



江口萝卜猪 *UCP3* 基因变异及其表达量与肉质性状关联性分析

张继¹ 吴雪¹ 邱淦远¹ 刘鹏程¹ 杨茂林² 刘若余^{1*}

1 贵州大学 动物科学学院/高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 贵阳 550025; 2 贵州省江口县科技局, 铜仁 554400

*通讯作者, liury1963@163.com

摘要 解耦联蛋白 3 (uncoupling protein 3, *UCP3*) 作为重要调控蛋白, 主要参与机体能量代谢调节, 在脂质代谢, 脂肪酸氧化和脂肪沉积中起着重要作用, 对氧化磷酸化反应途径是否产生 ATP 起决定性作用。为研究 *UCP3* 基因与猪肉品质性状之间的关系, 本研究测定了 165 头江口萝卜猪 (*Sus scrofa*) 11 项肉质性能指标, 利用混合 DNA 池扩增 *UCP3* 基因全部外显子, 测序筛选 SNPs 位点, 用单个样本 DNA 扩增 SNPs 位点对应外显子并测序, 以验证位点和分型, 分析各位点不同基因型江口萝卜猪肉品质性能差异。采用 qRT-PCR 检测了 *UCP3* 基因在背最长肌中的表达量, 进行基因型、肉质性能以及基因表达量的相关性研究。研究结果发现了 6 个 SNPs 位点, g. 3127A>G、g. 3205T>C、g. 10439C>T、g. 10441C>A、g. 10466G>A、g. 10479A>G/T。群体遗传参数分析发现除 g. 10479A>G/T 位点外的其他位点杂合度高, 说明群体内等位基因分布比较均匀; 有效等位基因数高, 表明群体内变异程度大; 多态信息含量均大于 0.25, 为中度多态, 表明位点可以提供一定的遗传信息。 χ^2 检验显示 6 个位点均极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。连锁不平衡分析发现, g. 3127A>G 和 g. 3205T>C 位点、g. 10439C>T 和 g. 10466G>A 位点为完全连锁不平衡, g. 10439C>T、g. 10441C>A、g. 10466G>A、g. 10479A>G/T 之间为强连锁不平衡。SNPs 位点与肉质的关联性分析发现 g. 10479A>G/T 位点 TT 型和 GG 型个体大理石纹评分显著高于 AA 型和 AG 型个体, 剪切力则反之; 基因型与背最长肌中 *UCP3* 基因表达量的关联性分析发现, g. 10439C>T、g. 10441C>A、g. 10466G>A 以及 g. 10479A>G/T 4 个位点上均为突变型个体表达量极显著高于另外两种基因型; *UCP3* 基因在背最长肌中的表达量与两项肉质指标存在极显著相关性, 其中与剪切力负相关, 与肌肉脂肪含量正相关。本研究结果表明, g. 10439C>T、g. 10441C>A、g. 10466G>A 以及 g. 10479A>G/T 位点为影响江口萝卜猪肉品质性能的重要 SNPs 位点, 且 *UCP3* 基因表达量提高有利于肌肉脂肪的沉积, 此研究结果为筛选有助于江口萝卜猪肌肉脂肪沉积的分子标记提供了参考依据。

关键词 江口萝卜猪; 解耦联蛋白 3 (*UCP3*); SNP; 肉质性状; 相关性分析

中图分类号 S828

文献标识码 A

Correlation Analysis of *UCP3* Gene Variation, Expression and Meat Quality Traits in Jiangkou Luobo Pig (*Sus scrofa*)

ZHANG Ji¹ WU Xue¹ QIU Gan-Yuan¹ LIU Peng-Cheng¹ YANG Mao-Lin² LIU Ru-Yu^{1*}

1 College of Animal Sciences, Guizhou University/Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountainous Region, Ministry of Education, Guiyang 550025, China; 2 Science and Technology Bureau of Jiangkou County, Tongren 554400, China

* Corresponding author, liury1963@163.com

Abstract Uncoupling protein 3 (*UCP3*), as an important regulatory protein, is mainly involved in the regulation of the body's energy metabolism and plays an important role in lipid metabolism, fatty acid

基金项目: 贵州省科技支撑计划项目(黔科合[2017]2590号)

收稿日期: 2018-08-08 接受日期: 2018-09-04

oxidation and fat deposition. It plays a decisive role in the production of ATP in oxidative phosphorylation. In order to study the relationship between *UCP3* gene and pork quality traits, 11 meat quality indexes of 165 Jiangkou Luobo pigs (*Sus scrofa*) were determined. SNPs loci were screened by sequencing all exons of *UCP3* gene amplified by mixed DNA pool. Single sample DNA was amplified and sequenced for validation and typing. At the same time, the difference of meat quality among individuals with different genotypes was analyzed. The expression of *UCP3* gene of individuals with different genotypes was detected to study the relationship between meat quality and *UCP3* gene expression. This study identified 6 SNPs, they were g.3127A>G, g.3205T>C, g.10439C>T, g.10441C>A, g.10466G>A and g.10479A>G/T. Population genetic parameters analysis showed that the heterozygosity except g.10479A>G/T locus was high, which indicated that the distribution of alleles in the population was relatively uniform; the number of effective alleles was high, which indicated that the degree of variation in the population was large; and the content of polymorphic information was more than 0.25, which indicated that the loci could provide some genetic information. χ^2 test showed that the genotype distribution of g.3127A>G and g.3205T>C loci was in Hardy-Weinberg equilibrium, while the genotype distribution of g.10439C>T, g.10441C>A and g.10466G>A loci deviated significantly from Hardy-Weinberg equilibrium. Linkage disequilibrium analysis showed that g.3127A>G and g.3205T>C loci, g.10439C>T and g.10466G>A loci were completely linkage disequilibrium, g.10441C>A, g.10466G>A and g.10479A>G/T were strongly linkage disequilibrium. The correlation analysis between SNPs loci and meat quality showed that marbling scores of TT and GG individuals at g.10479A>G/T loci were significantly higher than those of AA and AG individuals, whereas shear stress was the opposite. Genotype-expression correlation analysis showed that g.10439C>T, g.10441C>A, g.10466G>A and g.10479A>G/T loci were significantly higher than those of others. *UCP3* gene expression was negatively correlated with shear stress and positively correlated with intramuscular fat content. The results showed that g.10439C>T, g.10441C>A, g.10466G>A and g.10479A>G/T sites were important SNPs sites affecting the meat quality of Jiangkou Luobo pigs, and the increase of *UCP3* gene expression was beneficial to the deposition of intramuscular fat. The results provide a reference for the screening of molecular markers that contribute to intramuscular fat deposition in Jiangkou Luobo pig.

