

王旭东,唐雨甜,熊雪梅,等.团头鲂 *scxa* 基因 SNP 位点与肌间骨数目的关联性分析[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(4): 149-156.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.04.018

团头鲂 *scxa* 基因 SNP 位点与肌间骨数目的关联性分析

王旭东^{1,2}, 唐雨甜², 熊雪梅¹, 周佳佳¹, 李相珊³, 曹树洪³, 高泽霞^{1,4}

1. 华中农业大学水产学院/农业农村部淡水生物繁育重点实验室/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室/湖北省名优鱼育种与健康养殖工程技术研究中心/
长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心, 武汉 430070;
2. 武汉农业检测中心, 武汉 430023;
3. 湖北省阳新县浮屠镇水产服务中心, 黄石 435239; 4. 湖北洪山实验室, 武汉 430070

摘要 为研究 *scxa* 基因序列的多态性与团头鲂肌间骨数量性状之间的关联性, 以期进一步获得团头鲂肌间骨数目显著相关的 SNP 标记, 通过克隆获得团头鲂 *scxa* 基因的 cDNA 序列, 其开放阅读框为 609 bp, 共编码 202 个氨基酸。系统进化分析结果显示团头鲂 *scxa* 基因与斑马鱼、鲤、鲫、金线鲃具有较高保守性。荧光定量结果显示, 该基因在团头鲂肌肉和肌间骨中的表达量均显著高于其他组织, 且肌肉中的表达量显著高于肌间骨 ($P < 0.05$)。通过比较肌间骨数量极端群体 *scxa* 基因外显子序列, 共获得与肌间骨数目显著相关的 2 个 SNP 位点及 1 个插入/缺失位点。以上结果表明, *scxa* 基因在肌间骨发育过程中发挥潜在作用, 其序列多态性与肌间骨数目具有显著相关性。

关键词 团头鲂; 肌间骨; *scxa*; 表达模式; 基因多态性; 高通量测序; 基因克隆

中图分类号 S 917 : Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)04-0149-08

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 作为我国大宗淡水养殖鱼类之一, 肌间骨的存在严重影响了其食用和深加工价值。肌间骨 (intermuscular bones, IBs) 仅存在于低等真骨鱼类中, 由肌膈间的肌腱骨化而来。对肌间骨的相关研究中, 形态学研究较多^[1]。近年来, 鱼类肌间骨分子机制研究取得了较大进展。Yang 等^[2]、Su 等^[3]、Zhang 等^[4] 对 BMP 家族基因进行研究, 结果表明部分 BMP 家族基因与肌间骨发生发育密切相关; Nie 等^[5-6]、Wan 等^[7-8] 分别对肌间骨相关的组学数据进行分析, 揭示了肌间骨发育中重要的候选基因和 microRNA。在分子育种研究中, Tang 等^[9] 研究表明镜鲤肌间骨数量性状遗传力属于中等遗传力, 并发现 8 个肌间骨 QTLs 和 29 个肌间骨相关的候选基因。Xiong 等^[10] 评估显示, 团头鲂脉弓小骨数量性状遗传力为 0.37, 属于中等遗传力。Wan 等^[11] 首次利用混合分组分析法筛选出 181 个与肌间骨数量相关的候选 SNP 位点。

Perazza 等^[12] 发现无肌间骨大盖巨脂鲤 (*Colossoma macropomum*) 群体, Nunes 等^[13] 通过 GWAS 分析获得了与大盖巨脂鲤肌间骨数量显著相关的 675 个 SNP 位点, 并且有 13 个位点位于骨相关的候选基因附近。目前, 基因多态性已被证实与鱼类生长^[14]、抗病^[15-16]、繁殖^[17]、耐低氧^[18] 等多种性状有关联, 因此, 针对鱼类肌间骨性状的分子育种具有可行性。

Scleraxis (*scx*) 是肌腱早期发育中的一个特异性的标志转录因子, 对肌腱组织的分化起到重要作用^[19]。Kague 等^[20] 通过敲除斑马鱼 *scxa* 和 *scxb* 基因, 发现 *scx* 基因在斑马鱼肌腱发育和骨骼矿化过程中发挥作用。Nie 等^[21] 的研究表明 *scxa* 基因对鱼类肌间骨的数目具有一定的调控作用。因此, 研究 *scxa* 基因的多态性与团头鲂肌间骨数量性状之间的关联性, 筛选与团头鲂肌间骨数量显著相关的分子标记具有重要意义, 可为少刺团头鲂品种选

收稿日期: 2020-12-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31872559); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系建设项目 (CARS-46-08); 中央高校基本科研业务费专项 (2662018PY035); 武汉市科技计划项目 (2020020601012253)

