

DOI: 10.12264/JFSC2021-0511

鳙 *bmi1b* 基因单核苷酸多态性及其与生长和体型性状的关联性

高一凡^{1,2}, 俞小牧², 桂建芳², 童金苟²

1. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023;

2. 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北洪山实验室, 中国科学院种子创新研究院, 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072

摘要: *bmi1b* 基因作为转录抑制因子, 在维持多种干细胞的自我更新和增殖活性方面起重要作用。本研究对鳙 (*Hypophthalmichthys nobilis*) *bmi1b* 基因进行了单核苷酸多态性发掘及其与生长和体型性状的关联性分析。鳙 *bmi1b* 全长 5800 bp, 包含 9 个外显子、8 个内含子, 其氨基酸序列在进化上较为保守。*bmi1b* 在鳙下丘脑和肝脏中的表达量较高, 胚胎发育阶段从未受精卵至囊胚期都有极高的表达, 原肠期后表达量显著降低, 具有母源基因的表达特征。采用 PCR 扩增产物直接测序的方法, 在鳙 *bmi1b* 3' UTR 获得 2 个 SNPs g.5224 T>A 和 g.5550 C>T。利用来源于 1 个鳙混合群体的 169 尾鱼进行 SNP 基因分型及其与生长和体型性状的相关性分析, 结果表明: g.5224 T>A 与体重和头高呈显著相关($P<0.05$), 与体高和头长呈极显著相关($P<0.01$); g.5550 C>T 与体重和体型性状的相关性未达到显著水平。2 个 SNP 位点等位基因间的组合分析显示, 双倍型 D2 (AT CC) 为优势基因型组合, 其体重和体型性状的平均值显著高于其他双倍型。这些结果为进一步研究鱼类 *bmi1b* 基因的功能提供了参考; 同时鳙 *bmi1b* 基因 SNP 标记在生长和体型性状的分子育种研究中也具有良好的应用潜力。

关键词: 鳙; *bmi1b*; 单核苷酸多态性; 生长性状; 体型; 关联性分析

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)04-0503-12

B 细胞莫洛尼(氏)鼠白血病病毒插入位点 1 (B-cell-specific Moloney murine leukemia virus insertion site 1, BMI1) 是 PRC1 (polycomb repressive complex 1) 的家族成员, 是一种必不可少的转录抑制因子, 具有调控正常和癌症干细胞的细胞周期和自我更新的功能^[1-3]。在 *bmi1* 的 N 端有一个环指结构域, 通过这种环指结构, *bmi1* 在细胞增殖和抑制蛋白表达中发挥着关键作用^[4-5]。*bmi1* 与 c-Myc 的共同作用在肿瘤发生中也发挥了重要作用^[6]。Chen 等^[7]发现间充质干细胞(MSCs) 中 *bmi1* 通过失活 p16/p19 信号通路和抑制氧化应激过表达, 从而发挥抗衰老和抗骨质疏松作用。Lessard 等^[8]的研究表明, 缺乏 *bmi1* 的白血病干细胞和祖细胞的增殖潜能受到损害。基于全基因组

加倍事件, *bmi1* 在鱼类中有两个同源基因: *bmi1a* 和 *bmi1b*。*bmi1b* 基因在斑马鱼 (*Danio rerio*)^[9]、斑点叉尾鮰 (*Ictalurus punctatus*)^[10] 和墨西哥丽脂鲤 (*Astyanax mexicanus*)^[11] 等鱼类中有研究报道, 而其他鱼类中未见报道。

分子标记辅助育种(molecular marker-assisted breeding, MAS) 是利用与性状紧密相关的分子标记对具有目标性状的个体进行直接选择育种的技术^[12-13], 有多种方法能够获得性状相关的基因和分子标记, 候选基因法(candidate gene approach) 是其中之一^[13]。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP) 作为第 3 代遗传标记, 具有位点数量多、分布广和遗传多样性高等优点, 是目前最主流的 DNA 分子遗传标记, 也是候选基因

收稿日期: 2021-10-26; 修订日期: 2021-11-09.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31472268); 中国科学院战略性科技先导专项(A) (24030505).

作者简介: 高一凡(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类遗传学与分子育种. E-mail: yfgao1228@163.com

通信作者: 童金苟, 研究员, 研究方向为鱼类遗传育种. E-mail: jgtong@ihb.ac.cn

法中使用最为广泛的基因分子遗传标记^[14]。冯贺等^[15]研究发现, 延边黄牛 *ASB12* 基因 2 个突变位点的不同基因型与体高、体斜长差异显著($P<0.05$)。谢海强^[16]在山羊 *STAT5A* 基因内含子检测到 1 个 SNP 位点 G127A, 该位点与山羊体重、体斜长、管围和胸围显著相关。候选基因法在鱼类中也有大量的应用, 例如曹婷婷等^[17]草鱼羧肽酶 A1 基因(*CPA1*)部分片段上筛选到的 2 个 SNP 位点中, C+36A 位点不同基因型在体重、眼间距均值上存在显著差异。Wang 等^[18]发现载脂蛋白 *ApoA-Ib* 基因的 2 个 SNPs 对鳙(*Hypophthalmichthys nobilis*)的体重、体长等生长性状均有显著影响。Liu 等^[19]在鳙生长 QTL 分析中定位到 *TP53BP2* 基因以后, 进一步发现该基因外显子中的 1 个 SNP 与鳙的体重(BW)显著相关, 也与体长(BL)、体高(BH)和头长(HL)显著相关($P<0.05$)。

鳙是我国及部分亚洲国家最重要的水产养殖鱼类之一。由于长期的人工繁殖和种质资源管理欠规范等原因, 导致鳙等大宗鱼类的生长和体型性状有所退化, 迫切需要开展经济性状的遗传改良。本研究以 *bmi1b* 基因作为候选基因, 从鳙基因组中获取基因全长序列, 采用直接测序法检测该基因序列中的单核苷酸突变位点, 旨在研究 *bmi1b* SNP 与鳙生长或体型性状的相关性, 探究该基因在这些经济性状中可能的遗传调控作用和分子育种潜力。本研究旨在为鳙生长和体型性状的分子标记辅助育种研究提供候选基因和分子标记资源。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

用于 *bmi1* 基因 SNP 位点筛查的 10 尾鳙分别来源于长江流域的石首、木洞、巫山、云阳、忠县、秭归、仙桃、洪湖、洞庭湖、武汉。用于生长和体型性状相关性分析的鳙样品, 采自武汉市涨渡湖渔场, 选择同批繁育的混合家系子代以及在标准池塘养殖条件(24~30 °C, pH 6~9)下同塘饲养 6 个月的鳙群体样本 169 尾(平均体重 120 g 左右), 测定其体长(BL)、头长(HL)、头高(HH)、头宽(HW)、体重(BW)、体高(BH)和头体比

(HL/BL), 并剪取尾鳍置于无水酒精中, -20 °C 保存备用。

用于实时荧光定量表达分析的鳙亚成鱼、成鱼和各发育阶段的胚胎或鱼。鱼样本取自武汉市涨渡湖渔场。胚胎和鱼苗样本包括未受精卵、多细胞期、囊胚期、原肠期、神经胚期、体节出现期、肌肉效应期、出膜当天、出膜 1 d、出膜 5 d、出膜 20 d 和养殖 6 个月。选择 3 尾体重 1500 g 左右的鳙健康个体, 麻醉后解剖取脑、下丘脑、垂体、心脏、肝、脾、肾、皮肤、肌肉和肠共 10 个组织样品保存于液氮, 随后转移至-80 °C 冰箱保存备用。

