

猪孕酮受体基因的遗传变异及其与繁殖性状的相关性

张善文, 陈斌*

(湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘要:以猪孕酮受体(PGR)基因序列为模板设计引物,采用 PCR-RFLP 技术检测 PGR 基因外显子 1 在长白猪和大白猪中的单核苷酸多态性,同时研究该基因对猪总产仔数、产活仔数和出生窝重的影响。对于扩增的外显子 1 片段,在大白猪中检测到 GG、AG 和 AA 型,在长白猪中只检测到 GG 和 AG 型。测序结果表明,GG 型与 AA 型相比,在 326 bp 处有一单碱基突变(G→A),该基因所编码的氨基酸则由甘氨酸变为丝氨酸。长白猪 GG 型总产仔数、产活仔数和出生窝重与 AG 型总产仔数、产活仔数和出生窝重的差异均没有统计学意义。大白猪 AG 型总产仔数、产活仔数和出生窝重与 GG 型总产仔数、产活仔数和出生窝重的差异有统计学意义,大白猪 GG 型总产仔数、产活仔数和出生窝重与 AA 型总产仔数、产活仔数和出生窝重的差异没有统计学意义,大白猪 AG 型总产仔数、产活仔数与 AA 型总产仔数、产活仔数的差异有统计学意义,大白猪 AG 型出生窝重与 AA 型出生窝重的差异没有统计学意义。

关键词:猪;孕酮受体;遗传变异;繁殖性状

中图分类号:S828

文献标志码:A

文章编号:1007-1032(2013)01-0058-05

Genetic variation of progesterone receptor gene and its association with reproductive traits in pig

ZHANG Shan-wen, CHEN Bin*

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

Abstract: PCR-RFLP were developed using the primers designed based on the sequence of PGR gene to determine the single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of exon 1 of PGR gene in Landrace and Large White sows. And the influence of PGR gene on the total number born (TNB), number born alive (NBA) and litter birth weight (LBW) was also investigated. There were 3 genotypes (GG, AG and AA) in Large White sows, and two genotypes (GG and AG) in Landrace sows. There was a single base mutation (G→A) between GG genotype and AA genotype at position 326 bp, which caused a change of amino acid residue (Glycine→Serine). In Landrace sows, the differences of TNB, NBA and LBW between GG genotype and AG genotype did not approach statistical significance ($P>0.05$). In the Large White sows, the differences of TNB, NBA and LBW between AG genotype and GG genotype all reached statistical significance ($P<0.05$), while those differences between GG genotype and AA genotype did not reach statistical significance ($P>0.05$). The difference of TNB and NBA between AG genotype and AA genotype of Large White sows reached statistical significance ($P<0.05$), but the difference of LBW did not reach statistical significance ($P>0.05$).

Key words: pig; PGR gene; genetic variation; reproductive traits

繁殖性状是猪的重要经济性状之一,它的优劣不仅直接影响母猪的繁殖生产力,而且直接影响养

猪业的经济效益^[1]。繁殖性状为受多基因控制且遗传力低的数量性状,易受环境和发育因素的影响,

收稿日期:2012-07-16

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-36)

作者简介:张善文(1987—),男,湖南长沙人,硕士研究生,研究方向为动物遗传育种与繁殖,zhangshangwen511@163.com; *通信作者,chenbin7586@126.com

因而遗传进展相对比较缓慢^[2]。孕酮是动物内分泌系统、免疫系统、组织修复与再生、经血调控、血管发生、胚泡着床与维持妊娠交互作用的关键因子,尤其在动物生殖活动中发挥着重要的作用。孕酮不仅在受孕及维持妊娠中起关键作用,同时也是控制排卵与控制子宫、乳腺发育的主要因素^[3]。孕酮的生理作用是通过孕酮受体(progesterone receptor, PGR)来介导的^[4]。PGR 是甾体激素核受体家族的成员,属于配体活化的转录因子^[5]。PGR 能与特定 DNA 序列结合,抑制或增强基因的表达,从而调节生殖和形态发生等生理过程^[6]。猪的孕酮受体基因位于染色体的 9p13-p11^[7],编码区全长 2 805 bp,含 8 个外显子和 7 个内含子,编码含有 934 个氨基酸的蛋白质序列^[8]。

