

猪抗酶1基因核心启动子区鉴定 及单倍型转录活性比较

张爱玲^{1,2} 孙显月¹ 张哲¹ 李加琪¹ 张豪¹

1.广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室/华南农业大学动物科学学院,广州 510642;
2.广东第二师范学院生物与食品工程学院,广州 510303

摘要 通过双荧光素酶报告基因载体系统检测猪抗酶1(AZ1)基因启动子转录活性,分析蓝塘和长白猪群体AZ1基因启动子SNP及单倍型,在此基础上比较不同单倍型转录活性。结果表明: -453/+79为核心启动子区;在2个群体中检测到AZ1基因启动子8个SNPs,分别为-713 T>C、-584 A>C、-476 G>A、-365 T>C、-348 C>T、-294 G>C、-288 T>G和-234 T>C,蓝塘猪群体具有更丰富的单核苷酸多态性,而长白猪群体仅在-288座位存在GG和GT 2种基因型,其他7个SNPs均为纯合状态;蓝塘猪群体LTH1单倍型(TAGCCGTC, -713/-234)频率为0.526,为蓝塘猪优势单倍型,其次为LTH2(TAGCCGTT),频率为0.166;长白猪群体优势单倍型为Landrace-H(TAGTCGGT),频率为0.939。LTH1转录活性高于LTH2和Landrace-H,推测-234 T>C、-365 T>C和-288 T>G座位是造成不同单倍型转录活性差异的原因。

关键词 猪; 抗酶(AZ1)基因; 启动子; SNP; 单倍型

中图分类号 S 828.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)03-0094-07

多胺,包括腐胺、亚精胺、精胺等,是机体内广泛存在的一类脂肪族多价阳离子,对于基因表达、蛋白合成和细胞的程序性死亡具有重要的意义^[1-2]。但是多胺的代谢异常能够损害细胞功能并引起死亡^[3],如过低水平多胺导致细胞增殖停止^[4],过高则由于多胺的毒性使细胞死亡^[5],因此多胺水平在体内受到严格控制。合成多胺的原料是鸟氨酸,鸟氨酸在鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)的作用下脱去羧基生成腐胺,腐胺在相关酶的催化下进一步转变为精脞和精胺^[6]。ODC是多胺合成过程中的第一个限速酶,抗酶(antizyme, AZ)与ODC结合使之降解,从而控制细胞内多胺水平^[7]。此外AZ也能够直接调节多胺在细胞内的浓度,如降低细胞摄入多胺的速度,抑制细胞对多胺的摄取,刺激多胺的胞内向胞外运输,最终稳定细胞内多胺水平^[8]。

AZ家族有3种异构体,分别为AZ1、AZ2和AZ3^[9]。AZ3仅存在于睾丸中;AZ1和AZ2在动物细胞内广泛存在,但AZ1的浓度远高于AZ2, AZ1为动物体内的主要抗酶^[10],对于多胺的调节起主要

的作用。AZ1基因表达水平与胞内多胺浓度密切相关,细胞内多胺水平高低可以刺激AZ1基因的表达强度,如在体外培养的大鼠小肠上皮细胞(IEC-6)中,亚精胺能够导致AZ1基因表达大量升高^[11],反过来,AZ在不依赖于多胺的情况下也可以调节小肠上皮细胞的生长^[12]。在过表达AZ1转基因小鼠中,发现细胞增殖减慢,而由致癌物诱导的肿瘤细胞凋亡率增加^[13],所以AZ1被认为是细胞生长的负调节因子和肿瘤抑制因子。此外,AZ1除了与ODC结合外,还能够与一些小分子蛋白结合并促进其降解,如Smad1^[14]、Snip^[15]、CyclinD1^[16]等。

目前研究发现,在多个物种AZ1蛋白水平受到翻译+1移码(translation frameshift)机制的调节,移码效率关系到细胞内多胺的水平;细胞内高水平多胺能够提高移码效率^[10],便于多胺向胞外的运输。目前,多个物种AZ1基因序列已经得到克隆,如人、猴、牛、山羊、狗、鸡、爪蟾以及多种酵母等。本课题组前期克隆获得猪AZ1基因的全序列,与其他物种AZ1基因相比,猪AZ1基因同样存在2个阅读框(ORF)以及移码现象,移码位置在ORF1最后

收稿日期: 2015-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201771); 现代农业产业技术体系专项(CARS-36)

