

## 猪 *DECRI* 基因 SNPs 筛选及其多态性分析

黄生强, 柳小春\*, 蒋隽, 马乐

(湖南农业大学 动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

**摘要:** 以大白猪、长白猪和杜洛克 3 个猪种共 327 头为试验材料, 对 2,4-dienoyl-CoA reductase 1(*DECRI*) 基因第 6 至第 10 外显子区域进行 SNPs 筛选, 分析 SNP 突变位点的遗传多态性; 采用比较基因组方法, 根据人 *DECRI* 基因全长序列设计引物, 筛选猪 *DECRI* 基因的 SNP, 经 PCR-SSCP 技术和测序检测, 发现 Exon6 和 Exon8 区域各存在 1 个 SNP 突变位点(C/T,C/G), 但 Exon6 区域的 SNP 突变是无义突变, 而 Exon8 的是错义突变; 在对 Exon8 SNP 的遗传结构分析中, 3 个猪种中均检测到 CC、CG、GG 3 种基因型, 说明猪群在该位点均具有丰富的遗传多态性。

**关键词:** 猪; 单核苷酸多态性; *DECRI* 基因; 遗传多态性

中图分类号: S828 文献标志码: 文章编号: 1007-1032(2011)02-0192-03

### SNPs of *DECRI* gene and its genetic polymorphism in pigs

HUANG Sheng-qiang, LIU Xiao-chun\*, JIANG Juan, MA Le

(College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** Three hundred and twenty seven Yorkshire, Landrace and Duroc pigs were analysed to screen the SNPs in 6-10 Exon of mitochondrial 2,4-dienoyl-CoA reductase 1(*DECRI*) gene and analyse its genetic structure. The results showed: the primers were designed according to human *DECRI* gene by means of genome comparison, 2 SNPs were screened out in Exon6 and Exon8 by PCR-SSCP method, but mutation in Exon6 loci belonged to nonsense mutation, mutation in Exon8 loci belong to missense mutation. The polymorphism of the SNP in Exon8 were studied and 3 genotypes (CC, CG, GG) were tested in 3 breeds. There were abundant genetic polymorphism in Exon8 loci.

**Key words:** pig; single nucleotide polymorphisms(SNP); *DECRI* gene; genetic polymorphism

从 DNA 水平对猪肉品质性状进行研究, 对猪的生产和育种具有重要意义<sup>[1-2]</sup>。随着基因组学和 SNP 检测技术的发展, 以及大量 SNP 标记信息的涌现, SNP 已经成为基因组研究中越来越重要的领域<sup>[3]</sup>。线粒体 2,4-双烯酰辅酶 A 还原酶 1 基因(mitochondrial 2,4-dienoyl-CoA reductase 1, *DECRI*) 是进行不饱和脂肪酸  $\beta$  氧化的关键酶, 对猪脂肪的沉积具有重要的调节作用, 可能是影响猪肉品质性状的重要基因或遗传标记<sup>[4-6]</sup>。笔者采用 PCR-SSCP 和直接测序的分子技术, 筛选猪 *DECRI* 基因第 6 至第 10 外显子区域的 SNP 标记, 并分析大白猪、长白猪和杜洛克 3 个猪种 SNPs 的遗传多态性, 旨在为进一步分析 *DECRI* 基因与猪肉品质性状的关联打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验猪及样品采集

试验猪共 327 头, 其中, 来自湖南正虹原种猪场的大白猪 171 头、长白猪 102 头; 来自湖南益阳农科所种猪场的杜洛克猪 54 头。采样时取供试猪耳尖组织, 装入已灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管中, 置冰壶中保存, 带回实验室备用。猪基因组 DNA 的提取参照文献<sup>[4]</sup>的方法进行。

### 1.2 猪 *DECRI* 基因 SNP 位点的 PCR 扩增

#### 1.2.1 PCR 扩增引物的设计与合成

目前猪 *DECRI* 基因的全长序列可能并未获得

收稿日期: 2010-12-20

基金项目: 国家“863”项目(2008AA101008); 湖南省教育厅项目(10C0791)

作者简介: 黄生强(1968—), 男, 湖南郴州人, 博士, 副教授, 主要从事猪的遗传育种研究, hsq07@126.com; \*通信作者, hwj@hnu.cn

或暂未公布,而猪与人 *DECRI* 基因序列的同源性最高。人的 *DECRI* 基因定位于8号染色体上的q<sup>21.3</sup>区域,它包含10个外显子和9个内含子。为了筛查所有的外显子区域,采用比较基因组方法,根据

GenBank 数据库中人的 *DECRI* 基因(序列号 NG\_008042)全长序列设计引物,筛选猪 *DECRI* 基因的SNP,共设计引物12对,引物序列的相关信息见表1。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 PCR 扩增引物序列信息

