

雷琼牛 GH 基因第五外显子遗传多样性及其分化

李永红¹, 常 洪^{1,*}, 耿荣庆^{1,2}, 冀德君¹, 马国龙¹, 常春芳¹, 陈宏宇¹, 宋光明¹

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 盐城师范学院生命科学与技术学院, 盐城 224051)

摘要:对 16 头雷琼牛 GH 基因第 5 外显子序列进行分析, 发现了 1 个变异位点, 定义了 2 种单倍型。引用巴州牦牛 2 个个体 GH 基因同源区序列并结合 GenBank 中牛属普通牛、其它瘤牛和牦牛 3 个种群与黄牛 1 个远缘种 GH 基因同源区序列, 分别采用邻接(NJ)法和最大简约(MP)法构建分子系统发育树, 得到基本一致的拓扑结构, 结果显示 GH 基因的分化早于雷琼牛(瘤牛)、其它瘤牛、普通牛、牦牛和黄牛的分化, 瘤牛物种内存在多型, 同时证实了 GH 基因第 5 外显子区有着较高的突变率。

关键词:雷琼牛; GH 基因; 遗传多样性; 分化

文章编号:1000-0933(2007)12-5325-06 中图分类号:Q141 文献标识码:A

Genetic diversity and differentiation of Leiqiong cattle based on the fifth exon sequences of GH gene

LI Yong-Hong¹, CHANG Hong^{1,*}, GENG Rong-Qing^{1,2}, JI De-Jun¹, MA Guo-Long¹, CHANG Chun-Fang¹, CHEN Hong-Yu¹, SONG Guang-Ming¹

1 Animal Science and Technology College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

2 College of Life Science and Technology, Yancheng Teachers University, Yancheng 224051, China

Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(12): 5325 ~ 5330.

Abstract: One mutation and two different haplotypes were found when the fifth exon of GH gene sequences of 16 Leiqiong cattle were analyzed. Together with two homologous sequences of Bayingole yak and sequences of zebu (*Bos indicus*), *Bos taurus* and *Bos grunniens* and with the sequence of *Bubalus bubalis* as the outgroup, the fifth exon of GH gene sequences of 16 Leiqiong cattle were aligned and the base composition and nucleotide variation of GH gene were analyzed. The phylogenetic trees were constructed by the NJ method and the MP method respectively, both supporting almost the same topology. The results indicated that GH gene differentiation happened before *Bubalus bubalis* differentiated from *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bos grunniens*. Multiple haplotypes existed in breeds among zebu, conforming that the fifth exon of GH gene variation rate was high.

Key Words: Leiqiong cattle; GH gene; phylogenetic diversity; genetic differentiation

雷琼牛为海南牛和徐闻牛合并的品种^[1], 分布于海南岛和雷州半岛。由于产地的地理、生态环境和自身独特的体型外貌特征, 雷琼牛成为具有代表性的中国黄牛南方品种。中国南方黄牛的起源分化一直以来是畜牧学者研究的热点之一, 根据中国南方黄牛血液蛋白位点和 Y 染色体特征, 辅以体态、毛色特征与史料的考

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571323)

收稿日期: 2007-01-23; 修订日期: 2007-10-22

作者简介: 李永红(1981~), 女, 硕士生, 河南新乡人, 主要从事动物遗传资源评价保护与利用研究。E-mail: hong129532@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: hoch@yzn.net

Foundation item: The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China(No. 30571323)

Received date: 2007-01-23; **Accepted date:** 2007-10-22

Biography: LI Yong-Hong, Master candidate, mainly engaged in animal genetic resources. E-mail: hong129532@yahoo.com.cn

