

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00407

鲤鱼乳酸脱氢酶活性的 QTL 检测

毛瑞鑫^{1,2}, 刘福军^{1,3}, 张晓峰¹, 张研^{1,2}, 曹顶臣¹, 鲁翠云¹, 梁利群¹, 孙效文¹

1. 中国水产科学院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 200090;

3. 大连水产学院生命科学与技术学院, 大连 116023

摘要: 利用 SSR 分子标记结合“拟测交”策略, 以荷包红鲤抗寒品系和柏氏鲤远缘杂交所产生 F₁ 代为亲本及其 F₂ 代为作图群体, 应用 Windows Map Manager 2.0 软件的标记回归法进行乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)活性数量性状基因座单标记定位分析。在乳酸脱氢酶性状的标记回归研究中, 共发现 12 个标记与 LDH 性状关联, 对性状的贡献率为 4.00%~10.00%, 其中 HLJE222 达到极显著水平($P<0.01$)。为了进一步验证, 利用已有的生物信息学工具, 将与性状连锁的 EST 序列与公共数据库中的核酸序列进行同源搜索分析, 发现标记 HLJE222 的 EST 序列与斑马鱼 DAZ associated protein 1 的 mRNA 序列相匹配(相似性为 94%), 与公共数据库中的已知蛋白序列进行相似性比较, 同样发现 HLJE222 的 EST 与斑马鱼 DAZ associated protein 1 相匹配(相似性为 97%)。结果表明 HLJE222 位点与影响乳酸脱氢酶活性相关的基因连锁。

关键词: 鲤鱼; 标记回归分析; 乳酸脱氢酶; 拟测交策略; EST-SSR

Studies on quantitative trait loci related to activity of lactate dehydrogenase in common carp (*Cyprinus carpio*)

MAO Rui-Xin^{1,2}, LIU Fu-Jun^{1,3}, ZHANG Xiao-Feng¹, ZHANG Yan^{1,2}, CAO Ding-Chen¹, LU Cui-Yun¹, LIANG Li-Qun¹, SUN Xiao-Wen¹

1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China;

3. College of Life Science and Technology, Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China

Abstract: Microsatellite markers were used to make marker regression analysis on activity of lactate dehydrogenase based on double pseudo-testcross strategy using Windows Map Manager 2.0 software. The parents that came from the cross between progenies of Hebao-cold tolerance red carp and Barbless carp and F₂ progenies were used as segregating populations. For marker regression, a total of 12 markers associated with activity of lactate dehydrogenase were significant at $P<0.05$ and HLJE222 was significant at $P<0.01$. The variance explained by these loci, ranged from 4.00% to 10.00%. Locus HLJE222 was closely linked to the gene related to activity of lactate dehydrogenase of common carp. For further identification, EST-SSR markers were used to screen the protein and nucleotide database using bioinformatics tools in order to find the homologies. High sequence similarities of HLJE222 marker were observed with the nucleotide sequence of DAZ associated protein 1 mRNA of zebrafish (94%), and protein sequence of DAZ associated protein 1 (97%). DAZ protein is one

收稿日期: 2008-09-10; 修回日期: 2008-11-16

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: 2004CB117405)资助

作者简介: 毛瑞鑫(1983-), 男, 硕士研究生, 专业方向: 水产动物遗传育种。E-mail: maoruixin132@163.com

通讯作者: 孙效文(1955-), 男, 研究员, 研究方向: 水产动物遗传育种。E-mail: sunxw2002@163.com

of the short chain dehydrogenases, which is an important enzyme in the process of glucose metabolism in the organisms. This family contains a wide variety of dehydrogenases. This indicates that locus *HLJE222* was closely linked to the gene associated with activity of lactate dehydrogenase of common carp.

