

DOI: 10.1360/yc-007-0057

## 五指山猪 *IGF2* 基因 5'调控区单核苷酸多态性分析

常怀普<sup>1</sup>, 欧江涛<sup>2,3</sup>, 钟金城<sup>1</sup>, 王希龙<sup>2</sup>, 郭春华<sup>1</sup>, 宾石玉<sup>4</sup>, 马志杰<sup>5</sup>

1. 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041;
2. 海南省农业科学院畜牧兽医研究所, 海口 571100;
3. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094;
4. 广西师范大学, 桂林 541004;
5. 青海省畜牧兽医科学院畜牧研究所, 西宁 810016

**摘要:** 利用 PCR 产物直接测序法, 对五指山猪、滇南小耳猪、香猪、梅山猪和大白猪共 60 个样本的 *IGF2* 基因 5' 调控区部分片段的单核苷酸多态性进行了研究。找到 13 个 SNP, 分别是: C5872T、C5888T、A5976G、C6010T、T6029A、C6037T、C6043T、C6063T、C6112T、C6164T、G13520A、G13563A 和 G13669A。T6029A 为 T↔A 碱基颠换, A5976G、G13520A、G13563A 和 G13669A 为 A↔G 转换, 其他均为 C↔T 转换。针对 13 个 SNP 位点得到 23 种组合基因型。统计各位点等位基因和基因型以及各组合基因型在总群体与各品种内的分布频率, 发现 3 个小型猪在 A5976G、C6164T 和 G13669A 位点上的优势等位基因均分别为 G、T 和 A, 而梅山猪和大白猪的优势等位基因均分别为 A、C 和 G; *H19* 型为 3 个小型猪的特征组合基因型, 而另两个猪品种为 *H15* 型。同时对 123 头五指山猪 *IGF2* 基因 C5888T 位点进行了 PCR-RFLP 分析, 研究表明该位点 C 为优势等位基因 (0.8536), CC 为优势基因型 (0.7235)。卡方检验表明该位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。这些结果可为五指山猪等小型猪的生长发育规律、矮小机制等方面的研究提供遗传学依据。

**关键词:** 五指山猪; *IGF2* 基因; SNP; PCR-RFLP

## Single nucleotide polymorphism analysis on the 5' regulatory region of *IGF2* gene in Wuzhishan pig

CHANG Huai-Pu<sup>1</sup>, OU Jiang-Tao<sup>2,3</sup>, ZHONG Jin-Cheng<sup>1</sup>, WANG Xi-Long<sup>2</sup>,  
GUO Chun-Hua<sup>1</sup>, BIN Shi-Yu<sup>4</sup>, MA Zhi-Jie<sup>5</sup>

1. College of Life Science & Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;
2. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Hainan Academy of Agricultural Science, Haikou 571100, China;
3. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;
4. Guangxi Normal University, Guilin 541004, China;
5. Institute of Animal Science, Qinghai Academy of Animal Science and Veterinary Medicine, Xining 810003, China;

**Abstract:** Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in partial 5' regulatory region of the insulin-like growth factor 2 (*IGF2*) gene were studied by DNA sequencing in 60 pigs from the Wuzhishan, Diannan small-ear, Xiang, Meishan and Large White pig breeds. Thirteen SNP sites were detected, including one transversion at T6029A, 4 A↔G transitions (A5976G, G13520A, G13563A and G13669A) and 8 C↔T transitions (C5872T, C5888T, C6010T, C6037T, C6043T, C6063T,

收稿日期: 2006-07-28; 修回日期: 2006-08-24

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(国家 863 计划)(编号: 2004AA213112)资助[Supported by Chinese National Programs for High Technology Research and Development(863 Program) (No. 2004AA213112)]

作者简介: 常怀普(1981—), 男, 山东人, 硕士研究生, 专业方向: 分子遗传学

欧江涛(1975—), 男, 贵州人, 硕士, 专业方向: 动物分子遗传学。E-mail: [changhuaipu@yahoo.com.cn](mailto:changhuaipu@yahoo.com.cn)

常怀普, 欧江涛并列第一作者

通讯作者: 王希龙(1963—), 男, 吉林人, 博士, 教授, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: [ojt110@yahoo.com.cn](mailto:ojt110@yahoo.com.cn)

C6112T, C6164T). These 13 SNPs formed 23 composite genotypes. The gene, genotype and composite genotype frequencies of every SNP site in the whole group and in each breed were calculated. Results showed that the predominant allele in 3 miniature pig breeds was G, T and A at A5976G, C6164T and G13669A sites respectively, but the A-C-G allele was predominant in Meishan and Large White breeds. Moreover, H15 and H19 were the characteristic composite genotype for the large versus the miniature breeds, respectively. In addition, the C5888T SNP was analyzed in 123 Wuzhishan pigs by the PCR-RFLP method. Results showed that the predominant allele was C, and the predominant genotype was CC.  $\chi^2$ -test results indicated that the Wuzhishan pig breed was at Hardy-Weinberg equilibrium with respect to this SNP. These results provide the miniature pig breeds such as the Wuzhishan pig with certain genetic references on the regulation of growth and development, and the mechanism of its dwarfism.

