

鲤 *IGF2b* 基因 5'侧翼区序列克隆及不同鲤该区域 GC 富集区的甲基化分析

张成锋^{①②} 苏胜彦^{①②} 朱健^{①②} 朱文彬^{①②} 刘珊^② 董在杰^{①②③*}

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 无锡 214081;

② 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; ③ 南京农业大学动物科技学院 南京 210095

摘要: 鲤 (*Cyprinus carpio*) 胰岛素样生长因子 2b (insulin-like growth factor 2b, *IGF2b*) 基因为鲤 *IGF* 基因家族重要的成员, 已有的研究表明 5' 侧翼区序列对其功能的发挥有重要作用。因此, 采用基因组步移法获取 5' 侧翼区序列, 通过亚硫酸盐修饰的方法分析不同品种该区域 GC 富集区的甲基化状况。本文成功从鲤基因组 DNA 中获得 695 bp 的 *IGF2b* 5' 侧翼区序列。已获取的 *IGF2b* 5' 侧翼区序列经过 TFSEARCH 分析后发现了多个转录因子结合位点和 TATA 框, 通过 BLAST 比对发现, 鲤 *IGF2b* 5' 侧翼区 DNA 序列与斑马鱼 (*Danio rerio*) *IGF2b* 基因相比, 相似性为 87%。检测该区域富含 GC 的序列 17 个位点, 发现建鲤 (*C. c. var. jian*) 有 2 个个体的 3 个位点出现甲基化, 而黄河鲤 (*C. c. haematopterus*) 只有 1 个个体 1 个位点出现甲基化, 这说明 2 个品种鲤在这个区域出现甲基化修饰的几率低, 也验证了这 2 品种在该基因该区域 GC 富集区是稳定的。

关键词: 鲤; *IGF2b*; 5' 侧翼区; 甲基化

中图分类号: S965.116 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2012)02-98-07

Cloning of *IGF2b* 5' Flanking Region and Methylation Analysis of Its GC-rich Sequence in Common Carp (*Cyprinus carpio*)

ZHANG Cheng-Feng^{①②} SU Sheng-Yan^{①②} ZHU Jian^{①②}

ZHU Wen-Bin^{①②} LIU Shan^② DONG Zai-Jie^{①②③*}

① Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081;

② Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081;

③ College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: In Common Carp (*Cyprinus carpio*) *IGF2b* is an important member of IGF family, and the 5' flanking region sequence contributes to its function largely. The 5' flanking region sequence was cloned by genome walking method and the methylation of GC-rich region in the sequence was also analysed through sulfate-modified method. It was shown that *IGF2b* 5' flanking region sequence was 695 bp in length. Multiple transcription factor binding sites and TATA box were found by TFSEARCH analysis. *IGF2b* 5' flanking region

基金项目 现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (No. CARS-46), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (No. 2009JBF01), 江苏省自然基金项目 (No. BK2010146);

* 通讯作者, E-mail: dongzj@ffrc.cn;

第一作者介绍 张成锋, 男, 助理研究员; 研究方向: 鱼类养殖生物学; E-mail: zhangcf@ffrc.cn。

收稿日期: 2011-09-19, 修回日期: 2012-01-04

sequence shared 87% identity with that of zebrafish as revealed by BLAST. Two individuals of Jian Carp (*C. c. var. jian*) had 3 methylated sites, while only one individual of Huanghe Carp (*C. c. haematopterus*) had similar modification among the 17 GC-rich regions examined. Thus, methylation modification level is low in this region, and this GC-rich sequence was stable in both Jian Carp and Huanghe Carp.

