

牦牛 *IGF2* 内含子 8 的遗传多态性及其遗传效应分析

王丁科,梁春年,阎 萍,曾玉峰,裴 杰
(中国农业科学院 兰州畜牧与兽药研究所,甘肃 兰州 730050)

【摘 要】 【目的】研究牦牛胰岛素样生长因子 2(*IGF2*)基因内含子 8 的多态性与生长发育性状的相关性,探索其对开展牦牛分子育种的影响。【方法】以天祝白牦牛、甘南牦牛、大通牦牛、青海高原牦牛和新疆牦牛为供试动物,采集牦牛血样,提取其 DNA,采用 PCR-SSCP 方法检测牦牛 *IGF2* 基因内含子 8 的多态性,并分析其对体质量、体高、胸围和体长的遗传效应。【结果】扩增到牦牛 *IGF2* 基因内含子 8 的部分序列,其长度为 438 bp,存在 AA、AB、BB 3 种基因型,其中 AA 型是由 BB 型 330 位 G→C 和 358 位 A→G 转换造成的。除新疆牦牛以外,以上 3 种基因型在其他牦牛群体中均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。AA 和 AB 基因型个体体质量极显著高于 BB 基因型个体($P<0.01$),AA 与 BB 基因型个体在体高、体长和胸围性状上差异不显著。【结论】*IGF2* 基因有可能作为体质量性状的候选基因用于标记辅助选择,且其有不依赖于骨骼增长而增加体质量的作用机制。

【关键词】 胰岛素样生长因子 2;内含子 8;牦牛
【中图分类号】 S823.8⁺5 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2009)05-0039-04

Genetic polymorphisms and genetic effects of *IGF2* gene intron8 in yak

WANG Ding-ke, LIANG Chun-nian, YAN Ping, ZENG Yu-feng, PEI Jie
(Lanzhou Institute of Animal Science and Veterinary Pharmaceuticals, Chinese Academy of
Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730050, China)

Abstract: 【Objective】 The research studied the polymorphism of *IGF2* gene and the association of polymorphism with growth and development traits to improve performance and breeding of yak. 【Method】 Single nucleotide polymorphisms of the intron8 of the Yak' *IGF2* gene were tested using PCR-SSCP. Genetic effects of the *IGF2* gene on weight, stature, chest circumference and stem oblique length were analyzed. 【Result】 On the mainstay of the published DNA sequence(NW_001494548) of the bovine *IGF2* gene, pairs of primers were designed, and two polymorphisms, three genotypes were found in the PCR products amplified with intron8 primers. Transition of G→C at 330 site and A→G at 358 site of intron8 was detected for wild type by sequencing the homozygotes. The results showed that it didn't meet the equilibrium of Hardy-Weinberg only in Xinjiang Yaks. Using least square analysis, it showed that individuals of AA and BB genotypes had significantly higher ($P<0.01$) weight than BB genotype, but had no difference on the other growth traits. 【Conclusion】 *IGF2* has a mechanism of action which increases the weight without dependence on the growth of the bones.

Key words: *IGF2*; intron 8; yak

* [收稿日期] 2008-06-27
[基金项目] 甘肃省农牧厅农业生物技术研究与应用开发项目(GNSW-2006-10);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(BRF060101)
[作者简介] 王丁科(1982—),男,河南安阳人,在读硕士,主要从事分子遗传学与动物育种研究。
E-mail: wangdingke304@yahoo.com.cn
[通信作者] 阎 萍(1963—),女,山西临猗人,研究员,主要从事牦牛育种研究。

