

猪肛门闭锁候选基因 FN1 的克隆及其编码区突变

金秋实 刘睿泽 余梅 李小平

华中农业大学动物科技学院/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070

摘要 利用猪的 SNP 芯片筛选锁肛致病候选基因, 在猪 15 号染色体候选区域筛选出纤连蛋白 1 (fibronectin 1, FN1) 基因。分别用锁肛猪和正常猪 cDNA 池克隆得到 FN1 基因开放阅读框的 7 437 bp 序列, 鉴定 3 个选择性剪切外显子, 并通过直接测序获得 21 个编码区单核苷酸多态位点 (SNPs)。其中第 22 外显子的 148A>G 和第 27 外显子的 50G>C 引起氨基酸的改变 (1 167Ile>Val, 1 435Glu>Asp), 且这 2 个 SNPs 在现有锁肛猪和正常猪样品中基因型频率和基因频率均差异显著。研究结果提示 FN1 基因的突变可能影响肛门直肠的正常发育过程, 但还需要进一步的功能验证。

关键词 FN1; 肛门闭锁; 猪; SNPs

中图分类号 S 852.16⁺5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)02-0072-06

肛门闭锁 (anal atresia) 是一种先天性直肠末端发育缺陷, 在人、猪、猫等多种哺乳动物中均有发生。人的肛门闭锁的病理分类十分复杂, 包括简单的肛门闭锁、各种类型的直肠尿道瘘以及严重的一穴肛畸形, 而且常常伴随其他发育异常^[1]。肛门闭锁患者手术治疗费用昂贵, 且多数术后效果并不理想, 这给患者带来极度痛苦和沉重的经济负担。猪的肛门闭锁自然发生率高于人类, 表现形式跟人类非常相似, 且很少伴随其他综合征, 因此可以作为研究肛门闭锁比较理想的动物模型。

一般认为, 遗传因素和环境因素均可造成猪的肛门闭锁, 但主要由遗传因素造成。在澳大利亚大型商业化养猪场开展的一次为期超过 1 年的包括 14 535 头仔猪的调查表明, 新生猪有 2.9% 发生先天性畸形, 其中肛门闭锁症是最常见的一种遗传缺陷, 占先天性畸形总发生率的 9.3%^[2]。Taylor^[3]报道, 肛门闭锁症的遗传率为 0.009%; 在不同品系猪上的自然发生率为 0.1%~1.0%^[4]。发生肛门闭锁的公仔猪通常在生后 1~3 d 内死亡, 母仔猪在生后 1 月内死亡 50%^[5], 严重影响经济效益。因此, 从分子水平探索肛门闭锁症的遗传机制具有十分重要的意义。

已有研究报道肛门闭锁是混合遗传模型, 具有

单基因或多基因效应^[6]; 另有研究称肛门闭锁是一个隐性基因与一个显性基因的互作^[4], 所以, 肛门闭锁的发生机制十分复杂, 也曾有研究称肛门闭锁症的易感基因座位于 1、9 和 12 号染色体^[7], 可能涉及多个基因参与。前期, 我们用 12 头猪的 DNA 样本 (其中包含 10 头锁肛猪和 2 头致病基因携带者) 进行了 SNP 芯片扫描, 利用 IBD (identical by descent) 的分析方法, 我们推断出候选区域为 1 号染色体和 15 号染色体的 2 个区段 (数据尚未发表), 根据这一推断我们在 15 号染色体上的这段区域定位到 FN1 基因。FN1 基因编码纤连蛋白 (fibronectin, FN), 该蛋白是一种广泛存在于血液、体液及各种组织中的高分子糖蛋白, 由 2 个亚基通过链间二硫键连接而成。其亚基有 6 个致密的球状体, 每一区均有特定的功能, 可与特殊的配体结合, 具有多种生物学功能。纤连蛋白广泛参与细胞粘附和迁移, 在胚胎发生、损伤修复、血液凝固、宿主防御和新陈代谢等过程中发挥重要作用^[8-9]。另有研究表明 FN 可抑制多种细胞凋亡^[10-12], 而在泄殖腔的胚胎发育过程中, 尿直肠隔间质、直肠背侧间质和泄殖腔膜细胞凋亡的异常是导致肛门直肠畸形的原因之一。细胞凋亡的正常调控是保证肛门直肠胚胎期正常发育的关键机制之一^[13]。因此, FN1 基因可能

