

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00057

# 荷斯坦牛 *Nramp1* 基因遗传多态性及其与乳房炎相关性的研究

胡海川<sup>1,2</sup>, 王洪梅<sup>1</sup>, 李建斌<sup>1</sup>, 王长法<sup>1</sup>, 赖松家<sup>2</sup>, 李秋玲<sup>1</sup>, 仲跻峰<sup>1</sup>

1. 山东省农业科学院奶牛研究中心, 济南 250100;

2. 四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014

**摘要:** 利用 PCR-SSCP 技术检测了 344 头中国荷斯坦牛 *Nramp1* 基因 exon 11 的基因多态性, 并分析了其不同基因型与乳房炎及产奶量性状的关系。结果表明: 实验群体发现 3 种基因型 AA、AB、BB, 其中 A 等位基因为优势等位基因, 等位基因频率为 0.767, 而 B 等位基因频率则为 0.233。经  $\chi^2$  适合性检验, 群体处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ( $P>0.05$ )。测序结果显示: 扩增片段分别在 200 bp(C/G)和 254 bp(T/G)存在碱基突变, 并导致了氨基酸改变, 分别为丙氨酸替换为脯氨酸(Ala356Pro)、亮氨酸替换为蛋氨酸(Leu374Met)。通过构建最小二乘线性模型, 进行 *Nramp1* 基因多态性与产奶量、体细胞评分(SCS)的相关性分析表明, AA 型个体的 SCS 最小二乘均值显著低于 BB、AB 型 ( $P<0.05$ ), 而 AA 型、AB 个体的产奶量最小二乘均值显著高于 BB 型 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), AA 基因型可作为乳房炎抗性的优良基因型。因此, 可将 *Nramp1* 作为奶牛乳房炎候选基因应用于分子标记辅助选择育种。

**关键词:** *Nramp1*; 遗传多态性; PCR-SSCP; 乳房炎; 中国荷斯坦牛

## Genetic polymorphism of *Nramp1* gene and correlation with mastitis in Holstein cattle

HU Hai-Chuan<sup>1,2</sup>, WANG Hong-Mei<sup>1</sup>, LI Jian-Bin<sup>1</sup>, WANG Chang-Fa<sup>1</sup>, LAI Song-Jia<sup>2</sup>, LI Qiu-Ling<sup>1</sup>, ZHONG Ji-Feng<sup>1</sup>

1. Dairy Cattle Research Center, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250100, China;

2. College of Animal Science & Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

**Abstract:** In this research, PCR-SSCP technique was used to analyze the polymorphisms of the exon 11 of *Nramp1* gene in Chinese Holstein cattle ( $n=344$ ), and correlation between polymorphisms of *Nramp1* with somatic cell score (SCS) and milk production traits was analyzed. The results show that three genotypes namely AA, BB, and AB were detected. Allele A was predominant and the frequencies of alleles A and B were estimated to be 0.767 and 0.233, respectively. Chi-square test indicated that the polymorphic locus in Chinese Holstein fitted Hardy-Weinberg equilibrium ( $P>0.05$ ). Sequencing analysis showed two polymorphic sites at positions 200 bp (C/G) and 254 bp (T/G), which resulted in amino acid alteration Ala356Pro and Leu374Met. The least squares means of SCS in Holstein cattle was lower for genotype AA than that for genotypes AB and BB ( $P<0.05$ ). The least squares means of milk yield of genotype AA and AB were higher than that for

收稿日期: 2008-04-01; 修回日期: 2008-06-12

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2006AA10Z1D9)、山东省良种工程项目(编号: 2006LZ10-04)资助

作者简介: 胡海川(1983-), 男, 硕士, 专业方向: 分子生物学与牛的育种。E-mail: haichuan\_hu@163.com

通讯作者: 仲跻峰(1964-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 动物繁育。E-mail: sdox2@163.com

genotype *BB* ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ , respectively). Genotype *AA* was beneficial to mastitis resistance. This suggested that *Nramp1* may be a candidate gene responsible for mastitis in Holstein cattle.

