

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00755

SIM1 基因第 8 外显子的 SNP 对猪背膘厚的影响

郭晓令, 陈哲, 赵晓枫, 徐宁迎

浙江大学动物科学学院, 杭州 310029

摘要: 采用 PCR-SSCP 方法检测了约克夏、杜洛克、皮特兰、长白猪、嘉兴黑猪和金华猪 6 个品种共 169 头猪的 *SIM1* 基因外显子 8 的 SNP 及其基因型频率。结果共发现 *CC*、*CT*、*TT* 3 种基因型, 其基因型频率在国内外猪品种之间具有较大差异。其中, 国内猪种嘉兴黑猪和金华猪只存在 *TT* 基因型, 而国外猪种约克夏、杜洛克、皮特兰、长白猪则都存在 3 种基因型。用最小二乘法分析 SNP 对长白猪、约克夏猪和杜洛克猪的背膘厚的效应的结果表明, 纯合基因型个体的背膘厚大于杂合基因型个体。*SIM1* 基因型对国外猪种背膘厚有显著效应 ($P < 0.05$), 并且不同部位效应不同。

关键词: *SIM1* 基因; SNP; 背膘厚; 猪

Effect of SNP in the exon 8 of *SIM1* gene on backfat thickness in pigs

GUO Xiao-Ling, CHEN Zhe, ZHAO Xiao-Feng, XU Ning-Ying

College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

Abstract: SNP in exon 8 of the Single-minded 1 (*SIM1*) gene was detected using PCR-SSCP in 169 pigs of 6 pig breeds including Yorkshire, Duroc, Pietrain, Landrace, Jiaxinghei and Jinhua. The results showed three genotypes (*CC*, *CT*, *TT*) were found and their frequencies between domestic and foreign breeds were different. Only one genotype *TT* was found in Jiaxinghei and Jinhua pigs, but three genotypes were detected in each foreign breed. The effects of this SNP on backfat thickness in Landrace, Yorkshire and Duroc were estimated using least square method. The homozygote pigs had thicker backfat than the heterozygote ones. The significant effect of various genotypes was found in foreign breeds ($P < 0.05$). *SIM1* had different effects on backfat thickness of different points.

Keywords: *SIM1*; SNP; backfat thickness; pig

随着生活水平的提高, 猪肉品质引起了人们的更多关注, 从而猪的胴体性状改良也越来越被猪育种工作者所重视。背膘厚度是脂肪性状之一, 是胴体性状的一个重要指标。降低背膘厚度可以提高瘦肉率, 以满足人们的消费需求, 同时可以增加养殖

者的经济效益。通过研究与脂肪性状相关的基因, 利用基因型选择来降低背膘厚度, 是胴体性状改良的有效途径。

SIM1 (Single-minded 1) 基因是 bHLH-PAS (basic helix-loop-helix+period, aryI hydrocarbon receptor,

收稿日期: 2007-10-27; 修回日期: 2008-01-20

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(编号: 2006AA10Z1A2), 浙江省科技厅重大项目(编号: 2005C12005-2)和浙江省自然科学基金项目(编号: Y305244)资助[Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (No.2006AA10Z1A2), Major Program of Zhejiang Provincial Science and Technology Department (No. 2005C12005-2) and Zhejiang Natural Science Foundation (No. Y305244)]

作者简介: 郭晓令(1968-), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: guoxiaoling@gmail.com

通讯作者: 徐宁迎(1956-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: nyxu@zju.edu.cn

Single-minded) 转录因子家族成员之一, 研究表明该家族基因编码产生碱性螺旋-环-螺旋转录因子, 是决定神经细胞分化的功能基因^[1]。人和鼠的研究结果表明, *SIMI* 基因控制下丘脑内几种主要神经细胞形态最终阶段的分化, 从而影响下丘脑内视前核和室旁核的发育和形成, 推测 *SIMI* 基因突变可能导致人与鼠的采食量和体脂的增加^[2,3]。Zhao等(待发表)分离出猪的 *SIMI* 基因片段并将其定位在 1 号染色体上, 同时发现该基因第 8 外显子 780 bp 处 T/C 突变。基于这个 SNP 的发现, 本研究选择约克夏、杜洛克、皮特兰、长白猪、嘉兴黑猪和金华猪 6 个品种共 169 头猪为实验动物, 采用 PCR-SSCP 方法检测该位点在这些猪种中的遗传多样性, 分析该位点对背膘厚的影响, 进一步确定 *SIMI* 基因对脂肪性状的作用, 为猪的脂肪性状的分子遗传改良提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

