

斑马鱼 *GSTM* 单核苷酸多态性与低温耐受性的相关分析

王倩^{1,2}, 尤锋¹, 辛梦娇¹, 胡金伟^{1,2}, 谭训刚¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为分析谷胱甘肽硫-转移酶 M 基因(glutathione S-transferases M, *GSTM*)与鱼类低温耐受性的相关性, 本实验运用 PCR-SSCP 技术研究了 130 尾斑马鱼(*Danio rerio*)*GSTM* 基因 5'UTR、3'UTR 和第一内含子序列的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNPs), 同时分析了筛选到的基因型与其低温耐受性状的关联性。结果显示, 在其 5'UTR 区域检测到 AB、BC、AC 3 种基因型个体, 共 A、B、C 3 个等位基因, 其观测杂合度和期望杂合度分别是 1.000 和 0.570, 多态信息含量为 0.472, 所检测群体在该座位偏离了 Hardy-Weinberg 平衡; 第 1 内含子中检测到 DD、DE 和 EE 3 种基因型个体, 共 D、E 两个等位基因, 其观测杂合度和期望杂合度分别为 0.408 和 0.477, 多态信息含量为 0.362, 群体在该座位符合 Hardy-Weinberg 平衡。3'UTR 区域中没有发现多态性。上述 2 个 SNP 座位与斑马鱼低温耐受性状的关联分析结果表明, 5'UTR 区 3 种基因型与低温耐受性状均没有显著相关性($\chi^2 = 4.029$, $P > 0.05$)。而第 1 内含子 3 种基因型与低温耐受性状显著相关($\chi^2 = 8.498$, $P < 0.05$): DD 基因型在耐低温群体中占优势(50.00%), 并表现为对受低温胁迫斑马鱼的保护性因素(OR = 0.520, 95% CI = 0.255–1.061), 而 DE 基因型在不耐低温群体中占优势(51.31%), 表现为低温胁迫下斑马鱼的危险因素(OR = 3.012, 95% CI = 1.413–6.419)。研究结果为 *GSTM* 基因 SNPs 位点与斑马鱼低温耐受性能关联分析提供了依据, 也将为海水经济鱼类抗寒标记筛选育种提供参考。

关键词: 斑马鱼(*Danio rerio*); *GSTM*; PCR-SSCP; SNPs; 低温耐受相关

中图分类号: Q347 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)01-0001-07

doi: 10.11759/hyxx20140304002

鱼类属于变温动物, 水温的改变可直接影响鱼类生长、发育、代谢及繁殖等诸多生命活动^[1]。在生长过程中, 鱼类会面临昼夜性及季节性的水温变化并产生一定的适应性, 但是当水温降低超过其适应温度范围时, 往往造成大量死亡^[2]。因此研究鱼类抗寒机制, 筛选抗寒相关功能基因并进行分子标记开发, 获得抗寒鱼类品系显得尤为重要。

国内外学者采用抑制性消减杂交技术、比较转录组分析、表达谱差异分析等方法在多种鱼类中筛选出大量低温耐受相关基因, 功能分析发现它们主要集中在转录调控、信号传导、脂肪代谢、蛋白质合成及应激反应等^[3-7], 为开发抗寒分子标记提供了大量的候选基因。其中, 谷胱甘肽硫-转移酶 M (glutathione S-transferases M, *GSTM*)基因在鲤鱼(*Cyprinus carpio*)的转录组与斑马鱼(*Danio rerio*)的表达谱差异分析中, 表现为低温处理后上调表达^[5, 8], 是研究鱼类低温耐受性能的适宜候选基因之一。*GSTM*基因属于 *GST*基因家族, *GST*是广泛分布于哺

乳动物、鸟类、昆虫及微生物等体内的由多个基因编码的一组多功能同工酶, 具有过氧化酶活性, 能清除脂类自由基, 抑制微粒体过氧化反应, 在自由基引起的膜磷脂损伤中起修复作用^[9-10]。在植物中已有研究发现 *GST* 转基因植物具有更好的低温耐受能力^[11-12], 但鱼类中 *GSTM* 基因的研究较少, 只在斑马鱼^[13]、鲮鱼(*Cirrhinus molitorella*)^[14]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)、鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)^[15]、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)^[16]等鱼中有其基因克隆与表达的相关报道, 有关鱼类 *GSTM* 基因的多态性及其与低温耐受性能

