

猪 SDHD 和 DCN 基因多态性及遗传印记

李莉¹, 贾同¹, 吴同山², 张豪¹, 张守全¹

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室, 广东 广州 510642;

2 东莞市畜牧科学研究所, 广东 东莞 523086)

摘要:为揭示猪 SDHD 和 DCN 基因印记表达特征,该研究以长白、大白、蓝塘 3 个品种的 166 头纯种猪为试验材料,在猪的 SDHD 和 DCN 基因的外显子内寻找 SNP,通过 PCR-SSCP 方法对 SDHD 和 DCN 基因多态性进行检测;分别选取 SDHD 基因外显子 4 和 DCN 基因外显子 2 的 SNP 为杂合子的仔猪 3 头,以其主要的组织器官 mRNA 的产物分别进行 RT-PCR-RFLP 电泳和 RT-PCR-SSCP 电泳. 结果表明:SDHD 基因外显子 4 中有 1 个单核苷酸多态性位点,即 131 位碱基由 G 突变为 T,且该位点为 *Mbo*I 酶切位点;DCN 基因外显子 2 中有 1 个单核苷酸多态性位点,即编码区 30 位碱基由 T 突变为 A;SDHD 基因外显子 4 和 DCN 基因外显子 2 在上述 3 头仔猪的胃、胸腺、胰、脾、肺、肌肉、肝、舌、肾、脑、膀胱、心脏等主要组织器官和胎盘同时表达父母双方来源的等位基因. 可见,SDHD 和 DCN 基因在猪呈父母双方表达的遗传特征.

关键词:猪; SDHD 基因; DCN 基因; SNP; 遗传印记

中图分类号:S813.1

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2011)03-0087-05

Study on SNPs and Genomic Imprinting of the SDHD and DCN Gene in Swine

LI Li¹, JIA Tong¹, WU Tong-shan², ZHANG Hao¹, ZHANG Shou-quan¹

(1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Agro-Animal Genomics and Molecular Breeding, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Animal Science Institute of Dongguan, Dongguan 523086, China)

Abstract: In order to investigate the imprinting pattern of SDHD and DCN, one hundred and sixty-six samples were used to scan the SNPs of SDHD and DCN from Landrace, Yorkshire and Lantang breeds by PCR-SSCP; Expression of SDHD exon 4 and DCN exon 2 were observed in organs and placenta of three heterozygous piglets by RT-PCR-RFLP/SSCP. One SNP (a G→T transition) was identified in exon 4 of SDHD, located at the 131st nucleotide (5→3), which was a *Mbo*I restriction site. One SNP (a T→A transition) was identified in exon 2 of DCN, located at the 30th nucleotide. Biallelic expression of exon 4 of SDHD and exon 2 of DCN were showed in the main organs (stomach, thymus, pancreas, spleen, lung, muscle, liver, tongue, kidney, brain, bladder, heart) and placenta of three heterozygous pigs. In conclusion, SDHD and DCN were biallelically expressed in swine.

Key words: swine; SDHD gene; DCN gene; SNP; genomic imprinting

琥珀酸盐泛醌氧化还原酶亚基 D 基因 (Succinate-ubiquinone oxidoreductase subunit D, SDHD) 编码琥珀酸盐泛醌氧化还原酶复合体中细胞色素 b 的 1 个亚基,琥珀酸盐泛醌氧化还原酶复合体在三羧酸循环和线粒体电子呼吸链中具有重要的作用^[1].

SDHD 基因定位于人的 11 号染色体^[2]、猪的 9 号染色体和小鼠的 9 号染色体上. 人的 SDHD 基因序列已基本清楚,包括外显子和内含子共约 19 kb,有 4 个外显子. 猪 SDHD 基因的外显子长约 1 kb,也有 4 个外显子,翻译为多肽长度约 160 个氨基酸残基.

收稿日期:2010-08-13

作者简介:李莉(1971—),女,畜牧师,硕士;通信作者:张守全(1964—),男,教授,博士,E-mail: sqzhang@scau.edu.cn

基金项目:国家 973 计划(2011CB944202);国家自然科学基金(U0731004);国家转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08006-004)

SDHD 是典型的启动子缺少 TATA 的看家基因,它的表达需要转录因子的协调配合,这些转录因子包括核呼吸因子 NRF1 和 NRF2. Baysal 等^[1]研究发现:在胎儿脑、肾脏和成人脑、淋巴细胞中 SDHD 基因呈父母双方表达. 然而, Badenhop 等^[3]研究表明:SDHD 基因在患副神经节瘤的个体中只表达来自父方的等位基因,而羊和牛 SDHD 基因在主要组织中呈父母双方表达^[4].

