

牦牛 *LPL* 基因外显子 7 多态性与生长性状相关性的研究

梁春年,邢成峰,阎 萍,丁学智,裴 杰,郭 宪,包鹏甲,褚 敏,朱新书

(中国农业科学院 兰州畜牧与兽药研究所,甘肃 兰州 730070)

摘要:采用 PCR-SSCP 技术对 5 个牦牛品种共 398 头牦牛脂蛋白脂肪酶基因(*LPL*) 外显子 7 进行了多态性研究,分析了该基因与牦牛生长性状的相关性。结果表明,牦牛 *LPL* 基因外显子 7 存在 2 个等位基因 3 种基因型。各群体在该基因座上呈 Hardy-Weinberg 平衡状态。三种基因型与牦牛部分生长性状的最小二乘法分析表明,该位点多态与牦牛的体重、体高、胸围存在显著相关($P < 0.05$),BB 型个体体重、体高、胸围显著高于 AA 和 AB 型个体。初步推断牦牛 *LPL* 基因第 7 外显子可作为牦牛标记辅助选择的遗传标记之一。

关键词:牦牛;*LPL* 基因;多态性;性状标记;PCR-SSCP

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2010)05-0016-04

Study on Association of Single Nucleotide Polymorphism at Extron 7 of *LPL* Gene with Growth Traits in Yak

LIANG Chun-nian, XING Cheng-feng, YAN Ping, DING Xue-zhi, PEI Jie, GUO Xian, BAO Peng-jia, CHU-Min, ZHU Xin-shu

(Lanzhou Institute of Animal Science and Veterinary Pharmaceuticals, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Lanzhou 730050, China)

Abstract: The PCR-SSCP polymorphism of Lipoprotein lipase(*LPL*) gene sequence of part exon 7 and its correlation with growth traits were studied in 398 individuals from five breeds yak. The results showed that there were two alleles and three genotypes in the locus of *LPL* gene exon 7. They were at Hardy-Weinberg equilibrium state in this locus. The least square analysis showed that the different genotype of *LPL* exon 7 had a significant effect on partial traits of growth including body weight, heart girth, body height($P < 0.05$), and the genotype did not affected on body slanting length significantly($P > 0.05$). Therefore, these results imply that the mutation at the exon 7 of yak *LPL* gene could be used as the molecular genetic marker for yak breeding.

Key words: Yak; *LPL* gene; Polymorphism; Genetic marker; PCR-SSCP

脂蛋白脂肪酶(Lipoprotein lipase, *LPL*)是由脂肪细胞、骨骼肌细胞、乳腺细胞及巨噬细胞等实质细胞合成的由 448 个左右的氨基酸残基组成的一种蛋白水解酶,广泛存在于不同组织中,其中在脂肪细胞和骨骼肌细胞中含量较高^[1,2]。自 1987 年,已成功从人、鸡、牛和小鼠中克隆到了 *LPL* 基因,并进行了序列分析^[3]。有关牛的 *LPL* 基因多态性研究报道较少,郭艳青等^[4]利用 PCR-RFLP 技术对 6 个牛品种 *LPL* 基因的全部编码外显子 Exon 1~9 及 Intron

1 进行了遗传变异分析,发现 *LPL* 基因 Exon 2, 5, 6, 8, 9 及 Intron 1 上存在 SNPs 位点,其他均未发现多态。

牦牛(*Bos grunniens*)是青藏高原及毗邻地区特有的遗传资源,能适应青藏高原特殊生态环境,可充分利用青藏高原牧草资源进行动物性生产的牛种,其无论在生物学还是遗传学研究中,牦牛都具有独特的、不可替代的重大意义。本试验首次对牦牛 *LPL* 基因第 7 外显子序列进行 SNP 检测,同时测定

收稿日期:2010-08-04

基金项目:国家“863”资助项目(2008AA10Z137);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(BRF100101);甘肃省重大科技专项(0801NKDA036);国家科技支撑计划(2008BAD96B00-01)

