

猪 MX1 基因第 8 内含子多态性 及与生产性状的关联分析*

武华玉^{1,2} 李良华^{1,2} 彭先文^{1,2} 宋忠旭¹ 冯政¹ 梅书棋^{1,2**}

1. 湖北省农业科学院畜牧兽医研究所, 武汉 430064; 2. 动物胚胎工程及分子育种湖北省重点实验室, 武汉 430064

摘要 对猪 MX1 基因第 8 内含子进行了克隆、测序, 结果发现在 167 bp 处发现 1 个 G/A 突变, 引起 *Hpa* II 酶切多态。利用 PCR-RFLP 方法对国内外 6 个猪种 MX1 基因第 8 内含子的多态性进行分析, 发现在大白、长白、通城、清平、鄂西黑猪、大梅 F₂ 代等 6 个品种中等位基因 B 的基因频率分别为 0.83、0.89、0.94、0.87、0.89 和 0.55; 在 180 头大梅 F₂ 代资源家系中进行性状关联分析发现 MX1 基因第 8 内含子的多态性与屠宰率、瘦肉率、眼肌高显著关联, 屠宰率、眼肌高加性效应显著; 眼肌高、瘦肉率显性效应显著。

关键词 猪; MX1; PCR-RFLP; 关联分析

中图分类号 S 828.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)04-0475-04

MX 蛋白是由 Lindenmann 等在研究近交系 A2G 小鼠对流感病毒具有天然免疫力这一现象时发现并命名的一种 GTPase 结合蛋白, 在哺乳动物、鸟类、鱼类中高度保守, 均受干扰素的诱导表达, 主要对 RNA 病毒敏感, 具有抗流感病毒功能^[1]。体内试验研究表明, MX 基因受 I 型干扰素、双链 RNA 的诱导或病毒感染的情况下被激活, 表达 MX 蛋白发挥 GTP 酶活性, 水解病毒核衣壳, 抑制病毒复制, 以抵抗病毒对细胞的感染^[2-3]。

MX1 基因是迄今为止找到的为数不多的抗性基因或抗性标记之一。Salomon 等^[4] 发现表达 MX1 蛋白小鼠对高致病性禽流感 H5N1 具有天然抗性。Horisberger 等^[5] 研究发现猪 MX 蛋白可以抑制流感病毒、水疱性口炎病毒的生长, Zhang 等^[6] 发现猪繁殖与呼吸综合症病毒的感染能诱导 MX1 基因的转录以及 MX1 蛋白的表达。

猪 MX1 基因定位于 SSC13q47-49, 与干扰素受体 1 基因紧密连锁^[7], 在猪 13 号染色体定位了大量猪生产性状 QTL, 其中在 SSC13q46-49 区域定位了平均背膘厚和日增重的 QTL^[8], 因此有必要探讨 MX1 基因对生长、胴体等生产性能的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的大白猪、长白猪均采自湖北省农业科学院猪场, 通城猪采自湖北省通城县通城原种猪场, 清平猪采自当阳市清平猪保种场, 鄂西黑猪采自湖北省恩施州鄂西黑猪原种场, 样本含量见表 1。大白猪×梅山猪(L×M)资源家系 F₂ 代 180 头, 全部进行屠宰, 根据国家标准 GB8467-87^[9] 进行测定。采集血液, 利用常规的苯酚/氯仿抽提方法提取基因组 DNA^[10], 用 TE 溶液将 DNA 样品稀释成 50 ng/ μ L, 于 -20 °C 贮存备用。

1.2 引物及主要试剂

根据长白猪 MX1 基因序列(GenBank 登录号: DQ144503), 设计猪的内含子 8 的特异引物, 引物序列如下:

Forward primer: 5'-TTACAGAAGTATGGCTCCG-3'

Reverse primer: 5'-TTGGTAAACAGCCGACAC-3'

引物由上海生工生物技术有限公司合成, 去离子水溶解, -20 °C 保存。限制性内切酶 *Hpa* II、pMD-18T vector system、DH5 α 购自 TaKaRa 公司(大连); Gel Extraction Kit 购自上海生工生物技术有限公司。

