

建鲤 *IGFBP3* 基因多态性对生长的影响

魏可鹏^① 俞菊华^{①②*} 李红霞^② 李建林^② 唐永凯^②

① 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; ② 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心
农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室 无锡 214081

摘要:胰岛素样生长因子结合蛋白3 (insulin-like growth factor binding protein, *IGFBP3*) 是调节动物生长和代谢的重要基因。本实验查找了建鲤 (*Cyprinus carpio* var. *jian*) *IGFBP3s* 基因上的 SNP 位点。使用 PCR-RFLP 检测了其中 5 个位点 (*IGFBP3a*-I3_G-253T、*IGFBP3b*-I2_G30T、*IGFBP3b*-I3_A-341G、*IGFBP3b*-E4_C54T、*IGFBP3b*-E4_C72G) 在 931 尾 (485 ♂, 446 ♀) 建鲤中的基因型分布。基因型与增重的相关性分析结果显示, 5 个位点均与雌性鱼种阶段增重呈极显著 ($P < 0.01$) 或显著 ($P < 0.05$) 相关, 增重快个体的基因型分别为 TT 型、GG 型、AG 型、CC 型和 CG 型; 与雄性鱼种阶段增重显著 ($P < 0.05$) 相关的只有 G30T, 其中 GG 型个体增重显著较 TT 型快; C72G 和 A-341G 两个位点与雌、雄成鱼增重呈极显著 ($P < 0.01$) 或显著 ($P < 0.05$) 相关, C72G 的 CG 型增重显著快于 CC 型和 GG 型个体, A-341G 的 AG 型和 GG 型雄性个体增重显著 ($P < 0.05$) 较 AA 型快, 但雌鱼中增重最快个体的基因型为 AG 型; 此外, 与雌性成鱼增重相关的位点还有 G30T, 其 GG 型和 GT 型增重显著 ($P < 0.05$) 快于 TT 型个体, 在雄性成鱼中也是 GG 型鱼长得较快, 只是不显著; G-253T 的 GT 型雄性成鱼增重极显著 ($P < 0.01$) 快于 GG 和 TT 型个体, 但在雌鱼中没有这种趋势。在雌雄鱼中均增重快的个体是 G30T 的 GG 型、A-341G 的 AG 型和 C72G 的 CG 型, 可以作为今后分子育种的标记。分析表明随富集标记个数的增多, 增重也随之增大, 这与数量性状特性相符。

关键词:建鲤; 胰岛素样生长因子结合蛋白3; 单核苷酸多态性; 增重; 相关性

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2012)01-96-09

Isolation of *IGFBP3* Gene and SNPs Associated with Body Weight Gain in *Cyprinus carpio* var. *jian*

WEI Ke-Peng^① YU Ju-Hua^{①②*} LI Hong-Xia^② LI Jian-Lin^② TANG Yong-Kai^②

① Wuxi Fishery College, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081; ② Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: Insulin-like growth factor binding protein 3 (*IGFBP3*) is a most important gene regulating animal growth and metabolism. We isolated two *IGFBP3* genes from *Cyprinus carpio* var. *jian* in this experiment. Eighteen SNPs loci were identified on *IGFBP3a* and *IGFBP3b* respectively. Eight SNPs were located at exons. PCR-RFLP was applied to detect genotypes of five SNPs (*IGFBP3a* intron 3_G-253T, *IGFBP3b* intron 2_G30T, *IGFBP3b* intron 3_A-341G, *IGFBP3b* exon 4_C54T, *IGFBP3b* exon 4_C72G) in 931 individuals (485 ♂, 446 ♀). Correlation analysis between genotypes and weight gain showed that five SNPs were associated with

基金项目 国家支撑计划项目 (No. 2006BAD13B09), 农业部公益性行业专项 (No. 200903045) 和现代农业产业技术体系建设专项 (No. nyctx-49), 国家科技部“863 计划”项目 (No. 2011AA100401);

* 通讯作者, E-mail: yujh@ffrc.cn;

第一作者简介 魏可鹏, 男, 硕士研究生; 研究方向: 鱼类遗传育种; E-mail: lanqiuwangzi163@163.com。

收稿日期: 2011-8-16, 修回日期: 2011-11-11

female juvenile weight gain significantly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) and individuals with these five SNPs loci, TT, GG, AG, CC and CG genotype grew faster than other individuals. Only G30T was significantly related to male juvenile weight gain ($P < 0.05$) and the GG individuals grew significantly faster than TT ones. C72G and A-341G were significantly pertinent to adult weight gain ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Individuals with CG at C72G were significantly larger than those with CC and GG types. The AG and GG type male adult weight gain of A-341G were significantly higher than AA type, while AG type grew the fastest in female adult fish. G30T was significantly associated with female adult weight gain. The GG and GT type fish weight gain were significantly ($P < 0.05$) higher than TT type, and the GG male adult individuals also grew obviously faster than other types. The GT type male adult weight gain of G-253T was significantly higher than GG and TT type ($P < 0.01$), while no similar situation was found in female adult individuals. To conclude, with the fastest weight gain, GG type of G30T, AG type of A-341G and CG type of C72G could be used as molecular markers in *C. carpio* var. *jian* breeding. In addition, weight gain increased with the enrichment of molecular SNPs markers, consistent with the characteristics of quantitative traits.

