

牛生长激素基因外显子 5 序列变异及其分子进化特征

耿荣庆^{1,2}, 王兰萍¹, 常 洪^{2*}, 李永红², 冀德君², 常春芳²

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

摘 要: 通过双向直接测序法测定中国 5 个牛种生长激素(GH)基因外显子 5 序列, 并且在分析序列变异的基础上探讨 GH 基因外显子 5 序列的分子进化特征。序列分析表明, 5 个牛种 GH 基因外显子 5 的遗传变异水平较低, 平均核苷酸变异率约为 3.48%, 而且绝大多数位点的核苷酸替换是同义突变, 仅发现 1 个错义突变位点; 从 GH 基因外显子 5 序列单倍型构建的分子进化树来看, 水牛与普通牛、瘤牛、牦牛及大额牛的分化相对比较明显, 其他 4 个牛种之间并无明显分化, 还享有共同的祖先序列。研究结果也说明牛 GH 基因外显子 5 在进化过程中由于功能的约束表现相当保守, 进化速率缓慢。

关键词: 牛; 生长激素基因; 分子进化

中图分类号: S823.8

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2009)02-0006-04

Sequence Variations and Molecular Evolution at Exon 5 of Bovine Growth Hormone Gene

GENG Rongqing^{1,2}, WANG Lanping¹, CHANG Hong^{2*}, LI Yonghong²,
JI Dejun² and CHANG Chunfang²

(1. College of Life Science and Technology, Yancheng Teachers University, Yancheng Jiangsu 224051, China;

2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou Jiangsu 225009, China)

Abstract: Sequences of growth hormone gene at exon 5 in five indigenous Chinese bovine species were sequenced by standard double-strand DNA sequencing method. Characters of molecular evolution were also analysed basing on sequence variations. Mutation rate at exon of GH in five bovine species was very low with the percentage of 3.48%. The majority of nucleotide substitution was nonsense mutation and only one missense mutation was observed. Molecule tree based on haplotypes of bGH at exon 5 showed that differentiation was apparent relatively between *Bubalus bubalis* and *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos grunniens*, *Bos frontalis*. There was no apparent differentiation among other four bovine species and they shared mutual ancestral sequence. Our results also demonstrated that exon 5 of bGH gene was strictly conservative under functional constraint during the course of evolution together with low evolution rate.

Key words: Bovine; Growth hormone gene; Molecular evolution

牛生长激素(Bovine Growth Hormone, bGH)基因已经被定位于第 19 号染色体上, 由 1793 个核苷酸组成, 包括 5 个外显子和 4 个内含子, 编码 191 个氨基酸^[1]。国内外既有的报道表明^[2-8], bGH 基因是一个多功能基因, 具有明显的

促进生长发育作用, 对泌乳量、体重等经济性状也产生重要的影响, 并因此承受着一定程度的选择压力。本研究测定 5 个牛种生长激素基因外显子 5 序列, 分析序列变异特点并构建系统发育树, 旨在探讨不同牛种 GH 基因编码区域差异, 为阐明

收稿日期: 2008-07-14 修回日期: 2008-09-28

基金项目: 江苏省高校自然科学基金基础研究项目(08KJB230002); 江苏省高校“青蓝工程”; 国家自然科学基金项目(30571323); 盐城师范学院科学研究项目(07YCKL056)资助。

作者简介: 耿荣庆(1976-), 男, 江苏盐城人, 博士, 主要从事动物遗传学研究。E-mail: rqgeng@yahoo.com.cn.

