

文章编号: 1004-7271(2009)01-0008-06

# 大口黑鲈 IGF-I 基因内 含子 1、3 和 4 序列多态性研究

李小慧, 白俊杰, 叶星, 胡隐昌

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 中国水产科学研究院热带亚热带  
鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380)

**摘要:**根据大口黑鲈 IGF-I 基因的 cDNA 序列设计引物, 克隆 IGF-I 基因内含子核苷酸序列, 采用 PCR 产物直接测序方法, 在中国养殖群体和美国野生群体中筛选 IGF-I 基因内含子上的多态位点。应用 RFLP、CRS-RFLP 和 SSCP 技术建立多态位点的检测方法, 同时比较分析其中 4 个多态位点在两个群体中基因频率分布。结果表明: (1) IGF-I 基因内含子 1、3 和 4 序列长分别为 1 317 bp、712 bp 和 1 941 bp; (2) 在 3 个内含子上共发现 7 个多态位点, 其中在内含子 1 的 208 和 1070 位为 G-A 突变; 内含子 3 的第 40 个碱基为一个“A”的插入-缺失突变, 第 307 位为 C-T 突变, 683 位是 G-A 突变; 内含子 4 上的 696 碱基处有一个 20 bp 的插入-缺失突变, 在 1 563 位为 G-A 突变, 表明大口黑鲈 IGF-I 基因序列上存在较多的 SNPs; (3) 内含子 1 上 SNP G1070A 的 A 等位基因能为 Hind III 限制性内切酶识别, 采用 RFLP 技术分型。根据内含子 1 上 SNP G208A 侧翼序列, 设计错配引物, 使错配碱基和 A 等位基因共同形成 Taq I 酶切位点, 建立 CRS-RFLP 检测方法。内含子 4 上 SNP G1563A 采用 SSCP 检测方法, 同时对内含子 4 上的插入-缺失突变进行 PAGE 电泳分型。试验结果显示, RFLP、CRS-RFLP 和 SSCP 三种 SNP 检测方法简单易行, 适于在水产动物 SNP 标记研究中推广应用; (4) 在中国养殖群体中, 只有内含子 1 上的 SNP G1070A 具有多态性, 其它 3 个多态位点只在美国野生群体中存在多态, 证实中国养殖群体的遗传多样性相对较低。

**关键词:**大口黑鲈; 胰岛素样生长因子-I 基因; 内含子; 多态性

中图分类号: S 917 文献标识码: A

## Polymorphisms of intron 1, 3 and 4 of insulin-like growth factor I gene in largemouth bass

LIXiao-hui BAI Jun-jie YE Xing HU Yin-chang

(Pearl River Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation Chinese Academy of Fishery Sciences Guangzhou 510380 China)

**Abstract:** The sequences of intron 1, 3 and 4 of the largemouth bass IGF-I gene were isolated using primers that designed from IGF-I gene cDNA. PCR products of three introns were sequenced for detecting polymorphisms. The methods were developed for detecting polymorphisms. Moreover, the alleles frequencies of four polymorphisms were calculated in Chinese cultured population and American wild population. The results indicated: 1) The lengths of intron 1, 3 and 4 were 1 317 bp, 712 bp and 1 941 bp, respectively.

收稿日期: 2008-06-04

基金项目: 广东省自然基金项目 (7301732); 国家科技支撑项目 (2006BAD01A1209); 国家科技基础条件平台工作 (2005DKA21103)

作者简介: 李小慧 (1980-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事鱼类遗传育种学方面的研究。E-mail: kh152706@yahoo.com.cn

通讯作者: 白俊杰, Tel: 020-81616129; E-mail: baijj2005@21cn.com

2) Seven polymorphisms that included six SNPs and one insertion/deletion mutation were found in Chinese cultured population and American wild population. The polymorphisms in intron 1 were SNP G<sup>208A</sup> and SNP G<sup>1070A</sup> (number meant relative position in each intron); The polymorphisms in intron 3 were "A" nucleotide insertion/deletion mutation at 40 basepair and SNP G<sup>208A</sup> and SNP G<sup>1070A</sup>; The polymorphisms in intron 4 contained 20bp insertion/deletion mutation and SNP G<sup>1070A</sup>. The result indicated that there were abundant polymorphisms in largemouth bass IGF-I gene. 3) The polymorphisms in introns 1 and 4 were genotyped by RFLP, CRS-RFLP and SSCP methods. 4) In Chinese cultured population, only SNP G<sup>1070A</sup> in intron 1 was identified. The frequencies of genotypes were not significantly different between two populations. Other three polymorphisms did not exist in Chinese cultured population, which suggested that genetic diversity was very low in Chinese cultured population.

