

# 猪 IGF2 基因 G3072A 位点多态性及其与 大白猪初生重和早期生长的关系

孙 亿<sup>1</sup>, 费思清<sup>1</sup>, 唐 辉<sup>1</sup>, 武 英<sup>2</sup>, 樊新忠<sup>1</sup>, 姜运良<sup>1\*</sup>

(1. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018; 2. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所, 济南 250100)

**摘要:** 本研究采用 PCR-SSCP 技术对猪胰岛素样生长因子 2(IGF2) 基因 G3072A 位点在大白、长白和杜洛克猪群体的单核苷酸多态性(SNP)进行了检测, 对其与大白猪初生重和早期生长的关系进行了分析。结果表明, 在所分析的大白、长白和杜洛克猪群体的 511 个体中, IGF2 基因在该位点均呈现多态性, 大白、长白和杜洛克猪群体 AA、AB 和 BB 基因型均有分布, 且大白和长白猪群体均显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡( $P < 0.01$ ), 而杜洛克猪群未偏离 Hardy-Weinberg 平衡( $P > 0.05$ )。测序结果显示, 等位基因 A 和 B 分别对应于核苷酸 A 和 G, 在 A 等位基因中, 有 (AG) 二核苷酸的插入。关联分析表明, 在大白猪群中, AA、AB 和 BB 基因型个体的初生重差异显著( $P < 0.05$ ), AA 和 AB 基因型个体的 21、28 和 70 日龄体重以及从出生~21 日龄、21~28 日龄、28~70 日龄的日增重差异不显著( $P > 0.1$ )。

**关键词:** 猪; IGF2 基因; G3072A; 多态性; 初生重; 早期生长

中图分类号: S828.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)12-1306-05

## Polymorphism of G3072A in IGF2 Gene and Its Association with Birth Weight and Early Growth Traits in Yorkshire Pigs

SUN Yi<sup>1</sup>, FEI Si-qing<sup>1</sup>, TANG Hui<sup>1</sup>,

WU Ying<sup>2</sup>, FAN Xin-zhong<sup>1</sup>, JIANG Yun-liang<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; 2. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Academy of Agricultural Sciences of Shandong Province, Jinan 250100, China)

**Abstract:** By use of PCR-SSCP approach, the present study analyzed the single nucleotide polymorphism (SNP) at G3072A site of IGF2 intron 3 in Yorkshire, Landrace and Duroc pigs. The association of the polymorphism with birth weight and early growth traits were as well analyzed in Yorkshire pigs. The results indicated that the genotypes AA, AB and BB were found in Yorkshire, Landrace and Duroc pig populations, and the populations of both Yorkshire and Landrace pigs were in a state of Hardy-Weinberg equilibrium ( $P < 0.01$ ), whereas the Duroc pig population was not ( $P > 0.05$ ). Sequencing demonstrated that A and B alleles correspond to nucleotide A and G, respectively. In addition, for A allele, a (AG) dinucleotide was inserted at the 10-11<sup>th</sup> position downstream the mutation site. Association analysis indicated that the least square means of birth weight of AA, AB and BB pigs differ significantly ( $P < 0.05$ ), whereas body weight at 21, 28 and 70 days and average daily gain of body weight from birth to 21 days, from 21 days to 28 days and from 28 to 70 days of AA and AB individuals were not significantly different in Yorkshire pigs ( $P > 0.1$ ).

**Key words:** pig; IGF2 gene; G3072A; polymorphism; birth weight; early growth

收稿日期: 2006-11-23

基金项目: “863” 高新技术项目 (2006AA10Z1E1)

