

草原红牛 *Acot2* 基因的多态性分析

刘理想^{1,2}, 高一¹, 刘基伟^{1,3}, 吴健^{1,3}, 曹阳¹, 秦立红^{1,3}, 李旭^{1,3*},
张国梁^{1,3*}

(1. 吉林省农业科学院/农业农村部肉牛遗传育种重点实验室/吉林省肉牛繁育及养殖技术科技创新中心, 长春 130033;
2. 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118; 3. 吉林坤成牧业科技有限公司, 吉林 公主岭 136100)

摘要: 为了研究草原红牛 *Acot2* 基因的多态性, 为草原红牛育种工作中遗传标记的辅助选择提供参考数据, 本试验随机选取 127 头草原红牛公牛为研究对象, 提取血液 DNA 扩增 *Acot2* 基因全部外显子, 以 Sanger 测序法获得扩增片段序列, 通过序列比对, 获得多态位点, 分析草原红牛 *Acot2* 基因的多态性。结果表明: 草原红牛 *Acot2* 基因 chr10:84971902 bp 处发生碱基 A/G 的突变, 密码子由 ACG 变为 GCG, 在突变位点处, A 是优势等位基因, AA 是优势基因型, 多态信息含量表明 *Acot2* 基因突变位点属于低度多态座位。碱基突变引起的错义突变导致原序列编码的苏氨酸变成了丙氨酸, 推测可能引起蛋白质结构变化。

关键词: 草原红牛; 酰基辅酶 A 硫酯酶 2 (*Acot2*); 突变; 多态性

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)03-0066-05

Polymorphism Analysis of *Acot2* Gene in Grassland Red Cattle

LIU Lixiang^{1,2}, GAO Yi¹, LIU Jiwei^{1,3}, WU Jian^{1,3}, CAO Yang¹, QIN Lihong^{1,3}, LI Xu^{1,3*}, ZHANG Guoliang^{1,3*}

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Beef Cattle Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Jilin Province Beef Cattle Breeding and Breeding Technology Innovation Center, Changchun 130033; 2. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; 3. Jilin Kuncheng Animal Husbandry Technology Co., Ltd., Gongzhuling 136100, China)

Abstract: This experiment aimed to investigate the polymorphism of the *Acot2* gene in the grassland red cattle, providing reference data for the auxiliary selection of genetic markers in the breeding of grassland red cattle. In this experiment, 127 grassland red bulls were randomly selected as the research object, extracted blood DNA to amplify all exons of *Acot2* gene, obtained the amplified fragment sequence by Sanger sequencing, obtained polymorphic sites through sequence alignment, and analyzed the polymorphism of *Acot2* gene in grassland red cattle. The results showed that there was a mutation at the chr10:84971902 bp of *Acot2* gene in grassland red cattle, the codon changed from ACG to GCG, at the mutation site, A was the dominant allele, AA was the dominant genotype, and the polymorphism information content showed that the mutation site of *Acot2* gene belonged to low polymorphic locus. Missense mutations caused by base mutations lead to the conversion of threonine encoded by the original sequence to alanine, which may lead to structural changes of proteins.

Key words: Grassland red cattle; acyl-CoA thioesterase 2 (*Acot2*); Mutation; Polymorphism

收稿日期: 2020-01-06

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0501802); 国家肉牛牦牛产业技术体系项目(CARA-37); 吉林省科学技术厅重点科技研发项目(20180201039NY)

作者简介: 刘理想(1995-), 男, 在读硕士, 研究方向为动物遗传育种与繁殖。

通讯作者: 李旭, 男, 博士, 副研究员, E-mail: 4513046@163.com

张国梁, 男, 博士, 研究员, E-mail: zgl777777@163.com

近年来,随着消费者的健康意识逐渐提升,对肉类品质要求也越来越高。牛肉蛋白质含量丰富,脂肪中多不饱和脂肪酸含量高,氨基酸比例比其他肉类更符合人体需求^[1]。肌内脂肪(IMF)含量组成对牛肉品质有重要影响,不仅影响牛肉的嫩度和风味,而且影响牛肉的营养价值,肉类的 IMF 含量不仅会受到日粮的影响,还会受到遗传因素的影响^[2]。因此可利用现代分子生物学技术对影响肉类的 IMF 含量和 FA 组成的基因进行分析,从而为肉质性状的选育提供参考依据。

