

文章编号: 1000-5471(2007)01-0078-04

五指山猪生长激素基因全序列克隆及序列分析^①

林 莉^{1,2}, 欧江涛³, 郭春华^{1*}, 黄礼光³, 王希龙³

1. 西南民族大学生命科学院, 成都 610041; 2. 四川理工学院, 自贡 643000; 3. 海南省农科院畜牧所, 海口 510031

摘要: 通过筛选一对引物, PCR 扩增五指山小型猪 GH 基因全序列, 并进行克隆测序分析、序列分析及氨基酸分析. 结果表明, 有 98 个位点不同, 同源性为 95.026%, 外显子有 2 个碱基发生了突变, 其中外显子 2 有 1 个位点的碱基突变导致了氨基酸异义取代.

关键词: 五指山猪; 生长激素基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

五指山(WZS)猪是中国小型猪宝贵的资源库中的优良品种, 属于华南型猪种, 地理位置上绝大多数分布在海南岛, 该地区气候温暖、环境潮湿^[1]. 在温暖、高湿的环境中动物能量消耗较大, 动物须适应其生存的生态环境, 唯有不断的被自然选择, 缩小体型、降低能耗, 才能适应生存. 同时, 这些小型猪均产于交通闭塞, 经济文化落后, 农牧业生产水平低下的偏僻山区. 当地群众不喜食普通猪肉或外种猪肉, 导致外种猪血缘很难进入那些地方. 当地老百姓习惯于将猪进行亲子、同胞或半同胞交配, 导致小型猪基因纯合度很高^[2]. 五指山猪除了在食用, 抗病育种方面的开发价值外, 由于其心血管、消化系统、免疫系统及肾脏、皮肤, 在解剖组织、生理和营养代谢等方面与人类极为相似, 目前已成为重要的人类疾病的实验动物模型, 甚至可作为异种器官移植的供体^[3]. 由于生长激素(porcine growth hormone, pGH)通过直接或间接的方式, 作用于机体的组织器官、骨骼、肌肉^[4], 对动物体型影响非常大, 本研究对五指山小型猪的 pGH 基因克隆测序、氨基酸变异分析, 既为五指山小型猪的起源和分化积累资料, 为保护五指山小型猪这一宝贵的遗传资源, 同时在育种方面还可为不同体型猪的生长发育差异提供科学依据和理论指导.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集

试验材料采自海南农科院五指山猪原种场 30 头五指山猪的耳组织样装入经高压灭菌, 盛有 72% 酒精的 1.5 mL EP 管中, -20 °C 保存.

1.1.2 试剂

Taq 酶和 dNTPs; Marker DL 2 000., 其分子量标准是 2 000 bp, 1 000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp; pMD18-T Vector; 纯化试剂盒(奥米嘎公司); TakaRa 的 T 载体(未作说明均购自大连宝生物).

1.2 方法

用酚—氯仿法从猪耳组织中提取基因组 DNA.

① 收稿日期: 2006-06-28

基金项目: 西南民族大学重点科研资助项目(03NZ008); 海南省自然科学基金资助项目(琼科[2003]255).

作者简介: 林莉(1979-), 女, 四川自贡人, 硕士, 主要从事动物遗传育种研究.

通讯作者: 郭春华, 博士, 教授.

1.2.1 目的片段的扩增

利用引物设计软件 primer premier 5.0, 根据 Vize.Peter 所测出 GH 基因序列 (NCBI 登录号 M17704), 设计出所需的 PCR 引物, 扩增的 GH 基因序列片段大小约为 2 033 bp.

1) 引物序列

Forward primer: 5'-GTCGACGGGAACAGGATGAGTGGGAGGAGGTT-3'

Reverse primer: 5'-AAGCTTGCCGGGTCAACCATCATTTCAGTGTCT-3'

2) PCR 反应体系与条件

PCR 反应体系采用 50 μ L 反应体系, PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 2 min, 60 $^{\circ}$ C 45 S, 72 $^{\circ}$ C 2 min; 34 \times (94 $^{\circ}$ C 50 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min); 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存. PCR 产物的胶回收, 使用噢米嘎纯化试剂盒进行产物的胶回收.

1.2.2 连接反应

将回收的 PCR 扩增产物连接到 pMD18-T Vector 上, 按照下述加样, 充分混匀后, 16 $^{\circ}$ C 过夜反应约 14~18 h.