* 通讯作者: 常 洪。E-mail: hoch@yzcn.net

适应进化和分子进化的关系提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

5 个牛种的血液样本来源见表 1。用肝素钠溶液抗凝的颈静脉血液样本低温送回实验室后,以酚-氯仿法抽提 DNA,−20℃ 保存备用^[9]。

1.2 PCR 和序列测定

根据发表的普通牛 GH 基因全序列 (GenBank 登录号 M57764) 设计一对引物,用以扩增 5 个牛种外显子 5 序列。上、下游引物序列分别为

5'-TAGGGGAGGGTGGAAAATGGA-3' 和 5'-GACACCTACTCAGACAATGCG-3'。

50μL 反应体系包括 10 × buffer 5μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5μL, 2.5 mmol/L 混合 dNTP 2μL, 10 pmol/μL 的上、下游引物各 1μL, 5 U/μL Taq DNA polymerase 0.2μL, DNA 模板 100 ng, 剩余体积用灭菌水补足。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 60 s, 59℃ 50 s, 72℃ 50 s, 共 32 个循环; 72℃ 8 min; 4℃ 保存。PCR 扩增产物纯化后送上海生物工程有限公司双向测序。

表 1 样本采集的基本信息
Table 1 Basic information of sampling

物种名 Name of species	样本数 Number of samples	品种名及采样点 Name of breeds and location of sampling
普通牛 <i>Bos taurus</i>	19	蒙古牛, 新疆维吾尔自治区和静县巴音布鲁克区
瘤牛 <i>Bos indicus</i>	18	雷琼牛, 广东省雷州市郊区
牦牛 <i>Bos grunniens</i>	16	巴州牦牛, 新疆维吾尔自治区和静县巴音布鲁克区
大额牛 <i>Bos frontalis</i>	18	大额牛, 云南省泸水县老窝乡
亚洲水牛 <i>Bubalus bubalis</i>	18	海子水牛, 江苏省东台市郊区

1.3 序列统计分析

手工核对的序列结果用 Clustalx (Version 1.83) 软件进行比对, 再用 MEGA (Version 3.1)^[10] 软件包统计分析序列变异位点数、简约信息位点数、转换数、颠换数、遗传距离等基本参数, 以 Kimura 双参数模型为基础用邻近法 (Neighbor-joining, NJ) 构建分子进化树。

2 结果与分析

2.1 bGH 基因外显子 5 序列变异特点

PCR 扩增产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测显示, 引物在每个 DNA 样品中均能够扩增出大小一致的片段, 并且没有观察到其他杂带的影响 (图 1, 所用的分子量标准参照物为 pBR322 DNA/Msp I Markers)。PCR 扩增产物经双向测序后表明, 在 5 个牛种中获得的 GH 基因序列长度均为 404 bp, 包括部分内含子 4、外显子 5 及部分 3' 侧翼序列, 没有观察到插入和缺失变异。测序结果经与普通牛 (GenBank 登录号 M57764) GH 基因序列比对后确认, 所有外显子 5 长度均为 201 bp。

测得的序列可定义为 10 种单倍型类型 (图 2, 右侧括号内为单倍型在各自牛种内的比例), 单倍型比例约为 11.24%, 说明 5 个牛种 GH 基因外显子 5 的遗传变异程度相对较低。从单倍型的

分布来看, 普通牛单倍型多样性最高 (0.2105), 牦牛 (0.125) 和瘤牛 (0.1111) 次之, 大额牛和水牛均无单倍型多样性。

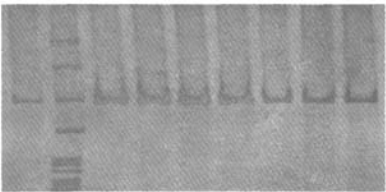


图 1 GH 基因的 PCR 扩增片段电泳图谱
Fig. 1 Electrophoresis photograph of PCR amplified fragments of GH gene

[	1111]
[	193359]
[	4235842]
<i>Bos indicus</i> -1	CTCTGCT (72.22%)
<i>Bos indicus</i> -2	..T... (27.78%)
<i>Bos frontalis</i>	 (100%)
<i>Bos taurus</i> -1	A. (63.16%)
<i>Bos taurus</i> -2	 (28.95%)
<i>Bos taurus</i> -3	G....A. (5.26%)
<i>Bos taurus</i> -4	G..... (2.63%)
<i>Bos grunniens</i> -1	A. (3.13%)
<i>Bos grunniens</i> -2	 (96.87%)
<i>Bubalus bubalis</i>	.C.CA.C (100%)

