

文章编号: 1674 - 5566(2012)01 - 0007 - 07

建鲤 *IGF-Ia* 基因的 SNPs 位点筛选及其与增重的相关性分析

李红霞¹, 刘楠楠², 浦天宁², 魏可鹏², 俞菊华^{1,2}, 李建林¹, 唐永凯¹

(1. 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, 江苏 无锡 214081; 2. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘要: 机体生长主要受到促生长激素释放激素—生长激素—胰岛素样生长因子(GHRH-GH-IGFs)生长轴调控, 类胰岛素生长因子 IGF-I 是生长激素(GH)发挥生物学功能的重要传导因子。实验特异性扩增了建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*) *IGF-Ia* 基因的 5 个外显子和 3 个内含子(内含子 1、内含子 3 和内含子 4)。通过比对 10 尾建鲤的序列, 共找到 SNPs 位点 8 个。使用 PCR-RFLP 方法检测了 5 个家系共 372 尾建鲤的内含子 1_C175G, 12 个家系共 987 尾的内含子 1_A993G 和内含子 4_A511C 3 个位点。内含子 1_C175G 雌雄个体均以 GG 型频率为最高, 分别是 0.44 和 0.43; 此位点在幼鱼和成鱼时期与雌、雄建鲤增重均无相关性; 内含子 1_A993G 雌雄个体均以 AG 型频率最高, 分别是 0.76 和 0.72; 此位点在成鱼阶段与雄性建鲤增重呈显著相关($P < 0.05$); 内含子 4_A511C 在雌雄个体中均以 CC 型频率最高, 分别是 0.48 和 0.47; 其在幼鱼和成鱼阶段均与增重存在极显著的相关性($P < 0.01$)。本次试验表明在建鲤体内, *IGF-I* 基因在不同生长阶段的表达量不同, 且处于同一生长阶段的雌雄个体间的表达也存在差异。内含子 1_A993G、内含子 4_A511C 均与建鲤增重存在相关性, 可以考虑作为建鲤分子育种的相关依据。

研究亮点: 胰岛素样生长因子是一类与生长密切相关的促生长因子。近年来, 在鸡、羊、牛等畜禽类动物生长相关分子标记筛选方面已有较多研究并取得一些阳性结果。IGFs 多态性及经济性状相关性在鱼类方面报道不多, 在鲤方面还没有开展, 本文首次自建鲤基因组 DNA 中分离了 *IGF-Ia* 基因, 查找了潜在的 SNPs 位点, 并使用可靠的 PCR-RFLP 方法检测了群体基因型分布, 通过与增重的相关分析, 筛选到了两个与增重显著相关的 SNP 位点, 为建鲤的分子育种奠定了基础。
关键词: 建鲤; *IGF-Ia*; SNPs; 增重; 相关性
中图分类号: S 917
文献标志码: A

胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factors, IGFs), 主要包括 IGF-I 和 IGF-II, 是一类广谱性的促生长因子。在 GH-IGFs 生长调控轴上, 生长激素是调控整个机体生长最重要的激素, 处于生长轴核心位置, 而类胰岛素生长因子则是处于生长轴下游关键的生长因子, 是生长激素发挥生物学功能的重要传导因子^[1]。IGF-I 是一类由约 70 个氨基酸组成的小分子多肽物质^[2], 主要在肝脏表达, 出生后及成年期发挥作用^[3]。IGF-I 以内分泌、旁分泌和自分泌的模式

发挥作用^[4], 主要受生长激素因子和营养因子的调控。IGF-I 在血液中与 IGF 结合蛋白 (IGF binding proteins, IGFBP) 结合后运送至不同靶细胞, 再从 IGFBP 中释放与细胞膜上 IGF 受体 (IGF receptors, IGFR) 结合, 并最终开启 2 条主要的信号通路: 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 途径和磷酸肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 途径, 前者主要介导细胞增殖, 后者对促进有丝分裂、代谢和抗细胞凋亡有重要作用^[5]。研究表明 GH 和

