

INCENP 基因功能性单倍型可调控启动子活性并影响公牛精液品质

刘娟^{1,2}, 孙艳², 姜强², 杨春红², 黄金明², 李建斌², 侯明海², 仲跻峰², 王长法², 刘保申¹

1. 山东农业大学农学院, 泰安 271000;

2. 山东省农业科学院奶牛研究中心, 济南 250131

摘要: 为研究内着丝粒蛋白(Inner centromere protein, INCENP)基因启动子区单核苷酸多态性(SNPs)与精液品质的相关性, 本文利用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测了 250 头中国荷斯坦公牛 INCENP 基因的基因型。在 INCENP 基因启动子区鉴定出两个 SNPs (g.-556 G>T, rs 136823901 和 g.-692 C>T, rs 211010999), 发现了 3 种单倍型(CG、TT、TG)。分析两个 SNP 位点的基因型频率和等位基因频率, 各 SNP 及单倍型组合与中国荷斯坦公牛精液品质的相关性, 结果表明 SNP 位点 g.-556 G>T GT 基因型个体的鲜精活力显著高于 GG 基因型个体($P<0.05$), 单倍型组合 H1H1(CCGG)、H1H3(CTGT)、H2H3(TTGT)和 H3H3(TTTT)个体的鲜精活力和冻精解冻后活力均显著高于 H1H2 个体($P<0.05$)。为进一步研究 g.-556 G>T 和 g.-692 C>T 影响精液品质的可能机理, 本文将 3 种单倍型质粒分别转染小鼠睾丸间质细胞(MLTC-1), 结果显示含 TG 单倍型的载体荧光素酶活性最高。由此推测, g.-556 G>T 和 g.-692 C>T 为启动子区功能性突变位点, 可通过调节启动子活性来调控 INCENP 基因表达, 进而影响精液品质。

关键词: INCENP; SNP; 单倍型; 启动子区; 精液品质; 基因表达

Functional haplotypes of INCENP affect promoter activity and bovine semen quality

Juan Liu^{1,2}, Yan Sun², Qiang Jiang², Chunhong Yang², Jinming Huang², Jianbin Li², Minghai Hou², Jifeng Zhong², Changfa Wang², Baoshen Liu¹

1. College of Agronomic Sciences in Shandong Agricultural University, Taian 271000, China;

2. Dairy Cattle Research Center, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan 250131, China

Abstract: To explore the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoter region of

收稿日期: 2015-05-26; 修回日期: 2015-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31401049, 31401050), 山东省农业良种工程种质创新应用项目(编号: 2014LZ), 现代农业产业技术体系奶牛岗位科学家项目(编号: CARS-37)和山东省农业产业技术体系牛产业创新团队项目(编号: SDAIT-12-011-02)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31401049, 31401050), the Well-Bred Program of Shandong Province (No. 2014LZ), the Program of National Cow Industrial Technology System (No. CARS-37), and Bovine Innovation team of Shandong Province Agricultural Technology System (No. SDAIT-12-011-02)]

作者简介: 刘娟, 硕士, 专业方向: 动物遗传与生物技术。E-mail: liujuanid@163.com

通讯作者: 王长法, 博士, 研究员, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: wangcf1967@163.com

DOI: 10.16288/j.yczs.15-230

网络出版时间: 2015-11-5 11:28:07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20151105.1128.005.html>

the inner centromere protein (*INCENP*) gene and bovine semen quality, the haplotypes in 250 Chinese Holstein bulls were detected using PCR-RFLP method in this study. Two SNPs (g.-556 G>T, rs 136823901 and g.-692 C>T, rs 211010999) and three haplotypes (CG, TT, TG) were identified in the promoter region of *INCENP*. The genotype frequency and allele frequency of these two SNPs as well as the correlation between different SNP haplotype combinations and bovine semen quality were then analyzed. Our results showed that fresh sperm motility of the GT genotype was significantly higher than that of the GG genotype ($P<0.05$) at the SNP site g.-556 G>T, while fresh and frozen-thawed sperm motilities of the haplotype combinations H1H1(CCGG), H1H3(CTGT), H2H3(TTGT) and H3H3(TTTT) were significantly higher than that of H1H2 ($P<0.05$). To further study the possible mechanisms by which g.-556 G>T and g.-692 C>T affect semen quality, three haplotype plasmids were respectively transfected into MLTC-1 cells. The TG haplotype demonstrated the highest luciferase activity, suggesting that g.-556 G>T and g.-692 C>T are functional mutations which could regulate *INCENP* gene expression by affecting promoter activity and thus affect semen quality.

Keywords: *INCENP*; SNP; haplotype; promoter region; semen quality; gene expression

中国荷斯坦牛是国内饲养范围最广、产奶量最多的一个品种。中国荷斯坦公牛作为奶牛繁育中重要的一环,其精液品质不仅决定着公牛站的经济效益,更显著影响母牛的繁殖效率^[1]。近年来,随着分子遗传技术的不断发展,候选基因法(Candidate gene approach)在遗传育种中得到了广泛应用。通过筛选候选基因上的多态位点,分析多态位点与精液品质的相关性,鉴定与精子质量相关的分子标记,进而为标记辅助选择(Marker assisted selected, MAS)提供理论指导。目前,多个研究团队通过全基因组关联分析鉴定了与精液品质密切相关的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNP)位点,发现这些 SNPs 位点影响精子活力、密度、畸形率以及受精后的胚胎发育^[2~6]。

内着丝粒蛋白(Inner centromere protein, *INCENP*)作为染色体乘客蛋白复合体(Chromosomal passenger complex, CPC)的主要成员,在有丝分裂和减数分裂过程中发挥重要的作用。近年来研究发现,*INCENP*不仅在细胞分裂过程中发挥重要的作用^[7],而且还与癌症发生^[8]以及生殖^[9]密切相关。2014年,Hering等^[10]对高、低精子活力的荷斯坦牛群进行了全基因组关联分析,筛查了距离显著标记 1 Mb 区域的所有基因,发现了多个与精子品质相关的候选基因,其中 *INCENP* 位于显著 SNP 标记 rs109416157 附近,与精子活力密切相关,在调控精子质量方面可能具有重要的作用。早期研究也发现,*INCENP* 主要参与细胞分裂过程中姐妹染色单体的分离和胞质分裂,*INCENP* 表达异常就会导致染色体畸形,从而影响