**Keywords:** *Nramp1*; genetic polymorphism; PCR-SSCP; mastitis; Holstein cattle

乳房炎是奶牛的一种多发病、常见病,也是造成奶牛业生产损失最严重的疾病之一。奶牛乳房炎的发病率存在着明显的品种差异和个体差异,因此,用遗传育种的方法来选育对乳房炎有高抗性的奶牛群,降低乳房炎的发生率,成为控制乳房炎的一个新的切入点。

天然抗性相关巨噬细胞蛋白家族成员最初发现于小鼠中<sup>[1]</sup>,其编码基因随后被命名为 Natural resistance associated macrophage protein (*Nramp*) 基因家族, *Nramp1* 是 *Nramp* 基因家族的成员之一,其编码蛋白为具有离子通道和转运功能特征的膜蛋白<sup>[2]</sup>。*Nramp1* 作为金属离子转运蛋白,表现出二价金属的离子转运功能。它可以通过转运  $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$  等金属离子,使细菌失去这些合成自身防御酶系所必需的离子从而使动物抗细菌感染<sup>[3]</sup>。*Nrmap1* 是较保守的基因,已定位于人 2q35、小鼠 1C3、牛 2q43-44 上<sup>[4-6]</sup>,在血液外周白细胞、脾脏、肺等网状内皮细胞器官的巨噬细胞中表达,既影响动物的固有免疫,又与多种胞内病原菌的抵抗有关<sup>[7,8]</sup>。因此, *Nrmap1* 基因是优良的抗病候选基因。近年来,各国学者对 *Nrmap1* 基因的抗病性进行了大量的研究。应用基因敲除和基因重组方法发现, *Nramp1* 基因与小鼠对分枝杆菌、沙门氏伤寒菌等胞内病原体的易感性或抗性有关<sup>[9]</sup>。牛的 3' UTR 区的遗传变异对布氏杆菌、分枝杆菌的抗性或敏感性差异显著<sup>[10-14]</sup>。吴宏梅等<sup>[15]</sup>研究表明,猪 *NRAMP1* 基因内含子 6 的多态性与中性粒细胞及单核巨噬细胞吞噬功能有显著的相关性。Hebert 等<sup>[16]</sup>首次报道 *Nramp1* 基因可抵抗细胞内乳房炎病原金黄色葡萄球菌的感染。应用定量 RT-PCR 方法分析发现,乳房炎抗性牛群 *Nramp1* 基因 mRNA 的表达高于易感性牛群,可根据这种差异选择乳房炎抗性牛<sup>[17]</sup>。上述牛 *Nrmap1* 基因的研究多局限于 3'UTR 区与布氏杆菌病、结核杆菌病的相关性研究,对其他位点的单核苷酸多态(Single nucleotide polymorphism, SNP)及其与乳房炎相关性的

研究未见报道。本研究以中国荷斯坦奶牛为研究对象,采用 PCR-SSCP 技术、测序技术进行 *Nramp1* 基因外显子 11 的 SNP 筛选,并进行其多态性与乳房炎的相关性分析,为奶牛的抗病育种提供辅助选择的分子标记。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验牛群和性状测定

采集来自天津和山东 5 个奶牛场的 344 头荷斯坦奶牛的血液样本,颈静脉采血,3.8%柠檬酸钠抗凝, -20℃ 冷冻保存备用。上述牛群均具备齐全的系谱资料、完整的生产性能数据。

#### 1.1.2 主要试剂

*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DL2000 Marker 由 TaKaRa(大连)有限公司生产,胶回收试剂盒、琼脂糖、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺为 Ameresco 公司生产。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA 的提取

