

基因组学与应用生物学  
*Genomics and Applied Biology*  
ISSN 1674-568X, CN 45-1369/Q

## 《基因组学与应用生物学》网络首发论文

题目：本土绵羊品种 GH 与 IGF-1 基因多态性研究  
作者：丁宁，刘思嘉，田菲，田得红，李雪，赵凯  
网络首发日期：2020-06-10  
引用格式：丁宁，刘思嘉，田菲，田得红，李雪，赵凯. 本土绵羊品种 GH 与 IGF-1 基因多态性研究. 基因组学与应用生物学.  
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20200610.1412.002.html>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

研究报告

Research Report

## 本土绵羊品种 *GH* 与 *IGF-1* 基因多态性研究

丁宁<sup>1,2,3</sup> 刘思嘉<sup>1</sup> 田菲<sup>1</sup> 田得红<sup>1</sup> 李雪<sup>1</sup> 赵凯<sup>1\*</sup>

1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810008; 2 中国科学院大学, 北京, 100049; 3 呼伦贝尔生态产业技术研究院, 海拉尔, 021000

\* 通信作者, zhaokai@nwipb.cas.cn

**摘要** 生长性状是绵羊育种中关注的重要性状。*GH* 和 *IGF-1* 基因已被证明是影响动物生长发育的重要候选基因。因此了解我国本土绵羊 *GH* 和 *IGF-1* 基因的遗传多样性, 将为提高本土绵羊的生产效率、制订遗传育种和品种改良措施奠定基础。本研究以本土绵羊品种呼伦贝尔羊、藏羊、湖羊、阿勒泰羊、小尾寒羊和滩羊为主要研究对象, 以澳白羊为参考, 通过 sanger 测序检测了 340 只绵羊 *GH* 和 *IGF-1* 外显子单核苷酸多态性。研究发现, *GH* 和 *IGF-1* 基因外显子区分别检测到 11 个和 3 个 SNPs, 呈品种特异性分布, 在群体中处于低度至中度多态。连锁不平衡分析发现, *GH* 基因的 SNP1、SNP3、SNP6、SNP7 和 SNP8 呈强连锁不平衡, 构建的 7 种单倍型中, CGACAG 是优势单倍型(52.6%), 而 *IGF-1* 基因的 3 个 SNPs 之间连锁关系很弱。生物信息学分析发现, 检测到的 14 个 SNPs 中 *GH* 的 SNP2、SNP4、SNP8 和 *IGF-1* 的 SNP1、SNP3 为新发现的多态位点, 其中 SNP4 和 SNP9 为错义突变, 可能会导致编码蛋白质二级结构与三级结构发生改变。研究结果表明, 与其他本土品种和澳白羊相比, 湖羊的 *GH* 和 *IGF-1* 基因具有较为丰富的遗传变异。由于已有研究证实 *GH* 的 SNP6 和 SNP9 以及 *IGF-1* 的 SNP2 不同基因型与绵羊的生长和胴体性状相关联, 且在本土品种中均有多态, 推测 *GH* 基因的 SNP6、SNP9 和 *IGF-1* 基因的 SNP2 可作为本土绵羊生长性状分子标记辅助选择的候选 SNPs。

**关键词** 生长激素, 胰岛素样生长因子, 基因多态性, 连锁不平衡, 绵羊

## Polymorphism of *GH* and *IGF-1* Genes in Native Sheep Breeds

Ding Ning<sup>1,2,3</sup> Liu Sijia<sup>1</sup> Tian Fei<sup>1</sup> Tian Dehong<sup>1</sup> Li Xue<sup>1</sup> Zhao Kai<sup>1\*</sup>

1 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810008; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049; 3

Hulun Buir Ecological Industry Academy of Technology, Hailar, 021000

\* Corresponding author, zhaokai@nwipb.cas.cn

DOI:

**Abstract** Growth traits are the important traits concerned in sheep breeding. *GH* and *IGF-1* genes are well-accepted candidate genes that affect animal growth and development. Understanding polymorphisms of *GH* and *IGF-1* genes lays the foundation to design the breeding strategy and to improve the productive efficiency for local sheep breeds. In the present study, 340 sheep breeds including 6 native breeds, Hulunbuir sheep, Tibetan

基金项目: 本研究由第二次青藏高原科学考察与研究项目(2019 QZKK0501)、国家重点研发资助计划(2016YFC0500700)、中国科学院 STS 重点项目(KFJ-STZ-ZDTP-004)和青海省动物生态基因组学重点实验室项目共同资助。

sheep, Hu sheep, Altay sheep, small tail Han sheep and Tan sheep, as well as Australian white sheep, which to be taken as reference were chosen to assess polymorphisms of exons in *GH* and *IGF-1* genes by using sanger sequencing. We identified 11 SNPs and 3 SNPs in exons of *GH* and *IGF-1* genes respectively. The identified SNPs had breed specificity and low to moderate polymorphic information content. The strong linkage disequilibrium was observed in SNP1, SNP3, SNP6, SNP7 and SNP8 of *GH* gene, which constructed 7 haplotypes and CGACAG was the dominant one(52.6%). In *IGF-1*, 3 SNPs showed weak linkage. Bioinformatics analysis found that, SNP2, SNP4 and SNP8 in *GH* as well as SNP1 and SNP3 in *IGF-1* were newly discovered mutation among the 14 SNPs. We found SNP4 and SNP9 of *GH* were missense mutations, which probably led to variations in secondary and tertiary structures of the encoded protein. Conclusively, *GH* and *IGF-1* genes of Hu sheep showed higher genetic polymorphism than that in other domestic breeds and Australian white sheep. According to the associations between different genotypes and growth traits as well as the polymorphisms of SNPs in previous studies, we inferred the potential application of SNP6 and SNP9 in *GH* gene and SNP2 in *IGF-1* gene as candidate SNPs for growth traits molecular marker-assisted selection in endemic sheep breeds.

**Key words** growth hormone, insulin-like growth factor, genetic polymorphism  
linkage disequilibrium, sheep

生长激素(Growth hormone, GH)调控多种生理功能, 如新陈代谢, 生长, 繁殖, 渗透调节和调节免疫系统(Bergan-Roller et al., 2017a)。GH 的促生长作用多数由胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor, IGF-1)介导, GH 刺激肝脏合成和分泌 IGF-1, IGF-1 又通过特异性 IGF 受体刺激多种靶组织和细胞的生长分化(Bergan-Roller et al., 2017b)。IGF-1 信号通路影响骨骼的合成代谢, 特别是 IGF-1 对动物机体的骨形成和重塑有重要作用(Tahimic et al., 2013)。已证实 GH 和 IGF-1 可提高肌肉萎缩相关疾病患者的肌肉质量(Fink and Nakazato, 2018)。骨骼肌是生长激素的靶组织, 生长激素通过提高肌肉质量来增强肌肉力量, 而不影响收缩力或纤维组成类型(Chikani and Ho, 2013; Venken et al., 2007)。GH 和 IGF-1 是决定体型大小的主要因素(Favier et al., 2001), 因此 GH 与 IGF-1 对动物的生长发育有重要作用, 并影响家畜的生产性能。研究证实, *GH* 不同基因型与长白猪脂肪厚度和平均日增重显著相关(Franco et al., 2005)。在鸡、牛以及其他动物中,*GH* 是作为鉴定基因多态性与其生长性状、胴体性状相关的候选基因之一(Stephen et al., 2001; Ishida et al., 2010; Liu et al., 2011)。基因多态性可由单个碱基突变, 即单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)引起。近年来, 利用分子标记(SNP)或筛选与生长性状相关的候选 SNP, 进行标记辅助选择, 加快育种进程, 已成为研究热点。而基因外显子发生突变可能会对其功能产生重要影响。研究发现, 水牛 *IGF-1* 基因外显子 1 和 4 上共检测到 2 个 SNPs, 不同基因型的统计分析表明, G64A 和 G280A 位点的 GG 基因型水牛个体在 3~6 月龄和 6~9 月龄的体重(BW)和平均日增重(ADG)均显著高于其他基因型 ( $P<0.05$ )(Mohammed et al., 2017; El-Maghd et al., 2017; Wang et al., 2003)。小尾寒羊 *IGF-1* 基因的外显子 2 和内含子 2 共检测到 2 个 SNPs, 虽然基因型效应不显著, 但是 2 个位点与十字部高、体高和体长指数等重要体尺性状显著相关(曹海洋, 2013)。

