

莱芜猪 DGA T1 基因的多态性研究

刘源¹,姜运良^{1,3},武莹²,魏述东³,杨晓慧¹

(1. 山东农业大学山东省动物生殖与育种生物技术重点实验室,泰安 271018;

2. 山东省农业科学院畜牧兽医研究所,济南 250100;3. 山东省莱芜市畜牧局,莱芜 271100)

摘 要 : 二酰基甘油酰基转移酶 1 (Diacylglycerol acyltransferase, DGA T1) 是催化酰基化的辅酶 A 和二酰基甘油要合成甘油三脂的关键限速酶。莱芜猪具有较强的脂肪沉积能力,可能与 DGA T1 基因的活性有关。本研究对莱芜猪 DGA T1 的外显子 6~8 共 476 bp 的序列进行了克隆、测序 (GenBank 登录号 :DQ289596) 和多态性分析,分别在外显子 6 的第 27 bp 位点和外显子 8 的第 56 bp 位点检测到单核苷酸多态 (SNP),均属于沉默突变。克隆了莱芜猪 5'调控区 737 bp 的序列,在 -241 bp (相对于起始密码子 ATG) 发现单个碱基的插入,该多态性位点与莱芜猪脂肪沉积的关系值得进一步探讨。

关键词 : 莱芜猪;二酰基甘油酰基转移酶 1 基因 (DGA T1);多态性

中图分类号 : S828.2 文献标识码 : A 文章编号 : 036626964 (2007) 0320214205

Study on DGA T1 Polymorphisms in Laiwu Pigs

LIU Yuan¹, JIANG Yunliang^{1,3}, WU Ying², WEI Shudong³, YANG Xiaohui¹

(1. Key Laboratory of Animal Reproduction, Breeding and Biotechnology of Shandong Province, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 2. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Academy of Shandong Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 3. Bureau of Livestock of Laiwu City, Shandong Province, Laiwu 271100, China)

Abstract : Diacylglycerol acyltransferase 1 (DGA T1) is a microsomal enzyme that catalyses the final and only committed step in the formation of triglycerides. The Laiwu pigs are capable of depositing more fat than western pigs. It is possible that they have a higher DGA T1 enzyme activity. In this study, exon six to exon eight of Laiwu DGA T1 was amplified and sequenced (GenBank accession number DQ289596). Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified at 27 bp of exon six and 56 bp of exon eight, respectively, both of which are silent mutations. A fragment of 737 bp of Laiwu DGA T1 promoter was as well cloned and sequenced. A deletion of adenosine (A) at 2241 (relative to initiation codon ATG) was identified in Laiwu pigs.

The association of the mutation with fat deposition remains to be elucidated.

Key words : Laiwu pig; diacylglycerol acyltransferase 1 gene (DGA T1); polymorphism

猪的脂肪沉积能力与背膘厚和肌内脂肪含量关系密切,是猪肉品质的重要影响因素之一。莱芜猪的脂肪沉积能力较强,肌内脂肪含量最高可达 101.14%。揭示莱芜猪脂肪沉积的分子遗传机制,可通过标记辅助渗入等手段,提高瘦肉型猪的肌内

脂肪含量、系水力、嫩度和香味等猪肉品质性状提供理论依据。二酰基甘油酰基转移酶 1 (Diacylglycerol acyltransferase, DGA T1) 催化酰基化的辅酶 A 和二酰基甘油合成甘油三脂,与动物的乳脂高低和脂肪沉

收稿日期 :2006203227

基金项目 “863”国家高技术研究发展计划项目 (2006AA10Z1 E1)