**Keywords:** Wuzhishan pig; *IGF2* gene; SNP; PCR-RFLP

五指山猪是我国小型猪种中体型最小、体重最轻、濒临灭绝的珍稀畜种,具有抗逆性强、遗传稳定、代谢率低等诸多特性。它的解剖学、生理学特征及疾病发生机理等都与人类极其相似,具有重要的经济和社会价值,可用于心血管病、皮肤烧伤和新药评价等许多方面的研究与应用,是我国不可多得的宝贵遗传资源<sup>[1]</sup>,相关特色性状分子机理的探讨已成为五指山猪等小型猪资源开发利用的客观要求。

胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factor 2, *IGF2*) 作为胰岛素样生长因子家族成员之一,是一种促细胞分裂多肽,可介导生长激素发挥作用、刺激培养细胞生长,在发育中具有促生长的重要功能。*IGF2* 基因是一种父本表达印记基因,对肌肉生长和分化有重要影响<sup>[2]</sup>。Jeon 等<sup>[3]</sup>、Nezer 等<sup>[4]</sup>、de Koning 等<sup>[5]</sup> 分别选用不同猪品种做参考家系,将一个影响肌肉生长、脂肪沉积和心脏大小的数量性状位点 (quantitative trait loci, QTL) 定位在猪的 2 号染色体短臂末端,猪 *IGF2* 基因也位于此区域 Chr 2p1.7<sup>[3]</sup>,并被作为该 QTL 的主要候选基因<sup>[3,4]</sup>。该基因由 10 个外显子和 9 个内含子组成,外显子 7、8、9 编码 *IGF2* 前体 (prepro *IGF2*), 外显子 1~6 和 4b 为非编码前导外显子 (leader exon)。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<sup>[6]</sup>。近年来,有关 *IGF2* 基因在人、鼠、鸡和牛等的研究较多<sup>[7-12]</sup>,而猪的相对较少<sup>[13-18]</sup>,尤其在五指山猪等小型猪上研究甚少<sup>[17]</sup>。

本文利用 PCR 产物直接测序法,研究了五指山猪、滇南小耳猪、香猪、梅山猪和大白猪 *IGF2* 基因 5' 调控区部分片段的单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), 并对特定 SNP 位点进行了 PCR-RFLP 分析,以期寻找品种内和品种间的特征 SNP 和组合基因型及其与性状的相关性,从而为五指山猪等小型猪资源生长发育规律、矮小机制等方面的研究提供遗传学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集及基因组提取

在 5 个猪品种中,随机选取健康的 163 头猪 (表 1), 剪取耳组织样,置于 70% 酒精中,冰盒带回实验室,参考《分子克隆实验指南》<sup>[19]</sup> 一书中的方法提取基因组 DNA,溶于 TE 中,用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法双重检测 DNA 的纯度和浓度,然后稀释成 100 ng/ $\mu$ L 浓度, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

表 1 实验材料来源

Table 1 Source of experimental materials

品种 Breed	样品采集地 Source of samples	个体数 Number
五指山猪 Wuzhishan pig	海南省农科院五指山猪原种场 The Wuzhishan Pig Breeding Farm, Haikou, Hainan province	123
滇南小耳猪 Diannan small-ear pig	云南省西双版纳自治州 Xishuang Banna, Yunnan province	10
香猪 Xiang pig	广西环江香猪原种保种场 The Xiang Pig Breeding Farm, Huanjiang, Guangxi province	10
梅山猪 Meishan pig	上海交大农学院小型猪保种场 The Miniature Pig Breeding Farm, College of Agriculture, Shanghai Jiaotong University	10
大白猪 Large white pig	华南农业大学 Supplied by South China Agricultural University	10

## 1.2 引物设计与合成

利用引物设计软件 Primer premier 5.0 和 Oligo 6.68, 据 GenBank 中 *IGF2* 基因序列(登录号: AY044828), 设计特异性引物 2 对:

IGF2-1: Forword primer(PF): 5'-TGGGCAGCT-CACCTCTCAACAC-3'

Reverse primer(PR): 5'-CCCCGTGAGTCCTGC-GAGTG-3'

IGF2-2: Forword primer(PF): 5'-GCG-CCCTTC-ACCATCTCTCCAG-3'

Reverse primer(PR): 5'-AGCCACCTGCACCC-AAACACT-3'

IGF2-1、IGF2-2 扩增片段理论大小分别为 443 bp、326 bp, 对应参照序列分别为 5747-6189 位、13426-13751 位, 其中, IGF2-1 涵盖外显子 1, IGF2-2 涵盖外显子 2。

## 1.3 PCR 扩增

PCR 扩增体系总体积 50  $\mu$ L, 组成为: DNA 模板 (50 ng/ $\mu$ L)6.0  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR buffer(Mg<sup>2+</sup> Free)5.0  $\mu$ L, dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)4.0  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)2.5  $\mu$ L, Ex *Taq* Polymerase(5 U/ $\mu$ L)0.5  $\mu$ L, PF(10 pmol/L)1.0  $\mu$ L, PR(10 pmol/L)1.0  $\mu$ L, 无菌去离子 H<sub>2</sub>O 30  $\mu$ L。

PCR 反应程序为: 95 预变性 5 min; 94 变性 40 s, IGF2-1 57 或 IGF2-2 56 复性 45 s, 72 延伸 50 s, 32 个循环; 最后 72 延伸 5 min。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.4 产物纯化及测序

