

建鲤 *FABP3* 基因分离及其多态性与增重的相关分析

俞菊华*, 李红霞, 李建林, 唐永凯, 夏正龙, 董在杰

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081)

摘要: 为获得与建鲤增重相关的分子标记进行建鲤分子育种, 实验在建鲤心肌型脂肪酸结合蛋白(FABP)基因上筛选了与增重相关的 SNP 位点。首先使用 PCR 扩增到 2 个建鲤 *FABP3* 基因, *jIFABP3a* 和 *3b* 基因, 两个基因均有 4 个外显子和 3 个内含子组成, *3a* 和 *3b* 阅读框相似性为 93%, 编码 133 个氨基酸, 相似性为 94%, 内含子长度和序列存在着明显差异。*jIFABP3* 的系统进化和传统的分类地位一致。通过序列比对, 在 *3a* 和 *3b* 上分别找到 26 和 25 个 SNP 位点。构建 PCR-RFLP 法检测了其中 3 个 SNPs 在建鲤群体中的分布, 并与增重进行相关分析, 结果显示, C30G 与检测群体雌、雄鱼鱼种阶段和雌鱼成鱼阶段增重显著相关($P < 0.05$), CC 型个体增重显著快于 CG 型个体。G267T 在 5 个家系中与雌鱼成鱼增重相关, 在 7 个家系中不同基因型个体增重虽呈相同趋势但差异不显著($P > 0.05$)。同时考虑 G267T 和 C30G 位点, 则发现 GGCC 个体在雌、雄鱼增重均最大, 在雌、雄鱼中分别比 GGCG 个体快 17% 和 12%。GGCC 个体在实验样本中占约 9%, 存在着较大的选育空间。

关键词: 建鲤; 心肌型胞内脂肪酸结合蛋白; 单核苷酸多态性; SNP-增重相关分析

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

胞内脂肪酸结合蛋白(fatty acid binding proteins, FABPs)属于一个多基因家族, 分子量 14~15 ku, 能结合脂肪酸和其它亲脂性物质如花生四烯酸和视黄醛, 参与疏水性长链脂肪酸的胞外和胞内膜间转移^[1], 也能作为分泌型蛋白调控细胞的生长和增殖^[2]。在哺乳类, 胞内或者细胞质 FABPs 至少包含 9 种截然不同的蛋白, 分别在不同的组织表达, 如主要在肝脏、骨骼肌表达的 L 型、在肠表达的 I 型、心脏和肌肉的 H 型(FABP3)、还有脂肪细胞的 A 型(FABP4)、表皮组织的 E 型、回肠的 IL 型、脑的 B 型、髓鞘的 M 型和精巢的 T 型^[1]。随研究的深入, 该家族的更多成员正被不断分离^[3]。不同的脂肪酸结合蛋白亚型具有类似的结构: 一个螺旋-转角-螺旋域和由 10 个反平行 β 链(β A- β J)组成的 β 桶, 配体长链脂肪酸结合在 β 折叠内空洞中心, 空洞内充满水, 水分子可置换脂肪酸, 维持空

洞内静电网络和蛋白稳定性^[4]。脊椎动物 FABP 基因家族的基因结构由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 尽管内含子的长度在不同成员间差异较大, 但内含子的插入位点相同^[3-4]。由于 FABPs 分子量较小, 在人类疾病诊断中被用作组织损伤的标志物, 如 FABP3 已被用于心肌梗塞、心绞痛等诊断的标志物^[5]。

在 FABP 家族中, *FABP3* 和 *FABP4* 被认为具有影响肌内脂肪(intramuscular fat, IMF)含量的候选基因, Gerbens 等^[6-9]研究了猪 *FABP3* 基因特征、表达以及多态性与肌肉脂肪含量(IMF)、生长特性等的关系, 结果表明 *FABP3* 基因上 T1324C 和 C1811G 两个 SNP 位点与 IMF 以及生长特性显著相关。Pang 等^[10]也发现这 2 个 SNP 位点与我国西部主要猪种的 IMF 等显著相关。猪不同基因型 *FABP3* mRNA 的表达量以及对脂肪代谢相关基因

收稿日期: 2012-02-09

修回日期: 2012-06-15

资助项目: 水产分子育种共性技术的建立与应用(200903045); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2011AA100401); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46)

通讯作者: 俞菊华, E-mail: yujh@ffrc.cn

表达量的调控可能是导致 IMF 差异的原因^[9,11]。Huang 等^[12]的研究则显示 FABP3 的表达量与 30~90 日龄哈萨克羊 IMF 显著相关,但有关羊 FABP3 的多态性还没有报道。FABP3 除了与 IMF 含量相关外,还参与抑制细胞生长和增殖,已分离到的乳腺生长抑制因子(mammary-derived growth inhibitor, MDGI)序列和 FABP3 一致^[13-14]。此外,已研究的肠型 I-FABP (FABP2)基因多态性与人的形体指数和体质量降低等也显著相关^[15-16]。

鱼类 FABP3 的研究报道不多,主要集中在 cDNA 的分离和表达。在 GenBank 中收录有鲤 (*Cyprinus carpio* GU205785)、齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti* GU205786)、斑马鱼(*Danio rerio* AF448057)^[17]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss* NM_001124713)^[18]、大西洋鲑 (*Salmo salar* NM_001123578)^[19]、罗非鱼(*Oreochromis niloticus* XP_003444095)、底鳍 (*Fundulus heteroclitus* AY034789)^[20]、银鲟(*Anoplopoma fimbria* BT083086)等鱼 FABP3 cDNA 序列。Liu 等^[17]还描述了斑马鱼 FABP3 的基因结构并将其定位在连锁群上。Jordal 等^[19]则测定了饲料脂肪酸对大西洋鲑 FABP3 基因的影响及其在不同生长阶段的表达变化。但关于鱼类 FABP3 多态性与 IMF 含量以及生长的相关性还没见报道。

本实验以我国人工选育的建鲤(*Cyprinus carpio* var. jian)为研究对象,在已有鲤 FABP3 cDNA 序列的基础上,首先分离了建鲤 2 个 *jIFABP3s* 的 DNA 序列,分析基因的结构,查找了建鲤群体中潜在的 SNP 位点,检测了其中 3 个 SNP 位点的基因型,并与个体增重进行了相关性分析,筛选到了与增重相关的分子标记。随着鱼类肌肉 IMF 测定标准的健全,本次实验还为今后筛选建鲤 IMF 的标记打下了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验鱼为建鲤选育群体,共 12 个家系,繁殖后分家系在网箱养殖 1 个月左右,每个家系取约 90 尾进行 PIT 标记,测定初始体质量、体长、体高、体厚、尾柄高、尾柄长等数据后混合养殖于同一池塘,位于中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴养殖基地。养殖至当年底扫描标记并测定体

