

# 建鲤 *leptin* 两种原核表达载体的构建和表达

唐永凯 李建林 李红霞 俞菊华\*

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:** 使用 SignalP-4.0 软件预测信号肽剪切位点,设计引物扩增建鲤 (*Cyprinus carpio* var. *jian*) *leptin* 基因 (*jLEP-A1*, *jLEP-B*) 不含信号肽的 ORF 区域。扩增产物分别连接到 pET-32a(+) 和 pGex-4T-1 原核表达载体,构建重组质粒,测序验证插入位点的正确性。将重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3),经 IPTG 诱导表达重组蛋白 pET-32a(+)/jLEP-A1, pET-32a(+)/jLEP-B 和 pGex-4T-1/jLEP-A1, pGex-4T-1/jLEP-B。结果表明,在 37℃ 和 1 mmol/L IPTG 的条件下诱导 5 h,重组蛋白表达量最大。SDS-PAGE 电泳显示重组蛋白主要以可溶蛋白形式存在。这一结果为后续在建鲤 *leptin* 基因功能研究奠定了基础。

**关键词:** 建鲤; *Leptin*; 载体; 原核表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2014)01-51-06

## Construction and Expression of *Cyprinus carpio* var. *jian* *Leptin* in Two Prokaryotic Expression Vectors

TANG Yong-Kai LI Jian-Lin LI Hong-Xia YU Ju-Hua\*

Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Science, Wuxi 214081, China

**Abstract:** The signal peptide cleavage of *Cyprinus carpio* var. *jian* LEP-A1 (*jLEP-A1*) and LEP-B (*jLEP-B*) sites were identified by SignalP-4.0 software. And pairs of primers were designed to amplify the *jleptinA1* and *jleptinB* ORF region without the signal peptide sequence. The amplification products were ligated into the prokaryotic expression vector of pET-32a(+) and pGex-4T-1 respectively, and the recombination plasmids were constructed. The plasmid sequence was confirmed by sequencing and transferred into the host bacteria, *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant proteins of pET-32a(+)/jLEP-A1, pET-32a(+)/jLEP-B, pGex-4T-1/jLEP-A1 and pGex-4T-1/jLEP-B were highly expressed by induction with IPTG. The optimum concentration of IPTG was 1 mmol/L for 5 h at 37°C. The recombinant proteins mainly existed in soluble form as revealed by SDS-PAGE electrophoresis analysis. The results provided useful information for research on *jleptin* function.

**Key words:** *Cyprinus carpio* var. *jian*; *Leptin*; Vector; Prokaryotic expression

瘦素 (*leptin*) 是 *obese* 基因表达的产物,在哺乳类动物上由成熟的脂肪组织分泌,通过血液循环透过血脑屏障,作用于下丘脑内的 *leptin* 受体,从而将外周信号反馈至中枢,调控动物能量动态平衡、葡萄糖与脂肪的代谢以及摄食 (Ahima et al. 1996, Tang 2008)。在鱼类上,目前已克隆出了绿色河豚 (*Tetraodon nigroviridis*) (Kurokawa et al. 2005)、斑马鱼 (*Danio rerio*)

(Gorissen et al. 2009)、青鳉 (*Oryzias latipes*)

基金项目 863 项目 (No. 2011AA100401),农业部公益性行业科研专项 (No. 200903045),中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (No. 2013JBFM03);

\* 通讯作者, E-mail: yujh@ffrc.cn;

第一作者介绍 唐永凯,男,博士;研究方向:鱼类遗传育种; E-mail: tangyk@ffrc.cn.

收稿日期:2013-05-30,修回日期:2013-09-29

(Kurokawa et al. 2009)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (Murashita et al. 2008)、大西洋鲑 (*Salmo salar*) (Trombley et al. 2011)、海鲈 (*Morone saxatilis*) (Won et al. 2012)、点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) (Zhang et al. 2013) 等鱼类 *leptin* 基因。序列分析显示鱼类 *leptin* 分为两类 (Lep-A 和 Lep-B), 序列相似性较低 (Gorissen et al. 2009, Kurokawa et al. 2009, Zhang et al. 2013)。

在鱼类上,主要通过观察重组 *leptin* 对鱼类摄食的影响来研究 *leptin* 功能。腹腔注射重组草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) *leptin* 后,草鱼出现厌食症 (Li et al. 2010)。腹腔注射重组虹鳟 *leptin* 后,虹鳟摄食量受到抑制 (Murashita et al. 2008)。这些研究结果表明,原核表达的重组 *leptin*,经提取纯化后,具有生物活性,能抑制鱼类的摄食。在金鱼 (*Carassius auratus*) 上,外周注射 *leptin* 也使金鱼摄食量减少,但剂量比中枢注射要高,这表明 *leptin* 主要在大脑中行使功能,控制能量动态平衡 (Volkoff et al. 2003)。

