

猪 *HNF-4 α* 基因多态性与肌纤维组织学特性 及生长性状的相关性分析

祝继原¹, 刘 娣^{1,2}, 王嘉博¹, 俄广鑫¹, 杨少成¹, 郭全和¹

(¹东北农业大学动物科技学院, 哈尔滨 150030;

²黑龙江省农业科学院畜牧研究所, 哈尔滨 150086)

摘要:肝细胞核因子-4 α (*HNF-4 α*)是肝细胞核因子(hepatocyte nuclear factor, *HNF*)家族成员之一,可在肝脏内高表达,该家族基因对肝细胞的分化调控起关键作用,同时参与肝脏糖、脂代谢相关基因特异性表达的调控。*HNF-4 α* 基因参与调节生命代谢活动的诸多方面,并且对动物生长发育过程起着重要作用。此研究采用PCR-SSCP的方法分析*HNF-4 α* 基因单核苷酸多态性与生长性状的相关性。结果发现SH1多态位点的BB基因型对法系长白猪个体的出生体长的效应值最大。SH2多态位点的AB基因型对法系长白猪个体的初生重的效应值最大。同时,该位点与大民猪肌纤维组织学特性也存在显著相关。AB型个体的肌纤维直径和肌纤维横截面积显著低于AA和BB型($P<0.05$)。

关键词:猪;肝细胞核因子-4 α ;PCR-SSCP;肌纤维

中图分类号:S813.3

文献标志码:B

论文编号:2010-1717

Studies on Polymorphisms of *HNF-4 α* Gene and their Relationships with Muscle Fiber and Growth Traits of Pigs

Zhu Jiyuan¹, Liu Di^{1,2}, Wang Jiabo¹, E Guangxin¹, Yang Shaocheng¹, Guo Quanhe¹

(¹Animal Science College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030;

²Livestock Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: Hepatocyte nuclear factor-4 α (*HNF-4 α*) is a member of the hepatocyte nuclear factor family, which can be highly expressed in the liver. The family of genes regulating the differentiation of liver cells played a key role, while involved in liver glucose and lipid metabolism in the regulation of specific gene expression. *HNF-4 α* gene involved in regulating many aspects of life and metabolic activity in animals played an important role in growth and development. In this study, PCR-SSCP method to analyze the *HNF-4 α* gene single nucleotide polymorphisms associated with growth traits. The results showed that polymorphisms of SH1 BB genotype individuals for French Landrace effect of birth length was the highest. SH2 polymorphic loci on the legal systems of AB genotype in Landrace the effect of individual birth weight of the maximum value. At the same time, the site with a large public histological properties of porcine muscle fiber there were significant correlation. AB-type individual muscle fiber diameter and muscle fiber cross-sectional area were significantly lower than AA and BB type ($P<0.05$).

Key words: pig; hepatocyte nuclear factor-4 α ; PCR-SSCP; muscle fiber

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划重点项目“畜禽特色优异基因资源挖掘与种质创新”(2008BADB2B02)。

第一作者简介:祝继原,男,黑龙江人,硕士,主要从事动物遗传育种与繁殖的分子生物学研究。通信地址:150086 黑龙江省哈尔滨市学府路290号五栋六单元402, E-mail: zhujiyuan2008@163.com。

通讯作者:刘娣,女,1963年生,吉林省人,教授,博士生导师,黑龙江省农科院副院长,研究方向:猪遗传繁育及家畜生物技术。通信地址:150086 黑龙江省哈尔滨市学府路368号, Tel: 0451-86677458, E-mail: liudi1963@163.com。

收稿日期:2010-06-04, 修回日期:2010-07-24。

0 引言

畜禽肉品是人类营养物质的重要来源,消费者对肉品的需求逐渐由数量向质量转变。因此,改善肉质、生产优质肉就成为现代畜禽育种工作的主要任务之一^[1]。利用分子生物学方法,筛选影响生长和肉质的主效基因和遗传标记是解决此问题的重要途径。对 *HNF-4 α* 基因功能和作用机理的进一步研究能够深入了解猪生长和肉质的遗传机理,有助于在养猪生产中提高饲料转化率,改善肉质,提高胴体质量,对畜牧业来说具有非常重要的经济意义。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

