

类胰岛素生长因子 II (IGF2) 基因多态性与 鸡体脂性状的相关研究

李志辉, 王启贵, 赵建国, 王宇祥, 李辉

(东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 以肉鸡和 3 个地方品种 (北京油鸡, 石岐杂, 白耳鸡) 以及海兰蛋鸡为试验材料, 用 1 对引物对类胰岛素生长因子 II (IGF2) 基因的外显子 2 进行 SNPs 检测, 探讨 IGF2 基因作为影响鸡脂肪性状候选基因的可能性。利用测序和单链构象多态 (SSCP) 的方法进行 SNPs 检测和基因型的分析。 χ^2 检验表明, 139 处点突变的基因型在各品种间差异极显著 ($P < 0.01$)。3 种基因型与肉鸡屠体性状的最小二乘分析结果表明, BB 基因型个体的腹脂重和腹脂率显著低于 AB 基因型的个体。初步推断 IGF2 基因可能是影响鸡脂肪性状的主效基因或与主效基因连锁, 推测可以利用该位点对鸡的脂肪性状进行标记辅助选择。

关键词: 鸡; 类胰岛素生长因子 II (IGF2); SNPs; 腹脂

Study on Correlation Analysis of Single Nucleotide Polymorphism of IGF2 Gene and Body Fatness Traits in Chicken

LI Zhi-hui, WANG Qi-gui, ZHAO Jian-guo, WANG Yu-xiang, LI Hui

(College of Animal Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: Insulin-like growth factor II has profound effects on the growth and differentiation of animal embryo. Some researches indicate that it affects the fat metabolism of poultry. This study was designed to investigate the effect of IGF2 on chicken fatness traits. Broiler, Hyline Brown layer and three native breeds (Shiqiza, Beijing You, Baier) were used in this research. Body weight and body composition traits were measured in broiler line at the age of 7 weeks. Primers for exon2 in IGF2 were designed from database of chicken genomic sequence. Polymorphisms were detected by PCR-SSCP and DNA sequencing. The results χ^2 showed that there was a significant difference ($P < 0.01$) in the frequency of genotype among breeds. A C/G mutation at base position 139 was found among individuals in broiler line and the least square analysis showed that BB birds had significant lower ($P < 0.05$) abdominal fat weight and percentage of abdominal fat than AB birds. It was concluded from the results that IGF2 gene is the major gene affecting the fatness traits of chicken or it links with the major gene, and the mutation could be used as the molecular genetic marker to select the chicken for low abdominal fat.

Key words: Chicken; IGF2; SNPs; Abdominal fat

经过多年对肉鸡的科学选育, 现代肉鸡的生产性能有了显著提高。但是, 在肉鸡早期生长速度得以明显提高的同时, 伴随着出现的突出问题是腹脂沉积过多。肉鸡体内沉积过多腹脂有许多不利: (1) 明显降低饲料效率, 因为沉积单位重量的脂肪比沉

积单位重量的瘦肉多消耗 3 倍的能量; (2) 降低了屠体中瘦肉对脂肪的比例, 因而降低了分割肉的产量; (3) 加工者和消费者多数将肉鸡沉积的脂肪组织废弃, 一方面造成损失, 另一方面污染环境。因此, 控制脂肪在鸡体内的过多蓄积, 提高肉鸡的饲料转化

收稿日期: 2003-03-11

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目 (2002AA211021) 和黑龙江省杰出青年基金资助项目 (JC-02-06)

作者简介: 李志辉 (1975-), 男, 博士研究生, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: Lzh96@hotmail.com。李辉为通讯作者, Tel: 0451-55191416; E-mail: Lihui645@hotmail.com