建鲤 (*Cyprinus carpio* var. *jian*) 是中国水产科学研究院淡水渔业研究中心培育出的鲤鱼品种,具有生长快、体型优、适应性与抗病力强等优点 (张建森等 2007)。在建鲤的遗传改良方面,主要侧重于生长这个重要的经济性状 (陶文静等 2011, 李红霞等 2012, 魏可鹏等 2012), 目前还未开展摄食因子 *leptin* 的相关研究,而摄食与饲料转化率相关。饲料转化率指消耗单位饲料重量与所得到的动物产品重量的比值,直接影响着养殖成本,这必将是鱼类育种的一个新方向。建鲤 *leptin* 基因已克隆,本研究在此基础上构建了 *leptin* 基因的 pET-32a(+) 和 pGex-4T-1 原核表达质粒,并在 BL21 (DE3) 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中得到高效表达,为进一步研究 *leptin* 在建鲤摄食调控中的功能奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 载体和菌株 原核表达载体 pET-32a

(+) 和 pGex-4T-1、大肠杆菌 BL21 (DE3) 和大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 *EcoR* I、*Xho* I、*Nco* I、*Taq* DNA 聚合酶、pMD18-T 载体、T4 DNA 连接酶、IPTG 购自大连 Takara 公司。DNA 凝胶回收和质粒纯化试剂盒购自上海申能博彩生物技术有限公司。蛋白分子量标准、考马斯亮蓝 R250 和 SDS-PAGE 试剂等购自上海生工生物工程有限公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 *jLEP-A1* 和 *jLEP-B* 基因编码区的 PCR 扩增 根据已克隆到的 *jLEP-A1* (GenBank 登录号: KC496017)、*jLEP-B* (GenBank 登录号: KC496019) cDNA 全序列以及翻译的氨基酸序列,应用 SignalP-4.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行蛋白质信号肽序列的预测。根据信号肽剪切点位置,设计用于扩增基因不含信号肽的编码区部分 (包括终止密码子 TAA) 的引物,并在引物的 5' 和 3' 端序列分别引入新的酶切位点 *Nco* I 和 *EcoR* I [匹配 pET-32a(+) 载体], *EcoR* I 和 *Xho* I (匹配 pGex-4T-1), 以便于基因的酶切和定向克隆。所有引物由上海博尚生物技术有限公司合成 (表 1)。

表 1 用于原核表达载体构建的引物序列  
Table 1 The primers used in construction of prokaryotic expression vector

引物 Primer	引物序列 Sequence (5'~3')
jLEP-A1F1 (P1)	CATGCCATGGCATTCCCAATTCATTCAGATAGCCT
jLEP-A1R1 (P2)	CCGGAATTC <b>T</b> TAGCAGCTTTTCAAATGGTC
jLEP-A1F2 (P3)	CCGGAATTCATTCATTCATTCAGATAGCCT
jLEP-A1R2 (P4)	CCGCTCAG <b>T</b> TAGCAGCTTTTCAAATGGTC
jLEP-BF1 (P5)	CATGCCATGGCATCCCACTTCATCCGGATAGC
jLEP-BR1 (P6)	CCGGAATTC <b>T</b> TAGCAGCTTTTCAAATGGTC
jLEP-BF2 (P7)	CCGGAATTCATCCCACTTCATCCGGATAGC
jLEP-BR2 (P8)	CCGCTCAG <b>T</b> TAGCAGCTTTTCAAATGGTC

*Nco* I, *Xho* I 和 *EcoR* I 酶切位点用下划线标出,反向引物的终止密码子用粗体字标出。

*Nco* I, *Xho* I 和 *EcoR* I restriction sites were marked by underline; the stop codon of reverse primers were in bold.

