

猪生长激素基因 *Apa* I 酶切位点多态性分析^{*}

邢晋[✉], 帅素容, 李学伟, 乔绍权

(四川农业大学 动物科技学院, 四川 雅安 625014)

[摘要] 利用 PCR-RFLP 技术, 分析了大约克猪和长白猪 GH 基因的 *Apa* I 酶切位点多态性。结果表明, 在 pGH 基因序列中共检测到 5 种基因型和 4 种等位基因; 基因型频率和等位基因频率在 2 个猪种间分布差异不显著。

[关键词] 猪; 生长激素基因; PCR-RFLPs

[中图分类号] S828.802⁺.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)05-0044-03

猪生长激素(porcine growth hormone, pGH)是猪垂体前叶分泌的一种单链多肽类激素, 具有调节新陈代谢, 促进生长速度的作用。pGH 基因已被定位在 12 p^{1.2}~p^{1.5} 区域上^[1]。它由 5 个外显子和 4 个内含子组成, 全长 2 231 bp, 其全序列由 Vize 等^[2]首先克隆确定。近年来, 国内外学者对 pGH 基因的多态性研究, 多为分析 pGH 基因 PCR 产物的 RFLP。但是, 用 PCR 方法扩增 pGH 基因, 至今多数只能获得该基因从第 1 内含子到第 3 外显子之间的部分序列, 用 PCR 方法扩增 pGH 基因全部内含子和外显子并分析其 RFLP 还未见报道。国外, Krikpatrick^[3]首次用 RFLP 标记对 4 个猪种进行了研究, 发现 pGH 基因 *Dra* I 酶切位点存在多态性。后来, Nielsen 等^[4]对 *Dra* I 酶切位点的多态性也进行了研究, 与 Soren 的结论一致。Kipatrick 等^[5,6]用 PCR-RFLPs 技术对 pGH 基因的 *Hae* II 和 *Msp* I 多态位点进行了研究, 分别在 + 308 和 + 577 位发现了酶切位点。Larsen 等^[7]分析了丹麦 4 个猪种 pGH 基因 - 119~ + 486 位的片段, 发现 *Apa* I 在 + 299 处, *Cfo* I 在 + 330 和 + 379 处存在切点。Balatskzi^[8]发现大白猪和 M irgorod 猪 pGH 基因 + 298 位存在 *Bsu* R I 切点。国内, 姜志华等^[9]对 pGH 基因的 PCR 产物进行了序列分析, 扩增了第 2 外显子区 230 bp 的片段, 发现了 7 处碱基替换, 其中 4 处能引起氨基酸变化, 其他为同义突变。方美英等^[10]、刘红林等^[11]用与姜志华同样的引物扩增, 检测了不同中国猪品种的 pGH 基因第 2 外显子和第

2 内含子区的 RFLP, 分析了猪生长激素基因 *Hha* I 酶切片段多态性的特征。结果表明, 在生长激素基因第 2 外显子和第 2 内含子区, *Hha* I 酶切等位片段的频率在猪品种间存在显著差异。仲飞等^[12]以 PCR 方法扩增了 pGH 基因的第 1 内含子, 共 243 bp, 发现 pGH 基因第 1 内含子存在序列多态性。宋成义等^[13]、陶勇等^[14]分别采用 PCR-RFLPs 方法, 检测了姜曲海猪 GH 基因 + 206~ + 711 区段 506 bp 片段中 *Msp* I 和 *Apa* I 酶切位点多态性, 以及姜曲海、长白、小梅山、皮特兰、杜洛克等 5 个猪品种在 - 119~ + 486 区段的遗传变异, 发现各品种该区段均存在 *Bsp* I, *Hha* I 酶切位点多态性。

本试验采用 PCR-RFLPs 技术, 检测 pGH 基因的 *Apa* I 酶切位点多态性在大约克和长白两个猪品种中的分布, 以期全面分析 pGH 基因的 RFLP 及其品种特异性, pGH 基因的 RFLP 与猪经济性状间的关系奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

四川绵阳种畜场大约克猪 44 头, 四川德阳种猪场长白猪 47 头。采集带毛囊的猪毛数根放入盛有 1.0 mL 质量浓度为 8.5 g/L 生理盐水的离心管中, - 70 °C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 将猪毛囊洗净, 放入盛 400 μ L TE 溶液的 1.5 mL 离心管中, 加入质量浓

* [收稿日期] 2002-01-14

[基金项目] 四川省“九五”重点攻关项目(分子生物技术在猪育种中的应用研究)

[作者简介] 邢晋[✉](1968-), 男, 山东曹县人, 在读硕士, 主要从事动物遗传育种研究。现在青岛市畜牧研究所工作(266100)。

度为 100 g/L 的 SDS 20 μ L、蛋白酶 K (20 mg/mL) 10 μ L 混匀, 60 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 后, 37 $^{\circ}$ C 水浴 12~24 h。

