

猪 *UCP2* 基因 5'调控区和外显子 1 的遗传变异研究*

李艳华^{1,3)} 郇汉杰²⁾ 赵兴波^{1,2)**} 李 宁¹⁾ 吴常信²⁾

⁽¹⁾中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094;

⁽²⁾中国农业大学动物科技学院, 农业部畜禽遗传育种重点开放实验室, 北京 100094;

⁽³⁾北京奶牛中心, 北京 100085)

摘要 解偶联蛋白家族 (uncoupling proteins, UCPs) 是线粒体内膜的转运蛋白, 具有解离氧化磷酸化偶联的功能, 对机体能量平衡涉及的体重(肥胖)、静止代谢率和食物转化效率等性状具有显著的影响. 首次对猪 *UCP2* 基因外显子 1 及开放阅读框上游部分序列 (-80~0) 进行了多态性分析, 通过 PCR-SSCP 发现猪群内存在 3 种单倍型, 经测序分析发现存在 3 个 SNPs 位点, 分别位于 G-42A、C-50T 和 T-51C 位点, 这 3 个 SNPs 位点均是首次发现的. 该研究表明, T-C-G 紧密连锁, C-T-A 突变也紧密连锁. 利用转录因子在线分析软件 TFSEARCH (ver 1.3), 对 *UCP2* 基因开放阅读框上游部分序列 (-80~0) 进行潜在转录因子结合位点预测, 发现该片段中的碱基 T→C(-51)、C→T(-50) 和 G→A(-42) 突变, 导致此处比野生型单倍型 A (T-C-G 碱基连锁) 少了一个 AML-1a 转录因子结合位点. 内江猪存在 A、B 和 AB 三种单倍型, 而其他猪种仅有单倍型 A, 说明内江猪具有独特的种质特性.

关键词 猪, 解偶联蛋白 2, 多态性

学科分类号 S81

1997年 Enerback 等^[1]通过小鼠解偶联蛋白 (uncoupling protein, UCP) 基因敲除实验证实了 UCP 的解离氧化磷酸化偶联的功能, 并揭示了 UCP 在体内供热代谢途径中的机制. 随后研究发现人 *UCP2* 或 *UCP3* 基因的碱基突变可引起肥胖, 例如 *UCP2* 基因 5'调控区-886G/A 突变^[2]、外显子 4 的 Ala-55-Val 错义突变和外显子 8 非翻译区 3'端的 45 bp 片段的插入或缺失^[3], *UCP3* 外显子 3 的 C/T 突变都可影响机体能量代谢, 对机体能量平衡涉及的体重(肥胖)、静止代谢率和食物转化效率等性状具有显著的效应^[4~6].

在猪的 *UCP* 基因家族的研究中, 研究最多的是 *UCP2* 和 *UCP3* 基因, *UCP2* 和 *UCP3* 基因紧密连锁, 定位在染色体 9p21-p24 上^[7]. 国外对猪 *UCP* 基因的研究主要是基因在特异组织或特定生理状态下的表达规律及调控上, 目前已证实猪 *UCP2* 和 *UCP3* 基因在不同品种猪中存在基因表达的差异^[8~10], 且在猪的生长和能量转化效率性状上发现具有显著的基因效应^[11], Mostyn 等^[12]研究表明, 仔

猪出生质量与 *UCP* 基因在特异组织中的表达量有关. 但这些差异是否直接影响重要经济性状尚需进行基因功能的相关研究. 猪 *UCP* 基因在遗传结构上的差异在国外没有被广泛研究^[13]. 在国内 Fang 等^[14]首次对猪 *UCP2* 外显子 3~4 进行了克隆测序, 并通过 PCR-SSCP 发现猪群内存在一新的单核苷酸多态 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点, 发生在第 3 内含子区域. 这是首次把 UCP 与家畜联系起来, 开辟了 UCP 在家畜育种中应用的新篇章. 有关猪 *UCP2* 基因多态性的研究未见其他更多报道.

