

网络出版时间:2014-06-21 18:03

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.07.022

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.07.022.html

背部肌肉注射含 *IGF2b* 基因慢病毒载体对 鲤鱼生长的影响

雷莹¹, 苏胜彦^{1,2}, 丁敬波¹, 刘浩亮¹, 袁新华^{1,2}

(1 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081; 2 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)

[摘要] 【目的】研究 *IGF2b* 基因对建鲤生长及体型的影响。【方法】用含有 *IGF2b* 基因的慢病毒载体注射建鲤背部肌肉组织, 注射量分别为 10, 20 和 40 μL /尾, 阴性对照组不进行任何处理, 阳性对照组注射 20 μL /尾去离子水。在相同饲养条件下饲养满 9 个月后, 分别测量建鲤的各项生长指标。【结果】注射 *IGF2b* 基因的建鲤体质量、体长、体高、体厚、尾长均显著大于阴性对照组和阳性对照组, 说明 *IGF2b* 基因在建鲤背部肌肉组织中过表达对鲤第 2 阶段生长同样具有促进作用, *IGF2b* 基因在鲤背部肌肉组织中过表达对鲤的体型也有一定的作用。鲤的体长、体高、体厚的 3D 图也说明, 随着 *IGF2b* 基因注射, 鲤鱼倾向于具有更大的体长、体高、体厚的值。用多元逐步回归法做体质量的回归方程可知, 鲤鱼的体质量与体长、体厚、尾长具有线性关系, 利用体长、体厚、尾长这 3 个自变量进行聚类分析, 即可准确得到鲤鱼 5 个注射组间的聚类关系: 阴性对照组与阳性对照组共属一类, 3 个注射组为一类, 其中注射组中 10 μL 注射组和 20 μL 注射组为一类, 40 μL 注射组为一类, *IGF2b* 基因对鲤鱼体型的影响在注射量大于 20 μL /尾之后产生了转折, 出现了负增长。【结论】*IGF2b* 基因对鲤第 2 阶段生长同样具有促进作用, 且对鲤鱼的体型有一定影响。

[关键词] 建鲤; *IGF2b* 基因; 慢病毒载体; 不同生长阶段; 背部肌肉注射; 聚类分析

[中图分类号] S965.116

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)07-0008-07

Effect of injecting vector containing *IGF2b* to dorsal muscle tissue on growth of common carp

LEI Ying¹, SU Sheng-yan^{1,2}, DING Jing-bo¹, LIU Hao-liang¹, YUAN Xin-hua^{1,2}

(1 Wuxi Fisherise College, Nanjing Agricultural University, Wuxi, Jiangsu 214081, China;

2 Key Open Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwaer Fishes, Freshwater Fisheries Research Center,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, Jiangsu 214081, China)

Abstract: 【Objective】This study investigated the influence of *IGF2b* gene on growth and body shape of Jian carp. 【Method】The lentiviral vector containing *IGF2b* gene was injected to dorsal muscle of Jian carp with dosages of 10, 20, and 40 μL /stern, respectively. The negative control group was not injected and positive control group was injected with 20 μL /stern deionized water. Morphological indexes were measured and compared after 9 months. 【Result】Body weight, body length, body height, body thickness, caudal peduncle length, and caudal peduncle thick of carps injected with *IGF2b* gene were greater than those of the control groups. It was indicated that over expression of *IGF2b* gene in dorsal muscle of carps improved the

[收稿日期] 2013-05-16

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2013JBFM14); “十二五”科技支撑计划项目“大宗淡水主养鱼类新品种选育”(2012BAD26B02); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-46)

[作者简介] 雷莹 (1989—), 女, 河南郑州人, 硕士, 主要从事水产养殖研究。E-mail: 923303039@qq.com

[通信作者] 袁新华 (1970—), 男, 江西遂川人, 研究员, 博士, 硕士生导师, 主要从事水产养殖研究。E-mail: yuanxh@ffrc.cn

growth in the second growth phase and it also had influence on the body shape. 3D graph also showed that body weight, body length, and body height of carp were larger as the increase of *IGF2b* concentration. Multivariate stepwise regression showed that carp weight had a linear relationship with body length, body thickness, and tail handle length. Cluster analysis of three independent variables of body length, body thickness, and tail handle length showed the cluster relationship of the three treatment groups and control groups. Negative control and positive control group clustered together, while all treatment groups clustered as another category. Of the latter category, 10 μL injection group and 20 μL injection group belonged to one class, different from the 40 μL injection group. Effect of *IGF2b* gene on carp shape changed to negative when the injection was greater than 20 μL . 【Conclusion】 The *IGF2b* gene promoted the growth of carps in the second growth phase and it also had influence on the body shape of carps.

