

• 遗传育种与繁殖 •

藏猪 Mx1 基因外显子 14 的遗传变异分析

强巴央宗¹, 卓嘎², 凌遥³, 商鹏¹, 张浩³

(1. 西藏农牧学院 动物科学系, 西藏 林芝 860000; 2. 西藏自治区畜牧总站 拉萨 850000;
3. 中国农业大学 动物科技学院 北京 100193)

中图分类号: S813.3

文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2012)01-0036-02

关键词: 藏猪; Mx1 基因; PCR-RFLP; 多态性

摘要: 为了解藏猪抗病性能分子遗传基础, 试验采用 PCR-RFLP 技术测定 112 头藏猪的 Mx1-Hin6 I 多态性。结果表明: 藏猪群体中 Mx1 基因外显子 14 有长度为 11 bp 片段的缺失, Hin6 I 酶切位点有 AA、AB 和 BB 3 种基因型, 基因频率分别为 73.21%、23.22% 和 3.57%, A 和 B 等位基因频率分别为 84.82%、15.18%, 与报道的野猪和五指山猪基因频率分布相近, 但与国外猪种和其他国内地方猪种基因频率分布存在一定差异, 这可能与藏猪的抗病和抗逆性能有关。

Genetic diversity in exon14 of Mx1 gene in Tibet pig

CHAMBA Yangzom¹, ZHUO Ga², LING Yao³, SHANG Peng¹, ZHANG Hao³

(1. Department of Animal Science, Tibet Agriculture and Animal Husbandry College, Linzhi 860000, China;
2. Animal Husbandry and Veterinary Station of Tibet Autonomous Region, Lasa 850000, China;
3. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Key words: Tibet pig; Mx1 gene; PCR-RFLP; polymorphism

Abstract: To understand the molecular genetic basis of disease resistance in Tibet pig, the polymorphism in exon14 of Mx1 gene was measured with PCR-RFLP in 112 individuals of Tibet pigs. The results showed that the missing of 11 bp fractions did not occur in exon14 of Mx1 gene in Tibet pig population. The polymorphisms of Mx1-Hin6 I in Tibet pig had three genotypes, AA, AB and BB, and their gene frequencies were 73.21%, 23.22% and 3.57% respectively, and the allele frequencies for A and B were 84.82% and 15.18% respectively, which were similar to wild boar and Wuzhishan pig, but were different with foreign pig breeds and other China local breeds reported. That might be related to the disease resistance and adversity resistance in Tibet pig.

Mx 蛋白是细胞受 I 型干扰素、双链 RNA 或病毒感染诱导表达的抗病毒蛋白, 它能水解病毒核衣壳、抑制病毒复制, 进而抵抗病毒对细胞的感染^[1-2]。猪的 Mx1 基因已定位于 13 号染色体上, cDNA 序列全长 2 545 bp, 包括 1 个编码 663 个氨基酸的开放阅读框^[3-4]。猪 Mx1 基因第 14 外显子存在 2 个多态性位点, 在不同品种中等位基因频率有很大差别^[5]。猪繁殖与呼吸综合征病毒的感染能诱导 Mx1 基因的转录以及 Mx1 蛋白的表达, 这预示着猪 Mx1 蛋白很有可能对目前在养猪业中危害很大的某些病毒具有一定的抵抗作用, 在提高家畜遗传抗性方面更具有开发利用潜能^[6], 研究猪 Mx1 基因对控制流感病毒的传

播具有重要作用。藏猪是分布在青藏高原的小型地方猪种, 长期放牧饲养, 体型外貌和生活习性与野猪相似, 具有较强的抗病、抗逆能力。研究分析了藏猪群体 Mx1 基因外显子 14 的遗传变异, 为研究藏猪特殊抗病能力的分子基础提供资料。

1 材料

研究样品来自西藏农牧学院教学实习牧场藏猪群体, 采集耳组织样品 112 份。将采集后的样品浸泡在 75% 乙醇溶液中冷冻保存, 带回实验室提取基因组 DNA。

2 方法

2.1 DNA 提取

采用苯酚-氯仿抽提法, TE 溶解, -20℃ 冷冻保存。

2.2 引物设计与合成

从 NCBI 上下载猪 Mx1 基因组序列 (GenBank 登录号为 AB259856), 长度为 137 747 bp, 用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 扩增 Mx1 基因的外显子 14 中长度为 134 bp 的片段。引物序列: F 5'-AC-

收稿日期: 2011-05-27; 修回日期: 2011-06-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (U1036604)

作者简介: 强巴央宗 (1965-), 女 (藏族), 教授, 博士, qbyz628@126.com。

通信作者: 张浩 (1968-), 男, 副研究员, 博士, zhanghao827@163.com。

CAGCGACAAGAGGAAGTT - 3', R 5' - GGTGGTC-CTCGTTGCCT - 3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

2.3 基因扩增

PCR 反应体系(25 μ L): 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTP Mix 2 μ L, 5 pmol/ μ L 上、下游引物各 1 μ L, 5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, DNA 模板 1 μ L, 加 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 最后降温至 4 $^{\circ}$ C。

