

# mRNA 差异显示技术研究中外猪种肉质性状差异表达基因

覃立立, 童雄, 徐建, 张豪, 李加琪, 王翀

(华南农业大学 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)

**摘要:**利用 mRNA 差异显示技术对广东省地方品种蓝塘猪和引进品种大白猪达到经济成熟时的眼肌组织 mRNA 进行比较分析,并对差异显示条带回收产物进行 PCR 扩增,检测到与肉质性状相关的 5 条 EST<sub>s</sub>。在 2 个猪种中存在表达差异,其中 EST<sub>sp7</sub> 在大白猪种中表达量高,而 EST<sub>sp8</sub>、EST<sub>sp9</sub>、EST<sub>sp10</sub> 和 EST<sub>sp11</sub> 在蓝塘猪中表达量高于大白猪。通过 NCBI 检索发现,EST<sub>sp7</sub> 序列与细胞色素 c 氧化酶亚单位 III 基因在 473 bp 的范围内相似性达到 100%, EST<sub>sp9</sub>、EST<sub>sp10</sub> 和 EST<sub>sp11</sub> 与猪 SLN (Sarcoplipin) 基因相似性达到了 94% ~ 95%, 而 EST<sub>sp8</sub> 搜索不到相似基因。

**关键词:**猪; mRNA 差异显示技术; 肉质性状; EST<sub>s</sub>

中图分类号: S813.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2011)04-0082-04

## Study on the Different Expression of Meat Quality Candidate Genes Between the Local and Exotic Pig Breeds Using mRNA Differential Display Technology

QIN Li-li, TONG Xiong, XU Jian, ZHANG Hao, LI Jia-qi, WANG Chong

(Guangdong Provincial Key Lab of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding,  
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Comparative mRNA expression analysis of the ophthalmoplegia was made between Lantang (one of the Chinese indigenous pig breeds) and Large White using mRNA differential display technology. Differential expression bands were recycled and re-amplified. Different expressions of five EST<sub>s</sub> which were related to the meat quality traits were detected in the two pig breeds. EST<sub>sp7</sub> was expressed higher whereas EST<sub>sp8</sub>, EST<sub>sp9</sub>, EST<sub>sp10</sub> and EST<sub>sp11</sub> were expressed lower in the Large White. Through the NCBI, it was found that EST<sub>sp7</sub> and cytochrome oxidase subunit III gene in the range of 473 bp had 100% similarity. EST<sub>sp9</sub>, EST<sub>sp10</sub>, EST<sub>sp11</sub> and pig's SLN (Sarcoplipin) gene had 94% - 95% similarity. EST<sub>sp8</sub> was not matched with any other genes.

**Key words:** pig; mRNA differential display technology; meat quality traits; EST<sub>s</sub>

真核生物基因组中,只有约 10% ~ 15% 的基因在单个细胞中表达,因而从 mRNA 水平上研究差异表达的基因对于从事家畜育种工作者是一项非常有意义的工作. Liang 等<sup>[1]</sup>创立了 mRNA 差异显示技术 (DDRT-PCR) 以研究 mRNA 的表达差异. 李盛霖等<sup>[2]</sup>利用该技术对福州黑猪、肉用型猪和其他杂种猪的肉质特性进行了研究,结果表明福州黑猪的各项肉质指标均高于各引进肉用型猪种,福州黑猪

的肌肉 pH 为  $5.24 \pm 0.16$ , 肌肉颜色评分为  $4.33 \pm 0.21$ , 肌肉大理石纹评分为  $3.33 \pm 0.21$ , 失水率为  $(19.28 \pm 5.49)\%$ , 肌纤维直径为  $(43.05 \pm 6.12) \mu\text{m}$ . Lonergan 等<sup>[3]</sup>认为造成猪种生长和肉质性状差异的原因是高强度选育. 李亮等<sup>[4]</sup>利用 mRNA 差异显示技术对丝羽乌骨鸡与快大型肉鸡肝脏组织中差异表达基因进行筛选,得到 10 条丝羽乌骨鸡与快大型肉鸡肝脏差异表达序列标签. Liu 等<sup>[5]</sup>应用 DDRT-

