

小型猪生长激素基因启动子区 SNPs 分析

郑茂恩^{1,2}, 潘登科¹, 冯书堂¹, 刘 晓³, 叶绍辉², 浦亚斌¹, 何晓红¹,
赵倩君¹, 关伟军¹, 马月辉^{1,2*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2. 云南农业大学动物科学与技术学院, 昆明 650201; 3. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 兰州 730050)

摘 要: 利用 PCR-SSCP 方法检测 4 种小型猪(五指山猪、巴马猪、香猪和藏猪)和 2 种中大型猪(达兰猪和长白猪)生长激素(GH)基因的单核苷酸多态性。发现小型猪中有 3 处碱基突变发生在 5'-调控区, 对基因型和等位基因频率进行分析, 4 种小型猪生长激素 5'-侧翼区基因位点中, 等位基因 A 和 D 为优势等位基因, 与达兰猪和长白猪中的分布差异显著($P < 0.05$)。以上结果表明猪品种间的体型差异可能与 GH 基因 5'-调控区的基因突变和前导肽中的氨基酸变异有关。

关键词: 小型猪; 生长激素; 启动子区; 矮小

中图分类号: S828; Q343.1⁺5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)05-0639-06

Analysis of SNPs in Promoter Region of Growth Hormone(GH)Gene in Minipigs

ZHENG Mao-en^{1,2}, PAN Deng-ke¹, FENG Shu-tang¹, LIU Xiao³, YE Shao-hui²,
PU Ya-bin¹, HE Xiao-hong¹, ZHAO Qian-jun¹, GUAN Wei-jun¹, MA Yue-hui^{1,2*}

(1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. Lanzhou Institute of Animal and Veterinary Pharmaceutics Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China)

Abstract: The single nucleotide polymorphism (SNP) of growth hormone gene was investigated in six different pig breeds, including four minipig breeds which were Wuzhishan pigs, Bama pigs, Xiang pigs and Tibet pigs, and other two breeds which were Dalan pigs and Landrace pigs. Three pairs of primers for promoter region of GH gene were designed on the basis of database of pig genomic sequence and the SNPs were detected by PCR-SSCP method. The results indicated that three mutations were in the 5'-flanking region. The analysis results showed that the frequencies of allele A and D in four minipig breeds were higher than that in other breeds at locus of 5'-flanking region ($P < 0.05$). According to the above results, difference of body size may have relationship with these SNPs of 5'-flanking region and amino acid mutation of the leading peptide of GH in these pig breeds.

Key words: minipigs; growth hormone; promoter region; dwarf

我国有着丰富的小型猪资源, 小型猪作为试验动物越来越广泛, 但小型猪小型化的分子遗传机制

一直不清楚。目前主要认为猪的生长轴中某些基因的变异导致蛋白结构的变化和功能活性的降低, 阻

收稿日期: 2008-01-07

基金项目: 国家自然科技资源共享平台专项(2005DKA21101); “十一五”国家科技支撑计划(2006BAD13B08); 中国实验用小型猪资源开发与研究应用(2004BA717B-01)项目资助

作者简介: 郑茂恩(1982-), 山东菏泽人, 硕士生, 主要从事分子生物学研究, E-mail: zh-maon@163.com

* 通讯作者: 马月辉(1964-), 研究员, 博导, 主要从事动物遗传资源评价研究, E-mail: yuehui.ma@263.net

碍细胞内信号的传导,影响了生长发育。生长激素(growth hormone, GH)基因是调控动物生长发育的核心,是调节动物生长发育的主效基因之一,并且动物生长速度的差异与生长激素基因的结构和表达水平密切相关。目前该基因多集中于 5'-侧翼区至第 3 外显子部分序列的多态性研究,而对生长激素基因启动子区域调控因子作用研究较少。猪 GH 基因之间的差异可能是导致品种间基因表达水平及其生长发育差异的根本原因^[1-5]。Li 等通过三维结构分析发现榕江香猪生长激素成熟肽第 108 位异亮氨酸的替换可能导致了生长激素与受体间亲和力下降,且在猪品种间存在很大差异^[6]。姚惠娟等通过测量小型猪生长激素含量推测出体型的大小与 GH 含量无关,可能与基因调控有关^[7]。研究利用 PCR-SSCP 方法和克隆测序技术对 4 个小型猪和 2 个中大型猪的生长激素启动子区序列进行单核苷酸多态