酰基辅酶 A 硫酯酶 2 (Acyl-CoA thioesterase-2, *Acot2*) 也称为 MTE-I、PTE2 和 ARTIS/p43^[3], *Acot2* 在心脏、骨骼肌、棕色脂肪细胞和肾脏线粒体中都高度表达,在肝脏线粒体中的表达相对较少^[4]。酰基辅酶 A (CoA) 水解是脂肪酸代谢的重要途径,涉及 *Acot2* 蛋白和 *Acot2* 基因^[5], *Acot2* 将酰基辅酶 A (CoA) 水解成游离脂肪酸和 CoA^[6], 具有维持细胞水平的游离脂肪酸和酰基 CoA (游离脂肪酸的活化形式) 的潜力,其在脂质代谢方面有重要作用。以小鼠 3T3-L1 细胞为研究材料,发现上调 microRNA-27b 能诱导 *Acot2* 表达,促进脂肪细胞分化^[6]。脂肪组织对机体能量代谢和平衡具有重要作用,同时对动物的肉质产生很大影响^[7]。肌内脂肪沉积是一个复杂的过程,目前对其分子网络研究还不透彻^[8]。因此可通过研究分析 *Acot2* 基因来探究其对 IMF 含量的影响,为进一步提高肉质提供理论参考。

中国草原红牛是 1985 年通过国家畜禽品种审定委员会审定的乳肉兼用型品种,牛肉品质优良,蛋白质含量高^[9]。经过多年不间断选育,屠宰率和净肉率分别达到 56.5% 和 43.9%^[10],肉质鲜嫩,肌间脂肪沉积良好。目前有关 *Acot2* 基因的研究多集中在鼠类,在畜禽方面的研究国内外鲜有报道。本研究随机选取 127 头 18 月龄的草原红牛为研究对象,通过 Sanger 测序进行多态性检测,探

究 *Acot2* 基因在草原红牛基因组中的多态性。

1 材料与方 法

1.1 试验动物

随机选取 127 头 18 月龄体况良好的草原红牛公牛,均来自吉林省农业科学院畜牧分院。

1.2 试验试剂、软件及仪器

1.2.1 试验试剂及分析软件

血液 DNA 提取试剂盒购自 AXYGEN 公司 (23618KC3), 琼脂糖购自 Shanghai Baygene Biotechnology Company Limited, 2×Es Taq MasterMix 购自 CWBIO 公司, DL2000 Maker 购自 TaKaRa, Gel-Red Nucleic Acid Stain 购自 BIOTIUM。

分析软件: Primer 5.0、DNAMAN、Genedoc、Excel 2010、Chromas。

1.2.2 试验仪器

Quawell-Q5000 超微量分光光度计 (北京鼎盛生物技术有限责任公司)、PCR 扩增仪 (Bio-Rad, 批号: 621BR09372)、电子天平 (乐祺, 型号: LQ-A10002)、凝胶电泳仪 (北京市六一仪器厂, 型号: DYY-6C 型)、凝胶成像分析仪 (北京市六一仪器厂, 型号: WD-9431AN)。

1.3 试验方法

1.3.1 样品采集

从草原红牛颈静脉采血, 每头牛采血 5 mL, 加入抗凝管中, -20 °C 保存。

1.3.2 基因组 DNA 的提取

根据血液 DNA 提取试剂盒说明书, 按照具体操作步骤从血液样品中提取 DNA; Quawell-Q5000 超微量分光光度计检测 DNA 质量, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值在 1.8~2.0 为未受到污染的 DNA, 置于 -20 °C 保存。

