

3个牛品种UCP3基因第5内含子和第6外显子部分序列的多态性研究

李秋玲¹, 许尚忠², 咎林森¹, 高雪², 张争锋¹, 任红艳², 陈金宝²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 中国农业科学院 畜牧研究所, 北京 100094)

[摘要] 以中国西门塔尔牛、安格斯牛和海福特牛为试验材料, 设计特异性引物扩增解耦联蛋白3基因(*UCP3*)的第5内含子和第6外显子部分序列, 利用PCR-SSCP技术对牛*UCP3*基因进行了SNPs检测和基因型分析。结果表明, 3个牛品种中的优势等位基因均为B, 中国西门塔尔牛和安格斯牛的优势基因型为BB型, 海福特牛的优势基因型为AB型; 中国西门塔尔牛和海福特牛在*UCP3*基因位点处于Hardy-Weinberg平衡状态, 而安格斯牛在*UCP3*基因位点处于Hardy-Weinberg非平衡状态; 中国西门塔尔牛和海福特牛在*UCP3*基因位点为中度多态, 安格斯牛在*UCP3*基因位点为高度多态。

[关键词] 牛; 解耦联蛋白3基因; SNPs; 基因型; 等位基因

[中图分类号] S823.1.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)11-0011-04

解耦联蛋白(Uncoupling Protein, UCP)是位于线粒体内膜的质子转运体, 可降低质子电化学梯度, 使呼吸链与ATP合成过程解耦联, 造成氧化磷酸化合成ATP的效率下降, 能量以热的形式散发, 因此人们推测, UCP提供了解释肥胖产生原因的新线索^[1]。

对于哺乳动物而言, UCP主要有5种存在形式: UCP1, UCP2, UCP3, UCP4和UCP5, 其中UCP3不仅能抑制活性氧(ROS)的产生, 防止细胞受损, 而且还与细胞老化、退行性疾病、糖尿病和肥胖有关^[2]。UCP基因家族参与机体能量代谢, 对与机体能量平衡有关的性状, 如体重、静止代谢率和食物转化效率等有显著影响^[3]。Liu等^[4]研究高加索肥胖人群发现, *UCP3*基因多态对体重指数(BMI)有显著影响, 表明*UCP3*基因多态有使肥胖者体重增加的危险。Rudofsky等^[5]研究认为, 人*UCP3*基因调节能量平衡, 与肥胖和糖尿病有关。

研究表明, 甲状腺素、去甲肾上腺素兴奋剂、糖皮质激素、肥胖基因产物(Leptin)及绝食状态均可调节UCP2和UCP3活性, 解耦联线粒体内膜呼吸链氧化磷酸化耦联作用, 减少ATP生成的数量, 降低磷/氧比率(P/O), 加快体内代谢速度, 产生热量^[6]。

据估测, 机体约有25%的能量通过氧化磷酸化耦联作用, 不合成ATP而是以热能形式散发^[7-8]。

牛的*UCP3*基因序列至少包括6个外显子和5个内含子, 目前还未见关于牛*UCP3*基因多态性的报道。因此, 本研究通过对牛*UCP3*基因第5内含子和第6外显子部分序列的单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)检测, 比较不同牛品种中基因型频率的差异, 为从分子遗传学角度探讨牛种的能量消耗机制提供理论依据, 以及为牛种对寒冷适应的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试动物

试验牛群为内蒙古通辽市三元牛场和宝龙山牛场的74头中国西门塔尔牛、24头海福特牛和26头安格斯牛。对每头牛颈静脉采血10 mL, ACD抗凝($V(ACD)/V(血液) = 1/6$), 低温下快速送回实验室于-20℃条件下保存备用。

1.2 主要试剂

Taq DNA聚合酶、10×Buffer、15 mmol/L Mg^{2+} 和dNTPs均购自北京赛百盛生物有限公司; 离心柱型琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京天为时代

· [收稿日期] 2005-10-31

[基金项目] 国家“863”计划项目(2002AA242011)

[作者简介] 李秋玲(1979-), 女, 吉林敦化人, 在读硕士, 主要从事生物技术与家畜育种研究。E-mail: liqiuling2000@yahoo.com.cn

[通讯作者] 许尚忠(1950-), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事分子数量遗传学与家畜育种研究。E-mail: simmenta@vip.sina.com

