

DOI: 10.1360/yc-007-0565

牛 *HTR1B* 基因的分子遗传特性研究

张春雷¹, 陈宏^{1,2}, 雷初朝¹, 房兴堂², 蓝贤勇¹, 张丽¹, 张爱玲¹, 王居强³, 胡沈荣¹

1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100;
2. 徐州师范大学细胞与分子生物学研究所, 徐州 221116;
3. 河南省肉牛工程技术研究中心, 郑州 450003

摘要: 用 PCR-SSCP 技术研究了涉及肉牛和奶牛共计 7 品种 *HTR1B* 基因的编码区和 3' 侧翼区的多态性, 以期为牛性情的标记辅助选择积累数据。扩增得到 4 个片段, 有 3 个片段存在(SSCP)多态性。对不同的 SSCP 带型对应片段进行测序, 共发现 6 个 SNP 多态位点(G205T、C507T、C546G、C744T、G816A 和 G942A)。各遗传群体内 G205T、C744T、G816A 和 G942A 位点均处于 Hardy-Weinberg 平衡, 而 C507T 和 C546G 位点只有鲁西牛处于 Hardy-Weinberg 平衡。奶牛 205T 等位基因频率显著高于其他肉牛品种($\chi^2 = 6.87$)。奶牛 G205T 位点多态信息含量为 0.25, 其余各位点在不同群体内均小于 0.10, 说明牛 *HTR1B* 基因较保守。

关键词: *HTR1B* 基因; PCR-SSCP; SNP; 牛

Molecular genetic characteristic of bovine *HTR1B* gene

ZHANG Chun-Lei¹, CHEN Hong^{1,2}, LEI Chu-Zhao¹, FANG Xing-Tang², LAN Xian-Yong¹, ZHANG Li¹, ZHANG Ai-Ling¹, WANG Ju-Qiang³, HU Shen-Rong¹

1. College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2. Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China;
3. The Research Center of Beef Engineering and Technology in Henan, Zhengzhou 450003, China

Abstract: The aim of the present study was to identify and characterize polymorphisms within the coding region and the 3' flanking region of the bovine serotonin receptor 1B gene among different cattle breeds. Four DNA fragments were amplified by polymerase chain reaction and then used for polymorphism identification by SSCP. The fragments showing different SSCP patterns were sequenced. And a total of six SNPs (G205T, C507T, C546G, C744T, G816A and G942A) were detected. The SNPs were at Hardy-Weinberg equilibrium except C507T and C546G in all genetic population. The frequencies of allele 205T of Holstein were much higher than that of the other six beef cattle populations. Almost the PIC of all SNPs were not more than 0.10 except that of G205T in Holstein cows, which indicated the bovine *HTR1B* gene was conserved.

Keywords: *HTR1B* gene; PCR-SSCP; SNPs; bovine

收稿日期: 2006-08-30; 修回日期: 2006-09-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(国家 863 计划)(编号: 2006AA10Z197); 河南省杰出人才基金(编号: 0521001900)和西北农林科技大学拔尖人才支持计划项目资助[Supported by Chinese National Programs for High Technology Research and Development(863 Program) (No. 2006AA10Z197), Phenom Innovation Foundation of Henan Province (No. 0521001900) and the Outstanding Talents Foundation of Northwest A & F University (No.05YCH018)]

作者简介: 张春雷(1980—), 男, 江苏邳州人, 在读博士研究生, 研究方向: 生物技术与家畜育种研究。E-mail: goose888@sina.com

通讯作者: 陈宏(1955—), 男, 陕西西安人, 教授, 博士生导师, 研究方向: 生物技术与动物育种。E-mail: chenhong1212@263.net

家畜性情是指家畜对管理者操作的反应, 主要是恐惧反应^[1]。在畜牧业生产中, 家畜的性情不仅影响管理, 而且影响畜产品的产量和质量。性情温驯的肉牛平均日增重^[2,3]和屠宰率^[4]均高于暴躁型牛, 并且肉质更细嫩^[5]。此外, 紧张型牛易患病, 生产潜力不能充分发挥, 生产成本较温驯型牛高。