1.3.3 引物设计

利用 Primer 5.0 软件设计牛 *Acot2* (GenBank 登录号: NM_001101938.1) 基因所有外显子的引物, 引物信息见表 1, 引物均由苏州金唯智生物科技

表 1 引物序列

外显子	引物序列 (5'-3')	片段大小 (bp)	退火温度 (°C)
Exon-1	F: GATTCCAAATCTGAAGAAGGC R: TTGTCGAGCACCTCCAGCT	487	58.2
Exon-2	F: TGTTCGGTTGTTGACGACCGTGA R: AACAAAGGAAGCTGGAGGCTCAC	486	58.6
Exon-3	F: GCACCACTGAAAAGAGTTTCA R: TGTCTGGGCTTCTAATGAA	283	57.2
Exon-4	F: CCAGATTCAGGCTCAGTTC R: TGTTCACAGGATAGATTAG	736	56.3

有限公司合成。

1.3.4 PCR 扩增条件

PCR 反应体系 20 μL: ddH₂O 8 μL, 2×ES Taq MasterMix 10 μL, 上、下游引物各 0.5 μL, cDNA 1 μL; 反应条件: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 退火 30 s (具体 T_m 见表 1), 72 °C 延伸 (2 000 bp 延伸 1 min), 34 个循环, 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。

1.3.5 DNA 混池测序及 SNP 查找

随机挑选 20 个 DNA 样品各 1 μL 进行混池, 以混池 DNA 为模板, 分别扩增 *Acot2* 的 4 个外显子, 采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 对鉴定正确的 PCR 产物送至苏州金维智生物科技有限公司测序。将测序结果利用 DNAMAN 软件进行 DNA 序列比对查找 SNP 位点。

1.3.6 PCR 产物测序

分别以 127 个样品 DNA 为模板, 扩增 *Acot2* 基因的 Exon-1, 采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 对鉴定正确的 PCR 产物送至苏州金维智生物科技有限公司测序。

1.3.7 多态位点的检测

利用 DNAMAN 软件进行 DNA 序列比对, 定位突变位点; 利用 Genedoc 软件进行氨基酸序列比对; 用 Chromas 软件分析序列突变位点突变类型。

1.3.8 数据的统计分析

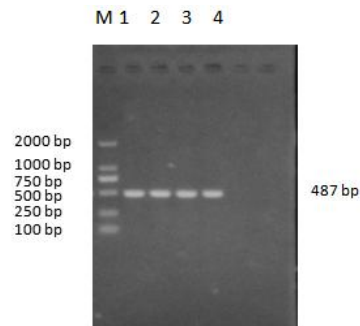
根据多态位点检测结果, 对各个基因型个体进行统计, 分析数据, 根据公式: $He = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$, $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$, $Ho = 1 - He$, $Ne = 1/(1 - He)$ 计算遗传杂合度 (He)、多态信息含量 (PIC)、遗传纯合度 (Ho) 和有效等位基因数 (Ne), 其中 i 为第 i 个等位基因, j 为第 j 个等位基因, P_i, P_j 为等位基因频率, n 为等位基因数。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

采用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 (100 V, 80 mA, 30 min) 检测草原红牛 *Acot2* 基因所有外显子扩增产物, 结果显示条带长度均达到预期要求, 其中

Exon-1 鉴定具体结果见图 1。测序结果比对显示, 片段大小与预期目的条带大小一致。

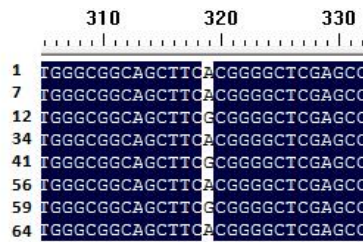


注: M 为 DL-2000Maker; 1、2、3、4 为不同 DNA 样品 PCR 产物

图 1 Exon-1 扩增电泳图

2.2 序列分析结果

利用 DNAMAN 对草原红牛 *Acot2* 基因 4 个外显子的测序结果进行核苷酸序列比对, 仅在 Exon-1 编码区 chr10:84971902 bp 处发现 A/G 突变, 具体结果见图 2。利用 Genedoc 软件进行氨基酸序列比对, 结果发现 chr10:84971902 bp 处的突变属于错义突变, 苏氨酸突变为丙氨酸, 具体结果见图 3。利用 Chromas 软件查看测序结果的波峰图, 查看核苷酸序列突变类型, 具体结果见图 4。



