

5种家畜 IGFBP3 基因遗传变异研究^{*}

于 姣¹, 陈 宏^{1,2}, 蓝贤勇¹, 潘传英¹,
孙维斌¹, 张润锋¹, 房兴堂², 刘 波¹

(1 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, 陕西 杨凌 712100;

2 徐州师范大学 细胞与分子生物学研究所, 江苏 徐州 221116)

[摘 要] 利用 PCR-RFLP 技术对山羊(西农萨能奶山羊和关中奶山羊)、绵羊(小尾寒羊)、普通牛(南阳牛)、水牛(湖南彬洲水牛)和牦牛(青海牦牛)等 5 种家畜 213 份样品 IGFBP3 *Hae*III 位点进行了遗传多样性研究, 并对山羊、绵羊、普通牛和水牛 IGFBP3 基因序列进行了同源性分析。结果显示, 5 种家畜物种 IGFBP3 基因 *Hae*III 酶切表现明显物种间多样性, 在普通牛上表现多态性, 而在山羊、绵羊和牦牛上未表现多态性; 山羊 IGFBP3 基因序列与绵羊、普通牛和水牛的同源性分别为 97%, 93%, 93%, 绵羊 IGFBP3 基因序列与普通牛和水牛的同源性分别为 93% 和 92%, 而普通牛和水牛的 IGFBP3 基因序列同源性为 96%; 绵羊和山羊的亲缘关系最近, 首先聚为一支, 然后再与普通牛、水牛相聚。表明 *Hae*III 酶切位点具有物种多样性, 可用于物种间亲缘关系的分析。

[关键词] 山羊; 绵羊; 水牛; 牦牛; 普通牛; IGFBP3 基因

[中图分类号] S813.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)03-0033-05

Genetic diversity of IGFBP3 gene among five domestic animal species

YU Jiao¹, CHEN Hong^{1,2}, LAN Xian-yong¹, PAN Chuan-ying¹,
SUN Wei-bing¹, ZHANG Run-feng¹, FANG Xing-tang², LIU Bo¹

(1 College of Animal Science and Technology, Shaanxi Key Laboratory of Agricultural Molecular Biology,

Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

Abstract: In this study, PCR-RFLP with endonuclease *Hae*III was applied to detect polymorphisms of IGFBP3 in 213 ruminant samples from 5 domestic animal species. The results revealed polymorphisms among ruminant including goat (including Xinong Saanen dairy, Guangzhong), sheep (Small Tail Han), bovine (Nanyang), buffalos (Bingzhou) and yak (Qinghai). Homology analysis of ruminant IGFBP3 gene sequence showed as follows: comparing nucleotide sequence of goat with that of sheep, buffalo and bovine, the homological percentages were 97%, 93% and 93%, respectively; comparing nucleotide sequence of sheep with that of buffalo and bovine, the homological percentages were 93% and 92%, respectively. The homology percentage of nucleotide sequence between buffalo and bovine was 96%. Molecular phylogenetic tree on ruminant constructed by IGFBP3 gene sequence with Clustalw software was unanimous. So, it could be concluded that sheep and goat had the nearest relative relationship, then, they clustered with bovine and

^{*} [收稿日期] 2006-02-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30471238); 国家“863”计划项目(2006AA10Z197); 河南省杰出人才创新基金项目(0521001900); 西北农林科技大学拔尖人才支持计划项目

[作者简介] 于 姣(1978-), 女, 山西汾阳人, 在读硕士, 主要从事生物技术与家畜育种研究。

[通讯作者] 陈 宏(1955-), 男, 陕西西安人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子生物技术与动物遗传育种研究。E-mail: chen hong1212@263.net

buffalo. In conclusion, present *Hae*III locus was polymorphic between species, and can be used in the analysis of the genetic relationship between species

