

秦川牛 $LXR\alpha$ 基因第二外显子多态性及其与部分胴体、肉用性状关联性研究

黄磊¹, 咎林森^{1,2*}, 王洪宝^{1,2}, 刘洪瑜¹

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100; 2. 国家肉牛改良中心, 杨凌 712100)

摘要: 旨在分析秦川牛肝 X 受体基因($LXR\alpha$)第二外显子的遗传变异与部分胴体、肉用性能指标的相关性。随机选择相同饲养条件下的 497 头 18~20 月龄秦川牛阉牛, 采用 PCR-SSCP 技术进行了 $LXR\alpha$ 基因部分区段遗传变异检测, 运用 SPSS 程序中的 GLM 模型分析所检测到的遗传变异与秦川牛部分肉用性能指标的关联性。结果, 找到了 $LXR\alpha$ 基因 DNA 序列中的一个突变位点 T1530C(NC_007313)。对该遗传变异结果进行分型并与 114 头秦川牛的肉用性状进行关联分析, 结果表明, 该位点的多态性与胴体长、大理石花纹评分和背膘厚之间存在显著相关($P < 0.05$), BB 和 AB 基因型个体胴体长显著高于 AA 基因型个体($P < 0.05$), BB 基因型个体大理石等级和背膘厚显著高于 AA 基因型个体($P < 0.05$), 与 AB 基因型个体差异不显著($P > 0.05$)。试验结果表明该 SNP 位点的 BB 基因型为优势基因型, 与胴体长、背膘厚、大理石花纹等肉用性状有相关性, 提示 $LXR\alpha$ 基因能够作为分子标记辅助选择的候选基因。

关键词: 秦川牛; 肝 X 受体基因($LXR\alpha$); PCR-SSCP; 肉用性状

中图分类号: S828 8.9; S813.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)05-0531-05

Study on SNP of $LXR\alpha$ Gene Exon2 and Its Association with Some Meat Traits in Qinchuan Cattle

HUANG Lei¹, ZAN Lin-sen^{1,2*}, WANG Hong-bao^{1,2}, LIU Hong-yu¹

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. National Beef Cattle Improvement Centre in China, Yangling 712100, China)

Abstract: The aim of this study was to analyze the association between hereditary variation of bovine $LXR\alpha$ exon2 and some meat traits. Four hundred and ninety-seven of 18-20 months old Qinchuan steers under identical feeding conditions were selected randomly and variation of $LXR\alpha$ gene was analyzed by PCR-SSCP technique. The association between SNP locus and some meat traits was analyzed using the general linear model (GLM) in SPSS program. One polymorphic site T1530C was found (NC_007313). Genotypic variation had a significant effect on backfat thickness, carcass length and marbling score ($P < 0.05$). The carcass length of individuals with BB and AB genotypes was significantly different from that of individuals with AA genotype ($P < 0.05$). The marbling score and backfat thickness of individuals with BB genotype were significantly different from that of individuals with AA genotype ($P < 0.05$). The results indicated that BB genotype was favorable genotype at this SNP locus and was highly associated with seven meat traits, which suggested that $LXR\alpha$ gene could be studied as a candidate gene for molecular marker assisted selection(MAS).

Key words: Qinchuan cattle; liver X receptor A ($LXR\alpha$); PCR-SSCP; meat traits

收稿日期: 2009-10-18

基金项目: 国家 863 计划项目转基因专项(2006AA10Z1A1)

作者简介: 黄磊(1985-), 男, 陕西西安人, 硕士生, 主要从事生物技术与家畜育种研究, Tel: 029-87091248, E-mail: huanglei_0107@126.com.cn

