

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00175

猪 *AMPD1* 基因的克隆与变异位点分析

刘慧¹, 许尧¹, 赵黎黎¹, 杨秀芹¹, 刘娣^{1,2}

1. 东北农业大学动物科技学院, 哈尔滨 150030;

2. 黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086

摘要: 腺苷一磷酸脱氨酶基因(*AMPD1*)在嘌呤代谢过程中起着重要的作用。*AMPD1* 基因主要在骨骼肌中高水平表达, 与肌肉中肌苷酸代谢有关。还发现 *AMPD1* 与猪的胴体性状有关。对 *AMPD1* 基因 CDS 进行了克隆、测序, 获得 2 195 bp 的 CDS 序列, 并利用 PCR-SSCP 方法对其进行分子扫描, 寻找多态位点, 分析不同基因型在不同猪种间的分布规律。 χ^2 独立性检验表明, 民猪、大白猪、杜洛克间不同基因型的分布存在着极显著的差异($P<0.01$)。

关键词: 猪; *AMPD1* 基因; 胴体性状; PCR-SSCP

Molecular cloning and mutation site analysis of *AMPD1* gene in swine

LIU Hui¹, XU Yao¹, ZHAO Li-Li¹, YANG Xiu-Qin¹, LIU Di^{1,2}

1. College of Animal Science Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China

Abstract: Adenosine monophosphate deaminase gene (*AMPD1*) plays an important role in the purine nucleotide cycle. The *AMPD1* gene is expressed predominantly in skeletal muscles. It related with Inosine monophosphate metabolism in muscles and carcass traits. Herein the *AMPD1* gene was cloned and a CDS sequence of 2 195 bp was obtained and analyzed with PCR-SSCP. χ^2 analysis showed that the distribution of genotypes among Min pig, Yorkshire and Duroc are extremely significant different ($P<0.01$).

Keywords: swine; *AMPD1*; carcass traits; PCR-SSCP

*AMPD*是一个大的多基因家族, 家族成员有 3 种: *AMPD1*, *AMPD2*, *AMPD3*, 这 3 个成员是同功异构酶, 其氨基酸和核苷酸序列有一定的保守性^[1]。*AMPD1* 存在于真核生物中, 主要在骨骼肌中高水平表达^[2,3], 与肌肉中肌苷酸代谢有关^[4], 其作用是催化AMP脱氨生成肌苷酸(IMP)。*AMPD1* 活化时可使AMP水解脱氨生成IMP, 同时提高了腺苷的能量供应。*AMPD1* 活化和腺苷能量转换可保护机体免受应激的损害。

Strail等^[5]对猪的*AMPD1* 基因进行了克隆测序和定位, 得到 1 323 bp的EST序列, 利用限制性酶 *Rsa* 切割, 发现两个等位基因, 根据 EMBL AJ242995 序列, 在内含子 426 位置上发现A-C的转换。通过连锁分析的方法, 发现*AMPD1* 基因与*NGFB* 基因紧密连锁, 将 *AMPD1* 基因定位到猪 4q1.6-q2.3^[6], 在M×P(梅山×皮特兰)群体内的遗传距离关系为: S0073-16.2-EAL-4.6-NGFB-0.0-AMP-

收稿日期: 2007-08-19; 修回日期: 2007-11-28

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目资助(编号: GB05B016)和黑龙江省杰出青年基金(编号: JC-05-19)资助[Supported by Key Program Item for Science and Technology of Heilongjiang Province (No.GB05B016) and Science Foundation for Distinguished Young Scholars of Heilongjiang Province (No.JC-05-19)]

作者简介: 刘慧(1976-), 女, 黑龙江人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物分子遗传学。Tel: 13836139570; E-mail: lh_9570@163.com

通讯作者: 刘娣(1963-), 女, 吉林人, 博士后, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。Tel: 13803644211

