

南江黄羊 LH β 基因序列测定及分析

李 利, 张红平, 吴登俊*

(四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014)

摘 要: 参照 GenBank 中发表的奶牛、绵羊和猪 LH β 基因序列设计引物, 以 35 只南江黄羊为研究对象, 利用 PCR 技术扩增并测定了山羊 LH β 基因部分序列 (GenBank 登录号: AY853264), 并利用 GenBank 中不同物种 LH β 基因的部分编码区序列进行了系统发育分析。结果表明: 在测定出的 929bp 序列中, 包含 LH β 基因 5' 侧翼区 (136bp)、2 个内含子全序列 (分别为 297bp 和 235bp)、第 1 和第 2 外显子全序列 (分别为 26bp 和 168bp) 以及第 3 外显子部分序列 (67bp)。除第 1 外显子前 11bp 为 5' 非翻译区外, 其余外显子序列共编码 83 个氨基酸, 前 20 个氨基酸为信号肽序列。山羊 LH β 基因序列富含 GC。在测定的 35 个个体中共检测到 8 个单碱基突变位点, 位于外显子中的 2 个突变位点均为同义突变, 其余 6 个突变位点位于 5' 侧翼区和内含子。系统发育分析结果与物种实际的演化顺序不完全相符, 可能是由物种间 LH β 基因 GC 含量的较大差异引起。本研究首次报道了山羊 LH β 基因序列, 为进一步探明山羊繁殖性能的遗传机理奠定了基础。

关键词: 南江黄羊; LH β 基因; 核苷酸序列; 氨基酸; 系统发育分析

中图分类号: S826.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)11-1130-05

Sequencing and Analysis of Luteinizing Hormone Beta Gene from Nanjiang Huang Goat

LI Li, ZHANG Hong-ping, WU Deng-jun*

(College of Animal Science and Technology,

Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: According to the LH β gene sequence of cow, sheep and pig in GenBank, the primers were designed and partial sequence of LH β gene from 35 Nanjiang Huang goat blood samples were amplified and sequenced by PCR method (GenBank No: AY853264). Furthermore, phylogenetic tree of different species were conducted using the LH β partial coding sequence. The result showed that the 929bp partial sequence of LH β gene included 5' flanking region (136bp), two introns (297bp and 235bp), two exons (26bp and 168bp) and partial sequence of exon3 (67bp). Exon sequence coded 83 amino acids except the 11bp nucleotide at the beginning of 1st exon, which was the 5' untranslated region (5' UTR), while the first 20 amino acids were the signal peptide. LH β gene was rich with GC. Eight nucleotide mutations were detected and two of them existed in exon were synonymous mutation. Phylogenetic relationship was not in accord with the actual species evolution process, which maybe caused by the different GC proportion of LH β gene among species. It was the first time to report goat LH β gene sequence which established the foundation of the further research about genetic principle of goat reproduction.

Key words: Nanjiang Huang goat; LH β gene; nucleotide sequence; amino acid; phylogenetic analysis

收稿日期: 2005-11-29

基金项目: 国家“863”基金项目 (2002AA242051); 四川农业大学青年创新基金 (00231000)

作者简介: 李 利 (1972-), 女, 重庆市北碚人, 讲师, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: lilyzh002@sohu.com

* 通讯作者: 吴登俊 (1956-), 教授, 博导, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, Tel: 0835-2885848, E-mail: wdengjun@sicau.edu.cn

促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)是垂体前叶嗜碱性粒细胞分泌的糖蛋白生殖激素,通过血液循环到达性腺及其它组织,与 FSH 一道以顺序和协同的方式作用于这些组织器官,促进动物性成熟和保持周期性的繁殖能力^[1]。它能促进雄性动物副性腺的发育和精子的成熟^[2],诱导雌性动物卵泡内卵母细胞成熟分裂的恢复和提高卵母细胞成熟后胚胎发育能力^[3]。在对猪和绵羊的研究中已发现高繁殖力品种与低繁殖品种间 LH 的分泌以及血液 LH 水平存在差异^[4~8]。

