



王思琪,李玉琦,周春雪,等. miR-23a/27a/24 基因簇 *g.65307469G>A* 突变对大白猪产仔数和启动子活性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2024,47(2):334-341.

WANG Siqi, LI Yuqi, ZHOU Chunxue, et al. The effect of *g.65307469G>A* variant in miR-23a/27a/24 gene cluster on litter size traits in Large White sow and promoter activity[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024,47(2):334-341.

miR-23a/27a/24 基因簇 *g.65307469G>A* 突变 对大白猪产仔数和启动子活性的影响

王思琪,李玉琦,周春雪,杨柳,杜星,吴望军,潘增祥,李齐发*

(南京农业大学动物科技学院,江苏 南京 210095)

摘要: [目的] 本文旨在研究大白猪 miR-23a/27a/24 基因簇启动子突变位点多态性与产仔数性状的关系及潜在机制,为母猪繁殖性状的分子育种提供新的潜在遗传标记。 [方法] 利用混池测序技术筛选猪 miR-23a/27a/24 基因簇启动子突变位点,直接测序法对大白猪群体($n=345$) miR-23a/27a/24 基因簇突变位点进行基因分型,计算遗传多样性;用线性模型对突变位点多态性与产仔数性状进行关联性分析;构建不同等位基因类型启动子载体,转染猪卵巢颗粒细胞,通过检测荧光素酶活性分析突变对启动子活性的影响;用生物信息学方法预测不同等位基因类型启动子潜在结合的差异转录因子,用荧光素酶活性分析差异转录因子对不同等位基因类型启动子活性的影响。 [结果] 在猪 miR-23a/27a/24 基因簇启动子-648 nt (Chr.2,65 307 469 nt)处发现 1 个新的 G/A 突变,命名为 *g.65307469G>A*。在大白猪群体中发现 3 种基因型(GG、GA 和 AA),其中 GG 为优势基因型(89.57%),G 等位基因为优势等位基因(94.64%)。关联性分析发现,GA 基因型母猪的总产仔数(TNB)比 GG 基因型母猪每胎高 0.56 头($P<0.05$)。荧光素酶活性分析结果显示 G 等位基因类型启动子活性显著高于 A 等位基因类型($P<0.05$)。在不同等位基因类型启动子间发现 1 个潜在结合的差异转录因子死亡相关蛋白 1 (THAP1),成功构建猪 THAP1 基因过表达载体,共转试验结果显示转录因子 THAP1 对不同等位基因类型启动子活性均无显著影响($P>0.05$)。 [结论] miR-23a、miR-27a 和 miR-24 是大白猪产仔数性状的候选基因,*g.65307469G>A* 突变抑制 miR-23a/27a/24 基因簇的启动子活性,但与转录因子 THAP1 无关。

关键词: 大白猪;miR-23a/27a/24 基因簇;变异位点;产仔数性状;启动子活性

中图分类号:S813

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)02-0334-08

The effect of *g.65307469G>A* variant in miR-23a/27a/24 cluster on litter size traits in Large White sow and promoter activity

WANG Siqi, LI Yuqi, ZHOU Chunxue, YANG Liu, DU Xing, WU Wangjun, PAN Zengxiang, LI Qifa*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: [Objectives] The paper aimed to study the relationship between the polymorphisms of variants in miR-23a/27a/24 gene cluster promoter and litter size traits and its potential mechanism in Large White sow, and to provide a new potential genetic marker for molecular breeding of reproductive traits in sow. [Methods] The pooled sequencing was used to screen for variants in the promoter region of porcine miR-23a/27a/24 gene cluster, and the direct sequencing was used to detect genotype variants in a Large White sows population ($n=345$). The association between the polymorphisms and litter size traits was analyzed by a linear model. Different allelic promoter vectors were constructed and transfected into porcine ovarian granulosa cells (GC), and the effect of the variants on promoter activity was analyzed by luciferase activity assay. Bioinformatic methods were used to predict the potential binding of differential transcription factors in different allelic promoter, and the effect of differential transcription factors on the activity of different allelic promoters was verified by luciferase activity assay. [Results] A novel G/A variant, named *g.65307469G>A*, was identified at -648 nt (Chr. 2, 65 307 469 nt) in the promoter region of porcine miR-23a/27a/24 gene cluster. Three genotypes (GG, GA and AA) were observed in the Large White sow population, of which GG was the dominant genotype (89.57%) and the G allele was the dominant allele (94.64%). The association analysis revealed that the total number of piglets born (TNB) of sows with GA genotype was 0.56 higher than that of sows with GG genotype per litter ($P<0.05$). Luciferase activity assay showed that the activity of promoter region with G allele was significantly higher than that of promoter region with the A allele ($P<0.05$). A potentially binding site for transcription factor

收稿日期:2023-03-20

基金项目:江苏省种业振兴揭榜挂帅项目(JBGS[2021]024);江苏省农业重大新品种创制专项(PZCZ201734)

*通信作者:李齐发,教授,主要从事动物分子遗传研究,E-mail:liqifa@njau.edu.cn。

thanos-associated protein 1 (THAP1) was found in the promoter regions with the G allele, but not A allele, and a porcine THAP1 overexpression vector was successfully constructed. The results of the co-transformation experiment revealed that the THAP1 had no significant effect on the activity of the promoter regions with the G or A alleles ($P>0.05$). [Conclusions] The miR-23a/27a/24 gene cluster was a candidate gene cluster for litter size traits in Large White sow. The g.65307469G>A mutation affected the promoter activity of miR-23a/27a/24 gene cluster, but was not related to the transcription factor THAP1.