收稿日期: 2014-03-04; 修回日期: 2014-05-16

基金项目: 国家 973 计划资助项目(2010CB126304); 国家 863 计划资助项目(2012AA10A408, 2012AA092203); 国家科技基础条件平台建设运行项目-水产种质资源平台运行服务(2006DKA30470017)

作者简介: 王倩(1987-), 女, 山东省曲阜人, 博士生, 主要从事海洋动物发育生物学研究, 电话, 0532-82898559, E-mail, amelaxing@163.com; 尤锋, 通信作者, 研究员, 电话, 0532-82898561, E-mail, youfeng@qdio.ac.cn

关联的研究尚未见到报道。

目前,有关鱼类低温分子标记的开发和研究多集中 RAPD、微卫星等 DNA 标记中,如鲤鱼中已开发出与抗寒性状相关的 10 个 RAPD 标记^[17-20]、2 个微卫星分子标记^[21]及 2 个 EST 标记^[22]。大黄鱼(*Pseudosciaena crocea* R.)中发现了一个与耐低温相关的微卫星标记^[23]。罗非鱼(*Oreochromis*)中也有研究通过 QTL 定位方法获得了与低温耐受性状连锁的微卫星分子标记^[24-25]。研究表明,大多数鱼类的重要经济性状包括耐低温能力等都表现为数量性状遗传,应用传统的遗传育种标记方法无法确定这些重要性状是由哪些具体的基因控制的,因此 DNA 分子标记技术与候选基因法相结合,可以有效地进行连锁标记的筛选,而应用于鱼类遗传育种,但是,用功能基因进行鱼类耐寒相关标记的筛选还几乎未见到报道。

斑马鱼是一种广泛使用的模式鱼类,其最适生长温度为 28.5℃,报道的生长温度范围为 16.5~38.6℃^[26]。利用斑马鱼进行鱼类抗寒机制研究已有报道,主要探究了低温下的基因表达谱变化^[8, 27-28],但还没有耐低温遗传标记筛选的报道。本研究以斑马鱼为研究对象,首次利用单链构象多态(Single-strand conformation polymorphism, SSCP)对 *GSTM* 基因 5'UTR、第 1 内含子及 3'UTR 区域进行 SNP 分析,以期筛选到与低温耐受性相关的 SNPs 分子标记,并检验其与低温耐受性状的关联性,为鱼类耐低温标记的筛选及其在海水经济鱼类耐寒育种中的应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验用斑马鱼成体共 130 尾,购自山东青岛南

山市场,饲养于本实验室内,水温为 28℃±0.5℃,光照为 14 h 光/10 h 暗周期。早晚各投喂 1 次商品化饵料。实验前进行形态学测量,其平均体质量为 0.18 g±0.01 g,平均全长为 2.17 cm±0.02 cm。

1.2 低温处理

经过预实验确定急性降温的条件:将 130 尾斑马鱼从 28℃±0.5℃直接移入 10℃±0.5℃水体低温处理 13 min,密度为 3 尾/L,处理后立即将实验鱼移至 24℃±0.5℃水体中进行恢复,并观察记录存活及死亡鱼数目。存活斑马鱼为低温耐受组,取其尾鳍组织样品,继续饲育;死亡斑马鱼为低温不耐受组,取其肌肉组织样品。采取样品均编号后置于液氮中,-80℃保存备用。

1.3 基因组 DNA 的提取及检测

样品基因组总 DNA 的提取采用盐析法^[29],提取后用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,并用 Nanodrop 1000 微量分光光度计测定其质量及浓度,-20℃保存备用。