收稿日期: 2010-09-15

作者简介: 覃立立 (1984—), 男, 博士研究生; 通信作者: 王翀 (1968—), 女, 教授, 博士, E-mail: betty@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金重点项目 (9251064201000005); 广东省科技计划项目 (2008B020600009)

PCR 技术研究大白、长白正反杂交组合与大白、梅山杂交组合之间背最长肌中基因表达的差异,发现了一个与 CO<sub>2</sub> 水合作用相关的新基因,命名为猪的 CA-III 基因.本研究利用 mRNA 差异显示技术对广东省地方品种蓝塘猪和引进品种大白猪达到经济成熟时的眼肌组织 mRNA 进行比较.利用 DDRT-PCR 技术研究中外猪种肉质性状相关差异表达基因,探讨造成中外猪种肉质表型差异的分子机制,对于充分发挥地方品种和引入品种的遗传优势、生产出更多满足人们需要的产品具有重要意义.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 纯种蓝塘猪眼肌组织样品采自广东省板岭原种猪场,共4头(公母各半);纯种大白猪也来自同一猪场,共4头(公母各半).采集的2个品种猪均为达到体成熟的健康猪.

1.1.2 差异显示引物 本研究所用的差异显示引物由美国 Iowa State University 的 Rothschild 教授惠赠,锚定引物序列见表1,随机引物序列见表2.

表1 差异显示3'锚定引物序列

Tab.1 3' anchor primer sequences of differential display

3'锚定引物	序列
Anchor 1	ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTTTGA
Anchor 2	ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTTTGC
Anchor 3	ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTTTGG
Anchor 4	ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTTTGT
Anchor 5	ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTTTCA
Anchor 6	ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTTTCC
Anchor 7	ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTTTCG
Anchor 8	ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTTTAA
Anchor 9	ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTTTAC
Anchor 10	ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTTTAG

1.1.3 差异显示条带重扩增所用引物 差异显示条带回收后重扩增所用引物如表3所示.

1.1.4 主要试剂 TRIZOL Reagent 为 Invitrogen 公司产品. Taq 酶、dNTPs、低熔点的琼脂糖、AMV 反转录酶、RNasin 为 TaKaRa 公司产品. DEPC、EDTA、TRIS、TEMED、去离子甲酰胺、过硫酸铵、硼酸、丙烯酰胺、双丙烯酰胺、甘油均为上海生物工程有限公司产品.

### 1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取 总 RNA 的提取按照 Invitrogen 公司的 TRIZOL Reagent 使用说明进行.用 DNase-I 处理以去除其中痕量的染色体 DNA 污染.

1.2.2 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 差异显示 PCR 产物在非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳上分离并拍照.

表2 差异显示5'随机引物序列

Tab.2 5' random primer sequences of differential display

5'随机引物	序列
Arbitrary 1	ACAATTTACACACAGGACTCCAAG
Arbitrary 2	ACAATTTACACACAGGAGCTAGCATGG
Arbitrary 3	ACAATTTACACACAGGAGACCATTGCA
Arbitrary 4	ACAATTTACACACAGGAGCTAGCAGAC
Arbitrary 5	ACAATTTACACACAGGAATGGTCGTCT
Arbitrary 6	ACAATTTACACACAGGATACAACGAGG
Arbitrary 7	ACAATTTACACACAGGATGGATTGGTC
Arbitrary 8	ACAATTTACACACAGGATGGTAAAGGG
Arbitrary 9	ACAATTTACACACAGGATAAGCCTAGC
Arbitrary 10	ACAATTTACACACAGGAGATCTCAGAC
Arbitrary 11	ACAATTTACACACAGGAACGCTAGTGT
Arbitrary 12	ACAATTTACACACAGGAGGTTACTAAGG
Arbitrary 13	ACAATTTACACACAGGAGTTGCACCAT
Arbitrary 14	ACAATTTACACACAGGATCCATGACTC
Arbitrary 15	ACAATTTACACACAGGACTTTCTACCC
Arbitrary 16	ACAATTTACACACAGGATCGGTCATAG
Arbitrary 17	ACAATTTACACACAGGACTGCTAGGTA
Arbitrary 18	ACAATTTACACACAGGATGATGCTACC
Arbitrary 19	ACAATTTACACACAGGATTTTGGCTCC
Arbitrary 20	ACAATTTACACACAGGATCGATACAGG