收稿日期: 2011-06-27 修回日期: 2011-10-09

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2011AA100401); 水产基因资源发掘与种质评价利用研究(2006BAD13B09); 水产分子育种共性技术的建立与应用(200903045); 现代农业产业技术体系建设专项(nyeytx-49)

作者简介: 李红霞(1982—), 女, 助理研究员, 研究方向为水生生物技术。E-mail: lihx@ffrc.cn

通讯作者: 俞菊华, E-mail: yujh@ffrc.cn

IGF- I 的浓度存在高度的相关性,用它们处理硬骨鱼类均能促进鱼体的生长。此外,研究表明 GH-IGF- I 轴还能调节鱼类的繁殖,与鱼体的渗透压调节也有一定的关系^[6]。

近年来,哺乳动物 IGFs 的作用原理、与人类生长、发育、疾病发生的关系等已研究得较深入,与畜禽类重要经济性状的研究也有较多报道^[7-9]。鱼类 IGF-I 的研究,自 1989 年银大麻哈鱼 IGF-I cDNA 的首次克隆^[10],人们已从鲤(*Cyprinus carpio*)^[11]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[12]、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[13]、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[14]、斑马鱼(*Danio rerio*)、鲫(*Carassius auratus*)中分离了 IGF-I 基因。对鲮(*Cirrhinus molitorella*)^[15]、加州鲈(*Micropterus salmoides*)^[16]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[17-18]、胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)^[19]等的 IGF- I 基因的生物学功能也进行了研究。另外,还报道了大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[20]、吉富罗非鱼(*GIFT strain Oreochromis niloticus*)^[21] IGF- I 的多态性及其与经济性状的相关性。在建鲤增重相关的分子标记筛选中,陶文静等^[22]在生长轴 GHRs (Growth hormone receptor, GHR)基因上筛选到 5 个与增重相关的 SNPs 位点。本实验通过分离建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*) IGF- I a 基因并查找 SNPs 位点,使用 PCR-RFLP 方法检测了其中的 3 个位点,通过这些位点不同基因型个体在幼鱼阶段和成鱼阶段增重的统计分析,筛选到了 2 个与建鲤增重相关的分子标记。

1 材料与方法

1.1 材料

建鲤,12 个家系共 987 尾,取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴养殖基地。采用 PIT 标记后,混合养殖,在生长过程中测定其体重,并采血备用。

1.2 建鲤基因组 DNA 的提取

从尾静脉采血 0.2 ~ 0.5 mL,加入 1/6 体积的 ACD 抗凝剂,置于 4 °C 冰箱沉淀 2 h。吸取 30 μ L 血细胞,使用传统的蛋白酶 K 消化过夜,酚-氯仿法提取基因组 DNA^[23]。DNA 完整性和浓度使用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检验和测定,OD_{260/280} 一般为 1.8 左右。用 TE 溶液将 DNA 样品稀释成 50 ng/ μ L 备用。

1.3 建鲤 IGF- I a 目的基因的分离

通过鲤 IGF- I a 的 cDNA (GenBank: D83271) 与斑马鱼的 IGF (GenBank: AF270703.1) 比较初步判断建鲤 IGF- I a 的内含子大概位置及大小。IGF- I a 基因由 5 个外显子和 4 个内含子组成^[3]。设计引物,扩增对应内含子基因片段(表 1)。PCR 总反应体系为 25 μ L,其中含模板 DNA 2 μ L (100 ~ 200 ng),引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L),其他组分根据 Taq 酶说明书要求,反应程序:94 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 30 s,50 ~ 65 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 ~ 2 min,30 个循环,72 °C 延伸 8 ~ 10 min,4 °C 保存,其中退火温度根据引物确定,延伸时间根据扩增片段大小确定。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,切下目的条带,用胶回收试剂盒(TaKaRa)纯化后,与 pMD18-T 载体连接,16 °C 过夜,转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 敏感态细胞中,使用 EcoRI 和 Hind III (TaKaRa) 双酶切鉴定,挑选阳性克隆送至上海博尚生物技术有限公司测序。

