

## 草鱼醛缩酶 B 基因部分序列的 SNP 多态性及其与生长性状的关联分析

曹婷婷<sup>1,2</sup>, 白俊杰<sup>1,2\*</sup>, 于凌云<sup>1</sup>, 樊佳佳<sup>1</sup>

(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:** 通过佛山市白金水产良种选育场提供的草鱼 EST 库的醛缩酶 B 基因重叠群的 2 个 Contig 扩增该基因的序列片段, 采用直接测序法, 经过序列比对, 共筛到 C+687G、C+1042A 和 A117C 等 3 个颠换 SNPs 位点。C+687G 位于醛缩酶 B 基因外显子 6 的 63 bp 处, 为同义突变; C+1042A 位于外显子 8 的 43 bp 处, 为错义突变; A117C 位于内含子 7 的 117 bp 处。采用 Snapshot 方法对同一群体的 296 尾草鱼的这 3 个 SNPs 位点进行检测和分型, 并统计基因型频率。3 个 SNPs 位点中 AA 的频率分别为 42.9%、32.8%、32.8%; AB 的频率分别为 42.9%、45.9%、45.6%; BB 的频率分别为 14.2%、21.3%、21.6%。利用一般线性模型分析 3 个 SNPs 位点与草鱼体质量、体长等重要生长性状的关系, 关联分析结果显示, C+687G 位点不同基因型只在体长/尾柄长比值上存在显著差异( $P<0.05$ ), 和体质量等重要生长性状不相关。A117C 和 C+1042A 两个位点都在体质量等 4 个生长性状上存在显著差异( $P<0.05$ )。将 3 个 SNPs 位点不同基因型两两位点组成 3 个组合的双倍型(都去掉了频率小于 3%的组合), 结果显示, C+687G 和 A117C 以及 C+687G 和 C+1042A 的 2 个组合分别组成的 7 种双倍型在体质量等 5 个生长性状上都存在显著差异( $P<0.05$ ); A117C 和 C+1042A 组成的 3 种双倍型在体质量、眼间距等 2 个生长性状上都存在显著差异( $P<0.05$ )。研究认为, 可以考虑将草鱼醛缩酶 B 基因作为生长相关的候选基因, 用于草鱼的分子辅助育种。

**关键词:** 草鱼; 醛缩酶 B; 基因型; 双倍型; 生长关联分析

**中图分类号:** Q 343.1<sup>+</sup>5; S 917.4

**文献标志码:** A

果糖-1, 6-二磷酸醛缩酶(fructose-1,6-bisphosphate aldolase, ALDO)是糖酵解和糖异生过程中的一种关键酶<sup>[1]</sup>, 它普遍存在于动物、植物、微生物体内, 已在高等植物的叶绿体、线粒体、细胞质内发现了多种醛缩酶<sup>[2]</sup>。在脊椎动物中发现的醛缩酶同工酶有 3 种: A 型、B 型和 C 型。A 型在肌肉中表达, B 型在肝脏、肾脏、胃及肠道中表达, 而 C 型则在脑、心脏及卵巢中表达<sup>[3]</sup>。这些同工酶有不同的

催化功能: 3 种同工酶都参与糖酵解, B 型相对于 A 型和 C 型来说, 又参与糖异生<sup>[3]</sup>。醛缩酶的 3 种同工酶结构基因在人、羊、猪、小鸡、大鼠、小鼠、斑马鱼、布鲁里锥虫和疟原虫等许多种属中均已被克隆出来。除 5' 和 3' 非翻译区外, 编码区序列大多由 8 个外显子和 7 个内含子所组成<sup>[4]</sup>。醛缩酶 B 基因的突变可造成该酶蛋白功能的缺陷并导致病人的遗传性果糖失耐症——HFI, Cross 等<sup>[5]</sup>首次发现了小肠

收稿日期: 2011-07-12 修回日期: 2012-02-14

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-46-03); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2011AA100403); 国家科技支撑计划(2012BAD26B02)

通讯作者: 白俊杰, E-mail: jjbai@163.net

上皮细胞、肝细胞和肾皮质细胞的醛缩酶B缺乏可导致HFI。

SNP在单个基因或整个基因组的分布是不均匀的<sup>[6]</sup>, 在外显子内, 其变异率仅为周围序列的1/5, 但它在遗传性疾病研究中却具有重要意义<sup>[7]</sup>。表达序列标签(expressed sequence tag, EST)是指在来源于不同组织的cDNA文库中随机挑选克隆、测序, 得到部分cDNA序列, 长度为150~500 bp, 只含有基因编码区域<sup>[8]</sup>。张晓峰等<sup>[9]</sup>从454测序获得的EST序列和公共数据库中下载的共255 768条鲤(*Cyprinus carpio*) EST序列为源序列, 鉴定与生长相关的EST序列5 375条。在缺乏基因组序列的非模式生物中, 从EST数据库中搜寻SNP位点已经成为获得SNP位点的重要途径, 目前, SNP分子标记已在鱼、虾、蟹、贝等水产动物中得到了广泛的研究和应用<sup>[10-14]</sup>, 包括亲缘关系分析、遗传多样性调查、QTL定位、分子标记辅助选育等方面<sup>[15]</sup>。