王旭东, E-mail: 3472199883@qq.com

通信作者: 高泽霞, E-mail: gaozx@mail.hzau.edu.cn

育提供分子基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用团头鲂均来自湖北百容水产良种有限公司。参考万世明等^[22]的肌间骨数目统计方法,对 640 尾团头鲂进行肌间骨数目计数(在进行肌间骨数目统计前,采集样本的体长等生物学信息,并用无水乙醇保存尾鳍鳍条,最终选取 24 尾肌间骨数目不大于 102 的个体,21 尾肌间骨数目不小于 129 的个体构建肌间骨数目极端群体。采用醋酸铵/异丙醇法提取 DNA。

1.2 团头鲂 *scxa* 基因克隆

从 Ensembl (http://asia.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index)上查找斑马鱼 *scxa* 基因序列,与团头鲂二代全基因组测序数据进行比对,获得匹配的 DNA 序列及其相应的染色体坐标,与团头鲂二代测序转录组序列进行比对,获得团头鲂 *scxa* 基因序列结构及相应染色体坐标,使用 ORF Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测开放阅读框,利用 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)验证和翻译序列。使用 Primer Premier 5.0 对团头鲂 *scxa* 基因序列设计引物(见表 1),送至武汉擎科生物科技有限公司进行合成。以肌间骨数量极端个体的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,检测产物质量后,送至武汉擎科生物科技有限公司测序。使用 ProtParam(<http://web.expasy.org/prot-param/>)分析编码蛋白的理化性质;ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/>)分析蛋白亲疏水性;TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)预测蛋白跨膜区结构;使用 DNAMAN 对不同脊椎动物 *scx* 基因进行同源性分析,采用最大似然法(maximum likelihood,ML)构建系统发育树。

1.3 团头鲂 *scxa* 基因组织表达分析

Trizol 法提取 1 龄团头鲂 8 个组织的总 RNA,并逆转录成 cDNA。利用 Primer Premier 5.0 设计其定量引物(表 1),以 β -actin 为内参基因。使用 ABI QuantStudio 6 Flex 荧光定量 PCR 仪(Thermo Scientific,美国)检测 *scxa* 基因在团头鲂 8 个组织的表达情况,按照 HieffTM qPCR SYBR © Green Master Mix (Low Rox Plus)(翊圣,上海)说明书进

行实验,每个样品设置 3 个平行,PCR 程序为:95 ℃,5 min;95 ℃,10 s;62 ℃,20 s;72 ℃,20 s;95 ℃,15 s;62 ℃,1 min;95 ℃,15 s。用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算相对表达水平,使用 SPSS 26.0 进行数据统计分析($\alpha=0.05$)。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
scxa1 引物 1	F:ATGATGTCGGAGGACGATGAA
scxa1 primer 1	R:TCAATGCGGTGAAGGCTGTA
scxa1 引物 2	F:GACCGCTCATTTTCGCTTGG
scxa1 primer 2	R:TGCTGGGTGAGCCGTGGT
scxa2 引物 1	F:TGACCTGACATTTCGTT
scxa2 primer 1	R:CCTCAACTCCCTGTG
scxa2 引物 2	F:TTTGACCACAGGGAGTTGAG
scxa2 primer 2	R:GTTGATCTTTATCTGGAGGGA
β -actin 定量引物	F:CGTGCTGTTTTCCCTTCCATT
β -actin qPCR primer	R:CAATACCGTGCTCAAAGGATACTT
<i>scxa</i> 定量引物	F:TCTTTCGCGATGGTGCGA
<i>scxa</i> qPCR primer	R:GCCACCACTTACTCCAGTTT

注:scxa1 表示 *scxa* 基因第一外显子,scxa2 表示 *scxa* 基因第二外显子。Note:scxa1 represents the first exon of *scxa* gene,scxa2 represents the second exon of *scxa* gene.

1.4 肌间骨数量关联性 SNP 位点筛选

将测序获得的肌间骨数量极端个体 *scxa* 基因序列用 DNAMAN 进行多序列比对,获取突变位点;用 Chromas 分析突变位点的基因型,统计多肌间骨组和少肌间骨组在突变位点的基因型频率和等位基因频率;用 SPSS 26.0 计算基因型频率和等位基因频率与多(或少)肌间骨数目的显著性。使用 SHEsis(<http://analysis.bio-x.cn/>)进行单倍型分析,并使用 Cervus3.0 对多态性位点进行遗传参数分析。

2 结果与分析

2.1 团头鲂 *scxa* 基因理化性质分析

团头鲂 *scxa* 基因开放阅读框为 609 bp;编码 202 个氨基酸,分子式为 C₉₃₅ H₁₅₁₁ N₂₉₇ O₃₀₈ S₈,分子质量为 22.10 ku;理论等电点(pI 值)为 9.41,为碱性蛋白;氨基酸残基中 Ser(14.4%)含量最高(图 1);不稳定系数为 56.81,属于不稳定蛋白;脂肪系数为 60.40,平均亲水性为-0.834,表明该蛋白为强亲水性,为可溶性蛋白;该蛋白不存在跨膜区域。