DI-11.6-Sw2435, 由于 *AMPDI* 基因定位在这样一个影响胴体性状(如胴体重、肩肉重、头重、眼肌面积等)的QTL中, 所以将 *AMPDI* 基因作为胴体性状的候选基因来研究。研究发现, 在M×P的F₁代群体中 *AMPDI* 表现出多态性, 通过PCR-RFLP的方法, 等位基因 C在梅山猪中出现, 而皮特兰中则出现A, 在F₂代群体中胴体性状也与 *AMPDI* 的等位基因有关。究竟 *AMPDI* 基因在其它群体中是否会出现等位基因的连锁不平衡还有待进一步的考证。

本研究以 *AMPDI* 基因为候选基因, 以民猪、大白猪、杜洛克为研究对象, 利用 PCR-SSCP 进行 SNPs 检测, 探讨不同基因型在 3 个猪种间的分布差异, 为进一步揭示猪 *AMPDI* 基因的遗传变异、寻找能够用到生产实践中的分子标记提供基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

采集民猪、杜洛克、大白猪 3 个猪种的耳组织和肌肉组织, 分别提取基因组 DNA 和 RNA。

表 1 克隆用引物

Table 1 Primers for clone

引物 Primers	扩增长度 Length (bp)	引物序列 Primer sequences (5' 3')	复性温度 Annealing temperature (°C)
C1	868	F: GGTCCATCAGATGCTCAA R: TTCCTTTCTCAGGCTGTT	58
C2	829	F: CCTCTGTTCAAACCTCC R: TGAGCATCTGATGGACC	60.6
C3	605	F: CAGGAGTGGACCATGGA R: CAGGTTTCATAGCGATAG	55.8

表 2 SSCP 用多态性引物及非变性聚丙烯酰胺凝胶浓度

Table 2 Polymorphic primers and Neutral polyacrylamide gel concentration for PCR-SSCP

引物 Primers	扩增位置 Location	扩增长度 Length (bp)	引物序列 Primer sequences (5' 3')	复性温度 Annealing temperature (°C)	凝胶浓度 Concentration (%)
S4	Exon 5	166	F: CGGGATAGAAGCTCTCC R: GCTACAGTGGAAGATTTTG	54.1	19
S5	Exon 6	220	F: ACAGGCCCTTGGGCAAT R: TCTTTACCCCTCCTATGA	52.4	16

2 结果与分析

2.1 克隆

测序共获得 2 195 bp 的 CDS 序列, 通过比对证实所得序列为猪 *AMPDI* 基因的部分 CDS 序列, 发

1.2 实验方法

1.2.1 克隆

根据 GenBank 上发表的猪 *AMPDI* 基因 EST 序列 (No.AJ242995) 及人的 *AMPDI* 基因序列 (No.NM_000036), 共设计 3 对引物克隆纯种猪的编码区, 引物序列及反应条件如表 1。取纯种猪 cDNA 进行 PCR 扩增, 产物回收纯化后, 连接于 PMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 JM109, 随机挑取阳性克隆, 摇菌培养后送英骏生物技术有限公司测序。

1.2.2 PCR-SSCP

根据所克隆的 CDS 序列设计引物, 其中出现多态的引物序列及 PCR-SSCP 反应条件见表 2。取 2 μL PCR 产物与 10 μL 上样缓冲液混匀, 98 °C 变性 10 min 后, 迅速冰浴 10 min。不同的引物用不同浓度的非变性聚丙烯酰胺凝胶, 室温下电泳 12~16 h。电泳结束后, 进行银染显色。对不同基因型的个体选取纯合子片段进行克隆、测序。

到 GenBank, 登录号: EF634313。

2.2 PCR-SSCP

选取纯合基因型片段进行克隆和测序, 共发现 4 个 SNPs(图 1)。测序所得的部分核苷酸序列与所提交序列(EF634313)进行比对(表 3)。

2.3 不同品种基因型的比较分析

对民猪、大白猪、杜洛克进行基因型检测, 计算了不同猪种的基因型频率和基因频率(表 4)。通过 χ^2 独立性检验表明民猪、大白猪、杜洛克 3 个品

种间不同基因型的分布存在着极显著的差异 ($P<0.01$), χ^2 分割检验表明, 民猪与大白猪、杜洛克在两个引物上的基因型分布均存在着极显著的差异 ($P<0.01$)。