分别以 *leptin* 基因克隆时构建的质粒 pMD/*jLEP-A1* 和 pMD/*jLEP-B* 为模板,利用 *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,反应条件均为

94℃ 3 min, 然后 30 个循环(94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min), 最后 72℃ 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 胶纯化试剂盒回收两目的基因。

**1.2.2 重组质粒的构建** 将以上获得的目的基因和表达载体 [pET-32a(+) 和 pGex-4T-1] 分别用 *Nco* I 和 *Eco*R I, 以及 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切, 酶切产物分别经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 胶纯化试剂盒回收。经纯化的目的 DNA 片段分别与载体在 T4 DNA 连接酶的作用下进行连接。连接产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆, 质粒送上海博尚生物技术有限公司测序。

**1.2.3 重组质粒 pET-32a(+) /jleptin 和 pGex-4T-1/jleptin 的原核表达** 将测序鉴定后的重组质粒 pET-32a(+) /jleptin 和 pGex-4T-1/jleptin 分别转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑单菌落接种于含 Amp<sup>+</sup> 的 LB 液体培养基中, 于 37℃ 培养过夜, 次日以 1:50 (体积比) 转接至新鲜 LB 液体培养基 (含 100  $\mu$ g/mL Amp, 0.6% 葡萄糖), 37℃, 200 r/min 培养菌液至 A<sub>600</sub> 为 0.5 ~ 0.7 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37℃ 下依次诱导 2 h、3 h、4 h、5 h。以未经 IPTG 诱导的重组质粒以及 IPTG 诱导的空表达载体作阴性对照, 进行 12% SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色和脱色。

**1.2.4 pGex-4T-1/leptin 融合蛋白的鉴定** 大量诱导表达的菌体 (标注为 S1), 经离心收集 (5 000 r/min, 4℃ 离心 5 min), 1  $\times$  PBS 重悬菌体后加终浓度为 1 g/L 的溶菌酶在冰上消化 30 min。7 300 r/min 4℃ 离心 10 min, 取上清, 标注为 S2。沉淀重悬于含 1% 的 Triton-X-100 的 1  $\times$  PBS 溶液中, 4℃ 混合 10 min, 离心 10 min, 取上清, 标注为 S3。S1、S2 和 S3 各加入等体积的 2  $\times$  SDS 上样缓冲液, 煮沸变性后等量上样, 进行 SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色和脱色。

## 2 结果与分析

### 2.1 建鲤 *leptin* 氨基酸的信号肽序列分析

运用 SignalP 4.0 软件在线预测建鲤 *leptin* 氨基酸的信号肽序列。jLEP-A1、jLEP-B 信号肽长度均为 20 个氨基酸, 剪切位点都位于第 20 和 21 个氨基酸之间 (图 1)。

**2.2 建鲤 *leptin* 基因编码区 (不含信号肽) 的 PCR 扩增** 以建鲤质粒 pMD18/*leptin* 为模板, 用引物 P1 ~ P8 分别扩增建鲤 *leptin* 基因编码区 (不含信号肽) 的序列, 得到与目的片段大小一致的条带, 其中 P1/P2 和 P3/P4 引物对扩增 jLEP-A1 条带大小分别为 476 bp、475 bp; P5/P6 和 P7/P8 引物对扩增 jLEP-B 条带大小分别为 467 bp、465 bp (图 2)。

