

猪 GH 基因部分多态特征与早期体重的相关研究

陶 勇¹, 经荣斌², 任善茂¹, 宋成义², 张金存³, 陈华才³

(1. 江苏省畜牧兽医职业技术学院, 泰州 225300; 2. 扬州大学畜牧兽医学院, 扬州 225009;

3. 江苏省姜堰市种猪场, 姜堰 225500)

摘要: 试验采用 PCR-RFLP 技术, Bsp I、Hha I 两种限制性内切酶, 检测到猪生长激素基因-119~+486 位共 605bp 片段中的 3 处碱基突变位点(+193, +330, +379), 分析比较了各多态位点对姜曲海猪早期体重的影响。结果发现: 姜曲海猪群中, Bsp I 酶切产生的三种基因型个体的早期平均体重间没有差异, 但 A₁A₁ 基因型个体早期的平均体重略高于其它两种基因型个体。Hha I 酶切产生的不同基因型中, C₁C₂ 型个体在 20 日龄、70 日龄的平均体重均显著地高于 C₁C₄ 基因型个体的体重 ($P < 0.05$)。

关键词: 猪生长激素基因; 多态性; 早期体重

中图分类号: S828.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2003)03-0217-04

生长激素 (Growth hormone, GH) 是由动物脑垂体前叶嗜酸性细胞合成和分泌的单一肽链的蛋白质激素, 在多种生理功能中起着非常重要的作用, 对调节动物的新陈代谢, 加快生长速度, 提高饲料报酬以及改善胴体组成等方面均有显著的作用^[1]。而生长激素基因则是一种重要的生理功能基因, 对生长激素的合成、分泌进行着直接的调控。目前, 猪的生长激素基因已经被定位于 12 号染色体的 P^{1.2}-P^{1.5} 区域内^[2], 1987 年 Vice 等人测定该基因全长 2231 bp, 由 5 个外显子和 4 个内含子组成^[3]。国内外学者对猪 GH 基因结构已经进行了大量的基础性工作, 并研究发现在不同猪生长激素基因的编码区和非编码区的核苷酸序列上存在着许多的差异, 表现出了丰富的多态, 有的碱基突变引起了氨基酸的变异^[4-10]。但是, 猪 GH 基因研究工作目前仍集中在多态位点的寻找, 研究区域也主要集中在 5' 端到第三外显子起始处, 而且对于由碱基突变而产生的基因多态性与生长性能、胴体品质、肌肉品质间的相关关系的研究报道也很少。鉴于此, 本试验采用 PCR-RFLP 技术检测了姜曲海猪生长激素基因的-119~+486 区域内的遗传变异, 并统计分析了不同基因型个体间的早期体重之间的差异, 以期筛选出对经济性状有显著影响的位点, 从而为我国地方猪种

的改良和选育提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试猪为江苏省姜堰市种猪场饲养的姜曲海猪, 共计 73 头。初生重、20 日龄体重、45 日龄体重、70 日龄体重均录自该场的生产记录。

TaqDNA 聚合酶、Bsp I、Hha I 内切酶、4dNTP 购自加拿大生物工程公司(上海); pGEM7zf(+)/Hae III Marker 标记购自华美生物工程公司; 其它试剂及常用消耗品均购自国内公司。

参照已发表的猪 GH 基因的全序列进行引物设计, 并由上海生物工程公司合成。具体序列为: Primer 1: -5' TTATC CATTG GCACA TGCCT GCCAG3' -;

Primer 2: -5' CTGGG GAGCT TACAA ACTCC TT3' -

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取: 参照文献[11]、[12], 采用改进的方法。每头供试猪采集 20~30 根猪毛, 剪取毛囊部 0.5 cm 并放入 Ependoff 管中, 加入 1 ml 细胞裂解液 5 ml 蛋白酶 K (10 mg/ml) 于 37℃ 孵育 2~3 h。冷却后用氯仿: 异戊醇 (24:1) 提取 3~4 次, 取上清液加无水乙醇在 -20℃ 沉淀过夜, 次日用 70% 的冰乙醇沉淀两次, 待乙醇挥发尽后, 加 TE 溶解, 在 -20℃ 贮存备用。

1.2.2 PCR 扩增: 25 μl 反应体系: 模板 DNA 1.5 μl; 10 × Buffer 2.5 μl; 4 × dNTP (2.5 mmol/L) 1 μl;

收稿日期: 2001-11-15

基金项目: 江苏省农业新技术革命项目 (DE98503-11)

