

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00935

奶牛 *HSP70* 基因表达及其连锁微卫星标记与耐热性状的相关性

刘延鑫, 李大齐, 崔群维, 史红霞, 王根林

南京农业大学动物科技学院, 南京 210095

摘要: 为了研究奶牛 *HSP70* 基因的 mRNA 表达规律和其紧密连锁的 3 个微卫星标记与耐热性状的相关性, 文中在日平均温湿度指数 (THI) 为 86.2 (高温期)、70.9 (临界高温期) 和 56.8 (适温期) 时分别采集 10 头处于同一泌乳阶段的同龄健康奶牛的尾静脉血, 采用实时荧光定量 RT-PCR 技术分析不同条件下奶牛 *HSP70* 基因在外周血淋巴细胞中的 mRNA 表达水平。结果表明: 随 THI 升高, *HSP70* mRNA 表达量呈上升趋势, 高温期奶牛的外周血淋巴细胞 *HSP70* mRNA 表达丰度极显著高于临界高温期和适温期 ($P < 0.01$), 且与奶牛的耐热指标具有一定的遗传相关, 表明 *HSP70* 基因可以作为奶牛热应激反应的候选基因。选取 23 号染色体上与 *HSP70* 紧密连锁的 3 个微卫星标记 *BMS468*、*BM1258* 和 *BM1815*, 用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析其在 160 头荷斯坦奶牛的遗传变异情况, 利用最小二乘法拟合线性模型初步探索了这 3 个微卫星座位与奶牛耐热指标的关系。相关分析表明: 耐热系数、红细胞钾含量及高温期日产奶量下降率的最有利基因型在 *BMS468* 基因座和 *BM1815* 基因座上, 分别为 134 bp / 128 bp ($P < 0.05$) 和 186 bp / 148 bp ($P < 0.05$); *BM1258* 基因座上, 最有利基因型 101 bp / 99 bp 的高温期日产奶量下降率最低 ($P < 0.05$)。

关键词: 奶牛; *HSP70*; 耐热性; 微卫星标记; 实时荧光定量 RT-PCR

Analysis of *HSP70* mRNA level and association between linked microsatellite loci and heat tolerance traits in dairy cows

LIU Yan-Xin, LI Da-Qi, CUI Qun-Wei, SHI Hong-Xia, WANG Gen-Lin

College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: The objective of this study was to investigate the variation of *HSP70* mRNA level in dairy cows and relationships of its closely linked microsatellite loci with heat tolerance traits. Blood samples were collected from ten healthy Holstein cows with the same age and milking stage at different temperatures-humid-index (THI) (86.2, high temperature; 70.9, critical high temperature, and 56.8, optimum temperature). The mRNA levels of *HSP70* of lymphocytes in peripheral blood were analyzed using real-time RT-PCR. The mRNA level of *HSP70* was increased with the THI; the mRNA level of *HSP70* at high temperature was higher than others ($P < 0.01$). This indicated that the bovine *HSP70* gene may act as a potential candidate gene for response to heat shock. Genetic variation of three microsatellite loci *BMS468*, *BM1258*, and *BM1815*, which were closely linked to *HSP70* gene on chromosome 23, was analyzed in 160 Holstein cows with non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The association between these microsatellite loci and heat tolerance traits were analyzed by

收稿日期: 2009-11-23; 修回日期: 2010-01-21

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (编号: 2006BAD04A01, 2006BAD04A12) 和江苏省科技支撑计划项目 (编号: BE2008306-2) 资助

作者简介: 刘延鑫 (1979-), 男, 在读博士, 专业方向: 动物生殖生理及调控。E-mail: liuyanxin@126.com

通讯作者: 王根林 (1957-), 男, 教授, 方向: 动物生殖生理及调控。E-mail: glwang@njau.edu.cn

least square linear model. The results showed that 134 bp/128 bp at BMS468 and 186 bp/148 bp at *BM1815* were the most favorable genotypes for HTC, red cell potassium, and decrement rate of milk yield in high temperature ($P<0.05$); 101 bp/99 bp at *BM1258* was the most favorable genotype for decrement rate of milk yield in high temperature ($P<0.05$).

