

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

刘新武, 咎林森, 张佳兰
(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】研究中国荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因第 2 外显子的多态性,分析其多态性与产奶性状的关系。 【方法】以中国荷斯坦奶牛为材料,利用 PCR-SSCP 技术对瘦素基因(*Leptin*)第 2 外显子的遗传多态性及其与奶牛产奶性状的相关性进行了分析。 【结果】中国荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因第 2 外显子有 2 种等位基因 A 和 B,等位基因频率分别为 0.697 5 和 0.302 5,群体多态信息含量为 0.333 0,杂合度为 0.422 0,A 等位基因是群体中的优势等位基因;BB 型个体第 1,2,3 胎的乳脂率和乳蛋白率及第 1,2 胎的产奶量等产奶性状显著或极显著优于 AA 型($P<0.01$ 或 $P<0.05$);第 1,2,3 胎的产奶量及第 1,2 胎的乳脂率和第 2 胎的乳蛋白率也显著或极显著优于 AB 型($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。 【结论】*Leptin* 基因可用于中国荷期坦奶牛产奶性状的辅助选择。

【关键词】 *Leptin* 基因;中国荷斯坦牛;PCR-SSCP;产奶性状

【中图分类号】 S823.9⁺12 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)11-0006-05

Study on the polymorphism in exon 2 of *Leptin* gene
and its relationship with milk production traits
in Chinese Holstein

LIU Xin-wu,ZAN Lin-sen,ZHANG Jia-lan
(College of Animal Science and Technology,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: 【Objective】 The polymorphism of exon2 of *Leptin* gene was studied and its association with milk production traits in Chinese Herstein Cattle was analyzed. 【Method】 This study was designed to identify the polymorphism of exon 2 of *Leptin* gene and its relationship with milk production traits in 200 Chinese Holstein by PCR-SSCP. 【Result】 The frequencies of alleles A and B were 0.697 5 and 0.302 5 respectively. Polymorphism information content was 0.333 0,and heterozygosity was 0.422 0. The allele A was the dominant allele in Chinese Holstein. Individuals with genotype BB had a significant higher average milk protein percentage and milk fat percentage for all three parities,and a significant higher average milk yield for the first parity and the second parity than that of genotype AA($P<0.01$ or $P<0.05$). They also had a significant higher milk yield for all three parities,milk fat percentage for the first parity and the second parity,milk protein percentage for the second parity better than that of genotypeAB($P<0.01$ or $P<0.05$). 【Conclusion】 The results indicated that *Leptin* gene could be used as the molecular genetic marker to select

* 【收稿日期】 2007-12-10
 【基金项目】 国家“十一五”奶业重大专项(2006BAD04A11);农业科技跨越计划项目(2007-23);西北农林科技大学拔尖人才支持计划项目
 【作者简介】 刘新武(1981—),男,江苏盐城人,在读硕士,主要从事生物技术在家畜育种中的应用研究。E-mail:lxw1223@126.com
 【通讯作者】 咎林森(1963—),男,陕西扶风人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物生长发育调控及牛的遗传育种与繁殖研究。
 E-mail:zanls@yahoo.com.cn

the milk production traits in cattle.

Key words: *Leptin* gene; Chinese Holstein; PCR-SSCP; Milk production trait

瘦素蛋白(*Leptin*)是肥胖基因(*obese gene*)编码的一种蛋白质激素,由脂肪细胞分泌,对家畜脂肪组织和神经内分泌有显著的调控作用,可通过对采食量和家畜能量平衡的调节,促进家畜的生长、繁殖和泌乳性能^[1-2]。*Leptin*能及时将脂肪贮存状况传递给下丘脑和其他神经内分泌区,促使神经内分泌系统调节其自身机能,以适应当时的能量平衡与脂肪贮存状况。

