

## 牛生长激素基因 (bGH) 编码区的遗传变异特征\*

耿荣庆<sup>1,2</sup>, 王兰萍<sup>1</sup>, 冀德君<sup>2</sup>, 李永红<sup>2</sup>, 常春芳<sup>2</sup>, 常洪<sup>2\*\*</sup>

(1. 盐城师范学院 生命科学与技术学院, 江苏 盐城 224051;

2. 扬州大学 动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

**摘要:** 以普通牛、瘤牛、牦牛、大额牛、沼泽型水牛和河流型水牛的代表牛种为对象, 探讨不同牛种 (或亚种) GH 基因编码区序列的遗传变异特征。结果表明, 6 个群体的 GH 基因编码区序列全长均为 654 bp, 共检测到 16 个 SNP 位点, 外显子 1 无变异位点, 外显子 2、外显子 3、外显子 4 和外显子 5 分别有 3 个、5 个、1 个和 7 个变异位点, 表明外显子 5 是编码区的高变区域, 而且 SNP 位点在不同牛种 (或亚种) 中的分布存在明显差异。16 个核苷酸替代位点中有 13 个为同义突变, 仅有 3 个非同义突变位点, 分别位于第 2 外显子、第 4 外显子和第 5 外显子处, 并造成其所编码的氨基酸发生改变。

**关键词:** 牛; GH 基因; 编码区; 单核苷酸多态性

**中图分类号:** S 823.2   **文献标识码:** A   **文章编号:** 1004-390X (2009) 04-0492-05

## Genetic Variations of Complete Coding Sequence of Bovine Growth Hormone Gene

GENG Rong-qing<sup>1,2</sup>, WANG Lan-ping<sup>1</sup>, JI De-jun<sup>2</sup>,

LI Yong-hong<sup>2</sup>, CHANG Chun-fang<sup>2</sup>, CHANG Hong<sup>2</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Yancheng Teachers University, Yancheng 224051, China;

2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** Typical bovine species or subspecies of *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos grunniens*, *Bos frontalis*, *Bubalus bubalis* (Swamp buffalo) and *Bubalus bubalis* (River buffalo) were used as experimental populations to detect genetic variations of complete coding sequence of bGH gene. The results showed that the GH gene was 654 bp in length of all 6 populations and 16 SNP sites were determined from coding region. There was no variation site in the 1<sup>th</sup> exon and 3, 5, 1 and 7 variation sites in the 2<sup>th</sup> exon, 3<sup>th</sup> exon, 4<sup>th</sup> exon and 5<sup>th</sup> exon, respectively. It was indicated that the 5<sup>th</sup> exon was the very high mutation in encoding region. Great difference of the distribution of SNP sites arised between different bovine species or subspecies. Of the total 16 substitutions, 13 sites were synonymous and only 3 sites were nonsynonymous. Three nonsynonymous sites were located in the 2<sup>th</sup> exon, 4<sup>th</sup> exon and 5<sup>th</sup> exon, and caused relevant amino acid revised.

**Key words:** bovine; growth hormone gene; coding region; single nucleotide polymorphism

收稿日期: 2008-09-27   修回日期: 2008-10-27

\* 基金项目: 江苏省高校自然科学基金基础研究项目 (08KJB230002); 江苏省高校“青蓝工程”; 国家自然科学基金项目 (30571323); 盐城师范学院科学研究项目 (07YCKL056)。

作者简介: 耿荣庆 (1976-), 男, 江苏盐城人, 博士, 主要从事动物遗传学研究。

E-mail: rqgeng@yahoo.com.cn

\*\* 通讯作者 Corresponding author: 常洪 (1939-), 男, 四川成都人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传资源学研究。E-mail: hoch@yzcn.net

中国是世界上牛种资源最丰富的国家之一。牛亚科家畜除了巴厘牛之外在我国境内都有分布, 普通牛、瘤牛、牦牛、大额牛和沼泽型水牛都是我国固有的牛种或半驯养动物, 河流型水牛是近代引进饲养的种类<sup>[1]</sup>。这些遗传资源资源是未来牛育种事业和产业化持续发展的基础。

牛生长激素 (Bovine Growth Hormone, bGH) 是由脑垂体前叶嗜酸性细胞分泌的一种单一肽链的蛋白质激素, 它是一种具有广泛生理功能的生长调节素, 能影响几乎所有的组织类型和细胞。bGH 基因是直接控制牛生长激素分泌水平、调节生长发育的主要基因。因此, bGH 基因是近年来在提高牛生长速度、生长性能等方面研究的热点之一。国内仅有关于 bGH 基因序列克隆、多态性检测以及遗传效应分析的零星报道, 为了解其结构和功能积累了一些基础资料<sup>[2-4]</sup>。

