

骨调素基因多态性及其与大河乌猪 繁殖性状相关分析的研究

尚帮华, 杨 婷, 连林生*, 鲁绍雄
(云南农业大学动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 研究了骨调素基因对大河乌猪繁殖性能的影响。结果表明, 大河乌猪初产活仔数、二产活仔数各基因型之间差异显著 ($P < 0.05$), 其中, 初产活仔数的基因型 189/171/166/150 与基因型 189/171/150 之间差异显著, 二产活仔数的基因型 166/150 与基因型 189/171, 189/166 之间差异显著; 而初产的总产仔数、乳头数、初生仔重各基因型间差异不显著。骨调素基因型 189/171/166/150 和基因型 166/150 是有利基因型, 骨调素可能是影响大河乌猪繁殖性状的候选基因, 可以作为提高大河乌猪初产活仔数和二产活仔数的遗传标记。

关键词: 大河乌猪; 骨调素; 繁殖性状

中图分类号: S 828.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2007)06-0843-04

Study on Osteopontin Gene Polymorphism and Relevance Analyses between the Polymorphism and Reproductive Traits of Black Dahe Pig

SHANG Bang-hua, YANG Ting, LIAN Lin-sheng, LU Shao-xiong
(Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: In this paper, the effect of Osteopontin (OPN) gene on the Black Dahe pig reproductive performance was researched. The results indicate that the genotypes between the first number born alive and the second number born alive are significantly different ($P < 0.05$), and the genotypes of the first number born alive between with 189/171/166/150 and 189/171/150 are significantly different, and the genotypes of the second number born between with 166/150 and 189/171, 189/166 are significantly different. But the genotypes among the number born alive (NBA), teat number and weight at birth are not significantly. The genotypes of Osteopontin (OPN) gene with 189/171/166/150 and 166/150 are advantageous genotypes. Therefore, Osteopontin (OPN) gene are likely to candidate gene infected to reproductive traits of Black Dahe pig. It can improve the first number born alive and the second number born alive on Black Dahe pig as genetic marker.

Key words: Black Dahe pig; OPN; reproductive traits

大河猪是首批公布的国家级保护猪品种, 因原产于云南省富源县大河、营上一带而得名, 以肉质优良、适宜加工优质云腿、毛色火红、耐粗饲料等为主要特点。大河乌猪是在大河猪 20 年选优提纯的

基础上, 应用现代遗传育种理论和技术, 经 6 个世代的持续选育、扩繁中试推广, 在云南首次育成的生产优质肉和腌制优质火腿的腌肉型猪种。2002 年经国家畜禽品种审定委员会审定通过, 农业部批

收稿日期: 2007-01-15 修回日期: 2007-04-16

* 通讯作者

作者简介: 尚帮华(1978-), 男, 湖北石首人, 在读研究生, 主要从事动物分子遗传育种研究。

E-mail: sanbang00@yahoo.com.cn

准并发布公告为国家培育新品种,中心产地在云南省曲靖市富源县^[1]。大河乌猪被毛乌黑,毛尖略带褐色,在阳光照射下显金黄色,俗称“黑火毛”,体质结实,体型匀称,以肌肉脂肪含量高为显著特征,具有肉质好、瘦肉率适中、生长快、耐粗饲、抗逆性强等优良特性,适合腌制优质“云腿”。

对大河乌猪不断选优提纯的过程,也是对猪经济性状不断选择和改良的过程。近 20 年来,随着人类基因组计划的完成和动物基因组计划的进行,猪基因组上明确的基因和标记越来越多,这为寻找影响猪重要经济性状的主效基因和候选基因提供了方便。目前,人们认为,影响猪繁殖性状的主效基因为 ESR 基因和 FSH- β 基因,对其它的候选基因如骨调素基因,国外已有一些文献开展了研究,但国内研究的比较少,为了探讨影响大河乌猪繁殖性状的候选基因的效应,特选择骨调素基因。

