

中国5个牛种 *lep tin* 基因外显子3的多态性分析*

杨东英¹, 陈宏^{1,2}, 张良志¹, 蓝贤勇¹, 张争锋¹, 王新庄³, 王居强³

(1 西北农林科技大学 动物科技学院 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 徐州师范大学 细胞与分子生物学研究所, 江苏 徐州 221116; 3 河南肉牛工程技术研究中心, 河南 郑州 450003)

[摘 要] 利用改进的DNA 提取方法和PCR-RFLP 技术, 对南阳牛、秦川牛、西镇牛、鲁西牛(地方黄牛品种)和荷斯坦奶牛等5个牛品种的263头个体 *lep tin* 基因外显子3多态性进行了分析。结果表明, 牛 *lep tin* 基因外显子3长度为330 bp, 存在 *Hae* III和 *Apa* I 限制性内切酶的酶切位点, 但在这2个酶切位点上无多态性, 2种酶酶切片段长度均为70 bp 和260 bp。说明牛 *lep tin* 基因外显子3在 *Hae* III和 *Apa* I 2个酶切位点上具有保守性。

[关键词] *lep tin* 基因; 外显子3; PCR-RFLP; 牛品种; 多态性分析

[中图分类号] S823.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)08-0017-04

Leptin, 即瘦素蛋白, 是肥胖基因(*obese gene*)编码的一种蛋白质激素, 由脂肪细胞分泌, 具有调节摄食行为、减少能量消耗和抑制动物采食的作用。因此, 其可控制哺乳动物的采食量和体组成。*Leptin* 受体还存在于包括脂肪在内的许多外周组织或器官中, 因此 *lep tin* 可通过作用于脂肪组织的 *lep tin* 受体, 而发挥促进脂解的作用^[1]。

Leptin 对家畜脂肪组织和神经内分泌有显著的调控作用, 可通过对采食量和家畜能量平衡的调节, 促进家畜的生长、繁殖和泌乳性能, 提高其免疫功能, 其中较重要的作用是对家畜体重和能量平衡的调节。*Leptin* 能及时将脂肪贮存状况传给下丘脑及其他神经内分泌区, 从而使神经内分泌系统调节其自身机能以适应当时的能量平衡与脂肪贮存状况。有研究^[2-3]证明, *lep tin* 通过下丘脑对体重、繁殖、泌乳的调节, 是通过神经肽Y(NPY)和黑色素皮质素4受体(MC4R)及其配体黑色素细胞刺激激素(MSH)而起作用的。*Leptin* 基因对牛的生长发育、饲料转化效率等起着关键的控制作用^[4-9], 近几年来, 被作为研究生长发育、肉质等性状的重要候选基因。

目前, 国内有关家畜 *lep tin* 基因的研究报道很少, 且多是有关猪的, 而作为大家畜的牛在此方面的研究更少。因此, 本试验利用PCR-RFLP 技术, 对5

个牛种 *lep tin* 基因外显子3的遗传多态性进行了初探, 为在分子水平上探讨中国牛种的遗传特性及其对肉质、生长发育的影响研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血 样 南阳牛血样采自河南省南阳市南阳牛保种场, 共92份; 荷斯坦奶牛血样采自陕西草滩牛场奶牛场, 共61份; 秦川牛血样采自陕西大荔, 共69份; 22份鲁西牛血样和19份西镇牛血样由陕西省农业分子生物学重点实验室保存, 共计263份血样。血样均由颈静脉采血, ACD 抗凝, 放入冰盒带回实验室于-80℃保存备用。

1.1.2 酶和试剂 限制性内切酶 *Hae* III、*Apa* I、*Taq* DNA 聚合酶为 TaKaRa 产品, 蛋白酶 K、dNTPs、琼脂糖等均购自上海生工生物工程公司。

1.1.3 引 物 参照 GenBank 收录的牛 *lep tin* 基因序列(登录号为LOCUS AY731089)设计1对引物。上游引物: 5'-GGGAAGGCGAGAAGATA GG-3'; 下游引物: 5'-AGGCAGACTGGT GAGGATC-3'。引物由上海生工合成。

1.2 基因组DNA 的提取

血液DNA 的提取参考文献[10]介绍的方法进行。用分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测提取的