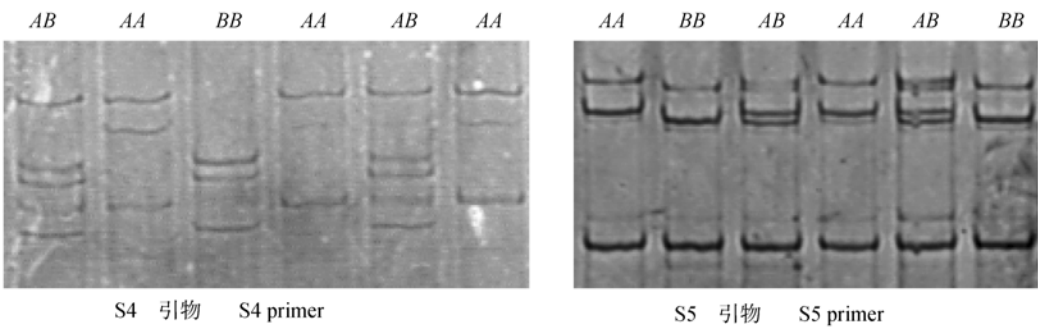


图 1 不同个体 *AMPD1* 基因的 SSCP 分析结果
Fig. 1 PCR-SSCP pattern for *AMPD1* gene of different individuals

表 3 测序结果的比较
Table 3 Comparision of sequencing results

引物 Primers	基因型和部分核苷酸序列 Genotypes and partial nucleotide sequences	变异位置 Mutation sites	氨基酸变化 Amino acids substitution
S4	AA : CAAAAACCGCTTCCAA BB : CAAAAACCGCTTCCAA	CDS : 484	484 : A/P
S5	AA : GAAAACCTG.....TCCCTAC...TACTAGCTT BB : GAAAACCTG.....TCCCTAC...TACTAGCTT	CDS : 608, 699, 744	608 : N/S

表 4 不同品种猪 *AMPD1* 基因的基因型频率和基因频率
Table 4 Allele frequencies and genotype frequencies of *AMPD1* among three swine breeds

引物 Primers	品种 Breeds	数量 Number	AA	AB	BB	A	B	PIC
S4	民猪 Min pig	32	0.219 (7)	0.25 (8)	0.531 (17)	0.344	0.656	0.349
	杜洛克 Duroc	54	0.611 (33)	0.278 (15)	0.111 (6)	0.750	0.250	0.305
	大白 Yorkshire	76	0.855 (65)	0.145 (11)	0	0.928	0.073	0.124
S5	民猪 Min pig	33	0	0.182 (6)	0.818 (27)	0.091	0.909	0.152
	杜洛克 Duroc	87	0.943 (82)	0.057 (5)	0	0.972	0.029	0.053
	大白 Yorkshire	48	0.771 (37)	0.229 (11)	0	0.886	0.115	0.181

3 讨论

本文对猪 *AMPD1* 基因编码区进行了克隆、测序, 并用 PCR-SSCP 技术寻找多态位点, 分析了不同基因型在民猪、杜洛克、大白猪 3 个猪种间的分布规律, 为以后分子遗传标记的进一步研究提供基

础。本研究在编码区共找到 4 个 SNPs, 有 2 个突变是颠换, 另外 2 个核苷酸的替代是转换。这 4 个 SNPs 中有 2 个属于沉默突变, 另 2 个导致了氨基酸的变化。在所检测的 SNPs 中, 3 个品种猪在 S5 引物均属于低度多态位点, 在 S4 引物大白猪属于低度多态位点 ($PIC<0.25$), 而民猪和杜洛克则属于中度多态

($0.25 < PIC < 0.5$)。民猪是我国优良的地方猪种, 其种质遗传特性的认识与遗传改良对于遗传资源保护与利用具有重要意义。不同基因型在这 3 个品种中分布的不平衡, 为进一步揭示猪 *AMPD1* 基因的遗传变异, 保护和利用地方优良猪种提供了基础。

