

猪 FSH β 亚基基因 RFLPs 研究初报

赵要风 李 宁 陈永福

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

吴常信

(中国农业大学动物科技学院, 北京 100094)

摘 要 本文用猪 FSH β 基因 cDNA 作为探针, 对二花脸猪、梅山猪、长白猪、大约克猪、香猪基因组 DNA 进行 EcoRI、BamHI 和 Hind III 三种限制性内切酶的 Southern 印迹分析。发现猪品种之间在该位点变异较大, 而且发现 FSH β /BamHI RFLPs 中, 太湖猪(二花脸、梅山猪)表现出品种内一致性。本研究为进一步分析 FSH 是否对太湖猪高的排卵率有影响提供了一定基础。

关键词 猪, FSH β 基因, RFLPs

卵泡刺激素是垂体前叶分泌的一种糖蛋白激素, 它作用于卵泡颗粒细胞上的受体蛋白, 促进卵泡发育和成熟。而且 FSH 和 LH 可协调促使卵泡内膜产生雌激素, 在雄性动物中可以促进生精上皮的发育和精子的形成, 因此 FSH 是相当重要的一种生殖激素, 它的蛋白生化结构是由二亚基组成, α 亚基及 β 亚基, α 亚基为 FSH、LH、TSH 所共有, 只有 β 亚基是特异的。一般认为活性中心位于 β 亚基上。

猪 FSH β cDNA 由 Kato 等人克隆成功^[1], 对于猪 FSH β 基因的多态性分析迄今尚未见报道, 另一方面实验所选用猪品种二花脸猪、梅山猪、长白猪、大约克猪、香猪在繁殖性状方面, 诸如排卵率、产仔数是差异较大的几个品种, 而 FSH 是直接参与卵泡发育和成熟相关的生殖激素。有文献发现, 大约克猪卵巢内总卵泡数要多于二花脸猪, 但成熟排卵数却少于二花脸猪^[2], 那么对卵泡发育和成熟起直接作用的 FSH 是否在其中起到作用值得研究。因此对 FSH 进行几个猪品种之间的 RFLPs 分析, 寻找合适的 RFLPs 标记研究 FSH 的作用具有一定意义。

1 材料方法

1.1 血样 二花脸猪、梅山猪、大约克猪、长白猪、香猪各 10~15 头, 其中二花脸猪、梅山猪、大约克猪采自江苏国营常熟畜禽良种场, 长白猪、香猪采自北京农业大学昌平实验站, 前腔静脉采血, ACD 抗凝, 冻存备用。

1.2 DNA 提取 取 10ml 冻存血样, 室温下融化, 加入等体积 PBS 充分摇匀后, 3 500g 离心 15min, 留取沉淀, 加入 7.5ml DNA 提取液, 37℃ 放置 1h, 加入蛋白酶 K 至终浓度 100 μ g/ml, 55℃ 水浴消化 24h, 等体积苯酚、苯酚:氯仿、氯仿各抽提一次, 乙醇沉淀, 挑出沉淀, 70% 乙醇

洗,真空抽干,适量 TE 溶解。

1.3 探针制备 1.0kb FSH β cDNA 为 Kato 博士^[1]室赠送,克隆在 pUC18 质粒 EcoRI 位点上,质粒经细菌转化大量扩增后,电泳分离 EcoRI 酶切质粒片段,Geneclean 法回收 1.0kb 片段,用于标记反应,探针标记采用德国 Boehringer 公司的高辛试剂盒,取 50ng 回收 FSH β cDNA,煮沸 10min 迅速冰浴 10min,加入 2 μ l 寡核苷酸混合物,2 μ ldNTP 标记混合物,1 μ lKlenow 酶,补加无菌水至终体积 20 μ l。轻轻混匀后于 37 $^{\circ}$ C 温育 3h,加入 1 μ l0.5mol/L EDTA(pH8.0) 终止反应,混匀,加入 5mol/L LiCl2.0 μ l,75 μ l 乙醇沉淀 DNA。-70 $^{\circ}$ C 放置 1h,12 000g 离心 15min,去上清,真空抽干,溶于 50 μ lTE(pH8.0)。

