

波尔山羊生长激素(GH)基因克隆及序列分析*

刘长国¹, 罗 军², 郑新民³, 杨公社², 苟德明⁴

(1 中国农科院 家禽研究所, 江苏 扬州 225003; 2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

3 湖北省农科院 生物工程中心, 湖北 武昌 430064; 4 武汉大学 生命科学学院, 湖北 武昌 430072)

[摘 要] 比较生长激素(GH)基因在不同物种间的相似性, 设计引物, 用 PCR 方法从波尔山羊基因组中扩增出一条长约 2 0 kb 的 DNA 片段, 然后用 PMD-18T 载体在感受态 DH5 α 株大肠杆菌中获得 GH 基因克隆子。DNA 测序结果表明, 波尔山羊 GH 基因 DNA 序列全长 1 951 bp (不含引物序列), 含完整的 5 个外显子编码区。应用 ClustalW 软件进行同源性分析, 结果表明, 波尔山羊 GH 基因与 Tokara 山羊、澳洲美利奴羊和黄牛的 GH 基因的相似度分别为 98.5%, 97.0% 和 95.4%; 内元比外元的变异程度高, 在 5 个外元中, 第一外元的保守性最高, 其他区域的变异程度随物种亲缘关系的增大而升高, 在分子水平上符合物种进化原理。

[关键词] 波尔山羊; GH 基因; 克隆; 序列测定; 同源性分析

[中图分类号] S813.3; S827.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)06-0013-05

生长激素(growth hormone, GH)是由垂体前叶分泌的一种单链蛋白, 由大约 190 个氨基酸组成, 分子质量约 22 ku。它具有促进脊椎动物机体生长发育、加速蛋白合成及促进脂类降解的生理功能^[1]。近年来, 研究人员通过改造或转移 GH 基因, 在提高物种的生产性能和生长速度方面取得了一定成效^[2,3]。哺乳动物的生长激素基因由 5 个外元和 4 个内元组成。其核酸序列的组成、内元的位置与长度、启动子、5'端和 3'端的非转录区都具有较高的保守性, 外元和内元的交界处绝大部分符合 GT-AG 规则, 启动子中含有顺式调控序列, 在转录起始位点上游 34 bp 以内有 TATA 盒。目前, 有关 GH 转基因动物的研究多采用其功能基因(cDNA)为靶序列。但研究发现, 内元和两端侧翼序列对 GH 基因的表达有重要影响^[4,5], 并且用基因组 DNA 建立的转基因老鼠模型, 其外源基因的整合与表达效果强于 cDNA^[6]。因此, 克隆 GH 基因组 DNA 序列对于研究 GH 基因的结构与调控、开展转基因动物研究及探索物种的分子进化均有重要意义。

Kioka 等^[7]以牛 GH cDNA 作为探针, 从 Tokara 山羊基因组中分离出 GH 基因, 测定了该基因的序列, 并与牛、猪、小鼠的基因序列进行了同源性比较; 任兆钧等^[8]克隆了绵羊 GH 基因, 序列全长

2 021 bp; Byrne 等^[9]和 Orian^[10]测定的美利奴羊和绵羊(品种不详)GH 基因序列全长分别为 1 792 bp 和 2 160 bp。波尔山羊是南非培育成的肉用山羊品种, 以体型大、增重快、产肉多、耐粗饲而著称于世, 具有“肉羊之父”的美称, 用其改良地方品种能显示出很强的杂交优势。目前我国已引进多群纯种波尔山羊对地方品种进行杂交改良, 旨在提高本地品种的生产性能或培育适应性强的高产肉羊品种, 但对其种质特性的基础研究较少, 特别是对与动物生产性能关系密切的 GH 基因的研究甚少, 目前尚无报道。本试验采用 PCR 方法, 从波尔山羊基因组中扩增出 GH 基因, 然后用 PMD-18T 载体在大肠杆菌 DH5 α 株中进行克隆、纯化, 最后测出其序列, 该序列已在国际 GenBank 数据库中登记并认可, 登录号为 AF534522。该研究结果不仅丰富了 GH 基因数据库资料, 有利于基因结构与表达调控的研究, 同时可为波尔山羊的生长特性、生产性能, 以及与其他物种的亲缘关系研究提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 材料

