

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00760

鸭前胰岛素原基因多态性及其与屠体性状的关联分析

孔祥洁, 刘小林, 吴艳, 王婕

西北农林科技大学动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100

摘要: 以 384 只北京鸭 (Z2 系、Z4 系、Z2×Z4 杂交系) 和樱桃谷鸭为材料, 利用 PCR-SSCP 结合测序技术, 对前胰岛素原基因外显子 2 与部分内含子的多态性进行了研究, 并分析对屠体性状的遗传效应。结果发现存在 2 个单核苷酸突变位点, 即在第 179 位和第 195 位分别发生了 T→C 和 C→T 的突变。适合性 χ^2 检验结果表明, 北京鸭各品系和樱桃谷鸭均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P>0.05$)。最小二乘分析 SNPs 与屠体性状的关系表明, 在北京鸭 3 个品系中, 基因型 BB 在胴体重、全净膛重和胸肌重上极显著 ($P<0.01$) 高于基因型 AA 和 AB, 在腿肌重和皮脂重上极显著 ($P<0.01$) 高于基因型 AB; 基因型 AA 在皮脂率和全净膛重上极显著 ($P<0.01$) 和显著 ($P<0.05$) 高于基因型 AB。而对于樱桃谷鸭, 只有 AB 型在皮脂重和腹脂重上显著 ($P<0.05$) 高于基因型 AA。研究结果表明, 鸭前胰岛素原基因多态性与鸭的部分屠体性状存在显著相关性, 且 B 等位基因有利于增加鸭的胴体重和胸肌重。

关键词: 鸭; 前胰岛素原基因; SNPs

Genetic variance of duck preproinsulin gene and its correlations to the traits of carcasses

KONG Xiang-Jie, LIU Xiao-Lin, WU Yan, WANG Jie

Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

Abstract: Genetic polymorphisms of exon 2 and partial intron of preproinsulin gene were studied in Peking duck and Cherry Valley duck by PCR-SSCP and DNA sequencing technologies. Two single nucleotide mutations, T179C and C195T, were found, respectively. χ^2 test reflects that the tested population of Peking duck and Cherry Valley duck were in the Hardy-Weinberg equilibrium state ($P>0.05$). The relationships between SNPs and the traits of carcasses were analyzed by the least square analysis, which showed that the genotype BB in three lines of Peking duck was significantly higher in carcass weight, carcass net weight and breast muscle weight than AA and BB ($P<0.01$) and significantly higher in leg muscle weight and sebum weight than AB ($P<0.01$). In addition, the genotype AA was significantly greater than AB in sebum rate ($P<0.01$) and carcass net weight ($P<0.05$), respectively. However, for Cherry Valley duck, only the genotype AB was significantly higher than AA in sebum weight and abdomen fat weight ($P<0.05$). The results indicated that there was significant correlation between the genetic polymorphisms of preproinsulin gene and the traits of duck carcasses and the allele B was valuable for increasing the carcass weight and breast muscle weight.

收稿日期: 2007-11-19; 修回日期: 2008-01-02

基金项目: 国家十一五支撑计划项目(编号: 2006BAD14B06)资助[Supported by Chinese National Key Technology R&D Program during the 11th Five-Years Plan Period (No.2006BAD14B06)]

作者简介: 孔祥洁(1976-), 女, 河南安阳人, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传资源。E-mail: xiangjie1212@163.com

通讯作者: 刘小林(1961-), 男, 陕西城固人, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: liuxiaolin@nwsuaf.edu.cn

Keywords: duck; preproinsulin gene; SNPs

胰岛素(Insulin)是动物重要的内分泌激素,在机体代谢调控中具有重要的作用。胰岛素的蛋白质序列在各个物种中均很相似,具有很高的保守性^[1]。Steiner等^[2]发现了胰岛素生物合成过程中的一种前体形式胰岛素原(Proinsulin),随后又发现另外一种形式前胰岛素原(Preproinsulin)^[3]。人的编码前胰岛素原的基因位于 11 号染色体短臂近末端处,接近于胰岛素样生长因子(IGF-2)基因区域,由 1 789 bp 组成,它包括 3 个外显子和 2 个内含子。前胰岛素原在胰岛β细胞内质网合成,含有信号肽、A 链、C 肽和 B 链,在胰岛β细胞高尔基体中脱去信号肽,形成含 86 个氨基酸残基的胰岛素原,然后经蛋白酶将 C 肽水解, A、B 链由 2 个二硫键相连成为有生物学活性的胰岛素^[4-6]。

