

网络出版时间:2016-06-08 16:20 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2016.07.001
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20160608.1620.002.html

牛 *PRKAA2* 基因 SNP 检测及与其生长和肉质性状的关联分析

田万强^{1,2},梅楚刚²,付常振²,辛亚平²,
张松²,王国庆²,咎林森^{2,3}

(1 杨凌职业技术学院 动物工程分院,陕西 杨凌 712100;2 西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100;
3 国家肉牛改良中心,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】研究秦川牛、南阳牛、鲁西牛和安格斯牛共 630 头个体的单磷酸腺苷激活的蛋白激酶 $\alpha 2$ 亚基 (AMPK $\alpha 2$) 基因 *PRKAA2* 的多态性,并分析其多态性与 200 头秦川牛生长及肉质性状的关联性。【方法】利用 PCR-SSCP、DNA 测序、飞行质谱 (MALDI-TOF) 等技术,分析检测 4 个品种牛 *PRKAA2* 基因 6 个外显子的单核苷酸多态性 (SNPs);采用生物信息学方法结合统计分析软件,分析秦川牛各多态位点的遗传变异特性与体尺及肉质性状的关联性。【结果】*PRKAA2* 基因第 2、4、6、7、8、9 外显子中,只检测到第 4 外显子 27 G>C 和 60 T>C 2 个突变位点;关联分析表明,27 G>C 位点与秦川牛背膘厚和眼肌面积显著关联 ($P<0.05$);60 T>C 位点与秦川牛体斜长极显著相关 ($P<0.01$),与体高、尻长、腰角宽、坐骨端宽、眼肌面积显著相关 ($P<0.05$)。【结论】*PRKAA2* 基因对秦川牛部分体尺及肉质性状有极显著或显著影响,可作为秦川肉牛新品种早期选择的候选基因和分子辅助标记。

[关键词] 秦川牛; *PRKAA2* 基因; 单核苷酸多态性 (SNPs); 体尺性状; 肉质性状

[中图分类号] S823.9⁺2

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2016)07-0001-09

SNPs of bovine *PRKAA2* gene and its association with growth and meat quality traits

TIAN Wanqiang^{1,2}, MEI Chugang², FU Changzhen², XIN Yaping²,
ZHANG Song², WANG Guoqing², ZAN Linsen^{2,3}

(1 Animal Engineering Department, Yangling Vocational & Technical College, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 National Beef Cattle Improvement Center, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】Polymorphism of *PRKAA2* gene on 630 individuals from four cattle breeds (Qinchuan, Nanyang, Luxi and Angus) was detected to analyze its genetic structures and varieties. The association of different genotypes with growth and meat quality traits of 200 Qinchuan cattle was also analyzed. 【Method】SNPs located in exon 2, exon 4, exon 6, exon 7, exon 8 and exon 9 were detected in *PRKAA2* gene of four cattle breeds by PCR-SSCP, random DNA sequencing method and MALDI-TOF technology. Genetic variation of SNPs and the association of different genotypes with growth and meat quality traits of Qinchuan cattle were also analyzed by bioinformatics method and SPSS software. 【Result】Two

[收稿日期] 2014-12-05

[基金项目] 国家 863 计划项目 (2013AA102505); 国家自然科学基金项目 (31272411); 陕西省自然科学基金项目 (2007C127); 陕西省科学技术发展计划项目 (2011K01-09)

[作者简介] 田万强 (1969—), 男, 陕西扶风人, 副教授, 博士, 主要从事家畜遗传育种与繁殖研究。E-mail: twqiang2003@163.com

[通信作者] 咎林森 (1963—), 男, 陕西扶风人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种及生殖生理调控研究。
E-mail: zanlinsen@163.com

SNPs (27 G>C and 60 T>C) located in only exon 4 were detected in 6 exons of *PRKAA2* gene. The 27 G>C SNP was associated with back fat thickness (BF) and loin muscle area (LMA) ($P<0.05$) significantly. The 60 T>C SNP was associated with body length (BL) ($P<0.01$) extremely significantly, and with withers height (WH), rump length (RL), hip width (HW), pin bone width (PBW) and LMA ($P<0.05$) significantly. 【Conclusion】 *PRKAA2* gene had potential effects on growth and meat quality traits of Qinchuan cattle and could be used for candidate gene and marker-assisted selection (MAS) in early selection of new varieties of Qinchuan cattle.

Key words: Qinchuan cattle; *PRKAA2* gene; SNPs; growth traits; meat quality traits

在动物生产中,家畜自开始驯化就受到集中选择,特别是关于生长、发育、繁殖、行为和对疾病的抵抗力等性状^[1]。近年来,随着分子育种技术的成熟,标记辅助选择(Marker assisted selection, MAS)方法已成为育种工作者对家畜重要经济性状进行标记选择进而提高育种效率的有效途径^[2]。

哺乳动物单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)是一个异源三聚体蛋白质,其组成亚基有 α 、 β 、 γ 3 种^[3-6]。已知的 AMPK 亚型包括 $\alpha1$ 、 $\alpha2$ 、 $\beta1$ 、 $\beta2$ 、 $\gamma1$ 、 $\gamma2$ 和 $\gamma3$ 共 7 种。从理论上讲, α 、 β 、 γ 的不同异构型可形成多达 12 种组合^[5-8]。AMPK $\alpha2$ 亚单位的编码基因为 *PRKAA2*,该基因主要在心脏、骨骼肌和肝脏中表达^[9],且大部分位于细胞核内^[10]。定位于核内的 *PRKAA2* 可以通过部分磷酸化转录因子来达到调节基因表达的作用^[11-12]。

AMPK $\alpha2$ 是参与 AMPK 激活的重要组成部分,是脂联素抑制肝脏葡萄糖输出的关键性靶点^[13],*PRKAA2* 基因的缺陷或表达水平降低将直接影响 AMPK 的作用,从而导致高糖血症及糖尿病的发生。Viollet 等^[14]研究发现,*PRKAA2* 基因敲除小鼠(*PRKAA2*^{-/-})表现为明显的高糖血症和胰岛素抵抗。Beall 等^[15]认为活化的 AMPK $\alpha2$ 亚基可能通过上调线粒体解偶联蛋白 2(UCP2)的浓度来维持胰岛 β 细胞对葡萄糖的敏感性。Foretz 等^[16]和 Viana 等^[17]研究发现,在正常小鼠的肝脏中短期表达活化形式的 AMPK $\alpha2$ 可以引起轻微的低糖血症,而在糖尿病小鼠模型中同样的处理可使原有的高糖血症有所缓解。