1.4 引物设计及 PCR 扩增

根据 NCBI 中的斑马鱼 *GSTM* 基因(NM_212676.1)的基因组序列,使用 Primer 5 软件针对 5'UTR、第 1 内含子和 3'UTR 区域进行引物设计,引物序列、预期 PCR 产物大小、扩增区域及退火温度见表 1。引物由上海生物工程有限公司合成,PCR 扩增在 PCR Thermal Cycler TP600(Takara,日本)上进行。扩增体系为 50 μL,包括:基因组 DNA 200 ng,正反引物各 0.4 μmol/L,2×Reaction Mix 25 μL, *Taq* DNA 聚合酶 1 μL(东盛,广州),DDW 补至 50 μL。PCR 反应条件为:94℃预变性 5 min;之后进行 30 个循环,每个循环包括 94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 15 s;最后 72℃再延伸 10 min。PCR 产物于 2%琼脂糖凝胶电泳后用紫外凝胶成像仪(BioRAD,美国)拍照检测扩增结果。

表 1 *GSTM* 基因 PCR-SSCP 的引物序列、扩增位置、产物大小及退火温度

Tab.1 The primer sequences, augmentation positions, corresponding PCR product sizes and annealing temperature for *GSTM* PCR-SSCP

扩增区域	引物序列(5'-3')	预期片段长度(bp)	退火温度(℃)
5'UTR	F- GGGTCTAAACGCACAGAGCCCA R- ACTACTGGTTCCTTACCCCGCGT	161	58.0
3'UTR	F-TGGCCAAATGGGGAAACAAGAAGG R-CAGACTGTTGTGTGTGTGCTGTGCT	155	58.0
第 1 内含子	F-CGTCCAAATGCCTTGTGTGACGCT R-AGTGTCGCCACACCCGAAGT	151	58.0

1.5 SSCP 分析

将 3 μ L PCR 产物与 9 μ L 上样缓冲液(98%去离子甲酰胺、10 mmol/L EDTA(pH 8.0)、2%甘油、0.025%溴酚蓝、0.025%二甲苯青)混合, 98 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 立即插入冰中 5 min。变性后的产物在 14%非变性聚丙烯酰胺凝胶中(丙烯酰胺与 N, N'-亚甲双丙烯酰胺质量比为 29:1)130 V 电泳过夜(15~18 h)。电泳结束后进行常规银染显色^[29]。

1.6 数据处理

采用 Cervus 3.0 软件及 Popgene 1.31 软件计算多态座位的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、多态性信息含量及 Hardy-Weinberg 平衡性等遗传参数, 利用 PASW Statistics 18.0 软件的皮尔逊- χ^2 检验分析多态座位基因型与低温耐受性之间的相关性, $P < 0.05$ 为差异显著。利用 2 $\times$ 2 交叉制表进行相对危险度分析, 并以比值比(OR)表示^[30]。

2 结果

2.1 PCR-SSCP 结果分析

对 *GSTM* 基因的 5'UTR、第 1 内含子和 3'UTR 进行 PCR 扩增, PCR 产物由 2%琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增产物特异性较好, 均为单一条带, 且与目的片段长度一致(图 1), 可以用来进行 SSCP 分析。

SSCP 检测结果显示, *GSTM* 基因 5'UTR 区域和第 1 内含子区域的 PCR 扩增产物存在多态性。其中 5'UTR 中检测到 3 种基因型: AB、AC 和 BC 型, 存在 3 个等位基因 A、B 和 C, (图 2A); 第 1 内含子中检测到 3 种基因型: DD、DE 和 EE 型, 存在 2 个等位基因 D 和 E(图 2B)。而 3'UTR 区域的 PCR 产物则没有检测到多态性。

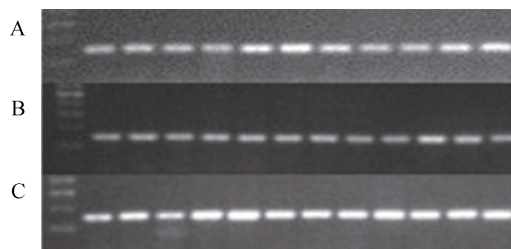


图 1 斑马鱼 *GSTM* 基因 5'UTR(A), 第 1 内含子区(B)和 3'UTR(C)的 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR products of *GSTM* gene 5'UTR(A), intron1(B) and 3'UTR(C) in *Danio rerio*

