



天祝白牦牛 *IGF-1* 基因克隆、生物信息学及差异表达分析

常永芳¹, 包鹏甲², 张永峰², 付东海²,

吴晓云², 褚敏², 阎萍^{1,2}

(1. 西北民族大学 生命科学与工程学院, 兰州 730030; 2. 中国农业科学院 兰州畜牧与
兽药研究所, 甘肃省牦牛繁育工程重点实验室, 兰州 730050)

摘要 旨在获得天祝白牦牛 *IGF-1* 基因序列, 分析其分子结构特征及在牦牛毛囊发育周期中的表达规律, 为解析白牦牛毛囊发育及被毛生长提供理论依据。以天祝白牦牛体侧皮肤为试验材料, 通过 PCR 扩增及测序技术克隆 *IGF-1* 基因 CDS 区序列, 并与黄牛序列比对, 进行生物信息学分析; 采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术检测天祝白牦牛毛囊发育不同时期 *IGF-1* 基因的 mRNA 表达水平。结果表明, 天祝白牦牛 *IGF-1* 基因的 CDS 区长 465 bp, 编码 154 个氨基酸; *IGF-1* 基因编码蛋白的分子质量为 17 065.81 ku, 理论等电点为 9.36; 蛋白质二级结构以无规卷曲 (57.79%) 和 α -螺旋 (27.27%) 为主, 序列分析表明, 天祝白牦牛 *IGF-1* 蛋白为不稳定亲水蛋白; qPCR 检测结果表明, *IGF-1* 基因在牦牛毛囊发育的生长期、退行期和休止期均有表达, 生长期和退行期表达量显著高于休止期。

关键词 *IGF-1* 基因; 天祝白牦牛; 克隆; 生物信息学

中图分类号 S823.85

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2019)12-1934-08

牦牛是生活在高寒低氧地区、具有重要文化和生产意义的放牧动物, 是高原上的生命之舟。其毛、肉、奶等副产品为藏牧民提供了有效的生活保障和经济来源^[1]。天祝白牦牛产自甘肃省天祝藏族自治县, 是中国乃至世界的珍稀牦牛种质资源, 其被毛纯白、厚密, 颈部、肩部、背部多绒毛, 体侧部多长毛并与尾毛共同形成裙毛^[1-2], 兼具利用价值和观赏价值^[2]。它的皮毛不仅具有抵御环境侵害(寒冷、强辐射和沙尘暴)、感觉、新陈代谢和调节体温的作用, 而且是制革和衬垫织物的高级原材料。毛囊是产生毛发的基本单位, 由上皮细胞和真皮细胞之间相互作用形成。哺乳动物毛囊生长具有周期性, 循环一般经历生长期、退行期和休止期。但受环境、季节以及个体差异影响, 不同物种间毛囊生长周期存在一定差异, 如内蒙古绒山羊次级毛囊 5—12 月为生长期, 1 月份进入退行期, 2—4 月份为休止期; 而兔子毛囊生长期经历两轮, 分别在每年 1—4 月和 9—12 月; 藏绵羊毛囊生长期处于 5—8 月, 11 月份进入退行期, 2

月处于休止期^[3-6]。毛囊的周期性活动伴随着毛纤维的新生与脱落, 且毛囊的这种循环生长受众多生长促进和抑制因子之间严格控制的平衡调节^[7-10]。因此, 研究毛囊发育和周期性生长活动中的调控因子对改善牦牛毛品质和产量具有重要意义。

胰岛素样生长因子(IGF), 是一种具有与胰岛素相似结构的同源单链多肽, 通常与胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP)相结合, 以复合物的形式存在于机体组织或血液中。IGF 包括 *IGF-1* 和 *IGF-2*, 均是由肝脏响应垂体分泌的生长激素(GH)所产生的蛋白质。*IGF-1* 作为一种内分泌激素, 负责机体组织的生长和发育, 例如肌肉、骨骼、肾脏、皮肤、肺和肝脏等, 同时 *IGF-1* 作为一个强劲的有丝分裂原, 可促进细胞生长、增殖、分化, 同时可抑制细胞凋亡^[11]。研究表明^[12-13], *IGF-1* 可通过刺激毛囊的表皮和真皮成分, 促进毛囊代谢, 增加产毛量等。其受体 *IGF-1R* 大量存在于动物皮肤毛囊的毛球和外根鞘中, 在间充质细胞

收稿日期: 2019-06-05 修回日期: 2019-08-08

基金项目: 国家现代农业(肉牛牦牛)产业技术体系建设专项(CARS-37); 中国农业科学院创新工程(CAASASTRP-2014-LIHP5-01)。

第一作者: 常永芳, 女, 硕士研究生, 研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail: 1500507897@qq.com

通信作者: 阎萍, 女, 研究员, 研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail: pingyanlz@163.com