收稿日期: 2014-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31000995); 教育部留学回国基金项目 (52113007)

金秋实, 硕士研究生。研究方向: 猪遗传育种与繁殖。E-mail: jqsl018@hotmail.com

通信作者: 李小平, 博士, 副教授。研究方向: 猪遗传育种与繁殖。E-mail: lixiaoping@mail.hzau.edu.cn

在肛门形成过程中起重要作用。

本研究以肛门闭锁猪(AA猪, $n=27$)、正常对照猪($n=28$)为试验动物,以 PCR、PCR-RFLP 和直接测序等试验方法,获得 *FN1* 基因 mRNA 全长序列及其结构变异,旨在为揭示 *FN1* 基因编码区突变与肛门闭锁症的关系提供更多的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验动物和组织

27 头肛门闭锁猪及正常对照猪($n=28$)均是大白猪或长白猪,并来自同一育种公司。基因组 DNA 是在所有仔猪出生时收集其尾巴组织,利用苯酚-氯仿抽提法抽提得到。其中 3 头锁肛猪(AA猪)和 3 头对照猪分别采集直肠于 RNASTore 保存,然后用 TRIzol Reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)从这些组织中提取总 RNA,再运用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术,扩增获得 cDNA 第一链。

1.2 主要试剂

TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA);PCRmix(康为世纪);限制性内切酶 *Mun* I (TaKaRa);限制性内切酶 *Sat* I (NEB);DNA 凝胶回收试剂盒(康为世纪)。

1.3 引物设计

以 ENSEMBL 序列 ENSSTCT00000017610 为模板,在 NCBI(National Center for Biotechnology Information)Primer-BLAST 中设计得到 9 对重叠引物扩增 *FN1* 基因的开放阅读框。其中,引物

FN1-cE20-26F/R, *FN1*-cE30-35F/R 和 *FN1*-cE34-42F/R 分别包含了选择性剪切外显子 25、33 和 40。另设计 2 对引物以 *FN1* 基因组 DNA 为模板扩增 E22 和 E27(表 1)。引物名称、位置、TM 值、PCR 产物大小以及测序得到的 SNPs 见表 2。

1.4 DNA 扩增测序

PCR 扩增:反应总体积为 20 μ L,其中上述制备得到的猪 cDNA 模板 1 μ L,双蒸水 8.2 μ L,PCRmix 10 μ L,10 mmol/L 正向引物和反向引物各 0.4 μ L。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后,循环 32 次(94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、60 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30~60 s),最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物经(2%, m/V)琼脂糖凝胶电泳检测。最后,将 3 头 AA 猪和 3 头对照猪样品分别混入 2 个池中回收,用 DNA 纯化试剂盒纯化后送公司测序,序列测定由北京擎科新业生物技术有限公司完成,基因片段测正反 2 个反应。

1.5 PCR-RFLP 检测 SNPs

PCR-RFLP 引物序列为扩增 *FN1* 基因组 DNA 第 22 外显子和第 27 外显子的引物,其引物序列、PCR 产物、TM 值、突变位点见表 1。PCR 扩增 27 头锁肛猪和 28 头正常对照猪基因组 DNA,然后进行 RFLP 检测。PCR 产物酶切反应体积是 10 μ L,其中 PCR 产物 4 μ L,双蒸水 4.9 μ L,10 \times 缓冲液 1 μ L,限制性内切酶为 0.1 μ L(10 U/ μ L),将样品混匀后离心,37 $^{\circ}$ C 培养箱放置 4 h,用 4%琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果,在紫外灯下拍照,并记录基因型。

