畜牧兽医学报 2007,38(3):209～213
Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica

马生长激素(*GH*)基因的 PCR-SSCP 研究

张焱如[1],芒 来[2]
(1. 内蒙古农业大学生物工程学院,呼和浩特 010018;
2. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院,呼和浩特 010018)

摘 要:选取 4 个蒙古马地方品种、1 个国内培育品种和 1 个国外引入品种共 281 匹马,采用 PCR-SSCP 技术,检测了 *GH* 基因 5′侧翼区、第 1 内含子、第 2 外显子和第 5 外显子 4 个位点的遗传多态性。结果显示:仅第 5 外显子出现多态性,表现出 AA、BB 和 AB 3 种基因型,其余位点未检测到多态。群体遗传学分析结果表明:除纯血马外,其余品种都是等位基因 A 为优势基因;Hardy-Weinberg 平衡检验显示,乌审马、乌珠穆沁马、巴尔虎马处于平衡状态,锡尼河马、三河马、纯血马处于非平衡状态;各品种马的多态信息含量均为中度多态(0.25<PIC<0.5)。本研究为今后马的分子育种奠定一定基础。

关键词:马;*GH* 基因;PCR-SSCP;遗传多态性
中图分类号:S821.2 **文献标识码**:A **文章编号**:0366-6964(2007)03-0209-05

Polymorphism Analysis of the Horse *GH* Gene by PCR-SSCP

ZHANG Yan-ru[1], MANG Lai[2]
(1. *College of Bioengineering, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot* 010018, *China*; 2. *College of Animal Science and Veterinary, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot* 010018, *China*)

Abstract: The genetic polymorphism of 5′-flanking region, 1st intron, 2nd exon and 5th exon of *GH* gene were investigated using PCR-SSCP methods in 281 horses from four local Mongolia breeds, one Chinese cultivating breed and one importing breed. The results showed that only the 5th exon had polymorphism that generated AA, BB and AB three genotypes; the rest loci were undetectable. Analysis of population genetics suggested that the frequency of A allele was dominant among the studied breeds except thoroughbred horse. The results of Hardy-Weinberg equilibrium test indicated that Wushen horse, Wuzhumuqin horse and Baerhu horse reached the equilibrium ($P>0.05$). All of the breeds had intermediate polymorphism information contents(0.25<PIC<0.5). These researches made an essential foundation for molecular breeding of horse in the future.

Key words: horse; *GH* gene; PCR-SSCP; genetic polymorphism

生长激素(Growth hormone,GH)是由动物脑垂体远侧部腺垂体合成、分泌的一种具有种属特异性的单链蛋白质类激素,由 186～191 个氨基酸组成,与催乳素(Prolactin,PRL)和胎盘催乳素(Placental lactogen,PL)同属一个基因家族。GH 广泛存在于各种脊椎动物中,是具有重要生理功能的生长调节素,其作用机理复杂,可影响动物机体蛋白质、脂肪和糖的代谢,与机体生长发育、繁殖等密切相关[3,4]。因此 *GH* 基因是近些年在提高动物生长速度、生产性能等方面研究的热点之一。对其它畜禽的研究发现,*GH* 基因存在丰富的多态性,且其多态性与畜禽许多数量性状(如生长速度、产乳率、乳

收稿日期:2006-04-17
基金项目:内蒙古自治区自然基金项目(200508010410)
作者简介:张焱如(1964-),女,山东安丘人,博士,副教授,主要从事动物分子遗传与发育研究,E-mail:yanru1964@163.com

脂率、产蛋量等)相关,但对马 *GH* 基因及其多态性的研究国内外罕见报道。

目前我国的马业正在兴起并逐步得到发展,特别是速度赛马业正日益受到人们的重视。我国有丰富的马遗传资源,尤其是蒙古马是我国特有的优良遗传资源,具有抗病力强、耐力好、易合群等优点[2]。三河马是我国自身培育的优良品种,其速度快、持久力强、遗传性稳定。纯血马为国外引入品种,其体格健壮、高大,是目前世界上速度最快的赛马品种。为此,本研究选取了 4 个蒙古马地方品种、1 个中国培育品种—三河马、1 个国外引入品种—纯血马共 281 匹,采用 PCR-SSCP 技术对其 *GH* 基因的遗传多态性进行了分析,为寻找导致不同品种马生长发育差异的遗传标记奠定研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料来源