量等数据,减去初始体质量计为鱼种阶段增重,第二年继续养殖至 11 月份,测定体质量等数据,减去第二次测定的体质量计为成鱼阶段增重。在养殖过程中存在标记丢失、鱼死亡等意外事件,最终实验鱼约 942 尾。

1.2 RNA 和 DNA 抽提

取 3 尾建鲤 (100 g 左右)背部新鲜肌肉组织混合样约 100 mg,使用 RNAiso Reagent (TaKaRa, 中国大连),按照说明书抽提总 RNA。

尾静脉采血,使用传统的蛋白酶 K 消化过夜,酚-氯仿法提取基因组 DNA, DNA 完整性和浓度使用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检验和测定, OD_{260/280} 一般为 1.8 左右。用 TE 溶液将 DNA 样品稀释成 50~100 ng/ μ L 备用。

1.3 序列扩增

根据 GenBank 中鲤 FABP3 cDNA (GU205785) 序列设计 TF(5'-CTCAGCTCT AAACATGG CAG-ACG-3')和 TR(5'-GAGGTTTCCCTTTATTCCGCC3'),在肌肉 cDNA 中扩增全长 *jIFABP3* cDNA。肌肉 cDNA 制备按照 MMLV (RNaseH free)(TaKaRa)说明书配制反转录反应液,总反应体系 20 μ L,内含 5 μ g 肌肉总 RNA, Oligo dT 和 6 mers 随机引物各 1 μ L, 42 $^{\circ}$ C 1 h, 85 $^{\circ}$ C 5 min 在 PCR 仪 (Eppendorf)上进行 RT 反应。以 DNA 为模板,使用引物对 F1(5'-ATGACCAAACCCACAACCATCAT-3')和 TR 扩增 *jIFABP3* 的内含子 2 和内含子 3,根据分离到的两种内含子 2 的差异设计引物 a-R(5'-GCTCT-GTGCAC ATTGAGATCTTATTAC-3')和 b-R(5'-TGTGCTCTGTGCGCATAATACC-3'),分别与 TF 配对扩增各自的内含子 1。

1.4 SNP 位点的查找和基因型的检测

使用引物对 F1-TR 和 a-或 b-R-TF 扩增 8 尾建鲤 FABP3s 的序列,使用 ClustalW 软件比对,以同一位点不同碱基出现比例大于 1/3 认定为潜在 SNP 位点。分析 SNP 位点碱基及其附近序列,确定是否有合适的限制性内切酶区分 SNP 位点的不同基因型,然后分析能否设计特异扩增 a 或 b 基因的引物,建立 PCR-RFLP 检测方法,即首先使用引物在不同个体 DNA 中扩增检测片段,然后经过合适的内切酶酶切,酶切产物使用电泳区分,确定基因型。本实验检测了 3 个 SNP 位点,分别是 a-E3-C51T、b-I2-G267T、b-I3-C30G,检测所使用的 PCR 引物、

限制性内切酶以及不同基因型酶切片段信息见表 1。PCR 扩增体系为 12.5 μL , 其中含模板 DNA 1.0 μL , 引物 0.25 μL (10 $\mu\text{mol/L}$)。反应结束取 6 μL

PCR 产物至 10 μL 酶切体系, 其中含内切酶 0.2 μL , 在不同酶推荐的温度下反应 3 h, 然后用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 确定基因型。

表 1 3 个 SNP 位点基因型检测的 PCR-RFLP 引物、限制性内切酶和酶切片段
Tab. 1 Primers, restriction enzymes used in detection of 3 SNP loci and restriction fragments

位点 locus	引物 primer sequence	内切酶 restriction enzyme	酶切片段/bp restriction fragments
a-E3-C51T	F: GTAATAAGATCTCAATGTGCACAGAGC R: GAGGTTTCCCTTTATTCGCC	<i>TaaI</i>	C: 393, 110, 180 T: 503, 180
b- I2-G267T	F: GGTATTATGCGCACAGAGCACA R: GAGGTTTCCCTTTATTCGCC	<i>TasI</i>	T: 53, 222, ... G: 275, ...
b- I3-C30G	同上	<i>BglI</i>	C: 468, 224 G: 692

1.5 PCR 反应和克隆

PCR 反应体系 25 μL , 内含 cDNA 2 μL 或 DNA 模板 100 μg , 正反向引物各 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 其余组分按照 *Taq* 酶 (TaKaRa, 大连) 说明书, 反应在 Eppendorf PCR 仪上进行, 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 预变性, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55~60 $^{\circ}\text{C}$ (根据引物 T_m 调整) 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1~2 min (根据扩增产物长度调整) 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 反应液经 1% 琼脂糖电泳分离, 切割目的条带, 使用胶回收试剂盒 (上海申能博彩) 回收, 后与 pMD18-T 载体 (TaKaRa, 大连) 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 2 h 以上, 后转入 DH5 α 敏感态细胞, 于 LB Amp⁺ 平板上培养过夜, 挑选白色菌落于 LB Amp⁺ 液体培养基中扩大培养, 使用质粒抽提试剂盒 (上海申能博彩) 抽提质粒, *Eco* RI+*Hin* dIII 双酶切验证阳性克隆, 每个平板送 2~5 个阳性克隆到上海博尚生物有限公司测序。

1.6 统计分析

根据限制性酶切结果判断不同个体基因型, 最小等位基因即不常见等位基因, 其频率为该等位基因在总等位基因中所占比例。利用 SPSS 软件包的 GLM 模型进行 SNP 位点不同基因型与不同阶段增重的关联分析。

2 结果

2.1 *jFABP3s* 基因序列

引物对 TF-TR 在肌肉 cDNA 中扩增产物的 5 个克隆序列完全一致, 与基因库中已有的鲤 *FABP3* (GU205785) 有 9 个氨基酸不一致, 称 *jFABP3b*。引物对 F-TR 在 DNA 中分离到 2 种序列, 和 cDNA 序列一致性比对后, 和 *jFABP3b* 一致的

