

猪 *PLIN1* 基因单核苷酸多态检测与遗传分析

黄 龙¹, 余大华², 何小雷¹, 朱卫华¹, 孟 云¹, 薛玮玮¹, 丁月云^{1*}, 殷宗俊^{1*}

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室, 合肥 230036;

2. 安徽安泰农业集团, 广德 242200)

摘 要: 以皖南黑猪、安庆六白猪、圩猪和霍寿黑猪共 236 头猪为研究对象, 采用 PCR-SSCP 方法检测猪脂滴包被蛋白 (Perilipin, *PLIN1*) 基因的遗传多态性。结果表明, 在皖南黑猪、安庆六白猪 *PLIN1* 基因 3 519 bp 碱基处发生 A>G 突变, 检测到 AA、AB、BB 3 种基因型, 其中 AA 基因型频率在这 2 个群体中分别为 8.97% 和 29.23%, AB 基因型频率分别为 43.59% 和 56.92%, BB 基因型频率分别为 47.44% 和 13.85%; 皖南黑猪、安庆六白猪的多态信息含量 (PIC) 分别为 0.335 3 和 0.369 0, 在该位点均处于中度多态; 卡方检验表明皖南黑猪群体和安庆六白猪群体均处于哈迪-温伯格平衡状态 ($P>0.05$); 在圩猪、霍寿黑猪群体中 *PLIN1* 基因的第 2 外显子没有检测到突变。*PLIN1* 基因的第 3 外显子在 4 个群体中均没有检测到突变。

关键词: 猪; *PLIN1* 基因; 单核苷酸多态性; 遗传分析

中图分类号: S828.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)05-0701-05

Single nucleotide polymorphism detection and genetic analysis of porcine *PLIN1* gene

HUANG Long¹, YU Da-hua², HE Xiao-lei¹, ZHU Wei-hua¹, MENG Yun¹,
XUE Wei-wei¹, DING Yue-yun¹, YIN Zong-jun¹

(1. Anhui Provincial Key Laboratory of Local Livestock and Poultry Genetic Resources Conservation and Bio-Breeding, School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036; 2. Anhui Antai Agriculture Group, Guangde 242200)

Abstract: Two hundred and thirty-six pigs from Wannan Black pig, Anqing Liubai pig, Wei Pig and Huoshou Black pig populations were used for detecting the polymorphism of *PLIN1* gene by PCR-SSCP method. The results showed that a A>G mutation at 3 519 base position, and 3 genotypes (AA, AB and BB) were found in Wannan Black and Anqing Liubai. The genotypic frequency of AA was 8.97%, 29.23%, respectively, AB was 43.59%, 56.92%, respectively, and BB was 47.44%, 13.85%, respectively. The polymorphism information content (PIC) was 0.335 3 in Wannan Black population and 0.369 0 in Anqing Liubai population, which were all in average polymorphism situation. According to the χ^2 test, there were in Hardy-Weinberg equilibrium in Wannan Black and Anqing Liubai population ($P>0.05$), but there was no mutation in exon 2 in Wei Pig and Huoshou Black pig populations. Moreover, there was no mutation in exon 3 in these four populations.

Key words: pig; *PLIN1* gene; single nucleotide polymorphism; genetic analysis

随着人们生活水平不断提高, 猪的肉质问题已逐渐引起了生产者和消费者的重视; 尤其是肌肉脂肪含量与肉质成正相关, 其影响肉质的风味、多汁性和嫩度^[1]。改善猪肉品质, 尤其改善肌肉脂肪含量, 是目前猪肉品质改良的主要方向之一^[2]。脂肪

沉积相关性状大多数需要屠宰后才能测定, 限制了测定规模, 是适宜标记辅助选择的性状。多年来对脂肪沉积性状的探索, 已经发现了一些候选基因, 如 *AdipoQ* 基因^[3], *PIT-1* 基因^[4], *Ob* 基因^[5]等, 但这些发现还不能对脂肪沉积性状完全解释, 需进一

收稿日期: 2013-03-25

基金项目: 国家自然科学基金 (31171200), 科技富民强县专项行动计划, 国家农业科技成果转化资金 (2011GB2C300017), 省级农业科技专家大院 (2012) 和科技部星火计划重点项目 (2010GA710001) 共同资助。