Key words: Common Carp (*Cyprinus carpio*); *IGF2b*; 5' flanking region; Methylation

胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 是一类进化上保守的具有胰岛素样代谢和促有丝分裂功能的多肽,在动物生长发育中起着重要的作用^[1-2]。IGF 包括 IGF1 和 IGF2 两种同源多肽类型,这两个单链多肽分子在氨基酸组成上具有 62% 的同源性,与胰岛素原具有 50% 的同源性^[3-4]。IGF2 也被称为生长调节素 A (somatomedin A),是一种促细胞分裂多肽,在所有胰岛素的靶细胞中发挥类胰岛素的功能,为胚胎生长和发育的重要调节因子,对细胞增殖、分化、细胞凋亡和转化具有重要作用^[5-7]。

在许多哺乳类、少数的鸟类、两栖类和硬骨鱼类中,已确定 IGF2 的编码序列,其由 67 个氨基酸残基组成,其前肽由 S、B、C、A、D 和 E 6 个区域组成^[8]。目前已有关于鲈科鱼大杜父鱼 (*Cottus scorpius*)^[9]、虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*)^[10]、尼罗罗非鱼 (*Tilapia nilotica*)^[11] 等 IGF2 基因序列的报道,根据这些鱼类的 IGF2 氨基酸序列分析发现,在鱼类中该分子具有高度的保守性,其同源性在 63% 以上^[12]。值得一提的是,在一些鱼类的研究中还发现存在两个 IGF2 基因,即 *IGF2a* 和 *IGF2b*,两个基因在胚胎时期和成鱼时期的表达位点存在差异^[13]。

印迹基因 (imprinted gene) 是指在配子发生过程中被双亲特异性甲基化修饰的基因^[14],它能调控基因的表达^[15]。大部分印迹基因都含有双亲差异甲基化区域 (differential methylated region, DMR),在这些区域的附近或内部存在一些控制单等位基因表达的表观调控元件^[16]。对哺乳动物的一些研究表明,正确的印迹方式能影响其正常的生长发育、出生后的行为以及大脑的发育或功能^[17]。IGF2 作为在小鼠 (*Mus musculus*) 中发现的第一个内源性印

迹基因,是目前研究较多的印迹基因之一^[5]。Lawton 等^[18]研究发现,小鼠 *IGF2* 基因有 3 个差异甲基化区域 DMR1、DMR2 和 H19-DMR ICR (imprinting control region, ICR) 每个不同的 DMR 都对应有不同的表观调控元件,控制着 *IGF2* 基因在不同发育时期和不同组织中的表达。谢冰花等^[14]以金鱼 (*Carassius auratus auratus*) *IGF2* 基因为研究对象,确定了在其基因内 CpG 岛在精子中被高度甲基化,在卵子中没有甲基化,证明是双亲特异性甲基化区域。因此对 *IGF2* 基因甲基化修饰的研究至关重要。

徐青等通过甲基化敏感扩增多态性 (methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP) 方法分析了白洛克肉鸡 (*Gallus gallus domesticus*) 和白来航蛋鸡及其杂交 F1 代基因组的甲基化状态,发现同一组织在不同群体的甲基化程度不同^[19]。同样,肖正中等使用 MSAP 方法分析了长白猪 (*Sus domestica*) 和蓝塘猪及其杂种基因组的甲基化水平,发现杂种和父母本的甲基化水平存在差异^[20]。这表明基因组甲基化与群体特征相关。因此,可从基因甲基化的角度剖析不同鲤 (*Cyprinus carpio*) 群体的群体特征,为群体的利用提供基础。

本研究利用 PCR 扩增和染色体步移法,根据斑马鱼 (*Danio rerio*) *IGF2b* 基因的 5' 侧翼区序列 (BX548049.9),分析不同鲤群体该区域 GC 集中区的甲基化状况,为研究 *IGF2b* 基因在鲤生长发育、产肉性能等方面提供参考,为鲤杂交育种和品种改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 建鲤 (*Cyprinus carpio* var.

jian)、黄河鲤 (*C. c. haematopterus*) 都取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴试验基地,其中黄河鲤引自河南黄河鲤鱼原种场。