张爱玲,博士,讲师. 研究方向: 分子遗传学. E-mail: zhangmeixiaL@163.com

通信作者: 张豪,博士,教授. 研究方向: 动物遗传育种与繁殖. E-mail: zhanghao@scau.edu.cn

1 个有义密码子的 3'端(第 69 位的密码子处), 密码子由 UCC-UGA-U 移码变成了 UCC-(U)-GAU, 产生了更长的 ORF2, 而且 AZ1 基因表达呈现组织差异性, 相比心、肝脏、肾等组织, 在肺脏中 AZ1 基因表达量最高^[17]。AZ1 基因的表达还受到其抑制物 AZ 抑制子(AZ inhibitor)的影响, AZ inhibitor 与 ODC 结构相似, 但缺少酶活性, 相比 ODC, AZ1 与 AZ inhibitor 有更强的亲和力, AZ1 与 AZ inhibitor 结合后 AZ1 活性降低, 而 AZ inhibitor 活性升高的同时 ODC 活性的升高也印证了 AZ1 基因对 ODC 的降解作用^[18]。

启动子是基因转录调节的重要元件, 关于 AZ1 基因启动子的研究比较少见。Dumont 等^[19]报道 AZ1 基因的多态性与血管平滑肌细胞的增殖和迁移有关。课题组前期工作发现 AZ1 基因启动子 RFLP 多态性与长白×蓝塘 F₂ 代群体眼肌面积和大理石纹相关^[20]。本研究以本地猪种蓝塘猪和外来猪种长白猪群体为研究对象, 分析不同群体 AZ1 基因启动子单核苷酸多态性, 及不同单倍型转录活性, 了解猪 AZ1 基因的转录调控机制, 探讨 AZ1 基

因作为猪的经济性状分子标记的可能性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蓝塘猪(40 头)、长白猪(49 头), 来自广东省某猪场, 耳组织 DNA 由笔者所在实验室保存。PCR 扩增体系试剂、DNA 分子质量标准、DNA 回收试剂盒为广东东盛生物技术公司产品; 限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 以及双荧光素酶报告基因载体系统为 Promega 公司产品, T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。

1.2 引物设计及 PCR 扩增方法

猪耳组织基因组 DNA 提取按试剂盒说明进行。以笔者所在实验室前期获得的猪 AZ1 基因 5' 调控区序列为模板(GenBank 登录号: JF831085)设计 5 对 PCR 引物, 用于扩增猪 AZ1 基因不同的启动子片段, 由上海生工生物工程有限公司合成, 见表 1。PCR 扩增体系(25 μL)为: 10×PCR Buffer 2.5 μL, 25 mmol/L MgSO₄ 1.5 μL, dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 3 μL, 上下游引物(20 μmol)各 0.3 μL,

表 1 引物名称及其序列

Table 1 The information of the primers

序号 Number	引物序列(5'-3') Sequences(5'→3')	扩增片段长度/bp Length
1	S: <u>CGG</u> <i>ggtacc</i> GTGACCCAAGCCACCACAGTGACAAC A: <i>ccc aagctt</i> CCGGCCGCTGGGGTCCGAAACC	AZ1-1, 2 238(-2 159/+79)
2	S: <u>CGG</u> <i>ggtacc</i> CCAGGCTAGGGGTTGAATCAGAGTTG A: <u>CGG</u> <i>aagctt</i> CCAGGCTAGGGGTTGAATCAGAGTTG	AZ1-2, 1 982(-1 903/+79)
3	S: <u>CGG</u> <i>ggtacc</i> TCCCAGGCTAAGGGTGAATCTGAGC A: <u>CGG</u> <i>aagctt</i> TCCCAGGCTAAGGGTGAATCTGAGC	AZ1-3, 1 559(-1 480/+79)
4	S: <u>CGG</u> <i>ggtacc</i> GGGACACATGCGGATTCAGCCACA A: <u>CGG</u> <i>aagctt</i> GGGACACATGCGGATTCAGCCACA	AZ1-4, 1 071(-992/+79)
5	S: <u>CGG</u> <i>ggtacc</i> AATACCCAGGACCTTTGTCGTCAGAGC A: <u>CGG</u> <i>aagctt</i> AATACCCAGGACCTTTGTCGTCAGAGC	AZ1-5, 532(-453/+79)
AZ1-SNP-p	S: TTGCAGACTCTGTGCCTAAACCCCT A: CTCGCCGTTCCGAAAATGG	809(-792/+17)

注: 下划线为保护碱基, 斜体小写字母 *ggtacc* 和 *aagctt* 分别为限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 识别序列。Note: Underline: Protective bases; Italic *ggtacc* and *aagctt* were the recognition sites for restriction enzyme site for *Kpn* I 和 *Hind* III.

