

猪 UCP5 基因克隆表达特性及 与屠体性状的关联分析*

李红霞^{1, 4)} 赵兴波^{1)**} 徐宁迎²⁾ 姜运良³⁾ 曹梦¹⁾ 刘玉方¹⁾ 方迟¹⁾ 李宁¹⁾

(¹⁾ 中国农业大学农业部动物遗传育种与繁殖重点开放实验室, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193;

²⁾ 浙江大学动物科学学院, 杭州 310029; ³⁾ 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018; ⁴⁾ 大连医科大学比较医学教研室, 大连 116000)

摘要 通过 3' 和 5' cDNA 末端快速扩增(RACE)获得了猪 UCP5 基因全长 cDNA 序列, 通过不同品种猪 UCP5 基因编码区和调控区单核苷酸多态分析, 发现 -1 567 bp 处存在 A→T 的突变, 从而导致转录因子 CdxA、HNF-1、Sox-5、GATA-2 结合位点发生了改变. 在金华×皮特兰 F2 代资源群中, 使用 PCR 限制性片段长度多态性(RFLP)方法, 对 524 头个体进行基因型测定, 并与屠体性状关联分析, 结果发现, AA 型活体重极显著高于 BB 型($P < 0.01$), AB 型活体重显著高于 BB 型($0.01 < P < 0.05$), AA 型的后腿肌肉重极显著高于 BB 型($P < 0.01$), AA 型的后腿脂肪重显著高于 BB 型($0.01 < P < 0.05$). 同时, 通过实时荧光定量 PCR 获得了 UCP5 基因在初生仔猪心、肝、脾、肺、肾、眼肌、腹脂和大脑等不同组织中基因表达的特性, 结果表明, UCP5 在猪的各种组织均有表达, 在脑和肺中表达量最多. *t* 检验发现, 初生达兰猪眼肌中 UCP5 的表达量显著高于金华猪.

关键词 猪, UCP5, 克隆, 表达特性, 屠体性状, 关联分析

学科分类号 S82

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00324

解耦联蛋白(uncoupling protein, UCP)是位于线粒体内膜的阴离子转运家族成员, 在调节能量分配中发挥着重要的作用, 目前在哺乳动物共发现了 UCP1、UCP2、UCP3、UCP4 和 UCP5 五个成员. UCP1 是最早发现的解耦联蛋白家族成员, 在褐色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)中特异表达, 具有解离氧化磷酸化耦联、减少 ATP 生成、产生热量以维持体温的重要作用^[1]. UCP2 广泛存在于动物脑、骨骼肌、白色脂肪等组织中^[2]. UCP3 在骨骼肌、脂肪及心肌中均有表达, 尤其在骨骼肌中具有高效、专一性表达的特点, 是骨骼肌线粒体内膜的重要转运蛋白^[3]. UCP4 和 UCP5 主要在脑和神经组织中表达, 对脂肪代谢、活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生和维持能量平衡具有重要的调控作用^[4-6]. 当前在对 UCP 的研究方面, 主要集中在人和鼠上, 而关于猪的 UCP 研究较少, 尤其是 UCP5 的研究未见报道.

本研究选用初生达兰猪为研究对象, 用 cDNA

末端快速扩增(RACE)法获得完整的猪 UCP5 基因 cDNA 序列, 并对其氨基酸组成等结构特点进行预测. 通过构建金华猪、莱芜猪、达兰猪和杜洛克猪基因组池, 对 UCP5 基因的各个外显子和 5' 及 3' 调控区进行克隆测序, 以确定存在的单核苷酸多态位点, 此后通过引入错配碱基创造酶切位点, 利用 PCR 限制性片段长度多态性(RFLP)方法, 研究探讨猪 UCP5 基因与屠体性状的关系. 通过实时荧光定量 PCR 研究 UCP5 基因在金华猪和达兰猪的心、肝、脾、肺、肾、眼肌、腹脂和大脑组织的表达, 并对其分布做比较, 以揭示 UCP5 的分布规律和在不同代谢类型猪种中表达上的差异.

* 转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08009-002, 2009ZX08009-157B)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62733417, E-mail: zhxb@cau.edu.cn

收稿日期: 2010-06-18, 接受日期: 2010-09-21

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物.

