

辽宁绒山羊 IGF- I 基因 5'调控区 多态性与产绒性状相关*

郭翠华¹⁾ 贾存灵²⁾ 张 微¹⁾ 朱晓萍¹⁾ 贾志海^{1)**}

(¹⁾中国农业大学动物科技学院, 北京 100193; ²⁾西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

摘要 根据表型性状选取少量辽宁绒山羊个体, 直接进行类胰岛素生长因子 - I (IGF- I) 基因 5'调控区克隆测序以确定单核苷酸多态(SNP)位点, 共发现 4 个 SNPs, 分别是 G→C (388 bp)、A→G (668 bp)、A→C (719 bp)、G→A (752 bp)的突变, 导致 5'调控区 305~800 bp 中比野生型个体减少一个 CdxA 转录因子结合位点, 但 C/EBP 的值 (89.2)高于野生型 (88.5), 然后通过引入错配碱基创造酶切位点技术和多聚酶链反应 - 限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP)方法, 对 520 只辽宁绒山羊进行基因型检测, 结果表明, 每个 SNP 位点在本群体中都有 AA (野生型)、AB 和 BB (突变型) 三种基因型, 且 4 个 SNPs 位点共有 13 种单倍型组合. 将不同 SNP 的基因型及单倍型组合与绒产量、绒纤维细度和绒纤维长度进行关联分析发现, SNP2 位点的 AA 基因型绒纤维细度极显著低于 AB 型和 BB 型 ($P < 0.01$), 而 SNP4 位点 AA 基因型产绒量显著高于 AB 型和 BB 型 ($P < 0.05$), 单倍型组合 H7H7 与产绒量和绒纤维细度均有显著相关 ($P < 0.05$). IGF- I 基因可能是影响绒山羊产绒性状的主要候选基因.

关键词 类胰岛素生长因子 - I (IGF- I), PCR-RFLP, 辽宁绒山羊, 产绒性状

学科分类号 S827.1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00627

类胰岛素生长因子 - I (IGF- I) 是类胰岛素生长因子 (IGF) 家族中的一员, 广泛分布于哺乳动物皮肤毛囊及真皮纤维细胞内, 具有促进有丝分裂活性和蛋白质合成等特性, 能刺激黑素细胞、上皮细胞和毛乳头细胞等各种细胞的增殖和分化^[1,2]. 毛囊是羊绒毛的重要组成部分, 是控制绒毛生长的重要结构, 主要由毛乳头、真皮鞘及上皮成分的内根鞘和外根鞘组成. IGF- I 是通过其受体 (IGF- IR) 间的细胞信号途径来刺激毛囊细胞增殖的^[3,4]. 目前已证实, 在绵羊皮肤毛囊中尤其是外根鞘有大量的 IGF- IR 分布^[5], 同样, 在安哥拉山羊和克什米尔绒山羊的毛乳头、真皮鞘及内根鞘和外根鞘也存在大量的 IGF- IR^[6]. 因此, IGF- I 与 IGF- IR 结合后可调控皮肤毛囊的生长发育, 进而影响羊的被毛生长.

目前, 对 IGF- I 基因与羊的绒毛生长关系的研究主要是在表达调控或细胞培养上. 通过将含有小鼠蛋白启动子的羊 IGF- I cDNA 转基因到绵羊体内, 皮肤中 IGF- I 基因的表达升高, 且净毛量增加^[7,8]. 对 Scottish 绒山羊皮肤进行体外培养, 研究表明, IGF- I 可调控山羊绒的生长^[9]. 由此可见,

IGF- I 是绒山羊被毛生长的重要调控因子. 但 IGF- I 是否直接影响羊的绒毛性状尚需进行基因功能的相关研究. 关于羊的 IGF- I 基因在遗传结构上的差异国内外研究较少. Yilmaz 等^[10]通过对绵羊 IGF- I 基因 5'调控区进行聚合酶链反应 - 单链构象多态性 (PCR-SSCP) 分析, 发现群体内存在两处新的单核苷酸多态 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 位点. Zhang 等^[11]研究表明, IGF- I 基因内含子 4 在南江黄羊群体中存在 1 个 SNP 位点. Mikawa 等^[12]首次成功地克隆并测序了山羊的 IGF- I 基因序列, 随后, 山羊 IGF- I 基因被定位在第 5 号染色体的 5q31 上^[13]. 但是, 在绒山羊群体中 IGF- I 基因是否存在遗传差异, 以及这些遗传差异与衡量绒山羊产绒性能和决定绒纤维纺织价值主要指标——产绒量、绒纤维细度和长度是否有关联还未见报道.

* 国家科技支撑计划资助项目 (2006BAD01A11) 和国家高技术研究发展计划 (863) 资助项目 (2007AA10Z151).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62732728, E-mail: jzh331@cau.edu.cn

收稿日期: 2008-09-09, 接受日期: 2008-10-24

本研究首先根据表型性状选取部分辽宁绒山羊个体, 直接进行 IGF- I 基因 5'调控区序列克隆测序, 寻找与 IGF- I 基因相关的 SNPs, 然后通过引入错配碱基创造酶切位点 (create restriction site, CRS) 技术和多聚酶链反应 - 限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 方法, 进一步研究探讨 IGF- I 基因与绒山羊产绒性状的相关关系, 揭示绒山羊产绒的分子机理和丰富绒山羊的分子标记种类提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及数据采集. 从辽宁省辽宁绒山羊育种中心羊场选取 10 只公羊的后代, 分布在 6 个圈舍内, 具有完整生产性能和系谱记录的 520 只绒山羊 (其中 450 只母羊, 70 只公羊). 生产性状数据来自辽宁省辽宁绒山羊育种中心羊场 2000~2007 年间的生产记录, 包括产绒量、绒纤维长度和细度数据.

