

## 中华鳖 *IGF2* 基因 SNP 标记与生长性状的关联分析

彭娜<sup>1,2</sup>, 曾丹<sup>1,2</sup>, 王晓清<sup>1,2\*</sup>, 王佩<sup>1,2</sup>, 罗志嘉<sup>1,2</sup>, 李潇<sup>1,2</sup>, 周先文<sup>1,2</sup>

(1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2. 水产高效健康生产湖南省协同创新中心, 湖南 常德 415000)

**摘要:** 采用四引物扩增受阻突变体系 PCR 法对中华鳖的 2 个 SNP 位点进行验证, 并统计其基因型频率。采用方差分析法分析 2 个 SNP 位点与中华鳖 6 个生长性状(体质量、背甲长、背甲宽、腹甲长、体高和裙边宽度)的差异。结果显示, 只有 A-1609G 位点上的体高和裙边宽度有显著差异; 这 2 个 SNP 位点的不同基因型共组成 6 种双倍型(去掉频率小于 3% 的双倍型 D1、D6 和 D9), ANOVA 分析结果表明这 6 种双倍型的 6 个生长性状间均存在显著差异, D4 双倍型 6 个生长性状的均值最大, 属于生长优势双倍型。筛选到的 *IGF2* 基因上的 2 个 SNP 位点具有用作中华鳖生长性状分子标记辅助育种的潜力。

**关键词:** 中华鳖; *IGF2* 基因; SNP 标记; 生长性状

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2018)01-0088-07

### SNP markers on *IGF2* gene in *Pelodiscus sinensis* and its correlation analysis to growth traits

PENG Na<sup>1,2</sup>, ZENG Dan<sup>1,2</sup>, WANG Xiaoping<sup>1,2\*</sup>, WANG Pei<sup>1,2</sup>, LUO Zhijia<sup>1,2</sup>, LI Xiao<sup>1,2</sup>, ZHOU Xianwen<sup>1,2</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. Collaborative Innovation Center for Aquatic Efficient Health Production of Fisheries in Hunan Province, Changde, Hunan 415000, China)

**Abstract:** The 2 sites of SNP in *Pelodiscus sinensis* were verified by adopting tetra-primer amplification refractory mutation system PCR (ARMS-PCR) method, genotype frequency were counted as well. The relationship between six growth traits (body weight, carapace length, carapace width, shell length, body height and calipash width) and 2 SNP sites were analyzed by mean of one-way ANOVA. The result showed that there was only one significant difference in body height and calipash width on the site of A-1609G. The different genotypes on 2 SNP sites composed 6 different diplotypes (excepted for D1, D6 and D9, which frequency lower than 3%), and they were significant difference on all growth traits by the analysis of one-way ANOVA. The D4 belonged to dominant genotypes with the largest mean value on all aspects of growth traits. The result indicated that the 2 SNP sites of *IGF2* gene could be used as a molecular marker-assistant breeding for growth traits of *Pelodiscus sinensis*.

**Keywords:** *Pelodiscus sinensis*; *IGF2* gene; SNP site; growth trait

胰岛素样生长因子2(Insulin-like growth factor 2, *IGF2*)含67~70个氨基酸的单链多肽, 相对分子质量约7 500, 前体由信号肽和B、C、A、D、E区域共6个部分组成<sup>[1]</sup>。*IGF2*在胎儿生长发育、肿瘤细胞增殖以及肌肉生长等方面具有重要作用<sup>[2-4]</sup>, 也

能调控动物细胞的增殖、分化、细胞凋亡和转化<sup>[5]</sup>。关于鱼类*IGF2*基因研究的报道较多, 1992年在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中首次分离出*IGF2*<sup>[6]</sup>; 之后在罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)<sup>[7]</sup>、鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[8]</sup>、吉富罗非鱼(GIFT Strain Nile Tilapia *Oreochromis*

收稿日期: 2017-09-06

修回日期: 2017-11-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372530, 31672640); 湖南省重点研发计划项目(2016NK2115)

作者简介: 彭娜(1993—), 女, 湖南浏阳人, 硕士, 主要从事水产动物遗传育种研究, pengnana312@163.com; \*通信作者, 王晓清, 博士, 教授, 主要从事水产动物遗传育种研究, wangxiao8258@126.com