作者简介 :刘源 (19792),男,山东德州人,硕士,主要从事动物遗传育种学研究

3 通讯作者 :姜运良,博士,博导,主要从事动物遗传育种学研究, E-mail : yljia ng723 @ yahoo . com . cn

积有关。DGA T1 敲除的小鼠不能沉积脂肪和泌乳 [1]。DGA T 影响牛的脂肪合成和乳脂率 [2,3]。牛 DGA T1 外显子 8 上 2 个相邻碱基 (AA →GC) 的突变导致 232 位氨基酸由赖氨酸突变为丙氨酸 (即 K232A),能使奶牛的乳脂率增加 [4],说明外显子 8

对于该基因的功能十分重要。除了影响牛奶性状以外,该基因也是牛肌肉脂肪含量的位置候选基因 [5]。本研究克隆了莱芜猪 DGA T1 外显子 6 至外显子 8 以及 5'调控区的序列,并对其多态性进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料来源

从山东省莱芜猪原种猪场共采集 43 头莱芜猪样本。从山东省农业科学院畜牧兽医研究所良种猪培育中心分别采集大约克、长白和杜洛克猪样本各 10 头,代表西方瘦肉型猪种。耳组织采样,放入 70%乙醇中 -20℃ 保存。

蛋白酶 K、DNA Marker DL2000、Taq 酶、r

dNTPs、MgCl₂、限制性内切酶 EcoR I Hind III、和 pMD182T vector、Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit 均购自大连宝生物公司。琼脂糖、丙烯酰胺、,N,N

2-甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、Tris ED2 TA 等试剂购自 Sigma 公司,其它常规试剂购自上海试剂公司。

1.2 猪耳组织基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取按常规方法进行 [6],采用 0.8%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测基因组 DNA 的浓度和纯度,-20℃ 保存。

1.3 引物

用于扩增 DGA T1 外显子 6 至外显子 8 的 DGA T12F6 和 DGA T12Ri8 引物参考文献 [7];引物

TCA GGTFCA G23' 和 2T

)DGA T1p r (5'

TCACA TC GTC GT GTCC G23'
2GC

根据调控区的序列设计引物(分)为 0.3697℃设计用于扩

1.4 PCR 扩增

在 25 μ 的反应体系中混合 2.5 μL 10×PCRL buffer [500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris2HCl (pH 8.3), 15 mmol/L MgCl₂, 0.1%明胶], 2 μL 2.5 mmol/L 的 dNTPs, 上游引物和下游引物 (均为 20 μmol/L) 各 0.5 μ, rTaq DNA 聚合酶 (5 U/μ) LL

0.25 μL,基因组 DNA (100 ng/μ) 1 μ,补 ddH₂O 至 25 μL。按 95℃ 5 min,然后 95℃ 30 s,退火 30

s,72℃ 1 min 循环 30 次,最后 72℃ 延伸 7 min 进行 PCR 扩增。

1.5 测序及序列分析

将 PCR 产物 200 μL 于 1.2%的琼脂糖凝胶中

125 V 电泳 30 min 后用 Agarose Gel DNA Fragment

Recovery Kit 纯化,直接双向测序;或将纯化

回收的片段与 pMD182T 载体连接,常规方

α法 [6] 转化 DH5,经 EcoR I Hind III 和酶切鉴定

后

测序。每个个体至少测 3 个克隆,以消除测序造成的偏差。

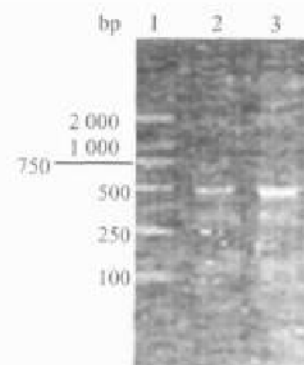
序列比对用 DNAMAN 5.2.2 软件包进行。5' 调控区转录因子的结合位点用 Mat Inspector 软件进行分析。

2 结果

2.1 DGA T1 外显子 6 至外显子 8 的扩增及测序猪

用引物 DGA T12F6 和 DGA T12Ri8 分别扩增莱芜猪和大约克 DGA T1 外显子 6 至外显子 8 的序列,得到一条 476 bp 的特异性带 (图 1)。克隆、测序得到 DGA T1 部分外显子 6 (52 bp)、内含子 6 (89 bp)、外显子 7 (114 bp)、内含子 7 (103 bp) 和部