取出样品管, 待冷至室温, 加入等体积 1:1 的酚: 氯仿抽提 2 次, 等体积氯仿抽提 1 次, 冰冻无水乙醇沉淀 DNA, 置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 引物及 PCR 反应 Forward primer 5'-GTG GAC GGG AAC AGG ATG AGT GGG AGG AGG TT; Reverse primer 3'-2020 AAG CTT GCC GGG TCA ACC ATC ATT CAG TGT CT。PCR 反应体系为: 10 $\times$ PCR Buffer (含 MgCl₂ 25 mmol) 2.5 μ L, 4 $\times$ dNTPs (2.5 mmol/L) 2.5 μ L, Primers (10 pmol/ μ L each) 1.25 μ L, Template DNA (1.19 μ g/ μ L) 4 μ L, Taq DNA polymerase (5 μ mol/(μ L $\cdot$ min)) 0.24 μ L, 加水至 25 μ L。

PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min 30 s, 35 个循环。循环结束后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5~10 min。

1.2.3 PCR-RFLPs 分析 取 10 μ L PCR 产物加入 0.5 μ L (15 μ mol/(μ L $\cdot$ min⁻¹)) *Apa* I 酶 10 $\times$ Buffer 2 μ L 及灭菌去离子水 2.5 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 3 h。酶切产物用体积分数 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 同时加入 DNA Marker DL 2000 共泳以作分子质量对照。缓冲液为 1 $\times$ TBE, 250 V 电泳 2.5 h, 银染, 并在英国 UV IP ro 凝胶成相分析系统上照相。

2 结果与分析

本试验所扩增的 pGH 基因序列为 2 107 bp, 包含全部 pGH 基因的 5 个外显子和 4 个内含子。经用 *Apa* I 酶切, 产生了 RFLP (图 1), 共有 4 种等位基因, 依次为等位基因 A (731, 619, 317, 163, 145, 133 bp)、等位基因 B (731, 619, 225, 224, 163, 145 bp)、等位基因 C (731, 619, 449, 163, 145 bp) 和等位基因 D (1068, 876, 163 bp)。共检测到 5 种基因型即 AA, CC, AC, BC 和 CD, 未检测到 BB 和 DD 纯合子。基因型频率和等位基因频率分布见表 1。

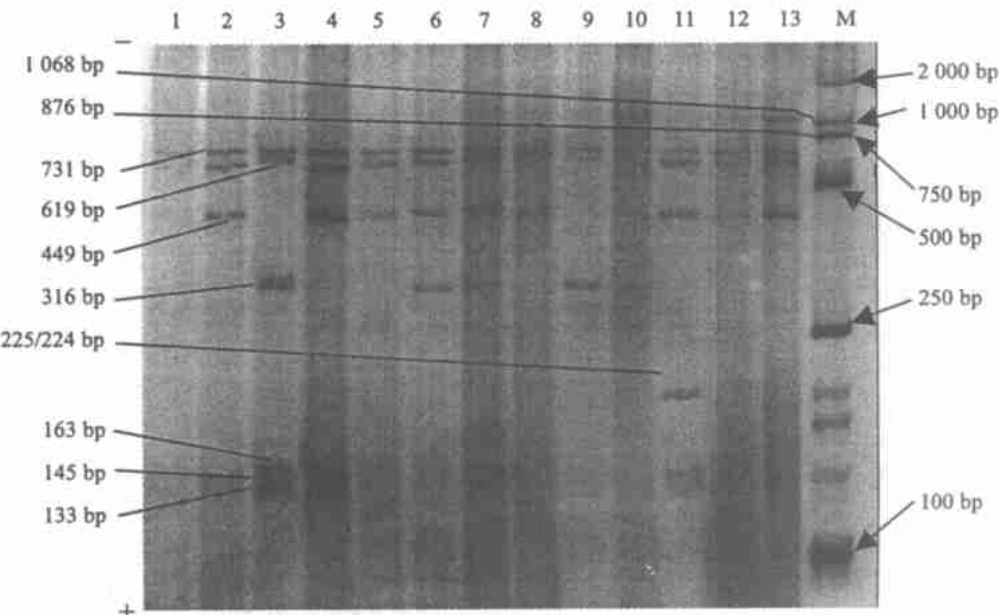


图 1 猪生长激素基因序列 *Apa* I 酶切 PCR-RFLPs 电泳图谱

1, 2, 4, 5, 8, 10, 12 基因型 CC; 3, 9 基因型 AA; 6, 7 基因型 AC; 11 基因型 BC; 13 基因型 CD; M. Marker DL 2000

Fig. 1 The PCR-RFLPs pattern in the sequence of PGH gene with *Apa* I digestion

1, 2, 4, 5, 8, 10, 12 Genotype CC; 3, 9 Genotype AA; 6, 7 Genotype AC; 11 Genotype BC; 13 Genotype CD; M. Marker DL 2000

