

猪雌激素受体基因 *Pvu* II 多态性与产仔数性状的关系

柳淑芳^{1,2}, 杜立新¹, 闫艳春²

(1. 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018; 2. 山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018)

摘要: 雌激素受体(estrogen receptor, ESR)能调控雌激素的合成, 影响繁殖功能。将 ESR 基因作为控制猪产仔数的候选基因, 分析其 *Pvu* II 多态性与高产猪种莱芜猪和国外引进猪种长白猪产仔数的关系。序列分析发现, PCR 扩增区 56bp 的 *Pvu* II 酶切片段位于 RFLP 分析获得的 3.7kb 正向序列的起始部分。因 ESR 基因在高产仔数的莱芜猪中的 *Pvu* II 多态性分布不能证实 B 基因为优势基因, 故推测 3.7kb 条带对该猪种产仔数可能不起决定作用。

关键词: 猪; 雌激素受体; *Pvu* II 多态性; 产仔数

中图分类号: Q434

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2002)03-0267-04

Relationship between *Pvu* II Polymorphisms at Estrogen Receptor Gene and Litter Size in Swine

LIU Shu-fang^{1,2}, DU Li-xin¹, YAN Yan-chun²

(1. College of Animal Science and Technology of Shandong Agriculture University, Tai'an 271018, China;

2. College of Life Science of Shandong Agriculture University, Tai'an 271018, China)

Abstract: Estrogen receptor (ESR) can regulate the synthesis of oestrogen and affect the reproduction of swine. The relationship between *Pvu*II polymorphisms at estrogen receptor gene and litter size was analyzed in Laiwu breed and Landrace breed by candidate gene method. The results were shown that 56bp of *Pvu*II polymorphisms was the same as the beginning sequence of 3.7kb of RFLP. The distribution of *Pvu*II polymorphisms also could not prove that B gene was a superior gene, and there was no decisive effect of 3.7kb band on litter size in pigs.

Key words: pig; ESR; *Pvu*II polymorphisms; litter size

雌激素受体(ESR)是类固醇受体家族的重要成员。类固醇激素及其受体在繁殖中起重要作用。雌激素与妊娠密切相关,其功能受到 ESR 的调控,此蛋白变异会导致自然流产和人类乳腺癌。最近的研究表明,带有无功能 ESR 基因的转基因小鼠的生殖系统有明显的表型变化。1987 年, Castagnoli 报道了人的 ESR 基因座的 *Pvu* II 多态性^[1], 1991 年, Rothschild 等报道了猪 ESR 基因座的 *Pvu* II 多态

性^[2]。接着, 1994 年 Rothschild 等利用人 ESR 的 1.8kb cDNA 为探针对含有 50% 中国梅山猪血缘的合成系进行 RFLP 分析, 发现其中一种基因型可以显著增加 1.5 头总产仔数/胎和 1.0 头产活仔数/胎, 其显性程度分别为 1.31 和 0.43, 反映出基因作用基本上是显性模式^[3]。1996 年, Rothschild 研究组又将高产仔数的梅山猪所特有的 3.7kb 条带的基因称作 B 基因, 而相对的低产仔数品种含有的

收稿日期: 2001-10-17; 修回日期: 2002-01-14

作者简介: 柳淑芳(1975-), 女, 在读博士生, 专业方向: 生物化学与分子生物学

通信作者: 杜立新(1956-), 男, 教授, 博士生导师, 现从事动物遗传育种与生物技术方面的研究。Tel: 0538-8242641, E-mail: lxdu@sdau.edu.cn

4. 3kb 条带的基因命名为 A 基因, 并将产数基因的主基因定位在梅山猪 3.7kb RFLP 片段上^[4]。但肖璐等(1997 年)研究发现, 低产仔数的大约克亦具有 3.7kb 特异带, 二花脸和梅山猪具有 2.5kb 和 3.7kb 带, 推测 3.7kb 条带对产仔数可能不起决定作用, 而 2.5kb 的片段才是产仔数主基因或与产仔基因相连锁^[5]。2000 年, 李凤娥等利用 PCR 技术, 检测了不同品种猪的 ESR 基因 PCR-RFLP, 结果表明品种间基因频率差异极显著($P < 0.01$)^[6]。为了进一步验证 3.7kb 带与产仔数的关系, 本文将 ESR 基因座作为控制产仔数的候选基因, 以产仔数仅次于太湖猪的高产猪种莱芜猪和国外引进猪种长白猪为材料进行 *Pvu* II 多态性分析。

