

# 猪的 *RBP4* 基因部分序列的克隆及多态性分析

杨 龙<sup>1</sup>, 张冬杰<sup>1</sup>, 汪晓鸿<sup>1</sup>, 王文涛<sup>1</sup>, 刘 琪<sup>2</sup>, 刘 娣<sup>1, 2</sup>

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

**摘要:** 在猪的 *RBP4* 基因的第 1 外显子和第 3 外显子处设计引物, 成功扩增了该基因的第 1 内含子和第 2 内含子, 与人和鼠的同源性分别为 80% 和 78%, 说明扩增正确。采用 PCR-RFLP 法对大白猪、杜洛克、长白猪、民猪和杂种猪的 *RBP4* 基因进行多态性检测。结果表明: 该基因经限制性内切酶 *Msp*I 酶切后获得 3 种带型: AA, BB 和 AB 型; 除大白猪与民猪、长白猪与杂种猪外, 其余各猪种间 *RBP4* 基因的基因型频率分布均差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 该基因在长白、大白和杂种猪的 *Msp*I 位点处于群体不平衡状态, 在杜洛克和民猪处于群体平衡状态; 基因多态信息含量 (PIC) 计算, 大白、长白、杜洛克、民猪和杂种猪均表现为中度多态性 ( $0.5 > \text{PIC} > 0.25$ ), 民猪的 B 等位基因为优势基因, 推测 B 等位基因与猪的高产性状相关。

**关键词:** 猪; *RBP4* 基因; 克隆; PCR-RFLP

中图分类号: S828; Q789 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)02-0011-03

## Clone and Polymorphism Analysis on Part of the Pigs' *RBP4* Sequences

YANG Long<sup>1</sup>, ZHANG Dong-jie<sup>1</sup>, WANG Xiao-hong<sup>1</sup>, WANG Wen-tao<sup>1</sup>,  
LIU Qi<sup>2</sup>, LIU Di<sup>1, 2</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, North East Agriculture University, Haerbin 150030, China; 2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Haerbin 150086, China)

**Abstract:** Based on the exon 1 and exon 3 of the pigs' *RBP4* gene, a pair of primers were designed and synthesized, successfully amplified the gene's intron 1 and intron 2, and the identity of *RBP4* gene sequences was 80% between pig and human, 78% between pig and mouse, the results showed that the amplification was correct. Polymers of *RBP4* gene in five strains was detected by PCR-RFLP. The strains were involved Yorkshire, Duroc, Landrace, Min pig and Crossbred pig. After genotyping with *Msp*I: there were AA, BB and AB; Except the Yorkshire and Min pig, the Landrace and Crossbred pig, the distribution of other pigs' genotype frequencies were significance ( $P < 0.01$ ). This *Msp*I site in the gene in Landrace, Yorkshire and Crossbred pig population were disequilibrium, in Duroc and Min pig populations were equilibrium. Used the polymers information content (PIC) to calculate, the five pig breeds appeared normal polymers ( $0.5 > \text{PIC} > 0.25$ ). The allele B of the Min pig is advantageous. It is presumed that the allele B is associate with pig's high production character.

**Key words:** Pig; *RBP4* gene; Clone; PCR-RFLP

RBP (Retinol-binding protein, 视黄醇结合蛋白)在猪的外胚层伸展期由子宫腔、孕体分泌, 滋养外胚层分泌少部分。RBP 至少有 4 种不同的蛋白, *RBP4* 是其中的一种。*RBP4* 之所以作为影响产仔数的候选基因, 在于它参与胚胎的早期发育, 它通过视黄酸受体促使转化生长因子的表达。*RBP4* 是体内一种重要的转运蛋白, 主要负责结合、转运全反式视黄醇

