

徐龙鑫,刘 镜,张 麟,等. 关岭黄牛 *ANGPTL4* 基因多态性与生长性状关联分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):51-53.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.014

# 关岭黄牛 *ANGPTL4* 基因多态性与生长性状关联分析

徐龙鑫,刘 镜,张 麟,何光中

(贵州省畜牧兽医研究所,贵州贵阳 550005)

**摘要:**为研究牛血管生成素样蛋白 4(angiotensin-like protein 4, *ANGPTL4*) 在调节脂肪和能量代谢中的作用,采用 DNA 测序技术,对关岭黄牛 92 头个体 *ANGPTL4* 基因的多态性进行研究,分析多态性位点与关岭黄牛生长性状的相关性。结果表明,在扩增片段为 752 bp 的产物中,发现 387 C>T、418 C>T、449 A>T 等 3 个突变位点,3 个突变位点均处于哈代-温伯格不平衡状态(HWE) ( $P<0.05$ ),3 个多态位点的多肽信息含量(PIC)均为中度多态。相关性检测结果表明,418 C>T 突变位点不同基因型关岭黄牛的体高、体斜长、胸围、腹围表现出差异极显著( $P<0.01$ ),449 A>T 突变位点不同基因型关岭黄牛的体高表现出差异显著( $P<0.05$ ),胸围、腹围表现出差异极显著( $P<0.01$ )。

**关键词:**关岭黄牛;*ANGPTL4* 基因;多态性;关联分析

**中图分类号:** S823.8<sup>+</sup>12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0051-02

血管生成素相关蛋白 4(angiotensin-related protein 4, *ANGPTL4*) 是与血管生成、脂类代谢、葡萄糖代谢、胰岛素敏感性密切相关的分泌性蛋白质因子<sup>[1-3]</sup>,并与 TGF $\beta$  信号通道直接关联,在肿瘤细胞的恶性转移过程中起着关键作用<sup>[4]</sup>。现有研究表明,类血管生成素 4 除了在血管发生方面同血管生成素(*ANGPTL*)相似的作用外,它还可以抑制脂蛋白脂肪酶的活性同时正调控血浆甘油三酯水平<sup>[5-6]</sup>,促进脂肪动员,抑制脂肪贮存<sup>[7]</sup>。它是调控脂类分化和葡萄糖代谢平衡的核受体,因此, *ANGPTL4* 基因可能在脂类代谢和葡萄糖代谢平衡的调控方面发挥作用<sup>[8-9]</sup>。

目前,在人和鼠上对 *ANGPTL4* 基因的研究报道较多,但是家畜该基因的研究报道较少。马云克隆了牛的 *ANGPTL4* 基因的 CDS 序列和部分 DNA 序列,运用测序和 PCR-SSCP 相结合的方法对该基因的部分基因组 DNA 片段进行单核苷酸多态性检测<sup>[10]</sup>,同时运用一般线性模式研究 *ANGPTL4* 基因与 8 个品种牛肉质性状的相关性,结果表明,牛 *ANGPTL4* 基因的遗传变异与牛育肥后肌内脂肪含量存在密切关系。研究 *ANGPTL4* 基因的结构和功能,剖析其影响牛肌间脂肪含量的分子机制,有助于实现肌间脂肪含量性状的遗传改良。

本研究采用直接测序方法,以贵州关岭黄牛为对象,研究 *ANGPTL4* 基因的多态性,同时与关岭黄牛生长性状进行关联分析,旨在寻找牛 *ANGPTL4* 基因与代谢调控的关系,寻找黄牛与生长性状有关的分子标记,为贵州黄牛标记辅助育种提供基础资料,为提高贵州黄牛的生育性能提供理论依据。

## 1 材料与方法

收稿日期:2016-03-19

基金项目:贵州省科学技术基金[编号:黔科合 J 字 LNK(2013)06 号];贵州省现代肉牛产业技术体系建设项目(编号:GZCYTX-03)。

作者简介:徐龙鑫(1981—),男,山东菏泽人,硕士,主要研究方向为动物遗传育种。E-mail:15286045978@163.com。

通信作者:何光中,研究员。E-mail:hgzhong0532@163.com。

### 1.1 试验材料

92 头关岭黄牛全血样采自贵州省关岭县种群核心保种区。采取的黄牛全血样肝素抗凝,放入冰盒中带回实验室-80℃保存备用。在采样的同时,对各个体的生长性状、体长数据进行测定。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

采用蛋白酶 K 和 TaKaRa Blood Genome DNA Extraction Kit(购于北京天根生物公司)提取基因组 DNA。

### 1.3 引物设计和 PCR 扩增

根据在 GenBank 中登录的牛 *ANGPTL4* 基因序列(GenBank 登录号为 NC 007305.4),使用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计 1 对引物,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列信息见表 1。