1.1.2 试剂及来源. Taq DNA 聚合酶、dNTPs、限制性内切酶 *Sal* I 和 *Xba* I 购自 Takara 公司, 限制性内切酶 *Afl* II 和 *Xmn* I 购自 NEB 公司, pMD-18T Vector 购自 Promega 公司, DNA 片段回收纯化试剂盒与质粒提取纯化回收试剂盒购自北京华美生物工程公司.

1.2 方法

1.2.1 绒山羊基因组 DNA 的提取及绒毛样品分

析. 从血液中提取 DNA, 方法见《分子克隆实验指南 (第三版)》. 每年春季辽宁省辽宁绒山羊育种中心羊场全场统一抓绒, 并称量个体产绒量. 抓绒前在绒山羊左侧肩胛骨后缘处紧贴皮肤剪取绒毛样品 3~5 g, 用奥达 2000 动物纤维测量分析仪测定绒纤维长度和直径 (细度).

1.2.2 少量个体 IGF- I 基因 SNP 位点的检测. 每对引物 (表 1) 选取 24 只表型性状 (产绒性状) 极端的辽宁绒山羊个体 (4 只产绒量最高、4 只产绒量最低; 4 只绒纤维最长、4 只绒纤维最短; 4 只绒纤维最细、4 只绒纤维最粗), 用于 IGF- I 基因 5'调控区序列的测定.

1.2.3 引物序列与 PCR 反应. 依据 GenBank 山羊 IGF- I 基因序列 (NO: D26119), 用 Oligo6.0 设计引物, 以进行少量个体 SNP 位点的检测, 引物序列见表 1, 扩增的 PCR 产物为 IGF- I 基因的 5'调控区序列. 通过少量个体 IGF- I 基因 5'调控区序列的测定, 检测到的 SNPs 位点不是酶切位点, 通过引物碱基错配技术来引入限制性内切酶酶切位点, 引入错配碱基的引物见表 2, 其中有下列碱基为错配碱基. 引物由上海生工生物公司合成. PCR 反应体系包括: 10×缓冲液 2.5 μl、dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μl、正反向引物 (10 μmol/L) 各 1.0 μl、Taq DNA 聚合酶 (5 U/μl) 0.3 μl、基因组 DNA (50 mg/L) 1 μl、灭菌水 17.2 μl. 最佳反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 56.9~60.1℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min.

Table 1 PCR primers for detection of SNPs in 5' flanking region of goat IGF- I gene

Primers	Sequence (5'→3')	Starting nucleotide position (GenBank No. D26119)	Fragment length/bp	Annealing temperature/℃
U1	F: GATCTTTCAACCCATGAGACAATCT R: AAAGTCAGGGAAGTGAAACTAC	1	382	56.9
U2	F: GCATTTCAAAGCTCCTCAT R: GAGTTCGCTCAAGCCTTCT	309	326	58.0
U3	F: TCACTCCTCGTGTCTAACT R: AGTAGCCTGGACCTTGTA	555	260	58.0
U4	F: GCAAACCTTGTTTATAGTCG R: TCAAGGGTTATGATGTCATTC	732	354	58.0
U5	F: CTGGCTTGACCATGTTG R: AAGATTTTGCTGAGCTGTAAAG	1 020	339	60.1

Table 2 PCR primers for creation of restriction site in 5' flanking region of IGF- I gene

Sites	Sequence (5'→3')	Starting nucleotide position (GenBank No. D26119)	Fragment length/bp	Annealing temperature/℃
SNP1	F: GCCTACCTCTTGATGATGT R: TTAAAAATATGAAAAGTGAACACT	245	170	56.9
SNP2	F: AACCAATCAGGTTTCCCTT R: TGTAGCCTGGACCTTGATTT	648	166	
SNP3	F: TCCTGGCCATGGCCATAAAGATCT R: AAGCCCAGCTTAGACATCCCAC	693	186	
SNP4	F: TCACTCCTCGTGTCTAACT R: GGACACAGTGATCCTGATGCGT	555	219	

1.2.4 酶切鉴定. 引入错配碱基引物的 PCR 扩增产物 3 μ l, 限制性内切酶 5 U, 反应体积 10 μ l, 在 37°C 水浴中反应 3 h. 酶切产物在 3% 琼脂糖胶上低压电泳, 溴化乙锭 (EtBr) 染色, 用美国 Bio/Rad 凝胶成像系统观察并拍照记录.

1.2.5 PCR 产物的纯化和序列测定. 分别将每对引物 (表 1) 选取的 24 只产绒性状表现极端的个体和 PCR-RFLP 分析后每种纯合基因型的 3 个个体的 PCR 扩增产物在琼脂糖凝胶中电泳后, 用柱式胶回收试剂盒进行回收纯化, 回收后的 DNA 片段用 pMD-18T Vector 连接后转化 DH5 α 菌株, 菌体 PCR 鉴定后, 用质粒提取试剂盒提取质粒 DNA 作为测序模板, 每一种纯合的基因型单独挑 2 个克隆分别测序.