有研究表明,*Leptin*对体重、繁殖、泌乳的调节,是通过神经肽(NPY)和黑色素皮质素 4 受体(MC4R)及其配体黑色素细胞刺激素(MSH)而起作用的^[3-5]。关于编码*Leptin*基因的结构已经被完全定位,牛*Leptin*基因位于第 4 号染色体,由 3 个外显子和 2 个内含子组成,基因全长约为 20 kb,其 cDNA 长度约为 2.9 kb,编码 168 个氨基酸,外显子 1 是*Leptin*基因的启动子序列,成熟蛋白的编码序列位于第 2 和第 3 外显子,共 504 bp。*Leptin*基因对牛的生长发育、泌乳性能等起重要的控制作用^[6-9]。

目前,国内外对奶牛*Leptin*基因第 2 内含子和第 3 外显子多态性的研究报道较多^[10-12],但对第 2 外显子的研究尚比较少。本试验利用 PCR-SSCP 技术,对中国荷斯坦奶牛*Leptin*基因外显子 2 的多态性进行了分析,并探讨了其与产奶性状的关系,以期为我国高生产性能奶牛新品系的分子标记辅助选择和培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 奶牛血样 本试验随机采集西安现代农业开发总公司奶牛一场、五场共 200 头中国荷斯坦奶牛血样,每头 10 mL,肝素钠抗凝,−70 ℃保存。

1.1.2 主要试剂 基因组提取试剂盒购自北京鼎国生物技术有限责任公司,*Taq* 酶、dNTPs、丙烯酰胺均购自上海生物工程公司。

1.1.3 引物设计 参照 GenBank 收录的牛*Leptin*基因序列(登录号为 AM266811),用 Primer 5.0 软件设计 1 对引物。其序列为:

Forward:5′-CGTTGTTATCCGCATCTGA-3′;
Reverse:5′-CGGTTCTACCTCGTCTCCCA-3′。

引物由上海生工有限公司合成。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用传统的氯仿提取法^[13]提取中国荷斯坦奶牛血样基因组 DNA。

1.3 中国荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因的 PCR 扩增

扩增体系(15 μL):10×Buffer 1.5 μL,dNTP (2.5 mmol/L)1.0 μL,上、下游引物(20 pmol/μL)各 0.25 μL,*Taq* DNA Polymerase(天根公司产品,0.5 U/μL)1.5 μL,Mg²⁺(25 mmol/L)1.5 μL,DNA 模板 50~100 ng,加水至 15 μL。

扩增程序:95 ℃ 5 min;94 ℃ 40 s;55.4 ℃ 30 s;72 ℃ 40 s,35 个循环后;72 ℃延伸 10 min;4 ℃保存。20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.4 中国荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因的 SSCP 分析

取 4 μL PCR 扩增产物,加 8 μL 变性剂(980 g/L 去离子甲酰胺,10 mmol/L EDTA,0.25 g/L 二甲苯青,0.25 g/L 溴酚蓝)98 ℃变性 10 min,立即冰浴 5 min 后全部上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),PAGE 的交联度为 39:1,质量浓度为 120 g/L,于 120 V、室温下电泳 6 h,银染显带。

1.5 PCR 产物的回收与测序

经 SSCP 后,将纯化回收的不同基因型个体 PCR 产物,送交上海生工有限公司测序。

1.6 数据统计与分析

根据文献[14]计算基因频率、基因型频率、群体多态信息含量、杂合度和纯合度。

采用固定模型 $Y_{ijk} = \mu_i + T_j + M_k + e_{ijk}$ 计算产奶量、乳脂率和乳蛋白率的基因效应,其中 Y_{ijk} 为个体表型记录, μ_i 为总体均数, T_j 为胎次, M_k 为标记基因型效应, e_{ijk} 为随机误差。由于场际效应不显著,所以未在模型中列出。

运用 SPSS 11.5 软件对数据进行分析,并用最小二乘拟合线性模型(GLM),分析各标记基因型对产奶性状影响的显著性。

2 结果与分析

2.1 中国荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因第 2 外显子的 PCR 扩增及 SSCP 分析

PCR 结果显示,扩增到的目的片段长度为 307 bp,与预期片段长度一致。扩增产物条带明晰,特异性好(图 1),可用于 SSCP 检测。SSCP 分析结果表明,中国荷斯坦奶牛*Leptin*基因第 2 外显子有 AA、

AB 和 BB 3 种基因型(图 2)

