

牦牛 IGF2 内含子的遗传多态性及其遗传效应分析

王丁科^{1,2}, 阎 萍², 梁春年², 曾玉峰², 裴 杰²

(1. 甘肃农业大学, 甘肃 兰州 730070; 2. 中国农业科学院 兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃 兰州 730050)

摘要:采用 PCR-SSCP 方法检测牦牛胰岛素样生长因子 2 (Insulin like growth factor 2, *IGF2*) 基因内含子 2, 7, 8 的多态性, 并分析其对体重、体高、胸围和体斜长的遗传效应。用 BioEdit 软件对牛、羊、人、猪等相关序列同源性比对以后, 主要依据牛 (NW-001494548) DNA 序列设计 3 对引物。结果在 intron7 和 intron8 引物扩增的片段上发现多态性, 并对纯合子进行测序, 发现 intron7 引物扩增片段 91 位存在 C→T 转换, intron8 引物扩增片段存在 330 位 G→C 和 358 位 A→G 转换, 且在该两对引物扩增产物均检测到 3 种基因型 (AA、AB、BB)。统计结果表明, intron7 的 3 种基因型在大通牦牛、青海高原牦牛和新疆巴州牦牛群体中的分布处于平衡状态, 而在甘南牦牛和天祝白牦牛群体中则处于极端不平衡状态。intron8 的 3 种基因型仅在新疆牦牛群体中处于不平衡状态, 最小二乘分析结果表明, AA 和 AB 基因型同 BB 基因型相比有较大体重 ($P < 0.01$), 但在体高、体长和胸围性状上 AA 与 BB 基因型均不显著, 说明 *IGF2* 基因有不依赖于骨骼增长而增加体重的作用机制。

关键词: IGF2; 内含子; 遗传多样性; 牦牛

中图分类号: S858.23 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)02-0107-05

Genetic Polymorphisms and Genetic Effects of IGF2 Gene in Yak

WANG Ding-ke^{1,2}, YAN Ping², LIANG Chun-nian², ZENG Yu-feng², PEI Jie²

(1. Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Lanzhou Institute of Animal Science and Veterinary Pharmaceutics, Chinese Academy of Agriculture Science, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Single nucleotide polymorphisms of the intron 2, 7, 8 of the Yak's *IGF2* gene were tested using PCR-SSCP. Genetic effects of the *IGF2* gene on weight, stature, heart girth and body slanting length were analyzed. After compared by correlated series homology of bovine, sheep, human and pig used software of BioEdit. On the mainstay of the published DNA sequence (NW-001494548) of the bovine *IGF2* gene, three pairs of primers were designed, and two polymorphisms, three genotypes were found in the PCR products amplified with intron7 and intron8 primers. C→T transition at 91 site of intron7, linked transition of G→C at 330 site and A→G at 358 site of intron8 was detected by sequencing the homozygotes. The results showed that: the genotype distribution of intron7 was meet the equilibrium of Hardy-Weinberg among the breeds of Datong Yak, Qinghai plateau Yak and Xinjiang Bazhou Yak. But it is not meet among Gannan Yak and Tianzhu White Yak. At intron8, it is not meet the equilibrium of Hardy-Weinberg only in Xinjiang Bazhou Yak. Using least square analysis, it was shown that individuals of AA and BB genotypes have significantly higher ($P < 0.01$) weight than BB genotype, but have no difference on the other growth traits, it was demonstrated that *IGF2* gene have a mechanism of action to add weight without depending on skeletal growth.