性(SNPs)研究,分析不同的基因型和等位基因频率在猪品种之间的差异,并探讨猪品种生长发育和体型差异之间的关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料和主要试剂

共采集 6 个猪品种(4 个小型猪种,1 个中型猪种,1 个大型猪种)185 个个体的耳组织样品(表 1)。采用酚/氯仿抽提法提取 DNA 后溶于 TE 中,用紫外分光光度计检测其纯度和浓度,然后稀释为 100 ng · μL⁻¹ 备用。

引物由上海生工生物工程有限公司合成;Taq DNA polymerase、Marker 购自北京汇天东方公司;质粒 pMD18-T Vector 购自大连宝生物公司;T₄ 连接酶购自 Promega 公司;DH5α 购自北京天根公司。

表 1 试验样品一览表

Table 1 List of samples used in the study

体型 Body size	品种 Breed	样本数 Number	样品来源 Source of sample
小型猪	五指山猪 WZSP	48	农业部国家五指山猪保种场(北京)
	巴马猪 Bama pig	31	中国实验用小型猪种质资源中心(北京)
	香猪 Xiang pig	15	贵阳中医学院试验猪场
	藏猪 Tibet pig	16	甘肃合作地区
中型猪	达兰猪 Dalan	45	北京养猪育种中心
大型猪	长白猪 Landrace	30	天津市宁河种猪场

1.2 引物设计和 PCR 扩增

根据 GenBank 上猪生长激素基因全序列

(M17704)和猪生长激素启动子区序列(U58113)利用 Primer Premier 5.0 设计 3 对引物(表 2)。

表 2 猪生长激素启动区及调控区 PCR 扩增引物

Table 2 Primers of coding and regulation regions of GH gene for PCR

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primers sequence	PCR 产物大小/bp PCR products size	退火温度/℃ Annealing temperature
P ₁	Forward: ATCCTCGTGGACAACCCC Reverse: TCCCACTCATCCTGTTC	201	59.0
P ₂	Forward: AGAGGAGGAGCGGGAACA Reverse: TGCTCACATTCGAAACCC	341	58.8
P ₃	Forward: CTTGGGCTTTGGGGTTTC Reverse: GGCGTTGGCAAATAGGCT	270	57.3

PCR 反应体系为 10 μL:10×Taq Buffer 缓冲液 1 μL,2.5 mmol · L⁻¹ dNTPs 0.4 μL,10 μmol · L⁻¹ 上下游引物各 0.3 μL,Taq DNA polymerase 0.25 U,DNA 模板 1 μL,加 ddH₂O 至 10.0 μL。

PCR 反应程序是:94 °C 5 min;94 °C 40 s,退火温度 30 s,72 °C 40 s,33 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。

1.3 PCR-SSCP 分析

3 μL PCR 扩增产物加 5~6 μL 上样变性缓冲液(98%去离子甲酰胺、0.025%溴酚蓝、0.025%二甲苯青、10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (pH8.0)、2%甘油), 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 立即冰浴 10 min, 使之保持变性状态, 变性后的 PCR 产物在 12% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶(Arc: Bus=29:1)中 150 V、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下电泳 8~12 h 后, 银染显色。

1.4 目的片段克隆和序列测定

根据 PCR-SSCP 分析结果, 选取不同基因型个体的样品进行克隆测序。PCR 产物经电泳鉴定后, 切胶回收目的片段进行纯化, 将纯化后的目的 DNA 片段用 T-A 克隆法克隆在 pMD18-T Vector 上, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 进行蓝白斑筛选, 取阳性菌落进行培养, 进行 PCR 扩增和质粒酶切鉴定, 最后进行序列测定。

