

陕北白绒山羊 *HSL* 基因外显子 1 的 SNPs 及其与部分生产性状的相关分析

刘俊霞, 罗 军, 滕炎玲, 绳贺军, 林先滋, 余 刚
(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】探讨陕北白绒山羊激素敏感脂酶(Hormone sensitive lipase, HSL)基因外显子 1 的 SNP 遗传多态性及其与产绒、胴体和生长性状的相关关系, 为陕北白绒山羊分子标记辅助选择提供理论依据。【方法】测定 168 只陕北白绒山羊部分生长、胴体指标。利用 PCR-SSCP 技术分析 *HSL* 基因外显子 1 的 SNP 遗传多态性。【结果】陕北白绒山羊 *HSL* 基因外显子 1 有 AB 和 AA 2 种基因型, 在群体中处于 Hardy-Weinberg 平衡状态; AB 与 AA 基因型个体的绒长差异极显著($P<0.01$), 体高和背膘厚差异显著($P<0.05$), 其他性状均无显著差异; AB 基因型个体初生重、断奶重、绒长、周岁重、体高、体长、管围、背膘厚大于 AA 基因型, 但 AA 基因型个体毛长、产绒量、胸围、眼肌面积大于 AB 基因型。【结论】陕北白绒山羊 *HSL* 基因外显子 1 具有多态性, 该基因可能是陕北白绒山羊产绒及胴体性状的主效基因, 或者与控制这些性状的主效基因相连锁。

【关键词】 陕北白绒山羊; *HSL* 基因外显子 1; PCR-SSCP; 单核苷酸多态性
【中图分类号】 S827.2 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2009)01-0001-04

Study on SNPs of exon 1 of *HSL* gene and its relationship with several production traits of Shaanbei white cashmere goats

LIU Jun-xia, LUO Jun, TENG Yan-ling, SHENG He-jun, LIN Xian-zi, YU Gang
(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This research analyzed the single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the exon 1 of *HSL* gene and its relationship with some growth and carcass traits in Shaanbei White-Cashmere Goat in order to provide a theoretical foundation for the marker-assisted selection. 【Method】 Several growth and carcass traits of 168 Shaanbei white cashmere goats were measured in the study. PCR-SSCP technique was used to analyze the SNPs at the exon 1 of the *HSL* gene. 【Result】 The exon 1 of *HSL* gene displayed AA and AB genotypes and the population was at the Hardy-Weinberg equilibrium. There was a significant difference between the genotype AB and AA for cashmere length ($P<0.01$), wither height and back-fat thickness ($P<0.05$). There was no significant difference for other traits. The trend of “AB>AA” was noted for birth weight, weaning weight, cashmere length, yearling weight, wither height, body length, circumference of cannon and back-fat thickness. The trend of “AA>AB” was observed in the traits of hair length, cashmere yield, heart girth and loin eye area. 【Conclusion】 The exon 1 of *HSL* gene of Shaanbei white cashmere goat demonstrated polymorphism. It suggested that *HSL* gene might be a major gene or a major gene-linked gene for growth and carcass traits of Shaanbei white cashmere goats.

Key words: Shaanbei white cashmere goat; Exon 1 of *HSL* gene; PCR-SSCP; SNPs

* [收稿日期] 2008-01-23
[基金项目] 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-05-0857)
[作者简介] 刘俊霞(1980—),女,山东招远人,在读硕士,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。
[通信作者] 罗 军(1965—),男,陕西扶风人,教授,博士,主要从事动物遗传育种研究。E-mail: luojun@nwsuaf.edu.cn