本研究通过对 *UCP2* 基因部分基因组序列 (包括外显子 1 和开放阅读框上游部分序列) 的测定和 PCR-单链构象多态性 (PCR-SSCP) 方法, 探究 *UCP2* 基因在生长和能量转化效率存在显著差异的 10 个品种猪上的表现形式及其遗传特征.

*国家自然科学基金(30471235)和霍英东基金(91028)资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 010-62733417, E-mail: zhxb@cau.edu.cn

收稿日期: 2005-10-13, 接受日期: 2005-11-28

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物. 长白猪、大白猪、杜洛克、民猪、金华猪、五指山猪、香猪、荣昌猪、内江猪、野猪共 10 个猪种的 DNA 样品为本实验室保存, 随机抽取 30 头个体进行检测。

1.2 方法

1.2.1 猪基因组 DNA 的提取. 从血液中提取 DNA, 方法见《分子克隆实验指南》(第二版)。

1.2.2 引物序列与 PCR 反应. 依据 GenBank 上猪 *UCP2* 基因序列 (NO: AF036757), 用 Oligo6.0 设计引物, 引物序列如下, 上游(F): 5' ATCTCGTC-TTGCTGCTGAGT 3', 下游(R): 5' CACCTGCAGC-CGGACTTTAG 3'. 扩增的 PCR 产物为 *UCP2* 基因外显子 1 的全部序列及开放阅读框上游 (-80~0) 序列, 扩增长度为 209 bp. 扩增反应程序为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min. 扩增反应均在 PE GeneAmp 9700 热循环仪上进行, 25 μl 反应体系中, 引物为 25 pmol, 模板 DNA 50 ng, Taq 酶 0.5 U, dNTP 浓度为 100 μmol/L。

1.2.3 单链构象多态电泳和染色. 取扩增产物 1 μl 加入 5 μl 上样缓冲液于 98℃ 保温 10 min, 立即置于冰上直至电泳, 电泳采用 12% 的丙烯酰胺(Acr): 甲叉双丙烯酰胺(Bis)为 29:1 的聚丙烯酰胺凝胶. 凝胶电泳结束后, 采用 Bassam 等^[15]的银染方法染色。

1.2.4 PCR 产物的纯化和序列测定. 对 SSCP 分析后的纯合基因型, 分别取 2 个个体的 PCR 扩增产物, 以 GeneClean 试剂盒回收纯化, 与 T-vector 连接转化 DH5α 菌株, 然后使用 ABI PRISM377 DNA 测序仪测序。

1.2.5 潜在调控元件及蛋白质结合位点的预测. 对开放阅读框上游区域部分序列利用 <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html> 网站进行转录因子结合位点的在线预测。

1.2.6 单倍型分析. 根据 SSCP 带型和测序结果划分单倍型, 将 GenBank 上的 *UCP2* 基因序列规定为野生型单倍型 A, 突变个体的单倍型为突变型单倍型 B。

2 结果与分析

2.1 PCR-SSCP 结果

UCP2 基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图谱见

图 1, 得到一条长度为 209 bp 的 DNA 片段, 与实验预期结果相吻合, 可以进行 SSCP 分析。

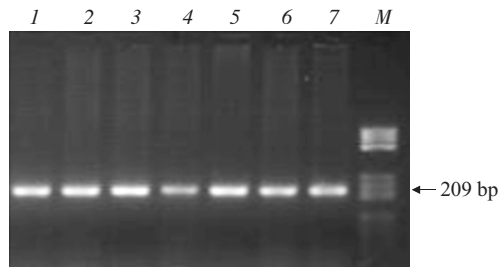


Fig. 1 Agarose gel image of PCR product of *UCP2* in pig
1~7: PCR product; M: pBR322 DNA mark.