采用上海生工生物工程技术有限公司的 PCR 产物纯化试剂盒, 参照其说明书, 对获得的 PCR 产物进行纯化, 送北京诺塞基因组研究有限责任公司测序。

## 1.5 SNP 位点筛查及其基因型判定

利用 DNAMAN 5.2.2、Clustalx 1.83、BioEdit 7.0.5、Chromas 2.23 等生物软件对所测序列进行校正及分析, 确定 SNP 位点, 并判定基因型和组合基因型。

## 1.6 PCR-RFLP 分析

利用 DNAMAN 5.2.2 对 IGF2-1 基因片段进行酶谱分析, 发现 C5888T 位点恰为限制性内切酶 *Eco*52 的识别位点, 遂选此酶对该片段进行 PCR-RFLP 分析。酶切体系及反应条件为: *Eco*52 酶 1.0  $\mu$ L(4-12 U/ $\mu$ L), 10  $\times$  *Eco*52 Basal Buffer 2.0  $\mu$ L,

0.1% BSA 2.0  $\mu$ L, 产物约 1.0  $\mu$ g, 加无菌去离子 H<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L; 置 Biometra Gradient PCR 仪中 37 反应 2.5 h, 10  $\times$  Loading buffer 终止反应, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测判型。

## 1.7 数据统计分析

### 1.7.1 频率统计

采用以下公式对各等位基因及基因型和组合基因型频率进行计算:

$$\text{基因型频率} = (\text{基因型个体数}/N) \times 100\%$$

$$\text{基因频率} = [2(ii) + (ij_1) + (ij_2) + \dots + (ij_n)]/2N$$

其中:  $i$  表示纯合复等位基因;  $j_1, \dots, j_n$  表示与  $i$  共显性的第 1 到第  $n$  个等位基因;  $N$  为样本总数。

### 1.7.2 酶切结果的卡方适合性检验

根据 C5888T 位点等位基因频率计算该位点各基因型频率的理论值, 然后计算  $\chi^2$ 。其公式为:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

其中:  $E_i$  为理论值;  $O_i$  为实际观察值;  $r$  为等位基因型数。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增及产物纯化

通过 PCR 扩增, 产物用纯化试剂盒纯化, 电泳检测结果为一条清晰的特异性条带(图 1, 图 2)。根据 DNA 分子量标准 DL 2000, 结合参考序列(登录号: AY044828)推断扩增片段大小分别为 443 bp 和 326 bp, 与理论值相符。

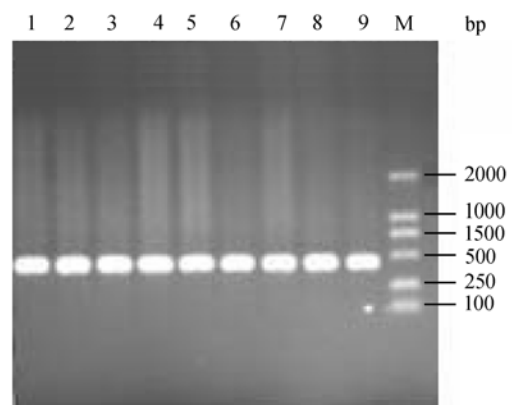


图 1 IGF2-1 产物琼脂糖凝胶电泳图

1~9: PCR 产物; M: DNA Marker DL 2000。1~9: PCR products; M: DNA Marker DL 2000)

Fig. 1 IGF2-1 fragment by agarose gel electrophoresis

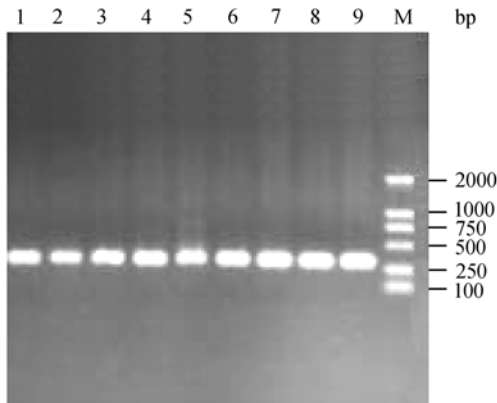


图 2 IGF2-2 产物琼脂糖凝胶电泳图

1~9: PCR 产物; M: DNA Marker DL 2000。1~9: PCR products; M: DNA Marker DL 2000)

Fig. 2 IGF2-2 fragment by agarose gel electrophoresis

## 2.2 SNP 位点筛查

将纯化的 PCR 产物进行直接测序, 每个片段均获得 60 条序列, 逐条校正后截取可靠的中间区域, IGF2-1、IGF2-2 片段分别得到长 355 bp、280 bp 的精确序列。利用 DNAMAN 5.2.2 进行多重比对分析, 结果在 IGF2-1 上找到 10 个 SNP 位点, 为 C5872T、C5888T、A5976G、C6010T、T6029A、C6037T、C6043T、C6063T、C6112T 和 C6164T(图 3); 而在 IGF2-2 上仅找到 3 个 SNP 位点, 为 G13520A、G13563A 和 G13669A(图 4)。

分析发现, C5872T 和 C5888T 位于外显子 1 上游, A5976G 位于外显子 1, C6010T、T6029A、C6037T、C6043T、C6063T、C6112T 和 C6164T 位