Keywords Jiangkou Luobo pig; Uncoupling protein 3 (UCP3); SNP; Meat quality; Correlation analysis

解耦联蛋白(uncoupling protein, UCPs)是线粒体上的质子载体,以质子漏方式把 H^+ 从外膜传递到内膜(Ricquier, Frédéric, 2000)。在氧化磷酸化过程中,可以降低膜内外的电化学梯度,在电子传递过程中实现质子回流,从而起到让呼吸链与ATP合成过程解耦联的作用,使能量以热能的形式散发,氧化磷酸化合成ATP的效率下降(张雷等, 2010)。UCP3基因是UCPs家族成员之一,与UCP2基因紧密连锁并定位于猪的9号染色体(Stone et al., 2015)。当受到脂肪酸刺激时,UCP3基因表达量上调,且UCP3蛋白参与脂肪酸和其他阴离子跨膜转运(Lapice et al., 2017)。UCP3活性对脂肪酸氧化和氨基酸代谢及其相关的生化途径具有重要调节作用(Aguer et al., 2016)。所以,很多畜禽研究者将其作为一个影响肉品质的重要功能候选基因展开

研究(李秋玲等, 2006; 伍革民等, 2007; 胡倩, 2008)。方美英等(2002)在对猪(*Sus scrofa*) *UCP3* 基因多态性的研究中,在内含子3发现了T272G变异位点。李艳华等(2006)分析了长白猪、杜洛克等5个国内外猪种*UCP3*基因的多态位点,发现位于启动子区的SNPs位点会造成转录因子结合位点的改变,影响对*UCP3*基因的转录和调控,从而影响猪的生产性能。陈哲(2011)在*UCP3*基因cDNA上检测到A448G突变位点,并发现该位点等位基因A对于改善猪脂肪性状具有积极作用。王阳等(2011)研究发现UCP3参与猪骨骼肌细胞脂肪代谢的调节,从而影响地方猪种的肉质和其他性状。但是关于*UCP3*基因表达量与肉质性能之间的相关性尚未见研究报道。

本研究以贵州优良地方品种江口萝卜猪为实验

材料,屠宰后测定其11项主要肉质性能指标,并提取背最长肌中的基因组DNA建立混合DNA池,扩增UCP3基因全部外显子并测序,初步筛选多态位点,然后以单个样本DNA为模板,扩增筛选到的位点对应外显子,用以测序验证并分型。对应肉质指标,对不同基因型猪进行肉质性能差异分析。提取背最长肌总RNA,检测不同基因型江口萝卜猪背最长肌中UCP3基因的平均表达量做差异显著性分析,分析基因型、表达量与肉质性能三者之间的关联性,以期探寻UCP3基因多态性对江口萝卜猪肉肉质性能的影响,为科学的选种选育提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物为贵州省江口萝卜猪(*Sus scrofa*)繁育中心提供的10~12月龄去势雄性江口萝卜猪,共165头无亲缘关系,体重为70~80 kg。屠宰后取腰大肌和背最长肌测定肉质性能,取部分组织置于75%酒精中保存,用于基因组DNA提取,另外在背最长肌中取部分组织用于RNA提取,用预装冻存液的冻存管置于-80℃低温冰箱保存。

1.2 主要试剂与仪器

2×Taq MasterMix (康为世纪,北京)、Ezup柱式动物基因组DNA抽提试剂盒(上海生工)、琼脂糖(上海生工)、TRIzol (RNAiso Plus, TaKaRa, 日本)、iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-rad, 美国)、RT-PCR Kit (K1622, 赛默飞, 美国)。

荧光定量PCR仪(CFX Connect, Bio-Rad, 美国)、胴体PH测定仪(PH-STAR, 德国, Matthaues)、肌肉嫩度仪(RTA-meat, 上海腾拔)、胴体肉色测定仪(OPTO-STAR, Matthaues, 德国)、肉质品质分析仪(series3000, NI, 澳大利亚)。

1.3 肉质性能测定

大理石纹、剪切力、熟肉率、滴水损失等肉质性能指标参照《猪肌肉品质测定技术规范》(NY/T 821-2004)测定。使用胴体PH测定仪测定pH值,使用胴体肉色测定仪测定肉色,肉色以Opto值(比色值)表示,Opto值参考标准:Opto≤53为差;肉质有缺陷的PSE猪肉(pale soft exudative meat, PSE肉);53≤Opto<63为良;较满意;Opto≥63为优;肉质好的猪肉(龚建军, 2005)。使用肉质品质分析仪测

定背最长肌粗蛋白含量、水分含量和肌肉脂肪含量,测定前需用索氏抽提法测定5个肉样,然后将数据输入肉质品质分析仪中校正仪器,其余肉样即可直接测定。

1.4 DNA池构建与cDNA合成

利用动物基因组DNA抽提试剂盒提取基因组DNA,提取的DNA用微量紫外分光光度计检测纯度和浓度。将所有样本DNA浓度调整至50 ng/μL,再各取5 μL构建混合DNA池,于-20℃冰箱保存备用。背最长肌的总RNA采用TRIzol法提取,并检测浓度和纯度,用逆转录试剂盒进行cDNA合成,总RNA用量为2 μg。

1.5 基因引物设计

参考NCBI上登录号为NC_010451.4的猪UCP3基因DNA参考序列,利用软件Primer Premier 5针对UCP3基因的7个外显子序列设计特异性引物,并根据mRNA参考序列设计荧光定量PCR引物,内参基因选用β-actin。由生工生物技术(上海)有限公司合成,基因引物信息见表1。

1.6 PCR扩增

反应体系(20 μL): 2×Taq PCR Master Mix 10 μL、10 pmol/μL上下游引物各2 μL、DNA模板2 μL、ddH₂O 4 μL。PCR扩增结束后取4 μL扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检查扩增效果。PCR反应程序:95℃预变性2 min;95℃变性30 s、退火30 s、72℃延伸30 s、总共35个循环;72℃终止延伸2 min。qRT-PCR反应体系(10 μL): 2×iTaq Universal SYBR Green Supermix 5 μL、cDNA模板1 μL、ddH₂O 3 μL、10 pmol/μL上、下游引物各0.5 μL。反应程序:95℃预变性3 min;95℃变性5 s、60.5℃退火30 s、72℃延伸30 s,共40个循环,并绘制扩增曲线。40个循环完成后从60℃至95℃以每5 s 0.5℃的速率上升,并收集荧光信号绘制溶解曲线。每个样品做3个重复。

1.7 统计分析

将以DNA池为模板的PCR扩增产物送由生物公司测序,用SeqMan查看峰图筛选套峰位点,再与参考序列比对,初步确定多态位点,然后以单个DNA为模板扩增相应序列并测序,用于对每个位点的分型。统计各个位点不同基因型个体数,计算

包括基因纯合度(homozygosity, *Ho*)、基因杂合度(heterozygosity, *He*)、有效等位基因数(effect number of allele, *Ne*)、多态信息含量(polymorphism information content, *PIC*)在内的各项群体遗传参数,并用 χ^2 检验 Hardy-Weinberg 平衡。各位点之间的连锁关系用在线软件 SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>)分析。不同基因型个体肉质性能利用 SPSS18.0 中的单因素方差分析进行差异显著性分析,计算每种基因型个体各项肉质指标平均值,结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。*UCP3* 基因在背最长肌中的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算,不同基因型个体表达量差异采用单因素方差分析,基因表达量与肉质性状的相关性分析采用双变量相关性分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增与引物特异性检测