Key words: goat; sheep; buffalo; yak; bovine; *IGFBP3* gene

胰岛素样生长因子家族(Insulin-like Growth Factor, IGF)包括 IGFs (IGF-I, IGF-II)、IGFBP1~IGFBP7 及 IGF 受体(IGF-IR, IGF-IIR)。IGFs 是一类对胚胎、神经、骨骼肌、骨骼的发育及细胞增殖、分化等具有重要作用的多肽,而 IGFBP3 作为 IGFs 的运输载体,可直接与大部分受体结合,并最终调控 IGFs 的生物学作用^[1]。因此, *IGFBP3* 基因成为当前研究热点之一。目前,关于家畜 *IGFBP3* 基因遗传多态性研究仅在秦川牛^[2]、中国荷斯坦牛^[3]和西农萨能奶山羊^[4]等物种上有零星报道,而有关其他家畜品种 *IGFBP3* 基因遗传多样性的研究尚未见报道。为此,本研究利用 PCR-RFLP 技术研究了普通牛(南阳牛)、水牛(湖南彬洲水牛)、牦牛(青海牦牛)、山羊(西农萨能奶山羊,关中奶山羊)和绵羊(小尾寒羊)等 5 种家畜 213 份样品 *IGFBP3* 基因 *Hae*III 酶切位点的遗传多样性,并对山羊、绵羊、普通牛和水牛 *IGFBP3* 基因序列进行同源性分析,以期有家畜遗传资源和生物多样性研究及该基因在家畜选育种中的进一步应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血样及组织样 样品共计 213 份,其中西农萨能奶山羊血样 69 份采自陕西千阳县西农萨能奶山羊种羊场核心群; 关中奶山羊样品 62 份(18 份血样, 5 份成年肝组织样和 39 份羔羊脾组织样), 分别采自西北农林科技大学动物实验中心、陕西省丹凤县种羊场和关中地区; 小尾寒羊血样 11 份, 采自河南台前县; 水牛血样 7 份, 采自湖南省彬洲; 南阳牛血样 61 份, 采自河南省南阳市黄牛良种繁育场; 牦牛血样 3 份, 采自青海省海南州藏族自治区。

1.1.2 酶及试剂 蛋白酶 K、Tris 饱和酚和琼脂糖购自华美生物工程公司; *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 和柱式 DNA 凝胶纯化试剂盒购自上海生物工程有限公司; 限制性内切酶 *Hae*III 购自 MBI 公司。

1.1.3 引物设计与合成 参考文献[5]设计 1 对引物: 上游引物 5'-CCA AGC GTG AGA CAG AAT AC-3'; 下游引物 5'-AGG AGG GAT AGG AGC AAG TT-3'。引物由上海生物工程公司合成, 预期

扩增片段长度约为 650 bp。

1.2 5 种家畜基因组 DNA 的提取

血样和组织样品基因组 DNA 的提取参考文献[6]。

1.3 5 种家畜 *IGFBP3* 基因的 PCR 扩增

PCR 反应体系为 25 μ L, 其中 *Taq* DNA 聚合酶 1 U, 10 $\times$ Buffer 2.5 μ L, 25 mol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2.5 μ L, 100 ng 基因组 DNA, 10 pmol/ μ L 上、下游引物各 0.25 μ L, 补加 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 34 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.4 5 种家畜 *IGFBP3* 基因 PCR 产物的鉴定

1.4.1 电泳鉴定 PCR 产物用 20 g/L 琼脂糖电泳、成像。

1.4.2 酶切鉴定 *IGFBP3* 基因 *Hae*III 位点的 PCR 产物酶切消化体系为: 10 $\times$ 缓冲液(含 BSA) 4 μ L, *Hae*III (1 U/ μ L) 6 μ L, PCR 产物 10 μ L。酶切消化条件为 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴摇床中消化 4 h。取酶切产物用 40 g/L 琼脂糖电泳、成像。