2.2 SNP 座位遗传变异分析

GSTM 基因 5'UTR 及第 1 内含子 2 个座位的遗传杂合度和多态性信息含量计算结果如表 2 所示, 多态性信息含量(PIC)分别为 0.472 和 0.362, 均属于中度多态($0.25 < PIC < 0.5$)。经检验, 5'UTR 区的 SNP 座位偏离 Hardy-Weinberg 平衡, 而第 1 内含子区的 SNP 座位则符合 Hardy-Weinberg 平衡。

2.3 耐低温组和不耐低温组基因型及等位基因频率的分布

根据 SSCP 检测结果, 统计耐低温组和不耐低温组 2 个 SNP 座位基因型及等位基因频率如表 3 所示, 5'UTR 区域的 AC 基因型频率在两组中分别为 84.21%和 85.19%, 都明显高于其他基因型; 等位基因 A 及 C 的频率在两组都非常接近, 并且明显高于 B 等位基因的频率。第 1 内含子区的 DE 基因型频率在不耐低温组中为 51.31%, 占优势地位, 而 DD 基因型频率在耐低温组中为 50.00%, 占优势地位; 等位基因 D 的频率在两组均高于等位基因 E 的频率。

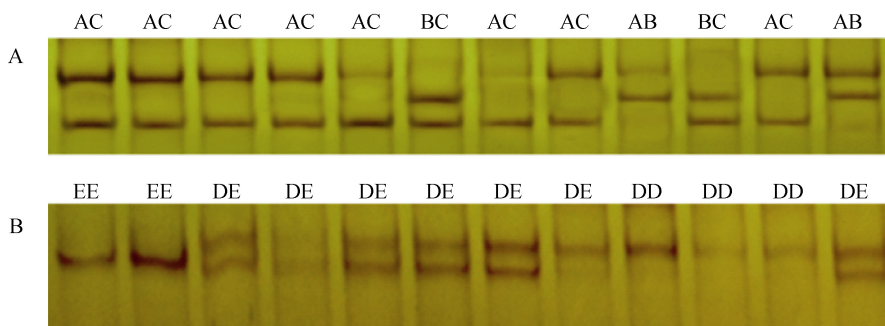


图 2 斑马鱼 *GSTM* 基因 5'UTR(A)及第 1 内含子(B)PCR-SSCP 检测结果

Fig.2 PCR-SSCP analysis on *GSTM* 5'UTR (A) and intron 1 (B) in *D. rerio*

表 2 *GSTM* 基因 2 个 SNP 座位的遗传多样性参数及 Hardy-Weinberg 平衡检验

Tab.2 Genetic diversity index and Hardy-Weinberg equilibrium analysis of *GSTM* SNPs

SNP 座位	等位基因数 (<i>Na</i>)	有效等位基因数 (<i>Ne</i>)	观测杂合度 (<i>Ho</i>)	期望杂合度 (<i>He</i>)	多态信息含量 (<i>PI</i> C)	哈温平衡检验 (<i>HW</i>)
5'UTR	3	2.3144	1.000	0.570	0.472	$P < 0.05$
内含子	2	1.9052	0.408	0.477	0.362	$P > 0.05$

表 3 斑马鱼 *GSTM* 基因 5'UTR、第 1 内含子区域基因型及等位基因频率统计

Tab.3 Genotype and allele frequency of *GSTM* 5'UTR and intron 1

位点	组别	个体数(尾)	基因型及其频率(%)			等位基因及其频率(%)		
			AB	BC	AC	A	B	C
5'UTR	不耐低温组	76	6.58(5)	9.21(7)	84.21(64)	45.39	7.89	46.71
	耐低温组	54	12.96(7)	1.85(1)	85.19(46)	49.07	7.41	43.52
	总计	130	9.23(12)	6.15(8)	84.62(110)	46.92	7.69	45.38
第 1 内含子			DD	DE	EE	D	E	
	不耐低温组	76	34.21(26)	51.31(39)	14.47(11)	59.87	40.13	
	耐低温组	54	50.00(27)	25.93(14)	24.07(13)	62.96	37.04	
	总计	130	40.77(53)	40.77(53)	18.46(24)	61.15	38.85	

