

## 皖南黑猪 *CETP* 基因单核苷酸多态检测与遗传分析

何小雷<sup>1</sup>, 余大华<sup>2</sup>, 黄龙<sup>1</sup>, 朱朋<sup>1</sup>, 吴涛<sup>1</sup>, 陈亮<sup>1</sup>, 丁月云<sup>1\*</sup>, 殷宗俊<sup>1\*</sup>

(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 112 头皖南黑猪为研究对象, 采用 PCR-SSCP 方法检测胆固醇酯转运蛋白 (cholesterol ester transfer protein, *CETP*) 基因的多态性。结果表明: (1) 皖南黑猪 *CETP* 基因第 1 内含子 795 碱基处发生 C→T 突变 (C795T); (2) 在 C795T 突变位点中检测到 CC、CT、TT 3 种基因型, 其基因型频率分别为 0.625 0、0.303 6 和 0.071 4; C 的基因频率为 0.776 8, T 的基因频率为 0.223 2; (3) 皖南黑猪 *CETP* 基因的多态信息含量 (PIC) 为 0.286 6, 该位点处于中度多态; 卡方检验表明, 该位点的  $\chi^2$  值为 1.738 8, 处于哈迪-温伯格平衡状态。

**关键词:** 皖南黑猪; *CETP* 基因; 单核苷酸多态; 遗传分析

中图分类号: S828.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)05-0706-04

### Single nucleotide polymorphism detection and genetic analysis of *CETP* gene in Wannan Black Pig

HE Xiao-lei<sup>1</sup>, YU Da-hua<sup>2</sup>, HUANG Long<sup>1</sup>, ZHU Peng<sup>1</sup>, WU Tao<sup>1</sup>,  
CHEN Liang<sup>1</sup>, DING Yue-yun<sup>1\*</sup>, YIN Zong-jun<sup>1\*</sup>

(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:** One hundred and twelve pigs from Wannan Black population were used for detecting the polymorphism of *CETP* gene by PCR-SSCP method. The results show as follows. (1) C>T mutation (C795T) occurred in 795 base position of intron 1; (2) Three genotypes (CC, CT and TT) were found in C795T site, genotypic frequency of CC, CT and TT was 0.625 0, 0.303 6 and 0.071 4, respectively, gene frequency of C and T was 0.776 8 and 0.223 2, respectively; (3) The polymorphism information content (PIC) was 0.286 6 in Wannan Black population, which indicated it was moderate polymorphism. The  $\chi^2$  value was 1.738 8, which was in Hardy-Weinberg equilibrium in Wannan Black population ( $P>0.05$ ).

**Key words:** Wannan Black pig; *CETP* gene; single nucleotide polymorphism; genetic analysis

猪为六畜之首, 猪肉占我国肉类消费总量的 85% 以上, 但猪肉中胆固醇含量较高 (1 g 五花肉含胆固醇 0.9~1.1 mg) [1], 因此生产低胆固醇的优质猪肉是当前养猪生产的现实要求。在我国, 低胆固醇猪肉生产领域尚处于薄弱环节, 畜牧工作者虽开展了大量的研究工作, 但更主要的是集中于营养、饲料领域 [2-3], 从遗传的角度开展低胆固醇猪品系选

育工作尚未取得实质性进展。

胆固醇酯转运蛋白 (cholesterol ester transfer protein, *CETP*) 是一种亲脂性极强的糖蛋白 [4], 主要由肝脏分泌, 在血液中循环, 促进胆固醇酯从高密度脂蛋白流向富含载脂蛋白 B 的极低密度脂蛋白和低密度脂蛋白, 调节血浆高密度脂蛋白胆固醇水平, 同时参与高密度脂蛋白颗粒重塑, 因此 *CETP*

收稿日期: 2013-03-26

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: 何小雷, 女, 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