促黄体素(LH)、卵泡刺激素(FSH)、促甲状腺素(TSH)和促性腺素(CG)4种糖蛋白激素都由 α 和 β 2个亚基共轭结合而组成,在同一种内甚至是所有哺乳动物中, α 亚基为它们共有,而 β 亚基具有物种和激素的特异性^[9]。因此,对糖蛋白激素的研究重点在于 β 亚基。自1983年Chin测定出大鼠的LH β 基因序列以来,猪、绵羊、马、牛、狗、鼠、兔、老虎、斑马鱼等动物的LH β 基因序列都有报道,而山羊的LH β 基因序列还没有结果发表。本研究利用其它物种的LH β 基因序列设计引物,扩增并分析南江黄羊LH β 基因部分序列,以期为进一步探明山羊繁殖性能的遗传机理提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

南江黄羊(35只)血样采自四川南江黄羊原种场,每只羊颈静脉采血2 mL,与冻存管中的血液保存液按1:1混合均匀后-20℃低温保存。带GC Buffer的高效长链LA Taq DNA聚合酶和DNA Marker(DL2000)购自大连宝生物工程有限公司。其它药品与试剂均使用国产或进口分装AR级。

1.2 基因组DNA提取

血样基因组DNA的提取采用酚/酚:氯仿(1:1)/氯仿:异戊醇(24:1)抽提,异丙醇沉淀,超纯水溶解,-20℃保存。

1.3 引物设计及目的DNA片段扩增、纯化

引物设计参照猪(D00579)、牛(M11506)、绵羊(S64747S2)LH β 基因序列,引物序列由上海生物工程公司合成。

上游引物:5'-ACT CTT GCC TCT CCC TGA CCT TG -3'

下游引物:5'-AGC GCA GCT CAT GGT AGG TGC ACA C-3'

PCR反应体系为25 μ L,其中包括:上、下游引物(10 pmol/ μ L)各1 μ L,LA Taq酶(5U)0.25 μ L, DNA模板2~3.5 μ L。PCR反应条件:94℃预变性1 min,94℃变性30 s,60℃退火25 s,72℃延伸2 min,30个循环,最后72℃再延伸5 min。PCR产物回收利用上海生物工程公司生产的少量柱式胶回收试剂盒。

1.4 目的DNA序列测定

测序反应使用PE公司的BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Kit按推荐的反应体系完成,乙醇-醋酸钠法纯化产物,ABI3100自动测序仪测序(在四川农业大学动物遗传育种与繁殖学科重点实验室完成)。

1.5 数据分析处理

利用BioEdit 2.0进行序列校对,之后使用DNASTAR软件的CLUSTAL W程序排列DNA同源序列,MEGA 2.0软件构建物种间的系统发育树,并进行自展检验(Bootstrap test)。

2 结果

2.1 PCR扩增

PCR产物经1%的琼脂糖凝胶检测,在900 bp左右出现一条清晰的DNA带(图1)。

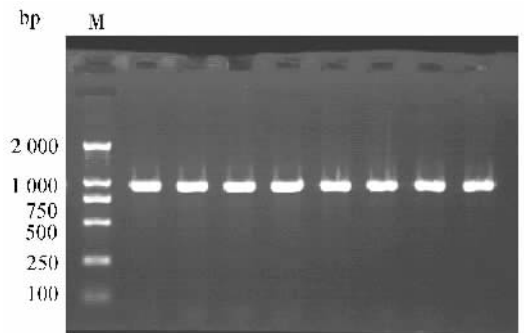


图1 南江黄羊LH β 基因PCR产物琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis photo of the Nanjiang-Huang goat LH β gene PCR products

2.2 序列测定

本试验测定出南江黄羊LH β 基因的929 bp长度(如图2,GenBank登录号:AY853264),其中1~136 bp为5'侧翼区(136 bp),163~459 bp为intron 1(297 bp),628~862 bp为intron 2(235 bp);第1外显子长26 bp,前11 bp为5'非翻译区,后15 bp为编码区,第2外显子长168 bp,自第863 bp开始的

67 bp 为第 3 外显子中的部分序列。4 种碱基的平均含量分别为 17.65% (T)、27.99% (C)、17.12% (A)、37.24% (G), 其中编码区中 GC 含量达到 66.80%, 密码子第 3 位 G 和 C 分别为 48.2% 和 40.8%。在测定的 35 个个体(929 bp)的序列中, 共