胰岛素是一种多功能的蛋白质激素,主要作用在肝脏、肌肉及脂肪组织等,不但控制着糖、蛋白质和脂肪 3 大营养物质的代谢和储存,而且还具有重要的促生长作用^[7]。胰岛素分泌功能的障碍或分泌相对不足将会引发疾病如糖尿病等^[8-10]。对胰岛素前体及其相关因素的研究有利于阐明胰岛素的作用机制和生理功能。毛微波等^[11]发现由胃黏膜分泌的小分子脑肠肽 Ghrelin 能够增加大鼠胰岛内前胰岛素原 mRNA 的表达,促进胰岛素合成。邵建华等^[12]发现游离脂肪酸促进基础状态体外大鼠胰岛β细胞分泌胰岛素,β细胞的过度增生是引起基础状态胰岛素过多分泌的一个原因;游离脂肪酸促进基础状态β细胞前胰岛素原 mRNA 表达,在转录水平促进前胰岛素原合成,造成胰岛素合成和分泌增加。乔虹等^[13]的研究也证实了游离脂肪酸抑制糖刺激下的胰岛素分泌和合成。目前,对胰岛素的研究主要集中在人、鼠和猪等物种上,尽管胰岛素的氨基酸结构已经阐明,但是在鸭上的研究尚未见到相关的报道。

本文根据鸭前胰岛素原基因序列(GenBank No. AY206806)设计引物,以北京鸭和樱桃谷鸭为实验材料,用单链构象多态(Single strand conformation polymorphism, SSCP)方法对鸭前胰岛素原基因的编码区和部分非编码区进行了单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNPs)检测,得到不同品种(系)鸭该基因的变异,并分析其遗传多态性与鸭屠体性状的相关性,为进一步研究该基因的功能及

用于鸭标记辅助选择中的应用奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

样本来自中国农业科学院畜牧研究所水禽研究中心,共 384 只鸭。采用随机抽样法采取北京鸭 Z2 系(母系)95 只、Z4 系(父系)98 只、杂交系(Z2×Z4)92 只和樱桃谷鸭 99 只。6 周龄翅静脉采血 5 mL(ACD 抗凝), -80 °C 冰箱保存。称活重后屠宰,测定胴体重、胸肌重、腿肌重、全净膛重、皮脂重、腹脂重、皮脂率和腹脂率(皮脂率=皮脂重/全净膛重×100%,腹脂率=腹脂重/全净膛重×100%)。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取及纯度测定

基因组 DNA 的提取参照孟安明等^[14]方法,用分光光度计测定 OD 值,根据 OD_{260}/OD_{280} 判断 DNA 纯度。

1.2.2 引物的设计和 PCR 扩增

根据 GenBank 登录序列 AY206806,设计引物对鸭的前胰岛素原外显子 2 和部分内含子序列进行 PCR 扩增。引物序列为: Forward, 5'-CCCTTCTTGC-TCTTTCTGG-3'; Reverse, 5'-GATAGGTGTCTGC-CTTTTGT-3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

PCR 扩增体系中包含 1.33 mmol/L $MgCl_2$ 、0.2 mmol/L dNTPs、0.3 μmol/L 引物、1 U *Taq* DNA 聚合酶和 100 ng 模板 DNA。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 60 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 PCR-SSCP

将扩增效果良好的 PCR 产物进行 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后,银染显色。对 SSCP 分析后的纯合基因型个体,各取 3 个个体的 PCR 扩增产物进行回收纯化,送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.4 数据统计分析

