

用焦磷酸测序技术研究猪 *KIT* 基因的基因型

白小青,潘红梅,赵献之,陈四清,王金勇,袁树楷,李 琴

(重庆市畜牧科学研究所 重庆市养猪科学重点实验室,重庆 荣昌 402460)

[摘 要] 为了探讨猪 *KIT* 基因等位基因的识别及 *KIT* 基因和毛色的关系,为实现猪毛色的定向分子育种奠定基础。以皮特兰、棕色杜洛克、白色杜洛克、长白猪、大白猪、B 系猪、荣昌猪、盆周山地猪共 8 个品种(系)98 头猪为试验材料,利用焦磷酸测序技术检测了猪 *KIT* 基因第 17 内含子区第一核苷酸处 G→A 突变的比例,推测了猪在 *KIT* 基因座位上的基因型或基因型组合。结果表明, A/A + G 呈现明显的品种特征:棕色杜洛克、盆周山地猪、荣昌猪、皮特兰猪 *KIT* 基因 A/A + G 均在 20 % 以下,推测棕色杜洛克和盆周山地猪在 *KIT* 基因座位上的基因型为 *ii*,荣昌猪、皮特兰在 *KIT* 基因座位上的基因型为 *ii*、*I^Pi* 和 *I^PI^P*;白色杜洛克、大白猪、长白猪、B 系猪 *KIT* 基因 A/A + G 呈现散在分布,依据理论基因型下 A/A + G 将其聚类。通过探讨 *KIT* 基因和毛色的关系,证实荣昌猪的全白毛色并非受传统的显性白等位基因控制。

[关键词] 猪; *KIT* 基因;焦磷酸测序;毛色

[中图分类号] S828.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)11-0006-05

Porcine *KIT* gene genotype detection by pyrosequencing

BAI Xiao-qing, PAN Hong-mei, ZHAO Xian-zhi, CHEN Si-qing,

WANG Jin-yong, YUAN Shu-kai, LI Qin

(Chongqing Animal Husbandry Institute, Chongqing Swine Science Key Laboratory, Rongchang, Chongqing 402460, China)

Abstract: In order to find out the base for molecular breeding of pig coat color, the identification of the alleles of *KIT* gene, and the relation between the *KIT* gene and the coat color were discussed. The splice mutation of *KIT* gene was detected by pyrosequencing in 98 pigs, including Pietrain, Duroc with brown coat, Duroc with white coat, Landrace, Large White, B line pig, Rongchang pig and Penzhoushandi pig. The genotype or genotype assemblage at *KIT* locus of every pig was hypothesised. The results showed that A/A + G showed clear breed characters, they were below 20 % when they were detected in Duroc with brown coat, Pietrain, Rongchang pigs and Penzhoushandi pigs, thus the genotypes of *KIT* gene in Duroc with brown and Penzhoushandi pigs were deduced to be *ii* and the genotypes of *KIT* in Pietrain and Rongchang were pigs *ii* or *I^Pi* or *I^PI^P*; while the percentages of A/A + G in Duroc with white, Large White, Landrace and B line pigs were interspersed among 0 % - 100 %. It's found that the dominant white allele could not explain Rongchang pigs' coat color. The molecular base of Rongchang pigs with white coat needed further study.

Key words: pig; *KIT* gene; pyrosequencing; coat color

毛色是猪品种的重要特征之一,消费者一般偏爱白肤色的猪肉,而有毛猪的毛根或皮肤上的有

色斑增加了屠宰后期处理的成本,因此,从中世纪开始育种家一直在为固定白毛白肤的表型而努力^[1]。

〔收稿日期〕 2006-10-17

〔基金项目〕 重庆市“十五”良种创新工程重大专项(合同号:7847);重庆市重点自然科学基金项目(CSTC2005BA1009)

〔作者简介〕 白小青(1976-),男,陕西泾阳人,助理研究员,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〕 王金勇(1970-),男,四川绵竹人,研究员,主要从事猪遗传育种研究。E-mail: kingyou@vip.sina.com