PCR-SSCP用组织样:法系长白猪120头和大民猪(大白×民猪)30头耳组织样,均采自黑龙江省农科院畜牧研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 性状测定方法 准确记录120头法系长白猪初生重、断奶重、出生体长、出生体高和出生胸围。另外,将30头在相同的饲养管理条件下,按正常营养标准饲养,生长至3月龄左右时的大民猪采用颈动脉放血法

致死,从左半侧胴体的第9~11肋骨处的背最长肌中部的横断面上取长、宽、高分别为6.0、2.0、2.0 cm的肌肉组织块一块(切面与肌纤维走向垂直)^[2]。取下后的肉样放入事先准备好的4%甲醛溶液中固定保存^[3]。将福尔马林溶液固定的猪背最长肌样品修块后经常规脱水浸蜡、石蜡包埋、切片机8 μm 厚度连续切片、60℃烤片8 h至干燥常温保存。切片采用常规HE染色,显微镜观察拍片^[4]。将制作完成的石蜡切片在显微镜下观察,并将图像输入计算机用Motic Images Plus 2.0软件进行分析测量。将每个石蜡切片随机观察3个视野,在选择视野时,避开较大的肌束膜,然后将3个视野的各个性状的测量值求其平均值为每头猪的最后性状测定值^[5]。

1.2.2 基因组DNA的提取和纯度测定 参照《现代分子生物学实验技术》^[6]提取猪基因组DNA。用分光光度计测定OD值,根据 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 判断DNA纯度,并稀释至50 mg/L。

1.2.3 引物设计与PCR扩增 *HNF-4 α* 基因PCR-SSCP分析所用引物的设计根据*HNF-4 α* 基因DNA序列(GenBank No. DQ450900),设计2对引物。引物序列见表1。

表1 引物序列

引物名称	引物序列	扩增长度/bp	扩增区域	退火温度/℃
SH1	F: 5'- AATCCTCATCCTGGCACTGC -3'	238	intron2	56
	R: 5'- GCGGTCGTTGATGTAATCCT -3'			
SH2	F: 5'- ATCAAGAGGCTGCGTTCC -3'	236	exon8	53
	R: 5'- CAGCAGGTTGCAATCTTGG -3'			

PCR扩增体系由1.50 μL 10×PCR Buffer、0.45 μL Forward Primer (5 pmol/ μL)、0.45 μL Reverse Primer (5 pmol/ μL)、1.50 μL DNA、0.10 μL rTaq (5 U/ μL)、9.90 μL ddH₂O组成,共15 μL ^[7]。

1.2.4 PCR-SSCP法检测单核苷酸多态性 用引物对法系长白猪和大民猪2个品种共150个个体基因组DNA进行PCR扩增,对扩增产物进行非变性聚丙烯酰胺电泳,其条件为取2 μL PCR产物置于PCR管中加8 μL 变性Buffer,混匀,98℃变性10 min,迅速插入冰中,使之保持变性状态。18%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。高压250 V预电泳5 min,然后5 V/cm,电泳14~16 h后,银染显色^[8]。

1.3 统计分析

猪群各基因型的频率及基因频率的计算方法参见文献^[9]。将基因型与各个性状指标进行最小二乘分析(JMP7.0)。用于分析的统计模型为: $Y = \mu + G + e$ (Y 为性

状的表型值, μ 为群体均值, G 为基因型固定效应, e 为剩余效应)。采用Motic Images Plus 2.0软件对HE染色拍照结果进行肌纤维密度、肌纤维横截面积和肌纤维直径统计。

2 结果与分析

2.1 PCR与PCR-SSCP检测结果

SH1与SH2的PCR扩增结果见图1。发现每对引物的扩增片段与目的片段大小一致,且目的条带清晰,特异性好,可直接用于SSCP分析。PCR-SSCP检测结果见图2和图3。