检测到 8 个多态位点, 其中 1 个[322(G-A)]单一信息位点, 7 个简约信息位点[39(G-T)、42(G-A)、45(T-A)、359(G-T)、401(G-A-C)、543(T-C)和 877(T-A)]。5'侧翼区和内含子 1 各有 3 个突变位点, 其余 2 个位点分别存在于外显子 2 和外显子 3。

```

01 ACTCTTGCCT CTCCTGACC TTGTCTGCTC TCGCCCGGG AGATTAGTGT CCAGGTTACC
61 CCACCATGCT GCCACCCCG GTGGCCTTGC CGCCCCACA GCCTGCAGGT ATAAGACTAG
121 GTGAACACAG CAGGGGAGGC ACCAAGG ATG GAG ATG CTC CAG GTAAGTCT GTAGGGCCCC
      M   E   M   L   Q
181 TTGTGACTCC ATCCAGGCCA CAGCTGGCAG GAAGTGGGAG AGTCCGGGGA CCTGGTAAAG
241 GAGGCCTCTT TAGAAGAGTG TGGGGAGAAG AGTAGGCCTG ACGGTGGGAG GAGGGCAGCA
301 GGTGGGGCCT GAGGTGTTGG GGTGTCTGGG GTCCCTGGGG ATGGAAAATC CTTGAATGGA
361 AGGTGGCAGG CACAGGAGCT GGGTCCCTGA ACGTGTGCAT GCAGGGCTTG GGGGTGGGGT
421 GAGGATCTGG CTGGCCCTGA GGCCTGGCC TTGTCCAG GGA CTG CTG CTG TGG CTG CTG
      G   L   L   L   W   L   L
481 CTG GGC GTG GCC GGG GTG TGG GCT TCC AGG GGG CCA CTG CGG CCG CTG TGC CAG
      L   G   V   A   G   V   W   A   S   R   G   P   L   R   P   L   C   Q
CCC ATC AAT GCC ACC CTG GCG GCT GAG AAG GAG GCC TGC CCT GTC TGT ATC ACT TTC
      P   I   N   A   T   L   A   A   E   K   E   A   C   P   V   C   I   T   F
ACC ACC AGC ATC TGC GCC GGC TAC TGC CCC AGC ATG
      T   T   S   I   C   A   G   Y   C   P   S   M
628      GTG AGCTGCCGAG GGCGGGCGGG TGCCACCAAC
661 CCAGCTCCAG GCAATTACTC GGGGCTAGGC CCACAGAAGA CCCGCAGTGG CAGTGGGGGT
721 GGAAGGTGG CCTGCTGCCT GGGGAAGGGG CCGGCAGGT GGAAGGAGA GCACAGAGGG
781 TCCCTGGGAT CTGTGGGCTG CAGTGGGGGA GCTCGGGGA GAGCTCAGCC CCATGGAGAC
841 ACTCAAGCTC CCTGCCCTCC AG AAG CGG GTG CTG CCT GTC ATC CTG CCG CCC ATG CCC
      K   R   V   L   P   V   I   L   P   P   M   P
CAG CGG GTG TGC ACC TAC CAT GAG CTG CGC T
      Q   R   V   C   T   Y   H   E   L   R

```

图 2 南江黄羊 LHβ 基因部分核苷酸序列及氨基酸序列
Fig. 2 Partial nucleotide and amino acid sequence of goat LHβ gene

试验中测定的 LHβ 基因编码区共编码 83 个氨基酸(图 2), 其中前 20 个氨基酸构成信号肽序列, 后 63 个氨基酸属于成熟肽部分。在 20 种常见氨基酸中, 除了天冬氨酸没有出现外, 其余 19 种氨基酸

都存在, 但各种氨基酸的组成差异很大, 其中亮氨酸(Leu)的含量最高, 达到 15.66%, 苯丙氨酸(Phe)和组氨酸(His)的含量最低(1.20%)。检测到的外显子中 2 个碱基变异都是沉默突变。

2.3 不同物种的 LH β 基因部分编码区系统发育分析

利用不同物种的 LH β 基因编码区部分序列,在 MEGA 2.0 上分别以 NJ 法、ME 法和 MP 法构建物种的系统发育树,并以 Bootstrap 法进行验证。由于 3 种系统树的拓扑结构一致,自展分析值(Bootstrap value)相差不大,因此只列出 NJ 树(图 3)。将建树结果与动物界的演化树^[10]比较,总的来看,在分类学上较近的物种聚在一起,如鱼类在一个

分支,哺乳动物聚在另一个分支上。绵羊、山羊和牛聚在一起,驴和马的距离较近,老虎和猫同属于猫科而聚在一个分支。但也表现出与传统分类学不一致的地方,如火鸡(鸟纲鸡形目)与斑马和驴(奇蹄目)聚在一起,将犀牛从奇蹄类中分离开,小鼠(啮齿目)与人(灵长目)聚在一起,猪是偶蹄目中的动物却与大鼠(啮齿目)聚在一个分支上,而且绵羊、山羊与牛的分化结果与实际演化顺序也不相符合。

