

五种牛 *THRSP* 基因部分第一外显子序列 PCR-SSCP 多态性研究

张小白¹, 咎林森^{1,2}, 王洪宝^{1,2}, 桂林生¹

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

摘要: *THRSP* 基因是调节动物脂肪生成的重要基因。试验利用 PCR-SSCP 和 DNA 测序方法对秦川牛(QC)、夏南牛(XC)、南阳牛(NC)、郟县红牛(JRC)、鲁西牛(LC)共 644 头牛的 *THRSP* 基因部分第一外显子序列进行遗传多样性分析。结果发现存在两个突变位点: 40bpC/T 和 78bpA/G; 四种基因型: AA, AB, BB, AC; 五种牛 A, B, C 基因的频率分布一致。从位点间杂合度来看: QC>XC>LC>NC>JRC; 从位点间多态信息含量看: QC 属于高度多态 (PIC>0.5), XC, LC, NC, JRC 属于中度多态 (0.25<PIC<0.5)。40bpC/T 突变导致 *THRSP* 基因第 3 个氨基酸发生错义突变, 由缬氨酸(GTG)→丙氨酸(GCG); 78bp 处的 A/G 突变引起 *THRSP* 基因第 16 个氨基酸发生错义突变, 由缬氨酸(GTC)→异亮氨酸(ATC)。

关键词: *THRSP* 基因; PCR-SSCP; 黄牛; 分子标记

中图分类号: S813.3

文献标识码: A

论文编号: 2009-1038

Study on PCR-SSCP Polymorphisms of *THRSP* Gene Exon1 in 5 Cattle

Zhang Xiaobai¹, Zan Linsen^{1,2}, Wang Hongbao^{1,2}, Gui Linsheng¹

(¹College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100

²National Beef Cattle Improvement Center, Yangling Shaanxi 712100)

Abstract: *THRSP* gene is a important gene which involved in the regulation of animal lipogenesis. In this research, PCR-SSCP and DNA sequencing were used to analysis the Polymorphisms of *THRSP* gene part exon1 in 644 cattle which comes from Qinchuan cattle (QC), Xianan cattle (XC), Nanyang cattle (NC), Jiexian Red cattle (JRC), Luxi cattle (LC). It was detected two mutations that is 40bpC/T and 78bpA/G and four genotype were found which is AA, AB, BB, AC. The allele frequencies is likely in five cattle breeds. In He, QC>XC>LC>NC>JRC; in PIC, QC belonged to high polymorphisms (PIC>0.5), XC, LC, NC, JRC belonged to moderate polymorphisms (0.25<PIC<0.5). The 40bp C/T mutation leads to a missense mutation from Val(GTG)→Ala(GCG), The 78bp A/G mutation leads to a missense mutation from Val(GTC)→Ile(ATC).

Key words: *THRSP* gene, PCR-SSCP, cattle, molecular marker

0 引言

甲状腺激素应答蛋白 Spot 14 (thyroid hormone responsive Spot 14, *THRSP*) 基因是在研究甲状腺素在脂肪组织中的反应时被发现的^[1-3]。*THRSP* 基因主要在脂肪生成组织如肝脏、腹脂和乳腺内表达。由于

spot14 蛋白对甲状腺素的刺激和高葡萄糖水平产生应答反应, 而且该基因所在的染色体区域与肥胖症有关, 因此普遍认为其对脂肪生成具有重要的作用^[4-5]。

对该基因的研究多集中于小鼠。人类上多是关注该基因与肥胖症和乳房炎的关系的研究^[6]。国内对于

基金项目: 国家“863”高技术研究与发展计划项目“秦川牛肉质性状相关功能基因研究”(2006AA10Z1A1); 西北农林科技大学拔尖人才支持计划资助。

第一作者简介: 张小白, 1982 年出生, 男, 河南通许县人, 在读硕士, 主要从事生物技术与家畜育种研究。通信地址: 邮政编码 具体地址、单位, 能收到信件, 要与通讯作者联系的可略, Tel: 029-87091247, E-mail: zxb2056@126.com。

通讯作者: 咎林森, 男, 1963 年出生, 陕西扶风人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事动物生长发育调控及牛遗传育种与繁殖研究。通信地址: 陕西杨凌西北农林科技大学动物科技学院黄牛研究室, Tel: 029-87091247, E-mail: zanls@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-05-16, 修回日期: 2009-06-04。

THRSP 基因的研究较多的是在家禽上,东北农大的曹志平等^[7]证实 THRSP 基因的多态性与鸡的体重显著相关。詹凯等^[8]在鸭上的研究显示 THRSP 基因与鸭的肝脏率有关,而与其它性状无显著相关。

