

# 豬隻產仔性狀候選標記 miR-27a 分析法之改進<sup>(1)</sup>

廖仁寶<sup>(2)</sup> 王思雅<sup>(2)</sup> 盧昱誼<sup>(3)</sup> 陳若菁<sup>(2)</sup> 賴永裕<sup>(2)</sup> 劉桂柱<sup>(3)</sup> 程梅萍<sup>(4)(5)</sup>

收件日期：2023 年 8 月 29 日；接受日期：2023 年 10 月 24 日

## 摘 要

miR-27a 遺傳標記為豬隻產仔性狀候選標記之一，本研究之目的在於利用 MS-PCR (mutagenically separated polymerase chain reaction) 技術改進 miR-27a 基因型鑑別方法，以利於擴大種豬群基因型鑑別，並進行遺傳標記之產業應用性評估。依參考文獻所述，利用 PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 方式找出不同 miR-27a 基因型，並設計 3 種不同特定引子，測試 PCR 反應物組成與反應溫度及時間，以找出可成功鑑別基因型的組成與條件。以新成功開發的鑑別方法檢測 9 家種豬場 942 頭豬隻基因型，結果顯示 AA、AB 及 BB 型百分比分別為 88.22、11.78 及 0.00%。分析 109 頭具產仔數性狀的母豬基因型，AA、AB 及 BB 型百分比分別為 88.99、11.01 及 0.00%，另由基因型與產仔數性狀之相關性初步分析顯示，AA 型之藍瑞斯與約克夏母豬比 AB 型有較高的產仔數。因此，進行省時省工與節省分析成本之 MS-PCR 方法分析種豬 miR-27a 基因型，有利於擴大種豬群的檢測，以期將標記 miR-27a 納入種豬產仔性狀選育輔助標的，提升種豬之產仔性能。

關鍵詞：產仔數性狀、候選標記、豬。

## 緒 言

種豬繁殖性能攸關養豬產業競爭力，若能提高種豬繁殖性能，則可減少種豬飼養頭數，進而飼料、管理及廢棄物處理等成本皆有減輕之效。依據 2021 臺灣養豬手冊資料，從示範戶雜交母豬 9,599 胎的數據分析得知，總產仔數與活仔數分別 10.92 與 9.73 頭 (財團法人中央畜產會，2022)，較歐美養豬大國如丹麥每胎可達 19.4 頭之成績，差距甚大 (<https://danbred.com/high-litter-size-with-high-piglet-survival/>)。若欲改善種豬繁殖性能，則可從遺傳育種、營養、畜舍、管理及生物安全方面著手，其中遺傳育種扮演火車頭之重要角色，有優良的遺傳因子，方能期望有良好的性能表現。唯有策略式的持續遺傳育種，族群的性能才可持續改進。

根據 Pig QTLdb 資料庫 (<https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/index>, data search on Aug. 28, 2023) 顯示，與繁殖性狀 (reproductive trait) 相關的數量性狀基因座 (quantitative trait locus, QTL) 多達 3,976 個，又產仔性狀 (litter trait) 為繁殖性狀重要組成成分之一，占有 1,609 個 QTL。在先前的研究顯示，母豬造骨蛋白 (osteopontin, OPN) 基因型對總產仔數與活仔數有影響，其中一種交替基因與總產仔數，另 4 種與活仔數相關 (廖等，1999)。以豬第 1、6 及 8 號染色體上的多個微衛星型遺傳標記分析藍瑞斯、約克夏、杜洛克及盤克夏 4 個品種經產母豬的基因型，並與其產仔性能資料分析後，發現一些具品種差異且與產仔性能相關的候選遺傳標記，如 SW373、SW1301 及 SW1514 (廖等，2006)；KS140、KS141、KS148、KS168、S188、KS192、SW61 及 SW1843 (廖等，2013)；MP35 和 SW1881 與藍瑞斯母豬產仔性狀顯著相關，SW1129 與約克夏母豬產仔性狀有極顯著相關且具正效應，MP35、SW2406 及 SW1881 則與杜洛克母豬產仔性狀有極顯著相關且具正效應 (廖等，2014)。另於國外許多研究發現，NR4A1 (nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1) 與 GNB2L1 (guanine nucleotide binding protein beta polypeptide 2 like-1) 基因多態性與母豬產仔性狀有顯著相關性，其中 NR4A1 g.3952A > G 對藍瑞斯母豬 TNB (total number born)、NBA (number of piglets born alive)、NWA (number of piglets weaned alive)、LWW (litter weight at weaning) 相關，GNB2L1 g.2373T > C 則對大白豬 (Large White) 母豬的出生窩仔重 (litter weight at birth) 相關 (Kumchoo and Mekchay, 2015)。候選基因 RBP4 (retinol-binding protein 4) AA 型與母豬繁殖性能 TNB、NBA 及