牛的性情是可遗传的, 但其分子遗传机制研究很少^[6]。5-羟色胺(HT)是哺乳动物行为调控的重要神经递质, 它可以调控包括睡眠、恐惧、攻击、情绪和采食等多种行为。HT 发挥功能是通过其受体超家族^[7]。HT 的 1B 型受体(HTR1B)是其成员之一。HTR1B 存在于多个大脑区域内的神经元突触前体和后体中, 可以调节 HT 和其他神经递质的分泌^[8]。HTR1B 基因缺失的小鼠攻击性增加^[9,10], 焦虑行为减少^[10]。人类 HTR1B 基因的数个多态位点与酗酒、自杀和强迫症相关^[11]。另外, HTR1B 基因的突变使人的体重^[12,13]增加。由此可见 HTR1B 可能在家畜的性情和生长调控中发挥着重要作用。

选取 6 个肉牛品种和 1 个奶牛品种共 673 头牛作为材料, 应用 PCR-SSCP 技术研究了 HTR1B 基因的多态性, 为牛性情性状的选择提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

68 份秦川牛血样采自陕西秦川牛原种场, 240 份南阳牛血样采自河南南阳黄牛研究所原种场, 144 份郟县红牛血样采自河南郟县, 57 份鲁西牛血样采自山东鲁西黄牛原种场, 61 份晋南牛血样采自山西运城, 43 份安格斯牛血样采自陕西杨凌, 61 份荷斯坦奶牛血样采自陕西西安草滩农场。样品 ACD 抗凝, -80℃ 冻存。用酚氯仿抽提法提取基因组 DNA, 4℃ 保存。

表1 PCR引物信息

Table 1 Primers for polymerase chain reaction (PCR) amplification

片段名称 Fragment name	片段位置* Fragment position	引物序列 Primer pairs	复性温度(°C) T _m
H1	165 ~ 449	5 -CCGCCGAGGAGTACATTTACCA-3	64
		5 -CCGACGACAGCCATAAGTCACAG-3	
H2	421 ~ 803	5 -GGTGGTCTGTGACTTATGGCTGTC-3	65
		5 -CGGTTCTGTTGGGCGTCTGT-3	
H3	781 ~ 1151	5 -GAAACAGACGCCAACAGAA-3	68
		5 -TGATGAGGGAGTTGAGATAGCC-3	
H4	992 ~ 1257	5 -AAAGCCACCAAGACCCT-3	61
		5 -AGGCGACCCATTGTA-3	

* 指在 XM_583895.2 的位置。

*: Correspond to the position of XM_583895.2.

1.2 引物的设计和 PCR 扩增

根据 GenBank 中已发表的牛 HTR1B 基因序列 (XM_583895.2) 设计引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成, 对牛的基因组进行扩增。引物及片段信息见表 1。

PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 复性 40 s, 72℃ 延伸 40 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 保存。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 PCR-SSCP 法检测单核苷酸多态

5 μL PCR 产物和 5 μL 的上样缓冲液(98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯青、10 mmol/L EDTA (pH8.0)、10% 甘油), 98℃ 变性 10 min, 迅速插入冰中, 放置 5 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。电泳结束后, 进行银染显带。最后进行单链构象多态性(SSCP)分析。

1.4 PCR 产物的克隆和测序

将 PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶中电泳并回收, 直接在 ABI3730 自动测序仪上双向测序。将测序结果提交 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> 网站比较, 以检测 SNP 位点。

1.5 数据统计

采用 PopGene 软件进行群体遗传分析。

2 结果与分析

2.1 PCR-SSCP 序列分析

H1 片段表现 2 种 SSCP 基因型(H1-A 和 H1-B) (图 1)。序列分析显示: H1 片段具有 2 种等位基因(205G 和 205T)。H1-A 为纯合型, H1-B 为杂合型。与序列 XM_583895 进行比对发现在该序列对应的第 205 碱基位置发生颠换 G>T。该突变导致其编码的氨基酸序列由天冬氨酸突变为丝氨酸。

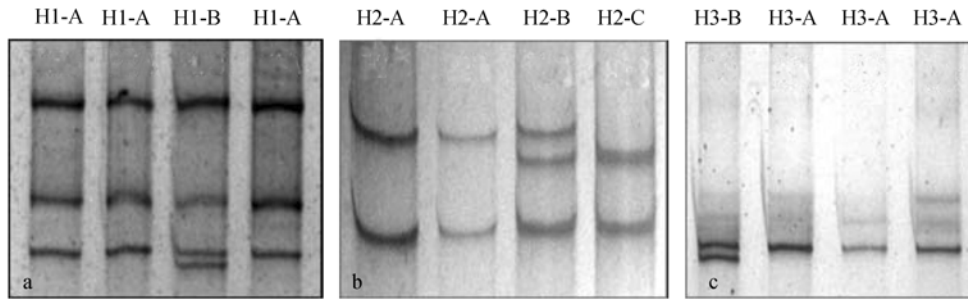


图 1 不同片段 SSCP 带型

a: H1; b: H2; c: H3。

Fig. 1 Electrophoretic patterns of fragments.

a: Banding pattern of H1 SSCP; b: Banding pattern of H2 SSCP; c: Banding pattern of H3 SSCP.

