

陆川猪 Leptin 基因的 SNP 检测及其 与部分生产性状的关联分析

张 冰¹, 孙 超^{1*}, 黄敏瑞², 孙俊丽²

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100; 2. 广西畜牧研究所, 南宁 530001)

摘 要: 以 82 头陆川猪为材料, 根据猪 Leptin 基因序列设计一对引物, 采用 PCR-SSCP 技术进行单核苷酸多态性(SNP)检测, 发现一个 SNP 位点, 并对该位点的 3 种基因型与陆川猪部分生产性状进行相关性分析。结果表明: CC 型个体的断奶重和平均日增重显著高于 TT 型和 CT 型($P < 0.05$)。由此初步推断 Leptin 基因可能是影响陆川猪生产性状的候选基因之一或与主基因相连锁, 可以用该位点对陆川猪生产性状进行标记辅助选择。

关键词: Leptin; 陆川猪; 单核苷酸多态性; 生产性状

中图分类号: S828

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2007)05-0026-04

SNP Detection in Luchuan Pig Leptin Gene and Its Associations with Partial Production Traits

ZHANG Bing¹, SUN Chao^{1*}, HUANG Min-rui² and SUN Jun-li²

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China;

2. Guangxi Institute of Animal Science, Nanning 530001, China)

Abstract: One pair of primer was designed according to porcine Leptin gene sequence and PCR-SSCP was carried out in a number of 82 Luchuan Pigs. We found a single nucleotide polymorphism (SNP) site within the product amplified. We analyzed the relationship between the three genotypes on the SNP site and the partial production traits in Luchuan pig. Results indicated that genotype CC had significant higher weaning weight and average daily gain than genotype TT and CT ($P < 0.05$). It could be inferred that the Leptin gene may be one of candidate genes or linked to the major genes affecting the production traits in Luchuan pig. The polymorphic site could be used to marker assisted selection program for production traits in Luchuan pig.

Key words: Leptin; Luchuan pig; SNP; Production trait

瘦素 (Leptin) 是一种主要由脂肪细胞分泌的蛋白质类激素, 是 Leptin 基因的蛋白产物, 主要参与采食量、体重、繁育和机体能量平衡的调控^[1]。Guay 等^[2]研究发现, 怀孕母猪背部脂肪组织中 Leptin mRNA 水平与背膘厚呈正相关。McNeel 等^[3]研究表明, 肥胖猪脂肪组织中 Leptin mRNA 水平显著高于瘦型猪的。Barb 等^[4]将猪

的重组瘦素注入猪体后, 猪的采食量下降, 生长激素分泌增加。以上研究结果表明, Leptin 基因有可能作为猪主要经济生产性状 (如采食量、膘厚、生长速度等) 的分子标记。

陆川猪具有肉嫩味美、皮薄肉香、抗逆性强、耐粗饲、体小早熟等诸多优点, 是广西优良的地方品种, 2000 年被农业部列入国家级畜禽品种资源

收稿日期: 2007-01-31 修回日期: 2007-04-05

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30471267), 教育部重点项目 (No. 105167) 和西北农林科技大学青年学术骨干支持计划资助。

作者简介: 张 冰 (1979—), 男, 河南鲁山人, 硕士, 主要从事生物技术与家畜育种研究。

* 通讯作者: 孙 超 (1968—), 博士, 副教授, 主要从事生物技术与家畜育种。Tel: 029-87082424, E-mail: schao@nw-suaaf.edu.cn

保护名录^[5]。然而,有关陆川猪 Leptin 基因的分子标记及其与生产性状的相关分析尚未见报道。本研究以陆川猪为试验材料,采用单链构象多态(single strand conformation polymorphism, SSCP)方法对 Leptin 基因进行单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)检测,并对其 SSCP 多态性与部分生产性状进行相关分析,旨在寻找与生产性状相关的遗传标记,为陆川猪高生产性能的标记辅助选择提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从广西畜牧研究所陆川猪保种场随机抽取陆川猪纯种公猪 82 头,这些猪的出生日期相近(相差 1 周左右),饲喂的营养水平和饲养管理条件一致。采取耳组织块 0.5~1 g,放置于装有 70%酒精的离心管中,−70℃ 保存备用。