表 1 *FN1* 基因 PCR-RFLP 所用引物信息

Table 1 Primers used for PCR-RFLP of porcine *FN1* gene

| 引物名称 Primer name | 引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3') | 引物位置 Primer location | 产物大小/bp Product size | TM/ $^{\circ}$ C | SNP 位于 PCR 产物的位置 SNP location in the PCR product |
|---------------------|---|-------------------------|-------------------------|------------------|---|
| FN1E22F | CGCAACCTCTCAGCAGTAAC | Intron21 | 779 | 60 | 220A>G(Ile-Val) exon 22 |
| FN1E22R | CCAGGAGACGGTAAGCACTC | Exon23 | | | |
| FN1E27F | CAGGGCTTAGAGATGCTCCAG | Intron26 | 357 | 60 | 244G>C(Glu-Asp) exon 27 |
| FN1E27R | GTAGACCACATTTTCGCTCCT | Intron27 | | | |

2 结果与分析

2.1 猪 *FN1* 基因开放阅读框及选择性剪切位点的鉴定结果

以 9 对 *FN1* 基因重叠引物得到 7 706 bp mRNA 序列,其中开放阅读框 7 437 bp,编码 2 478 aa。起始密码子 ATG 位于第 1 外显子,终止密码子 TAA 位于第 45 外显子(图 1)。蛋白质序列分析显示 *FN1* 基因在脊椎动物进化过程中是保守的。猪

FN1 蛋白序列与人(82%,NP_002017.1)、牛(84%,NP_001157250.1)和鼠(81%,NP_001263337.1)高度同源。

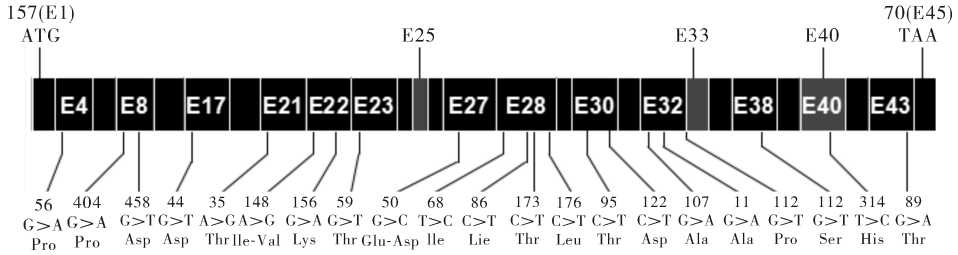
FN1 基因共有 45 个外显子,验证所包含的 3 个选择性剪切位点在猪上都是存在的,为了探究 3 个选择性剪切位点在锁肛猪和正常猪是否相同,设计的引物 *FN1*-cE20-26F/R 包含了选择性剪切外显子 25,引物 *FN1*-cE30-35F/R 包含选择性剪切外显子 33,引物 *FN1*-cE34-42F/R 包含选择性剪切外显

子 40。结果发现在锁肛猪和正常猪的个体中都有 2 种转录本,1 种包含选择性剪切位点,1 种不包含选择性剪切位点。

2.2 猪 FN1 基因编码区 SNPs 检测结果

利用覆盖了 FN1 基因 45 个外显子的 9 对重叠引物,在锁肛猪和正常猪(各 6 头)cDNA 池中进行

PCR 扩增、回收、测序,共找到 21 个单核苷酸多态位点(SNPs)。其中,19 个 SNPs 为同义突变,另 2 个 SNPs 为错义突变。第一个错义突变是位于第 22 外显子的 148A>G,引起 1 167 Ile>Val;另一个错义突变是位于第 27 外显子的 50G>C,引起 1 435Glu>Asp。引物信息和单核苷酸多态位点见表 2 和图 1。



开放阅读框起始密码子(ATG)位于第 1 外显子,终止密码子(TAA)位于第 14 外显子。每个核苷酸多态性位点都位于外显子。The full ORF starts at nucleotide 157-159 (ATG) in exon 1 and terminates at nucleotide 70-72 (TAA) in exon 45. The location for each polymorphism is the nucleotide site in the located exon.

