

中国荷斯坦牛 *AGPAT6* 基因第 2 内含子 PCR-SSCP 分析张佳兰¹, 咎林森² (1. 长江大学动物科学学院, 湖北荆州 434025; 2. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100)

摘要 [目的] 寻找影响奶牛产奶性能的候选基因。[方法] 以中国荷斯坦牛为研究对象, 采用 PCR-SSCP 方法对 *AGPAT6* 基因第 2 内含子进行单核苷酸多态性检测并分析多态位点对奶牛产奶量、乳脂率、乳蛋白率和乳中体细胞评分的影响。[结果] 扩增出 462 bp 的中国荷斯坦牛 *AGPAT6* 基因第 2 内含子; PCR-SSCP 分析该基因第 2 内含子有 AA、AB 和 BB 3 种基因型, 其频率分别为 0.151 1、0.657 8 和 0.191 1; 不同基因型与中国荷斯坦牛产奶量、乳脂率和乳蛋白率之间显著相关 ($P < 0.05$), 与体细胞评分相关不显著 ($P > 0.05$)。[结论] 初步认为 *AGPAT6* 是影响奶牛产奶性能的一个候选基因或分子标记, 该研究为奶牛选育提供了理论依据。

关键词 *AGPAT6* 基因; 中国荷斯坦牛; PCR-SSCP 分析

中图分类号 S823 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)27-12970-02

PCR-SSCP Analysis on Intron 2 of *AGPAT6* Gene in Chinese Holstein

ZHANG Jia-lan et al (College of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025)

Abstract [Objective] The aim was to search for the candidate gene for influencing milk performance of dairy cow. [Method] With Chinese Holstein as research object, the single nucleotide polymorphism of intron 2 of *AGPAT6* gene was detected by PCR-SSCP and the effect of polymorphic loci on milk yield, milk fat percentage, milk protein percent and somatic cell score of dairy cow were analyzed. [Result] The 462 bp intron 2 of *AGPAT6* gene of Chinese Holstein was amplified, which could be used for PCR-SSCP analysis. There were 3 genotypes AA, AB and BB in intron 2 of *AGPAT6* gene and their genotype frequency were 0.151 1, 0.657 8 and 0.191 1, resp. There was significant relation between different genotypes in milk yield, milk fat percentage, milk protein percentage ($P < 0.05$) and no significant relation in somatic cell score ($P < 0.05$). [Conclusion] The results preliminary showed that *AGPAT6* gene was either a candidate gene influencing milk performance of dairy cow or a molecular marker. The research provided the theoretical basis for dairy cow breeding.

Key words *AGPAT6* gene; Chinese Holstein; PCR-SSCP analysis

产奶量和乳品质是奶牛重要的经济性性状, 选育高产奶量和优良乳品质的奶牛是育种、饲养和消费者三方共同的愿望。奶牛的产奶性能为数量性状 (complex trait), 遗传受多基因控制并且受很多因素的影响。因此, 寻找影响奶牛产奶性能的主效基因, 探测其 QTL 的遗传效应, 将常规育种方法与分子标记辅助选择相结合对提高奶牛产奶性能有重要意义。甘油三酯是乳脂和体脂的主要成分, 磷酸甘油酰基转移酶 (1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, AGPAT) 是甘油三酯合成的关键酶^[1]。AGPAT 可能有 8 种异构体, 对小鼠研究表明, 鼠的 AGPAT1 和 AGPAT3 在多种组织中表达, 而 AGPAT2、AGPAT4 和 AGPAT5 的表达具有组织特异性^[2], AGPAT6 在乳腺组织的乳腺上皮细胞中高水平表达, 而在周围的脂肪组织中不表达^[3]。AGPAT6 基因敲除鼠泌乳期乳腺导管和小泡不发达, 并且乳腺上皮细胞和乳腺导管中乳脂肪滴的数量和大小显著下降, 乳中甘油二酯和甘油三酯含量也显著下降。因此, 认为 AGPAT6 酶对乳脂肪的产生至关重要^[4], 可作为影响奶牛泌乳性能的候选基因。该研究以中国荷斯坦牛为研究对象, 采用 PCR-SSCP 方法对 *AGPAT6* 基因第 2 内含子进行单核苷酸多态性检测并分析多态位点对奶牛产奶量、乳脂率、乳蛋白率和乳中体细胞评分的影响, 旨在为奶牛选育提供理论依据。