Key words: *Cyprinus carpio* var. *jian*; Insulin-like growth factor binding protein 3; Single nucleotide polymorphism; Weight gain; Correlation

胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin-like growth factor binding proteins, IGFbps) 是胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 的运输蛋白^[1], 在人和其他哺乳动物, 该家族有 6 个成员, 与约 98% 的 IGFs 结合, 而 IGFBP3 是该家族中含量最高的蛋白, 与大约 80% 的 IGF-1 和酸不定亚基 (acid-labile subunit, ALS) 结合形成 150 ku 的三元复合物, 延长 IGF-1 在血液循环中的半衰期、调节 IGF-1 从血管内向血管外跨膜转运、预防 IGF-1 产生低血糖等功能^[2-3]。至今在斑马鱼 (*Danio rerio*) 中已克隆出 5 种 IGFbps, 分别是 IGFBP1、IGFBP2、IGFBP3、IGFBP5 和 IGFBP6^[3]。另外, 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[4]、斑点叉尾 (*Ictalurus punctatus*)^[5]、青甘鱼 (*Seriola quinqueradiata*)^[6]、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)^[7] 等的 IGFBP3 cDNA 序列已成功克隆。哺乳动物中 IGFBP3 主要表达部位是肝, 而鱼类的 IGFBP3 主要在咽弓和内耳表达^[3, 8]。

IGFBP3 的作用方式可分为 IGF 依赖性和非 IGF 依赖性两种。IGF 依赖性方式是 IGFBP3 与 IGF 受体竞争性地结合 IGF-1, 调节 IGF-1 的作用。IGFBP3 可经过不同的翻译后修饰, 调节其与 IGF-1 的亲合力。IGFBP3 的非 IGF 依赖性方式是通过与生长有关的调节因子或受体结合, 调控细胞增殖, 与 IGF-1 相比, 亲

和力要弱^[9]。由于 IGFBP3 结构中存在核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) 序列, 可帮助亲核蛋白进入细胞核, 阻遏 IGF-1 受体基因的表达, 启动凋亡相关基因 (*ced-3*) 的表达, 抑制癌细胞的增殖, 促进细胞凋亡^[10]。在鱼类中还发现了 IGFBP3 的其他一些功能, 如 Chen 等从斑马鱼 IGFBP3 在囊胚阶段高表达, 推测其可能参与胚胎早期的发育调节^[2]。

随着生物技术的高速发展, 使用分子标记辅助或者指导动物育种已经受到各国科学家的重视。在筛选与生长相关的分子标记时直接在与生长相关的基因上寻找, 目的性强且目前已有一些研究结果报道。陈雪峰等^[11]通过对吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) IGF-2 基因多态性的研究, 筛选到 2 个与鱼体增重相关的 SNPs 位点。阮瑞霞等^[12]则在 *GHR* 基因上筛选到 4 个与吉富罗非鱼增重相关的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点。李小慧等通过对大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) IGF-1^[13] 基因的多态性分析, 发现 7 个 SNPs 位点。刘福平等^[14]在罗非鱼 (*Tilapia nilotica*) *MC4R* 基因上筛选到 5 个 SNPs 位点。于凌云等在大口黑鲈 *Myod*^[15]、*MSTN*^[16] 基因上分别发现了 7 个和 2 个 SNPs 位点。Schennink 等^[17]研究发现, *PPARGCIA* 基因内含子 9 的 T-

C 突变显著影响奶牛 (*Bos taurus*) 乳脂率, C 等位基因与提高乳脂率有显著作用, 而 T 等位基因可能是一个古老的序列变异。Cantrell 等^[18] 在绵羊 (*Ovis aries*) 蓝色抗病基因上找到一个 SNP 单倍型。Li 等^[19] 在山羊 (*Capra hircus*) 的 *agouti* 基因上查找到 1 个与黑色表现型相关的 SNP 位点。在鲤鱼分子育种中, 俞菊华等^[20] 在分离了建鲤生长抑制素基因 (*MSTN*) 的基础上, 筛选到与建鲤体型和平均日增重相关的 SNP 位点各 1 个。陶文静等^[21] 在已分离到的 4 个 *jIGHRS* 基因的基础上, 筛选到 5 个与建鲤增重显著相关的 SNPs 位点。

鉴于 IGFBP3 与生长的密切关系, 在鲤鱼 IGFBP3 cDNA 序列的基础上, 本实验通过序列克隆分离到 2 个 *jIGFBP3s* 基因序列, 各包括 4 个外显子和 3 个内含子, 其中外显子和内含子 2 已分离完全, 内含子 1、内含子 3 只分离了靠近外显子部分的序列。查找这 2 个基因在建鲤群体中存在的多态位点, 使用 PCR-RFLP 法检测了其中的 5 个 SNPs, 筛选到与雌雄建鲤不同养殖阶段增重相关的 SNP 位点, 可用于建鲤分子育种实践中。