由于缺乏相应个体胴体性状的记录, 本研究所得的这些多态位点是否可以作为猪胴体性状的分子标记, 实现标记辅助选择, 将是我们进一步的研究工作。

参考文献(References):

- [1] Mahnke-Zizelman DK, Sabinal RL. N-terminal sequence and distal histidine residues are responsible for pH-regulated cytoplasmic membrane binding of human AMP deaminase isoform E. *Biol Chem*, 2002, 277(45): 42654–42662. [\[DOI\]](#)
- [2] Manoba T, Hasegawa K. Sensory changes in umami taste of inosine 5'-monophosphate solution after heating. *Journal of Food Science*, 1991, 56(5): 1429–1432. [\[DOI\]](#)
- [3] CHAI Li-Juan. Study on polymorphisms of *AMPD1* gene and its association with IMP content in chickens [Dissertation]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2003.
- 柴丽娟. 鸡 *AMPD1* 基因多态性及其肌苷酸含量的关系的研究[学位论文]. 山西农业大学, 2003.
- [4] ZHANG Xue-Yu, JI Cong-Liang, CHEN Guo-Hong, HUANG Zhao-Ming, SU Yi-Jun, SHEN Xiao-Peng. Cloning and analysis of sequence of adenosine monophosphate deaminase 1 gene in 6 chicken breeds. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2004, 19(2): 224–226.
- 张学余, 季从亮, 陈国宏, 黄兆明, 苏一军, 沈晓鹏. 6 个鸡种腺苷单磷酸脱氨酶基因克隆及序列分析. 云南农业大学学报, 2004, 19(2): 224–226.
- [5] Strail A, Knoll A, Moser G, Kopečný M, Geldermann H. The porcine adenosine monophosphate deaminase 1(*AMPD1*) gene maps to chromosome 4. *Anim Genet*, 2000, 31(2): 147–148. [\[DOI\]](#)
- [6] Lahbib-Mansais Y, Mellink C, Yerle M, Gellin J. A new marker (*NGFB*) on pig chromosome 4, isolated by using a consensus sequence conserved among species. *Cytogenet Cell Genet*, 1994, 67(2): 120–125.

“中国科学院发育系统生物学国际会议”邀请函

“中国科学院发育系统生物学国际会议”定于 2008 年 5 月 18 - 20 日在北京九华山庄举行, 本次会议由中国科学院、国家自然科学基金委主办, 中国科学院遗传与发育生物学研究所和中国科学院生物物理研究所联合承办, 中国卫生部、中国科学院院士、美国科学院外籍院士陈竺博士将担任本次大会组委会主席。

本次大会以介绍国际国内系统生物学研究领域的最新研究方法及最前沿的研究内容为主, 会期 3 天, 包括专题报告和研究方法 2 个板块, 邀请了 35 位国内外系统生物学及其相关领域的著名专家学者做大会专题报告, 其中包括陈竺院士, 贺福初院士、李家洋院士、陈润生院士, 美国科学院院士、加州大学教授 Michael Levine 博士, 芝加哥大学 Wen-Hsiung Li 博士、Chung-I Wu 博士, 新加坡淡马锡生命科学研究员 Pernille Rorth 博士、Steve Cohen 博士, 中国科学院上海生命科学院副院长吴家睿, 中国科学院生物物理研究所所长徐涛等一大批优秀的学者。这次大会是一次分子系统生物学的盛会, 必将吸引众多国内外同领域的专家与学者参加。大会组委会现诚征分子系统生物学及相关研究领域研究性论文及综述, 并在会议开幕之前从中遴选出优秀论文整理成集, 发表在《遗传学报》(*Journal of Genetics and Genomics*) 2008 年第 5 期上。征文截止日期: 2008 年 3 月 31 日。

大会同时诚邀企业界有识之士参与本次会议, 与我们一道, 共同促进中国系统生物学研究的发展!

会议网址: <http://www.genetics.ac.cn/isdsb2008>

招商及参会咨询电话: 86-10-64845797, 86-10-62553286

联系人: 韩敬东、张颖娇、牛超群