

草原红牛IGF2 基因外显子 4 的遗传多态性及遗传效应分析*

牛伟萍, 刘晶, 张金玉, 张明军**, 杨润军**, 赵志辉
吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062

摘要: 运用PCR-SSCP方法检测草原红牛IGF 2基因第4外显子的多态性, 采用最小二乘法拟合线性模型将突变位点的不同基因型与牛胴体和肉质性状进行关联分析。结果表明: 在外显子4上有1个SNP位点(C250G), 该基因具有AA和AB 2种基因型, 草原红牛AB基因型个体肋脂质量比AA基因型个体高3.1% ($P<0.05$), 骨质量和眼肌面积较AA基因型个体分别低15.7%和46.05% ($P<0.01$)。IGF2基因的遗传多态性可能直接影响草原红牛的肉质性状。

关键词: 草原红牛; 胰岛素样生长因子 2; 遗传多样性; 遗传效应

中图分类号: S603.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-5684(2011)

DOI:

网络出版地址:

Genetic Polymorphisms in Exon 4 of IGF 2 Gene of Red Cattle and Its Genetic Effects

NIU Wei-ping, LIU Jing, ZHANG Jin-yu, ZHANG Ming-jun, YANG Run-jun, ZHAO Zhi-hui
College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China

Abstract: The method of PCR-SSCP was used to study the genetic polymorphism of IGF2 gene exon 4 in Red Cattle. Using the linear model, the correlations of different genotypes of mutation points with the naked body and meat quality traits was analyzed. The results showed that there is a SNP site (C250G) in exon 4. The gene has two genotypes, AA and AB. In rib fat weight, genotype AB is 3.1% higher than genotype AA ($P<0.05$). Meanwhile, in bone weight and eye muscle area, genotype AB is 15.7% and 46.05% lower than genotype AA, respectively ($P<0.01$). The genetic polymorphism of the IGF2 gene Exon4 probably has direct genetic effects on meat quality traits in Red Cattle.

Key words: Red Cattle; IGF2 gene; genetic polymorphism; genetic effect

草原红牛是我国以英国短角牛为父本, 当地蒙古牛为母本经过级进杂交, 选择理想型个体进行横交固定培育而成的肉乳兼用型优良品种, 主要分布于吉林、内蒙古、河北、辽宁 4 个省区^[1]。

胰岛素样生长因子IGFs有 2 种类型, 即IGF1 和 IGF2, 它们在氨基酸水平上有约 70% 同源性。IGF2 在胎儿生长发育、肿瘤细胞增殖、肌肉生长等方面具有重要的调控作用^[2]。牛的IGF2 由 10 个外显子和 9 个内含子组成, 外显子 7、8、9 编码 181 个氨基酸组成的IGF2 前体, 外显子 1~6 非编码前导外显子, 其

中外显子 1、4、5、6 分别对应该基因的 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^[3-5]。

本研究以 IGF2 基因作为影响草原红牛肌肉生长发育和肉质性状的候选基因, 采用 PCR-SSCP 方法对 IGF2 基因外显子 4 的多态性进行研究, 分析其与肉质性状的关联性, 以期对草原红牛的分子育种提供理论依据。

* 基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2007BAD55B01), “863” 计划项目 (2008AA101010)

作者简介: 牛伟萍, 女, 硕士研究生, 主要从事生物化学和分子生物学研究。

收稿日期: 2010-08-24

网络出版时间:

** 通讯作者

1 材料和方法

1.1 试验动物

生长发育良好的8月龄草原红牛50头(公牛,吉林省农业科学院)。颈静脉采血,用ACD抗凝,-20℃保存备用。

1.2 性状测定

进行305d舍饲育肥,在育肥期结束时测定牛的体质量、胴体质量、肾脂质量、骨质量、净肉质量、肋脂质量、眼肌面积等性状。所有性状的测定根据国家标准GB/T1723821998执行。

1.3 基因组DNA提取

参照文献[6]提取牛基因组DNA。

1.4 引物的设计与合成

根据GenBank上牛IGF2的DNA序列,用Primer5软件设计该基因外显子4的序列引物,上游引物:5'-TGCGTTCCCGCAATTGG-3';下游引物:5'-CGCACTGAAGGTGACGCGAGAC-3',扩增长度为338bp,由上海生工公司合成。

1.5 PCR扩增

PCR扩增体系为2.5μL10倍PCR缓冲液,0.5μL0.01mmol/L引物,2.0μL2.0mmol/LdNTPs,0.125μL5U/μL Taq酶,1.0μL50mg/LDNA,反应体系为25μL。