Taq DNA 多聚酶(2 U/μL) 0.5 μL, DNA 模板 0.3 μL, ddH₂O 16.6 μL。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 然后转至 94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30~35 个循环后 72 °C 延伸 10 min, 备检测。

1.3 猪 AZ1 基因启动子 5' 缺失片段载体的构建与双荧光素酶检测

将上述 PCR 扩增获得的 DNA 片段用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收纯化后, 用 *Kpn* I 和

Hind III 进行双酶切, 同时对 pGL-Basic 载体进行酶切, 酶切体系为: PCR 产物或者载体 15 μL, *Kpn* I 和 *Hind* III 各 1.5 μL, 10×Buffer 5 μL, ddH₂O 27 μL, 37 °C 反应 3 h。

将双酶切后的 DNA 片段和 pGL-Basic 载体分别用 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收纯化, 各 DNA 片段分别与 pGL-Basic 载体进行连接: 10×Buffer 1 μL, DNA 片段 3 μL, pGL3-Basic 载体 2 μL, T4DNA 连接酶 1 μL, ddH₂O 3 μL, 转化大肠杆菌

DH5 α ,涂布氨苄青霉素琼脂平板,37 °C 过夜培养,然后挑取单克隆进行测序。

培养猪胎儿成纤维细胞^[21],将上述构建好的载体和 pRL-TK 质粒用阳离子脂质体法转染细胞,48 h后,用双荧光素酶报告基因系统进行 Luciferase 活性检测,收集数据比较各启动子片段转录活性。

1.4 猪 AZ1 基因启动子 SNP 筛选与单倍型分析

根据前期对猪 AZ1 基因启动子的生物信息学分析^[17],设计 AZ1-SNP-p 引物(见表 1),用于扩增 AZ1 基因启动子 809 bp (-792/+17),分析长白和蓝塘猪 2 个群体的单核苷酸多态性,SNP 单倍型分析采用 Haploview 软件进行。

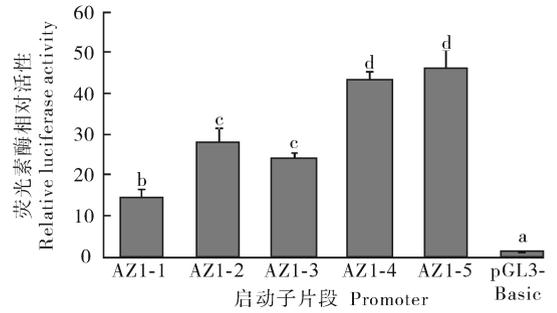
1.5 长白和蓝塘猪群体 AZ1 基因启动子不同单倍型的转录活性分析

选取在长白和蓝塘猪 2 个群体中优势单倍型个体作为研究对象,以其基因组 DNA 为模板,用扩增 AZ1-4 片段的 DNA 作为引物,分别扩增不同的单倍型,并按照本文“1.3”方法,构建相应的双荧光素酶报告基因载体,转染猪胎儿成纤维细胞,分析不同单倍型转录活性。

2 结果与分析

2.1 猪 AZ1 基因启动子 5' 缺失片段扩增及转录活性检测

用相应的引物分别扩增获得了猪 AZ1 基因启动子片段:AZ1-1(2 238 bp)、AZ1-2(1 982 bp)、AZ1-3(1 559 bp)、AZ1-4(1 071 bp)、AZ1-5(532 bp),与 pGL3-Basic 载体连接,并测序验证。将上述测序正确的猪 AZ1 基因启动子 5' 系列缺失片段重组载体转染猪成纤维细胞,同时共转染内参 pRL-TK 质粒,通过检测荧光素酶活性,分析不同启动子片段的活性,结果见图 1。可以看出:5 个 5' 缺失片段转录活性与对照 pGL3-Basic 活性差异显著;AZ1-4(-992/+79)与 AZ1-5(-453/+79)转录活性最高,两者之间差异不显著,与 AZ1(-2 159/+79)、AZ2(-1 940/+79)、AZ3(-1 480/+79)差异极显著,AZ1-5 较 AZ1-4 启动子活性更高。AZ1-2、AZ1-3 两者差异不显著,但与 AZ1 片段差异极显著,最长片段的重组质粒 AZ1-1 的活性最低。以上结果说明在 -992/+79 之间可能存在丰富的顺式作用元件,-453/+79 为核心启动子区。



误差线代表算术平均数的标准误;相同字母表示差异不显著($P>0.05$);不同字母表示差异极显著($P<0.01$)。下同。The error bars are the standard errors of the arithmetic means. The same letters represent $P>0.05$, and different letters represent $P<0.01$.The same as below.