初生金华猪(浙江大学动物科学学院附属实验猪场提供)、达兰猪(国家饲料工业中心提供)、莱芜猪和杜洛克猪(山东农业大学动物科技学院提供)雄性各6头,将出生3天内仔猪处死后,迅速采集心、肝、脾、肺、肾、眼肌、腹脂和大脑,放入液氮带回实验室,于-80℃长期保存.

金华×皮特兰 F2 代猪 524 头,于 21 周龄屠宰时采集血样,并对活体重、后腿肌肉重、后腿脂肪重、平均背膘厚、6~7 肋间膘厚、眼肌面积和板油重 7 个屠体性状进行测定.测定方法根据《种猪测定原理与方法》进行^[7].

1.1.2 试剂及来源. Trizol、GeneRacer 试剂盒和高保真 Taq 聚合酶购自 Invitrogen 公司;反转录酶购自 Promega 公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司;宿主大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、质粒载体 pMD19T-Vector、普通 Taq 聚合酶、dNTP 均购自 Takara 公司;Power SYBR[®] Green PCR Master Mix 荧光定量试剂盒购自 ABI 公司;Tris 饱和酚购自北京百泰克公司;限制性内切酶 *EcoR* I 购自 NEB 公司.

1.2 方法

1.2.1 RNA 和 DNA 提取. 各种组织总 RNA 提取采用 Trizol 一步法, DNA 提取采用酚仿抽提法,具体步骤见《分子克隆实验指南》(第三版)^[8].

1.2.2 UCP5 完整 cDNA 序列的获得.

将从初生达兰猪大脑提取的 RNA 反转录成 cDNA,方法见《分子克隆实验指南》(第三版)^[8],此后,用在人和鼠 UCP5(GenBank Accession No. NM_003951 和 BC048692)保守区设计的引物(表 1),以反转录得到 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增.产物回收后用 pMD19T-Vector 连接后转化 DH5 α 菌株,菌体 PCR 鉴定后,用质粒提取试剂盒提取质粒 DNA 作为测序模板,每个片段单独挑 2 个克隆分别双向测序,通过序列对比拼接,获得部分 cDNA 序列.

按照 GeneRacer 试剂盒说明书,依次对 mRNA 进行去磷酸化、去帽子、连接 RNA Oligo 和反转录,获得 cDNA 模板.用试剂盒提供的引物和设计的基因特异性(GSP)引物(表 1)扩增 cDNA,此后再进行巢式扩增,产物克隆测序,每个片段单独挑 2 个克隆分别双向测序,获得完整的 3'和 5'序列,通过序列拼接获得完整的猪 UCP5 基因 cDNA 序列.本研究所用引物均由北京奥科生物技术有限公司合成,测序工作均由上海英俊公司完成.

Table 1 Primers for pig UCP5 cloning

Primers	Sequence(5'→3')	Annealing temperature/℃	Fragment length/bp
UCP5 cDNA	1. F: TTTCCCGGAATAATCCTA R: TAGAACATCGGTGGGATTGGCTA	60	486
	2. F: TAGAGGGATGTTCCATGCGCTGTT R: CAGGGTCCAAGCCGAAGCCA	57	675
UCP5 5' RACE	GeneRacer 5' Primer: CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	55	600
	5' GSP Primer: ATTGCCCTCTGGTTCATCATGCGAGTTC		
	GeneRacer 5' Nested Primer: GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA	55	521
	5' GSP Nested Primer: TCTTTAGCACATCGGTGGGATTGGCTAT		
UCP5 3' RACE	3' GSP Primer: CTTCCACTATAGCCAATCCCACCGATGT	55	900
	GeneRacer 3' Primer: GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG		
	3' GSP Nested Primer: ATAGCCAATCCCACCGATGTGCTAAAGA	55	800
	GeneRacer 3' Nested Primer: CGCTACGTAACGGCATGACAGTG		

1.2.3 UCP5 基因 SNP 位点的检测。根据(SSCX: 104997400-105027407)设计引物(表 2)，以金华猪、达兰猪、莱芜猪和杜洛克猪的池基因组为模板，分别扩增 UCP5 基因的每个外显子、3'和 5'序列。PCR 产物克隆，每个片段单独挑 2 个克隆，双向测序，经序列对比得到多态位点信息。