本文结合 PCR 扩增和 DNA 测序技术, 比较分析牛亚科 6 个群体 GH 基因编码区全序列的遗传变异, 以期获得不同牛种 (或亚种) 间的序列特征信息, 为进一步探讨牛生长发育规律和开展生产性能差异的分子基础研究的遗传育种实践工作提供必要依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集和基因组 DNA 提取

以蒙古牛 (新疆维吾尔自治区和静县, 19 头, 缩写符号 MG)、雷琼牛 (广东省雷州市, 18 头, 缩写符号 LQ)、巴州牦牛 (新疆维吾尔自治区和静县, 16 头, 缩写符号 BM)、独龙牛 (云南省泸水县, 20 头, 缩写符号 DA)、海子水牛 (江苏省东台市, 18 头, 缩写符号 SB) 和尼里-拉菲水牛 (广西水牛研究所, 16 头, 缩写符号 RB) 分别代表普通牛、瘤牛、牦牛、大额牛、沼泽型水牛和河流型水牛, 采集 6 个群体共计 107 个个体的颈静脉抗凝血样。采用标准的苯酚-氯仿法提取基因组 DNA, TE 溶解, -20 °C 保存备用<sup>[5]</sup>。

### 1.2 引物设计与合成

根据 GORDON 等<sup>[6]</sup>已经发表的普通牛 GH 基因序列 (GenBank 登录号 M57764) 设计 4 对引物, 扩增 GH 基因各目标片段。引物委托上海生工生物工程有限公司合成。引物序列、PCR 扩增目标片段大小和位置等基本基本信息见表 1。

表 1 PCR 扩增引物序列、位置、片段大小和退火温度

Tab. 1 Sequence, location, fragment size and annealing temperature of the primers

片段 fragment	引物序列 primer sequence	位置 location	片段大小/pb fragment size	退火温度/°C annealing temperature
GH1	P1 5' - TCTCAAGCTGAGACCCTGTGT - 3'	408 ~ 860	453	59
	P2 5' - GGCCAAATGTCTGGGTGTAGA - 3'			
GH2	P1 5' - TTGGGCTTTAGGGCTTCCGAA - 3'	805 ~ 1 224	420	60
	P2 5' - TGAACCTCCTCAGTTTCCTCCC - 3'			
GH3	P1 5' - ATCCACACCCCTCCACACAGT - 3'	1 182 ~ 2 072	891	61
	P2 5' - CATTTTCCACCCTCCCCTACAG - 3'			
GH4	P1 5' - TAGGGGAGGGTGGAAAATGGA - 3'	2 054 ~ 2 457	404	60
	P2 5' - GACACCTACTCAGACAATGCC - 3'			

### 1.3 PCR 扩增、产物纯化和测序

采用 50  $\mu\text{L}$  反应体系, 包括 10  $\times$  buffer 5  $\mu\text{L}$ , 25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  1.5  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L 混合 dNTP 2  $\mu\text{L}$ , 10 pmol/ $\mu\text{L}$  的上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 5 U/ $\mu\text{L}$  Taq DNA polymerase 0.2  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 100 ng, 剩余体积用灭菌水补足。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 60 s, 59 ~ 61 °C 50 s, 72 °C 50 s, 共 32 个循环; 72 °C 8 min; 4 °C 保存。

PCR 产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增效果后, 将检测到特异性目标片段的 PCR 产物直接用北京 TIANGGEN 生物技术有限公司公司 DP204 DNA 产物纯化试剂盒纯化, 然后送上海生工生物工程有限公司双向测序。

### 1.4 数据统计

测序结果经核对、拼接后, 以 Clustal  $\times$  1.83<sup>[7]</sup> 进行多序列对位排列。以软件

DnaSP4. 10<sup>[8]</sup>和 MEGA 3. 1<sup>[9]</sup>统计分析 GH 基因编码区序列的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 以及遗传变异特征。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增及测序结果

应用 Primer Premier 5. 0 软件设计出 PCR 扩增引物后, 先对 PCR 反应的基本条件进行优化,

然后再对 6 个群体的所有 DNA 样本逐个进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物经凝胶电泳法检测显示, 每一对引物在 6 个群体的 DNA 样品中均能够扩增出大小基本一致的 DNA 片段, 而且没有观察到其它杂条带的影响。这也说明所设计的各对引物具有较好的特异性与可重复性。GH 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳检测结果分别如图 1 所示。

