

猪 *CACNA2D1* 基因定位及与相关遗传图谱的整合分析

李建华¹,杨明生¹,徐宁迎²

(1 孝感学院,湖北 孝感 432003;2 浙江大学 动物科学学院,浙江 杭州 310029)

【摘要】 **【目的】**定位猪 *CACNA2D1* 基因并分析该基因是否可作为影响猪某些生产性状的候选基因。**【方法】**扩增并测定猪 *CACNA2D1* 基因的部分序列,运用辐射杂种细胞系对其进行定位并将定位结果与相关遗传图谱进行整合分析。**【结果】**将猪 *CACNA2D1* 基因定位在猪 9 号染色体 79.3~86.7 cM 的位置上,发现在 *CACNA2D1* 基因定位区域有 3 个分别影响母猪发情期排卵数、胴体肩胛重以及 10 周龄体重的 QTL,在定位区域附近有影响猪屠宰 24 h 后肌肉 pH 值的 QTL。**【结论】**猪 *CACNA2D1* 基因可作为猪繁殖性状、胴体性状、生长性状甚至肉质性状的候选基因进行进一步的研究。

【关键词】 猪;*CACNA2D1* 基因; 基因定位; 候选基因

【中图分类号】 S828.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2008)01-0049-05

Mapping of porcine *CACNA2D1* gene and the integrative analysis of correlative genetic maps

LI Jian-hua¹, YANG Ming-sheng¹, XU Ning-ying²

(1 Xiaogan University, Xiaogan, Hubei 432003, China;
2 College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029, China)

Abstract: **【Objective】** The study was conducted to map porcine *CACNA2D1* gene and to analyses if the gene could be used as a candidate gene influencing some production traits of porcine. **【Method】** Porcine *CACNA2D1* gene was mapped by radiation hybrid panel and the mapping result was compared with correlative genetic maps after partial sequence of porcine *CACNA2D1* gene beening amplified and sequenced. **【Result】** Porcine *CACNA2D1* gene was located on 79.3~86.7 cM of porcine chromosome 9. Three QTL affecting ovulation rate, shoulder weight, body weight at 10 weeks of age respectively have been found in the located domain and one QTL affecting pH 24 hours post mortem has been found also near the area of *CACNA2D1* gene. **【Conclusion】** *CACNA2D1* gene could be studied more as a candidate gene influencing reproduction, carcass, and growth traits, even as the meat quality traits of porcine.

Key words: pig (sus, porcine); *CACNA2D1* gene; gene mapping; candidate gene

确定基因准确位置并与相关遗传图谱进行整合分析,对于了解该基因的潜在功能具有重要意义。

有研究表明,存在于许多不同类型细胞中的钙离子通道,可对动作电位和亚去极化信号作出反应,引发

* [收稿日期] 2007-01-16
[基金项目] 湖北省教育厅优秀中青年人才项目(Q200626001)
[作者简介] 李建华(1969—),男,湖北孝感人,博士,副教授,主要从事动物遗传及分子生物学研究。
E-mail: zmkzmzn 2001@yahoo. com. cn
[通讯作者] 徐宁迎(1956—),男,浙江湖州人,教授,博士生导师,主要从事动物遗传育种研究。

膜的去极化和钙的跨膜流动^[1]。钙离子通过依电压钙离子通道进入细胞后,可作为传递电信号的第二信使,触发膜内诸如收缩、分泌、突触传导、基因表达等一系列生理活动^[2]。钙离子通道由主成孔亚基 α_1 和辅助亚基 α_2 、 β 、 γ 和 δ 组成,主要存在于骨骼肌钙离子通道中的 α_2 和 δ_1 亚基由 1 个基因 *CACNA2D1* 编码。 α_2 和 δ_1 亚基通过二硫键结合在一起,具有可提高钙离子通道在膜上的表达水平、增加配体结合位点、改变钙流的依电压动力学活性等生理功能^[3]。目前,只有人、鼠、牛等少数几种生物的 *CACNA2D1* 基因被克隆,尚未见有关该基因功能研究的报道。为此,本研究设计了同源引物,克隆了猪 *CACNA2D1* 基因的部分序列,用辐射杂种细胞系技术将其定位在猪 9 号染色体的特定位置上,并与相关的遗传图谱进行了整合分析^[4],评估其对猪生产性状的潜在影响,以期确定为猪 *CACNA2D1* 基因能否作为某些生产性状的候选基因提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试 剂 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、 $MgCl_2$ (25 mmol/L)、琼脂糖 (Agarose) 等用于 DNA PCR 扩增反应及扩增产物检测的试剂,均购自上海生物工程有限公司。

