

海南地方猪 *POU1F1* 基因多态性与体质量的相关性

孙瑞萍^{1,2}, 魏立民^{1,2}, 郑心力^{1,2}, 刘圈伟^{1,2}, 黄丽丽¹, 晁哲^{1,2}, 王峰^{1*}

(1.海南省农业科学院 畜牧兽医研究所, 海南 海口 571100; 2.海南省热带动物繁育与疫病控制重点实验室, 海南 海口 571100)

摘 要: 采用 PCR-SSCP、PCR-RFLP 技术, 对海南五指山猪封闭群及其近交系、海南黑猪 2 个品系(临高猪、屯昌猪)的 *POU1F1* 基因外显子 4、外显子 5、外显子 6、内含子 3 的多态性进行研究。结果表明: 猪 *POU1F1* 基因外显子 5、外显子 6 不存在多态性, 内含子 3、外显子 4 存在 2 个等位基因和 3 种基因型; 在外显子 4 基因座上, 五指山猪、临高猪、屯昌猪呈 Hardy-Weinberg 平衡状态, 五指山猪近交系呈不平衡状态, 4 个猪种群的遗传多态性均处于中度多态($0.25 < PIC < 0.5$); 在内含子 3 位点, 4 个猪种群均呈 Hardy-Weinberg 平衡状态, 五指山猪和五指山猪近交系群体的遗传多态性均处于中度多态($0.25 < PIC < 0.5$), 临高猪、屯昌猪 2 个猪种群处于高度多态 ($PIC > 0.5$); 利用 SPSS 软件分析五指山猪 *POU1F1* 基因内含子 3 和外显子 4 基因的多态性与其 3 个生长阶段体质量的相关性, 发现引物 P1 与 P4 不同基因型个体体质量的差异均不显著。

关 键 词: 五指山猪; *POU1F1* 基因; 限制性片段长度多态性聚合酶链反应; 单链构象多态

中图分类号: S813.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)02-0187-05

Association of *POU1F1* gene polymorphism with growth traits in Hainan native pig breeds

SUN Rui-ping^{1,2}, WEI Li-min^{1,2}, ZHENG Xin-li^{1,2}, LIU Quan-wei^{1,2}, Huang Li-li¹, CHAO Zhe^{1,2}, WANG Feng^{1*}

(1. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Hainan Academy of Agricultural Science, Haikou 571100, China; 2. Hainan Key Lab. of Tropical Animal Reproduction & Breeding and Epidemic Disease Research, Haikou 571100, China)

Abstract: The PCR-SSCP and PCR-RFLP in exon 4, exon 5, exon 6 and intron 3 of *POU1F1* gene and their correlations with growth traits were investigated in Hainan WZS pig in a closed breeding colony and their inbred line and in Hainan black pigs (Lingao pig and Tunchang pig). The results showed there were two alleles and three genotypes in exon 4 and intron 3 of *POU1F1* gene and there were no polymorphism in exon 5 and exon 6. They were Hardy-Weinberg equilibrium state in exon 4 of *POU1F1* gene in WZS pig, Lingao pig and Tunchang pig, while WZS pig inbred line showed unequilibrium state, and the four breeds all had intermediate genetic polymorphism ($0.25 < PIC < 0.50$). And there were Hardy-Weinberg equilibrium state in intron 3 of *POU1F1* gene in all the four pig breeds, with intermediate genetic polymorphism in WZS pig and WZS pig inbred line ($0.25 < PIC < 0.50$) and high genetic polymorphism in Lingao pig and Tunchang pig ($PIC > 0.50$). The least square analysis showed that the different genotype of exon 4 and intron 3 of *POU1F1* gene did not affect body weight of 2, 8 and 12-month-old pigs ($P > 0.05$).