Keywords: cow; *HSP70*; heat tolerance; microsatellite; real-time RT-PCR

我国南方夏季高温高湿,持续期长,热应激一直是困扰奶牛生产的一个瓶颈。研究表明,荷斯坦奶牛适宜的温度是 $-0.5 \sim 20$ [1],热应激还与湿度有关,当温湿度指数(THI)超过 72 奶牛即表现热应激反应[2]。奶牛出现热应激反应后,会造成采食量和产奶量显著下降等一系列问题[3,4],带来巨大的经济损失。奶牛热应激的已有研究较多集中在采用通风、遮阴等手段来物理散热[5~7]或应用饲料添加剂[8]等方面。奶牛热应激反应的个体存在差异,且可以通过THI模型进行数量化[9],表明奶牛耐热性是数量性状,但遗传力较低[10],常规育种效果不明显,而以分子标记辅助育种和转基因育种为代表的分子育种,就成为选育抗热应激奶牛的新突破点。

研究表明热应激会引起细胞水平的反应[11]和相关基因表达水平的改变[12],热休克蛋白(Heat shock proteins, *HSPs*)的研究因而受到持续关注,它是一类重要的家族蛋白,具有高度保守性,当机体受到应激原的刺激后产生的非特异性细胞保护作用,对维持细胞生存和内环境稳定起重要作用[13]。*HSP70* 家族是近年来研究最为广泛及深入的一种可诱导热休克蛋白,主要功能是作为分子伴侣参与蛋白质折叠、传递和降解[14]。

实时荧光定量RT-PCR (Real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR) 技术是近年来发展起来的技术,具有准确、敏感、简便等特点,在基因表达研究方面有广泛的应用[15,16]。微卫星又称简单序列重复(Simple sequence repeat, SSR) 因数量多、分布广、多态性丰富、呈共显性遗传方式以及检测快速方便等优点,作为一种新型DNA 标记已被广泛应用家畜的分子标记辅助选择育种领域[17~19]。

本研究利用实时荧光定量 PCR 技术检测不同条件下奶牛外周血淋巴细胞 *HSP70* 基因的表达水平,并对 *HSP70* 基因所在 23 号染色体上紧密连锁的 3 个微卫星标记与耐热性状进行关联分析,旨在为加速奶牛耐热性状遗传的研究进展,实施分子育种与

常规育种相结合提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

选择体重 600 kg,处于相同泌乳阶段的同龄健康高产奶牛 10 头,采样时间为:夏季 8 月 15 日:日平均气温 32.5 (高温期);9 月 15 日:日平均气温 25.5 (临界高温期);秋季 11 月 15 日:日平均气温 12.5 (适温期)。温湿度指数(THI)根据Du[2]计算,分别为 86.2、70.9 和 56.8。

选择 3~5 胎次处于泌乳中期的健康高产奶牛 160 头奶牛,供测定耐热指标及提供 DNA 血样。所有奶牛均来自同一牛场,饲养管理条件一致,每日挤奶 3 次。

1.2 方法

1.2.1 耐热指标测定

本研究采用耐热系数 HTC (Heat tolerance coefficient)、高温期日产奶量下降率及红细胞钾含量作为奶牛耐热性能的评定指标。在夏季 8 月 13~15 日,THI 为 86.2 期间,根据 Rhoad (1944) [20] 的公式 $HTC = 100 - 10 (ART - 38.3)$ 计算耐热系数 HTC,其中 ART 为测试奶牛的连续 3 日的平均直肠温度;38.3 为牛正常的直肠温度。

根据 DHI 和牛场记录数据选择 4 月 15 日(日平均气温 12, THI=55.7)和 8 月 13 日(日平均气温 32.5, THI=86.2)的日产奶量计算高温期日产奶量下降率。

采用 OPTIMA 2100DV 电感耦合等离子体发射光谱仪测定高温期间奶牛红细胞钾含量,单位为 mg/L。

1.2.2 奶牛外周血淋巴细胞 RNA 提取

对 10 头供试牛尾静脉采集 ACD 抗凝血,在 2 h 内取 1 mL 人淋巴细胞分离液试剂(上海恒信化学试剂二厂),缓慢加到等体积的新鲜血样,3 000 r/min 离心 20 min,分离淋巴细胞。之后加入 1 mL RNAiso