证,以及对雷琼牛 mtDNA 的研究,证实了雷琼牛是中国南方典型的瘤牛型黄牛^[2~5]。

生长激素(Growth Hormone, GH)是由脑垂体前叶嗜酸性细胞合成和分泌的一种单一肽链的蛋白质激素,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,对动物新陈代谢的调节、机体的生长发育发挥着重要的作用。GH 基因是 GH 的遗传物质,其所制约的表型具有对选择的适应性。牛 GH 基因位于 19 号染色体上,含约 2850 个碱基,由 5 个外显子和 4 个内含子组成。国内外有关 GH 基因多态的报道较多,Zhang 等^[6]、Schlee 等^[7]、Lucy 等^[8]和 Yao 等^[9]均报道 GH 基因第 5 外显子 2141 位发生 C-G 的颠换,导致牛生长激素 127 位的亮氨酸变为缬氨酸。Cowan 等^[10]、曹红鹤等^[11]报道在 GH 基因第 5 外显子 2258 位发生 C-T 的转换,导致 *MspI/HapII* 的酶切多态,Yao 等^[9]还在 GH 基因第 5 外显子 2291 bp 处检测到 A-C 的颠换。近些年的研究结果表明,牛的 GH 基因位点上,不同的个体之间存在着广泛的变异。但还未见到关于雷琼牛 GH 基因在这方面的报道。本文旨在通过对雷琼牛 GH 基因第 5 外显子序列的测定,探讨其序列变异特点及其在雷琼牛品种内、瘤牛物种内和牛亚物种间进化分化特征,从分子水平为研究分子进化与适应进化之间的关系、雷琼牛进化分化脉络提供部分参考依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

采用中心产区典型群随机抽样的方法,16 个雷琼瘤牛血样分别采自广东省雷州市南兴镇和龙门镇 3 个行政村,避免有可追溯亲缘关系的两个(及以上)个体一并进入样本,巴州牦牛的 2 个个体采自新疆维吾尔自治区巴音郭楞州和静县巴音布鲁克区,颈静脉采血,血样低温带回实验室, -20℃ 保存备用。

1.1.2 雷琼牛 GH 基因部分序列的 PCR 扩增

根据 YAO 等发表的引物序列合成一对引物^[9],引物序列如下:

上游引物 5'-TAGGGGAGGGTGGAAAATGGA-3'

下游引物 5'-GACACCTACTCAGACAATGCG-3'

以上引物由上海生工生物工程有限公司合成。

采用酚/氯仿抽提法提取雷琼牛全基因组 DNA。以雷琼牛的全基因组 DNA 为模板,PCR 反应体系:10 × buffer 5 μl, Mg²⁺ 3 μl (25 mmol/μl), dNTP 4 μl, 引物各 2 μl (10 pmol/μl), Taq DNA 聚合酶 1.2 μl (2.5 U/μl), 加灭菌双蒸水至 50 μl。

PCR 反应程序:94℃ 5min;94℃ 1 min、59℃ 1min、72℃ 50s, 32 个循环;72℃ 8min, 4℃ 保存。

1.1.3 PCR 扩增产物的检测和测序

PCR 扩增产物用 PAGE 胶电泳检测大小、纯度及浓度,由上海生工生物工程有限公司进行 PCR 扩增产物的纯化、回收与双向测序。

1.1.4 统计分析

采用 DNAMAN 5.2.2 软件对雷琼牛 16 个个体的 GH 基因部分序列,结合巴州牦牛 2 个个体以及 GenBank 中牛属普通牛(*Bos taurus*) (GenBank 序列号:M57764 M28453)、其它瘤牛(*Bos indicus*) (GenBank 序列号:AF034386)、牦牛(*Bos grunniens*) (GenBank 序列号:AY271297)、水牛(*Bubalus Bubalis*) (GenBank 序列号:AJ011533) GH 基因分别进行同源序列排序,并采用动态比对法进行序列比对、剪切同源序列。用 MEGA3.1 软件计算不同序列间的核苷酸替代数、序列间差异与序列分歧度。用 MEGA3.1 软件基于 P 距离构建邻接(NJ)树,基于近邻互换算法(CNI, close-neighbor-interchange)构建最大简约(MP)树,以水牛作为外群进行分析,系统树各分枝的置信度由 1000 次自展法(Bootstrap)重复检测。