Table 1 Primers sequence for PCR amplification

外显子	引物序列	退火温度/°C	扩增片段位置/bp	PCR 产物大小/bp
Exon6	F: 5'-GAGCAGCATTCTTCTTCTATT-3' R: 5'-TTCCCTGAGCCACCAACTGT-3'	60	40 490~40 651	161
Exon8	F: 5'-AAACCCGACACAACCTAATT-3' R: 5'-GAAATAAACAAACGCTTACTG-3'	62	48 460~48 662	202

### 1.2.2 PCR 扩增反应体系和程序

PCR反应体系 20 μL: 10×Buffer 2 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2 μL, 2 mmol/L dNTPs 1.4 μL, 10 pmol/L正向引物0.6 μL, 10 pmol/L反向引物0.6 μL, ddH<sub>2</sub>O 11.3 μL, 1 U/μL *Taq* DNA polymerase 1.6 μL, 100 ng/μL DNA 模板0.5 μL。扩增反应程序为: 94 °C 预变性4 min; 94 °C 变性30 s, 退火30 s, 退火温度见表1, 72 °C 延伸 36 s, 共32个循环; 72 °C 后延伸6 min。2个SNP位点的扩增产物大小相差不大, 除退火温度外, 其余反应程序基本相同。

### 1.3 PCR 扩增产物检测和 PCR-SSCP 分析

扩增产物检测: 取10 μL PCR扩增产物, 用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测, 以50 bp DNA markers为参照, 60~100 V恒压电泳30~60 min。

SSCP分析: 取3 μL PCR扩增产物, 加入9 μL 上样变性缓冲液, 充分混匀; 将混合物于98 °C 变性10 min后, 迅速插入冰块中, 放置10 min后, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

### 1.4 *DECRI* 基因突变位点的测序分析

猪 *DECRI* 基因外显子的扩增产物经纯化后, 送上海生工生物工程有限公司进行直接测序, 并用DNA Star6.0进行序列分析。

### 1.5 统计分析

SNP突变位点的基因型频率和基因频率、遗传纯合度、遗传杂合度、有效等位基因数、多态信息含量计算参见文献[7]。

## 2 结果与分析

### 2.1 猪与 4 个不同物种 *DECRI* 基因的同源性

根据GenBank中猪、牛、小家鼠、褐家鼠、人等5个物种的 *DECRI* 基因mRNA序列, 运用DNA

Star 6.0序列分析软件进行同源性分析, 发现猪与牛、小家鼠、褐家鼠、人的序列同源性分别为89.7%、82.5%、81.6%、89.8%, 同源性都非常高。

### 2.2 猪 *DECRI* 基因 SNP 的筛选结果

经筛查, 外显子6(Exon6)和外显子8(Exon8)处各存在1个SNP突变。

### 2.3 猪 *DECRI* 基因 Exon6 和 Exon8 扩增产物检测及其 PCR-SSCP 分析结果

针对外显子6和外显子8所设特异性引物, 按其扩增条件和反应程序进行PCR扩增, 得到目标片段的大小分别为161、202 bp。PCR-SSCP分析结果表明, 只在Exon6(图1)和Exon8区域(图略)各发现了1个SNP突变。

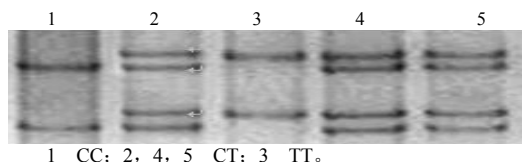


图 1 Exon6 PCR-SSCP 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱  
Fig.1 PCR-SSCP PAGE patterns of Exon6

### 2.4 猪 *DECRI* 基因 Exon6 和 Exon8 的测序结果

猪 *DECRI* 基因Exon6(图略)和Exon8(图2)的测序

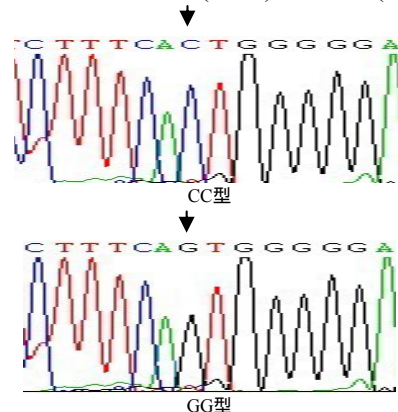


图 2 Exon8 的 SNP 部分测序图  
Fig.2 Sequencing maps of SNP in Exon8 locus

结果表明, Exon6、Exon8 SNP位点分别是C/T、C/G突变。

### 2.5 猪 *DECRI* 基因突变位置的氨基酸变化

将测序结果与网上公布的猪*DECRI* 基因外显子6到外显子10的CDS序列进行比对,发现在739 bp处外显子6区域有C-T突变的多态位点,但其编码的氨基酸没有变化,属于无义突变;在867 bp处外显子8区域有1个C-G突变产生的多态性位点,而其编码的氨基酸由丙氨酸Ala(C)突变为甘氨酸Gly(G),是错义突变。

