

猪 *SHP* 基因外显子 1 单核苷酸多态性研究

李建华, 褚晓红, 赵晓枫, 徐宁迎*

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310029)

摘要: 微小异源二聚体伴侣基因 (Small heterodimer partner gene, *SHP*) 主要在肝脏、心脏、胰脏和脂肪组织中表达, 影响脂类在机体内的动态平衡。用 PCR-SSCP 方法研究猪 *SHP* 基因外显子 1 在 5 个猪群 (长白猪、大白猪、皮特兰猪、金华猪和野猪) 中的 DNA 多态性, 结果检测到 3 种基因型 (GG、GA 和 AA)。 χ^2 独立性检验结果表明, 3 种基因型频率分布在各品种间差异显著 ($P < 0.05$)。对纯合子个体测序检测发现, 在 *SHP* 基因第 1 外显子内存在一个多态位点 (G374A, DQ002896), 且导致编码氨基酸由精氨酸 (Arg) 替换为组氨酸 (His)。对金华 × 皮特兰 F_2 代资源家系猪进行了该多态片段的基因型鉴定, 并分析了不同基因型对猪背膘厚和肌内脂肪含量的遗传效应, 结果显示: AA 基因型猪肩背膘厚、胸背膘厚、臀背膘厚以及肌内脂肪含量分别比 GG 基因型猪的低 27.0%, 30.6%, 19.5% 和 40.9% ($P < 0.05$); AA 基因型猪 6~7 肋背膘厚比 GA 基因型猪的低 23.0% ($P < 0.05$)。

关键词: *SHP*; PCR-SSCP; 背膘厚; 肌内脂肪含量

中图分类号: S828.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)11-1253-04

Study on the Single Nucleotide Polymorphism in Porcine *SHP* Gene Exon 1

LI Jian-hua, CHU Xiao-hong, ZHAO Xiao-feng, XU Ning-ying*

(College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Small heterodimer partner gene is expressed in liver, heart, pancreas and adipose tissue and influences the lipid homeostasis. Three genotypes (GG, GA and AA) of *SHP* gene exon 1 were identified by PCR-SSCP and their distribution was significant different ($P < 0.05$) in five pig breeds (Large White, Landrace, Pietrain, Jinhua and Wild boar) by Chi-square analysis. The homozygotes were sequenced and one polymorphic locus (G374A, DQ002896) was found which changed the amino acid from Arg to His. Moreover, association analysis of *SHP* polymorphism with backfat thickness and intramuscular fat contents was conducted in the F_2 generation from the Jinhua × Pietrain resource family. The results showed that the pigs with genotype AA had 27.0%, 30.6%, 19.5% and 40.9% lower backfat thickness at three positions (shoulder, thorax-waist and buttock) and intramuscular fat contents respectively than those with genotype GG ($P < 0.05$); At 6th-7th rib backfat thickness, the pigs with genotype AA was significantly lower than those with genotype GA by 23.0% ($P < 0.05$).

Key words: *SHP*; PCR-SSCP; backfat thickness; intramuscular fat contents

微小异源二聚体伴侣基因 (Small heterodimer partner gene, *SHP*) 是一种非典型的缺少常见的 DNA 结合区 (DBD) 的孤生核受体, 在肝脏、心脏、胰脏和脂肪等器官和组织中表达^[1,2]。*SHP* 抑制和

阻止肝 X 受体 (LXR) 和类维生素 A_x 受体 (RXR, NR2B1) 的转录活性, 这两个受体在维持机体脂类动态平衡中发挥着重要的作用^[3]; 另外有研究表明 *SHP* 可增加过氧化物酶增生物激活体 γ (PPAR- γ)

收稿日期: 2006-10-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371024); 国家高技术发展计划项目 (2004AA213110)

作者简介: 李建华 (1969-), 男, 湖北孝感人, 副教授, 博士, 主要从事动物遗传育种及分子生物学研究

* 通讯作者: 徐宁迎, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: ningying56@hzncnc.com

的转录活性。PPAR- γ 是脂细胞分化的重要调控因子,它与 ADD1 和 CCAAT 元件增强结合蛋白(C/EBPs)共同调控脂肪细胞的分化过程^[4]。Agnes 等^[5]认为 SHP 是前脂肪细胞中芳香化酶(Aromatase)转录的有力抑制子,它可通过肝脏受体荷尔蒙(LRH-1)间接抑制芳香化酶在前脂肪细胞中的表达。在动物脂肪组织中调节 SHP 的表达量或活性可显著影响芳香化酶在前脂肪细胞中的表达,敲除芳香化酶的老鼠由于性腺沉积脂肪而明显肥胖。在人和老鼠中由于芳香化酶编码基因自然突变而导致的芳香化酶数量或活性的降低也会导致新陈代谢综合征,特别是肝脏的脂肪聚积^[6]。这表明 SHP 基因功能的任何改变都可能会通过调节 RXR、LXR、PPAR- γ 和 LRH-1 等的活性来间接影响脂类在体内的动态平衡。