扩增图谱见图 1,其中 1~5 为以基因组 DNA 为模板扩增的全部外显子序列;6~7 为以 cDNA 为模板,普通 PCR 扩增的荧光定量 PCR 引物对应目的片段,用于检测引物特异性。PCR 结束后各取 4 μ L 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,可以看到电泳条带清晰明亮,无杂带,无拖尾,说明引物特异性好,扩增片段可用于直接测序,且对照 DNA Marker 可以看出扩增片段大小与实验设计引物对应片段大小一致,与实验设计相符。

2.2 PCR 测序分型

扩增得到的江口萝卜猪 *UCP3* 基因所有外显子序列送由生工生物工程(上海)股份有限公司双向测序,在所有外显子序列中共筛选到 6 个多态位

点,将猪 *UCP3* 基因参考序列第 1 外显子的第 1 位碱基定义为+1,则这 6 个位点分别命名为:g.3127A>G、g.3205T>C、g.10439C>T、g.10441C>A、g.10466G>A 和 g.10479A>G/T。g.3127A>G 和 g.3205T>C 位点位于 5'UTR,其余 4 个位点均位于 3'UTR,其中 g.10479A>G/T 位点存在 A>T 型和 A>G 型两种突变类型(图 2)。测序验证多态位点和分型见图 3。将不同于参考序列的纯合型个体定义为突变型,杂合个体定义为杂合型,与参考序列相同的纯合型个体定义为野生型,其中 g.10479A>G/T 位点只检测到 4 种基因型,分别为突变型 GG 和 TT,野生型 AA,以及杂合型 AG,其余位点均检测到 3 种基因型。

2.3 群体遗传参数分析

如表 2 所示,*UCP3* 基因上的 6 个 SNPs 位点中,g.10479A>G/T 位点 A 为优势等位基因,等位基因频率为 0.560 6,其中 T 等位基因频率较低,为 0.121 2,由于该位点存在 3 个等位基因,但只检测到 4 种基因型,造成此位点等位基因分布不均匀,有效等位基因数低,但杂合度为 0.569 8,多态信息含量接近于高度多态,说明此位点变异程度大遗传信息较丰富。位于 5'UTR 的 2 个位点和位于 3'UTR 的 3 个位点遗传参数趋于一致,推测是因为位点之间距离较近,导致遗传上存在连锁。但是可以看到几个位点杂合度、有效等位基因数均较高,多态信息含量显示为中度多态,表明群体内变异程度大,可以提供一定的遗传信息。 χ^2 检验显示所有位点基因型分布均极显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡,这可能是由于长期的人工选择淘汰,导致一些基因型个体数量较少所致。

表 1 *UCP3* 基因引物信息

Table 1 Primer information of *UCP3* gene

引物名称	片段大小/bp	引物序列(5'~3')	<i>Tm</i> /℃	用途
Primer name	Product length	Primer sequences		Usage
UCP3E1	472	F: CTCCAGTCAAGTGATCGGGC; R: TGGGGCAAGGGCTTTATG	62.8	PCR
UCP3E2	527	F: GCTGGGATGCAGGGTCA; R: TTGGGCGATGGTGATGG	60.0	PCR
UCP3E3-4	892	F: CGCCACGAACCTGTCAAT; R: TGGTTAGGGTGTTGGTTTAGAAT	57.0	PCR
UCP3E5-6	1214	F: TCTCTAAGACAGACACGGATAAT; R: GTTGCTGATGGCACTTTGAC	50.5	PCR
UCP3E7	932	F: CCTCTGCCCCGAGTTCCCT; R: GCTTTGTGCTCCCATTTTACG	62.8	PCR
UCP3	194	F: CCAACATCACGAGGAATGCC; R: CGAGTTCATGTACCGGGTCT	61.0	qRT-PCR
β -actin	165	F: CTTCTTGGGCATGGAGTC; R: TAGAGGTCCTTCCTGATGT	61.0	qRT-PCR

UCP3:解耦联蛋白 3; β -actin: β -肌动蛋白;下同

UCP3: Uncoupling protein 3; The same below

2.4 连锁不平衡分析

运用 SHEsis 在线软件对江口萝卜猪 *UCP3* 基因 6 个 SNPs 位点进行连锁不平衡分析, 结果如表 3 和图 4。其 D' 值和 r^2 值为位点之间连锁程度的判断依据, 其中 D' 值为 1 时位点之间完全连锁, $r^2=1$ 为完美连锁, $D'=0$ 或 $r^2=0$ 为无连锁或连锁平衡, $r^2>0.33$ 提示为强连锁。 *UCP3* 基因 g.3127A>G 和 g.3205T>C 位点、g.10439C>T 和 g.10466G>A 位点, $D'=1$, $r^2=1$ 为完全连锁不平衡, g.10439C>T、g.10441C>A、g.10466G>A、g.10479A>G/T 4 个位点之间 $D'\approx 1$, $r^2>0.33$, 为强连锁不平衡。此结果表明 g.3127A>G 和 g.3205T>C 位点以及 g.10439C>T 和 g.10466G>A 位点是紧密连锁作为一个整体遗传, 而其余位点之间趋向于相互独立遗传。

2.5 基因型与肉质性状的关联性分析

UCP3 基因上共检测到 6 个 SNPs 位点, 表 4 可以看出在大理石纹评分和剪切力两项指标上, g.10479A>G/T 位点野生型和杂合型个体大理石纹评分与两种突变型个体相比较低, 差异显著而剪切

力则反之。其余位点各项肉质指标和肌肉组成成分含量差异均不显著, 但是也可以看到, g.10439C>T、g.10441C>A 以及 g.10466G>A 位点上突变型个体大理石纹评分和肌内脂肪含量与野生型以及杂合型相比明显较高, 剪切力为突变型个体明显低于野生型和杂合型。总体而言, 这几个 SNPs 位点不同基因型的江口萝卜猪主要在大理石纹、剪切力和肌内脂肪含量 3 项指标上存在明显差异, 且突变型均为大理石纹评分和肌内脂肪含量较高, 剪切力较低, 肉质性能表现较好, 这提示 *UCP3* 基因 3'UTR 的 SNPs 位点变异可能促进江口萝卜猪肌内脂肪的沉积。

2.6 不同基因型个体 *UCP3* 基因表达量差异分析

本实验每个位点每种基因型选择 10 个 RNA 样本, 随机选择 13 号肉猪样本 cDNA 荧光定量 PCR 扩增 *Ct* 值为对照, 计算 *UCP3* 基因各多态位点不同基因型江口萝卜猪背最长肌中 *UCP3* 基因相对表达量平均值(图 5)。可以看到, *UCP3* 基因 5'UTR 上的 g.3127A>G 和 g.3205T>C 位点各基因型表达量差异不大, 说明 2 个位点对 *UCP3* 基因的表达量影响较小。3'UTR 上的 g.10439C>T、g.10441C>A、