1.2 总 DNA 提取和 PCR 扩增测序 鲤基因组总 DNA 提取采用 TaKaRa 全血基因组试剂盒,后进行凝胶电泳检测提取 DNA 的质量,用分光光度计测算 DNA 浓度。根据基因库中鲤 *IGF2* 基因的 cDNA 序列 (AF402958) 设计引物 (表 1) 扩增第一外显子和启动子区的 DNA 序列。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

表 1 鲤 *IGF2b* DNA 扩增所需引物

Table 1 Primers for *IGF2b* DNA amplification

	引物序列 Oligo sequence (5' - 3')	扩增产物 长度 Length (bp)	退火温度 Annealing temperature Tm (°C)
<i>IGF2b</i>	GGGGAACACTAAAC CGACATT GGCATTTCGTATGGA CCAGTA	200	56
<i>IGF2b</i> 验证引物	TGGACGGGTCAGC CTGTAAA	730	55
<i>IGF2b</i> proofed primer	TCITATTCCTCACA ACTCAGGCA		

PCR 反应体系为 25 μ l, 包括 10 \times buffer 15 μ l, Mg^{2+} (25 mmol/L) 1 μ l, dNTPs (各 2 mmol/L) 1 μ l, 上下游引物 (10 mmol/L) 各 1 μ l, 模板 DNA 1 ng, *Taq* DNA 聚合酶 (Promega) 1 U, ddH₂O 补足。扩增反应均在 TaKaRa 公司梯度 PCR 仪上完成。PCR 反应程序为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 20 s, 退火 56°C 20 s, 72°C 延伸 30 s, 28 个循环; 72°C 延伸 10 min。将反应后的 PCR 产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结合 goldview 显色进行检测, 溴酚蓝为上样液 (0.25% 溴酚蓝, 40% 蔗糖水溶液), UVP 成像系统 (UVP gel doc™ Imaging System, UVP Inc) 拍照。上海英骏生物技术有限公司测序。

1.3 染色体步移法 对鲤 *IGF2b* 基因 (AF402958) 5' 端进行克隆, 采用染色体步移法, 通过 TaKaRa 基因组步移试剂盒进行, 所需的引物见表 2。

表 2 步移法扩增 *IGF2b* 基因 5' 侧翼区的引物序列

Table 2 Primers for *IGF2b* 5' flanking region sequence cloning by genome walking method

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5' - 3')	引物长度 Primer length (bp)
IGF2b SP1	CACAGTTTCAAAGCAGTTCCG	22
IGF2b SP2	CTCGTGCAAGAGAAAATGCGT	21
IGF2b SP3	GATATGTCCAAGATTCCGTAAAAGT	24
IGF2b SP4	GCTGCCGCTGTTTTCCAAGAAGT	23
IGF2b SP5	CGAATAGCGTATCTGACCCAAATCAT	25
IGF2b SP6	CAGAAATGCCGAGGTAATCAATATC	25

1.4 亚硫酸氢盐修饰和甲基化分析 取 1 ~ 2 μ g DNA 用去离子水稀释至 50 μ l, 加入 5.5 μ l 3 mol/L NaOH, 置于 37°C 30 min, 使 DNA 变性后加入新鲜配制的 10 mmol/L 对苯二酚 30 μ l 及 3.6 mol/L 的亚硫酸氢钠 520 μ l, 石蜡油封层, 55°C 水浴脱氨基 16 h。Wizard DNA Clean-up System 纯化。加入 5.5 μ l 3 mol/L 的 NaOH, 4 μ l glycogen (10 g/L, 33 μ l 10 mol/L 的 NH₄AC), 3 倍体积的无水乙醇沉淀, 洗涤, 去离子水稀释。