外显子 8 (75 bp) 的序列。莱芜猪 DGA T1 外显子 6 至外显子 8 的序列已提交至 GenBank 数据库 (GenBank 登录号: DQ289596)。



1~3. 分别代表 DL2000 DNA Marker 以及大约克、莱芜猪 DGA T1 的扩增产物

1-3. represent DNA Marker DL2000, amplification product s f ro m Yorkshire and Laiwu

图 1 DGA T1 外显子 6 至外显子 8 的 PCR 扩增猪
Fig. 1 PCR amplification of exon 6 through exon 8 of porcine DGA T1

2.2 莱芜猪 DGA T1 外显子 6 至外显子 8 序列的多态性

将莱芜猪和大约克 DGA T1 外显子 6~8 的序

列与 GenBank 登录的序列 (A Y093657) 进行比对, 结果如图 2 所示。

Laiwu	CACGTGGCCAACCTGGCCACCATCCTGCTTCCCAGCGGGCCGTGGCTTTCCTGCTGGAG	60
Yorkshire	-----	60
AY093657	----- G -----	60
Laiwu	TCCATCACTCCAGGTGGGCCCCACCCACCCGCGCACCGGGTCCCTGGGGCCTGTGGGA	120
Yorkshire	-----	120
AY093657	-----	120
Laiwu	GAGACCTGTGGCGGGCGGGCCTGAGCATGCCTCTCCTGCAGTGGGCTCCCTGCTGGCTC	180
Yorkshire	-----	180
AY093657	-----	180
Laiwu	TGATGGTCTACGCCATCCTCTTCTCAAGCTGTTCTCCTACCGGGACGTCAACCTGTGGT	240
Yorkshire	-----	240
AY093657	-----	240
Laiwu	GCCGAGAGCGCAGGGCTACTGCCAAGGCCAAGGCCGGTGAGGGGCTGCCTGGGGCTGGGG	300
Yorkshire	-----	300
AY093657	-----	300
Laiwu	CTTGCTGGGGCTGCCAGGTGCCCTGGGCGGGACCTGGGCAGCGGCATCGCCTCACCCCA	360
Yorkshire	-----	360
AY093657	-----	360
Laiwu	CCCTGCCACTTGCTGGCAGCTTCTGCAGGTAGAAAGGCCAACGGGGCGCCGCCAGCAC	420
Yorkshire	-----	420
AY093657	-----	420
Laiwu	AGCGTGAGCTACCCGGA	437
Yorkshire	-----C-----	437
AY093657	-----C-----	437

图2 不同品种猪 DGA T1 外显子 6 至外显子 8 的序列比对,方框内表示突变碱基的位置,下划线表示牛 DGA T1 K232A 突变(AA→GC)的位置
 Fig. 2 Alignment of exon 6 through exon 8 sequence in DGA T1 from different breeds. Bases in bracket indicate mutant base position. The mutant position (AA→GC) in bovine DGA T1 is underlined

所测序的 7 个莱芜猪、一个由 20 头莱芜猪混合的 DNA 池和西方猪种样本在 DGA T1 外显子 6 第 60 bp 处均为 C,在相应位置 GenBank 登录的序列为 G。与大约克及 GenBank 登录的序列不同,莱芜猪在 DGA T1 外显子 8 第 56 bp 处有一个 C→G 的单碱基突变。上述两处单碱基突变均未造成编码氨基酸的改变,属于沉默突变。在外显子 8 未发现对应于牛 DGA T1 K232A 位置的碱基突变(图 2)。

2.3 DGA T1 5'猪调控区的克隆及多态性

猪 DGA T1 5'调控区的部分序列得到了特异性扩增(图 3a)。将本研究获得的莱芜猪与大约克的序列与网上提交的序列相比,在 -241 bp 处(相对于起始密码子 ATG)发现莱芜猪存在腺嘌呤(A)

