



猪甲状腺激素应答 Spot14 基因编码区 多态性与猪产脂能力的关联性^{*}

周倩倩^{1, 2)} 陈宏权^{1, 2)**} 魏汉卿¹⁾ 秦 婕¹⁾ 陈 华^{1, 2)} 张翼鹏¹⁾

(¹⁾安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; ²⁾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)

摘要 甲状腺激素应答 Spot14 (THRSP) 是甲状腺激素诱导的核内蛋白质, 对动物脂肪生成具有重要的调控作用. 为了探明中国地方猪品种(脂肪型)和引入品种(瘦肉型)胴体脂肪沉积之差异的遗传机理, 提取脂肪型猪(皖南花猪、绩溪黑猪、定远猪, $n=228$)和瘦肉型猪(长白猪、大白猪、杜洛克及其杂种猪, $n=92$)的耳组织 DNA, 检测 THRSP 基因编码区的单核苷酸多态性 (SNP), 分析其变异对 mRNA 折叠和蛋白质二级结构的影响以及在群体中的分布规律, 研究其变异与猪产脂能力之间的关联性. 结果发现, 猪 THRSP 基因编码区的核苷酸序列与人和牛的同源性分别为 86%和 88%, 存在 2 个 SNPs 位点(G123A 和 A308G)分别位于距 CDS 起点的 123 bp 和 308 bp 处, 其中 G123A 为同义突变, 而 A308G 导致 THRSP 蛋白质 103 位的赖氨酸变为精氨酸, 引起了酪蛋白激酶 II 磷酸化位点由 TKEE 转变为 TREE, 并产生了 2 种类型的 mRNA 折叠和蛋白质二级结构, 脂肪型猪群中 123G 和 308A 的频率分别为 0.975 9 和 0.589 9, 瘦肉型猪群的 123G 和 308A 频率分别为 0.657 7 和 0.815 2, 脂肪型猪 123G308A 和 123G308G 配子的总频率达到 0.975 9, 而瘦肉型猪的 123A308A 和 123G308A 配子的总频率为 0.815 3. 实验提示, THRSP 基因编码区的 G123A 和 A308G 位点多态性与猪脂肪生成能力密切相关, 对脂肪生成相关基因表达具有重要的调节作用.

关键词 猪, THRSP 基因, 单核苷酸多态性(SNP), 脂肪沉积
学科分类号 Q75, S81

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00419

脂肪是机体的主要成分之一, 是维持正常生命活动所必需的物质基础, 也是影响猪胴体品质和消费者对产品口感、风味和多汁性需求的重要因素^[1]. 中国地方猪种和引入猪种之间的肉质差异常被用来作为培育不同类型产品的素材. 中国地方猪种和引入猪种的产肉性能存在显著差异, 其中中国地方猪种胴体脂肪含量要比引入品种高出 15%左右, 被人们分别称之为脂肪型猪与瘦肉型猪, 体现出机体一系列脂肪合成代谢之差异. 为探明其特定的遗传背景和脂肪代谢机制, 研究者先后解析了脂肪代谢过程中的关键酶基因以及起生理调控作用的激素类基因^[2-3], 并从中获得了不少与体脂含量关联的分子标记^[4], 为猪种培育和胴体性状改良提供了依据, 但这种标记真正能为我们所用却甚少.

从功能上看, 激素调控上下层级分明. 新近发现的甲状腺激素应答 Spot14 (thyroid hormone

responsive spot 14, THRSP)就是核内受甲状腺激素诱导表达的基因之一^[5-6], 其基因编码的蛋白质又称 Spot14 或 S14, 是甲状腺素受体调控激活的转录因子. THRSP 蛋白能刺激甲状腺素, 对高葡萄糖水平产生应答反应, 并且该基因所在的染色体区域与肥胖症有关, 因而该基因被认为对脂肪生成具有重要的调控作用^[7]. 目前, 对该基因的研究多见于人、大鼠和小鼠, 近几年在鸡、鸭等畜禽上的研究也越来越多. 对猪 THRSP 基因的研究, 陈华等^[8]

^{*} 安徽省科技攻关项目(08010302070), 国家高技术研究发展计划(2008AA101008)和农业部转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08008-007B)资助项目.