*niloticus*)<sup>[9]</sup>、双棘黄姑鱼(*Protonibea diacanthus*)<sup>[10]</sup>等鱼类中分离出了 *IGF2* 基因。*IGF2* 基因在鱼类腮、肾、肠、心、脑和性腺等组织中均有表达<sup>[11]</sup>。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)于1996年由美国学者LANDER<sup>[12]</sup>首次提出,是第3代DNA遗传标记,与其他分子遗传标记相比具有密度高、遗传稳定性和代表性强、易实现自动化分析等优点<sup>[13-16]</sup>。目前检测的SNP方法有很多种,其中,PCR-RFLP<sup>[17]</sup>、SSCP<sup>[18]</sup>、TaqMan探针技术<sup>[19]</sup>等较为常见。四引物扩增受阻突变体系PCR法(tetra-primer amplification refractory mutation system PCR, tetra-primer ARMS PCR)是一种在普通PCR基础上发展起来并专门用于检测SNP的衍生技术。该技术用于检测单核苷酸突变具有快速、简便、低成本和可以区分等位基因是否纯合等优点<sup>[20]</sup>。

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)具有较高的营养价值和药用价值,是中国重要的淡水养殖动物。目前,通过PCR-RELP、SSR、PARD等分子标记方法对龟鳖遗传多样性和品种选育的研究较多<sup>[21-23]</sup>,但与其生长相关的研究尚少。为提高中华鳖的生长性能,加快中华鳖的良种选育进程,笔者采用直接测序法,结合序列多重比较,确定中华鳖 *IGF2* 基因的多态性,并用四引物扩增受阻突变体系PCR法检测267只中华鳖的 *IGF2* 基因型,采用SPSS分析SNP位点与中华鳖体质量、背甲长、背甲宽、腹甲长、体高、裙边宽度的关系,以期中华鳖生长性状的分子标记辅助育种提供候选标记。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

中华鳖共267只,取自湖南省常德市河州水产有限公司。随机选取同批次一起喂养的中华鳖,用电子天平称取中华鳖样本的体质量,用游标卡尺测量样本的背甲长、背甲宽、腹甲长、体高和裙边宽度,测量3次,结果取平均值。剪取30 mg左右的裙边组织置于无水乙醇中, -20 °C 保存, 备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因组 DNA 的提取

采用Transgen EasyPure Genomic DNA Kit试剂盒提取中华鳖裙边组织DNA,用1.5%琼脂糖电泳进

行检测,确定其质量。用Eppendorf BioSpectrometer紫外分光光度计测定光密度值,确定中华鳖DNA浓度,于-20 °C 保存, 备用。

#### 1.2.2 中华鳖 *IGF2* 基因 SNPs 位点的筛选

将中华鳖转录组测序结果比对到全基因组,获得 *IGF2* 部分片段序列。采用Primer Premier 6.0软件设计1对引物 P<sub>1</sub>(F为5'-TTTCGTTCTCACCC TGCTTT-3', R为5'-ACCTCTTTCTCACACTTCA TCT-3')。从267只中华鳖DNA样本中随机挑选20个DNA样本扩增P<sub>1</sub>引物和筛选SNP位点。PCR反应体系共25 μL: 上、下游引物各0.5 μL, DNA 1 μL, Mix 12.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL。PCR扩增程序: 94 °C 预变性5 min; 94 °C 变性30 s, 55 °C 退火30 s, 72 °C 延伸30 s, 共进行25个循环; 72 °C 延伸7 min, 4 °C 保存。上、下游引物浓度均为10 μmol/L, 稀释后的DNA浓度约为50 ng/μL, Mix为TIANDZ Instant PCR Kit 3.0 A型产品, 主要成分为PCR MagicMix 3.0(编号90805)和专用染料(编号131212)。将扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测0.5 h, 置于Bio-Rad凝胶成像系统Image-lab下观察, 拍照。将PCR产物直接送上海铂尚生物技术有限公司进行测序, 用Chromas软件查看测序结果峰图, 获得SNP突变点。