1.2 基因组 DNA 和总 RNA 提取

基因组 DNA 提取采用经典的苯酚-氯仿抽^[20]提法, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳(1×TBE 5 V/cm)检测所提取的 DNA 质量, 取 1 μL 在 NanoDrop 2000 微量分光光度计上测定 DNA 浓度和纯度。将 DNA 样品浓度稀释至 30 ng/μL 工作液于-20 °C 保存。

使用 Trizol Reagent 进行胚胎、鱼苗及成鱼组织总 RNA 提取, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 在 NanoDrop 2000 微量分光光度计上测定总 RNA 浓度和 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值后, 保存于-80 °C 备用。

1.3 序列分析

在鳙基因组^[21]中查找获得 *bmi1a* 和 *bmi1b* 基因全长和 cDNA 序列。从 GenBank 查询下载哺乳动物 *bmi1* 基因序列以及硬骨鱼类 *bmi1a* 和 *bmi1b* 基因序列。通过 NCBI 网站 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 获得 *bmi1b* 开放阅读框(open reading frame, ORF)。利用 NCBI 网站 (<http://blast.Ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行氨基酸预测。利用 ProtParam 程序 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测编码蛋白的理化性质。用 SignalP 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测蛋白信号肽。通过 TMHMM Server v.2.0 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析蛋白的跨膜结构。使用 Pfam 程序 (<http://pfam.xfam.org/search>) 预测蛋白结构域。使用 SWISS-MODEL 网站 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白二级结构。使用 ESPript 程序 (<http://escript.ibcp.fr/EScript/>)

cgi-bin/ESPrpt.cgi)进行序列多重比对分析, 以 MEGA 4.0 软件和邻接法^[22] (neighbor-joining method, NJ)构建系统发育树。

1.4 荧光定量 RT-PCR

将提取的总 RNA 稀释至 500 ng/μL, 使用 M-MLV 第一链 cDNA 合成试剂盒(Illumina, 美国)反转录合成 cDNA 第一链, 于-20 ℃保存备用。将鳙胚胎、鱼苗和成鱼各组织 cDNA 稀释 3 倍作为模板。设计 1 对鳙 *bmi1b* 引物和 1 对鳙 *β-actin* 引物用于荧光定量 RT-PCR。将下丘脑第一链 cDNA 进行 10 倍梯度稀释, 制作各 RT-PCR 引物的标准曲线, 并计算它们的扩增效率, 扩增效率大于 0.95 且无非特异性扩增产物的引物将用于下一步定量分析。定量 RT-PCR 反应体系如下: 总体积 12 μL, 包括: 6 μL Power SYBR Green PCR Master Mix、0.25 μL 的上下游引物、1.5 μL cDNA。在 ABI StepOne™ Real-Time PCR System 上进行定量 RT-PCR 反应, 反应程序如下: 95 ℃预变性 10 min; 95 ℃变性 15 s, 57 ℃退火和延伸 1 min, 40 次循环; 并绘制熔解曲线。各组织的表达分析设计 3 个生物学重复, 每个样品的定量 RT-PCR 反应设计 3 个操作重复。依据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算每个基因相对于内参基因 *β-actin* 的相对表达量^[23]。用 SPSS 22.0 软件分析表达差异水平。

1.5 *bmi1b* 基因引物设计及 SNP 位点的筛选

使用 NCBI 网站的 Blast 比对查找获得的 *bmi1b* 基因序列。利用 Primer premier 5.0 软件对外显子和 UTR 区设计 PCR 扩增引物(表 1), 扩增来自不同地区的 10 个鳙样本的基因组 DNA, PCR 反应总体积为 25 μL: 含有 1.5 μL DNA 模板, 2.5 μL 10×PCR Buffer, 0.75 μL rTaq 酶(TaKaRa, 日本), 0.8 μL 4×dNTP, 0.8 μL 的正向和反向引物混合物(各 2.5 μmol/L), 最后加入适量灭菌超纯水至 25 μL。反应条件除退火温度有所差异外, 其他条件均为: 95 ℃变性 5 min; 随后 38 个循环, 每个循环包括 95 ℃变性 30 s, 退火 30 s, 72 ℃延伸 15 s; 最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 扩增产物先于 1 % 的琼脂糖凝胶中进行电泳检测, 紫外凝胶成像仪观察为单一一条带后, 把扩增产物送北京奥科鼎盛生物科技有限公司进行纯化和测序。用 Clustalx 软件对来源于不同水系的 10 尾鳙个体的测序结果进行比对, 以最小频率等位基因出现率大于 30% 的单核苷酸变异位点, 作为本研究后续分析的候选 SNP 位点。

1.6 SNP 位点的分型

SNP 分型采用直接测序法。将所获 *bmi1b* 基因序列片段上的候选 SNP 位点, 以 169 尾鳙群体样本的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物送

表 1 鳙 *bmi1b* 基因扩增和所用引物

Tab. 1 Primers used for *bmi1b* gene amplification and genotyping in *Hypophthalmichthys nobilis*

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	温度/℃ <i>T_m</i>	用途 usage
Hynbmi1b-1F	TTCGCACTGAACCATC	50	扩增 5' UTR 区
Hynbmi1b-1R	CGTGACTCCGCTCTT		
Hynbmi1b-2F	AGTGCAGTTGACCATCTAA	52	扩增 1、2、3 外显子
Hynbmi1b-2R	ACTTACTTTGAACAGACCCAGG		
Hynbmi1b-3F	GATGAAACGAAGGAGGGATT	52	扩增 4、5、6 外显子
Hynbmi1b-3R	GGCATTGTAAGTACCGCTTTA		
Hynbmi1b-4F	GAAAGTCATGTAAAAGTAGTAGGCT	52	扩增 7、8、9 外显子
Hynbmi1b-4R	GAGACTGGACAGGGGTGC		
Hynbmi1b-5F	ATTGAAGTTATGTATGAAGATGAGC	50	扩增 3' UTR 区
Hynbmi1b-5R	GCACATTTCAGCCGAATA		
Hynbmi1b-qPCR-F	TCATTGACGCGACCACCAT	57	qRT-PCR
Hynbmi1b-qPCR-R	CCGCATAAAAATCCCTCCTTC		
Hyn β -actin-qPCR-F	TATCCTATTGAGCACGGTATTG	57	qRT-PCR
Hyn β -actin-qPCR-R	CCTGTTGGCTTGGGATTC		

北京奥科鼎盛生物科技有限公司纯化和测序。利用 Finch TV 软件对测序结果进行等位基因和基因型分型，辅以必要的人工核对和校正。

1.7 数据统计与分析

实验数据采用平均值±标准差表示。利用 SPSS 22.0 软件进行混合群体中 *bmi1b* SNP 位点不同基因型与体重、体长、头长、头高、头宽、头体比和体高等 7 个生长和体型性状的关联分析。首先对数据进行单因素方差分析，若组间有显著差异，再进行 Duncan's 多重比较分析。 $P < 0.05$ 时被认为差异性显著， $P < 0.01$ 时被认为差异性极显著， $P > 0.05$ 时没有差异。

