

新疆褐牛产奶性状候选基因 SNPs 检测及其遗传效应分析

刘丽元^{1,2}, 周靖航², 张梦华¹, 魏趁¹, 王丹¹, 方季青³, 李金芝⁴, 王爱芳⁵, 黄锡霞¹

(¹新疆农业大学动物科学学院, 乌鲁木齐 830052; ²宁夏大学农学院, 银川 750021;

³新疆乌鲁木齐种牛场, 乌鲁木齐 830000; ⁴塔城地区种牛场, 新疆塔城 834700;

⁵新疆天山畜牧生物工程股份有限公司, 新疆昌吉 831100)

摘要:本研究旨在探索新疆褐牛产奶性状相关候选基因多态性与泌乳性状及体细胞评分(SCS)的相关性, 探究新疆褐牛多态性位点的群体遗传特征。基于课题组前期 DNA 混池重测序的结果筛选 17 个 SNPs 突变信息, 并采用基质辅助激光电离解吸飞行时间质谱法(Sequenom MassArray Genotype)分型技术验证 *FASN*、*FSHR*、*HAL*、*GPIHBP1*、*NIBPL*、*C9*、*PDE9A*、*PTK2*、*STAT1*、*ZNF66*、*ZNF567*、*ZNF7*、*ZNF623* 和 *ZNF804A* 基因在新疆乌鲁木齐种牛场、新疆天山畜牧生物工程股份有限公司和新疆塔城地区种牛场共计 262 头新疆褐牛母牛群体中的遗传多态性, 运用 SAS 8.1 软件 GLM 过程分析这 14 个基因多个 SNP 位点对新疆褐牛群体的遗传效应及其与 305 天产奶量、乳脂率、乳蛋白率、乳糖率、总固体和 SCS 的关联性。结果表明, 17 个 SNPs 均处于哈代-温伯格平衡状态($P>0.05$), 9 个 SNPs 与新疆褐牛 1 个或多个泌乳性状达到显著($P<0.005$)或极显著($P<0.001$)关联, 这些位点分别位于 *FASN*、*FSHR*、*HAL*、*ZNF66*、*ZNF7*、*ZNF804A*、*GPIHBP1* 和 *PDE9A* 基因上。提示这些基因可尝试作为新疆褐牛产奶性状分子标记的候选基因, 为新疆褐牛产奶性状的分子标记辅助选育提供依据和参考。

关键词:新疆褐牛; 产奶性状; SCS; 候选基因; SNP; 关联分析

中图分类号: SB23.8⁺1

文献标志码: A

论文编号: casb16080102

Genetic Effect and Detection of SNPs in Candidate Genes Related to Milk Production Traits of Xinjiang Brown Cattle

Liu Liyuan^{1,2}, Zhou Jinghang², Zhang Menghua¹, Wei Chen¹, Wang Dan¹,

Fang Jiqing³, Li Jinzhi⁴, Wang Aifang⁵, Huang Xixia¹

(¹College of Animal Science and Technology, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052; ²School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021; ³Cattle Farm in Urumqi, Urumqi 830000; ⁴Cattle Farm in Tacheng Area of Xinjiang, Tacheng Xinjiang 834700; ⁵Xinjiang Tianshan Animal Husbandry Biological Engineering Co., Ltd, Changji Xinjiang 831100)

Abstract: This study aims to explore the association between polymorphisms of candidate genes related to milk production traits and somatic cell score (SCS), and explore the genetic feature of polymorphism from these SNPs in Xinjiang brown cattle. Totally 262 cattle from Urumqi cattle farm, Tianshan Animal Husbandry Biological Engineering Co., Ltd and Tacheng cattle farm were selected. Based on previous SNPs data obtained by re-sequencing technology in DNA pools, totally 17 SNPs of *FASN*, *FSHR*, *HAL*, *GPIHBP1*, *NIBPL*, *C9*, *PDE9A*, *PTK2*, *STAT1*, *ZNF66*, *ZNF567*, *ZNF7*, *ZNF623* and *ZNF804A* genes were screened. At the same time, combining with Sequenom MassArray Genotype technology, the genetic polymorphism was detected. The

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划课题“优质奶牛新品种(系)选育与关键技术研究及示范”(2011BAD28B02); 现代农业(奶牛)产业技术体系建设专项资金资助(CARS-37)。

第一作者简介:刘丽元, 女, 1990 年出生, 河南上蔡人, 博士, 研究方向为动物遗传育种。通信地址: 750021 宁夏银川西夏区文萃北街 217 号 宁夏大学, E-mail: 729124817@qq.com。

通信作者:黄锡霞, 女, 1963 年出生, 四川中江人, 教授, 博士生导师, 研究方向为反刍动物遗传育种。通信地址: 830052 乌鲁木齐市沙依巴克区农大东路 311 号 新疆农业大学, E-mail: au-huangxixia@163.com。

收稿日期:2016-08-24, **修回日期:**2016-11-27。

genetic effect of the 17 SNPs on 305-day milk yield, milk fat percentage, milk protein percentage, lactin percentage, total solids content and SCS were analyzed by GLM procedure of SAS 8.1. The results showed that the 17 SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium, and 9 SNPs had significant ($P<0.005$) or extremely significant ($P<0.001$) association with milk production traits, and these SNPs were located in *FASN*, *FSHR*, *HAL*, *ZNF66*, *ZNF7*, *ZNF804A*, *GPIHBP1* and *PDE9A* genes. The results indicate that these genes can be taken as candidate genes for screening molecular markers of milk production traits. Association analysis of this study provides a theoretical basis and reference for the molecular marker-assisted selection of Xinjiang brown cattle.