注: 1~64 为随机挑选的测序样品, 下同

图 2 Exon-1 核苷酸序列比对

2.3 突变位点的群体遗传学分析

2.3.1 基因型频率、等位基因频率、χ² 检验

草原红牛 *Acot2* 基因的基因频率、基因型频率见表 2, AA、AG 和 GG 基因型频率分别为 0.764、0.189 和 0.047, AA 基因型为优势基因型; A 和 G 基因频率分别为 0.858 5 和 0.141 5, A 为优势等位基因。经卡方适合性检验发现, 草原红牛在该位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 (P>0.05)。

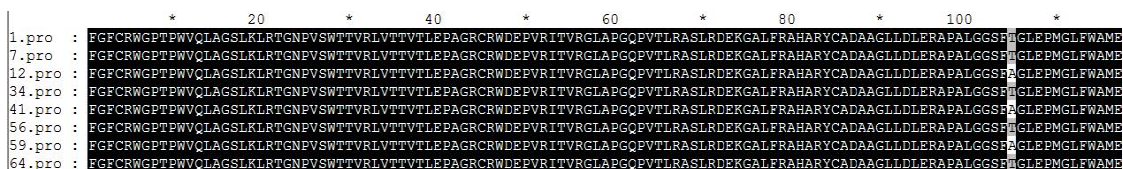


图 3 Exon-1 氨基酸序列比对

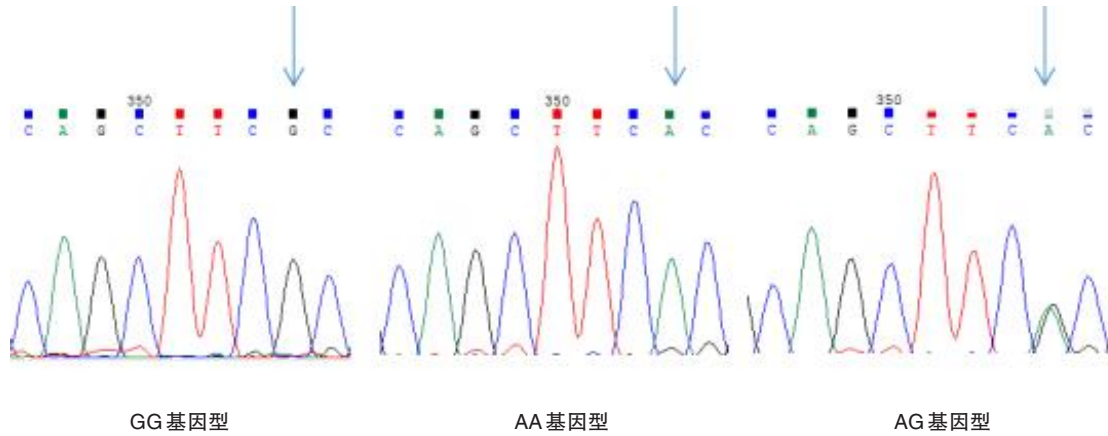


图4 Exon-1的测序峰图(GG、AA、AG基因型)

表2 草原红牛 *Acot2* 基因 SNP 位点等位基因和基因型频率

位点	基因型频率			基因频率		χ^2
	AA	AG	GG	A	G	
chr10:84971902 bp	0.764(97)	0.189(24)	0.047(6)	0.858 5	0.141 5	4.75