作者简介: 孙 亿 (1981-), 女, 山东济南人, 硕士, 主要从事动物分子遗传学研究

\* 通讯作者: 姜运良, 教授, 博导, 主要从事动物分子遗传育种学研究, E-mail: ylijiang723@yahoo.com.cn

胰岛素样生长因子 2 (Insulin-like growth factor 2, IGF2) 在动物细胞的增殖、分化、细胞凋亡和转化中具有重要作用<sup>[1]</sup>。IGF2 的表达水平与动物骨骼肌的发育调控有关<sup>[2]</sup>, 是影响猪产肉性能的主要功能基因之一。Van 等的研究表明, 位于 IGF2 基因内含子 3 的 3072 位点的 G/A 多态与猪的骨骼肌发育有关, 父本表达的 3072A 等位基因使出生后个体骨骼肌 IGF2 的 mRNA 表达水平增加 3 倍以上, 从而使猪的瘦肉率增加<sup>[3]</sup>。Van 等采用 Pyrosequencing 方法确定猪在 IGF2 内含子 3 的 3072 G/A 位点的基因型。由于该方法需要特殊的仪器, 一般的实验室和育种场的条件难以满足, 因此, 建立一种更加简便的检测方法十分必要。

本研究建立了一种检测该多态位点的 PCR-SSCP 方法, 便于在育种场或养殖户进行群体的检测; 通过对两个猪场大白、长白和杜洛克猪 3 个品种 511 个体的检测, 证明了该方法的有效性和该多态位点在群体中的多态性; 估计了该位点与大白猪初生重、21、28 和 70 日龄体重及日增重的关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

猪的耳组织样取自济宁原种猪场和山东省农业科学院种猪场。限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、*Eco*R I, Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit、pMD18-T 载体、X-gal、IPTG、LA *Taq* 酶、2×GC buffer II, dNTPs 等均购自 TaKaRa(大连)公司。引物合成于上海生工生物技术服务公司; 其它常规试剂  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、NaCl、NaOH、Tris、EDTA、氯仿、乙醇、琼脂糖、溴化乙锭、硼酸、SDS、EB、丙烯酰胺、硝酸银、TEMED、甘油、过硫酸铵等均为国产分析纯。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取按常规方法进行<sup>[4]</sup>, 采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测基因组 DNA 的浓度和纯度, -20℃ 保存。

### 1.3 PCR 扩 增

根据猪 IGF2 的核苷酸序列在内含子 3 的 3 072G/A 多态位点的两侧分别设计上游引物 IGFf (5'-ACC GAG CCA GGG ACG AGC CT-3') 和下游引物 IGFr (5'-TAC GAG GCC CGC GGA CT-3')。PCR 反应体系 (25  $\mu\text{L}$ ) 各组分及含量如下: 2×GC buffer II 12.5  $\mu\text{L}$ , 0.8 mmol/L 的 dNTPs, 1

$\mu\text{mol/L}$  IGFf 引物, 1  $\mu\text{mol/L}$  IGFr 引物, 1 U LA *Taq* DNA 聚合酶和 1  $\mu\text{L}$  基因组 DNA (30~100 ng)。PCR 扩增按照 94℃ 预变性 2.5 min; 94℃ 30 s, 67℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环 30 次; 72℃ 延伸 7 min。PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的产量和特异性。

### 1.4 多态位点的检测

在 PCR 管中加入 5  $\mu\text{L}$  的变性上样缓冲液 (98% 甲酰胺, 10 mmol/L EDTA pH 8.0, 0.025% 二甲苯青 FF, 0.025% 溴酚兰, 10% 甘油), 然后加入 1  $\mu\text{L}$  的 PCR 产物, 混匀并做好标记后 95℃ 变性 5 min, 然后迅速放入冰浴中冷却备用。变性后的 PCR 产物通过 15% 的聚丙烯酰胺凝胶 (丙烯酰胺:N,N-亚甲双丙烯酰胺的比例为 29:1, 加 5% 甘油) 电泳和银染显色。根据单链构象的不同分辨 3 种基因型。具体操作参见文献 [5]。

### 1.5 克隆、测序与序列比对

将 PCR 产物 200  $\mu\text{L}$  于 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳 30 min, 用 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit 纯化回收的扩增产物, 与 pMD18-T 载体连接, 常规方法<sup>[6]</sup>转化 DH5 $\alpha$ , 经 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切鉴定后测序。每个个体至少测 3 个克隆, 以消除测序造成的偏差。序列比对用 DNAMAN 5.2.2 软件包进行。