图 1 体外翻译 FN1 mRNA 编码区多态性及其相应氨基酸缩写

Fig. 1 *In vitro* translation of the FN1 mRNA and the identified polymorphisms in the coding region as well as their corresponding amino acid abbreviation

表 2 FN1 基因的引物和单核苷酸多态性位点信息

Table 2 Primers and SNPs identified in porcine FN1 gene

| 引物名称 Primer name | 引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3') | 引物位置 Primer location | 产物大小/bp Product size | TM/°C | SNP 位于 PCR 产物的位置 SNP location in the PCR product |
|---------------------|---|-------------------------|-------------------------|-------|---|
| FN1-cE1-7F | ACTGGAAGGGACTCCTCTGG | E1 | 988 | 60 | 569G>A exon 4 |
| FN1-cE1-7R | GGCTGGTAAATGGCTGTTCG | E7 | | | |
| FN1-cE7-11F | GGGATACCTGGAGCAAGAAG | E7 | 888 | 60 | 362G>A exon 8 |
| FN1-cE7-11R | GTCCCTCCTCGTGACGTTTG | E11 | | | 416C>T exon 8 |
| FN1-cE11-16F | GCATCGGAGATCAGTGGGAC | E11 | 879 | 60 | No SNPs |
| FN1-cE11-16R | CTGTGCTGGGAAGATCCAGG | E16 | | | |
| FN1-cE16-20F | GGTGGAGTATGAGCTGAGCG | E16 | 925 | 60 | 220C>T exon 17 |
| FN1-cE16-20R | GCCAGGCTGCAGATTCTTA | E20 | | | |
| FN1-cE20-26F | AGCCCAAGCAGTACAACGTG | E20 | 1 142 | 60 | 176A>G exon 21 |
| FN1-cE20-26R | ATTTGTGAGGACCACTGCCT | E26 | or 869 | | 384A>G(Ile-Val) exon 22 |
| | | | | | 392G>A exon 22 |
| | | | | | 464C>T exon 23 |
| | | | | | 224G>C(Glu-Asp) exon 27 |
| | | | | | 332T>C exon 28 |
| | | | | | 350C>T exon 28 |
| FN1-cE26-31F | CTCCACTGACCTGCGATTT | E26 | 881 | 60 | 437C>T exon 28 |
| FN1-cE26-31R | CCACCTGACACTGATGCTGT | E31 | | | 440C>T exon 28 |
| | | | | | 746C>T exon 30 |
| | | | | | 773C>T exon 30 |
| FN1-cE30-35F | TGTCCAGGAGTTCCTGCTGC | E30 | 946 | 60 | 415G>A exon 32 |
| FN1-cE30-35R | CTGAGCTGGTCTGCTTGTC | E35 | or 676 | | 703G>A exon 32 |
| | | | | | 805C>T exon 32 |
| FN1-cE34-42F | GGTAACACCCACAAGCCTGA | E34 | 1 472 | 60 | 631C>T exon 38 |
| FN1-cE34-42R | GCTCCACTCTTCTCCGATG | E42 | or 1 005 | | 1 093T>C exon 40 |
| FN-cE42-45F | TAAGCCAACCCACGGATGAC | E42 | 740 | 60 | 368G>A exon 43 |
| FN-cE42-45R | AACACTCCCAGGGTGATGC | E45 | | | |

2.3 FN1 基因第 22 和 27 外显子错义突变位点 PCR-RFLP 结果

1) FN1 基因第 22 外显子 *Mun* I-RFLP。FN1 基因第 22 外显子的 148A>G, 引起氨基酸的改变, 且造成 *Mun* I 酶切位点的多态性。为了比较该位点等位基因频率在锁肛猪和正常猪群中是否存在差异, 我们在基因组 DNA 上重新设计引物, 扩增获得

779 bp 的 PCR 产物, 突变位点位于该段序列 220 bp 处。进一步在 27 头锁肛猪和 24 头正常猪中进行 *Mun* I-RFLP, 结果在正常猪中主要是 AA 型, 而在锁肛猪中 AA 型和 AG 型频率接近, 且两组均未出现 GG 型。方差分析结果显示, 锁肛猪与正常猪该位点的基因型频率 ($P=0.0416$) 和基因频率 ($P=0.0198$) 均差异显著 (表 3)。