常规方法从冷冻血样中提取基因组 DNA。

#### 1.2.2 PCR 引物和 PCR 扩增

根据 *Nramp1* 基因 DNA 序列(GenBank 登录号: NC007300),采用 Oligo6.0 软件设计引物,序列为:上游引物: 5'-GACCGTGGCAGTGGACATT-3',下游引物: 5'-CTGCCTTGTGCTCAGACACC-3',由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PCR 反应体系为 25  $\mu$ L: 10 $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu$ L, 25 mmol/L  $MgCl_2$  1.8  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 0.3  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 上、下游引物分别为 1.0  $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶 1 U, DNA 模板 50 ng。PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min, 降温

至 4 保存, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.2.3 SSCP 分析

2  $\mu\text{L}$  PCR 产物加入 8.0  $\mu\text{L}$  的变性缓冲液, 然后 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 min 后, 立即冰浴, 15 min 后上样于预冷的 12% 聚丙烯酰胺凝胶, 于  $1\times\text{TBE}$  电泳液、4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱内以 10~12.5 V/cm 电压电泳 14~16 h。电泳结束后硝酸银染色并记录结果。

### 1.2.4 PCR 产物的回收测序

经 SSCP 分析后, 将不同基因型个体的 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有限公司进行测序。

### 1.2.5 统计分析方法

根据实验结果计算该位点的基因频率与基因型频率, 对该位点基因型的分布进行 Hardy—Weinberg 平衡的  $\chi^2$  适合性检验。配合下列模型进行最小二乘方差分析, 采用 SAS8.0 统计软件的 GLM

过程完成, 比较荷斯坦牛 SCS 在 *Nramp1* 基因型之间的差异:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + C_j + G_k + S_l + e_{ijkl}$$

其中:  $Y_{ijkl}$  为个体性状表型值;  $\mu$  为群体平均值;  $T_i$  为第  $i$  个胎次的固定效应;  $C_j$  为第  $j$  个环境的固定效应;  $G_k$  为第  $k$  个标记基因型的固定效应;  $S_l$  为第  $l$  个季节的固定效应;  $e_{ijkl}$  为随机残差效应。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR-SSCP 分析

用所合成的引物扩增基因组, 所得的产物用 1% 琼脂糖检测, 扩增到约 300 bp 的目的片段, 条带清晰特异性好(图 1A), 可直接用于 SSCP 分析。PCR 产物经 SSCP 分析结果表现出 3 种基因型, 分别为 AA、BB、AB(图 1B)。

### 2.2 测序分析

测序结果表明, 扩增片段大小为 327 bp, 分别在 200 bp(C/G)和 254 bp(T/G)存在碱基突变(图 2),

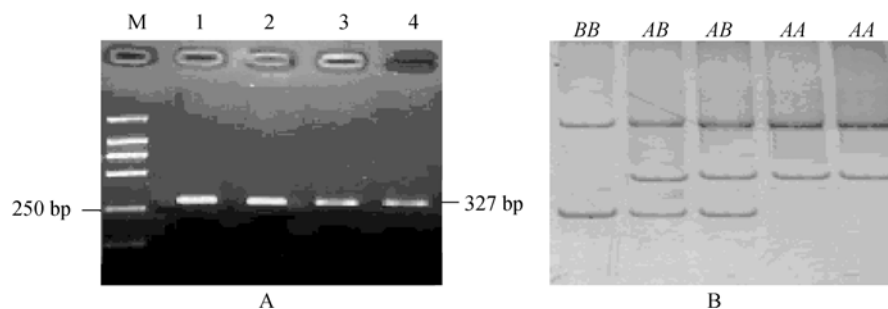


图 1 *Nramp1* 基因外显子 11 的 PCR 扩增产物(A)及 PCR-SSCP 凝胶电泳(B)

