

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18306

## 基于黄河鲤新品系 *IGF2b* 基因 SNPs 获取体系的建立及在该品系选育中的应用

谢元澄<sup>1,2</sup>, 李欣原<sup>1,2</sup>, 苏胜彦<sup>1,3</sup>, 梁敬东<sup>2</sup>, 徐跑<sup>1,3</sup>, 贺鑫晋<sup>3,4</sup>,  
Bouzoualegh Raouf<sup>1,3</sup>

1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;
2. 南京农业大学信息科学技术学院, 江苏 南京 210014;
3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业与种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;
4. 山西农业大学动物科技学院, 山西 晋中 030801

**摘要:** 为了建立鲤 *IGF2b* (insulin-like growth factor 2) 基因全基因组信息 SNPs (single nucleotide polymorphism) 的获取体系, 并验证该获取体系在黄河鲤新品系选育中运用的适用性, 本研究首先对 10 个不同鲤品种的 33 个鲤个体重测序数据进行分析, 整体了解 *IGF2b* 基因的单核苷酸位点及其在基因组上的分布情况。然后在基因组 DNA 水平上分段获取 *IGF2b* 基因的 SNPs 信息, 并以不同的鲤品种验证引物的适用性, 最后在黄河鲤新品系中检测其应用。研究结果: 获得 8 对聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 引物进行分段克隆的结果, 并通过直接测序和限制性片段长度多态性来获取相应的 SNPs。经过直接测序, 本文对黄河鲤、建鲤、黄河鲤和建鲤的正反交后代进行 PCR 检测发现条带单一, 目地片段正确; 结合黄河鲤新品系的体重数据, 本文又以 *IGF2b*<sup>3#</sup> 引物检测到一个与体重明显相关的 SNPs, 同时检测到一个与该基因表达量相关的另一个 SNPs。本研究的方法能够在该基因全基因组范围内开展鲤分子育种中 SNPs 的检测, 并验证发现黄河鲤新品系 *IGF2b*<sup>3#</sup> 引物 227 号位点处, 出现的突变位点使体重降低, 且有一处 SNPs 与其表达量有关。这将为其他物种、其他功能基因的多态性分子标记研究提供思路。

**关键词:** 黄河鲤; 品系选育; *IGF2b*; 分段克隆; SNPs; 分子育种

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)04-0686-09

鲤是世界上最早养殖的鱼类之一, 在中国有着悠久的历史。至今在淡水养殖鱼类中, 鲤依然占据举足轻重的地位。2017 年淡水养殖产量共为 3179.26 万 t, 其中鲤位居第三, 占淡水水产养殖产量的 11%<sup>[1]</sup>。在众多养殖的鲤品种中, 黄河鲤具有丰富的文化底蕴, 在沿黄河地区具有较大的养殖面积。项目组在河南省水产科学研究院培育的豫选黄河鲤群体第 9 代的基础上, 通过最佳线性无偏预测 (best linear unbiased prediction, BLUP)、

家系选育、分子辅助育种等手段对其开展相关选育工作, 经过 3 个世代的选择育种, 项目组成功获得了体重提高 20.5%, 不饱和脂肪酸提高了 9.5% 的黄河鲤新品系<sup>[2]</sup>。为了明确选育系生长优势的机制, 项目组应用比较基因组的方法, 以黄河鲤新品系选育系和对照系共 240 尾鱼为研究对象, 通过 genome-wide association study (GWAS) 分析, 筛选出与鲤生长相关的功能基因, 如 *IGF2*、bone morphogenetic protein (*BMP4*), Neurexin-1a-

收稿日期: 2018-09-11; 修订日期: 2019-01-22.

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目专题(2012BAD26B02); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2013JBFM14); 南京农业大学中央高校基本科研业务费自主创新重点项目(KYZ201550); 中国水产科学研究院基本科研业务费(2016HY-JC0308).

作者简介: 谢元澄(1976-), 男, 副教授, 主要从事生物信息学、机器学习研究. E-mail: xieych@njau.edu.cn

通信作者: 徐跑, 研究员, 主要从事水产养殖研究和渔业科技管理. E-mail: xup@ffrc.cn

like (*NRXN1a*)等。

*IGF2* 具有促进细胞分裂的功能, 其结构与胰岛素类似<sup>[3]</sup>, 在胰岛素的靶细胞中发挥类胰岛素的功能。此外, 也是生长激素发挥作用的中间信使, 传递生长激素, 对机体的生长和发育起作用<sup>[4-7]</sup>。1986年, Andersson 等<sup>[8]</sup>提出 *IGF2* 可以调节猪体内生长激素与代谢水平, 刺激肌纤维的增殖和分化, 从而影响生长发育。研究表明正常范围内 *IGF2* 水平与许多大型哺乳动物从胎儿期到青年期的生长率成正相关<sup>[9-11]</sup>。Chen 等<sup>[12]</sup>使用外源性的重组 *IGF2* 载体腹腔注射罗非鱼 5 周后, 与对照组相比体重和体长分别增加了 72% 和 34%, 验证了其表达量的增加对罗非鱼生长具有促进作用。*IGF2* 在哺乳动物中只存在单个基因, 在鲤中存在 *IGF2a* 和 *IGF2b* 两个同源基因, 且鲤 *IGF2b* 与哺乳动物中的 *IGF2* 基因同源性更高, 但 *IGF2b* 基因是否影响黄河鲤新品系的生长尚不清楚。