表 3 FN1 基因第 22 外显子错义突变位点 (148A>G, 1 167Ile>Val) 在锁肛猪和正常猪中 *Mun* I-RFLP 结果¹⁾

Table 3 *Mun* I-RFLP results of the non-synonymous SNP (148A>G, 1 167Ile>Val) in exon 22 for porcine FN1 gene

| 群体 Pig groups | 数量 Number | 基因型频率(n) Genotype frequency | | | 基因频率(n) Allele frequency | |
|------------------|--------------|-----------------------------|-----------|-------|--------------------------|-----------|
| | | AA | AG | GG | A | G |
| 锁肛猪 AA pigs | 27 | 0.54 (14) | 0.46 (13) | 0 (0) | 0.76 (41) | 0.24 (13) |
| 正常猪 Normal pigs | 24 | 0.79 (19) | 0.21 (5) | 0 (0) | 0.90 (43) | 0.10(5) |
| P 值 P-value | | 0.0416* | | | 0.0198* | |

1) * : $P<0.05$. 下同。The same as below.

2) FN1 基因第 27 外显子 *Sat* I-RFLP。FN1 基因第 27 外显子的 50G>C 也是一个错义突变位点, 造成 *Sat* I 酶切位点的多态性。对其基因组 DNA 设计引物, PCR 产物 357 bp, 突变位点在该段序列中位于 244 bp 处。我们在 27 头锁肛猪和 28

头正常猪中进行 *Sat* I-RFLP, 结果发现, 在对照猪中主要是 GG 基因型, 无 CC 基因型; 而在锁肛猪中主要是 GC 基因型, 并有 2 例 CC 基因型。方差分析结果显示, 锁肛猪与正常猪该位点的基因频率差异显著 ($P=0.0158$), 但基因型频率无显著差异 (表 4)。

表 4 FN1 基因第 27 外显子错义突变位点 (50G>C, 1 435Glu-Asp) 在锁肛猪和正常猪中 *Sat* I-RFLP 结果

Table 4 *Sat* I-RFLP results of the non-synonymous SNP (50G>C, 1 435Glu-Asp) in exon 27 for porcine FN1 gene

| 群体 Piggroups | 数量 Number | 基因型频率(n) Genotype frequency | | | 基因频率(n) Allele frequency | |
|-----------------|--------------|-----------------------------|-----------|----------|--------------------------|-----------|
| | | GG | GC | CC | G | C |
| 锁肛猪 AA pigs | 27 | 0.26(7) | 0.67 (18) | 0.07 (2) | 0.59 (32) | 0.41 (22) |
| 正常猪 Normal pigs | 28 | 0.61 (17) | 0.39 (11) | 0 (0) | 0.80(45) | 0.20(11) |
| P 值 P-value | | 0.0709 | | | 0.0158* | |

3 讨论

肛门闭锁在人、猪、猫等多种哺乳动物中均有发生, 但目前还没有人报道可用于肛门闭锁遗传筛查的基因。因此, 本文以猪为模型探索肛门闭锁的遗传机制, 寻找其致病基因。

对肛门直肠胚胎发育的研究为我们探讨肛门直肠畸形提供了理论依据。形态学研究显示, 大鼠胚胎 14~15 d 为泄殖腔的发育晚期, 以尿直肠隔下降并与泄殖腔膜融合, 将尿生殖窦与直肠完全分隔为主要特征。现在很多学者认为, 尿直肠隔的下降、融合和泄殖腔构型的变化是膀胱尿道和肛门直肠分离的关键因素^[14-16]。肛门直肠畸形的大鼠胚胎这 3 个过程均存在发育异常, 并且它的异常与凋亡的异常调控密切相关, 提示细胞凋亡是保证胚胎期肛门直肠正常发育的关键机制之一^[17-18]。多种研究结果显

示, 我们用 SNP 芯片扫描到的 FN1 基因与细胞凋亡密切相关^[10-12]。例如, 在 FN 干预 TRAIL (肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; TNF-related apoptosis inducing ligand) 诱导大鼠 HSC-T6 模型中, *pFAK* 表达增加, 线粒体内 *Bax* 表达下降, 可见 FN 能够抑制细胞凋亡^[12]。王大佳^[19]用基因表达芯片对正常婴儿和肛门直肠畸形患儿的直肠末端组织进行基因表达分析, 发现 FN1 基因在患儿直肠末端组织表达水平比正常对照组织中表达水平上调 4 倍。这提示 FN1 基因可能在肛门直肠发育过程中发挥重要作用。

