

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01417

郟县红牛 ZAG 基因多态性与生长性状的相关性

郭义昆¹, 陈宏^{1,2}, 张宝¹, 潘传英¹, 张良志¹, 赵苗¹, 张存芳¹, 蓝贤勇¹, 王居强³

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. 河南肉牛工程技术研究中心, 郑州 450003

摘要: ZAG 基因的功能主要是促进脂肪分解, 减少脂肪含量。文章利用 PCR-SSCP 和 DNA 测序技术研究了 145 头郟县红牛 ZAG 基因编码区 4 个位点(Z1、Z2、Z3、Z4)的多态性, 发现 Z1、Z3、Z4 位点存在 SSCP 多态。对不同 SSCP 带型的对应片段进行了测序分析, 共发现 6 个新的 SNP 多态位点(C115T、A3257G、A4013G、T4027C、C4032T、T4120C)。Z3 位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, Z1、Z4 位点处于非平衡状态。不同基因型与生长发育性状的相关性分析显示, Z4 位点上, AC 基因型个体的体斜长、胸围、管围、体重指标显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$), 大于 AA、AB 基因型个体, 暗示该位点有可能作为郟县红牛生长性状标记辅助选择的标记之一。

关键词: 郟县红牛; ZAG 基因; PCR-SSCP; 生长发育性状

Polymorphisms of ZAG gene with growth traits in Jiaxian red cattle

GUO Yi-Kun¹, CHEN Hong^{1,2}, ZHANG Bao¹, PAN Chuan-Ying¹, ZHANG Liang-Zhi¹, ZHAO Miao¹, ZHANG Cun-Fang¹, LAN Xian-Yong¹, WANG Ju-Qiang³

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 Cattle Engineering Technology in Henan, Zhengzhou 450003, China

Abstract: The main function of ZAG gene is to enable the decomposition of fat, and reduced fat content. In this study, polymorphisms of four loci (Z1, Z2, Z3, Z4) at the coding region of the bovine ZAG gene were detected in 145 Jiaxian red cattle, and polymorphisms were found on Z1, Z3, Z4 loci. The fragments showing different SSCP patterns were sequenced, and a total of six SNPs (C115T, A3257G, A4013G, T4027C, C4032T, and T4120C) were found. The Z3 locus of ZAG gene was at Hardy-Weinberg equilibrium, while Z1 and Z4 loci of ZAG gene were not at Hardy-Weinberg disequilibrium. The association analysis of different genotypes with some of the growth and development traits showed that the individuals with genotype AC had a larger body length, heart girth, circumference of cannon bone, body weight than the individuals with genotypes AA and AB ($P<0.05$ or $P<0.01$, respectively) in Z4 locus. It is suggest that Z4 locus may be one of the marker-assisted selection used as growth traits in Jiaxian red cattle.

Keywords: Jiaxian red cattle; ZAG gene; PCR-SSCP; growth and development traits

收稿日期: 2008-04-08; 修回日期: 2008-07-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30771544)、国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2006AA10Z197)、国家支撑计划(编号: 2006BAD01A10-5)、河南省杰出人才创新基金项目(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 National Natural Science Foundation of China (No. 30771544), Hi-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA10Z197), National Key Technology R&D Program(No. 2006BAD01A10-5), Innovative Foundation of Outstanding Talent from Henan Government(No. 0521001900), and Sustaining Program for Topnotch Persons of Northwest A&F University]

作者简介: 郭义昆(1980-), 男, 河北玉田人, 硕士研究生, 专业方向: 生物技术与家畜育种。E-mail: gyk.2000@tom.com

通讯作者: 陈宏(1955-), 男, 陕西西安人, 博士生导师, 研究方向: 生物技术与家畜育种。Tel: 029-87092004; E-mail: chen hong1212@263.net

