

猪 *CACNA2D1* 基因 3' UTR 单核苷酸多态性与肉质性状的效应研究

李建华^{1,2}, 杨明生¹, 徐宁迎²

(1. 孝感学院, 湖北 孝感 432003; 2. 浙江大学 动物科学学院, 浙江 杭州 310029)

摘要: *CACNA2D1* 基因定位在猪的第9号染色体上, 其位置与影响肉质性状的 QTL 重叠, 可作为肉质性状的候选基因。采用 PCR-SSCP 技术, 对 160 头金华×皮特兰资源家系 F₂ 猪 *CACNA2D1* 基因 3' 端非翻译区片段进行扩增分型, 共产生 2 种等位基因, 3 种基因型。通过测序发现, 在 *CACNA2D1* 基因 3' 端非翻译区(序列 DQ981407)有一单核苷酸替换(C[→]A)。对不同标记基因型与肉质性状的最小二乘分析表明, AA 基因型猪大腿肌肉的 pH₄₅ 值、大腿肌肉导电率和肌内脂肪含量的最小二乘均值比 BB 基因型分别高 0.169、0.26 和 0.021, 差异显著($P < 0.05$); A 等位基因的加性效应分别为 0.084 5、0.133 5 和 0.010 5。

关键词: 猪; *CACNA2D1* 基因; PCR-SSCP; 肉质

中图分类号: S828.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0076-05

Single Nucleotide Polymorphism in 3' UTR of Porcine *CACNA2D1* Gene and Its Genetic Effect on Meat Quality Traits

LI Jian-hua^{1,2}, YANG Ming-sheng¹, XU Ning-ying²

(1. Xiaogan University, Xiaogan 432003, China;

2. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: *CACNA2D1* could be a candidate gene for meat quality traits because it has been mapped to porcine chromosome 9 and many QTLs influencing meat quality traits have been also detected in this region. In this research, 160 individuals from the F₂ generation of Jinhua×Pietrain resource family had been genotyped on the locus of 3' UTR of *CACNA2D1* gene, and 2 alleles, 3 genotypes had been found by PCR-SSCP. One single nucleotide substitution(C[→]A) at the position of 3' UTR of *CACNA2D1* gene(GenBank accession No: DQ981407) was identified by sequencing. The relationship among different genotype from meat quality traits was studied by the least square analysis. The result showed that the least square means of ham muscle pH₄₅ value, ham muscle electric conductivity and eye muscle crude lipid content relative quantity in AA genotype is significant higher than that of BB genotype by 0.169, 0.26 and 0.021($P < 0.05$) and the additive effect of A allele is 0.084 5, 0.133 5 and 0.010 5 respectively.

Key words: Pig; *CACNA2D1* gene; PCR-SSCP; Meat quality

猪肉品质的好坏是影响养猪业经济效益的重要因素。猪肉的品质问题在欧洲已造成了相当于猪肉产值 10% 的损失, 美国每年由劣质肉造成的损失达 1 亿美元^[1]。如何提高猪肉品质, 已成为猪遗传育种工作者目前研究的重点。肉质是一个综合性状, 受多种因素的影响, 其中遗传因素是最主要的。肉质性状 QTL 定位研究表明, 几乎在所有的染色体上

存在着影响肉质性状的 QTL^[2], 对这些已发现的 QTL 进一步鉴定或为它们筛选合适的候选基因具有重要意义。

CACNA2D1 基因编码骨骼肌钙离子通道的 $\alpha_2\delta_1$ 辅助亚基, 是人类恶性高温综合症的(Malignant hyperthermia syndrome)候选基因之一^[3], 与之对应的猪的应激综合症(PSS)不仅能引起猪的死亡, 而且可导

收稿日期: 2007-04-12

基金项目: 湖北省教育厅优秀中青年人才项目(Q200626001)