Key words: IGF2; Intron; Genetic polymorphisms; Yak

牦牛是唯一能够充分利用青藏高原草地资源进行动物性生产的优势牛种和特有的遗传资源, 也是高寒牧区人民的乳、肉等主要食品及皮毛、骨、角等生活用品的原料, 在该地区具有不可替代的生态、社会和经济地位。然而, 高寒恶劣的自然条件、草场品

质差异较大及分布不均、粗放的饲养管理等因素使不同地区牦牛生产性能差异很大^[1], 给育种造成很大负面影响。为提高选种准确性和加速牦牛育种进程, 有必要利用包括分子标记辅助选择在内的各种育种措施。

收稿日期: 2008-12-09

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。

通讯作者: 阎 萍 (1963-), 女, 山西运城人, 研究员, 博士, 主要从事牦牛育种研究。

IGF2 是迄今所知功能最复杂的生长调控因子,它能促进细胞的有丝分裂和分化,参与生后基因组重建,与 X 染色体的失活有重要关系^[2]。牛 IGF2 由 10 个外显子和 9 个内含子组成,外显子 1~7 为非编码前导外显子(牛 IGF2 不含 4b 外显子)^[3]。和其他物种一样,牛 IGF2 基因也有 4 个启动子(p1 - p4),在不同生长发育时期翻译出不同组成的蛋白质^[4]。虽然在各种转基因动物试验中都未观察到 IGF2 对整个机体生长的作用,但在局部组织过量表达 IGF2 的转基因动物中,IGF2 特异地促进组织生长的作用却很明显。IGF2 以浓度依赖的方式刺激肌纤维的增殖与分化,IGF2 基因多态性对猪的生长速度、瘦肉率、背最长肌面积、心脏重量和背膘厚有重要影响^[5-7],其发挥作用的方式主要为加性效应,可作为猪提高瘦肉率的候选基因^[8-11]。Lamberson W R 等^[12]对 9 周龄和 21 周龄猪进行测定,发现 IGF2 浓度与生长期所测定的体重呈正相关。Knoll 等^[13]在内含子 2 上发现一个 Nci 多肽位点,后经 Nezer 等分析发现,该位点的等位基因频率与瘦肉率存在显著关系。Vykoukalova 等^[14]在内含子 7 上检测到 2 个多态性位点,基因型间背膘厚及瘦肉率的差异显著。刘桂兰等^[15]在内含子 8 检测到一个 Nci 多肽位点,且基因型间脂肪沉积和瘦肉量差异显著。

本试验以 IGF2 基因作为影响牦牛体重等重要经济性状的候选基因,采用 PCR-SSCP 方法对与经济性状相关的 IGF2 内含子 2,7,8 的多态性进行研究,分析其与体重、体高、体斜长和胸围等性状的相关性,以期对牦牛品种资源保护和育种工作从分子水平上提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

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、新疆巴州牦牛 50 头作为试验动物。颈静脉采血 10 mL,ACD 抗凝(6 1),-70℃保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取参照文献^[16]。

1.2.2 PCR-SSCP 过程

1.2.2.1 引物 根据 GenBank 中已发表的牛(DQ298739、NW-001494548)、羊(AY182033、U00666)、人(AF517226)等 IGF2 DNA 序列,BioEdit 软件序列同源性比对以后,利用 Primer premier 5.0 软件对 IGF2 基因 intron2、intron7、intron8 同源性较强的序列设计引物(若序列突变则以牛为主),由上海生物工程技术有限公司合成。引物序列见表 1。

1.2.2.2 PCR 扩增 PCR 扩增反应体系为 10 × Buffer(含 Mg²⁺) 2.0 μL,20 μmol/L 引物 0.2 μL,2.5 mmol/L dNTPs 1.6 μL,5 U/μL Taq 酶 0.1 μL,50 mg/L DNA 0.4 μL,加水 15.5 μL 至总体积 20 μL。PCR 程序为:94℃ 5 min;95℃ 30 s,复性温度(表 1) 30 s,延伸 72℃ 45 s,共 30 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。用 1%TAE 做缓冲液,100 V 电压条件下,PCR 产物在 2%琼脂糖凝胶中电泳 30 min,用凝胶成像系统分析检测扩增结果。