激素敏感脂酶(Hormone sensitive lipase,HSL)是动物体脂肪分解的关键酶^[1-3]。1988 年,Holm 等^[4]利用 2 个互补策略(即表达文库的抗体筛选和根据 HSL 氨基酸序列构建寡核苷酸探针)从鼠的脂肪组织克隆到 HSL 基因的全长 cDNA 序列,并利用人-鼠的 HSL cDNA 作为探针,通过和人-鼠杂种细胞 DNA 杂交,分离到人 HSL 基因,并将其定位于 19 号染色体 cent-q13.3 上。Goldspink 等^[5]研究认为,HSL 基因所在的染色体区域是影响猪背膘厚、瘦肉率和脂肪含量的重要区域。Otsu 等^[6]研究认为,HSL 基因是人和动物与脂类代谢相关的重要基因,可以作为动物重要经济性状的候选基因。

陕北白绒山羊是在陕北长城沿线风沙区和黄土高原丘陵沟壑区交错地带独特的地理环境下,以辽宁绒山羊为父本,本地黑山羊为母本,采用级进杂交方法培育而成的品种^[7-8]。目前,关于陕北白绒山羊生长发育和生产性能等性状候选基因特性和标记辅助选择的研究报道较少。本研究对陕北白绒山羊 HSL 基因外显子 1 片段进行了 SNPs 分析,探讨了其多态性与生长、产绒和胴体性状间的关系,以期对陕北白绒山羊分子标记辅助选择提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 血 样 样本来自陕西省横山县狄青原陕北白绒山羊原种场,随机采集 168 只 1 周岁陕北白绒山羊(公羊 100 只,母羊 68 只)颈静脉血样,采血量 9 mL/只,与 ACD 抗凝剂充分混匀置冰盒中带回实验室,−80 °C 冷冻保存。

1.1.2 引物设计与合成 根据 GenBank 中牛及人(GenBank 登录号分别为:NM_174508 和 NM_005357)的 HSL 基因序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对引物。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,序列如下:

F:5'-ATGGACCTGCGCACCATGACACA-3';
R:5'-GAAACCCAGGCAGCGCCGTA-3'。

1.2 陕北白绒山羊基因组 DNA 的制备

解冻山羊血样,利用酚-氯仿法^[9]提取血液基因组 DNA,检测 DNA 的纯度与浓度后,−20 °C 保存备用。

1.3 陕北白绒山羊 HSL 基因外显子 1 的 PCR 扩增

PCR 反应体系为 12 uL:Mix(5 U/μL)0.2 μL,模板 DNA(50.0 ng/L) 0.5 μL,10 pmol/μL 上、下游引物各 0.5 L,加 ddH₂O 至 12 μL。PCR 反应程

序:95 °C 5 min;94 °C 45 s,65.2 °C 1 min,72 °C 50 s,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。

1.4 陕北白绒山羊 HSL 基因外显子 1 的 SSCP 分析

取 4 μL PCR 产物与 8 μL 变性剂(体积分数 95%的去离子甲酰胺 10 mL,0.5 mol/L 的 EDTA (pH8.0) 200 μL,溴酚兰 0.025 g 和二甲苯青 0.025 g)混匀,98 °C 变性 10 min,迅速冰浴 10 min,放置 5 min,使之保持变性状态。样品于 100 g/L 聚丙烯酰胺凝胶(交联度 Acr:Bis=9:1)中,在温度为 20 °C,电压为 10 V/cm 的条件下电泳 8 h。电泳结束后,银染照相。

1.5 陕北白绒山羊 HSL 基因外显子 1 的序列测定

经 SSCP 检测,将不同基因型的 PCR 扩增产物送上海生工生物技术有限公司进行正、反双向测序,以进一步证实多态位点的存在。

1.6 陕北白绒山羊胴体指标和体尺指标的测定

1.6.1 胴体指标 眼肌面积和背膘厚参考 Silva 等^[10]的方法进行测量,应用加拿大 AMI-900 型便携式兽用 B 超仪于羊体左侧第 12 与第 13 肋骨之间脊椎旁的背最长肌区域测得,位置为与脊柱垂直线上距背正中线 2.5 cm 处。于每只羊的相同部位获取三张高质量影像图,最后求平均值。

