

猪 $OLR1$ 基因克隆及其与生产性状的关联、表达分析

郭咪咪^{1,2} 乔木¹ 吴俊静¹ 李良华¹ 梅书棋¹ 李助南²

1. 湖北省农业科学院畜牧兽医研究所/动物胚胎与分子育种湖北省重点实验室, 武汉 430064;

2. 长江大学动物科学学院, 荆州 434025

摘要 为鉴定对猪生产性状有重要影响的新分子标记, 采用电子克隆技术结合 PCR 方法获得了猪氧化型低密度脂蛋白受体 1 (oxidized low-density lipoprotein receptor 1, $OLR1$) 基因编码区序列, 在 $OLR1$ 基因第 4 内含子 246 bp 处发现了 1 个新 SNP 位点 A246G, 并建立了 PCR-Pag1-RFLP 基因分型方法, 分析了 4 个不同品种猪群中该等位基因频率, 发现国外品种大白、长白猪群 G 等位基因频率高于 A 等位基因频率, 而国内品种梅山、大梅群体 A 等位基因频率高于 G 等位基因频率。在大梅猪群体中的关联分析结果发现, A246G 位点与胸腰椎间膈厚、平均背膘、背最长肌含水量、背最长肌肌内脂肪含量、屠宰率、板油质量、6~7 腰椎间膈厚、背最长肌大理石纹、股二头肌大理石纹显著或极显著相关。通过 RT-PCR 分析发现, $OLR1$ 在恩施黑猪和长白猪群中心脏表达量最高, 其次是背脂, 同品种不同组织间表达量差异大, 表明 $OLR1$ 基因是脂肪相关的候选基因。

关键词 猪; $OLR1$; PCR-RFLP; 关联分析; 表达谱

中图分类号 S 828 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)03-0082-07

随着经济发展和生活水平的提高, 消费者日益注重猪肉产品品质。脂肪性状是肉质的一项重要指标, 是猪肉食用品质的决定因素, 直接关系到肉的嫩度、风味和多汁性^[1], 但脂肪过度沉积不仅影响动物产品的品质, 食入过量的脂肪还会对人体健康造成损害。影响猪脂肪性状的决定性因素是遗传因素, 随着分子生物技术的不断发展, 将传统的育种方法与分子生物学和基因工程技术相结合, 为育种工作提供了行之有效的技术方法。

氧化型低密度脂蛋白受体 1 (oxidized low-density lipoprotein receptor 1, $OLR1$) 是一个清道夫受体, 具有结合、内化和降解低密度脂蛋白的作用^[2]。目前对 $OLR1$ 基因的研究主要集中在对人类的心血管疾病方面, 脂质代谢异常会导致心血管疾病的发生, 多项研究发现 $OLR1$ 基因多态性与冠状动脉粥样硬化性心脏病、急性心肌梗死、他汀类药物的抗血小板活性和阿尔茨海默病发病有着密切关系^[3-9]。Chui 等^[10]研究表明, $OLR1$ 的增量表达能够提高胆固醇含量, 游离脂肪酸 (FFA) 摄取量和脂滴中甘油

三酯的含量也随之上升, 说明 $OLR1$ 基因与甘油三酯储存及肥胖产生具有密切关系。孙超等^[11]发现 $OLR1$ 在小鼠前体脂肪细胞的增殖中发挥作用, 新发现 $OLR1$ 在脂肪组织脂代谢过程具有重要作用^[12-13], 为 $OLR1$ 基因开拓更广阔的研究领域。

目前对 $OLR1$ 基因的研究主要集中在人、小鼠、大鼠和牛等^[2, 5-6, 10-11], 在猪中研究报道较少, 因此, 本研究将 $OLR1$ 基因作为影响猪脂肪性状的重要候选基因, 在猪脂肪组织中进行 $OLR1$ 基因克隆, 探讨不同组织中的表达模式, 同时对 $OLR1$ 基因进行 SNP 扫描, 进行遗传多样性与遗传效应分析, 探索其有用的分子标记, 旨在为优质猪的分子育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大白猪、长白猪、梅山猪、大白×梅山 F_2 代猪均来自湖北省农科院育种试验场; 恩施黑猪来自湖北天之力优质猪育种有限公司育种场。采集大白猪、长白猪、梅山猪和大白×梅山 F_2 代猪耳组织(用于