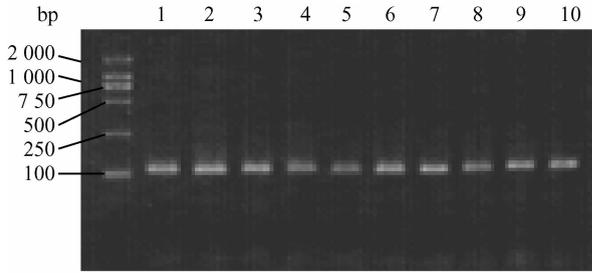
### 1.6 统计 分析

对各群体用  $\chi^2$  检验, 分析在该多态位点群体是否偏离 Hardy-Weinberg 平衡。用统计软件包 SAS8.2 中的 PROC GLM 程序分析该位点不同基因型对大白猪初生重、21、28 和 70 日龄体重及日增重的关系; 其中, 基因型效应 (3 个水平)、场-年-季效应 (3 个水平)、性别效应 (2 个水平) 作为固定效应, 窝产仔数效应作为协变量以校正其对初生重和早期生长的影响。

## 2 结 果

### 2.1 猪 IGF2 基因包含内含子 3 的 3 072G/A 位点的 PCR 扩 增

PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 结果如图 1 所示, 可见 PCR 扩增具有较高的特异性, 扩增片段大小约为 120 bp, 与根据猪 IGF2 基因登录的序列预测的大小相同。扩增的特异性和片段大小适合用 PCR-SSCP 方法进行 SNP 检测。



1~10. PCR 扩增结果;M. DL2000 marker

Lanes 1-10. PCR amplifications; M. DL2000 marker

图1 猪 *IGF2* 基因包含内含子3的3072位点G/A多态的PCR扩增(1.5%琼脂糖)

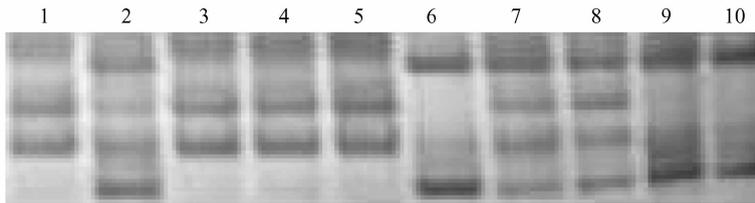
Fig. 1 PCR amplification of the region flanking intron 3 3072 G/A polymorphism of porcine *IGF2* gene (1.5% agarose)

## 2.2 猪 *IGF2* 基因内含子3的3072位点G/A多态的检测

用含5%甘油的15%聚丙烯酰胺凝胶电泳进行SSCP分析,结果(图2)可明显区分为AA型(1,3,4,5泳道)、BB型(6,9,10泳道)和AB型(2,7,8泳道)3种基因型。

## 2.3 猪 *IGF2* 基因内含子3的3072位点G/A多态在大白、长白和杜洛克猪群体中的分布

对大白、长白和杜洛克猪3个猪群 *IGF2* 基因内含子3 G3072A位点多态的检测结果如表1所示。在总计511头猪中,大白猪331头,等位基因A、B的频率分别为0.5695和0.4305,大白猪群体在该多态性位点显著偏离Hardy-Weinberg平衡



1,3,4,5. AA型;6,9,10. BB型;2,7,8. AB型

1,3,4,5. AA;6,9,10. BB;2,7,8. AB

图2 猪 *IGF2* 基因内含子3的3072位点G/A多态位点的基因型分析

Fig. 2 Genotyping of intron 3 3072 G/A polymorphism of porcine *IGF2* by SSCP

( $\chi^2=37.038, P<0.01$ )。在119头长白猪中,等位基因A、B的频率分别为0.3067、0.6933,在该多态性位点显著偏离Hardy-Weinberg平衡( $\chi^2=10.33, P<0.01$ )。在检测的61头杜洛克中,A、B的等位基因频率分别为0.9508和0.0492,在该多态性位点未偏离Hardy-Weinberg平衡( $\chi^2=0.78, P>0.50$ )。可见,在所检测的3个品种中,在该多态位点的等位基因分布不同,杜洛克以等位基因A