* 通讯作者: 咎林森, E-mail: zanls@yahoo.com.cn

秦川牛是我国著名的优良黄牛品种,肉役性能突出,遗传稳定,适应性强,被誉为“国之瑰宝”。但由于秦川牛是一个肉役兼用型品种,其生长发育较慢,后躯肌肉欠充实等缺陷尚未完全克服,加之肉用性状本身是一个典型的微效多基因控制的数量性状,遗传力较低,利用常规的表型选择,会遇到选择效率低、准确性差、世代间隔长、遗传进展缓慢等问题。因此,育种工作者开始选用标记辅助选择(marker assisted selection, MAS)的方法试图来提高育种效率。肝 X 受体(liver X receptors, LXRs)属核受体超家族配体激活的转录因子,人 LXRs 最早是由 Willy 于 1995 年从肝 cDNA 文库分离得到,因在肝脏表达丰富而命名^[1-4],包括 LXR α (NR1H3)和 LXR β (NR1H2)两种同源亚型,序列分析显示 LXR α 与 LXR β 紧密相关,在 DNA 结合域及配体结合域中 77%的氨基酸序列具有同一性,而且都能够以相似的亲和力与内源性氧化甾醇结合^[5-7]。它们主要分布在不同的组织中, NR1H3 除了在肝脏中表达外,在其他与脂代谢密切相关的组织如脂肪组织、肾脏、小肠、肺、肾上腺和巨噬细胞也有大量表达,但在肝脏中含量最多;而 LXR α 表达广泛,在全身各组织中都能检测到^[8-10]。目前,人的 LXR α 和 LXR β 基因分别定位于 11 和 19 号染色体,猪的分别定位于 2 和 6 号染色体,牛的分别定位于 15 和 18 号染色体。2001 年 Malek 等用巴克夏和大约克猪为资源群体,在 2 号染色体上检测到与眼肌面积、大理石花纹和脂肪总量相关的 QTL,而 LXR α 正好被定位在这一区域里,因此 LXR α 基因被认为是一个很好的候选基因^[11-12]。后来, Bosak 和 Yu 等人都验证了这一结果^[13-15]。随着人们对 LXRs 分子结构和功能的研究进展,对其生物学功能也有了进一步的深入了解。LXRs 作为一种氧化型固醇激活的核受体,参与机体多种生理活动的调节,包括胆固醇代谢、脂肪代谢、糖代谢和炎症等过程^[16]。

本试验采用 PCR-SSCP 技术研究秦川牛 LXR α 基因第 2 外显子的遗传变异情况,分析其基因型效应与肉用性状之间的相关性。探讨是否可以将 LXR α 基因作为牛部分肉用性能的候选基因,为培育秦川肉牛新品系奠定理论基础和提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 秦川牛血样 497 份,采自陕西秦宝牧业有限公司、陕西省秦川牛良种繁育中心,每

头牛采血 10 mL,加 ACD 抗凝剂, -80 °C 保存备用。其中 114 头来自陕西秦宝牧业有限公司的 18 ~ 20 月龄的阉牛屠宰后经 4 °C、24 h 排酸嫩化处理后,对背膘厚、眼肌面积等胴体性状进行测定,在第 12~13 胸椎处采集外脊肉样,测定大理石花纹、嫩度、系水力等肉质性状。

1.1.2 主要试剂 Golden DNA Polymerase 和含染料 Reaction Mix 等分子生物试剂均购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.3 引物 根据 GenBank(NC_007313)公布的牛 LXR α 基因 DNA 全序列,用 Primer 5.0 软件设计 1 对引物,其上下游引物序列分别为: F: 5'-TGGGCGGAGATAGACTTG-3', R: 5'-TGGACT-TAACCTGATCTCAT-3',引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 秦川牛基因组 DNA 的提取

牛血样基因组 DNA 的提取用常规的酚-氯仿抽提法,提取后的 DNA 用 TE 缓冲液溶解后,采用 0.5% 琼脂糖凝胶电泳检测和紫外分光光度计测定浓度后, -4 °C 保存^[17]。