Key words: Xinjiang brown cattle; milk production traits; SCS; candidate gene; SNP; association analysis

0 引言

近年来,随着现代分子生物学和分子克隆技术的发展,遗传标记从形态学标记、细胞标记、生化标记发展到DNA分子标记,DNA分子标记可直接反映DNA分子水平上的差异,因其多态性高、数量多,故理论与应用价值不可估量。众多的分子标记中,SNP(single nucleotide polymorphism)标记是当前遗传标记研究中最多的,作为目前最具发展潜力的分子标记,已广泛应用于基因组制图、疾病相关性分析、群体遗传学及药物研究等众多领域^[1-2]。SNP的检测方法有很多,基质辅助激光解吸飞行时间质谱法是新近涌现的基因分型技术,其优点在于高通量、低样本量、高灵敏度和高分辨率。产奶量和乳成分性状(主要包括乳脂率、乳蛋白率、乳糖率和总固体等)是奶牛生产重要的经济性状,属典型的微效多基因控制的数量性状,在动物育种中,利用常规育种技术并结合现代分子生物技术能极大地加快群体遗传进展,提高育种效率^[3]。目前,越来越多的产奶性状QTL和候选基因相继被报道,主要以*GHR*、*DGAT1*、*STAT5A*、*ABCG2*、*PRL*、*Leptin*等基因研究较多^[4]。

新疆褐牛作为新疆特有的品种资源,具有高乳脂乳蛋白、低体细胞数、抗逆性强、适应性好等优秀特质。本研究依据产奶性状候选基因最新报道,基于课题组前期的DNA混池重测序结果获得的大量SNPs数据,并根据MassArray分型技术检测要求,选取17个SNPs在新疆褐牛群体中进行个体基因型检测,分析其与产奶性状和体细胞评分(SCS)性状之间的关系,以期新疆褐牛产奶性状的分子标记辅助选育提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

数据来自于新疆乌鲁木齐种牛场、天山畜牧生物工程股份有限公司牛场和新疆塔城地区种牛场共计262头健康的新疆褐牛母牛2010—2015年生产性能测

定记录,尾静脉采血,EDTA-K2抗凝,4℃保存。生产性能测定记录包括305天产奶量(由各牛场提供)、乳脂率、乳蛋白率、乳糖率、总固体和体细胞计数(由新疆维吾尔自治区奶业办公室提供)。泌乳天数大于305天的个体只取其前305天累积产奶量,泌乳天数小于305天的个体根据新疆褐牛产奶量校正系数将产奶量校正为305天产奶量^[5]。将体细胞数(SCC)用公式转化为呈正态分布的体细胞评分(SCS)作为乳房炎评价指标,见公式(1)^[6]。

$$SCS = \log_2 \frac{SCC}{100} + 3 \dots\dots\dots (1)$$

其中SCC单位为($\times 10^3$ 个/mL)。本研究以中国气象数据网公布的新疆地区30年的平均气温记录,依据候温法将新疆地区的季节划分为春季(4—5月)、夏季(6—8月)、秋季(9月)、冬季(10月—次年3月);胎次按自然胎次划分6个水平(1胎、2胎、3胎、4胎、5胎、6胎及以上)。

1.2 方法

1.2.1 血液基因组DNA提取 利用苯酚-氯仿抽提法进行基因组DNA提取,TE缓冲液溶解后,利用NANODROP 2000紫外分光光度计和凝胶电泳检测DNA提取质量,将合格DNA放置于-20℃冰箱保存备用。

1.2.2 DNA池重测序筛选SNP 查阅国内外产奶性状的最新报道,选择14个产奶性状相关候选基因在DNA池测序结果中筛选SNPs,根据Sequenom MassARRAY Genotype SNP分型技术的检测要求和后续试验的可行性和准确性,最终选择17个SNP位点进行个体基因型检测,位点筛选条件如下:(1)变异位点位于外显子区域;(2)变异类型选取错义突变;(3)一个基因出现多个位点变异的SNPs;(4)样本基因型为杂合变异;(5)测序深度大于40,测序深度越深,变异位点准确性越高。

1.2.3 引物设计 将上一步确定的SNP利用Illumina公

表1 SNP相关信息

SNP	SNP	最近基因	染色体	物理位置	突变类型
1	T51397250C	<i>FASN</i>	19	51397250	T/C
2	C31176783G	<i>FSHR</i>	11	31176783	C/G
3	C60625677T	<i>HAL</i>	5	60625677	C/T
4	Hapmap30086-BTC-002066ab	<i>ZNF66</i>	14	1490178	G/A
5	Hapmap30646-BTC-002054b	<i>GPIHBP1</i>	14	1461085	C/T
6	T47091355G	<i>ZNF567</i>	18	47091355	T/G
7	C1517553T	<i>ZNF7</i>	14	1517553	C/T
8	C11595662T	<i>ZNF804A</i>	2	11595662	C/T
9	rs29018751	<i>NIPBL</i>	20	39518857	T/C
10	rs41586699	<i>PDE9A</i>	1	145954149	A/G
11	rs41624797	<i>PTK2</i>	14	2201870	G/A
12	rs41627764	<i>ZNF623</i>	14	894252	A/C
13	rs41647754	<i>HAL</i>	5	64833594	T/C
14	rs41941646	<i>C9</i>	20	37399087	G/A
15	rs41942492	<i>NIPBL</i>	20	39485917	T/C
16	rs42954630	<i>NIPBL</i>	20	39601103	C/T
17	rs43706906	<i>STAT1</i>	2	79923716	C/G