作者简介:梁春年(1973-),男,甘肃武威人,副研究员,在读博士,主要从事牦牛遗传育种研究。

通讯作者:阎 萍(1963-),女,山西运城人,研究员,博士,主要从事牦牛育种研究。

牦牛部分生长发育指标,分析 SNP 突变造成的不同基因型与牦牛生长发育指标的相关性,以期找到可行的遗传标记,为牦牛 *LPL* 基因的分子生物学研究及牦牛分子育种奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 采集成年天祝白牦牛血样 111 头份;甘南牦牛血样 95 头份;大通牦牛血样 72 头份,青海高原牦牛血样 70 头份,新疆巴州牦牛血样 50 头份;血样的采集与处理:颈静脉采血 5 mL,用 ACD 抗凝后,置于 -70°C 低温保存待测。同时,对采血牦牛现场测定体斜长、体高、胸围和体重等指标。

1.1.2 主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、蛋白酶 K、琼脂糖、溴化乙锭、Tris 饱和酚、DNA Ladder、V-gene 纯化试剂盒均购自北京经科生物工程公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用常规的酚-氯仿抽提法从全血中提取牦牛基因组 DNA^[5]。每 100 μL 全血中提取的 DNA 用 70 μL 的 TE 缓冲液溶解, 4°C 保存。

1.2.2 引物设计与合成 参照牛 *LPL* 基因序列 (GenBank, N-M01075120), 用 Primer5.0 软件设计 1 对引物,预期扩增长度为 286 bp。上游引物: 5'-AGTGCCTGCTTGTGTTG-3', 下游引物: 5'-TATGCCCTTTCTGTTTCCT-3', 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.3 PCR-SSCP 反应条件 PCR 反应体系为 20 μL 。其中 10 \times PCR Buffer 2.0 μL , dNTPs 1.6 μL (2.5 mmol/L), 上、下游引物各 0.4 μL (10 mmol/L), *Taq* 酶 0.1 μL (5 U/ μL), 模板 0.4 μL , ddH₂O 14.7 μL 。反应程序: 95°C 预变性 5 min, 95°C 45 s, 52.5°C 30 s, 72°C 30 s, 32 个循环; 72°C 再延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶检测后置于 4°C 冷藏保存供 SSCP 分析。

扩增产物的 SSCP 分析, 2 μL PCR 产物和 7 μL 变性剂 (98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯氰、10% 甘油、10 mmol/L EDTA, pH 8.0) 混匀, 98°C 变性 10 min, 冰浴 10 min。变性后 PCR 产物以 10% 聚丙烯酰胺凝胶 (丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺 = 29:1) 常温电泳过夜, 银染显带。

1.2.4 PCR 产物回收、测序 对于具有单核苷酸构象多态性的 PCR 片段利用 V-gene 纯化试剂盒进行纯化, 经纯化的 PCR 扩增产物送上海生工生物工

程技术服务有限公司测序。

1.3 统计方法

1.3.1 计算基因型频率和基因频率、并进行群体平衡性检验 某基因位点的 Hardy-Weinberg 平衡性检测采用皮尔逊 χ^2 统计量, 其公式为:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^m \frac{(f_i - np_i)^2}{np_i}$$

其中, m 为某一遗传位点基因型应有个数; i 为基因型序号; f_i 代表第 i 个基因型的实际个体数量; n 为样本数量; p_i 代表第 i 个基因型的理论频率。

1.3.2 多态信息含量 (Polymorphism information content, PIC)^[6] 根据 Bostein 等公式计算多态信息含量 (PIC)。式中 P_i 、 P_j 分别为群体中第 i 、 j 个等位基因频率, n 为等位基因数。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