1 材料与 方法

1.1 试验动物

莱芜猪(58 头)样品采自山东莱芜雪野种猪场, 长白猪(39 头)样品采自山东济宁种猪场。本研究记录的产仔数性状包括总产仔数(total number born, TNB)和产活仔数(number born alive, NBA), 其中总产仔数按活仔数加死胎记, 但不包括木乃伊胎儿数。

1.2 引物设计

参考文献[4]。引物由上海生物工程公司合成。引物 I: 5' CCTGTTTTTACAGTGA CTTTTACAGAG 3'; 引物 II: 5' CACTTCGAGGGTCAG TC-CAATTAG 3'。

1.3 PCR 仪及反应条件

PCR 仪为 MJResearch USA, 反应总体积为 25 μ l。10 \times 缓冲液成分为: 100mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 500mmol/L KCl, 10mmol/L MgCl₂, 0.1% 明胶, dNTP 终浓度为 200 μ mol/L, 引物终浓度为 1.0 μ mol/L。1IU *Taq* DNA 聚合酶。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 热变性 2min, 然后 95 $^{\circ}$ C 40s, 58 $^{\circ}$ C 复性 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 保温 7min。

1.4 数据处理

数据分析软件为 SAS(6.12 版本)。

所构建的用来分析产仔数性状 TNB 和 NBA 的统计模型包括固定效应: 胎次效应、ESR 基因各基因型效应; 随机效应: 随机残差效应。

$Y = \text{均数} + \text{基因型效应} + \text{胎次效应} + \text{场年季效应} + \text{残差效应}$

加性效应 $a = (BB - AA) / 2$

显性效应 $d = AB - (AA + BB) / 2$

显性度 $D = d/a$

2 结 果

2.1 ESR 基因的 PCR 扩增及 *Pvu* II 酶切

用引物 I、II 对猪基因组 DNA 进行 PCR 扩增得到长为 121bp 的条带。*Pvu* II 限制性内切酶消化后, 3.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果有 3 种: 只有 121bp 条带(AA); 有 56bp 和 65bp 条带(BB); 有 121bp, 56bp 和 65bp 条带(AB), 见图 1。

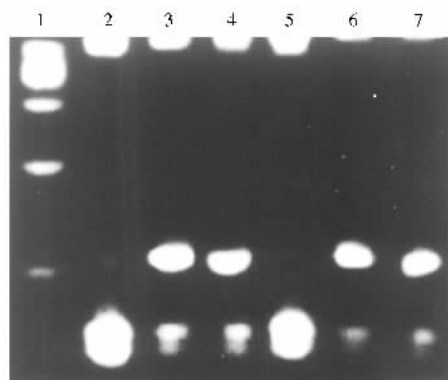


图 1 不同猪种中 ESR 基因 PCR 扩增图谱

Fig. 1 Electrophoresis pattern of PCR amplification of ESR gene in different pig breeds

(1: Marker; 2, 5, 6, 7: AB)

检测结果显示, 在莱芜猪和长白猪群体中, ESR 基因呈现极度的偏态分布, 均未检测到 BB 基因型的个体。不同品种猪 ESR 基因多态性分布见表 1。

表 1 ESR 基因在几个猪品种内的多态性分布

Table 1 Polymorphism of ESR gene in different pig breeds

猪种	基因型分布			总 计	基因频率		基因型频率		
	AA	AB	BB		A	B	AA	AB	BB
莱芜猪	36	22	0	58	0.8103	0.1897	0.6207	0.3793	0
长白猪	33	6	0	39	0.9231	0.0769	0.8462	0.1538	0

2.2 重组克隆的鉴定

根据 ESR 基因 PCR 扩增产物经 *Pvu* II 限制性内切酶消化的结果, 回收 PCR 扩增得到的 A 基因和 B 基因, 分别与 pGEM-T Easy 质粒载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞。挑选在含有 Amp、X-gal、IPTG 的 LB 平板上呈白色的转化菌落, 提取质粒 pESR-A 和 pESR-B, 以此为模板进行 PCR 扩

增,结果均扩增出 121bp 的特异带。

进一步选用 pGEM-T Easy 载体上的双酶切位点(*Eco*RI 限制性内切酶)分别消化转化质粒 pESR-AA 和 pESR-BB,1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,发现切下一个 3.0kb 左右的大片段(大小与 pGEM-T Easy 分子质量相当)和一个 140bp 左右