2 结果与分析

2.1 GH 基因 PCR 扩增产物检测及测序结果

PCR 扩增产物大小为 404 bp,经双向测序结果表明目标片段 404 bp,中间无缺失和插入。序列从 2054 ~ 2457,包括部分第 4 内含子,第 5 外显子(2138 ~ 2439)和部分 3'端侧翼区。产物(图 1)。

2.2 GH 基因 PCR 扩增产物序列分析

所检测的雷琼牛 16 个个体 GH 基因第 5 外显子序列中,在 2230 位置发现 1 个变异位点(图 2),定义了 2 种单倍型,A 类型个体 12 个(2230 位为 C),B 类型个体 4 个(2230 位为 T),巴州牦牛 2 个个体序列完全一致。结合 GenBank 中牛属普通牛、其它瘤牛、牦牛和水牛同源区序列,共发现 8 个变异位点。巴州牦牛 2 个个体序列与牦牛序列一致,A 类型序列与 2 个巴州牦牛、牦牛序列一致,与普通牛、其它瘤牛序列比较,在 2291 位发生了颠换,与水牛序列比较,在 2272、2275 和 2305 位发生了转换,在 2291、2380 和 2439 位发生了颠换,在 2358 位水牛序列缺失 1 个 T。B 类型序列与 2 个巴州牦牛、牦牛序列比较,在 2230 位发生了转换,与普通牛、其它瘤牛序列比较,在 2230 位发生了转换,在 2291 位发生了颠换,与水牛序列比较,在 2230、2272、2275 和 2305 位发生了转换,在 2291、2380 和 2439 位发生了颠换,在 2358 位水牛序列缺失 1 个 T(图 3)。

2.3 系统发育树的构建

本研究涉及牛 GH 基因第 5 外显子序列 22 条,每个位点的核苷酸替代数目 Jukes &Cantor 估计值 d 为 $0.013 < 0.05$,因此,以距离法构建系统发育树时宜采用 P 距离或 Jukes &Cantor 模型的距离测度^[12],以距离法进行系统发育推断的研究中,邻接法也是基于最小进化原理,被认为是最小进化(ME)法的简化方法^[12],Saitou 和 Nei 经过数学论证和计算机模拟,指出此法优于几乎所有的其他距离矩阵法^[13,14];本研究涉及的牛 GH 基因第 5 外显子 22 条序列平均序列分歧度为 0.011,因为当序列的分歧度较低时($d \leq 0.1$),无需模型的 MP 法可以获得比其他方法更加可靠的系统树^[12,15]。因此,采用基于 P 距离模型运用邻接(NJ)法构建系统树;基于近邻互换算法(CNI,close-neighbor-interchange)运用最大简约(MP)法构建系统树^[15],两种方法中均以水牛作为外群进行分析,系统树各分枝的置信度由 1000 次自展法(Bootstrap)重复检测(见图 4、图 5)。从图 4、图 5 中可见,基于 P 距离模型运用邻接(NJ)法构建的系统树和基于 CNI 算法运用最大简约(MP)法构建的系统树具有基本一致的拓扑结构。由图 4、图 5 可以看出雷琼牛的两变异类型与牦牛、巴州牦牛在自展置信值 97%、99% 的显著水平上首先聚为一类,然后与普通牛和其它瘤牛聚在一起,最后与水牛聚为一类。

3 讨论

3.1 在本研究中,发现瘤牛物种内存在多型现象,雷琼牛种内的变异较小,16 个个体 GH 基因第 5 外显子序列仅发生了一位的变异,未发现其它的变异位点。种间共发现了 8 个变异位点,同样也发现了 2291 位的变异,这与 Yao 等^[9]的研究结果一致。证实了牛的 GH 基因位点上,不同的物种间和物种内存在着广泛的变异,GH 基因第 5 外显子区有着较高的突变率^[6~11]。

3.2 GH 基因在动物的生长发育过程中起着重要的作用,是近些年研究动物的生长速度,生产性能方面的热点之一。同时,GH 基因本身核苷酸序列变异特点也是研究的热点之一。尽管 mtDNA 是目前分析母系起源的恰当根据,但不是决定雷琼牛起源系统的唯一根据,同样,对 GH 基因的研究可以为认识雷琼牛起源系统提供一部分新的依据,以作为最终解决雷琼牛系统地位问题的依据之一。GH 基因对牛的生长、泌乳及乳腺的发