DNA 来自陕西丹凤县种羊场波尔山羊纯种种公羊血液。PCR 试剂盒、PMD 18-T Vector 试剂盒及

* [收稿日期] 2003-05-14

[基金项目] 1999 年度国家教委优秀青年教师基金资助项目(1511)

[作者简介] 刘长国(1973-), 男, 江西南丰人, 助理研究员, 博士, 主要从事家禽遗传资源研究。

[通讯作者] 罗 军(1965-), 男, 陕西扶风人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种研究。E-mail: luojun1@yahoo.com

工具酶购自大连宝生物工程有限公司(Takara), 地高辛试剂盒购自Boehringer Mannheim 公司。探针为猪 dDNA 序列, 由湖北省农科院生物工程中心赠送。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 参照文献[11], 从山羊全血中提取基因组DNA。

1.2.2 GH 基因的扩增 参考 Genbank 上绵羊、牛、猪、鹿的生长激素基因序列, 设计 1 对引物, 正向引物为 (F): 5'-CAGGGATTGAACCTGAGTCTCCTGCATTTG; 反向引物为 (R): 5'-TCATGACCCTCAGGTACGTCTCCGTCTTGGCAG。该引物由大连宝生物工程公司(Takara)合成。PCR 扩增体系为: 1×buffer, 0.2 mmol/L dNTPs, 正反向引物各 4 ng/μL, Taq DNA 聚合酶 1.5 U, DNA 模板约 6 ng/μL, 加水至终体积 25 μL。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 13 s, 65 °C 复性 35 s, 72 °C 延伸 160 s, 10 个循环。然后为使产物合成完全, 采用延伸时间递增的程序: 95 °C 变性 13 s, 65 °C 复性 35 s, 72 °C 延伸 120+ (n-1)×10 s (其中 n 表示这一轮中第 n 个循环), 共 25 个循环。最后 70 °C 保温 6 min, 4 °C 保存。

1.2.3 PCR 产物的鉴定与回收 先将 PCR 产物于 65 °C 水浴 10 min, 采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 接着转移到带正电的尼龙膜上进行 Southern 杂交以鉴定目的条带。按前述操作, 重新将 PCR 产物于琼脂糖凝胶上分离, 将目的片段切下, 于透析袋中电泳, 酚抽提, 回收。

1.2.4 山羊 GH 基因的克隆纯化与鉴定 参照 PMD-18T 载体使用说明书, 将目的基因与载体构建成重组质粒。先用 PCR 法检测重组质粒是否构建成功, 随后采用热激法于 42 °C, 90 s 用重组质粒转化感受态 DH_{5α} 株大肠杆菌, 然后利用 IPTG 和 X-gal 对菌落进行筛选与增殖, 再用碱裂解法从大肠杆菌中回收重组质粒, 再用工具酶 *EcoRI* 对重组质粒进行酶切, 电泳, 最后通过 Southern 杂交进行目的基因的阳性鉴定。

1.2.5 山羊 GH 基因的测序与分析 以阳性重组质粒为模板, 在大连宝生物工程有限公司(Takara)利用 370 全自动序列分析仪(ABI 公司), 依据 Sanger 双脱氧终止法进行序列测定, 共测定 2 遍。先利用上述引物从正反方向进行序列测定, 分别测出 550 个碱基时, 再根据已知序列合成 1 对引物, 将剩余部分测完。然后将所得的序列在 NCBI 网站进

行 Blast 序列比较分析。

2 结果与讨论

2.1 山羊生长激素基因的 PCR 扩增结果

用 PCR 方法进行分子克隆比较快捷, 但要注意扩增反应的严谨性, 有人对引物或反应条件加以控制, 最终获得了理想的基因序列^[5, 12, 13]。在本试验中, 为了增强引物与模板的特异结合, 引物设计得比较长, 另外扩增的复性温度高达 65 °C, 复性时间减少为 35 s。鉴于本次扩增的序列较长, 因此采用了较长的延伸时间, 获得了较佳的效果。PCR 反应结束后, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 1 所示。图 1 表明, 本试验获得了 1 条约 2.0 kb 的片段, 与引物设计时所预计的片段大小相当。由图 1 还可见, 扩增产物中还有 1 条产量略低, 约 1.6 kb 的片段。Gootwine 等^[14]在分析几个绵羊品种、萨能山羊及荷斯坦牛的生长激素基因多态性时认为, 牛在生长激素位点仅为单拷贝, 而绵羊、山羊的生长激素为双拷贝基因。据此认为, 第 2 条更小的片段可能是引物在基因组中的非特异性扩增产物, 也可能是山羊生长激素的假基因。