Keywords: Large White sow; miR-23a/27a/24 gene cluster; variant; litter size traits; promoter activity

作为一类广泛分布于各种细胞和组织中的内源性非编码 RNA, 微小 RNA (miRNA) 一般通过其自身种子序列 (seed sequence) 直接与靶 mRNA 的 3' UTR 或启动子结合, 参与调控机体一系列重要的生理过程^[1]。在家畜中, 研究证实 miRNA 与重要经济性状相关的细胞功能密切相关^[2-4]。例如, miR-106^[5] 和 miR-221^[6] 被证实分别参与调控乳腺上皮细胞的脂质代谢及增殖, 进而影响奶牛的泌乳量和乳脂率; miR-143^[7] 和 miR-26a^[8] 参与调控真皮乳头细胞的增殖, 与羊毛生长和羊毛卷曲表型相关; miR-23b^[9] 和 miR-503^[10] 通过调控前体脂肪细胞的分化, 影响猪肉品质的重要指标肌肉脂肪含量和背膘厚度。基于 miRNA 在家畜重要经济性状相关细胞功能中的调控作用, 科学家们开始探索 miRNA 及其变异位点作为家畜重要经济性状分子育种的遗传标记的可行性^[11]。Cardoso 等^[12] 通过多组学 (包括全基因组、转录组和蛋白组) 联合分析发现, bta-miR-2419-3p、bta-miR-193a-2 和 bta-miR-1291 基因上含有牛肉脂肪酸含量显著关联的单核苷酸变异 (single nucleotide variation, SNV), 是控制牛肉脂肪酸组成的候选基因。在牛和山羊中, 利用生物信息学方法分别发现 4 679 个和 127 个 miRNA 基因的遗传变异位点位于产乳量性状基因座中^[13]。但是, 与蛋白编码基因相比, miRNA 上发现的变异位点较少, 而已被证实与家畜重要经济性状显著关联的变异位点更少^[14-15]。前人研究发现 miR-23a/27a/24 簇的 3 个成员 (miR-23a、miR-27a 和 miR-24) 均位于猪繁殖性状 QTL 内^[16-17], 且本课题组前期研究证实 miR-23a/27a/24 簇为猪卵巢颗粒细胞 (granulosa cell, GC) 中的凋亡诱导因子^[18]。本研究拟以 miR-23a/27a/24 基因簇为潜在的候选基因, 筛选大白猪 miR-23a/27a/24 基因簇启动子 SNV, 分析 SNV 对大白猪繁殖性能的影响及其潜在的分子机制, 为进一步评估 miR-23a、miR-27a 和 miR-24 作为大白猪繁殖性状候选基因的可行性提供试验依据, 并筛选可用于大白猪繁殖性状分子育种的可靠遗传标记。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析

猪 miR-23a/27a/24 基因簇的启动子序列 (100316598, GenBank ID), 以及猪 (100621925)、人 (55145)、小鼠 (73754)、牛 (538615) 和羊 (101119790) 等物种死亡相关蛋白 1 (thanos-associated protein 1, THAP1) 基因编码区 (CDS) 序列均从 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中获得。启动子潜在结合的转录因子由 JASPAR 数据库 (<http://jaspar.genereg.net/>) 预测。

1.2 DNA 提取、SNV 筛选与基因分型

从江苏康乐农牧有限公司随机抽取 345 头有繁殖性状记录的大白母猪的耳组织样, 将耳组织样剪碎后, 用含蛋白酶 K 的 DNA 裂解缓冲液消化 12 h 后依次添加 Tris 饱和酚、氯仿、异戊醇和无水乙醇提取样品 DNA, 最终提取的 DNA 稀释至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 作为 DNA 模板。用表 1 中的引物对混池 DNA 及单个样品

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

基因或载体 Gene or vectors	引物序列 Primer sequences (5'→3')	退火温度/°C Annealing temperature	产物长度/bp Product size	用途 Usage
miR-23a/27a/24	F: GAAACTGAGGCTTAAAGGG R: AGGAAGCTCCCAAAGCCAGGG	58	370	扩增 Amplification
pGL3-G/T	F: CCGCTAGCCGAGGGACCCAGCTTTTCAT R: CCCTCGAGGGACCCAGCTCAAGGTGCA	53	197	载体构建 Vector construction
pcDNA3.1-THAP1	F: CCGCTAGCCGAGGATGCTGCACTCTGTT R: CCCTCGAGGGACCTTTTCACGCTGTACTT	54	651	载体构建 Vector construction
THAP1	F: TGCTTCAAGAGGAGTG/R: GCCTCAACCTGGGAAAT	60	221	荧光定量 PCR qPCR
GAPDH	F: GGACTCATGACCACCGTCCAT/R: TCAGATCCACAACCGACACGT	60	163	荧光定量 PCR qPCR

注: 下划线部分为限制性内切酶 *Nhe* I (上游引物) 和 *Xho* I (下游引物) 的酶切位点。

Note: The underlined part is the restriction enzyme site of *Nhe* I (upstream primer) and *Xho* I (downstream primer).