#### 1.2.3 SNP 位点的分型与验证

用软件Primer Premier 6.0设计由测序所获得的2个SNP位点的引物如表1。运用四引物法在267个中华鳖DNA样本中验证SNP位点。PCR反应体系共25 μL: 引物2 μL, DNA 1 μL, Mix 12.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。A-1609G位点的引物组成: 外引物上游0.5 μL, 下游0.3 μL; 内引物上、下游均为0.6 μL。G-1586A位点的引物组成: 外引物上游0.4 μL, 下游0.2 μL; 内引物上游0.4 μL, 下游1.0 μL。PCR扩增程序: 94 °C 预变性5 min; 94 °C 变性30 s, 64 °C 退火30 s, 72 °C 延伸30 s, 5个循环; 94 °C 变性30 s, 62 °C 退火30 s, 72 °C 延伸30 s, 5个循环; 94 °C 变性30 s, 60 °C 退火30 s, 72 °C 延伸30 s, 5个循环; 94 °C 变性30 s, 58 °C 退火30 s, 72 °C 延伸30 s, 15个循环; 72 °C 延伸7 min, 4 °C 保存。将扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测1 h, 置于Bio-Rad凝胶成像系统Image-lab下观察, 拍照。

表1 SNP引物序列

Table 1 Lists of SNP primers

SNP 位点	引物位置	上游引物(5'—3')	下游引物(5'—3')
A-1609G	外引物	GGAATACCGCATTGTCAGCAA	GCATCTGTGTATGAGTGATAGCC
	内引物	CTGAGAAGAAATTCGAAGAA	CACAAATTCAGATGGGTCC
G-1586A	外引物	ATAACTTCCCTAGCCCTTACCC	CCCTTCCTTTACCTCTTTCTCAC
	内引物	GCACCTTTACTTAAAAAGAAAG	GGAATTTCTTCTCAGTTACT

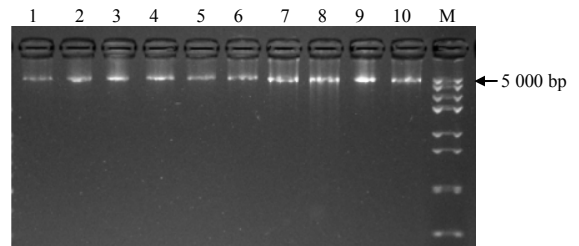
1.2.4 数据处理

采用R-studio软件计算观测杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )、多态信息含量( $PIC$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、哈迪-温伯格平衡( $HWE$ )和等位基因频率等遗传参数。用软件SPSS 22对IGF2基因的SNP位点基因型与生长性状指标(体质量、背甲长、背甲宽、腹甲长、体高、裙边宽度)进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取结果

由图1可见,基因组DNA的条带清晰,表明基因组DNA提取质量可靠,完整性良好,满足后续试验条件。



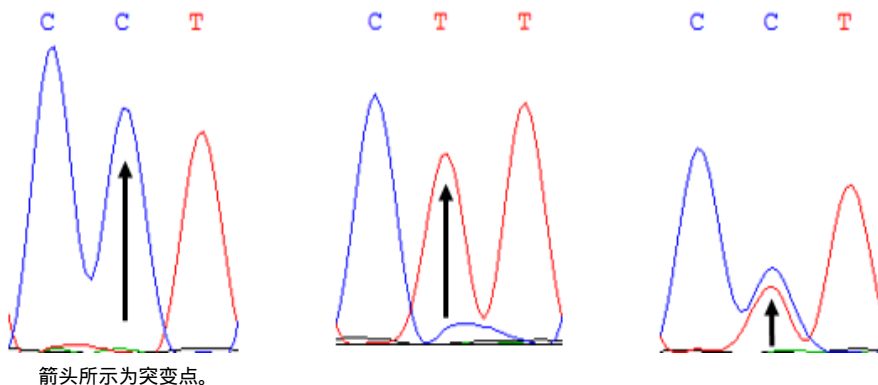
1~10 为 DNA 泳道; M 为 DNA 分子量标准(5 000 DNA ladder)。