图 1 PCR 扩增结果

1, 3 扩增结果; 2 阴性对照; M. λ DNA/HindIII

Fig 1 The result of PCR

1, 3 The result of PCR; 2 Control; M. λ DNA/HindIII

2.2 山羊生长激素基因 PCR 产物的 Southern 杂交结果

用猪 GH dDNA 为探针, 对山羊 GH 基因 PCR 产物 Southern 杂交, 结果见图 2。图 2 显示, 扩增所获得的 2.0 kb 片段为山羊的 GH 基因, 而第 2 条更小的片段没有出现阳性反应, 又由于假基因与真基因间具有高度的同源性^[15], 因此认为第 2 条带为非特异性扩增产物。

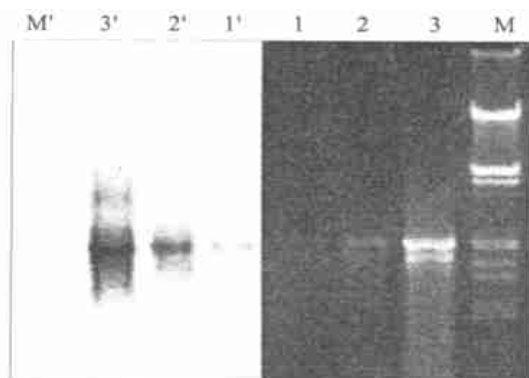


图 2 PCR 产物的 Southern 杂交结果

1~3 分别为 0.1, 1.0, 5.0 μ L PCR 产物;

1'~3' 分别为泳道 1~3 对应的杂交结果;

M, M' : λ DNA / EcoR I + H indIII

Fig 2 Southern hybridization result

1~3 0.1, 1.0, 5.0 μ L PCR mixture,

respectively; 1'~3' are the Southern

hybridization results of Lane 1, 2, 3, respectively;

M, M' : λ DNA / EcoR I + H indIII

2.3 重组质粒基因克隆结果

由于 PCR 产物中还含有剩余的反应成分及非特异扩增产物, 因此必须先进行电泳分离、纯化后再回收。但由于回收的片段可能会含有未分离干净的上述成分, 也可能由于回收过程中紫外辐射造成损伤而使片段断裂, 因此, 将回收的片段与 PMD18-T 载体构建重组质粒, 然后在感受态 DH₅ α 大肠杆菌中进行基因克隆。图 3 所示为从大肠杆菌中回收的重组质粒的电泳结果, 初步认为第 9 泳道为阳性重组质粒。

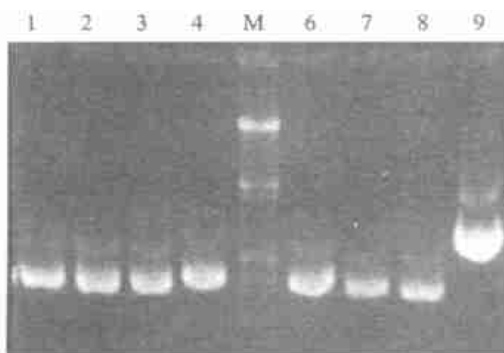


图 3 重组质粒回收结果

1~9 重组质粒; M: λ DNA / EcoR I + H indIII

Fig 3 A gel electrophoresis analysis of recombinant plasmids

1~9 The recombinant plasmids from different bacteria

strains, respectively. M: λ DNA / EcoR I + H ind III

2.4 重组质粒的进一步鉴定结果

借鉴已发表的绵羊 GH 基因序列, 分析其酶切图谱, 并结合 PMD18-T 载体的酶切图谱, 选用仅在 PMD18-T 载体上有单酶切位点, 而在绵羊 GH 基因上无酶切位点的工具酶 EcoR I 进行酶切, 电泳,

转膜, 然后以猪 GH cDNA 为探针对这几个重组质粒酶切结果进行 Southern 杂交分析, 结果如图 4 所示。由图 4 可见, 第 2 道反应很强, 可判断为阳性克隆, 以此作为测序模板。而第 1, 3 道杂交信号较弱, 有可能是操作造成的差异。