白色相对有色呈显性^[2],受单一显性基因控制^[3-4]。研究发现,猪 *KIT* (mast/ steel cell growth factor receptor) 基因第 17 内含子发生的突变 ($G \rightarrow A$) 恰好位于该基因 5' 剪接位点上^[5-6],而 5' 剪接位点高度保守的 GT 序列是 mRNA 前体剪接所需蛋白因子的结合位点,也是精确剪接的决定因素之一。因此, $G \rightarrow A$ 突变阻止了剪接所需蛋白因子的结合,使外显子 17 不能被识别,导致阅读框发生移码突变,最终成熟的 mRNA 缺失 41 个氨基酸。突变的 *KIT* 基因表达的肥大细胞生长因子受体缺乏酪氨酸激酶活性,黑色素细胞前体物不能正常迁移,皮肤和毛囊没有黑色素细胞,产生白毛色表型。对猪白毛色形成分子遗传机制的深入了解,使得借助分子生物技术实现全白毛色猪新品种的分子育种成为可能。

然而,传统的突变分析技术(包括测序技术)无法区分猪 *KIT* 基因 $G \rightarrow A$ 突变的比例,进而不能准确筛选显性纯合个体。焦磷酸测序技术是由 Ronaghi 等^[7]建立的一种新的 DNA 序列分析技术,主要适用于序列已知的、短的 DNA 片段分析。与 Sanger 法不同,该技术是同一反应体系中的酶级联化学发光反应,其反应体系包括 4 种酶(DNA 聚合酶、硫酸化酶、荧光素酶和双磷酸酶)、反应底物(adenosine 5' phosphosulfate 和荧光素)、待测序 DNA 单链和测序引物。在每一轮测序反应中,只加入一种 dNTP (dATPS、dTTP、dCTP、dGTP),若该 dNTP 与模板配对,聚合酶就可以将其掺入到引物链中,并释放出等摩尔数的焦磷酸基团 (PPi)。PPi 可最终转化为可见光信号,光信号由 CCD 摄像机检测并由 pyrogramTM 反应为一个峰,每个峰值的高度与反应中掺入的核苷酸数目成正比。然后加入下一种 dNTP,继续 DNA 链的合成。焦磷酸测序技术的优点在于不需要荧光染料和同位素,也无需电泳,分析方法简单,结果准确可靠,能同时满足自动化和高通量分析的要求。目前,该技术已开始应用于已知 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 的鉴定^[8-10]、SNP 频率分析^[11-12]、细菌的鉴定与分型^[13-15]和疾病诊断^[16-17]。Pielberg 等^[12]首次利用焦磷酸测序技术检测了猪 *KIT* 基因内含子第一核苷酸处 $G \rightarrow A$ 突变的比例,并结合实时荧光定量 PCR 技术确定了猪 *KIT* 基因的拷贝数,进而用于猪 *KIT* 基因型的识别。

本研究利用焦磷酸测序技术检测猪 *KIT* 基因第 17 内含子区第一核苷酸处 $G \rightarrow A$ 突变的比例,探讨了猪 *KIT* 基因的等位基因的识别,以及 *KIT* 基因和毛色的关系,以期为实现猪毛色的定向分子育

种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 大白猪 4 头,全白毛色;长白猪 26 头,全白毛色;皮特兰 2 头,白毛为主,有大片黑毛;杜洛克 6 头,1 头为棕红毛色,5 头为白毛色,并带有大面积的黑皮斑;B 系猪 51 头,除 2 头为白毛色、头部带有 1 小块黑皮外,其余均为全白毛色;荣昌猪 8 头,3 头为洋眼(全白毛色),1 头为小黑眼(双眼周围是黑毛带黑皮,但黑色未超过眼周至耳根前沿的一半),1 头为大黑眼(双眼周围是黑毛带黑皮,且超过眼周至耳根前沿的一半,未到耳根),2 头为小黑头(双眼周围是黑毛带黑皮,且扩散到耳根前沿,未翻过耳背),1 头为大黑头(双眼周围是黑毛带黑皮,扩散到耳根并翻过耳背,有的甚至达颈部);盆周山地猪 1 头,全黑毛色。所有猪种均来自重庆市畜牧科学研究院种猪场。