Key words: *Cyprinus carpio* var Jian; *IGF2b* gene; lentiviral vector; different growth stages; injection in dorsal muscle tissue; clustering analysis

鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 属于鲤科 (Cyprinidae), 原产于亚洲。建鲤 (*Cyprinus carpio* var Jian) 是我国人工育成的遗传性状稳定的优良鲤鱼品种, 它具有生长快、品质好、抗病力强、饲料转化率高等特点^[1-2]。类胰岛素生长因子 (Insulin-like growth factor, IGF) 是一种能促进细胞分裂的多肽, 它包括 IGF1 和 IGF2 2 种, 其结构与功能同胰岛素类似^[3]。IGF 通过与特异性的膜结合糖蛋白受体结合行使其各种生理功能。目前在硬骨鱼的脑、鳃、胃、肠、肾等组织中都发现有 IGF 的表达^[4-5]。

IGF2 在鱼类的研究中已有很多报道, 其对斑马鱼和草鱼脊索和中线的发育具有重要作用^[6-7]。IGF2 能诱导罗非鱼、斑马鱼卵母细胞的成熟和颗粒细胞的增值与分化^[8-9]。在对斑马鱼和草鱼等 IGF2 基因的研究中发现, IGF2 基因存在 *IGF2a*、*IGF2b* 2 种^[10-11]。Sharon 等^[12]在 2002 年首先成功克隆了鲤鱼的 IGF2 基因, 对鲤鱼 IGF2 基因的研究发现, 其在鲤鱼肝脏、心脏、脑等组织中广泛表达。建鲤体内同样存在 *IGF2a*、*IGF2b* 2 种基因, 并成功克隆出 IGF2b 基因的内含子, 构建了 IGF2b 基因的慢病毒载体^[13-14]。

IGF2 具有促进生长^[15-16]、刺激或抑制一些激素的释放^[17]、促进脂肪存积^[18-19]等作用。张宁^[20]使用构建好的含有 IGF2b 和 EGFP 基因的第 4 代慢病毒载体, 利用逆转录病毒感染法转移基因, 并感染建鲤背部肌肉组织, 观察了感染 IGF2b 基因在建鲤的生长情况, 结果表明 IGF2b 基因在建鲤背部肌肉组织中过表达对其第 1 阶段的生长有促进作用。有研究表明, 鲤鱼在不同的生长阶段有不同的生长特点, 各品种不同时期体质量变化都有所不同^[21-22]。IGF2b 基因对建鲤在不同生长阶段的影响也可能存

在差异, 并且随着时间的增长, IGF2b 基因对鲤鱼生长的影响是否稳定, 这些都有待深入研究。本试验在上述研究的基础上, 进一步探讨了 IGF2b 在建鲤第 2 生长阶段对鲤鱼生长的影响, 并试图发现 IGF2b 对鲤鱼体型的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 250 尾建鲤, 平均体质量 5 g/尾, 试验前养殖于中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉实验基地; IGF2b 基因的载体 (含 IGF2b 基因和 EGFP 基因的第 4 代慢病毒载体), 来自于中国水产科学研究院淡水渔业研究中心; 其他试验材料包括丁香油、乙醇、10 g/L SDS、量鱼板、电子天平、微量进样器 (25 μL) 等。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒介导 IGF2b 基因感染鲤鱼背部肌肉组织 将供试的 250 尾建鲤随机分为 5 组: 第 1 组作为阴性对照组, 不进行任何处理; 第 2 组为阳性对照组, 使用微量进样器向建鲤的背部肌肉组织中注射 20 μL /尾去离子水; 第 3、4、5 组采用同样的方法, 分别向建鲤背部肌肉组织中注射含 IGF2b 基因和 EGFP 基因的慢病毒载体液 10, 20, 40 μL /尾, 病毒滴度为 5.54×10^6 IFU/mL。注射后在水族箱中饲养观察 48 h, 然后转移到同一池塘中 5 个规格相同的网箱里, 每天定时投喂等量相同的饲料。用过的微量进样器浸于 10 g/L SDS 中过夜。

1.2.2 生长指标的测定 2011 年 7 月初对试验用鱼进行 PIT 标记, 7 月中旬在中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉实验基地选取 1 个试验鱼池, 平均水深 1.8 m, 按 45 000 尾/hm² 的密度放养,

统一投喂正大公司商品饲料(蛋白质含量 300 g/kg),每日 2 次,投饲率为 4%~5%。每日巡塘 2 次,看水色,看鱼情,记录发病和死亡等情况。2012 年 4 月初(饲养满 9 个月)进行生长指标的测量。生长指标测量时,首先用丁香油和体积分数 70%乙醇混合液(体积比 1:1.5)对 5 组建鲤进行麻醉^[23],再根据伍献文^[24]的方法分别测量体质量、体长、体高、体厚、尾长、尾柄厚等指标。

1.3 数据处理

试验数据采用 SAS 8.0 软件处理,用一般线性模型(General linear model, GLM)法进行差异性分析。使用软件 R2.14.0 的 ward 方法对所有注射组进行聚类。

2 结果与分析

2.1 含 IGF2b 基因慢病毒载体对鲤鱼生长的影响

2012 年 4 月初,经测量 5 组试验鱼的生长差异如表 1 所示。由表 1 可知,3 个试验组鲤鱼的体质量、体长、体高、体厚、尾长均显著大于阴性对照组和

阳性对照组($P<0.05$)。

3 个试验组中,40 μL 注射组鲤鱼的体质量和体厚显著大于 10 μL 注射组($P<0.05$),10 μL 注射组体质量和体厚显著大于 20 μL 注射组;40 μL 注射组的体高显著大于 20 μL 注射组($P<0.05$),10 μL 注射组体高与 20 和 40 μL 注射组差异不显著;40 μL 注射组的体长显著大于 10 和 20 μL 注射组($P<0.05$),10 μL 注射组与 20 μL 注射组体长无显著差异;尾长依次为 40 μL 注射组>10 μL 注射组>20 μL 注射组,但三者之间无显著差异。阴性对照组的体质量、体长、体高、尾长均与阳性对照组无明显差异,但阴性对照组体厚显著大于阳性对照组($P<0.05$)。