1.6.2 体尺指标 体重、体高、体长、胸围及管围的测量参考张沉^[11]的方法,由同一人实地度量称测,同时从羊场生产记录中查询并登记被测个体的初生重和 5 月龄断奶重。

1.7 数据统计分析

计算陕北白绒山羊 HSL 基因外显子 1 位点的等位基因频率、基因型频率、多态信息含量(PIC)、位点杂合度(Heterozygosity)和有效等位基因数(Ne)。同时用卡方适合性分析检验群体在该位点是否处于 Hardy-Weinberg 平衡。利用 SPSS 软件进行方差分析。统计分析模型为: $Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + C_{ij} + E_{ij}$ 。式中: Y_{ij} 为个体性状的观测值, μ 为性状的群体均值, A_i 为 SNP 位点的第 i 个基因型效应(i 代表位点基因型), B_j 为性别效应($j=1,2$,分别代表公羊和母羊), C_{ij} 为互作效应(i 代表基因型, j 代表性别), E_{ij} 为随机残差效应。

2 结果与分析

2.1 陕北白绒山羊 HSL 基因外显子 1 的 PCR 扩增

对扩增产物进行 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检

测,结果表明扩增片段长度为 513 bp,与预期目的片段长度一致且特异性好(图 1),可用于 SSCP 分析。

2.2 陕北白绒山羊 *HSL* 基因外显子 1 的 PCR-SSCP 检测与序列分析

结果显示,在陕北白绒山羊群体样本中共检测到 AA 和 AB 2 种基因型(图 2)。将 2 种基因型测序并与 GenBank 上登录的山羊 *HSL* 基因序列(EU273879)进行比对发现,在 *HSL* 基因外显子 1 在 239 位发生了 G→A 突变(图 3)。该突变导致编码的氨基酸发生了精氨酸(R)→组氨酸(H)的替换。

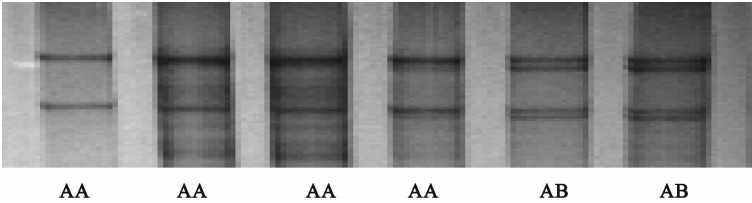


图 2 陕北白绒山羊 *HSL* 基因外显子 1 PCR-SSCP 检测结果
Fig. 2 PCR-SSCP genotyping results of the exon1 of *HSL* gene in Shaanbei white cashmere goat

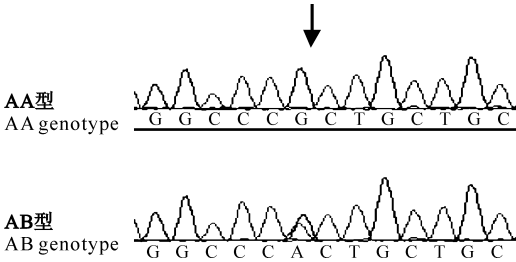


图 3 陕北白绒山羊 *HSL* 基因外显子 1 2 种基因型序列分析

Fig. 3 Sequence analysis of two genotypes of exon 1 of *HSL* gene in Shaanbei white cashmere goat

2.3 陕北白绒山羊 *HSL* 基因外显子 1 位点的遗传多态性分析

HSL 基因外显子 1 位点的基因型频率、基因频率及卡方检验结果见表 1。由表 1 可以看出,在所

表 2 陕北白绒山羊 *HSL* 基因外显子 1 的多态性分析

Table 2 Polymorphic analyses of exon 1 of *HSL* gene in Shaanbei white cashmere goat