1 材料与方

1.1 材料 225 头中国荷斯坦奶牛血样采自西安现代农业综合开发总公司奶牛一场、五场和宝鸡得力康公司, 有完整的生产记录, 颈静脉采血 10 ml, ACD (柠檬酸 4.8 g, 柠檬酸钠 13.2 g, 葡萄糖 14.7 g, 溶于 1 000 ml 纯水) 抗凝, -20 ℃

保存。

主要试剂: pGEM-T 载体、*Taq* DNA 聚合酶购自美国 Promega 公司; dNTPs 购自广州东胜生物科技有限公司; 全血基因组提取试剂盒购自北京鼎国生物技术有限公司; DNA 纯化回收试剂盒购自安徽优品生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物。 根据人、鼠 *AGPAT6* 的 mRNA, 通过 Blast 找到与牛对应的 mRNA, 登陆号为 GI:76655933。通过 Blast 寻找 Exon 的结合点, 然后分别在 exon 2 的下游和 exon 3 的上游利用 Primer 5.0 设计上下游引物, 扩增 *AGPAT6* 基因第 2 内含子。引物序列为, Forward primer: 5'-GCCAAGGAGAAGAACCACCA-3', Reverse primer: 5'-GGAGGCAGTAGCGGATGAGTA-3', 由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 PCR-SSCP 分析。 采用试剂盒法提取全血基因组 DNA。PCR 反应总体积为 15 μ l, 反应程序同文献[5], 退火温度为 66 ℃。PCR 反应完成后, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, EB 染色, UVP 凝胶成像系统进行凝胶成像。用去离子甲酰胺作变性剂, 98 ℃ 变性 10 min, 冰浴 5 min, 用 12% 的丙烯酰胺和 N,N-甲叉双丙烯酰胺 (39:1, V/V) 进行凝胶电泳 22 h 后, 硝酸银染色至出现清晰条带。对每种纯合基因型的 PCR 产物进行纯化回收, 并利用 T_4 DNA ligase (Promega, America) 连接到 pGEM-T (Promega, America), 转化大肠杆菌 DH5 α 后将阳性重组子送上海基康生物技术有限公司测序。

1.3 数据统计处理

1.3.1 等位基因频率和基因型频率。 基因频率根据公式 $P_i = [2(\ddot{i}) + (\dot{j}_1) + (\dot{j}_2) + \dots + (\dot{j}_n)] / 2N$ 进行计算。其中, P_i 为第 i 个等位基因的频率; i 为纯合复等位基因; j_1, j_2, \dots, j_n 为与 i 共显的第 1 ~ n 个等位基因; N 为测定群体的个体总数。基因型频率 = 每种基因型的个体数 / 测定群体的个体总

基金项目 长江大学博士启动基金项目。

作者简介 张佳兰 (1971 -), 女, 陕西武功人, 博士, 副教授, 从事分子营养与饲料添加剂的研究。

收稿日期 2009-05-12

数。基因频率和基因型频率采用 χ^2 独立性检验其差异显著性。

1.3.2 统计分析。 奶牛 305 d 产奶成年当量是根据中国奶牛协会规定的统一校正方法得到。平均乳脂率、体细胞计数和平均蛋白率是根据全泌乳期的每个月测 1 次后的平均值计算。

根据影响乳脂率、蛋白率和体细胞记数等性状的因素,采用固定模型 $Y_{ij} = \mu + T_i + M_j + e_{ij}$, 其中, Y_{ij} 为个体表型记录, μ 为总体均数, T_i 为胎次效应, M_j 为基因型效应, e_{ij} 为随机残差。305 d 产奶成年当量,采用固定模型 $Y_i = \mu + M_i + e_i$, 其中, Y_i 为个体表型记录, μ 为总体均数, M_i 为基因型效应, e_i 为随机残差。

根据公式 $SCS = \log_2(SCC/100\ 000) + 3$ 进行体细胞计数与体细胞评分之间的换算,式中 SCC (somatic cell count) 为体细胞计数,单位为 1 000 个/ml, SCS (somatic cell score) 为体细胞评分。

