

荣昌猪 TYR 基因的克隆测序及多态性检测^{*}

白小青^{1,2}, 郁 枫¹, 王金勇², 程 丰¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 重庆市养猪科学研究院, 重庆 荣昌 402460)

[摘 要] 根据人、猪、牛的酪氨酸酶(Tyrosinase, TYR)基因部分序列(GenBank: AF237808, AF237809, AF181962, AY046527), 利用Oligo 6.0软件设计5对引物, 对荣昌猪的TYR基因进行了PCR扩增, 并用单链构象多态分析(SSCP)方法进行了多态性检测。结果发现, 外显子1呈多态, 其余3个外显子均呈单态。克隆测序首次得到猪的酪氨酸酶基因外显子2, 3, 4的部分序列(序列已被GenBank收录, 登录号分别为AY236997, AY279998, AY242973), 而且发现外显子1的多态是由于起始密码子上游第46位的G突变成A造成的。

[关键词] 酪氨酸酶基因; 序列分析; 多态性; 猪

[中图分类号] S828.2; Q754

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)08-0081-04

猪的各种毛色表型是由黑色素在毛皮质和髓质中沉积的种类和数量的不同造成的。黑色素有两种: 真黑色素和褐黑色素^[1]。两种黑色素的形成均与酪氨酸氧化有关, 而酪氨酸酶是酪氨酸氧化过程中的关键酶^[2]。酪氨酸酶由白化位点的酪氨酸酶基因编码, 后者发生功能性突变, 可导致白化, 这已在人^[3]、牛^[4]、猕猴^[5,6]等动物上得到证明。而且, 已发现有西欧白狼、白化猫、白虎、白化指猴、白化绿猴等其他白化动物^[7]。由此可见, 酪氨酸酶可能对猪白毛色的形成有重要影响。Giuffra等^[8]用PCR产物直接测序的方法, 得到猪的酪氨酸酶基因外显子1的部分序列, 并用于猪的起源进化研究, 研究中发现, 酪氨酸酶基因有4个同义突变, 但与毛色无关。目前, 尚无猪的酪氨酸酶基因cDNA序列测定, 以及酪氨酸酶基因与猪毛色相关性方面的报道。本研究采用PCR-SSCP方法, 对24头荣昌猪的酪氨酸酶(TYR)基因的多态性进行了检测, 以期对TYR基因突变与猪毛色的相关性研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

24头无相关成年荣昌猪的耳组织采自重庆市养猪科学研究院种猪场, 耳组织样置于Eppendorf管, 加入适量体积分数为70%的乙醇, -20℃保存。Taq DNA聚合酶、dNTP购自北京鼎国生物中心,

pMD18-T购自大连宝生物工程有限公司, PCR产物回收纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京博大泰克生物工程有限公司。引物由上海国际生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 耳组织DNA的提取 参照文献[9]的方法进行。

1.2.2 引物设计 根据GenBank AF181962序列, 利用Oligo 6.0软件自行设计2对引物:

1-1F. GCTGGAAA GAGAA GTGTG;

1-1R. GCCTTGGA CA GAA TGA TG;

1-2F. TCA TTCTGTCCAA GGCA C;

1-2R. TAAA GTGA GGTA GGCA A G。用于扩增包括TYR基因5'非翻译区在内的外显子1。两个PCR产物片段长度分别为254 bp (11~264)和248 bp (249~496)。

根据人(GenBank: AF237808, AF237809)和牛的序列(GenBank: AY046527)设计引物:

2-F. TGTA GCCGA TTGGA GGA G;

2-R. GCTTTA GAAA TACACTGGAA;

3-F. TAGTCCACTTACTGGGTA G;

3-R. ACAAATGCA TGGTGAA GAA G;

4-F. TATTTTTTGAA CA GTGGCT;

4-R. CTGAATCTTGTA GGTA GC。用于外显子2, 3和4的扩增。预测片段大小分别为210, 135,

^{*} [收稿日期] 2004-02-27

[基金项目] 国家“十五”攻关项目(2002BA514A-7-5); 重庆市中青年科技专家基金项目(6852)

[作者简介] 白小青(1976-), 男, 陕西泾阳人, 在读硕士, 主要从事生物技术与家畜育种研究。E-mail: jeff499@sohu.com

[通讯作者] 郁 枫(1959-), 女, 江苏南通人, 副教授, 主要从事动物毛囊生物学研究。E-mail: ffeng66@yahoo.com

182 bp。

1 2 3 PCR 扩增 反应体系:DNA 模板 1 μL (100 ng), 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μL , 20 mmol/L MgCl₂ 2 μL , 2.5 mmol/L dNTP 2 μL , 引物各 1 μL (25 $\mu\text{mol/L}$), Taq DNA 聚合酶 1 μL (2 U/ μL), 加水至 25 μL 。PCR 反应条件: 首次 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min 后, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 52~55 $^{\circ}\text{C}$ (54, 52, 55, 55, 55) 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min。