表 1 目的 DNA 片段与 pMD18-T 载体连接

Table 1 Ligation of the DNA fragments on GHRH gene of Swine and pMD18-T Vector

成分	用量/ μ L	成分	用量/ μ L
ddH ₂ O	3	T 载体	1
胶回收 PCR 产物	1	总体积	10
Ligation I	5		

1.2.3 转化反应

将 10 μ L 连接反应物加入 200 μ L 准备好的感受态细胞中, 参照 Gunawardana 等^[5]的方法进行操作. 利用蓝白斑遗传学筛选法筛选阳性克隆. 将挑出的白色重组子放入 LB 液体培养基中培养; 菌液送北京三博远志公司测序.

2 结果分析

从扩增产物的电泳图谱分析中可以看出, 该扩增产物片段大小在 2 000 bp 左右, 是所扩增的目的片段. 通过序列测定, 本试验扩增的 pGH 基因的全长为 2 069 bp. 与 Peter Vize 所做的结果 (2 231 bp), 从 -141 位开始到 +1 950 碱基位点基本相同, 包含了全部 5 个外显子和 4 个内含子序列. (该基因序列在 NCBI 登录号为 DQ 073 397, 由于碱基片断较长不在此列出).

```

Sus 1  MAAGPRTSALLAFALLCLPWTREVGAFPAMPLSSLFANAVLRAQHLHQLAADTYKEFERAYI 62
WZS 1  MAAGPRTSALLAFALLCLPWTREVGAFPAMPLSSLFANAVLRAQHLHQLAADTYKEFERAYI 62
Sus 63  PEGQRYSIQNAQA AFCFSETIPAPT GKDEAQQRS DVELLRFSLLLIQSWLGPVQFLSRVFTN 124
WZS 63  PEGQRYSIQNAQA AFCFSETIPAPT GKDEAQQRS DVELLRFSLLLIQSWLGPVQFLSRVFTN 124
Sus 125 SLVFGTSDRVYEK LKDL EEGIQALMRELEDGSPRAGQILKQTYDKFDTNLRSD DALLKNYGL 186
WZS 125 SLVFGTSDRVYEK LKDL EEGIQALMRELEDGSPRAGQILKQTYDKFDTNLRSD DALLKNYGL 186
Sus 187 LSCFKKDLHKAETYLRVMKCRRFVESSCAF 216
WZS 187 LSCFKKDLHKAETYLRVMKCRRFVESSCAF 216
    
```

注: sus 为普通猪 wzs 为五指山猪

图 2 pGH 基因氨基酸序列对比分析

Fig. 2 The Comparison and Analysis of pGH Gene Amio Acid Sequences



M: marker DL 2000; 1-7 泳道为五指山猪 pGH 基因 PCR 扩增产物

图 1 pGH 基因 PCR 扩增产物 1.2% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of pGH Gene Pattern PCR Products on 1.2% Agrose Gel

在五指山猪与普通猪的 GH 基因序列比较中, 所测得的五指山猪的序列与 Peter 的, 有 1 971 个碱基完全相同, 有 98 个位点不同, 变异率为 4.74%。其中在 5'侧翼序列有 3 处, 内含子 1 有 9 处, 外显子 2 有 2 处, 内含子 2 有 6 处, 内含子 3 有 25 处, 内含子 4 有 5 处, 3'侧翼序列有 48 处。在 +368 位碱基, 即第 22 位氨基酸, 五指山猪由于密码子 CGG→CAG, 导致氨基酸由 Arg(精氨酸)→Gln(谷氨酰胺), 这个突变位点发生在第二外显子高变区, 这个结果与邢晋祎 2002 所做的实验结果一致。外显子 2, 在第 +456 位碱基处, T→C, 但是为同义取代。可以看出, 在 GH 基因序列不论外显子还是内含子都存在着一一定的多态性。

3 讨 论

孟安明(1996)对五指山猪、长白猪和枫泾猪酶切基因组 DNA 进行了 Southern 杂交分析, 检测到 2 头原始引种的五指山小型猪之间的 DNA 指纹图相似系数高达 0.632, 扩群群体中相似系数更高达 0.738±0.047(SD), 证明五指山猪在原产地经历近亲繁殖, 对近亲繁殖有相当高的耐受力^[6]。冯书堂(2003)研究发现, 五指山猪的 GH 基因序列与 Vize 等(1987)发表的猪的 GH 基因全序列不同, 五指山猪在非编码区 14 个碱基丢失或错位, 编码区 3 个碱基替换并都导致编码的氨基酸残基改变, 且有 2 个发生在高度保守区^[3]。在本研究中, 五指山猪的 GH 基因全序列与 Vize 等(1987)发表的猪的 GH 基因全序列比较起来^[7], 有 98 个碱基不同, 其中有 31 处发生在内含子, 1 处发生在 3'端。发生在外显子 2 区的碱基突变同样引起了氨基酸基团改变, 在这一点与冯书堂研究相同。邢晋祎(2002)对猪的生长激素基因全序列进行了扩增以及 RFLP 分析, 发现了 pGH 不论在外显子还是内含子都存在着一一定的多态性^[8]。帅素容(2004)对中外 11 个品种猪进行了 pGH 基因全序列测定, 发现 pGH 基因对同义密码子的使用具有强烈偏爱性; pGH 基因核苷酸多态性丰富; 不同品种的 pGH 基因进化的速率和方式有差异, 外显子区受到很强的进化选择作用^[9]。物种间在基因及其内含子的长度以及前 GH 的氨基酸数目上的变异可能与进化程度有关^[10]; 研究发现不同品种 pGH 基因序列在信号肽区域存在氨基酸残基的差异^[11,12]。故本文的研究还可为五指山小型猪的遗传分化及分子进化提供理论依据。