2 结果与分析

2.1 鲔 *bmi1b* 基因结构与序列变异

通过 BLST 对基因组 DNA 与 cDNA 序列进行比对分析，得到鳙 *bmi1b* 基因的结构(图 1)。*bmi1b* 基因全长 5800 bp，包含 9 个外显子和 8 个内含子，9 个外显子的长度分别为 118 bp、102 bp、60 bp、51 bp、111 bp、51 bp、101 bp、87 bp、331 bp；外显子与内含子的剪接符合 GT-AG 规则。*bmi1b* cDNA 全长 1732 bp，包括 1 个 983 bp 的开放阅读框(ORF)、346 bp 的 5' UTR 和 1 个 403 bp 的 3' UTR。

经 ORF 预测结果显示，*bmi1b* 基因编码 326 个氨基酸(图 2)。蛋白结构和特性预测显示 Bmi1b 为非跨膜蛋白，该蛋白为不稳定的亲水性蛋白，但未找到信号肽结构。该蛋白在 20~58 位氨基酸为 RING 结构域，该结构域为指形结构域，参与介导蛋白间相互作用。在 162~226 位氨基酸为 RAWUL 结构域，该结构域位于多梳状环指蛋白 C 端，是泛素结构域。由于公共数据库中 *bmi1b* 基因和 Bmi1b 蛋白的研究报道还较少，SWISS-

MODEL 网站仅能预测 Bmi1b 蛋白的 123~232 位氨基酸二级结构，目前尚不能获得该蛋白完整的功能结构域空间信息。

从鳙基因组序列中调取 *bmi1a* 和 *bmi1b* 的氨基酸序列，其中 *bmi1a* 基因编码 323 个氨基酸，将这两个氨基酸序列与脊椎动物 *bmi1*、*bmi1a* 和 *bmi1b* 基因编码(表 2)的氨基酸序列构建系统进化树(图 3)，对该进化树的拓扑结构进行了自展检验(bootstrap)，重复 1000 次。结果表明，在系统进化树上鳙 *bmi1a*、*bmi1b* 各自聚为一支，分别与金线鲃属鱼类的 *bmi1a*、*bmi1b* 亲缘关系最近。

2.2 鲔 *bmi1b* 时空表达分析

利用实时荧光定量 RT-qPCR，对鳙胚胎发育期和幼鱼期样本以及成鱼不同器官组织样本进行 *bmi1b* 的时空表达分析。结果表明，*bmi1b* 在鳙的胚胎发育各时期中，未受精卵、多细胞期和囊胚期的表达量显著高于其他时期($P < 0.05$)，其中多细胞期的相对表达量是肌肉效应期的 30 倍。原肠期后表达量趋于稳定。*bmi1b* 基因在鳙成鱼的各组织中均有表达，其中下丘脑的表达量最高，脑、垂体和肝也有较高的表达，脾和肠的表达量最低。图 4 和图 5 分别显示的是采用 RT-qPCR 检测鳙 *bmi1b* 的时间和空间表达模式。

2.3 鲔 *bmi1b* 基因 SNP 位点与生长性状的关联性分析

通过 NCBI 上 BLAST 功能对测序结果进行比对分析，确认本研究所获得的序列是鳙 *bmi1b* 基因片段。通过直接测序法，在长度为 1732 bp 的鳙 *bmi1b* 基因 DNA 中共获得 6 个 SNP 位点，分别是位于第 4 内含子的 g.4045 C>T，位于第 5 内含子的 g.4230 C>T、g.4278 G>A 和 g.4316 C>T，位于 3' UTR 的 g.5224 T>A 以及 g.5550 C>T。根据同一位点不同碱基出现比例大于 30% 作为有效 SNP

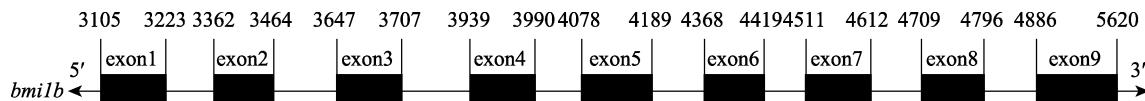
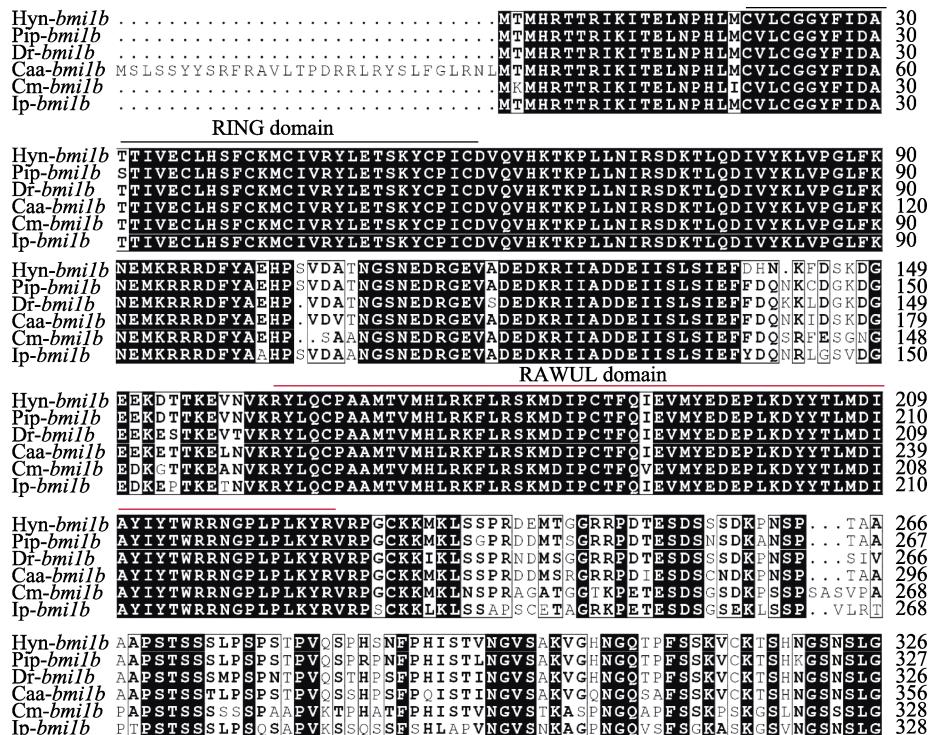


图 1 鲔 *bmi1b* 基因结构示意图

左箭头表示 5' 非翻译区，黑色矩形表示外显子，直线表示内含子，右箭头表示 3' 非翻译区。

Fig. 1 Structure of *Hypophthalmichthys nobilis bmi1b* gene

Left arrow represents 5' UTR; black rectangle represents exon; straight line represents intron, and right arrow represents 3' UTR.