1.2.6 潜在调控元件及蛋白质结合位点的预测. 对 IGF- I 基因 5' 调控区序列利用 <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html> 网站进行转录因子结合位点的在线预测.

1.2.7 统计分析. 根据 PCR-RFLP 带型和测序结果划分基因型, 将 GenBank 上的 IGF- I 基因序列规定为野生型基因型 AA, 突变个体的基因型为突变型基因型 BB. 应用 PHASE (version2.1) 软件构建单倍型并估计单倍型频率^[4]. 根据试验群体特点, 构建以下线性模型进行最小二乘分析: $Y = \mu + G + S + N + A + Q + F + e$. 其中 Y 代表产绒性状的观察值; μ 代表产绒性状的群体平均值; G 代表每个 SNP 基因型 (或者不同单倍型组合) 固定效应; S 代表性别的固定效应; N 代表年份的固定效应; A 代表年龄的固定效应; Q 代表圈舍的固定效应; F 代表家系的随机效应; e 代表随即残差效应. 采用 SAS 8.2 (version) 中的 GLM 过程进行关联分析.

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

引物 U1、U2、U3、U4、U5、SNP1、SNP2、SNP3 和 SNP4 的 PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 片段长度与预扩增片段大小一致, 无非特异性条带, 引物 U1、U2、U3、U4 和 U5 的 PCR 产物可以进行克隆测序, 引物 SNP1、SNP2、SNP3 和 SNP4 的扩增产物可以进行 RFLP 分析.

2.2 少量个体 IGF- I 基因 SNP 位点的检测结果

用 DNAMAN 软件将引物 U1、U2、U3、U4 和 U5 的 PCR 产物测序结果与 GenBank 上的基因序列进行同源性分析发现, 在选取的产绒性能极端

的辽宁绒山羊群体中, IGF- I 基因 5' 调控区存在 4 个 SNPs 位点, 分别为 388 bp (SNP1) 处 G 替换成 C、668 bp (SNP2) 处 A 突变成 G、719 bp (SNP3) 处 A 替换成 C、752 bp (SNP4) 处 G 突变成 A, DNA 序列见图 1.

ACTTTCAGACAAAGTGTGCA	GTTTCCTTTGAGGGCACCCA
388 bp ↓	668 bp ↓
ACTTTCAGACAAAGTGTGCA	GTTTCCTTTGAGGGCACCCA
AAAGACCTACCAAGAGTTTC	GTTTATAGTCAAGCATCAGG
719 bp ↓	752 bp ↓
AAAGACCTACCAAGAGTTTC	GTTTATAGTCAAGCATCAGG

Fig. 1 Mutation in the 5' flanking region of IGF- I gene

2.3 PCR-RFLP 检测结果

通过少量辽宁绒山羊个体 IGF- I 基因 5' 调控区的检测, 发现了 4 个 SNPs, 然后通过酶切分析, 进一步在 520 只辽宁绒山羊群体中验证这几个 SNPs. 酶切产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳检测, 产生 3 种带型, 根据后续的错配 PCR 产物的测序结果, 规定野生型为 AA 型, 突变型为 BB 型或 AB 型.

当绒山羊 IGF- I 基因 5' 调控区 388 位点为 G 时, PCR 扩增产物经 *Xmn* I 酶切后形成 2 个片段 (148 bp 和 22 bp, 其中 22 bp 的片段太小并未出现在胶图上). 而当 388 位点为 C 时, 不能被 *Xmn* I 酶切, PCR 产物酶切后只有 1 个片段 (170 bp), 此基因型为 BB 型. 当 388 位点为 G/C 时, PCR 产物经酶切后会有 3 个片段 (170 bp、148 bp 和 22 bp), 此基因型为 AB 型 (图 2).

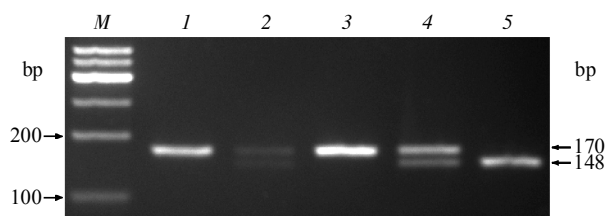


Fig. 2 PCR-RFLP result of SNP1 digested by *Xmn* I

M: Marker (100~600 bp); 1, 3: BB genotype; 2, 4: AB genotype; 5: AA genotype.

绒山羊 IGF- I 基因 5' 调控区 668 位点为 A 时, 产生限制性内切酶 *Afl* II 酶切位点, PCR 产物分别经酶切后, 产生 2 个片段 (148 bp 和 18 bp, 其中 18 bp 的片段太小并未出现在胶图上), 此基因型为 AA 型. 当 668 位点为 G 时, 不会产生 *Afl* II 的酶

切位点, PCR 产物酶切后只有 1 个片段 (166 bp), 此基因型为 BB 型. 当 668 位点为 A/G 时, PCR 产物经酶切后会有 3 个片段 (166 bp、148 bp 和 18 bp), 此基因型为 AB 型 (图 3).

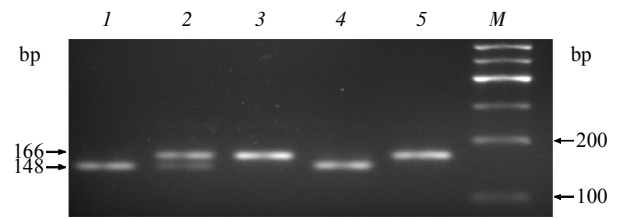


Fig. 3 PCR-RFLP result of SNP2 digested by *Afl* II
M: Marker(100~600 bp); 1, 4: AA genotype; 2: AB genotype; 3, 5: BB genotype.