1.4 建鲤 IGF- I a 多态位点筛选和检测

使用 Clustal W 1.83^[24] 软件对所得 IGF- I a 序列进行比对,将不同碱基比例大于 1/3 的位点判定为 SNPs 位点。通过分析,筛选到 4 个可用 PCR-RFLP 方法检测的 SNPs 位点,并检测了其中 3 个位点。PCR 扩增体系为 12.5 μ L,其中含模板 DNA 1.0 μ L,引物 0.5 μ L (10 μ mol/L)。反应结束取 5 ~ 6 μ L PCR 产物至 10 μ L 酶切体系,其中含内切酶 0.2 μ L,在不同酶推荐的温度下反应 3 ~ 5 h (根据酶切效果确定),最后 2.0% ~ 2.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,确定基因型。

1.5 数据分析

使用 Clustal W 1.83 软件进行序列比对,使用 DNASTar 软件包进行引物设计。参照郭满才等^[25]计算等位基因频率和基因型频率,利用 SPSS 中文版 1.7 软件包的 GLM 模型进行 IGF- I a 基因 SNPs 位点不同基因型、不同性别在幼鱼阶段和成鱼阶段与增重的相关性分析,其中增重为因变量,不同基因型为固定变量。

2 结果与分析

2.1 获得的建鲤 IGF- I a 基因及 SNPs 位点

本次试验共扩增到建鲤 IGF- I a 基因的 5 个外显子和 3 个内含子,分别是外显子 1 为 48 bp、

外显子 2 为 129 bp、外显子 3 为 129 bp、外显子 4 为 36 bp、外显子 5 为 60 bp、内含子 1 为 159 bp、内含子 3 为 380 bp、内含子 4 为 201 bp (Genebank 登陆号为 JN128642, JN128643)。

通过比对 10 个建鲤个体 *IGF-Ia* 基因序列,共找到 8 个 SNPs 位点,其位置、突变碱基及比例见表 2。其中有 1 个位于外显子上,另外 7 个均

位于不同的内含子上,内含子 3 中有一连锁碱基突变,即 A,C 型对应 G,T 型双碱基突变,A,C 碱基间间隔两个碱基,G,T 碱基间间隔两个碱基。本次试验采用 PCR-RFLP 方法检测的 3 个 SNPs 位点均位于内含子上,分别为内含子 1_C175G,内含子 1_A993G 和内含子 4_A511C 3 个位点(表 3)。

表 1 试验中所用引物信息

Tab.1 Information of primers used in this experiment

引物	序列 (5' - 3')	退火温度 $T_m/^\circ\text{C}$	扩增片段及长度/bp
F1	GATGTCTAGCGGWCATTTCTTCCAG	57	外 1 - 内 1 - 外 2
R1	CTGCAGCGTGTCTACAAGCTCC		1 337
F2	GTGGATGAATGCTGCTTTCAGAG	55.5	外 3 - 内 3 - 外 4
R2	CCTTACAGGAAGAGTGGCTATGTCC		546
F3	TGTGTCCCTACAGAAACCTTTAC	56	外 4 - 内 4 - 外 5
R3	GCCATTGCGCTTACTGTCTCTAA		1 382

表 2 建鲤 *IGF-Ia* 的 SNPs 位点

Tab.2 The SNPs of *IGF-Ia* in *Cyprinus carpio* var. *jian*

区域	位点	突变碱基	序列数	比例
外显子 1	13	C/T	10	3:7
内含子 1	175	C/G	10	4:6
	993	A/G	10	3:7
内含子 3	216/219	A, C/G, T	10	7:3
内含子 4	236	C/T	10	3:7
	326	G/T	10	7:3
	511	A/C	10	6:4
	1 133	G/T	10	6:4

表 3 建鲤 *IGF-Ia* 基因 3 个 SNPs 位点的检测引物、限制性内切酶和酶切产物条带

Tab.3 Primers, restriction enzymes and restriction fragments of 3 SNPs of *IGF-Ia* in *Cyprinus carpio* var. *jian*