Key words: WZS pig; *POU1F1* gene; restriction fragment length polymorphism (RFLP); single strand conformation polymorphism (SSCP)

收稿日期: 2011-11-07

基金项目: 海南省自然科学基金项目(309018); 海南省科学事业费项目(琼财预[2009]1061号; 琼财预[2010]139号; 琼财预[2006]105号)

作者简介: 孙瑞萍(1982—), 女, 山西运城人, 硕士研究生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, ruiping937@126.com; *通信作者,

hnxmsjx@126.com

由于独特的自然、地理、生态条件,在海南形成了许多适应当地环境条件的品质优良的畜禽品种资源或类型,如海南黑猪(包括临高猪、屯昌猪、定安黑猪、文昌猪等)、五指山猪、文昌鸡、定安四季鹅等。海南地方猪的肉质风味、繁殖力、抗逆性、耐粗性等品质都显著优于目前国内外推广的商品猪品种。五指山猪是中国小型猪种中体型最小、体质量最轻、濒临灭绝的珍稀畜种,它的解剖学、生理学特征及疾病发生机理等都与人类极其相似,具有重要的经济和社会价值,可用于对心血管病、皮肤烧伤和新药评价等的研究,是不可多得的宝贵遗传资源,也是中国实验用小型猪资源开发与应用研究的理想材料。

垂体转录因子-1 又称生长激素因子-1,是 POU 基因家族的重要成员,现已被正式命名为 POU1F。该蛋白在哺乳动物胚胎分化和生长发育过程中起关键作用,具有重要的生物学功能^[1-2]。POU1F1 基因的突变会导致垂体发育不全,并影响 GH、PRL、TSH β 的正常分泌,从而使个体因多种垂体激素的缺乏而导致矮小症状^[3-4]。猪 POU1F1 基因被定位于第 13 号染色体上的 q46 区域内,由 6 个外显子和 5 个内含子组成,其 cDNA 序列全长 876 bp。POU1F1 基因对猪生长发育起着重要的作用,是标记生长性状理想的候选基因^[5-9]。笔者以 216 头海南地方猪为材料,应用 PCR-RFLP、PCR-SSCP 技术对 POU1F1 基因进行突变分析,并分析 POU1F1

基因遗传变异位点基因多态性与五指山猪生长性状的关系,旨在为与五指山猪矮小性状相关的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

分别于每头猪(海南省五指山猪原种场的封闭群五指山猪 100 头、五指山猪的近交系猪 40 头;海南省临高县种猪场临高猪 36 头;海南省屯昌县屯牧种猪场屯昌猪 40 头)的前腔静脉采血 5 mL,加 EDTA 抗凝剂,20 °C 冻存储备。五指山猪 2 月龄、8 月龄、12 月龄 3 个生长阶段的体质量数据来自于国家五指山猪保种场的系谱记录。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取

采用常规苯酚-氯仿抽提方法提取基因组 DNA,用 TE 溶解,取部分 DNA 样品稀释至 100 ng/ μ L, -20 °C 冻存储备。

1.2.2 引物设计

POU1F1 基因的引物序列均参照文献[5]、[8]中的原有引物进行设计,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列、PCR 产物大小及所在位置见表 1。

表 1 PCR 扩增所用的引物序列、产物大小及位置

Table 1 Sequences and the target fragments of the primers and the sizes of PCR products

引物	序列	片段大小/bp	退火温度/°C	片段位置
P1	F: 5'-TTCACAGGATACACCCAA-3' R: 5'-GCTTCCTCCAGCCATT-3'	159	55	Exon 4
P2	F: 5'-TAATTACTCTTTCCCC-3' R: 5'-TTTGCTTCTCAGGGCCGCA-3'	144	55	Exon 5
P3	F: 5'-ATCTACCAAAAACATCCCTAAAC-3' R: 5'-GCTGGAGAAGAGAAAAGAATGAGA-3'	332	58	Exon 6
P4	F: 5'-AAAATCAGAGAAGTGAAGTTGCC-3' R: 5'-GGCTTCCCAACATTTGTTGGG-3'	2 100	60	Intron 3

1.2.3 PCR 扩增与 PCR 产物酶切

引物 P1~P4 的 PCR 反应体系为 15 μ L: ddH₂O 4.5 μ L, Taq MIX(北京天根)7.5 μ L, 引物(10.5 pmol/ μ L)

各 0.75 μ L, DNA 模板 1.5 μ L。

引物 P1~P3 的 PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, X °C (表 1) 复性 45 s, 72 °C 延伸

