

DOI: 10.1360/yc-007-0206

## IGF1 调控区微卫星座位对金华猪生长性能的影响

赵晓枫<sup>1</sup>, 徐宁迎<sup>1</sup>, 胡晓湘<sup>2</sup>, 李宁<sup>2</sup>

1. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310029;
2. 中国农业大学农业与生物技术国家重点实验室, 北京 100094

**摘要:** 类胰岛素生长因子 *IGF1* 及其相关结合蛋白和跨膜受体 *IGFR* 在哺乳动物的生长过程中扮演着重要角色。本文基于最小二乘法分析了 *IGF1* 5' 调控序列微卫星座位对金华猪初生重, 断奶重, 120 日龄重, 180 日龄重和出生窝重等生长性状的影响。结果表明: 286/286 基因型对金华猪初生重有显著影响 ( $P < 0.05$ ); 280/286 基因型对金华猪开产后出生窝重影响显著 ( $P < 0.05$ ), 进一步通过等位基因平均替代效应分析发现 274 bp 和 286 bp 等位基因有利于提高初生重, 280 bp 等位基因有利于第二胎出生窝重的提高。同时通过相关性分析发现金华猪开产母猪出生窝重、总产仔数和产活仔数间的相关性极显著 ( $P < 0.01$ ), 因此出生窝重的增加有利于提高金华猪的产仔性能。

**关键词:** 金华猪; 微卫星; *IGF1*; 生长性状

## Effects of microsatellite in the regulatory region of *IGF1* on growth traits in Jinhua swine

ZHAO Xiao-Feng<sup>1</sup>, XU Ning-Ying<sup>1</sup>, HU Xiao-Xiang<sup>2</sup>, LI Ning<sup>2</sup>

1. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;
2. State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agriculture University, Beijing 100094, China

**Abstract:** Insulin-like growth factor 1 (*IGF1*) and its associated binding proteins and transmembrane receptors (*IGFR*) play an important role in the physiologic process of mammalian growth. The objectives of present work were to estimate the effects of microsatellite markers located in the 5'-regulatory region of the *IGF1* on birth weight (BW), weaning weight (WW), weight at the 120th day, the 180th day and litter weight at birth (LWB) by the least square method in Jinhua pig. Significant effect was found for *IGF1* genotype on BW ( $P < 0.05$ ), with positive effects associated with the 286/286 genotype, and 280/286 genotype on LWB in second parity ( $P < 0.05$ ). Furthermore, according to analysis of allele average substitution effect, alleles 274 bp and 286 bp was favourable for BW increase, allele 280 bp was favourable for LWB increase in the second parity. By correlation analysis, total number of birth, number of birth alive and LWB of the second parity in jin hua pig had highly significant correlation ( $P < 0.01$ ), therefore increasing LWB of the second parity could improve litter performance of Jinhua pig.

**Keywords:** Jinhua pig; microsatellite; *IGF1*; growth trait

类胰岛素生长因子 1 (*IGF1*) 是类胰岛素生长因子 (*IGF*) 家族中的一员<sup>[1,2]</sup>, 猪胰岛素样生长因子 1 是

由 70 个氨基酸组成的单链碱性多肽, 分子量为 7,649 kDa<sup>[3]</sup>, 该基因由 6 个外显子和 5 个内含子组成, 全长

收稿日期: 2006-06-02; 修回日期: 2006-07-31

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30371024)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30371024)]

作者简介: 赵晓枫(1980—), 男, 博士研究生, 专业方向: 动物遗传育种。E-mail: zxf79@sina.com

通讯作者: 徐宁迎(1956—), 男, 教授 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种。Tel: 0571-86971199; E-mail: nyxu@zju.edu.cn

80 kb<sup>[4]</sup>。其生物学功能主要是介导生长激素的促生长作用<sup>[5]</sup>。*IGF*绝大部分由肝脏合成,主要存在于血液中,其他组织,如乳腺、卵巢、子宫、胎盘等也能合成*IGF*。国内外遗传育种专家已把*IGF1*作为影响猪生长速度的候选基因,研究其对猪肌肉生长的影响作用,为猪的选育改良提供新思路。