绵羊 *GH* 基因(GenBank: KU341778.1)定位在 11 号染色体负链, 基因全长 1 958bp, 包含 5 个外显子和 4 个内含子, 外显子总长 654bp, 编码 217 个氨基酸。*IGF-1* 基因(GenBank: NM\_001009774)定位于 3 号染色体负链, 总长 591bp, 由 6 个外显子, 5 个内含子组成, 外显子总长 465bp, 编码 154 个氨基酸。目前, 对动物 *GH* 与 *IGF-1* 基因多态性的研究主要集中在猪、牛、羊等的 *GH* 外显子 1 和 4, 内含子 3 和 4; *IGF-1* 的外显子 1 和 4 及内含子 2 上, 没有针对全部外显子筛选候选 SNPs。因此, 本研究选取呼伦贝尔羊、藏

羊、湖羊、阿勒泰羊、小尾寒羊、滩羊 6 个本土品种和澳洲白绵羊外来品种为研究对象, 根据 *GH* 与 *IGF-1* 基因外显子测序结果, 分析 *GH* 与 *IGF-1* 基因外显子在 7 个绵羊品种上的单核苷酸多态性, 并对筛选出的 SNPs 进行了群体遗传学和连锁不平衡等分析, 评估我国本土绵羊生长相关基因的多态水平, 为今后本土绵羊分子选育和品种改良提供基础数据。

## 1 结果与分析

### 1.1 7 个绵羊品种 *GH* 与 *IGF-1* 基因外显子 SNPs 筛选

对 7 个品种共 340 只绵羊的 *GH* 和 *IGF-1* 基因外显子 PCR 产物进行 sanger 测序。在 *GH* 基因外显子区共检测到 11 个突变位点(其中, 外显子 2 和 3 均检测到 4 个 SNPs, 外显子 5 发现 3 个 SNPs, 而外显子 4 未检测到多态性), 以其定位于染色体的绝对位置顺序编号(如图 1a), 依次定义为 SNP1-11, 其中 SNP1 为湖羊、阿勒泰羊和小尾寒羊特有, SNP2 仅在藏羊和小尾寒羊中发现, SNP3 和 SNP7 分别仅在澳白羊和湖羊中发现, SNP10 发现于藏羊、小尾寒羊和滩羊, 其余 SNP4-SNP6、SNP8、SNP9 和 SNP11 在 7 个品种中均有分布(表 1)。从突变类型分析, 除 SNP3、SNP7 和 SNP9 为颠换外, 其余突变均为转换, 碱基突变结果显示 SNP2、SNP3 和 SNP5-8 为同义突变, SNP1、SNP4 和 SNP9-SNP11 为错义突变。与 *GH* 基因相比, 在 *IGF-1* 基因上发现的 SNP 数量较少, 仅发现 3 个 SNPs(其中, 外显子 2 和 5 分别发现 2 个和 1 个 SNPs, 外显子 3 和 4 均未检测到多态位点), 均为同义突变, 定义为 SNP1-3(图 1b, 表 2)。其中 SNP3 为 7 个品种所共有, SNP1 在本土品种呼伦贝尔羊、湖羊、阿勒泰羊和滩羊中均有分布, SNP2 则分布在呼伦贝尔羊、湖羊和澳白羊群体中。

表 1 7 个绵羊品种 *GH* 基因 SNPs 筛选结果

Table 1 SNPs identified in *GH* gene in seven sheep breeds

名称	染色体位点	碱基突变	mRNA 位点	氨基酸变异	品种
Name	Chromosomal loci	Base mutation	mRNA loci	Amino acid variation	Breeds
SNP1	47540268	G→A	G103A	Glycine(Gly)→serine(Ser)	Hu、ALT、Han
SNP2	47540269	C→T	C102T	Tyrosine(Tyr)	Z、Han
SNP3	47540284	G→C	G87C	Alanine(Ala)	A
SNP4	47541051	G→A	G161A	Gly→Ser	all
SNP5	47541061	A→G	A151G	Proline(Pro)	all
SNP6	47541073	C→T	C139T	Ser	all
SNP7	47541136	G→T	G76T	Pro	Hu
SNP8	47541408	A→G	A212G	Glutamine(Glu)	all
SNP9	47541452	G→C	G168C	Gly→Arginine(Arg)	all
SNP10	47541476	G→A	G144A	Ala→Threonine(Thr)	Z、Han、T
SNP11	47541496	C→T	C124T	Pro→Leucine(Leu)	all

注: H 为呼伦贝尔羊, Z 为藏羊, Hu 为湖羊, ALT 为阿勒泰羊, Han 为小尾寒羊, T 为滩羊, A 为澳洲白绵羊, all 代表全部品种。下同。

Note: H is Hulun Buir sheep, Z is Tibetan sheep, Hu is Hu sheep, ALT is Altay sheep, Han is small-tailed Han sheep, T is Tan sheep, A is Australian white sheep, and all represents all breeds. The same below.

表 2 7 个绵羊品种 *IGF-1* 基因 SNPs 筛选结果

Table 2 SNPs identified in *IGF-1* gene in seven sheep breeds

名称	染色体位点	碱基突变	mRNA 位点	氨基酸变异	品种
Name	Chromosomal loci	Base mutation	mRNA loci	Amino acid variation	Breeds
SNP1	171268448	G→A	G48A	Threonine(Thr)	H、Hu、ALT、T
SNP2	171323180	G→A	G199A	Alanine(Ala)	H、Hu、A
SNP3	171323186	T→C	T205C	Proline(Pro)	all

## 1.2 7 个绵羊品种 SNPs 多态性和群体遗传学统计分析

### 1.2.1 7 个绵羊品种 *GH* 和 *IGF-1* 基因外显子多态位点统计学分析

根据测序结果分析了 7 个品种共 340 只绵羊 *GH* 和 *IGF-1* 基因外显子 SNPs 位点基因型频率和等位基因频率。结果显示, *GH* 的 SNP4、SNP6 和 SNP11 在小尾寒羊和澳白羊以及 SNP9 在澳白羊中不存在野生纯合型, 其他位点均存在野生纯合型和杂合突变型两种基因型。其中品种特异性的 SNPs 均表现为野生纯合型频率高于突变杂合型。7 个品种共有的 SNPs 中, SNP8 在呼伦贝尔羊、藏羊、湖羊和滩羊的野生纯合型频率略高于突变杂合型, 而在阿勒泰羊、小尾寒羊和澳白羊的野生纯合型频率略低于突变杂合型。基因频率计算结果显示品种特异性的 SNPs, 除了澳白羊的 SNP3 位点外, 其余 SNPs 的优势等位为野生型, 而品种共有的 SNPs, 其 SNP4、SNP9 和 SNP11 位点在大部分品种中野生型和突变型的比例接近 1: 1。在各个品种中, SNP8 的野生型和突变型比例差异较大(澳白羊约 1.9: 1、阿勒泰羊约 2.3: 1、藏羊约 4.5: 1), SNP5 在阿勒泰羊和澳白羊中野生型和突变型比例约为 2: 1, SNP6 在阿勒泰羊中野生型和突变型比例约为 2: 1, 而在其它品种中接近 1:1(表 3)。

