

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00329

郟县红牛 *DGAT2* 基因多态性与生长性状的相关性分析

毛海霞^{1,3}, 陈宏^{1,2}, 陈付英¹, 张春雷¹, 王新庄⁴, 王居强⁴

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. 山西师范大学生命科学院动科系, 临汾 041000;
4. 河南省肉牛工程技术研究中心, 郑州 450003

摘要: 利用 PCR-RFLP 技术对随机抽取的 92 头郟县红牛的 *DGAT2* 基因进行多态性分析。结果表明, *DGAT2* 基因第 6 内含子的 PCR 扩增产物被限制性酶 *Taq* I 酶切消化后表现多态性。经电泳检测后, 显出 *AA*、*AB* 两种不同基因型。该基因座处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 通过对郟县红牛 *DGAT2* 基因多态性与体重及体尺指标的方差分析显示: 郟县红牛 *DGAT2* 基因不同基因型对郟县红牛体重和体长有显著影响 ($P < 0.05$), 而对其他体尺指标在统计学上无显著影响 ($P > 0.05$), 且初步认为 *AB* 基因型对选择有正向效应。

关键词: 郟县红牛; PCR-RFLP; *DGAT2*; 生长性能

Association of polymorphisms of *DGAT2* gene with growth traits in Jiaxian red cattle

MAO Hai-Xia^{1,3}, CHEN Hong^{1,2}, CHEN Fu-Ying¹, ZHANG Chun-Lei¹, WANG Xin-Zhuang⁴, WANG Ju-Qiang⁴

1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling 712100, China;
2. Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China;
3. College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen 041000, China;
4. Research Center of Cattle Engineering Technology in Henan, Zhengzhou 450003, China

Abstract: The polymorphisms of *DGAT2* gene in 92 Jiaxian red cattle were analyzed using PCR-RFLP method. Results showed that the PCR products digested with *Taq*I demonstrated polymorphisms, and showed two kinds of genotype: *AA* and *AB*. This polymorphic locus of *DGAT2* gene was at Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). The results of general linear model analysis showed that polymorphisms of *DGAT2* gene had significant association ($P < 0.05$) with body weight and body length, while had no significant association with others growth traits ($P > 0.05$). Therefore, genotype *AB* may have positive effect on body weight.

Keywords: Jiaxian red cattle; PCR-RFLP; *DGAT2*; growth traits

收稿日期: 2007-08-16; 修回日期: 2007-11-15

基金项目: 国家“863”计划项目(编号: 2006AA10Z197); 国家科技支撑计划(编号: 2006BAD01A10-5); 国家自然科学基金(编号: 30771544); 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 Chinese National Programs for High Technology Research and Development(863 program)(No. 2006AA10Z197), National Key Technology R&D Program(No. 2006BAD01A10-5), National Natural Science Foundation of China (No. 30771544), 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: 毛海霞(1970-), 女, 山西省临汾市人, 硕士, 专业方向: 分子生物技术与动物育种。E-mail: 13096647976@sohu.com

通讯作者: 陈宏(1955-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子生物技术与动物育种。E-mail: chen hong1212@263.net

郑县红牛是我国良种黄牛之一,主产于河南省平顶山市的郑县、宝丰县、汝州市等。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^[1],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。

二酰甘油酰基转移酶 2(DGAT2)和二酰甘油酰基转移酶 1(DGAT1)都是催化甘油三酸酯合成最后一步反应的关键酶^[2]。DGAT2 与脂肪代谢、脂类在组织中的沉积有很大关系^[3],在肝脏新合成的脂肪酸聚集成极低密度脂蛋白颗粒中发挥重要作用^[4],与瘦素基因及胰岛素样受体底物 2 基因有密切的关系。Suzuki 等^[5]研究表明,瘦素基因敲除导致小鼠肥胖,且脂肪组织的 *DGAT2* 基因表达增强。Meegalla 等^[6]证明胰岛素促进 *DGAT2* 的表达。

