

# 延边黄牛 *GHR* 基因第 8 外显子一个新多态位点的发现

蔡锦顺<sup>1,2</sup>, 张嘉保<sup>1\*</sup>, 严昌国<sup>2</sup>, 姜昊<sup>1</sup>, 高岩<sup>1</sup>, 梁成云<sup>2</sup>

(1. 吉林大学农学部, 吉林长春 130062; 2. 延边大学农学院, 吉林龙井 133400)

**摘要** [目的]寻找可用于标记辅助选择的分子标记,为延边黄牛分子生物学选种提供依据。[方法]以 46 头纯种延边黄牛血样为试材,利用 PCR-SSCP 技术对 *GHR* 基因的第 8 外显子进行检测并测序,检测了延边黄牛群体内 *GHR* 的遗传变异。[结果]对扩增产物进行的 SSCP 检测发现,有 3 种基因型,分别为 AA、BB、AB,其中 AA、BB 为纯合子,AB 为杂合子。以 AA 和 BB 个体为样本的测序分析发现,有一个新多态性位点。*GHR* 基因多态位点遗传分析表明,AA 型个体较多,AB 型和 BB 型个体较少。*GHR* 基因的 AA 基因型效应在部分生长性状上优于其他基因型,差异达到显著水平。[结论]研究提示,*GHR* 基因有可能作为延边黄牛生长性状的候选基因;在育种时应结合多个基因位点才能达到有效选育目的。

**关键词** 延边黄牛; *GHR* 基因; PCR-SSCP; 多态性

**中图分类号** S823 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)33-16261-02

## Discovery on a New Polymorphic Site of *GHR* Gene Exon 8 in Yanbian Cattle

CAI Jin-shun et al (Department of Agronomy, Jilin University, Changchun, Jilin 130062)

**Abstract** [Objective] The study aimed to seek for molecular marker used in the marker aid selection and provide the basis for molecular breeding of Yanbian cattle. [Method] With the blood samples from 46 pure breeds of Yanbian cattle as tested materials, the exon 8 of *GHR* gene was detected and sequenced by using PCR-SSCP technique and the genetic variation of *GHR* in Yanbian cattle population was determined. [Result] SSCP detection on amplified product discovered that there were 3 genotypes as AA, BB and AB, in which, AA and BB were homozygous and AB was heterozygous. The sequencing analysis with AA and BB as the individuals discovered that there was a new polymorphic site. The genetic analysis on the polymorphic site of *GHR* gene showed that AA individuals were more and AB and BB individuals were less. AA genotype effect was superior to that of other genotypes on some growth traits, with the difference being significant among genotypes. [Conclusion] This study suggested that *GHR* gene may be a candidate gene responsible for growth trait in Yanbian cattle and more gene sites should be combined in breeding so as to realize the effective breeding.

**Key words** Yanbian cattle; *GHR* gene; PCR-SSCP; Polymorphism

生长激素受体(GHR)是一种跨膜糖蛋白,是细胞因子/造血因子受体超家族的成员之一。研究表明,在肌肉、脂肪、乳腺、骨、肾和胚胎干细胞,甚至在免疫组织中都存在着 GHR 位点。牛生长激素受体基因(*bGHR*)由 10 个外显子、9 个内含子组成,被定位在 20 号染色体上<sup>[1-2]</sup>,由于生长激素为生物大分子,不能直接透过细胞膜,必须通过与位于靶细胞膜上的 *bGHR* 结合,经过介导体将信息传递到细胞内,才能发挥其生物学功能;即 2 分子 GHR 与 1 分子生长激素(GH)结合导致 GHR 二聚化,GHR 的二聚体激活信息分子或信息通道,激发 GH 信号转导。如果 *GHR* 基因碱基序列发生突变就可能影响到 GH 正常功能的发挥,从而影响到产奶、产肉等许多性状。因此,将 *bGHR* 作为候选基因来研究其与生产性状的关系,对牛的育种有很大实践意义。国外已有对 *GHR* 基因多态性与生产性状关系的研究,发现了一些对生产性状有影响的多态位点<sup>[3-4]</sup>。

