

绵羊 *IGF- I* 基因的表达及其 SNPs 与生长性状的相关分析研究

周明亮¹, 张翔宇³, 蔡松智², 王 琪², 吴登俊^{2*}, 杨平贵¹

(1. 四川省草原科学研究院, 成都 611743; 2. 四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014;

3. 四川省畜牧科学研究院, 成都 610066)

摘 要: 试验旨在研究 *IGF- I* 基因调控绵羊生长发育的表达模式和其 SNPs 位点与生长性状的相关性, 采用 qRT-PCR 技术检测绵羊的大脑、肌肉、皮肤、肝脏和心脏组织的 *IGF- I* 基因在 15、60、105、150、195 和 240 d 等 6 个时间点的变化, 利用 SSCP 技术分析 *IGF- I* 基因的 SNPs 位点与生长性状的相关性。结果表明: 5 个组织在 105 d 时出现第 1 个表达拐点, 15~105 d 时肌肉、大脑和肝脏组织的表达降低后再升高, 而皮肤和心脏组织在 15 和 60 d 时的表达无显著差异, 105 d 时才显著或极显著升高; 105 d 后, 肝脏组织的表达逐渐降低, 肌肉、心脏、大脑和皮肤组织在 195 d 时出现第 2 个拐点, 但肌肉和心脏组织并未引起表达的显著差异, 而大脑和皮肤组织在 195 d 时的表达显著高于 150 和 240 d, 提示 *IGF- I* 基因在 5 个组织的表达具有一定的同步性; *IGF- I* 基因的外显子前导区和外显子 3 的 2 个 SNP 位点为中低度多态性, P-1 引物扩增的 SNP 位点与凉山半细毛羊的初生重具有显著的关联性 ($P < 0.05$); P-2 引物扩增的 SNP 位点与断奶日增重和断奶重具有显著的关联性 ($P < 0.05$)。 *IGF- I* 基因在不同的组织中表现出比较一致的表达模式, 其 SNP 位点与绵羊的早期生长性状存在较强的相关性, 为凉山半细毛羊的生长调控机理和 SNPs 辅助选择育种提供理论基础。

关键词: *IGF- I*; 凉山半细毛羊; 生长性状; 表达; SNP

中图分类号: S826; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)09-1363-08

Expression and Association between SNPs and Growth Traits of *IGF- I* Gene in Sheep

ZHOU Ming-liang¹, ZHANG Xiang-yu³, QI Song-zhi², WANG Qi², WU Deng-jun^{2*},
YANG Ping-gui¹

(1. Sichuan Academy of Grassland Science, Chengdu 611743, China; 2. College of Animal

Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

3. Sichuan Animal Science Academy, Chengdu 610066, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the expression patten of *IGF- I* gene regulating growth and development of sheep and correlation of its SNPs with growth traits in sheep. The *IGF-1* gene expression change of *IGF- I* in brain, musle, skin, liver and heart were detected at six growth stages (15, 60, 105, 150, 195, 240 days) by qRT-PCR approach and the correlation of SNPs of *IGF- I* gene with growth traits were analyzed by SSCP method in Liangshan Semi-wool sheep population. The results showed that the first inflection point of the expression of *IGF- I* gene in musle, skin, brain, liver and heart tissues was at 105 day and the second inflection point

收稿日期: 2013-04-09

基金项目: 四川省畜禽育种攻关项目(01NG029-18); 四川省科技厅支撑项目(2012JY0126)

作者简介: 周明亮(1976-), 男, 重庆合川人, 副研究员, 博士, 主要从事藏绵羊遗传资源保护与利用方面的研究, E-mail: zhou760302@163.com;

张翔宇(1981-)男, 四川凉山人, 副研究员, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖方面的研究, E-mail: zhangxiangyu757@163.com。二

者共同为第一作者

* 通信作者: 吴登俊, 教授, E-mail: wdengjun@sicau.edu.cn

was at 195 day without the liver tissue. From 15 to 105 day, the expression of *IGF-1* gene in muscle, brain and liver tissues decreased at 60 day, and then increased at 105 day, however, it is not significantly different at 15 and 60 day, and increased significantly at 105 day in skin and heart tissues. After 105 day, the expression of *IGF- I* were degraded in all of the tissues at 150 day, and the expression in liver tissue was decreased gradually from 105 to 240 day, but the expression in skin and brain tissues were higher at 195 day than that at 150 and 240 day, and no difference at among 150, 195 and 240 day in muscle and heart tissues. The two SNPs which were detected with 587 Liangshan Semi-wool sheep were moderate polymorphism. The SNP of the P-1 primer affected significantly birth weight($P<0.05$) and the SNP of the P-2 primer affected significantly weaning weight and the weaning daily gain($P<0.05$). The results suggest that the expression of *IGF- I* in all tissues have the similar expression patterns, and strong correlation between SNPs of *IGF-1* and confirmed the early growth traits provide theoretical basis for the growth regulation and can be applied to assisted selective breeding with the SNPs in Liangshan Semi-wool sheep.