细胞的正常分裂^[11,12]。在精子发生过程中,染色单体的正常分离是产生功能正常精子的必备条件^[13],因此猜测 *INCENP* 基因多态性可能调控 *INCENP* 的表达,作用于精子发生过程的细胞分裂,进而影响精子质量。目前的研究多侧重于 *INCENP* 在细胞分裂中的作用,以及 *INCENP* 突变导致恶性肿瘤的发生,而对于 *INCENP* 在精子发生中的作用研究却鲜有报道。本研究主要探讨了 *INCENP* 启动子区 SNP 与中国荷斯坦牛精液品质的相关性及其可能的作用机理,从而鉴定出与中国荷斯坦公牛精液品质相关的分子标记,为种公牛的早期培育提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验用的公牛选自国内三大种公牛站:北京奶牛中心(84头),上海光明荷斯坦牧业有限公司(56头)和山东奥克斯种公牛站(110头)。实验公牛的冻精储存于液氮中。实验公牛个体均具有完整的精液品质相关记录,包括采精时间、射精量、鲜精密度、射精总次数、鲜精活力、**RS** 精子解冻后活力和精子畸形率等,精子性状的最大值/最小值取自 2005~2014 年间各牛精液品质性状的平均值(表 1)。

小鼠睾丸间质细胞瘤细胞(MLTC-1)购自中国科学院细胞库。

1.2 方法

1.2.1 启动子区 DNA 片段扩增及 SNPs 的鉴定

参照 GenBank 上牛 *INCENP* 基因(登录号:

表 1 250 头中国荷斯坦公牛精液性状数据统计
Table 1 Data statistics of semen traits in 250 Chinese Holstein bulls

精子性状	平均值±标准误	最大值/最小值
射精量(mL)	5.82 ± 0.43	10.16/2.30
鲜精活力(%)	67.32 ± 0.24	78.84/38.91
鲜精密度(×10 ⁸ /mL)	10.50 ± 0.51	19.37/4.00
解冻后精子活力(%)	42.94 ± 0.19	57.45/11.48
畸形率(%)	15.91 ± 0.36	28.20/9.99

AC_000186.1)序列设计引物,扩增启动子区 DNA 片段。引物序列:

F: 5'-ACAGTCCACAGGGTCAGCTA-3';
R: 5'-AGACTCACTTGACTGCACCG-3'。

引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。随机抽取 36 头公牛的冻精 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 扩增体系为 25 μL,包括:2 × Power Taq PCR MasterMix 12.5 μL,10 μmol/L 上下游引物各 0.5 μL,模板 1 μL,ddH₂O 补足到 25 μL。PCR 扩增程序:95 预变性 5 min;95 变性 30 s,59 复性 30 s,72 延伸 65 s,35 个循环;最后再 72 延伸 10 min。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,确定目的条带后,PCR 扩增产物由北京六合华大基因科技股份有限公司进行双向测序。测序结果用 DNAMAN 与 GenBank 上 *INCENP* 基因的参考序列进行序列比对,结合测序峰图,确定目的片段中的 SNP 位点。

1.2.2 PCR-RFLP 基因分型

根据 dCAPs 在线软件(<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>),对 2 个 SNPs 位点分别选取合适的限制性内切酶进行基因分型,设计引物扩增包含 SNP 位点的目的片段(表 2)。检测 PCR 产物为目的片段后,用相应的限制性内切酶将 PCR 产物于 37 消化 30 min,

通过 PCR-RFLP 方法对 SNP 位点进行多态性分析。酶切反应体系为 30 μL:PCR 产物 10 μL,10 U/μL 限制性内切酶 1 μL,10 × buffer 2 μL,ddH₂O 补足到 30 μL。酶切产物用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测,各 SNP 所需的限制性内切酶及酶切后片段长度见表 2。根据电泳得到的条带区分统计不同的基因型,分析各 SNP 位点的多态性情况。

1.2.3 牛 *INCENP* 基因启动子区载体的构建与鉴定

根据 pGL3-basic 载体上的多克隆位点选取合适的限制性内切酶,设计添加保护碱基和酶切位点引物。引物序列为:

上游引物:5'-CGACGCGTACAGTCCACAGG-GTCAGCTA-3';

下游引物:5'-CCCAAGCTTAGACTCACTTG-ACTGCACCG-3'。

以 CG、TT、TG 单倍型个体冻精 DNA 为模板进行 PCR 扩增,为确保 PCR 扩增产物的保真性,使用 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa),PCR 扩增体系为 25 μL,包括:5 × PrimeSTAR GXL Buffer 5 μL,1 × dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μL,每种碱基的终浓度为 200 μmol/L,10 μmol/L 上、下游引物各 0.5 μL,1.25 U/μL PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 0.5 μL,模板 1 μL,最后加 ddH₂O 补足到 25 μL。产物经测序检测无突变后同 PGL3-空载体分别双酶切,PCR 产物和 pGL3-Basic 载体的双酶切体系分别为 30 μL 和 20 μL。其中,PCR 产物酶切体系包括:PCR 产物 10 μL,FastDigest[®] *Mlu* 1 μL, FastDigest[®] *Hind* 1 μL, FastDigest[®] Buffer 2 μL, ddH₂O 补足到 30 μL。pGL3-Basic 载体的双酶切体系包括:pGL3-Basic 载体 2 μL, FastDigest[®] *Mlu* 1 μL, FastDigest[®] *Hind* 1 μL, FastDigest[®] Buffer 2 μL, ddH₂O 补足到 20 μL。酶切产物用凝胶回收试