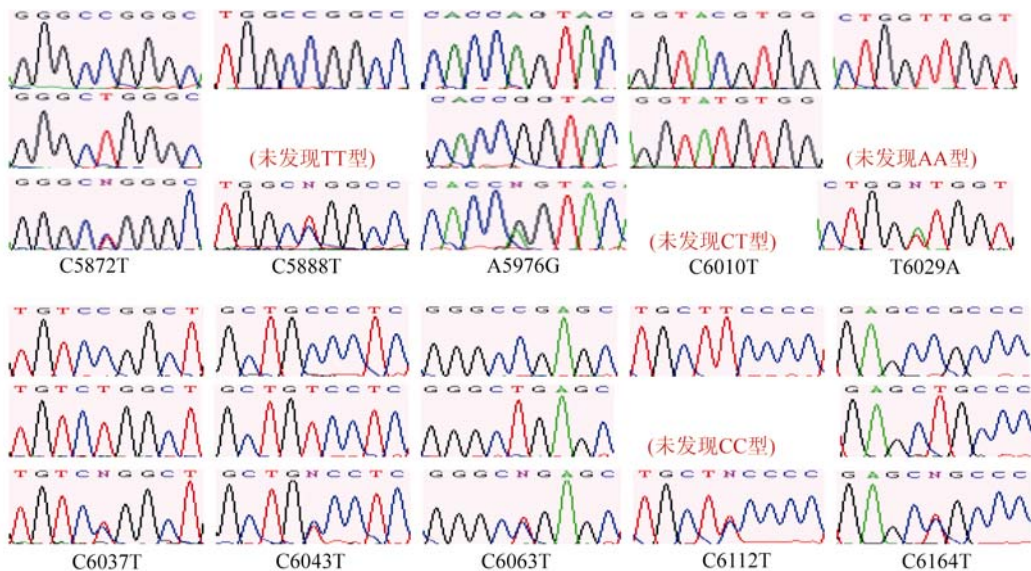


图 3 IGF2-1 片段 SNP 位点测序图谱

Fig. 3 Chromatograms of the SNP sites in IGF2-1 fragment

于内含子 1, G13520A、G13563A 和 G13669A 均位于外显子 2。13 个 SNP 位点均表现为二等位基因, 其中, 除 T6029A 为颠换外, 其他 12 种全为转换, 这与 SNP 方法自身特点相一致<sup>[21]</sup>。在 12 种转换中, A5976G、G13520A、G13563A 和 G13669A 属于 A ↔ G 转换, 而其他 8 种均为 C ↔ T 转换。对参考序列进一步分析发现, IGF2-1 片段 GC 含量为 70.7%, 属于 GC 富集区; 所以推测 IGF2-1 片段 C ↔ T 转换频率较高可能与该段序列的 GC 含量高有关, 因为在 GC 含量高的区域, 尤其在 CpG 岛 C 碱基常处于甲基化状态, 能自发地脱氨基从而替换为 T<sup>[21]</sup>。

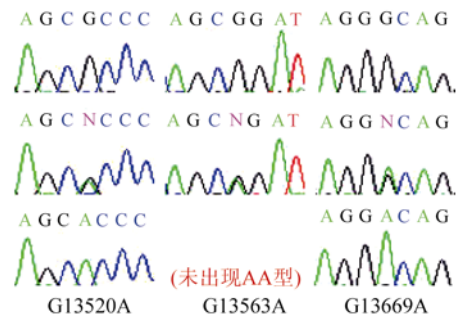


图 4 IGF2-2 片段 SNP 位点测序图谱

Fig. 4 Chromatograms of the SNP sites in IGF2-2 fragment



### 2.3 组合基因型判定及频率统计

针对所找到的 13 个 SNP 位点, 按各位点对应参考序列位置的先后将其组合到一起, 纯合位点用单碱基表示, 杂合位点用 N 表示, 各位点的 N 仅代表该位点的杂合状态, 得到 23 种组合基因型, 分别为: CCGCTCCTTTAGA 型、CCGCTCCTTTNGA 型、NCGCTCCTNNNA 型、NCGCTNCTTTNGA 型、NCGTCTTTNGA 型、NCNCNCNNTTNGA 型、NCNCTCCTTCNGN 型、NCNCTCCTTNNGN 型、NCNCTCNNTTNGN 型、NNGCTNCTTTGGA 型、NNNCTCNCTTGNN 型、NNNCTCNNTTGGN 型、TCACNCNNTNGGN 型、TCACNCTCTTGGN 型、TCACTCCTTCGGG 型、TCACTCTCTTGGN 型、TCATTCTCTCGGA 型、TCGCTNCTNNGNA 型、TCGCTTCTTTGGA 型、TCNCTCNNTTGNN 型、TCNCTNCTTNGGN 型、TCNCTNNNTTGGA 型和 TCNCTNNNTTGGN 型, 分别命名为: *H1—H23* 型。并利用 Excel 软件统计各组合基因型在各品种内及总群体中的分布频率(表 2)。