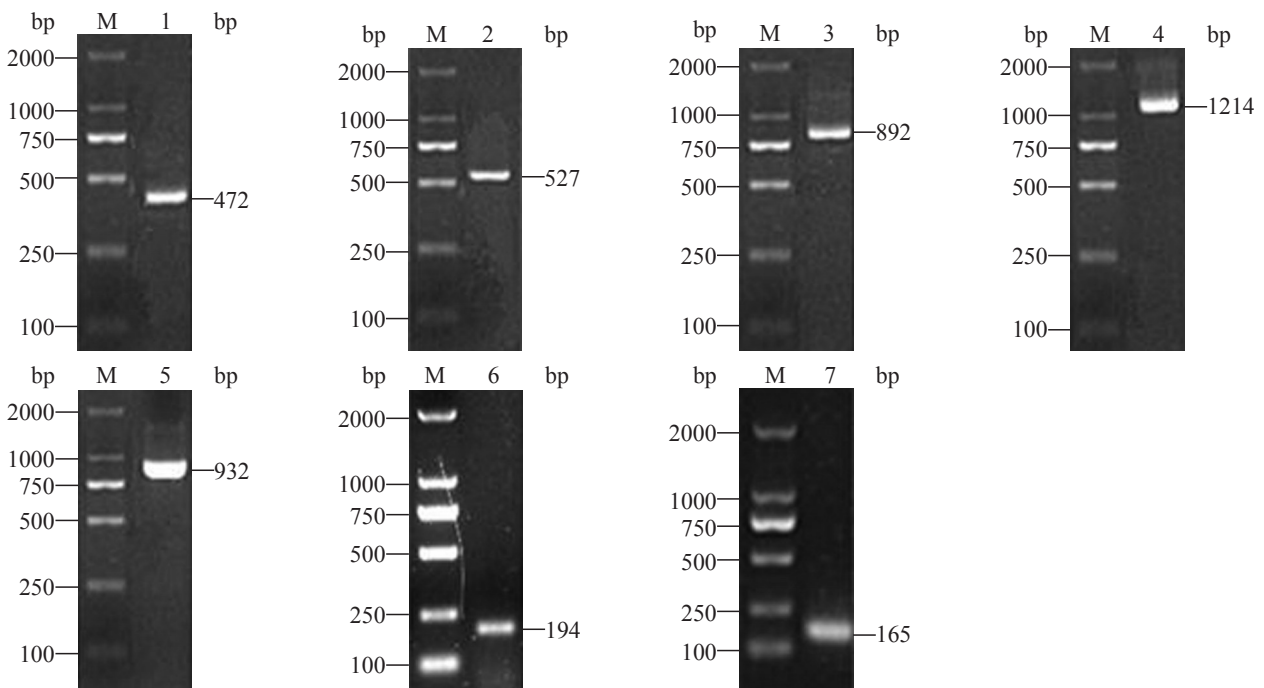


图1 *UCP3* 基因的 PCR 扩增

Figure 1 PCR amplification of *UCP3* gene

M:DL2000 DNA Marker; 1~5:外显子扩增片段; 6:*UCP3* 基因荧光定量 PCR 扩增片段; 7:内参基因荧光定量 PCR 扩增片段

1~5: Exon amplification fragment; 6: Real time quantitative PCR amplification fragment of *UCP3* gene; 7: Real time quantitative PCR amplification fragment of internal reference gene

g.10466G>A 以及 g.10479A>G/T 位点基因表达量差异显著,为突变型高、野生型和杂合型低,说明这 4 个位点基因的变异对 *UCP3* 基因在背最长肌中的