Reagent(TaKaRa 公司), 反复吹打, 提取淋巴细胞总 RNA, 使用核酸测定仪(Eppendorf 公司)检测总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 比值, 要求在 1.8~2.0 之间, 同时 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 质量。

1.2.3 逆转录反应(RT-PCR)

逆转录反应体系: RNA 1 μg ; 25mmol/L MgCl_2 4 μL , reverse transcription 10 \times buffer 2 μL , 10 mmol/LdNTP mixture 2 μL , RNAsin ribonuclease inhibitor 0.5 μL , AMV 反转录酶 15 U(TaKaRa 公司), 随机引物 0.5 μg , 补充双蒸水到 20 μL 。反应条件: 42 60 min, 70 15 min, 之后于冰水中冷却, -20 保存。

1.2.4 引物设计

根据 NCBI 的牛 *HSP70* mRNA 序列(GenBank 登录号: NM_203322), 采用 Oligo 6.0 软件设计引物 F: 5'-TGTCGCTGGGACTGGAGA-3'; R: 5'-GCTG GTTGTCCGAGTAGGTG-3', 预期扩增片段长度为 111 bp。内参基因为 18S rRNA, 引物为 F: 5'-TTGA CGGAAGGGCACCA-3'; R: 5'-CCCACGGAATCGA GAAAGAG-3', 预期扩增片段长度为 122 bp。

1.2.5 实时荧光定量 RT-PCR 检测奶牛外周血淋巴细胞 *HSP70* mRNA 表达

实时荧光定量RT-PCR反应体系: 1 μL cDNA; 10 μL 2 \times SYBR premix Ex *Taq*(TaKaRa公司); 0.4 μL 50 \times Rox Dye; 每种引物 10 pmol; 双蒸水加至 20 μL 。反应程序: 95 10 s; 然后 95 5 s, 56 15 s, 72 31 s, 40 个循环; 加上系统自带熔解曲线程序: 95 15 s, 60 1 min, 95 15 s, 60 15 s, 从 65 缓慢升温至 95 , 每升高 0.5 检测一次荧光信号值。每个样本设 3 个重复, 同时设无模板阴性对照。反应结束仪器自动生成Ct (Threshold cycles)值及熔解曲线图。*HSP70* mRNA相对表达量的计算方法根据 Livak^[21]的公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

1.2.6 微卫星分析

采用苯酚-氯仿法从 1 mL 血液中提取基因组 DNA, 紫外分光光度法测定 DNA 的浓度和纯度, 稀释至 50 ng/ μL 。根据 NCBI 牛染色体物理图谱, 综合考虑微卫星座位在染色体中的位置、微卫星座位多态性和产物大小等多方面因素, 最后确定了位于 23 号染色体上 HSPA1A(GenBank 登录号: NC_007324.1) 上游的微卫星座位 *BM1258*、*BM1815* 及下游的 *BMS468*, 物理距离分别为 6 723 356 bp、3 502 792 bp 和 4 626 109 bp, 遗传距离均小于 1 cM。3 对微卫星标记引物均由 TaKaRa 公司合成, 具体见表 1。

PCR 反应体系: 10 \times PCR buffer 2 μL , 模板 DNA 20~50 ng, dNTPs 终浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 终浓度 1.5~2.0 mmol/L, 引物终浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$, *Taq* DNA 聚合酶 1 U(TaKaRa), 双蒸水加至 20 μL 。PCR 反应条件为: 95 预变性 4 min; 95 变性 45 s, 57 ~58 复性 45 s, 72 延伸 45 s, 30 个循环; 最后再 72 延伸 8 min。

PCR 扩增产物首先用 1.5%琼脂糖凝胶检测, 扩增效果好的用 12%丙烯酰胺凝胶电泳(丙烯酰胺: 双丙烯酰胺=29:1), 160 V 电泳 6~8 h, 银染显示出条带后, 使用 Bio-Ray凝胶成像系统检测和拍照, 计算微卫星等位基因大小, 并确定基因型。

1.2.7 统计学分析

HSP70 mRNA 表达水平用 $\bar{x} \pm S.E$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析比较不同温度条件下的各组 *HSP70* mRNA 相对表达丰度。

使用 POPGENE1.31 进行群体遗传参数的分析, 计算微卫星座位的等位基因频率、多态信息含量 (Polymorphic information content, *PIC*)、有效等位基因数(Effective numbers of alleles, *Ne*)和遗传杂合度 (Heterozygosity, *He*)。