牛 *PRKAA2* 基因(GenBank 登录号: AC_000160)位于 20 号染色体,基因全长 71 908 bp,包含 8 个内含子和 9 个外显子。目前,对该基因多态性的研究多集中在人上。Horikoshi 等^[18]研究发现,*PRKAA2* 多态性与日本人群胰岛素抵抗和 II 型糖尿病有关。刘靖星^[19]以甘肃兰州人群为对象,研究了 *PRKAA2* 基因多态性与 II 型糖尿病及脂联

素、抵抗素(Resistin)的相关性,发现病例组和对照组中均存在 AMPK-rs2796516 位点 G/A 基因突变,II 型糖尿病患者 AMPK-rs2796516 G/A 基因多态性与胰岛素抵抗和血脂代谢明显相关($P<0.05$)。宋娇等^[20]在肉鸡上的研究发现,*PRKAA2* 基因表达水平与肌内脂肪(IMF)沉积显著相关($P<0.05$),1 日龄 AA 鸡 *PRKAA2* 基因表达水平显著高于 56 日龄($P<0.05$),IMF 含量 1 日龄显著高于 56 日龄($P<0.05$),*PRKAA2* 基因表达与 IMF 含量呈正相关。高丽南^[21]研究发现,西杂牛、利杂牛、夏杂牛 *PRKAA2* 基因第 4 外显子 55 513 bp 处均发生了 C>T 突变,在第 6 外显子 59 233 bp 处发生了 A>G 突变,但关联分析结果发现,这 3 种肉牛 *PRKAA2* 基因第 4 外显子和第 6 外显子突变位点不同基因型与肉牛个体脂肪含量、体质量、屠宰率等性状均无显著差异($P>0.05$)。

本试验以秦川牛、南阳牛、鲁西牛和安格斯牛等 4 个牛品种作为研究对象,探究其 *PRKAA2* 基因单核苷酸多态性(SNP),并分析其多态性与秦川牛体尺和肉质性状是否相关,以期寻求该基因与秦川牛体尺和肉质性状密切相关的遗传标记位点,为肉牛新品种(系)的培育提供理论依据和技术方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

蛋白酶 K 购自德国默克公司;Tris 饱和酚、ED-TA、Tris、硼酸、甲醛、丙烯酰胺(Acrylamide)、N、N'-亚甲基双丙烯酰胺(Bis)、二甲基亚砜(DMSO)、N,N,N,N'-四甲基乙二胺(TEMED)、含染料 Reaction MIX、DNA Marker、琼脂糖等,均购自天根生化科技(北京)有限公司;十二烷基磺酸钠(SDS)和去离子甲酰胺,购自北京鼎国生物技术有限公司。

PCR 仪、凝胶成像系统(Bio-Rad 公司,美国),冷冻高速离心机(CENTURION,英国),电泳槽、稳流稳压电泳仪、脱色摇床(六一仪器,北京),Aquila

Vet CE0344 型兽用 B 超仪(Pie 公司,荷兰)。

1.2 牛血样的采集及其体尺和肉质性状的测量

从 4 个牛品种群体中随机抽取个体,每头牛颈静脉采血 10 mL,ACD 抗凝($V(\text{血液}):V(\text{ACD})=6:1$),轻微颠倒混匀, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。共采取血液样品 630 份,其中秦川牛 364 份,血样采自陕西秦川牛业有限公司杨凌秦川肉牛良种繁育中心;南阳牛 84 份,血样采自河南省南阳市南阳黄牛繁殖场;鲁西牛 102 份,血样采自山东鲁西牛保种场;安格斯牛 80 份,血样采自陕西秦宝牧业发展有限公司眉县繁育场。从秦川牛中选取饲养条件相同的 24~30 月龄健康育肥阉牛 200 头,测量其 8 项体尺指标(体斜长、体高、腰高、尻长、腰角宽、胸深、胸围和坐骨端宽),并采用 B 超仪测定 3 项肉质指标(背膘厚、眼肌

面积和肌内脂肪)。

1.3 血液 DNA 的提取及检测

采用酚-氯仿法^[22] 从血样中提取牛基因组 DNA,用质量分数 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。DNA 无降解的用紫外分光光度计测定其质量浓度,稀释至 $50\text{ ng}/\mu\text{L}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 牛 *PRKAA2* 基因外显子的多态性检测

1.4.1 引物的设计与合成 通过查阅 NCBI 上提供的牛 *PRKAA2* 基因序列(GenBank 登录号:AC_000160),利用 Primer 5.0 软件分别针对外显子 2、4、6、7、8、9 设计 P1、P2、P3、P4、P5、P6 共 6 对特异性引物(见表 1),交由上海(生工)生物工程股份有限公司合成。

表 1 牛 *PRKAA2* 基因外显子的引物设计

Table 1 Primers of *PRKAA2* gene in cattle

引物 Primer	序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	大小/bp Size	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ T_{m}	扩增区域 Location
P1	F:GGTTACAGAGGAAGGAAGCA R:CAGGTGCAGAAGTACTTACAG	239	58.5	外显子 2 Exon 2
P2	F:ACTTGCTATGTAGATGTCCC R:CAGCTAGTACACTTCTGAAC	239	56.3	外显子 4 Exon 4
P3	F:CATTTGAGTCTGCACTGTGT R:GCCTAACATAAAGCAAGCATTC	415	60.0	外显子 6 Exon 6
P4	F:CTTGCCAAAGCATGTTCTTAC R:GTCCCCAACATCAACAGTTC	784	58.5	外显子 7 Exon 7
P5	F:TTTGTTCTCTACCCCACTCCT R:CCACCACGTCTTTGAGATG	339	58.5	外显子 8 Exon 8
P6	F:TGGGAAACTGGGAATCAGCAT R:CCACCACCTCATCTGAAATG	438	58.1	外显子 9 Exon 9

1.4.2 PCR 扩增 反应由 15 μL 体系组成:其中 dNTPs(10 mmol/L)0.5 μL 、*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/ μL)0.15 μL 、 $10\times$ Buffer(含 15 mmol/L Mg^{2+})的 MIX 6.85 μL 、5 $\mu\text{mol/L}$ 混合引物(上游引物和下游引物均为 10 pmol/ μL) 各 0.3 μL 、模板 DNA (50 ng/ μL) 1.0 μL 、 ddH_2O 5.9 μL 。PCR 反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,退火 30 s(退火温度见表 1),72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 35 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物用质量分数 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.3 PCR 扩增产物的回收及纯化 使用 DNA 回收试剂盒进行 PCR 扩增产物回收纯化,按照试剂盒具体说明进行操作,纯化产物送交上海(生工)生物工程股份有限公司测序。