绒山羊 IGF- I 基因 5'调控区 719 位点为 A 时, 能被 *Xba* I 酶切, PCR 产物分别经酶切后产生 2 个片段 (164 bp 和 22 bp, 其中 22 bp 的片段太小并未出现在胶图上), 此基因型为 AA 型. 当 719 位点为 C 时, 不能被 *Xba* I 酶切的位点, PCR 产物酶切后只有 1 个片段 (186 bp), 此基因型为 BB 型. 当 719 位点为 A/C 时, PCR 产物经酶切后会有 3 个片段 (186 bp、164 bp 和 22 bp), 此基因型为 AB 型 (图 4).

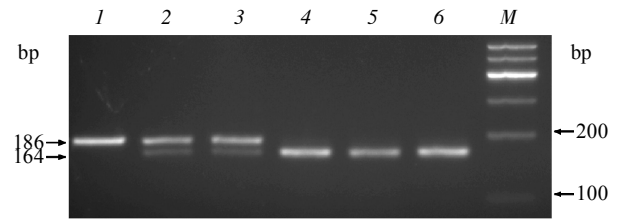


Fig. 4 PCR-RFLP result of SNP3 digested by *Xba* I
M: Marker(100~600 bp); 1: BB genotype; 2, 3: AB genotype; 4, 5, 6: AA genotype.

绒山羊 IGF- I 基因 5'调控区 752 位点为 G 时, 产生限制性内切酶 *Sal* I 的酶切位点, PCR 产物分别经酶切后, 形成 2 个片段 (194 bp 和 25 bp, 其

中 25 bp 的片段太小并未出现在胶图上), 此基因型为 AA 型. 当 752 位点分别为 A 时, 不会产生 *Sal* I 的酶切位点, PCR 产物酶切后只有 1 个片段 (219 bp), 此基因型为 BB 型. 752 位点为 G/A 时, PCR 产物经酶切后会有 3 个片段 (219 bp、194 bp 和 25 bp), 此基因型为 AB 型 (图 5).

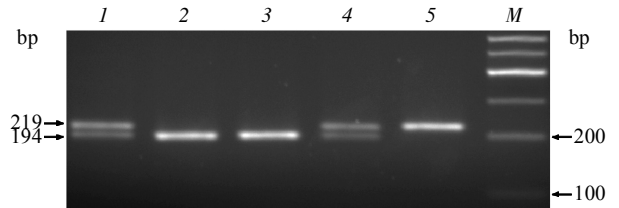


Fig. 5 PCR-RFLP result of SNP4 digested by *Sal* I
M: Marker(100~600 bp); 2, 3: AA genotype; 1, 4: AB genotype; 5: BB genotype.

2.4 IGF- I 基因 5'调控区潜在的调控元件及蛋白质结合位点预测

本文所分析的片段是 IGF- I 基因 5'调控区部分, 使用网站 (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 上的 TFSEARCH (ver1.3) 软件, 预测绒山羊 IGF- I 基因 4 个 SNPs 位点的纯合基因型 (AA 和 BB) 5'调控区部分序列 (305~800 bp) 上的调控元件及蛋白质结合位点改变情况. 预测结果表明, BB 基因型比 AA 野生型少了一个 CdxA 转录因子结合位点, 但 BB 型的 CCAAT 增强子结合蛋白(C/EBP)转录调控因子的值 (89.2) 高于 AA 型 (88.5).

2.5 IGF- I 基因 5'调控区 4 个 SNP 位点基因型、等位基因频率分布

根据 PCR-RFLP 检测结果, 分析了辽宁绒山羊群体中 IGF- I 基因型频率和基因频率, 统计结果见表 3. SNP1 和 SNP4 的基因型频率为 AA > AB > BB, SNP2 为 AA < AB < BB, SNP3 为 AB > AA > BB. SNP1、SNP3 和 SNP4 的基因频率为 A > B, SNP2 为 A < B. 在 SNP1、SNP3 和 SNP4 位点中, 等位基因 A 为优势等位基因, 而在 SNP2 中 B 为优势等位基因.

Table 3 Frequencies of genotype and alleles of four SNPs in goat IGF- I gene

Items	Number of goats	Genotype frequency			Alleles frequency	
		AA	AB	BB	A	B
SNP1	520	0.76 (395)	0.22 (113)	0.02 (12)	0.87	0.13
SNP2	520	0.11 (56)	0.37 (193)	0.52 (271)	0.29	0.71
SNP3	520	0.38 (197)	0.45 (235)	0.17 (88)	0.60	0.40
SNP4	520	0.42 (216)	0.39 (201)	0.19 (103)	0.61	0.39

2.6 IGF- I 基因 5'调控区各 SNP 位点基因型与绒山羊产绒性状的最小二乘分析

为了研究 IGF- I 基因 5'调控区的不同基因型对绒山羊产绒性状的影响, 本研究采用最小二乘分

析方法对 520 只辽宁绒山羊 IGF- I 基因 5'调控区上各 SNPs 的不同基因型与辽宁绒山羊产绒性状(绒产量、绒纤维长度、绒纤维细度)进行了最小二乘分析, 结果见表 4.