对 6 个品种共 281 个个体马于颈静脉抽血 3～5 mL,其中 48 匹乌审马(内蒙古鄂尔多斯市鄂托克旗),48 匹乌珠穆沁马(内蒙古锡林郭勒盟东乌珠穆沁旗),50 匹巴尔虎马(内蒙古呼仑贝尔新巴尔虎左旗),50 匹锡尼河马(内蒙古呼仑贝尔鄂温克自治旗),50 匹三河马(内蒙古呼仑贝尔陈巴尔虎旗),35 匹纯血马(北京万方亭马术俱乐部),均采用 ACD 抗凝,置液氮罐带回实验室,－70 ℃冰箱中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 参考《分子克隆实验指南》[1]。

1.2.2 引物设计与合成 根据张焱如等在 GenBank 登录(AY867571)的蒙古马 *GH* 基因序列,设计 4 对引物,由北京赛百盛生物工程公司合成 。引物序列、PCR 产物大小和位置见表 1。

表 1 4 个基因座 PCR 引物序列、位置和扩增产物片段长度

Table 1 The primer sequences of 4 loci, location and the length scope of products

基因座 Locus	引物序列 Primer sequences	位置 Location	产物长度/bp The length scope of products
GH-P1	5′ATG ACG AGC CTG GGG GAC ATG 3′ 5′GTT GGG TGA GCT GTC CAC AGG 3′	5′侧翼区 5′-flanking region	246
GH-P2	5′ATG GCT GCA GGT AAG CGC 3′ 5′GAG AAA CAC ATG GAG GGT GGC 3′	第 1 内含子 1st intron	260
GH-P3	5′GCC ACC CTC CAT GTG TTT CTC 3′ 5′ACC CAT CCC TGG GAA GCT TAC 3′	第 2 外显子 2nd exon	207
GH-P4	5′TCT CTT TTC TCC TTC TCT TC G 3′ 5′AGG ATC AAG GGA GGC ACT G 3′	第 5 外显子 5th exon	271

1.2.3 PCR 扩增 PCR 反应体系为 20 μL,其中包括 10 × PCR Buffer 2.0 μL,混合引物(10 pmol/μL) 2.0 μL,*Taq* DNA Polymerase(5 U/μL) 0.2 μL,DNA 模板(80～100 ng/μL)1.0 μL,dNTP (2.5 mmol/L)1.6 μL,加 ddH_2O 至 20 μL。

反应条件基本一致,仅退火温度稍有差异:首先 94 ℃预变性 5 min;(57～61 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s),进行 35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。

1.2.4 扩增产物的转化与测序 PCR-SSCP 检测后,选取纯合基因型个体,对其 PCR 产物进行纯化,经转化、筛选,将阳性克隆送上海生工测序。

1.2.5 统计指标 计算了多态位点的等位基因频率(Allele frequency)、基因型频率(Genotype frequency)、遗传纯合度(Homozygosity,Ho)、遗传杂合度(Heterozygosity,He)、有效等位基因数(Effective number of alleles,Ne)和多态信息含量(Polymorphism information content, PIC)。

2 结果与分析

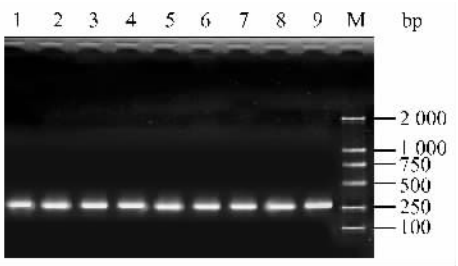
经 PCR-SSCP 分析发现,在所扩增的 4 个片段中,仅第 5 外显子出现多态性,其余 3 个片段未检测到多态性,故仅对第 5 外显子进行分析。

2.1 第 5 外显子 PCR 扩增结果

第 5 外显子长 271bp,扩增结果见图 1,由图 1 看出,扩增条带清晰,特异性强,适于 SSCP 分析。

2.2 第 5 外显子 PCR-SSCP 结果

经 SSCP 分析,第 5 外显子存在单核苷酸多态



1～9. 不同品种马第 5 外显子的 PCR 扩增产物

1-9. The PCR product of the 5th exon of the different breeds; M. DNA marker (DL2000)