1.4.4 PCR-SSCP 分析 取 PCR 产物 5 μL 与 10 μL 变性缓冲液(按照去离子甲酰胺 9.9 mL,5 mol/L EDTA 100 μL ,二甲苯青 0.012 5 g,溴酚蓝

0.012 5 g 配制,调 pH 为 8.0)混合于 PCR 反应管,98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,迅速将管插入冰水混合物中冰浴 5~10 min,然后加样于 12%非变性聚丙烯酰胺凝胶中,先进行 15 min 250 V 高压电泳,再 115 V 电泳 16 h。电泳结束后,将凝胶取出,用超纯水漂洗 2~3 次,然后加 0.1%硝酸银溶液浸没凝胶,在脱色摇床上染色 10~15 min;弃染色液,超纯水漂洗 2~3 次,加少量 20 g/L NaOH 与甲醛混合显色液(500 mL 20 g/L NaOH 溶液和 5 mL 甲醛)预显色 30 s,弃显色液,然后再加新鲜显色液至凝胶浸没,摇动直至显现清晰条带为止。

1.4.5 飞行质谱(MALDI-TOF) 选取质量和质量浓度(20~50 ng/ μL)均符合 MALDI-TOF 飞行质谱要求的 DNA,与针对待测位点设计的引物(每个待测位点处设计 3 条特异性引物,其中 2 条用于 PCR 扩增,1 条用于延伸)一起,送上海(生工)生物工程股份有限公司进行 MALDI-TOF 分析。

1.5 数据统计分析

运用遗传多样性分析软件(Genpop 32)统计各突变位点的等位基因频率和基因型频率,同时计算多态信息含量(PIC)、有效等位基因数(N_e)、遗传杂合度(H_e)和遗传纯合度(H_o)^[23-24]。其中, $PIC>0.5$ 说明该突变位点处于高度多态; $0.25<PIC\leq 0.5$ 位点为中度多态; $PIC\leq 0.25$ 位点为低度多态。运用 SPSS 16.0 软件对不同品种基因型分布进行 χ^2 检验,并用最小二乘法拟合线性模型,对 PRKAA2 基因不同基因型与体尺及肉用性状间进行关联性分析,采用 $Y_{ij}=\mu+A_i+G_j+e_{ij}$ 回归模型,其中 Y_{ij} 为个体表型值, μ 是群体均值, A_i 为测量年龄效

应, G_j 为标记基因型效应, e_{ij} 为随机误差。

2 结果与分析

2.1 PRKAA2 基因外显子 2、6、7、8 多态位点的检测

2.1.1 PRKAA2 基因外显子 2、6、7、8 PCR 扩增结果 对 4 品种牛 PRKAA2 基因的外显子 2、6、7、8 进行 PCR 扩增,所得产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,扩增片段长度与预期扩增产物片段长度一致,条带清晰特异性好(以秦川牛为例的结果见图 1),可直接进行 SSCP 检测。

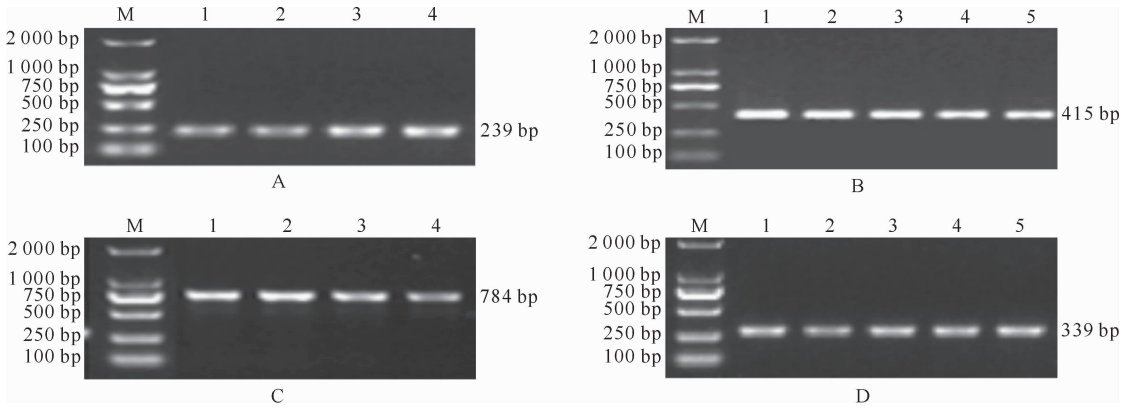


图 1 秦川牛 PRKAA2 基因外显子 2、6、7、8 的 PCR 扩增结果

A. 外显子 2; B. 外显子 6; C. 外显子 7; D. 外显子 8; M. DNA Marker DL 2000; 1~5. PCR 扩增产物
Fig.1 Amplified products of PRKAA2 exon 2,exon 6,exon 7 and exon 8 in Qinchuan cattle
A. Exon 2; B. Exon 6; C. Exon 7; D. Exon 8; M. DNA Marker DL 2000; 1-5. Products of PCR

2.1.2 PRKAA2 基因外显子 2、6、7、8 的 PCR-SSCP 分析 4 品种牛 PRKAA2 基因外显子 2、6、7、8

的 PCR 扩增产物经 SSCP 检测,结果(以秦川牛为例的结果见图 2)在各牛群中均未发现多态。

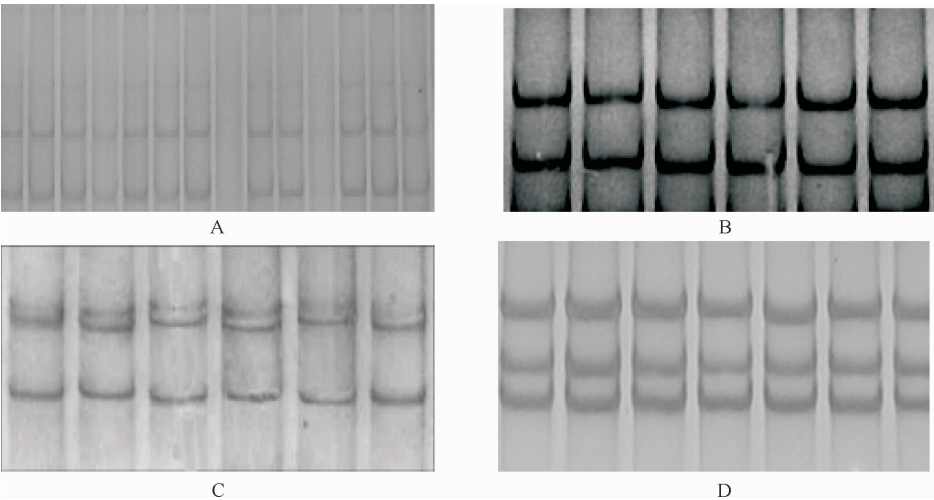


图 2 秦川牛 PRKAA2 基因外显子 2、6、7、8 的 PCR-SSCP 检测结果

A. 外显子 2; B. 外显子 6; C. 外显子 7; D. 外显子 8
Fig.2 PCR-SSCP detection of PRKAA2 exon 2,exon 6,exon 7 and exon 8 in Qinchuan cattle
A. Exon 2; B. Exon 6; C. Exon 7; D. Exon 8