是胆固醇逆转运过程中的一个关键交换因子<sup>[5]</sup>, 与体内血脂水平、血浆中高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇的水平、成分组成及颗粒的大小密切相关<sup>[6-7]</sup>。当 *CETP* 基因发生突变时, 其结构功能和活性发生改变, 使高密度脂蛋白胆固醇水平升高或降低, 从而影响胆固醇逆转运效率, 使外周组织 (如血液、肌肉) 胆固醇含量升高或降低<sup>[8-10]</sup>。因此, *CETP* 在猪体内胆固醇代谢过程中发挥重要作用, 研究其基因的结构、遗传变异及其与相关性状的关联性分析, 筛选其关键性的多态性位点可能会提供一些新的分子标记, 对低胆固醇肉猪培育相关工作的开展具有重要的理论和实践指导意义。

本试验采用 PCR-SSCP 方法, 对皖南黑猪群体进行 *CETP* 基因 SNP 筛查, 分析其在皖南黑猪群体中的遗传效应, 以期为后期开展 *CETP* 基因与皖南黑猪胆固醇水平相关性状关联性的研究奠定基础, 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

皖南黑猪 112 头, 采用前腔静脉采血, 置于肝素钠抗凝管中, 于 -20℃ 保存备用。采用血液基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 进行血液基因组 DNA 的提取, 超微量紫外分光光度计测浓度和纯度, 于 4℃ 备用。

### 1.2 引物设计

根据 NCBI 登录的猪 *CETP* 基因序列 (登录号: AF333037), 采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。上游引物: 5'-AGGGTCAGGGTCAAATCTC-3'; 下游引物: 5'-CCTCAGTGGTCTCC TGCTTC-3'。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 去离子水溶解后, 于 -20℃ 保存备用。

### 1.3 PCR 扩增

扩增反应体系为 15.0 μL, 包括: 2×*Taq* PCR Master Mix 7.5 μL (北京天根生化科技有限公司); 上、下游引物各 0.5 μL; 模板 DNA 1.0 μL; 灭菌双蒸水 5.5 μL。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后置于 4℃ 保存。

### 1.4 SSCP 分析及克隆测序

将 PCR 产物与 SSCP 上样液按体积比 3:7 混合, 98℃ 变性 10 min 后迅速冰浴 10 min。将 10% (体积分数) 聚丙烯酰胺凝胶置于 300 V 电压中空跑 30

min, 点样后, 300 V 电压预电泳 30 min, 随后 120 V 恒压电泳 11~14 h。电泳结束后, 进行银染显带, 拍照保存。

根据 PCR-SSCP 的结果, 挑选不同基因型的 PCR 扩增产物经纯化后送交生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行正反双向测序。

## 1.5 统计分析方法

**1.5.1 基因频率及基因型频率计算** 计算公式为:

$$P_i = 2(ii) + (ij_1) + (ij_2) + \dots + (ij_{m-1}) + (ij_m) / 2n$$

式中,  $P_i$  为第  $i$  个等位基因的频率;  $ii$  为第  $i$  个等位基因纯合的个体数;  $j_m$  为与  $i$  共显的第  $m$  个等位基因;  $ij_m$  为含有  $i$  与  $j_m$  共显性等位基因的个体数;  $n$  为一个群体内个体总数。由于 PCR-SSCP 方法检测结果为共显性等位基因, 因此表型频率即为基因型频率。基因型频率 = 基因型个体数 / 测定群体总数。

**1.5.2 基因频率及基因型频率的差异显著性检验** ( $\chi^2$  独立性检验) 根据基因频率计算各种基因型频率理论值, 计算  $\chi^2$ 。本研究资料的自由度  $df=1$ , 基因型理论值均大于 5, 可采用以下公式:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

式中  $E_i$  为理论值;  $O_i$  为实际观察值。

**1.5.3 *CETP* 基因的杂合度、有效等位基因数和多态信息含量的计算** 基因杂合度计算公式为:

$$He = 1 - Ho = 1 - \sum P_i^2$$

式中:  $He$  为某一位点的杂合度,  $P_i$  为某一位点上第  $i$  个等位基因频率,  $Ho$  为基因纯合度。

有效等位基因数计算公式为:

$$Ne = 1 / Ho = 1 / \sum P_i^2$$

多态信息含量 (polymorphism information content,  $PIC$ ) 是用于度量群体多态程度的指标, 一个标记在群体中的  $PIC$  是根据其等位基因频率来计算的。其公式:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n P_i P_j^2$$