1 材料与方法

1.1 材料 实验鱼养殖在中国水产科学研究院无锡淡水渔业研究中心宜兴养殖基地, 2009 年 4 月繁殖, 2009 年 8 月 13 日进行 PIT 标记 (广州市洪腾条码技术有限公司, 中国广州) 并测定体重等数据, 为初重, 后混合饲养, 于 2009 年 10 月 15 日测其体重, 两次体重差值为鱼种增重, 于 2010 年 11 月 17 日采血时再测定其体重, 与 2009 年 10 月 15 日测量体重差值为成鱼增重。实验鱼共 931 尾 (485 ♂, 446 ♀)。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 从鱼尾静脉抽血 0.5 ~ 1.0 ml, 加入 1/5 体积的枸橼酸葡萄糖 (acid citrate dextrose, ACD) 抗凝剂, 静置于 4℃ 冰箱中 2 h。吸取血细胞 30 μl, 蛋白酶 K 消化过夜, 酚-氯仿法抽提基因组 DNA^[22]。0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性, 紫外分光光

度计 (Eppendorf) 测定吸光度值, 确定浓度, A_{260}/A_{280} 一般为 1.8 左右^[23]。用 TE 稀释成 50 ng/μl 后使用。

1.2.2 建鲤 IGFBP3s 基因的分离 根据 GenBank 中斑马鱼 IGFBP3 基因序列 (CR926131) 与斑马鱼 (AJ299410)、鲤鱼 (FJ424519) 的 cDNA 序列比对, 确定鲤鱼 IGFBP3 基因中内含子的大体位置, 设计引物分离内含子 2。PCR 反应体系为 25 μl, 其中模板 DNA 50 ng, 引物各 0.5 μl (10 μmol/L), 其他组分根据 Taq 酶 (上海申能博彩生物有限公司) 说明书添加。PCR 反应条件为: 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存。由于斑马鱼 IGFBP3 内含子 1、内含子 3 大于 10 kb, 根据已得到的内含子 2 序列, 设计 2 条正向引物和 2 条反向引物, 使用 LA PCR *in vitro* Cloning Kit (Takara, 中国大连) 分离内含子 1 靠近外显子 2 和内含子 3 靠近外显子 3 部分的序列。简单步骤为选用合适的限制性内切酶酶切基因组 DNA, 然后加上限制性酶特异接头, 以接头外引物和基因特异外引物进行第一次 PCR。反应条件为: 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 55℃ 2 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。反应结束后, 取第一步的 PCR 液为模板使用内引物进行第二次 PCR, 反应条件同第一步。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/ml EB) 电泳分离, 切下目的条带, 用胶回收试剂盒 (上海申能博彩生物有限公司) 回收 DNA。与 pMD18-T 载体 (Takara, 中国大连) 连接 2 h 以上, 转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 敏感态细胞中。于 LB Amp⁺ 平板上培养过夜, 挑选白色菌落于 LB Amp⁺ 液体培养基中扩大培养, 使用质粒抽提试剂盒 (上海申能博彩) 抽提质粒。EcoR I、Hind III (上海捷瑞生物工程有限公司) 双酶切验证。阳性克隆送至上海博尚生物技术有限公司测序。引物由上海博尚生物技术有限公司合成, 详细信息见表 1。

1.2.3 建鲤 IGFBP3s 基因 SNPs 位点的查找及检测 通过测序, 拼接得到 3a、3b 两个基因

表 1 实验中所用引物信息

Table 1 Information of primers used in this experiment

引物名称 Primer	引物序列 (5'-3') Sequence of primer	复性温度 (°C) Annealing temperature	产物及长度 (bp) Product and the length
F1	GCTGAGACAGTCCAGGACACAAC	55.0	内含子 2
R1	GAAACCCCTTTTGGTCACAGTTTGG		3a (441), 3b (439)
F2	GCTCCATGACGGGACTGTGTG	57.5	内含子 1
F3	GAGAGCAAACCTCTGCAGGCTCTGC		3a (573), 3b (1 080)
R2a	CCTTTAAAGGTCTGCCCTTTCCTGG	55.0	3a 内含子 1 (548)
R3a	CTTTTGTGATTATCTCTTCTTTGATGTGCCG		
R2b	CCTCTGCTTATAACGATTGTAACCTTGGTG	55.0	3b 内含子 1 (1 112)
R3b	CTCTTTTGATCATCTCCTCTTTGGTGTGTG		
F4a	GGCAATAGAGACCATAGATCCTATGCCG	55.0	3a 内含子 3 (849)
F5a	CATCAAAGAAGAGATAATCAAAAAAGAACAAACC		
F4b	CCAAAGAGGAGATGATCAAAAGAGATCAATTG	55.0	3b 内含子 3 (1 025)
F5b	CTATTCCTACTTACTTGTTCATAGCCAAAC		
R4	GTCCATACCTTGTCCACGCCAGCAGCAG	56.5	内含子 3
R5	CTCCCTTCACTTTGTCTCCATG		3a (801), 3b (1 194)

