

猪雌激素受体基因(*ESR*)一个新多态位点的发现

张冬杰¹, 杨国伟², 刘 娣^{1,3}

(1. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业经济职业技术学院, 牡丹江 157041; 3. 黑龙江省农业科学院 哈尔滨 150086)

摘要: *ESR* 基因是影响猪产仔数的主效基因, 而且与猪的生长发育性状及胴体性状之间不存在负的基因多效性影响。目前对它的研究大都局限于 Rothschild 等人发现的 *Pvu* II 酶切位点。本实验采用 PCR-SSCP 方法, 对 *ESR* 基因的外显子 7 进行检测, 发现了一个新多态性位点, 得到 3 种基因型, 可以作为一个新的标记位点进一步研究。

关键词: 猪; *ESR* 基因; 产仔数性状; PCR-SSCP

中图分类号: S828

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)01-0036-03

A New Polymorphic Site of *ESR* Gene in Pigs

ZHANG Dong-Jie¹, YANG Guo-Wei², LIU Di³

(1. College of Animal Science and Technology, North East Agriculture University, Harbin 150030;
2. HeiLongJiang Agricultural Economy Professional College, Mudanjiang 157041;
3. HeiLongJiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: *ESR* (Estrogen Receptor) gene has been determined to be one of the major genes affecting phenotype of litter size without any genetic negative correlation to growth and carcass trait. Recent studies mainly focused on the *Pvu* II enzyme site found by Rothschild in 1996. An optimized standard PCR-SSCP protocol was employed to detect the exon 7 of *ESR* gene. The results showed that there were a new mutation site and three genotypes, which may be used as a new DNA marker site to further research.

Key words: pig; *ESR* (estrogen receptor); litter size; PCR-SSCP

雌激素受体基因(estrogen receptor, *ESR*)是美国依阿州立大学的 Rothschild 实验室自 1991 年开始利用候选基因法研究猪的产仔性状时确定的第一个候选基因, 选择该基因的理由是雌激素在猪的生殖循环周期中起着中心作用^[1]。他们在 1991 年对梅山猪与大白猪的合成系 DNA 进行扩增, 并用 *Pvu* II 内切酶进行 PCR-PFLP 分析, 发现了 3 种基因型并确定 B 基因为优势基因, 随后 Short 等人也对该结论进行了验证^[2~4], 吴常信、陈克飞等人^[5,6]采用相同的方法对我国的地方猪种进行了研究, 均得到了类似的结论。但是到目前为止对 *ESR* 基因的研

究大多局限于 Rothschild 和 Short 等人所发现的这个位点上, 很少有人进行其他位点的多态性研究。本实验通过对 *ESR* 基因外显子 7 序列的仔细检测, 发现了一个新的多态性位点。

1 材料和方法

1.1 PCR 反应程序及 PCR 产物检测

根据 GenBank 上所提交的 *ESR* 基因序列 (GenBank 登录号: AF034973) 设计引物 P1: 5'-CAC CGG CTC CCC TTG GAG T-3'; P2: 5'-AGT CAG GCC CGC TTT GG-3', 扩增片段长 174 bp, 反应程序

收稿日期: 2004-09-24; 修回日期: 2005-03-13

基金项目: 中国博士后基金资助 [Supported by Postdoctoral Foundation of China]

作者简介: 张冬杰 (1980—), 女, 在读博士生, 研究方向: 动物分子遗传。E-mail: zdj8109@163.com

通讯作者: 刘 娣 (1963—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: liudi1963@163.com

为:95℃ 5 min,94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 30 s 循环 30 次,72℃ 10 min。PCR 产物通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2 SSCP 分析

用 14% 非变性聚丙烯酰胺 + 1% 甘油的凝胶,室温下电压 115 V 电泳过夜,电泳结束后用 AgNO₃ 显色,待电泳条带清晰后换上去离子水停显,装入封口袋内保存。

2 实验结果

由点突变造成的 3 种基因型在非变性聚丙烯酰胺凝胶上表现为 3 种构像:AA、BB 均为 2 条带,但位置有明显区别,AB 则包含以上 4 条带。对纯合基因型个体进行测序,测得序列用 Primer5.0 软件进行分析,发现存在一个点突变 A→G,导致它所翻译的氨基酸发生了从组氨酸到精氨酸的改变(His→Arg),属于错义突变。

PCR-SSCP 检测结果如图 1 所示;基因型频率在不同猪品种间的比较如表 1 所示;测序结果如图 2 所示。

卡方检验结果表明东北民猪中 A、B 基因频率的分布与大约克、长白和杜洛克中 A、B 基因频率的分布差异显著($P < 0.01$)

