

民猪细胞色素C氧化酶I基因的克隆、多态性检测及冷诱导研究*

杨俊静¹, 别墅¹, 张冬杰², 汪亮², 刘娣^{1,2**}

1.东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030; 2.黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086

摘要:采用克隆测序和PCR-SSCP方法对民猪COX I基因序列及多态性进行了检测与分析,采用实时荧光定量PCR法对同一饲养水平下经冷诱导处理的民猪和长白猪肌肉、肝脏组织中COX I基因的表达变化进行了分析。结果表明:民猪的COX I基因序列与其他猪种相比,存在18个核苷酸突变,导致5个氨基酸发生变化;C260T、G275A和C1253T位点民猪以B等位基因占优势,大白猪、长白猪、北京黑猪、野猪则是A等位基因占优势;冷诱导后低温组民猪COX I基因的表达量与常温组民猪和低温组长白猪相比,均显著下降($P < 0.05$)。据此推测冷诱导可导致COX I基因表达量降低从而产生更多的ATP为机体提供能量抵御寒冷,COX I基因可能是一个与猪的抗寒性显著相关的候选基因。

关键词: 民猪; 细胞色素C氧化酶; 冷诱导; 多态性分析

中图分类号: S828;Q78

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684(2011)

DOI: CNKI:22-1100/S.20111222.1045.001

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/22.1100.S.20111222.1045.001.html>

Study on Cloning and Polymorphism Analysis of COX I Gene in Min Pig During Cold Induction

YANG Jun-jing¹, BIE Shu¹, ZHANG Dong-Jie², WANG Liang², LIU Di^{1,2}

1.College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2.Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China

Abstract: In this research, we analyzed the sequences of COX I gene in min pig by cloning and PCR-SSCP. With the method of fluorescence quantitative PCR, we analyzed the expression differences of COX I gene in muscles and liver between Min pig and Landrace with the same feeding during cold induction. The results showed that, compared to other pigs, there were 18 nucleotide mutations in Min pig which led to the changes of 5 amino acids. At C260T, G275A and C1253T site, allele B predominated in min pig and allele A predominated in large white, Landrace, Beijing black pig and wild boar. Compared to min pig during normal temperature and Landrace during cold induction, the expressions of COX I gene in min pig during cold induction were lower significantly ($P < 0.05$). We inferred that, during cold induction the expressions of COX I gene would be lower in order to provide the energy for individuals, and COX I gene might be one of the candidate genes associated with cold resistance.

Key words: min pig; COX I; cold-induction; polymorphism analysis

细胞色素C氧化酶又呼吸链复合物(Cytochrome oxidase, COX I)是真核生物线粒体内膜和需氧细菌细胞膜电子传递链上的终端酶,在生物体的氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation)过程

中扮演重要角色。位于线粒体DNA上,有3个亚基(COX I、COX II、COX III),直接参与ATP的合成,主要影响需要高能量的组织器官如脑、心脏、肌肉等,其基因缺失往往导致某些与能量代谢相关疾病的发

* 基金项目:“十一五”国家科技支撑计划重点项目(2008BADB2B02)

作者简介:杨俊静,女,在读硕士,研究方向:动物遗传育种与繁殖。

收稿日期:2011-07-30

网络出版时间:2011-12-22 10:45

** 通讯作者

生^[1]。COX I 基因的研究较早,在动物体中主要参与维持正常生理功能并于炎症、细胞有丝分裂和特异性信号传导有关^[2]。

民猪作为我国优良的地方品种之一,除了具有较高的繁殖性能外,其抗寒性也较为突出,目前对民猪的抗寒机制尚缺乏深入系统的理论研究。本研究采用克隆测序的方法对民猪 COX I 基因的序列特征及与其他猪种间的差异进行了比较分析,并检测了该基因在冷诱导条件下在民猪和大白猪肌肉组织中的表达变化情况。

1 材料与方法

1.1 试验材料

75日龄民猪3窝,每窝4头共计12头,将每窝个体随机分成2组即试验组和对照组,同日龄大白猪3头,设为试验组,均购自黑龙江省农科院畜牧研究所。多态性检测的样本为黑龙江省农科院畜牧研究所

