

朱淑斌, 周春宝, 韩大勇, 等. 姜曲海猪 *FoxO1* 基因遗传多态性及与肉质性状的相关分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1065-1069.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.05.019

姜曲海猪 *FoxO1* 基因遗传多态性及与肉质性状的相关分析

朱淑斌¹, 周春宝¹, 韩大勇¹, 倪黎纲^{1,2}, 陶 勇¹, 赵旭庭¹, 王平安¹

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300; 2. 姜曲海猪保种场, 江苏 泰州 225300)

摘要: 为探究姜曲海猪 *FoxO* 转录因子家族中 *FoxO1* 基因的多态性及其与肉质性状的相关性, 采用内切酶 *Bpil* PCR-RFLP 分子标记技术, 分析了 112 头姜曲海猪 *FoxO1* 基因外显子 1 的遗传变异情况。结果表明, 姜曲海猪试验猪群 *Bpil* 酶切位点存在多态性, 酶切得到 EE、Ee、ee 3 种基因型, *E* 基因频率为 0.834 8, 表现为低度多态 ($PIC=0.237\ 8$); 试验猪群的基因频率和基因型频率都处于哈迪温伯格平衡状态 ($P>0.05$)。分析不同基因型对肉质性状的影响, 发现 *FoxO1* 基因第 1 外显子 *Bpil* 酶切位点多态性与猪肌肉脂肪含量、大理石纹和剪切力性状关联显著。可见, 姜曲海猪 *FoxO1* 基因的多态性对其肉质性状有重要的影响。

关键词: 姜曲海猪; *FoxO1* 基因; PCR-RFLP; 肉质性状

中图分类号: S828.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)05-1065-05

Genetic polymorphism of *FoxO1* gene and correlation with meat quality of Jiangquhai swine

ZHU Shu-bin¹, ZHOU Chun-bao¹, HAN Da-yong¹, NI Li-gang^{1,2}, TAO Yong¹, ZHAO Xu-ting¹, WANG Ping-an¹

(1. Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary College, Taizhou 225300, China; 2. Jiangquhai Pig Breed Conservation Farm, Taizhou 225300, China)

Abstract: To identify the polymorphism of transcription factor family member *FoxO1* gene and its correlation with meat quality of swine, PCR-RFLP (*Bpil* restriction enzyme) was employed to study the genetic variation of *FoxO1* gene exon 1 in 112 Jiangquhai swine. Three polymorphic loci were detected in *FoxO1* exon 1 with three genotypes (EE/Ee/ee). The frequency of allele *E* was 0.834 8, showing low polymorphism ($PIC=0.237\ 8$). The gene frequencies and genotype frequencies of swine followed Hardy-Weinberg law ($P>0.05$). The polymorphism in *FoxO1* in exon 1 showed significant correlations with intramuscular fat (IMF) content, marbling and shear stress. It was obvious that the polymorphism of *FoxO1* gene might contribute to meat quality.

Key words: Jiangquhai swine; *FoxO1* gene; PCR-RFLP; meat quality

收稿日期: 2015-05-21

基金项目: 发改委生物育种能力与产业化专项[(2014)2573]; 江苏农牧科技职业学院重点课题(NSFZD1301); 大学生创新创业训练计划项目

作者简介: 朱淑斌(1977-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 博士, 副教授, 研究方向为动物遗传育种。(E-mail) zhushubin2003@163.com

随着生活水平的不断提高, 人们对畜产品品质的要求也不断提高。猪肉作为人膳食中的重要组成部分, 其质量更是人们一直关注的重点, 高蛋白、低脂肪、低胆固醇、鲜嫩多汁的鲜猪肉在市场最受消费

者欢迎。

FoxO 转录因子是 Fox 家族的亚家族成员,在哺乳动物中主要有 FoxO1、FoxO3、FoxO4 和 FoxO6,每种蛋白质均高度保守^[1]。FoxO 转录因子具有广泛的生物学效应,对机体的多个组织,如肌肉组织、脂肪组织和肝脏等都起着重要调控作用^[2-3]。猪的 *FoxO1* 基因定位于 11 号染色体,含有 2 个外显子和 1 个内含子。王玲研究发现牛 *FoxO1* 基因单倍型组合与肌内脂肪含量、剪切力、肌纤维直径和肌纤维密度存在不同程度的相关性^[4]。

本研究利用 PCR-RFLP 方法对地方猪种姜曲海猪的 *FoxO1* 基因多态型以及 *FoxO1* 基因对猪肉品质性状的遗传效应进行分析,旨在寻找与姜曲海猪肉品质性状相关的遗传标记,为提高肉质的研究工作探寻更为简便有效的方法,并进一步为姜曲海猪地方猪种种质资源特性及标记辅助选择(MAS)研究提供分子生物学参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