Key words: *IGF-I*; Liangshan Semi-wool sheep; growth trait; expression; SNP

IGFs 在动物的胚胎期和生后的生长发育期都介导了 GH 激素大部分的促进生长的生物学功能, 调节动物机体内糖类代谢、脂肪代谢、蛋白合成、肝脏功能和线性生长等功能。IGFs 的分泌受到神经内分泌激素的调控, 主要由动物机体的肝脏和各个组织所分泌, 分泌的 IGFs 进入血液循环系统和细胞液系统, 依赖于 IGFbPs 家族基因的运载而提高 IGFs 的半衰期以及组织的偏向性而促进组织细胞的分化与增殖。

IGF- I 基因的研究是一个长期的课题, 在胚胎期及生后的生长发育过程中都具有重要作用。J. Verhaeghe 等^[1]的研究表明, 出生胎儿脐血中 *IGF-I* 的浓度与初生重呈正相关, 早产的婴儿脐血中 *IGF-I* 的浓度降低 40%, 而正常胎龄出生的婴儿脐血中 *IGF- I* 的浓度提高 28%; T. Mushtaq 等^[2]以胚胎小鼠的跖骨为研究素材研究 *IGF- I* 对胚胎骨骼生长发育的影响, *IGF- I* 单独或联合地塞米松处理都提高骨的生长, 而 GH 无效应, *IGF- I* 提高生长骨内的细胞增殖, 特别是在软骨膜的增殖明显高于生长板, 而地塞米松降低细胞增殖, 在含有 *IGF- I* 的所有处理提高了该肥大区 3 倍的长度; D. A. Josrph 等^[3]的研究表明, *IGF- I* 对大脑的正常发育具有重要作用, *IGF- I* 基因的过表达将引起大脑的过度生长或 *IGF- I* 基因缺失引起大脑生长的迟缓。围绕 *IGF- I* 基因外显子及内含子区域 SNP 位点的研究涉及到多个物种。A. K. Bennett 等^[4]以序列比对检测得到鸡 *IGF- I* 基因的 SNP 位点, 该位点与鸡的 5 周龄体重呈显著的相关性。L. B. Johnston

等^[5]研究表明, 初生胎儿的体尺与 *IGF- I* 基因的启动子区 SNP 位点、内含子 2 的重复序列区的微卫星标记以及血液中的 *IGF- I* 浓度存在相关性。众多研究表明, 在 *IGF- I* 基因的启动区和外显子的 SNP 以及内含子 2 的重复序列区的微卫星标记等都与动物的早期生长发育具有相关性^[6-9]。

凉山半细毛羊以山谷型藏绵羊(粗毛型)为基础, 用新疆细毛羊和引进国外的边区莱斯特羊、林肯羊等多个绵羊品种的复杂杂交, 前后历经了 40 余年选育与提高而育成的半细毛羊新品种。早期的研究表明, 在凉山半细毛羊 *Chr3* 上存在影响早期生长性状的 QTL 位点^[10], 结合绵羊的虚拟基因组图谱^[11-12], *IGF- I* 基因在染色体上的位置与所定位的 QTL 位点极为接近, 为此试验提供了基础。本试验采用 qRT-PCR 和 SSCP 技术研究凉山半细毛羊 *IGF- I* 基因的表达及 SNP 位点, 以期凉山半细毛的选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验群体

试验动物来自于四川省凉山州布拖县的凉山半细毛羊原种场, 试验设置了 15、60、105、150、195 和 240 d 等 6 个时间点, 每个时间点选取 3 只羔羊(♀), 共 18 只。随机选择符合时间点的羊只宰杀, 取大脑、心脏、皮肤、肌肉和肝脏组织, 快速置于液氮中带回实验室, 置于 -80 ℃ 冰箱中保存备用。

