

鸡类胰岛素生长因子结合蛋白2基因编码区克隆及表达

牟彦双¹, 王宇祥², 李辉^{2*}

(1. 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2. 东北农业大学动物科学技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 为了研究鸡类胰岛素生长因子结合蛋白2 (insulin-like growth factor binding protein 2, IGFBP2) 基因在鸡脂肪发育中的功能, 通过 RT-PCR 和 5'-RACE 的方法克隆该基因编码区序列并检测 IGFBP2 基因在鸡组织中表达。结果显示: 本试验克隆并获得了鸡 IGFBP2 基因编码区 536 bp 序列, 并用生物信息学方法证明了该序列的正确性。在检测的 7 周龄鸡 27 种组织中, IGFBP2 基因在 26 种组织中均有表达, 仅在胰腺中没有表达。

关键词: 鸡; IGFBP2 基因; 克隆; 表达

中图分类号: S831.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2014)07-0077-04

类胰岛素生长因子结合蛋白 2 (insulin-like growth factor binding protein 2, IGFBP2) 属于生长激素超家族因子, 主要是通过 IGFs、TGF β 等生长因子结合来调节其生物活性, 具有广泛的生物学功能^[1], 同时, IGFBP2 可以通过特异性受体直接发挥调节作用^[2]。在哺乳动物中研究表明, IGFBP2 对生物体重及免疫器官的发育有重要的影响, 并参与体内脂类代谢的调控^[3-4]。在转基因小鼠中过量表达 IGFBP2 基因, 小鼠的脑重明显降低, 而肾、脾重与对照组相比有了显著的提高^[5]; 在敲除 IGFBP2 基因的小鼠中, 脾脏重显著降低, 而肝脏重有显著的增加^[6]。这些结果说明, IGFBP2 基因对脾脏、肝脏、肾脏的发育有重要的影响。IGFBP2 基因在鸡脂肪组织发育及体脂性状中也有重要功能, Lei 等^[7]发现鸡 IGFBP2 基因单倍型与鸡生长和体组成性状呈显著正相关。Li 等^[8]发现 IGFBP2 基因上一个单核苷酸突变位点与鸡脂肪性状呈显著相关。

本研究克隆了鸡的 IGFBP2 基因编码区序列, 并分析 7 周龄肉鸡中 IGFBP2 基因 mRNA 的组织表达情况, 为进一步研究鸡 IGFBP2 在脂肪代谢中功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

白羽 AA 肉鸡, 自由采食、饮水。各种组织均采自 7 周龄肉鸡。TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司。Xho I、EcoR I 限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、pMD18-T 载体连接试剂盒、RT-PCR 3.0 Kit, 5'-RACE 试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司; 胶少量回收试剂盒、质粒少量抽提试剂盒购自百泰克生物工程有限公司。

1.2 引物的设计与合成

具体引物序列见表 1, 引物均由上海博亚生物公司合成。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段长度/bp	GenBank 登录号
GAPDH 基因	GF: AGAACATCATCCCAGCGT	184	K01458
	GR: AGCCTTCACTACCTCTTTG		
IGFBP2 基因	P6F: CAGCATGTCTCTTTTAGGC	221	U15086
	P6R: GGAAAGCAGTCCCTTCTG		
IGFBP2 基因 CDS	BP2E-F: GACAACGGTGATGACCGGTC	536	U15086
	BP2E-R: AGCAAGCAGGACCACATCC		
IGFBP2 基因 5'-RACE	BP2-RT: GTTCACCTTCTCCCT	107	U15086
	BP2-S1: TGATGACTGGAGCCAGC		
	BP2-S2: GAAGGAGATGCCGGTGAT		
	BP2-A1: CGTGGTTCTCAGCAAGG		
	BP2-A2: GGTCATCACCCGTTGTCTG		

收稿日期: 2013-08-06; 修回日期: 2014-05-18

基金项目: 国家自然科学基金资助 (31101033); 黑龙江省教育

厅基金 (11551039); 东北农业大学博士启动基金 (2009RC56)

作者简介: 牟彦双 (1980-), 男, 博士, 助理研究员

* 通信作者: 李辉, 教授, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: lihui@neau.edu.cn