序列分析采用 DNASTar 软件包中的 SeqMan 软件

进行,并根据SSCP得到的SNPs划分基因型。将GenBank上的鸭前胰岛素原基因序列定为野生型基因型,突变个体的基因型为突变型基因型。根据所检测群体的数据结构,利用SAS8.2 统计软件包的PROC-GLM对所发现的突变位点与鸭的屠体性状进行统计分析。统计分析模型: $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + G_k + E_{ijk}$, 其中 Y_{ijk} 为个体屠宰性状的观测值; μ 为屠宰性状的群体均值; A_i 为第 i 个品系效应 ($i = 1, 2, 3$); B_j 为性别效应 ($j = 1, 2$, 分别代表公鸭和母鸭); G_k 为第 k 个基因型效应 (k 代表位点基因型); E_{ijk} 为随机误差效应。

2 结果与分析

2.1 PCR-SSCP 序列分析

用所设计的引物进行PCR扩增获得了较理想的结果,扩增片段大小和预期结果(214 bp)一致(图1),没有非特异性扩增产物,可以用于SSCP分析。经SSCP分析,结果检测到3种基因型AA、BB和AB(图2)。对存在SNPs的纯合基因型个体的PCR产物进行测序,然后将测得的含突变位点的序列与GenBank的前胰岛素原基因已知序列(AY206806)进行同源性比较,发现共存在2个点突变。即在第179位和第195位发生了T→C和C→T的突变(图3)。AA为野生型基

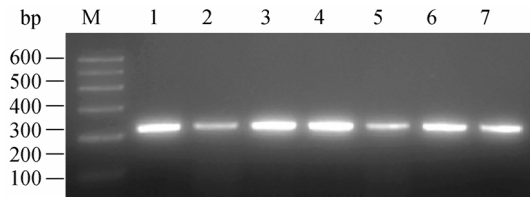


图1 前胰岛素原基因PCR产物图谱

M: DNA marker; 1~7: 不同个体的PCR扩增产物。

Fig. 1 Electrophoretic patterns of preproinsulin gene PCR products

M: DNA marker; 1~7: Individual PCR products.

表1 北京鸭和樱桃谷鸭PCR-SSCP的遗传参数分析

Table 1 Analysis of genetic parameters of PCR-SSCP in Peking and Cherry Valley duck

品种和品系 Breeds and lines	样本数 Numbers	基因型频率 Genotype frequencies				等位基因频率 Allele frequencies		H_e	PIC
		AA	AB	BB	χ^2	A	B		
北京鸭 Z2 系 Z2 line of Peking Duck	95	0.22	0.53	0.25	0.22	0.48	0.52	0.50	0.37
北京鸭 Z4 系 Z4 line of Peking Duck	98	0.10	0.39	0.51	0.55	0.30	0.70	0.42	0.33
北京鸭杂交系 Hybrid line of Peking Duck	92	0.26	0.47	0.27	0.46	0.49	0.51	0.50	0.37
樱桃谷鸭 Cherry Valley duck	99	0.30	0.47	0.23	0.50	0.54	0.46	0.50	0.37

因型, BB 为突变型基因型, AB 为杂合基因型。

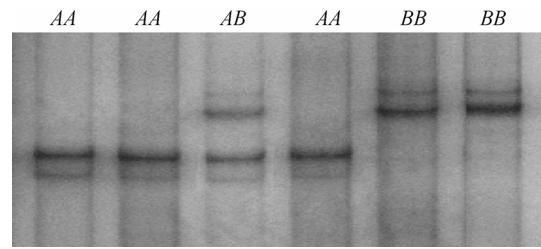


图2 前胰岛素原基因SSCP带型

Fig. 2 Electrophoretic patterns of preproinsulin gene PCR-SSCP analysis

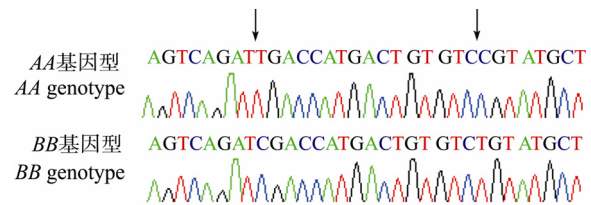


图3 前胰岛素原基因SNPs序列分析

箭头表示突变位点。

Fig. 3 Sequence analysis for the isolated genotype of preproinsulin gene

Arrows indicated mutation sites.

