

猪 *Pit-1* 基因的多态性研究庞 瑾<sup>1</sup>, 李宏滨<sup>1</sup>, 郑友民<sup>2\*</sup>, 杜立新<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094; 2. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081)

**摘 要:** 选取 7 个中国地方猪种和 3 个国外引入猪种共 473 头, 应用 PCR-SSCP 技术在 7 个中国地方猪种中检测到 1 个 *Pit-1* 基因第 4 外显子上的突变; 应用 PCR-RFLP 技术在 3 个国外引入猪种中, 扩增长度为 1 747 bp 的片段中检测到 1 个 *Rsa*I 限制性内切酶的多态酶切位点。遗传多态性分析结果表明: 外显子 4 上的突变, 在 7 个中国地方猪种中是 A 型等位基因和 AA 基因型频率占优势。其中沂蒙黑猪和巴马小型猪处于 Hardy-Weinberg 平衡; 北京黑猪、沂蒙黑猪、巴马小型猪、滇南小耳猪和香猪处于中度多态。*Rsa*I 酶切多态位点的突变在 3 个国外引入猪种中也是 A 型等位基因和 AA 基因型频率占优势。其中大白猪和杜洛克猪处于 Hardy-Weinberg 平衡; 3 个国外引入猪种的多态信息含量均为中度多态。

**关键词:** 猪; *Pit-1* 基因; PCR-SSCP; PCR-RFLP

中图分类号: S828.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)06-0531-05

垂体特异性转录因子(Pituitary-Specific Transcription Factor) *Pit-1* 在哺乳动物垂体发育和激素表达过程中起重要作用。通过生物化学和个体发育研究表明, *Pit-1* 是畜禽垂体前叶特异表达的一种具有重要功能的转录因子。其在哺乳动物的垂体前叶腺中参与激活生长激素基因<sup>[1]</sup>、催乳素基因<sup>[2-3]</sup>和促甲状腺素基因<sup>[4]</sup>的表达, 通过调节这些基因的表达而对畜禽的生长、发育、繁殖和免疫等方面产生重要的影响。

猪的 *Pit-1* 基因被定位在第 13 号染色体上<sup>[5]</sup>。国外学者已经对猪 *Pit-1* 基因进行了一些研究, Brunseu 等选用欧洲野猪 × 皮特兰的杂交家系, 对于 F<sub>2</sub> 代个体的生长、肉质、胴体组成和应激敏感性等相关的 50 个参数进行了评估, 结果表明, 14 个生长与胴体组成性状与 *Pit-1* 基因型有关<sup>[6]</sup>; Yu 等选用了包括 4 个中国梅山猪和欧洲的长白猪组成的 3 代杂交资源家系为试验动物, 结果发现, *Msp*I CC 基因型的猪对于 DD 基因型的猪有较大的初生重。在背膘厚的测量指标上, 也均高于 DD 基因型的猪<sup>[7]</sup>; Tuggle 等在中国地方猪种—梅山猪的 *Pit-1* 基因中发现了一个 *Bam*H I 的多态基因座, 但在 5 个美国猪种中并没有发现同样的多态基因座<sup>[8]</sup>。其

后, Yu 等又在包括梅山猪、民猪、枫泾猪等中国猪种及约克夏猪的 *Pit-1* 基因的 POU 结构域中发现了 *Msp*I 多态性<sup>[9]</sup>。

本研究选取了 7 个中国地方猪种和 3 个国外引入猪种共 473 头, 应用 PCR-SSCP 及 PCR-RFLP 技术, 对 *Pit-1* 基因进行突变分析, 目的是为了后续与相关生产性状的研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

## 1.1 试验材料

表 1 10 个试验猪品种来源、名称及样本数量

Table 1 The sources, names and sample numbers of 10 breeds

来源 Source	品种 Breed	样本数量 Sample numbers
北京黑猪原种场	北京黑猪 Beijing Black	37
山东省临沂市种猪场	沂蒙黑猪 Yimeng Black	45
山东省莱芜市种猪场	莱芜黑猪 Laiwu Black	50
广西南宁市种猪场	巴马小型猪 Bama Small	52
云南省西双版纳 种猪场	滇南小耳猪 Diannan Small-Ear	55
海南省农业科学院 五指山猪原种场	五指山猪 Wuzhishan	56
贵州省畜禽良种场	香猪 Xiang	50
中国农业科学院畜牧 研究所昌平试验基地	大白猪 Yorkshire	48
北京华都种猪繁育 有限责任公司	长白猪 Landrace	50
江苏省姜堰种猪场	杜洛克 Duroc	30