1.2 基因组 DNA 的抽提

参考《分子克隆实验指南》的酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA^[6]。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

根据 GenBank 数据库中已登录的猪 Leptin 基因序列(U66254),设计扩增产物为 279bp (3249 ~ 3527) 的一对引物,上游为:5'-TCGGGCCTAGATAGGATTG-3',下游为:5'-GAAGGCAGACTGGTGAGGA-3'。引物由上海生物工程有限公司合成。

PCR 反应体系为:10×PCR buffer 2.5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.6 μL,基因组 DNA 100 ng, Taq Plus 酶 1U,加双蒸水至 25 μL。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,54.3℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 35 s,32 个循环;72℃ 终延伸 10 min,4℃ 保存。产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 SSCP 分析

取 5 μL PCR 产物和 5 μL 的上样缓冲液(98% 去离子甲酰胺、10 mmol/L EDTA (pH 8.0)、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯青、3% 甘油)置于 PCR 管中,离心混匀,98℃ 变性 10 min,迅速插入冰中,放置 8 min,使之保持变性状态。样品在 14% 非变性聚丙烯酰胺(丙烯酰胺:N',N-亚甲基双丙烯酰胺=29:1)凝胶中电泳,230V 高压预电泳 10 min 后换成 110V 恒压电泳,约

11h 后进行银染显带,然后在凝胶成像系统中拍照并分析。

1.5 克隆测序

根据 SSCP 分型结果,将不同基因型纯合个体的 PCR 扩增产物用 H. Q. & Q 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化,回收后的 DNA 片段与 pMD-18T 载体连接,转化感受态大肠杆菌 DH5α;挑选经过 X-gal 筛选的白斑,用菌落 PCR 扩增鉴定阳性克隆;然后用 H. Q. & Q 质粒微量提取试剂盒抽提质粒 DNA(碱裂解法),每个样本挑选 4 个克隆送上海生物工程有限公司测序。

1.6 统计分析

采用初生重(birth weight, WB)、30 日龄断奶重(weaning weight, WW)和平均日增重(average daily gain, ADG) 3 种指标描述陆川猪的生产性状,根据固定效应模型,分析不同基因型与生产性状的关联性。统计分析模型为: $y_{ijk} = \mu + HYS_i + G_j + e_{ijk}$ 。其中: y_{ijk} 为生产性状(初生重、断奶重或平均日增重)的记录值, μ 为群体平均值, HYS_i 为第 i 个场年季的固定效应, G_j 为 Leptin 基因突变位点的基因型效应, e_{ijk} 为随机残差效应。运用 SPSS 统计软件对数据进行分析。

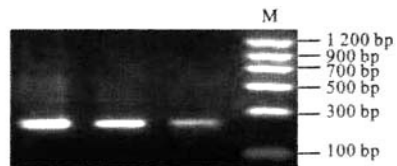


图 1 Leptin 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 Banding patterns of PCR amplification of Leptin gene

1, 3, 4, 6, 8, 10: CC 型; 7: TT 型; 2, 5, 9: CT 型
1, 3, 4, 6, 8, 10: genotype CC; 7: genotype TT; 2, 5, 9: genotype CT

图 2 Leptin 基因的 SSCP 分析

Fig. 2 SSCP analysis of for Leptin gene

2 结果与分析

2.1 PCR-SSCP 检测结果与分析

PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测有较好的效果,得到一条 279 bp 的特异性条带,且没

有非特异性扩增带(图 1),可直接用于 PCR-SSCP 分析。对扩增的 PCR 产物进行 SSCP 分析,发现扩增片段存在 3 种基因型,分别定义为 CC、TT 和 CT(图 2)。