表达有积极影响。

2.7 *UCP3* 基因表达量与肉质性能相关性分析

利用 SPSS18.0 中的双变量相关性分析,研究

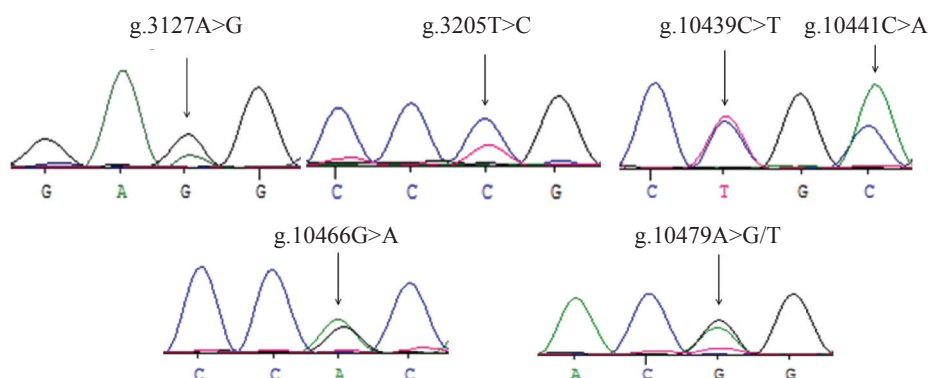


图2 SNPs位点混池测序图谱

Figure 2 SNPs locus pooled sequencing map

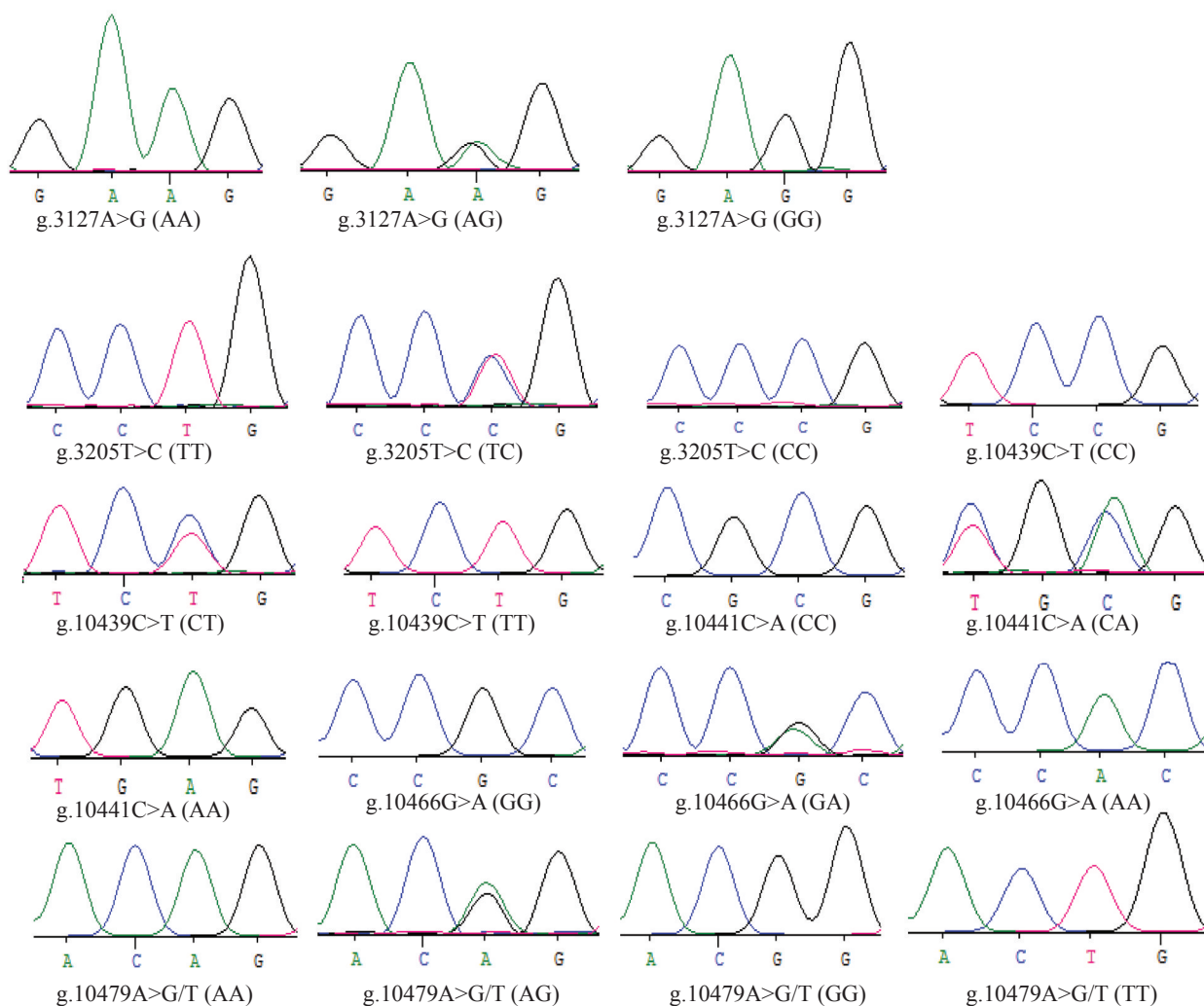


图3 SNPs位点不同基因型测序图谱

Figure 3 SNPs loci sequencing map of different genotypes

UCP3 基因在背最长肌中的表达量与肉质性状之间的相关性(表5)。可以看到,*UCP3* 基因在背最长肌中的表达量与肉色、水份含量等指标为正相关,与pH、粗蛋白含量等指标为负相关。其中,肌内脂肪

含量呈极显著正相关,与剪切力呈极显著负相关。可见,*UCP3* 基因的表达量与肌内脂肪的沉积密切相关,*UCP3* 基因在背最长肌中的表达量越高,越有利于肌内脂肪的沉积,肉质性能就越好。

表2 *UCP3* 基因群体遗传参数

Table 2 Genetic parameters of *UCP3* gene population

位点 Locus	样本数 Sample number	基因型 Genotype	基因型频率 Frequency of genotype	等位基因 Allele	等位基因频率 Allele frequency	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Ne</i>	<i>PIC</i>	<i>HWE</i> (χ^2)
g.3127A>G	10	AA	0.0606	A	0.3788	0.5294	0.4706	1.8890	0.3599	17.7778
	105	AG	0.6364	G	0.6212					
	50	GG	0.3030							
g.3205T>C	10	TT	0.0606	T	0.3788	0.5294	0.4706	1.8890	0.3599	17.7778
	105	TC	0.6364	C	0.6212					
	50	CC	0.3030							
g.10439C>T	80	CC	0.4848	C	0.5606	0.5073	0.4927	1.9710	0.3713	79.1156
	25	CT	0.1515	T	0.4394					
	60	TT	0.3636							
g.10441C>A	80	CC	0.4848	C	0.5606	0.5073	0.4927	1.9710	0.3713	79.1156
	25	CA	0.1515	A	0.4394					
	60	AA	0.3636							
g.10466G>A	80	GG	0.4848	G	0.5606	0.5073	0.4927	1.9710	0.3713	79.1156
	25	GA	0.1515	A	0.4394					
	60	AA	0.3636							
g.10479A>G/T	80	AA	0.4848	A	0.5606	0.4302	0.5698	2.3244	0.4939	229.8186
	25	AG	0.1515	G	0.3182					
	40	GG	0.2424	T	0.1212					
	20	TT	0.1212							

Ho: 纯合度; *He*: 杂合度; *Ne*: 有效等位基因数; *PIC*: 多态信息含量; $PIC > 5$: 高度多态, $0.25 < PIC < 0.5$: 中度多态, $PIC < 0.25$: 低度多态; *HWE*(χ^2): 基因型哈代温伯格平衡, $\chi^2_{0.01(2)} = 9.21$

Ho: Homozygosity; *He*: Heterozygosity; *Ne*: Number of effective alleles; *PIC*: Information content of gene polymorphism; $PIC > 5$: High diversity, $0.25 < PIC < 0.5$: Moderate diversity, $PIC < 0.25$: Low diversity; *HWE*(χ^2): Genotype Hardy-Weinberg equilibrium, $\chi^2_{0.01(2)} = 9.21$

表3 江口萝卜猪 *UCP3* 基因SNPs位点连锁不平衡分析

Table 3 Linkage disequilibrium analysis of *UCP3* gene SNPs in Jiangkou Luobo pigs

位点 Locus	g.3127A>G	g.3205T>C	g.10439C>T	g.10441C>A	g.10466G>A	g.10479A>G/T
g.3127A>G		1.000	0.595	0.599	0.595	0.602
g.3205T>C	1.000		0.595	0.599	0.595	0.602
g.10439C>T	0.165	0.165		1.000	1.000	1.000
g.10441C>A	0.178	0.178	0.941		1.000	1.000
g.10466G>A	0.165	0.165	1.000	0.941		1.000
g.10479A>G/T	0.139	0.139	0.771	0.726	0.771	

表对角线上方为 *D'* 值, 对角线下方为 *r*² 值

Above the diagonal of the table is the value of *D'*, below the diagonal is the value of *r*²

表4 *UCP3* 基因SNPs与江口萝卜猪肉质性状关联性分析Table 4 Association analysis of SNPs of *UCP3* gene with meat quality traits in Jiangkou Luobo pigs