内含子 2 和内含子 3 分别为 335 bp 和 189 bp, *jFABP3a* 的则分别为 341 bp 和 175 bp。在 *a* 和 *b* 内含子 2 差异处分别设计特异的反向引物, a-R 和 TF 序列结果中内含子 1 为 1 208 bp, b-R 和 TF 扩增的内含子 1 长为 1 256 bp, *jFABP3a* 和 *3b* 基因登录号分别为 JQ342674, JQ342675, 表 2 为两个基因不同区域的长度。*jFABP3b* DNA 序列中的外显子部分与本实验扩增的 cDNA 序列完全一致, 与 *jFABP3a* 序列中的外显子碱基相似性为 93%, *3a*、*3b* 与 GU205785 碱基序列的相似性分别为 92% 和 94%。

表 2 *jFABP3s* 基因各部分序列长度
Tab. 2 Lengths of different regions in *jFABP3s*

基因 gene	外显 子 1	内含 子 1	外显 子 2	内含 子 2	外显 子 3	内含 子 3	外显 子 4
	exon1	intron1	exon2	intron2	exon3	intron3	exon4
<i>jFABP3a</i>	73	1208	173	341	102	175	54
<i>jFABP3b</i>	73	1256	173	335	102	189	54

注: 外显子 1 从翻译起始点开始, 外显子 4 到终止子结束。

Notes: Exon 1 starts from the initiation codon, and exon 4 ends at the termination codon.

2.2 *jFABP3s* 氨基酸序列的特征及其系统发育

jFABP3a 和 *3b* 与斑马鱼、人 *FABP3* 一致, 均翻译 133 个氨基酸, 理论计算的分子量为 14.8 ku, *3a* 和 *3b* 存在 7 个差异氨基酸, 相似性为 94%; 与 GU205785 氨基酸差异数分别为 8 和 9 个, 相似性均为 92%。和斑马鱼 (NP_694493)、人 (CAG33148) 的相似性分别为 86% 和 74% (图 1)。*jFABP3s* 中第 7~24 个氨基酸为胞质 FABP 的特征序列。氨基酸序列中碱性氨基酸 (K, R)、酸性氨基酸 (D, E)、疏水性氨基酸 (A, I, L, F, W, V) 和极性氨基酸 (N, C, Q, S, T, Y)

的个数和斑马鱼、人的基本一致, 3a 和 3b 分别有 18 个和 17 个碱性氨基酸、20 个酸性氨基酸, 44 个和 42 个疏水性氨基酸, 34 个和 35 个极性氨基酸。和南极鱼亚目冷水性底层鱼包括鮟南极鱼(*Gobionotothen gibberifrons*, AAC60359)、南极岩斑鲆(*Notothenia coriiceps*, AAC60358)、头带冰鱼(*Chaenocephalus aceratus*, AAC60356)、南极小带腭鱼(*Cryodraco antarcticus*, XP_002716106)和同是底层冷水性的黑鲈亚目的银鲈(*Anoplopoma fimbria*, ACQ58118)相比, 强酸、强碱性氨基酸的个数少 3 个左右。

为了解 *jIFABP3s* 的系统进化, 在基因库中提取了已登录的其它鱼类、代表性的哺乳类和鸟类的 FABP3 蛋白序列, 使用 Mega 以斑马鱼肠型 FABP2 (NP_571506)为外群, 构建 NJ 树(图 2), 结果与现有分类系统一致, 根据 Bootstrap 值小于 70 的不可靠为依据, 本系统树中的鱼类共可分为 3 支, 鲤科鱼类的鲤、齐口裂腹鱼和斑马鱼聚在一起后再与鲇科的鲇 (*Ictalurus furcatus*, ADO28361)汇成为一支; 鲑科鱼类的大西洋鲑和虹鳟在同一支; 另外一支则由鲈形目的罗非鱼和军曹鱼(*Rachycentron canadum*)、纲鲤齿目的底鲆以及南极鱼亚目的鮟南极鱼、南极岩斑鲆、头带冰鱼、南极小带腭鱼和同是底层冷水性的黑鲈亚目的银鲈组成。哺乳类和鸟类则单独成支。系统树上显示建鲤的 2 个 FABP3 对应于斑马鱼 1 个 FABP3, 大西洋鲑肌肉中分离到的 FABP3 和虹鳟心脏中分离到的 FABP3 在同一小支。

2.3 *jIFABP3s* SNP 位点的查找

通过比对 8 个个体 *FABP3s* 序列, 在 *jIFABP3a*

和 *3b* 基因上分别找到 26 个和 25 个 SNP 位点, 其中 *3a* 外显子 1 和 3 上分别有 1 个和 2 个, 外显子 3_A83G 突变使第 110 个氨基酸由谷氨酰胺突变为丝氨酸, 另外 2 个为无义突变, 内含子 1 和 2 中分别有 22 个和 1 个 SNP 位点; *3b* 外显子 1 和 2 中分别有 1 和 2 个 SNP, 均为无义突变, 内含子 1、2 和 3 上分别有 16 个、5 个和 1 个, SNP 具体位置见表 3。51 个 SNP 位点中, a/g 和 c/t 转换最多, 分别是 15 和 14 个, 约占了 57%, 其余均为颠换, 其中 a/t 颠换 8 个, a/c 和 g/t 颠换分别为 5 和 6 个, 另外 3 个为 c/g 颠换。

2.4 SNP 位点不同基因型检测及与增重的相关性

通过分析 SNP 位点附近序列特征兼顾考虑 *3a* 和 *3b* 特异性扩增引物的设计位置, 本实验构建了 *jIFABP3a*-E3-C51T 和 *3b*-I2-G267T, *3b*-I3-C30G 3 个 SNP 位点的 PCR-RFLP 检测法, 图 3 为各位点的基因分型图。结果表明, 3 个位点 3 种基因型在实验建鲤群体中均存在, 但基因型频率存在较大差异, 有的基因型个体数明显偏少, 如 *3b*-I3-C30G 位点的 GG 型鱼只占 2%~3% (表 4, 表 5)。

