

大白猪 *AHR* 基因多态性与生长性状的关联研究

张志彬¹, 赵聪哲², 罗晓彤¹, 于永生^{1*}

(1. 吉林省农业科学院, 吉林 公主岭 136100; 2. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133002)

摘要: 为了研究大白猪芳香烃受体(AHR)多态性与生长性状的关联, 采用高分辨率熔解曲线(HRM)分型技术进行了基因分型, 结合生长性状进行了相关性分析。提取246头大白猪耳组织DNA, 进行混池测序, 筛查多态性位点, 针对发现的多态性位点重新设计引物, 利用HRM分型法对个体进行多态性检测, 结合已测定的生长性能数据进行关联分析。结果显示: 检测到一个多态性位点 38 332 C>T, 群体内存在C和T两个等位基因, CC、CT、TT三种基因型; χ^2 检验表明该位点的基因型频率和等位基因频率在种群中分布差异显著, 不符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 ($P>0.05$); 群体遗传学分析表明该位点在所检测群体中处于中度多态 ($0.25 \leq \text{PIC} \leq 0.5$); 关联分析发现该位点对6月龄体重和日增重的影响较为显著 ($P<0.05$)。综上, *AHR* 基因上的该位点多态性对大白猪的生长发育具有一定程度的影响, 可为后续选育提供参考。

关键词: 大白猪; 芳香烃受体; 多态性; 生长性能; 高分辨率熔解曲线

中图分类号: S828

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)04-0079-04

Association between *AHR* Polymorphisms and Growth Traits in Large White

ZHANG Zhibin¹, ZHAO Congzhe², LUO Xiaotong¹, YU Yongsheng^{1*}

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100; 2. Agricultural College, Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: In order to explore the association between polymorphism of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) and growth traits in Large White, high resolution melting analysis (HRM) was used for genotyping, and correlation analysis was carried out in combination with growth traits in this research. The DNA samples of the ear tissue from 246 Large White were extracted. After PCR amplification, the polymorphic sites in AHR were searched by mixed pool sequencing. The primers designed for the polymorphic loci were used to test for polymorphism by HRM, and the results were correlated with the growth traits data. The results showed that a mutation site 38,332 C>T, two alleles C and T, and three genotypes CC, CT and TT were detected in the AHR gene. The χ^2 suitability test showed that the genotype frequency and allele frequency of this site were significantly different among the populations, which was not consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium law ($P>0.05$). According to population genetics analysis, this site was moderately polymorphic ($0.25 \leq \text{PIC} \leq 0.5$). The mutation site of 38,332 C>T had a significant effect on the 6-month-old body weight and average daily weight ($P<0.05$) in the association analysis with growth traits. In summary, the mutation site of 38,332 C>T in AHR gene had a certain influence on the growth and development of Large White, which would provide a reference for Large White breeding.

Key words: Large White; AHR; Polymorphism; Growth traits; HRM

芳香烃受体(Aryl Hydrocarbon Receptor, AHR)是一种配体激活的转录因子, 在调节细胞色素

p450的生理活性、介导环境有毒有害物质毒性等方面发挥着重要作用^[1-2]。在免疫学研究领域, 肠道上皮内广泛存在的淋巴细胞会因AHR或AHR配体的缺乏而受到损伤, 引起上皮细胞损伤和免疫激活能力异常^[3]。AHR还具有调控细胞生理过程、细胞因子分泌水平、异常增殖、卵巢发育等功能^[4-5]。目前*AHR*基因在生猪领域主要集中在产仔数方面的研究^[6-7], 其多态性是否与生长性状相关缺乏研究。

收稿日期: 2019-11-07

基金项目: 吉林省科技厅重点科技攻关项目(20170204044NY);
吉林省农业科技创新工程(CXGC2021TD009)

作者简介: 张志彬(1982-), 男, 助理研究员, 从事猪遗传繁育研究。

通讯作者: 于永生, 男, 博士, 副研究员, E-mail: yuyongsheng2002@163.com

大白猪作为引进的优良猪种,具有生长快、饲料转化率高、瘦肉率高等优点,并且适应性好,在我国大部分区域都能饲养^[8]。种猪引进后需要进行持续选育,以防止其退化。分子育种技术可在早期利用分子标记技术对个体进行评价,这就需要快速诊断个体的基因型。高分辨率熔解曲线(High Resolution Meltanalysis, HRM)分型是利用不同碱基导致的熔解曲线差异来区分基因型,具有成本低、效率高、特异性好等优点,为基因分型提供了技术手段^[9-10]。