本试验成功进行了五指山猪的 pGH 基因全序列扩增, 试验中 pGH 基因全序列扩增(2006 bp), 包括 5 个外显子和 4 个内含子及 5'和 3'侧翼序列, 五指山猪与普通猪在 GH 基因上有部分碱基发生了突变并引起了氨基酸残基的改变, 欧阳菁(2002)对含 pGH 基因的重组质粒的表达效率进行了测定, 发现昆虫细胞内表达的产生的重组猪生长激素浓度达到 8.98%, 表达水平明显提高^[13]。由此还需要进一步对那些氨基酸进行生物理化性质测定和相应的调控因子的互作, 来判断是否它们导致了小型猪体型较小和生长迟缓的原因。

参考文献:

- [1] 郑丕留. 中国猪品种志[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 70-71.
- [2] 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.
- [3] 冯书堂, 牟玉莲, 张 莉, 等. 中国小型猪实验动物化培育及种质特异性研究[J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(增刊): 7-12.
- [4] Florini J R, Ewton D Z, Coolican S A. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis[J]. Endocrinology Review, 1998, 78(3): 745-761.
- [5] Gunawardana A, Fries R. Assignment of the HOX2 and HOX3 gene clusters to the bovine chromosome regions 19q17-pter and 5q14-23[J]. Animal Genetics, 1992, 23(2): 161-165.
- [6] 孟安明, 冯书堂, 蔡正华. 五指山小型猪在 GH 位点位点和小卫星位点上与长白猪和枫泾猪的差异[J]. 畜牧兽医学报, 1996, 27(5): 433-435.
- [7] Vize P D, Wells J R E. Isolation and characterization of the porcine growth hormone gene[J]. Gene, 1987, 55: 339-344.
- [8] 邢晋祎, 帅素容. 猪生长激素(pGH)基因全序列扩增及序列分析[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(2): 182-185.
- [9] 帅素容. 猪生长激素基因核苷酸多样性、分子进化和 PCR-RFLP 及遗传效应研究[D]. 博士学位论文, 雅安: 四川农业大学, 2004: 105-106.

- [10] 黄勇富. 动物 GH 基因和前 GH 一级结构的比较研究[J]. 四川农业大学学报, 1996, 14(2): 267 - 272.
- [11] 刘燕飞, 尉 研, 付若彬, 等. 猪生长激素基因的克隆及在哺乳动物细胞中的表达[J]. 中国兽医 科技, 2005, 35(2): 134 - 138.
- [12] Kato Y, Shimokawa N, Kato T, et al. Porcine growth hormone; molecular cloning of cDNA and expression in bacterial and mammalian cells[J]. Biochem Biophys Acta, 1990, 1 048(2-3): 290 - 293.
- [13] 欧阳菁, 龙肇新, 杨 林, 等. 猪生长激素基因在昆虫细胞中的分泌表达[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(5): 482 - 485.

Molecular Cloning and Sequence Analysis of Growth Hormone Gene for WZS-Miniature Pig

LIN Li^{1,2}, OU Jing-tao³, GUO Chun-hua^{1*},
HUANG Li-guang³, WANG Xi-long³

1. Life Science and Technology Institute, Southwest university of Nationalities, Chengdu, Sichuan 610041, China;

2. Sichuan University of Science & Engineering, Zigong Sichuan 643000, China;

3. Hainan Husbandry Research Institute, Haikou, Hainan 510031, China

Abstract: The whole-length sequence of GH gene in WZS-miniature pig was amplified with PCR, using a pair of selected primers, and the amplified DNA fragment was directly sequenced by cloning. Alignment with the sequence reported by Peter Vized in 1987 showed that 98 bp differences were present in the full sequence, the homology between them being 95.26%, and in the 5 exons only 2 bp differences were detected.

Key words: WZS-miniature pig; growth hormone (GH) gene; cloning; sequence analysis

责任编辑 夏 娟