作者简介: 李建华(1969-), 男, 湖北孝感人, 副教授, 博士, 主要从事动物遗传育种及分子生物学研究

通讯作者: 徐宁迎(1956-), 男, 浙江湖州人, 教授, 博士, 主要从事动物遗传育种研究。

致劣质肉(如 PSE, DFD 肉等)。利用辐射杂种细胞系已将 *CACNA2D1* 基因定位在猪的第 9 号染色体上^[4], 其位置与 De Koning 等在 9 号染色体上分别发现的影响肉质性状的 QTL 重叠。本研究利用 PCR-SSCP 方法, 首次在猪资源家系中对 *CACNA2D1* 基因 3' 端非翻译区(3' UTR) 进行 SNP 检测, 并分析 SNP 位点与猪肉肉质性状的相关性, 为猪肉肉质性状的分子标记辅助选择提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 试验猪群及性状测定

本试验以金华×皮特兰资源家系 F₂ 160 头猪为研究对象, 前腔静脉采血, EDTA 抗凝后, 用常规的酚-氯仿抽提法提取样本总基因组 DNA, 用 Ultraspec 2000 紫外可见光蛋白核酸分析仪(德国 Amacia Biotech 公司)进行纯度及浓度检测后, 贮于-20℃冰箱备用。

对这 160 头猪全部进行了屠宰测定, 测定方法根据《种猪测定原理与方法》进行^[6], 所测定的性状包括: 眼肌及大腿肌色值(Meat Color, MC1, 包括 L*, a*, b*, C*, H* 值)、系水力(Water Holding Capacity, WHC) 眼肌及大腿肌温度(Temperature)、pH₄₅值(pH₄₅ value)、导电率(Electric conductivity)、肌内脂肪含量(Intramuscular Fat Content, IMF)等。

1.2 引物设计与 PCR 扩增

根据人基因组 DNA 序列(GenBank Accession No: AC006145)与鼠基因组 DNA 序列(GenBank Accession No: AC158586), 进行同源性比较后, 设计一对引物, 对包含猪 *CACNA2D1* 基因第 39 外显子及 3' 端非翻译区的片段进行特异扩增。该引物对为 F(5'-CTCCTCAAGCACCTTTAG-3') 和 R(5'-CAGGAGGAT-TATACCGACTG-3')。

PCR 反应总体系为 10 μL, 其中 10× Buffer 1.0 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 0.7 μL, 10 mmol/L dNTP 0.2 μL, 上、下游引物(10 pmol/L)各 0.8 μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, 模板 DNA 0.6 μL(25 ng), 加 ddH₂O 至 10 μL。

PCR 扩增条件为: 94℃ 4 min; 94℃ 1 min, 57℃ 40 s, 72℃ 50 s。35 个循环后再 72℃ 延伸 8 min, 扩增片段长度为 426 bp, 2% 琼脂糖检测表明, 扩增条带特异性好, 可直接用于 SSCP 检测。

1.3 PCR-SSCP 检测

取 5 μL PCR 扩增产物, 加入 7 μL 变性上样缓冲液(95% 去离子甲酰胺, 0.2 mmol/L EDTA, 0.05% 二甲苯酚, 0.05% 溴酚蓝)混匀, 于 98℃ 变性 8 min, 立即冰

浴 5 min, 取 10 μL 上样, 12% 非变性聚丙烯酰胺(29:1), 恒压 400 V, 循环水泵控温至 25℃ 以下电泳 18 h, 剥胶银染^[7]。银染后用扫描仪将凝胶上的电泳带谱扫描进电脑中保存, 以供分析。

1.4 数据统计分析

统计参数包括: ①基因型频率; ②基因频率; ③基因频率方差, $Var(P_i) = (1/2n)(P_i + P_{ii} - 2P_i^2)$, 式中 P_i , P_{ii} 表示相应基因频率和基因型频率的样本统计值; ④基因频率协方差, $Cov(P_A, P_B) = 1/4n(P_{AB} - 4P_AP_B)$, 式中 P_{AB} , P_A , P_B 分别代表 AB 基因型频率、A 基因频率、B 基因频率; ⑤群体基因频率 95% 置信区间 $P_i \pm 1.96 \sqrt{Var(P_i)}$; ⑥杂合度, $H = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2$; ⑦群体的多态信息含量根据公式 $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{j=1}^{n-1} \sum_{i=j+1}^n 2P_i^2 P_j^2$ 。