1.1.2 试剂与仪器 组织基因组 DNA 提取试剂盒,上海华舜公司产品;Hotstart Taq DNA 聚合酶,德国 Applichem 公司产品;链霉亲和素包被的凝胶微粒,英国 Amersham Biosciences 公司产品;焦磷酸测序样品准备试剂盒 (PSQ 96 Sample Preparation Kit (PSQ-40-0007), Pyro Gold Reagent Kit (PSQ-40-0044)), 瑞典 Pyrosequencing AB 公司产品。Mastercycler Gradient PCR 仪,德国 Eppendorf 公司生产;样本处理工作站 (vacuum prep workstation) 和 PSQ 96MA 测序系统,瑞典 Pyrosequencing AB 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 猪耳组织 DNA 的提取 采集试验猪的耳组织,按照组织基因组 DNA 提取试剂盒说明提取基因组 DNA。

1.2.2 引物的设计与合成 以白小青^[18]测得的包含第 17 内含子区 SNP 位点在内的 *KIT* 基因序列为基础设计引物,预期 PCR 产物长度为 87 bp。引物序列为,PF: 5' TGG TCT AGC CAG AGA CAT CAA GAA-3'; PR: 5' Biotin-CTT CAC GGG ACT GTC AGG AGA-3'。其中,PR 的 5' 端用生物素标记。另外,设计 1 条引物用于焦磷酸测序。引物序列为, P: 5' TTA CGT GGT CAA AGG A-3'。引物均由上海国际生物工程公司合成。

1.2.3 猪 *KIT* 基因的 PCR 扩增 PCR 反应体系: DNA 模板 2 μ L, 10 $\times$ PCR Buffer 5 μ L, 25

mmol/L MgCl₂ 2.0 μL,10 mmol/L dNTP 混合物 1 μL,PF、PR (10 μmol/L) 各 1 μL,Hotstart Taq DNA 聚合酶 0.5 μL (2.5 U),加灭菌水至 50 μL。

PCR 反应条件:95 ℃15 min;95 ℃30 s,58 ℃30 s,72 ℃30 s,共 50 个循环;最后 72 ℃5 min。与一般 PCR 条件相比,此条件增加了预变性的时间和循环数,主要目的是尽可能消耗完所有的引物。因为本研究用于纯化和分离 PCR 产物单链的主要原理是,利用引物一端的生物素标记与链霉素和素包被的凝胶微粒的结合。

1.2.4 猪 *KIT* 基因的焦磷酸测序 取 50 μL PCR 扩增产物,加 46 μL 结合缓冲液和 4 μL 链霉素和素包被的凝胶微粒,常温下混匀 5 min。打开样本处理工作站的真空泵,用连接在真空泵一端的真空抓取工具抓取凝胶微粒。将带有凝胶微粒的真空抓取工具放入体积分数 70 %乙醇中 5 s;再移到变性液中 5 s,使不含有生物素标记的单链被抽弃,洗涤缓

冲液中清洗 5~10 s。关掉真空泵,将真空抓取工具放在盛有测序引物和复性缓冲液的 PSQ 96 板中,释放凝胶微粒。移去真空抓取工具,将 PSQ 96 板置于 80 ℃2 min,再冷却到室温,使测序引物与待测序的单链复性。利用瑞典 Pyrosequencing AB 公司的 PSQ 96MA 测序仪和配套试剂,依照说明进行测序。

1.2.5 猪 *KIT* 基因座位基因型的判定 *KIT* 基因存在 7 个等位基因(I^1 、 I^2 、 I^3 、 I^P 、 I^{Be} 、 i 、 I^L),自由组合则有 28 种基因型。对于每种基因型的个体,*KIT* 基因第 17 内含子区第一核苷酸处 G→A 突变的理论比值不尽相同。本研究按照 *KIT* 基因 G→A 突变的理论比值划分为 10 类(表 1)。应用焦磷酸测序技术得到每头待检测猪 A/A+G 检测值,依据 Pielberg 等^[12]检测值与理论值的差异,将其一一归类,初步判定检测猪的可能基因型组合。结合猪的毛色特征,进一步缩小范围或判定准确的基因型。