杜洛克(10 头)、约克夏(34 头)、长白(18 头)的耳样取自浙江省种猪质量监控中心测定猪, 金华猪(20 头)、长白猪(20 头)的耳样取自浙江省种质资源调查群体, 皮特兰(31 头)样品取自浙江大学实验牧场, 嘉兴黑猪(36 头)样品取自嘉兴市嘉兴黑猪种猪场。其中浙江省种猪质量监控中心猪群进行活体 10~11 肋背膘厚、平均背膘厚(肩胛后沿、最后一根肋骨处及腰荐结合处三点平均背膘厚)和终测体重的测定, 平均终测体重为 98 kg; 浙江省种质资源调查群体猪测定四点背膘厚(肩部最厚处、6~7 肋间、最后一根肋骨处、腰荐结合处), 平均屠宰重 96.7 kg。采用苯酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA, TE 溶解, -20℃ 保存。

1.2 实验方法

1.2.1 PCR 引物设计与合成

序列参照 NCBI GenBank 登录号 NC_000076, 采用 Oligo 6 软件设计特异引物(Forward 5'-ATTGATTTGGGCCCGTTTCAG-3'; Reverse 5'-TGAGGACNTAGTTGACGCTG-3')。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 用无离子水溶解后, -20℃ 保存待用。

1.2.2 PCR 扩增体系和扩增程序

PCR 扩增体系: 10×PCR 缓冲液 1.5 μL; MgCl₂ (25 mmol/L) 1.2 μL; dNTP (10 mmol/L each) 0.375 μL; 上下游引物 (100 μmol/L) 各 0.45 μL; 模板 DNA 1 μL;

Taq DNA 酶 (2 U/μL) 0.5 μL; 加灭菌双蒸水至总反应体积 15 μL。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 58℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 最后再 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.3 PCR-SSCP 分析

变性反应体系 12 μL, 其中 5 μL PCR 产物, 7 μL 的 loading buffer (98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯青、10 mmol/L EDTA (pH 8.0) 和 2% 甘油), 98℃ 变性 10 min, 然后立即冰浴 5 min 以上。12% PAGE 胶 (29:1) 电泳 18 h, 电泳结束后银染显带, 利用凝胶成像系统观察并记录。

1.3 统计分析

基因频率和基因型频率的计算方法参见文献^[5]方法。以终测体重为协方差, 利用 SAS 9.0 软件 GLM 过程估计了基因型对脂肪性状的效应。统计模型采用 $Y_i = \mu + g + \alpha_i + g * \alpha_i + e_i$, 其中 Y_i 为性状测定值, μ 为总体平均数, g 为种群效应值, α_i 为基因型效应值, $g * \alpha_i$ 为种群与基因型互作效应值, e_i 为随机误差。

2 结果与分析

2.1 基因型检测

琼脂糖凝胶电泳结果显示, PCR 扩增产物长度约 200 bp。进行 SSCP 分析, 发现 3 种基因型 (图 1), 测序结果显示, 3 种基因型分别为 CC、CT 和 TT 型 (图 2)。