DNA 进行 PCR 扩增、测序和筛选 SNV, 并对 SNV 进行基因分型。DNA 混池、PCR 扩增、测序、筛选 SNV 和基因分型方法见文献[19]。

1.3 关联分析

利用 SAS v9.2 软件的 GLM 程序分析 miR-23a/27a/24 基因簇多态性与母猪繁殖性状的关系。具体模型: $y_{ijklmn} = \mu + a_i + b_k + c_l + d_m + e_{ijklmn}$ 。式中: y 为繁殖性状观察值; μ 为所有个体的平均值; a_i 为季节效应; b_k 为胎次效应; c_l 为日龄效应; d_m 为基因型效应; e_{ijklmn} 为随机误差。

1.4 质粒构建

设计含酶切位点的特异性引物, 从猪 DNA 中扩增出含变异位点不同等位基因类型的 miR-23a/27a/24 基因簇启动子片段, 经纯化、酶切和连接等步骤, 克隆至 pGL3-basic 载体 (Promega 公司), 构建双荧光素酶报告载体。扩增猪 THAPI 的 CDS 区片段, 经纯化、酶切和连接等步骤, 克隆至 pcDNA3.1 载体 (Promega 公司), 构建过表达载体。构建载体用的引物见表 1。

1.5 GC 培养与转染

用生理盐水 (含 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 庆大霉素) 和 75% 乙醇交替洗涤当天采集的猪新鲜卵巢 3~5 次, 直至液体清澈。抽取洗净卵巢中 3~5 mm (直径) 健康卵泡的卵泡液, 收集至离心管中, $1200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃去卵泡液。GC 使用预热的 PBS 清洗 2 次后, 弃去 PBS。使用 DMEM/F12 培养基 (含 15% 胎牛血清和 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 青链霉素) 重悬 GC, 接种至细胞培养板中, 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养。36 h 后按照 HighGene (Abclonal 公司) 说明书将质粒转染到 GC 中。

1.6 荧光素酶活性分析

转染质粒 24 h 后根据荧光素酶报告基因试剂盒 (南京诺维赞) 说明书收集样品, 使用发光检测仪检测样品中的萤火虫荧光与海肾荧光。样品的相对荧光值为萤火虫荧光值与海肾荧光值的比值。

1.7 RNA 提取与荧光定量 PCR (qPCR)

收集转染后的 GC 按 TRIzol 试剂 (南京诺维赞) 说明书中的步骤提取总 RNA, 经 4×gDNA wiper Mix 去除 DNA 后, 用 HiScript II Q Select RT SuperMix 反转录成 cDNA。用 SYBR Green Master Mix Kit (南京诺维赞) 进行荧光定量检测。以 GAPDH 作为内参, 反应体系和具体步骤见文献[19]。用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算基因相对表达水平。定量引物信息见表 1。

1.8 数据处理与分析

数据均以平均数±标准误 ($\bar{x} \pm SE$) 的形式呈现。用 GraphPad Prism 5 软件对数据进行统计分析和制图, 用 t 检验进行差异显著性比较。

2 结果与分析

2.1 大白猪 miR-23a/27a/24 基因簇 g.65307469G>A 位点鉴定与多态性分析

利用池 DNA 测序在大白猪 miR-23a/27a/24 基因簇启动子-648 nt (Chr.2, 65 307 469 nt) 处发现了 1 个新的变异位点, 为 G/A 单碱基突变, 命名为 g.65307469G>A (图 1-A)。利用直接测序法对 345 头大白母猪 miR-23a/27a/24 基因簇 g.65307469G>A 位点进行分型。结果显示, 大白猪 miR-23a/27a/24 基因簇启动子 g.65307469G>A 位点存在 3 种基因型 (GG、GA 和 AA) (图 1-B)。进一步分析发现, 这 3 种基因型 (GG、GA 和 AA) 的基因型频率分别为 89.57% (309/345)、10.14% (35/345) 和 0.29% (1/345) (图 1-C), 可见 GG 基因型为优势基因型。另外, 2 个等位基因中 G 等位基因频率为 94.64%, A 等位基因频率仅为 5.36%, 表明 G 是优势等位基因 (图 1-D)。

2.2 大白猪 miR-23a/27a/24 基因簇 g.65307469G>A 位点遗传多样性

遗传多样性分析结果显示, 大白猪群体 miR-23a/27a/24 基因簇 g.65307469G>A 位点的杂合度 (H_e) 为 0.101 4, 多态信息含量 (PIC) 为 0.096 3, 提示该位点变异程度较低, 为低度多态性位点 ($PIC < 0.25$)。大白猪群体中 miR-23a/27a/24 基因簇 g.65307469G>A 位点的 Hardy-Weinberg 平衡检验的 χ^2 值为 0.015 ($P > 0.05$), 处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