1.4.3 测序鉴定 分别挑选绵羊、山羊、普通牛和水牛 PCR 扩增效果好的个体, 通过柱式 DNA 凝胶纯化试剂盒对其进行纯化, 并测序。测序在 ABI 3730 型全自动序列分析仪上(上海博亚公司)进行。

1.5 4 种家畜 *IGFBP3* 基因的序列比对和系统进化树构建

用 Clustalw 软件(<http://www.ebi.ac.uk/Clustalw>)对测序结果分别进行两两序列比对和多序列比对, 构建 *IGFBP3* 基因系统进化树。

2 结果与分析

2.1 5 种家畜 *IGFBP3* 基因 PCR 产物电泳鉴定结果

由图 1 可知, 5 种家畜均能扩增出 *IGFBP3* 基因片段, 长度约为 650 bp, 扩增效果非常好, 可用于限制性酶 *Hae*III 的酶切分析。

2.2 5 种家畜 *IGFBP3* 基因 *Hae*III 酶切鉴定结果

结果显示, 绵羊、山羊、水牛和牦牛 *IGFBP3* 基因在 *Hae*III 酶切位点无多态性(图 2~5); 普通牛在

该位点存在多态性, 出现 AA 和 AB 2 种基因型 (图 6)。

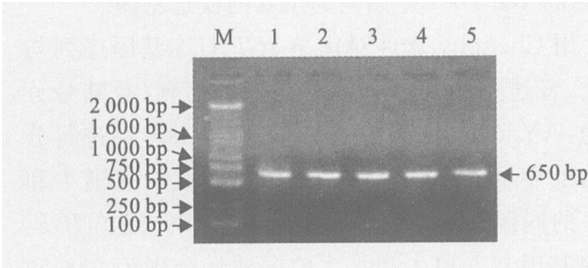


图 1 5 种家畜 *IGFBP3* 基因 *Hae*III 酶切电泳图谱
M. DGL 2000M arker; 1~ 5 依次为绵羊、山羊、普通牛、
水牛、牦牛 *IGFBP3* 基因 PCR 产物

Fig 1 Electrophoresis patterns of PCR
products of *IGFBP3* gene in five species
M. DGL 2000M arker; 1- 5 Samples of sheep, goat,
bovine, Buffalo and Yak

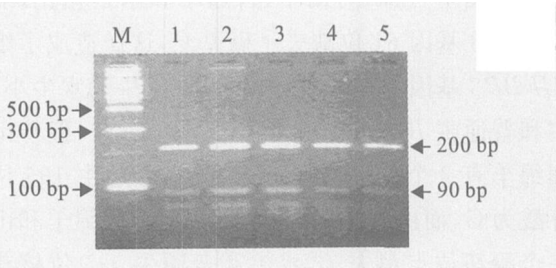


图 2 西农萨能奶山羊和关中奶山羊 *IGFBP3*
基因 *Hae*III 酶切电泳图谱
M. SD004M arker; 1~ 5 萨能和关中奶山羊不同个体酶切

Fig 2 Electrophoresis patterns of *Hae*III
PCR-RFLP of *IGFBP3* gene in dairy goat
M. SD004M arker; 1- 5 Different indivi-
duals in dairy goats

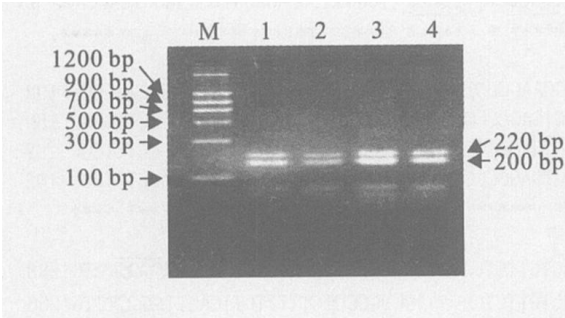


图 3 小尾寒羊 *IGFBP3* 基因 *Hae*III 酶切电泳图谱
M. SD004M arker; 1~ 4 不同小尾寒羊个体酶切结果
Fig 3 Electrophoresis patterns of *Hae*III PCR-RFLP
of *IGFBP3* gene in Small Tailed Han sheep
M. SD004M arker; 1- 4 Different individuals in sheep