和表皮细胞中表达^[11,14]。*IGF-1* 通过与其受体 (*IGF-1R*) 相互作用来调节毛囊的生长周期,并刺激毛母质和毛乳头细胞的增殖和分化,同时抑制细胞的凋亡,对维持毛囊的生长周期至关重要^[15-16]。研究表明,沉默与过表达 *IGF-1* 基因都会影响毛囊的发生及形态结构变化,外源性 *IGF-1* 会加快角质细胞增殖,可有效促进体外培养毛囊的生长^[17-18]。魏玉青^[12]研究发现, *IGF-1* 能够通过调节 *IGF-1* 家族基因的表达来促进绒山羊毛囊发育并维持其毛囊形态结构。此外, *IGF-1* 基因还可促进白鹅次级毛囊的发育^[19]; Trueb 等^[20]研究表明, *IGF-1* 影响毛囊增殖、头发生长周期以及毛囊分化,对人头发的生长和防止脱发具有重要作用。目前, *IGF-1* 对牦牛毛囊发育的分子调控机制尚不明确,其在物种进化过程中相对保守,但也存在一定的种间差异。因此,本研究以天祝白牦牛皮肤组织为试验材料,克隆天祝白牦牛 *IGF-1* 基因序列,分析其分子结构及功能,并探究 *IGF-1* 基因在天祝白牦牛毛囊发育不同时期的表达特征,以期为该因子对毛囊发育和毛发纤维生长的调控及其功能研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

白牦牛均来自于甘肃省天祝县白牦牛养殖场,选取同一养殖场年龄相近(2~3岁)、饲养条件相同且相互之间无遗传相关的3头雌性空怀天祝白牦牛,分别在1、3、10月份采集这3头牦牛的体侧皮肤组织,用生理盐水和PBS处理组织样品表面异物,分装标记并迅速投入液氮罐中,备用。

1.2 试验试剂

DNA 纯化试剂盒、反转录试剂盒、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、pMD 19-T 克隆载体、DL 2 000DNA marker、2 $\times$ *Taq* PCR Master Mix、胶

回收试剂盒,均购自 TaKaRa 公司;Amp(氨苄青霉素)、Trizol 均购自 Solarbio 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 通过 Trizol 法提取皮肤组织总 RNA,并通过 NanoDrop 仪器检测 RNA 的质量浓度和纯度,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。以皮肤组织 RNA 为模板,使用 TaKaRa 反转录试剂盒进行 cDNA 合成, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

1.3.2 引物设计与合成 根据 GenBank 中黄牛 *IGF-1* 基因 mRNA 序列(登录号: NM_001077828.1),利用 NCBI 在线工具 Pick Primer 设计引物,详见表 1。

1.3.3 目的片段的 TA 克隆与测序 以天祝白牦牛皮肤组织 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,引物见表 1,总反应体系 20 μL :上下游引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), cDNA 1 μL , RNase-Free ddH $_2$ O 7 μL , 2 $\times$ *Taq* PCR Master Mix 10 μL 。PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存;用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。回收目的片段,将适量 PCR 产物连接到 pMD19-T 克隆载体(16 $^{\circ}\text{C}$, 30 min),将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞中,挑取白色阳性单克隆菌落至 LB (Amp $^{+}$) 液体培养基中扩大培养(37 $^{\circ}\text{C}$),最后进行菌液 PCR 鉴定,选择 PCR 鉴定正确的阳性单克隆送至北京奥科鼎盛生物科技有限公司进行测序。

1.3.4 生物信息学分析 利用 ORF Finder 在线程序对白牦牛 *IGF-1* 基因序列进行开放阅读框分析,并用 BLAST 进行序列同源性比对分析;使用 ExPASy 中的在线工具 ProtParam 和 ProtScale 分别分析 *IGF-1* 氨基酸序列的理化性质和亲疏水性;使用 ExPASy 中的 SOPMA、

表 1 *IGF-1* 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of *IGF-1* gene

基因名称 Gene name	引物类型 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature	片段大小/bp Product size
<i>IGF-1</i>	克隆 Cloning	F: TTTCCAGACTTTGCACTTCAGA	59	465
		R: TTTGGTAGGTCTTCTGGTGTTT		
	Q-PCR	F: TCTTGAAGCAGGTGAAGATGCC	60	144
		R: ACACGAAGTGGAGAGCATCC		
<i>GAPDH</i>	Q-PCR	F: GGGGAAAGCGGACTTAGGA	60	244
		R: TGGTTCACGCCATCACA		

SWISS-MODEL 工具预测 IGF-1 蛋白的二、三级结构;使用 SignalP 4.1 和 TMHMM 在线工具预测牦牛 IGF-1 蛋白的信号肽和跨膜结构;利用 SMART 和 PSORT II Prediction 分析 IGF-1 蛋白的结构域和亚细胞定位;利用 Mega 7.0 软件构建 *IGF-1* 基因的系统生物进化树^[21]。