Key words: largemouth bass; IGF-I gene; intron; polymorphisms

胰岛素样生长因子-I (insulin-like growth factor-I, IGF-I)在哺乳动物和禽类的胚胎期以及出生后的生长过程中起重要作用<sup>[1]</sup>, IGF-I基因上的多态位点与家畜和家禽的生产性状密切相关<sup>[2-6]</sup>。近年来研究证实,基因的内含子在维持基因的特异功能和基因的表达发挥重要作用<sup>[7]</sup>。猪 IGF-I基因的内含子不仅调控基因的表达和功能<sup>[8]</sup>,其多态位点更与生长速度、肌肉和脂肪的沉积密切相关<sup>[9-11]</sup>。在鱼类, IGF-I具有调节细胞代谢,促进细胞生长、分化和分裂,抑制细胞死亡等多种生理功能<sup>[12]</sup>,生长激素 GH也是通过调节肝脏的 IGF-I的表达和功能而发挥促生长作用<sup>[13]</sup>。鱼类 IGF-I基因与生长性状的关联研究已见报道,一个 SNP G/T存在于红点鲑的 IGF-I基因启动子上,但与红点鲑早期生长没有相关性<sup>[14]</sup>。本研究以大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)为研究对象,将 IGF-I基因作为大口黑鲈生长性状的候选基因,寻找 IGF-I基因内含子上的遗传多态位点,为寻找大口黑鲈生长性状的分子标记、构建遗传连锁图谱和开展标记辅助育种 (MAS)工作奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

大口黑鲈样本分 2 个群体共 52 尾,其中美国群体 (AL, 12 尾)均为野生个体,鳍条组织样本由美国德克萨斯州公园和野生动物处 (Texas Parks & Wildlife Department) 的 Djar Lutz-Carrillo 博士提供,采用上海生工生物工程技术有限公司 (SANGON) 基因组提取试剂盒提取鳍条 DNA; 中国养殖群体 (CL, 40 尾),来自广东省加州鲈良种场,从养殖群体中随机抽取。所有鱼尾鳍静脉取血,抗凝剂 (ACD)与血液体积比为 6:1,采用北京时代天根生化公司 (TIANGEN) 血液基因组提取试剂盒提取鱼血液 DNA。所有 DNA 样本均放于 -20℃ 保存。

### 1.2 试验材料

Taq DNA 聚合酶和 dNTP 购自华美生物工程公司,限制性内切酶和 PMD19-T Vector 购自大连宝生物公司 (TAKARA),琼脂糖、氯化钙、去离子甲酰胺丙烯酰胺和 N,N'-亚甲双丙烯酰胺等购自广州威佳生物技术有限公司,大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

### 1.3 引物设计及合成

草鱼和大马哈鱼的 IGF-I 基因的全序列已经获得,两种鱼类的 IGF-I 基因都包括 5 个外显子和 4 个内含子。将已经克隆的大口黑鲈 IGF-I 基因的 cDNA 序列 (EF536889)<sup>[15]</sup>与斑马鱼的全基因组序列进行比对,对照草鱼 (AF465830) 和大马哈鱼 (AF063216) 的基因组结构和序列,推测大口黑鲈 IGF-I 基因外显子区,根据外显子序列设计内含子扩增引物 (表 1)。引物交由上海英骏生物技术有限公司合成 (INVITROGEN)。

表 1 大口黑鲈 IGF-I 基因内含子扩增和多态位点检测引物

Tab. 1 The primers of amplifying introns and genotyping polymorphisms of the largemouth bass IGF-I gene

引物名称	引物序列 (5'-3')	退火温度 (°C)	扩增片段长度 (bp)	目标序列
P1	F: GTGGCATTATGTGATGTCTTC	63	1 379	内含子 1
	R: AGAGGGTGTGGCTACAGGAGAT			
P2	F: AGTAAACCAACAGGCTATGG	58	1 000	内含子 3
	R: GGATGAATGACTATGTCCAGAT			
P3	F: GGACATAGTCATTTCATCCTTC	56	2 025	内含子 4
	R: CTACATTCKGTAATTTCTGCCCC			
P4	F: GCATCAGTAGTGGCACCTCT	62	211	内含子 1
	R: CTCTGGCACCAAGTGGAAAGT			
P5	F: CAACTGTCCTGCATTTCITGGT <del>CG</del>	58	127	SNP G1070A
	R: CCAGAGCAGTAAAACCTCGTG			内含子 1
P6	F: TCCTCAATATCGTGTCTCTC	56	225	SNP G208A
	R: TCTATTACTGCACTCCCTG			内含子 4
P7	F: GAAATACGAGTTCTCCTCAC	58	232 /252	SNP G1563A
	R: AATGTGGTAAAGGGACAG			内含子 4 插入 缺失突变