式中,  $n$  为等位基因数目;  $P_i$  和  $P_j$  分别为第  $i$  和第  $j$  个等位基因在群体中的频率。

## 2 结果与分析

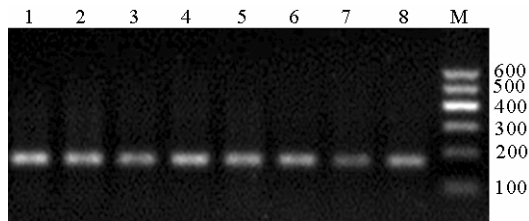
### 2.1 PCR 扩增结果

引物扩增结果如图 1 所示, *CETP* 基因引物扩增片段为 175 bp, 与预期扩增片段大小一致, 特异性好且没有明显的非特异性条带, 可进行后续实验。

### 2.2 猪 *CETP* 基因 SSCP 结果

将皖南黑猪 *CETP* 基因 PCR 扩增产物进行

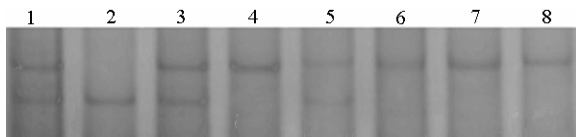
SSCP 分析, 可得到 3 种基因型: CC 型、CT 型和 TT 型 (图 2)。



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

图 1 皖南黑猪 CETP 基因 PCR 扩增产物

Figure 1 PCR amplification products of pig CETP gene



1、3、5 为 CT 型, 2 为 TT 型, 4、6、7、8 为 CC 型  
1, 3 and 5 are of CT type; 2 is of TT type; 4, 6, 7 and 8 are of CC type

图 2 CETP 基因 175 bp 片段的 SSCP 分析

Figure 2 SSCP analysis of the 175 bp for CETP gene

### 2.3 测序结果

挑选 PCR 产物进行克隆测序, 并将测序结果与猪 CETP 基因 DNA 序列 (GenBank 登录号为

AF333037) 进行比对, 结果发现在皖南黑猪 CETP 基因第 1 内含子 795 碱基处存在 C→T 的突变位点 (C795T), 且在 C795T 位点既有突变型也有野生型, 测序结果见图 3。

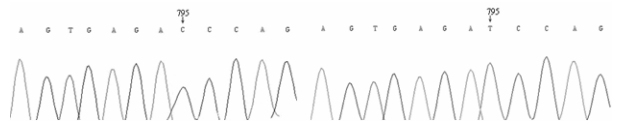


图 3 皖南黑猪 CETP 基因 C795T 位点处序列比较

Figure 3 Sequence comparison of CETP gene at C795T mutation in Wannan Black pig

根据 PCR-SSCP 和测序结果, 将 795 位点未发生突变的个体命名为 CC 型, 而发生 C 突变为 T 的个体命名为 TT 型。

### 2.4 群体遗传学分析

由表 1 和表 2 可知, 在皖南黑猪群体中, CC 型即野生型占绝对优势, TT 型即突变型最少, 使得 C 等位基因分布频率远高于 T 等位基因的分布频率。经卡方检验,  $\chi^2=1.7388 (P>0.05)$ , 表明皖南黑猪群体 CETP 基因在此位点的基因频率处于 Hardy-Weinberg 平衡状态; 在 C795T 位点处处于中度多态 ( $PIC=0.2866$ ),  $He$  为 0.3468,  $Ne$  为 1.5308, 表明 CETP 基因 C795T 位点的变异可作为较有效的遗传标记用于该群体遗传资源的评价。

表 1 皖南黑猪 CETP 基因在 C795T 位点的等位基因频率和基因型频率

Table 1 Allele and genotype frequency of C795T site of CETP gene in Wannan Black pig

| 基因型分布 Distribution of gene type |    |    | 总计 Total | 基因频率 Gene frequency |         | 基因型频率 Gene type frequency |         |         |
|---------------------------------|----|----|----------|---------------------|---------|---------------------------|---------|---------|
| CC                              | CT | TT |          | C                   | T       | CC                        | CT      | TT      |
| 70                              | 34 | 8  | 112      | 0.776 8             | 0.223 2 | 0.625 0                   | 0.303 6 | 0.071 4 |