本实验首先检测了 5 个家系 326 尾建鲤在这 3 个位点的基因型, 3 个位点最小等位基因频率为 0.22~0.50。运用 SPSS 软件 GLM 程序, 对 3 个 SNP 位点的不同基因型与增重进行关联分析, 结果显示, 3 个位点均与雌鱼成鱼增重显性相关 ($P < 0.05$), 与雄鱼成鱼增重相关性均不显著, 其中 G267T 和 C30G 不同基因型的增重雌雄鱼趋势一致, 但 C51T 位点不同基因型个体增重在雌雄鱼表现不一致。与雌鱼鱼种阶段增重相关的位点有两个 C30G

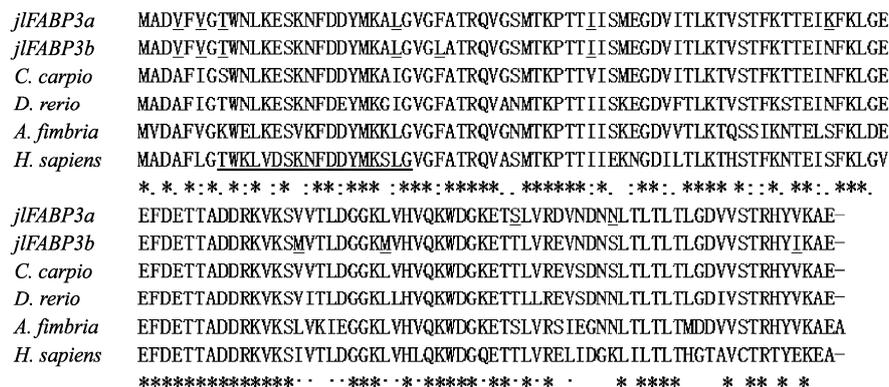


图 1 鲤与其他物种 *FABP3* 的序列比对

*表示一致, 粗下划线为胞质脂肪酸特征序列, 细下划线为 *jIFABP3s* 与网上鲤 *FABP3* 的差异位点。

Fig. 1 Alignment of *FABP3* among common carp and other species

* means identical, the characteristic sequence of cytoplasmic fatty acid are thick underlined, the variant amino acids between *jIFABP3s* and *C. carpio* *FABP3* sequence from the internet are in fine underlined.

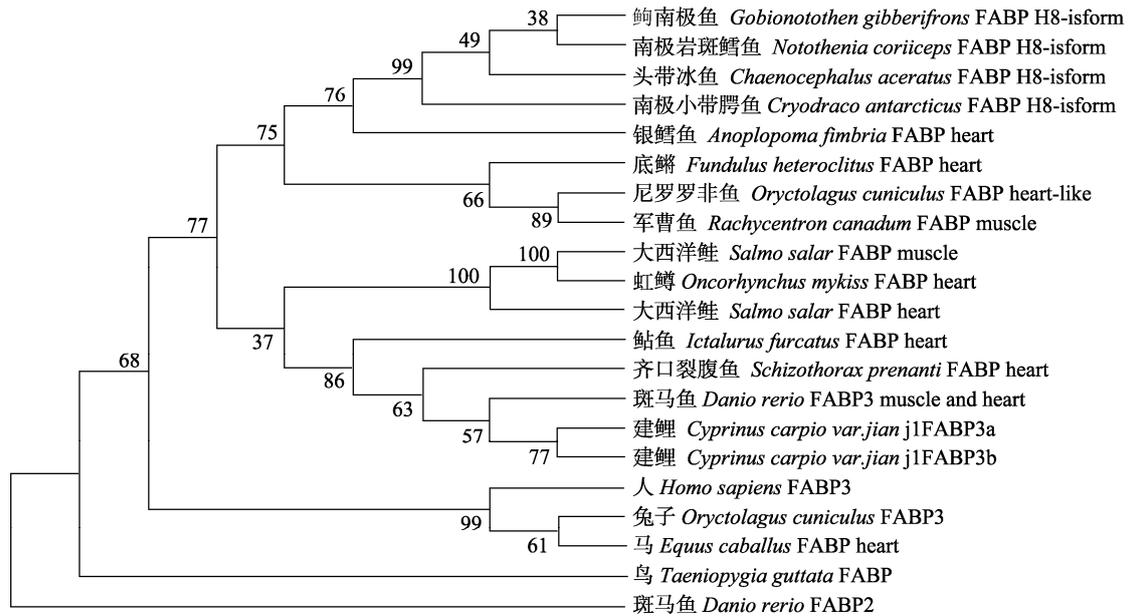


图 2 *FABP3s* 邻接法系统进化树

系统树中使用的序列基因号: 斑马鱼 (NP_694493), 鲈(ADO28361), 齐口裂腹鱼(ADA61017), 大西洋鲑(心型 ACI69211, 肌肉型 NP_001117050), 虹鳟 (NP_001118185), 尼罗罗非鱼(XP_003444095), 军曹鱼(ABY90513), 底鳉(AAK61550), 银鳉 (ACQ58118), 南极小带腭鱼(AAC60357), 鲟南极鱼(AAC60359), 南极岩斑鳉鱼(AAC60358), 头带冰鱼(AAC60356), 人(CAG-33148), 兔 (XP_002716106), 斑胸草雀(NP_001232098), 马(NP_001157357), 斑马鱼(FABP2 NP_571506)。

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree of *FABP3s* protein sequences

The GenBank NO. of sequences used in phylogenetic tree: *Danio rerio* (NP_694493), *Ictalurus furcatus* (ADO28361), *Schizothorax prenanti* (ADA61017), *Salmo salar* (heart ACI69211, muscle NP_001117050), *Oncorhynchus mykiss* (NP_001118185), *Oreochromis niloticus* (XP_003444095), *Rachycentron canadum* (ABY90513), *Fundulus heteroclitus* (AAK61550), *Anoplopoma fimbria* (ACQ58118), *Cryodraco antarcticus* (AAC60357), *Gobionotothen gibberifrons* (AAC60359), *Notothenia coriiceps* (AAC60358), *Chaenocephalus aceratus* (AAC60356), *Oryctolagus cuniculus* (XP_002716106), *Homo sapiens* (CAG33148), *Taeniopygia guttata* (NP_001232098), *Equus caballus* (NP_001157357), *Danio rerio* (FABP2 NP_571506).