2.2 北京鸭和樱桃谷鸭前胰岛素原基因的遗传多态性分析

在北京鸭各品系和樱桃谷鸭中均检测到3种基因型,各基因型频率和等位基因频率见表1。在北京鸭中,B等位基因频率高于A等位基因频率,以Z4系最为明显;而在樱桃谷鸭中,则A等位基因频率高于B等位基因频率。适合性 χ^2 检验结果表明,北京鸭各品系和樱桃谷鸭均处于Hardy-Weinberg平衡状态($P > 0.05$)。对该位点的基因型频率进行 χ^2 检验,结果表明北京鸭各品系间及其与樱桃谷鸭的基因型频率差异均不显著($P > 0.05$)。

各群体杂合度(He)和多态信息含量(PIC)如表 1 所示, 尽管北京鸭 Z2 系和杂交系以及樱桃谷鸭的等位基因频率不同, 而其杂合度和多态信息含量却相同, 均为 0.50 和 0.37。4 个群体中以北京鸭 Z4 系的杂合度和多态信息含量较低。

2.3 遗传效应分析

采用 SAS8.2 统计软件中的非均衡数据的方差分析(GLM)对不同基因型与屠体性状进行分析, 并

用最小显著差数法(LSD)进行多重比较, 结果见表 2 和表 3。在北京鸭中, 基因型 BB 在胴体重、全净膛重和胸肌重上极显著($P<0.01$)高于基因型 AA 和 AB , 腿肌重和皮脂重极显著($P<0.01$)高于基因型 AB ; 基因型 AA 在皮脂率和全净膛重上极显著($P<0.01$)和显著($P<0.05$)高于基因型 AB 。而对于樱桃谷鸭, 仅 AB 型在皮脂重和腹脂重上显著($P<0.05$)高于基因型 AA 。

表 2 北京鸭不同基因型的多重比较

Table 2 The results of multiple comparisons among the genotypes of preproinsulin in Peking duck

性状 Traits	基因型 Genotypes		
	$AA(n=55)$	$BB(n=99)$	$AB(n=131)$
胴体重 Carcass weight (g)	2451.50±251.93 ^A	2580.95±291.64 ^B	2471.70±263.81 ^A
全净膛重 Carcass net weight (g)	1108.40±108.02 ^{aa}	1183.09±111.58 ^{Bb}	1142.95±122.50 ^a
胸肌重 Breast muscle weight (g)	186.78±39.07 ^A	211.10±49.50 ^B	189.53±42.55 ^A
腿肌重 Leg muscle weight (g)	126.68±15.60 ^{AB}	130.33±18.71 ^B	124.17±15.75 ^A
皮脂重 Sebum weight (g)	624.47±77.82 ^{AB}	644.26±108.26 ^B	606.33±93.75 ^A
腹脂重 Abdomen fat weight (g)	50.50±10.77	52.14±12.62	50.21±12.62
皮脂率 Sebum rate (%)	56.50±6.21 ^A	54.44±7.71 ^{AB}	52.88±8.50 ^B
腹脂率 Abdomen rate (%)	4.58±0.97	4.41±1.00	4.41±1.12

注: 同一行右标大写字母不同表示基因型之间差异极显著($P<0.01$); 同一行小写字母不同表示差异显著($P<0.05$); 有相同字母则表示不显著($P>0.05$)。

Notes: The different capital letters in the same column indicated extremely significant difference ($P<0.01$) between the means in genotypes, and the different small letters in the same column indicated significant difference ($P<0.05$). The same letters indicated no significant difference ($P>0.05$).

表 3 樱桃谷鸭不同基因型的多重比较

Table 3 The results of multiple comparisons among the genotypes of preproinsulin in Cherry Valley duck

