

草鱼 *GSTR* 基因外显子 1、外显子 2 的 SNPs 筛选及其与生长性状的关联分析

刘小献^{1,2} 白俊杰¹ 徐磊³ 于凌云¹ 樊佳佳¹ 韩林强³

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, 广州 510380;

2. 大连海洋大学生命科学与技术学院, 大连 116023; 3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要 根据草鱼 EST 数据库中的 rho 型谷胱甘肽硫转移酶基因 cDNA 序列设计引物, 扩增预计存在的 SNP 位点。采用 PCR 产物测序法和 PCR-RFLP 法, 在珠江水系草鱼养殖群体中筛选到 2 个 SNP 位点, 分别位于外显子 1 和外显子 2 上, 为 C-T 突变, 且属于同义突变, 统计了多态位点在群体中的分布: C+129T 位点 CC 型占 0.69%, TC 型占 8.75%, TT 型占 80.56%; C+192T 位点 CC 型占 25.4%, TC 型占 48.6%, TT 型占 26.1%。利用一般线性模型将 SNPs 与草鱼 6 个生长性状进行关联分析, 结果表明, C+129T 位点 TT 型个体 6 个生长性状均值比 TC 型高 ($P > 0.05$); C+192T 位点 TT 型个体体质量均值高于 TC 型和 CC 型个体 ($P < 0.05$)。双倍型关联分析表明 D1 型个体的体质量均值明显高于 D3 型和 D6 型 ($P < 0.05$), 因而可以考虑将 *GSTR* 基因作为影响草鱼体质量等生长性状的候选基因, 应用于草鱼分子辅助育种。

关键词 草鱼; SNPs; 谷胱甘肽硫转移酶; rho 型谷胱甘肽硫转移酶基因; 多态性; 生长

中图分类号 Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)06-0753-06

草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 具有生长快、肉质鲜美和养殖成本低等优点, 是我国淡水渔业中最重要的养殖品种之一。由于草鱼性成熟周期长, 亲鱼个体大等原因, 给良种选育带来困难, 目前草鱼尚未获得遗传改良的品系。利用 DNA 遗传标记进行辅助选育已经成为动物育种过程中的重要方法^[1]。筛选和利用与草鱼经济性性状相关的分子标记, 可有效提高选择效率, 缩短育种年限, 对加快培育具有优良经济性状的草鱼养殖品系, 具有重要的意义。SNPs 作为第 4 代分子遗传标记以其优良特性在动植物育种中被广泛应用^[2], 但目前国内对经济动物 SNPs 的研究主要集中在畜禽类动物中, 在水产动物研究中涉及较少, 与其他分子标记相比, SNPs 分辨率高, 覆盖基因组范围大, 遗传稳定, 以“有或无”的形式存在, 利于发展自动化分析。

谷胱甘肽硫转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 是一种广泛存在于生物组织中的小分子水溶性蛋白, 具有解毒^[3]、抑制脂质过氧化作用^[4-7]。*GSTR* 是鱼类所特有的一种 GST 同工酶基因, 在微

囊藻毒素解毒过程中有重要作用。对金鱼 (*Carassius auratus*) *GSTR* 基因研究发现, 其转录水平的变动会增加金鱼的健康风险^[8]。目前有近 20 种鱼的 *GSTR* 基因成功克隆, 但有关 *GSTR* 基因多态性对鱼类生长影响的研究尚未见报道。笔者研究了草鱼 *GSTR* 基因上的 SNPs 对生长性状的影响, 以期作为草鱼分子标记辅助育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试鱼及材料

供试草鱼取自广东省佛山市三水白金水产种苗有限公司, 亲本来源于珠江水系。为同批繁殖和同池养殖 20 月龄的草鱼群体, 体质量为 (1 292.5 ± 342.3) g。均采用尾静脉活体取血, 抗凝剂 (ACD) 与血液体积比为 6 : 1, 采用天根生化科技 (北京) 有限公司 (TIANGEN) 血液基因组提取试剂盒提取鱼血液 DNA, 所有 DNA 样本均放于 -20 °C 保存。

Taq DNA 聚合酶, buffer 和 dNTP 购自华美生物工程公司, 限制性内切酶 *Mbo* I 购自 Fermentas

收稿日期: 2011-03-29

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (Nycytx-49-07)