饰胶蛋白(Decorin, DCN)基因编码 1 个小的富含亮氨酸的蛋白多糖,而此蛋白多糖是组织连接的一个组成部分,它紧贴在胶原质上,并在胶原质聚集到纤维上的过程中发挥重要作用. 此外还参与细胞的增殖及分化并可依其核心蛋白成分与转化生长因子 β (Transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 结合而中和其活性,它是 TGF- β 1 活性的一种负反馈调节因子^[5]. 近年来,一些学者经试验证实 DCN 基因具有抑制肿瘤细胞生长的作用,如 Nash 等^[6]曾观察到外源性添加 DCN 基因不仅可抑制卵巢癌细胞的生长,还可改变其恶性表型; Koninger 等^[7]发现 DCN 基因可以通过细胞生长周期的 G1/S 关卡点阻滞、延缓胰腺癌细胞增殖; Biglari 等^[8]通过给 Lewis 大鼠颅内接种胶质瘤细胞株,发现表达 DCN 基因的 CNS21 细胞株接种的大鼠,体内瘤体生长明显减缓;另外也有学者通过转染 DCN 基因以期达到治疗胶质瘤的目的^[9]. DCN 基因分别定位于人的 12 号、鼠的 10 号、牛的 5 号染色体上. 人的 DCN 基因序列基本清楚,其序列总长约 38 kb,含有 8 个外显子和 7 个较大的内含子,其中 2 个长约 5.4 和 13.2 kb. 在 5' 非翻译区域有 2 种外显子剪接形式,起始外显子 Ia 和 Ib. 猪 DCN 基因外显子总长约 1.5 kb,翻译为多肽长度约 360 个氨基酸残基. Mizuno 等^[10]发现 DCN 基因在小鼠的胎盘组织表达母方来源的等位基因,在其他组织呈父母双方表达. 牛的 DCN 基因在各种组织中表达父方来源的等位基因^[4].

本研究采用 SSCP (Single-strand conformational polymorphism) 方法分别寻找 SDHD 和 DCN 基因的外显子里 SNP,然后利用 RT-PCR 技术对猪的 SDHD 和 DCN 基因作印记分析,试图揭示 SDHD 和 DCN 基因在猪上的印记遗传状况. 对 SDHD 和 DCN 基因印记状况的研究将为印记基因与家畜生长发育和生产的系谱研究打下基础,同时也进一步验证哺乳动物基因组印记的保守性.

1 材料与方法

1.1 材料

采用广东板岭原种猪场的长白猪(100 头)、大白猪(34 头)和蓝塘(32 头)3 个品种共 166 头样品.

1.2 PCR-SSCP 多态性检测

酚仿抽提法提取猪耳组织中的基因组 DNA,参考猪 SDHD 基因(DQ486897)的 DNA 序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)设计引物, S077 F: 5'-GCATTGGACAAGTCGTTAC-3', S078 R: 5'-CTCAGAGCTTCCACAACAT-3'; 参考猪 DCN 基因(NM_213920)的 DNA 序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)设计引物, S079 F: 5'-GGCAACTATCGTCTTCCTCTT-3', S080 R: 5'-CTCAGAGCTTCCACAACAT-3'. 25 μ L PCR 反应体系包括: 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 正反向引物各 8 μ mol/L, 200 μ mol/L dNTP, 1.5 mmol/L Mg^{2+} 离子. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 进行 30 个循环; 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min.

SSCP: 3 μ L PCR 产物与 8 μ L 凝胶上样缓冲液(98 g/L 甲酰胺, 20 mmol/L EDTA, 0.05 g/L 二甲苯腈, 0.05 g/L 溴酚蓝)混匀上样. 聚丙烯酰胺凝胶浓度为 12 g/L, 150 V 电泳约 24 ~ 30 h, 银染显色.

1.3 克隆测序

经 SSCP 分析后,以杂合基因型个体的 PCR 扩增产物送至上海生工生物技术有限公司测序.