牛的 THRSP 基因位于第 29 号染色体上,包含两个外显子,一个内含子,且只有第一外显子编码蛋白,第一外显子长度为 490 bp。目前在牛上还没有关于该基因的多态性的报道,研究大多集中在该基因的网络通路及其在脂肪中的表达,目的在于预测牛肌肉内脂肪含量情况,以确定牛只的生产潜力,对生产具有重要的指导意义^[9-10]。

笔者运用 PCR-SSCP 技术对五个品种牛的 THRSP 基因第一外显子的部分序列进行遗传多态性分析,对发现的两个突变位点的基因频率,多态信息含量等指标进行了计算与比较,以期对今后的黄牛育种有所帮助。

1 材料与方 法

1.1 试验动物

秦川牛(QinChuan cattle,QC),血样采自陕西省秦川肉牛良种繁育中心,共 405 头。

夏南牛(XiaNan cattle,XC),血样采自河南省南阳市夏南牛繁育场,共 86 头。

南阳牛(Nanyang cattle,NC),血样采自河南省南阳牛保种场,共 40 头。

郟县红牛(Jiaxian Red cattle,JRC)。血样采自河南省郟县红牛保种场,共 65 头。

鲁西牛(Luxi cattle,LC)。血样采自山东鲁西牛保种场,共 48 头。

对每头牛颈静脉采血 10 ml,ACD 抗凝(ACD:血液=1:6),低温下快速送回实验室于-80℃条件下保存备用。

1.2 基因组 DNA 制备

牛血样基因组 DNA 的提取用常规的酚氯仿抽提法^[11],提取后的 DNA 用 TE 缓冲液溶解后,经 0.5% 琼脂糖凝胶电泳检测和紫外分光光度计测定浓度

后,-20℃保存备用。

1.3 PCR

试验针对 THRSP 基因第一外显子,参照 GeneBank 中提供的牛 THRSP 基因的序列(登录号:No. NC_007330),利用 Primer 5.0 软件设计引物进行 SSCP 分析。引物的合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。

设计的引物预期扩增的目的片段长度为 234 bp,退火温度 64℃。引物序列如下:

上游引物:5'-3': TGTGTTGACCTACTGGCTGG

下游引物:5'-3': GAAGACTGGGGATCATCACC

15 μl PCR 反应体系包含: 10×Buffer(含 15 mmol Mg²⁺) 1.5 μl, 2 mM dNTPs 1.5 μl, 2 U/μl Taq DNA 聚合酶 0.25 μl, 5 μM 混合引物(上游引物和下游引物各为 10 pmol/μl)0.6 μl,模板 DNA (50 ng/μl) 1.0 μl, ddH₂O 10.15 μl。

PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 5 min; 35 个循环(94℃ 35 s, 64.0℃ 35 s, 72℃ 40 s); 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。

1.4 PCR 产物 SSCP 分析

5 μl PCR 产物和 5 μl 的上样缓冲液(98%去离子甲酰胺、0.025%溴酚蓝、0.025%二甲苯菁、10 mmol/L EDTA,调节 pH 8.0)混合,于 PCR 仪中 98℃ 变性 10 min,取出迅速置于事先准备好的冰上,放置 10 min,使之保持单链状态。样品在 12%非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳,电泳缓冲液为 1×TBE,先用 250 V 电压电泳 10 min,然后用 110 V 电压室温电泳 16 h。电泳结束后,进行银染显带并用紫外凝胶成像系统照相分析。

经 PCR-SSCP 分析后,挑选特异性较好的各基因型产物送上海生工生物公司进行纯化后测序。

2 结果与分析

2.1 THRSP 基因 PCR 产物的电泳检测

利用设计好的引物对不同品种牛的基因组 DNA 进行扩增,PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳后用 UVP 凝胶成像系统分析检测扩增结果(图 1),特异性扩增良好,可直接进行 SSCP 分析。