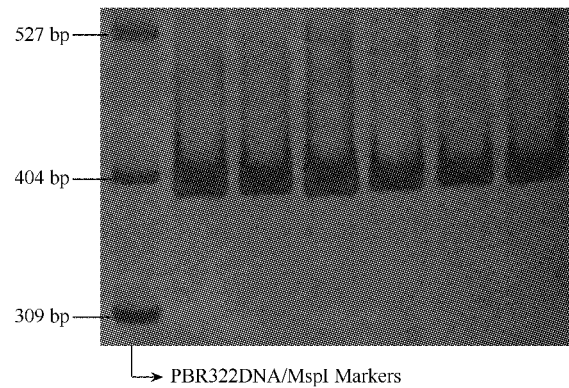


图 1 GH 基因 PCR 扩增产物的 PAGE 胶电泳图谱

Fig. 1 GH gene fragment by PAGE gel electrophoresis

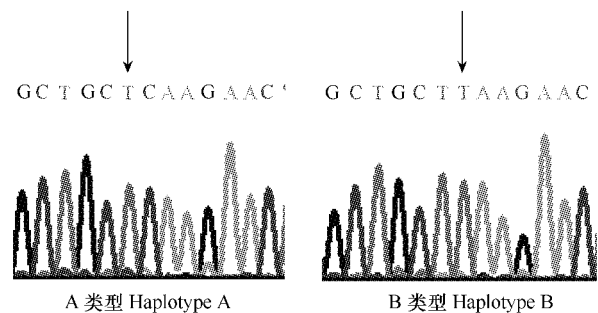


图 2 16 个个体 GH 基因第 5 外显子序列中出现的两种类型

Fig. 2 The fifth exon sequences of two GH gene variation chromatograms

LQ1.txt	CGACGCGTGTCTCAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCGGAAGGACCTGCATAAGACGGAGACGTACCTGCGGGTCA	160
LQ2.txt	-----	160
LQ3.txt	-----	160
LQ4.txt	-----	160
LQ5.txt	-----t-----	160
LQ6.txt	-----t-----	160
LQ7.txt	-----	160
LQ8.txt	-----	160
LQ9.txt	-----t-----	160
LQ10.txt	-----	160
LQ11.txt	-----	160
LQ12.txt	-----	160
LQ14.txt	-----	160
LQ15.txt	-----t-----	160
LQ16.txt	-----	160
Bzyak1.txt	-----	160
Bzyak2.txt	-----	160
BT.txt	-----a-----	160
BI.txt	-----a-----	160
BG.txt	-----	160
BB.txt	-----c-a-----a-----	160
LQ1.txt	TGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCCGTGCCTTC	240
LQ2.txt	-----	240
LQ3.txt	-----	240
LQ4.txt	-----	240
LQ5.txt	-----	240
LQ6.txt	-----	240
LQ7.txt	-----	240
LQ8.txt	-----	240
LQ9.txt	-----	240
LQ10.txt	-----	240
LQ11.txt	-----	240
LQ12.txt	-----	240
LQ14.txt	-----	240
LQ15.txt	-----	240
LQ16.txt	-----	240
Bzyak1.txt	-----	240
Bzyak2.txt	-----	240
BT.txt	-----	240
BI.txt	-----	240
BG.txt	-----	240
BB.txt	-----t-----	239
LQ1.txt	CTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTCTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGC	302
LQ2.txt	-----	302
LQ3.txt	-----	302
LQ4.txt	-----	302
LQ5.txt	-----	302
LQ6.txt	-----	302
LQ7.txt	-----	302
LQ8.txt	-----	302
LQ9.txt	-----	302
LQ10.txt	-----	302
LQ11.txt	-----	302
LQ12.txt	-----	302
LQ14.txt	-----	302
LQ15.txt	-----	302
LQ16.txt	-----	302
Bzyak1.txt	-----	302
Bzyak2.txt	-----	302
BT.txt	-----	302
BI.txt	-----	302
BG.txt	-----	302
BB.txt	-----a-----g-----	301