1.2.2.3 SSCP 分析 取 3 μL PCR 产物和 8 μL 的 Loading Buffer(98%甲酰胺、0.025%溴酚蓝、0.025%二甲苯氰、10 mmol/L EDTA(pH 8.0)、10%甘油)混匀,98℃ 变性 10 min,然后冰浴 10 min,使之保持变性状态。变性后的 PCR 产物用 12%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Acr Bis = 29:1)。10 V/cm 电泳 16~17 h 后,银染显色。扩增产物送交上海生物工程技术有限公司纯化和测序。

表 1 牦牛胰岛素样生长因子 2 基因引物序列

Tab. 1 Primer sequence of insulin like growth factor 2 in Yak

引物名称 Primer name	扩增区域 Amplified region	引物序列 Primer sequences(5'-3')	片段大小/bp Length of fragment	复性温度/ Annealing temperature
intron2	DQ298739 644~850	F:CCTCTATCCTCACTCCCTACAC R:GCACCAACAAGAACGACC	207	62.0
intron7	NW-001494548 3024~3254	F:CCAA GCCTCGGCAATAATACG R:GCCACCTTCTAAGTCCAA GTCCAG	231	60.8
intron 8	NW-001494548 3248~3685	F:AGGTGGCTGGGCTT A GGGT R:GCGAGTCATGTGGCTGGAA	438	56.0

1.2.2.4 数据统计分析 计算 3 种基因型个体在不同牦牛品种(类型)中的分布,对之进行了差异显著性检验;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、年龄、性别

和基因型对牦牛的体重、体高、体长、胸围的效应。统计分析模型为:

$$y_{ijkmn} = \mu + \text{Breed}_i + \text{Age}_j + \text{Sex}_k + \text{Genotype}_m + X_n + e_{ijkmn}$$

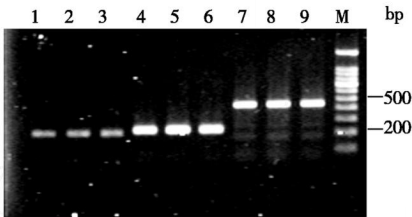
其中: μ 为生产性能的最小二乘均值; y_{ijkmn} 为个体表型记录; $Breed_i$ 为品种效应; Age_j 为年龄效应; Sex_k 为性别效应; $Genotype_m$ 为标记基因型效应; X_n 为各种二级和二级以上互作效应, 如: $Breed \times Age$, $Breed \times Sex$, $Breed \times Genotype$, $Age \times Sex$, $Age \times Genotype$, $Sex \times Genotype$, $Breed \times Age \times Sex$, 等; e_{ijkmn} 为随机误差。

2 结果与分析

2.1 PCR-SSCP 分析结果

用所设计的引物以基因组 DNA 为模板进行 PCR 特异性扩增, 所获产物的片段长度与预期大小一致(图 1), 且没有非特异性条带, 可以进行 SSCP 分析。将 3 对引物扩增的 PCR 产物分别进行 SSCP 分析, 结果在 intron7 和 intron8 均发现多态性, 出现 3

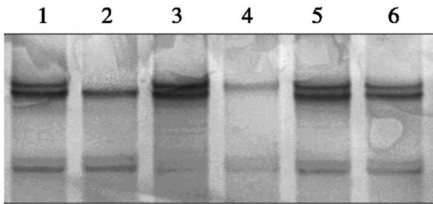
种基因型, 分别定义为 AA、AB、BB(图 2)。并对 AA 和 BB 基因型进行测序, 发现 intron7 91 位 C T 转换(图 3), intron8 330 位 G C 和 358 位 A G 转换(图 4)。



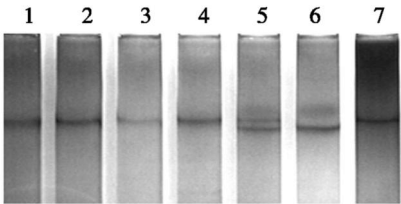
1~3. intron2 引物的扩增结果(207 bp); 4~6. intron7 引物扩增结果(231 bp); 7~9. intron8 引物扩增结果(438 bp); M. 100 bp DNA marker。
1~3. Result (207 bp) of primer intron2; 4~6. Result (231 bp) of primer intron7; 7~9. Result (438 bp) of primer intron8; M. 100 bp DNA marker.