1.3.3 有效等位基因数 (Effective number of alleles, N_e) 根据 Kimura and Crow 公式计算。式中 P_i 为群体中第 i 个等位基因频率, n 为等位基因数。

$$N_e = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2$$

1.3.4 基因纯合度 (Homozygosity, H_o) 与基因杂合度 (Heterozygosity, H_e)。

$$H_o = \sum_{i=1}^n (P_i)^2$$

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n (P_i)^2$$

1.3.5 基因多态性与牦牛生长发育性状的相关性分析 根据影响生长发育性状的因素不同, 考虑到品种效应、年龄和性别效应以及遗传效应, 分析时采用了以下固定模型:

$$y_{ijkm} = \mu + B_i + A_j + S_k + M_m + e_{ijkm}$$

其中: y_{ijkm} 为个体表型记录; B_i 为品种效应; A_j 为年龄效应; S_k 为性别效应; M_m 为标记基因型效应; e_{ijkm} 为随机误差。SPSS 13.0 对数据进行分析, 并用最小二乘法拟合线性模型, 对各标记基因型间生长发育指标进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 SSCP 检测

LPL 基因外显子 7 的 PCR-SSCP 分析表明, 该位点存在三种基因型, 即 AA, AB, BB, 由一对等位基因 A 和 B 控制, 其电泳结果见图 1。

2.2 序列分析

将两个纯合基因型个体的 PCR 产物进行纯化后送上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 结果发现 AA 型与 BB 相比, 在该扩增片段中发生了一

个 C 到 T 的单碱基突变(图 2)。

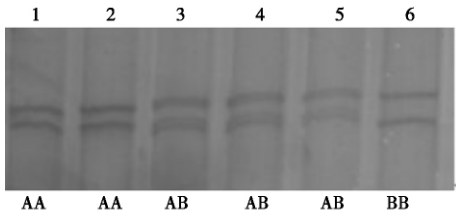


图 1 牦牛 *LPL* 基因外显子 7 的 PCR-SSCP 图谱

Fig.1 PCR-SSCP analysis at the exon 7 of yak *LPL* gene

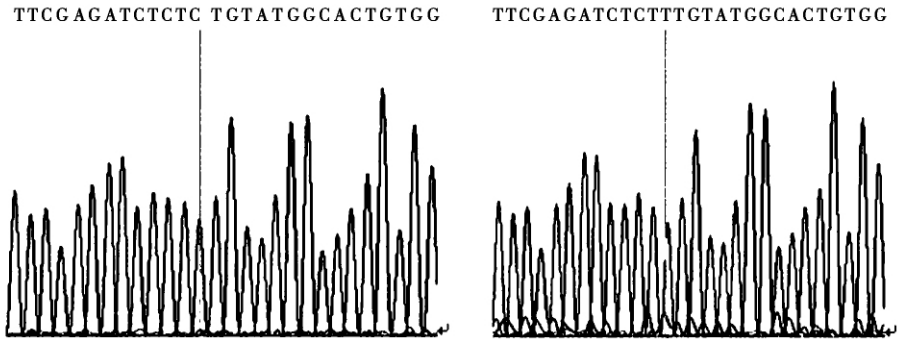


图 2 牦牛 *LPL* 基因外显子 7 基因座测序图谱

Fig.2 The sequencing map of the exon 7 of yak *LPL* gene

表 1 5 个群体 *LPL* 基因第 2 内含子基因座的 PCR-SSCP 基因频率和基因型频率

Tab.1 Gene and genotype frequencies at the exon 7 of yak *LPL* gene in five populations

群体 Breed	样本 含量 Number	各基因型个体数 Number of each genotype			基因型频率 Genotypic frequencies			基因频率 Allelic frequencies		位点平衡检测 Locus equilibrium χ^2 test
		AA	AB	BB	AA	AB	BB	A	B	
牦牛 Datong yak	72	36	30	6	0.500 0	0.416 7	0.083 3	0.708 3	0.291 7	0.347 2
甘南牦牛 Gannan yak	95	55	31	9	0.578 9	0.326 3	0.094 7	0.742 1	0.257 9	0.254 6
天祝白牦牛 Tianzhu White yak	111	73	30	8	0.657 7	0.270 3	0.072 0	0.792 8	0.207 2	0.185 3
青海高原牦牛 Qinghai Highland yak	70	38	27	5	0.542 9	0.385 7	0.071 4	0.735 7	0.264 3	0.295 0
新疆巴州牦牛 Xinjiang Bazhou yak	50	32	12	5	0.640 0	0.260 0	0.100 0	0.690 0	0.310 0	0.202 2