项目 Item	位点纯合度 Homozygosity	位点杂合度 Heterozygosity	有效等位基因数 <i>N_e</i>	多态信息含量 PIC
结果 Result	0.894 7	0.105 3	1.108 0	0.094 8

2.4 陕北白绒山羊 *HSL* 基因外显子 1 的遗传效应分析

由表 3 可知,*HSL* 基因外显子 1 位点的 AB 与

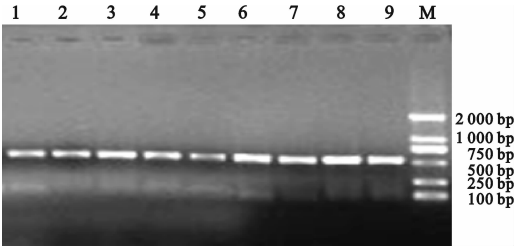


图 1 陕北白绒山羊 *HSL* 基因外显子 1 的 PCR 扩增
M. DNA Marker DL2000;1~9. 扩增产物
Fig. 1 PCR amplification of exon 1 of *HSL* gene in Shaanbei white cashmere goat
M. DNA Marker DL2000;1~9. Amplified band

研究群体中,AA 型为优势基因型;A 基因为优势等位基因; $\chi^2 = 0.262\ 6$,表明群体处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

HSL 基因外显子 1 的遗传多样性指标见表 2。由表 2 可以看出,陕北白绒山羊 *HSL* 基因外显子 1 位点 PIC 值为 0.094 8, $\chi^2 < 0.25$,为低度多态,表明群体在该位点上纯度较高。

表 1 陕北白绒山羊 *HSL* 基因外显子 1 的基因频率和基因型频率

Table 1 Allele and genotype frequencies of exon 1 of *HSL* gene in Shaanbei white cashmere goat

项目 Item	基因型 Genotypes		等位基因 Alleles	
	AA(<i>n</i> = 143)	AB(<i>n</i> = 25)	A	B
频率 Frequencies	0.897 6	0.049 8	0.947 4	0.052 6
χ^2	0.262 6			

AA 基因型间绒长差异极显著($P < 0.01$),体高和背膘厚差异显著($P < 0.05$),其他性状差异不显著;初生质量、断奶质量、绒长、周岁质量、体高、体斜长、管

围、背膘厚等指标 AB 型>AA 型,毛长、产绒量、胸围、眼肌面积等指标 AA 型>AB 型。陕北白绒山羊性别与不同基因型间的交互作用不显著($P>0.05$)。

表 3 陕北白绒山羊 *HSL* 基因外显子 1 位点基因型对生长、产绒及胴体性状的影响

Table 3 Effect of the genotypes of exon 1 of *HSL* gene on growth, cashmere production and carcass traits of Shaanbei white cashmere goats

性状 Trait	基因型 Genotypes	
	AA($n=143$)	AB($n=25$)
初生质量/kg Birth weight	2.49±0.35	2.53±0.15
断奶质量/kg Weaning weight	14.80±2.08	14.98±2.86
绒长/cm Cashmere length	5.33±0.91 B	5.88±1.07 A
毛长/cm Hair length	14.20±9.99	13.76±1.33
产绒量/g Cashmere yield	381.40±109.44	367.20±96.29
周岁质量/kg Yearling weight	18.21±2.94	18.36±3.47
体高/cm Wither height	51.06±3.16 b	52.80±3.97 a
体斜长/cm Body length	56.77±4.84	57.96±5.10
胸围/cm Heart girth	64.37±4.03	63.80±4.70
管围/cm Circumference of cannon	6.04±0.37	6.08±0.37
眼肌面积/cm ² Loin eye area	3.59±0.47	3.43±0.44
背膘厚/cm Back-fat thickness	0.40±0.04 b	0.43±0.05 a

注:同行数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。

Note: Values in the same row with different lower case superscripts differed at $P<0.05$; and with different capital superscripts differed at $P<0.01$.