检测的 SNP 位点	引物 (5' - 3')	内切酶及反应温度 / $^\circ\text{C}$	酶切片段/bp
内含子 1_C175G	F: GATGTCTAGCGGWCATTTCTTCCAG	<i>Hha</i> I (57)	GG: 224, 134
	R: CTGGTGCATCATGATATGACTCACC		CC: 358
内含子 1_A993G	F: TTGTCATCTTCTTATATGCAACGAGT	<i>Bse</i> GI (55)	GG: 163, 135, 112
	R: CTGCAGCGTGTCTACAAGCTCC		AA: 135, 275
内含子 4_A511C	F: AGTACTGCAATATCAGCTGACTGA	<i>Ava</i> II (57)	CC: 614, 185
	R: CAATGTACCAGCATTATTTGCTGACA		AA: 814

2.2 建鲤 *IGF-Ia* 基因 SNPs 的检测及其分布

内含子 1_C175G 位点共检测建鲤 372 尾,有效数据为 353 尾。其中雌鱼 CC 型、CG 型、GG 型分别有 36 尾、57 尾、72 尾;雄鱼 CC 型、CG 型、GG 型分别有 27 尾、68 尾、73 尾。基因型频率以 GG 型最高,雌鱼 0.44,雄鱼 0.43。

内含子 1_A993G 位点共检测建鲤 987 尾,有效数据为 927 尾。其中雌鱼 AA 型、AG 型、GG 型分别有 97 尾、367 尾、20 尾;雄鱼 AA 型、AG 型、GG 型分别有 100 尾、320 尾、25 尾,以杂合型 AG

型频率最高,雌鱼为 0.76,雄鱼为 0.72。GG 型频率偏低,小于 0.1。

内含子 4_A511C 位点共检测建鲤 987 尾,其中有效数据为 909 尾。其中雌鱼 AA 型、AC 型、CC 型分别有 90 尾、143 尾、216 尾。雄鱼 AA 型、AC 型、CC 型分别有 111 尾、148 尾、230 尾,以 CC 型基因频率最高,雌鱼为 0.48,雄鱼为 0.47。各位点的不同基因型及雌雄个体中的相应频率详细信息见图 1 和表 4。