1.3 秦川牛 LXR α 基因第二外显子 PCR 扩增

PCR 扩增体系为 12.5 μ L,包括 DNA 0.5 μ L (μ mol \cdot L⁻¹)模板、上下游引物各 0.5 μ L (μ mol \cdot L⁻¹)、2 \times Taq PCR Mix(产品组成:0.1 U Taq Polymerase \cdot μ L⁻¹ 500 μ mol \cdot L⁻¹ dNTP each、20 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl (pH8.3)、100 mmol \cdot L⁻¹ KCl、3 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂)6.25 μ L 和 ddH₂O 4.25 μ L。PCR 扩增条件:95 °C 预变性 7 min;94 °C 变性 30 s,59.7 °C 退火 35 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min 结束, -20 °C 保存。

1.4 秦川牛 LXR α 基因第二外显子 SSCP 分析

取干净的变性板加入 8 μ L 变性上样缓冲液,然后加入 4 μ L PCR 扩增产物,98 °C 变性 10 min,立即冰浴 15 min,于 10% 聚丙烯酰胺凝胶上样,200 V 预电泳 20 min,120 V 过夜(恒温 4 °C),1 g \cdot L⁻¹ 硝酸银染色,显色剂(500 mL ddH₂O,10 g NaOH,1 mL 甲醛)显色,照相,判型后保存。

1.5 秦川牛 LXR α 基因第二外显子 PCR 产物的回收与测序

经 SSCP 后,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收的不同基因型个体 PCR 产物,交由上海生物工程技术有限公司进行测序。

1.6 数据统计分析

采用遗传多样性分析软件(PopGen32)和多态信息含量计算软件(PIC-Calc 0.6)计算群体的遗传多样性指标。采用 SPSS(17.0)软件,根据一般线性模型(GLM)分析 *LXRα* 基因不同基因型个体和肉用性状间的相关性,以 $P < 0.05$ 为差异显著水平。采用如下模型:

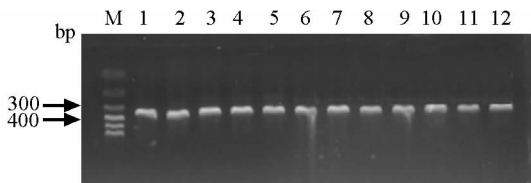
$$Y_{ijk} = \mu + \text{Age}_j + \text{Marker}_k + e_{ijk}$$

其中: Y_{ijk} :个体表型记录, μ :总体均数, Age_j :年龄效应, Marker_k :标记基因型效应, e_{ijk} :随机误差。

2 结果

2.1 秦川牛 *LXRα* 基因第二外显子 PCR 扩增及 SSCP 分析

用所合成的引物扩增基因组,产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,所获得目的片段与预期片段一致,为 363 bp。扩增产物条带明晰,特异性好,如图 1 所示,可用于 SSCP 检测,结果发现 AA、BB 和 AB 3 种基因型,见图 1、图 2。



1~12. PCR 扩增产物;M. DNA 相对分子质量标准
1-12. The PCR products; M. DNA marker

图 1 *LXRα* 基因第二外显子 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplified products of *LXRα* gene exon2 in Qinchuan cattle

2.2 秦川牛 *LXRα* 基因第二外显子序列分析结果

根据 PCR-SSCP 结果,选择扩增效果好的 AA、BB 和 AB(各 2 个)基因型个体的 PCR 产物纯化回收测序(双向),用 DNASTar 软件将测序结果与 EMBL 上相应的 *LXRα* 基因序列进行比较。结果发现,在秦川牛 *LXRα* 基因第二外显子 1 530 bp (NC_007313)处发生了 T→C 的突变,见图 3。

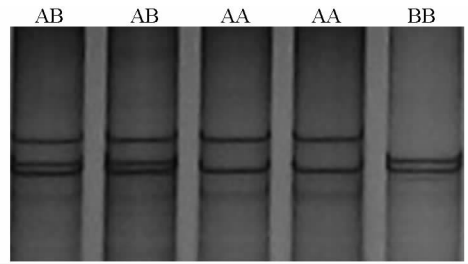


图 2 *LXRα* 基因第二外显子 SSCP 结果

Fig. 2 SSCP detection genotypes of product of *LXRα* gene exon2 in Qinchuan cattle