在*IGF1*座位上,短串连重复序列(CA)<sub>n</sub>微卫星被定位于*IGF1*基因的5'调控区<sup>[6]</sup>,该分子标记已经被广泛应用于数量性状位点(QTL)相关研究。本研究采用GENESCAN及GENOTYPER技术,基于最小二乘法分析了*IGF1*的微卫星多态对金华猪生长性能的影响,并通过等位基因平均替代效应分析进一步剖析等位基因对金华猪生长性能的效应。

## 1 材料和方法

### 1.1 样本基因组DNA提取和性状测定

实验动物血样来自浙江省金华市金华猪的3个亚群体:金华猪系血样(168头)采自浙江省金华种猪场,金华猪系血样(40头)采自浙江省金华职业技术学院牧场,金华猪系血样(56头)采自浙江省东阳良种场。猪前腔静脉采血5 mL, EDTA抗凝冻藏。用传统酚/氯仿抽提法提取基因组DNA,产物纯度约在80%~97%左右,TE溶解后稀释到终浓度40 ng/ $\mu$ L。相关性状测定记录由各场技术人员完成。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 PCR扩增

PCR扩增反应体系为15  $\mu$ L,反应体系组成为40 ng基因组DNA,1 $\times$ PCR buffer,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,0.2 pmol/L dNTP和5 U *Taq*酶,正反向引物各0.2  $\mu$ mol/L(该微卫星荧光引物由美国猪基因组计划提供),其中正向5'端标有6-FAM亚磷酸酰胺。PCR反应条件为:94 预变性5 min,然后进行程序为:94 变性40 s,55 复性40 s,72 延伸40 s,30个循环,最后是72 延伸7 min,4 保存;利用2%浓度琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 1.2.2 微卫星PCR扩增产物的检测分析

用灭菌去离子水将PCR扩增产物稀释20~30倍,取少量的稀释产物,加入等量的上样缓冲液,上样前94 变性5 min,取出后立即插置于冰上。变性的PCR产物用4.5%的聚丙烯酰胺凝胶在ABI377序列分析仪GS-Run-36C-2400-module下电泳3 h,收集胶图像。应用Genescan<sup>TM</sup>3.0软件进行收集数据、泳

道线校正、分子量内标校正和迁移片断大小测量,后用Genotyper<sup>TM</sup>2.0软件进行基因分型。

#### 1.2.3 统计处理

群体内群体间等位基因频率和基因型频率计算方法采用Weir(1996)提出的方法<sup>[7]</sup>,基因及基因型在遗传群体间比较采用卡方检验。利用SAS9.0软件GLM模型采用最小二乘法估计基因型对生长和繁殖性状的效应。基因频率低于0.01的等位基因排除于统计分析。统计模型采用 $Y_i = \mu + \alpha_i + e_i$ 其中 $Y_i$ 为性状测定值, $\mu$ 为总体平均数, $\alpha_i$ 为基因型效应值, $e_i$ 为随机误差。

由于微卫星是共显性的,为了进一步剖分研究等位基因的效应,我们对*IGF1*平均等位基因的替代效应利用软件SAS9.0采用回归分析法进行统计分析,等位基因280 bp作为被替代等位基因。统计模型采用 $Y_{ij} = \mu + g_1m_{ij} + g_2n_{ij} + e_{ij}$ 其中 $Y_{ij}$ 为性状测定值, $\mu$ 为群体平均数, $m_{ij}$ , $n_{ij}$ 为*IGF1*基因型中每个等位基因所占比例的值, $g_1$ , $g_2$ 为相应的偏回归系数, $e_i$ 为随机误差。并对金华猪开产母猪出生窝重、总产仔数和产活仔数间的相关性进行了统计分析。