表 1 *ANGPTL4* 基因引物序列信息

反应编号	引物序列 (5'→3')	产物大小 (bp)	退火温度 (℃)
F	GCAGCCACTTCTTATTC	752	57
R	AAGGGCAAGATGGGAGGGA		

PCR 反应体系为 20  $\mu$ L,其中 2  $\times$  Taq PCR Master Mix 10  $\mu$ L,购于北京天根生物公司;上下游引物各 1  $\mu$ L;DNA 模板 2  $\mu$ L;ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。PCR 反应条件为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,57℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,30 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存备用。

### 1.4 PCR 产物的测序

将 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳,然后用琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒回收扩增片段,送生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

### 1.5 数据统计与分析

用 DNASTAR 软件包中的 SeqMan 对测序所得的序列进行校对,用 Clustalx 程序进行同源性比对。基因型频率、等位基因频率、杂合度等群体遗传参数采用 PopGene 生物技术软件处理。运用 SPSS 13.0 分析生长性能数据及关联性。

2 结果与分析

2.1 *ANGPTL4* 基因 SNP 检测

由图 1 可见,关岭黄牛 *ANGPTL4* 基因 PCR 扩增片段长度为 752 bp,经测序检测发现,387 C>T、418 C>T、449 A>T 等 3 个突变位点均存在 2 种基因型。

2.2 关岭黄牛 *ANGPTL4* 基因多态性分析

由表 2 可见,3 个变异位点均是杂合子基因型为优势基因型。387 C>T 变异位点 C 等位基因频率小于 T 等位基因,418 C>T 变异位点 C 等位基因频率大于 T 等位基因,449 A>T 变异位点 A 等位基因频率大于 T 等位基因。HWE 检测结果表明,3 个变异位点均处于 HWE 不平衡状态( $P<0.05$ )。3 个变异位点的杂合度( $H_e$ )介于 0.441 9~0.492 7

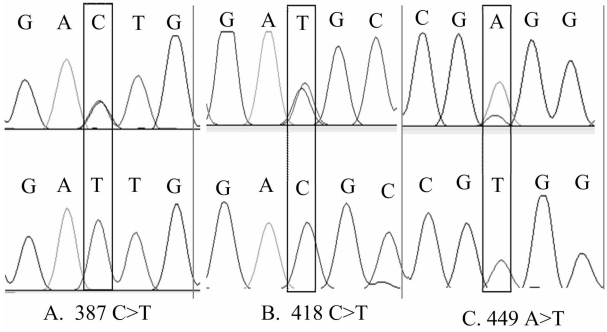


图1 关岭黄牛 *ANGPTL4* 基因的测序结果

之间,有效等位基因( $N_e$ )介于 1.784 1~1.960 8 之间,多态信息含量(PIC)均呈现中度多态。

表 2 关岭黄牛 *ANGPTL4* 基因的多态性分析

位点	观察基因型 ( $n=92$ )	等位基因频率	哈-温平衡 $P$ 值	杂合度	有效等位 基因数	多态信息 含量
387 C>T	TT;28;CT;64	C;0.347 8;T;0.652 2	<0.05	0.456 2	1.830 4	0.354 2
418 C>T	CC;32;CT;60	C;0.673 9;T;0.326 1	<0.05	0.441 9	1.784 1	0.374 9
449 A>T	AA;13;AT;79	A;0.570 7;T;0.429 3	<0.05	0.492 7	1.960 8	0.366 3

2.3 关岭黄牛 *ANGPTL4* 基因多态位点与生长性状关联性分析

如表 3 所示,将关岭黄牛 *ANGPTL4* 基因多态位点与关岭黄牛体高、体斜长、胸围、腹围、管围、十字部高、坐骨端宽 7

个生长性状指标进行关联性分析,418 C>T 变异位点 CT 基因型个体体高、体斜长、胸围、腹围极显著大于 CC 基因型;449 A>T 变异位点 AA 基因型个体体高显著大于 AT 基因型,胸围、腹围极显著大于 AT 基因型。