1.3 单链构象多态分析(SSCP)检测

经琼脂糖凝胶检测的 PCR 产物 3 μL , 加 8 μL 变性缓冲液, 置于 PCR 仪中, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 迅速置于冰上 5 min。经变性处理的 PCR 产物分别上样于体积分数 13%, 13%, 14%, 12% 和 14% 聚丙烯酰胺凝胶, 100 V, 室温下电泳过夜。依文献[10]进行银染。用凝胶成像系统拍照。

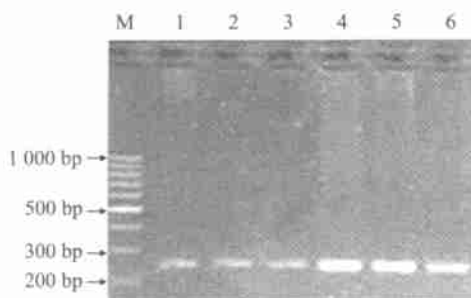


图 1 猪 TYR 基因外显子 1 的 PCR 扩增产物电泳图谱(引物:1-1F 和 1-1R)

M, DNA maker; 1~6, PCR 产物

Fig. 1 Electrophoresis patterns of PCR products for exon 1 of porcine TYR gene (Primers: 1-1F, 1-1R)
M, DNA maker; 1~6, PCR products

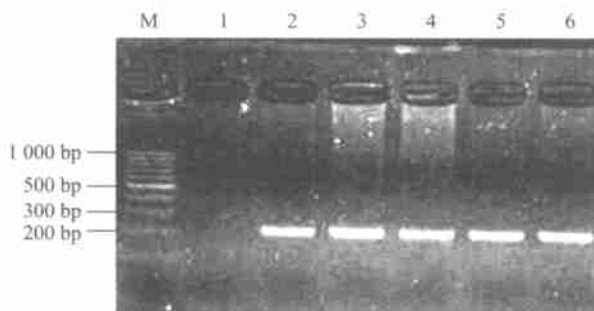


图 3 猪 TYR 基因外显子 2 的 PCR 扩增产物电泳图谱(引物:2-F 和 2-R)

M, DNA maker; 1, 阴性对照; 2~6, PCR 产物

Fig. 3 Electrophoresis patterns of PCR products for exon 2 of porcine TYR gene (Primers: 2-F, 2-R)
M, DNA maker; 1, Negative control; 2~6, PCR products

1.4 PCR 产物回收及克隆测序

采用北京博大泰克生物工程有限公司 PCR 产物回收纯化试剂盒, 从 1% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物。用 pMD18-T 载体连接, 转入 DH5 α 菌株, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h, 挑取白色单菌落划线后培养。用北京博大泰克生物工程有限公司质粒提取试剂盒提取质粒, 经酶切和质粒 PCR 两种方法验证为阳性克隆的, 用 M13 做引物对其测序。序列分析用 BLASTN。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

PCR 扩增结果表明, 退火温度为 52~55 $^{\circ}\text{C}$ 时, 各对引物的扩增产物均为唯一的稳定条带, 片段大小均与预期的一致, 如图 1~5 所示。

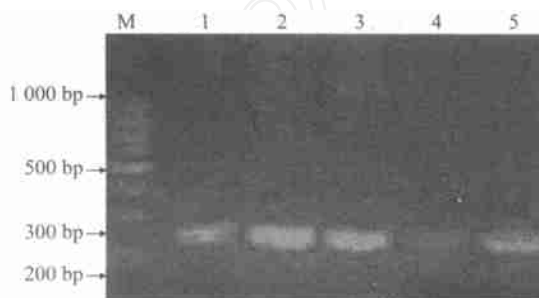


图 2 猪 TYR 基因外显子 1 的 PCR 扩增产物电泳图谱(引物:1-2F 和 1-2R)

M, DNA maker; 1~5, PCR 产物

Fig. 2 Electrophoresis patterns of PCR products for exon 1 of porcine TYR gene (Primers: 1-2F, 1-2R)
M, DNA maker; 1~5, PCR products