收稿日期: 2004-01-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(39970542); 国家重点基础研究发展规划“973”项目(TG2000016104)

作者简介: 庞 瑾(1973-), 女, 河北曲阳人, 硕士, 助理畜牧师, 主要从事猪分子遗传方面的研究

\* 通讯作者: 郑友民, E-mail: zhengym@mail.caas.net.cn

## 1.2 基因组 DNA 的制备

将裂解的冻全血加入蛋白酶 K 至终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 混匀, 55  $^{\circ}\text{C}$  水浴消化。在消化好的血液中加入等体积 Tris 饱和酚, 缓慢颠倒后离心, 收集上清, 重复 1 次。于上清中加入等体积的酚和氯仿: 异戊醇(24: 1) 混合液, 缓慢颠倒后离心, 收集上清于新管, 重复 1 次。在收集的上清中加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH5.2) 和 2.5 倍体积的冰乙醇沉淀 DNA。然后用 70% 乙醇洗涤沉淀 2 次。最后将 DNA 晾干后加入适量 TE, 于 -20  $^{\circ}\text{C}$  储存。

## 1.3 PCR 扩增反应

引物 P<sub>1</sub> 根据 GenBank 上发表的有关序列, 利用 Primer 5.0 软件设计; P<sub>2</sub> 是参照文献[10]中的原有引物。所用引物均由赛百盛生物工程公司合成。引物序列、PCR 产物大小及所在位置见表 2。

表 2 PCR 扩增所用的引物序列、产物大小及位置  
Table 2 Primer sequence, corresponding PCR product size and position

引物 Primer	产物 大小 /bp Product Size	产物 位置 Product Position
P <sub>1</sub> 5'-TTTCACAGGATACACCCAA-3' 5'-GCTTCCTCCAGCCATT-3'	159	<i>Pit-1</i> 基因 Exon 4
P <sub>2</sub> 5'-AGTGTAGCCAGAGCATCT-3' 5'-ACCACATCTGCACACTCA-3'	1 747	<i>Pit-1</i> 基因 部分 In4、 Ex5、In5、 Ex6 及 部分 3' 侧翼 序列

应用引物 P<sub>1</sub> 对所提取的基因组 DNA 进行扩增, PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 53.5  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 经过 34 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

引物 P<sub>2</sub> 的 PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 61  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 3 min, 经过 34 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

12  $\mu\text{L}$  反应体系中各组分的终浓度分别为: dNTPs 0.2 mmol/L,  $\text{Mg}^{2+}$  1.5 mmol/L, 混合上下游引物 0.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , *Taq* DNA 聚合酶 5 U/ $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$  (约 50 ng/ $\mu\text{L}$ )。PCR 扩增产物根据其片段大小分别于 2.0% 和 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.4 扩增产物的转化和测序

PCR-SSCP 分析选取有突变的五指山猪的个体, PCR-RFLP 分析选取有突变的大白猪个体, 采用玻璃奶吸附的方法进行纯化后, 在 T4 DNA 连接酶的作用下与载体 (T-easy Vector, Promega 产品) 相连接, 之后转化大肠杆菌 (DH 5 $\alpha$ ), 经选择性平板培养后进行蓝、白斑筛选。鉴定转化成功的白斑阳性克隆送交上海博亚生物公司测序。

## 2 结果

### 2.1 猪 *Pit-1* 基因第 4 外显子的 PCR-SSCP 分析及其克隆测序

2.1.1 猪 *Pit-1* 基因第 4 外显子扩增产物的 PCR-SSCP 分析

2.1.2 测序结果对猪 *Pit-1* 基因第 4 外显子的 2 个纯合基因型的序列对比发现: AA 基因型在第 52 位碱基序列处产生了 1 个 C  $\rightarrow$  T 的突变, 此突变使 CAC  $\rightarrow$  CAT, 但并没有引起氨基酸的变化, 编码均为组氨酸。而 BB 基因型在该碱基序列处无此突变。