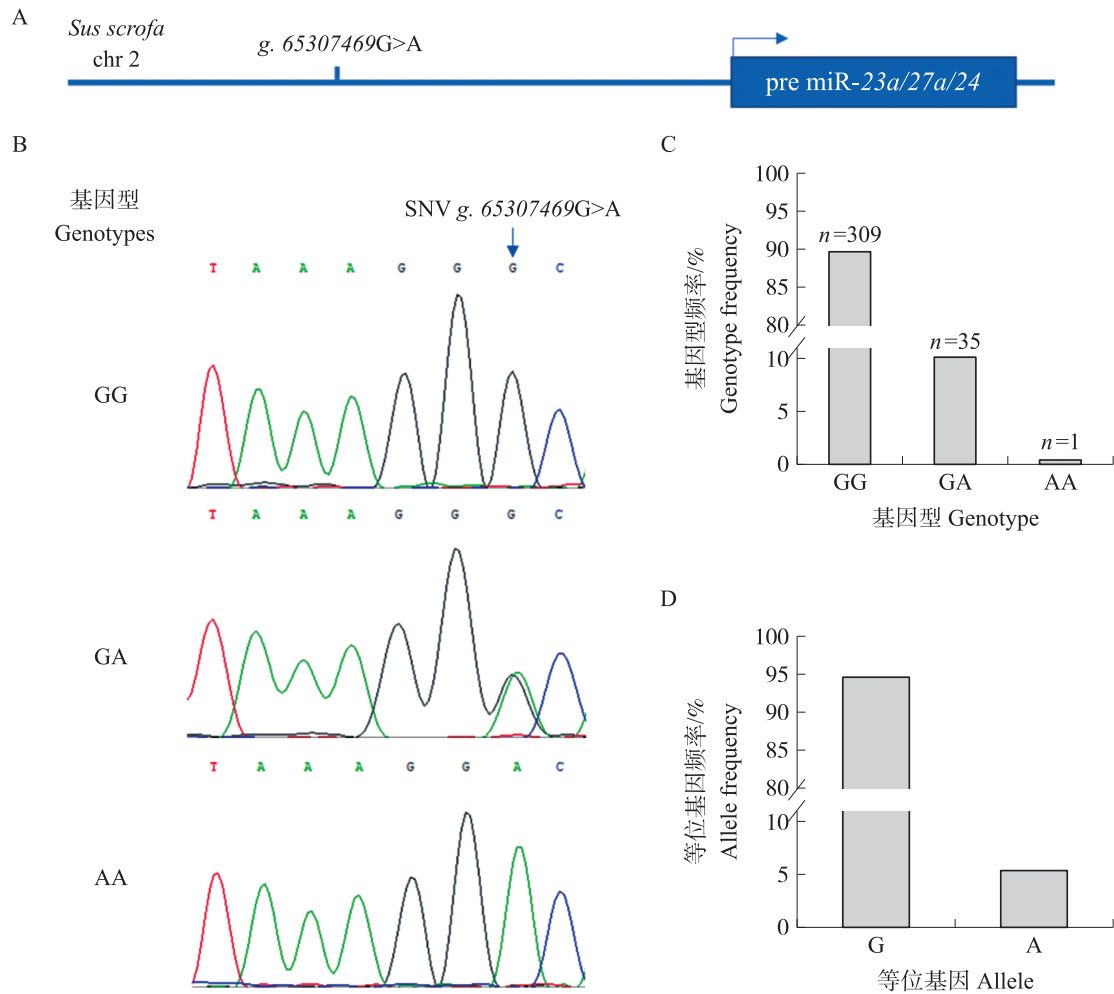


图 1 大白猪 miR-23a/27a/24 基因簇启动子 g.65307469G>A 位点多态性分析

Fig. 1 Polymorphism analysis of mutation g.65307469G>A of miR-23a/27a/24 cluster in Large White sow

A. g.65307469G>A 位置示意图;B 测序峰图;C. 基因型频率;D. 等位基因频率。

A. Schematic representation of the g.65307469G>A position;B. Sequencing peak map;C. Genotype frequency;D. Allele frequency.

2.3 miR-23a/27a/24 基因簇 g.65307469G>A 位点多态性与大白猪产仔数性状的关联性分析

为了解 miR-23a/27a/24 基因簇 g.65307469G>A 多态性与大白猪产仔数性状的关系,采用混合模型进行了关联性分析。从图 2 可以看出:在大白猪群体(n=345)中,GA 基因型母猪的总产仔数(TNB)显著高于 GG 基因型母猪。miR-23a/27a/24 基因簇 g.65307469G>A 多态性与其他繁殖性状包括产活仔数(NBA)、健仔数(NSP)、死胎数(NSB)和木乃伊胎(MM)之间均没有显著关联。上述结果表明,miR-23a、miR-27a 和 miR-24 是母猪繁殖力性状的候选 miRNA。由于 AA 基因型母猪只有 1 头,没有纳入关联性分析中,但其每胎总产仔数(TNB)(14.26 头)比 GG 基因型母猪多 0.97 头,比 GA 型基因型母猪多 0.41 头。

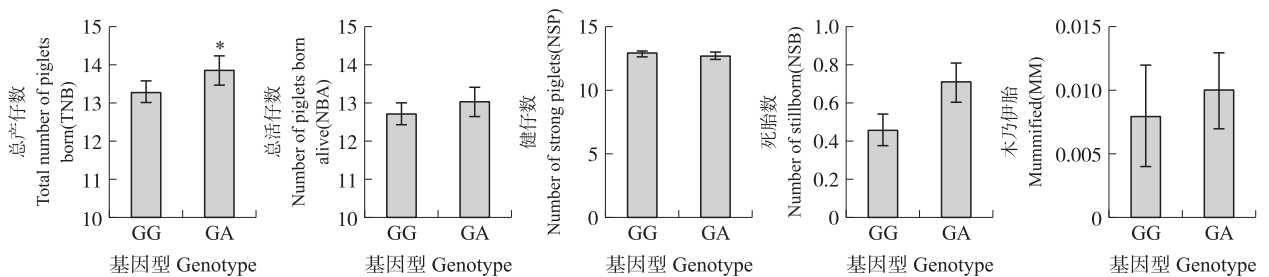


图 2 大白猪 miR-23a/27a/24 基因簇启动子 g.65307469G>A 位点多态性与产仔数性状的关联分析

Fig. 2 Association analysis between the polymorphism of g.65307469G>A in miR-23a/27a/24 cluster promoter and litter size traits in Large White sow

* P<0.05.