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是草食动物, 但是在人工养殖过程中常采用投喂配合饲料。配合饲料中含有多糖成分, 而糖类首先要经过消化酶分解成葡萄糖才能为鱼体吸收利用<sup>[16]</sup>。一般来说, 草食性、杂食性鱼类较肉食性鱼类对糖的利用能力较强<sup>[17]</sup>。当饲料中糖的含量适宜时, 可减少蛋白质作为能量的消耗, 促进鱼体内蛋白质合成的增加<sup>[18]</sup>。草鱼对糖的利用能力较强, 能从饲料中吸收糖分, 而醛缩酶B参与糖酵解过程, 其突变可能影响糖的分解, 进而可能影响草鱼的糖代谢和生长代谢机制, 所以该基因上的突变可能和草鱼生长性状的变化有关。本实验将醛缩酶B基因作为草鱼生长相关的候选基因, 从已有的草鱼EST库扩增草鱼该基因序列片段, 采用直接测序法检测草鱼的SNP突变位点, 分析草鱼该基因片段上的SNP突变对其生长性状的影响, 为草鱼分子标记辅助育种奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品来源

用于做生长性状相关性分析的草鱼样品于2011年4月, 采自广东省佛山市白金水产良种选育场, 选择同批繁育和同塘饲养的1500 g左右的草鱼296尾, 剪取尾鳍放入酒精中保存。

用于筛选草鱼SNP位点的4个不同来源的草鱼群体的鳍条样品由本实验室保存, 分别来源于湖北石首、广东清远、湖南长沙的亲鱼和小鱼苗。每个群体选取5个样品, 每对引物分别用20个样品进行筛选。

### 1.2 主要试剂和材料

DNA提取试剂盒购自北京天根时代公司。dNTP、*Taq*DNA聚合酶体系为上海申能博彩公司产品。琼脂糖, 购自广州威佳科技有限公司。引物合成和测序由上海英骏和上海生工生物技术有限公司完成。

### 1.3 引物设计

根据本实验室已有的草鱼EST库中的醛缩酶B基因的2个Contig片段, 运用引物设计软件Primer Premier 5.0设计2对引物P1和P2。

### 1.4 SNP位点的筛选

分别用20个样本的基因组扩增醛缩酶B基因序列2个Contig片段上的预计存在的SNP位点, PCR产物用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。目的片段都很特异, 条带都很亮。把这两对引物的共40个未纯化的PCR产物, 送上海生工生物技术有限公司测序, 用Vector NIT Suite 11.0比对分析测序结果及获得SNPs位点。

### 1.5 SNP位点的分型

将所获醛缩酶B基因序列片段上的3个SNPs位点送上海捷瑞生物工程有限公司用Snapshot方法分型, 同时提供296条草鱼样品的鳍条DNA, 每个

表1 草鱼醛缩酶B基因及SNP分型引物信息  
Tab. 1 The primers of ALDO B gene and SNP genotyping of grass carp

引物 primer	碱基组成(5'-3') nucleotide constitutes	产物长度/bp length of products	退火温度/°C annealing temperature	用处 usage
P1	F: TGGCTTGGTTCCCATTTGTAGAG R: GCTGGTTCATGGCATTGAGATT	326	60	扩增 Contig1
P2	F: CGCGCCTTACCGAGAAGTAC R: GCATAGCTGGCGGTTAAAGAGG	270	60	扩增 Contig2

注: F. 正向引物; R. 反向引物。

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

样品的 DNA 浓度为 500 ng/μL。SNP 分型的步骤如下: 首先, 针对 3 个 SNPs 位点分别设计 3 对引物用于多重 PCR 的扩增; 扩增后取 3μL PCR 产物用 *ExoI* 和 *Sap* 纯化, 主要是去除反应产物中的引物及 DNTP; 纯化好后进行延伸反应, 预先混好延伸引物; 最后在测序仪(型号为 ABI 3730XL)上进行检测: 取 1μL 延伸产物, 加 8 μL 上样 loading(8 μL loading+0.2 μL GS120 Liz), 95℃ 变性 3 min, 立即冰水浴。

**1.6 数据统计分析**

等位基因频率分析利用 Popgene(Version 3.2) 处理。

等位基因频率=表现为某个等位基因的样本数/总样本数

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时间、环境及人工饲养技术差别, 利用 SPSS17.0 软件一般线性模型(general linear model, GLM), 将醛缩酶 B 基因片段的不同 SNPs 位点的基因型与草鱼主要生长性状之间的相关性进行最小二乘分析。统计分析模型为

$$Y_{ij} = \mu + B_i + e_{ij}$$

式中,  $Y_{ij}$  为某个性状第  $i$  个标记第  $j$  个个体观测值;  $\mu$  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残差效应。

**2 结果**

**2.1 醛缩酶 B 基因部分序列的扩增**

对扩增到的 PCR 产物测序, 得到了该基因的两段序列, 分别为 475 和 345 bp, 与预期的片段大小相符。

用 Vector NIT Suite 11.0 进行了序列比对, 并进一步与 NCBI 上斑马鱼的醛缩酶 B 基因的序列比对, 推测扩增到的草鱼的该基因序列片段: 草鱼的醛缩酶 B 基因的外显子 4 的部分序列共 140 bp, 外显子 6 共 175 bp, 外显子 7 的部分序列共 160 bp, 内含子 7 的部分序列共 126 bp(以 GT 开始), 外显子 8 共 96 bp。

