

# 草原红牛胰岛素样生长因子结合蛋白 6 基因外显子 2 的遗传多态性及遗传效应分析

杨春, 刘振, 李春义

(中国农业科学院特产研究所, 吉林省特种动物分子生物学重点实验室, 吉林长春 130112)

**摘要:** 本试验旨在研究草原红牛不同基因型与屠宰肉用性状的关联性。选用草原红牛作为试验群体, 采用 PCR-SSCP 方法检测胰岛素样生长因子结合蛋白 6 (insulin-like growth factors binding proteins 6, IGFBP6) 基因外显子 2 的多态性, 采用最小二乘法拟合线性模型将突变位点的不同基因型与牛屠宰肉用性状进行关联分析。结果表明, 在 *IGFBP6* 基因外显子 2 上发现 1 个多态性位点 A180G, 具有 3 种基因型: AA、AB 和 BB。SPSS 13.0 统计分析结果表明, *IGFBP6* 基因外显子 2AB 和 BB 基因型净肉重极显著高于 AA 基因型 ( $P < 0.01$ ); 眼肌面积和骨重显著高于 AA 基因型 ( $P < 0.05$ ), 而在宰前活重、胴体重、肾脂重和肋脂重方面 3 种基因型个体之间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。结果显示, *IGFBP6* 基因的多态性与屠宰肉用性状具有一定的关联性, 可为今后草原红牛的育种保种工作提供理论依据, 并对草原红牛肉用性状的改善提供参考。

**关键词:** 草原红牛; 胰岛素样生长因子结合蛋白 6; 遗传多态性; 遗传效应

**中图分类号:** S813.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-7236(2014)11-0227-05

胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin-like growth factors binding proteins, IGFBPs) 包括 6 个相关蛋白, 与胰岛素样生长因子家族有高亲和力 (Pollak 等, 2008)。IGFBPs 有高度保守的 N 端和

C 端序列, 中间区的差别很大, 是糖基化、磷酸化和蛋白酶作用的位点, 并有助于 IGFBPs 三级结构的形成和稳定。其中, IGFBP1-5 对 IGF-I 和 IGF-II 都有高亲和力, 而 IGFBP6 与 IGF-II 的结合能力是与 IGF-I 亲和力的 20~100 倍, 即使高水平的 IGFBP6 对 IGF-II 的活性也没有抑制作用 (Moschos 等, 2002; Lee 等, 2002)。IGFBP6 是一种分泌型糖蛋白, 能够与 IGF-II 特异结合并在血液中运送该因子到各种组织和器官, 一定程度上抑制和促进 IGF-II 生物学活性。通过对成肌细胞研究发现, IGFBP6 对其发育和分化具有作用。IGFBP6 可能主要是通

**收稿日期:** 2014-02-25

**作者简介:** 杨春 (1983—), 男, 吉林人, 博士, 助理研究员, 研究方向: 特种动物分子生物学。

**通信作者:** 李春义 (1959—), 男, 河北人, 研究员, 研究方向: 特种动物分子生物学。E-mail: lichunyi1959@163.com; Tel: 0431-87861445

**基金项目:** 国家自然科学基金 (31070878); 973 前期研究专项 (2011CB111515)。

## Effect of miR-138 on Development and Lactation in Mouse Mammary Gland

LI Dan, WANG Jie, XIE Xue-jiao, LI Qing-zhang, WANG Chun-mei

(Key Laboratory Dairy Science of Education Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** microRNAs (miRNAs) play a key role in cell proliferation, differentiation and apoptosis. miRNA involved in the regulation of mammary gland development in cell proliferation and differentiation. In this experiment, we used mice as an animal model to study the role of miR-138 in mouse mammary gland development and lactation. Maternal tail vein injection of miR-138 inhibitors, pups weighing method applied to detect the changes of milk yield; electron microscopy techniques was used to observe Ultrastructure changes in mammary gland tissue. The results showed that after intravenous injection of miR-138 inhibitor, female mouse increased maternal mammary epithelial cells, increasing the amount of milk secretion, ultrastructure of cells found in the metabolic activity, collect female mouse milk after miR-138 inhibitor, detect lactose and casein of the milk were all increased. The results suggested that the inhibition of miR-138 could stimulate mammary epithelial cell proliferation, increase the secretion of milk, and regulation of the ingredient of the milk.

