



# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

中文計劃題目：應用 DNA 晶片於豬隻生長潛能早期偵測之技術研發

英文計劃題目：Research and development of DNA chips in early detecting growth potential of pigs

計畫編號：NSC 90-2313-B-009-003

執行期限：90 年 8 月 1 日 至 91 年 7 月 31 日

主持人：林志生 台灣動物科技研究所 生物科技組

## 一、中文摘要

我們利用 cDNA microarray 技術來分示桃園豬與杜洛克兩豬種間，於骨骼肌細胞中表現顯著差異的基因群。本研究藉由一載有 9,182 個不同功能性基因片段的 cDNA microarray，分示出 57 個及 61 個分別在杜洛克及桃園豬肌肉組織中顯著高表現的基因群。這些基因包括有 29 個 ESTs 序列、11 個轉錄作用調節因子、13 個代謝酵素及 15 個結構性蛋白質基因。經由進一步 RT-PCR 的分析，上述被分示出的基因群中，已有 36 個基因的表現差異性及其基因序列被確認無誤，它們已被選殖並將組成一豬隻生長潛能預測 DNA 晶片，藉此晶片亦可用於肌肉生長有關因子的篩選工作。

**關鍵詞：**豬、肌肉生長、cDNA 微矩陣、基因

## Abstract

The skeletal muscles of Toayuan and Duroc were applied to differentiate genes related to the growth potential by a cDNA microarray technique. We screened a set of 9,182 unique genes and resulted that the expression of 57 genes in the Duroc subjects is significant greater than those in the Toayuan and 61 genes with significantly decreased expression. Among these differentiated genes, we identified 29 genes

were unknown ESTs, 11 genes encoding transcription factors, 13 genes related to metabolism, and 15 genes encoding proteins associated with cellular structure. The expression and sequence of 36 genes out of the differentiating genes were identical by RT-PCR from porcine mRNA and were cloned. These identified clones are the candidates for constructing a growth-predicted chip for screening the muscle growth related factors.

**Keywords:** pig, muscle growth, cDNA microarray, genes

## 二、緣由與目的

本研究目的為以桃園豬與杜洛克兩豬種肌肉組織中具顯著差異表現之標的基因群為基礎，研發豬肌肉生長潛能偵測 DNA 晶片及篩選與肌肉生長有關因子或其標誌。

cDNA microarray 為在一玻璃晶片上放置約萬個不同基因的 cDNA 片段作為探針(probe)，再與已標定之成對欲檢測組織的 cDNA 進行競爭性的 DNA 雜交作用 (competitive hybridization) [1,2]，據此技術研究者可有效率的分示出具有表現差異性之基因群 [3,4]。例如，利用 cDNA microarray 技術可做為基因調控研究、藥物開發及疾病診斷等的工具 [5-7]。本研究

策略即使用這種高密度 cDNA microarray 以高效率的分示出與豬隻肌肉生長有關的基因群，進而篩選出調控豬隻生長性狀相關之基因，或成為基因標誌。已知目前運用分子遺傳學方法以篩選某特定性狀主要影響基因群的研究中，其畜群種別最好是源自於兩特定表型有極鉅差異者 [8-10]。據此，可使生長快速的肌肉組織與生長緩慢的肌肉組織的 cDNA 進行競爭性的 DNA 雜交，以達到本研究目的 [11,12]。

利用高密度 cDNA microarray 來篩選調控豬隻生長性狀相關的標的基因，除了可高效率的進行研究工作外 [3,4]，也可解決利用數量性狀基因座 (quantitative trait loci; QTL) [8-10] 或基因表現分子分示法 (differential display; DD) [13] 來篩選與某特定性狀相關之標的基因時，都需要相當龐大的研究經費與人力投入，且耗時甚多，始能有具體成果的限制。

### 三、研究成果與討論

出生 24 小時內的桃園豬與杜洛克仔豬各 3 頭，分離其背最長肌並萃取其組織 poly A<sup>+</sup> RNA，用於 Human uniGEM V2 cDNA microarray 進行競爭雜交反應，最後經共軛螢光掃描儀掃描讀取結果並分析之 (圖 1)，而所受測的基因在杜洛克與桃園豬間的表現差異度超過 1.75 倍時，即可判定受測成對樣品間該基因表現量具有顯著差異。

Human uniGEM V2 cDNA microarray 上包含 9,182 個單一基因。綜合三重複資料分析顯示，在桃園豬肌肉樣品中基因表現量顯著高於杜洛克者有 61 個基因；在桃園豬肌肉樣品中基因表現量顯著低於杜洛克者有 57 個基因。這些基因包括有 29 個 expression sequence tags (ESTs) 序列、11 個轉錄作用調節因子、13 個代謝酵素及 15

個結構性蛋白質基因；在杜洛克豬高表現基因群中包括有 8 個 chaperones 及 5 個 ribosome 基因，而此類基因並未發現於桃園豬高表現基因群中 (表 1)。我們將上述兩個基因群視為未來欲開發之肌肉生長潛能偵測 DNA 晶片的基礎殖系群 (clone base)，其中部分 ESTs，為僅知其序列而未知基因明確功能之殖系，此為本計畫未來開發與肌肉生長調節有關的 novel 基因群。

經由 GenBank 及 ESTBank 的索檢與序列比對後，就杜洛克與桃園兩豬種肌肉組織表現顯著差異基因群中，我們獲得 45 個相似性 >90% 的豬功能性基因或 ESTs 序列。根據上述已知豬隻基因序列，設計適當引子，並經由 RT-PCR 分別偵測該基因分別在杜洛克與桃園豬肌肉組織中的表現量，且選殖其 DNA 片段和建立 clones。這些 clones 用於定序以確認為標的基因序列。結果顯示，在所測定的 45 個基因中，有 36 個基因於杜洛克與桃園兩豬種肌肉組織中表現相對量與原 cDNA microarray 所呈現的結果趨勢一致，且其 clones 所構築入的序列也如原預期之序列相同。