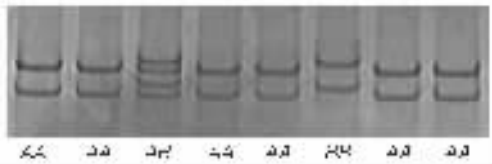


图 1 *ESR* 基因的点突变检测结果

Fig.1 Detection result of mutation site in *ESR* gene

表 1 基因型频率在不同猪种间的比较

Table 1 The comparisons of frequencies of genotype in different pig breeds

基因型 Genotype	东北民猪 Min pig	杜洛克 Duroc	大约克 Yorkshire	长白 Landrace
AA	83.3% (30)	100% (85)	100% (90)	100% (102)
BB	5.6% (2)	0(0)	0(0)	0(0)
AB	11.1% (4)	0(0)	0(0)	0(0)

注:括号内是不同基因型的个体数。

Note: Bracket means the number of different genotypes.

```

AA TCACAGACACCTTGATCC A C C T G A T G G C C A A A G C G G G
BB TCACAGACACCTTGATCC G C C T G A T G G C C A A A G C G G G

```

图 2 *ESR* 基因突变位点处的测序结果

Fig.2 Sequence of mutation site in *ESR* gene

3 讨论

雌激素受体是一种与特定激素应答 DNA 元件相结合的激活转录因子,它广泛存在于各种动物体内,参与雌性脊椎动物性腺组织基因的表达与调控。结合了配体的 *ESR* 与雌激素应答元件相互作用可以改变受雌激素调控基因的转录,进一步影响雌性第二性征、繁殖周期、生殖力、妊娠维持,从而影响胚胎发育和系统分化,进而影响家畜的繁殖性能及其他生产性能^[7]。

ESR 基因对母猪繁殖性能的影响,最早是由 Rothschild 等人发现的,他们用含 50% 梅山猪血缘的两个合成系涉及 50 个全同胞家系的 161 头母猪为材料,对 *ESR* 基因进行 RFLPs 分析,发现了一个 *Pvu* II 多态性酶切位点,并证明这个多态性位点与初生窝产仔数高度相关,纯合子 BB 型母猪第一胎产仔数和产活仔数都比纯合子 AA 母猪多 2.3 头($P < 0.01$),所有胎次多 1.5 头($P < 0.01$)。随后很多人都对这一结论进行了验证,均证明这个位点可以用来作为猪高产仔数的标记辅助选择位点^[8,9]。但是猪的 *ESR* 基因较大,在长达 14 kb 的基因序列中是否还存在其他的有效的标记辅助选择位点,仍需要做大量的实验来检测和验证。

到目前为止,只有极少数的几个人对 *ESR* 基因的其他多态性位点进行过研究^[10~12],Stanislaw 等人采用 PCR-RFLP 方法对 103 头波兰大白猪进行分析,发现了一个多态性酶切位点 *Ava* I,得到 3 种基因型 WW,MM 和 WM,并发现这个突变位点与猪的产仔数性状显著相关;Drogemuller 等人在 *ESR* 基因上发现了 *Ava* I 和 *MspA* II 两个多态性酶切位点均与产仔数性状相关;Munoz 等通过放射杂交技术,发现了位于 1 号染色体上的 *ESR2* 基因,而且在其外显子 5 处通过 PCR-RFLP 方法,发现了一个多态性酶切位点 *Met/Val*,但经过验证该位点与产仔数性状相关不显著。以上实验均说明在 *ESR* 基因上,一定还存在着除了 *Pvu* II 以外的其他标记位点。

本实验通过对 *ESR* 基因外显子 7 序列的仔细

筛选,发现了一个新的多态性位点,以东北民猪、大约克、长白和杜洛克为实验材料,发现该位点在大约克、长白和杜洛克猪群中表现出极端的偏态分布,在这3个样本中均未检测到 *ESR* 基因的 *AB* 型和 *BB* 型,所有个体全部为 *AA* 型, *A* 基因频率为 100%, 而 *B* 基因频率为 0, 是极度不平衡群体;东北民猪群中 3 种基因型均存在, *A* 基因频率大于 *B* 基因频率,使用哈代-温伯格定律计算和卡方适合性检验结果表明,东北民猪群体是一个平衡群体。产生这一结果的原因很可能是由于东北民猪近些年来一直处于保种阶段,人为干预少,遗传资源保存良好,而大约克、长白和杜洛克为人工选育的商品猪种,在对繁殖性状或是其他经济性状进行选择时,将另一种纯合型个体淘汰掉了。

通过对纯合型个体测序发现,在扩增片段内,存在一个错译突变位点 $A \rightarrow G$, 导致它所翻译的氨基酸发生了从组氨酸到精氨酸的改变 ($His \rightarrow Arg$)。用 DNASTar 软件对这一片段所编码的蛋白质进行二级结构模拟,发现这个氨基酸的变化导致了其二级空间结构的变化,这种结构上的变化是否会影响其最终编码蛋白的结构和功能,进而影响 *ESR* 基因的生理功能都还需要进一步的实验研究。