1.3 总 RNA 的提取及反转录

分别取约 400 mg 的鸡各种组织放入坩埚，立即倒入液氮进行充分研磨，按 TRIzol Reagent 说明书方法提取组织总 RNA。将获得的组织总 RNA 用 DEPC 水溶解。利用紫外分光光度计测定总 RNA 的 OD 值，计算 RNA 浓度。用 1% 的甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 的完整性。总 RNA 保存于 -80 °C 冰箱。各取 1 μg 不同组织总 RNA 按照 RT-PCR 3.0 试剂盒 (宝生物公司) 说明书方法对提取的 RNA 进行反转录，所得 cDNA 保存于 -20 °C 冰箱。

1.4 鸡 IGFBP2 基因编码区 (CDS) 的 PCR 扩增

以鸡脂肪组织 cDNA 为模板，BP2E-F、BP2E-R 作为引物进行 PCR 反应，反应体系：10 × *Ex Taq* DNA 聚合酶 buffer 2 μL，dNTP 2.5 μL，*Ex Taq* DNA 聚合酶 1 μL，BP2E-F 1 μL，BP2E-R 1 μL，ddH₂O 11.5 μL，模板 cDNA 1 μL。PCR 反应条件：94 °C 5 min；94 °C 30 s，58 °C 1 min，72 °C 1 min，共 32 个循环；72 °C 10 min；4 °C 保存。PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 IGFBP2 基因的 5'-RACE 反应

在已知鸡 IGFBP2 基因序列基础上设计 5'-RACE 引物，以脂肪组织 cDNA 为模版，用 5'-Full RACE Kit (大连宝生物公司) 对 IGFBP2 基因进行 PCR 扩增。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 IGFBP2 基因 RT-PCR 反应

以不同组织中总 RNA 反转录所得 cDNA 为模版进行 RT-PCR，所用引物为 P6F 和 P6R 为引物。反应体系：*Ex Taq* DNA 聚合酶 1 μL，10 × *Ex Taq* buffer 2 μL，dNTP 2.5 μL，P6F 1 μL，P6R 1 μL，ddH₂O 11 μL，模板 cDNA 1.5 μL。扩增条件为：94 °C 5 min，94 °C 30 s，59 °C 30 s，72 °C 30 s，30 个循环，72 °C 7 min。以 GAPDH 基因作为内参基因。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 DNA 序列的测定

将 PCR 扩增产物纯化后连接到 pMD18-T 载体上，转化到 CaCl₂ 法制备的大肠杆菌 JM109 感受态细菌。序列测定由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.8 序列的生物信息学分析

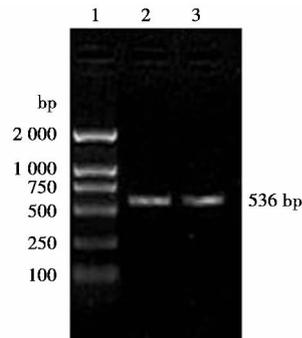
应用 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 网站的 BLAST 及软件 DNAMAN 完成序列对比分析。

2 结果与分析

2.1 IGFBP2 基因 CDS 扩增

根据 GenBank (No. U15086) 的鸡 IGFBP2 基因 mRNA 序列，设计鸡 IGFBP2 编码区全长引物，以鸡脂肪组织 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，但没有扩增

出预期的片段。因此，把 IGFBP2 基因编码区分为 5' 端的 400 bp 和 3' 端的 536 bp 的 2 段序列，分别设计引物，以鸡脂肪组织 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。结果 5' 端 400 bp 的序列没有扩增出预期片段，而 3' 端 536 bp 片段 PCR 扩增出目的条带，经测序证明为目的片段 (图 1)。

