

# 大白猪 *pGH* 基因的多态性与生长性状的关联研究

赵聪哲<sup>1,2</sup>, 胡忠昌<sup>2</sup>, 张立春<sup>1</sup>, 张志彬<sup>1</sup>, 于永生<sup>1\*</sup>

(1. 吉林省农业科学院畜牧科学分院, 吉林 公主岭 136100; 2. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133002)

**摘要:**本研究利用HRM分型的方法检测了大白猪生长激素(*pGH*)的多态性,并对其进行与生长性状进行关联性分析。以246头大白猪作为研究对象,利用DNA提取试剂盒提取耳组织DNA,对20个样本进行PCR扩增后,通过测序方法寻找该基因在该群体中的多态性位点,针对已发现的多态性位点设计HRM专用引物,利用HRM方法对剩余226头大白猪进行多态性检测,将所得结果与生产数据进行关联性分析。结果表明,在*pGH*基因中检测到一个突变位点1856C>T,两个等位基因C和T,三种基因型CC、CT和TT。通过 $\chi^2$ 适合性检验显示,该基因的基因型频率和等位基因频率在小种群中分布差异不显著,符合Hardy-Weinberg平衡定律( $P>0.05$ ),但在大种群中该基因的基因型频率和等位基因频率分布差异显著,不符合Hardy-Weinberg平衡定律( $P<0.05$ )。根据多态信息含量(PIC)分析显示,*pGH*基因在小群体中该群体处于低度多态( $PIC<0.25$ ),但在大种群中属于中度多态( $0.25<PIC<0.5$ )。在与生长性状的关联分析中发现,*pGH*基因对于20天重以及二月龄重具有较为显著的影响( $P<0.05$ )。综上所述,*pGH*基因对大白猪的生长发育具有一定的影响,为后续大白猪肉质性状与生长性状的现代分子选育提供一定的参考。

**关键词:**大白猪;生长激素;多态性;生长性能;高分辨率溶解曲线

中图分类号:S828

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2019)02-0039-05

## Association between Polymorphism and Growth Traits of *pGH* Gene in Large White Pigs

ZHAO Congzhe<sup>1,2</sup>, HU Zhongchang<sup>2</sup>, ZHANG Lichun<sup>1</sup>, ZHANG Zhibin<sup>1</sup>, YU Yongsheng<sup>1\*</sup>

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100; 2. College of Agronomy, Yanbian University, Yanji 133002, China)

**Abstract:** In this study, the polymorphism of growth hormone (*pGH*) in Large White Pigs was detected by HRM typing, and its correlation with growth traits was analyzed. A total of 246 large white pigs were collected as research objects. Ear tissues DNA was extracted using DNA extraction kit. After PCR amplification of samples from 20 pigs, the polymorphic sites of the gene in the population were searched by sequencing. HRM-specific primers were designed for the polymorphic sites found, and the HRM method was used to detect polymorphism in samples from 226 pigs, and the results were correlated with production data. The results showed that one mutation site 1856C>T, two alleles C and T, three genotypes CC, CT and TT were detected in the *pGH* gene sequence. The  $\chi^2$  suitability test showed that the genotype frequency and allele frequency of the gene were not significantly different among the small populations, which was consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium law ( $P>0.05$ ), but the genotype frequency of the gene in the large population. The frequency distribution of the alleles was significantly different and did not conform to the Hardy-Weinberg equilibrium law ( $P<0.05$ ). According to polymorphic information content (PIC) analysis, the *pGH* gene was in low polymorphism ( $PIC<0.25$ ) in small populations, but moderate polymorphism ( $0.25<PIC<0.5$ ) in large populations. In the association analysis with growth traits, the *pGH* gene had a significant effect on the weight of 20 days and the weight of the two months ( $P<0.05$ ). In summary, the *pGH* gene has a certain influence on the growth and development of Large White Pigs. This will provide reference for the modern molecular breeding of the subsequent white pork quality traits and growth traits.