对 *IGF-1* 基因外显子 SNPs 位点基因型频率和等位基因频率的分析结果显示, SNP1 在呼伦贝尔羊、阿勒泰羊和滩羊中存在野生纯合型和杂合突变型两种基因型(基因型频率: 呼伦贝尔羊和阿勒泰羊-野生纯合型 > 杂合突变型、滩羊-杂合突变型 > 野生纯合型), 在湖羊中存在野生纯合型、杂合突变型和纯合突变型三种基因型(基因型频率: 野生纯合型等于纯合突变型且为杂合突变型的二倍)。品种特异性的 SNP2 在呼伦贝尔羊和湖羊群体中无野生纯合型, 而是表现为突变杂合型和突变纯合型两种基因型(基因型频率: 呼伦贝尔羊-突变纯合型 > 突变杂合型、湖羊-突变杂合型 > 突变纯合型); 在澳白羊中存在野生纯合型、杂合突变型和纯合突变型三种基因型(基因型频率: 野生纯合型 > 杂合突变型 > 纯合突变型)。品种共有的 SNP3 在呼伦贝尔羊、藏羊、小尾寒羊、滩羊和澳白羊中均存在野生纯合型、杂合突变型和纯合突变型三种基因型(基因型频率: 野生纯合型 > 杂合突变型 > 纯合突变型), 而在湖羊和阿勒泰羊中仅存在野生纯合型和杂合突变型(基因型频率: 野生纯合型 > 杂合突变型)(表 5)。

### 1.2.2 7 个绵羊品种 *GH* 和 *IGF-1* 基因外显子多态位点群体遗传学分析

根据表 4 和 6 统计结果可知, 7 个品种的 *GH* 基因各位点的期望杂合度( $H_o$ )平均值均大于 0.5(0.66~0.86) 高于观测杂合度( $H_e$ : 0.39~0.55), 说明种群内多样性水平较高。*IGF-1* 基因的 3 个 SNPs 位点在湖羊和滩羊的  $H_o$  平均值分别为 0.51 和 0.64 均大于 0.5, 说明这三个 SNPs 在种群内多样性水平较高。*GH* 基因的 SNP9



在藏羊、湖羊和滩羊群体中偏离平衡，其余位点和 *IGF-1* 的三个位点均处于哈代-温伯格平衡状态，说明绵羊群体基因平衡，未经历自然选择(王世锋等, 2019)。多态信息含量(Polymorphic information content, *PIC*)结果表明，*GH* 与 *IGF-1* 基因外显子的各个 SNPs 均处于低度和中度多态，说明绵羊群体的选育程度较低。

分析有效等位基因数( $N_e$ )发现，*GH* 基因在 7 个品种共有的 SNPs 中，SNP4 在小尾寒羊和澳白羊群体以及 SNP5、SNP6、SNP8、SNP9、SNP11 在 7 个品种中  $N_e$  均接近或等于 2，而品种特异性位点  $N_e$  均较低(1.03~1.47)。*IGF-1* 的 SNPs 中，品种共有的 SNP3 在 7 个品种群体的  $N_e$  均接近 2，品种特异性的 SNP1 在湖羊、阿勒泰羊、滩羊和 SNP2 在湖羊中  $N_e$  近似等于 2，说明试验群体中品种共有的 SNPs，其等位基因分布比品种特异性 SNPs 更均匀，更适合用于分析多态性与生长性状的关系(曹海洋, 2013)。

表 3 7 个绵羊品种 *GH* 基因多态位点的基因型频率和基因频率

Table 3 Genotype and gene frequencies of *GH* gene polymorphic loci in 7 sheep breeds

绵羊品种 Sheep breeds	突变 Mutation	样本量 Sample number	基因型频率 Genotype frequency		等位基因频率 Allele frequency	
			野生型 Wild type	杂合型 Heterozygosity	野生型 Wild type	突变型 Mutation
H	SNP4	54	0.04	0.96	0.52	0.48
	SNP5	54	0.17	0.83	0.58	0.42
	SNP6	54	0.04	0.96	0.52	0.48
	SNP8	64	0.56	0.44	0.78	0.22
	SNP9	64	0.03	0.97	0.52	0.48
	SNP11	64	0.03	0.97	0.52	0.48
Z	SNP2	5	0.60	0.40	0.80	0.20
	SNP4	60	0.07	0.93	0.53	0.47
	SNP5	60	0.23	0.77	0.62	0.38
	SNP6	60	0.07	0.93	0.53	0.47
	SNP8	57	0.63	0.37	0.82	0.18
	SNP9	57	0.09	0.91	0.55	0.45
Hu	SNP10	57	0.95	0.05	0.97	0.03
	SNP11	57	0.07	0.93	0.54	0.47
	SNP1	5	0.80	0.20	0.90	0.10
	SNP4	58	0.07	0.93	0.53	0.47
	SNP5	58	0.17	0.83	0.59	0.41
	SNP6	58	0.07	0.93	0.53	0.47
	SNP7	58	0.97	0.03	0.98	0.02
	SNP8	59	0.58	0.42	0.79	0.21
SNP9	59	0.05	0.95	0.52	0.48	
SNP11	59	0.05	0.95	0.53	0.48	

表3 续表

绵羊品种 Sheep breeds	突变 Mutation	样本量 Sample number	基因型频率 Genotype frequency		等位基因频率 Allele frequency		
			野生型 Wild type	杂合型 Heterozygosity	野生型 Wild type	突变型 Mutation	
ALT	SNP1	5	0.80	0.20	0.90	0.10	
	SNP4	9	0.11	0.89	0.56	0.44	
	SNP5	9	0.33	0.67	0.67	0.33	
	SNP6	9	0.22	0.78	0.61	0.39	
	SNP8	10	0.40	0.60	0.70	0.30	
	SNP9	10	0.10	0.90	0.55	0.45	
	SNP11	10	0.10	0.90	0.55	0.45	
Han	SNP1	5	0.80	0.20	0.90	0.10	
	SNP2	5	0.60	0.40	0.80	0.20	
	SNP4	59	0.00	1.00	0.50	0.50	
	SNP5	59	0.19	0.81	0.59	0.41	
	SNP6	59	0.00	1.00	0.50	0.50	
	SNP8	60	0.43	0.57	0.72	0.28	
	SNP9	59	0.02	0.98	0.51	0.49	
	SNP10	60	0.93	0.07	0.97	0.03	
	SNP11	60	0.00	1.00	0.50	0.50	
	T	SNP4	60	0.08	0.92	0.54	0.46
		SNP5	60	0.12	0.88	0.56	0.44
SNP6		60	0.08	0.92	0.54	0.46	
SNP8		58	0.66	0.35	0.83	0.17	
SNP9		58	0.12	0.88	0.54	0.46	
SNP10		58	0.97	0.03	0.98	0.02	
SNP11		58	0.07	0.93	0.53	0.47	
A	SNP3	5	0.80	0.20	0.90	0.10	
	SNP4	22	0.00	1.00	0.50	0.50	
	SNP5	22	0.46	0.55	0.73	0.27	
	SNP6	22	0.00	1.00	0.50	0.50	
	SNP8	26	0.31	0.69	0.65	0.35	
	SNP9	26	0.00	1.00	0.50	0.50	
	SNP11	26	0.00	1.00	0.50	0.50	