表 2 SNP 检测引物序列、限制性内切酶和酶切产物条带

Table 2 Primers, restriction enzymes and restriction fragments of the SNP loci

基因 Gene	区域 Region	引物名称 Primer	引物序列 (5'-3') Sequence of primer	内切酶及反应温度 (°C) Restriction enzyme and temperature	酶切片段 (bp) Length of restriction fragments
3a	内含子 3 距外 显子 4_G253T	F1	TGCACACAGTACGCATACCCTAGC	<i>Bsp</i> 1286 I 37°C	GG;305,620 TT;925
		R1	TGACTATGTTACACTTCCCTCTCAGG		
3b	内含子 2_G30T	F2	GGCAATAGAGACCATAGATCCTATGCCG	<i>Mph</i> 1103 I 37°C	GG;192,84 TT;276
		R2	CAAACATGTCAGGAGACTGGAGACAC		
3b	内含子 3 距外 显子 4_A341G	F3	CAAATTGTGAATTTATCAGCACATGATAC	<i>Apa</i> L I 37°C	AA;55,471 GG;526
		R3	CTCCCTTCACTTTTCTCCATG		
3b	外显子 4_C54T	F4	CAAATTGTGAATTTATCAGCACATGATAC	<i>Afa</i> I 37°C	CC;451,320 TT;771
		R4	TGACTATGTTACACTTCCCTCTCAGG		
3b	外显子 4_C72G	F5	CAAATTGTGAATTTATCAGCACATGATAC	<i>Sma</i> I 30°C	CC;771 GG;468,303
		R5	TGACTATGTTACACTTCCCTCTCAGG		

序列。设计特异引物 (表 2) 分段 PCR, 测定 8 个个体的 3a、3b 基因序列, 使用 Clustal W^[24] 分别比对, 查找 SNPs 位点。采用 PCR-RFLP 方法检测了其中 5 个 SNPs 位点。PCR 反应体系为 12.5 μ l, 其中模板 DNA 25 ng, 其他组分根据 *Taq* 酶 (上海申能博彩生物有限公司) 说明书要求添加。PCR 反应条件为: 94°C 2 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 延伸 5 min, 4°C 保存 (退火温度可根据引物序列的 T_m 值改变, 延伸时间可根据扩增片段的大小改变)。反应结束后取 3 μ l PCR 产物电泳检测

扩增结果。取 5 μ l PCR 产物, 加限制性内切酶 2U (表 2, 上海捷瑞, Takara), 适宜温度下消化 4~6 h, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 确定基因型。

1.2.4 数据分析 利用 SPSS 软件单因素方差分析和独立 *t*-检验对不同基因型与建鲤增重进行相关性分析。

2 结果

2.1 建鲤 IGFBP3 基因序列 内含子 2 的克隆获得差异明显的 2 个基因序列, 分别称 *IGFBP3a* 和 *IGFBP3b*, 内含子长分别为 164 bp

和 162 bp, 序列的差异为 11.73%。根据基因步移法筛选得到内含子 1 靠近外显子 1 部分的两条序列, 长分别为 573 bp 和 1 080 bp, 序列差异为 13.26%; 内含子 1 靠近外显子 2 部分的两条序列, *a* 型 548 bp, *b* 型 1 112 bp, 序列差异为 11.70%; 内含子 3 靠近外显子 3 部分的序列, *a* 型 849 bp, *b* 型 1 025 bp, 序列差异为 8.16%; 内含子 3 靠近外显子 4 部分的两条序列, 长分别为 801 bp 和 1 194 bp, 序列差异为 6.54%。

筛选到的序列的外显子部分经与 GenBank 中查找到的 *IGFBP3a* 基因的 cDNA 序列 (FJ424519) 比对, 确定了内含子 1 靠近外显子 1 部分的 *a* 型序列 573 bp 和 *b* 型序列 1 080 bp; 内含子 3 靠近外显子 4 部分的 *a* 型序列 801 bp 和 *b* 型序列 1 194 bp (表 1)。

实验得到 2 个 *IGFBP3s* 基因序列, 包括 4 个外显子和内含子 2, 内含子 1 和内含子 3 靠近外显子部分的序列。3*a*、3*b* 2 个基因的 cDNA 序列差异为 6.24%, 与斑马鱼 cDNA 的差异分别为 13.47% 和 13.81%。

2.2 SNPs 位点的检测及不同基因型对增重的影响 通过比对 8 个个体的基因序列, 在外显子及靠近外显子的内含子区域共查找到 36 个 SNPs 位点 (表 3)。检测的 5 个 SNPs 中, 1 个位于 3*a*, 4 个位于 3*b* 基因, 分别为 3*a*-I3_G-253T、3*b*-I2_G30T、3*b*-I3_A-341G、3*b*-E4_C54T、3*b*-E4_C72G。位于外显子上的 2 个 SNPs 为同义突变。本实验检测了 5 个 SNPs 位点的基因型在 931 尾 (485 ♂, 446 ♀) 建鲤群体中的分布情况 (图 1)。结果表明各位点 3 种基因型都存在, 但不同基因型的个体数存在差异 (表 4)。

运用 SPSS 软件, 对 931 尾 (485 ♂, 446 ♀) 建鲤 5 个 SNPs 位点的不同基因型与增重进行关联分析。结果表明, G-253T、G30T、A-341G、C54T 和 C72G 5 个位点均与雌性鱼种阶段增重呈极显著 ($P < 0.01$) 或显著 ($P < 0.05$) 相关, 增重快个体的基因型分别为 TT 型、GG 型、AG 型、CC 型和 CG 型; 与雄性鱼种阶段增重显著 ($P < 0.05$) 相关的只有 G30T, 其中 GG 型个体