锌- α_2 -糖蛋白(zinc- α_2 -glycoprotein, ZAG)是存在于血浆及多种体液中的一种蛋白质^[1], 主要功能是促进脂肪动员分解, 减少脂肪含量, 故又名脂肪动员因子^[2-5], ZAG 属于主要组织相容性复合物(MHC)I 型家族的一员^[6,7]。新近研究发现, 人和小鼠脂肪细胞亦可分泌此种蛋白, 证明它是继肿瘤坏死因子(TNF)- α 、瘦素、脂联素等之后又一参与脂肪能量代谢的脂肪因子, 它能强烈地促进脂肪分解, 明显降低人和小鼠的体重。同时 ZAG 还对目前着重研究的脂联素、瘦素等脂肪细胞因子有强的调节作用^[5-8]。ZAG 可能是调节体重的一个候选基因。这些研究结果均提示, ZAG 可能在脂肪代谢过程中发挥重要的调节作用, 从而影响动物的生长和发育。

牛的 ZAG 基因, 定位在 25 号染色体, 由 4 个外显子, 3 个内含子组成。人类 ZAG 基因定位于染色体 7q22.1, 含 4 个外显子及 3 个内含子, 第一个外显子包括 5'非翻译区、编码信号肽和前 6 个氨基酸的序列; 第二个外显子编码 A 结构域; 第三个外显子编码 B 结构域; 第四个外显子编码 C 结构域, 并包括 3 非翻译区序列^[7]。到目前为止, 还没有关于牛 ZAG 基因多态性的报道。

郑县红牛是我国地方良种黄牛之一, 主产于河南省平顶山市的郑县、宝丰县、鲁山县, 在汝州、禹州、襄城等县(市、区)亦有分布。郑县红牛肌肉发达、骨骼粗壮、后躯发育较好、耐粗饲、抗病力强、

遗传性能稳定、肉用潜力较大, 是发展肉牛产业和培育优良肉牛品种不可多得的宝贵资源, 具有重大的保种价值。本文选取 145 头郑县红牛作为材料, 应用 PCR-SSCP、DNA 测序和生物统计分析方法研究了 ZAG 基因的多态性及其与生长性状的相关性, 试图找到与郑县红牛生长性状相关的分子标记, 为郑县红牛的标记辅助选择育种提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

从河南省郑县红牛保种区郑县随机抽取 145 头成年郑县红牛母牛的血样, 静脉采血, ACD 抗凝, 冰冻运回后放入-80 超低温冰箱保存待用。采样的同时用专门的测量仪测量牛的各项体尺指标。血样基因组 DNA 的提取按 Chen 等^[9]的方法。

1.2 方法

1.2.1 引物设计和 PCR 扩增

根据 GenBank 中牛 ZAG 基因序列(NC_007326)设计 4 对引物(由上海生工生物工程技术服务有限公司合成), 对牛的基因组进行扩增。引物及扩增片段信息见表 1。PCR 扩增条件为 95 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。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 PCR 引物信息

Table 1 Primers for PCR amplification

| 位点 Loci | 片段位置* Fragment position | 引物序列 Primer sequences (5' 3') | 复性温度 Annealing temperature () |
|------------|----------------------------|---|-----------------------------------|
| Z1 | 1~182 (exon1) | ACATTGTCTGCTGCCTGC TACCTCCCCTCCGTTCTT | 58.7 |
| Z2 | 1998~2375 (exon2) | AGGGACGCCACTCCTCAAAG TGCTTCCATCCCGCTCAC | 61.3 |
| Z3 | 2928~3315 (exon3) | TGGTGGCAGACTGTGCAAGA GCATAGGCAGCAGCGGGTA | 63.8 |
| Z4 | 3901~4327 (exon4) | ACACCCTGTCCCTCCACA AGTCTTCCCTCCCAAATCC | 64.5 |

注: * 指在 NC_007326 的位置。

Note: * Corresponding to the position of NC_007326.

1.2.2 PCR-SSCP 检测与扩增产物的回收测序

5 μ L PCR 产物和 5 μ L 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 (pH 8.0)、10%甘油), 98 $^{\circ}$ C 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 10%非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳。电泳结束后, 进行银染显带和判型。经 SSCP 分析后, 对不同基因型个体的 PCR 扩增产物用柱式胶回收