1.4 酶切反应(PCR-RFLP)

取 8 μ L PCR 产物与 3 U 限制性内切酶 *Mbo*I 及 0.9 μ L 10 $\times$ Buffer 混合, 37 $^{\circ}$ C 酶切过夜, 然后用 3 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.5 印记分析

1.5.1 样本的选择 选择 SNP 基因型母猪为纯合子、仔猪为杂合子的仔猪(15 日龄)3 头, 屠宰后采集胃、胸腺、胰、脾、肺、肌肉、肝、舌、肾、脑、膀胱、心脏, 液氮保存. 另在仔猪出生时采集胎盘, 液氮保存.

1.5.2 组织总 RNA 的提取 组织总 RNA 用 Trizol (Invitrogen 公司)试剂提取, 方法参照试剂盒说明.

1.5.3 RT-PCR 反转录反应体系: 4 μ L 5 $\times$ AMV Buffer(含 Mg^{2+}), 2 μ L 10 mmol/L dNTPs, 1 μ L Oligod(T)18 (50 μ mol/L), 0.5 μ L RNasin(40 U/ μ L), 1 μ L AMV RTase (5 U/ μ L), 4 μ L 模板 RNA, 加 DEPC 水至 24 μ L. 反转录反应条件: 将上述组分混匀后于 42 $^{\circ}$ C 温浴 20 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min, cDNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存. PCR 反应体系和反应条件同 1.2.

1.5.4 SSCP 胶电泳 方法见 1.2.

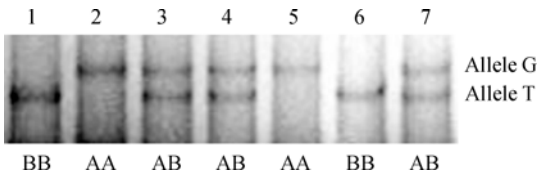
1.6 统计分析

用 χ^2 检验分析 SNP 基因型是否符合 Hardy-Weinberg 平衡.

2 结果与分析

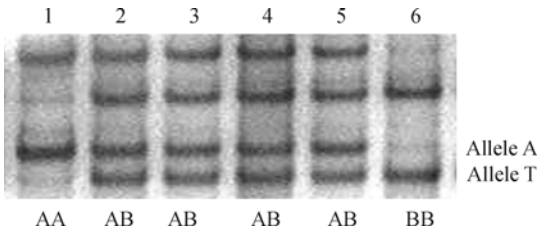
2.1 多态性检测

随机抽取 6~7 头猪耳组织中的基因组 DNA,然后进行 PCR-SSCP 多态性检测,结果在 SDHD 外显子 4 区域和 DCN 外显子 2 区域中分别发现 1 个多态位点,电泳结果见图 1 和图 2。



2、5 为纯合子 AA,1、6 为纯合子 BB,3、4、7 为杂合子 AB.
图 1 SDHD 基因外显子 4 的 PCR-SSCP 分析结果

Fig.1 PCR-SSCP profiles in exon 4 of SDHD gene



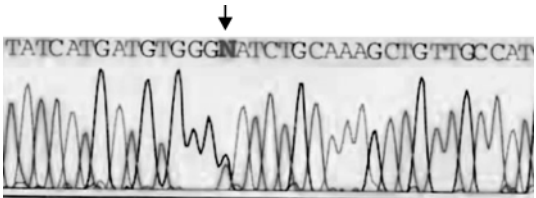
1 为纯合子 AA,2、3、4、5 为杂合子 AB,6 为纯合子 BB.
图 2 DCN 基因外显子 2 的 PCR-SSCP 分析结果

Fig.2 PCR-SSCP profiles in exon 2 of DCN gene

2.2 猪 SDHD 基因外显子 12 区域和 DCN 基因外显子 2 区域的多态测序验证

以基因型为 AB 的样本,PCR 扩增后进行测序,

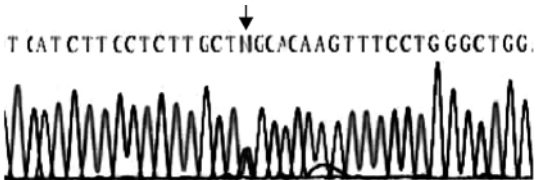
发现猪 SDHD 基因外显子 4 区域的第 131 个(从 5'端开始)碱基 G 突变成 T(图 3),并发现此 SNP 是 MboI 酶切位点;猪 DCN 基因外显子 2 编码区的第 30 个碱基(从 5'端开始)碱基 T 突变成 A(图 4)。



碱基(5'→3')G 突变为 T.