表3 差异显示条带重扩增引物序列

Tab.3 Re-amplified primer sequences of differential display bands

引物名称	序列
M13rev-48p	AGCGGATAACAATTTACACACAGGA
T7promoter	GTAATACGACTCACTATAGGGC

1.2.3 银染显带 在银染的每一步都要戴上干净的手套,避免在胶板上留下指纹.步骤为凝胶板的分离、固定、凝胶染色、显影、固定、拍照.

1.2.4 差异显示条带回收与重扩增 用洁净的手术刀片将凝胶上的差异条带切下,放入 0.5 mL 的离心管中,加入 50 μL 双蒸水,煮沸 15 min,然后在 4 °C、8 000 r/min 离心 1 min,吸取上清液, -20 °C 保存.取上述回收产物 1 μL 做模板,用与第一次 PCR 相同的反应体系,分别用 T7 promoter 和 M13rev-48p 作为重扩增的上下游引物,进行 PCR. PCR 反应程序为: 94 °C 变性 5 min 后,按 94 °C 30 s、60 °C 40 s、72 °C 1 min 共进行 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min.

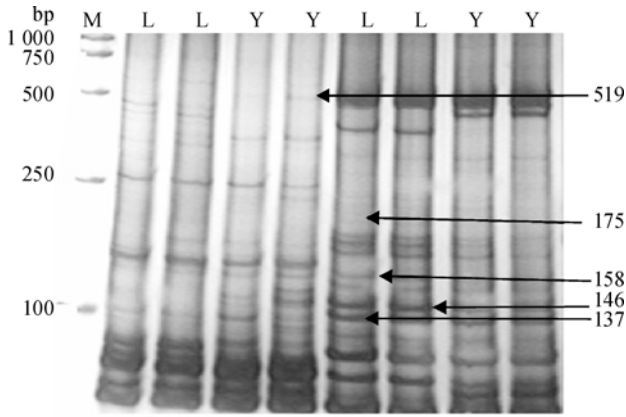
1.2.5 测序 将差异表达 EST<sub>s</sub> 的 PCR 产物送交上海英骏生物技术有限公司测序.

## 2 结果

### 2.1 差异显示结果

2.1.1 差异显示 EST<sub>s</sub> 的重复性 为了便于直观地显示出差异表达的条带,并且保证有差异的条带具有可重复性,本试验在电泳时,将 2 个重复样品连续

点样,同一对引物组合 4 个样品平行上样,如图 1 所示.其中 EST<sub>sp7</sub> 在大白猪种中表达量高,而 EST<sub>sp8</sub>、EST<sub>sp9</sub>、EST<sub>sp10</sub>、EST<sub>sp11</sub> 在大白猪中表达量低.差异显示结果见表 4.



L 和 Y 分别代表蓝塘猪和大白猪肌肉组织样本, M 为 DNA marker DL2000,箭头所指的条带即为扩增产物.

图 1 差异显示 PCR 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 1 Differential display PCR in polyacrylamide gel electrophoresis

2.1.2 差异显示 EST<sub>s</sub> 测序结果 本研究得到的差异显示 EST<sub>s</sub> 测序结果见表 5.

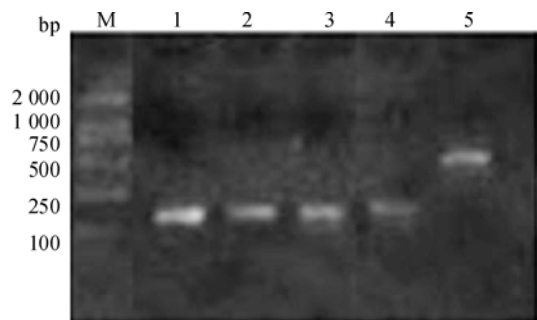
2.1.3 差异显示条带的重扩增 对差异比较明显的目的条带回收后,以回收产物作模板进行 PCR,其

产物用普通琼脂糖凝胶电泳检测,得到特异性的条带(图 2).