图 1 猪 AZ1 基因启动子 5' 端缺失片段对荧光素酶基因转录活性分析结果

Fig.1 The luciferase activities of the five 5'-deletion fragments of porcine AZ1 gene promoter

2.2 猪 AZ1 基因启动子 SNP 筛选与单倍型分析

根据前期构建 DNA 池对猪 AZ1 基因启动子 SNP 筛选^[17]以及核心启动子活性检测结果,通过 DNA 测序法分析蓝塘猪和长白猪群体 -992/+79 启动子区域 SNP,结果如表 2 所示。虽然在前期研究中检测到 -734 座位存在 T 碱基缺失,但是在这 2 个群体中并未检测到缺失突变,在其他座位 2 个群体则差异较大。在长白猪群体中,除了 -288 座位中存在 GG 和 GT 2 种基因型外,其他 7 个 SNP 座位均为纯合状态。而蓝塘猪群体中所检测到的 8 个 SNP 座位呈现不同程度多态性,每个 SNP 座位为遗传平衡状态(表 2)。-713T、-584A、-476G、-365C、-294G 和 -288T 等位基因在蓝塘猪群体中为优势等位基因,基因频率分别为 0.706、0.757、0.692、0.949、0.718 和 0.795,而这些等位基因在长白猪群体中为纯合状态,也属于优势等位基因。

鉴于蓝塘猪群体 AZ1 基因启动子存在较丰富的单核苷酸多态性,对该群体进行了单倍型分析。8 个 SNP 共产生 1 个单倍型模块,10 种单倍型。LTH1(TAGCCGTC)(-713/-234)单倍型频率为 0.526,为优势单倍型,其次是 LTH2(TAGCCGTT)单倍型,频率为 0.166,其他单倍型频率则较低(表 3)。在长白猪群体中,共产生 2 种单倍型:TAGTCGGT 和 TAGTCGTT(-713/-234),前者为优势单倍型(命名为 Landrace-H),频率为 0.939,并未在蓝塘猪群体中检测到,后者与蓝塘猪 LTH6 单倍型相同(表 3)。LTH6 单倍型碱基序列为 TAGTCGTT,与 AZ1-4 序列一致。

表 2 蓝塘(LT)和长白猪(LD)AZ1 基因启动子 SNP 座位基因型与基因型频率分布

Table 2 Genotypic and allelic frequencies of SNPs of AZ1 promoter in Lantang (LT) and Landrace (LD) populations

座位 SNPs	群体 Populations	基因型频率 Genotypic frequencies			基因频率 Allelic frequencies		H-W P
		MM	MN($He_{(s)}$)	NN	M	N	
		-234 T/C	LT	0.231(9)	0.487(19)	0.282 (11)	
	LD	1.000 (49)	0.000(0)	0.000 (0)	1.000	0.000	—
-288 T/G	LT	0.539 (21)	0.333 (13)	0.128 (5)	0.706	0.294	0.513
	LD	0.000 (0)	0.122 (6)	0.878 (43)	0.061	0.939	—
-294 G/C	LT	0.564 (22)	0.385 (15)	0.051 (2)	0.757	0.243	1.000
	LD	1.000 (49)	0.000 (0)	0.000 (0)	1.000	0.000	—
-348 C/T	LT	0.410 (16)	0.359 (14)	0.231 (9)	0.590	0.410	1.000
	LD	1.000 (49)	0.000 (0)	0.000 (0)	1.000	0.000	—
-365 T/C	LT	0.128 (5)	0.359 (14)	0.513(20)	0.308	0.692	0.481
	LD	0.000 (49)	0.000 (0)	0.000 (0)	0.000	0.000	—
-476 G/A	LT	0.897 (35)	0.103 (4)	0.000	0.949	0.051	1.000
	LD	1.000 (49)	0.000 (0)	0.000 (0)	1.000	0.000	—
-584 A/C	LT	0.538 (21)	0.359 (14)	0.103 (4)	0.718	0.282	0.673
	LD	1.000 (49)	0.000 (0)	0.000 (0)	1.000	0.000	—
-713 T/C	LT	0.615 (24)	0.359 (14)	0.026 (1)	0.795	0.205	1.000
	LD	1.000 (49)	0.000 (0)	0.000 (0)	1.000	0.000	—

注:1)LT:蓝塘猪;LD:长白猪。2)在 SNP 座位, MM 型为上述表格座位列内斜线前碱基纯合基因型, NN 为斜线后碱基纯合基因型,杂合基因型: MN。*: 该 SNP 位点为 Hardy-Weinberg 非平衡状态。—: 没有进行检验。Note: 1) LT: Lantang; LD: Landrace.2) MM: The homozygous genotypes of the base before the oblique line in the first column; NN: The homozygous genotypes of the base behind the oblique line.MN was the heterozygous genotype of the SNPs。*: The locus was not in a genetic equilibrium.—: The H-W test was not analyzed.