45 s, 32 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。

引物 P4 的 PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 复性 4 min, 72 °C 延伸 4 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物均用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR 产物用限制性内切酶 *Msp* I 进行消化。酶切反应总体系为 15 μL, 其中, PCR 扩增产物 5 μL, 限制性内切酶 (10 U/μL) 1.0 μL, Reb × Buffer (含 BSA) 2 μL, ddH₂O 7 μL。于 37 °C 置 3.5 h。酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 于 80 V 恒压电泳 1.5 h。用美国 UVP 凝胶成像系统拍照。

1.2.4 SSCP 分析

3 μL PCR 产物和 6 μL 加样缓冲液 (98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯氰、10 mmol/L EDTA (pH 8.0)、10% 甘油) 混匀, 98 °C 变性 10 min, 然后冰浴至上样。变性后, PCR 产物用交联度 (Acr 与 Bis 的质量比) 为 29 : 1 的非变性聚丙烯酰胺凝胶 (P3 用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶, P1 ~ P2 用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶) 120 V 过夜电泳, 银染显色、拍照并分析。

1.3 数据分析

1) 基因型频率、基因频率的计算及群体平衡性的检验。某基因位点的 Hardy-Weinberg 平衡性检测采用皮尔逊 χ^2 统计。

2) 基因多态性与五指山猪生长发育性状相关性的分析。根据 PCR-SSCP 电泳图谱统计不同基因型在群体内的分布情况。PCR-RFLP、PCR-SSCP 标记条带效应值的最小二乘分析模型为 $Y_{ij} = e + G_i + E_{ij}$ 。式中: Y_{ij} 为第 i 个个体的性状观察值; e 为群体均值; G_i 为第 i 个个体的基因型效应值; E_{ij} 为随机误差。根据以上线性模型, 利用 SPSS (13.0) 的 ANOVA 过程对不同月龄五指山猪的体质量进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 *POU1F1* 基因的 PCR-SSCP 分析结果

引物 P1、P1、P3 PCR 产物的大小与理论大小一致。经 SSCP 检测后, 发现仅引物 P1 的 PCR 片

断表现有多态性, 且出现 3 种基因型, 分别将其定义为 AA、BB 和 AB; 引物 P2、P3 未见多态性。对比纯合基因型序列 AA、BB 后发现: AA 基因型相对于 BB 基因型在第 52 位碱基序列处产生了 1 个 C → T 突变, 但并没有引起氨基酸的变化, 编码均为组氨酸。

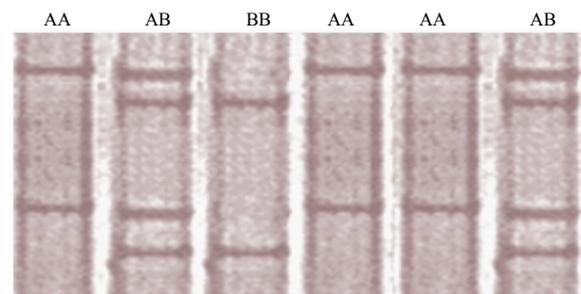


图 1 引物 P1 不同基因型个体的 SSCP 结果

Fig.1 PCR-SSCP patterns with primer P1

2.2 *POU1F1* 基因的 PCR-RFLP 分析结果

海南 4 个猪种 *POU1F1* 基因内含子 3 的 PCR 扩增产物经电泳检测, 均得到 1 条 2 100 bp 的特异性条带。*POU1F1* 基因内含子 3 的 *Msp*I 酶切图谱见图 2。参照文献 [6] 作出如下分型: CC (1 680 bp、420 bp)、CD (1 680 bp、850/830 bp、420 bp) 和 DD (850/830 bp、420 bp) 3 种基因型。