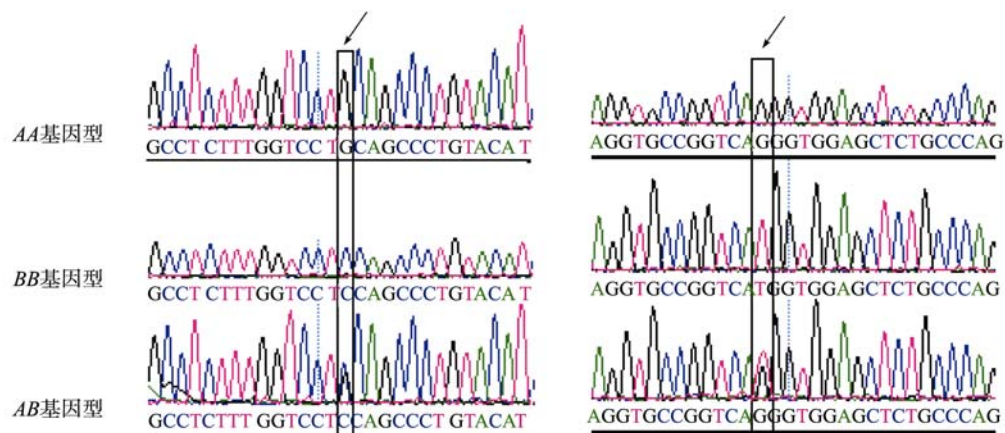


图 2 *Nramp1* 基因 AA、BB 和 AB 基因型 DNA 序列比较  
箭头示碱基突变位置

即分别对应参考序列(GenBank 登录号: NC007300)的 7401 处(C/G)和 7455 处(T/G)存在碱基突变, 均导致氨基酸的改变, 分别为 Ala356Pro(丙氨酸替换为脯氨酸)和 Leu374Met(亮氨酸替换为蛋氨酸), 见图 3。

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

图 3 *Nramp1* 基因 AA 和 BB 基因型编码蛋白序列比较

2.3 *Nramp1* 基因外显子 11 基因频率和基因型频率分析

基因型频率和等位基因频率见表 1。*A* 等位基因为优势等位基因, 就基因型而言, AA 基因型频率最大, BB 最小, AB 介于两者之间。

2.4 *Nramp1* 基因外显子 11 的遗传多态性指数

*Nramp1* 基因外显子 11 在群体中的多态信息含量、杂合度、有效等位基因数及  $\chi^2$  检验见表 2。结果表明, 多态信息含量(PIC)处于 0.25 和 0.50 之间, 表明该位点处于中度多态。经过  $\chi^2$  适合性检验, 中国荷斯坦牛  $\chi^2$  值为 3.358( $P > 0.05$ ), 该位点突变达到 Hardy-Weinberg 平衡状态。

表 1 中国荷斯坦牛 *Nramp1* 基因 PCR-SSCP 的基因型和基因频率

牛品种	样本数	基因型频率			基因频率	
		AA	AB	BB	A	B
中国荷斯坦奶牛	344	0.610	0.314	0.076	0.767	0.233

表 2 中国荷斯坦牛 PCR-SSCP 的  $\chi^2$  检验、多态信息含量、杂合度及有效等位基因数

品种	卡方值	多态信息含量	杂合度	有效等位基因数
中国荷斯坦奶牛	3.358	0.2942	0.3574	1.5562

表 3 各因素对中国荷斯坦奶牛群的体细胞评分和产奶量的影响

因素	场次	胎次	产犊季节	基因型
<i>F</i> 值(体细胞评分)	9.62**	10.02**	8.33**	5.70**
<i>F</i> 值(产奶量)	0.49	2.43*	0.06	3.81*

\*:  $P < 0.01$ ; \*\*:  $P < 0.0001$ 。

2.5 *Nramp1* 基因外显子 11 的遗传多态性与乳房炎的相关性分析

用标记效应组成的固定模型对 SCS 进行方差分析, 结果见表 3。可以看出基因型、产犊季节对 SCS 有较大的影响, 场次、胎次对 SCS 的影响极显著( $P < 0.0001$ )。