**Key words:** miR-138; mammary gland development; lactation

(责任编辑 晋大鹏)

过同 IGF-Ⅱ 的结合,阻断其同细胞表面受体的结合,从而抑制由 IGF-Ⅱ 所介导的生长和发育。研究表明,IGF-Ⅱ 对肌肉生长具有重要调控作用,是影响动物肌肉生长发育的主要候选基因。目前,对 IGFBP6 的研究主要集中于肿瘤抑制作用,对动物肌肉生长发育性状研究较少。肌肉的发育情况关系到动物的经济价值,肉质性状的形成和调控一直是动物遗传育种界的研究热点。草原红牛是中国第一个肉乳兼用型优良品种(李向阳等,2006),具有肉质好和遗传力强等突出优点(俞美子,2001;金海国等,2002)。本研究采用 PCR-SSCP 技术对 *IGFBP6* 基因外显子 2 进行遗传多态性分析,从分子水平上研究草原红牛肉用性状与遗传标记之间的关系,以期草原红牛进一步选育和肉用牛新品系的培育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试验动物** 试验选用草原红牛 51 头(8 月龄,身体健康,生长发育良好的公牛),由吉林省农业科学院进行育肥,颈静脉采血,EDTA 抗凝, -20℃ 保存备用。

**1.1.2 主要试剂与仪器** 全血基因组 DNA 提取试剂盒购自 V-gene 公司; *Taq* DNA 聚合酶、dNTP 均购自天根生化科技(北京)有限公司;琼脂糖、N,N-甲叉双丙烯酰胺、二羟甲基甲烷(Tris)均购自长春宝泰克生物科技公司;TEMED、过硫酸铵、丙烯酰胺、乙二醇四乙酸均购自鼎国生物技术有限公司。

PCR 仪(PTC-100, UNITED STATES);凝胶自动成像系统(Gel-3000, 鼎用生物技术有限公司);DYY-3 型电泳仪(北京六一仪器厂);高速台式离心机(TGL-16G, 上海安亭仪器厂)。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因组 DNA 提取** 采用蛋白酶 K 和苯酚抽提法提取基因组 DNA。

**1.2.2 引物合成** 参考序列(GenBank 登录号: NW\_001040495)使用 Primer Premier 5.0 设计外显子 2 引物,扩增片段大小为 182 bp。引物序列为:上游引物:5'-GGCTCTTCTTCCACC-3';下游引物为:5'-CCCTTCTGCACCT-3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

**1.2.3 PCR 扩增** PCR 扩增体系为 25 μL:10×PCR Buffer 2.5 μL,上、下游引物(10 pmol/L)各 0.5 μL, dNTPs (2.0 mmol/L) 2.0 μL, *Taq* 酶(5 U/μL) 0.125 μL, DNA 模板(50 mg/L)

1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足体系。PCR 扩增程序为:95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;72℃ 延伸 7 min;4℃ 保存。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统分析检测扩增结果。

**1.2.4 PCR-SSCP 分析** 取 2 μL PCR 产物和 8 μL 变性 Buffer,沸水浴 10 min,然后冰浴 10 min,变性后的 PCR 产物用 11% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,150 V 电压电泳 19 h 后,银染显色。

