

秦川牛高档牛肉产量的分子标记研究^{*}

孙维斌¹, 陈 宏^{1, 2}, 雷雪芹³, 张夫千¹,
雷初朝¹, 李瑞彪¹, 张英汉¹, 咎林森¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨陵 712100;

2 徐州师范大学 生物技术研究所, 江苏 徐州 221009; 3 河南科技大学, 河南 洛阳 471000)

[摘 要] 以 IGFBP-3 基因作为候选基因, 对秦川牛群体中 IGFBP-3 位点与秦川牛高档牛肉产量的关系进行了分析。结果发现, 不同基因型对秦川牛高档牛肉产出率有一定影响, AA、AB 及 BB 型个体的屠宰率、净肉率及西冷、牛柳、眼肉和嫩肩肉的产率逐渐降低, 但差异不显著 ($P > 0.05$); AA 型个体的眼肌面积大于 BB 型个体 ($P < 0.05$), AB 型和 BB 型个体胴体脂肪含量高于 AA 型个体 ($P < 0.01$)。

[关键词] 秦川牛; 高档牛肉产量; 胰岛素样生长因子结合蛋白-3 (IGFBP-3) 基因; PCR-RFLP

[中图分类号] S823.8⁺12

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)04-0067-04

胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGFs) 是一类单链多肽激素, 结构上与胰岛素具有高度同源性, 具有促进蛋白质合成、分解血糖等作用, 因而能促进动物生长, 提高泌乳性能和产肉能力。IGFs 的作用又受到很多因素的调节, 其中胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin-like growth factor binding protein, IGFBP) 对其具有重要影响, IGFBP 有延长 IGF 的半衰期、调节 IGF 的生物学活性等作用。现已发现 IGFBP 有 7 种^[1], 每种 IGFBP 的表达与分布都受到严格精细的调控, 并随家畜生长发育阶段的不同而发生变化。IGFBP-3 主要存在于血液中, 对 IGF-I 和 IGF-II 具有很高的亲和力, 是血液中最丰富的 IGFBP 结合形式。血液中 95% 的 IGF-I 和 IGF-II 都与 IGFBP-3 结合, 因此, IGFBP-3 对于 IGFs 作用的发挥具有重要作用, 从而间接地影响家畜的泌乳性能、生长发育及肉的品质等。因此, 有关动物的 IGFBP 基因及其作用机理的研究已引起人们的关注。但有关 IGFBP 基因多态性及其与动物产肉性状关系的研究, 目前还尚未见报道。

秦川牛虽是我国著名的地方黄牛品种之一, 但与国外优良肉牛品种相比, 其生长速度慢, 体重偏小, 臀部肌肉欠丰满。鉴于 IGFs 在牛生长发育中的

作用及 IGFBP-3 与 IGFs 的作用机理, 本研究首次将 IGFBP-3 基因作为秦川牛产肉性状的候选基因, 分析了 IGFBP-3 基因多态性与秦川牛高档牛肉产量的相关性, 以期为提高秦川牛产肉性能分子筛选体系的建立进行初步的探索。

1 材料与方法

1.1 秦川牛的屠宰与分割

13 头 24 月龄左右的秦川牛经短期肥育后, 测定屠宰率、净肉率、胴体净肉率、肉骨比及西冷、眼肉、嫩肩肉、眼肌面积和胴体脂肪含量等指标。

采集每个个体的肝脏样品-80℃冻存备用。

1.2 主要试剂

蛋白酶 K、Tris 饱和酚 (pH 8.0)、限制性内切酶 *Hae* III、*Taq* 酶、dNTPs 等购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.3 基因组 DNA 的提取

秦川牛基因组 DNA 的提取方法参照文献[2]。

1.4 PCR 引物的设计与合成

参照 Maciulla 等^[3]的引物序列合成 1 对引物, 上游引物为 5'-CCA AGC GTG AGA CAG AAT AC-3', 下游引物为 5'-AGG AGG GAT AGG AGC

^{*} [收稿日期] 2002-12-18

[基金项目] 国家“863”计划项目 (2001AA 243052); 国家自然科学基金项目 (30070551); 杨凌示范区专项基金 (99KG8); 农业部留学回国人员活动基金 (1999-12D); 西北农林科技大学青年基金资助项目 (0808)

[作者简介] 孙维斌 (1973-), 男, 陕西留坝人, 讲师, 在读博士, 主要从事养牛生产及生物技术与动物遗传育种研究。E-mail: wbsun@263.net

[通讯作者] 陈 宏 (1955-), 男, 陕西长安人, 教授, 博士生导师, 主要从事生物技术与动物遗传育种研究。E-mail: chen hong1212@263.net

AA G TT-3'.