图 3 猪 SDHD 基因外显子 4 区域的 SNP 序列图谱

Fig.3 Sequencing results of SNP in exon 4 of SDHD gene



碱基(5'→3')T 突变为 A.

图 4 猪 DCN 基因外显子 2 区域的 SNP 序列图谱

Fig.4 Sequencing results of SNP in exon 2 of DCN gene

2.3 猪 SDHD 基因外显子 4 区域和 DCN 基因外显子 2 区域的 SNP 基因型频率

对 166 头长白、大白和蓝塘猪样品用 PCR-RFLP 方法进行了 SNP 基因型检测,其具体的基因型频率结果见表 1 和表 2。

表 1 猪 SDHD 基因外显子 4 的 SNP 不同基因型分布频率

Tab.1 Allelic frequencies of SNP in exon 4 of SDHD gene

品种	数量/头	AA		BB		AB		Hardy-Weinberg 平衡检验
		数量/头	基因频率	数量/头	基因频率	数量/头	基因频率	
长白	100	51	0.510	12	0.120	37	0.370	$P>0.05$
大白	34	14	0.412	8	0.235	12	0.353	$P>0.05$
蓝塘	32	2	0.063	18	0.562	12	0.375	$P>0.05$
合计	166	67	0.404	38	0.229	61	0.367	$P>0.05$

表 2 猪 DCN 基因外显子 2 的 SNP 不同基因型分布频率

Tab.2 Allelic frequencies of SNP in exon 2 of DCN gene

品种	数量/头	AA		BB		AB		Hardy-Weinberg 平衡检验
		数量/头	基因频率	数量/头	基因频率	数量/头	基因频率	
长白	100	0	0	84	0.840	16	0.160	$P>0.05$
大白	34	0	0	26	0.765	8	0.230	$P>0.05$
蓝塘	32	4	0.125	12	0.375	16	0.500	$P>0.05$
合计	166	4	0.024	122	0.735	40	0.241	$P>0.05$

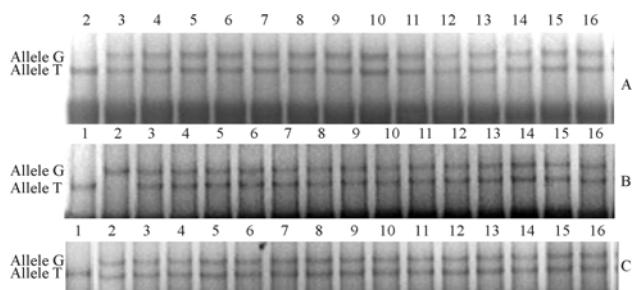
由表 1 和表 2 可知 SDHD 基因外显子 4 区域和 DCN 基因外显子 2 区域的 SNP 基因型频率在 3 个品

种猪中分布平衡($P>0.05$),说明了在自然和人工选择中对群体该基因座的影响不显著。

2.4 猪 SDHD 基因外显子 4 区域和 DCN 基因外显子 2 区域遗传印记表达

选择猪 SDHD 基因外显子 4 区域的 SNP 基因型为杂合子 AB 的 3 头仔猪(仔猪编号分别为 008-2、042280-1、0344904-1)及其母亲 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,获得特异条带后与仔猪的各主要器官 RT-PCR 产物一起进行 SSCP 胶电泳,结果见图 5。

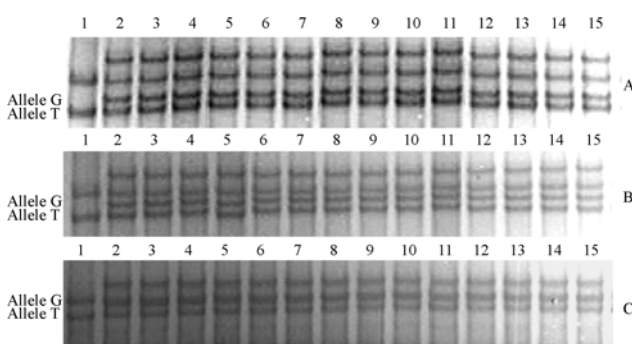
选择猪 DCN 基因外显子 2 区域的 SNP 基因型为杂合子 AB 的 3 头仔猪(仔猪编号分别为 3-4、5-2、008-2)及其母亲 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,获得特异条带后与仔猪的各主要器官 RT-PCR 产物一起进行 SSCP 胶电泳,结果见图 6。