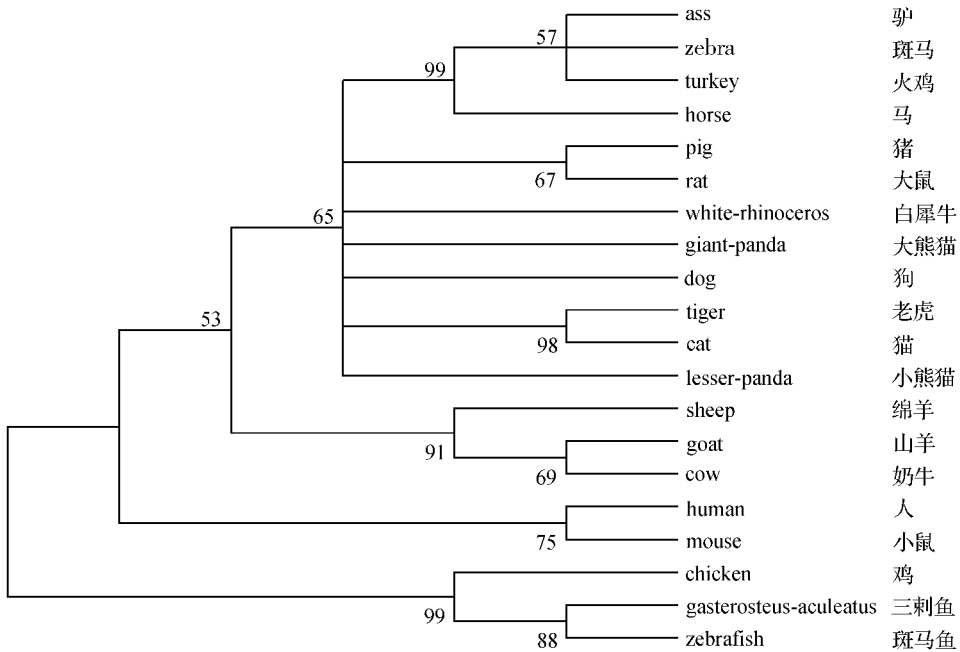


图 3 用 MEGA2.0 构建的不同物种的 LH β 基因 NJ 树(枝上的值为自展分析值)

Fig. 3 Neighbour-Joining tree of LH β gene among specie(The numbers were Bootstrap values)

3 讨论

3.1 山羊 LH β 基因核苷酸组成

脊椎动物的基因组 GC 含量处在约 40%~45% 的范围中,但这些 GC 并不是平均分布在基因组内,在某些 DNA 片段上其含量可高达 60% 以上,而在另一些区域则只有 33% 左右^[11],即脊椎动物基因组是富 GC 区和贫 GC 区的嵌合体^[12],这种 GC 含量的差别,在基因表达的调控和基因突变上都可能扮演着重要的角色^[13]。本试验测定出的南江黄羊 LH β 基因碱基组成的重要特点是 GC 含量丰富,达到 65.23%,尤其密码子的第 3 位 GC 高达 89.0%。说明山羊 LH β 基因是位于富 GC 同质区,这种碱基组成上的偏差是否与基因的功能有紧密联

系需要进一步深入进行研究。

3.2 LH β 基因的保守性

对不同品种猪的 LH β 基因进行研究发现:调控区上游 +1~-627 范围内的序列中没有发现可能的变异,3 个外显子和 3' 调控区内也没有任何 SNPs 位点,仅检出 2 个多态位点[1 367(G-A)和 1 823(C-A)],它们分别位于内含子 1 和内含子 2 中^[14]。本试验一共检测到山羊 LH β 基因 8 个碱基突变位点,其中有 2 个存在于外显子序列中,但这 2 个变异位点均为同义密码子导致的沉默突变,所有测定个体的氨基酸序列一致。表明山羊 LH β 基因也具有较强的保守性,可能与 LH 在动物生长发育中具有重要的功能密切相关。