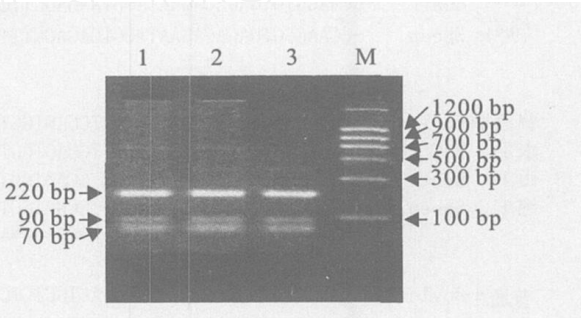


图 4 牦牛 *IGFBP3* 基因 *Hae*III 酶切电泳图谱
M. SD004M arker; 1~ 3 不同牦牛个体酶切结果
Fig 4 Electrophoresis patterns of
*Hae*III PCR-RFLP of *IGFBP3* gene in Yak
M. SD004M arker; 1- 3 Individuals in Yak

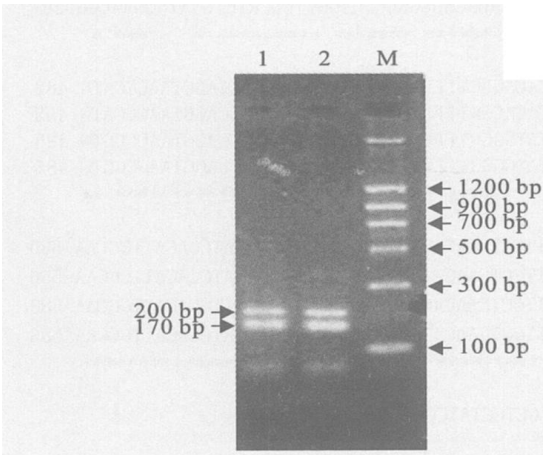


图 5 水牛 *IGFBP3* 基因 *Hae*III 酶切电泳图谱
M. SD004M arker; 1, 2 不同水牛个体酶切结果
Fig 5 Electrophoresis patterns of
*Hae*III PCR-RFLP of *IGFBP3* gene in buffalo
M. SD004M arker; 1, 2 Individuals in buffalo

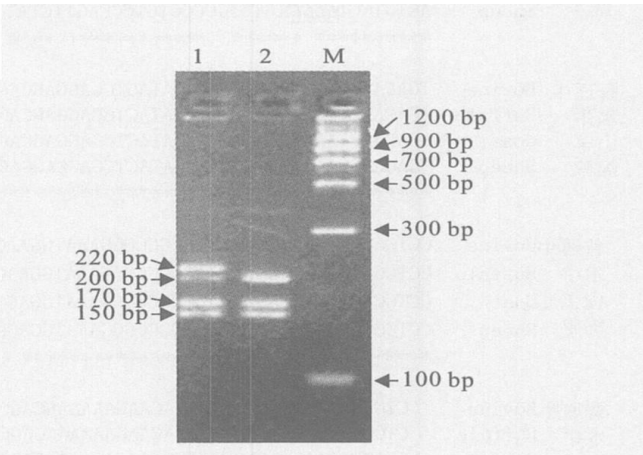


图 6 普通牛 *IGFBP3* 基因 PCR 产物 *Hae*III 酶切电泳图谱
M. SD004M arker; 1 AA 型; 2 AB 型
Fig 6 Electrophoresis patterns of *Hae*III
PCR-RFLP of Jiaxian Red cattle *IGFBP3* gene
M. SD004M arker; 1 Genotype AA; 2 Genotype AB