图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 Result of PCR amplification



intron 7 的 SSCP 的检测结果
1,3,5,6.AB 基因型; 2.BB 基因型; 4.AA 基因型。
Result of intron7 SSCP detection; 1,3,5,6. Genotype AB; 2. Genotype BB; 4. Genotype AA.



intron 8 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。
Result of intron8 SSCP detection; 1,2,3,4,7. Genotype BB; 5. Genotype AB; 6. Genotype AA.

图 2 PCR 扩增产物的 SSCP 检测结果(12 %PAGE)

Fig. 2 The result of PCR amplification product by SSCP(12 %PAGE)

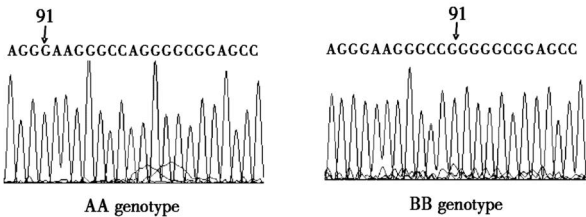


图 3 intron7 引物 AA 基因型和 BB 基因型的序列比较(反向)

Fig. 3 Comparison of sequence to genotype AA and BB of primer intron7(backward sequence)

2.2 基因频率和基因型频率在不同牦牛群体中的分布

IGF2 基因 intron7 的 3 种基因型在不同牦牛品种(类型)的分布见表 2, 大通牦牛、青海高原牦牛和新疆巴州牦牛以 BB 基因型为优势基因型, B 等位基因为优势等位基因, 其基因频率分别为 0.898 6, 0.713 3 和 0.950 0; 而甘南牦牛和天祝白牦牛则不然, AB 基因型是优势基因型, 其 B 等位基因的频率分别为 0.484 1 和 0.495 0。大通牦牛、青海高原牦牛和新疆巴州牦牛处于 Hardy-Weinberg 平衡, 甘南牦牛和天祝白牦牛则极不平衡。

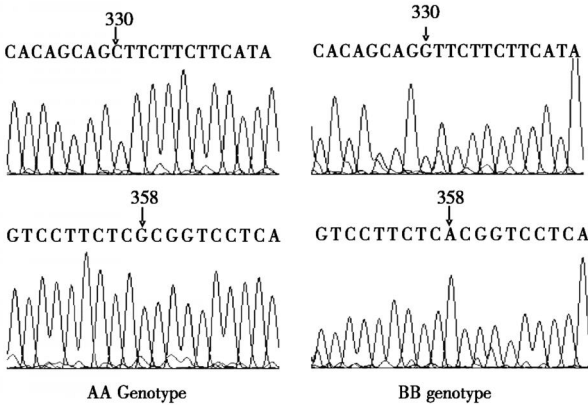


图 4 intron8 引物 AA 基因型和 BB 基因型的序列比较

Fig. 4 Comparison of sequence to genotype AA and BB of primer intron8

IGF2 基因 intron8 的 3 种基因型在不同牦牛品种(类型)的分布比较一致(表 3), 均以 B 等位基因为优势等位基因, 大通牦牛、甘南牦牛、天祝牦牛、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 7, 0.853 5, 0.867 6, 0.830 0; 除了新疆牦牛不符合 Hardy-Weinberg 平衡以外, 其他均处于平衡状态。

表 2 基因型频率和基因频率在不同牦牛种群的分布(intron7 引物)

Tab.2 Distribution of genotypic and gene frequency in different breed of Yak(primer)