表 1 *KIT* 基因 A/A+G 理论值下的基因型分布

Table 1 Genotypic distribution of <i>KIT</i> gene according to the percentage A/A+G in theory					
类型 Type	理论值/ %Value in theory	检测值/ %Value detected	基因型 Genotype		
I	0	≤5	$I^P I^P$	$I^P I^{Be}$	$I^P i$
II	20	25~35	$I^2 I^P$	$I^{Be} I^{Be}$	$I^{Be} i$
III	25	35~44	$I^2 I^2$	$I^2 I^P$	$i i$
IV	33	44~50	$I i$	$I^{Be} I^2$	$I^L I^P$
V	40	50~58	$I I^2$	$I^3 I^P$	
VI	50	58~66	$I I$	$I^2 I^3$	$I^3 I^{Be}$
VII	60	> 66	$I^3 i$	$I^L i$	$I^L I^2$
VIII	67		$I^L I^{Be}$		
IX	75		$I^3 I^3$	$I^L I$	
X	100		$I^L I^3$		
			$I^L I^L$		

2 结果与分析

2.1 猪 *KIT* 基因的 PCR 扩增结果

猪 *KIT* 基因扩增结果(图 1)显示,得到了预期的目标条带。

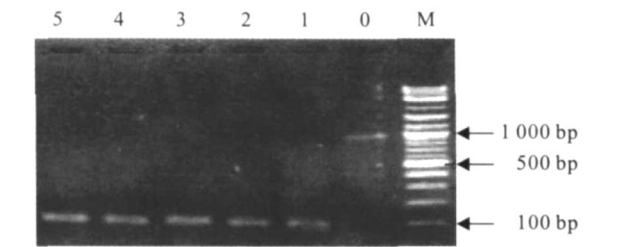


图 1 猪 *KIT* 基因的 PCR 扩增产物电泳图谱

M. DNA Maker;0. 阴性对照;1~5. PCR 产物

Fig. 1 Electrophoresis patterns of PCR products for porcine *KIT* gene

M. DNA Maker;0. Negative control;1 - 5. PCR product

2.2 猪 *KIT* 基因的突变分析及个体基因型的判定结果

利用焦磷酸测序技术检测每头猪 *KIT* 基因第 17 内含子区第一核苷酸处 G→A 突变的比例。结果显示,检测个体中,4 个品种(荣昌猪、盆周山地猪、棕色杜洛克、皮特兰)中每头猪 *KIT* 基因 A/A+G 检测值均在 20 %以下,详见表 2。在扣除因为核苷酸 A 作为测序反应底物而引起的背景信号(即检测值与理论值的差值)后认为,所检测荣昌猪、盆周山地猪、棕色杜洛克、皮特兰的 *KIT* 基因并未发生 G→A 的突变。结合毛色特征,可以排除 5 个等位基因 I^1 、 I^2 、 I^3 、 I^{Be} 和 I^L ,则剩下 I^P 和 i 等位基因。对于棕色杜洛克和盆周山地猪而言,可以准确判定其基因型为 $i i$ 。对于荣昌猪(包括全白毛色和非全白毛色)和皮特兰而言,其可能的基因型有 $i i$ 、 $I^P i$ 和 $I^P I^P$ 3 种,可以通过荧光定量 PCR 技术研究

该基因的拷贝数,进一步判定其准确的基因型。*ii* 型个体有 2 个拷贝、*I^Pi* 型个体有 3 个拷贝、*I^PI^P* 型个体有 4 个拷贝。

表 2 猪 *KIT* 基因 A/A + G 检测值的分布

Table 2 Mutation distribution of *KIT* gene according to the detected percentage A/A + G

品种 Variety	数量 Number	A/A + G/ %
荣昌猪 Rongchang pigs	8	13.84 ±2.00
盆周山地猪 Penzhoushandi pigs	1	14.1
棕色杜洛克 Duroc with brown	1	11.8
皮特兰 Pietrain	2	12.10 ±0.42

大白猪中有 2 头 A/A + G 分别为 61 % 和 61.3 %, 将其归为理论值为 50 %, 其基因型为 *II*、*I²I³*、*I³I^{Be}*、*I³i*、*I^Li*、*I^LI²* 或 *I^LI^{Be}*; 1 头 A/A + G 为 43.8 %, 将其归为理论值为 25 %, 其基因型为 *II^P*、*I²I^{Be}* 或 *I²i*; 1 头 A/A + G 为 52.3 %, 将其归为理论值为 40 %, 其基因型为 *I²* 或 *I³I^P*。

