

猪激素敏感脂肪酶基因外显子 1 的遗传多态性分析

薛慧良* 徐来祥

(曲阜师范大学生命科学院, 曲阜 273165)

摘要 采用 PCR-SSCP 方法检测猪激素敏感脂肪酶(hormone sensitive lipase, *HSL*)基因外显子 1 的多态性, 并分析其与初生重、断奶重、6 月龄重和背膘厚的关联性。根据猪 *HSL* 基因的 DNA 序列(AJ000483)设计 5 对引物, 结果在 P5 引物对扩增的片段上发现了多态性, 并对纯合子进行测序, 发现外显子 1 的 874 bp 处存在 G → A 转换, 且存在 3 种基因型(AA、AB、BB)。统计结果表明, 3 种基因型在各品种中的分布不一致, 长白猪和大白猪与莱芜猪和沂蒙黑猪比较差异极显著($P < 0.01$), 长白猪与大白猪比较, 莱芜猪与沂蒙黑猪比较差异均不显著($P > 0.05$)。固定效应模型分析结果表明, 背膘厚基因型间差异显著($P < 0.05$), 而初生重、断奶重和 6 月龄重基因型间差异均不显著($P > 0.05$)。最小二乘分析结果表明, BB 基因型个体同 AB 和 AA 基因型个体比较背膘厚的差异显著($P < 0.05$), 3 种基因型在背膘厚的大小排列顺序为 $BB < AB < AA$ 。因此, 推测 *HSL* 基因对个体胴体瘦肉率存在一定的影响, 将 *HSL* 基因应用于猪育种过程中的标记辅助选择可以加快猪的育种进程。

关键词 猪; 激素敏感脂肪酶基因; 遗传多态性; 遗传效应

脂肪是动物体内重要的储能物质, 其合成分解是一个复杂的生理生化过程。动物体内脂肪的含量直接影响到肌肉的品质。当机体需要时, 甘油三酯脂肪酶将甘油三酯水解成游离脂肪酸和甘油, 供其他组织利用。由于甘油三酯脂肪酶的活性受多种激素调控, 故将其称为激素敏感脂肪酶(hormone sensitive lipase, *HSL*)。HSL 是负责分解脂肪组织中甘油三酯释放游离脂肪酸的关键酶和限速酶, 是调控脂肪组织分解的最关键因素, 也是影响动物脂肪沉积的关键酶之一^[1]。在蛋白质分子结构上, HSL 有 3 个功能区: 调节区, 催化区, 脂质结合区^[2]。调节区包括两个磷酸化位点: 一个为调节位点, 一个为基本位点。调节位点和基本位点的作用机制是基本位点的磷酸化并不直接影响 HSL 的活性, 而是阻断了调节位点与 cAMP- 依赖性蛋白激酶复合物的结合, 从而使 HSL 不能被活化而没有活性。HSL 基因主要在脂肪组织、肾上腺、卵巢、睾丸、胎盘、巨噬细胞、心脏、骨骼肌和平滑肌中表达^[1]。猪 *HSL* 基因全长 10~11 kb, 包括 9 个外显子, 编码 171 个氨基酸^[3], 位于 6p^{1.1}~q^{1.2}^[4,5]。

目前在猪 *HSL* 基因外显子 1^[6,7], 内含子 7^[8]和外显子 8^[9,10]上检测到多态性位点, 并对基因型分布^[6,8-10]和基因型效应^[7]进行了分析。外显子 8 上的多态性位点是采用 PCR-SSCP 方法检测到的, 而外显子 1 上的多态性位点是采用 PCR-RFLP 方法检测到的, 由于

PCR-RFLP 方法检出率低, 费用高, 而 PCR-SSCP 方法检出率高。本研究以猪 *HSL* 基因作为影响猪脂肪沉积的候选基因, 采用 PCR-SSCP 方法对 *HSL* 基因外显子 1 的遗传多态性进行分析, 并研究其与肌肉生长和脂肪沉积相关性状的关联性, 有望为今后我国养猪业的保种和育种工作从分子水平上提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以长白猪(78 头)、大白猪(82 头)、莱芜猪(102 头)和沂蒙黑猪(76 头)作为试验动物。前腔静脉采血 10 ml, ACD 抗凝(6:1), -70 °C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取参照文献^[11]。

1.2.2 PCR-SSCP 过程

(1) 引物

根据 GenBank 中已发表的猪 *HSL* DNA 序列(AJ000483), 利用 Primer3 软件(<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>)对猪 *HSL* 基因外显子 1 设计 5 对引物, 由上海生物工程技术有限公