注:带下划线的碱基为 CRS-RFLP检测时的错配碱基

#### 1.4 SNP位点筛选

从中国养殖群体和美国野生群体中各随机挑选 7 个样本,扩增 IGF-I 基因内含子 1、3 和 4 序列,送到上海英骏生物技术有限公司进行纯化测序,用 Vector NIT Suite 8.0 比对分析测序结果寻找 IGF-I 基因上的突变位点。

#### 1.5 SNP位点检测和分析

采用下列几种方法对部分突变进行检测。

##### 1.5.1 限制性切断长度多态性 (restricted fragment length polymorphism, RFLP)

限制性内切酶是一类能识别 DNA 序列上的特异位点 (通常为 4~6 bp 的反向重复序列),并在特异位点处切割的 DNA 酶类。对于一条 DNA 分子来说会产生特定大小和数目的酶切片段。由于基因的突变会产生或消除某些酶切位点,从而改变酶切片段的大小和数目,这些酶切片段称为 RFLP,并可以通过电泳方法检测出来。本实验应用 RFLP 方法检测大口黑鲈 IGF-I 基因内含子 1 上的 SNP G1070A。包含 SNP G1070A 位点的 PCR 产物用 Hind III 限制性内切酶酶切,酶切体系为:PCR 产物 5  $\mu$ L, Buffer 1  $\mu$ L, 酶 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3.5  $\mu$ L。酶切产物用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Ac: Bis=29:1), 140 V 衡压电泳后,银染显色。

##### 1.5.2 创造限制酶切位点 PCR 法 (CRS-PCR, created restriction site PCR)

CRS-RFLP 是应用引物错配技术结合 SNP 的一个等位基因而配合成一个酶切位点,使 SNP 可用于 PCR RFLP 分析的一种方法。IGF-I 基因内含子 1 上的 SNP G208A 采用 CRS-RFLP 方法检测,错配引物 (表 1) 设计应用在线引物设计软件 dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>)<sup>[16]</sup>。

##### 1.5.3 单链构象多态性 (single-strand conformational polymorphism, SSCP)

SSCP 是以构象为基础的检测基因组中 SNP 的方法,由日本学者 Orita 等发明。其原理是:单链 DNA 片段呈复杂的空间折叠构象,这种立体结构主要是由其内部碱基配对等分子内相互作用力来维持的,当有一个碱基发生改变时,会使空间构象发生改变。空间构象有差异的单链 DNA 分子在聚丙烯酰胺凝胶中受到阻力不同,因此,构象上有差异的 DNA 分子可以通过电泳分离<sup>[17]</sup>。本实验建立了大口黑鲈 IGF-I 基因内含子 4 上的 SNP G1563A 的 SSCP 检测方法。具体步骤如下:取 2  $\mu$ L PCR 产物和 6  $\mu$ L 加样缓冲液 [98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯菁、10 mmol/L EDTA (pH 8.0)、10% 甘油] 混匀,99 °C 变性 10 min,然后冰浴 5 min 使之保持变性状态。变性后的 PCR 产物用 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Ac: Bis=29:1) 10 V/cm 电泳 10~12 h 后,银染显色。

## 1.6 数据统计

统计 SNPs在美国野生群体和中国养殖群体中的等位基因频率和基因型频率,卡方分析进行独立性检验,统计软件为 SPSS 15.0。

## 2 结果与分析

### 2.1 IGF-I基因内含子序列扩增

成功扩增了包含大口黑鲈 IGF-I基因的内含子 1、3和 4的序列,扩增片段长度分别为 1 379 bp、1 000 bp和 2 025 bp。将所得序列与大口黑鲈 IGF-I cDNA 比对后删除外显子序列,内含子 1、3和 4分别为 1 317 bp、712 bp和 1 941 bp 并且内含子与外显子边界均符合 GT-AG 规则。