**2.2 醛缩酶 B 基因部分序列的 SNP 位点的获得和分析**

通过直接测序法, 软件比对之后, 醛缩酶 B 基因部分序列上共获得了 3 个 SNPs 位点, 这 3 个突变都属于颠换突变, P1 通过扩增获得一个 SNP 位点: C+687G, 位于草鱼醛缩酶 B 基因外显子 6 的 63

bp 处, 即起始密码子 ATG 的 687 bp 处。P2 通过扩增获得 2 个 SNPs 位点, 分别为 A117C 和 C+1042A, 分别位于草鱼醛缩酶 B 基因内含子 7 的 117 bp 处和外显子 8 的 43 bp 处, 即起始密码子 ATG 的 1 042 bp 处。经过和斑马鱼该基因的序列比较之后, 将 C+687G 和 C+1042A 的 CC 型, A117C 的 AA 型, 统一命名为 AA 型; 将 C+687G 的 GG 型, A117C 的 CC 型和 C+1042A 的 AA 型统一命名为 BB 型; 将 C+687G 的 GC 型, A117C 和 C+1042A 的 AC 型统一命名为 AB 型(图 1~图 3)。

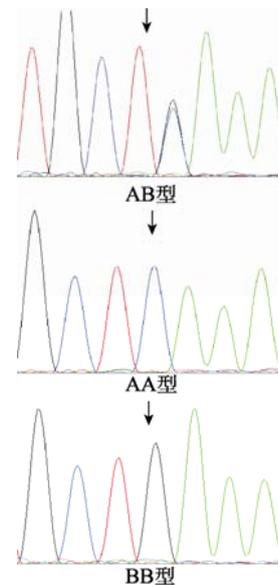


图 1 C+687G 位点测序峰图  
Fig. 1 DNA sequencing map of C+687G site

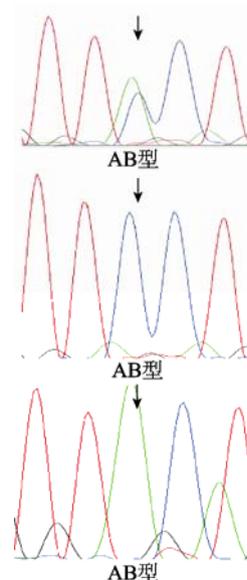


图 2 A117C 位点测序峰图  
Fig. 2 DNA sequencing map of A117C site

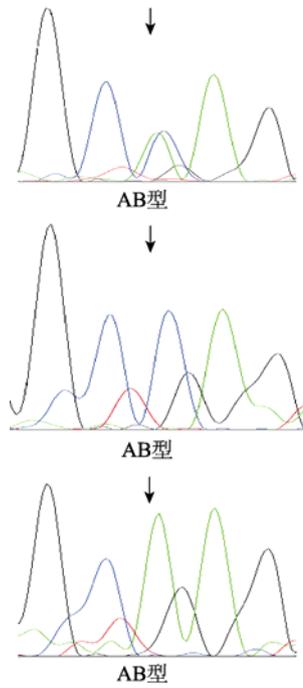


图 3 C+1042A 位点测序峰图  
Fig. 3 DNA sequencing map of C+1042A site

经序列分析 C+687G 位点密码子改变类型为 CTC-CTG, 编码亮氨酸(Leu), 氨基酸没有改变, 为同义突变。而 A117C 位点位于非编码序列的内含子 7 上, 不编码氨基酸。C+1042A 的密码子改变类型为 CAG-AAG, 分别编码谷氨酰胺-赖氨酸(Gln-Lys), 该突变位点造成了氨基酸的改变, 为错义突变。

2.3 醛缩酶 B 基因 3 个 SNPs 位点在草鱼群体中的多态性分析

用 296 尾草鱼样本对 3 个 SNPs 位点做多态性分析, Snapshot 分型和 Popgene 处理后, 遗传参数如表 2 所示。根据  $PIC > 0.5$  时, 该位点为高度多态;  $0.25 < PIC < 0.5$  为中度多态;  $PIC < 0.25$  为低度多态,

这 3 个多态位点都属于中度多态位点, 且 C+1042A 位点的遗传变异最高, A117C 次之, C+687G 最低。

A117C 和 C+1042A 两个位点的突变的位置上, 经过 296 尾草鱼样品的 SNP 分型, 产生的基因型几乎完全一样(除了 90# 样本外, A117C 的基因型是 AC, C+1042A 的基因型是 CC)。A117C 的突变位点在 1# 样本上的基因型是 AA 型, 相应地, C+1042A 的突变位点在 1# 样本上的基因型也是 AA 型。推测这两个位点相邻, 可能受单倍型的影响, 所以产生相似的结果。

C+687G、A117C 和 C+1042A 3 个位点的 3 种基因型及其等位基因频率的统计结果见表 3。在 296 尾草鱼样本中, C+687G 位点的 AA 和 AB 型一样多, 42.9%, BB 型最少。A117C 位点和 C+1042A 位点都以 AB 型居多, 约占 50%, AA 型次之, BB 型最少。3 个位点中, 等位基因 A 频率明显比等位基因 B 频率高, 等位基因 A 为优势等位基因。