A、B、C 分别为 008-2、042280-1、0344904-1 仔猪各组织器官 RNA RT-PCR 产物的 SSCP-PAGE,其中 1~3 为 DNA 的 PCR 产物,1 为父亲,2 为母亲,3 为仔猪,4~16 分别为仔猪的胃、胸腺、胰、脾、肺、肌肉、肝、舌、胎盘、肾、脑、膀胱、心脏。

图 5 猪 SDHD 基因外显子 4 区域遗传印记表达

Fig. 5 Genomic imprinting expression in exon 4 of the SDHD gene in swine



A、B、C 分别为 3-4、5-2、008-2 仔猪各组织器官 RNA RT-PCR 产物的 SSCP-PAGE. 其中 1、2 为 DNA 的 PCR 产物,1 为母亲,2 为仔猪,3~15 分别为仔猪的胃、胸腺、胰、脾、肺、肌肉、肝、舌、胎盘、肾、脑、膀胱、心脏。

图 6 猪 DCN 基因外显子 2 区域遗传印记表达

Fig. 6 Genomic imprinting expression in exon 2 of the DCN gene in swine

由图 5 可知猪 SDHD 基因外显子 4 在以上 3 头仔猪的胃、胸腺、胰、脾、肺、肌肉、肝、舌、胎盘、肾、脑、膀胱、心脏等器官中同时表达父母双方来源的等

位基因,证明 SDHD 基因在仔猪上呈父母双方表达的遗传特性。

由图 6 可知猪 DCN 基因外显子 2 在以上 3 头仔猪的胃、胸腺、胰、脾、肺、肌肉、肝、舌、胎盘、肾、脑、膀胱、心脏等器官中同时表达父母双方来源的等位基因,证明 DCN 基因在仔猪上呈父母双方表达的遗传特性。有研究表明 DCN 基因在小鼠的胎盘组织表达母方来源的等位基因^[10],由此可知,DCN 基因在猪和小鼠胎盘中的表达不一样。

3 讨论

由于 SDHD 基因在呼吸链中的重要性,同时 SDHD 基因作为抑癌基因参与嗜铬细胞瘤(Pheochromocytoma, PCC)等的发生^[11],因此在人的其他组织或其他物种方面,研究 SDHD 基因的印记状况会有重要意义。来源于患副神经节瘤人群的组织样本,通过 RT-PCR 分析证明,人 SDHD 基因为表达父方来源的等位基因^[12]。另外,引起遗传性副神经节瘤的最常见原因是 SDHD 基因的突变,由 SDHD 基因突变导致的副神经节瘤是由父系传递的,这表明 SDHD 缺陷基因的表达受到基因组印记的修饰作用。SDHD 基因包含了位于来自母亲的染色体 11q22-23 的等位基因杂合性丢失区,这与实际上的副神经节瘤由父系传递而不是母系传递存在矛盾。由基因印记的传递模式的提示做出假设,在正常的副神经节 SDHD 基因不被完全修饰,或者在肿瘤形成期间基因印记对 SDHD 基因的抑制发生松弛。对 SDHD 基因野生型等位基因的缺失与等位基因的杂合性丢失引起功能缺失的突变体的观察表明 SDHD 基因是编码线粒体蛋白质的首要的抑癌基因。然而, Baysal 等^[1]的研究发现,SDHD 基因在胎儿和成人的大脑及胎儿的肾脏和成人的淋巴组织中都表达父母双方来源的基因。而且在羊和牛研究^[4,13]方面,SDHD 基因都表现为表达父母双方来源的基因。本试验通过 PCR-SSCP 方法对猪的 SDHD 基因多态性进行检测,发现该基因外显子 4 中有一个单核苷酸多态性位点,即 131 位碱基由 G 突变为 T,且该位点为 *Mbo*I 酶切位点,同时也证明猪 SDHD 基因表现为表达父母双方来源基因。

本试验还通过在 DCN 基因不同的外显子上设计引物进行基因型分析,结果在 DCN 基因外显子 2 上发现一个 SNP,从而以此为标记,研究了 DCN 基因的表达状况。在哺乳动物中,只有小鼠和牛的 DCN