骨调素 (Osteopontin, OPN) 又称骨桥蛋白、唾液酸蛋白 (Secreted Phosphoprotein I, SPP I), 由 HERRING 等于 1983 年首次从骨基质中分离出来。骨调素富含唾液酸,是一种含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp, RGD) 序列的分泌型糖基化蛋白, RGD 序列在不同物种的骨调素中普遍存在,对于骨调素的粘附功能起着重要作用。ROHRER^[2]等利用 PCR 检测骨调素基因启动子区域的双核苷酸重复序列,结果发现了 7 种重复片段,自 142 ~ 164 bp 核苷酸数不等,并出现交替基因。骨调素是一种重要的组织营养物质,在动物生殖过程中发挥着重要作用。国外大量报道已经证实骨调素基因与猪排卵率和子宫长度密切相关。STEINHEUER^[3]等报道骨调素基因有 10 个等位基因, 148 等位基因显著影响产活仔数 ($P < 0.01$)。SHORT^[4]等应用微卫星标记的方法研究位于 8 号染色体上的骨调素基因时,发现在商业合成系母猪中骨调素基因对产仔数有显著影响,在骨调素 8 个等位基因中,骨调素 4, 5, 6 对增加产仔数有影响。ELLEGREN^[5]等利用 RFLP 技术,通过连锁分析将骨调素基因定位到猪 8 号染色体上。后来又有研究发现,猪的骨调素基因位于 8 号染色体上的长臂末端。美国 MILEHAM, JOHN 等已经申请了骨调素基因和产仔数关系的专利(专利号为 6, 410, 227)。LIAW^[6]等利用微卫星标记和 PCR 技术,研究了母猪骨调素基因与新生仔猪存活率之间的关系,研究结果表明,骨调素可作为提高新生大白猪

存活率的遗传标记。针对骨调素基因对猪繁殖性状的显著影响,本文选择大河乌猪作为研究材料,旨在研究大河乌猪的骨调素基因型对产仔性状的影响,为利用遗传标记开展标记辅助选择改进大河乌猪的繁殖性能提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

在云南省富源县大河种猪场,根据猪场现有猪群的数量及现状,采用随机取样与典型群体抽样相结合的形式采集。用耳号钳夹取猪耳组织,每头采集组织约 20 g,剔除多余毛发后,装进采样管,用 75% 酒精浸泡,带回实验室 -20 °C 保存。共采集大河乌猪 125 头,其中公猪 18 头,母猪 107 头。母猪的繁殖性能记录包括初生仔重、乳头数和各胎次总产仔数和产活仔数。

1.2 DNA 模板的提取

猪耳组织的基因组 DNA 提取采用常规的酚、氯仿抽提方法^[7]。

1.3 酶及实验试剂

TaqDNA 聚合酶、pUC18 DNA/MspI 和 dNTP 均购于北京天根生化科技有限公司。

1.4 引物合成

根据 GeneBank 上的 DNA 序列,应用 Primer 5.0 进行引物设计,OPN 基因引物序列为:

5' - CCAATCCTATTCACGAAAAAGC - 3',

5' - CAACCCACTTGCTCCAC - 3',

引物由上海生工生物公司合成。

1.5 PCR 反应

PCR 总反应体积为 25 μ L: 10 \times Buffer 2.5 μ L, Mg²⁺ 终浓度 1.5 mmol/L, dNTP 终浓度 0.2 mmol/L, 引物 2 pmol/L, TaqDNA 聚合酶 0.5 IU, 模板 DNA 100 ng。

骨调素基因 PCR 反应程序: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 最后 72 °C 延伸 4 min 后, 冷却到 4 °C 直到取出。