作为胰岛素样生长因子家族成员之一,胰岛素样生长因子 2(Insulin-like Growth Factor 2, IGF2) 是一种促细胞分裂多肽,可介导生长激素发挥作用、刺激培养细胞生长,在发育中具有促生长的重要功能。IGF2 基因是一种父本表达印记基因,对肌肉生长和分化有重要影响。成熟胰岛素样生长因子 2 (IGF2) 是一类由 67 个氨基酸残基组成的小分子弱酸性多肽,相对分子质量 7 471,它能促进细胞有丝分裂和分化,参与出生后基因组重建,与 X 染色体的失活有重要关系^[1]。研究表明,IGF2 基因多态性对猪的生长速度、瘦肉率、背最长肌面积、心脏质量和背膘厚有重要影响^[2-4],可作为提高猪瘦肉率的候选基因^[5-8]。Lamberson 等^[9]研究发现,IGF2 浓度与猪生长期的体质量呈正相关。Knoll 等^[10]在猪的 IGF2 上发现一个 *Nci* I 多肽位点,经分析发现,该位点的等位基因频率与瘦肉率存在显著关系。Vykoukalova 等^[3]在猪 IGF2 上检测到 2 个多态性位点,且不同基因型猪的背膘厚及瘦肉率差异显著。Liu 等^[11]在猪 IGF2 检测到一个 *Nci* I 多态位点,且基因型间脂肪沉积量和瘦肉量差异显著。国内外对牦牛 IGF2 基因及 IGF2 基因多态性与生长发育性状相关性的研究还不多见。本研究以 IGF2 基因作为影响牦牛体质量等重要经济性状的候选基因,采用单链构象多态方法对 IGF2 基因内含子 8 的多态性进行研究,分析其与体质量、体高、体斜长和胸围等性状的相关性,以期从分子水平上为牦牛品种资源保护和育种工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物 以天祝白牦牛 99 头、甘南牦牛 94 头、大通牦牛 69 头、青海高原牦牛 68 头、新疆牦牛 50 头作为试验动物。颈静脉采血 10 mL,复方柠檬酸钠(ACD)抗凝(6:1),-70 ℃ 保存备用。采血的同时,测定牦牛体高、胸围、体长、体质量等指标。

1.1.2 主要试剂 主要试剂包括: *Taq* DNA 聚合酶(Mg^{2+})、Buffer、dNTPs、蛋白酶 K、琼脂糖、溴化乙锭(EB)、Tris 饱和酚、溴酚蓝、二甲基苯氰 FF、磷酸二氢钾、甲叉双丙烯胺、丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱)、十二烷基硫酸钠(SDS)、乙二醇四乙酸钠盐(EDTA)、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(AP)、去离子甲酰胺等。

1.2 牦牛基因组 DNA 的提取

采用常规酚-氯仿抽提法^[12]从血样中提取牦牛

全血 DNA。

1.3 牦牛 IGF2 基因内含子 8 的 PCR-SSCP

1.3.1 引物设计与合成 根据 GenBank 中已发表的牛(GenBank 登录号为: NW_001494548)、羊(GenBank 登录号为: AY182033, U00666)、人(GenBank 登录号为: AF517226)等 IGF2 DNA 序列,用 BioEdit 软件进行序列同源性比对后,利用 Primer premier 5.0 软件设计引物(若物种间有序列突变则以牛为主)。引物由上海生物工程有限公司合成,序列如下: F: AGGTGGCTGGGCTTAGGGT-3', R: 5'-GCGAGTCATGTGGCTGGAA。

1.3.2 PCR 扩增 PCR 扩增反应体系为 10 × Buffer(含 Mg^{2+}) 2.0 μ L, 20 μ mol/L 引物 0.2 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 1.6 μ L, 5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.1 μ L, 50 mg/L DNA 0.4 μ L, 加双蒸水至总体积 20 μ L。

PCR 程序为: 94 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 共 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。用 1 g/L TAE 做缓冲液, 100 V 电压条件下, 将 PCR 产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶中电泳 30 min, 用凝胶成像系统分析扩增结果。

1.3.3 单核苷酸多态性(SSCP)分析 取 3 L PCR 产物和 8 L Loading buffer(体积分数 98% 甲酰胺、体积分数 0.025% 溴酚蓝、体积分数 0.025% 二甲苯氰、10 mmol/L EDTA(pH 8.0)、体积分数 10% 甘油)混匀, 98 ℃ 变性 10 min, 然后冰浴 10 min, 使 PCR 产物保持变性状态。将变性后的 PCR 产物用 120 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳条件为: 10 V/cm 电泳 16~17 h, 电泳后银染显色。选取表现纯合基因型的扩增产物, 送交上海生物工程有限公司纯化和测序。

1.3.4 数据统计分析 计算不同基因型个体在不同牦牛品种(类型)中的分布, 并进行卡方适合性检验; 根据固定效应模型, 利用 SPSS 软件包的 GLM (General Linear Model) 过程分析品种(breed)、年龄(age)、性别(sex)和基因型(genotype)对牦牛的体质量、体高、体长、胸围的效应。固定效应模型为:

$$y_{ijkmn} = \mu + B_i + A_j + S_k + G_m + X_n + e_{ijkmn}。$$

式中: y_{ijkmn} 为个体表型记录; μ 为生产性能的最小二乘均值; B_i 为品种效应; A_j 为年龄效应; S_k 为性别效应; G_m 为标记基因型效应; X_n 为各种二级和二级以上互作效应, 如: Breed × Age、Breed × Sex、Breed × Genotype、Age × Sex、Age × Genotype、Sex × Genotype、Breed × Age × Sex 等; e_{ijkmn} 为随机