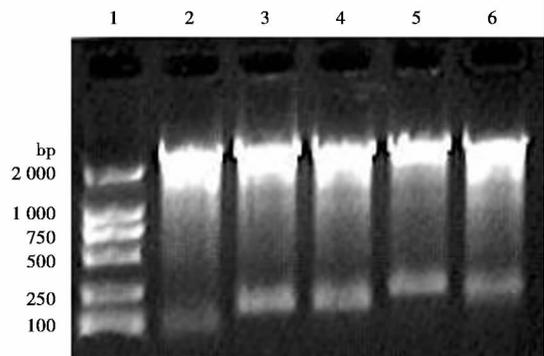


1. DL2000 DNA marker; 2-3. 目的片段

图 1 IGFBP2 基因部分 CDS 的扩增

2.2 IGFBP2 基因 mRNA 序列 5'-RACE

在已获得鸡 IGFBP2 基因编码区序列基础上，用 5'-RACE 方法对鸡 IGFBP2 基因 5' 端进行扩增。经过 2 次 PCR 扩增后获得清晰的 DNA 条带，将 PCR 产物经过胶回收后，连接到 pMD-18T 载体上，经 *Xho*I、*Eco*R I 酶切鉴定 (图 2)，证明 DNA 片段已经连入 T 载体，将质粒测序。结果表明，获得片段长度为 107 bp 的鸡 IGFBP2 基因编码区序列，并且序列在已经获得的 3' 端序列基础上向 5' 端延伸了 50 个碱基。



M. DL2000 DNA marker; 1-5. pMD-18T 酶切电泳

图 2 回收片段与 pMD-18T 载体连接后酶切鉴定

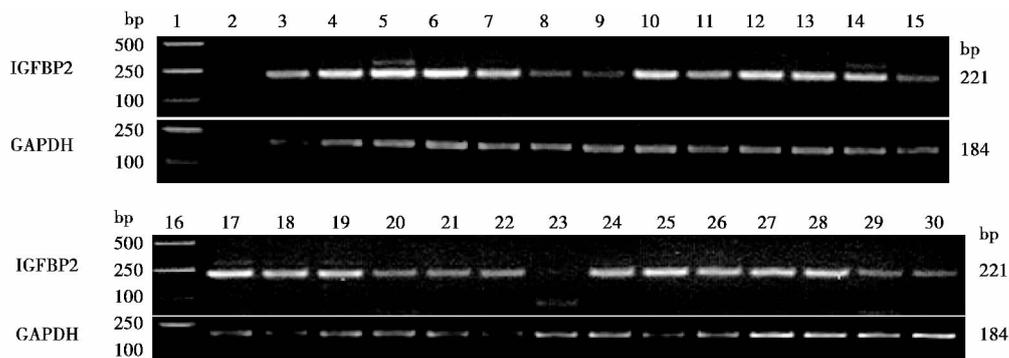
2.3 IGFBP2 基因序列生物信息学分析

为获得 IGFBP2 基因编码区端序列信息，将本研究中获得序列与 NCBI 数据库中序列比对，获得 1 个

mRNA 同源序列 (U15086) 和 2 个同源的表达序列标签 (EST) 序列 (BM491792 和 BM491536), 这些序列与本研究中获得 IGFBP2 基因编码区序列均有交叉重叠部分 (图 3), 说明本试验中获得的 RNA 序列为鸡 IGFBP2 基因编码区序列。同时, 序列比对结果证实鸡 IGFBP2 基因 5' 端 400 bp 序列中 GC 含量高达 80% 以上。



图 3 IGFBP2 基因序列分析



1、16. DL2000 DNA marker; 2. 阴性对照; 3. 腹部脂肪; 4. 肠系膜脂肪; 5. 皮下脂肪; 6. 嗦囊周围脂肪; 7. 肌胃周围脂肪; 8. 胸肌; 9. 腿肌; 10. 股骨; 11. 龙骨; 12. 胫骨; 13. 趾骨; 14. 关节软骨; 15. 龙骨前软骨; 17. 十二指肠; 18. 空肠; 19. 回肠; 20. 肝脏; 21. 心脏; 22. 脾脏; 23. 胰腺; 24. 肾脏; 25. 肌胃; 26. 腺胃; 27. 大脑; 28. 延髓; 29. 睾丸; 30. 卵巢