试剂盒回收纯化, 回收后的 DNA 片段送交上海生工生物工程技术服务有限公司直接在 ABI3730 自动测序仪上双向测序。

1.2.3 数据分析

利用 PopGen32 软件计算遗传多态性指标; 用 SPSS 13.0 软件的一般线性模型(GLM)分析个体基因型对牛生长性状的影响。

$$Y = \mu + \text{age} + \text{marker} + \text{MA} + e$$

式中 Y 为性状表型值, μ 为群体平均值, $marker$ 为基因型效应, age 为年龄效应, MA 是年龄与基因型之间的互作效应, e 为环境效应。

2 结果与分析

2.1 郟县红牛 ZAG 基因 PCR-SSCP 分析

Z1 位点表现 2 种 SSCP 基因型(AA 和 AB)(图 1A)。序列分析显示: AA 型与 GenBank 中 NC_007326 序列对应位置完全一致, AB 型与 NC_007326 序列进行比对发现在该序列对应的第 115 碱基位置发生 C>T 的转换。该突变导致其编码的氨基酸序列由色氨酸突变为脯氨酸。Z2 位点表现为 1 种 SSCP 带型。该片段序列与 NC_007326 序列对应位置完全一致, 无多态性。Z3 位点表现 2 种 SSCP 基因型(AA 和 AB)(图 1B)。序列分析显示: AA 型与 NC_007326 序列对应位置完全一致, AB 型与 NC_007326 序列进行比对分析发现, 在该序列对应的第 3257 碱基位置处发生 A>G 的转换。该突变导致其编码的氨基酸序列由精氨酸突变为赖氨酸。Z4 位点表现 3 种 SSCP 基因型(AA, AB 和 AC)(图 1C)。对 AA, AB 和 AC 型的核苷酸序列测定和与 NC_007326 序列的比对分析, 发现所有个体都存在 4032C>T 和 4120T>C 的转换。另外, AB 型还有 4027T>C 的转换, AC 型还有 4013A>G 和 4027T>C 的转换。4032C>T 突变未引起氨基酸序列改变。4013A>G, 4027T>C, 4120T>C 都引起了氨基酸序列改变, 分别是甘氨酸到谷氨酸, 精氨酸到色氨酸, 脯氨酸到丝氨酸的氨基酸序列变化。

2.2 郟县红牛 ZAG 基因遗传多态性指标分析

郟县红牛 ZAG 基因的遗传多态性指标见表 2。 χ^2 检验显示, Z3 位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 而 Z1 和 Z4 位点处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态; 3 个位点的杂合度(He)分别为 0.32、0.05、0.32; 有效等位基因数(Ne)分别为 1.47、1.05、1.48; Z1 和 Z4 位点均处于中度多态, Z3 位点处于低度多态。

2.3 郟县红牛 ZAG 基因多态性与生长性状的联分析

经分析显示: ZAG 基因 Z1、Z3 位点不同基因型对郟县红牛体尺、体重没有明显影响, 而 Z4 位点不同基腰角宽、胸围、尻长、管围、体重都要高于 AA 和 AB 基因型, 其中体斜长、胸围、管围的影响达到了显著水平($P<0.05$), 对体重影响达极显著水平($P<0.01$)。

3 讨论

在牛脂肪因子基因中对脂联素和瘦素多态性研

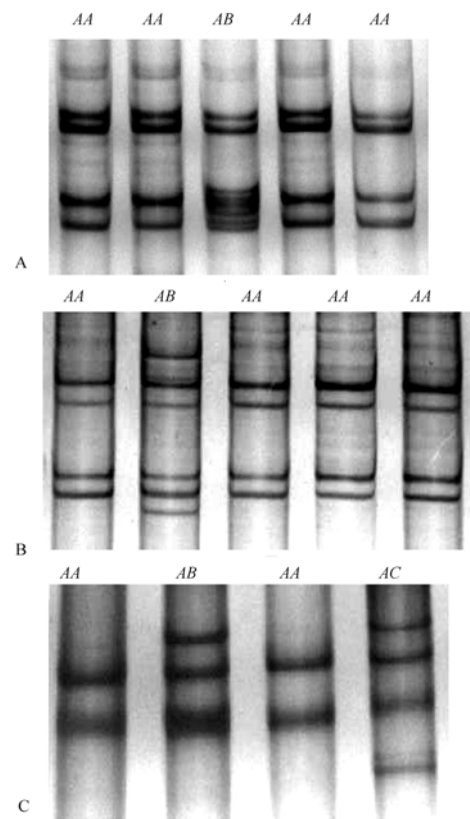


图 1 郟县红牛 PCR 产物的 SSCP 带型

A: Z1; B: Z3; C: Z4。

Fig. 1 SSCP electrophoretic patterns of PCR products in Jiaxian red cattle

A: Banding pattern of Z1 SSCP; B: Banding pattern of Z3 SSCP; C: Banding pattern of Z4 SSCP.