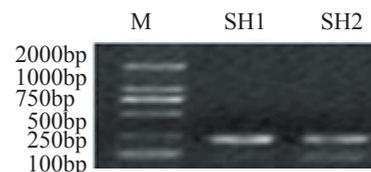


图1 SH1、SH2引物扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测

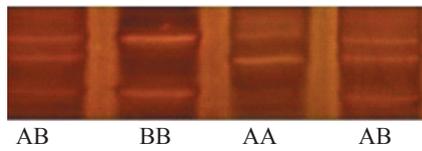


图2 SH1引物对不同个体的SSCP检测结果

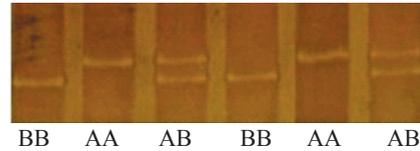


图3 SH2引物对不同个体的SSCP检测结果

对2对引物的扩增产物进行SSCP分析,结果2对引物的扩增产物SSCP分析均表现出3种基因型(图2、3),2种纯合型(AA、BB)和1种杂合型(AB)。

将检测到的纯合子基因型(AA和BB)个体的扩增产物送上海英俊生物技术公司进行测序,引物SH1扩增片段测序比对后发现一个SNP,在intron2的第4244碱基处,AA(C)→BB(T)。引物SH2扩增片段测序比对后发现2个SNP,在exon8第101978位点AA

(T)→BB(C)的突变并没有引起氨基酸序列的改变,属于同义突变,第102001位点的多态性AA(A)→BB(G),引起氨基酸G→E的改变,属于错义突变。

2.2 基因型频率和多态信息含量

SH1和SH2位点的基因型频率和多态信息含量见表2。从表2可见,SH1和SH2位点均为中度多态位点,并且SH1位点法系长白猪与大民猪的等位基因频率存在显著差异。

表2 猪 *HNF-4α* 基因不同位点的统计参数值

引物	品种	数目	基因型频率			等位基因频率		杂合度	PIC
			AA	AB	BB	A	B		
SH1	法系长白猪	120	0.500 (60)	0.217(26)	0.283(34)	0.608	0.392	0.477	0.363
	大民猪	30	0.133 (4)	0.233(7)	0.633(19)	0.25	0.75	0.375	0.304
SH2	法系长白猪	120	0.367 (44)	0.225(27)	0.408(49)	0.479	0.521	0.499	0.374
	大民猪	30	0.433 (13)	0.267(8)	0.300(9)	0.567	0.433	0.491	0.370

注:括号内为实际检出个体数。

2.3 背最长肌肌纤维染色结果

大民猪的背最长肌肌纤维染色结果见图4,伊红

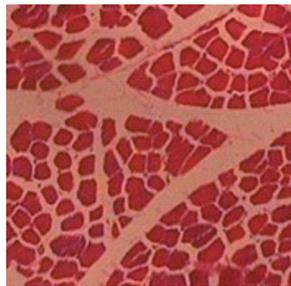


图4 背最长肌肌纤维横切面石蜡切片染色结果观察图(10×)

将肌纤维细胞质染成桃红色。

2.4 不同基因型与法系长白猪生长性状的相关分析

将 *HNF-4α* 基因 SH1、SH2 多态位点产生的3种不同基因型与法系长白猪群体的初生重、断奶重、出生体高、出生体长和出生胸围等性状进行最小二乘分析。结果表明,SH1多态位点基因型对法系长白猪群体的初生重、断奶重、出生体高和出生胸围均无显著影响 ($P>0.05$),对出生体长有极显著影响 ($P<0.01$);SH2多态位点基因型对群体的断奶重、出生体长、出生体高和出生胸围无显著影响 ($P>0.05$),对初生重有显著影响 ($P<0.05$)(表3)。

表3 *HNF-4α* 基因不同位点的基因型对性状的影响

位点	基因型	个体数	初生重/kg	出生体长/cm
SH1	AA	60	1.30±0.03	21.74±0.34 ^{ab}
	BB	34	1.29±0.04	23.25±0.33 ^a
	AB	26	1.31±0.03	22.99±0.43 ^a
SH2	AA	44	1.34±0.04 ^{ab}	21.94±0.24
	BB	49	1.27±0.05 ^a	22.24±0.36
	AB	27	1.48±0.06 ^b	22.16±0.45