**1.2.5 牛生产性能测定** 将所选择的符合试验要求的公牛,进行 305 d 舍饲育肥后,称重并屠宰,根据国家标准 GB/T172382-1998 测定其肉用性能,测定试验牛的胴体重、肾脂重、骨重、净肉重、肋脂重、眼肌面积等指标。

**1.2.6 统计分析** 本试验所用牛的年龄、性别、身体状况以及饲料、饲养管理等其他试验条件一致,因此采用二因素交叉分组的试验设计。根据 PCR-SSCP 分析结果和各生产性状测定结果,运用 SPSS 13.0 中 GLM 对数据进行非均衡资料的方差分析,对不同基因型间生产性状指标(平均值±标准差)差异显著性进行检验并进行多重比较。如果拥有某一基因型的个体某一生产性状均值显著高于拥有其他基因型个体均值,说明这一标记基因型与该生产性状间存在相关性,再进一步分析等位基因的效应。

## 2 结果与分析

**2.1 PCR-SSCP 分析** 以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,所得片段长度为 182 bp,与预期片段大小一致,且没有非特异性扩增(图 1),可以进行 PCR-SSCP 分析。

将 PCR 产物进行 PCR-SSCP 分析,结果在扩增片段上发现了多态性位点,并对纯合子进行测序,在外显子 2 上发现 1 个多态性位点 A180G,具有 2 种等位基因,出现 1 条带的纯合子分别命名为 AA 和 BB 基因型,出现 2 条带的杂合子命名为 AB 基因型(图 2)。

**2.2 克隆测序** 将含有多态片段的不同基因型的 PCR 产物进行凝胶回收并连接于 pMD18-T 载体,经 DH5α 转化,菌液 PCR 检测和测序鉴定,结果显示,在 180 bp 处存在 1 个 G→A 的单碱基突变(图 3)。

**2.3 序列分析结果** 将 2 种基因型测序结果进行比较,结果显示,草原红牛 *IGFBP6* 基因外显子 2 多态性是由片段中单碱基突变造成的。AA 基因型序列与 GenBank 中序列(登录号: NW\_001040495)相同,AB 基因型在 180 bp 处存在碱基突变,由原来的 G(AA 基因型)突变为 A(AB、BB 基因型)(图 4)。