收稿日期: 2014-08-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201791); 湖北省自然科学基金项目(2013CFA099); 动物胚胎工程及分子育种湖北省重点实验室开放课题(2013ZD102); 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-36); 国家“十二五”科技支撑计划(2011BAD28B01-13); 湖北省农业科技创新中心创新团队项目(2011-620-001-003)

郭咪咪, 硕士研究生。研究方向: 动物繁殖与遗传育种。E-mail: guomimi110@163.com

通信作者: 梅书棋, 研究员。研究方向: 猪遗传育种。E-mail: msqife@163.com

基因分离),置于 -20°C 保存,另采集大白猪、恩施黑猪(各3头)心、肝、脾、肺、背脂、腹脂、背最长肌、大肠组织(用于不同品种不同组织间的表达研究),立即放入液氮中保存备用。

1.2 试剂与仪器

主要试剂:组织细胞基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒均购自艾德莱生物公司、反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司、pMD18-T Vector 购自 Yeastern Biotech 公司、RT-PCR 试剂盒购自 BIONEER 公司、Pag1 限制性内切酶购自湖北晶茂生物技术有限公司。

主要仪器:DNA Engine PCR 仪、DYY-6B 电泳仪(北京市六一仪器厂)、DHZ-DA 全温型大容量恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂)、LRH-250F 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)、BIO-RAD IQ5 多色实时荧光定量 PCR 仪(联想生物科技有限公司)、美国 Bio-rad 伯乐凝胶成像系统(联想生物科技有限公司)。

1.3 DNA、总 RNA 的提取、cDNA 合成及性状测定

按照艾德莱生物公司 DNA 提取试剂盒推荐的

方法提取猪基因组 DNA。采用 Trizol 方法提取各组组织总 RNA,并在如下的反应体系中反转录成 cDNA:5 × gDNA Eraser Buffer 2.0 μL, gDNA Eraser 1.0 μL,总 RNA 2.0 μL,加去离子水至体积 10.0 μL,经 42°C 反应 2 min,将所得反应物加 5 × PrimeScript Buffer2 4.0 μL,PrimeScript RT Enzyme mix1 1.0 μL,RT Primer Mix 1.0 μL,加去离子水至总体积 20.0 μL,经 37°C 反应 15 min, 85°C 5 s,最后将所得 cDNA 产物置于 -20°C 保存。

试验猪群的性状测定包括活体性状测定,体质量达 100 kg 左右时,集中屠宰测定胴体性状、肉质性状和其他性状。测定方法根据文献[14]描述进行。

1.4 引物设计

根据 GenBank 数据库中的猪 ESTs(GenBank 登录号分别为 CU856657.3、AB018668.1)设计引物 P1 以扩增 OLR1 的 cDNA 序列;设计引物 P2 扩增第 4,5 内含子序列,筛查 SNP 位点;引物 P3 用于 PCR-RFLP 分型;P4 和 P5 用于表达谱 RT-PCR 分析。所有引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成,引物序列、复性温度及片段大小见表 1。

表 1 引物序列及 PCR 条件

Table 1 Primers and PCR conditions

编号 Number	引物 Primers	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	复性温度/ $^{\circ}\text{C}$ Renaturation temperature	片段大小/bp Fragment size
P1	OLF OLR	CTGCTCCACTCCCTCATT TCACTGTGCTCTCAAGAGAT	58	861
P2	OLDF2 OLDR2	TCCTCTGGCCATTAGT TCGCCCTCTTCTGACATA	57	904
P3	OLSPF OLSPR	CGGTGGAAGAGCATTGT ACCTTGGGTCAGGCACTT	53	583
P4	OLQF2 OLQR2	AGTCTTTCCACTCGGCGGT GCTAAAGCCTGTCCCTCCA	60	176
P5	β -actin-F β -actin-R	CCAGGTCATCACCATCGG CCGTGTTGGCGTAGAGGT	60	158