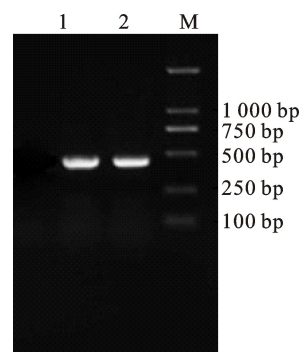
1.3.5 qRT-PCR 技术检测 *IGF-1* 基因的相对表达量 以皮肤组织的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应,反应体系(总体积为 20 μ L):SYBR-Green II 10 μ L,上、下游引物各 1 μ L (10 μ mol/L),模板 cDNA 1 μ L,ddH₂O 7 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 s,共 39 个循环。每个样品 3 个重复,以 *GAPDH* 为内参基因。

1.3.6 数据处理 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算毛囊发育 3 个时期的相对表达量,并使用 SPSS 22.0 软件对 *IGF-1* 基因在牦牛毛囊发育不同时期的表达量进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *IGF-1* 基因 PCR 扩增检测结果

如图 1 所示,扩增产物电泳条带清晰明亮,特异性良好,且扩增片段的大小与预期一致。



1~2. *IGF-1* 基因 PCR 产物 PCR products of *IGF-1* gene;
M. DL2000 DNA marker

图 1 *IGF-1* 基因 PCR 扩增产物电泳检测

Fig.1 The electrophoresis of PCR amplification products of *IGF-1* gene

2.2 *IGF-1* 基因克隆测序与序列分析

将克隆测序得到的序列与 GenBank 上黄牛 *IGF-1* 基因(NM_001077828.1)序列比对发现,第 316 位存在一个碱基差异(T $\rightarrow$ C),为同义突变。序列分析表明,该序列包含一个长度为 465 bp 的完整开放阅读框(图 2),编码 154 个氨基酸;76 bp 处为起始密码子(ATG),540 bp 处为终止密码子(TAG),碱基组成为 A = 22.58%、G = 28.60%、T = 21.29%、C = 27.53%,C + G (56.13%)高于 A + T (43.87%),说明 *IGF-1* 基因编码区的 DNA 双链比较稳定。

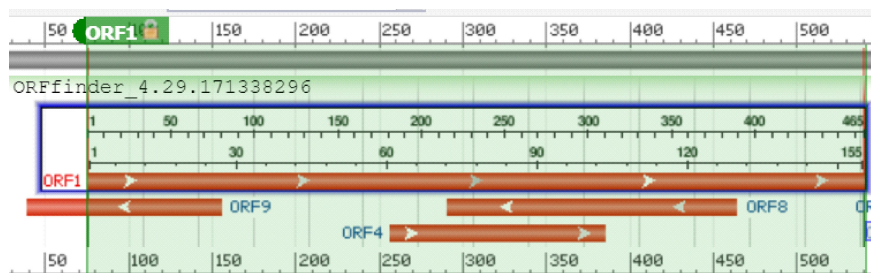


图 2 *IGF-1* 基因开放阅读框分析

Fig.2 The open reading frame analysis of *IGF-1* gene

2.3 *IGF-1* 蛋白基本理化性质分析

基本理化性质分析表明,天祝白牦牛 IGF-1 蛋白分子式为 C₇₄₄H₁₁₈₆N₂₁₄O₂₁₆S₁₅,分子质量为 17 065.81 ku,理论等电点为 9.36;含 20 种氨基酸(表 2),其中亮氨酸 Leu (9.7%)、丙氨酸 Ala (9.7%)的频率最高,其水溶液在 280 nm 处的消光系数为 8 075,半衰期为 30 h,不稳定系数为 55.06,属于不稳定蛋白。亲/疏水性预测结果显示(图 3),该基因编码的蛋白质疏水性最大值为

2.756(第 37 位),最小值为 -1.978(第 127 位),总平均亲水性为 -0.249,为亲水性蛋白。

2.4 *IGF-1* 蛋白信号肽与跨膜结构预测

天祝白牦牛 IGF-1 蛋白信号肽预测分析结果如图 4 所示,Y-max 为 0.671、C-max 为 0.631、S-max 为 0.903,均大于阈值 0.5,表明该蛋白存在信号肽区域,为分泌蛋白,氨基酸序列在 1~49 区域的 S 值较高,预测为信号肽区域;IGF-1 蛋白跨膜结构预测结果如图 5 所示,该蛋白存在一个

