

西藏小型猪 GH 基因部分序列的 SNP 分析

王玉珏, 岳敏, 顾阳, 顾为望, 田雨光

(南方医科大学实验动物中心暨比较医学研究所, 广州 510515)

【摘要】 目的 对西藏小型猪 GH 基因(部分序列)进行 SNP 分析, 筛选体型较小的基因型。方法 采用 PCR 产物直接测序法对 108 头西藏小型猪 GH 基因 5' 端部分片段进行单核苷酸多态性(SNP)分析。结果 通过对比发现 GH 基因共有 5 个变异位点, 其中 T45C 位点的多态信息含量最高。不同基因型生长性状比较的结果显示: 在 GH 基因中 T45C 突变位点上 TC 基因型 6~8 月龄的西藏小型猪的腹围值较小, G84A 突变位点上 AA 基因型 3~5 月龄的西藏小型猪的体重、体长值较小, G93A 突变位点上 GG 基因型 6~8 月龄的西藏小型猪的体长、体高值较小。结论 在 GH 基因中 T45C、G84A、G93A 位点突变的 TC、AA、GG 基因型可能与体型较小有关。同时发现西藏小型猪在以上位点遗传变异程度大, 具有较高的杂合度和遗传多样性, 可以为选育工作提供比较丰富的素材。

【关键词】 西藏小型猪; GH 基因; SNP

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 01-0050-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.001.009

Single nucleotide polymorphism analysis of growth hormone gene in Tibet minipigs

WANG Yu-jue, YUE Min, GU Yang, GU Wei-wang, TIAN Yu-guang

(Center of Laboratory Animal and Institute of Comparative Medicine of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 Objective To screen genotypes of small body in Tibet minipigs by single nucleotide polymorphism analysis (SNP) of growth hormone (GH) gene. **Methods** The PCR products are sequenced. According to the results, SNP analysis are applied in GH gene 5' fragment of 108 Tibet minipigs. **Results** Five mutation points were found by comparison. The polymorphism information content of the T45C locus is highest. The results of growth traits of different genotypes showed that the abdomen of 6~8 month old Tibet minipigs of TC genotype at T45C mutation site is small; the weight and height of 3~5 month old Tibet minipigs of AA genotype at G84A mutation site is small; the body length and height of 6~8 month old Tibet minipigs of GG genotype at G93A mutation site is small. **Conclusion** The AA TC, GG genotypes of T45C, G84A, G93A mutation sites in GH gene may be associated with small body. We also found that genetic mutations always occur in the above sites with high heterozygosity and genetic diversity, which can provide rich material for breeding research.

【Key words】 Tibet minipigs; Growth hormone gene; Single-nucleotide polymorphism (SNP)

【基金项目】 国家自然科学基金(81402625); 国家 973 项目(2011CBA01006); 广东省自然科学基金(S2013010014720); 中国博士后科学基金(2014M550439); 国际科技合作专项(2011DFA33290)。

【作者简介】 王玉珏(1983-), 女, 助理研究员, 研究方向: 比较医学和人类疾病动物模型, E-mail: yujue.wang@qq.com。岳敏(1983-), 女, 实验师, 研究方向: 比较医学和人类疾病动物模型。E-mail: 343779791@qq.com。两者为并列第一作者。

【通讯作者】 田雨光(1987-), 男, 博士生, 研究方向: 比较医学和人类疾病动物模型, E-mail: yuguang.tian@qq.com。顾为望(1956-), 男, 教授、博导, 研究方向: 比较医学和人类疾病动物模型。E-mail: 645294283@qq.com。

由于具有体型小、便于操作,而且解剖生理特性与人特别相近的特点,小型猪已逐渐成为生物医药研究的重要模式动物,应用数量逐年大幅递增^[1]。本研究中的西藏小型猪是世界上体型较小的小型猪之一,来源于青藏高原、海拔 2500 ~ 4300 m 的农区和半农牧区,是唯一能够适应高海拔气候和以放牧为主的猪种,封闭的地理环境使西藏小型猪保存了非常纯正的品种资源。本课题组于 2004 年将西藏小型猪从西藏引进至广州,目前已完成风土驯化及实验动物化研究,并开展了相关动物模型、药物实验及转基因克隆等研究。从免疫学、遗传学研究发现,该品系具有独特的免疫相关指标和遗传特征,加上其独特的外形,是一种优良的实验用小型猪品种^[2]。