注:均值比较时,同一列无相同字母者表示差异显著(a-b $P<0.05$; A-B $P<0.01$)。

表4 *HNF-4 α* 基因不同位点的基因型对性状的影响

位点	基因型	个体数	肌纤维直径/ μm	肌纤维横截面积/ μm^2
SH2	AA	13	3.12 \pm 0.18 ^a	7.04 \pm 0.47 ^A
	BB	9	2.78 \pm 0.21 ^{ab}	6.18 \pm 0.56 ^{AB}
	AB	8	2.32 \pm 0.23 ^b	4.78 \pm 0.59 ^B

注:均值比较时,同一列无相同字母者表示差异显著(a-b P <0.05; A-B P <0.01)。

2.5 不同基因型与大民猪肌纤维组织学特性的相关性分析

将*HNF-4 α* 基因SH1、SH2多态位点产生的3种不同基因型与大民猪群体的肌纤维直径、密度和横截面积等性状进行最小二乘分析,结果见表4。由表4可见,SH1多态位点基因型对大民猪群体的肌纤维直径、密度和横截面积均无显著影响(P >0.05);SH2多态位点基因型对群体的肌纤维直径和肌纤维横截面积有显著影响(P <0.05),该位点对群体的肌纤维密度无显著影响(P >0.05)。

3 讨论

3.1 *HNF-4 α* 基因的多态性与法系长白猪生长性状的相关性分析

对*HNF-4 α* 基因SH1多态位点的3种基因型个体的出生体长进行多重比较,结果表明,BB基因型对法系长白猪个体的出生体长极显著高于AA基因型个体(P <0.01)。BB基因型对个体的出生体长的最小二乘均值最大,证明该基因型在该位点对个体的出生体长的效应值最大。由于该突变位点位于内含子上,从生物信息学的角度分析,内含子不参与基因蛋白质编码,也就不会明显的改变该基因的生物学功能^[10]。但在国内外诸多文献上都有结果表明内含子上的突变与相关的性状有关,例如,崔天益^[11]采用PCR-RFLP技术发现早衰蛋白-1基因内含子多态性与Alzheimer病有关,方华^[12]发现猪POU1F1第一内含子单核苷酸多态性和生长性状相关。但对内含子的工作机理尚不清楚,为了确定此位点可否用作此性状遗传改良的分子标记,需进一步在今后的研究中进一步证实。

SH2多态位点基因型对群体的断奶重、出生体长、出生体高和出生胸围无显著影响(P >0.05),对初生重有显著影响(P <0.05)。对*HNF-4 α* 基因SH2多态位点的3种基因型个体的初生重进行多重比较,结果表明,AB基因型个体的初生重显著高于BB基因型个体(P <0.05),AA基因型个体与BB和AB基因型个体差异不显著(P >0.05)。AB基因型对个体的初生重的最小二乘均值最大,证明该基因型在该位点对个体的初生重的效应值最大。长期实践证明,仔猪初生重至关重要,

它是提高其成活率、断奶重和育成率的关键,故也会严重影响猪场的经济效益。仔猪初生重在1.3~1.5 kg的,成活率和育成率均可达到98%左右;而初生重在0.5~0.7 kg的,成活率和育成率则只有70%左右。差别如此之大,经济效益显而易见。此实验所用的法系长白猪所产的仔猪初生重均值为(1.48 \pm 0.06) kg,属于正常标准。但是28日龄断奶重只有(5.48 \pm 0.24) kg,低于正常标准6.5~7.5 kg,断奶体重小也会给养猪场带来了一系列的不良后果,如断奶过渡难度大、保育期死亡率增加、育肥期增重速度慢、饲料效率变差,也是影响猪场经济效益的关键因素。介于初生重正常,断奶重低于正常标准,可能是因为母猪日进料能量不足,日喂饲次数少,饮水量不足,仔猪生长环境等因素造成^[13]。