通过在线软件 (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>) 分析和设计甲基化处理 DNA 扩增的特异性引物 (表 3), 进行 PCR 扩增, 反应体系为 25 μ l, 包括 10 \times buffer 2.5 μ l, Mg^{2+} (25 mmol/L) 0.8 μ l, dNTPs (2 mmol/L) 0.5 μ l, 上下游引物 (10 mmol/L) 各 0.5 μ l, 模板 DNA 2 μ l, *Taq* DNA 聚合酶 (Promega) 1 U, ddH₂O 补足。扩增反应均在 TaKaRa 公司梯度 PCR 仪上完成, PCR 反应程序为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 20 s, 53°C 退火 30 s, 72°C 延伸 40 s, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。将反应后的 PCR 产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结合 goldview 显色进行检测, 溴酚蓝为上样液 (0.25% 溴酚蓝, 40% 蔗糖水溶液), UVP 成像系统拍照。上海英骏生物技术有限公司测序。

1.5 数据分析 序列比对通过 NCBI 数据库中 Blast 进行, 通过在线软件 MethPrimer 预测 GC 富集区, 采用 RepeatMasker 预测重复序列;

表 3 用于分析 *IGF2b* 基因 5'侧翼区
甲基化状况所需的引物

Table 3 Primers for *IGF2b* 5'flanking region
sequence methylation analysis

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence	产物长度 (bp) Product length
P1-F	AGGTTGATTTCGTTAAAGG	212
P1-R	TCAATCACAAATAAAAAACAATCT	
P2-F	TAATTTAGTGTGTTGATTTTGGT	202
P2-R	TCAAAATTCAAAAAACAACA	

通过 TFSEARCH (<http://mbs.cbrc.jp/research/>

*TCATCTAAYTCTTCATTATCTCTCAGTGCTCTGGACGGGTGCCTGTAAAGTGAATTACCATCATTACGCCACTATTTCGCGTGAGG
ATCGATAAGGCAGGTGCGTATCAGAGGAAATGACGGCAGAAAGCGTTTCATCTGCTCTCTTATCATCCGGGGCAGTTTCCATTGTAA
AGTTTTACACATCGAGTGTCTGTGAGAACTCTGGTGGTCCGCTGCACAGACTGATAATAGCTACTGATATTGATTACGTGCGC
ATTTCTGAAAIATTTACTTTTTTATTATTCTATTCTGTTTATTTTAAAGTATCACTTATTCCCTGTTTATTACTGTTTAAATGCACATG
TATYATTATGATTGGGTCAGATACGCTATTCAAATCAITTTGGGGAATACTACTTGGCTTGACGTCACATTTAGGAAGGCACAGAAA
ATTTGGACATTTAAACAAGGTGTTATGACATATTCTCTAATGCCATTGACCTTTTGTGATCTGGACTTCTTGGAAAACAGCGGCA
GGGAATCGGGCGGACTGCTGGAGATTGACTGACCGCATCGAGGTTGACCTCTCAYGGACATGCCGCGCCGAGGGGCGGGGGGT
GGAGGGGGTTAAGGGGCGGGTTGGGTATATAAAACGCTCTCAGAGAATTTGCTGTCGCCTGAGTTTGGGACAGCTCCA
CACACCATCTTAACACCAACTGGGAACTAAACCGACATTCTTAACCAATACAACAGCACAGCATTTTTTCCCTTTTTTT
TCTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTAIGTTGACATGGAGGACCAACTAAAACAATCATTTCTTTGTGCCATACTTGTGAGAACA
GACAGTGTCAATAAAGTAAAGAAAGACTTTTTTACAACCTTTACGGAATCTTGGACATATCTGGCGATGAKTGAATAGT
TAAGCTCTCTTAAACAGAAAAAAAACCTCGTTTTTATAGACTTGCAAAAAATAGAATCGT*

图 1 *IGF2b* 基因的 5'侧翼区 DNA 序列

Fig. 1 *IGF2b* 5'flanking region sequence

斜体字母表示本次试验扩增的序列,正体部分表示本实验室通过 PCR 方法
已获得的序列,带有框的为翻译起始位点和部分翻译区。

Italic alphabetical letters stand for the cloned sequence; Unitalic alphabetical letters denote the sequence cloned in
our lab; rimmed sequence stands for the translation start site and partial translation sequence.