2.2 *PRKAA2* 基因外显子 4、9 的多态位点检测

2.2.1 *PRKAA2* 基因外显子 4、9 的 PCR 扩增及突变位点检测 秦川牛、南阳牛、鲁西牛和安格斯牛 4 个群体中每个群体随机挑选 10 头个体的 DNA 样品,分别对其 *PRKAA2* 基因的外显子 4、9 进行 PCR 扩增,所得产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,PCR 扩增片段长度与预期扩增产物片段长度一致,条带清晰、特异性好(以秦川牛为例的结果见图 3)。扩增产物经胶回收、纯化后,送上海(生工)生物工程有限公司测序。测序结果用 DNA STAR 比

对,在 *PRKAA2* 基因外显子 4 上发现了 2 个潜在的多态位点,分别是第 27 位颠换 G>C 和第 60 位转换 T>C。将这 2 个多态位点分别命名为 27 G>C、60 T>C。而在第 9 外显子区域未发现突变位点。经分析,外显子 4 上的 27 G>C、60 T>C 突变均未引起氨基酸的变化,属同义突变。27 G>C 位点测序得到 GG、GC 2 种基因型(以秦川牛为例的结果见图 4),60 T>C 位点测序得到 TT、TC 2 种基因型(以秦川牛为例的结果见图 5)。

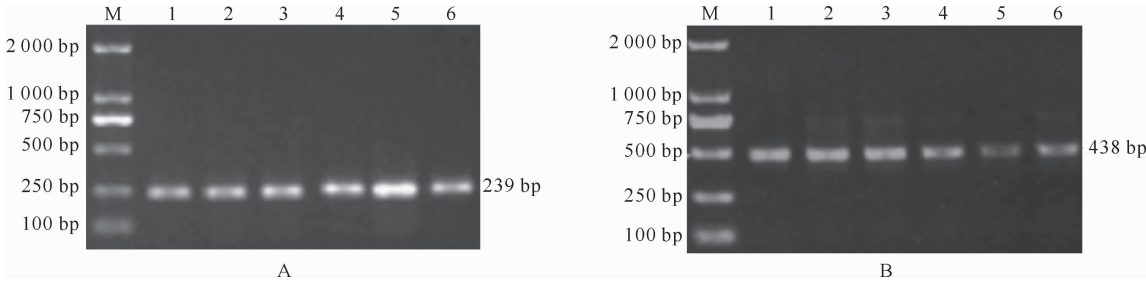


图 3 秦川牛 *PRKAA2* 外显子 4、9 PCR 扩增结果
A. 外显子 4; B. 外显子 9; M. DNA Marker DL 2000; 1~6. PCR 扩增产物
Fig. 3 Amplified products of *PRKAA2* exon 4 and exon 9 in Qinchuan cattle
A. Exon 4; B. Exon 9; M. DNA Marker DL 2000; 1—6. Products of PCR

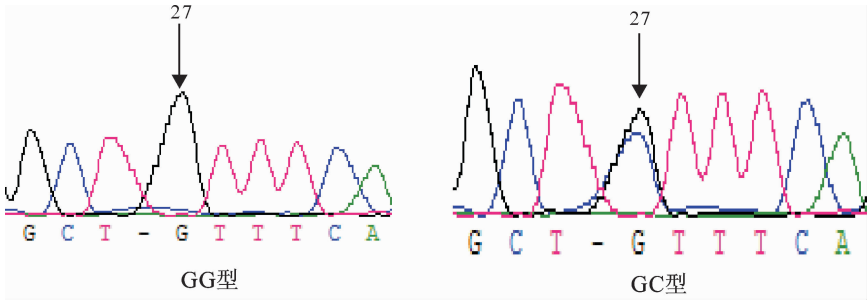


图 4 秦川牛 *PRKAA2* 基因外显子 4 第 27 位点 GG、GC 基因型测序图(部分结果)

Fig. 4 Sequencing results of genotype GG and GC in *PRKAA2*-exon 4 at the 27th locus in Qinchuan cattle(Partial result)

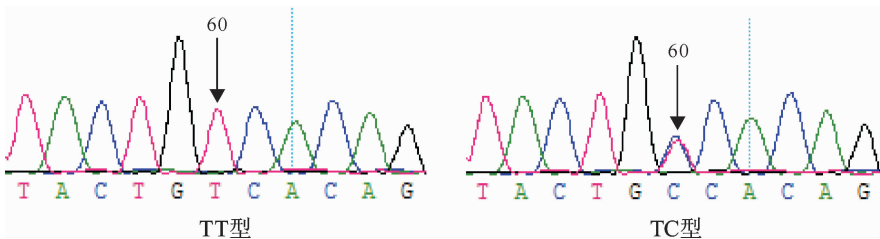


图 5 秦川牛 *PRKAA2* 基因外显子 4 第 60 位点 TT、TC 基因型测序图(部分结果)

Fig. 5 Sequencing results of genotype TT and TC in *PRKAA2*-exon 4 at the 60th site in Qinchuan cattle(Partial result)

2.2.2 *PRKAA2* 基因外显子 4 多态位点飞行质谱分型检测及验证 因 *PRKAA2* 基因第 4 外显子 2 个潜在突变位点距离太近,依靠 PCR-SSCP 等常规电泳试验技术难以分型,故采用飞行质谱技术对这 2 个位点进行进一步的基因分型检测。

(1)*PRKAA2* 基因外显子 4 多态位点飞行质谱检测引物设计。对第 4 外显子 27 G>C 和 60 T>C 突变位点分别设计特异性引物(见表 2)。
(2)质谱分型验证及检测结果。飞行质谱结果除检测到 27 G>C 和 60 T>C 突变位点通过测序

确定的 2 种基因型外,还检测到 2 个位点测序没有发现的第 3 种基因型,即 CC 基因型,因此,飞行质谱法得到 27 G>C 和 60 T>C 2 个位点全部基因型(图 6)。

表 2 牛 PRKAA2 基因外显子 4 多态位点飞行质谱引物设计

Table 2 MALDI-TOF primer sequences of PRKAA2 gene exon 4 in cattle

引物名称 Primer	作用 Function	序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	引物长度/bp Size	针对位点 Locus
A2-1_W1_20F	扩增 Amplification	ACGTTGGATGGGTTTCAGGTCTCGATGAAC	30	27 G>C
A2-1_W1_20R		ACGTTGGATGGTTGAAGAGATGGAAGCTCG	30	
A2-1_W1_20U	延伸 Extension	GACTGCAGACAGAATCTGCTGAAA	24	60 T>C
A2-2_W1_16F	扩增 Amplification	ACGTTGGATGGTTGAAGAGATGGAAGCTCG	30	
A2-2_W1_16R		ACGTTGGATGGGTTTCAGGTCTCGATGAAC	30	
A2-2_W1_16U	延伸 Extension	TTATGTCTGCCGTGGATTACTG	22	