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2769 號。

(2) 農業部畜產試驗所遺傳生理組。

(3) 台灣區種豬產業協會。

(4) 農業部畜產試驗所副所長室。

(5) 通訊作者，E-mail: mpcheng@mail.ttri.gov.tw

NW (number of piglets weaned) 有統計分析顯著性, A 為有利產仔性能之交替基因 (Marantidis *et al.*, 2016) ; Wang *et al.* (2018) 發現大白豬母豬之 FUT2 ( $\alpha$ -1,2 fucosyltransferases) 基因型與產仔數和離乳數有顯著相關性, 並認為 TT 是有利於繁殖性狀的基因型。EXOC4 (exocyst complex component 4) 基因, CC 型杜洛克母豬之 NBA、NW 及 LWW (litter weight at weaning) 高於 CT 與 TT 型者 (He *et al.*, 2021) 。Lei *et al.* (2011) 發現 miR-27a 基因與豬之產仔性狀相關, 而 MicroRNAs (miRNAs) 常為轉錄與後轉錄作用之重要調節因子, miR-27a 基因潛在功能為濾泡的凋亡 (Chhabra *et al.*, 2009) , 且發現基因所在附近含有木乃伊胎之 QTL 。Pang *et al.* (2019) 分析發現 ESR (estrogen receptor) 、FSH $\beta$  (follicle stimulating hormone b subunit) 、CTNNAL1 (catenin alpha like 1) 及 miR-27a 與大白豬產仔性能有關。

本研究針對產仔性狀相關候選標記 miR-27a 基因型鑑別法予以改進, 採用 MS-PCR (mutagenically separated polymerase chain reaction) 技術開發新的檢測方法, 以取代 PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 鑑別法, 並將此可降低檢測成本與節省檢測時間之新方法應用於種豬群之基因型分析, 藉以評估標記之產業應用性。

## 材料與方法

### I. 種豬樣品收集

配合台灣區種豬產業協會, 計收集 9 家種豬場 942 頭豬隻血液樣品, 包括杜洛克 371 頭 (公 351 頭、母 20 頭)、藍瑞斯 414 頭 (公 116 頭、母 298 頭) 及約克夏 157 頭 (公 53 頭、母 104 頭), 其中 109 頭母豬具分娩紀錄, 分別為杜洛克 8 頭、藍瑞斯 62 頭及約克夏 39 頭。利用商業核酸萃取套組 (EasyPure® Genomic DNA Kit, TransGen Biotech, China) 進行 DNA 分離純化, 測定濃度後冷凍備用。逢機挑選同胎產仔數高與低的豬隻 DNA 樣品, 並選取具產仔數資料的經產母豬 DNA 樣品, 進行 miR-27a 基因型分析。