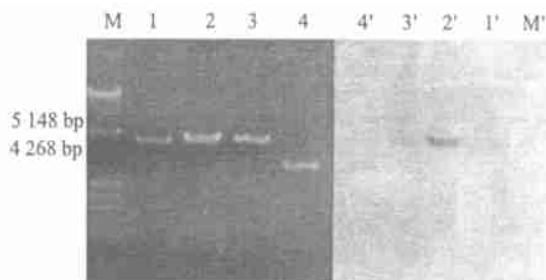


图 4 重组质粒酶切后 Southern 杂交结果

1~4 不同克隆株中的重组质粒酶切结果;

1'~4' 泳道 1~4 对应的杂交结果;

M, M' : λ DNA / EcoR I + H indIII

Fig 4 The result of Southern hybridization of digested recombinant plasmids

1~4 The digested recombinant plasmids from different cloning strains, respectively;

1'~4' The Southern hybridization result of lane 1, 2, 3, 4, respectively; M: λ DNA / EcoR I + H indIII; M' : Corresponding lane M

2.5 波尔山羊 GH 基因序列

本次测序连续进行 2 次, 所测得的序列全长为 1 951 个碱基 (不包括引物在内), 所得序列已录入 GenBank, 登录号为 AF534522。

通过 ClustalW 软件进行序列分析, 与 Tokara 山羊^[7] GH 的同源性为 98.5% (参比碱基 1 945 个, 有 29 个突变), 与澳洲美利奴绵羊^[9] 的同源性为 97.0% (参比碱基 1 875 个, 有 56 个突变), 与黄牛^[16] 序列的同源性为 95.4% (参比碱基 1 843 个, 有 85 个突变)。

本序列的 330~401 位, 647~810 位, 1 036~1 152 位, 1 382~1 544 位, 1 822~1 957 位, 分别与上述山羊、绵羊、黄牛的 1、2、3、4 和第 5 外元对应, 因此认为这几个序列片段为本序列的 1、2、3、4 和第 5 外元, 从序列可看出外元与内元交界处具有 GT-AG 特征。

本序列中 302~308 位与 Tokara 山羊^[7] 及绵羊^[10] 的 TATA 盒序列吻合一致, 为 TATAAAA。而 388~400 位及 649~713 位与澳洲美利奴^[9] 及绵羊^[10] 的信号肽编码序列一致。在与其他山羊、绵羊相应序列作进一步比较分析时发现, 388~400 位的序列很保守, 无突变, 但 649~713 位的序列却在部分物种间存在个别突变。

如表 1 所示,在与 Tokara 山羊^[7]相应外元比较中,共有 8 次突变,占总突变数的 26.2% (8/29);而与澳洲美利奴^[9]相应外元比较中,共有 10 次突变,占总突变数的 17.9% (10/56);与黄牛^[16]的比较结果为,外元中共有 10 个突变,占总突变数的 11.8%

(10/85)。由此可看出,物种内与物种间的突变主要来源于内元,并且物种距离越大,内元突变概率越大。但在本次试验分析中,本序列与 Tokara 山羊^[7]比较时,外元中发生的突变也相对较多,占 8 次。总体而言,第 4 与第 5 外元中突变较多。

表 1 本序列与几个反刍物种相应序列比较中外元突变情况

Table 1 Result of mutation happened in exons as this sequence aligned to GH gene of several other ruminant species

物种 Species	第一外元 1st exon	第二外元 2nd exon	第三外元 3rd exon	第四外元 4th exon	第五外元 5th exon
与山羊 ^[7] 比较 Compared with the GH gene of some goat	无 No mutation	650(C→G) 659(C→G)	无 No mutation	1 531(T→C) 1 532(C→T) 1 536(C→G)	1 847(C→G) 1 897(C→G) 1 915(C→G)
与澳洲美利奴 ^[9] 比较 Compared with the GH gene of Australia Merino sheep	无 No mutation	无 No mutation	1 118~1 119 (缺失 C) 1 118~1 119 (C deletion) 1 127(G→A)	1 493(G→T) 1 494(T→G) 1 531(T→C) 1 532(C→T)	1 836(C→T) 1 892(C→T) 1 895(C→T) 1 913(C→T)
与黄牛 ^[16] 比较 Compared with the GH gene of some bovine	无 No mutation	678(A→G) 782(A→G)	1 118~1 119 (缺失 C) 1 118~1 119 (C deletion)	1 416(T→C) 1 471(C→T) 1 531(T→C) 1 532(C→T)	1 836(T→G) 1 837(T→C) 1 847(C→G)