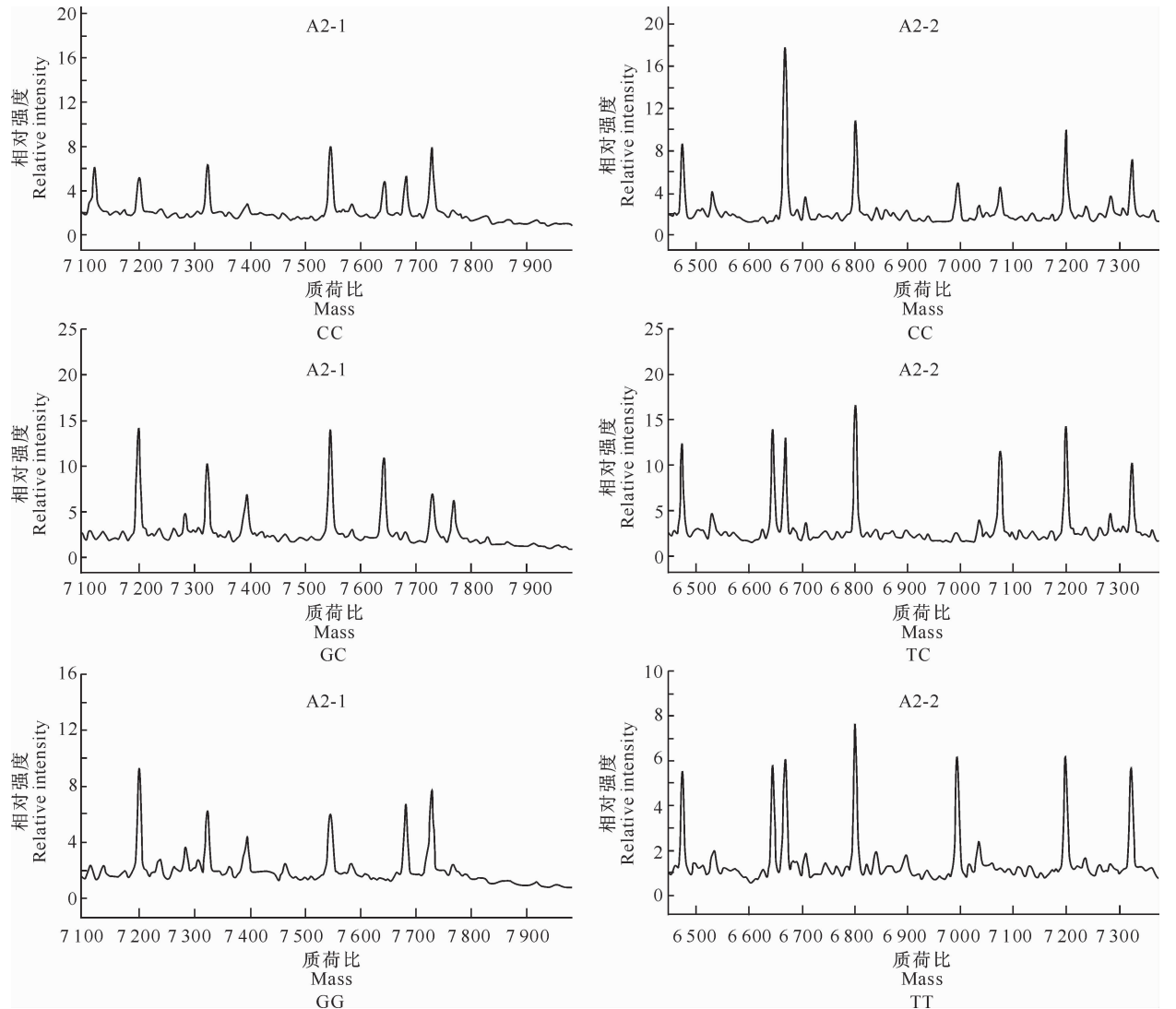


图 6 秦川牛 PRKAA2 基因第 4 外显子多态位点飞行质谱图

A2-1 为 27 G>C 位点;A2-2 为 60 T>C 位点

Fig. 6 MALDI-TOF maps of SNPs of Qinchuan cattle PRKAA2 gene exon 4

A2-1 is 27 G>C locus and A2-2 is 60 T>C locus

2.3 PRKAA2 基因外显子 4 SNP 位点遗传多态性分析

2.3.1 等位基因频率、基因型频率及 H-W 检验 PRKAA2 基因第 4 外显子 2 个 SNPs 的基因型频

率和等位基因频率统计结果见表 3 和表 4。从表 3 和表 4 可以看出,2 个 SNPs 在 4 个牛群体中均以普通纯合基因型频率最高,其次为杂合基因型,突变型最低,说明这 2 个位点普通纯合型为优势基因型。

表 3 *PRKAA2* 基因第 4 外显子 27 G>C SNPs 位点基因型及等位基因频率

Table 3 Genotypic and allelic frequencies for 27 G>C locus in exon 4 of *PRKAA2* gene

品种 Breeds	个体数 Number	基因型频率 Genotypic frequency			等位基因频率 Allelic frequency	
		GG	GC	CC	G	C
秦川牛 QC	364	0.615 4(224)	0.329 7(120)	0.054 9(20)	0.780 2	0.219 8
南阳牛 NY	84	0.523 8(44)	0.404 8(34)	0.071 4(6)	0.726 2	0.273 8
鲁西牛 LX	102	0.656 9(67)	0.294 1(30)	0.049 0(5)	0.803 9	0.196 1
安格斯 AN	80	0.650 0(52)	0.275 0(22)	0.075 0(6)	0.787 5	0.212 5
总计 Total	630	0.614 3(387)	0.327 0(206)	0.058 7(37)	0.777 8	0.222 2

注:括号中的数据为观测个体数。表 4 同。
Note:Data in brackets are the number of observations. The same for Table 4.