Table 2 Primers for SNP screen in pig UCP5			
Primers	Sequence(5'→3')	Fragment length/bp	Annealing temperature/℃
UCP5-1	F: GCTGTTGCTGCCGCGCTACT R: TTAGCCCCTCACGTGATGGTTCTGT	780	58
UCP5-2	F: TGCCAGTCTCCCAGAGTAGTTGT R: AAAGATCAAGGACGCAAATA	561	55
UCP5-3	F: GGTGCTGAGATATTTGCGTC R: AGAGAGATCAAAGGACCGTTAAG	714	59.7
UCP5-4	F: GAAACTAAAGAGAAAGTATTGGG R: TGGCACCTAGTTCAACAACGAT	788	62
UCP5-5	F: CTAAGTTGGGTGTGCTAGATGG R: CAGCAGAAATCCCTATCTTAACTCC	702	60
UCP5-6	F: ACCCATGAAACTTTGTACATAAGAG R: ACTGGCACATCGATATTGAA	715	58
UCP5-7	F: TTGTTTATGACCCAAATACGTTCT R: TAGATGAGGGCAGCATTAATC	575	58
UCP5-8	F: TTTATTTTCACAGGCTTTGTAGTTC R: CTTTAATCCCTAACAACCCTATGT	439	61
UCP5-9	F: GCCATGATGGGAACTCCTAAAT R: CATATACAGTACCCAAACATTAAGC	618	55
UCP5-10	F: TTTGTTTCCACTGAGCCATGACACG R: CTGACGGGCTACTGTATTAGA	687	60
UCP5-11	F: ATGTGTGTTTGGCCTAAT R: ATATGTTGGGTCCTTCTATCAG	504	56
UCP5-12	F: GAAGAGTACCTTGCATATTGTAG R: AGAGGAGAACTTTCGCATATC	471	63
UCP5-13	F: TGGCACAGATTAAATAACTCAAT R: ATTATAAACTAGGCTACCCTTAC	702	55
UCP5-14	F: GCAGAATCACTTTGGCTTGTCT R: GGCAAAGCAGATACATCAATGG	720	63

1.2.4 SNP 位点的 PCR-RFLP 分析。对已确定的突变位点，如果存在酶切位点，直接进行酶切，如不存在酶切位点，通过设计错配引物(表 3)引入酶切位点。酶切产物在 3%琼脂糖凝胶上电泳(电压 100 V)，根据酶切片段的大小进行多态分析。

Table 3 Primers for PCR-RFLP test in pig UCP5					
Primers(Locus)	Sequence (5'→3')	Annealing temperature/℃	Fragment length/bp	Enzyme	Product length/bp
UCP5(A-1567T)	F: CCCACAAACCTCATGGTTCCTAGTAGAA R: AAGCGTTTCATGTTACACAACACTACTCT	57	402	EcoR I	26+376

1.2.5 统计分析。根据测序结果和 PCR-RFLP 带型划分基因型。基于试验群体特点，构建以下线性模型进行最小二乘分析： $Y_{ij} = \mu + G_i + S_j + b_{ij}X_{ij} + e_{ij}$ ，其中 Y_{ij} 为性状表型值， μ 为平均值， G_i 为基因型效应， S_j 为性别效应， b_{ij} 为屠宰体重的回归系数， X_{ij} 为屠宰体重， e_{ij} 为残差效应。采用 SAS 8.2 (version)

中的 GLM 过程进行关联分析.

1.2.6 UCP5 基因的表达特性. 分别提取初生达兰猪和金华猪的心、肝、脾、肺、肾、眼肌、腹脂和大脑组织的 RNA, 反转录合成 cDNA. 以 cDNA 为模板, 用 UCP5 基因特异引物(表 4)进行

Real-time PCR, 同时以 GADPH 作为内参基因进行校正. Real-time PCR 反应过程为 50℃ UNG 孵育 2 min, 95℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 15 s, 72℃ 延伸 20 s, 40 个循环.