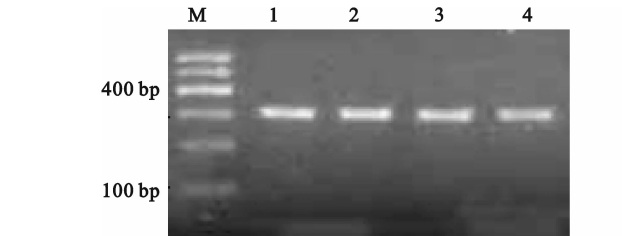


图 1 中国荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因第 2 外显子的 PCR 扩增
M. DNA Marker I ;1~4. 不同个体的 *Leptin* 基因第 2 外显子

Fig. 1 Detection of the exon 2 of *Leptine* gene in Chinese Holstein
M. DNA Marker I ;1-4. Individual PCR product

2.2 中国荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因第 2 外显子 PCR 扩增片段的测序

根据 PCR-SSCP 结果,选择扩增效果好的 AA、AB 和 BB(各 2 个)型个体的 PCR 产物进行纯化回

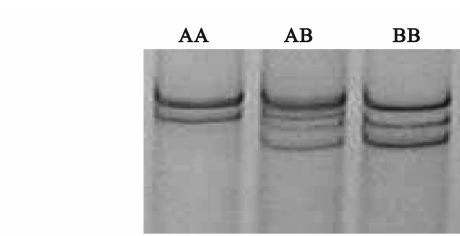


图 2 中国荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因第 2 外显子多态性的 SSCP 检测

Fig. 2 Inspection of PCR-SSCP of *Leptin* exon 2 in Chinese Holstein

收并测序(双向),用 DNASTAR 软件将测序结果与 NCBI 上相应的 *Leptin* 基因序列进行比较。结果发现,中国荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因第 2 外显子 BB 型个体在 204 bp 处发生了 C → T 的转换突变(图 3)。

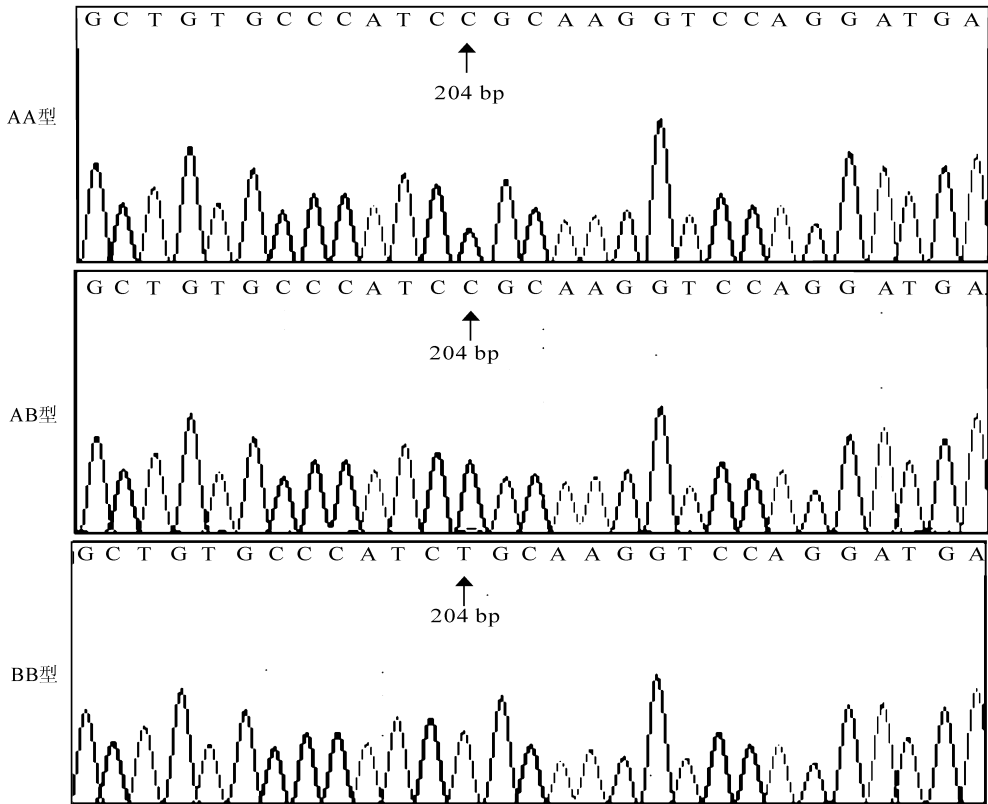


图 3 中国荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因第 2 外显子的突变位点图
Fig. 3 Mutational site in the exon 2 of *Leptin* gene of Chinese Holstein

