

绵羊肌肉 IGF-IR 基因表达的发育性变化研究

黄治国^{1,2}, 谢庄^{2*}

(1. 四川理工学院酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川自贡 643000; 2. 南京农业大学动物科技学院, 江苏南京 210095)

摘要 [目的] 为绵羊的生长发育研究提供基础资料。[方法] 以 2、30、60、90、120 日龄雄性哈萨克羊和 2、30、60、90 日龄新疆细毛羊为试验动物, 对其肌肉 IGF-IR 基因进行 PCR 扩增, 并对扩增产物进行电泳检测和序列分析。[结果] 绵羊肌肉 IGF-IR 基因 PCR 扩增产物在琼脂糖凝胶上出现了 287 和 379 bp 2 条带, 该基因与牛 IGF-IR 基因序列的同源性为 98.59%; 在整个研究过程中, 哈萨克羊 IGF-IR mRNA 表达量较低、较稳定, 仅在 30 日龄时略有上升; 新疆细毛羊 IGF-IR mRNA 表达量在 2 日龄时较高, 30 日龄时略有下降, 60 日龄时达到最高峰, 90 日龄时降到最低水平, 且各日龄表达量差异显著; 哈萨克羊 mRNA 表达量在 2~60 日龄时显著低于新疆细毛羊, 而 90 日龄时显著高于新疆细毛羊。[结论] 绵羊肌肉 IGF-IR 基因表达存在较大的品种间差异。

关键词 绵羊; 肌肉; IGF-IR 基因; 表达

中图分类号 S826 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)12-05406-03

Study on Developmental Change of Muscle IGF-IR Gene Expression in Sheep

HUANG Zhi-guo et al (Liquor-making Biotechnology and Application Key Laboratory of Sichuan, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong, Sichuan 643000)

Abstract [Objective] The study was to provide the basic data for studying growth and development of sheep. [Method] With Kazakh male sheep of 2, 30, 60, 90, 120 day-old and Xinjiang fine wool sheep of 2, 30, 60, 90 day-old as the tested animal, the IGF-IR gene in their muscle was amplified with PCR, and the amplified products were detected by electrophoresis and its sequence was analyzed. [Result] The PCR amplified products of IGF-IR gene appeared 2 strips with 287 and 379 bp in agarose gel. The homology of IGF-IR gene in sheep and cow was 98.59%. During the whole research process, the expression level of IGF-IR mRNA in Kazakh sheep was lower and stable and slightly increased at 30 day-old. The expression level of IGF-IR mRNA in Xinjiang fine wool sheep was higher at 2 day-old, and slightly decreased at 30 day-old and reached the highest peak at 60 day-old, and decreased to the lowest level at 90 day-old, and the expression level at different day-old was significantly different. The expression level of mRNA in Kazakh at 2~60 day-old was obviously lower than that in Xinjiang fine wool sheep, and was significantly higher than that in Xinjiang fine wool sheep at 90 day-old. [Conclusion] The IGF-IR gene expression in sheep muscle had big difference between varieties.

Key words Sheep; Muscle; IGF-IR gene; Expression

生长激素(growth hormone, GH) 位于生长轴的中心环节, 对动物生长发育具有重要作用^[1], 其作用主要是通过靶器官 GHR 来实现^[2]。GH 在动物体内主要有 2 种作用方式: 一是先作用于肝脏等靶器官, 与 GHR 结合, 产生胰岛素样生长因子(IGFs), IGFs 以内分泌方式进入血液, 与胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBPs) 结合后到达靶器官, 作用于胰岛素样生长因子受体(IGFR), 从而调节动物生长发育; 二是 GH 直接作用于靶器官 GHR, 通过旁分泌或自分泌 IGF 直接作用于 IGFR, 影响细胞代谢, 从而调节动物生长发育^[3]。肌肉 IGF-R 基因对初生动物生长发育的调控可能具有重要的生理作用。笔者采用 real time PCR 法研究雄性哈萨克羊和新疆细毛羊肌肉 IGF-R 基因在绵羊生长发育早期的表达, 以期为绵羊的生长发育研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物。取自新疆维吾尔自治区石河子市紫泥

泉种羊场的 2、30、60、90 和 120 日龄雄性哈萨克羊和新疆细毛羊各 6 只(120 日龄的只有新疆细毛羊), 共 54 只羊, 测体重后屠宰, 取背最长肌, 立即置于液氮中速冻, -70℃ 保存。