司的MassArray分型技术进行SNP分型^[7]。根据已知SNPs信息进行引物设计,引物设计包括PCR扩增引物和单碱基延伸引物,共设计17对引物,见表2。

1.2.4 统计分析 计算基因型频率、等位基因型频率并检测每个位点的哈代-温伯格平衡情况,并利用Haploview软件进行单倍型与连锁不平衡分析。运用

表2 引物信息表

SNP	一级引物	二级引物	延伸引物
1	ACGTTGGATGTCAACTCACAGGATGAGTGG	ACGTTGGATGAGCCGTAGAAGGACTTCTTC	ggTTCAGGGCCACCAGGT
2	ACGTTGGATGTACAGATATCGGAGGTTGGG	ACGTTGGATGTGAAAAGGCCAACAACCTGC	gggACCTGCTATACATCGAC
3	ACGTTGGATGCTGTGGATTCTCTCTCCACC	ACGTTGGATGTGCTCCACATGCTCAATGAC	CCATCCTCCCATGGAGA
4	ACGTTGGATGAAGTGCTGGGTTCTTCAAC	ACGTTGGATGATGCTGGCTTGGTCTGAGGT	gtgGGTCTGAGGTGAGAAC
5	ACGTTGGATGGTCTTGCGCCACCAATACCT	ACGTTGGATGAGGAAAAGGCAGGCTCCCA	TAACACGAGGGATGGAGA
6	ACGTTGGATGATCAATGTGGGAGGACCATC	ACGTTGGATGACTGTGCTGGAGTTCCATC	ccCCATCTTATGATATTGTGTGATC
7	ACGTTGGATGTGGCAAGGGGTCAGCAAGA	ACGTTGGATGTTGTCTTGTGAGGCCCTAC	cggGCCCAATGGGCTGGACCTAGAC
8	ACGTTGGATGCCAAGGAAACTGTTAAGGGC	ACGTTGGATGCCTCTCAGAATTTACAGGG	AATTTACAGGGGTCAACA
9	ACGTTGGATGCAACTCTGCCTGTGCTGTAT	ACGTTGGATGCTCAACAGTGGGCTTAAAGT	acCCATGTTATAAACAATATGCT
10	ACGTTGGATGACAGGGTTTCTTCTCATGAC	ACGTTGGATGCTCTCTGATGTTGACGATAC	CATAAAAAACATAGACAGACAG
11	ACGTTGGATGCACCTCTGTGTTCTAAGC	ACGTTGGATGTCCACTTCAGCAGAAACACG	gaggaAGCGTGAACCTAAGAGAAGA
12	ACGTTGGATGATCCCATCACAAAGTCCAAG	ACGTTGGATGTCTGGATCTACCCAAAGATG	AAACATCTTGGGAAAACCTTA
13	ACGTTGGATGTGGTGTGGAGAGCATTTTAC	ACGTTGGATGCCCTGGTTTCTGTCTGTGTC	cctgCTGTGTCCCTTCATTGC
14	ACGTTGGATGGCCACCCACAAATCAAAG	ACGTTGGATGCTGAGTGAAAGCCTGAGTG	ggatCCTGAGTGTGAGAGGACTA
15	ACGTTGGATGGTCCAACAATAGGGGACCAC	ACGTTGGATGCACTATCTCTGTACTAGC	AGCATCATTATAATTATCTAATGTG
16	ACGTTGGATGCTATTAGTTAGTCCTTAGGC	ACGTTGGATGATTCCTGCTGAGAGCATAG	AGTTATTAATAATTATTGCAGAAGA
17	ACGTTGGATGGAAGCTCATACCACTGGGAC	ACGTTGGATGGAAGAAGCACAAATGCTAGAC	TCCATTTATGATCCGTGCT

SAS 8.1的GLM过程对不同基因型与泌乳性状和SCS进行关联分析的模型见公式(2)。

$$Y_{ijklmn} = \mu + G_i + L_j + N_k + F_l + P_m + e_{ijklmn} \dots\dots\dots (2)$$

其中 Y_{ijklmn} 为产奶性状观察值(305天产奶量、乳脂率、乳蛋白率、乳糖率、总固体和SCS); μ 为群体均值; G_i 为基因型或单倍型固定效应; L_j 为场固定效应; N_k 为产犊年度固定效应; F_l 为产犊季节固定效应; P_m 为胎次固定效应; e_{ijklmn} 为随机误差。

为保证多重比较过程总的I型错误概率低于0.05和0.01,将显著性水平校正为 $P < 0.005$ (显著)和 $P < 0.001$ (极显著)。

2 结果与分析

2.1 产奶性状描述性统计量

运用SPSS 16.0软件对262头新疆褐牛群体的产奶性状和SCS表型数据进行简单统计量分析,结果见表3。

2.2 基因分型

通过质谱软件分析统计,得到了17个SNPs分型

结果,图1显示了其中两个SNP位点的聚类图。不同的颜色代表不同质量的光谱信号,针对数据可计算出不同碱基并进行统计,可得出不同位点的不同基因型频率;其中,横坐标表示一种等位基因型的信号强度,纵坐标为另一种等位基因型的信号强度。由图1可知,聚类图较清晰,未识别出的碱基数较少,可进行下一步SNP位点多态性与产奶性状遗传效应的研究。

2.3 群体等位基因频率和基因型频率

运用MassArray分型技术对17个位点进行基因型分型,所有的SNPs位点均检测出2种或3种基因型,平均检出率范围在97.8%~99.6%。由表4可知,17个SNPs位点均具有多态性,经哈代-温伯格平衡检测,17个SNPs位点均处于平衡状态($P > 0.05$)。其中,SNP11、SNP12和SNP13位点处于低度多态($PIC < 0.25$),其余位点均处于中度多态($0.25 < PIC < 0.5$)。

2.4 SNPs位点与产奶性状及SCS的关联分析

表5为17个SNPs不同基因型与新疆褐牛305天产奶量、乳脂率、乳蛋白率、乳糖率、总固体含量及SCS

表3 产奶性状及SCS描述性统计量

性状	N	最小值	最大值	均值	标准差	变异系数/%
305天产奶量/kg	431	1566.24	12823.23	4683.22	1518.88	32.43
乳脂率/%	2770	2.00	7.00	3.88	0.86	22.16
乳蛋白率/%	2940	2.25	5.72	3.37	0.37	10.98
乳糖率/%	2769	2.13	5.50	4.79	0.42	8.77
总固体/%	2761	9.01	17.63	11.94	1.09	9.13
SCS	2750	0.84	9.77	3.612	0.91	25.19