作者简介: 黄 龙, 男, 硕士研究生。

* 通信作者: 丁月云, 女, 博士, 讲师。E-mail: dingyueyun@ahau.edu.cn

殷宗俊, 男, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: yinzongjun@ahau.edu.cn

步寻找相关基因。

PLIN1 基因编码的脂滴包被蛋白(Perilipin, *PLIN1*), 是脂肪细胞和类固醇生成细胞内包裹在脂质颗粒外面的一类可磷酸化蛋白^[6-7], 对脂肪分解具有双向调控作用: 基础状态下, *PLIN1* 包被于脂滴表面, 阻止脂肪酶接触到脂滴内的甘油三酯, 从而抑制脂肪分解; 能量需求增加时, cAMP-PKA 信号通路被激活, *PLIN1* 磷酸化, 促进脂解^[8]。诸多研究表明, *PLIN1* 蛋白在脂类代谢过程中扮演重要角色。*PLIN1* 基因敲除的小鼠瘦体重较大, 脂肪细胞较小, 表明它能增加瘦素的表达, 并且能够抵抗饮食诱导的肥胖^[9]。对人类的研究发现, *PLIN1* 基因在肥胖个体的脂肪组织中过量表达^[10], 且该基因的单核苷酸多态性与体脂重、低体重指数、肥胖风险以及总胆固醇水平关联^[11-13]。对秦川牛 *PLIN1* 基因的研究表明, *PLIN1* 基因多态性对脂肪沉积有一定的影响^[14]。对外来猪 *PLIN1* 基因的研究表明, *PLIN1* 基因多态性与猪的平均日增重、瘦肉率和背膘厚关联^[15]。

然而, *PLIN1* 基因在地方品种猪上的研究还少见报道。鉴于该基因对脂类代谢的重要作用, 本研究采用 PCR-SSCP 以及 DNA 测序方法, 对皖南黑猪、安庆六白猪、圩猪和霍寿黑猪 *PLIN1* 基因 SNP

位点进行检测, 分析其在 4 个地方猪品种中的遗传变异情况, 以期为后期开展 *PLIN1* 基因与地方品种猪脂肪沉积性状相关性的研究奠定基础, 为地方品种猪种质资源特性及标记辅助选择研究提供分子生物学参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

来自 4 个群体的猪耳组织样品 236 份, 其中皖南黑猪耳样 78 份, 采自安徽省绩溪县; 安庆六白猪耳样 65 份, 采自安徽省望江县; 圩猪耳样 30 份, 采自安徽省广德县; 霍寿黑猪耳样 63 份, 采自安徽省霍邱县。用耳号钳夹取一小块耳组织(约 0.5 g), 放置于装有 1 mL 70% (体积分数) 乙醇的 1.5 mL Eppendorf 管中, 低温保存带回实验室, -20℃ 保存备用。采用 DNA 提取试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)提取猪耳组织细胞基因组 DNA, 超微量紫外分光光度计测浓度和纯度, 置 4℃ 备用。

1.2 引物设计

根据 NCBI 登录的猪的 *PLIN1* 基因序列(NCBI 登录号: NC_010449), 借助 Primer 5.0 软件设计引物(表 1)。所设引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 1 猪 *PLIN1* 基因引物序列
Table 1 Primer sequences of pig *PLIN1* gene

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/℃ Annealing Temperature	目的片段长度/bp Aim fragment length
<i>PLIN1</i> -exon 2	F: 5'-TGCCAGGAGCAGGAGAAC-3'	55	254
	R: 5'-GCAGTGAACGAGCAAGCAG-3'		
<i>PLIN1</i> -exon 3	F: 5'-TGGGTTCTCGCAGGATGG-3'	59	269
	R: 5'-CCAGCCCTGGAGGCATT-3'		

1.3 PCR 扩增

扩增反应体系为 15 μL, 包括: 10 μmol·L⁻¹ 上下游引物各 0.2 μL; 2×Reaction Mix 7.5 μL; Golden DNA Polymerase 0.14 μL (2.5 U·μL⁻¹) (北京天根生化科技有限公司); 50 mg·L⁻¹ DNA 模板 1 μL; 超纯水 5.95 μL。PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, T_m °C (退火温度依引物而定) 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 8 min, 4℃ 保存。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 SSCP 分析及测序