究较多^[10, 11], ZAG 基因多态性还未见报道。牛的 ZAG 基因位于 25 号染色体, 本文首次研究了牛 ZAG 基因的多态性, 共发现 6 个单核苷酸多态位点(115C>T, 3257A>G, 4013A>G, 4027T>C, 4032C>T, 4120T>C), 其中 5 个突变导致了氨基酸的变化, 分别是: 115C>T 突变, 导致了第 17 位 Ser 突变为 Pro; 3257A>G 突变, 导致了第 189 位 Arg 突变为 Lys; 4013A>G 突变, 导致了第 233 位 Gly 突变为 Glu; 4027T>C 突变, 导致了第 238 位 Arg 突变为 Trp; 4120T>C 突变, 导致了第 269 位 Pro 突变为 Ser。在 Z1 位点, B 等位基因的频率达到了 0.21, 但并没有检测到 BB 基因型, 一种情况可能是 BB 纯合时导致个体的生活力降低而死亡, 第二种情况还有可能是样本量不够大, 从而没有检测到 BB 基因型, 但这需要进一步验证。本文检测到 ZAG 基因编码区 5 个 SNP 导致 5 个氨基酸的突变, 这些氨基酸的改变可能引起锌- α_2 -糖蛋白的功能改变, 从而对牛的生长发育性状产生影响, 但所发现的突变是否影响该基

表 2 郟县红牛 ZAG 基因遗传多态性指标

Table 2 Genetic diversity of ZAG gene in Jiaxian red cattle

| 位点 Loci | 基因型频率 Genotype frequencies | | | 等位基因频率 Allele frequencies | | | 杂合度 <i>He</i> | 有效等位基 因数 <i>Ne</i> | 多态信息含量 <i>PIC</i> | 位点是否平衡 χ^2 |
|------------|-------------------------------|------|------|------------------------------|------|------|------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|
| | AA | AB | AC | A | B | C | | | | |
| Z1 | 0.60 | 0.40 | — | 0.79 | 0.21 | — | 0.32 | 1.47 | 0.27 | $P<0.05$ |
| Z2 | 1.00 | 0 | 0 | 1.00 | 0 | 0 | 0.00 | 1.00 | 0.00 | $P>0.05$ |
| Z3 | 0.95 | 0.05 | — | 0.98 | 0.02 | — | 0.05 | 1.05 | 0.04 | $P>0.05$ |
| Z4 | 0.61 | 0.31 | 0.08 | 0.81 | 0.15 | 0.04 | 0.32 | 1.48 | 0.29 | $P<0.05$ |

表 3 郟县红牛 ZAG 基因外显子 4 基因型对体尺、体重的影响

Table 3 Effects of genotypes of ZAG gene exon 4 on bodyweight and body measurements of Jiaxian red cattle

| 生长性状 Growth traits | | 基因型 Genotype | | |
|--------------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | AA | AB | AC |
| 体高 | Body height (cm) | 125.16±0.60 | 123.88±0.88 | 127.60±1.07 |
| 十字部高 | Height at hip cross (cm) | 124.57±0.69 | 123.74±1.01 | 126.55±1.91 |
| 体斜长 | Body length (cm) | 149.95 ^b ±1.11 | 150.41 ^b ±1.61 | 157.60 ^a ±3.06 |
| 腰角宽 | Hip width (cm) | 44.51±0.37 | 44.21±0.54 | 45.50±1.02 |
| 胸围 | Heart girth (cm) | 176.58 ^b ±0.98 | 176.07 ^b ±1.42 | 182.60 ^a ±2.70 |
| 尻长 | Rump length (cm) | 48.51±0.47 | 46.86±0.68 | 49.10±1.29 |
| 坐骨端宽 | Hucklebone width (cm) | 25.08±0.47 | 24.17±0.69 | 24.30±1.31 |
| 管围 | Circumference of cannon bone (cm) | 17.03 ^b ±0.13 | 16.90 ^b ±0.07 | 17.91 ^a ±0.35 |
| 体重 | Body weight (kg) | 469.31 ^B ±7.48 | 467.94 ^B ±10.86 | 533.06 ^A ±20.61 |

注: 表中数值为平均值±标准误; 在同一行中标有不同字母 A、B 的数据间差异为 $P<0.01$; 标有 a、b 为差异显著水平 $P<0.05$ 。

Notes: Estimates are given as mean±SE. Data with different letters (A, B) and (a, b) within the same line differ significantly at 0.01 and 0.05 level, respectively.