* [收稿日期] 2005-12-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30471238); 国家“863”高技术研究与发展计划项目(2003AA 243051); 河南省杰出人才创新基金(0521001900); 西北农林科技大学拔尖人才支持计划基金和研究生教育创新基金(05YCH018)

[作者简介] 杨东英(1974-), 女, 山东嘉祥人, 在读博士, 主要从事生物技术与遗传育种研究。E-mail: yangdongying@126.com

[通讯作者] 陈宏(1955-), 男, 陕西西安人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子生物技术与动物遗传育种研究。E-mail: chen hong1212@263.net

DNA 浓度和质量。-20℃保存备用。

1.3 牛 *leptin* 基因外显子3的PCR扩增

PCR反应体系为25.0 μL: 10×Buffer 为2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.5 μL, MgCl₂ (2.5 mmol/L) 1.5 μL, *Taq* DNA聚合酶 (5 U/μL) 0.125 μL, 上游引物和下游引物(均为10 pmol/μL) 共0.5 μL, 模板DNA (50.0 ng/μL) 1.0 μL, 灭菌纯水16.88 μL。反应程序为: 95℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 62℃复性40 s, 72℃延伸40 s, 共30个循环; 最后72℃延伸10 min。

1.4 牛 *leptin* 基因外显子3的多态性检测

利用PCR-RFLP方法对牛 *leptin* 基因外显子3的多态性进行检测, PCR产物酶切体系共10 μL, 内

含限制性内切酶(1 U/μL) 0.5 μL, PCR产物5 μL, 灭菌纯水3.5 μL, Buffer 1.0 μL。然后于37℃恒温水浴摇床中消化3~5 h, 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳。

2 结果与分析

2.1 牛 *leptin* 基因外显子3基因组DNA的电泳检测

由图1和图2可知, 分离的牛基因组DNA既无降解也无RNA, 纯度和浓度均符合试验要求, 可用于多态性检测。

2.2 牛 *leptin* 基因外显子3 PCR产物的电泳检测

由图3和图4可知, 扩增条带明亮清晰, 片段的长度为330 bp, 可用于PCR-RFLP分析。

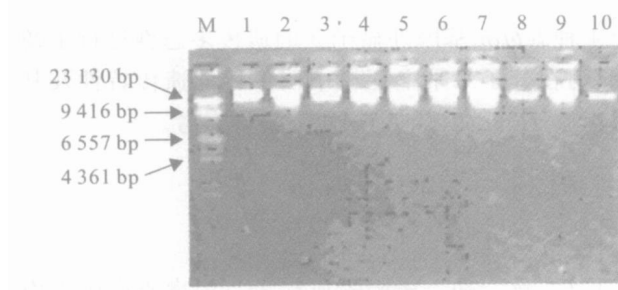


图1 黄牛血液基因组DNA的电泳检测结果

M. λ DNA/H indIII Marker; 1~3 南阳牛血样DNA; 4~6 秦川牛血样DNA; 7~8 鲁西牛血样DNA; 9~10 西镇牛血样DNA

Fig. 1 Electrophoresis detection of genomic DNA in Yellow cattle

M. λ DNA/H indIII Marker; 1-3 DNA of Nanyang cattle; 4-6 DNA of Qinchuan cattle; 7-8 DNA of Luxi cattle; 9-10 DNA of Xizhen cattle