占优势,大白猪等位基因A和B的频率接近,长白猪等位基因B的频率高于等位基因A的频率。

## 2.4 3072多态位点基因型AA和BB的序列比较

测序结果(图3)显示,AA和BB基因型相比,有一个碱基由G/A的转换:在内含子3的3072位点,A等位基因的核苷酸序列为A,B等位基因的核苷酸序列为G。另外,与B等位基因相比,A等位基因在G/A多态位点后第10-11个核苷酸位置有

表1 3个猪群 *IGF2* 基因内含子3 3072位点G/A多态位点的基因型频率和基因频率

Table1 Genotypic frequency and allelic frequency of porcine *IGF2* intron 3 3072 G/A polymorphism

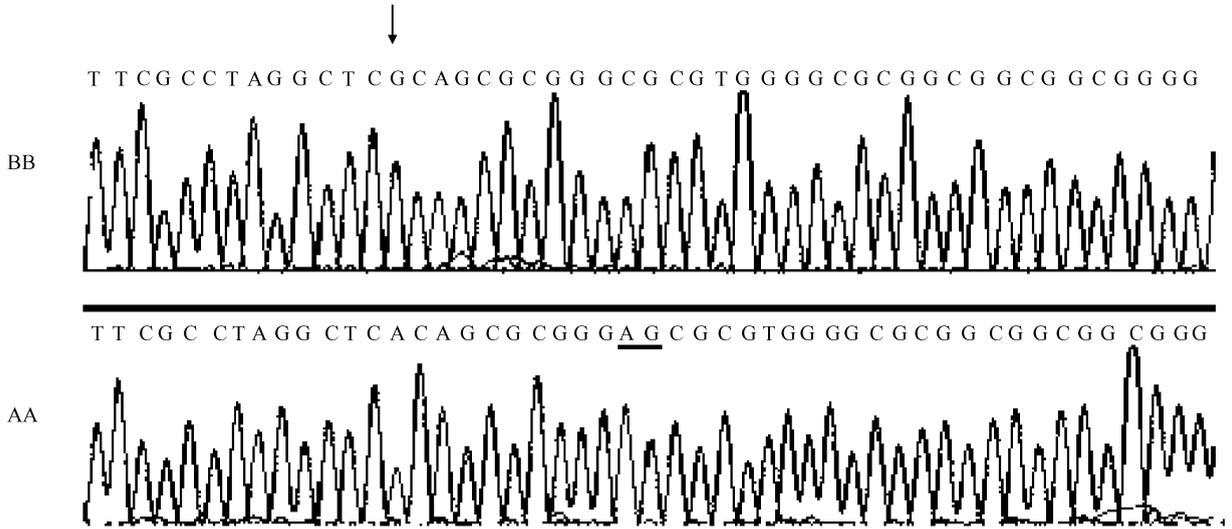
| 品种 Breeds        | 个体数 Number | 基因型频率(个体数)                     |                 |                | 等位基因频率             |        |
|------------------|------------|--------------------------------|-----------------|----------------|--------------------|--------|
|                  |            | Genotypic frequencies (number) |                 |                | Allele frequencies |        |
|                  |            | AA                             | AB              | BB             | A                  | B      |
| 大白猪<br>Yorkshire | 331        | 0.4109<br>(136)                | 0.3172<br>(105) | 0.2719<br>(90) | 0.5695             | 0.4305 |
| 长白<br>Landrace   | 119        | 0.1597<br>(19)                 | 0.2941<br>(35)  | 0.5462<br>(65) | 0.3067             | 0.6933 |
| 杜洛克<br>Duroc     | 61         | 0.9016<br>(55)                 | 0.0984<br>(6)   | 0.0000<br>(0)  | 0.9508             | 0.0492 |