用剪耳钳在绵羊耳缘处剪下一黄豆粒大小的组织块, 尽量去掉组织上的毛和杂物, 置于已灭菌的

1.5 mL 离心管中,用采样冰盒带回实验室,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。共采集了 2002-2005 年度出生的 587 只羔羊的耳样组织,收集组织样品对应的 2002-2008 年的生长性状数据,性状包括羔羊初生重(Birth weight, BW)、断奶重(Weaning weight, WW)、断奶日增重(Weaning daily gain, WDG)、育成重(18-month Weight, 18-MW)和成年重(30-month weight, 30-MW)等。

1.2 引物设计

从 NCBI 的 GenBank 中下载 IGF- I (NM_001009774) 基因的 mRNA 序列以及内参基因 β ac-

tin (NM_001009784)、*TOP2B* (XM_001254709) 和 *GAPDH* (AF030943) 等的序列,参阅 IGF- I 基因 SNP 位点的相关文献,下载绵羊 IGF- I 基因的 X69472(外显子 A、1 和 2)、X69473(外显子 3)、X69474(外显子 4)和 X51403(外显子 5)等 DNA 序列。所有引物采用 Primer 5.0 软件进行设计,Oligo 6.0 软件和 NCBI 的 Blast 程序评价与验证引物,后续试验仅在外显子的前导区和外显子 3 检测到 SNP 位点,具有 SNP 位点的引物和荧光定量引物的信息如表 1, P-1 为前导区的引物编号, P-2 为外显子 3 的引物编号,引物由 Invitrogen 公司合成。

表 1 SSCP 和 qRT-PCR 的引物信息

Table 1 Primer information for SSCP and qRT-PCR

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	片段大小/bp Length	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ T _m
P-1	F: CAGGTTCTAGGAAATGAGATC R: TTAGTGACAAGAGGAGCAGAC	316	59.3
P-2	F: CAAGGACCCAGGAGGAAGAT R: GCGAGAGGGAGGCTACTTACT	220	60.0
IGF- I	F: CACATCCTCCTCGCATCTCTTC R: TGAAATAAAAAGCCCCTGTCTCC	143	58.7
β actin	F: CCGTCTTCCCTTCCATCGT R: TGGTGACAATGCCGTGCT	147	60
TOP2B	F: TTGTGATGGGCGTGAACC R: CCCTCCACGATGCCAAA	127	60
GAPDH	F: TTGGATGAAACGGGAGTGG R: CCGTCCACCTTTTGTGTGTTG	138	60

1.3 RNA 和 DNA 提取

肝脏、心脏、肌肉、皮肤和大脑等组织的总 RNA 提取采用 TaKaRa RNAiso reagent 试剂盒的操作说明书进行,用 Bio-Rad 核酸蛋白检测仪测定浓度,经 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性后使用 SYBR * PrimeScriptTM RT-PCR Kit (TaKaRa) 进行 cDNA 的合成。耳样组织的 DNA 提取采用常规酚-氯仿法。

1.4 PCR 扩增及 SSCP 检测

PCR 扩增总体系为 25 μL : 2 \times Master Mix *Taq* 酶 12.5 μL , DNA 模板 2 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , 灭菌 ddH₂O 8.5 μL 。PCR 程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后 35 个循环 (94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火温度退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min, 循环结束后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 2 μL PCR 产物于 EP 管中, 加 6 μL 变性 Buffer 混匀, 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 立即冰

浴 5 min, 取变性样品 3~5 μL 于 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 室温下 1~8 V \cdot cm⁻² 电泳 12 h, 银染显带。取具有不同基因型的 PCR 产物各 50 μL , 送 Invitrogen 公司测序。

1.5 qRT-PCR 与标准曲线

将 IGF- I 及 3 个内参基因 (β actin、*Top2B* 和 *GAPDH*) 进行 PCR 扩增, 反应体系为 25 μL , 2 \times Master Mix *Taq* 酶 12.5 μL , DNA 模板 2 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , 灭菌 ddH₂O 8.5 μL 。PCR 程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后 35 个循环 (94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火温度退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min, 循环结束后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。送 Invitrogen 公司测序, 验证引物准确性后回收 PCR 产物, 以此作为制备标准曲线的标准 DNA, 用 EASY Dilution 按照 3 μL : 27 μL 的浓度稀释, 依次稀释成 $1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^{-10}$ 共 11 个浓度, 选择 $1 \times 10^{-5} \sim$