2 结果与分析

根据试验结果分析, 引物 P₃ 的扩增产物在 4 种小型猪种和 2 种中大型猪种中均未发现多态性。

2.1 启动子区中引物 P₁ 扩增序列的分析

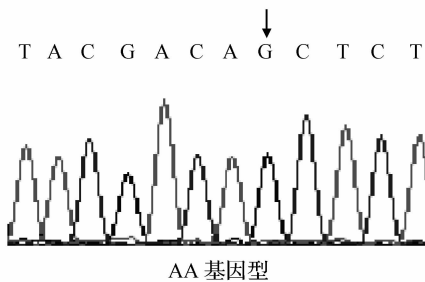
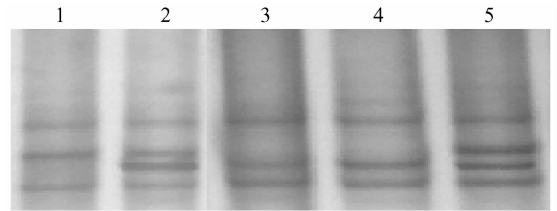


图 2 AA 和 BB 基因型图谱及序列分析

Fig. 2 The mutation at 113 nt nucleotide between AA and BB genotypes

2.1.1 引物 P₁ 扩增片段的 PCR-SSCP 分析结果

所设计引物的 PCR 扩增片段与预期大小一致, 并且没有非特异性条带(图略)。对引物 P₁ 的扩增产物进行 SSCP 检测。分析显示, 在启动子区引物 P₁ 扩增片段上检测到 3 种基因型, 分别命名为 AA、BB 和 AB(图 1)。



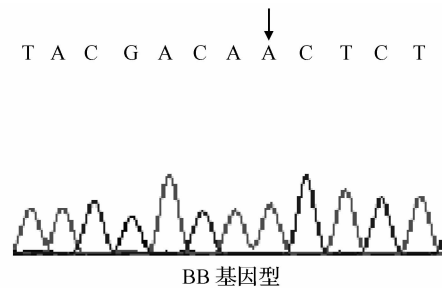
3,4. BB;1. AA;2,5. AB

图 1 引物 P₁ 的 PCR 扩增产物的 SSCP 分析

Fig. 1 SSCP analysis of PCR products by primer P₁ in different pig breeds

2.1.2 引物 P₁ 不同基因型个体的克隆测序及分析

取 AA 和 BB 2 种基因型的 PCR 产物片段进行凝胶回收、纯化, 然后克隆测序, 进一步证实多态位点的存在(图 2)。BB 与 AA 基因型相比在 5'-调控区 113 nt 处发生 G→A 突变。



2.2 启动子区中引物 P₂ 扩增序列的分析

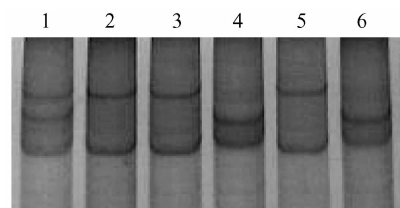
2.2.1 引物 P₂ 扩增片段的 PCR-SSCP 分析结果

对引物 P₂ 的扩增产物进行 SSCP 检测, 在启动子区引物 P₂ 扩增片段上检测到 3 种基因型, 分别命名为 CC、DD 和 CD(图 3)。

2.2.2 引物 P₂ 不同基因型个体的克隆测序和分析

对在 SSCP 中呈现多态性个体的 PCR 产物进行凝胶回收、纯化, 然后进行克隆测序, 进一步证实多态位点的存在(图 4)。结果表明, DD 基因型在处于起始位点 353 nt(T→C)处发生了碱基突变。而 306