将扩增的 PCR 产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 发现存在多态. 部分猪的 SSCP 分析结果及其不同单倍型所显示的带型见图 2. 经后续的测序结果, 规定野生型为单倍型 A, 有不同突变的单倍型相应的分别命名为单倍型 B 和单倍型 BC。

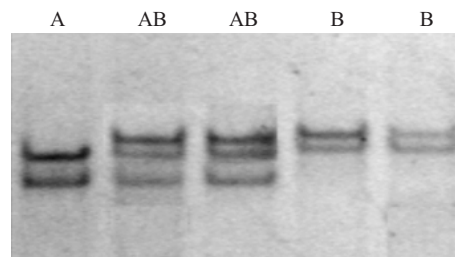


Fig. 2 PAGE image of SSCP of pig *UCP2* partial sequence
A, B, AB are different haplotypes.

2.2 测序结果

将具有不同单倍型的个体进行测序, 用 DNAMAN 软件与 GenBank 上的基因序列进行同源性分析发现, 此扩增片段共存在 3 个 SNPs 位点, 分别位于 G-42A、C-50T 和 T-51C 位点, 在被检测的猪种中, SSCP 仅发现了 3 种单倍型, 说明这 3 个突变位点是紧密连锁的, 不同单倍型命名原则如下: T-C-G 连锁碱基与 GenBank (序列号: AF036757) 序列一致, 命名为野生型单倍型 A; C-T-A 连锁突变命名为突变型单倍型 B; N-N-N 连锁突变命名为突变型单倍型 AB. 这 3 个突变位点均是首次发现的, 且突变都发生在开放阅读框上游, 第一外显子内无多态性位点. 2 种纯合单倍型的 DNA 序列见图 3。

2.3 开放阅读框上游区域潜在的调控元件及蛋白质结合位点预测

本文所分析的片段是解偶联蛋白 2 基因开放阅

读框上游区域部分序列和外显子 1, 使用网站 <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html> 上的 TFSEARCH (ver 1.3) 软件, 预测猪 *UCP2* 基因的 2 种纯合单倍型在开放阅读框上游部分序列

```

GGAGGCGTCTCCTTCTGCGGTTCTCTGTGTCTCTGA Haplotype A
      -51 ↓ ↓ -50      ↓ -42
GGAGGCGTCTCCTTCTGCGGTTCTCTGTGTCTCTGA Haplotype B

```

Fig. 3 Mutation in ORF upstream region of *UCP2* gene

2.4 *UCP2* 基因开放阅读框上游不同单倍型在各猪种中的分布

为了研究 *UCP2* 基因不同单倍型对猪种质特性的影响, 本实验对 10 个有代表性的猪品种进行了 *UCP2* 基因座位 PCR-SSCP 分析, 分别得到了具有不同单倍型的个体数. 该基因在各个猪种中的单倍型频率见表 1.

Table 1 Haplotype frequencies in *UCP2* by PCR-SSCP

Breed	Number	Haplotype frequencies		
		A	B	AB
Landrace	30	1.00	0	0
Large White	30	1.00	0	0
Duroc	30	1.00	0	0
Jinhua	30	1.00	0	0
Wuzhishan	25	1.00	0	0
Min	30	1.00	0	0
Xian(g)	29	1.00	0	0
Rongchang	30	1.00	0	0
Wild boar	24	1.00	0	0
Neijiang	30	0.50	0.19	0.31

从表 1 可以看出, 内江猪存在 A、B 和 AB 三种单倍型, 单倍型 B 和单倍型 AB 是内江猪种所特有的, 其单倍型频率也较高, 而其他猪种仅有单倍型 A, 说明内江猪具有独特的种质特性.

3 讨 论

随着我国人民生活水平的不断提高, 人们对猪肉的要求已从对数量的增长转移到品质、风味的提高, 因此研究肉质、风味性状的遗传机制是现今畜牧学、食品科学乃至生命科学的一个热点问题. *UCP* 基因参与机体能量代谢, 对机体能量平衡涉及的体重(肥胖)、静止代谢率和食物转化效率等性状具有显著的效应, 是影响肌肉生长和品质的重

(-80~0) 的调控元件及蛋白质结合位点改变情况. 预测结果表明, 突变型的单倍型 B 比野生型的单倍型 A 少了一个 AML-1a 位点.