用同一个草鱼群体对 3 个多态位点的基因型进行 Hardy-Weinberg 平衡检验, 结果如表 4 所示。经过  $\chi^2$  处理后, 3 个位点均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ( $P > 0.05$ )。

2.4 草鱼醛缩酶 B 基因 3 个 SNPs 位点的多态性与草鱼生长性状关联分析

对草鱼醛缩酶 B 基因部分序列 3 个不同的 SNPs 位点的分析表明, 基因频率符合 Hardy-Weinberg 定律( $P > 0.05$ ), 3 个 SNP 位点不同基因型的体质量、体长、体宽和尾柄的实验, 结果如表 5~表 8 所示。

关联分析结果显示, C+687G 位点的不同基因型在体长/尾柄长比值存在显著差异( $P < 0.05$ )。CC 型在体质量、体宽、体长/尾柄长等指标上都比 CG

表 2 醛缩酶 B 基因 3 个 SNPs 位点的遗传参数  
Tab. 2 The polymorphic parameters of three SNPs sites of ALDO B gene

位点 locus	纯合度 $H_o$	杂合度 $H_e$	多态信息含量 $PIC$	有效等位基因数 $N_e$
C+687G	0.570 9	0.429 1	0.353 5	1.847 6
A117C	0.540 5	0.459 5	0.371 7	1.974 0
C+1042A	0.543 9	0.456 1	0.371 9	1.975 4

表 3 草鱼醛缩酶 B 基因突变点基因型及其等位基因频率  
Tab. 3 Genotype and gene frequency of SNP sites of ALDO B gene in grass carp

位点 locus	样品数 number	基因型频率/% (样本数) ratio of different genotypes			等位基因频率/% ratio of different alleles	
		AA	AB	BB	A	B
C+687G	296	42.9(127)	42.9(127)	14.2(42)	64.4	35.6
A117C	296	32.8(97)	45.9(136)	21.3(63)	55.7	44.2
C+1042A	296	32.8(97)	45.6(135)	21.6(64)	55.6	44.4

和 GG 型高。纯合型 CC 和 GG 的各项指标均比 CG 型高, 而 CG 和 GG 在体质量等各项指标上差异不显著, 各项均值都很接近。

A117C 和 C+1042A 两个位点都在体质量、体长/体宽、体长/尾柄长和尾柄长/尾柄高等生长性状上存在显著差异( $P<0.05$ )。A117C 位点的 CC 型在

表 4 SNP 位点的哈迪-温伯格平衡检验  
Tab. 4 Hardy-Weinberg equilibrium test of SNP sites of ALDO B gene in grass carp

位点 locus	H-W平衡	Hardy-Weinberg equilibrium
C+687G	$\chi^2=1.31$	$P=0.25$
A117C	$\chi^2=1.47$	$P=0.23$
C+1042A	$\chi^2=1.80$	$P=0.18$

表 5 草鱼醛缩酶 B 基因 3 个位点不同基因型的生长性状的关联分析

Tab. 5 Association of three SNP sites of ALDO B gene polymorphisms with growth traits in grass carp

位点 locus	基因型 (样本量) genotype	体质量/g body weight	体长/cm body length	体宽/cm body width	尾柄长/cm caudal peduncle length	尾柄高/cm caudal peduncle height	体长/体宽 body length/body width	体长/尾柄长 body length/caudal peduncle	尾柄长/尾柄高 caudal peduncle/caudal peduncle height
C+687G	CC(127)	1497.46±23.48	43.55±0.32	7.18±0.04	6.95±0.09	5.12±0.04	6.07±0.04	6.36±0.06 <sup>A</sup>	1.36±0.01 <sup>a</sup>
	CG(127)	1445.77±23.48	43.49±0.32	7.14±0.04	7.16±0.09	5.12±0.05	6.06±0.04	6.13±0.06 <sup>B</sup>	1.40±0.01 <sup>b</sup>
	GG(42)	1443.05±40.83	44.26±0.56	7.14±0.07	7.16±0.15	5.18±0.07	6.21±0.08	6.23±0.10	1.38±0.02
A117C	AA(97)	1441.32±26.58 <sup>b</sup>	43.92±0.37	7.12±0.05 <sup>b</sup>	7.20±0.10	5.15±0.05	6.18±0.05 <sup>a</sup>	6.15±0.07 <sup>Bb</sup>	1.40±0.01 <sup>Aa</sup>
	AC(136)	1435.79±22.45 <sup>Ab</sup>	43.44±0.31	7.14±0.04 <sup>b</sup>	7.06±0.08 <sup>a</sup>	5.11±0.04	6.06±0.04	6.21±0.06 <sup>Bb</sup>	1.38±0.01 <sup>a</sup>
	CC(42)	1540.26±32.98 <sup>Ba</sup>	43.55±0.46	7.27±0.06 <sup>a</sup>	6.86±0.12 <sup>b</sup>	5.12±0.06	5.99±0.06 <sup>b</sup>	6.47±0.08 <sup>Aa</sup>	1.34±0.02 <sup>Bb</sup>
C+1042A	AA(97)	1441.32±26.60 <sup>b</sup>	43.92±0.37	7.12±0.05 <sup>b</sup>	7.20±0.10	5.15±0.05	6.18±0.05 <sup>a</sup>	6.15±0.07 <sup>Bb</sup>	1.40±0.01 <sup>Aa</sup>
	AC(135)	1436.65±22.55 <sup>b</sup>	43.45±0.31	7.14±0.04	7.07±0.08	5.11±0.04	6.06±0.04	6.20±0.06 <sup>Bb</sup>	1.38±0.01 <sup>a</sup>
	CC(64)	1536.82±32.75 <sup>a</sup>	43.52±0.46	7.27±0.06 <sup>a</sup>	6.85±0.12	5.11±0.06	5.99±0.06 <sup>b</sup>	6.48±0.08 <sup>Aa</sup>	1.34±0.02 <sup>Bb</sup>