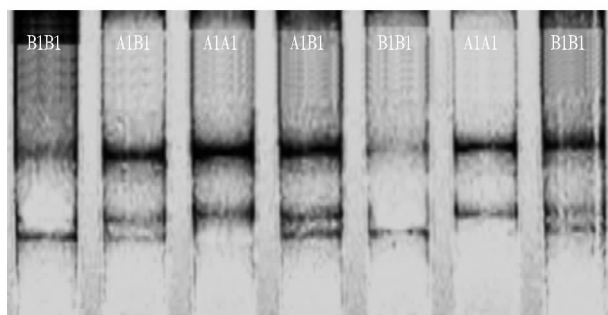
运用 SPSS 软件对数据进行分析,并用最小二乘法拟合线性模型(GLM),对各标记基因型与产奶性能的关系进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 *AGPAT6* 基因第 2 内含子 PCR-SSCP 多态性检测结果 筛选 66.0 °C 为最佳退火温度,在此温度扩增出 *AGPAT6* 基因的第 2 内含子,片段大小为 462 bp,扩增片段明亮,特异性好,可用于 PCR-SSCP 分析。

对扩增产物变性并用 12% 丙烯酰胺凝胶 160 V 电压电泳过夜,电泳结束后进行银染,结果见图 1。由图 1 可看出,该片段存在多态信息,表明该片段内可能含有碱基突变。根

据条带不同将其分为 AA、AB、BB 3 种基因型。从中挑选分型不同的个体进行扩增,回收测序,并用 DNASTAR 进行比对,结果发现该片段在 281 bp 处有 T-C 的突变。



注:3、6 泳道为 AA 型;2、4、7 泳道为 AB 型;其余泳道为 BB 型。

Note: Lane 3 and 6, Genotype AA; Lane 2, 4 and 7, Genotypes AB; The others are genotypes BB.

图 1 *AGPAT6* 基因第 2 内含子 PCR-SSCP 凝胶电泳图

Fig.1 PCR-SSCP gel electrophoresis of *AGPAT6* gene intron 2

2.2 *AGPAT6* 基因第 2 内含子多态性等位基因分布 在检测的 225 头中国荷斯坦牛个体中,共存在 3 种基因型,AA 型的频率为 0.151 1, AB 型的频率为 0.657 8, BB 型的频率为 0.191 1; A 等位基因频率为 0.480 0, B 等位基因频率为 0.520 0。 χ^2 适合性检验表明,该多态位点处于 Hardy-Weinberg 非平衡状态($P < 0.01$)。

2.3 牛 *AGPAT6* 基因第 2 内含子多态性与奶牛产奶性能相关分析 由表 1 可知, *AGPAT6* 基因第 2 内含子基因型与中国荷斯坦牛产奶量、乳脂率和乳蛋白率显著相关($P < 0.05$); 与体细胞评分的相关不显著($P > 0.05$)。

表 1 牛 *AGPAT6* 基因第 2 内含子多态性与中国荷斯坦牛产奶性状相关

Table 1 The correlation between the polymorphism of intron 2 of *AGPAT6* gene and the milk performance traits in Chinese Holstein

基因型	305 d 产奶量//kg	乳脂率//%	乳蛋白率//%	体细胞评分
Genotype	305-d milk yield	Milk fat percentage	Milk protein rate	Somatic cell score
AA	6 805.55 ± 265.37 b	3.95 ± 0.06 b	3.29 ± 0.05 ab	3.81 ± 0.12
AB	7 457.62 ± 185.25 a	4.01 ± 0.05 b	3.28 ± 0.04 b	3.93 ± 0.12
BB	6 387.98 ± 329.23 b	4.22 ± 0.08 a	3.47 ± 0.12 a	4.06 ± 0.20

注:同列不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Data with different letters in the same column show significant difference ($P < 0.05$).

3 讨论

研究表明,与脂肪吸收、合成和沉积相关酶基因的多态性可能和奶牛乳脂率以及产奶量等性状相关^[6]。对小鼠的研究表明, *AGPAT6* 在脂肪组织和乳腺上皮细胞中高水平表达,且是乳脂合成的必需酶^[7]。人、大鼠、小鼠 *AGPAT6* 基因已克隆均含有 12 个外显子,人 mRNA 长 2 423 bp。该研究中检测到 *AGPAT6* 基因第 2 内含子 SSCP 多态性与中国荷斯坦牛产奶量、乳脂率和乳蛋白率显著相关, AB 型个体的产奶量最高,而 BB 型个体的乳脂率和乳蛋白率均较高。尽管这个多态性位于内含子序列,但内含子序列可能在基因的转录及 mRNA 剪接中起着重要作用。徐秀荣等报道, *DGAT2* 基因第 6 内含子多态性与三河牛平均乳脂率和平均干物质率相关^[8]。笔者研究认为,内含子虽然不编码蛋白,但该位点的多态性对中国荷斯坦牛产奶性能有显著影响,这个多态可能