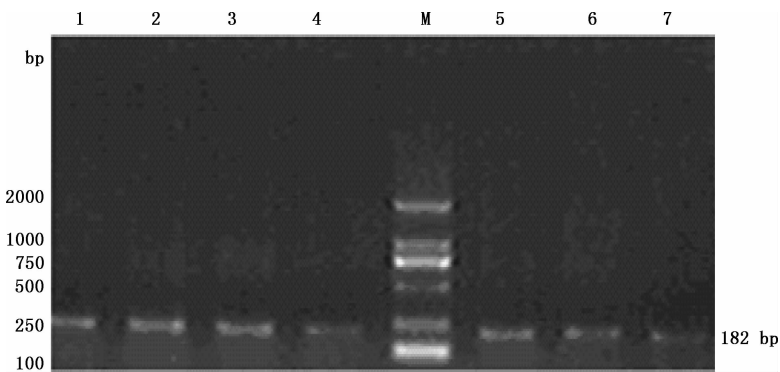


图1 IGFBP6 基因外显子 2 PCR 扩增结果

注:M,DL2000 DNA Marker;1~7,7 个样品的 IGFBP6 基因外显子 2 PCR 扩增产物。

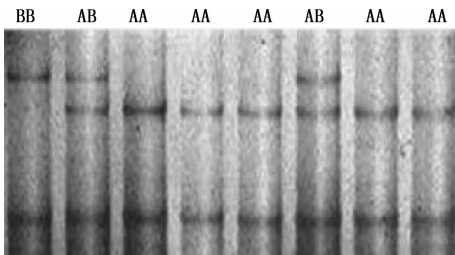


图2 IGFBP6 基因外显子 2 PCR-SSCP 检测结果

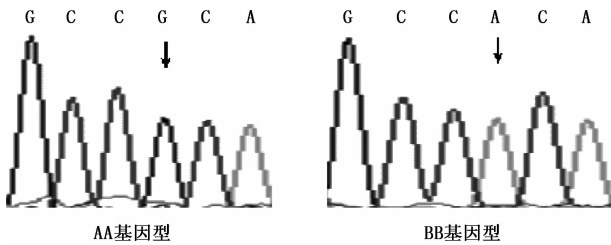


图3 IGFBP6 基因外显子 2 的测序峰图

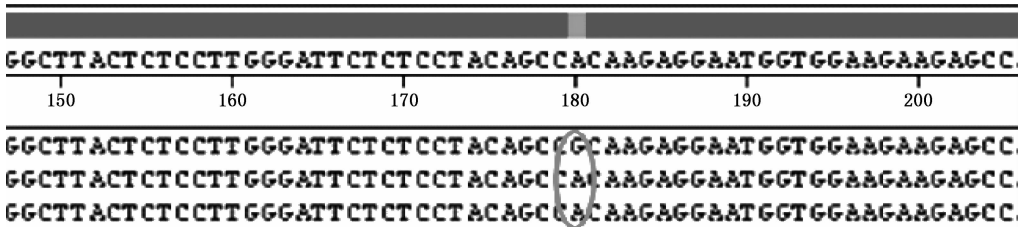


图4 MegAlign 软件对 IGFBP6 基因 3 种基因型的序列比对结果

**2.4 基因型频率与基因频率** 草原红牛群体中 IGFBP6 基因基因型频率与基因频率见表 1。由表 1 可知,IGFBP6 基因的外显子 2 中 AA、AB、BB 基因型频率分别为 0.765、0.196、0.039,AA 基因型为优势基因型;A 等位基因频率为 0.729,B 等位基因频率为 0.271,A 为优势等位基因。以上结果说明,等位基因 A 在群体中占有明显优势。对结果进行  $\chi^2$  适合性检验,发现该群体不处于 Hardy-Weinberg 平衡状态( $P<0.05$ )。

**2.5 基因型与屠宰肉质性状的关联性分析** 由表 2 可知,AA 基因型个体宰前活重、肋脂重大于 AB 和 BB 基因型,胴体重、肾脂重、骨重、净肉重、眼肌面积小于 AB 和 BB 基因型。经 SPSS 软件最小二乘法分析结果表明,AB 和 BB 基因型个体骨重、眼肌面积显著高于 AA 基因型个体( $P<0.05$ );AB 和 BB 基因型个体净肉重极显著高于 AA 基因型个体( $P<0.01$ );3 种基因型个体间宰前活重、胴体重、肾脂重和肋脂重差异均不显著( $P>0.05$ )。

表 1 *IGFBP6* 基因的外显子 2 基因型频率与基因频率

| 基因            | 检出数(个) | 基因型频率     |           |          | 基因频率  |       |
|---------------|--------|-----------|-----------|----------|-------|-------|
|               |        | AA        | AB        | BB       | A     | B     |
| <i>IGFBP6</i> | 51     | 0.765(39) | 0.196(10) | 0.039(2) | 0.729 | 0.271 |

表 2 *IGFBP6* 基因的外显子 2 不同基因型对草原红牛屠宰肉质性状的影响

| 基因型               | 宰前活重(kg)      | 胴体重(kg)       | 肾脂重(kg)      | 骨重(kg)                    | 净肉重(kg)                    | 肋脂重(kg)     | 眼肌面积(cm <sup>2</sup> )     |
|-------------------|---------------|---------------|--------------|---------------------------|----------------------------|-------------|----------------------------|
| AA( <i>n</i> =39) | 538.563±6.806 | 313.776±5.722 | 9.587±0.420  | 58.175±1.659 <sup>a</sup> | 255.601±4.951 <sup>A</sup> | 0.970±0.043 | 130.226±4.907 <sup>a</sup> |
| AB( <i>n</i> =10) | 535.898±9.250 | 320.910±8.287 | 10.056±0.842 | 58.229±3.172 <sup>b</sup> | 262.411±8.687 <sup>B</sup> | 0.944±0.069 | 136.061±8.578 <sup>b</sup> |
| BB( <i>n</i> =2)  | 536.510±4.530 | 318.650±7.254 | 9.986±0.643  | 58.221±2.980 <sup>b</sup> | 261.853±2.786 <sup>B</sup> | 0.951±0.056 | 135.893±2.271 <sup>b</sup> |