表 2 C795T 位点在皖南黑猪中的遗传特性

Table 2 Genetic characteristics of C795T site in Wannan Black pig

| $\chi^2(P)$      | 多态信息含量 (PIC) | 杂合度 (He) | 有效等位基因数 (Ne) |
|------------------|--------------|----------|--------------|
| 1.738 8(0.187 3) | 0.286 6      | 0.346 8  | 1.530 8      |

## 3 讨论

CETP 基因在胆固醇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 CETP 基因在猪上的研究逐渐增多。猪 CETP 基因位于 6 号染色体(1/2p14)-p15 上<sup>[11]</sup>。大量研究<sup>[12-14]</sup>表明, 6 号染色体上许多基因, 如盐藻糖基转移酶基因(FUT1)、氟烷基因(HAL)、激素敏感脂肪酶基因(HSL)等与背膘厚度、瘦肉率和脂肪含量等性状相关。由于 CETP 在脂肪代谢转运蛋白中的重要作用和在染色体上所处的位置, 不少学者把 CETP 基因作为与肉质性状

及生长性能相关的候选基因来研究。

杜海波等<sup>[15]</sup>指出猪 CETP 蛋白作为脂多糖结合蛋白家族的一份子, 可以与脂多糖相互作用, 是参与天然免疫反应的细胞因子, CETP 基因可能在机体抗某些革兰氏阴性病原菌或其引起的疾病和胚胎发育过程中起重要作用, 也可能是影响畜禽某些生长性状的主效基因或与主效基因紧密连锁的标记基因。刘桂芬<sup>[16]</sup>等研究了胆固醇酯转运蛋白(CETP)基因在猪各个组织的表达特性以及在不同品种之间表达的差异。结果表明, 所检测的组织中除下丘脑外, CETP 基因在其余组织都有不同程度的表达,

其中肝脏的表达量最高,且地方猪种槐猪的表达量高于外来猪种长白猪。

在 *CETP* 基因的多态性研究方面, Shi 等<sup>[17]</sup>通过对 PCR 产物测序结果分析,与基因库中猪 *CETP* 基因序列(AF333037)对比发现约克夏猪和梅山猪 *CETP* 基因第一内含子区域存在 9 个单核苷酸多态位点(T19C, G69A, C132T, G175T, C203G, C224G, G234C, G853T 和 T858C)。其中 C224G 位点处为限制性内切酶 II (Ava II) 的识别位点,酶切后产生 241 bp 和 195 bp 2 个片段,当此酶切位点因变异(C→G)而消失时,两片段合并产生 436 bp 的片段,定义等位基因为 A(436 bp)和 a(241 bp+195 bp),对其进行进一步的遗传特性分析发现, A 等位基因频率在大白猪、梅山猪、汉普夏猪以及欧洲野猪群体中分别为 0.74、0.17、1.00 以及 0.25。魏麟<sup>[18]</sup>等应用 PCR-RFLP 技术对湖南黔邵花猪 280 个个体的 *CETP* 基因 436 bp 进行扩增,用限制性内切酶 Ava II 对其酶切得到 3 种基因型,碱基位点突变情况与 Shi 等报道的 C224G 位点一致,并发现该位点突变不同基因型对湖南黔邵花猪生长性状有重要影响。

本研究应用 PCR-SSCP 技术检测了皖南黑猪群体中 *CETP* 基因的多态性分布,发现第 1 内含子 795 位点处存在 C→T 的碱基突变,该位点突变不同与 Shi 等报道的 *CETP* 基因第 1 内含子 9 个多态性位点中的任何一个,并检测到 CC、CT 和 TT 3 种基因型。该群体中 CC 基因型频率为 0.625,占优势地位,*CETP* 基因的 PIC 为 0.286 6,表现为中度多态,说明所选群体遗传变异较大。一般来说,一个品种的遗传基础越广泛,其 DNA 多态性就越高,皖南黑猪群体在此位点的遗传变异较为丰富,这可能与该群体近年来的开放保种有一定关系<sup>[19]</sup>。另经  $\chi^2$  独立性检验表明,该多态位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ( $P>0.05$ ),这可能是由于该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。

本研究结果丰富了 *CETP* 基因在猪种上的研究,在下一步的研究工作中,将进一步检测 *CETP* 基因 C795T 多态对皖南黑猪 *CETP* 基因表达、胆固醇水平及肉质性状的相关性分析,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低胆固醇肉质性状的标记辅助选择奠定基础。

## 参考文献:

[1] 江霞,胡彩虹,许梓荣. 猪肝 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达产物的 RT-PCR 定量检测[J]. 上海畜牧兽医

通讯,2005(4): 20-21.