(维生素 A, VitA)。VitA 及其衍生物如 11-cis-视黄醛, all-trans-视黄酸等, 均是体内非常重要的疏水分子, 与视觉循环、胚胎发育等多种过程有关。*RBP4* 的功能障碍会导致 VitA 的储存、转运、分布及代谢的异常, 进而引发各种疾病, 并影响上皮、骨组织的生长、分化与繁殖、胚胎发育<sup>[1]</sup>。

本研究利用 PCR-RFLP 技术, 对 5 个不同猪种

收稿日期: 2006-10-12

基金项目: 黑龙江省科技攻关课题 (GZ05B106); 黑龙江省杰出青年基金 (JC-05-09)

作者简介: 杨 龙 (1982-), 男, 黑龙江海伦人, 在读硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖的研究工作

通讯作者: 刘 娣 (1963-), 女, 吉林四平人, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种与繁殖的研究工作。

的 *RBP4* 基因进行了多态性研究,以期对猪的 *RBP4* 基因结构及功能的全面认识提供参考,并为 *RBP4* 基因不同基因型与产仔数关系的进一步研究奠定基础,为猪的育种提供借鉴。

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

长白猪和大白猪各 60 头,来自东北农业大学原种猪培育中心;杜洛克 60 头来自大庆采油四场猪场;东北民猪 40 头来自黑龙江省兰西种猪场;杂种猪(野猪×长白猪)60 头来自黑龙江省庆安县双峰林场。

## 1.2 引物设计

根据 GenBank(登陆号 M68860)上所提交的序列,在第 1 外显子和第 3 外显子处设计 1 对引物,序列如下:F1:5'-CGA GTG AGC AGC TTC CGA GTC-3', R1:5'-GAT GCT ACG CCC CAG TAC TTC ATC T-3',扩增该基因的第 1 内含子和第 2 内含子;参考 Linville<sup>[3]</sup> 等人的引物序列:F2:5'-GAG CAA GAT GGA ATG GGT T-3', R2:5'-CTC GGT GTC TGT AAA GGT G-3'对该基因进行多态性检测。

## 1.3 DNA 提取及 PCR 扩增

DNA 的提取及检测<sup>[3]</sup>。第 1 对引物的 PCR 扩增程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃复性 30 s,72℃延伸 40 s,30 个循环;72℃延伸 10 min,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,连接入 T 载体,转化入大肠杆菌感受态细胞,将所提质粒邮寄到上海生工测序。第 2 对引物

的 PCR 扩增程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,57℃复性 40 s,72℃延伸 40 s,30 个循环;72℃延伸 10 min,PCR 产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.4 扩增产物的 PCR-RFLP 分析

用限制性内切酶 *Msp* I 酶切 PCR 产物,酶切体系为:内切酶 10 U, Buffer 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 5 μL, 37℃酶切 3 h。酶切产物经 10%PAGE 胶于 120 V 恒压电泳 4.5 h,硝酸银染色, GX800 凝胶成像系统拍照。

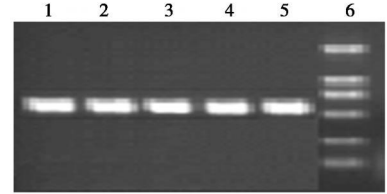
## 1.5 统计分析

采用  $\chi^2$  检验对试验结果进行统计分析。

# 2 结果与分析

## 2.1 克隆测序结果

第 1 对引物经 PCR 扩增后获得 1 条 533 bp 的特异带,电泳结果见图 1,测序结果见图 2。与网上所提交的人的 *RBP4* 基因的同源性为 80%,与鼠的 *RBP4* 基因的同源性为 78%,说明本试验中所扩增的序列是正确的,NCBI 提交序列号为 DQ344026。



泳道 1~5 为第 1 对引物 PCR 扩增结果;泳道 6 为 DL2000 marker  
Line 1—5. The amplified product of the first primer; Line 6. DL2000 marker