这些组合基因型反映了 *IGF2* 基因虽在第 7、8、9 外显子区域比较保守<sup>[6]</sup>, 但在 5'端调控区域仍具有一定的多态性。分析可知, 不同组合基因型在总群体中的频率不同; 不同猪品种中, 出现的组合基因型种类和数目不同, 同一组合基因型的频率也不同。在总群体中, *H15* 型频率最高, 为 0.183; *H19* 型次之, 频率为 0.150; 之后是 *H4* 型, 频率刚好为 0.100; 其余组合基因型频率均低于 0.100, 位于 0.017 和 0.083 之间。在五指山猪、滇南小耳猪、香猪、梅山猪和大白猪中分别出现 13 种、5 种、7 种、5 种和 2 种组合基因型, 说明这 2 个片段在五指山猪多态性较国内其他猪种高, 这可能与五指山猪样本相对较大有关, 但总体说来, 国内猪种比国外猪种偏高, 这与欧江涛等<sup>[22]</sup>的研究一致。在五指山猪中

*H1* 和 *H19* 型频率最高, 均为 0.150; 滇南小耳猪 *H2* 和 *H19* 型最高, 均为 0.200; 香猪 *H19* 型最高, 为 0.400; 梅山猪 *H21* 型最高, 为 0.400, *H15* 型次之, 为 0.300; 大白猪 *H15* 型最高, 为 0.800。 *H1* 型和 *H2* 型和 *H10* 型仅出现在五指山猪和滇南小耳猪中, *H21* 型仅出现于香猪和梅山猪中, 同时某些组合基因型仅出现于一个猪品种中, 这些特有组合基因型可能与某些特异性状或品种特性有关。此外, *H15* 型仅出现于梅山猪和大白猪中, 频率分别为 0.300 和 0.800, 为优势组合基因型; 而 *H19* 型仅出现在 3 个小型猪中, 频率分别为 0.150、0.200 和 0.400, 也为优势组合基因型, 它们是否与猪的矮小性状有关, 有待进一步深入分析及验证。

### 2.4 SNP 位点基因及基因型频率统计

根据测序图谱、DNAMAN5.2.2 比对结果及组合基因型统计结果, 利用 Excel 软件统计各位点基因型在各品种内及总群体中的分布频率, 并根据基因型频率计算各等位基因频率(表 3)。

在总群体中, 不同 SNP 位点优势基因型和优势等位基因种类及频率大小均有不同程度的差别, C5872T、C5888T、A5976G、C6010T、T6029A、C6037T、C6043T、C6063T、C6112T、C6164T、G13520A、G13563A 和 G13669A 位点的优势基因型分别是 *TT*、*CC*、*GG*、*CC*、*TT*、*CC*、*CC*、*TT*、*TT*、*TT*、*GG*、*GG* 和 *AA* 型, 频率分别为 0.566、0.916、0.483、0.983、0.933、0.550、0.783、0.783、0.933、0.600、0.650、0.917 和 0.533; 优势等位基因分别是 *T*、*C*、*G*、*C*、*T*、*C*、*C*、*T*、*T*、*T*、*G*、*G* 和 *A*, 频率分别为 0.725、0.925、0.608、0.983、0.967、0.690、0.867、0.858、0.967、0.692、0.792、0.958 和 0.675。同一 SNP 位点的各优势基因型及等位基因种类及频率大小在不同猪品种间也有不同程度的差别,

表 2 各品种内及总群体中部分组合基因型的分布频率

Table 2 Partial composite genotype frequencies in each breed and in the whole group

组合基因型 Composite genotype	五指山猪 Wuzhishan pig	滇南小耳猪 Diannan small-ear pig	香猪 Xiang pig	梅山猪 Meishan pig	大白猪 Large white pig	总群体 Whole group
<i>H1</i>	0.150	0.100	0.000	0.000	0.000	0.067
<i>H2</i>	0.050	0.200	0.000	0.000	0.000	0.050
<i>H4</i>	0.050	0.300	0.100	0.100	0.000	0.100
<i>H11</i>	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017
<i>H12</i>	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017
<i>H15</i>	0.000	0.000	0.000	0.300	0.800	0.183
<i>H19</i>	0.150	0.200	0.400	0.000	0.000	0.150

注: 详细原始数据可向作者索取。

Note: All original data can be obtained from the authors.

表 3 各品种内和总群体中部分 SNP 位点基因与基因型频率

Table 3 Allele and genotype frequencies of several SNP sites in each breed and in the whole group

位点 SNP sites	基因及基因型 Alleles and genotypes	五指山猪 Wuzhishan pig	滇南小耳猪 Diannan small-ear pig	香猪 Xiang pig	梅山猪 Meishan pig	大白猪 Large white pig	总群体 the whole group
C5888T (5 Flanking)	CC	0.800	0.900	1.000	1.000	1.000	0.916
	TT	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.067
	CT	0.200	0.100	0.000	0.000	0.000	0.017
	C	0.900	0.950	1.000	1.000	1.000	0.925
	T	0.100	0.050	0.000	0.000	0.000	0.075
A5976G (Exon1)	AA	0.050	0.100	0.100	0.300	1.000	0.267
	GG	0.650	0.900	0.600	0.100	0.000	0.483
	AG	0.300	0.000	0.300	0.600	0.000	0.250
	A	0.200	0.100	0.250	0.600	1.000	0.392
C6164T (Intron1)	G	0.800	0.900	0.750	0.400	0.000	0.608
	CC	0.000	0.100	0.000	0.400	0.800	0.217
	TT	0.850	0.900	0.900	0.100	0.000	0.600
	CT	0.150	0.000	0.100	0.500	0.200	0.183
	C	0.075	0.100	0.050	0.650	0.900	0.308
G13669A (Exon2)	T	0.925	0.900	0.950	0.350	0.100	0.692
	GG	0.000	0.000	0.000	0.300	0.800	0.184
	AA	0.700	1.000	0.700	0.100	0.000	0.533
	GA	0.300	0.000	0.300	0.600	0.200	0.283
	G	0.150	0.000	0.150	0.600	0.900	0.325
	A	0.850	1.000	0.850	0.400	0.100	0.675

注: 详细原始数据可向作者索取。

Note: All original data can be obtained from the authors.