5 头白色杜洛克 A/A + G 分别为 39.5 %, 41.8 %, 45.5 %, 45.8 % 和 47 %, 其中 2 头 A/A + G 为 39.5 % 和 41.8 %, 将其归为理论值为 25 %, 其基因型为 *II^P*、*I²I^{Be}* 或 *I²i*; 3 头 A/A + G 为 45.5 %, 45.8 % 和 47 %, 将其归为理论值为 33 %, 其基因型为 *Ii*、*II^{Be}*、*I²I²* 或 *I^LI^P*。

B 系猪 A/A + G 呈现散在分布: 51 头 B 系猪中有 3 头 A/A + G 均在 20 % 以下, 未发生 G→A 突变, 其基因型为 *I^PI^P*、*I^PI^{Be}*、*I^Pi*、*I^{Be}I^{Be}*、*I^{Be}i* 或 *ii*; 有 5 头 A/A + G 均在 35 %~44 %, 其基因型为 *II^P*、*I²I^{Be}* 或 *I²i*; 有 9 头 A/A + G 均在 44 %~50 %, 其基因型为 *Ii*、*II^{Be}*、*I^LI^P* 或 *I²I²*; 有 15 头 A/A + G 均在 50 %~58 %, 其基因型为 *I²* 或 *I³I^P*; 有 18 头 A/A + G 均在 58 %~66 %, 其基因型为 *II*、*I^Li*、*I^LI²*、*I^LI^{Be}*、*I²I³*、*I³I^{Be}* 或 *I³i*; 有 1 头 A/A + G 在 66 % 以上, 其基因型为 *I³*。

长白猪 A/A + G 呈现散在分布: 26 头长白猪中有 3 头 A/A + G 均在 25 %~35 %, 其基因型为 *I²I^P*; 有 8 头 A/A + G 均在 35 %~44 %, 其基因型为 *II^P*、*I²I^{Be}* 或 *I²i*; 有 2 头 A/A + G 均在 44 %~50 %, 其基因型为 *Ii*、*II^{Be}*、*I^LI^P* 或 *I²I²*; 有 7 头 A/A + G 均在 50 %~58 %, 其基因型为 *II²* 或 *I³I^P*; 有 6 头 A/A + G 均在 58 %~66 %, 其基因型为 *II*、*I^Li*、*I^LI²*、*I^LI^{Be}*、*I²I³*、*I³I^{Be}* 或 *I³i*。