图 1　马 *GH* 基因第 5 外显子的 PCR 扩增

Fig. 1　The PCR product of the 5th exon of horse *GH* gene

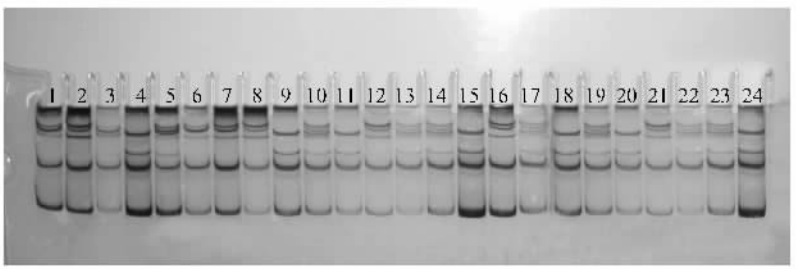
性,出现 AA、BB、AB 3 种基因型,结果见图 2。

2.3　测序结果与分析

选取两种纯合基因型 AA、BB 进行测序,测序结果经 DNAMAN 进行同源比对(与 GenBank accession U02929 相比),结果发现,在马 *GH* 基因第 5 外显子 43 处有一个 T→C 的突变,在 67 处有 G→A 的突变,由此导致等位基因 B 变为等位基因 A。(见图 3)。

2.4　马 *GH* 基因第 5 外显子遗传多态性分析

2.4.1　等位基因频率计算及 Hardy-Weinberg 平衡检验　等位基因频率是估计和比较遗传变异最基



1、2、3、6、7、8、12、16、21. AA 基因型;4、9、11、15、18、20、24. BB 基因型;5、10、13、14、17、19、22、23. AB 基因型

1,2,3,6,7,8,12,16,21. AA genotype;4,9,11,15,18,20,24. BB genotype;5,10,13,14,17,19,22,23. AB genotype

图 2　马 *GH* 基因第 5 外显子 PCR-SSCP 结果

Fig. 2　The PCR-SSCP result of the 5th exon in 6 breeds horse *GH* gene

```
AA          GCAAACCTACGACAAGTTTGACACAAACTTGCGCAGTGAT     40
BB          GCAAACCTACGACAAGTTTGACACAAACTTGCGCAGTGAT     40
U02929      GCAAACCTACGACAAGTTTGACACAAACTTGCGCAGTGAT     40
Consensus   GCAAACCTACGACAAGTTTGACACAAACTTGCGCAGTGAT
AA          GACGCACTGCTCAAGAACTACGGGCTACTCTCCTGCTTCA     80
BB          GATGCACTGCTCAAGAACTACGGGCTGCTCTCCTGCTTCA     80
U02929      GATGCACTGCTCAAGAACTACGGGCTGCTCTCCTGCTTCA     80
Consensus   GA GCACTGCTCAAGAACTACGGGCT CTCTCCTGCTTCA
AA          AGAAGGACCTGCACAAGGCCGAGACGTACCTGCGGGTCAT    120
BB          AGAAGGACCTGCACAAGGCCGAGACGTACCTGCGGGTCAT    120
U02929      AGAAGGACCTGCACAAGGCTGAGACGTACCTGCGGGTCAT    120
Consensus   AGAAGGACCTGCACAAGGC GAGACGTACCTGCGGGTCAT
AA          GAAGTGTCGCCGCTTCGTGGAAAGCAGCTGTGCCTTCTAG    160
BB          GAAGTGTCGCCGCTTCGTGGAAAGCAGCTGTGCCTTCTAG    160
U02929      GAAGTGTCGCCGCTTCGTGGAAAGCAGCTGTGCCTTCTAG    160
Consensus   GAAGTGTCGCCGCTTCGTGGAAAGCAGCTGTGCCTTCTAG
AA          TGGTGGGCTTCTCTGTTACCCCTCCTCAGTGCCTCCCTTG    200
BB          TGGTGGGCTTCTCTGTTACCCCTCCTCAGTGCCTCCCTTG    200
U02929      TGCTGGGCTTCTCTGTTACCCCTCCTCAGTGCCTCCCTTG    200
Consensus   TG TGGGCTTCTCTGTTACCCCTCCTCAGTGCCTCCCTTG
AA          ATCC                                        204
BB          ATCC                                        204
U02929      ATCC                                        204
Consensus   ATCC
```