2.3.4 种家畜 *IGFBP3* 基因序列的同源性分析

由图 7 可知,与山羊、普通牛和水牛相比,绵羊 *IGFBP3* 基因 61 位缺失了碱基 C,这样造成了绵羊 *IGFBP3* 基因酶切片段较山羊、普通牛和水牛小;水牛和普通牛 *IGFBP3* 基因序列基本一致,但与山羊和绵羊有 2 个位点差异:①水牛和普通牛 195 位核苷酸为 G,而山羊和绵羊为 A,从而导致绵羊和山羊一个酶切位点消失;②水牛和普通牛 535 位核苷酸为 G,导致一个酶切位点消失,而山羊和绵羊为 C,则存在酶切位点,造成了牛与羊间 *HaeIII* 酶切片段长度的差异。由此推测,山羊、绵羊、普通牛、水牛和牦牛等 5 种家畜间 *IGFBP3* 基因存在丰富的遗传

多样性。因此,在家畜遗传资源和生物多样性研究中,可将 *IGFBP3* 基因列为重要的候选基因。

用 Clustalw 软件对山羊 *IGFBP3* 基因序列与绵羊、普通牛和水牛 *IGFBP3* 基因序列(登陆号分别为: A Y306012, A Y355439 和 A Y338972)进行分析结果显示,山羊 *IGFBP3* 基因与绵羊、普通牛和水牛的同源性分别为: 97%, 93%, 93%; 绵羊 *IGFBP3* 基因与普通牛和水牛的同源性分别为 93% 和 92%, 而普通牛和水牛的 *IGFBP3* 基因序列同源性为 96%。