3.2 *HNF-4 α* 基因的多态性与大民猪肌纤维组织学特性的相关性分析

肌纤维是肌肉组成的基本单位,密度大,直径小,结缔组织纹理细致的肌束是肉质细嫩的特征,肌纤维测定基本内容为肌纤维密度和直径^[14]。川井田博研究表明,肌纤维直径和密度是判定肉质嫩度的重要依据,并用肌纤维细嫩度来衡量肉质^[15]。此实验将*HNF-4 α* 基因SH1和SH2多态位点产生的3种不同基因型与3月龄大民猪群体的肌纤维直径、密度和横截面积等性状进行最小二乘分析。结果表明,SH1多态位点基因型对大民猪群体的肌纤维直径、密度和横截面积均无显著影响(P >0.05);SH2多态位点基因型对群体的肌纤维直径和肌纤维横截面积有显著影响(P <0.05),该位点对群体的肌纤维密度无显著影响(P >0.05)。

对*HNF-4 α* 基因SH2多态位点的3种基因型个体的肌纤维直径和肌纤维横截面积进行多重比较,结果表明,AA基因型个体的肌纤维直径显著高于AB基因型个体(P <0.05),BB基因型个体与AA和AB基因型个体差异不显著(P >0.05)。另外,AA基因型个体的肌纤维横截面积显著高于AB基因型个体(P <0.01),BB基因型个体与AA和AB基因型个体差异不显著(P >0.05)。由此可见,此位点的多态性很有可能是造成肉质差异的分子基础,提高AB基因型在品种内的频率有望减小肌纤维直径与面积,从而提高猪肉品质。

但由于此实验所采集的样本数量有限,所以今后需要选用更多群体检测以上突变位点,以进一步对它进行研究,也可以采取其他的试验方法进行研究论证,以证实其能否用于生长性状和肌纤维性状的分子标记辅助选择。

参考文献

- [1] 王继英,王怀中.猪肌纤维特性的研究进展[J].肉质与猪产品加工,2004,23(1):28-30.
- [2] 林万华,黄路生.MyoG 基因型对二花脸猪早期生长性状及肌肉组织学特性的影响[J].农业生物技术学报,2002,10(4):367-372.
- [3] 武艳群,吴旧生.猪 CAST 基因多态性与肌纤维组织学特性及屠宰性状的相关性分析[J].遗传,2007,29(1):65-69.
- [4] 赵年彪.组织切片技术浅见[J].中国畜牧杂志,2009,26(2):55-58.
- [5] 刘安芳,刘益平.鸡 CAST 基因编码区的单核苷酸多态与肌纤维性状的相关研究[J].畜牧兽医学报,2008,39(4):437-442.
- [6] Bruce S W. Genetic Data Analysis-Methods for Discrete Population Genetic Data.Sinauer Associates[M].Inc.Sun-derland,1990.
- [7] 张冬杰,刘娣.野家杂交猪 F₁ 代群体 8 个繁殖功能基因的多态性分析[J].中国农学通报,2009,25(4):10-13.
- [8] 郭晓令,陈哲.SIM1 基因第八外显子的 SNP 对猪背膘厚的影响[J].遗传,2008,30(6):755-759.
- [9] 关庆芝,杨秀琴,郭丽娟.野猪一家猪及野家杂种猪 *calpain3* 基因的多态性分析[J].黑龙江畜牧兽医,2009,25(4):10-13.
- [10] 王玉明.2 型糖尿病血管并发症患者 *eNOS* 基因第 4 内含子多态性的初步研究[J].临床检验杂志,2004,23(1):28-30.
- [11] 崔天益.早衰蛋白-1 基因内含子多态性与 Alzheimer's 病的关系[J].基础医学与临床,2000,33(5):18.
- [12] 方华.猪 POU1F1 第一内含子单核苷酸多态性和生长性状相关性研究[J].中国农业科学,2009,32(4):33-34.
- [13] 陈宗刚,张志新.肉用野猪的舍饲与繁殖技术[M].北京:科学技术文献出版社,2007:11-14.
- [14] 刘艳芬.生长猪肌纤维类型的转化规律[J].西北农业学报,1996,5(4):41-44.
- [15] 张惠予,刘海峰.藏猪肌纤维生长发育规律初探[J].黑龙江畜牧兽医,2008,10(4):367-372.