### 2.2 猪 *Pit-1* 基因的 PCR-RFLP 检测及克隆测序

2.2.1 猪 *Pit-1* 基因 1 747 bp 扩增产物的 PCR-RFLP 分析 选用 *Pst* I、*Afl* I、*Alu* I、*Hinf* I、*Rsa* I 5 种限制性内切酶进行酶切, 但只有 *Rsa* I 酶切产物呈现多态性。

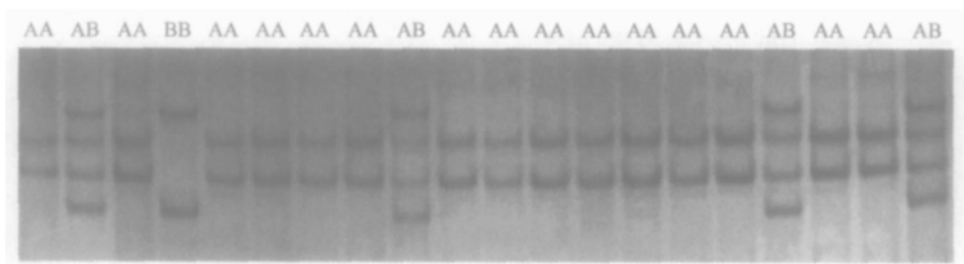


图 1 用引物 P<sub>1</sub> 对猪 *Pit-1* 基因第 4 外显子 159 bp 片段的 PCR-SSCP 分析(12%聚丙烯酰胺凝胶)

Fig. 1 12% PAGE pattern of porcine *Pit-1* gene exon4 159 bp fragment PCR-SSCP analysis

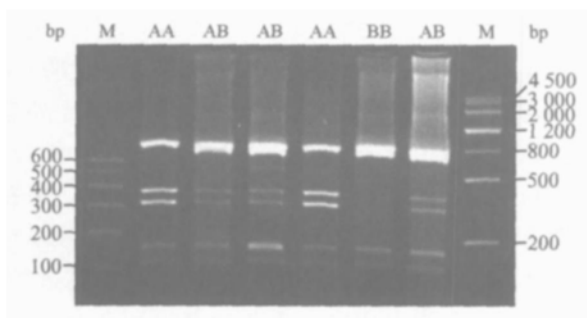


图 2 猪 *Pit-1* 基因 1 747 bp 扩增产物的 *Rsa* I 酶切(1.5% 琼脂糖电泳)

Fig. 2 Separation of 1 747 bp PCR product of *Pit-1* gene following digestion with *Rsa* I

2.2.2 测序结果 片段总长为 1 747 bp, 共存在 4 个 *Rsa* I 酶切位点。这 4 个 *Rsa* I 酶切位点分别位于碱基序列的第 156 位、第 542 位、第 866 位和第 1 640 位。其中位于碱基序列第 542 位的切点为多态性切点。当 AA 基因型在第 542 位碱基处发生 G → C 的突变时, 导致了 *Rsa* I 酶切多态性的产生。该切点存在时产生的片段定位等位基因 A, 则 AA 基因型多态片段大小分别为: 774 bp+ 386 bp+ 324 bp+ 156 bp+ 107 bp (与 GenBank accession U00793 相比较得到)。该切点消失时产生的片段定位等位基因 B, BB 基因型多态片段大小分别为: 774 bp+ 710 bp+ 156 bp+ 107 bp (与 GenBank accession U00793 相比较得到)。

### 2.3 *Pit-1* 基因在 10 个猪种中的遗传多态性分析

2.3.1 基因频率及基因型频率的计算 用 PCR-SSCP 方法及 PCR-RFLP 方法检测的突变, 分别在不同猪种中的基因和基因型频率计算结果见表 3 和表 4。

