

西农萨能奶山羊 IGFBP3 基因多态与产羔数、体尺性状的关联分析

胡沈荣¹, 于 姣¹, 蓝贤勇¹, 陈 宏^{1,2}, 赵 苗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] 为了研究山羊 *IGFBP3* 基因多态及其与繁殖、生长发育性状的关系, 利用 *Hae*、*Taq*、*Alw26* 和 *Xsp* 限制性内切酶分析了 74 只西农萨能奶山羊 *IGFBP3* 基因 RFLP, 并利用最小二乘法研究了其多态性与产羔数、初生质量、成年质量、体尺性状的关联性。结果表明, 仅在 *Xsp* 位点发现西农萨能奶山羊群体表现多态性, 存在 GG、GA 和 AA 3 种基因型, G 等位基因频率为 0.682 5, A 等位基因频率为 0.317 5, 处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。西农萨能奶山羊 *IGFBP3-Xsp* 基因座不同基因型与第 2 胎产羔数存在显著相关 ($P < 0.05$), 且与初生质量也存在显著相关 ($P < 0.05$), GG 基因型个体初生质量显著高于 AA、GA 基因型个体 ($P < 0.05$)。表明西农萨能奶山羊群体 *IGFBP3* 基因存在 *Xsp* 位点多态, 且该位点对产羔性状和初生质量有显著影响。

[关键词] 西农萨能奶山羊; *IGFBP3* 基因; PCR-RFLP; 体尺性状; 关联分析

[中图分类号] S827.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)11-0001-05

Association of polymorphism of IGFBP3 gene with litter size and body sizes of Xinong Saanen dairy goat

HU Shen-rong¹, YU Jiao¹, LAN Xian-yong¹, CHEN Hong^{1,2}, ZHAO Miao¹

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

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

Abstract : The object of this paper was to study the association of polymorphism of *IGFBP3* gene with production traits so that it could provide scientific information about goat marker-assisted selection (MAS). PCR-RFLP technique was used to analyze the polymorphisms of *IGFBP3* with *Hae*, *Taq*, *Alw26* and *Xsp* in 74 Xinong Saanen dairy goats, and least square means method was adopted to analyze the association of polymorphism with litter size and body size. The polymorphism of *IGFBP3* gene was only detected by *Xsp* PCR-RFLP methods and three genotypes were found in Xinong Saanen dairy goat. The frequency of "G" and "A" allele were 0.682 5 and 0.317 5, respectively. The analyzed population was in Hardy-Weinberg equilibrium. Moreover, the result showed significant relationship between *Xsp* polymorphism with litter size of the second birth and birth weight. The individuals with GG genotype had better performance than those of GA and AA genotype ($P < 0.05$). The *Xsp* polymorphism of *IGFBP3*

†收稿日期] 2006-10-08

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(2004C122); 西北农林科技大学拔尖人才支持计划项目(01110101); 西北农林科技大学研究生教育创新计划项目(No. 05 YCH018)

[作者简介] 胡沈荣(1969-), 女, 陕西杨凌人, 实验师, 主要从事生物技术研究。E-mail: hushrnw@126.com

[通讯作者] 陈 宏(1955-), 男, 陕西西安人, 教授, 博士生导师, 主要从事生物技术与家畜育种研究。
E-mail: chen hong1212 @263.net

gene was detected in Xinong Saanen dairy goat and had significantly effect on litter size and birth weight.

Key words: Xinong Saanen dairy goat; *IGFBP3* gene; PCR-RFLP; body sizes; association analysis

IGF 家族包括 IGF-、IGF-、IGF- R、IGF- R 及 IGFBP(1-7),其中,IGFs 对胚胎、神经、骨骼肌、骨骼的发育,细胞增殖、转化等具有重要作用。*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,有关肉牛和奶牛、山羊 *IGFBP3* 基因遗传多态性的研究较多^[2-8],而有关该基因与山羊繁殖、生长发育性状关系的研究尚未见报道。为此,本研究利用 PCR-RFLP 技术,研究了西农萨能奶山羊 *IGFBP3* 基因多态性及其与产羔数和体尺性状的关联性,以期奶山羊繁殖、生长发育性状的标记研究提供科学资料,为奶山羊品种的遗传改良提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验动物与试剂