目前,国内外有关 PGR 基因与猪的繁殖性状之间的关系报道很少,笔者以 PGR 基因作为候选基因,对 2 个引进猪种(长白猪,大白猪)PGR 基因进行遗传变异分析,检测不同基因型在供试猪种群中的分布频率,并结合猪种的繁殖性能记录分析 PGR 基因与繁殖性状的相关性,探讨利用标记辅助选择方法改进猪繁殖性状的可行性,并为之提供技术方法和策略。

1 材料与方法

1.1 材料

供试猪为 184 头母猪,其中大白猪(Large White, LW) 117 头、长白猪(Landrace, LR) 67 头。采用随机抽样的方法,选择有繁殖性状记录的母猪进行活体采样,用耳号钳剪取一小块耳组织,放入装有 70% 乙醇的 Eppendorf 管中, -20℃ 保存,备用。

Taq DNA polymerase、dNTPs 购自上海生工生物工程技术服务有限公司, *Xag* I 购自 MBI Fermentas 公司,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

耳组织样基因组 DNA 的提取采用酚/氯仿抽提法^[7],用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测基因组 DNA 的浓度和纯度,稀释至 100 ng/μL, -20℃ 保存。

1.2.2 PCR-RFLP 分析

1.2.2.1 引物设计

根据猪 PGR 基因序列(登录号为 NM_001166488)设计引物,上游引物(Forward Primer)序列为 5'-CAGCCCTTGGTGCTTGTGG-3',下游引物(Reverse Primer)序列为 5'-CCTTCGGCTCGTCGTCT-3'。扩增区域为外显子 1 部分的序列,序列大小为 701 bp。

1.2.2.2 PCR 扩增

PCR 扩增反应体系为: ddH₂O 16.8 μL, 10× PCR Buffer 2.5 μL, 25 mmol/L Mg²⁺ 1.5 μL, 2 mmol/L dNTPs 0.5 μL, *Taq* DNA Polymerase 0.2 μL, 10 pmol/μL Forward Primer 0.75 μL, 10 pmol/μL Reverse Primer 0.75 μL, 100 ng/μL DNA 模板 2 μL。

PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 4 min; 35 个循环参数为 94℃ 变性 45 s, 59℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s; 最后 72℃, 8 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用 Tanon 凝胶成像系统拍照保存。

1.2.2.3 PCR 产物测序及变异位点分析

经电泳检测扩增片段为目的片段后,将 PCR 扩增产物送上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。用 DNA Star 软件包对测序结果进行分析,寻找变异位点,并确定用于 RFLP 分析的核酸内切酶。

1.2.2.4 PCR 产物的酶切

根据核酸内切酶的使用说明书,用特异的核酸内切酶对 PCR 扩增产物进行酶切,酶切反应体系为: nuclease-free water 18 μL, 10×Buffer R 2 μL, 限制性内切酶 *Xag* I 1 μL, PCR 产物 10 μL。将反应体系置于 37℃ 温浴 10 h,然后 65℃ 温浴 20 min 使酶失活。酶切产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用 Tanon 凝胶成像系统拍照。

1.2.3 统计分析

对 PGR 基因经 PCR-RFLP 分析后的各种基因型进行统计,用 Excel 软件统计基因型频率、基因频率,并作 χ^2 检验;运用 SAS9.13 GLM (general linear model)程序,配合模型($Y = \text{均数} + \text{基因型效应} + \text{品种效应} + \text{残差}$)进行最小二乘分析,比较各基因型猪总产仔数、产活仔数及出生窝重的差异。