作者简介: 陶勇 (1975-), 男, 汉, 江苏仪征人, 讲师, 硕士, 主要从事动物遗传与繁育。

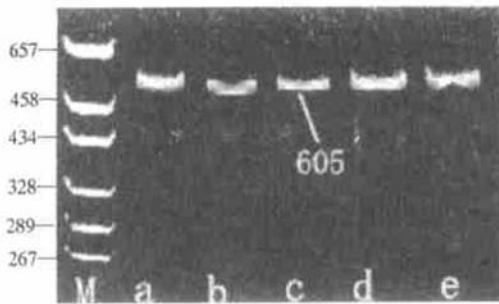


图 1 PCR 扩增产物分子量标记

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product from GH gene a, b, c, d, e: 605 bp PCR product; M: pGEM7Zf(+)/Hae III Marker

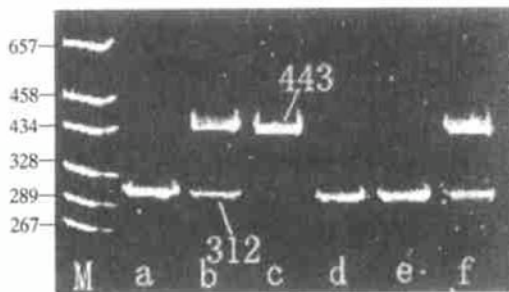


图 2 605 bp PCR 产物 Bsp I 酶切图谱

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of Bsp I digested PCR product a, d, e: A₂A₂ genotype; b, f: A₁A₂ genotype; c: A₁A₁ genotype; M: pGEM7Zf(+)/Hae III Marker

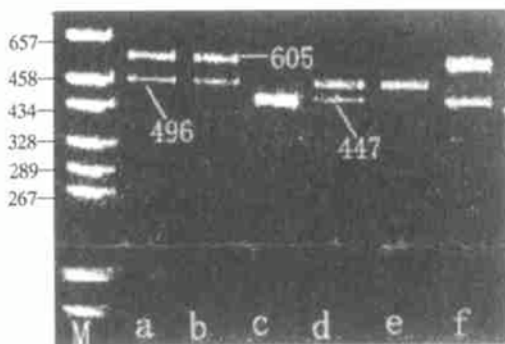


图 3 605 bp PCR 产物 Hha I 酶切图谱

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of Hha I digested PCR product a, b: C₁C₂ genotype; c: C₁C₄ genotype; d: C₂C₄ genotype; e: C₂C₂ genotype; f: C₁C₄ genotype; M: pGEM7Zf(+)/Hae III Marker

MgCl₂(25 mmol/L) 2.25 μl; Primer(6 pmol/L) 各 1 μl; Taq DNA 聚合酶 0.5 U。

扩增条件: 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 45 s, 59 °C 60 s, 76 °C 90 s, 共 30 个循环; 76 °C 延伸 10 min。

1.2.3 RFLP 分析: 取 PCR 产物 10 μl 加入一种限制性内切酶(Bsp I, Hha I) 8U 及相应的 Buffer 缓

冲液 双蒸水, 37 °C 水浴孵育 2~3 h。酶切产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 缓冲液为 1 × TBE, 用 pGEM7Zf(+)/Hae III Marker 标记, 180 V 恒压 1 h, 溴化乙锭(EB) (0.5 μg/ml) 染色 30 min, 在紫外灯下观察结果并拍照保存。

1.3 统计分析

采用 SPSS 统计分析软件建立原始数据库, 并进行统计分析。

2 结果

2.1 GH 基因多态性

试验中所扩增的猪 GH 基因 -119~+486 区域共 605 bp 片段中含有丰富的多态, 突变位点在内含子和外显子中都有分布。本试验选择 Bsp I、Hha I 两种限制性内切酶来检测姜曲海猪群的位点突变情况, 其识别序列分别为: 5' G ↓ GGCC 3' 和 5' G ↓ CGC 3'。所扩增的 605 bp 片段分别用 Bsp I、Hha I 酶切之后, 均产生了遗传多态性, 变异图谱如图 2、3 所示。根据 Vice Larsen 等人的研究报告, 在姜曲海猪群中检测到: Bsp I 酶切之后产生的 A₁A₁ (443 bp)、A₁A₂ (443 bp、312 bp) 和 A₂A₂ (312 bp) 三种基因型个体; Hha I 酶切产生的 C₁C₂ (605 bp、469 bp)、C₁C₄ (605 bp、447 bp)、C₂C₂ (496 bp)、C₂C₄ (496 bp、447 bp) 和 C₄C₄ (447 bp) 5 种基因型个体。本试验中所检测到的片段大小与他人的报道完全相符, 但在该群体中没有检测到 Hha I 的等位基因 C₁, 也没有检测到纯合的 C₁C₁ 基因型个体。