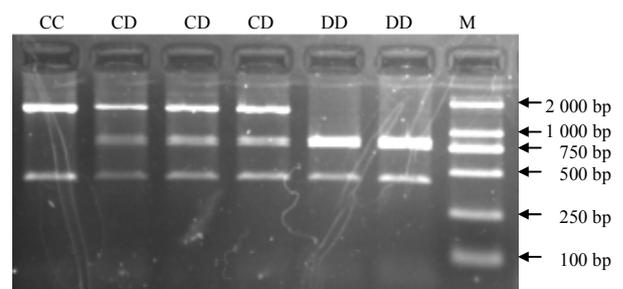


图 2 引物 P4 *Msp*I 酶切结果

Fig.2 *Msp*I patterns with primer P4

2.3 猪 *POU1F1* 基因群体遗传结构

由表 2 可见, 在这 4 个猪种中, AA 基因型频率较 BB 基因型频率高; A 型等位基因频率较 B 型等位基因频率高; 在五指山猪的近交系中没有发现 AB 基因型。群体遗传多态性检测均处于中度多态 ($0.25 < PIC < 0.5$)。群体的 Hardy-Weinberg 平衡检验结果显示: 五指山猪的近交系猪群体处于非平衡状态, 而其他 3 个猪种群体均处于平衡状态。

表2 海南地方猪 *POUIF1* 基因的遗传结构分析结果Table 2 Population genetic structure analysis of *POUIF1* gene for Hainan native pig breeds

基因型	频率				多态信息含量				卡方值			
	W	WJ	L	T	W	WJ	L	T	W	WJ	L	T
AA	0.68	0.70	0.70	0.57	0.38	0.26	0.33	0.45	0.27	40 *	2.73	0.17
AB	0.28	0.00	0.22	0.36								
BB	0.04	0.30	0.08	0.07								
A	0.82	0.70	0.81	0.75								
B	0.18	0.30	0.19	0.25								
CC	0.82	0.78	0.50	0.53	0.25	0.28	0.52	0.52	0.98	1.53	1.64	1.65
CD	0.18	0.22	0.36	0.32								
DD	0.00	0.00	0.14	0.15								
C	0.91	0.89	0.68	0.69								
D	0.09	0.11	0.32	0.31								

W 五指山猪; WJ 近交系猪; L 临高猪; T 屯昌猪。

2.4 *POUIF1* 基因多态性与五指山猪体质量的相关性

由表 3 可知, 用 SPSS 软件分析五指山猪 *POUIF1* 基因内含子 3 和外显子 4 基因多态性与五指山猪 3 个生长阶段体质量的关联程度, 发现引物 P1 和 P4 不同基因型的体质量间均无显著差异。

表 3 五指山猪 *POUIF1* 不同基因型与其不同生长阶段体质量的相关性

Table 3 Correlation analysis between different genotypes of *POUIF1* gene and growth traits

引物	基因型	体质量/kg		
		2月龄	8月龄	12月龄
P1	AA	5.59±1.25	14.87±0.83	19.35±3.10
	AB	5.74±1.34	15.67±2.38	20.57±2.25
	BB	6.20±1.14	15.55±2.51	21.60±4.27
P4	CC	6.04±1.30	15.56±2.27	21.36±3.28
	CD	4.95±1.93	15.53±0.84	20.56±2.61

3 结论与讨论

a. *POUIF1* 基因外显子 2 多态性及群体遗传分析。本试验结果表明: 海南地方猪 *POUIF1* 基因第 4 外显子存在 T>C 碱基突变, 形成了 3 种不同的基因型, 而第 5、第 6 外显子高度保守, 未发生任何突变; 对该位点的遗传结构进行分析, 发现 A 型等位基因频率较 B 型高, 在五指山猪的近交系中没有发现 AB 基因型, 这与对莱芜猪、滇南小耳猪等 7 个中国地方猪的研究结果^[5]相同, 说明海南地方猪种与国内其他地方猪种一样, 在该位点相对保守。