品种 Breed	基因型频率 Genotypic frequency			基因频率 Gene frequency		2
	AA	AB	BB	A	B	
大通牦牛	0.014 5(1)	0.173 9(12)	0.811 6(56)	0.101 4	0.898 6	0.146 7
甘南牦牛	0.031 9(3)	0.968 1(91)	0	0.515 9	0.484 1	82.551 5
天祝白牦牛	0.010 1(1)	0.989 9(98)	0	0.505 0	0.495 0	95.059 8
青海高原	0.073 5(5)	0.426 5(29)	0.500 0(34)	0.286 8	0.713 2	0.122 5
新疆巴州牦牛	0	0.100 0(5)	0.900 0(45)	0.050 0	0.950 0	0.138 5

注:括号内为个体数, $\chi^2_{0.05}(df=2) = 5.99$, $\chi^2_{0.01}(df=2) = 9.21$ 。表 3 同。
Note :Biomass is in the sign of aggregation , $\chi^2_{0.05}(df=2) = 5.99$, $\chi^2_{0.01}(df=2) = 9.21$. The same as Tab.3.

表 3 基因型频率和基因频率在不同牦牛种群的分布(intron8 引物)

Tab.3 Distribution of genotypic and gene frequency in different breed of Yak(intron8)

品种 Breed	基因型频率 Genotypic frequency			基因频率 Gene frequency		2
	AA	AB	BB	A	B	
大通牦牛	0.014 5(1)	0.246 4(17)	0.739 1(51)	0.137 7	0.862 3	0.093 0
甘南牦牛	0.031 9(3)	0.148 9(14)	0.819 2(77)	0.106 3	0.893 7	4.416 6
天祝白牦牛	0.040 4(4)	0.212 1(21)	0.747 5(74)	0.146 5	0.853 5	2.351 4
青海高原	0.029 4(2)	0.205 9(14)	0.764 7(52)	0.132 4	0.867 6	0.709 9
新疆巴州牦牛	0.080 0(4)	0.180 0(9)	0.740 0(37)	0.170 0	0.830 0	6.557 8

2.3 基因型与生长性状的关联性分析

由表 4 可以看出 ,intron7 的 3 种基因型在生长性状上均差异不显著。而对于 intron8 来说,在本试验所测定的部分生长性状中,体重在 IGF2 基因 AA、AB 型个体较 BB 型个体要大,差异达极显著水

平($P < 0.01$);体长在 AA 型和 AB 型个体间差异不显著,但与 AB 型个体比较差异极显著;胸围仅在 AB 型和 BB 型之间达到极显著水平,而与 AA 型个体之间差异均不显著。在体高性状上,3 种基因型间差异均不显著。

表 4 不同基因型生长性状的最小二乘均值及标准误

Tab.4 Mean and standard error of LSQ of growth traits in different genotype

位点 Locus	基因型 Genotype	体重/ kg Weight	体高/ cm Height	体长/ cm Body length	胸围/ cm Herrt girth
intron7	AA	105.172 0 ±4.104	91.919 5 ±1.599	92.603 2 ±2.0	117.972 3 ±2.425
	AB	105.656 6 ±1.132	92.328 0 ±0.444	91.683 7 ±0.551	114.055 4 ±0.671
	BB	108.133 8 ±1.876	90.205 1 ±1.16	89.575 8 ±0.813	114.461 7 ±0.982
intron8	AA	115.309 ±4.455A	95.003 9 ±2.535	99.149 5 ±3.062A	116.113 6 ±3.536AB
	AB	108.508 ±1.671A	91.620 3 ±0.858	90.951 2 ±1.036B	120.271 3 ±1.197A
	BB	106.361 ±2.225B	92.003 1 ±0.639	95.023 8 ±0.771A	112.980 8 ±0.891B

注:同一性状组合中不含相同字母的两值间差异极显著($P < 0.01$)。
Note :Extremely conspicuous discrepancy between both groups indicated by different supscript and subscript letter in common trait combination.