表 4 7 个绵羊品种 *GH* 基因外显子遗传多态性

Table 4 Genetic polymorphism of *GH* gene exon in 7 sheep breeds

绵羊品种	突变	样本量	HWE	群体遗传结构指标				
			<i>P</i> 值	Population genetic structure index				
Sheep breeds	Mutation	Sample number	<i>P</i> -value	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>N<sub>e</sub></i>	<i>PIC</i>	
H	SNP4	54	<i>P</i> >0.05	0.97	0.96	0.50	0.37	
	SNP5	54	<i>P</i> >0.05	0.83	0.49	1.95	0.37	
	SNP6	54	<i>P</i> >0.05	0.96	0.50	2.00	0.37	
	SNP8	64	<i>P</i> >0.05	0.44	0.34	1.52	0.28	
	SNP9	64	<i>P</i> >0.05	0.97	0.50	2.00	0.37	
	SNP11	64	<i>P</i> >0.05	0.97	0.50	2.00	0.37	
Z	SNP2	5	<i>p</i> >0.05	0.40	0.32	1.47	0.27	
	SNP4	60	<i>P</i> >0.05	0.93	0.93	0.50	0.37	
	SNP5	60	<i>P</i> >0.05	0.77	0.47	1.90	0.36	
	SNP6	60	<i>P</i> >0.05	0.93	0.50	1.99	0.37	
	SNP8	57	<i>P</i> >0.05	0.37	0.30	1.43	0.25	
	SNP9	57	<i>P</i> <0.05	0.91	0.49	1.98	0.37	
	SNP10	57	<i>p</i> >0.05	0.05	0.05	1.05	0.06	
Hu	SNP11	57	<i>P</i> >0.05	0.93	0.50	1.99	0.37	
	SNP1	5	<i>p</i> >0.05	0.20	0.18	1.22	0.16	
	SNP4	58	<i>P</i> >0.05	0.95	0.93	0.50	0.37	
	SNP5	58	<i>P</i> >0.05	0.83	0.49	1.94	0.37	
	SNP6	58	<i>P</i> >0.05	0.93	0.50	1.99	0.37	
	SNP7	58	<i>p</i> >0.05	0.03	0.03	1.03	0.04	
	SNP8	59	<i>P</i> >0.05	0.42	0.33	1.50	0.28	
	SNP9	59	<i>P</i> <0.05	0.95	0.50	2.00	0.37	
	SNP11	59	<i>P</i> >0.05	0.95	0.50	2.00	0.37	
	ALT	SNP1	5	<i>p</i> >0.05	0.20	0.18	1.22	0.16
		SNP4	9	<i>P</i> >0.05	0.90	0.89	0.49	0.37
SNP5		9	<i>P</i> >0.05	0.67	0.44	1.80	0.34	
SNP6		9	<i>P</i> >0.05	0.78	0.48	1.91	0.36	
SNP8		10	<i>P</i> >0.05	0.60	0.42	1.72	0.33	
SNP9		10	<i>P</i> >0.05	0.90	0.50	1.98	0.37	
	SNP11	10	<i>P</i> >0.05	0.90	0.50	2.00	0.37	



表 4 续表

绵羊品种	突变	样本量	HWE	群体遗传结构指标				
			<i>P</i> 值	Population genetic structure index				
Sheep breeds	Mutation	Sample number	<i>P</i> -value	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>N<sub>e</sub></i>	<i>PIC</i>	
Han	SNP1	5	$p>0.05$	0.20	0.18	1.22	0.16	
	SNP2	5	$p>0.05$	0.40	0.32	1.47	0.27	
	SNP4	59	$P>0.05$	1.00	0.50	2.00	0.38	
	SNP5	59	$P>0.05$	0.81	0.48	1.93	0.37	
	SNP6	59	$P>0.05$	1.00	0.50	2.00	0.38	
	SNP8	60	$P>0.05$	0.57	0.49	1.94	0.32	
	SNP9	59	$P>0.05$	0.98	0.50	2.00	0.37	
	SNP10	60	$p>0.05$	0.07	0.06	1.06	0.06	
	SNP11	60	$P>0.05$	1.00	0.50	2.00	0.38	
	T	SNP4	60	$P>0.05$	0.93	0.92	0.50	0.37
		SNP5	60	$P>0.05$	0.88	0.49	1.97	0.37
SNP6		60	$P>0.05$	0.92	0.50	1.99	0.37	
SNP8		58	$P>0.05$	0.35	0.28	1.40	0.24	
SNP9		58	$P<0.05$	0.88	0.50	1.98	0.37	
SNP10		58	$p>0.05$	0.03	0.03	1.03	0.04	
A	SNP11	58	$P>0.05$	0.93	0.50	1.99	0.37	
	SNP3	5	$p>0.05$	0.20	0.18	1.22	0.16	
	SNP4	22	$P>0.05$	1.00	0.50	2.00	0.38	
	SNP5	22	$P>0.05$	0.55	0.40	1.66	0.32	
	SNP6	22	$P>0.05$	1.00	0.50	2.00	0.38	
	SNP8	26	$P>0.05$	0.69	0.45	1.83	0.35	
	SNP9	26	$P>0.05$	1.00	0.50	2.00	0.38	
SNP11	26	$P>0.05$	1.00	0.50	2.00	0.38		

注:  $PIC>0.5$  为高度多态,  $0.25\leq PIC\leq 0.5$  为中度多态,  $PIC<0.25$  为低度多态。

Note:  $PIC>0.5$  is highly polymorphic,  $0.25\leq PIC\leq 0.5$  is moderately polymorphic,  $PIC<0.25$  is low polymorphic

表 5 7 个绵羊品种 *IGF-1* 基因多态位点的基因型频率和基因频率

Table 5 Genotype and gene frequencies of *IGF-1* gene polymorphic loci in 7 sheep breeds

绵羊品种 Sheep breeds	突变 Mutation	样本量 Sample number	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency	
			野生型 Wild type	杂合型 Heterozygosity	突变纯合 Homozygous mutation	野生型 Wild type	突变型 Mutation
			H	SNP1	8	0.88	0.13
	SNP2	42	0.00	0.05	0.95	0.98	0.02
	SNP3	42	0.48	0.45	0.07	0.70	0.30
Z	SNP3	22	0.55	0.38	0.07	0.74	0.26
Hu	SNP1	5	0.40	0.20	0.40	0.50	0.50
	SNP2	22	0.00	0.96	0.05	0.98	0.02
	SNP3	22	0.73	0.27	0.00	0.86	0.14
ALT	SNP1	5	0.60	0.40	0.00	0.70	0.30
	SNP3	7	0.57	0.43	0.00	0.79	0.21
Han	SNP3	26	0.50	0.39	0.12	0.69	0.31
T	SNP1	5	0.20	0.80	0.00	0.60	0.40
	SNP3	40	0.50	0.48	0.03	0.74	0.26
A	SNP2	21	0.86	0.10	0.05	0.90	0.10
	SNP3	21	0.48	0.43	0.10	0.69	0.31

表 6 7 个绵羊品种 *IGF-1* 基因外显子遗传多态性

Table 6 Genetic polymorphism of *IGF-1* gene exon in 7 sheep breeds

绵羊品种 Sheep breeds	突变 Mutation	样本量 Sample number	HWE	群体遗传结构指标 Population genetic structure index			
			<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>N<sub>e</sub></i>	<i>PIC</i>
H	SNP1	8	<i>P</i> >0.05	0.13	0.12	1.13	0.11
	SNP2	42	<i>P</i> >0.05	0.05	0.05	1.05	0.04
	SNP3	42	<i>P</i> >0.05	0.45	0.42	1.72	0.33
Z	SNP3	22	<i>P</i> >0.05	0.38	0.39	1.64	0.31
Hu	SNP1	5	<i>P</i> >0.05	0.20	0.50	2.00	0.38
	SNP2	22	<i>P</i> >0.05	1.05	0.04	2.00	0.37
	SNP3	22	<i>P</i> >0.05	0.27	0.24	1.31	0.21
ALT	SNP1	5	<i>P</i> >0.05	0.40	0.42	1.72	0.33
	SNP3	7	<i>P</i> >0.05	0.43	0.34	1.51	0.28
Han	SNP3	26	<i>P</i> >0.05	0.39	0.43	1.74	0.34
T	SNP1	5	<i>P</i> >0.05	0.80	0.48	1.92	0.36
	SNP3	40	<i>P</i> >0.05	0.48	0.39	1.63	0.31
A	SNP2	21	<i>P</i> >0.05	0.10	0.17	1.21	0.16
	SNP3	21	<i>P</i> >0.05	0.43	0.43	1.75	0.34

注: *PIC*>0.5 为高度多态, 0.25≤*PIC*≤0.5 为中度多态, *PIC*<0.25 为低度多态。

Note: *PIC*>0.5 is highly polymorphic, 0.25≤*PIC*≤0.5 is moderately polymorphic, *PIC*<0.25 is low polymorphic.

