

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00628

建鲤肠型脂肪酸结合蛋白基因的分离及其 SNPs 与增重的相关分析

夏正龙¹, 俞菊华^{1,2}, 李红霞², 李建林², 唐永凯², 任洪涛³, 朱双宁¹

1. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214081;
2. 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, 无锡 214081;
3. 河南科技大学动物科技学院, 洛阳 471003

摘要: 文章采用 PCR 方法从建鲤 (*Cyprinus carpio* var. *jian*) 基因组分离到 2 个肠型脂肪酸结合蛋白基因 (Fatty acid binding protein 2, *FABP2*), ORF 长度均为 399 bp, 相似度为 92.2%, 分别记为 *jIFABP2a*、*jIFABP2b*, 和斑马鱼 (*Danio rerio*) *FABP2* ORF 的相似度分别为 88.0%和 90.5%。*jIFABP2s* 基因结构与 *FABPs* 家族其他成员一致, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成, *2a* 和 *2b* 间内含子序列和长度差异明显。系统树显示这 2 个基因对应斑马鱼的 1 个 *FABP2* 基因, 和鲤鱼染色体数是斑马鱼的 2 倍一致。实时荧光定量 PCR 结果显示, *jIFABP2a*、*2b* 在建鲤肠中的表达量极显著高于脑、肝脏、肌肉、肾脏、心脏、性腺等其他组织 ($P < 0.01$), 且 *2a* 表达量显著 (雄鱼, $P < 0.05$) 或极显著 (雌鱼, $P < 0.01$) 高于 *2b*, 但在其他组织则 *2b* 表达量稍高, 暗示 *2a* 为肠特异性表达, *2b* 则为广谱表达。通过比对 8 尾建鲤的 *2a* 和 *2b* 基因序列, 在 *2a* 和 *2b* 上分别找到 12 个和 4 个 SNP, 均位于内含子上。使用 PCR-RFLP 法检测 *jIFABP2a* 上 4 个 SNP 位点 I1-A15G、I1-A99G、I2-C487T 和 I3-A27T 在建鲤选育群体中的基因型分布, 并进行了基因型与个体增重的关联分析, 结果表明, 4 个位点与雌、雄成鱼阶段增重分别有极显著或显著相关。同时考虑 4 个位点的基因型与增重的关系, 结果基因型 *AGGGCCXX* 和 *AGGGXXAT* 的个体平均增重比其他个体快 15%, 这两种基因型个体在选育群中占了 9%, 具有较大的选育空间, 可用于建鲤分子育种计划中。

关键词: 建鲤; 肠型脂肪酸结合蛋白; 组织表达; 单核苷酸多态性; SNP-增重相关分析

Sequences analysis of *jIFABP2* and the correlation between polymorphisms and body weight gain in *Cyprinus carpio* var. *jian*

XIA Zheng-Long¹, YU Ju-Hua^{1,2}, LI Hong-Xia², LI Jian-Lin², TANG Yong-Kai², REN Hong-Tao³, ZHU Shuang-Ning¹

1. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

收稿日期: 2012-09-23; 修回日期: 2012-11-12

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(编号: 200903045), 国家科技部“863 计划”项目(编号: 2011AA100401), 现代农业产业技术体系建设专项资金(编号: CARS-46)和鲤肉质相关分子标记的挖掘项目(编号: 2013JBFM03)资助

作者简介: 夏正龙, 硕士研究生, 专业方向: 水生生物技术。Tel: 0510-85554198; E-mail: zjhill@126.com

通讯作者: 俞菊华, 博士, 研究员, 研究方向: 水生生物技术。E-mail: yujh@ffrc.cn

网络出版时间: 2013-3-12 13:25:51

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130312.1325.001.html>

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

3. Animal Science and Technology College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

Abstract: Two replicate intestine fatty acid binding protein genes (*jIFABP2a* and *jIFABP2b*) were cloned from *Cyprinus carpio* var. jian using PCR. Both ORFs were 399 bp in length sharing 92.2% similarity with each other, and 88.0% and 90.5% with their counterpart in zebrafish, respectively. The gene structure of *jIFABP2s* was same as other *FABPs*, which contained four exons and three introns. Sequences and lengths of introns between *2a* and *2b* were obviously different. Phylogenetic tree displayed that two *jIFABP2s* corresponded to one zebrafish *FABP2* which matches the fact that the chromosome number of common carp was twice of zebrafish. Real time-PCR showed that *jIFABP2* genes mainly expressed in intestine and the expression level was very significantly higher than other tissues such as brain, liver, muscle, kidney, and gonad ($P < 0.01$). The expression level of *jIFABP2a* was significantly (male, $P < 0.05$) or very significantly (females, $P < 0.01$) higher than *2b* in intestine; and *2b* was expressed slightly higher than *2a* in other tissues. It seemed that *2a* expressed specifically in intestine, while *2b* expressed ubiquitously. Twelve and four SNP loci were found at *jIFABP2a* and *2b* introns through comparison sequences from 8 individuals, respectively. Genotypes of I1-A15G, I1-A99G, I2-C487T, and I3-A27T on *jIFABP2a* were detected using PCR-RFLP in selection population of *C. carpio* var. jian. The SNP genotypes and individual weight gain correlation indicated that four SNPs were significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) associated with adult weight gain. Diplotype analysis displayed that individuals with genotype *AGGGCCXX* or *AGGGXXAT* grew faster than other individuals by 15%. The individuals with these two genotypes only occupied 9% in total selection populations, indicating the presence of large selection space. The 4 SNPs detected in this experiment can be used in *C. carpio* var. Jian growth selection breeding plan.