从表型值来看,东北民猪是仅次于梅山猪的另一个高产猪种,它的平均窝产仔数和产活仔数都要高于杜洛克、大约克和长白猪^[13]。从目前的检测结果来看,3 个商品猪群中都不存在 *B* 基因, *B* 基因仅存在于东北民猪内,因此我们推测 *B* 基因的存在可能是导致 4 个猪种在繁殖性状上存在差异的一个因素,也可能是影响高产仔数的一个优势等位基因。

参考文献(References):

- [1] Isler B J, Irvin K M, Neal S M, Moeller S J, Davis M E. Examination of the relationship between the estrogen receptor gene and reproductive traits in swine. *Journal Animal Science*, 2002, 80(9): 2334~2339.
- [2] Rothschild M F, Carol Jacobson, David Vaske, Christopher, Tuggle, Lizhen Wang, Tom Short, Gregg Eckardt, Shoji Sasaki, Amy Vincent, David McLaren, Olwen Southwood, Hein Van der Steen, Alan Mileham, Graham Plastow. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *National Academy Science*, 1996, 93(1): 201~205.
- [3] Rothschild M F, Larson C D, Jacobson, Pearson P. Pvu II polymorphisms at the porcine estrogen receptor locus (*ESR*). *Animal Genetic*, 1991, 22(5): 448.
- [4] Short T H, Rothschild M F, Southwood O I, McLaren D G, Vries A de, Steen H van der, Eckardt G R, Tuggle C K, Helm J, Vaske D A, Mileham A J, Plastow G S. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. *Journal of Animal Science*, 1997, 75(12): 3138~3142.
- [5] CHEN Ke-Fei, HUANG Lu-Sheng, LI Ning, ZHANG Qin, LUO Ming, WU Chang-Xin. The genetic effect of estrogen receptor (*ESR*) on litter size traits in pig. *Acta Genetica Sinica*, 2000, 27(10): 853~857.
陈克飞, 黄路生, 李宁, 张勤, 罗明, 吴常信. 猪雌激素受体 (*ESR*) 基因对产仔数性状的影响. *遗传学报*, 2000, 27(10): 853~857.
- [6] JIANG Yun-Liang, LI Ning, XI Qian-Yun, WU Chang-Xin. Detection of point mutation of porcine estrogen receptor gene (*ESR*) by PCR-SSCP approach. *Hereditas (Beijing)*, 2000, 22(4): 214~216.
姜运良, 李宁, 习欠云, 吴常信. 猪雌激素受体基因 (*ESR*) 点突变的 PCR-SSCP 检测. *遗传*, 2000, 22(4): 214~216.
- [7] MAO Yong-Jiang, DING Jia-Tong. Advances in estrogen receptor of pig. *Heilongjiang Journal of Animal Reproduction*, 2003, 11(3): 17~20.
毛永江, 丁家桐. 猪雌激素受体基因研究进展. *黑龙江动物繁殖*, 2003, 11(3): 17~20.
- [8] LIU Shu-Fang, DU Li-Xin, YAN Yan-Chun. Relationship between Pvu II polymorphisms at estrogen receptor gene and litter size in swine. *Hereditas (Beijing)*, 2002, 24(3): 267~270.
柳淑芳, 杜立新, 闫艳春. 猪雌激素受体基因 Pvu II 多态性与产仔数性状的关系. *遗传*, 2002, 24(3): 267~270.
- [9] XU Ning-Ying, ZHANG Sheng-Qiao, PENG Shu-Hong. Investigation the distribution and their effects on reproduction traits of three major genes in Jinhua pigs. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(12): 1090~1096.
徐宁迎, 章胜乔, 彭淑红. 金华猪 3 个繁殖性状主基因的分布及其效应的研究. *遗传学报*, 2003, 30(12): 1090~1096.
- [10] Munoz G, Ovilo C, Amills M, Rodriguez C. Mapping of the porcine oestrogen receptor 2 gene and association study with litter size in Iberian pigs. *Animal Genetics*, 2004, 35(3): 242~244.
- [11] Stanislaw KAMINSKI, Anna RUSC, Pawel BRYM. Relation between Ava I polymorphism within the estrogen receptor gene (*ESR*) and meatiness in Polish Large White boars. *Journal of Applied genetics*, 2003, 44(4): 521~524.
- [12] Drogemuller C, Thieven U, Harlizius B. An Ava I and a MspA II polymorphism at the porcine oestrogen receptor (*ESR*) gene. *Animal Genetics*, 1997, 28(1): 59.
- [13] Editorial Group of the "Pig Breeds in China". Pig Breeds in China. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishes, 1986, 62~133.
中国猪品种志编写组. 中国猪品种志. 上海: 上海科学技术出版社, 1986, 62~133.