由表 2 可知,在所检测的 5 个牦牛群体中,天祝白牦牛的基因杂合度、有效等位基因数、多态信息含量等均最低,而新疆巴州牦牛的基因杂合度、有效等

2.3 基因座的遗传多态性分析

由表 1 可知,在所检测的 5 个牦牛群体中均发现 AA,AB 和 BB 3 种基因型,各牦牛群体中均以 AA 型为优势基因型。不同牦牛群体中均检测到 A 和 B 2 个等位基因,且 A 基因频率相对高于 B 基因频率,A 等位基因为各牦牛群体中的优势等位基因。 χ^2 检验结果显示,在该基因座上,所有群体均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态($P > 0.05$)。

位基因数、多态信息含量等均最高。3 个牦牛品种的多态信息含量均低于 0.5,为低度多态。

表 2 5 个群体 *LPL* 基因第 7 外显子基因座遗传多态性指标

Tab.2 Genetic diversity indices at at the exon 7 of yak *LPL* gene in five populations

群 体 Population	基因杂合度 He	基因纯合度 Ho	有效等位基因数 Ne	多态信息含量 PIC
大通牦牛 Datong yak	0.413 2	0.586 8	1.704 2	0.327 8
甘南牦牛 Gannan yak	0.382 8	0.617 2	1.620 2	0.309 5
天祝白牦牛 Tianzhu White yak	0.328 5	0.671 5	1.489 3	0.274 6
青海高原牦牛 Qinghai Highland yak	0.388 9	0.611 1	1.636 4	0.312 7
新疆巴州牦牛 Xinjiang Bazhou yak	0.427 8	0.572 2	1.747 6	0.336 2

表 3 不同基因型对牦牛生长发育性状的影响 (Mean \pm SE)

Tab.3 Effects of different genotypes on production of at the exon 7 of yak *LPL* gene((Mean \pm SE))

性状 Traits	基因型 Genotypes			基因型 Genotype effect	
	AA	AB	BB	F	P
体高/cm Body height	118.82 \pm 3.96	115.89 \pm 3.95	126.85 \pm 4.02	4.54	0.011 5
胸围/cm Heart girth	154.26 \pm 4.92	152.36 \pm 4.73	165.86 \pm 4.82	3.06	0.048 3
体斜长/cm Body slanting length	112.75 \pm 5.03	119.97 \pm 5.09	134.68 \pm 5.44	2.98	0.052 7
体重/kg Body weight	190.93 \pm 8.79	184.10 \pm 8.49	229.60 \pm 9.09	3.32	0.037 7

2.4 牦牛 *LPL* 基因外显子 7 多态性与生长发育性状相关性

由表 3 可知, *LPL* 基因第 7 外显子多态对牦牛的体重、体高、胸围存在显著相关, BB 型的体重、体高、胸围显著高于 AA、AB 型 ($P < 0.05$); *LPL* 基因第 7 外显子多态对牦牛的体长无显著性影响 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

