

文章编号: 1674 - 5566(2012)03 - 0351 - 07

镜鲤碱性磷酸酶和酸性磷酸酶 QTL 定位分析

尹森^{1,2}, 于倩^{1,3}, 郑先虎^{1,2}, 于彬彬^{1,3}, 张晓峰¹, 曹顶臣¹, 匡友谊¹,
鲁翠云^{1,2}, 李超¹, 孙效文¹

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 农业部淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 3. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 磷酸酶普遍存在于动物的各组织中, 对磷酸单酯键具有水解活性, 是机体生长代谢、保持内环境稳定和维持机体健康所必需的酶。以镜鲤(*Cyprinus carpio* L.) 全同胞家系 190 个个体为材料, 用 992 对微卫星(SSR) 标记进行基因组扫描, 采用区间作图法, 对肠组织的碱性磷酸酶和酸性磷酸酶进行了 QTL 定位分析。QTL 检测显示: 5 个 QTL 区间与酸性磷酸酶活性相关, 其中 3 个 QTL 为 99% 染色体水平显著性, 分别位于 LG2 (CA2049-CA2371)、LG25 (HLJ2941-HLJ3946) 和 LG28 (CA2263-HLJ2873), 另外两个 QTL 区间为 95% 染色体水平显著性, 位于 LG14 (HLJ3275-CA174) 和 LG14 (CA1276-CA2208), 解释表形变异率范围为 8.1% ~ 38.9%; 2 个与碱性磷酸酶相关的 QTL 区间均为 95% 染色体水平显著性, 分别位于 LG8 和 LG13, 可解释变异率分别为 7.3% 和 7.0%。

研究亮点: 在水产动物中首次以碱性磷酸酶和酸性磷酸酶作为数量性状进行研究, 采用镜鲤全同胞家系的微卫星图谱, 定位出影响磷酸酶活性的 QTL 区间, 拓宽了鲤 QTL 研究范围, 其结果可以为鲤生理生化等性状的 QTL 研究提供参考, 为鲤辅助育种提供依据。

关键词: 酸性磷酸酶; 碱性磷酸酶; QTL; 镜鲤

中图分类号: S 917

文献标志码: A

鲤(*Cyprinus carpio* L.) 是世界上重要的淡水经济鱼类, 种类繁多, 对环境适应性强, 是我国淡水养殖传统的优良对象。目前, 鲤数量性状方面的研究已经取得了很大的进展。在形态学性状方面, 对体长^[1]、体重^[2]、眼径和眼间距^[3] 性状进行了 QTL 定位研究及其遗传效应分析。在生理、生化、品质性状等也有很多报道, 如抗寒^[4]、饲料转化率^[5]、乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH) 活性^[6]、肌纤维切面面积与肌纤维密度^[7] 等。

磷酸酶普遍存在于动物的各组织中, 对磷酸单酯键具有水解活性, 是机体生长代谢、保持内环境稳定和维持机体健康所必需的酶, 根据最适 pH 的不同, 可分为碱性磷酸酶(ALP) 和酸性磷酸

酶(ACP)^[8-10]。ALP 不仅与蛋白质的合成和分泌、甲壳素的分泌和骨骼的钙化^[11] 有关、对胚胎的发育^[12] 也具有重要作用。ACP 除了参与磷酸酯的代谢外, 还参与能量转换以及信号传导等重要生命活动。血液 ALP 在猪^[13]、鼠^[14] 和人类中^[15] 都已经进行了 QTL 定位, 与哺乳动物研究相比, 水生动物 ALP 和 ACP 的研究较多集中于组织学、酶的生化性质等方面。

本研究以镜鲤全同胞家系为材料, 采用 992 个 SSR 标记构建连锁图谱, 首次对碱性磷酸酶和酸性磷酸酶进行 QTL 定位分析, 拓宽了鲤 QTL 研究范围, 其结果可以为鲤生理生化等性状的 QTL 研究提供参考, 以及为鲤辅助育种提供依据。

收稿日期: 2011-10-30

修回日期: 2011-12-20

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2010CB126305); 农业部 948 计划项目(2011 - G12)

作者简介: 尹森(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物遗传育种。E-mail: yinsen86@163.com