1×10^{-9} 共 5 个浓度水平为标准品, 设置 3 个重复。基线由 iQ5 软件自动设置, 标准曲线由软件自动分析, 得到斜率、截距和扩增效率等。

qRT-PCR 在 Bio-Rad 公司的 IQ 5.0 上运行, 反应体系为 $25 \mu\text{L}$: $2 \times \text{Premix Ex Taq}^{\text{TM}} 12.5 \mu\text{L}$, 上下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $1 \mu\text{L}$, cDNA 模版 $2 \mu\text{L}$, ddH₂O $8.5 \mu\text{L}$ 。反应程序: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 10 s , 然后 45 个循环 ($95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 s , $58.7 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 20 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 15 s , 并在每一循环的 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 收集荧光信号) 循环结束后于 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 开始熔解曲线, 每循环 1 次温度增加 $0.5 \text{ }^\circ\text{C}$, 直至完成 80 个循环, 同时收集荧光信号。每个待测样品 cDNA 设置 3 个重复, 对得到的 3 个 Ct 值取平均值, 以备带入公式进行计算。

1.6 数据分析

以 IQ5.0 软件计算基因拷贝数, 将单个基因的最大拷贝数设为 1 表示相对表达量。采用 GeNorm 软件计算内参基因的标准化因子 (Normalization factor, NF)^[13]。

$$\text{NF} = \sqrt[3]{\text{REF}_{\beta\text{actin}} \text{REF}_{\text{GAPDH}} \text{REF}_{\text{Top2B}}}$$

REF 代表内参基因的相对表达量, 以目的基因相对表达量与对应的 NF 的比值作为目的基因标准化后的相对表达量。采用 SAS 9.1.3 软件按如下模型进行分析。 $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$, 其中, Y_{ij} 表示某个基因 mRNA 相对表达量; μ 表示总体平均值; α_i 表示 i 日龄水平产生的效应; β_j 表示第 j 组织产生的效应; ϵ_{ij} 为随机误差效应。

IGF-I 基因的 SNPs 与绵羊生长性状的相关分析采用如下模型进行分析: $Y_{ijkl} = \mu + F_i + G_j + N_k + S_l + \epsilon_{ijkl}$, 模型中, Y_{ijkl} 为体重性状的表型值; μ 为群体平均值; G_j 为基因型效应; N_k 为年度效应; S_l 为性别效应; F_i 为家系效应; ϵ_{ijkl} 为随机误差效应。

2 结果

2.1 IGF-I 基因表达的发育性变化

在绵羊的肌肉、肝脏、心脏、皮肤和大脑组织中均检测到 IGF-I 基因 mRNA 的表达, 各个组织的发育性表达模式如图 1 所示。心脏组织中, IGF-I 基因在 105 d 时的表达最高, 极显著高于其他各个时间点的表达 ($P < 0.01$), 而其他各个时间点之间表达量差异不显著 ($P > 0.05$); 皮肤组织中, 105 d 时的表达量显著升高 ($0.05 > P > 0.01$), 达到各个时间点的峰值, 随后显著降低, 但在 195 d 时出现第 2 次升高, 并显著高于 150 和 240 d 时的表达; 肌肉

组织中, 15~60 d, IGF-I 基因的表达显著降低 ($0.05 > P > 0.01$), 105 d 时的表达量达到峰值 ($P < 0.05$), 随后表达量下降, 150、195 和 240 d 时的表达差异不显著 ($P > 0.05$), 在 105 和 195 d 时出现表达升高的转折点; 肝脏组织中, IGF-I 的表达量在 105 d 时表达量极显著升高并出现表达的转折点 ($P < 0.01$), 之后逐渐下降, 195 和 240 d 时极显著降低 ($P < 0.01$); 大脑组织中, 15~60 d, IGF-I 基因的表达量显著降低 ($0.05 > P > 0.01$), 维持到 150 d, 在 195 d 时出现生长峰值, 显著高于 150 和 240 d 时的表达 ($0.05 > P > 0.01$)。

2.2 IGF-I 基因的多态分析

在 IGF-I 基因外显子的前导区和外显子 3 区域各发现 1 个 SNP 位点, 将具有不同基因型个体的 PCR 产物送 Invitrogen 公司测序, 结果如图 2 和图 3。引物 P-1 扩增序列的 SNP 位点位于该序列的 900 bp 位置处, 为 C/G 突变, 共检测到 3 种基因型, G/G 对应于 AA 基因型, C/G 对应于 AB 基因型, C/C 对应于 BB 基因型; 引物 P-2 扩增序列的 SNP 位点位于该序列的 211 bp 位置处, 为 A/G 突变, 共检测到 2 种基因型, G/G 对应于 CC 基因型, A/G 基因型对应于 CD 基因型。