表 3 *jIFABP3s* 基因上潜在的 SNP 位点
Tab. 3 SNP loci on two *jIFABP3s*

基因 gene	区域 region	SNP 位点 SNP locus
<i>jIFABP3a</i>	外显子 1(exon 1)	C51T a37g, a62g, a117g, a296g, c302t, a379t, a421t, a465t, c468t, a555g, c642t, a677g, a720g, c802t, a823t, g950t, c967t, g1046t, a1049g, a1074c, a1085c, c1115t
	内含子 1(intron 1)	
	内含子 2(intron 2)	a48t
	外显子 3(exon 3)	C51T, A83G
	外显子 1(exon 1)	C51T
<i>jIFABP3b</i>	内含子 1(intron 1)	c101t, c103g, g360t, a363g, g591t, a609t, a635g, a790c, c828t, c838g, g1000t, a1021g, a1031t, a1117g, a1121c, a1126c
	外显子 2(exon 2)	C68T, C71T
	内含子 2(intron 2)	a40g, a53t, a73c, c239t, g268t
	内含子 3(intron3)	C30G

和 C51T, 且增重快基因型 CC 和 TT 的生长优势保持到了成鱼阶段 (表 4)。从增重绝对值上, 不同基因型个体鱼种阶段增重和成鱼阶段增重趋势一致,

但 C51T 位点的 CC 与 CT 型雌鱼和 CT 与 TT 型雄鱼鱼种阶段和成鱼阶段增重趋势相反。

考虑到 G267T 和 C30G 在雌雄成鱼表现一致, 筛选出的标记方便在选育中使用。为了检测标记的适用性, 检测了另外 7 个家系共 592 尾建鲤在这两个 SNP 位点的基因型, 最小基因型频率比 5 个家系中的略小为 0.19~0.44。不同基因型与增重的相关性分析结果显示, G267T 只与雄鱼鱼种阶段增重极显著性相关 ($P < 0.01$), 与雌鱼成鱼阶段增重的相关性不显著 ($P > 0.05$); C30G 的表现则与在 5 个家系中的基本一致, 与雌雄鱼鱼种和雌鱼成鱼增重均显著性 ($P < 0.05$) 或者极显著性相关 ($P < 0.01$), 且均是 CC 型个体增重快 (表 5)。

根据 G267T 和 C30G 两个位点不同基因型可把 12 个家系建鲤分成 9 种不同基因型, 其中 6 种基因型的样本数在 20 尾以上, 分析这些基因型与增重的相关性, 结果, 增重最快的是 GGCC 型, 占总样本量的 9% 左右, 增重最慢的为 GGCG 型, 接近总样本量的 10%, 雌、雄 GGCC 型个体比 GGCG 型个体分别快 17% 和 12% (表 6)。

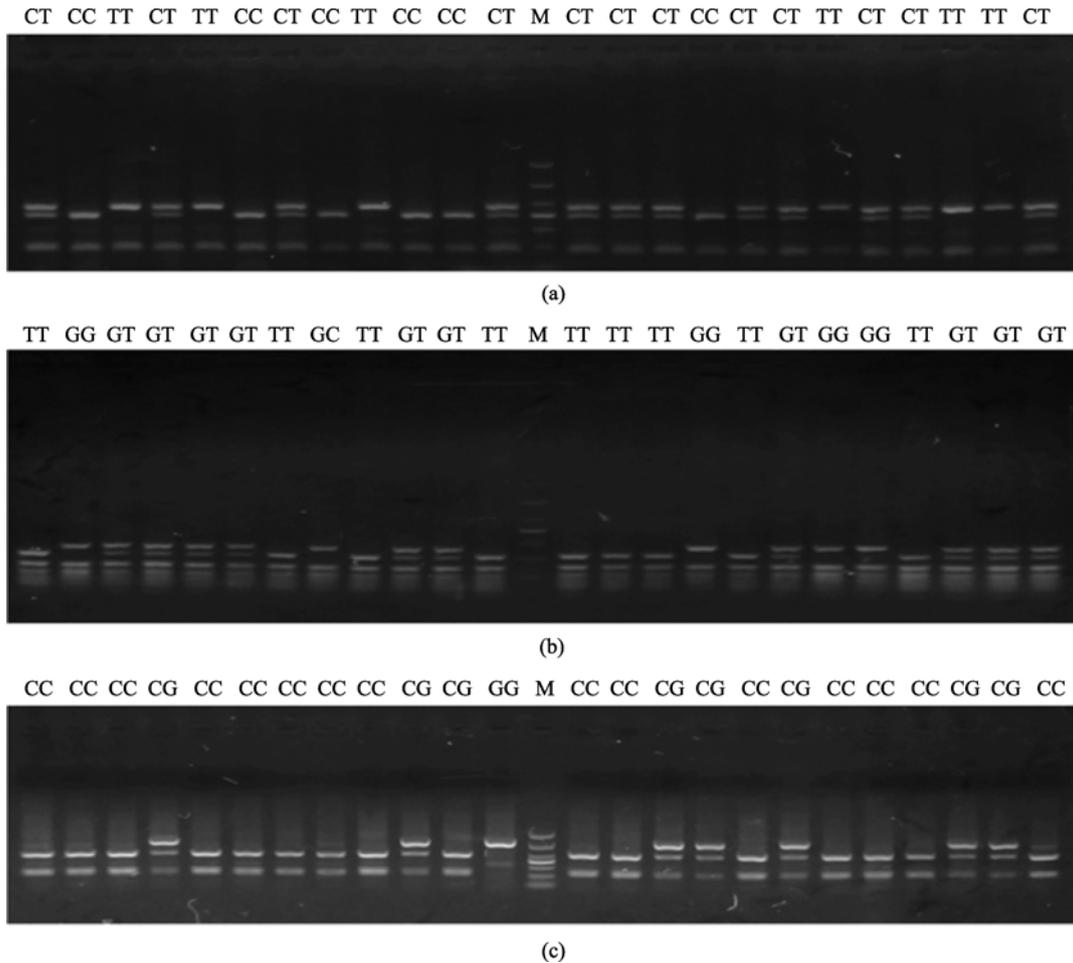


图 3 3 个 SNP 位点不同基因型的电泳结果

(a) *jFABP3a-E3-C51T*; (b) *jFABP3b-12-G267T*; (c) *jFABP3b-13-C30G* 其中 M 为 DNA 分子标记 (DL1000)。

Fig. 3 Electrophoresis patterns of different genotypes in three SNP loci

(a) *jFABP3a-E3-C51T*; (b) *jFABP3b-12-G267T*; (c) *jFABP3b-13-C30G* M: DNA marker (DL1000).