图1 中华鳖基因组 DNA 的电泳图谱

Fig.1 Gel electrophoresis patterns of genome DNA from *Pelodiscus sinensis*

2.2 中华鳖 IGF2 基因 SNP 位点的筛选与验证结果

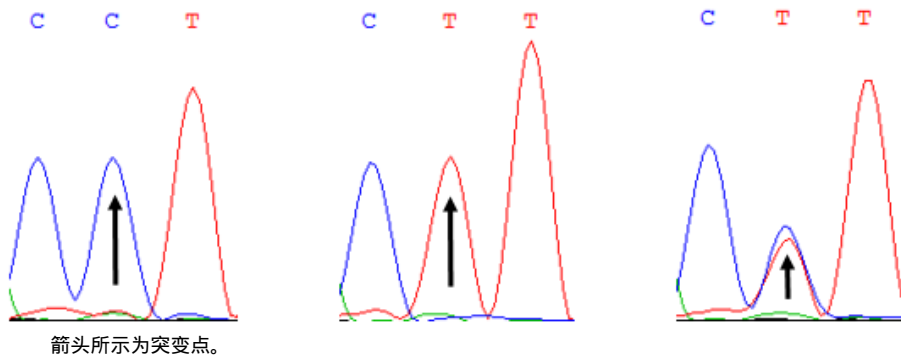
对20个中华鳖进行PCR扩增和测序,获得了2个SNP位点(图2和图3)。将这2个SNP分别命名为A-1609G和G-1586A。



箭头所示为突变点。

图2 A-1609G 位点测序峰图

Fig.2 DNA sequencing map on site of A-1609G



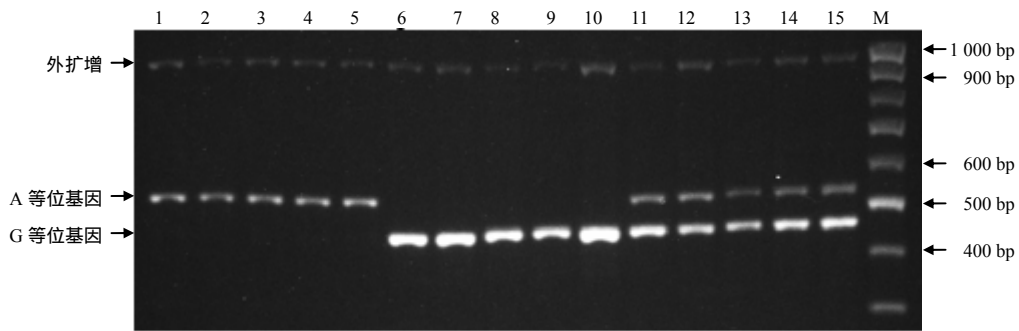
箭头所示为突变点。

图3 G-1586A 位点测序峰图

Fig.3 DNA sequencing map on site of G-1586A

由图4可见，A-1609G位点267只中华鳖均有AA、GG、AG共3种基因型；AA基因型显示的条带为513 bp，GG基因型显示的条带为440 bp。由图5可

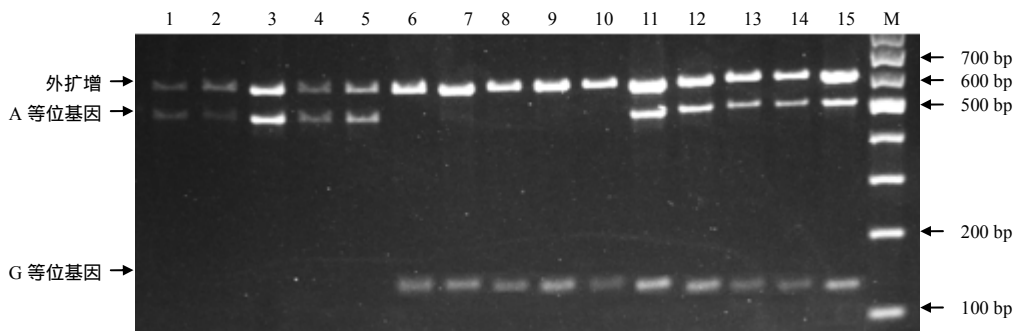
见，G-1586A位点267只中华鳖均有AA、GG、AG共3种基因型；AA基因型显示的条带为548 bp，GG基因型显示的条带为129 bp。



1—5 为 AA 型；6—10 为 GG 型；11—15 为 AG 型；M 为 DNA 分子量标准(100 bp DNA ladder)。

图 4 A-1609G 位点 3 种基因型的电泳结果

Fig.4 Gel electrophoresis patterns on site of A-1609G



1—5 为 AA 型；6—10 为 GG 型；11—15 为 AG 型；M 为 DNA 分子量标准(100 bp DNA ladder)。

图 5 G-1586A 位点 3 种基因型的扩增结果

Fig.5 Gel electrophoresis patterns on site of G-1586A

### 2.3 中华鳖 *IGF2* 基因 2 个 SNP 位点在中华鳖群体中的分布

由表 2 可知，中华鳖 *IGF2* 基因 SNP 位点 A-1609G 和 G-1586A 的观测杂合度 ( $H_o$ ) 分别为 0.479 4 和 0.651 7，期望杂合度 ( $H_e$ ) 分别为 0.499 8 和 0.491 4。当多态信息含量 ( $PIC$ ) < 0.25 时群体处于低