作物与家畜分子育种重点实验室保存的长白猪、大白猪、北京黑猪、民猪各30头和野猪10头的耳组织DNA样品。

1.2 试验动物预处理

2009年12月25日至2010年1月7日冷处理15d,试验组民猪和长白猪在舍外半敞式大棚内饲养,温度为-18~-25℃,测量温度平均值为-20℃,将对照组民猪置于正常舍内饲养,温度约为10℃。饲喂相同的饲料量,代谢能为(平均每头每天)1808.4MJ,处理结束后屠宰,取肝脏和背肌组织各约10g,液氮带回实验室,-80℃冰箱冻存。

1.3 引物设计与PCR扩增

根据GenBank上提供的COX I 基因序列(EU333163)设计引物。A1为COX I 基因扩增引物,B1为Real-time PCR扩增引物,C1~C4为PCR-SSCP多态性分析引物(表1)。

表1 PCR扩增引物的序列

Table 1. The sequence of primers for amplifying COX I

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Sequence of primers	退火温度/℃ Annealing temperature	扩增区域/bp Application
A1	F: GACATTCACCACGGA ACT R: GAAAGGGTAAGCCATAGAG	58	6371-8160
B1	F: CAT GCA GGA GCT TCA GT R: TTC AGG TTG CGG TCT GT	60	410-645
C1	F: AACCTACTTGGCGA TG R: ATAGGAAGGATGGTGAA	51	133-329
C2	F: ACCAGGGTTCGGAATAA R: ATTGTGGCAGATGTAAAG	51	741-927
C3	F: TACATATTATGTAGTCGCACAC R: TCATGCTGTGTATGCGTC	51	1105-1348
C4	F: GGAATACTCGACGATAC R: GGAGGAGGACATCCGTGT	51	1301-1500
β-actin	F: GGGACCTGACCGACTACCTC R: GGCCGTGATCTCCTTCTGCA	60	182-591

以DNA为模板,引物A1的PCR扩增程序:94℃预变性10min;94℃变性45s,58℃复性45s,72℃延伸45s,30个循环;72℃延伸10min;引物C1~C4的PCR扩增程序:94℃预变性10min;94℃变性30s,51℃复性30s,72℃延伸30s,30个循环;72℃延伸5min。PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳检测,将所获得的特异带回收后,接入T载体,转化入大肠杆菌感受态细胞,将所提质粒酶切后送上海生工测序。

1.4 多态性检测

以民猪、长白猪、大白猪、北京黑猪、野猪共130个个体的DNA为模板进行PCR扩增,对扩增产物进行非变性聚丙烯酰胺电泳,其条件为取2 μL PCR产物置于PCR管中加8 μL变性Buffer混匀,98℃变性10min,迅速插入冰中,使之保持变性状态。18%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。高压250 V预电泳5 min,然后5V/cm,电泳14~16 h,银染显色、判断基因型^[3]。

1.5 Real Time PCR 反应

采用荧光定量PCR的方法测定COX I 基因在冷

环境下的表达差异。使用特异性引物B1，参照SYBR Green PCR Master Mix说明书，采用2步法进行PCR扩增：95℃10min；95℃30s、60℃1min，40个循环；95℃1min、55℃30s、95℃30s。绘制熔解曲线，记录每个反应的扩增量，以β-actin为内参计算目的基因的相对扩增量。试验结果表示为 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{试验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{对照组}$ ， $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算COX I 基因mRNA相对表达水平^[4]。

1.6 数据分析

采用 χ^2 进行哈代-温伯格平衡定律基因型平衡态检验，BLAST方法进行同源性比对，使用SPSS软件进行t检验和 χ^2 检验。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物电泳结果

PCR 扩增后，得到 COX I 大小为 1790bp 的特异性扩增片段，与预期的大小一致（图 1）。COX I 基因 4 个多态引物扩增出特异性片段与预期大小相一致（图 2）。

2.2 基因序列比对及突变位点分析

测序结果与 GenBank 基因序列相比，COX I 基因全长 1544bp 编码 514 个氨基酸，有 18 个碱基发生突变，核苷酸同源性为 98.83%，引起 5 个氨基酸突变，氨基酸同源性为 99.02%（表 2）。包含 2 个 heme 基团和