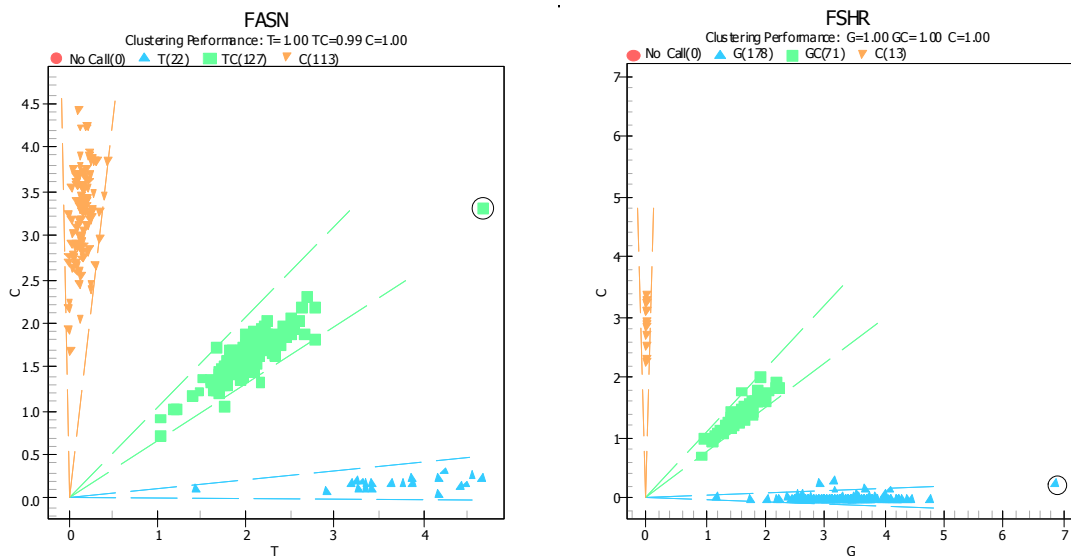


图1 多态位点聚类图

表 4 17 个 SNPs 位点的基因型频率和基因频率及 χ^2 检验

SNP	基因型	基因型频率	等位基因	等位基因频率	杂合度	有效等位基因数	PIC	χ^2	<i>P</i>	
1	C(113)	0.431	C	0.674	0.44	1.78	0.34	2.75	0.10	
	TC(127)	0.485		T						0.326
	T(22)	0.084								
2	C(13)	0.050	C	0.185	0.30	1.43	0.26	2.71	0.10	
	GC(71)	0.271		G						0.815
	G(178)	0.679								
3	T(42)	0.16	T	0.406	0.48	1.93	0.37	0.11	0.74	
	TC(129)	0.492		C						0.594
	C(91)	0.347								
4	G(70)	0.269	G	0.519	0.50	2.00	0.37	0.00	0.98	
	AG(130)	0.500		A						0.481
	A(60)	0.231								
5	C(73)	0.279	C	0.531	0.50	1.99	0.37	0.03	0.85	
	TC(132)	0.504		T						0.469
	T(57)	0.218								
6	G(28)	0.107	G	0.347	0.45	1.83	0.35	0.97	0.33	
	GT(126)	0.481		T						0.653
	T(108)	0.412								
7	T(116)	0.443	T	0.681	0.43	1.77	0.34	2.55	0.11	
	TC(125)	0.477		C						0.319
	C(21)	0.08								
8	C(113)	0.431	C	0.670	0.44	1.79	0.34	1.62	0.20	
	TC(125)	0.477		T						0.330
	T(24)	0.092								
9	T(138)	0.527	T	0.731	0.39	1.65	0.32	0.38	0.54	
	CT(107)	0.408		C						0.269
	T(17)	0.065								
10	A(214)	0.527	A	0.731	0.39	1.65	0.32	0.38	0.54	
	GA(37)	0.408		G						0.269
	G(11)	0.065								
11	G(238)	0.908	G	0.954	0.09	1.10	0.08	0.60	0.44	
	GA(24)	0.092		A						0.046
12	A(246)	0.939	A	0.969	0.06	1.06	0.06	0.26	0.61	
	CA(16)	0.061		C						0.031
13	C(229)	0.874	C	0.937	0.12	1.13	0.11	1.18	0.28	
	CT(33)	0.126		T						0.063
14	A(64)	0.244	A	0.487	0.50	2.00	0.37	0.23	0.63	
	AG(127)	0.485		G						0.513
	G(71)	0.271								
15	T(138)	0.529	T	0.738	0.39	1.63	0.31	1.62	0.20	
	TC(109)	0.418		C						0.262
	C(14)	0.054								

续表 4

SNP	基因型	基因型频率	等位基因	等位基因频率	杂合度	有效等位基因数	PIC	χ^2	P
16	C(155)	0.594	C	0.778	0.35	1.53	0.29	1.07	0.30
	CT(96)	0.368	T	0.222					
	T(10)	0.038							
17	G(53)	0.203	C	0.454	0.50	1.98	0.37	0.04	0.84
	GC(131)	0.502	G	0.546					

表 5 17个 SNPs 位点与产奶性状及 SCS 的关联分析(最小二乘均值±标准误)

SNP	基因	基因型	305天产奶量/kg	乳脂率/%	乳蛋白率/%	乳糖率/%	总固体/%	SCS
1	FASN	C	4649.45±172.77	3.98±0.05	3.27±0.02c	4.75±0.03	12.04±0.08	3.44±0.07
		T	4644.84±361.54	3.98±0.08	3.30±0.03b	4.81±0.04	12.09±0.11	3.38±0.09
		TC	4700.74±184.96	3.95±0.05	3.32±0.02a	4.78±0.03	12.07±0.08	3.39±0.07
		P值	0.9420	0.6808	0.0037*	0.0798	0.6849	0.3715
2	FSHR	C	4439.08±407.88	3.92±0.08	3.25±0.03	4.74±0.05	11.91±0.11	3.45±0.10B
		G	4722.45±161.02	3.96±0.05	3.30±0.02	4.78±0.03	12.07±0.08	3.37±0.07C
		GC	4282.69±231.82	4±0.05	3.33±0.02	4.75±0.04	12.05±0.09	3.53±0.07A
		P值	0.0670	0.5331	0.0376	0.3003	0.1657	0.0004**
3	HAL	C	4437.86±220.9B	3.95±0.05	3.31±0.02	4.75±0.03	12.01±0.09	3.45±0.07
		CT	4900.51±169.29A	3.97±0.05	3.31±0.02	4.78±0.03	12.07±0.08	3.39±0.07
		T	4241.78±210.4C	3.98±0.06	3.27±0.02	4.76±0.04	12.09±0.09	3.4±0.08
		P值	0.0009**	0.8147	0.0985	0.1642	0.3657	0.2329
13	HAL	C	4653.21±159.87	3.96±0.04b	3.3±0.02	4.77±0.03	12.05±0.08	3.41±0.07
		CT	4158.36±282.69	4.10±0.06a	3.29±0.03	4.73±0.04	12.19±0.10	3.45±0.08
		P值	0.0418	0.0039*	0.4056	0.0906	0.0160	0.4459
4	ZNF66	A	4218.47±225.35	3.98±0.06	3.31±0.02	3.31±0.02	12.12±0.09	3.39±0.08B
		AG	4723.94±166.44	3.99±0.05	3.31±0.02	3.31±0.02	12.06±0.08	3.40±0.07B
		G	4847.92±211.71	3.89±0.05	3.29±0.02	3.29±0.02	11.95±0.09	3.55±0.07A
		P值	0.0116	0.0245	0.5120	0.7807	0.0089	0.0001**
6	ZNF567	G	4104.89±328.94	4.01±0.07	3.32±0.03	4.78±0.04	12.22±0.10	3.43±0.09
		GT	4363.98±209.28	3.96±0.05	3.31±0.02	4.78±0.03	12.05±0.08	3.41±0.07
		T	4757.53±161.99	3.97±0.05	3.29±0.02	4.75±0.03	12.03±0.08	3.40±0.07
		P值	0.0173	0.6775	0.4033	0.1630	0.0354	0.8872
7	ZNF7	C	4544.3±388.43	4.02±0.07	3.33±0.03	4.76±0.04	12.12±0.10	3.30±0.09C
		CT	4641.14±172.62	3.99±0.05	3.31±0.02	4.79±0.03	12.09±0.08	3.35±0.07B
		T	4718.86±184.15	3.95±0.05	3.29±0.02	4.75±0.03	12.02±0.08	3.48±0.07A
		P值	0.8241	0.3478	0.1848	0.0699	0.1972	0.0002**
8	ZNF804A	C	4321.02±180.05C	3.98±0.05	3.31±0.02a	4.75±0.03	12.04±0.08	3.43±0.07
		CT	4694.27±179.18B	3.94±0.05	3.31±0.02a	4.80±0.03	12.08±0.08	3.38±0.07
		T	5386.15±235.21A	3.99±0.07	3.23±0.03b	4.76±0.04	12.07±0.10	3.41±0.09
		P值	<0.0001**	0.4488	0.0017*	0.0179	0.6290	0.3034
12	ZNF623	A	4634.52±160.45	3.97±0.04	3.30±0.02	4.77±0.03	12.06±0.08	3.41±0.07
		CA	4676.73±520.85	3.90±0.09	3.28±0.04	4.85±0.05	12.15±0.12	3.32±0.10
		P值	0.9325	0.3852	0.5075	0.0313	0.3233	0.2718