表 4 5 条差异显示的 EST<sub>s</sub>

Tab. 4 Five differential display EST<sub>s</sub>

EST	长度/bp	引物组合	差异方向	相似基因	相似性
EST <sub>sp7</sub>	519	P <sub>J</sub> + P <sub>9</sub>	Y > L	CO III	100%
EST <sub>sp8</sub>	175	P <sub>11</sub> + P <sub>20</sub>	L > Y	无	
EST <sub>sp9</sub>	158	P <sub>D</sub> + P <sub>13</sub>	L > Y	SLN( Sarcolipin)	95%
EST <sub>sp10</sub>	137	P <sub>D</sub> + P <sub>13</sub>	L > Y	SLN( Sarcolipin)	94%
EST <sub>sp11</sub>	146	P <sub>D</sub> + P <sub>13</sub>	L > Y	SLN( Sarcolipin)	94%



1 ~ 5 依次为 EST<sub>sp10</sub>、EST<sub>sp11</sub>、EST<sub>sp9</sub>、EST<sub>sp8</sub>、EST<sub>sp7</sub>, M 为 DNA marker DL2000.

图 2 差异条带重扩增电泳图

Fig. 2 Differential band re-amplification in gel electrophoresis

表 5 EST<sub>s</sub> 测序结果

Tab. 5 Sequencing results of EST<sub>s</sub>

EST	序列
EST <sub>sp7</sub>	ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTAGGATCCTCATCAATAGATTGATACGTAAGGAATAGTCAAACACTACATC TACGAAGTGTCAGTATCAGGCTGCGGCTTCAAAGCCGAAAGTGGTGGTTGGATGTGAAGTGGAATTTAGTTGTGCGTA GTAAGCATACTGCTAGGAAAGTAGATCCGATGATTACGTGCAACCCGTGAAACCCTGTAGCCACAAAAGAAAGTGGTA TCCATACACTCCGTCGGAGATTGTGAATGGTGTCTTCGTAATATTCTGAGGCTTGGAGGAGGGTGAAGTATACGCCTA GTGCAATGGTGATGGATAGTGTCTTGGATTATGTGTTTTCCGGTCCCCTTCTATTAGGCTGTGATGGGCTCAGGTAATGG ATACTCCTGAGGGCAGGAGGATTGAGGTGTTTACTAGGGGTAATCTAGGGGGTTTACTGGGTGAATTCCTGTTGCT GGTCAGCAACCTCCTAATTCGGGTGTTGGTGCTAGGCTTATCCTGTGTGAAATTGT
EST <sub>sp8</sub>	ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTAAATATTCCAAATTGAGCTCAGTTSTATCCTGAGGACTCTTCCCCTACAAT ATAGTTCTGAATCAAATCTATTTTTACCCTTAATCTATCACCCAGCTCTGGKGTTCCTTTGGCACTTCCCTGTATCG ATCCTGTGTGAAATTGT
EST <sub>sp9</sub>	CGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTGTGGTTGACAATTTTATCCCATGACAGCTATAGGGGCTGATGACGATTTTC CTTTAAGGGTTCCTTCTTCGGGCCAGTTGATTTAAAGTTTGGTTGCTGAGNNGGAGTCATGGATCCTGTGTGAAATTGT
EST <sub>sp10</sub>	ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTGTGGTTGACAATTTTATCCCATGACAGCTATAGGGGCTGATGACGATTT CCTTTAAGGGTTCCTTCTTCGGGCCAGTTGATTTAAAGTTTGGTTGCTGAGNNGGAGT
EST <sub>sp11</sub>	ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTGTGGTTGACAATTTTATCCCATGACAGCTATAGGGGCTGATGACGATTT CCTTTAAGGGTTCCTTCTTCGGGCCAGTTGATTTAAAGTTTGGTTGCTGAGNNGGAGTCATGGATCC