1 个 Cu 离子(Cun)配位的组氨酸。

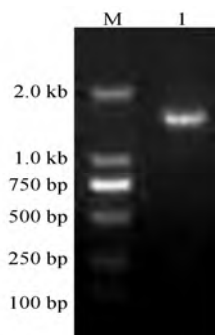


图 1 COX I 基因 PCR 扩增结果

Fig.1. PCR amplification results of COX I gene

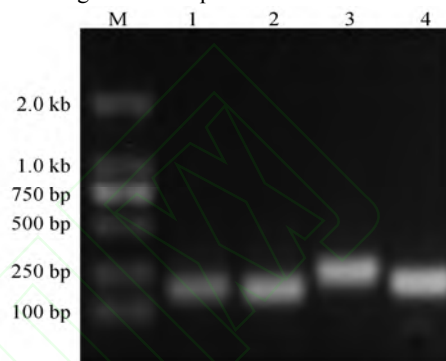


图 2 C1、C2、C3、C4 引物进行 PCR 扩增结果

Fig.2. PCR amplification results of C1、C2、C3、C4 primers

表 2 民猪与其他猪种 COX I 序列碱基突变位置及氨基酸突变比较

Table 2. Comparison of homology among COX I from min pig and other pig breeds

基因 Gene	碱基突变位点/bp bas-mutation Loci	氨基酸突变位点 Amino acid mutation Loci
COX I	68、238、260、275、354、723、803、857、896、1023、1034、1037、1160、1247、1253、1420、1427、1448	80(N→S)、119(K→E)、242(K→E)、268(L→F)、474(G→E)

通过对民猪 COX I 基因多次测序并与 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 提交的巴克夏、滇南小耳猪、杜洛克、汉普夏、长白猪、大白猪、宁夏猪、东北野猪、荣昌猪和梅山猪序列比对后发现，民猪在 260bp、275bp 和 1253bp 处存在 3 个特异的核苷酸突变，其中 260bp、275bp 处突变是连锁的。

2.3 COX I 基因的 PCR-SSCP 检测结果

引物C1、C2、C3和C4均检测到3种基因型（图3），不同位点的基因型频率和基因频率见表3（“*”表示 $P>0.05$ ，即符合哈代-温伯格平衡定律基因型平衡态，括号中的数字为该猪种基因型的个体数）。

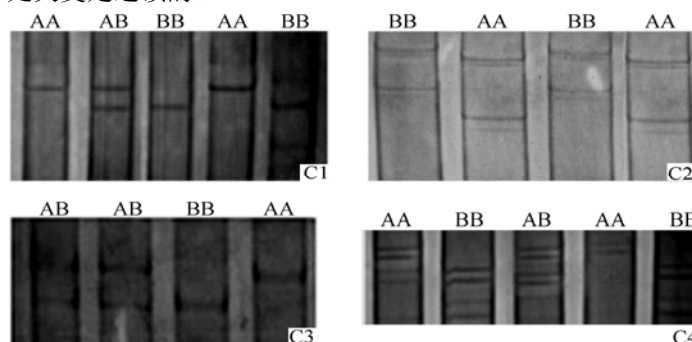


图 3 PCR-SSCP 检测结果

Fig. 3. PCR-SSCP results for C1、C2、C3、C4

引物C1的5个品种中民猪是B等位基因占优势,其余猪种均是等位基因A占优势,经 χ^2 检测,民猪、野猪符合哈代-温伯格平衡定律基因型平衡态;引物C2未检测出AB基因型个体,野猪、民猪、北京黑猪是B等位基因为优势基因,大白猪、长白猪则是A等位基因占优势;引物C3,大白猪、长白猪、北京黑猪、

野猪是A等位基因为优势基因,民猪则是B等位基因为优势基因,除大白猪、北京黑猪外3个猪种 χ^2 检测,均符合哈代-温伯格平衡定律为基因型平衡态;引物C4,野猪、民猪是A等位基因为优势基因,大白猪和长白猪、北京黑猪则是B等位基因为优势基因,均符合哈代-温伯格平衡定律基因型平衡态。