续表 5

SNP	基因	基因型	305天产奶量/kg	乳脂率/%	乳蛋白率/%	乳糖率/%	总固体/%	SCS
9	NIPBL	C	4192.78±363.86	3.95±0.08	3.27±0.03	4.82±0.05	12.13±0.11	3.20±0.10
		CT	4569.51±170.34	3.93±0.05	3.31±0.02	4.76±0.03	12.00±0.08	3.43±0.07
		T	4852.06±186.46	3.99±0.05	3.30±0.02	4.77±0.03	12.09±0.08	3.42±0.07
		P值	0.0510	0.2229	0.4360	0.1902	0.0875	0.0112
15	NIPBL	C	3889.75±393.86	3.92±0.09	3.29±0.04	4.82±0.05	12.16±0.12	3.25±0.11
		T	4772.02±185.27	3.99±0.05	3.30±0.02	4.77±0.03	12.09±0.08	3.42±0.07
		TC	4547.55±171.27	3.94±0.05	3.31±0.02	4.76±0.03	12.01±0.08	3.41±0.07
		P值	0.0339	0.2550	0.7947	0.2716	0.1118	0.1529
16	NIPBL	C	4638.04±172.91	3.98±0.05	3.30±0.02	4.77±0.03	12.08±0.08	3.41±0.07
		CT	4636.05±185.17	3.95±0.05	3.31±0.02	4.76±0.03	12.00±0.08	3.42±0.07
		T	4448.70±490.87	3.91±0.10	3.31±0.04	4.83±0.05	12.12±0.13	3.25±0.11
		P值	0.9211	0.5827	0.9120	0.2359	0.1360	0.2048
5	GPIHBP1	C	4820.25±208.38	3.92±0.05	3.3±0.02	4.76±0.04	11.96±0.09	3.55±0.07A
		T	4217.22±224.65	3.95±0.06	3.30±0.02	4.78±0.04	12.10±0.09	3.39±0.08B
		TC	4735.72±166.29	3.99±0.05	3.31±0.02	4.77±0.03	12.07±0.08	3.37±0.07B
		P值	0.0123	0.1306	0.8313	0.6329	0.0119	0.0001**
10	PDE9A	A	4696.95±158.87	3.97±0.04	3.31±0.02	4.77±0.03	12.05±0.08	3.43±0.07a
		G	5514.58±687.86	3.91±0.10	3.22±0.04	4.79±0.05	12.17±0.13	3.20±0.11b
		GA	3961.78±290.07	3.97±0.07	3.32±0.03	4.78±0.04	12.15±0.10	3.28±0.08b
		P值	0.0066	0.7829	0.0583	0.7918	0.1641	0.0016*
11	PTK2	G	4692.95±160.78	3.97±0.05	3.30±0.02	4.76±0.03	12.04±0.08	3.43±0.07
		GA	4029.92±285.38	3.95±0.06	3.29±0.03	4.80±0.04	12.15±0.10	3.30±0.08
		P值	0.0110	0.7357	0.6775	0.2021	0.1057	0.0254
14	C9	A	4758.93±181.76	3.97±0.05	3.32±0.02	4.76±0.04	12.06±0.09	3.41±0.07
		G	4199.16±211.53	3.98±0.05	3.29±0.02	4.78±0.03	12.11±0.09	3.35±0.07
		GA	4715.21±192.79	3.95±0.05	3.30±0.02	4.77±0.03	12.02±0.08	3.44±0.07
		P值	0.0063	0.7965	0.4238	0.7027	0.1897	0.0893
17	STAT1	C	4679.41±192.01	3.99±0.05	3.31±0.02	4.74±0.03	12.03±0.09	3.44±0.07
		G	4753.01±233.07	4.01±0.05	3.33±0.02	4.79±0.04	12.11±0.09	3.42±0.08
		GC	4574.54±176.09	3.94±0.05	3.29±0.02	4.77±0.03	12.04±0.08	3.41±0.07
		P值	0.6324	0.2730	0.6002	0.1115	0.2917	0.8191

注:同组数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.005$);同组数据后不同大写字母表示差异极显著($P<0.001$),下同。

的关联分析。由表 5 可知,9 个 SNPs 与新疆褐牛至少一个泌乳性状存在显著($P<0.005$)或极显著($P<0.001$)关联。其中,SNP3 和 SNP8 与新疆褐牛 305 天产奶量达到极显著关联($P<0.001$);SNP13 与乳脂率性状达到显著关联($P<0.005$);SNP1 和 SNP8 与乳蛋白率性状达到显著关联($P<0.005$);SNP2、SNP4、SNP7 和 SNP10 位点与 SCS 达到显著($P<0.05$)和极显著关联($P<0.01$),研究中未发现与乳糖率和总固体含量相关的 SNP。

2.5 单倍型与连锁不平衡分析

运用 Haploview 软件对新疆褐牛 17 个 SNPs 位点构建单倍型,如图 2,其中表 6 为各单倍型的基因型频率。由图 2 可以看出,本研究群体中,17 个 SNPs 共构成 3 个单倍型模块,分别命名为 Block1、Block2、Block3,其中 Block1 和 Block2 均处于强连锁不平衡状态($r^2>0.6$),Block3 连锁不平衡程度较弱。Block1 包含 SNP4 和 SNP5 两个位点,其中 D' 和 r^2 值为 0.892 和