刘小献, 硕士, 研究方向: 生物技术和动物遗传育种. E-mail: littlebearliu@126.com

通讯作者: 白俊杰, 研究员, 研究方向: 生物技术和动物遗传育种. E-mail: jjbai@163.net

公司,琼脂糖、去离子甲酰胺丙烯酰胺和 N,N-亚甲双丙烯酰胺等均购自广州威佳科技有限公司。

1.2 引物设计及合成

利用引物设计软件 Primer 5.0,根据草鱼 EST 数据库中具有多态位点的序列设计引物,由上海英骏生物技术有限公司合成(INVITROGEN),上游引物 P_F: ACACACAGTTACAGCCACATTTCT;下游引物 P_R: CGCACTCTCCAGATACAGACACG。

1.3 SNP 位点验证

用引物 P_F和 P_R对 144 个草鱼 DNA 样本中随机挑选的 15 个样本进行 PCR 扩增,PCR 反应体积 20 μ L, 10 \times PCR buffer 2.0 μ L, dNTP (10 mmol/L)0.3 μ L, Taq 酶(5 U/ μ L)0.2 μ L, 上下游引物(20 μ mol/L)各 0.4 μ L, 基因组 DNA(80 ng/ μ L)1 μ L, ddH₂O 15.8 μ L。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 32 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,12 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶(EB: 0.5 μ g/mL)中进行电泳检测。PCR 产物经纯化后送广州博尚生物技术有限公司进行测序,用 Vector NIT Suite 8.0 软件分析测序结果,查找 SNP 位点。

1.4 SNP 位点 PCR-RFLP 检测

PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,用限制性内切酶酶切,酶切体系:PCR 产物 0.20 μ g, 10 \times FastDigest Buffer 0.8 μ L, 酶 0.3 μ L, ddH₂O 6 μ L。酶切产物用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(Acr: Bis=29:1),120 V 恒压电泳后,银染显色。

1.5 统计分析

采用 Popgene (Version 3.2) 软件分析基因型频率和等位基因频率。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年季、环境及人工饲养技术差别,利用 SPSS 15.0 软件一般线性模型(general linear model, GLM),对 SNPs 位点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。采用 $y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$ 线性模型公式,进行最小二乘分析。式中 y_{ij} 为某性状第 i 个标记第 j 个个体的观测值; μ 为试验观测的所有个体的平均值(即总体平均值); a_i 为第 i 个标记的效应值; e_{ij} 为随机误差。

2 结果与分析

2.1 草鱼 GSTR 基因序列扩增结果

根据设计引物对 GSTR 基因进行扩增,扩得片段条带清晰,特异性好,将测序结果与草鱼 GSTR 基因(EU107283) cDNA 序列比对,该引物共扩得 553 bp,其中外显子 1、内含子 1、外显子 2 序列长度分别为 168、153、232 bp,且内含子与外显子边界符合 GT-AG 规则。

2.2 草鱼 GSTR 基因 SNPs 位点分析

将测序结果进行比对分析,发现存在 2 个多态位点。在外显子 1 第 129 个碱基处(以起始密码子 ATG 始),存在 C-T 突变,突变比例为 T: N=11: 2(N 为 TC 杂合型),未测得 CC 型(图 1-A)。外显子 2 上第 192 碱基处存在 C-T 突变,突变比例为 T: C: N=7: 5: 2(图 1-B)。经序列分析 C+129T 位点密码子改变类型为 CAC-CAU,编码组氨酸(His),位于草鱼 GSTR 基因氨基酸序列的第 43 个氨基酸;C+192T 位点的密码子改变类型为 GAC-GAU,编码天冬氨酸(Asp),位于第 64 个氨基酸,该 2 个突变位点均未造成氨基酸改变(表 1)。

2.3 草鱼 GSTR 基因 SNPs 位点基因型检测

采用限制性内切酶 Sdu I (酶切位点为 GDGCH \downarrow C, D 代表 A、G、T; H 代表 A、C、T)对 C+129T 位点多态性进行酶切验证,该序列存在 3 个公共酶切位点,经酶切出现 3 种基因型,分别命名为 CC 型(79,6,91,37,228 bp),TC 型(79,6,128,91,37,228 bp)和 TT 型(79,6,128,228 bp)(图 2),因 37 和 6 bp 片段较小,电泳中在 Marker 的最小片段下方,在此图中未能标识。用限制性内切酶 Mbo I (酶切位点为 \downarrow GATC)对 C+192T 位点的多态性进行酶切验证,该序列上存在 1 个公共酶切位