1.1.2 主要试剂和仪器。MMLV 购自美国 Promega 公司, Taq DNA 聚合酶、EX Taq HS DNA 聚合酶和 pMD18-T Simple Vector 购自大连 TaKaRa 公司, 梯度 PCR 仪购自美国 BIORAD 公司, Opticon 荧光实时定量 PCR 仪购自美国 MJ 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成。IGF-R 基因引物序列参考贾斌^[4]的研究进行设计, 用持家基因 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, GAPDH) 基因作为内参。从 Genbank 中检索绵羊 GAPDH mRNA 序列, 用 Primer premier 5.0 软件设计引物(表 1)。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.2 RNA 提取和反转录。用硫氰酸胍-酚-氯仿 RNA 一步提取法提取肌肉总 RNA, 用紫外分光光度计测定总 RNA

表 1 IGF-R 和 GAPDH 的引物参数

Table 1 Primer parameters of IGF-R and GAPDH genes

目的基因 Target genes	cDNA 参考序列 Reference sequence	引物序列 Primer sequence	产物大小 bp Product size	退火温度 Annealing temperature
IGF-R	GenBank X54980	P1: 5'-CCGGTCTGTGATAGTGG-3'	287	56
		P2: 5'-GCCTCGTTCACCGTCTTA-3'	646~932	
GAPDH	GenBank AF030943	P1: 5'-ACTTTGGCATCGTGGAGG-3'	379	56
		P2: 5'-GAAGAGTGTGCTCGCTGTTG-3'	364~742	

的浓度和纯度($OD_{260}/OD_{280} = 1.8 \sim 2.0$)。

用随机引物对总 RNA 进行反转录, 反应体系为 25 μl: 2 μg 总 RNA, 1 μg 随机引物, 0.4 mmol/L dNTP, 20 U RNase in-

基金项目 新疆建设兵团博士基金(2003-02)。
作者简介 黄治国(1978-), 男, 四川广安人, 博士, 从事生物技术与分子遗传学研究。* 通讯作者。
收稿日期 2009-01-12