待引物获得特异性良好的 PCR 产物后, 进行 SSCP 分析。将 PCR 产物与 SSCP 上样液按体积 2:8 混合, 98℃ 变性 10 min, 迅速冰浴 10 min, 使之变

性, 10% (体积分数) 中性聚丙烯酰胺凝胶电泳 12 h, 银染显色, 紫外凝胶成像系统成像保存, 所得不同基因型 PCR 产物, 送至上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.5 数据统计分析

计算各群体的基因型频率、等位基因频率、有效等位基因数 (*N_e*)、群体遗传纯合度 (*H_o*)、杂合度 (*H_e*) 和多态信息含量 (*PIC*)^[16], 并进行哈迪-温伯格平衡检测。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

两对引物扩增结果如图 1 所示, *PLIN1*-exon 2 引物扩增片段为 254 bp(左图), *PLIN1*-exon 3 引物

扩增片段为 269 bp (右图), 与预期扩增片段大小一致, 特异性扩增良好且没有明显的非特异性条带, 可进行后续的试验。

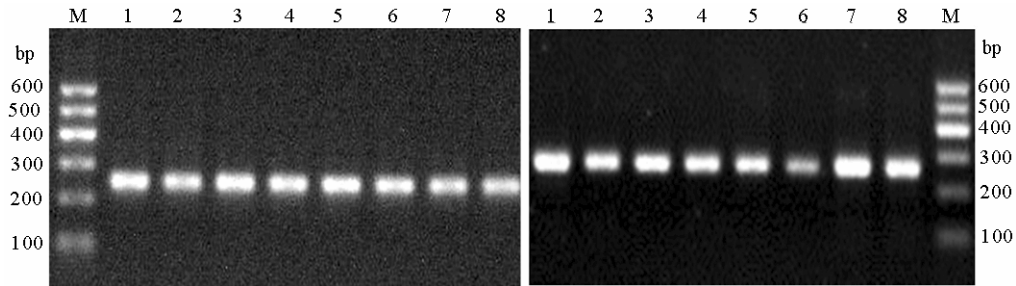
2.2 猪 *PLIN1*-exon 2 引物 PCR 扩增 SSCP 结果

对猪 *PLIN1*-exon 2 引物 PCR 扩增条带进行 SSCP 分析, 发现扩增产物上存在 3 种基因型: AA

型、AB 型和 BB 型 (图 1)。

2.3 猪 *PLIN1*-exon 3 引物 PCR 扩增 SSCP 结果

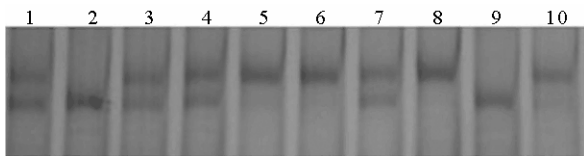
对猪 *PLIN1*-exon 3 引物 PCR 扩增条带进行 SSCP 分析, 发现扩增产物上只存在 1 种基因型 (图 2), 没有检测到突变位点。



M. DNA Marker I; 1~8. PCR 扩增产物 M. DNA Marker I; 1-8. PCR amplified products

图 1 猪 *PLIN1* 基因 PCR 扩增产物

Figure 1 PCR amplification products of pig *PLIN1* gene



1、3、4 和 7 为 AB 型; 2 和 9 为 AA 型; 5、6、8、10 为 BB 型

1, 3, 4 and 7 represent AB type; 2 and 9 represent AA type; 5, 6, 8 and 10 represent BB type