图 1 第 1 对引物 PCR 扩增结果  
Fig. 1 The amplified product of the first primer

CGAGTGAGCAGCTTCCGAGTCAAAGAGAACTTCGACAAGGCTCGTGTAGGTATCAGCTTCCCGGATCCCCAGCATTCCC  
CTTCCCGGCGGTAAGCCGGGCGCTCCGGGACATCAAACCTGGTCTCCTCTCTCCCCAGTCTCCGGCACCTGGTAC  
GCCATGGCCAAGAAGGACCCCGAGGGGCTCTTCTGCAAGGACAACATCGTCGCCGAATTCTCCGTGGACGAGAATGGCC  
ACATGAGCGCCACGGCCAAGGGTTCGAGTCCGTCTTTTAAAGTCAGTGGCATCTGGAGGGAGGGGAGAGGGACTGTGCTC  
TTTGTGCTGCAGGGTCCCCCGGGCTGAGCGCCCAACTCTGACTGGGGAGGGAAAGGAGAACCCTGGGTGGGATGGAGG  
GAAGACACCCCTTTGCTTGGCCTGGCTCAGGATCCACCTGGCTTTTGCAGTAAGTGGGACGTGTGCGCAGACATGGTGGG  
CACCTTTACAGACACCGAGGACCCCTGCCAAGTTCGAAGATGAAGTACTGGGGCGTAGCATC

图中下划线部分为所扩内含子部分 The intron sequence underlined are amplified

图 2 测序结果  
Fig. 2 Sequencing result

## 2.2 5 个猪种的 PCR-RFLP 分型结果

*RBP4* 基因的 PCR 产物经 *Msp*I 酶切后,共获得 3 种带型,即 AA, BB 和 AB 型,试验结果见图 3;不同基因型在不同猪种中的分布及 A, B 基因频率见表 1。

表 1 5 个猪种 *RBP4* 基因的基因型分布及基因频率  
Tab 1 Gene frequency and genotype of the *RBP4* gene in five pig breeds

品种(系) Breed( Line)	数目 Number	AA	AB	BB	A	B
长白 Landrace	60	0.483 3(29)	0.516 7(31)	0(0)	0.741 7	0.258 3
大白 Yorkshire	60	0(0)	0.683 3(41)	0.316 7(19)	0.341 7	0.658 3
杜洛克 Duroc	60	0.266 7(16)	0.533 3(32)	0.200 0(12)	0.533 3	0.466 7
民猪 Min pig	17	0(0)	0.705 9(12)	0.294 1(5)	0.352 9	0.647 1
杂种猪 Crossbred pig	60	0.450 0(27)	0.550 0(33)	0(0)	0.725 0	0.275 0

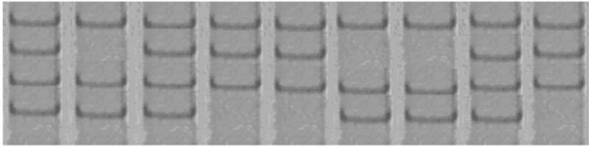


图 3 *RBP4* 基因的 *Msp*I 酶切分析

Fig. 3 Identification of *RBP4* gene digested by *Msp*I enzyme

表 2 5 个猪种间基因型频率  $\chi^2$  检验

Tab. 2 The chi-square test of the genotype frequency in five pig breeds

品种(系) Breed(Line)	长白 Landrace	大白 Yorkshire	杜洛克 Duroc	民猪 Min pig
大白 Yorkshire	58.00 **	—	—	—
杜洛克 Duroc	15.76 **	18.70 **	—	—
民猪 Min pig	38.73 **	0.04	12.76 **	—
杂种猪 Crossbred pig	0.16	46.86 **	14.80 **	36.91 **

注: df= 2,  $\chi^2_{0.05(2)}= 5.99$ ,  $\chi^2_{0.01(2)}= 9.21$ ; \*\*表示 1% 水平上显著  
Note: df= 2,  $\chi^2_{0.05(2)}= 5.99$ ,  $\chi^2_{0.01(2)}= 9.21$ ; \*\*Denoted significance at 0.01 level