2.2 团头鲂 *scxa* 基因氨基酸序列分析

经同源性分析(图 2)发现:团头鲂 *scxa* 基因氨

基酸序列与鲫 (75.40%)、鲤 (74.60%)、金线鲃 (73.41%)、斑马鱼 (72.22%) *scxa* 基因氨基酸序列同源性较高; *scxa* 基因氨基酸序列存在 79 个保守的位点。从氨基酸序列比对分析发现,相对鸟类、哺乳动物等外群,鱼类 *scxa* 基因氨基酸序列中存在 9 个氨基酸缺失(图 3)。使用 MAGE X 构建进化树(图 4),主要聚为 3 个分支:鱼类 *scx*、鱼类 *scxa/b* 和其他动物 *scx*。团头鲂 *scxa* 与鲤、鲫、斑马鱼和金

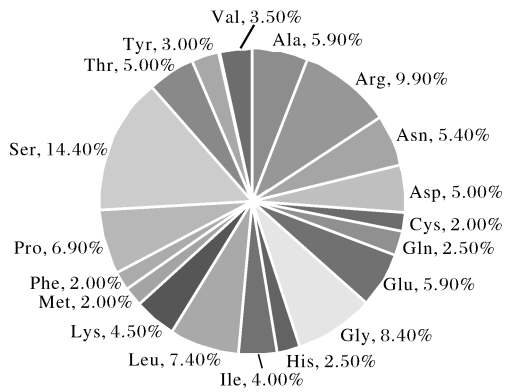
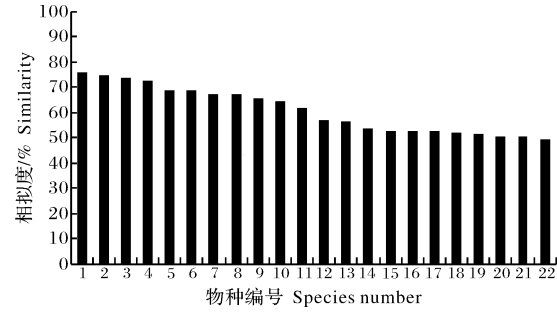


图 1 团头鲂 *scxa* 基因氨基酸频率分布图

Fig.1 Amino acid frequency distribution of *scxa* in *M. amblycephala*



1: 鲫 *Carassius auratus*; 2: 鲤 *Cyprinus carpio*; 3: 金线鲃 *Sinocyclocheilus grahami*; 4: 斑马鱼 *Danio rerio*; 5: 纳氏锯脂鲤 *Pygocentrus nattereri*; 6: 斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus*; 7: 墨西哥脂鲤 *Astyanax mexicanus*; 8: 黄颡鱼 *Tachysurus fulvidraco*; 9: 大西洋鲱 *Clupea harengus*; 10: 大西洋鲑 *Salmo salar*; 11: 斑点雀鲷 *Lepisosteus oculatus*; 12: 美丽硬骨舌鱼 *Scleropages formosus*; 13: 原鸡 *Gallus gallus*; 14: 半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis*; 15: 尼罗罗非鱼 *Oreochromis niloticus*; 16: 牛 *Bos taurus*; 17: 小鼠 *Mus musculus*; 18: 人 *Homo sapiens*; 19: 青鳉 *Oryzias latipes*; 20: 多育花岩鲮 *Poeciliopsis prolifica*; 21: 红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes*; 22: 非洲爪蟾 *Xenopus tropicalis*.

图 2 团头鲂 *scxa* 蛋白序列与其他 22 个物种的同源性比较结果

Fig.2 Comparison of homology between *scxa* protein in *M. amblycephala* sequence and the other 22 species