2.1.4 相似性比对结果 将差异显示 PCR 得到的 5 条 EST<sub>s</sub> 序列与 GenBank 上已知序列进行对库检索,结果表明:EST<sub>sp7</sub> 序列与细胞色素 c 氧化酶亚单位 III 基因在 473 bp 的范围内相似性达到 100%,而 EST<sub>sp9</sub>、EST<sub>sp10</sub>、EST<sub>sp11</sub> 均与猪 SLN 基因相似性达到了 94% ~ 95%,表明这 3 段 EST<sub>s</sub> 位于猪 SLN 基因的不同位置. EST<sub>sp8</sub> 未搜索到相似基因.

### 3 讨论

Janzen 等<sup>[6]</sup> 利用 DD RT-PCR 的方法鉴定了一个经过选择纯化的品系和一个随机的对照品系的背最长肌的差异表达基因,分离和鉴定了一条在选择品系的背最长肌中有很高表达量的 590 bp 的 cDNA,该 cDNA 与牛的相对分子质量为 16 000 的 cAMP -

调控磷蛋白 (Regulated phosphoprotein, ARPP-16) cDNA 序列的 3' - 非转录区有 89% 的相似性. 对猪的 ARPP-16 的 RT-PCR 扩增和测序证实 DD 法得到的 cDNA 是猪的 ARPP-16 转录子的 3' 末端. 半定量 PCR 分析表明 ARPP-16 在选择品系中表达量比对照品系提高了 4 倍 ( $P < 0.01$ ), 表明 ARPP-16 可能是调控猪骨骼肌生长的一个重要的基因. 银巍等<sup>[7]</sup>应用 mRNA 差异显示技术获得 164 个在大鼠小脑颗粒神经元凋亡模型中差异表达的 EST<sub>s</sub>, 对其中的 17 个 EST<sub>s</sub> 进行了克隆并测序, 再通过反 Northern 杂交初步筛选得到 5 个阳性片段. Muráni 等<sup>[8]</sup>用 DDRT-PCR 技术对胚胎期的皮特兰和杜洛克骨骼肌转录本进行研究, 对其中 80 个 cDNA 片段测序, 43 个与生长的时期相关, 37 个与猪种相关, 在得到的 85 条特异 EST<sub>s</sub> 中, 有 52 条位于已知的基因上. Mario 等<sup>[9]</sup>用 DDRT-PCR 技术对新生小猪的左右心室的基因表达进行比较, 在得到的 5 600 条带中, 有 153 条被识别的差异显示条带. Ponsuksili 等<sup>[10]</sup>为了鉴定可能代表猪胴体性状候选基因的 EST<sub>s</sub>, 采用 DD 法对一个资源群体的 F<sub>2</sub> 代个体和纯种的德国长白猪进行研究, 得到了 6 条差异表达的 EST<sub>s</sub>, 其中的 3 条与已知基因无任何相似性, 另 3 条与已知基因存在不同程度的相似性. 本研究利用 200 对引物组合筛选到了在蓝塘和大白猪种中存在明显差异表达的 5 个肌肉组织的 EST<sub>s</sub>, 其中 EST<sub>sp7</sub> 与已知的线粒体基因组编码的细胞色素 c 氧化酶亚单位 III 基因高度相似. 在线粒体编码的 3 个大亚基中, 亚基 I 是一种完整的膜蛋白并带有 12 个跨膜螺旋 (I ~ XII), 含有 3 个氧化还原反应中心, 并存在于所有的亚铁血红素 - 铜氧化酶中<sup>[11]</sup>. 是否参与氧化呼吸链, 影响肌肉的熟化代谢过程还有待深入研究. EST<sub>sp9</sub>、EST<sub>sp10</sub>、EST<sub>sp11</sub> 与猪 SLN 基因相似性达到了 94% ~ 95%, 表明是该基因的不同区段. SLN 基因在骨骼肌肌浆网快肌纤维中有较高的表达, 而在慢肌纤维中表达减少<sup>[12]</sup>. 在心力衰竭的狗的心房中, 检测到 SLN 蛋白表达水平提高了 3 倍多, 而在心肌缺血的心房中, 表达水平减少 30%. 在受磷蛋白缺失的心房中, SLN 蛋白表达量增加, 在心房中 SLN 蛋白代偿缺失了的受磷蛋白<sup>[13]</sup>. 研究表明猪 SLN 基因在猪的背最长肌组织中表达最高, 在大梅杂种猪中, 背最长肌中该基因的表达量要高于梅山猪<sup>[14]</sup>. 本研究发现, 该基因上的 EST<sub>s</sub> 片段在蓝塘猪中表达均高于大白猪, 能否作为一个影响中外猪种的产肉机制的候选基因, 还需深入研究.