注: 括号内数字为该基因型的个体数

2.4 *GSTM* 基因多态性与抗寒性状相关分析

GSTM 基因 2 个 SNP 的各基因型及等位基因与低温耐受性关联分析结果显示: 5'UTR 中, AB、BC、AC 3 种基因型的分布与低温耐受性没有显著关联性 ($\chi^2 = 4.029$, $P = 0.115$), 3 种等位基因 A、B、C 也没有显示出与低温耐受性的关联 ($\chi^2 = 0.343$, $P = 0.842$); 第一内含子中, DD、DE、EE 3 种不同基因型的分布与低温耐受性有显著关联性 ($\chi^2 = 8.498$, $P = 0.014$), 其中 DD 型在耐低温组中占优势, 频率为 50.00%, DE 型则在不耐低温组中所占比例较大, 为 51.31%。但是, D、E 的分布与低温耐受性均没有统计学意义上的关联 ($\chi^2 = 0.225$, $P = 0.614$)。进一步对第 1 内含子的 3 种不同基因型进行了相对危险度分析, OR 值计算结果表明: 在斑马鱼受到低温胁迫时, DD 基因型和 EE 基因型对斑马鱼起到保护性作用, (DD: OR = 0.520, 95% CI = 0.255–1.061; EE: OR = 0.534, 95% CI = 0.219–1.304), 而 DE 基因型是一个危险因素 (OR = 3.012, 95% CI = 1.413–6.419)。

3 讨论与结论

鱼类的低温耐受性状是其重要的经济性状之一, 提高鱼类的低温耐受能力对于延长经济鱼类生长期、降低其越冬成本及越冬死亡率都具有重要意义, 从而有益于鱼类养殖的健康发展, 因而鱼类的耐低温研究一直受到国内外鱼类生物学家和养殖业者的

关注。目前, 已经在多种鱼类如鲤鱼^[17-22]、大黄鱼^[23]、罗非鱼^[24-25]等中筛选出了与耐低温相关的分子标记, 但主要为 RAPD 及微卫星标记等 DNA 标记。新一代分子标记-SNP 标记的相关研究报道尚未见到, 采用候选基因法筛选 SNP 标记的研究在鱼类中也未见到报道, 而该方法是目前鉴定数量性状基因座位的一种有效方法, 是通过揭示直接在生理发育上或生长发育过程中能得以表现的基因 DNA 序列差异与性状差异之间的关系而进行的标记辅助选择, 可以明显提高其标记筛选的有效性。如倪静等^[29]就在牙鲆养殖群体中发现与鱼类生长密切相关的生长激素基因 *GH* 第 4 个外显子存在多态性, 且该多态性与体质量和头长具有一定的相关关系; 徐田军等^[31]在牙鲆野生群体中也分析了与鱼类免疫密切相关的 *MHC-DAA* 基因与抗病性相关的等位基因。鱼类的低温耐受是一个非常复杂的过程, 这种性状往往也是由多个基因控制形成数量遗传性状(QTL), 故以耐低温相关基因为候选基因筛选与抗寒相关遗传标记预期是有效的。

在耐低温相关基因中, *GSTM* 基因属于 GSTs 家族中的 μ 亚型同工酶, 具有抗氧化作用, 可以缓解机体内氧自由基的积累。该基因在斑马鱼、鲤鱼中均表现为低温下表达量显著上调。低温下鱼体内的代谢酶系受到抑制, 导致大量中间产物的积累, 其中大部分属于自由基, 自由基的毒害作用可能是导致