表 1 3 个微卫星座位的 PCR 扩增条件

微卫星座位	引物序列(5 3)	复性温度 ()	Mg^{2+} 浓度 (mmol/L)
<i>BMS468</i>	GTTAAGCAGAGGGTTTCCCC TATCCCAGGTGCTCTGAGG	57	1.5
<i>BM1258</i>	GTATGTATTTTCCCCACCCTGC GAGTCAGACATGACTGAGCCTG	58	2.0
<i>BM1815</i>	AGAGGATGATGGCCTCCTG CAAGGAGACAAGTCAAGTTCCC	58	1.8

不同微卫星座位基因型与奶牛耐热性状之间的关联分析采用 SPSS 13.0 软件的 GLM (General Linear Mode)模型进行最小二乘方差分析, 统计模型为: $Y_{ijkl}=\mu+P_i+S_j+G_k+e_{ijkl}$ 。其中, Y_{ijkl} 为奶牛耐热性状的测定值; μ 为群体平均值; P_i 为第 i 个胎次的固定效应; S_j 为第 j 头公牛的固定效应; G_k 为微卫星标记第 k 种基因型的固定效应; e_{ijkl} 为随机残差效应。采用 SPSS13.0 计算 *HSP70* 表达丰度与耐热指标间的 Pearson 相关系数。

2 结果与分析

2.1 *HSP70* 基因的表达规律及其与耐热指标的相关性

奶牛外周血淋巴细胞 *HSP70* mRNA 相对表达水平在夏季高温、临界高温和秋季适温期分别为 5.59 ± 1.02 、 2.41 ± 0.88 和 1.72 ± 0.35 。统计分析表明, *HSP70* mRNA 表达水平在夏季高温期高于临界高温和秋季适温 ($P<0.01$); 临界高温期与秋季适温期 *HSP70* mRNA 表达丰度差异不显著 ($P>0.05$) (图 1)。*HSP70* 的 mRNA 表达丰度与 HTC、高温期日产奶量下降率和红细胞钾含量的相关系数分别为 $0.58(P<0.01)$ 、 $-0.43(P<0.05)$ 和 $-0.29(P>0.05)$ 。以上表明 *HSP70* 基因参与了奶牛热应激分子水平的调控, 其表达丰度与耐热指标具有一定的相关性。

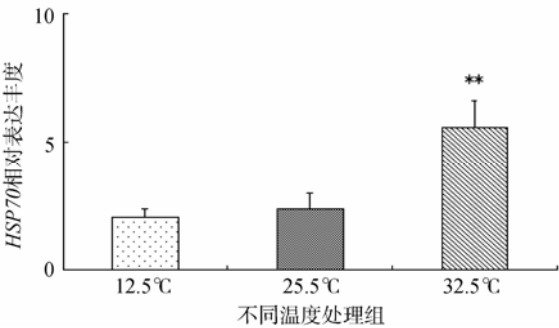


图 1 不同温度条件下 *HS70* mRNA 相对表达水平
注: **表示 $P<0.01$ 。

表 2 微卫星座位在荷斯坦奶牛中的遗传特性

座位	等位基因数	等位基因范围(bp)	多态信息含量(PIC)	有效等位基因数(Ne)	杂合度(He)
BMS468	5	128~154	0.6819	3.6644	0.7271
BM1258	6	99~119	0.7316	4.2985	0.7674
BM1815	4	144~186	0.5940	2.9197	0.6575

2.2 微卫星座位的遗传特性及相关分析

2.2.1 微卫星座位的遗传特性

3 个微卫星座位在荷斯坦奶牛中的遗传特性见表 2, 可以看出, *BM1258* 多态信息含量(PIC)、有效等位基因数(Ne)和杂合度(He)最大, 而 *BM1815* 的多态信息含量、有效等位基因数和杂合度最小。