将 *Nramp1* 基因外显子 11 多态性与产奶性状进行最小二乘均值显著性检验, 结果见表 4。结果表明, AA 基因型所对应的 SCS 最小二乘均值显著低于 AB 和 BB 型( $P < 0.05$ ); AA 基因型所对应的 305 d 产奶量的最小二乘均值极显著高于 BB 型( $P < 0.01$ ), AB 基因型所对应的 305 天产奶量的最小二乘均值显著高于 BB 基因型( $P < 0.05$ )。

3 讨论

3.1 *Nramp1* 基因多态性分析

近年来, 有关牛 *Nramp1* 基因多态性的报道多见 3' UTR(GT)<sub>n</sub> 多态性的报道<sup>[10-14, 18]</sup>, Martínez 等<sup>[19]</sup>报道了印度牛 (*Bos indicus*) 编码区存在 A272V、D321N、P356A 多态性。本研究所发现的 2 个 SNP, 其中 7455 处(T/G)为新的 SNP, 而 7401 处(C/G)与 P356A 相一致。另外, 本研究发现牛 *Nramp1* 基因外显子 11 具有中度多态性, 表明遗传变异较大, 对其选择可望获得更大的遗传进展。

表 4 *Nramp1* 基因外显子 11 不同基因型与体细胞评分、产奶量间最小二乘均值及标准误

基因型	体细胞评分	产奶量
AA	4.70±0.25 <sup>b</sup>	7302±335 <sup>ac</sup>
AB	5.16±0.26 <sup>ab</sup>	7201±337 <sup>ab</sup>
BB	5.40±0.28 <sup>ab</sup>	6433±400 <sup>b</sup>

注: 同一性状中标有不同小写字母 a、b 肩标的平均值间差异显著( $P < 0.05$ )。

### 3.2 SCS 与乳房炎的关系分析

由于 SCS 可直接反应奶牛乳房炎的严重程度, 与乳房炎的遗传相关约 0.40~0.80 之间, SCS 的增高可引起奶损失的增加, 从而降低产奶量<sup>[20]</sup>。因此, 本研究将 SCC 转化为 SCS, 并对每个胎次的 10 个泌乳月的 SCS 校正为泌乳期平均 SCS。但本研究所统计的 SCS 数据明显高于国内外的相关研究(20 SCC<50 为隐性乳房炎, 即 4 SCS<5.32)<sup>[21, 22]</sup>, 与王兴平等<sup>[23]</sup>报道的中国荷斯坦牛品种对 SCS 影响最小二乘均值为 5.37 相近, 出现这种结果可能有以下 3 个原因: (1)由于国外开展奶牛群改良计划(Dairy Herd Improvement, DHI)已有 50 余年的历史, 相对而言饲养管理水平较高, 乳房炎控制较好; (2)国内近十年来仅在北京、上海、天津等部分地区开展 DHI, 推广力度远远不够; (3)目前国内乳房炎候选基因的研究所采用的生产数据不是严格的 DHI 数据, 而是仅采集测定 2~3 次奶样的数据。而本研究采用的实验牛群来自于平均单产水平超过 6 500 kg、参加 DHI 测定的牛场, 均具备 2~4 个胎次、每个胎次 10 个泌乳月的产奶数据, 从而保证数据的准确性和可靠性。虽然这些牛场历经数年的 DHI 测定, 产奶水平远高于国内奶牛平均单产水平(3 500 kg), 但 SCS 仍较高。因此, 在加强 DHI 推广的同时, 严格根据 DHI 指导奶牛生产, 亟待提高饲养管理水平。

### 3.3 *Nramp1* 基因与奶牛乳房炎的关系分析

由于长期对高产奶量的选育从而增加了奶牛对于疾病的易感性<sup>[24]</sup>。*Nramp1* 在家畜机体中具有重要的抵抗胞内寄生菌活性, 已经使其成为家畜抗病育种的研究热点。现已证实牛 *Nramp1* 基因 3' UTR (GT)<sub>n</sub> 多态性与布氏杆菌、结核杆菌的抗性有关<sup>[10~14]</sup>。Joo 等<sup>[17]</sup>首次报道了乳房炎抗性牛群 *Nramp1* 基因 mRNA 的表达高于易感性牛群, 可根据这种差异选