图 3　第 5 外显子 AA、BB 基因型序列同源性比较

Fig. 3　Homologous comparison of AA and BB genotype at the 5th exon site

本的数据。本研究从群体遗传学角度统计了 6 个品种马 *GH* 基因第 5 外显子 PCR-SSCP 位点的基因型频率和等位基因频率(见表 2)。

表 2 可见,除纯血马外,5 个品种马都是等位基因 A 较等位基因 B 占优势,A 基因在乌珠穆沁马中频率最高,达 0.76,纯血马则最低,为 0.486;Hardy-Weinberg 平衡检验显示,乌审马、乌珠穆沁马、巴尔虎马处于平衡状态,锡尼河马、三河马、纯血马处于非平衡状态。

2.4.2 遗传纯合度(Ho)、杂合度(He)、有效等位基因数(Ne)及多态信息含量(PIC) 遗传杂合度(He)和多态信息含量(PIC)是衡量群体遗传变异和遗传多态性的合适参数。表 3 可看出,在不同品种马 *GH* 基因第 5 外显子位点,各品种马的 PIC 值均在 0.298～0.375 之间,所有品种均表现为中度多态。

表 2 不同马种 *GH* 基因第 5 外显子基因型和基因频率分布

Table 2 Genotype and allele frequencies distribution of the 5th exon site of *GH* gene in dirrerent horse breeds

品种 Breeds	样本数 Sample size	基因型频率 Genotype frequencies			位基因频率 Allele frequencies		χ^2 值[d] χ^2 value
		AA	BB	AB	A	B	
乌审马 Wushen	48	0.500(24)	0.375(18)	0.125(6)	0.688	0.312	0.778
乌珠穆沁马 Wuzhumuqin	48	0.625(30)	0.271(13)	0.104(5)	0.760	0.240	3.163
锡尼河马 Xinihe	50	0.420(21)	0.220(11)	0.360(18)	0.530	0.470	15.591**
巴尔虎马 Baerhu	50	0.300(15)	0.480(24)	0.220(11)	0.540	0.460	0.057
三河马 Sanhe	50	0.460(23)	0.120(6)	0.420(21)	0.520	0.480	28.850**
纯血马 Thoroughbred	35	0.371(13)	0.229(8)	0.400(14)	0.486	0.514	10.300**

df=2,$\chi^2_{0.05}=5.99$,$\chi^2_{0.01}=9.21$

表 3 第 5 外显子位点纯合度(Ho)、杂合度(He)、有效等位基因数(Ne)和多态信息含量(PIC)

Table 3 The genetic polymorphism parameters of the 5th exon site

品种 Breeds	纯合度 Homozygosity(Ho)	杂合度 Heterozygosity (He)	有效等位基因数 Effective number of alleles(Ne)	多态信息含量 Polymorphism information content (PIC)
乌审马 Wushen	0.571	0.429	1.752	0.337
乌珠穆沁马 Wuzhumuqin	0.635	0.365	1.574	0.298
锡尼河马 Xinihe	0.502	0.498	1.993	0.374
巴尔虎马 Baerhu	0.503	0.497	1.987	0.373
三河马 Sanhe	0.501	0.499	1.997	0.375
纯血马 Thoroughbred	0.500	0.500	1.998	0.375

3 讨 论

3.1 关于马 *GH* 基因的多态性

本研究对扩增到的马 *GH* 基因共 4 个位点进行了检测,结果仅第 5 外显子表现出多态,其余 3 个位点未检测到多态,即使是第 5 外显子也仅表现出 3 种基因型,这与牛、羊、猪等家畜 *GH* 基因有比较大的差异。高雪[6]对牛 *GH* 基因进行 PCR-SSCP 分析时,在其 5′侧翼区和第 5 外显子均检测到了多态性;姜志华[4]和方英美[5]对猪第 2 外显子检测发现,其存在较丰富的遗传变异。而马 *GH* 基因第 2 外显子则未检测到多态,说明马 *GH* 基因在本研究所检测的这几个位点,遗传变异不及其他家畜丰富。马 *GH* 基因其他位点的变异性如何,有待进一步研究。