3 讨 论

3.1 猪 *KIT* 基因等位基因的识别

猪 *KIT* 基因的等位基因和个体基因型的识别经历了两个阶段: 阶段一, 利用毛色表型和杂交系谱信息的判定; 阶段二, 利用分子检测结果、毛色表型特征信息和杂交系谱信息的综合判定。通过观察不同毛色猪品种杂交后代毛色表型的分离比, 研究者先后提出 *KIT* 基因存在 *I*、*I^d*、*I^P*、*i*、*i^m* 共计 5 个等位基因, 分别对应显性白色、灰杂色、黑斑、正常毛色和隐性白色, 其显性系列为 *I*、*I^d*、*I^P*、*i*、*i^m* [4, 19-20]。随着分子生物技术的发展, 研究者通过 PCR-RFLP、PCR-SSCP、焦磷酸测序、荧光定量 PCR 等方法, 先后证实了 *I*、*I²*、*I³*、*I^P*、*I^{Be}*、*i*、*I^L* 共计 7 个等位基因 [6, 12, 21-22]。这样, 理论的个体基因型就有 28 种。如果仅考虑单拷贝 *KIT* 基因 DNA 序列的变异, 那么有 2 个 *KIT* 基因: *KIT1*、*KIT2*。*KIT1* 是正常 *KIT* 基因, *KIT2* 相对于 *KIT1* 发生了 1 处突变, 即内含子 17 第一个核苷酸处的 G 被替换成 A。*KIT* 基因的 7 个等位基因实际上是 *KIT1*、*KIT2* 和拷贝数的不同组合。其中, *i* 和 *I^{Be}* 为单拷贝的 *KIT1*; *I^L* 是 1 个拷贝的 *KIT2*; *I* 是 1 个拷贝 *KIT1* 和 1 个拷贝 *KIT2* 的组合; *I²* 是 2 个拷贝 *KIT1* 和 1 个拷贝 *KIT2* 的组合; *I³* 是 1 个拷贝 *KIT1* 和 2 个拷贝 *KIT2* 的组合; *I^P* 是 2 个拷贝 *KIT1* 的组合。由此可以看出, *KIT* 基因座位上等位基因的多样性及等位基因间存在的差异不仅是质上(核酸突变)的, 更有量上(拷贝数)的, 更有甚者有的 (*I^{Be}* 和 *i*) 还没有找到遗传上的差异, 这在一定程度上增加了个体基因型判定的难度, 这也正是虽经 100 多年的选育, 仍然很难从白毛猪种彻底剔除带有黑斑表型猪个体的原因所在。本研究利用焦磷酸测序技术, 检测了皮特兰、棕色杜洛克、白色杜洛克、长白猪、大白猪、B 系猪、荣昌猪、盆周山地猪共 8 个品种(系) 98 头猪 *KIT* 基因第 17 内含子区第一核苷酸处 G→A 突变的比例, 推测了猪个体在 *KIT* 基因座位上的基因型或基因型组合。结果显示, 28 种理论基因型中, *I^LI³* 和 *I^LI^L* 两种基因型未检测到; 荣昌猪、棕色杜洛克、皮特兰的 *KIT* 基因第 17 内含子第一核苷酸处未发生 G→A 突变, 该结果与白小青 [18]、师科荣等 [23] 的研究结果一致; 盆周山地猪、白色杜洛克和 B 系猪属 *KIT* 基因研究中首次采用的猪种, 检测结果显示, 盆周山地猪 *KIT* 基因第 17 内含子第一核苷酸处未发生 G→A 突变, B 系猪、长白猪 A/A + G 均呈

现散在分布。棕色杜洛克和盆周山地猪的基因型均为 ii , 对于其他猪种个体, 本研究只给出了可能的基因型组合, 至于准确的基因型, 还需要检测其拷贝数并综合必要的杂交系谱才能最终确定。

3.2 *KIT* 基因与毛色的关系

Marklund 等^[6]发现 *KIT* 基因的决定性突变, 从而奠定了猪毛色遗传的分子基础。研究认为, 显性白表型是 *KIT* 基因突变造成的: 一是基因复制, 复制增加了 *KIT* 基因的表达量, 影响了青灰生长因子配体的可利用性, 扰乱了黑色素细胞前体物的正常迁移和存活, 产生黑斑表型; 一是一拷贝中的剪接突变, 即内含子 17 第一核苷酸处发生 $G \rightarrow A$ 的突变, 导致外显子 17 的缺失。而剪接突变导致肥大细胞生长因子受体缺乏酪氨酸激酶活性, 黑色素细胞前体物不能正常迁移和存活, 皮肤和毛囊没有黑色素细胞, 产生白毛色。世界上白毛色猪都是 *KIT* 基因 2 个突变的纯合体或杂合体。

本研究中长白猪、大白猪、白色杜洛克的 *KIT* 基因均发生 $G \rightarrow A$ 突变, 而盆周山地猪、棕色杜洛克未发生 $G \rightarrow A$ 突变。用显性白理论完全可以解释其毛色成因。盆周山地猪的黑色可能归因于 E 位点上 E^{D1} 等位基因的作用, 因为中国地方猪的黑色主要由 E^{D1} 等位基因调控^[24]。杜洛克的棕红色归因于 E 位点上 e 等位基因的作用^[25]。值得注意的是, 尽管 B 系猪 $A/A + G$ 也呈现散在分布, 但仍有 3 头未检测到 $G \rightarrow A$ 突变。B 系猪是荣昌猪与大白猪杂交育成的含有约 45% 荣昌猪血缘的新品系, 既然荣昌猪不存在 $G \rightarrow A$ 突变, 那么在 B 系猪中有 3 头未检测到 $G \rightarrow A$ 的突变是正常的。至于这 3 头全白色 B 系猪的毛色成因, 还有待进一步研究。