^{**} 通讯联系人.

Tel: 0551-5786326, E-mail: chenhq62@126.com

收稿日期: 2010-08-13, 接受日期: 2010-10-11

克隆并分析了 *THRSP* 基因 5' 调控区的特性, 但未见对其编码区的研究和分析报道, 有关猪该基因的相关报道甚少.

本文利用上述猪种在产脂能力上的差异, 通过检测 *THRSP* 基因编码区的遗传变异, 分析其对 mRNA 折叠和蛋白质结构的影响, 研究基因在不同产脂能力猪种之间的分布及其群体动力学, 以揭示 *THRSP* 基因编码区的遗传变异与猪产脂能力之间的关联性.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试猪 DNA 制备. 320 头供试猪 DNA 样本分别来自 2 种不同产脂类型的猪群: 脂肪型猪(228 头)分别来自中国地方猪种中的皖南花猪、绩溪黑猪和定远猪, 瘦肉型猪(92 头)来自长白猪、大白猪和杜洛克引入品种及其杂种(长白猪×大白猪、长白猪×大白猪×杜洛克). 所有猪均来自种猪场及其繁育猪场, 取耳组织经酚氯仿抽提法提取基因组 DNA, 溶于 TE 缓冲液, 4℃ 保存.

1.1.2 主要试剂. DNA Taq 酶、DNA Marker 和 dNTP 购自北京全式金生物有限公司; 限制性内切酶 *Mva* I 和 *Pvu* II 购自 MBI 公司.

1.2 方法

1.2.1 引物设计. 由于猪 *THRSP* 基因序列还未公布, 因此从 GenBank 中以人、黑猩猩、猕猴、马的 *THRSP* 基因外显子 I 序列设计兼并引物 TP-1: TP-1S, AAGCMRCCATGCAGGTGCTA, TP-1A, GATGRAGRCTGGAGAAGTGC, 其中 M=A 或 C, R=A 或 G. 对引物 TP-1 产物测序, 并据其设计多态性分析引物 TP-2: TP-2S, TACCCCAAGAACTG-CCTGCTGA, TP-2A, GGTGGAAGTGGGCTTCTA-GGTC. 引物由上海生物工程公司合成.

1.2.2 PCR 扩增. 25 μl PCR 扩增反应体系: 上下游引物各 1.0 μl (10 μmol/L)、10 × PCR 缓冲液 2.5 μl、dNTPs 2.0 μl (2.5 mmol/L)、Taq DNA 聚合酶 0.5 μl (5U/μl)、DNA 模板 1.0 μl (50 mg/L)、双蒸水 17 μl. PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, TP-1 引物 55℃ (TP-2 引物 58℃) 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存. 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.3 RFLP 分析.

将 PCR 产物克隆测序, 通过测序结果对比, 以限制性内切酶 *Mva* I 和 *Pvu* II 酶切分型.

15 μl 酶切的反应体系: PCR 产物 6 μl、内切酶 0.5 μl (10U/μl)、10×缓冲液 1.5 μl、双蒸水 7 μl, 酶切 12 h. 3% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶成像仪拍照和分析, 统计基因型.

1.2.4 基因频率. 单个单核苷酸多态性(SNP)位点基因频率: $p = D + 0.5H$, $q = 1 - p$, 其中: D 是纯合子基因型频率, H 是杂合子基因型频率. 2 个联合 SNP 位点的联合基因频率计算^[8]: $p_{ik} = D_{iikk} + 0.5(H_{ijkk} + H_{iikl}) + 0.25H_{ijkl}$, 其中 p_{ik} 是第一位点的 i 基因与第二位点的 k 基因组成联合基因频率, D_{iikk} 是 2 个位点均为纯合状态的联合基因型频率, H_{ijkk} 或 H_{iikl} 是其中一个位点处于杂合状态的联合基因型频率, H_{ijkl} 是 2 个位点均处于杂合状态的联合基因型频率.

