

滇南小耳猪生长激素基因多态性研究

何保丽, 角建林, 陈丽玲, 李 波, 李进涛, 王利梅
(昆明医科大学实验动物学部, 云南 昆明 650502)

[摘要] **目的** 探讨滇南小耳猪生长激素基因多态性, 为滇南小耳猪的选育提供分子标记辅助选择的依据。**方法** 采用 PCR-RFLP 方法对滇南小耳猪 GH 基因的 Apa I 酶切位点多态性进行了分析。**结果** 检测到两种基因型 AA 和 AB, AB 型的频率高于 AA 型。没有检测到 BB 基因型个体。等位基因 A 的基因频率高于等位基因 B, 等位基因 A 在群体中占优势。**结论** 滇南小耳猪群生长激素基因具有较丰富的多态性。

[关键词] 滇南小耳猪; 生长激素基因; 多态性

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 11 - 0023 - 03

Studies on the Polymorphism of Growth Hormone Gene in Diannan Small-ear Pig

HE Bao-li, JIAO Jian-lin, CHEN Li-ling, LI Bo, LI Jin-tao, WANG Li-mei
(Dept. of Experimental Zoology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To provide foundation for molecular marker-assisted selection in Diannan small-ear pig through investigating the gene polymorphism of growth hormone. **Method** The polymorphism of pGH gene was investigated by using PCR-RFLP at Apa I restriction loci. **Results** Genotypes AA and AB were detected. The frequency of genotype AB was higher than AA. Genotype BB was not detected. The allele A frequency was higher than B, A was dominant in Diannan small-ear pig colony. **Conclusion** The growth hormone has gene polymorphism in Diannan small-ear pig.

[Key words] Diannan small-ear pig; Growth hormone gene; Polymorphism

猪生长激素 (porcine growth hormone, pGH) 基因全序列由 Vize 等^[1]首先克隆确定, 由 5 个外显子和 4 个内含子组成, 全长 2231bp。近年来, 国内外学者对 pGH 基因的多态性做了大量的研究, 但对滇南小耳猪的生长激素基因多态性研究尚少。滇南小耳猪是云南地方特有的猪种, 因其体型小、半驯化、区域性封闭繁殖及基因纯合度高等品质而倍受实验动物学界的关注。本研究旨在通过对滇南小耳猪 GH 基因多态性研究, 以期探讨滇南小耳猪 GH 基因多态性与生长繁殖性状之间的关系提供理论基础, 为今后滇南小耳猪的选育提供分子标记辅助选择的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用材料为滇南小耳猪血液, 采自昆明医学院实验动物中心, 随机抽取了自繁的滇南小耳猪 23 头。前腔静脉采血 2 mL, EDTA-K2 抗凝, -80 °C 冻存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取参照 Sukamol Srikwan 等^[2]的方法稍加改进。主要步骤: (1) 冰冻血样室温融化, 将 750 μ L 全血加入

[基金项目] 云南省教育厅青年基金资助项目 (09Y0176)