在多态位点层面, 以往的研究多从进食状态、营养物质的转运等方面研究 *IGF2* 基因的功能。Bachner-Melman 等<sup>[13]</sup>在以家庭为单位的饮食失调症调查中发现, *IGF2* Apal A/G 位点与进食态度测试分数、身体质量指数显著关联。Petry 等<sup>[14]</sup>通过对 1160 个家庭(每个家系包括父母本和子代)的研究发现, 父源 *IGF2* 基因两个多态位点与妊娠晚期母体的葡萄糖浓度和出生时胎盘 *IGF2* 浓度呈正显著相关。Van Laere 等<sup>[15]</sup>的研究证明, 位于 *IGF2* 内含子 3 上的 G/A 多态使猪的瘦肉率增加。后来该位点扩展到了外三元的研究分析中, 通过研究大白、长白和杜洛克猪中出生重和早期生长速度的关系, 证实了该位点对早期生长速度、饲料转化率等的关联性<sup>[16-17]</sup>, 即影响肉质的 *IGF2* 基因 SNP 位点与该基因的表达有关。那么本文拟从重测序的角度获得与黄河鲤新品系 *IGF2* 相关的 SNPs 位点, 并通过分段检测该基因在黄河鲤新品系育种群体中的 SNPs 和对应基因表达量, 来研究其多态位点和基因表达量的关系。

从上述描述可以看出, *IGF2* 基因可通过其表达量、多态性及它们的相互联系来影响动物机体的生长性能。而在鲤和斑马鱼上均发现了 *IGF2* 基因存在两个基因<sup>[18-19]</sup>, 因此, 本研究以与哺乳

动物相似度更高的 *IGF2b* 基因为研究对象, 从基因组 DNA 水平上分段获取 *IGF2b* 基因的 SNPs 信息, 并以不同的鲤品种验证其适用性, 同时在黄河鲤新品系中检测其应用, 为分子辅助育种、基因组育种提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

RNA 提取试剂 RNAiso Plus、cDNA 反转录试剂盒、DL2000 Marker、TaKaRa 全血基因组试剂盒均购自 Takara 宝生物工程(大连)有限公司; 琼脂糖等购自上海申能博彩生物科技有限公司; DYY-7C 型电泳仪购自北京市六一仪器厂; TaKaRa 梯度 PCR 扩增仪由日本 TaKaRa 公司生产; UVP Gel-Doc-It™ Imaging System 由美国 UVP 凝胶成像系统公司生产, 4℃ 冷冻离心机、实时定量荧光 PCR 仪由美国 Bio-Rad 生产。

### 1.2 实验动物

从中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉试验基地随机选取黄河鲤、建鲤以及二者的正反交后代各 5 尾, 体重约 200 g (用于引物条件摸索和测序验证)、黄河鲤新品系同一世代二龄的选育群体中随机选取 60 尾(用于分子标记和基因表达量检测)。实验鱼体况良好, 称量体重并记录。宰杀取肌肉组织。部分组织在 -20℃ 保存, 用于提取 DNA, 部分组织用液氮处理后于 -80℃ 冻存, 用于总 RNA 的提取。

### 1.3 数据来源

从 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载 33 条 10 个不同品种鲤的重测序序列(具体序列号参考 Xu 等<sup>[20]</sup>的文章)

### 1.4 重测序数据组装及 *IGF2b* 的所有有关 SNPs 的获取

通过 fastq-dump v2.2.2 软件将上述下载的序列从 SRA 格式转换为 FASTQ 格式。再以上述组装的序列作为参考序列, 运用软件 BWA 进行匹配。给参考基因组构建索引, 生成以参考基因组为基础的 amb、ann、bwt、pac、sa 格式的文件。寻找输入读长的 SA 坐标生成 pair-end 测序对应 2 个文件的 sai 文件。运用 BWA 生成 sam 格式的比

对文件并对其进行重排序,然后将排序后的 sam 文件转换为 bam 文件,再对 bam 文件进行 sort 排序处理和加头处理。如果一个样本分为多个通道进行测序,应先将各个通道的 bam 文件合并。使用 picard tools 去掉序列重复的部分,去掉重复后的文件通过 samtools 形成对应的索引文件,格式为 bai 文件。使用 GATK 中的 RealignerTarget-Creator 和 IndelRealigner 对由 indel 导致错配的区域进行重新比对,将 indel 附近的比对错误率降到最低。使用 BaseRecalibrator 和 PrintReads 将经过质量值校正的数据输出到新的 bam 文件中,用于后续的变异检测。使用 ReduceReads 将 bam 文件进行压缩,生成新的 bam 文件;使用 samtools 形成 VCF 文件。获得原始 VCF 文件后,通过以下标准进行分子标记的筛选:所有个体的单个位点覆盖度必须是10×以上;读长大于10,质量分数大于 20,最小基因频率大于 0.01;所有的多态位点每个个体均应有对应的碱基,不存在缺失情况。在获得筛选过的 VCF 文件后,根据基因组的注释文件找到所有有关 *IGF2b* 基因的 SNPs。