74 只西农萨能奶山羊经产母羊颈静脉血样采自陕西千阳种羊场核心群,每个体 10 mL,加抗凝剂低温带回实验室, - 80 保存备用,同时收集该羊场产羔数资料;初生质量、体高、体斜长、胸围、管围、成年质量的记录为该场的累积资料或现场测量数据。蛋白酶 K、*Taq* DNA 聚合酶等购自上海生工生物工程有限公司,限制性内切酶 *Hae*、*Taq*、*Alw26* 购自 MBI(Fermentas)公司,内切酶 *Xsp* 购自 Takara 公司。

1.2 西农萨能奶山羊基因组 DNA 的分离

血样基因组 DNA 的分离参考 Chen 等^[9]的方法。

1.3 西农萨能奶山羊 *IGFBP3* 基因 PCR 扩增

根据 *IGFBP3* 基因序列设计 1 对引物^[10],上游引物序列:5'-CCA AGC GTG AGA CAG AAT AC-3',下游引物序列:5'-AGG AGG GAT AGG AGC AAG TT-3',均由上海生工生物工程有限公司合成。

反应体系 25 μ L:10 $\times$ Buffer 2.5 μ L,MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μ L,dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μ L,*Taq* DNA 聚合酶(0.5 U/mL) 2.0 μ L,上、下游引物(5 pmol/ μ L) 各 1.0 μ L,模板 DNA (50 ng/ μ L) 1.5 μ L,加灭菌双蒸水至 25 μ L。

PCR 反应程序:95 预变性 5 min;94 变性 30 s,60 复性 1 min,72 延伸 2 min,共 35 个循环;最后 72 延伸 10 min。

1.4 西农萨能奶山羊 *IGFBP3* 基因的 PCR-RFLP 分析

酶切反应体系:10 $\times$ 缓冲液(含 BSA) 1 μ L,限制性内切酶(10 U/ μ L) 0.5 μ L,PCR 产物 8.5 μ L,合计 10 μ L。经瞬时离心后置于 37 恒温水浴摇床消化 3.5 h,25 g/L 琼脂糖电泳、成像。

1.5 数据统计与分析

利用独立 χ^2 分析 *IGFBP3* 基因多态性与产羔数的关联性^[11]。按不同基因型,将产单羔和双羔样本分类,利用 SPSS 软件(11.0)进行独立 χ^2 或 Fisher 精确概率分析。

利用 SPSS 软件分析基因型与体尺性状的关联性,其 PCR-RFLP 标记条带效应值的最小二乘线性模型为:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + E_{ij},$$

式中: Y_{ij} 为第 i 个个体的性状观察值, μ 为群体均值, G_i 为第 i 个个体的基因型效应值, E_{ij} 为随机误差。

2 结果与分析

2.1 西农萨能奶山羊 *IGFBP3* 基因的 PCR 扩增结果

利用 PCR 引物对西农萨能奶山羊 *IGFBP3* 基因进行扩增,结果(图 1)表明其片段大小为 655 bp,与预期片段大小相符,且条带清晰明亮,可用于进一步分析。

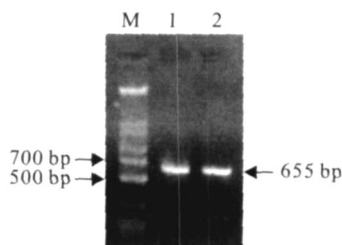


图 1 西农萨能奶山羊 *IGFBP3* 基因的 PCR 产物电泳图

M. DL2000;1,2. PCR 产物

Fig. 1 Electrophoresis of PCR of *IGFBP3* gene in Xinong Saanen dairy goat

M. DL2000;1,2. PCR products

2.2 西农萨能奶山羊 *IGFBP3* 基因的酶切分析

2.2.1 *Hae* 酶切分析 在 *Hae* 位点未发现酶

切多态性,片段大小在 200 bp 以下(图 2)。

2.2.2 *Alw26* 酶切分析 *Alw26* 酶切后所有个体均表现 340,303 和 10 bp 条带(由于 10 bp 条带太小,图 3 中不可见),没有多态性。