### 1.3 绵羊 *GH*和 *IGF-1* 基因 SNPs 染色体定位

根据筛选出的 11 个多态位点构建绵羊 *GH* 和 *IGF-1* 基因 SNPs 染色体定位图, 如图 1(a)所示, *GH* 定位于 11 号染色体负链上, 图 1(a 右)紫色的片段从上到下依次为 *GH* 基因的外显子 5 到 1, SNP8-11 定位于外显子 2 上, SNP4-7 定位于外显子 3 上, SNP1-3 定位于外显子 5 上, 与 Ensembl 数据库比对后发现 SNP2、SNP4 和 SNP8 为新发现的多态位点(标注为红色), SNP1、SNP3、SNP5、SNP6、SNP7、SNP9-11 为已知位点(标注为绿色)。 *IGF-1* 基因的定位结果如图 1(b)所示, 其位于 3 号染色体负链上, SNP1 定位于外显子 5 上, SNP2、SNP3 定位于外显子 2 上, 且 SNP1 和 SNP3 为新发现位点(标注为红色), 其它已报道的 SNPs 在本研究的试验群体中均未检测到。

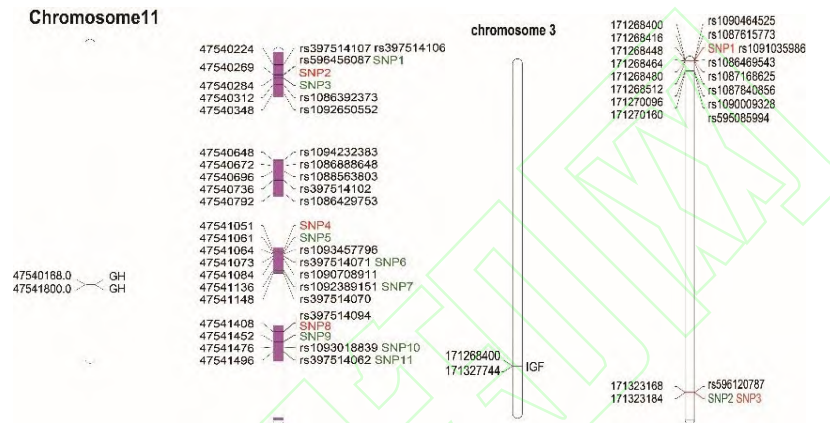


图 1 绵羊 *GH*(a)与 *IGF-1*(b)基因 SNPs 染色体定位图

Figure 1 Chromosomal location of SNPs identified in sheep *GH* (a) and *IGF-1* (b) gene

### 1.4 绵羊 *GH*和 *IGF-1* 基因多态性的连锁不平衡分析

连锁不平衡分析结果表明, *GH* 的 SNP1 分别与 SNP3、SNP6、SNP7 和 SNP8 呈强连锁不平衡( $r^2 > 0.8$ ), SNP3 与 SNP7, SNP6 和 SNP7 呈强连锁。本试验群体检测到 7 种单倍型, 其中 CGACAG 为优势单倍型, 占 52.6%, 其次是 TCATGA, 比例为 27.6%, 其余 5 种单倍型如图 3 所示, 比例较低(13%~14.5%)。由图 3 可知, *IGF-1* 基因的 3 个位点之间连锁关系很弱, 主要形成 3 种单倍型, 其中 TG 为优势单倍型, 比例达到 55.9%, 其次分别为 CG(26.5%)和 TA(17.6%)(图 2)。

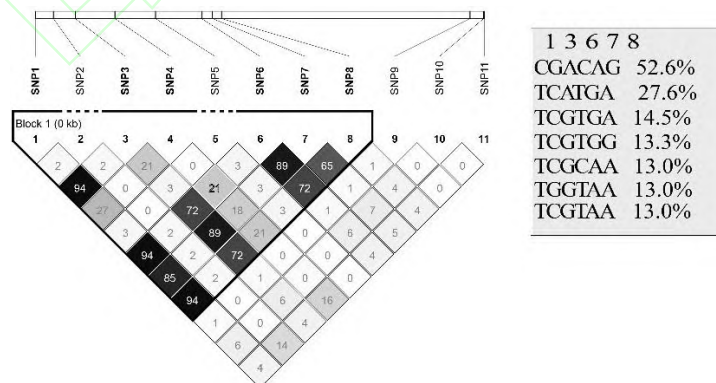


图 2 绵羊 *GH* 基因 SNP1~SNP11 位点连锁不平衡分析( $r^2$ )

Figure 2 Linkage disequilibrium( $r^2$ )analysis of SNP1~SNP11 loci in sheep *GH* gene

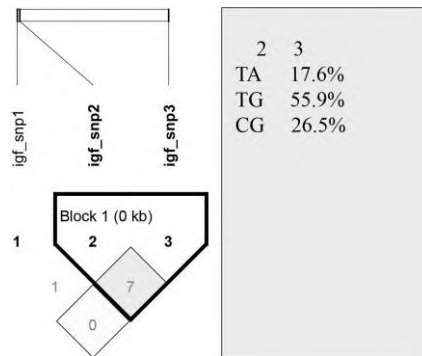


图3 绵羊 *IGF-1* 基因 SNP1~SNP11 位点连锁不平衡分析( $r^2$ )

Figure 3 Linkage disequilibrium( $r^2$ )analysis of SNP1~SNP3 loci in sheep *IGF-1* gene

### 1.5 绵羊 *GH* 基因多态位点蛋白质二级和三级结构预测

由于七个品种绵羊的 *IGF-1* 基因的 SNPs 为同义突变, 所以仅分析了 *GH* 基因可能的蛋白质结构变异。利用 MEGA 软件对 *GH* 基因核苷酸测定序列翻译成蛋白质, 发现第 35 位和 89 位氨基酸残基发生改变(图 4), SNP4 突变位点碱基 G 转换成 A 导致其编码的蛋白质第 89 位的氨基酸残基由甘氨酸(Gly, G)突变为丝氨酸(Ser, S), SNP9 碱基 G 到 C 的颠换导致其编码蛋白质第 35 位的氨基酸残基由甘氨酸突变为精氨酸(Arg, R)。利用蛋白质二级结构在线分析软件 PSIPRED, 针对绵羊 *GH* 基因的错义突变位点 SNP4 和 SNP9 进行蛋白质二级结构预测, 结果如图 5 所示, 氨基酸序列突变没有影响蛋白质的二级结构。为了进一步分析碱基突变是否改变编码蛋白质的生物学功能, 我们利用蛋白质三级结构预测软件 SWISS-Model(<http://swissmodel.expasy.org/>)(Biasini et al., 2014)进行绵羊 *GH* 基因蛋白质三级结构的预测, 如图 6 V1 所示, 突变前第 35 位甘氨酸除了与 89 位甘氨酸有相互作用力外, 还与邻近的 88 位苏氨酸(Thr)产生相互作用力, 稳定蛋白质三维结构。图 6 V2 即突变后只有 35 位(Arg)和 89 位丝氨酸(Ser)之间存在相互作用力, 蛋白质构象发生改变, 推测可能会影响蛋白质功能。



图4 绵羊 *GH* 基因多态位点氨基酸序列

注: V1 和 V2 分别为试验群体测定序列和参考序列的多肽链。

Figure 4 Amino acid sequence of polymorphism site of sheep *GH* gene

Note: V1 and V2 are the test and reference sequences polypeptide chains respectively.