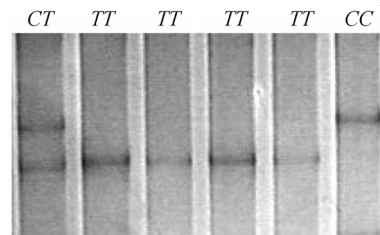


图 1 *SIMI* 的 PCR-SSCP 电泳图谱

Fig. 1 PCR-SSCP pattern of *SIMI* gene

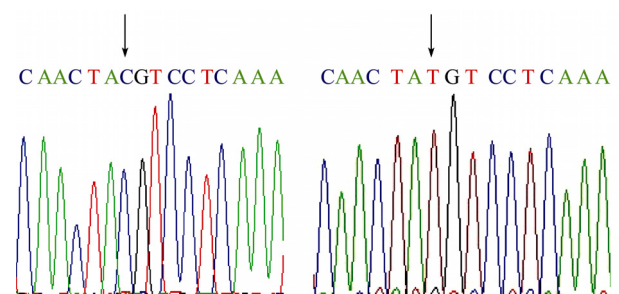


图 2 CC 型和 TT 型突变位点的碱基序列测定

Fig. 2 Sequence detecting of CC and TT genotypes

2.2 基因频率及基因型频率

6 个猪品种在 *SIMI* 外显子 8 的基因频率和基因型频率分布列于表 1。由表 1 可以看出, 国内外猪种在此位点存在很大差异, 国外猪种中, *CT* 基因型平均频率最高, 为 0.58, 国内猪种中只有 *TT* 基因型。在国外猪种中长白猪的 *CC* 基因型频率(0.11)最高, 皮特兰的 *CT* 基因型频率(0.80)最高, 约克夏的 *TT* 基因型频率(0.65)最高, 而在国内猪种嘉兴黑猪和金华猪中只检测到 *TT* 基因型。在国外猪种中等位基因 *C* 的频率(0.50)在皮特兰猪中最高, 等位基因 *T* 的频率(0.80)在约克夏猪中最高。

2.3 *SIMI* 基因对猪背膘厚的影响

2.3.1 *SIMI* 基因对长白猪背膘厚的效应

采用 SAS 统计软件, 对浙江省种质资源调查群长白猪不同基因型对个体胴体性状效应进行了显著性检验和多重比较, 结果发现: *SIMI* 基因型对长白猪腰荐结合处背膘厚的效应显著。*SIMI* 基因 *CC* 型个体比 *CT* 型个体背膘厚增厚显著($P<0.05$),

CC 型个体比 *CT* 型个体的背膘厚增加 48.9%, 但是 *TT* 型个体与 *CC* 型个体以及 *CT* 型个体之间的背膘厚差异不显著。在肩部背膘、6~7 肋骨背膘和最后一根肋骨背膘, 各基因型个体间差异均不显著(表 2)。

2.3.2 *SIMI* 基因对杜洛克、约克夏、长白猪 10~11 肋背膘厚和平均背膘厚的影响

通过 SAS 软件分析了 *SIMI* 不同基因型对浙江省种猪质量监控中心国外种猪 10~11 肋背膘厚和平均背膘厚的效应(表 3)。由表 3 可以看出, 不同 *SIMI* 基因型对 10~11 肋背膘厚效应显著, 对平均背膘厚效应极显著。在 10~11 肋处, *CC* 型个体和 *TT* 型个体的背膘厚均显著地高于 *CT* 型个体的背膘厚($P<0.05$), *CC* 型个体比 *CT* 型个体背膘厚增加 23.1%, *TT* 型个体比 *CT* 型个体背膘厚增加 9.2%。对于平均背膘厚, *CC* 型个体和 *TT* 型个体的背膘厚也均显著地高于 *CT* 型个体的背膘厚($P<0.05$), *CC* 型个体比 *CT* 型个体平均背膘厚增加 24%, *TT* 型个体比 *CT* 型个体背膘厚增加 10.8%。

表 1 6 个猪品种 *SIMI* 基因外显子 8 的 SNP 的基因型和等位基因频率
Table 1 Allele and genotype frequency of *SIMI* exon-8 SNP in six pig breeds

群体 Breed	头数 Number of pigs	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency	
		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>
约克夏 Yorkshire	34	0.06	0.29	0.65	0.20	0.80
长白 Landrace	38	0.11	0.63	0.26	0.42	0.58
皮特兰 Pietrain	31	0.10	0.80	0.10	0.50	0.50
杜洛克 Duroc	10	0.10	0.70	0.20	0.45	0.55
嘉兴黑猪 Jiaxinghei	36	0	0	1.00	0	1.00
金华猪 Jinhua	20	0	0	1.00	0	1.00

表 2 *SIMI* 基因型对长白猪背膘厚的效应
Table 2 The effect of *SIMI* gene on backfat of Landrace

基因型 Genotype	肩部背膘厚 Backfat of shoulder		6~7 肋骨背膘厚 Backfat of 6~7 ribs		最后一根肋骨背膘厚 Backfat of the last rib		腰荐结合处背膘厚 Backfat of gluteus medius	
	平均值 Mean	标准误 SE	平均值 Mean	标准误 SE	平均值 Mean	标准误 SE	平均值 Mean	标准误 SE
<i>CC</i>	3.379	0.474	2.590	0.290	1.770	0.266	1.995 ^a	0.294
<i>CT</i>	2.824	0.316	1.977	0.194	1.480	0.178	1.018 ^b	0.196
<i>TT</i>	3.334	0.358	2.126	0.219	1.681	0.201	1.613 ^{ab}	0.222

注: 肩标 a, b 之间表示平均值差异显著。
Note: Superscripts a and b indicate significant differences between the means.