Keywords: *Cyprinus carpio* var. jian; *FABP2*; tissue expression; single nucleotide polymorphisms loci; SNP-weight gain association analysis

脂肪酸结合蛋白 (Fatty acid binding protein, FABP) 是细胞内脂肪结合蛋白基因家族 (Intracellular lipid binding proteins, iLBPs) 的成员, 存在于脊椎动物和非脊椎动物的多种组织细胞的胞浆中, 对细胞内长链脂肪酸的摄取、转运及代谢调节发挥着重要作用^[1]。肠型脂肪酸结合蛋白 (*FABP2* 或 *I-FABP*) 是脂肪酸结合蛋白家族中首次被分离出来的一种类型, 和其他 *FABPs* 一样, 分子量约为 14 ~ 16 kDa, 含 126 ~ 137 个氨基酸, 基因序列由 4 个外显子和 3 个内含子构成, 不同物种中内含子的长度差异较大。

哺乳动物中, *FABP2* 特异地在肠胃中表达^[2], 并参与食物中脂肪酸的吸收和细胞内脂肪酸的转运^[3]。研究表明 *FABP2* 对细胞的生长和分化等生理过程中发挥着重要的作用^[1,4], 初丽丽等^[5]对鸡 *I-FABP* 基因进行 SNPs 检测, 结果表明突变位点不同基因型对肉仔鸡体重、屠体重有显著的影响。De Luis 等^[6]研究发现 *I-FABP* 基因多态性与人的体重降低有关。

至今 *FABP2* 基因只在斑马鱼 (*Danio rerio*)^[7]、大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[8]、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)^[9]、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus Punetaus*)^[10] 等少数鱼上有一些研究, 关于 *FABP2* 和鱼类的生长等性状关联的研究尚未见报道。本研究分离了 2 个建鲤 *FABP2* (*jIFABP2*), 测定了它们在不同组织的表达量, 查找了 *jIFABP2* 上的 SNP 位点, 并利用 PCR-RFLP 法检测了 *jIFABP2a* 上 4 个 SNP 位点的基因型在建鲤群体中的分布, 通过基因型和增重关联分析, 筛选与建鲤增重相关的分子标记, 用于改良建鲤生长的分子选育计划中。

1 材料和方法

1.1 材料

实验鱼取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴养殖基地, 为建鲤选育群体, 共 12 个家系。采用 PIT 标记后, 混合养殖, 在当年年底测定增重与标记时的体重差为鱼种阶段的增重, 第二年

年底的体重与鱼种第一年年底的体重差为成鱼阶段的增重。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 和总 RNA 的提取

从尾静脉采血, 使用蛋白酶 K 消化过夜, 酚-氯仿法提取基因组 DNA, 用琼脂糖凝胶电泳检验提取的 DNA, 用紫外分光光度计 (Eppendorf) 测定浓度和 OD 值, $OD_{260/280}$ 一般为 1.8 左右。DNA 样品用 TE 溶液稀释成 50~100 ng/ μ L 备用。

分别取雌、雄建鲤新鲜组织 (n=3) (肌肉、小肠、肝胰脏、心脏、脑、肾脏、性腺) 约 0.1 g 用 RNAiso Plus (宝生物工程(大连)有限公司), 按照使用说明书抽提总 RNA。紫外分光光度计测定 RNA 浓度和 OD 值, $OD_{260/280}$ 一般为 1.9~2.1。

1.2.2 *jIFABP2* 基因分离

利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 Nucleotide 数据库并结合 BLAST 检索已有鱼类 *FABP2* 基因序列, 与现有鲤鱼基因库中的序列比对, 在 *FABP2* 基因保守区设计引物 (表 1)。以建鲤 DNA 为模板, 进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增, 总反应体系为 25 μ L。其中模板 2 μ L (100~200 ng), 引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L), 其他组分根据 Taq 酶 (天根生化科技有限公司) 说明书要求。反应程序: 94 预变性 2 min; 94 变性 30 s, 58 复性 40 s, 72 延伸 1 min, 30 个循环; 72 延伸 8 min, 4 保存, 复性温度和延伸时间根据引物和扩增片段大小确定。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切下目的条带, 用 DNA 胶回收试剂盒 (上海申能博彩生物有限公司) 回收, 回收产物与 pMD18-T 载体 (宝生物工程(大连)有限公司) 连接, 转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 敏感态细胞中, 于 LB Amp⁺平

板上培养过夜, 挑选白色菌落于 4 mL 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, *EcoR*、*Hind* (上海捷瑞生物工程有限公司) 双酶切验证, 阳性克隆送至上海博尚生物技术有限公司测序。

1.2.3 序列分析

用 ClustalW 比对 *jIFABP2* DNA 序列与斑马鱼 *FABP2* 基因的 cDNA, 分析 *jIFABP2* 的基因结构和 cDNA 序列, 通过 DNASTAR 软件查找基因编码区开放阅读框 (ORF) 并翻译成氨基酸序列。使用 MEGA5.0^[11] 构建 *FABP2* NJ 分子进化树, 软件参数设置如下: “Substitution Model” 选择 “Kimura 2-parameter”, “Substitutions to Include” 选择 “d: Transitions+Transversions”, “Gaps/Missing Data” 选项设置为 “Complete Deletion”; 各分支置信度由自举 (bootstrap) 分析 1000 次获得, 其余参数选择默认值。