从表 1 中还可看出,本序列第 4 外元区中第 1 531 位的 T 均突变为 C,而 1 532 位的 C 均突变为 T。在 NCBI 信息库中,进一步与其他几个物种进行 Blast 分析,所得结果与此一致,因此认为这 2 个连续碱基的突变可作为波尔山羊的特征性标记,并且它们的突变可能对波尔山羊该基因的表达及基

因产物的构象产生影响,当然这有待进一步确证。

在以上序列比较中,除了外元中存在 2 个特征性突变外,在内元中也存在其他 3 个特征性的突变,即 942 位与 943 位之间缺失 A,而 1 178 位 T 突变为 C,1 561 位的 A 突变为 G。估计这几个位点的突变也可作为波尔山羊种质特性的分子标记。

[参考文献]

- [1] Miller W L, Eberhardt N L. Structure and evolution of the growth hormone gene family[J]. Endocrine Review, 1983, 4: 97.
- [2] Miller W L. Regulation of gene expression by hormones[M]. New York: Plenum Press, 1983. 177.
- [3] Malveiro E, Pereira M, Marques P X, et al. Polymorphisms at the five exons of the growth hormone gene in the algarvia goat: possible association with milk traits[J]. Small Rum Res, 2001, 41: 163- 170.
- [4] Birnbaum M J, Baxter J D. Glucocorticoids regulate the expression of a rat growth hormone gene lacking 5' flanking sequence[J]. J Bio Chem, 1986, 261: 291- 297.
- [5] 李 宁, 章 岩. 鸡生长激素 cDNA 及其 5' 端调控区的克隆分析[J]. 中国农业科学, 1998, 31(2): 76- 82.
- [6] Brinster R L, Chen H Y. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting egg[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 4438- 4442.
- [7] Kioka N, Manabe E, Abe M, et al. Cloning and sequencing of goat growth hormone gene[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53(6): 1583- 1587.
- [8] 任兆钧, 叶增灿. 羊生长激素结构基因的全顺序测定[J]. 生物化学与生物物理学报, 1991, 23(3): 236- 245.
- [9] Byrne C R, Wilson B W, Ward K A. The isolation and characterization of the ovine growth hormone gene[J]. Aust J Biol Sci, 1987, 40(4): 459- 468.
- [10] Orian J M. Cloning and sequencing of the ovine growth hormone gene[J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16(18): 9046.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [12] 吕道俊, 何明清. 益生地衣芽孢杆菌天冬氨酸激酶 II 基因的 PCR 扩增及序列分析[J]. 四川农业大学学报, 1999, 17(4): 411- 416.
- [13] 赵晓祥, 李 晶, 李荣萍, 等. 鲤鱼生长激素基因的 PCR 扩增、克隆及其序列比较[J]. 生物工程学报, 1996, 12(3): 284- 288.
- [14] Gootwine E, Valinsky A. Restriction fragment length polymorphism at the growth hormone gene in sheep, goats and cattle[A]. Proceedings of the 4th world congress on genetics applied to livestock production[C]. Edinburgh: Organizing Committee 4WCGALP, 1990. 83- 85.
- [15] 阎隆飞, 张玉麟. 分子生物学[M]. 第 2 版. 北京: 中国农业大学出版社, 1997. 78.

