

猪 *APOE* 基因外显子 4 的多态性分析

李仕新^{1,2}, 高萍¹, 陈赞谋¹, 张豪¹, 李加琪^{1*}

(1. 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2. 仲恺农业工程学院, 广东 广州 510225)

摘要: 生物的生命受到遗传和环境的影响, 利用模式生物对衰老相关基因的研究已取得显著成果。母猪利用年限作为一个复杂的适应性性状, 与寿命直接相关。母猪的利用年限缩短会导致母猪群的繁殖寿命缩短。本研究根据比较基因组学和生物信息学, 以猪 *APOE* 基因作为影响母猪利用年限的重要候选基因, 研究了大白和大花白两个猪种的 *APOE* 基因外显子 4 的多态性并对不同基因型及基因频率作统计分析。结果表明: 猪 *APOE* 基因外显子 4 的第 227 位碱基发生了 C→T 转换, 这一变异导致相应蛋白质序列中的氨基酸发生了亮氨酸和脯氨酸替换。该位点基因型: 大白猪 CC 型频率为 42%, CT 型频率为 30%, TT 型频率为 28%, 而大白猪 CC 型为 100%。大白母猪与大白母猪的利用年限差异较大, 而猪 *APOE* 基因外显子 4 等位基因频率的差异可能说明了两者之间的利用年限差异的原因。

关键词: 猪; 母猪利用年限; *APOE*; 外显子; 单核苷酸多态性

中图分类号: S828.212 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)04-0647-04

The Single Nucleotide Polymorphism of the Porcine *APOE* Exon 4

LI Shi-xin^{1,2}, GAO Ping¹, CHEN Zan-mou¹, ZHANG Hao¹, LI Jia-qi^{1*}

(1. College of Animal Science, SCAU, Guangzhou 510642, China; 2. College of Life Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: Longevity is dependent on genetics and environmental factors. Many Significant results have been achieved by using model organisms for the study on aging-related genes. Sow longevity, as a complex adaptive trait, is directly associated with lifespan. Reducing sow longevity leads to shortened productive life. Based on comparative genomics and bioinformatics, the porcine *APOE* gene was regarded as the candidate gene of sow longevity and the polymorphism of the gene exon 4 was studied in this study. Also, the genotype and allelic frequencies for Dahuabai and Landrace porcine *APOE* gene exon 4 were calculated. The results were as follows: the 227 bp of base C was replaced by base T in porcine *APOE* gene exon 4, which led to the change of amino acid from leucine to proline. The genotype frequencies of the same polymorphic locus stated above were CC 42%, CT 30% and TT 28% in Dahuabai, while CC totally 100% in Landrace. As there is difference in productive life between Landrace and Dahuabai sows, the different allelic frequencies in porcine *APOE* gene exon 4 between the two breeders suggest that it may be the cause of the difference in sow longevity.

Key words: sow longevity; apolipoprotein E (*APOE*); single nucleotide polymorphism (SNP)

有研究表明母猪较长的利用年限(从第一胎至淘汰)和较低的淘汰率能带来良好的经济效益^[1-2]。因此母猪的利用年限是值得关注的性状。但种猪选育由于长期通过提高母猪年产瘦肉量、降低料肉

收稿日期: 2010-05-04 修回日期: 2010-06-22

基金项目: 国家“863”计划(2007AA10Z161, 2008AA10Z136)和国家自然科学基金项目(30771545)

作者简介: 李仕新(1966-), 男, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: lishixin6618@163.com; * 通讯作者: 李加琪 教授, E-mail: jqli@scau.edu.cn。

比来提高经济效益,一定程度上导致了母猪群的利用年限缩短。母猪的利用年限,与其他大多数重要经济性状一样,既受到遗传因素的影响,同时也受到环境因素的影响。目前模式生物如酵母、线虫、果蝇和小鼠的寿命相关基因已进行了深入的研究。这些研究已经初步阐明寿命受某些特定基因的调控。

载脂蛋白 E 基因与人类寿命密切相关^[3]。人载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apoE) 是一种胆固醇转运蛋白,由肝、脾、肾等合成后进入血液循环广泛分布于全身。apoE 是一种多功能分子,是血浆脂蛋白的主要组分,通过低密度脂蛋白(Low density lipoprotein, LDL)受体途径负责对脂蛋白残粒的摄取。它还是中枢神经系统的主要组分,对脑组织淀粉样蛋白的沉积与清除、微管蛋白稳定性的维持、细胞信号传导、免疫调节、葡萄糖代谢、氧化应激等都有潜在的作用,其他功能还包括免疫调节和细胞生长和分化的调节^[4]。与其它载脂蛋白相比,apoE 在许多外周组织中都有表达,具有十分广泛的生物学活性。在体内脂质代谢及其它生化过程发挥重要的作用。