Keywords: common carp(*Cyprinus carpio*); marker regression; lactate dehydrogenase; double pseudo-testcross strategy; EST-SSR

鲤鱼的重要性状如生长速度、肉质、抗逆性等,都属于数量性状。与质量性状不同,数量性状受多基因控制,遗传基础复杂,而易受环境影响,表现为连续变异,控制数量性状的基因在基因组中的位置称为数量性状基因座(QTL)^[1]。

乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)是在细胞内催化乳酸氧化成丙酮酸的重要酶,其在组织中的活力大大高于血液中的活力,当机体各组织器官病变时,其组织器官本身的LDH要发生变化,同时也可引起血液中LDH的改变,若血液中LDH活力升高则预示着肝脏、肾脏和肌肉等组织细胞结构发生改变、受到损伤,这些指标在评价鱼类健康方面具有重要意义^[2]。所以,对乳酸脱氢酶活性进行QTL定位,找到与QTL连锁的分子标记,从而根据乳酸脱氢酶活性来评价鱼类健康与否。将分子标记辅助选择用于育种实践,可大大增强对数量性状的遗传操纵能力,提高育种中对数量性状优良基因型的选择效率。目前,鲤鱼遗传连锁图谱以及数量性状QTL的研究已有一些进展,但是对乳酸脱氢酶活性数量性状定位的研究还未见报道。Tanck等^[3]利用双单倍体(DH)家系,使用 11 个微卫星标记,对体重、体长、细胞膜上的葡萄糖和乳酸盐水平进行了单标记的QTL分析,筛选到 1 个与体重关联的标记(*MFW050*)和 2 个与细胞膜上葡萄糖水平关联的微卫星标记(*MFW001* 和 *MFW002*)。Sun等^[4]利用耐寒的黑龙江鲤与不耐寒大头鲤杂交的单倍体家系构建了鲤鱼的第一张遗传连锁图谱,并筛选到 4 个与耐低温性状关联的RAPD标记(*5N1451c*, *10C900c*, *10C1300c* 和 *19C1200c*)。张研等^[5]利用人工雌核发育群体对体长性状进行了QTL分析。随着遗传连锁图谱标记密度的增加,找到这些基因并定位逐渐成为可能,为实现分子标记辅助育种迈进了很重要的一步。

目前,水产动物基因组作图已有很大进展,但

与在陆生动物及植物基因组图谱方面已取得的成果相比,水产动物的遗传连锁图谱的研究及应用还不够深入广泛,主要表现在作图群体选择难度大。近年来在林木的图谱构建中发展出来一种策略,即以亲缘关系相对较远的杂合亲本交配所得的 F_1 为作图群体,因亲本杂合,许多位点在 F_1 中即发生分离,选取在亲本中多态且在 F_2 中以 1:1 分离的位点来模拟近交系中的测交位点作图,这种作图方法称为拟测交策略^[6,7]。对于在性状上有明显差异而又难获得近交系的远源杂交生物而言,拟测交策略正好避免水产动物遗传连锁图谱研究过程中遇到的问题,可在较短的时间内建立作图群体。

本实验利用荷包红鲤抗寒品系和柏氏鲤杂交 F_2 家系为作图群体,结合微卫星技术,通过拟测交策略,对乳酸脱氢酶活性进行了单标记的 QTL 分析,筛选到 12 个与乳酸脱氢酶活性关联的标记,其中 *HLJE222* 达到极显著水平($P<0.01$),利用已有的生物信息学工具,进一步证实 *HLJE222* 位点与影响乳酸脱氢酶活性相关的基因连锁。

1 材料和方法

1.1 材料

实验家系以荷包红鲤抗寒品系和柏氏鲤为亲本,交配产生 F_1 代, F_1 代 1-1 交配产生 F_2 代,对性状明显分离的 92 个 F_2 代个体进行表型和基因型分析。

1.2 方法

1.2.1 乳酸脱氢酶活性的度量

乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒购于南京建成生物技术有限公司。酶活性处理和测定按照试剂盒说明书进行操作。反应后采用分光光度计在 440 nm 光波条件下,测各肌肉组织反应吸光度,即 OD 值,根据公式:

组织中的LDH活力
(U/gprot) = (测定管OD值 - 测定空白管OD值)

$\times A^* \div \text{样品取样量}(\text{mL}) \div \text{蛋白浓度}(\text{gprot/mL})$

其中: * U/gprot=单位/克蛋白, A^* 为标准曲线斜率倒数, 本所提供的 A 值为 0.380。

1.2.2 基因型测定

采用PCR扩增方法对重组家系群体进行基因型检测。引物来自: (1)本实验室鲁翠云开发的20个微卫星标记; (2)来自于NCBI数据库的40个EST系列微卫星标记, 所有引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 生化试剂均购自美国Promega公司, 其他试剂为国产分析纯。PCR反应程序为: 94 预变性 3 min; 然后 94 变性 20 s, 复性温度 48~65 20 s, 72 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72 延伸 10 min。用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测每个个体的基因型。