生长激素(growth hormone, GH)是由垂体前叶中嗜酸性细胞合成和分泌的单链多肽激素,由 190 ~ 191 个氨基酸组成^[3]。它是重要的生理功能物质,具有调节脂类、糖类和蛋白质代谢,促进生长的作用^[4]。GH 基因是 GH 的遗传物质基础,它是重要的生理功能基因,与醛缩酶、cAMP 依赖性蛋白调节单位类型存在连锁。因此 GH 基因研究一直为人们所关注^[5]。

本实验采用直接测序法对西藏小型猪 GH 基因 5' 调控区部分片段的单核苷酸多态性(SNP)进行分析比较,寻找品种内 SNP 位点以及不同基因型与其生产性状之间的相关性。

1 材料和方法

1.1 实验动物及基因组 DNA 提取

1.1.1 实验动物

西藏小型猪(108 头)均达到性成熟和体成熟,年龄在 3 ~ 8 月龄之间,均由南方医科大学实验动物中心提供【SCXK(粤)2011-0015】。

1.1.2 基因组 DNA 的提取

采集西藏小型猪前腔静脉血并提取基因组 DNA(北京艾德莱生物科技有限公司全血/组织/细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒),紫外分光光度法检测 DNA 的纯度, A_{260}/A_{280} 介于 1.65 ~ 1.85 之间。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 中猪 GH (GI: 347618782) 基因的序列,运用引物设计软件 Primer5.0 设计引物,由宝生物工程(大连)有限公司合成,引物序列:上游引物 5'-GGAGGAGAAGGGACAGGG-3';下游引物

5'-TAGGTGTCGGCAGCCAGT-3'。

1.3 PCR 扩增

PCR 扩增总体积为 50 μ L(北京艾德莱生物科技有限公司),体系组成:50 ng 样品 DNA,2 μ L 引物混合物(10 μ mol/L),25 μ L 2 \times MasterMix (Taq DNA Polymerase: 0.05 units/ μ L; $MgCl_2$: 4 mmol/L; dNTPs: 4 mmol/L),ddH₂O 加至 50 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物 1% 凝胶电泳,凝胶成像仪下观察。

1.4 PCR 产物测序分型

PCR 产物送英潍捷基(上海)贸易有限公司进行纯化测序。使用 DNA STAR Lasergene v7.1, Chromas 等生物信息软件来寻找 SNP 位点,并进行基因分型。用 Popgene32 软件进行 SNP 位点确定,同时对基因型频率(genotypic frequency)、等位基因频率(allele frequencies)、观测杂合度(observed heterozygosity, Ho)、期望杂合度(expected heterozygosity, He)进行计算,并对西藏小型猪群体 GH 基因做 Hardy-Weinberg 平衡状态检验,使用 PIC Calc 0.6 软件进行多态信息含量(polymorphism information content, PIC)的计算。通过 SPSS13.0 对具有统计学意义的基因型频率及等位基因型频率做卡方检验。

1.5 西藏小型猪部分生长性状的测量

分别选取 3 ~ 8 月龄的西藏小型猪早饲前用电子天平称重;用体尺从两耳连线中点至尾根部测体长,从两前腿后胸肋凸起部测胸围,肩胛部最高点站立时垂直向下测体高^[6]。通过 SPSS13.0 对不同基因型的生长性状进行单向方差分析。

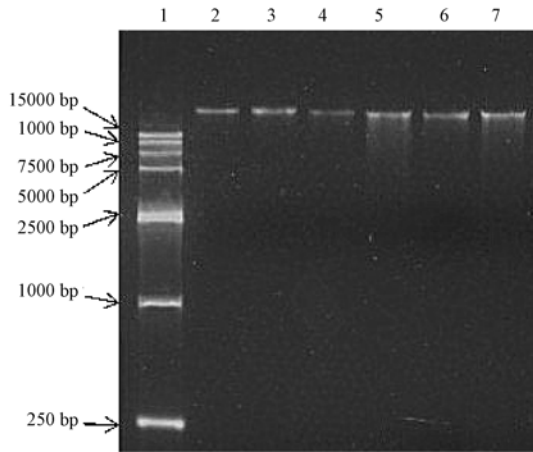
2 结果

2.1 西藏小型猪基因组 DNA 的提取

本实验成功的提取到了西藏小型猪的基因组 DNA,通过紫外分光光度仪分析 DNA 提取的结果, A_{260}/A_{280} 均在 1.8 ~ 2.0 之间。据电泳图谱中 DM15000 Mark 的标识判断对比,均在约 15000 bp 以上出现特异性条带(图 1)。