- [2] 胡彩虹,夏枚生,张红梅. 丙酸钠对肥育猪胆固醇代谢的影响[J]. 营养学报,2005,27(2): 163-166.
- [3] 屠友金,胡彩虹. 低聚果糖和丙酸钠对肥育猪胆固醇代谢的影响[J]. 中国粮油学报,2005,20(1): 65-68.
- [4] Annema W, Tietge U J. Regulation of reverse cholesterol transport—a comprehensive appraisal of available animal studies[J]. Nutrition & Metabolism, 2012, 9(1): 25.
- [5] Annema W, Tietge U J. Role of hepatic lipase and endothelial lipase in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport[J]. Current Atherosclerosis Reports, 2011, 13(3): 257-265.
- [6] Ashley S, Been L F, Sarju R, et al. Genetic variation in cholesterol ester transfer protein, serum CETP activity, and coronary artery disease risk in Asian Indian diabetic cohort[J]. Pharmacogenetics and Genomics, 2012, 22: 95-104.
- [7] Yilmaz H, Isbir T, Agachan B, et al. Effects of cholesterol ester transfer protein Taq1B gene polymorphism on serum lipoprotein levels in Turkish coronary artery disease patients[J]. Cell Biochem Funct, 2005, 23(1): 23-28.
- [8] Manichaikul A, Chen W M, Williams K, et al. Analysis of family and population-based samples in cohort genome-wide association studies[J]. Hum Genet, 2012, 131(2): 275-287.
- [9] Sarzynski M A, Jacobson P, Rankinen T, et al. Association of GWAS-based candidate genes with HDL-cholesterol levels before and after bariatric surgery in the Swedish obese subjects study[J]. Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(6): E953-957.
- [10] Papp A C, Pinsonneault J K, Wang D X, et al. Cholesteryl Ester transfer protein (CETP) polymorphisms affect mRNA splicing, HDL levels, and sex-dependent cardiovascular risk[J]. PloS one, 2012, 7(3): e31930.
- [11] Yerle M, Echard G, R0bic A, et al. A somatic hybrid panel for pig regional gene mapping Characterized by molecular cytogenetics[J]. Cytogenet Cell Genet, 1996, 73: 194-202.
- [12] Bao W B, Ye L, Zhu J, et al. Evaluation of M307 of FUT1 gene as a genetic marker for disease resistance breeding of suta pigs[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(4): 4223-4228.
- [13] Elisabeth L, Thierry S, Claudia T, et al. Differences in pig muscle proteome according to HAL genotype: implications for meat quality defects[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(11): 4913-4923.
- [14] 王安娜,冉雪琴,王嘉福,等. 贵州地方猪品种 HSL 基因多态性与屠宰性状的关联性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(5): 627-632.
- [15] 杜海波,黄生强,马乐. 猪脂多糖结合蛋白家族及其基因的研究进展[J]. 国外畜牧学, 2010, 30(3): 89-90.
- [16] 刘桂芬,王爱国,傅金恋. 猪 *CETP* 基因表达变化及其对胆固醇合成的影响研究[J]. 中国畜牧杂志, 2008, 44(19): 12-15.
- [17] Shi X W, Zhang Y D, Rothschild M F, et al. Rapid communication: Genetic linkage and physical mapping of the porcine cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene [J]. Journal of Animal Science, 2002, 80(5): 1390-1391.
- [18] 魏麟,姚元枝,刘胜贵,等. 黔邵花猪 *CETP* 基因多态特征及其与生长性能的相关性[J]. 湖南农业大学学报, 2007, 33(3): 302-304.
- [19] 严燕,张陈华,王阳,等. 圩猪 OB 基因 SNPs 检测及其与仔性能的关系[J]. 中国农业大学学报, 2010, 15(6): 78-83.