2 结果与分析

2.1 PGR 基因 exon 1 PCR 检测结果

PGR 基因 exon 1 的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶

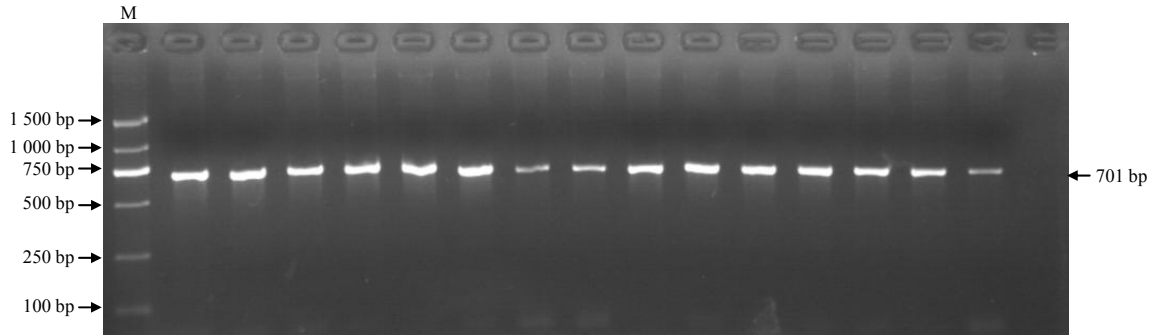


图 1 PGR 基因 exon 1 PCR 扩增检测结果

Fig.1 PCR amplification of exon 1 of PGR gene

2.2 PGR 基因 exon 1 测序结果

PCR 扩增产物经测序后,用 DNASTar 软件包对测序结果进行分析,发现有 1 个变异位点,结果见封三图 2。在 326 位的 G 碱基突变为 A 碱基,经 DNASTar 软件包分析后发现,突变后 318—327 bp 段的序列能被限制性内切酶 *Xag* I (识别序列 5'-CCTNN*NNNAGG 3')识别,可用其进行基因分型。

电泳检测,检测结果见图 1。经 PCR 扩增后得到 1 条 701 bp 的特异性条带,其大小与目的片段大小一致,可将 PCR 产物送至公司测序。

2.3 PGR 基因 exon 1 的 PCR-RFLP 检测结果

PGR 基因 exon 1 PCR 扩增产物经 *Xag* I 酶切后电泳,结果见图 2。酶切产物电泳后得到 3 种带型,其中含有 380 bp 和 321 bp 2 条带的命名为 GG 型,含有 701、380 和 321 bp 3 条带的命名为 AG 型,只有 701 bp 1 条带的命名为 AA 型。

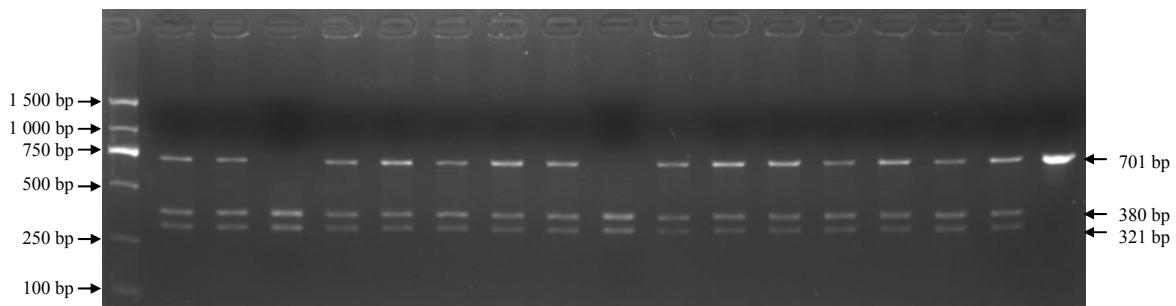


图 2 PGR 基因 exon 1 PCR-RFLP 检测结果

Fig.2 PCR-RFLP of exon 1 of PGR gene

2.4 PGR 基因 exon 1 的 Hardy-Weinberg 平衡检验

通过 PCR-RFLP 分析,检测试验猪 PGR 基因 exon 1 变异位点的基因型,并参照基因频率与基因型

频率的关系: $p=D+H/2$, $q=R+H/2$; 计算出 2 个试验猪种等位基因 A 和等位基因 G 的频率,并对 2 个品种猪群的基因型分布频率进行卡方检验,结果见表 1。

表 1 PGR 基因 exon 1 的 Hardy-Weinberg 平衡检验

Table 1 Hardy-Weinberg Test for exon 1 of PGR gene

猪种	猪数量/头	基因型频率			等位基因频率		χ^2 检验
		GG	AG	AA	G	A	
LR	67	0.029 9(2)	0.970 1(65)	0.000 0(0)	0.514 9	0.485 1	38.4350**
LW	117	0.179 5(21)	0.786 3(92)	0.034 2(4)	0.572 6	0.427 4	25.0542**

$\chi^2_{0.05(2)}=5.991$, $\chi^2_{0.01(2)}=9.210$; **示差异极显著;括号内的数字为个体数。

由表 1 可见,在大白和长白猪中优势等位基因均是 G 基因,2 个品种中的优势基因型均为 AG 型,其次为 GG 型,最末为 AA 型,并且在长白猪中未检测到 AA 型个体。