2.3 中国荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因第 2 外显子的多态性分析

由表 1 可知,中国荷斯坦奶牛个体中,A 和 B 等位基因的频率分别为 0.697 5 和 0.302 5,AA,AB

和 BB 基因型频率分别为 0.535 0,0.325 0 和 0.140 0;中国荷斯坦奶牛群体 *Leptin* 基因遗传杂合度为 0.422 0,纯合度为 0.578 0,多态信息含量为 0.333 0,达到中度多态,遗传变异较大。

表 1 中国荷斯坦奶牛 <i>Leptin</i> 基因第 2 外显子的基因型频率和等位基因频率							
Table 1 Genotype and alleles frequencies of SSCP detected in exon 2 of <i>Leptin</i> gene in Chinese Holstein							
座位 Locus	基因型 Genotype	基因型频率 Genotype frequency	等位基因 Allele	基因频率 Allele frequency	多态信息含量 Polymorphism information content	杂合度 Heterozy-gosity	纯合度 Homozy-gosity
Leptin 基因 第 2 外显子 Exon 2 of <i>Leptin</i> gene	AA	0. 535 0(107/200)	A B	0. 697 5	0. 333 0	0. 422 0	0. 578 0
	AB	0. 325 0(65/200)		0. 302 5			
	BB	0. 140 0(28/200)					

2. 4 中国荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因第 2 外显子的多态性与奶牛产奶性状的相关性

Leptin 基因第 2 外显子的 SSCP 多态性与中国荷斯坦奶牛产奶性状的分析结果见表 2。由表 2 可以看出,*Leptin* 基因第 2 外显子不同基因型对中国荷斯坦奶牛的产奶量、乳脂率和乳蛋白率均有显著的影响。BB 基因型个体第 1,2 胎的产奶量和乳脂

率均显著或极显著地高于 AA 型个体和 AB 型个体 ($P<0. 01$ 或 $P<0. 05$);第 3 胎的产奶量也极显著高于 AB 型个体 ($P<0. 01$)。BB 型个体第 2 胎的乳蛋白率显著或极显著地高于 AA 型和 AB 型个体 ($P<0. 01$ 或 $P<0. 05$);第 1,2 胎的乳蛋白率及第 3 胎的乳脂率也显著高于 AA 型个体 ($P<0. 05$)。

表 2 中国荷斯坦奶牛 <i>Leptin</i> 基因第 2 外显子 SSCP 多态性与部分产奶性状的相关性				
Table 2 Effect of SSCPs in <i>Leptin</i> exon 2 on several milk production traits in Chinese Holstein				
胎次 Parity	基因型 Genotype	产奶性状 Milk production		
		产奶量/kg Milk yield	乳脂率/% Milk fat percentage	乳蛋白率/% Milk protein percentage
1	AA	7205. 29±129. 22 Aa	3. 75±0. 07 a	3. 08±0. 07 a
	AB	7772. 19±165. 80 Bb	3. 79±0. 10 a	3. 16±0. 09 ab
	BB	8412. 82±252. 61 Bc	4. 14±0. 14 b	3. 41±0. 14 b
2	AA	8232. 51±154. 98 a	3. 84±0. 07 a	3. 09±0. 08 Aa
	AB	8159. 57±198. 84 a	3. 82±0. 08 a	3. 18±0. 10 ABa
	BB	8931. 96±302. 95 b	4. 16±0. 13 b	3. 58±0. 16 Bb
3	AA	9100. 28±177. 71 ABa	3. 80±0. 07 a	3. 10±0. 07 a
	AB	8604. 68±228. 00 Ab	3. 81±0. 09 ab	3. 25±0. 09 ab
	BB	9807. 54±347. 39 Bc	4. 13±0. 14 b	3. 44±0. 14 b

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著,标不同大写字母表示差异极显著。
Note: Values in each column with different lower case superscripts are at $P<0. 05$;and with capital superscripts different at $P<0. 01$.