PCR反应程序为95℃5min,然后94℃30s,62℃30s,延伸1min,32个循环,72℃延伸7min,4℃保存。PCR产物在2%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统分析检测扩增结果。

1.6 SSCP分析

取2μLPCR产物和8μL变性Buffer,沸水浴10min,然后冰浴10min,变性后的PCR产物用11%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,150V电压电泳19h,银染显色。如果条带泳动距离一致即表现为单态型,若有差异即为多态性,并确定个体基因型。

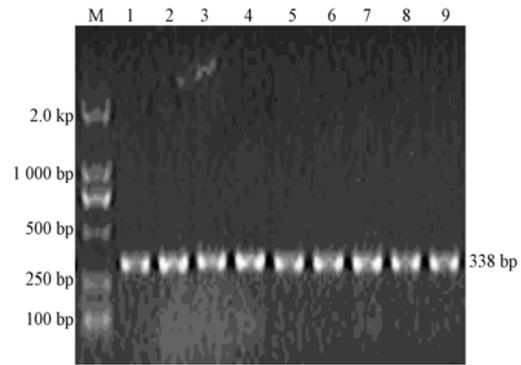
1.7 统计分析

采用二因素交叉分组试验设计。用最小二乘法拟合线性模型对数据进行非均衡资料的分析,对不同基因型间生产性状指标(平均数±标准差)差异显著性进行检验并进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 PCR-SSCP分析

以DNA为模版,用Exon4引物进行PCR特异性扩增,获得了较好的结果,片段长度与预期大小一致,且没有非特异性扩增(图1)。将PCR产物进行SSCP分析,在扩增片段上发现了多态性位点(图2)。



M.D2000 Marker; 1-9.Exon4 PCR扩增片段 Exon4 amplified fragment

图1 IGF2基因Exon4引物的PCR扩增产物

Fig. 1. Exon4 amplified fragment of IGF2 gene

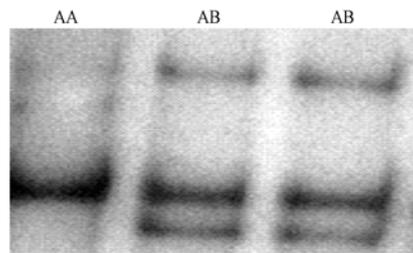


图2 SSCP检测结果

Fig.2. Patterns of SSCP for IGF2 Exon4

2.2 克隆测序及结果分析

将不同带型的PCR产物进行凝胶回收,连接pMD18-T载体,经DH5α转化,菌液经PCR鉴定和测序,结果显示,在250bp处有1个C→G的单碱基突变(图3)。将2种基因型分别命名为AA型和AB型。

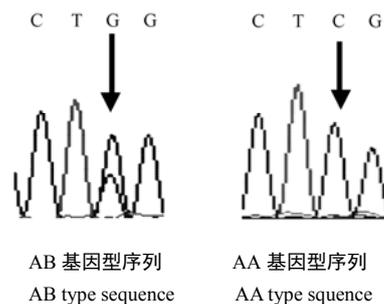


图3. IGF2的测序峰图

Fig.3. The ridge of sequencing of IGF2

2.3 基因型与基因频率的分布

由表1可知,草原红牛群体中IGF2基因AA基因型的频率最高。等位基因A的频率明显高于等位基因B的频率,说明等位基因A在群体中占有明显优势。

表1 IGF2基因的基因频率与等位基因频率
Table 1. Allele and genotype frequencies of IGF2 gene in Red Cattle

	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency	
	AA	AB	BB	A	B
检出数量 Number	33	17	0		
频率/% Frequency	66	34	0	0.81	0.19

2.4 基因型与生长性状的关联性分析

由表 2 可知，草原红牛在屠宰肉用性状方面，

表2 IGF2基因的Exon4不同基因型对草原红牛屠宰肉用性状的影响

Table 2. Least squares means of meat slaughter traits obtained for the genotype at the Exon4

基因型 Genotype	宰前活质量/kg SBW	胴体质量/kg HCW	肾脂质量/kg NAW	骨质量/kg BW	净肉质量/kg NMW	肋脂质量/kg RCW	眼肌面积/cm ² REA
AA (n=33)	532.091± 7.448	315.998±6.316	10.045±0.455	61.015±1.695 ^A	254.983±5.754	0.909±0.045 ^a	139.765±5.039 ^A
AB (n=17)	548.861±10.085	313.839±8.552	9.026±0.617	53.000±2.296 ^B	255.283±7.792	1.067±0.062 ^b	116.286±6.823 ^B

注：同行数据肩注不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Note: Superscript small letters of the same row data indicate significant difference ($P < 0.05$). Superscript capital letters indicate extremely significant difference ($P < 0.01$)