哈迪-温伯格平衡用 χ^2 检验, 公式 $\chi^2 = \sum (O - E)^2 / E$, 式中 O 与 E 分别代表基因型频率的观测值和期望值。

用 SAS(9.1) 的 GLM 程序对所检测金华×皮特兰资源家系 F₂ 个体的基因型与肉质性状进行最小二乘分析^[8], 模型如下:

$$y_{ij} = \mu + s_i + g_j + e_{ij}$$

式中 y_{ij} 表示性状观察值; μ 表示分析性状的群体均值; s_i 表示性别效应; g_j 表示 SNP 位点的基因型效应; e_{ij} 表示随机残差效应。

2 结果与分析

2.1 *CACNA2D1* 基因多态性片段的 PCR-SSCP 分型结果

比较电泳带谱(图 1), 靠上面的 2 条带型定义为 AA 基因型, 靠下面的带型定义为 BB 基因型, 同时具有 3 条带的带型(中间的 2 条带位置重叠)定义为 AB 基因型。取 AA 和 BB 2 种基因型的 PCR 产物片段进行纯化测序, 发现在序列 DQ981407 176 bp 处 AA 基因型为胞嘧啶(C), BB 基因型为腺嘌呤(A)(图 2)。

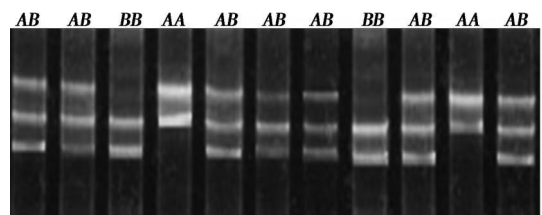


图 1 *CACNA2D1* 基因多态性片段的 PCR-SSCP 检测结果

Fig. 1 PCR-SSCP test of *CACNA2D1* gene polymorphism fragment

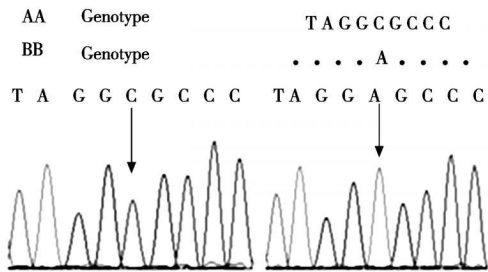


图 2 AA 和 BB 基因型测序峰图

Fig.2 The substitution of single nucleotide acid between AA and BB genotype

2.2 CACNA2D1 基因多态位点等位基因及基因频率等统计参数

从表 1 可以看出,B 基因频率高于A 基因,二

表 1 CACNA2D1 基因多态位点各参数值

Tab.1 Parameters with different genotype of CACNA2D1 gene

| 基因型 Genotype | 统计数 Numbers | 基因型 频率/% Genotype frequency | 基因 Allele | 基因频率/% Allele frequency | 基因频率 方差 Allele frequency variance | 群体基因 频率/% 置信区间 95% Confidence interval | 基因频 率协方差 Allele frequency covariance | 杂合度 H | 多态信 息含量 PIC |
|-----------------|----------------|--------------------------------------|--------------|-------------------------------|---|--|--|----------|-------------------|
| AA | 18 | 11.3 | A | 42.5 | 0.0006 | 37.6 47.4 | | | |
| AB | 100 | 62.5 | | | | | -0.0006 | 0.489 | 0.369 |
| BB | 42 | 26.2 | B | 57.5 | 0.0005 | 53.2 61.8 | | | |