表 1 基因型频率和等位基因频率分布及 χ^2 检验结果

Table 1 Genotype frequencies and allele frequencies of the pGH gene between Yorkshire and Landrace										%
品种(系)	基因型频率 Genotype frequencies					等位基因频率 Allele frequencies				χ^2 检验 (χ^2 test)
Breed	AA	CC	AC	CD	BC	A	B	C	D	
大约克猪	13.63	43.18	34.09	4.55	4.55	30.68	2.27	64.78	2.27	$\chi^2 = 3.19$ $P > 0.05$
Yorkshire	(6)	(19)	(15)	(2)	(2)					
长白猪	19.15	44.68	34.04	2.13	0	36.17	0	62.77	1.06	
Landrace	(9)	(21)	(16)	(1)	(0)					

注: 括号内数字为不同基因型的个体数。
Note: The figure in the bracket means the number of different genotype porcine

由表1及 χ^2 值可知,基因型CC为优势基因型,AC次之,BC最低。不同基因型在大约克和长白猪之间分布差异不显著。在这2个猪品种中,都是等位基因C最高(分别为64.78%和62.77%),A次之;等位基因B和D在大约克猪中分布最低(为2.27%),而B在长白猪中没有检测到(为0)。

3 讨论

该试验采用自己设计的引物,对pGH基因序列进行了扩增,包括了pGH基因全部5个外显子和4个内含子。用Apa I内切酶对其序列酶切后产生了多态性。依据Apa I内切酶的识别序列(GGGCC↓C),对照Vize等^[2]的序列可知,Apa I内切酶分别

在pGH基因全序列的-18,+299,+432,+1051,+1196位点有切点,可产生6个片段(160,317,133,619,145,857 bp)。而本试验酶切后所产生的片段中,检测到了这5个切点,从而产生等位基因A。等位基因B可能是等位基因C的片段449 bp中的1条链,分别在+204位点的A→G和+209位点的A→C造成的,从而增加了1个Apa I酶识别序列。等位基因C可能是因+299处的切点缺失产生的。而+299,+432和+1196位点的缺失形成了等位基因D。究竟是否是这样产生的,必须把这些酶切片段收集、纯化后测序才能清楚。另外,未检测到纯合子BB,DD,可能是样本含量较少所致。

【参考文献】

- [1] Yerle M, Lahbib-Mansais Y, Thom sen P D, et al Location of the porcine growth hormone gene to chromosome 12p¹⁻²~p¹⁻⁵[J]. *Animal Genetics*, 1993, 24: 2, 129- 131.
- [2] Vize P D, Wells J R E. Isolation and characterization of the porcine hormone gene [J]. *Gene*, 1987, 55: 339- 344.
- [3] Kirkpatrick B W. Double-strand DNA conformation polymorphisms as a source of highly genetic markers[J]. *Animal Genet*, 1993, 24(3): 155- 161.
- [4] Nielson V H, Larsen N J. Restriction fragments length polymorphisms at the growth hormone gene in pigs[J]. *Animal Genetics*, 1991, 22(3): 291- 294.
- [5] Kirkpatrick B W, Huff B M. Detection of insertion polymorphisms in 5' flank and second intron of the porcine growth hormone gene[J]. *Animal Genetics*, 1991, 22(2): 192- 193.
- [6] Kirkpatrick B W. Hae III and Msp I polymorphisms are detected in the second intron of the porcine growth hormone gene[J]. *Animal Genetics*, 1992, 23(2): 180- 181.
- [7] Larsen N J, Nielsen V H. Apa I and Cfo I polymorphisms in the porcine growth hormone[J]. *Animal Genetics*, 1993, 24(1): 71.
- [8] Balatskzi N. Polymorphism of the BsuRI restriction site in the porcine growth hormone gene[J]. *Tsitologiya i Genetika*, 1995, 29(1): 45- 48.
- [9] 姜志华, Rottann O J. 猪生长激素基因第二外显子区域遗传变异的序列基础[J]. *南京农业大学学报*, 1997, 20(2): 67- 71.
- [10] 方美英, 姜志华, 刘红林. 六个品种猪生长基因座位遗传多态性检测[J]. *动物学研究*, 1998, 19(4): 334- 336.
- [11] 刘红林, 姜志华, 方美英, 等. 中国地方猪种生长激素基因Hha I酶切片段多态特征研究[J]. *江苏农业学报*, 1998, 14(2): 85- 89.
- [12] 仲 飞, 刘维全, 孙丽翠, 等. 含第1内含子的猪生长激素DNA基因的构建[J]. *中国兽医学报*, 2000, 20(4): 347- 351.
- [13] 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.
- [14] 陶 勇, 经荣斌, 宋成义, 等. 猪生长激素基因座位Bsp I, Hha I酶切片段多态特征的研究[J]. *华中农业大学学报*, 2001, 20(5): 460- 462.

Analysis of Apa I polymorphisms in porcine growth hormone gene

XING Jin-yi, SHUA I Su-rong, L I Xue-wei, QIAO Shao-quan

(College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: Apa I polymorphism of pGH gene's sequence was analyzed by PCR-RFLP in Yorkshire and Landrace. The results showed that there were 5 genotypes and 4 alleles. The difference of Genotype frequencies and allele frequencies was not significant in the two porcine breeds.

Key words: porcine; growth hormone gene; PCR-RFLPs