

不同品种猪解耦联蛋白基因 3' 调控区的遗传变异

方美英^① 赵兴波^{①*} 李 宁^② 吴常信^①

(^①中国农业大学动物科学技术学院, 北京 100094; ^②中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094.

* 联系人, E-mail: zhxb@cau.edu.cn)

摘要 对猪 *UCP3* 基因 3'调控区进行了克隆测序, 通过序列比对分析发现长白猪、内江猪、民猪和二花脸猪存在 15 个碱基位点的多态, 利用 PCR-RFLP 分析长白猪、大白猪、内江猪、民猪、二花脸猪及梅山猪存在连续的 9 个多态位点, 经 χ^2 检验发现二花脸猪与长白猪、大白猪、内江猪和民猪差异极显著, 与梅山猪差异显著, 梅山猪与长白猪、民猪差异显著, 提示太湖猪具有独特的种质特性。

关键词 猪 解耦联蛋白基因 克隆 PCR-RFLP

随着我国人民生活水平的不断提高, 人们对猪肉的要求已从对数量的增长转移到品质和风味的提高, 因此研究肉质和风味性状的遗传机制是现今畜牧学、食品科学乃至生命科学研究的一个热点问题^[1~4]。解耦联蛋白(uncoupling protein, UCP) 基因参与机体能量代谢, 对机体能量平衡涉及的体重(肥胖)、静止代谢率和食物转化效率等性状具有显著的效应, 是新近发现的影响肌肉生长和品质的重要功能基因^[5]。因此, 近年来解耦联蛋白基因为众多遗传学家和营养学家所关注。猪的 *UCP3* 基因定位在 9p21~p24^[6], 与 *UCP2* 紧密连锁, 但比 *UCP2* 表达更广泛^[7]。目前已证实猪 *UCP3* 具有显著的影响肌肉和脂肪能量转化的基因效应^[8], 但不同品种间是否存在基因序列的差异目前尚不清楚。本文通过 *UCP3* 基因的 3'调控区序列的测定和 PCR-RFLP 分析, 探究 *UCP3* 基因在猪的不同能量代谢类型中的表现形式及其遗传特征。

1 材料与方法

(i) 实验动物。长白猪、大白猪、梅山猪、二花脸猪、内江猪和民猪 DNA 样品为本实验室保存, 每个品种随机抽取 13~25 头个体进行检测。

(ii) 引物序列与 PCR 反应。依据已报道的人 *UCP3* 基因序列设计引物, 扩增片段为 *UCP3* 的 3'调控区, 第 1 对引物序列为: pUCP33-utrF 5'- AGGAC-ACGTTTCGTGTGGCACTGA-3', pUCP33-utrR 5'-GCCCTGGTTCCTTTGGTCTGA-3', 扩增片段大小为 691 bp; 第 2 对引物序列为: pUCP332-utrF 5'-CCT-TCAGGACACGTTTCGTGT-3', pUCP33-utrR 5'-GC-CCCTGGTTCCTTTGGTCTGA-3'; 扩增片段大小为

696 bp。扩增条件如下: 94℃, 5 min 后进行 30 个循环的 94℃, 50 s, 60℃, 50 s, 72℃, 50 s, 最后, 反应于 72℃ 延伸 7 min。

(iii) PCR 产物的纯化。以 Geneclean 试剂盒 (Biolab LTD)回收纯化扩增产物。

(iv) PCR 扩增产物的序列测定。纯化的 PCR 产物与 T 载体连接转化 DH5 α 菌株, 用博大科技公司的 Dye primer 测序试剂盒进行 DNA 测序。

(v) PCR-RFLP 分析。在 10 μ L PCR 产物中加入 0.5 U 限制性内切酶 *Ava* I, 1.5 μ L 10 $\times$ 酶切缓冲液, 37℃温育 4 h, 依片段大小酶切产物采用琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

2 实验结果和讨论

2.1 *UCP3* 基因非编码区 PCR 扩增结果

比较人的已知序列(GenBank: AF050113)和猪的 cDNA 文库(EMBL: AF095744)设计引物对猪的 *UCP3* 基因进行扩增, 经反复实验, 筛选出一对在实验猪种中都能取得理想扩增结果的引物(第 2 对引物), 扩增片段为 696 bp(图 1)。

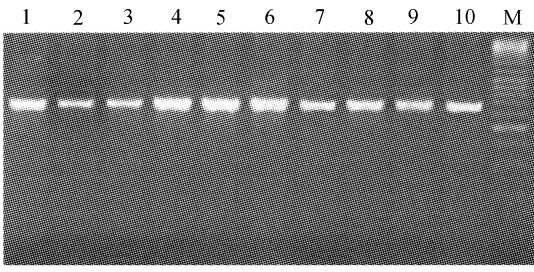


图 1 猪 *UCP3* 基因 3'调控区 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

1~10 示 PCR 扩增产物, 扩增片段为 696 bp; M 示 1 kb 标准分子

2.2 UCP3 基因 3'调控区的序列分析

对长白猪、内江猪、民猪和二花脸猪 UCP3 基因 3'调控区扩增片段克隆测序, 测序结果如图 2 所示.