取 112 头姜曲海猪耳样组织(均来自姜曲海猪保种场),用耳号钳剪一小块耳组织(约 0.5 g),放入盛有 1 ml 70% 乙醇的 1.5 ml Eppendorf 管中,样品于 -20 ℃ 保存。选取含有不同组合基因型的试验猪进行屠宰,于右半胴体背最长肌中段最后肋与第一、二腰椎间中心部位取样,测定肉质性状。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 参照文献[5]按常规方法提取基因组 DNA,将干燥后的 DNA 溶于 100 μl TE 中,并用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 的质量。

1.2.2 PCR 扩增 参照 GenBank 中 *FoxO1* 基因(NM_214014.2)序列,设计引物 P1(5'-TGTCAT-TATGGGAGGAGAGT-3')、P2(5'-GAGATAAG-CAATCCTGAGAAC-3'),PCR 产物大小为 337 bp。引物由上海生工公司合成。PCR 扩增体系(50.0 μl):5×Goldstar PCR buffer 10.0 μl,Goldstar Taq polymerase 2.5 μl,dNTP(2.5 mmol/L) 5.0 μl,上、下引物各 2.5 μl,模板 DNA 5.0 μl,灭菌蒸馏水 22.5 μl。PCR 扩增条件:预变性 95 ℃ 10 min;变性 95 ℃ 30 s,退火 59 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 30 s,共 35 个循环;

最后 72 ℃ 延伸 7 min;4 ℃ 保存。

1.2.3 PCR 扩增产物的酶切 用 *Bpil* 酶切 337 bp 扩增产物,酶切体系 20.0 μl,其中,PCR 扩增产物 5.0 μl,10×Buffer 2.0 μl,限制性内切酶 0.5 μl,灭菌蒸馏水 12.5 μl。37 ℃ 反应 1 h 45 min,95 ℃ 10 min,酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.4 肉质性状的测定 肉色、大理石纹、pH 值、系水力和剪切力测定方法参照文献[6],肌内脂肪含量测定参照文献[7],采用索氏抽提法提取肌内脂肪。

1.3 统计分析

1.3.1 基因频率和基因型频率的计算 计算公式为: $P_i = [2(\ddot{ii}) + (\ddot{j}_1) + (\ddot{j}_2) + \cdots + (\ddot{j}_{n-1}) + (\ddot{j}_n)] / 2n$,式中, P_i 为第 i 个等位基因的频率, i 为纯合的复等位基因, \ddot{ii} 为第 i 个等位基因纯合的个体数, j_n 为与 i 共显性的第 n 个等位基因, \ddot{j}_n 为含有 i 与 j_n 共显性等位基因的个体数, n 为一个群体内个体的总数, j_1, j_2, \cdots, j_n 为与 i 共显性的第 1 到第 n 个等位基因。由于 PCR-RFLP 方法的检测结果为共显性等位基因,因此表型频率即为基因型频率。基因型频率 = 基因型个体数/测定群体总数。

1.3.2 基因频率和基因型频率的差异显著性检验 (χ^2 独立性检验) 首先根据基因频率计算各种基因型频率的理论值,然后计算 χ^2 。由于本研究资料的自由度 $df=1$,某些基因型理论值小于 5,因此采用矫正公式: $\chi^2 = \sum_i^n [(|A_i - T_i| - 0.5)^2 / T_i]$,式中, T_i 为理论值, A_i 为实际观察值, n 为等位基因数。

1.3.3 *FoxO1* 转录因子的纯合度、杂合度、有效等位基因数的计算 纯合度计算公式为: $H_0 = \sum_{i=1}^n p_i^2$,式中, H_0 为某一位点的纯合度, P_i 为第 i 个等位基因的频率, n 为某一位点的等位基因数。杂合度计算公式为: $H_e = 1 - H_0 = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$,式中, H_e 为某一位点的杂合度, P_i 为某一位点上第 i 个等位基因频率, n 为某一位点的等位基因数。有效等位基因数计算公式为: $N_e = 1 / H_0$ 。

1.3.4 *FoxO1* 转录因子多态信息含量的计算 多态信息含量(PIC)是由 Bostein 等提出的用于度量群体多态程度的指标,一个标记在群体中的 PIC 值是根据其等位基因的频率来计算的。其公式为: $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i p_j^2$,式中, n 为等位基因数目, P_i 和 P_j