1.2.4 组织表达分析

在两重复基因的特异区域设计引物分析 *jIFABP2a* 和 *jIFABP2b* 在各组织的表达水平, *jIFABP2a*-DF 和 *2a*-DR 的扩增产物可以被限制性内切酶 *Tai* 酶切成 123 bp 和 89 bp, 而 *jIFABP2b*-DF 和 *2b*-DR 的扩增产物则没有 *Tai* 酶切位点。以 5 μ g 总 RNA 为模板, 根据 M-MLV (宝生物工程(大连)有限公司) 说明书进行 RT 反应, 定量 PCR 反应体系为 20 μ L, 内含 cDNA 1.6 μ L, 引物各 0.8 μ L (10 μ mol/L), 根据 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (宝生物工程(大连)有限公司) 说明在 TaKaRa TP800 型实时荧光定量 PCR 仪上进行实时定量 RT-PCR 试验。反应程序: 94 预变性 2 min; 94 变性 10 s, 61 复性 15 s, 72 延伸 20 s, 40 个循环; 72 延伸 2 min 后, 熔解曲线检测。每个样本进行 3 个重复, 空白对照采用 ddH₂O 作为模板。 *jIFABP2a*、

表 1 实验所使用的引物

引物	序列 (5'→3')	最适复性温度 T_m (°C)	产物(bp)
<i>jIFABP2</i> -F	GTGAGCTTTACTCAGCCACATCAGCA	60	1334
<i>JIFABP2</i> -R	GCCAAGAGGATTTTCAAGAGGAGCTAA		1548
<i>jIFABP2a</i> -DF	GAAAACAGCACTTTCCGCTCGG	61	212
<i>jIFABP2a</i> -DR	CCTTCATAGGTATAGCTCTGTACAAGCTCTC		
<i>jIFABP2b</i> -DF	GGAAGTCAGCACTTTCCGCACAC	61	205
<i>jIFABP2b</i> -DR	GGTATAGCTCTGTACAAGTTCATCACCAATAAC		

jIFABP2b、 β -*actin* 基因分别作标准曲线, 以 β -*actin* 作为内标, 使用双曲线法计算 *jIFABP2a* 和 *jIFABP2b* 在不同组织的相对表达量。

1.2.5 SNP 多态位点的查找和检测

使用 ClustalW 软件比对来自 8 尾建鲤的 *jIFABP2* 序列, 同一位点不同碱基出现比例大于 1/4 的认定为 SNP 位点, 使用 PCR-RFLP 法检测了 *jIFABP2a* 上 4 个 SNP 位点 I1-A15G、I1-A99G、I2-C487T 与 I3-A27T 在建鲤个体中的基因型。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 2。PCR 扩增体系为 12.5 μ L, 其中 DNA 模板 1.0 μ L, 引物 0.25 μ L (10 μ mol/L)。反应结束取 6 μ L PCR 产物至 10 μ L 酶切体系, 其中含内切酶 0.1 μ L, 在相应限制性内切酶的最适温度下反应 2~12 h (根据酶切效果确定), 最后用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 确定基因型。

1.2.6 SNP 位点的双倍型分析

同时考虑 4 个位点, 将增重优势基因型 I1-A15G (AG) 记为 1 型、I1-A99G (GG) 记为 2 型、I2-C487T (CC) 记为 3 型和 I3-A27T (AT) 记为 4 型, 所检测的建鲤可分成不含增重优势基因的个体 0; 只有一个增重优势基因型的个体 1、2、3 和 4, 有两个增重优势基因型的个体 12、13、14、23、24 和 34; 以及 3

个和 4 个优势增重基因型的个体; 共 16 种基因型, 由于 4 个位点均为优势基因型 (AGGGCCAT) 的样本只有 3 尾, 未对其进行统计分析。通过 15 种双倍型与增重的关联分析, 筛选出可用于建鲤选育计划的基因型。

2 结果与分析

2.1 建鲤 *FABP2* 基因序列分析

实验扩增得到两条 *jIFABP2* 基因序列, 分别为 1 334 bp 和 1 548 bp, 记作 *jIFABP2a* (GenBank 登录号: JX683796) 和 *jIFABP2b* (GenBank 登录号: JX683797), 序列分析表明这两个基因与斑马鱼 (*DrFABP2*: NW_003334054.1) 一样, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成; 两基因内含子序列和长度有较大差异 (表 3), 但 ORF 的长度一致, 均为 399 bp, 编码 132 个氨基酸, 碱基相似度为 92.2%, 翻译的氨基酸相似度为 96.2%。和斑马鱼 *FABP2* (NM_131431.1) ORF 的相似度分别为 88.0% 和 90.5%。以深绿木霉 (*Trichoderma atroviride*) 细胞视黄酸结合蛋白的氨基酸序列 (EHK42188.1) 为外群, 构建 *FABP2* 氨基酸的 NJ 进化树 (图 1)。结果显示, *FABP2* 可构成 2 大支, 其中一支为以较低置信度聚在一起的鱼类 *FABP2*, 另一支则是以 98 的置信度聚在一起的鸟类、两栖类、和哺乳类 *FABP2*。不同科鱼类间的小支置信度低,

表 2 建鲤 *FABP2a* 4 个 SNP 位点的检测引物、限制性内切酶和酶切产物条带

SNP 位点	引物(5'→3')	内切酶(反应温度)	酶切片段长度(bp)
I1-A15G	jIIFABP-1F: GCACAGGTATAAAAAGTCAGACGCG	<i>Hha</i> (37)	AA : 460
	jIIFABP-1R: ACGCCTCTGAAATCTGAACGGA		GG : 309、151
I1-A99G	jIIFABP-2F: GCACAGGTATAAAAAGTCAGACGCG	<i>Apa</i> L (37)	AA : 460
	jIIFABP-2R: ACGCCTCTGAAATCTGAACGGA		GG : 233、227
I2-C487T	jIIFABP-3F: CCACTTCAAAAAGGGACAAATATGTACC	<i>Fsp</i> B (37)	CC : 469
	jIIFABP-3R: CTTGAAAATCCTCTTGGCCTCGACT		TT : 358、111
I3-A27T	jIIFABP-4F: CCACTTCAAAAAGGGACAAATATGTACC	<i>Bgl</i> (37)	CC : 469
	jIIFABP-4R: CTTGAAAATCCTCTTGGCCTCGACT		TT : 348、121