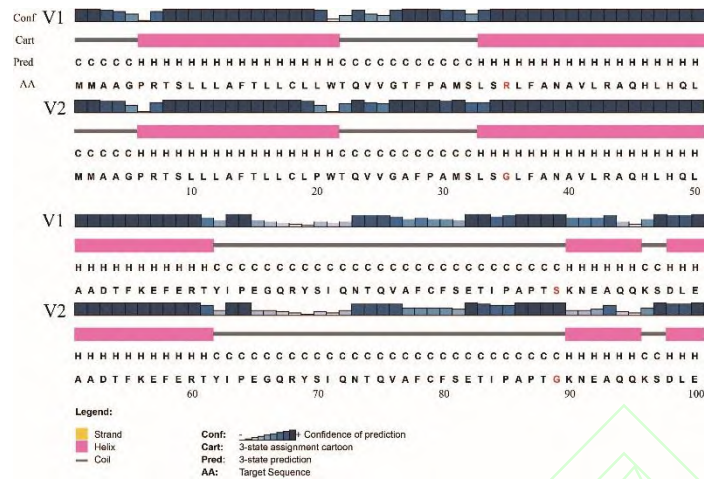


图5 绵羊 *GH* 基因多态位点蛋白质二级结构预测

Figure 5 Prediction of protein secondary structure at polymorphism sites of sheep *GH* gene

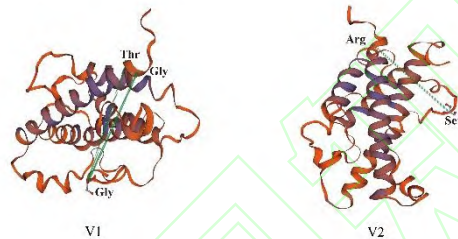


图6 绵羊 *GH* 基因多态位点蛋白质三级结构预测

注：V1 和 V2 分别为突变前后预测的蛋白质三维结构。

Figure 6 Prediction of protein tertiary structure at polymorphism sites of sheep *GH* gene

Note: V1 and V2 are respectively predicted protein tertiary structures before and after mutation.

## 2 讨论

由于 *GH* 与 *IGF-1* 基因在生长发育，特别是在分子标记辅助选择和遗传改良中的潜在作用，本研究对我国 6 个本土绵羊品种和 1 个商业品种 *GH* 与 *IGF-1* 的遗传多样性进行了检测。本研究在 *GH* 基因外显子区共检测到 11 个 SNPs，其中 SNP2、SNP4 和 SNP8 为三个新的 SNP 位点，SNP1、SNP3、SNP5-7 和 SNP9-11 为已知位点。分析等位基因频率可知，所有 SNPs 在 7 个种群体的突变等位基因频率偏低(0.02~0.5)，而且均无纯合突变，这对估计加性效应和显性效应造成困难。先前的研究结果已证实，*GH* 基因的外显子具有多态性，而且部分 SNPs 与绵羊的生长性状相关。

研究表明，SNP5(突变类型为错义突变)在索尔斯克绵羊群体存在 AA 和 AG 两种基因型，且 AG 杂合型的断奶重、9 月龄重和日增重均显著(极显著)大于 AA 型个体。本试验群体(7 个品种)的 SNP5 也表现为这两种基因型，但为同义突变(Gorlov et al., 2017)。Afifi 等人发现哈里绵羊 *GH* 基因外显子 4 有多态性，其突变位点(G1383A)的 AA 基因型(纯合突变)的初生重和日增重均显著高于 GG 和 GA 型(Afifi et al., 2017)。而本试验群体的 *GH* 基因外显子 4 未检测到多态位点。SNP9 在藏羊群体存在 GG、GC 和 CC 三种基因型，GG 为优势基因型，基因型频率比值：GG/GC 约为 1.7:1，GC/CC 约为 1.8:1。突变等位基因频率：野生型



G 大于突变型 C。*PIC* 中度多态，*Ne* 近似等于 2。进一步关联分析表明，GG 基因型的体重、体长、体高和胸围大于 CC 型，GC 基因型的体长和体重大于 CC 型，说明等位基因 G 与体重正相关(Han et al., 2016)。本研究检测到的 SNP9 的等位基因频率、*Ne*、*PIC* 与 Han 等相同。但本试验群体仅存在 GG 和 GC 两种基因型，GC 为优势基因型，而澳白羊只有 GC 杂合型。此外，SNP9 位点仅在藏羊群体未达到哈代-温伯格平衡状态，而其余六个品种群体均处于哈温平衡。本试验群体所检测到 SNP9 的突变类型、基因型、基因型频率和优势等位基因与 Han 等不一致，可能是品种差异造成的，而在相同品种藏羊上的这些差异，或许是受地域因素影响。Meira 等在肉用品种圣伊内斯(Santa Ines)绵羊群体中检测到 *GH* 基因的两个多态位点 SNP3 和 SNP6。其中 SNP3 为沉默突变，不影响蛋白质生理功能与胴体性状无关联，SNP6 为错义突变。SNP3 和 SNP6 的突变等位基因频率低，没有纯合突变，野生型 GG 和 CC 分别为优势基因型。Meira 等未做群体遗传性分析。关联分析表明，SNP6 对圣伊内斯绵羊的肋骨重和腿重具有加性效应，CC 基因型的绵羊胴体质量较高(Meira et al., 2018)。本研究仅在澳白羊检测到 SNP3，基因型、基因型频率和等位基因频率与 Meira 等研究结果一致，但 6 个本土品种均未检测到。可能由于澳白羊和圣伊内斯绵羊为国外专门肉用品种，与本土品种存在差异。

关于绵羊 *IGF-1* 基因多态性（尤其是外显子基因多态性）与生长性状的关联分析较少。已有研究表明 *IGF-1* 基因多态性与伊朗本土绵羊的体重和体尺等性状显著相关，但以上研究结果大多针对 *IGF-1* 基因的 5'侧翼区和内含子，而对 *IGF-1* 基因外显子多态性与生长性状的相关性分析却很少(Tahmoorepur et al., 2009, Negahdary et al., 2013, Gholibeikifard et al., 2013)。本研究在 *IGF-1* 基因外显子区检测到了 3 个 SNPs，均为同义突变，其中 SNP1 和 SNP3 为新发现的多态位点。已证实，*IGF-1* 基因的 SNP2 在小尾寒羊群体中存在三种基因型，GG、GA、和 AA。基因型频率：GG 与 AA 基本相同，AA 仅占 10%。等位基因频率，野生型 G 为优势等位。群体遗传参数表明，小尾寒羊在该位点处于中度多态，符合哈温平衡。进一步关联分析得出，GA 型个体的十字部高、体高显著高于 GG 和 AA 基因型个体(曹海洋, 2013)。本研究仅在呼伦贝尔羊、湖羊和澳白羊中检测到 SNP2。其突变类型、在澳白羊群体的基因型、基因型频率和优势等位基因与曹海洋一致。SNP2 的 *PIC* 在湖羊群体也为中度多态。呼伦贝尔羊、湖羊和澳白羊均处于哈温平衡。但本研究未在小尾寒羊上检测到 SNP2，可能是由于试验群体小造成的。呼伦贝尔羊和湖羊仅检测到两种基因型：GA 和 AA。在呼伦贝尔羊群体中，AA 基因型为优势基因型，比例达 95%，GA 仅占 5%，而湖羊群体的基因型比例与呼伦贝尔羊恰恰相反。分析群体遗传参数发现，湖羊的杂合度高达 0.96，而曹海洋在小尾寒羊群体检测到的杂合度仅为 0.5。在呼伦贝尔羊( $H_o=0.05$ )和澳白羊( $H_o=0.1$ )群体中杂合度极低。呼伦贝尔羊和澳白羊 *PIC* 为低度多态。这表明，与呼伦贝尔羊和澳白羊相比，SNP2 更适合用于分析湖羊基因多态性与生长性状的关系。