C5888T、C6010T、T6029A、C6043T、C6063T、C6112T、G13563A 共 7 个位点在 5 个猪品种中的优势基因型和优势等位基因频率均一致, 这些位点可能与猪 *IGF2* 基因的基本生物学功能有关; C5872T 和 G13520A 共 2 个位点在 5 个猪品种中的优势等位基因频率一致, 但优势基因型不完全一致; C6037T 位点在香猪中的优势基因型为 *TT* 型, 优势等位基因为 *T*, 而在其他 4 个猪品种均与之不同。

A5976G、C6164T 和 G13669A 共 3 个位点在小型猪和梅山猪与大白猪 2 品种间有一定差异: A5976G 位点在 3 个小型猪中优势基因型均为 *GG* 型, 频率分别为 0.650、0.900 和 0.600, 优势等位基因均为 *G*, 频率分别为 0.800、0.900 和 0.750, 而在梅山猪和大白猪中优势基因型分别为 *AG* 和 *AA* 型, 频率分别为 0.600 和 1.000, 优势等位基因均为 *A*, 频率分别为 0.600 和 1.000; C6164T 位点在 3 个小型猪品种中优势基因型均为 *TT* 型, 频率分别为 0.850、0.900 和 0.900, 优势等位基因均为 *T*, 频率分别为 0.925、0.900 和 0.950, 而在梅山猪和大白猪中优势基因型分别为 *CT* 和 *CC* 型, 频率分别为 0.500 和 0.800, 优势等位基因均为 *C*, 频率分别为 0.650 和 0.900; G13669A 位点在 3 个小型猪品种中优势基因型均为 *AA* 型, 频率分别为 0.700、1.000 和 0.700, 优势等位

基因均为 *A*, 频率分别为 0.850、1.000 和 0.850, 在梅山猪和大白猪中优势基因型分别为 *GA* 和 *GG* 型, 频率分别为 0.600 和 0.800, 优势等位基因均为 *G*, 频率分别为 0.600 和 0.900。这 3 个 SNP 位点是否与猪的矮小性状有关, 还需进一步研究。

## 2.5 PCR-RFLP 分析

*IGF2-1* 基因 C5888T 位点存在 C $\leftrightarrow$ T 碱基变异, 为 *Eco52* 的识别位点(CGGCCG), 片段可切成 142 bp 和 301 bp 两个部分, 结果可检测到 3 种带型, 1 条为 *TT* 型, 2 条为 *CC* 型, 3 条为 *CT* 杂合型(图 5)。

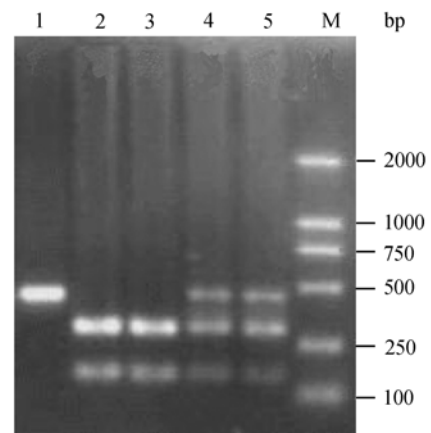


图 5 C5888T 位点 *Eco52* I 酶切图

Fig. 5 *Eco52* Digestion of PCR products at SNP C5888T

表 4 C5888T 位点 *Eco52 I* 酶切基因型及等位基因频率Table 4 Genotype and allele frequencies at the C5888T site according to *Eco52 I* digestion

五指山猪(123) Wuzhishan pig(123)	基因型频率 Genotype frequencies			等位基因频率 Allele frequencies		$\chi^2$
	<i>TT</i>	<i>CT</i>	<i>CC</i>	<i>T</i>	<i>C</i>	
	0.0163(2)	0.2602(32)	0.7235(89)	0.1464	0.8536	0.2094

统计 123 头五指山猪 *IGF2* 基因在 C5888T 位点的基因型分布频率及等位基因频率(表 4)。结果显示, 该位点 *CC* 型个体数最多, 高达 89 个, 频率为 0.7235, 为优势基因型; *CT* 杂合型次之, 数目为 32 个, 频率为 0.2602; 而仅发现 2 个样本为 *TT* 型, 频率为 0.0163; *C* 为优势等位基因, 频率为 0.8536。卡方适合性检验 ( $P>0.05$ ) 表明五指山猪在该位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

### 3 讨论

#### 3.1 SNP 位点筛查

猪 *IGF2* 基因作为一个影响肌肉生长、脂肪沉积和心脏大小等性状的候选基因, 其 SNP 多态性及其与生长发育性状相关性已成为重要研究方向之一。Nezer 等<sup>[4]</sup>、Knoll 等<sup>[14]</sup>、van Laere 等<sup>[13]</sup>、Vykoukalova 等<sup>[18]</sup>、刘桂兰等<sup>[15]</sup>、刘鑫等<sup>[16]</sup>针对不同猪品种对 *IGF2* 基因的外显子 2、内含子 2、3、7 和 8 进行了多态性研究, 发现了 4 处单碱基变异和多个 *Nci* 酶切位点; 刘德武<sup>[17]</sup>采用变性高效液相色谱技术 (DHPLC), 用 12 对引物对猪 *IGF2* 基因进行了 SNP 筛查, 找到 21 处 SNP 位点, 并构建了 SNP 图谱。