2.2 PCR 扩增及产物纯化

通过 PCR 扩增获得 GH 基因片段,电泳检测,据电泳图谱中 DM2000 的标识判断在约 605 bp 处出现 1 条特异性条带(图 2)。图中扩增条带清晰,是所需的条带。



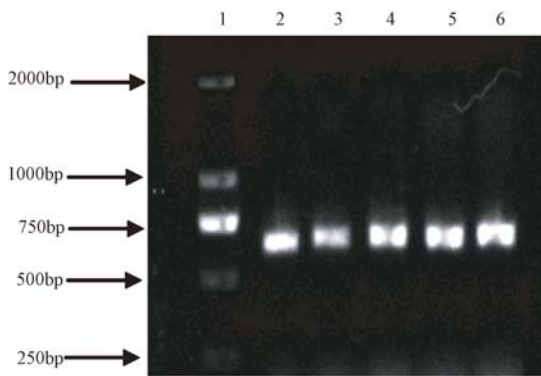
注:泳道 1 为 DM15000M;泳道 2~7 为基因组 DNA。

图 1 基因组提取产物琼脂糖凝胶电泳检测

Note: Lanes 1: D2000Marker;

Lanes 2 ~ 7: Products of DNA extraction.

Fig.1 Electrophoretic pattern of PCR products



注:泳道 1 为 DM2000;泳道 2~6 为 GH 基因扩增产物。

图 2 扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测

Note: Lanes 1: D2000Marker;

Lanes 2 ~ 6: PCR products of GH gene.

Fig.2 Electrophoretic pattern of PCR products

2.3 西藏小型猪 GH 基因的多态性分析

从表 1 的结果我们可以看出:在 GH 基因扩增的这一区域中,有 A12G, T45C, G84A, G93A, C133T 5 个 SNP 位点,在 A12G、G84A、G93A、C133T 突变位点上的优势等位基因分别为 G、A、G、C。同时,对西藏小型猪进行基因变异度程度分析可知 GH 基因杂合度较高 ($H_o = 0.3704$)。GH 基因 A12G (PIC = 0.360), T45C (PIC = 0.375), G84A (PIC = 0.256), G93A (PIC = 0.211), C133T (PIC = 0.369) 5 个 SNP 位点多态信息含量均较高,大部分属于中度多态。其中 T45C,该位点的多态信息含量最高。所研究西藏小型猪群体 GH 基因做 Hardy-Weinberg 平衡状态检验,卡方检验结果表明:该区域的西藏小型猪群体均处于平衡状态 ($P > 0.05$)。

2.4 GH 基因不同基因型的生长性状比较分析

从表 2 的结果我们可以看出:GH 基因在 T45C 突变位点上 TC 基因型 6~8 月龄西藏小型猪的腹围值较小,G84A 突变位点上 AA 基因型 3~5 月龄西藏小型猪的体重、体长值较小,G93A 突变位点上的 GG 基因型 6~8 月龄西藏小型猪的体长、体高值较小。我们推测在 GH 基因 T45C、G84A、G93A 位点突变的 TC、AA、GG 基因型可能与体型较小有关。

3 讨论

成熟的猪生长激素 (PGH) 分子由 190 个氨基酸形成 4 个几乎平行的 α -螺旋束,呈上-上-下-下的排布形式,分子量为 22×10^3 ,所含的 2 个二硫键为其生物活性所必需,其生物学功能主要是促进机体生长,增加肌肉重量和蛋白沉积等。猪 GH 基因全长 2231 bp,由 5 个外显子和 4 个内含子构成,定位

表 1 西藏小型猪 GH 基因的频率和等位基因频率
Tab.1 Genotype and allele frequency of GH gene in Tibet mini-pigs