1.5 PCR 反应条件

反应体系的组成为: 10 × PCR Buffer, 25 mmol/L MgCl₂, 2.5 mmol/L dNTPs, 0.5 U/μL Taq 酶各 2.5 μL, 混合引物(100 ng/μL) 0.5 μL, 模板 DNA (50 ng/μL) 1 μL, 加纯水至总体积为 25 μL。PCR 反应条件: 预变性 97 °C 5 min, 然后 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延长 10 min 后 4 °C 保存。

1.6 PCR 产物的酶切与电泳

PCR 产物在 200 μL 的离心管中进行限制性消化。反应体系为: 10 × Buffer C 3 μL, BSA (1 mg/mL) 3 μL, PCR 产物 15 μL, Hae III (1 U/μL) 6 μL, 灭菌纯水 3 μL, 合计 30 μL, 经瞬时离心后, 置于 37 °C 恒温箱消化 12~14 h。消化产物经无水乙醇沉淀和体积分数 70% 乙醇洗涤后干燥, 再用 TE 缓冲液溶解过夜, 最后用 4% 琼脂糖电泳, Kodak 自动成像系统分析。

1.7 基因和基因型频率的计算

根据 Macciulla 等^[3]的方法进行基因型的判定和统计。

1.8 数据的统计与分析

全部数据用 SAS (6.12) 软件进行方差分析和多重比较^[4]。

2 结果与分析

2.1 IGFBP-3 基因的 PCR-RFLP 分析

秦川牛 IGFBP-3 基因的扩增产物经 Hae III 消化和 4% 琼脂糖凝胶电泳后表现出明显的多态性(图 1), 表现为二等位基因的变异, 其中等位基因 A 表现为 8 条带, 大小分别为 199, 164, 154, 56, 36,

18, 16 和 8 bp, 等位基因 B 也表现为 8 条带, 分别为 215, 164, 154, 56, 36, 18, 16 和 8 bp, 其中 215, 199, 164 和 154 bp 4 条带纹清晰可见。因此, 可根据 215, 199 bp 两条带纹的有无判断不同个体的基因型。

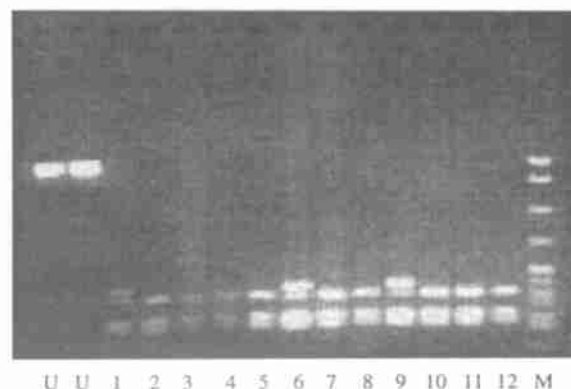


图 1 秦川牛 IGFBP-3 基因 PCR 产物经 Hae III 限制性消化产物的基因型观察

U 为未消化 PCR 产物; 2~5, 7, 8, 10~12 泳道

为 AA 基因型; 1, 6, 9 泳道为 AB 基因型; M: pBR322/Msp I

Fig 1 Genotype observation for partial sequence of IGFBP-3 gene in Qinshuan cattle after amplification and Hae III digestion

U was undigested PCR product; 2-5, 7, 8, 10-12 were genotype AA; 1, 6, 9 were genotype AB; M was pBR322/Msp I marker

2.2 IGFBP-3 基因不同基因型与秦川牛高档牛肉产量指标的方差分析

从表 1 中可以看出, 在屠宰的 13 头秦川牛中, AA 型、AB 型个体分别为 9 头、4 头, 未发现 BB 型个体。AA 型、AB 型个体的频率依次为 0.69、0.31, 等位基因 A、B 的频率分别为 0.845 和 0.155。经 χ^2 检验, 这个群体处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P > 0.05$)。

表 1 秦川牛 IGFBP-3 基因多态位点基因及基因型频率分布

Table 1 Allele and genotype frequency distribution at IGFBP-3 locus in Qinshuan cattle