### 1.5 DNA 提取和 PCR 扩增测序

采用 TaKaRa 试剂盒提取黄河鲤、建鲤、黄河

鲤和建鲤的正反交后代以及黄河鲤新品系肌肉组织总 DNA,凝胶电泳检测所提取 DNA 的质量,并用分光光度计检测 DNA 浓度。其中黄河鲤、建鲤、黄河鲤和建鲤的正反交后代 DNA 用于 *IGF2b* 基因的分段克隆,黄河鲤新品系 DNA 用于已筛选 SNPs 的应用及与该基因表达量相关程度的检测。

根据基因库中鲤 *IGF2b* 基因的 cDNA 序列 (AF402958)和基因组 DNA 序列(HM755899)设计引物(表 1)分段扩增该基因的 DNA 序列。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。本文对 *IGF2b*<sup>3#</sup> 采用的是直接测序法,测序的结果使用 DNAMAN9 确定 SNPs,然后对照测序峰图确定实验结果的准确性。

PCR 反应体系为 25  $\mu$ L,包括 10×buffer 15  $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  (25 mmol/L) 1  $\mu$ L, dNTPs (2 mmol/L) 1  $\mu$ L,上下游引物(10 mmol/L)各 1  $\mu$ L,模板 DNA 1 ng, Taq DNA 聚合酶(Promega)1 U, ddH<sub>2</sub>O 补足。扩增反应在 TaKaRa 公司生产的梯度 PCR 仪上完成。PCR 反应程序设置为: 94℃预变性 3 min, 94℃变性 20 s, 56℃退火 20 s, 72℃延伸 30 s, 28 个循环; 72℃延伸 10 min。8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

表 1 鲤 *IGF2b* DNA 扩增所需引物  
Tab. 1 Primers for *IGF2b* DNA amplified

引物名称 primer	引物序列(5'-3') oligo sequence	扩增长度/bp length	温度/℃ $T_m$	方法 method
<i>IGF2b</i> <sup>2#</sup>	GCGATTCGCGTAATGCA ATCCTCAACCTCGTTCCTCT	281	56	直接测序
<i>IGF2b</i> <sup>3#</sup>	TCATCCTCTAGCGTTAAGCAG GGCATTTCGTATGGACCAGTA	749	55	直接测序
<i>IGF2b</i> <sup>4#</sup>	TTAACCTGTCTGCCTTCG TGAGGTAGCCTGGGAACAT	377	58	直接测序
<i>IGF2b</i> <sup>5#</sup>	AGGGAAAGTAATAGTACCCAAGTG AAGAGTGGATCTGGTGCATAGA	374	55	直接测序
<i>IGF2b</i> <sup>6#</sup>	CTGTCCACGCAACAAAAGTC GCACAAGTTCAGCAGAAAGAA	469	56	AluI
<i>IGF2b</i> <sup>7#</sup>	CACATCCCTACAGGTCATCCC GTGCTCCACAGAAGAAAGTCG	517	53	<i>Eco</i> RII
<i>IGF2b</i> <sup>8#</sup>	TGGAAGTCCATTACCCC ACAGATTCTACTGGATGACCCTAT	511	55	AluI
<i>IGF2b</i> <sup>9#</sup>	TGAGTTTATAGGGTCATCCAGTAG TTGGACGTAATCCGTGGC	787	56	Alu

结合 goldview 显色进行扩增片段检测, 由 UVP 成像系统(UVP gel doc<sup>TM</sup> Imaging System, UVP Inc) 拍照, 上海英骏生物技术有限公司测序。

### 1.6 总 RNA 的提取及其反转录、qPCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 实验

按照 RNAiso Plus 操作说明书对黄河鲤新品系肌肉组织进行总 RNA 的提取, 采用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的提取情况, 用分光光度法检测 RNA 的浓度, RNA 反转录成 cDNA 用于后续的 PCR 反应, 其余的 RNA 于 -80℃ 保存。

用实时荧光定量 PCR 仪(MJ Research)检测测序结果中随机选取差异基因的表达水平, 使用的 *IGF2b* 基因以及内参 *hACTB* 引物见文献[21]。PCR 反应体系 20  $\mu$ L, 包括 RT 产物 1.0  $\mu$ L, dNTP 200  $\mu$ mol/L, 目的基因上、下游引物各 10 pmol, Taq DNA 聚合酶 3 U, 荧光探针 10 pmol, 10 $\times$ PCR Buffer (含 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 500 mmol/L KCl) 1  $\mu$ L。扩增条件为 94℃ 预变性 3 min, 然后按 94℃ 变性 45 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环。反应结束后由电脑自动分析出定量结果。

### 1.7 数据分析

在 NCBI 数据库中采用 Blast 进行序列比对, 使用 Python2 自写脚本完成对 VCF 文件中数据的提取、图的制作。实验数据在 Microsoft Excel 中初步整理后, 使用 SAS8.0 分析。实时荧光定量 PCR 中基因表达量采用  $\Delta\Delta C_t$  法进行计算, 采用 *t* 检验进行统计, 显著水平设定为 0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 基于鲤重测序数据的 *IGF2b* 基因 SNPs 的获取

从 10 个鲤品种重测序数据和基因组注释发现 *IGF2b* 基因共有两个转录本, 且两个转录本所在的区域 80% 交叉重合。筛选重测序数据发现, 转录本 I 和转录本 II 分别有 107 个和 72 个该基因的 SNPs, 其中转录本 I 中外显子占 20 个, 内含子占 87 个, 转录本 II 中外显子占 18 个, 内含子占 54 个, 相较于转录本 II, 转录本 I 多了 2 个外显子。且在 2 个转录本中内含子区域大小都远高于外显子区, 这些 SNPs 在两个转录本上的分布情