因的表达及活性的发挥还有待于进一步的验证。

本试验首次对 ZAG 基因的多态性与郟县红牛的体高、十字部高、体斜长、腰角宽、胸围、尻长、坐骨端宽、管围、体重等性状的相关进行了分析, 发现 Z4 位点 AC 基因型的大多数指标平均值最大, 其中体斜长、胸围、管围、体重与 AA、AB 基因型的差异达到了显著或极显著水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 推测 C 等位基因可能是郟县红牛生长性状的一个有利基因, 但 C 等位基因的频率比较低, 可以通过人工选择来增加其在群体中的基因频率。Z4 位点可能是影响郟县红牛生长发育比较可靠的标记位点, 这些将为郟县红牛的选择提供依据。

参考文献(References):

- [1] Burgi W, Schmid K. Preparation and properties of Zn-alpha 2-glycoprotein of normal human plasma. *J Biol Chem*, 1961, 236: 1066-1074.
- [2] Russell ST, Zimmerman TP, Domin BA, Tisdale MJ. Induction of lipolysis in vitro and loss of body fat in vivo by zinc-alpha2-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1636 (1): 59-68.
- [3] Tzanavari T, Bing C, Trayhurn P. Postnatal expression of zinc-alpha2-glycoprotein in rat white and brown adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 2007, 279(1-2): 26-33. [\[DOI\]](#)
- [4] Delker SL, West AP Jr, McDermott L, Kennedy MW, Bjorkman PJ. Crystallographic studies of ligand binding by Zn-alpha2-glycoprotein. *J Struct Biol*, 2004, 148(2): 205-213. [\[DOI\]](#)
- [5] McDermott LC, Freel JA, West AP, Bjorkman PJ, Kennedy MW. Zn-alpha 2-glycoprotein, an MHC class I-related glycoprotein regulator of adipose tissues: modification or abrogation of ligand binding by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 2006, 45(7): 2035-2041. [\[DOI\]](#)
- [6] Russell ST, Tisdale MJ. Effect of a tumour-derived lipid-mobilising factor on glucose and lipid metabolism *in vivo*. *Br J Cancer*, 2002, 87(5): 580-584. [\[DOI\]](#)
- [7] Sanchez LM, Chirino AJ, Bjorkman P. Crystal structure of human ZAG, a fat-depleting factor related to MHC molecules. *Science*, 1999, 283(5409): 1914-1919.
- [8] Gohda T, Makita Y, Shike T, Tanimoto M, Funabiki K, Horikoshi S, Tomino Y. Identification of epistatic interaction involved in obesity using the KK/Ta mouse as a Type 2 diabetes model: is Zn-alpha 2 glycoprotein-I a candidate gene for obesity? *Diabetes*, 2003, 52(8): 2175-2181. [\[DOI\]](#)
- [9] Chen H, Leibenguth F. Studies on multilocus fingerprints RAPD markers and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*Carassius auratus gibelio*). *Biochem Genet*, 1995, 33 (9-10): 297-306. [\[DOI\]](#)
- [10] Morsci NS, Schnabel RD, Taylor JF. Association analysis of adiponectin and somatostatin polymorphisms on BTA1 with growth and carcass traits in Angus cattle. *Anim Genet*, 2006, 37(6): 554-562. [\[DOI\]](#)
- [11] Yang D, Chen H, Wang X, Tian Z, Tang L, Zhang Z, Lei C, Zhang L, Wang Y. Association of polymorphisms of leptin gene with body weight and body sizes indexes in Chinese indigenous cattle. *J Genet Genomics*, 2007, 34(5): 400-405. [\[DOI\]](#)