一个(AG)二核苷酸的插入。

### 2.5 3 072 多态位点不同基因型与大白猪初生重和早期生长的关系

对 *IGF2* 基因 3072 位点 G/A 多态与大白猪初生重和早期生长的关系进行了分析。3 种基因型大白猪个体的初生重的最小二乘均值 AA 高于 AB 和

BB( $P < 0.05$ ), AB 基因型个体 21、28 和 70 日龄体重以及从出生~21 日龄、出生~28 日龄和 28~70 日龄之间的日增重的最小二乘均值均高于 AA 型, 但差异并不显著( $P > 0.1$ )。由于在该猪群中没有检测到有早期生长性状记录的 BB 基因型个体, 因此未做分析。



箭头所指为 3072 位点 G/A 多态, 下划线指示 AA 基因型中有一 AG 二核苷酸的插入

The G/A mutation is indicated by an arrow, a (AG) dinucleotide insertion is underlined

图 3 猪 *IGF2* 基因内含子 3 3072 位点 G/A 多态位点 AA 和 BB 基因型的序列比较

Fig. 3 Sequencing and comparison of genotypes AA and BB at intron 3 3072 G/A polymorphism site of porcine *IGF2* gene

表 2 大白猪 *IGF2* 基因内含子 3 3072 位点 G/A 多态位点不同基因型个体生产性能的最小二乘均值

Table 2 Least squares means of performance of three genotypes at the 3072 G/A site of *IGF2* in Yorkshire

| 性状<br>Trait   | 基因型 Genotypes                     |                                   |                                  |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
|   | AA                                | AB                                | BB                               |
| 初生重/kg<br>Birth weigh                                 | 1.40±0.02 <sup>a</sup><br>(n=136) | 1.31±0.02 <sup>b</sup><br>(n=105) | 1.27±0.03 <sup>b</sup><br>(n=17) |
| 21 日龄体重/kg<br>Body weight at 21 d                     | 6.80±0.11<br>(n=93)               | 6.82±0.26<br>(n=17)               | —                                |
| 28 日龄体重/kg<br>Body weight at 28 d                     | 8.33±0.16<br>(n=93)               | 8.71±0.38<br>(n=17)               | —                                |
| 70 日龄体重/kg<br>Body weight at 70 d                     | 28.33±0.50<br>(n=93)              | 28.92±0.19<br>(n=17)              | —                                |
| 0~21 日龄日增重/g<br>Average daily gain from 0 d to 21 d   | 253.1±5.2<br>(n=93)               | 254.2±12.2<br>(n=17)              | —                                |
| 0~28 日龄日增重/g<br>Average daily gain from 0 d to 28 d   | 244.5±5.6<br>(n=93)               | 258.2±13.6<br>(n=17)              | —                                |
| 28~70 日龄日增重/g<br>Average daily gain from 28 d to 70 d | 477.7±10.6<br>(n=93)              | 495.3±25.7<br>(n=17)              | —                                |

<sup>a,b</sup> 同一行的均值上不同的肩标表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

<sup>a,b</sup> means in the same column lacking a common superscript differ at  $P < 0.05$

### 3 讨论

*IGF2* 是控制畜禽骨骼肌和脂肪沉积的重要基因之一。李志辉等、王根宇等的研究表明 *IGF2* 外显子 2 的 139 处 C/G 点多态与鸡的腹脂重和腹脂率有关<sup>[7,8]</sup>。Van 等的研究证实了 *IGF2* 基因内含子 3 的 3 072 位点 G/A 多态同时使猪的瘦肉率增加和背膘厚降低,是一个影响瘦肉率和肉质的重要数量性状核苷酸(Quantitative trait nucleotide, QTN)<sup>[3]</sup>。刘桂兰等发现 *IGF2* 第 8 内含子片段的两个 *Nci* I 酶切位点的多态性与大白猪×梅山猪 F<sub>2</sub> 代成年猪肌肉量、肥肉量和背膘厚有关,但对肌内脂肪没有影响<sup>[9]</sup>。刘鑫等发现 *IGF2* 内含子 2 的 *Nci* I 酶切位点的多态性<sup>[10]</sup>与杜洛克、长白、大白猪的生长速率有关,等位基因 A 对猪的生长具有正效应<sup>[11]</sup>。