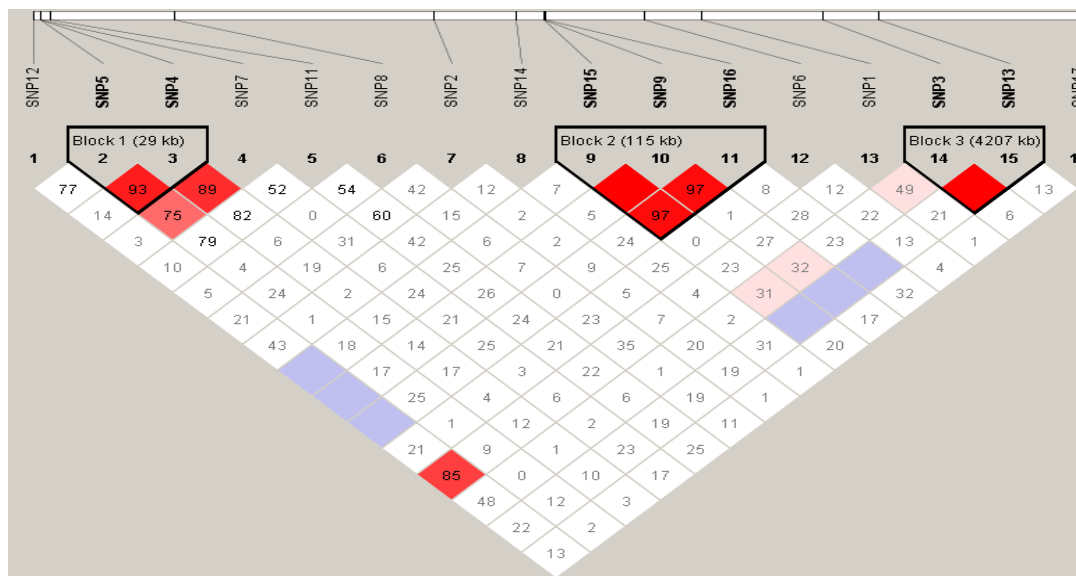


图2 17个SNP连锁不平衡估计

0.607,因此Block1为强连锁不平衡状态,构成4种单倍型,分别为CG、TA、CA和TG单倍型;Block2包含SNP9、SNP15和SNP163个位点,其中由SNP9和SNP15构成的单倍型模块*D'*和*r*²值为1.000和0.976,由SNP15和SNP16构成的单倍型模块*D'*和*r*²值为1.000和0.988,由SNP9和SNP16构成的单倍型模块*D'*和*r*²值为1.000和0.976,因此Block2为强连锁不平衡状态,构成3种单倍型,分别为TTC、CCT和CCC,2个单倍型模块之间的连锁不平衡系数*D'*为0.19。Block3包含SNP3和SNP13两个位点,构成的单倍型模块*D'*和*r*²值为1.000和0.047,因此Block3为弱连锁不平衡状态,构成3种单倍型,其中,单倍型CC个体最多,占群体总数的53.1%,而CT型个体最少,仅占群体总数的6.3%,Block2和Block3模块之间的连锁不平衡系数*D'*为0.32。

表6 3个单倍型模块构成的单倍型

单倍型模块	单倍型	基因型频率
Block1	CG	0.503
	TA	0.454
	CA	0.027
	TG	0.016
Block2	TTC	0.727
	CCT	0.219
	CCC	0.044
Block3	CC	0.531
	TC	0.406
	CT	0.063

2.6 单倍型与产奶性状及SCS的关联分析

由表7可以看出,由Block1模块构成的单倍型与

表7 单倍型与产奶性状及SCS的关联分析(最小二乘均值±标准误)

单倍型模块	单倍型	乳脂率/%	乳蛋白率/%	乳糖率/%	总固体/%	SCS
Block1	CG(814)	3.85±0.07	3.26±0.03	4.77±0.07	12.03±0.16	3.52±0.15a
	TA(483)	3.95±0.07	3.28±0.03	4.77±0.07	12.19±0.16	3.35±0.14b
	<i>P</i> 值	0.0719	0.5211	0.8576	0.0147	0.0024*
Block2	CCC(1566)	3.76±0.26	3.34±0.11	4.51±0.15	12.11±0.39	3.69±0.31
	CCT(103)	3.90±0.11	3.27±0.04	4.79±0.06	12.00±0.16	3.26±0.13
	TTC(14)	3.97±0.06	3.27±0.02	4.74±0.04	11.99±0.11	3.41±0.09
	<i>P</i> 值	0.5437	0.8158	0.1292	0.9437	0.1884
Block3	CC(78)	3.96±0.10	3.35±0.04	4.78±0.05	12.03±0.14	3.40±0.12
	TC(437)	4.05±0.10	3.31±0.04	4.80±0.05	12.20±0.14	3.28±0.12
	<i>P</i> 值	0.1265	0.0735	0.6571	0.0173	0.0655

新疆褐牛 SCS 达到显著关联 ($P < 0.005$), 其中单倍型 CG 型个体的 SCS 显著高于 TA 型个体, 其余单倍型均未发现与新疆褐牛产奶性状和 SCS 的关联性。由于研究群体 305 天产奶量数据较少, 因此本研究并未分析单倍型与 305 天产奶量的关联性。

3 讨论

3.1 SNPs 遗传多态性分析

本研究对课题组前期 DNA 混池重测序技术筛选的 SNPs 采用 MassArray 技术进行个体基因分型并检测其多态性。结果得知, 17 个 SNP 均具有多态性, 通过哈代-温伯格平衡检测得到 17 个位点均符合平衡状态。其中 SNP11(*PTK2*)、SNP12(*ZNF623*) 和 SNP13(*HAL*) 为低度多态, 有效等位基因数目也较少, 即这 3 个位点在新疆褐牛群体中遗传变异程度较低, 推测新疆褐牛在长期的育种选择及进化过程中, *PTK2*、*ZNF623* 和 *HAL* 基因所受的选择压力不大, 其余位点均属于中度多态, 遗传变异较大。

3.2 SNPs 位点对新疆褐牛产奶性状及 SCS 的遗传效应分析

通过对 17 个 SNPs 多态性和新疆褐牛群体 5 个泌乳性状及 SCS 的关联分析, 发现有 9 个 SNPs 与至少 1 个泌乳性状达到了显著或极显著关联。