### II. miR-27a 基因型分析

參考 Pang *et al.* (2019) 進行引子合成與 PCR 反應條件測試, 引子對序列為 5'-TGGTGGTCCAGCTTCTCTCT-3' 與 5'-TGAGCCAGTCTGCACAAATC-3'; PCR 反應組成分為 20–50 ng 模板 DNA、0.25 mM dNTPs、每個引子 0.5  $\mu$ M、1 $\times$  反應緩衝液及 0.5 U (單位) Taq 聚合酶 (TaKaRa Bio Inc., Japan), 反應總體積為 20  $\mu$ L。利用 PCR 儀器 (SureCycler 8800, Agilent, USA) 進行標的 DNA 片段的增幅, PCR 反應條件: 第一步變性, 94 $^{\circ}$ C、5 min; 第二步循環增幅 35 次, 94 $^{\circ}$ C、30 s, 55 $^{\circ}$ C、45 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min; 第三步延長, 72 $^{\circ}$ C、5 min。取 10  $\mu$ L PCR 產物進行限制酶之切割作用, 其餘組成分含 1 $\times$  反應緩衝液、10 U 限制酶 HpaII 及超純水, 反應總體積為 15  $\mu$ L, 在 37 $^{\circ}$ C 作用 2.5 h 後, 取 10  $\mu$ L 進行 3% 瓊脂膠體電泳分析 (Mupid-2plus, Advance, Japan), 再予以染色成像, 並以影像分析儀 (AlphaImager™, AlphaInnotech, USA) 擷取電泳影像儲存。

### III. miR-27a 基因型分析法改進

參考 Kwok *et al.* (1990)、Rust *et al.* (1993) 及 Lockley *et al.* (1996) 等之研究成果, 採用 MS-PCR 技術, 針對 miR-27a 序列分別設計 A 交替基因專一性引子 5'-CCTCCCCAGTGGTAGGATACCCAGGCAGGAGGGGAGAGGTGGCAGGGCAA-3'、B 交替基因專一性引子 5'-GGCAGGCAGGAGGGGAGAGGTGGCAGGGACG-3' 及共用反向引子 5'-GCTTGTGAGCAGGTCCACAGCAAGTCGTG-3', 引子序列中粗體加底線部分為強化基因型結果所做的修飾, 3' 端斜體部分則為核酸變異點, 以進行 PCR 反應組成與溫度條件之測試。PCR 反應組成分為 20–50 ng 模板 DNA、0.25 mM dNTPs、A 交替基因專一性引子 0.067  $\mu$ M、B 交替基因專一性引子 0.1  $\mu$ M、反向共用引子 0.133  $\mu$ M、1 $\times$  反應緩衝液及 0.5 U Taq 聚合酶 (TaKaRa Bio Inc., Japan), 反應總體積為 15  $\mu$ L。利用 PCR 儀器 (SureCycler 8800, Agilent, USA) 進行標的 DNA 片段的增幅, PCR 反應條件: 一次增幅, 94 $^{\circ}$ C、1 min, 69 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C、1 min; 第二步循環增幅 35 次, 94 $^{\circ}$ C、30 s, 69 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、20 s; 第三步延長, 72 $^{\circ}$ C、5 min。取 10  $\mu$ L PCR 產物進行 3% 瓊脂膠體電泳分析 (Mupid-2plus, Advance, Japan), 再予以染色成像, 並以影像分析儀 (AlphaImager™, AlphaInnotech, USA) 擷取電泳影像儲存。

### IV. 種豬 miR-27a 基因型與產仔數相關性分析

參考廖等 (2013) 分析具產仔性狀資料之種豬與其基因型之相關性, 以種母豬所具有遺傳標記基因型與其產仔性能, 應用 SAS (Statistical Analysis System) 套裝軟體之一般線性模式 (general linear model, GLM) 與最小平方平均法 (least square means) 進行分析 (SAS, 2013) 。