1.6 统计分析

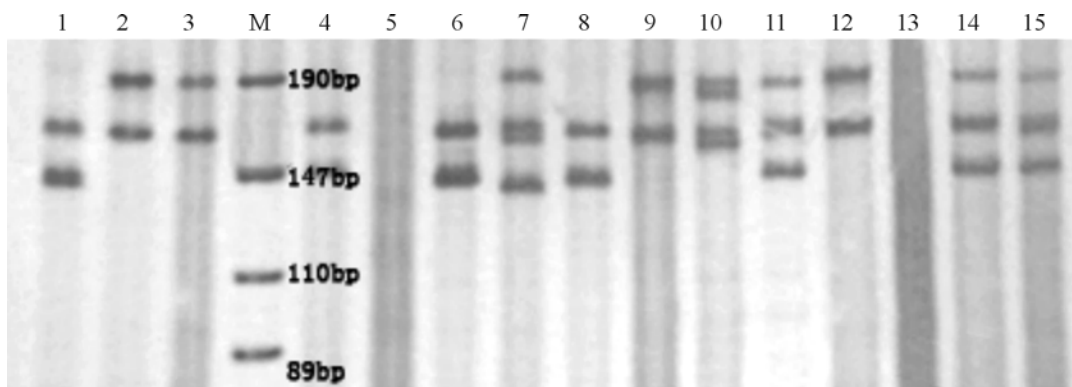
整理各胎次的初生仔重、乳头数和各胎次总产仔数和产活仔数的原始数据,应用 SAS6.12 统计分析软件对各基因型数据进行单因素方差分析,用最小显著差数法 (LSD) 进行多重比较,试验数据以“平均数 \pm 标准差”表示。

2 结果与分析

从图1可知,大河乌猪骨调素等位基因多态性非常丰富。通过标准 Marker pUC18 DNA/MspI (如图“M”示)进行对比发现,125 头大河乌猪样本中有 189 bp,171 bp,166 bp,150 bp 共 4 个条带,其中 166 bp 出现的次数最多;有 189 bp/171 bp,189 bp/171 bp/166 bp/150 bp,189 bp/171 bp/150 bp,189 bp/166 bp,189 bp/166 bp/150 bp,171 bp/166 bp/150 bp,171 bp/150 bp,166 bp/150 bp 共

8 种基因型,其中 189 bp /166 bp 基因型出现的频率最高。

从表1可知,大河乌猪初产活仔数和二产活仔数各基因型之间差异显著($P < 0.05$),其中,初产活仔数的基因型 189/171/166/150 与基因型 189/171/150 之间差异最显著,二产活仔数的基因型 166/150 与基因型 189/171,189/166 之间差异最显著;而乳头数、初生仔重和其余各胎次总产仔数、产活仔数各基因型间差异不显著。



1~15: 杂合子 Heterozygote; M: PUC18DNA/MSPi分子量标准 Markers

图1 大河乌猪骨调素基因扩增片段的微卫星分析结果

Fig. 1 Osteopontin gene amplified fragment microsatellite analysis of Dahe Black swine

表1 骨调素基因型对大河乌猪繁殖性状的影响

Tab.1 Effect of OPN genotype on reproductive traits of Black Dahe swine

基因型/bp genotype	初产 first number born			乳头数/个 teat number	二产活仔/头 the second number born
	总产仔/头 TNB	产活仔/头 NBA	初生仔重/kg weight at birth		
189/171	9.00 ± 1.56 ^a	8.15 ± 0.84 ^{ab}	0.85 ± 0.38 ^a	11.00 ± 0.87 ^a	7.40 ± 0.97 ^b
189/171/166/150	9.96 ± 1.01 ^a	9.00 ± 1.19 ^a	0.91 ± 0.27 ^a	11.09 ± 0.35 ^a	9.01 ± 2.18 ^{ab}
189/171/150	10.00 ± 1.56 ^a	6.95 ± 0.65 ^b	1.44 ± 0.38 ^a	12.30 ± 0.87 ^a	8.00 ± 0.82 ^{ab}
189/166	7.81 ± 0.64 ^a	7.67 ± 0.35 ^{ab}	1.25 ± 0.15 ^a	11.09 ± 0.35 ^a	7.91 ± 0.47 ^b
189/166/150	8.03 ± 0.89 ^a	8.00 ± 0.47 ^{ab}	0.94 ± 0.22 ^a	10.40 ± 0.50 ^a	8.01 ± 0.69 ^{ab}
171/166/150	9.00 ± 1.01 ^a	8.01 ± 1.46 ^{ab}	0.91 ± 0.27 ^a	11.09 ± 0.35 ^a	8.00 ± 1.54 ^{ab}
171/150	9.00 ± 1.01 ^a	7.49 ± 0.53 ^{ab}	0.91 ± 0.27 ^a	10.00 ± 0.61 ^a	9.11 ± 0.73 ^{ab}
166/150	10.50 ± 1.11 ^a	8.52 ± 0.57 ^{ab}	0.90 ± 0.27 ^a	10.38 ± 0.61 ^a	10.00 ± 0.82 ^a

注:同列数据上标字母相同者,经邓肯检验($\alpha = 0.05$)差异不显著。

Note: Means followed by different superscript letters in the same column are significant at the 0.05 level.