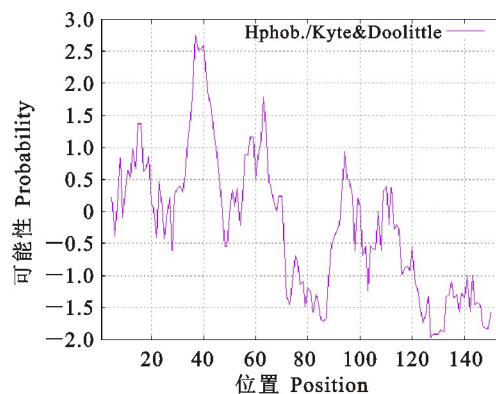
跨膜结构。

表 2 IGF-1 编码蛋白中氨基酸的含量

Table 2 Amino acid content of protein

encoded by *IGF-1* gene %

序号 Number	氨基酸 Amino acid	含量 Content
1	Ala	8.4
2	Arg	7.1
3	Asn	2.6
4	Asp	3.9
5	Cys	6.5
6	Gln	3.9
7	Glu	3.2
8	Gly	6.5
9	His	1.9
10	Ile	1.9
11	Leu	9.7
12	Lys	7.1
13	Met	3.2
14	Phe	5.8
15	Pro	5.2
16	Ser	9.7
17	Thr	5.8
18	Trp	0.0
19	Tyr	3.2
20	Val	3.9



正值表示疏水, 负值表示亲水 Positive values indicate hydrophobic and negative values indicate hydrophilic

图 3 白牦牛 IGF-1 蛋白亲/疏水性预测

Fig. 3 Prediction of hydrophilicity/hydrophobicity of white yak IGF-1 protein

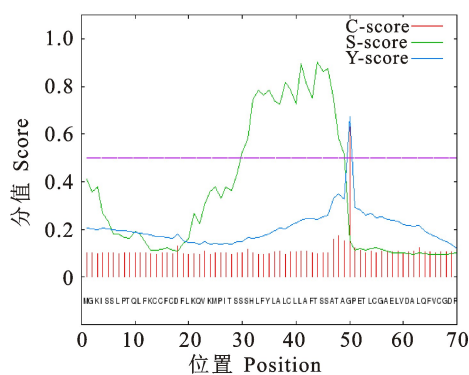


图 4 白牦牛 IGF-1 蛋白信号肽预测

Fig. 4 Prediction of signal peptide of white yak IGF-1 protein

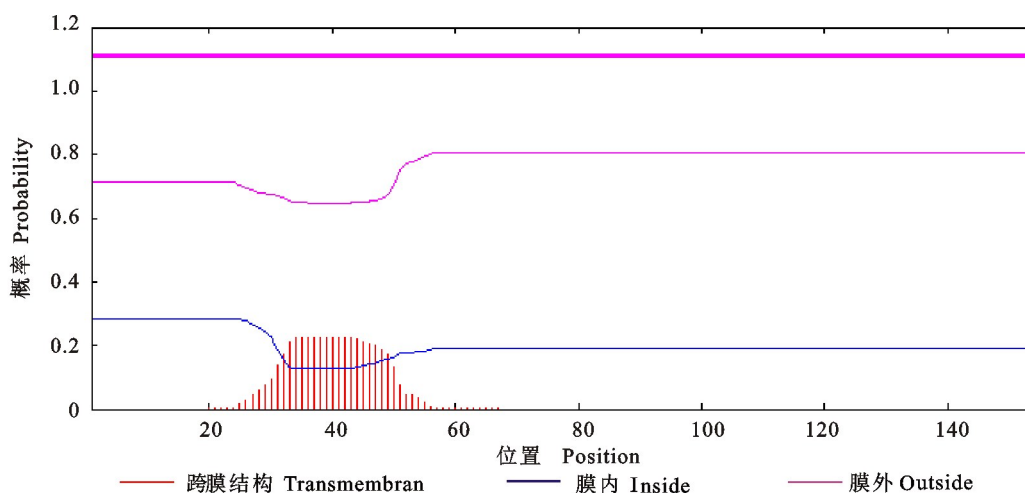


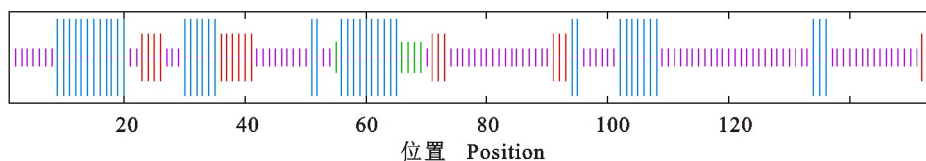
图 5 白牦牛 IGF-1 蛋白跨膜结构预测

Fig. 5 Prediction of transmembrane structure of white yak IGF-1 protein

2.5 IGF-1 蛋白二、三级结构分析

天祝白牦牛 IGF-1 蛋白二级结构预测结果显示,主要由 α -螺旋(27.27%)、 β -转角(3.25%)、无规则卷曲(57.79%)和 11.69%的延伸链组成(图

