

鸡 *IGF-1R* 基因序列变异与骨骼、 体重性状的相关研究*

王佩佩, 李晓存, 冷丽, 王守志**, 李辉**

(农业部鸡遗传育种重点实验室,
黑龙江省普通高等学校动物遗传育种与繁殖重点实验室,
东北农业大学动物科学技术学院 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要 以东北农业大学 F_2 资源群体为试验材料, 采用 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 对胰岛素样生长因子-1 受体 (*IGF-1R*) 基因 130 936 bp 区域内的 7 个多态性位点 (g.26636C>T, g.101698A>G, g.111012C>G, g.115412A>C, g.115463T>C, g.123900G>A 和 g.130936T>C) 进行多态性检测和基因分型, 利用 Haploview 软件对 *IGF-1R* 基因进行 tag SNPs 筛选。结果显示, g.26636C>T, g.101698A>G, g.111012C>G, g.115412A>C 和 g.115463T>C 多态性位点为 *IGF-1R* 基因的 tag SNPs, g.115463T>C, g.123900G>A 和 g.130936T>C 3 个多态性位点彼此之间强连锁, 处于一个单倍型块中 ($r^2 > 0.8$), g.115463T>C 是单倍型块的 tag SNP。进一步研究 tag SNPs 对鸡生长和体组成性状的影响, 发现 g.115463T>C 对绝大部分骨骼和体重性状有显著或接近显著的影响。因此推断影响鸡骨骼生长发育和 6~12 周龄体重的 QTL 可能位于此单倍型块内或处于与此单倍型块紧密连锁的下游区域。

关键词 鸡, 胰岛素样生长因子-1 受体 (*IGF-1R*), 连锁不平衡 (LD), 骨骼, 体重

Association Analysis between Chicken *IGF-1R* Gene Sequence Variations and Skeleton Body Weight Traits*

WANG Peipei, LI Xiaocun, LENG Li, WANG Shouzhii**, LI Hui**

(Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding of Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Education Department of Heilongjiang Province, College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract PCR-RFLP and PCR-SSCP were used to detect the seven polymorphisms of insulin-like growth factor 1

收稿日期 2014-04-03

修回日期 2014-05-19

*基金项目 国家高技术研究发展计划 863 项目 (2011AA100301);

国家肉鸡产业技术体系建设资助项目 (CARS-42) 东北农业大学创新团队发展计划 (CXT006)

**通讯作者 E-mail shouzhiiwang@126.com;

lihui@neau.edu.cn

receptor (*IGF-1R*) gene (g.26636C>T, g.101698A>G, g.111012C>G, g.115412A>C, g.115463T>C, g.123900G>A and g.130936T>C) in Northeast agricultural university F₂ resource population. The haplotype block and tag SNPs were detected by the software of Haploview. The tag SNPs of *IGF-1R* gene were g.26636C>T, g.101698A>G, g.111012C>G, g.115412A>C and g.115463T>C. The polymorphisms of g.115463T>C, g.123900C>T and g.130936T>C were in strong linkage disequilibrium (LD) and formed a haplotype block ($r^2 > 0.8$), and g.115463T>C was the tag SNP of haplotype block. Association analysis indicated that g.115463T>C was significantly related to the majority of skeleton and body weight traits in chickens. The correlations revealed that the region of haplotype block or downstream region of *IGF-1R* gene might exist QTL which had an important influence on growth and development of skeleton and body weight in 6 to 12 weeks age chicken.

Key words: chicken; insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R); linkage disequilibrium (LD); skeleton; body weight

胰岛素样生长因子-1受体(IGF-1R)是动物生长轴上重要的因子,对胚胎期和出生后生长十分必要,在免疫调节、淋巴细胞生成、肌肉和骨骼生长方面起着重要的作用^[1]。目前在人、鼠等物种对*IGF-1R*基因的研究均有报道,*IGF-1R*基因改变会影响IGF-1R的生理功能,甚至会导致生长受阻、肿瘤和其它一些疾病^[2]。鸡IGF-1R由单个基因编码,属于酪氨酸激酶受体家族(RTK)^[3],位于鸡10号染色体,基因全长150 kb,由21个外显子构成,mRNA全长4 698 bp,编码1 363个氨基酸残基。作为IGFs(IGF-I、IGF-II)唯一受体,鸡*IGF-1R*基因在结构与胰岛素受体高度相似,对IGFs发挥功能非常重要,是影响鸡生长和体组成性状的重要候选基因^[4]。