Table 4 Primers for pig UCP5 mRNA expression test using real-time PCR method

Gene	Sequence(5'→3')	Annealing temperature/℃	Fragment length/bp
GADPH	F:GTCCACTGGTGTCTTCACGA R:GCTGACGATCTTGAGGGAGT	60	156
UCP5	F:AGCATGATTGGCAGCTTCATT R:CATAAACGGGCAGCTCTACTCC	60	150

2 结果与分析

2.1 UCP5 基因克隆表达分析

采用 3' RACE 和 5' RACE 技术得到了 UCP5 基因完整的 3' 和 5' 端(图 1a)序列, 将 RACE 得到的 3' 和 5' 端序列与事先获得的 cDNA 片段进行序列拼接, 获得完整的猪 UCP5 基因 cDNA 序列, cDNA 长度为 1 611 bp(GenBank Accession No. HM222520), 开放读码框长 975bp, 编码 324 个氨基酸. 经在线分析 (http://ca.expasy.org/cgi-bin/pi_tool), 蛋白质分子质量为 35.81 ku, 等电点为 9.63, 其中 223 ~ 1 197 bp 为 CDS 区. 用 DNAMAN 进行多肽链序列对比发现, UCP5 蛋白与 UCP2 和 UCP3 蛋白的相似性分别为 31.19% 和 32.08%. 通过 PyMOL 软件对 UCP5 蛋白进行二级结构预测发现, 该蛋白质具有由 6 个典型的 α 螺旋结构组成类似通道状的主体结构(图 1b).

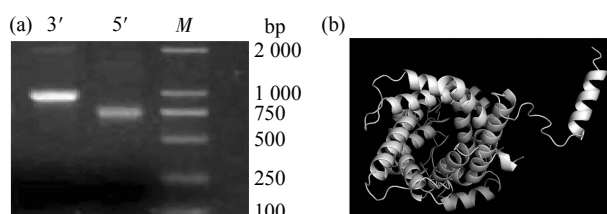


Fig. 1 RACE results and protein structure prediction of pig UCP5

2.2 SNP 位点的检测结果

在猪 UCP5 全基因范围内设计引物, 以构建的

基因组池为模板, 扩增各个外显子、5' 和 3' 区序列, 产物克隆测序, 结果表明仅在基因 -1 567 bp 处存在 A→T 的突变(图 2). 对 UCP5 基因上游系列进行转录因子结合位点在线预测 (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), 发现突变导致转录因子的结合发生变化, 当 UCP5 基因上游 -1 567 bp 处 A→T 时, 减少了一个转录因子 CdxA 结合位点, 转录因子 HNF-1 转变为 CdxA, Sox-5 转变为 GATA-2.

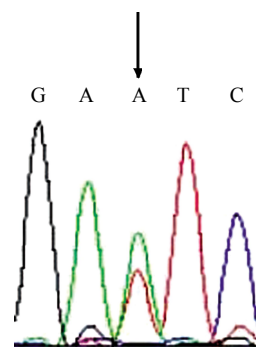


Fig. 2 The SNP at -1 567 bp site of pig UCP5

2.3 SNP 位点的 PCR-RFLP 分析

通过测序发现, 猪 UCP5 基因上游 -1 567 bp 处存在 1 个 SNP(A→T). 设计错配引物引入酶切位点, 用 PCR-RFLP 方法, 进一步在 524 头金华×皮特兰 F2 代猪资源群中验证这个 SNP. 酶切产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳检测, 产生 3 种带型, 规定野生型为 AA 型, 突变型为 BB 型和 AB 型.

当猪 UCP5 基因上游 -1 567 bp 位点处为 A 时, PCR 扩增产物不能被 *EcoR* I 酶切, 酶切产物只有

一个片段 402 bp, 此基因型为 AA 型. 当该位点突变为 T 时, PCR 产物经 *EcoR* I 酶切后产生 2 个片段(376 bp 和 26 bp, 其中 26 bp 的片段太小未出现在胶图上), 此基因型为 BB 型. 当-1 567 bp 位点

为 A/T 时, PCR 产物经酶切后会有 3 个片段(402、376 和 26 bp, 其中 26 bp 的片段太小未出现在图上), 此基因型为 AB 型(图 3).

