



# 两个国内小型猪品种 GH 基因部分序列的多态性分析

顾 阳, 田雨光, 岳 敏, 顾为望

(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 对西藏小型猪和广西巴马小型猪生长激素基因(GH 基因)部分序列的多态性进行分析。方法 采用内切酶 *ApaI* 和 *Hin6I* 对西藏小型猪(108 头)和广西巴马小型猪(132 头) GH 基因 -119 bp ~ +486 bp 之间的区域进行 PCR-RFLPs 分析。结果 (1)从 *ApaI* 酶切产生的结果来看, *ApaI* 酶切产生 A(449 bp + 101 bp + 55 bp)、B(316 bp + 133 bp + 101 bp + 55 bp)两种等位基因。等位基因 A 的频率高于等位基因 B, 等位基因 A 为优势基因。AA 基因型频率高于 AB 和 BB 基因型频率;(2)从 *Hin6I* 酶切产生的结果来看, *Hin6I* 酶切产生 G1(605 bp)、G2(498 bp + 107 bp)、G3(449 bp + 156 bp)、G4(449 bp + 107 bp + 49 bp)四种等位基因。等位基因 G4 的频率高于等位基因 G1、G2、G3。等位基因 G1 频率很低。基因型 G2G3、G2G4、G3G4、G4G4 的频率较高。(3)由酶切产生的基因和基因型多态性,发现西藏小型猪与广西巴马小型猪在该基因部分序列差异不显著( $P > 0.05$ )。结论 国内的优质实验用小型猪,如西藏小型猪和广西巴马小型猪等位基因 A 频率均较高。

**【关键词】** GH 基因;小型猪;PCR-RFLPs;多态性

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)12-0031-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.012.009

## Analysis of the Growth Hormone Gene Segment in Two Species of Chinese Miniature Pigs by PCR-RFLPs

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

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

**【Abstract】** **Objective** To analyze the polymorphism of GH gene in Tibet miniature pig and Guangxi Bama miniature pig by PCR-RFLP. **Methods** The polymorphism of the -119bp- +486 bp fragment (growth hormone gene) of 108 Tibet miniature pigs and 132 Guangxi Bama miniature pigs was detected by PCR-*ApaI*-RFLP and PCR-*Hin6I*-RFLP. **Results** (1) The PCR products were cut by *ApaI*, and produced two alleles: A (449 bp + 101 bp + 55 bp) and B (316 bp + 133 bp + 101 bp + 55 bp). The frequency of allele A was higher than that of allele B. The frequency of the AA genotype was higher than that of the AB and BB genotypes. (2) The PCR products were cut by *Hin6I*, and produced four alleles: G1 (605 bp), G2 (498 bp + 107 bp), G3 (449 bp + 156 bp) and G4 (449 bp + 107 bp + 49 bp). The allele frequency of G4 was higher than that of G1, G2 and G3. The frequency of allele G1s was the lowest. Both Tibet miniature pig and Guangxi Bama miniature pig exhibited moderate polymorphism. The frequencies of G2G3, G2G4, G3G4 and G4G4 genotypes were higher than others. (3) There was no significant difference between the expressions of the allele in the Tibet miniature pig and Guangxi Bama miniature pig revealed by PCR-RFLPs. **Conclusions** The frequency of allele A of GH gene in Chinese miniature pig species, such as Tibet miniature pig and Guangxi Bama miniature pig, are rather high.

**【基金项目】** 广东省科技计划项目(编号 2010A011200003); 国家科技部国际项目合作司项目(编号 2011DFA33290)

**【作者简介】** 顾阳(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 比较医学和人类疾病动物模型。E-mail: 723765873@qq.com。

**【通讯作者】** 顾为望(1956-), 男, 教授, 博士生导师。E-mail: guww100@163.com。

**【Key words】** Growth hormone gene; Miniature pig; Polymorphism; PCR-RFLPs

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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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 基因座研究一直为人们关注。

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  $\alpha$ -螺旋束, 呈上-上-下-下的排布形式, 分子量为 22 kD, 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<sup>[3]</sup>, 定位于 12q1.2 - 1.5<sup>[4]</sup>。

目前我国的小型猪品系主要有: 五指山小型猪、贵州小型香猪、版纳微型猪、广西巴马小型猪、西藏小型猪。它们是我国珍惜的实验用小型猪物种资源, 将在小型猪新品系育种工作中发挥重要的作用。其中西藏小型猪来源于青藏高原、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。从免疫学、遗传学研究发现, 该品系具有其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系<sup>[5]</sup>。广西巴马小型猪原产于广西巴马县及周边地区, 由于处在交通闭塞的边远山区, 经过长期的近交, 基因高度纯合, 并且其体型矮小, 性成熟早, 已成为生命科学研究中重要的模式动物。