科技有限公司; pGEM-T easy 载体购自美国 Premega 公司; 菌株DH5 α 购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司。

1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 登录的牛UCP3 基因序列(登录号AF127030)设计1对引物, 上游引物F 序列为: 5'-CTC TAA TGA GGT GGT TGG G-3'; 下游引物R 序列为: 5'-CCA TCT TCA GCA TAC AGT CG-3'; 引物均由上海博亚生物技术有限公司合成, 预期扩增片段长601 bp, 包括UCP3 基因内含子5 和外显子6 的部分序列。

1.4 牛血液基因组DNA 提取

牛血样基因组DNA 的提取参照文献[9]的方法。提取后的DNA 用TE (Tris-EDTA) 缓冲液溶解后, 采用UV-2102C 型紫外分光光度计和8 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 牛UCP3 基因第5 内含子和第6 外显子部分序列的PCR 扩增

用1.3 设计的引物扩增不同品种牛的UCP3 基因第5 内含子和第6 外显子部分片段, PCR 反应体系为: 10 $\times$ PCR Buffer (不含Mg²⁺) 1.2 μ L, 15 mmol/L Mg²⁺ 1.0 μ L, 2 mmol/L dNTPs 1.2 μ L, 10 μ mol/L 上、下游引物各0.24 μ L, Taq 酶0.5 U, 50 ng/ μ L DNA 模板1 μ L, 加ddH₂O 至12 μ L。PCR 反应程序为95 5 min; 94 30 s, 60 30 s, 72 30 s, 34 个循环后; 72 延伸10 min, 4 保温。PCR 产物在15 g/L 琼脂糖凝胶中电泳后, 用UVPGDS-8000 凝胶成像系统分析检测扩增结果。

1.6 牛UCP3 基因的单核苷酸多态链式反应 (Single-strand conformation polymorphism, SSCP) 分析

取2 μ L 1.5 得到的PCR 产物加入到8 μ L 的loading buffer(每100 mL 含: 去离子甲酰胺98 mL, 溴酚蓝0.025 g, 二甲苯青0.025 g, EDTA (pH 8.0) 1 mmol, 甘油10 mL)中, 98 变性10 min, 迅速插入冰中, 放置5 min, 使之保持变性状态。PCR 产物变性后, 于100 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶(m (丙烯酰胺) m (亚甲基双丙烯酰胺) = 39:1)中电泳(10 V/cm) 7~8 h, 银染分析。

1.7 牛UCP3 基因扩增产物的克隆测序

通过PCR-SSCP 分析, 选取不同纯合基因型个体的PCR 产物, 用离心柱型琼脂糖凝胶回收试剂盒回收, 回收后的DNA 片段与pGEM-T easy 载体连

接后转化大肠杆菌DH5 α 中, 经菌落PCR 筛选阳性克隆, 每种纯合基因型分别单独挑取2 个送交北京华大基因研究中心测序。

1.8 数据统计分析

计算各种基因型个体在不同品种中的分布, 进行显著性检验, 并计算群体的多态信息含量(PIC)、群体中基因纯合度(H_o)、杂合度(H_e)和有效等位基因数(N_e)。

2 结果与分析

2.1 牛UCP3 基因第5 内含子和第6 外显子部分的PCR 扩增的结果

牛UCP3 基因的PCR 扩增结果特异性良好(图1), 可直接进行SSCP 分析。

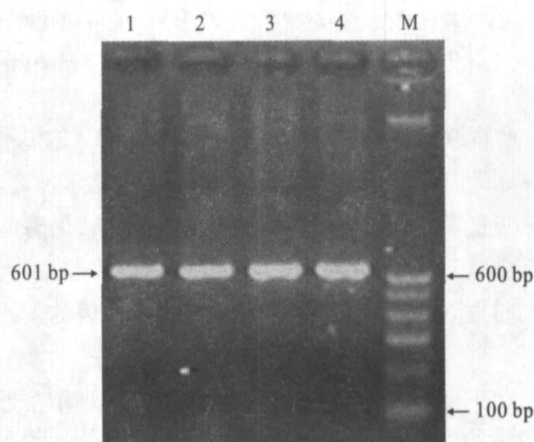


图1 3 个品种牛UCP3 基因第5 内含子和第6 外显子部分扩增产物

1~4 扩增产物; M: SD002 M marker

Fig 1 Amplified products of the part of the fifth intron and the sixth exon of UCP3 in three bovine breeds