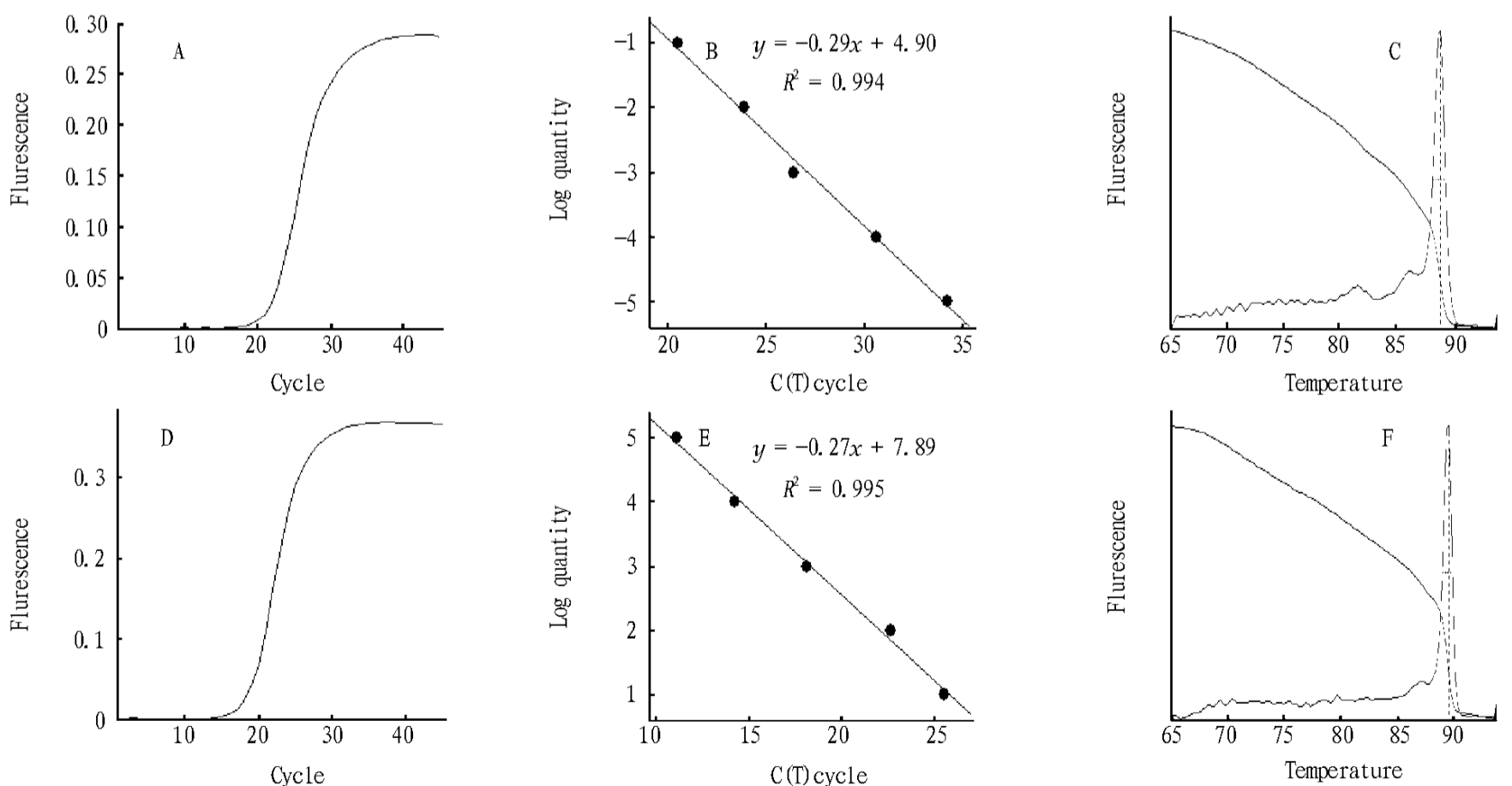
hibitor, 200 U MMLV 反转录酶, 5 μ l 5 \times RT buffer (含 250 mmol/L Tris-HCl pH 值 8.3, 50 mmol/L MgCl₂, 250 mmol/L KCl, 50 mmol/L DTT, 2.5 mmol/L Spermidine)。反应程序: 先加 RNA 模板, dNTP 和随机引物, 70 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后立即置于冰上冷却, 然后再加其余试剂, 混匀后于 37 $^{\circ}$ C 反应 60 min, 95 $^{\circ}$ C 灭活 5 min。RT 产物 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 PCR 反应、产物回收及克隆测序。 反应体系为 10 μ l: 0.5 μ l RT 产物, 1 U Taq DNA 聚合酶, 1 μ l 10 \times PCR buffer (100 mmol/L Tris-HCl pH 值 8.3, 500 mmol/L KCl), 0.25 mmol/L dNTP, 1.25 mmol/L MgCl₂, 0.5 μ mol/L 上游和下游引物。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 40 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染后用凝胶成像系统照相。

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外灯下割取目的片段, 用 V-gene DNA 凝胶回收试剂盒纯化(按说明书操作)。将回收的 DNA 片段与 pMD18-T Simple Vector 载体连接(按说明书操作), 并转化 JM109 菌株。用 V-gene 质粒 DNA 提取试剂盒提取质粒(按说明书操作), PCR 鉴定后, 送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.4 real time PCR。 反应体系为 20 μ l: 1 μ l RT 产物, 1 U EX Taq HS DNA 聚合酶, 4 μ l 5 \times PCR Buffer, 0.3 mmol/L dNTP, 3.75 mmol/L MgCl₂, 0.5 μ mol/L 上游和下游引物, 1 μ l 20 \times SYBR green。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 45 个循环, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 然后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。进行融解曲线分析: 65 ~ 94 $^{\circ}$ C, 每隔 0.2 $^{\circ}$ C 读 1 次板(温度恒定 1 s 后读板)。

每样品 2 个重复, 取其平均值进行计算。将克隆有目的



注: A 为 IGF-1R 基因的扩增曲线; B 为 IGF-1R 基因的标准曲线; C 为 IGF-1R 基因的熔解曲线; D 为 GAPDH 基因的扩增曲线; E 为 GAPDH 基因的标准曲线; F 为 GAPDH 基因的熔解曲线。