<i>Megalobrama amblycephala_scxa</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	SSGGFSTSNYYH.....	HGSFS	168
<i>Danio rerio_scxa</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	SSGGFSTSNYYH.....	HGSFS	170
<i>Carassius auratus_scxa</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	SSGGFSTSNYYH.....	HGSFS	167
<i>Cyprinus carpio_scxa</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	SSGGFSTSNYYH.....	HGSFS	167
<i>Sinocyclocheilus grahami_scxa</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	SSGGFSTSNYYH.....	HGSFS	167
<i>Ictalurus punctatus_scxa</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	SSGGFSA.AYYH.....	HGSFT	163
<i>Astyanax mexicanus_scxa</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	SSGGFSA.SYYH.....	HGSFG	167
<i>Pygocentrus nattereri_scxa</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	SSGGFSA.SYYH.....	HGSFG	169
<i>Tachysurus fulvidraco_scxa</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	SSGGFST.AYYH.....	HGSFT	167
<i>Lepisosteus oculatus_scxa</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	HTT.....SSYYH.....	HGSFG	150
<i>Scleropages formosus_scx</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	AS.....SIYYC.....	HGSFG	152
<i>Clupea harengus_scx</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	SSGGFSA.SSYYH.....	HGSFA	170
<i>Takifugu rubripes_scx</i>	SSYISHLGNVLLVGEGLDGGQPC	APSP...PFFHV.....	NSSFT	177
<i>Cynoglossus semilaevis_scx</i>	SSYISHLGNVLLVGEGLDGGQPC	APSP...PFFHV.....	NSSFS	182
<i>Oryzias latipes_scxa</i>	SSYISHLGNVLLVGEGLDGGQPC	APSP...PFFHV.....	SSSFT	179
<i>Oreochromis niloticus_scx</i>	SSYISHLGNVLLVGEGLDGGQPC	APSP...PFFHV.....	SSSFT	181
<i>Gallus gallus_scx</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	HTSP...AFFHHG.....	GGGSEFP	153
<i>Homo sapiens_scx</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	HSGP...AFFHAARAGSP	PPPPFPFP	166
<i>Mus musculus_scx</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	HSGP...AFFHSGRAGSP	PLPPFPFP	169
<i>Xenopus tropicalis_scx</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	HTGG...PYYPF...HFAAATA	EFK	150
<i>Bos taurus_scx</i>	SSYISHLGNVLLVGEACDGGQPC	HSGP...AFFHASRAGSP	PPPPFPFP	168
Consensus	SSYISHLGNVLL	G DGQPC	p	

黑色方框表示鱼类缺失的氨基酸序列。The black box indicates the amino acid sequence missing from fish.

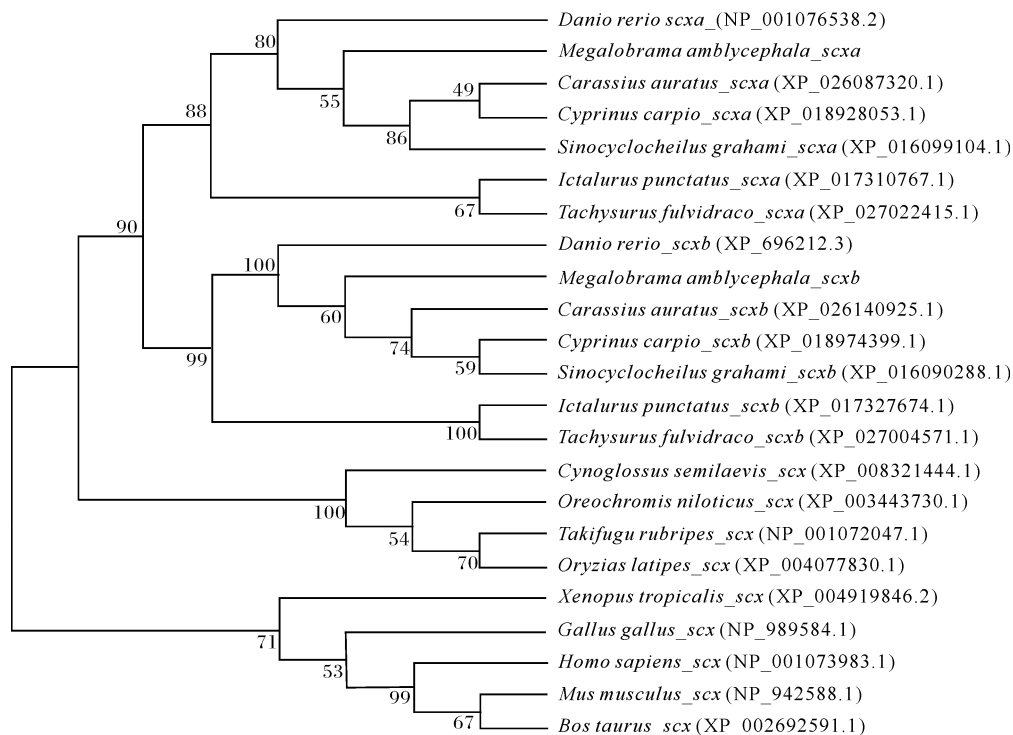
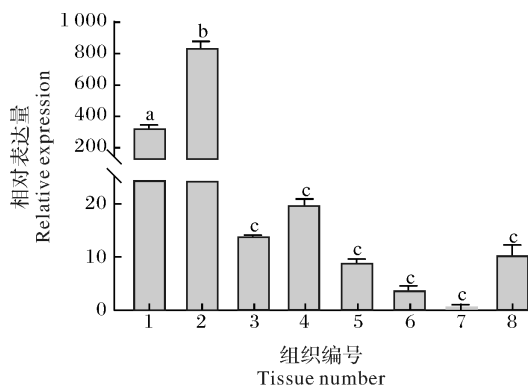
图 3 不同物种 *scxa/scx* 氨基酸序列部分比对分析