通讯作者: 孙效文, E-mail: sunxw2002@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验用鱼由黑龙江水产研究所松浦试验站培育。于 2009 年选取成熟的镜鲤雌性个体 40 尾,雄性个体 20 尾,用 30 对 SSR 标记对其进行遗传背景分析,根据个体亲缘关系进行配组,构建 30 个家系。本研究采用其中一个全同胞家系(190 尾)为材料,饲养 3 个月后,取肠组织用于测定酶活性,鳍条用于提取 DNA。

1.2 酶活性的测定

ALP 和 ACP 用南京建成生物工程研究所研制的试剂盒来测定。ALP 活力单位定义:在 37 ℃ 水浴下每克组织蛋白与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为一个酶活力单位(U)。ACP 活力单位定义:在 37 ℃ 水浴下每克组织蛋白与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为一个酶活力单位(U)。总蛋白用南京建成生物工程研究所研制的考马斯亮蓝蛋白试剂盒测定。

1.3 基因型分析

选取了 992 对 SSR 标记(包括 31 对 EST-SSR)对样本进行了基因型分析,除 5 对是 DAVID 等^[16]发表的 Koi 系列标记外,其余均为本实验室开发。PCR 反应体系为 10 μL,包括 1 × buffer (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.5, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 0.1% Triton X-100) 7.2 μL、上下游引物(10 μmol/L)各 0.25 μL、模板 DNA 1 L、Taq DNA 聚合酶(Promega) 0.5 U,用 ddH₂O 补足体积。PCR 反应程序:94 ℃ 变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,50 ~ 64 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 25 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。扩增产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染后进行基因分型。所有标记的基因型数据采用本实验室编写的软件(专利号:ZL200710144749.3)进行数据统计和格式转化。

1.4 连锁图谱构建及 QTL 定位

采用 Joinmap 4.0^[17] 软件构建,分子标记多态性按软件推荐方法读取,0.4 作为最大重组值,LOD 值大于 4 构建连锁群,Kosambi 方法换算成图距(cM)。QTL 分析采用 MAPQTL 6.0^[18] 进行区间作图(interval mapping,IM),通过该软件对每条染色体进行 1 000 次 Permutation 检测来确定阈

值。置信区间的确定:用 Bootstrap(1 000 次)确定 QTL 的 95% 置信区间长度作为精细定位的区间。

2 结果与分析

2.1 酶活性测定

对 2 个性状数据进行正态分布检测发现,ALP 和 ACP 的数据不符合正态分布,应用 LN 函数进行校正,使数据符合正态分布。以 $P > 0.05$ 为是否符合正态分布的显著性阈值(表 1)。

表 1 酸性磷酸酶和碱性磷酸酶性状的统计

Tab.1 The description statistics of activity of acid phosphatase and alkaline phosphatase for common carp

性状	平均值 ± 标准差	个体数	偏度	峰度	P 值
ACP	257.76 ± 8.25	181	0.181	0.359	0.162
ALP	24.14 ± 1.23	186	0.178	0.355	0.380

2.2 遗传连锁图谱特征

选取 992 个能稳定扩增,并具有多态性的 SSR 标记,分布于 51 个连锁群上,图谱长度为 5 183.9 cM,标记间平均间隔为 5.23 cM。最小连锁群有 9 个标记,最大连锁群有 40 个标记,平均每个连锁群有 19.5 个标记。

2.3 QTL 定位分析

ACP 分析,检测到 5 个与 ACP 活性相关的 QTL 区间(表 2)。与 ACP 活性相关的 5 个 QTL 中,3 个 QTL 为 99% 染色体水平显著性,分别位于 LG2 (CA2049-CA2371)、LG25 (HLJ2941-HLJ3946) 和 LG28 (CA2263-HLJ2873),置信区间分别为 0 ~ 15 cM、73 ~ 83 cM 和 23 ~ 43 cM,可解释表型变异率分别为 9.9%、9.9% 和 39.8%;2 个 QTL 均为 95% 染色体水平显著性,分别位于 LG14 (HLJ3275-CA174) 和 LG14 (CA1276-CA2208),置信区间分别为 76 ~ 87 cM、96 ~ 103 cM,可解释表型变异分别为 8.3% 和 8.1% (图 1)。