3.2 关于马 *GH* 基因在品种间的遗传变异

多态信息含量(PIC)是衡量位点多态性的一个合适的参数。PIC 数值越大,群体内基因一致性越差,变异性就越高,选择潜力越大;反之,PIC 数值越小,说明群体变异程度越低,选择的潜力越小[7,8]。本试验显示:在马 *GH* 基因第 5 外显子位点,各品种马的 PIC 值均在 0.298～0.375 之间,为中度多态,说明该位点在各品种马中的变异程度相似,没有太

大的差异。

3.3　关于马 *GH* 基因的遗传平衡分析

马的特性和特征形成是长期自然选择和人工选择的结果。一般来讲,品种的遗传基础越广泛,品种选育程度越低,其 DNA 的多态性就越丰富[8]。基因和基因型频率的计算结果显示:6 个品种马中,有 5 个品种均表现出等位基因 A 为优势基因,仅纯血马例外。从品种产生历史看,乌珠穆沁马、乌审马和巴尔虎马都属于蒙古马中的不同地方类群,这些群体在各自相对封闭的环境中自然繁育而成,其基因分布比较平衡。三河马为一培育品种,纯血马为国外引入品种,后代繁育大多是人工选择交配,尤其是纯血马,其后代繁衍有着更为严格的人工选择,必然会造成基因分布的不平衡。锡尼河马本为一地方品种,主要分布于呼伦贝尔的鄂伦春旗,近些年,由于当地牧民热衷于速度赛马活动,逐渐在锡尼河马中有意导入部分外血,以提高锡尼河马的速度,其后代繁育过程人工选择的比例在加大,因此其基因分布也会出现不平衡现象。

综上所述,利用 PCR-SSCP 技术首次对不同品种马 *GH* 基因遗传多态性进行了初步的分析,为寻找导致不同品种马生长发育差异的遗传标记及我国赛马业的发展提供了理论依据。

参考文献:

[1] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T,著. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁,黎孟枫,侯云德,等译. 第 2 版,北京:科学出版社,1992. 463～481.

[2] 李金莲,芒　来,石有斐. 利用微卫星标记对蒙古马和纯血马遗传多样性的研究[J]. 畜牧兽医学报,2005,36(1):6～9.

[3] 张焱如,乌尼尔夫,芒　来. 蒙古马生长激素基因的克隆与序列分析[J]. 中国畜牧杂志,2006,42(9):10～12.

[4] 姜志华, Pircher F, Rottann O J. 猪生长激素基因第 2 外显子区域遗传变异的序列基础[J]. 南京农业大学学报,1997,20(2):67～71.

[5] 方英美,姜志华,刘红林,等. 6 个品种猪生长激素基因座位遗传多态性检测[J]. 动物学研究,1998,19(4):334～336.

[6] 高　雪,徐秀容,许尚忠,等. 中国地方黄牛 GH 基因多态性研究[J]. 畜牧兽医学报,2005,36(10):991～995.

[7] 李美玉,潘玉春. 山羊 GH 基因 5′调控区的单核苷酸多态性研究[J]. 莱阳农学院学报,2004,21(3):193～195.

[8] 经荣斌,宋成义,陶　勇,等. 猪 GH 基因部分突变位点在不同品种中的分布[J]. 扬州大学学报,2003,1:30～33.

[9] Ascacio-Martinez J A, Barrera-Saldana H A. Sequence of a cDNA encoding horse growth hormone [J]. Gene,1994,143(2):299～300.

[10] Brandon R B, Giffard J M, Bell K. Single nucleotide polymorphism in the equine transferring gene[J]. Animal Genet,1999,30(6):439～443.

[11] Aberle K S, Hamann H, Drogemuller C, *et al*. Genetic diversity in German draught horse breeds compared with a group of primitive, riding and wild horses by means of microsatellite DNA markers[J]. Animal Genetics,2004,35(4):270～273.