表 4 *PRKAA2* 基因第 4 外显子 60 T>C SNPs 位点基因型及等位基因频率

Table 4 Genotypic and allelic frequencies for 60 T>C locus in exon 4 of *PRKAA2* gene

品种 Breeds	个体数 Number	基因型频率 Genotypic frequency			等位基因频率 Allelic frequency	
		TT	TC	CC	T	C
秦川牛 QC	364	0.607 1(221)	0.337 9(123)	0.054 9(20)	0.776 1	0.223 9
南阳牛 NY	84	0.631 0(53)	0.333 3(28)	0.035 7(3)	0.797 6	0.202 4
鲁西牛 LX	102	0.647 1(66)	0.313 7(32)	0.039 2(4)	0.803 9	0.196 1
安格斯 AN	80	0.650 0(52)	0.325 0(26)	0.025 0(2)	0.812 5	0.187 5
总计 Total	630	0.793 5(392)	0.147 8(209)	0.058 7 (29)	0.867 4	0.132 6

2.3.2 2 个 SNPs 位点在群体中的遗传特性分析
PRKAA2 基因外显子 4 中 2 个 SNPs 在群体中的纯合度、杂合度、有效等位基因数、*PIC* 分析统计结果见表 5。由表 5 可以看出,试验牛群在 2 个位点的群体基因杂合度在 0.304 7~0.397 7,有效等位基因数在 1.438 2~1.660 2, *PIC* 为 0.258 3~0.318 6,均介于 0.25~0.50,表明 4 个牛群体在这

2 个位点均处于中度多态。经 χ^2 检验,秦川牛、南阳牛、鲁西牛、安格斯牛在 27 G>C 和 60 T>C 2 个位点的 χ^2 值均小于 5.991,说明 4 个牛群体在这 2 个位点均处于 H-W 平衡状态($P>0.05$)。从总群体来看,4 个牛群体在这 2 个位点均处于 H-W 平衡状态。

表 5 *PRKAA2* 基因外显子 4 中 2 个 SNPs 位点在各群体中的遗传特性

Table 5 Genetic indices of 2 SNPs for *PRKAA2* gene exon 4 in every population

多态位点 SNP	品种 Breed	多态信息含量 <i>PIC</i>	杂合度 <i>He</i>	有效等位基因数 <i>Ne</i>	χ^2
27 G>C	秦川牛 QC	0.284 1	0.343 0	1.522 0	0.523 2
	南阳牛 NY	0.318 6	0.397 7	1.660 2	0.026 7
	鲁西牛 LX	0.265 6	0.315 3	1.460 4	0.458 9
	安格斯 AN	0.278 7	0.334 7	1.503 1	2.544 4
	群体 Total	0.285 9	0.345 7	1.528 3	1.842 6
60 T>C	秦川牛 QC	0.287 1	0.347 5	1.532 7	0.279 3
	南阳牛 NY	0.270 7	0.322 8	1.476 8	0.006 4
	鲁西牛 LX	0.265 6	0.315 3	1.460 4	0.051 7
	安格斯 AN	0.258 3	0.304 7	1.438 2	0.088 5
	群体 Total	0.278 2	0.334 0	1.501 5	0.028 7

2.4 秦川牛 *PRKAA2* 基因外显子 4 多态性与体尺和肉质性状的关联分析

2.4.1 与体尺性状的关联分析 考虑场地、年龄和基因型的效应,利用 SPSS 软件的 GLM 模型分析秦川牛 *PRKAA2* 基因多态性与其体尺性状的关联性。结果(表 6)显示,*PRKAA2* 基因第 4 外显子 27 G>C 多态位点与秦川牛 8 项体尺性状指标未达到显著相关($P>0.05$)。60 T>C 多态位点与秦川

牛体斜长极显著相关($P<0.01$),与体高、尻长、腰角宽、坐骨端宽显著相关($P<0.05$)。具体表现为体斜长性状上,CC 基因型个体极显著高于 TC 和 TT 基因型个体($P<0.01$),TC、TT 基因型个体之间差异不显著($P>0.05$);在尻长、腰角宽、坐骨端宽 3 项体尺性状指标上,均是 CC 基因型个体显著高于 TC 和 TT 基因型个体($P<0.05$),TC 与 TT 基因型个体之间差异不显著。

表 6 *PRKAA2* 基因外显子 4 中 2 个 SNPs 位点与秦川牛体尺性状的关联性

Table 6 Association of 2 SNPs locus for exon 4 of <i>PRKAA2</i> gene with growth traits in Qinchuan cattle cm					
多态位点 SNP	基因型 Genotypes	体斜长 BL	体高 WH	腰高 HH	尻长 RL
27 G>C	CC(<i>n</i> =10)	130.700±3.904	118.000±2.857	120.300±2.279	39.400±1.653
	GC(<i>n</i> =60)	127.267±1.594	116.500±1.166	119.767±0.931	39.200±0.675
	GG(<i>n</i> =112)	126.223±1.167	117.089±0.854	121.277±0.681	39.589±0.494
60 T>C	CC(<i>n</i> =10)	136.800±3.776 A	123.300±2.771 a	124.700±2.257	43.000±1.606 a
	TC(<i>n</i> =58)	126.638±1.568 B	117.052±1.151 b	120.862±0.937	39.517±0.667 b
	TT(<i>n</i> =114)	126.026±1.118 B	116.333±0.821 b	120.307±0.669	39.105±0.476 b
多态位点 SNP	基因型 Genotypes	腰角宽 HW	胸深 CD	胸围 HG	坐骨端宽 PBW
27 G>C	CC(<i>n</i> =10)	37.000±1.956	57.700±2.295	155.200±8.184	18.800±1.140
	GC(<i>n</i> =60)	36.167±0.799	56.300±0.937	156.367±3.341	17.933±0.465
	GG(<i>n</i> =112)	36.589±0.585	56.045±0.686	155.804±2.445	18.054±0.341
60 T>C	CC(<i>n</i> =10)	40.800±1.900 a	58.100±2.292	163.400±8.140	20.800±1.102 a
	TC(<i>n</i> =58)	36.345±0.789 b	56.207±0.952	156.379±3.380	17.759±0.457 b
	TT(<i>n</i> =114)	36.158±0.563 b	56.061±0.679	155.088±2.411	17.965±0.326 b

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下表同。
Note:Data with a different superscript capital letters in one column differ significantly at the level of 0.01,small letters at the level of 0.05.
The following table is same.