表 3 关岭黄牛 *ANGPTL4* 基因的 SNPS 与生长性状关联性分析

位点	基因型	体高 (cm)	体斜长 (cm)	胸围 (cm)	腹围 (cm)	管围 (cm)	十字部高 (cm)	坐骨端宽 (cm)
387 C>T	TT	110.11±9.49	120.64±14.20	150.46±15.76	174.11±24.63	14.04±2.08	111.86±9.06	17.93±3.07
	CT	100.41±7.77	121.05±12.87	150.87±17.45	172.95±20.64	14.69±2.31	109.23±14.42	17.54±2.73
418 C>T	CC	108.19±10.83	114.94±16.95	145.78±22.77	161.66±25.20	13.31±2.28	110.53±10.97	17.50±3.22
	CT	111.45±6.35**	124.12±9.41**	153.40±12.08**	179.52±16.92**	15.12±1.99	109.77±14.09	17.75±2.62
449 A>T	AA	111.23±3.44*	124.92±2.39	153.69±4.698**	180.85±8.57**	15.23±1.74	104.92±27.99	17.07±0.76
	AT	110.16±8.83	120.27±1.55	150.27±18.08	172.06±23.06	14.37±2.32	110.87±8.52	17.76±3.03*

注: \*、\*\* 分别表示两者之间差异显著( $P<0.05$ )、极显著( $P<0.01$ )。

3 结论与讨论

候选基因法是一种寻找畜禽重要经济性状遗传标记的常用方法,它可以直接研究该基因多态性与个体经济性状的关系。本研究通过测序方法对关岭黄牛的 *ANGPTL4* 基因进行多态性分析,并与生长性状进行关联性分析。结果发现,3 个变异位点均具有 2 种基因型。从进化角度看,群体中的遗传多样性是历史的产物<sup>[11]</sup>,多态性信息含量和杂合度都是群体内遗传变异的重要度量指标,杂合度值越大,群体内的遗传变异就越大。多态信息含量值衡量基因变异程度高低,Botstein 等提出衡量基因变异程度高低的 多态信息含量指标,当  $PIC>0.5$  时,该变异位点为高度多态;当  $0.25<PIC\leq0.5$  时,为中度多态基因座; $PIC\leq0.25$  时,为低度多态<sup>[12]</sup>。本研究中 3 个变异位点的杂合度( $H_e$ )介于 0.441 9~0.492 7 之间,多态信息含量(PIC)介于 0.354 2~0.374 9 之间,均属于中度多肽。根据 HWE 平衡定律,如果没有选择、突变和迁移等发生,在 1 个大的随机交配群体内,等位基因频率和基因型频率随世代的增加而保持不变,本研究中 3 个变异位点均处

于 HWE 不平衡状态,这也许是由于在生产中人工选择导致数量性状的主效基因及其连锁的基因平衡被打破,人工选择强度较大。以上结果表明,关岭黄牛 POMC 基因的遗传多样性相对比较丰富,选择潜力较大。

*ANGPTL4* 蛋白是一种具有广泛生理功能的物质,尤其对脂代谢的调控具有重要作用,脂代谢影响肉质的嫩度、风味和多汁性,脂肪性状是衡量肉质的重要指标之一。因此,研究 *ANGPTL4* 基因的突变对对牛生长发育的影响具有重要的理论和实践意义。本研究中发现,418 C>T 变异位点 CT 基因型个体体高、体斜长、胸围、腹围极显著大于 CC 基因型;449 A>T 变异位点 AA 基因型个体体高显著大于 AT 基因型,胸围、腹围极显著大于 AT 基因型。因此,*ANGPTL4* 基因完全可以作为牛生长性状的潜在遗传标记,为贵州黄牛肉用性能分子育种提供理论依据。

参考文献:

[1] Hato T, Tabata M, Oike Y. The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism[J]. Trends in Cardiovascular Medicine,

龚 静, 林 森, 徐亚欧, 等. 泸宁鸡 *MyoD* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(9): 53–57.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.015

# 泸宁鸡 *MyoD* 基因的克隆及生物信息学分析

龚 静<sup>1</sup>, 林 森<sup>2</sup>, 徐亚欧<sup>2</sup>, 贺庆华<sup>2</sup>, 林亚秋<sup>2</sup>

(1. 四川广播电视大学农林卫生学院, 四川成都 610073; 2. 西南民族大学生命科学与技术学院, 四川成都 610041)

**摘要:** 为了研究 *MyoD* 基因在鸡生长发育与肉质形成中的作用, 以泸宁鸡为研究对象, 采用 RT-PCR 技术克隆 *MyoD* 基因序列, 并利用生物信息学的方法, 对其氨基酸同源性、理化性质等进行分析和预测。结果表明: 泸宁鸡 *MyoD* 基因序列长度为 988 bp, 其编码的蛋白含 299 个氨基酸残基, 具有碱性螺旋-环-螺旋结构(bHLH); 根据 *MyoD* 基因比对, 构建的进化树显示泸宁鸡与人等哺乳动物的同源性为 63%~67%, 与原鸡、绿头鸭、游隼的同源性为 94%~99%。