2.2.3 *Taq* 酶切分析 PCR 产物经 *Taq* 酶切后,所有个体均表现 416 和 239 bp 带纹,未发现多

态性(图 4)。

2.2.4 *Xsp* 酶切分析 PCR 产物经 *Xsp* 酶切后,产生多态性:GG、GA 和 AA 基因型,其中,GG 基因型 655 bp;GA 基因型 655,421 和 234 bp;AA 基因型 421 和 234 bp(图 5)。

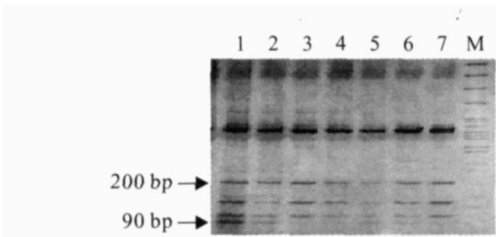


图 2 西农萨能奶山羊 *IGFB P3* 基因的 *Hae* 酶切电泳图
M. PBR322 DNA/ *Msp* ;1~7. BB 基因型

Fig. 2 Electrophoresis of *Hae* PCR-RFLP at *IGFB P3* locus in Xinong Saanen dairy goat
M. PBR322 DNA/ *Msp* ;1- 7. Genotype BB

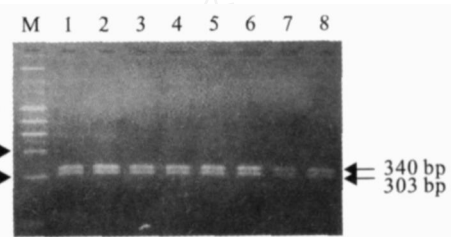


图 3 西农萨能奶山羊 *IGFB P3* 基因的 *Alw26* 酶切电泳图
M. SD004;1~8. BB 基因型

Fig. 3 Electrophoresis of *Alw26* PCR-RFLP at *IGFB P3* locus in Xinong Saanen dairy goat
M. SD004;1- 8. Genotype BB

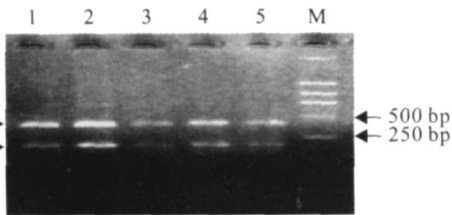


图 4 西农萨能奶山羊 *IGFB P3* 基因的 *Taq* 酶切电泳图
M. SD004;1~5. BB 基因型

Fig. 4 Electrophoresis of *Taq* PCR-RFLP at *IGFB P3* locus in Xinong Saanen dairy goat
M. SD004;1- 5. Genotype BB

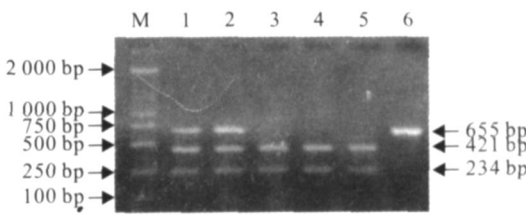


图 5 西农萨能奶山羊 *IGFB P3* 基因的 *Xsp* 酶切电泳图
M. DL2000;1,2. GA;3~5. AA;6. GG

Fig. 5 Electrophoresis of *Xsp* PCR-RFLP at *IGFB P3* locus in Xinong Saanen dairy goat
M. Marker DL2000;1,2. Genotype GA;
3- 5. Genotype AA;6. Genotype GG

2.3 群体遗传结构分析

西农萨能奶山羊 *IGFB P3-Xsp* 基因座的基因频率和基因型频率见表 1。由表 1 可见,西农萨

能奶山羊 *IGFB P3-Xsp* 位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,基因抽样误差在 5 %以内。

表 1 西农萨能奶山羊 *IGFB P3-Xsp* 基因座的基因频率和基因型频率

Table 1 Frequencies of genotypes and alleles for <i>IGFB P3-Xsp</i> loci in Xinong Saanen dairy goat							
基因座 Locus <i>IGFB P3-Xsp</i>	基因型 Genotypes			等位基因 Alleles		总计 Total	平衡(χ^2) Equilibrium (χ^2)
	GG	GA	AA	G	A		
样本量 Samples	34	7	33			74	
频率 Frequencies	0.459 5	0.094 6	0.445 9	0.682 5	0.317 5	1	1.484 $\times 10^{-3}$ 0.062 ($P > 0.05$)