率和胴体质量是我国养禽业亟需解决的重大问题, 选育低脂肉鸡品系也是今后世界范围内肉鸡育种的奋斗目标之一^[1]。

类胰岛素生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 是一种促细胞分裂的多肽, 包括 IGF1 和 IGF2, 其结构和功能与胰岛素类似, 在所有胰岛素的靶细胞中都能发挥作用^[2~4]。IGF 是生长激素发挥作用的中间信使, 即生长激素首先作用于 IGF, 再由 IGF 作用于靶器官, 进而发挥促进生长发育的作用^[5]。

IGF2 也被称为生长调节素 A (somatomedin A), 是胰岛素-胰岛素样生长因子-释放生长因子家族的成员之一。它与有促进有丝分裂活性作用的胰岛素在结构上有同源性, 已经证明, IGF2 至少在啮齿类动物中是促进有丝分裂的主要生长因子^[6]。体外细胞培养试验已证明, IGF2 是肌细胞生长过程中的自分泌信号^[7], 早在 1986 年 Florini 等就提出 IGF2 是以浓度依赖的方式刺激肌纤维的增殖与分化的^[8]。肌束中肌纤维在分化过程中, 类胰岛素生长因子 1 受体 (insulin-like growth factor receptor- I, IGF1R) 的变化进一步证明了 IGF 在肌纤维生成中的作用^[9]。Darling 等首次克隆了鸡的 IGF2 基因^[10]。1996 年 Spencer 等通过给 4 周龄肉鸡注射 IGF2 (0.5 mg·kg⁻¹), 发现 IGF2 能直接或间接的改变血浆的 T3 ($P < 0.05$) 的含量, 影响腹脂的沉积^[11]。

随着分子生物学技术的发展, 分子标记辅助选择将有可能成为现代育种的有力手段。对于 IGF2 基因, 在人^[12]和鸡^[13]上已分别发现了与肥度性状相关的多态性位点, 在猪上发现 IGF2 基因和脂肪沉积有关^[14, 15]。本研究以鸡 IGF2 基因为影响脂肪性状的候选基因, 通过对鸡 IGF2 基因 exon2 进行 SNPs (single nucleotide polymorphisms) 检测, 比较不同品种 (系) 中的基因型频率, 并在肉鸡中分析不同基因型与生产性能的关系, 目的在于寻找与脂肪性状高度相关的遗传标记, 为低脂肉鸡的分子育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验鸡群和性状的测定

试验鸡群为东北农业大学动物科学技术学院鸡育种基地饲养的高、低脂双向选择品系第五世代肉鸡; 地方品种为北京油鸡、白耳鸡、石歧鸡以及海兰蛋鸡。肉鸡公鸡 7 周龄屠宰, 测量体重、屠体重、

半净膛、肝重、腹脂重。

1.2 主要试剂

引物由博亚生物公司合成; Taq DNA 聚合酶、pMD-18 T Vector 购自 PE 公司; dNTPs 购自 Amersham Pharmacia 公司; DNA 片段回收纯化试剂盒、小量质粒纯化试剂盒由上海华舜生物工程公司提供; 测序反应由上海博联生物信息有限公司完成。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

根据 GenBank 登录的鸡 IGF2 基因序列 (Accession No. S82962) 设计引物:

F1: 5' — GGAGGAGTGCTGCTTCCG — 3'

R1: 5' — TTTCCCTTTTCTCTCTTC — 3'

预期扩增 IGF2 外显子 2 178 bp 长的片段。

PCR 扩增反应体系为 25 μ l: 10 \times PCR buffer 2.5 μ l, 10⁻³ mmol·L⁻¹ dNTPs 2 μ l, 10⁻⁹ mmol·L⁻¹ 上下游引物各 0.5 μ l, Taq 酶 1.0 U, 50 ng· μ l⁻¹ DNA 模板 1 μ l, ddH₂O 18.3 μ l。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s 共 35 次循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保温。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 结束后用 UVP 凝胶成像系统分析检测扩增结果。