上述已建立的 36 個豬基因殖系，加上前述 29 個 ESTs 序列，我們將建立一豬隻生長潛能預測 DNA 晶片，藉由此晶片亦可用於肌肉生長有關因子的篩選工作。

### 四、參考文獻

1. Gerhold D, Rushmore T, Caskey CT. 1999. DNA chips: promising toys have become powerful tools. Trends Biochem Sci 24:168-73.
2. Jordan BR. 1998. Large-scale expression measurement by hybridization methods: from high-density membranes to "DNA chips". J Biochem 124:251-8.
3. Jenssen TK, Laegreid A, Komorowski J, Hovig E. 2001. A literature network of human genes for high-throughput analysis of gene expression. Nat Genet

28:21-28.

display. *Methods Enzymol* 254:304-21.

4. Persidis A. 1998. Biochips. *Nat Biotechnol* 16:981-3.
5. Wallace RW. 1997. DNA on a chip: serving up the genome for diagnostics and research. *Mol Med Today* 3:384-389.
6. Wang Y, Rea T, Bian J, Gray S, Sun Y. 1999. Identification of the genes responsive to etoposide-induced apoptosis: application of DNA chip technology. *FEBS Lett* 445:269-273.
7. Zimmer Y, Milo-Landesman D, Svetlanov A, Efrat S. 1999. Genes induced by growth arrest in a pancreatic beta cell line: identification by analysis of cDNA arrays. *FEBS Lett* 457:65-70.
8. Jeon JT, Carlborg O, Tornsten A, Giuffra E, Amarger V, Chardon P, Andersson-Eklund L, Andersson K, Hansson I, Lundstrom K, Andersson L. 1999. A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 locus. *Nat Genet* 21:157-158.
9. Andersson L. 1997. The use of a wild pig x domestic pig intercross to map phenotypic trait loci. *J Hered* 88:380-383.
10. Andersson L, Haley CS, Ellegren H, Knott SA, Johansson M, Andersson K, Andersson-Eklund L, Edfors-Lilja I, Fredholm M, Hansson I. 1994. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science* 263:1771-1774.
11. Rohrer GA, Keele JW. 1998. Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: II. Muscling and wholesale product yield traits. *J Anim Sci* 76:2255-62.
12. Serra JJ, Ellis M, and Haley CS. 1992. Genetic components of carcass and meat quality traits in Meishan and Large Whitw pigs and their reciprocal crosses. *Anim. Prod.* 54:117-27.
13. Liang P, Bauer D, Averboukh L, Warthoe P, Rohrwild M, Muller H, Strauss M, Pardee AB. 1995. Analysis of altered gene expression by differential

表 1、桃園豬與杜洛克具顯著差異基因功能分類

桃園豬高表現之 基因群分類	基因 數	杜洛克高表現之 基因群分類	基因 數
Signal transduction	3	Signal transduction	3
Transcription factors	5	Transcription factors	6
Membrane transport	3	Membrane transport	2
Electron transfer	1	Electron transfer	2
Localized and structural protein	3	Localized and structural protein	12
Metabolism	8	Metabolism	5
Inflammatory response	1	Nucleic acid modification	2
Antigen recognition ESTs	1	Proteases	1
Unclassified	11	Chaperones	8
		Ribosome	5
		Enzyme	4
		ESTs	4
Unclassified	3	Unclassified	3
Total	61	Total	57

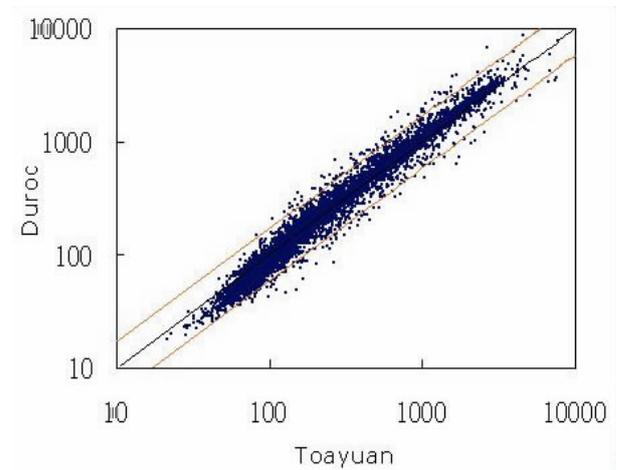


圖 1、利用 Human uniGEM V2 cDNA microarray 進行新生桃園與杜洛克仔豬背最長肌肉組織中基因表現量的比較分析。縱軸代表在杜洛克樣品中基因表現量所測得的相對螢光讀值，橫軸代表在桃園豬樣品中基因表現量所測得的相對螢光讀值。中每一點為其對應之縱軸讀值除以橫軸讀值。橫軸與縱軸皆以對數數值呈現之。圖示中大多數的數值位於 45° 角斜線上，此表示這些基因在兩豬種的肌肉組織中表現量相似，即為同一基因在杜洛克樣品中的表現值除以在桃園豬樣品中的表現值約等於 1。在此 45° 角斜線上、下兩邊的斜線分別表示在杜洛克豬的肌肉組織中表現量大於或小於在桃園豬中表現量的 1.75 倍者，而據 uniGEM V2 cDNA microarray 之測試計算可知，若所受測的樣品間基因表現差異超過 1.75 倍時，即可判定受測成對樣品間該基因表現具有顯著差異。