择乳房炎抗性, 从而揭示了 *Nramp1* 基因与乳房炎抗性有关。国内关于牛 *Nramp1* 基因研究仅见 3' UTR (GT)<sub>n</sub> 多态性与乳房炎途径分析<sup>[18]</sup>。本研究对 *Nramp1* 基因多态性与 SCS 的相关进行了分析, 结果表明, 不同基因型所对应的 SCS 和产奶量最小二乘均值分别为 AA(4.70)<AB(5.16)<BB(5.40)、AA(7302)>AB(7201)>BB(6433), 表明 SCS 数值越高, 引起的产奶量下降越明显。同时表明, AA 基因型个体表现出乳房炎抗性, A 等位基因是乳房炎抗性的优良基因。另外, 本研究采用标记效应组成的固定模型, 对 SCS 进行方差分析, 场效应及胎次效应对 SCS 影响极显著, 表明牛场和胎次对乳房炎的影响很大。

综上所述, 可将 *Nramp1* 作为奶牛乳房炎候选基因进行深入研究, 而关于其抗病的分子机制尚需进一步揭示, 从而为奶牛的抗病育种研究提供理论依据。

### 参考文献(References):

- [1] Vidal S, Gros P, Skamene E. Natural resistance to infection with intracellular parasites: molecular genetics identifies *Nramp1* as the Bcg/Ity/Lsh locus. *J Leukoc Biol*, 1995, 58(4): 382–390.
- [2] Gruenheid S, Cellier M, Vidal S, Gros P. Identification and characterization of a second mouse *Nramp* gene. *Genomics*, 1995, 25(2): 514–525. [\[DOI\]](#)
- [3] Blackwell JM. Structure and function of the natural resistance associated macrophage protein 1 (*Nramp1*), a candidate protein for infections and autoimmune disease susceptibility. *Mol Med Today*, 1996, 2(5): 205–211. [\[DOI\]](#)
- [4] Cellier M, Govoni G, Vidal SM, Kwan T, Groulx N, Liu J, Sanchez F, Skamene E, Schurr E, Gros P. Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J Exp Med*, 1994, 180(5): 1741–1752. [\[DOI\]](#)
- [5] Govoni G, Vidal S, Cellier M, Lepage P, Malo D, Gros P.