本研究对品种共有的 SNPs 位点进行蛋白质二级结构和三级结构预测发现，*GH* 的 SNP4 和 SNP9 导致编码蛋白质构象发生改变，可能会影响其生理功能，需要结合表型数据进行关联分析，进一步验证 SNP4 和 SNP9 作为影响本土绵羊生长性状候选 SNPs 的可能性。

研究表明，与其他本土绵羊品种相比，湖羊的 *GH* 和 *IGF-1* 基因具有较为丰富的遗传变异。7 个品种共有的 SNPs 更适合于分析多态性与生长性状的关系，其中 *GH* 基因的 SNP6、SNP9 和 *IGF-1* 基因的 SNP2 可作为研究多态位点与绵羊生长性状的候选 SNPs。同时，不同基因型个体的表型信息对进一步的基因型表型关联分析至关重要，将为筛选重要的候选位点奠定基础。



### 3 材料与方法

#### 3.1 试验材料

用耳钳采集大小约为 1 cm<sup>3</sup> 的 7 个品种绵羊的耳组织,放入装有 1 mL 无水乙醇的冻存管中,带回实验室-20℃保存,用于基因组 DNA 的提取。其中本土地方品种为 310 只基础母羊,外来品种为 30 只澳洲白种公羊。试验羊均选取体型接近(母羊体型大小接近,公羊体型大小接近)健康状况良好且年龄为 3 岁的群体,品种信息见表 7。

表 7 绵羊品种

Table 7 Sheep breeds

品种	数量	采样地点
Breeds	Number	Sampling place
呼伦贝尔羊 (H)	60	内蒙古呼伦贝尔市呼伦贝尔羊种羊场
Hulunbuir sheep		Hulunbuir sheep breeding farm of Hulunbuir city in Inner Mongolia
藏羊 (Z)	60	青海省海西州乌兰县
Tibetan sheep		Wulan county of Haixi prefecture in Qinghai province
滩羊 (T)	60	宁夏盐池县
Tan sheep		Yanchi county in Ningxia
湖羊 (Hu)	60	山东临清润林牧业有限公司
Hu sheep		Linqingrunlin of Shandong animal husbandry limited company
小尾寒羊 (Han)	60	内蒙古呼伦贝尔市大杨树镇
Small-tail Han sheep		Dayangshu town of Hulunbuir city in Inner Mongolia
阿勒泰羊 (ALT)	10	新疆建设兵团 184 团羊场
Altay sheep		The 184 regiments of Xinjiang construction corps
澳洲白绵羊 (A)	30	天津奥群牧业有限公司
Australian white sheep		Tianjin Aoqun animal husbandry of limited company

#### 3.2 试验方法

##### 3.2.1 提取基因组 DNA

首先利用试剂盒(天根动物组织基因组 DNA 快速提取试剂盒)提取绵基因组 DNA,随后琼脂糖凝胶(浓度为 1%)电泳检测 DNA 质量,电泳条件为 120 V, 25 min,使用 Nano drop 2000 检测浓度。

##### 3.2.2 绵羊 *GH* 和 *IGF-1* 基因 PCR 扩增与测序

根据 Ensembl 数据库中绵羊 *GH* 与 *IGF-1* 基因外显子的 SNP 进行初步筛选,发现 *GH* 的外显子 1 和 *IGF-1* 的外显子 1、6 没有定位到 SNP,其他外显子均定位到了 SNP,故选取 *GH* 外显子 2-5 和 *IGF-1* 外显子 2-5 进行测序筛选候选 SNP。利用 Primer Premier 6.0 软件设计、合成绵羊 *GH* 与 *IGF-1* 基因的 4 个外显子引物(上海生工生物工程股份有限公司),表 8 为引物信息。采用 35 μL 的体系进行 PCR 扩增(PCR 试剂选用

TaKaRa, 扩增反应体系为: 3 L dNTP mix, 3.5 L 10×buffer, 上下游引物各 0.7 L, 1 L 基因组 DNA, 0.2 L rTaq DNA Polymerase 和 25.9 L ddH<sub>2</sub>O), 反应条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s; 53~58℃(具体退火温度见表 8)退火 30 s; 72℃延伸 45 s; 30 个循环; 72℃延伸 10 min; 4℃保存。2%琼脂糖凝胶电泳检测合格的产物送武汉天一辉远生物科技有限公司进行 sanger 测序。

表 8 绵羊 *GH* 与 *IGF-1* 引物信息

Table 8 Information of primer sequences in sheep *GH* and *IGF-1* gene

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence	退火温度(°C) Annealing temperature	产物长度(bp) Length	扩增区域 mplified region
<i>GH 2-F</i>	GGAGATCAGGCGTCTAGCTC	53	305	第二外显子
<i>GH 2-R</i>	CAGTTCCTCCCATTTGTGTG			Exon 2
<i>GH 3-F</i>	GGAGATCAGGCGTCTAGCTC	55	248	第三外显子
<i>GH 3-R</i>	TGGGGCAGCCTACTTAGGAT			Exon 3
<i>GH 4-F</i>	TGGTTGGTGGTGGTGGCA	58	344	第四外显子
<i>GH 4-R</i>	CCAGCCCACGTGTGTTCT			Exon 4
<i>GH 5-F</i>	TAGGGGAGGGTGGAAAATGG	58	363	第五外显子
<i>GH 5-R</i>	AAAGGACAGTGGGCACTGGA			Exon 5
<i>IGF1-2-F</i>	AGGAATGCAGAGATGGGGTAA	55	330	第二外显子
<i>IGF1-2-R</i>	CACAGGCGGTCATTCAGCT			Exon 2
<i>IGF1-3-F</i>	TGGGGAGAGGAGTTTTTCAGG	54	355	第三外显子
<i>IGF1-3-R</i>	GCTGCTGCTGCTAAGTTGCT			Exon 3
<i>IGF1-4-F</i>	CATCTATGGAGCCAAGGCAT	58	205	第四外显子
<i>IGF1-4-R</i>	TCTGCTGACTTGCTTCCGTC			Exon 4
<i>IGF1-5-F</i>	AAGGGGACCACCTGTTCTCA	54	231	第五外显子
<i>IGF1-5-R</i>	CCGTGTTTCCTTTCTTGCCTG			Exon 5

### 3.3 数据处理与统计分析

采用 MEGA 6.0 和 Chromas 2 软件进行序列比对分析, 确定 SNPs 位点, 利用 Haploview 软件分别对 *GH* 与 *IGF-1* 基因的外显子 SNPs 进行连锁不平衡分析。自写 perl 程序, 提取染色体信息, 构建 *GH* 与 *IGF-1* 基因 SNPs 染色体定位图。利用 PSIPRED 在线软件分析蛋白质二级结构、SWISS-Model 在线软件分析预测蛋白质三级结构。用 Microsoft Excel 2016 统计 *GH* 与 *IGF-1* 各位点的基因型频率、等位基因频率、观测杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )、有效等位基因数( $N_e$ )计算方法参考(李青等, 2019)。通过 SPSS19.0 软件进行卡方检验, 检验各个 SNPs 是否符合哈代-温伯格(Hardy-weinberg)法则, PIC\_CALC 软件统计各位点多态信息含量(PIC)。

