

### 3 种猪孕酮受体基因(*pgr*)多态性分析

高利华, 马国辅, 陈超, 邢军, 张建生, 吴井生\*

(江苏农林职业技术学院, 江苏 句容 212400)

**摘 要:**采用混合基因组 DNA 池 PCR 扩增和测序技术, 对小梅山猪、枫泾猪、大白猪 *pgr* 基因的外显子区域进行扫描, 共发现 1 个单核苷酸多态性位点(SNP)。外显子 1 序列中 1 319 bp 处发生 C→T 的碱基突变, 即 C1319T, 未引起氨基酸的变化, 属于同义突变; 针对突变位点, 建立错配 PCR-限制性长度多态性(RFLP)方法进行检测, 发现 3 种猪的 *pgr* 基因可以分为 AA、BB、AB 3 个基因型, 小梅山和枫泾猪有 AA、AB 2 种基因型, 大白猪中有 BB、AB 2 种基因型。

**关 键 词:**猪孕酮受体基因(*pgr*); 小梅山猪; 枫泾猪; 大白猪; 多态性

中图分类号: S828.8

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)06-0621-05

### Polymorphism of *pgr* gene in three pig populations

GAO Li-hua, MA Guo-fu, CHEN Chao, XING Jun, ZHANG Jian-sheng, WU Jing-sheng\*

(Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Jurong, Jiangsu 212400, China)

**Abstract:** All exons in progesterone receptor(*pgr*) gene in Xiaomeishan, Fengjing and Large White pig populations were screened using mixed genome DNA pool and direct sequencing methods. The results showed that only one site exhibits nucleotide polymorphism (SNP), which is in exon1 of pig *pgr* gene at 1 319 bp with base mutation from C to T (C1319T). This mutation do not cause the change of amino acid residue, which is a synonymous mutation. Based on this mutation, mismatched PCR-RFLP method was established to analyze polymorphism of *pgr* gene in the above mentioned pig populations. According to PCR-RFLP, three pig populations is divided into AA, AB and BB genotypic types, in which AB types exist in Xiaomeishan and Fengjing pig populations, and BB, AB types in Large White pig population.

**Key words:** pig progesterone receptor gene (*pgr*); Xiaomeishan pig; Fennjing pig; Large White pig; polymorphism

孕酮是一种重要的甾体激素, 在受孕和维持妊娠中起关键作用, 同时也是控制排卵、子宫和乳腺发育的重要因素<sup>[1]</sup>。孕酮的生理作用是通过孕酮受体(progesterone receptor, PGR)介导的<sup>[2]</sup>, 因此, 孕酮的生理效应不仅取决于孕酮本身的分泌和代谢, 还与孕酮受体的表达与功能密切相关。PGR 属于类固醇核受体超家族的成员, 是配体活化的转录因子, 能与 DNA 特定序列结合, 增强或抑制基因表达, 从而调节生殖及形态发生等生理过程<sup>[3]</sup>。PGR 存在 2 种功能不同的野生亚型结构: PGR-A 和 PGR-B。两者为同一基因的编码产物, 由 2 个不同

启动子在不同转录起始位点和起始密码子转录翻译而成<sup>[4]</sup>。对 *pgr* 基因的研究大部分集中在人<sup>[5-9]</sup>和绵羊<sup>[10-11]</sup>上, 关于猪 *pgr* 基因的研究还较少。本试验以小梅山猪、枫泾猪和大白猪为研究对象, 拟根据 *pgr* 基因的多态性对 3 个猪群进行分型, 旨在为进一步研究 *pgr* 不同基因型与 3 种猪繁殖性状的关系, 选择繁殖遗传标记提供参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试猪

106 头小梅山猪与 42 头枫泾猪均来自江苏省小

收稿日期: 2013-03-27

基金项目: 江苏镇江市科技项目(NY2009016); 江苏农林职业技术学院项目(2012[8])

作者简介: 高利华(1966—), 女, 江苏句容人, 副教授, 主要从事兽医临床研究; \*通信作者, wujingsheng2@sohu.com

梅山猪育种中心 ;70 头大白猪来自江苏丹阳荣鑫农牧发展有限公司。用耳号钳采集每头猪的耳样约 0.15 g , -20 ℃保存 , 备用。

1.2 DNA 的提取与处理

用常规的酚氯仿抽提法提取猪基因组 DNA ,对基因组 DNA 进行 OD 值测定 , 计算其浓度。

将单个个体的基因组 DNA 溶液稀释至终浓度为 100 ng/μL , 从所有 DNA 样品中分别取出 5 μL , 混合到一起并混匀 , 即为基因组 DNA 池 , 于 -20 ℃保存 , 备用。