1.4 SSCP 分析

1 μ l PCR 产物和 5~6 μ l 的 loading buffer 即 98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯青、10 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0)、10% 甘油, 98 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 迅速插入冰中, 放置 5 min, 使之保持变性状态。16% 非变性聚丙烯酰胺凝胶, (Acr:Bis=29:1) 电泳。10V/cm 电泳 11~12 h 后, 银染显色。

1.5 克隆测序

经 SSCP 分析后, 取 2 个不同基因型纯合个体的 PCR 扩增产物用柱式胶回收试剂盒回收纯化。回收后的 DNA 片段用 pMD-18 T 载体连接, 并转化 JM109 菌株, 用华舜公司质粒提取试剂盒小量提取质粒, 双酶切鉴别。每一种基因型单独挑 1 个克隆分别测序。

1.6 统计分析

计算各种基因型个体在不同品种的分布, 进行独立性检验, 并在肉鸡群体中进行基因型与屠宰性状的最小二乘分析, 统计软件用 SAS 6.12。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

用设计的引物对不同品种鸡的 Genomic DNA 进行扩增, PCR 产物用 1% 琼脂糖检测。结果发现特

异性扩增良好，片段长度与预期的相符，可直接进行SSCP分析（图1）。

2.2 SSCP 检测结果

对PCR产物进行SSCP分析结果表现出3种基因型（AA、AB、BB）（图2）。

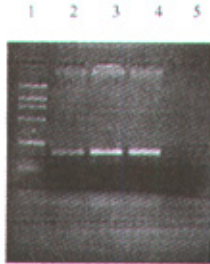
2.3 不同基因型的纯合子个体的克隆测序

取2个纯合基因型的片断进行回收，并克隆到载体。测序结果表明，多态位是由该段序列中的一个核苷酸的点突变造成的，AA型的基因序列和

GenBank（Accession No.S82962）中的一致，定义为野生型；BB型139处发生了C→G突变，定义为突变型，将突变后的核苷酸序列演绎成氨基酸序列后，发现该处的氨基酸没有改变仍是Ser。因此，该突变是一个沉默突变。

2.4 不同品种基因型和基因频率统计结果

对我国地方鸡种北京油鸡、白耳鸡、石岐杂以及肉鸡和海兰蛋鸡进行基因型检测，计算不同鸡种该基因的基因型频率和基因频率并进行卡方检验。基因型和基因频率统计结果见表1。独立性检验（ χ^2 ）总体结果表明，品种间基因型频率差异极显著（ $P < 0.01$ ）。进一步分析发现，基因型频率在海兰蛋鸡和肉鸡间的差异达到显著水平（ $P < 0.05$ ），而在其它任意2个鸡种间差异都达到极显著的水平（ $P < 0.01$ ）。



1. DL 2000 分子量标准；2~4. PCR 产物；5. 阴性对照
1. DL 2000 Marker; 2~4. PCR products; 5. Negative control

图1 PCR产物

Fig.1 PCR products



图2 不同基因型个体的SSCP结果

Fig. 2 SSCP analysis on PCR amplification with primer in different individuals

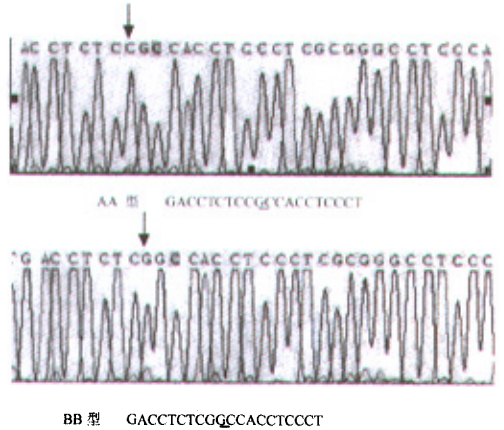


图3 AA和BB基因型139处的突变的测序峰

Fig.3 The mutant in 139 nucleotide acid between AA and BB genotype

表1 基因型和基因频率在不同品种间比较¹⁾

Table 1 The comparisons of frequencies of genotype and gene among different breeds