1.5 PCR 扩增及序列分析

引物序列见表 1 中 P1,PCR 反应体系如下:0.8 μL cDNA 模板,1 μL primer I (10 μmol/L),1 μL primer II (10 μmol/L),12.5 μL 2 × Taq Master Mix,加去离子水至总体积 25 μL。PCR 反应程序: 94°C 预变性 4 min;然后 4°C 变性 40 s, 58°C 40 s, 72°C 延伸 50 s,共 35 个循环;最后 72°C 延伸 10 min。PCR 回收产物通过 pMD18-T Vector 连接转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,用菌落 PCR 扩增鉴定阳性克隆,鉴定为阳性的质粒送北京奥科生物

技术有限责任公司进行序列测定。

采用 Clustal X1.81 软件对所得的猪脂肪组织 OLR1 基因 mRNA 序列与 GenBank 上已发表的相关物种 OLR1 基因进行多序列比对。

1.6 SNP 位点筛查

利用表 1 引物 P2,分别对 5 头大白猪的 DNA 混合液和 5 头梅山猪的 DNA 混合液进行 PCR 扩增,PCR 反应体系如下:2.0 μL DNA 混合液模板,1.5 μL primer I (10 μmol/L),1.5 μL primer II (10 μmol/L),25.0 μL 2 × Taq Master Mix,加去离子

水至总体积 50 μL 。PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 复性 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物送北京奥科生物技术有限责任公司进行双向序列测定,利用 Chromas 软件对测序结果进行分析,寻找有价值的 SNP 位点。

1.7 PCR-RFLP

利用表 1 引物 P3,PCR 扩增体系如下:1.0 μL DNA 模板,1 μL primer I (10 $\mu\text{mol/L}$),1 μL primer II (10 $\mu\text{mol/L}$),12.5 μL $2\times\text{Taq}$ Master Mix,加去离子水至总体积 25 μL 。PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,53 $^{\circ}\text{C}$ 复性 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

酶切体系:取 5.5 μL PCR 产物加入 0.5 μL (10 U/ μL) Pag I,1 μL 10 \times buffer(含 10 \times BSA),加去离子水至总体积 10 μL ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切过夜,用琼脂糖凝胶电泳对酶切产物进行检测,成像系统观察和记录酶切结果。

1.8 统计分析

应用模型对猪 *OLR1* 基因 Pag1 -RFLP 不同基因型与猪生产性状进行关联分析,用于统计分析的试验材料为大白 \times 梅山 F_2 代总共 240 头猪,所分析的性状主要为胴体性状和肉质性状。

根据 Liu^[15] 所述方法建立单标记回归统计模型,采用 SAS 统计软件(SAS Institute Inc,Version 8.0)glm 过程进行单标记方差分析,同时采用 reg 过程计算基因加性效应和显性效应,并进行显著性检验,所采用模型为:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + F_j + S_k + Y_l + b_{ijkl}X_{ijkl} + e_{ijkl}$$

Y_{ijkl} 为性状表型值, μ 为平均值, G_i 为基因型效应; S_k 、 Y_l 、 F_j 为固定效应,分别为性别、年度、家系效应, b_{ijkl} 为屠宰体质量或屠宰日龄的回归系数, X_{ijkl} 为协变量(胴体性状以屠宰体质量为协变量,肉质性状以屠宰日龄为协变量), e_{ijkl} 为残差效应。

1.9 表达谱分析

采用 Real-time RT-PCR 方法进行猪 *OLR1* 基因在不同品种、不同组织间的表达分析,荧光染料采用 SYBR Green I,以 β -actin 作为内参,引物序列见表 1 中 P4 和 P5。PCR 反应体系为 20 μL ,其中模板 cDNA 为 1 μL ,每条引物 0.5 μL , $2\times\text{GreenStar}$ qPCR Master mix 10 μL ,50 \times Rox Dye 0.4 μL ,加

去离子水至总体积 20 μL 。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s,60.4 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s(82 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 读板),共 45 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

每个待测样品 cDNA 设置 3 个重复,记录所得结果,对得到的 3 个 Ct 值取平均值,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 mRNA 相对表达量^[16]。