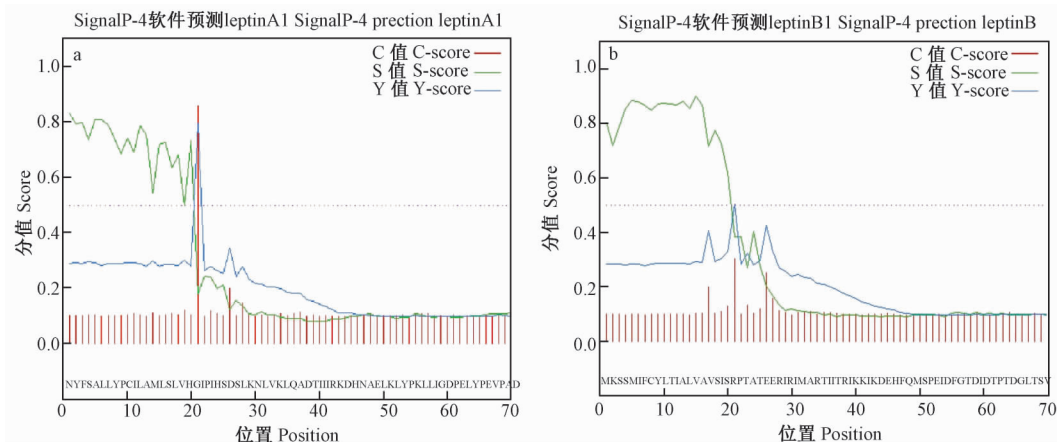


图 1 建鲤 *leptins* 氨基酸的信号肽分析

Fig. 1 Analysis of peptide sequence of jLEP-A1 and jLEP-B

a. jLEP-A1; b. jLEP-B

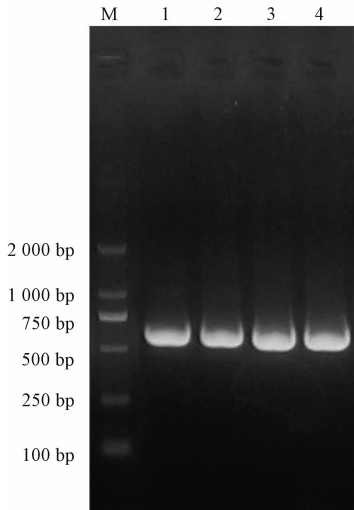


图2 建鲤 *leptin* 基因编码区(不含信号肽)的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of *leptin* ORFs

excluding signal peptide in *Cyprinus carpio* var. *jian*

M. DL2000 DNA 分子量标准; 1. *jLEP-A1* 基因片段 (P1/P2 引物对扩增); 2. *jLEP-A1* 基因片段 (P3/P4 引物对扩增); 3. *jLEP-B* 基因片段 (P5/P6 引物对扩增); 4. *jLEP-B* 基因片段 (P7/P8 引物对扩增)。

M1. DL2000 DNA marker; 1. PCR product of *jLEP-A1* by P1 and P2; 2. PCR product of *jLEP-A1* by P3 and P4; 3. PCR product of *jLEP-B* by P5 and P6; 4. PCR product of *jLEP-B* by P7 and P8.

### 2.3 重组质粒 pET-32a(+)/*leptin* 和 pGex-4T-1/*leptin* 的构建及鉴定

将含有目的基因的质粒和表达载体分别用相对应的限制性内切酶进行酶切,酶切产物经 T4 DNA 连接酶连接后,转化到 DH5a 感受态细胞,菌落 PCR 鉴定阳性克隆后,送生物公司测序,测序引物分别为 S. tag(5'-GAA CGC CAG CAC ATG GAC-3')和 pGex-5(5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG-3')。测序结果表明,所构建的重组质粒序列正确,插入载体位点正确,能按正常阅读框翻译出目的基因。

### 2.4 重组质粒 pET-32a(+)/*leptins* 和 pGex-4T-1/*leptins* 的原核表达

SDS-PAGE 电泳结果显示,在 37°C 经 IPTG 诱导表达 5 h,重组质粒表达量达到最高。重组质粒 pET-32a(+)/*jLEP-A1* 和 pET-32a(+)/*jLEP-B* 在约 39 ku 处出现一条明显的条带(图 3)。重组质粒

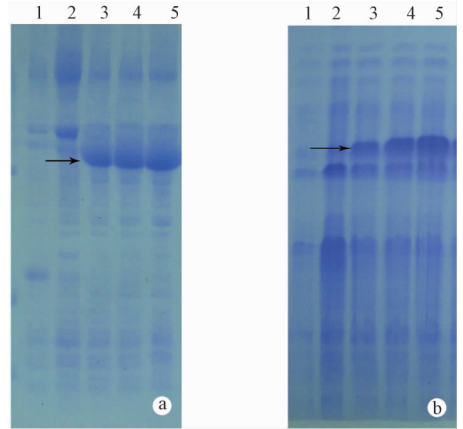


图3 含 pET-32a(+ )载体的融合蛋白在不同时间下诱导表达分析

Fig. 3 Analysis of fusion protein including pET-32a(+ ) vector expressed at different times

a. pET-32a(+ )/*jLEP-A1*; b. pET-32a(+ )/*jLEP-B*.

1. 未加 IPTG 诱导的融合蛋白; 2. IPTG 诱导的 pET-32a(+ ); 3~5. 为融合蛋白在 37°C 下 IPTG 分别诱导 3 h, 4 h, 5 h; 箭头示目的蛋白。

1. Fusion protein uninduced by IPTG; 2. pET-32a(+ ) induced by IPTG; 3-5. Fusion protein induced by IPTG for 3 h, 4 h, 5 h, respectively; Target proteins were showed by arrows.

pGex-4T-1/*jLEP-A1* 和 pGex-4T-1/*jLEP-B* 在约 45 ku 处出现一条明显的条带(图 4)。

### 2.5 pGex-4T-1/*leptins* 融合蛋白的鉴定

分别将总蛋白 S1,破碎细胞后的上清蛋白 S2 以及沉淀蛋白 S3 煮沸变性后等量上样,进行 SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色和脱色操作。结果发现在上清液以及沉淀中均有目的蛋白,而且上清液中的蛋白浓度大于沉淀中的蛋白浓度(图 5)。