表 4 3 个 SNP 位点的不同基因型在 5 个家系中的分布及与增重的相关性

Tab. 4 Genotypes distribution of three SNPs loci and correlation with weight gains in five families

位点 loci	基因型 genotype	雄鱼增重/g male weight gain			雌鱼增重/g female weight gain			最小等位基因(频率) minor allele (frequency)
		鱼种 juvenile	成鱼 adult	样本数 sample	鱼种 juvenile	成鱼 adult	样本数 sample	
G267T	GG	108.96±32.07	512.94±96.83	40	123.64±40.95	638.5±148.67 ^{ab}	39	T(0.50)
	TG	98.77±30.47	503.91±98.83	82	108.78±36.51	614.64±140.55 ^b	82	
	TT	105.14±32.06	534.56±113.33	37	122.05±48.30	678.89±189.72 ^a	44	
C30G	CC	100.54±29.22 ^b	512.33±106.56	103	121.09±43.45 ^a	656.81±182.07 ^a	101	G(0.22)
	GC	103.59±33.33 ^{ab}	511.95±88.35	52	103.42±29.70 ^b	602.25±95.83 ^b	50	
	GG	126.93±41.99 ^a	567.37±127.27	6	122.2±53.39 ^{ab}	623.04±135.40 ^{ab}	14	
C51T	CC	102.33±27.09	493.64±67.91	27	107.88±30.78 ^b	660.27±190.58 ^{ab}	20	C(0.43)
	TC	102.14±33.70	524.68±112.61	85	109.89±36.16 ^{Bb}	611.46±120.01 ^b	92	
	TT	103.5±29.42	504.02±100.21	44	130.79±52.04 ^{Aa}	683.67±202.37 ^a	47	

注: 不同大写和小写字母分别表示差异极显著($P < 0.01$)和差异显著($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著($P > 0.05$), 下表注释同此。

Notes: Different capital and small letters indicate very significant ($P < 0.01$) and significant difference ($P < 0.05$), respectively, and the same letter means the difference is not significant ($P > 0.05$). The same as the followings.

表 5 2 个 SNP 位点的不同基因型在 7 个家系中的分布及与增重的相关性
 Tab. 5 Genotypes distribution of two SNPs loci and correlation with weight gain in seven families

位点 loci	基因型 genotype	雄鱼增重/g male weight gain			雌鱼增重/g female weight gain			最小等位基因(频率) minor allele (frequency)
		鱼种 juvenile	成鱼 adult	样本数 sample	鱼种 juvenile	成鱼 adult	样本数 sample	
G267T	GG	105.23±26.15 ^A	581.56±133.2	52	103.25±24.49	684.66±134.25	62	G(0.44)
	TG	93.45±22.65 ^B	567.05±112.06	158	106.31±27.45	712.29±146.49	138	
	TT	101.37±24.77 ^A	559.42±108.27	105	106.27±25.24	680.97±128.34	77	
C30G	CC	100.63±23.48 ^a	576.19±110.43	207	108.73±25.73 ^{Ab}	715.52±138.79 ^a	172	G(0.19)
	GC	93.73±25.64 ^b	550.5±122.46	103	102.08±26.25 ^b	673.61±136.98 ^b	96	
	GG	79.22±13.41 ^b	520.4±59.76	5	83.92±18.96 ^{Cc}	604.77±104.82 ^b	9	

表 6 双位点不同基因型在 12 个家系中的分布与成鱼增重的相关性
 Tab. 6 Genotypes distribution of two SNPs loci and correlation with weight gain in twelve families

基因型 genotype	样本数 sample	雄鱼成鱼增重/g male adult weight gain	样本数 sample	雌鱼成鱼增重/g female adult weight gain
GGCC	39	584.45±147.62 ^a	39	728.11±142.55 ^{Aa}
GGCG	47	522.82±91.59 ^b	42	623.15±124.48 ^{Bb}
TGCC	153	544.92±104.23 ^b	135	684.68±156.48 ^{ac}
TGCG	82	545.54±124.20 ^{ab}	75	660.64±138.92 ^{bc}
TTCC	114	553.73±106.89 ^{ab}	95	685.05±164.10 ^{ac}
TTCG	26	539.08±114.61 ^{ab}	23	656.62±103.92 ^{abc}
GGGG	6	565.65±126.76	14	624.56±138.76
TGGG	4	502.38±50.96	7	575.49±82.58
TTGG			2	696.60±106.35

3 讨论

本实验在鲤基因组分离到两个与斑马鱼 *FABP3* 相似性极高的基因, 和鲤的 *MSTN*^[21]、*GHR*^[22]、*GHSR*^[23]以及鲤免疫相关基因 *TLR3*、*TLR7* 和 *MyD88*^[24]等一致, 均反映了鲤基因组“四倍化”现象。双倍化基因的存在或者是两个基因的表达存在着组织或发育阶段的差异, 或者在功能上有差异^[25]。在肌肉组织克隆 *FABP3* cDNA 时测了多个重组质粒, 结果只克隆到 *jIFABP3b*, 这很可能就是由于 *3a* 在肌肉中的表达量较 *3b* 少, 以及 PCR 扩增的竞争性所致, 间接说明了 *3a* 和 *3b* 表达量存在差异。鲑鳟鱼类也是“四倍体”, 存在着和鲤相同的功能基因数, 如也存在 4 个 *MSTN* 基因^[26], 系统树上可见, 从大西洋鲑心脏和肌肉中分别分离到不同的 *FABP3*, 其中, 大西洋鲑心型 *FABP3* 和虹鳟肌型 *FABP3* 聚在一起, 这首先说明大西洋鲑的两个 *FABP3* 存在着组织表达差异, 另外也说明了两个 *FABP3* 在不同鲑鳟鱼类表现不一致。*3a* 和 *3b* 在鲤不同组织中的表达差异, 以及在不同地理种群鲤中的表达特点, 很值得继续深入研究, 但 *3a*

和 *3b* cDNA 序列一致性很高, 很难设计特异引物, 这使定量检测两者的表达存在难度, 尚且需要开发灵敏度更高的检测方法。此外, *FABP3* 氨基酸组成分析显示, 强酸、强碱性氨基酸的个数在南极鱼类比鲤、斑马鱼等多 3~4 个, 这是否与不同生存环境有关值得研究。