的小片段。酶切分析结果表明,重组质粒中插入了 121bp 左右的 *ESR* 基因 DNA 片段。

2.3 重组克隆插入片段的序列测定

测序结果表明该序列发生了两个点突变 A54→C, T57→C, 突变后得到 *Pvu* II 酶切位点(CAG↓CTG)(图 2)。

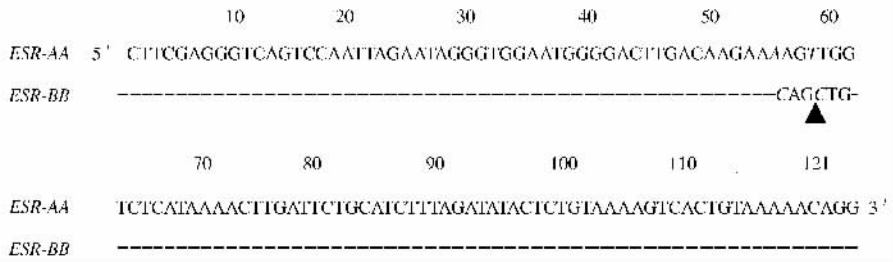


图 2 *ESR* 基因座 A 基因和 B 基因的序列比较

Fig. 2 Sequence analysis of gene A and B on *ESR* locus

2.4 *ESR* 基因与产仔数的关系

本研究中所检测的莱芜猪、长白猪群体, *ESR* 基因座位表现出极端的偏态分布。在莱芜猪、长白猪样本中均未检测到 *ESR* 基因的 BB 基因型, 因此难以直接计算出 AA 基因型和 BB 基因型在总产仔数和产活仔数上的差异。假设显性度为 0.50, 根据表 1 中的统计结果进行估计, *ESR* 基因对于初产和经产的莱芜猪, AA 基因型母猪的总产仔数和产活

仔数略高于 BB 基因型母猪, 但差异不显著($P > 0.05$)。在长白猪群体中, *ESR* 基因对于长白猪的第 1 胎产仔数, BB 基因型比 AA 基因型母猪总产仔数和产活仔数的差异分别为 2.73 ($P < 0.01$) 和 2.43 ($P < 0.01$)。对于经产长白猪, BB 基因型比 AA 基因型母猪总产仔数和产活仔数的差异分别为 2.35 ($P < 0.01$) 和 1.61 ($P < 0.01$)。统计结果见表 2。

表 2 *ESR* 基因对猪产仔数性状的影响

Table 2 Affect on the reproduction of pigs by *ESR* gene

猪种	基因型	初产					经产				
		N	TNB	SD	NBA	SD	N	TNB	SD	NBA	SD
长白猪	AA	24	10.75	2.09	9.58	1.95	54	12.44	3.48	11.19	2.79
	AB	5	12.80	2.17	11.50	3.34	8	14.20	2.16	12.4	1.67
莱芜猪	AA	18	9.67	1.91	9.00	1.85	47	12.26	2.43	10.72	2.05
	AB	14	8.87	2.31	8.21	2.46	37	11.65	1.75	10.40	1.90

(N 为总记录数, TNB 为总产仔数, NBA 为产活仔数, SD 为标准差)

3 讨 论

ESR 基因由于发生点突变(A→C, T→C)而产生了 *Pvu* II 酶切位点(CAG↓CTG)。Rothschild 等用 *Pvu* II 限制性内切酶消化基因组 DNA, 然后与含有人 1.3kb *ESR* 基因 cDNA 的探针杂交, 得到 3.7kb 或 4.3kb 特异带型^[4]。可能这一段序列为未知序列或者考虑到该序列的商业价值受专利保护, 因而, 在 GenBank 中无此序列的有关报道, 目前对猪 *ESR* 基因的全序列亦不知道。1999 年, 陈克飞对 3.7kb 的带

进行了测序^[7]。利用 DNA Star 软件对本试验的测序结果和 3.7kb 特异性 RFLP 片段阳性克隆的正向序列进行比较分析, 发现 PCR 扩增区 56bp 的 *Pvu* II 酶切片段位于 3.7kb 正向序列的起始部分(图 3)。

Rothschild 等将产仔数基因的主基因定位在梅山猪 3.7kb RFLP 片段上^[4], 而李宁研究组以 *ESR* 基因为产仔数主效基因的候选基因, 用人 *ESR* 基因的 1.8kb 的 cDNA 为探针, 对不同品种猪的 DNA 进行了 *Pvu* II 酶切的 RFLP 多态性分析时发现, 低产仔数的大约克也具有 3.7kb 特异带, 二花脸和梅

山猪具有 2.5kb 和 3.7kb 带,这说明 3.7kb 条带对产仔数可能不起决定作用^[5],所以李宁研究组认为

2.5kb 的片段才是产仔数主基因或与产仔基因相连锁。

3.7kb 带:

CTGTTCTTGTC AAGTCCCCATTCCACCCCTATTCTAATTGGACTGACCCTCGAAGTGTTC.....