低温致死的原因之一^[32-33]。因此,作者推测 *GSTM* 基因的上调表达有助于减少低温胁迫下鱼体内有害自由基的积累,从而表现为鱼体应对低温刺激的一种适应机制。斑马鱼 *GSTM* 基因(NM_212676.1)位于第 8 号染色体上,包括 8 个外显子和 7 个内含子,全长 1 141 bp,其中 ORF 为 660 bp,编码 219 个氨基酸,根据其在基因组上的串联重复,又可分为 *GSTM1*、*GSTM2*、*GSTM3*、*GSTM4*、*GSTM5*^[34]。目前,*GSTM* 基因多态性的研究大部分与疾病相关,如在人类中已确认 *GSTM3* 在第 6 内含子中存在 3 个碱基的缺失,会导致患喉癌、结肠腺瘤等疾病的危险性增加^[35-36];*GSTM3* 起始密码子上游第 63 位的 A/C SNP 座位和第 783 位 A/G SNP 座位(即位于 5'UTR 区域)与 RNA 聚合酶 II 结合能力相关,*GSTM3* -63C 等位基因结合 RNA 聚合酶 II 的能力显著下降,可能造成多种与谷胱甘肽转移酶缺陷相关的疾病^[37],其根本原因是细胞内的自由基不能得到及时清除,累积造成氧化损伤。有关该基因与低温相关 SNP 标记的研究还几乎没有涉及。

作者筛查的斑马鱼 *GSTM* 基因的 5'、3'UTR 及第 1 内含子区中,仅在第 1 内含子区发现了与耐低温性状显著相关的多态性座位。关于功能基因内含子区域多态性的报道已有很多,其中同样可以发现影响基因功能的 SNP 座位,如刘峰等^[38]比较了 3 种鳊鱼(*Siniperca*)生长激素基因内含子,发现其序列多态性与生长性状差异具有关联性;黄军等^[39]在东方鲀中也发现生长激素基因内含子 2 在品种间的差异远大于品种内差异。事实上,内含子虽然不编码蛋白,但并不能说明内含子的突变对功能没有影响,这些座位可能会通过影响基因的转录水平、剪接等机制影响基因的表达及功能,从而达到调控的作用,所以内含子中 SNP 的多态性也是不能忽略的。

综上,本研究在斑马鱼 *GSTM* 基因第 1 内含子区域发现的 1 个 SNP 座位的 DD 基因型与低温耐受性状存在相关性,并表现为对低温胁迫下斑马鱼的保护性因素,研究结果初步显示该基因参与鱼类低温适应的调控过程,可以应用于后续的耐低温育种研究,也可以为耐寒鱼类的遗传改良研究及海水经济鱼类抗寒品系分子辅助育种研究提供依据。

参考文献:

- [1] Donaldson M R, Cooke S J, Patterson D A, et al. Cold shock and fish[J]. *Journal of Fish Biology*, 2008, 73(7): 1491-1530.
- [2] Beitinger T L, Bennett W A, McCauley R W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2000, 58(3): 237-275.
- [3] 李林春,李青,龙勇,等. 温度刺激对斑马鱼仔鱼基因转录表达的影响[J]. *水生生物学报*, 2012, 36(5): 882-891.
- [4] 徐丽华,常玉梅,刘春雷,等. 鲤脑组织低温差异表达候选基因的筛选[J]. *遗传*, 2011, 33(3): 262-269.
- [5] Gracey A Y, Fraser E J, Li W, et al. Coping with cold: An integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(48): 16970-16975.
- [6] Ju Z, Dunham R A, Liu Z. Differential gene expression in the brain of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in response to cold acclimation[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 268(1): 87-95.
- [7] Logan C A, Somero G N. Transcriptional responses to thermal acclimation in the eurythermal fish *Gillichthys mirabilis* (Cooper 1864)[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2010, 299(3): R843-R852.
- [8] Vergauwen L, Benoot D, Blust R, et al. Long-term warm or cold acclimation elicits a specific transcriptional response and affects energy metabolism in zebrafish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology*, 2010, 157(2): 149-157.
- [9] Meijerman I, Beijnen J H, Schellens J H. Combined action and regulation of phase II enzymes and multidrug resistance proteins in multidrug resistance in cancer[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2008, 34(6): 505-520.
- [10] Singhal S S, Saxena M, Ahmad H, et al. Glutathione S-transferases of human lung: characterization and evaluation of the protective role of the alpha-class isozymes against lipid peroxidation[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1992, 299(2): 232-241.
- [11] Huang C, Guo T, Zheng S C, et al. Increased cold tolerance in *Arabidopsis thaliana* transformed with