位点 Locus	数量 No.	基因型 Geno - type	pH ₁	pH ₂₄	肉色 Meat color (Opto)	大理石纹 Marbling scores	熟肉率 Cooked meat percentage	失水率 Rate of water loss	滴水损失 Drip loss	剪切力 Shearing force (N)	水份/% Moisture	肌内脂肪/% Intramuscu - lar fat	粗蛋白/% Crude protein
g.3127A>G	10	AA	6.33±0.02	5.72±0.18	62.01±1.79	3.49±0.57	64.61±1.40	19.21±0.99	1.85±0.91	42.88±4.45	67.99±1.53	4.74±0.81	19.45±0.35
	105	AG	6.29±0.26	5.81±0.22	64.28±1.99	3.55±0.62	65.06±1.37	19.95±0.97	1.82±0.84	32.78±4.56	68.71±2.05	4.83±0.73	19.61±0.59
	50	GG	6.36±0.30	5.86±0.25	62.88±2.37	3.56±0.77	64.01±1.02	18.88±0.91	1.90±0.65	31.29±5.09	68.09±2.31	4.86±0.68	19.72±0.91
	10	TT	6.33±0.02	5.72±0.18	62.01±1.79	3.49±0.57	64.61±1.40	19.21±0.99	1.85±0.91	42.88±4.45	67.99±1.53	4.74±0.81	19.45±0.35
	105	TC	6.29±0.26	5.81±0.22	64.28±1.99	3.55±0.62	65.06±1.37	19.95±0.97	1.82±0.84	32.78±4.56	68.71±2.05	4.83±0.73	19.61±0.59
g.3205T>C	50	CC	6.36±0.30	5.86±0.25	62.88±2.37	3.56±0.77	64.01±1.02	18.88±0.91	1.90±0.65	31.29±5.09	68.09±2.31	4.86±0.68	19.72±0.91
	80	CC	6.32±0.26	5.84±0.23	63.75±1.94	3.43±0.56	64.95±1.44	19.00±0.86	1.99±0.81	35.44±3.34	68.33±2.71	4.66±0.77	19.56±0.79
	25	CT	6.29±0.33	5.91±0.24	63.43±2.01	3.45±0.61	63.77±1.22	18.71±0.69	1.91±0.84	33.88±4.82	67.87±1.97	4.61±0.87	19.19±0.66
	60	TT	6.38±0.29	5.88±0.36	64.65±2.67	3.83±0.77	64.25±1.24	18.66±1.01	1.96±0.76	27.12±3.63	67.94±2.01	5.01±0.75	19.35±0.72
	80	CC	6.32±0.26	5.84±0.23	63.75±1.94	3.43±0.56	64.95±1.44	19.00±0.86	1.99±0.81	35.44±3.34	68.33±2.71	4.66±0.77	19.56±0.79
g.10441C>A	25	CA	6.29±0.33	5.91±0.24	63.43±2.01	3.45±0.61	63.77±1.22	18.71±0.69	1.91±0.84	33.88±4.82	67.87±1.97	4.61±0.87	19.19±0.66
	60	AA	6.38±0.29	5.88±0.36	64.65±2.67	3.83±0.77	64.25±1.24	18.66±1.01	1.96±0.76	27.12±3.63	67.94±2.01	5.01±0.75	19.35±0.72
	80	GG	6.32±0.26	5.84±0.23	63.75±1.94	3.43±0.56	64.95±1.44	19.00±0.86	1.99±0.81	35.44±3.34	68.33±2.71	4.66±0.77	19.56±0.79
	25	GA	6.29±0.33	5.91±0.24	63.43±2.01	3.45±0.61	63.77±1.22	18.71±0.69	1.91±0.84	33.88±4.82	67.87±1.97	4.61±0.87	19.19±0.66
	60	AA	6.38±0.29	5.88±0.36	64.65±2.67	3.83±0.77	64.25±1.24	18.66±1.01	1.96±0.76	27.12±3.63	67.94±2.01	5.01±0.75	19.35±0.72
g.10466G>A	80	GG	6.32±0.26	5.84±0.23	63.75±1.94	3.43±0.56	64.95±1.44	19.00±0.86	1.99±0.81	35.44±3.34	68.33±2.71	4.66±0.77	19.56±0.79
	25	GA	6.29±0.33	5.91±0.24	63.43±2.01	3.45±0.61	63.77±1.22	18.71±0.69	1.91±0.84	33.88±4.82	67.87±1.97	4.61±0.87	19.19±0.66
	60	AA	6.38±0.29	5.88±0.36	64.65±2.67	3.83±0.77	64.25±1.24	18.66±1.01	1.96±0.76	27.12±3.63	67.94±2.01	5.01±0.75	19.35±0.72
	80	AA	6.39±0.28	5.82±0.25	63.77±2.51	3.20±0.53 ^a	64.73±0.89	18.56±1.11	2.05±0.83	42.13±4.54 ^a	67.77±2.32	4.65±0.61	19.77±0.80
	25	AG	6.43±0.33	5.80±0.24	62.39±3.01	3.21±0.44 ^a	63.98±1.21	18.92±0.81	2.04±0.79	40.88±3.25 ^a	68.44±1.70	4.63±0.88	19.91±0.54
g.10479A>G/T	40	GG	6.34±0.26	5.84±0.23	63.66±2.55	4.07±0.66 ^b	63.56±1.43	19.04±0.99	1.89±0.61	23.32±3.98 ^b	67.91±2.01	5.19±0.47	19.40±0.44
	20	TT	6.37±0.22	5.74±0.10	62.14±3.47	4.02±0.59 ^b	64.00±1.44	19.12±0.77	1.97±0.59	22.33±3.09 ^b	68.07±0.85	5.13±0.62	19.62±0.41

同列不同基因型之间标记不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$); pH₁, pH₂₄ 分别为屠宰后 1 和 24 h 的胴体 pH; 下同Different lowercase letters among the different genotypes of the columns indicate significant differences ($P<0.05$); pH₁ and pH₂₄: Carcass pH at 1 and 24 h after slaughter, respectively;

The same below

3 讨论

很多研究已经证实, *UCP3* 基因主要在骨骼肌和棕色脂肪中表达(Boss et al., 1997), 在脂肪酸代谢中发挥着重要作用(Argyropoulos et al., 1998)。因此, 本研究选择 *UCP3* 基因为候选基因, 研究其多态性以及表达量与江口萝卜猪肉质性能之间的相关性。本研究扩增了 *UCP3* 基因所有外显子序列, 共发现6个SNPs位点, 其中g.10479A>G/T位点发现两种突变形式, A>T型的颠换和A>G型的转换。单个样本测序分型时发现g.10479A>G/T位点仅有4种基因型, 其余位点均检测到3种基因型。从杂合度、有效等位基因数和多态信息含量这几项群体遗传参数来去除g.10479A>G/T位点外的4个位点等位基因分布均匀, 在群体内变异程度大, 且可以提供一定的遗传信息。推测g.10479A>G/T位点等位基因频率差异较大可能是由于长期自然选择或人工选育造成的。连锁不平衡分析发现, g.3127A>G和g.3205T>C位点以及g.10439C>T和

g.10466G>A位点为完全连锁不平衡, 说明两个位点作为一个整体遗传, 共同对基因发挥调控作用。在基因型与肉质的关联性分析中, 仅发现g.10479A>G/T位点不同基因型个体在大理石纹评分和剪切力两项指标上存在显著差异, 对于其余位点, 从数据也可以直观的看出g.10439C>T、g.10441C>A和g.10466G>A位点突变型个体与另两种基因型个体在大理石纹评分、剪切力、肌内脂肪含量3项指标中存在明显差异, 说明 *UCP3* 基因3'UTR上的4个位点与肌内脂肪含量存在明显相关, 而5'UTR上的2个位点不同基因型个体肉质指标和基因表达量差异不大, 推测其对 *UCP3* 基因表达和江口萝卜猪肉

表5 *UCP3* 基因表达量与肉质相关性分析
Table 5 Correlation analysis between *UCP3* gene expression and meat quality