收稿日期:2018-11-09

基金项目:科技厅重点科技攻关项目(20170204044NY)

作者简介:赵聪哲(1993-),女,在读硕士,从事动物遗传育种与繁殖研究。

通讯作者:于永生,男,博士,副研究员,E-mail:yuyongsheng2002@163.com

**Key words:** Large White Pig; Porcine growth hormone; Polymorphism; Growth traits; High resolution melt

猪生长激素(Porcine growth hormone, pGH)是由猪脑垂体前叶的中性嗜酸细胞合成和分泌出的一种单链多肽蛋白质激素,该激素的功能是促进动物生长发育,对猪的生长发育发挥着重要作用<sup>[1-2]</sup>。Vize等<sup>[3]</sup>对猪生长激素基因进行了克隆,该基因全长2 231 bp,由5个外显子和4个内含子组成。Yerle等<sup>[4]</sup>将该基因定位于12号染色体上。猪生长激素基因通过调节营养物质在肌肉和脂肪组织中的分配来提高饲料利用率、促进生长发育、增加蛋白质合成、降低脂肪沉积,是一种理想的生长促进剂和胴体品质改良剂<sup>[5]</sup>。目前,猪生长激素基因的多态性研究始终是科学界研究的重点之一。

大白猪作为养猪产业的主要品种,具有繁殖性能较高、增重快、饲料转化率高、胴体瘦肉率高、产仔数相对较多的优点,且在中国分布较广,有较好的适应性<sup>[6]</sup>。因此,对其研究具有一定的代表性及实际的理论指导作用。高分辨率溶解曲线(High Resolution Melt, HRM)是一种近两年应用较为普遍的低成本高效率的遗传学分析方法,与其他已经确立的方法(例如凝胶法)相比,速度显著增快,费用显著降低,却能提供很高的特异度、敏感度和便利性<sup>[7-8]</sup>。

对pGH基因已发现的突变位点的分型方法大多集中在测序以及酶切位点方面<sup>[9-12]</sup>,利用高分辨率溶解曲线(HRM)分型法未见报道。本研究以pGH基因为研究目标,通过测序和HRM方法检测基因的多态性,同时结合生产性能指标进行研究分析,探寻与大白猪生产性能密切相关的分子遗传标记,期望为大白猪的分子标记辅助选育提供新的理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

在吉林省世纪生态农业开发有限公司猪场选择大白猪246头作为研究对象,分为两组,小群20头用于测序,大群226头用于HRM试验,分别采集其耳组织,放入75%酒精中,-20℃冷冻保存,用于基因组DNA提取。

### 1.2 主要试剂及仪器

AxyPrep基因组DNA提取试剂盒购自Axygene公司,2×ES Taq MasterMix购自CWBIO公司,LightCycler® 480 HRM Master Mix试剂盒购自美国罗氏公司,超微量分光光度计Quawell-Q5000购自北京鼎盛生物技术有限责任公司,PCR扩增仪T100购自上海伯乐生命医学产品有限公司。

### 1.3 基因组DNA提取及浓度质量检测

将猪耳组织用PBS清洗干净,利用AxyPrep基因组DNA提取试剂盒进行提取。吸取1μL DNA用超微量分光光度计Q5000检测其浓度和OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>值。将每个样品的DNA稀释10倍,-20℃保存备用。

### 1.4 pGH基因的多态性检测

#### 1.4.1 引物设计

根据NCBI pGH基因组序列(GenBank登录号为:A02321.1),按照引物设计的一般原则,利用Primer Premier 5软件设计扩增了pGH基因的部分序列。针对已发现的pGH基因的1856C>T位点,根据引物设计的一般原则,利用Beacon Designer 7软件进行HRM引物设计,并扩增出了包含突变位点的部分序列。引物序列见表1。引物均由上海生物工程技术有限公司合成。

表1 PCR和HRM检测引物

基因	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)	产物大小(bp)	延伸时间(s)
pGH	F: TTCACTCTCGACCCGAGAA	58.6	489	15
	R: CCATCGCAGAGTGACACCTA			
HRM-pGH	F: TAGTTGCTGGGCATCTCT R: CATTGGGGTGGCACTTTC	59	68	30

### 1.5 PCR扩增

PCR反应体系为20μL,其中2×ES Taq MasterMix 10μL,上游引物0.5μL,下游引物0.5μL, DNA模板1μL,加ddH<sub>2</sub>O至20μL。PCR反应条件为:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,退火(退火温度

见表1)30 s,72℃延伸15 s,34个循环,再72℃延伸8 min,4℃保持。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

### 1.6 HRM反应程序

采用LightCycler® 480 HRM Master Mix 试剂

盒,具体 HRM 反应体系为 20 $\mu$ L,其中 FastStart TaqDNA 混和物 10 $\mu$ L,上游引物 1 $\mu$ L,下游引物 1 $\mu$ L, DNA 模板 1 $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 2 $\mu$ L,加 ddH<sub>2</sub>O 至 20 $\mu$ L。反应程序为:预孵育 95 $^{\circ}$ C 10 min;扩增 95 $^{\circ}$ C 10 s,退火温度 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s 探测模式为 single,循环 55 次;高分辨率熔解 95 $^{\circ}$ C 1 min,40 $^{\circ}$ C 1 min,65 $^{\circ}$ C 10 s,95 $^{\circ}$ C 探测模式为 continuous,探测次数每 1 $^{\circ}$ C 25 次;冷却 40 $^{\circ}$ C 10 s。反应结束后用 LightCycler<sup>®</sup> 480 基因扫描软件进行数据分析。