鉴于 *DGAT2* 基因在牛生长发育中的重要作用,本研究首次利用 PCR-RFLP 对郑县红牛 *DGAT2* 基因内含子 6 多态性进行了检测,并分析了其多态性与生长性状的相关性,以期为提高郑县红牛产肉性能提供新的科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

从河南省郑县随机抽取 92 头郑县红牛成年母牛的血样,为静脉采血,ACD 抗凝,冰冻运回后放入 -80°C 保存待用。采样的同时用专门的测量仪按《养牛学》^[7]的方法测量牛的各项体尺指标。

1.2 实验方法

本实验采用 PCR-RFLP 技术,参考张争锋等^[8]设计的引物,扩增 *DGAT2* 基因内含子 6,然后用限制性内切酶 *Taq* 酶切,统计分析不同基因型在郑县红牛群体中的分布及其与生长性状的相关性。

1.2.1 引物

DGAT2 基因内含子 6 引物由上海生物工程技术有限公司合成,引物序列如下: F: 5'-AATCGCAA-GGGCTTTGTGAAAC-3', R: 5'-CCCCAGGTGTC-AGAGGAGAAGA-3'。

1.2.2 PCR 扩增

PCR 扩增体系 20 μL : 10 \times buffer 2 μL , 10 mmol/L dNTPs 0.4 μL , 25 mmol/L MgCl_2 1.2 μL , 5 U *Taq* DNA 聚合酶 0.13 μL , DNA 模板 1 μL (100 ng), 上下游引物 [10 pmol/ μL] 各 0.4 μL , ddH₂O 14.47 μL 。PCR

扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 共 34 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min, 最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 酶切

利用限制性酶 *Taq* 酶对 PCR 扩增产物进行酶切,酶切反应体系为 20 μL : PCR 扩增产物 10 μL , 10 \times buffer (含 BSA) 2 μL , 10 U/ μL *Taq* 酶 0.25 μL , ddH₂O 7.75 μL 。根据酶推荐的温度 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 12 h。酶切产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,所用 Marker 为天为时代的 DL2000, Kodak 凝胶成像系统拍照,最后确定酶切图谱的基因型。

1.3 数据处理

根据最小二乘线性模型,对 *DGAT2* 基因型效应分析的模型如下: $Y_{ijk} = \mu + \text{marker}_k + e_{ijk}$, 其中 Y_{ijk} —个体表型的记录值; μ —群体平均值; marker_k —标记基因型效应; e_{ijk} —随机误差。

2 结果与分析

2.1 对 *DGAT2* 基因第 6 内含子的 PCR-RFLP 分析

DGAT2 基因内含子 6 的 PCR 扩增产物为 1 008 bp (图 1)。经限制性内切酶 *Taq* 酶切后,得到 AA 和 AB 两种基因型: AA 型显示 596 bp、385 bp 两条带; AB 型显示 981 bp、596 bp、385 bp 3 条带。AA 型为纯合子, DNA 双链上各有 2 个相同的酶切位点,将双链分别切成 596 bp、385 bp 和 27 bp 3 个片段; AB 基因型为杂合子, DNA 双链的一条链上只有 1 个酶切位点,将该链切成 981 bp 和 27 bp 2 个片段,而另一条链的 2 个酶切位点将该链切成 596 bp、385 bp 和 27 bp 3 个片段,由于在 2% 的琼脂糖凝胶电泳中 27 bp 的片段基本看不见,因而 AA 型只能显示 596 bp、385 bp 两个片段; AB 型显示 981 bp、596 bp、385 bp 3 个片段。

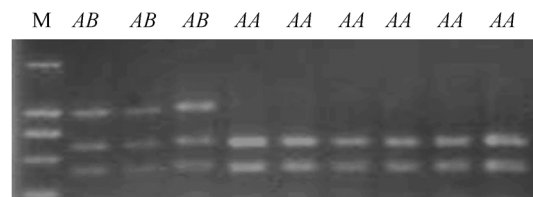


图 1 牛 *DGAT2* 基因内含子 6 PCR 产物 *Taq* I 酶切多态性凝胶电泳检测图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis detection of *Taq* I digested PCR product of *DGAT2* gene intron 6
M: DL2000.