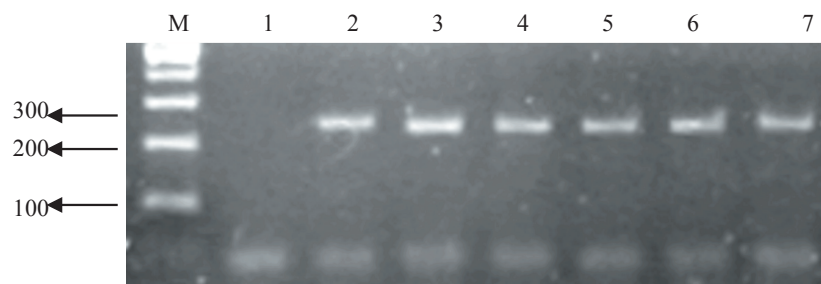


图 1 扩增产物

注: M: Marker; 1:阴性对照 2,3,4,5,6,7:扩增产物

2.2 PCR 产物的 SSCP 分析和序列测定

对五个品种牛的扩增产物用 14% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳检测, 发现 4 种不同基因型, 将其分别命名为 AA、BB、AB、AC (图 2)。各种基因型对应的碱基突变及测序图见表 1 和图 3。对 *THRSP* 基因

40 bp T/C 和 78 bp A/G 突变造成的氨基酸变化进行分析, 发现分别引发了 *THRSP* 基因第一外显子上第 4 个和第 16 个氨基酸发生错义突变, 分别为缬氨酸 (GTG) → 丙氨酸 (GCG), 缬氨酸 (GTC) → 异亮氨酸 (ATC) (图 4)。

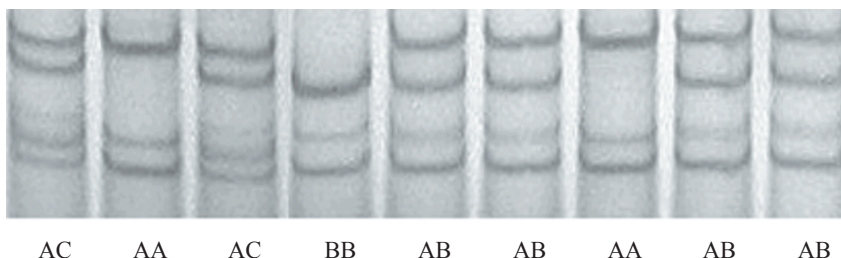


图 2 *THRSP* 基因第一外显子 40、78 bp 位点的 PCR-SSCP 结果

表 1 *THRSP* 基因第一外显子 PCR-SSCP 各种电泳类型对应的碱基

基因型	AA		BB		AB		AC	
对应碱基	40 bp	78 bp	40 bp	78 bp	40 bp	78 bp	40 bp	78 bp
	T	G	T	A	T	A/G	T/C	G

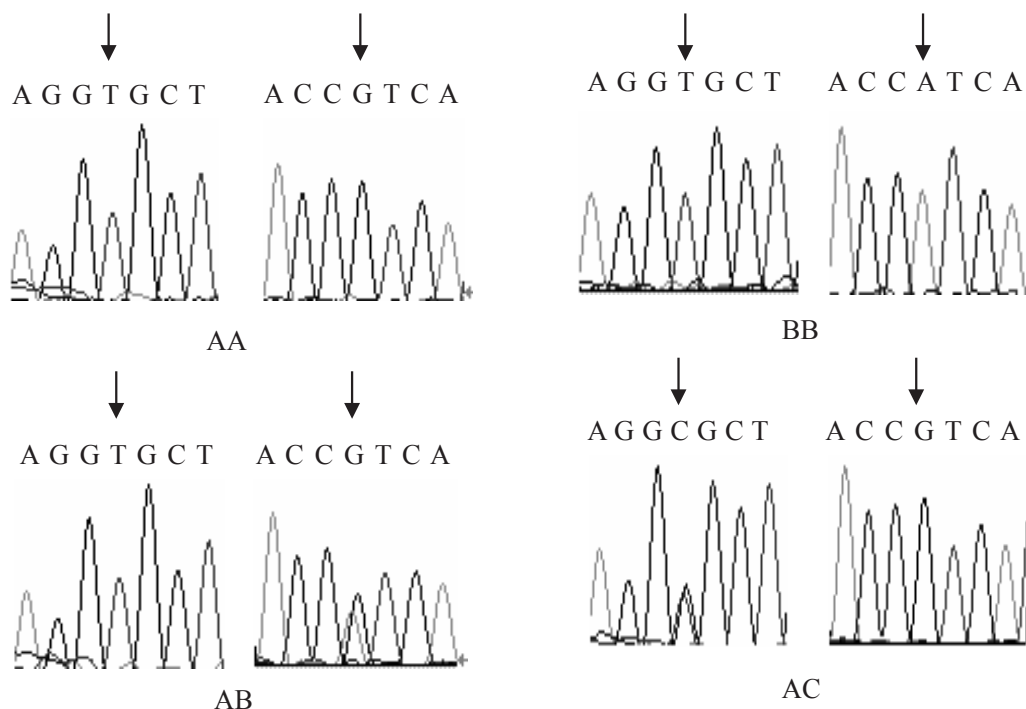


图 3 AA、BB、AB、AC 基因型序列的比较

```

ATGCAGGTGCTGACCAAGCGCTACCCCAAGAACTGCCTGCTGACCGTATGGACCGGTAC
M Q V L T K R Y P K N C L L T V M D R Y
ATGCAGGCGCTGACCAAGCGCTACCCCAAGAACTGCCTGCTGACCATCATGGACCGGT
M Q A L T K R Y P K N C L L T I M D R
    
```