延边黄牛在品种起源上同源于韩国的韩牛和日本的和牛。据文献记载,延边黄牛为输入我国的朝鲜牛和我国东北地区的本地牛以及蒙古牛进行长期的杂交改良精心培育而成,现在东北三省均有分布。由于社会经济的发展和人民生活水平的不断提高及市场的变化,延边黄牛向肉用型选育已成为历史的必然。笔者以 *GHR* 基因为候选基因,利用 PCR-SSCP 技术及测序法检测了延边黄牛群体内 *GHR* 的遗传变异,试图找到一些突变位点,寻找可用于标记辅助选择的分子标记,为延边黄牛分子生物学选种提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 46 头纯种延边黄牛血样采自延边大学农学院养牛基地。所采样本牛年龄集中在 6 月龄左右,按文献[5]的方法测定牛全期增重、胴体重、屠宰率、净肉率、眼肌面积等。均为静脉采血,ACD 抗凝, -20℃ 保存备用。蛋白酶 K、Tris 饱和酚、*Taq* 聚合酶、dNTP 等购自宝生物工程(中国)有限公司。聚丙烯酰胺、甲叉、甘油等电泳所用试剂购自华美生物工程(中国)有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取。** 延边黄牛基因组 DNA 的提取方法参照文献[6]。

**1.2.2 引物设计与 PCR 反应扩增。** 参照 Blott 等的引物序列合成 1 对引物<sup>[7]</sup>,上游引物为 5'-GTG GCT ATC AAG TGA AAT CAT TGAC-3';下游引物为 5'-ACT GGG TTG ATG AAA CAC TTC ACTC-3',扩增片段长 350 bp,反应程序为:95℃ 5 min,94℃ 40 s,64℃ 40 s,72℃ 40 s 循环 30 次,72℃ 10 min。PCR 产物通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.2.3 SSCP 分析。** 用 14% 非变性聚丙烯酰胺加 1% 甘油的凝胶,室温下电压 115 V 电泳 16 h,电泳结束后用 AgNO<sub>3</sub> 显色,待电泳条带清晰后换上去离子水停显,装入封口袋内保存。

**1.2.4 扩增产物的回收测序。** 经 SSCP 分析后,不同纯合基因型个体的 PCR 扩增产物用柱式胶回收试剂盒回收纯化,回收后的 DNA 片段送交上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

**1.3 统计分析** 根据最小二乘线性模型,对群体 *GHR* 基因型效应进行分析,采用如下模型:

$$Y_{ijk} = \mu + sex_j + marker_k + e_{ijk}$$

**基金项目** 国家科技支撑计划项目(2007BAD55B03)。

**作者简介** 蔡锦顺(1968-),女,吉林延吉人,在读博士,讲师,从事动物遗传育种与繁殖调控研究。\*通讯作者,博士生导师。

**收稿日期** 2009-09-07

式中,  $Y_{ijk}$  为个体表型的记录值;  $\mu$  为群体平均值;  $sex_j$  为性别效应;  $marker_k$  为标记基因型效应;  $e_{ijk}$  为随机误差。根据以上线性模型, 统计软件采用 SPSS 12.0。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增

用所合成的引物扩增基因组, 所得产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增片段与目的片段大小一致, 且条带清晰, 特异性好, 如图 1 所示, 可直接用于 SSCP 分析。

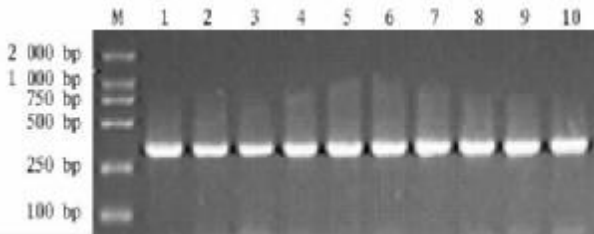


图 1 延边黄牛 *GHR* 基因第 8 外显子 PCR 产物电泳图

Fig. 1 PCR amplified products electrophoresis of exon 8 of *GHR* gene in Yanbian Cattle

### 2.2 SSCP 分析

对扩增产物进行 SSCP 检测, 发现有 3 种基因型, 分别为 AA、BB、AB, 其中 AA、BB 为纯合子, AB 为杂合子, 如图 2 所示。图 2 中 5、8、9、10 号条带为 AA 型, 13 号条带为 BB 型, 6、11、12、15 号条带为 AB 型。

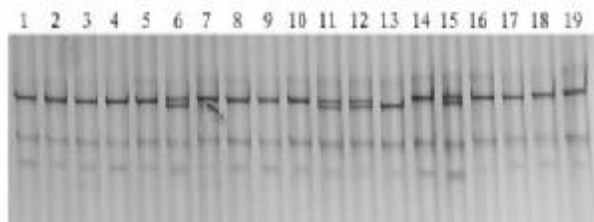


图 2 延边黄牛 *GHR* 基因第 8 外显子 SSCP 电泳图

Fig. 2 SSCP detection of exon 8 of *GHR* gene in Yanbian Cattle

### 2.3 不同基因型纯合子个体的测序

以 SSCP 检测结果的 2 种纯合基因型 AA、BB 个体为样本, 分别进行测序, 测得序列用 Primer 5.0 软件进行分析, 发现存在一个点突变 A→T (图 3), 该突变导致翻译产生的氨基酸由 Leu 变为 His。