表 3 蓝塘猪 AZ1 基因启动子区单倍型频率分布

Table 3 The haplotype frequencies of porcine AZ1 gene promoter in LT population

单倍型 Haplotypes	-713 T/C	-584 A/C	-476 G/A	-365 T/C	-348 C/T	-294 G/C	-288 T/G	-234 T/C	单倍型频率 Haplotype frequency
LTH1	T	A	G	C	C	G	T	C	0.526
LTH2	T	A	G	C	C	G	T	T	0.166
LTH3	C	C	G	T	T	C	G	T	0.141
LTH4	T	C	G	T	C	G	G	T	0.038
LTH5	C	C	A	T	T	C	G	T	0.038
LTH6	T	A	G	T	C	G	T	T	0.026
LTH7	T	C	G	T	T	C	G	T	0.026
LTH8	C	C	G	T	T	C	T	T	0.013
LTH9	C	C	G	T	C	C	G	T	0.013
LTH10	T	C	A	T	T	C	G	T	0.013

2.3 2 个猪群体 AZ1 基因启动子不同单倍型转录活性分析

为深入探讨 AZ1 基因是否在 2 个群体中存在转录调控差异,以及不同单倍型之间是否存在差异,选择 2 个群体中实际存在的 AZ1 基因启动子单倍型纯合个体(表 4),即 LTH1、LTH2、Landrace-H 和 AZ1-4 进行转录活性分析。结果表明:LTH1 转录活性最高,与 AZ1-4、LTH2、Landrace-H 差异显著,LTH2 和 Landrace-H 两者之间差异不显著,AZ1-4 与其他 3 个均差异显著($P < 0.01$,图 2)。在所分析的 4 个单倍型中,-713 座位处均为 T 碱基,-476 座位均为 G 碱基。在剩下的 6 个 SNP 座位

中,优势单倍型 LTH1 在 -365 处为 CC 型,在 -234 处为 CC 型,其他 3 个单倍型则在这 2 个位点均为 TT 型,由于 LTH1 转录活性显著高于其他 3 个单倍型,推测 -365T>C 和 -234C>T 突变是造成 LTH1 与其他单倍型转录活性差异的原因之一。

LTH2 和 Landrace-H 两者转录活性差异不显著($P > 0.05$),表明 -584C>A、-348T>C、-294C>G 突变并不能引起转录活性的改变。此外,-288TT 是单倍型 AZ1-4 与 LTH(GG)和 Landrace-H(GG)的序列差异所在,由于 AZ1-4 转录活性显著低于 LTH2 和 Landrace-H,表明 -288G>T 是造成三者转录活性差异的因素。LTH1

单倍型在 -288 处为 TT 型,与 AZ1-4 相同,因此 -288G>T 不是引起转录活性改变的关键因素。

表 4 用于 AZ1 启动子转录活性比较的蓝塘猪和长白猪群体纯合个体基因型

Table 4 The homozygote genotypes for the AZ1 promoter transcriptional activity analysis in LT and Landrace populations

单倍型 Haplotypes	SNP 座位 SNP Loci							
	-713	-584	-476	-365	-348	-294	-288	-234
AZ1-4	T	C	G	T	C	G	T	T
LTH1	T	A	G	C	C	G	T	C
LTH2	T	C	G	T	T	C	G	T
Landrace-H	T	A	G	T	C	G	G	T

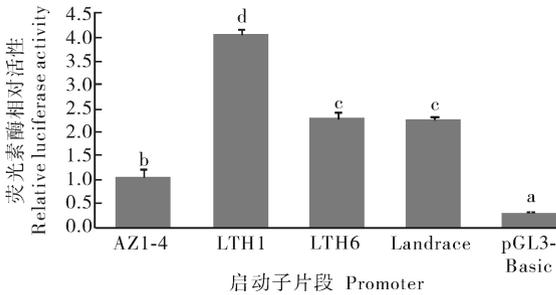


图 2 猪 AZ1 基因启动子 4 个单倍型转录活性比较

Fig.2 The luciferase activities of the four haplotypes of porcine AZ1 gene promoter