增重显著较 TT 型快; 与雌、雄成鱼增重极显著或显著相关的位点均有 3 个, 其中 C72G 和 A-341G 两个位点与雌、雄成鱼增重均相关, C72G 的 CG 型增重显著 ($P < 0.05$) 快于 CC 型和 GG 型个体, A-341G 的 AG 型个体增重显著 ($P < 0.05$) 较 AA 型快; 与雌性成鱼增重相关的位点还有 G30T, 其 GG 型和 GT 型增重显著 ($P < 0.05$) 快于 TT 型个体, 在雄性成鱼中也是 GG 型鱼长得较快, 但差异不显著; G-253T 则为雄性成鱼增重的另一个位点, GT 型雄性成鱼增重极显著 ($P < 0.01$) 快于 GG 和 TT 型个体, 但在雌鱼中没有这种趋势 (表 4)。

表 3 *IGFBP3* 的 SNPs 位点

Table 3 The SNPs in *IGFBP3*

基因 Genes	区域 Region	SNPs 位点 SNPs
3 <i>a</i>	5'非编码区 5'UTR	C-216G, C-201G
	外显子 1 Exon 1	C55T, C69G,
	内含子 1 Intron 1	C40G
	外显子 2 Exon 2	A147T, A272G
	内含子 2 Intron 2	C54T, C64T, A77C,
	外显子 3 Exon 3	G96T, A100G,
	内含子 3 Intron 3	A60G
		G-267T, G-253T,
		A-122G, A-114G
		3'非编码区 3'UTR
3 <i>b</i>	5'非编码区 5'UTR	C-91T
	内含子 1 Intron 1	A59C, C169T
	外显子 2 Exon 2	A203C
	内含子 2 Intron 2	G30T
		G-691T, A-626T, A-356T,
	内含子 3 Intron 3	A-341G, A-307G, C-229T,
		A-226C, C-131T, A-126C
	外显子 4 Exon 4	C54T, C72G
	3'非编码区 3'UTR	C20T, G31T

位点中的“-”表示突变碱基距 3' 端后一个外显子。

“-”indicates mutation base to next exon in 3' end direction.

2.3 标记富集对增重的影响 本实验检测的 5 个 SNPs 位点在雌雄鱼不同生长阶段与增重相关性不同。从表 4 可看出, C72G 的 CG 型、A-341G 的 AG 型和 G30T 的 GG 型个体在雌雄鱼中均增重快。分析这 3 个位点的标记富集个数与增重的相关性, 结果为, 随标记富集个数的增加, 个体增重值增大。在鱼种阶段, 富集 3 个标记的个体增重值极显著 ($P < 0.01$) 大于标

记个数少的个体;在成鱼阶段,富集 3 个标记的个体增重值极显著 ($P < 0.01$) 大于无标记的个体,而富集 3 个标记的个体比富集 1、2 个标记的个体生长快,只是差异不显著(表 5)。