利用 Popgene32 软件统计 2 个 SNPs 位点的等位基因频率、多态信息含量及杂合度等, 结果见表 2。在整个群体中, P-1 和 P-2 引物的多态信息含量分别为 0.276 和 0.237, 根据 Botstein 定义标记多态信息含量的标准^[12], P-1 为中度多态, P-2 为低度多态。

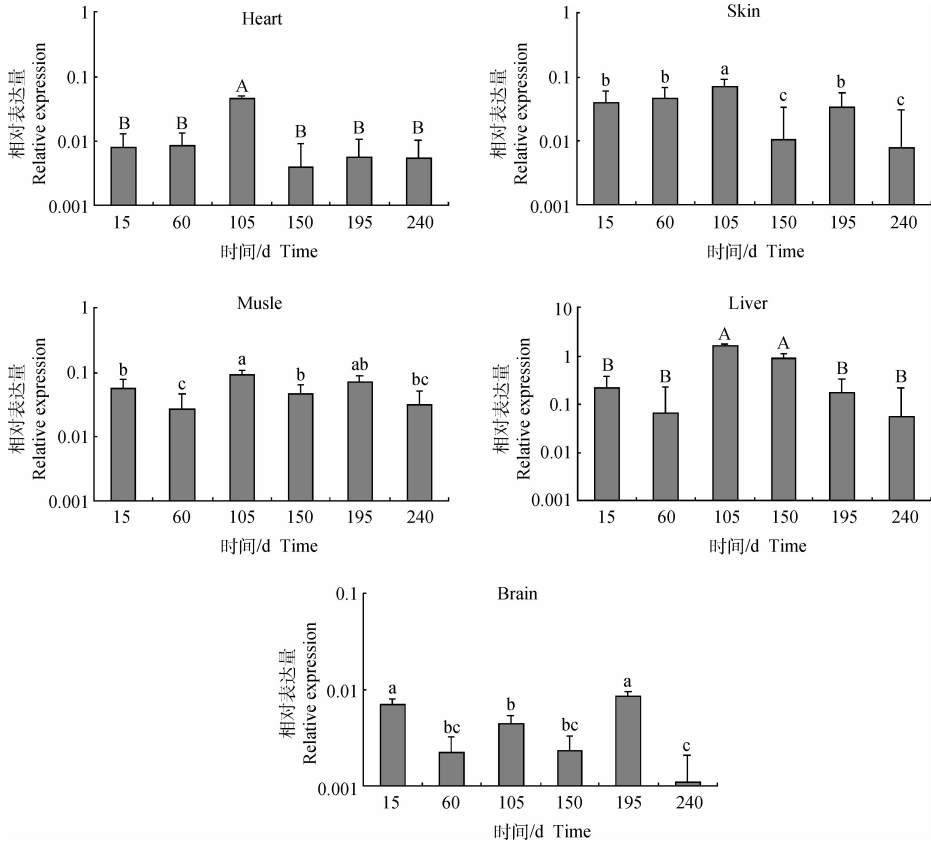
2.3 IGF-I 基因与生长性状的关联分析

在模型中考虑家系、年度效应、性别效应和基因型效应, 方差分析结果见表 3。在整个群体中, 家系对初生体重、断奶体重、断奶日增重和成年体重等性状具有重要的效应, 而在育成体重中的效应相对较弱; 年度效应在初生体重、断奶体重和断奶日增重等性状的效应较为显著, 可能是每年初生的羔羊及母羊在不同的年度因气候、饲草料等条件的限制而影响母羊的妊娠及初生羔羊的生长发育; 而相应的性别效应则不明显。

对 P-1 和 P-2 扩增产物的基因型分析, P-1 对初生重的影响达到极显著的水平, 在胚胎发育过程中, IGF-I 具有一定的作用, 调控胚胎的生长, 在该位点对断奶体重、断奶日增重、育成体重及成年体重却没有显著的效应; P-2 位点对断奶重及断奶日增重 2 个性状具有极显著的基因效应, 而对育成体重、成年

体重的效应不显著,该位点可能是调控着 IGF- I 基因的生后表达,而引起生长的变化,在后期的生长过程中,受到环境、饲草以及性状测量等因素的影响越

来越大,环境因素覆盖了基因对性状的部分效应,因而在关联分析之时较难检测到与基因型之间的相关。



上标字母相同表示同一组织不同日龄间差异不显著($P>0.05$),字母不同表示差异显著($P<0.05$,小写字母)或极显著($P<0.01$,大写字母)

The same superscript letter indicates no significant difference among six growth stages in same tissue($P>0.05$), the different small letters indicate significant difference at 5% level, the different capital letters indicate significant difference at 1% level