本研究以东北农业大学F₂资源群体为试验材料,应用PCR-RFLP、PCR-SSCP方法对鸡*IGF-1R*基因的7个多态性位点进行基因型检测,利用Haploview软件筛选tag SNPs,分析tag SNPs与生

长和体组成性状的关系,寻找与体重和骨骼性状相关的遗传标记,为肉鸡生长和体组成遗传基础研究和分子育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验鸡群和性状度量

以东北农业大学F₂资源群体4个家系共283只鸡为试验材料,试验鸡群按常规方法进行饲养管理。12周龄时翅静脉采血,EDTA抗凝,酚、氯仿抽提DNA之后,TE溶解-20℃保存。

测定初生重,1~12周龄体重,4、6、8、10和12周龄跖骨长、跖骨围,之后屠宰,测量屠体重、龙骨长、胸宽、股骨长、股骨重、胫骨长、胫骨重和跖爪重,并除以12周龄活重计算相应的比率。

1.2 引物设计

根据卞立红^[5]提供的SNPs信息和鸡基因组序列,使用Primer 5.0设计7对引物(见表1),引物由北京英骏生物公司合成。

表1 引物序列

位点	引物序列	退火温度(℃)	扩增长度(bp)	扩增区域	检测方法
g.26636C>T	F 5'-CTTGAGGAACATAACCCG-3' R 5'-TGGAGGTCTTCTCGCAC-3'	55.3	194	Exon2	PCR-SSCP
g.101698A>G	F 5'-AAGCACGGTTCTCCTCACGC-3' R 5'-TACAACACCACCACCCATTTCG-3'	51.8	708	Intron2	PCR-RFLP
g.111012C>G	F 5'-GCTCACATTCCTTGCCCTTCT-3' R 5'-TTTGGCTCCCATTCGGTAT-3'	53.0	341	Exon3	PCR-RFLP
g.115412A>C	F 5'-GGACTGGAACCATCATAAC-3' R 5'-TAAACTTACAAGAGGCTCTC-3'	54.0	176	Exon5	PCR-SSCP
g.115463T>C	F 5'-GTGACGGGATATGTGAAG-3' R 5'-GAGACTTAGCCTCTTGTGG-3'	56.0	168	Exon5	PCR-SSCP
g.123900G>A	F 5'-TTGGCTAATGGCTACTTTG-3' R 5'-GTGCGTCATATTATCTTTTCG-3'	52.4	177	Exon8	PCR-SSCP
g.130936T>C	F 5'-GAAATCAAGTATGGGCAGTA-3' R 5'-TAAACCTGGATTCTCTGAGG-3'	51.0	162	Exon12	PCR-RFLP

1.3 多态性检测

本研究共检测7个多态性位点,具体检测情况见图1。其中g.26636C>T、g.115412A>C、g.115463T>C和g.123900G>A突变位点利用SSCP方法进行基因型检测,反应条件:1 μL PCR产物、4 μL变性上样缓冲液,利用14%聚丙烯酰胺凝胶电泳判别基因型。

g.101698A>G和g.111012C>G突变位点利用RFLP方法进行基因型检测,反应条件:5 μL PCR产物、3 U *Tth*111 I内切酶、2 μL缓冲液和12.9 μL ddH₂O混合,37℃过夜,利用琼脂糖凝胶电泳判别基因型。

g.130936T>C突变位点RFLP反应条件:5 μL PCR产物、3U *Afa* I内切酶、2 μL缓冲液和12.9 μL ddH₂O混合,37℃过夜,3 μL酶切产物、4 μL的非变性上样缓冲液,利用14%聚丙烯酰胺凝胶电泳判别基因型。

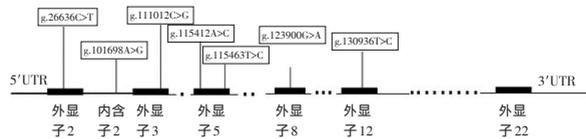


图1 IGF-1R基因多态性位点的检测情况

1.4 相关分析统计模型的建立

根据东北农业大学F₂资源群体的特点,构建线性模型如下:

$Y = \mu + H + G + S + G \times H + G \times S + F + D(F) + BW_{12} + e$,其中Y为性状观察值,μ为群体均值,H为孵化批次固定效应,G为基因型固定效应,S为性别固定效应,G×H为基因型与孵化批次的互作效应,G×S为基因型与性别的互作效应,F为家系随机效应,D(F)为家系内母鸡的随机效应,BW₁₂为协变量,e为剩余值。采用统计软件JMP4.0检验基因型与性状间的相关程度,并估计性状的最小二乘均值。本研究相关分析中P<0.05为显著影响,P<0.01为极显著影响,P<0.2为一定程度影响。