肉质指标	相关系数
Meat quality index	Correlation coefficient
pH ₁	-0.209
pH ₂₄	-0.078
肉色 Meat color	0.231
大理石纹 Marbling scores	0.421
熟肉率 Cooked meat percentage	0.036
失水率 Rate of water loss	-0.217
滴水损失 Drip loss	-0.221
剪切力 Shearing force	-0.918**
水份 Moisture	0.020
肌内脂肪 Intramuscular fat	0.968**
粗蛋白 Crude protein	-0.056

*: 显著相关; **: 极显著相关
*: Significant correlation; **: Extremely significant correlation

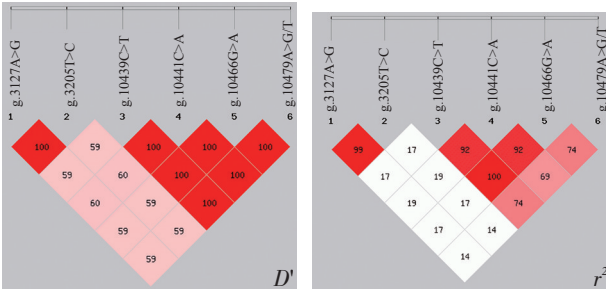


图4 *UCP3* 基因连锁不平衡分析
Figure 4 *UCP3* gene linkage disequilibrium analysis
颜色越深表示连锁程度越强
The darker the color, the stronger the linkage

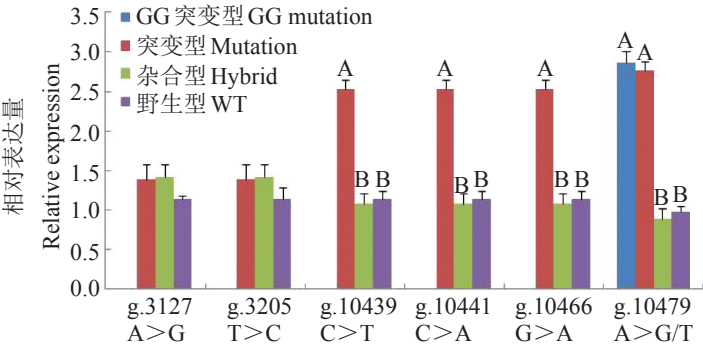


图5 *UCP3* 基因不同基因型个体相对表达量
Figure 5 Individual relative expression levels of different genotypes of *UCP3* gene
不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$); 内参基因: β -actin; n=3
Different uppercase letters indicate that the difference is extremely significant ($P<0.01$); Reference gene: β -actin; n=3

质性状影响不大。这与任亮等(2006)和陈哲等(2012)发现不同,推测这可能是由于多态位点不同所致,也有可能是因为猪品种差异,但是总体可以看出各位点的变异有利于肌肉脂肪的沉积。

在基因型与基因表达量的关联性分析中发现 *UCP3* 基因 g.3127A>G 和 g.3205T>C 位点 3 种基因型表达量差异不大; g.10439C>T、g.10441C>A、g.10466G>A 以及 g.10479A>G/T 位点则为杂合型和野生型个体基因表达量极显著低于突变型,说明这 5'UTR 上的 4 个位点基因的变异会提高 *UCP3* 基因在背最长肌中的表达量,而 5'UTR 上的 2 个位点对基因的表达无显著影响。对比不同基因型江口萝卜猪肉质性能和表达量的差异,本研究发现 *UCP3* 基因各位点的变异有利于肌肉脂肪的沉积,而且变异也会提高 *UCP3* 基因在背最长肌中的表达量。那是否说明 *UCP3* 基因的高表达有利于肌肉脂肪的沉积呢? 本研究最后分析了 *UCP3* 基因的表达量与肉质性能的相关性,发现 *UCP3* 基因在背最长肌中的表达量与肌肉脂肪含量呈极显著正相关,与剪切力呈极显著负相关,说明 *UCP3* 基因在背最长肌中表达量的提高有利于肌肉脂肪的沉积。但是 *UCP3* 基因对畜禽肌肉脂肪沉积究竟存在正向还是负向的调控作用还没有一个准确的定论,有研究显示 *UCP3* 基因可能与其家族中的其他成员功能相似,参与脂肪酸的氧化分解,如刘建华(2013)的研究发现在被 PPAR β 激活后, *UCP3* 会参与脂肪酸的氧化的氧化分解;黄爱霞(2011)在对 *UCP3* 基因表达和鸡肉肌肉脂肪的沉积的研究中发现,两者之间呈弱负相关关系。还有一些研究结果则相反,如有研究者在敲除小鼠(*Mus musculus*) *UCP3* 基因后,检测小鼠体内脂肪酸含量,发现并无明显变化, Joubert 等(2010)认为此现象是因为 *UCP3* 基因存在补偿机制效应,基因相当于脂肪酸合酶抑制因子,增加代谢效率和脂肪储存的再次积累,彭广南等(2013)研究证实了这一结论,其研究中发现广西三黄鸡(*Gallus gallus*)胸肌中的 IMF 与 *UCP3* 基因的表达量呈显著正相关,与本研究的结果一致。所以以现有的研究来看,还难以清楚的解释 *UCP3* 基因对畜禽肌肉脂肪的沉积的调控机制,但是已有的研究足以证明对畜禽肉质品质, *UCP3* 基因的变异以及表达有着非常重要的影响,值得更多研究者将其作为一个影响肌肉脂肪沉积的重要的候选功能基因,展开更深入的研究去揭示其内在调控机制。

4 结论

本研究在江口萝卜猪 *UCP3* 基因上筛选到 6 个 SNPs 位点, g.3127A>G、g.3205T>C 位于 5'UTR, g.10439C>T、g.10441C>A、g.10466G>A、g.10479A>G/T 位于 3'UTR; SNPs 位点与肉质的关联性分析发现, g.10479A>G/T 位点 TT 型和 GG 型个体大理石纹评分显著高于 AA 型和 AG 型个体, 剪切力则反之; 基因型与表达量关联性分析发现, g.10439C>T、g.10441C>A、g.10466G>A 以及 g.10479A>G/T 位点则为突变型表达量极显著高于杂合型和野生型; *UCP3* 基因表达量与肌肉脂肪含量和剪切力存在极显著相关关系, 分别为极显著正相关和极显著负相关。综上表明 *UCP3* 基因表达量提高有利于肌肉脂肪的沉积。