度多态性水平；当  $0.25 < PIC < 0.50$  时群体处于中度多态水平；当  $PIC > 0.50$  时群体处于高度多态性水平<sup>[24]</sup>。本研究中 2 个 SNP 位点均为低度多态性位点，经  $\chi^2$  检验得到 2 个位点均处于哈迪-温伯格平衡状态 ( $P > 0.05$ )。

表 2 *IGF2* 基因 2 个 SNP 位点的遗传参数

Table 2 Polymorphism analysis on 2 SNPs loci of *IGF2* gene

SNP 位点	观测杂合度	期望杂合度	多态信息含量	有效等位基因数	哈迪-温伯格平衡
A-1609G	0.479 4	0.499 8	0.124 4	1.920 86	$P=0.543 3, \chi^2=0.445 8$
G-1586A	0.651 7	0.491 4	0.094 8	2.871 00	$P=0.537 5, \chi^2=0.445 8$

由表 3 可知，在 267 个中华鳖样本中，A-1609G 位点的 AG 基因型最多，AA 基因型个体数与 GG 基因型个体数仅相差 5 个，等位基因 A 的频率比等位基因 G 的频率稍高。G-1586A 位点的 AG 基因型最多，AA

基因型次之，GG 基因型最少，AA 基因型个体数是 GG 基因型个体数的 2 倍，等位基因 A 的频率显著高于等位基因 G 的频率，推测该位点的等位基因 A 为优势等位基因。

表3 中华鳖 IGF2 基因 A-1609G 位点和 G-1586A 位点的基因型及其等位基因频率

Table 3 Genotype and allele frequency on site of A-1609G and G-1586A in gene IGF2

SNP 位点	基因型	样品数/个	基因型频率/%	等位基因频率/%
A-1609G	AA	72	26.97	A/50.94
	AG	128	47.94	G/49.06
	GG	67	25.09	
G-1586A	AA	63	23.60	A/56.18
	AG	174	65.17	G/43.82
	GG	30	11.23	

2.4 SNP 关联分析

由表4可知，A-1609G位点基因型GG的体高和

表4 IGF2 基因 SNP 位点不同基因型的生长性状指标

Table 4 Growth traits of different genotype of gene IGF2

SNP 位点	基因型	体质量/g	背甲长/mm	背甲宽/mm	腹甲长/mm	体高/mm	裙边宽度/mm
A-1609G	AA	380.07±23.08	134.57±3.34	116.20±2.55	102.17±2.35	(8.76±1.03)ab	(22.88±0.62)ab
	AG	398.41±17.23	138.06±2.50	118.01±1.88	104.12±1.74	(8.85±0.78)b	(23.40±0.49)b
	GG	342.20±12.57	129.11±3.93	111.37±2.98	98.26±2.62	(9.67±1.18)a	(21.53±0.78)a
G-1586A	AA	418.13±27.16	140.12±3.76	119.93±2.80	105.42±2.55	44.32±1.11	23.58±0.76
	AG	364.88±15.46	132.83±2.25	114.21±1.71	100.87±1.55	41.88±0.70	22.41±0.43
	GG	381.93±34.18	135.68±4.79	116.83±3.72	102.45±3.48	42.77±1.64	23.34±0.95

同一 SNP 位点数据后字母不同示组间差异显著(P<0.05)；n=267。

A-1609G位点和G-1586A位点共组成9种双倍型，剔除3个频率小于3%的双倍型D1、D6和D9，对其余6种双倍型的生长性状指标进行差异显著性分析的结果见表5。由表5可见，体质量、背甲长、背甲宽、腹甲长、体高、裙边宽度等生长性状指标双倍型间的差异均达显著水平(P<0.05)。双倍型D8的6个指标均值均低于其他双倍型的，其体质量尤其低于其他双倍型的，而双倍型D4的各指标均值都

裙边宽度均显著高于基因型AG的 (P<0.05)，而3种基因型体质量间的差异、背甲长间的差异、背甲宽间的差异和腹甲长间的差异均无统计学意义 (P>0.05)。在此位点上，除体高外，杂合型基因型AG的体质量、背甲长、背甲宽、腹甲长和裙边宽度等各生长性状指标的均值均高于纯合型基因型AA的和GG的。G-1586A位点表4中3种基因型间各生长性状指标的差异均无统计学意义(P>0.05)，纯合型基因型AA表4中各生长性状指标均明显高于纯合型基因型GG的和杂合型基因型AG的，AG生长性状指标的均值均相对较低。