非全白荣昌猪、皮特兰的毛色表型特征以白色为主, 有大块黑斑。检测也未发生 $G \rightarrow A$ 突变。这样, 其个体基因型只能是 ii 、 $I^P i$ 或 $I^P I^P$ 。对于其毛色的成因, 有两种可能解释: 第一, Johansson 等^[20]将其归为 *KIT* 基因的 I^P 等位基因作用。 I^P 等位基因是双拷贝的 *KIT* 基因, 增加了 *KIT* 基因的表达量, 影响了 *KIT* 受体结合的配体的可利用性, 扰乱了黑色素细胞前体物的正常迁移和存活, 产生黑斑表型。第二, Kijas 等^[25]认为其与 E 位点有关, 是 $E^P E^P$ 造成的。

对于全白色的荣昌猪而言, 其在表型上与全白色的长白猪、大白猪并无差异, 但是其遗传调控机制完全不同。在 *KIT* 基因上, 全白色的荣昌猪并没有像全白色的长白猪、大白猪那样发生 $G \rightarrow A$ 的突变。

这充分说明, 荣昌猪的白色并非受传统的显性白等位基因控制。该结果与白小青^[18]的研究结果一致。至于荣昌猪全白毛色形成的分子机制还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Wiseman J. A history of the british pig[M]. Worcester: Ebenezer Baylis & Son, 1986.
- [2] Spillman W J. Inheritance of coat color in swine[J]. Science, 1906, 24: 441-443.
- [3] Wright S. Color inheritance in mammals VIII Swine[J]. Journal of Heredity, 1918, 9: 33-38.
- [4] Hetzer H O. Inheritance of coat color in swine IV. Analysis of hybrid of Landrace and Large Black[J]. Journal of Heredity, 1945d, 36: 309-312.
- [5] Johansson M M, Chaudhary R, Hellmen E, et al. Pigs with the dominant white coat color phenotype carry a duplication of the *KIT* gene encoding the mast/stem cell growth factor receptor[J]. Mammalian Genome, 1996, 7: 822-830.
- [6] Marklund S, Kijas J, Rodriguez-Martinez H, et al. Molecular basis for the dominant white phenotype in the domestic pig[J]. Genome Research, 1998, 8: 826-833.
- [7] Ronagi M, Uhlir M, Nylund P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate[J]. Science, 1998, 281: 363-365.
- [8] White H E, Durston V J, Seller A, et al. Accurate detection and quantitation of heteroplasmic mitochondrial point mutations by pyrosequencing[J]. Genet Test, 2005, 9(3): 190-199.
- [9] Andreasson H, Asp A, Alderborn A, et al. Mitochondrial sequence analysis for forensic identification using pyrosequencing technology[J]. Biotechniques, 2002, 32(1): 124-126, 128, 130-133.
- [10] Gustafsson A C, Kijas J M, Alderborn A, et al. Screening and scanning of single nucleotide polymorphisms in the pig melanocortin 1 receptor gene (*MC1R*) by pyrosequencing[J]. Anim Biotechnol, 2001, 12(2): 145-153.
- [11] Wasson J, Skolnick G, Love Gregory L, et al. Assessing allele frequencies of single nucleotide polymorphisms in DNA pools by pyrosequencing technology[J]. Biotechniques, 2002, 32(5): 1144-1150.
- [12] Pielberg G, Olsson C, Syvanen A C, et al. Unexpectedly high allelic diversity at the *KIT* locus causing dominant white color in the domestic pig[J]. Genetics, 2002, 160: 305-311.
- [13] Clarke S C. Pyrosequencing: nucleotide sequencing technology with bacterial genotyping applications[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2005, 5(6): 947-953.
- [14] Jonasson J, Olofsson M, Monstein H J. Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments[J]. APMIS, 2002, 110(3): 263-272.