2.2 *DGAT2* 基因座的遗传多态性指标

郑县红牛 *DGAT2* 基因的遗传多态性指标见表 1。由表 1 可知, 郑县红牛 *DGAT2* 基因内含子 6 位点经 *Taq* 酶切表现的多态信息含量(*PIC*)为 0.152, 为低度多态(*PIC*<0.25)。经 χ^2 检验, 该位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态($P>0.05$); 其基因座的等位基因 *A/B* 频率为 0.9088/0.0912; 位点纯合度(H_o)为 0.826; 位点杂合度(H_e)为 0.174; 有效等位基因数(N_e)为 1.2106。

表 1 郑县红牛 *DGAT2* 基因内含子 6 遗传多态性指标
Table 1 Genetic diversity of *DGAT2* gene intron 6

样本数 (N)	基因型频率 Genotype frequencies		基因频率 Gene frequencies		纯合度 (H_o)	杂合度 (H_e)	有效等位基 因数(N_e)	多态信息 含量(<i>PIC</i>)	位点是否 平衡(χ^2)
	$N_{AA}(P_{AA})$	$N_{AB}(P_{AB})$	<i>A</i>	<i>B</i>					
92	76(0.826)	16(0.174)	0.9088	0.0912	0.826	0.174	1.2106	0.152	$P>0.05$

表 2 郑县红牛 *DGAT2* 基因内含子 6 对体尺、体重的影响
Table 2 Effects of genotypes of *DGAT2* gene intron 6 on body weight and body measurements

生长发育性状 Growth traits	基因型 Genotypes	样本数 N	平均值±标准误 Mean±std.error
体高	<i>AA</i>	76	125.44±0.62
Withers height(kg)	<i>AB</i>	16	125.63±0.92
十字部高	<i>AA</i>	76	125.71±1.22
Height at hip cross (cm)	<i>AB</i>	16	124.17±1.03
体长	<i>AA</i>	76	151.04±1.20 ^b
Body length(cm)	<i>AB</i>	16	156.34±2.07 ^a
腰角宽	<i>AA</i>	76	44.74±0.56
Hip width(cm)	<i>AB</i>	16	45.67±0.86
胸围	<i>AA</i>	76	179.04±0.90
Heart girth (cm)	<i>AB</i>	16	180.81±1.55
尻长	<i>AA</i>	76	48.34±0.53
Rump length(cm)	<i>AB</i>	16	49.67±1.02
坐骨端宽	<i>AA</i>	76	24.14±0.80
Ischium width(cm)	<i>AB</i>	16	24.42±1.58
体重	<i>AA</i>	76	490.54±4.79 ^b
Body weight(cm)	<i>AB</i>	16	511.06± 8.81 ^a

注：同一性状肩注不同表示差异显著 ($P<0.05$)。
Note: Different letters in the upper right corner of the data for the same trait show significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

DGAT2 对生物体内甘油三酸的合成起着非常重要的作用, 并且是哺乳动物维持生命所必需的^[9,10], 在肠道内它可以替代 *DGAT1* 合成甘油三酯^[2,6]。Sylvaine 等^[11]2001 年克隆了哺乳动物的第二个 *DGAT* 基因(*DGAT2*)。Winter 等^[12]通过荧光原位杂交技术(FISH)将牛的 *DGAT2* 基因定位于

2.3 郑县红牛 *DGAT2* 基因多态性与生长性状指标的关联分析

分析显示: *DGAT2* 基因不同基因型对郑县红牛体尺有一定的影响, 从表 2 中可以看出: *AB* 基因型个体的生产数据大多高于具有 *AA* 基因型的个体。含 *AB* 基因型个体的体高、体长、腰角宽、胸围、尻长、坐骨端宽、体重比含 *AA* 基因型的个体分别高 0.15%、3.51%、2.09%、0.99%、2.75%、1.16%、4.18%, 但仅对体重、体长的影响达显著水平 ($P<0.05$)。

