

西藏小型猪 IGF-1 基因的克隆测序分析

王玉珏, 田雨光, 顾为望*, 岳敏*

(南方医科大学实验动物中心, 广州 510515)

【摘要】 目的 克隆西藏小型猪的肝脏组织中的 IGF-1 基因的 cDNA 序列, 并与 Pubmed 中查询到的猪 cDNA 进行比对分析。**方法** 提取了西藏小型猪肝脏组织的总 RNA, 应用 RT-PCR 技术扩增了 IGF-1 基因的 cDNA 序列, 将扩增出的片段克隆到 pMD18-T 载体上, 构建重组质粒 pMD18-T-IGF-1, 进行测序分析。**结果** 克隆出西藏小型猪肝脏组织中的 IGF-1 的 cDNA 序列, 获得了大小为 567 bp 长的片段, 编码了 186 个氨基酸, 与 Pubmed 中查询到的猪 (NM_214256.1) 的 IGF-1 基因高度同源, 比对序列发现, 在 440、455 bp 处发生了 G→A、C→T 的突变, 该位点的突变引起相应编码氨基酸的变化, 分别由组氨酸变成了精氨酸、亮氨酸转变成了丝氨酸。**结论** 为西藏小型猪的生长发育机制研究提供了分子学依据。两个位点的突变引起的氨基酸的改变是否是导致西藏小型猪矮小的原因, 需要进一步论证。

【关键词】 西藏小型猪; IGF-1 基因; 克隆测序

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 01-0046-03

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.01.009

Analysis of the cloned IGF-1 gene cDNA sequence of Tibet minipig

WANG Yu-jue, TIAN Yu-guang, GU Wei-wang, YUE Min

(Laboratory Animal Center, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 Objective To compare and analyze the sequence between Tibet minipigs and Pubmed pig (NM_214256.1) IGF-1 cDNA by cloning and sequencing the IGF-1 gene cDNA of the liver tissue of Tibet minipigs. **Methods** Total RNA was extracted from Tibet minipig liver and amplified the sequence of IGF-1 gene by RT-PCR. The amplified fragment was cloned into pMD18-T vector, and the recombinant plasmid pMD18-T-IGF-1 was constructed and sequenced. **Results** Tibet minipig IGF-1 gene fragment containing the coding region of 567 bp. The coding region encoded 186 amino acids, and 99% were homologous compared with that of the pig (NM_214256.1). Compared with pig (NM_214256.1), we found that the mutation in the 440 bp, 455 pb, occurred at G→A, C→T mutation, and the corresponding amino acids were changed, histidine→arginine and leucine→serine, respectively. **Conclusions** The results of this study provide a molecular basis for breeding research. Whether the mutation at the two sites changes the protein function and body size or not need to be further studied.

【Key words】 Tibet minipig; IGF-1 gene; Cloning; Sequencing

胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 是调控动物机体生长、发育和代谢的一个

重要因子, IGF-1 主要介导生长激素发挥促生长作用^[1]。猪 IGF-1 基因被定位于第 5 号染色体的 q23

【基金项目】 国家自然科学基金 (81402625); 广东省自然科学基金 (S2013010014720); 中国博士后科学基金 (2014M550439); 国际科技合作专项 (2011DFA33290)。

【作者简介】 王玉珏 (1983 -), 女, 助理研究员, 医学博士, 研究方向: 比较医学和人类疾病动物模型 E-mail: yujue.wang@qq.com。

田雨光 (1987 -), 男, 博士研究生, 研究方向: 比较医学和人类疾病动物模型 E-mail: yuguang.tian@qq.com

王玉珏与田雨光为并列第一作者

【通讯作者】 岳敏 (1982 -), 女, 实验师, 医学博士, 研究方向: 比较医学和人类疾病动物模型 E-mail: 343779791@qq.com

顾为望 (1956 -), 男, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 比较医学和人类疾病动物模型 E-mail: 645294283@qq.com