收稿日期: 2007-06-05 接受日期: 2007-06-29

曲阜师范大学科研启动项目(No.2004)和国家自然科学基金(No.30470247, No.30670335)资助

* 通讯作者。Tel: 0537-4458169, E-mail: hui-liang-xue@163.com

表1 猪 *HSL* 基因外显子1的引物序列

引物名称	扩增区域	引物序列	片段大小(bp)	退火温度(°C)
P1	418~654	F: 5'-TCCTGGGTTTCAGGAAGAGAA-3' R: 5'-CAGGGACCCAAGTTCAGGTA-3'	237	53
P2	785~957	F: 5'-GGCTGAGGGATCAAACCTCAA-3' R: 5'-TTCCAGGAGTCCAGGCTCTA-3'	173	55
P3	938~1164	F: 5'-TAGAGCCTGGACTCCTGGAA-3' R: 5'-AATACCCGCAAAGACACCTG-3'	227	55
P4	1 145~1 322	F: 5'-CAGGTGTCTTTGCGGGTATT-3' R: 5'-ACGTAGCGTGATTTGTGCAG-3'	178	54
P5	1 341~1 677	F: 5'-CATCTTCTCCGACAAGC-3' R: 5'-CAGGAACACAGACCATCGTG-3'	337	53

司合成。引物序列见表1。

(2)PCR 扩增

PCR 扩增反应的 25 μ l 反应体系为: 2.5 μ l 10 \times PCR 缓冲液, 1.5 μ l 25 mmol/L MgCl₂, 1.0 μ l 0.01 mmol/L 引物, 2.5 μ l 2.0 mmol/L dNTPs, 0.2 μ l 5 U/ μ l Tag 酶, 2 μ l 50 mg/L DNA。PCR 程序为: 94 °C 5 min; 95 °C 45 s, 退火温度(表1)30 s, 延伸 72 °C 45 s, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 8 min, 4 °C 保存。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 用凝胶成像系统分析检测扩增结果。

(3)SSCP 分析

SSCP 分析方法参照文献^[12]。

(4)数据统计分析

计算3种基因型个体在不同猪种的分布, 对之进行差异显著性检验; 根据固定效应模型, 利用 SPSS 软件包的 GLM (general linear model) 过程分析场-年-季、品种及猪 *HSL* 基因型对猪的初生重、断奶重、6 月龄重和背膘厚的效应。统计分析模型为:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + f_{ys_j} + m_k + e_{ijkl}$$

其中: Y_{ijkl} : 为第 i 个品种, 在第 j 个场-年-季的第 k 种基因型个体的生产性能观察值; μ : 为生产性能的最小二乘均值; B_i : 为品种的第 i 个水平对生产性能的效应值; f_{ys_j} : 为场-年-季的第 j 个水平对生产性能的效应值; m_k : 为基因型的第 k 个水平对生产性能的效应值; e_{ijkl} : 为对应于观察值的随机残差效应。

2 结果

2.1 PCR-SSCP 分析结果

用所设计的引物以基因组 DNA 为模板进行 PCR 特异性扩增获得了较好的结果, 片段长度与预期大小一致, 且没有非特异性条带, 可以进行 SSCP 分析(图1)。将 5 对引物扩增的 PCR 产物分别进行 SSCP 分

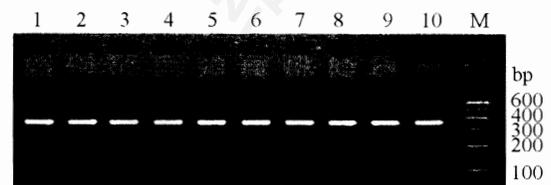


图1 P5引物的PCR扩增结果(337 bp)

M: 100 bp DNA marker.

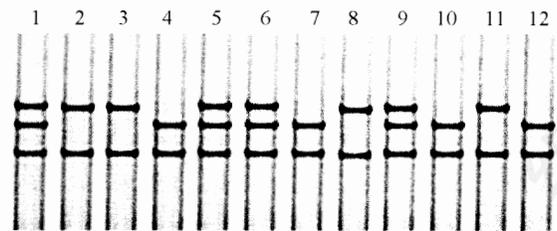


图2 P5引物的PCR扩增产物的SSCP检测结果(10% PAGE)

2、3、8、11: AA 基因型; 4、7、10、12: BB 基因型; 1、5、6、9: AB 基因型。

析, 结果在 P5 引物扩增的片段发现了多态性, 出现了 3 种基因型, 分别定义为 AA、AB、BB(图2)。并对 AA 和 BB 基因型进行测序, 发现外显子1的 874 bp 处存在 G \rightarrow A 转换(图3)。采用 DNAMAN 软件将外显子1核苷酸序列翻译成氨基酸序列, 对氨基酸序列进行同源性比较, 结果表明核苷酸的转换并没引起氨基酸的替代, 属于沉默突变。