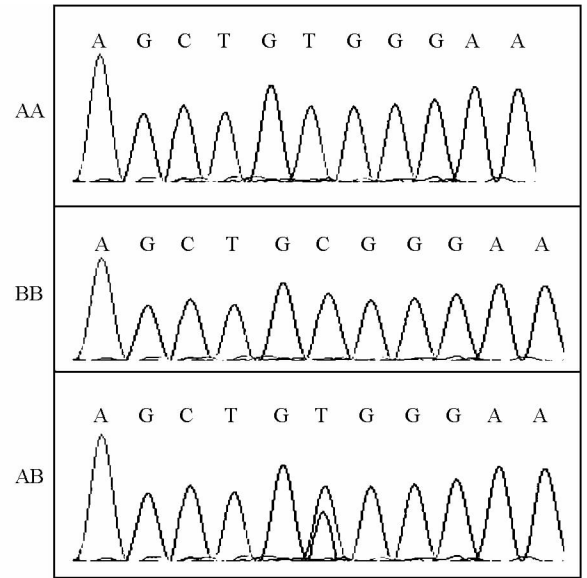


图 3 秦川牛 *LXRα* 基因第二外显子突变位点

Fig. 3 Mutational site on the exon2 of *LXRα* gene in Qinchuan cattle

2.3 秦川牛 *LXRα* 基因第二外显子多态位点的遗传分析结果

秦川牛 *LXRα* 基因第二外显子 3 种基因型 AA、AB 和 BB 频率分别为 0.609 7、0.352 1 和 0.038 2,等位基因 A 和 B 的频率分别为 0.785 7 和 0.214 3(表 1)。同时计算了该位点的多态信息含量(Polymorphism information content, PIC)、杂合度(Heterozygosity, H_e)、纯合度(Homozygosity, H_o)和有效等位基因数(Effective number of alleles, EN_A)等遗传多样性指标(表 2)。

表 1 秦川牛 *LXRα* 基因第二外显子 SSCP 的基因型和等位基因频率

Table 1 Allele and genotype frequencies of the SSCP at *LXRα* gene exon2 locus in Qinchuan cattle

品种 Breed	数量/头 Quantity	基因型频率 Genotypic frequency			等位基因频率 Allele frequency	
		AA	AB	BB	A	B
秦川牛 Qinchuan cattle	497	0.609 7(303)	0.352 1(175)	0.038 2(19)	0.785 7	0.214 3

表 2 秦川牛 *LXRα* 基因第二外显子的多态性分析Table 2 Genetic diversity in *LXRα* gene exon2 locus in Qinchuan cattle

指标 Index	杂合度 <i>He</i>	纯合度 <i>Ho</i>	多态信息含量 <i>PIC</i>	有效等位基因数 <i>ENA</i>
结果 Result	0.3367	0.663 3	0.280 0	1.507 7

2.4 秦川牛 *LXRα* 基因第二外显子多态性与肉用性状的关系

对 102 头屠宰牛的 7 个生产性状(包括宰前活体质量、胴体质量、胴体长、背膘厚、眼肌面积、大理石花纹、嫩度和系水力)与 *LXRα* 基因第二外显子的基因型分型后进行关联分析。结果表明,该位点

的多态性与胴体长、大理石花纹评分和背膘厚之间存在显著相关($P < 0.05$);BB 和 AB 基因型个体胴体长显著高于 AA 基因型个体($P < 0.05$),BB 基因型个体大理石等级和背膘厚显著高于 AA 基因型个体($P < 0.05$),与 AB 基因型个体间差异不显著($P > 0.05$);其余指标间无显著差异(表 3)。

表 3 秦川牛 *LXRα* 基因第二外显子 SSCP 多态性与肉用性状的关系Table 3 The association between variance analysis of SSCP in *LXRα* gene exon2 and meat traits