图 2 鲂 *bmi1b* 与其他硬骨鱼类 *bmi1b* 之间的同源比对

Hyn—鳙; Pip—黑头软口鲦; Dr—斑马鱼; Caa—鲫; Cm—大盖巨脂鲤; Ip—斑点叉尾鮰。

预测的 RING 结构域和 RAWUL 结构域显示在氨基酸序列的上方。

Fig. 2 Comparison of deduced amino acid sequence of *Hypophthalmichthys nobilis* *bmi1b* with its homologues from other species of osteichthyes

Hyn—*Hypophthalmichthys nobilis*; Pip—*Pimephales promelas*; Dr—*Danio rerio*; Caa—*Carassius auratus*; Cm—*Colossoma macropomum*; Ip—*Ictalurus punctatus*. The putative RING domain and RAWUL domains are shown above the amino acid sequences.

表 2 用于构建 NJ 树的物种及氨基酸序列号

Tab. 2 Species and amino acid sequences used for NJ tree construction

基因名称 gene name		物种 species	GenBank 登录号 GenBank accession No.	基因名称 gene name	物种 species	GenBank 登录号 GenBank accession No.
<i>bmi1</i>	鸡 <i>Gallus gallus</i>		AY616032.1	<i>bmi1b</i>	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NM_001080751.1
<i>bmi1</i>	人 <i>Homo sapiens</i>		NM_005180.9	<i>bmi1b</i>	大西洋鲱 <i>Clupea harengus</i>	XM_012827972.3
<i>bmi1</i>	小鼠 <i>Mus musculus</i>		NM_007552.4	<i>bmi1b</i>	美洲鲥 <i>Alosa sapidissima</i>	XM_042073102.1
<i>bmi1</i>	野猪 <i>Sus scrofa</i>		NM_001285971.1	<i>bmi1b</i>	黑头软口鲦 <i>Pimephales promelas</i>	XM_039677706.1
<i>bmi1</i>	狼 <i>Canis lupus</i>		NM_001287063.1	<i>bmi1b</i>	纳氏锯脂鲤 <i>Pygocentrus nattereri</i>	XM_017725252.2
<i>bmi1a</i>	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>		XP_042570836.1	<i>bmi1b</i>	大盖巨脂鲤 <i>Colossoma macropomum</i>	XM_036556691.1
<i>bmi1a</i>	大西洋鲱 <i>Clupea harengus</i>		XP_012688726.2	<i>bmi1b</i>	电鳗 <i>Electrophorus electricus</i>	XM_027017021.2
<i>bmi1a</i>	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>		NP_919347.1	<i>bmi1b</i>	巴丁鱼 <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	XM_026940823.2
<i>bmi1a</i>	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>		XP_036790978.1	<i>bmi1b</i>	白斑狗鱼 <i>Esox lucius</i>	XM_010895367.4
<i>bmi1a</i>	大盖巨脂鲤 <i>Colossoma macropomum</i>		XP_036414372.1	<i>bmi1b</i>	斑点叉尾鮰 <i>Ictalurus punctatus</i>	XP_017351863.1
<i>bmi1a</i>	斑点叉尾鮰 <i>Ictalurus punctatus</i>		XP_017309396.1	<i>bmi1b</i>	墨西哥丽脂鲤 <i>Astyanax mexicanus</i>	XP_007236127.1
<i>bmi1a</i>	尖吻鲈 <i>Lates calcarifer</i>		XP_018557543.1	<i>bmi1b</i>	遮目鱼 <i>Chanos chanos</i>	XP_030631562.1
<i>bmi1a</i>	黄颡鱼 <i>Tachysurus fulvidraco</i>		XP_027032564.1	<i>bmi1b</i>	鲱 <i>Denticeps clupeoides</i>	XP_028832128.1
<i>bmi1a</i>	鲫 <i>Carassius auratus</i>		XP_026056777.1	<i>bmi1b</i>	黄颡鱼 <i>Tachysurus fulvidraco</i>	XP_026998707.1
<i>bmi1a</i>	金线鲃 <i>Sinocyclocheilus grahami</i>		XP_016140926.1	<i>bmi1b</i>	鲫 <i>Carassius auratus</i>	XP_026062350.1
<i>bmi1a</i>	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>		XP_042570836.1	<i>bmi1b</i>	安水金线鲃 <i>Sinocyclocheilus anshuiensis</i>	XP_016342859.1
<i>bmi1a</i>	尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>		XP_013125824.2	<i>bmi1b</i>	金线鲃 <i>Sinocyclocheilus grahami</i>	XP_016127874.1
<i>bmi1a</i>	墨西哥丽脂鲤 <i>Astyanax mexicanus</i>		XP_007254844.2			

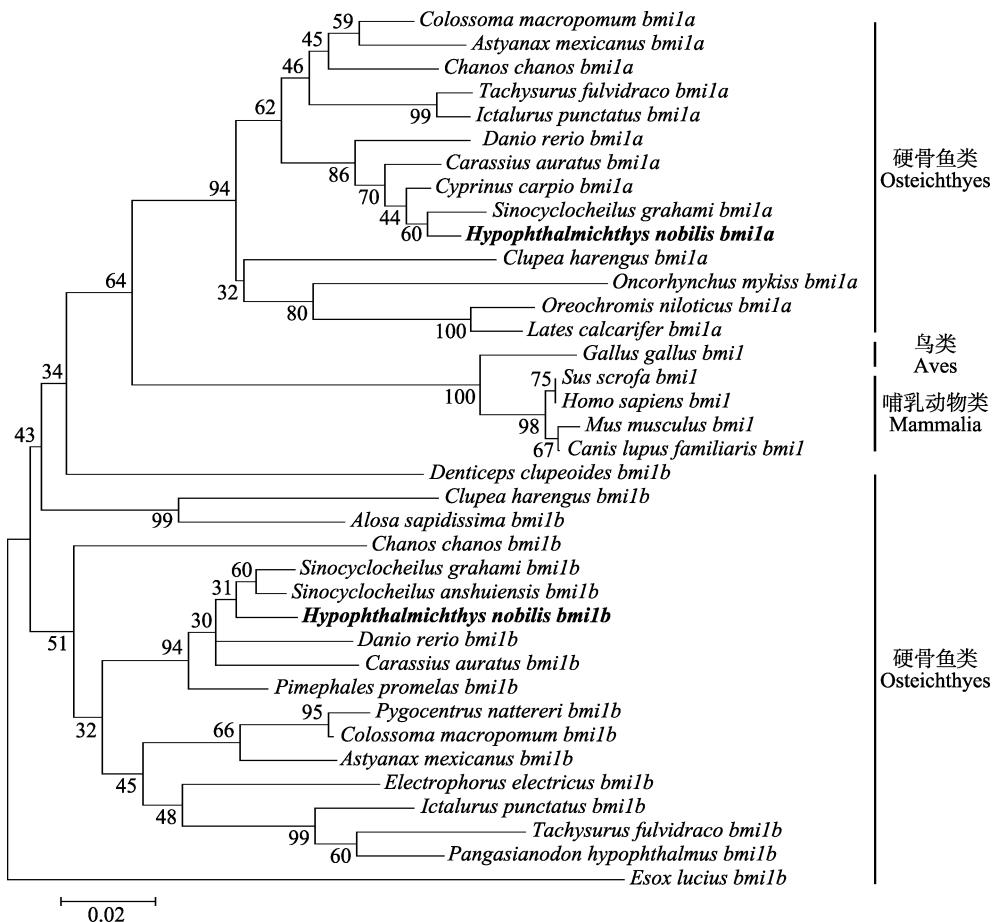


图 3 基于 Bmi1 氨基酸序列的脊椎动物系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree for selected species of vertebrates based on amino acid sequences of Bmi1