尾柄厚结果显示,阴性对照组尾柄厚显著高于阳性对照组和 3 个注射组($P<0.05$),10 和 40 μL 注射组尾柄厚差异不显著,但均显著高于阳性对照组和 20 μL 注射组;阳性对照组的尾柄厚也大于 20 μL 注射组,但两者差异也不显著。

表 1 背部肌肉注射含 IGF2b 基因的慢病毒载体对鲤鱼生长的影响

Table 1 Influence of back muscle injection of lentiviral vector containing IGF2b gene on growth of carps			
处理组 Group	体质量/(g·尾 ⁻¹) Body weight	体长/mm Body length	体高/mm Body height
阴性对照组 Negative control	22.21±1.25 d	87.85±1.51 c	28.62±0.76 c
阳性对照组 Positive control	21.07±1.14 d	88.04±1.37 c	28.35±0.69 c
10 μL 注射组 10 μL injection group	30.26±1.25 b	100.23±1.51 b	33.25±0.76 ab
20 μL 注射组 20 μL injection group	26.46±1.14 c	96.42±1.37 b	31.86±0.69 b
40 μL 注射组 40 μL injection group	35.83±1.46 a	106.02±1.76 a	35.30±0.89 a
处理组 Group	体厚/mm Body thickness	尾长/mm Caudal peduncle length	尾柄厚/mm Caudal peduncle thickness
阴性对照组 Negative control	17.63±0.34 c	14.10±0.47 b	6.66±0.13 a
阳性对照组 Positive control	16.49±0.31 d	14.99±0.42 b	5.72±0.12 c
10 μL 注射组 10 μL injection group	19.40±0.34 b	17.15±0.47 a	6.28±0.13 b
20 μL 注射组 20 μL injection group	18.28±0.31 c	17.00±0.42 a	5.58±0.12 c
40 μL 注射组 40 μL injection group	21.14±0.39 a	17.89±0.54 a	6.14±0.15 b

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。下表同。

Note: Different lowercase and uppercase letters indicate significant difference ($P<0.05$). The same for table 2.

2.2 含 IGF2b 基因慢病毒载体对鲤鱼体型的影响

分别对 5 组试验鱼的体长、体高、体厚、尾长、尾柄厚的数值进行处理,不同组之间的体型差异如表 2 所示。由表 2 可以看出,5 个组的体长/体高的值差异不显著。

体长/尾柄厚和尾长/尾柄厚的结果显示:阴性对照组体长/尾柄厚的值和尾长/尾柄厚的值显著低于阳性对照组与 3 个试验组($P<0.05$),阳性对照组和 10 μL 注射组的体长/尾柄厚的值和尾长/尾柄厚的值显著低于 20 μL 注射组和 40 μL 注射组($P<0.05$)。

体长/体厚的结果显示:阴性对照组和 40 μL 注射组的体长/体厚的值显著低于阳性对照组和 20 μL 注射组($P<0.05$),10 μL 注射组的体长/体厚的值与其他各组差异均不显著。

体高/体厚的结果显示:阴性对照组的体高/体厚的值显著低于阳性对照组、10 μL 注射组、20 μL 注射组($P<0.05$),40 μL 注射组的体高/体厚的值与阴性对照组、阳性对照组、10 μL 注射组、20 μL 注射组均无显著差异。

体长/尾长的结果显示:阴性对照组的体长/尾长的值显著高于 10 μL 注射组和 20 μL 注射组

($P<0.05$),阳性对照组和 40 μL 注射组的体长/尾长的值与阴性对照组、10 μL 注射组、20 μL 注射组

表 2 背部肌肉注射含 IGF2b 基因的慢病毒载体对鲤鱼体型的影响

Table 2 Influence of back muscle injection of lentiviral vector containing IGF2b gene on body shape of carps			
处理组 Group	体长/体高 Body length/Body height	体长/体厚 Body length/Body thickness	体高/体厚 Body height/Body thickness
阴性对照组 Negative control	3.17±0.08	5.01±0.07 b	1.62±0.03 b
阳性对照组 Positive control	3.16±0.07	5.35±0.06 a	1.72±0.03 a
10 μL 注射组 10 μL injection group	3.03±0.08	5.19±0.07 ab	1.72±0.03 a
20 μL 注射组 20 μL injection group	3.04±0.07	5.30±0.06 a	1.75±0.03 a
40 μL 注射组 40 μL injection group	3.02±0.09	5.04±0.08 b	1.67±0.04 ab