3 讨 论

目前,对奶牛 *Leptin* 基因多态性与生产性状相关性的研究报道较多,主要集中在外显子 3 和内含子 2 上,且研究结果不尽一致。Madeja 等^[11]研究表明,波兰荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因第 3 外显子存在突变位点,其中 TT 基因型的产奶量、乳脂率和乳蛋白率均显著高于 CC 型和 CT 型;但 Liefers 等^[10]在新西兰荷斯坦奶牛群体中没有发现任何显著影响;杨东英等^[15]在中国荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因外显子 3 上没有发现多态。在内含子 2 上,Buchanan 等^[12]在研究 *Leptin* 基因与肉牛脂肪沉积的相关性时发现,在 *Leptin* 基因外显子 2 上出现了 C73T 的突变,该突变对加拿大荷斯坦奶牛的产奶量和乳脂量也有显著影响,TT 型个体比 CC 型个体平均日产奶量高出 1. 5 kg,并且体细胞数偏高,但该突变对乳蛋白量没有显著影响;Liefers 等^[10]发现,新西兰荷斯

坦奶牛杂合型 CT 个体比野生 CC 型个体日产奶量增加 1. 32 kg;但 Madeja 等^[11]在研究 *Leptin* 基因的 3 个 RFLP 位点与波兰荷斯坦公牛乳脂肪和乳蛋白含量育种值的关系时发现,TT 基因型个体的产奶量和乳蛋白产量均显著高于 CC 型和 CT 型。以上研究说明,*Leptin* 基因可能存在品种差异,故还需作进一步研究。

对 *Leptin* 基因第 2 外显子多态性的研究报道较少。Buchanan 等^[12]发现,TT 基因型的产奶量与乳蛋白率显著高于 CC 型和 CT 型。本研究对中国荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因第 2 外显子进行的 PCR-SSCP 多态性分析发现,共有 3 种基因型 AA、AB 和 BB,AA 和 AB 在群体中分布比较均匀,而 BB 型个体很少,说明中国荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因第 2 外显子在遗传上存在着较高变异,群体遗传变异较大。BB 基因型奶牛的产奶量、乳脂率和乳蛋白率显著高于 AA 基因型和 AB 基因型,说明 B 基因对中国荷

斯坦奶牛的产奶性状有显著影响。

多态信息含量和杂合度均是群体内遗传变异大小的评定指标,数值越高,遗传变异越大。本研究发现,中国荷斯坦奶牛 *Leptin* 基因第 2 外显子表现为中度多态,适合作为中国荷斯坦奶牛遗传多态性与生产性状研究的分子育种标记。

[参考文献]

[1] 刘仕军,王加启,李文娟,等. 奶牛肥胖蛋白(Leptin)的研究进展[J]. 中国奶牛,2005(3):22-25.
Liu S J, Wang J Q, Li W J, et al. Study progress of Leptin in cow[J]. Chinese Cow, 2005(3):22-25. (in Chinese)

[2] 郭亚宁,侯水生,刘小林,等. 动物肥胖基因(*ob*)的研究进展[J]. 黄牛杂志,2002,28(4):35-38.
Guo Y N, Hou S S, Liu X L, et al. Study progress of *Leptin* in animal[J]. Magazine of Yellow Cattle, 2002, 28(4):35-38. (in Chinese)

[3] 刘华珍,彭克美. *Leptin* 及其受体的研究进展[J]. 华中农业大学学报,2003,22(1):90-94.
Liu H Z, Peng K M. Study progress of *Leptin* and *Leptin* receptor[J]. Journal of HuaZhong Agricultural University, 2003, 22(1):90-94. (in Chinese)

[4] Sommer S S, Groszbach A R. PCR amplification of specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting know singlebase changes[J]. Bio Techniques, 1992, 82:82-87.