SNP1 位于 *FASN* 基因上, *FASN* 为奶牛脂肪酸合成酶, 其在脂肪酸合成中起着关键性作用。本研究发现该位点对新疆褐牛乳蛋白率性状有显著影响, 其中杂合型 TC 个体的乳蛋白率显著高于纯合型 CC 和 TT 型个体。王小龙等^[8]对扬州大学实验农场 265 头中国荷斯坦牛 *FASN* 第 34 外显子多态性进行检测, 发现其对乳脂率有显著影响。马彦男等^[9]采用 PCR-SSCP 并结合测序技术发现 *FASN* 第 34 外显子 SNP 对中国荷斯坦牛乳脂量有显著影响。本研究得出 SNP2 与新疆褐牛 SCS 性状有极显著关联, 且杂合型 GC 个体有较高的 SCS, 说明 GC 为优势基因型, 该位点位于 *FSHR* 基因上, 牛 11 号染色体。有研究显示 *FSHR* 基因与水牛超数排卵性状有关联, 然而, 目前为止, 国内外关于 *FSHR* 基因的相关研究主要集中在人和猪上^[10-12]。

SNP3 和 SNP13 均位于 *HAL* 基因上, SNP3 与新疆褐牛 305 天产奶量达到极显著关联, 而 SNP13 与乳脂率达到显著关联, 其中 CT 型个体具有较高的 305 天产奶量和乳脂率。关于 *HAL* 基因的相关研究多集中在猪和水牛上^[13-15], 此外, Wang 等^[16]研究结果得出 *HAL* 基因上的 5 个 SNPs 与中国荷斯坦牛一个或多个产奶性状有关联, 并进行了 RT-PCR 验证, 得出这些 SNPs 可作为中国荷斯坦牛产奶性状的分子标记, 进一步

验证了本研究结果。

SNP4 与新疆褐牛 SCS 性状达到极显著关联, Jiang 等^[17]GWAS 研究结果显示该位点与中国荷斯坦牛产奶量和乳脂率均有关联, 该位点位于 *ZNF66* 基因上。SNP6 位于 *ZNF567* 基因上, 本研究未发现该位点与泌乳性状的关联性。SNP7 位于 *ZNF7* 基因上, 本研究得出该位点与新疆褐牛 SCS 性状达到极显著关联。齐超等^[18]研究结果表明该位点与北京地区中国荷斯坦牛的乳脂率有显著关联, 这提示了 *ZNF7* 基因可能与奶牛产奶性能有关。本研究结果得出 SNP8 位点与新疆褐牛 305 天产奶量和乳蛋白率有关, 该位点位于 *ZNF804A* 基因上, 目前, 较为成熟的是与人类精神分裂症的相关研究, 而与产奶性状的相关研究鲜有报道^[19-21]。SNP12 位于 *ZNF623* 基因上, 本研究未发现该位点与新疆褐牛产奶性状的关联性, 而 Jiang^[17]的研究结果表明该位点与中国荷斯坦牛乳脂率、乳蛋白率和总固体性状有关联, 揭示该基因很可能与奶牛的泌乳性能有关。

SNP10 位于 *PDE9A* 基因上, 研究表明, *PDEs* 家族作为第二信使环核苷酸的调节因子, 参与人体内多种生理学功能的调节, 如细胞生长、基因表达、平滑肌收缩、脂肪生成以及糖代谢等^[22-24]。谢岩^[25]利用 RT-PCR 技术的表达谱分析结果得出 *PDE9A* 基因在奶牛泌乳期中国荷斯坦牛乳腺组织中的 mRNA 表达量均高于其它组织, 初步证明 *PDE9A* 基因与奶牛的泌乳功能相关。Yang 等^[26]运用 DNA 池测序技术鉴定 *PDE9A* 基因的 5' 调控区的 6 个 SNPs 均对中国荷斯坦牛产奶性状有显著或极显著影响, 且该基因在乳腺组织中的 mRNA 表达量显著高于其它组织, 证实这些 SNPs 可作为中国荷斯坦牛产奶性状的分子标记。本研究发现 SNP10 位点与新疆褐牛 SCS 性状达到显著关联, 且纯合型个体的 SCS 显著高于杂合型个体。

SNP9、SNP15 和 SNP16 均位于 *NIPBL* 基因上, 有研究表明果蝇的 Nipped-B 蛋白 (*NIPBL* 的同源物) 能促进增强子与启动子的远距离作用, 在细胞增殖中起重要作用。另有研究发现 *NIPBL* 突变与先天性多系统器官发育障碍综合征有关^[27-28]。直到目前为止, 该基因与产奶性状的相关研究还未见报道, 本研究也未发现其与新疆褐牛产奶性状及 SCS 的关联性。

3.3 单倍型与连锁不平衡分析

由图 2 所知, SNP4 和 SNP5 位点, SNP9、SNP15 和 SNP16 3 个位点处于强连锁不平衡状态; SNP3 和 SNP13 处于弱连锁不平衡状态, 单倍型模块之间连锁程度较低, 这可能是由于各个位点间物理位置相距较

远所造成^[29-30]。单倍型关联分析结果表明,单倍型与新疆褐牛 SCS 性状达到显著关联。研究表明,用多个 SNPs 构建单倍型,进而分析单倍型对产奶性状的遗传效应,能够为以标记辅助选择为基础的奶牛分子育种带来更多的遗传学信息^[31]。