图 1 IGF- I 基因在大脑、皮肤、肌肉、肝脏和心脏组织中的发育性变化

Fig. 1 Relative expression quantity of IGF- I gene at different age in five tissues

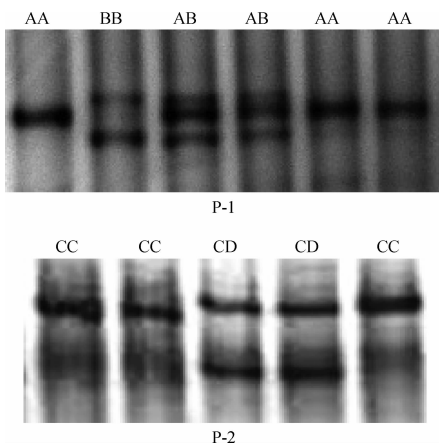


图 2 P-1 和 P-2 引物 PCR 扩增产物的 SSCP 电泳
Fig. 2 SSCP analysis of the PCR product of primer P-1 and P-2

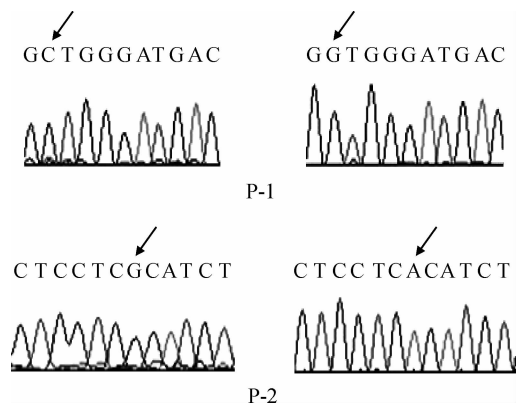


图 3 P-1 和 P-2 不同基因型的测序结果
Fig. 3 Sequencing result of the different genotypes

表 2 IGF- I 基因的遗传多态性

Table 2 Genetic diversity of IGF- I gene

引物 Primer	样本数 Number	观察杂合度 Hobs	期望杂合度 Hexp	多态信息含量 PIC	等位基因频率 Allele frequency	
P-1	587	0.332	0.331	0.276	A	B
					0.790	0.210
P-2	587	0.328	0.275	0.237	C	D
					0.840	0.160

对绵羊初生体重、断奶体重和断奶日增重等性状进行多重比较,剔除无显著影响的性状如育成体重和成年体重,结果见表 4。P-1 位点的 A 即为该位点的优势等位基因,群体中该等位基因的频率较高,与选育过程中对性状的选择有关,逐步将 B 等位基因淘汰,但部分家系中可能还存在 AB 基因型

的杂合子公畜,使得在群体中存在 BB 基因型的个体。P-2 位点的 C 为优势等位基因,CC 基因型的效应显著高于 CD,CC 在对断奶重及断奶日增重显著高于 CD 基因型,在整个群体中未见 DD 基因,可能是在选育的过程中已经将该基因型逐步淘汰掉,仅存在部分杂合子的情况。

表 3 不同引物对间体重性状表型值的 F 检验

Table 3 F-test of deviation between primer pairs and weight traits

引物号 Primer	效应 Effect	初生重 Birth weight	断奶重 Weaning weight	断奶日增重 Weaning daily gain	育成体重 18-month weight	成年体重 30-month weight
P-1	Family	13.88 * *	8.8 * *	8.97 * *	2.09 *	3.22 * *
	Year	95.77 * *	21.1 * *	24.59 * *	2.01	1.28
	Sex	1.04	3.62	3.79	0.88	1.85
	G-1	9.21 * *	2.79	2.05	0.52	0.06
P-2	Family	14.17 * *	9.94 * *	10.11 * *	2.01	3.21 * *
	Year	97.77 * *	23.99 * *	27.7 * *	2.15	1.31
	Sex	1.06	4.22 *	4.45 *	0.85	1.83
	G-2	1.36	68.62 * *	69.95 * *	1.05	0.68

*. 表示显著效应; * *. 表示极显著效应

*. Indicates significant effect at 5% level; * *. Indicate significant effect at 1% level