显著高于其他双倍型的，由此可推测双倍型D4属于生长优势双倍型。双倍型D5为双杂合型(AG×AG)，其个体数在群体中所占的比例最大，但其6个生长性状指标双倍型间的差异均无统计学意义 (P>0.05)。剔除3个频率小于3%的双倍型D1、D6和D9，双倍型D1的体质量、背甲长、背甲宽、腹甲长、体高、裙边宽度均值均高于其他双倍型的，而双倍型D9的各指标均值均比其他双倍型的低。

表5 IGF2 基因不同双倍型的生长性状指标

Table 5 Growth traits of different diplotype of gene IGF2

双倍型	基因型		样品数/个	频率/%	体质量/g	背甲长/mm	背甲宽/mm	腹甲长/mm	体高/mm	裙边宽度/mm
	A-1609G	G-1586A								
D2	AA	AG	42	15.73	(362.43±31.52)ab	(130.85±4.58)ab	(113.78±3.52)ab	(100.35±3.17)ab	(41.85±1.41)ab	(22.28±0.86)ab
D3	AA	GG	24	8.99	(397.17±38.83)ab	(138.33±5.52)ab	(118.54±4.20)b	(103.32±4.10)ab	(43.68±1.75)b	(23.71±1.06)b
D4	AG	AA	29	10.86	(425.84±37.22)b	(141.59±5.28)b	(120.30±3.90)b	(106.09±3.63)b	(45.19±1.72)b	(23.97±1.00)b
D5	AG	AG	95	35.58	(392.41±19.90)ab	(137.31±2.92)ab	(117.40±2.21)ab	(103.66±2.04)ab	(43.23±0.88)b	(23.29±0.57)b
D7	GG	AA	29	10.86	(405.99±44.49)b	(137.01±6.07)ab	(118.24±4.53)b	(103.72±4.06)ab	(42.88±1.63)ab	(23.22±1.29)b
D8	GG	AG	37	13.86	(296.99±35.69)a	(123.58±5.13)a	(106.51±3.86)a	(94.33±3.40)a	(38.46±1.65)a	(20.32±0.95)a
D1	AA	AA	6	2.25	435.20±68.83	145.54±9.14	123.77±7.17	110.40±6.07	47.69±2.14	23.76±1.42
D6	AG	GG	4	1.5	342.28±102.21	130.34±12.16	115.88±10.99	100.90±8.72	38.65±5.77	22.11±3.05
D9	GG	GG	1	0.37	165.23	104.46	91.61	85.11	31.59	17.17

同列数据后字母不同示组间差异显著(P<0.05)。

### 3 结论与讨论

SNP是基因组水平上单核苷酸的变异,是继RFLP和SSR后的第3代分子遗传标记,在遗传多样性结构分析<sup>[25]</sup>、高密度连锁图谱构建<sup>[26]</sup>、性状关联分析<sup>[27]</sup>等方面具有广阔的应用前景。本研究中通过对*IGF2*基因进行生物信息学分析,发现了2个SNP位点(A-1609G位点和G-1586A位点),并用四引物扩增受阻突变体系PCR对这2个位点进行了验证。所获得2个位点的优势基因型分别为AG型和AA型,优势等位基因均为A。A-1609G位点仅有体高间和裙边宽度间表现出显著差异,其他性状间的差异均无统计学意义;G-1586A位点所有性状间的差异均无统计学意义,表明单个位点基因型与中华鳖的生长不相关;双倍型D4(A-1609G位点的AG型和G-1586A位点的AA型组合)的6个生长性状指标均值都最高,生长优势明显,推测这2种基因型存在协同作用,而双倍型D8(A-1609G位点的GG型和G-1586A位点的AG型组合)的6个生长性状指标均值都较低,不存在生长优势,推测这2种基因型存在拮抗作用。该现象在中华鳖*IGF1*基因上也有类似连锁反应。李婷<sup>[28]</sup>在研究中华鳖2个群体中*IGF1*基因SNP位点的遗传结构特征时发现,中华鳖极大群体中*IGF1*基因3个位点S1、S3和S4出现频率最高的基因型分别为杂合型AG、AT、CT,而极小群体中*IGF1*基因3个位点S1、S3和S4出现频率最高的基因型也是杂合型AG、CG、AT,且S1和S3的基因型频率和等位基因频率完全一致。周春龙等<sup>[29]</sup>在大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)的高密度脂蛋白结合蛋白基因(high density lipoprotein binding protein, HBP)上筛选了H1、H2和H3这3个SNP位点,其中H1和H2位点的基因型和基因频率都一致,单个位点基因型与生长不相关,而二者组成的BB基因型与生长密切相关,认为这2个位点之间连锁,之间存在协同或拮抗作用。