的缺失,导致 Yin and Yang 1 阻抑物结合位点转变为 Neuro genin 1 and 3 (ngn1/3) 结合位点,可能影响 DGA T1 的转录。另外,在 -231 bp 处莱芜猪和大约克均缺失一个胸腺嘧啶(T)(图 3b 和 c)。莱

芜猪和大约克 DGA T1 5'控区的序列已提交调 GenBank,收录号分别为 DQ463322 和 DQ463321。

3 讨论

DGA T1 除了与牛乳脂率有关以外,Thaller 等^[8]还证明该基因的 K242A 突变可能对肌间脂肪和皮下脂肪有一定影响。Wu 等研究表明,DGA T1 对牛的皮下脂肪有加性效应^[9]。白色脂肪组织中缺失 DGA T1 的小鼠表现为肥胖抗性^[10]。

猪 DGA T1 cDNA 序列全长 1 935 bp,包括 198 bp 的 5' TR,1 470 bp 的编码区和 261 bp 的 3' UTR,有 17 个外显子和 16 个内含子。猪 DGA T1 的 cDNA 与小鼠、人和牛的同源性分别是 83%、^[7]88%和 91%。猪 DGA T1 定位于 4 号染色体 (SSC4),与背膘厚或肌肉脂肪的 QTL 连锁;日前未发现猪 DGA T1 的错义突变^[7]。

为了找到莱芜猪 DGA T1 基因与西方猪种的不同,本研究将长白猪、杜洛克猪和大约克各 10 头混成西方猪种 DNA 池作为莱芜猪的对照。本研究克隆了莱芜猪和大约克 DGA T1 外显子 6~8 的序列并进行了比对,发现除外显子 6 第 27 位和外显子 8