| 品种 (系) | 检测个体数 | AA | AB | BB | A | B | χ^2 |
|-------------|--------|-------------|-------------|------------|-------|-------|----------------------------------|
| Line | Number | | | | | | |
| 北京油鸡 | 109 | 0.312 (34) | 0.505 (55) | 0.183 (20) | 0.564 | 0.436 | $\chi^2 = 178.073$ $P < 0.01$ |
| Beijing you | | | | | | | |
| 白耳鸡 | 90 | 0.144(13) | 0.467(42) | 0.389(35) | 0.377 | 0.623 | |
| Baier | | | | | | | |
| 石岐杂 | 106 | 0.764 (81) | 0.217 (23) | 0.019 (2) | 0.873 | 0.127 | |
| Shiqiza | | | | | | | |
| 肉鸡 | 413 | 0.637 (263) | 0.305 (126) | 0.058 (24) | 0.789 | 0.211 | |
| Broiler | | | | | | | |
| 海兰蛋鸡 | 115 | 0.565 (65) | 0.417 (48) | 0.018 (2) | 0.774 | 0.226 | |
| Layer | | | | | | | |

¹⁾括号内是个体数 The figures in the brackets are the number of chicken

2.5 各种基因型与生产性能的相关研究

对肉鸡的 3 种基因型与屠体性状进行最小二乘分析, 表明, 基因型对活重、屠体重、半净膛重和肝脏重没有显著的影响 ($P > 0.05$), 而对腹脂重和腹脂率有显著影响 ($P < 0.05$)。

表 2 139 处突变不同基因型对屠体性状的多重比较¹⁾

Table 2 The muticomparison of primer 139 mutant genotypes in the weight and percentage of abdominal fat

| 基因型 Genotype | 个体数 Number | 腹脂重 Abdominal fat weight | 腹脂率均值 Percentage of abdominal fat |
|--------------|------------|--------------------------|-----------------------------------|
| AA | 71 | 47.83ab ± 2.45 | 0.0192ab ± 0.0009 |
| AB | 37 | 54.49a ± 3.27 | 0.0214a ± 0.0011 |
| BB | 7 | 37.83b ± 6.86 | 0.0152b ± 0.0024 |

¹⁾同一列间字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$) Different letters mean significant difference at 0.05 level

3 讨论

研究发现, IGF2 是影响动物胚胎生长分化的重要因子, 参与多种代谢的调节^[16]。在家禽循环水平上 IGF2 含量的增加导致了游离脂肪酸含量和腹脂垫重量的加大^[17, 18], 表明 IGF2 直接或间接的影响脂类的代谢。Spencer 等发现 IGF2 能直接或间接的改变血浆的 T3 ($P < 0.05$) 的含量, 使 T3 的含量降低, 进而降低了糖类代谢和氧化磷酸化中多种酶的活性, 增加了脂肪的沉积^[11]。1987 年 Decuypere 等也发现 T3 的含量与鸡的腹脂重呈正相关^[19]。IGF1R 的磷酸酪氨酸激酶途径是诱导脂肪细胞分化的主要信号通路^[20], 有试验表明家禽 IGF2 基因不与 IGF2R 结合, 可能通过 IGF1R 和胰岛素受体发挥作用^[21], 这样 IGF2 就可以诱导脂肪细胞分化, 影响家禽的脂肪代谢。