1.1.2 辐射杂种细胞系 猪基因组 DNA 和仓鼠基因组 DNA 来自于猪仓鼠体细胞放射杂交板 (*IMpRH* panel),由法国细胞遗传学实验室提供。该杂交板是用 60 Gy 的辐射剂量制作的 121 管猪-仓鼠体细胞杂交板,其中包括 118 管猪和仓鼠细胞的杂交克隆系、1 管猪基因组 DNA 阳性对照、1 管仓鼠基因组 DNA (Wg3) 阳性对照和 1 管没有任何 DNA 模板的 TE 阴性对照。

1.2 猪 *CACNA2D1* 基因的 PCR 扩增

1.2.1 引物设计 将 GenBank 上猪 *CACNA2D1* 基因 mRNA 序列 (GenBank 登录号: NM_214183) 与人 *CACNA2D1* 基因基因组序列 (GenBank 登录号: AC004408) 进行比对,确定猪 *CACNA2D1* 基因外显子 36 和 37 的序列,并发现这两个外显子之间的内含子较小,适合于在外显子 36 和 37 上设计上、下游引物,进行普通的跨内含子 PCR 扩增。

根据猪 *CACNA2D1* 基因外显子 36 和 37 的序列设计 1 对引物,其中上游引物 (位于 exon 37) F: 5'-CCC CAC TGA AGG ATT TGC TAT CAT-3',

下游引物 (位于 exon 36) R: 5'-CTC TTG AGT TTG ACC TTT CCA CGA-3'。以猪基因组 DNA 为模板,用这对引物扩增出 1 段长 495 bp 的序列,测序后将这段序列 (GenBank 登录号: AY966874) 与鼠的相应序列 (GenBank 登录号: NW_001030784) 进行比对,在猪 *CACNA2D1* 基因 36 内含子非保守区设计 1 个特异性下游引物 M: 5'-GGT CAT TTT GGT CTC TGT TAT GTA G-3',与上游引物 F 配对,用于定位的猪 *CACNA2D1* 基因。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.2 猪 *CACNA2D1* 基因目的片段的扩增 以猪基因组 DNA 为模板,用引物 F 和 R 进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应总体系为 10 μ L,其中 10 $\times$ Buffer 1.0 μ L,25 mmol/L $MgCl_2$ 0.7 μ L,10 mmol/L dNTP 0.2 μ L,10 pmol/L 引物 F 和引物 R 各 0.8 μ L,5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L,模板 DNA 25 ng,灭菌超纯水 5.7 μ L。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}C$ 30 s,57 $^{\circ}C$ 30 s,72 $^{\circ}C$ 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}C$ 延伸 8 min。

1.3 猪 *CACNA2D1* 基因 PCR 产物的测序与验证

将扩增出的猪 *CACNA2D1* 基因特异性 PCR 产物,送上海生物工程技术服务有限公司,经正反测序整理后,与人和鼠的相应序列进行比对验证。

1.4 *IMpRH* 板的 PCR 扩增

以引物 F 和 M 组成定位引物对,用上述的 PCR 反应体系和条件扩增 *IMpRH* 板中的 118 个猪-仓鼠体细胞杂交系及其阳性、阴性对照。PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,能扩增出 PCR 产物的以“1”表示为阳性,不能扩增出 PCR 产物的以“0”表示为阴性,判断不清楚的用“?”表示,重复扩增 2 次后统计扩增结果,并按与 *IMpRH* panel 一一对应的 118 孔板格式制成 Excel 表。