nt 处的碱基突变(T→A)发生在核心启动区附近。



4,6. CC;2,3,5. DD;1. CD

图 3 引物 P₂ 扩增片段的 PCR-SSCP 分析结果

Fig. 3 SSCP analysis of PCR products by primer P₂ in different pig breeds

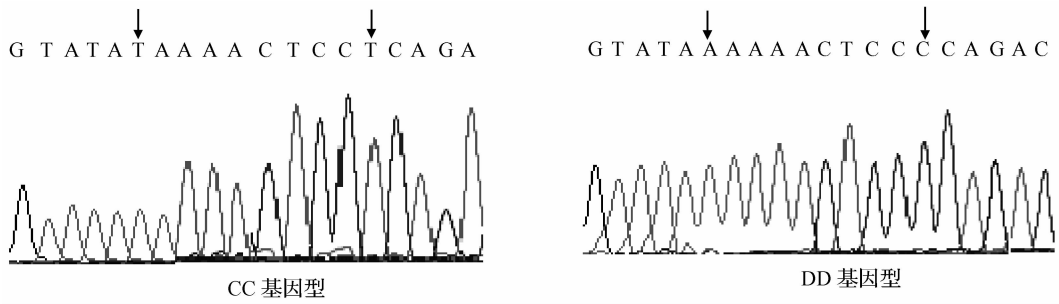


图 4 CC 和 DD 基因型图谱及序列分析

Fig. 4 The mutations at 306 nt and 353 nt nucleotide between CC and DD genotypes

2.3 不同猪品种间 GH 基因型频率和等位基因频率分析

根据 SSCP 电泳带型分析结果,对五指山猪、巴马猪、香猪、藏猪、达兰猪和长白猪的 AA、AB、BB 基因型频率及 A、B 2 种等位基因的频率进行统计,并对结果进行适合性 χ^2 检验和方差分析,以观察各群体是否处于 Hardy-Weinberg 平衡和多态位点的差异性。适合性 χ^2 检验结果表明,各群体在该位点均处于 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$)。由表 3

可知,引物 P₁ 的扩增产物在 4 种小型猪中检测到的 AA 基因型频率分别为 0.625、0.935、0.534 和 0.500;等位基因 A 的频率分别为 0.760、0.968、0.567 和 0.719,在五指山猪、广西巴马猪、贵州香猪、甘肃藏猪 4 种小型猪中为优势等位基因,AA 基因型在 4 种小型猪中的基因型频率均高于达兰猪和长白猪(达兰猪为 0.178,长白猪为 0.066)。巴马猪 BB 基因型频率为 0,与其它品种猪存在很大的差异。

表 3 6 个猪品种 GH 基因 5'-调控区中引物 P₁ 扩增产物的基因型和等位基因频率

Table 3 The frequencies of genotype and allele of GH gene 5'-flanking region amplified by primer P₁ in six pig breeds

品种 Breed	样本数 Number	AA	AB	BB	A	B	χ^2
五指山猪 WZSP	48	0.625(30)	0.271(13)	0.104(5)	0.760	0.240	3.163
巴马猪 Bama pig	31	0.935(29)	0.065(2)	0.000(0)	0.968	0.032	0.0344
香猪 Xiang pig	15	0.534(8)	0.333(5)	0.133(2)	0.567	0.433	3.515
藏猪 Tibet pig	16	0.500(8)	0.438(7)	0.062(1)	0.719	0.281	0.108
达兰猪 Dalan pig	45	0.178(8)	0.578(26)	0.244(11)	0.467	0.533	1.162
长白猪 Landrace	30	0.066(2)	0.267(8)	0.667(20)	0.200	0.800	0.833

括号内的数据为个体数。 $\chi^2_{0.05(2)} = 5.99$, $\chi^2_{0.01(2)} = 9.21$ 。下同

The data in brackets mean the number of individuals. The same as below

根据 SSCP 电泳图谱结果分析,对 6 个猪种的基因型频率及等位基因频率进行统计,并对结果进行适合性 χ^2 检验和方差分析,由表 4 可知,除巴马猪外,其他各群体在该位点的等位基因频率均处于 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$)。等位基因 D 在五指山猪、巴马猪、香猪、藏猪小型猪种中的频率分别为 0.688、0.952、0.767 和 0.656;而达兰猪和长白猪种等位基因 D 的频率分别为 0.367 和 0.300,等位基因 D 在 4 种小型猪种中为优势等位基因,DD 基因型在 4 种小型猪种中的基因型频率为 0.417~0.935。

3 讨论

3.1 pGH 基因 SNP 位点分析

现在认为人 Laron 症、小鼠、性连锁矮小鸡的矮小主要是由于其生长激素受体上的结合位点的碱基发生了突变,犬类是由于胰岛素样因子发生了变异^[8-11],而对小型猪的小型化分子机制还不太清楚。通过对生长激素基因启动区的分析,发现 4 种小型猪与 2 种中大型猪之间存在一定的差异,引物 P₁ 扩增片段的 SSCP 检测分析认为,此多态性是由

表 4 6 个猪品种 GH 基因 5'-调控区中 P₂ 扩增产物的基因型和等位基因频率Table 4 The frequencies of genotype and allele of GH gene 5'-flanking region in six pig breeds amplified by primer P₂