表 3 *FABP2* 基因结构比较

基因	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*	编码氨基酸
<i>jIFABP2a</i>	67	121	173	593	108	101	51	132
<i>jIFABP2b</i>	67	144	173	785	108	85	51	132
<i>DrFABP2</i>	67	77	173	2119	108	83	51	132

注: *: 外显子 1 从起始密码子开始, 外显子 4 到终止密码子。

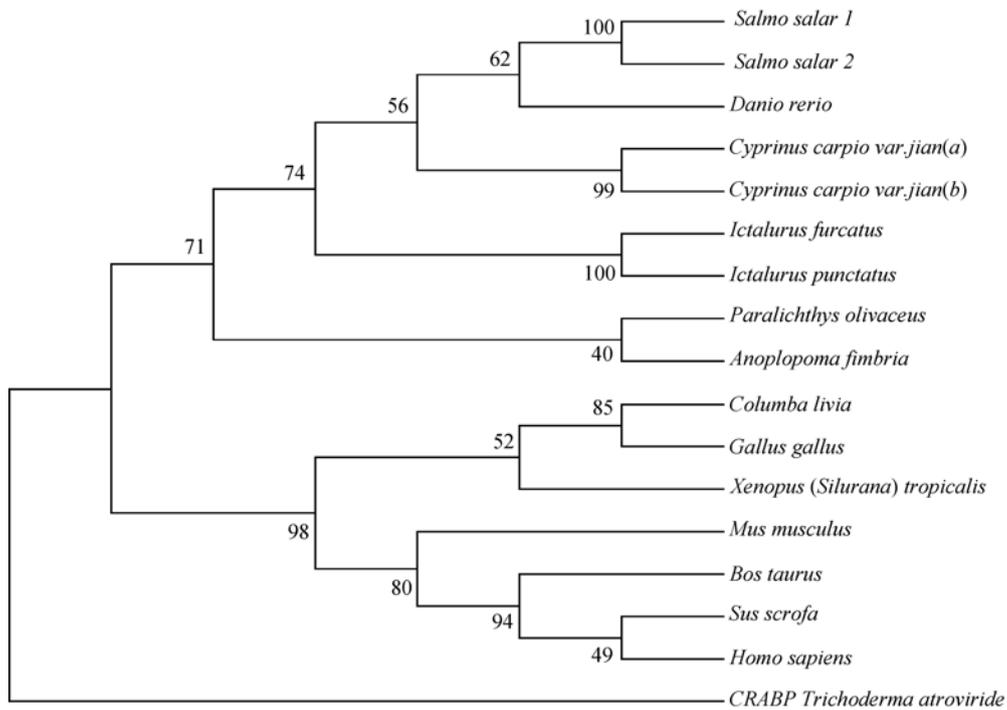


图 1 FABP2 系统进化树

NJ 系统进化树中所用的 FABP2 氨基酸序列: 大西洋鲑 (*Salmo salar*, 1: ACI66664.1; 2: ACI67840.1), 斑马鱼 (*Danio rerio*, NP_571506.1), 斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*, NP_001187833.1), 蓝鳃 (*Ictalurus furcatus*, ADO28265.1), 裸盖鱼 (*Anoplopoma fimbria*, ACQ58030.1), 牙鲆 (*Paralichthys livaceus*, ABV91589.1), 鸡 (*Gallus gallus*, NP_001007924.1), 原鸽 (*Columba livia*, AEH05982.1), 非洲爪蟾 (*Xenopus tropicalis*, NP_001106373.1), 小鼠 (*Mus musculus*, NP_032006.1), 牛 (*Bos Taurus*, NP_001020503.1), 猪 (*Sus scrofa*, NP_001026950.1), 人类 (*Homo sapiens*, NP_000125.2), 深绿木霉 CRABP (EHK42188.1)。

未能反映不同分类地位物种间的亲缘关系。系统树中鲤鱼的 2 个 FABP2 以 99 的置信度聚在一起显示了较高的相似性。

2.2 建鲤 FABP2 基因的组织表达

用实时荧光定量 PCR 检测了 *jIFABP2a* 和 *2b* 在雌、雄建鲤的脑、肝脏、小肠、肌肉、肾脏、心脏、性腺各组织的表达水平, 结果表明, 各基因的熔解曲线峰值单一, *jIFABP2a* 扩增产物可以完全被限制性内切酶 *Tail* 酶切, 而 *jIFABP2b* 扩增产物则不能 (图 2), 说明 *jIFABP2a* 和 *2b* 引物的特异性高, 不存在交叉。双标准曲线法计算 *jIFABP2* 在各组织的相对表达量, 结果表明, 两 *jIFABP2* 基因在小肠中表达量最高, 极显著高于在其他组织的表达 ($P < 0.01$), *2a* 在肠中的表达量极显著 (雌鱼, $P < 0.01$) 或显著 (雄鱼, $P < 0.05$) 高于 *2b*。在其他组织 *jIFABP2* 的表达量较低, *2b* 表达量都略高于 *2a*, 差异不显著 ($P > 0.05$) (图 3)。