2.4 *g.65307469G>A* 位点突变影响猪 *miR-23a/27a/24* 基因簇启动子活性

为了进一步确定 *g.65307469G>A* 突变是否影响猪 *miR-23a/27a/24* 基因簇启动子活性,本研究构建了 2 个等位基因类型启动子报告载体 pGL3-G 和 pGL3-A (图 3-A)。荧光素酶活性分析结果显示,在猪 GC 中,G 等位基因类型启动子报告载体的荧光素酶活性极显著高于 A 等位基因类型(图 3-B),表明 *g.65307469G>A* 突变通过影响启动子活性影响猪 GC 中 *miR-23a/27a/24* 基因簇的转录,进而影响大白猪繁殖力(即总产仔数)。

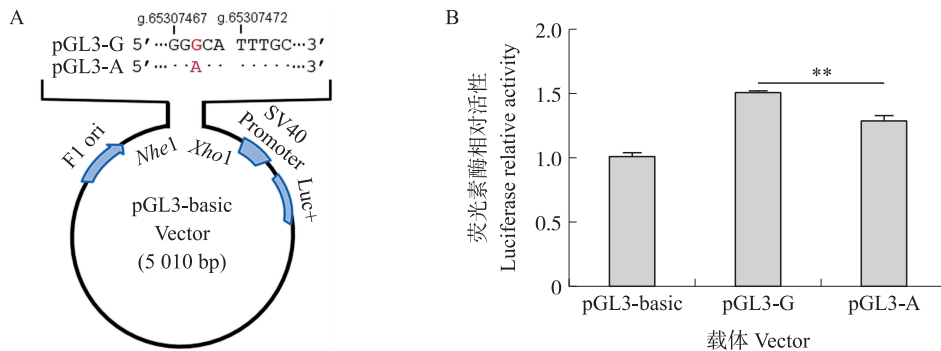


图 3 *g.65307469G>A* 突变对 *miR-23a/27a/24* 基因簇启动子活性的影响

Fig. 3 Effects of *g.65307469G>A* on the promoter activity of *miR-23a/27a/24* cluster

A. pGL3-G 和 pGL3-A 载体构建示意图;B. pGL3-G 和 pGL3-A 的荧光素酶活性检测。 ** $P < 0.01$, 下同。
A. Schematic diagram of pGL3-G and pGL3-A vector construction;B. Detection of fluorescence activity of pGL3-G and pGL3-A. ** $P < 0.01$. The same below.

2.5 猪 *THAP1* 基因编码区序列克隆与过表达载体构建

为了研究 *g.65307469G>A* 突变抑制猪 GC 中 *miR-23a/27a/24* 基因簇转录活性的机制,预测了 2 种等位基因类型启动子上潜在结合的转录因子。结果发现:转录因子 THAP1 的潜在结合元件 (THAP1-binding element, TBE) 仅存在于猪 *miR-23a/27a/24* 基因簇 G 等位基因类型启动子上(图 4-A)。为了验证 *g.65307469G>A* 突变是否影响转录因子 THAP1 对 *miR-23a/27a/24* 基因簇转录活性的调控,构建猪 *THAP1* 基因过表达载体。首先,克隆了大白猪 *THAP1* 基因 CDS 序列,结果发现大白猪 *THAP1* 基因 CDS 序列长度为 642 bp,与 GenBank 数据库中杜洛克猪参考基因组相应序列的一致性为 100%(图 4-B);编码蛋白含有 212 个氨基酸,DNA 结合域 (THAP 结构域,4~82 aa) 在哺乳动物中高度保守(图 4-C)。其次,将大白猪

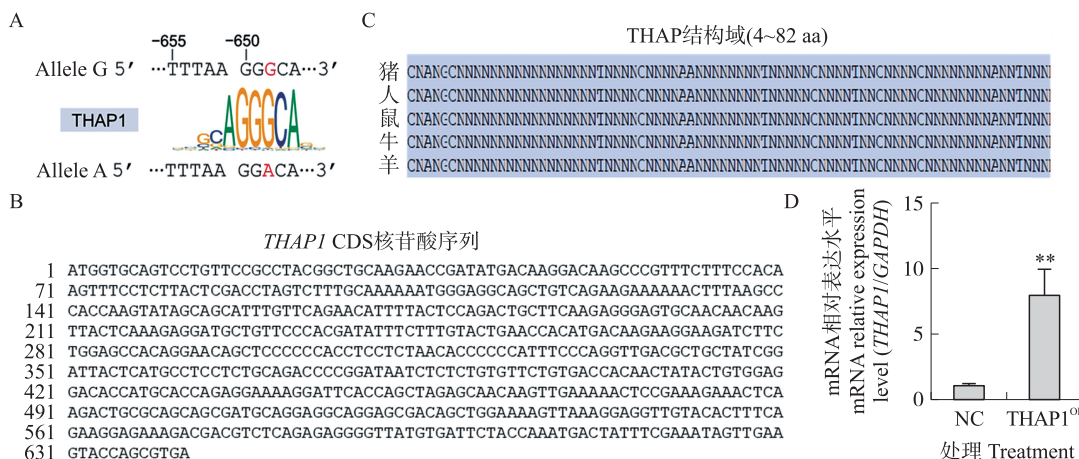


图 4 猪 *THAP1* 基因过表达载体的构建与验证

Fig. 4 Construction and validation of overexpression vectors for porcine *THAP1*

A. JASPAR 预测 2 种等位基因类型启动子上转录因子 THAP1 结合位点;B. 猪 *THAP1* 基因 CDS 核苷酸序列;C. 多物种 THAP1 蛋白 DNA 结构域比对;D. *THAP1* 过表达载体效率验证。NC: pcDNA3.1;THAP1^{OE}: pcDNA3.1-*THAP1*。下同。

A. Prediction of binding sites for transcription factor THAP1 in *miR-23a/27a/24* cluster promoter with allele G and allele A by using JASPAR;B. Alignment of *THAP1* CDS nucleotide sequence of pig; C. Alignment of DNA domain of THAP1 protein among multispecies; D. Validation of *THAP1* overexpression vector efficiency. NC: pcDNA3.1;THAP1^{OE}: pcDNA3.1-*THAP1*. The same below.