岳敏与顾为望为并列通讯作者

~24 区域^[2],由 6 个外显子和 5 个内含子组成,全长 80 kb^[3]。研究表明 IGF-1 基因可作为影响猪生长性状的候选基因^[4-6]。

本研究中的西藏小型猪,来源于青藏高原、海拔 2500~4300 m 的农区和半农牧区,是唯一能够适应高海拔气候和以放牧为主的猪种,封闭的地理环境使西藏小型猪保存了非常纯正的品种资源。本课题组于 2004 年将西藏小型猪从西藏引进至广州,目前已完成风土驯化及实验动物化研究,并开展了相关动物模型、药物实验及转基因克隆等研究。从免疫学、遗传学研究发现,该品系具有独特的免疫相关指标和遗传特征,加上其独特的外形,是一种优良的实验用小型猪品种^[7]。西藏小型猪成年体重仅有 25~40 kg,是商业肉猪体重的 15%~20%。因此西藏小型猪具有体型较小的特点,本实验对西藏小型猪的生长相关性基因 IGF-1 基因进行了克隆和测序分析,为西藏小型猪的体型较小提供分子理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6 月龄西藏小型猪肝脏组织取自南方医科大学实验动物中心[SCXK(粤)2011-0015],麻醉后,活体取部分肝脏,放入去 RNA 酶的 1.5 mL EP 管中,做好标记后立即放入液氮中保存备用。

1.2 实验方法

提取了西藏小型猪肝脏组织的总 RNA,应用 RT-PCR 技术分别扩增 IGF-1 基因的全序列,将这些基因分别克隆到 pMD18-T 载体上,构建重组质粒 pMD18-T-IGF-1,进行测序分析。

1.2.1 引物设计

根据 GenBank 中猪 IGF-1 基因的序列(Gene Accession No.:NM_214256.1),运用引物设计软件 Primer 5.0 设计特异性引物,由宝生物工程(大连)有限公司合成。

引物如下所示:Up(P1):5'-TACAAGGTTA-AGATGCACATCACATCCTCT-3'。Down(P2):5'-CGGGAATGTTTACTTGTGTATTTTCATTGGG-3'。

1.2.2 IGF-1 基因的 PCR 扩增

以西藏小型猪肝脏组织的 cDNA 为模板,使用 Taq 酶、即用型高保真 PCR 试剂盒进行 PCR 扩增。

反应程序:94℃ 5 min,(94℃ 30 s,64℃~52℃ 30 s,72℃ 40 s)每个循环降一度退火温度,(94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 40 s)×16 循环,暂停 PCR 仪,加入 0.2 μL Taq 酶,72℃ 10 min 4℃。

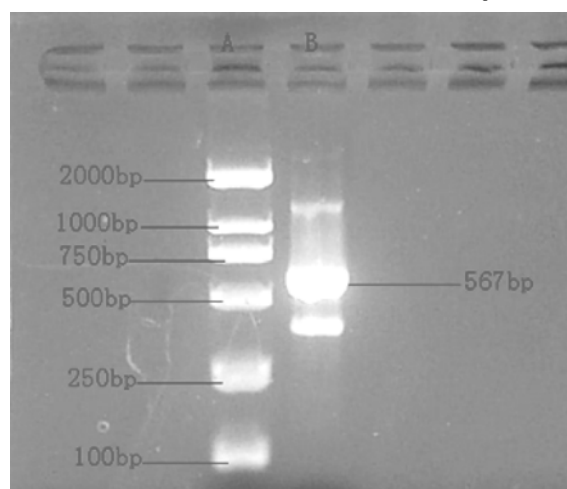
1.2.3 PCR 产物的克隆

纯化后采用北京天恩泽基因科技有限公司一站

式 AT 克隆试剂盒(CAT#90801A-20)进行克隆。

2 结果

2.1 IGF-1 基因 PCR 电泳结果 见图 1。



注:泳道 A:DL2000 DNA marker;泳道 B:IGF-1 基因的扩增产物。

图 1 IGF-1 基因 PCR 电泳结果

Note: Lane A: DL2000 DNA marker; Lane B: PCR amplification products of IGF-1 gene.