1.2.5 分析软件. 通过 Motif Scan(http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)预测蛋白质的功能区域^[9], 使用 YASPIN 预测 *THRSP* 蛋白质二级结构^[10], 利用 Vienna RNA 折叠程序进行有义链的折叠(设定不允许 GU 配对折叠)和核苷酸反向重复分析^[11], 参照张同燕等^[12]的方法分析密码子使用的倾向性. 所有过程均包括不同基因型的对比分析.

2 结果与分析

2.1 目的片段的序列分析

PCR 的凝胶电泳图见图 1. TP-1 引物的 PCR 产物片段长度为 388 bp, TP-2 引物的 PCR 产物片段长度为 334 bp.

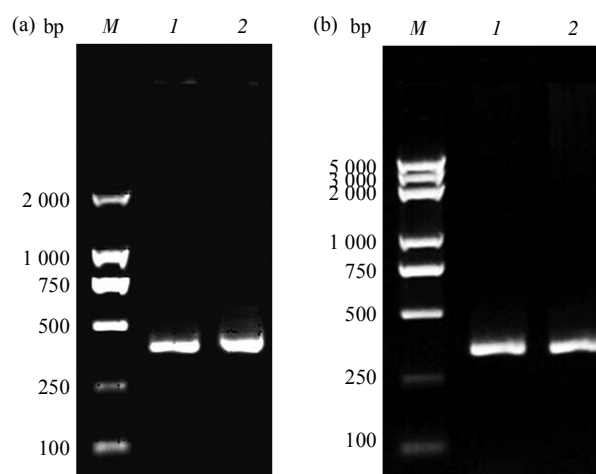


Fig. 1 PCR amplification of pig *THRSP* gene

Electrophorised with 1.5% agarose. (a) M: Trans 2k DNA marker; PCR products with primer TP-1 in 1 and 2. (b) M: Trans 2k Plus DNA marker; PCR products with primer TP-2 in 1 and 2.

将引物 TP-1 的 PCR 产物测序, 得到猪 *THRSP* 外显子 I (编码区) 的核苷酸序列及其对应蛋白质的氨基酸序列见图 2 所示. 将该片段核苷酸序列与人

和牛相比, 其同源性分别为 86% 和 88%. 分析蛋白质的有关功能区域, 发现存在 2 个潜在的酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 TVMD 和 TKEE.

aaggaagccgcatgcaggtgctagccaagcgctacccaagaactgcctgctgaccgtcatggaccggtac	72
M Q V L A K R Y P K N C L L <u>T V M D</u> R Y	20
ctggccgtggctcgcaacatggagcaggtggtgatgatccccagcctgctgcgggatgtgcagctgagtga	144
L A V A R N M E Q V V M I P S L L R D V Q L S A	44
catgggtgccaggccagtcggggggcccccatttctacaactacttcaccatgctcaaggccatccgtgtg	216
H G C Q A Q S G A P D F Y N Y F T M L K A I R V	68
gctgtggaccatgggctgctgccccgggaggagtgaggccaagggtggcggtggcaaaaacgatggggct	288
A V D H G L L P R E E W Q A K V A D G K N D G A	92
gagaatgaagctgcagagaccgaagagaccaaggaggagaggtcttggggcagctggacctagaagccag	360
E N E A A E T E E <u>T K E E</u> R L L G Q L D L E A Q	116
ttccacctgcacttctccagtttcatc	388
F H L H F S S L H	125

Fig. 2 The nucleotide sequence of the coding region of pig *THRSP* gene and its amino acid sequence

TVMD and TKEE underlined were Casein kinase II phosphorylation sites.

2.2 SNPs 检测

将不同类型猪的目的片段(混合样)进行测序, 发现该基因 CDS 的第 123 位存在 G→A 突变(G123A)和 308 位 A→G 突变(A308G). 突变位点的序列见图 3.

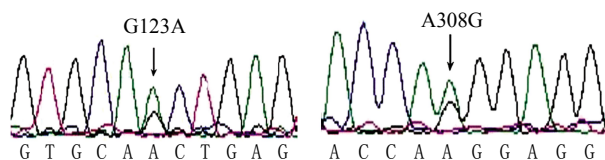


Fig. 3 The polymorphic sites in the coding region of pig *THRSP* gene

G123A and A308G sites were located at 123 bp and 308 bp away from the start of the CDS, respectively.