2.2 基因频率和基因型频率在不同猪种的分布

3种基因型在不同猪种的分布不一致(表2), 长白猪和 大白猪以 A 等位基因为优势基因, 其基因频率分别为 0.81 和 0.73; 莱芜猪和沂蒙黑猪以 B 等位基因为优势基因, 其基因频率分别为 0.86 和 0.84。3 种基因型在不同猪种分布多重比较结果表明, 长白猪与 大白猪比较, 莱芜猪与沂蒙黑猪比较差异均不显著($P >$

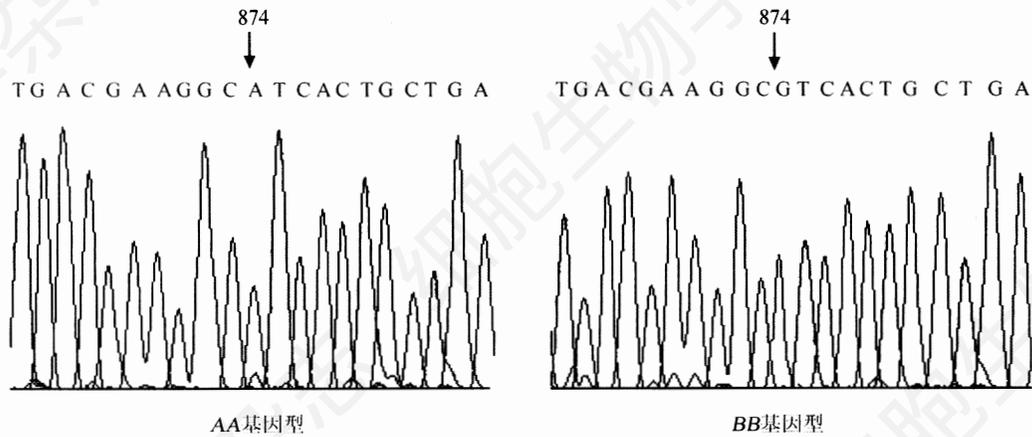


图3 AA 基因型和 BB 基因型的序列比较

表2 基因型频率和基因频率在不同猪种的分布(P5 引物)

基因型和基因频率	长白猪	大白猪	莱芜猪	沂蒙黑猪
AA	0.72(56)	0.59(48)	0.05(5)	0.08(6)
AB	0.19(15)	0.28(23)	0.18(18)	0.16(12)
BB	0.09(7)	0.13(11)	0.77(79)	0.76(58)
A	0.81	0.73	0.14	0.16
B	0.19	0.27	0.86	0.84

括号内为个体数。

表3 不同基因型在不同猪种分布的差异 χ^2 检验(P5 引物)

	长白猪	大白猪	莱芜猪
大白猪	3.0904		
莱芜猪	21.8009**	18.7131**	
沂蒙黑猪	19.1519**	17.0554**	0.7277

莱芜猪与长白猪、大白猪比较, 沂蒙黑猪与长白猪、大白猪比较, ** $P < 0.01$ 。

0.05); 其他猪种间基因型分布的差异均极显著($P < 0.1$)(表 3)。

2.3 基因型与生长性状的关联性分析

最小二乘分析结果表明, 品种间初生重、断奶重、6 月龄重和背膘厚差异均极显著($P < 0.01$); 场-年-季间各个性状差异均不显著($P > 0.05$); 基因型间背膘厚差异显著($P < 0.05$), 而初生重、断奶重和 6 月龄重差异均不显著($P > 0.05$)(表 4)。其中 BB 基因型个体同 AB 和 AA 基因型个体比较背膘厚的差异显著

($P < 0.05$), 3 种基因型在背膘厚的大小排列顺序为 $BB < AB < AA$ (表 5)。

3 讨论

本研究以猪 HSL 基因作为影响猪生长速度和脂肪沉积的候选基因, 在猪 HSL 基因外显子 1 的 874 bp 处检测到 G → A 转换, 检测到 2 种等位基因(A 和 B), 3 种基因型(AA、AB、BB)。长白猪和大白猪以 A 等位基因为优势基因; 莱芜猪和沂蒙黑猪以 B 等位基因为优势基因。长白猪与大白猪比较, 莱芜猪与沂

表4 利用最小二乘分析各变因对各个生长性状的影响

变异来源	自由度	F 值			
		初生重	断奶重	6 月龄重	背膘厚
品种	3	14.112**	17.408**	16.738**	15.716**
场-年-季	5	4.018	2.997	4.794	5.883
基因型	2	3.182	4.052	3.703	8.586*