2.2 GH 基因多态性与早期体重间的相关关系分析

本试验利用姜曲海猪的生产资料, 分析比较 Bsp I、Hha I 两种限制性内切酶酶切突变位点中的不同基因型对早期体重的影响。Bsp I 和 Hha I 酶切突变位点不同基因型对姜曲海猪早期体重的影响差异见表 1、2。其中 Bsp I 酶切产生的不同基因型个体的早期体重间没有差异, 但 A₁A₁ 基因型个体的早期体重均略高于其它两种基因型个体的早期体重。Hha I 酶切产生的不同基因型个体间, C₁C₂ 型个体在 20 日龄、70 日龄的体重均显著地高于 C₁C₄ 基因型个体的体重 (P < 0.05), 而 C₁C₂ 基因型个体、C₁C₄ 基因型个体与其它基因型个体体重的差异均不显著。而不同基因型个体在初生、45 日龄时的体重间也没有显著差异。

表 1 Bsp I 不同基因型对姜曲海猪早期体重的影响
Table 1 Effects of different Bsp I genotypes on Jiangquhai pigs' early weight

体重(kg) Body weight	基 因 型 Genotype		
	A ₁ A ₁ (n= 10)	A ₁ A ₂ (n= 21)	A ₂ A ₂ (n= 34)
初生重 Birth weight	1.5600 ± 0.1056	1.5381 ± 0.2519	1.5265 ± 0.2340
20 日龄 Day	6.6900 ± 1.0225	6.3381 ± 1.2359	6.3588 ± 1.2735
45 日龄 Day	18.5700 ± 2.7833	17.2000 ± 3.1130	16.3588 ± 3.8479
70 日龄 Day	36.4500 ± 5.3200	36.6667 ± 9.4942	35.5941 ± 8.3368

表 2 Hha I 不同基因型对姜曲海猪早期体重的影响
Table 2 Effects of different Hha I genotypes on Jiangquhai pigs' early weight

体 重 Body weight	基 因 型 Genotype				
	C ₁ C ₂ (n= 30)	C ₁ C ₄ (n= 14)	C ₂ C ₂ (n= 6)	C ₂ C ₄ (n= 6)	C ₄ C ₄ (n= 9)
初生重 Birth weight	2.0800 ± 2.8277	1.5714 ± 0.1437	1.5833 ± 0.3430	1.4167 ± 0.2137	1.5333 ± 0.2739
20 日龄 Day	6.7300 ± 1.0313 ^a	5.9286 ± 1.3837 ^b	6.6667 ± 1.0577	6.2167 ± 1.1923	5.9889 ± 1.5260
45 日龄 Day	17.1300 ± 3.4124	16.3786 ± 3.6501	18.4500 ± 2.4607	18.6167 ± 3.8254	16.1444 ± 3.5313
70 日龄 Day	38.1867 ± 5.5905 ^a	32.6286 ± 9.3069 ^b	37.6667 ± 8.8638	32.1500 ± 5.3687	35.9222 ± 13.1354

同一日龄同一行小写字母不同者差异显著($P < 0.05$)。平均数 ± 标准差(Mean ± SD)

The means with different small letter within the same row in the same date is significantly different ($P < 0.05$)

3 讨 论

试验使用 Bsp I、Hha I 在所扩增的区域内共检测到 3 个多态位点, 突变位点所在位置与其他学者的报道相一致。其中 Bsp I 检测到的 + 193 位突变位于第一内含子中, 故具体的序列没有测定。Hha I 在 + 330、+ 379 位检测到的突变位点位于第二外显子内, 根据已经发表的 GH 基因序列可推测, + 330 位突变可能为 C/T 突变, + 379 位为 G/A 突变, 这两处的突变均可能导致氨基酸的替换。因而, 这两处突变位点均有可能成为有效的遗传标记。

Hha I 识别的突变位点所产生的不同基因型对姜曲海猪的 20 日龄、70 日龄体重的影响差异显著, 这可能是由于这两处的突变对 GH 基因的表达产生影响, 从而影响到个体的生长发育。因此, 扩大样本量, 进一步分析不同基因型对血浆中的 GH 浓度及生长速度等生产性能的效应显得很有必要。

本次试验没有发现姜曲海猪群体中 Bsp I 酶切突变产生的不同基因型个体在早期体重上产生显著差异。但由于试验中样本量较少以及其它影响因素的存在, 目前还不能肯定猪 GH 基因在 + 193 位的突变对早期体重没有影响, 因此, 其中的相关关系也值得做继续深入的研究。

参考文献:

- [1] Etherton T D. Biology of somatotrophin in growth and lactation of domestic animals[J]. *Physio Rev*, 1998, 78: 745 ~ 761.
- [2] Yerle M, Mansais Y, Thomsen P D, et al. Location of the porcine hormone gene to chromosome 12P^{1.2}-P^{1.5}[J]. *Animal Genetics*, 1993, 24(2): 129~ 131.
- [3] Vize P D, Wells J R E. Isolation and characterization of the porcine growth hormone gene[J]. *Gene*, 1987, 55: 339~ 344.
- [4] Nielson V H, Larsen N J. Restriction fragment length polymorphisms at the growth hormone gene in pigs[J]. *Animal Genetics*, 1997, 22(3): 291~ 294.
- [5] Larsen N J, Nielsen V H. Apa I and Cfo I polymorphisms in the porcine growth hormone gene[J]. *Animal Genetics*, 1993, 24(1): 71.
- [6] Balatsky V N. Multiple forms of pigs somatotrophin and growth hormone gene polymorphisms[J]. *Appl Livest Prod*, 1994, 21: 144~ 147.
- [7] Kirkpatrick B W. Hae II and Msp I polymorphisms are detected in the second intron of the porcine growth hormone gene[J]. *Animal Genetics*, 1992, 23(2): 180~ 181.
- [8] Kirkpatrick B W, Huff B M, Casas-Carrillo E. Double-strand DNA conformation polymorphisms as a source of highly genetic markers[J]. *Animal Genetics*, 1993, 24

- (3): 155~ 161.
- [9] 姜志华, Roffmann O J, Pirchner F. 猪生长激素基因第二外显子区域遗传变异的基础[J]. 南京农业大学学报, 1997, 20(2): 67~ 71.
- [10] 陶勇, 经荣斌, 宋成义, 等. 猪生长激素基因座位 Bsp I Hha I 酶切片断多态特征的研究[J]. 华中农业大学学报, 2001.
- [11] 宋成义, 经荣斌, 陶勇, 等. 猪 GH 基因部分突变位点对生产性能的影响[J]. 遗传, 2001, 23(5): 427~ 430.
- [12] J 萨姆布鲁克, EF 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯(金冬雁等译). 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社(第二版), 1992.

The Study on the Relationships between Some Polymorphism Restriction Sites of Porcine GH Gene and the Early Bodyweight

TAO Yong¹, JING Rong-bin², REN Shan-mao¹, SONG Cheng-yi², ZHANG Jir-cun³, CHEN Hua-cai³
 (1. Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary College, Taizhou 225300;
 2. Yangzhou University, Yangzhou 225009;
 3. Jiangyan Pig Breeding Farm of Jiangsu Province, Jiangyan 225500)

Abstract: The genotypes of 73 Jiangquhai pigs at GH gene from - 119~ + 486 were detected by PCR-RFLP. The PCR products were cut by Bsp I and Hha I, and produced three polymorphism sites: one for Bsp I at + 193, two for Hha I at + 330 and + 379. Effects of different genotypes on early bodyweight were analyzed. The results showed that no significant differences were observed among different Bsp I genotypes, while 20-day and 70-day bodyweight of the pigs with C₁C₂ genotype were significantly higher than that of pigs with C₁C₄ genotype ($P < 0.05$).

Key words: Porcine GH gene; Polymorphisms; Early bodyweight

有交流才有盛会, 有盛会才有相知

——真诚欢迎学者参加中国畜牧兽医学会 2003 年学术年会

一、背景: 中国畜牧兽医学会 1936 年成立以来已走过 67 年的历程。在几代科学家的辛勤耕耘培育下, 成为我国畜牧兽医学术界的著名团体。倍受广大科技人士的关爱, 倍受政府、院校、科研单位的支持。目前, 学会拥有 34 个学科分会近 6 万名会员, 涉及面广, 影响力之大在农科学会中十分显著……。

二、年会主题: 质量、标准、安全

三、主题发言人有贾幼陵、吴常信、沈荣显、区仲生、谢庆阁、李德发、杨汉春、林德贵教授。另有旭日干、陈章良、张子仪、熊远著教授莅临会议并指导。(内容见 272 页)

四、日程安排: 8 月 19 日报到 8 月 20 日大会开幕式及主题报告; 晚上: 招待会; 中国畜牧兽医学会原理事长陈凌风先生 90 寿辰庆典 8 月 21 日四个分会场会议; 晚上: 庆祝《中国畜牧杂志》、《中国兽医杂志》创刊五十周年招待会 8 月 22 日上午: 理事会及秘书长会; 小动物临床医学分会会场活动

五、参会代表须知(略)

联系人: 石娟 李传业 电话: 010-85959010 85959009

传真: 010-85959010 E-mail: caavxshb@public.bta.net.cn

地址: 北京市农展馆南路 9 号博雅园 1-106 中国畜牧兽医学会 邮编: 100026