图 3 *GHR* 基因突变位点处的测序结果

Fig. 3 Sequencing results of mutation site in *GHR* gene

### 2.4 *GHR* 基因多态位点的遗传分析

该多态位点的基因型频率和基因频率统计结果见表 1。由表 1 可以看出, 在所研究的群体中, AA 型个体较多, AB 型和 BB 型个体较少。

表 1 延边黄牛 *GHR* 基因第 8 外显子 SSCP 基因频率和基因型频率  
Table 1 Allele and genotype frequencies of the SSCP in exon 8 of *GHR* gene in Yanbian Cattle

项目 Item	个体数		频率
	Number of individuals		Frequency
基因型 Genotypes	AA	35	0.760 9
	AB	8	0.173 9
	BB	3	0.065 2
等位基因 Alleles	A	-	0.847 8
	B	-	0.152 2

### 2.5 生长性状分析

延边黄牛 *GHR* 基因第 8 外显子基因座个体分型后, 对个体的全期增重、胴体重、屠宰率、净肉率、眼肌面积指标进行方差分析, 分析结果见表 2。由表 2 可以看出, AA 型个体在各项指标上群体值高于其他基因型。其中, 全期增重和日增重 2 项指标上, AA 型个体显著高于 AB 和 BB 型个体。

表 2 *GHR* 第 8 外显子基因座不同基因型在延边黄牛群体中的最小二乘均值及标准误

Table 2 Analysis of the relationship between genotypes and productive performances by the least square method (LSM)

基因型/个	全期增重//kg	胴体重//kg	屠宰率//%	净肉率//%	眼肌面积//cm <sup>2</sup>	日增重//kg
Genotypes	Whole increased weight	Body weight	Slaughter rate	Net meat rate	Eye muscle area	Daily increased weight
AA/35	292.125 ± 4.546 <sup>b</sup>	295.279 ± 6.459	0.572 ± 0.005	0.487 ± 0.005	96.579 ± 2.612	1.281 ± 0.022 <sup>b</sup>
AB/8	277.667 ± 7.424 <sup>b</sup>	295.463 ± 10.548	0.575 ± 0.008	0.488 ± 0.008	91.933 ± 4.265	1.137 ± 0.035 <sup>a</sup>
BB/3	245.000 ± 9.093 <sup>a</sup>	280.005 ± 12.919	0.575 ± 0.010	0.490 ± 0.010	91.520 ± 5.224	1.065 ± 0.043 <sup>a</sup>

注: 数值为平均数 ± 标准误; 标记字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 多重比较采用  $t$  检验。

Note: Data in the mean ± standard error. Values in each line marked with superscripts are significance at 0.05 level;  $t$  test was used for multiple comparison.

## 3 讨论

### 3.1 *GHR* 基因第 8 外显子多态性分析

研究影响生长性状的基因对我国地方黄牛品种向肉用方向培育有重要意义。延边黄牛是我国著名的五大黄牛品种之一, 属役肉兼用品种, 是宝贵的种质资源和育种素材, 具有优质高档牛肉的内在潜质。前期的研究表明, *GHR* 基因可以作为影响牛肉用性状的候选基因。Aggrey 等在研究肉牛 *GHR* 基因的调控序列时发现, 含 Alu 标记个体会有 AluI (-/-), 具有更好的肥

育育种值 ( $P \leq 0.016$ ), 他们认为 Alu 的多态性作为奶牛的辅助标记选择的遗传标记<sup>[8]</sup>。Hale 等在安格斯牛群中发现 *GHR* 基因启动区的 (TG)<sub>n</sub> 微卫星多态, 并发现 (TG)<sub>11</sub> 主要存在于瘤牛群体中, (TG)<sub>16~20</sub> 主要存在于普通牛群中, 其纯合基因型对安格斯牛的断奶重和胴体重有明显影响<sup>[9]</sup>。Blott 等报道, 在 Holstein-Friesian 牛的第 8 外显子、第 9 外显子、第 3 外显子均发现多态, 并由于第 8 外显子的苯丙氨酸 (下转第 16270 页)



图3 短果杜鹃试管苗移栽成活

Fig. 3 Plantlet transplant survival of *Rhododendron brachycarpum* D. Don

mg/L + IBA 0.30 mg/L + GA<sub>3</sub> 3.00 mg/L 中进行节增殖同时生根培养,遗传稳定性好,速度快、成苗率高,从而缩短了增殖周期,提高了增殖倍数,方法简捷、经济实用、可操作性强,

(上接第16262页)