误差。

2 结果与分析

2.1 牦牛 *IGF2* 基因内含子 8 的 PCR-SSCP 分析结果

以牦牛基因组 DNA 为模板,用所设计的引物进行 PCR 特异性扩增,所获产物的片段长度为 438

bp(图 1),与预期大小一致,且无非特异性条带,可以用于 SSCP 分析。牦牛 *IGF2* 基因内含子 8 扩增产物电泳条带出现 3 种基因型,分别定义为 AA、AB、BB(图 2),并对 AA 和 BB 基因型进行测序,发现 AA 型是由 BB 型的 330 位 G→C 和 358 位 A→G 转换造成的(图 3)。

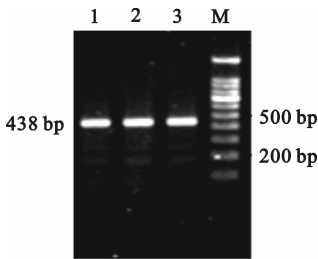


图 1 牦牛 *IGF2* 基因内含子 8 的 PCR 扩增结果
1,2,3. 扩增产物;M. Marker
Fig. 1 PCR products of the 8th intron of yak *IGF2* gene
1,2,3 . PCR products;M. Marker

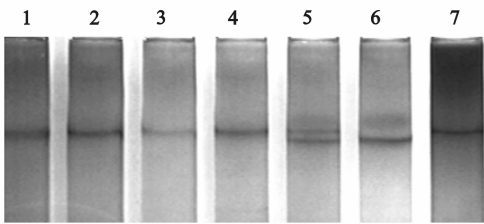


图 2 牦牛 *IGF2* 基因内含子 8 PCR 扩增产物的 SSCP 检测结果
1,2,3,4,7. BB 基因型;5. AB 基因型;6 . AA 基因型
Fig. 2 PCR- SSCP analysis on 8th intron of yak *IGF2* gene
1,2,3,4,7. BB;5. AB;6. AA



图 3 牦牛 *IGF2* 基因内含子 8 AA 和 BB 基因型的序列比较
Fig. 3 Sequence comparison between genotype AA and BB of *IGF2* gene intron8 of yak
2.2 *IGF2* 基因内含子 8 基因型和基因在不同牦牛品种的分布频率
表 1 显示,*IGF2* 基因内含子 8 基因的 3 种基因型在不同牦牛品种(类型)的分布比较一致,且均以 B 等位基因为优势等位基因,大通牦牛、甘南牦牛、

天祝白牦牛、青海高原牦牛和新疆牦牛 B 等位基因的频率分别为 0.862 3,0.893 6,0.853 5,0.867 6 和 0.830 0;除新疆牦牛不符合 Hardy-Weinberg 平衡以外,其他均处于平衡状态。

表 1 *IGF2* 基因内含子 8 基因型和基因在不同牦牛品种的分布频率
Table 1 Genotype frequency and gene frequencies on the 8th intron of yak in different populations

品种 Breed	基因型频率 Genotype frequency			基因频率 Gene frequency		χ^2
	AA	AB	BB	A	B	
大通牦牛 Datong yak	0.014 5(1)	0.2464 (17)	0.7391 (51)	0.137 7	0.862 3	0.093 0
甘南牦牛 Gannan yak	0.031 9 (3)	0.148 9(14)	0.8192 (77)	0.106 4	0.893 6	4.416 6
天祝白牦牛 Tianzhu White yak	0.040 4(4)	0.2121 (21)	0.747 5(74)	0.146 5	0.853 5	2.351 4
青海高原牦牛 Qinghai Highland yak	0.029 4(2)	0.205 9(14)	0.764 7(52)	0.132 4	0.867 6	0.709 9
新疆牦牛 Xinjiang yak	0.0800(4)	0.180 0(9)	0.740 0(37)	0.170 0	0.830 0	6.557 8

注:括号内为个体数; $\chi^2_{0.05}(df=2)=5.99$, $\chi^2_{0.01}(df=2)=9.21$ 。
Note: In brackets for the individual number, $\chi^2_{0.05}(df=2)=5.99$, $\chi^2_{0.01}(df=2)=9.21$.