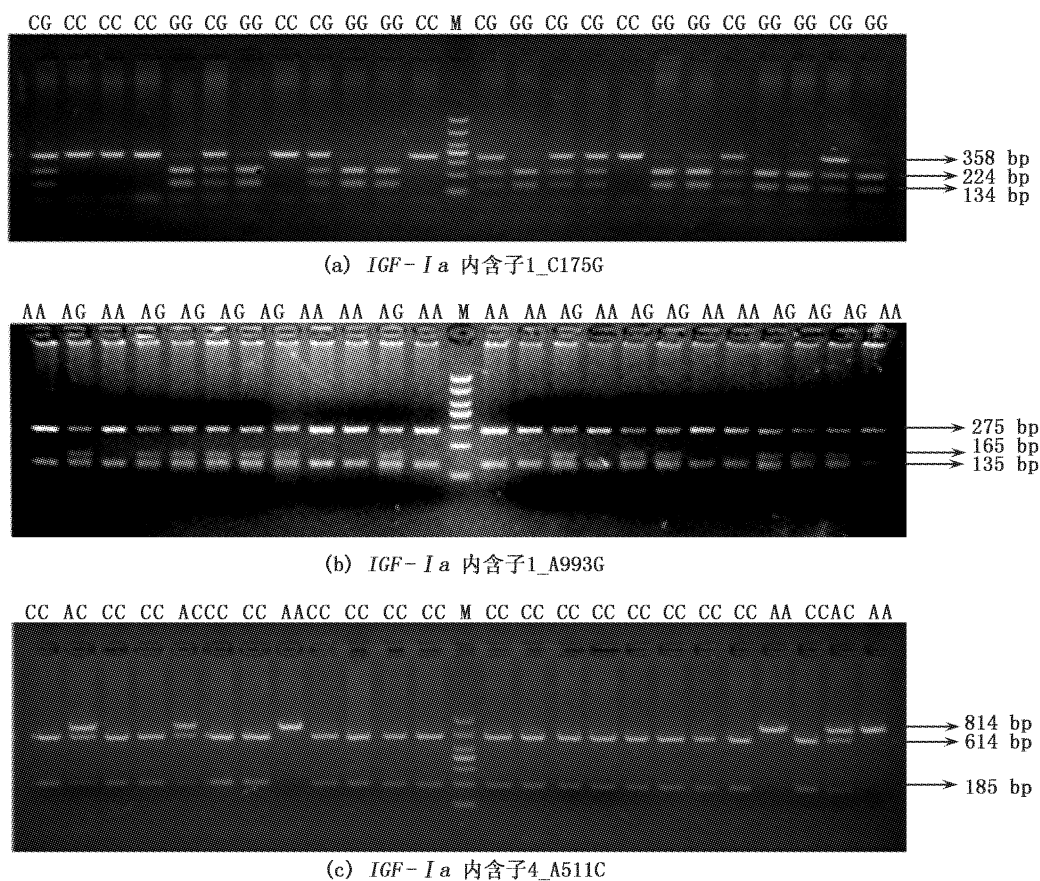


图 1 建鲤 *IGF-Ia* 基因 3 个 SNPs 位点不同基因型的部分电泳结果
 Fig. 1 Electrophoresis patterns of different genotypes in 3 SNP loci of *IGF-Ia* in *Cyprinus carpio* var. *jian* M. Marker (DL1000)

表 4 建鲤 *IGF-Ia* 基因 SNPs 位点的基因型与相应频率

Tab. 4 Genotypes and relevant frequencies in SNPs of *IGF-Ia* in *Cyprinus carpio* var. *jian*

位点	性别	基因型	样本数	基因型频率	等位基因	基因频率
<i>IGF-Ia</i> 内含子 1_C175G	雌	CC	36	0.22	C	0.39
		CG	57	0.35	G	0.61
		GG	72	0.44		
	雄	CC	27	0.16	C	0.36
		CG	68	0.40	G	0.64
		GG	73	0.43		
<i>IGF-Ia</i> 内含子 1_A993G	雌	AA	97	0.20	A	0.58
		AG	367	0.76	G	0.42
		GG	20	0.04		
	雄	AA	100	0.22	A	0.58
		AG	320	0.72	G	0.42
		GG	25	0.06		
<i>IGF-Ia</i> 内含子 4_A511C	雌	AA	90	0.20	A	0.36
		AC	143	0.32	C	0.64
		CC	216	0.48		
	雄	AA	111	0.23	A	0.38
		AC	148	0.30	C	0.62
		CC	230	0.47		

2.3 建鲤 *IGF-Ia* 不同基因型、不同性别在不同生长阶段与体重的相关性分析

利用 SPSS 中文版 1.7 软件包的 GLM 模型进行 *IGF-Ia* 基因 SNPs 位点不同基因型、不同性别在幼鱼和成鱼阶段与增重的相关性分析,分析结果见表 5。内含子 1_C175G 不同性别在幼鱼和成鱼阶段均无明显差异。内含子 1_A993G 在幼鱼阶段不同基因型的雌雄鱼中与增重均无显著差异,但是在成鱼阶段,雄性建鲤 AG 型与 GG 型之

间增重存在显著差异 ($P < 0.05$),雌性建鲤的 AG 型也大于 GG 型,但未达到显著差异。内含子 4_A511C 在幼鱼阶段,雌性建鲤 AA 型与 CC 型存在显著差异 ($P < 0.05$),AC 型与 CC 型存在极显著差异 ($P < 0.01$)。雄性建鲤 AA 型、AC 型、CC 型 3 种基因型之间均存在极显著差异 ($P < 0.01$)。成鱼阶段,雌雄建鲤表现为 AA 型、AC 型与 CC 型均存在极显著差异 ($P < 0.01$)。

表 5 不同基因型、不同性别在幼鱼与成鱼阶段与增重的相关性分析

Tab. 5 Correlation between genotypes and weight gain of individuals in different growth stages and sexes