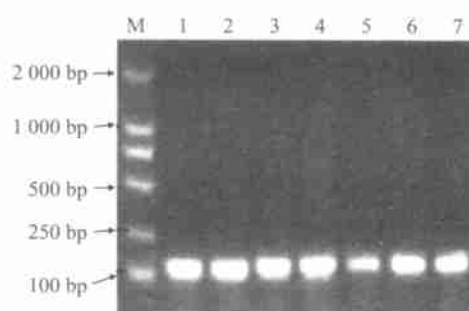


图 4 猪 TYR 基因外显子 3 的 PCR 扩增产物电泳图谱(引物:3-F 和 3-R)

M, DNA maker; 1~7, PCR 产物

Fig. 4 Electrophoresis patterns of PCR products for exon 3 of porcine TYR gene (Primers: 3-F, 3-R)
M, DNA maker; 1~7, PCR products

2.2 SSCP 检测结果

经 SSCP 检测后发现, 外显子 2, 3 和 4 均为单态。外显子 1 用引物 1-1F 和 1-1R 扩增的产物检测



图5 猪 TYR 基因外显子 4 的 PCR 扩增产物电泳图谱(引物: 4-F 和 4-R)

M. DNA maker; 1~6. PCR 产物

Fig. 5 Electrophoresis patterns of PCR products for exon 4 of porcine TYR gene (Primers: 4-F, 4-R)

M. DNA maker; 1~6. PCR products

2.3 测序结果

经测序发现, TYR 基因外显子 1 的多态是由起始密码子上游第 46 位的 G 突变成 A 造成的。该结果与 Giuffra 等^[8]的报道一致。BB 基因型序列与 GenBank AF181962 的部分序列一致。AA 基因型序列与 BB 基因型序列是单碱基差异(G→A)。但是, Giuffra 等^[8]报道的 1 个突变 331C→T 并未检测到。

3 讨论

3.1 单链构象多态检测

单链构象多态检测技术具有灵敏度高、易于操作、不需要昂贵的设备等优点, 被普遍用于单核苷酸突变的检测。SSCP 对待检测片段的长度有一定的要求, 一般 100~300 bp^[10]。本研究设计特异引物的 PCR 产物长度均在 135~254 bp。在充分考虑影响 SSCP 显示效果因素的基础上, 特意设置不同凝胶浓度梯度, 以摸索最佳显示条件, 取得了满意的研究结果。

3.2 酪氨酸酶基因的多态

酪氨酸酶是一种含铜的金属糖蛋白, 在黑色素生物合成中至少催化最初的两步反应: 酪氨酸经此酶作用被羟化成 L-3, 4-二羟基苯丙氨酸(多巴), 多巴经此酶作用被氧化成多巴醌, 而后再进一步转变为各种衍生物, 黑色素是多巴醌、吲哚-5, 6-醌、多巴色素的聚合物^[2]。酪氨酸酶基因有 4 个重要的功能区: 2 个为铜离子结合部位, 这 2 个区域的突变会减弱其与铜离子的结合; 另 2 个主要集中在外显子 1 和外显子 4 内, 推测该区域可能是多巴或酪氨酸酶

抑制剂的结合部位。Spritz^[11]报道的人类酪氨酸酶基因的病理性突变大约有 60 处, 主要分布于上述 4 个功能区。本试验设计 5 对引物进行 PCR 扩增, 几乎囊括了猪的酪氨酸酶基因所有外显子序列(除了外显子 5)。但是, 只在外显子 1 检测到 G→A。

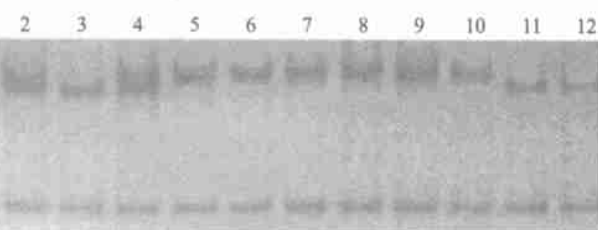


图6 猪 TYR 基因外显子 1 的 SSCP 电泳图谱(引物 1-1F 和 1-1R)

1, 5~10. BB 基因型; 3, 11, 12. AA 基因型; 2, 4. AB 基因型

Fig. 6 Electrophoresis patterns of PCR-SSCP for exon 1 of porcine TYR gene (Primer: 1-1F, 1-1R)

1, 5~10. BB genotype; 3, 11, 12. AA genotype; 2, 4. AB genotype

3.3 关于荣昌猪白毛色的解释

荣昌猪是我国最著名的地方优良品种之一, 其独一无二的毛色(眼圈四周有黑斑, 其余部位全白, 国外又称“熊猫”猪)是国家明确列出的保护性状。尽管荣昌猪的毛色以“熊猫”猪为代表, 但是其群体内变异很大, 有 10 个亚型之多(包括全白)。