人 APOE 基因位于 19 号染色体^[5],处于 APOC-I 基因上游 5.5 kb 处,与 APOC-I/APOC-II 基因构成紧密连锁的载脂蛋白基因家族。APOE 基因全长 3.7 kb,与其它载脂蛋白基因具有相似的结构:由 4 个外显子(44, 66, 193, 860 bp)和 3 个内含子(760, 1 092, 582 bp)组成。APOE 基因的 TATA 盒元件位于转录起始点上游 33 bp 处。其编码的前体蛋白包括:18 个氨基酸的信号肽和 299 个氨基酸的成熟 APOE 蛋白^[6]。

APOE 基因敲除的小鼠或缺失 APOE 基因的人将出现严重的高胆固醇血症和动脉粥样硬化^[7]。APOE 的缺失可促进动脉粥样硬化的发生,给 APOE 基因敲除小鼠反复注射 APOE 重组蛋白、在肝组织中用腺病毒载体表达 APOE 蛋白、移植带有 APOE 基因的小鼠骨髓,都能使 APOE 基因敲除小鼠的动脉粥样硬化得到康复,这表明 APOE 基因及其表达产物对动脉粥样硬化的发生具有抑制作用。另外近年来国外许多研究还发现小鼠的认知功能出现障碍^[8]。

猪的 APOE 基因位于 6 号染色体的 q2.1,也由四个外显子(26, 66, 190, 843 bp)和 3 个内含子(804, 744, 374 bp)组成,编码的 APOE 前体蛋白包括 18 个氨基酸的信号肽和 299 个氨基酸的成熟蛋白。APOE 基因的内含子 3 有(GC)₁₃ 的微卫星标记,在此座位上约克夏、汉普夏、长白、杜洛克至少有 4 个等位基因^[9]。

为了寻找遗传因素对母猪利用年限的影响,本研究将猪载脂蛋白 E 基因作为影响母猪利用年限的候选基因。选取利用年限差异较大的两个猪种大白和长白母猪为研究对象,对 APOE 基因的第 4 外显子进行了遗传变异研究,为揭示 APOE 基因对母猪利用年限的影响提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取 50 头广东大白母猪和 50 头长白猪为实验材料,每个个体采耳组织块约 1.0 g 于干净小瓶中,置于 -70 °C 冰箱备用。

1.2 基因组 DNA 的提取

按 TAKARA 公司 Universal Genomic DNA Extraction Kit 说明书方法抽提。

1.3 引物设计及 PCR 反应

参照 GenBank 中公布的 pAPOE 基因序列(SSU70240),用 primer primer5.0 软件设计引物,由上海生物工程公司合成。上游引物:5' - CCCAGGGAGCTGATAGAGG - 3';下游引物:5' - CAGTGCAGG-GAAGGAAAGG - 3',目的片段的长度为 915 bp。PCR 反应体系:10 × PCR Buffer 5.0 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 3.0 μL, 10 mmol/L dNTP 1.0 μL, 上游引物(20 μmol/L)和下游引物(20 μmol/L)各 1.0 μL, Taq DNA 聚合酶(3 U/μL) 0.5 μL, DNA 模板(100 ng/μL) 1.5 μL,加水至 50.0 μL。PCR 反应条件:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 1 min, 61 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;72 °C 延伸 5 min。取 PCR 产物 10 μL 进行琼脂糖凝胶电泳,并在 UVP 计算机凝胶成像系统上观察扩增效果并照相。

取大白、长白猪各 5 个体 APOE 基因外显子 4 的 PCR 产物进行纯化,用分光光度计测定各 PCR 产物的浓度并调至一致,然后各取 5 μL 共 50 μL 的混合样送上海英骏公司测序,以确定多态位点。

PCR 扩增大白、长白母猪各 50 个体的 APOE 基因外显子 4 片段,PCR 产物纯化后送上海英骏公司测序。对两品种猪基因型频率和等位基因频率进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物的电泳结果

以大花白、长白猪样品的基因组 DNA 为模板,用特异引物对 *APOE* 基因 3032 ~ 3946 区域共 915 bp 片段进行扩增。结果显示所有的 100 个样品的扩增都获得了特异性较好的 PCR 产物,电泳图谱见图 1。