[作者简介] 何保丽 (1978~), 女, 云南马关县人, 动物学硕士, 实验师, 主要从事实验动物分子与数量遗传研究工作。

1.5 mL 离心管中, 加入等体积 PBS 缓冲液, 混匀 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; (2) 加入 600 μ L SET, 混匀 5~10 min, 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h; (3) 加入蛋白酶 K (20 mg/mL) 至终浓度为 100 μ g/ μ L, 充分混匀, 再加入 70 μ L SDS, 于 56 $^{\circ}$ C 水浴温和振荡, 消化过夜至不见粘稠团块; (4) 加入等体积的 Tris 饱和酚、盖紧管盖、缓慢地来回颠倒混合至少 10 min, 12 000 rpm、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min; (5) 将上清转移至一新的灭菌离心管中, 用 Tris 饱和酚重复抽提一次; (6) 再向上清中加入等体积的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 混合液, 缓慢颠倒离心管 10 min, 使溶液两相充分混匀, 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min; (7) 转移上清至另一灭菌离心管中, 加入等体积氯仿:异戊醇 (24:1), 同上再抽提一次; (8) 向上清液中加入 2.5 倍体积的冰乙醇, 加 1/10 体积的 3M NaAc (pH = 5.2), 盖紧管盖、水平摇晃直到可看到絮状 DNA 沉淀; (9) 将 DNA 沉淀挑出, 置于 1.5 mL 灭菌离心管中, 加入 1 mL 70% 的乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次; 12 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min; (9) 小心倒掉乙醇, 将离心管倒扣于纸巾上, 置于 37 $^{\circ}$ C 温箱干燥 (15 min 左右) 或自然凉干; (10) 待乙醇完全挥发尽, 加入 100~200 μ L TE (TE 加入量视 DNA 团的大小而定), 4 $^{\circ}$ C 过夜以溶解 DNA。

1.2.2 引物及 PCR 反应条件 用于生长激素基因为点 PCR-RFLP 分析的引物参照经荣斌等^[3]设计的引物序列, 引物序列为: primer1:5'-GCCAAATTT-TAAATGTCCCTG-3'; primer2:5'-CTGTCCCTCCG-GGATGTAG-3'。PCR 扩增的产物大小为 506 bp, 产物位置在 5' 上游区 +295~+300 bp 区间。引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应体系总体积为 25 μ L, 反应混和液中 10 \times PCR buffer (含 MgCl₂ 25 mmol/L) 3 μ L, dNTP (25 mmol/L) 3 μ L, primer-1 (10 pmol/L) 0.8 μ L, primer2 (10 pmol/L) 0.8 μ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, DNA Template (50~100 ng/ μ L) 1 μ L, 加 ddH₂O 至反应体积为 25 mL。PCR 反应程序: 91 $^{\circ}$ C 预变性 8 min, 92 $^{\circ}$ C 变性 35 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 74 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环, 最后于 72 $^{\circ}$ C 下延伸 8 min。

1.2.3 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测 恒压 150 V, 1 \times TAE 电泳缓冲液, 5 μ L PCR 扩增产物混合 1 μ L 的琼脂糖凝胶上样缓冲液, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增是否成功。

1.2.4 PCR-RFLP 分析 PCR 产物酶切反应体系为: PCR 产物 6 μ L, ddH₂O 8 μ L, 10 \times buffer 1.5 μ L, Apa I 限制性内切酶 1.5 μ L。酶切产物用 8%

的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 同时加入 DNA Marker DL2000 作分子量标记。60 V 电压, 电泳 12 h。银染, 显色后的凝胶经凝胶成像分析仪扫描成像, 并分析、判定等位基因扩增片段的大小。

1.2.5 基因型分析 PCR 产物的长度为 506 bp, Apa I 限制性内切酶酶切 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 其基因命名方法见表 1。

表 1 基因型判断标准

Tab. 1 The fragment sizes of different genotypes		
基 因	带型	基因型命名
GH	280 bp/226 bp	AA
	280 bp/134 bp/92 bp	BB
	280 bp/226 bp/134 bp/92 bp	AB

2 结果

2.1 血液基因组 DNA 的提取结果

采用常规酚/氯仿抽提法提取猪的血液基因组 DNA, 提取的基因组 DNA 于 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳图谱见图 1。

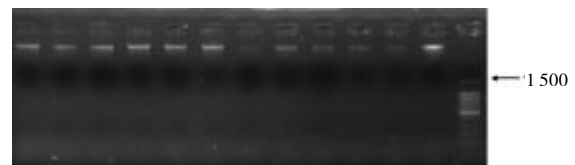


图 1 提取的基因组 DNA 电泳图谱
Fig. 1 Genomic DNA isolated from pig blood

2.2 PCR 扩增产物检测

PCR 扩增产物与 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳图谱见图 2, 由图可以看出, pGH 基因位点 PCR 扩增特异性良好, 产物片段大小与预期片段大小相符。