要功能基因. 因此, 近年来解偶联蛋白基因为众多遗传学家和营养学家所关注, 特别是猪的研究更为活跃.

本实验采用 PCR-SSCP 和克隆测序结合的方法研究猪生长和能量转化效率候选基因——*UCP2* 基因的遗传功能, 该方法的分析效率取决于 SSCP 的灵敏度 (通常在 300 bp 左右) 和自动化程度, 因此是在功能基因检测的研究中进行基因扫描较为简便而快速的实验方法之一. 通过对 10 个不同品种猪的 PCR-SSCP 分析发现, 猪群内共存在 3 种单倍型, 分别是单倍型 A、B 和 AB, 从表 1 可以看出, 内江猪存在 A、B 和 AB 3 种单倍型, 而其他猪种仅有单倍型 A, 也就是说, 在单倍型分布上, 内江猪表现出不同于其他猪种的种质特性, 这可能与内江猪具有极强的适应性和耐受性等独特的优良特性有关. 据研究发现^[6], 分别对平均体重 30 kg 的长白猪和内江猪进行限饲, 仅供给日粮需要量的 2/3, 30 天内长白猪失重 3.6 kg, 而内江猪仅失重 1.8 kg, 两者差异极显著 ($P < 0.05$). 充分说明内江猪具有耐受性强的特点, 这可能与 UCP 基因参与机体能量代谢有关^[1], 但 *UCP2* 基因是如何参与调节能量平衡还有待于进一步研究.

UCP2 基因开放阅读框上游是解偶联蛋白 2 基因功能的调控区, 本研究检测到的 SSCP 多态性是 3 个单碱基突变, 即碱基 T→C(-51)、C→T(-50)和 G→A(-42)转换突变, 导致此处比野生型单倍型 A 少了一个 AML-1a 转录因子结合位点, 表明单倍型 B 转录因子结合位点的减少可能影响 *UCP2* 基因表达量, 从而影响能量转化效率, 进而使猪表现出不同的适应性和耐受性等特性. 另外, 在外显子 1 内不存在任何多态性位点, 这表明 *UCP2* 基因外显子 1 在进化上具有保守性, 确保了 *UCP2* 基因遗传的稳定性.