2.2 测序结果与分析

以两猪种各 5 个个体的相同浓度 PCR 产物混合样双向测序,测序图出现双峰,证明存在多态位点。与 GenBank 上猪 *APOE* 基因序列进行比较,发现猪 *APOE* 基因外显子 4 第 227 位碱基发生了 C→T 突变,这一变异导致相应蛋白质序列中的氨基酸发生了亮氨酸和脯氨酸替换,之后将两品种各 50 个体纯化的 PCR 产物测序,对基因进行分型。

CC 型: GCTGCGGAGCGCGC

TT 型: GCTGCGTGAGCGCGC

猪 *APOE* 外显子 4 C/T SNP 的 DNA 序列分析见图 2。

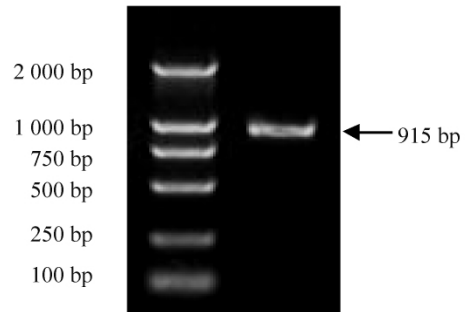
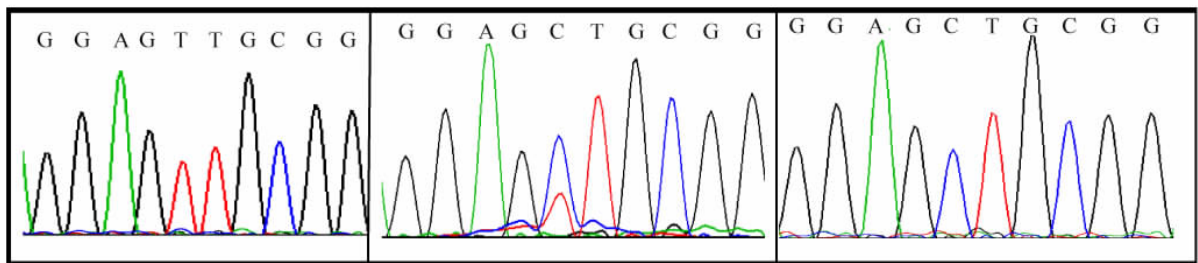


图 1 猪的 *APOE* 基因外显子 4 PCR 产物电泳结果
Fig.1 PCR amplification of the porcine *APOE* exon 4



左为 TT 型,中为 CT 型,右为 CC 型。

(Left) T/T homozygous DNA. (Center) C/C homozygous DNA. (Right) C/T heterozygous.

图 2 猪 *APOE* 外显子 4 C/T SNP 的 DNA 序列分析

Fig.2 DNA sequence analysis of the porcine *APOE* exon 4 C/T SNP

2.3 多态位点的基因型频率和等位基因频率

大花白和长白基因型频率和等位基因频率统计结果见表 1。由表 1 可知,大花白 CC 型频率为 0.42, CT 型频率为 0.30, TT 型为 0.28,而长白猪全为 CC 型。

表 1 大花白及长白猪 *APOE* 基因外显子 4 基因型和等位基因频率

Tab.1 Genotype and Allelic frequencies for Dahuabai and Landrace porcine *APOE* gene exon 4

群体 Population	个体数 individuals	基因型频率(个体数) / % Genotype frequencies(individuals)			等位基因频率 / % Allelic frequencies	
		CC	CT	TT	C	T
大花白 Dahuabai	50	42(21)	30(15)	28(14)	57	43
长白 Landrace	50	100(50)	0(0)	0(0)	100	0

3 讨论

单核苷酸多态性,或简称 SNP,是指发生在 DNA 上某个特定位置上的单个碱基变异,其中最少出现的等位基因频率应该大于或等于 1%^[10]。SNP 在动物基因组中广泛分布,发生在编码区位置的 SNP 称为 cSNP(coding regions SNP),此外在基因的 5'、3'端非编码区,以及内含子上都有发生^[11],均有可能引起基因表达及功能的改变,继而引起整个机体正常生理功能的变化。关于 *APOE* 基因外显子多态性分