## 3 讨论

本文选用了两种原核载体 pET-32a(+ )和 pGex-4T-1,一个含有 His 标签,一个含有 GST 标签,都方便于蛋白的纯化回收。构建的 pET-32a(+ )融合蛋白表达后,含有 Trx 融合蛋白 11.7 ku,一个 His 标签 0.8 ku,一个 S-Tag 1.7 ku,目的蛋白与 Trx 蛋白融合表达时连接两蛋白部分的分子量 5.1 ku,加上目的蛋白

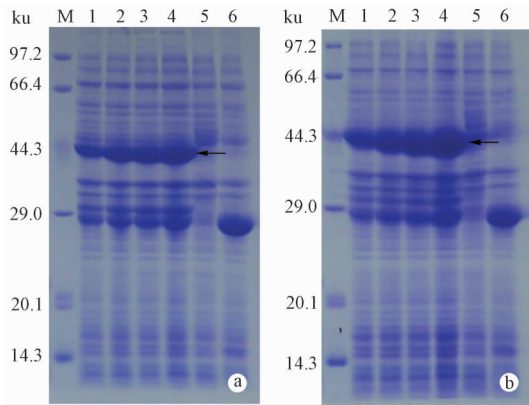


图 4 含 pGex-4T-1 载体的融合蛋白在不同时间下诱导表达分析

Fig. 4 Analysis of fusion protein including pGex-4T-1 vector expressed at different times

a. pGex-4T-1/jlLEP-A1; b. pGex-4T-1/jlLEP-B.

M. 蛋白质分子量标准; 1~4. 为融合蛋白分别在 37℃ 下 IPTG 分别诱导 2 h、3 h、4 h、5 h; 5. 未加 IPTG 诱导的融合蛋白; 6. IPTG 诱导的 pGex-4T-1; 箭头示目的蛋白。

M. protein marker; 1-4. fusion protein induced by IPTG for 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, respectively; 5. fusion protein uninduced by IPTG; 6. pGex-4T-1 induced by IPTG; target proteins were showed by arrows.

19.2 ku, 融合蛋白总的分子量约为 39 ku, 与图 3 的结果一致, 这表明本文构建的 pET-32a (+) 融合蛋白表达出了目的基因。pGex-4T-1 融合蛋白表达后, GST 标签约为 26 ku, 加上目的蛋白 19.2 ku, 融合蛋白总的分子量约为 45 ku, 与图 4 的结果一致, 这说明本文构建的 pGex-4T-1 融合蛋白同样也表达出了目的基因。

在原核生物中, 基因没有区域间隔, 边转录边表达, 信号肽不能被细胞识别切除, 影响蛋白的空间结构, 蛋白质不能正确折叠, 导致蛋白活性也改变。另外原核生物本身的基因中是不存在信号肽序列的, 目的基因信号肽序列中的密码子对原核生物来说可能是稀有密码子, 影响其表达。而且信号肽大多是疏水性的, 溶解性较差, 表达后容易形成包涵体, 影响后续的蛋白纯化(Kurucz et al. 1995, Huang et al. 2012)。在构建原核表达质粒时, 需要进行信号肽预测, 本文构建的原核表达质粒均不含信号肽。从

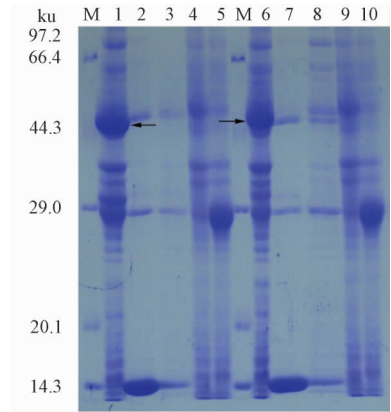


图 5 含 pGex-4T-1 载体的融合蛋白的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of recombination protein including the prokaryotic vector pGex-4T-1

M. 蛋白质分子量标准; 1. 诱导 pGex-4T-1/jlLEP-A1 后的总蛋白; 2、3. 诱导 pGex-4T-1/jlLEP-A1 裂解后的上清和沉淀; 4. 未诱导的 pGex-4T-1/jlLEP-A1; 5、10. IPTG 诱导后的 pGex-4T-1; 6. 诱导 pGex-4T-1/jlLEP-B 后的总蛋白; 7、8. 诱导 pGex-4T-1/jlLEP-A1 裂解后的上清和沉淀; 9. 未诱导的 pGex-4T-1/jlLEP-B; 箭头示目的蛋白。