## 1.7 统计分析

### 1.7.1 多态性统计分析

利用 Excel 2016 计算两个群体 *pGH* 基因的基因频率及基因型频率,利用 SPSS Statistics 统计期望杂合度 (expected heterozygosity,  $H_e$ )、观测杂合度 (observational heterozygosity,  $H_o$ )、有效等位基因数 (effective allele number,  $N_e$ ) 和多态信息含量 (polymorphic information content, PIC) 等遗传多样性参数, $\chi^2$  适合性检验,以  $P>0.05$  为差异显著性判断标准,检测是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。

### 1.7.2 数据统计分析

利用 IBM SPSS Statistics 19.0 软件中的单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 统计群体中不同基因型与生长性状的关联性,结果用“平均值 $\pm$ 标准差”表示。利用邓肯氏法 (Duncan's) 进行差异显著性分析,以  $P<0.05$  为差异显著性判断标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增结果

扩增后的 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,结果见图 1,获得预期大小片段。

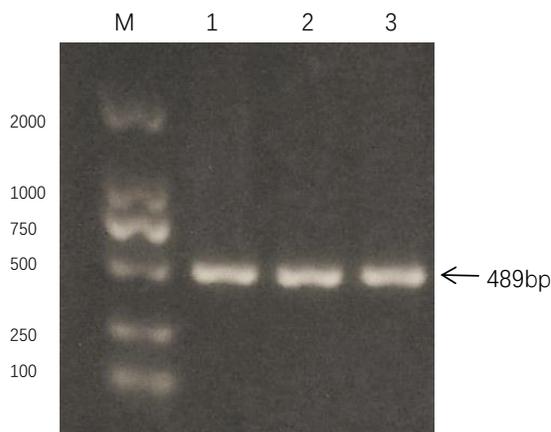


图 1 大白猪 *pGH* 基因扩增产物电泳图

注: M 为 Marker DL2000, 1、2、3 为 *pGH* 基因 PCR 产物

### 2.2 测序验证

将 PCR 产物回收,由上海生物工程技术有限公司进行测序,结果显示,存在一处点突变 (1856C>T),且有不同类型的峰图:CT 型和 CC 型 (图 2)。

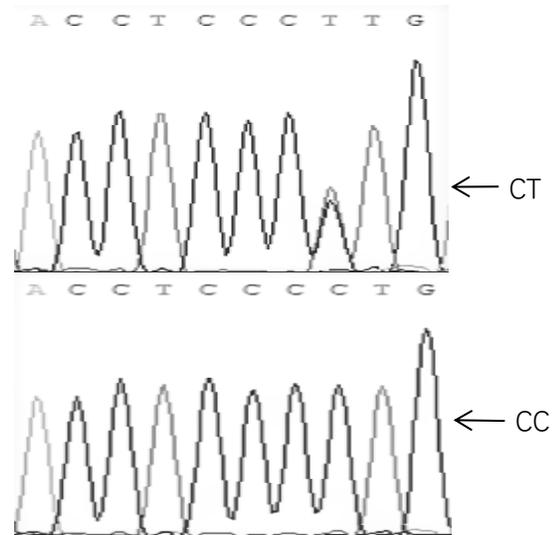


图 2 *pGH* 基因测序峰图

### 2.3 HRM 分型

结果见图 3,存在三种基因型 CC、CT 和 TT。

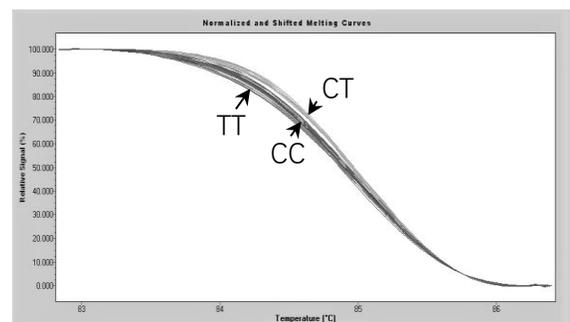


图 3 大白猪基因 *pGH* 分型结果图

### 2.4 大白猪 *pGH* 基因的多态性分析

在小群体中,*pGH* 基因的突变位点  $\chi^2 < \chi^2_{0.05(2)}$ ,推测该群体在该位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ( $P>0.05$ ),但在大群体中, $\chi^2 > \chi^2_{0.05(2)}$ ,推测该群体在这个位点上未处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ( $P<0.05$ )。*pGH* 基因 CC 型个体数量多于 TT 和 CT 型,等位基因 C 为优势基因 (表 2)。