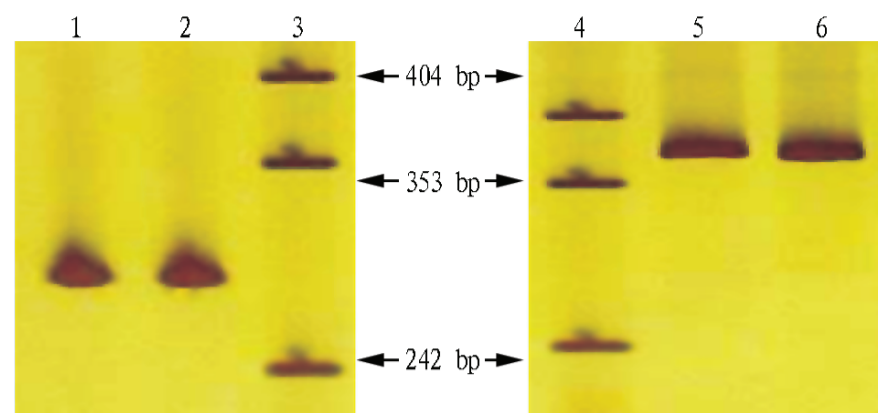
Note: A. Amplification curve of IGF-1R; B. Standard curve of IGF-1R; C. Melting curve of IGF-1R; D. Amplification curve of GAPDH; E. Standard curve of GAPDH; F. Melting curve of GAPDH.

图3 肌肉 IGF-1R 和 GAPDH 基因的扩增曲线、标准曲线和熔解曲线

Fig.3 The amplification, standard and melting curves of muscle IGF-1R and GAPDH genes

片断的质粒进行梯度稀释后作为标准品, 制作标准曲线。

1.3 数据分析 试验数据采用 SPSS11.5 For Windows 软件进行分析。

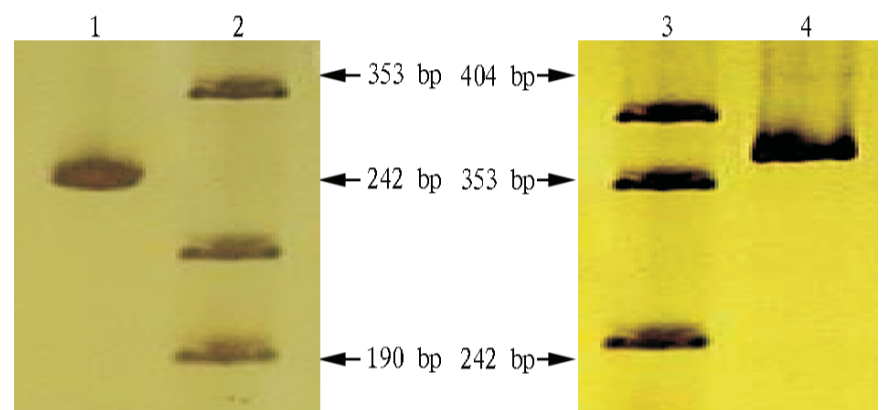


注: 1~2 为 IGF-R; 5~6 为 GAPDH; 3~4 为 DNA 分子量标记 PUC18。

Note: 1-2. IGF-R; 5-6. GAPDH; 3-4. DNA Marker PUC18.

图1 IGF-R 和 GAPDH 基因的 RT-PCR 电泳图

Fig.1 RT-PCR electrophoresis image of IGF-R and GAPDH genes



注: 1 为 IGF-R; 4 为 GAPDH; 2, 3 为 DNA 分子量标记 PUC18。

Note: 1. IGF-R; 4. GAPDH; 2-3. DNA Marker PUC18.

图2 IGF-R 和 GAPDH 基因克隆质粒 PCR 电泳图

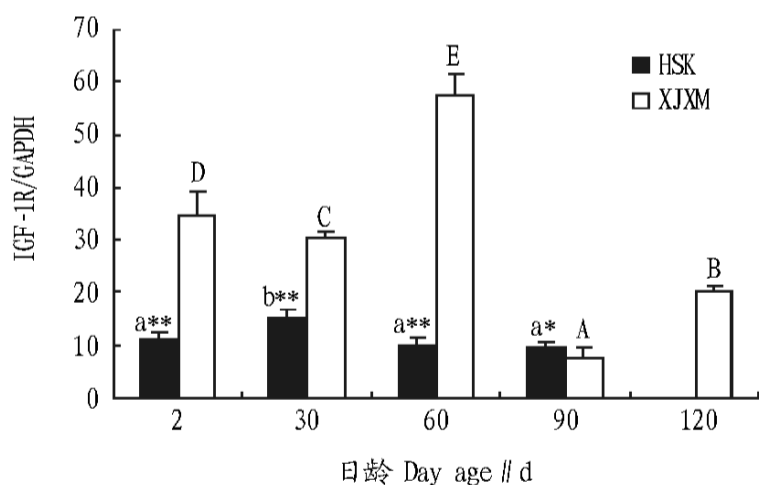
Fig.2 PCR electrophoresis image of IGF-R MD18-T and GAPDH pMD18-T