M. protein marker; 1. total protein of induced pGex-4T-1/jlLEP-A1; 2-3. supernatant and precipitation of induced pGex-4T-1/jlLEP-A1; 4. uninduced pGex-4T-1/jlLEP-A1; 5, 10. induced pGex-4T-1; 6. total protein of induced pGex-4T-1/jlLEP-B; 7-8. supernatant and precipitation of induced pGex-4T-1/jlLEP-B; 9. uninduced pGex-4T-1/jlLEP-B; target proteins were showed by arrows.

pGex-4T-1 载体的融合蛋白的表达分析上看, 融合蛋白主要存在于上清中, 这有利于后续的 GST 标签蛋白纯化。

在诱导温度、诱导时间以及 IPTG 浓度上, 不同的载体可能会出现不同的结果, 低温通常会减少包涵体的形成(冯海洋等 2011)。在本研究中, 采用 37℃、1 mmol/L 的 IPTG、5 h 的诱导条件, 能诱导出目的蛋白, 而且目的蛋白主要存在于上清中, 这为后续蛋白纯化以及 leptin 的功能研究奠定了基础。

## 参 考 文 献

- Ahima R S, Prabakaran D, Mantzoros C, et al. 1996. Role of *Leptin* in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382 (6588): 250-252.
- Gorissen M, Bernier N J, Nabuurs S B, et al. 2009. Two divergent leptin paralogues in zebrafish (*Danio rerio*) that

- originate early in teleostean evolution. *Journal of Endocrinology*, 201(3): 329–339.
- Huang L R, Ma H L, Li Y L, et al. 2012. Antihypertensive activity of recombinant peptide IYPR expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 83(1): 15–20.
- Kurokawa T, Murashita K. 2009. Genomic characterization of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in the Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *General and Comparative Endocrinology*, 161(2): 229–237.
- Kurokawa T, Uji S, Suzuki T. 2005. Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Peptides*, 26(5): 745–750.
- Kurucz I, Titus J A, Jost C R, et al. 1995. Correct disulfide pairing and efficient refolding of detergent-solubilized single-chain Fv proteins from bacterial inclusion bodies. *Molecular Immunology*, 32(17/18): 1443–1452.
- Li G G, Liang X F, Xie Q L, et al. 2010. Gene structure, recombinant expression and functional characterization of grass carp leptin. *General and Comparative Endocrinology*, 166(1): 117–127.
- Murashita K, Uji S, Yamamoto T, et al. 2008. Production of recombinant leptin and its effects on food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(4): 377–384.
- Tang B L. 2008. Leptin as a neuroprotective agent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(2): 181–185.
- Trombley S, Maugars G, Kling P, et al. 2011. Effects of long-term restricted feeding on plasma leptin, hepatic leptin expression and leptin receptor expression in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *General and Comparative Endocrinology*, 175(1): 92–99.
- Volkoff H, Eykelbosh A J, Peter R E. 2003. Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting. *Brain Research*, 972(1/2): 90–109.
- Won E T, Baltzegar D A, Picha M E, et al. 2012. Cloning and characterization of leptin in a Perciform fish, the striped bass (*Morone saxatilis*): control of feeding and regulation by nutritional state. *General and Comparative Endocrinology*, 178(1): 98–107.
- Zhang H X, Chen H P, Zhang Y, et al. 2013. Molecular cloning, characterization and expression profiles of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and Comparative Endocrinology*, 181(3): 295–305.
- 冯海洋, 邱高峰. 2011. 中华绒螯蟹和罗氏沼虾 cyclin B 蛋白的原核表达、抗体制备及其鉴定. *中国水产科学*, 18(4): 713–719.
- 李红霞, 刘楠楠, 浦天宁, 等. 2012. 建鲤 IGF-I a 基因的 SNPs 位点筛选及其与增重的相关性分析. *上海海洋大学学报*, 21(1): 7–13.
- 陶文静, 马龙俊, 阮瑞霞, 等. 2011. 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*, 35(4): 622–629.
- 魏可鹏, 俞菊华, 李红霞, 等. 2012. 建鲤 IGFBP1 基因的克隆及与增重相关的 SNP 位点分析. *华北农学报*, 27(3): 75–80.
- 张建森, 孙小异. 2007. 建鲤新品系的选育. *水产学报*, 31(3): 287–292.