处理组 Group	体长/尾长 Body length/ Caudal peduncle length	体长/尾柄厚 Body length/ Caudal peduncle thickness	尾长/尾柄厚 Caudal peduncle length/ Caudal peduncle thickness
阴性对照组 Negative control	6.36±0.15 a	13.34±0.28 c	2.13±0.07 c
阳性对照组 Positive control	6.00±0.13 ab	15.50±0.25 b	2.63±0.07 b
10 μL 注射组 10 μL injection group	5.91±0.15 b	16.03±0.28 b	2.74±0.07 b
20 μL 注射组 20 μL injection group	5.75±0.13 b	17.42±0.25 a	3.07±0.07 a
40 μL 注射组 40 μL injection group	6.05±0.17 ab	17.42±0.33 a	2.93±0.09 a

2.3 背部肌肉注射含 IGF2b 基因慢病毒载体后鲤鱼的体长、体高、体厚的 3D 图

为更直观地说明 IGF2b 基因对鲤鱼生长的作用,根据试验鲤鱼的体长、体高、体厚,用 SAS 软件制作鲤鱼体长、体高、体厚的 3D 图,结果如图 1 所

示。由图 1 可知,3 个试验组的体长、体高、体厚均大于阴性对照组和阳性对照组,鲤鱼的 3D 图分布是由右前方逐渐向左后方平移,趋向于具有更高的体长、体高、体厚的值,其中中间部分的一致性、整齐度较高。

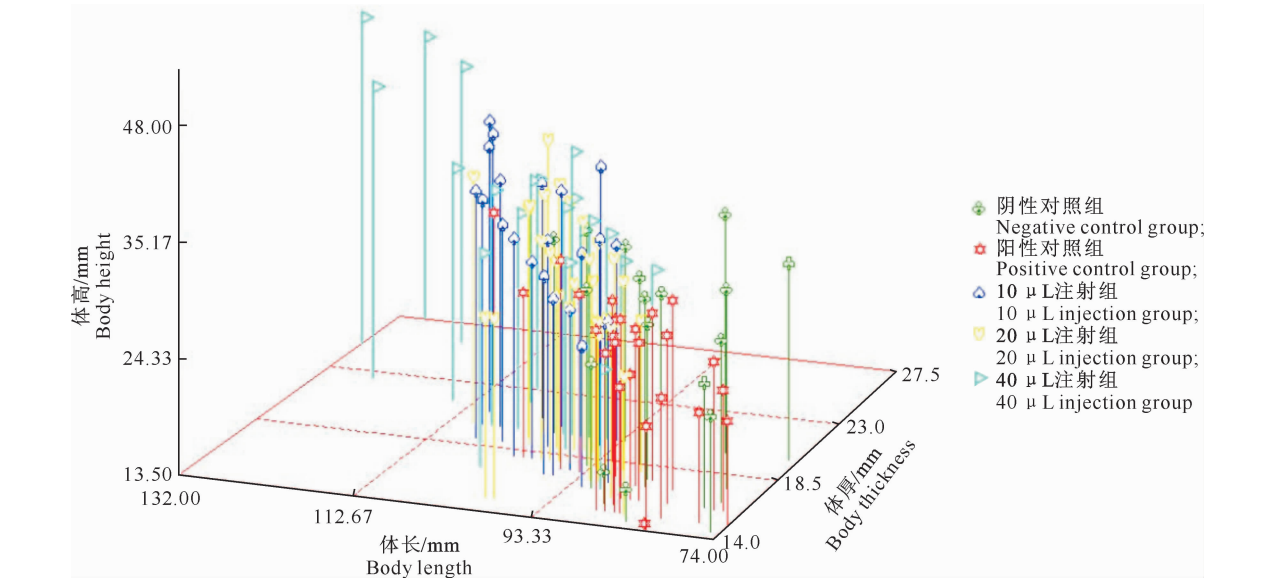


图 1 背部肌肉注射含 IGF2b 基因的慢病毒载体后鲤鱼体长、体高和体厚的 3D 图

Fig. 1 3D graph of body length, body height, and body thickness of carps after back muscle injection of lentiviral vector containing IGF2b gene

2.4 鲤鱼生长指标的聚类分析

3D 图仅显示了对不同处理组鲤鱼体长、体高、体厚的变化,并不能完全反映出 5 个处理组对鲤鱼 6 个生长指标的影响,所以对 5 个处理组鲤鱼 6 个生长指标进行了聚类分析。首先,对 5 个处理组的体质量、体长、体高、体厚、尾长、尾柄厚的结果进行

聚类分析,结果如图 2-A 所示;其次,对 5 个处理组的体长、体高、体厚、尾长、尾柄厚的结果进行聚类分析,结果如图 2-B 所示;最后,对 5 个处理组的体长、体高、体厚、尾长、尾柄厚的结果经体质量标准化处理之后进行聚类分析,结果如图 2-C 所示。对比图 2 的 3 个聚类分析结果可知,在对鲤鱼的体质量进