进一步分析显示, G123A 位点可以选用 *Pvu* II

酶切加以鉴别, 属于一种同义突变, 没有导致氨基酸变化; A308G 位点可以选用 *Mva* I 酶切加以鉴别, 该突变导致蛋白质中相应位置的赖氨酸变为精氨酸.

使用 *Pvu* II 酶切不同类型猪的 PCR 产物, 获得 3 种基因型: 123AA (片段 310 bp/24 bp)、123GG (片段 207 bp/103 bp/24 bp) 和 123AG. 使用 *Mva* I 酶切不同类型猪的 PCR 产物, 获得 3 种基因型: 308AA (212 bp/81 bp/41 bp)、308GG (164 bp/81 bp/48 bp/41 bp) 和 308AG. 酶切基因型的凝胶电泳结果见图 4, 可见 2 种酶均可清晰地分离出突变位点的基因型, 48 bp 和 41 bp 的条带几乎重叠不易分辨, 但每种基因型均含有这 2 种条带, 不影响基因型的判定.

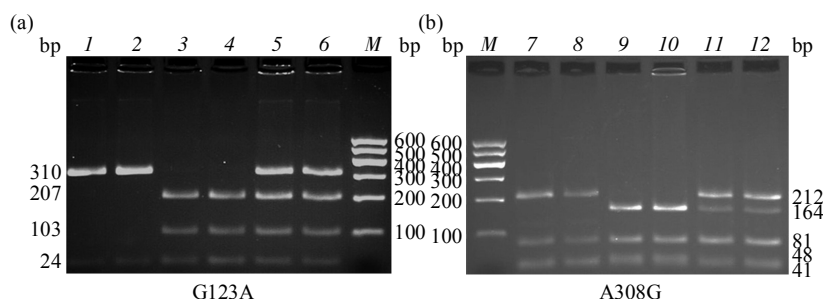


Fig. 4 RFLP patterns of PCR products at G123A site for *Pvu* II and at A308G site for *Mva* I in the coding region of pig *THRSP* gene

(a) G123A. (b) A308G. Electrophorised with 3% agarose; M: Marker I; 1, 2: AA genotypes; 3, 4: GG genotypes; 5, 6: AG genotypes; 7, 8: AA genotypes; 9, 10: GG genotypes; 11, 12: AG genotypes.

2.3 G123A 和 A308G 变异的群体动力学分析

不同猪群在 G123A 和 A308G 位点的基因型和基因频率分布情况分别见表 1。可见, 脂肪型猪在 G123A 位点 123G 的基因频率高达 0.975 9, 而瘦肉型猪的 123G 基因频率为 0.657 7。在 A308G 位点, 瘦肉型猪的 308A 基因频率为 0.815 2, 而脂肪

型猪中 308A 为 0.589 9。

对不同猪群进行 Hardy-Weinberg 平衡群体检测, 结果表明, 2 种类型猪在 G123A 位点均处于平衡状态, 而在 A308G 位点仅瘦肉型猪处于平衡状态, 脂肪型猪在该位点则处于非平衡状态。

Table 1 The distribution of genotype and gene frequencies of <i>THRSP</i> gene in fat- and lean-type pig groups									
G123A site					A308G site				
	Fat-type pigs		Lean-type pigs			Fat-type pigs		Lean-type pigs	
	Sample size	Frequency	Sample size	Frequency		Sample size	Frequency	Sample size	Frequency
Genotype					Genotype				
123AA	0	0	12	0.130 4	308AA	67	0.293 9	59	0.641 3
123AG	11	0.048 2	39	0.423 9	308AG	135	0.592 1	32	0.347 8
123GG	217	0.951 8	41	0.445 7	308GG	26	0.114	1	0.010 9
Gene					Gene				
123A					308A				
123G					308G				
	$\chi^2=0.139\ 3, P>0.05$		$\chi^2=0.316\ 3, P>0.05$			$\chi^2=11.418\ 1, P<0.01$		$\chi^2=2.196\ 3, P>0.05$	