图 4 利用 DNAMAN 软件进行氨基酸比对的结果

2.3 *THRSP* 基因第 1 外显子 40bp, 78bp 位点的遗传分析

由表 2 可知, 五个牛群体的 *THRSP* 基因第 1 外显

子 40 bp 和 78 bp 的基因型分布频率不一致, 秦川牛群体中以 AB 型个体最多, 而夏南牛以 AC 型个体最多, 南阳牛, 郟县红牛, 鲁西牛三个群体以 AA 型个体最

表2 THRSP基因第一外显子40 bp, 78 bp处突变位点的基因频率和基因型频率

品种	秦川牛	夏南牛	南阳牛	郑县红牛	鲁西牛
样本量(<i>N</i>)	405	86	40	65	48
$P_{AA}(N_{AA})$	0.1605 (65)	0.3720 (32)	0.4250 (17)	0.4615 (30)	0.3333 (16)
$P_{AB}(N_{AB})$	0.4543 (184)	0.1512 (13)	0.2250 (9)	0.2000 (13)	0.3958 (19)
$P_{BB}(N_{BB})$	0.0370 (15)	0.0698 (6)	0.0750 (3)	0.0462 (3)	0.0000 (0)
$P_{AC}(N_{AC})$	0.3481 (141)	0.4070 (35)	0.2750 (11)	0.2923 (19)	0.2708 (13)
A基因频率(P_A)	0.5617	0.6511	0.6750	0.7077	0.6666
B基因频率(P_B)	0.2642	0.1454	0.1875	0.1462	0.1979
C基因频率(P_C)	0.1741	0.2035	0.1375	0.1461	0.1355

表3 THRSP基因在不同群体中基因型分布差异的 χ^2 检验

品种	χ^2			
	夏南牛	南阳牛	郑县红牛	鲁西牛
秦川牛	34.79**	20.10**	42.26**	4.82
夏南牛		2.36	2.17	10.85*
南阳牛			0.53	2.64
郑县红牛				5.26

注: **表示差异极显著($P < 0.01$), *表示差异显著($P < 0.05$)。

表4 THRSP基因第1外显子40 bp, 78 bp多态性分析

品种	位点纯合度	位点杂合度	有效等位基因数	多态信息含量
秦川牛	0.4157	0.5843	2.4056	0.5170
夏南牛	0.4865	0.5135	2.0555	0.4587
南阳牛	0.5091	0.4909	1.9643	0.4397
郑县红牛	0.5435	0.4565	1.8399	0.4127
鲁西牛	0.5020	0.4980	1.9920	0.4456

注: $PIC > 0.5$ 为高度多态, $0.25 < PIC < 0.5$ 为中度多态, $PIC < 0.25$ 为低度多态

多。由基因频率可以看出,五个群体中优势等位基因是A基因。通过 χ^2 独立性检验表明在基因型分布上秦川牛与夏南牛、南阳牛、郑县红牛差异极显著($P < 0.01$);夏南牛与鲁西牛差异显著($P < 0.05$)(表3)。

由表4可知,位点间纯合度为:郑县红牛 > 南阳牛 > 鲁西牛 > 夏南牛 > 秦川牛;位点间杂合度:秦川牛 > 夏南牛 > 鲁西牛 > 南阳牛 > 郑县红牛;位点间多态信息含量为秦川牛 > 夏南牛 > 鲁西牛 > 南阳牛 > 郑县红牛,秦川牛群体属于高度多态,夏南牛,鲁西牛,南阳牛,郑县红牛群体都属于中度多态。

3 讨论

3.1 关于五个黄牛品种THRSP基因遗传多态性的讨论

从基因型的分布来看,秦川牛与夏南牛、南阳牛、郑县红牛差异极显著($P < 0.01$),说明秦川牛与这三个牛品种的遗传资源有较大差异。推测原因可能是夏南牛、南阳牛、郑县红牛三个牛品种所处的地理位置和环