2 结果与分析

2.1 变异位点基因分型

针对g.26636C>T、g.115412A>C、g.115463T>C和g.123900G>A突变位点分别用设计的引物进行PCR扩增,扩增片段与目的片段大小一致且特异性较好,PCR产物采用PCR-SSCP方法进行基因分型,其中图2为g.115463T>C位点的分型胶图;

针对g.101698A>G、g.111012C>G和g.130936T>C突变位点分别用设计的引物进行PCR扩增,扩增片段与目的片段大小一致且特异性较好,PCR产物采用PCR-RFLP方法进行基因分型,其中图3为g.111012C>G位点的分型胶图。

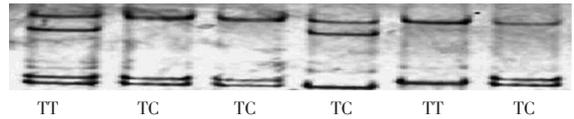


图2 IGF-1R基因g.115463T>C多态性位点不同基因型个体的PCR-SSCP分析结果

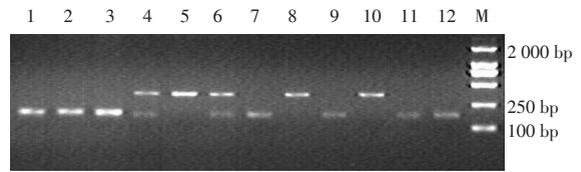
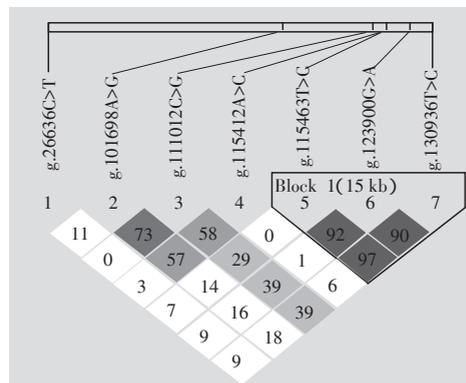


图3 IGF-1R基因g.111012C>G多态性位点不同基因型个体的PCR-RFLP分析结果

2.2 Tag SNP筛选及多态性位点相关分析

2.2.1 Tag SNP筛选

在连锁不平衡分析的基础上由Haploview中的LD Plot结果可知,多态性位点g.26636C>T、g.101698A>G、g.111012C>G、g.115412A>C和g.115463T>C是IGF-1R基因的tag SNP,其中多态性位点g.115463T>C、g.123900G>A和g.130936T>C处于强连锁状态,位于一个单倍型块中(r²>0.8),g.115463T>C为所构建单倍型的tag SNP(见图4)。



注:颜色越深的方格表示连锁程度越高

图4 IGF-1R基因SNP连锁不平衡图谱

2.2.2 多态性位点的相关分析

在东北农业大学F₂资源群体中,IGF-1R基因的7个多态性位点对鸡生长和体组成性状的影响

见表2 其中多态性位点g.26636C>T、g.101698A>G、g.111012C>G和g.115412A>C对所测量性状的影响几乎都不显著 ;g.115463T>C为g.115463T>C、g.123900G>A和g.130936T>C多态位点所组成单倍型块的 tag SNP ,除6周龄体重、8周龄跖骨围和股骨长外 ,对其他体重和骨骼性状均有显著或

接近显著的影响。

进一步对多态位点g.115463T>C多重比较发现 对于12周龄跖骨围、龙骨长、胫骨长、股骨重 ,CC型个体显著高于TC、TT型个体($P<0.05$) ;对于10、11和12周龄体重 ,TT型个体显著高于TC型个体($P<0.05$)(见表3)。