**关键词:** *MyoD* 基因; 基因克隆; 泸宁鸡; 生物信息学

**中图分类号:** S831.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0053-05

自 Davis 等首次对人类生肌决定因子(myogenic determining factor, *MyoD*) 进行克隆以来, 生物学家对该基因的结构特征及生物学功能产生了浓厚兴趣<sup>[1]</sup>; *MyoD* 在肌肉生成早期分化过程中和成肌细胞增殖阶段进行表达, 主要参与生肌过程<sup>[2]</sup>, 具有决定肌卫星细胞能否成为肌肉干细胞的功能, 并控制着整个肌肉的发育过程<sup>[3-5]</sup>, 属于初级生肌调节因子(MRFs)。由于 *MyoD* 基因产物在多种分化细胞向肌细胞转

化的过程中扮演了重要角色, 因此, 近年来在动物肉质改良育种工作中, 对该基因的研究成为热点。对于成年动物而言, *MyoD* 基因可以调节控制肌细胞的增殖、分化和肌肉组织的增生<sup>[6]</sup>。Akizawa 等学者研究表明, *MyoD* 可与肌球蛋白、肌细胞生成素及肌酸激酶 CK 等基因的启动子区结合, 正调控骨骼肌的生长发育<sup>[7-8]</sup>。Liu 在研究火鸡胚胎发育时发现, 随着火鸡的胚胎发育, *MyoD* 的 mRNA 表达量呈显著下降趋势<sup>[9]</sup>。Gayraud-Morel 等学者指出了, *MyoD* 和 *Myf5* 表达量在成年动物的骨骼肌发育有关<sup>[6]</sup>。国外学者 Powell 等、国内学者李娟等研究发现, 营养状况对动物肌卫星细胞的分裂活性以及肌肉发育有重要影响, 并且赖氨酸、蛋氨酸、胱氨酸及亮氨酸的浓度与 *MyoD* 蛋白表达水平有着正相关关系<sup>[10-16]</sup>, 以上均表明 *MyoD* 在动物肌肉生长中具有不可或缺的调控作用。

基于上述研究, 对 *MyoD* 的功能研究显得尤为重要, 但目

收稿日期: 2016-04-04

基金项目: 四川省畜禽育种攻关项目(编号: 2016NZ0099-36)。

作者简介: 龚 静(1974—), 男, 四川渠县人, 硕士, 讲师, 主要从事微生物分子生物学研究。E-mail: gongjing397@163.com。

通信作者: 贺庆华(1977—), 男, 四川彭州人, 博士, 副教授, 主要从事分子生物学研究。E-mail: 341400255@qq.com。

2008, 18(1): 6–14.

[2] Adachi H, Fujiwara Y, Kondo T, et al. *Angptl 4* deficiency improves lipid metabolism, suppresses foam cell formation and protects against atherosclerosis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 379(4): 806–811.

[3] Aronsson L, Huang Y, Parini P, et al. Decreased fat storage by *Lactobacillus paracasei* is associated with increased levels of angiopoietin-like 4 protein (ANGPTL4) [J]. *PLOS One*, 2010, 5(9): 13087.

[4] Kaddatz K, Adhikary T, Finkernagel F, et al. Transcriptional profiling identifies functional interactions of TGF  $\beta$  and PPAR  $\beta/\delta$  signaling: synergistic induction of *angptl 4* transcription [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(38): 29469–29479.

[5] Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, et al. Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(46): 17450–17455.

[6] Lichtenstein L, Berbée J F, van Dijk S J, et al. *Angptl 4* upregulates cholesterol synthesis in liver via inhibition of LPL- and HL-dependent hepatic cholesterol uptake[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis*

and Vascular Biology, 2007, 27(11): 2420–2427.

[7] 朱洪新, 李锦军, 覃文新, 等. 新基因 *ANGPTL4* 的克隆及其在血管新生中的功能研究[J]. *中华医学杂志*, 2002, 82(2): 94–99.

[8] Köster A, Chao Y B, Mosior M, et al. Transgenic angiopoietin-like (angptl) 4 overexpression and targeted disruption of *angptl4* and *angptl3*: regulation of triglyceride metabolism [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(11): 4943–4950.

[9] Xu A, Lam M C, Chan K W, et al. Angiopoietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(17): 6086–6091.

[10] 马 云. 牛三个基因的分离、定位及其牛经济性状的关联研究[D]. 杨凌: 西北农业大学, 2006.

[11] Nei M, Tajima F, Tatenos Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1983, 19(2): 153–170.

[12] Valizadeh M, Kang K K, Kanno A, et al. Analysis of genetic distance among nine *Medicago* species by using DNA polymorphisms [J]. *Breeding Science*, 1996, 46(1): 7–10.