图3 雷琼牛 GH 基因第5 外显子序列与其它牛种比对结果

Fig. 3 The aligned result of the fifth exon sequences of Leiqiong

lq1 ~ lq16 为雷琼牛原始编号; Bzyak, BT, BI, BG, BB 分别为雷琼牛巴州牦牛, 普通牛, 其他瘤牛, 牦牛, 水牛 lq1 ~ lq16 are original serial numbers of each Leiqiong cattle; Bzyak, BG, BI, BT and BB are Bayingole yak, *Bos grunniens*, *Bos taurus*, *Bos indicus* and *Bubalus Bubalis* respectively

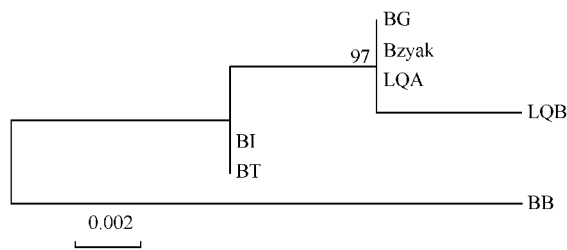
图4 基于 P 距离模型以邻接(NJ)法构建的系统树

Fig.4 NJ tree based on p -distance model with Bootstrap test (1000 replication)

图中数字为自展置信水平 P_B 值 the values of P_B of the nodes are indicated above the branches

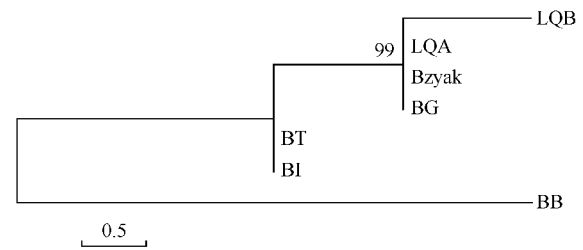


图5 基于 CNI 方法运用最大简约(MP)法构建系统树

Fig.5 MP tree based on CNI method with Bootstrap test (1000 replication)

图中数字为自展置信水平 P_B 值 the values of P_B of the nodes are indicated above the branches

育起着重要作用,表型效应明显与选择有关系,氨基酸变化的结果可能会对选择产生影响,意味着分子进化与适应进化可能有着一定的联系。

3.3 雷琼牛主产于雷州半岛的徐闻、雷州、遂溪及海南省的琼山县,地处亚热带和热带气候地区,分布于湛江市的廉江、吴川、坡头、麻章、东海岛等县(市、区)及海南岛的各县(市),与外界隔离条件较好。雷琼牛现今的地理分布与普通牛的地理分布较近,与牦牛的地理分布较远。众多的研究证实了雷琼牛具有瘤牛起源,是中国南方典型的瘤牛型黄牛,但从图4、图5中可以看出 GH 基因树的拓扑结构与这几个牛亚科家畜已知物种树的拓扑结构是有区别的,雷琼牛首先与牦牛聚在一起而不是与其它瘤牛聚在一起。雷琼牛与牦牛之间有着不完全的生殖隔离,通过母系进行基因传递^[16]。常洪等^[17]指出,长期以来,中国黄牛通过雌系牦牛混入了一部分牦牛血统。《水东日记》曰:“牦牛与封牛合,则生犏牛”,封牛即瘤牛。但就 GH 基因第5外显子而言,这可能是悠久的物种分化历程中遗传漂变留下的痕迹,意味着 GH 基因的分化早于雷琼牛(瘤牛)、其它瘤牛、普通牛、牦牛和水牛的分化。

4 结论

本研究证实了瘤牛种内 GH 基因存在多型。GH 基因的分化早于物种的分化。中国雷琼牛不同于南亚瘤牛,在牛亚物种中,瘤牛、普通牛、牦牛关系相对密切,与水牛的分化不在同一层次。在进化历程中和物种分化完成以后,牦牛对中国瘤牛有血统贡献。