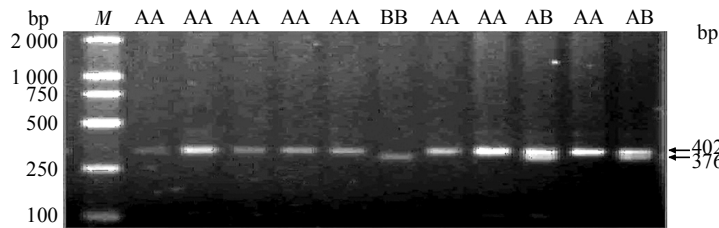


Fig. 3 PCR-RFLP /*EcoR* I at the A-1567T of pig UCP5 gene

2.4 SNP 位点基因型频率和等位基因频率

在 524 头金华×皮特兰 F2 代资源群中, 用 PCR-RFLP 方法, 分析了 UCP5 基因 A-1567T SNP 位点基因型频率和基因频率, 统计结果见表 5. 基因型频率为: AA > AB > BB, 等位基因 A 为优势基因.

Table 5 Frequencies of genotypes and alleles for A-1567T mutation in pig UCP5 gene

Locus	Genotype frequency			Allele frequency	
	AA	AB	BB	A	B
A-1567T	0.706(370)	0.176(92)	0.118(62)	0.794	0.206

2.5 SNP 位点与屠体性状的最小二乘分析

为研究 UCP5 基因上游-1 567 bp 处 SNP 位点的不同基因型对猪活体重、后腿肌肉重、后腿脂肪重、平均背膘厚、6~7 肋间膘厚、眼肌面积和板油重 7 个屠体性状的影响, 本研究对 524 头金华×皮特兰 F2 代资源群中 UCP5 基因上游-1 567 bp 处 SNP 位点的不同基因型与 7 个不同屠体性状进行了最小二乘分析. 结果见表 6.

Table 6 Effects for different genotypes at A-1567T mutation in pig UCP5 gene on carcass traits

Traits	Genotype (LSM±SE)		
	AA	AB	BB
Live weight	85.45 ± 1.67 ^a	82.21 ± 2.51 ^a	75.91 ± 2.77 ^b
Muscle weight of hind leg	5.89 ± 0.12 ^a	5.63 ± 0.18	5.32 ± 0.21 ^b
Fat weight of hind leg	2.02 ± 0.07 ^a	2.00 ± 0.10	1.77 ± 0.12 ^b

Values with different letters within a row indicate significant difference($P < 0.05$).

由表 6 可以看出, AA 基因型的活体重是最大的, 极显著高于 BB 基因型($P < 0.01$), AB 基因型的活体重显著高于 BB 型($0.01 < P < 0.05$). AA 基因型的后腿肌肉重极显著高于 BB 型, 而 AB 型和 BB 型间差异不显著($P > 0.05$). BB 基因型的后腿脂肪重显著低于 AA 基因型, AB 基因型与 BB 基因型间差异不显著.

2.6 UCP5 基因在猪不同组织和不同品种中的表达

通过实时荧光定量 PCR 研究了 UCP5 基因在猪不同品种和不同组织中的分布, 结果发现, UCP5 基因在猪大脑和肺中的表达量最多, 在心、肝、脾、肾、眼肌和腹脂中的表达量都比较少, 在达兰猪和金华猪中各组织的分布基本相似. 通过比较达兰猪和金华猪的心、肝、脾、肺、肾、眼肌、

腹脂和大脑组织中 UCP5 基因的表达丰度发现(图 4), 各组织存在不同程度差异, t 检验表明, 达兰猪眼肌中 UCP5 的表达量显著高于金华猪。

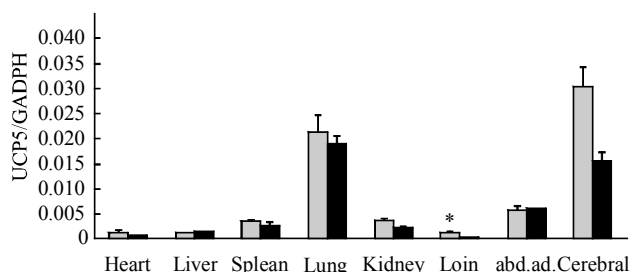


Fig. 4 Comparison of UCP5 in different tissues for Jinhua pig and Dalan pig
□: Dalan; ■: Jinhua.