## 結果與討論

### I. miR-27a 基因型分析法比較

參考 Lei *et al.* (2011) 的檢測方法，將 580 bp 長的 PCR 產物經過限制酶 *HpaII* 作用後，再由電泳分離結果得知 AA 基因型含有 319 與 261 bp 二條帶，AB 基因型則有 319、261、141 及 120 bp 等 4 個條帶（圖 1A）。另外，應用 MS-PCR 的技術，開發一種較省時省工與分析成本的新檢測方法。利用新開發的檢測法，PCR 產物經過電泳分離後，AA 基因型具有 121 bp 的一個條帶，AB 基因型則含有 102 與 121 bp 兩種大小的條帶（圖 1B），另理論上 BB 基因型應僅具一個 102 bp 的條帶。相同樣品經過不同鑑別法分析，發現兩者結果一致，都可獲得樣品的正確基因型資訊（圖 1）。如表 1 所示，以一次分析 48 個樣品為例，應用 MS-PCR 檢測法約可較 PCR-RFLP 法節省 3 小時（50%）的檢測時間（人力操作與限制酶作用時間），以及節省新臺幣 540 元分析成本（半盤 96 孔分析盤 40 元、限制酶 480 元（10 元 / 樣品）、其他耗材 20 元）。若不計分析成本，購置基因晶片分析系統或即時 PCR 定量分析系統，採用比較昂貴的基因晶片或螢光引子、反應試劑和耗材，將可提升分析效率（Wang *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2021）。本研究開發之新檢測法，僅需利用一般之 PCR 儀器與電泳設備，且以目前種豬產業協會進行種豬重要基因型，如緊迫基因與多產基因分析的操作模式與分析樣品數量而言，此檢測法已可符合基因型分析需求。

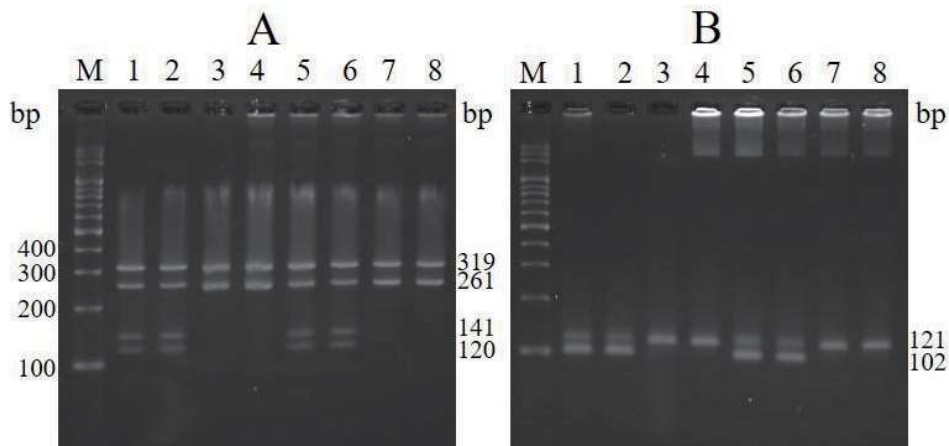


圖 1. miR-27a 基因型電泳分析結果。

A: PCR-RFLP; B: MS-PCR, M: DNA 大小標梯；AA 型：Lanes 3, 4, 7, 8；AB 型：Lanes 1, 2, 5, 6。

Fig. 1. The results of miR-27a genotyping by agarose gel electrophoresis.

Panel A: PCR-RFLP; Panel B: MS-PCR. M: DNA size ladder; AA genotype: Lanes 3, 4, 7, 8; AB genotype: Lanes 1, 2, 5, 6.

表 1. miR27-a 基因型鑑別法比較

Table 1. Comparison of miR-27a genotyping methods

Items	miR-27a genotyping method	
	MS-PCR	PCR-RFLP
Cost, NT\$		
96-well plate	40	80
PCR mixture	69	67
Restriction reaction mixture ( <i>HpaII</i> )	-	502
Imaging	84	84
Time, h		
PCR	2	2
Restriction reaction	-	3
Imaging	1	1

A total of 48 samples were identified per test.