人 SHP 基因被定位在染色体 1p36.1 的位置上,根据人猪基因组比较图谱,猪 SHP 基因位于猪第 6 号染色体上,其有影响猪肌内脂肪的 QTL 的区域,可作为影响脂肪的候选基因^[7]。本研究运用 PCR-SSCP 技术,检测了 SHP 基因外显子 1 在 5 个猪种中的单核苷酸多态性,并以金华 \times 皮特兰 F₂代资源家系为研究材料,分析 SHP 基因外显子 1 的单核苷酸多态性对猪背膘厚和猪肌内脂肪含量的遗传效应。

1 材料和方法

1.1 材料

大白猪(31头)、长白猪(27头)、皮特兰猪(28头)和金华 \times 皮特兰 F₂代资源家系(160头)猪血样采自浙江大学动物科学学院试验牧场;金华猪(34头)血样采自浙江省金华农校种猪场;野猪(19头)血样采自浙江省宁波市象山野猪养殖场。所采血样量为 10 mL/头,用 ACD 抗凝,-20℃冻存。

1.2 性能测定猪的饲养及性状测定

进行性能测定的为金华 \times 皮特兰 F₂代资源家系,根据《中国肉脂型猪饲养标准》(1986)配制日粮,日喂 2 次,自由饮水。160 日龄屠宰,屠宰测定 160 头(73 头去势公猪和 87 头小母猪),屠宰后用钢尺直接测量猪肩背膘厚、6~7 肋背膘厚、胸腰部背膘厚和臀部背膘厚等 4 个背膘厚值,用傅立叶变换近红外光谱法测定猪眼肌内脂肪含量^[8]。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

根据猪 mRNA 序列(GenBank 登录号:

DQ002896)设计引物。上游引物为 S1:5'-CCAT-GCCAGAGTGCAGCAG-3';下游引物为 S2:5'-CAGGGTTGAAGAGAATGGTC-3'。引物由上海生物工程公司合成。PCR 反应总体系为 10 μ L,其中 10 \times Buffer 1.0 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 0.7 μ L,10 mmol/L dNTPs 0.2 μ L,上、下游引物(10 pmol/L)各 0.8 μ L,5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L,模板 DNA 0.6 μ L(25 ng),加 ddH₂O 至 10.0 μ L。PCR 扩增条件为:94℃ 4 min;94℃ 1 min,57℃ 40 s,72℃ 50 s,34 个循环;72℃ 延伸 8 min。2%琼脂糖凝胶电泳检测。预期扩增片段大小为 516 bp。

1.4 SSCP 分析

5 μ L PCR 产物和 7 μ L 的上样缓冲液(98% 去离子甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯青、10 mmol/L pH 值为 8.0 的 EDTA)混匀,98℃ 变性 10 min,迅速插入冰中,放置 5 min,使之保持变性状态。样品在 12%非变性聚丙烯酰胺凝胶(Acr:Bis=29:1)中,温度为 20℃,电压 10 V/cm 的条件下电泳 8 h。电泳结束后,进行银染显带^[9]。

1.5 PCR 产物的序列测定

经 SSCP 分析后,不同纯合基因型个体的 PCR 扩增产物在 2%琼脂糖凝胶中电泳并回收,回收的 DNA 送上海生工测序。

1.6 数据统计分析

根据电泳图谱的显示统计基因型频率。对猪群多态片段的基因型分布进行 χ^2 独立性检验,以了解每种类型在群体间的分布关系,用适合性 χ^2 检验各群体在该位点的基因频率是否处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。用 SAS(9.1)的 GLM 程序对所检测金华 \times 皮特兰资源家系 F₂代个体的基因型与 4 个背膘厚值以及肌内脂肪含量值进行最小二乘分析^[10],模型如下:

$$y_{ij} = \mu + s_i + g_j + e_{ij}$$

式中 y_{ij} 为性状观察值; μ 为分析性状的群体均值; s_i 为性别效应; g_j 为 SNP 位点的基因型效应; e_{ij} 为随机残差效应。

2 结果

2.1 PCR 扩增

用所设计的一对引物对不同品种猪的基因组进行扩增,所得 PCR 扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明:扩增片段与预期目的片段大小一致