图 2 *PLIN1* 基因第 2 外显子的 SSCP 分析

Figure 2 SSCP of the Exon 2 for *PLIN1* gene

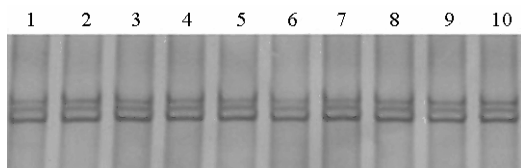


图 3 *PLIN1* 基因第 3 外显子 SSCP 分析

Figure 3 SSCP of in Exon 3 for *PLIN1* gene

2.4 猪 *PLIN1*-exon 2 扩增产物测序结果

取猪 *PLIN1*-exon 2 引物 PCR 产物进行克隆测序, 并将测序结果与猪 *PLIN1* 基因 DNA 序列 (NCBI

登录号为 NC_010449) 进行对比, 结果发现: 在外显子 2 上找到 1 个多态位点: A3519G, 本试验部分个体 *PLIN1* 基因第 2 外显子测序结果见图 3。

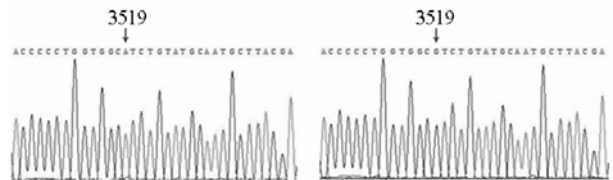


图 4 猪 *PLIN1* 基因测序结果对比图

Figure 4 The comparison chart of pig *PLIN1* gene sequence

根据 PCR-SSCP 和测序结果, 将 3 519 位点未发生突变的个体命名为 AA 型, 而将 3 519 位点发生 A 突变为 G 的个体命名为 BB 型。

2.5 群体遗传学分析

检测群体 *PLIN1* 基因第 2 外显子基因频率和基因型频率见表 2, 皖南黑猪 BB 基因型频率为 47.44%, 安庆六白猪 AB 基因型频率为 56.92%, 分别为两个群体的优势基因型, 而圩猪与霍寿黑猪在第 2 外显子上没有检测到突变。

表 2 猪 *PLIN1* 基因第 2 外显子 SNP 位点的基因型频率和基因频率

Table 2 Genotype frequencies and gene frequencies of the SNP site of pig *PLIN1* gene exon 2

品 种 Breeds	个数 Number	基因型频率/% Genotypic frequency			基因频率/% Allelic frequency	
		AA	AB	BB	A	B
皖南黑猪 Wannan Black pig	78	8.97	43.59	47.44	30.77	69.23
安庆六白猪 Anqing Liubai pig	65	29.23	56.92	13.85	57.69	42.31

表3 猪 *PLIN1* 基因第2外显子 SNP 位点在群体中的多态信息含量(*PIC*)、杂合度(*He*)、有效等位基因数(*Ne*)及 χ^2 检验

品种		多态信息含量	杂合度	有效等位基因数	χ^2
Breeds		<i>PIC</i>	<i>He</i>	<i>Ne</i>	
皖南黑猪	Wannan Black pig	0.335 3	0.426 0	1.742 3	0.041 8
安庆六白猪	Anqing Liubai pig	0.369 0	0.488 2	1.953 8	1.792 4

基因座位在群体中的杂合度、有效等位基因数、多态信息含量见表3。由表3可以看出,皖南黑猪群体的多态信息含量(*PIC*)为0.3353,处于0.25~0.50之间,表明该位点处于中度多态。经过 χ^2 适合性检验,皖南黑猪群体在该位点的 χ^2 值为0.0418,处于哈迪-温伯格平衡状态($P < 0.05$);安庆六白猪的多态信息含量(*PIC*)为0.3690,处于中度多态,在该位点的 χ^2 值为1.7924,处于哈迪-温伯格平衡状态($P > 0.05$)。

3 讨论

猪是典型的脂肪沉积型动物,大理石花纹,肌肉内脂肪含量,背膘厚是典型的脂肪沉积性状,脂肪沉积性状的优劣直接影响肉产品品质的判定^[17]。诸多研究表明,当肌肉内沉积2%~3%脂肪时,其断面形成大理石花纹状,此时的肉品鲜嫩多汁,且口感风味俱佳^[18-19]。而动物脂肪沉积的多寡取决于脂肪细胞的数量和体积,其中脂肪细胞的体积主要由细胞内甘油三酯的多少来决定^[20],因此动物脂肪细胞甘油三酯的合成和分解对动物脂肪沉积具有重要的影响,而*PLIN1*蛋白对脂肪组织中甘油三酯的代谢有双重调节作用:既可通过阻止脂肪酶接近脂滴降低基础状态下的脂解,又可促进激素刺激的脂肪分解^[21-22]。因此,根据其生理功能可知,*PLIN1*基因可以作为畜禽脂肪代谢和脂肪沉积以及肉质研究的重要候选基因。