## II. miR-27a 基因型頻率

以新開發之檢測法分析 9 家種豬場 942 頭豬 DNA 樣品的 miR-27a 基因型，其中 AA 型占 88.22%，AB 型 11.78%，然而並無發現 BB 型（表 2）。進一步分析各品種公、母豬的基因型分布，可得知藍瑞斯公、母豬為 AA 型與 AB 型的百分比分別為 88.79 vs. 90.70%、11.21 vs. 9.30%；約克夏為 81.13 vs. 83.65%、18.87 vs. 16.35%；杜洛克為 88.60 vs. 85.00%、11.40 vs. 15.00%。針對其中 109 頭具產仔數資料的經產母豬，包括 62 頭藍瑞斯豬、39 頭約克夏豬及 8 頭杜洛克豬，進行基因型與交替基因頻率分析，藍瑞斯、約克夏及杜洛克豬為 AA 型與 AB 型的百分比分別為 91.84 vs. 8.06%、87.74 vs. 10.26%、62.50 vs. 37.50%，因此得知 A 交替基因的頻率皆遠大於 B 交替基因（表 3）。Lei *et al.* (2011) 以 PCR-RFLP 方式分析 142 頭大白豬 miR-27a 基因型，結果僅 2 頭為 BB 型，占 1.41%，AB 型有 19 頭，占 13.38%，其餘 121 頭為 AA 型，因此，B 交替基因頻率為 0.081，而 A 交替基因頻率為 0.919。分析 36 頭本地種梅山豬，B 交替基因頻率 0.778 高於 A 交替基因頻率 0.222。另分析 120 頭合成品系 DIV 豬，A 交替基因頻率為 0.850，B 交替基因頻率為 0.150。Pang *et al.* (2019) 分析 432 頭具產仔性狀資料的大白豬母豬，在共計 1,587 胎數資料中，AA 型 1,138 胎，AB 型 388 胎，BB 型 61 胎，其中 BB 型占 3.84%。由上述參考文獻與本研究結果得知，BB 型在大白豬族群占比相當低。推測此結果的可能原因為豬群經過多世代的選育，不良的基因型逐漸汰除而致。另有研究指出，miR-27a 基因位於豬第 2 號染色體中結處，且與所在附近之木乃伊胎 QTL 有連鎖關係 (Holl *et al.*, 2004; Lei *et al.*, 2011)。

表 2. 種豬場豬 miR-27a 基因型分布

Table 2. Distribution of porcine miR-27a genotypes from stock pig farms

Breed	Sex	n	miR-27a genotype percentage, %		
			AA	AB	BB
Landrace	Male	116	88.79	11.21	0.00
	Female	298	90.70	9.30	0.00
	Subtotal	414	90.17	9.83	0.00
Yorkshire	Male	53	81.13	18.87	0.00
	Female	104	83.65	16.35	0.00
	Subtotal	157	82.80	17.20	0.00
Duroc	Male	351	88.60	11.40	0.00
	Female	20	85.00	15.00	0.00
	Subtotal	371	88.41	11.59	0.00
Total		942	88.22	11.78	0.00

n: number of pigs tested.

表 3. 純種經產母豬 miR-27a 基因型頻率

Table 3. miR-27a genotype frequency of parous purebred sows

Breed	n	miR-27a genotype percentage, %			Allele frequency	
		AA	AB	BB	A	B
Landrace	62	91.84	8.06	0.00	0.9597	0.0403
Yorkshire	39	89.74	10.26	0.00	0.9487	0.0513
Duroc	8	62.50	37.50	0.00	0.8125	0.1875
Total	109	88.99	11.01	0.00	0.9450	0.0550

n: number of parous sows tested.

## III. miR-27a 基因型與產仔數相關性分析

以 SAS 軟體一般線性模式與最小平方平均法，分析經產母豬 miR-27a 基因型與產仔數性狀相關性時，可發現在初產的分析資料顯示，AA 型藍瑞斯母豬平均產仔數略高於 AB 型 ( $12.42 \pm 0.41$  頭 vs.  $12.20 \pm 1.39$  頭)，在全胎次的資料分析，AA 型藍瑞斯母豬平均產仔數高於 AB 型 ( $13.30 \pm 0.26$  頭 vs.  $11.57 \pm 1.09$  頭)，另在排除初產的分析資料中，AA 型藍瑞斯母豬平均產仔數顯著高於 AB 型 ( $14.01 \pm 0.30$  頭 vs.  $10.00 \pm 1.77$  頭， $P < 0.05$ )；AA 型杜洛克母豬平均產仔數不論初產 ( $8.20 \pm 1.17$  頭)、全胎次 ( $8.40 \pm 0.42$  頭)、排除初產 ( $8.50 \pm 0.28$  頭)，