SNP 主要指在基因组水平上单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性。SNP 位点在基因组中分布广泛, 多态性丰富, 人体许多表型差异、对药物或疾病的易感性等等都可能与 SNP 有关, 如最近报道的筛选到与日本人群乳腺癌相关的 SNP 位点 rs1447295^[27]。在动物养殖业中, 有较多使用候选基因法筛选性状相关的 SNP 位点用于改良动物生长、繁殖性能和肉质等性状的报道, 如 Zhang 等^[28]在 *orexin* 基因 5'调控区筛选到中国本地牛增重快的基因型。Chang 等^[29]在 *PNRC1* 基因的 3'非翻译区找到与菜鸭繁殖性能相关的 SNP 位点。Tyra 等^[30]报道了 *FABP3* 基因的表达与猪肌内脂肪酸的关系, 并筛到了相关的 SNP 位点。在水产养殖业中的类似报道有: Prasertlux 等^[31]在 *RuvBL2* 基因上

筛选到与斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 生长相关的基因型, 与罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[32-34]、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[35]和鲤^[21,23,36-37]生长相关的 SNP 位点也陆续有报道。总之, 候选基因法筛选性状相关分子标记具有多态位点选择简单、数据统计简单、操作简便和结果便于应用的优点, 已成为当前主要的方法之一。

本实验在两个建鲤 *jIFABP3s* 基因上共找到了 51 个 SNP 位点, 其中外显子上只有 6 个, 只有 1 个有义突变, 这与不同位点所受选择压力有关。51 个 SNP 位点中, 转换较颠换比例高 14%, 这和转换本身比颠换容易一致。由于鲤鱼基因的双倍化, 很多 SNP 位点由于不能设计特异区分两个基因的引物而无法进行检测。本实验构建了其中 3 个 SNPs 位点的检测方法, 从实验图谱可以看出, 检测结果清晰、可靠。3 个 SNPs 不同基因型与雌、雄以及不同阶段建鲤增重的相关性分析显示: 不同基因型在雌、雄鱼的表现不完全一致, 如 5 个家系分析结果显示 3 个位点均与雌鱼成鱼阶段增重相关, 但与雄鱼成鱼增重未表现出相关性, C51T 不同基因型在雌雄成鱼阶段的增重趋势也不完全一致; 不同基因型在鱼不同生长阶段的表现也不完全一致, 5 个家系中 C30G 与雄鱼鱼种增重显著相关, 但与成鱼增重则相关性不显著; 不同基因型在不同群体中的表现不完全一致, 如 G267T 在 5 个家系中与雌性成鱼增重相关, 但在 7 个家系中则只与雄鱼鱼种阶段增重相关。这些差异可能与该基因在不同性别和不同阶段的表达差异有关, 如阮瑞霞等^[33]在进行筛选吉富罗非鱼 GHR 上增重相关 SNP 时就出现类似雌雄差异的情况是与基因表达水平相一致的。此结果也说明分析时进行区分的必要性, 特别是雌雄区分可以排除性别对增重的影响, 鲤雌鱼比雄鱼生长快。由于生长是多基因控制的数量性状, 要使某个标记的影响凸显出来, 就必须减少其它因子的影响, 可以推测在遗传多样性丰富的群体中筛选到与生长相关显性标记的难度要比在遗传背景基本一致的群体中的大, 但阳性标记的适用范围可能会更广。另外, 同时考虑 G267T 和 C30G, 发现雌雄鱼增重最快个体的基因型为 GGCC, 较基因型 GGCG 的个体快 12%~17%。

FABP 家族主要与脂肪酸运输相关, 也参与细胞生长和增殖的调控, 至今在 *FABP3* 基因上

已经筛选到与猪肌肉脂肪含量相关的多个分子标记, 在 *FABP2* 上找到了与人体质量相关的标记。本实验在 2 个鲤 *FABP3* 基因上筛选到能用于建鲤增重选育的相关分子标记 G267T 和 C30G, 确定基因型为 GGCC 的建鲤个体增重最快。本文获得的 3 个 SNP 位点也为今后进一步筛选与建鲤肌肉脂肪含量相关的标记打下了基础。

参考文献:

- [1] Chmurzynska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism [J]. *Journal of Applied Genetics*, 2006, 47(1): 39-48.
- [2] Zimmerman A W, Veerkamp J H. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins [J]. *Cellular and Molecular Life Science*, 2002, 59 (7): 1096-1116.
- [3] Liu R Z, Li X, Godbout R. A novel fatty acid-binding protein (FABP) gene resulting from tandem gene duplication in mammals: transcription in rat retina and testis [J]. *Genomics*, 2008, 92 (6): 436-45.
- [4] Hanhoff T, Lucke C, Spener F. Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2002, 239(1-2): 45-54.
- [5] Pelsers M M, Hermens W T, Glatz J F. Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2005, 352 (1-2): 15-35.
- [6] Gerbens F, Rettenberger G, Lenstra J A, et al. Characterization, chromosomal localization, and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein gene[J]. *Mammalian Genome*, 1997, 8(5): 328-332.
- [7] Gerbens F, van Erp A J, Harders F L, et al. Effect of genetic variants of the heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and performance traits in pigs [J]. *Journal of Animal Science*, 1999, 77(4): 846-852.
- [8] Gerbens F, de Koning D J, Harders F L, et al. The effect of adipocyte and heart fatty acid-binding protein genes on intramuscular fat and backfat content in Meishan crossbred pigs[J]. *Journal of Animal Science*, 2000, 78(3): 552-559.
- [9] Gerbens F, Verburg F J, van Moerkerk H T, et al. Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs[J]. *Journal of Animal Science*, 2001, 79 (2): 347-354.
- [10] Pang W J, Bai I, Yang G S. Relationship among H-FABP gene polymorphism, intramuscular fat content, and adipocyte lipid droplet content in main pig breeds with different genotypes in western China[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(6): 515-524.
- [11] Zhao S M, Ren L J, Guo L, et al. Muscle lipid metabolism gene expression in pigs with different H-FABP genotypes [J]. *Livestock Science*, 2010, 128(1-3): 101-107.