Fig.3 Comparison of *scxa/scx* amino acid sequence in different species

线鲃同源性较高。聚类结果显示,鲤、鲫、金线鲃、斑马鱼和团头鲂聚为一类;斑点叉尾鲷、黄颡鱼聚为一类;半滑舌鳎、青鳉、红鳍东方鲀和尼罗罗非鱼聚为一类;原鸡、非洲爪蟾、牛、人、小鼠聚为一类。

2.3 *scxa* 基因在团头鲂不同组织的表达分析

定量表达分析结果显示,*scxa* 在肌间骨和肌肉中表达量相对较高,与其他组织中的表达水平存在显著差异($P < 0.05$),*scxa* 基因在肌肉中的表达量显著高于在肌间骨中的表达量($P < 0.05$)(图 5)。

图 4 *scx* 基因的系统发育树Fig.4 Phylogenetic tree of *scx* genes

1:肌间骨 Intermuscular bone; 2:肌肉 Muscle; 3:脑 Brain; 4:鳍 Fin; 5:心 Heart; 6:肝 Liver; 7:脾 Spleen; 8:肋骨 Rib.不同的小写字母表示 *scxa* 在不同组织中的差异显著性 ($P < 0.05$). Lowercase letters indicates the significant difference for *scxa* in the different tissues, respectively ($P < 0.05$).

图 5 *scxa* 基因在团头鲂不同组织中的相对表达量

Fig.5 Relative expression levels of *scxa* gene in the different tissues of *M. amblycephala*

2.4 *scxa* 基因多态性与团头鲂肌间骨数量的相关性

基于所检测的团头鲂群体, *scxa* 基因在肌间骨较多和较少群体个体中的多态性位点信息如表 2 所示, 2 个 SNP 位点和 1 个插入缺失位点的等位基因频率和基因型频率在 2 个极端群体存在显著性差异 ($P < 0.05$)。其中, SNP 位点 chr09_22667389 位于第一外显子, chr09_22661743 位于第二外显子; 插入缺失位点 chr09_22661345-chr09_22661344 位于第二外显子(图 6)。单倍型分析中, 剔除频率小于 3% 的组合, 共发现 3 种单倍型; 其中 Haplotype 1 频率 (0.73) 最高, Haplotype 2 频率 (0.05) 最低(表 3)。chr09_22661743、chr09_22661345-22661344、chr09_22667389 位点的多态性信息含量分别为 0.239 2、0.246 1 和 0.258 3。统计结果显示, 3 个位点的观测杂合度的数值范围为 0.087 0~0.238 1, 期望杂合度的数值范围为 0.284 6~0.311 2, 无有效等位基因的数值范围为 0.076 9~0.533 3(表 4)。

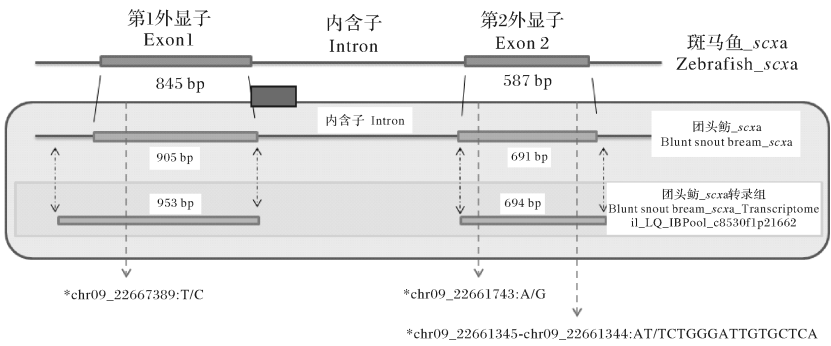


图 6 团头鲂 *scxa* 多态性位点定位信息

Fig.6 The SNP polymorphic location information of *scxa* in *M. amblycephala*

表 2 团头鲂肌间骨数量性状显著相关突变位点信息

Table 2 The SNPs information related to the number traits of IBs in *M. amblycephala scxa* gene

位点坐标 Locus	基因型 Genotype	少肌间骨组 Less_IBs	多肌间骨组 More_IBs	显著性 <i>P</i> value	位点坐标 Locus	等位基因 Allele	少肌间骨组 Less_IBs	多肌间骨组 More_IBs	显著性 <i>P</i> value
chr09_22661743	AA	21	15	0.017	chr09_22661743	A	42	35	0.034
	AG	0	5			G	0	7	
	GG	0	1						
chr09_22661345—22661344	AT/AT	23	14	0.030	chr09_22661345—22661344	AT	46	30	0.014
	AT/TCTGGGA					TCTGGGAT	0	6	
	TTGTGCTCA	0	2			TGTGCTCA			
	TCTGGGAT								
	TGTGCTCA/	0	2			TGTGCTCA			
	TCTGGGAT								
chr09_22667389	TT	24	16	0.040	chr09_22667389	T	48	34	0.022
	CT	0	2			C	0	8	
	CC	0	3						