3 讨 论

3.1 UCP5 基因的克隆与蛋白质结构分析

人的 UCP5 有 3 种存在形式, 分别是长型、短型和含 31 个氨基酸片段的插入型, 其中长型表达量占 66.8%, 短型占 32.5%, 插入型占 0.8%^[9]. 本实验中仅仅发现了一个转录本, 可能是由于物种的不同, 猪中只存在一种转录本; 也可能由于实验所用品种、个体等有限, 没能发现另外 2 种形式; 当然, 也可能是因为各种形式间相差太小, 如果测序的克隆数不是足够多, 根本不可能发现. 因此, 猪的 UCP5 基因是否存在更多的形式有待于以后研究的发现.

经蛋白质结构在线预测 (<http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>) 发现, UCP5 基因编码蛋白的立体结构是由 6 个 α 螺旋组成的一个类似通道状的蛋白质(图 1b), 这种结构正符合典型的 UCP 家族成员的构型^[10]. 尽管该基因的具体功能还没有直接的实验得以验证, 只能通过间接的实验推测^[6, 11], 但从该基因编码的蛋白质结构, 可以对 UCP5 是通过在线粒体内膜上形成一个通道来介导 H^+ 的内流功能, 提供一种结构学上的可能.

3.2 UCP5 与屠体性状的关联分析

UCP5 基因 A-1567T 位点的突变导致减少了一个转录因子 CdxA 结合位点, 转录因子 HNF-1 转变为 CdxA、Sox-5 转变为 GATA-2. CdxA 是“同源异形盒”基因家族的一个重要成员, 主要在上皮细胞表达, 对消化器官, 尤其是肠发育有很重要的调节作用, 一般位于基因的 5'端, 是一种调控区的结合蛋白序列, 作为启动子的一部分而起作用,

在某些表达 CdxA 蛋白的报告基因表达系统中, 含有 CdxA 元件的载体能够增强基因的转录活性, 但 CdxA 蛋白与相应 DNA 相互作用的亲和力却存在差异^[12], CdxA 还具有影响生长激素释放的功能^[13]. UCP5 基因 A-1567T 位点发生突变后, 因为缺失了转录因子 CdxA 结合位点, 使肠的发育受到影响, 从而在整体水平上对机体造成影响; 另一方面降低了 UCP5 基因转录的效率, 减少了生长激素的释放.

转录因子 Sox-5 通过阻止正常离皮神经元成熟前体的出现, 控制不同的离皮神经元亚型的生成顺序. GATA 是具有调控靶基因表达水平作用的转录因子家族, 有保守的锌指结构, 而 GATA-2 作为其家族成员之一, 不仅存在于胚胎器官, 还对成体造血细胞系、神经系统、垂体和泌尿生殖系统中细胞的功能和维持都必不可少, 在发育的许多过程中起重要作用. Tong 等^[14]报道 GATA 转录因子在脂肪的形成中也起重要作用, 尤其是 GATA-2、GATA-3, 在鼠科动物的前脂肪细胞中专一表达, 但在成熟的脂肪细胞中却没有. 在前脂肪细胞系中持续表达 GATA 转录因子, 能阻止前脂肪细胞分化成成熟的脂肪细胞, GATA 这种对脂肪分化的抑制, 部分是因为抑制脂肪形成因子的启动子, 包括 PPAR γ . 因此, 突变导致的转录因子 Sox-5 转变为 GATA-2 后, 抑制了脂肪形成.

肝细胞核因子 HNF 与 MODY (Maturity-onset diabetes of the young) 有重要关系, 遗传研究已经确认了 4 个 MODY 的易感基因, 分别是 HNF-1 α 、HNF-1 β 、HNF-4 α 和 IPF1^[15]. MODY3 发病的 65% 是由于 HNF-1 α 的突变造成^[16], 突变后胰岛 β 细胞不能正常分泌胰岛素, 而胰岛素的主要作用是调节糖、脂肪和蛋白质的代谢, 促进脂肪的合成和贮存, 一方面促进细胞对氨基酸的摄取和蛋白质的合成, 一方面抑制蛋白质的分解, 从而有利于生长. 突变导致转录因子 HNF-1 转变为 CdxA, 从功能上来说, 二者都对促进生长有利, 突变前后影响不大.