注:同列数据肩标不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ );肩标不同大写字母表示差异显著( $P<0.01$ );肩标相同字母或无字母标注表示差异不显著( $P>0.05$ )。

3 讨论

胰岛素样生长因子(IGF)包括 IGF-I 和 IGF-II,是一类重要的细胞调控因子,具有促进成肌细胞生长和分化作用,IGF 的主要作用方式为信号体系,包括主要的配体 IGFs 及其与 IGF 具有高亲和力的胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBPs)(房希碧等,2013)。IGFBP6 因与 IGF-II 具有较高的亲和力而备受关注。IGFBP6 通过 2 条途径发挥作用,即 IGF 依赖性途径和 IGF 非依赖性途径。研究结果表明,IGF-II 对肌肉生长等方面具有重要的调控作用,是影响猪瘦肉量的主要候选基因(Knoll 等,2000;Kolaikov 等,2003)。在 IGF 作用途经中,IGFBP6 通过与 IGF-II 结合对动物肌肉生长发育具有重要影响。Bach 等(1994)研究报道,重组的人 IGFBP6 能够抑制 IGF-II 诱导 COS-7 细胞增殖。进一步研究 *IGFBP6* 基因对肌肉生长作用,Bienvenu 等(2004)研究表明,高表达 IGFBP6 转基因小鼠体重减轻。以上结果表示,*IGFBP6* 基因对于肌肉的生长和发育及肉质性状的形成具有重要调控作用(郭玉姣等,2008)。本研究采用 PCR-SSCP 方法,从候选基因 *IGFBP6* 外显子中检测到与牛肉质高度相关的多态性位点,结果显示,在草原红牛 *IGFBP6* 基因外显子 2 上检测到 1 个多态性位点 A180G,该位点对草原红牛的骨重、眼肌面积和净肉重有显著的生物学意义,此结果与孙维斌等(2003)和党瑞华等(2005)对 IGFBP3 多态性与肉质性状的研究结果相一致。利用 SPSS 软件统计分析结果表明,*IGFBP6* 基因外显子 2 的 3 种基因型在净肉重方面有极显著差异( $P<0.01$ ),眼肌面积和骨重有显著差异( $P<0.05$ );此结果与胡沈荣等(2007)对 IGFBP3 与鲁西牛屠宰性状相关性的报道一致。而在宰前活重、胴体重、肾脂重和肋脂重方面 3 种基因

型个体之间无显著差异( $P>0.05$ ),与刘桂兰等(2003)报道的 *IGFBP6* 基因多态性与屠宰肉用性状具有一定的关联性不一致。由此可见,本研究可为今后草原红牛的育种保种工作提供理论依据,并为草原红牛肉用性状的改善提供理论上的指导。

随着牛肉品质在肉牛改良选育过程中受重视程度的提高,利木赞牛杂交改良草原红牛的肉质水平同样也成为草原红牛育种工作者关注的主要指标。随着研究工作的不断深入,草原红牛及其利木赞杂交改良肉用新品系必将形成完整稳定的肉用性能,真正成为适合中国北方气候条件的高产优秀肉牛品种。

参 考 文 献

1 刘桂兰,蒋思文,熊远著,等. *IGF2* 基因 PCR-RFLP 多态性与脂肪沉积相关性状关联分析[J]. 遗传学报,2003, 30(12): 1107~1112.

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 张金玉,秦立红,张国梁,等. 草原红牛胰岛素样生长因子 I 受体基因 3'UTR 序列多态性分析[J]. 中国畜牧兽医,2010, 37(7): 103~105.