2.2 *IGF2b* 5'侧翼区序列转录位点分析 已获取的 *IGF2b* 5'侧翼区序列经过 TFSEARCH 分析后发现:转录因子结合位点有 cap, Oct-1, Nkx-2, GATA-2, S8, CdxA, MyoD, StuAp, NIT2, Dfd, CDPCR, Sn, deltaE, GATA-1, HSF, GATA-2, GATA-3, CREB, Skn-1, CRE-BP, deltaE, CdxA, c-Ets-, NIT2, ADR1, Dfd, BR-C Z, HNF-3b, Pbx-1, Croc, XFD-2, SRY, XFD-3, ADR1, ATF, MZF1, Ik-1, Lyf-1, RORalp, RORalp, STATx, PolyA, AML-1a, ADR1, STRE, Sp1, GCbox, RREB-1, CF2-II, TATA 框。通过 BLAST 比对发现,鲤 *IGF2b* 5'侧翼区 DNA 序列与斑马鱼 *IGF2b* 基因该区域序列 (BX548049.9) 相比,相似性为 87%。

2.3 建鲤和黄河鲤 *IGF2b* 基因 5'端侧翼区 GC 位点的甲基化差异分析 由于建鲤和黄

河鲤生长速度不同,而 *IGF2b* 基因与鲤生长速度相关,因此,本文通过检测该基因 5'侧翼区的甲基化,分析该区域甲基化与生长速度的关系,来说明这 2 品种该基因 5'端侧翼区 GC 位点的甲基化差异。根据扩增的鲤 *IGF2b* 基因 5'侧翼区 DNA 序列上富含 GC 位点的区域设计引物(表 3),此区域可检测位点 17 个,重复样本为 10 个,用于分析 5'端侧翼区的甲基化状况(图 2,3)。从图 2 中可以看出,得到了 2 对引物都有特异性扩增的目的片段;从图 3 中可以看出,建鲤有 2 个个体的 3 个位点出现甲基化,而黄河鲤只有 1 个个体 1 个位点出现甲基化,2 个品种鲤在这个区域出现甲基化修饰的几率低;第 2 对引物建鲤和黄河鲤均未检测到甲基化的位点,也就是说在这个区域没有甲基化修饰。

2 结果

2.1 *IGF2b* 5'侧翼区 DNA 序列 依据鲤 *IGF2* 基因的 cDNA 序列(AF402958),通过染色体步移试剂盒,从鲤基因组 DNA 中获得的扩增片段回收测序,获得长度 695 bp 的基因组 DNA 序列(图 1)。

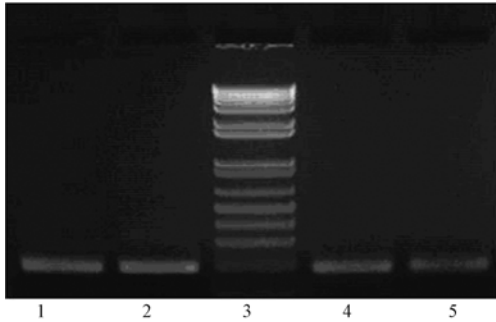


图2 *IGF2b* 5'侧翼区 DNA 序列上的 GC 位点集中区扩增

Fig. 2 Cloning of *IGF2b* 5'flanking GC-rich sequence

1: 第一对引物(P1-F 和 P1-R),以建鲤 DNA 模版扩增的产物; 2: 第一对引物(P1-F 和 P1-R),以黄河鲤 DNA 模版扩增的产物; 3: 1 kb DNA 分子量标准,从中间空隙至下依次为 1 000、850、600、500、400、300、200、100 bp; 4: 第二对引物(P2-F 和 P2-R),以建鲤 DNA 模版扩增的产物; 5: 第二对引物(P2-F 和 P2-R),以黄河鲤 DNA 模版扩增的产物。
 1: First primer (P1-F and P1-R) for Jian Carp DNA; 2: First primer (P1-F and P1-R) for Huanghe Carp DNA; 3: 1 kb plus DNA ladder (1000,850,600,500,400,300,200,100 bp); 4: Second primer (P2-F and P2-R) for Jian Carp DNA; 5: Second primer (P2-F and P2-R) for Huanghe Carp DNA.