2.2.2 微卫星座位基因型与耐热性状的相关分析

个体数小于 5 的基因型不予分析。3 个微卫星座位上不同基因型与耐热性状的最小二乘均值及标准误见表 3。

由表 3 可见: 微卫星座位 *BMS468* 和 *BM1815* 对耐热系数影响显著 ($P<0.05$); 3 个微卫星座位对高温期日产奶量下降率均有不同程度的显著影响 ($P<0.05$); 微卫星座位 *BMS468* 和 *BM1815* 对红细胞钾含量影响显著 ($P<0.05$)。显著影响耐热系数的最有利基因型在 *BMS468* 座位上为 134 bp/128 bp ($P<0.05$), 在 *BM1815* 座位上为 186 bp/148 bp ($P<0.05$); 显著影响高温期日产奶量下降率在 *BMS468* 座位上为 134 bp/128 bp ($P<0.05$), *BM1258* 座位上是 101 bp/99 bp ($P<0.05$), 极显著影响高温期日产奶量下降率在 *BM1815* 上是 186 bp/148 bp ($P<0.01$); 显著影响红细胞钾含量的最有利基因型在 *BMS468* 座位上为 134 bp/ 128 bp ($P<0.05$), *BM1815* 座位上为 186 bp/148 bp ($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 实时荧光定量PCR检测热应激奶牛外周血淋巴细胞*HS70* mRNA表达情况

实时荧光定量 PCR 分析包括绝对定量和相对定量两种方法, 其中相对定量是针对起始材料数量、反转录效率、目的基因扩增效率不一致时, 通过参照基因校正差异, 描述目的基因表达的相对变化的一种定量方法, 具有快速、简便的特点。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法在目的基因与参照基因的扩增效率基本相同且接近 100%

表 3 3 个微卫星座位不同基因型耐热指标的的最小二乘均值及标准误

座位	基因型	耐热系数	高温期日产奶量下降率 (%)	红细胞钾含量 (mg/L)
<i>BMS468</i>	154/134(14)	77.75±3.77 ^{ab}	30.93±1.92 ^a	663.65±13.63 ^a
	146/128(10)	73.58±3.64 ^b	33.06±2.39 ^a	737.75±14.73 ^a
	140/134(20)	80.65±2.97 ^{ab}	22.13±2.24 ^{ab}	535.35±12.31 ^{ab}
	140/128(15)	78.48±3.26 ^{ab}	29.34±1.87 ^a	685.84±12.52 ^a
	134/134(24)	74.03±2.75 ^b	35.40±2.84 ^a	764.57±13.14 ^a
	134/128(20)	84.81±2.97 ^a	18.92±1.37 ^b	480.10±11.71 ^b
	128/128(27)	76.94±2.58 ^{ab}	23.61±1.34 ^{ab}	578.55±12.47 ^b
<i>BM1258</i>	117/101(29)	79.50±3.39	24.13±1.48 ^a	597.67±11.32
	113/101(23)	75.48±3.71	28.65±1.94 ^a	676.41±12.81
	113/99(13)	80.43±4.15	18.27±2.03 ^{ab}	532.25±13.03
	103/101(16)	77.42±3.71	25.73±1.84 ^a	627.15±14.26
	101/101(22)	78.25±3.39	22.86±1.92 ^{ab}	580.91±11.54
	101/99(13)	82.31±4.80	16.80±1.73 ^b	509.33±10.38
	99/99(25)	76.74±3.71	29.11±2.34 ^a	673.12±14.11
<i>BM1815</i>	186/148(18)	81.36±3.31 ^a	15.65±1.84 ^B	503.09±10.70 ^b
	168/168(14)	78.29±2.62 ^{ab}	25.32±1.97 ^A	568.25±14.38 ^{ab}
	168/148(20)	79.23±2.80 ^{ab}	22.05±2.07 ^{AB}	633.43±12.47 ^a
	168/144(36)	79.98±2.14 ^a	23.41±2.12 ^A	612.67±12.12 ^a
	144/144(33)	74.18±2.23 ^b	27.59±2.65 ^A	795.46±13.23 ^a

注: 括号内的数字是个体数。同列中具有不同小写字母肩标的平均值间差异显著($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。

时即可进行相对定量分析。本实验*HSP70* 和 18S rRNA的扩增效率分别为 0.98 和 1.06, 满足采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的条件^[21]。