行标准化处理后,得到的聚类分析结果与之前的结果相比发生了变化。

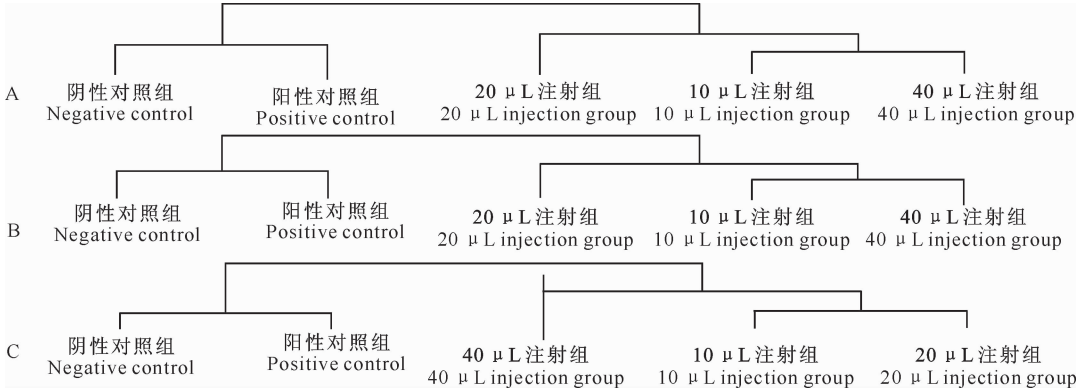


图 2 背部肌肉注射含 *IGF2b* 基因的慢病毒载体后鲤鱼生长指标的聚类分析结果

A. 体质量、体长、体高、体厚、尾长、尾柄厚的聚类分析结果;B. 体长、体高、体厚、尾长、尾柄厚的聚类分析结果;
C. 体长、体高、体厚、尾长、尾柄厚进行体质量标准化后的聚类分析结果

Fig. 2 Cluster analysis of the growth indexes of carps after back muscle injection of lentiviral vector containing *IGF2b* gene

A. Cluster analysis of body weight, body length, body height, body thickness, caudal peduncle length, and caudal peduncle thickness;
B. Cluster analysis of body length, body height, body thickness, caudal peduncle length, and caudal peduncle thickness; C. Cluster analysis of body length, body height, body thickness, caudal peduncle length, and caudal peduncle thickness after standardization

2.5 鲤鱼体质量与体长、体厚和尾长的相关性

聚类分析表明,在对体质量这一指标进行标准化处理之后,3 个试验组聚类分析的结果与未进行标准化处理的结果有很大差别。这说明体质量与其他生长指标之间有一定的关系。用多元逐步回归法做体质量的回归方程,结果如下。

10 μL 注射组:

$y = -50.07 + 0.64x_1 + 1.35x_2 - 0.55x_3$ 。

20 μL 注射组: $y = -39.41 + 0.31x_1 + 1.94x_2$ 。

40 μL 注射组: $y = -62.46 + 0.65x_1 + 1.37x_2$ 。

式中: y 表示体质量, x_1 表示体长, x_2 表示体厚, x_3 表示尾长。

回归方程显示,10 μL 注射组的体质量与体长、体厚、尾长存在线性关系,20 μL 注射组和 40 μL 注射组的体质量仅与体长、体厚有线性关系。这说明,体长、体厚、尾长 3 个形态指标与体质量之间存在直接的线性关系。

2.6 鲤鱼体长、体厚和尾长的聚类分析

鲤鱼体长、体厚、尾长与体质量之间存在线性关系。利用体长、体厚、尾长这 3 个自变量对 5 个处理组再次进行聚类分析,结果如图 3-A 所示;对体长、体厚、尾长进行体质量标准化处理之后再次进行聚类分析,结果如图 3-B 所示。

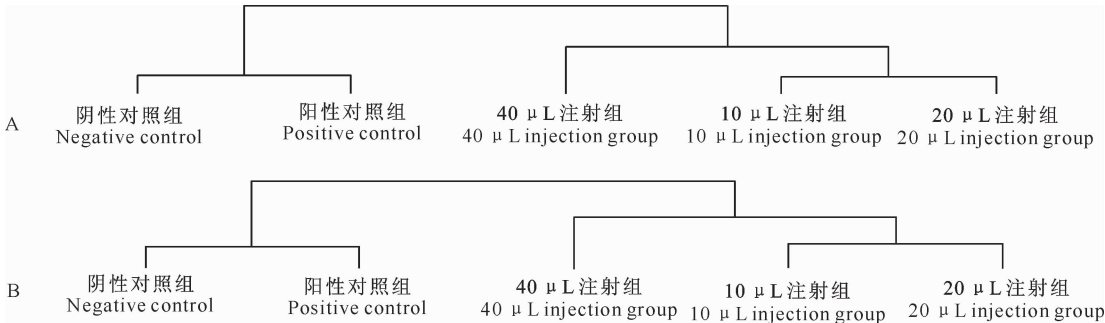


图 3 背部肌肉注射含 *IGF2b* 基因的慢病毒载体后鲤鱼体长、体厚、尾长的聚类分析

A. 体长、体厚、尾长的聚类分析结果;B. 体长、体厚、尾长进行体质量标准化后的聚类分析结果

Fig. 3 Cluster analysis of body length, body height, and caudal peduncle length after back muscle injection of lentiviral vector containing *IGF2b* gene

A. Cluster analysis of body length, body height, and caudal peduncle length;

B. Cluster analysis of body length, body height, and caudal peduncle length after standardization

由图3可知,无论是否对体长、体厚、尾长进行标准化处理,所得到的聚类分析结果是一致的,并且与5个处理组的体长、体高、体厚、尾长、尾柄厚的值进行体质量标准化处理后的聚类分析结果也是一致的。