表 3 *scxa* 基因外显子多态性位点单倍型分析

Table 3 Haplotype analysis of polymorphic sites in the exon of *scxa* gene

单倍型 Haplotype	位点 Site			频率 Frequency
	chr09_22661743	chr09_22661345-22661344	chr09_22667389	
1	A	AT	T	0.73
2	A	AT	C	0.05
3	G	TCTGGGATTGTGCT	C	0.12

表 4 *scxa* 基因 3 个多态性位点的遗传参数

Table 4 Genetic parameters of 3 polymorphic loci in *scxa* gene

多态性位点 Site	观测杂合度 <i>H</i> _o	期望杂合度 <i>H</i> _e	无效等位基因数 <i>F</i> (Null)	多态性信息含量 PIC
chr09_22661743	0.238 1	0.284 6	0.076 9	0.239 2
chr09_22661345-22661344	0.087 0	0.293 7	0.533 3	0.246 1
chr09_22667389	0.125 0	0.311 2	0.417 7	0.258 3

注 Note: *H*_o:观测杂合度 Observed heterozygosity; *H*_e:期望杂合度 Expected heterozygosity; PIC:多态性信息含量 Polymorphism information content.

3 讨论

本研究通过高通量测序和基因克隆技术获得团头鲂 *scxa* 基因的 cDNA 序列,通过 ProParam 进一步分析 *scxa* 基因的理化性质,为研究 *scxa* 基因对于团头鲂肌间骨发生发育的作用提供理论依据。对该基因编码的氨基酸序列分析发现,团头鲂 *scxa* 与鲤、鲫等鲤科鱼类 *scxa* 具有高度同源性,与其他物种的 *scxa* 同源性相对较低。而且 *scxa* 在不同进化地位的鱼类中也存在差异。另外,*scxa* 存在 79 个氨基酸保守位点;鱼类的氨基酸序列相对于哺乳类存在一段 9 个氨基酸的缺失,推测这段缺失的氨基酸序列可能与物种所处的进化地位有关。

Nie 等^[21]研究发现 *scxa* 基因敲除斑马鱼肌间骨数量显著减少。本研究定量结果显示,*scxa* 基因在团头鲂肌肉中的表达量最高,在肌间骨中表达量次之。已有研究表明,*scx* 在哺乳动物肌腱发育中发挥了重要作用。例如,Sakabe 等^[23]发现 *scx* 基因缺失小鼠在发育过程中肌腱完全缺失,导致异位骨化现象;陈宇龙等^[24]定量分析了团头鲂 *tnmd* 基因在团头鲂肌间骨发育过程的 4 个关键时期表达情况,结果表明 *tnmd* 基因的表达情况与肌间骨的发育存在同步性。Shukunami 等^[25]研究表明 *scx* 基因促进 *tnmd* 表达,正向调节肌腱细胞的分化和成熟。因此,我们可以推测 *scxa* 基因在鱼类肌间骨发育过程中发挥重要作用。

本研究在团头鲂 *scxa* 基因外显子上获得 2 个与多肌间骨数量性状相关的 SNP 位点,这 2 个位点均为转换类型。研究表明其转换发生概率通常比其他几个位点变异更高,这是因为细胞中胞嘧啶大多甲基化并自发除去氨基以形成胸腺嘧啶^[26]。研究^[27]表明基因编码区 SNP 在外显子上的突变率为其周围序列的 1/5,但位于基因编码区的 SNP 突变会对该基因的表达产生潜在影响,从而可能对表型变化发挥作用。因此,编码区 SNP 对生物育种有重要意义。多态信息含量与杂合度是群体内遗传变异的测度,其值的高低反映了群体内个体的均质度,遗传变异大,数值就高。但由于不同标记得出的数值有很大的差异,Vaiman 等^[28]提出了确定位点多态性的标准:PIC>0.5 为高度多态座位,PIC<0.25 为低度多态座位,0.25<PIC<0.5 为中度多态座位。

chr09_22667389 表现中度多态性,适合作为分子育种标记。

INDEL 是指在近缘种或同一物种不同个体之间基因组同一位点的序列发生不同大小核苷酸片段的插入或缺失,是同源序列比对产生空位的现象。INDEL 分子标记在动植物遗传育种中得到了广泛应用^[29]。本研究获得的 chr09_22661345-chr09_22661344 位点仅存在于多肌间骨个体中,并且该位点发生变异时,chr09_22667389、chr09_22661743 分别也会产生变异,但这种连锁关系并不双向发生。由此推测,该位点的变异会影响其他多肌间骨关联性 SNP 位点的发生,但需要扩大样本做进一步验证。目前对于肌间骨发育关键基因上的 SNP 位点尚未有研究报道,但肌间骨数量相关 SNP 位点的筛选和应用将有助于快速活体检测鱼类肌间骨数量信息,相对于传统解剖学肌间骨计数法更加节省资源,从而促进相关育种研究的进展。