析 在人类中 *APOE* 具有 3 个等位基因 *APOE ϵ 2*、*APOE ϵ 3* 及 *APOE ϵ 4* ,分别编码 3 种异构蛋白 ,分别命名为 *APOE2* ,*APOE3* 和 *APOE4*^[12] ,它们主要的区别是其 DNA 水平上的外显子 4 上存在两个位点的碱基替代 ,造成它们所编码的 *APOE* 在第 112 位和第 158 位的氨基酸残基发生了相应的变化。在对长寿人群研究中发现 ,该基因中与早期动脉粥样硬化发病相关的 ϵ 4 等位基因出现的频率显著减少。通过对 405 个家系中 1 873 个研究对象每个基因的一些 SNP 位点进行研究 ,结果证明 *APOE* 还与肥胖的表型相关^[13]。不仅如此 ,该基因也与白内障 ,Alzheimer 病等一系列老年疾病相关^[14]。因此 *APOE* 基因可以作为潜在的治疗 Alzheimer 病的药物靶标^[15]。

本研究结果表明 猪 *APOE* 基因外显子 4 的第 227 位碱基发生了 C→T 突变 ,这一变异导致相应蛋白质序列中的氨基酸发生了亮氨酸和脯氨酸替换。该位点基因型: 大花白 CC 型频率为 42% ,CT 型频率为 30% ,TT 型频率为 28% ,而长白猪 CC 型为 100%。大花白与长白之间的 *APOE* 外显子 4 的基因型频率存在较大的差异。大花白母猪的利用年限比长白母猪长 猪 *APOE* 基因外显子 4 等位基因的频率差异可能说明了两者之间的差异; TT 型个体可能具有相对较长的使用寿命。推测 *APOE* 基因外显子 4 的 277 位点多态性可能是影响母猪利用年限性状的分子标记。

参考文献:

- [1]Te Brake J H A. Culling of sows and the profitability of piglet production[J]. *Neth J Agri Sci* ,1986 ,34(3) : 427 - 435.
- [2]Jalvingh A W ,Dijkhuizen A A ,van Arendonk J A M ,et al. An economic comparison of management strategies on reproduction and replacement in sow herds using a dynamic probabilistic model[J]. *Lives Prod Sci* ,1992 ,32(4) : 331 - 350.
- [3]Schachter F ,Faure - Delanef L ,Guenot F ,et al. Genetic associations with human longevity at the *APOE* and *ACE* loci[J]. *Nat Genet* ,1994 ,6(1) : 29 - 32.
- [4]Mahley R W. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology [J]. *Science* ,1988 ,240(4852) : 622 - 630.
- [5]Olaisen B ,Teisberg P ,Gedde - Dahl T Jr. The locus for apolipoprotein E (apoE) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man [J]. *Hum Genet* ,1982 ,62(3) : 233 - 236.
- [6]Paik Y - K ,Chang D J ,Reardon C A ,et al. Medical Sciences Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene [J]. *Proc Natl Acad Sci* ,1985 ,82(10) : 3445 - 3449.
- [7]杨秀丽 张文高 郑广娟. 幼龄 *APOE* 基因敲除小鼠认知功能障碍的跳台实验 [J]. *中国行为医学科学* 2007 ,16(12) : 1077.
- [8]Jawien J ,Nastalek P ,Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis [J]. *J Physiol Pharmacol* 2004 ,55(3) : 17 - 503.
- [9]Ramsoundar J J ,Rucker E B ,Vasquez J C ,et al. Isolation and genetic characterization of the porcine apolipoprotein E gene [J]. *Anim Genet* ,1998 ,29(1) : 43 - 47.
- [10]Cargill M ,Altshuler D ,Ireland J ,et al. Characterization of single nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes [J]. *Nat Genet* ,1999 ,22(3) : 231 - 238.
- [11]杜玮南 孙红霞 方福德. 单核苷酸多态性的研究进展 [J]. *中国医学科学院学报* 2000(4) : 392 - 394.
- [12]Weisgraber K H ,Rall SC Jr ,Mahley R W. Human APOE protein heterogeneity Cysteinearginine interchanges in the amino acid sequence of the APOE isoforms [J]. *J Biol Chem* ,1981 ,256(17) : 83 - 9077.
- [13]Long J R ,Liu P Y ,Liu Y J ,et al. APOE and TGF - beta - 1 genes are associated with obesity phenotypes [J]. *J Med Genet* 2003 ,40(12) : 918 - 924.
- [14]Olichney J M ,Hansen L A ,Galasko D ,et al. The apolipoprotein E epsilon - 4 allele is associated with increased neuritic plaques and cerebral amyloidangiopathy in Alzheimer's disease and Lewy body variant [J]. *Neurology* ,1996 ,47(1) : 190 - 196.
- [15]Ye S ,Huang Y ,Mullendorff K ,et al. Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid β peptide production in cultured neuronal cells: ApoE structure as a potential therapeutic target [J]. *Proc Natl Acad Sci* 2005 ,102(51) : 18700 - 18705.