3 讨论

本研究以 IGF2 基因作为影响牦牛体重等生长性状的候选基因,在 IGF2 基因 intron7 的 91 位发现 C T 转换,在 intron8 发现 330 位 G C 和 358 位 A G 连锁转换,在这两对引物对应序列均检测到 2 种等位基因(A 和 B)和 3 种基因型(AA ,AB ,BB)。

intron7 的 3 种基因型在大通牦牛、青海高原牦牛和新疆牦牛 3 个种群处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,且在这 3 个种群中均以 BB 型为优势基因型,而在甘南牦牛和天祝牦牛群体中则处于极端不平衡状态,在采样个体中未检测到 BB 型个体,两群体以 AB 型为优势基因型。由于牦牛是比较原始的牛种,管理粗放,其繁殖过程很少有人工干预,基本上处于

随机的自然交配状态,所以一般处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。之所以在甘南牦牛和天祝牦牛种群出现了不平衡,原因可能是由于 intron7 与某性状有很强相关性,而该性状与当地自然条件或社会需求密切相关,所以在该性状上实施了很大强度的自然选择或人工选择,致使该基因在这两个种群处于极端不平衡状态。最小二乘分析结果表明,intron7 的 91 位 C T 转换不影响体重、体高、胸围和体斜长性状表型值。

intron8 只在新疆牦牛处于轻度 Hardy-Weinberg 不平衡状态,这可能与样品数量少有关。最小二乘分析结果显示,AA 和 AB 基因型同 BB 基因型有较大体重($P < 0.01$),提示在育种过程中,将 IGF2 基因作为体重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重,加速育种进程,提高经济效益。但在体高、体长和胸围性状上 AA 与 BB 基因型均不显著。说明 intron8 的 A 等位基因有不依赖骨骼增长而增加体重的作用机制,具体途径还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 阎 萍. 牦牛养殖实用技术问答[M]. 兰州:甘肃民族出版社,2007.
- [2] Thorvaldsen J L, Verona R I, Bartolomei M S. X-tra ! X-tra ! News from the mouse X chromosome[J]. Dev Biol, 2006, 298 (2) :344 - 353.
- [3] Goodall J J, Schmutz S M. Linkage mapping of *IGF-2* on cattle chromosome 29[J]. Animal Genetics, 2003, 34 :302 - 318.
- [4] Sussenbach J, Steenbergh P H, Holthuisen P. Structure and expression of the human insulin-like growth factor genes[J]. Growth Regul, 1992 (2) :165 - 167.
- [5] 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.
- [6] Vykoukalov áZ, Knoll A, Dvor ák J, Āepica S S. 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.
- [7] Rattink A P, de Koning D J. Fine mapping and imprinting analysis for fatness trait QTLs in pigs [J]. Mamma Genome, 2000, 11 :656 - 661.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 薛惠良, 徐来祥. 猪 *IGF2* 基因的遗传多态性及其遗传效应分析[J]. 遗传, 2008, 30 (2) :179 - 184.
- [12] Lamberson W R, Sterle J A, Matteri R L. Relationships of serum insulin-like growth factor-2 concentrations to growth, compositional, and reproductive traits of swine [J]. Animal Science, 1996, 74 :1753 - 1756.
- [13] Knoll A, Putnova L, Dvorak J, et al. A Nci PCR-RFLP within intron2 of the porcine insulin-like growth factor-2 (*IGF2*) gene[J]. Anim Genet, 2000, 31 (2) :150 - 151.
- [14] 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]. Anim Breed Genet, 2006, 123 (3) :204 - 207.
- [15] LIU Gui-Lan, JIANG Si-Wen, XIONG Yuan-Zhu, et al. Association of PCR-RFLP polymorphisms of *IGF2* gene with fat deposit related traits in pig resource family [J]. Acta Genet Sin, 2003, 30 (12) :1107 - 1112.
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, et al. Translated by Jin Dong-Yan, Li Meng-Feng. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed[M]. Beijing: Science Press, 1996.