本研究以引进的大白猪为研究对象,利用HRM对*AHR*基因的多态性开展检测,结合生长性状数据进行关联分析,以期为大白猪的分子育种提供素材。

表1 PCR和HRM检测引物

基因	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)	产物大小(bp)	延伸时间(s)
<i>AHR</i>	F:TCTCAAAGTTCATGGTTCCCACT	56.5	964	29
	R:GAGGACAACCAAAAGGCACG			
<i>HRM-AHR</i>	F:TTTATCTCTGCCCTGCTT	50.7	81	30
	R:GCCAACTACTGTATTCATTCA			

Premier 5设计引物。针对多态性位点区域,利用Beacon Designer 7设计HRM引物。引物序列见表1。

1.5 PCR扩增

在20 μL PCR反应体系中加入2×Taq MasterMix10 μL、上下游引物各0.5 μL、DNA模板1 μL、ddH₂O 8 μL。94℃预变性5 min,然后按照94℃变性30 s,退火(温度见表1)30 s,72℃延伸15 s的程序进行34个循环,72℃最终延伸8 min,4℃保存。利用1%琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行鉴定。

1.6 高分辨率熔解曲线分析

在20 μL反应体系中加入2×FastStart TaqDNA混合物10 μL、上下游引物各1 μL、DNA模板1 μL, MgCl₂ 2 μL, ddH₂O 5 μL。95℃预变性10 min,然后按照95℃变性10 s,退火(温度见表1)30 s,72℃延伸30 s的程序进行55个循环。最后95℃1 min,40℃1 min,65℃10 s,每1℃收集信号25次,最终40℃冷却10 s。利用HRM分析软件分析熔解结果。

1.7 统计分析

1.7.1 多态性统计分析

多态性位点的基因频率及基因型频率采用Excel进行分析,期望杂合度(expected heterozygosity, *He*)、观测杂合度(observational heterozygosity, *Ho*)、有效等位基因数(effective allele number, *Ne*)

1 材料和方法

1.1 实验材料

采集246头具有生长性能测定数据的大白猪耳组织,用于基因组DNA提取。

1.2 主要试剂及仪器

基因组DNA提取试剂盒购自Axygene公司,Taq MasterMix购自Takara公司,LightCycler® 480 HRM Master Mix购自Roche公司。

1.3 基因组DNA提取及浓度质量检测

按照试剂盒说明书提取耳组织基因组DNA,测定浓度和评价DNA质量后稀释,-20℃保存。

1.4 引物设计

根据*AHR*序列(NM_001303026.1),利用Primer-

和多态信息含量(polymorphic information content, PIC)等群体遗传学参数利用SPSS Statistics进行分析, χ^2 检验是否符合Hardy-Weinberg平衡定律。

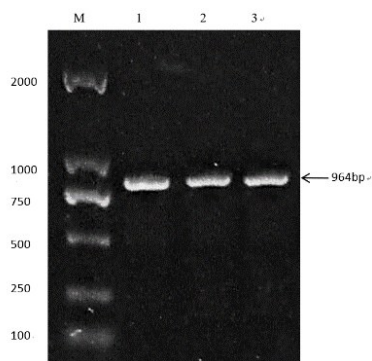
1.7.2 数据统计分析

利用单因素方差分析统计个体基因型与生长性状的关联性,邓肯氏法(Duncan's)分析显著性。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增结果