1.5 定 位

将统计结果提交给 *IMpRH* 服务器 (<http://imprh.toulouse.inra.fr/>) 进行分析,得到与该基因距离最近的微卫星标记,并获取其染色体定位信息,然后借助猪 RH 图和遗传连锁图谱将 *CACNA2D1* 基因定位在猪染色体的相应位置上。

2 结果与分析

2.1 猪 *CACNA2D1* 基因扩增片段及 *IMpRH* 板的 PCR 扩增

以猪基因组 DNA 为模板,用引物 F 和 R 进行 PCR 扩增,得到了长为 495 bp 的 DNA 片段 (图 1)。

对 PCR 产物进行纯化后测序,并将测序结果提交给 GenBank(GenBank 登录号:AY966874)。对扩增片段与 GenBank 上 CACNA2D1 基因的同源性分析发现,其外显子部分与猪和牛相应序列(GenBank 登录号分别为 AF077665 和 XM609993)的同源性分别为 100.0%和 98.1%,说明扩增结果准确可靠。

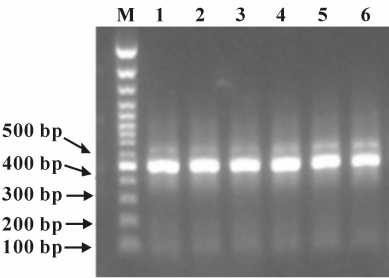


图 1 猪 CACNA2D1 基因的 PCR 扩增

M. DNA 标记;1~6. 猪 CACNA2D1 基因的扩增结果
Fig. 1 Amplified product of porcine CACNA2D1 gene
M. DNA Marker;1-6. Amplified product of porcine CACNA2D1 gene

用引物对 F 和 M 对猪-仓鼠体细胞放射杂交板试剂盒(*IMpRH* panel)进行扩增并进行电泳检测,其结果为:1000100001 01000? 0000 010000110? 0111000000 1011000000 0000000000 1110100000 0000011011 0000010001 0010110001 0111100110 10000101。

2.2 猪 CACNA2D1 基因的 RH 定位

将上述扩增结果递交 *IMpRH* server,统计分析后得到与待定位基因 CACNA2D1 连锁较为紧密的 4 个微卫星标记位点(表 1)。

表 1 猪 CACNA2D1 基因的 RH 定位分析

Table 1 RH mapping results of porcine CACNA2D1 gene

微卫星位点 Microsatellite Location	分布/cR Dist	LOD 值 LOD Score
SWR123	0. 21	16. 46
SW886	0. 28	14. 18
SW944	0. 36	11. 79
SW1006	0. 46	9. 28

由表 1 可知,位点 SWR123 与 CACNA2D1 基因的距离最小。经与猪 Genome base 的比较分析,结合遗传连锁图和 RH 制图将 CACNA2D1 基因定位在猪 9 号染色体上(图 3-a)。对照美国农业部(USDA)肉畜研究中心的猪 9 号染色体基因组综合图

分别以猪和仓鼠基因组 DNA 为模板,用引物对 F 和 M 进行 PCR 扩增,结果得到了猪 CACNA2D1 基因长度为 263 bp 的扩增产物,但未得到仓鼠基因组的扩增产物(图 2),与预期结果一致,表明这对引物可用于猪 CACNA2D1 基因的定位。

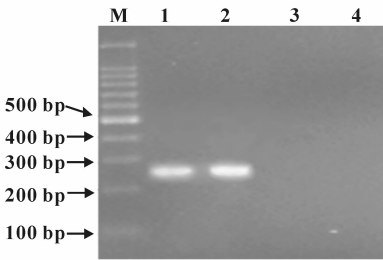


图 2 以猪和仓鼠基因组为模板的 PCR 扩增

M. DNA 标记;1~2. 以猪基因组 DNA 为模板;
3~4. 以仓鼠基因组 DNA 为模板
Fig. 2 Amplified product of CACNA2D1 gene using porcine and hamster genome DNA respectively
M. DNA Marker;1-2. Amplified product of porcine genome DNA;
3-4. Amplified product of hamster genome DNA