3 讨论

3.1 注射 *IGF2b* 基因对鲤不同阶段的促生长作用

张宁^[20]在建鲤背部肌肉组织中注射含 *IGF2b* 基因的慢病毒载体,结果表明在饲养4个月后 *IGF2b* 基因在鲤背部肌肉组织中的过表达对鲤的生长有促进作用。本试验采用相同的方法,于建鲤背部肌肉组织中注射含 *IGF2b* 基因的慢病毒载体,在相同条件下继续喂养满9个月后,3个试验组鲤鱼的体质量、体长、体高、体厚、尾长均显著高于阴性对照组和阳性对照组,而且40 μL 注射组的各项指标都大于10 μL 注射组,说明 *IGF2b* 基因的过表达对鲤第2阶段的生长同样具有促进作用。在斑点叉尾鲷、草鱼等的研究中也类似结果^[25],在罗非鱼体内注射 *IGF* 基因可引起罗非鱼体质量增长高达72%^[10]。上述结果表明, *IGF2b* 基因在不同阶段对鲤鱼生长都具有促进作用。本试验向建鲤背部肌肉组织中局部注射含 *IGF2b* 基因的慢病毒载体,结果显示 *IGF2b* 在鲤背部肌肉组织中局部的过表达促进了鲤整体快速地增长^[26]。

本试验结果表明,阴性对照组的尾柄厚大于3个试验组和阳性对照组,10 μL 注射组和40 μL 注射组的尾柄厚显著高于20 μL 注射组和阳性对照组,说明 *IGF2b* 基因对鲤鱼尾柄厚度的影响与对身体其他部位的影响有所不同。有研究表明,体长、体高、体厚对体质量的决定程度大,尾柄厚对体质量的决定程度最小,不到1%^[27]。Li等^[28]的研究证明,快速增长的鱼具有相对较小的尾柄厚,这是因为快速生长的鱼具有相对较大的体质量、体型,从而降低了游泳的能力。表明 *IGF2b* 基因的促生长作用使得建鲤的尾柄厚较对照组小。

鲤杂交试验结果显示,第1阶段建鲤的体质量增加较杂交组合快,第2阶段杂交组合的体质量增加明显高于纯种^[22],表明杂交的方法可促进建鲤在第2阶段的生长。而通过注射 *IGF2b* 基因慢病毒载体的方法同样可促进建鲤生长,2种不同的方法同样都起到了促进建鲤生长的作用。

3.2 注射 *IGF2b* 基因对鲤体型的影响

5个处理组中鲤鱼的体长/体高的值相近,无显

著差异,表明 *IGF2b* 基因对体长、体高的影响是同比例、等量的,未引起体长、体高的非正常增长,也表明 *IGF2b* 基因在鲤背部肌肉组织中的局部过表达促进了鲤整体的增长。

体长/体厚和体高/体厚的值均先增加后减小。有研究表明环境胁迫会抑制生物的生长^[29],对鱼类进行捕捞抓取也会对鱼类的体质量造成影响^[30]。阴性对照组的体长/体厚和体高/体厚的值均明显小于阳性对照组,这可能是注射操作的刺激作用导致2个值的增大。而 *IGF2b* 基因的表达减轻了这种作用,使体长/体厚和体高/体厚的值有所减小。所以 *IGF2b* 基因的表达使体长/体厚和体高/体厚的值减小。

体长/尾柄厚和尾长/尾柄厚的值均是逐渐在增大,说明注射和 *IGF2b* 的表达都使得这2个值增加。鲤鱼体型的变化是复杂的、多变的,既与 *IGF2b* 基因的表达相关,又受到 *IGF2b* 基因载体转移方式的影响。

3.3 注射 *IGF2b* 基因对鲤体型影响的聚类分析

3D图仅显示了不同注射组鲤鱼体长、体高、体厚的变化,并不能完全反映出5个处理组6个生长指标之间的关系,所以对5个处理组的6个生长指标进行聚类分析。体质量作为形态变化判定的重要依据,在5个处理组中变化最大,体质量的变化也同样影响着其他指标,故排除体质量的影响再聚类分析,发现5个处理组体质量标准化后的聚类分析结果与未进行标准化处理的结果差异较大,说明体质量与其他指标之间存在很大的关系。进一步采用多元逐步回归法获得体质量的回归方程,结果表明体质量与体长、体厚、尾长这3个变量之间存在线性关系。再利用体长、体厚、尾长3个自变量进行聚类分析,发现无论是否进行体质量标准化处理,得到的聚类分析结果均与5个处理组的体长、体高、体厚、尾长、尾柄厚的数值进行体质量标准化处理之后的聚类分析结果一致。

上述结果说明,体质量对5个处理组聚类分析结果的影响较大。在对鲤鱼的5个处理组进行聚类分析时,只有排除了体质量的影响,才能得到更准确的结果。所以直接用体长、体厚、尾长这3个自变量进行聚类分析,或者用体长、体高、体厚、尾长、尾柄厚的数值经体质量标准化处理之后进行聚类分析,可准确得到建鲤5个不同处理组间的关系。

本研究中5个处理组的聚类分析结果表明:阴性对照组与阳性对照组同属一类,10 μL 和20 μL

注射组为同一类, 40 μL 注射组为一类。表明 *IGF2b* 基因的注射导致了鲤鱼体型较大的变化, 当注射量超过 20 μL /尾之后, 产生了一个转折点, *IGF2b* 基因对鲤鱼体型改变的影响作用发生了变化。