2.4.2 与肉质性状的关联分析 利用 SPSS 软件的 GLM 模型分析秦川牛 *PRKAA2* 基因多态性与肉质性状的关联性,结果(表 7)显示,*PRKAA2* 基因外显子 4 上 27 G>C 与背膘厚和眼肌面积 2 项指

标显著相关,GG、GC 基因型显著大于 CC 基因型($P<0.05$);60 T>C 位点与秦川牛眼肌面积显著相关,CC 基因型显著大于 TC 基因型($P<0.05$),CC 与 TT、TT 与 TC 基因型之间差异不显著($P>0.05$)。

表 7 *PRKAA2* 基因外显子 4 中 2 个多态位点与秦川牛肉质性状的关联性

Table 7 Association of 2 SNP locus for exon 4 of <i>PRKAA2</i> gene with meat quality traits in Qinchuan cattle				
多态位点 SNP	基因型 Genotypes	背膘厚/cm Backfat thickness	眼肌面积/cm ² Loin muscle area	肌内脂肪含量/% Intramuscular fat content
27 G>C	CC(<i>n</i> =10)	0.676±0.101 a	43.274±6.158 a	7.928±0.409
	GC(<i>n</i> =60)	0.858±0.041 b	48.448±2.514 b	7.499±0.167
	GG(<i>n</i> =112)	0.852±0.030 b	48.446±1.480 b	7.516±0.122
60 T>C	CC(<i>n</i> =10)	0.822±0.103	52.244±6.112 a	7.604±0.410
	TC(<i>n</i> =58)	0.849±0.043	45.361±2.538 b	7.460±0.170
	TT(<i>n</i> =114)	0.844±0.030	49.230±1.810 ab	7.564±0.122

3 讨论与结论

在真核生物中,AMPK 是一个重要的蛋白激酶,是哺乳动物激酶级联反应的核心组成部分,主要协调能量代谢的需要,通过阻断三磷酸腺苷(ATP)消耗和促进 ATP 再生的生物合成途径来防止哺乳动物细胞代谢应激,故有“细胞能量调节器”之称^[4-7,25]。
本研究在秦川牛、南阳牛、鲁西牛和安格斯牛 4 个品种肉牛 *PRKAA2* 基因第 2、6、7、8、9 外显子未检测到突变位点,只在第 4 外显子中均发现了 27 G>C 和 60 T>C 2 个突变,且均未引起相应氨基酸的变化,属于同义突变。同义 SNP 是进化过程中对环境压力的适应和自然选择而形成的“密码子使用偏好”在基因组中的遗迹,有研究表明它能够通过影响翻译效率^[26]、mRNA 的稳定性^[27]和拼接控制

来调节机体生理活动^[28],或者由于密码子替换导致翻译速度发生改变,进而通过影响蛋白折叠的动力学控制使蛋白质无法完成正确的折叠^[29]。因此,同义突变从某种方面也能影响基因的表达和调节,进而影响个体表型性状。
在 4 个牛群体中,27 G>C、60 T>C 2 个突变位点均以普通纯合基因型频率最高,突变型频率最低,2 个位点的等位基因频率表现同一趋势,均是 G>C、T>C。对该基因的研究,单从检测得到的 SNP 数量与 Zhang 等^[30]的研究结果比较,本研究只在第 4 外显子检测到 2 个 SNPs,与 Zhang 等^[30]在 *PRKAA2* 基因扫描的外显子区域不同。
关联分析显示,27 G>C 位点与秦川牛背膘厚和眼肌面积显著关联($P<0.05$),60 T>C 位点与秦川牛体斜长极显著相关($P<0.01$),与体高、尻长、腰角宽、坐骨端宽、眼肌面积显著相关。本研究

的部分结果与 Lin 等^[31]在猪上得到的结果相一致,但与高丽南^[21]在牛上报道的结果有较大差异,这可能与试验牛品种差异有一定关系。

由本研究结果可知,*PRKAA2* 基因可作为秦川牛标记辅助育种的候选基因,为秦川肉牛应用生物技术育种提供了新的思路 and 手段。然而因牛屠宰成本太高,本研究分析的数据和肉质性状相对偏少,还有待进一步扩大样本数量对其他肉质性状进行分析,并在细胞水平更深层次研究该基因功能及其相关调控机理。

[参考文献]

[1] Andersson L,Georges M. Domestic animal genomics:deciphering the genetics of complex traits [J]. Nat Rev Genet,2004,5 (3):202-212.

[2] Wu X L,MacNeil M D,De S,et al. Evaluation of candidate gene effects for beef backfat via Bayesian model selection [J]. Genetica,2005,125(1):103-113.

[3] Hardie D G,Carling D. The AMP-activated protein kinase——fuel gauge of the mammalian cell [J]. Eur J Biochem,1997,246:259-273.

[4] Hardie D G,Salt1 P,Hawley S A,et al. AMP-aetivated proteinkinase:an ultrasensitive system for monitoring cellular energy change [J]. Biochem J,1999,338(3):717-722.

[5] Hardie D G,Carling D,Carlson M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily:metabolic sensors of the eukaryotic cell [J]. Annu Rev Biochem,1998,67:821-855.

[6] Hardie D G,Sakamoto K. AMPK;a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle [J]. Physiology (Betlesda),2006,21:48-60.

[7] Wadley G D,Lee-Young R S,Canny B J,et al. Effect of exercise intensity and hypoxia on skeletal muscle AMPK signaling and substrate metabolism in humans [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab,2006,290(4):E694-E702.

[8] Yu H,Fujii N,Hirshman M F,et al. Cloning and characterization of mouse 5'-AMP-activated protein kinase γ 3 subunit [J]. Am J Physiol Cell Physiol,2004,286:C283-C292

[9] Stapleton D,Mitchelhill K I,Gao G,et al. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily [J]. J Biol Chem,1996,271:611-614.

[10] Turnley A M,Stapleton D,Mann R J,et al. Cellular distribution and development expression of AMP-activated protein kinase isoform in mouse central nervous system [J]. J Neurochem,1999,72:1707-1716.

[11] Dyck J R,Gao G,Widmer J,et al. Regulation of 5'-AMP-activated protein kinase activity by the noneatalytic beta and gamma subunits [J]. J Biol Chem,1996,271:17798-17803.

[12] Dyck J R,Kudo N,Barr A J,et al. Phosphorylation control of cardiac acetyl-CoA carboxylase by cAMP-dependent protein kinase and 5'-AMP activated protein kinase [J]. Eur J Bio-

chem,1999,262(1):184-190.

[13] Andreelli F,Foretz M,Knauf C,et al. Liver adenosine monophosphate-activated kinase-alpha2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin [J]. Endocrinology,2006,147:2432-2441.

[14] Viollet B,Andreelli F,Jorgensen S B,et al. The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity [J]. Clin Invest,2003,111(1):91-98.

[15] Beall C,Piipari K,Al-Qassab H,et al. Loss of AMP-activated protein kinase alpha2 subunit in mouse beta-cells impairs glucose-stimulated insulin secretion and inhibits their sensitivity to hypoglycaemia [J]. Biochem J,2010,429(2):323-333.

[16] Foretz M,Ancellin N,Andreelli F,et al. Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver [J]. Diabetes,2005,54(5):1331-1339.