3 小结与讨论

骨调素基因具有丰富的多态性,SOUTHWOOD

研究了大白猪和梅山猪的骨调素基因多态性,结果发现有 13 个骨调素等位基因^[8]。本试验研究大河乌猪样本骨调素基因的多态性,共发现 4 个等位基

因, 这比 SOUTHWOOD 研究的少, 一方面可能是样本量少的缘故, 另一方面, 与大河乌猪养殖的地理范围局限性有关, 大河乌猪是由云南土著猪种大河猪经过提纯选育导入外种猪血缘育成的培育品种, 到目前为止, 养殖的区域范围还仅仅局限在云南省曲靖市及周边少数几个县市, 推广养殖的范围有限, 因此等位基因没有大白猪和梅山猪多。

SOUTHWOOD 还研究发现, 骨调素基因的 5 个等位基因在大白猪品系的初产仔数能获得显著的加性效应, 而经产仔数表现不明显。这与本试验研究的结果有一定差异, 大河乌猪各基因型之间除初产活仔数有显著差异外, 二产活仔数也有些显著差异。

国内孟庆利^[9]的研究结果表明, 骨调素 152/170 基因型是一个有利基因型, 显著影响二花脸和苏钟猪的产仔数, 与本试验研究初产活仔数的有利基因型 189/171/166/150 和二产活仔数的有利基因型 166/150 结果略有差异。有学者提出, 骨调素还可以作为母猪产仔数和仔猪生前成活率的一个候选基因。

本研究结果显示, 骨调素基因型 189/171/166/150 和基因型 166/150 是有利基因型, 分别显著影响大河乌猪的初产活仔数和二产活仔数, 因此, 可以作为提高大河乌猪产仔数的一个遗传标记开展标记辅助选择。在大河乌猪中存在着骨调素基因显著影响母猪的初产活仔数和二产活仔数, 但这种影响的确切效应还不明确, 是影响排卵率还是影响胚胎成活率, 有待进一步研究, 但初步研究表明, 骨调素基因可能是影响大河乌猪繁殖性状的候选基因。

[参考文献]

- [1] 司徒乐愉. 优质猪品种——大河乌猪[J]. 中国畜牧业通讯, 2003, 10:54-55.
- [2] ROHRER G A, ALEXANDER L J, KEELE J W, et al. . A microsatellite linkage map of the porcine genome [J]. *Genomics*, 1994, 136:231-245.
- [3] STEINHEURE R, DROQMULLER C, HAMANN H, et al. . Possible uses of genetic markers for improving fertility and health in swine production[J]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 2003, 110(6): 255-265.
- [4] SHORT T H, VAN DER STEEN H, ROTHSCHILD M F, et al. . Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig [J]. *Anim Sci*, 1997, 75(12):3138-3142.
- [5] ELLEQREN H, FREDHOLM M, EDFOS LILJA I, et al. . Conserved synteny between pig chromosome 8 and human chromosome 4 but rearranged and distorted linkage maps[J]. *Genomics*, 1993, 17(3): 599-603.
- [6] LIAW L, GRAWFORD H C. Functions of the extracellular matrix and matrix degrading proteases during tumor progression[J]. *Braz J Med Biol Res*, 1999, 32(7): 805-812.
- [7] 墨锋涛. 斯格猪群体遗传结构与经济性状的微卫星标记的研究[D]. 河北农业大学硕士学位论文, 2004.
- [8] SOUTHWOOD O I, SHORT T H, PLASTOW G S. Genetic markers for litter size in commercial lines of pig [A]. In: Armidale, Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production [C]. Australia, 1998, 453-456.
- [9] 孟庆利. 骨调素和雌激素受体基因与猪繁殖性能关系的研究[D]. 南京农业大学硕士学位论文, 2004.