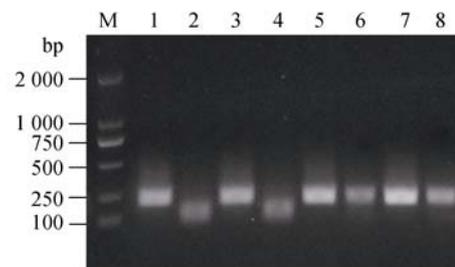


图 2 *jIFABP2a*、*2b* 定量 RT-PCR 产物酶切图

1、3 和 2、4 分别为 *2a* PCR 产物和 *Tail* 酶切结果; 5、7 和 6、8 为 *2b* PCR 产物和 *Tail* 酶切结果; M: DL2000 DNA Marker。

2.3 FABP2 的 SNP 位点检测及分析

2.3.1 SNP 位点检测

分别比对 8 尾建鲤的 *jIFABP2a*、*jIFABP2b* 基因序列, 在 *jIFABP2a* 上找到 12 个 SNP 位点, 分别位于内含子 1 的第 15、49、99 位碱基, 内含子 2 的第 118、131、143、149、160、212、238、487 位碱基和内含子 3 的第 27 位碱基, 其中有 8 个碱基转换, 4

个颠换; *jIFABP2b* 上有 4 个 SNP 位点, 分别位于内含子 1 的第 59、93 位碱基和内含子 2 的第 87、108 位碱基, 其中有 3 个转换, 1 个颠换。使用 PCR-RFLP 法检测了 *jIFABP2a* 内含子 1 上的 I1_A15G 和 I1_A99G, 内含子 2 上的 I2_C487T, 内含子 3 上的 I3_A27T 四个 SNP 位点的基因型, 结果表明能清楚区分不同基因型 (图 4)。4 个位点在检测建鲤群体中

的最小等位基因频率分别为 0.31、0.41、0.43、0.20; I3_A27T 的 AA 型比例最低, 只有 3 尾鱼, 仅占 0.33%, 显示了较高的选择偏差。