### 2.2 SNP位点筛查和检测结果

将测序结果比对后,两个群体共发现 6个 SNPs和一个插入-缺失突变(表 2)。其中 2个 SNPs位于内含子 1上,在第 208和 1 070位碱基都发生了 G-A 突变(相对各内含子位置,下同);在内含子 3上发现 3个 SNPs,40位为一个 A 碱基插入-缺失突变,在 307碱基为 C-T 突变,在 683位碱基为 G-A 突变;在内含子 4上的 696碱基处有一个 20 bp 的插入-缺失突变,另一个 SNP 为 1563位碱基的 G-A 突变。根据两个群体各 7个样本的测序结果,只有内含子 1上的 SNP G<sup>1070</sup>A 在中国养殖群体中有多态性,其他多态位点都只存在于美国野生群体中。

表 2 大口黑鲈 IGF-I基因内含子上多态位点  
Tab. 2 The polymorphisms in introns of the largemouth bass IGF-I gene

位置(相对各内含子)	类型	分布
内含子 1 208	G-A	美国
1 070	G-A	中国、美国
内含子 3 40	A(插入-缺失)	美国
307	C-T	美国
683	G-A	美国
内含子 4 696	cccaccTgTgggTgggcggT(插入-缺失)	美国
1 563	G-A	美国

建立相应的检测方法,进一步分析 IGF-I内含子 1和 4的多态位点在美国野生群体和中国养殖群体的多态分布。内含子 1上 1 070位碱基突变可用 RFLP方法检测,经引物 P4F和 P4R 扩增后获得 211 bp 的 PCR 产物,经 Hind III 酶切后电泳,GG 基因型个体仍为 211 bp 的条带,GA 基因型个体为 211 bp、153 bp 和 58 bp 三条带,AA 基因型个体为 153 bp 和 58 bp 两条带(图 1-a)。内含子 1上 208位碱基突变采用 CRS-RFLP方法检测,设计错配引物 P5-F 与等位基因“A”组合成一个 Taq I 酶切位点 TCGA,扩增片段长度为 127 bp。经酶切后电泳检测,GG 基因型仍为 127 bp 条带,GA 基因型为 127 bp 和 103 bp 两条带,AA 基因型为一个 103 bp 条带(图 1-b)。内含子 4上的插入-缺失突变直接采用 PAGE 电泳检测,定义插入型为 GG,大小为 252 bp 缺失型为 AA,大小为 232 bp 插入-缺失杂合型为 GA,为 252 bp 和 232 bp 两条带(图 1-c)。内含子 4上的 SNP 采用 SSCP方法检测,共检测出 3种带型,经测序验证,3种带型分别与 AA、GG 和 GA 基因型对应,结果如图 1-d 所示。

### 2.3 4个多态位点在两个群体中的基因频率分布

为了进一步验证 IGF-I基因多态性在两个群体的差异,我们用已经建立的 SNP 和插入-缺失突变检测方法,分析两个群体全部样本多样性。3个 SNPs 和 1个插入-缺失突变在中国养殖群体和美国野生群体中的基因型和等位基因频率见表 3。试验表明,只有内含子 1上 SNP G<sup>1070</sup>A 存在于中国养殖群体中,其它 3个多态位点只存在于美国野生群体中,与测序结果一致。在美国和中国群体中,内含子 1上 SNP G<sup>1070</sup>A G 等位基因都为优势等位基因。卡方检验显示,内含子 1上的 SNP G<sup>1070</sup>A 在两个群体的

基因频率分布没有显著差异。

### 3 讨论

本研究使用了 RFLP、CRS-RFLP 和 SSCP 方法分别检测了内含子 1 上的 SNP G1070A、SNP G208A 和内含子 4 上的 SNP G1563A。三种方法都是基于 PCR 和电泳技术而建立,对实验仪器要求不高,并且成本低廉,适合普及应用。RFLP 检测技术具有操作简单、特异性高、重复性好等优点,而且可以直接确定 SNP 的性质和具体位置,是最常使用的方法。但是,并不是所有 SNP 位点都与其邻近碱基构成限制性内切酶切序列,有时内切酶价格的过于昂贵也会大大增加其检测成本,使得 RFLP 的应用受到一些限制。CRS-RFLP 方法可以克服 SNP 位点核苷酸序列的限制,通过向一个引物的 3 端引入错配碱基,结合 SNP 位点而构成一个酶切位点,使 SNP 可采用 PCR-RFLP 进行分析,为 SNP 检测提供了更多选择。此外,本试验采用 SSCP 方法检测内含子 4 上已知 SNP G1563A 的多态性,SSCP 方法还适用于筛选未知 SNP 位点。在实际应用中,可以综合应用这三种检测方法,先以 SSCP 结合测序方法筛选 SNP 位点,测序验证后依据 SNP 位点的具体特征来选择相对方便和经济的检测方法,用于 SNP 的分型,以及标记与性状间的关联分析等。