品种间初生重, 断奶重, 6 月龄重, 背膘厚, ** $P < 0.01$; 基因型间, 背膘厚, * $P < 0.05$ 。

表5 不同基因型生长性状的最小二乘均值及标准误

基因型	初生重	断奶重	6 月龄重	背膘厚
AA	1.538±0.117	6.374±0.523	110.571±5.427	8.175±1.018 ^a
AB	1.529±0.092	6.582±0.492	109.280±6.813	7.902±0.511 ^a
BB	1.506±0.251	6.401±0.370	111.506±8.206	6.483±0.906 ^b

同一性状组合中上标不含相同字母的两值间差异显著($P < 0.05$)。

蒙黑猪比较基因型分布差异均不显著($P>0.05$); 其他猪种间基因型分布的差异均极显著($P<0.01$)。莱芜猪和沂蒙黑猪是经过长期的自然选择和人工选择而形成的, 是山东省特有的地方品种。长白猪和大白猪是引入品种。初步认为, 供试猪种基因型分布与其形成历史是相一致的, 这是长期自然选择的结果, 应加强地方猪种的保护和利用。其他学者的研究结果表明^[6, 8-10], 不同猪种间基因型分布存在差异, 这与本研究结果相一致。

本研究结果表明, 基因型间背膘厚差异显著($P<0.05$), 其中 *BB* 基因型个体同 *AB* 和 *AA* 基因型个体比较有较小的背膘厚($P<0.05$)。雷明刚等^[7]的结果表明, 基因型间眼肌面积存在显著差异。除此之外, 没有关于猪 *HSL* 基因型对生长速度和脂肪沉积相关性状关联性研究的报道。根据本研究结果, 提示在选种、育种过程中, 将猪 *HSL* 基因作为脂肪沉积的

分子标记应用于标记辅助选择, 选择带有 *B* 等位基因的个体有望提高后代的胴体瘦肉率, 改善猪肉品质, 加快育种进程。

参考文献 (References)

- [1] Frayn KN *et al.* *Adv Enzyme Regul*, 1995, **35**: 163
- [2] Yeaman ST. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1052**: 128
- [3] Harbitz I *et al.* *Anim Genet*, 1999, **30**: 10
- [4] Gu F *et al.* *Hereditas*, 1992, **117**: 231
- [5] Harbitz I *et al.* *Genomics*, 1990, **8**: 243
- [6] 雷明刚等. *华中农业大学学报*, 2001, **21**: 7
- [7] 雷明刚等. *遗传学报*, 2005, **32**: 354
- [8] 吴珍芳等. *华中农业大学学报*, 2000, **19**: 194
- [9] 吴珍芳等. *遗传学报*, 2000, **27**: 686
- [10] 杨 阳等. *农业生物技术学报*, 2001, **9**: 142
- [11] Sambrook J *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 16~34
- [12] 薛慧良等. *细胞生物学杂志*, 2007, **29**: 623

Genetic Polymorphisms of Exon 1 of Hormone Sensitive Lipase Gene in Pigs

Hui-Liang Xue*, Lai-Xiang Xu

(College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China)

Abstract Single-nucleotide polymorphisms of exon1 of hormone sensitive lipase (*HSL*) gene were tested using PCR-SSCP. Correlations between the *HSL* gene and the birth weight, the weaning weight, the weight at the six-month and the backfat thickness were analyzed. On the basis of the published DNA sequence (AJ000483) of the porcine *HSL* gene, five pairs of primers were designed, and one polymorphism was found in the PCR product amplified with P5 primers. A G → A transition at 874 site of exon1 of *HSL* gene was detected by sequencing the homozygotes. Three genotypes existed. The results show that: firstly, the genotype distribution wasn't in consistent among the different pig breeds. Significant differences ($P<0.01$) were found for the genotype distribution while the Landrace and the Large White compared with the Laiwu and the Yimeng pig breeds; whereas no significant differences ($P>0.05$) existed while the Landrace compared with the Large White, the Laiwu compared with the Yimeng pig breeds. Secondly, on the basis of the fixed effect model, significant differences ($P<0.05$) were found in the backfat thickness, whereas no significant differences ($P>0.05$) existed in the birth weight, the weaning weight and the weight at the six-month. Thirdly, using least square analysis, it was shown that individuals of the *BB* genotype have significantly lower ($P<0.05$) backfat thickness than those of *AB* and *AA* genotypes, with the order being *BB*<*AB*<*AA*. These results suggest that *HSL* gene has significant effects on fat deposit. The *HSL* gene can be used in marker-assisted selection to accelerate the breeding progress.

Key words pigs; hormone sensitive lipase gene; genetic polymorphisms; genetic effects

Received: June 5, 2007 Accepted: June 29, 2007

This work was supported by the Project of Qufu Normal University for Scientific Research Initiation (No.2004) and the National Natural Science Foundation of China (No.30470247 and No.30670335)

* Corresponding author. Tel: 86-537-4458169, E-mail: huiliangxue@163.com