位点	生长阶段	基因型	增重/雌性	增重/雄性
内含子 1_C175G	幼鱼	CC	117.1 ± 41.9	107.3 ± 30.3
		CG	119.4 ± 40.3	103.9 ± 32.0
		GG	111.8 ± 42.3	99.0 ± 31.2
	成鱼	CC	724.3 ± 179.5	602.2 ± 117.6
		CG	786.2 ± 209.5	612.8 ± 107.8
		GG	740.4 ± 159.9	633.3 ± 127.4
内含子 1_A993G	幼鱼	AA	104.6 ± 26.1	98.5 ± 28.4
		AG	109.1 ± 34.10	100.1 ± 26.1
		GG	111.7 ± 28.0	89.2 ± 30.7
	成鱼	AA	777.4 ± 156.6	635.2 ± 124.6 ^a
		AG	792.6 ± 176.9	656.8 ± 126.5 ^a
		GG	751.3 ± 142.4	591.6 ± 142.5 ^b
内含子 4_A511C	幼鱼	AA	107.1 ± 27.6 ^b	98.6 ± 24.7 ^B
		AC	98.9 ± 28.6 ^{Bb}	89.2 ± 25.1 ^C
		CC	117.1 ± 36.1 ^{Aa}	106.6 ± 27.2 ^A
	成鱼	AA	732.5 ± 132.3 ^B	622.4 ± 109.7 ^B
		AC	741.7 ± 159.4 ^B	604.6 ± 119.3 ^B
		CC	837.8 ± 174.5 ^A	691.7 ± 126.6 ^A

注:同列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 ($P < 0.01$)。

3 讨论

本实验通过比较鲤 *IGF* 基因 cDNA 序列与斑马鱼全套 DNA 序列,得出建鲤 *IGF-I* 基因的内含子位置,然后设计引物,选择性地扩增建鲤 *IGF-Ia* 的 5 个外显子和 3 个内含子(内含子 1、内含子 3 和内含子 4)。通过比较大麻哈鱼、罗非鱼、斑马鱼和草鱼 *IGF-I* 基因组序列,发现其内含子 2 序列在 6 ~ 11 kb 之间,采用 PCR 扩增直接获得 *IGF-I* 基因内含子 2 的序列有一定难度,后续的多态位点筛选和分型工作也需投入大量的资金和时间^[20],因此本次实验未扩增内含子 2。通过 Clustal W 1.83 进行序列比对,找出 SNPs 位点共 8 个,其中外显子上 1 个,内含子上 7 个,内含子上的突变频率远远高于外显子的突变频

率,这可能由于外显子的选择压力较大,外显子可以直接编码,一般其突变会对动物体造成重大影响。

本次实验采用了 PCR-RFLP,其操作简单,灵敏度高,重复性好。但并不是每个 SNP 位点都可以找到合适的引物和限制性内切酶,其酶切效果、酶切片段大小也有较高要求。如外显子 1_C13T 无法找合适的引物,内含子 3_216A, C/219G, T 位点酶切效果不佳等。本试验也尝试了用四引物突变特异性扩增系统(tetra-primer PCR method and the amplification refractory mutation system, Tetra-primers ARMS)的方法检测,但四引物法条件难以掌握,特异性扩增率太低,导致条带不够清晰。

根据实验结果可知,在内含子 1_C175G 位点

上 3 种基因型表现较为中性,各占一定比例,从增重上看,在个体发育不同时期 3 种基因型各有优势。在内含子 1_A993G 位点上,杂合体占有绝对优势,GG 型个体很少,从增重上可以发现,AG 增重最大,GG 型增重较小。在内含子 4_A511C 位点上,CC 型个体增重显著,无论幼鱼阶段还是成鱼阶段,其增重均与其余两种基因型存在显著乃至极显著差异,可以作为优质选育基因型。

由于雌雄建鲤间的生长差异比较明显,本试验同时对雌雄建鲤个体分别分析。根据不同时期,雌雄鱼间增重分析可知:内含子 1_A993G 位点,在幼鱼时期与增重无显著相关性($P > 0.05$),但是在成鱼时期则表现为与雄鱼增重有显著相关($P < 0.05$)。内含子 4_A511C 位点无论幼鱼还是成鱼时期,3 种基因型之间均存在显著差异($P < 0.05$),甚至极显著差异($P < 0.01$),但不同时期不同性别间,3 种基因型与增重相关性有略微差异。动物血 IGF- I 水平与生长速度呈正相关^[26],不同时期增重差异可能因为不同时期 IGF- I 表达量不同所致。不同动物 IGF- I 表达量都会呈现出规律性的表达,当动物体长到一定阶段,会有一个表达高峰期^[27],但具体何时达到最高峰仍有待研究。与阮瑞霞^[21]的吉富罗非鱼研究结果一致,建鲤 IGF- I 表达量在雌雄个体之间有可能也存在差异。