## 2 结果

### 2.1 基因频率和基因型频率

在金华猪上*IGF1*微卫星的7种等位基因(252, 256, 264, 274, 280, 282和286 bp)被检测出。排除低频率( $P < 0.01$ )的等位基因,金华猪在全群中280/280与280/286基因型频率较高(表1),分别达到0.3902, 0.4470;在各亚群中,金华猪系:280/280与286/286基因型频率为0.3550, 0.4497;金华猪系:280/280与286/286基因型频率达到0.4, 0.5;金华猪系:280/280与280/286基因型频率达到0.4909, 0.4;在全群和各亚群中274/274, 274/280和274/286基因型个体数极少:在全群中分别占0.0189, 0.0265, 0.0114;且亚群中只在金华猪系中检测出,其余亚群均未发现。从等位基因频率来看,金华猪全群及各亚群中等位基因280和286频率都较高(表2),且等位基因280频率显著高于等位基因286及274频率( $P < 0.05$ )。

### 2.2 微卫星*IGF1*多态对金华猪生长性状的影响

采用一般线性模型分析微卫星*IGF1*不同基因型对金华猪初生重、断奶重、120日龄重和180日

表 1 微卫星 *IGF1* 基因型频率在各系及全群分布情况Table 1 Genotype frequencies of SSR *IGF1* obtained for the three lines and for the whole populations

标记 Marker	基因型 Genotype	遗传群体 Group			
		Line1	Line2	Line3	Whole
<i>IGF1</i> microsatellite	274/274	0.0296	0	0	0.0189
	274/280	0.0414	0	0	0.0265
	274/286	0.0176	0	0	0.0114
	280/280	0.3550	0.4	0.4909	0.3902
	280/286	0.4497	0.1	0.4	0.4470
	286/286	0.1065	0.5	0.0727	0.0985

表 2 微卫星 *IGF1* 基因频率各系及全群分布情况Table 2 Allele frequencies of SSR *IGF1* obtained for the three lines and for the whole populations

标记 Marker	等位基因 Allele	遗传群体 Group			
		Line1	Line2	Line3	Whole
<i>IGF1</i> microsatellite	274	0.059 <sup>a</sup>	0.000 <sup>b</sup>	0.000 <sup>b</sup>	0.038 <sup>a</sup>
	280	0.601 <sup>Aa</sup>	0.650 <sup>Aa</sup>	0.691 <sup>Aa</sup>	0.627 <sup>Aa</sup>
	286	0.340 <sup>Ba</sup>	0.350 <sup>Ba</sup>	0.273 <sup>Ba</sup>	0.328 <sup>Ba</sup>

注: a 与 b 之间表示群内差异显著; A 与 B 之间表示群间差异显著。

Note: A, B: Significantly different allele frequencies within line; a, b: Significantly different allele frequencies between lines.

龄重的效应。结果表明(表 3), 基因型除了 280/280, 其他基因型对金华猪初生重有显著提高的效应 ( $P < 0.05$ ), 对断奶重、120 日龄重和 180 日龄重则无显著的影响。

### 2.3 微卫星 *IGF1* 多态对金华猪出生窝重的影响

采用一般线性模型分析微卫星 *IGF1* 不同基因型对金华猪初产、2 胎、经产和所有胎次的出生窝重效应。结果表明(表 4), 基因型 280/286、286/286 对金华猪 2 胎的出生窝重有显著提高的作用 ( $P < 0.05$ ), 对其他胎次则无显著的影响。

### 2.4 微卫星 *IGF1* 等位基因平均替代效应

由上面结果知 *IGF1* 对初生重及第二胎出生窝重影响显著, 我们对这两个性状进行了 *IGF1* 等位基因平均替代效应的剖分。结果表明: 对于初生重, 274 bp 和 286 bp 两等位基因的平均替代效应达到极显著 ( $P < 0.01$ ), 且都是正效应(图 1)。对于第二胎出生窝重, 274 bp 和 286 bp 两等位基因的平均替代效应达到显著 ( $P < 0.05$ ), 且都是负效应(图 2)。因此, 274 bp 和 286 bp 等位基因对初生重, 280 bp 等位基因对第二胎出生窝重这两种性状分别是有利的。

表 3 微卫星 *IGF1* 基因型对金华猪生长性状的效应Table 3 The effect of SSR *IGF1* Genotype on Jinhua swine growth trait