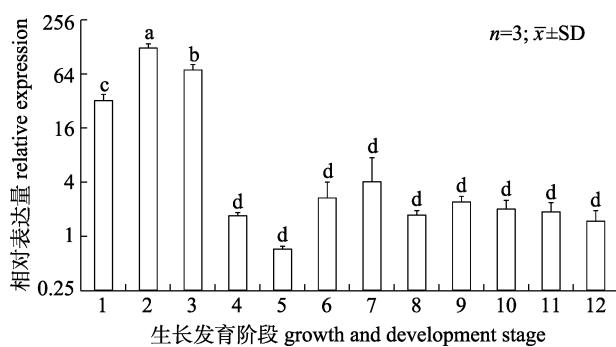


图 4 鲢 bml1b 在生长发育阶段的相对表达水平

1. 未受精卵; 2. 多细胞期; 3. 囊胚期; 4. 原肠期; 5. 神经胚期; 6. 体节出现期; 7. 肌肉效应期; 8. 出膜当天; 9. 出膜 1 d; 10. 出膜 5 d; 11. 出膜 20 d; 12. 6 月龄亚成鱼。
- 柱上不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 4 Relative expression levels of *bml1b* in growth and development stages of *Hypophthalmichthys nobilis*

1. unfertilized egg; 2. multi-cell; 3. blastula; 4. gastrula; 5. nerve embryonic; 6. somite; 7. muscular effect; 8. newly hatched larvae; 9. larvae of 1 day post-hatch (1dph); 10. 5 dph; 11. 20 dph; 12. 6 months. Values with different letters mean significant difference ($P<0.05$).

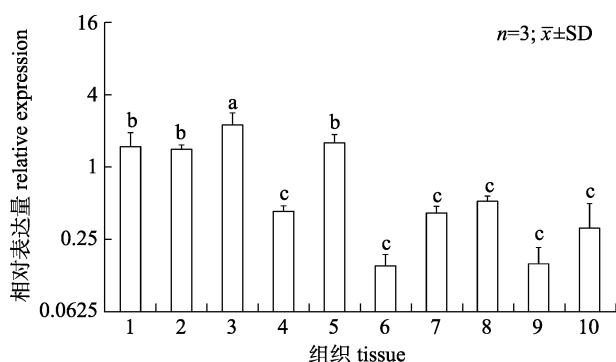


图 5 鲢 bml1b 在不同成鱼组织中的相对表达水平

1. 脑; 2. 垂体; 3. 下丘脑; 4. 心脏; 5. 肝; 6. 脾; 7. 肾; 8. 肌肉; 9. 肠; 10. 皮肤。柱上不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 5 Relative expression levels of *Hypophthalmichthys nobilis bml1b* in different tissues

1. brain; 2. hypophysis; 3. hypothalamus; 4. heart; 5. liver; 6. spleen; 7. kidney; 8. muscle; 9. intestines; 10. skin. Values with different letters mean significant difference ($P<0.05$).

的原则, 从上述单核苷酸多态性位点中共筛选出 2 个有效 SNP 位点(g.5224 T>A 和 g.5550 C>T), 其

突变类型和在群体中能够检测到的基因型如图 6 和图 7 所示。

在 169 尾鳙群体样品中进行 g.5224 T>A 和 g.5550 C>T 位点的基因分型, g.5224 T>A 位点只检测到两种基因型(AT/AA), AT 基因型占比相对较高(53.3%), 等位基因 A 频率明显高于等位基因 T。g.5550 C>T 位点同样也只检测到两种基因型(CC/TC), CC 基因型出现频率明显高于 TC, 等位

基因频率 C 是 T 的 4 倍以上(表 3)。

利用 SPSS 软件进行的 SNP 变异与鳙生长和体型性状的关联性分析结果显示, g.5224T>A 位点的不同基因型与头长呈显著相关($P<0.05$), 与头高和体高呈极显著相关($P<0.01$); 其中 AT 基因型在体长、体重、头长等指标上都高于 AA 型(表 4)。统计结果显示, g.5550 C>T 位点与各个生长和体型性状指标之间的相关性都没有达到显著相关水平。

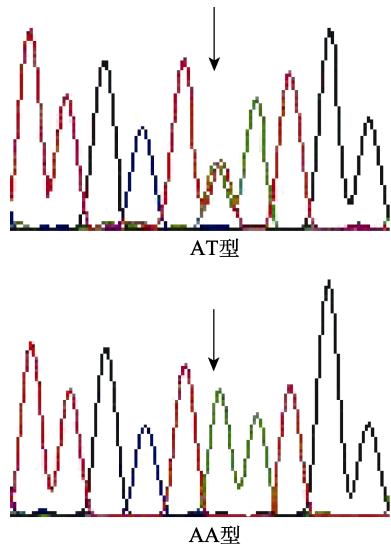


图 6 鲤 *bmi1b* g.5224 T>A 位点测序峰图

Fig. 6 DNA sequencing chromatograms of *bmi1b* g.5224 T>A site in *Hypophthalmichthys nobilis*

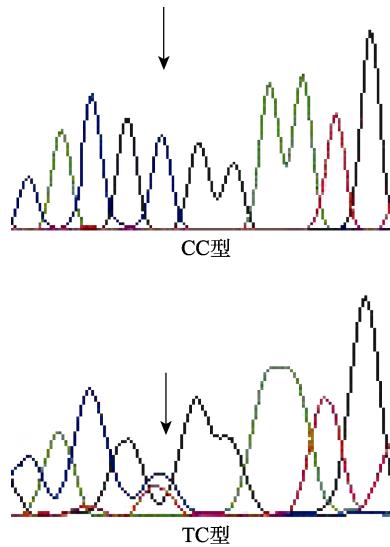


图 7 鲤 *bmi1b* g.5550 C>T 位点测序峰图

Fig. 7 DNA sequencing chromatograms of *bmi1b* g.5550 C>T site in *Hypophthalmichthys nobilis*

表 3 鲤 *bmi1b* 单核苷酸多态性位点在群体中的基因型分布

Tab. 3 Distribution of the genotypes of *bmi1b* SNPs in *Hypophthalmichthys nobilis* population

位点 site	样品数 number	基因型频率/% ratio of different genotypes	等位基因频率/% ratio of different alleles
g.5224 T>A	169	AA/46.7	AT/53.3
g.5550 C>T		CC/72.2	TC/27.8

g.5224 T>A 和 g.5550 C>T 之间的组合基因型分析表明, 两个 SNP 位点可以组成 4 种双倍型。双倍型与鳙群体中的 169 尾个体的生长和体型性状进行关联性分析, 子代数目较多的双倍型统计结果见表 5。在体重、头宽和头体比这 3 个指标上, 双倍型 D1 与 D2 呈显著相关($P<0.05$); 在体高、头长和头高指标上, 双倍型 D1 与 D2 呈极显著相关($P<0.01$)。其中, 双倍型 D2 的绝大多数生长和体型性状指标的均值皆高于其他双倍型, 是群体中的优势组合基因型。由于 D4 双倍型只有 1 尾鱼, 无法对该双倍型与生长或体型指标的关联