2.4 酶切

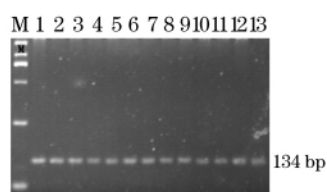
藏猪 Mx1 基因 PCR 产物用 Hin6 I 酶切。酶切反应体系(20 μ L): 10 $\times$ PCR Buffer 1.5 μ L, 3 ~ 5 U/ μ L Hin6 I 酶 0.5 μ L, PCR 产物 8 μ L, 加 ddH₂O 至 20 μ L。酶切反应条件: 37 $^{\circ}$ C 反应 4 h。反应结束后, 用 4% 琼脂糖凝胶电泳分析基因型。

2.5 统计分析

采用 POPGene 1.32 统计软件计算基因型和基因频率, 并进行 Hardy - Weinberg 平衡适合性检验。

3 结果与分析

3.1 藏猪 Mx1 基因 PCR 产物电泳(结果见图 1)

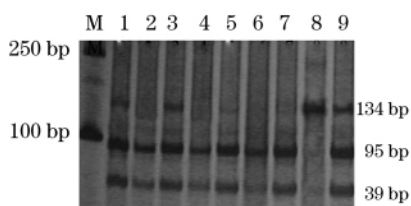


M. DL-2 000 Marker; 1 ~ 13. 134 bp。

图1 藏猪 Mx1 基因 PCR 产物电泳结果

由图 1 可知: 长度为 134 bp 的目的产物条带清晰, 且均无长度为 11 bp 片段的缺失发生。

3.2 Hin6 I 酶切多态性(结果见图 2)



M. DL-2 000 Marker; 1, 3, 9. AB 基因型;

2, 4 ~ 7. AA 基因型; 8. BB 基因型。

图2 藏猪 Mx1 基因 Hin6 I 酶切电泳结果

由图 2 可知: 等位基因 A 为 95 bp、39 bp 2 条带, 等位基因 B 为 134 bp 1 条带。藏猪群体中出现 AA、AB 和 BB 3 种基因型(见表 1), 其中 AA 基因型频率

最高为 73.21%, BB 基因型频率较低为 3.57%。等位基因 A 和 B 频率分别为 84.82%、15.18%。卡方分析结果显示, 藏猪群体内 Mx1 基因 Hin6 I 酶切基因型分布符合 Hardy - Weinberg 平衡。

表1 藏猪 Mx1 基因 Hin6 I 酶切多态性 %

项目	基因型			等位基因	
	AA	AB	BB	A	B
观察值	73.21	23.21	3.57		
期望值	80.52	28.97	2.52		
频率	73.21	23.22	3.57	84.82	15.18
检验	$\chi^2 = 1.2073$ $P = 0.2719$				

4 讨论

根据参考文献[5, 7]报道, 猪 Mx1 基因的外显子 14 中有长度为 11 bp 片段的缺失, 但研究未发现藏猪缺失这段序列, 不表现缺失片段多态性。在 11 bp 的片段内有 Hin6 I 酶切位点, 此酶切位点会因发生突变(G $\rightarrow$ T)而消失, 在淮猪、梅山猪、苏太猪群体中表现为多态性[7]。藏猪该基因位点存在 AA、AB 和 BB 3 种基因型, A 等位基因频率为 84.82%, 与报道的野猪和五指山猪群体基因型分布较接近[8], 野猪和五指山猪也属于抗病、抗逆性较强的品种。研究中藏猪等位基因频率与吴圣龙等[8]报道的藏猪等位基因频率较一致, 但其研究中藏猪群体该基因位点只有 AA 和 AB 2 种基因型, 未出现 BB 基因型, 与本研究结果稍有差别。

参考文献:

- [1] KOCHS G, HALLER O. GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of thogoto virus (ortho - myxoviridae) [J]. J Biol Chem, 1999, 274: 4370 - 4376.
- [2] WEBER F, HALLER O, KOCHS G. MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted thogoto virus ribonucleoprotein complexes [J]. Journal of Virology, 2000, 74(1): 560 - 563.
- [3] MULLER M, WINNACKER E L, BREM G. Molecular cloning of porcine Mx cDNAs: new members of a family of interferon-inducible proteins with homology to GTP-binding proteins [J]. J Interferon Res, 1992, 12(2): 119 - 129.
- [4] TUNGTRAKOOLSUB P, NODA T, MOROZUMI T, et al. Polymorphisms in the promoter region of the porcine antiviral Mx1 and Mx2 genes [J]. Anim Genet, 2008, 39(1): 22 - 27.
- [5] MOROZUMI T, SUMANTRI C, NAKAJIMA E, et al. Three types of polymorphisms in exon 14 in porcine Mx1 gene [J]. Biochem Gene, 2001, 39: 251 - 260.
- [6] 杨吉成. MxA 抗病毒蛋白的研究进展 [J]. 苏州医学院学报, 2000, 20(6): 499 - 504.
- [7] 吴圣龙, 包文斌, 鞠慧萍, 等. 猪 Mx1 基因第 14 外显子多态性分析及新突变位点的发现 [J]. 遗传, 2007, 29(6): 693 - 698.
- [8] 吴圣龙, 包文斌, 鞠慧萍, 等. 野猪和 16 个国内外猪种 Mx1 基因第 14 外显子多态性分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(3): 257 - 261.

(015)