3 讨 论

PCR-SSCP 技术是分析基因遗传多态性的常用技术,具有廉价、快捷、简单等优点,结合 DNA 测序技术可大大提高其准确性。影响 PCR-SSCP 结果准确性的因素很多,主要包括 PCR 产物片段长度、聚丙烯酰胺凝胶浓度和交联度及温度、电泳电压等,这些因素均会影响 SSCP 的基因型结果判定等。因此严格控制 and 掌握试验各个环节的条件,是 PCR-SSCP 分析成功的关键所在。本研究 *HSL* 基因外显子 1 PCR 产物片段长度为 513 bp、用交联度 29:1、质量浓度 100 g/L 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,取得了理想的结果。

Knoll 等^[12]将 *HSL* 基因进行 *Bsa*H I 酶切后,采用 PCR-RFLP 对其外显子 1 进行分析,结果发现,皮特兰猪、大白猪($n=7$)和长白猪($n=8$)只存在 GG 基因型;梅山猪有 A、G 2 种等位基因;杜洛克猪($n=11$)有 AG 和 GG 2 种基因型。吴珍芳等^[13]、雷

明刚等^[14]发现,猪 *HSL* 基因外显子 1 存在多态性,脂肪型猪和瘦肉型猪表现不同基因型。本研究利用 PCR-SSCP 结合 DNA 测序分析,证实陕北白绒山羊 *HSL* 基因外显子 1 存在多态性,有 AA 和 AB 2 种基因型,等位基因 A、B 的基因频率分别为 0.947 4 和 0.052 6, A 为优势等位基因;该位点在陕北白绒山羊群体中处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,说明陕北白绒山羊选育过程未对该位点产生影响。多态信息含量、杂合度和有效等位基因数均可用来度量群体内遗传变异,其值的高低反映了群体内个体的一致度,数值越高,遗传变异越大,选择潜力越大。本研究结果表明,陕北白绒山羊 *HSL* 基因外显子 1 位点处于低度多态水平,群体在该位点上纯度较高。

HSL 基因在脂解过程中的特殊作用决定了研究该基因的价值,不同物种染色体定位研究预示该基因可能是脂肪沉积和代谢相关性状的重要候选基因。Kazala 等^[15]研究表明, *HSL* 水平与肉牛肌内脂肪含量和大理石纹存在相关性,并建议将其作为早期选种的指标。本研究对陕北白绒山羊 *HSL* 基因外显子 1 多态性与生长、产绒、胴体性状的相关分析表明, AA 型和 AB 型个体间的绒长、体高和背膘厚差异达显著或极显著水平,其他性状 AA 型与 AB 型差异不显著;初生质量、断奶质量、周岁质量、体高、体长、管围、绒长、背膘厚等性状 AB 型>AA 型,而胸围、眼积面积、产绒量等性状为 AA 型>AB 型。本研究未发现 BB 型,可能是由于所检测样本数有限所致,今后应进一步扩大样本量以得到更准确的分析结果。

[参考文献]

[1] Guenter H, Robert Z, Rudolf Z. Letting lipids go: Hormone-sensitive lipase [J]. Current Opinion lipidol, 2003, 14: 289-297.

[2] Kazala E C, Jennifer L P, Fred J L, et al. Hormone-sensitive lipase activity in relation to fat content of muscle in Wagyu hybrid cattle [J]. Livestock Production Sci, 2003, 79: 87-96.

[3] Kraemer F B, Shen W J. Hormone sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholestervl ester hydrolysis [J]. Lipid Res, 2002, 43: 1585-1594.

[4] Holm C, Svenson K L, Kirchgessner T G, et al. Hormone-sensitive lipase sequence, expression and chromosomal localization to 19cent-q13. 3 [J]. Science, 1988, 241: 1503-1506

[5] Goldspink G, Yang S P. Muscle structure development and growth [M]//CAB international. Poultry Meat Sci, 1999: 11.