图 2 5 个牛种 GH 基因外显子 5 序列单倍型类型及其在各自种内的百分比

Fig. 2 Haplotypes and their percentage of GH gene at exon 5 of 5 bovine species

多序列比对结果表明,5 个牛种中共检测到 7 个变异位点,包括 5 个单一多态位点和 2 个简约信息多态位点,约占核苷酸总数的 3.48%,说明不同牛种 *GH* 基因外显子 5 序列变异水平较低。7 个变异位点中出现了转换和颠换 2 种突变类型,其中 A↔G 转换 1 个,T↔C 转换 4 个,A↔C 颠换和 C↔G 颠换各 1 个,转换频率(71.43%)明显高于颠换频率(28.57%)。将核苷酸序列翻译为氨基酸后发现,7 个核苷酸取代突变中 6 个位点为同义突变,仅有 1 个错义突变位点,对应于外显子 5 编码的第 2 位氨基酸上位(亮氨酸↔缬氨酸)。

表 2 牛种间核苷酸歧异度(上三角)、遗传距离(下三角)及种内核苷酸多样性(对角线)
Table 2 Nucleotide divergence(upper right),genetic distance(lower left)between bovine species and nucleotide diversity(along diagonal)within bovine species

牛种 Bovine species	普通牛 <i>Bos taurus</i>	瘤牛 <i>Bos indicus</i>	牦牛 <i>Bos grunniens</i>	大额牛 <i>Bos frontalis</i>	水牛 <i>Bubalus bubalis</i>
普通牛 <i>Bos taurus</i>	0.0100	0.0075	0.0050	0.0050	0.0249
瘤牛 <i>Bos indicus</i>	0.0080	0.0050	0.0025	0.0025	0.0224
牦牛 <i>Bos grunniens</i>	0.0050	0.0050	0.0050	0.0025	0.0224
大额牛 <i>Bos frontalis</i>	0.0050	0.0030	0.0020	0	0.0199
水牛 <i>Bubalus bubalis</i>	0.0250	0.0230	0.023	0.0200	0

2.3 以 *bGH* 基因外显子 5 序列单倍型构建分子进化树

根据本研究中测定的普通牛、瘤牛、牦牛、大额牛和水牛 *GH* 基因外显子 5 序列单倍型,采用邻近法以 Kimura 双参数模型构建分子进化树,自展法(bootstrap method)重复抽样 1000 次检验

2.2 不同牛种间核苷酸歧异度、遗传距离以及种内核苷酸多样性

从表 2 可以看出,普通牛核苷酸多样性最高(1.00%),瘤牛和牦牛居中(0.50%),大额牛和水牛最低(均为 0)。种间核苷酸歧异度是普通牛和水牛间最大(2.49%),瘤牛、牦牛和大额牛三者间的核苷酸歧异度最小且相等(均为 0.25%)。基于 Kimura 双参数模型计算牛种间的遗传距离表明,普通牛和水牛间遗传距离最大(0.025),大额牛和牦牛的遗传距离最小(0.002)。牛种间遗传距离的大小与地理距离远近存在一定的关系,但并不呈直线相关。

系统树的可靠性。从图 3 看,普通牛、瘤牛、牦牛和大额牛共享了同一种单倍型,普通牛和牦牛还共享了另外一种单倍型,水牛不与其他 4 个牛种共享单倍型。该结果说明水牛与普通牛、瘤牛、牦牛、大额牛的差异相对较大而遗传分化较为明显,普通牛、瘤牛、牦牛、大额牛之间无明显的分化。