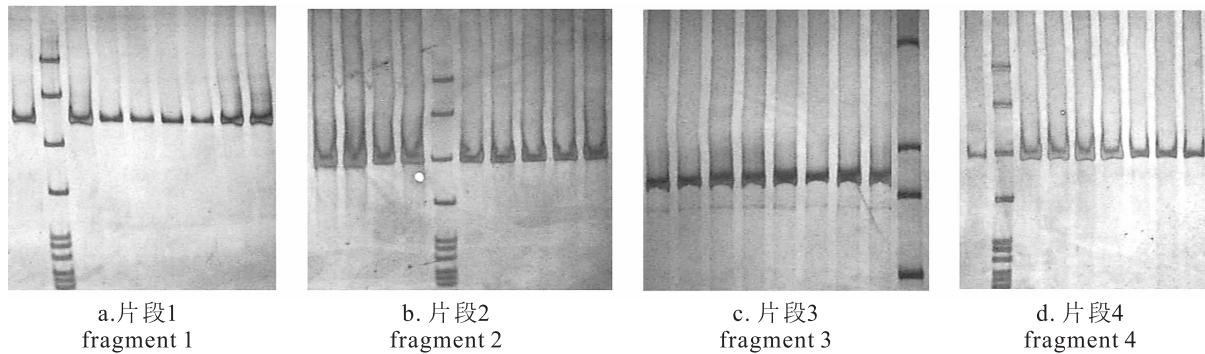


图 1 GH基因PCR扩增产物电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis photographs of PCR amplified products of GH gene

PCR 扩增产物经纯化后直接用于测序。测序结果表明, GH 基因 4 个扩增片段的长度依次是 453 bp, 420 bp, 891 bp 和 404 bp (以 GenBank 登录号 M57764 序列为参照)。所有扩增出的 DNA 片段长度均与理论设计片段长度完全一致。

### 2.2 GH 基因编码区的单核苷酸多态性位点筛查与序列变异特征分析

将 GH 基因的全部测序结果对照峰图逐条核对后, 拼接得到完整的编码区序列, 全长 654 bp (以 GenBank 登录号 M57764 序列为参照)。经多重序列比对分析后, 在 6 个群体中共确定了 16 个 SNP 位点 (见图 2), 而且无论是在种 (或亚种) 内还是在种 (或亚种) 间, 均表现为二等位基因形式。从图 2 显示的 GH 基因编码区序列特征可以看出, 普通牛、瘤牛、牦牛、大额牛的种间差异较小, 在 2~6 个碱基位点之间, 变异位点约占编码区核苷酸总数的 0. 30%~0. 90%; 沼泽型水牛与河流型水牛间的序列无差异, 但它们与普通牛、瘤牛、牦牛、大额牛的核苷酸差异比较明显, 在 12~13 个碱基位点之间, 变异位点约占编码区核苷酸总数的 1. 83%~1. 99%。

根据筛查出的 16 个 SNP 位点, 按照各位点对应基因型进行不同位点间的组合, 共得到 10 种

[	111222244	455566]	
[	7007467915	568175]	
[	8237354147	568175]	
MG1	CCGGTGTAGS	TCTGMT	G1
MG2	.....S	....A.	G2
MG3	.....C	.....	G3
MG4	.....C	....A.	G4
LQ1	.T.....C	.T..C.	G5
LQ2	.T.....SC	.T..C.	G6
LQ3	.....C	.Y..C.	G7
LQ4	.....C	....C.	G8
BM1	.....C	.....	G3
BM2	.....C	....C.	G8
BM3	Y.....	....C.	G9
DA	.....C	....C.	G8
SB	..AACACG.C	C.CACC	G10
RB	..AACACG.C	C.CACC	G10

图 2 GH基因编码区的SNP位点

Fig.2 SNP sites of CDS of GH gene

基因型 (纯合位点用单个碱基表示, 杂合位点以各自的简并碱基表示), 分别命名为 G1 到 G10 (见图 2 右侧标注)。由命名的基因型可以看出, 普通牛具有 4 种类型, 瘤牛具有 4 种类型, 牦牛具有 3 种类型, 大额牛、沼泽型水牛和河流型水牛均只具有 1 种类型; 普通牛与牦牛拥有 1 种共同的单倍型 G3, 瘤牛、牦牛及大额牛拥有 1 种共