境比较相似,产地位于河南南阳和平顶山,都属于中原牛品种。相对来说,秦川牛位于关中地区,由于长期自然选择和人工选择的因素造成了其同中原牛品种不同的基因型分布。夏南牛是以法国夏洛来牛为父本,以中国地方良种南阳牛为母本,经导入杂交、横交固定和自群繁育三个阶段的开放式育种,培育而成的肉牛新品种^[12]。 χ^2 独立性检验表明,夏南牛与鲁西牛差异显著($P < 0.05$)。

从多态信息含量来看,秦川牛属于高度多态,南阳牛、郑县红牛、鲁西牛、夏南牛都属于中度多态。对一个群体而言, PIC 高,杂合度大,表明该位点遗传变异程度高,有较大的选择潜力。研究表明,中国黄牛的遗传资源很丰富,在以后的工作中要注意对其遗传资源进行保护和合理的利用。尤其是秦川牛的 $PIC > 0.05$,在生产中更应注意对这一宝贵的种质资源进行保护。

3.2 关于牛THRSP基因未来研究的展望

THRSP 基因是影响动物脂肪生成的重要候选基因。Graunard DE 等^[9]在安格斯牛上的研究结果表明,7月龄大牛的 *THRSP* 基因在肌肉脂肪组织表达量的多少,可以以预测成年后的生产能力。试验发现的这两个突变位点,均导致氨基酸的错义突变,所以推测它可能对蛋白的表达有所影响。因此未来的研究方向应着重于 RNA 表达和蛋白水平上的研究,国外对 *THRSP* 基因研究的热点则在于对这一基因的信号通路的研究。

另外,由于 *THRSP* 基因对肉牛肌肉脂肪含量的多少有重要作用,所以以后应该进行 *THRSP* 基因与生产性状及肉质性状相关性的研究,为进一步揭示 *THRSP* 基因的功能、探讨其与生产性状之间的联系以及确定分子遗传标记进而实现标记辅助选择提供理论基础。

参考文献

- [1] 詹凯,杨宁,徐桂云,等.鸡、鸭甲状腺激素应答基因(*THRSP*)的研究进展[J].遗传,2009,31(02):131-136
- [2] 曹志平,李辉.Spot14基因研究进展[J].东北农业大学学报,2008,39(02):285-288.
- [3] Seelig S,Liaw C,Towle H C,et al.;Thyroid Hormone Attenuates and Augments Hepatic Gene Expression at a Pretranslational level[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,1981,78:4733-4737.
- [4] Anderson GW, Zhu Q, Metkowski J,et al. The *Thrsp* null mouse (*Thrsp*(tm1cnm)) and diet-induced obesity[J]. Mol Cell Endocrinol. 2009 Apr 10;302(1):99-107
- [5] Zhu Q,Anderson GW,Mucha GT,et al.The spot 14 protein is required for denovo lipid synthesis in the lactating mammary gland [J]. Endocrinology,2005,146(8) :3343-3350
- [6] WendyA.Wells, Gary N. Schwartz,et al.Cole en-nifer J. Gibson and William B. Kinlaw.Expression of “Spot 14” (*THRSP*) predicts disease free survival in invasive breast cancer:immunohistochemical analysis of a-new molecular marker[J]. Breast Cancer Research and Treatment.2006,98(2):231-240.
- [7] Z.P.Cao,S.Z.Wang,Q.G.Wang,et al.Association of Spot14 α Gene Polym-orphisms with Body Weight in the Chicken[J]. Poultry Science.2007,86:1873-1880.
- [8] 詹凯,徐桂云,杨宁,等.鸭 *THRSP* α 基因内含子多态与生长和屠体性状相关性研究[J].中国畜牧杂志,2007,(03):1-3.
- [9] Graunard DE, Piantoni P, Bionaz M,et al. Adipogenic and energy metabolism gene networks in longissimus lumborum during rapid post-weaning growth in Angus and Angus x Simmental cattle fed high-starch or low-starch diets[J].Genomics.2009,31;10:142.
- [10] KevinJ Harvatine,DaleE Bauman.Sreb1 and thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA[J]. Journal of Nutrition,2006,136(10): 2468-74.
- [11] [美]J 萨姆布鲁克,D W 拉塞尔.分子克隆实验指南(上、下册)[M].北京:科学出版社,2002:467-470.
- [12] 祁兴磊,李鹏飞,王之保.等.夏南牛新品种培育技术研究[J].中国牛业科学,2008,34(5):16-23.