皆低於 AB 型之產仔數 ( $9.00 \pm 1.51$  頭 vs.  $9.00 \pm 0.66$  頭 vs.  $9.00 \pm 0.51$  頭)；然 AA 型約克夏母豬平均產仔數不論初產 ( $13.40 \pm 0.63$  頭) 或全胎次 ( $14.53 \pm 0.35$  頭)，皆高於 AB 型產仔數 ( $12.00 \pm 1.85$  頭與  $14.43 \pm 0.95$  頭)，然在排除初產資料中，AA 型約克夏母豬平均產仔數 ( $15.10 \pm 0.40$  頭) 低於 AB 型 ( $15.40 \pm 1.05$  頭) (表 4)。Lei *et al.* (2011) 分析 miR-27a 基因型與產仔數相關性，在合成品系 DIV 豬 56 胎初產資料顯示，AA 型之 TNB 為  $11.214 \pm 0.337$  頭顯著高於 BB 型之  $8.875 \pm 0.772$  頭 ( $P < 0.01$ )，亦高於 AB 型之  $9.167 \pm 0.892$  頭 ( $P < 0.05$ )。另在 393 全胎次資料中，AA 型 TNB 為  $11.560 \pm 0.163$  頭顯著高於 AB 型之  $10.161 \pm 0.494$  頭 ( $P < 0.01$ )。在大白豬 50 胎初產資料中顯示，AA 型 TNB 為  $10.543 \pm 0.442$  頭低於 AB 型之  $11.333 \pm 1.730$  頭，但高於 BB 型之  $10.000 \pm 2.997$  頭，另在 165 全胎次的分析資料，AA 型之 TNB 為  $10.509 \pm 0.231$  頭高於 AB 型之  $10.481 \pm 1.188$  頭與 BB 型之  $9.725 \pm 2.897$  頭。Pang *et al.* (2019) 分析大白豬產仔性狀與 miR-27a 基因型的相關性，在 TNB 與 NBA 的比較中，AA 型比 BB 型分別多 0.30 頭與 0.26 頭，AA 型之 TNB 與 NBA 亦比 AB 型分別多 0.28 頭與 0.16 頭，且 TNB-EBV (the estimated breeding value of total number born) 的分析項目，AA 型為  $0.45 \pm 0.02$  頭顯著高於 BB 型之  $0.35 \pm 0.10$  頭 ( $P < 0.05$ )，但略低於 AB 型之  $0.46 \pm 0.04$  頭。另於木乃伊胎數分析項目，BB 型為  $0.50 \pm 0.14$  頭顯著高於 AB 型之  $0.13 \pm 0.05$  頭 ( $P < 0.05$ )，亦高於 AA 型 ( $0.22 \pm 0.03$  頭)。綜合本研究與相關的文獻結果，AA 型的藍瑞斯與約克夏豬應為往後種豬基因型選育的目標。

表 4. 經產母豬 miR-27a 基因型與產仔數性狀之相關性分析

Table 4. Association analysis between miR-27a genotypes and litter size trait of parous sows

Breed	Parity	No. of litters	Litter size (least square means $\pm$ SE)	
			AA	AB
Landrace	First	62	$12.42 \pm 0.41$	$12.20 \pm 1.39$
	Second to last	72	$14.01 \pm 0.30^a$	$10.00 \pm 1.77^b$
	All	134	$13.30 \pm 0.26$	$11.57 \pm 1.09$
Yorkshire	First	39	$13.40 \pm 0.63$	$12.00 \pm 1.85$
	Second to last	79	$15.10 \pm 0.40$	$15.40 \pm 1.05$
	All	118	$14.53 \pm 0.35$	$14.43 \pm 0.95$
Duroc	First	8	$8.20 \pm 1.17$	$9.00 \pm 1.51$
	Second to last	13	$8.50 \pm 0.28$	$9.00 \pm 0.51$
	All	21	$8.40 \pm 0.42$	$9.00 \pm 0.66$

<sup>a,b</sup> Means within the same row without the same superscripts differ ( $P < 0.05$ ).