表 4 IGF- I 基因不同基因型对体重性状的影响

Table 4 Effect of different genotypes of IGF- I gene on weight traits

引物号 Primer	基因型 Genotype	初生重 Birth weight	断奶重 Weaning weight	断奶日增重 Weaning daily gain	育成体重 18-month weight	成年体重 30-month weight
P-1	AA	3.48±2.33 ^a	20.25±2.37	0.209 8±0.014 6	47.04±3.66	58.38±4.79
	AB	3.40±1.24 ^a	19.48±2.46	0.200 6±0.015 7	47.26±2.82	58.33±3.99
	BB	3.20±1.31 ^b	18.85±2.15	0.195 6±0.014 1	49.29±2.03	59.30±2.45
P-2	CC	3.48±2.23	21.17±2.35 ^a	0.221 4±0.014 2 ^a	47.47±3.64	58.67±5.77
	CD	3.42±1.34	17.27±2.45 ^b	0.173 1±0.015 5 ^b	46.57±3.84	57.80±4.01

相同字母表示同列同一引物的基因型的表型值差异不显著($P>0.05$),不同字母表示差异显著($P<0.05$)

The different small letter means that the phenotypic values with P-1 or P-2 primer are significant difference at 5% level in same column, the same small letter mean no significant difference($P>0.05$)

3 讨 论

IGF-I 基因对胚胎的生长发育及生后的生长具有重要的作用,调控各种组织及器官的发育。本试验研究的 5 个组织中,均检测到 IGF-I 基因 mRNA 的表达,在设置的 6 个时间点的表达具有一定的同步性。刘国庆等^[14]研究表明,雄性哈萨克羊和新疆细毛羊的肝脏组织 IGF-I 基因的表达从 2~60 d 都持续上升,哈萨克羊在 60 d 后就开始下降,而新疆细毛羊在 90 d 后才开始下降;贾斌等^[15]研究表明,绵羊皮肤组织的 IGF-I 基因在 90 d 时出现生后表达的转折点,90 d 后基因的表达逐渐降低;与此次试验所选择的凉山半细毛羊母羊的 IGF-I 基因在 105 d 时出现表达的转折点存在一定的相似性,但与其他物种的研究结果存在一定的差异^[16-17]。IGF-I 基因在 5 个组织中的表达与凉山半细毛羊的生长规律具有较强的相关性,母羊产羔后的羊奶中具有丰富的营养物质,供给羔羊营养而促进羔羊的生长,随着羔羊的生长,羔羊逐渐由羊奶为主食逐渐转变为采食,因而导致营养供给方式的转变,而导致羔羊在 60 d 时 IGF-I 基因表达的降低,当逐渐适应采食后,IGF-I 基因表达再次升高。随着母羔羊的生长及发情期的到来,体内分泌雌激素的增加,可能引起 190 d 前后 IGF-I 基因表达的升高。

试验采用 PCR-SSCP 技术在 IGF-I 基因外显子的前导区和外显子 3 的 2 个区域各检测到 1 个 SNP 位点,等位基因 A 和 C 及基因型 AA 和 CC 在群体中占优势,揭示凉山半细毛羊经过多年的选育而使优良基因具有较高的纯合度,但仍然存在少量的劣势等位基因和基因型。按照 D. Botstein 等^[12]提出衡量基因变异程度高低的多元信息含量指标 (PIC) 的标准,试验中检测到的 SNP 位点为中、低度多态。虽然从群体遗传多态性角度要求 PIC 高,等位基因数目多,杂合度大,则该群体在该位点的遗传变异高,有较大的选择余地,但对于高度纯合的核心群体中似乎是不可能的,试验中所检测到的杂合度及 PIC 都偏低,与凉山半细毛羊的长期选择有关,揭示根据基因的 SNP 位点进行标记辅助选择更为必要,可进一步淘汰劣势等位基因或基因型。

IGF-I 基因的外显子前导区 SNP 位点与绵羊初生时的体重存在相关性,意味着该 SNP 位点调控 IGF-I 基因在胚胎期的表达,而促进胎儿的生长。周明亮等^[10]将影响绵羊生长发育的初生体重、断奶

体重和断奶日增重性状的 QTL 分别初步定位于凉山半细毛羊 3 号染色体的 99、219 和 273 cM,根据绵羊的虚拟基因组图谱,IGF-I 位于绵羊 Chr3 的 183.2 cM,结合 IGF-I 基因的已有研究结果,IGF-I 基因极可能是 3 号染色体所检测到的 QTL 候选基因。在 IGF-I 外显子 3 的 A→G 突变并未引起氨基酸的改变,但该 SNP 位点与绵羊出生后的断奶体重和断奶日增重存在相关性,该 SNP 位点可能影响 IGF-I 基因在生后的表达而调控机体的生长,并与先前的 QTL 定位结果一致。结合 IGF-I 的各个组织及不同时间点的表达规律,试验中 IGF-I 基因外显子的 SNP 位点虽不引起氨基酸的改变,但可能调控 IGF-I 基因在不同组织和不同时间点的表达差异,而引起体内代谢调控途径的变化,在整个机体表现为可测量的体重变化。