电泳结果显示,获得了预期大小的片段(图1)。



注:M为Marker DL2000,1、2、3为*AHR*基因PCR产物

图1 大白猪*AHR*基因PCR扩增产物

2.2 测序验证

将多个个体的PCR产物进行混池测序,在第10外显子检测到多态性位点38 332 C>T,对部分个体进

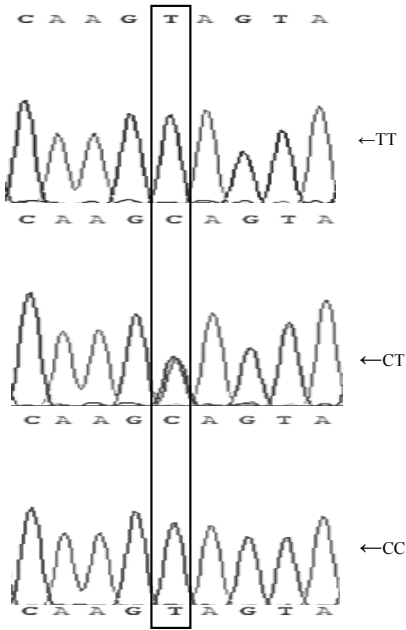


图2 *AHR* 基因测序峰图

行测序,发现存在TT、CT和CC三种基因型(图2)。

2.3 HRM 基因分型

对大白猪个体进行 HRM 基因分型,获得了 CC、CT 和 TT 基因型的预期集合(图3)。

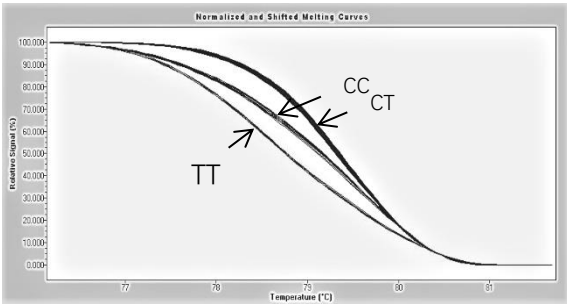


图3 利用 HRM 对大白猪 *AHR* 基因进行分型

2.4 大白猪 *AHR* 基因的多态性分析

在所测定的群体中,CT型个体最多,C为优势基因,突变位点 $\chi^2 > \chi^2_{0.05(2)}$,表明该位点未处于 Hardy-Weinberg 平衡状态($P < 0.05$)(表2)。该多

表2 基因 *AHR* 的基因频率和基因型频率

基因	样本量(头)	基因型频率			基因频率		χ^2
		TT	CT	CC	T	C	
<i>AHR</i>	246	0.142 (35)	0.634 (156)	0.224 (55)	0.459	0.541	17.36

注: $\chi^2_{0.05(2)} = 5.991$, $\chi^2_{0.01(2)} = 9.21$

态性位点 N_e 均接近于 2, PIC 均在 0.25~0.5,说明处于中度多态(表3)。

表3 基因 *AHR* 的多态性检测

基因	纯合度	杂合度	有效等位基因数	多态信息含量
<i>AHR</i>	0.502	0.498	1.992	0.374

注: PIC<0.25,低度多态; 0.25≤PIC≤0.5,中度多态; PIC>0.5,高度多态

2.5 大白猪 *AHR* 基因的多态性与生长性状关联分析

将不同基因型个体的生长性状指标进行统计和显著性分析,发现该多态性位点对6月龄体重、日增重指标具有显著的影响($P < 0.05$),对于其他指标无显著影响($P > 0.05$)(表4)。

3 讨 论

目前对 *AHR* 基因的研究多集中在医学领域,尤其是免疫与肿瘤领域^[11-13]。在畜牧领域,研究发现猪发情周期的卵泡期和黄体期在生殖和神经内分泌组织中均可检测到 *AHR* 的表达,并且存在一定的表达水平差异性,说明 *AHR* 参与猪的生殖

表4 *AHR* 基因第 10 外显子 38 332 C>T 多态性与生长性能的关联分析

指标	基因型		
	CC	CT	TT
出生重(kg)	1.508±0.065	1.497±0.068	1.494±0.704
20天重(kg)	5.390±0.124	5.355±0.126	5.400±0.128
断奶重(kg)	7.669±0.176	7.706±0.183	7.661±0.192
2月龄体长(cm)	71.90±1.153	71.83±1.114	72.24±1.226
2月龄体高(cm)	41.33±0.834	41.58±0.903	41.15±0.972
2月龄体重(kg)	21.85±1.255	21.98±2.181	21.85±1.326
6月龄体重(kg)	116.9±1.083a	114.5±1.018ab	112.1±1.124b
6月龄体长(cm)	117.7±1.700	117.4±1.695	117.7±1.594
6月龄体高(cm)	72.60±1.333	72.57±1.290	72.27±1.376
日增重(kg)	0.648±0.089a	0.635±0.090ab	0.618±0.086b

注:同行数据后小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),小写字母相同或无字母标注表示差异不显著($P > 0.05$)

功能的调节^[14]。研究表明,在大白猪和长白猪群体中 *AHR* 基因的拷贝数存在变异,且该变异与产仔数、活仔数显著相关,因此, *AHR* 基因上可能含有潜在的分子遗传标记^[15]。但 *AHR* 基因上是否存在与生产性能相关的分子标记尚不明确。