2.4 西农萨能奶山羊 *IGFB P3* 基因多态与产羔数的关联分析

由表 2 可见,西农萨能奶山羊 *IGFB P3-Xsp* 基因座不同基因型与第 2 胎产羔数显著相关 ($\chi^2 =$

4.269, $P = 0.039$)。

2.5 西农萨能奶山羊 *IGFB P3* 基因多态与体尺性状的关联分析

由表 3 可见,西农萨能奶山羊 *IGFB P3-Xsp*

基因座不同基因型与初生质量之间存在显著相关，型个体 ($P < 0.05$)。且 GG 基因型个体初生质量显著高于 AA、GA 基因

表 2 西农萨能奶山羊 *IGFB P3-Xsp* 基因座的不同基因型与产单、双羔的关联分析

Table 2 Association of genotypes with litter sizes for *IGFB P3-Xsp* loci in Xinong Saanen dairy goat

胎次 Birth	产单羔数 Litter size		产多羔数 Litter sizes		P 值 P value
	GG	GA	GG	GA	
1	7	4	5	2	1.000
2	2	7	19	12	0.039
3	0	1	17	7	0.320
4	2	3	8	8	1.000

表 3 西农萨能奶山羊 *IGFB P3-Xsp* 基因座的不同基因型与体尺指标的关联分析

Table 3 Association of *IGFB P3-Xsp* loci genotypes with body size indexes in Xinong Saanen dairy goat

性状 Traits	GG(n)	AA(n)	GA(n)	均方 MS		F 值 F value	P 值 P value
				组间 Between	组内 Within		
初生质量/ kg Birth weight	3.58 ±0.08 b(n=24)	3.17 ±0.27 a(n=3)	3.19 ±0.13 a(n=20)	0.92	0.25	3.75	0.03
体高/ cm Stature	69.36 ±1.09 (n=18)	68.00 ±2.00 (n=2)	68.79 ±0.94 (n=14)	2.46	17.12	0.14	0.87
体斜长/ cm Body size	79.08 ±0.56 (n=18)	76.50 ±0.50 (n=2)	78.00 ±0.91 (n=14)	8.81	7.99	1.10	0.345
管围/ cm Shank girth	8.37 ±0.13 (n=18)	8.25 ±0.25 (n=2)	8.25 ±0.15 (n=14)	3.78	17.82	0.21	0.81
成年质量/ kg Body weight	47.28 ±1.05 (n=18)	45.50 ±2.50 (n=2)	48.46 ±1.70 (n=14)	0.06	0.30	0.21	0.81
胸围/ cm Heart girth	85.56 ±0.88 (n=18)	86.50 ±0.50 (n=2)	86.50 ±1.30 (n=14)	10.51	28.01	0.38	0.69

注:同行不同小写字母表示差异显著 ($\alpha = 0.05$);相同小写字母表示差异不显著。
Note :Different small letters mean $\alpha = 0.05$;the same letters mean insignificant difference at the same a value.

3 讨 论

3.1 西农萨能奶山羊 *IGFB P3* 基因多态性

本试验利用 *Hae*、*Alw26* 和 *Taq* 限制性内切酶分析了西农萨能奶山羊 *IGFB P3* 基因,未发现多态性,说明山羊 *IGFB P3* 基因多态性较贫乏且比较保守。这与孙维斌等^[2]研究秦川牛 *IGFB P3* 基因 *Hae* 位点存在多态性不一致,揭示山羊和普

通牛 *IGFB P3* 基因存在物种间多样性。本试验利用限制性内切酶 *Xsp* 分析西农萨能奶山羊 *IGFB P3* 基因时发现了多态性。Lan 等^[6]认为,AA 和 GG 纯合基因型在第 2 内含子第 217 位 (Accession No. :526114) 发生 A →G 转换。在该位置是 A 的定义为等位基因 A,即存在 *Xsp* 酶切位点,等位基因 A 有 234 和 421 bp 2 条带;是 G 的定义为等位基因 G,等位基因 G 仅有 1 条带,没有 *Xsp* 切点,这与闵令江^[12]的变异位置有差异。在试验群体中,G 等位基因为优势基因,相应地 GG 基因型为优势基因型,处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,表明西农萨能奶山羊在选择、迁徙和遗传漂变等因素作用下,该基因座处于动态平衡中,且人工选育可能对这一基因座的选择压力不强。

