC, CASANOVA J, *et al.* The homeodomain protein, Pit-1/GHF-1, is capable of binding to and activating cell-specific elements of both the growth hormone and prolactin gene promoters [J]. *Molecular Endocrinology*, 1990, 4 (7): 1069 – 1080.
- [22] 刘志. 马岗鹅 PRL 基因及 PRLR cDNA 的克隆与生物信息学分析[D]. 广州: 华南农业大学, 2006.
- [23] JOUDREY E M, LECHNLA K D, PETRIK J, *et al.* Expression of growth hormone and its transcription factor Pit-1 in early bovine development [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2003, 64 (3): 275 – 283.
- [24] LAZAR L, GAT-YABLONSKI G, PERTZELAN A, *et al.* A novel mutation in PIT-1: phenotypic variability in familial combined pituitary hormone deficiencies [J]. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 2002, 15(3): 325 – 330.
- [25] AKEY J, JIN L, XIONG M. Haplotypes vs single marker linkage disequilibrium tests: what do we gain [J]. *European Journal of Human Genetics*, 2001, 9 (4): 291 – 300.
- [26] FALLIN D, COHEN A, ESSIUX L, *et al.* Genetic analysis of case/control data using estimated haplotype frequencies: application to APOE locus variation and Alzheimer's disease [J]. *Genome Research*, 2001, 11(1): 143 – 151.
- [27] MORRIS R W, KAPLAN N L. On the advantage of haplotype analysis in the presence of multiple disease susceptibility alleles [J]. *Genetic Epidemiology*, 2002, 23(3): 221 – 233.
- [28] SCHAID D J, ROWLAND C M, TINES D E, *et al.* Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous [J]. *American Journal of Human Genetic*, 2002, 70 (2): 425 – 434.
- [29] ZAYKIN D V, WESTAFLI P H, YOUNG S S, *et al.* Testing association of statistically inferred haplotypes with discrete and continuous traits in samples of unrelated individuals [J]. *Human Heredity*, 2002, 53(2): 79 – 91.
- [30] EPSTEIN M P, SATTEN G A. Inference on haplotype effects in case-control studies using unphased genotype data [J]. *American Journal of Human Genetic*, 2003, 73(6): 1316 – 1329.
- [31] CLARK A G. The role of haplotypes in candidate gene studies [J]. *Genetic Epidemiology*, 2004, 27 (4): 321 – 333.
- [32] SCHAID D J. Evaluating associations of haplotypes with traits [J]. *Genetic Epidemiology*, 2004, 27 (4): 348 – 364.
- [33] OSCARSON M, HIDESTRAND M, JOHANSSON I, *et al.* A combination of mutations in the CYP2D6* 17 (CYP2D6Z) allele causes alterations in enzyme function [J]. *Molecular Pharmacology*, 1997, 52(6): 1034 – 1040.

Effects of SNPs in *POU1F1* promoter on growth traits in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

DU Fang-fang^{1,2}, BAI Jun-jie^{1*}, LI Sheng-jie¹, LI Xiao-hui¹, FAN Jia-jia¹

(1. Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fish Breeding and Cultivation, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In the present study, the promoter sequence of largemouth bass *POU1F1* was cloned which is 1 629 bp in length, predicted the existence of four octamer transcription factor 1 (Oct-1) binding sites, one homeobox transcription factors sites, two cAMP-responsive element binding proteins sites and a TATA box. Using directly sequencing, two nucleotides mutations were identified which were located at the -18 and -183 sites, and only two haplotypes were identified (haplotype A and haplotype B). The different genotype individuals and the mutant alleles in stochastic population (126 individuals) were examined. The frequency of A haplotype and B haplotype was 0.246 and 0.754 respectively. The population correlation analysis showed that the AA and AB genotypes have significantly correlated with BB genotype individuals' weight, body length, full length, body depth and body width ($P < 0.05$), but there is no significant correlation between AA genotype individuals and AB genotype individuals. Identified growth traits markers for growth traits could be implemented through marker-assisted selection (MAS), with the aim of producing rapidly growing largemouth bass.

Key words: largemouth bass (*Micropterus salmoides*); pituitary specific transcription factor1; SNPs; correlation analysis

Corresponding author: BAI Jun-jie. E-mail: jjbai@163.net