4 结论

本研究基于 DNA 混池重测序获得的 SNPs 数据,依据产奶性状最新报道筛选多个基因的 17 个 SNPs 信息,采用 MsaaArray 技术在 262 头新疆褐牛母牛群体中进行遗传多态性检测,并分析其对新疆褐牛泌乳性状和 SCS 的影响。研究结果表明 9 个 SNPs 分别与新疆褐牛至少 1 个泌乳性状有关联,这些位点分别位于 *FASN*、*FSHR*、*HAL*、*ZNF66*、*ZNF7*、*ZNF804A*、*GPIHBP1* 和 *PDE9A* 基因上,其中 *GPIHBP1* 和 *PDE9A* 基因,已有学者在 RNA 水平和细胞水平上对其进行了功能验证,并初步证明了其与奶牛的泌乳功能相关。本研究发现的显著 SNPs 很可能影响新疆褐牛的产奶性能,候选基因遗传效应分析结果可为新疆褐牛产奶性状的分子标记辅助育种提供依据和参考,但各位点的遗传效应差异及突变对乳汁合成等方面值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] Alain V, Denis M, Magali S C. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics[J]. *Genetics Selection Evolution Gse*,2002,34(3):275-305.
- [2] 唐立群,肖层林,王伟平. SNP 分子标记的研究及其应用进展[J]. *中国农学通报*,2012,28(12):154-158.
- [3] 初芹,李东,侯诗宇,等. 基于 DNA 池测序法筛选奶牛高信息量 SNP 标记的可行性[J]. *遗传*,2014,36(7):691-696.
- [4] 李峥,李馨,邵广,等. 奶牛泌乳性状相关基因的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*,2016(7):76-78.
- [5] 付雪峰,王雅春,郭俊青,等. 新疆褐牛产奶量校正系数的制定[J]. *畜牧兽医学报*,2010,41(5):536-542.
- [6] 白瑞景,孙少华,马亚宾. 乳中体细胞数或体细胞评分变化规律及其与乳成分的关系研究[J]. *畜牧与兽医*,2010,42(12):79-81.
- [7] Oeth P B M, Park C, Kosman D, et al. iPLEX™ Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY System Through Single Base Primer Extension with Mass- Modified Terminators[EB/OL]. <https://www.garvan.org.au/research/capabilities/molecular-genetics/documents/sequenom-plex-assay.pdf>,2005-08-25.
- [8] 王小龙. 中国荷斯坦牛体型线性评定、K-CN 基因、FASN 基因多态性及其与部分生产性状的相关分析[D]. 扬州:扬州大学,2007.
- [9] 马彦男,贺鹏迦,马永生,等. 中国荷斯坦牛 FASN 基因部分序列 PCR-SSCP 多态性与泌乳性状的相关性[J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*,2013(12):1-6.
- [10] 印贤琴,周燕,张清. FSHR 基因多态性与卵巢早衰和多囊卵巢综合征的关系[J]. *广东医学*,2016(1):113-117.
- [11] Henriksen L S, Hagen C P, Assens M, et al. Genetic variations in FSH action affect sex hormone levels and breast tissue size in infant girls: a pilot study[J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*,2016,101(8):3191-3198.
- [12] Mathilde M, Julie G, Louis G, et al. In Vitro Effects of the Endocrine Disruptor p,p'DDT on Human Follicle Receptor[J]. *Environmental Health Perspectives*,2016,124(7):991-999.
- [13] 陶新,邓波,门小明,等. 不同猪种肉质相关基因 Hal,RN 和 FTO 的多态性研究[J]. *畜牧兽医学报*,2012,43(5):676-683.
- [14] 刘卫东,吴常信,陶立. 中国地方品种准猪 FSH β 亚基,ESR 和 HAL 基因的多态性及其产仔效应分析[J]. *中国畜牧杂志*,2006,42(15):4-7.
- [15] Bodh D, Singh K, Gopinathan A, et al. Comparative evaluation of halothane and isoflurane maintenance anesthesia in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) [J]. *Journal of Applied Animal Research*,2013,45(3):1249-1253.
- [16] Wang H, Jiang L, Wang W, et al. Associations between variants of the HAL gene and milk production traits in Chinese Holstein cows [J]. *BMC Genetics*,2014,15(1):125-131.
- [17] Jiang L, Liu J, Sun D, et al. Genome wide association studies for milk production traits in Chinese Holstein population[J]. *Plos One*, 2010,5(10):e13661.
- [18] 齐超,谢岩,吴晓平,等. 基于全基因组信息鉴定中国荷斯坦牛产奶性状基因及功能注释[J]. *畜牧兽医学报*,2012(6):872-877.
- [19] 韩燕,王彬,焦李子,等. *znf804a* 基因遗传多态性在精神分裂症患者核心家系中的传递不平衡检验[J]. *西安交通大学学报*,2012(2):5-11.
- [20] Walters J T R, Corvin A, Owen M J, et al. Psychosis susceptibility gene ZNF804A and cognitive performance in schizophrenia[J]. *Archives of General Psychiatry*, 2010, 67(7): 692-700.
- [21] Kuswanto C N, Woon P S, Zheng X B, et al. Genome-wide supported psychosis risk variant in ZNF804A gene and impact on cortico - limbic WM integrity in schizophrenia[J]. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*,2012,159(3):255-262.
- [22] Guipponi M, Scott H S, Kudoh J, et al. Identification and characterization of a novel cyclic nucleotide phosphodiesterase gene (PDE9A) that maps to 21q22. 3: alternative splicing of mRNA transcripts, genomic structure and sequence[J]. *Human Genetics*, 1998, 103(4): 386-392.
- [23] Almeida C B, Traina F, Lanaro C, et al. High expression of the cGMP-specific phosphodiesterase, PDE9A, in sickle cell disease (SCD) and the effects of its inhibition in erythroid cells and SCD neutrophils[J]. *British Journal of Haematology*,2008,142(5):836-844.
- [24] Wang P, Wu P, Egan R W, et al. Identification and characterization of a new human type 9 cGMP-specific phosphodiesterase splice variant (PDE9A5): differential tissue distribution and subcellular localization of PDE9A variants[J]. *Gene*,2003,314:15-27.
- [25] 谢岩. 奶牛产奶性状候选基因 EEF1D 和 PDE9A 功能验证[D]. 北

- 京:中国农业大学,2013.
- [26] Yang S H, Bi X J, Xie Y, et al. Validation of PDE9A Gene Identified in GWAS Showing Strong Association with Milk Production Traits in Chinese Holstein[J].International Journal of Molecular Sciences,2015,16(11):26530-26542.
- [27] 单丽红,徐伟珍,毛伟敏. NIPBL 调控肿瘤细胞分化的可能机制研究[J].医学研究杂志,2013,42(12):133-135.
- [28] Nizon M, Henry M, Michot C, et al. A series of 38 novel germline and somatic mutations of NIPBL, in Cornelia de Lange syndrome [J].Clinical Genetics,2015,89(5):584-589.
- [29] Kim E S, Kirkpatrick B W. Linkage disequilibrium in the North American Holstein population[J].Animal Genetics,2009,40(3):279-288.
- [30] Calafell F, Grigorenko E L, Chikarian A A, et al. Haplotype evolution and linkage disequilibrium: a simulation study[J].Human Heredity,2000,51(1-2):85-96.
- [31] 何峰,孙东晓,俞英,等. 荷斯坦奶牛 STAT5A 基因的 SNPs 检测及其与产奶性状的关联分析[J]. 畜牧兽医学报,2007,38(4):326-331.