本研究首次通过试验获得了猪 FN1 基因 7 437 bp 的开放阅读框, 预测了其氨基酸序列, 且发现外显子 25、33 和 40 是 3 个选择性剪切位点, 这与人类的研究结果吻合。但遗憾的是由于该基因转录本很长, 且可能具有多个转录本, 因此, 我们未能通过试

验获得 *FN1* 基因的全部转录本及其序列。通过直接测序我们在该基因编码区发现了 21 个 SNPs, 这显示该基因具有丰富的多态性。另外, 我们还发现了 2 个引起氨基酸改变的多态位点(错义突变), 分别位于第 22 和 27 外显子。肽链上氨基酸的改变可能影响蛋白质的折叠, 改变其疏水性以及与配体的亲和力, 进而影响其控制的性状。由单碱基错义突变导致的人类疾病或家畜性状改变已有多次报道。例如, 在探讨中国地方猪种二花脸为什么相对国外猪种具有更大的耳面积时, 发现猪 *PPARD* 基因 G32E 突变是引起猪耳面积改变的关键因素。其具体机制是突变下调了 Wnt 信号通路中 β -catenin 及其下游靶基因的表达, 提高了耳组织中脂肪的生成和储存, 进而增加了耳面积^[20]。Zhao 等^[21] 发现 *DMP1* 基因第 6 外显子的一个无义突变(250C>T, R145X)引起考力代羊遗传性佝偻病, 基因分型结果显示病例个体全部呈现 TT 型, 携带者是 CT 型, 而正常对照是 CT 或 CC 型。因此, 我们对发现的 2 个错义突变位点在锁肛猪和正常猪中也进行了基因分型, 结果发现在锁肛猪和正常猪样品中它们的基因型并未出现完全绝对的分离。肛门闭锁仔猪可能由遗传因素引起, 也可能由环境因素引起, 比如饲料发霉、注射了某些药物等。而在实际采样过程中, 某些锁肛仔猪无法追踪系谱故无法判断其是否是遗传因素引起的, 因此, 我们搜集到的 27 个锁肛样本中可能包含了非遗传性病例, 这对基因分型将会造成干扰。但统计分析结果显示这 2 个位点的基因型频率和基因频率在 2 组样品中均差异显著, 提示猪 *FN1* 基因可能与肛门闭锁存在联系。但其在肛门闭锁发生过程中的具体作用, 还需要进一步的功能研究。