样本数 Samples	位点 Loci	基因型频率 Genotype frequency			基因频率 Allele frequency		多态信息含量 PIC	χ^2	P
		AA	AG	GG	A	G			
108	12	0.1111 (12)	0.5370 (58)	0.3519 (38)	0.380	0.620	0.360	2.12	0.14
	45	0.2685 (29)	0.4629 (50)	0.2685 (29)	0.500	0.500	0.375	0.59	0.44
	84	0.0556 (6)	0.2592 (28)	0.6852 (74)	0.185	0.815	0.256	2.14	0.14
	93	0.7593 (82)	0.2037 (22)	0.0370 (4)	0.861	0.139	0.211	2.38	0.12
	133	0.2222 (24)	0.4074 (44)	0.3704 (40)	0.426	0.574	0.369	3.01	0.08

表 2 西藏小型猪 GH 基因不同基因型的生长性状的比较
Tab.2 Comparative analysis of GH gene of Tibet mini-pig growth traits in different genotypes

位点 Loci	月龄 Months	基因型 Loci	样本数 Samples	生长性状					
				体重(kg) Weight	体长(cm) Length	体高(cm) Height	胸围(cm) Chest	腹围(cm) Abdominal	
12	3月5日	AA	8	9.22 ± 3.11	75.38 ± 10.62	35.31 ± 2.59	48.38 ± 5.03	47.44 ± 4.84	
		AG	30	9.40 ± 2.70	75.72 ± 9.31	33.17 ± 2.69	47.03 ± 5.34	48.12 ± 6.27	
		GG	16	9.08 ± 2.58	75.88 ± 9.03	33.94 ± 2.79	48.81 ± 4.60	49.22 ± 8.15	
		F		0.074	0.008	2.069	0.706	0.226	
		P		0.929	0.993	0.137	0.498	0.799	
		6月8日	AA	4	10.50 ± 1.79	72.50 ± 7.27	34.63 ± 2.29	51.75 ± 1.89	54.75 ± 8.39
	AG	28	12.86 ± 2.46	82.86 ± 9.15	37.71 ± 3.66	53.64 ± 5.11	54.29 ± 5.08		
	GG	22	12.84 ± 3.42	82.81 ± 10.96	36.89 ± 3.07	53.07 ± 4.87	53.64 ± 5.13		
	F		1.242	2.045	1.59	0.295	0.127		
	P		0.298	0.14	0.214	0.746	0.881		
	45	3月5日	TT	10	9.15 ± 2.81	75.50 ± 10.14	32.25 ± 2.55	47.55 ± 4.90	47.20 ± 7.64
			TC	32	9.36 ± 2.50	76.05 ± 8.51	33.66 ± 2.83	48.22 ± 5.03	49.39 ± 6.84
CC			12	9.17 ± 3.22	75.00 ± 11.07	34.25 ± 2.86	46.71 ± 5.54	46.50 ± 4.85	
F				0.034	0.057	0.366	0.39	1.016	
P				0.967	0.945	0.695	0.679	0.369	
6月8日			TT	18	13.05 ± 3.60	82.19 ± 10.09	37.19 ± 3.64	53.56 ± 4.76	54.69 ± 5.30
TC		16	12.38 ± 2.29	82.28 ± 10.96	36.69 ± 2.11	52.28 ± 4.64	51.59 ± 4.26 *		
CC		20	12.75 ± 2.56	81.58 ± 9.81	37.75 ± 4.27	54.15 ± 4.84	55.95 ± 5.46		