表 2 H1 片段基因型和等位基因频率

Table 2 Distribution of genotype and allele frequencies of different polymorphisms within H1 fragment

群体 Populations	样本数 N	基因型频率 Genotype frequencies			等位基因频率 Allele frequencies	
		H1-A	H1-B	χ^2	205G	205T
秦川牛 Qinchuan	68	0.91	0.09	NS*	0.91	0.09
南阳牛 Nanyang	240	0.90	0.10	NS	0.90	0.10
鲁西牛 Luxi	57	1.00	0.00	-	1.00	0.00
晋南牛 Jinnan	60	1.00	0.00	-	1.00	0.00
郑县红牛 Jiaxian	144	0.92	0.08	NS	0.92	0.08
安格斯 Angus	43	0.98	0.02	NS	0.98	0.02
荷斯坦 Holstein	61	0.70	0.30	NS	0.70	0.30

*: 适合度检验差异不显著, 凡给出数值的表示差异显著($df=1, \chi^2_{0.01}=6.64$), 以下同。

*: Means there is no difference, and values shown in this column means there are significant difference by Chi-square test ($df=1, \chi^2_{0.01}=6.64$).

表 3 H2 片段多态性基因型和等位基因频率

Table 3 Distribution of genotype and allele frequencies of different polymorphisms within H2 fragment

群体 Populations	样本数 N	基因型频率 Genotype frequencies				等位基因频率 Allele frequencies	
		H2-A	H2-B	H2-C	χ^2	H2-CC	H2-TG
秦川牛 Qinchuan	68	0.93	0.03	0.04	41.84	0.94	0.06
南阳牛 Nanyang	240	0.98	0.01	0.01	204.42	0.98	0.02
鲁西牛 Luxi	57	0.96	0.04	0.000	NS	0.98	0.02
晋南牛 Jinnan	60	0.98	0.00	0.02	119.01	0.98	0.02
郑县红牛 Jiaxian	144	0.96	0.00	0.04	156.56	0.96	0.04
安格斯 Angus	43	1.00	0.00	0.00	-	0.98	0.02
荷斯坦 Holstein	61	0.967	0.016	0.016	39.66	0.97	0.03

H2 片段表现 3 种 SSCP 基因型(H2-A、H2-B 和 H2-C)(图 2)。对该片段的核苷酸序列进行分析表明, 该片段存在 2 种等位基因(H2-CC 和 H2-TG)。基因型 H2-A 和 H2-C 为纯合型, H2-B 为杂合型。与序列 XM_583895 比对表明, H2 片段在与该序列对应的第 507 和第 546 个碱基分别发生转换(C>T)和颠换(C>G), 突变未引起氨基酸序列改变。

H3 片段表现为 2 种 SSCP 基因型(H3-A 和 H3-

B)(图 3)。对该片段的核苷酸序列进行分析表明, 该片段存在 2 种等位基因(H3-CGG 和 H3-TAA)。与序列 XM_583895 比对表明, H2 片段在与该序列对应的第 744、816 和 942 位碱基分别发生了转换(C>T、G>A 和 G>A)。

H4 片段表现为 1 种 SSCP 基因型。该片段的序列与 XM_583895 对应位置完全一致, 无多态性。

表4 H3片段多态性基因型和等位基因频率

Table 4 Distribution of genotype and allele frequencies of different polymorphisms within H3 fragment

群体 Populations	样本数 N	基因型频率 Genotype frequencies			等位基因频率 Allele frequencies	
		H3-A	H3-B	χ^2	H3-CGG	H3-TAA
秦川牛Qinchuan	68	1.00	0.00	—	1.00	0.00
南阳牛Nanyang	240	0.98	0.02	NS	0.99	0.01
鲁西牛Luxi	57	1.00	0.00	—	1.00	0.00
晋南牛Jinnan	60	1.00	0.00	—	1.00	0.00
郑县红牛Jiaxian	144	0.96	0.04	NS	0.98	0.02
安格斯Angus	43	1.00	0.00	—	1.00	0.00
荷斯坦Holstein	61	1.00	0.00	—	1.00	0.00