G123A 和 A308G 两位点联合基因型及配子型频率见表 2。联合基因型只出现 6 种, 而 123AA308AG、123AA308GG 和 123GA308GG 均未检测到。脂肪型猪中, 123G308A 和 123G308G 配子频率达到 0.975 9, 而瘦肉型猪的 123A308A

和 123G308A 配子频率达 0.815 3。

对不同猪群的 G123A 和 A308G 联合位点进行 Hardy-Weinberg 平衡群体检测, 结果表明瘦肉型猪的联合位点处于平衡状态, 而脂肪型猪则处于非平衡状态。

Table 2 The frequencies of genotypes and gamete-types based on G123A and A308G sites of <i>THRSP</i> gene in fat- and lean-type pig groups								
	Fat-type pigs		Lean-type pigs		Gamete types	Fat-type pigs	Lean-type pigs	
	Sample size	Frequency	Sample size	Frequency				
123AA308AA	0	0	12	0.130 4	123A308A	0.013 2	0.307 1	
123GA308AA	1	0.004 4	26	0.282 6	123G308A	0.576 8	0.508 2	
123GA308AG	10	0.043 9	13	0.141 3	123G308G	0.399 1	0.149 5	
123GG308AA	66	0.289 5	21	0.228 3	123A308G	0.011 0	0.035 3	
123GG308AG	125	0.548 2	19	0.206 5				
123GG308GG	26	0.114 0	1	0.010 9				
	$\chi^2=16.13, P<0.05$		$\chi^2=7.42, P>0.05$					

2.4 G123A 和 A308G 变异对 mRNA 折叠的影响

利用 Vienna RNA 折叠方法对变异后 2 种类型的 mRNA 有义链进行折叠, 在不允许 GU 配对折叠的情况下, G123A 位点的核苷酸替换没有影响 mRNA 折叠形态, 而 A308G 位点核苷酸替换导致 2 种不同类型的 mRNA 折叠方式, 尤其是 2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点由相互贴近(TVMD 和

TKEE)转变为相互背离(TVMD 和 TREE), 进而可能影响折叠的顺利打开和相应位点的磷酸化。在不同类型猪群中, 瘦肉型猪使用图 5 中 K 折叠方式的频率为 0.641 3, 使用 R 和 K 两种混合折叠方式的频率为 0.347 8; 而脂肪型猪则更多的是使用图 5 中 R 和 K 两种混合折叠方式(频率 0.592 1), 使用 K 折叠方式的频率仅为 0.293 9。

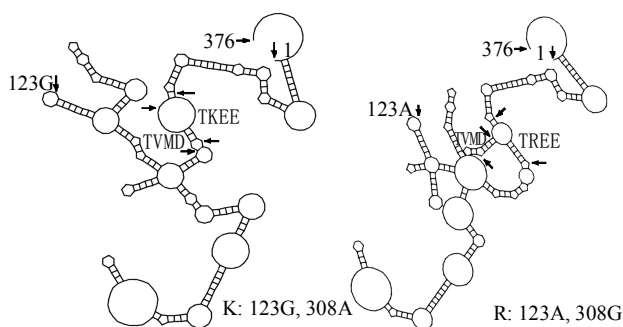


Fig. 5 The effects of the mutations at G123A and A308G sites on mRNA folding of pig *THRSP* gene

Vienna RNA-folding parameters: Temperature is 37°C, GU pairing is not allowed at all, and fold with specially stable tetra loops. Nucleotide position is indicated by the arrow, and TKEE, TVMD and TREE located between two arrows, respectively, show the position of casein kinase II phosphorylation sites.

The secondary structure prediction of THRSP protein with TKEE

Amino acid sequence: MQVLAKRYPKNCLLTVM^{DR}YLAVARNMEQVVMIPSLRLDVQLSAHGCAQSGAPDFYNYFTMLKAIR
 Secondary structure: CCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHCCCEEEECCECCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHH
 Amino acid sequence: VAVDHGLLPREEWQAKVADGKNDGAENEAETEETKEERLLGQLDLEAQFHLHFSSLH
 Secondary structure: HHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHCCCC

The secondary structure prediction of THRSP protein with TREE

Amino acid sequence: MQVLAKRYPKNCLLTVM^{DR}YLAVARNMEQVVMIPSLRLDVQLSAHGCAQSGAPDFYNYFTMLKAIR
 Secondary structure: CCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHCCCEEEECCECCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHH
 Amino acid sequence: VAVDHGLLPREEWQAKVADGKNDGAENEAETEETREERLLGQLDLEAQFHLHFSSLH
 Secondary structure: HHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHCCCC

Fig. 6 The secondary structure prediction of THRSP protein

H=helix, E=strand, C=coil; Amino acids underlined are casein kinase II phosphorylation sites.