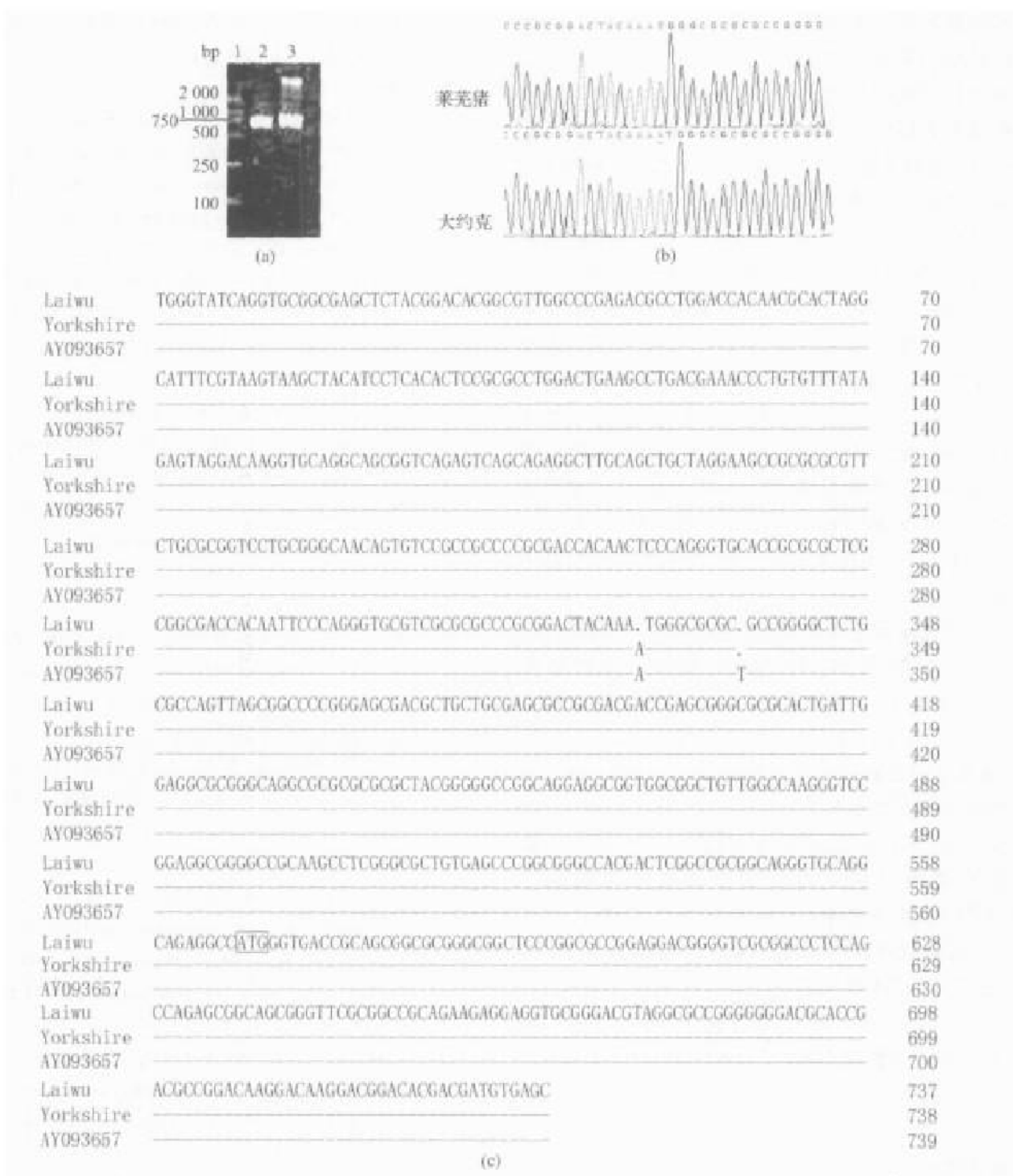


图 3 DGA T1 5'调控区的扩增、测序及序列比对结果。(a)猪 DGA T1 5'调控区的特异性扩增,1、2、3 分别为 DL200023 DNA marker、大约克和莱芜猪的扩增结果;(b)测序结果:上图为莱芜猪,下图为大约克;(c)序列比对结果。在起始密码子 ATG(加框表示)上游 -241 处和 -231 处莱芜猪分别缺失 A 和 T,在 -231 处,大约克缺失 T

Fig. 3 Amplification, sequencing result and alignment of porcine DGA T1 promoter region. (a) Specific amplification of porcine DGA T1 promoter region; lanes 1, 2 and 3 represent DL2000, Yorkshire and Laiwu, respectively; (b) Sequencing results: upper, Laiwu; lower, Yorkshire; (c) Alignment results: Del (A) and Del(T) were found at -241 and -231 (initiation codon ATG is designated as +1) in Laiwu and Del(T) at -231 in Yorkshire

第 56 位核苷酸不同以外,其余均相同。在外显子 6 的第 27 位碱基处,本研究共测序了 7 头莱芜猪、1 个由 20 头莱芜猪样本混合而成的 DNA 样本池和 1

个西方猪种的 DNA 池,结果无论莱芜猪还是西方猪种的 DGA T1 在该位置均为 C,AY093657 该位置的序列为 G。Y093657 序列来自美国农业部肉 A

用动物研究中心的 MARC 2 PIG 标准化文库,该文库所使用的猪品种包括长白和大约克 [11]。测序结果的不同可能与 2 个试验所用的群体不同有关,也可能是笔者所测序的大约克个体数少所造成的。在

DGA T1 基因外显子 8 的第 56 碱基处,共测序了 3 个莱芜猪样本、1 个莱芜猪混合 DNA 样本池和 1 个西方猪种 DNA 池,发现了一处 G→C 的单碱基突变,其位置与 Nonneman 和 Rohrer 报道的相同 [7]。