- Choristoneura fumiferana* glutathione S-transferase gene[J]. *Biologia Plantarum*, 2009, 53(1): 183-187.
- [12] 赵凤云, 王晓云, 赵彦修, 等. 转入盐地碱蓬谷胱甘肽转移酶和过氧化氢酶基因增强水稻幼苗对低温胁迫的抗性[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2006, 32(2): 231-238.
- [13] Timme-Laragy A R, Goldstone J V, Imhoff B R, et al. Glutathione redox dynamics and expression of glutathione-related genes in the developing embryo[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 65(1): 89-101.
- [14] Cheng W X, Liang X F, Shen D, et al. Seasonal variation of gut Cyanophyta contents and liver GST expression of mud carp (*Cirrhina molitorella*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the tropical Xiangang Reservoir (Huizhou, China)[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2012, 57(6): 615-622.
- [15] Liang X F, Li G G, He S, et al. Transcriptional responses of alpha- and rho-class glutathione S-transferase genes in the liver of three freshwater fishes intraperitoneally injected with microcystin-LR: relationship of inducible expression and tolerance[J]. *Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*, 2007, 21(5): 289-298.
- [16] Kim J H, Dahms H U, Rhee J S, et al. Expression profiles of seven glutathione S-transferase (*GST*) genes in cadmium-exposed river pufferfish (*Takifugu obscurus*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2010, 151(1): 99-106.
- [17] 梁利群, 孙效文. 鲤耐寒性状分子标记在遗传连锁图上的定位[J]. *大连水产学院学报*, 2003, 18(4): 278-281.
- [18] 常玉梅, 孙效文, 梁利群. 鲤鱼耐寒性状研究[J]. *上海水产大学学报*, 2003, 12(2): 102-105.
- [19] 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: 165-172.
- [20] 梁利群, 高俊生, 李绍戊, 等. 与鲤鱼抗寒性状相关的 RAPD 分子标记的筛选及其克隆[J]. *中国水产科学*, 2006, 13(3): 360-364.
- [21] 潘贤, 梁利群, 雷清泉. 筛选与鲤鱼抗寒性状相关的微卫星分子标记[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2008, 40(6): 915-918.
- [22] 常玉梅, 高国强, 徐丽华, 等. 鲤 EST 标记与耐低温性状的相关性分析及定位[J]. *动物学研究*, 2010, 31(6): 581-586.
- [23] 高国强, 常玉梅, 韩启霞, 等. 大黄鱼耐低温性状相关微卫星标记的筛选[J]. *遗传*, 2010, 32(3): 248-253.
- [24] Cnaani A, Hallerman E M, Ron M, et al. Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F₂ tilapia hybrid[J]. *Aquaculture*, 2003, 223: 117-128.
- [25] Moen T, Agresti J J, Cnaani A, et al. A genome scan of a four-way tilapia cross supports the existence of a quantitative trait locus for cold tolerance on linkage group 23[J]. *Aquaculture Research*, 2004, 35(9): 893-904.
- [26] Lopez-Olmeda J F, Sanchez-Vazquez F J. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2011, 36(2): 91-104.
- [27] Long Y, Li LC, Li Q, et al. Transcriptomic characterization of temperature stress responses in larval zebrafish[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37209.
- [28] Long Y, Song G, Yan J, et al. Transcriptomic characterization of cold acclimation in larval zebrafish[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 612.
- [29] 倪静, 尤锋, 张培军, 等. 牙鲈 *GH* 基因外显子多态性与生长性状关系的初步研究[J]. *高技术通讯*, 2006, 16(3): 307-312.
- [30] Grimes D A, Schulz K F. Making sense of odds and odds ratios[J]. *Obstetrics and Gynecology*, 2008, 111(2): 423-426.
- [31] 徐田军, 陈松林. 牙鲈 *MHC-DAA* 结构及其等位基因多态性[J]. *遗传*, 2009, 31(10): 1020-1028.
- [32] Blomgren K, Hagberg H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 40(3): 388-397.
- [33] Tseng Y C, Chen R D, Lucassen M, et al. Exploring uncoupling proteins and antioxidant mechanisms under acute cold exposure in brains of fish[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18180.
- [34] Lizard-Nacol S, Coudert B, Colosetti P, et al. Glutathione S-transferase M1 null genotype: lack of association with tumour characteristics and survival in advanced breast cancer[J]. *Breast Cancer Research*, 1999, 1(1): 81-87.
- [35] Nadejda J M, Anu V, Christine B, et al. Glutathione S-transferase *GSTM3* and *GSTP1* genotypes and Larynx