THAP1 基因 CDS 序列克隆到 pcDNA3.1 载体,经测序确认成功构建了猪 *THAP1* 基因的过表达载体 pcDNA3.1-*THAP1*。最后,将 pcDNA3.1-*THAP1* 转染 GC,结果显示 GC 中 *THAP1* 基因表达水平极显著增加(图 4-D)。

2.6 转录因子 *THAP1* 对不同等位基因类型 miR-23a/27a/24 基因簇启动子活性的影响

为了进一步分析转录因子 *THAP1* 是否参与了 *g.65307469G>A* 突变对 miR-23a/27a/24 基因簇启动子活性的抑制,将 pcDNA3.1-*THAP1* 分别与 pGL3-G 和 pGL3-A 共转 GC。荧光素酶活性分析显示,转录因子 *THAP1* 对 2 种等位基因类型启动子区的活性均无显著影响(图 5),表明 *THAP1* 不是调控猪 miR-23a/27a/24 基因簇的转录因子,与 *g.65307469G>A* 突变抑制 miR-23a/27a/24 基因簇启动子活性无关。

3 讨论

母畜的繁殖力决定了养殖业经济效益。越来越多的证据表明,雌性家畜生殖的重要生理过程均受 miRNA 调控,如排卵、胚胎发育和激素分泌等^[20-21]。例如,miR-574 通过靶向卵丘细胞中的透明质酸酶 2(HAS2),抑制猪卵母细胞成熟^[22]。miR-7 在猪垂体中高度表达,介导去甲肾上腺素(NE)调节卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)分泌,进而影响性成熟和生殖功能^[23]。虽然 miRNA 与蛋白编码基因一样在哺乳动物雌性生殖中发挥重要的调控作用,如敲除单个 miRNA 同样会引起卵泡发育和排卵障碍、妊娠失败和繁殖力下降等^[24-25],但目前鉴定的母畜繁殖力性状的关键候选基因还主要是蛋白编码基因,相应的候选变异位点也多位于蛋白编码基因中,而 miRNA 基因则很少^[26-27]。这一方面与研究者的重视程度不够有关,在利用高通量技术(如全基因组关联分析和全基因组测序)筛选繁殖性状的候选基因时,一般只选择差异选择区域(DSR)或 QTL 内的蛋白编码基因作为潜在候选基因和位于蛋白编码基因的变异位点进行分析,直接忽略了 miRNA 基因^[26]。另一方面与 miRNA 基因本身序列长度较短(成熟序列为 22 nt 左右,前体序列也仅有 80 nt 左右)有关。本研究在猪 miR-23a/27a/24 基因簇启动子鉴定了一个新的突变位点(*g.65307469G>A*),发现该位点多态性与大白猪产仔数性状显著关联。结合本课题组前期证实 miR-23a/27a/24 簇是猪卵巢 GC 中促凋亡因子^[15]的结果,说明 miR-23a/27a/24 簇是大白猪产仔数性状的功能 miRNA 簇。另外,前人研究发现在发育潜能高的猪卵母细胞中,miR-23a 的表达量显著高于低发育潜能组,能够作为猪卵母细胞发育潜能的分子标志物^[28];miR-27a 和 miR-24 受猪卵泡闭锁和 GC 凋亡相关 lncRNA(*NORFA*)和转录因子 NFIX 的调控^[29],且两者在母猪妊娠 30 和 90 d 的胎盘中的表达存在显著差异,进一步证实 miR-23a/27a/24 基因簇与猪卵巢功能和繁殖力有关^[30]。总之,本研究结果为母猪繁殖性状(产仔数性状)的分子育种提供了一个新的潜在遗传标记,也说明 miRNA 可用作家畜重要性状的候选基因,但也还需要在猪育种实践中进一步验证。

启动子变异如 SNV 和插入/缺失(Indel)等往往都会影响基因的转录活性,这里的基因既包括蛋白编码基因^[31],也包括非编码基因如 miRNA^[32]和长链非编码 RNA(lncRNA)^[33]。例如,与产羔数性状显著关联的 *g.-700T>G* 突变显著降低湖羊 *NR5A2* 基因启动子活性^[34]。与攻击行为相关的 *rs345058216* 位点突变导致猪 *SLC6A4* 基因启动子活性极显著上调^[31]。Du 等^[33]在猪 lncRNA *NORFA* 基因启动子发现一个 19 bp 序列的插入/缺失突变,其中二花脸猪(世界著名高繁殖力猪种) *NORFA* 基因启动子含有双拷贝 19 bp 序列,有较高的转录活性,而大白猪和长白猪 *NORFA* 基因启动子则仅含有单拷贝 19 bp 序列,转录活性显著降低。本研究发现 *g.65307469G>A* 突变可显著抑制猪 GC 中 miR-23a/27a/24 基因簇启动子活性,说明 *g.65307469G>A* 突变通过影响 miR-23a/27a/24 基因簇转录影响母猪繁殖力,是影响大白猪繁殖力(产仔数)性状的关键候选变异位点。本研究虽然预测到 miR-23a/27a/24 基因簇 *g.65307469G>A* 位点 2 种等位基因启动子间潜在结合的差异转录因子 *THAP1*,但试验证实转录因子 *THAP1* 并未参与 *g.65307469G>A*