我国曾多批次引进大白猪、长白、杜洛克等瘦肉型品种猪,其中 *IGF2* 内含子 3 3072 位点 G/A 多态的分布情况值得调查。本研究对该位点的检测方法、多态性及对大白猪初生重及早期生长的效应进行分析。在该多态位点的检测方面, Van 等采用 Pyrosequencing 的方法,但该方法需要专门的仪器,价格昂贵<sup>[3]</sup>, Carrodeguas 等建立了实时 PCR 检测方法,通过荧光标记含多态位点的一段序列区分不同基因型<sup>[12]</sup>。本研究建立了一种 PCR-SSCP 方法,经测序证明该多态性正是由内含子 3 的 3 072 位点 G/A 多态造成;与 Van 等和 Carrodeguas 等所使用的方法相比,本研究所建立的方法简便、实用,一般的育种场经过简单配置即可进行检测。

本研究在 AA 基因型的个体中发现了(AG)二核苷酸的插入,而在 BB 基因型核苷酸序列的对应位置无插入,这一点未见其他作者报道。群体的多态性分析表明,在所检测的猪群中对瘦肉率不利的 B 等位基因<sup>[3]</sup>在大白猪和长白猪中仍有较高的比例,说明在猪的育种工作中在使用上述品种时,仍需对该位点进行检测。

本研究对该多态与大白猪初生重、21、28 和 70 日龄体重以及日增重关系的分析结果显示,该多态与猪的初生重及早期生长速度无关,与 Jeon 等通过 QTL 定位方法所得到的结果<sup>[12]</sup>相一致。

本研究所建立的检测方法具有准确、简便、快速和检测费用低等优点,能用于优质瘦肉猪的选育和商品猪的选择以改善猪的胴体性状。

### 参考文献:

- [1] 蒋思文, 彭 健, 熊远著. 胰岛素样生长因子 2 研究进展[J]. 遗传, 2004, 26(2): 271~273.
- [2] Florini J R, Ewton D Z, McWade F J. IGFs, muscle growth, and myogenesis[J]. Diabetes Rev, 1995, 3: 73~92.
- [3] 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 pig[J]. Nature, 2003, 23(425): 832~836.
- [4] 姜运良, 杜立新, 张 玲, 等. 山东引进良种猪 *RYR1* 基因的测定[A]. 杜立新. 中国动物遗传育种研究进展[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997. 94~97.
- [5] 姜运良, 李 宁, 习欠云, 等. 猪雌激素受体基因(ESR)点多态的 PCR-SSCP 检测[J]. 遗传, 2000, 22(4): 214~216.
- [6] Sambrook, J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- [7] 李志辉, 王启贵, 赵建国, 等. 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[J]. 中国农业科学, 2004, 37(4): 600~604.
- [8] 王根宇, 颜炳学, 邓学梅, 等. *IGF2* 基因对鸡生长及屠体性状的影响及印记状况的研究[J]. 中国科学(C辑), 2004, 34(5): 429~435.
- [9] 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关联分析[J]. 遗传学报, 2003, 12(30): 1 107~1 112.
- [10] Knoll P, Dvora K J, Cepica S A. *Nci* I PCR-RFLP within intron 2 of the porcine insulin-like growth factor-2 (*IGF2*) gene[J]. Animal Genetics, 2000, 31: 150~151.
- [11] 刘 鑫, 施启顺, 柳小春, 等. 不同猪种 *IGF2* 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(自然科学版), 2006, 32(1): 63~66.
- [12] Carrodeguas J A, Burgos C, Moreno C, et al. Incidence in diverse pig populations of an *IGF2* mutation with potential influence on meat quality and quantity: An assay based on real time PCR (RT-PCR) [J]. Meat Science, 2005, 71: 577~582.
- [13] Jeon J T, Carlborg Ö, Törnsten A, et al. A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pig maps to the *IGF2* locus[J]. Nature Genetics, 1999, 21: 156~158.