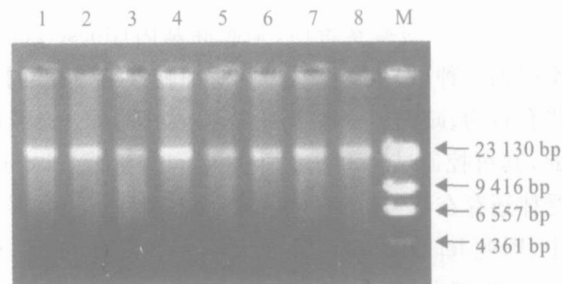


图2 荷斯坦奶牛血液基因组DNA的电泳检测结果

M. λ DNA/H indIII Marker; 1~8 不同个体荷斯坦奶牛血样DNA

Fig. 2 Electrophoresis detection of genomic DNA in Holstein

M. λ DNA/H indIII Marker; 1-8 DNA of individual Holstein

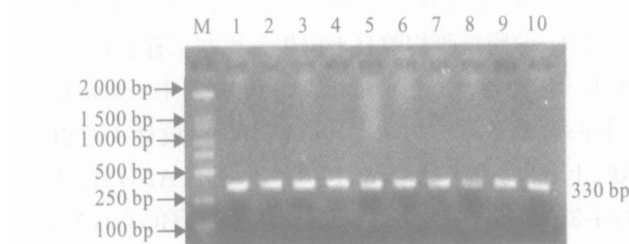


图3 黄牛 *leptin* 基因外显子3的PCR扩增产物电泳检测结果

M. DL 2000 DNA Marker; 1~3 南阳牛 *leptin* PCR产物; 4~6 秦川牛 *leptin* PCR产物; 7~8 鲁西牛 *leptin* PCR产物; 9~10 西镇牛 *leptin* PCR产物

Fig. 3 Electrophoresis patterns of *leptin* exon 3 in Yellow cattle

M. λ DNA/H indIII Marker; 1-3 PCR product of Nanyang cattle; 4-6 PCR product of Qinchuan cattle; 7-8 PCR product of Luxi cattle; 9-10 PCR product of Xizhen cattle

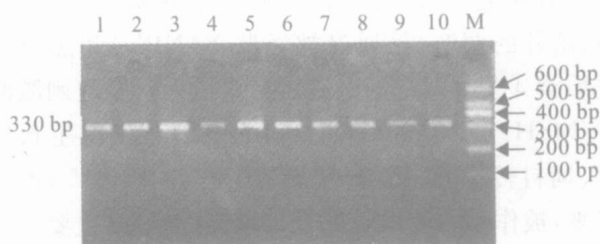


图4 荷斯坦奶牛 *leptin* 基因外显子3的PCR扩增产物电泳检测结果

M. DNA Marker; 1~10 不同荷斯坦奶牛 *leptin* PCR产物

Fig. 4 Electrophoresis patterns of *leptin* exon 3 in Holstein

M. DNA Marker; 1-10 PCR product of individual Holstein

2.3 牛 *lep tin* 基因外显子3的 *Apa* I 酶切图谱

由图5和6可知, *lep tin* 基因外显子3存在 *Apa* I 酶切位点, 但在此位点上无多态性, 酶切片段大小为70 bp 和260 bp, 所有的个体均表现相同的酶切条带。

2.4 牛 *lep tin* 基因外显子3的 *Hae* III 酶切图谱

lep tin 基因外显子3存在 *Hae* III 的酶切位点, 但

没有发现其在此位点的多态性, 所有片段长度均为70 bp 和260 bp 左右(图7, 8)。但由于该序列酶切片段较小, 为了消除琼脂糖凝胶电泳对较小片段分辨率低的缺点, 以进一步确定该酶切结果, 所以又进行了120 g/L PAGE 检测。结果表明, 本试验所用的个体酶切结果一致, 均为一致的基因型, 没有发现 *Hae* III 酶切位点的多态性。

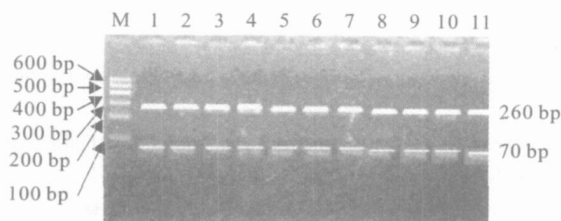


图5 黄牛 *lep tin* 基因外显子3 *Apa* I 酶切电泳结果
M. DNA Marker I; 1~3 南阳牛 *lep tin* 外显子3 *Apa* I 酶切;
4~6 秦川牛 *lep tin* 外显子3 *Apa* I 酶切; 7~9 鲁西牛 *lep tin*
外显子3 *Apa* I 酶切; 10~11 西镇牛 *lep tin* 外显子3 *Apa* I 酶切;

Fig 5 Electrophoresis patterns of *Apa* I
digesting *lep tin* exon 3 in Yellow cattle
M. DNA Marker I; 1- 3 *Apa* I digesting of
lep tin exon 3 of Nanyang cattle; 4- 6 *Apa* I
digesting of *lep tin* exon 3 of Qinchuan cattle;
7- 9 *Apa* I digesting of *lep tin* exon 3 of Luxi cattle;
10- 11 *Apa* I digesting of *lep tin* exon 3 of Xizhen cattle