本研究克隆了大口黑鲈 IGF-I 基因的内含子 1、3 和 4 的序列。在 3 个内含子中,共发现 6 个 SNPs 和 1 个插入-缺失多态位点。内含子 1 的两个 SNP 位点都为 G-A 突变;内含子 3 上有 3 个 SNPs 包括一个 A 碱基插入-缺失突变、一个 G-A 突变和一个 C-T 突变;内含子 4 上一个为 G-A 突变,另一个为 20 bp 的插入-缺失突变。然而,在本研究中,除内含子上 1 070 位 SNP A-G 在中国地区养殖群体中存在多样性以外,其它 SNPs 只存在于美国野生群体中,说明中国养殖大口黑鲈的遗传多样性较低,试验结果与本实验室先前应用 RAPD 和微卫星的研究结果基本一致<sup>[17-18]</sup>。这可能是由于大口黑鲈引进时种质单一、有效亲本数量过少所造成。本研究未能获得大口黑鲈 IGF-I 基因的内含子 2 序列,主要原因可能与内含子 2 序列较长有关。通过比较大马哈鱼、罗非鱼、斑马鱼和草鱼的 IGF-I 基因组序列,发现其内含子 2 序列在 6~10 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。

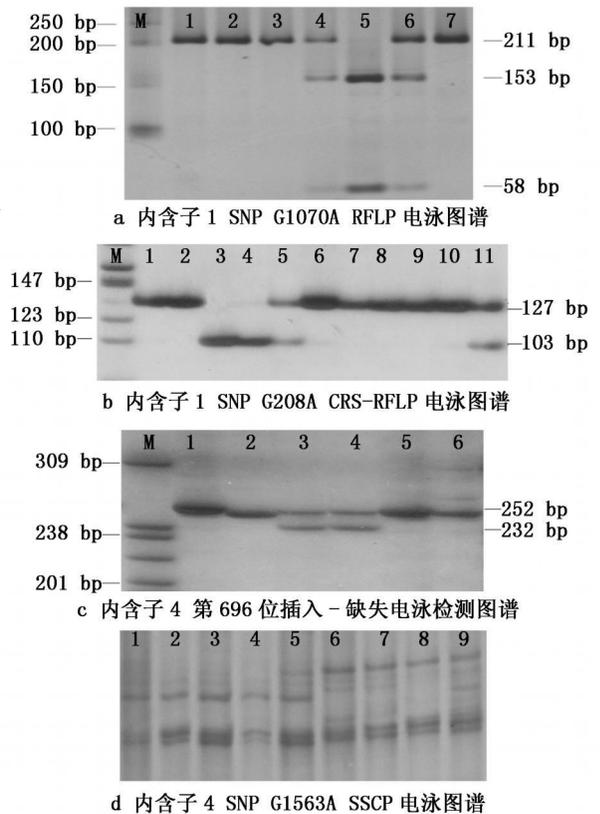


图 1 大口黑鲈 IGF-I 基因内含子 1 上多态位点电泳检测结果

Fig 1 The results of genotyping the polymorphisms in introns of IGF-I gene in largemouth bass

a 内含子 1 SNP G1070A RFLP 电泳图谱。M: Marker 泳道 1~3、7 为 GG 基因型;泳道 4 和 6 为 GA 杂合型;泳道 5 为 AA 基因型; b 内含子 1 SNP G208A CRS-RFLP 电泳图谱。M: Marker 泳道 1、2、6~10 为 GG 基因型;泳道 3 和 4 为 AA 基因型;5 和 11 为 GA 杂合型; c 内含子 4 第 696 位插入-缺失电泳检测图谱;M: Marker 泳道 1、2、5、6 为插入型 +/+;泳道 3 和 4 为杂合型 +/-; d 内含子 4 SNP G1563A SSCP 电泳图谱。泳道 1~5 为 AA 型;6~8 为 GG 型;9 为 AG 杂合

表 3 大口黑鲈 IGF-1基因内含子上 4 个多态位点在中国养殖群体和美国野生群体中基因频率分布  
Tab. 3 Frequencies of alleles and genotypes of four polymorphisms in introns of largemouth bass IGF-1 gene in Chinese cultured population and American wild population