表 2 牛 *INCENP* 基因启动子区 SNP 扩增及 PCR-RFLP 分型
Table 2 PCR and PCR-RFLP of SNP in promoter region of bovine *INCENP* gene

引物名称	引物序列(5' 3')	限制性内切酶	片段大小(bp)	复性温度()
g.-692 C>T	F: ACAGTCCACAGGGTCAGCTA	<i>Mae</i>	CC: 543、86	59
	R: TACAAGTCCCAGCGTGCATT		CT: 629、543、86	
			TT: 629	
g.-556 G>T	F: ACAGTCCACAGGGTCAGCTA	<i>Apo</i>	GG: 1049	56
	R: AGACTCACTTGACTGCACCG		GT: 1049、829、220	
			TT: 829、220	

剂盒(TIANGEN)纯化后,将双酶切的 pGL3-basic 空载体和 PCR 酶切产物用 T4 连接酶进行连接。连接体系为 10 μ L,包括:PCR 酶切产物 5 μ L, pGL3-basic 酶切载体 3 μ L, T4 Ligase 1 μ L, T4 Ligase 10 \times Buffer 1 μ L。取 10 μ L 连接产物转化入 50 μ L DH5⁺ 大肠杆菌感受态细胞。涂板后挑取平皿中小而圆并长势良好的菌落增菌,菌液 PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,初步鉴定为目的片段后,菌液由北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序,选取无突变菌液参照 Endo-free Plasmid Mini Kit (Omega)试剂盒说明书提取所需目的片段质粒。

1.2.4 转染及荧光检测

参照 Lipofectamine2000 (Invitrogen)说明书,将提取的 pGL3-CG、pGL3-TT 和 pGL3-TG 质粒及 pGL3-空载、内参质粒(pRL-TK)分别转染到小鼠睾丸间质细胞中(MLTC-1),运用 Dual-luciferase[®] Reporter Assay System (Promega)试剂盒测定基因的表达水平。

1.2.5 统计学分析

采用 SAS 9.0 统计软件,调用 GLM 程序,利用最小二乘法拟合线性模型,分析公牛精液性状(采精量、鲜精密度、鲜精活力、冻后活力和畸形率)与基因型的相关性^[14],数据用 3 个重复的平均值 \pm 标准误差(Mean \pm SE)的形式表示, $P < 0.05$ 代表差异显著。

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + Y_j + H_k + e_{ijk}$$

公式中: Y_{ijk} =公牛精子各种性状的观察值; μ =群体均值; G_i :基因型的固定效应, i :1、2、3; Y_j :季节的固定效应, j :1、2,1为4~9月,2为10月到次年3月; H_k :场次的固定效应, k :1、2、3; e_{ijk} :随机残差效应。

使用 POPGENE32 软件分析多态信息含量(PIC)、遗传杂合度(H_e)和有效等位基因数(N_e); SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>)分析基因型频率及连锁不平衡(LD)。

2 结果与分析

2.1 牛 *INCENP* 基因启动子区 SNP 鉴定及 PCR-RFLP 分型

通过用 DNAMAN 比对测序结果,再结合

ChromasPro 中的测序峰图,在启动子区鉴定出两个 SNPs:g.-556 G>T 和 g.-692 C>T(图 1),NCBI 的登录号分别为 rs 136823901 和 rs 211010999。通过 PCR-RFLP 技术对 250 头中国荷斯坦公牛的多态位点 g.-556 G>T 和 g.-692 C>T 进行基因分型,酶切产物用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示 g.-556 G>T 被限制性核酸内切酶 *Apo* 识别后,有 3 种基因型,分别是 GG 基因型(片段大小为 1049 bp)、GT 基因型(片段大小为 1049 bp、829 bp 和 220 bp)和 TT 基因型(片段大小为 829 bp 和 220 bp)。g.-692 C>T 被限制性核酸内切酶 *Mae* 识别后,有 3 种基因型,分别是 CC 基因型(片段大小为 543 bp 和 86 bp)、CT 基因型(片段大小为 629 bp、543 bp 和 86 bp)和 TT 基因型(片段大小为 629 bp)(图 1),根据电泳条带统计每个个体的基因型。

使用在线软件 JASPAR database (http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl?rm=browse&db=core&tax_group=vertebrates)预测转录因子结合位点发现,位于-692 位点处的位点 C 突变为 T 后导致转录因子 Arnt 结合位点(TACGTG)的缺失,增加了转录因子 FOXO3 的结合(TCTACACA);位于-556 位点处的位点 G 突变为 T 时增加了转录因子 Ets1(GAAATTCCTCTGCA)和 FLI1(AGAGGAAATTT)的结合位点(图 2)。

2.2 牛 *INCENP* 遗传参数统计分析

中国荷斯坦种公牛 *INCENP* 基因各基因型频率及等位基因频率见表 3。其中,g.-692 C>T 位点、CT 基因型在群体中占优势,C、T 等位基因频率大致相同;g.-556 G>T 位点、GT 基因型在群体中占优势,且 G 等位基因频率大于 T。 PIC 、 H_e 、 N_e 及 χ^2 检验的结果表明,g.-556 G>T 和 g.-692 C>T 的 P 值均大于 0.05,群体内两突变位点的基因型频率和基因频率都达到 Hardy-Weinberg 平衡状态,且此两多态位点在群体中均为中度多态。连锁平衡分析表明,g.-556 G>T 和 g.-692 C>T 两突变位点同时遗传的频率明显高于预期的随机频率,存在较强的连锁不平衡关系(Linkage disequilibrium, LD) ($D^2=1$, $r^2=0.894$)。