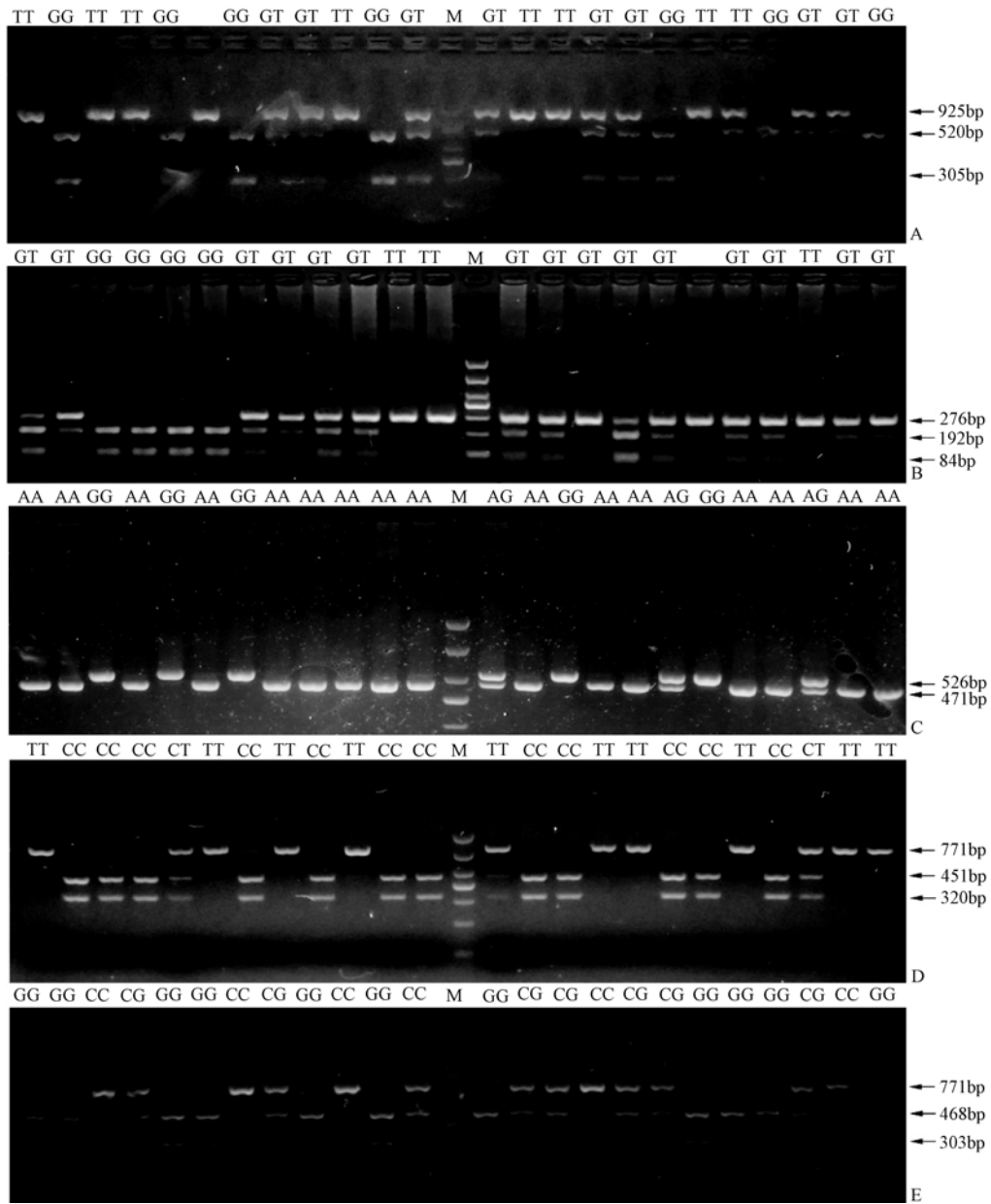


图 1 5 个 SNPs 位点不同基因型的电泳结果

Fig.1 Electrophoresis patterns of different genotypes in five SNPs loci

M. DL1000 DNA 分子量标记。M. DL1000 DNA marker.

A. *jIGFBP3a*-I3_G-253T; B. *jIGFBP3b*-I2_G30T; C. *jIGFBP3b*-I3_A-341G; D. *jIGFBP3b*-E4_C54T; E. *jIGFBP3b*-E4_C72G.

3 讨论

IGFBP3 作为 IGF-1 最主要的运输蛋白,对

动物的生长起着非常重要的作用。我们在建鲤基因组中筛选到 3a 和 3b 两个基因,两基因编码区与斑马鱼 *IGFBP3* 同源性均高达 85% 左

表 4 建鲤不同基因型与增重的相关性
Table 4 Correlation different genotypes with weight gain in Jian Carp

位点 Loci	基因型 Genotype	雄鱼 Male			雌鱼 Female		
		鱼种增重 Juvenile weight gain	成鱼增重 Adult weight gain	个体数 Sample size (ind)	鱼种增重 Juvenile weight gain	成鱼增重 Adult weight gain	个体数 Sample size (ind)
3a-I3_G-253T	GG	99.4 ± 27.8	611.3 ± 109.7 ^B	46	106.7 ± 23.2 ^{AB}	784.1 ± 144.1	42
	GT	97.6 ± 24.7	667.7 ± 133.0 ^A	267	104.7 ± 29.2 ^A	785.3 ± 161.5	252
	TT	102.6 ± 29.6	633.5 ± 116.2 ^B	165	117.3 ± 40.4 ^B	786.1 ± 187.0	147
3b-I2_G30T	GG	101.4 ± 28.2 ^a	662.8 ± 138.6	216	113.4 ± 35.7 ^A	799.0 ± 182.7 ^b	200
	GT	99.1 ± 26.1 ^{ab}	642.8 ± 119.1	221	108.4 ± 30.9 ^a	788.3 ± 162.3 ^b	227
	TT	89.7 ± 22.5 ^b	616.9 ± 99.6	29	92.5 ± 23.2 ^{Bb}	718.1 ± 116.5 ^a	30
3b-I3_A-341G	AA	97.5 ± 65.8	627.6 ± 118.2 ^{Aa}	238	101.0 ± 28.5 ^A	772.1 ± 172.3 ^a	230
	AG	105.4 ± 27.4	658.9 ± 125.8 ^b	114	122.7 ± 39.2 ^{Ba}	822.3 ± 169.0 ^b	96
	GG	104.7 ± 26.7	683.1 ± 143.5 ^B	94	111.1 ± 24.9 ^{Bb}	783.5 ± 150.5 ^{ab}	91
3b-E4_C54T	CC	101.7 ± 27.5	657.9 ± 127.5	223	113.5 ± 37.7 ^a	800.1 ± 168.7	216
	CT	96.9 ± 28.4	641.6 ± 139.4	155	105.1 ± 27.0 ^b	775.9 ± 157.5	141
	TT	96.4 ± 22.7	627.8 ± 92.4	81	104.0 ± 26.1 ^b	772.6 ± 172.6	90
3b-E4_C72G	CC	95.7 ± 25.0	646.0 ± 131.4 ^b	221	101.7 ± 25.1 ^A	766.8 ± 156.5 ^A	215
	CG	107.4 ± 31.9	679.8 ± 139.4 ^{Aa}	124	119.5 ± 39.3 ^B	820.0 ± 151.4 ^B	113
	GG	105.7 ± 86.5	621.1 ± 98.2 ^B	129	116.1 ± 39.6 ^B	796.6 ± 190.9 ^{AB}	123

同组中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$), 不同大小写的相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 名称中的“-”表示突变碱基距 3' 端后一个外显子。

Lowercase letters indicate significant difference at $P < 0.05$ level; and capital letters indicate significant difference at $P < 0.01$ level; The same letter in different cases indicate the difference is not significant ($P > 0.05$); “-” indicates mutation base to next exon in 3' end direction.