性进行统计学分析。

3 讨论

3.1 鲤 *bmi1b* 基因结构与功能

鳙 *bmi1b* 基因开放阅读框为 983 bp, 由 9 个外显子和 8 个内含子组成。5' UTR 为 346 bp、3' UTR 为 403 bp。与其他硬骨鱼类氨基酸序列比对结果显示, 鲤 *bmi1* 基因高度保守(图 2)。在进化上, *bmi1* 在鱼类中包含 *bmi1a* 和 *bmi1b* 两种亚型(图 3), 这与鱼类在进化上发生第 3 次全基因组加倍的事件相吻合^[24]。

表 4 鲔 *bmi1b* 2 个 SNPs 基因型与生长和体型性状的关联性Tab. 4 Association of genotypes of *bmi1b* two SNPs with growth and body type traits in *Hoplophthalichthys nobilis*

项目 item	g.5224 T>A		g.5550 C>T	
	AT	AA	CC	TC
体重/kg body weight	0.127±0.015 ^a	0.121±0.015 ^b	0.124±0.01	0.126±0.02
体长/cm body length	17.73±0.66	17.52±0.73	17.61±0.69	17.69±0.72
体高/cm body height	5.19±0.25 ^A	5.06±0.24 ^B	5.12±0.24	5.17±0.27
头长/cm head length	6.50±0.30 ^A	6.38±0.29 ^B	6.44±0.30	6.47±0.32
头高/mm head height	47.05±2.34 ^a	46.00±2.18 ^b	46.40±2.23	46.97±2.52
头宽/mm head width	31.15±2.01	30.51±1.86	30.82±1.89	30.94±2.16
头体比 head length/body length	0.367±0.009	0.364±0.008	0.366±0.008	0.366±0.010

注: 不同小写字母之间显示显著差异($P<0.05$); 不同大写字母之间显示极显著差异($P<0.01$); 相同的字母之间显示没有显著差异.

Note: Different superscript letters within a column means significant difference ($P<0.05$), and different superscript capital letters within a column means extremely significant difference ($P<0.01$). The same superscript letters within a column means no significant difference.

表 5 鲔 *bmi1b* g.5224 T>A 和 g.5550 C>T 双倍型与生长和体型性状的关联性Tab. 5 Association of diplotypes of *bmi1b* g.5224 T>A and g.5550 C>T with growth and body type traits in *Hoplophthalichthys nobilis*

项目 item	双倍型 diplotype							
	D1		D2		D3		D4	
	AA	CC	AT	CC	AT	TC	AA	TC
频率/% frequency	46.15		26.04		27.22		0.59	
体重/kg body weight	0.122±0.015 ^b		0.128±0.013 ^a		0.126±0.016		0.118	
体长/cm body length	17.53±0.73		17.76±0.60		17.70±0.72		17.30	
体高/cm body height	5.07±0.24 ^B		5.21±0.23 ^A		5.18±0.28		4.90	
头长/cm head length	6.39±0.29 ^B		6.53±0.28 ^A		6.48±0.32		6.20	
头高/mm head height	45.99±2.20 ^B		47.13±2.13 ^A		46.97±2.55		47.01	
头宽/mm head width	30.51±1.88 ^b		31.37±1.81 ^a		30.94±2.19		30.86	
头体比 head length/body length	0.364±0.008 ^b		0.368±0.009 ^a		0.366±0.010		0.358	

注: 不同小写字母之间显示显著差异($P<0.05$); 不同大写字母之间显示极显著差异($P<0.01$); 相同的字母之间显示没有显著差异.

D1–D4: 分别表示鲻的 4 种双倍型.

Note: Different superscript letters within a column means significant difference ($P<0.05$), and different superscript capital letters within a column means extremely significant difference ($P<0.01$). The same superscript letters within a column means no significant difference. D1–D4: four different diploid types, respectively.

由于鲻 *bmi1b* 基因未预测到跨膜结构域及信号肽, 因此推测 *bmi1b* 为非跨膜蛋白。通过结构域预测可知, 鲔 *bmi1b* 基因编码的蛋白主要包括 RING 结构域和 RAWUL 结构域 2 个蛋白结构域。含 RING 结构域的蛋白质最早发现于 1991 年^[25]。随后大量含有 RING finger 结构域的蛋白质被发现, 他们的功能主要为介导蛋白质之间的相互作用以及蛋白质的降解^[26]。RAWUL 结构域是于 2008 年由 Luis 等^[27]发现的 PRC1 环指蛋白中一个新的泛素样结构域。在 PRC1 复合体中, Ring1 和 Bmi1 通过 N 端环指结构域相互作用, 而 RAWUL

结构域与其他 PRC1 核心蛋白相互作用, 形成功能不同的 PRC1 复合物^[28]。Xiao 等^[29]在拟南芥中鉴定到含有 RAWUL 结构域的蛋白家族 RING1a/b 和 BMI1a/b/c, 它们在发育阶段发挥调控细胞增殖的作用。本研究通过分析基因结构和比较结构域的保守性判断, *bmi1b* 在鲻机体的生长和发育中发挥了广泛的生理作用, 其分子机制可能涉及细胞分化和增殖的调控。对于其他硬骨鱼类来说, 该分子调控机制可能表现为对生长和体型或头部尺寸等相关性状的调控, 对揭示鲻快速生长和头部发育的遗传调控机制有参考意义。鲻 *bmi1b* 的

功能还有待进一步采用基因敲除等功能基因组方法加以实验验证。

3.2 鲢 *bmi1b* 功能推测及基因时空表达特征

本研究的实时荧光定量 PCR 结果显示, *bmi1b* 基因在鳙胚胎发育各时期以及幼鱼期均有表达。值得注意的是, 在未受精卵、多细胞期以及囊胚期这 3 个时期鳙 *bmi1b* 基因的相对表达量显著($P < 0.05$)高于其他时期(例如多细胞期的表达量是肌肉效应期的 30 倍), 原肠期以后的其他发育时期的表达量水平相对稳定。由此我们推测, 鲢 *bmi1b* 是一种母源基因。有研究表明, 胚胎早期的发育过程不是由其细胞核控制的, 而是由以 mRNA 和蛋白质形式储存在卵质中的母源基因(maternal gene)所控制^[30]。母源 mRNA 调节和指导从未受精卵到单细胞胚胎的发育。由于母源 mRNA 发生瞬时多聚或脱腺苷酸化, 使细胞内保持一定数量的表达, 从而对早期胚胎发育具有调节作用^[31]。鳙 *bmi1b* 基因在成鱼组织的空间表达模式表明, 该基因在各主要组织中均有表达, 其中在脑、下丘脑、垂体和肝中的相对表达量高于其他组织。这意味着, 该基因可能是通过生长轴对鱼体的各个器官组织的发育发挥重要的调控作用。脑是中枢神经系统最重要的组成部分, *bmi1* 介导染色质修饰, 进而调控中枢神经系统前体细胞的增殖^[32]。Molofsky 等^[33]研究证明, *Bmi1* 可以抑制 *Cdkn2a* 位点, 是神经干细胞自我更新所必需的。*bmi1* 基因与许多哺乳动物的肿瘤发生有关^[34], 在原发性肝癌中也发现 *bmi1* 基因的过表达^[35]。肝脏是许多重要蛋白合成的场所, 也是生长调控轴组成部分之一, 这也许是鳙 *bmi1b* 基因在肝中表达量高于其他组织的原因。根据上述这些神经-内分泌等组织中的较高表达量等信息, 我们认为 *bmi1b* 可能具有促进鳙生长和脑部及其他器官组织发育的作用。