ALP 分析,检测到 2 个与 ALP 活性相关的 QTL 区间(表 2)。2 个 QTL 均为 95% 染色体水平显著性,其中一个 QTL 位于 LG8 (HLJ2634-HLJ3465),95% 置信区间为 0 ~ 9 cM,可解释表型变异率为 7.3%,另一个 QTL 位于 LG13 (CA2278-CA246),95% 置信区间为 19 ~ 29 cM,可解释表型变异率为 7.0% (图 2)。

表 2 QTL 区间分析结果
Tab.2 Analysis of QTL

性状	连锁群	标记区间	置信区间/cM	LOD	解释表形变异	95% 染色体水平阈值	99% 染色体水平阈值
ACP	2	CA2049-CA22371	0 ~ 15	4.09 **	9.9%	3.0	3.8
	14	HLJ3275-CA2152	76 ~ 87	3.42 *	8.3%	3.0	3.9
		CA1276-CA2208	94 ~ 106	3.3 *	8.1%	3.0	3.9
	25	HLJ2941-HLJ3946	73 ~ 83	4.08 **	9.9%	3.0	3.7
	28	CA2263-HLJ2873	23 ~ 43	4.5 **	39.8%	2.9	3.9
ALP	8	HLJ2634-HLJ3465	0 ~ 9	3.04 *	7.3%	2.9	3.9
	13	CA2278-HLJ782	19 ~ 29	2.93 *	7.0%	2.7	3.7

注: * 表示 95% 染色体水平阈值; ** 表示 99% 染色体水平阈值。

3 讨 论

影响 QTL 定位效果的因素很多,包括用于 QTL 定位的作图群体的规模和结构、性状的遗传特性、遗传图谱上的标记密度及多态、QTL 效应的大小及其在染色体上的位置等^[19]。近年来,主要水产动物 QTL 研究取得了重大进步,研究较多的性状主要包括:抗病^[20-21]、温度耐受性^[4,22]、产卵时间^[23-24]和肉质^[7,25]等。F₂ 群体或回交群体设计是 QTL 定位分析所采用的最为常用和有效的设计之一,因为 F₂ 相对容易获得并且提供的遗传分析信息最为丰富,可以同时估计加性效应和显性效应。相对这些优点外,由于一部分动植物的性成熟年龄较长,F₂ 或回交群体的获得相对较困难,因此,用 F₁ 进行遗传图谱的构建和 QTL 定位研究可以节省大量的时间和获得较好的 QTL 分析效果。但是 F₁ 作为 QTL 分析群体具有一定的局限性,其检测同等效力的 QTL 所需样本量大,在家畜中一般采用多个半同胞或全同胞家系进行 QTL 分析,以提高检测精度和效力。F₁ (全同胞或半同胞家系) QTL 的分析方法被开发^[26],在植物^[27]、畜牧^[28]和水产动物^[7]已被广泛应用于 QTL 的分析。

磷酸酶是动植物体内普遍存在的与其生命活动密切相关的酶系。凡是物质交换、吸收运转旺盛的器官中,都显示出 ALP 的高活性;细胞的接替与吸收又和 ACP 的活性相关。一些生化实验中证明,磷酸酶与卵球成熟排放呈正相关^[29],胚胎发育中细胞增殖、信号传导和物质代谢^[30]并与毒素的代谢都有紧密联系^[31],通过控制磷酸酶的活性来抑制淡水鱼肌肉 IMP 降解,将会较好地保留鱼肉的鲜味^[32],也就是说磷酸酶的活性与整个生命过程关系密切。所以可以通过对磷酸酶活性的 QTL 定位,来进一步确定候选基因,调控

磷酸酶的表达过程来精细定位,找出与性状相关的候选基因或利用这些 QTL 紧密连锁的标记进行辅助育种,可以同时多个性状进行改良,进行聚合育种,达到事半功倍的效果。本实验中确定的肠组织碱性磷酸酶 QTL 区间,与肝脏组织碱性磷酸酶 QTL 区间都定位在 LG8 (HLJ1244-2-HLJ1897) 同一连锁群上,推测 LG8 连锁群上可能存在碱性磷酸酶调控因子。初步定位到的 QTL 只说明染色体上的该区域可能存在控制数量性状的基因,并不能明确基因的具体基因组位置,所以要想确定控制肠组织磷酸酶活性的候选基因存在还需要进一步缩小区间范围。