2.3.2 SNPs 基因型与建鲤增重的关联分析

用 SPSS 软件分别对 4 个 SNP 位点的不同基因型和建鲤增重关联分析, 结果位点 I1_A15G 与雌、

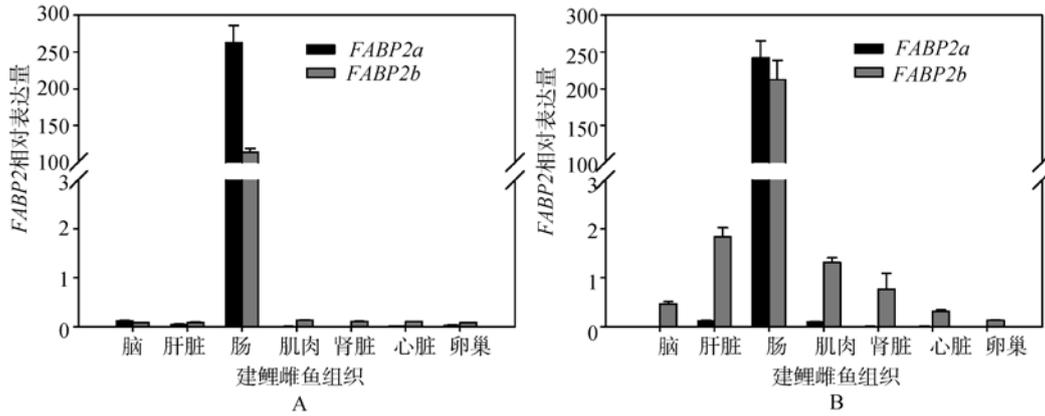


图 3 *jIFABP2* 基因在建鲤雌(A)、雄(B)个体的组织表达分析

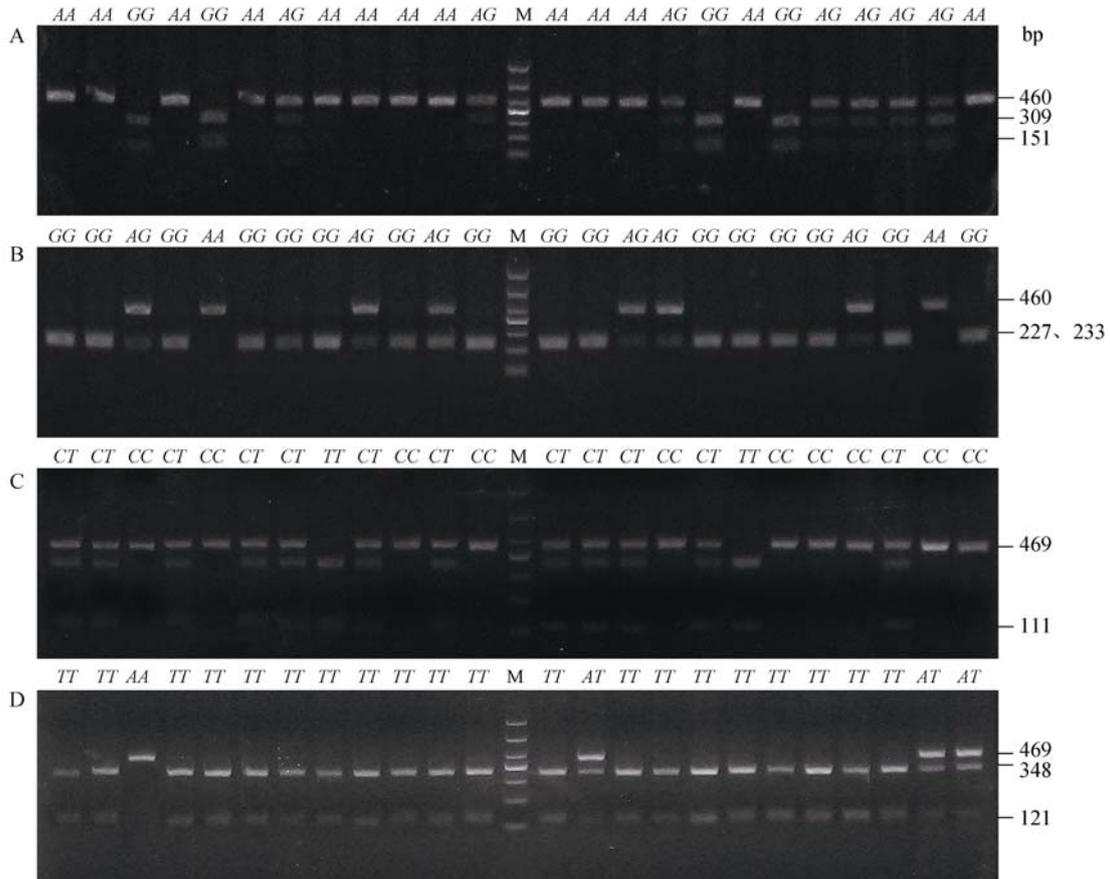


图 4 4 个 SNP 位点不同基因型的电泳结果

A: I1_A15G; B: I1_A99G; C: I2_C487T; D: I3_A27T; M: DL1000 DNA Marker。

雄鱼增重分别呈极显著 ($P<0.01$) 和显著相关 ($P<0.05$), *AG* 型雄鱼增重显著快于 *AA* 型, *AG* 型雌鱼增重极显著比 *AA* 型和 *GG* 型个体快。位点 *I1_A99G* 与雄鱼成鱼阶段增重极显著相关 ($P<0.01$), *AG* 型和 *GG* 型个体增重极显著得大于 *AA* 型; 与雌鱼鱼种和成鱼阶段增重极显著相关 ($P<0.01$) 和显著相关 ($P<0.05$), *GG* 型个体增重明显大于 *AA* 型和 *AG* 型。位点 *I2_C487T*, *CC* 型雄鱼个体在成鱼阶段的增重极显著比 *TT* 型个体大 ($P<0.01$); *CC* 型雌鱼个体在鱼种和成鱼阶段增重均显著大于 *TT* 型个体 ($P<0.05$)。位点 *I3_A27T* 的 *AT* 型个体在雌、雄成鱼阶段的增重均显著比 *TT* 型个体快 ($P<0.05$) (表 4)。

2.3.3 SNP 位点的双倍型分析

15 种基因型 (4 个位点均为优势基因型 (*AGG GCCAT*) 的个体只有 3 尾, 未对其进行统计分析) 与增重的关联分析显示, 不含增重优势基因型个体与含 1 个增重优势基因型的个体间增重没有显著差异, 其中 1 型优势基因型的个体增重较快 (728.4 g), 其次是 2 型 (696.8 g)。具有两个增重优势基因型的 6 种类型群体中只有 13 基因型个体 (782.1 g) 比 14

基因型个体 (691.3 g) 增重明显快 ($P<0.05$), 其余均差异不显著。有 3 个增重优势基因型的 4 个群体中包含 1 型的组合增重显著高于不含 1 型的组合个体 ($P<0.05$); 表 5 显示除了少数基因型个体外, 优势基因多的个体比优势基因少的个体增重要快, 尽管不一定具有显著差异。数据显示基因型为 123 (*AGGGCCXX*) 和 124 (*AGGGXXAT*) 的个体比其他基因型个体的平均增重快 15% (表 5)。

3 讨论

本实验扩增得到两个 ORF 相似性极高的建鲤 *FABP2* 基因 *jlFABP2a*、*jlFABP2b*, 和 Chen 等^[9] 在鲤鱼中分离到的 *FABP2a* (GU937798.1)、*FABP2b* (GU937799.1) 序列相似度分别为 95.1% 与 95.9%, 氨基酸序列相似度为 97.7% 和 99.2%, 这些差异很可能是因为实验鲤鱼种群不同所致, 显示了鲤鱼丰富的遗传多样性。鲤鱼基因组存在 2 个 *FABP2* 基因和鲤鱼染色体数是鲤科模式鱼斑马鱼的 2 倍相一致, 类似的情况已有较多报道^[12-15]。实时荧光定量 RT-PCR 显示 *jlFABP2* 主要在建鲤肠中表达, 这和哺乳动物等的研究结果一致^[2], 肠中 *jlFABP2a* 表达量显著高

表 4 4 个 SNPs 位点在 12 个家系中的基因型分布以及与增重的相关性

位点	基因型	雄鱼增重(克)			雌鱼增重(克)			最小等位基因(频率)
		鱼种	成鱼	样本数	鱼种	成鱼	样本数	
<i>I1_A15G</i>	<i>AA</i>	96.76±24.02 ^b	635.34±120.10 ^b	255	104.68±29.72 ^{Bb}	766.07±162.30 ^B	234	<i>G</i> (0.31)
	<i>AG</i>	110.62±28.32 ^a	671.44±132.02 ^a	132	129.58±38.51 ^A	863.80±191.84 ^A	121	
	<i>Hha</i>	<i>GG</i>	104.67±31.11 ^{ab}	658.30±144.668 ^{ab}	78	92.73±24.12 ^{Bc}	738.93±119.13 ^B	
<i>I1_A99G</i>	<i>AA</i>	92.07±25.91	610.73±113.32 ^B	86	101.78±30.75 ^B	736.12±167.09 ^b	79	<i>A</i> (0.41)
	<i>AG</i>	103.43±67.83	659.91±128.44 ^A	213	104.78±28.92 ^B	789.12±170.52 ^a	180	
	<i>Apal</i>	<i>GG</i>	105.39±30.09	660.43±133.08 ^A	166	118.45±36.63 ^A	817.80±167.87 ^a	
<i>I2_C487T</i>	<i>CC</i>	102.10±28.65	670.686±125.66 ^A	166	112.97±26.66 ^a	811.46±179.34 ^a	145	<i>T</i> (0.43)
	<i>CT</i>	98.35±26.98	644.25±140.24 ^{AB}	209	109.89±33.99 ^{ab}	786.19±172.10 ^{ab}	198	
	<i>FspB</i>	<i>TT</i>	106.16±35.74	620.83±3.27 ^B	92	102.76±26.76 ^b	759.66±148.57 ^b	
<i>I3_A27T</i>	<i>AA</i>	126.7	617.9	1	110.05±22.98	839.75±309.22	2	<i>A</i> (0.20)
	<i>AT</i>	105.38±69.61	672.31±126.42 ^a	202	109.68±28.30	812.98±171.31 ^a	157	
	<i>Bgl</i>	<i>TT</i>	98.50±28.73	633.69±126.34 ^b	274	108.89±36.36	775.03±168.72 ^b	