研究表明, 细胞在受到热应激后, 首先热休克因子 1(*HSP1*)发生三聚化反应, 之后结合热休克元件(*HSE*), 引起*HSP70* 蛋白合成增加, 可减弱因热应激引起的细胞凋亡^[22, 23], 但*HSP70* 过度表达却会诱导细胞的凋亡^[24]。本研究表明, 夏季高温期间, 奶牛热应激反应加剧, 外周血淋巴细胞*HSP70* mRNA表达水平也随温度呈上升趋势; 原因可能在于*HSP70* mRNA 转录水平增加, 以翻译出足量的*HSP70* 蛋白, 作为分子伴侣对细胞起到保护作用, 使细胞维持正常的功能和内环境的稳定。本结果与蔡亚非等^[12]采用半定量PCR 检测奶牛外周血淋巴细胞*HSP70* 基因定量检测结果类似。本实验证实了*HSP70* 参与了奶牛热应激反应的分子调控, 可以作为研究奶牛热应激性状的一个候选基因。

3.2 微卫星座位的遗传特性与奶牛耐热指标的选择

本研究采用的牛 23 号染色体上的微卫星座位 *BMS468*、*BM1258* 和 *BM1815* 的 *PIC* 分别为 0.6819、

0.7316 和 0.5940, 平均为 0.6692。据报道牛的微卫星座位的平均多态信息含量为 0.6^[25], Bostein等^[26]提出当*PIC*值大于 0.5 时该座位为高度多态性座位, 当*PIC*值在 0.25~0.5 之间时为中度多态性座位, 当*PIC*值小于 0.25 时为低度多态性座位。杂合度指标反映了群体在不同基因座上的遗传变异, 也是度量群体遗传变异的一个最适参数。3 个微卫星座位在检测的荷斯坦奶牛群体中平均杂合度为 0.7173。以上表明本研究选取的 3 个微卫星标记均为高度多态基因座, 多态信息含量丰富, 可以用于分子标记辅助选择, 经过选择可望获得更多遗传进展。

关于耐热指标的选择上, 国内外学者提出了直肠温度^[27, 28]、HTC^[29, 30]、呼吸频率^[28, 30]、红细胞钾含量^[31~34]及夏季产奶量下降率^[10]几个指标, 但也存在较多的争议, 如认为呼吸频率在耐热牛与非耐热牛群无显著差别, 且准确性较低^[27]; 红细胞钾含量在奶牛的热应激与非热应激期间并无显著变化^[35]。综上, 本研究选用了HTC、红细胞钾及高温期日产奶量下降率作为奶牛耐热性指标。HTC是在直肠温度的基础上计算的来的, 该系数越高表示耐热能力越强。由于选育抗热应激奶牛的根本目的在于提高

夏季奶牛的日产奶量, 所以高温期日产奶量下降率也被作为奶牛耐热性状的参考指标。红细胞钾含量与奶牛的耐热性状有较强的负相关, 赖登明建议选择 550 mg/L 以下的奶牛建立奶牛抗热应激品系^[33]。

3.3 微卫星座位与耐热性状的相关性

在家畜育种中, 经常选用与主效基因或 QTL 连锁的微卫星标记进行优良性状的分子标记辅助选择。李延璐等^[18]分析了与绵羊高繁殖力主效基因 *FecB* 紧密连锁的微卫星座位 *BMS2508* 在不同繁殖力绵羊品种中的遗传多态性, 同时探讨该微卫星座位与小尾寒羊 *FecB* 基因的连锁不平衡关系。孙伟等^[19]同样选择了绵羊第 6 号染色体上与 *FecB* 基因紧密连锁的 4 个微卫星标记对湖羊的产羔性状进行研究, 为湖羊品种的分子标记辅助选择高产性状提供了参考依据。

本研究的关联分析表明: 3 个微卫星座位与 HTC、红细胞钾含量及高温期日产奶量下降率显著相关, 说明 *HSP70* 基因可以作为奶牛热应激性状的候选基因, 理论上可以采用其连锁的微卫星标记进行分子水平辅助选育抗热应激奶牛。在 *BMS468* 基因座上, 耐热性状的最有利基因型为 134 bp/128 bp; *BM1258* 基因座上, 最有利基因型 101 bp/99 bp 的高温期日产奶量下降率最低; 在 *BM1815* 基因座上, 耐热性状的最有利基因型为 186 bp/148 bp。