指标 Indexes	基因型 Genotypes			等位基因 Alleles	
	AA	AB	BB	A	B
头数 Number	9	4	0		
频率 Frequency	0.69	0.31	0	0.845	0.155

不同基因型个体的屠宰性状方差分析结果见表 2。由表 2 可以看出, IGFBP-3 基因型与秦川牛的部分高档牛肉的产出率分析表明, 两者存在一定的相关性, 其中 AA 型、AB 型及 BB 型的西冷、牛柳、眼肉、嫩肩肉的产出率逐渐下降, 但差异不显著 ($P > 0.05$); IGFBP-3 的不同基因型对秦川牛的其他两

个重要的屠宰指标, 即眼肌面积和胴体脂肪含量影响显著, 其中 AA 型的秦川牛个体的眼肌面积显著高于 BB 型 ($P < 0.05$); 而 AB 型和 BB 型的秦川牛个体的胴体脂肪含量显著高于 AA 型个体 ($P < 0.01$)。

表 2 秦川牛 IGFBP-3 基因型与部分优质牛肉切块产量的方差分析

Table 2 Variance analysis of IGFBP-3 genotypes and several beef cutting yields in Qinchuan cattle

基因型 Geno- type	西冷 Striploin percentage				牛柳 Tenderloin percentage			
	个体数 Number	基因型频率 Frequency	均值/% Mean	标准误/% SE	个体数 Number	基因型频率 Frequency	均值/% Mean	标准误/% SE
AA	9	0.69	1.92 a	0.25	9	0.69	0.89 a	0.06
AB	4	0.31	1.86 a	0.43	4	0.31	0.65 a	0.05
BB			1.83 a *				0.57 a *	

基因型 Geno- type	眼肉 Ribeye percentage				嫩肩肉 Tender shoulder percentage			
	个体数 Number	基因型频率 Frequency	均值/% Mean	标准误/% SE	个体数 Number	基因型频率 Frequency	均值/% Mean	标准误/% SE
AA	9	0.69	1.80 a	0.09	9	0.169	4.92 a	0.31
AB	4	0.31	1.73 a	0.16	4	0.31	4.43 a	0.063
BB	0		1.70 a *				4.27 a	

基因型 Geno- type	眼肌面积 Ribeye area				胴体脂肪含量 Beef fat percentage			
	个体数 Number	基因型频率 Frequency	均值/cm ² Mean	标准误/cm ² SE	个体数 Number	基因型频率 Frequency	均值/% Mean	标准误/% SE
AA	9	0.69	57.93 a	2.37	9	0.69	4.68 a	0.36
AB	4	0.31	45.75 ab	0.94	4	0.31	11.23 b	2.77
BB			41.69 b				13.41 b	

注: 不同基因型的均值中标相同字母者表示差异不显著, 显著水平 $\alpha=0.05, 0.01$; * 表示在屠宰的秦川牛中未检测到BB 型个体, 此处根据林富玉等^[5]的方法估算; % 以胴体重为基数计算。

Note: In this table, means with same superscripts were not different significantly and with different superscripts means were variant significantly, the significant level is $\alpha=0.05, 0.01$; *: In this slaughter trial, individuals with genotype of BB have not been detected, it was estimated according to the method of Lin Fu-yu^[5]; % was caculated with carcass weight

3 讨 论

3.1 IGF 与 IGFBP 的多态性研究

IGF 在动物的生长、泌乳、乳腺的发育过程中起着重要的作用, 因此, 已被作为候选基因与数量性状位点(QTL)作连锁分析, 用于数量性状的辅助标记选择。人们已经发现, IGF 基因对猪的生长速度具有主效作用, 澳大利亚也将 IGF-I 作为一个重要的经济性状标记用于育种实践^[6]。Dierkes 等^[7]研究了巴西水牛的 IGF 基因的多态性, 在扩增出的 1 394 bp 片段中的 C→A 颠换改变了 Mae I 限制性位点, 其等位基因 A、B 的频率分别为 0.53, 0.47。Chung 等^[8]研究了 IGF-I 的多态性, 发现 A、B 两个等位基因在高产奶牛群和低产奶牛群中的频率分布稍有差异, 认为 IGF-I 的 PCR-RFLP 基因型可作为韩牛(Hanwoo)产奶量的一个有效标记。Ge 等^[9]研究了 IGF-I 的 SSCP (单链构象多态性) 与安格斯牛生长性状的关系, 结果发现 BB 型的犏牛断奶后 20 d 的