在小群体中,*pGH* 基因该位点有效等位基因数 ( $N_e$ ) 接近于 1,多态信息含量 (PIC) 小于 0.25,属于低度多态,而在大群体中, $N_e$  接近于 2, PIC 介于 0.25 到 0.5 之间,属于中度多态。无论是小群体还是大群体,该位点观测杂合度 ( $H_o$ ) 均高于期望杂合度 ( $H_e$ ) (表 3)。

表2 基因 *pGH* 的基因频率和基因型频率

基因	样本量(头)	基因型频率			基因频率		$\chi^2$
		TT	CT	CC	T	C	
<i>pGH</i>	20	0 (0)	0.300 (6)	0.700 (14)	0.150	0.850	0.623
<i>pGH</i>	226	0.314 (71)	0.142 (32)	0.544 (123)	0.385	0.615	88.11

$\chi^2_{0.05(2)}=5.991, \chi^2_{0.01(2)}=9.21$

表3 基因 *pGH* 的多态性检测

基因	观测杂合度	期望杂合度	有效等位基因数	多态信息含量
<i>pGH</i> (20)	0.745	0.255	1.340	0.222
<i>pGH</i> (226)	0.526	0.474	1.899	0.361

注: PIC<0.25, 低度多态; 0.25<PIC<0.5, 中度多态; PIC>0.5, 高度多态

### 2.5 大白猪 *pGH* 基因的多态性与生产性状关联分析

将246头大白猪的9个生长性状与 *pGH* 基因该位点不同基因型进行关联分析, 结果见表4。

*pGH* 基因对于20天重的影响极为显著 ( $P<0.01$ ), 对于2月龄体重有着显著的影响 ( $P<0.05$ ), 但对于体长、体高、出生重和日增重等并没有显著影响 ( $P>0.05$ )。

表4 *pGH* 基因的多态性位点不同基因型与生长性状的关联分析

指标	基因型		
	CC	CT	TT
出生重(kg)	1.509±0.589	1.490±0.689	1.494±0.716
20天重(kg)	5.402±0.128 <sup>a</sup>	5.328±0.1170 <sup>b</sup>	5.359±0.1246 <sup>ab</sup>
断奶重(kg)	7.694±0.168	7.693±0.203	7.689±0.187
2月龄体长(cm)	71.74±1.078	72.00±1.077	71.96±1.193
2月龄体高(cm)	41.40±0.903	41.46±0.841	41.49±0.935
2月龄体重(kg)	22.25±1.261 <sup>a</sup>	21.06±4.023 <sup>b</sup>	21.97±1.183 <sup>a</sup>
6月龄体重(kg)	102.6±1.713	102.1±1.457	102.4±1.548
6月龄体长(cm)	117.5±1.722	117.2±1.533	117.5±1.700
6月龄体高(cm)	72.64±1.425	72.40±1.291	72.50±1.250
日增重(kg)	0.561±0.009	0.558±0.079	0.560±0.087

注: 同行数据肩标不同表示差异显著 ( $P<0.05$ ), 同行数据肩标相同或无字母标注表示差异不显著 ( $P>0.05$ )

## 3 讨论

家畜生长速度与经济效益显著相关, 目前报道表明 *pGH* 基因与家畜的生长性状相关, 并且该基因对于脂肪的沉积在不同品种群体中均发挥着一定的作用<sup>[13]</sup>。但是对于不同品种猪, 其作用的结果也有所不同且差异较大<sup>[14]</sup>。目前已经发现并报道的位点大多数通过PCR产物的RFLP方法分析该基因与实际生产性状的关联性<sup>[15-17]</sup>。本研究通过HRM技术对 *pGH* 基因多态性与大白猪生产性状相关性分析, 研究发现存在1856C>T, CC型是优势基因型, C为优势等位基因。该突变位

点不处于Hardy-Weinberg平衡状态 ( $P<0.05$ ), 说明该群体遗传受到较多的人工选择或者发生过遗传漂变, 受选择的压力较大。*pGH* 基因的SNPs位点的实际观测基因杂合度比例高于理论期望值, 说明该样本所在的群体中, 这个位点的突变表现出较高的杂交优势; 有效等位基因数( $N_e$ )是反映群体遗传变异大小的一个指标, 其数值越接近所检测到的等位基因的绝对数表明等位基因在群体中分布越均匀。由此可以发现, *pGH* 基因的有效等位基因数更接近于2, 说明已发现的等位基因在群体中分布较为均匀。同时还发现, *pGH* 基因的PIC属于中度多态 ( $0.25<PIC<0.5$ ), 说明该位点