由于本研究仅选择了 23 号染色体上与 *HSP70* 基因连锁的 3 个微卫星座位, 而且检测的样本量也较少, 因此 3 个微卫星座位与奶牛耐热指标之间的关系探索只是初步的, 还需要使用更多的微卫星座位和扩大样本进行进一步分析, 以便在育种实践中验证。

参考文献(References):

- [1] Johnson HD. Bioclimate effects on growth, reproduction, and milk production. World Animal Science (Netherlands): Elsevier, 1987, 35–37.
- [2] Du Preez JH, Hattingh PJ, Giesecke WH, Eisenberg BE. Heat stress in dairy cattle and other livestock under southern African conditions. III. Monthly temperature-humidity index mean values and their significance in the performance of dairy cattle. *Onderstepoort J Vet*, 1990, 57(4): 243–248.
- [3] Holter JB, West JW, McGilliard ML. Predicting ad libitum dry matter intake and yield of Holstein cows. *J Dairy Sci*, 1997, 80(9): 2188–2199. [\[DOI\]](#)
- [4] Valtorta SE, Gallardo MR. Evaporative cooling for Holstein dairy cows under grazing conditions. *Int J Biometeorol*, 2004, 48(4): 213–217. [\[DOI\]](#)
- [5] Turner LW, Chastain JP, Hemken RW, Gates RS, Crist WL. Reducing heat stress in dairy cows through sprinkler and fan cooling. *Appl Eng Agric*, 1992, 48(4): 251–256.
- [6] Smith TR, Chapa A, Willard S, Herndon Jr C, Williams RJ, Crouch J, Riley T, Pogue D. Evaporative tunnel cooling of dairy cows in the southeast. II: Impact on lactation performance. *J Dairy Sci*, 2006, 89(10): 3915–3923. [\[DOI\]](#)
- [7] Armstrong DV. Heat stress interaction with shade and cooling. *J Dairy Sci*, 1994, 77(7): 2044–2050. [\[DOI\]](#)
- [8] Silanikove N, Maltz E, Halevi A, Shinder D. Metabolism of water, sodium, potassium, and chlorine by high yielding dairy cows at the onset of lactation. *J Dairy Sci*, 1997, 80(5): 949–956. [\[DOI\]](#)
- [9] Ravagnolo O, Misztal I, Hoogenboom G. Genetic component of heat stress in dairy cattle, development of heat index function. *J Dairy Sci*, 2000, 83(9): 2120–2125. [\[DOI\]](#)
- [10] 穆玉云. 乳牛耐热性的数量指标和遗传力. 中国畜牧杂志, 1990, 26(5): 46.
- [11] Feige U, Morimoto R, Yahara I, Polla BS. Stress-inducible Cellular Responses. Birkhäuser Verlag Basel, Boston, Berlin, 1996, 239–254.
- [12] Cai YF, Liu QH, Xing GD, Zhou L, Yang YY, Zhang LJ, Li J, Wang GL. Polymorphism of the promoter region of *Hsp70* gene and its relationship with the expression of *HSP70*mRNA, *HSF1*mRNA, *Bcl-2* mRNA and *Bax-A* mRNA in lymphocytes in peripheral blood of heat shocked dairy cows. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2005, 18(5): 734–740.
- [13] Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 1993, 259(5100): 1409–1410. [\[DOI\]](#)
- [14] Bruemmer-Smith S, Stüber F, Schroeder S. Protective functions of intracellular heat shock protein (HSP) 70 expression in patients with severe sepsis. *J Intensive Care Med*, 2001, 27(12): 1835–1841. [\[DOI\]](#)
- [15] Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription- polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem*, 2000, 285(2): 194–204. [\[DOI\]](#)
- [16] Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J*