1.3 单核苷酸多态性(SNPs)的筛选

根据 GenBank 中公布的人 *pgr* 基因全序列(登

录号为 AY525610.1)和猪 *pgr* mRNA 序列(登录号为 NM\_001166488.1) , 比对两者的蛋白质序列 , 确定猪 *pgr* 基因外显子区域 , 利用 Primer 5.0 和在线设计软件设计 10 对引物(表 1 , 引物由上海生物工程有限公司合成) 对猪 *pgr* 基因 8 个外显子进行扩增。PCR 扩增反应体系为 20 μL , 包括 10×Buffer 2.0 μL、25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 2.2 μL、10 mmol/L dNTPs 0.8 μL、10 μmol/L 上、下游引物各 1 μL、DNA 池模板 1 μL(100 ng)、5 U/μL *Taq* 酶 0.2 μL、ddH<sub>2</sub>O 11.8 μL。PCR 扩增反应程序 : 94 ℃预变性 5 min ; 31 个循环 (94 ℃变性 1 min , 54 ℃ ~ 61 ℃退火 30 s , 72 ℃延伸 1 min) ; 最后 72 ℃延伸 10 min , 4 ℃保存产物。

表 1 猪 *pgr* 基因引物序列  
Table 1 Primer sequences for pig *pgr* gene

引物	引物序列 5'—3'	NM_001166488.1 中的位置	扩增区域	退火温度/℃	扩增片段长度/bp
PGR-1.1Fp	gactgagctgaaggcaagg	1 031	外显子 1	60	676
PGR-1.1Rp	cteggagtcactcctcctct	1 706			
PGR-1.2Fp	F:agctgctgccctcgactg	575	外显子 1	58	674
PGR-1.2Rp	R:cggaaaaatccgggaagac	1 248			
PGR-1.3Fp	F:gccctgaagatcaaggaaga	1 144	外显子 1	60	488
PGR-1.3Rp	R:ttgagataggcgtgtacacct	1 631			
PGR-2 Fp	F:gattcagaagccagccagag	2 673	外显子 2	54	146
PGR-2 Rp	R:tccattgccttttaagaaga	2 818			
PGR-3 Fp	F:gcacaactacttatgtgtggaa	2 825	外显子 3	61	108
PGR-3 Rp	R:aggaccatgccagcctga	2 932			
PGR-4 Fp	F:tcgaaagttaaaaaagtcaataaagt	2 939	外显子 4	60	300
PGR-4 Rp	R:agtacttagaccacttgactactga	3 238			
PGR-5 Fp	F:ttttcgaaactacatattgatgacc	3 245	外显子 5	60	144
PGR-5 Rp	R:tcatttagtattagatcaggtgcaaa	3 388			
PGR-6 Fp	F:acagcggatgaaggaatcat	3 389	外显子 6	59	109
PGR-6 Rp	R:tttcatacagagaaactcttctgg	3 497			
PGR-7 Fp	F:cctttggaaggactaagaagtca	3 522	外显子 7	62	154
PGR-7 Rp	R:catgcaagttatcaagaagttttgt	3 675			
PGR-8 Fp	F:tgtaacaacttcctctgtactgc	3 680	外显子 8	62	216
PGR-8 Rp	R:tcttgacaaaaacgaaaacaga	3 895			

1.4 PCR 产物单链构象多态性(SSCP)检测

根据 SNPs 的筛选结果 , 针对 SNP 位点重新设计 2 对引物 , 用于 PCR-SSCP 分析。PCR 扩增反应体系和反应程序同上 , 调整退火温度 4 ℃保存产物。

SSCP 检测程序为 : 取 2.5 μL PCR 产物和 7.5 μL 上样缓冲液混匀 , 98 ℃变性 10 min , 然后冰浴 10 min , 产物用 10%聚丙烯酰胺凝胶 120 V 电泳 12 h , 银染 , 拍照保存。选取不同的基因型样品送上海生物工程有限公司测序。