2 结果与分析

2.1 绵羊 IGF-R 和 GAPDH 基因 RT-PCR 扩增及克隆质粒测序结果 以雄性哈萨克羊肌肉总 RNA 为模板,用 IGF-IR 和 GAPDH 基因引物分别对其进行 RT-PCR 扩增,PCR 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳,分别获得 287 和 379 bp 2 条带(图1)。

将 IGF-IR 和 GAPDH 基因的扩增片段克隆到 pMD18-T Vector 中,PCR 鉴定(图2)后测序,用 DNASTAR 对测序结果与引物设计源序列进行同源性比较,结果发现,IGF-IR 基因片段的序列与牛 IGF-1R 基因序列相比存在 4 处单碱基突变,即扩增片段 42 位的 C→T 突变,65 位的 G→A 突变,120 位的 C→T 突变和 138 位的 T→G 突变,同源性为 98.59%。GAPDH 基因扩增片段的序列与引物设计源序列的同源性为 100%,表明 PCR 扩增片段为特异的 IGF-IR 和 GAPDH cDNA。

2.3 绵羊肝脏 IGF-IR 基因表达的发育性变化 用 real time PCR 对 2、30、60、90 和 120 日龄雄性哈萨克羊和新疆细毛羊(120 日龄的只有新疆细毛羊)肌肉 IGF-IR mRNA 的表达进行定量(图3)分析。结果发现,2 品种绵羊肌肉 IGF-IR mRNA 表达的发育性变化模式差异较大,哈萨克羊的表达量在整个研究时期均处于较低水平且比较平稳,仅在 30 日龄时略有上升,然后又降回基线水平;而新疆细毛羊 IGF-IR mRNA 的表达量波动较大,在 2 日龄时较高,30 日龄时略有下降,60 日龄时上升到最高峰,90 日龄时又降到最低水平,然后又逐渐回升,各日龄绵羊 IGF-IR mRNA 表达量差异显著($P < 0.05$)。哈萨克羊 IGF-IR mRNA 的表达量在 2~60 日龄期间均极显著低于新疆细毛羊($P < 0.01$),在 90 日龄时显著高于新疆细毛羊($P < 0.05$)(图4)。



注:品种内不同日龄间的差异用字母表示(哈萨克羊用小写字母表示;新疆细毛羊用大写字母表示),不同字母表示差异显著($P < 0.05$);*表示同日龄2品种间差异显著($P < 0.05$);**表示同日龄2品种间差异极显著($P < 0.01$);HSK代表哈萨克羊;XJXM代表新疆细毛羊。

Note: Letters indicate the difference of different day ages in varieties (lowercase letters indicate Kazakh sheep; capital letters indicate Xinjiang fine wool sheep), different letters indicate significant difference at 0.05 level; * indicates significant difference at 0.05 level in the same day age during two varieties; ** indicates significant difference at 0.01 level in the same day age during two varieties; HSK means Kazakh sheep; XJXM means Xinjiang fine wool sheep.

图4 肌肉 IGF-IR mRNA 表达的发育性变化

Fig.4 Developmental changes of muscle IGF-IR mRNA expression

3 结论与讨论

IGF 的作用是通过 IGF-R 介导的。Alexandrides 等^[5]研究发现,大鼠胎儿肌肉 IGF-IR 水平在怀孕后期到出生后 28 d 保持稳定,然后逐渐下降到成年水平。Peng 等^[6]研究表明,猪背最长肌 IGF-IR mRNA 的表达随年(胎)龄增加而减少。胥清富^[3]发现,二花脸猪和大约克猪背最长肌 IGF-IR mRNA 相对丰度从初生到 180 日龄无明显的发育性变化,总体上大约克猪 IGF-IR mRNA 丰度显著高于二花脸猪。Xing 等^[7]研究发现,核移植山羊 IGF-IR 基因的表达水平极显著高于普通山羊($P < 0.01$)。