3 讨论

国内外学者在猪、牛等家畜的IGF2 内含子上发现部分多态位点。如Knoll等^[7]在猪的IGF2 基因的内含子 2 上发现 1 个SNP位点；VanLaere等^[8]在猪IGF2 基因内含子 3 上检测到 1 个突变位点；Vykoukalova等^[9]在IGF2 基因内含子 7 上检测到 2 个多态性位点；刘桂兰等^[10]在IGF2 基因内含子 8 上检测到 1 个NciI 多态性位点。在IGF2 基因的外显子上筛查SNP的研究相对较少，本研究在系统研究草原红牛肉质相关性状遗传标记的基础上，采用PCR-SSCP方法，从候选基因IGF2 的外显子中检测与牛肉质高度相关的突变位点。研究结果显示，在草原红牛IGF2 基因Exon4 上检测到IGF2-ex4-C250G 1 个多态性位点，该位点与草原红牛的肋脂质量及眼肌面积有显著的生物学意义。由于IGF2 基因的外显子 4 是编码外显子的基因，所以有可能引起氨基酸序列的改变，可能在基因是否表达及表达量多少方面起作用。

高雪等^[11]研究表明IGF2 基因内含子 7 上具有多态性位点，并表明不同的基因型在南阳牛，鲁西牛和中国西门塔尔牛间具有不同的分布情况。Vykoukalova等^[9]研究表明，猪IGF2 基因内含子 7 上多态性位点的基因型间背膘厚及瘦肉率的差异显著。本研究中检测到的多态性位点，基因型间骨质量和眼肌面积差异极显著，在肋脂质量方面有显著差异。最

IGF2 基因 2 种基因型间，AA 基因型个体宰前活质量、净肉质量、肋脂质量均低于 AB 基因型个体，胴体质量、肾脂质量、骨质量和眼肌面积均高于 AB 基因型个体。经 SPSS 软件运用 GLM 模型分析表明，IGF2 基因的 2 种基因型肋脂质量差异显著 ($P < 0.05$)，骨质量和眼肌面积 2 种基因型间差异极显著 ($P < 0.01$)，宰前活质量、胴体质量、肾脂质量和净肉质量 2 种基因型之间无显著差异 ($P > 0.05$)。AB 基因型个体肋脂质量比 AA 基因型个体高 3.1%，骨质量和眼肌面积比 AA 基因型个体低 15.7%和 46.05%。

小二乘法分析结果表明，在草原红牛群体中AB基因型个体肋脂质量比AA基因型个体高 3.1% ($P < 0.05$)，而骨质量和眼肌面积AB基因型个体较AA基因型个体低 15.7%和 46.05% ($P < 0.01$)。通过以上研究，所检测到的IGF2 基因的多态性位点可以作为屠宰肉用性状的遗传标记应用于标记辅助选择，为进一步选育、提高草原红牛肉用性能提供理论依据和技术支持。

参考文献：

- [1] 杨国忠, 张嘉保, 任文陟, 等. 草原红牛及其杂种牛群体遗传变异与肉用性能的微卫星标记研究[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37 (2): 128-133.
- [2] 陈照丽. IGF 系统的生物学功能及其与肿瘤的关系[J]. 国外医学: 分子生物学分册, 2003, 25 (1): 34-37.
- [3] 戴文鑫, 吴智勇. IGF-I 的生物学活性及其调节[J]. 中国热带医学, 2007, 7(10): 1890-1892.
- [4] 薛慧良, 徐来祥. 猪 IGF2 外显子 3 的遗传多态性及遗传效应分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(7): 643-648.
- [5] 虞德兵. 猪 IGF-II 基因变异对猪生长性状及肌肉发育相关基因表达的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2007: 6.
- [6] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南[M]. 2 版, 北京: 科学出版社, 1996.
- [7] Knoll A, Putnova L, Dvorak J, et al. A Nci I PCR-RFLP within intron 2 of the porcine insulin-like growth factor-2b (IGF2) gene[J]. Anim Genet, 2000, 31(2): 150-151.
- [8] Van Laere A S, Nguyen M, Braunschweig M, et al. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the

4 吉林农业大学学报 2011年02月

pig[J]. Nature, 2003,425(6960):832-836

[9]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]. J Anim Breed Genet, 2006,123(3) :204-207

[10]刘桂兰,蒋思文,熊远著等.IGF2 基因 PCR-RFLP 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.

[11]高雪,徐尚忠.牛类胰岛素生长因子 IGF-I 基因研究[J].畜牧兽医学报,2006,37(12): 1245-1249.