且特异性好,可用于 SSCP 分析。

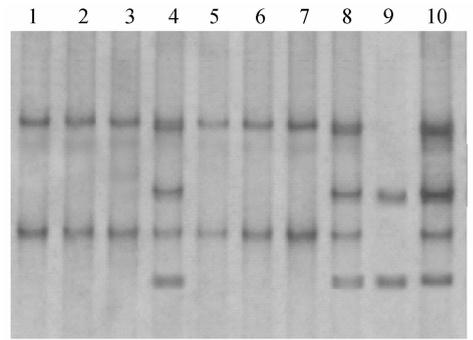
2.2 PCR-SSCP 检测与序列测定

在 5 个品种及金华×皮特兰 F₂代资源家系猪群中,共检测到 3 种基因型。对纯合子个体测序,发现在 SHP 基因第 1 外显子内存在一个 G→A 的单核苷酸替换(序列 DQ002896 中第 374 位碱基),该单核苷酸替换导致 SHP 基因相应位置编码的氨基酸发生变化,由精氨酸(Arg)变为组氨酸(His)。将该位点为 G 的纯合子的基因型定义为 GG 型,将该位点为 A 的纯合子的基因型定义为 AA 型,杂合子定义为 GA 型(图 1)。

2.3 不同品种猪群 SHP 基因外显子 1 的基因频率和基因型频率分析

根据 SSCP 带型对 5 个品种猪进行统计,并进

行基因型和相应基因频率计算(表 1)。



1, 2, 3, 5, 6, 7. GG genotype; 9. AA genotype; 4, 8, 10. GA genotype

图 1 猪 SHP 基因外显子 1 PCR 产物的 SSCP 分析
Fig. 1 SSCP analysis of PCR amplification products of SHP gene exon 1

表 1 不同品种猪群 SHP 基因外显子 1 的基因频率和基因型频率

Table 1 Gene frequency and genotype frequency of SHP gene exon 1 in different porcine breeds

		大白猪		长白猪		皮特兰猪		金华猪		野猪	
		Large White		Landrace		Pietrain		Jinhua		Wild boar	
		检出数 N	频率 P	检出数 N	频率 P	检出数 N	频率 P	检出数 N	频率 P	检出数 N	频率 P
基因型 Genotypes	GG	5	0.161	4	0.148	9	0.321	20	0.558	8	0.421
	GA	10	0.323	8	0.296	12	0.479	10	0.294	7	0.368
	AA	16	0.516	15	0.556	7	0.250	4	0.118	4	0.211
等位基因 Allele genes	G	0.323		0.296		0.536		0.735		0.605	
	A	0.677		0.704		0.464		0.265		0.395	

结果显示,该 SNP 位点在大白猪、长白猪、皮特兰猪等外来猪种中以等位基因 A 为主,基因频率在 0.464~0.704 之间,而在中国地方猪种金华猪和野猪中则以等位基因 G 为主,基因频率分别为 0.735 和 0.605。对以上种群进行基因型频率独立性 χ^2 检验发现,群体间基因型频率分布差异显著($P < 0.05$)。

适合性 χ^2 检验结果表明,各群体在该位点的基因频率均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态(各群体

χ^2 均小于 $\chi_{0.05(1)}^2$)。

2.4 3 种基因型对猪背膘厚和肌内脂肪含量的影响

不同基因型与猪背膘厚的关系统计结果见表 2。统计分析结果显示:AA 基因型猪的 4 个背膘厚值均较低,AA 基因型猪的肩背膘厚、胸腰部背膘厚和臀部背膘厚的值分别比 GG 基因型的要低 27.0%、30.6%和 19.5%($P < 0.05$);AA 基因型猪 6~7 肋背膘厚比 GA 基因型的要低 23.0%($P <$

表 2 SHP 基因外显子 1 不同基因型对背膘厚和肌内脂肪含量的影响

Table 2 Effect of different genotype in SHP gene exon 1 on backfat thickness and intramuscular fat contents

基因型 Genotypes	检出数 Number	肩背膘厚 SFT/cm	6~7 肋骨背膘厚 RFT/cm	胸腰部背膘厚 TFT/cm	臀部背膘厚 BFT/cm	肌内脂肪含量 IMF/%
GG	44	5.11±0.23 ^a	3.37±0.21 ^{ab}	2.61±0.17 ^a	2.41±0.17 ^a	3.52±0.28 ^a
GA	92	4.71±0.13 ^{ab}	3.38±0.12 ^a	2.36±0.09 ^{ab}	2.34±0.10 ^{ab}	2.59±0.19 ^b
AA	24	3.73±0.37 ^b	2.60±0.33 ^b	1.81±0.27 ^b	1.94±0.28 ^b	2.08±0.39 ^b

数值为平均数±标准差;同列上角标字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

Datas are means±standard error. Values in a line with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$