肥度性状是受多基因座位控制的, 影响肥度性状主基因的确定对低脂肉鸡的育种有重要意义。候选基因法是寻找畜禽 QTL 一种非常有效的方法, 它可以直接研究具有特定功能基因的多态性与经济性状之间的关系。本研究以鸡 IGF2 基因作为影响脂肪性状的候选基因进行 SNPs 检测, 结果在外显子 2 发现 1 个多态性位点。对我国地方鸡种北京油鸡、白耳鸡、石歧杂以及肉鸡和海兰褐蛋鸡进行基因型检测, 计算了不同鸡种的基因型频率和基因频率 (表 1)。通过独立性检验发现, 基因型频率分布与品种有关, 品种间基因型频率差异极显著 ($P < 0.01$)。进一步分析发现, 基因型频率在任意 2 个鸡种间差异都达到显著水平 ($P < 0.05$) 或极显著的水平 ($P < 0.01$)。白耳鸡和北京油鸡 B 基因频率高于其它品种, 海兰蛋鸡居中, 而石歧杂、AA 肉鸡 B 基因频

对 3 种基因型间的屠体性状进行多重比较, 结果见表 2。由表 2 可以看出, AA 和 AB 个体的腹脂重和腹脂率较高, 但差异不显著 ($P > 0.05$), BB 基因型最低, 并且和 AB 基因型间差异显著 ($P < 0.05$)。

率是 5 个群体中最低的。白耳鸡是一种体形较小的蛋用地方品种, 成年体重 1.0~1.2 kg (中国家禽品种志), 脂肪沉积较少, 北京油鸡是一种体形较小的蛋肉兼用型地方品种, 成年体重 1.6~1.7 kg (中国家禽品种志), 肌间脂肪分布良好, 肉质细致, 肉味鲜美, 腹脂沉积较少; 石歧杂鸡是肉用型地方品种, 成年体重 2.2~2.4 kg, 生长速度较白耳鸡、北京油鸡快, 有一定的脂肪沉积能力, 肉鸡由于多年的人工选择, 伴随着早期生长速度的提高, 有着极强脂肪沉积能力, 因此, 我们推测等位基因 B 可能影响体重和脂肪沉积, 其结果需进一步验证。在肉鸡对 3 种基因型与屠体性状进行了最小二乘分析, 在腹脂重和腹脂率上差异显著 ($P < 0.05$), BB 型个体腹脂重和腹脂率显著低于 AB 型的个体 ($P < 0.05$)。这 3 种基因型间在体重、屠体重、半净膛、肝重差异不显著。

由以上研究结果可见, IGF2 基因外显子 2 内的单核苷酸变异影响腹脂沉积量, 可以用该多态性位点 (IGF2-Exon2) 对鸡的腹脂性状进行分子标记辅助选择。

References

- [1] 李辉, 杨山. 控制鸡体内脂肪沉积的研究进展. 中国畜牧兽医学会第十届全国会员代表大会暨学术年会论文集(畜牧卷)北京: 中国农业大学出版社, 1996: 168-173.
- [2] Li H, Yang S. Research progress in genetic marker of body and abdominal fat in broiler. *Animal Science Abroad*, Beijing: China Agricultural University Press, 1996: 168-173. (in Chinese)
- [3] Rinderknecht E, Humbel R E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *Journal of Biology Chemistry*, 1978, 253(8): 2 769-2 776.
- [4] Rinderknecht E, Humbel R E. Primary structure of human