谱^[5](<http://iowa.thearkdb.org>),将猪 CACNA2D1 基因定位在猪 9 号染色体的 79. 3~86. 7 cM(图 3-b,Map name:USDA-MARC V2)靠近 82. 4 cM 的地方。

2.3 猪 CACNA2D1 基因定位区域的 QTL 及其潜在功能评估

登陆动物基因组 QTL 数据库,查询猪第 9 号染色体上的 QTL 标记(http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/draw_chromap)发现,在猪 CACNA2D1 基因定位区域(SW 944~SW 1006)存在有 3 个 QTL 标记(图 3-c),其位置及对相应生产性状的影响见表 2。在这 3 个 QTL 标记中,OV RATE 与母猪发情期排卵数的相关性达到显著水平^[6],SHOU WT 与胴体肩胛重、WT 与 10 周龄体重的相关性分别达到建议显著水平($P < 0. 1$)^[7-8]。这表明 CACNA2D1 基因可能对母猪发情期排卵数、胴体肩胛重以及 10 周龄体重有影响。另外,在 CACNA2D1 基因的定位区域附近,有影响猪屠宰 24 h 后肌肉 pH 值^[9]的 QTL(QTL 标记:pH),考虑到 CACNA2D1 基因功能的广泛性以及基因 RH 定位和 QTL 连锁图谱本身存在一定的误差,CACNA2D1 基因对猪肉质性状也可能有潜在影响。

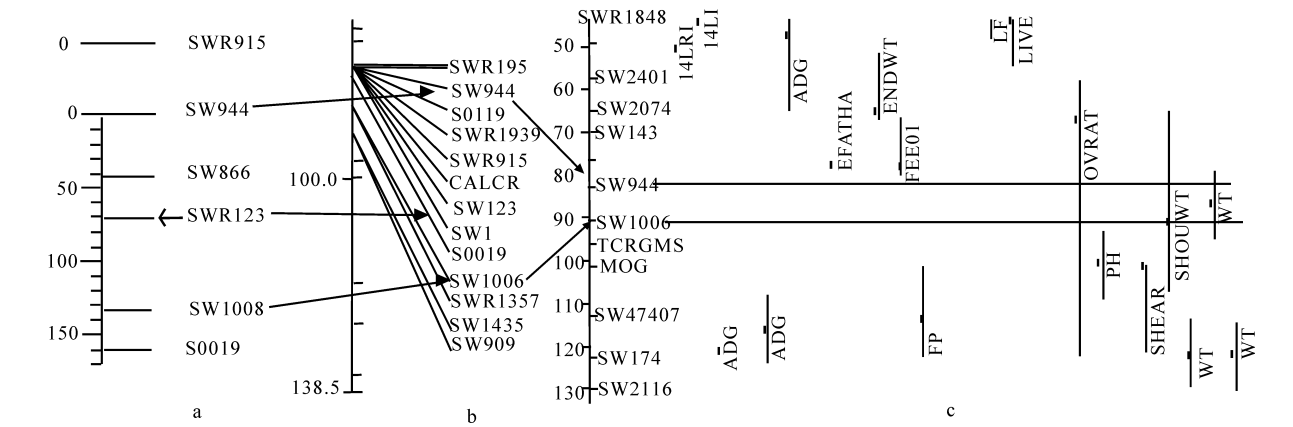


图 3 猪 CACNA2D1 基因的定位及比较分析

a. 利用 *IMpRH* panel 将 *CACNA2D1* 基因定位在猪 9 号染色体; b. 猪 9 号染色体基因组综合图谱; c. 猪第 9 号染色体上的 QTL 标记