1~4 Amplified products; M: SD002 M marker

2.2 牛UCP3 基因的SSCP 分析结果

对扩增产物进行SSCP 检测发现, 牛UCP3 基因有3 种基因型, 分别命名为AA, AB 和BB (图2)。

2.3 不同基因型纯合子个体的克隆测序

对不同基因型纯合子个体进行测序的结果(图3)表明, 3 450 位的碱基发生了缺失, 在2 966, 3 328 和3 374 位3 个位点的碱基发生了点突变, 其中所有个体在2 966 位均发生了C $\rightarrow$ A; BB 型为野生型, AA 型个体在3 328 位发生了G $\rightarrow$ A, 在3 374 位发生了C $\rightarrow$ T。

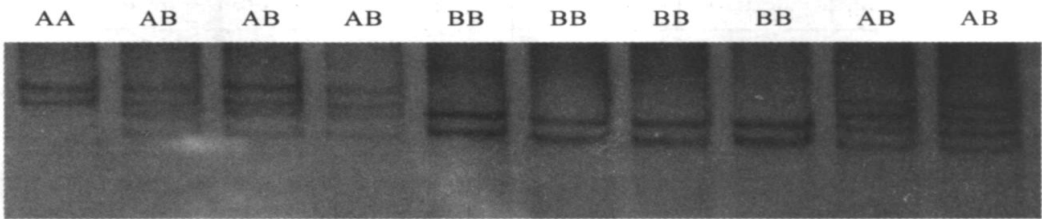


图2 不同基因型牛品种的 SSCP 检测结果

Fig. 2 PCR-SSCP analysis in different individuals with different genotypes

2 881 GGCCTTCTCT GACCAGTTTC CTCTAATGAG GTGGTTGGGC CGGATTAGCT TCCAACCTCTG
2 941 GGACAGCCCA GTTTTGTGAG TCCTCATCAA GAGCTCCATC TTGGCACTGC AAGAGATTTG
3 001 GAAAACACTA TCCTCATACT TGGGCTTCCC TGGTGACTCA GACCGTAAAG AATCCACGGG
3 061 CAATGCAGGA GATACAGGTT CCATCCCTGG GTCAGGAAGA TCCCCTGGAA GAGGAAATGG
3 121 AACCCACTCC AGTATTCTTG CCTAGGGAAA TCCCATGGGC AGAGGGACCT GGTGGGCTAC
3 181 TGTCCAGGGG CTTGCAAAGA GTCAGATTTG ACGGAGCACA AGCACTAGAC TATACTAACC
3 241 TCATGCCCAG GGAGTTCAGT TTCATTAGGG ACAAACAATG AACACGTGTG AAACAGAAAA
3 301 CAAGGGCCGT CTTCATCTCA CAGCCCAATA TCTGCTCTTC CTACCCTGCG ACAGACAACCT
3 361 TCCCCTGCCA CTTTTGTCTCT GCCTTTGGAG CTGGCTTCTG TGCCACCCTG GTGGCCTCCC
3 421 CGGTGGACGT GGTGAAGACG CGGTATATGA ACTCGCCCCC AGGCCAGTAC CACAGCCCCT
3 481 TCGACTGTAT GCTGAAGATG GTGACCCAGG AGGGCCCCAC AGCCTTCTAC AAGGGGTGAG

图3 3 个品种牛 *UCP3* 基因部分序列比较结果

— 突变碱基; □ . 缺失碱基

Fig. 3 Compared results of partial sequence of *UCP3* among three bovine breeds

— Mutation base; □ . Deleted base

2 4 3 个品种牛 *UCP3* 基因型频率和等位基因频率统计结果

计算 3 个品种牛 *UCP3* 基因型频率和等位基因频率并进行卡方检验, 结果见表 1。从表 1 可以看出, 中国西门塔尔牛和安格斯牛的优势基因型为 BB 型, 海福特牛的优势基因型为 AB 型, 3 个牛群中的优势等位基因均为 B。中国西门塔尔牛和海福特牛的 χ^2