参考文献 References

- [1] NIE C H, HILSDORF A W S, WAN S M, et al. Understanding the development of intermuscular bones in teleost: status and future directions for aquaculture[J]. Reviews in aquaculture, 2020, 12(2): 759-772.
- [2] YANG G, QIN Z D, KOU H Y, et al. A comparative genomic and transcriptional survey providing novel insights into bone morphogenetic protein 2 (bmp2) in fishes[J/OL]. International journal of molecular sciences, 2019, 20(24): 6137 [2020-12-30]. <https://doi.org/10.3390/ijms20246137>.
- [3] SU S Y, DONG Z J. Comparative expression analyses of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) expressions in muscles of tilapia and common carp indicate that BMP4 plays a role in the intermuscular bone distribution in a dose-dependent manner[J]. Gene expression patterns, 2018, 27: 106-113.
- [4] ZHANG W Z, LAN T, NIE C H, et al. Characterization and spatiotemporal expression analysis of nine bone morphogenetic protein family genes during intermuscular bone development in blunt snout bream[J]. Gene, 2018, 642: 116-124.
- [5] NIE C H, WAN S M, TOMLJANOVIC T, et al. Comparative proteomics analysis of teleost intermuscular bones and ribs provides insight into their development[J]. BMC genomics, 2017, 18(1): 1-14.
- [6] NIE C H, WAN S M, LIU Y L, et al. Development of teleost intermuscular bones undergoing intramembranous ossification based on histological-transcriptomic-proteomic data[J/OL]. International journal of molecular sciences, 2019, 20(19): 4698

- [2020-12-30].<https://doi.org/10.3390/ijms20194698>.
- [7] WAN S M, YI S K, ZHONG J, et al. Identification of microRNA for intermuscular bone development in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. International journal of molecular sciences, 2015, 16(5): 10686-10703.
- [8] WAN S M, YI S K, ZHONG J, et al. Dynamic mRNA and miRNA expression analysis in response to intermuscular bone development of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J/OL]. Scientific reports, 2016, 6: 31050 [2020-12-30]. <https://doi.org/10.1038/srep31050>.
- [9] TANG G P, LÜ W, SUN Z P, et al. Heritability and quantitative trait locus analyses of intermuscular bones in mirror carp (*Cyprinus carpio*) [J/OL]. Aquaculture, 2020, 515: 734601 [2020-12-30]. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734601>.
- [10] XIONG X M, ROBINSON N A, ZHOU J J, et al. Genetic parameter estimates for intermuscular bone in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) based on a microsatellite-based pedigree [J]. Aquaculture, 2019, 502: 371-377.
- [11] WAN S M, XIONG X M, TOMLJANOVIC T, et al. Identification and mapping of SNPs associated with number of intermuscular bone in blunt snout bream [J]. Aquaculture, 2019, 507: 75-82.
- [12] PERAZZA C A, DE MENEZES J T B, FERRAZ J B S, et al. Lack of intermuscular bones in specimens of *Colossoma macropomum*: an unusual phenotype to be incorporated into genetic improvement programs [J]. Aquaculture, 2017, 472: 57-60.
- [13] NUNES J R S, PÉRTILLE F, ANDRADE S C S, et al. Genome-wide association study reveals genes associated with the absence of intermuscular bones in tambaqui (*Colossoma macropomum*) [J]. Animal genetics, 2020, 51(6): 899-909.
- [14] 王春晓, 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) GHSR 和 ghrelin 基因多态性分析及其生长相关 SNP 标记的筛选 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2015. WANG C X. Polymorphism analysis of GH-SR and ghrelin gene in *Oreochromis niloticus* and screening of their growth related SNPs [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [15] BAO Y B, LI L, ZHANG G F. Polymorphism of the superoxide dismutase gene family in the bay scallop (*Argopecten irradians*) and its association with resistance/susceptibility to *Vibrio anguillarum* [J]. Developmental & comparative immunology, 2010, 34(5): 553-561.
- [16] 逢锦菲. “黄海 2 号”中国对虾高通量 SNP 筛选及其与抗 WSSV 性状的关联分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013. PANG J F. High-throughout screening of SNP and its association with WSSV-resistance traits in *Fenneropenaeus chinensis* “Huanghai NO.2” [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013 (in Chinese with English abstract).
- [17] HE F, WEN H S, LI J F, et al. Single nucleotide polymorphisms of the GnRHR gene associated with reproductive traits of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Asian-Australasian journal of animal sciences, 2011, 24(4): 463-470.
- [18] 陈柏湘, 王伟峰, 王卫民, 等. 团头鲂低氧耐受相关 SNPs 标记的开发 [J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(2): 23-29. CHEN B X, WANG W F, WANG W M, et al. Isolation of SNP markers associated with hypoxia tolerance in *Megalobrama amblycephala* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2019, 38(2): 23-29 (in Chinese with English abstract).
- [19] ASLAN H, KIMELMAN-BLEICH N, PELLE G, et al. Molecular targets for tendon neoformation [J]. The journal of clinical investigation, 2008, 118(2): 439-444.
- [20] KAGUE E, HUGHES S M, LAWRENCE E A, et al. Scleraxis genes are required for normal musculoskeletal development and for rib growth and mineralization in zebrafish [J]. The FASEB journal, 2019, 33(8): 9116-9130.
- [21] NIE C H, WAN S M, CHEN Y L, et al. Loss of scleraxis leads to distinct reduction of mineralized intermuscular bone in zebrafish [J]. Aquaculture and fisheries, 2021, 6(2): 169-177.
- [22] 万世明, 易少奎, 仲嘉, 等. 团头鲂肌间骨发育的形态学观察 [J]. 水生生物学报, 2014, 38(6): 1143-1151. WAN S M, YI S K, ZHONG J, et al. Developmental and morphological observation of intermuscular bones in *Megalobrama amblycephala* [J]. Acta hydrobiologica sinica, 2014, 38(6): 1143-1151 (in Chinese with English abstract).
- [23] SAKABE T, SAKAI K, MAEDA T, et al. Transcription factor scleraxis vitally contributes to progenitor lineage direction in wound healing of adult tendon in mice [J]. The journal of biological chemistry, 2018, 293(16): 5766-5780.
- [24] 陈宇龙, 张丽红, 周佳佳, 等. 团头鲂肌腱发育相关基因 *tnmd/xirp2a* 的克隆和表达 [J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(2): 1-8. CHEN Y L, ZHANG L H, ZHOU J J, et al. Cloning and expression analysis of *tnmd/xirp2a* genes relating to tendon development in *Megalobrama amblycephala* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2019, 38(2): 1-8 (in Chinese with English abstract).
- [25] SHUKUNAMI C, TAKIMOTO A, NISHIZAKI Y, et al. Scleraxis is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes [J/OL]. Scientific reports, 2018, 8: 3155 [2020-12-30]. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21194-3>.
- [26] 黄智慧. 大菱鲆耐高温性状选育及遗传机理研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014. HUANG Z H. Studies on thermal tolerance breeding and genetic mechanism research on turbot (*Scophthalmus maximus*) [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014 (in Chinese with English abstract).
- [27] 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): 19-21. YANG Y Q, WANG W J, XU C B. Research progress of single nucleotide polymorphism [J]. Chemistry & bioengineering, 2009, 26(8): 19-21 (in Chinese