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 4。

表 5 4 个位点双倍型分析

基因型	样本数	成鱼增重
0	191	670.6±147.5 ^e
3	79	671.9±133.3 ^e
4	59	675.5±126.4 ^e
234	37	680.0±125.9 ^e
14	37	691.3±108.6 ^{de}
2	63	696.8±171.8 ^{de}
24	48	709.3±134.2 ^{cde}
23	35	721.6±128.6 ^{bde}
1	39	728.4±206.1 ^{bde}
12	50	750.0±192.6 ^{abede}
34	75	763.4±166.8 ^{abcd}
13	15	782.1±217.8 ^{abc}
134	22	801.8±200.2 ^{ab}
123	23	815.9±197.6 ^a
124	47	823.9±201.7 ^a

注: 不同字母肩标表示差异显著 ($P < 0.05$)。

于 *jiFABP2b*, 显示了重复基因正经历着的分化^[16]。Chen 等基因表达分析结果是 *2b* 在肠中表达量显著高于 *2a* ($P < 0.05$), 和本研究结果相反, 这有可能是不同鲤鱼种群差异所致, 值得进一步深入研究。本研究分离的建鲤 *FABP2* 在序列和表达特征两个方面均符合肠型 *FABP* 的特征。*FABP2* 系统树显示, 不同纲动物的 *FABP2* 间的遗传距离和分类地位一致, 很好地显示了鱼纲、两栖类、鸟类和哺乳类, 但在目和科水平则不能显示分类地位之间的关系, 这和 Chen 等 *FABP2* 系统树结果一致^[9]。其原因可能是肠道 *FABP2* 属于细胞内脂肪酸结合蛋白, 与环境、形态等的关系不很密切, 应该属于比较保守的家族, 故其进化和分类地位的关系不是很密切。

SNP 查找结果显示, *2a* 比 *2b* 基因上有较多的 SNP, 显示 *2a* 所受的选择压力比 *2b* 小, 定量结果显示 *2b* 在肠的表达量显著低于 *2a*, 但在其余组织的表达量均是 *2b* 高, *2b* 的表达比 *2a* 更广谱。脊椎动物体内存在着 *FABP* 家族, 敲除小鼠 *FABP1* (肝型), 在外表、形态、生存能力及血清中三酰甘油和脂肪酸的水平均没有显著变化, 说明尽管不同组织存在特有的 *FABP*, 但 *FABP* 家族的其它成员间能起补偿作用^[17]。鲤鱼 *2b* 的广谱表达, 暗示在其它组织也起一定的作用, 这可能是限制 *2b* 突变的一个原因。由于鲤鱼基因组内存在两套重复基因, 因此在查找和检

测 SNP 时均应区分不同的基因。本研究尽管在 *2a* 和 *2b* 上查找到较多的 SNP 位点, 但由于 SNP 位点均在内含子, 设计引物的合适区域有限 (内含子区域 AT 含量较高), 还要兼顾引物特异扩增其中 1 个重复基因, *FRLP* 法还需要突变位点存在合适的酶切位点, 这 3 方面的原因导致只构建了 *2a* 基因上的 4 个 SNP 位点的 PCR-RFLP 检测方法, 实验结果表明该方法结果清晰、重复性强, 且不需要特殊的仪器设备。

使用 *FABP2* 作为筛选增重相关分子标记的候选基因, 在人和鸡有报道, 如在人类 *FABP2* 基因第 2 外显子 54 位点的单核苷酸多态性, 即 54Ala/Thr 与肥胖症有关联; 初丽丽等^[5]在鸡的 *FABP2* 上找到了和体重相关的分子标记。本研究检测的 4 个 *FABP2a* 内含子上的 SNP 与建鲤增重均有显著的相关性, 越来越多的证据表明有些内含子区域有调节基因表达的功能^[18]。4 个位点中除了 A15G 中 *AG* 型个体显著比两纯合基因型个体增重快, 显示杂合优势外, 其余的位点杂合优势均不明显, 大部分呈基因剂量关系, 如 C435T, 纯合的 *CC* 型增重最快, 其次是 *CT* 型个体, *TT* 型个体则增重最慢, C 等位基因含量越多则增重越快。