Nonneman 和 Rohrer 在猪 DGA T1 检测到 17

个 SNPs,其中 5 个是沉默突变,在外显子 8 未发现类似牛 K232A 的错义突变。Mercade 等认为,虽然猪 DGA T1 定位于 4 号染色体上,但定位于影响脂肪酸合成的 QTL 之外,因此不是该性状的位置候选基因 [12]。本研究结果也表明,脂肪沉积能力存

在明显差异的莱芜猪和西方瘦肉型猪种在 DGA T1 的外显子 6~8 无错义突变,与他们的研究结果基本一致。

本研究克隆了莱芜猪 DGA T1 基因 5'调控区的序列,与大约克和 AY093657 相比,莱芜猪在 -241bp 处缺失一个腺嘌呤 (A)。该缺失位于序列 (AC TACAAA T) 中,属于调控区中富含 AT 的区

域,缺失后造成顺式作用元件由 Yin and Yang 1 抑制物结合位点转变为 Neurogenin 1 and 3 (ngn1/3) 结合位点。Kuhn 等认为,除 K232A 突变以外,5'调

控区可变数目串状重复的多态性亦可能调节

[13]DGA T1 的转录水平,影响乳脂

率。莱芜猪在

-241 bp 处腺嘌呤 (A) 的缺失是否影响 DGA T1 的表达进而造成脂肪沉积的差异,值得进一步探讨。

另外,与 AY093657 相比,莱芜猪和大约克在 -231 bp 处均少一个胸腺嘧啶 (T),可能与 2 个试验所用

的品种及群体不同有关。

参考文献:

- [1] Smith S J, Cases S, Jensen D R, et al. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat [J]. *Nat Genet*, 2000, 25 (1):87~90.
- [2] Moore S S, Li C, Basarab J, et al. Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate genes for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of Bos taurus [J]. *J Anim Sci*, 2003, 81 (8):1 919~1 925.
- [3] 徐秀容,高,许尚忠,等.牛 DGA T2 基因第 6 内含子 Ms p2RFL Ps 和 Taq2RFL Ps 及其与牛经济性状相关性研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36 (10): 981~986.
- [4] Grisart B, Coppieters W, Farnir F, et al. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine DGA T1 gene with major effect on milk yield and composition [J]. *Genome Res*, 2001, 12:222~231.
- [5] Thaller G, Kuhn C, Winter A, et al. DGA T1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle [J]. *Anim Genet*, 2003, 34:354~357.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual* [M]. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N Y. 1989.
- [7] Nonneman D, Rohrer G A. Linkage of porcine DGA T1 to a region of chromosome 4 that contains QTL for growth and fatness [J]. *Anim Genet*, 2002, 33:468~485.
- [8] Thaller G, Kramer W, Winter A, et al. Effects of DGA T1 variants on milk production traits in German cattle breeds [J]. *J Anim Sci*, 2003, 81:1 911~1 918.
- [9] Wu X L, Macneil M D, De S, et al. Evaluation of candidate gene effects for beef backfat via Bayesian model selection [J]. *Genetica*, 2005, 125 (1): 103~113.
- [10] Chen H C, Jensen D R, Myers H M, et al. Obesity resistance and enhanced glucose metabolism in mice transplanted with white adipose tissue lacking acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111 (11):1 715~1 722.
- [11] Fahrenkrug S C, Smit H T P L, Freking B A, et al. Porcine gene discovery by normalized cDNA2library sequencing and EST cluster assembly [J]. *Mamm Genome*, 2002, 13:475~478.
- [12] Mercade A, Sanchez A, Folch J M. Exclusion of the acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 gene (DGA T1) as a candidate for a fatty acid composition QTL on porcine chromosome 4 [J]. *J Anim Breed Genet*, 2005, 122 (3):161~164.
- [13] Kü C, Thaller G, Winter A, et al. Evidence for multiple alleles at the DGA T1 locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle [J]. *Genetics*, 2004, 167:1 873~1 881.