由表 3 可见, 在这 7 个国内地方品种中, A 型等位基因频率较 B 型等位基因频率占优势; AA 基因型频率较 BB 基因型频率占优势。但在沂蒙黑猪和南宁巴马小型猪中则是 AB 基因型频率略占优势。沂蒙黑猪和南宁巴马小型猪的基因型分布相似, 而滇南小耳猪和五指山猪的基因型分布相似。

表 4 可见, 在 3 个国外引入猪品种中, A 型等位基因占绝对优势, AA 基因型频率较 BB 基因型频率占绝对优势。

2.3.2 10 个猪品种群体的 Hardy-Weinberg 平衡检验 由表 5 可知, 在 10 个不同猪品种的群体中, 其中沂蒙黑猪、巴马小型猪、大白猪和杜洛克猪群体处

于平衡状态, 而其它猪群体均处于非平衡状态。

表 3 猪 *Pit-1* 基因第 4 外显子 PCR-SSCP 的基因频率及等位基因频率

Table 3 Genotypes and allele frequencies of PCR-SSCP in exon 4 of porcine *Pit-1* gene

品种 Breed	等位基因频率 Allele frequency		基因型频率 Genotype frequency		
	A	B	AA	AB	BB
北京黑猪 Beijing Black	0.74	0.26	0.54	0.41	0.05
沂蒙黑猪 Yimeng Black	0.66	0.34	0.38	0.55	0.07
莱芜猪 Laiwu	0.84	0.16	0.70	0.28	0.02
巴马小型猪 Bama Small	0.65	0.35	0.38	0.54	0.08
滇南小耳猪 Diannan Small Ear	0.83	0.17	0.71	0.24	0.05
五指山猪 Wuzhishan	0.83	0.17	0.71	0.23	0.06
香猪 Xiang	0.76	0.24	0.60	0.32	0.08

表 4 猪 *Pit-1* 基因 1 747 bp 扩增片段 *Rsa* I -RFLP 的基因型频率及等位基因频率

Table 4 Genotypes and allele frequencies of *Rsa* I -RFLP in 1 747 bp fragment of porcine *Pit-1* gene

品种 Breed	等位基因频率 Allele frequency		基因型频率 Genotype frequency		
	A	B	AA	AB	BB
大白猪 Yorkshire	0.70	0.30	0.50	0.40	0.10
长白猪 Landrace	0.75	0.25	0.58	0.34	0.08
杜洛克 Duroc	0.73	0.27	0.60	0.27	0.13

表 5 10 个猪群体的 Hardy-Weinberg 平衡检验

Table 5 Equilibrium analysis of Hardy-Weinberg for ten breeds

品种 (breeds)	Chi square
北京黑猪 Beijing Black	4.64*
沂蒙黑猪 Yimeng Black	2.54
莱芜猪 Laiwu	10.74**
巴马小型猪 Bama Small	2.61
滇南小耳猪 Diannan Small Ear	8.60**
五指山猪 Wuzhishan	8.89**
香猪 Xiang	4.92*
大白猪 Yorkshire	3.62
长白猪 Landrace	4.72*
杜洛克 Duroc	3.41

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ,  $df = 1$ ,  $\chi^2_{0.05(1)} = 3.84$ ,  $\chi^2_{0.01(1)} = 6.63$

### 2.3.3 *Pit-1* 基因的杂合度、有效等位基因数和多态信息含量

7个中国地方猪种 PCR-SSCP 和 3个国外引入猪种 PCR-*Rsa* I 的纯合度、杂合度、有效等位基因数和多态信息含量见表 6 和表 7。由以上数据分析可得: 莱芜猪和五指山猪的 PIC 表现为低度多态; 而其余 5 个中国猪种均表现为中度多态。这其中又以巴马小型猪和沂蒙黑猪的多态性为最高。

表 6 7 个中国地方品种 PCR-SSCP 的纯合度、杂合度、有效等位基因数和多态信息含量

Table 6 The genetic polymorphism parameters of *Pit-1* gene PCR-SSCP in seven Chinese local breeds