- Mol Endocrinol*, 2002, 29(1): 23–39. [\[DOI\]](#)
- [17] 储明星, 周国利, 金海国, 石万海, 曹福存, 方丽, 叶素成, 朱颜. 7 个微卫星座位与北京荷斯坦母牛体细胞评分关系的研究. *遗传学报*, 2005, 32(5): 471–475.
- [18] 李延璐, 储明星, 陈宏权, 方丽, 狄冉, 马月辉, 李奎. 绵羊微卫星 BMS2508 和 *FecB* 基因的多态及连锁分析. *遗传*, 2009, 31(5): 500–507.
- [19] 孙伟, 常洪, 金银, 王鹏, 钱建共, 吴文忠, 陈玲, 王伟. 湖羊产羔性状的微卫星标记与可能生产力的关联性分析. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(1): 7–14.
- [20] Rhoad AO. The Iberia heat tolerance test for cattle. *Trop Agr*, 1944, 21(9): 162–164. [\[DOI\]](#)
- [21] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [22] Ahn SG, Thiele DJ. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Gene Dev*, 2003, 17(4): 516–528. [\[DOI\]](#)
- [23] Zhang Y, Huang L, Zhang J. Targeted disruption of *hsf1* leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-induced Hsp molecular chaperones. *Cell Biochem*, 2002, 86(2): 376–393. [\[DOI\]](#)
- [24] Mosser DD, Caron AW, Bourget L. Role of the human heat shock protein HSP70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(9): 5317–5321.
- [25] Vaiman D, Mercier D, Moazami-Goudarzi K, Eggen A, Ciampolini R, Lépingle A, Velmalá R, Kaukinen J, Varvio SL, Martin P, Levéziel H, Guérin G. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mamm Genome*, 1994, 5(5): 288–297. [\[DOI\]](#)
- [26] Bostein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet*, 1980, 32(3): 314–331.
- [27] 穆玉云, 李如治, 黄昌澍. 乳牛耐热性指标的检测. *安徽农业大学学报*, 1993, 20(1): 69–75.
- [28] 李建国, 桑润滋, 张正珊, 王铁征, 朱慧中. 热应激对奶牛生理常值、血液生化指标、繁殖及泌乳性能的影响. *河北农业大学学报*, 1998, 21(4): 69–75.
- [29] Abdel-Samee AM. Response of New Zealand white rabbits to thermal stress and its amelioration during winter and summer of North Sinai, Egypt. *J Arid Environ*, 1997, 36(2): 333–342. [\[DOI\]](#)
- [30] McManus C, Paludo GR, Louvandini H, Garcia JAS, Egitto AA, Mariante AS. Heat tolerance in naturalised cattle in Brazil: physical factors. *Arch Zoote*, 2005, 54(206): 453–458.
- [31] Evans J. Adaptation to subtropical environments by Zebu and British breeds of cattle in relation to erythrocyte characters. *Aust J Agr Res*, 1963, 14(4): 559–571. [\[DOI\]](#)
- [32] 史彬林, 李如治, 黄昌澎, 林全曾, 金穗华. 奶牛耐热性评定指标的研究. *中国奶牛*, 1996, (2): 20–22
- [33] 赖登明, 夏东, 李如治, 谭志明, 谢伍生. 红细胞钾含量对奶牛耐热性的影响. *中国奶牛*, 1997, (2): 15–16.
- [34] 苏光华, 肖兵南, 燕海峰, 张元跃, 邓缘, 吴晓林, 刘海林. 南方中国荷斯坦牛耐热性的遗传分析. *中国奶牛*, 2007, (1): 21–25
- [35] 王泽英, 黄金明, 王长法, 刘延鑫, 李大齐, 仲跻峰, 王根林. 荷斯坦牛血红细胞 Na^+K^+ -ATP 酶活力与其耐热性的相关性研究. *中国牛业科学*, 2009, 35(3): 1–5.

• 遗传咨询 •

母亲是 18-三体携带者, 能生育正常宝宝吗?

答: 18 三体综合征又称 Edward 综合征, 本病临床症状复杂, 主要特征是生长发育障碍, 智力低下, 小眼, 眼距宽。耳低位、畸形, 先天性心脏病, 有特殊握拳姿势等。本病最常见的染色体畸变是单纯 18 三体, 即核型为 47, XX(XY), +18, 此类核型占全部患儿的 80%, 多于出生后一岁内死亡。还有 10% 的患者是嵌合型, 即 46, XY(或 XX)/47, XY(或 XX), +18, 其余病例为各种易位、部分三体或多重三体, 较少见。如果母亲是嵌合体, 那么能否生育正常宝宝取决于生殖细胞的核型是否正常; 如果是易位携带者, 理论上其子女是正常人、18 三体综合征或易位携带者的几率均是 1/3。

(中国科学院遗传与发育生物学研究所 张喆, 李巍)