3 讨论

3.1 鲤 *IGF2b* 基因 5'侧翼区序列 研究发

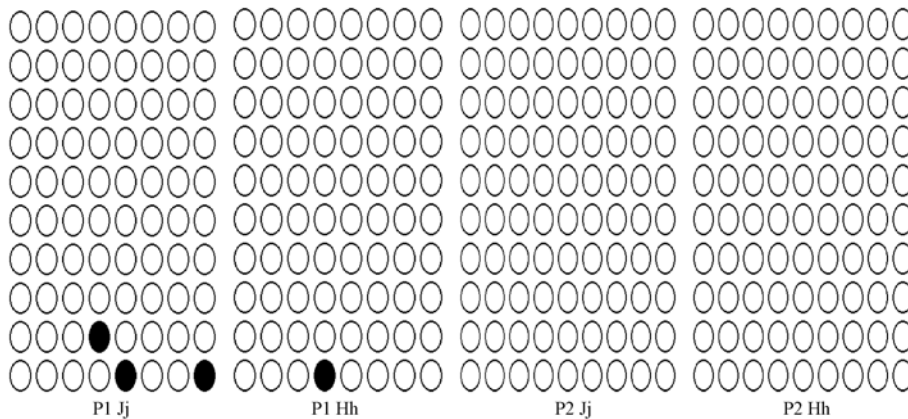


图3 建鲤、黄河鲤 *IGF2b* 5'端侧翼区 2 个 GC 位点集中区的甲基化状况

Fig. 3 Methylation analysis of two GC-rich regions of *IGF2b* 5'flanking sequence in Jian Carp and Huanghe Carp

○ 代表未甲基化的 GC 位点; ● 代表甲基化的 GC 位点; Jj: 建鲤; Hh: 黄河鲤; P1: 第 1 对引物, P2: 第 2 对引物。

○ denote unmethylated GC locus; ● denote methylated GC locus; Jj: Jian Carp; Hh: Huanghe Carp; P1: First primers; P2: Second primers.

现 *IGF2* 基因与鱼类的生长发育相关,在鲤的脑、鳃、肠、肾、肝、肌肉中用生长激素 (growth hormone, GH) 处理,可增加 *IGF2* mRNA 含量^[21]。Chen 等^[22]用重组 *IGF2* 腹腔注射罗非鱼 (*Tilapia*) 5 周后,体重和体长分别较对照组增加了 72% 和 34%。这些说明, *IGF2* 基因表达量与鱼类生长速度密切相关。 *IGF2* 基因 5'侧翼区序列 CpG 岛的甲基化可抑制基因的表达^[23-24]。因此,5'侧翼区序列的克隆是研究该基因功能的基础之一,同时该区域均有富含 GC 的区域,该区域可能会有甲基化修饰或是转录结合位点的调控或是功能性多态位点^[25-26]。在鲤和斑马鱼, *IGF2* 基因存在 2 个同源物^[27],而本文关注 *IGF2b* 基因并克隆了该基因的 5'侧翼区序列,通过与斑马鱼 *IGF2b* 基因该区域相比,发现 2 个序列相似性为 87%,并用 TFSEARCH 预测转录调控位点,发现斑马鱼和鲤鱼 *IGF2b* 基因 5'侧翼区序列存在类似的转录调控位点。这些结果表明,可参照斑马鱼的 *IGF2b* 基因所在染色体的信息研究鲤 *IGF2b* 基因的功能及其应用,这种对比方式在酪蛋白 5'侧翼区序列转录调控位点的研究中已得到应用^[28-29]。