同的单倍型 G8, 沼泽型水牛与河流型水牛拥有 1 种共同单倍型 G10, 其余的单倍型都是各牛种 (或亚种) 所特有的类型。

### 2.3 单倍型与核苷酸多样性分析

将 6 个群体的全部编码区序列定义为 10 种单倍型 (GenBank 登录号 EU344985 ~ EU344999)。普通牛、瘤牛、牦牛和大额牛共享了同一种单倍

型, 普通牛和牦牛还共享了另外一种单倍型, 沼泽型水牛和河流型水牛也共享了同一种单倍型, 其余单倍型均为各群体独自享有。6 个群体的总单倍型多样性 (Hd) 为 0.592 (表 2)。从单倍型的分布可知, 瘤牛的单倍型多样性最高 (0.565), 普通牛 (0.528)、牦牛 (0.198) 次之, 大额牛、沼泽型水牛及河流型水牛单倍型多样性为零。

表 2 GH 基因编码区全序列单倍型与核苷酸多样性

Tab. 2 Haplotype diversity and nucleotide diversity of CDS of GH gene

物种 species	单倍型多样性 (Hd) haplotype diversity	核苷酸多样性 (Pi) nucleotide diversity	平均核苷酸差异数 (k) mean nucleotide difference
普通牛 <i>Bos taurus</i>	0.528 ± 0.067	0.000 91 ± 0.000 51	0.593
瘤牛 <i>Bos indicus</i>	0.565 ± 0.085	0.001 35 ± 0.000 64	0.881
牦牛 <i>Bos grunniens</i>	0.198 ± 0.083	0.000 31 ± 0.000 51	0.202
大额牛 <i>Bos frontalis</i>	0	0	0
沼泽型水牛 (swamp buffalo) <i>Bubalus bubalis</i>	0	0	0
河流型水牛 (river buffalo) <i>Bubalus bubalis</i>	0	0	0
total	0.592 ± 0.044	0.00175 ± 0.00115	1.148

核苷酸多样性分析结果表明 (表 2), 总核苷酸多样性 (Pi) 为 0.001 75, 平均核苷酸差异数 (K) 为 1.148。核苷酸多样性最丰富的牛种是瘤牛 (Pi = 0.001 35), 其平均核苷酸差异数 K = 0.881; 普通牛 (Pi = 0.000 91, K = 0.593), 牦牛 (Pi = 0.000 31, K = 0.202) 次之; 核苷酸多样性非常贫乏的牛种是大量牛、沼泽型水牛及河流型水牛, 它们的核苷酸多样性和平均核苷酸差异数均为 0。

### 3 讨论

GH 基因作为影响牛生长、发育及生产性能等多个性状的候选基因, 被定位于第 19 号染色体上, 其 SNP 多态性与若干重要性状的相关性已经成为研究的重要方向之一<sup>[10]</sup>。本研究通过对牛亚科 6 个牛种 (或亚种) GH 基因编码区序列的多态性分析发现, 共检测到 16 个 SNP 位点, 平均核苷酸突变率为 2.45%, 表明牛 GH 基因编码区序列的变异相对较为贫乏。在普通牛、瘤牛和牦牛中分别检测到 2 个、3 个和 2 个 SNP 位点, 并且突变位点也有较大差异, 但在大量牛、沼泽型水牛和河流型水牛中均未检测到 SNP 位点, 表明 SNP 位点在不同牛种 (或亚种) 中的分布存在明显差异。在编码区序列的 16 个 SNP 位点中, 外

显子 1 无变异位点, 外显子 2 有 3 个变异位点, 外显子 3 有 5 个变异位点, 外显子 4 有 1 个变异位点, 外显子 5 有 7 个变异位点, 表明外显子 5 是编码区的高变区域。国内外已有的报道也表明<sup>[11~15]</sup>, 牛 GH 基因的第 5 外显子属于高突变区, 在不同牛种的第 5 外显子 2 141 bp, 2 258 bp 和 2 291 bp 处 (以 GenBank 登录号 M57764 序列为参照) 均检测到变异。这 3 处变异位点在本研究中也检测到, 分别对应于编码区核苷酸的第 457 位 G/C 突变、第 546 位 C/T 突变和第 607 位 C/A 突变。

本研究中, 牛 GH 基因编码区核苷酸全长 654 bp, 翻译成氨基酸序列后编码 217 个氨基酸。16 个核苷酸替代位点中有 13 个为同义突变, 仅有 3 个非同义突变位点。3 个非同义突变位点分别是编码的第 35 位氨基酸 (甘氨酸 ↔ 丝氨酸)、第 138 位氨基酸 (赖氨酸 ↔ 天冬酰胺) 和第 153 位氨基酸 (亮氨酸 ↔ 缬氨酸), 对应于 GH 基因第 2 外显子、第 4 外显子和第 5 外显子处。特别是第 5 外显子处的突变, 其与牛的产奶量、乳脂率、乳蛋白含量以及体重、体高、体斜长、胸围和肉用指数等生长发育性状的相关性一直受到广泛的关注<sup>[3,4,16~20]</sup>。因此, 这些氨基酸的突变是否影响 GH 的生物学活性以及它们与生产性能或