1.4 Southern 印迹分析 0.8%琼脂糖凝胶 50V 电压条件下分离酶切基因组片段,至溴酚蓝跑至胶缘,将 DNA 真空转移至杂交膜上,杂交膜 120 $^{\circ}$ C 烘烤 30min,置于杂交袋中,加入预杂交液(5 \times SSC,0.02%SDS,1%Blocking Reagent,0.1%N-Laurolsarcosine)68 $^{\circ}$ C 预杂交 3h,换加杂交液(5 \times SSC,0.02%SDS,1%Blocking Reagent,0.1% N-Laurolsarcosine 及标记探针)杂交 16h,洗膜及显色步骤按的高辛试剂盒说明书。

2 结果

2.1 Southern 印迹分析结果 本文进行三种限制性内切酶的 Southern 印迹分析,结果见表。

表 FSH β 基因在五个品种的 RFLPs 状况
Table RFLPs of FSH β gene in pig breeds

	二花脸 Erhualian	梅山 Meishan	大约克 Yorkshire	长白猪 Landrace	香猪 Chinese minipig
FSH β /BamHI	3.0kb	3.0kb	3.2kb 3.2kb	3.5kb 3.0kb	3.5kb 3.0kb
FSH β /EcoRI	1.0kb	1.0kb	1.0kb	3.5kb 1.0kb	1.0kb
FSH β /Hind III	6.0kb	6.0kb	6.0kb	6.0kb 5.5kb	5.5kb 3.5kb

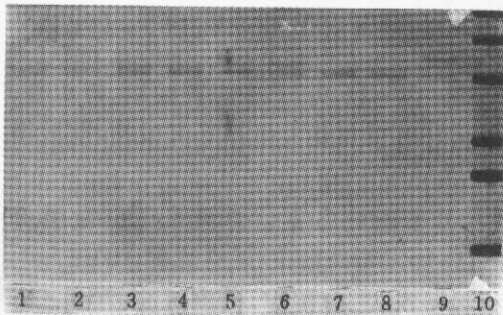


图1 FSH β /BamHI 杂交结果

1、2. 香猪; 3、4. 梅山猪; 5、6. 大约克; 7、8. 二花脸; 9. 长白猪; 10. 1kb Ladder

Fig.1 Hybridization results of FSH β /BamHI

1、2. Chinese minipig; 3、4. Meishan; 5、6. Yorkshire; 7、8. Erhualian; 9. Landrace; 10. 1kb ladder.

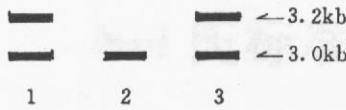


图 2 家系杂交结果

1. 大约克 2. 二花脸 3. 杂交后代

Fig. 2 Hybridization results of a family genomic DNA

1. Yorkshire 2. Erhualian 3. F1 generation

从表中可以看出,FSH β 基因在不同猪品种之间存在变异。在三种内切酶试验中,二花脸与梅山猪均表现出一致性,而且对 FSH β /BamHI RFLPs 来说,二花脸、梅山猪(高产仔率品种)与其他猪种呈现出对应状况。我们对二花脸、大约克杂交 F₁ 代的 Southern 分析结果表明, F₁ 代杂交条带均为 3.2kb,3.0kb 两条带(图 2),表明二花脸与大约克对应多态位点均呈纯合状态。