本研究采用 PCR 产物直接测序法, 在 *IGF2* 基因外显子 1 上游部分序列、内含子 1 和内含子 2 部分序列以及外显子 1、2 序列进行了筛查, 找到 13 个 SNP 位点, 即 C5872T、C5888T、A5976G、C6010T、T6029A、C6037T、C6043T、C6063T、C6112T、C6164T、G13520A、G13563A 和 G13669A。其中 C5872T、C6037T、G13520A 和 G13669A 位点与刘德武<sup>[17]</sup>的研究一致, 其他位点均为首次报道, 它在一定程度上反映了采用直接测序法对基因小片段进行 SNP 筛查的优越性。

#### 3.2 特征标记分析

由于五指山猪等小型猪在医学及实验动物化方面的潜在价值, 近年来对其种质特性的研究较多, 其中矮小机制的研究倍受关注。本研究以五指山猪为重点, 选取滇南小耳猪、香猪、梅山猪和大白猪作对照, 采用 PCR 产物直接测序法对 5 个猪品种

*IGF2* 基因 5' 调控区部分片段进行了系统的 SNP 筛查, 研究尚属首次。在对各个 SNP 位点分析的基础上, 又从组合基因型的角度对多个 SNP 位点进行总体研究, 涉及信息含量更多, 对于数量性状的研究更贴近实际, 但由于在传代过程中存在性状分离的可能, 因此, 本课题组现正着手从单体型角度做进一步分析。

该研究通过对 13 个 SNP 位点和 23 种组合基因型的综合分析, 获得与猪的矮小机制可能存在一定联系的 2 个组合基因型和 3 个 SNP 位点, 即 *H15* 和 *H19* 型及 A5976G、C6164T 和 G13669A 位点。其中, *H19* 和 *H15* 型分别为小型猪和梅山猪与大白猪的特征组合基因型, 在 A5976G、C6164T 和 G13669A 位点, 小型猪的优势等位基因分别为 *G*、*T* 和 *A*, 而梅山猪与大白猪的优势等位基因均分别为 *A*、*C* 和 *G*, 与小型猪截然不同。

#### 3.3 PCR-RFLP 分析

对 123 头五指山猪研究发现, *IGF2* 基因 C5888T 位点 *C* 为优势等位基因, *CC* 为优势基因型。卡方检验表明该位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。而王苏<sup>[20]</sup>选择 *Rsa* 和 *Hae* 酶分别对五指山猪 SLA-DQB 基因第 2 外显子进行酶切, 结果均不处于 Hardy-Weinberg 平衡。这可能与该猪种基因纯合度低、受到外来猪种遗传改良的影响和人工选择有关, 在遗传资源的保护与开发利用中值得注意。至于 C5888T 位点是否与五指山猪的生长性状紧密相关, 还有待进一步深入分析, 有关个体的早期生长性状正在测定中。此外, 其他 SNP 位点的 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 研究也正在进行, 这些研究将为五指山猪生长发育规律和矮小机制等方面奠定坚实的遗传学基础。

#### 参考文献(References):

- [1] HUANG Li-Guang, WANG Xi-Long, OU Jiang-Tao, GUO Chun-Hua, LI Xiao-Cheng, WANG Feng, ZHENG Xin-Li. Genetic analysis of 32 microsatellite loci in 13 families of wuzhishan pig by multiplex PCR and gene scanning technique. *Hereditas*(Beijing), 2005, 27(1): 70-74.  
黄礼光, 王希龙, 欧江涛, 郭春华, 李小成, 王峰, 郑心力.