品种 Breed	样本数 Number	CC	CD	DD	C	D	χ^2
五指山猪 WZSP	48	0.083(4)	0.458(22)	0.417(22)	0.312	0.688	0.213
巴马猪 Bama pig	31	0.032(1)	0.032(1)	0.935(29)	0.048	0.952	13.086
香猪 Xiang pig	15	0.0667(1)	0.333(5)	0.600(9)	0.233	0.767	0.070
藏猪 Tibet pig	16	0.188(3)	0.312(5)	0.500(8)	0.344	0.656	1.511
达兰猪 Dalan pig	45	0.444(20)	0.378(17)	0.178(8)	0.633	0.367	1.567
长白猪 Landrace	30	0.467(14)	0.467(14)	0.067(2)	0.700	0.300	0.370

于在 GH 基因序列中 113 nt 处发生 G→A 突变,结果显示在五指山猪、巴马猪、贵州香猪和藏猪 4 种小型猪中 A 等位基因的分布占有优势,频率较高,广西巴马猪与其它猪种相比,较为显著的是 BB 基因型频率为 0,这是否可以用来进行猪品种之间的鉴定和作为一种分子遗传辅助标记还需要综合考虑群体样本的大小。从等位基因频率来看,4 种小型猪与达兰猪和长白猪的生长激素基因多态位点的分布有很大差异。引物 P₂ 扩增片段 SSCP 检测分析,在 306(T→A)和 353 nt 处(T→C)发生了碱基突变,等位基因 D 主要分布在 4 种小型猪中,从等位基因 D 的频率来看,小型猪与达兰猪和长白猪差异很大。引物 P₃ 所扩增的片段中包含部分外显子 2,通过片段分析存在一定基因连锁性,外显子 2 无论是在小型猪还是中大型猪中都存在 SNPs 变异位点,这与前人的报道相一致^[12]。

3.2 pGH 基因转录因子分析

功能基因的表达调控是多层次的,并且受各种信号网络调控,主要表现在基因转录、mRNA 的加工、修饰和翻译等环节。5'-调控区包含了调控基因的许多转录因子、增强子和上游元件,他们对基因的表达和调控都起到很重要的作用,转录因子在调控区的结合位点一般具有较强的保守性,在不同的物种之间序列基本一致。CdxA 元件在基因调控区能增强基因转录的活性,ADR1、GATA 家族属于锌指结构,这些转录因子在 DNA 的转录过程中都提高了启动子转录的强度和活性^[13-14]。通过 TFsearch 在线软件分析,生长激素 5'-调控区的基因突变影响了 CdxA、ADR1、GATA-1、GATA-2、GATA-3 等转录因子的活性。试验中发现 4 种小型猪在该序列发生了变异,这些变异可能影响蛋白质的亲和力。

3.3 pGH 基因 SNPs 的生物学意义

利用 PCR-SSCP 方法对上游至外显子 2 的序

列进行了分析,共发现 3 个 SNPs 位点,113(G→A)和 306 nt 处(T→A)发生在 5'-调控区,它们在小型猪与达兰猪和长白猪之间的分布存在着很大的差异,这有可能与调控基因的功能有关;353 nt 处(T→C)发生在第 1 内含子区,内含子的突变可以抑制信使 RNA 产物的产生和影响外显子的剪接,一般情况下是有害的,但是此处的内含子突变还不太清楚。前导肽是信号肽的一种,而许多蛋白的前导肽具有分子内伴侣功能,在蛋白的转运过程中起到引导性和调控性作用。帅素容等研究发现,前导肽中氨基酸的突变可能对 GH 的生物活性和在细胞内的转运、定位的调控作用有关,663 nt 处(C→T)发生的突变导致了前导肽中 1 个氨基酸变异位点的突变(A→V)^[15-16]。缬氨酸(V)主要分布在 4 种小型猪中,而丙氨酸(A)主要分布在达兰猪和长白猪中。

参考文献:

- [1] CASAS-CARRILLO E. Association of growth hormone and insulin like growth hormone factor genotypes with growth and carcass traits in offspring of purebred swine[J]. *Proc 5th World Congr Genet Appa Livest Prod*, 1994,21:272-275.
- [2] 宋成义,经容斌. 畜禽 GH 基因多态性与生产性能相关研究进展[J]. *国外畜牧科技*,2002,27(2):25-27.
- [3] VIZE P D, WELLS J R E. Isolation and characterization of the porcine hormone gene [J]. *Gene*, 1987, 55: 339-344.
- [4] YERLE M, MANSAIS Y, THOMSEN P D, et al. Location of the porcine growth hormone gene to chromosome 12P^{1.2}-P^{1.5} [J]. *Animal Genetics*, 1993, 24(4):129-131.
- [5] KOPCHICK J J, ANDRY J M. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction [J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2000,71,293-314.