1.2.3 QTL 分析

选用在 F_2 代个体中具有多态性且在 F_2 中以 1:1 分离的分子标记, 应用 Windows Map Manager2.0 软件, 进行标记回归分析, 采用最大似然比法, 以 $P=0.05$ 作为阈值检测单一分子标记与性状的关联程度。

2 结果与分析

2.1 微卫星标记分析与乳酸脱氢酶活性测定结果

从 F_2 代中随机抽取 10 个个体用于扫描微卫星标记的多态性, 其中多态性至少在 10% 以上的微卫星基因座可以用于连锁图谱建立和 QTL 分析的候选

标记, 然后从候选标记中选用在 F_2 中以 1:1 分离的分子标记, 应用 Windows Map Manager2.0 软件, 进行单标记回归分析。乳酸脱氢酶活性平均为 $2\,409.563 \pm 1\,037.275$ U/gprot。图 1 显示利用微卫星 *HLJE222* 对 92 个样本的扩增结果。

2.2 QTL 单标记定位结果

通过对这 60 个多态性微卫星标记与 LDH 性状单标记回归分析, 结果表明(表 1): *HLJE222* 等 12 个基因座与该性状显著关联($P<0.05$), 解释了表型变异型的 4%~10%, 其中 *HLJE222* 基因座与该性状极显著关联($P<0.01$), 解释了表型变异型的 10.00%。说明这些基因座可能与影响 LDH 活性相关的基因连锁, 可作为评价鱼类健康方面的指标, 进而作为分子标记辅助育种应用的可选对象。

2.3 定位结果分析

利用 NCBI 的 BLAST(Basic Local Alignments Search Tool)软件, 将单标记回归分析所获 EST 与公共数据库中的核酸序列进行相似性比较, 发现 *HLJE222* 的 EST 与斑马鱼 DAZ associated protein 1 的 mRNA 同源(相似性为 94%); 与公共数据库中的已知蛋白序列进行相似性比较, 同样发现 *HLJE222* 的 EST 与斑马鱼 DAZ associated protein 1 同源(相似性为 97%)。DAZ associated protein 1 是一种短链脱氢酶, 是生物体细胞内糖代谢过程的重要酶, 短链脱氢酶是一个大的酶家族, 这个家族包括各种各样的脱氢酶, 如 NAD^+ 和 NADP^+ 。LDH 是结合类酶, 其