目前为止, 对人、牛、羊、猪、马等的 *LPL* 基因的多态性都有研究报道, 但牦牛 *LPL* 基因的研究几乎是空白。已有的研究表明, 在人类 *LPL* 基因中, 已检测到 283 个突变位点, 突变种类繁多, 包括了错义突变、无义突变、同义突变、缺失及插入等, 在各种突变中, 错义突变发生频率较高, 与各种代谢异常的关系也最为密切, 其中第 6 内含子和第 8 内含子的 *Pvu* II 和 *Hind* III 多态性与脂代谢疾病密切相关^[7,8]。赵郁等^[9]研究结果表明, *LPL* 基因内含子 3 和外显子 5 的突变多与高甘油三酯相关, 可能是高甘油三酯的遗传易感因子。有关牛的 *LPL* 基因多态性研究报道较少, 郭艳青等利用 PCR-RFLP 技术对 6 个牛品种 *LPL* 基因的第 5 外显子进行了遗传变异分析, 并分析了 *Msp* I 酶切多态位点与相关肉质性状的关系。发现突变基因型的个体的背膘厚明显低于未突变的野生型个体。郭艳青等还对牛 *LPL* 基因全部编码外显子 Exon 1~9 及 Intron 1 多态性位点进行了检测, 发现 *LPL* 基因 Exon 2, 5, 6, 8, 9 及 Intron 1 上存在 SNPs 位点, 其他均未发现多态。本研究分析了中国 5 个牦牛群体 *LPL* 基因第 7 外显子的多态性, 发现在所扩增片段有一个 C 到 T 的单碱基突变。在所检测的 5 个牦牛群体中均发现 AA, AB 和 BB 3 种基因型, 各牦牛群体中均以 AA 为优势基因型。不同牦牛群体中均检测到 A 和 B 两个等位基因, 且 A 基因频率相对高于 B 基因频率。据此推断, A 等位基因可能对牦牛的生长发育、脂肪沉积有正效应, 所以在长期的人工选育过程中受到正向选择, 处于优势地位。本研究发现在 *LPL* 基因第 7 外显子这一基因座上, 5 个牦牛群体均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 这可能由于这一基因座的选择压力不强, 因此在人工选择、迁徙和遗传漂变等各种因素的作用下该基因座处于动态平衡中。因此, 这

提示牦牛育种工作者, 在牦牛的改良过程中, 可以加大人工选育力度, 坚决淘汰生长速度慢和生产性能低下的个体, 以打破平衡状态, 选育出优良品种。

本研究对牦牛 *LPL* 基因外显子 7 基因座表现的多态性与其部分生长发育指标进行相关分析表明, *LPL* 基因第 7 外显子多态对牦牛的体重、体高、胸围存在显著相关, BB 型的体重、体高、胸围显著高于 AA、AB 型; *LPL* 基因第 7 外显子多态对牦牛的体长无显著性影响。这提示牦牛育种工作者在今后牦牛的育种工作中, *LPL* 基因外显子 2 基因座表现的多态有可能作为一种遗传标记, 通过对有利基因型的选择, 加快牦牛的遗传改良步伐。

参考文献:

- [1] Scanu A. Serum high-density lipoprotein: effect of change in structure on activity of chicken adipose tissue lipase [J]. Science, 1966, 153(736): 640-641.
- [2] Clarke S D, Armstrong M K. Cellular lipid binding proteins: expression, function, and nutritional regulation [J]. FASEB J, 1989, 3(13): 2480-2487.
- [3] Sparkes R S. Glycosylation of lipoprotein lipase in human subcutaneous and omental adipose tissues [J]. Genom, 1987, 1: 138.
- [4] 郭艳青. 牛 *LPL*, *HSL* 基因克隆、SNPs 筛查及其与肉质性状的关联分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning [M]. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989: 463-469.
- [6] Botstein D, White R L, Skolnick, M. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32: 314-331.
- [7] Garene C, Perusse L, Gagnon J, et al. Linkage and association studies of the lipoprotein lipase gene with postheparin plasma lipase activities, body fat, and plasma lipid and lipoprotein concentrations: the HERITAGE family study [J]. Metabolism, 2000, 49(4): 432-439.
- [8] Gotoda T, Yamada N, Murase T, et al. Detection of three separate DNA polymorphisms in the human lipoprotein lipase gene by gene amplification and restriction endonuclease digestion [J]. Lipid Res, 1992, 33: 1067-1072.
- [9] 赵郁, 穆云翔. 脂蛋白脂酶基因突变的研究 [J]. 天津医药, 2004, 32(11): 657-659.