2.3 牛 *INCENP* 基因不同基因型及单倍型组合与公牛精液性状的相关性分析

运用 SAS 软件分析 *INCENP* 不同基因型与中国荷斯坦牛精液品质性状的相关性,结果见表 4。突变

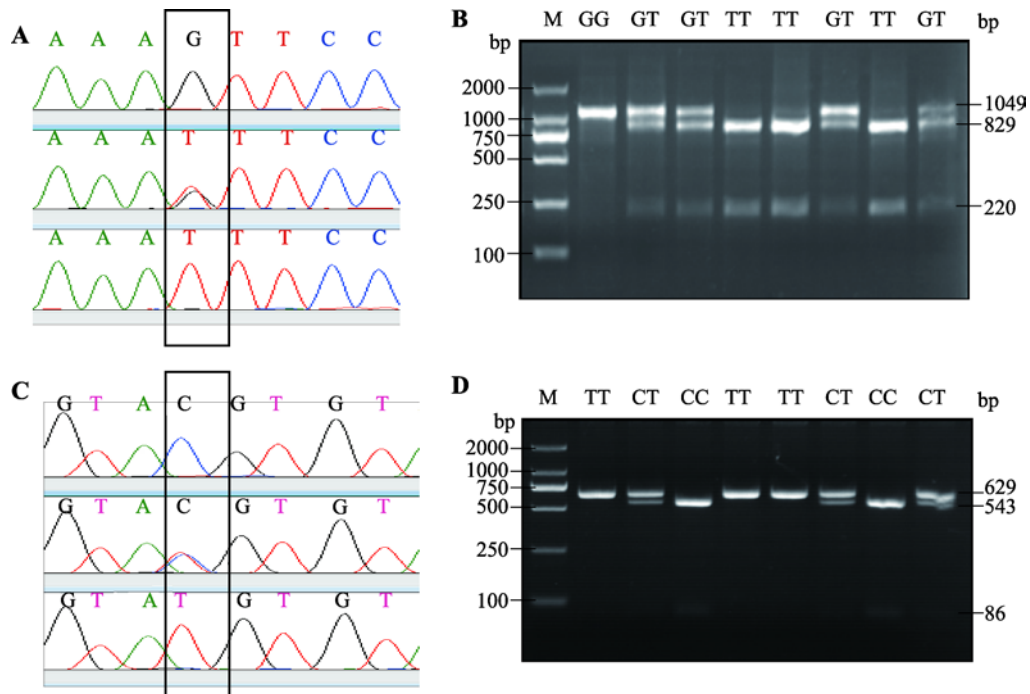


图 1 牛 *INCENP* 基因启动子区 SNP 测序峰图及酶切图谱

Fig. 1 Sequencing and genotyping figures of two SNPs in promoter region of bovine *INCENP* gene

A: SNPs 位点 g.-556 G>T 的测序峰图; B: SNPs 位点 g.-556 G>T 的 PCR-RFLP 分型图; C: SNPs 位点 g.-692 C>T 的测序峰图; D: SNPs 位点 g.-692 C>T 的 PCR-RFLP 分型图。突变位点用方框标出, M 为 DL2000 Marker。

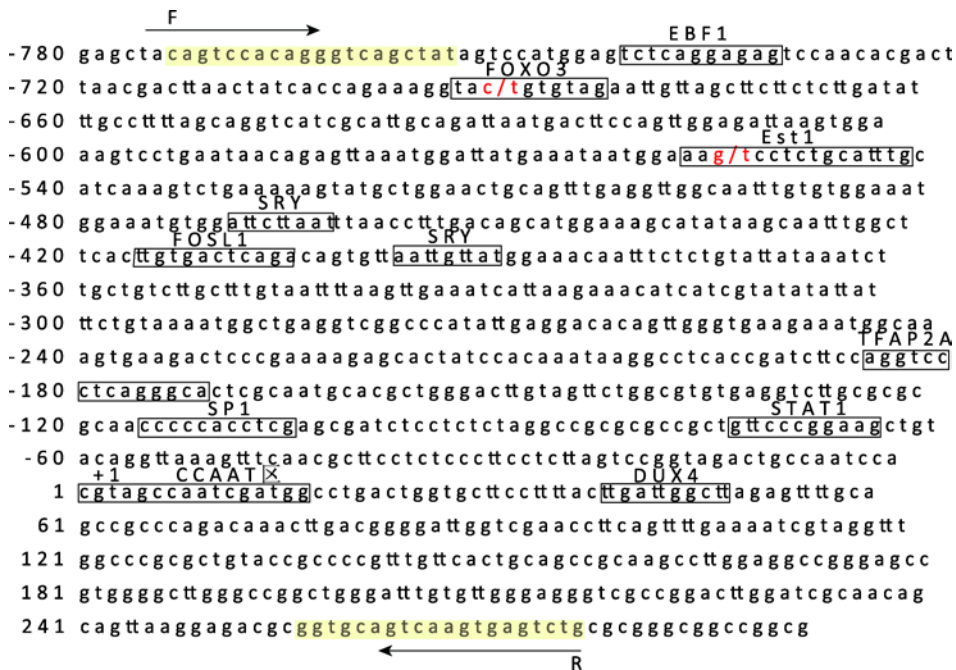


图 2 牛 *INCENP* 基因启动子区-780~+290 序列

Fig. 2 The -780 bp to +290 bp in promoter region of bovine *INCENP* gene

基因序列包含启动子区、外显子 1 以及部分内含子 1; 黑色方框标示转录因子的结合位点; 红色碱基表示多态位点; 黄色背景部分的碱基表示扩增 *INCENP* 启动子区序列的引物对, F 和 R 分别表示正向和反向引物; 标有+1 的碱基为转录起始位点 TSS 的第一个碱基 C, 基因序列编号与转录起始位点相对应。

表 3 牛 *INCENP* 基因启动子区 g.-692 C>T 和 g.-556 G>T 基因频率、基因型频率及遗传多样性统计分析
Table 3 Gene frequencies, genotype frequency and statistical analysis of genetic parameters of g.-692 C>T and g.-556 G>T in promoter region of bovine *INCENP* gene