表 1 草鱼 GSTR 基因外显子 1 和外显子 2 上的多态位点

Table 1 Polymorphisms of exon 1 and exon 2 in GSTR gene of grass carp

位置(相对起始 ATG) Position (relative to ATG)	碱基突变类型 Base mutation type	密码子类型 Codon type	氨基酸 Amino acid	突变类型 Mutation type
C+129T	C-T	CAC-CAU	His	同义 Synonymous
C+192T	C-T	GAC-GAU	Asp	同义 Synonymous

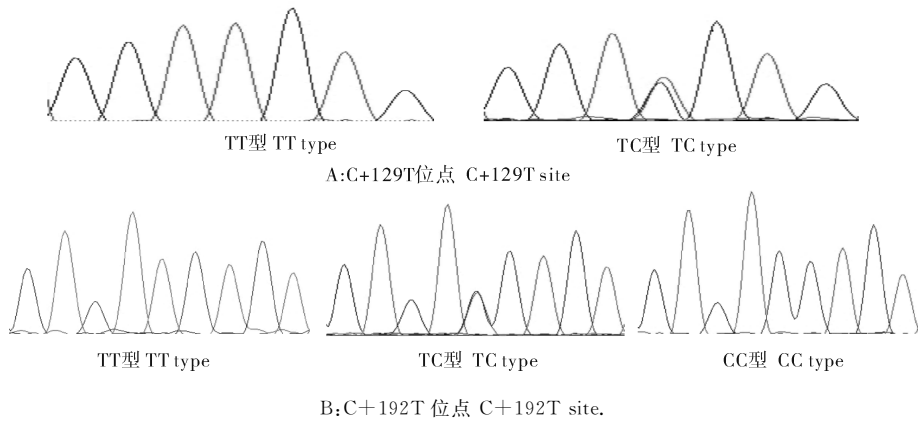
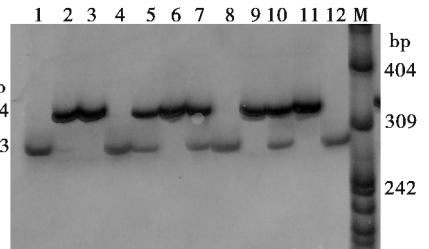


图 1 草鱼 *GSTR* 基因 C+129T 和 C+192T 位点测序峰图

Fig. 1 DNA sequencing map of C+129T site and C+192T site in *GSTR* gene of grass carp

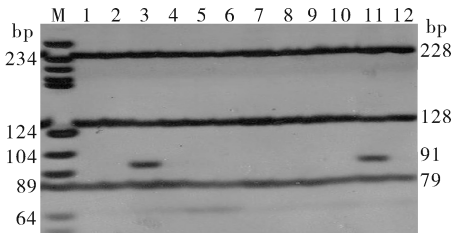
点,经酶切后出现 3 种基因型:分别命名为 CC 型(107,334 bp)、TC 型(334,107,283,51 bp)和 TT 型(107,283,51 bp)(图 3),因酶切后片段长度相差较远,此图仅截取 3 种基因型中含有能表示不同基因型的特异条带,107 和 51 bp 带在该图中未标识。



M: Marker pBR322 DNA/*Msp* I, 2,3,6,9,11 为 CC 基因型; 5,7,10 为 TC 基因型; 1,4,8,12 为 TT 基因型。M: Marker pBR322 DNA/*Msp* I; 2,3,6,9,11: CC genotype; 5,7,10: TC genotype; 1,4,8,12: TT genotype.

图 3 草鱼 *GSTR* C+192T 位点 *Mbo* I 酶切电泳图谱

Fig. 3 SNPs-C+192T demonstrated by *Mbo* I PCR-RFLP in *GSTR* of grass carp



M: pBR322 DNA/*Bsu*RI marker; 泳道 3,11 为 TC 基因型; 泳道 1,2,4~10,12 为 TT 基因型。M: pBR322 DNA/*Bsu*RI marker; 3, 11: TC genotype; 1,2,4-10,12: TT genotype.