<i>IGF1</i> SSR	初生重 Birth weight			断奶重 Weaning weight			120 日龄重 120 DW			180 日龄重 180 DW		
	平均数 Mean	标准误 SD	个数 N	平均数 Mean	标准误 SD	个数 N	平均数 Mean	标准误 SD	个数 N	平均数 Mean	标准误 SD	个数 N
	274/274	1.0000 <sup>a</sup>	0.0500	3	0	0	0	30.8333	2.9297	3	0	0
274/280	0.8875 <sup>a</sup>	0.2428	4	13.5000	0	2	28.8750	3.8379	4	49.7500	4.5962	2
280/280	0.6269	0.1481	13	12.0417	1.2695	12	28.6538	1.8187	13	44.5833	3.3360	12
280/286	0.8620 <sup>a</sup>	0.2468	25	12.8409	1.9110	22	31.3125	3.4320	24	46.7273	4.2081	22
286/286	0.9178 <sup>a</sup>	0.3185	9	13.8125	2.3290	8	31.6667	2.8831	9	48.0000	5.6844	9
Total	0.8243	0.2550	54	12.8295	1.8582	44	30.5094	3.1676	53	46.5444	4.4221	45

注: a 之间表示平均数差异不显著。

Note: a: Significantly different allele frequencies between the means.

表 4 微卫星 *IGF1* 基因型对金华猪生长性状的效应

Table 4 The effect of SSR *IGF1* genotype on Jinhua swine litter weight at birth

<i>IGF1</i> SSR	初产 First parity			2 胎 Second parity			经胎 Late parity			所有胎次 All parity		
	平均数 Mean	标准误 SD	个数 N	平均数 Mean	标准误 SD	个数 N	平均数 Mean	标准误 SD	个数 N	平均数 Mean	标准误 SD	个数 N
275/275	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
275/280	7.78	4.18	3	7.34 <sup>b</sup>	5.22	4	9.125	5.76	2	7.88	4.39	9
280/280	6.06	2.84	17	6.21 <sup>b</sup>	2.67	15	9.59	2.90	23	7.58	3.26	55
280/286	10.74	12.18	24	8.75 <sup>a</sup>	1.83	22	12.94	17.59	56	11.52	14.35	102
286/286	6.49	3.46	5	8.99 <sup>a</sup>	3.16	4	9.28	3.31	14	8.62	3.37	23
Total	8.50	8.97	49	7.80	2.80	45	11.51	13.71	95	9.85	10.92	189

a b: 平均数差异显著。

a b: Significantly different allele frequencies between the means.

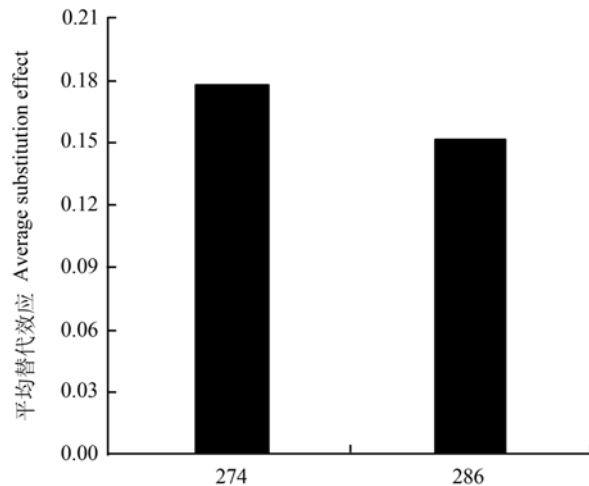


图 1 对初生重微卫星 *IGF1* 等位基因平均替代效应  
Fig. 1 Average substitution effect of *IGF1* alleles for BW