注: 同一列数值中, 肩标含相同字母者表示两种基因型之间差异不显著( $P>0.05$ ), 不同小写字母代表差异显著( $P<0.05$ ), 不同大写字母代表差异极显著( $P<0.01$ )。以下各表注释同表 5。

Notes: The values with the same superscript letters within the same column were not significantly different ( $P>0.05$ ) between two genotypes, and the different small letter represents  $P<0.05$ , the different capital letter represents  $P<0.01$ . The same as the following.

表 6 草鱼醛缩酶 B 基因 C+687G 和 A117C 组成的不同双倍型与草鱼生长性状的关联分析

Tab. 6 Association of ALDO B gene diplotypes of C+687G and A117C with growth traits in grass carp

双倍型 diplotype	SNPs 位点		频率/% frequency	体质量/g body weight	体宽/cm body width	体长/cm body length	尾柄高/cm caudal peduncle height	体长/尾柄长 body length/caudal peduncle	尾柄长/尾柄高 caudal peduncle/caudal peduncle height
	C+687G	A117C							
D1	CC	AA	21.62	1536.82±32.41 <sup>Aa</sup>	7.27±0.06 <sup>Aa</sup>	43.52±0.46	5.11±0.06	6.48±0.08 <sup>Aa</sup>	1.34±0.02 <sup>Bc</sup>
D2	CC	AC	15.88	1437.87±37.82 <sup>bc</sup>	7.17±0.07 <sup>b</sup>	43.47±0.53	5.11±0.07	6.32±0.09 <sup>ABab</sup>	1.36±0.02 <sup>Bbc</sup>
D3	CC	CC	5.41	1372.19±64.81 <sup>c</sup>	6.89±0.11 <sup>Bc</sup>	43.86±0.91	5.16±0.12	6.00±0.16 <sup>BcBc</sup>	1.43±0.03 <sup>ab</sup>
D4	CG	AA	10.81	1513.88±45.83 <sup>ab</sup>	7.23±0.08 <sup>ab</sup>	44.56±0.64 <sup>a</sup>	5.25±0.08 <sup>a</sup>	5.89±0.11 <sup>Cc</sup>	1.45±0.02 <sup>Aa</sup>
D5	CG	AC	18.58	1388.75±34.96 <sup>Bc</sup>	7.06±0.06 <sup>bc</sup>	42.75±0.49 <sup>b</sup>	5.04±0.06 <sup>b</sup>	6.28±0.09 <sup>ABab</sup>	1.37±0.02 <sup>Bbc</sup>
D6	CG	CC	13.51	1496.66±41.80 <sup>abc</sup>	7.20±0.07 <sup>ab</sup>	43.63±0.58	5.12±0.08	6.13±0.10 <sup>BcBc</sup>	1.41±0.02 <sup>ab</sup>
D7	GG	AC	11.49	1396.56±44.46 <sup>bc</sup>	7.05±0.08 <sup>bc</sup>	44.11±0.62	5.18±0.08	6.16±0.11 <sup>bc</sup>	1.39±0.02 <sup>abc</sup>

表 7 草鱼醛缩酶 B 基因 A117C 和 C+1042A 组成的不同双倍型与草鱼生长性状的关联分析

Tab. 7 Association of ALDO B gene diplotypes of A117C and C+1042A with growth traits in grass carp

双倍型 diplotype	SNPs 位点		频率/% frequency	体质量/g body weight	体长/cm body length	体宽/cm body width	尾柄长/cm caudal peduncle	尾柄高/cm caudal peduncle height	体长/尾柄长 body length/caudal peduncle	尾柄长/尾柄高 caudal peduncle/caudal peduncle height
	A117C	C+1042A								
D1	AA	AA	32.77	1529.30±268.35 <sup>Aa</sup>	43.89±3.79	7.26±0.44 <sup>a</sup>	7.10±1.08	5.16±0.49	6.29±0.28	1.38±0.16
D2	AC	AC	45.16	1408.28±262.37 <sup>Bb</sup>	43.34±3.67	7.10±0.47 <sup>b</sup>	6.98±0.93	5.10±0.48	6.27±0.55	1.37±0.13
D3	CC	CC	21.28	1465.482±41.46 <sup>Aab</sup>	43.83±3.32	7.15±0.46 <sup>ab</sup>	7.20±0.85	5.14±0.43	6.14±0.58	1.40±0.13