### 1.5 错配 PCR 产物限制性酶切长度多态性(RFLP)检测

根据 *pgr* 的 SNPs, 设计 1 对错配引物, 用于错配 PCR-RFLP, 扩增体系如上所述, 扩增反应程序同上, 改变退火温度。

RFLP 检测程序: 反应体系为 10  $\mu$ L, 包括 2  $\mu$ L PCR 产物、0.2  $\mu$ L 内切酶、1  $\mu$ L 10 $\times$ Buffer、6.8  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。酶切温度 16  $^{\circ}$ C 水浴过夜, RFLP 产物用 10% 聚丙烯酰胺凝胶 120~200 V 电泳 3~4 h, 银染, 拍照保存。

用建立的 PCR-RFLP 方法检测 3 种猪单个个体的 DNA, 对其 *pgr* 进行基因分型, 扩增体系同上, 将模板改为个体 DNA。扩增程序及酶切程序同上。

### 1.6 数据统计分析

应用 Excel 软件分别计算基因型频率、等位基

因频率, 并应用 CHITEST 与 CHIINV 程序分别计算  $P$  值与  $\chi^2$  值, 分析基因位点是否偏离 Hardy-Weinberg 平衡状态。

## 2 结果与分析

### 2.1 *pgr* 基因 SNPs 的筛选结果

从 DNA 混合池扩增 *pgr* 8 个外显子序列, 将产物直接测序, 对序列进行分析。结果发现, 仅在引物 PGR-1.1Fp 和 PGR-1.1Rp 所扩增的片段中存在 1 个 SNP, 即位于外显子 1 的 1319 位点的 C $\rightarrow$ T 的突变(图 1), 此突变未引起氨基酸的变化, 均编码甘氨酸, 属于同义突变。在该基因的其他外显子区域内均未发现任何 SNP 位点。

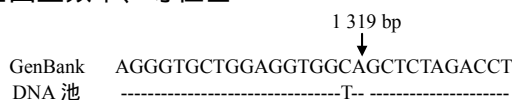


图 1 猪 *pgr* 基因 SNPs 筛选结果

Fig.1 SNP detected in pig *pgr* gene

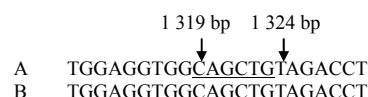
### 2.2 PCR-SSCP 检测结果

对猪 *pgr* 基因外显子 1 中 C1319T, 设计 2 对引物, PGR-1.4-F(5'-ccaggacaggaaccagac-3')和 PGR-1.4-R(5'-aagctcagagccaaacaagc-3')、PGR-1.5-F(5'-ccaggacaggaaccagac-3')和 PGR-1.5-R(5'-aatactccctgggtggaagg-3'), 进行 PCR-SSCP 检测分析。结果发现, 2 对引物扩增区域均未能检测出多态性。可能是由于外显子 1 中 C1319T 均未能导致上述 2 对引物所扩区域分子构象的改变。

### 2.3 错配 PCR-RFLP 检测结果

由于未能通过 PCR-SSCP 技术检测出该突变位点(C1319T), 同时该位点也未能引起酶切位点的改变, 所以采用错配 PCR 方法加以检测, 即在设计引物时人为掺入突变碱基, 从而掺入的碱基与检测的碱基协同作用产生新的酶切位点。根据错配 PCR-RFLP 技术的原理, 应用 DNAMAN 软件分析碱基错配情况, 在错配 1 个碱基的情况下, 发现 *Pvu*II 酶切位点(图 2), 以酶切位点 *Pvu*II 为依据, 在 1324 bp 处错配 1 个碱基 G(C1324G), 设计引物 PGR-1.6-F(5'-acaggaaccagacgggaaga-3')和 PGR-1.6-R(5'-tc

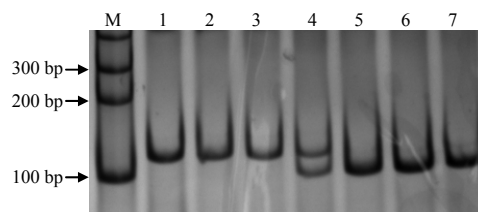
ttttccgagggtctac(g)agc-3'), 进行 PCR 扩增, 扩增产物用 *Pvu*II 酶切进行 RFLP 检测。结果检测出 3 种基因型: AA、BB 和 AB, 检测结果见图 3。测序结果表明, AA 基因型个体在 1319 bp 处碱基为 T(突变型), BB 型为 C(野生型, 图 4), 那么 AB 型 1319 bp 处的碱基则为 T 或 C。