6);三级结构预测结果与二级结构预测结果基本一致(图 7)。三级结构以 3Iri. 1. A 为模板,序列相似度为 87.34%,符合同源建模法中序列相似度大于 35%的要求。



图中竖线按照由长到短递减依次表示 α -螺旋、延伸链、 β -转角、无规则卷曲 The vertical lines in the graph according to descending order indicated alpha helix, extended strand, beta turn and random coil, respectively

图 6 白牦牛 IGF-1 蛋白二级结构预测

Fig. 6 Prediction of secondary structure of white yak IGF-1 protein

IGF-1 基因在哺乳动物进化过程中比较保守。



图 7 IGF-1 蛋白三级结构预测

Fig. 7 Prediction of tertiary structure of white yak IGF-1 protein

2.6 IGF-1 蛋白结构域及亚细胞定位分析

天祝白牦牛 IGF-1 蛋白包含一个结构域,第 52(Glu)至第 110(Cys)位氨基酸为 Insulin / insulin-like growth factor / relaxin family(IIGF) 家族典型的保守结构功能域(图 8);IGF-1 亚细胞定位预测结果表明:IGF-1 蛋白在细胞核、线粒体、细胞外、细胞质、内质网、分泌系统囊泡中分别占 65.2%、17.4%、4.3%、4.3%、4.3%和 4.3%,在细胞核中分布最多。

2.7 IGF-1 基因同源性分析

利用 MEGA 7.0 软件对天祝白牦牛、黄牛、梅花鹿、马鹿、山羊、绵羊、野猪、仓鼠、田鼠、鼠兔等物种的 IGF-1 氨基酸序列进行同源性分析,并构建系统发育树(图 9)。结果显示:天祝白牦牛与黄牛亲缘关系最近,同源性为 100%;其他依次为绵羊 98%、梅花鹿 98%、马鹿 97%、野猪 97%、山羊 96%、仓鼠 92%、田鼠 90%、鼠兔 90%,表明

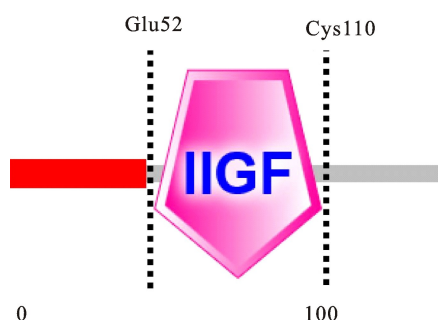


图 8 白牦牛 IGF-1 蛋白结构域

Fig. 8 Protein domains of white yak IGF-1

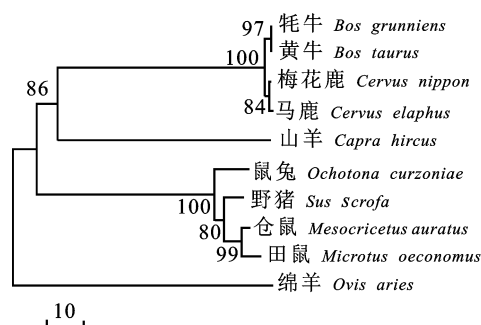
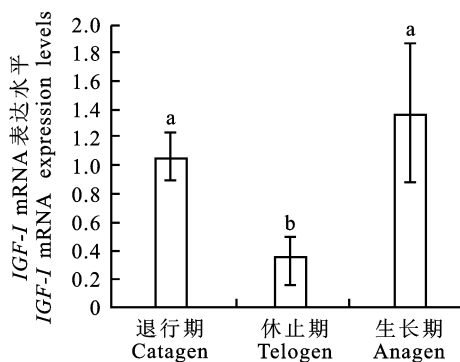


图 9 IGF-1 基因系统发育树

Fig. 9 Phylogenetic tree of IGF-1 gene

2.8 qRT-PCR 技术检测 IGF-1 基因相对表达量

qRT-PCR 技术检测 IGF-1 基因在牦牛毛囊发育不同时期的表达水平,结果表明(图 10),在 3 个时期均能检测到 IGF-1 基因的表达,并且在生长期表达量最高,休止期表达量最低,生长期和退行期的表达量显著高于休止期($P < 0.05$),退行期表达量与生长期无显著差异($P > 0.05$)。



上标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different letter on the bar indicates statistical difference ($P < 0.05$)