图 4 IGFBP2 基因在鸡不同组织表达检测

3 讨论

IGFs、TGF β 家族成员在脂肪沉积过程中发挥重要作用, 而 IGFBP2 是通过与这些家族成员蛋白结合调节其功能, 因此推测, IGFBP2 基因在脂肪代谢过程中发挥重要作用。同哺乳动物相比, 鸡 IGFBP2 基因编码区 5' 端 400 bp 序列 GC 含量高达 80% ~ 100%, 基因转录为 RNA 后, 会形成结合紧密的 RNA 二级结构, 这些异常结构会导致反转录过程中很难直接 PCR 获得鸡 IGFBP2 基因全长编码区序列。1995 年, Schoen 等^[9] 报道了鸡 IGFBP2 基因 mRNA 全长序列, 但其 IGFBP2 mRNA 序列不是直接 PCR 获得, 而是先反转录获得 1 773 bp 序列, 然后用 5' - RACE 方法得到鸡 IGFBP2 基因 5' 端序列。2003 年, Gordon 等^[10] 对鸡 IGFBP2 基因 mRNA 进行克隆结果只获得了基因 3' 端 1 773 bp 序列, 并没有获得鸡 IGFBP2 基因全长编码区。2005 年, Fisher 等^[11] 研究 IGFBP2 基因对鸡长骨发育的影响时, 在鸡中过表达

2.4 鸡 IGFBP2 基因在 7 周龄肉鸡组织中表达分析

采用 RT - PCR 的方法对 IGFBP2 基因在 7 周龄肉鸡 27 种组织中的表达进行检测, 以 GAPDH 基因作为内参对照基因。结果表明在 7 周龄肉鸡的 26 种组织中均检测到 IGFBP2 基因 mRNA 的表达, 仅在胰腺中没有表达。表达 IGFBP2 基因的 26 种组织包括胸肌、腿肌、股骨、龙骨、胫骨、趾骨、关节软骨、龙骨前软骨、腹脂、肠系膜脂肪、皮下脂、嗦囊周围脂肪、肌胃周围脂肪、十二指肠、空肠、回肠、肝脏、心脏、脾脏、肾脏、肌胃、腺胃、大脑、延髓、睾丸、卵巢 (图 4)。

IGFBP2 基因, 使用的是人 IGFBP2 基因编码区全长。这些研究表明, 鸡 IGFBP2 基因由于 5' 端高 GC 含量, 很难用直接 PCR 的方法获得鸡 IGFBP2 基因编码区全长序列。

本研究中利用 RT - PCR 方法扩增获得鸡 IGFBP2 基因编码区 536 bp 序列, 并通过 5' - RACE 和生物信息学分析证明了该序列的正确性。同时, 对鸡 IGFBP2 基因在 7 周龄 27 种组织中的表达情况进行了检测, 在检测的鸡 27 种组织中该基因仅在胰腺中不表达, 鸡 IGFBP2 基因的广泛表达说明其参与的机体生物学功能较多。这些研究结果为下一步研究鸡 IGFBP2 基因在脂肪沉积过程中的生物学功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] Rajaram S, Baylink D J, Mohan S. Insulin - like growth factorbinding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions [J]. *Endocrine Reviews*, 1997, 18: 801 - 831.

复合非淀粉多糖酶对断奶仔猪生长性能和血清生化指标的影响

乔家运¹, 张蕊驿², 李海花¹, 王春艳³, 高欣¹, 郑成江¹, 王文杰^{1*}

(1. 天津市畜牧兽医研究所, 天津 300381;

2. 南开大学数学科学学院, 天津 300071;

3. 天津市泰康饲料厂, 天津 301508)

摘要: 为了研究不同复合木聚糖酶和 β -甘露聚糖酶对断奶仔猪生长性能和血液生化指标的影响, 选择 72 头体重 (6.75 ± 0.26) kg “杜×长×大”断奶仔猪, 分为 3 个处理, 每个处理 4 个重复, 每个重复 6 头猪, 对照组饲喂基础日粮 (CT), 试验 1 组饲喂基础日粮 + 0.5% 复合酶 1 (E1), 试验 2 组饲喂基础日粮 + 0.5% 复合酶 2 (E2)。结果显示: 与对照组相比, 试验 1 组能显著提高断奶仔猪平均日增重 ($P < 0.05$), 试验 2 组能显著提高断奶仔猪平均日增重 ($P < 0.05$)、降低料肉比 ($P < 0.05$); 试验 1 组能显著提高断奶仔猪血清总蛋白、白蛋白浓度 ($P < 0.05$), 降低血清尿素氮浓度 ($P < 0.05$); 试验 2 组能显著提高断奶仔猪血清总蛋白 ($P < 0.01$)、白蛋白浓度和碱性磷酸酶活性 ($P < 0.05$), 降低血清尿素氮浓度 ($P < 0.05$)。说明日粮中添加酶制剂可以调节血清中蛋白质代谢相关指标, 提高断奶仔猪的生长性能。