本研究在混池测序基础上,通过HRM技术对大白猪*AHR*基因特定位点的多态性进行了分析,进而结合大白猪生长性状测定数据开展了关联分析,在第10外显子38 332处检测多态性位点(C>T),CT基因型个体在所检测的群体中是优势基因型个体,C为优势等位基因。群体遗传学分析显示该突变位点未处于Hardy-Weinberg平衡状态($P<0.05$),说明位点受选择压力较大,可能发生了过遗传漂变;该多态性位点的纯合度(H_o)与杂合度(H_e)十分接近,表明该位点具有较高的遗传均匀性,高水平的杂合度数值说明等位基因间的差异较大,遗传丰富度较高。在检测群体中*AHR*上的该多态性位点的有效等位基因数接近2,表明该等位基因分布比较均匀,PIC值介于0.25与0.5之间,表明该多态性属于中度多态,因此具有一定的遗传潜力,可以承受持续的人工选择压力。关联性分析显示,*AHR*基因上的该多态性位点对于6月龄体重和日增重的影响较为显著($P<0.05$),而6月龄是目前白猪出栏的时间,从具体的测定数据来看,TT型个体测定值小于CT型和CC型个体,因此利用该位点可以在出栏体重和日增重指标方面进行早期选择,逐渐提高等位基因的频率。该多态性位点对仔猪出生重、断奶重、2月龄和6月龄体长体高等指标未发现显著影响($P>0.05$)。

4 结 论

在大白猪*AHR*基因第10外显子发现38 332 C>T多态性位点,该位点对于6月龄大白猪体重和日增重具有较为显著的影响($P<0.05$),对其他生长性状未发现显著影响($P>0.05$),该位点可能是潜在的影响猪肉生长性状的分子标记位点。

参考文献:

- [1] Sadowska A, Paukszto L, Nynca A, et al. Transcript variations, phylogenetic tree and chromosomal localization of porcine aryl hydrocarbon receptor (AhR) and AhR nuclear translocator (ARNT) genes[J]. *Journal of Genetics*, 2017, 96(1): 75-85.
- [2] 么秀华,徐立霞,闫 华.芳香烃受体调节免疫应答的研究进展[J]. *免疫学杂志*, 2019, 35(1): 84-88.
- [3] Li Y, Innocentin S, Withers D R, et al. Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation[J]. *Cell*, 2011, 147(3): 629-640.
- [4] 范丽萍,孙 凯,张永为,等. UC中芳香烃受体AHR的表达及其对IL-17信号效应调控的研究[J]. *浙江临床医学*, 2018, 20(4): 643-645.
- [5] Zhu Y L, Li W B, Yang B, et al. Signatures of selection and interspecies introgression in the genome of chinese Domestic pigs [J]. *Genome Biology Evolution*, 2017, 9(10): 2592-2603.
- [6] 张 倩,方宇瑜,李平华,等. *ESR*、*FSHβ*、*AHR*基因多态性对二花脸猪产仔数的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2019, 42(6): 1150-1157.
- [7] 陈 浩. 利用全基因组重测序鉴别法系大白猪的高产仔基因[D]. 南昌: 江西农业大学, 2018.
- [8] 杨公社. 猪生产学(第14版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013: 42-43.
- [9] 嘎利兵嘎. 高分辨率熔解曲线(HRM)技术在动物病毒基因分型中的研究及应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [10] 陈焱森,沈永巧,祁梦凡,等. 应用高分辨溶解曲线(HRM)技术分析猪微卫星多态性[J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(1): 9-14.
- [11] 张国楠,朱 熠,黄建鸣. 对靶向MyD88、IDO1和AHR为中心的免疫抑制信号通路和卵巢上皮性癌免疫治疗的思考[J]. *中华妇产科杂志*, 2018, 53(7): 448-451.
- [12] Wu C C, Yu S R, Tan Q X, et al. Role of AhR in regulating cancer stem cell-like characteristics in choriocarcinoma[J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(18): 2309-2320.
- [13] 何 珩,张智慧. AHR与肿瘤发生发展相关性的研究进展[J]. *肿瘤预防与治疗*, 2017, 30(3): 226-231.
- [14] Jablonska O, Piasecka J, Ostrowska M, et al. The expression of the aryl hydrocarbon receptor in reproductive and neuroendocrine tissues during the estrous cycle in the pig[J]. *Animal Reproduction Science*, 2011, 126(03-04): 221-228.
- [15] 杨凯捷. 猪*AHR*基因拷贝数变异及其与繁殖性状的关联研究[D]. 晋中: 山西农业大学, 2015.

(责任编辑:刘洪霞)

[1] Sadowska A, Paukszto L, Nynca A, et al. Transcript variations,