总体来看 UCP5 基因 -1 567 bp 处发生 A 到 T 的突变后, 由于减少一个转录因子 CdxA 结合位点, Sox-5 转变为 GATA-2, 导致 UCP5 的表达量降低, 减少了生长激素的释放, 抑制了脂肪形成, 由于肠道发育受到影响, 总体的代谢水平也受损. 表现在具体的性状就是活体重、后腿肌肉重和后腿脂肪重下降, 因此, 这 3 个屠体性状的表型值都是

AA > AB > BB. 所以说本研究在间接证实了 UCP5 在能量代谢中重要作用的同时, 也阐述了其与猪屠体性状的相关.

3.3 UCP5 基因的表达

研究发现 UCP5 基因在猪的心、肝、脾、肺、肾、眼肌、腹脂和大脑中都有分布, 尤其在脑和肺中最多, 这种表达模式与人的 UCP5 基因的分布基本相似, 但猪肺中 UCP5 的大量表达在其他物种却未见报道, 具体原因有待于 UCP5 功能的进一步研究. 研究者推测, UCP5 mRNA 在脑中的高表达, 暗示其在中枢神经系统中扮演着重要生理角色并参与了脑组织的代谢^[7]. 因此, 从 UCP5 的分布、功能来看, 它可能与组织特异性的温度调节和代谢调节有关.

UCP5 基因在金华猪和达兰猪中各组织的分布特征基本相同, 但达兰猪眼肌中 UCP5 的表达显著高于金华猪眼肌. Lengacher 等^[11]研究表明, UCP5 基因在哺乳动物细胞中过表达能够减少线粒体内膜的跨膜电位, 与食欲调控机制、体温调节和脑组织代谢有关. Sánchez-Blanco 等^[6]发现, UCP5 基因敲除果蝇的寿命比对照组低热量饮食果蝇的寿命要长, 繁殖力下降, 比高热量饮食对照组体重小. UCP5 基因敲除果蝇身体组成的总糖含量较低, 在饥饿应激时, 它们的甘油三酯储备的消耗比对照组快, 这些数据显示, UCP5 对维持果蝇的代谢是很重要的. Yonezawa 等^[4]通过 RT-PCR 发现, UCP5 基因在牛乳房上皮细胞的表达受饱和脂肪酸升高, 而胰岛素则导致 UCP5 基因表达的下调, 暗示 UCP5 在脂质和能量代谢过程中起重要的作用, 因此, 认为 UCP5 促进能量代谢. 达兰猪是具有大白和皮特兰血液的外国猪种, 代谢快、脂肪含量少, 而代谢慢、脂肪含量多正是中国地方品种的主要特征, 这种眼肌中 UCP5 分布的差异或许可以为 2 个猪种间脂肪含量的差异提供解释, 为解释猪的不同代谢类型提供新的依据. 同时, 也进一步暗示了 UCP5 基因在能量代谢方面的重要功能.