2 结果与分析

2.1 猪 *OLR1* 基因的克隆和序列分析

以大白猪、长白猪、梅山猪 3 个猪种脂肪组织提取总 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板,用表 1 所示的引物 P1 进行 PCR 扩增,扩增产物回收纯化后克隆测序,测序结果显示:片段长度为 861 bp;序列分析表明该 cDNA 序列具有 825 bp 的开放阅读框,编码了 274 个氨基酸组成的蛋白质,有 7 个外显子和 6 个内含子;猪 *OLR1* 基因与牛(D89049.4)、人(AB010710.1)、小鼠(AF303744.1)的 *OLR1* 基因同源性分别是 85.00%、79.67%、70.57%。其中猪与牛的亲缘性较近,与人和小鼠的亲缘性就逐渐疏远。

2.2 猪 *OLR1* 基因的 SNP 分析

利用表 1 引物 P2 进行了 SNP 位点的筛查,通过测序比对所获得的 5 头大白猪和 5 头梅山猪 *OLR1* 基因部分序列,发现了新 SNP 位点,序列中出现双峰处表示 A/G 转换,如图 1 所示。其中,第 4 内含子的 A246G 替换会引起 Pag1 酶切位点(TCATGA)多态性。本研究针对该处突变位点设计了表 1 所示的引物 P3 进行 Pag1 -RFLP 多态分析。PCR 产物长度为 583 bp,当该位点为 A 时,

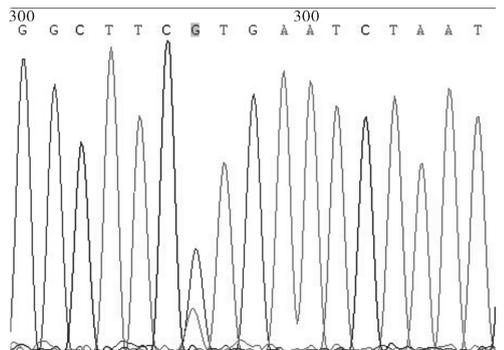
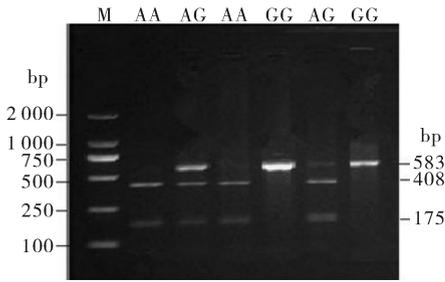


图 1 猪 *OLR1* 基因部分测序结果(正向测序)

Fig. 1 The partial result of pig *OLR1* gene sequence(Forward sequence)



M: 分子质量标记物 DL 2000 marker.

图 2 猪 *OLR1* 基因 *Pag1*-RFLP 多态分型结果
Fig. 2 The result of pig *OLR1* genotype *Pag1*-RFLP polymorphism

Pag1 酶切后产生 2 个片段, 长度分别为 175 bp 和 408 bp(A 等位基因); 当第 4 内含子的 A246G 位点为 G 时, 不能被 *Pag1* 酶切, 酶切后只有 1 个片段, 长度为 583 bp(G 等位基因)。猪 *OLR1* 基因的 *Pag1*-RFLP 酶切分型结果如图 2 所示。GG 基因型只有 1 个片段 583 bp; AA 基因型有 2 个片段, 175 bp 和 408 bp; AG 基因型有 3 个片段, 583、175 和 408 bp。

利用 *Pag1*-RFLP 方法, 在大白猪、长白猪、梅山猪和大白×梅山 F_2 代猪群体中进行了基因分型。如表 2 所示, 在大白猪、长白猪中 G 等位基因的频率高于 A 等位基因, 尤其是长白猪中 G 等位基因的频率达到 0.91。结果表明, 提高 G 等位基因可减少脂肪沉积。在梅山猪、大白×梅山 F_2 代猪群体中 A 等位基因的频率高于 G 等位基因的频率, 梅山猪 A 等位基因频率高达 0.85, 说明 A 等位基因频率促进脂肪的沉积, 大白×梅山 F_2 代猪 A 等位基因频率 (0.57) 较梅山猪的 A 等位基因频率 (0.85) 低, 瘦