SNP 位点	基因型	样本数	基因型频率	等位基因频率	$\chi^2(P$ 值)	<i>PIC</i>	<i>He</i>	<i>Ne</i>
g.-692 C>T	CC	65	0.260	C:0.494	1.020(0.313)	0.375	0.500	2.000
	CT	117	0.468					
	TT	68	0.272	T:0.506				
g.-556 G>T	GG	73	0.292	G:0.522	1.530(0.216)	0.375	0.499	1.996
	GT	115	0.460					
	TT	62	0.248	T:0.478				

表 4 牛 *INCENP* 基因不同基因型精液品质相关性分析
Table 4 Correlation analysis of semen traits for different genotypes in the bovine *INCENP* gene

SNP 位点	基因型	射精量(mL)	鲜精密度($\times 10^8$ /mL)	鲜精活力(%)	解冻后活力(%)	畸形率(%)
g.-692 C>T	CC	5.89 \pm 0.20	10.84 \pm 0.39	66.28 \pm 1.01	41.76 \pm 0.83	16.02 \pm 0.49
	CT	5.98 \pm 0.15	10.94 \pm 0.29	67.94 \pm 0.75	42.08 \pm 0.62	15.66 \pm 0.37
	TT	6.18 \pm 0.25	10.54 \pm 0.38	67.25 \pm 0.98	42.24 \pm 0.81	16.26 \pm 0.50
g.-556 G>T	GG	5.90 \pm 0.19	10.93 \pm 0.37	65.71 \pm 0.94 ^b	41.21 \pm 0.78	16.05 \pm 0.46
	GT	5.94 \pm 0.15	10.77 \pm 0.29	68.55 \pm 0.75 ^a	42.58 \pm 0.63	15.60 \pm 0.38
	TT	5.51 \pm 0.21	10.72 \pm 0.40	66.95 \pm 1.02	42.01 \pm 0.85	16.28 \pm 0.51

注：同列中具有不同字母(a, b)上标的平均值间差异显著($P<0.05$)。

表 5 牛 *INCENP* 基因不同单倍型组合精液品质相关性分析
Table 5 Correlation analysis of semen traits for different haplotype combinations in the bovine *INCENP* gene

单倍型组合(样本数)	射精量(mL)	鲜精密度($\times 10^8$ /mL)	鲜精活力(%)	解冻后活力(%)	畸形率(%)
H1H1(64)	5.85 \pm 0.20	10.89 \pm 0.39	66.16 \pm 1.00 ^a	41.91 \pm 0.83 ^a	15.99 \pm 0.50
H1H2(7)	5.66 \pm 0.72	11.46 \pm 1.39	59.40 \pm 3.02 ^b	36.93 \pm 2.52 ^b	17.37 \pm 1.61
H1H3(111)	6.01 \pm 0.15	10.89 \pm 0.30	68.53 \pm 0.76 ^a	42.31 \pm 0.63 ^a	15.58 \pm 0.38
H2H3(6)	5.38 \pm 0.66	8.74 \pm 1.27	70.39 \pm 3.26 ^a	44.58 \pm 2.72 ^a	15.57 \pm 3.21
H3H3(62)	5.51 \pm 0.21	10.72 \pm 0.40	66.95 \pm 1.01 ^a	42.01 \pm 0.85 ^a	16.28 \pm 0.51

注：H1=CG；H2=TG；H3=TT；同列中具有不同字母(a, b, c, d)上标的平均值间差异显著($P<0.05$)。

位点 g.-556 G>T GT 基因型个体的鲜精活力显著高于 GG 基因型个体($P<0.05$)，而不同基因型个体间的射精量、鲜精密度、冻后活力、畸形率无显著差异($P>0.05$)。突变位点 g.-692 C>T 的 3 种基因型(CC、CT、TT)与种公牛的精液品质性状不相关($P>0.05$)。

两个 SNPs 位点(g.-692 C>T、g.-556 G>T)理论上应该存在 4 种单倍型：CG、TG、TT、CT，但在试验群体中只鉴定出 3 种单倍型：CG (H1)、TG (H2)、TT (H3)，在群体中的频率分别为 49.2%、2.6%、48.2%。在群体中共发现 5 种单倍型组合：H1H1 (CCGG)，H1H2 (CTGG)，H1H3 (CTGT)，H2H3 (TTGT)，H3H3

(TTTT)。运用 SAS 软件分析 *INCENP* 不同单倍型组合与中国荷斯坦公牛精液品质性状的相关性，结果发现单倍型组合 H1H1 (CCGG) ($P<0.05$)、H1H3 (CTGT) ($P<0.05$)、H2H3 (TTGT) ($P<0.05$)和 H3H3 (TTTT) ($P<0.05$)个体的鲜精活力和解冻后活力均显著高于 H1H2 (CTGG)个体，不同单倍型组合个体间的射精量、鲜精密度和畸形率无显著差异($P>0.05$) (表 5)。

2.4 荧光检测及启动子活性分析

将含不同单倍型片段的质粒(pGL3-CG、pGL3-TT、pGL3-TG)及 pGL3-空载质粒、内参质粒(pRL-TK)分

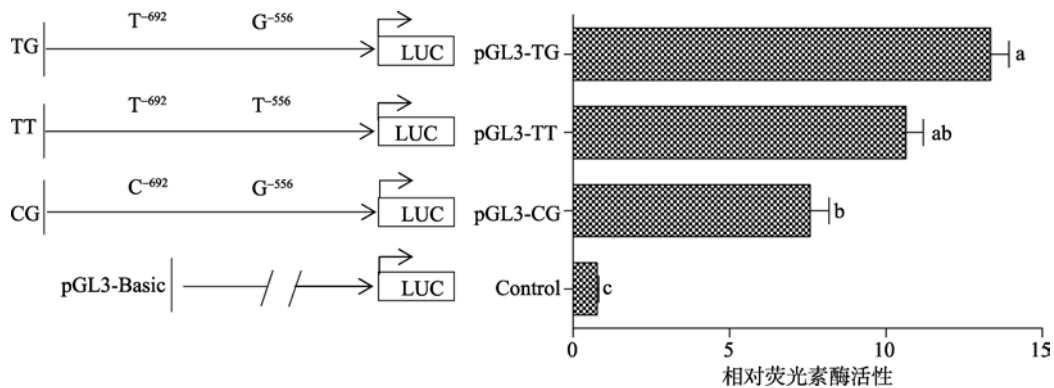


图 3 牛 *INCENP* 基因不同单倍型在 MLTC-1 细胞中的启动子活性

Fig. 3 Promoter activity analysis of the bovine *INCENP* gene different haplotype in MLTC-1 cells