Fig. 3 *CACNA2D1* gene mapping and comparative analysis

a. *CACNA2D1* gene mapped on chromosome 9 of porcine by *IMpRH* panel; b. Genomic integration map on chromosome 9 of pig;

c. QTL markers on chromosome 9 of pig

表 2 猪 CACNA2D1 基因定位区域的 QTL

QTL 标记 QTL Symbol	QTL 区间/cM QTL Span	QTL 中心位置/cM Center location	性状 Trait	显性效应 Dominance effect	加性效应 Additive effect
OVRATE	57~122	67	排卵数 Ovulation rate	0.10	-1.98
SHOUWT	65~108	91	肩胛重 Shoulder weight	0.08	0.05
WT	—	87	10 周龄体重 Body weight at 10 weeks of age	—	—

3 讨 论

运用辐射杂种细胞系技术定位基因的关键,是用来定位的引物对要有较好的特异性,即定位引物对在以猪基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增时,可以扩增出相应的 DNA 片段,而以仓鼠基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增时没有扩增产物。本试验在未知猪 *CACNA2D1* 基因基因组 DNA 序列的情况下,将 GenBank 上猪 *CACNA2D1* 基因 mRNA 序列与人 *CACNA2D1* 基因基因组序列进行比对,确定猪 *CACNA2D1* 基因外显子 36 和 37 的序列,并在外显子 36 和 37 上设计上下游引物,扩增测定出猪 *CACNA2D1* 基因 36 内含子序列。由于内含子序列保守性差,在与鼠的相应序列进行比对后,很容易在其中找到适合设计引物的非保守区段,找到后在该段非保守区设计下游引物 M,与引物 F 配对,用于定位扩增,这就保证了定位引物对的特异性,试验结果证实这种方法是可行的。

本研究运用辐射杂种细胞系技术,将猪 *CACNA2D1* 基因定位在猪 9 号染色体的 q 臂上,与 4 个微卫星的 LOD 值均在 5 以上,达到了定位的标准和要求,其中与微卫星 SWR123 的 LOD 值更是高达

16.46,定位结果较为理想。

对复杂性状的遗传分析是一件困难而重要的工作,当前科技的发展为综合运用各种数据资源,分析动物复杂性状创造了新的机会^[10]。动物生产性状大多为数量性状,由许多微效基因控制,这些基因在染色体上的位置称为数量性状基因座位(Quantitative Trait Locus, QTL)。借助基因图谱资源,建立资源家系,通过 QTL 扫描,人们已经鉴别出了许多影响猪重要经济性状的 QTL。猪 QTL 数据库(pig QTL db)收集了近 10 年所发表的 235 个性状的 1 129 个 QTL 数据^[11],这些数据使得比较、证实、定位猪重要经济性状的基因成为可能。本研究发现,在猪 *CACNA2D1* 基因定位区域存在 3 个分别影响母猪发情期排卵数、胴体肩胛重以及 10 周龄体重的 QTL,同时在定位区域附近还有影响猪屠宰 24 h 后肌肉 pH 值的 QTL,这与钙离子通道具有重要而广泛的生理功能是相符的,这也表明猪 *CACNA2D1* 基因可能对猪繁殖性状、胴体性状、生长性状甚至肉质性状有潜在的影响,可作为影响猪这些生产性状的候选基因进行进一步研究。

[参考文献]

[1]

Mori Y, Friedrich T, Kim M S, et al. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel[J]. *Nature*, 1991, 350: 398-402.

[2]

Birnbaumer L, Qin N, Olcese R, et al. Structures and functions of calcium channel β subunits[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 1998, 30: 357-375.

[3]

Felix R, Gurnett C A, De M, et al. Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca^{2+} channel $\alpha 2\delta$ subunit[J]. *J Neurosci*, 1997, 17: 6884-6891.

[4]

Tuggle C K, Dekkers J C M, Reecy J M. Integration of structural and functional genomics[J]. *Animal Genetics*, 2006, 37 (Suppl. 1): 1-6.

[5]

Rohrer G A, Alexander L J, Hu Z L, et al. A comprehensive map of the porcine genome[J]. *Source Genome Research*, 1996, 6: 371-391.