Table 4 Effects of the different genotypes of each SNP in goat IGF- I gene on cashmere fiber traits

Sites	Cashmere fiber traits	Three genotypes of each SNP		
		AA	AB	BB
SNP1	Cashmere weight (g)	934.13 ± 9.06 ^a	968.29 ± 17.86 ^a	1016.43 ± 15.06 ^a
	Cashmere length (cm)	7.15 ± 0.04 ^a	7.20 ± 0.08 ^a	7.39 ± 0.07 ^a
	Cashmere diameter (μm)	15.96 ± 0.05 ^a	16.01 ± 0.07 ^a	16.46 ± 0.06 ^a
SNP2	Cashmere weight (g)	917.81 ± 18.32 ^a	930.66 ± 14.46 ^a	951.83 ± 10.35 ^a
	Cashmere length (cm)	7.09 ± 0.11 ^a	7.13 ± 0.06 ^a	7.19 ± 0.04 ^a
	Cashmere diameter (μm)	15.58 ± 0.08 ^{ab}	15.93 ± 0.06 ^{ab}	16.07 ± 0.04 ^{ab}
SNP3	Cashmere weight (g)	958.50 ± 13.77 ^a	934.10 ± 11.73 ^a	935.92 ± 18.20 ^a
	Cashmere length (cm)	7.16 ± 0.06 ^a	7.15 ± 0.05 ^a	7.18 ± 0.08 ^a
	Cashmere diameter (μm)	16.01 ± 0.06 ^a	15.97 ± 0.05 ^a	15.95 ± 0.07 ^a
SNP4	Cashmere weight (g)	972.01 ± 12.60 ^a	924.37 ± 13.62 ^b	924.20 ± 15.42 ^b
	Cashmere length (cm)	7.18 ± 0.05 ^a	7.17 ± 0.06 ^a	7.13 ± 0.07 ^a
	Cashmere diameter (μm)	16.01 ± 0.05 ^a	15.88 ± 0.06 ^a	16.07 ± 0.07 ^a

The different is not significant for the mean with the same letter. The difference is significant for the mean with the different letter.

从表 4 中可以看出: 绒产量、绒纤维长度、绒纤维细度在 SNP1 和 SNP3 各基因型个体之间差异不显著 ($P > 0.05$). SNP2 的 AA 基因型个体绒纤维细度极显著地低于 BB 基因型和 AB 基因型个体 ($P < 0.01$), 但基因型 BB 和基因型 AB 的个体绒纤维细度之间差异不显著 ($P > 0.05$), SNP2 各基因型个体之间的绒产量和绒纤维长度差异不显著 ($P > 0.05$). SNP4 的 AA 基因型个体绒产量显著高于 BB 基因型和 AB 基因型个体 ($P < 0.05$), 但基因型 BB 和基因型 AB 的个体绒产量之间差异不显著 ($P > 0.05$), SNP4 各基因型对辽宁绒山羊绒纤维长度和绒纤维细度没有影响.

2.7 单倍型分析

应用 PHASE (version 2.1) 软件对 4 个 SNPs 位点进行单倍型分析, 其结果见表 5, 在 520 只辽宁绒山羊群体中共出现 7 种单倍型, 其中有 4 个主要的单倍型: CGAG、GGCA、GGAG 和 GAAG, 它们占总体数的 92.19%. 在 7 种单倍型中, 单倍型 GGCA 频率最高, 而单倍型 GGAA 最低.

2.8 不同单倍型组合与辽宁绒山羊产绒性状的相关性分析

以上 7 种单倍型在本实验群体中共出现 13 种单倍型组合 (表 6). 对不同单倍型组合与辽宁绒山

羊产绒性状进行最小二乘分析, 结果表明: 不同单倍型组合对产绒量和绒细度的影响达到显著的水平 ($P < 0.05$), 对绒长度没有影响 ($P > 0.05$). 其中单倍型组合 H1H2、H1H5、H2H4、H3H5、H5H5 和 H7H7 的个体平均产绒量在 950 g 以上, 产绒量高低顺序为 H1H2 > H2H4 > H7H7 > H5H5 > H1H5 > H3H5, 且这几组之间差异不显著 ($P > 0.05$). 单倍型组合 H7H7 个体的绒细度在各不同单倍型组合中最低, 显著地低于单倍型组合 H1H2、H1H5、H2H2、H2H4、H2H5、H3H7、H5H5 和 H5H7 个体的绒纤维细度 ($P < 0.05$), 但与其他单倍型组合个体的绒细度差异不明显 ($P > 0.05$).

Table 5 Haplotype frequencies of the four SNPs in 5' flanking region of goat IGF- I gene

Items	Haplotype	Observation	Frequency/%
H1	CGAG	128	12.30
H2	GGCA	375	36.05
H3	GGCG	33	3.17
H4	GGAA	11	1.06
H5	GGAG	193	18.56
H6	GAAA	21	2.02
H7	GAAG	276	26.54