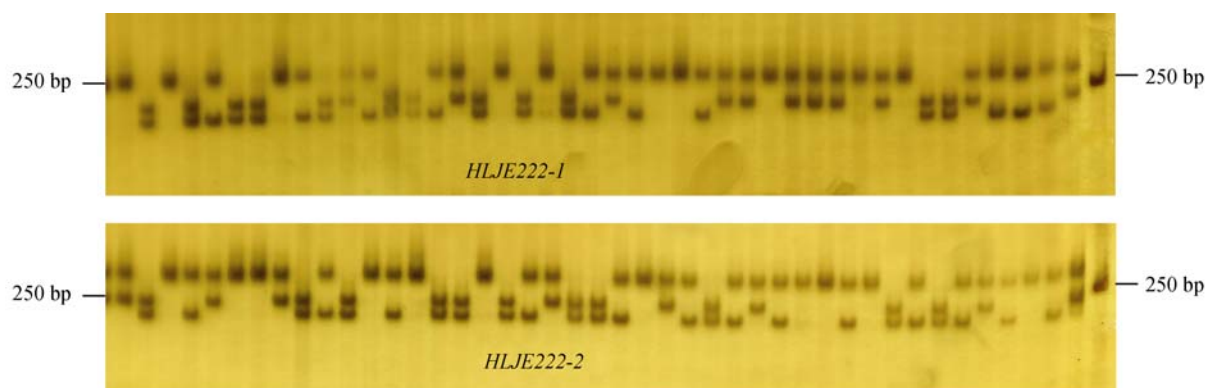


图 1 微卫星基因座 *HLJE222* 在 92 个样本的扩增结果

表 1 标记回归分析结果及遗传效应估计

微卫星基因座	GenBank 登录号	似然比例 (LR)	解释表型变异 (%)	显著水平 (<i>P</i>)	加性效应
<i>HLJ1144</i>	EU861324	5.5	6	0.01941	5.38
<i>HLJ1123</i>	EU861317	4.3	5	0.03865	4.78
<i>HLJ1211</i>	EU861342	5.1	5	0.02358	5.40
<i>HLJ1230</i>	EU861343	4.0	4	0.04610	5.35
<i>HLJE324</i>	GI158826064	6.2	6	0.01306	-5.77
<i>HLJE518</i>	GI158908314	6.5	7	0.01104	-6.92
<i>HLJE335</i>	GI158826292	5.1	5	0.02390	-4.80
<i>HLJE547</i>	GI158908819	4.7	5	0.02935	-4.63
<i>HLJE339</i>	GI158826332	5.5	6	0.01886	-5.01
<i>HLJE547</i>	GI158908819	4.7	5	0.02935	4.63
<i>HLJE222*</i>	GI158824544	9.6	10	0.00196	-7.61
<i>HLJE229</i>	GI158824628	4.6	5	0.03263	4.54

*代表显著水平为 $P < 0.01$ 。

辅酶为尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH+H⁺)。由此,我们推测生物体作用 NADH 来影响乳酸脱氢酶的活性。结果表明 *HLJE222* 基因座与影响乳酸脱氢酶活性相关的基因连锁。

3 讨论

3.1 “拟测交”理论的应用

拟测交策略最早应用于遗传组成高度杂合,自交不亲的林木等多年生异交植物,多以两杂合亲本杂交得到的F₁代作为试验群体。由于鲤鱼的基因组存在着广泛的基因复制现象^[8,9],远缘杂交的F₁代鲤鱼群体难以成为理想的试验群体。本实验以荷包红鲤抗寒品系和柏氏鲤远缘杂交所产生F₁代作为亲本, F₂代作为作图群体,避免鲤鱼遗传连锁图谱研究过程中遇到的上述问题,可在较短的时间内建立作图群体。尽管本研究构建鲤鱼的遗传图谱标记数量有限,但是它采用了全新的技术路线,从而在相对短的时间内为鲤鱼遗传连锁图谱的构建奠定了基础,使目的基因的定位成为可能,为实现分子标记辅助育种迈进一步。

3.2 EST 标记在 QTL 定位中的作用

EST是基因组中可表达的部分,携带着完整基因的某些片段。由于EST序列包含了基因可编码蛋

白的显子区域,因此,可将基因组序列直接与EST数据库进行比较。如果该EST序列与公共数据库中的核酸序列以及已知蛋白序列存在同源序列,可对该EST所代表基因的功能进行分析及鉴定^[10,11]。本研究用标记数量有限,无法构建连锁群和进行QTL区间定位,但是利用单标记回归分析,发现12个标记与鲤鱼乳酸脱氢酶活性显著关联,为鲤鱼遗传连锁图谱的构建奠定了基础。利用已有的生物信息学工具,将关联的EST-SSR标记与公共数据库中的核酸序列以及已知蛋白序列进行相似性搜索分析^[12],结果发现与鲤鱼乳酸脱氢酶活性极显著关联的EST(*HLJE222*),与斑马鱼DAZ associated protein 1的mRNA同源,DAZ蛋白是一种短链的脱氢酶,是生物体细胞内糖代谢过程的重要酶。这说明此基因座与控制乳酸脱氢酶活性相关的基因连锁,可以作为评价鱼类健康的指标之一。标记回归分析中达显著水平的标记可以说明这些标记与特定性状间可能存在关联,而几个基因座同时与一个性状关联,说明这些基因座存在着多因一效的现象^[13],但由于还没有其他鲤鱼乳酸脱氢酶的QTL定位结果可以比较,本实验所得的其他遗传标记还有待进一步的分析和验证。

标记-性状连锁分析是根据标记位点基因型以及数量性状的表型对个体进行显著性检验,差异显

著则说明标记与数量性状存在关联, 其遗传基础可能是该标记与控制性状的QTL或主基因连锁。因此, 如果一个群体内或两个群体间的性状差异显著或差异很大是可以通过标记与性状的关联分析, 找出与性状相关的标记, 这种相关性的发现对于选种是十分有利的, 可以提高选种的准确性和加快育种进程, 从而为标记辅助选择育种提供重要工具^[14, 15]。

参考文献(References):