[参考文献]

- [1] 佟雪红, 董在杰. 建鲤与黄河鲤的杂交优势研究及主要生长性状的通径分析 [J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(3): 159-163.
Tong X H, Dong Z J. The heterosis of F_1 hybrids (Jian carp $\times$ Huanghe carp) and path analysis of main growth traits [J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2007, 22(3): 159-163. (in Chinese)
- [2] 朱 健, 王建新. 建鲤品种特性研究进展 [J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2004, 23(1): 52-55.
Zhu J, Wang J X. Status of the studies on the characteristics of Jian carp, *Cyprinus carpio* var Jian [J]. Journal of Zhejiang Ocean University, 2004, 23(1): 52-55. (in Chinese)
- [3] Blundell T L, Bedarkar S, Rinderknecht E, et al. Insulin-like growth factor: A model for tertiary structure accounting for immunoreactivity and receptor binding [J]. The National Academy of Sciences, 1978, 75(1): 180-184.
- [4] McRory J E, Sherwood N M. Catfish express two forms of insulin-like growth factor4 (IGF-I) in the brain [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(28): 2855-2864.
- [5] Shved N, Berishvili G, D'Cotta H, et al. Ethinylestradiol differentially interferes with IGF-I in liver and extrahepatic sites during development of male and female bony fish [J]. Journal of Endocrinology, 2007, 195: 513-523.
- [6] Zou S, 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, 9(4): e7026.
- [7] Radaelli G, Domeneghini C, Arrighi S, et al. Localization of IGF-I, IGF-I receptor, and IGFBP-2 in developing *Umbrina cirrosa* (Pisces: Osteichthyes) [J]. General and Comparative Endocrinology, 2003, 130: 232-244.
- [8] Sharon N N, Glen V D. Characterization and regulation of the insulin-like growth factor (IGF) system in the zebrafish (*Danio rerio*) ovary [J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 168: 111-120.
- [9] Sharon N N, Glen V D. The role of the insulin-like growth factor (IGF) system in zebrafish (*Danio rerio*) ovarian development [J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 168: 103-110.
- [10] 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): 347-360.
- [11] DeChiara T M, Efstratiadis A, Roberts E J, et al. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting [J]. Nature, 1990, 345: 78-80.
- [12] Sharon N N, Glen V D. Characterization and regulation of the insulin-like growth factor (IGF) system in the zebrafish (*Danio rerio*) ovary [J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 168: 111-120.
- [13] Nezer C, Moreau L, Brouwers B, et al. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs [J]. Nat Genet, 1999, 21(2): 155-166.
- [14] Burgos C, Galve A, Moreno C, et al. The effects of two alleles of IGF2 on fat content in pig carcasses and pork [J]. Meat Science, 2012, 90: 309-313.
- [15] Kamei H, Ding Y, Kajimura S, et al. IGF signaling regulates catch-up growth and accelerated developmental timing in zebrafish embryos in response to oxygen availability [J]. Poster Presentations/Growth Hormone & IGF Research, 2010, 20: 39-81.
- [16] Yuan X N, Jiang X Y, Pu J W, et al. Functional conservation and divergence of duplicated insulin-like growth factor 2 genes in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Gene, 2011, 470: 46-52.
- [17] Tse M C L, Vong Q P, Cheng C H K. PCR-cloning and gene expression studies in common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor-II [J]. J Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1575(1/2/3): 63-74.
- [18] 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.
- [19] 苏胜彦, 董在杰, 袁新华. 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): 77-86.
Su S Y, Dong Z J, Yuan X H. 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]. Journal of Sun Yatsen University, 2012, 51(2): 77-86. (in Chinese)
- [20] 张 宁. 慢病毒载体介导的 *IGF2b* 基因在鲤背部肌肉组织中的过表达及对鲤生长的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
Zhang N. Lentiviral vector mediated *IGF2b* gene over expression in dorsolateral muscle of common carp and the effect on growth of common carp [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [21] 苏胜彦, 董在杰, 袁新华, 等. 3×3 完全双列杂交 F_1 不同阶段生长特点的分析 [J]. 水生生物学报, 2012, 36(4): 618-625.
Su S Y, Dong Z J, Yuan X H, et al. Characters of different growth stage on the F_1 progeny of 3×3 full diallel cross in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Journal of Aquatic Organisms, 2012, 36(4): 618-625. (in Chinese)

[J]. Wildl Biol,2003,9(1):29-36.

[22] 邓天鹏,郑合勋,曾国仕. 河南伏牛山北坡野猪夏季觅食生境特征的初步研究 [J]. 四川动物,2008,27(5):747-750.

Deng T P,Zheng H X,Zeng G S. The preliminary study of wild boar summer foraging habitat characteristics at Henan Funiu North Mountain [J]. Sichuan Animal,2008,27(5):747-750. (in Chinese)

[23] 李振营,罗泽珣. 东北野猪 [J]. 野生动物,1983,2(3):16-20.

Li Z Y,Luo Z X. The northeast wild boar [J]. Chinese Wildlife,1983,2(3):16-20. (in Chinese)

[24] 颜忠诚,陈永林. 动物的生境选择 [J]. 生态学杂志,1998,17(2):43-49.