本实验首次对肠组织中 ACP 和 ALP 进行 QTL 分析,ACP 定位在 4 个连锁群上的 5 个 QTL 区间: LG28 (CA2263-HLJ2873), LG2 (CA2049-CA2371)、LG14 (HLJ3275-CA174)、LG14 (CA1276-CA2208) 和 LG25 (HLJ2941-HLJ3946)。ALP 定位在 2 个连锁群上的 2 个 QTL 区间: LG8 (HLJ2634-HLJ3465) 和 LG13 (CA2278-CA246)。在 7 个影响磷酸酶活性的 QTL 区间中,有位于 LG25 (HLJ2941-HLJ3946) 对酸性磷酸酶有影响的 QTL 区间和两个对碱性磷酸酶有影响的区间的置信区间都小于等于 10 cM,可以直接用于图位克隆的研究和育种研究。在作物中,多个水稻产量性状的 QTL 已经被克隆而且应用到生产中,从而使得水稻分蘖减少、穗粒数和千粒重增加,同时茎秆变得粗壮,抗倒伏能力增强,进而提高产量^[33]。

下一步工作就是加大 QTL 区间标记的密度进行精细定位和基因筛查。将 QTL 定位到一个更小、更精确的区间,然后,利用鲤全基因组信息,同时分析在该区间的具有相关生理功能的基因的遗传效应,最后初步确定相应的候选基因。