图 10 毛囊发育周中期皮肤组织
IGF-1 基因的 mRNA 表达水平

Fig. 10 mRNA expression level of *IGF-1*
in the skin of during hair cycle

3 讨论

本研究通过克隆白牦牛 *IGF-1* 基因 CDS 区, 分析其序列特征, 探究 *IGF-1* 基因在毛囊周期性发育中的功能。将获得的天祝白牦牛 *IGF-1* 基因的编码区序列与黄牛的序列比对, 发现第 316 位发生 1 个碱基突变 (TAT→TAC), 为同义突变。以往基因同义突变被认为不会引起功能性的变化, 但近年来研究发现在密码子高度保守的区域内存在一种同义突变, 影响基因表达、翻译效率或蛋白质折叠速率及蛋白质构象, 甚至是蛋白质功能^[22]。对 *IGF-1* 氨基酸序列预测显示, 其编码 154 个氨基酸, 是不稳定蛋白质; 贾浩等^[23]研究表明, 蛋白质的半衰期与其稳定性呈正相关, 而在本研究中 *IGF-1* 蛋白半衰期较长为 30 h, 却不是稳定性蛋白, 这一研究结果与贾浩等^[23]的研究报道不符, 天祝白牦牛 *IGF-1* 基因出现这种不一致的特性, 可能与其特殊的作用方式及与 IGFS 家族内相关受体作用有关, 需进一步研究和探讨。各物种氨基酸序列同源性分析发现, 天祝白牦牛与黄牛 *IGF-1* 氨基酸序列同源性为 100%, 相似度最高, 不同物种之间 *IGF-1* 基因存在较高保守性, 这意味着该基因在人、小鼠、绒山羊、牦牛等多种哺乳动物皮肤毛囊中的作用具有相似性; 天祝白牦牛 *IGF-1* 蛋白结构域预测结果表明, 该蛋白在第 52~110 位氨基酸含有一个 Insulin / insulin-like growth factor / relaxin family (IIGF) 家族典型的保守结构功能域, 为该基因功能的深入研究提供理论参考。

毛发的生长主要受毛囊和其他表皮细胞间的相互作用影响, 毛囊周期性循环过程中毛囊细胞的激活以及新旧毛干的交替受多个生长因子和信号通路的共同调控。*IGF-1* 通过与其受体结合促进 *IGF-1R* 酪氨酸残基磷酸化, 也可通过 MAPK、ERK1/2 信号通路, 激活 *IGF-1* 的生物学效应, 从而触发下游反应, 最终刺激细胞分裂, 调控动物的生长发育^[24-26]。研究 *IGF-1* 基因在天祝白牦牛皮肤组织中的表达趋势发现, 该基因在毛囊发育不同时期均有表达, 但毛囊发育生长期 *IGF-1* 表达量显著高于休止期, 这与魏玉青^[12]和刘道等^[19]的研究结果基本一致。由于生长期毛囊生长处于最活跃的状态, 此时毛乳头持续增大且毛囊隆突部的干细胞迅速增殖, 毛母质细胞的增殖分化能力不断增强, 使得毛囊和毛干不断生长^[27-28], 推测 *IGF-1* 可能在毛囊生长期刺激毛囊增殖分化中发挥重要作用。此外, *IGF-1* 能够通过激活 RNA 聚合酶等活性, 来促进非组蛋白的磷酸化, 同时增加 mRNA 水平^[29]。近年来研究发现在毛囊发育过程中 *IGF-1* 被认为具有调节细胞增殖和迁移的作用, 需通过与特定的细胞表面受体结合来激活细胞, 进而发挥其生物学作用^[24,30], 同时 *IGF-1* 在许多细胞类型中被认为是一种抗凋亡的生存因子, 可能在毛囊周期的生长期抑制细胞凋亡, 从而维持毛囊生长期^[31]。由此推断 *IGF-1* 基因可能通过刺激毛囊细胞的生长活动参与调控白牦牛毛囊发育及其周期性变化。由于毛囊的周期性活动是由众多生长促进和抑制因子之间严格控制的平衡和相互作用来调节的, 是一个复杂的调节网络, 因此 *IGF-1* 自身以及与其他因子的相互作用对哺乳动物毛囊发育及其毛发生长的调控机理还需进一步探索。

4 结论

通过 RT-PCR 技术成功克隆天祝白牦牛 *IGF-1* 基因 CDS 序列, 并研究发现 *IGF-1* 基因在白牦牛毛囊发育不同时期皮肤组织中呈规律性表达。表明 *IGF-1* 基因参与调控白牦牛毛囊的生长及毛囊的周期性循环, 为解析白牦牛毛囊发育及被毛生长提供理论依据, 同时也为研究 *IGF-1* 基因在白牦牛毛囊生长发育中的作用机制提供理论基础。

参考文献 Reference:

- [1] 牛春娥, 张利平, 高雅琴, 等. 天祝白牦牛被毛组织结构及超

- 微结构[J]. 纺织学报, 2010, 31(2): 14-18.
- NIU CH E, ZHANG L P, GAO Y Q, *et al.* Histological structure and ultrastructure of Tianzhu white yak hair[J]. *Journal of Textile Research*, 2010, 31(2): 14-18.
- [2] 薛天柱. 天祝白牦牛种群品质保护探索[J]. 畜牧兽医杂志, 2017(5): 104-105.
- XUE T ZH. Exploration of Tianzhu white yak population quality protection[J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017(5): 104-105.
- [3] 李娜, 孔德清, 张若竹, 等. 内蒙古绒山羊毛囊形态发生规律[J]. 西北农业学报, 2013, 22(3): 33-37.
- LI NA, KONG D Q, ZHANG R ZH, *et al.* Hair follicle morphogenesis in Inner Mongolian cashmere goat embryos[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2013, 22(3): 33-37.
- [4] ALONSO L, FUCHS E. The hair cycle[J]. *Journal of Cell Science*, 2006, 119(119): 391-393.
- [5] 宋静, 杨发龙, 陈刚, 等. 青海藏系绵羊毛囊生长周期性变化的研究[J]. 中国兽医杂志, 2016(5): 43-44.
- SONG J, YANG F L, CHEN G, *et al.* Study on the growth cycle of Tibetan sheep hair follicles in qinghai province[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2016(5): 43-44.
- [6] 卢光, 郁枫, 任志丹. 牦牛胚胎皮肤及其附属物形态发生规律[J]. 西北农业学报, 2011, 20(2): 21-26.
- LU G, YU F, REN ZH D. Morphogenesis of yak embryonic skin and its appendages[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2011, 20(2): 21-26.
- [7] COTSARELIS G, MILLAR S E. Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2001, 7(7): 293-301.
- [8] BERNARD B A. Advances in understanding hair growth[J]. *Fresearch*, 2016, 5.
- [9] PAUS R, COTSARELIS G. The biology of hair follicles[J]. *The New Englang Journal of Medicine*, 1999, 341(7): 491-497.
- [10] YANG X, CUI Y, YUE J, *et al.* The histological characteristics, age-related thickness change of skin, and expression of the HSPs in the skin during hair cycle in yak (*Bos grunniens*)[J]. *Plos One*, 2017, 12(5): e0176451.
- [11] LITTLE J C, WEWGTGATE G E, EVANS A, *et al.* Cytochrome gene expression in intact anagen rat hair follicles[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 1994, 103(5): 715-720.
- [12] 魏玉青. 绒山羊皮肤组织中 IGF-1 家族的表达及作用机理研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.
- WEI Y Q. Research on the expression and mechanism of IGF-1 family in skin tissues of cashmere goats [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016.
- [13] 李桂芳, 赵宗胜, 李大全. 胰岛素样因子 (IGF-I) 对绵羊毛囊体外培养的研究[J]. 生物技术, 2005, 15(5): 28-29.
- LI G F, ZHAO Z SH, LI D Q. Research on insulin-like growth factor-I (igf-1) of hair follicle growth in vitro[J]. *Biotechnology*, 2005, 15(5): 28-29.
- [14] 胡帅鹏, 杨姗姗, 姬凯元, 等. IGF1 和 IGF1R 在小鼠第一个毛囊生长周期皮肤的表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016(6): 699-705.
- HU SH P, YANG SH SH, JI K Y, *et al.* Expression of IGF-1 and IGF1R in mouse skins at first hair follicle cycle [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2016(6): 699-705.
- [15] 王婷, 邢海权, 曹靖, 等. IGF-1 对羊驼皮肤成纤维细胞作用的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(6): 880-887.
- WANG T, XING H Q, CAO J, *et al.* Study on the effect of Insulin like growth factor 1 (IGF-1) on the alpaca skin fibroblasts[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2013, 44(6): 880-887.
- [16] STENN K S, PAUS R. Controls of hair follicle cycling[J]. *Physiological Reviews*, 2001, 81(1): 449.
- [17] WEGER N, SCHLAKE T. Igf-I signalling controls the hair growth cycle and the differentiation of hair shafts[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2005, 125(5): 873-882.
- [18] BHORA F Y, DUNKIN B J, BATZRI S, *et al.* Effect of growth factors on cell proliferation and epithelialization in human skin[J]. *Journal of Surgical Research*, 1995, 59(2): 236-244.
- [19] 刘道, 姜玉杰. 吉林白鹅毛囊发育及 IGF-1、EGF 基因对其发育调控的影响[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(7): 1424-1429.
- LIU X, LOU Y J. Development of feather follicle and regulating effect of IGF-1 and EGF gene on its development in Jilin white goose[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2018, 38(7): 1424-1429.
- [20] TRUEB, RALPH M. Further clinical evidence for the effect of IGF-1 on hair growth and alopecia[J]. *Skin Appendage Disorders*, 2018, 4(2): 90-95.
- [21] 薛庆中. DNA 和蛋白质序列数据分析工具[M]. 北京: 科学出版社 2012: 71-105.
- XUE Q ZH. DNA and Protein Sequence Data Analysis Tool[M]. Beijing: Science Press, 2012: 71-103.
- [22] CHANEY J L, CLARK P L. Roles for synonymous codon usage in protein biogenesis[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2015, 44(1): 143-166.
- [23] 贾浩, 张小白, 宋晓峰. 人类胞内蛋白半衰期与其亚细胞定位的相关性研究[J]. 计算机与应用化学, 2011, 28(4): 411-414.
- JIA H, ZHANG X B, SONG X F. Correlation between human intracellular protein half-life and its subcellular localization[J]. *Computers and Applied Chemistry*, 2011, 28(4): 411-414.
- [24] PEUS D, PITTELKOW M R. Growth factors in hair organ development and the hair growth cycle[J]. *Dermatologic Clinics*, 1996, 14(4): 559-572.
- [25] ULLRICH A, SCHLESSINGER J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity[J]. *Cell*, 1990, 61(2): 203-212.
- [26] 王恭远. 不同发育阶段小鼠皮肤 IGF-1、IGF-1R、NGF、VEGF、FGF5 作用的研究[D]. 山西太谷: 山西农业大学, 2014.
- WANG G Y. Effect of IGF-1, IGF-1R, NGF, VEGF, FGF5 on different development stages of mouse skin[D]. Taigu Shanxi: Shanxi Agricultural University, 2014.
- [27] SAXENA N, MOK K W, RENDL M. An updated classification of hair follicle morphogenesis[J]. *Experimental Dermatology*, 2019, 28(4): 332-344.
- [28] BAKER R E, MURRAY P J. Understanding hair follicle