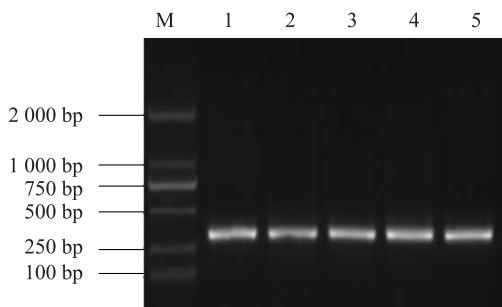
分别为第 i 和第 j 个等位基因在群体中的频率。 PIC 值用于对标记基因多态性的估计, $PIC > 0.50$ 为高度多态, $PIC < 0.25$ 为低度多态, $0.25 \leq PIC \leq 0.50$ 为中度多态。

1.3.5 *FoxO1* 转录因子对肌内脂肪 (IMF) 含量的效应分析模型 采用固定模型: $Y_{ijklm} = \mu + A_i + B_j + C_k + D_l + R_m + e_{ijklm}$ 。式中, Y_{ijklm} 为 IMF 含量测量值, μ 为群体均值, A_i 为场效应, B_j 为品种效应, C_k 为年龄效应, D_l 为性别效应, R_m 为基因型效应, e_{ijklm} 为随机残差效应^[8]。由于选择的试验群体来自同一猪场的同一品种,屠宰年龄接近,所以去掉场效应、年龄效应和品种效应,以上固定模型简化为 $Y = \mu + D_l + R_m + e_{lm}$ 。采用 SPSS13.0 软件包的 GLM (General linear model) 过程分析不同 *FoxO1* 转录因子不同基因型对肉质性状的影响。

2 结果

2.1 姜曲海猪 *FoxO1* 基因 PCR 扩增产物的电泳结果

PCR 扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,结果 (图 1) 显示,扩增片段 (337 bp) 与目的片段大小一致,且特异性较好,可直接进行 PCR-RFLP。



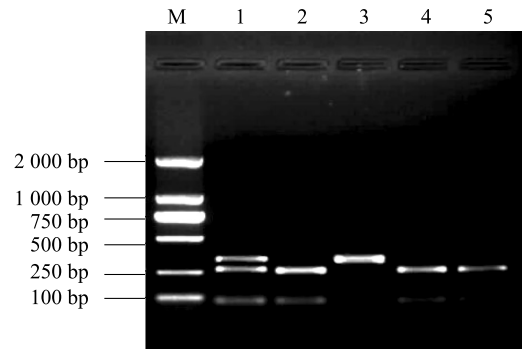
M: DL 2000; 1~5: 个体 PCR 扩增产物。

图 1 *FoxO1* 基因 337 bp 的 PCR 产物

Fig. 1 PCR product of *FoxO1* gene

2.2 *FoxO1* 基因的 RFLP 结果

酶切产物中出现 3 种带型,酶切产物的琼脂糖凝胶电泳图谱见图 2。将此酶切位点不存在时产生的酶切片段类型定义为等位基因 E (337 bp),存在时产生的酶切片段类型定义为等位基因 e (245 + 92 bp)。



M: DL 2000 marker; 1: Ee 基因型; 2、4、5: ee 基因型; 3: EE 基因型。

图 2 *Bpil* 酶切 337 bp PCR 产物的琼脂凝胶电泳图谱

Fig. 2 Agarose gel image of PCR product of *FoxO1* digested with *Bpil*

2.3 试验猪群的 Hardy-Weinberg 平衡状态检验

χ^2 适合性检验结果显示 χ^2 值为 4.07, 小于 5.99, 表明该群体基因频率和基因型频率都处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P > 0.05$), 主要原因可能是由于该群体在适应性方面具有遗传优势, 为长期自然和人工选择所致。

2.4 *FoxO1* 基因 *Bpil* 位点的基因型、基因频率及遗传多态性分析

利用 PCR-*Bpil*-RFLP 检测了姜曲海猪猪群的基因频率并分析了其遗传多态性。结果显示:*FoxO1* 基因各基因型在姜曲海猪群中都有分布, 在 112 头姜曲海猪中有 81 头为 EE 型, 25 头为 Ee 型, 6 头为 ee 型; 基因 (E) 频率为 0.834 8; *Bpil* 位点杂合度 (H_e) 为 0.275 8, 有效等位基因数 (N_e) 为 1.380 8; 姜曲海猪多态信息含量 (PIC) 为 0.237 8, 属低度多态 ($PIC < 0.25$)。