表5 各片段的杂合度、有效等位基因数和多态信息含量

Table 5 The H_e , N_e and PIC of different fragments

群体 Populations	H1			H2			H3		
	H_e	N_e	PIC	H_e	N_e	PIC	H_e	N_e	PIC
秦川牛Qinchuan	0.09	1.09	0.08	0.03	1.12	0.10	0.00	1.00	0.00
南阳牛Nanyang	0.10	1.11	0.10	0.00	1.03	0.02	0.02	1.02	0.02
鲁西牛Luxi	0.00	1.00	0.00	0.04	1.04	0.03	0.00	1.00	0.00
晋南牛Jinnan	0.00	1.00	0.00	0.00	1.03	0.03	0.00	1.00	0.00
郑县红牛Jiaxian	0.08	1.08	0.07	0.00	1.09	0.08	0.04	1.04	0.06
安格斯Angus	0.02	1.02	0.02	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	0.00
荷斯坦Holstein	0.30	1.34	0.25	0.02	1.05	0.05	0.00	1.00	0.00

2.2 HTR1B 基因遗传多态性分析

基因型频率和等位基因频率品种间差异很大(表2~表4)。H1片段中, H1-A为优势基因型, 鲁西牛和晋南牛群体中没有发现 H1-B基因型, 而荷斯坦奶牛的205T等位基因频率显著高于其他群体($\chi^2=6.87$)。H2片段中, H2-A为优势基因型, 群体的突变基因型频率都小于0.05。H3片段中, H3-A为优势基因型, 鲁西牛、晋南牛和安格斯牛只有H3-A型。

χ^2 检验显示, 各遗传群体H1片段和H3片段多态位点均处于Hardy-Weinberg平衡状态, 而H2位点只有鲁西牛处于Hardy-Weinberg平衡。

各片段的杂合度、有效等位基因数和多态信息含量见表5。各位点的杂合度均很低, 只有奶牛的H1片段超过0.10。而有效等位基因数均接近于1.00。各多态片段的多态信息含量除荷斯坦H1片段为0.25外, 其余各品种各片段均小于0.25, 为低度多态。

3 讨论

关于人和模式动物HTR1B基因功能和分子遗传特性的研究很多^[9~11]。结果显示, 人和小鼠HTR1B基因存在很多与行为有关的单核苷酸多态位点。牛

的HTR1B基因位于9号染色体。本文首次研究了牛HTR1B基因的多态性, 共发现6个单核苷酸多态位点, 但其等位基因的突变频率均很低, 说明HTR1B基因比较保守。其中205G>T突变, 导致了第69位Ala突变为Ser。该突变位于HTR1B受体的第一跨膜区, 它属于高度保守的7tm_1区。其他物种与牛HTR1B 69Ser对应位置的氨基酸残基均为Ala, 表明该位点的突变很可能影响牛HTR1B受体的功能。

奶牛的205T等位基因频率显著大于其他品种。很多实验证明人和小鼠HTR1B基因的突变会导致其行为的改变^[9~11]。并且, Schutz等^[13]将1个与牛性情相关的QTL定位于牛的9号染色体上。而人们在选育奶牛的过程中会将性情纳入选择, 因此奶牛这些等位基因频率的升高有可能是由人工选择造成的。如果以上推测成立, 那么HTR1B很可能是参与性情调控的重要基因。

所研究位点大多处于Hardy-Weinberg平衡状态, 这可能是由于这些位点所处的选择压较小。传统肉牛选育的重点在生长速度和屠宰性状以及繁殖性状, 很少涉及性情指标。近年来, 随着消费者对畜产品品质要求的提高, 和动物福利的提出, 已有学者开展畜禽性情的QTL定位研究^[14~16]。

参考文献 (References):