- [1] 徐云碧, 朱立煌. 分子数量遗传学. 北京: 中国农业出版社, 1994.
- [2] 陈思种, 陈芳. 关于乳酸脱氢酶的学习和总结. 卫生职业教育, 2008(2): 71-72.
- [3] Tanck MWT, Palstra AP, van de Weerd, van de Weerd M, Leffering CP, van der Poel JJ, Bovenhuis H, Komen J. Segregation of microsatellite alleles and residual heterozygosity at single loci in homozygous androgenetic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Genome*, 2001, 44(5): 743-751. [\[DOI\]](#)
- [4] Sun X, Liang L. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and mapping of a locus associated with cold tolerance. *Aquaculture*, 2004, 238(1): 165-172. [\[DOI\]](#)
- [5] 张研, 梁利群, 常玉梅, 侯宁, 鲁翠云, 孙效文. 鲤鱼体长性状的 QTL 定位及其遗传效应分析. 遗传, 2007, 29(10): 1243-1248.
- [6] 岳志芹, 王伟继, 孔杰, 戴继勋, 王清印. AFLP 分子标记构建中国对虾遗传连锁图谱的初步研究. 高技术通讯, 2004, 5: 88-93.
- [7] 刘贤德, 刘晓, 张国范. 皱纹盘鲍遗传图谱构建及生长相关性状的 QTL 定位[学位论文]. 中科院海洋研究所, 2005.
- [8] Zhang Y, Liang LQ, Jiang P, Li DY, Lu CY, Sun XW. Genome evolution of common carp (*Cyprinus carpio*) as revealed by the analysis of microsatellite loci in a gynogenetic family. *J Genet Genomics*, 2008, 35(2): 97-103. [\[DOI\]](#)
- [9] David L, Jinggui F, Palanisamy R, Hillel J, Lavi U. Polymorphism in ornamental and common carp strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by AFLP analysis and a new set of microsatellite markers. *Mol Gen Genomics*, 2001, 266(3): 353-362. [\[DOI\]](#)
- [10] 李桂源, 钱骏. 基于 www 的生物信息学应用指南. 长沙: 中南大学出版社, 2004.
- [11] 宋宇轩, 曹斌云. 表达序列标签(ESTs)及其应用. 家畜生态, 25(4): 152-155.
- [12] 钱骏, 董利, 李桂源. 表达序列标签数据库搜索鉴定小鼠 UBAP1 基因及其数字化表达分析. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(2): 323-327.
- [13] 徐鹏, 王慧, 李群, 盖钧镒, 喻德跃. 大豆油分含量 QTL 的定位. 遗传, 2007, 29(1): 92-96.
- [14] 侯宁, 张研, 鲁翠云, 李勇, 李大宇, 季旭, 丁雷, 孙效文. 微卫星 DNA 标记分析德国镜鲤的遗传潜力. 遗传, 2007, 29(12): 1509-1518.
- [15] Maliepaard C, Jansen J, van Ooijen JW. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications. *Genet Res*, 1997, 70(3): 237-250. [\[DOI\]](#)

• 综合信息 •

《中国组织工程研究与临床康复》(CRTER) 杂志 2009 年征订及组稿启事

CRTER 杂志是一本传播组织工程领域一流学术研究成果的专业期刊, 系卫生部主管, 中国康复医学会、《中国组织工程研究与临床康复》杂志主办的国家级学术期刊。ISSN 1673-8225, CN 21-1539/R, 国内外公开发行, 发行代号 8-584, 周刊, 200 页/期, A4 开本, 插图随文, 印刷精致。

CRTER 被美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘》(EM)、SCOPUS 数据库、EMCare 数据库、EMBiology 数据库、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、波兰《哥伯尼索引》(IC)、俄罗斯全俄科学技术信息研究所数据库(VINITI)、中国科技论文统计源期刊、中国中文核心期刊(临床医学类)第 5 版、中国科学引文数据库等收录。

2008 年版中国科技期刊引证报告(核心版), 中国科技论文统计源期刊最新数据显示: CRTER 总被引频次为 5343, 在 1765 种科技期刊中排位第 8 名, 影响因子 0.593, 他引率 0.77, 基金论文比 0.44。

2008 年北大图书馆《中文核心期刊要目总览》(第 5 版): CRTER 为其核心期刊。

2009 年 CRTER 杂志出版重点: 生物材料研究、干细胞研究、组织工程研究、医学植入物与数字化医学研究、器官移植研究。

订阅汇款: 沈阳 1200 邮政信箱 邮编: 110004

网站: www.crter.org, 电话: 024-23384352, 024-23380579