表 8 草鱼醛缩酶 B 基因 C+687G 和 C+1042A 组成的不同双倍型与草鱼生长性状的关联分析  
 Tab. 8 Association of ALDOB gene diplotypes of C+687G and C+1042A with growth traits in grass carp

双倍型 diplotype	位点 locus		频率/% frequency	体质量/g body weight	体宽/cm body width	体长/cm body length	尾柄高/cm caudal peduncle height	体长/尾柄长 body height /caudal peduncle	尾柄长/尾柄高 caudal peduncle /caudal peduncle height
	C+687G	C+1042A							
D1	CC	AA	21.62	1536.82±32.42 <sup>Aa</sup>	7.27±0.06 <sup>Aa</sup>	43.52±0.46	5.11±0.06	6.48±0.08 <sup>Aa</sup>	1.34±0.02 <sup>Bc</sup>
D2	CC	AC	15.88	1437.87±37.83 <sup>bc</sup>	7.17±0.07 <sup>b</sup>	43.47±0.53	5.11±0.07	6.32±0.09 <sup>ABab</sup>	1.36±0.02 <sup>Bbc</sup>
D3	CC	CC	5.41	1372.19±64.84 <sup>c</sup>	6.89±0.11 <sup>Bc</sup>	43.86±0.91	5.16±0.12	6.00±0.16 <sup>BCbc</sup>	1.43±0.03 <sup>ab</sup>
D4	CG	AA	10.81	1513.88±45.85 <sup>ab</sup>	7.23±0.08 <sup>ab</sup>	44.57±0.64 <sup>a</sup>	5.25±0.08 <sup>a</sup>	5.89±0.11 <sup>Cc</sup>	1.45±0.02 <sup>Aa</sup>
D5	CG	AC	18.24	1389.90±35.30 <sup>Bc</sup>	7.06±0.06 <sup>bc</sup>	42.75±0.50 <sup>b</sup>	5.04±0.06 <sup>b</sup>	6.29±0.09 <sup>ABab</sup>	1.36±0.02 <sup>Abc</sup>
D6	CG	CC	13.85	1466.20±40.51 <sup>abc</sup>	7.18±0.07 <sup>ab</sup>	43.60±0.57	5.11±0.07	6.12±0.10 <sup>BCbc</sup>	1.41±0.02 <sup>Bab</sup>
D7	GG	AC	11.49	1396.56±44.48 <sup>bc</sup>	7.05±0.08 <sup>bc</sup>	44.11±0.62	5.18±0.08	6.16±0.11 <sup>bc</sup>	1.39±0.02 <sup>abc</sup>

体质量等指标上都比 AA 和 AC 型高, 纯合型 CC 和 AA 的各项指标都比杂合型 AC 高, 但是 AA 和 AC 在体质量等各项指标上差异不显著, 各项均值都很接近。位于外显子 8 的 C+1042A 突变位点导致了氨基酸的改变。CC 型在体质量、体宽、体长/尾柄长这 3 个指标上都比 AA 和 AC 型高, 纯合型 CC 和 AA 的各项指标都比杂合型 AC 高, 而 AA 和 AC 在体质量等各项指标上差异不显著, 各项均值都很接近。

关联分析结果显示, C+687G 和 A117C 两个位点组成的 7 种双倍型(去掉 2 个频率小于 3% 的组合)在体质量、体宽、尾柄长、体长/尾柄长和尾柄长/尾柄高等 5 个生长性状上都存在显著差异( $P < 0.05$ )。而 D1(由纯合型基因型 AA 和 CC 组成)和 D5(由杂合型基因型 CG 和 AC 组成)在体质量上存在极显著差异( $P < 0.01$ )。D1 与体质量呈正相关, D5 与体质量呈负相关。D5 在其他生长性状指标上也比其他的双倍型都低。D3 是由两个位点的基因型 CC 型组成, 得到的各项指标均值都不高, 推测可能是该频率在群体中较低, 影响了结果。由纯合型组成的双倍型比由其他基因型组成的双倍型在体质量上的均值要高, 这个结果与单个位点的分析结果相似。

关联分析结果显示, A117C 和 C+1042A 两个位点组成的 3 种双倍型(去掉一个频率小于 3% 的组合)在体质量、眼间距这 2 个生长性状上都存在显著差异( $P < 0.05$ )。纯合型 AA 型组成的双倍型(D1)的各项指标都比纯合型 CC 型和杂合型 AC 型组成的双倍型(D2 和 D3)高, 而由纯合型 CC 和 AA 型组成的双倍型(D1 和 D3)的各项指标都比由 AC 型组成的双倍型高。

关联分析结果显示, C+687G 和 C+1042A 两个位点组成的 7 种双倍型(去掉 2 个频率小于 3% 的组合)在体质量、尾柄长、体宽、体长/尾柄长和尾柄长/尾柄高这 5 个生长指标上都存在显著差异( $P < 0.05$ )。这个结果与 C+687G 和 A117C 两个位点组成的 7 个双倍型的结果一样。由 C+687G 位点的 CC 型和 C+1042A 位点的 AA 型组成的双倍型 D1 的各项指标(包括体质量和体长)都比其他基因型组成的双倍型高, 而 D3 的各项指标均值都不高, 推测可能是该频率在群体中较低, 影响了结果。这与单个位点分析纯合型时所体现的优势结果相似。A117C 和 C+1042A 位点的不同基因型与草鱼的生长性状相关, 而它们与 C+687G 位点组成的双倍型也同样与生长性状相关。