Table 6 The least square analysis for cashmere traits and Diplotypes

Diplotype	Percent/%	Cashmere weight/g	Cashmere length/cm	Cashmere diameter/ μm
H1H2	10.04	1025.84 $\pm$ 24.86 ^a	7.37 $\pm$ 0.11 ^a	16.20 $\pm$ 0.11 ^a
H1H5	5.59	974.28 $\pm$ 22.55 ^{ab}	7.19 $\pm$ 0.15 ^a	16.06 $\pm$ 0.14 ^{ab}
H1H7	9.07	915.97 $\pm$ 28.38 ^{bc}	7.07 $\pm$ 0.18 ^a	15.76 $\pm$ 0.18 ^{bc}
H2H2	12.55	933.62 $\pm$ 20.14 ^{bc}	7.23 $\pm$ 0.09 ^a	15.98 $\pm$ 0.09 ^{ab}
H2H4	2.12	990.27 $\pm$ 31.01 ^{ab}	7.04 $\pm$ 0.19 ^a	16.19 $\pm$ 0.11 ^{ab}
H2H5	11.77	886.70 $\pm$ 21.87 ^c	7.02 $\pm$ 0.09 ^a	16.09 $\pm$ 0.09 ^{ab}
H2H6	4.05	827.99 $\pm$ 25.23 ^c	6.70 $\pm$ 0.25 ^a	15.78 $\pm$ 0.21 ^{abc}
H2H7	19.31	917.24 $\pm$ 18.46 ^{bc}	7.17 $\pm$ 0.08 ^a	15.84 $\pm$ 0.08 ^{abc}
H3H5	3.47	952.99 $\pm$ 19.96 ^{ab}	7.13 $\pm$ 0.23 ^a	15.89 $\pm$ 0.20 ^{abc}
H3H7	2.70	948.97 $\pm$ 21.62 ^{abc}	7.10 $\pm$ 0.23 ^a	16.03 $\pm$ 0.22 ^{ab}
H5H5	5.02	975.00 $\pm$ 28.97 ^{ab}	7.24 $\pm$ 0.13 ^a	16.17 $\pm$ 0.13 ^{ab}
H5H7	6.37	939.55 $\pm$ 27.39 ^{bc}	7.01 $\pm$ 0.12 ^a	16.09 $\pm$ 0.12 ^{ab}
H7H7	7.91	988.48 $\pm$ 21.35 ^{ab}	7.31 $\pm$ 0.13 ^a	15.49 $\pm$ 0.13 ^c

The different is not significant for the mean with the same letter. The difference is significant for the mean with the different letter.

3 讨 论

山羊绒产品以其轻薄、保暖、美观、柔软等特点，在国内外市场受到广泛青睐，我国是山羊绒的主要生产和出口国，约占世界贸易额的 50% 以上。产绒量是衡量绒山羊产绒性能的主要指标，绒细度和长度是衡量山羊绒品质的重要指标，决定绒纤维纺织价值。辽宁绒山羊是我国特有的优良绒山羊品种，具有产绒量高、绒长质优的特点。根据山羊绒生长的生理生化特点及 IGF- I 基因在绒山羊皮肤中的表达，可以将 IGF- I 基因作为绒山羊产绒性状的候选基因进行深入研究。

本研究通过引入错配碱基创造酶切位点和 PCR-RFLP 的方法，研究辽宁绒山羊产绒性状候选基因——IGF- I 基因的遗传功能。研究结果表明，在所研究的 520 只绒山羊群体中，IGF- I 基因 5'调控区共存在 4 个 SNPs，每个 SNP 位点都有 AA、AB 和 BB 三种基因型和 A、B 两个等位基因。研究检测到的 4 个单碱基突变，即碱基 G→C (388)、A→G (668)、A→C (719)、G→A (752)，导致在 5'调控区部分序列 (305~800 bp) 中 BB 基因型比 AA 野生型少了一个 CdxA 转录因子结合位点，而 C/EBP 的值 (89.2) 高于 AA 型 (88.5)。CdxA 是“同源异形盒”基因家族的一个重要成员，一般位于基因的 5'端，是一种调控区的结合蛋白序列，作为启动子的一部分而起作用，在某些表达 CdxA 蛋白的报告基因表达系统中，含有 CdxA 元件的载体能够增强基因的转录活性，但 CdxA 蛋白与相应 DNA 相互作用的亲和力却存在差异^[15]。CdxA 具有

影响生长激素释放的功能^[16]，研究表明，生长激素可使美利奴羊的产毛量增加^[17]，且影响山羊绒的生长^[18]，而 IGF- I 是生长激素和营养物质发挥促生长作用的主要介导因子^[19]，因此，IGF- I 可能参与绒生长过程的调节。C/EBP 是 dZIP 转录因子家族的成员，通过对靶基因调控区的识别和结合发挥转录调控作用，参与细胞的增殖、分化、肿瘤发生、凋亡及机体的免疫、应激反应、能量代谢、血液生成等生命活动^[20]，目前已证实，人的皮肤中高度表达 C/EBP，C/EBP 能够显著提高垂体细胞中催乳素 (PRL) 分泌的水平，而且它还可与垂体特异转录因子 (PIT-1) 协同调控 PRL 基因的表达^[21, 22]。已有研究表明，PRL 基因可以影响山羊绒的生长^[23]，而 IGF- I 是 PRL 作用于羊毛生长的调控因子^[5]，由此可以说明 IGF- I 基因在山羊绒毛生长过程中有重要的调控作用。本研究中，5'调控区的这些调控元件及蛋白质结合位点改变可能影响绒山羊皮肤中 IGF- I 基因的表达量，从而影响山羊的产绒性能，表现出不同的产绒量、绒纤维长度或细度。最小二乘分析证实，该基因 5'调控区 SNP2 位点和 SNP4 位点分别与绒纤维细度、产绒量存在显著的相关关系，然而，有关绒山羊 IGF- I 基因的结构、调控元件的研究很少，关于不同基因型 5'调控区的转录因子及其结合位点是如何影响和调节基因，并最终影响绒山羊绒毛性状等方面有待于进一步研究。