经序列分析软件 DNAMAN 分析, 发现所测序列与人的相应序列同源性为 67%. 通过对不同品种猪的序列比对发现存在 15 个位点的多态(表 1).

第 1 对引物在大白猪和长白猪中都得到很好的扩增, 但梅山猪、二花脸猪、内江猪和民猪扩增效率很低, 几乎没有扩增产物. 针对中国地方猪种使用第 1 对引物扩增结果不理想的情况, 通过引物向前平移(向 5'端)重新设计了正向引物, 结果使中国猪种扩增效果明显提高, 同时在国外猪种中扩增效果也很理想. 根据克隆测序结果, 发现中国地方猪种在第 1 对引物的正向引物 3'端最后一个碱基为 C(即图 2 中的第 28 位碱基), 而大白和长白猪为碱基 A, 由此导致了第 1 对引物在 4 个中国地方品种中扩增的低效.

碱基 427, 429 ~ 436 为连续的 9 个多态位点, 构成了一个碱基变异区, 经序列分析发现可通过限制性内切酶 *Ava* I 对这一碱基变异区进行基因分型.

2.3 6 个猪种 UCP3 基因 3' 调控区 *Ava* I PCR-RFLP 分析

采用限制性内切酶 *Ava* I 对猪的 UCP3 基因 3'调控区 PCR 产物进行消化. 在 6 个猪种中共出现 3 种基因型, 酶切片段为 AA 型: 263/433 bp; AB 型: 696/433/263 bp; BB 型: 696 bp (图 3).

PCR-RFLP 基因型结果表明: 长白猪、大白猪、内江猪、民猪及梅山猪中 A 基因均为优势基因, 民猪中基因 B 的频率为零. 只有二花脸猪的基因频率分布较为独特, 与其他猪种差异较大. 经 χ^2 检验发现: 二花脸猪与长白猪、大白猪、内江猪和民猪达极显著差异水平, 与梅山猪间达差异显著水平; 梅山猪与长白猪、民猪差异显著(表 2).

UCP3 基因是目前发现的 UCP 基因家族中分布最为广泛、表达最重要的一个^[9]. 本研究发现不同猪种间存在 UCP3 基因频率的差异可能和猪种的进化和形成有关, 代表了 UCP3 基因在不同品种中的特征表现. 二花脸猪和梅山猪虽然同为太湖猪, 具有高繁殖性能、生活力强和肉质好的特点, 但二者也存在进化和生产性能的差别, 二花脸猪具有世界最高的产仔数记录, 梅山猪其次^[10]. 因此, UCP3 基因的差异

```
1  CCTTCAGGAC ACGTTCGTGT GGCAC TGACA AGATGCTCAA TAAATTATAT TAATTTGTGA
61  AACCCACTAG GATGGATGCC TAACATTTAG GCAAAAGAAG ATAAACCAGA ATGGATCCAT
121 ATGGATAAAA CAGACGTTTG CAAACTTCCG TCCCCTGGAA AACGATCAGG TGTCAACAGA
181 TAAGGCTGCA AGCCTGGGAC AGGATTGAGA CTCGATACAC TTGGAAATCA GCCGAGTCTA
241 GAGGGGCACT GCCAAAGCCA CACAAGGCTT TCAACGGCAG CCTTCGGCTA CCCACGGATC
301 ACCAGCCACA TTTGCCATGT GTCTGCCTGG TAGAACCAC CAGGATTCGG GGATTCGGGA
361 AAAGAAAAAG AGCAAAGCCA GCTCCTGTGA CAAAGGAGCC CTGCTGGGCC GGCTGGGGCT
421 GAGGCCGGGA TGCTCGGGAG ACCCGGAGGG TCAGGAGGGC GGGCTCGGCC TCCTCTCCCG
481 TAAATGGGA GCACAAAGCC CTCTCTCCTA CCTCCCTGG GGTGTACGA GGATCAAGCG
541 AGAAGCTGGG CAAGGAGGCG CTTTATAAAA GCTCCATGAA ATGTGTATAT AAGGACGAGG
601 CCTTGGGAAT GTTTTCGTCC GTCAGTGAGG CAGTGCCGGG GAAGAAGCTT TAGAAAGACA
661 CAGATGTCCA GAGGTCAGAC CAAAGGAACC AGGGGC
```