不同小写字母(a, b, c)上标的平均值间差异极其显著($P < 0.01$), 相同小写字母上标的平均值间差异显著($P < 0.05$)。

别转染到小鼠睾丸间质细胞中(MLTC-1), 运用 Promega 荧光检测仪检测含不同单倍型片段的质粒(pGL3-CG、pGL3-TT、pGL3-TG)及 pGL3-空载的荧光素酶的活性, 并用内参质粒的海肾荧光素酶活性值来校正观察值(图 3)。结果表明, pGL3-TG 质粒的启动子活性最高 pGL3-CG 质粒的启动子活性最低。因此推测, 位于 *INCENP* 基因启动子区的两个多态位点 g.-556 G>T 和 g.-692 C>T 为功能性突变位点, 影响着 *INCENP* 基因的启动子活性, 可能与 *INCENP* 基因的转录调控密切相关。

3 讨 论

基因构件的改变可能影响基因的表达, 从而改变其功能活性。单核苷酸多态性(SNP)是最普遍的基因突变方式, 主要指 DNA 序列上单个碱基突变, 包括单个碱基的转换、颠换、插入及缺失等。编码区 SNP (Coding SNP, cSNP)可能对蛋白质的结构和功能产生影响^[15], 在遗传性疾病的研究中具有重要意义。启动子区 SNP, 尤其是有转录因子结合的 SNP 位点, 可能影响启动子活性, 进而调控基因的表达水平^[16]。近年来 SNP 引起了广大科研人员的兴趣, SNP 研究是基因组计划从基础理论走向实际应用的重要步骤。Alvarado-Arnez 等^[17]的研究表明, 位于 *IL-10* 基因的 g.-819 C>T SNP 位点(rs1800871)与麻风病易感性显著相关, 因此它可作为麻风病初步诊断指标之一。de Camargo 等^[18]结合生物信息学和分子检测

技术发现位于 X 染色体基因上的 SNPs 与肉牛的雄性特征及生长性状显著相关。本研究采用 PCR-RFLP 技术^[19]检测了中国荷斯坦公牛 *INCENP* 基因启动子区的基因多态性, 在 *INCENP* 基因启动子区鉴定出两个多态性位点: g.-556 G>T 和 g.-692 C>T, 其中 SNP 位点(g.-556 G>T)与中国荷斯坦公牛的鲜精活力密切相关。由于受精过程是对精子体力和耐力的考验, 虽然一次射精可以产生上百亿个精子, 但绝大部分的精子还未到达输卵管的壶腹部时就因失去活力而死亡, 只有顺利到达正确的受精部位并且速度最快的精子才可能与卵子结合完成受精作用, 因此精子活力的高低是评价精子质量好坏的关键指标^[20], 研究 *INCENP* 基因 SNPs 与中国荷斯坦公牛精液性状的相关性对于指导中国荷斯坦牛的育种工作具有非常重要的意义。

转录因子(Transcription factors, TFs)作为基因启动子区重要的调控元件, 可以与 RNA 聚合酶形成转录起始复合体参与转录起始的过程, 其种类的改变必然对基因表达造成严重的影响^[21]。因此, 本研究结合生物信息分析软件, 预测到-556 位点处 G 突变为 T 后增加了转录因子 Ets1 和 FLI1 的结合位点, Ets1 和 FLI1 属于 Ets 转录因子家族, Ets1 可以与基因启动子区的增强子结合, 增强基因的表达水平^[22], FLI1 可以调控许多组织的生物学过程, 目前侧重于研究 FLI1 在上皮细胞或组织衍生的癌症上的作用, 包括乳腺癌^[23]。-692 位点处 C 突变为 T 后增加了转录因子 FOXO3 的结合位点, 但却导致转录因 Arnt

结合位点(TACGTG)的缺失。FOXO3 在调节细胞分化、细胞周期停滞、细胞凋亡和 DNA 修复中具有高度保守的作用^[24]。Arnt 是碱性螺旋-环-螺旋转录因子超家族中 PAS 亚家族的成员之一,与体内多个 bHLH-PAS 蛋白形成有活性的转录起始复合物,调控低氧状态下相应的生物学现象,包括细胞的存活、增殖以及糖酵解等^[25]。虽然 g.-556 G>T 和 g.-692 C>T 位点碱基突变后都有转录因子的增加和/或减少,但是究竟是哪个转录因子起主要的调控作用以及两 SNPs 位点结合的转录因子是否有相互作用还需后续实验的验证。*INCENP* 属于着丝粒蛋白家族,与细胞分裂密切相关,*INCENP* 异常会导致染色体畸变、胞质分裂失败,从而产生形态缺陷的细胞^[26]。当 *INCENP* 基因启动子区-556 和-692 位点发生突变时,结合在突变位点的转录因子也会随之发生改变,由此本文推测此突变可能影响基因的表达,而 *INCENP* 的异常表达也可能影响精子的形成,产生形态异常的精子,从而间接影响精子的活力。张朝晖等^[27]研究发现,精子的形态与精子活力密切相关,形态正常率低的精子其活力也相对较低。本课题组在前期研究中也发现 *KATNALI* 基因启动子区的一个 SNP (c.163-210 T>C)与中国荷斯坦公牛精子畸形率密切相关^[14];Pan 等^[28]研究发现 *PLCζ* 基因启动子区的 SNP (g. 2456 G>A)影响中国荷斯坦公牛的射精量。Dai 等^[29]分析了 3 个品种公牛的 *FSH* 基因上游调控区,发现 5'端侧翼区的突变改变了转录因子的结合位点,该突变可导致精液中 *FSH* 浓度的改变,解释了 *FSH* 突变基因型个体精子密度较低和顶体完整性较差的可能机理。