χ^2 适合性检验结果表明,大白猪和长白猪的 χ^2 值均大于 9.210,差异极显著($P<0.01$),2 个群体均未处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,可能猪场已通过人工选育培育出繁殖性能好的猪群体。

2.5 PGR 基因 exon 1 的多态性分析

通过计算 2 个品种的多态信息含量(PIC)、遗传杂合度(He)、遗传纯合度(Ho)、有效等位基因数(Ne)等衡量群体变异的指标,分析 exon 1 变异位点在 2 个猪群中的多态性程度,结果见表 2。在 2 个猪群中遗传纯合度和遗传杂合度均约为 0.5,属于中等水平;在有效等位基因数方面,长白猪和大白猪的有效等位基因数均很高,分别达 1.998 4 和 1.958 9,说明等位基因在群体中分布很均匀;在多态信息含

量方面,2 个猪群均在 0.25~0.5,属于中度多态,说明该位点在 2 个猪群中存在较大的遗传变异性。

表 2 不同品种 exon 1 的位点多态性

Table 2 Analysis of polymorphism of exon 1 in different breeds

品种	Ho	He	Ne	PIC
LR	0.500 4	0.499 6	1.998 4	0.374 8
LW	0.510 5	0.489 5	1.958 9	0.369 7

2.6 PGR 基因 exon 1 位点与繁殖性状的关联分析

长白猪和大白猪的总产仔数(TNB)、产活仔数(NBA)和出生窝重(BLW)的最小二乘分析结果见表 3。在长白猪中,GG 型猪总产仔数、产活仔数和出生窝重与 AG 型总产仔数、产活仔数和出生窝重的差异没有统计学意义;在大白猪中,AG 型猪的总产仔数与 GG、AA 型的总产仔数差异有统计学意义($P<0.05$),但 GG 型的总产仔数与 AA 型的差异没有统计学意义($P>0.05$);AG 型的产活仔数与 AA 型的产活仔数差异有统计学意义($P<0.05$);AG 型猪的出生窝重与 GG 型的差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 3 长白猪和大白猪的总产仔数、产活仔数和出生窝重

Table 3 TNB, NBA and BLW of Landrace and Large White sows

猪种	基因型	总产仔数/头	产活仔数/头	出生窝重/kg
LR	AA	—	—	—
	AG	10.772 7±0.388 9	10.000 0±0.426 4	12.772 3±0.877 3
	GG	11.000 0±1.824 0	11.000 0±2.000 0	16.200 0±4.114 8
LW	AA	(7.000 0±1.726 2)a	(6.000 0±1.679 9)a	(8.730 0±2.758 6)ab
	AG	(11.700 0±0.272 9)b	(10.425 0±0.265 6)b	(13.217 5±0.436 2)a
	GG	(9.750 0±0.863 1)a	(8.750 0±0.839 9)ab	(10.287 5±1.379 3)b

3 讨论

关于 PGR 基因与繁殖性状的相关性, Yang 等^[9]对 171 头中国荷斯坦奶牛内含子 3 和内含子 4 的 2 个 SNP 位点与超排卵性状之间的相关性进行了研究,认为 PGR 基因可以作为中国荷斯坦奶牛超排卵性状的一个分子标记。Driver 等^[10]对 PGR 基因内含子 3 的一个 SNP 位点的研究认为这一 SNP 位点在受精率和胚胎存活率方面可以用于荷斯坦奶牛的标记辅助选择育种。王凭青等^[11]的研究认为 PGR 基因可能是控制济宁青山羊多羔性的一个主效基

因或是与之存在紧密遗传连锁的一个标记。查丽莎等^[12]对 PGR 基因 217 bp 处的 A/G 突变的研究认为, PGR 基因的 G 等位基因是提高绵羊产羔数的一个潜在有效的 DNA 标记。

本研究结果表明, PGR 基因可以作为猪繁殖性状的一个分子标记。但由于本研究的结果只是在较小的大白猪群体中取得的,还需要扩大群体进一步验证,以确定 PGR 基因能否真正应用于猪繁殖性状的分子标记辅助选择。