收稿日期: 2009-08-24; 修回日期: 2010-04-16

* “十一五”国家科技支撑项目(2006BAD01A08, 2008BADB2B02)、国家生猪现代产业体系建设专项项目(NYCYTX-009)、湖北省农业科技创新中心项目(2007-602-001-03)和动物胚胎工程及分子育种湖北省重点实验室开放课题(2010ZD140-149)资助

** 通讯作者. E-mail: msqife@163.com

武华玉, 男, 1980 年生, 硕士, 助理研究员. 研究方向: 动物育种与健康养殖. E-mail: huayuwood@163.com

1.3 PCR 扩增与克隆、测序

PCR 扩增体积为 25 μL , 体系组分为: 50 ng 模板 DNA, 2.5 mmol/L $1\times\text{Taq}$ buffer, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 2.5 mmol/L dNTPs, 0.5 mmol/L PCR primers, 2 U Taq DNA 聚合酶 (MBI)。PCR 的运行程序如下: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^\circ\text{C}$ 45 s, 59 $^\circ\text{C}$ 40 s, 72 $^\circ\text{C}$ 40 s, 35 个循环; 最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。

PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测; 将目的带用 Gel Extraction Kit 试剂盒纯化回收, 回收后的 PCR 产物片段与 pMD-18T vector system 连接并转化 DH5 α , 经鉴定正确的重组克隆子送北京奥科生物公司测序。

1.4 PCR-RFLP 分析

选用 Hpa II 对 PCR 产物进行消化, 酶切反应总体积为 10 μL , 其中 PCR 扩增产物 5 μL , 限制性内切酶 0.5 μL (10 U/ μL), $10\times$ buffer 1 μL , ddH $_2$ O 3.5 μL , 置 37 $^\circ\text{C}$ 恒温反应过夜, 后经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5 统计分析

根据 Liu^[11] 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 程序进行最小二乘分析, 同时采用 reg 程序计算基因加性效应和显性效应。模型:

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

Y_{ij} 为性状表型值, μ 为平均值, G_i 为基因型效应 (包括基因加性效应和显性效应; 加性效应用 -1, 0 和 1 分别代表 AA、AB 和 BB 基因型, 显性效应用 1, -1 和 1 分别代表 AA、AB 和 BB 基因型); S_k 、 Y_l 、 F_j 为固定效应, 分别为性别、年度、家系效应, b_{ijkl} 为屠宰体质量的回归系数, 胴体性状以屠宰体质量为协变量, e_{ijkl} 为残差效应。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增产物

Primer pair 分别在大白猪、长白猪、通城、清平、鄂西黑猪、大梅 F $_2$ 代等品种中扩增, 取扩增产物 5 μL 在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳, 其大小为 563 bp, 与 GenBank 上公布的猪 MX1 基因的序列大小一致 (图 1)。PCR 产物经切胶回收、克隆和测序, 结果发现在 167 bp 处有 1 个 G/A 转换, 引起 Hpa II 酶切位点 (C'CGG) 多态。

2.2 扩增产物的 PCR-RFLP 分析

该位点经限制性内切酶 Hpa II 酶切分析发现:

当 167 bp 处的碱基都为 A 时 Hpa II 不识别该位点, 记为 AA 型 (339 bp + 224 bp), 当突变位点碱基都为 G 时 Hpa II 酶识别该位点, 记为 BB 型 (224 bp + 174 bp + 165 bp), 当 G 和 A 都存在时记为 AB 型 (339 bp + 224 bp + 174 bp + 165 bp)。猪 MX1 基因的 PCR- Hpa II-RFLP 的酶切分型结果如图 2 所示。

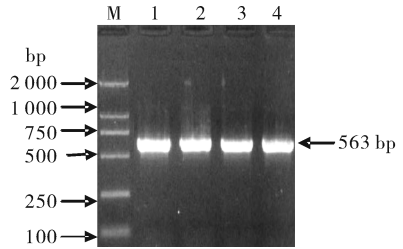


图 1 猪 MX1 基因第 8 内含子的扩增结果
Fig. 1 PCR amplification results of the 8th intron of porcine MX1 gene