2.2 FSH β /BamHI 多态性分析 1990 年 Hirai^[3] 等人克隆了 FSH β 全基因。其结构中 BamHI 位点分布如图 3。

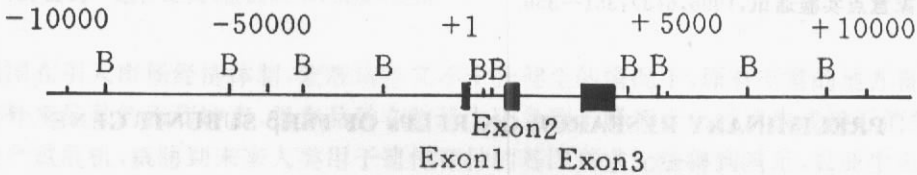


图 3 FSH β 基因 BamHI 酶切图谱

Fig. 3 BamHI restriction map of FSH β subunit gene

就 FSH β cDNA 所能检测范围来看,杂交条带应为两条,一条约 3.5kb 和一条 3.0kb 条带,这和所检测大约克猪、长白猪、香猪结果是一致的,而梅山猪、二花脸猪两条带均为 3.0kb,造成这种现象的原因可能有几种情况,首先可能是在太湖猪 FSH β 基因中 3.5kb 区多出一个 BamHI 位点,另一种可能是该区存在插入或缺失现象。赵要风等^[4]1995 年对该区的扩增结果显示太湖猪、香猪扩增条带要长于大约克、长白猪约 300bp,因此可以推测造成 FSH β 座位在几个猪品种存在 BamHI 多态性原因是太湖猪在该区的插入片段中存在 BamHI 位点,而香猪插入片段可能不存在 BamHI 位点。

3 讨论

实验结果证明 FSH β 基因在几个猪品种之间存在多态性,而且作为一种促进卵泡发育和成熟的糖蛋白激素,高排卵数猪品种二花脸、梅山猪与其他低排卵数品种表现出对应性差异。焦淑贤等人发现太湖猪首次发情周期内血清中 FSH 浓度显著高于长白猪^[5],说明 FSH 在不同猪种之间的表达调控可能存在差异,1996 年赵要风等人^[6]分析了几个猪品种 FSH β 基因 5' 调控区的部分 DNA 序列,研究证明 5' 调控区的差异可能不会引起太湖猪与其他猪种 FSH 表达的差异,本文发现的 BamHI 多态性是结构区插入造成的结果,那么这种插入现象是否会造成 FSH 表达的差异,需要进一步研究分析,但它提供了一种很好的分子标记,可直接用于连锁

分析,研究 FSH 座位是否对太湖猪高排卵产仔数有贡献。

参 考 文 献

- [1] Kato et al. Cloning and DNA sequencing analysis of the cDNA for the precursor of porcine follicle stimulating hormone β subunit. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1988, 55, 107~112
- [2] 羌志华,牛树理,冯紫云等. 二花脸和大约克猪产仔数主要组分性状的基因效应研究. *南京农业大学学报*, 1995, 18(2): 79~83
- [3] Hirai T et al. The gene for the β subunit of porcine FSH; absence of consensus oestrogen -responsive element and presence of retroposons. *Journal of Molecular Endocrinology*, 1990, 5, 147~158
- [4] 赵要风,李宁,冯继东等. 猪 FSH β 亚基因结构区的 PCR 扩增. 第八次全国动物遗传育种学术讨论会论文集. 北京: 中国农业科技出版社, 1995, 51~53
- [5] 焦淑贤,王瑞祥,蔡振华等. 枫泾和长白青年母猪首次发情周期内血清中 5 种生殖激素的变化. *畜牧兽医学报*, 1993, 23(3): 202~206
- [6] 赵要风,李宁,陈永福等. 猪 FSH β 亚基因 5' 端调控区的 PCR 克隆测序及变异分析. *自然科学进展—国家重点实验通讯*, 1996, 6(3): 351~356

PRELIMINARY RESEARCH ON RFLPs OF FSH β SUBUNIT GENE

Zhao Yaofeng, Li Ning, Chen Yongfu

(National laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Wu Changxin

(College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract

Highly polymorphisms was found among five pig breeds in the locus of FSH β . One RFLP patten revealed with BamH I enzyme was significantly different between prolific pig breeds (Such as Meishan and Erhualian) and non-prolific pig breeds (Such as Yorkshire, Landrace and Chinese minipig). These results imply FSH locus may have a positive affection on reproduction trait in pig.

Key words Pig, FSH β subunit gene, RFLPs