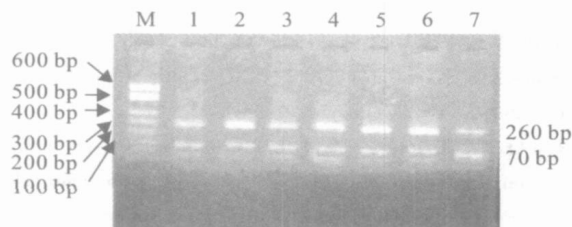


图6 荷斯坦奶牛 *lep tin* 基因外显子3 *Apa* I 酶切电泳结果

M. DNA Marker; 1~7 不同个体荷斯坦奶牛
lep tin 外显子3 *Apa* I 酶切

Fig 6 Electrophoresis patterns of *Apa* I
digesting *lep tin* exon 3 in Holstein
M. DNA Marker; 1- 7 *Apa* I digesting of
lep tin exon 3 of individual Holstein

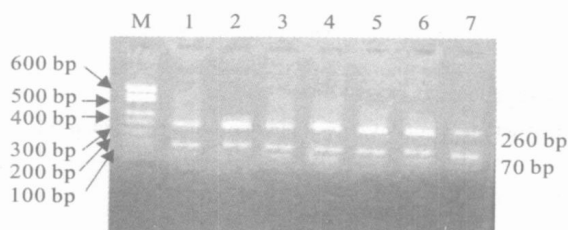


图7 黄牛 *lep tin* 基因外显子3 *Hae* III 酶切电泳结果
M. DNA Marker I; 1~2 南阳牛 *lep tin* 外显子3 *Hae* III 酶切;
3~4 秦川牛 *lep tin* 外显子3 *Hae* III 酶切; 5~6 鲁西牛 *lep tin*
外显子3 *Hae* III 酶切; 7 西镇牛 *lep tin* 外显子3 *Hae* III 酶切;

Fig 7 Electrophoresis patterns of *Hae* III
digesting *lep tin* exon 3 in Yellow cattle
M. DNA Marker I; 1- 2 *Hae* III digesting of
lep tin exon 3 of Nanyang cattle; 3- 4 *Hae* III
digesting of *lep tin* exon 3 of Qinchuan cattle;
5- 6 *Hae* III digesting of *lep tin* exon 3 of Luxi cattle;
7 *Hae* III digesting of *lep tin* exon 3 of Xizhen cattle

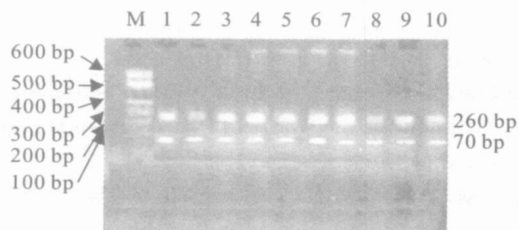


图8 荷斯坦奶牛 *lep tin* 基因外显子3 *Hae* III 酶切电泳结果
M. DNA Marker; 1~10 不同个体荷斯坦奶牛
lep tin 外显子3 *Hae* III 酶切

Fig 8 Electrophoresis patterns of *Hae* III
digesting *lep tin* exon 3 in Holstein
M. DNA Marker; 1- 10 *Hae* III digesting of
lep tin exon 3 of individual Holstein

3 讨论

戴如娟等^[11]对猪 *lep tin* 基因的克隆与序列分析表明, *lep tin* 基因在不同物种之间具有很强的保守性, 猪与人和鼠的编码区核苷酸序列的同源性分别为88.5%和84.5%。Rocha等^[12]分析了约克夏、长

白和杜洛克猪 *lep tin* 基因的多态性与生产性状的相关性, 结果表明猪群中的多态性较低。本试验利用2种限制性内切酶 *Apa* I 和 *Hae* III 对牛 *lep tin* 基因外显子3进行酶切分析发现, *lep tin* 基因外显子3存在 *Hae* III 和 *Apa* I 酶切位点, 但这2个酶切位点上均没有多态性, 说明牛 *lep tin* 基因外显子3在这2个位点