表 2 *OLR1* 基因 *Pag1*-RFLP 在不同群体中的多态性

Table 2 The polymorphism of *Pag1*-RFLP *OLR1* gene in different groups

品种 Breed	数量(头) Number	基因型 Genotype			基因频率 Gene frequency	
		AA	AG	GG	A	G
大白猪 Large White	27	3	17	7	0.43	0.57
长白猪 Landrace	23	0	4	19	0.09	0.91
梅山猪 Meishan	20	14	6	0	0.85	0.15
大白×梅山猪 Large White×Meishan	240	75	124	41	0.57	0.43

肉率提高, 具有明显杂交优势。结果表明, 该 SNP 可作为改良猪脂肪沉积性状的重要分子标记位点。

2.3 猪 *OLR1* 基因的 *Pag1*-RFLP 基因型与生产性状的统计分析

Pag1-RFLP 基因型检测结果表明: 在所检测的 240 头大白×梅山 F_2 代猪个体中, AA、AG、GG 基因型分别为 75、124、41 头, 与生产性状间的统计分析结果总结于表 3。

通过对不同基因型与生产性状的关联分析可知: *OLR1* 基因的不同基因型在胸腰椎间膘厚、平均背膘、背最长肌含水量、背最长肌肌内脂肪含量 4 个指标中相关极显著 ($P < 0.01$); 在屠宰率、板油质量、6~7 腰椎间膘厚、背最长肌大理石纹、股二头肌大理石纹 5 个指标中相关显著 ($P < 0.05$)。GG 基因型的屠宰率、板油质量、6~7 腰椎间膘厚、胸腰椎间膘厚、平均背膘比 AA 基因型的低, 说明该位点的多态性与脂肪沉积显著相关, GG 基因型具有降低脂肪沉积的效应, 该结果与不同猪种间基因型的基因频率分析结果一致。基因效应方面胸腰椎间膘厚、平均背膘的加性效应达到极显著水平 ($P < 0.01$), 屠宰率、板油质量和 6~7 腰椎间膘厚的加性效应达到显著水平 ($P < 0.05$), 该结果说明 *OLR1* 基因是与脂肪相关的重要候选基因, 可以通过分子标记这种有效的方法对猪进行选育, 为猪的育种工作提供依据。背最长肌含水量、背最长肌肌内脂肪含量的显性效应达到显著水平 ($P < 0.05$), 其中对背最长肌肌内脂肪含量的显著相关对提高猪肉品质, 对于猪肉的嫩度、多汁性、风味和表观接受程度等均有重要的影响^[17], *OLR1* 基因可以作为影响肉质性状的候选基因。

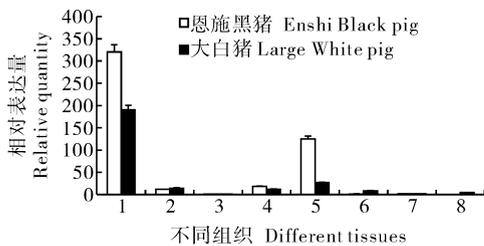
2.4 猪 *OLR1* 基因在不同品种、不同组织的表达分析

本研究利用表 1 引物 P4 和 P5 对猪 *OLR1* 基因在不同品种、不同组织中进行了 Real-time RT-PCR 表达分析, 结果如图 3 所示。 *OLR1* 基因在恩施黑猪和大白猪 2 个品种不同组织中均有表达, 且表达量有较大差异, 在恩施黑猪中各组织的表达情况为: 心 > 背脂 > 肺 > 肝 > 肌 > 腹脂 > 脾 > 大肠, 其中大肠的表达量极低; 在大白猪中各组织的表达情况为心 > 背脂 > 肝 > 肺 > 腹脂 > 大肠 > 肌 > 脾。两品种猪 *OLR1* 基因的表达量均是心脏中表达量最高, 其次是背脂; 脂肪型猪种恩施黑猪背脂中表达量

表 3 *OLR1* 基因 *Pag1*-RFLP 基因型与生产性状关联分析和基因效应分析¹⁾
Table 3 *OLR1* gene *Pag1*-RFLP genotype and statistical association with production traits