### 作者贡献

丁宁负责实验操作和论文撰写; 刘思嘉负责数据分析; 田菲负责修改论文; 李雪和田得红负责采样和协助实验操作; 赵凯为项目负责人, 负责实验设计。全体作者都阅读并同意最终的文本。

## 致谢

本研究由第二次青藏高原科学考察与研究项目(2019 QZKK0501)、国家重点研发资助计划(2016YFC0500700)、中国科学院 STS 重点项目(KFJ-STZ-ZDTP-004)和青海省动物生态基因组学重点实验室项目共同资助。

## 参考文献

- Afifi M., Abdelmoneim T.S., Brooks P.H., and Swelum A.A., 2016, Sequencing of growth hormone gene for detection of polymorphisms and their relationship with body weight in harri sheep, *Indian Journal of Animal Research*, 51(2): 205-211
- Bergan-Roller H.E., and Sheridan M.A., 2017a, The growth hormone signaling system: insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone, *General and Comparative Endocrinology*, 258: 119-133
- Bergan-Roller H.E., Ickstadt A.T., Kittilson J.D., and Sheridan M.A., 2017b, Insulin and insulin-like growth factor-1 modulate the lipolytic action of growth hormone by altering signal pathway linkages, *General and Comparative Endocrinology*, 248: 40-48
- Biasini M., Bienert S., Waterhouse A., Arnold K., Studer G., Schmidt T., Kiefer F., Cassarino G.T., Bertoni M., Bordoli L., and Schwede T., 2014, Swiss-model: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information, *Nucleic Acids Research*, 42: 252-258
- Cao H.Y., 2013, The analysis of polymorphism and genetic effect in *ADPN* and *IGF1* genes in small tail Han Sheep, Thesis for M.S., Shandong Agricultural University, Supervisor: Wang J.M, Wang G.Z., pp.25-31(曹海洋, 2013, 小尾寒羊 *ADPN* 和 *IGF1* 基因多态性及其遗传效应分析, 硕士学位论文, 山东农业大学, 导师: 王建民, 王桂芝, pp.25-31)
- Chikani V., and Ho K.K.Y., 2013, Action of *GH* on Skeletal Muscle Function: Molecular and Metabolic Mechanisms, *Journal of Molecular Endocrinology*, 52(1): R107-R123
- El-Magd M.A., Saleh A.A., Nafeaa A.A., El-Komy S.M., and Afifi M.A., 2017, Polymorphisms of the *IGF1* gene and their association with growth traits, serum concentration and expression rate of *IGF1* and *IGF1R* in buffalo, *Journal of Zhejiang University-Science B*, 18(12): 1064-1074
- Fink J., Schoenfeld B.J., and Nakazato K., 2018, The role of hormones in muscle hypertrophy, *The Physician and Sports Medicine*, 46(1): 129-134
- Franco M.M., Antunes R.C., Silva H.D., and Goulart L.R., 2005, Association of *PIT1*, *GH* and *GHRH* polymorphisms with performance and carcass traits in Landrace pigs, *Journal of Applied Genetics*, 46(2): 195-200
- Favier R.P., Mol J.A., Kooistra H., and Rijnberk A., 2001, Large body size in the dog is associated with transient *GH* excess at a young age, *Journal of Endocrinology*, 170(2): 479-484
- Gholibeikifard A., Aminafshar M., and Mashhadi M.H., 2013, Polymorphism of *IGF-1* and *ADRB3* genes and their association with growth traits in the Iranian baluchi sheep. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15(6): 1153-1162
- Gorlov I.F., Kolosov Y.A., Shirokova N.V., Getmantseva L.V., Slozhenkina M.I., Mosolova N.I., Bakoev N.F., Leonova M.A., Kolosov A.Y., and Zlobina E.Y., 2017, Association of the growth hormone gene polymorphism with growth traits in salsk sheep breed, *Small Ruminant Research*, 150: 11-14
- Han C., Sun Y.G., and Li Q., 2016, Growth hormone polymorphisms and growth traits in Chinese Tibetan sheep *ovis aries*, *Genetics and Molecular Research*, 15(3)
- Ishida T., Umebayashi A., Tsuruta S., Akashi R., and Harada H., 2010, Polymorphisms in growth hormone gene and their associations with calf weight in Japanese Black cattle, *Animal Science Journal*, 81(6): 623-629

- Li Q., Hui H., Lu Z.K., Jin M.L., Chu M.X., and Wei C.H., 2019, Association of the *PDGF-D* gene genetic Variation with sheep tail traits, Chinese Journal of Veterinary and Animal Science, 50(04): 20-32(李青, 慧华, 卢曾奎, 金美林, 储明星, 魏彩虹, 2019, 绵羊 *PDGF-D* 基因多态性与尾型的关联, 畜牧兽医学报, 50(04): 20-32)
- Liu Y., Lan X., Qu Y., Li Z., Chen Z., Lei C., Fang X.T., and Chen H., 2011, Effects of genetic variability of the dairy goat growth hormone releasing hormone receptor(*GHRHR*)gene on growth traits, Molecular Biology Reports, 38(1): 539–544
- Meira A.N., Montenegro H., Coutinho L.L., Mourao G.B., Azevedo H.C., Muniz E.N., Machado A.L., Sousa L.P., Pedrosa V.B., and Pinto L.F.B., 2018, Single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and *IGF* type-1(*IGF1*)genes associated with carcass traits in Santa Ines sheep, Animal, 13(3): 460-468
- Negahdary M., Hajihosseini A., and Ajdary M., 2013, PCR-SSCP variation of *IGF-1* and *PIT1* genes and their association with estimated breeding values of growth traits in Makoei Sheep, Genetics Research International, 2013: 1-6
- Stephen C.Y.I., Zhang X.Q., and Frederick C.L., 2001, Genomic growth hormone gene polymorphisms in native Chinese chickens, Experimental Biology and Medicine, 226(5): 458–462
- Tahimic C.G.T., Yongmei W., and Bikle D.D., 2013, Anabolic effects of *IGF1* signaling on the skeleton, Frontiers in Endocrinology, 4
- Tahmoorespur M., Valeh M., Nassiry M., Moussavi A., and Ansary M., 2009, Association of the polymorphism in the 5' flanking region of the ovine *IGF-1* gene with growth traits in the baluchi sheep, South African Journal of Animal Science, 39(5): 97-101
- Venken K., Moverare-Skrtic S., Kopchick J.J., Coschigano K.T., Ohlsson C., Boonen S., Bouillon R., and Vanderschueren D., 2007, Impact of androgens, growth hormone, and *IGF1* on bone and muscle in male mice during puberty, Journal of Bone and Mineral Research, 22(1): 72-82
- Wang S.F., Song W.Y., Zhan J.L., Zhang X.Y., Wang Y.T., and Tuerxun A., 2019, Polymorphic analysis of *TLR9* gene of local sheep in xinjiang, Genomics and Applied Biology, 38(5): 1983-1989 (王世锋, 宋旺阳, 詹建立, 张秀英, 王玉涛, 阿布都热合曼 吐尔逊, 2019, 新疆地方绵羊 *TLR9* 基因多态性分析, 基因组学与应用生物学, 38(5): 1983-1989)
- Wang Y., Price S.E., and Jiang H., 2003, Cloning and characterization of the bovine class 1 and class 2 insulin-like growth factor-1 mRNAs, Domestic Animal Endocrinology, 25(4): 315-328