凉山半细毛羊的选育、提高及形成核心群体经历了近 60 年的时间,前后杂交过程引进了新疆美利奴细毛羊、边区莱斯特羊、林肯羊和考力代羊等绵羊品种。融入了多种绵羊的血缘,将各种优势等位基因引入到群体,选育的后期,根据选育的目的选择性状优异的个体,导致劣势等位基因逐步被淘汰掉,进而留下大量的优势等位基因及优势基因型,逐步形成了以 A 和 C 等位基因占优势的现象,但在群体中依然存在较多的 AB 和 CD 杂合子形式的基因型,淘汰这些杂合子基因型将是一个漫长的过程。

参考文献:

- [1] VERHAEGHE J, VAN B R, VAN H E, et al. C-peptide, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in umbilical cord serum; Correlations with birth weight[J]. *Am J Obst Gynecol*, 1993, 169(1): 89-97.
- [2] MUSHTAQ T, BIJMAN P, AHMED S F, et al. Insulin-like growth factor-I augments chondrocyte hypertrophy and reverses glucocorticoid-mediated growth retardation in fetal mice metatarsal cultures [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(5): 2478-2486.
- [3] JOSRPH D A, YE P. Expanding the mind: insulin-like growth factor I and brain development[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(12): 5958-5962.
- [4] BENNETT A K, HESTER P Y, SPURLOCK D E. Polymorphisms in vitamin D receptor, osteopontin, insulin-like growth factor 1 and insulin, and their associations with bone, egg and growth traits in a lay-

- er-broiler cross in chickens[J]. *Anim Genet*, 2006, 37(3): 283-286.
- [5] JOHNSTON L B, DAHLGREN J, LEGER J, et al. Association between insulin-like growth factor I (IGF-I) polymorphisms, circulating IGF-I, and pre- and postnatal growth in two European small for gestational age populations [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(10): 4805-4810.
- [6] ZHOU H, MITCHELL A D, MCMURTRY J P, et al. Insulin-like growth factor-I gene polymorphism associations with growth, body composition, skeleton integrity, and metabolic traits in chickens[J]. *Poult Sci*, 2005, 84(2): 212-219.
- [7] TAYLOR J F, PORTER M J, BROMAGE N R, et al. Relationships between environmental changes, maturity, growth rate and plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female rainbow trout[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, 155(2): 257-270.
- [8] AMILLS M, JIMENEZ N, VILLALBA D, et al. Identification of three single nucleotide polymorphisms in the chicken insulin-like growth factor 1 and 2 genes and their associations with growth and feeding traits[J]. *Poult Sci*, 2003, 82(10): 1485-1493.
- [9] MAJ A, SNOCHOWSKI M, SIADKOWSKA E, et al. Polymorphism in genes of growth hormone receptor (GHR) and insulin-like growth factor-1 (IGF1) and its association with both the IGF1 expression in liver and its level in blood in Polish Holstein-Friesian cattle[J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2008, 29(6): 981-989.
- [10] 周明亮, 吴登俊, 张翔宇. 绵羊 3 号染色体的遗传连锁图谱构建及 QTL 定位[J]. *遗传*, 2007, 29(12): 1475-1482.
- [11] BRIAN P D, EWEN F K, MIKHAIL N, et al. Using comparative genomics to reorder the human genome sequence into a virtual sheep genome[J]. *Genome Biol*, 2007, 8(7): R152.
- [12] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism[J]. *Am J Human Genet*, 1980, 32(3): 314-331.
- [13] VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. *Genome Biol*, 2002, 3(7): 34-42.
- [14] 刘国庆, 黄治国, 刘振山, 等. 羔羊肝脏 IGF-I 和 IGF-IR 基因表达的发育性变化研究[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(12): 2577-2581.
- [15] 贾 斌, 席继峰, 张苏云, 等. 绵羊皮肤中 GHR、IGF-I 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.
- [16] XIAN C J, SHOUBRIDGE C A, READ L C. Degradation of IGF-1 in the adult rat gastrointestinal tract is limited by a specific antiserum or the dietary protein casein[J]. *J Endocrinol*, 1996, 146: 215-225.
- [17] RAO R K, PHILIPPS A F, WILLIAMS C S, et al. Luminal stability of insulin-like growth factors 1 and 2 in developing rat gastrointestinal tract[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1998, 26: 179-185.

(编辑 郭云雁)