性状 Traits	<i>OLR1</i> PCR- <i>Pag1</i> -RFLP 基因型 ($\mu \pm SE$) <i>OLR1</i> PCR- <i>Pag1</i> -RFLP genotype			基因效应 ($\mu \pm SE$) Genetic effect	
	AA 基因型 AA genotype	AG 基因型 AG genotype	GG 基因型 GG genotype	加性效应 Additive	显性效应 Dominance
	肥肉率 FMP	0.244 \pm 0.007	0.239 \pm 0.006	0.247 \pm 0.009	-0.001 \pm 0.006
瘦肉率 LMP	0.549 \pm 0.006	0.547 \pm 0.005	0.540 \pm 0.007	0.004 \pm 0.005	-0.001 \pm 0.003
瘦肥肉比例 RLP	2.387 \pm 0.108	2.426 \pm 0.093	2.269 \pm 0.142	0.058 \pm 0.090	-0.049 \pm 0.064
屠宰率 DP	0.732 \pm 0.005 a	0.734 \pm 0.005 a	0.717 \pm 0.007 b	0.007 \pm 0.004 *	-0.004 \pm 0.003
板油质量 LFW	0.861 \pm 0.030 a	0.822 \pm 0.024 ab	0.770 \pm 0.036 b	0.045 \pm 0.023 *	-0.003 \pm 0.017
肩部膘厚 SFT	3.783 \pm 0.084	3.593 \pm 0.068	3.570 \pm 0.100	0.106 \pm 0.066	0.041 \pm 0.047
6~7 腰椎间膘厚 RFT	2.890 \pm 0.066 a	2.866 \pm 0.053 a	2.670 \pm 0.078 b	0.110 \pm 0.051 *	-0.043 \pm 0.037
胸腰椎间膘厚 TFT	2.382 \pm 0.078 Aa	2.158 \pm 0.061 b	1.925 \pm 0.105 B	0.228 \pm 0.065 * *	-0.002 \pm 0.045
平均背膘 ABT	2.742 \pm 0.061 A	2.621 \pm 0.050 AB	2.503 \pm 0.074 B	0.120 \pm 0.048 * *	0.001 \pm 0.035
背最长肌含水量 LD WC	73.414 \pm 0.072 A	73.684 \pm 0.058 B	73.576 \pm 0.085 AB	-0.080 \pm 0.056	-0.094 \pm 0.041 *
背最长肌大理石纹 LD MM	3.574 \pm 0.017 a	3.531 \pm 0.013 b	3.542 \pm 0.020 ab	0.016 \pm 0.013	0.013 \pm 0.010
股二头肌大理石纹 BF MM	4.074 \pm 0.017 a	4.030 \pm 0.013 b	4.042 \pm 0.020 ab	0.016 \pm 0.013	0.013 \pm 0.010
背最长肌肌内脂肪含量 LD IMF	3.786 \pm 0.052 A	3.597 \pm 0.042 B	3.660 \pm 0.061 AB	0.063 \pm 0.041	0.063 \pm 0.029 *

1) 以上数值为最小二乘均值 \pm 标准误;不同基因型中,含有相同字母表示差异不显著,不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$);基因效应中,*表示差异显著($P < 0.05$),**表示差异极显著($P < 0.01$)。Above value for the least squares mean \pm standard error. In different genotypes,with the lowercase indicates no significant difference,different lowercase mean significant difference ($P < 0.05$),and different capital letters showed extremely significant difference ($P < 0.01$). In genetic effect,* means significant difference ($P < 0.05$),** means extremely significant difference ($P < 0.01$).



1:心 Heart; 2:肝 Liver; 3:脾 Spleen; 4:肺 Lung; 5:背脂 Back fat; 6:腹脂 Abdominal fat; 7:肌肉 Muscle; 8:大肠 Large intestine.