- insulin-like growth factor II. *FEBS Letter*, 1978, 89(2): 283-286.
- [4] Blundel T L, Bedarkar I S. Insulin-like growth factor: a model for tertiary structure accounting for immunoreactivity and receptor binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1978, 75(1): 180-184.
- [5] Vasilatos-Youngken R, Scanes C G. Growth hormone and insulin-like in poultry growth: required, optimal or ineffective. *Poultry Sciences*, 1991, 70: 1764-1780.
- [6] Dechiara T M, Efstratiadis A, Robertson E J. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth II gene. *Cell*, 1991, 64: 849-859.
- [7] Gerrard D E, Okamura C S, Ranalletta M A, Grant A L. Developmental expression and location of IGF-I and IGF-II mRNA and protein in skeletal muscle. *Journal of Animal Sciences*, 1998, 76(4): 1004-1011.
- [8] Florini J R, Ewton D Z, Falen S L, Van Wyk J J. Biphasic concentration dependency of stimulation of myoblast differentiation by somatomedins. *American Journal of Physiology*, 1986, 250: 771-778.
- [9] Florini J R, Magri K A, Ewton D Z, James P L, Grindstaff K, Rotwein P S. "Spontaneous" differentiation of skeletal myoblast is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266: 15917-15923.
- [10] Darling D C, Brickell P M. Nucleotide sequence and genomic structure of the chicken insulin-like growth factor-II (IGF-II) coding region. *General and Comparative Endocrinology*, 1996, 102(3): 283-287.
- [11] Spencer G S G, Decuyper E, Buyse J, Zeman M. Effect of recombinant human insulin-like growth factor II on weight gain and body composition of broiler chickens. *Poultry Sciences*, 1996, 75: 388-392.
- [12] Roth S M, Schrager M A, Metter E J, Riechman S E, Fleg J L, Hurley B F, Ferrell R E. IGF1 genotype and obesity in men and women across the adult age span. *International Journal of Obesity*, 2002, 26: 585 - 587.
- [13] 严炳学, 李 宁, 邓学梅, 胡晓湘, 刘兆良, 赵兴波, 连正兴, 吴常信. 鸡类胰岛素生长因子-II基因单核苷酸多态性与生长、屠体性状相关性的研究. *遗传学报*, 2002, 29(1): 30-33. Yan B X, Li N, Deng X M, Hu X X, Liu Z L, Zhao X B, Lian Z X, Wu C X. Single nucleotide polymorphism analysis in chicken insulin-like growth factor-II gene and its associations with growth and carcass traits. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(1): 30-33. (in Chinese)
- [14] Nezer C, Moreau L, Brouwers B, Coppieters W, Detilleux J, Hanset R, Karim L, Kvasz A, Leroy P, Eorges M. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs. *Nature Genetics*, 1999, 21: 155-156.
- [15] Jeon J T, Carlborg O, Tornsten A, Giuffra E, Amarger V, Chardon P, Andersson-Eklund L, Andersson K, Hansson I, Lundstrom K, Andersson L. A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 locus. *Nature Genetics*, 1999, 21: 157-158.
- [16] O' Dell S D. Day INM: Molecules in focus: Insulin-like growth factor II (IGF-II). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 1998, 30: 767-771.
- [17] McMurtry J P, Francis G L, Vasilatos-Youngken R. Metabolic responses of the chicken to an intravenous injection of either chicken (cIGF-I) or human insulin-like growth factor-I (hIGF-I). *Poultry Sciences*, 1996, 75(suppl 1): 47.
- [18] Huybrechts L M, Decuyper E, Buyse J, Kuhn E R, Tixier-boichard M. Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on weight gain, fat content, and hormonal parameters in broiler chickens. *Poultry Sciences*, 1992, 71: 181-187.
- [19] Decuyper E, Leenstra F R. Plasma levels of growth hormone and insulin-like growth factor-I and -II from 2 to 6 weeks of age in meat-type chickens selected for 6 week body weight or for feed conversion and reared under high or normal environmental temperature conditions. *Reproduction Nutrition Development*, 1993, 33: 361-372.
- [20] Yang Y W H, Robbins A R, Nissley S P. The chick embryo fibroblast cation-independent mannose 6-phosphate receptor is functional and immunologically related to the mammalian insulin-like growth factor-II (IGF-II)/man 6-P receptor but does not bind IGF-II. *Endocrinology*, 1991, 128: 1177-1189.
- [21] 金生浩, 廖 佩. 脂肪细胞分化的转录调控. *生命的化学*, 1999, 5: 216-219. Jin S H, Liao K. Transcription and regulation of fat cell. *Chemistry of Life*, 1999, 5: 216-219. (in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)