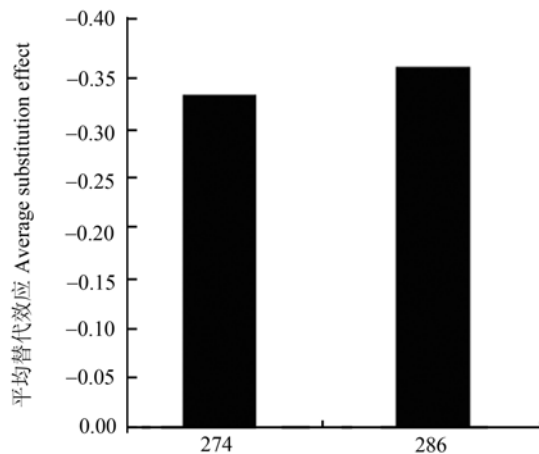


图 2 对第二胎出生窝重微卫星 *IGF1* 等位基因平均替代效应  
Fig. 2 Average substitution effects of *IGF1* alleles for LWB of second parity

### 2.5 开产母猪出生窝重、总产仔数和产活仔数间的相关性分析

相关分析表明开产母猪所产仔猪出生窝重与总产仔数显著正相关 ( $P < 0.01$ ) (表 5), 相关系数达到 0.951; 开产母猪所产仔猪出生窝重与产活仔数显著正相关 ( $P < 0.01$ ) 相关系数达到 0.875。

表 5 开产母猪出生窝重、总产仔数和产活仔数间的相关系数

Table 5 The correlation coefficient between the traits litter weight birth (LWB), total number birth (TNB) and number birth alive (NBA) following parity of sows

Trait	LWB	TNB	NBA
LWB	1	0.951**	0.875**
TNB		1	0.823**
NBA			1

\*\*：相关系数达到极显著 ( $P < 0.01$ )。

\*\*：Correlation coefficient had highly significance ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

由于所用的引物不同, 本文中的 *IGF1* 微卫星等位基因大小与一些文献对该位点研究所得到的片段大小不同<sup>[8]</sup>。本文中 286 bp 等位基因相当于一些文献资料中的 201 bp 等位基因。具此换算发现金华猪 *IGF1* 微卫星的 274 和 280 等位基因在梅山猪、欧洲野猪和皮特兰猪上尚未见到报道。并且, 金华猪 *IGF1* 微卫星所表现出的低重复数和一些研究如 Behl 等<sup>[9]</sup>报道的该位点使用相同引物扩增结果存在差异, 这主要是由微卫星在滑动复制进化过程中所产生的<sup>[10]</sup>。

由本文结果可知 *IGF1* 微卫星对金华猪各性状

有不同的效应, 对其初生重有显著影响而在生长后期影响不显著, 对金华猪第二胎的出生窝重有显著影响, 而对其初产和经产出生窝重都无显著影响, 这和Andréa Pozzi Pereira [11]在肉牛中研究结果很相似, 他发现IGF1 微卫星对肉牛初生重有显著影响, 但是对肉牛后期生长过程确无显著影响。究其原因动物机体中不同时期IGF1 水平差异造成的, Buonomo [12]发现初生小猪血清中IGF1 水平显著高于其他时期, Carroll [13]也报道了当仔猪出生时, 血清中IGF1 水平达到最高。有趣的是, 本研究IGF1 微卫星不仅影响同一世代的初生重, 并且对该世代后代的出生窝重也有显著影响, 这更加说明了血液中的IGF1 水平差异的重要作用。但李加琪等[14]研究发现IGF1 基因的遗传效应分析说明该基因对断奶后日增重有显著的遗传影响, 这与本文研究结果存在差异, 就其原因可能是两方面的, 一是本文研究的是IGF1 调控区微卫星多态, 其效应与该基因的PCR-RFLP多态有所区别, 其次是所选用的研究猪种不同, 正如周杰等[15]报道的IGF1 基因表达存在着品种间差异。另外, 根据相关性分析(表 5), 发现金华猪开产母猪出生窝重、总产仔数和产活仔数间的相关性极显著( $P < 0.01$ ), 出生窝重的提高可以间接的提高开产母猪产仔性能。因此在金华猪的后期选育中, 我们可以有目的对影响金华猪出生窝重的等位基因进行选择以提高其产仔性能。