### 3 讨论

利用 DNA 遗传标记进行辅助选育已经成为动物选育种的新方法<sup>[19]</sup>。本实验根据实验室提供的草鱼 EST 库的醛缩酶 B 基因编码区序列片段经扩增、测序和比对获得了 3 个 SNPs 位点。相关分析结果显示, 同义突变的 C+687G 位点的不同基因型仅与草鱼的体长/尾柄长比值存在显著差异( $P < 0.05$ ), 而错义突变的 A117C 和 C+1042A 两个位点都与草鱼的体质量等 4 个重要生长指标存在显著差异( $P < 0.05$ )。A117C 和 C+1042A 位点与草鱼生长性状的相关性比 C+687G 位点相关性强。可见, 错义突变由于改变了编码序列导致翻译的氨基酸序列发生改变, 引起蛋白质生物学功能的变化, 进而影响了草鱼的生长性状。Cross 等<sup>[5,20]</sup>对醛缩酶 B 基因的错义突变进行了研究, 发现在 HF I 患者的醛缩酶 B 基因外显子上也有 3 个错义突变, 1 个位于外

显子 5 上和 2 个位于外显子 9 上, 这些突变可导致酶蛋白功能的缺陷。

C+687G 位点的 CC 型各项指标均值比 GG 型高, A117C 和 C+1042A 位点的 CC 型各项指标均值比 AA 型高, 而 3 个位点的杂合型的各项指标均值与 GG 型、AA 型和 AA 型相比没有显著差异, 比值均值很接近。推测可能是因为醛缩酶 B 在草鱼糖代谢过程中参与了糖酵解, 而醛缩酶 B 基因的突变可能影响了醛缩酶的活性, 继而影响了糖酵解。也可能是因为醛缩酶 B 在糖代谢过程中也参与糖异生, 而该基因的突变可能使醛缩酶活性发生了改变, 影响了糖异生作用, 进而影响了生长。所以该基因的 3 个突变位点的 CC 型都在体质量、体宽等生长指标均值上比 GG 型、AA 型和 AA 型高, 而杂合型的指标均值与 GG 型、AA 型和 AA 型显著不差异。

草鱼醛缩酶 B 基因的 3 个位点两两组成不同的双倍型的 3 个组合都在体质量等重要生长性状指标上存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。而且, 由纯合基因型组成的双倍型在各项指标上都较高, 这与单个 SNP 位点的分析结果相似, 单个位点分析的时候, 也是纯合型的指标均值较高, 有着显著的优势。并且不同的双倍型在做生长性状关联分析时, 比单个位点的不同基因型对草鱼生长性状的影响更大, 这与刘福平等<sup>[21]</sup>对罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) MC4R 基因的 5 个 SNPs 位点以及由其组成的双倍型与罗非鱼生长性状进行关联分析的结果相似。A117C 和 C+1042A 这两个位点不管是单个位点的生长关联分析结果, 还是由它们的不同基因型和 C+687G 位点组成的双倍型方面的生长关联分析结果都相似。这与杜芳芳等<sup>[22]</sup>研究的大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) POU1F1 启动子区域的 -18 和 -183 两个位点的产生的两种相同的等位基因以及由这 2 种单倍型组成的 3 种基因型对生长的影响结果相似, 推测是由于不同 SNPs 之间存在相互作用, 因而由单倍型构成的双倍型比单个 SNP 能够提供更多而准确的信息<sup>[23]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Rutter W J. Evolution of aldolase[J]. Federation Proceedings, 1964, 23: 1248-1257.
- [2] Penhoet E, Rajkumar T, Rutter W J. Multiple forms of

fructose diphosphate aldolase in mammalian tissues[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1966, 56(4): 1275-1282.