考虑到鲤鱼性别对增重的影响, 本实验对雌、雄鲤鱼分别进行分析, 结果基因型对雌、雄鱼增重的影响一致, 只是影响程度略有差异, 如 I1_A15G 的 *AG* 型雌鱼极显著快于 *AA* 和 *GG* 型雌鱼, 而 *AG* 型雄鱼则只是显著快于 *AA* 型雄鱼。因此本实验获得的增重快基因型适用于鲤鱼群体。标记富集结果表明, 具有标记多的个体比标记少的个体增重速度快, 这反映出了生长是数量性状。但由于本研究分析的 4 个 SNP 位点来自同一个基因, 对个体遗传全貌的认识有限, 因此也存在标记少但增重不慢的情况, 如 1 型个体增重比 24、234 个体均快。就本实验结果分析, 位点之间存在着协同和拮抗作用, 3 和 4 位点存在协同作用, 单独具有 3 和 4 型的个体增重没有 1 和 2 型的增重快, 但 34 型的增重则比 12 快, 而 1 和 4 位点则相反有拮抗作用。但由于多位点一起分析后, 各小群的样本数不够大, 尚需扩大样本数进一步验证。本研究结果表明选择培养具有 123 (*AGGGC CXX*) 和 124 (*AGGGXXAT*) 基因型的个体, 平均增重比没有优势基因型的个体快 22%, 比群体

平均增重快 15%，另外，这两种基因型个体在现有选育群体中所占比例为 9%，显示具有较大的选育空间，可用于今后选育快速增长建鲤的育种计划中。

参考文献(References):

- [1] Chmurzyńska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet*, 2006, 47(1): 39–48. [DOI](#)
- [2] Veerkamp JH, Maatman RGJH. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. *Prog Lipid Res*, 1995, 34(1): 17–52. [DOI](#)
- [3] Levy E, Ménard D, Delvin E, Stan S, Mitchell G, Lambert M, Ziv E, Feoli-Fonseca JC, Seidman E. The polymorphism at codon 54 of the FABP2 gene increases fat absorption in human intestinal explants. *J Biol Chem*, 2001, 276(43): 39679–39684. [DOI](#)
- [4] Zimmerman AW, Veerkamp JH. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59(7): 1096–1116. [DOI](#)
- [5] 初丽丽, 王启贵, 关天竹, 李辉. I-FABP 基因侧翼区多态性与鸡生长和胴体组成性状的相关研究. *东北农业大学学报*, 2008, 39(9): 70–74. [DOI](#)
- [6] de Luis DA, Aller R, Izaola O, Sagrado MG, Conde R. Influence of *ALA54THR* polymorphism of fatty acid binding protein 2 on lifestyle modification response in obese subjects. *Ann Nutr Metab*, 2006, 50(4): 354–360. [DOI](#)
- [7] Zhang W, Zhang YT, Zhang HX, Wang JS, Cui RN, Dai JY. Sex differences in transcriptional expression of *FABPs* in zebrafish liver after chronic perfluorononanoic acid exposure. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(9): 5175–5182. [DOI](#)
- [8] Leong JS, Jantzen SG, von Schalburg KR, Cooper GA, Messmer AM, Liao NY, Munro S, Moore R, Holt RA, Jones SJ, Davidson WS, Koop BF. *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome. *BMC Genomics*, 2010, 11: 279. [DOI](#)
- [9] Chen XW, Jiang S, Shi ZY. Identification and expression analysis of *FABP2* gene from common carp *Cyprinus carpio*. *J Fish Biol*, 2012, 80(3): 679–691. [DOI](#)
- [10] Chen F, Lee Y, Jiang YL, Wang SL, Peatman E, Abernathy J, Liu H, Liu SK, Kucuktas H, Ke CH, Liu ZJ. Identification and characterization of full-length cDNAs in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue catfish (*Ictalurus furcatus*). *PLoS One*, 2010, 5(7): e11546. [DOI](#)
- [11] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731–2739. [DOI](#)
- [12] 俞菊华, 李红霞, 李建林, 唐永凯, 夏正龙, 董在杰. 建鲤 FABP3 基因分离及其多态性与增重的相关分析. *水产学报*, 2012, 36(12): 1809–1818. [DOI](#)
- [13] 俞菊华, 李红霞, 唐永凯, 李建林, 董在杰. 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. *农业生物技术学报*, 2010, 18(6): 1062–1072. [DOI](#)
- [14] 俞菊华, 李红霞, 唐永凯, 李建林, 董在杰. 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. *水生生物学报*, 2011, 35(2): 218–228. [DOI](#)
- [15] Kongchum P, Palti Y, Hallerman EM, Hulata G, David L. SNP discovery and development of genetic markers for mapping innate immune response genes in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 29(2): 356–361. [DOI](#)
- [16] Sharma MK, Liu RZ, Thisse C, Thisse B, Denovan-Wright EM, Wright JM. Hierarchical subfunctionalization of *fabp1a*, *fabp1b* and *fabp10* tissue-specific expression may account for retention of these duplicated genes in the zebrafish (*Danio rerio*) genome. *FEBS J*, 2006, 273(14): 3216–3229. [DOI](#)
- [17] Martin GG, Danneberg H, Kumar LS, Atshaves BP, Erol E, Bader M, Schroeder F, Binas B. Decreased liver fatty acid binding capacity and altered liver lipid distribution in mice lacking the liver fatty acid-binding protein gene. *J Biol Chem*, 2003, 278(24): 21429–21438. [DOI](#)
- [18] Markljung E, Jiang L, Jaffe JD, Mikkelsen TS, Wallerman O, Larhammar M, Zhang XL, Wang L, Saenz-Vash V, Gnirke A, Lindroth AM, Barrés R, Yan J, Strömberg S, De S, Pontén F, Lander ES, Carr SA, Zierath JR, Kullander K, Wadelius C, Lindblad-Toh K, Andersson G, Hjälml G, Andersson L. ZBED6, a novel transcription factor derived from a domesticated DNA transposon regulates *IGF2* expression and muscle growth. *PLoS Biol*, 2009, 7(12): e1000256. [DOI](#)