表 3 *SIMI* 基因型对国外猪种背膘厚的效应Table 3 The effect of *SIMI* gene on backfat of foreign breeds

基因型 Genotypes	10~11 肋背膘厚 Backfat of 10-11 ribs		平均背膘厚 Average backfat	
	平均值 Mean	标准误 SE	平均值 Mean	标准误 SE
CC	1.547 ^a	0.130	1.581 ^a	0.121
CT	1.189	0.040	1.201	0.037
TT	1.309 ^a	0.043	1.346 ^a	0.040

注: a 之间表示平均值差异不显著。

Note: a: Same Superscript a indicates no significant.

3 讨论

3.1 *SIMI* 基因作为脂肪性状的候选基因可行性

到目前为止,许多研究报道了下丘脑室旁核同能量平衡和食欲调节的关系,Choi等^[4]证明室旁核内的选择性损伤会导致大鼠摄食过度 and 肥胖;Kalra等^[5]发现室旁核内显微注射多种促食欲信号蛋白可以增加小鼠食欲,而注射抑制食欲蛋白则会降低小鼠食欲;Cowley等^[6]发现室旁核内的神经元细胞可以寻找并结合具有食欲调节作用的轴突分泌物,例如MSH信号蛋白;并且发现多个调控能量平衡的关键因子都在下丘脑表达^[7,8]。由此可见,下丘脑室旁核在食欲调节和能量平衡中起到关键作用。

Holder等^[9]发现*SIMI* 基因主要表达在野生成年鼠下丘脑的室旁核和视前核,Michaud等^[10]证明*SIMI* 纯合缺失(*SIMI*^{-/-})小鼠室旁核没有发育,出生前死亡,而*SIMI* 杂合缺失(*SIMI*^{+/-})小鼠能够成活,但*SIMI*^{+/-}鼠的室旁核内神经细胞数量只有同窝正常小鼠的 76%,并且表现早发性肥胖、生长迅速,伴有高胰岛素血症。人和鼠*SIMI* 基因第 8 外显子也存在一个T/C突变,但其位置不同(GenBank登录号分别为NC_000006 和NC_000076)。*SIMI* 基因被平衡易位断开的患者临床表现PWS(Prader-Willi syndrome)症状、早发性肥胖、食欲旺盛^[11]。室旁核内的神经细胞表达MC4R(Melanocortin-4 Receptor),MC4R作为α-促黑素激素的靶细胞,在人和鼠的体重、能量稳态和采食量的调控中具有重要作用^[11]。由此可以推断,*SIMI* 基因在人和鼠的能量平衡、脂肪代谢过程中起重要作用。

De Koning等^[12]在*SIMI* 基因所在区域发现了一个影响生长率的QTL,Nezer等^[13]利用基因组扫描

检测皮特兰×大白猪杂交家系,在这一区域发现了一个影响背膘厚和日采食量的QTL,Beeckmann等^[14]报道了在这一区域发现影响头的重量和采食量的QTL。因此可以推测,*SIMI* 是猪胴体性状合适的候选基因。

3.2 *SIMI* 基因对猪脂肪性状的效应

本实验中,长白、约克夏、杜洛克猪群的*SIMI* 基因纯合子个体背膘厚大于杂合子个体背膘厚,CC型个体和TT型个体背膘厚与CT型个体背膘厚差异达到显著。由此可推测该位点纯合子有脂肪沉积效应,而杂合子效应不明显。实验中还发现嘉兴黑猪和金华猪在该位点不存在变异,均表现为TT型,外国猪种CT型个体较多,皮特兰CT型个体达到80%,且不同品种等位基因C的分布频率也不同,这可能是皮特兰猪具有高瘦肉率的一个原因。