A 为 1319 位点为 C 的序列; B 为 1319 位点为 T 的序列; 下划线表示 *Pvu*II 配识别位点; 1324 位点的 G 为错配碱基。

图 2 错配 PCR-RFLP 产物序列分析

Fig.2 Analysis of restriction locus of mismatched PCR products



M DNA Marker I(购自 SunShineBio); 1~3 基因型 AA; 4 基因型 AB; 5~7 基因型 BB。

图 3 错配 PCR 产物酶切结果

Fig.3 Digestion of products from mismatched PCR

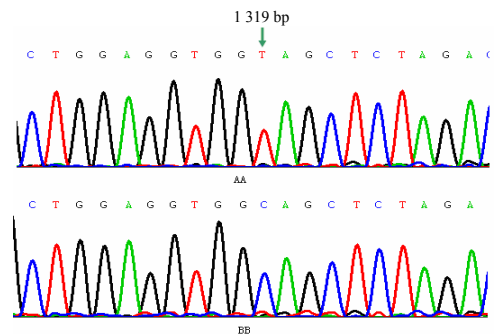


图 4 错配-PCR-RFLP 产物测序结果  
Fig.4 Sequencing results for products of mismatched PCR-RFLP

表 2 3 个猪群 *pgr* 基因的基因型频率与等位基因型频率

Table 2 Allele frequency and genotype frequency of <i>pgr</i> gene in the three pig populations							
猪群	基因型频率			等位基因频率		$\chi^2$ 检验	<i>P</i>
	AA	AB	BB	A	B		
小梅山猪	0.953(101)	0.047(5)	0.000(0)	0.976	0.024	0.062	0.970
枫泾猪	0.952(40)	0.048(2)	0.000(0)	0.976	0.024	0.025	0.988
大白猪	0.000(0)	0.043(3)	0.957(67)	0.021	0.979	0.034	0.983

括号内数字表示猪的头数。

经  $\chi^2$  检验，小梅山猪、枫泾猪和大白猪在 PGR-1.6 位点上均处于哈代-温伯格平衡状态，表明这 3 个猪群 PGR-1.6 位点的基因型频率没有受到选择、突变或迁移的因素的影响。

3 结论与讨论

本试验对基因组 DNA 池扩增测序后，检测出 1 个 SNP(C1319T)，对该位点进行酶切位点分析，未导致任一酶切位点的改变。根据上述结果，设计 2 对引物，采用 PCR-SSCP 技术对该位点进行检测，但未能检测出多态性，故采用错配 PCR-RFLP 技术对其进行检测，PCR 产物酶切后，条带清晰，基因型判型清楚。

Tang 等<sup>[12]</sup>对 132 头鲁西黄牛的 *pgr* 基因进行检测时发现 1 个 SNP(G59752C)。张善文等<sup>[13]</sup>对 76 头长白母猪和 144 头大白母猪的 *pgr* 基因 exon1 进行 PCR-RFLP 检测，结果检测出 1 个 SNP，即 G326A，为错义突变，导致甘氨酸变为丝氨酸。本研究对 106 头小梅山猪、42 头枫泾猪与 70 头大白猪的 *pgr* 基因所有外显子进行基因池测序检测，仅在外显子 1 中检测出 1 个 SNP，即 C1319T，未能引起氨基酸的变化，属于同义突变，与张善文<sup>[13]</sup>、Tang 等<sup>[12]</sup>报道的 *pgr* 基因的 SNP 数量一致，同时该位点

2.4 *pgr* 基因 PGR-1.6 位点的基因型频率与等位基因频率

用在错配 PCR-RFLP 方法对 3 种猪个体进行 *pgr* 多态性检测分型，利用 Excel 软件计算 3 个猪品种 PGR-1.6 位点基因型频率、等位基因频率、 $\chi^2$  和 *P* 值(表 2)。结果显示，3 个猪群中，共检测到 3 种基因型与 2 个等位基因，小梅山猪与枫泾猪中检测到 AA 型和 AB 型，未能检测到 BB 型个体；大白猪中检测到 AB 型和 BB 型，未能检测到 AA 型个体。