况见图 1。相比外显子区域, 内含子区含有较多的 SNPs, 同时转录本 I 的 SNPs 数量高于转录本 II。

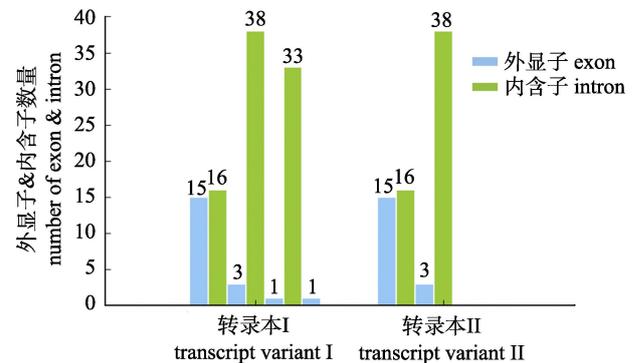


图 1 鲤全基因组 *IGF2b* 基因所有 SNPs 在两个转录本上的分布情况

Fig. 1 Statistical graph of exon & intron of *IGF2b* in *Cyprinus carpio* whole-genome

### 2.2 基于鲤 *IGF2b* 基因全序列分段克隆

为了分析 *IGF2b* 基因的 SNPs 与鲤生产性能的关系, 利用 8 对 PCR 引物鲤 *IGF2b* 基因分别进行内含子区的分段克隆和测序获取相应的 SNPs, 并对获得的分段克隆片段采用直接测序进行验证。然后分别对黄河鲤、建鲤、黄河鲤和建鲤的正反交后代进行 PCR 检测以验证其通用性, 扩增结果见图 2。根据片段的大小和序列特征, 选择直接测序和限制性片段长度多态性(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)结合进行。对于 *IGF2b* 基因克隆后 SNP 的检测, PCR 检测发现条带单一, 目的片段大小正确。

### 2.3 基于鲤 *IGF2b* 基因 SNPs 在黄河鲤新品系中的应用

利用 *IGF2b* 基因 3<sup>#</sup>引物对黄河鲤新品系 DNA 进行扩增、测序, 发现 227 位点处存在 A 变 C 的基因多态性(图 3), 其中 AA 的基因型频率为 0.75, AC 的基因型频率为 0.25, 并且两个基因型之间体重差异显著, 纯合型体重较大, 杂合子体重较小(图 4)。