统计不同的基因型,并计算基因型频率与基因频率(表 1)。由表 1 可见,各基因型在陆川猪

群体中呈偏态分布,CC 型占绝对优势,TT 型最少,使得 C 等位基因的分布频率远远高于 T 等位基因的分布频率。进行卡方适合性检验, $\chi^2 = 0.984 < \chi^2_{0.05(1)}, P > 0.05$,表明 Leptin 基因在此位点的基因频率处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

表 1 陆川猪 Leptin 基因的等位基因频率和基因型频率

Table 1 Gene frequency and genotype frequency of Leptin gene in Luchuan pig

品种 Breed	数量 No.	基因频率 Gene frequency		基因型频率 Genotype frequency		
		C	T	CC	CT	TT
陆川猪 Luchuan Pig	82	0.8171	0.1829	0.6829(56)	0.2683(22)	0.0488(4)

注:括号内的数字表示不同基因型的个体数。
Note: The numbers in the brackets are the genotype individuals.

2.2 测序结果与分析

为了确定突变位点在序列中的位置,将不同纯合基因型个体的 PCR 产物进行克隆测序,并将测序结果与猪 Leptin 基因 DNA 序列(GenBank 登录号为 u66254)进行比较。结果发现,TT 型

与 GenBank 中的序列相同,而 CC 型在第 3469 碱基处(按照 GenBank 中的序列所在的位置)发生了一个由 T→C 的转换(图 3),这个突变是同义突变。

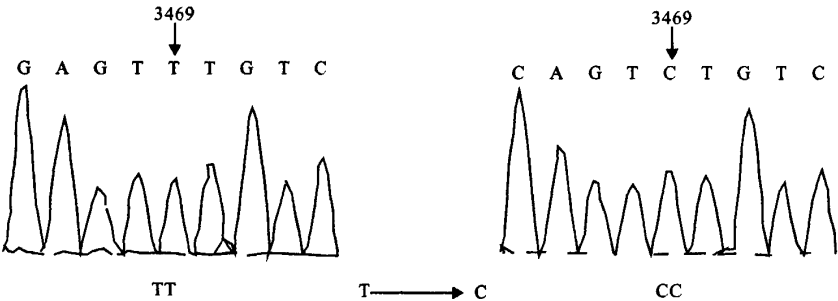


图 3 Leptin 基因 TT 和 CC 基因型的序列比较

Fig. 3 Sequence comparison of genotypes TT and CC of Leptin gene

表 2 Leptin 基因 T3469C 点突变对陆川猪部分生产性状的基因型效应(最小二乘均数±标准误)

Table 2 Effects of T3469C point mutation of Leptin gene on the partial production traits in Luchuan pig (LSM±S. E.)

基因型 Genotypes	数量 No.	初生重/kg WB	断奶重/kg WW	平均日增重/g ADG
CC	56	0.60±0.11	6.01±0.11a	180.27±3.55a
CT	22	0.59±0.14	5.50±0.16b	163.89±5.15b
TT	4	0.55±0.27	5.19±0.19b	154.75±6.74b

注:同列中 a, b 表示差异显著($P < 0.05$)。
Note: a, b represent significant difference ($P < 0.05$) within a column.

2.3 Leptin 基因 T3469C SNP 与生产性状的相关性分析

对 T3469C SNP 与陆川猪部分生产性状进行相关性分析,初生重、断奶重和平均日增重的基因型效应的最小二乘均数见表 2。由表 2 可知:T3469C SNP 对断奶重和平均日增重影响显著

($P < 0.05$),CC 型仔猪比 TT 型仔猪分别多 0.82 kg 和 25.52 g,比 CT 型也分别多产约 0.51kg 和 16.38g;对初生重影响不显著,但也呈现 CC > CT > TT 的趋势。

3 讨论与结论

Jeffrey MF 等^[7]研究发现,Leptin 在调节机体脂肪和维持体重方面具有重要作用,能够降低食欲,控制体重,减少体内脂肪含量。据报道,Leptin 基因的多态性与人的病态肥胖显著相关^[8],与肉牛的胴体脂肪含量显著相关^[9]。对猪的研究发现,Leptin 基因多态性与杜洛克、汉普夏、长白和大白猪的膘厚显著相关^[10],与长白猪的采食量和生长速度显著相关^[11]。Chen 等^[12]研究发现,在杜洛克、约克夏和长白猪上 Leptin 基因多态性对膘厚的影响不显著。尽管以上研究结