与 *AGPAT6* 基因 mRNA 转录有关或者可能与控制产奶性状的 QTL 有关。关于 *AGPAT6* 能否作为影响奶牛产奶性能的候选基因及其对奶牛产奶性能的影响程度还需进一步研究。

参考文献

- [1] YE G M, SONG C, HUANG S, et al. Cloning and characterization a novel human 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase gene *AGPAT7* [J]. DNA Sequence-The Journal of Sequencing and Mapping, 2005, 16: 386 - 390.
- [2] LU B, JIANG J Y, ZHOU Y L, et al. Cloning and characterization of murine 1-acyl-sn-glycerol 3-phosphate acyltransferases and their regulation by PPAR α in murine heart [J]. Biochem J, 2005, 385: 469 - 477.
- [3] ANNE P B, LAURENT V, XIN Q, et al. Agpat6-a novel lipid biosynthetic gene required for triacylglycerol production in mammary epithelium [J]. J Lipid Res, 2006, 47: 734 - 744.
- [4] LAURENT V, ANNE P B, RYAN D, et al. *Agpat6* deficiency causes subdermal lipodystrophy and resistance to obesity [J]. Journal of Lipid Research, 2006, 47: 745 - 754.

(下转第 13075 页)

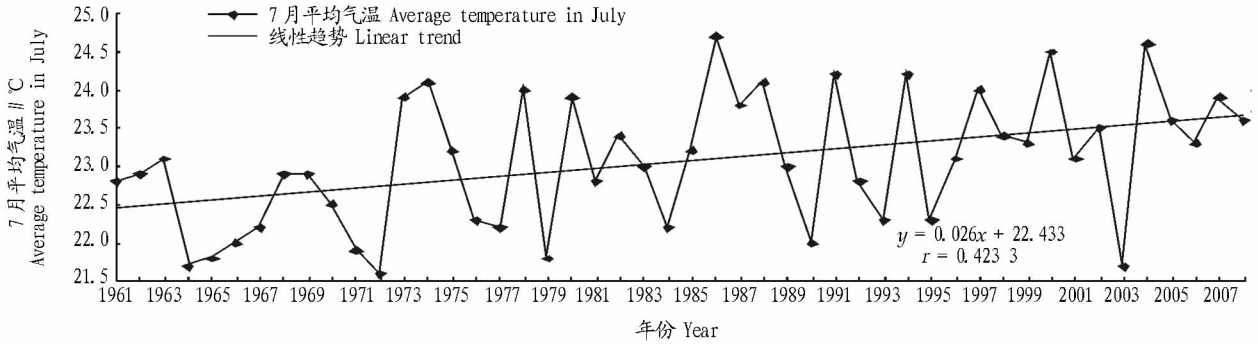


图2 1961~2007年7月焉耆平均气温年际变化情况

Fig. 2 Annual variation of average temperature in Yanqi in July from 1961 to 2007