### 2.4 基于鲤 *IGF2b* 基因 3<sup>#</sup>引物多态性与该基因表达量的关系

采用 qPCR 对 *IGF2b* 基因 3<sup>#</sup>引物进行黄河鲤新品系基因型检测, 检测结果见图 5。根据测序图

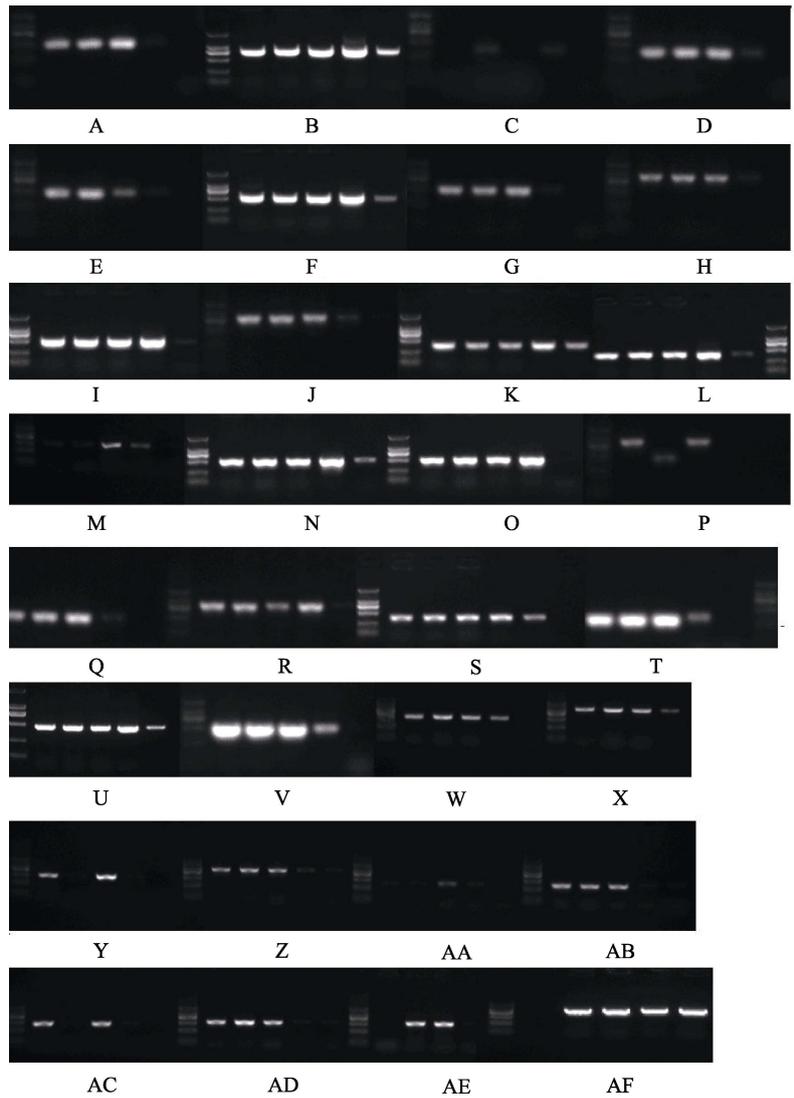


图 2 IGF2b 产物的扩增结果

Marker: DL 2000 DNA 分子标记; A~H: 在黄河鲤中对 IGF2b 基因进行 SNP 分析的 8 对引物; I~P: 在建鲤中对 IGF2b 基因进行 SNP 分析的 8 对引物; Q~X: 在建鲤黄河鲤正交个体中对 IGF2b 基因进行 SNP 分析的 8 对引物; Y~AF: 在建鲤黄河鲤反交个体中对 IGF2b 基因进行 SNP 分析的 8 对引物。

Fig. 2 Products of IGF2b SNP amplification

Marker: DL 2000 DNA marker; A~H: 8 primer pairs were used to analysis of IGF2b SNP in Huanghe carp; I~P: 8 primer pairs were used to analysis of IGF2b SNP in Jian carp; Q~X: 8 primer pairs were used to analysis of IGF2b SNP in direct cross individuals of Jian carp and Huanghe carp; Y~AF: 8 primer pairs were used to analysis of IGF2b SNP in reciprocal cross individuals of Jian carp and Huanghe carp.

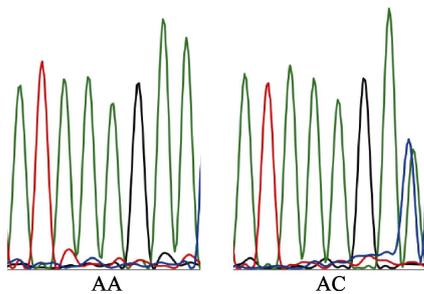


图 3 IGF2b<sup>3#</sup>引物 227 号位点出现的基因型  
 Fig. 3 Genotypes of IGF2b<sup>3#</sup> on 227 locus

可看出, 该片段存在 AA 纯合子变为 AT 杂合子的现象, 经计算发现 AA 的基因型频率为 0.33, AT 的基因型频率为 0.67。在分型的基础上, 对所研究的黄河鲤新品系的 cDNA 进行表达量的检测, 得到的扩增曲线和熔解曲线, 如图 6 所示。从图中可以看出扩增曲线和熔解曲线都符合要求, 可用于表达量的检测。统计表明 IGF2b<sup>3#</sup>不同基因型之间存在着表达量差异, 杂合子具有较大的基因表达量, 且差异显著, 见图 7。

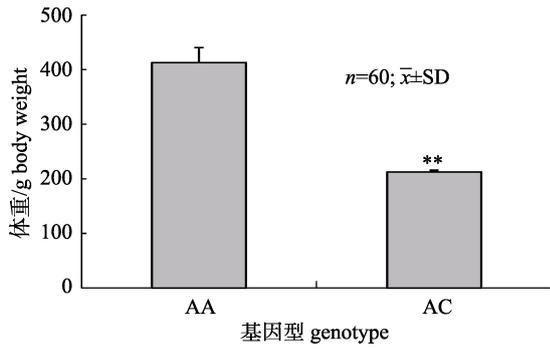


图 4 *IGF2b*<sup>3#</sup>引物 227 号位点出现的基因型对体重的影响  
\*\*表示  $P<0.01$ .

Fig. 4 Effect on body weight of genotypes *IGF2b*<sup>3#</sup> on 227 locus  
\*\*means  $P<0.01$ .

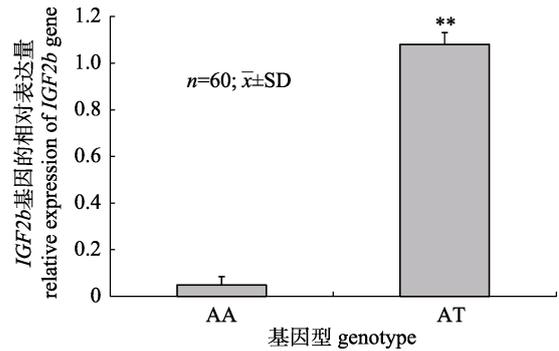


图 7 用于 *IGF2b* 基因 3<sup>#</sup>引物不同基因型之间该基因表达量的差异

\*\*表示  $P<0.01$ .

Fig. 7 Expression difference in different genotypes for *IGF2b* 3<sup>#</sup>

\*\*means  $P<0.01$ .

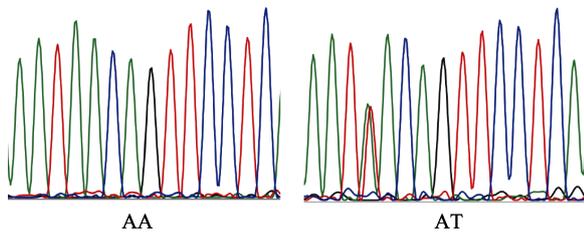


图 5 *IGF2b* 基因表达量有差异的该基因基因型测序图  
Fig. 5 Sequence graph of *IGF2b*'s different genotypes which had significant transcription expression level