表2 IGF-1R基因多态性位点对鸡生长和体组成性状的影响

性状	g.26636C>T (P值)	g.101698A>G (P值)	g.111012C>G (P值)	g.115412A>C (P值)	g.115463T>C (P值)	g.123900G>A (P值)	g.130936T>C (P值)
6周龄体重	NS ¹	NS	NS	NS	0.1282	0.1815	0.1838
7周龄体重	NS	NS	NS	NS	0.0699	0.1072	0.0761
8周龄体重	0.0988	NS	0.0730	NS	0.0683	0.0783	0.0454
9周龄体重	NS	NS	NS	NS	0.0387	0.0697	0.0556
10周龄体重	NS	NS	0.1900	NS	0.0266	0.0552	0.0309
11周龄体重	NS	NS	NS	NS	0.0382	0.0560	0.0444
12周龄体重	NS	NS	NS	NS	0.0491	0.0778	0.0579
6周龄跖骨长	NS	0.0748	NS	NS	0.0657	0.1815	0.0115
8周龄跖骨长	NS	NS	NS	NS	0.0714	NS	0.0047
8周龄跖骨围	NS	0.0696	0.1289	0.1068	NS	0.0250	0.1084
12周龄跖骨长	NS	NS	NS	NS	0.0391	0.0548	0.0106
12周龄跖骨围	NS	NS	NS	NS	0.0164	0.0007	0.0010
跖爪重	NS	NS	NS	NS	0.0743	0.0013	NS
龙骨长	0.1828	NS	0.1669	0.0801	0.0437	0.0696	0.0500
胸宽	NS	NS	NS	NS	0.0037	NS	0.0309
胫骨长	0.0765	0.0897	NS	NS	0.0134	0.0729	0.0100
股骨长	NS	NS	0.1676	NS	0.1249	0.0446	NS
股骨重	NS	NS	NS	NS	0.0404	0.0412	NS

注 :NS表示 $P>0.2$ 。

表3 多态位点g.115463T>C对鸡生长和体组成性状的影响(最小二乘均值)

性状	g.115463T>C(P值)	CC型	TC型	TT型
10周龄体重	0.0266	1 719.83±67.92 ^{ab}	1 644.66±28.61 ^a	1 725.21±27.19 ^b
11周龄体重	0.0382	1 887.22±74.56 ^{ab}	1 830.25±30.29 ^a	1 915.62±28.26 ^b
12周龄体重	0.0491	2 066.01±79.70 ^{ab}	2 019.40±33.79 ^a	2 108.53±31.71 ^b
12周龄跖骨围	0.0164	4.55±0.06 ^a	4.37±0.03 ^b	4.40±0.03 ^b
龙骨长	0.0437	13.93±0.15 ^a	13.63±0.11 ^b	13.67±0.11 ^b
胫骨长	0.0134	13.10±0.15 ^a	12.70±0.074 ^b	12.69±0.07 ^b
股骨重	0.0404	15.14±0.52 ^a	13.93±0.31 ^b	13.99±0.30 ^b

注 同行肩注小写字母不同者表示差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 Tag SNP筛选

连锁不平衡(LD)亦称为配子相不平衡 ,指的是一个群体内不同座位等位基因之间的非随机关联^[6]。为了通过LD统计量的数值界定各位点间的LD水平 ,就必须理解这些统计量的遗传学意义。常用的LD度量标准有 $|D'|$ 和 r^2 ^[7]。一般说来 , D' 和 r^2 反映了LD的不同方面 , D' 仅包括重组史 ,而 r^2 在包括了重组史的同时也包括了突变史以及如自然或

人工选择、基因转换、遗传漂变、群体扩张、群体混入等可以影响LD水平的历史事件^[8]。Devlin等^[9]指出 , $|D'|$ 主要用来度量重组比率 ,当 $|D'|>0.5$ 时 ,说明这两个位点间发生历史重组事件的可能性很小 , r^2 除受重组影响外还受等位基因频率的影响 ,当 $r^2>1/3$ 时 ,说明两个位点间处于强的连锁不平衡状态。本研究采用 $r^2>0.8$ 为标准对IGF-1R基因进行单倍型块划分。由Haploview中的LD Plot结果可知 ,在F₂资源群体中IGF-1R基因的tag

SNPs 为 g.26636C>T、g.101698A>G、g.111012C>G、g.115412A>C 和 g.115463T>C。

Wang 等^[10]指出单倍型是基因组内处于 LD 状态的一组紧密连锁的等位基因,不易受重组的影响,而是作为一个整体或一个单元遗传。几个多态性位点可以组成特定的单倍型,并且较低的单倍型多样性有利于仅用少数的单倍型标签 SNP (htSNP)或标签 SNP(tSNP)来区分不同的单倍型。Haploview 软件给出 g.115463T>C 与 g.123900G>A、g.130936T>C 处于强连锁状态($r^2>0.8$),位于一个单倍型块中, g.115463T>C 为单倍型块的 tag SNP (见图 4),由相关分析结果可知 g.115463T>C 可以代表 g.123900G>A、g.130936T>C 的大部分信息,因此可以通过对多态性位点 g.115463T>C 的研究来获知整个单倍型块的信息,为利用标记辅助选择进行鸡的分子育种提供依据。