表3 不同品种猪COXI基因基因型频率和基因频率

Table 3. Allele frequencies and genotype frequencies of COX I among five swine breeds

品种 Breed	引物 Primer	卡方检验 χ^2	基因型频率 Genotype frequencies			基因频率 Allele frequencies		引物 Primer	卡方检验 χ^2	基因型频率 Genotype frequencies			基因频率 Allele frequencies	
			AA	BB	AB	A	B			AA	BB	AB	A	B
民猪 M	C1	0.15 **	0.200 (6)	0.267 (8)	0.533 (16)	0.333	0.667	C2	30.00	0.167 (5)	0.833 (25)	0 (0)	0.167	0.833
大白猪 L		18.33	0.900 (27)	0.067 (2)	0.033 (1)	0.933	0.067		30.00	0.867 (26)	0.133 (4)	0 (0)	0.867	0.133
长白猪 Y		12.64	0.933 (28)	0.033 (1)	0.033 (1)	0.950	0.050		30.00	0.700 (21)	0.300 (9)	0 (0)	0.700	0.300
北京黑猪 B		13.31	0.767 (23)	0.133 (4)	0.100 (3)	0.833	0.167		30.00	0.167 (5)	0.833 (25)	0 (0)	0.167	0.833
野猪 W		2.74 **	0.600 (6)	0.200 (2)	0.200 (2)	0.700	0.300		30.00	0.400 (4)	0.600 (6)	0 (0)	0.400	0.600
民猪 M	C3	0.12 **	0.233 (7)	0.300 (9)	0.467 (14)	0.383	0.617	C4	2.39 **	0.467 (14)	0.200 (6)	0.333 (10)	0.633	0.367
大白猪 L		12.58	0.533 (16)	0.300 (9)	0.167 (5)	0.683	0.317		0.22 **	0.300 (9)	0.167 (5)	0.533 (16)	0.383	0.617
长白猪 Y		5.43 **	0.600 (18)	0.167 (5)	0.233 (7)	0.683	0.317		0.13 **	0.267 (8)	0.267 (8)	0.467 (14)	0.400	0.600
北京黑猪 B		10.20	0.500 (15)	0.300 (9)	0.200 (6)	0.650	0.350		1.16 **	0.267 (8)	0.333 (10)	0.400 (12)	0.433	0.567
野猪 W		3.40 **	0.500 (5)	0.300 (3)	0.200 (2)	0.600	0.400		3.6 **	0.400 (4)	0.400 (4)	0.200 (2)	0.600	0.400

注: M. Min pig; L. Landrace; Y. Yorkshire; B. Beijing black pig; W. Wild boar

2.4 冷诱导民猪 COX I 基因背肌、肝脏 mRNA 的动态表达

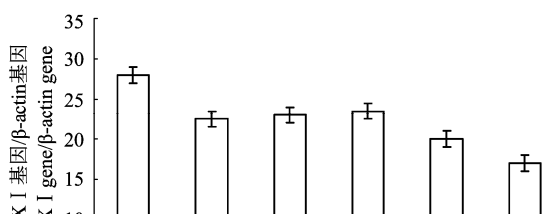
将常温组民猪的 COX I 基因 mRNA 表达量设定为 1, 以相对表达水平的差异倍数为纵坐标, 低温组民猪和长白猪为横坐标, 测得 COX I 基因 mRNA 动态表达水平见图 4。通过 t 检测结果显示, 经冷诱导实验组民猪肝脏及背肌组织中 COX I 基因的表达水平有显著的上调 ($P < 0.05$); 与同条件下冷诱导的长白猪肝脏、背肌组织相比上调显著 ($P < 0.05$)。