综上所述,IGF- I α 基因表达量可能随着个体的生长发育呈现规律性改变,内含子 1_A993G 位点、内含子 4_A511C 位点均表现出与增重有显著甚至极显著相关性,推测这两个基因的变异会影响建鲤的生长性状,因此建议在今后建鲤的分子选育中,可以此两个位点作为依据。

参考文献:

- [1] 张春香,罗海玲,陈喻,等. IGF- I 基因内含子 4 多态性与南江黄羊生长性状的关系[J]. 中国草食动物, 2008, 28(5):14-16.
- [2] 张殿昌. 鱼类胰岛素样生长因子研究进展[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(1): 66-71.
- [3] 章力,黄希贵,王德寿. 鱼类胰岛素样生长因子(IGF)系统的研究进展[J]. 动物学杂志, 2005, 40(2): 99-105.
- [4] 王蕾,杨连玉. 胰岛素样生成因子- I (IGF- I) 促生长作用的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2009,30(10): 10-12.
- [5] POZIOS K C, DING J, DEGGER B, et al. IGFs stimulate zebrafish cell proliferation by activating MAP kinase and PI3-kinase-signaling pathways [J]. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2001, 280(4):1230-1239.
- [6] DEANE E E, KELLY S P, LUK J C, et al. Chronic salinity adaptation modulates hepatic heat shock protein and insulin-like growth factor I expression in black sea bream [J]. Marine Biotechnology, 2002, 4(2): 193-205.
- [7] 刘大林,王金玉,魏岳,等. 京海黄鸡 IGF- I 基因与生长和屠体性状的关联分析[J]. 中国畜牧杂志, 2009, 45(11): 9-12.
- [8] NIKOLIC-JUDITH A, SAMANC H, KOVACEVIC M, et al. Serum concentrations of insulin-like growth factors and thyroid hormones in healthy and ketotic dairy cows during the puerperium [J]. Acta Veterinaria Beograd, 2001, 51(2/3):73-88.
- [9] DAVIS M E, BOYLES S L, MOELLER S J, et al. Genetic parameter estimates for serum insulin-like growth factor I concentration and carcass traits in Angus beef cattle [J]. Journal of Animal Science, 2003,81(9):2164-2170.
- [10] CAO Q P, DUGUAY S J, PLISETSKAYA E, et al. Nucleotide sequence and growth hormone-regulated expression of salmon insulin-like growth factor I mRNA [J]. Molecular Endocrinology, 1989, 3(12): 2005-2010.
- [11] VONG Q P, CHAN K M, LEUNG K, et al. Common carp insulin-like growth factor- I gene: complete nucleotide sequence and functional characterization of the 5'-flanking region [J]. Gene, 2003, 322: 145-156.
- [12] CLEVELAND B M, WEBER G M, BLEMINGS K P, et al. Insulin-like growth factor- I and genetic effects on indexes of protein degradation in response to feed deprivation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2009, 297(5): 1332-1342.
- [13] CLAY L A, WANG S Y, WOLTERS W R, et al. Molecular characterization of the insulin-like growth factor- I (IGF- I) gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1731(3):139-148.
- [14] SCHMID A C, ESTHER N, KLOAE W, et al. Insulin-like growth factor- I and II in the ovary of a bony fish, *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: in situ hybridization, immunohistochemical localization, Northern blot and cDNA sequences [J]. Molecular and cellular Endocrinology, 1999, 156(1/2): 141-149.
- [15] 张殿昌,江世贵,苏天凤,等. 鲢胰岛素样生长因子- I (IGF- I) cDNA 的分子克隆和序列分析[J]. 上海水产大学学报, 2002,11(2): 97-101.
- [16] 李胜杰,白俊杰,叶星,等. 加州鲈生长激素和胰岛素样生长因子- I cDNA 的克隆及序列分析[J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(3):1-5.
- [17] 叶星,白俊杰,简清,等. 草鱼胰岛素样生长因子- I 基因在大肠杆菌中的表达[J]. 中国生物化学与分子生物学