2.3 哈迪- 温伯格平衡

经 χ^2 检验, $\chi^2=0.0775 < \chi^2_{0.05(1)}$ ($P>0.05$, 差

异不显著,表明该座位在金华×皮特兰资源家系 F₂ 猪群体中处于遗传平衡状态。

表 2 不同基因型对肉质性状的影响

Tab.2 The phenotype value of meat quality traits with different genotype

| 性状 Traits | 最小二乘均数±标准误 Least square mean±Standard error | | | 加性效应 a Additive effect | 显性效应 d Dominant effect | 显性度 D Dominancy |
|--|--|--------------|--------------|------------------------------|------------------------------|--------------------|
| | AA | AB | BB | | | |
| L* | 49.250±1.076 | 48.188±0.504 | 47.643±0.741 | 0.8035 | -0.2585 | -0.3217 |
| a* | 0.479±0.397 | 0.118±0.186 | 0.060±0.273 | 0.2095 | -0.1515 | -0.7232 |
| b* | 10.052±0.417 | 9.768±0.195 | 9.310±0.287 | 0.371 | 0.087 | 0.2345 |
| C* | 10.219±1.715 | 10.951±0.804 | 9.511±1.180 | 0.354 | 1.086 | 3.0678 |
| H* | 88.737±2.416 | 89.504±1.132 | 90.030±1.663 | -0.6465 | 0.1205 | -0.1864 |
| 眼肌 pH ₄₅ Eye muscle pH ₄₅ | 6.214±0.198 | 5.951±0.092 | 6.170±0.136 | 0.022 | -0.241 | -10.9545 |
| 大腿肌肉 pH ₄₅ Ham muscle pH ₄₅ | 6.383±0.066a | 6.317±0.031a | 6.214±0.045b | 0.0845 | 0.0185 | 0.2189 |
| 眼肌温度/℃ Eye muscle temperature | 38.995±0.334 | 39.121±0.156 | 38.858±0.230 | 0.0685 | 0.1945 | 2.8394 |
| 大腿肌肉温度/℃ Ham muscle temperature | 39.822±0.254 | 39.732±0.112 | 39.348±0.165 | 0.237 | 0.147 | 0.6203 |
| 眼肌导电率 Eye muscle electric conductivity | 2.996±0.157 | 2.818±0.078 | 2.717±0.122 | 0.1395 | -0.0385 | -0.2760 |
| 大腿肌肉导电率 Ham muscle electric conductivity | 4.057±0.228ab | 4.217±0.112a | 3.790±0.173b | 0.1335 | 0.2935 | 2.1985 |
| 系水率/% Water holding capacity | 0.574±0.024 | 0.578±0.010 | 0.598±0.016 | -0.012 | -0.008 | 0.6667 |
| 肌内脂肪含量/% Intramuscular fat content | 0.111±0.009a | 0.081±0.004b | 0.090±0.005b | 0.0105 | -0.0195 | -1.8571 |

注: 加性效应 $a=(AA-BB)/2$; 显性效应 $d=AB-(AA+BB)/2$; 显性度 $D=d/a$ 。同行上标字母不同的表示差异显著($P<0.05$)
Note: Additive effect $a=(AA-BB)/2$; Dominant effect $d=AB-(AA+BB)/2$; Dominancy $D=d/a$. Values in each line with different superscripts are significantly different at $P<0.05$

者相差 15%。两基因频率方差不同,说明 A, B 基因频率差异不是由抽样误差引起。两基因频率协方差值大致反映了选择某一基因时群体中两基因的变化趋势。两基因频率群体估计值的置信区间不重叠,进一步证明了金华×皮特兰资源家系 F₂ 猪群体中 A, B 基因数量不相等。基因杂合度值接近 0.5, 这表明该座位属于多态座位(Polymorphic locus)。一般而言, $PIC>0.5$ 时,为高度多态位点, $0.5>PIC>0.2$ 时,为中度多态位点^[9]。对于一个群体来说, PIC 高,等位基因数目多,杂合度大,表明该位点的遗传变异程度高,有较大的选择潜力^[10]。本研究位点 PIC 值为 0.369,这说明该位点属于中度多态位点,具有一定的选择潜力。