### 2.6 猪 *DECRI* 基因 Exon8 (C/G) 突变位点的多态性

由于猪*DECRI*基因Exon6(C/T)位点属于无义突变,故不再进行遗传多态性研究,只研究Exon8(C/G)位点的遗传多态性。由表2可见,在大白猪、长白猪和杜洛克3个猪种中,都是CC基因型频率最高,为优势基因型,其次是CG型,GG型频率最低。3个猪种都是C等位基因为优势基因。

表2 *DECRI* 基因 Exon8 突变位点的遗传多态性

品种	个体数/头			基因型频率/%			基因频率/%	
	CC	CG	GG	CC	CG	GG	C	G
大白	90	58	23	52.63	33.92	13.45	69.59	30.41
长白	65	29	8	63.73	28.43	7.84	77.94	22.06
杜洛克	31	17	6	57.41	31.48	11.11	73.15	26.85

由表3可见,3个猪种的遗传杂合度均低于0.5;长白猪的有效等位基因数最高,大白猪的最低;各猪种的多态信息含量均为0.3~0.4。

表3 不同品种 Exon8 突变位点的多态性

Table 3 Analysis of polymorphism of Exon8 locus in different breed

品种	有效等位基因数	遗传杂合度	遗传纯合度	多态信息含量
杜洛克	1.905 9	0.475 3	0.524 7	0.362 3
长白	1.984 6	0.496 1	0.503 9	0.373 5
大白	1.767 6	0.434 3	0.565 7	0.329 6

## 3 结论与讨论

运用DNA Star6.0序列分析软件,分析猪与牛、小家鼠、褐家鼠、人等的*DECRI*基因的同源性,结果表明,猪与人*DECRI*基因的同源性高达89.8%。这为采用比较基因组方法,利用人*DECRI*的全基因组序列设计引物,筛选猪*DECRI*基因的SNP提供了基础。共设计了12对引物,对猪*DECRI*基因第

6至第10个外显子区域进行SNPs筛选,但只有5对引物能扩增出较理想的目的片段,其他引物扩增失败的原因可能是:①人*DECRI*基因与猪*DECRI*基因的同源性虽然非常高,但是所设引物处所在区域的同源性不高。②PCR反应条件优化不够,产生了较多的非特异性条带。

检测发现的2个SNP突变中,只有Exon8的是错义突变,且在大白猪、长白猪和杜洛克3个猪种中都具有丰富的遗传多态性,这为分析*DECRI*基因与猪肉质等经济性状的关联提供了很好的理论基础,对提高养猪生产水平具有重要意义<sup>[8-9]</sup>。

### 参考文献:

- [1] 倪德斌,熊远著,邓昌彦,等.影响猪肉质因素的探讨[J].华中农业大学学报,1998,17(5):474-477.
- [2] 苏玉虹,熊远著,邓昌彦.猪的肉质性状基因定位研究进展[J].遗传,2000,27(5):334-338.
- [3] 唐棣,王志民.SNPs检测方法研究进展[J].上海交通大学学报:农业科学版,2007,25(2):405-418.
- [4] 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].金冬雁,黎孟枫.北京:科学出版社,1992.
- [5] Kaminski S, Brym P, Wojcik E. A note on associations between polymorphism within the 2,4-dienoyl-CoA reductase gene (*DECRI*) and growth rate of Polish Landrace boars[J]. Anim and Feed Sci, 2009,18: 71-77.
- [6] Roberta Davoli, Luca Fontanesi, Silvia Braglia, et al. Investigation of SNPs in the ATP1A2, CA3 and *DECRI* genes mapped to porcine chromosome 4: Analysis in groups of pigs divergent for meat production and quality traits[J]. Italian Journal of Animal Science, 2010, 5(3): 57-62.
- [7] 张青峰,张青峰,冯书堂,等.微卫星DNA检测近交系五指山小型猪(WZSP)群体遗传结构[J].安徽农业大学学报,2007,34(1):66-69.
- [8] Amills M, Vidal O, Varona L, et al. Polymorphism of the pig 2,4-dienoyl CoA reductase 1 gene (*DECRI*) and its association with carcass and meat quality traits[J]. J Anim Sci, 2005, 83(3): 493-498.
- [9] Kamiński S, Koćwin-Podsiadła M, Sieczkowska H, et al. Screening 52 single nucleotide polymorphisms for extreme value of glycolytic potential and drip loss in pigs[J]. J Anim Breed Genet, 2010, 127(2): 125-132.

责任编辑:王赛群

英文编辑:罗文翠