3 讨 论

THRSP 作为一种酸性转录激活因子, 以同型二聚体方式发挥作用^[13]。THRSP 基因主要在脂肪生成组织如肝脏、腹脂和乳腺内表达, 与脂肪生成有关。研究者发现 THRSP 基因的变异对鸡的腹脂重^[14]和体重^[15]、鸭的肝脏率^[16]、牛肉的嫩度及系水力^[17]、猪的背膘厚^[18]等具有明显的关联性, 可见 THRSP 基因作为脂肪性状候选基因在不同畜种间具有高度的一致性。在 THRSP 的主效基因地位方面, 研究者发现人和小鼠 THRSP 基因所在的染色体区域与肥胖症有关^[18-19]。Kinlaw 等^[20]用 Spot14 反义寡核苷酸探针转染肝细胞后, 能抑制 ATP-柠檬

2.5 THRSP 基因密码子的倾向性使用及其对蛋白质二级结构的影响

G123A 位点的同义突变是将谷氨酰胺(Gln, Q)的 2 个密码子 CAG→CAA 互变。从密码子使用频率来看, 本文 THRSP 片段有 8 个 Gln, 其中 7 个 Gln 的密码子使用 CAG, 脂肪型猪倾向于使用 CAG, 瘦肉型猪偏爱 CAA。

A308G 位点突变导致 THRSP 蛋白 103 位的赖氨酸(AAG, K)变为精氨酸(AGG, R)。从基因频率分析可以看出, 脂肪型猪更多的是使用精氨酸, 瘦肉型猪则偏爱使用赖氨酸。使用 YASPIN 预测 THRSP 蛋白二级结构表明, 氨基酸的替换造成蛋白质的二级结构出现明显的变化(图 6)。显然, 在氨基酸替换处的蛋白质二级结构表现出差异, 使得酪蛋白激酶 II 磷酸化位点由螺旋(TKEE)结构转变为盘绕和螺旋(TREE)结构的交汇点, 造成 TKEE 和 TREE 在功能作用上的改变。

酸裂解酶、脂肪酸合成酶和苹果酸酶等的表达; Brown 等^[21]也证实 Spot14 蛋白能调节脂肪合成酶系中 6 种关键酶的基因转录, 从而表明了 THRSP 基因可能在脂肪性状发育中发挥主效基因的作用。本研究在脂肪型猪和瘦肉型猪中发现 THRSP 基因编码区中存在 G123A 和 A308G 突变, 并在不同猪群中表现出不同的分布特点和基因频率差异, 证实了 THRSP 基因的功能和作用与猪的脂肪生成特点存在密切的关联性。

G123A 和 A308G 位点的变异可能通过改变 mRNA 折叠^[22]、替换氨基酸和密码子^[23-24]等诸多方式来影响 THRSP 基因的最终功能和作用, 进而造成猪产脂能力的变化, 但本研究的这种现象在未针

对该基因的人工选择中被两极分化了. 根据本文结果, 我们可以推测猪基于 G123A 和 A308G 位点的野生型为 123GG308AA, 中国猪种在人工选择时间间接地将选择压施加在 G123A 位点, 而将携有 123GG308AG 的个体选留在脂肪型猪群中(2 种类型配子频率为 0.975 9), 瘦肉型猪则间接地将选择压施加在 A308G 位点, 更多地携有 123GA308AA 的个体选留下来(2 种类型配子频率为 0.815 3). 选择压的作用使得 G123A 和 A308G 位点时常出现偏离 Hardy-Weinberg 平衡. 分子结构的变异和选择限制是基于功能上的可接受性^[25], 本文虽未对相关话题做出讨论, 但来自 G123A 和 A308G 位点的突变在不同猪群中的分布特点暗示我们, *THRSP* 基因的功能和作用在脂肪型和瘦肉型猪群中存在明显的差异.