值分别为 0.04 和 2.52, 均小于 $\chi^2_{0.05(2)}$ (5.99), 表明其 *UCP3* 基因的基因型频率和等位基因频率的实际值与理论值差异不显著, 群体处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。而安格斯牛的 χ^2 值为 7.34, 大于 $\chi^2_{0.05(2)}$, 表明其 *UCP3* 基因的基因型频率和等位基因频率的实际值与理论值差异显著, 群体处于 Hardy-Weinberg 非平衡状态。

表 1 3 个牛品种 *UCP3* 基因型频率和基因频率及卡方检验结果

Table 1 Genotype and allele frequency of <i>UCP3</i> gene and χ^2 analysis of three bovine breeds							
品种 Species	样本数 Number	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency		χ^2
		AA	AB	BB	A	B	
中国西门塔尔牛 Chinese Simmental	74	15(0.20)	28(0.38)	31(0.42)	0.40	0.60	0.04
海福特牛 Heiford	24	5(0.21)	12(0.50)	7(0.29)	0.46	0.54	2.52
安格斯牛 Angus	26	1(0.04)	8(0.31)	17(0.65)	0.19	0.81	7.34

从表 2 可以看出, 中国西门塔尔牛和海福特牛为中度多态 ($0.25 < PIC < 0.5$), 安格斯牛为高度多

态 ($PIC > 0.5$)。由此可见, 3 个牛品种 *UCP3* 基因的多态性较高, 遗传变异较大。

表2 3个牛品种UCP3基因的遗传多态性指标

Table 2 Genetic diversity of UCP3 gene in three bovine breeds

品种 Species	多态信息含量 PIC	纯合度 H ₀	杂合度 H _e	有效等位基因数 N _e
中国西门塔尔牛 Chinese Simmental	0.36	0.52	0.48	1.91
海福特牛 Heiford	0.37	0.50	0.50	1.99
安格斯牛 Angus	0.62	0.33	0.67	3.03

3 结论与讨论

涂荣剑等^[10]对猪的UCP3基因进行研究发现,其开放阅读框(ORF)的842位碱基发生了突变,导致其编码的氨基酸序列发生相应改变(甲硫氨酸→苏氨酸),并对一些胴体肉质性状产生了显著影响。Knoll等^[11]研究发现,在猪UCP3基因5'调控区的1个Ala I酶切位点对肌肉和脂肪能量转化影响显著。Uhammer等^[12]和方启晨等^[13]研究表明,人UCP3基因外显子3的C/T突变影响能量代谢。

目前,还未见有关牛UCP3基因多态性的报道,本研究采用PCR-SSCP技术首次对牛UCP3基因片段进行了研究,对该位点在不同牛群体中的基因型分布进行了鉴定及独立性检验。结果表明,3个牛品种的优势等位基因均为B,中国西门塔尔牛和安格斯牛的BB型基因频率较高,海福特牛AB型基因频

率较高。 χ^2 检验结果显示,中国西门塔尔牛和海福特牛3种基因型实际分布和理论分布间差异不显著,群体达到Hardy-Weinberg平衡状态,表明在人工选育、迁徙和遗传漂变等因素作用下,中国西门塔尔牛和海福特牛UCP3基因处于动态平衡中。安格斯牛3种基因型实际分布和理论分布间差异显著,群体未达到Hardy-Weinberg平衡状态。造成这种不平衡状态的原因可能与人工选择有关,也可能与品种本身有关。

本试验在合适的交联度、胶浓度、温度、电压等条件下,在目的基因片段(601 bp)大于300 bp的基础上运用PCR-SSCP技术,成功检测出目的序列的SNPs位点,突破了以往只能在小片段基因(<300 bp)情况下运用PCR-SSCP技术的限制,证明在一定范围内大片段基因也可采用该技术,这也为分子生物学技术的更广泛运用提供了参考。

[参考文献]