- cancer risk[J]. Cancer epidemiology, Biomarkers & Prevention, 1999, 8: 185-188.
- [36] Cortessis V, Siegmund K, Chen Q, et al. A case-control study of microsomal epoxide hydrolase, smoking, meat consumption, glutathione S-transferase M3, and risk of colorectal adenomas[J]. Cancer Research, 2001, 61(6): 2381-2385.
- [37] Liu X, Campbell M R, Pittman G S, et al. Expression-based discovery of variation in the human glutathione S-transferase M3 promoter and functional analysis in a glioma cell line using allele-specific chromatin immunoprecipitation[J]. Cancer Research, 2005, 65(1): 99-104.
- [38] 刘峰, 鲁双庆, 刘臻, 等. 三种鳊鱼(*Siniperca*)生长激素基因内含子多态性的比较研究[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(4): 470-478.
- [39] 黄军, 严美姣, 陈国宏, 等. 东方鲈生长激素基因内含子2的克隆与多态性分析[J]. 遗传, 2007, 29(11): 1378-1384.

Correlation analysis between polymorphisms of *GSTM* gene and cold-tolerance trait in zebrafish, *Danio rerio*

WANG Qian^{1, 2}, YOU Feng¹, XIN Meng-jiao¹, HU Jin-wei^{1, 2}, TAN Xun-gang¹

(1. Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Mar., 4, 2014

Key words: *Danio rerio*; *GSTM*; PCR-SSCP; SNPs; association to cold tolerance

Abstract: In order to explore the correlation between Glutathione S-transferases M (*GSTM*) gene and cold tolerance traits in fish, the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *GSTM* gene in 130 zebrafish were investigated using PCR-SSCP method, and the association between the polymorphisms and cold tolerance traits was also analyzed. In the 5'UTR region, AB, BC and AC genotypes were detected, and there were A, B and C alleles. The observed heterozygosity and expected heterozygosity of this locus were 1.000 and 0.570, respectively. The polymorphism information content was 0.472 and the locus in this zebra stock was significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium. In intron 1 of the *GSTM* gene, three genotypes (denoted DD, DE and EE) were found, and there were D and E alleles. The observed heterozygosity and expected heterozygosity of this locus were 0.408 and 0.477, respectively. The polymorphism information content was 0.362 and the genotypes distribution fitted to the Hardy-Weinberg equilibrium. And no polymorphism site was identified in 3'UTR region. The correlation between different genotypes and cold-tolerance traits of zebrafish was analyzed by Pearson's chi-square test. The results indicated that there was no significant correlation between the genotypes of 5'UTR and cold-tolerance traits ($\chi^2 = 4.029$, $P > 0.05$). While the genotypes of intron 1 were significantly associated with the cold-tolerance traits ($\chi^2 = 8.498$, $P < 0.05$). Among them, the DD genotype was dominant in the cold-tolerance group (50.00%) and performed as a protective factor for zebrafish under cold stress (OR = 0.520, 95% CI = 0.255–1.061). The DE genotype was dominant in the cold-sensitive group (51.31%) and acted as a risk factor for zebrafish enduring cold stress (OR = 3.012, 95% CI = 1.413–6.419). These results could provide a basis for a further research on *GSTM* gene in association with cold tolerance in zebrafish, and a reference for the Marker Assistant Selection Breeding in marine commercial fish culture.

(本文编辑: 谭雪静)