参 考 文 献

- [1] Mourot J, Hermier D. Lipids in monogastric animal meat. *Reprod Nutr Dev*, 2001, **41**(2): 109–118
- [2] Mead J R, Irvine S A, Ramji D P. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med*, 2002, **80**(12): 753–769
- [3] Donkin S S, McNall A D, Swencki B S, *et al.* The somatotropin dependent decrease in hepatic fatty acid synthase mRNA is the result of a decrease in gene transcription. *J Mol Endocrinol*, 1996, **16**(2): 151–158
- [4] Geldermann H, Cepica S, Stratil A, *et al.* Genome-wide mapping of quantitative trait loci for fatness, fat cell characteristics and fat metabolism in three porcine F2 crosses. *Genet Sel Evol*, 2010, **42**(1): 31
- [5] Seelig S, Liaw C, Towle H C, *et al.* Thyroid hormone attenuates and augments hepatic gene expression at a pretranslational level. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**(8): 4733–4737
- [6] Jump D B, Narayan P, Towle H, *et al.* Rapid effects of triiodothyronine on hepatic gene expression. Hybridization analysis of tissue-specific triiodothyronine regulation of mRNA S14. *J Biol Chem*, 1984, **259**(5): 2789–2797
- [7] Liaw C W, Towle H C. Characterization of a thyroid hormone-responsive gene from rat. *J Biol Chem*, 1984, **259**(11): 7253–7260
- [8] 陈华. *THRSP* 基因 5'侧翼区的 SNPs, 启动子效率及其与猪背膘厚之关联性[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010: 16–17
Chen H. SNPs and Promoter Efficiency in 5' Flanking Region of *THRSP* Gene and Its Association with Backfat Thickness of Pigs [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2010: 16–17
- [9] Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, *et al.* The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(Database issue): D245–249
- [10] Lin K, Simossis V A, Taylor W R, *et al.* A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. *Bioinformatics*, 2005, **21**(2): 152–159
- [11] Frier S M, Kierzak R, Jaeger J A, *et al.* Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**(24): 9373–9377
- [12] 张同燕, 陈宏权, 梁 忠, 等. 鹅黑素皮质素受体-4 基因的克隆与序列分析. *畜牧兽医学报*, 2007, **39**(9): 913–919
Zhang T Y, Chen H Q, Liang Z, *et al.* *Acta Veterinaria et Zootechnica Scinica*, 2007, **39**(9): 913–919
- [13] Cunningham B A, Maloney M, Kinlaw W B. Spot 14 protein-protein interactions: evidence for both homo- and heterodimer formation *in vivo*. *Endocrinology*, 1997, **138**(12): 5184–5188
- [14] Wang X F, Carre W, Zhou H J, *et al.* Duplicated Spot 14 genes in the chicken: characterization and identification of polymorphisms associated with abdominal fat traits. *Gene*, 2004, **332**(5): 79–88
- [15] Cao Z P, Wang S Z, Wang Q G, *et al.* Association of spot14 α gene polymorphisms with body weight in the chicken. *Poult Sci*, 2007, **86**(9): 1873–1880
- [16] 詹 凯, 徐桂云, 杨 宁, 等. 鸭 *THRSP α* 基因内含子多态与生长和屠体性状相关性研究. *中国畜牧杂志*, 2007, **43**(3): 1–3
Zhan K, Xu G Y, Yang N, *et al.* *J Chinese Animal Husbandry*, 2007, **43**(3): 1–3
- [17] 张小白, 咎林森, 王洪宝, 等. *THRSP* 基因 C184T 突变与秦川牛肉肉质性状相关性的研究. *中国农业科学*, 2009, **42**(11): 4058–4063
Zhang X B, Zan L S, Wang HB, *et al.* *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, **42**(11): 4058–4063
- [18] Wells W A, Schwartz G N, Morganelli P M, *et al.* Expression of "Spot 14" (*THRSP*) predicts disease free survival in invasive breast cancer: immunohistochemical analysis of a new molecular marker. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2006, **98**(2): 231–240
- [19] Anderson G W, Zhu Q, Metkowsky J, *et al.* The thrsp null mouse (*Thrsp^{mlcm}*) and diet-induced obesity. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, **302**(1): 99–107
- [20] Kinlaw W B, Church J L, Harmon J, *et al.* Direct evidence for a role of the spot 14 protein in the regulation of lipid synthesis. *Biochem Mol Biol*, 1995, **270**(28): 16615–16618
- [21] Brown S B, Maloney M, Kinlaw W B. "Spot14" protein functions the pretranslational level in the regulation of hepatic metabolism by thyroid hormone and glucose. *J Biol Chem*, 1997, **272**(4): 2163–2166
- [22] Jia M, Luo L. The relation between mRNA folding and protein structure. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **343**(1): 177–182
- [23] Kahalia B, Basaka S, Ghosh T C. Reinvestigating the codon and amino acid usage of *S. cerevisiae* genome: A new insight from protein secondary structure analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **354**(3): 693–699
- [24] Nishikawa K, Noguchi T. Predicting protein secondary structure based on amino acid sequence. *Methods in Enzymology*, 1991, **202**: 31–44
- [25] Kimura M. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge: Cambridge University Press, 1983: 149–193