图 3 *OLR1* 基因在不同品种、不同组织中的表达模式图
Fig. 3 *OLR1* gene expression patterns in different breeds and different tissues

比瘦肉型大白猪的表达量高出 200%,表明 *OLR1* 基因在脂肪沉积促进方面具有显著的品种差异,并且 *OLR1* 基因在背脂的表达量远高于腹脂,揭示 *OLR1* 基因的脂肪沉积作用更主要在背膘。

3 讨论

分子标记技术与表型的关系可以作为研究

遗传变异有用的标签,它促进了动、植物分类学、进化关系以及其他各种研究的发展^[18]。本研究首次从大白猪中克隆得到 cDNA 序列,筛查出新 SNP 位点,并对该位点与猪的生产性状进行了关联分析。

通过对猪的 *OLR1* 基因 *Pag1*-RFLP 不同基因型与猪生产性状的关联分析,发现 GG 基因型的个体比 AA 基因型的个体具有更低的板油质量、肩部膘厚、6~7 腰椎间膘厚、胸腰椎间膘厚和平均背膘,说明 GG 基因型的个体在低脂肪含量的胴体性状的指标中更具有优势。我们在育种中,可以选择 GG 基因型的个体作为低脂肪的育种群体,制定合理的育种计划,选择合适的基因型,从而达到理想的育种目标。

通过对猪 *OLR1* 基因进行表达谱分析,发现 *OLR1* 基因在猪的各个不同组织中均有表达,其表达量在同品种猪的不同组织表达差异很大,两品种猪的 *OLR1* 基因均在心脏中表达量最高,其次是背脂,此结果进一步验证了 *OLR1* 基因是与心血管疾

病及脂肪相关的重要候选基因。Sawamura 等^[19]最初在牛主动脉内皮细胞发现 *OLR1* 基因 mRNA 的表达, Schennink 等^[20] 研究发现 *OLR1* 基因中 C8232A 替换与长链脂肪酸之间的关系, 可能导致 *OLR1* 基因在心脏组织和产生长链脂肪酸的组织中高表达。刘春伟^[21] 在对大白猪和关中黑猪 2 种不同经济类型猪 *OLR1* 基因的表达量研究中发现, 背脂表达量比内脏组织表达量高, 皮下脂肪是脂肪的主要贮存场所, 脂质沉积作用相对于内脏脂肪要更强, 所以 *OLR1* 可能在背部脂质沉积方面发挥重要作用。孙超等^[11] 在脂肪细胞中研究表明, *OLR1* 的增量表达能够使胆固醇含量提高, 并伴随着游离脂肪酸(*FFA*)摄取量的增加和脂滴中甘油三酯含量的上升, 说明 *OLR1* 与甘油三酯储存及肥胖产生有着密切关系。在恩施黑猪和大白猪两不同品种猪群中, 恩施黑猪背脂表达量高于大白猪, 结果也验证了脂肪型地方品种猪的脂肪含量高于国外引进瘦肉型品种猪, 进一步表明 *OLR1* 基因是脂肪沉积的重要候选基因。对于该基因在脂肪中的具体调控机制和功能有待进一步研究, 将会对提高猪肉品质及养猪业的发展具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 周根来, 王恬. 动物脂肪代谢的营养调控[J]. 饲料工业, 2003, 24(1): 42-44.
- [2] 李托, 赵志东, 王婧. 秦川牛 *OLR1* 基因多态性与肉质性状的关联分析[J]. 西北农林科技大学学报, 2012, 21(4): 17-20.
- [3] LAMBERT J C, LUEDECKING Z E, MERROT S. Association of 3'-UTR polymorphisms of the oxidised LDL receptor 1 (*OLR1*) gene with Alzheimer's disease[J]. Journal of Medical Genetics, 2003, 40: 424-430.
- [4] ZHANG G G, BAI Y P, SHI R Z. Inhibitory effect of reinoside C on monocyte-endothelial cell adhesion induced by oxidized low-density lipoprotein[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2009, 380(5): 399-406.
- [5] MAGOMED K, SONA M, WANG X W. Oxidized LDL receptor 1 (*OLR1*) as a possible link between obesity, dyslipidemia and cancer[J]. PLoS One, 2011, 6(5): 1-9.
- [6] WANG X, LI T, ZHAO H B. A mutation in the 3' untranslated region diminishes microRNA binding and alters expression of the *OLR1* gene[J]. Journal of Dairy Science, 2013, 96(10): 6525-6528.
- [7] EICHHORN B, MULLER G, LEUNER A. Impaired vascular function in small resistance arteries of *LOX-1* overexpressing mice on high-fat diet[J]. Cardiovascular Research, 2009, 8(3): 493-502.
- [8] MUSSO G, CASSADER M, MICHELIELI F D. Effect of lectin-like oxidized LDL receptor-1 polymorphism on liver disease, glucose homeostasis, and postprandial lipoprotein metabolism in nonalcoholic steatohepatitis[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2011, 94: 1033-1042.
- [9] CRUCET M, WUSTC S J, SPIELMANN P. Hypoxia enhances lipid uptake in macrophages; role of the scavenger receptors *Lox1*, *SRA* and *CD36*[J]. Atherosclerosis, 2013, 229(1): 110-117.
- [10] CHUI P C, GUAN H P, LEHRKE M, et al. *PPARγ* regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1 [J]. Clin Invest, 2005, 115: 2244-2256.
- [11] 孙超, 刘春伟. 脂肪酸对小鼠前体脂肪细胞增殖分化及 *OLR1* 基因转录表达的作用[J]. 西北农林科技大学学报, 2009, 37(3): 1-6.
- [12] 刘春伟, 孙超. 猪 *OLR1* 基因克隆及生物信息学分析[J]. 西北农业学报, 2008, 17(5): 51-55.
- [13] AJUWON K M, FRANKLIN D M, BANZ W J, et al. Linoleic acid regulates the expression of oxidized low density lipoprotein receptor (*OLR1*) in 3T3-L1 adipocytes via ERK and JNK pathways[J]. FASEB Journal, 2007, 21(5): 455.
- [14] 熊远著, 邓昌彦. 种猪测定原理与方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 57-118.
- [15] LIU B H. Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis[M]. Boca Raton: CRC Press LLC, 1998.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] 李明洲, 朱砾, 李学伟, 等. 长白猪和太湖猪不同生长阶段脂肪中肉质和胴体性性状相关基因的表达谱分析[J]. 中国科学, 2008, 38(8): 729-741.
- [18] 黄映萍. DNA 分子标记研究进展[J]. 中山大学研究生学刊, 2010, 31(2): 27-36.
- [19] SAWAMURA T, KUME N, AOYAMA T, et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein [J]. Nature, 1997, 386(6620): 73-77.
- [20] SCHENNINK A, BOVENHUIS H, VISKER M H, et al. Effect of polymorphisms in The *FASN*, *OLR1*, *PPARGC1A*, *PRL* and *STAT5A* genes on bovine milk-fat composition [J]. Animal Genetics, 2009, 40(6): 909-916.
- [21] 刘春伟. 猪 *OLR1* 基因克隆、序列分析及脂肪酸对其转录表达的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学图书馆, 2008.