性状 Traits	基因型 Genotypes		
	$AA(n=30)$	$BB(n=23)$	$AB(n=46)$
胴体重 Carcass weight (g)	2457.10±256.69	2519.24±169.30	2530.84±213.59
全净膛重 Carcass net weight (g)	1223.89±124.59	1248.36±104.69	1246.65±116.01
胸肌重 Breast muscle weight (g)	275.94±53.76	295.22±42.76	280.75±48.25
腿肌重 Leg muscle weight (g)	137.82±16.97	142.03±13.62	142.87±16.23
皮脂重 Sebum weight (g)	427.12±68.39 ^a	449.02±57.25 ^{ab}	461.44±56.55 ^b
腹脂重 Abdomen fat weight (g)	24.50±8.56 ^a	28.22±7.08 ^{ab}	29.50±9.88 ^b
皮脂率 Sebum rate (%)	34.94±4.97	36.20±5.30	37.30±5.80
腹脂率 Abdomen rate (%)	2.03±0.80	2.29±0.63	2.41±0.94

注: 同一行小写字母不同表示差异显著($P<0.05$); 有相同字母则表示不显著($P>0.05$)。

Notes: The different small letters in the same column indicated significant difference ($P<0.05$). The same letters indicated no significant difference ($P>0.05$).

3 讨论

1979 年, Cordell 等^[15]首次克隆到大鼠的胰岛素基因, 继而在许多种属中均发现了该基因的表达。胰岛素基因除了在某些鼠类和鱼类中具有两个非等位基因外, 在大多数动物中包括人类都是单拷贝基因。前胰岛素原的生物学作用同胰岛素相比活性较弱, 但它的降血糖作用却较胰岛素持久。关于人和模式动物胰岛素及其前体形式基因功能和表达调控

的研究, 多集中在胰岛素用于糖尿病等疾病的治疗上; 而有关前胰岛素原基因的遗传多样性研究在其他物种上还未见报道。

本文首次研究了鸭的前胰岛素原基因的遗传多态性, 发现了两个单核苷酸多态位点。独立性检验表明不同群体基因型频率、基因频率分布存在差异, 这种差异可能是由于育种者对这些品种向不同方向的选择所造成的。北京鸭为我国肉蛋兼用型地方品

种, 其中 Z2 系是作为母系培育的, Z4 系是作为父系培育的; 樱桃谷鸭是外来引进的肉用品种。在本实验中, 北京鸭各品系和樱桃谷鸭均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态($P>0.05$), 说明该群体没有对前胰岛素原基因中的外显子 2 和部分内含子位点进行直接或间接选择, 或虽经过选择, 又重新达到平衡状态。

从群体遗传多态性角度分析, 如果 PIC 高, 等位基因数目多, 杂合度大, 表明该群体在该位点的遗传变异高, 有较大的选择余地, 可以利用该位点进行与生产性状相关的标记辅助选择。Botstein 等提出了衡量基因变异程度高低的多元信息含量指标 (PIC)。当 $PIC>0.5$ 时, 该位点为高度多态位点, 当 $0.5>PIC>0.25$ 时, 该位点为中度多态位点, 当 $PIC<0.25$ 时, 该位点为低度多态位点。北京鸭各品系和樱桃谷鸭 PIC 均为中度多态, 说明这些品种在该基因还可以进一步加以选择。

T179C 和 C195T 标记位点基因型与性状间关联分析发现, 在北京鸭 3 个品系中, 基因型 BB 在胴体重、全净膛重和胸肌重上极显著($P<0.01$)高于基因型 AA 和 AB, 在腿肌重和皮脂重上极显著($P<0.01$)高于基因型 AB; 基因型 AA 在皮脂率和全净膛重上极显著($P<0.01$)和显著($P<0.05$)高于基因型 AB。而对于樱桃谷鸭, 只有 AB 型在皮脂重和腹脂重上显著($P<0.05$)高于基因型 AA。说明北京鸭和樱桃谷鸭不同基因型对各性状的影响不同, 这可能是由于北京鸭与樱桃谷鸭之间的遗传差异、不同的基因型等原因造成的; 此外, 本研究结果还说明, 本实验样本中的 B 等位基因具有增加胴体重和胸肌重的效应。该位点能否作为肉鸭屠体性状的分子标记, 还需要增加鸭的品种数、扩大样本数、进行标记与屠体性状关联作深入研究, 最终得到真实可靠的分子遗传标记, 用于肉鸭屠体性状标记辅助选择的育种实践。

参考文献(References):