利用几个 SNPs 构建单倍型进行关联分析可以弥补单个 SNP 提供信息量不足的缺点，不考虑群体遗传学因素，单倍型提高了相关分析的效力^[24]。本研究采用 IGF- I 基因的 4 个 SNPs 构建单倍型，

进而可以有效地分析单倍型组合对山羊产绒性状的效应, 为标记辅助选择为基础的绒山羊分子育种提供更多的遗传学基础信息. 本研究群体中, 单倍型组合 H7H7 的个体产绒量比单倍型组合 H1H2 和 H2H4 个体分别低 37.36 g 和 1.79 g, 但未达到显著水平, 且比其他单倍型组合个体的产绒量高. 单倍型组合 H7H7 个体的绒纤维细度在所有的单倍型组合个体中最低, 分别比单倍型组合 H1H2 和 H2H4 个体低 0.70 μm 和 0.71 μm , 且达到显著的水平. 综合产绒量、绒纤维长度和绒纤维细度这三个产绒性状的指标, 根据绒山羊在选育过程中必须要遵循提高羊绒产量和绒长度的同时要保持或降低羊绒细度, 以利保持产绒量高、绒长且绒质细等特点的原则^[25], 认为单倍型组合 H7H7 可以作为产绒性状的首选标记, IGF- I 基因 5'调控区上的突变对山羊产绒性状有显著影响, 这证实了英国学者 Galbraith 等^[9]研究的结论: IGF- I 可能是山羊绒纤维生长的一个重要调节剂.

作为一种经济动物, 绒山羊的基因组研究最终是以重要经济性状 QTL 定位和重要基因的位置克隆为目标, 以研究如产绒量、绒纤维长度和细度等一些有利数量性状作为主要任务, 而这些性状可能是由多位点的等位基因作用决定的. 寻找畜禽重要经济性状的连锁标记, 候选基因法是非常有效的方法, 它可以更直接地研究基因的多态性与经济性状的关系. 本研究通过寻找辽宁绒山羊 IGF- I 基因 5'调控区的 SNPs, 并结合辽宁绒山羊产绒性状进行分析, 发现 IGF- I 是调控山羊绒毛生长的重要因子, 在山羊绒毛生长中起着极其重要的作用, 绒山羊 IGF- I 基因是影响产绒性状的重要候选基因之一.

本研究的结果表明, 辽宁绒山羊 IGF- I 基因 5'调控区存在与产绒性状显著相关的 SNPs 基因位点. 因此, IGF- I 基因可能是辽宁绒山羊产绒性状的候选主效基因或者与控制产绒性状的主效基因连锁, 这为辽宁绒山羊的分子育种和生产奠定了坚实的理论基础.

致谢 本实验是在中国农业大学农业生物技术国家重点实验室完成的, 感谢李宁教授给予的帮助. 感谢中国农业大学动物科技学院张勤教授对本研究中实验数据的统计分析给予的指导. 感谢中国农业大学动物科技学院赵兴波教授在本文文写作上给予的帮助.

参 考 文 献

- 1 Little J C, Westgate G E, Evans A. Cytokine gene expression in intact rat hair follicles. *J Invest Dermatol*, 1994, **103**(5): 715~720
- 2 Itami S, Kurata S. Androgen induction of follicular epithelial cell growth is mediated via insulin-like growth factor I from dermal papilla cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **212**(3): 988~994
- 3 Harris P M, McBride B W, Gurnsey M P. Direct infusion of a variant of insulin-like growth factor- I into skin of sheep and effects on local blood flow, amino acid utilisation and cell replication. *Endocrinology*, 1993, **139**(3): 463~472
- 4 Stewart E H, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev*, 1996, **76**(4): 1005~1026
- 5 Nixon A J, Ford C A, Oldham J M, *et al.* Localisation of insulin-like growth factor receptors in skin follicles of sheep (*Ovis aries*) and changes during an induced growth cycle. *Comp Biochem Phys A*, 1997, **118**(4): 1247~1257
- 6 Dicks P, Morgan C J, Morgan P J, *et al.* The localisation and characterisation of insulin-like growth factor I (IGF- I) receptors and the investigation of melatonin receptors on the hair follicles of seasonal and non-seasonal fibre-producing goats. *J Endocrinol*, 1996, **151**(1): 55~63
- 7 Damak S, Su H Y, Jay N P, *et al.* Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor I . *Biores Tech*, 1996, **14**(2): 185~188
- 8 Su H Y, Jay N P, Gourley T S, *et al.* Wool production in transgenic sheep: results from first-generation adults and second-generation lambs. *Anim Biotechnol*, 1998, **9**(2): 135~147
- 9 Galbraith H, Sims D, Hazlerigs D. The effect of IGF- I on the growth of secondary hair follicles of the cashmere goat *in vitro*. *Proceedings of the British Society of Animal Science*. Penicuik: British Society of Animal Science Press, 1997. 170 (Abstr)
- 10 Yilmaz A, Davis M E, Hines H, *et al.* Detection of two nucleotide substitutions and putative promoters in the 5' flanking region of the ovine IGF- I gene. *J Appl Geophys*, 2005, **46**(3): 307~309
- 11 Zhang C X, Zhang W, Luo H L, *et al.* A new single nucleotide polymorphism in the IGF- I gene and its association with growth traits in the Nanjiang huang goat. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2008, **21**(8): 1073~1079
- 12 Mikawa S, Yoshikawa G, Aoki H, *et al.* Dynamic aspects in the expression of the goat insulin-like growth factor- I (IGF- I) gene: diversity in transcription and post-transcription. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, **59**(1): 87~92
- 13 Schibler L, Vaiman D, Oustry A, *et al.* Comparative gene mapping: a fine-scale survey of chromosome rearrangements between ruminants and humans. *Genome Res*, 1998, **8**(9): 901~915
- 14 Stephens M, Donnelly P A. Comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet*, 2003, **73**(5): 1162~1169
- 15 Chang M H, Chou C M, Hsieh Y C, *et al.* Identification of 5' -upstream region of pufferfish ribosomal protein L29 gene as a strong constitutive promoter to drive GEP expression in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **314**(1): 249~258
- 16 Bajic V B, Choudhary V, Hock C K. Content analysis of the core promoter region of human genes. *In Silico Biol*, 2004, **4**(2): 109~125