## 結論

本研究已成功開發省時省工及節省分析成本的 miR-27a 基因型鑑別方法，分析顯示 miR-27a AA 型約克夏母豬比 AB 型有較高的產仔數，又在藍瑞斯母豬方面亦有類似結果，然全胎次的產仔數分析尚未達到顯著差異性水準。未來將擴大種豬群之檢測，驗證 miR-27a 基因標記之可利用性，俾利於種豬群的產仔數性能提升。

## 誌謝

本研究承農業部（原行政院農業委員會）經費支持（111 農科 -2.1.1- 畜 -L7、112 農科 -2.1.5- 畜 -L1），試驗期間承蒙畜產試驗所遺傳生理組蔡秀容小姐收集種豬資料與多家種豬場之支持，始克其功，特此致謝。

## 參考文獻

- 財團法人中央畜產會。2022。2021 臺灣養豬統計手冊。第 9 頁。臺北市。
- 廖仁寶、張秀鑾、賴永裕、劉錦條、吳明哲。1999。母豬造骨蛋白遺傳型對新生仔豬存活率之影響。中畜會誌 28：33-39。

- 廖仁寶、黃鈺嘉、賴永裕、顏念慈、吳明哲、張秀鑾。2006。以豬第一號染色體微衛星行遺傳標記交替基因頻率與序列比較經產母豬產仔性能。畜產研究 39：99-110。
- 廖仁寶、黃鈺嘉、賴永裕、吳明哲、張秀鑾。2013。豬第 8 號染色體微衛星型遺傳標記與經產母豬產仔性能之相關性研究。畜產研究 46：21-32。
- 廖仁寶、黃鈺嘉、賴永裕、吳明哲、張秀鑾。2014。豬第 6 號染色體微衛星遺傳標記與經產母豬產仔性能之相關性研究。畜產研究 47：71-82。
- Chhabra, R., Y. K. Adlakha, M. Hariharan, V. Scaria, and N. Saini. 2009. Upregulation of miR-23a, 27a, 24-2 cluster induces caspase dependent and -independent apoptosis in human embryonic kidney cells. PLoS ONE 4: e5848.
- Ding, R., Y. Qiu, Z. Zhuang, D. Ruan, J. Wu, S. Zhou, J. Ye, L. Cao, L. Hong, Z. Xu, E. Zheng, Z. Li, Z. Wu, and J. Yang. 2021. Genome-wide association studies reveals polygenic genetic architecture of litter traits in Duroc pigs. Theriogenology 173: 269-278.
- He, Y., X. Zhou, R. Zheng, Y. Jiang, Z. Yao, X. Wang, Z. Zhang, H. Zhang, J. Li, and X. Yuan. 2021. The association of an SNP in the EXOC4 gene and reproductive traits suggests its use as a breeding marker in pigs. Animals (Basel) 11: 521.
- Holl, J. W., J. P. Cassady, D. Pomp, and R. K. Johnson. 2004. A genome scan for quantitative trait loci and imprinted regions affecting reproduction in pigs. J. Anim. Sci. 82: 3421-3429.
- Kumchoo, T. and S. Mekchay. 2015. Association of NR4A1 and GNB2L1 genes with reproductive traits in commercial pig breeds. Genet. Mol. Res. 14:16276-16284.
- Kwok, S., D. E. Kellogg, N. McKinney, D. Spasic, L. Goda, C. Levenson, and J. J. Sninsky. 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. Nucleic Acids Res. 18: 999-1005.
- Lei, B., S. Gao, L. F. Luo, X. Y. Xia, S. W. Jiang, C. Y. Deng, Y. Z. Xiong, and F. E. Li. 2011. A SNP in the miR-27a gene is associated with litter size in pigs. Mol. Biol. Rep. 38: 3725-3729.
- Lockley, A. K., J. S. Bruce, S. J. Franklin, and R. G. Bardsley. 1996. Use of mutagenically separated PCR for the detection of the mutation associated with porcine stress syndrome. Meat Sci. 43: 93-97.
- Marantidis, A., G. P. Laliotis, and M. Avdi. 2016. Association of RBP4 genotype with phenotypic reproductive traits of sows. Genet. Res. Int. 2016: 4940532.
- Pang, P., Z. Li, H. Hu, L. Wang, H. Sun, S. Mei, and F. Li. 2019. Genetic effect and combined genotype effect of ESR, FSH $\beta$ , CTNNAL1 and miR-27a loci on litter size in a Large White population. Anim. Biotechnol. 30: 287-292.
- Rust, S., H. Funke, and G. Assmann. 1993. Mutagenically separated PCR (MS-PCR): a highly specific one step procedure for easy mutation detection. Nucleic Acids Res. 21: 3623-3629.
- SAS. 2013. SAS user guide: Statistics. SAS Inst., Cary, NC., USA.
- Wang, Y., X. Ding, Z. Tan, K. Xing, T. Yang, Y. Wang, D. Sun, and C. Wang. 2018. Genome-wide association study for reproductive traits in a Large White pig population. Anim. Genet. 49: 127-131.
- Wu, P., K. Wang, Q. Yang, J. Zhou, D. Chen, J. Ma, Q. Tang, L. Jin, W. Xiao, A. Jiang, Y. Jiang, L. Zhu, M. Li, X. Li, and G. Tang. 2018. Identifying SNPs and candidate genes for three litter traits using single-step GWAS across six parities in Landrace and Large White pigs. Physiol. Genomics 50: 1026-1035.