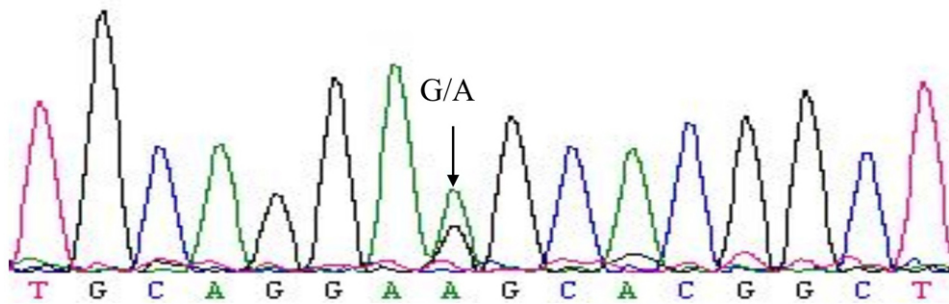
参考文献:

[1] 陈斌,江爱平.大约克夏猪繁殖性状的相关分析[J].畜

- 牧兽医杂志, 1999, 18(2): 3-5.
- [2] 李玉华, 曾勇庆. 猪繁殖性状的遗传改良策略[J]. 动物科学与动物医学, 2003, 20(1): 11-14.
- [3] Arck P, Hansen P J, Mulac Jericevic B, et al. Progesterone during pregnancy: Endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress[J]. Am J Reprod Immunol, 2007, 58(3): 268-279.
- [4] Shang Yong-Feng. Gene regulation by nuclear receptors[J]. Health Science, 2002, 34(5): 440-449.
- [5] Tsai M J, O'Malley B W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members[J]. Annu Rev Biochem, 1994(63): 451-486.
- [6] Kastner P, Krust A, Turcotte B, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B[J]. EMBO J, 1990, 9(5): 1603-1614.
- [7] Hu Z L, Abbott M A, Yerle M, et al. The progesterone receptor (PGR) gene maps to porcine chromosome 9p13-p11 by a rodent-porcine somatic cell hybrid panel[J]. J Anim Sci, 1998, 76(10): 2749-2750.
- [8] Iwai M, Yasuda K, Fukuoka M, et al. Luteinizing hormone induces progesterone receptor gene expression in cultured porcine granulosa cells[J]. Endocrinology, 1991, 129(3): 1621-1627.
- [9] Yang W C, Tang K Q, Li S J, et al. Association analysis between variants in bovine progesterone receptor gene and superovulation traits in Chinese Holstein cows[J]. Reprod Domest Anim, 2011, 46(6): 1029-1034.
- [10] Driver A M, Huang W, Gajic S, et al. Short communication: Effects of the progesterone receptor variants on fertility traits in cattle[J]. J Dairy Sci, 2009, 92(8): 4082-4085.
- [11] 王凭青, 鲁浪, 储明星, 等. 孕酮受体基因多态性及其与济宁青山羊产羔数关系[J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1768-1775.
- [12] 查丽莎, 储明星, 狄冉, 等. 孕酮受体基因多态性及其与小尾寒羊产羔数的关系[J]. 华中农业大学学报, 2011, 35(2): 148-153.

责任编辑: 罗 维

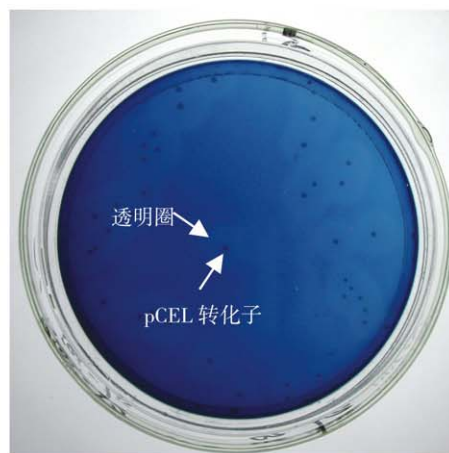
英文编辑: 罗 维



第60页 图2 PGR基因exon1序列分析
Fig.2 on page 60 Sequence analysis of exon1 of PGR gene



第55页 图3 表达淀粉酶的*E. coli* pAMY、*E. coli* pAMY1转化子
Fig.3 on page 55 Transformants *E. coli* pAMY and *E. coli* pAMY1 expressing α -amylase



第55页 图4 表达纤维素酶的*E. coli* pCEL转化子
Fig.4 on page 55 Transformants *E. coli* pCEL expressing cellulase