贾斌等^[8]研究发现,哈萨克羊皮肤 IGF-IR mRNA 的表达量在 30~90 日龄显著升高($P < 0.05$),90 日龄出现高峰,之后显著下降($P < 0.01$);罗米丽(Ronilly Hillys)×中国美利奴(新疆军垦型)杂交一代优质细毛羊皮肤 IGF-IR mRNA 的表达量随日龄增加而缓慢下降($P > 0.05$),无发育性变化,而 2 品种 IGF-IR mRNA 表达量无性别差异。刘国庆等^[9]研究发现,羔羊肝脏 IGF-R 基因的表达量呈下降趋势,其中哈萨克羊肝脏 IGF-R 基因在 2 日龄时的表达量最高,然后持续下降,2 日龄时 IGF-IR mRNA 表达量与其他各时期差异显著($P < 0.05$);新疆细毛羊肝脏 IGF-R 基因在 2 日龄时表达量最高,然后持续下降,2 日龄时 IGF-IR mRNA 表达量与其他各时期差异显著($P < 0.05$)。哈萨克羊肝脏 IGF-R 基因的表达量在 2 和 90 日龄时均极显著低于新疆细毛羊($P < 0.01$)。该研究表明,绵羊肌肉 IGF-IR mRNA 的表达呈先上升后下降的趋势,但哈萨克羊肌肉 IGF-IR mRNA 的基础表达水平较低,其表达量只在 30 日龄时出现峰值,然后又下降到基线水平;而新疆细毛羊肌肉 IGF-IR mRNA 的基础表达水平较高,60 日龄时其表达量出现峰值,各日龄绵羊 IGF-IR mRNA 表达量差异显著。绵羊肌肉 IGF-IR 基因的表达模式与皮肤及肝脏 IGF-IR mRNA 的表达模式不同^[8-9],表明绵羊 IGF-IR mRNA 的表达存在组织特异性。该研究还发现,绵羊肌肉 IGF-IR mRNA 的表达存在较大的品种间差异,哈萨克羊的肌肉 IGF-IR mRNA 表达量在 2~60 日龄期间均极显著低于新疆细毛羊,但在 90 日龄时其表达量显著高于新疆细毛羊。这可能是 2 品种绵羊生长发育差异较大的原因之一。

参考文献

- [1] ETHELTON D, BAUMAN D E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals[J]. Physiological Reviews, 1998, 78(3): 745-761.
- [2] ARGEISINGER L S, CARTER S U C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor[J]. Physiological Reviews, 1996, 76(4): 1089-1107.
- [3] 胥清富. 猪生长轴有关激素和受体基因在肝脏和肌肉上表达的发育性变化及调控[D]. 南京: 南京农业大学, 2002.
- [4] 贾斌. 新疆绵羊微卫星遗传分析及羊毛生长的神经内分泌调控[D]. 南京: 南京农业大学, 2003.
- [5] ALEXANDRIDES T, MOSES A C, SMITH R J. Developmental expression of receptors for insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I), and IGF-II in rat skeletal muscle[J]. Endocrinology, 1989, 124(2): 1064-1076.
- [6] PENG M, PELLETIER G, PALIN M F, et al. Ontogeny of IGFs and IGF-BPs mRNA levels and tissue concentrations in liver, kidney and skeletal muscle of pig[J]. Growth Dev Aging, 1996, 60(3/4): 171-187.
- [7] XING B, XU Y, CHENG Y, et al. Overexpression of IGF2R and IGF1R mRNA in SCNF produced goats survived to adulthood[J]. J Genet Genomics, 2007, 34(8): 709-719.
- [8] 贾斌, 席继峰, 张苏云, 等. 绵羊皮肤中 GHR, IGF-1 和 IGF-IR 基因表达的发育性变化及品种特点[J]. 遗传, 2006, 28(9): 1078-1082.
- [9] 刘国庆, 黄治国, 刘振山, 等. 羔羊肝脏 IGF 和 IGF-R 基因表达的发育性变化研究[J]. 中国农业科学, 2006, 39(12): 2577-2581.