图 1 猪 MX1 基因第 8 内含子的扩增结果
Fig. 1 PCR amplification results of the 8th intron of porcine MX1 gene

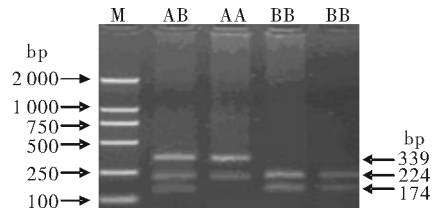


图 2 猪 MX1 基因的 PCR- Hpa II-RFLP 的酶切分型结果
Fig. 2 Patterns of PCR- Hpa II-RFLP of porcine MX1 gene

表 1 MX1 基因第 8 内含子 Hpa II 酶切多态在不同品种中的分布结果¹⁾
Table 1 Distribution of PCR- Hpa II-RFLP genotype in MX1 gene intron 8 and allele frequencies in six pig breeds

品种 Breed	数量 No.	基因型 Genotype			等位基因频率 Allele frequency	
		AA	AB	BB	A	B
大白 Large White	38	3(0.08)	7(0.18)	28(0.74)	0.17	0.83
长白 Landrace	32	1(0.03)	5(0.16)	26(0.81)	0.11	0.89
通城 Tongcheng	24	1(0.04)	1(0.04)	22(0.92)	0.06	0.94
清平 Qingping	28	2(0.07)	3(0.11)	23(0.82)	0.13	0.87
鄂西黑猪 Exi black	35	2(0.06)	4(0.11)	29(0.83)	0.11	0.89
大梅 F $_2$						
Large White \times Meishan F $_2$	180	36(0.2)	89(0.49)	55(0.31)	0.45	0.55

1) 括号中数据表示基因型频率 Data in round parentheses show frequencies of genotypes.

2.3 猪MX1基因Hpa II位点在不同猪种中的基因频率和基因型频率

在4个中国猪种和2个国外猪种中检测猪MX1基因第8内含子PCR-Hpa II-RFLP多态性分布频率,检测结果如表1所示。在大白、长白、通城、清平和鄂西黑猪中基因型频率和基因频率差异不显著,BB基因型占优势,等位基因B的频率较高,其在大白、长白、通城、清平和鄂西黑猪中的频率分别为0.83、0.89、0.94、0.87、0.89。在大梅F₂群体中A

等位基因频率为0.45,B等位基因频率为0.55。

2.4 猪MX1基因Hpa II位点基因型与生产性状的关联分析

应用SAS软件对180头大梅F₂代个体进行MX1基因不同基因型与生产性状的关联分析和遗传效应估计,结果见表2。MX1基因第8内含子Hpa II位点与屠宰率、瘦肉率、眼肌高显著关联;屠宰率、眼肌高在该家系中表现为加性效应($P<0.05$),眼肌高和瘦肉率表现为显性效应。

表2 猪MX1基因第8内含子PCR-Hpa II-RFLP基因型与胴体性状的统计分析¹⁾

Table 2 Statistical analysis of porcine MX1 PCR-Hpa II-RFLP genotype in intron 8 with carcass traits