具有一定的遗传潜力,遗传变异的可能性大,选育潜力大。*pGH*基因的突变位点对于大白猪的出生重、断奶重、体高以及体长等性状并无显著差异( $P>0.05$ ),但对于2月龄体重有着较为显著的影响( $P<0.05$ ),对20天重有着极为显著的影响( $P<0.01$ ),表明该基因型对种猪断奶后销售和早期生长具有重要影响。通过HRM技术对基因型分型,不仅可以节约试验经费,还可以节约大量时间,HRM技术的高准确性和高敏感性为试验数据的可靠性提供了保障。

### 3 结 论

本研究结果表明,*pGH*基因在大白猪群体内存在1856C>T多态性,该多态性与20日龄体重和2月龄体重存在显著相关( $P<0.05$ ),可将其作为影响猪生长性状的位点进行标记辅助选择,其应用有望加速大白猪的选育进程。

### 参考文献:

- [ 1 ] Brameld J M, Atkinson J L. Effect of growth hormone administration and dietary protein intake on insulin like growth factor 1 and growth hormone receptor mRNA expression in porcine liner skeletal muscle and adipose tissue[J]. *J Animal Science*, 1996, 74 (8): 1832-1841.
- [ 2 ] 方希修,王冬梅,张响英,等.猪生长激素作用机理与应用研究进展[J]. *农业与技术*, 2004, 24(1): 80-83.
- [ 3 ] Vize P D, Wells J R. Isolation and characterization of the porcine hormone gene[J]. *Gene*, 1987, 55(2-3): 339-344.
- [ 4 ] Yerle M, Lahbib-Mansais Y, Thomsen P D, et al. Localization of the porcine growth hormone gene to chromosome 12p<sup>12</sup>-p<sup>15</sup>[J]. *Animal Genetics*, 1993, 24(2): 129-131.
- [ 5 ] 徐金先,夏 东,赵茹茜,等.猪下丘脑和垂体中生长激素受体、胰岛素样生长因子 I 型受体的发育性变化[J]. *遗传学报*, 2004, 31(5): 495-501.
- [ 6 ] 杨公社.猪生产学[M].北京:中国农业出版社, 2013: 42-43.
- [ 7 ] 嘎利兵嘎.高分辨率熔解曲线(HRM)技术在动物病毒基因分型中的研究及应用[D].北京:中国农业大学, 2015.
- [ 8 ] 陈焱森,沈永巧,祁梦凡,等.应用高分辨溶解曲线(HRM)技术分析猪微卫星多态性[J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(1): 9-14.
- [ 9 ] 张 浩,强巴央宗,张明明,等.藏猪生长激素基因(*pGH*)多态性研究[J]. *西北农业学报*, 2010, 19(2): 15-19.
- [ 10 ] 赵中权,帅素容,蒋忠荣,等.藏猪生长激素基因核苷酸多态性分析[J]. *中国畜牧杂志*, 2006, 42(3): 12-13.
- [ 11 ] 李军成,路彩霞,景志忠.藏猪生长激素基因的同源性和多态性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(4): 98-102.
- [ 12 ] 帅素容,李学伟,李 辉,等.内江猪生长激素基因序列多态性分析[A]. 窦忠英、陈 宏.全国首届动物生物技术学术研讨会论文集[C]. 杨凌:中国农业生物技术学会, 2004: 83-89.
- [ 13 ] 赵 青.金华猪生长激素(*pGH*)与肌细胞生成素基因(*MyoG*)多态性及其对生长性状影响的研究[D].杭州:浙江大学, 2011.
- [ 14 ] 金甲正.三江白猪 *GH*、*IGF-I* 基因多态性及与早期生长性能的关联分析[D].大庆:黑龙江八一农垦大学, 2011.
- [ 15 ] 刘海峰,帅素容,侯万儒,等.*pGH*基因全序列选Apa I 酶切位点多态性与生产性能的相关分析[J]. *西华师范大学学报(自然科学版)*, 2003, 24(3): 330-334.
- [ 16 ] 俞沛初,华修国,郭传甲.3个品种猪生长激素基因的多态性分析[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2005, 23(3): 280-283.
- [ 17 ] 帅素容,李学伟,朱 砾,等.11个猪品种生长激素(*pGH*)基因多态性及其遗传分化研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(8): 753-759.