聚类结果见图 8。由图 8 可知,绵羊和山羊亲缘关系最近,首先聚为一支;然后与普通牛、水牛相聚。

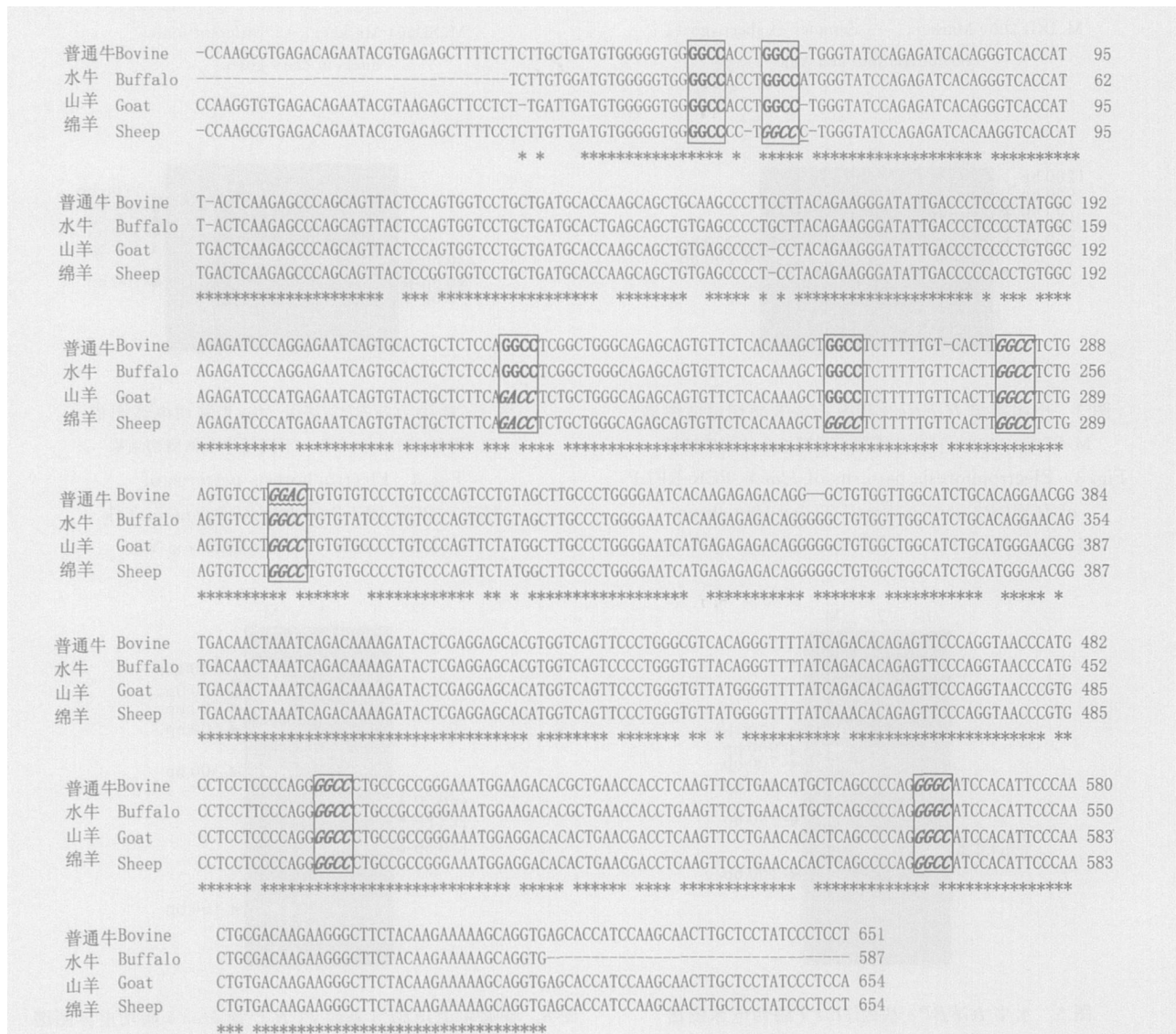


图 7 4 个家畜品种间 *IGFBP3* 序列的比对结果

□. 示 *HaeIII* 酶切位点(GGCC)或其突变情况;—. 表示碱基缺失, * . 表示碱基相同

Fig. 7 Sequence contrast of *IGFBP3* gene in four species

□. *HaeIII* site; —. Lost of nucleotide; * . The same nucleotide

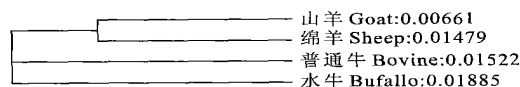


图8 4种家畜的遗传进化树

Fig 8 Cladogram tree of goat, sheep, bovine, buffalo

3 讨论

IGFBP3 基因有许多生物学功能, 已成为学者研究的热点之一。本实验结果表明, *IGFBP3* 基因存在明显的物种间遗传多样性, 即绵羊、山羊、水牛和牦牛该基因座位未表现多态, 而南阳牛该基因座位存在多态性。在南阳牛中表现多态, 与党瑞华^[7]在鲁西牛和晋南牛上及孙维斌^[2]在秦川牛上利用 PCR-RFLP 的研究结果相似。表明在 *IGFBP3* 基因位点上, 普通牛存在普遍的多态性, 而绵羊、山羊、水牛和牦牛不存在多态性。