[17] Viana A Y,Sakoda H,Anai M,et al. Role of hepatic AMPK activation in glucose metabolism and dexamethasone-induced regulation of AMPK expression [J]. Diabetes Res Clin Pract,2006,73(2):135-142.

[18] Horikoshi M,Hara K,Ohashi J,et al. A polymorphism in the AMPK α 2 subunit gene is associated with insulin resistance and type 2 diabetes in the Japanese population [J]. Diabetes,2006,55(4):919-923.

[19] 刘靖星. AMPK α 2 基因多态性与 2 型糖尿病及脂联素、抵抗素相关性研究 [D]. 兰州:兰州大学,2009.

Liu J X. Correlation between AMPK α 2 subunit gene polymorphism and type2 diabetes mellitus, adiponectin and resistin [D]. Lanzhou:Lanzhou University,2009.

[20] 宋 娇,付睿琦,李颖颖,等. 肉鸡 *PRKAA* 基因表达与 *MyHC* 基因表达和肌肉脂肪沉积关系的研究 [J]. 中国畜牧杂志,2012,48(23):10-13.

Song J,Fu R Q,Li Y Y,et al. The study of relationship between *MyHC* gene expression and intramuscular fat deposition in broiler *PRKAA* gene expression [J]. Chinese Journal of Animal Science,2012,48(23):10-13.

[21] 高丽南. AMPK 对肉牛脂肪沉积的影响及其基因多态性研究 [D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2012.

Gao L N. Research on AMPK and its gene polymorphism influence on beef fat deposition [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University,2012.

[22] J 萨姆布鲁克,D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南(上、下册) [M]. 黄培堂译. 北京:科学出版社,2002.

Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual (Volume 1,2) [M]. Translated by Huang P T. Beijing:Science Press,2002.

[23] Nei M,Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,1979,76(10):5269-5273.

- (4):484-494.
- [2] Crispinil L, Deiana M, Loi A. The putative forkhead transcription factor *FOXL2* is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome [J]. *Nat Genet*, 2001 (27): 159-166.
 - [3] Pisarska M D, Barlow G, Kuo F T. Minireview: roles of the forkhead transcription factor *FOXL2* in granulosa cell biology and pathology [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(4): 1199-1208.
 - [4] Oshima Y, Naruse K, Nakamura Y, et al. Sox3: a transcription factor for *CYP19* expression in the frog *Rana rugosa* [J]. *Gene*, 2009, 445: 38-48.
 - [5] Cheng J C, Klausen C, Leung P C K. Overexpression of wild-type but not C134W mutant *FOXL2* enhances GnRH-induced cell apoptosis by increasing GnRH receptor expression in human granulosa cell tumors [J]. *PloS one*, 2013, 8(1): e55099.
 - [6] Rosario R, Blenkiron C, Shelling A N. Comparative study of microRNA regulation on *FOXL2* between adult-type and juvenile-type granulosa cell tumours *in vitro* [J]. *Gynecologic Oncology*, 2013, 129(1): 209-215.
 - [7] Nonis D, McTavish K J, Shimasaki S. Essential but differential role of *FOXL2*wt and *FOXL2* C134W in GDF-9 stimulation of follistatin transcription in co-operation with Smad3 in the human granulosa cell line COV434 [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 372(1/2): 42-48.
 - [8] Jonckheere N, Vincent A, Perrais M, et al. The human mucin MUC4 is transcriptionally regulated by caudal-related homeobox, hepatocyte nuclear factors, forkhead box A, and GATA endodermal transcription factors in epithelial cancer cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (31): 22638-22650.
 - [9] Loffler K A, Zarkower D, Koopman P. Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: *FOXL2* is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(7): 3237-3243.
 - [10] Uhlenhaut N H, Treier M. *FOXL2* function in ovarian development [J]. *Mol Genet Metab*, 2006; 88(3): 225-234.
 - [11] Takasawa K, Kashimada K, Pelosi E, et al. *FOXL2* transcriptionally represses *Sf1* expression by antagonizing *WT1* during ovarian development in mice [J]. *The FASEB Journal*, 2014, 28(5): 2020-2028.
 - [12] Yang W H, Gutierrez N M. Antagonistic regulation of *StAR* gene expression and synergistic regulation of *Mc2R* gene expression by *FOXL2* and *SF-1* [J]. *Biol Reprod*, 2009, 81: 343.
 - [13] Eozenou C, Carvalho A V, Forde N, et al. *FOXL2* is regulated during the bovine estrous cycle and its expression in the endometrium is independent of conceptus-derived interferon tau [J]. *Biology of Reproduction*, 2012, 87(2): 32.
 - [14] Govoroun M S, Pannetier M, Pailhoux E, et al. Isolation of chicken homolog of the *FOXL2* gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development [J]. *Developmental Dynamics*, 2004, 231(4): 859-870.
 - [15] Burrowes O J, Diamond G, Lee T C. Recombinant expression of pleurocidin cDNA using the *Pichia pastoris* expression system [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2005(4): 374-384.
 - [16] 李 青, 周晓宏. 新型生物防腐剂-多聚阳离子抗菌肽在毕赤酵母中的表达 [J]. *食品科学*, 2012(3): 1-8.
 - Li Q, Zhou X H. New biological preservatives-polymer cationic antimicrobial peptide in *Pichia* expression [J]. *Food Science*, 2012(3): 1-8.

(上接第 9 页)

- [24] Nei M, Roychoudhury A K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance [J]. *Genetics*, 1974, 76(2): 379-390.
- [25] Carling D. AMPK [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(6): R220.
- [26] Lavner Y, Kotlar D. Codon bias as a factor in regulating expression via translation rate in the human genome [J]. *Gene*, 2005, 345(1): 127-138.
- [27] Chamary J V, Hurst L D. Evidence for selection on synonymous mutations affecting stability of mRNA secondary structure in mammals [J]. *Genome Biology*, 2005, 6(9): R75. 1-R75. 12.
- [28] Eskesen S T, Eskesen F N, Ruvinsky A. Natural selection affects frequencies of AG and GT dinucleotides at the 5' and 3' ends of exons [J]. *Genetics*, 2004, 167(1): 543-550.
- [29] Purvis I J, Bettany A J E, Santiago T C, et al. The efficiency of folding of some proteins is increased by controlled rates of translation *in vivo*: a hypothesis [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1987, 193(2): 413-417.
- [30] Zhang Q, Zhao S, Chen H, et al. SNP discovery and haplotype analysis in the bovine *PRKAA2* gene [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 1551-1556.
- [31] Lin L, Flisikowski K, Schwarzenbacher H, et al. Characterization of the porcine AMPK alpha 2 catalytic subunit gene (*PRKAA2*): genomic structure, polymorphism detection and association study [J]. *Anim Genet*, 2010, 41: 203-207.