2.4 基因型与肉质性状的连锁分析

由表 2 可以看出, AA 基因型猪大腿肌肉的 pH₄₅ 值、大腿肌肉导电率和眼肌粗脂肪相对含量的最小二乘均数比 BB 基因型分别高 0.169, 0.26 和 0.021, 差异显著 ($P < 0.05$); A 等位基因可以显著提高猪大腿肌肉的 pH₄₅ 值、大腿肌肉导电率和眼肌粗脂肪相对含量, 加性效应分别为 0.084 5, 0.133 5 和 0.010 5 ($P < 0.05$)。不同基因型对所检测的其他肉质性状的影响差异不显著。

3 讨论

$\alpha_2\delta_1$ 亚基广泛存在于骨骼肌中, 它可通过对钙离子通道激活与失活的动力学特征、前脉冲易化以及电流大小产生影响来影响钙离子通过钙离子通道进入细胞的量。钙离子通过依电压钙离子通道进入细胞后可作为传递电信号的第二信使, 触发膜内的诸如收缩、分泌、突触传导、基因表达一系列生理活动。这些生理活动的改变有可能对猪肉质性状产生影响。

本研究在猪 *CACNA2D1* 基因 3' 端非翻译区发现的这个 SNP 中度多态位点, 在金华 × 皮特兰资源家系 F₂ 代猪群体中处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 这表明在迁移、突变、交配、遗传漂变以及选择等因素的作用下, 该位点处于动态平衡中; 同时也表明, 人工选育对这一位点造成的选择压力可能不强。

该片段通过 PCR-SSCP 扩增分型共产生 2 种等位基因, 3 种基因型。其中, A 等位基因可以显著提高猪大腿肌肉的 pH₄₅ 值、大腿肌肉导电率和肌肉脂肪含量。这表明, 在本研究一定样本量的试验群体中, *CACNA2D1* 基因 3' 端非翻译区部分片段单核苷酸多态性导致猪某些肉质性状呈现不同程度的差异。*CACNA2D1* 基因可能是影响猪肉质性状的主效基因或与主效基因紧密连锁的标记基因, 可作为对

猪肉质性状进行分子标记辅助选择的候选基因进行进一步深入的研究。

参考文献:

[1] Kauffman R, Sybesma W, Smulders F J M, *et al.* The use of filter paper to estimate drip loss of porcine musculature [J]. *Meat Science*, 1998, 18: 191–200.

[2] Massoud Malek, Jack C M, Dekkers, *et al.* A molecular genome scans analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition [J]. *Mammalian Genome*, 2001, 12: 637–645.

[3] Robinson R L, Curran J L, Ellis F R, *et al.* Multiple interacting gene products may influence susceptibility to malignant hyperthermia [J]. *Annals of Human Genetics*, 2000, 64: 307–320.

[4] Li J H, Chu X H, Guo X L, *et al.* Radiation hybrid mapping of three skeletal muscle calcium channel genes *CACNB1* and *CACNV1* to porcine chromosome 12 and *CACNA2D1* to porcine chromosome 9 [J]. *Animal Genetics*, 2005, 36(4): 358–359.

[5] De Koning D J, Harlizius B, Rattink A P, *et al.* Detection and characterization of quantitative trait loci for meat quality traits in pigs [J]. *Journal of Animal Science*, 2001, 79: 2812–2819.

[6] 熊 远. 种猪测定原理与方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.

[7] 许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 等. 简单快速的 DNA 银染和胶保存方法 [J]. *遗传*, 2002, 24(3): 335–336.

[8] 黄 燕, 吴 平, 汪 安, 等. SAS 统计分析及应用 [M]. 北京: 机械工业出版社, 2006: 106–185.

[9] 白文林, 尹荣焕, 赵素君, 等. 林甸鸡和大骨鸡微卫星 DNA 标记遗传多样性的比较研究 [J]. *华北农学报*, 2005, 20(6): 24–27.

[10] 高爱琴, 李 宁, 李金泉, 等. 山羊 *FGF5* 基因单核苷酸多态性群体遗传学分析 [J]. *华北农学报*, 2006, 21(3): 71–76.