性状 Trait	基因型 Genotype (Mean±SE)		
	AA(303)	AB(175)	BB(19)
宰前活体质量/kg Live weight (LW)	358.50±54.76	411.65±18.78	457.20±17.32
胴体质量/kg Carcass weight (CW)	174.50±30.49	215.00±10.46	236.15±9.64
胴体长/cm Carcass length (CL)	132.00±4.99 ^a	139.77±1.71 ^b	145.00±1.58 ^b
大理石花纹评分 Marbling score (MS)/1-5	1.24±0.15 ^a	1.500±0.45 ^{ab}	2.400±0.14 ^b
眼肌面积/cm ² Loin muscle area (LMA)	72.34±13.18	87.52±4.52	83.07±4.17
背膘厚/cm Backfat thickness (BF)	0.76±0.07 ^a	0.92±0.19 ^{ab}	1.12±0.06 ^b
嫩度/kg Meat tenderness(MT)	2.17±0.14	2.29±0.45	1.99±0.15
系水力/% Water holding capability (WHC)	0.23±0.09	0.23±0.08	0.26±0.02

同行数据后所标字母相异表示差异显著($P < 0.05$),所标字母相同表示差异不显著($P > 0.05$)

Different letters in the same row mean significant difference between the treatments($P < 0.05$), the same letter in the same row means not significant difference between treatments($P > 0.05$)

3 讨论

当前,国内外对 *LXR*s 基因的研究主要集中在它的功能上。*LXR*s 在脂肪代谢中发挥重要作用,*LXR*s 可上调甾醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element-binding protein-1c,SREBP1c)的表达。SREBP1c 是参与脂肪合成基因的主要转录因子,可激活多种参与脂肪酸和甘油三酯合成的酶的转录,包括乙酰 CoA 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase,ACC)、脂肪酸合酶(fatty acid synthase,FAS)和硬脂酰 CoA 去饱和酶(steroyl-CoA desaturase,SCD-1)等^[18]。*LXR*s 也可直接活化 FAS 的转录,因为 FAS 启动子同时含有 *LXR*s 和 SREBP1c 的结合位点。Cha 等发现,糖类应答元件结合蛋白(carbohydrate response element-binding protein,ChREBP)是 *LXR*s 的靶基因,ChREBP 可上调肝型丙酮酸激酶(liver-type pyruvate kinase)的表达,ChREBP 和肝型丙酮酸激酶在糖类向脂类转化过程中发挥着重要的作用^[19]。

Harhay 和 Sonstegard 等人研究显示,*LXRα* 基因定位在牛的 15 号染色体上,并且在影响屠宰性状和产量的 QTL 区域内^[20-21]。根据对人和鼠的大量研究结果,表明 *LXR*s 对体内脂质代谢调节平衡有重要作用。Bosak 和 Yu^[13-15] 等人利用 PCR-RLFP 技术发现猪 *LXRα* 的 *Bsl* I 多态性与瘦肉率呈显著相关;同时与大理石纹呈显著相关;猪 *LXRβ* 的 *Aci* I 酶切位点对其瘦肉率及脂肪率有显著影响。初步表明 *LXR*s 对猪瘦肉率、体内脂肪含量、肌内脂肪含量等均有影响,*LXR*s 基因可能是影响瘦肉生长和脂肪含量的潜在基因。本试验结果显示 *LXRα* 基因第二外显子 T→C 的突变与秦川牛的胴体长、大理石花纹评分和背膘厚等肉质性状相关,这与 Bosak 和 Yu^[13-15] 等人在猪上的研究报道一致,进一步证明了该基因在肉质方面极有可能存在重要作用。