这些小型猪品系是我国珍惜的实验用小型猪物种资源, 将在小型猪新品系育种工作中发挥重要的作用, 但是目前对它们的 GH 基因与其生长性状的相关性分析的研究较少, 在一定程度上阻碍了小型猪遗传育种的进程。本研究采用 PCR-RFLPs 技术, 扩增出西藏小型猪和广西巴马小型猪 GH 基因部分序列, 并对其进行 PCR-RFLP 分型, 以期对西藏小型猪中体型较小的猪种的选育打下基础。

## 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)、广西巴马

小型猪 (132 头), 均达到性成熟和体成熟, 年龄在 6 ~ 12 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: 采取猪新鲜血液 2 mL, 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 和 1.85 之间。

### 1.2 试剂

内切酶 *ApaI* 购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 内切酶 *Hin6I* 购自上海跃腾生物技术有限公司; 全血/组织/细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒、PCR 试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司; 酒精、异丙醇等购自广东光华科技股份有限公司; DM500Mark、DM2000Mark、DM15000Mark 购自北京康为世纪生物科技有限公司; 琼脂糖购自基因科技 (上海) 有限公司; 引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。

### 1.3 引物设计及 PCR 反应

PCR 引物合成, 上游引物: TTA TCC ATT AGC ACA TGC CTG CCA G, 下游引物: CTG GGG AGC TTA CAA ACT CCT T。

PCR 反应体系 50  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR buffer ( $Mg^{2+}$  Plus) 5  $\mu$ L, dNTP mixture (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, 上、下游引物 (20 mmol/L) 各 1  $\mu$ L, 模板 DNA 100 ng, Taq (5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 灭菌水加至 50  $\mu$ L。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。产物用 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统检测。

### 1.4 PCR-RFLPs

PCR 扩增产物的 *ApaI* 酶切体系为 20  $\mu$ L, 其中 PCR 产物 10  $\mu$ L, *ApaI* 内切酶 1.0  $\mu$ L, 10  $\times$  L buffer 2.0  $\mu$ L, 灭菌水加至 20  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴酶切 3 h 以上。酶切产物用 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统检测, 分型。

PCR 扩增产物 *Hin6I* 酶切, 其中 PCR 产物 10  $\mu$ L, *Hin6I* 内切酶 1.5  $\mu$ L, 10  $\times$  buffer Tango 2.0  $\mu$ L, 灭菌水 18  $\mu$ L, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴酶切 3 h 以上。酶切产物用 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统检测, 分型。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增结果

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

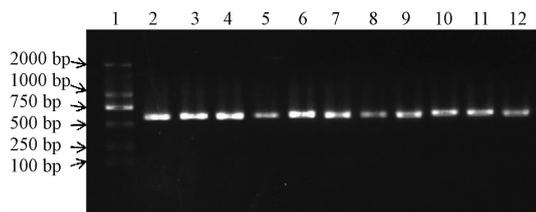


图 1 扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 1 Electrophoretic pattern of the PCR products.

泳道 1 为 DM2000 marker;泳道 2~12 为 GH 基因扩增产物  
Lanes 1: DM2000 marker; Lanes 2-12: PCR products of GH gene.

### 2.2 PCR-RFLPs 检测结果

PCR 扩增产物为 605 bp,用 *Apa*I 酶切产生 2 种等位基因:A(449 bp + 101 bp + 55 bp)和 B(316 bp + 133 bp + 101bp + 55 bp);3 种基因型:AA(449 bp + 101 bp + 55 bp),AB(449 bp + 316 bp + 133 bp + 101 bp + 55 bp)和 BB(316 bp + 133 bp + 101 bp + 55 bp)(见图 2)。

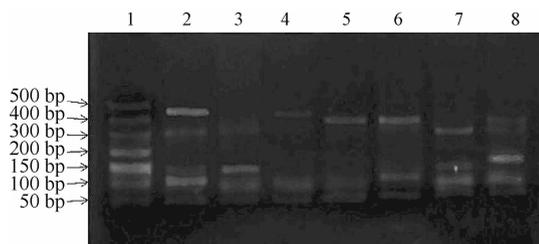


图 2 GH 基因的 PCR-*Apa*I-RFLP 检测结果

Fig. 2 Electrophoretic pattern of *Apa*I digested PCR products.