图 4 常温及冷诱导下肌肉、肝脏组织中民猪 COX I 基因相对表达量

Fig. 4. Expression level of COX1 mRNA in min pig

3 讨论

细胞色素C氧化酶是由线粒体和核DNA共同编



码的，是线粒体呼吸链的主要限制酶，其释放和细胞凋亡密切相关。有研究表明起重要功能作用的部分氨基酸在哺乳动物中是保守的，但不断受到氧应激攻击的细胞色素C氧化酶基因在生物进化过程中碱基突变率及蛋白质的氨基酸替换率也是很大的，细胞色素氧化酶基因上的缺陷，包括突变，能够导致严重的常常甚至是致命的代谢紊乱^[5]。目前大多数学者皆是通过研究COX各蛋白质亚基及其mRNA水平来观察、分析其调节机制（转录或转录后）^[6]，已有研究报道氧浓度、激素、年龄、腺苷酸浓度等多种因素会对线粒体COX亚基的表达产生影响^[7]。猪肌纤维线粒体酶活性变化中发现，-12℃冷诱导后肌纤维中COX、CK活性显著增强^[8]。预计仔猪处于冷环境下表现为肌肉快速颤栗，耗氧量增加，呼吸频率加快，线粒体酶的活性增强。冷刺激下线粒体中COX的表达量增高，合成大量的ATP为机体提供能量，并会增加肌肉耗氧量，使得呼吸频率加快。

民猪在冬季室外散养条件下可稳定过冬，其优势明显。本研究对-20℃且饲料量相同条件下模拟散养的民猪、长白猪采集背肌，采用荧光定量 PCR 方法检测 COX I 基因 mRNA 的表达差异。结果显示，冷诱导后的民猪肝脏及背肌组织中 COX I 基因的表达水平有显著上调 ($P<0.05$)，证明 COX I 基因与动物冷应激相关。

针对COX I 基因高度保守的特性^[9]，通过测序得到民猪COX I 基因序列，比对发现 18 个碱基发生突变，导致 5 处氨基酸的变异。对SNPs位点进行PCR-SSCP多态性分析，C1 (C260T、G275bpA)、C3 (C1253T) 民猪以B等位基因占明显的优势，其余猪种则是A等位基因的频率较高，推测可能与民猪的种质特性有关。C2 (T804G)、C4 (A1420G、T1427C

连锁突变) 中大白猪、长白猪与民猪、北京黑猪、野猪的稳定基因型处于相反的状态，可能是与国内外猪种血统间差异有关。希望通过多态性研究找到民猪的优势基因型个体，并为优质猪种选育工作奠定基础。

参考文献:

- [1] 柏干荣,陆松敏.线粒体 DNA 编码细胞色素氧化酶亚基基因的进展[J].国外医学:分子生物学分册, 2003, 2 (56): 354-357.
- [2] 谢燕, 江海洪, 龚茜芬, 等.微波对大鼠脑线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基转录水平的影响[J].第三军医大学学报, 2003, 6 (25): 987-989.
- [3] 程金花, 赵文明, 乔娜.鹅 Pit-21 基因部分序列多态性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40 (5): 658-663.
- [4] 赵阿勇, 陈国宏. 鹅 IDH1 基因的分离、序列分析及表达特征研究[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40 (7): 992-998.
- [5] Pecina P, Houstkova H, Hansikova H, et al. Genetic Defects of Cytochrome c Oxidase Assembly, Physiol, 2004, 53(11): 213-223.
- [6] Blake P A, Weaver R E, Hollis D G. Diseases of humans (other than cholera) caused by Vibrios [J]. Annu Rev Microbiol, 1980, 34: 341-367.
- [7] 马志科, 咎林森. 细胞色素 C 在生物医学方面的研究进展[J]. 畜牧兽医杂志, 2006, 25 (5): 30-35.
- [8] Herpin P. Characterisation of oxidative phosphorylation in skeletal muscle mitochondria sub-populations in pig: a study using top-down elasticity analysis[J]. Science, 2000, 16(475): 84-88.
- [9] 李连之, 黄仲贤, 细胞色素 C 氧化酶研究新进展[J]. 无机化学学报, 2001, 11 (6): 17.
- [10] Blake P A, Weaver R E, Hollis D G. Diseases of humans (other than cholera) caused by Vibrios [J]. Annu Rev Microbiol, 1980, (34): 341-367.
- [11] Adkins R M, Honeycutt R L. Evolution of the primate cytochrome c oxidase subunit II gene[J]. Mol Evol. 1994, 38(3): 215-31