关键词: 复合非淀粉多糖酶; 断奶仔猪; 生长性能; 生化指标

中图分类号: S828 文献标志码: B 文章编号: 0529-5130(2014)07-0080-03

断奶仔猪消化、免疫系统发育不完善, 内源消化酶分泌不足, 断奶应激造成腹泻, 严重影响后期的生长性能。饲料原料中的各种非淀粉多糖 (NSP), 例如小麦中的木聚糖以及豆粕中的 β -甘露聚糖, 在猪消化道内会直接增加食糜黏性, 阻碍养分和消化酶的

结合; 降低食糜通过消化道的速度, 为细菌尤其是致病菌的繁殖提供了有利条件, 损害肠道健康^[1]。有研究表明, 日粮中添加外源酶制剂可以改善仔猪对饲料的消化, 促进养分的消化吸收^[2], 改善生长性能^[3]。但是, 鉴于影响酶制剂功效的因素很多, 仅根据酶活评定很难反映出其真实作用效果。因此, 本研究对酶活相同的 2 种复合酶, 通过体内试验评价, 观察对断奶仔猪生长性能和血清生化指标的影响, 为猪场或饲料厂对复合酶制剂的使用, 也为酶制剂的快速评估技术研究提供参考。

收稿日期: 2013-06-20; 修回日期: 2014-05-08

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2013BAD10B01)

作者简介: 乔家运 (1979-), 男, 副研究员, 博士

* 通信作者: 王文杰, 研究员, 主要从事动物营养与非常规饲料的开发研究, E-mail: anist@vip.163.com

- [2] Sloomweg M C, Ohlsson C, Salles J P, et al. Insulin-like growth-factor binding proteins -2 and -3 stimulate growth hormone receptor binding and mitogenesis in rat osteosarcoma cells [J]. *Endocrinology*, 1995, 136(10): 4210-4217.
- [3] Hoeflich A, Schmidt P, Foll J, et al. Altered growth of mice divergently selected for body weight is associated with complex changes in the growth hormone/insulin-like growth factor system [J]. *Growth Horm IGF Res*, 1998, 8(2): 113-123.
- [4] Brogkman G A, Haley G S, Wblf E, et al. Genome-wide search for loci controlling serum IGF binding Protein levels of mice [J]. *Faseb*, 2001, 15: 978-987.
- [5] Hoeflich A, Nedbal S, Blum W F, et al. Growth inhibition in giant growth hormone transgenic mice by overexpression of insulin-like growth factor-binding protein -2 [J]. *Endocrinology*, 2001, 142: 1889-1898.
- [6] Wood T L, Rogler L E, Czick M E, et al. Selective alterations in organ sizes in mice with a targeted disruption of the insulin-like growth factor binding protein -2 Gene [J]. *Mol Endocrinol*, 2001, 14: 1472-1482.
- [7] Lei M M, Nie Q H, Peng X, et al. Single nucleotide polymorphisms of the chicken insulin-like factor binding protein 2 gene associated with chicken growth and carcass traits [J]. *Poult Sci*, 2005, 84: 1191-1198.
- [8] Li Z H, Li H, Zhang H, et al. Identification of a single nucleotide polymorphism of the insulin-like growth factor binding protein 2 gene and its association with growth and body composition traits in the chicken [J]. *Anim Sci*, 2006, 84: 2902-2906.
- [9] Schoen T J, Mazuruk K, Waldbillig R J, et al. Cloning and characterization of a chick embryo cDNA and gene for IGF-binding protein -2 [J]. *Mol Endocrinol*, 1995, 15: 49-59.
- [10] Gordon J A, Augusta Z, Iain M, et al. Major components of the insulin-like growth factor axis are expressed early in chicken embryogenesis, with IGF binding protein (IGFBP) -5 expression subject to regulation by Sonic Hedgehog [J]. *Anat Embryol*, 2003, 207: 73-84.
- [11] Fisher M C, Meyer C, Garber G, et al. Role of IGFBP2, IGF-I and IGF-II in regulating long bone growth [J]. *Bone*, 2005, 37: 741-750.