Cloning, association with production traits and expression analysis of the porcine *OLR1* gene

GUO Mi-mi^{1,2} QIAO-Mu¹ WU Jun-jing¹
LI Liang-hua¹ MEI Shu-qi¹ LI Zhu-nan²

1. Hubei Key Laboratory of Animal Embryo and Molecular Breeding, Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China;
2. College of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China

Abstract To identify new DNA markers which have significant impact on pig production traits, full coding sequence of the porcine *OLR1* (oxidized low-density lipoprotein receptor 1) gene were isolated using in silico cloning and PCR. A single nucleotide polymorphism (SNP, A246G) in intron 4 were found and the PCR-Pag1-RFLP method was used to genotype the polymorphic site. In all the four detected pig populations, the western commercial pig breeds (Large White and Landrace) had higher frequencies of the G allele, and the Chinese indigenous breeds (Meishan and Large White × Meishan) had higher frequencies of the A allele. Association analysis showed that the polymorphic site had a significant or dominant significant effect on thorax-waist fat thickness, average backfat thickness, water content of longissimus dorsi, intramuscular fat of longissimus dorsi, dress percentage, leaf fat weight, 6-7 rib fat thickness, meat marbling of longissimus dorsi and meat marbling of biceps femoris. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analyses showed that the porcine *OLR1* gene was highly expressed in the heart tissue, followed by the back fat in Enshi black and Large White pigs, and it was differentially expressed in different tissues. These results indicated that the *OLR1* is a fat relevant candidate gene.

Key words pig; *OLR1*; PCR-RFLP; association analysis; expression profile

(责任编辑:边书京)