遗传参数 Genetic parameter	北京黑猪 Beijing Black	沂蒙黑猪 Yimeng Black	莱芜猪 Laiwu	巴马小型猪 Bama Small	滇南小耳猪 Diannan Small Ear	五指山猪 Wuzhi Shan	香猪 Xiang
H <sub>o</sub>	0.62	0.55	0.73	0.55	0.71	0.72	0.64
H <sub>e</sub>	0.38	0.45	0.27	0.45	0.29	0.28	0.36
N <sub>e</sub>	1.62	1.81	1.37	1.83	1.40	0.39	1.57
PIC	0.31	0.35	0.23	0.35	0.25	0.24	0.30

PIC > 0.5 为高度多态, 0.25 < PIC < 0.5 为中度多态, PIC < 0.25 为低度多态。下同

表 7 3 个引进品种 PCR-*Rsa* I 的纯合度、杂合度、有效等位基因数和多态信息含量

Table 7 The genetic polymorphism parameters of *Pit-1* gene PCR-*Rsa* I in three foreign breeds

遗传参数 Genetic parameter	大白猪 Yorkshire	长白猪 Landrace	杜洛克 Duroc
H <sub>o</sub>	0.58	0.63	0.62
H <sub>e</sub>	0.42	0.37	0.38
N <sub>e</sub>	1.73	1.60	1.61
PIC	0.33	0.31	0.31

3 个国外引入猪品种的 PIC 表现均为中度多态, 这其中又以大白猪的多态性为最高。说明 *Pit-1* 基因在国外引入品种猪群体中的多态性较高, 遗传变异较大。

## 3 讨论

猪种的特征和特性是在一定的自然和社会条件下, 通过不断的选育形成的。一般来说, 品种的遗传

基础越广泛、品种选育程度越低, 其 DNA 多态性就会越丰富。基因和基因型频率的计算结果表明: 在 7 个中国地方猪种中表现出的 *Pit-1* 基因第 4 外显子上 PCR-SSCP 多态性中, A 型等位基因占优势, AA 基因型频率也较 BB 基因型频率占优势。但在沂蒙黑猪和南宁巴马小型猪则是 AB 基因型频率略占优势。在这几个中国地方猪种中, 又以莱芜猪、滇南小耳猪和五指山猪的 A 型等位基因频率为高, 分别为 0.84、0.83 和 0.83, 说明这 3 个品种在该位点较为保守。北京黑猪为培育品种, 受巴克夏猪影响较大, 其等位基因 A 的频率为 0.74; 沂蒙黑猪和巴马小型猪等位基因 A 的频率分别为 0.66 和 0.65, 相对其他的国内猪种表现的较低, 说明这 2 个品种内类群结构相对丰富, 差异较大。同样, 在 3 个国外引入猪种中表现出的 *Rsa* I-RFLP 多态性也是 A 型等位基因频率和 AA 基因型频率占优势。其中又以长白猪 A 型等位基因频率最高为 0.75, 由此说明等位基因 A 在此猪种中的突变频率低, 此猪种的品种纯度较高。

$\chi^2$  适合性检验表明: 第 4 外显子上的突变在 7 个中国地方猪种中, 只有沂蒙黑猪和巴马小型猪处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 而北京黑猪、莱芜猪、滇南小耳猪、五指山猪和香猪均未达到平衡; 在 3 个国外引入猪种中的扩增长度为 1 747 bp 片段中的突变, 大白猪和杜洛克猪处于平衡状态, 而长白猪未达到平衡。造成这种不平衡状态的原因可能与人工选择有关, 还可能与数据结构和品种本身有关。而达到平衡的群体可能是由于相应的基因和基因型在适应性方面具有遗传优势, 经过长期进化和选育而达到平衡。

从群体遗传多态性角度分析: 7 个中国地方猪种中, 莱芜猪和五指山猪表现为低度多态, 其余 5 个猪种均为中度多态, 其中又以巴马小型猪和沂蒙黑猪的多态性为最高; 而 3 个国外引入品种均表现为中度多态。由此说明 *Pit-1* 基因标记的多态信息含量较高, 这个基因的多态性较高, 遗传变异较大, 因此, 可望获得更多的遗传进展。

## 参考文献:

- [1] Mangalam H J, Albert V A, Ingraham H A, et al. A Pituitary POU domain protein, *PIT1*, activates both growth hormone and prolactin promoters transcriptionally [J]. *Genes & Dev*, 1989, 3: 946~958.