本实验结果显示, 山羊与绵羊的亲缘关系最近, 其次是与普通牛和水牛, 该结果与从形态、细胞和生化等方面的分类结果一致。因此, *IGFBP3* 基因核苷酸序列适合于物种间分子进化树的构建。但是, 本实验结果与蓝贤勇等^[8]和樊保良等^[9]的研究结果有一定的差异, 所以对以上家畜亲缘关系分析还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Reichenmiller K M, Mattern C, Ranke M B, et al. IGFs, IGF-BPs, IGF-binding sites and biochemical markers of bone metabolism during differentiation in human pulp fibroblasts [J]. *Hum Res*, 2004, 62(1): 33-39
- [2] 孙维斌, 陈宏, 雷雪芹, 等. *IGFBP3* 基因多态性与秦川牛部分屠宰性状的相关性[J]. *遗传*, 2003, 25(5): 511-516
- [3] 张润锋, 陈宏, 蓝贤勇, 等. 西安荷斯坦奶牛群 5 个基因座位遗传多态性 PCR-RFLP 分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(6): 545-549
- [4] 潘传英, 陈宏, 蓝贤勇, 等. 西农萨能奶山羊 *IGFBP3* 基因多态性研究[J]. *Animal Biotechnology Bulletin*, 2004, 9(1): 313-316
- [5] Lan X Y, Chen H, Pan C Y, et al. Cloning and sequencing of *IGFBP3* gene in Xinong Saanen dairy goat [J]. *Animal Biotechnology Bulletin*, 2002, 9(1): 45-48
- [6] Chen H, Leibenguth E. Studies on multilocus fingerprints RAPD markers and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*Carassius auratus* Gibelio) [J]. *Biochem Genet*, 1995, 33: 297-306
- [7] 党瑞华, 魏伍川, 陈宏, 等. *IGFBP3* 基因多态性与鲁西牛和晋南牛部分屠宰性状的相关性[J]. *中国农学通报*, 2005, 3(4): 19-22
- [8] 蓝贤勇, 陈宏, 潘传英, 等. 山羊 FSHR 基因第 10 外显子的 PCR-SSCP 检测及其序列分析[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(4): 484-488
- [9] 樊保良, 李 宁, 吴常信, 等. 依据乳蛋白基因序列构建反刍动物种系发生树的研究[J]. *遗传学报*, 2000, 27(6): 485-497

(上接第 32 页)

- [2] Reed J C, Haldar S, Croce C M, et al. Complementation by BCL-2 and C-HA-RA S on co genes in malignant transformation of rat embryo fibroblasts[J]. *Mol Cell Boil*, 1990, 10(8): 4370-4374
- [3] Adachi M, Zhang Y B, Inai K, et al. Mutation of BAD within the BH3 domain impairs its phosphorylation-mediated regulation[J]. *FEBS Letters*, 2003, 551: 147-152
- [4] Vema S, Zhao L J, Chinnadurai G, et al. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 4671-4676
- [5] Li H, Zhu H, Xu C, et al. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway to apoptosis[J]. *Cell*, 1998, 94: 491-501
- [6] 柳向军, 张令强, 刘小林, 等. 细胞凋亡中的 Bcl-2 家族蛋白及其 BH3 结构域的功能研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(3): 221-225
- [7] Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions[J]. *Mol Immunol*, 2003, 39: 615-647
- [8] Kroemer G, Reed J C. Mitochondrial control of cell death[J]. *Nat Med*, 2000, 6: 513-519
- [9] Gross A, McDonnell J M, Korsmeyer S J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis[J]. *Genes Dev*, 1999, 13: 1899-1911
- [10] Coultas L, Bouillet P, Loveland K L, et al. Concomitant loss of proapoptotic BH3-only Bcl-2 antagonists Bik and Bim arrests spermatogenesis[J]. *EMBO J*, 2005, 24(22): 3963-3973
- [11] Suominen J S, Yan W, Toppari J, et al. The expression and regulation of Bcl-2-related ovarian killer (Bok) mRNA in the developing and adult rat testis[J]. *Eur J Endocrinol*, 2001, 145(6): 771-778
- [12] Yan W, Huang J X, Lax A S, et al. Overexpression of Bcl-W in the testis disrupts spermatogenesis: revelation of a role of BCL-W in male germ cell cycle control[J]. *Mol Endocrinol*, 2003, 17(9): 1868-1879
- [13] Yan W, Samson M, Jegou B, et al. Bcl-w forms complexes with Bax and Bak, and elevated ratios of Bax/Bcl-w and Bak/Bcl-w correspond to spermatogonial and spermatocyte apoptosis in the testis[J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 14(5): 682-699