2.5 姜曲海猪 *FoxO1* 基因不同酶切基因型对肉质性状的影响

利用 SPSS 软件对不同基因型姜曲海猪肉质性状数据进行统计分析, 结果 (表 1) 表明 *FoxO1* 基因 *Bpil* 位点 3 种基因型对姜曲海猪的大理石纹、剪切力和肌内脂肪含量均有不同程度影响。EE 型和 Ee 型姜曲海猪大理石纹和肌内脂肪含量均显著高于 ee 型 ($P < 0.05$), EE 型和 Ee 型之间差异均不显著 ($P > 0.05$); EE 型剪切力显著低于 Ee 型和 ee 型 ($P < 0.05$); 肉色、pH 值和失水率基因型间无显著差异。

表 1 姜曲海猪 *FoxO1* 基因 PCR-Bpil-RFLP 的 3 种基因型肉质性状比较Table 1 Comparison of meat quality among three genotypes of *FoxO1* gene in Jiangquhai swine

基因型	肉色分值	pH 值	大理石纹分值	失水率 (%)	剪切力 (N)	肌肉脂肪含量 (%)
EE (<i>n</i> = 39)	3.49±0.53	6.13±0.35	3.85±0.35a	17.78±3.25	19.43±5.17b	4.94±0.88a
Ee (<i>n</i> = 14)	3.54±0.61	6.01±0.42	3.63±0.42a	19.14±3.94	22.71±5.33a	4.82±0.93a
ee (<i>n</i> = 3)	3.43±0.77	6.14±0.63	2.10±0.61b	19.72±5.30	23.59±6.03a	4.58±1.08b

同列不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

猪种基因遗传多态性丰富程度与该品种的遗传基础有着紧密的联系,品种的遗传基础越广泛,其 DNA 多态性就越丰富。本研究中,首次检测了地方品种姜曲海猪 *FoxO1* 基因的多态性。从 NCBI 中可以知道猪的 *FoxO1* 基因定位于 11 号染色体,含有 2 个外显子和 1 个内含子,内含子片段很长,目前 *FoxO1* 基因多态性研究多集中在人和小鼠方面。Lunetta 等采用全基因组关联分析发现在弗明汉人群中 *FoxO1* 基因有 2 个 SNP (单核苷酸多态) [5]。唐媛等研究了中国北方汉族人群 *FoxO1* 基因的多态性 [6]。在家畜方面 *FoxO1* 基因多态性的研究很少,王玲等通过测序技术检测到 *FoxO1* 在肉牛群体中分别存在 8 个多态性位点 [4]。

本试验利用 PCR-RFLP 检测了姜曲海猪 *FoxO1* 基因多态性,先将肉质差异较大的样品进行克隆测序,初步筛选 SNP 位点,根据位点的实际情况,再选用适宜方法检测 SNP。结果表明 *FoxO1* 基因第 1 外显子 1 404 bp 存在 SNP,姜曲海猪 *FoxO1* 基因出现了全面的多态性,基因的各种基因型频率和基因频率的 χ^2 检验结果显示, χ^2 值均小于 5.99,表明该群体基因频率和基因型频率都处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P > 0.05$)。姜曲海猪 *FoxO1* 基因多态信息含量为 0.237 8,属低度多态。一般认为,多态性越高的群体,其遗传多样性越丰富。由此可知,姜曲海猪的 *FoxO1* 基因遗传多样性低,这可能与群体本身的遗传结构和近年保种有关。群体的遗传结构受群体大小、交配系统、祖先群体的多态性以及迁移、突变和选择等许多因素的影响。

目前, *FoxO* 基因多态性与性状的关联分析报道主要集中在人类医学研究方面。唐媛等研究了中国北方汉族人群 *FoxO1* 基因的多态性与 2 型糖尿病易感性的关联性 [6]。Lunetta 等报道在弗明汉人群

中 *FoxO1* 基因的 2 个 SNP 与死亡年龄显著相关 [5]。黄宁等报道 *FoxO1* 基因与肿瘤、糖尿病及代谢疾病密切相关 [7]。由此可见, *FoxO* 转录因子功能极其广泛,主要是由于 *FoxO* 转录因子能够调节 PI3K/AKT 或 PI3K/PKB 信号通路中的下游基因,而这些基因与细胞生理过程相关,如细胞凋亡、DNA 损伤/修复、应激等,此外 *FoxO* 转录因子在脂肪分化、肌肉生成等过程中也发挥着关键作用。张辉等以 C₂C₁₂ 成肌细胞为模型,研究发现过表达 *FoxO1* 能诱导 I 型肌纤维向 II 型肌纤维转化,并显著降低钙调磷酸酶活力 [8]。由此我们推断猪 *FoxO* 基因可能也影响猪的多方面机能。