3.2 不同品种鲤 *IGF2b* 基因 5'侧翼区序列的甲基化差异 2009 年, Xie 等^[30]克隆了金鱼 *IGF2* 基因 5'侧翼区序列,并分析了该区域 GC 富集区在胚胎发育不同阶段以及成鱼不同组织部位的甲基化状况,结果显示金鱼的 *IGF2* 基因该区域存在基因印迹(也就是甲基化方式不同),只是在胚胎发育期发生了改变。也就是说在鱼的 *IGF2* 基因 5'侧翼区序列在不同发育阶段和不同组织部位存在着甲基化差异。另有研究发现,不同种群之间有完整序列基因的 5'侧翼区序列存在甲基化模式的不同^[31]。因此,通过检测不同品种 *IGF2b* 基因 5'侧翼区序列的甲基化差异,建鲤有 2 个个体的 3 个位点出现甲基化,而黄河鲤只有 1 个个体 1 位点出现甲基化,说明 2 个品种鲤在 *IGF2b* 基因 5'侧翼区出现 CG 位点甲基化数量不同。有研究报道 5'侧翼区序列的甲基化常与环境的改变有关^[32-33],基于此观点鲤鱼 2 品种这种甲基化数量的不同可能与二者对环境改变的适应程度有关。

品种之间的甲基化差异也可从基因组甲基化的程度来说明,徐青等^[19]研究发现,同一组织在不同群体的甲基化程度不同。洪柳等研究发现,品种之间的甲基化模式存在较大差异^[34]。这说明可通过甲基化的方式分析品种之间乃至其杂交后代的差异。因此,从基因组甲基化和功能基因 5'侧翼区序列甲基化的角度分析品种之间的差异是进行品种多态性、环境适应性评估和利用的有效途径之一。

参 考 文 献

- [1] Martin D M, Feldman E L. Regulation of insulin-like growth factor-II expression and its role in autocrine growth of human neuroblastoma cells. *Journal of Cellular Physiology*, 1993, 155(2): 290 - 300.
- [2] Kim J, Song G, Gao H J, et al. Insulin-like growth factor II activates phosphatidylinositol 3-kinase-protooncogenic protein kinase 1 and mitogen-activated protein kinase cell Signaling pathways, and stimulates migration of ovine trophoblast cells. *Endocrinology*, 2008, 149(6): 3085 - 3094.
- [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. *动物学杂志*, 2005, 40(2): 99 - 105.
- [4] Rindernecht E, Humbel R E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *Biol Chem*, 1978, 253(8): 2769 - 2776.
- [5] Dechiara T M, Efstratiadis A, Robertson E J. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, 1991, 64(4): 849 - 849.
- [6] Grard D E, Okamura C S, Banalietta M A, et al. Developmental expression and location of IGF-I and IGF-II mRNA and protein in skeletal muscle. *J Anim Sci*, 1998, 76(4): 1004 - 1011.
- [7] Florini J R, Ewton D Z, McWade F J. IGFs, muscle growth, and myogenesis. *Diabetes Rev*, 1995, 3: 73 - 92.
- [8] 张殿昌. 鱼类胰岛素样生长因子研究进展. *上海水产大学学报*, 2005, 14(1): 66 - 71.
- [9] Loffing-Cueni D, Schmid A C, Reinecke M. Molecular cloning and tissue expression of the insulin-like growth factor II prohormone in the bony fish *Cottus scorpius*. *General and Comparative Endocrinology*, 1999, 113(1): 32 - 37.
- [10] Shablott M J, Chen T T. Identification of a second insulin-like growth factor in a fish species. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, 89(19): 8913 - 8917.
- [11] 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. *DNA Cell Biol*, 1997, 16(7): 883 - 892.
- [12] Tse M C, Vong Q P, Cheng C H, et al. PCR-cloning and gene expression studies in common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor-II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1575(1/3): 63 - 74.
- [13] 黄建峰, 廖志勇. 胰岛素样生长因子结构与生理功能. *科协论坛*: 下半月, 2011, (3): 59 - 60.
- [14] 谢冰花, 张蕾, 郑康, 等. 低等脊椎动物中存在基因组印迹进化的基础. *科学通报*, 2009, 54(5): 603 - 609.
- [15] 余升红. 基因组印迹调节. *生物技术*, 2005, 15(3): 83 - 85.
- [16] Murrell A, Heeson S, Bowden L, et al. An intragenic methylated region in the imprinted *Igf2* gene augments transcription. *EMBO Rep*, 2001, 2(12): 1101 - 1106.
- [17] Reik W, Walter J. Genomic imprinting: Parental influence on the genome. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(1): 21 - 32.