参 考 文 献

- [1] KHOURY M J, CORDERO J F, GREENBERG F, et al. A population study of the VACTERL association: evidence for its etiologic heterogeneity[J]. *Pediatrics*, 1983, 71(5): 815.
- [2] MULLEY R C, EDWARDS M J. Prevalence of congenital abnormalities in pigs[J]. *Australian Veterinarian Journal*, 1984, 61: 116-120.
- [3] TAYLOR D J. Pig diseases[M]. 6th edition. Cambridge: St. Edmundsbury Press (Cambridge) Ltd, 1995.
- [4] HORI T, GIUFFRA E, ANDERSSON L, et al. Mapping loci causing susceptibility to anal atresia in pigs, using a resource pedigree[J]. *Journal of Pediatric Surgery*, 2001, 36: 1370-1374.
- [5] NORRISH J G, RENNIE J C. Observations on the inheritance of atresia ani in swine[J]. *Journal of Heredity*, 1968, 59: 186-187.
- [6] THALLER G, DEMPFLER L, HOESCHELE I. Maximum likelihood analysis of rare binary traits under different modes of inheritance[J]. *Genetics*, 1996, 143(4): 1819-1829.
- [7] SABINE W, RUEDI F, GEORG T. Genome wide scan for anal atresia in swine identifies linkage and association with a chromosome region on *Sus scrofa* chromosome 1[J]. *Genetics*, 2005, 171: 1207-1217.
- [8] MADSEN C D, SIDENIUS N. The interaction between urokinase receptor and vitronectin in cell adhesion and signalling[J]. *Eur J Cell Biol*, 2008, 87(8/9): 617-629.
- [9] WANG Y, WU X J, GU L J, et al. Effects of fibronectin on growth of CHO-C28 cells[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2009(1): 80-82.
- [10] EDDERKAOUI M, HONG P, LEE J K, et al. Insulin-like growth factor-I receptor mediates the prosurvival effect of fibronectin[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(37): 26646-26655.
- [11] KAO C L, LIN H T, CHEN Y W, et al. Fibronectin suppresses lipopolysaccharide-induced liver damage and promotes the cytoprotection abilities of hepatocyte-like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Transplant Proc*, 2007, 39(10): 3444-3445.
- [12] GAO J, XU C H, LIANG M, et al. Effect of fibronectin on protection of rat hepatic stellate cells HSC-T6 from TRAIL-induced apoptosis[J]. *Clinical Hepatology*, 2011, 11: 17.
- [13] ZHANG H L, BAI Y Z, ZHANG Z B, et al. Cell apoptosis during the cloacal embryonic development in rats with anorectal malformations[J]. *Chin J Contemp Pediatr*, 2009, 9: 709-713.
- [14] NIEVELSTEIN R A J, VANDER-WERFF F A, VERBEEK F J, et al. Normal and abnormal embryonic development of the anorectum in human embryos[J]. *Teratology*, 1998, 57: 70-78.
- [15] PAIDAS C N, MORREALE R F, HOLOSKI K M, et al. Separation and differentiation of the embryonic human cloaca[J]. *Pediatr Surg*, 1999, 34: 877-884.
- [16] KLUTH D, HILLEN M L, AMBRECHT W. The principle of normal and abnormal hindgut development[J]. *Pediatr Surg*, 1995, 30: 1143-1147.
- [17] QI B Q, WILLIAM S, BEALE Y, et al. Clarifications of the process that lead to anorectal malformations in the ETU-induced rat model of imperforate anus[J]. *Pediatr Surg*, 2002, 37: 1305-1312.
- [18] QI B Q, WILLIAMS A, FRIZELLE F, et al. Clarification of the process of separation of the cloaca into rectum and urogenital sinus in the rat embryo[J]. *Pediatr Surg*, 2000, 35: 1810-1816.
- [19] 王大佳. 先天性肛门直肠畸形相关基因筛选、表达及多态性研

究[D]. 沈阳: 中国医科大学图书馆, 2008.

[20] YANG B, GUO Y, XIAO S, et al. A missense mutation in PP-ARD causes major QTL effect on ear size in pigs[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(5): e1002043.

[21] ZHAO X, DITTMER K E, BLAIR H T, et al. A novel non-sense mutation in the DMP1 gene identified by a genome-wide association study is responsible for inherited rickets in Corriedale sheep[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21739.

Cloning and coding region mutation of *FN1* as an anorectal malformation candidate gene in pigs

JIN Qiu-shi LIU Rui-ze YU Mei LI Xiao-ping

Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics/Breeding, and Reproduction of Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract SNP (single nucleotide polymorphism) chips were applied to screen the candidate genes linked with anorectal malformation, and the Fibronectin1 (*FN1*) gene on porcine chromosome 15 was captured as a candidate gene. By direct sequencing using the cDNA pools, we obtained the porcine *FN1* mRNA sequence with a 7 437 bp ORF, encoding 2 478 aa. And 21 SNPs as well as three regions subject to alternative splicing were also identified. Of these SNPs, two (148 A>G in exon 22, 50 G>C in exon 27) were non-synonymous (1 167Ile>Val, 1435Glu>Asp). PCR-RFLP analysis of these two SNPs suggested that the allele and genotype frequencies in the AA pigs and unaffected pigs were different ($P < 0.05$). Therefore, *FN1* mutations may affect the normal development of anorectal process, but the result need to be further verified.

Key words *FN1*; anorectal malformation; pig; SNPs

(责任编辑: 边书京)