3 讨论

本研究是在克隆猪 AZ1 基因基础上^[17],获得该基因启动子序列(-2 159/+79),并确定该基因启动子的核心转录活性区域位于-453/+79,在蓝塘和长白猪 2 个肉用性状差异明显的群体中共检测到 8 个 SNP,随后检测了 2 个群体实际存在的优势单倍型的转录活性。前期研究中,通过 PCR-RFLP 方法,检测到长白×蓝塘猪 F₂ 代群体 AZ1 基因启动子-792/-433 区域存在-713T>C、-584A>C 和-476G>A 突变,AZ1 基因启动子不同的基因型与长白×蓝塘猪 F₂ 代群体部分性状相关^[20], -713 座位 TT 基因型、-584AA 和-476GG 基因型是潜在的生长和肉质性状相关分子标记^[22]。由于 PCR-RFLP 方法的局限性,前期研究仅在-792/-433 区间检测到了 3 个 SNP。鉴于 SNP 可能引起潜在的启动子转录活性的改变,因此,对性状差异明显的蓝塘和长白猪群体进行 AZ1 基因启动子的 SNP 筛查,以获得更多的信息。本研究通过测序的方法在较长的 AZ1 基因启动子区检测到的 8 个 SNP,包括上述检测到的 3 个 SNP。在 8 个 SNP 中,长白猪群体中只有 1 个(-288)座位存在 T>G

突变,而在蓝塘猪群体中 8 个 SNP 均存在不同程度的多态性,表明外来猪群体中 AZ1 基因启动子比较保守,在本地群体中存在较大变异。在长白×蓝塘猪 F₂ 群体中,-713TT、-584AA 和-476GG 为优势基因型,而在蓝塘猪和长白猪 2 个群体中,它们也是优势基因型,而且在长白猪群体中并没有变异(表 2)。单倍型分析结果也表明在蓝塘猪和长白猪 2 个群体中优势单倍型-713T、-584A 和-476G 总是紧密连锁。

在蓝塘猪群体中,AZ1 基因的 8 个 SNP 理论上产生 10 种单倍型(表 3),但是实际上多数单倍型频率非常低,只有 LTH1、LTH2 和 LTH3 为优势单倍型,在 2 个群体中实际存在且为优势纯合基因型的是 LTH1、LTH2、LTH6(AZ1-4)和 Landrace-H。LTH1 单倍型在蓝塘猪群体占优势,而 Landrace-H 在长白猪群体中占绝对优势,可以认为优势基因型代表了该群体的大部分遗传信息。分析 4 个单倍型 SNP 组成,在蓝塘猪群体 4 个基因型片段上,-713 座位碱基均为 T,-365、-288、-234 座位为不同的碱基;在长白猪群体中,仅存在-288 座位多态性。与前期研究比较,代表了 2 个群体大多数基因型的单倍型在-713T、-584A、-476G 3 处相同,并没有产生其他基因型,原因可能在于研究的群体不同,如本工作中研究群体为蓝塘和长白猪群体,而前期为长白×蓝塘猪 F₂ 代群体,不过在长白×蓝塘猪 F₂ 代群体,-713TT、-584AA、-476GG 为优势基因型^[20],这一点与本研究结果一致。在长白×蓝塘猪 F₂ 代群体中,-713TT 和-584AA 基因型个体大理石纹评分要低于其他基因型个体,-476GG 基因型个体中躯脂质量大于其他基因型个体,而且是处于连锁状态,为优势单倍型,可以认为-713T、-584A、-476G 是潜在与大理石纹密切相关的 SNP 标记。在本研究中,检测到了更多 SNP,蓝塘猪群体和长白猪群体 2 个优势单倍型 LTH1 和 Landrace-H 在这 3 个位点碱基相同,不同之处在于-365、-288 和-234 处,由于受到样品来源与性状记录限制,本研究未进行 SNP 与经济性状的相关分析,但是可以进一步推测这 3 处 SNP 可能是影响大理石纹的关键碱基变异。

LTH1 转录活性显著高于其他单倍型,AZ1-4 活性最低,LTH2 和 Landrace-H 之间转录活性差异不显著,但高于 AZ1-4 单倍型($P<0.01$,图 2)。根据单倍型的 SNPs 异同,可知-365C>T

和-234C>T突变使LTH1的转录活性高于与其他3种单倍型,-288G>T突变使AZ1-4的转录活性低于与LTH2和Landrace-H单倍型。生物信息学分析除-713的突变外,其他突变多数可引起潜在的相结合转录因子的改变^[17],对于上述3个位点,生物信息学预测结果为-365T>C、-288T>G,未引起潜在结合转录因子的改变(分别为CREB和MZF1),而-234T>C则导致潜在结合因子由SP1F转变为KLFS。不过,生物信息学预测结果还需要进一步实验验证3个SNP是否引起结合因子的改变进而影响转录活性及经济性状。由于在不同组织中转录因子的差异也会影响到启动子的活性,因此在特定组织中研究该SNP对性状的影响则更有意义,如在肌细胞中研究可以揭示更精确的效应。