性状 Trait	MX1 PCR-Hpa II-RFLP 基因型 MX1 PCR-Hpa II-RFLP genotype			基因效应 Genetic effect	
	AA 基因型 AA genotype	AB 基因型 AB genotype	BB 基因型 BB genotype	加性效应 Additive	显性效应 Dominance
	瘦肉率 LMP/%	54.595±0.343 a	56.138±0.357 b	55.380±0.460 a	-0.355±0.292
屠宰率 DP/%	72.855±0.442 a	72.026±0.460 a	71.441±0.595 b	0.689±0.374 *	0.044±0.298
内脂率 IFR/%	2.975±0.060	2.968±0.062	2.900±0.080	0.033±0.051	-0.015±0.040
肩部膘厚 SFT/cm	3.500±0.061	3.387±0.063	3.504±0.081	-0.007±0.051	0.056±0.041
6~7 腰椎间膘 6~7 RFT/cm	2.761±0.048	2.717±0.050	2.701±0.065	0.027±0.040	0.006±0.032
胸腰椎间膘厚 TFT/cm	2.029±0.046	1.964±0.048	1.982±0.062	0.021±0.038	0.020±0.030
臀部膘厚 BFT/cm	1.894±0.055	1.896±0.057	1.839±0.074	0.022±0.046	0.015±0.037
平均背膘 ABT/cm	2.548±0.045	2.491±0.047	2.508±0.061	0.016±0.038	0.017±0.030
眼肌高 LEH/cm	7.210±0.184 a	8.043±0.192 b	8.034±0.247 b	-0.399±0.155 *	-0.208±0.123 *
眼肌宽 LEW/cm	6.032±0.156	5.883±0.163	5.774±0.210	0.214±0.132	0.107±0.105
眼肌面积 LEA/cm ²	29.295±0.397	30.765±0.414	29.780±0.533	-0.246±0.332	-0.614±0.265

1)小写字母表示基因型间差异显著($P<0.05$),*表示基因效应差异显著($P<0.05$)。Significantly differences between the genotype are indicated with different lower case superscripts are at $P<0.05$,asterisk(*) indicates significant differences between the gene effect at $P<0.05$. LMP:Lean meat percentage; DP:Dressing percentage; IFR:Internal fat rate; SFT:Shoulder fat thickness; 6~7RFT:6-7 rib fat thickness; TFT:Thorax-waist fat thickness; BFT:Buttock fat thickness; ABT:Average backfat thickness; LEH:Loin eye height; LEW:Loin eye width; LEA:Loin eye area.

3 讨论

3.1 MX1基因的突变研究

Takeya等^[12]分离了猪MX1基因第14外显子的序列,同时对其在7个不同猪种中的多态性进行了研究,结果发现了3种不同形式的多态,导致猪MX1蛋白C末端的结构差异引起抗病性的差异;吴圣龙等^[13]用PCR-RFLP方法对国内外7个猪种MX1基因第14外显子的多态性进行分析,共检测到3个等位基因在不同品种中等位基因频率呈现很大差别。Nakajima等^[14]研究发现猪MX1基因第13外显子3bp的缺失和14外显子11bp的缺失,11bp缺失使MX1丧失了对滤过性病毒活性的抗性。

本研究首次发现MX1基因第8内含子167bp处突变在大白、长白、通城、清平和鄂西黑猪中均具有多态性,但呈偏态分布,可能是由于样本含量较小

所致。该位点在180头大梅F₂代中A、B两等位基因的频率接近。猪MX1基因第8内含子片段具有大量的转录因子结合位点,转录因子具有调控基因表达功能,因此猪MX1基因第8内含子对该基因的表达可能起着重要的调控作用。

3.2 MX1基因性状关联分析

本试验中,AB基因型猪的瘦肉率明显优于AA和BB基因型猪($P<0.05$),A和B基因似乎存在一种“杂种优势”的现象。AB、BB基因型屠宰率、眼肌高明显高于AA基因型($P<0.05$),屠宰率、眼肌高在该家系中表现为加性效应($P<0.05$),在育种实践中有利于对猪胴体性状屠宰率、眼肌高的遗传固定,眼肌高和瘦肉率表现为显性效应,在生产实践中有利于利用杂种优势提高眼肌高和瘦肉率。

猪的生产性能受疾病感染和遗传机制双重因素影响,如果猪对某种疾病只有部分抗性,则其生产性能下降程度由抗性程度和感染程度决定。目前对抗

病力、免疫应答能力与生产性能之间的关系研究甚少,所得结果也有一定的差异^[15]。MX1 基因对多个胴体性状具有显著的遗传效应,这对于在抗病育种中应用该基因十分有利,其遗传机制有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] VAN-DER-BLIEK A M. Functional diversity in the dynamin family[J]. Trends Cell Biol,1999,9(3):96-102.