56bp 带:

CTGTTCTTGTC AAGTCCCCATTCCACCCCTATTCTAATTGGACTGACCCTCGAAGTG

图 3 PCR 扩增区序列与 3.7kb 正向序列同源性比较

Fig. 3 Homology Comparison between 3.7 kb sequence and sequence amplified by PCR

虽然在中国梅山猪和约克夏猪种群,雌激素受体被确定为影响猪产仔数主效基因或与影响猪产仔数的主基因相连锁的分子标记,但是这一结果未能通过采用梅山和大白猪杂交进行的 QTL 步查得到验证^[6],这个基因座在不同种群中控制产仔数的效应也并不一致,且这个优良的等位基因没有在其他国外猪种中发现^[9]。

本研究中,在所检测的莱芜猪和长白猪群体内,ESR 基因呈现极度的偏态分布,均未检测到 BB 基因型的个体。通过估算,ESR 基因对于初产和经产的莱芜猪,AA 基因型母猪的总产仔数和产活仔数略高于 BB 基因型母猪,但差异不显著($P > 0.05$)。在长白猪群体中,经产长白猪 BB 基因型与 AA 基因型总产仔数和产活仔数的差异分别为 2.35($P < 0.01$)和 1.61($P < 0.01$)。

将本试验的测序结果和 3.7kb 特异性 RFLP 片段阳性克隆的正向序列相比较,发现 PCR 扩增区 *Pvu* II 酶切后得到的 56bp 片段位于 3.7kb 正向序列的起始部分。如果 3.7kb 条带与产仔数效应无关,则该基因座的 *Pvu* II 多态性对产仔数没有实际意义。且本研究中,ESR 基因在高产仔数的莱芜猪中的多态性分布亦不能证实 B 基因为优势基因,故推测 3.7kb 条带对该猪种产仔数可能不起决定作用。但 2.5kb 带是否是理想的高产仔基因的遗传标记还有待于进一步研究。

目前,在 ESR 基因的研究中,尚不知 ESR 基因到底是猪产仔数的一个数量性状位点或仅仅是一个与之存在紧密连锁的标记基因。ESR 在控制产仔数方面的真正功能还不清楚。有人提出一种假设,认为 ESR 可能影响胚胎的存活,这还需要进一步的研究来证实。

4 小 结

猪 ESR 基因的 121bp PCR 扩增区存在 *Pvu* II

酶切多态性,且 56bp 的 *Pvu* II 酶切片段位于 RFLP 分析获得的 3.7kb 正向序列的起始部分。由于对高产仔数莱芜猪 ESR 基因 121bp 条带与产仔数效应关系的研究中,未发现显著性差异,且 ESR 基因在的莱芜猪和长白猪中的 *Pvu* II 多态性分布亦不能证实 B 基因为优势基因,故推测 3.7kb 条带对该猪种产仔数可能不起决定作用,所以目前尚不能确定究竟 3.7kb 条带还是 2.5kb 条带与产仔数效应有关。

参 考 文 献 (References):

- [1] Castagnoli A, Maestri I, Bernardi F, et al. *Pvu* II RFLP inside the human estrogen receptor gene [J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 26; 15(2): 866.
- [2] Rothschild M F, Larson R G, Jacobson C, et al. *Pvu* II polymorphisms at the porcine oestrogen receptor locus (ESR)[J]. *Anim Genet*, 1991, 22(5): 448.
- [3] Rothschild M F. Analysis of RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) on estrogen receptor in pigs[A]. *Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*[C]. 1994, 21: 225~228.
- [4] Rothschild M F, Jacobson C, Vaske D, et al. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(1): 201~205.
- [5] 肖 璐, 李 宁, 陈永福, 等. 猪雌激素受体 (ESR) 基因座 RFLP 的分析[J]. *遗传*, 1997, 19(Suppl): 32~34.
- [6] 李凤娥, 熊远著, 邓昌彦, 等. 猪品种间 ESR 基因 PCR-RFLP 的初步研究[J]. *华中农业大学学报*, 2000, 19(1): 37~39.
- [7] 陈克飞. 猪雌激素受体 (ESR) 一卵泡刺激素 (FSHB) 单倍型对产仔数性状的影响的研究[D]. 硕士学位论文, 江西农业大学, 1999, 44~49.
- [8] Rothschild M F. Identification of quantitative trait loci and interesting candidate genes in the pig[A]. *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production* [C]. 1998, 26: 403~409.
- [9] Short T H, Rothschild M F, Southwood O I, et al. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines[J]. *J Anim Sci*, 1997, 75: 3183~3192.