参 考 文 献

- 1 Enerback S, Jacobsson A, Simpson E M, *et al.* Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*, 1997, **387** (6628): 90~94
- 2 Esterbauer H, Schneitler C, Oberkofler H, *et al.* A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans. *Nat Genet*, 2001, **28** (2): 178~183
- 3 Otabe S, Clement K, Rich N, *et al.* Mutation screening of the human UCP 2 gene in normoglycemic and NIDDM morbidly obese patients: lack of association between new UCP 2 polymorphisms and obesity in French Caucasians. *Diabetes*, 1998, **47** (5): 840~842
- 4 Krempler F, Esterbauer H, Weitgasser R, *et al.* A functional polymorphism in the promoter of UCP2 enhances obesity risk but reduces type 2 diabetes risk in obese middle-aged humans. *Diabetes*, 2002, **51** (11): 3331~3335
- 5 Schonfeld-Warden N A, Warden C H. Physiological effects of variants in human uncoupling proteins: UCP2 influences body-mass index. *Biochem Soc Trans*, 2001, **29** (6): 777~784
- 6 Walder K, Norman R A, Hanson R L, *et al.* Association between uncoupling protein polymorphisms (UCP2-UCP3) and energy metabolism/obesity in Pima Indians. *Hum Mol Genet*, 1998, **7** (9): 1431~1435
- 7 Werner P, Neuenschwander S, Stranzinger G. Characterization of the porcine uncoupling proteins 2 and 3 (UCP2 & UCP3) and their localization to chromosome 9 p by somatic cell hybrids. *Anim Genet*, 1999, **30** (3): 221~224
- 8 Damon M, Vincent A, Lombardi A, *et al.* First evidence of uncoupling protein-2 (UCP-2) and -3 (UCP-3) gene expression in piglet skeletal muscle and adipose tissue. *Gene*, 2000, **246** (1~2): 133~141
- 9 Katsumata M, Matsumoto M, Kawakami S, *et al.* Effect of heat exposure on uncoupling protein-3 mRNA abundance in porcine skeletal muscle. *J Anim Sci*, 2004, **82** (12): 3493~3499
- 10 Mostyn A, Litten J C, Perkins K S, *et al.* Influence of genotype on the differential ontogeny of uncoupling protein 2 and 3 in subcutaneous adipose tissue and muscle in neonatal pigs. *J Endocrin*, 2004, **183** (1): 121~131
- 11 Spurlock M E, Ji S Q, Godat R L, *et al.* Changes in the expression of uncoupling proteins and lipases in porcine adipose tissue and skeletal muscle during feed deprivation. *J Nutr Biochem*, 2001, **12** (2): 81~87
- 12 Mostyn A, Litten J C, Perkins K S, *et al.* Influence of size at birth on the endocrine profiles and expression of uncoupling proteins in subcutaneous adipose tissue, lung, and muscle of neonatal pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, **288** (6): 1536~1542
- 13 Knoll A, Putnova L, Dvorak J, *et al.* Linkage mapping of an Ava I PCR-RFLP with the porcine uncoupling protein3 (UCP3) gene. *Anim Genet*, 2000, **31** (2): 156~157
- 14 Fang M Y, Liu C S, Zhao X B, *et al.* Sequences and polymorphisms of exons 3 and 4 in porcine UCP2 gene. *Prog Nat Sci*, 2002, **12** (7): 551~552
- 15 Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1991, **196** (1): 80~83
- 16 杨公社, 孙世择, 孟德连, 等. 绿色养猪新技术. 北京: 中国农业出版社, 2004. 21~22
- Yang G S, Sun S Z, Meng D L, *et al.* New Technology of Green Porcine Production. Beijing: China Agricultural Press, 2004. 21~22

Research on Genetic Variation of 5' Regulatory Region and Exon1 of *UCP2* in Pigs*

LI Yan-Hua^{1,3)}, LI Han-Jie²⁾, ZHAO Xing-Bo^{1,2)*}, LI Ning¹⁾, WU Chang-Xin²⁾

¹⁾State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

²⁾Ministry of Agriculture Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction,

College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

³⁾Beijing Dairy Cattle Center, Beijing 100085, China)

Abstract Uncoupling proteins (UCPs) are mitochondrial membrane transporters, acting as an uncoupler in oxidative phosphorylation. UCPs were also discovered associated with body mass index, resting metabolic rate and percentage of fat. Three haplotypes were detected by PCR-SSCP and then confirmed by DNA sequencing. For the first time, three single strand conformation polymorphisms (SNPs), G-42A, C-50T, and T-51C, were discovered in the promoter region of the *UCP2* gene in pigs. T-C-G is close linkage and C-T-A is also linkage. The potential protein factor binding sites were predicted by transcription factor analysis tool TFSEARCH ver1.3 on line. The result clewed that three mutations, T→C(-51), C→T(-50), and G→A(-42) in the promoter region of the *UCP2* may have some effect on the regulation of *UCP2* gene transcription and regulation because those mutations

increase a AML-1a site. There are three different haplotypes which are A , B and AB haplotype detected in Neijiang pig while other pig breeds have only haplotype A, suggesting Neijiang pig have specific property.

Key words pig, uncoupling proteins (UCP2), polymorphism

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30471235) and Fok Ying Tung Education Foundation (91028).

**Corresponding author . Tel: 86-10-62733417, E-mail: zhxb@cau.edu.cn

Received: October 13, 2005 Accepted: November 28, 2005