[2] LEE S H, VIDAL S M. Functional diversity of the MX proteins: variations on a theme of host resistance to infection[J]. Genome Res,2002,12:527-530.

[3] HALLER O, STAEHELI P, KOCHS G. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense[J]. Biochimie,2007,89(6/7):812-818.

[4] SALOMON R, STAEHELI P, KOCHS G, et al. Mx1 gene protects mice against the highly lethal human H5N1 influenza virus[J]. Cell Cycle,2007,6(19):241721-241724.

[5] HORISBERGER M A. Virus-specific effects of recombinant porcine interferon- γ and the induction of Mx proteins in pig cells[J]. J Interferon Res,1992,12(6):439-444.

[6] ZHANG X, SHIN J, MOLITOR T W, et al. Molecular responses of macrophages to porcine reproductive and respiratory

syndrome virus infection[J]. Virology,1999,62(1):152-162.

[7] RETTENBERGER G, BRUCH J, FRIES R, et al. Assignment of 19 porcine type I loci by somatic cell hybrid analysis detects new regions of conserved synteny between human and pig[J]. Mamm Genome,1996,7(4):275-279.

[8] KIM C, HONG Y, YUN S, et al. Use of microsatellite markers to detect quantitative trait loci in Yorkshire pigs[J]. J Reprod Dev,2006,52(2):229-237.

[9] 熊远著,邓昌彦.瘦肉型种猪性能测定技术规程[M].北京:中国农业出版社,1999.

[10] 熊统安,朱猛进,郭宏,等.中国藏猪 ESR 基因 *Pvu* II 位点多态性分析[J].华中农业大学学报,2005,24(5):485-488.

[11] LIU B H. Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis[M]. New York: CRC Press,1998:404-409.

[12] TAKEEY M, CECE S, EMIKO N, et al. Three types of polymorphisms in exon 14 in porcine *Mx1* gene[J]. Biochemical Genetics,2001,39(7/8):251-260.

[13] 吴圣龙,包文斌,鞠慧萍,等.猪 *Mx1* 基因第 14 外显子多态性分析及新突变位点的发现[J].遗传,2007,29(6):693-698.

[14] NAKAJIMA E, MOROZUMI T, TSUKAMOTO K, et al. A naturally occurring variant of porcine *Mx1* associated with increased susceptibility to influenza virus *in vitro* [J]. Biochem Genet,2007,45(1/2):11-24.

[15] 姜勋平,刘永刚,熊远著,等.猪 *FUT1* 基因对肉品质和胴体性状的影响[J].遗传,2005,27(4):566-570.

Polymorphism of Intron 8 of Porcine *MX1* Gene and Its Association Analysis with Productive Traits

WU Hua-yu^{1,2} LI Liang-hua^{1,2} PENG Xian-wen^{1,2}
SONG Zhong-xu¹ FENG Zheng¹ MEI Shu-qi^{1,2}

1. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan 430064, China;

2. Hubei Key Laboratory of Animal Embryo and Molecular Breeding, Wuhan 430064, China

Abstract Cloning and sequencing of the eighth intron of porcine *MX1* gene indicated that a G167A substitution which can be detected by restriction endonuclease *Hpa* II. This polymorphism was analyzed with PCR-RFLP among six foreign and Chinese pig breeds. The analysis results showed that frequencies of allele B in six pig breeds was 0.83, 0.89, 0.94, 0.87, 0.89, 0.55 in Large White, Landrace, Tongcheng, Qingping, Exi black pig, Large White \times Meishan F₂ progeny pigs respectively. Statistical analysis in 180 Large White \times Meishan F₂ progeny pigs showed that the *Hpa* II polymorphism in the F₂ population was significantly associated with dressing percentage, lean meat percentage, and loin eye height. Additive effects of dressing percentage, loin eye height were significant. Dominance effect of height and lean meat percentage was significant.

Key words pig; *MX1*; PCR-RFLP; association analysis

(责任编辑:边书京)