- [1] Simon J, Laurent S, Grolleau G, Thoraval P, Soubieux D, Rasschaert D. Evolution of preproinsulin gene in birds. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 30: 755–766. [\[DOI\]](#)
- [2] Steiner DF, Cunningham D, Spigelman L, Aten B. Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science*, 1967, 157(789): 697–700. [\[DOI\]](#)
- [3] Steiner DF. Insulin today. *Diabetes*, 1977, 26: 322–340.
- [4] GU Tian-Jue. Biochemistry. 3rd edition. Beijing: The People Public Health Publishing Company, 1990. 169–170.
顾天爵. 生物化学. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 1990. 169–170.
- [5] Chang X, Joergensen AM, Bardrum P, Led JJ. Solution structures of the R6 human insulin hexamer. *Biochemistry*, 1997, 36: 9409–9422. [\[DOI\]](#)
- [6] SUN Da-Ye, GUO Yan-Lin, MA Li-Geng. Cell Signal Transduction. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2000, 17–20.
孙大业, 郭艳林, 马力耕. 细胞信号转导. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2000, 17–20.
- [7] SHI Min, FENG You-Min. The growth promoting effects of insulin. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1997, 24(3): 215–219.
史民, 冯佑民. 胰岛素的促生长作用. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(3): 215–219.
- [8] Defronzo KA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. *Diabetes Care*, 1992, 15: 318–338. [\[DOI\]](#)
- [9] Mallone R, Ortolan E, Baj G, Funaro A, Giunti S, Lillaz E, Saccucci F, Cassader M, Cavallo-Perin P, Malavasi F. Autoantibody response to CD38 in Caucasian patients with type 1 and type 2 diabetes: immunological and genetic characterization. *Diabetes*, 2001, 50(4): 752–762. [\[DOI\]](#)
- [10] Del Prato S, Marchetti P, Bonadonna RC. Phasic insulin release and metabolic regulation in type 2 diabetes. *Diabetes*, 2002, 51(Suppl.1): 109–115. [\[DOI\]](#)
- [11] MAO Wei-Bo, GUO Xiao-Hui, GAO Yan, TONG Yu, TANG Zhao-Shu. Ghrelin promotes preproinsulin mRNA expression and glucose2 induced insulin secretion by islets isolated from rats. *Basic Medical Sciences and Clinics*, 2004, 24(4): 432–435.
毛微波, 郭晓慧, 高妍, 童玉, 唐朝枢. Ghrelin 促进大鼠胰岛素合成及高葡萄糖诱导的胰岛素分泌. 基础医学与临床, 2004, 24(4): 432–435.
- [12] SHAO Jian-Hua, GAO Yan, YUAN Zhen-Fang, LI Chang-Hong, WANG Shu-Feng. Effects of free fatty acids on insulin release and preproinsulin mRNA expression rat pancreatic β cells in basal condition. *Journal of Beijing Medical University*, 1998, 30(2): 127–130.
邵建华, 高妍, 袁振芳, 李长红, 王淑凤. 游离脂肪酸对基础状态 β 细胞胰岛素分泌和前胰岛素原 mRNA 表达的影响. 北京医科大学学报, 1998, 30(2): 127–130.
- [13] QIAO Hong, LI Qiang. Free fatty acids inhibit glucose-induced islets function. *Journal of Harbin Medical University*, 2003, 37(6): 494–497.
乔虹, 李强. 游离脂肪酸抑制葡萄糖刺激的胰岛功能. 哈尔滨医科大学学报, 2003, 37(6): 494–497.
- [14] MENG An-Ming, QI Shun-Zhang, GONG Gui-Fen. The DNA fingerprint generated by four fingerprint of poultry. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1993, 20(2): 139–142.
孟安明, 齐顺章, 宫桂芬. 四个探针产生的家禽 DNA 指纹图谱. 生物化学与生物物理进展, 1993, 20(2): 139–142.
- [15] LUO Tian-Hong, CHEN Jia-Lun. Theoretical and clinical research of proinsulin. *Foreign Medical Science: Sub-volume of Internal Medicine*, 1995, 15(2): 57–60.
骆天红, 陈家伦. 胰岛素原的基础和临床研究. 《国外医学》内分泌学分册, 1995, 15(2): 57–60.