- 17 Adams N R, Briegel J R, Ward K A. The impact of a transgene for ovine growth hormone on the performance of two breeds of sheep. *J Anim Sci*, 2002, **80**(9): 2325~2333
- 18 Villar D, McMillen S R, Dicks P, *et al.* The effects of bovine somatotropin on hair follicle activity and cashmere fibre growth in goats. *Aus J Agr Res*, 1999, **50**(8): 1365~1373
- 19 Salmon W D Jr, Danghaday W H. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. *J Lab Clin Med*, 1957, **49**(6): 825~836
- 20 Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos K G. Biological role of the CCAAT/enhancerbindingprotein family of transcription factors. *J Biol Chem*, 1998, **273**(44): 28545~28548
- 21 Jacob K K, Stanley F M. CCAAT/enhancer-binding protein alpha is a physiological regulator of prolactin gene expression. *Endocrinology*, 1999, **140**(10): 4542~4550
- 22 Enwright J F III, Kawecki-Crook M A, Voss T C, *et al.* A PIT-1 homeodomain mutant blocks the intranuclear recruitment of the CCAAT/enhancer binding protein alpha required for prolactin gene transcription. *Mol Endocrinol*, 2003, **17**(2): 209~222
- 23 Ibraheem M, Galbraith H, Scaife J, *et al.* Growth of secondary hair follicle of cashmere goat to prolactin *in vitro*. *Proc Nutr Soc*, 1994, **52**: 263A (Abstr)
- 24 Clark A G. The role of haplotypes in candidate gene studies. *Genet Epidemiol*, 2004, **27**(4): 321~333
- 25 Liu H Y, Li N, Jia C L, *et al.* Effect of the polymorphisms of keratin associated protein 8.2 gene on fibre traits in Inner Mongolia cashmere goats. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2007, **20**(6): 821~826

Polymorphisms in The 5'flanking Region of IGF- I Gene are Associated With Cashmere Fibre Traits in Liaoning Cashmere Goats*

GUO Cui-Hua¹⁾, JIA Cun-Ling²⁾, ZHANG Wei¹⁾, ZHU Xiao-Ping¹⁾, JIA Zhi-Hai^{1)**}

¹⁾College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

²⁾College of Animal Science and Technology, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract Insulin-like growth factor I (IGF- I) is essential for the growth and differentiation of hair follicles which is an important part of wool and cashmere. But there is no report on polymorphisms of the IGF- I gene in cashmere goat, and also few candidate genes for cashmere production traits have been reported in cashmere goats. The objectives of this work were to detect the single nucleotide polymorphism (SNP) in the 5' flanking region of IGF- I gene and to determine their association with fibre traits in Liaoning cashmere goats. The fibre traits data investigated in the experiment were combed cashmere weight, cashmere fibre length and cashmere fibre diameter. A few individuals of the Liaoning cashmere goats, selected according to phenotypic character, were used for SNPs detection in the 5' flanking region of IGF- I gene, and four point mutation G→C (388 bp), A→G (668 bp), A→C (719 bp), G→A (752 bp) were identified, which result in a CdxA bonding-site lack, and score increase of C/EBP site in the 5' flanking region compared with the wild type. Then different genotypes were detected in 520 Liaoning cashmere goats using create restriction site (CRS) and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), three genotypes, AA, AB and BB were observed coded for by two different alleles A and B for each SNP, and 13 diplotypes were identified in the groups of the four SNPs. The relationships between the genotypes and combed cashmere weight, cashmere fibre length and cashmere fibre diameter were analyzed. The statistical analysis showed that animals with the genotype AA of SNP2 in Liaoning cashmere goats had the thinnest cashmere fiber diameter compared with those with the AB and BB genotype ($P < 0.01$), and individuals with genotype AA of the SNP4 had the highest cashmere weight compared with those with the other genotypes ($P < 0.05$). The relationship between diplotype and cashmere fiber traits was also analyzed, the results showed that both cashmere fiber diameter and cashmere weight were significantly correlated with the diplotype H7H7 ($P < 0.05$). These results suggested that IGF- I gene would be useful candidate gene in selection program on cashmere fiber traits in cashmere goats.

Key words IGF- I , PCR-RFLP, Liaoning cashmere goats, cashmere fibre traits

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00627

*This work was supported by grants from The National Key Technology R & D Program of China (2006BAD01A11) and Hi-Tech Research and Development Program of China (2007AA10Z151).

**Corresponding author. Tel: 86-10-62732728, E-mail: jzh331@cau.edu.cn

Received: September 9, 2008 Accepted: October 24, 2008