*PLIN1*基因在动物脂类代谢调控中的重要作用引起学者的广泛关注,目前国内外关于*PLIN1*基因在猪上的研究逐渐增多。杨红文等^[22]以大白猪为研究对象,通过比较基因组学和简并PCR方法研究发现猪*PLIN1*基因与人和小鼠的相应序列有较高的同源性,预测的氨基酸序列与人、小鼠、牛和绵羊的相应区域的相似性也较高;Gandolf等^[23]采用免疫组化*PLIN1*蛋白方法染色欧洲杂交猪半膜肌,发现高肌肉脂肪含量组比低肌肉脂肪含量组*PLIN1*染色脂肪细胞的总横截面积要大,结果表明*PLIN1*蛋白在附加的猪的肌细胞内脂质沉积的调节中发挥关键的作用。

在*PLIN1*基因的多态性研究方面,Vykoukalová

等^[15]采用PCR-RFLP法检测*PLIN1*基因在长白猪、大白猪、杜洛克猪、汉普夏猪、梅山猪5个品种中的遗传多态性分布,结果发现*PLIN1*基因存在5个SNP位点,并且g.4119A>G和g.7966T>C突变位点与大白猪背膘厚显著相关;雷娜等^[24]采用PCR-SSCP技术检测杜长大商品猪*PLIN1*基因的多态性,发现2个SNP位点,并且g.3520T>C和g.6817G>A突变位点组合与猪背膘厚和肌肉脂肪含量达到极显著水平。而对地方品种猪*PLIN1*基因多态性的研究目前报道较少。

本研究检测了*PLIN1*基因在皖南黑猪、安庆六白猪、圩猪和霍寿黑猪4个地方品种群体中的多态性分布,发现皖南黑猪和安庆六白猪*PLIN1*基因3519位点存在A→G的碱基突变,检测到AA、AB、BB3种基因型,其中AA、BB型为纯合型,AB型为杂合型,而圩猪与霍寿黑猪*PLIN1*基因第2外显子没有检测到突变,可能与本试验样本量较小和两群体该基因座比较保守有关。皖南黑猪群体中BB基因型占优势地位,安庆六白猪群体中AB基因型占优势地位,2个群体*PLIN1*基因的*PIC*分别为0.3353、0.3690,表明在该位点处于中度多态,说明两群体在该位点遗传变异较大。哈迪-温伯格平衡 χ^2 独立性检验表明,两个群体在该位点均处于Hardy-Weinberg平衡状态。这可能是由于这2个群体在适应性方面具有遗传优势,并经过长期进化和选择达到了平衡状态。4个群体在*PLIN1*基因第3外显子上均没有检测到突变,原因可能是:试验猪群均为保种场纯繁个体,外来血缘很少,并通过长期的群体内部自然近交,使得有利基因不断纯化,同时也丢失了部分等位基因;试验群体在该基因座比较保守;试验样本量较小所致。

在下一步的研究工作中,将进一步检测皖南黑猪及安庆六白猪*PLIN1*基因3519位点碱基突变与胴体性能、肉质性状的关联分析,并在不同的群体中进一步验证,为寻找有效的分子遗传标记位点,进而实现地方品种猪胴体性状及肉质性状的标记辅助选择奠定基础。

参考文献:

- [1] Oczkiewicz M, Tyra M, Ropka-Molik K, et al. Effect of IGF2 intron3-g.3072G>A on intramuscular fat (IMF) content in pigs raised in Poland[J]. *Livestock Science*, 2012, 149(3): 301-304.
- [2] 张宏宇, 单安山, 徐林, 等. 猪肌肉脂肪调控研究进展[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(2): 156-160.
- [3] Guan J Q, Li M Z, Lou P E, et al. Gene expression changes in porcine adiponQ and its receptors, adiponR1 and R2 in adipose tissues[J]. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2012, 11(5): 637-640.
- [4] Song C Y, Gao B, Teng S H, et al. Polymorphisms in intron 1 of the porcine POU1F1 gene[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2005, 46(2): 195-200.
- [5] Vitari F, Giancamillo A D, Domeneghini C. Leptin (the ob gene product), ob-receptor and ghrelin immunolocalizations in fasted and fed swine gastrointestinal mucosa[J]. *Livestock Science*, 2010, 134(1/3): 33-36.
- [6] Brasaemle D L, Dolios G, Shapiro L, et al. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 46835-46842.
- [7] Brasaemle D L. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis[J]. *The Journal of Lipid Research*, 2007, 48: 2547-2559.
- [8] Londos C, Brasaemle D L, Schultz C J, et al. On the control of lipolysis in adipocytes[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1999, 892: 155-168.
- [9] Tansey J T, Sztalryd C, Gruia-Gray J, et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(11): 6494-6499.
- [10] Kern P A, Di G G, Lu T, et al. Perilipin expression in human adipose tissues is elevated with obesity[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2004, 89: 1352-1358.
- [11] Qi L, Corella D, Sorli J V, et al. Genetic variation at the perilipin (*PLIN1*) locus is associated with obesity-related phenotypes in White women[J]. *Clinical Genetics*, 2004, 66: 299-310.
- [12] Qi L, Haiqing S, Larson I, et al. Gender-specific association of a perilipin gene haplotype with obesity risk in a White population[J]. *Obesity Research*, 2004, 12: 1758-1765.
- [13] Yan W, Chen A, Huang J, et al. Polymorphisms in *PLIN1* and hypertension combined with obesity and lipid profiles in Han Chinese[J]. *Obesity Research*, 2004, 12: 1733-1737.
- [14] 樊月圆, 咎林森, 王洪宝, 等. *PLIN* 基因多态性与秦川牛胴体、肉质性状的相关性研究[J]. *畜牧兽医学报* 2010, 41: 268-273.
- [15] Vykoukalová Z, Knoll A, Čepica S. Porcine perilipin (*PLIN*) gene: Structure, polymorphism and association study in Large White pigs[J]. *Czech Journal of Animal Science*, 2009, 54(8): 359-364.
- [16] Falconer D S, Mackay T F C. Introduction to quantitative genetics [M]. 4rd ed. England: Longman, 1996.
- [17] Wood J D, Richardson R I, Nute G R, et al. Effects of fatty acids on meat quality: a review[J]. *Meat Science*, 2003, 66: 21-32.
- [18] Grześkowiak E, Lisiak D, Borzuta K, et al. Study of interrelation between chosen slaughter value traits of pigs and marbling of muscles [J]. *Nauka Przyroda Technologie*, 2009, 3(4).
- [19] Nishimura T, Hattori A, Takahashi K. Structural changes in intramuscular connective tissue during the fattening of Japanese black cattle: effect of marbling on beef tenderization[J]. *Journal Animal Science*, 1999, 77:93-104.
- [20] Tansey J T, Sztalryd C, Hlavin E M, et al. The central role of perilipin A in lipid metabolism and adipocyte lipolysis[J]. *IUBMB Life*, 2004, 56(7): 379-385.
- [21] 张利红, 张立杰, 杨公社. 一种调控脂解的重要蛋白—围脂滴蛋白(Perilipin)[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22(12): 931-934.
- [22] 杨红文, 王春风, 栗朝芝, 等. 猪围脂滴蛋白基因 cDNA 部分片段的克隆及序列分析[J]. *吉林农业大学学报*, 2010, 32(1): 104-107.
- [23] Gandolfi G, Mazzoni M, Zambonelli P, et al. Perilipin 1 and perilipin 2 protein localization and gene expression study in skeletal muscles of European cross-breed pigs with different intramuscular fat contents[J]. *Meat Science*, 2011, 88: 631-637.
- [24] 雷娜, 贾青, 赵广珍, 等. *PLIN1* 第 2、4 外显子多态性与猪脂肪沉积性状的相关性分析[J]. *河北农业大学学报*, 2012, 35(3): 106-111.