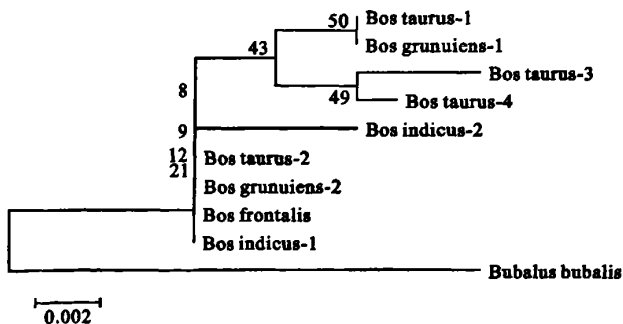


图 3 以牛 *GH* 基因外显子 5 序列构建的分子进化树
Fig. 3 Molecule tree based on exon 5 sequences of *bGH* gene

3 讨论

牛 *GH* 基因属于功能性结构基因,其变异位点少而且进化相当缓慢。本研究中,外显子 5 作为编码牛生长激素最长的序列,在牛亚科 5 个牛种中只检测到 7 个变异位点,约占核苷酸总数的

3.48%,并且在不同牛种中的分布频率也存在较大差异。在普通牛、瘤牛和牦牛种群中,在外显子 5 的第 4 位、第 93 位以及第 154 位检测到突变,而在大额牛和水牛种群中却没有观察到任何种内突变。该结果说明中国牛亚科 5 个牛种 *GH* 基因外显子 5 序列变异贫乏,在进化过程中由于功能

的约束表现得相当保守。由此可见,无论在种内还是种间,具有重要编码功能的 *bGH* 基因进化速率相对较低,与前人关于 *GH* 基因在大部分哺乳动物中进化速率都很缓慢的结论相符^[11]。

从 *GH* 基因外显子 5 单倍型构建的分子进化树来看,水牛与其他 4 个牛种的分化相对比较明显,普通牛、瘤牛、牦牛和大额牛相互之间并无明显的分化。普通牛、瘤牛、牦牛和大额牛共享了同一种单倍型序列,而且除了普通牛外(频率 28.95%),这种单倍型序列在种群内都是频率最高的(瘤牛为 72.22%,牦牛为 96.87%,大额牛为 100%)。这一共享的单倍型序列可能是普通牛、瘤牛、牦牛和大额牛 *GH* 基因外显子 5 的共同祖先序列,其他单倍型序列可以看作是在此基础上发生的随机突变类型(主要是遗传漂变的影响)。

分析牛种间的遗传距离发现,地理距离也会对遗传距离产生影响。这可能是因为牛亚科家畜间无绝对的生殖隔离,不同牛种间可自由交配的程度也不一样,从而使得生活在同一地区的不同牛种间可能产生一定的基因交流而影响种间遗传距离。普通牛与瘤牛可任意杂交产生可育的后代,牦牛与普通牛、瘤牛也可进行杂交,它们之间通过能育的母犏牛进行基因交流^[12-13]。本研究中,普通牛和牦牛生活在同一地区,地理距离也很近,而且牦牛的 2 种单倍型序列都与普通牛共享,的确有可能是两个邻近牛种间发生一定程度的基因交流而表现出相对较小的遗传距离。

本研究中仅分析了不同牛种 *GH* 基因外显子 5 序列的遗传变异特点,作为全基因组序列中的一小部分,它虽然不能反映全基因组序列的进化趋势,但也从是对该区域进化结果的客观反映,有助于进一步了解 *GH* 基因乃至全基因组序列的分子进化历程。

参考文献:

- [1] Fries R, Eggen A, Womack J E. The bovine genome map [J]. *Mamm Genome*, 1993, 4: 405.
- [2] Unanian M M, Barreto C C, Freitas A R, *et al.* Associations between growth hormone gene polymorphism and weight traits in Nelore bovines [J]. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2000, 29: 1380-1386.
- [3] Ge W, Davis M E, Hines H C, *et al.* Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle [J]. *Journal of Animal Science*, 2003, 81: 641-648.
- [4] Zhou G L, Liu H G, Liu C, *et al.* Association of genetic polymorphism in *GH* gene with milk production traits in Beijing Holstein cows [J]. *J Biosci*, 2005, 30(5): 595-598.
- [5] Wu X L, Macneil M D, De S, *et al.* Evaluation of candidate gene effects for beef backfat via Bayesian model selection [J]. *Genetica*, 2005, 125(1): 103-113.
- [6] 高 雪, 徐秀容, 许尚忠, 等. 中国地方黄牛 *GH* 基因遗传多态性研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(10): 991-995.
- [7] 高 雪, 徐秀容, 任红艳, 等. 不同基因型对南阳牛生长发育性状的影响 [J]. *遗传*, 2006, 8: 19-24.
- [8] 高 雪, 徐秀容, 许尚忠, 等. 影响牛生长发育性状的 *GH* 基因遗传效应分析 [J]. *中国农业科学*, 2006, 39(3): 606-611.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗时奇 E F, 罗尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 325-340.
- [10] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150-163.
- [11] Wallis M. Variable evolutionary rates in the molecular evolution of mammalian growth hormones [J]. *J Mol Evol*, 1994, 38: 619-627.
- [12] 常 洪, 耿社民, 武 彬, 等. 中国黄牛源流考之一(下) [J]. *黄牛杂志*, 1991, 1: 3-9.
- [13] 钟金城. 牦牛遗传与育种 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1996: 1-23.

牛生长激素基因外显子5序列变异及其分子进化特征

作者：[耿荣庆](#)，[王兰萍](#)，[常洪](#)，[李永红](#)，[冀德君](#)，[常春芳](#)，[GENG Rongqing](#)，[WANG Lanping](#)，[CHANG Hong](#)，[LI Yonghong](#)，[JI Dejun](#)，[CHANG Chunfang](#)

作者单位：[耿荣庆, GENG Rongqing \(盐城师范学院, 生命科学与技术学院, 盐城, 224051; 扬州大学, 动物科学与技术学院, 扬州, 225009\)](#)，[王兰萍, WANG Lanping \(盐城师范学院, 生命科学与技术学院, 盐城, 224051\)](#)，[常洪, 李永红, 冀德君, 常春芳, CHANG Hong, LI Yonghong, JI Dejun, CHANG Chunfang \(扬州大学, 动物科学与技术学院, 扬州, 225009\)](#)

刊名：[西北农业学报](#) **ISTIC** **PKU**

英文刊名：[ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OccIDENTALIS SINICA](#)

年，卷(期)：2009, 18(2)

被引用次数：2次

参考文献(13条)

1. [Fries R; Eggen A; Womack J E](#) [The bovine genome map](#) [外文期刊] 1993
2. [Unanian M M; Barreto C C; Freitas A R](#) [Associations between growth hormone gene polymorphism and weight traits in Nellore bovines](#) 2000
3. [Ge W; Davis M E; Hines H C](#) [Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle](#) [外文期刊] 2003
4. [Zhou G L; Liu H G; Liu C](#) [Association of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows](#) [外文期刊] 2005(05)
5. [Wu X L; Macneil M D; De S](#) [Evaluation of candidate gene effects for beef backfat via Bayesian model selection](#) [外文期刊] 2005(01)
6. 高雪; 徐秀容; 许尚忠 [中国地方黄牛GH基因遗传多态性研究](#) [期刊论文] - [畜牧兽医学报](#) 2005(10)
7. 高雪; 徐秀容; 任红艳 [不同基因型对南阳牛生长发育性状的影响](#) [期刊论文] - [遗传](#) 2006(08)
8. 高雪; 徐秀容; 许尚忠 [影响牛生长发育性状的GH基因遗传效应分析](#) [期刊论文] - [中国农业科学](#) 2006(03)
9. 萨姆布鲁克·J; 弗时奇E F; 罗尼阿蒂斯T [分子克隆实验指南](#) 1999
10. [Kumar S; Tamura K; Nei M](#) [MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment](#) 2004
11. [Wallis M](#) [Variable evolutionary rates in the molecular evolution of mammalian growth hormones](#) 1994
12. 常洪; 耿社民; 武彬 [中国黄牛源流考之一\(下\)](#) 1991(01)
13. 钟金城 [牦牛遗传与育种](#) 1996