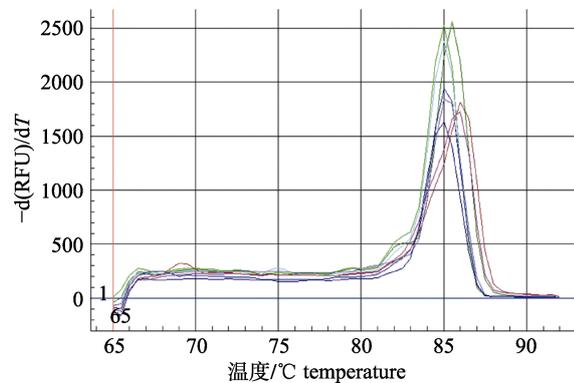
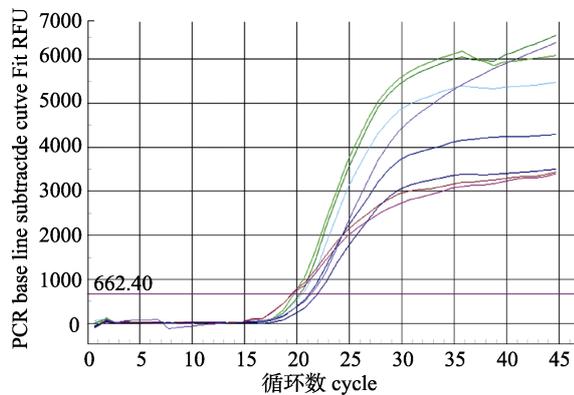


图 6 用于 *IGF2b* 基因表达检测的扩增曲线和溶解曲线  
Fig. 6 Amplification and melting curves of *IGF2b* realtime PCR

### 3 讨论

#### 3.1 从基因组重测序到 PCR 分段克隆获得 *IGF2b* 基因的 SNPs

本文通过基因库获取已有的重测序数据, 从整体上把握与目的性状相关的目标基因的所有 SNPs 及分布情况, 然后分段克隆获取目标 SNPs。在思路不同于传统的方法, 即通过基因克隆结合一代测序的路径查找潜在的 SNPs, 然后通过酶切等手段获取多个个体的 SNPs<sup>[11, 15, 22-23]</sup>来研究单个基因 SNPs 与选育性状的关系。另外本文从全基因组重测序角度, 从 10 个中外鲤品种共计 33 个个体获得 *IGF2b* 基因 SNPs 的分布情况, 同时分 8 个基因段, 对 10 个品种中的 2 个品种及其正反交后代做了可行性验证, 结果具有可靠性。这将为其他物种、其他功能基因的多态性分子标记研究提供思路。

#### 3.2 *IGF2b* 基因 SNPs 多态性、基因型表达量与黄河鲤新品系体重的关联

研究结果显示黄河鲤新品系 *IGF2b*<sup>3#</sup>引物 227 号位点处, 出现突变位点, 使得其体重降低。*IGF2* 基因突变是否会通过表达量的变化影响生产性能的变化? 查阅资料发现, 张宁等<sup>[24]</sup>通过构建鲤 *IGF2b* 载体并注射幼体鲤证实了该基因表达量与体重显著相关。因此本文基于此推断 *IGF2b*<sup>3#</sup>引物 227 号位点与该基因表达量有关, 从而影响了黄河鲤新品系的体重。Younis 等<sup>[25]</sup>通过转基因和基

因敲除手段证实了 *IGF2* 基因突变通过扰乱该基因与转录因子 ZBED6 的结合而影响该基因的表达量,进而影响家猪的瘦肉率。这与本文的结果类似。类似的, Msalya 等<sup>[26]</sup>研究证明 PRNP 基因 del/del 基因型可调控该基因有 23 bp 长度 RNA 的表达。Helmig 等<sup>[27]</sup>同样报道了 *TNF $\alpha$*  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) 基因 308 野生型和杂合型个体血液白细胞中该基因表达有显著差异, Gossner 等<sup>[28]</sup> *Prnp* (prion protein gene) 基因型可影响 *Prnp* 基因的表达量。近年来,更有研究报道从基因组水平上研究不同基因型之间的表达差异<sup>[29]</sup>。可以看出,靶基因型和表达量均可能与所研究的目标性状有关。但是它们之间并不相关的情况也有报道。比如, Olsson 等<sup>[30]</sup>研究发现 *SELS* (selenoprotein S) 基因基因型和表达量均与风险因子有关,但是不同基因型和表达量的关系没有检测到。同样的报道显示,与热耐受力有关的 *GSTP1* (glutathione S-transferase pi-1) 基因表达量与基因型都与耐热性有关,但是也没有发现二者的相关性<sup>[31]</sup>。这与本研究中 *IGF2b* 基因的 SNP 报道不一致,这说明影响表型的 SNP 不一定通过表达量来影响生产性能。

通过对鲤的重测序数据及其 *IGF2b* 基因 SNPs 的分析,并将其应用于黄河鲤新品系中进行验证,发现黄河鲤新品系 *IGF2b*<sup>3#</sup>引物 227 号位点处,出现的突变位点使体重降低,且有一处 SNPs 与其表达量有关。此方法已能够在该基因全基因组范围内开展鲤分子育种中 SNPs 的检测。