图 2 草鱼 *GSTR* C+129T 位点 *Sdu* I 酶切电泳图谱

Fig. 2 SNPs-C+129T demonstrated by *Sdu* I PCR-RFLP in *GSTR* of grass carp

2.4 草鱼 *GSTR* 基因 SNPs 位点在群体中的分布

GSTR 基因 C+129 T 位点和 C+192T 位点 3 种基因型及其等位基因频率的统计结果见表 2。在 144 个样本中,C+129 T 位点 TT 型最多,TC 型居中,CC 型比例低,只有 1 个个体,T 为优势等位基

表 2 草鱼 *GSTR* 基因突变位点基因型及其等位基因频率

Table 2 Genotype and allele frequency of *GSTR* gene SNPs of grass carp

基因名称 Gene name	位点 Site	样品数 Number	基因型频率(个体数)/%			等位基因频率/%	
			Genotype frequency(Number)			Allele gene frequency	
			TT	TC	CC	T	C
<i>GSTR</i>	C+129T	144	80.56(116)	18.75(27)	0.69(1)	89.93	10.07
	C+192T	142	26.06(37)	48.59(69)	25.35(36)	50.35	49.65

因。C+192T 位点以 TC 型居多,约占 50%,TT 型和 CC 型比例相差不大,T、C 基因频率基本相当。

2.5 草鱼多态位点密码子及编码氨基酸与 12 种鱼类的比较

把草鱼 *GSTR* 基因上的 2 个多态位点对应的密码子和氨基酸与 5 种鲤科鱼类(鲮、鲢、鲤、鲫、斑

马鱼)和 7 种鲈形目鱼类(斑马鱼、斜带石斑鱼、真鲷、金头鲷、斑鳢、鳊、大口黑鲈、尼罗罗非鱼)进行比较,结果见表 3。草鱼 *GSTR* 基因 C+129T 位点对应的密码子有 CAC 和 CAU 两种类型,其他 12 种鱼类在该处的密码子为 CAC,编码 His。草鱼 C+192T 位点对应的密码子有 GAC 和 GAU 两种类

表 3 草鱼 GSTR 多态位点密码子与 12 种鱼类的比较

Table 3 The codons of SNPs in GSTR gene of grass carp compared with other 12 species

物种 Species	C+129T 位点密码子 C+129T site codons	C+192T 位点密码子 C+192T site codons
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	CAC-CAU	GAC-GAU
鳊 <i>Aristichthys nobilis</i>	CAC	GAC
鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	CAC	GAC
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	CAC	GAC
鲫 <i>Carassius auratus</i>	CAC	GAC
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	CAC	GAG
斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>	CAC	GAC
真鲷 <i>Pagrosomus major</i>	CAC	GAC
金头鲷 <i>Sparus aurata</i> Linnaeus	CAC	GAC
斑鳢 <i>Channa maculata</i>	CAC	GAC
鳊 <i>Siniperca chuatsi</i>	CAC	GAC
大口黑鲈 <i>Micropterus salmoides</i>	CAC	AAC
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	CAC	AAC

型,与鳊、鲢、鲤、鲫 4 种鲤科鱼类的一致,编码 Asp; 斑马鱼在该处的密码子为 GAG,编码 Glu,与其他鱼类均不同。鲈形目中斜带石斑鱼、真鲷、金头鲷、斑鳢、鳊这 5 种鱼类在该处的密码子是 GAC;大口黑鲈和尼罗罗非鱼在该处的密码子是 AAC,编码 Asn,与其他 10 种鱼类所编码的氨基酸不同。