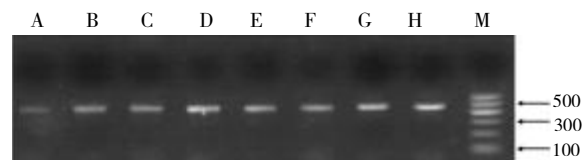


图 2 PCR 产物电泳图谱
Fig. 2 Electrophoresis of amplified fragments for pG-H gene

2.3 酶切产物聚丙烯酰胺凝胶电泳

pGH 基因 PCR 产物经限制性内切酶酶切后, 于 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳判定基因型, 电泳图谱见图 3.

2.4 GH 基因 Apa I 酶切位点多态性

根据酶切产物电泳图谱进行基因型判定, 计算出滇南小耳猪选育群 GH 基因的基因型频率、等位基因频率见表 2.

由表 2 可以看出, 经 23 头猪血液样品检测, 滇南小耳猪 GH 基因在 +295 ~ +300 区段的 Apa I 酶切位点只检测到两种基因型, 即 AA 和 AB, 基因型频率分别为 0.217 4, 0.782 6, AB 型的频率

比 AA 型高. 没有检测到 BB 基因型个体. 等位基因 A 和 B 的基因频率分别为 0.608 7 和 0.391 3, 等位基因 A 的频率比 B 高.

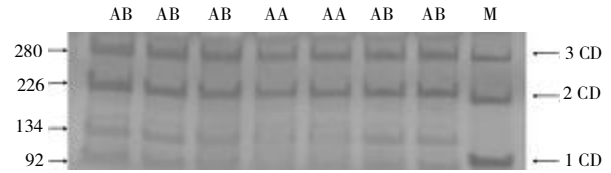


图 3 GH 基因酶切产物电泳图谱
Fig. 3 RFLP electrophoresis of GH gene

表 2 基因型频率与基因频率

Tab. 2 Genotype frequencies and gene frequencies

基因	基因型	个体数	基因型频率	等位基因	基因频率
GH	AA	5	0.217 4	A	0.608 7
A	AB	18	0.782 6	B	0.391 3

3 讨论

本研究通过对 23 头滇南小耳猪血液样品分析发现, GH 基因在 +295 ~ +300 区段的 Apa I 酶切位点等位基因 A 在群体中占优势, 基因频率为 0.607 8, 等位基因 B 在群体中处于劣势. 实验只检测到两种基因型 AA 和 AB, AB 型的频率高于 AA 型. 未检测到 BB 基因型. 王文君等^[4,5]对中外 10 个猪种生长激素基因 Apa I 多态位点的检测结果表明, 我国地方猪种的 AA 基因型频率明显比国外猪种高, 等位基因 A 的频率均大于 0.6. 这与本实验研究结果有相似之处. 但本研究所用的样本量较少, 未检测到 BB 基因型是否是样本含量较少所致, 还有待于增大样本含量做进一步的研究分析.

the porcine hormone gene[J]. Gene, 1987, 55: 339 - 344.

- [2] SUKAMOL SRIKWAN, KRISTINA HUFFORD, LORIE-GGERT, et al. Variable microsatellite markers for genotyping tree shrews, tupaia, and their potential use in genetic studies of fragmented populations[J]. Science Asia, 2002, 28: 93 - 97.
- [3] 经荣斌, 宋成义, 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, 23(5): 427 - 460.
- [4] 王文君, 任军, 黄路生, 等. 中外不同猪品种生长激素基因遗传多态性检测 [J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(1): 103 - 104.
- [5] 张依裕, 刘若余, 刘培琼, 等. 剑白猪生长激素基因多态性与部分生产性能的关联分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009, 7(4): 107 - 109.

(2012 - 29 - 05 收稿)

[参考文献]

- [1] VIZE P D, WELLS J R E. Isolation and characterization of