本研究结果表明,中华鳖*IGF2*基因2个SNP位点不同基因型的体质量间、背甲长间、背甲宽间、腹甲长间、体高间、裙边宽度间均存在差异,但差异均无统计学意义( $P>0.05$ , A-1609G位点的体高和裙边宽度除外),但频率大于3%双倍型D2、D3、D4、D5、D7和D8的生长性状指标间差异均达显著水平

( $P<0.05$ )。刘福平等<sup>[30]</sup>从尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)*MC4R*基因中筛选出5个SNP位点, GLM关联分析结果表明各位点的基因型差异和生长性状间差异均不明显,但将这5个突变点的不同基因型组合成7种双倍型,双倍型D4和D2均与其他双倍型有差异,属于负效双倍型。樊佳佳等<sup>[31]</sup>从草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)柠檬酸合酶基因中筛选出了A-386G和C-499G 2个SNP位点, 2个位点的不同基因型生长性状间差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。由这2个位点组成的5种双倍型的生长性状中,仅有头长存在显著差异( $P<0.05$ ),其他性状间的差异均不明显。本试验中2个位点组成的6种双倍型的体质量间、背甲长间、背甲宽间、腹甲长间、体高间、裙边宽度间的差异显著( $P<0.05$ ),双倍型D4的各生长性状指标均高于其他各组双倍型的,说明双倍型D4属于生长优势双倍型。分析频率小于3%的双倍型D1、D6和D9,双倍型D1的体质量、背甲长、背甲宽、腹甲长、体高、裙边宽度均比D4的略高,而双倍型D9的均比其他双倍型的低,双倍型D6的较双倍型D9的生长略好。由此可推测,基因型为双倍型D1的中华鳖生长较快,而基因型为双倍型D9的中华鳖生长较慢,但由于这两种双倍型样本数所占比例较少,所以,无法分析双倍型D1和D9的影响效用。

本研究结果表明,在*IGF2*基因中,双倍型D4(AG×AA)为中华鳖的生长优势双倍型,可以作为分子标记辅助育种的候选标记。

#### 参考文献:

- [1] REINECKE M, BJÖRNSSON B T, DICKHOFF W W, et al. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2005, 142(1/2): 20-24. DOI: 10.1016/j.ygcen.2005.01.016.
- [2] FLORINI J R, MAGRI K A, EWTON D Z, et al. "Spontaneous" differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(24): 15917-15923.
- [3] MAGRI K A, BENEDICT M R, EWTON D Z, et al. Negative feedback regulation of insulin-like growth factor-II gene expression in differentiating myoblasts *in vitro*[J]. *Endocrinology*, 1994, 135(1): 53-62. DOI: 10.1210/endo.135.1.8013391.
- [4] 刘桂兰, 蒋思文, 熊远著, 等. 胰岛素样生长因子2的遗传学特征与生物学作用[J]. *遗传*, 2002, 24(2): 211-213. DOI: 10.3321/j.issn: 0253-9772.2002.02.027.