Reference:

- [1] Editorial Section of the "Bovine Breeds in China". Bovine Breeds in China. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 1998.
- [2] Chen Y C. Characteristics of Chinese Yellow Cattle Ecospecies and Their Course of Utilization. Beijing: Agricultural Press, 1990.
- [3] Nie L, Chen Y J, Wang W, *et al.* Mitochondrial DNA polymorphism in XuWen yellow cattle and HaiNan yellow cattle. Zoological Research, 1996, 17 (3): 269-274.
- [4] Wang Z F, Lei C C, Chen H, *et al.* Study on mtDNA D-loop Genetic Diversity in Leiqiong Cattle. Journal of Yellow Cattle Science, 2005, 31 (5): 14-15.
- [5] Chen H, Qiu H, Zhan T S, *et al.* Studies on Sex Chromosome Polymorphism of Four Local Cattle (*Bos taurus*) Breeds in China. Hereditas, 1993, 15 (4): 14-17.
- [6] Zhang H M, Brown D R, Denise S K, *et al.* Nucleotide sequence deter mutation of a bovine somatotropin allele. Animal Genetics, 1992, 23: 578.
- [7] Schlee P, Graml R, Rottmann O, *et al.* Influence of growth hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls. Journal of Animal Breeding and Genetics, 1994, 11: 253-256.
- [8] Lucy M C, Hauser S D, Eppard P J, *et al.* Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. Domestic Animal Endocrinology, 1993, 10 (40): 325-333.
- [9] Yao J, Aggrey S E, Zadworny D, *et al.* Sequence variations in the bovie growth hormone gene characterized by single-strand conformation

- polymorphism(SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. *Genetics*, 1996, 144 (4) :1809—1816.
- [10] Cowan C M, Dentine M R, Ax R L, *et al.* Restriction fragment length polymorphisms associated with growth hormone and prolactin genes in Holstein bulls; evidence for a novel growth hormone allele. *Animal Genetics*, 1989, 20 (2) : 157—165.
- [11] Cao H H. Studies on biochemical and molecular genetic markers for major performance traits in beef cattle. Ph. D. Thesis the Chinese Agricultural of University, 2000.
- [12] Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*, English; Oxford University Press, 2002.
- [13] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 1987, 4: 406—425.
- [14] Li B Z. Construction of molecule evolutionary tree. *Zoological Research*, 1993, 14(2) : 186—193.
- [15] Saitou N. Property and efficiency of the maximum likelihood for molecular phylogeny. *J. Mol. Evol.*, 1988, 27:261—273.
- [16] Qiu H. *Chinese Yellow Cattle*. Beijing: Agricultural Press, 1992.
- [17] Chang H, Miao Z R. *Yellow cattle breeding*. Beijing: China Environmental Science Press, 1988.

参考文献:

- [1] 《中国牛品种志》编写组. 中国牛品种志. 上海:上海科学技术出版社, 1988.
- [2] 陈幼春. 中国黄牛生态种特征及其利用方向. 北京:农业出版社, 1990.
- [3] 聂龙, 陈永久, 王文, 等. 海南黄牛和徐闻黄牛线粒体 DNA 的多态性及其品种分化关系. *动物学研究*, 1996, 17(3) :269~274.
- [4] 王朝锋, 雷初朝, 陈宏, 等. 雷琼牛 mtDNA D-loop 遗传多态性研究. *黄牛杂志*, 2005, 31(5) :14~15.
- [5] 陈宏, 邱怀, 詹铁生, 等. 中国四品种黄牛性染色体多态性的研究. *遗传*, 1993, 15(4) :14~17.
- [11] 曹红鹤. 肉牛主要生产性状的生化和分子遗传标记研究. 中国农业大学博士论文, 2000.
- [14] 吕宝忠. 分子树的构建. *动物学研究*. 1993 24:186~193
- [16] 邱怀. 中国黄牛. 北京:农业出版社, 1992.
- [17] 常洪, 苗泽荣. 黄牛育种. 北京:中国环境科学出版社, 1988.