Fig. 1 The PCR amplification products of IGF-1 gene of the Tibet minipig

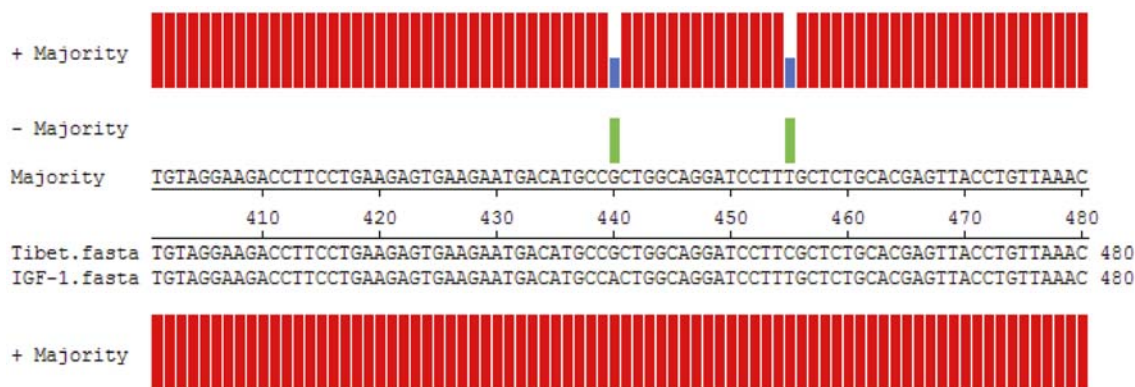
2.2 西藏小型猪 IGF-1 基因序列分析

所获得的西藏小型猪 IGF-1 基因的片段包含编码区 567 bp,该编码区编码了 186 个氨基酸,将该基因的编码区在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) GenBank 中进行同源性搜索,与猪(NM_214256.1)的 IGF-1 基因高度同源达 99%,与小鼠(AF440694.1)、绵羊(HQ285865.1)、马(EU018459.1)牛(BC126802.1)分别具有 89%、94%、94%、94%的同源性。

利用 Lasergene 生物信息软件将西藏小型猪 IGF-1 基因的编码区与 GenBank 中搜索到猪的 IGF-1 基因的 cDNA 序列进行比对分析(见图 2)发现,在 440 bp、455 pb 处发生了 G→A、C→T 的突变,该位点的突变引起相应编码氨基酸的变化,分别由组氨酸变成了精氨酸、亮氨酸转变成了丝氨酸(见图 3)。

3 讨论

胰岛素样生长因子-1 在各种细胞和组织中表达,是一种细胞生长、子宫内发育和出生后生长的必需因子。人和小鼠 IGF-1 的缺失则会引起宫内和出生后的生长延迟、围产期死亡和骨骼、肌肉及生殖系统的发育缺陷。GH 促进出生后生长有几种模式, GH 可以作用于肝脏,来刺激 IGF-1 的合成和分泌, IGF-1 可以进入靶组织发挥作用。GH 也可以通过