[5] Liu Q T, John A H. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tude method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes[J]. Genome Research, 1997, 7:389-398.

[6] Liefers S C, Veekamp R F, Wtepas M F, et al. *Leptin* concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight, and estrus in Dairy cows[J]. Journal of Dairy Science, 2007, 86:799-807.

[7] Sejrnsen K, Purup S, Vestergaard M, et al. High body weight gain and reduced bovine mammary growth: physiological basis and implications for milk yield potential[J]. Domest Anim En-

docrinol, 2000, 19:93-104.

[8] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse *obese* gene and it's human homologue [J]. Nature, 1994, 372:425-432.

[9] Buchanan F C, Fitzsimmons C J, Van Kessel A G, et al. Association of a missense mutation in the bovine *Leptin* gene with carcass fat content and *Leptin* mRNA leves [J]. Genet Sel Evol, 2002, 34:105-116.

[10] Liefers S C, Wtepas M F, Veerkamp R F, et al. Associations between *leptin* gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein Heifers [J]. J Dairy Sci, 2002, 85:1633-1638.

[11] Madeja Z, Adamowicz T, Chmurzynska A, et al. Short communication: Effect of *Leptin* gene polymorphisms on breeding value for milk production traits [J]. J Dairy Sci, 2004, 87:3925-3927.

[12] Buchanan F C, Van Kessel A G, Waldner C, et al. An association between a *Leptin* single nucleotide polymorphism and milk and protein yield [J]. J Dairy Sci, 2003, 86:3164-3166.

[13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning A Laboratory Manual [M]. Jin Dong-yan, Li Meng-feng, Hou Yun-de, et al. Translated. Beijing: Science Press, 1999.

[14] 付小波, 咎林森, 张佳兰, 等. 中国荷斯坦奶牛 *CSN1S2* 基因第 2 外显子 SSCP 多态性与产奶性状的关系 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2006, 34(8):21-24.
Fu X B, Zan L S, Zhang J L, et al. Study on the *CSN1S2* gene's exon 2 of the China Holstein by PCR-SSCP [J]. Journal of Northwest A& F University: Natural Science Edition, 2006, 34(8):21-24. (in Chinese)

[15] 杨东英, 陈宏, 张良志, 等. 中国 5 个牛种 *Leptin* 基因外显子 3 的多态性分析 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2006, 34(8):17-20.
Yang D Y, Chen H, Zhang L Z, et al. Polymorphic analysis of *Leptin* exon 3 in five Chinese cattle breeds [J]. Journal of Northwest A& F University: Natural Science Edition, 2006, 34(8):17-20. (in Chinese)

(上接第 5 页)

[12] Nohara A, Kawashiri M A. High frequency of a retinoid X receptor gamma gene variant in familial combined hyperlipidemia that associates with atherogenic dyslipidemia [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(4):923-928.

[13] Moller M, Berg F. High-resolution comparative mapping of pig Chromosome 4, emphasizing the *FAT1* region [J]. Mamm Genome, 2004, 15(9):717-731.

[14] Waxman J S, Yelon D. Comparison of the expression patterns of newly identified zebrafish retinoic acid and retinoid X receptors [J]. Dev Dyn, 2007, 236(2):587-595.

[15] Klein S L, Strausberg R L. Genetic and genomic tools for Xenopus research: The NIH xenopus initiative [J]. Dev Dyn,

2002, 225(4):384-391.

[16] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd Ed. Beijing: Science Press, 2001:516-532.

[17] Clagett-Dame M, Plum L A. Retinoid-regulated gene expression in neural development [J]. Cril Rev Eukaryot Gene Expr, 1997, 7:299-342.

[18] Davies P J, Nagy L. Retinoid X receptors: X-ploring their (patho) physiological functions [J]. Cell Death and Differentiation, 2004, 11(2):126-143.

[19] Foster P G, Hickey D A. Compositional bias may affect both DNA-based and protein-based phylogenetic reconstructions [J]. Molecular Evolution, 1999, 48:284-290.