不仅SNP可能引起转录活性的改变,其实对于同一种单倍型,在不同的组织中也会呈现不同的转录活性,如AZ1基因mRNA在蓝塘猪的肺脏和骨骼肌呈现较高水平表达,在其他组织表达量则很低^[17],表明AZ1基因启动子具有组织特异性。AZ1基因的高表达量意味着该组织的细胞生长较活跃,并产生较多的多胺,刺激AZ1基因的表达量升高以此来降解多胺以达到细胞内稳定水平。相比长白猪品种,本地品种蓝塘猪则表现较慢的生长水平。在本研究中,蓝塘猪优势单倍型LTH1的转录活性高于代表长白猪的优势单倍型Landrace-H,意味着对于大多数蓝塘猪个体而言,其核心启动子的转录活性高于长白猪群体,但并不能说明大多数单倍型群体其AZ1基因表达量一定会高于长白猪群体,因为用于单倍型活性分析的宿主细胞均为杜长大杂交种的胎儿成纤维细胞。AZ1基因对于动物细胞的生长、增殖、分裂和分化起着重要的调节作用^[1-2],AZ1和IGF-1基因协同调控细胞的生长和分化^[23],因此,AZ1基因是潜在的与机体生长发育相关候选基因。蓝塘猪和长白猪品种在生长速度、肉质性状、繁殖性能等方面存在较大差异,如果从2个品种的不同发育阶段、更多特异组织着手去检测AZ1基因的表达情况,将更有助于揭示AZ1基因在猪生长发育、肉质性状等方面的功能。本研究表明,AZ1基因不同单倍型的转录活性不同,因此还需要进一步的研究证实其功能性。本研究虽然未对SNP与肉质性状进行关联分析,但是SNP造成潜在转录活性变化有望为2个群体在生长速度、肉质性状的差异分子机制探索提供资料。

综上,通过双荧光素酶报告基因载体系统,确定猪AZ1基因核心启动子区位于-453/+79处;在此基础上,在对蓝塘和长白猪2个群体中共获得8个SNP,其中只有-288座位在长白猪群体中存在多态性,产生2个单倍型,而8个SNP在蓝塘猪群体中呈现丰富的多态性,产生10个单倍型;对实际存在的4个单倍型进行转录活性分析,发现在蓝塘猪群体中的优势单倍型转录活性显著高于长白群体单倍型及其他单倍型,-234T>C、-365T>C和-288T>G座位可能是造成体外转录活性差异的原因,因此,可能是功能性SNP。

参 考 文 献

- [1] CHILDS A C, MEHTAE D J, GERNER E W. Polyamine-dependent gene expression [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60(7): 1394-1406.
- [2] WALLACE H M, FRASE A V, HUGHES A A. A perspective of polyamine metabolism [J]. *Biochem J*, 2003, 376(1): 1-14.
- [3] SEILER N, RAUL F. Polyamines and apoptosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9(3): 623-642.
- [4] MEYSKENS F L, GERNER E W. Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(5): 945-951.
- [5] TOBIAS K E, KAHANA C. Exposure to ornithine results in excessive accumulation of putrescine and apoptotic cell death in ornithine decarboxylase overproducing mouse myeloma cells [J]. *Cell Growth Differ*, 1995, 6(10): 1279-1285.
- [6] SHANTZ L M, LEVIN V A. Regulation of ornithine decarboxylase during oncogenic transformation: mechanisms and therapeutic potential [J]. *Amino acids*, 2007, 33(2): 213-223.
- [7] BERCOVICH Z, SNAPIR Z, KEREN-PAZ A, et al. Antizyme affects cell proliferation and viability solely through regulating cellular polyamines [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(39): 33778-33783.
- [8] SAKATA K, KASHIWAGI K, IGARASHI K. Properties of a polyamine transporter regulated by antizyme [J]. *Biochem J*, 2000, 347(1): 297-303.
- [9] IVANOV I P, GESTELAND R F, ATKINS J F. Antizyme expression: a subversion of triplet decoding, which is remarkably conserved by evolution, is a sensor for an autoregulatory circuit [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(17): 3185-3196.
- [10] COFFINO P. Regulation of cellular polyamines by antizyme [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(3): 188-194.
- [11] RAY R M, BHATTACHARYA S, BAVARIA M N, et al. Spermidine, a sensor for antizyme 1 expression regulates intracellular polyamine homeostasis [J]. *Amino acids*, 2014, 46(8): 2005-2013.
- [12] RAY R M, BHATTACHARYA S, BAVARIA M N, et al. Antizyme (AZ) regulates intestinal cell growth independent of