果存在不一致,但可以肯定的是,Leptin 基因对猪主要经济生产性状(如采食量、膘厚、生长速度等)是有影响的。

本研究根据 Bidwell 等^[13]发表的猪 Leptin 基因 DNA 序列设计一对引物,用 PCR-SSCP 方法在扩增片段上发现了一个单碱基突变位点。对 Leptin 基因 T3469C SNP 与陆川猪的初生重、断奶重和平均日增重进行关联分析,结果表明: T3469C SNP 对断奶重和平均日增重影响显著($P < 0.05$),对初生重影响不显著($P > 0.05$)。Chen 等^[12]研究发现, T3469C SNP 对长白猪的平均日增重影响显著($P < 0.05$),对杜洛克和约克夏的平均日增重影响不显著($P > 0.05$)。Leptin 基因 T3469C SNP 对不同品种猪的平均日增重影响不同,原因可能是各个品种猪的遗传背景不同。

本研究表明,Leptin 基因 3469 位点各基因型在陆川猪群体中呈偏态分布,等位基因分布频率相差明显。影响等位基因频率的因素主要有选择、突变、随机遗传漂变和系祖基因频率;如果没有选择,等位基因频率和群体有效含量主要取决于随机遗传漂变^[14]。卡方适合性检验结果表明,在陆川猪上 Leptin 基因在此位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,该基因在育种过程中没有受到选择作用。随机遗传漂变是否是影响陆川猪 Leptin 基因 3469 位点基因频率和基因型频率分布的主要原因还有待于进一步的研究。

本研究证实,Leptin 基因 3469 位点多态性与陆川猪的断奶重和平均日增重呈显著相关($P < 0.05$)。由此初步推断 Leptin 基因可能是影响陆川猪生产性状的候选基因之一或与主基因相连锁,可以用该位点对陆川猪生产性状进行标记辅助选择。但由于本研究样本含量不是很大,因此还需扩大样本含量对 Leptin 基因 3469 位点多态性与陆川猪生产性状间的相关性做进一步的验证。

参考文献:

- [1] Liefers S C, Pas M F, Veerkamp P F, *et al.* Associations between Leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers[J]. *Journal of Dairy Science*, 2002, 85:1633~1638.
- [2] Guay F, Palin M F, Matte J J, *et al.* Effects of breed, parity, and folic acid supplement on the expression of letin and its receptors' genes in embryonic and endometrial tissues from pigs at day 25 of gestation [J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 65:921~927.
- [3] McNeel R L, Ding S T, Smith E O, *et al.* Effect of feed restriction in adipose tissue transcript concentrations in genetically lean and obese pigs[J]. *Journal of Animal Science*, 2000, 78:934~942.
- [4] Barb C R, Yan X, Azain M J, *et al.* Recombinant porcine Leptin reduces feed intake and stimulates growth hormone secretion in swine [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 1998, 15:77~86.
- [5] 谢栋光,丘立天. 陆川猪保种选育报告[J]. 广西畜牧兽医, 2003, 19(2):76~78.
- [6] J 萨姆布鲁克, DW 拉塞尔著,黄培堂等译. 分子克隆实验指南(第三版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002. 479~485.
- [7] Jeffrey M F, Jeffrey L H. Leptin and the regulation of body weight in mammals [J]. *Nature*, 1998, 395:763~770.
- [8] Ohshiro Y, Ueda K, Nishi M, *et al.* A polymorphic marker in the Leptin gene associated with Japanese morbid obesity [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2000, 78:516~520.
- [9] Buchanan F C, Fitzsimmons C J, Van Kessel A G, *et al.* Association of missense mutation in the bovine Leptin gene with carcass fat content and Leptin mRNA levels [J]. *Genetics, Selection, Evolution*, 1996, 34:105~116.
- [10] Jiang Zhi-hua, Gibson J P. Genetic polymorphisms in the Leptin gene and their association with fatness in four pig breeds [J]. *Mammalian Genome*, 1999, 10 (2): 191~193.
- [11] Kennes Y M, Murphy B D, Pothier F, *et al.* Characterization of swine Leptin (LEP) polymorphisms and their association with production traits [J]. *Animal Genetics*, 2001, 32: 215~218.
- [12] Chen C C, Chang T, Su H Y. Genetic polymorphisms in porcine Leptin gene and their association with reproduction and production traits [J]. *Australian Journal of Agricultural Research*, 2004, 55:699~704.
- [13] Bidwell C A, Ji S, Frank G R, *et al.* Cloning and Expression of the Porcine Obese Gene [J]. *Animal Biotechnology*, 1997, 8 (2):191~206.
- [14] Linville R C, Pomp D, Johnson R K, *et al.* Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine [J]. *Journal of Animal Science*, 2001, 79:60~67.