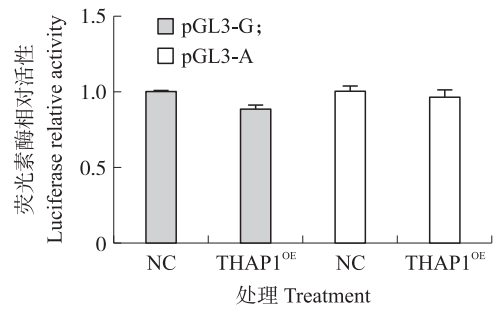


图 5 转录因子 *THAP1* 对不同等位基因型 miR-23a/27a/24 基因簇启动子活性的影响

Fig. 5 Effects of transcription factor *THAP1* on activity of miR-23a/27a/24 cluster promoter with different alleles

突变对 miR-23a/27a/24 基因簇启动子活性的调控。实际上,通过创造新的转录因子结合位点或丢失现有的转录因子结合位点来影响转录因子与基因启动子的结合,是启动子变异影响基因转录活性的重要机制。例如,Li 等^[34]研究 *g.-700T>G* 突变在湖羊 *NR5A2* 基因启动子上创造了一个新的转录因子 MTF-1 结合位点,*rs345058216* 位点突变使猪 *SLC6A4* 基因启动子新增了一个转录因子 MAZ 结合位点,而二花脸猪 *NORFA* 基因启动子双拷贝 19 bp 序列增加了一个转录因子 NFIX 结合位点来募集更多的 NFIX,进而影响 *NORFA* 基因的转录活性和在 GC 中的转录水平^[33]。

总之,本研究在猪 miR-23a/27a/24 基因簇启动子上鉴定到 1 个新的 SNV (*g.65307469G>A*),发现该位点多态性与大白猪产仔数性状显著关联,证实 miR-23a/27a/24 基因簇是影响大白猪产仔数性状的重要候选基因簇。机制上,*g.65307469G>A* 突变影响大白猪产仔数性状是通过调控 miR-23a/27a/24 基因簇启动子活性来实现的,但 *g.65307469G>A* 影响 miR-23a/27a/24 基因簇启动子活性与转录因子 THAP1 无关,具体分子机制还有待于进一步研究。

参考文献 References:

- [1] Bartel D P. Metazoan microRNAs[J]. *Cell*,2018,173(1):20-51.
- [2] Raza S H A,Kaster N,Khan R,et al. The role of microRNAs in muscle tissue development in beef cattle[J]. *Genes*,2020,11(3):295.
- [3] He J M,Huang X X,Zhao B R,et al. Integrated analysis of miRNAs and mRNA profiling reveals the potential roles of miRNAs in sheep hair follicle development[J]. *BMC Genomics*,2022,23(1):722.
- [4] Wang J Q,Hao Z Y,Hu L Y,et al. MicroRNA-199a-3p regulates proliferation and milk fat synthesis of ovine mammary epithelial cells by targeting *VLDLR*[J]. *Frontiers in Veterinary Science*,2022,9:948873.
- [5] Chen Z,Chu S F,Wang X L,et al. MicroRNA-106b regulates milk fat metabolism via ATP binding cassette subfamily A member 1(ABCA1) in bovine mammary epithelial cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,2019,67(14):3981-3990.
- [6] Jiao B L,Zhang X L,Wang S H,et al. MicroRNA-221 regulates proliferation of bovine mammary gland epithelial cells by targeting the *STAT5a* and *IRS1* genes[J]. *Journal of Dairy Science*,2019,102(1):426-435.
- [7] Hu T Y,Huang S N,Lv X Y,et al. MiR-143 targeting CUX1 to regulate proliferation of dermal papilla cells in hu sheep[J]. *Genes*,2021,12(12):2017.
- [8] Ding Y Y,Xue X L,Liu Z F,et al. Expression profiling and functional characterization of miR-26a and miR-130a in regulating Zhongwei goat hair development via the TGF- β /SMAD pathway[J]. *International Journal of Molecular Sciences*,2020,21(14):5076.
- [9] Li M,Zhang N,Li J,et al. MiR-23b promotes porcine preadipocyte differentiation via *SESN3* and *ACSL4*[J]. *Cells*,2022,11(15):2339.
- [10] Cai R,Chao M K,Zhao T T,et al. MiR-503 targets MafK to inhibit subcutaneous preadipocyte adipogenesis causing a decrease of backfat thickness in Guanzhong Black pigs[J]. *Meat Science*,2023,198:109116.
- [11] Jevsinek Skok D,Godnic I,Zorc M,et al. Genome-wide in silico screening for microRNA genetic variability in livestock species[J]. *Animal Genetics*,2013,44(6):669-677.
- [12] Cardoso T F,Coutinho L L,Bruscadin J J,et al. Multi-omics approach reveals miR-SNPs affecting muscle fatty acids profile in nelore cattle[J]. *Genes*,2021,12(1):67.
- [13] Bourdon C,Boussaha M,Bardou P,et al. In silico identification of variations in microRNAs with a potential impact on dairy traits using whole ruminant genome SNP datasets[J]. *Scientific Reports*,2021,11(1):19580.
- [14] Mahmoudi P,Rashidi A,Rostamzadeh J,et al. A novel variant in the promoter region of miR-9 gene strongly affects litter size in Markhoz goats[J]. *Theriogenology*,2020,158:50-57.
- [15] Wang S Q,Li Y Q,Zeng Q,et al. A mutation in endogenous saRNA miR-23a influences granulosa cells response to oxidative stress[J]. *Antioxidants*,2022,11(6):1174.
- [16] Onteru S K,Fan B,Du Z Q,et al. A whole-genome association study for pig reproductive traits[J]. *Animal Genetics*,2012,43(1):18-26.
- [17] Lei B,Gao S,Luo L F,et al. A SNP in the miR-27a gene is associated with litter size in pigs[J]. *Molecular Biology Reports*,2011,38(6):3725-3729.
- [18] 王思琪,张卓凡,杨柳,等. MiR-23a-27a-24 簇在猪卵巢颗粒细胞凋亡中的作用[J]. *畜牧与兽医*,2022,54(4):1-9.
Wang S Q,Zhang Z F,Yang L,et al. The role of the miR-23a-27a-24 cluster in the apoptosis of porcine ovarian granulosa cells[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*,2022,54(4):1-9(in Chinese with English abstract).
- [19] 王杨,王苗苗,单保森,等. LncRNA BRE-AS 启动子负调控区变异与启动子活性、母猪繁殖力的关系[J]. *南京农业大学学报*,2023,46(6):1153-1160. DOI:10.7685/jnau.202204002.
Wang Y,Wang M M,Shan B S,et al. Relationship between the variation of the negative regulatory region of the BRE-AS promoter, and promoter activity and sow fertility[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*,2023,46(6):1153-1160(in Chinese with English abstract).
- [20] Gonella-Diaza A M,Lopes E,da Silva R K,et al. Steroidal regulation of oviductal microRNAs is associated with microRNA-processing in beef cows[J]. *International Journal of Molecular Sciences*,2021,22(2):953.