- cycling: a systems approach[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2012, 22(6): 607-612.
- [29] 安 静. IGF1 在绵羊成肌细胞增殖与分化中的作用[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2013.
- AN J. The role of IGF1 in proliferation and differentiation of sheep myoblast abstract[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2013.
- [30] 韩 营, 任战军, 常万波, 等. 不同能量水平对断奶獭兔皮肤组织 *IGF-1* 和 *IGF-1R* 基因表达的影响[J]. 西北农业学报, 2014, 23(1): 17-22.
- HAN Y, REN ZH J, CHANG W B, *et al.* Effects of different dietary energy on *IGF-1* and *IGF-1R* gene expressions in skin tissue of weanling rex rabbits[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2014, 23(1): 17-22.
- [31] STEWART C E, ROTWEIN P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors[J]. *Physiological Reviews*, 1996, 76(4): 1005-1026.

Cloning, Bioinformation Analyzing, and Expressional Detecting for *IGF-1* in Tianzhu White Yak

CHANG Yongfang¹, BAO Pengjia², ZHANG Yongfeng², FU Donghai²,
WU Xiaoyun², CHU Min² and YAN Ping^{1,2}

(1. College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China;

2. Key Laboratory of Yak Breeding Engineering of Gansu Province, Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China)

Abstract The purpose of this study is to obtain the sequence and molecular structure of *IGF-1* gene from Tianzhu white yak, to analyze expression pattern in the development cycle in yak hair follicles, to provide a theoretical basis for analyzing the development of hair follicles and hair growth of Tianzhu white yak. Therefore, in the experiments, the skin of Tianzhu white yak was chosen as experimental material, and the full-length coding sequence(CDS) of yak *IGF-1* gene was cloned. The cloned *IGF-1* gene CDS was compared with the cattle sequence and analyzed by related softwares and *IGF-1* mRNA expression of Tianzhu white yak hair follicle development was detected in the anagen, catagen and telogen by real-time quantitative PCR (qPCR). The results showed that the CDS of *IGF-1* was 465 bp in length, encoded 154 amino acid with the molecular mass of protein of 17 065. 81 ku and the theoretical isoelectric point was 9. 36. The secondary structure of *IGF-1* protein mainly contained random coil (57. 79%) and α -helix (27. 27%). The sequence analysis showed that *IGF-1* protein of Tianzhu white yak was an unstable hydrophilic protein. The results of qPCR showed that *IGF-1* gene was expressed in the anagen, catagen and telogen of yak hair follicles, and the expression was significantly higher in the telogen than those of anagen and catagen. This study revealed the molecular structure characteristics of the *IGF-1* encoding sequence of Tianzhu white yak and the expressional characteristics in the development cycle of yak hair follicle, providing theoretical basis for the biological function that *IGF-1* regulates the hair follicle development in Tianzhu white yak.

Key words *IGF-1* genes; Tianzhu white yak; Clone; Bioinformatics

Received 2019-06-05

Returned 2019-08-08

Foundation item The National Beef Cattle Industry Technology & System (No. CARS-37); the Agricultural Science and Technology Innovation Program (No. CAASASTRP-2014-LIHPS-01).

First author CHANG Yongfang, female, master student. Research area: animal genetics, breeding and reproduction. E-mail: 1500507897@qq.com

Corresponding author YAN Ping, female, research fellow. Research area: animal genetics, breeding and reproduction. E-mail: ping.yanz@163.com

(责任编辑: 顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)