泳道 1 为 DM500 marker;泳道 2,8 为 AB 基因型;泳道 4,5,6 为 AA 基因型;泳道 3,7 为 BB 基因型  
Lanes 1: D500 marker; Lanes 2,8: AB genotype; Lanes 4,5,6: AA genotype; Lanes 3,7: BB genotype.

用 *Hin*6I 酶切产生 4 种等位基因:G1(605bp)、G2(498 + 107 bp)、G3(449 + 156 bp)和 G4(449 + 107 + 49 bp);10 种基因型:G1G1、G1G2、G1G3、G1G4、G2G2、G2G3、G2G4、G3G3、G3G4 和 G4G4(见图 3)。

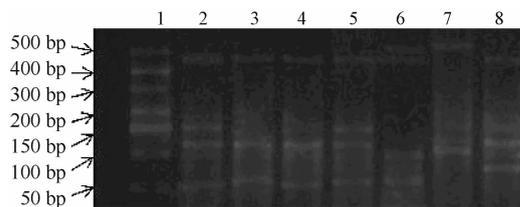


图 3 GH 基因的 PCR-*Hin*6I-RFLP 检测结果

Fig. 3 Electrophoretic pattern of *Hin*6I digested PCR products.

泳道 1 为 DM500marker;泳道 2,5,8 为 G3G4 基因型;泳道 3,4 为 G4G4 基因型;泳道 6 为 G2G4 基因型;泳道 7 为 G2G2 基因型。  
Lanes 1: DM500marker; Lanes 2,5,8: G3G4 genotype; Lanes 3,4: G4G4 genotype; Lanes 6: G2G4 genotype; Lanes 7: G2G2 genotype.

### 2.3 基因频率及基因型频率的计算和统计分析

用 *Apa*I 酶切 PGH 基因 - 119 bp ~ + 486 bp 区域共 605 bp 的 PCR 扩增产物,检测结果(基因和基因型命名据颜瑛等<sup>[6]</sup>的实验),产生 2 种等位基因:A 和 B;3 种基因型:AA,AB 和 BB。其基因频率及基因型频率见表 1。其频率均未偏离 Hardy-Weinberg 平衡状态。两种小型猪 GH 基因 *Apa*I-RFLP 基因型频率及基因频率差异不显著。

用 *Hin*6I 酶切 PGH 基因 - 119 bp ~ + 486 bp 区域共 605 bp 的 PCR 扩增产物,检测结果(基因和基因型命名据颜瑛等<sup>[6]</sup>的实验),产生 4 种等位基因:G1、G2、G3 和 G4;10 种基因型:G1G1、G1G2、G1G3、G1G4、G2G2、G2G3、G2G4、G3G3、G3G4 和 G4G4。其基因频率及基因型频率见表 2。其频率均未偏离 Hardy-Weinberg 平衡状态。两种小型猪 GH 基因 *Hin*6I-RFLP 基因型频率及基因频率差异不显著( $P > 0.05$ )。

表 1 两种不同类型的小型猪 GH 基因 *Apa*I-RFLP 基因型频率及基因频率的分布

Tab. 1 The allele frequency and genotype frequency of GH gene detected by PCR-*Apa*I-RFLP

品种 Pigs	样品数 Samples	基因型频率(%) Genotype frequency			基因频率(%) Allele frequency	
		AA	BB	AB	A	B
西藏小型猪 Tibet minipig	108	49.07	11.11	39.82	68.98	31.02
广西巴马小型猪 Bama minipig	132	43.94	17.42	38.64	63.26	36.74

注:两种小型猪 GH 基因 *Apa*I-RFLP 基因型频率及基因频率差异不显著( $P > 0.05$ )

Note: The differences between the allele frequency and genotype frequency of GH gene detected by PCR-*Apa*I-RFLP in the Tibet and Bama minipigs are not significant ( $P > 0.05$ ).

**表 2** 两种不同类型的小型猪 GH 基因 Hin6I-RFLP 基因型频率及基因频率的分布

**Tab. 2** The allele frequency and genotype frequency of GH gene detected by PCR-Hin6I-RFLP

频率 Frequency (%)	西藏小型猪 Tibet minipig	广西巴马小型猪 Bama minipig
G1G1	0	0.76
G1G2	0.93	1.52
G1G3	0	0.76
G1G4	1.85	2.27
G2G2	8.33	6.06
G2G3	12.04	9.85
G2G4	25	26.52
G3G3	4.63	0
G3G4	23.15	6.82
G4G4	24.07	45.45
G1	1.39	3.03
G2	27.31	25
G3	22.22	8.71
G4	49.07	63.26
样本量 Samples	108	132

注:两种小型猪 GH 基因 Hin6I-RFLP 基因型频率及基因频率差异不显著( $P > 0.05$ )

Note: The differences of the allele frequency and genotype frequency of GH gene detected by PCR-Hin6I-RFLP in the Tibet minipigs and Bama minipigs are not significant ( $P > 0.05$ ).