(下转第 14 页)

程中,应加强选择含有乳房炎抗性基因的个体,逐步建立具有抗乳房炎特性的奶牛品系。

[参考文献]

- [1] Plaffl M W, Wittmann S L, Meyer H H D, et al. Gene expression of immunologically important factors in blood cells, milk cells and mammary tissue of cows[J]. Journal of Dairy Science, 2003, 86(3): 538-545.
- [2] Seyfert H M, Tuckoricz A, Interthal H, et al. Structure of the bovine lactoferrin-encoding gene and its promoter[J]. Gene, 1994, 143(2): 265-269.
- [3] Schanbacher F L, Goodman R E, Talhouk R S. Bovine mammary lactoferrin: implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins[J]. Journal of Dairy Science, 1993, 76(12): 3812-3831.
- [4] Gaunt S N, Raffio N, Kingsbury E T, et al. Variation of lactoferrin and mastitis and their heritabilities[J]. Journal of Dairy Science, 1980, 63(11): 1874-1880.
- [5] Zheng J, Ather J L, Sonstegard T S, et al. Characterization of the infection-responsive bovine lactoferrin promoter[J]. Gene, 2005, 353(1): 107-117.
- [6] Eberhart R J, Hutchinson L J, Spencer S B. Relationships of bulk tank somatic cell count to prevalence of intramammary infection and to indices of herd production[J]. J Food Prot, 1982, 45: 1125-1128.
- [7] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3): 314-331.
- [8] 储明星, 周国利, 金海国, 等. 7 个微卫星座位与北京荷斯坦母牛体细胞评分关系的研究[J]. 遗传学报, 2005, 32(5): 471-475.
- [9] Hansen L B, Young C W, Miller K P, et al. Health care requirements of dairy cattle I. Response to milk yield selection[J]. Journal of Dairy Science, 1979, 62(12): 1922-1931.
- [10] Ashwell M S, Heyen D W, Sonstegard T S, et al. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in holstein cattle[J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87(2): 468-475.
- [11] Schulman N F, Viitala S M, Koning D J, et al. Quantitative trait loci for health traits in finnish ayrshire cattle[J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87(2): 443-449.
- [12] 高树新, 许尚忠, 李金泉, 等. BoLA-DQA, DRB3 exon2 多态性及其与奶牛乳房炎的关联分析[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(4): 317-320.
- [13] 张利军, 蔡亚非, 刘庆华, 等. 奶牛乳铁蛋白基因启动子区 PCR-RFLP 分析与乳房炎的相关性[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2005, 34(1): 87-90.
- [14] Seyfert H M, Kuhn C. Characterization of a first bovine lactoferrin gene variant, based on an *EcoR* I polymorphism[J]. Animal Genet, 1994, 25(1): 54.
- [15] Monstein H, Nikpour-Badr S, Jonasson J. Rapid molecular identification and subtyping of *Helicobacter pylori* by pyrosequencing of the 16S rDNA variable V1 and V3 regions[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 199(1): 103-107.
- [16] Kijas J M, Juneja R K, Gafvert S, et al. Detection of the causal mutation for canine leukocyte adhesion deficiency (CLAD) using pyrosequencing[J]. Anim Genet, 2000, 31(5): 326-328.
- [17] Nilsson T K, Johansson C A. A novel method for diagnosis of adult hypolactasia by genotyping of the 13910 C/T polymorphism with pyrosequencing technology[J]. Scand J Gastroenterol, 2004, 39(3): 287-290.
- [18] 白小青. 荣昌猪毛色分子遗传标记的研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- [19] Berge S. Heredity of color in pigs (in Norwegian) [M]. Tidsskrift: Norske Landbruk, 1961: 159-188.
- [20] Johansson M, Ellegren H, Marklund L, et al. The gene for dominant white color in the pig is closely linked to ALB and PDGFRA on chromosome 8 [J]. Genomics, 1992, 14: 965-969.
- [21] Gerli P, Day A E, Graham S, et al. A sensitive method for detecting variation in copy numbers of duplicated genes[J]. Genome Research, 2003, 13: 2171-2177.
- [22] Guiffa E, Evans G, Tornsten A, et al. The belt mutation in pigs is an allele at the dominant white (I/KIT) locus[J]. Mammalian Genome, 1999, 10(12): 1132-1136.
- [23] 师科荣, 王爱国, 李 宁, 等. 白色基因座(I)在中国地方猪种毛色遗传中的作用研究[J]. 遗传学报, 2005, 32(3): 275-281.
- [24] 邓素华. 猪黑素皮质素受体基因和肥大细胞/干细胞生长因子受体基因与毛色表性的相关性研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2001.
- [25] Kijas J M, Moller M H, Plastow G, et al. A frameshift mutation in MC1R and a high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs [J]. Genetics, 2001, 158: 779-785.

(上接第 10 页)