- [2] Ingraham H A, Flynn S E, Voss J W, et al. A family of POU-domain and *PIT1* tissue specific transcription factors in Pituitary and neuroendocrine development [J]. *Ann Rev Physiol*, 1990, 52: 773~ 791.
- [3] Ingraham H A, Flynn S E, Voss J W, et al. The POU-specific domain of *PIT1* is essential for sequence-specific, high affinity DNA binding and DNA-dependent *PIT1-PIT1* interactions [J]. *Cell*, 1990, 61: 1 021 ~ 1 033.
- [4] Steinfelder H J, Radovick S, Wondisford F E, et al. Hormonal regulation of the thyrotropin  $\beta$ -subunit gene phosphorylation of the Pituitary-specific transcription factor *PIT1* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 5 942~ 5 945.
- [5] Archibald A L, Brown J F, Couperwhite S, et al. The PigMap consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*) [J]. *Mamm Genome*, 1995, 6: 157~ 175.
- [6] Brunscu C, Sternstein I, Reinecke P, et al. Analysis of associations of *PIT1* genotypes with growth, meat quality and carcass composition traits in pigs [J]. *Appl Genet*, 2002, 43(1): 85~ 91.
- [7] Yu T P, Tuggle C, Schmitz C K, et al. Association of *PIT-1* polymorphisms with growth and carcass traits in pigs [J]. *J Anim Sci*, 1995, 73: 1 282~ 1 288.
- [8] Tuggle C K, Yu T P, Helm J, et al. Cloning and restriction fragment length polymorphism analysis of a cDNA for swine *PIT-1*, a gene controlling growth hormone expression [J]. *Animal Genetics*, 1993, 24 (1): 17~ 21.
- [9] Yu T P, Rothschild M F, Tuggle C K et al. Rapid communication: a *Msp I* restriction fragment length polymorphism at the swine *PIT-1* locus [J]. *Journal of Animal Science*, 1993, 71: 2 275.
- [10] Yu T P, Schmitz C B, Rothschild M F, et al. Expression pattern, genomic cloning and RFLP analyses of the swine *PIT-1* gene [J]. *Animal Genetics*, 1994, 25: 229~ 233.

### Analyses of the Polymorphisms of Pig *Pit-1* Gene

PANG Jin<sup>1</sup>, LI Hong-bin<sup>1</sup>, ZHENG You-min<sup>2\*</sup>, DU Lixin<sup>1</sup>

(1. *Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;*

2. *Institute of Agricultural Quality Standard and Detection Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)*

**Abstract:** Seven Chinese local pig breeds, including Beijing Black pig, Yimeng Black pig, Laiwu pig, Bama Small pig, Diannan Small-ear pig, Wuzhishan pig, Xiang pig, and three foreign breeds, including Large White, Landrace and Duroc were used as experimental examples. A mutation in exon4 of pig *Pit-1* gene in seven Chinese local breeds was found by using PCR-SSCP analysis. A *Rsa I* restriction enzyme polymorphic site in three foreign introduced breeds was detected by using PCR-RFLP analysis. The result of population genetics analyses showed that in the mutation of exon4, the frequency of A allele and AA genotype were significantly higher than B allele and BB genotype in the most of seven Chinese local breeds. A  $\chi^2$  square analysis suggested that Beijing Black pig and Bama Small pig reached Hardy-Weinberg equilibrium ( $P > 0.05$ ), Beijing Black pig, Yimeng Black pig, Bama Small pig, Diannan Small-ear pig and Xiang pig had intermediate polymorphism ( $0.25 < PIC < 0.5$ ). For *Rsa I*-RFLP, the frequency of A allele and AA genotype were higher than B allele and BB genotype. Large White and Duroc reached Hardy-Weinberg equilibrium ( $P > 0.05$ ); and all of the three foreign introduced breeds had intermediate polymorphism ( $0.25 < PIC < 0.5$ ).

**Key words:** pig; *Pit-1* gene; PCR-SSCP; PCR-RFLP

\* Corresponding author