F			0.228	0.026	0.499	0.701	3.372		
P			0.797	0.974	0.612	0.501	0.042		
84		3月5日	GG	4	11.73 ± 0.64 ^{##}	84.75 ± 3.10 ^{##}	35.13 ± 1.89	48.75 ± 2.22	49.38 ± 2.17
			GA	12	9.32 ± 2.63	75.54 ± 9.46	34.63 ± 2.53	48.42 ± 5.52	48.50 ± 5.56
	AA		38	9.01 ± 2.73	74.82 ± 9.24	33.28 ± 2.83	47.45 ± 5.19	48.18 ± 7.28	
	F			13.58	11.074	1.702	0.243	0.061	
	P			0	0.001	0.193	0.785	0.941	
	6月8日		GG	2	10.20 ± 2.83	77.50 ± 4.24	36.25 ± 1.77	53.00 ± 0.00	55.75 ± 6.01
	GA	16	12.68 ± 2.25	80.69 ± 10.56	37.22 ± 3.99	53.03 ± 4.86	54.63 ± 5.47		
	AA	36	12.81 ± 3.13	82.94 ± 10.06	37.17 ± 3.25	53.39 ± 4.99	53.71 ± 5.25		
	F		0.771	0.487	0.071	0.033	0.268		
	P		0.468	0.618	0.931	0.968	0.766		
	93	3月5日	GG	42	9.45 ± 2.51	76.81 ± 8.86	33.89 ± 2.70	48.42 ± 4.73	48.92 ± 6.51
			GA	8	8.46 ± 3.09	70.69 ± 8.41	33.56 ± 3.31	46.50 ± 5.84	47.19 ± 7.83
AA			4	9.08 ± 3.95	74.25 ± 13.60	32.13 ± 2.29	43.38 ± 5.57	44.63 ± 4.96	
F				0.463	1.56	0.758	2.196	0.908	
P				0.632	0.22	0.474	0.122	0.41	
6月8日			GG	40	12.30 ± 3.09	80.49 ± 9.94 [#]	36.48 ± 2.96 [#]	52.64 ± 4.42	53.60 ± 5.44
GA		14	13.75 ± 1.89	86.61 ± 9.17	39.07 ± 3.92	55.07 ± 5.58	55.36 ± 4.66		
F			2.695	4.084	6.702	2.738	1.16		
P			0.107	0.048	0.012	0.104	0.286		
133		3月5日	CC	10	9.67 ± 2.28	76.80 ± 7.83	32.45 ± 1.48	46.55 ± 4.79	48.25 ± 5.68
			CT	18	8.36 ± 2.50	73.06 ± 9.25	34.56 ± 2.94	49.47 ± 4.72	49.08 ± 7.66
			TT	26	9.76 ± 2.85	77.13 ± 9.66	33.62 ± 2.88	47.04 ± 5.26	47.87 ± 6.38
	F			1.621	1.126	1.977	1.616	0.176	
	P			0.208	0.332	0.149	0.209	0.839	
	6月8日		CC	14	13.54 ± 3.76	82.54 ± 10.93	37.86 ± 2.40	54.14 ± 4.72	54.14 ± 4.45
	CT	26	12.22 ± 2.66	80.88 ± 10.11	36.46 ± 3.55	52.48 ± 4.91	53.42 ± 6.14		
	TT	14	12.64 ± 2.22	83.82 ± 9.39	37.71 ± 3.92	53.86 ± 4.85	55.14 ± 4.29		
	F		0.953	0.407	1.03	0.675	0.479		
	P		0.392	0.672	0.364	0.514	0.622		