- polyamines [J]. *Amino acids*, 2014, 46(9): 2231-2239.
- [13] FONG L Y, FEITH D J, PEGG A E. Antizyme overexpression in transgenic mice reduces cell proliferation, increases apoptosis, and reduces N-nitrosomethylbenzylamine-induced forestomach carcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(14): 3945-3954.
- [14] GRUENDLER C, LIN Y, FARLEY J, et al. Proteasomal degradation of Smad1 induced by bone morphogenetic proteins [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(49): 46533-46543.
- [15] LIN Y, MARTIN J, GRUENDLER C, et al. A novel link between the proteasome pathway and the signal transduction pathway of the bone morphogenetic proteins (BMPs) [J]. *BMC cell biology*, 2002(3): 15-35.
- [16] NEWMAN R M, MOBASCHER A, MANGOLD U, et al. Antizyme targets cyclin D1 for degradation. A novel mechanism for cell growth repression [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(40): 41504-41511.
- [17] ZHANG A L, WU X Y, LI J Q, et al. Molecular characterization, tissue expression and nucleotide variation of the porcine AZ1 gene [J]. *Gene*, 2012, 501(1): 79-84.
- [18] MURAKAMI Y, ICHIBA T, MATSUFUJI S, et al. Cloning of antizyme inhibitor, a highly homologous protein to ornithine decarboxylase [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(7): 3340-3342.
- [19] DUMONT J, ZUREIK M, BAUTERS C, et al. Association of OAZ1 gene polymorphisms with subclinical and clinical vascular events [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(10): 2120-2126.
- [20] ZHANG H, WU X Y, LIU D W, et al. Antizyme 1 gene is associated with loin muscle area and Marbling in Landrace × Lantang F-2 resource population [J]. *Agricultural sciences in China*, 2009, 8(7): 887-890.
- [21] 李仕新, 陈松玲, 李加琪, 等. 长大二元杂交猪胎儿成纤维细胞的生物学特性 [J]. *四川农业大学学报*, 2012, 30(2): 220-225.
- [22] 张爱玲, 吴雪艳, 李加琪, 等. 猪抗酶基因 1(OAZ1)5'调控区单核苷酸多态性与屠宰性状的相关性分析 [J]. *广东农业科学*, 2011, 38(14): 10-13.
- [23] RODRIGUEZ-SALLABERRY C, SIMMEN R F A, SIMMEN R C. Polyamine- and insulin-like growth factor-I-mediated proliferation of porcine uterine endometrial cells; a potential role for spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase during peri-implantation [J]. *Biol Reprod*, 2001, 65(2): 587-594.

Identification of core promoter of porcine AZ1 gene and transcriptional activity of haplotypes

ZHANG Ailing^{1,2} SUN Xianyue¹ ZHANG Zhe¹ LI Jiaqi¹ ZHANG Hao¹

1. *Guangdong Provincial Key Laboratory of Agro-Animal Genomics and Molecular Breeding / College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China* ;
2. *College of Biological and Food Engineering, Guangdong University of Education, Guangzhou 510303, China*

Abstract In the study, the core region of porcine AZ1 gene promoter was identified through the Dual-luciferase Reporter Assay System. SNPs and haplotypes were analyzed in Lantang and Landrace pig populations, and the transcriptional activities of different haplotypes were measured. The results showed that the region of -453 / +79 nt was the core region of the promoter. Eight SNPs were found in the two populations, and they were -713 T>C, -584 A>C, -476 G>A, -365 T>C, -348 C>T, -294 G>C, -288 T>G, and -234 T>C. Richer SNPs were found in the Lantang pigs. In the Landrace population, GG and GT genotypes were found at -288 locus, and no heterozygotes were detected in the other seven loci. The frequencies of predominant haplotypes of LTH1 (TAGCCGTC) and LTH2 are 0.526 and 0.166 respectively in Lantang population, and the Landrace-H haplotype (TAGTCGGT) was predominant in the Landrace population. The activity of LTH1 was stronger than that of LTH2 and Landrace-H. The SNPs of -234 T>C, -365 T>C and -288 T>G might be the causative mutations that change the different activities of the haplotypes.

Keywords pig; AZ1(antizyme 1) gene; promoter; SNP; haplotype

(责任编辑:边书京)