#### 参考文献:

- [1] Fisheries Bureau of Ministry of Agriculture. China Fisheries Statistical Yearbook. 2017[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017. [农业部渔业局编制. 中国渔业统计年鉴. 2017[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.]
- [2] Su S Y, Zhang C F, Dong Z J, et al. The breeding gain of Huanghe carp (*Cyprinus carpio* hacmalopterus Temminck et Schlegel) new strain G3—The effect of higher carbohydrate diet on growth and fatty acid profile of Huanghe carp new strain[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2018, 39(2): 63-66. [苏胜彦, 张成锋, 董在杰, 等. 黄河鲤新品系 G3 代选育进展——饲喂高碳水化合物饲料对其生长和脂肪酸组分的影响[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2018, 39(2): 63-66.]
- [3] Rinderknecht E, Humbel R E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin[J]. Journal of Biological Chemistry, 1978, 253(8): 2769-2776.
- [4] Vasilatosyounken R, Scanes C G. Growth hormone and insulin-like growth factors in poultry growth: Required, optimal, or ineffective?[J]. Poultry Science, 1991, 70(8): 1764-1780.
- [5] Kouros-Mehr H, Werb Z. Candidate regulators of mammary branching morphogenesis identified by genome-wide transcript analysis[J]. Developmental Dynamics, 2006, 235(12): 3404-3412.
- [6] Su S Y, Dong Z J, Qu J Q, et al. Molecular cloning and single, nucleotide polymorphism analysis of *IGF2a* genes in the common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Genetics and Molecular Research, 2012, 11(2): 1327-1340.
- [7] Yuan Y, Hong Y. Medaka insulin-like growth factor-2 supports self-renewal of the embryonic stem cell line and blastomeres *in vitro*[J]. Scientific Reports, 2017, 7: Article No. 78.
- [8] Andersson L, Haley C S, Ellegren H, et al. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs[J]. Science, 1994, 263(5154): 1771-1774.
- [9] Liu G L, Jiang S W, Xiong Y, et al. Association of PCR-RFLP polymorphisms of *IGF2* gene with fat deposit related traits in pig resource family[J]. Acta Genetica Sinica, 2003, 30(12): 1107-1112. [刘桂兰, 蒋思文, 熊远, 等. *IGF2* 基因 PCR-RFLP 多态性与脂肪沉积相关性状的关联分析[J]. 遗传学报, 2003, 30(12): 1107-1112.]
- [10] Knoll A, Putnová L, Dvořák J, et al. A *NciI* PCR-RFLP within intron 2 of the porcine insulin-like growth factor 2b (*IGF2*) gene[J]. Animal Genetics, 2000, 31(2): 150.
- [11] Wang G Y, Yan B X, Deng X M, et al. Effects of *IGF2* gene on growth and carcass traits of chickens and their imprinting status[J]. Science in China Ser. C: Life Sciences, 2004, 34(5): 429-435. [王根宇, 颜炳学, 邓学梅, 等. *IGF2* 基因对鸡生长及屠体性状的影响及印记状况的研究[J]. 中国科学: C 辑, 生命科学, 2004, 34(5): 429-435.]
- [12] Chen J Y, Chen J C, Chang C Y, et al. Expression of recombinant tilapia insulin-like growth factor-I and stimulation of juvenile tilapia growth by injection of recombinant IGFs polypeptides[J]. Aquaculture, 2000, 181(3-4): 347-360.
- [13] Bachner-Melman R, Zohar A H, Nemanov L, et al. Association between the insulin-like growth factor 2 gene (*IGF2*) and scores on the Eating Attitudes Test in nonclinical subjects: A family-based study[J]. American Journal of Psychiatry, 2005, 162: 2256-2262.