- [18] Lawton B R, Carone B R, Obergfell C J, et al. Genomic imprinting of *IGF2* in marsupials is methylation dependent. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 205.
- [19] 徐青, 张沅, 孙东晓, 等. 应用 MSAP 方法检测鸡不同组织基因组的甲基化状态. *遗传*, 2011, 33(6): 620 - 626.
- [20] 肖正中, 刘小红, 王翀, 等. 长白猪 × 蓝塘猪及其杂种基因组 DNA 甲基化分析. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(5): 613 - 620.
- [21] Tse M C, Vong Q P, Cheng C H, et al. PCR-cloning and gene expression studies in common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor II. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1575(1/3): 63 - 74.
- [22] 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. *Aquaculture*, 2000, 181(3/4): 347 - 360.
- [23] Huang Y H, Peng J X, Oberley L W, et al. Transcriptional inhibition of manganese superoxide dismutase (SOD2) gene expression by DNA methylation of the 5' CpG island. *Free Radical Biology & Medicine*, 1997, 23(2): 314 - 320.
- [24] Vu T H, Li T, Nguyen D, et al. Symmetric and asymmetric DNA methylation in the human IGF2-H19 imprinted region. *Genomics*, 2000, 64(2): 132 - 143.
- [25] Machida H, Ito M, Okamoto R, et al. Molecular cloning and analysis of the 5P-flanking region of the human MYPT1 gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1517: 424 - 429.
- [26] Saeki M, Kurose K, Hasegawa R, et al. Functional analysis of genetic variations in the 5'flanking region of the human MDRI gene. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2011, 102(1): 91 - 98.
- [27] 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*). *Genetics and Molecular Research*, (accepted)
- [28] Fujiwara Y, Miwa M, Suzuki T, et al. A Comparative study of 5' flanking sequences of the α S1 and β -casein genes; human and other mammalian species. *Journal of Reproduction and Development*, 1997, 43(4): 333 - 338.
- [29] Gerencsér ú, Barta E, Boa S, et al. Comparative analysis on the structural features of the 5' flanking region of κ -casein genes from six different species. *Genet Sel Evol*, 2002, 34: 117 - 128.
- [30] Xie B H, Zhang L, Zheng K, et al. The evolutionary foundation of genomic imprinting in lower vertebrates. *Chinese Sci Bull*, 2009, 54(8): 1354 - 1360.
- [31] Shimizu T S, Takahashi K, Tomita M. CpG distribution patterns in methylated and non-methylated species. *Gene*, 1997, 205(1/2): 103 - 107.
- [32] Fukuda M, Naito E, Dewa K, et al. A VNTR polymorphism in human 5' H19 flanking regions in Japanese and German populations. *International Congress Series*, 2003, 1239: 157 - 158.
- [33] Strömqvista M, Tookeb N, Brunström B. DNA methylation levels in the 5'flanking region of the *vitellogenin I* gene in liver and brain of adult zebrafish (*Danio rerio*)-Sex and tissue differences and effects of 17 α -ethinylestradiol exposure. *Aquatic Toxicology*, 2010, 98(3): 275 - 281.
- [34] 洪柳, 邓秀新. 应用 MSAP 技术对脐橙品种进行 DNA 甲基化分析. *中国农业科学*, 2005, 38(11): 2301 - 2307.