2.6 GSTR 基因多态性与草鱼生长性状关联分析

将 2 个 SNPs 位点不同基因型与草鱼的体质量、体长、体高、头长、尾柄长和尾柄高 6 个主要生长性状进行一般线性模型(GLM)分析,结果见表 4。C+129T 位点 TT 型 6 个生长性状的均值都高于 TC 型,但未达到显著水平($P>0.05$),CC 型个体其 6 项指标均值比 TT 型和 CC 型低,因只有 1 个样本,未进行统计学分析。C+192T 位点 TT 型的 6 个生长性状的均值最高,CC 型的各项指标均值最低,关联分析表明,TT 型与 TC 型和 CC 型的体质量均值存在显著差异($P<0.05$)。将 2 个突变位点不同基因型组合成 6 种双倍型,结果见表 5。D1 型的体质量均值最高,D6 型的体质量均值最低,D1 型与 D3 型和 D6 型的体质量均值存在显著差异($P<0.05$)。

表 4 草鱼 GSTR 基因 C+129T 和 C+192T 位点不同基因型的生长性状的关联分析¹⁾

Table 4 Association of SNPs in GSTR gene polymorphisms with growth traits of grass carp

SNPs 位点 SNPs site	基因型 Genotype	体质量/g Body mass	体长/cm Body length	体高/cm Body height	头长/cm Head length	尾柄长/cm Caudal peduncle length	尾柄高/cm Caudle peduncle height
C+129T	TT	1 305.34±31.75	42.52±0.41	9.84±0.10	9.21±0.09	7.30±0.08	4.70±0.05
	TC	1 218.28±65.25	41.24±0.84	9.56±0.21	8.96±0.19	7.16±0.17	4.54±0.11
	TT	1 403.5±55.07 a	42.94±0.72	9.94±0.18	9.34±0.17	7.37±0.15	4.76±0.09
C+192T	TC	1 252.8±40.32 b	41.99±0.53	9.72±0.13	9.08±0.12	7.21±0.11	4.64±0.07
	CC	1 228.2±55.84 b	42.02±0.73	9.71±0.18	9.10±0.17	7.27±0.15	4.62±0.09

1)表中数值为平均值±标准误差,同一列字母不同表示差异显著($P<0.05$)。下同。Values with different superscript letters within a column indicates significant difference at $P<0.05$. The same as below.

表 5 草鱼 GSTR 基因不同双倍型与草鱼生长性状的关联分析

Table 5 Association of GSTR gene diplotype with growth traits of grass carp

双倍型 Diplotype	SNPs 位点		频率/% Frequency	体质量/g Body mass	体长/cm Body length	体高/cm Body height	头长/cm Head length	尾柄长/cm Caudal peduncle length	尾柄高/cm Caudle peduncle height
	C+192T	C+129T							
D1	TT	TT	22.70	1 409.51±59.55 a	42.97±0.78	9.93±0.20	9.28±0.18	7.37±0.16	4.77±0.10
D2	TT	TC	3.55	1 365.16±150.66 ab	42.75±1.97	10.02±0.49	9.72±0.45	7.38±0.40	4.68±0.25
D3	TC	TT	41.13	1 258.36±44.23 b	42.15±0.58	9.78±0.15	9.15±0.13	7.22±0.12	4.67±0.07
D4	TC	TC	7.80	1 223.58±101.57 ab	41.11±1.33	9.48±0.33	8.70±0.30	7.19±0.27	4.50±0.17
D5	CC	TT	17.02	1 280.00±68.77 ab	42.80±0.90	9.87±0.23	9.25±0.21	7.40±0.18	4.68±0.11
D6	CC	TC	7.80	1 146.22±101.57 b	40.69±1.32	9.44±0.33	8.87±0.30	7.02±0.27	4.50±0.17