突变为酪氨酸,从而影响牛的产奶性状<sup>[7]</sup>。

笔者首次分析延边黄牛群体 *GHR* 基因第8外显子的SSCP多态性,发现延边黄牛群体在该座位存在2个等位基因,其中A等位基因为优势基因,而B等位基因频率较低。

**3.2 *GHR* 多态性与生长性状关系的分析** 该研究发现,群体内部,AA基因型个体在所研究的各项指标的群体均值(全期增重、胴体重、屠宰率、净肉率、眼肌面积)上略高于其他基因型个体。多重比较结果显示,全期增重和日增重2项指标上,AA型个体与AB型、BB型个体差异达显著水平( $P < 0.05$ )。这些指标作为主要测定指标能够反映出肉牛生长发育状况,存在差异,可能是因为 *GHR* 基因的表达产物,与生长激素(GH)结合,对动物生长发育、新陈代谢起重要调控作用<sup>[10]</sup>。提示,AA基因型可以作为延边黄牛生长发育性状候选基因型之一。

AA型个体在各项指标群体均值上都高于AB、BB型个体,并且在某些指标上显著高于AB、BB基因型个体,提示A等位基因有利于生长发育,而B等位基因则有可能是不利于生长发育的基因。A基因频率较高(0.8478)可能正是长期进化的结果。

产肉性状是一个数量性状,受多个基因影响,单个基因作用较小。从该试验的结果来看,AA型个体虽然在各项指标的群体均值上都高于其他型个体,但是差异达显著水平指标的基因型群体较少,说明 *GHR* 基因的作用比较轻微。提示人们进行育种工作时,应结合多个基因位点,才能达到有

达到了快速增殖的目的。应用均匀设计法处理和分析数据大大缩短了培养基配方的摸索周期。

近年来,德国、意大利、比利时等国家的高山杜鹃已驯化为园艺栽培种进入我国市场。而在我国,仅甘肃、云南等少许高山品种得到半引种。短果杜鹃系长白山高山杜鹃,该类型高山杜鹃至今未得到引种。该研究建立了短果杜鹃的高效离体快繁体系,对长白山高山杜鹃的开发利用和工厂化育苗有一定的参考意义。

#### 参考文献

- [1] 周繇. 长白山区杜鹃花科稀有濒危植物的区系特点和保护评价[J]. 湖北大学学报:自然科学版, 2006, 28(4): 393-406.
- [2] 顾地周, 从小力, 宋利丽, 等. 木通马兜铃的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(1): 136.
- [3] 顾地周, 朱俊义, 姜云天, 等. 东北刺人参组培快繁培养基的筛选[J]. 林业科学研究, 2008, 21(6): 867-870.
- [4] 顾地周, 孙忠林, 何晓燕, 等. 牛皮杜鹃的组培快繁及种质试管保存技术[J]. 园艺学报, 2008, 35(4): 603-606.
- [5] 秦静远, 黄玉敏. 杜鹃的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(1): 38.

效选育的目的。

#### 参考文献

- [1] GEORGES M, NIELSEN D, MACKINNON M A, et al. Mapping quantitative trait loci controlling milk production by exploiting progeny testing[J]. J Genetics, 1995, 139: 907-920.
- [2] ARRANZ J J, COPPIETERS W, BERZI P, et al. A QTL affecting milk yield and composition maps[J]. J Theor Appl Genet, 1998, 93: 71-80.
- [3] FALAKI M, GENGLER N, SNEYERS M, et al. Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls[J]. J Dairy Sci, 1996, 79: 1446-1453.
- [4] AGGREY S E, YAO J, SABOUR M P, et al. Markers within the regulatory region of the growth hormone receptor gene and their association with milk-related traits in Holsteins[J]. Heredity, 1999, 90(1): 148-151.
- [5] 王根林. 养牛学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [7] BLOTT S, KIM J J, MOISIO S, et al. Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition[J]. J Genetics, 2003, 163: 253-266.
- [8] AGGREY S E, YAO J, SABOUR M P, et al. Markers within the regulatory region of the growth hormone receptor gene and their association with milk-related traits in Holsteins[J]. J Heredity, 1999, 90(1): 148-151.
- [9] HALE C S, HERRING W O, SHIBUYA H, et al. Decrease growth in Angus steers, with TG-microsatellite allele in p1 promoter of the growth hormone receptor gene[J]. J Animal Science, 2000, 78: 2099-2104.
- [10] GENT J, VAN KERKHOF P, ROZA M, et al. Ligand-independent growth hormone receptor dimerization occurs in the endoplasmic reticulum and is required for ubiquitin system-dependent endocytosis[J]. Cell Biology, 2002, 99(15): 9858-9863.
- [11] MENG X W, ERDENGQIMUGE, HONG H, et al. Polymorphism analysis of the 3' flank region of equine *IGF-I* gene by PCR-SSCP[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(6): 39-42.