- [1] Burrow HM. Measurement of temperament and their relationship with performance traits of beef cattle. *Anim Breed Abstr*, 1997, 65: 478–495.
- [2] Voisinet BD, Grandin T, Tatum JD. Feedlot cattle with calm temperaments have higher average daily gains than cattle with excitable temperaments. *J Anim Sci*, 1997, 75: 892–896.
- [3] Fell LR, Colditz IG, Walker KH. Associations between temperament, performance and immune function in cattle entering a commercial feedlot. *Aust J Exp Agric*, 1999, 39: 795–802.
- [4] Petherick JC, Holroyd RG, Doogan VJ. Productivity, carcass and meat quality of lot-fed *Bos indicus* cross steers grouped according to temperament. *Aust J Exp Agric*, 2002, 42: 389–398.
- [5] Voisinet BD, Grandin T, Tatum JD. *Bos indicus*-cross feedlot cattle with excitable temperaments have tougher meat and a higher incidence of borderline dark cutters. *Meat Sci*, 1997, 4: 367–377.
- [6] Boissya A, Fisher AD, Bouix J. Genetics of fear in ruminant livestock. *Livest Prod Sci*, 2005, 93: 23–32.
- [7] Voisinet BD, Grandin T, Tatum JD. Feedlot cattle with calm temperaments have higher average daily gains than cattle with excitable temperaments. *J Anim Sci*, 1997, 75: 892–896.
- [8] Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002, 71: 533–554.
- [9] Saudou F, Amara DA, Dierich A. Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT_{1B} receptor. *Science*, 1994, 265: 1875–1878.
- [10] Zhuang X, Gross C, Santarelli L, Compan V, Trillat AC, Hen R. Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptors. *Neuropsychopharmacology*, 1999, 21: 52S–60S.
- [11] Sanders AR, Duan J, Gejman PV. DNA variation and psychopharmacology of the human serotonin receptor 1B (*HTR1B*) gene. *Pharmacogenomics*, 2002, 3: 745–762.
- [12] Bouwknecht JA, van der Gugten J, Hijzen T H. Male and female 5-HT_{1B} receptor knockout mice have higher body weights than wildtypes. *Physiol Behav*, 74 (4-5): 507–516.
- [13] Levitan RD, Kaplan AS, Masellis M. Polymorphism of the serotonin 5-HT_{1B} receptor gene (*HTR1B*) associated with minimum lifetime body mass index in women with bulimia nervosa. *Biological Psychiatry*, 2001, 50: 640–643.
- [14] Schutz SM, Stookey JM, Winkelman-Sim DC. A QTL study of cattle behavioral traits in embryo transfer families. *J Heredity*, 2001, 92 (3): 290–292.
- [15] Buitenhuis AJ, Rodenburg TB, Siwek M. Quantitative trait loci for behavioural traits in chickens. *Livest Prod Sci*, 2005, 93: 95–103.
- [16] Karin S, Susanne K, Örjan C. QTL analysis of a red Junglefowl × White Leghorn intercross reveals trade-off in resource allocation between behavior and production traits. *Behav Genet*, 2002, 32(6): 423–433.

第十四次全国动物遗传育种学术讨论会将在武汉召开

根据中国畜牧兽医学动物遗传育种学会理事会的决定,第十四次全国动物遗传育种学术讨论会暨理事会换届选举会议将于 2007 年 10 月 8 日至 11 日在武汉召开。届时将汇集国内外从事动物遗传育种教学、科研和实践的专家、学者及技术人员,展示目前国内外本领域最前沿的研究进展和成果。本次会议将主要收集研究论文摘要且不公开出版,目的在于让各位研究者提供最新的研究成果供会议交流的同时,不影响在专业杂志上发表自己的研究成果。

征文为涵盖动物遗传育种领域的最新研究进展、研究报告、经验交流、研究简报。(1)数量遗传学、群体遗传学、生化遗传学、细胞遗传学、免疫遗传学、发育遗传学、进化遗传学及其在动物育种中的应用;(2)分子遗传学、基因组学、蛋白组学及其在动物育种中的应用;(3)畜禽、水生动物、特种经济动物、实验动物的遗传改良;(4)动物遗传资源的评估、保护、利用(杂种优势利用、开发利用)与创新;(5)电子计算机、生物信息与系统生物学、繁殖

生物技术等新技术及其在动物遗传育种中的应用;(6)动物遗传育种、生物信息及相关课程的教学法研究。

本次征文须是未曾在国内外公开发表过的学术论文(被其他学术会议录用过但该会议无正式出版物的仍可提交,但应注明被哪个会议录用)。以研究报告为主,除特约稿外,一般不受理综述性文章。以摘要形式出版。每篇论文摘要字数不超过 1,500 字。征集论文截止时间为 2007 年 7 月 31 日。

请尽量通过电子邮件提交,邮件主题请用“第一作者姓名+单位名称”格式,收件人地址:animalmeeting@gmail.com 和 zhumentingjin@yahoo.com.cn。

会议秘书组联系人 范盛先,朱猛进(华中农业大学动物科技学院)电话:027-87282091

E-mail: animalmeeting@gmail.com, zhumentingjin@yahoo.com.cn

(朱猛进)