本文读者也读过(10条)

1. [柯涛](#); [马向东](#); [陈明洁](#); [汪越胜](#); [何光源](#); [KE Tao](#); [MA Xiang-dong](#); [CHEN Ming-jie](#); [WANG Yue-sheng](#); [HE Guang-yuan](#) [核苷酸类似物应用于定向分子进化的研究](#) [期刊论文] - [生命的化学](#) 2005, 25(3)
2. [卢坤](#); [张凯](#); [柴友荣](#); [李加纳](#) [芸蓼属紫色酸性磷酸酶12基因家族的分子进化特征](#) [会议论文] - 2008
3. [聂庆华](#); [张细权](#); [杨关福](#); [梁志清](#) [鸡生长激素基因内含子4新等位基因的序列分析](#) [期刊论文] - [畜牧兽医学报](#) 2002, 33(5)
4. [庞瑾](#) [猪Pit-1基因分子遗传多态性研究](#) [学位论文] 2004
5. [帅素容](#) [猪生长激素\(pGH\)基因核苷酸多样性、分子进化和PCR-RFLP及其遗传效应研究](#) [学位论文] 2004
6. [欧江涛](#); [钟金城](#); [陈智华](#); [赵益新](#) [牦牛生长激素全基因的克隆测序和遗传多态性研究](#) [会议论文] - 2003
7. [张春玲](#); [张德强](#); [赵树堂](#); [胥耀平](#); [卢孟柱](#); [ZHANG Chun-ling](#); [ZHANG De-qiang](#); [ZHAO Shu-tang](#); [XU Yao-ping](#); [LU](#)

Meng-zhu 杨树形成层区域扩张蛋白PtEXP1基因的克隆与分析[期刊论文]-西北农林科技大学学报（自然科学版）
2006, 34(6)

8. 姜树林. 徐金先. 胥清富 动物生长激素受体基因组织特异性表达及其调控(续)[期刊论文]-饲料研究2006(5)
9. 马志杰. 魏雅萍. 钟金城. 陈智华. 卢虹. 童子保. MA Zhi-Jie. WEI Ya-Ping. ZHONG Jin-Cheng. CHEN Zhi-Hua. LU Hong. TONG Zi-Bao 藏绵羊GHR基因5'侧翼区序列特征分析[期刊论文]-遗传2007, 29(8)
10. 宋成义. 经荣斌. 陶勇. 高波. 张金存. 陈华才. 黄富林. 杨元清 猪GH基因部分突变位点对生产性能的影响[期刊论文]-遗传2001, 23(5)

引证文献(2条)

1. 牛志刚. 史洪才. 刘明军. 周振勇. 张扬 新疆褐牛GH基因第5外显子Alu I 位点多态性与早期生长性状的相关性[期刊论文]-南方农业学报 2012(5)
2. 蒋钦杨. 韦英明. 陈宝剑. 郭亚芬. 蒋和生 马生长激素基因多态性与体尺指标之间的关联性分析[期刊论文]-中国畜牧杂志 2013(3)

引用本文格式: 耿荣庆. 王兰萍. 常洪. 李永红. 冀德君. 常春芳. GENG Rongqing. WANG Lanping. CHANG Hong. LI Yonghong. JI Dejun. CHANG Chunfang 牛生长激素基因外显子5序列变异及其分子进化特征[期刊论文]-西北农业学报 2009(2)