者经济性状之间的真实关系应该是进一步研究的重点,从而为确定可能用于牛相关性状早期辅助选择的有效分子标记提供理论依据。

#### [参考文献]

- [1] 中国畜禽遗传资源状况编委会. 中国畜禽遗传资源状况 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 12-23.
- [2] 欧江涛, 钟金城, 赵益新, 等. 牦牛生长激素基因的测序和多态性研究 [J]. 黄牛杂志, 2003, 29 (2): 9-12.
- [3] 高雪, 徐秀容, 许尚忠, 等. 中国地方黄牛 GH 基因遗传多态性研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36 (10): 991-995.
- [4] 高雪, 徐秀容, 许尚忠, 等. 影响牛生长发育性状的 GH 基因遗传效应分析 [J]. 中国农业科学, 2006, 39 (3): 606-611.
- [5] 耿荣庆, 常洪, 冀德君, 等. 雷琼牛母系起源的遗传学证据 [J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39 (7): 849-852.
- [6] GORDON D F, QUICK D P, ERWIN C R, et al.. Nucleotide Sequence of the Bovine Growth Hormone Chromosomal Gene [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 1983, 33: 81-95.
- [7] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSN T J. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice [J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22: 4673-4680.
- [8] ROZAS J J, SANCHEZ - BELBARRIO J C, MESSEGUER X et al.. DnaSP, DNA Polymorphism Analyses by the Coalescent and Other Methods [J]. Bioinformatics, 2003, 19: 2496-2497.
- [9] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5: 150-163.
- [10] FRIES R, EGGEN A, WOMACK J E. The Bovine Genome Map [J]. Mammalian Genome, 1993, 4: 405.
- [11] COWAN C M, DENTINE M R, AX R L et al.. Restriction Fragment Length Polymorphisms Associated with Growth Hormone and Prolactin Genes in Holstein bulls: Evidence for a Novel Growth Hormone Allele [J]. Animal Genetics, 1989, 20 (2): 157-165.
- [12] LUCY M C, HAUSER S D, EPPARD P J et al.. Variants of Somatotropin in Cattle: Gene Frequencies in Major Dairy Breeds and Associated Milk Production [J]. Domestic Animal Endocrinology, 1993, 10: 325-333.
- [13] YAO J, AGGREY S E, ZADWORN D, et al.. Sequence Variations in the Bovine Growth Hormone Gene Characterized by Single-strand Conformation Polymorphisms (SSCP) Analysis and their Association with Milk Production Traits in Holsteins [J]. Genetics, 1996, 144: 1809-1816.
- [14] LAGZIEL A, SOLLER M. DNA Sequence of SSCP Haplotypes at the Bovine Growth Hormone (bGH) Gene [J]. Animal Genetics, 1999, 30: 362-365.
- [15] 曹红鹤. 肉牛主要生产性状的生化 and 分子遗传标记研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2000.
- [16] EPPARD P J, ROGAN G. J, BOYSEN B G et al.. Effect of High Doses of a Sustained-release Bovine Somatotropin on Antibody Formation in Dairy Cows [J]. Journal of Dairy Science, 1992, 75: 2959-2967.
- [17] LEE B K, LIN G F, CROOKER B A et al.. Association of Somatotropin Gene Polymorphism at the 5<sup>th</sup> Exon with Selection for Milk Yield in Holstein Cows [J]. Domestic Animal Endocrinology, 1996, 13: 373-381.
- [18] SCHLEE P, GRAML R, SCHALLENBERGER E et al.. Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor I Concentration in Bull of Various Growth Hormone Genotype [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 88 (3-4): 497-500.
- [19] UNANIAN M M, BARRETO C C, FREITAS A R, et al.. Associations Between Growth Hormone Gene Polymorphism and Weight Traits in Nellore Bovines [J]. Revista Brasileira de Zootecnia, 2000, 29: 1380-1386.
- [20] GE W, DAVIS M E, HINES H C, et al.. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in the Growth Hormone and Growth Hormone Receptor Genes with Blood Serum Insulin-like Growth Factor I Concentration and Growth Traits in Angus cattle [J]. Journal of Animal Science, 2003, 81: 641-648.