BTA15q25–26。Meegalla 等^[6]证明与哺乳动物的生长密切相关的胰岛素^[13]能促进 *DGAT2* 的表达。同时有研究表明, *DGAT2* 基因与动物的体重、体尺等指标有关^[14~16]。

张争锋等^[8]研究南阳牛 *DGAT2* 基因内含子 6 检测到 *Taq* 多态性, 得到 *AA* 和 *AB* 两种基因型, *AA* 与 *AB* 基因型频率分别为 0.75、0.25。徐秀荣等^[17]在鲁西牛、晋南牛、秦川牛、三河牛和利木赞×鲁西牛杂交后代中得到的 *AA* 与 *AB* 基因型频率分别是: 0.79/0.21、0.91/0.09、0.98/0.02、0.98/0.02、0.92/0.08。本研究中的 *AA* 与 *AB* 基因型频率分别为 0.826、0.174。所得的数据都有一定的差距, 通过上述数据分析, 差异主要是由于品种不同所造成的。*DGAT2* 基因内含子 6 *Taq* 酶切后, 该位点有 2 个等位基因 *A*、*B*, 本实验中只出现了 *AA*、*AB* 基因型, 但却没有发现基因型 *BB*, *A* 等位基因为优势基因, 这同前者的实验结果相符。本研究中多态信息含量低, 表明该品种的遗传纯度比较高。通过与体尺、体重等生长性状的关联分析发现, 含 *AB* 基因型个体的生产数据大多高于含 *AA* 基因型个体的数据, 推测 *B* 等位基因很可能是郑县红牛生长性状的一个有利基因, 由于 *A* 等位基因突变为 *B* 等位基因, 从而失去了一个酶切位点, 可以通过人工选择来增加其在群体中的基因频率。但差异达到显著水平的性状较少, 这说明这个有利突变的作用比较微弱, 这就提示我们在进行育种工作时应结合多个基因位点来选择有利的生长性状。*DGAT2* 基因内含子 6 虽然不是编码

蛋白质的 DNA 序列, 但近年来不断有证据证实内含子对基因的表达调控有着重要的调节作用^[18], 可能在基因的转录及 mRNA 剪接中起重要作用^[19], 本研究中所发现的突变是否影响该基因的表达及活性的发挥还有待于进一步的验证。

参考文献(References):