本研究中,国内猪种只检测到TT基因型,因而无法分析在国内猪种不同基因型是否也存在类似国外猪种的情况。此外,国内猪种的背膘厚都高于国外猪种的背膘厚,可能在讨论*SIMI* 基因特定基因型对背膘厚的影响时,要考虑遗传背景的影响。我们知道国内地方猪种具有生长速度慢、肉质优良而脂肪含量高的特点,而国外猪种具有生长速度快,脂肪含量较低,背膘较薄的特点,这与等位基因C在国内猪种和国外猪种上的分布差异相一致,而人和鼠的相关研究表明*SIMI* 影响脂肪合成和代谢,由此可以推测,*SIMI* 在该位点的突变可能影响猪的脂肪沉积。Zhao等(待发表)以F₂资源家系为材料,分析了该位点多态性同脂肪性状的相关性,结果发现等位基因C与脂肪沉积、膘厚以及肌内脂肪含量相关。这一结果与本实验结果相一致,由此可见,*SIMI* 基因对脂肪性状存在着潜在影响。

参考文献(References):

- [1] Holder JL, Butte NF, Zinn AR. Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the *SIM1* gene. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(1): 101–108. [\[DOI\]](#)
- [2] Michaud JL, Rosenquist T, May NR, Fan CM. Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor *SIM1*. *Genes Dev*, 1998, 12(20): 3264–3275. [\[DOI\]](#)
- [3] Varela MC, Simões-Sato AY, Kim CA, Bertola DR, De Castro CI, Koiffmann CP. A new case of interstitial 6q16.2 deletion in a patient with Prader-Willi-like phenotype and investigation of *SIM1* gene deletion in 87 patients with syndromic obesity. *Eur J Med Genet*, 2006, 49(4): 298–305. [\[DOI\]](#)
- [4] Choi S, Dallman MF. Hypothalamic obesity: multiple routes mediated by loss of function in medial cell groups. *Endocrinology*, 1999, 140(9): 4081–4088. [\[DOI\]](#)
- [5] Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev*, 1999, 20(1): 68–100. [\[DOI\]](#)
- [6] Cowley MA, Pronchuk N, Fan W, Dinulescu DM, Colmers WF, Cone RD. Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron*, 1999, 24(1): 155–163. [\[DOI\]](#)
- [7] Wright DE, Seroogy KB, Lundgren KH, Davis BM, Jenness L. Comparative localization of serotonin1A, 1C and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. *J Comp Neurol*, 1995, 351(3): 357–373. [\[DOI\]](#)
- [8] Sahly I, Gogat K, Kobetz A, Marchant D, Menasche M, Castel M, Revah F, Dufier J, Guerre-Millo M, Abitbol MM. Prominent neuronal-specific *tub* gene expression in cellular target of tubby mice mutation. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(9): 1437–1447. [\[DOI\]](#)
- [9] Holder JL, Zhang L, Kublaoui BM, DiLeone RJ, Oz OK, Bair CH, Lee YH, Zinn AR. *SIM1* gene dosage modulates the homeostatic feeding response to increased dietary fat in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 287(1): 105–113. [\[DOI\]](#)
- [10] Michaud JL, Boucher F, Melnyk A, Gauthier F, Goshu E, Lévy E, Mitchell GA, Himms-Hagen J, Fan CM. *SIM1* haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(14): 1465–1473. [\[DOI\]](#)
- [11] LIU Gui-Lan, JIANG Si-Wen, XIONG Yuan-Zhu, ZHENG Rong, QU Yan-Chun. Molecular screening of *MC4R* gene and association with fat trait in pig resource family. *Acta Genet Sin*, 2002, 29(6): 497–501.
刘桂兰, 蒋思文, 熊远著, 郑嵘, 屈彦纯. 猪资源家系 *MC4R* 基因扫描及其与脂肪性状的相关分析. *遗传学报*, 2002, 29(6): 497–501.
- [12] De Koning DJ, Rattink AP, Harlizius B, Groenen MAM, Brascamp EW, Arendonk JAM. Detection and characterization of quantitative trait loci for growth and reproduction traits in pigs. *Livestock Prod Sci*, 2001, 72(3): 185–198. [\[DOI\]](#)
- [13] Nezer C, Moreau L, Wagenaar D, Georges M. Results of a whole genome scan targeting QTL for growth and carcass traits in a Pietrain × Large White intercross. *Genet Sel Evol*, 2002, 34(3): 371–387. [\[DOI\]](#)
- [14] Beeckmann P, Schröffle J, Moser JG, Bartenschlager H, Reiner G, Geldermann H. Linkage and QTL mapping for *Sus scrofa* chromosome 1. *J Ani Breed Genet*, 2003, 120(1): 1–10. [\[DOI\]](#)