- 应用多重 PCR 和基因扫描技术对五指山猪 13 个家系 32 个微卫星基因座的遗传分析. *遗传*, 2005, 27(1): 70—74.
- [2] LIU Gui-Lan, JIANG Si-Wen, XIONG Yuan-Zhu, QU Yan-Chun. The character of heredity and biological function of insulin-like growth factor 2. *Hereditas*(Beijing), 2002, 24(2): 211—213.  
刘桂兰, 蒋思文, 熊远著, 屈彦纯. 胰岛素样生长因子 2 的遗传学特征与生物学作用. *遗传*, 2002, 24(2): 211—213.
- [3] Jeon JT, Carlborg O, Tornsten A, Giuffra E, Amarger V, Chardon P, Andersson-Eklund L, Adersson K, Hansson I, Lundstrom K, Andersson L. A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the *IGF2* locus. *Nat Genet*, 1999, 21(2): 157—158. [\[DOI\]](#)
- [4] Nezer C, Moreau L, Brouwers B, Coppieters W, Detilleux J, Hanset R, Karim L, Kvasz A, Leroy P, Georges M. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to *IGF2* locus in pigs. *Nat Genet*, 1999, 21(2): 155—156. [\[DOI\]](#)
- [5] de Koning DJ, Rattink AP, Harlizius B, van Arendonk JA, Brascamp EW, Groenen MA. Genome-wide scan for body composition in pigs reveals important role of imprinting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(14): 7947—7950. [\[DOI\]](#)
- [6] Amarger V, Nguyen M, Van Laere AS, Braunschweig M, Nezer C, Georges M, Andersson L. Comparative sequence analysis of the *INS-IGF2-H19* gene cluster in pigs. *Mamm Genome*, 2002, 13(7): 388—398. [\[DOI\]](#)
- [7] Monk D, Sanches R, Arnaud P, Apostolidou S, Hills FA, Abu-Amero S, Murrell A, Friess H, Reik W, Stanier P, Constancia M, Moore GE. Imprinting of *IGF2 P0* transcript and novel alternatively spliced *INS-IGF2* isoforms show differences between mouse and human. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(8): 1259—1269. [\[DOI\]](#)
- [8] Murphy SK, Huang Z, Wen Y, Spillman MA, Whitaker RS, Simel LR, Nichols TD, Marks JR, Berchuck A. Frequent *IGF2/H19* domain epigenetic alterations and elevated *IGF2* expression in epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(4): 283—292. [\[DOI\]](#)
- [9] Fowden AL, Sibley C, Reik W, Constancia M. Imprinted genes, placental development and fetal growth. *Horm Res*, 2006, 65(Suppl.3): 50—58. [\[DOI\]](#)
- [10] Wang G, Yan B, Deng X, Li C, Hu X, Li N. Insulin-like growth factor 2 as a candidate gene influencing growth and carcass traits and its biallelic expression in chicken. *Sci China C Life Sci*, 2005, 48(2): 187—194. [\[DOI\]](#)
- [11] Szabo PE, Han L, Hyo-Jung J, Mann JR. Mutagenesis in mice of nuclear hormone receptor binding sites in the *Igf2/H19* imprinting control region. *Cytogenet Genome Res*, 2006, 113(1-4): 238—246. [\[DOI\]](#)
- [12] Flisikowski K, Maj A, Zwierzchowski L, Adamowicz T, Switonski M, Hiendleder S, Pareek C. Nucleotide sequence and variation of *IGF2* gene exon 6 in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *Anim Biotechnol*, 2005, 16(2): 203—208. [\[DOI\]](#)
- [13] van Laere AS, Nguyen M, Braunschweig M, Nezer C, Collette C, Moreau L, Archibald AL, Haley CS, Buys N, Tally M, Andersson G, Georges M, Andersson L. A regulatory mutation in *IGF2* causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature*, 2003, 425(6960): 832—836.
- [14] Knoll A, Putnova L, Dvorak J, Cepica S. A Nci PCR-RFLP within intron 2 of the porcine insulin-like growth factor-2 (*IGF2*) gene. *Anim Genet*, 2000, 31(2): 150—151. [\[DOI\]](#)
- [15] LIU Gui-Lan, JIANG Si-Wen, XIONG Yuan-Zhu, ZHENG Rong, QU Yan-Chun. Association of PCR-RFLP polymorphisms of *IGF2* gene with fat deposit related traits in pig resource family. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(12): 1107—1112.  
刘桂兰, 蒋思文, 熊远著, 郑嵘, 屈彦纯. *IGF2* 基因 PCR-RFLP 多态性与脂肪沉积相关性状的关联分析. *遗传学报*, 2003, 30(12): 1107—1112.
- [16] LIU Xin. Studies on effects of *IGF-* gene on partial growth and carcass traits in pigs[Dissertation]. Hunan Agricultural University, 2004.  
刘鑫. 猪 IGF- 基因与部分生长、胴体性状相关性的研究[学位论文]. 湖南农业大学, 2004.
- [17] LIU DW. Study on SNP of several genes related to the pig growth [Dissestation]. South China Agricultural University, 2005.  
刘德武. 猪生长相关基因的单核苷酸多态性研究[学位论文]. 华南农业大学, 2005.
- [18] Vykoukalova Z, Knoll A, Dvorak J, Cepica S. New SNPs in the *IGF2* gene and association between this gene and backfat thickness and lean meat content in Large White pigs. *J Anim Breed Genet*, 2006, 123(3): 204—207. [\[DOI\]](#)
- [19] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A laboratory manual. Beijing: Science Press, 2002.  
[美]J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南(上、下册). 北京: 科学出版社, 2002.
- [20] WANG Su. Polymorphism analysis of *SLA-DQB* with PCR-RFLP in three Hainan indigenous pig breeds [Dissestation]. Southwest University for Nationalities, 2006.  
王苏. 三个海南猪品种 *DQB* 基因第 2 外显子的多态性研究[学位论文]. 成都: 西南民族大学, 2006.
- [21] Nei M. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press, 1987.
- [22] WANG Xi-Long, OU Jiang-Tao, HUANG Li-Guang, GUO Chun-Hua, ZHONG Jin-Cheng, LI Xiao-Cheng, WANG Feng, ZHENG Xin-Li. Genetic diversity in the Wuzhishan pig from Hainan based on 32 microsatellite loci. *Biodiversity Science*, 2005, 13(1): 20—26.  
王希龙, 欧江涛, 黄礼光, 郭春华, 钟金城, 李小成, 王峰, 郑心力. 海南五指山猪遗传多样性的微卫星分析. *生物多样性*, 2005, 13(1): 20—26.