对 4 个猪种群体进行 Hardy-Weinberg 平衡检验, 五指山猪近交系群体处于非平衡状态, 而其他 3 个猪种群体均处于平衡状态, 这可能是在五指山猪世代近交中人为选育使该位点逐渐趋于纯合导致的结果。

b. *POUIF1* 基因内含子 3 的基因多态性及群体遗传性。本研究结果表明: 在五指山猪封闭群及其近交群体中未检测到 DD 基因型, 只检测到 CC 及 CD 基因型; 在临高猪和屯昌猪群中均检测到 CC、CD、DD 3 种基因型; 4 个品种群体间的基因型和等位基因频率分布不均匀, 均表现为 CC、CD、DD 依次递减, C 等位基因所占比例较高。内含子是基因中无编码功能的插入序列, 虽然不直接参与翻译, 但发生在内含子的碱基缺失可能影响外显子的正常翻译, 进而影响基因的表达。内含子的 SNPs 对猪的生产性状有重要作用^[10]。本研究中对 *POUIF1* 内含子 3 的 *MSPI* 酶切结果与文献[8]、[9]报道的结果相吻合。从群体遗传多态性角度分析, 五指山猪及其近交系表现为中度多态, 而海南黑猪的 2 个品种均表现为高度多态。这说明 *POUIF1* 基因标记的多态信息含量较高, 遗传变异较大, 可望获得更多的遗传进展。

c. *POUIF1* 基因多态性与五指山猪体质量的相关性。通过分析 *POUIF1* 基因遗传变异与五指山猪 3 个生长阶段体质量的相关性, 发现 CC 基因型个体和 CD 基因型个体在猪 2 月龄、8 月龄、12 月龄

的差异不显著。这与 *POUIF1* 基因遗传变异仅对初生体质量和早期生长有显著影响的观点^[6-7]不一致,这可能是由于五指山猪的个体较小(出生时仅有 0.5 kg)和生长较慢有关,也说明某一特定的突变位点对不同猪种同一性状的影响不完全一致,可能受到其他相关因素的影响而在不同群体内有不同的表现。*POUIF1* 基因能否作为猪育种的辅助分子标记,还有待通过增加猪品种数量后,在 RNA 水平、蛋白质水平等方面进一步研究。

参考文献:

- [1] Rosenfeld M G . POU-domain transcription factors : Powerful developmental regulators[J]. *Genes Development* , 1991 , 5 : 897-907 .
- [2] Hausman D B , Hausman G J , Martin R J . Endocrine regulation of fetal adipose tissue metabolism in the pig : Interaction of porcine growth hormone and thyroxine[J]. *Obesity Research* , 1999 , 7 : 76-82 .
- [3] Cohen L E , Wondisford F E , Radovick S . Role of *POUIF1* in the gene expression of growth hormone , prolactin , and thyrotropin[J] . *Endocrinol Metab Clin North Am* , 1996 , 25 : 523 -540 .
- [4] Ingraham H A , Albert V R , Chen R , et al . A family of POU-domain and *POUIF1* tissue-specific transcription factors in pituitary and neuroendocrine development[J]. *Annu Rev Physiol* , 1990 , 52 : 773-791 .
- [5] 庞瑾 , 李宏滨 , 郑友民 , 等 . 猪 *POUIF1* 基因的多态性研究[J] . *畜牧兽医学报* , 2005 , 36(6) : 531-535 .
- [6] Yu T P , Schmitz C B , Rothschild M F , et al . Expression pattern , genomic cloning and RFLP analyses of the swine *POUIF1* gene[J] . *Animal Genetics* , 1994 , 25 : 229-233 .
- [7] Yu T P , Tuggle C K , Schmitz C B , et al . Association of *POUIF1* polymorphisms with growth and carcass traits in pigs[J] . *J Anim Sci* , 1995 , 76(5) : 1282-1288 .
- [8] 滕勇 , 经荣斌 , 宋成义 . 猪 *POUIF1* 基因第 3 内含子 *MspI* 酶切片段多态性特征的研究[J] . *华中农业大学学报* , 2004(2) : 8-11 .
- [9] 滕勇 , 宋成义 , 经荣斌 . 猪 *POUIF1* 基因第 3 内含子 *Msp I* 酶切片段多态特征及其与生长性能相关性的研究[J] . *畜牧兽医学报* , 2005 , 36(2) : 205-208 .
- [10] 方华 , 郑友民 , 李宏滨 , 等 . 猪 *POUIF1* 第一内含子单核苷酸多态性和生长性状相关性研究[J] . *中国农业科学* , 2009 , 42(1) : 283-289 .

责任编辑: 王赛群