- [3] 余南, 何嵩, 李卓雅, 等. 刚地弓形虫醛缩酶基因及其内含子的分析[J]. 中国人畜共患病杂志, 2005, 21(7): 580-583.
- [4] 周玉球, 卢义钦, 刘俊凡. 醛缩酶及其同工酶研究进展[J]. 医学分子生物学杂志, 1993, 15(5): 237-240.
- [5] Cross N C, Tolan D R, Cox T M. Catalytic deficiency of human aldolase B in hereditary fructose intolerance caused by a common missense mutation[J]. Cell, 1988, 53(6): 881-885.
- [6] Halushka M K, Fan J B, Bentley K, et al. Patterns of single nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis[J]. Nature Genetics, 1999, 22(3): 239-247.
- [7] 杨永强, 王巍杰, 徐长波. 单核苷酸多态性研究进展[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(8): 9-21.
- [8] 倪净. 牙鲆和大黄鱼经济性状候选基因的 DNA 分子标记研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2008.
- [9] 张晓峰, 杨晶, 孙效文. 基于 EST 序列的鲤鱼生长相关 SNP 发掘[J]. 水产学杂志, 2009, 22(4): 1-7.
- [10] Li R H, Li Q, Kong L F. Characterization of expressed sequence tag-derived single-nucleotide polymorphisms in the bay scallop *Argopecten irradians irradians*[J]. Fisheries Science, 2009, 75(6): 1389-1400.
- [11] Li H J, Zhu D, Gao X G, et al. Mining single nucleotide polymorphisms from EST data of hard clam *Meretrix meretrix*[J]. Conservation Genetics Resources, 2010, 2(S1): 69-72.
- [12] Hubert S, Tarrant B J, Higgins B, et al. Development of single nucleotide polymorphism markers for Atlantic cod (*Gadus morhua*) using expressed sequences[J]. Aquaculture, 2009, 296(1-2): 7-14.
- [13] Qi H G, Liu X, Zhang G F, et al. Mining expressed sequences for single nucleotide polymorphisms in Pacific abalone *Haliotis discus hannai*[J]. Aquaculture Research, 2009, 40(14): 1661-1667.
- [14] Li H J, He C B, Yang Q, et al. Characterization of single nucleotide polymorphisms from expressed sequence tags of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Aquatic Biology, 2010, 11(2): 193-199.
- [15] 高文. 草鱼对糖的利用及  $Mg^{2+}$  对草鱼和罗非鱼利用高糖的影响[D]. 广州: 中山大学, 2006.
- [16] 谭肖英, 罗智, 刘永坚. 鱼类对饲料中糖的利用的研究进展[J]. 中国饲料, 2007, 6: 19-23.
- [17] 林鼎, 毛永庆. 鱼类营养与配合饲料[M]. 广州: 中山大学出版社, 1987: 23-28.
- [18] 张洪伟, 傅洪拓, 夏德全. 农业经济动物的 SNPs 研究进展[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2007, 26(2): 192-197.
- [19] 尹绍武, 黄海, 雷从改, 等. DNA 标记技术在鱼类

- 遗传育种中的应用[J]. 水产科学, 2005, 4(11): 42–45.
- [20] Cross N C, de Franchis R, Sebastio G, *et al.* Molecular analysis of aldolase B genes in hereditary fructose intolerance [J]. *The Lancet*, 1990, 335(8685): 306–309.
- [21] 刘福平, 白俊杰, 叶星, 等. 罗非鱼 MC4R 基因克隆及与其生长相关的 SNPs 位点[J]. 中国水产科学, 2009, 16(6): 816–823.
- [22] 杜芳芳, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈 *POU1F1* 启动子区域 SNPs 对生长的影响[J]. 水产学报, 2011, 35(6): 793–800.
- [23] Stephens M, Smith N, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2001, 68(4): 978–989.

## Polymorphisms of SNPs in ALDO B gene and association analysis with growth traits in grass carp(*Ctenopharyngodon idellus*)

CAO Ting-ting<sup>1,2</sup>, BAI Jun-jie<sup>1,2\*</sup>, YU Ling-yun<sup>1</sup>, FAN Jia-jia<sup>1</sup>

(1. Key Lab of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation of Chinese Academy of Fishery Sciences, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;  
2. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Aldolase is a glycolytic enzyme, which plays a key and pivotal role in glycolysis and glucose metabolism. And compared to aldolase A and aldolase C, aldolase B is involved in both glycolysis and gluconeogenesis. In this research, the two genomic sequence fragments are amplified according to two contigs cDNA fragments of ALDOB gene from EST database of grass carp(*Ctenopharyngodon idellus*). Then three nucleotides mutations were identified by using directly sequencing and blasting. The polymorphisms are C+687G, A117C and C+1042A, which are in exon 6, intron 7 and exon 8 respectively. C+687G is synonymous mutation and -A63C is non-synonymous mutation. 296 grass carps were used to genotype polymorphisms and then calculate the genotype and gene frequency by Snpshot method. Frequencies of the AA genotype were 42.9%, 32.8% and 32.8% respectively, the AB genotype were 42.9%, 45.9% and 45.6% respectively, the BB genotype were 14.2%, 21.3% and 21.6% respectively. A general linear model was used to statistically analyze the relationship between ALDOB gene polymorphisms and major growth traits. The result indicated that the three different genotypes of C+687G site only showed significant association at body length/caudal peduncle ratio ( $P < 0.05$ ), while they showed no significant association at body weight. The three different genotypes of A117C and C+1042A sites showed significant association at body weight and so on ( $P < 0.05$ ). Three combinations of seven, three and seven diplotypes, with the minor allelic frequencies of above 3%, were constructed based on three SNPs in the experiment population. Association analysis indicated that three combinations of diplotypes were all significant association between diplotypes and body weight ( $P < 0.05$ ): the seven diplotypes of C+687G, A117C and C+687G, C+1042A showed significant association at body weight, body width and so on ( $P < 0.05$ ). And the three diplotypes of A117C and -43C, C+1042A showed significant association at body weight and space. Not only different genotypes of three SNPs sites, but also diplotypes showed significant association in major growth traits in grass carp. And the homozygous genotypes were higher than heterozygote genotypes in the main growth traits. As a result, ALDO B gene could be a candidate modifier gene for grass carp growth traits which could be useful for grass carp molecular breeding.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idellus*; aldolase B; genotype; diplotype; correlation analysis

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