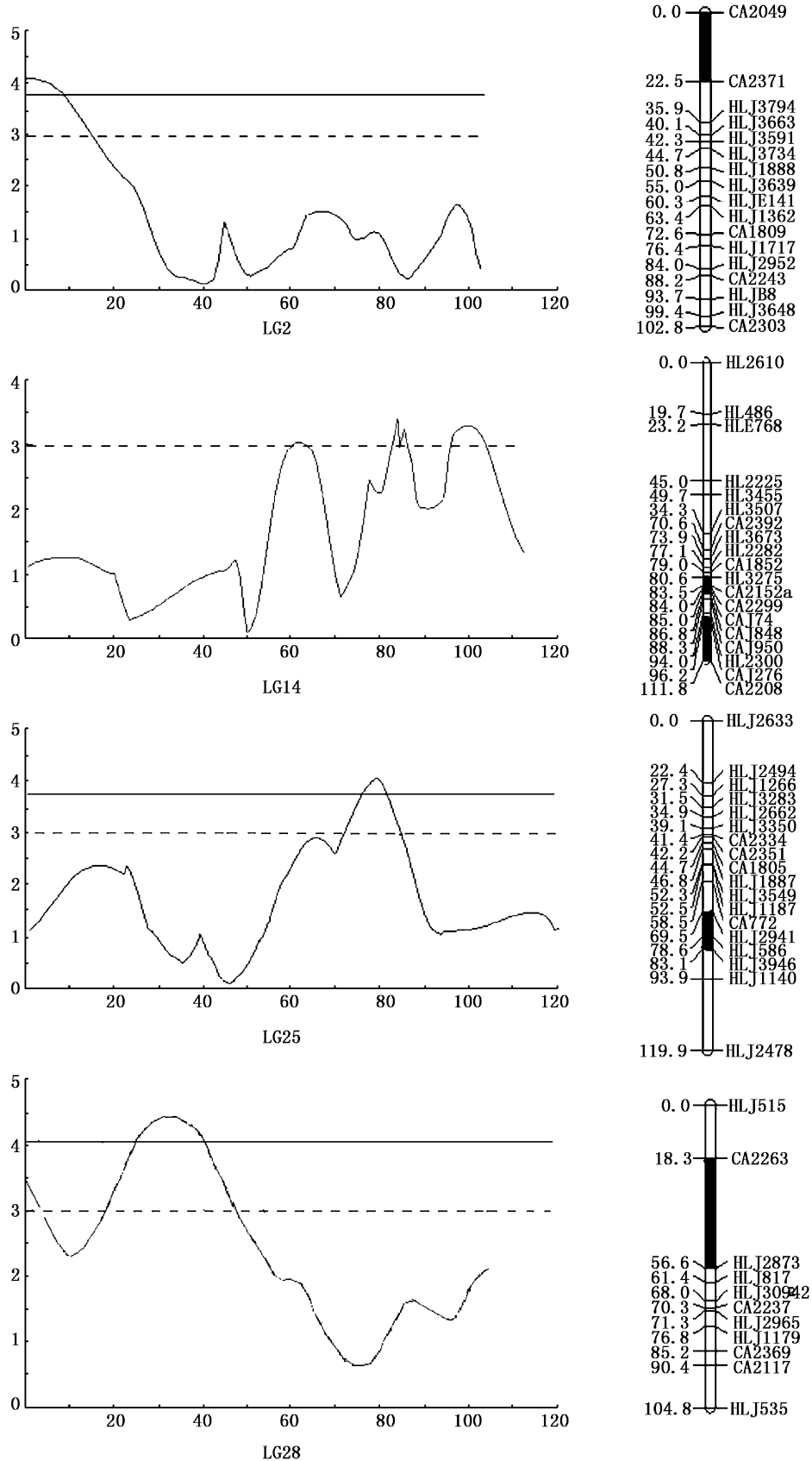


图 1 ACP 活性 QTL 区间在各连锁群上相对位置和 LOD 值曲线

Fig. 1 Analysis of activity of acid phosphatase traits on LG2, LG14, LG25 and LG28

X 轴表示图谱的位置 (cM); Y 轴表示 LOD 值; 虚线表示 95% 染色体水平阈值; 实线表示 99% 染色体水平阈值。

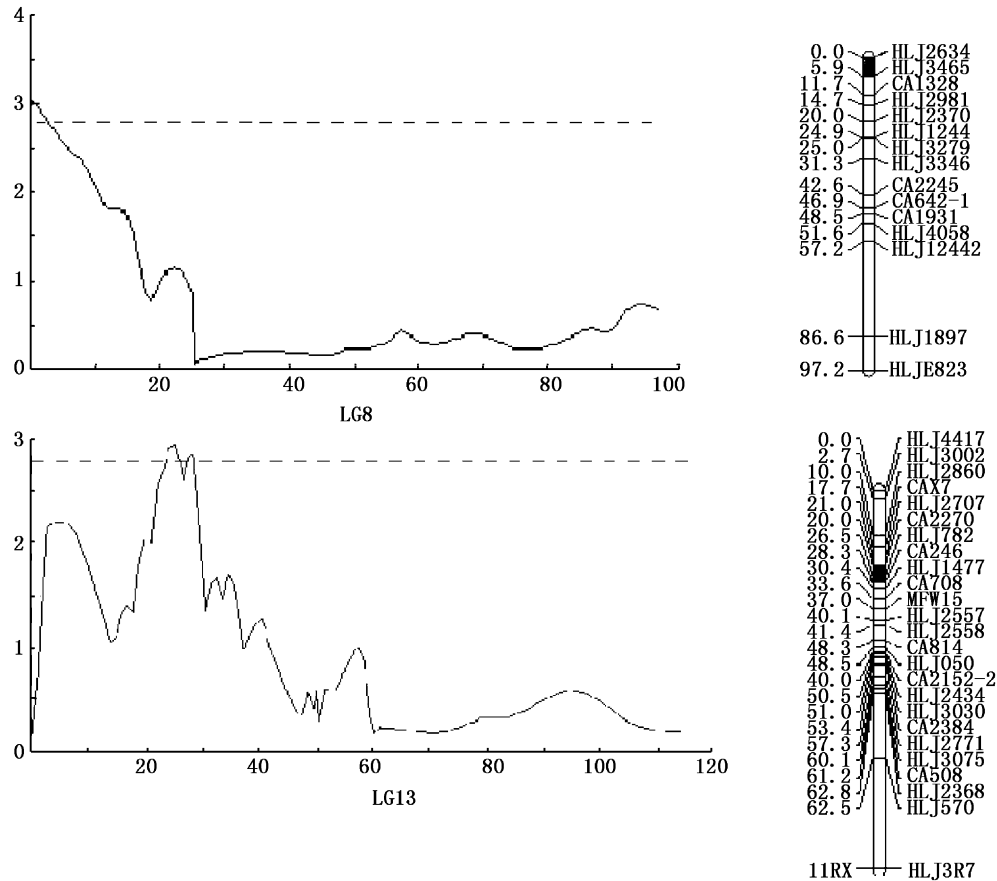


图2 ALP 活性 QTL 区间在各连锁群上相对位置和 LOD 值曲线

Fig. 2 Analysis of activity of alkaline phosphatase traits on LG8 and LG13

X 轴表示图谱的位置 (cM); Y 轴表示 LOD 值; 虚线表示 95% 染色体水平阈值 2.8。

参考文献:

- [1] 张研,梁利群,常玉梅,等. 鲤鱼体长性状的 QTL 定位及其遗传效应分析[J]. 遗传,2007,29(10):1243-1248.
- [2] 郑先虎,曹顶臣,匡友谊,等. 镜鲤体质量、体长 QTL 定位研究[J]. 中国水产科学,2012,19(2):214-220.
- [3] 刘继红,张研,常玉梅,等. 鲤鱼 (*Cyprinus carpio* L.) 头长、眼径、眼间距 QTL 的定位[J]. 遗传,2009,31(5):508-514.
- [4] SUN X W, LIANG L Q. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and mapping of a locus associated with cold tolerance[J]. Aquaculture,2004,238(1/4):165-172.
- [5] 李欧,曹鼎臣,张研,等. 利用 EST-SSR 分子标记研究鲤的饲料转化率性状[J]. 水产学报,2009,33(4):624-631.
- [6] 毛瑞鑫,刘福军,张晓峰,等. 鲤鱼乳酸脱氢酶活性的 QTL 检测[J]. 遗传,2009,31(4):407-411.
- [7] ZHANG Y, XU P, LU C, et al. Genetic linkage mapping and analysis of muscle fiber-related QTLs in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Marine Biotechnology, 2011, 13(3):376-392.
- [8] 陈素丽,陈清西,杨佩真. 长毛对虾磷酸酯酶的研究[J]. 中山大学学报:自然科学版,2000,39(s1):135-140.
- [9] 魏炜,张洪渊,石安静. 育珠蚌酸性磷酸酶活力与免疫反应关系的研究[J]. 水生生物学报,2001,25(4):413-415.
- [10] COLEMAN J E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase [J]. Annual review of biophysics and biomolecular structure,1992,21(1):441-483.
- [11] 王石莹,闫素梅. 碱性磷酸酶在动物骨骼代谢中的研究进展[J]. 饲料博览,2009(4):14-17.
- [12] BERNSTINE E G, HOOPER M L, GRANDCHAMP S, et al. Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1973, 70(12):3899.
- [13] REINER G, CLEMENS N, FISCHER R, et al. Mapping of quantitative trait loci for clinical Cchemical traits in swine [J]. Animal Genetics,2009,40(1):57-64.
- [14] SRIVASTAVA A, MASINDE G, YU H, et al. Mapping quantitative trait loci that influence blood levels of alkaline phosphatase in MRI/ M_pJ and SJL/ J mice [J]. Bone,2004,35(5):1086-