4 李向阳,张嘉保. 草原红牛肉用性状微卫星标记研究[J]. 中国牛业科学,2006,32(1):9~13.

5 国家畜禽遗传资源委员会. 中国畜禽遗传资源志——猪志[M]. 北京:中国农业出版社,2011.

6 房希碧,贾泓瑶,张昕,等. 西藏小型猪与军牧一号白猪 *IGFBP-6* 基因表达差异分析[J]. 吉林农业大学学报,2013, 35(6): 727~731.

7 金海国,俞美子. 草原红牛主要经济性状的遗传参数估计[J]. 河北农业大学学报,2002, 25(3):74~77.

8 俞美子. 草原红牛部分数量性状的遗传参数及育种值的估计[J]. 延吉:延边大学,2001.

9 胡沈荣,于姣,蓝贤勇,等. 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[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,5(11):1~5.

10 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,2005,21(3):19~22.

11 郭玉姣,唐国庆,李学伟,等. 猪脂肪组织中 *IGF2* 和 *IGFBP3* 基因表达的发育性变化及其品种差异[J]. 遗传,2008,30(5):602~606.

12 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京:科学出版社,1996.

13 Bach L A,Hsieh S, Brown A L, et al. Recombinant human insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-6 inhibits IGF-II -induced differentiation of L6A1 myoblasts[J]. Endocrinology, 1994,135(5):2168~2176.

14 Bienvenu G, Seurin D, Grellier P, et al. Insulin-like growth factor binding protein-6 transgenic mice:Postnatal growth, brain development, and reproduction abnormalities[J]. Endocrinology, 2004, 145(5):2412~2420.

15 Knoll A, Putnová L, Dvůrák J, et al. A NciI PCR-RFLP within intron 2 of the porcine insulin-like growth factor 2 (IGF2) gene[J]. Animal Genetics, 2000, 31(2):150~151.

16 Kolaikov O, Putnov L, Urban T, et al. Association of the *IGF2* gene with growth and meat efficiency in Large White pigs[J]. J Appl Genet, 2003, 4(44):509~513.

17 Lee H Y, Chun K H, Liu B, et al. Insulin-like growth factor binding protein-3 inhibits the growth of non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res, 2002, 62(12):3530~3537.

18 Moschos S J, Mantzoros C S. The role of the IGF system in cancer, from basic to clinical studies and clinical applications[J]. Oncology, 2002, 63(4):317~332.

19 Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia[J]. Nature Reviews Cancer, 2008, 8(12):915~928.

# Genetic Polymorphisms of Exon 2 of *IGFBP6* Gene and its Genetic Effects in Red Cattle

YANG Chun, LIU Zhen, LI Chun-yi

(State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economic Animals, Institute of Special Animal and Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China)

**Abstract:**This experiment was conducted to study the slaughter of the relationship between meat traits and genotypes. This study selected Red cattles as the experimental group, using PCR-SSCP method of detection of bovine *IGFBP6* gene exon 2 polymorphism analysis with the slaughter of the relationship between meat traits by the GLM model of the SPSS 13.0 statistical software to analysis. The results showed that *IGFBP6* gene had a polymorphic site A180G in exon2, at the same time had three genotypes of AA, AB and BB. Between the three genotypes,AB and BB genotypes were very significant higher than AA genotypes in net meat weight ( $P<0.01$ ),and were significant higher than AA genotypes in eye muscle area and bone weigh ( $P<0.05$ ), while in the ante-mortem live weight, carcass weight, kidney fat weight and rib fat weight in the three genotypes were no significant differences ( $P>0.05$ ). These results indicated that the slaughter of meat was associated with certain traits, accessibility for the future protection of breeding species of Red cattle to provide a theoretical basis, and Red cattle of beef with traits improve the delivery methods and theoretical on the guidance.

**Key words:**Red cattle;*IGFBP6* gene;genetic polymorphism;genetic effects

(责任编辑 晋大鹏)