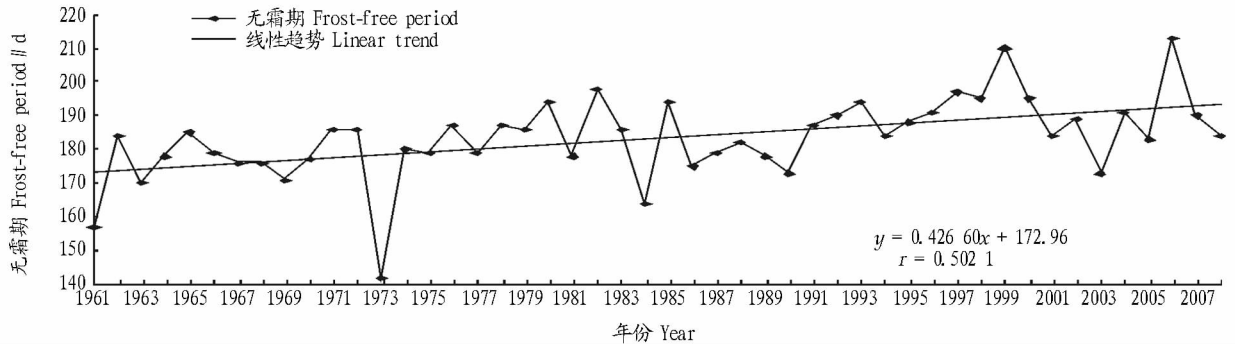


图3 1961~2007年焉耆无霜期年际变化情况

Fig. 3 Annual variation of frost-free period in Yanqi from 1961 to 2007

段,适宜温度范围是25~30℃,而焉耆盆地 $\geq 20^\circ\text{C}$ 积温只有1325℃,年平均日最高气温 $\geq 35^\circ\text{C}$ 只有3d,82%的年份7月平均气温 $< 24^\circ\text{C}$,棉花热量“饥饿”,且强度不足,造成发育期推迟,影响产量和品质。

5.3 吐絮期气温下降过快,成熟期热量不足 焉耆盆地棉区秋季温度下降快,9月份平均气温 17°C ,10月上旬平均气温降至 12°C ,后期的热量不足,成为棉花高产优质的重要限制因素。

6 小结

焉耆盆地植棉一般年份均能正常生长成熟,主要问题是热量强度不足,特别是7月平均气温偏低是焉耆盆地被划分为风险棉区的主要原因。从气候变化趋势看,焉耆盆地气候条件向有利于植棉演变,综合水、土资源等条件,结合作物换茬及调配用水等方面因素,在一些沙性土壤、小气候条件相对较好的地块种植早熟棉可以获得成功。棉花在幼苗生长

期间,必须密切注意大风、降雨、低温、霜冻的危害。焉耆盆地植棉热量条件虽有好转,但总体较差,且年际间变化较大,植棉风险高。因此,种植结构调整应坚持“减少棉花面积,扩大辣椒、工业西红柿等经济作物种植面积”的指导方针。

参考文献

- [1] 张家宝,张学文. 新疆气象手册[M]. 北京:气象出版社,2006:242-245
- [2] 杨青. 近十年新疆气候变化特征[J]. 新疆气象,1998,21(2):9-23
- [3] 郑维,林修碧. 新疆棉花生产与气象[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1992.
- [4] 蒋桂英,白丽,赖先齐等. 绿洲农区棉花生产的生态适应性分析[J]. 干旱地区农业研究,2006(5):157-160,192.
- [5] 徐德源. 新疆农业气候资源区划[M]. 北京:气象出版社,1989.
- [6] 姜逢清,杨德刚. 新疆棉花产量构成要素分析[J]. 干旱区研究,2003,20(2):104-109.
- [7] 李新建,何清,袁玉江. 新疆棉花严重气候减产的热量特征分析[J]. 新疆农业大学学报,2000,23(4):27-36.
- [8] 袁玉江,李新建,何清. 影响阿克苏棉区棉花气象产量的温度因子研究[J]. 棉花学报,2001,13(4):220-224.
- [9] 徐秀容,高雪,许尚忠,等. 牛DGAT1基因K232A取代对3个品种奶牛群体部分经济性状的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(9):6-10.
- [10] MENG X W, ERDENGQIMUGE, HONG H, et al. Polymorphism analysis of the 3' flank region of equine IGF-I gene by PCR-SSCP[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(6):39-42.
- [11] 刘新武,谷林森,张佳兰. 中国荷斯坦奶牛Leptin基因第2外显子多态性及其与产奶性状的相关性[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2008,36(11):6-10.

(上接第12971页)

- [5] 张佳兰,谷林森,申光磊. 牛催乳素受体(PRLR)基因HinfI多态性与奶牛生产性能相关性研究[J]. 畜牧兽医学报,2007,38(9):888-892.
- [6] BENNEWITZ J, REINSCH N, PAUL S, et al. The DGAT1 K232A mutation is not solely responsible for the milk production quantitative trait locus on the bovine chromosome 14[J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87(2):431-442.
- [7] LU B, JIANG Y J, MAN M Q, et al. Expression and regulation of 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferases in the epidermis[J]. Journal of Lipid Research, 2005, 46(11):2448-2457