- [6] LI J, RAN X Q, WANG J F. Identification and function of the growth hormone gene in Rongjiang pig of China [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2006, 58(3): 217-224.
- [7] 姚惠娟, 鲍世民. 中国小型猪生长激素测定[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(5): 44-45.
- [8] LARON Z, PERTZELAN A, MANNHEIMER S. Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone—a new inborn error of metabolism? [J]. *Israel Journal Medical Sciences*, 1966, 2(2): 152-155.
- [9] CHARLTON H M, CLARK R G, ROBINSON I C, et al. Growth hormone-deficient dwarfism in the rat; a new mutation[J]. *The Journal of Endocrinology*, 1988, 119(1): 51-58.
- [10] HUANG N, COGBURN L A, AGARWAL S K, et al. Over expression of a truncated growth hormone receptor in the sex-linked dwarf chicken; evidence for a splice mutation [J]. *Molecular Endocrinology*, 1993, 7(11): 1391-1398.
- [11] NATHAN B, SUTTER, CARLOS D, et al. A single IGF1 allele is a major determinant of small size in dogs[J]. *Science*, 2007, 316(5821): 112-115.
- [12] JIANG Z H, ROTTMANN O J, PIRCHNER F. Sequence characterization of genetic polymorphism at the 2nd exon of porcine growth hormone gene[J]. *The Journal of Nanjing Agricultural University*, 1996, 20(2): 67-71.
- [13] THUKRAL S K, MORRISON M L, YOUNG E T. Mutations in the zinc fingers of ADR1 that change the specificity of DNA binding and transactivation [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1992, 12(6): 2784-2792.
- [14] CECELIA D, TRAINOR R, SIMPSON M A. GATA zinc finger interactions modulate DNA binding and transactivation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275, 36: 28157-28166.
- [15] 帅素容, 李学伟, 朱 砺, 等. 11个猪品种生长激素(pGH)基因多态性及其遗传分化研究[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(8): 753-759.
- [16] 赵中权, 帅素容, 李 平, 等. 藏猪生长激素基因核苷酸多态性分析[J]. 中国畜牧杂志, 2006, 42(3): 12-13.

动物疫情快递

安哥拉发生狂犬病

2009年4月24日,安哥拉 Antonio Jose 博士向 OIE 通报了狂犬病疫情。疫情始于 2009年4月6日,于4月8日确诊,此次疫情是临床发病,LUANDA 省犬的狂犬病发病率(1%→2%)和死亡率(1%→2%)异常升高。病原是狂犬病病毒,血清型未定。Onderstepoort 兽医研究所进行了直接免疫荧光试验(结果未定)。目前已经采取了狂犬病控制措施。安哥拉采取了区域化和紧急免疫措施。疫情发生后对动物展开了捕捉和免疫工作。正在搜查和确定可能的接触人群和动物。大规模的免疫工作已完成,接种了 111 000 余只动物(犬、猫和猴)。常规免疫正在进行。

以色列发生马脑炎

2009年4月28日,以色列 Moshe Chaimovitz 博士向 OIE 通报了马脑炎疫情。疫情始于 2008年10月1日,共计 42 起,于 2009年3月30日确诊。此次疫情是临床发病,病原是马脑炎病毒,易感动物是马,共有易感马 800 匹,病例 150 例,症状为体温升高、食欲不振、虚弱和咳嗽。感染来原是空气传播。Kimron 兽医研究所马病室(国家实验室)的病原分离和血清中和试验结果不确定(2009年1月10日);兽医实验研究所(VLA, OIE 参考实验室)的 PCR 结果为阳性(2009年3月30日)。以色列采取了国内限制移运措施,未禁止免疫,未对动物进行治疗。目前疫情已解除。

(摘译自 OIE 网站)