Association of Polymorphism in The Coding Region of *THRSP* Gene With Lipogenesis Capability in Pigs*

ZHOU Qian-Qian^{1,2)}, CHEN Hong-Quan^{1,2)**}, WEI Han-Qing¹⁾, QIN Jie¹⁾, CHEN Hua^{1,2)}, ZHANG Yi-Peng¹⁾

¹⁾ Anhui Agricultural University, College of Animal Science and Technology, Hefei 230036, China;

²⁾ Local Animal Genetic Resources Conservation and Biobreeding Laboratory of Anhui Province, Hefei 230036, China)

Abstract Thyroid hormone responsive spot 14 (THRSP) is a nucleoprotein induced by thyroid hormone, which makes an essential effect on the regulation of animal lipogenesis. In order to clarify the genetic mechanisms of the differences between Chinese native pig breeds (fat-type group, FTG) and introduced pig species (lean-type group, LTG) in carcass fat deposition, DNA samples of ear tissues were extracted from FTG ($n = 228$) composed of Wannan Spotted, Jixi Black and Dingyuan and LTG ($n = 92$) from Landrace, Large White, Duroc and their hybrid pigs and then detected the SNPs in the coding region of *THRSP* gene. The effects of SNPs on mRNA folding and protein secondary structure in FTG and LTG were predicted using Vienna RNA folding software and YASPIN web services, and their distribution and association with lipogenesis capability in FTG and LTG were analyzed. The results showed that the homologies of nucleotide sequence in coding region of pig *THRSP* gene with human and cattle were 86% and 88%, respectively. Two SNP sites, G123A and A308G, were located at 123 bp and 308 bp away from the start of the CDS, respectively. The mutation at G123A site was a synonymous mutation, but the mutation at A308G site caused the change of amino acids from lysine to arginine at 103rd site of THRSP protein which resulted in the changes of casein kinase II phosphorylation site from TKEE to TREE, mRNA folding and protein secondary structure. The frequencies of alleles 123G and 308A were 0.975 9 and 0.589 9 in FTG, respectively, while that of alleles 123G and 308A were 0.657 7 and 0.815 2 in LTG. The total frequency of gamete 123G308A and 123G308G in FTG achieved 0.975 9, while that of gamete 123A308A and 123G308A in LTG was 0.815 3. Data from the present study imply the association of polymorphism at G123A and A308G sites with lipogenesis capability of pigs and their important regulating role in the expression of lipogenesis genes in pigs.

Key words pig, *THRSP* gene, SNP, lipogenesis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00419

*This work was supported by grants from Scientific and Technological Project of Anhui Province (08010302070), Hi-Tech Research and Development Program of China(2008AA101008) and New Varieties of GMO Cultivation of Major Projects of the Ministry of Agriculture(2009ZX08008-007B).

**Corresponding author.

Tel: 86-551-5786329, E-mail: chenhq62@126.com

Received: August 13, 2010 Accepted: October 11, 2010