### 3 讨论

#### 3.1 西藏小型猪和广西巴马小型猪 GH 部分序列 ApaI 酶切位点的多态性

从表 1 实验数据获知,西藏小型猪和广西巴马小型猪中 AA 基因型频率均较高;等位基因 A 频率分别为 0.69 和 0.63,为优势基因。王文君等<sup>[7]</sup>对中外 10 个猪种 GH 基因 ApaI 多态位点的检测结果表明,中国地方猪种的等位基因 A 频率大于 0.6。颜瑛等<sup>[6]</sup>对 5 个藏猪群体的 ApaI 多态位点的检测结果亦表明:除理塘藏猪之外,A 等位基因在藏猪中也表现为优势基因,其频率大于 0.6。本研究的结果与上述实验结果一致。这与 Knorr 等<sup>[8]</sup>研究的结果也相一致。

#### 3.2 西藏小型猪和广西巴马小型猪 GH 基因部分序列 Hin6I 酶切位点的多态性

从表 2 实验数据获知:在西藏小型猪中,G4 基因为优势基因,G2 的频率较高。据王文君的实验结果,在约克夏等国外猪种中 G4 同样为优势基因,但 G1 的频率并不低<sup>[9]</sup>,西藏小型猪和广西巴马小型猪的 G1 频率很低,与约克夏等国外猪种的基因频率及基因型分布有一定的差异。据颜瑛等<sup>[6]</sup>实验结果,G3 除在工布江达藏猪之外的其他藏猪群体中的频率也很低,本实验藏猪群体 G3 基因频率较高,这

与本实验所用西藏小型猪群体引种于工布江达有关。西藏小型猪基因型多为 G2G4、G3G4、G4G4,广西巴马小型猪基因型多为 G2G4、G4G4。两种小型猪在该基因序列上的基因型分布比较集中,多态性较低。这可能是中国地方猪种多产于偏远山区,自繁自养方式高度近交,从而使其遗传、表型更加稳定。

#### 3.3 由 ApaI 和 Hin6I 两种酶切 GH 基因 -119 bp ~ +486 bp 之间的区域产生的基因和基因型多态性

发现西藏小型猪与广西巴马小型猪在该基因部分序列差异不显著( $P > 0.05$ )。

#### 3.4 国内的优质实验用小型猪,如西藏小型猪和广西巴马小型猪等位基因 A 频率均较高

我们已经跟踪测定这两种小型猪的不同月龄(初生、2 月龄、4 月龄、6 月龄)的体重,体长,体高,进一步分析 GH 基因多态性与其生产性状的关系,为实验用西藏小型猪的较小体型猪种的选育打下了基础,并为中国地方猪种资源的保护和开发利用提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 程治平. 内分泌生理学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1984: 64-70.
- [2] Etherton T D. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals [J]. *Physiol Rev*, 1998, 78:745-761.
- [3] Vize PD, Wells JRE. Isolation and characterization of porcine growth hormone gene [J]. *Gene*, 1987, 55:339-344.
- [4] Yerle M, Lahbib-Mansais Y, Thomsen PD, et al. Localization of the porcine growth hormone gene to chromosome 12p<sup>1.2</sup>-p<sup>1.5</sup> [J]. *Animal Genetics*, 1993, 24:129-131.
- [5] 黄黎珍, 那顺巴雅尔, 赖良学, 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.
- [6] 颜瑛, 任军, 丁能水, 等. GH 基因在 5 个藏猪群体中的遗传多态性分析 [J]. *江西畜牧兽医杂志*, 2007, 06(14):14-16.
- [7] 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.
- [8] Knorr C, Moser G, Muller E, et al. Association of GH gene variants with performance traits in F2 generations of European wild boar, Pietrain and Meishan pigs [J]. *Anim Genet*, 1997, 28:124-128.
- [9] 王文君. 生长激素基因(GH)和胰岛素样生长因子-1 基因(IGF-1)对猪部分生长性状影响的研究 [D]. 南昌, 江西农业大学, 2001.