注: * 代表 TC 基因型 vs CC 基因型的生长性状之间有显著性差异 ($P < 0.05$), # 代表 GG 基因型 vs GA 基因型的生长性状之间有显著性差异 ($P < 0.05$), ** 代表 GG 基因型 vs AA 基因型的生长性状之间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Note: *^TC genotype compare with CC genotype $P < 0.05$; #GG genotype compare with GA genotype $P < 0.05$; **GG genotype compare with AA genotype $P > 0.05$.

于 12q1.2 ~ 1.5^[7-8]。作为生长速度的候选基因,对我国地方猪胰岛素样生长因子的研究已有很多,但对我国小型猪 GH 基因的研究却很少。近几年来,国内外学者已经对猪 GH 基因结构做出了大量基础性工作。自 1983 年 Seeburg 等^[9]完成对猪 GH 基因的 cDNA 克隆,猪 GH 基因的研究取得突破性进展。2007 年王荣梅等^[10]采用变性高效液相色谱 (DHPLC) 技术,在猪生长激素 (GH) 基因包含第 5 外显子区的 572 bp 序列进行未知 SNPs 的筛选,对有变异的色谱峰型进行分类、测序,结果发现在该区域有 4 处变异。其中 +1579 位点的变异可以用基因型频率 (AA、AB、BB) 和基因频率来估算。2010 年侯冠彧等^[11]以五指山猪为试验材料,采用 PCR-SSCP 和测序相结合技术,对 GH 基因进行多态性检测,并分析其与生长性状 (体重质量、体高、体长和胸围) 的相关性。结果表明, GH 基因第 2 外显子存在一处 G→A 转换,属沉默突变,该位点与生长性状关联分析显示, BB 基因型的体重显著高于 AA 基因型和 AB 基因型。可见,由于扩增区域不同,分型的方法不同所以结果也有所差异。本实验通过直接测序和软件分析,发现 GH 基因在检测区域中有 5 个突变位点,分别为 A12G, T45C, G84A, G93A, C133T。在 GH 基因中, GH 基因杂合度较高 ($H_o = 0.3704$)。GH 基因 A12G (PIC = 0.360), T45C (PIC = 0.375), G84A (PIC = 0.256), G93A (PIC = 0.211), C133T (PIC = 0.369) 5 个 SNP 位点,多态信息含量均较高,大部分属于中度多态。其中 T45C 该位点的多态信息含量最高。这表明西藏小型猪在以上位点遗传变异程度大,具有较高的杂合度和遗传多样性有较大的选择潜力,可以为选育工作提供比较丰富的素材。

杂合度又称基因多样性反应群体在不同基因座位上的遗传变异,被认为是衡量群体遗传变异的一个最适参数,与之对应的是纯合度。衡量群体在一个位点上遗传变异的指标还包括有效等位基因数和多态信息含量。一般而言,品种的基础越广泛,纯度则越低, DNA 多态性越丰富,多态信息含量 (PIC) 越高。当 $PIC > 0.5$ 时,该位点为高度多态;当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时,则为中度多态;当 $PIC < 0.25$ 时,则为低度多态。在本文中 GH 基因 5 个

SNP 位点多态信息含量均较高,大部分属于中度多态。其中 T45C, 该位点的多态信息含量最高。一个群体的 PIC 越高、等位基因数越多、杂合度越大,则说明在该位点上存在的遗传变异性就越高,该群体具有的选择潜力就越大。

对所研究西藏小型猪群体做 Hardy-Weinberg 平衡状态检验,结果提示群体基因遗传平衡,样本来自同一蒙德尔群体。同时发现 GH 基因在 T45C 突变位点上 TC 基因型 6 ~ 8 月龄西藏小型猪的腹围值较小, G84A 突变位点上 AA 基因型 3 ~ 5 月龄西藏小型猪的体重、体长值较小, G93A 突变位点上的 GG 基因型 6 ~ 8 月龄西藏小型猪的体长、体高值较小。我们推测在 GH 基因 T45C、G84A、G93A 位点突变的 TC、AA、GG 基因型可能与体型较小有关。

参考文献:

- [1] 黄黎珍. 基因修饰克隆西藏小型猪研究[D]. 广州, 南方医科大学, 2010.
- [2] 黄黎珍, 那顺巴雅尔, 顾为望, 等. 西藏小型猪胚胎成纤维细胞的分离培养及性别鉴定[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(10): 58-60.
- [3] 程治平. 内分泌生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社. 1984: 64-70.
- [4] Etherton T D. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals[J]. Physio Rev, 1998, 78: 745-761.
- [5] 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, 5: 427-430.
- [6] 詹纯列, 徐本法, 李建军, 等. SPF 小型猪阶段生长指标的测定[J]. 中国实验动物学杂志, 2001, 11(2): 95-97.
- [7] Vize P D, Wells J R E. Isolation and characterization of porcine growth hormone gene[J]. Gene, 1987, 55: 339-344.
- [8] Yerle-M, Lahbib-Mansais Y, Thomsen P D, et al. Localization of the porcine growth hormone gene to chromosome 12p1.2 - p1.5 [J]. Animal Genetics, 1993, 24: 129-131.
- [9] Seeburg P H. Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormones[J]. DNA, 1983, 2: 37-45.
- [10] 王荣梅, 苏荣胜, 张纲权, 等. 变性高效液相色谱分析猪 GH 基因单核苷酸多态性及与生产性能的关系[J]. 畜牧与兽医, 2007, 39(4): 20-24.
- [11] 侯冠彧, 曾鸿普, 周汉林, 等. 五指山猪 GH、IGFBP3 基因 SNPs 检测及与生长性状的关联分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(3): 4.

[修回日期] 2014-10-08