- 1094.
- [15] HAVILL L M, ROGERS J, COX L A, et al. QTL with pleiotropic effects on serum levels of bone-specific alkaline phosphatase and osteocalcin maps to the baboon ortholog of human chromosome 6p23-21. 3 [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2006, 21(12): 1888 - 1896.
- [16] DAVID L, RAJASEKARAN P, FANG J, et al. Polymorphism in ornamental and common carp strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by AFLP analysis and a new set of microsatellite markers [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, 266(3): 353 - 362.
- [17] MANLY K F, CUDMORE J R H, MEER J M. Map manager QTX, cross-platform software for genetic mapping [J]. *Mammalian Genome*, 2001, 12(12): 930 - 932.
- [18] VAN OOIJEN J. MapQTL(R) 5, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations [M]. Kyazma BV, Wageningen, the Netherlands, 2004.
- [19] 鲁绍雄, 连林生. 畜禽数量性状基因座位的精细定位 [J]. *中国牛业科学*, 2006, 32(1): 38 - 42.
- [20] OZAKI A, SAKAMOTO T, KHOO S, et al. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, 265(1): 23 - 31.
- [21] YU Z, GUO X. Identification and mapping of disease-resistance QTLs in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin [J]. *Aquaculture*, 2006, 254(1/4): 160 - 170.
- [22] CHARE-KAISA H, REZK M A, BOVENHUIS H, et al. Heritability of cold tolerance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, juveniles [J]. *Aquaculture*, 2005, 249(1/4): 115 - 123.
- [23] DIAZ N F, CORTEZ S, GOMEZ G, et al. Microsatellites associated to spawning date in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are also associated to the trait in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. *Aquaculture*, 2007, 272: s251.
- [24] LEDER E, DANZMANN R, FERGUSON M. The candidate gene, Clock, localizes to a strong spawning time quantitative trait locus region in rainbow trout [J]. *Journal of Heredity*, 2006, 97(1): 74.
- [25] JOHNSTON I A, LI X, VIEIRA V L A, et al. Muscle and flesh quality traits in wild and farmed Atlantic salmon [J]. *Aquaculture*, 2006, 256(1/4): 323 - 336.
- [26] KNOTT S A, HALEY C S. Maximum likelihood mapping of quantitative trait loci using full-sib families [J]. *Genetics*, 1992, 132(4): 1211.
- [27] COSTANZO S, SIMKO I, CHRIST B, et al. QTL analysis of late blight resistance in a diploid potato family of *Solanum phurejia* S. stenotomum [J]. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111(3): 609 - 617.
- [28] WALLING G, VISSCHER P, WILSON A, et al. Mapping of quantitative trait loci for growth and carcass traits in commercial sheep populations [J]. *Journal of Animal Science*, 2004, 82(8): 2234.
- [29] 傅朝君, 鲁大椿, 刘宪亭, 等. 草鱼卵球成熟、排放与碱性磷酸酶、酸性磷酸酶关系的研究 [J]. *淡水渔业*, 1983(1): 24 - 26, 36.
- [30] 王书平, 孔祥会, 江红霞, 等. 金鱼胚胎发育过程中磷酸酶活性的变化 [J]. *水产科学*, 2011, 30(7): 405 - 408.
- [31] 高举, 赵欣平, 詹付凤, 等. 鲫鱼酸性磷酸酶酶学特性及不同效应物对酶活力的影响 [J]. *水生生物学报*, 2010, 34(2): 394 - 401.
- [32] 王彩霞, 刘茹, 刘友明, 等. 淡水鱼肌肉中酸性磷酸酶的酶学特性 [J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(4): 518 - 521.
- [33] 樊叶杨, 王凯, 庄杰云, 等. 水稻产量性状 QTL 的克隆研究及育种应用进展 [J]. *中国稻米*, 2010, 16(6): 1 - 5.

Quantitative trait loci analysis for activity of acid phosphatase and alkaline phosphatase in mirror carp

YIN Sen^{1,2}, YU Qian^{1,3}, ZHENG Xian-hu^{1,2}, YU Bin-bin^{1,3}, ZHANG Xiao-feng¹, CAO Ding-chen¹, KUANG You-yi¹, LU Cui-yun^{1,2}, LI Chao¹, SUN Xiao-wen¹

(1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, Heilongjiang, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. College of Life Science and Technology, Dalian Ocean University, Dalian 116023, Liaoning, China)

Abstract: A phosphatase is an enzyme that removes a phosphate group from its substrate by hydrolysing phosphoric acid monoesters, which is widely distributed in most organisms and expressed in lots of tissues. This phosphatase is necessary enzyme for growth, maintaining metabolic homeostasis and keeping the body healthy. In this research, a whole genome scan was conducted on 190 progenies from a full-sib family using 992 microsatellite markers and interval mapping strategy for identifying QTL of activity of acid phosphatase and alkaline phosphatase traits in intestinal tissue. The results indicated that: five QTL affected the activity of acid phosphatase, of which three QTL were at the 99% chromosome-wide level located on the LG2 (CA2049-CA2371), LG25 (HLJ2941-HLJ3946) and LG28 (CA2263-HLJ2873) and the remaining two QTL were at 95% chromosome-wide level explaining 8.1% – 38.9% of the total variation, and two QTL affecting the activity of alkaline phosphatase were identified at 95% chromosome-wide level located at LG8 and LG13 explaining 7.3% and 7% of the total variation, respectively.

Key words: acid phosphatase; alkaline phosphatase; QTL; mirror carp