作者: 张冰, 孙超, 黄敏瑞, 孙俊丽, ZHANG Bing, SUN Chao, HUANG Min-rui, SUN Jun-li
作者单位: 张冰, 孙超, ZHANG Bing, SUN Chao(西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌, 712100), 黄敏瑞, 孙俊丽, HUANG Min-rui, SUN Jun-li(广西畜牧研究所, 南宁, 530001)
刊名: 西北农业学报 ISTIC PKU
英文刊名: ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OccIDENTALIS SINICA
年, 卷(期): 2007, 16(5)
被引用次数: 1次

参考文献(14条)

1. Liefers S C; Pas M F; Veerkamp P F Associations between Leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers 2002
2. Guay F; Palin M F; Matte J J Effects of breed, parity, and folio acid supplement on the expression of letin and its receptors' genes in embryonic and endometrial tissues from pigs at day 25 of gestation 2001
3. cNeel R L; Ding S T; Smith E O Effect of feed restriction in adipose tissue transcript concentrations in genetically lean and obese pigs 2000
4. Barb C R; Yan X; Azain M J Recombinant porcine Leptin reduces feed intake and stimulates growth hormone secretion in swine 1998
5. 谢栋光, 丘立天 陆川猪保种选育报告[期刊论文]-广西畜牧兽医 2003(2)
6. J萨姆布鲁克; DW拉塞尔; 黄培堂 分子克隆实验指南 2002
7. Jeffrey M F; Jeffrey L H Leptin and the regulation of body weight in mammals 1998
8. Ohshiro Y; Ueda K; Nishi M A polymorphic marker in the Leptin gene associated with Japanese morbid obesity 2000
9. Buchanan F C; Fitzsimmons C J; Van Kessel A G Association of missense mutation in the bovine Leptin gene with carcass fat content and Leptin mRNA levels 1996
10. Jiang Zhi-hua; Gibson J P Genetic polymorphisms in the Leptin gene and their association with fatness in four pig breeds 1999(02)
11. Kennes Y M; Murphy B D; Pothier F Characterization of swine Leptin (LEP) polymorphisms and their association with production traits 2001
12. Chen C C; Chang T; Su H Y Genetic polymorphisms in porcine Leptin gene and their association with reproduction and production traits 2004
13. Bidwell C A; Ji S; Frank G R Cloning and Expression of the Porcine Obese Gene 1997(02)
14. Linville R C; Pomp D; Johnson R K Candidate gene analysis for loci affecting liter size and ovulation rate in swine 2001

引证文献(1条)

1. 赵婷, 朱滕义, 刘齐元, 张美良, 蒋海燕 烟草线粒体基因atp6的SNP及其与CMS的相关性[期刊论文]-作物学报 2009(09)

引用本文格式：[张冰](#). [孙超](#). [黄敏瑞](#). [孙俊丽](#). [ZHANG Bing](#). [SUN Chao](#). [HUANG Min-rui](#). [SUN Jun-li](#) [陆川猪Leptin基因的SNP检测及其与部分生产性状的关联分析](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2007(5)