- with English abstract).
- [28] VAIMAN D, MERCIER D, MOAZAMI-GOUDARZI K, et al. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, syntenic mapping, and polymorphism[J]. *Mammalian genome*, 1994, 5 (5): 288-297.
- [29] 杨洁, 赫佳, 王丹碧, 等. InDel 标记的研究和应用进展[J]. *生物多样性*, 2016, 24(2): 237-243. YANG J, HE J, WANG D B, et al. Progress in research and application of InDel markers[J]. *Biodiversity science*, 2016, 24 (2): 237-243 (in Chinese with English abstract).

Expression of *scxa* and correlation analysis between SNP and number of intermuscular bones in *Megalobrama amblycephala*

WANG Xudong^{1,2}, TANG Yutian², XIONG Xuemei¹, ZHOU Jiajia¹,
LI Xiangshan³, CAO Shuhong³, GAO Zexia^{1,4}

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education/Engineering Technology Research Center for Fish Breeding and Culture in Hubei Province/Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education, Wuhan 430070, China;
2. Wuhan Agricultural Testing Center, Wuhan 430023, China;
3. Aquatic Products Service Center of Futu Town, Yangxin County, Hubei Province, Huangshi 435239, China;
4. Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China

Abstract To study the association between the polymorphism of the *scxa* gene sequence and the intermuscular bone (IB) quantity traits, and to obtain SNPs that are significantly related to the number of IBs in *Megalobrama amblycephala*, the cDNA sequence of the *scxa* gene in *M. amblycephala* was obtained by cloning. Its open reading frame is 609 bp, encoding 202 amino acids. Phylogenetic analysis showed that the *scxa* gene of *M. amblycephala* is highly related with that of zebrafish, common carp, crucian carp, and golden thread carp. The fluorescence quantitative PCR results showed that the expression of *scxa* in the muscle and IB was significantly higher than that in other tissues, and the expression in the muscle was significantly higher than that in IB ($P < 0.05$). By comparing the *scxa* exon sequence of the IB-extreme population, 2 SNPs and 1 InDel that were significantly related to the number of IB were obtained. This result indicates that *scxa* gene plays a potential role in the development of IB, and its polymorphism is significantly correlated with the number of IB in *M. amblycephala*.

Keywords *Megalobrama amblycephala*; intermuscular bones; *scxa*; expression mode; SNPs; high-throughput sequencing; gene cloning

(责任编辑:边书京)