经  $\chi^2$  独立性检验, 各猪种间 *RBP4* 基因的基因型频率比较结果见表 2; Hardy-Weinberg 平衡状态的检测结果表明, *RBP4* 基因在长白、大白和杂种猪的 *Msp*I 位点处于群体不平衡状态, 在杜洛克和民猪的 *Msp*I -RFLP 位点处于群体平衡状态; 基因多态信息含量(PIC)<sup>[4]</sup> 计算, 大白、长白、杜洛克、民猪和杂种猪均表现为中度多态性(0.5> PIC> 0.25)。

3 讨论

1996 年, Messer 等将 *RBP4* 定位于猪的第 14 号染色体, 同年, 他的研究组又将 *RBP4* 作为窝产仔数候选基因, 确定了法国 2 个大白猪品系在该位点的基因型。 *RBP4* 在法国超高产仔大白猪中每窝增加 0.52 头猪; 在法国对照大白猪中每窝增加 0.45 头。窝产仔数的等位替代效应从表型标准差的 5% 变化到 17%, 这些数据表明 *RBP4* 基因可明显影响猪的窝产仔数。2001 年, Drogemuller 等研究了德国长白、杜洛克和一个合成系, 发现在德国长白和杜洛克猪中基因型与产仔数显著相关。但是, 据 Linville 等报

道, 在长白和大白组成的基础群中, 未发现 *RBP4* 基因型与产仔数的关系。他分析认为, 一方面可能在不同品系中 *RBP4* 对产仔数的影响不同; 另一方面可能作用于产仔数的是微效基因<sup>[5-8]</sup>。

经  $\chi^2$  检验表明, 在 *RBP4* 基因的 *Msp*I 酶切位点上, 民猪和大白猪是 B 等位基因频率较高, 而长白、杜洛克和杂种猪是 A 等位基因的频率较高, 民猪作为地方猪种繁殖性状仅低于梅山猪, 而位居第二, 通过本试验研究结果推测, B 基因为优势等位基因, 与猪的高产性状相关。

本研究中 5 个猪种的等位基因频率有着显著的差异, 长白猪和杜洛克是 A 等位基因占优势, 杂种猪也是因为引入了长白猪的血液使得 A 等位基因的频率较高, 而民猪和大白猪是 B 等位基因占优势, 因此, 本研究认为 *RBP4* 基因的 *Msp*I -RFLP 可以作为与猪产仔数相关的遗传标记, 研究 *RBP4* 基因的多态性可以探讨 *RBP4* 基因对于猪繁殖性状的重要意义。

参考文献:

[1] 梁学颖, 徐琪寿. 视黄醇结合蛋白的分子生物学[J]. 生物科学进展, 2000, 31(3): 277—279.  
[2] Linville R C, Pomp D, Johnson R K, et al. Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine [J]. J Anim Sci, 2001, 79: 60—67.  
[3] 杨秀芹, 刘 娣, 李景芬. 不同品种猪抑肌素基因启动区的 RFLP 分析[J]. 畜牧与兽医, 2002, 34(10): 1—2  
[4] 庞卫军, 杨公社, 曹景峰, 等. 猪 *H-FABP* 基因 PCR-RFLP 分子标记研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2004, 32(7): 11—15.  
[5] 朱海梅, 谢保胜. 猪产仔数相关基因的研究进展[J]. 青海大学学报, 2004, 22(4): 47—51.  
[6] 郭晓红, 储明星, 周忠孝. 视黄醇结合蛋白及其基因的分子生物学[J]. 遗传, 2004, 26(2): 257—262  
[7] 程 丰, 赵云焕, 易本驰, 等. 猪 *CAST* 基因 PCR-RFLPs 与肉质相关性的分析[J]. 河南农业科学, 2006(2): 105—108  
[8] 赵光辉, 张改平, 王选年, 等. 猪囊尾蚴幼 18 kD 蛋白基因的克隆及其序列分析[J]. 河南农业科学, 2006(12): 89—92