- [21] Paulson E E, Fishman E L, Schultz R M, et al. Embryonic microRNAs are essential for bovine preimplantation embryo development[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2022, 119(45): e2212942119.
- [22] Pan B, Toms D, Li J L. MicroRNA-574 suppresses oocyte maturation via targeting hyaluronan synthase 2 in porcine cumulus cells[J]. American Journal of Physiology Cell Physiology, 2018, 314(3): C268-C277.
- [23] Li X, Li H J, Zhang D, et al. MiR-7 mediates the signaling pathway of NE affecting FSH and LH synthesis in pig pituitary[J]. The Journal of Endocrinology, 2020, 244(3): 459-471.
- [24] Hasuwa H, Ueda J, Ikawa M, et al. MiR-200b and miR-429 function in mouse ovulation and are essential for female fertility[J]. Science, 2013, 341(6141): 71-73.
- [25] Guo Y, Wu Y B, Shi J H, et al. miR-29a/b₁ regulates the luteinizing hormone secretion and affects mouse ovulation[J]. Frontiers in Endocrinology, 2021, 12: 636220.
- [26] Fernandez-Rodriguez A, Munoz M, Fernandez A, et al. Differential gene expression in ovaries of pregnant pigs with high and low prolificacy levels and identification of candidate genes for litter size[J]. Biology of Reproduction, 2011, 84(2): 299-307.
- [27] Ding R R, Qiu Y B, Zhuang Z W, et al. Genome-wide association studies reveals polygenic genetic architecture of litter traits in Duroc pigs[J]. Theriogenology, 2021, 173: 269-278.
- [28] 吴德, 晋超, 方正锋, 等. 一种快速检测母猪卵母细胞质量的 microRNA 分子标记 miR-23a 及其应用: CN105112549B[P]. 2018-08-28. Wu D, Jin C, Fang Z F, et al. MicroRNA(micro ribonucleic acid) molecular marker miR-23a for quickly detecting quality of oocytes of sows and application of microRNA molecular marker miR-23a: CN105112549B[P]. 2018-08-28 (in Chinese).
- [29] Du X, Li Q Q, Yang L, et al. Transcriptomic data analyses reveal that sow fertility-related lincRNA *NORFA* is essential for the normal states and functions of granulosa cells[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 9: 610553.
- [30] Su L J, Zhao S H, Zhu M J, et al. Differential expression of microRNAs in porcine placentas on days 30 and 90 of gestation[J]. Reproduction, Fertility, and Development, 2010, 22(8): 1175-1182.
- [31] Guo Y L, Zhao J, Xu Q L, et al. Identification of functional single nucleotide polymorphisms in the porcine *SLC6A4* gene associated with aggressive behavior in weaned pigs after mixing[J]. Journal of Animal Science, 2022, 100(5): skac131.
- [32] Wang S Q, Li Y Q, Du X, et al. Two single nucleotide variants in the miR-23a promoter affect granulosa cell apoptosis[J]. Animal Genetics, 2023, 54(2): 207-210.
- [33] Du X, Liu L, Li Q Q, et al. *NORFA*, long intergenic noncoding RNA, maintains sow fertility by inhibiting granulosa cell death[J]. Communications Biology, 2020, 3(1): 131.
- [34] Li Y X, Zhang J, Qian Y, et al. A T>G mutation in the *NR5A2* gene is associated with litter size in hu sheep through upregulation of promoter activity by transcription factor MTF-1[J]. Frontiers in Genetics, 2019, 10: 1011.

责任编辑:周广礼