[6]

Rohrer G A, Ford J J, Wise T H, et al. Identification of quantitative trait loci affecting female reproductive traits in a multi-generation Meishan-White composite swine population[J]. *J Anim Sci*, 1999, 77(6): 1385-1391.

[7]

Milan D, Bidanel J P, Iannuccelli N, et al. Detection of quantitative trait loci for carcass composition traits in pigs[J]. *Genet Sel Evol*, 2002, 34(6): 705-728.

[8]

Quintanilla R, Milan D, Bidanel J P. A further look at quantitative trait loci affecting growth and fatness in across between Meishan and Large White pig populations[J]. *Genet Sel Evol*, 2002, 34(2): 193-210.

[9]

de Koning D J, Harlizius B, Rattink A P, et al. Detection and characterization of quantitative trait loci for meat quality traits in pigs[J]. *J Anim Sci*, 2001, 79(11): 2812-2819.

[10]

Arbilly M, Pisant  A, Devor M, et al. An integrative approach for the identification of quantitative trait loci[J]. *Animal Genetics*, 2006, 37(Suppl. 1): 7-9.

[11]

亓小红, 吴克亮. 猪基因组信息资源的整合与利用[J]. *猪业科学*, 2006, 16(2): 16-17.

Qi X H, Wu K L. Integration and use of porcine genome informational resources[J]. *Swine Industry Science*, 2006, 16(2): 16-17.

(上接第 48 页)

[2]

Farid A, O'Reilly E, Dollard C, et al. Genetic analysis of ten sheep breeds using micro-satellite markers[J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 2000, 80: 9-17.

[3]

Saitbekova N, Gaillard C, Obexer-Ruff G, et al. Genetics diversity in Swiss goat breeds based on micro-satellite analysis[J]. *Animal Genetics*, 1999, 30: 36-41.

[4]

Charlier C. The mh gene causing double muscling in cattle maps to bovine chromosome 2[J]. *Mammalian Genome*, 1995, 6: 788-792.

[5]

储明星, 王吉振, 王爱国, 等. 小尾寒羊五个微卫星座位遗传多态性研究[J]. *遗传学报*, 2002, 29(6): 502-506.

Chu M X, Wang J Z, Wang A G, et al. Genetic polymorphisms of five microsatellite loci in small tail han sheep[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(6): 502-506. (in Chinese)

[6]

杜立新, 曹顶国. 小尾寒羊微卫星与 RAPD 标记的研究[J]. *遗传学报*, 2003, 30(11): 1041-1044.

Du L X, Cao D G. Studies on microsatellite and RAPD markers in little-tailed Han sheep[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30 (11): 1041-1044. (in Chinese)

[7]

贾 斌, 陈 杰, 赵茹茜, 等. 新疆 8 个绵羊品种遗传多样性和系统发生关系的微卫星分析[J]. *遗传学报*, 2003, 30(9): 847-854.

Jia B, Chen J, Zhao R Q, et al. Microsatellite analysis of genetic diversity and phylogenetic relationship of eight sheep breeds in Xinjiang[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(9): 847-854. (in Chinese).

[8]

萨姆布鲁克 J, 拉赛尔 D M. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 463-471.

Sambrook J, Russell D M. *Molecular cloning: A laboratory manual*[M]. Huang P T, Wang J X, Zhu H C, et al. Translated. Beijing: Science & Technology Press, 2002: 463-471. (in Chinese)

[9]

杨国忠, 张嘉保, 赵玉民, 等. 草原红牛及其杂种牛群体遗传变异与肉用性能的微卫星标记研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37 (2): 128-133.

Yang G Z, Zhang J B, Zhao Y M, et al. Study on the population genetic variation and microsatellite marker of beef performance of Grassland Red cattle and its hybrid[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica sinica*, 2006, 37(2): 128-133. (in Chinese)

[10]

刘 波. 秦川牛及其杂交后代生长发育性状的分子标记研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2005.

Liu B. Study on DNA molecular marker of growth development traits in Qin Chuan Cattle and its hybrid offspring Cattle [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A & F University, 2005. (in Chinese)