- [16] Gordon D F, Q ick D P, Erw in C R, et al Nucleotide sequence of the bovine grow th homone chromosomal gene[J]. Mol cell Endocrinol, 1983, 33(1): 81- 95

Cloning and sequence analysis of the Boer goat grow th homone gene

L IU Zhang-guo¹, L UO Jun², ZHENG Xin-m in³, YANG Gong-she², GOU De-m ing⁴

(1 Institute of Poultry Science, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Yangzhou, Jiangsu 225003, China;

2 College of Animal Science and Technology, North West Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 Center for Biotechnology, Academy of Agriculture Science of Hubei Province, Wuhan, Hubei 430064, China;

4 College of Life Science, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China)

Abstract Based on the similarity of growth hormone gene in different species, two primers were designed and used to amplify an approximately 2 0 kb DNA fragment by PCR technique from genomic DNA sample of Boer goat. The PCR products were ligated into the PMD-18T vector, and then transformed into competent cells of *E. coli* DH₅α. The DNA sequencing result showed that the GH gene of Boer goat is 1 951 bp (without primer sequence) in length and contains five complete exons. The homology analysis of the GH gene of sequences by ClustalW software indicated that the nucleotide sequence homologies of GH gene of Boer goats were 98.5% with Tokara goats, 97.0% with Merino sheep, and 95.4% with bovine GH genes; variability of introns was greater than exons, the variation of other regions increased with the increasing genetic relationships of species, which is generally in agreement with the molecular evolution of species.

Key words: Boer goat; GH gene; cloning; sequencing; homology analysis

· 简 讯 ·

“秦巴山区人工种草与牛羊饲养技术研究”获陕西省科学技术二等奖

由西北农林科技大学罗军教授主持的“秦巴山区人工种草与牛羊饲养技术研究”项目, 2002年5月通过了安康市科技局组织的鉴定, 2004年4月获得陕西省科学技术二等奖。

该项目针对秦巴山区畜牧业发展中的关键问题进行了全面分析和探索。自1999年起, 项目组先后从原西北农业大学、原陕西省农科院及北京、四川等地引进多年生黑麦草、1年生黑麦草、苇状羊茅、冬牧-70黑麦草、百喜草、白三叶、红三叶、紫花苜蓿、红豆草、皇竹草、鲁梅克斯、苏丹草、串叶松香草等优良牧草品种23个, 分别在试验点进行品比试验。经过连续3年的品比研究, 筛选出适于该地区种植的12种优良牧草品种, 其中大多数品种能安全过夏并在冬季保持青绿, 具有耐旱、耐瘠薄、抗逆性强等特点。同时通过推广牧草规范化栽培技术, 使项目区人工草地禾本科牧草产量达90 t/hm²以上; 豆科牧草产量达45 t/hm²以上; 中高山区牧草产量一般是上述产量的50%~70%; 混播牧草产量达105 t/hm²以上。由于秦巴山区牛羊在饲养过程中缺乏优质越冬饲料, 因此项目组针对秦巴山区农户饲养规模小、分散的特点, 重点在项目区内推广饲料的塑料袋半干青贮技术, 收到了良好的效果。同时, 对秸秆微贮、氨化技术等进行了专题研究, 结果表明, 稻秸微贮、氨化后饲喂西镇牛, 其日增重较稻秸对照组分别提高135%和118%。秦巴山区的林果种植面积较大, 为了充分利用林下草地, 项目组选择苜蓿、红三叶、白三叶、毛苕子等牧草品种进行林草间作研究, 结果表明, 林下种植白三叶、毛苕子的效果最好, 既可增加土壤肥力, 又有利于果林生长。1999年, 首次引进波尔山羊, 并利用波尔山羊与南江黄羊进行了杂交改良和商品生产。项目组研制的肉山羊草粉全价颗粒饲料, 在满足山羊营养需要的基础上, 增加了草粉的比例, 成功制作了草粉含量为20%的全价颗粒料, 饲喂方便, 适口性好。波尔山羊和南江黄羊分别与陕南山羊杂交后的杂交一代用草粉全价颗粒料饲喂后, 其日增重较陕南山羊分别提高50%和35%, 增重效果显著。项目实施后累计新增产值1.12亿元, 人工种草和牛羊生产等新增纯收入9118万元。

该成果的取得, 解决了秦巴山区长期以来存在的缺乏优良牧草品种和饲料贮藏加工技术、缺少优良牛羊品种和配套饲喂方法等问题, 为该地区农业人口增收提供了有力的技术保障。该成果的鉴定专家一致认为, 该研究成果为秦巴山区和全国同类地区畜牧业、草业的发展提供了科学依据; 林下种草试验能够有效解决目前退耕还林还草远近期效益的矛盾, 与国内外同类研究相比, 达国内领先水平。

(窦春蕊 供稿)