上多态性贫乏。*Leptin* 基因由3个外显子与2个内含子组成,其cDNA 长度约为2.9 kb,有较长的3'非翻译区^[9]。由于许多育种者考虑到*leptin* 基因突变会导致动物体内缺失 *leptin* 而造成机体肥胖,故将 *leptin* 基因作为产肉性状分子标记研究的重要候选基因之一。本试验未检测到牛 *leptin* 基因外显子3在 *Apa* I

和 *Hae* III的多态性,一方面说明该基因座位在这2个位点上很保守,发生遗传变异的概率极小,同时也说明 *leptin* 基因外显子3可能存在多态性,但由于实际中大约一半的SNP 并不改变限制性酶切位点^[13],因而尚未被检测到,这有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 郭亚宁,侯水生,刘小林,等. 动物肥胖基因(ob)的研究进展[J]. 黄牛杂志, 2002, 28(4): 35-38
- [2] Sommer S S, Groszbach A R. PCR amplification of specific alleles (PA SA) is a general method for rapidly detecting known singlebase changes[J]. Bio Techniques, 1992, 82: 82-87.
- [3] Liu Q, E C T, John A H, et al Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes[J]. Genome Research, 1997, 7: 389-398
- [4] Kononoff P J, Deobald H M, Stewart E L, et al The effect of a leptin single nucleotide polymorphism on quality grade, yield grade, and carcass weight of beef cattle[J]. Journal of Animal Science, 2005, 83(4): 927-932
- [5] Schenkel F S, Miller S P, X Ye, et al Association of single nucleotide polymorphisms in the *leptin* gene with carcass and meat quality traits of beef cattle[J]. Journal of Animal Science, 2005, 83(9): 2009-2020
- [6] Williams G L, Amstalden M, Garcia M R, et al Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2002, 23: 339-349
- [7] Sejrsen K, Purup S, Vestergaard M, et al High body weight gain and reduced bovine mammary growth: physiological basis and implications for milk yield potential[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2000, 19: 93-104
- [8] Engelbregt M J, Weissenbruch M M van, Popp-Snijders C, et al Delemarre-van de Waal Body mass index, body composition, and leptin at onset of puberty in male and female rats after intrauterine growth retardation and after early postnatal food restriction[J]. Pediatric Research, 2001, 50: 474-478
- [9] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. Nature, 1994, 372: 425-432
- [10] Chen H, Leibenguth F. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA of three farm animal species cattle, sheep and goat[J]. Comp Biochem Physiol, 1995, 111B: 643-649
- [11] 戴如娟, 李 宁, 吴常信. 猪肥胖基因cDNA 的克隆与测序分析[J]. 遗传学报, 2000, 27(4): 290-297.
- [12] Rocha J L, Baker J F, Womack J E, et al Statistical association between restriction fragment length polymorphism and quantitative traits in swine[J]. Journal of Animal Science, 1992, 70: 3360-3370
- [13] 高秀丽, 景奉香, 杨剑波, 等. 单核苷酸多态性检测分析技术[J]. 遗传, 2005, 27(1): 110-122

Polymorphic analysis of *leptin* exon 3 in five Chinese cattle breeds

YANG Dong-yang¹, CHEN Hong^{1,2}, ZHANG Liang-zhi¹, LAN Xian-yong¹,
ZHANG Zheng-feng¹, WANG Xin-zhuang³, WANG Ju-qiang³

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Shaanxi Key Laboratory of Agricultural Biology, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China;

3 The Research Center of Cattle Engineering Technology in Henan, Zhengzhou, Henan 450003, China)

Abstract: Improved DNA extract method and PCR-RFLP were used in this trial. The polymorphism of *leptin* exon 3 was analyzed in Nanyang cattle, Qinchuan cattle, Xizhen cattle, Luxi cattle (local yellow cattle breeds) and Holstein cow and 263 individuals were used in this trial. Fragment of 330 bp was amplified with the primer and products were digested with endonuclease *Hae* III and *Apa* I, and produced fragments of both were about 70 bp and 260 bp. The results showed that the *leptin* gene in yellow cattle and Holstein cow had no polymorphism in the two enzymatic digestion sites.

Key words: *leptin*; exon 3; PCR-RFLP; cattle breed; polymorphic analysis