3.3 LH β 基因与分子进化分析

分子进化的一项重要内容是应用分子生物学技术来揭示生物类群的系统发育和进化历程^[15]。在研究分子进化时,人们通常根据一些相对保守的序列进行分析,如 rRNA、蛋白质的氨基酸序列、编码蛋白质的核酸序列^[16]。本试验以 LH β 基因的部分编码区构建的物种树中,有表现出与传统分类学不一致的地方。根据 Li 的理论^[15],分析不同物种的 LH β 基因的碱基组成,发现鸡的 GC 含量最低,只有 40.7%,斑马鱼、三刺鱼 GC 含量分别为 52.0% 和 57.5%,犀牛的 GC 含量(70.8%)最高,其余物种的 GC 含量介于 60%~70% 之间,其中火鸡的 GC 含量达到 65.2%,与驴和斑马的 GC 含量一致。大鼠与小鼠的 GC 含量分别为 63.6% 和 68.8%,相差 5 个百分点。表明不同物种尤其是近缘物种的 LH β 基因 GC 含量的较大差异可能引起了核苷酸替代率不同,从而基因的演变速率与物种的演变存在差异,导致利用不同物种的同一基因构建的基因树与物种树的结果有一定出入。因此,在利用功能基因进行物种间的系统发育分析时,不但一个基因片段要利用多种方法构建进化树并进行检验,同时应尽量从形态学、生态学、遗传学、地理学等多学科角度进行综合研究,才能得到比较真实的所研究类群的起源演化过程^[17]。

参考文献:

- [1] Marshall J C, Kelch R P. GnRH: role of pulsatile secretion in the regulation of reproduction[J]. *New England Journal of Medicine*, 1986, 315: 1 459~1 468.
- [2] 杨筱珍,陈耀星,王子旭,等. 生殖激素对雄性生殖细胞凋亡调控的研究进展[J]. *动物医学进展*, 2003, 24(6): 7~10.
- [3] Zuelke K A, Brackett B G. Luteinizing hormone-enhanced *in vitro* maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation [J]. *Biol Reprod*, 1990, 43(5): 784~787.
- [4] Prunier A, Chopineau M. Sexual maturation of Meishan gilts[A]. *Chinese Pig Symposium*[C]. Toulous, France, 1990, 37~40.
- [5] 焦淑贤,王瑞祥,蔡正华,等. 枫泾和长白猪发情期促卵泡素、促黄体素含量动态变化研究[J]. *中国农业科学*, 1992, 25(6): 80~85.
- [6] 郑亦辉,张德福,马恒东. 湖羊和美利奴羊发情期外周血浆中促性腺激素脉冲分泌的差异[J]. *中国畜牧杂志*, 1991, 27(2): 23~24.
- [7] 张英杰,刘月琴,储明星. 小尾寒羊高繁殖力和常年发情内分泌机理的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2001, 32(6): 510~516.
- [8] McNatty K P, Hudson N, Henderson K M, *et al.* Differences in gonadotrophin concentration and pituitary responsiveness to GnRH between Booroola ewes which were homozygous(FF) and non-carriers(++) of a major gene influencing their ovulation rate[J]. *J Reprod Fertil*, 1987, 80: 577~588.
- [9] Pierce J G, Parsons T F. Glycoprotein hormones: structure and function [J]. *Annu Rev Biochem*, 1981, 50: 465~495.
- [10] 丁汉波. 脊椎动物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986. 487~489.
- [11] Sueoka N. On the genetic basis of variation and heterogeneity of DNA base composition[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1962, 48: 582~592.
- [12] Bernadi G, Olofsson B, Filipski J, *et al.* The mosaic genome of warm-blooded vertebrates [J]. *Science*, 1985, 228: 953~958.
- [13] Bernadi G, Mouchiround D, Gautier C, *et al.* Compositional patterns in vertebrate genomes: Conservation and change in evolution [J]. *J Mol Evol*, 1988, 28: 7~18.
- [14] 王爱华,李 宁,吴常信. 猪 LH β 亚基基因的单核苷酸多态性研究[J]. *遗传*, 2002, 24(6): 649~652.
- [15] Li W H, Craur D. *Fundamentals of molecular evolution*[M]. Massachusetts: IAC Publishers, 1991.
- [16] Russo C, Takezaki N, Nei M. Efficiencies of different genes and different trees building methods in recovering a known vertebrate phylogeny[J]. *Mol Biol Evol*, 1996, 13: 525~536.
- [17] 张淑霞,杨 岚,杨君兴. 近代鸟类分类与系统发育研究[J]. *动物分类学报*, 2004, 29(4): 675~682.