#### 参考文献:

- [1] LIANG Peng, PARDEE A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. Science, 1992, 257(5072): 967-971.
- [2] 李盛霖, 陈岩峰, 郑逢源, 等. 福州黑猪、肉用型猪及其杂种猪肉质特性的研究[J]. 福建农业学报, 1996, 11(1): 8-11.
- [3] LONERGAN S M, HUFF-LONERGAN E, ROWE L J, et al. Selection for lean growth efficiency in Duroc pigs influences pork quality[J]. J Anim Sci, 2001, 79(8): 2075-2085.
- [4] 李亮, 赵小玲, 李琴, 等. 利用 mRNA 差异显示技术筛选丝羽乌骨鸡肝脏差异表达序列标签[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(4): 387-391.
- [5] LIU Yong-yang, XIONG Yuan-zhu, DENG Chang-yan et al. Isolation, cDNA sequence analysis and tissue expression profile of a novel swine gene differentially expressed in the Longissimus dorsi muscle tissues from Large White × Meishan cross combination[J]. Progress in Natural Science, 2005(12): 3-6.
- [6] JANZEN M A, KUHLERS D L, JUNGST S B, et al. ARPP-16 mRNA is up-regulated in the longissimus muscle of pigs possessing an elevated growth rate[J]. J Anim Sci, 2000, 78(6): 1475-1484.
- [7] 银巍, 黄奕俊, 皮荣标, 等. 应用 mRNA 差异显示技术筛选大鼠小脑颗粒神经元凋亡模型中差异表达基因[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(11): 2141-2146.
- [8] MURÁNI E, MURÁNIOVÁ M, PONSUKSILI S, et al. Identification of genes differentially expressed during prenatal development of skeletal muscle in two pig breeds differing in muscularity[J]. BMC Developmental Biology, 2007, 7: 109.
- [9] MARIO T, RAGUEL I, BEATRIZ N, et al. Identification of candidate genes potentially relevant to chamber-specific remodeling in postnatal ventricular myocardium[J]. J Biomed Biotechnol, 2010, 10: 1155.
- [10] PONSUKSILI S, WIMMERS K, SCHELLANDER K. Application of differential display RT-PCR to identify porcine liver EST<sub>s</sub>[J]. Gene, 2001, 280(1/2): 75-85.
- [11] 江海洪, 谢燕, 刘倩予. 细胞色素 c 氧化酶的分子生物学研究进展[J]. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 2001(1): 20-22.
- [12] BECUCCI L, GUIDELLI R, KARIM C B, et al. An electrochemical investigation of sarcolipin reconstituted into a mercury-supported lipid bilayer[J]. Biophys J, 2007, 93(8): 2678-2687.
- [13] GOPAL J B, POOMIMA B, CYNTHIA A C, et al. Differential expression of sarcolipin protein during muscle development and cardiac pathophysiology[J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 43(2): 215-222.
- [14] 黄涛. 杂种大白 × 梅山 F<sub>1</sub> 代与其母本梅山猪背最长肌间差异表达基因的克隆鉴定及其特征分析[D]. 武汉: 华中农业大学动物科技学院, 2006.