微卫星标记近几年发展非常迅速, 其可变的遗传基础非常容易识别, 因而在群体生物学研究中逐渐代替 RFLP、RAPDS 等遗传标记而成为一种非常有效的遗传标记。并且基于多重 PCR 技术应用的大规模基因组扫描工作 GENESCAN, 使得微卫星基因型判别具有高通量高精度高效率的特性。因此, 基于以上技术, 这种候选基因调控区的微卫星标记也可以作为一种后期进行标记辅助选育的一种高效实用的遗传标记。

#### 参考文献(References):

- [1] Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor 1 and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem*, 1978, 253(8): 2679—2776.
- [2] Milner SJ, Carver JA, Ballard FJ, Francis GL. Probing the disulfide folding pathway of insulin-like growth factor-1. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 62(6): 693—711.
- [3] Svoboda ME. Purification of somatomedin-C from human plasma: chemical and biological properties, partial sequence analysis, and relationship to other somatomedins. *Biochemistry*, 1980, 19: 790. [DOI]
- [4] Samaras SE, Canning SF, Barber JA. Regulation of insulin-like growth factor-1 biosynthesis in porcine granulosa cell. *Endocrinology*, 1996, 137(11): 4657—4664. [DOI]
- [5] Salmon WD, Daughaday WH. The importance of amino acids diayzable components of rat serum which promote sulfate uptake by cartilage from hypophysectomized rats *in vitro*. *J Lab Clin Med*, 1958, 51: 167—173.
- [6] Kirkpatrick BW. Identification of a conserved microsatellite site in the porcine and bovine insulin-like growth factor-I gene 5'flank. *Anim Genet*, 1992, 23: 543—548.
- [7] Weir BS. Genetic data analysis: Methods for discrete population genetic data. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, 1996.
- [8] Lee SS, Chen Y, Moran C. Linkage and QTL mapping for Sus scrofa chromosome 5. *J Anim Breed Genet*, 2003, 120: 38—44. [DOI]
- [9] Behl R, Sheoran N, Behl J, Vijn RK. Genetic analysis of Ankamali pigs of India using microsatellite markers and their comparison with other domesticated Indian pig types. *J Anim Breed Genet*, 2006, 123: 131—135. [DOI]
- [10] Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews*, 2004, 5: 435—445. [DOI]
- [11] Pereira AP. Association of GH and IGF-1 polymorphisms with growth traits in a synthetic beef cattle breed. *Genet Mol Biol*, 2005, 28: 230—236. [DOI]
- [12] Buonomo FC, Klindt J. Ontogeny of growth hormone, insulin like growth factors (IGF-1 and IGF-2), and IGF binding protein-2 in genetically lean and obese swine. *Domest Anim Endocrinol*, 1993, 10(3): 257—2651. [DOI]
- [13] Carroll JA, Daniel JA, Keisler DH, Matteri RL. Postnatal function of the somatotrophic axis in pigs born naturally or by caesarian section. *Domest Anim Endocrinol*, 2000, 19: 39—52. [DOI]
- [14] LI Jia-Qi, CHEN Zan-Mou, LIU De-Wu, LIU Xiao-Hong, SUN Bao-Li, LING Fei, ZHANG Hao, CHEN Yao-Sheng. Genetic effects of IGF-1 gene on the performance in Landrace × Lantang pig resource population. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(9): 835—839.  
李加琪, 陈赞谋, 刘德武, 刘小红, 孙宝丽, 凌飞, 张豪, 陈瑶生. IGF-1 基因对长白×蓝塘猪资源群生产性能的遗传效应分析. *遗传学报*, 2003, 30 (9): 835—839.
- [15] ZHOU Jie, ZHAO Ru-Qian, WEI Xi-Hui, XIA Dong, XU Qing-Fu, CHEN Jie. The developmental patterns of GH-R, IGF-1 and IGF-IR gene expression in adipose tissue of Erhualian and Large Wllite pigs. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30 (7): 657—666.  
周杰, 赵茹茜, 韦习会, 夏东, 胥清富, 陈杰. 二花脸和大白猪的脂肪组织中 GH-R, IGF-1 和 IGF-IR 基因表达的发育性变化. *遗传学报*, 2003, 30 (7): 657—662.