- [1] Daniel R, Frederic B. The uncoupling protein homologues UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP[J]. Biochem, 2000, 345: 161-179
- [2] Zaninovich A A. Role of uncoupling proteins UCP1, UCP2 and UCP3 in energy balance, type 2 diabetes and obesity[J]. Synergism with the Thyroid Medicina (B Aires), 2005, 65(2): 163-169
- [3] Ricquier D, Bouillaud F. The mitochondrial uncoupling protein: structural and genetic studies[J]. Nucleic Acid Res Mol Biol, 1997, 56: 83-108
- [4] Liu Y J, Liu P Y, Long J, et al Linkage and association analyses of the UCP3 gene with obesity phenotypes in Caucasian families[J]. Physiol Genomics, 2005, 22(2): 197-203
- [5] Rudofsky G J, Schroedter A, Schlotterer A, et al Functional polymorphisms of UCP2 and UCP3 are associated with a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 1 diabetes[J]. Diabetes Care, 2006, 29(1): 89-94
- [6] Schrauwen P, Walder K, Ravussin E. Human uncoupling proteins and obesity[J]. Obes Res, 1999, 7(1): 97-105
- [7] Rolfe D F, Vrand M D. Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate[J]. American Journal of Physiology, 1996, 271: 1380-1398
- [8] Porter R K, Andrews J F. Effects of leptin on mitochondrial "proton leak" and uncoupling proteins: implications for mammalian energy metabolism[J]. Proc Nutr Soc, 1998, 57(3): 455-460
- [9] Sambrook J, Russell D. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Lab (CSHL) Press, 2001
- [10] 涂荣剑, 邓昌产, 熊远著. 猪UCP3基因部分编码区序列分析及其单核苷酸多态与胴体、肉质性状的遗传效应[J]. 遗传学报, 2004, 31(8): 807-812
- [11] Knoll A, Putnova L, Dvorak J, et al Linkage mapping of an Alu I PCR-RFLP within the porcine uncoupling protein 3 (UCP3) gene[J]. Anim Genet, 2000, 31(2): 156-157
- [12] Uhammer S A, Dalgaard L T, Sorensen T I, et al Organisation of the coding exons and mutational screening of the uncoupling protein 3 gene in 142 Bouillaud R UCP1, UCP2 and UCP3: are they true uncouplers of respiration? [J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 1999, 23(6): 19-23
- [13] 方启晨, 贾伟平, 杨明, 等. 解偶联蛋白3基因启动子区-55(C>T)多态与中国人静息能量消耗及体脂含量与分布的关系[J]. 中华医学遗传学杂志, 2005, 22(5): 485-488

(下转第20页)

immunohistochemistry. The results were as follows: testosterone was presented in the cytoplasm of spermatogonia (SPG) in April. It was detected in the nuclear of SPG in May when SPG would become primary spermatocyte (ISPC). During Jun-Jul, T positive reactivity was also detected in the nuclear of spermatocyte (SPC) and spermatid (SPD). In Aug, there were T slight positive reaction dots scattered in the immature region and mature region. In Sep-Oct, T was presented in the cytoplasm of SPG in immature region and spermatozoa (SPZ) in mature region. T positive reactivity weakened in the cytoplasm of SPG and SPZ in Nov. During the annual reproductive cycle, T positive location always presented in the certain part in the testis. T was also detected in Leydig cells (LC) and Sertoli cells (SC) of the testis during Apr-May and Sep-Oct. The result shows that testosterone disperses periodically and regularly in testis of *Batrachuperus tibetanus* and it plays an regulative role in proliferation of germ cell and spermatogenesis.

Key words: *Batrachuperus tibetanus*; testosterone; spermatogenesis; annual reproductive cycle

(上接第14页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)11-0011-CA

Study on polymorphisms of part sequence of intron 5 and exon 6 of bovine *UCP3* gene

LI Qiu-ling¹, XU Shang-zhong², ZAN Lin-sen¹, GAO Xue²,
ZHANG Zheng-feng¹, REN Hong-yan², CHEN Jin-bao²

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

2 Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100094, China)

Abstract: Take Chinese Simmental, Angus and Heiford as experiment materials, a pair of primers for the part of intron 5 and exon 6 of uncoupling protein 3 gene were designed. The polymorphisms were analyzed by PCR-SSCP and DNA sequencing. The results showed that allele B was the predominance allele in these three populations, genotype AA was the predominance genotype in Chinese Simmental and Angus and it was AB in Heiford. There was no significant difference ($P > 0.05$) in *UCP3* locus of both Chinese Simmental and Heiford, while significant differences existed in Angus. Analysis of polymorphisms index showed the polymorphism of the locus was moderate in Chinese Simmental and Heiford and high in Angus.

Key words: bovine; *UCP3*; SNPs; genotype; allele