3.2 西农萨能奶山羊 *IGFB P3-Xsp* 位点对产羔数的影响

本研究结果表明,西农萨能奶山羊 *IGFB P3* 基因对第 2 胎产羔数有显著影响。这可能是由于类固醇激素通过 IGF 系统的中介作用或 IGF 系统协同其他内分泌因子在排卵、附植、妊娠维持和胚胎发育等生殖环节中发挥作用。Lan 等^[6]研究发现,山羊 *IGFB P3* 基因第 2 外显子单核苷酸多态性 (SNPs) 与产羔数之间存在显著相关。说明 *IGFB P3* 基因对繁殖性状有显著影响。在标记辅助选择方面,*IGFB P3-Xsp* 位点可作为山羊产羔性状选育提高的 DNA 标记之一。

3.3 西农萨能奶山羊 *IGFB P3-Xsp* 位点与体尺性状的关系

本研究发现,西农萨能奶山羊 *IGFB P3-Xsp* 位点对初生质量有显著影响,且 GG 基因型个体初生质量显著高于 AA、GA 基因型个体 ($P < 0.05$)。然而,闵令江^[12]研究发现,波尔山羊及其杂交后代 *IGFB P3-Xsp* 位点对初生质量无显著影响。这可能与山羊品种(系)、用途和选育程度有关。西农萨能奶山羊是以产奶特性为主的奶山羊品种,而波尔山羊及其杂种后代是以产肉性能为主的肉用山羊品

种。因此,在选育程度上,西农萨能奶山羊向奶用性能方向发展,而波尔山羊向肉用性能方向发展,从而形成了不同的基因型分布特征。但关于该位点对初生质量是否有影响的问题,还需要在其他山羊品种进行进一步深入分析。

3.4 *IGFBP3* 基因与动物遗传育种

胰岛素样生长因子是一类单链多肽激素,具有促进蛋白质合成、分解血糖等作用,被认为对动物生长、产肉、产奶有影响,故将其作为候选基因研究动物的生长发育等经济性状是合理的。*IGFBP3* 基因对很多性状具有较大的遗传效应,是控制这些性状的众多基因之一,可能是主基因之一或是与控制这些性状的主基因相连锁^[13]。因此,将 *IGFBP3* 基因用于标记辅助选择意义重大。本研究结果表明,*IGFBP3* 基因对山羊繁殖性状和生长发育性状有显著影响。根据 GG 基因型个体初生质量显著优于 GA、AA 基因型个体的信息,加强对 GG 基因型个体的选择将有利于改善群体初生质量的状况。

[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]. Horm 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] 蓝贤勇. 西农萨能奶山羊经济性状的 DNA 分子标记及 5 个山羊品种 DNA 多态性研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- [5] 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]. 动物生物技术通讯, 2004, 9(1): 313-316.
- [6] Lan X Y, Pan C Y, Chen H, et al. The novel SNPs of the *IGFBP3* gene and their associations with litter size and weight traits in goat [J]. Archives of Animal Breeding, 2007, 50(2): 223-224.
- [7] Lan X Y, Pan C Y, Chen H, et al. The *Hae* and *Xsp* PCR-RFLP detecting genetic variations of *IGFBP3* gene in goat [J]. Small Ruminant Research, 2007, 73: 283-286.
- [8] 于姣, 陈宏, 蓝贤勇, 等. 5 种家畜 *IGFBP3* 基因遗传变异研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(3): 33-37.
- [9] Chen H, Leibenguth F. Studies on multilocus fingerprints RAPD markers and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*Carassius auratus gibelio*) [J]. Biochem Genet, 1995, 33: 297-306.
- [10] Macilla H J, Zhang H M, Denise S K. A novel polymorphism in the bovine insulin-like growth hormone factor binding protein-3 (*IGFBP3*) gene [J]. Animal Genetics, 1997, 28: 375.
- [11] 袁志发, 周静芋. 试验设计与分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [12] 闵令江. 山羊肉用性能候选基因遗传分析及生长发育性状 QTL 定位[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [13] 高雪. 牛生长发育性状候选基因的分子标记研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2004.