2.3 牦牛 *IGF2* 基因内含子 8 不同基因型与生长性状的关联性分析

由表 2 可以看出,在本试验所测定的部分生长性状中,*IGF2* 基因 AA、AB 型个体体质量较 BB 型个体大,且差异达极显著水平($P<0.01$);AA 和

BB 型个体体长差异不显著,但 AB 型个体与 AA、BB 型差异极显著;AB 与 BB 型个体胸围差异达到极显著水平,而与 AA 型个体之间差异均不显著;3 种基因型个体在体高性状上差异均不显著。

表 2 牦牛 *IGF2* 基因内含子 8 不同基因型生长性状的最小二乘均值及标准误
Table 2 Genotype different growth characteristics and the least-square mean
standard error on the 8th intron of yak *IGF2* gene

基因型 Genotype	体质量/cm Weight	体高/kg Height	体长/cm Body lengthth	胸围/cm Herrt girth
AA	115.309±4.455 A	95.004±2.535	99.150±3.062 A	116.114±3.536 AB
AB	108.508±1.671 A	91.620±0.858	90.951±1.036 B	120.271±1.197 A
BB	106.361±2.225 B	92.003±0.639	95.024±0.771 A	112.981±0.891 B

注:数据以“最小二乘均值±标准误”表示。同列数据后标不同大写字母者表示差异极显著($P<0.01$),标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。
Note: Values sign as “least square means±standard error”,Values with different capital letters in the same row at the same population mean very significant difference($P<0.01$);Values with different small letters in the same line at the same population mean significant difference($P<0.05$).

3 讨 论

本试验对牦牛 *IGF2* 基因内含子 8 表现的多态性进行了研究,在 *IGF2* 基因内含子 8 发现 330 位 G→C 和 358 位 A→G 发生了转换,在所检测的各牦牛群体均检测到 2 种等位基因(A 和 B)和 3 种基因型(AA、AB、BB),各群体均以 B 等位基因为优势等位基因。在该位点上,大通牦牛、甘南牦牛、天祝白牦牛、青海高原牦牛处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,新疆牦牛处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态,这可能与采样误差或样品数量少有关。

生长发育性状是受多基因座控制的,影响生长性状的主基因对改善我国地方牦牛品种生产性能具有重要意义。确定候选基因是寻找畜禽数量性状基因座的有效方法之一,其可以直接研究具有特定功能基因的多态性与经济性性状间的关系。本研究将 *IGF2* 基因作为影响牦牛生长发育性状的候选基因,结果发现,AA、AB 型个体体质量较 BB 型个体大,提示在育种过程中,*IGF2* 基因有可能作为体质量性状的候选基因用于标记辅助选择,选择带有 A 等位基因的个体有望提高后代的平均体质量,加速育种进程,体高经济效益。但在体高、体长和胸围性状上,AA 与 BB 基因型差异均不显著。说明 *IGF2* 基因内含子 8 的 A 等位基因并不是通过影响骨骼发育来增加体质量的,具体途径还有待进一步研究。

News from the mouse X chromosome [J]. Dev Biol 2006,298 (2):344-353.

[2] 刘桂兰,蒋思文,熊远著,等. *IGF2* 基因 PCR-RFLPs 多态性与脂肪沉积相关性状的关联分析 [J]. 遗传学报,2003, 30(12): 1107-1112.

Liu G L,Jiang S W,Xiong Y Z,et al. *IGF2* gene PCR-RFLPs polymorphism and fat deposition related traits associated analysis [J]. Acta Genetica Sinica,2003,30(12):1107-1112. (in Chinese)

[3] Vykoukalova Z,Knoll A,Dvorak J,et al. New SNPs in the *IGF2* gene and association between this gene and backfat thickness and lean meat content in Large White pigs [J]. Animal Breed Genet,2006,123(3):204-207.

[4] Rattink A P,De Koning D J. Fine mapping and imprinting analysis for fatness trait QTLs ln pigs [J]. Mamma Genome,2000, 11:656-661.

[5] 刘 鑫,施启顺,柳小春,等. 不同猪种 *IGF-2* 基因 PCR-RFLP 多态性与部分生长性状相关性分析 [J]. 湖南农业大学学报, 2006,32(1):63-66.

Liu X,Shi Q S,Liu X C,et al. Different breeds *IGF-2* gene PCR-RFLP polymorphism of the growth traits associated with the analysis of [J]. Journal of the Hunan Agricultural University,2006,32(1):63-66. (in Chinese)

[6] 虞德兵,何宗亮,张伟峰,等. 猪 *IGF2* 基因内含子 3 变异的遗传效应分析 [J]. 遗传,2008,30(1):87-93.

Yu D B,He Z L,Zhang W F,et al. Pig *IGF2* gene intron 3 of the genetic effects of variability [J]. Genetic,2008,30(1):87-93. (in Chinese)

[7] Yang G C,Ren J,Guo Y M,et al. Genetic evidence for the origin of an *IGF2* quantitative trait nucleotide in Chinese pigs [J]. Animal Genet,2006,37(2):179-180.

[参考文献]

[1] Thorvaldsen J L,Verona R I,Bartolomei M S. X-tra! X-tra!