- [12] Huang Z G, Xiong L, Liu Z S, *et al.* The Developmental Changes and Effect on IMF Content of H-FABP and PPAR γ mRNA Expression in Sheep Muscle[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(6): 507–514.
- [13] Borchers T, Hohoff C, Buhlmann C, *et al.* Heart-type fatty acid binding protein-involvement in growth inhibition and differentiation[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1997, 57(1): 77–84.
- [14] Zimmerman A W, Veerkamp J H. New insights into the stature and function of fatty acid-binding proteins[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2002, 59(7): 1096–1116.
- [15] Damcott C M, Feingold E, Moffett S P, *et al.* Variation in the FABP2 promoter alter transcriptional activity and is associated with body composition and plasma lipid levels[J]. *Human Genetics*, 2003, 112(5–6): 610–616.
- [16] de Luis D A, Aller R, Izaola O, *et al.* Influence of ALA54THR polymorphism of fatty acid binding protein 2 on lifestyle modification response in obese subjects[J]. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2006, 50(4): 354–360.
- [17] Liu R Z, Denovan-Wright E M, Wright J M. Structure, linkage mapping and expression of the heart-type fatty acid-binding protein gene (*fabp3*) from zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270(15): 3223–3234.
- [18] Ando S, Xue X H, Tibbits G F, *et al.* Cloning and sequencing of complementary DNA for fatty acid binding protein from rainbow trout heart[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 119 (1): 213–217.
- [19] Jordal A E, Hordvik I, Pelsers M, *et al.* FABP3 and FABP10 in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)-general effects of dietary fatty acid composition and life cycle variations[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 145 (2): 147–158.
- [20] Bain L J. cDNA cloning, sequencing, and differential expression of a heart-type fatty acid-binding protein in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*) [J]. *Marine Environmental Research*, 2002, 54 (3–5): 379–383.
- [21] 俞菊华, 李红霞, 唐永凯, 等. 建鲤生长抑制素基因 MSTN 的分离、表达及多态性与体型、平均日增重相关性研究[J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(6): 1062–1072.
- [22] 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): 218–229.
- [23] 俞菊华, 李红霞, 李建林, 等. 建鲤生长激素促泌素受体 1 基因的特性及其对增重的影响[J]. *中国水产科学*, 2012, 19(3): 390–398.
- [24] Kongchum P, Palti Y, Hallerman E M, *et al.* SNP discovery and development of genetic markers for mapping innate immune response genes in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29: 356–361.
- [25] Sharma M K, Liu R, Thisse C, *et al.* Hierarchical sub-functionalization of *fabp1a*, *fabp1b* and *fabp10* tissue-specific expression may account for retention of these duplicated genes in the zebrafish (*Danio rerio*) genome[J]. *FEBS Journal*, 2006, 273(16): 3216–3229.
- [26] Østbye T K K, Wetten O F, Ave T K, *et al.* Myostatin (MSTN) gene duplications in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Evidence for different selective pressure on teleost MSTN-1 and -2[J]. *Gene*, 2007, 403(1–2): 159–169.
- [27] Hamano T, Matsui H, Sekine Y, *et al.* Association of SNP rs1447295 and microsatellite marker DG8S737 with familial prostate cancer and high grade disease[J]. *The Journal of Urology*, 2010, 184(2): 738–742.
- [28] Zhang A, Zhang L, Zhang L, *et al.* Single Nucleotide polymorphism (SNP) analysis of *orexin* gene 5' regulatory region in Chinese indigenous cattle populations[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2011, 10(8): 1273–1279.
- [29] Chang M T, Cheng Y S, Huang M C. A novel SNP of the PNRC1 gene and its association with reproductive traits in Tsaiya ducks[J]. *Theriogenology*, 2012, 78(1): 140–146.
- [30] Tyra M, Ropka-Molik K. Effect of the FABP3 and LEPR gene polymorphisms and expression levels on intramuscular fat (IMF) content and fat cover degree in pigs[J]. *Livestock Science*, 2011, 142(1): 114–120.
- [31] Prasertlux S, Khamnamtong B, Chumtong P, *et al.* Expression levels of RuvBL2 during ovarian development and association between its single nucleotide polymorphism (SNP) and growth of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Aquaculture*, 2010, 308(1): S83–S90.
- [32] 刘福平, 白俊杰, 叶星, 等. 罗非鱼 MC4R 基因克隆及与生长相关的 SNP 位点[J]. *中国水产科学*, 2009, 16(6): 816–823.
- [33] 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.
- [34] 于凌云, 白俊杰, 樊佳佳, 等. 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分析[J]. *水产学报*, 2010, 34(6): 665–671.
- [35] 陶文静, 马龙俊, 俞菊华, 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): 1–8.
- [36] 魏可鹏, 俞菊华, 李红霞, 等. 建鲤 IGFBP3 基因多态性对生长的影响[J]. *动物学杂志*, 2012, 47(1): 96–104.

Sequences analysis of *jlFABP3s* and the correlation between polymorphisms and body weight gain in *Cyprinus carpio* var. jian

YU Ju-hua*, LI Hong-xia, LI Jian-lin, TANG Yong-kai, XIA Zheng-long, DONG Zai-jie

(Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Fatty Acid Binding Proteins are mainly involved in fatty acid transfer in the extracellular and intracellular membrane, and also take part in the regulation of cell growth and proliferation. In this experiment, two heart and muscle fatty acid binding protein genes, *jlFABP3a* and *3b*, were isolated from *C. carpio* var. jian. Consistent with other FABP3s, *jlFABP3s* contain four exons and three introns. The open reading frames of *3a* and *3b* encode 133 amino acids and share 93% and 94% similarity with each other in DNA and protein level, respectively. And there was clear difference in sequences and lengths between two genes introns. Twenty-six and twenty-five SNPs were found on *jlFABP3a* and *3b* respectively in *C. carpio* var. jian population using alignment sequences from different individuals. And genotypes in 3 SNP loci were detected using PCR-RFLP. The SNP-weight gain correlation analysis indicated C30G was significantly associated with male juvenile, female juvenile and adult fish weight gain ($P < 0.05$) in total experimental samples. Individuals with CC genotype grew faster than CG individuals. G267T was significantly correlated with female adult fish weight gain ($P < 0.05$) in 5 families, and three genotype individuals had same growth trends in the 7 populations, though not significant ($P > 0.05$). Taking two SNPs (G267T and C30G) into account, correlation analysis revealed individuals with GGCC grew the fastest in female and male fish, and grew 17% and 12% faster than GGCG ones. In the experimental samples, the GGCC individuals account for only about 9%, indicating the presence of large selection space, and can be used as reference in molecular assistant breeding of *C. carpio* var. jian.

Key words: *Cyprinus carpio* var. jian; heart and muscle fatty acid binding protein; single nucleotide polymorphism; SNP-weight gain correlated analysis

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