图 2 猪 UCP3 基因 3'调控区序列

图中所示为长白猪的序列, 碱基 6 ~ 28(下画线)为引物 pUCP33-utrF, 碱基 1 ~ 20 为引物 pUCP32-utrF (黑体), 碱基 675 ~ 696 为引物 pUCP33-utrR (黑体)

表 1 不同品种猪 UCP3 基因 3'调控区多态位点

猪种	多态位点														
	28	37	40	215	317	427	429	430	431	432	433	434	435	436	449
二花脸猪	C	A	A	G	C	A	A	T	G	C	T	C	G	C	A
长白猪	A	T	A	G	A	G	G	A	T	G	C	T	C	G	G
民猪	C	A	A	A	C	G	A	T	G	C	T	C	G	G	A
内江猪	C	T	C	G	A	G	G	A	T	G	C	T	C	G	G

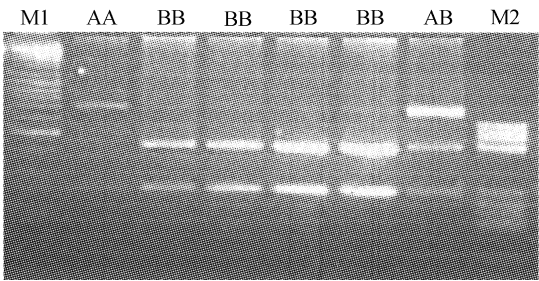


图 3 猪 *UCP3* 基因的非编码区 *Ava* I 酶切结果
M1 示 1 kb 标准分子, M2 示 pBR322/*Msp* I

表 2 6 个猪种 *UCP3* 基因 3'调控区 *Ava* I 的
PCR-RFLP 基因频率

猪种	头数	基因型分布			基因频率	
		AA	AB	BB	A	B
长白猪	30	29	1	0	0.983	0.017
大白猪	35	34	1	0	0.986	0.014
二花脸猪	33	8	18	7	0.515	0.485
梅山猪	33	26	4	3	0.848	0.152
民猪	20	20	0	0	1.000	0.000
内江猪	30	26	3	1	0.917	0.083

是否是梅山猪和二花脸猪的特征尚需在更广泛的猪品种中得到验证.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 30000119)和国家高技术研究发展计划(批准号: 2001AA213121)资助项目.

参 考 文 献

1 Patrick S. Skeletal muscle uncoupling protein 3 (UCP3):

mitochondrial uncoupling protein in search of a function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2002, 5: 265~270

2 Bell M E, Bhargava A, Soriano L, et al. Sucrose intake and corticosterone interact with cold to modulate ingestive behaviour, energy balance, autonomic outflow and neuroendocrine responses during chronic stress. *J Neuroendocrinol*, 2002, 14(4): 330~342

3 McDaneld T G, Nielsen M K, Miner J L. Uncoupling proteins and energy expenditure in mice divergently selected for heat loss. *J Anim Sci*, 2002, 80(3):602~608

4 李丽春, 田维熙. 脂肪酸合成酶抑制剂与减肥研究的新进展. *科学通报*, 2001, 46(20): 1673~1675

5 Enerback S, Jacobsson A, Simpson E M, et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*, 1997, 387: 90~94

6 Werner P, Neuenschwander S, Stranzinger G. Characterization of the porcine uncoupling proteins 2 and 3 (*UCP2* & *UCP3*) and their localization to chromosome 9p by somatic cell hybrids. *Anim Genet*, 1999, 30(3): 221~224

7 Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett*, 1997, 408(1): 39~42

8 Knoll A, Putnova L, Dvorak J, et al. Linkage mapping of an *Ava* I PCR-RFLP within the porcine uncoupling protein 3 (*UCP3*) gene. *Anim Genet*, 2000, 31(2): 156~157

9 赵兴波, 李宁, 吴常信. 线粒体解耦联蛋白(uncoupling protein, UCP)与体内供热. *中国科学基金*, 2000, 14(5): 261~264

10 太湖猪育种委员会. 中国太湖猪, 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 15

(2002-01-08 收稿, 2002-04-27 收修改稿)