- Genomic structure, promoter sequence and induction of expression of the mouse *NRAMP1* gene in macrophage. *Genomics*, 1995, 27(1): 9–19. [\[DOI\]](#)
- [6] Feng J, Li Y, Hashad M, Schurr E, Gros P, Adams LG, Templeton JW. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) gene. *Genome Res*, 1996, 6(10): 956–964. [\[DOI\]](#)
- [7] Lam-Yuk-Tseung S, Picard V, Gros P. Identification of a tyrosine-based motif (YGSI) in the amino terminus of *Nramp1* (Slc11a1) that is important for lysosomal targeting. *J Biol Chem*, 2006, 281(42): 31677–31688. [\[DOI\]](#)
- [8] McDermid JM, Prentice AM. Iron and infection: effects of host iron status and the iron-regulatory genes haptoglobin and *NRAMP1* (SLC11A1) on host-pathogen interactions in tuberculosis and HIV. *Clin Sci*, 2006, 110(5): 503–524. [\[DOI\]](#)
- [9] Vidal S, Tremblay ML, Govoni G, Gauthier S, Sebastiani G, Malo D, Skamene E, Olivier M, Jothy S, Gros P. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *NRAMP1* gene. *J Exp Med*, 1995, 182(3): 655–666. [\[DOI\]](#)
- [10] Paixão TA, Poester FP, Carvalho Neta AV, Borges AM, Lage AP, Santos RL. *NRAMP1* 3' untranslated region polymorphisms are not associated with natural resistance to *Brucella abortus* in cattle. *Infect Immun*, 2007, 75(5): 2493–2499. [\[DOI\]](#)
- [11] Barthel R, Feng J, Piedrahita JA, David N, Murray M, Templeton JW, Adams LG. Stable transfection of the bovine *Nramp1* gene into murine RAW264.7 cells: effect on *Brucella abortus* survival. *Infect Immun*, 2001, 69(5): 3110–3119. [\[DOI\]](#)
- [12] Kumar N, Mitra A, Ganguly I, Singh R, Deb SM, Srivastava SK, Sharma A. Lack of association of brucellosis resistance with (GT)<sub>13</sub> microsatellite allele at 3'UTR of *NRAMP1* gene in Indian zebu (*Bos indicus*) and crossbred (*Bos indicus* × *Bos taurus*) cattle. *Vet Microbiol*, 2005, 111(1–2): 139–143. [\[DOI\]](#)
- [13] Paixão TA, Ferreira C, Borges AM, Oliveira DA, Lage AP, Santos RL. Frequency of bovine *Nramp1* (Slc11a1) alleles in Holstein and Zebu breeds. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 109(1–2): 37–42. [\[DOI\]](#)
- [14] Estrada-Chávez C, Pereira-Suárez AL, Meraz MA, Arriaga C, García-Carrancá A, Sánchez-Rodríguez C, Mancilla R. High-level expression of *NRAMP1* in peripheral blood cells and tuberculous granulomas from *Mycobacterium bovis*-infected bovines. *Infect Immun*, 2001, 69(11): 7165–7168. [\[DOI\]](#)
- [15] 吴宏梅, 王立贤, 程笃学, 马小军. 猪 *Nramp1* 基因多态性与免疫功能的相关性. 中国农业科学, 2008, 41(1): 215–220.
- [16] Hébert A, Sayasith K, Sénéchal S, Dubreuil P, Lagacé J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 193(1): 57–62.
- [17] Joo YS, Moon JS, Foxl K, Suh GH, Kwon NH, Kim SH, Park YH. Comparison of natural resistance-associated macrophage protein (*NRAMP1*) expression between cows with high and low milk somatic cells counts. *Asian-Aust. Anim Sci J*, 2003, 16(12): 1830–1836.
- [18] 马捷琼, 陈宏, 刘缠民, 房兴堂, 陈宗芳. 徐州荷斯坦牛 *NRAMP1* 基因多态性与乳房炎途径分析. 黑龙江畜牧兽医, 2007, (4): 33–35.
- [19] Martínez R, Dunner S, Barrera G, Cañon J. Novel variants within the coding regions of the *Slc11A1* gene identified in *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds. *J Anim Breed Genet*, 2008, 125(1): 57–62. [\[DOI\]](#)
- [20] Barkema HW, Van Der Ploeg JD, Schukken YH, Lam TJ, Benedictus G, Brand A. Management style and its association with bulk milk somatic cell count and incidence rate of clinical mastitis. *J Dairy Sci*, 1999, 82(8): 1655–1663.
- [21] Hansen LB, Young CW, Miller KP, Touchberry RW. Health care requirements of dairy cattle response to milk yield selection. *J Dairy Sci*, 1979, 62(12): 1922–1931.
- [22] 张夫千, 郑小敏, 唐大伟, 赵鹏, 史远刚. 荷斯坦牛 *BoLA-DRB3* 基因多态性及其与乳房炎抗性关系分析. 畜牧兽医学报, 2007, 38(2): 115–119.
- [23] 王兴平, 许尚忠, 马腾壑, 高雪, 任红艳, 陈金宝. 牛 *TLR4* 基因的遗传多态性与乳房炎的关联分析. 畜牧兽医学报, 2007, 38(2): 120–124.
- [24] Stramdborg E, Shook GE. Genetic and economic responses to breeding programs that consider mastitis. *J Dairy Sci*, 1989, 72(8): 2136–2142.