3 讨论

不同物种的基因在密码子使用上存在着明显的

偏性,不同功能的基因,其密码子使用偏性也存在着较大差异^[9-12]。tRNA 的种类及含量不同是生物长期进化过程中根据外界压力而选择的结果^[13-15]。

Ikemura^[16] 研究发现,同义密码子的使用频率与细胞质中对应的 tRNA 丰度呈正相关,tRNA 丰度越高,蛋白质翻译效率和准确性越高。将草鱼 *GSTR* 基因多态位点处的密码子与 12 种鱼类 *GSTR* 基因对应位点比较,发现 C+129T 位点处的密码子趋于一致,为 CAC,编码 His;C+192T 位点处有 4 种密码子,编码 3 种氨基酸: Asp、Asn 和 Glu,5 种鲤科鱼类除斑马鱼外,都编码 Asp,鲈形目中的大口黑鲈和尼罗罗非鱼在该位点处编码 Asn,可见该位点处密码子使用在不同目的鱼类中有一定的偏性。C+129T 位点位于草鱼 *GSTR* 基因编码的氨基酸序列第 43 个氨基酸处,草鱼在该位点处 TT 型比例约 80%,且 6 项生长性状均值均高于 TC 型,CC 型个体只有 1 个,其值低于 TT 型和 TC 型,从以上结果推测草鱼该位点密码子的改变,对草鱼生长有促进作用,*T* 为有利等位基因。C+192T 位点对应的密码子编码草鱼 *GSTR* 基因氨基酸序列的第 64 个氨基酸,TT 型体质量均值比 TC 型和 CC 型个体高,且差异显著,推测该位点的突变对草鱼的生长也有促进作用,*T* 为有利等位基因。C+129T 位点反密码子由 GUA 突变为 GUG,C+192T 位点反密码子由 CUA 突变为 CUG,该 2 个突变位点的存在,改变了在翻译过程中 tRNA 的使用。本试验中发现的 2 个同义突变虽然不导致基因编码氨基酸的改变,但有可能影响 mRNA 的合成、成熟、运输及翻译,最终导致功能的变化^[17],可能对草鱼该基因表达水平产生了一定影响,最终对草鱼生长有影响。

单倍型(haplotype)是指位于一条染色体上或某一些区域的一组相关联的 SNP 位点,它包含着多个 SNPs 的遗传信息。由于不同的 SNPs 之间存在着相互作用,因而由单倍型构成的双倍型比单倍型 SNPs 能够提供更多而准确的信息^[18]。对草鱼双倍型分析结果显示:D1 型的体质量均值最高,D6 型的体质量均值最低,且 D1 型与 D3 型和 D6 型在体质量均值存在显著差异,该相关性与 C+192T 位点单独分析时有一定的联系,即当 C+192T 位点为 TT 的 2 种单倍型(D1 和 D2 型),其体质量均值较高,而该位点为 CC 的 2 种双倍型(D5 和 D6 型)其值最低,且该 6 种双倍型的生长性状均值有依次降低的趋势(由于 C+129T 位点 TC 型比例较少,导致 D4 型的频率较低,与 D5 型的生长性状均值相比较小,在统计上存在一定的误差,对该趋势有一点影响)。D1 型的体质量均值比 C+192T 位点 TT 型高,D6

型体质量均值比 C+192T 位点 CC 型更低,由以上分析可以发现,2 个位点都是有利基因型的双倍型,其 6 项生长性状的均值比只含 1 个位点为有利基因型的双倍型要高;当 2 个位点都是不利基因型时其 6 项生长性状的均值最低,通过数据比较发现这 2 个位点对生长性状的联合作用中,C+192T 位点的作用较大。

微囊藻毒素在水体中普遍存在,鱼类通过摄食浮游藻类或含毒素的浮游动物会在肝脏、胃、鳃中富集毒素,鱼类对毒素通常比较敏感,较低浓度的毒素积累即可造成鱼类死亡,有研究发现谷胱甘肽转移酶基因表达越多的鱼类对微囊藻毒素的抵抗力越强^[19-20]。草鱼 *GSTR* 基因外显子上的同义突变对草鱼生长的有利作用,可能与突变后草鱼 *GSTR* 基因的表达量提高有一定的关系,目前尚需进一步的研究。本研究发现了 *GSTR* 基因上 2 个 SNP 位点,并与草鱼的生长性状存在一定的相关性,因此可以考虑将 *GSTR* 基因作为影响草鱼生长性状的候选因子,将这 2 个位点作为标记,应用于草鱼的分子辅助育种。