- [5] 蒋思文,彭健,熊远著. 胰岛素样生长因子 2 研究进展[J]. 遗传, 2004, 26(2): 271-273. DOI: 10.3321/j.issn: 0253-9772.2004.02.029.
- [6] SHAMBLOTT M J, CHEN T T. Identification of a second insulin-like growth factor in a fish species[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(19): 8913-8917. DOI: 10.1073/pnas.89.19.8913.
- [7] CHEN J Y, CHANG C Y, CHEN J C, et al. Production of biologically active recombinant tilapia insulin-like growth factor-II polypeptides in *Escherichia coli* cells and characterization of the genomic structure of the coding region[J]. DNA Cell Biol, 1997, 16(7): 883-892. DOI: 10.1089/dna.1997.16.883.
- [8] 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.
- [9] 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、增重的相关性[J]. 动物学杂志, 2010, 45(2): 107-114.
- [10] 林权卓,沈卓坤,杨宪宽,等. 双棘黄姑鱼 *IGF2* 基因克隆及其在卵巢发育中的作用研究[J]. 广东农业科学, 2015, 42(3): 119-124, 130, 封 3. DOI: 10.3969/j.issn. 1004-874X.2015.03.026.
- [11] 彭凤兰. 金鱼胰岛素样生长因子 2 基因克隆与组织表达[D]. 长沙:湖南师范大学, 2006. 10.7666/d.y913069.
- [12] LANDER E S. The new genomics: global views of biology[J]. Science, 1996, 274(5287): 536-539. DOI: 10.1126/science.274.5287.536.
- [13] COOPER D N, SMITH B A, COOKE H J, et al. An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome[J]. Hum Genet, 1985, 69(3): 201-205. DOI: 10.1007/bf00293024.
- [14] XIONG M, JIN L. Comparison of the power and accuracy of biallelic and microsatellite markers in population-based gene-mapping methods[J]. The American Journal of Human Genetics, 1999, 64(2): 629-640. DOI: 10.1086/302231.
- [15] COLLINS F S, GUYER M S, CHARKRAVARTI A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation[J]. Science, 1997, 278(5343): 1580-1581. DOI: 10.1126/science.278.5343.1580.
- [16] 季华员,张学良,刘林秀,等. 基因组单核苷酸多态性图谱构建方法研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(8): 59-63.
- [17] TAO W J, BOULDING E G. Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.)[J]. Heredity (Edinb), 2003, 91(1): 60-69. DOI: 10.1038/sj.hdy. 6800281.
- [18] ORITA M, IWAHANA H, KANAZAWA H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(8): 2766-2770. DOI: 10.1073/pnas.86.8.2766.
- [19] MORITA A, NAKAYAMA T, DOBA N, et al. Genotyping of triallelic SNPs using TaqMan PCR[J]. Mol Cell Probes, 2007, 21(3): 171-176. DOI: 10.1016/j.mcp. 2006.10.005.
- [20] YE S, DHILLON S, KE X, et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(17): E88-E88. DOI: 10.1093/nar/29.17.e88.
- [21] 张林,吴涛,何力. 4个不同地理群体中华鳖 *pomc* 基因 PCR-RFLP 分析[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(5): 106-111.
- [22] 孟庆辉,许晓军,张海琪. 中华鳖日本品系、清溪乌鳖及其杂交子代微卫星分析[J]. 浙江农业科学, 2013(9): 1194-1197.
- [23] 刘至治,蔡完其,李思. 中华鳖五群体遗传变异的 RAPD 分析[J]. 水产学报, 2004, 28(2): 119-126.
- [24] Botstein D, Whit R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980(3): 314-331.
- [25] LIN B Z, SASAZAKI S, MANNEN H. Genetic diversity and structure in *Bos taurus* and *Bos indicus* populations analyzed by SNP markers[J]. Nihon chikusan Gakkaiho, 2010, 81(3): 281-289. DOI: 10.1111/j.1740-0929.2010. 00744.x.
- [26] STICKNEY H L, SCHMUTZ J, WOODS I G, et al. Rapid mapping of zebra fish mutations with SNPs and oligonucleotide microarrays[J]. Genome Res, 2002, 12(12): 1929-1934. DOI: 10.1101/gr.777302.
- [27] 张世勇,王明华,钟立强,等. 斑点叉尾 *MSTN* 基因 4 个 SNP 位点及其与生长性状的相关性[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(1): 30-33.
- [28] 李婷. 中华鳖生长相关分子标记的筛选[D]. 上海:上海海洋大学, 2016.
- [29] 周春龙,白俊杰,李胜杰,等. 大口黑鲈高密度脂蛋白结合蛋白基因(HBP)SNPs 的筛选及与生长性状关联性分析[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(2): 232-238.
- [30] 刘福平,白俊杰,叶星,等. 罗非鱼 MC4R 基因克隆及与其生长相关的 SNPs 位点[J]. 中国水产科学, 2009, 16(6): 816-823.
- [31] 樊佳佳,刘小献,白俊杰,等. 草鱼柠檬酸合酶基因 SNP 筛选及与生长性状的关联分析[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(3): 84-89.

责任编辑: 王赛群  
英文编辑: 王 库