- [14] Petry C J, Seear R V, Wingate D L, et al. Associations between paternally transmitted fetal *IGF2* variants and maternal circulating glucose concentrations in pregnancy[J]. *Diabetes*, 2011, 60(11): 3090-3096.
- [15] Van Laere A S, Nguyen M, Braunschweig M, et al. A regulatory mutation in *IGF2* causes a major QTL effect on muscle growth in the pig[J]. *Nature*, 2003, 425(6960): 832-836.
- [16] Sun Y, Fei S Q, Tang H, et al. Polymorphism of G3072A in *IGF2* gene and its association with birth weight and early growth traits in Yorkshire pigs[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2007, 38(12): 1306-1310. [孙亿, 费思清, 唐辉, 等. 猪 *IGF2* 基因 G3072A 位点多态性及其与大白猪初生重和早期生长的关系[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(12): 1306-1310.]
- [17] Fassa V B, Carden T R, Marini S J, et al. Analysis of the effects of five genes (*IGF2*, *CTSD*, *TBC1D1*, *MC4R* and *FABP3*) on feed conversion, growth rate and the content of subcutaneous fat in pigs of the Landrace breed[J]. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 2015, 41(3): 282-288.
- [18] Zou S M, Kamei H, Modi Z, et al. Zebrafish IGF genes: gene duplication, conservation and divergence, and novel roles in midline and notochord development[J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(9): e7026.
- [19] Su S Y, Dong Z J, Qu J Q, et al. Molecular cloning and single nucleotide polymorphism analysis of *IGF2a* genes in the common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2012, 11(2): 1327-1340.
- [20] Xu P, Zhang X F, Wang X M, et al. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*[J]. *Nature Genetics*, 2014, 46: 1212-1219.
- [21] Su S Y, Dong Z J, Yuan X H, et al. Clone of *IGF2b* introns, analysis of its genomic sequence and construction of lentiviral vector (Lenti-*IGF2*-IRES-EGF) in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2012, 51(2): 77-85. [苏胜彦, 董在杰, 袁新华, 等. 鲤 *IGF2b* 基因内含子的克隆, 基因组序列分析及慢病毒载体构建[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2012, 51(2): 77-85.]
- [22] Li Z H, Wang Q G, Zhao J G, et al. Study on correlation analysis of single nucleotide polymorphism of *IGF2* gene and body fatness traits in chicken[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37(4): 600-604. [李志辉, 王启贵, 赵建国, 等. 类胰岛素生长因子 II (*IGF2*)基因多态性与鸡体脂性状的相关研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(4): 600-604.]
- [23] Yu D B, He Z L, Zhang W F, et al. The genetic effects of *IGF2* gene intron3 variance in pigs[J]. *Hereditas*, 2008, 30(1): 87-93. [虞德兵, 何宗亮, 张伟峰, 等. 猪 *IGF2* 基因内含子3变异的遗传效应分析[J]. 遗传, 2008, 30(1): 87-93.]
- [24] Zhang N, Su S Y, Yuan X H, et al. The effect of overexpression of *IGF2b* gene mediated by lentiviral vector in dorsal muscle of common carp on growth of common carp: *Cyprinus carpio* L.)[J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2015, 36(3): 31-35. [张宁, 苏胜彦, 袁新华, 等. 慢病毒载体介导的 *IGF2b* 基因在鲤鱼背部肌肉组织中过表达对鲤鱼生长的影响[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2015, 36(3): 31-35.]
- [25] Younis S, Schönke M, Massart J, et al. The ZBED6-*IGF2* axis has a major effect on growth of skeletal muscle and internal organs in placental mammals[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(9): E2048-E2057.
- [26] Msalya G, Shimogiri T, Ohno S, et al. Evaluation of *PRNP* expression based on genotypes and alleles of two indel loci in the medulla oblongata of Japanese Black and Japanese Brown cattle[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(5): e18787.
- [27] Helmig S, Aliahmadi N, Stephan P, et al. TNF- $\alpha$ -308 genotypes are associated with TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ <sub>1</sub> mRNA expression in blood leucocytes of humans[J]. *Cytokine*, 2011, 53(3): 306-310.
- [28] Gossner A G, Bennet N, Hunter N, et al. Differential expression of Prnp and Sprn in scrapie infected sheep also reveals Prnp genotype specific differences[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 378(4): 862-866.
- [29] Lee E, Cho S, Kim K, et al. An integrated approach to infer causal associations among gene expression, genotype variation, and disease[J]. *Genomics*, 2009, 94(4): 269-277.
- [30] Olsson M, Olsson B, Jacobson P, et al. Expression of the selenoprotein S (*SELS*) gene in subcutaneous adipose tissue and *SELS* genotype are associated with metabolic risk factors[J]. *Metabolism*, 2011, 60(1): 114-120.
- [31] Yao J, Liao K, Li Q L, et al. mRNA expression of glutathione S-transferase Pi (*GSTP1*) under heat stress and association of genotypes with heat tolerance ability in Holstein[J]. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2011, 10(6): 757-763.

## Construction of SNPs from common carp *IGF2b* and its application in Huanghe carp new strain (*Cyprinus carpio hacmalopterus* Temminck et Schlegel)

XIE Yuancheng<sup>1,2</sup>, LI Xinyuan<sup>1,2</sup>, SU Shengyan<sup>1,3</sup>, LIANG Jingdong<sup>2</sup>, XU Pao<sup>1,3</sup>, HE Xinjin<sup>3,4</sup>, Bouzoualegh Raouf<sup>1,3</sup>

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Information Science and Technology College, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China;

3. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

4. Animal Science and Veterinary Medicine College, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China

**Abstract:** In order to establish an SNP (single nucleotide polymorphism) acquisition system for the *IGF2b* (insulin-like growth factor 2) gene, a total of 33 DNA samples extracted from 10 different carp species were sequenced and the data were analyzed to verify the function and efficacy of the breeding process for the new Huanghe carp strain. By determining the position and distribution of SNPs on the genome and obtaining the *IGF2b* gene by segmentation at the genomic DNA level in this way, the applicability of primers from different carp species for use in Huanghe carp new strains was verified. As a result of the segmentation at the genomic DNA level, eight pairs of polymerase chain reaction (PCR) primers were obtained, and the corresponding SNPs were determined by direct sequencing and restriction fragment length polymorphisms. Furthermore, direct sequencing showed a single band from the PCR of Huanghe carp and Jian carp as well as the progenies resulting from their reciprocal crosses, which allowed us to confirm the validity of the target fragment. Finally, analysis of the Huanghe carp body weight data combined with the latest results allowed the detection of an SNP significantly associated with the body weight using *IGF2b*<sup>3#</sup> primers. Likewise, another SNP was detected in association with the expression level of this gene. The methods used in this study were able to detect the SNPs of genes in the molecular breeding of carp within the range of the whole genome, to verify that the mutation at the No. 227 site on the *IGF2b*<sup>3#</sup> primer of Huanghe carp led to reduced body weight, and to identify another SNP related to the expression level of *IGF2b*. This will provide the background for the study of polymorphic molecular markers and other functional genes in other species.

**Key words:** *Cyprinus carpio hacmalopterus* Temminck et shlegel; *IGF2b*; divided parts clone; SNPs; molecular breeding

**Corresponding author:** XU Pao. E-mail: xup@ffrc.cn