增重比 AA 型高 4.69 kg ($P<0.05$)。

随着人们对 IGF/IGFBP 系统认识的提高, 也开始了对动物 IGFBP 基因的研究。但关于 IGFBP 多态性的研究报道相对还较少, 相信在未来的数年内将有更多的学者关注这方面的研究, 这对于搞清楚 IGF、IGFBP 及 IGF 受体在动物体内的作用机理, 提高家畜的生产性能具有重要意义。

3.2 IGFBP 基因与生产性能的关系

由于 IGFBP 有许多生物学功能, 如运输并影响 IGF 在血液中的释放, 因而可延长 IGFs 的半衰期, 此外还可调节 IGFs 的生物活性, 因此与 IGFs 一起直接或间接影响动物的生产性能。尽管在本研究中 IGFBP 的不同基因型对秦川牛的多个产肉性能影响差异不显著, 但这也可能是由于屠宰个体数少所造成的抽样误差。尽管如此, 还是可以看出, IGFBP-3 不同基因型个体的高档牛肉产量确有明显差异。因此, IGFBP-3 基因可作为一个候选基因用于秦川牛产肉性能的分子标记辅助选择。

[参考文献]

[1] 杜清友, 王会信. 胰岛素样生长因子研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(2): 104- 158
[2] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1999
[3] Maciulla H J, Zhang H M, DeNise S K. A novel polymorphism in the bovine insulin-like growth hormone factor binding protein-3 (IGFBP-3) gene[J]. Animal Genetics, 1997, 28: 375

- [4] 胡小平, 王长发. SAS 基础及统计实例教程[M]. 西安: 地图出版社, 2001.
- [5] 林富玉, 李 宁, 陈永福. 中国荷斯坦牛 κ 酪蛋白基因多态性与产奶量的相关分析[J]. 中国畜牧杂志, 1999, 1: 8- 9.
- [6] 王文君, 丁能水, 陈克飞, 等. 诸胰岛素样生长因子-1 的研究[J]. Animal Biotechnology Bulletin, 2000, 1: 55.
- [7] Dierkes B, Kriegsmann B, Sila A, et al. Identification of a MaeI RFLP in the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) gene of swamp buffaloes[J]. Animal Genetics, 2000, 31: 68- 79.
- [8] Chung E R, Kim W T, Kim Y S, et al. PCR-SSCP genotype effects of growth prolactin and insulin-like growth factor-1 genes on milk yield in Korean cattle (Hanwoo) [J]. Asian-Australian Journal of Animal Science, 2000, (Suppl): 223.
- [9] Ge W, Davis M E, Hines H C, et al. A association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor concentration and growth traits in Angus cattle[J]. Journal of Animal Science, 2001, 79: 1757- 1762.

Polymorphisms of insulin-like growth factor binding protein-3 gene and its associations with several carcass traits in Qinchuan Cattle

SUN Wei-bin¹, CHEN Hong^{1,2}, LEI Xue-qin³, ZHANG Fu-qian¹,
LEI Chu-zhao¹, LI Rui-biao¹, ZHANG Ying-han¹, ZAN Lin-sen¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry,

Shaanxi Key Laboratory of Agricultural Molecular Biology, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Biotechnology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221009, China;

3 Henan Science and Technology University, Luoyang, Henan 473003, China)

Abstract: In this study, DNA samples from 13 Qinchuan cattle (*Bos taurus*) were analyzed with PCR-RFLPs. This locus showed three genotypes, namely AA, AB and BB after electrophoresis. Frequencies of the genotype AA, AB, BB and allele A, B were 0.69, 0.31, 0 and 0.845, 0.155, respectively. This polymorphic locus of IGFBP-3 gene was at Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). The genotypes of AA, AB, BB slightly affected high quality beef cutting of Qinchuan cattle. Strip loin percentage, Tenderloin percentage, Ribeye percentage and Tender shoulder percentage were decreased with the genotypes of AA, AB and BB in Qinchuan cattle, but it was not significant ($P > 0.05$). Average ribeye area in individuals of AA genotype was significantly higher than that in individuals of BB genotype ($P < 0.05$), and beef fat content in individuals of genotype AB and BB was significantly higher than that in individuals of AA genotype ($P < 0.01$).

Key words: Qinchuan cattle; high quality beef cutting yield; insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) gene; DNA polymorphism