相比于探究某个基因单个位点核苷酸多态性与生物性状的相关性,研究多个多态位点之间的单倍型组合可能更有建设性意义,因为这可以同时考虑到多态位点之间的相互作用^[30]。在本研究中只鉴定出 CG (H1)、TG (H2)、TT (H3) 3 种单倍型,比理论中少一种 CT(H4)的单倍型,推测可能原因有:实验样本小;有可能单倍型 CT(H4)个体因存在明显的表型缺陷或存活率较低等原因而被早期淘汰,而现有的种公牛实验群体多经过长期的人工选育,因而未检测到 CT(H4)单倍型个体。采用最小二乘法对

INCENP 基因启动子区的两个多态位点的单倍型组合进行精液性状的关联分析,结果表明单倍型组合 H1H1 (CCGG)、H1H3 (CTGT)、H2H3 (TTGT)和 H3H3 (TTTT)个体的鲜精活力和冻后活力均显著高于 H1H2 (CTGG)个体。为进一步研究上述二个突变位点影响表型的可能作用机理,本文分别构建了 3 种单倍型(CG、TG、TT)的表达载体,转染到 MLTC-1 中观察荧光素酶的相对活性变化。结果显示 pGL3-TG 质粒的启动子活性最高,其次是 pGL3-TT 质粒。推测-556 位点处 G 突变为 T, -692 位点处 C 突变为 T 后可能引起 *INCENP* 基因启动子活性增强,进而可能导致 *INCENP* 基因表达量升高,从而影响精液品质。本课题组在前期研究中也通过实验证明 *PLCζ* 基因核心启动子区域 g.-456 G>A 位点可能影响 *PLCζ* 基因的表达量,从而影响公牛的繁殖力^[28]。虽然 pGL3-TG 质粒的启动子活性最高,但是基因的表达调控是个复杂的过程,不仅仅包含转录水平的调控,还应包含转录后水平、翻译水平和翻译后水平等。再加上中国荷斯坦种公牛的培育是一个优胜劣汰的过程,精液性状差的种公牛会被提前淘汰,这也可能是实验群体中 TG 基因型个体数较少的原因。

本实验发现 *INCENP* 基因上与种公牛精子活力相关的 SNPs,因此可以通过检测 SNPs 筛选精子活力高的种公牛,为奶牛业繁殖提供理论指导。

参考文献(References):

- [1] Büyükleblebici S, Taşdemir U, Tuncer PB, Durmaz E, Özgürtaş T, Büyükleblebici O, Coşkun E, Gürçan İS. Can linoleic acid improve the quality of frozen thawed bull sperm? *Cryo Letters*, 2014, 35(6): 473–481. [DOI]
- [2] Blaschek M, Kaya A, Zwald N, Memili E, Kirkpatrick BW. A whole-genome association analysis of noncompensatory fertility in Holstein bulls. *J Dairy Sci*, 2011, 94(9): 4695–4699. [DOI]
- [3] Minozzi G, Nicolazzi EL, Stella A, Biffani S, Negrini R, Lazzari B, Ajmone-Marsan P, Williams JL. Genome wide analysis of fertility and production traits in Italian Holstein cattle. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80219. [DOI]
- [4] Fortes MRS, Reverter A, Kelly M, McCulloch R, Lehnert SA. Genome-wide association study for inhibin, luteinizing hormone, insulin-like growth factor 1, testicular size and semen traits in bovine species. *Andrology*, 2013, 1(4): 644–650.