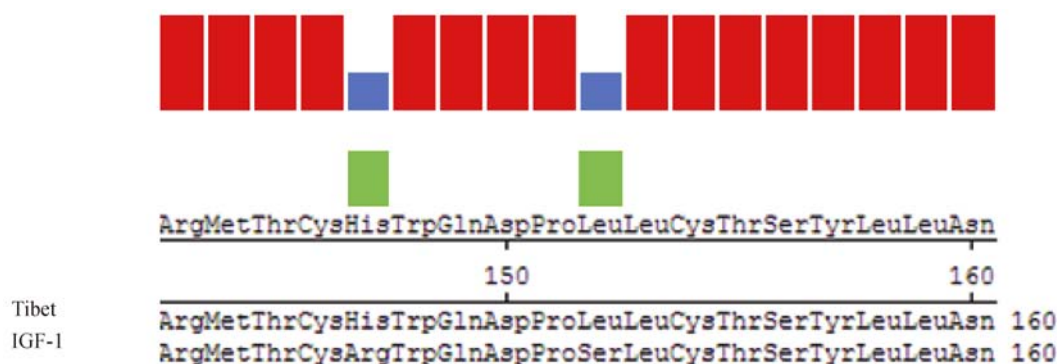


注: Tibet: 西藏小型猪; IGF-1: pubmed 查询猪。

图 2 不同品种猪 IGF-1 基因序列比对

Note. Tibet: Tibet minipig; IGF-1: Pubmed (NM_214256.1).

Fig. 2 Sequence alignment of IGF-1 gene in different pig breeds.



注: Tibet: 西藏小型猪; IGF-1: pubmed 查询猪。

图 3 不同品种猪 IGF-1 氨基酸的序列比对

Note. Tibet: Tibet mini-pig; IGF-1: Pubmed (NM_214256.1)

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of IGF-1 gene in different pig breeds.

局部生产 IGF-1 直接刺激骨骼的纵向生长。反之, IGF-1 也可以调节 GH 的作用^[8]。

将该基因的编码区与猪 (NM_214256.1) 的 IGF-1 基因进行比对分析, 发现高度同源达 99%, 与小鼠 (AF440694.1)、绵羊 (HQ285865.1)、马 (EU018459.1) 牛 (BC126802.1) 分别具有 89%、94%、94%、94% 的同源性。说明西藏小型猪与绵羊、马、牛亲缘关系较近, 与小鼠亲缘关系较远。

本研究中, 西藏小型猪 IGF-1 基因的编码区与 GenBank 中搜索到猪的 IGF-1 基因的 cDNA 序列进行比对分析, 发现了在 440 bp、455 pb 处发生了 G→A、C→T 的突变, 该位点的突变引起相应编码氨基酸的变化, 分别由组氨酸变成了精氨酸、亮氨酸转变成了丝氨酸。具体该位点的突变是否导致蛋白质功能的改变有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 王文君, 任军, 陈克飞, 等. 胰岛素样生长因子-1 基因多态性与猪部分生产性能的关系 [J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33 (4): 336-339.
- [2] Wintere AK, Fredholm M, Andersson L. Assignment of the gene

for porcine insulin-like growth factor 1 (IGF-1) to chromosome 5 by linkage mapping [J]. Animal Genetics, 1994, 25(1): 37-39.

- [3] Samaras SE, Canning SF, Barber JA, et al. Regulation of insulin-like growth factor-1 biosynthesis in porcine granulosa cells [J]. Endocrinology, 1996, 137(11): 4657-4664.
- [4] 李加琪, 陈赞谋, 刘德武, 等. IGF-1 基因对长白×蓝塘猪资源群生产性能的遗传效应分析 [J]. 遗传学报, 2003, 30 (9): 835-839.
- [5] 肖书奇, 张树敏, 张嘉保, 等. 松辽黑猪 IGF-1 基因的单核苷酸多态性 (SNP) 及其与生长和胴体性状的相关性 [J]. 中国兽医学报, 2008, 28(6): 724-728.
- [6] Suzuki K, Nakagawa M, Katoh K, et al. Genetic correlation between serum insulin-like growth factor-1 concentration and performance and meat quality traits in Duroc pigs [J]. J Animal Sci, 2004, 82(4): 994-999.
- [7] 岳敏, 范沛, 唐华, 等. 西藏小型猪与高原藏猪的血液生理生化值的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(5): 431-432.
- [8] 邢海权, 闫梦菲. 胰岛素样生长因子 IGF-1 的研究进展 [J]. 畜禽业, 2011, 26(8): 36-37.

[收稿日期] 2014-08-11