表 5 标记富集对增重的影响
Table 5 Effects of markers enrichment on weight gain

标记个数 No. of markers	鱼种增重 Juvenile weight gain	成鱼增重 Adult weight gain	样本数 Sample size (ind)
0	93.0 ± 25.2 ^A	685.5 ± 146.1 ^A	303
1	105.0 ± 31.8 ^B	727.3 ± 175.3 ^B	383
2	109.3 ± 28.9 ^B	733.6 ± 151.0 ^B	154
3	143.1 ± 52.3 ^C	780.9 ± 188.9 ^B	29

同列中不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Capital letters indicate significant difference at $P < 0.01$ level.

右, 3a 和 3b 编码区相似性高达 93%, 但内含子序列差异明显。这与鲤鱼染色体 ($2n = 100$) 是大部分鲤科鱼类 ($2n = 48 \sim 50$) 的两倍相对应。在建鲤 *MSTNs*^[20] 和 *GHRs*^[23] 等基因分离时均发现了鲤鱼基因数是斑马鱼的 2 倍。*IGFBP3s* 基因的内含子 1 和内含子 3 太长, 斑马鱼中分别为 15.67 kb 和 10.37 kb, 使用一般 PCR 分离存在难度。位于外显子上的突变和靠近外显子附近的内含子上的碱基突变, 可能会改变基因

产物功能和影响内含子正常切割^[25-26], 相对内含子中间部分可能更重要。因此, 本实验使用基因步移的方法, 分离了靠近外显子的内含子片段, 查找和筛选了这些区域的 SNPs。

本实验在外显子及其邻近内含子区域查找到 36 个 SNPs 位点。其中, 外显子上 8 个; 3a 基因上 5 个, 3b 基因上 3 个; 内含子上 28 个; 3a 基因上 13 个, 3b 基因上 15 个。内含子的突变频率高于外显子, 这与外显子所受选择压力大有关^[27]。检测 SNPs 时, 由于鲤鱼基因组比较复杂, 存在 2 套相似基因, 没有合适的差异区域以供设计引物而导致一些 SNPs 不能检测, 特别是四引物等检测方法需要设计多个引物而受到影响。本实验筛选到的大部分 SNPs, 因没有合适的引物设计区域而不能检测, 因此最好能开发对引物要求不高但灵敏度够高的方法检测这些 SNPs 的基因型。

本实验在建鲤 *IGFBP3s* 基因上筛选了与雌雄鱼种和成鱼阶段增重相关的 SNPs。结果发现, 雌鱼鱼种阶段的标记明显比雄鱼鱼种阶

段多,在成鱼阶段雌雄鱼中的标记不同,可能与在雌雄鱼及不同生长阶段基因表达水平不同有关;雄鱼成鱼阶段的标记数比鱼种阶段多,雌鱼成鱼阶段的标记数比鱼种阶段少,可能是由于遗传、营养、环境等因子对生长的影响力发生了变化,推测鱼种阶段的生长受遗传因子的影响较大,而成鱼阶段可能营养、环境等其他因子的累积作用更明显。考虑到生长本身是数量性状,受多因素的影响,要筛选能适合所有鲤鱼群体的标记比较困难,因此标记存在一定的适用范围。影响生长的因素很多,如摄食量、饲料利用率、消化吸收率等,对于筛选到的标记影响的是哪一种因子尚不清楚,除与增重关联分析外,如能同时与摄食量等联系的话,可使筛选到的标记更准确,适用范围更广泛。

由于位点 G-253T 在成鱼阶段的 GT 型雄鱼增重值极显著大于 TT 型,而在鱼种阶段 TT 型雌鱼增重值极显著大于 GT 型。C54 在成鱼阶段对增重影响不显著,所以只对 3 个位点 G30T、A-341G 和 C72G 的标记富集个数与增重的相关性进行分析,结果表明标记富集个数与增重的相关性结果符合数量性状特征,其中富集 3 个标记的个体比富集 2 个标记的个体在鱼种阶段增重快 31%,在成鱼阶段增重快 6.4%,占 29 尾,存在很大的选育空间。综合考虑,本实验获得的标记 3b_I2_G30T 的 GG 型、3b_E4_C72G 的 CG 型和 3b_I3_A-341G 的 AG 型个体在建鲤雌雄鱼中均增重快,可以作为今后分子育种的标记。