SNP	群体	基因型频率(样本数, %)			基因频率(%)		
		样本数	GG	AA	AG	G	A
内含子 1	中国	40	62.5(25)	2.5(1)	35(14)	80	20
1070 A>G	美国	12	75(9)	0	25(3)	81	19
内含子 1	中国	40	100(40)	0	0	100	0
208 A>G	美国	12	58(7)	17(2)	25(3)	71	29
内含子 4	中国	40	0	100(40)	0	0	100
1563G>A	美国	12	25(3)	58(7)	17(2)	33	67
内含子 4	中国	40	100(40)	0	0	0	100
696 +/-	美国	12	58(7)	0	42(5)	21	79

感谢李胜杰和于凌云在样本采集方面的支持,宋红梅、陈敏、樊佳佳、何小燕、刘福平和张宁宁在血样采集和大口黑鲈体重、体尺指标测量等工作中的热情帮助。

## 参考文献:

- [1] Jones J R, Clemmons D R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions[J]. *Endocr Rev* 1995, 16(1): 23-34.
- [2] Nagaraja S C, Aggrey S E, Yao J, et al. Brief communication: trait association of a genetic marker near the IGF-1 gene in egg-laying chickens[J]. *J Hered* 2000, 91(2): 150-156.
- [3] Amills M, Jimenez N, Villalba D, et al. Identification of three single nucleotide polymorphisms in the chicken insulin-like growth factor 1 and 2 genes and their associations with growth and feeding traits[J]. *Poult Sci* 2003, 82(10): 1485-1493.
- [4] 李加琪, 陈赞谋, 刘德武, 等. IGF-1基因对长白×蓝塘猪资源群生产性能的遗传效应分析[J]. *遗传学报*, 2003, 30(9): 853-885.
- [5] Moody D E D, Pamp S N, MacNeil M D. Characterization of DNA polymorphisms and their associations with growth and maternal traits in line 1 Hereford cattle[C]//Guelph Ontario Canada. Proc 5th World Cong Genet Appl Livest Prod 1994, 21: 221-224.
- [6] Moody D E, Pamp D, Newman S, et al. Characterization of DNA polymorphisms in three populations of Hereford cattle and their associations with growth and maternal EPD in Line 1 Herefords[J]. *J Anim Sci* 1996, 74(8): 1784-1793.
- [7] 邱晓云, 卢大儒. 内含子在基因表达调控中的作用[J]. *国外医学遗传学分册*, 1996, 19(1): 44-45.
- [8] Jungerius B J, van Laere A S, Te Pas M F, et al. The IGF-2 intron<sup>3</sup>-G3072A substitution explains a major imprinted QTL effect on backfat thickness in a meishan × european white pig intercross [J]. *Genet Res* 2004, 84(2): 99-101.
- [9] Knoll A, Putnova L, Dvorak J, et al. A Nci I PCR-RFLP within intron 2 of the porcine insulin-like growth factor 2 (IGF2) gene[J]. *Anim Genet* 2000, 31(2): 150-151.
- [10] van Laere A S, Nguyen M, Braunschweig M, et al. A regulatory mutation in IGF-2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig [J]. *Nature* 2003, 425(6960): 832-836.
- [11] Estany J, Tor M, Villalba D, et al. Association of CA repeat polymorphism at intron 1 of insulin-like growth factor (IGF-I) gene with circulating IGF-I concentration, growth, and fatness in swine[J]. *Physiol Genomics* 2007, 31(2): 236-243.
- [12] Upton Z, Yandell C A, Degger B G, et al. Evolution of insulin-like growth factor-I (IGF-I) action: in vitro characterization of vertebrate IGF-1 proteins [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1998, 121(1): 35-41.
- [13] Moriyama S, Ayson F G, Kawauchi H. Growth regulation by insulin-like growth factor I in fish [J]. *Biotechnol Biochem* 2000, 64(8): 1553-1562.
- [14] Tao W J, Boukling E G. Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) [J]. *Heredity* 2003, 91(1): 60-69.
- [15] 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.
- [16] Neff M M, Turk E, Kalishman M. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis [J]. *Trends Genet* 2002, 18(12): 613-615.
- [17] 梁素娴, 白俊杰, 叶星, 等. 养殖大口黑鲈的遗传多样性分析[J]. *大连水产学院学报*, 2007, 22(4): 260-263.
- [18] Bai J J, Lutz-Carrillo D J, Quan Y C, et al. Taxonomic status and genetic diversity of cultured largemouth bass *Micropterus salmoides* in China [J]. *Aquaculture* 2008, 278(1-4): 27-30.