4 结论

本试验结果表明 *LXRα* 基因第二外显子多态

性与秦川牛大理石花纹评分和背膘厚之间存在显著相关, BB 基因型个体的大理石花纹评分和背膘厚显著高于 AA 基因型个体 ($P < 0.05$)。认为 *LXR α* 基因第二外显子 T \rightarrow C 的突变有可能影响了秦川牛的大理石花纹评分和背膘厚等肉质性状。不过本试验测得的 BB 基因型个体数量较少, 该结果还有待于在更多的群体中进一步验证, 以明确是否可以用该多态位点对秦川牛的胴体性状和肉质性状进行标记辅助选择。

参考文献:

- [1] 王 卓, 咎林森. 秦川牛 H-FABP 基因第一外显子 SNPs 及其与部分肉用性状相关性的研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2008, (11): 11-15.
- [2] 杨大鹏, 咎林森. 秦川牛 CS-1 基因单核苷酸多态性 (SNPs) 检测及其与胴体、肉质性状相关性研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(13): 1-4.
- [3] LEHMANN J M, KLIEWER S A, MOORE L B, et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(6): 3137-3140.
- [4] 刘伟志, 叶 飞. 核受体 LXR α 靶基因研究进展[J]. 世界科学技术与发展, 2003, 25(6): 51-54.
- [5] JOSEPH S B, TONTONOZ P. LXRs new therapeutic targets in atherosclerosis[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2003, 3(2): 192-197.
- [6] REPA J J, MANGELSDORF D J. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16: 459-481.
- [7] MANGELSDORF D J, THUMMEL C, BEATO M, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade[J]. *Cell*, 1995, 83(6): 835-839.
- [8] KOHRO T, NAKAJIMA T, WADA Y, et al. Genomic structure and mapping of human orphan receptor LXR alpha; upregulation of NR1H3 mRNA during monocyte to macrophage differentiation[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2000, 7(3): 145-151.
- [9] PEET D J, JANOWSKI B A, MANGELSDORF D J. The LXRs: a new class of oxysterol receptors[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8(5): 571-575.
- [10] WHITNEY K D, WATSON M A, GOODWIN B, et al. Liver X receptor (LXR) regulation of the LXR Alpha gene in human macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(47): 43509-43515.
- [11] MALEK M, DEKKERS J C, LEE H K, et al. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition[J]. *Mamm Genome*, 2001, 12(8): 637-645.
- [12] MALEK M, DEKKERS J C, LEE H K, et al. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. I. Growth and body composition[J]. *Mamm Genome*, 2001, 12(8): 630-636.
- [13] BOSAK N, FARAUT T, MIKAWA S, et al. Construction of a high-resolution comparative gene map between swine chromosome region 6q11->q21 and human chromosome 19 q-arm by RH mapping of 51 genes[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 102(1-4): 109-115.
- [14] HUFF-LONERGAN E, BAAS T J, MALEK M, et al. Correlations among selected pork quality traits [J]. *J Anim Sci*, 2002, 80(3): 617-627.
- [15] YU M, GEIGER B, DEEB N, et al. Liver X receptor alpha and beta genes have the potential role on loin lean and fat content in pigs[J]. *J Anim Breed Genet*, 2006, 123(2): 81-88.
- [16] GEYEREGGER R, ZEYDA M, STULNING T M, et al. Liver X receptors in cardiovascular and metabolic disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63: 524-539.
- [17] 李秋玲. 牛 UCP3 基因多态性与血清生化指标的关联性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- [18] REPA J J, LIANG G, OU J, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta[J]. *Genes Dev*, 2000, 14: 2819-2830.
- [19] CHA J Y, REPA J J. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 743-751.
- [20] SONSTEGARD T S, CAPUCO A V, WHITE J, et al. Analysis of bovine mammary gland EST and functional annotation of the *Bos taurus* gene index[J]. *Mamm Genome*, 2002, 13(7): 373-379.
- [21] HARHAY G P, SONSTEGARD T S, KEELE J W, et al. Characterization of 954 bovine full-CDS cDNA sequences[J]. *BMC Genomics*, 2005, 6: 166.