参 考 文 献

- [1] 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,2005,24(11):42-45.
- [2] RAFALSKI J A. Application of single nucleotide polymorphisms in crop genetics[J]. Current Opinion in Plant Biology,2002,5(2):94-100.
- [3] STOREY K B. Oxidative stress: animal adaptations in nature [J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 1996,29:1715-1733.
- [4] 方允中,李文杰. 自由基与酶[M]. 北京:科学出版社,1989:133-142.
- [5] 周玫,陈媛. 谷胱甘肽过氧化物酶[J]. 生物化学与生物物理进展,1985(3):27-30.
- [6] 王咏梅. 自由基与谷胱甘肽过氧化物酶[J]. 解放军药学报,2005,21(5):369-371.
- [7] 杨海灵,聂力嘉,朱圣庚,等. 谷胱甘肽硫转移酶结构与功能研究进展[J]. 成都大学学报,2006,25(1):19-23.
- [8] HAO L, XIE P, FU J, et al. The effect of cyanobacterial crude extract on the transcription of GST mu, GST kappa and GST rho in different organs of goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Aquatic Toxicology,2008,90:1-7.
- [9] CHIAPPELLO H, LISACEK F, CABOCHE M, et al. Codon usage and gene function are related in sequences of *Arabidopsis thaliana* [J]. Gene,1998,209(1/2):1-38.
- [10] POWELL J R, SEZZI E, MORIYAMA E N, et al. Analysis of a

- shift in codon usage in *Drosophila* [J]. *Molecular Evolution*, 2003, 57: 214-225.
- [11] POWELL J R, MORIYAMA E N. Evolution of codon usage bias in *Drosophila* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94 (15): 7784-7790.
- [12] LIU Q, DOU S, JI Z, et al. Synonymous codon usage and gene function are strongly related in *Oryza sativa* [J]. *Biosystems*, 2005, 80(2): 123-131.
- [13] MORIYAMA E N, POWELL J R. Gene length and codon usage bias in *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(13): 3188-3193.
- [14] IKEMURA T. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms [J]. *Mol Biol Evo*, 1985(2): 13-35.
- [15] ANTEZANA M A, KREITMAN M. The nonrandom location of synonymous codons suggests that reading frame - independent forces have patterned codon preferences [J]. *Mol Evol*, 1999, 49(1): 36-43.
- [16] IKEMURA T. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes [J]. *Mol Biol*, 1981, 146(11): 1-21.
- [17] SHEN L X, BASILION J P, STANTON J R V P, et al. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 7871-7876.
- [18] STEPHENS M, SMITH N, DONNELLY P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data [J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68: 978-989.
- [19] 廖婉琴, 梁旭方, 王琳, 等. 鲢鱼可溶性谷胱甘肽 S-转移酶 (sGST) 基因 cDNA 全序列与 5' 调控区的克隆与分析 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22(6): 470-476.
- [20] LIAO W Q, LIANG X F, WANG L, et al. Molecular cloning and characterization of alpha-class glutathione S-transferase gene from the liver of silver carp, bighead carp, and other major Chinese freshwater fishes [J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2006, 20(3): 114-126.

SNPs in exon 1, exon 2 of *GSTR* gene and its relationship with growth traits in grass carp

LIU Xiao-xian^{1,2} BAI Jun-jie¹ XU Lei³ YU Ling-yun¹ FAN Jia-jia¹ HAN Lin-qiang³

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

2. *College of Life Science and Technology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;*

3. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*

Abstract Primers were designed according to glutathione S-transferase-rho gene from EST database of grass carp. The PCR products were sequenced for detecting polymorphisms in cultured population and two SNPs sites were found: C+129T in exon 1 and C+192T in exon 2. Both SNPs are synonymous mutation. The polymorphisms were genotyped by PCR-RFLP methods. The percentage of CC, TC and TT genotype in C+129T site was 0.69%, 18.75% and 80.56%, respectively. The percentage of CC, TC, and TT genotype in C+192T site was 25.4%, 48.6% and 26.1%, respectively. A general linear model was used to analyze relationship between *GSTR* gene polymorphisms and 6 major growth traits. The results indicated that the average value of growth character TT genotype was higher than that of TC genotype in C+129T site, although no significant difference was observed. The average body weight of TT genotype was higher than that of TC and CC genotype in C+192T site ($P < 0.05$). Six diplotypes were constructed based on two SNPs in the experiment population and the average body weight of diplotype D1 was higher than that of D3 diplotypes and D6 diplotypes ($P < 0.05$). *GSTR* gene could be recommended as a candidate gene for characterizing grass carp growth traits which could be useful for molecular breeding.

Key words grass carp; SNPs; glutathione S-transferase; *GSTR*; polymorphisms; growth

(责任编辑:边书京)