现代分子生物学理论认为, 长白和大白猪的白毛色是由 KIT 基因的突变造成的。Marklund 等^[12]研究认为: I 等位基因是双拷贝的 KIT 基因。其中 1 个拷贝正常, 另 1 个拷贝发生了两种突变: 内含子 18 缺失四碱基的调节突变导致 KIT 基因表达失调; 内含子 17 第 1 个核苷酸处发生 G→A 的剪接突变, 导致外显子 17 的缺失。表达突变的 KIT 受体的黑色素细胞前体物不能正常迁移和存活, 皮肤和毛囊无或有极少量的黑色素细胞, 产生白毛色。师科荣^[13]在研究荣昌猪 KIT 基因的多态时发现, KIT 基因内含子 18 没有发生缺失突变, 内含子 17 第 1 个核苷酸处也没有发生 G→A 的突变。由此得出结论, 荣昌猪的白毛色与国外品种(长白和大白猪)的白毛色分别属于不同的两个毛色控制体系。而对多年荣昌猪毛色资料的统计分析也表明, 荣昌猪的白毛色并不能用常规显性白的遗传规律来解释。本研究选取可能对猪的白毛色形成有重要影响的酪氨酸酶基因进行多态分析, 结果未找到与荣昌猪的各种

毛色类型对应的决定性突变。由此可以推测,酪氨酸酶基因属于毛色形成的控制基因之一,而荣昌猪各种毛色类型的出现还有其他基因控制系统。为了更

清楚地了解荣昌猪各种毛色类型出现的基因控制体系,还需要进行更深入的研究。

[参考文献]

- [1] Kazumatsu M L, Shosuke I Interaction of major coat color functions in mice as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin[J]. *Pigment Cell Research*, 2001, 14: 21- 23
- [2] Ponnazhagan S, Hou L, Kwon B S Structural organization of the human tyrosinase gene and sequence analysis and characterization of its promoter region[J]. *J Invest Dermatol*, 1994, 102(5): 744- 748
- [3] Spritz R A, Strunk K M, Giebel L B, et al Detection of mutations in the tyrosinase gene in a patient with type A oculocutaneous albinism[J]. *New England Journal of Medicine*, 1990, 332: 1724- 1728
- [4] Sheila M S, Tom G B, Daniel C C, et al A form of albinism in cattle is caused by a tyrosinase frameshift mutation[J]. *Mammalian Genome*, 2004, 15: 62- 67
- [5] 张亚平 猕猴白化病基因的研究[J]. *中国科学院院刊*, 2000, 15(5): 354- 355
- [6] Ding B, Ryder O A, Wang X, et al Molecular basis of albinism in the rhesus monkey[J]. *Muta Res*, 2000, 449(1- 2): 1- 6
- [7] 王所安, 振武 动物学专题[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1991
- [8] Giuffra E, Kijas J M H, Amarger V, et al The origin of the domestic pigs: independent domestication and subsequent introgression[J]. *Genetics*, 2000, 154: 1785- 1791
- [9] 卢圣栋 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999
- [10] 姜运良, 李 宁, 赵兴波, 等 影响 PCR-SSCP 的因素分析[J]. *农业生物技术学报*, 2000, 8(3): 245- 247
- [11] Spritz R A. Molecular genetics of oculocutaneous albinism[J]. *Hum Mol Genetics*, 1994, 3: 1469- 1475
- [12] Marklund S, Kijas J, Rodriguezmartinez, et al Molecular basis for the dominant white phenotype in the domestic pig[J]. *Genome Research*, 1998, 8: 826- 833
- [13] 师科荣 中国地方猪种毛色基因 MC1R, KIT 和 ASIP 的遗传研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2003

Cloning, sequencing and polymorphism detecting of tyrosinase gene in Rongchang pig

BAI Xiao-qing^{1,2}, YU Feng¹, WANG Jin-yong², CHENG Feng¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Chongqing Swine Science Academy, Rongchang, Chongqing 402460, China)

Abstract: According to known DNA sequences of tyrosinase in human, pig and cattle, we designed five pairs of primers and amplified all exon DNA sequences of tyrosinase in pigs except exon 5. With the method of SSCP, we detected all genotypes in Rongchang pigs. The result revealed exon 1 was polymorphic and other three exons were monomorphic. The products were cloned and sequenced. Three new sequences have been authorized three accession codes: AY236997, AY279998, AY242973. We also found that the polymorphism in exon 1 of tyrosinase gene came from a single nucleotide: G → A.

Key words: tyrosinase gene; sequencing; polymorphism; pig