C1319T 在 3 个群体中处于基因平衡状态，这可能是由于 *pgr* 基因在猪和牛上属于低丰度基因，在长期的自然选择或人工选择中趋于稳定，或与基因片段扩增的局限性有关，因为在 GenBank 中只有猪 *pgr* 基因 mRNA 序列，通过与 *pgr* 基因全序列的比对，确定猪 *pgr* 基因的外显子区域，并根据外显子区域进行引物设计，所以，猪 *pgr* 基因外显子区域不能被全部扩增，这也一定程度上降低了 SNP 的检测数量。本试验未能检测到张善文<sup>[13]</sup>报道的 G326A 位点，可能跟试验动物的特异性或样本大小有关。另外，该位点上 3 个猪群体间基因频率与基因型频率的差异，即在小梅山猪与枫泾猪中未能检测到 BB 型个体，大白猪中未能检测到 AA 型个体，这可能跟品种起源、选育方向及培育条件等因素有关。

许多研究表明，*pgr* 基因的多态性与繁殖性状有关<sup>[14-17]</sup>，本研究通过构建错配 PCR-RFLP，对小梅山猪、枫泾猪和大白猪的 *pgr* 基因进行了分型，不同基因型与 3 种猪繁殖性状的关系还需进一步分析。

参考文献：

[1] 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.

- [2] Jacobsen B M , Schittone S A , Richer J K , et al . Progesterone-independent effects of human progesterone receptors(PGRs) in estrogen receptor-positive breast cancer : PR isoform-specific gene regulation and tumor biology[J] . *Mol Endocrinol* , 2005 , 19(3) : 574-587 .
- [3] 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 .
- [4] Horwitz K B , Mockus M B , Pike A W , et al . Progesterone receptor replenishment in T47D human breast cancer cells : Roles of protein synthesis and hormone metabolism[J] . *J Biol Chem* , 1983 , 258(12) : 7603-7610 .
- [5] Romano A , Delvoux B , Fischer D C , et al . The PROGINS polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone[J] . *J Mol Endocrinol* , 2007 , 38(1/2) : 331-350 .
- [6] Johnatty S E , Spurdle A B , Beesley J , et al . Progesterone receptor polymorphisms and risk of breast cancer : Results from two Australian breast cancer studies[J] . *Breast Cancer Res Treat* , 2008 , 109(1) : 91-99 .
- [7] Su M T , Lee I W , Chen Y C , et al . Association of progesterone receptor polymorphism with idiopathic recurrent pregnancy loss in Taiwanese Han population[J] . *Assist Reprod Genet* , 2011 , 28(3) : 239-243 .
- [8] Romano A , Lindsey P J , Fischer D C , et al . Two functionally relevant polymorphisms in the human progesterone receptor gene(+331 G/A and progins) and the predisposition for breast and/or ovarian cancer[J] . *Gynecol Oncol* , 2006 , 101(2) : 287-295 .
- [9] Schweikert A , Rau T , Berkholz A , et al . Association of progesterone receptor polymorphism with recurrent abortions[J] . *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* , 2004 , 113(1) : 67-72 .
- [10] 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 .
- [11] 张利平 . BMPR-IB 基因和 PGR 基因作为小尾寒羊多胎候选基因的研究[D] . 兰州 : 甘肃农业大学动物科学技术学院 , 2005 .
- [12] Tang K Q , Yang W C , Pai B , et al . Effects of PGR and ESRa genotypes on the pregnancy rates after embryo transfer in Luxi cattle[J] . *Mol Biol Rep* , 2013 , 40(1) : 579-584 .
- [13] 张善文 , 陈斌 . 猪孕酮受体基因的遗传变异及其与繁殖性状的相关性研究[J] . *湖南农业大学学报 : 自然科学版* , 2013 , 39(1) : 58-62 .
- [14] De Vivo I , Hankinson S E , Colditz G A , et al . A functional polymorphism in the progesterone receptor gene is associated with an increase in breast cancer risk[J] . *Cancer Res* , 2003 , 63(17) : 5236-5238 .
- [15] De Vivo I , Hankinson S E , Colditz G A , et al . The progesterone receptor Val660→Leu polymorphism and breast cancer risk[J] . *Breast Cancer Res Treat* , 2004 , 6(6) : 636-639 .
- [16] Karadeniz M , Erdogan M , Berdeli A , et al . The progesterone receptor PROGINS polymorphism is not related to oxidative stress factors in women with polycystic ovary syndrome[J] . *Cardiovasc Diabetol* , 2007 , 10(6) : 29 .
- [17] Yu K D , Chen A X , Shao Z M . No association between a progesterone receptor gene promoter polymorphism (+331G>A) and breast cancer risk in Caucasian women : Evidence from a literature-based meta-analysis[J] . *Breast Cancer Res Treat* , 2010 , 122(3) : 853-858 .

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维