Yan Z C,Chen Y L. Habitat selection in animals [J]. Chinese Journal of Ecology,1998,17(2):43-49. (in Chinese)

[25] 张永录,李贵臣,田家龙. 黑龙江省野猪种群现状及其生境选择的研究 [J]. 中国林副特产,2003(1):19-20.

Zhang Y L,Li G C,Tian J L. Wild boar population status and habitat selection in Heilongjiang Province [J]. Quarterly of Forest By-Product and Speciality in China,2003(1):19-20. (in Chinese)

[26] 徐 飞,蔡体久,琚存勇,等. 黑龙江凤凰山自然保护区野猪秋季生境选择 [J]. 北京林业大学学报,2011,33(3):86-91.

Xu F,Cai T J,Ju C Y,et al. Autumn habitat selection of wild boar in the Fenghuangshan Nature Reserve, Heilongjiang Province [J]. Journal of Beijing Forestry University,2011,33(3):86-91. (in Chinese)

[27] 朱洪强,葛志勇,常素慧,等. 黄泥河自然保护区野猪冬季栖息地利用 [J]. 生态学杂志,2011,30(4):734-738.

Zhu H Q,Ge Z Y,Chang S H,et al. Winter habitat selection of wild boar (*Sus scrofa*) in Huangnihe Nature Reserve [J]. Chinese Journal of Ecology,2011,30(4):734-738. (in Chinese)

[28] 李 乐,刘 鹤,万冬梅,等. 辽宁老秃顶子保护区野猪冬季觅食地生境选择 [J]. 生态学杂志,2010,29(12):2408-2413.

Li L,Liu H,Wan D M,et al. Foraging habitat selection of wild boar in Laotudingzi Natural Reserve of Liaoning Province in winter [J]. Chinese Journal of Ecology,2010,29(12):2408-2413. (in Chinese)

[29] 刘振生,曹丽荣,翟 昊,等. 贺兰山区马鹿对冬季生境的选择性 [J]. 动物学研究,2004,25(5):403-409.

Liu Z S,Cao L R,Zhai H,et al. Winter bed-site selection by blue sheep (*Pseudois nayaur*) in Helan Mountains, Ningxia, China [J]. Zoological Research,2004,25(5):403-409. (in Chinese)

[30] Wecker S C. Habitat selection [J]. Scientific American,1964,211:109-116.

[31] Bailey J A. Principles of wild life management [M]. New York:John Wiley & Sons Inc,1984.

[32] 刘振生,王小明,李志刚,等. 贺兰山岩羊冬春季取食生境的比较 [J]. 动物学研究,2005,26(6):580-589.

Liu Z S,Wang X M,Li Z G,et al. Comparison of seasonal feeding habitats by bluesheep (*Pseudois nayaur*) during winter and spring in Helan Mountain, China [J]. Zoological Research,2005,26(6):580-589. (in Chinese)

(上接第 14 页)

[22] 李灵玲,董在杰,苏胜彦,等. 吉富罗非鱼家系选育 3 代后形态性状变异及其对体质量的影响 [J]. 水产学报,2012,36(4):489-496.

Li L L,Dong Z J,Su S Y,et al. Morphological variation and mathematical analysis of effects of morphological traits on body-weight of GIFT tilapia after 3 generations of breeding [J]. Journal of Fisheries of China,2012,36(4):489-496. (in Chinese)

[23] 张 宁,马庆男. 丁香油和乙醇混合液对福瑞鲤的麻醉效果 [J]. 广东海洋大学学报,2012,32(1):92-96.

Zhang N,Ma Q N. Anesthetic effect of clove oil and alcohol mixture on furui carp [J]. Journal of Guangdong Ocean University,2012,32(1):92-96. (in Chinese)

[24] 伍献文. 中国鲤科鱼类志 [M]. 上海:上海人民出版社,1900.

Wu X W. Cyprinoid fish of China [M]. Shanghai:Shanghai People's Publishing House,1900. (in Chinese)

[25] Peterson B C,Waldbieser G C,Bilodeau L. IGF-I and IGF-II mRNA expression in slow and fast growing families of US-DA103 channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology,2004,139:317-323.

[26] Vasilatos Y R,Scanes C G. Growth hormone and insulin-like growth factors in poultry growth: Required, optimal, or ineffective [J]. Poult Sci,1991,70(8):1764-1780.

[27] 王新安,马爱军. 大菱鲂幼鱼表型形态性状与体重之间的关系 [J]. 动物学报,2008,54(3):540-545.

Wang X A,Ma A J. Relationship between morphometric attributes and body weight of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* [J]. Current Zoology,2008,54(3):540-545. (in Chinese)

[28] Li D,Hu W,Wang Y,et al. Reduced swimming abilities in fast-growing transgenic common carp *Cyprinus carpio* associated with their morphological variations [J]. Journal of Fish Biology,2009,74(1):186-197.

[29] Laura E Petes,Bruce A Menge,Gayle D Murphy. Environmental stress decreases survival, growth, and reproduction in New Zealand mussels [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology,2007,351:83-91.

[30] Conte F S. Stress and the welfare of cultured fish [J]. Applied Animal Behavior Science,2004,86(3/4):205-223.