0.05);GG基因型猪肌内脂肪含量显著大于GA和AA基因型猪($P<0.05$)。

3 讨论

Árnyasi等^[11]用直接测序法,分析了5头杜洛克×长白杂交猪(Duroc×Landrace)SHP基因外显子1、内含子1和外显子2部分序列,在约1900bp核苷酸序列中共发现了12个单核苷酸多态位点。其中有1个单核苷酸多态位点位于外显子1中,但这个突变是同义突变,没有引起SHP基因所编码的蛋白质中氨基酸的改变,另外的11个单核苷酸多态位点位于内含子1中。Árnyasi等还用PCR-RFLP技术研究了其中4个单核苷酸突变与猪肉质性状的关系,发现这些RFLP在 $P<0.1$ 的水平上与猪背膘厚和肌内脂肪含量有关联。

本研究用PCR-SSCP技术,检测了SHP基因外显子1部分序列在5个品种共139头猪的单核苷酸多态性,共发现了3种基因型,对纯合子测序后发现,在SHP基因第1外显子内存在1个错义突变位点(G→A,序列DQ002896中第374位碱基),这个位点与Árnyasi等发现的多态位点不同,另外本研究没有发现Árnyasi等^[11]在SHP基因外显子1中发现的多态位点有多态性,这可能与所研究的猪群以及研究的数量不同有关。

本研究发现的多态位点不同基因的基因频率在品种间差异显著,这可能是因为各品种在形成之初基因频率本来就不同,品种形成过程中存在奠基者效应。所研究位点在各品种中均处于Hardy-Weinberg平衡状态,这表明在迁移、突变、交配、遗传漂变以及选择等因素的作用下,该位点处于动态平衡中;同时也表明,在大白、长白、皮特兰和金华猪群体中,人工选育对这一位点的选择压力可能不强。

SHP基因外显子1在所检测的几个猪种中均存在较为丰富的单核苷酸多态性,但基因频率的分布与猪种有关。大白、长白和皮特兰等3个外来瘦肉型猪种以AA基因型为主,A等位基因频率较高,脂肪型中国地方猪种金华猪和野猪以GG基因型为主,G等位基因频率较高,这表明G等位基因可能对猪沉积脂肪的能力呈正相关。结合不同基因型对金华×皮特兰F₂代资源家系猪背膘厚和肌内脂肪含量的遗传效应数据(表2),可以初步认为SHP基因多态性与猪沉积脂肪的能力有连锁关系,SHP基因可能是影响猪背膘厚和肌内脂肪含量的重要候选

基因。至于由该单核苷酸突变而引起的氨基酸的改变,是如何影响SHP基因的活性并进而影响脂肪沉积相关性状,还有待从生物化学及分子生物学等方面进行进一步的研究。

参考文献:

- [1] Seol W, Choi H S, Moore D D. An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors[J]. Science, 1996, 272:1 336~1 339.
- [2] Nishizawa H, Yamagata K, Shimomura I, et al. Small heterodimer partner an orphan nuclear receptor, augments proximosome proliferator activated receptor c transactivation[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 1 586~1 592.
- [3] Brendel C, Schoonjans K, Botrugno O A, et al. The small heterodimer partner interacts with the liver X receptor alpha and represses its transcriptional activity[J]. Mol Endocrinol, 2002, 16:2 065~2 076.
- [4] Spiegelman B M, Flier J S. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture[J]. Cell, 1996, 87 (3):377~389.
- [5] Agnes K, Caroline J, Evan R, et al. Inhibition of aromatase transcription via promoter II by short heterodimer partner in human preadipocytes[J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(1):252~259.
- [6] Misso M L, Hewitt K N, Boon W C, et al. Cholesterol feeding prevents adiposity in the obese female aromatase knockout (ArKO) mouse[J]. Hormone and Metabolic Research, 2005, 37 (1): 26~31.
- [7] Grindflek E, Szyda J, Liu Z, et al. Detection of quantitative trait loci for meat quality in a commercial slaughter pig cross[J]. Mamm Genome, 2001, 12: 299~304.
- [8] 刘 炜,俞湘麟,孙东东,等. 傅立叶变换近红外光谱法快速检测鲜猪肉中肌内脂肪、蛋白质和水分含量[J]. 养猪, 2005,3:47~50.
- [9] 许绍斌,陶玉芬,杨昭庆,等. 简单快速的DNA银染和胶保存方法[J]. 遗传, 2002, 24 (3) :335~336.
- [10] 黄 燕,吴 平,汪 安,等. SAS统计分析及应用[M]. 北京:机械工业出版社,2006. 106~185.
- [11] Árnyasi M, Grindflek E, Javor A, et al. Investigation of two candidate genes for meat quality traits in a quantitative trait locus region on SSC6: the porcine short heterodimer partner and heart fatty acid binding protein genes[J]. J Anim Breed Genet, 2006, 123:198~203.