- 报,2001,17(6):725-728.
- [18] 陶洋,邹曙明. 草鱼胰岛素样生长因子结合蛋白 IGFBP-1 基因的全长 cDNA 克隆及表达[J]. 上海海洋大学学报,2011,20(1):15-21.
- [19] 郑凯迪,陈小川,李英文. 胭脂鱼胰岛素样生长因子-I (IGF-I) cDNA 的分子克隆、序列分析及组织表达[J]. 动物学杂志,2007,42(2):39-45.
- [20] 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[J]. 上海海洋大学学报,2009,18(1):8-13.
- [21] 阮瑞霞,俞菊华,李红霞,等. 吉富罗非鱼 *IGF-I* 基因的基因型对生长和体型的影响[J]. 中国水产科学,2011,18(3):682-688.
- [22] 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[J]. 水生生物学报,2011,35(4):622-629.
- [23] SAMBROOK J, FRITSCH E, MANIATIS T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd. New York: Cold Springs Harbor Laboratory Press, 1989.
- [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 [J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(22): 4673-4680.
- [25] 郭满才,袁志发,陈宏,等. 遗传多样性指标体系研究[J]. 动物生物技术通讯,2002,8(1):359-364.
- [26] YOSHIHITO S, KENTARO N, KAZUKI N. Change of plasma insulin-like growth factor -1 (IGF-1) concentration with early growth in Japanese beef cattle[J]. Animal Science Journal, 2003, 74(3): 205-210.
- [27] 张根华,陈伟华,赵茹茜,等. 肉鸡和蛋鸡早期发育阶段胰岛素样生长因子水平的比较[J]. 南京农业大学学报,1997,20(4):71-74.

SNPs identification and the correlation analysis with weight gain of *IGF-Ia* in *Cyprinus carpio* var. *jian*

LI Hong-xia¹, LIU Nan-nan², PU Tian-ning², WEI Ke-peng², YU Ju-hua^{1,2}, LI Jian-lin¹, TANG Yong-kai¹
(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, Jiangsu, China; 2. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, Jiangsu, China)

Abstract: The GHRH-GH- I GFs growth axis plays an essential and central role in body growth. The insulin-like growth factor, located downstream of the axis, is a critical conduction factor of GH transmission and biological function exertion. In this experiment, we specifically isolated 5 exons and 3 introns (intron1, intron3, and intron4) of *IGF-Ia* gene in *Cyprinus carpio* var. *jian*. A total of 8 SNPs were screened by comparing the sequences of 10 individuals. PCR-RFLP was applied in detecting the intron 1_C175G genotypes of 372 individuals from 5 families; the intron 1_A993G and intron 4_A511C genotypes of 987 individuals from 12 families. And then we identified the genotype, counted the allele frequency and analyzed the correlation between the three SNPs and weight gain. The results showed that the GG genotype frequency (male 0.43 and female 0.44) was the highest in intron 1_C175G, while this locus showed no association with weight gain. Intron 1_A993G locus significantly correlated with male weight gain in adult stages ($P < 0.05$) and AG genotype displayed the highest frequency, 0.76 in female and 0.72 in male. 0.48 in female and 0.47 in male of CC genotype was the highest allele frequency for locus intron 4_A511C, which was remarkably associated with both male and female weight gain in both juvenile and adult stages ($P < 0.01$). This experiment indicated that the expression of IGF- I gene varied between the different growth stages in *Cyprinus carpio* var. *jian*. Furthermore, expression diversity also existed between male and female individuals even at the same growth stage. The intron 1_A993G and intron 4_A511C were found significantly related with weight gain and could be considered as references in molecular breeding in *Cyprinus carpio* var. *jian*.

Key words: *Cyprinus carpio* var. *jian*; insulin-like growth factor; single nucleotide polymorphisms; weight gain; correlation