- [DOI]
- [5] Hering DM, Oleński K, Ruś A, Kaminski S. Genome-wide association study for semen volume and total number of sperm in Holstein-Friesian bulls. *Anim Reprod Sci*, 2014, 151(3–4): 126–130. [DOI]
- [6] Cochran SD, Cole JB, Null DJ, Hansen PJ. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertilizing ability of sperm and subsequent embryonic development in cattle. *Biol Reprod*, 2013, 89(3): 69. [DOI]
- [7] Muñoz-Barrera M, Monje-Casas F. Increased Aurora B activity causes continuous disruption of kinetochore-microtubule attachments and spindle instability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(38): E3996–E4005. [DOI]
- [8] Barbanis S, Ioannou M, Kouvaras E, Karasavvidou F, Nakou M, Papamichali R, Koukoulis G. INCENP (inner centromere protein) is overexpressed in high grade non-Hodgkin B-cell lymphomas. *Pathol Oncol Res*, 2009, 15(1): 11–17. [DOI]
- [9] Leblond GG, Sarazin H, Li RZ, Suzuki M, Ueno N, Liu XJ. Translation of incenp during oocyte maturation is required for embryonic development in *Xenopus laevis*. *Biol Reprod*, 2012, 86(5): 161. [DOI]
- [10] Hering DM, Olenski K, Kaminski S. Genome-wide association study for poor sperm motility in Holstein-Friesian bulls. *Anim Reprod Sci*, 2014, 146(3–4): 89–97. [DOI]
- [11] Wheatley SP, Kandels-Lewis SE, Adams RR, Ainsztein AM, Earnshaw WC. INCENP binds directly to tubulin and requires dynamic microtubules to target to the cleavage furrow. *Exp Cell Res*, 2001, 262(2): 122–127. [DOI]
- [12] Resnick TD, Dej KJ, Xiang YB, Hawley RS, Ahn C, Orr-Weaver TL. Mutations in the chromosomal passenger complex and the condensin complex differentially affect synaptonemal complex disassembly and metaphase I configuration in *Drosophila* female meiosis. *Genetics*, 2009, 181(3): 875–887. [DOI]
- [13] Zhuang XJ, Huang J, Jin XH, Yu Y, Li JS, Qiao J, Liu P. Chromosome aberrations and spermatogenic disorders in mice with Robertsonian translocation (11; 13). *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(11): 7735–7743. [DOI]
- [14] Zhang X, Wang C, Zhang Y, Ju Z, Qi C, Wang X, Huang J, Zhang S, Li J, Zhong J, Shi F. Association between an alternative promoter polymorphism and sperm deformity rate is due to modulation of the expression of KATNAL1 transcripts in Chinese Holstein bulls. *Anim Genet*, 2014, 45(5): 641–651. [DOI]
- [15] Rasal KD, Shah TM, Vaidya M, Jakhesara SJ, Joshi CG. Analysis of consequences of non-synonymous SNP in feed conversion ratio associated *TGF-β* receptor type 3 gene in chicken. *Meta Gene*, 2015, 4: 107–117. [DOI]
- [16] Ju ZH, Zheng X, Huang JM, Qi C, Zhang Y, Li JB, Zhong JF, Wang CF. Functional characterization of genetic polymorphisms identified in the promoter region of the bovine *PEPS* gene. *DNA Cell Biol*, 2012, 31(6): 1038–1045. [DOI]
- [17] Alvarado-Arnez LE, Amaral EP, Sales-Marques C, Durães SMB, Cardoso CC, Sarno EN, Pacheco AG, Lana FCF, Moraes MO. Association of IL10 polymorphisms and leprosy: a Meta-analysis. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0136282. [DOI]
- [18] de Camargo GMF, Porto-Neto LR, Kelly MJ, Bunch RJ, McWilliam SM, Tonhati H, Lehnert SA, Fortes MRS, Moore SS. Non-synonymous mutations mapped to chromosome X associated with andrological and growth traits in beef cattle. *BMC Genomics*, 2015, 16: 384. [DOI]
- [19] Lagares A Jr, Agaras B, Bettiol MP, Gatti BM, Valverde C. A cultivation-independent PCR-RFLP assay targeting *oprF* gene for detection and identification of *Pseudomonas* spp. in samples from fibrocystic pediatric patients. *J Microbiol Methods*, 2015, 114: 66–74. [DOI]
- [20] Govindaraju A, Dogan S, Rodriguez-Osorio N, Grant K, Kaya A, Memili E. Delivering value from sperm proteomics for fertility. *Cell Tissue Res*, 2012, 349(3): 783–793. [DOI]
- [21] Dai HY, Charnigo R. Compound hierarchical correlated beta mixture with an application to cluster mouse transcription factor DNA binding data. *Biostatistics*, 2015, 16(4): 641–654. doi: 10.1093/biostatistics/kxv016. [DOI]
- [22] Saldana-Caboverde A, Perera EM, Watkins-Chow DE, Hansen NF, Vemulapalli M, Mullikin JC, Nisc Comparative Sequencing Program, Pavan WJ, Kos L. The transcription factors *Ets1* and *Sox10* interact during murine melanocyte development. *Dev Biol*, 2015, 407(2): 300–312. [DOI]
- [23] Scheiber MN, Watson PM, Rumboldt T, Stanley C, Wilson RC, Findlay VJ, Anderson PE, Watson DK. FLI1 expression is correlated with breast cancer cellular growth, migration, and invasion and altered gene expression. *Neoplasia*, 2014, 16(10): 801–813. [DOI]
- [24] Kang H, Corr M, Mansson R, Welinder E, Hedrick SM, Stone EL. Loss of murine FOXO3 in cells of the myeloid lineage enhances myelopoiesis but protects from K/BxN-Serum transfer-induced arthritis. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126728. [DOI]
- [25] Scott C, Cha K, Rao R, Liddle C, George J, Gunton JE. Hepatocyte-specific deletion of ARNT (aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) results in altered fibrotic

- gene expression in the thioacetamide model of liver injury. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121650. [DOI]
- [26] Yang KT, Li SK, Chang CC, Tang CJC, Lin YN, Lee SC, Tang TK. Aurora-C kinase deficiency causes cytokinesis failure in meiosis I and production of large polyploid oocytes in mice. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(14): 2371–2383. [DOI]
- [27] Zhang ZH, Qin YJ. Correlation between sperm morphology and motility and its application in male infertility. *Medical Information*, 2011, 24(8): 102.
张朝晖, 秦瑛键. 精子形态与活动力的相关性及其在男性不育症中的应用探讨. 医学信息, 2011, 24(8): 102. [DOI]
- [28] Pan Q, Ju ZH, Huang JM, Zhang Y, Qi C, Gao Q, Zhou L, Li QL, Wang LL, Zhong JF, Liu M, Wang CF. *PLCz* functional haplotypes modulating promoter transcriptional activity are associated with semen quality traits in Chinese Holstein bulls. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58795. [DOI]
- [29] Dai LS, Zhao ZH, Zhao RF, Xiao SQ, Jiang H, Yue XP, Li XC, Gao Y, Liu JF, Zhang JB. Effects of novel single nucleotide polymorphisms of the FSH beta-subunit gene on semen quality and fertility in bulls. *Anim Reprod Sci*, 2009, 114(1–3): 14–22. [DOI]
- [30] Capparelli R, Parlato M, Amoroso MG, Roperto S, Marabelli R, Roperto F, Iannelli D. Mannose-binding lectin haplotypes influence *Brucella abortus* infection in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Immunogenetics*, 2008, 60(3–4): 157–165. [DOI]

(责任编辑: 赵要风)

• 综合信息 •

2015 年《遗传》再获佳绩

2015 年最新发布的《中国科技期刊引证报告(核心版)》数据显示,《遗传》在生物学基础学科期刊中,核心影响因子(0.858)排名第 3,核心总被引频次(2102)排名第 1,核心综合评价总排名第 1。

因出色的办刊成绩,《遗传》于 2015 年获得中国科协精品科技期刊项目学术质量提升项目资助,并荣获“2014 年百种杰出学术期刊”、“2015 年中国国际影响力优秀学术期刊”等称号。