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] Fleury C, Neverova M, Collins S, *et al.* Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet*, 1997, **15**(3): 269-272
- [3] Daniel R, Fredric B. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J*, 2000, **345**(2): 161-179
- [4] Yonezawa T, Haga S, Kobayashi Y, *et al.* Saturated fatty acids stimulate and insulin suppresses BMCP1 expression in bovine mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **390**(3): 915-919
- [5] Guevara R, Santandreu F M, Valle A, *et al.* Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 2009, **46**(2): 169-175
- [6] Sánchez-Blanco A, Fridell Y W, Helfand S L. Involvement of Drosophila uncoupling protein 5 in metabolism and aging. *Genetics*, 2006, **172**(3): 1699-1710
- [7] 熊远著, 邓昌彦. 种猪测定原理与方法. 北京: 中国农业出版社. 1999: 57-118
- [8] Xiong Y Z, Deng C Y. Principles and Methods of Swine Testing. Beijing: China Agriculture Press, 1999: 57-118
- [8] Joseph Sambrook Russell D, eds. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Third ed. New Work: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 463-470; 522-525
- [9] Yang X, Pratley R E, Tokraks S, *et al.* UCP5/BMCP1 transcript isoforms in human skeletal muscle: relationship of the short-insert isoform with lipid oxidation and resting metabolic rates. *Mol Genet Metab*, 2002, **75**(4): 369-373
- [10] Smorodchenko A, Rupprecht A, Sarilova I, *et al.* Comparative analysis of uncoupling protein 4 distribution in various tissues under physiological conditions and during development. *Biochim Biophys Acta*, 2009, **1788**(10): 2309-2319
- [11] Lengacher S, Magistretti P J, Pellerin L. Quantitative rt-PCR analysis of uncoupling protein isoforms in mouse brain cortex: methodological optimization and comparison of expression with brown adipose tissue and skeletal muscle. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, **24**(7): 780-788
- [12] Chang M H, Chou C H, Hsieh Y C, *et al.* Identification of 5'-upstream region of pufferfish ribosomal protein L29 gene as a strong constitutive promoter to drive GEP expression in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **314**(1): 249-258
- [13] Bajic V B, Choudhary V, Hock C K. Content analysis of the core promoter region of human genes. *In Silico Biol*, 2004, **4**(2): 109-125
- [14] Tong Q, Tsai J, Hotamisligil G S. GATA transcription factors and fat cell formation. *Drug News Perspect*, 2003, **16**(9): 585-588
- [15] Takeda J. Mutations in the genes of the HNF-family cause maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Nippon Rinsho*, 1998, **56**(9): 2419-2426
- [16] Ryffel G U. Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J Molecular Endocrinology*, 2001, **27**(1): 11-29
- [17] Yu X X, Mao W, Zhong A, *et al.* Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation. *FASEB J*, 2000, **14**(11): 1611-1618

Cloning, Expressing Characterization and Association Analysis With Carcass Traits for Pig UCP5 Gene*

LI Hong-Xia^{1,4)}, ZHAO Xing-Bo^{1)**}, XU Ning-Ying²⁾, JIANG Yun-Liang³⁾,
CAO Meng¹⁾, LIU Yu-Fang¹⁾, FANG Chi¹⁾, LI Ning¹⁾

¹⁾ College of Animal Science and Technology, State Key Laboratory for Agribiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

²⁾ College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

³⁾ College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China;

⁴⁾ Comparative Medicine Staff, Dalian Medical University, Dalian 116000, China)

Abstract The cDNA of UCP5 gene was obtained by 3' and 5' RACE, the length was 1 611 bp. One A→T mutation was found at -1 567 bp of UCP5 gene. The mutation resulted in the change of transcript factors CdxA, HNF-1, Sox-5, GATA-2. Different genotypes were detected in 524 Jinhua× Pietrain pigs using PCR-RFLP, and the relationships between the genotypes and live weight, muscle weight of hind leg, fat weight of hind leg, average back-fat thickness, back-fat thickness in the 6th~7th rib, area of loin and leaf fat weight were analyzed. The statistical analysis showed that animals of the AA genotype had the highest live weight, which was significantly higher than that of BB genotype and obviously higher than that of AB genotype. For muscle weight of hind leg and hind leg fat weight, AA genotype was also higher than AB and BB genotype. By Real-time quantitative PCR, UCP5 expression was analyzed in heart, liver, spleen, lung, kidney, loin, abdominal adipose and cerebral tissues. The results showed that UCP5 existed in all tissues, and the expression of UCP5 was the majority in cerebral tissue and lung. The result of *t*-test showed that the distribution of UCP5 in loin of Dalan pigs was significantly higher than that of Jinhua.

Key words pig, UCP5, cloning, expression characterization, carcass traits, association analysis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00324

*This work were supported by grants from Domain-Specific Projects for Transgenic Biological Breeding (2008ZX08009-002, 2009ZX08009-157B).

**Corresponding author.

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

Received: June 18, 2010 Accepted: September 21, 2010