基因的表达情况已研究清楚.小鼠DCN基因除了在胎盘为母方表达,父方印记外,在所有其他的组织(包括:脑、皮肤、心脏、肝、肺、肾、胸腺、肠、肌肉等)都为表达父母双方的基因^[10].而与小鼠所不同的是,牛DCN基因在所有的检测组织都为表达父母双方的基因^[4].DCN基因在2个物种上印记情况的差异可能与它们胎盘的发育和结构不同有关,比如小鼠和人的胎盘在形态发生和内分泌功能2方面都存在差异一样^[14].而且,牛或羊的胎盘的发育是由胎盘特异性表达基因决定的,牛上有一个生长激素基因,但没有证据表明它在胎盘中表达,而在绵羊上有2个生长激素基因在怀孕早期都表达^[15].胎盘特异性调控的另一个机制是通过基因组印记来实现的,比如,类胰岛素生长因子-2(IGF-2)的印记缺失会导致牛或羊胎盘和胎儿生长畸形.而猪IGF-2基因为父方表达的印记基因,作用是使个体健康成长和具备较强的生存能力,促进胎儿迅速生长,促进胎盘的发育并为胎儿提供更多的营养,以期获得强壮的个体.而本试验的结果显示:猪的DCN基因的表达情况与牛DCN基因的表达情况是一致的,而与小鼠DCN基因表现出胎盘上的印记表达不同,而这种不同可能是由于2个物种胎盘的发育和结构不同以及胎盘特异性表达基因是否表达而引起的.也许猪DCN基因的表达并不参与猪胎盘生长发育的调控系统,这有待于进一步研究.

参考文献:

- [1] BAYSAL B E, FERRELL R E, WILLETT-BROZICK J E, et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma[J]. Science, 2000, 287(5454):848-851.
- [2] KYTOLA S, NORD B, EDSTROM E E, et al. Alterations of the SDHD gene locus in midgut carcinoids, Merkel cell carcinomas, pheochromocytomas, and abdominal paragangliomas[J]. Genes Chrom Cancer, 2002, 34(3):325-332.
- [3] BADENHOP R F, CHERIAN S, LORD R S, et al. Novel mutations in the SDHD gene in pedigrees with familial carotid body paraganglioma and sensorineural hearing loss[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2001, 31(3):255-263.
- [4] KHATIB H. The COPG2, DCN and SDHD genes are biallelally expressed in cattle[J]. Mamm Genome, 2005, 16(7):545-552.
- [5] NISHIMURA T, FUTAMI E, TANEICHI A, et al. Decorin expression during development of bovine skeletal muscle and its role in morphogenesis of the intramuscular connective tissue[J]. Cells Tissues Organs, 2002, 171(2/3), 199-214.
- [6] NASH M A, DEEVERS M T, FREEDMAN R S. The expression of decorin in human ovarian tumors[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(6):1754-1760.
- [7] KONINGER J, GIESE N A, MOLA F F, et al. Overexpressed decorin in pancreatic cancer: potential tumor growth inhibition and attenuation of chemotherapeutic action[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(14):4776-4783.
- [8] BIGLARI A, BATAILLE D, NAUMANN U, et al. Effects of ectopic decorin in modulating intracranial glioma progression *in vivo* in a rat syngeneic model[J]. Cancer Gene Ther, 2004, 11(11):721-732.
- [9] STANDERT M, NAUMANN U, DUMITRESCU L, et al. Decorin gene transfer-mediated suppression of TGF-beta synthesis abrogates experimental malignant glioma growth *in vivo*[J]. Gene Ther, 1998, 5(9):1187-1194.
- [10] MIZUNO Y, SOTOMARU Y, KATSUZAWA Y, et al. Asb4, Ata3, and Dcn are novel imprinted genes identified by high-throughput screening using RIKEN cDNA microarray[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(5):1499-1505.
- [11] GIMM O, ARMANIOS M, DZIEMA H, et al. Somatic and occult germline mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in nonfamilial pheochromocytoma[J]. Cancer Res, 2000, 60(24):6822-6825.
- [12] BADENHOP R F, CHERIAN S, LORD R S, et al. Novel mutations in the SDHD gene in pedigrees with familial carotid body paraganglioma and sensorineural hearing loss[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2001, 31(3):255-263.
- [13] KHATIB H. Characterization and analysis of the imprinting status of the ovine SDHD and COPG2 Genes[J]. Anim Genet, 2005, 36(2):186-188.
- [14] MALASSINE A, FRENDON J L, EVAIN - BRION D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model[J]. Hum Reprod Update, 2003, 9(6):531-539.
- [15] GOOTWINE E. Placental hormones and fetal-placental development[J]. Anim Reprod Sci, 2004, 82/83:551-566.

【责任编辑 柴 焰】