3.3 鲢 *bmi1b* 基因多态性 SNP 与生长和体型性状的关联性

本研究在鳙 *bmi1b* 基因中共发现 6 个 SNP 位点, 对其中突变率不小于 30 % 的 2 个位点 g.5224 T>A 和 g.5550 C>T 进行研究, 这 2 个位点都位于 3' UTR 区。SNP 在基因组中的分布广泛, 主要位于基因编码区和非编码区^[36]。基因编码区的 SNP

可能产生非同义突变或同义突变, 导致氨基酸改变或蛋白质空间构象稳定性的变化。尽管我们测序筛查了所有的外显子序列, 但并未在在 *bmi1b* 的外显子中发现 SNP, 暗示鳙 *bmi1b* 基因具有较高的功能保守性(functional constrain), 从而限制其外显子区域存在 SNP 变异。存在于编码区邻近调控序列的 SNP 突变位点, 也可能引起基因的表达产物或表达水平发生改变, 因此成为研究基因组多态性以及进行疾病和生长、繁殖性能等相关基因识别和定位的一种新工具^[37]。已有不少研究表明, 位于非编码区的 3' 非翻译区(3' UTR) SNP 突变对基因的表达效应有一定影响, 这些 SNP 不仅调控 mRNA 在体内的稳定性及降解速率, 控制其利用效率, 还调控 mRNA 的翻译时间、位点及产物^[38-42]。于莹莹等^[43]研究发现鸡 *IGFBP2* 基因 3' UTR 1196C>A SNP 影响 miRNA 对 *IGFBP2* 基因表达的调控作用。故此我们推测, 3' UTR 的 2 个 SNP 对鳙 *bmi1b* 基因的表达和发挥生理功能有调控作用。

本研究在 g.5224 T>A 和 g.5550 C>T 位点都只检测到一种纯合基因型, 而另一种纯合基因型没有在该群体被检测到, 推测与隐性致死基因位点连锁或样品数量和来源等其他未知的遗传或环境因素有关。将鳙 *bmi1b* 基因 g.5224 T>A 和 g.5550 C>T 位点与生长性状进行关联分析, 结果显示 g.5224 T>A 位点的不同基因型与头长呈显著相关($P < 0.05$), 与头高和体高呈极显著相关($P < 0.01$)。而 g.5550 C>T 位点与各生长性状之间没有显著相关性。将 g.5224 T>A 和 g.5550 C>T 两个位点组成的 4 种双倍型与生长性状进行关联性分析后发现, 双倍型 D2 在体重和体型的主要性状的平均值均高于其他双倍型, 因此该双倍型是鳙潜在的优势基因型, 具有较好的分子标记辅助研究和育种应用的潜力。

4 结论

bmi1 作为在鱼类中研究较少的基因, 本研究结果证实鳙 *bmi1b* 在进化上具有保守性, 其基因表达特性上可能存在母源效应。通过候选基因法扩增和测序筛选, 我们发现位于鳙 *bmi1b* 基因

3' UTR 区的 2 个 SNP 位点(g.5224 T>A 和 g.5550 C>T)的基因型和组合基因型与生长和体型性状的部分指标有显著或极显著关联性, 具有潜在的分子标记辅助育种价值, 值得对其开展进一步的基因功能分析和验证。

参考文献:

- [1] Spivakov M, Fisher A G. Epigenetic signatures of stem-cell identity[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2007, 8(4): 263-271.
- [2] Haupt Y, Bath M L, Harris A W, et al. *Bmi-1* transgene induces lymphomas and collaborates with myc in tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 1993, 8(11): 3161-3164.
- [3] Alkema M J, Jacobs H, van Lohuizen M, et al. Perturbation of B and T cell development and predisposition to lymphomagenesis in E μ *Bmi1* transgenic mice require the *Bmi1* RING finger[J]. *Oncogene*, 1997, 15(8): 899-910.
- [4] Chen H, Zhou L, Wan G L, et al. BMI1 promotes the progression of laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Oral Oncology*, 2011, 47(6): 472-481.
- [5] Jacobs J J L, Kieboom K, Marino S, et al. The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus[J]. *Nature*, 1999, 397(6715): 164-168.
- [6] Jacobs J J L, Scheijen B, Voncken J W, et al. *Bmi-1* collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF[J]. *Genes & Development*, 1999, 13(20): 2678-2690.
- [7] Chen G P, Zhang Y, Yu S X, et al. *Bmi1* overexpression in mesenchymal stem cells exerts antiaging and antosteoporosis effects by inactivating p16/p19 signaling and inhibiting oxidative stress[J]. *Stem Cells*, 2019, 37(9): 1200-1211.
- [8] Lessard J, Sauvageau G. *Bmi-1* determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells[J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 255-260.
- [9] Dupret B, Völkel P, le Bourhis X, et al. The polycomb group protein Pcgf1 is dispensable in zebrafish but involved in early growth and aging[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(7): e0158700.
- [10] Liu S K, Zhang Y, Zhou Z C, et al. Efficient assembly and annotation of the transcriptome of catfish by RNA-Seq analysis of a doubled haploid homozygote[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 595.
- [11] Pasquier J, Cabau C, Nguyen T, et al. Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: The PhyloFish database[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 368.
- [12] Lu C Y, Kuang Y Y, Zheng X H, et al. Advances of molecular marker-assisted breeding for aquatic species[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 36-53. [鲁翠云, 匡友谊,
- 郑先虎, 等. 水产动物分子标记辅助育种研究进展[J]. *水产学报*, 2019, 43(1): 36-53.]
- [13] Tong J G, Sun X W. Genetic and genomic analyses for economically important traits and their applications in molecular breeding of cultured fish[J]. *Science China Life Sciences*, 2015, 58(2): 178-186.
- [14] De-Santis C, Jerry D R. Candidate growth genes in finfish—Where should we be looking?[J]. *Aquaculture*, 2007, 272(1-4): 22-38.
- [15] Feng H, Zhao Y Z, Sun X Z, et al. Polymorphism of the *ASB12* gene and its association with growth traits of Yanbian yellow cattle[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 51(9): 11-16. [冯贺, 赵英哲, 孙学钊, 等. ASB12 基因 SNPs 位点多态性与延边黄牛生长性状关联分析[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(9): 11-16.]
- [16] Xie H Q, Gong Y, Jiao R G, et al. Association analysis between polymorphism of *STAT5A* gene and growth traits in Guizhou native goat[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2014, 33(4): 775-781. [谢海强, 龚俞, 焦仁刚, 等. 贵州本地山羊 STAT5A 基因多态性及其与生长性状关联分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(4): 775-781.]
- [17] Cao T T, Bai J J, Yu L Y, et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of carboxypeptidase A1 gene (*CPA1*) segments and their association with the growth traits of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20(3): 301-307. [曹婷婷, 白俊杰, 于凌云, 等. 草鱼羧肽酶 A1 基因(*CPA1*)部分片段的单核苷酸多态性(SNP)多态性及其与生长性状的关联分析[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(3): 301-307.]
- [18] Wang X H, Yu X M, Tong J G. Molecular characterization and growth association of two apolipoprotein A-Ib genes in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(9): 1569.
- [19] Liu H Y, Fu B D, Pang M X, et al. QTL fine mapping and identification of candidate genes for growth-related traits in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*)[J]. *Aquaculture*, 2016, 465: 134-143.
- [20] Taggart J B, Hynes R A, Prodöhl P A, et al. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes[J]. *Journal of Fish Biology*, 1992, 40(6): 963-965.
- [21] Fu B D, Zhou Y, Liu H Y, et al. Updated genome assembly of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) and its differences between male and female on genomic, transcriptomic, and methylation level[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 728177.
- [22] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular*

- Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [23] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [24] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Fish-specific genome duplication[J]. Zoological Research, 2006, 27(5): 525-532. [周莉, 汪洋, 桂建芳. 鱼类特异的基因组复制[J]. 动物学研究, 2006, 27(5): 525-532.]
- [25] Freemont P S, Hanson I M, Trowsdale J. A novel cysteine-rich sequence motif[J]. Cell, 1991, 64(3): 483-484.
- [26] Peng Z, Ji Z N, Shi T P, et al. RNF122 induces cell apoptosis dependent on its RING domain[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2011, 38(9): 816-820. [彭智, 吉兆宁, 石太平, 等. RNF122诱导细胞凋亡功能依赖于其RING结构域[J]. 生物化学与生物物理进展, 2011, 38(9): 816-820.]
- [27] Sanchez-Pulido L, Devos D, Sung Z R, et al. RAWUL: A new ubiquitin-like domain in PRC1 Ring finger proteins that unveils putative plant and worm PRC1 orthologs[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 308.
- [28] Kim C A. The role of RAWUL and SAM in polycomb repression complex 1 assembly and function[M]/Polycomb Group Proteins. Amsterdam: Elsevier, 2017: 5-31.
- [29] Xiao J, Wagner D. Polycomb repression in the regulation of growth and development in *Arabidopsis*[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2015, 23: 15-24.
- [30] Evsikov A V, Gruber J H, Brockman J M, et al. Cracking the egg: Molecular dynamics and evolutionary aspects of the transition from the fully grown oocyte to embryo[J]. Genes & Development, 2006, 20(19): 2713-2727.
- [31] Zhu X C, Ge W H, Wang B W. Regulation of maternal gene expression in early embryonic development[J]. Chemistry of Life, 2001, 21(5): 360-362. [朱新产, 葛文华, 王宝维. 早期胚胎发育母源基因的表达调控[J]. 生命的化学, 2001, 21(5): 360-362.]
- [32] Mochida G H, Ganesh V S, de Michelena M I, et al. *CHMP1A* encodes an essential regulator of BMI1-INK4A in cerebellar development[J]. Nature Genetics, 2012, 44(11): 1260-1264.
- [33] Molofsky A V, Pardal R, Iwashita T, et al. *Bmi-1* dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation[J]. Nature, 2003, 425(6961): 962-967.
- [34] Valk-Lingbeek M E, Bruggeman S W M, van Lohuizen M. Stem cells and cancer: The polycomb connection[J]. Cell, 2004, 118(4): 409-418.
- [35] Wang H, Pan K, Zhang H K, et al. Increased polycomb-group oncogene Bmi-1 expression correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2008, 134(5): 535-541.
- [36] Yang Y Q, Wang W J, Xu C B. Research progress of single nucleotide polymorphism[J]. Chemistry & Bioengineering, 2009, 26(8): 19-21. [杨永强, 王巍杰, 徐长波. 单核苷酸多态性研究进展[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(8): 19-21.]
- [37] Pritchard J K, Przeworski M. Linkage disequilibrium in humans: Models and data[J]. The American Journal of Human Genetics, 2001, 69(1): 1-14.
- [38] Mayr C. What are 3' UTRs doing?[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2019, 11(10): a034728.
- [39] Matoukova E, Michalova E, Vojtesek B, et al. The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells[J]. RNA Biology, 2012, 9(5): 563-576.
- [40] Andken B B, Lim I, Benson G, et al. 3'-UTR SIRF: A database for identifying clusters of short interspersed repeats in 3' untranslated regions[J]. BioMed Central, 2007, 8(1): 274.
- [41] Andken B B, Lim I, Benson G, et al. 3'-UTR SIRF: A database for identifying clusters of whorl interspersed repeats in 3' untranslated regions[J]. BMC Bioinformatics, 2007, 8: 274.
- [42] Lai E C. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation[J]. Nature Genetics, 2002, 30(4): 363-364.
- [43] Yu Y Y, Qiao S P, Sun Y N, et al. Identification and analysis of a functional SNP 1196C>A in 3' UTR of chicken *IGFBP2* gene[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2014, 41(11): 1163-1172. [于莹莹, 乔书培, 孙婴宁, 等. 鸡 *IGFBP2* 基因 3' UTR 区 1196C>A 单核苷酸多态性的功能鉴定及分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2014, 41(11): 1163-1172.]

Single nucleotide polymorphisms in *bmi1b* and their associations with the growth and body type traits of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*)

GAO Yifan^{1,2}, YU Xiaomu², GUI Jianfang², TONG Jingou²

1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Hubei Hongshan Laboratory, Innovation Academy of Seed Design, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

Abstract: As a transcription repressor, the *bmi1b* gene plays an important role in maintaining the self-renewal and proliferation of many stem cells. This study identified single nucleotide polymorphisms of *bmi1b* and conducted an association analysis with bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). The bighead carp *bmi1b* gene has 5800 bp in length including nine exons and eight introns; therefore, its amino acid sequence is evolutionarily conserved. The hypothalamus exhibited the greatest spatial expression of *bmi1b* in the tissues of adult bighead carp. During the embryonic development and larval stages of bighead carp, this gene was highly expressed from the unfertilized egg to the blastocyst stage, whilst its expression was significantly lowered after the gastrula stage. Two single-nucleotide polymorphism (SNPs), g. 5224 T>A and g.5550 C>T, were obtained at the 3' UTR of bighead carp *bmi1b* by direct sequencing of polymerase chain reaction (PCR)-amplified products. The results from genotyping these two SNP loci in 169 fish from a multi-family population of bighead carp and their correlation with growth and body type highlighted three key findings: (1) g. 5224 T>A was significantly associated with body weight and head height ($P<0.05$); (2) g. 5224 T>A was significantly associated with body height and head length ($P<0.01$); and (3) g.5550 C>T had no significant association with body weight and body type traits. Allele combination analysis of the two SNPs showed that the diplotype D2 (AT CC) was the dominant genotype combination and its mean body weight and size traits were significantly higher than other diplotypes. These results provide a valuable reference for further research on the function of the *bmi1b* gene in fish. Additionally, the SNP markers of the *bmi1b* gene and their dominant genotype show good potential in molecular breeding studies of growth and body type traits in bighead carp.

Key words: *Hypophthalmichthys nobilis*; *bmi1b*; single nucleotide polymorphism; growth; body type; association analysis

Corresponding author: TONG Jingou. E-mail: jgtong@ihb.ac.cn