本试验研究了猪 *FoxO1* 基因遗传多态性与肉质性状的相关性,发现姜曲海猪 *FoxO1* 基因不同基因型间大理石纹、剪切力和肌肉脂肪含量均有不同程度差异。*FoxO1* 基因 PCR-Bpil-RFLP 的 3 种基因型中,EE 型和 Ee 型的大理石纹和肌肉脂肪含量显著高于 ee 型,这可能与 *FoxO1* 基因间接参与脂肪代谢有关。张野等采用实时荧光定量 PCR 技术,对不同月龄民猪和长白猪肾周脂肪中 *FoxO1*、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR γ) 和 CAAT 区/增强子结合蛋白 α (C/EBP α) 基因 mRNA 表达量进行检测,结果表明 *FoxO1* 基因可能通过抑制 PPAR γ 和 C/EBP α 这 2 个基因的表达来减少脂肪沉积 [9]。史新娥等报道 *FoxO1* 转录因子去磷酸化可以抑制猪前体脂肪细胞分化 [10]。

鉴于猪 *FoxO1* 基因遗传多态性与肉质性状存在相关性,可以推断,在骨骼肌生长发育中, *FoxO* 扮演了重要角色。其主要原因是由于 *FoxO* 转录因子广泛参与生理代谢 [11]。祁样正报道 *FoxO* 基因表达量会随着肌肉生长分化有所增长,而 *FoxO1* 在肌肉分化过程中,表达量一直保持较高,而且变化不明显,这可能与重要的功能有关 [12]。杨燕军等报道 *FoxO1* 与 I 型和 II b 型肌纤维基因的表达密切相

关^[13]。

在本研究中,由于试验条件的限制,样本数目有限,这在一定程度上影响了遗传效应分析的准确性。在今后的研究中应扩大样本含量,在更多的群体中进行分析,以深入研究 *FoxO* 家族基因对肌肉和脂肪性状所起的作用,找到有效的分子标记应用于标记辅助选择育种。

参考文献:

- [1] BRUNET A, TRAN H, GREENBERG M E. FoxO transcription factors: key targets of the PI3K-Akt pathway that regulate cell proliferation, survival, and organismal aging[J]. Regulation of Organelle and Cell Compartment Signaling: Cell Signaling Collection, 2011, 6:43-56.
- [2] SEILER F, HELLBERG J, LEPPER P M, et al. FoxO transcription factors regulate innate immune functions in respiratory epithelial cells[J]. Pneumologie, 2012, 66(11): 1-11.
- [3] GUO Y, LI J, SHANG J, et al. Development of muscle-related genes and their effects on meat quality [J]. Energy Procedia, 2012, 16: 229-233.
- [4] 王 玲. 普通牛 *FoxO1*、*FoxO3*、*FoxO4* 基因的克隆、表达及其对肉质性状的遗传效应分析[D]. 成都:四川农业大学,2010.
- [5] LUNETTA K L, DAGOSTINO R B, KARASIK D, et al. Genetic correlates of longevity and selected age-related phenotypes: a genome-wide association study in the Framingham study[J]. BMC Med Genet Suppl, 2007, 1:13-15.
- [6] 唐 媛,程 熠,乔乙春,等. *FoxO1* 基因多态性与2型糖尿病易感性的关联性分析[J]. 吉林大学学报,2013,39(1):87-91.
- [7] 黄 宁,李文佳,安利国,等. FoxO1 的功能及其与人类疾病的关系[J]. 生命科学,2012(4):334-339.
- [8] 张 辉,史新娥,袁 媛,等. FoxO1 抑制猪骨骼肌 MyHCL 的表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2010,26(3):283-289.
- [9] 张 野,崔世泉,狄生伟,等. 叉头框转录因子 O 亚族 1 基因对猪肾周脂肪沉积代谢的影响[J]. 中国畜牧兽医,2013,40(2):117-120.
- [10] 史新娥,宋子仪,杨 浩,等. 叉头框转录因子 O 亚族 1 (FoxO1) 去磷酸化抑制猪前体脂肪细胞分化[J]. 农业生物技术学报,2011,19(5):837-842.
- [11] WANG Y X, WANG T. Regulatory roles of FoxO transcription factors in metabolism[J]. J Anim Sci Biotech, 2011, 2:179-184.
- [12] 祁样正. FOXOs 转录调控因子家族对肌肉细胞末期分化的影响[D]. 台湾:国立中央大学,2006.
- [13] 杨燕军,庞卫军,白 亮,等. 八眉猪、长白猪和长×八杂交猪肌肉组织中 *FoxO1* 基因的表达[J]. 遗传,2008,30(2):185-189.

(责任编辑:张震林)