# Genotyping improvement for a candidate marker miR-27a associated with porcine litter size trait <sup>(1)</sup>

Ren-Bao Liaw <sup>(2)</sup> Si-Ya Wang <sup>(2)</sup> Yu-Syuan Lu <sup>(3)</sup> Jo-Ching Chen <sup>(2)</sup> Yung-Yu Lai <sup>(2)</sup>  
Kuei-Juh Liu <sup>(3)</sup> and Mei-Ping Cheng <sup>(4)(5)</sup>

Received: Aug. 29, 2023 ; Accepted: Oct. 24, 2023

## Abstract

The miR-27a genetic marker is one of the candidate markers for porcine litter size traits. The purpose of this study was to use MS-PCR (mutagenically separated polymerase chain reaction) technology to improve the conventional genotyping method of miR-27a, so as to facilitate the genotype identification of more stock pigs and to evaluate the marker availability for the pig industry. According to the references, the different genotypes of miR-27a were identified by the conventional PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) method, and three different specific primers were designed to test the PCR reaction mixture composition and the reaction temperature conditions for successful genotyping. The genotypes of 942 pigs from 9 breeding farms were identified by the newly developed genotyping method, and the results showed that the percentages of AA, AB and BB genotypes were 88.22, 11.78 and 0.00%, respectively. The genotypes of 109 parous sows with litter size trait were analyzed, and the percentages of AA, AB, and BB types were 88.99, 11.01, and 0.00%, respectively. In addition, the preliminary association analysis between genotypes and litter size trait showed that the Landrace and Yorkshire sows with an AA genotype had a higher litter size than those of AB genotype. The newly developed method that saves time, labor and analysis costs can be easily employed to genotype more stock pigs by using a simple equipment. In the future, the marker miR-27a is expected to be incorporated into the breeding scheme of stock pigs to improve their litter size performance.

Key words: Litter size trait, Candidate marker, Pig.

---

(1) Contribution No. 2769 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Genetics and Physiology Division, MOA-TLRI, HsinHua, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Formosan Farmers Association for Swine Improvement, Taipei 100011, Taiwan, R. O. C.

(4) Deputy Director General Office, MOA-TLRI, HsinHua, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(5) Corresponding author, E-mail: mpcheng@mail.tlri.gov.tw.