参 考 文 献

- [1] Hwa V, Oh Y, Rosenfeld R G. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocrine Reviews*, 1999, 20(6): 761 - 787.
- [2] Chen J Y, Chen J C, Huang W T, et al. Molecular cloning and tissue-specific, developmental-stage-specific, and hormonal regulation of *IGFBP3* gene in zebrafish. *Mar Biotechnol*, 2004, 6(1): 1 - 7.
- [3] 焦爽, 卢玲, 李筠, 等. 斑马鱼类胰岛素生长因子信号途径及作用机制研究进展. *国际病理科学与临床杂志*, 2009, 29(3): 235 - 239.
- [4] Bauchat J R, Busby Jr W H, Garmong A, et al. Biochemical and functional analysis of a conserved IGF-binding protein isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatoma cells. *Journal of Endocrinology*, 2001, 170(3): 619 - 628.
- [5] Peterson B C, Waldbieser G C. Effects of fasting on IGF-I, IGF-II, and IGF-binding protein mRNA concentrations in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domestic Animal Endocrinology*, 2009, 37(2): 74 - 83.
- [6] Pedroso F L, Fukada H, Masumoto T. *In vivo* and *in vitro* effect of recombinant salmon growth hormone treatment on IGF-I and IGFBPs in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fisheries Science*, 2009, 75(4): 887 - 894.
- [7] Chen W, Li W, Lin H. Common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2): molecular cloning, expression profiles, and hormonal regulation in hepatocytes. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(3): 390 - 399.
- [8] 张永宏, 高妍, 陈承祯, 等. 草原红牛 *IGFBP3* 基因多态性及与部分屠宰性状的相关性分析. *中国兽医学报*, 2010, 30(4): 549 - 551.
- [9] 漆正堂. 胰岛素样生长因子结合蛋白-3. *生命的化学*, 2003, 23(2): 102 - 105.
- [10] Arany E, Zabel P, Hill D J. Rapid clearance of human insulin-like growth factor binding protein-3 from the rat circulation and cellular localization in liver, kidney and stomach. *Growth Regulation*, 1996, 6(1): 32 - 41.
- [11] 陈雪峰, 杨国梁, 俞菊华, 等. 吉富罗非鱼 *IGF2* 基因分离及其单核苷酸多态性与体型、增重相关性. *动物学杂志*, 2010, 45(2): 107 - 114.
- [12] 阮瑞霞, 俞菊华, 李红霞, 等. 吉富罗非鱼两种生长激素受体基因分离及与增重相关的 SNPs 位点. *动物学杂志*, 2011, 46(3): 37 - 46.
- [13] 李小慧, 白俊杰, 叶星, 等. 大口黑鲈 *IGF-I* 基因内含子 1、3 和 4 序列多态性研究. *上海海洋大学学报*, 2009, 18(1): 8 - 13.
- [14] 刘福平, 白俊杰, 叶星, 等. 罗非鱼 *MC4R* 基因克隆及其与生长相关的 SNPs 位点. *中国水产科学*, 2009, 16(6): 816 - 823.
- [15] 于凌云, 白俊杰, 叶星, 等. 大口黑鲈 *MyoD* 基因结构和单核苷酸多态性位点的筛选. *水产学报*, 2009, 33(1): 1 - 8.
- [16] 于凌云, 白俊杰, 樊佳佳, 等. 大口黑鲈肌肉生长抑制素基因单核苷酸多态性位点的筛选及其与生长性状关联性分析. *水产学报*, 2010, 34(6): 665 - 671.
- [17] Schennink A, Bovenhuis H, Léon-Kloosterziel K M, et al. Effect of polymorphisms in the *FASN*, *OLR1*, *PPARGC1A*, *PRL* and *STAT5A* genes on bovine milk-fat

- composition. *Animal Genetics*, 2009, 40(6): 909–916.
- [18] Fang D D, Xiao J, Canci P C, et al. A new SNP haplotype associated with blue disease resistance gene in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 2010, 120: 943–953.
- [19] Li X L, Zhao J W, Tang C J, et al. Sequencing of part of the goat agouti gene and SNP identification. *Biochemical Genetics*, 2010, 48(1/2): 152–156.
- [20] 俞菊华, 李红霞, 唐永凯, 等. 建鲤生长抑制素基因 (*MSTN*) 的分离、表达及多态性与体型、平均日增重相关性研究. *农业生物技术学报*, 2010, 18(6): 1062–1072.
- [21] 陶文静, 马龙俊, 阮瑞霞, 等. 建鲤 *GHR* 基因多态性及与增重相关的 SNP 位点的筛选. *水生生物学报*, 2011, 35(4): 1–8.
- [22] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Beijing: Science Press, 2001.
- [23] 俞菊华, 李红霞, 唐永凯, 等. 建鲤生长激素受体基因分离、转录子多态性以及组织表达特性. *水生生物学报*, 2011, 35(2): 218–228.
- [24] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(22): 4673–4680.
- [25] Nowacki M, Higgins B P, Maquilan G M, et al. A functional role for transposases in a large eukaryotic genome. *Science*, 2009, 324(5929): 935–938.
- [26] Smith C W J, Valcárcel J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, 25(8): 381–388.
- [27] 卢泳全, 汪旭升, 黄伟素, 等. 基于水稻内含子长度多态性开发禾本科扩增共有序列遗传标记. *中国农业科学*, 2006, 39(3): 433–439.