- [1] The Editorial Board. Report on domestic animal genetic resources in China. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2004.
《中国畜禽遗传资源状况》编委会编, 中国畜禽遗传资源状况, 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [2] Meegalla RL, Billheimer JT, Cheng D. Concerted elevation of acyl-coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity through independent stimulation of mRNA expression of DGAT1 and DGAT2 by carbohydrate and insulin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 298(3): 317–323. [\[DOI\]](#)
- [3] Buhman KK, Smith SJ, Stone SJ. DGAT1 is not essential for intestinal *t* triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis. *J Biol Chem*, 2002, 277(28): 25474–25479. [\[DOI\]](#)
- [4] Wakimoto K, Chiba H, Michibata H, Seishima M, Kawasaki S, Okubo K, Mitsui H, Torii H, Imai Y. A novel diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) is decreased in human psoriatic skin and increased in diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 310(2): 296–302. [\[DOI\]](#)
- [5] Suzuki R, Tobe K, Aoyama M, Sakamoto K, Ohsugi M, Kamei N, Nemoto S, Inoue A, Uchida S, Hara K, Yamauchi T, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T. Expression of DGAT2 in white adipose tissue is regulated by central leptin action. *J Biol Chem*, 2005, 280(5): 3331–3337. [\[DOI\]](#)
- [6] Yu YH, Ginsberg HN. The role of acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase(DGAT) in energy metabolism. *Ann Med*, 2004, 36(4): 252–261. [\[DOI\]](#)
- [7] WANG Gen-Lin. Cattle Production. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2000.
王根林. 养牛学. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [8] ZHANG Zheng-Feng, CHEN Hong, LI Qiu-Ling, LEI Chu-Zhao, ZHANG Chun-Lei, WANG Xin-Zhuang, WANG Ju-Qiang, WANG Yi-Min. Polymorphisms of DGAT2 gene and its associations with several growth traits in Nanyang cattle. *Hereditas(Beijing)*, 2007, 29(8): 945–950.
张争锋, 陈宏, 李秋玲, 雷初朝, 张春雷, 王新庄, 王居强, 王轶敏. 南阳牛 DGAT2 基因 PCR-RFLP 多态性及其与生长性状相关性研究. *遗传*, 2007, 29(8): 945–950.
- [9] Liu BH. Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis. LLC: CRC Press, 1998, 404–409.
- [10] He X, Chen GQ, Lin JT. Diacylglycerol acyltransferase activity and triacylglycerol synthesis in germinating castor seed cotyledons. *Lipids*, 2006, 41(3): 281–285. [\[DOI\]](#)
- [11] Sylvaine Cases, Scot JS, Ping Zhou, Eric Yen, Bryan Tow, Kathryn DL, Toni Voelker, Robert VF Jr. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 38870–38876. [\[DOI\]](#)
- [12] Winter A, van Eckeveld M, Bininda-Emonds OR, Habermann FA, Fries R. Genomic organization of the DGAT2/MOGAT gene family in cattle (*Bos taurus*) and other mammals. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 102(1-4): 42–47. [\[DOI\]](#)
- [13] Lagonigro R, Wiener P, Pilla F, Woolliams JA, Williams JL. A new mutation in the coding region of the bovine *leptin* gene associated with feed intake. *Anim Genet*, 2003, 34(5): 371–374. [\[DOI\]](#)
- [14] Bucher H, Zapf J, Torresani T, Prader A, Froesch ER, Illig R. Insulin-like growth factors I and II, prolactin, and insulin in 19 growth hormone-deficient children with excessive, normal, or decreased longitudinal growth after operation for craniopharyngioma. *N Engl J Med*, 1983, 309(19): 1142–1146.
- [15] Chen N, Liu L, Zhang Y. Whole-body insulin resistance in the absence of obesity in FVB mice with overexpression of dgat1 in adipose tissue. *Diabetes*, 2005, 54(12): 3379–3386. [\[DOI\]](#)
- [16] Orland MD, Anwar K, Cromley D. Acyl coenzyme a dependent retinol esterification by acyl coenzyme A: diacylglycerol acyltransferase 1. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1737(1): 76–82.
- [17] XU Xiu-Rong, GAO Xue, XU Shang-Zhong, ZHANG Ying-Han, REN Hong-Yan, LI Jun-Ya. *Msp* I -RFLPs and *Taq* I -RFLPs in DGAT2 intron 6 and their effects on bovine economic traits. *Acta Veterinaria Zootechnica Sinica*, 2005, 36(10): 981–986.
徐秀容, 高雪, 许尚忠, 张英汉, 任红艳, 李俊雅. 牛 DGAT2 基因第 6 内含子 *Msp* I -RFLPs 和 *Taq* I -RFLPs 及其与牛经济性性状相关性研究. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(10): 981–986.
- [18] Nott A, Meislin SH, Moore MJ. A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. *RNA*, 2003, 9(5): 601–607. [\[DOI\]](#)
- [19] ZAN Lin-Sen, ZHANG Jia-Lan, LIU Xin-Wu. Association study on AGPAT6 intron3 polymorphism and milk performance of dairy cattle. *Scientia Agriculture Sinica*, 2007, 40(7): 1498–1503.
竺林森, 张佳兰, 刘新武. 牛 AGPAT6 基因遗传特征与奶牛产奶性能相关性研究. *中国农业科学*, 2007, 40(7): 1498–1503.