参考文献

- 陈哲. 2011. 猪 *SIM1*、*PPAR γ 2* 和 *UCP3* 基因分子特性及遗传效应研究[D]. 硕士学位论文, 浙江大学, 导师: 徐宁迎, pp. 111-112. (Chen Z. 2011. The characterizations and genetic effect of porcine *SIM1*, *PPAR γ 2* and *UCP3* Genes[D]. Thesis for M.S., Zhejiang University, Supervisor: Xu N Y, pp. 111-112.)
- 陈哲, 于峰祥, 于建宁, 等. 2012. 猪 *UCP3* 基因第 4 内含子 Bcc I 多态性检测及其与胴体和肉质性状的关联分析[J]. 江苏农业学报, 28(06): 1338-1343. (Chen Z, Yu F X, Yu J N, et al. 2012. Detection of Bcc I polymorphism in intron 4 of porcine gene and its correlation with carcass and meat quality traits[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 28(06): 1338-1343.)
- 方美英, 赵兴波, 吴常信, 等. 2002. 不同品种猪解耦联蛋白基因 3'调控区的遗传变异[J]. 科学通报, 47(13): 1010-1012. (Fang M Y, Zhao X B, Wu C X, et al. 2002. Genetic variation of the 3' regulatory region of the pig's uncoupling protein gene in different varieties[J]. Chinese Science Bulletin, 47(13): 1010-1012.)
- 龚建军. 2005. 德国猪肉品质测定技术[J]. 中国畜牧兽医, 32(9): 23-26. (Gong J J. 2005. German pork quality measurement technology[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 32(9): 23-26.)
- 胡倩. 2008. 贵州地方猪种肉质功能基因的研究[D]. 硕士学位论文, 贵州大学, 导师: 王嘉福, pp. 54-56. (Hu Q. 2008. Study of function gene to meat quality performance in Guizhou local porcine[D]. Thesis for M.S., Guizhou University, Supervisor: Wang J F, pp. 54-56.)

- 黄爱霞. 2011. 浙江省主要鸡种肉品质分析及 *Leptin receptor* 基因对鸡脂肪代谢影响分子机制的研究[D]. 硕士学位论文, 浙江大学, 导师: 吴天星, pp. 75-76. (Huang A X. 2011. Analysis of chicken meat quality in Zhejiang province and study on molecular mechanism of leptin receptor gene in lipid metabolism[D]. Thesis for M.S., Zhejiang University, Supervisor: Wu T X, pp. 75-76.)
- 李秋玲, 许尚忠, 咎林森, 等. 2006. 3个牛品种 *UCP3* 基因第5内含子和第6外显子部分序列的多态性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 34(11): 11-20. (Li Q L, Xu S Z, Zan L S, et al. 2006. Study on polymorphisms of part sequence of intron 5 and exon 6 of bovine *UCP3* gene[J]. Journal of Northwest A&F University(Nature Science Edition), 34(11): 11-20.)
- 李艳华, 酆汉杰, 赵兴波, 等. 2006. 猪 *UCP2* 基因5'调控区和外显子1的遗传变异研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 33(3): 262-266. (Li Y H, Li H J, Zhao X B, et al. Research on genetic variation of 5' regulatory region and exon 1 of *UCP2* in pigs[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 33(3): 262-266.)
- 刘建华. 2013. 绵羊 *UCP2* 和 *UCP3* 基因的克隆、表达及其遗传变异研究[D]. 山西农业大学, 导师: 刘文忠, pp. 142-143. (Liu J H. 2013. Study on the cloning, expression and genetic variation of ovine *UCP2* and *UCP3* genes [D]. Shanxi Agricultural University, Supervisor: Liu W Z, pp. 142-143.)
- 彭广南. 2013. 广西三黄鸡 *PPAR γ* 和 *UCP3* 基因表达水平与脂肪性状的相关研究[D]. 硕士学位论文, 广西大学, 导师: 郭亚芬, pp. 62-66. (Peng G N. 2013. Corelation analysis between expression levels of *PPAR γ* and *UCP3* gene and meat quality traits in Guangxi Sanhuang chicken[D]. Thesis for M.S., Guangxi University, Supervisor: Guo Y F, pp. 62-66.)
- 任亮, 朱宝芹, 韩丹, 等. 2006. 猪 *UCP3* 基因多态性及其与脂肪沉积、肉质性状的相关分析[J]. 农业生物技术学报, 14(5): 652-656. (Ren L, Zhu B Q, Han D, et al. 2006. Polymorphism of porcine uncoupling protein 3 (*UCP3*) and its association with fat deposition and meat quality[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 14(5): 652-656.)
- 涂荣剑. 2003. 猪解耦联蛋白基因3 (*UCP3*) 的序列及多态性研究[D]. 华中农业大学, 导师: 邓昌彦, pp. 39-41. (Tu R J. 2003. Research on sequence and polymorphism of porcine uncoupling protein gene 3[D]. Huazhong Agricultural University, Supervisor: Deng C Y, pp. 39-41.)
- 王阳, 冉雪琴, 王嘉福, 等. 2011. 糯谷猪解耦联蛋白3和心脏型脂肪酸结合蛋白在骨骼肌中的表达和定位[J]. 中山大学学报(自然科学版), 50(01): 99-103. (Wang Y, Ran X Q, Wang J F, et al. 2001. Expression and localization of uncoupling protein 3 and heart fatty acid-binding protein in skeletal[J]. ACTA Scientiarum Nat Uralium Universitatis Sunyatseni, 50(01): 99-103.)
- 伍革民, 许晓风, 章熙霞, 等. 2007. 山猪 *UCP3* 基因遗传变异及其与胴体、肉质性状的相关研究[J]. 江苏农业科学, (04): 132-135. (Wu G M, Xu X F, Zhang X X, et al. 2007. Study on genetic variation of *UCP3* gene and its correlation with carcass and meat quality traits in mountain pigs[J]. Jiangsu Agricultural Science, (04): 132-135.)
- 张雷, 文生萍, 谷大海, 等. 2010. *UCPs* 基因多态性与脂肪代谢的相关性研究[J]. 中国畜牧兽医, 37(8): 78-83. (Zhang L, Wen S P, Gu D H, et al. 2010. The polymorphisms of *UCPs* genes associated with fat metabolism [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 37(8): 78-83.)
- Aguer C, Piccolo B D, Fiehn O, et al. 2016. A novel amino acid and metabolomics signature in mice overexpressing muscle uncoupling protein 3[J]. The FASEB Journal, 31(2): 814-827.
- Argyropoulos G, Brown A M, Willi S M, et al. 1998. Effects of mutations in the human uncoupling protein 3 gene on the respiratory quotient and fat oxidation in severe obesity and type 2 diabetes[J]. Journal of Clinical Investigation, 102(7): 1345-1351.
- Boss O, Samec S, Paoloni-giacobino A, et al. 1997. Uncoupling protein-3: A new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression[J]. FEBS Letters, 408(1): 39-42.
- Joubert R, Coustard S M, Swennen Q, et al. 2010. The beta-adrenergic system is involved in the regulation of the expression of avian uncoupling protein in the chicken[J]. Domestic Animal Endocrinology, 38(2): 115-125.
- Lapice E, Monticelli A, Cocozza S, et al. 2016. The combination of *UCP3*-55CT and *PPAR γ* 2Pro12Ala polymorphisms affects BMI and substrate oxidation in two diabetic populations[J]. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 26(5): 400-406
- Ricquier D, Frédéric B. 2000. Mitochondrial uncoupling proteins: From mitochondria to the regulation of energy balance[J]. The Journal of Physiology, 529(1): 3-10.
- Stone R T, Rexroad C E, Smith T P. 2015. Bovine *UCP2* and *UCP3* map to BTA15[J]. Animal Genetics, 30(5): 378-381.

(责任编辑 崔学平)