3.2 鸡 *IGF-1R* 基因 tag SNP 对生长和体组成性状的影响

哺乳动物的研究表明,不同生理条件下 IGFs 作用于其受体将会激活不同的信号通路,导致不同的生理现象。在禽类中,IGF-1R 作为 IGFs(IGF-I、IGF-II)唯一的受体,对 IGFs 发挥功能非常重要,具体机制为:IGF1 通过与 IGF-1R 结合激活 IGF-1R 细胞内酪氨酸激酶活性从而引发诸如细胞增殖、分化、迁移和抗凋亡等一系列反应^[11]。

研究表明,IGF-1R 介导 IGF1 的促生长活性。本研究对 tag SNP 与鸡生长和体组成性状进行相关分析发现 g.26636C>T、g.101698A>G、g.111012C>G 和 g.115412A>C 多态性位点对性状几乎没有显著性影响(见表 2),可能是由于各位点本身不是功能性位点或与功能性位点不连锁造成。对 g.115463T>C 多态性位点的相关分析可知, g.115463T>C 多态性位点对绝大多数体重和骨骼性状有显著或接近显著的影响。*IGF-1R* 基因多态性研究在芦花鸡^[12]、日本鹌鹑^[13]、武定鸡^[14]、东北农业大学肉鸡高低脂系^[15]的研究中也发现了类似的结果。因此推断 *IGF-1R* 基因中 g.115463T>C、g.123900C>T 和 g.130936T>C 多态性位点所构成的单倍型块是影响鸡 6~12 周龄体重的稳定遗传单位或与影响该性状的遗传单位紧密连锁。

表达谱研究表明在鸡的胚胎期,与骨骼发育相关的所有器官都有 *IGF-1R* 基因的表达^[16]。基

因功能研究表明, *IGF-1R* 基因为甲状旁腺激素促进骨形成的过程所必需^[17]。同时在鱼类中的研究表明, *IGF-1R* 基因高表达时伴随骨密度的增加^[18]。免疫组织化学研究表明, *IGF-1R* 在整个生长过程中,随着年龄的增长,在股骨近端和胫骨远端(臀部和踝关节)的表达量持续下降,但是在股骨远端和胫骨近端(膝盖)会继续高表达^[19]。因此推测 *IGF-1R* 对骨骼的生长发育有重要作用。

4 结论

本研究结果表明,影响鸡骨骼性状生长发育和 6~12 周龄体重的 QTL 可能位于 g.115463T>C、g.123900G>A 和 g.130936T>C 多态位点所组成单倍型块内或处于与此单倍型块紧密连锁的下游区域。

参考文献:

- 1 Denley A, Cosgrove L J, Booker G W *et al.* Molecular interactions of the IGF system[J]. Cytokine Growth F R 2005, 16 #21-439.
- 2 刘宝英, 王会信. 胰岛素样生长因子 1 受体激活机制及信号转导特异性[J]. 生理科学进展, 1998, 29(3): 249-252.
- 3 Ullrich A. Insulin-like growth factor receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity[J]. EMBO J, 1986, 5: 2503-2512.
- 4 Zhang H, Fagan D H, Zeng X *et al.* Inhibition of cancer cell proliferation and metastasis by insulin receptor down regulation[J]. Oncogene 2010, 29(17): 2517-27.
- 5 卞立红. 鸡 *IGF1*、*IGF1R* 基因多态性与生长和体组成性状的相关研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007.
- 6 Zhang W, Collins A, Maniatis N. Properties of linkage disequilibrium(LD)maps[J]. Proc Natl Acad Sci 2002, 99: 17004-17007.
- 7 Long J R, Zhao L J, Liu P Y *et al.* Patterns of linkage disequilibrium and haplotype distribution in disease candidate genes[J]. BMC Genetics 2004, 5: 11.
- 8 Slatkin M. Linkage disequilibrium—understanding the evolutionary past and mapping the medical future[J]. Nat Rev Genet, 2008, 9(6): 477-485.
- 9 Ardlie K G, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome[J]. Nat Rev Genet 2002, 3(4): 299-309.
- 10 Wang Q H, Dooner H. Remarkable variation in maize genome structure inferred from haplotype diversity at the bz locus[J]. Proc Natl Acad Sci 2006, 103(47): 17644-17649.

(11~19 参考文献略, 需要者与编辑部索取)