注: $\chi^2_{0.100(2)}=4.61$; $\chi^2_{0.05(2)}=5.99$

2.3.2 多态指标分析

Acot2 基因 Exon-1 多态位点在群体中的多态性信息含量、有效等位基因数、遗传纯合度、遗传杂合度见表3。*Acot2* 基因 Exon-1 突变位点遗传杂合度较低;多态信息含量为0.188,表现为低度多态。

表3 草原红牛 *Acot2* 基因 SNP 位点的遗传多态性指标

位点	多态信息含量(PIC)	有效等位基因数(Ne)	遗传杂合度(He)	遗传纯合度(Ho)
chr10:84971902 bp	0.188	1.321	0.243	0.757

注:多态信息含量, PIC<0.25 为低度多态; 0.25<PIC<0.5 为中度多态; PIC>0.5 为高度多态

3 讨论

本研究通过随机挑选20个样本建立DNA池,初步确定草原红牛 *Acot2* 基因的突变位点。研究表明, *Acot2* 基因在云岭牛和中国西门塔尔牛的不饱和脂肪酸合成途径中差异表达,推测造成此结果原因有二:一是品种之间的差异;二是 *Acot2* 基因存在突变所导致,具体原因有待进一步验证^[11]。利用 Sanger 测序法对127头草原红牛 *Acot2* 基因突变位点进行多态性检测,结果表明: *Acot2* 基因 Exon-1 检测到1个多态位点(A chr10:84971902 bp G), A 为优势等位基因,其中 AA 基因型为优势基因型。突变位点经卡方适合性检验知处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P>0.05$)。在突变情况下,经自然选择加上人为选育干扰,最终各种因

素相互抵消,使群体仍处于遗传动态平衡状态^[12]。

通过对突变位点多态性指标进行分析,多态信息含量(PIC<0.25)处于低度多态,推测原因:在自然选择和人工选育过程中该位点遗传变异较低,种群内基因交流缺乏^[13]。*Acot2* 基因在干细胞成脂分化后期高度表达^[14]。*Acot2* 基因表达促进肝脏中的线粒体脂肪酸氧化^[15]。以小鼠 3T3-L1 细胞为研究材料,发现上调 microRNA-27b 能诱导 *Acot2* 表达,促进脂肪细胞分化^[6]。在药物性脂肪肝的小鼠模型中, *Acot2* 基因显著表达^[16]。这些结果表明 *Acot2* 基因对 IMF 含量成有一定调控作用,从而影响肉质。因此可通过扩大群体水平,探究草原红牛 *Acot2* 基因 Exon-1 突变位点多态性与 IMF 含量之间的关系,为草原红牛肉品质的改良提供理论参考依据。

4 结论

本研究结果发现,草原红牛 *Acot2* 基因 Exon-1 处存在 A/G 突变,苏氨酸突变为丙氨酸,属于错义突变,推测可能会使蛋白质结构发生变化。*Acot2* 基因 SNP 位点的变化可能影响草原红牛脂质积累和脂肪酸含量。需要在细胞水平和实际生产中进一步验证。

参考文献:

[1] 徐英,李石友,李琦华,等.蛋白质水平对牛肉肌苷酸含量的影响[J].西南农业学报,2011,24(1):294-296.

- [2] Ramayo-Caldas Y, Mach N, Esteve-Codina A, et al. Liver transcriptome profile in pigs with extreme phenotypes of intramuscular fatty acid composition[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 547.
- [3] Hunt M C, Yamada J, Maltais L J, et al. A revised nomenclature for mammalian acyl-CoA thioesterases/hydrolases[J]. Journal of Lipid Research, 2005, 46(9): 2029-2032.
- [4] Bekeova C, Anderson-Pullinger L, Boye K, et al. Multiple mitochondrial thioesterases have distinct tissue and substrate specificity and CoA regulation, suggesting unique functional roles[J]. Journal of Biology Chemistry, 2019, 294(50): 19034-19047.
- [5] Kirsanova E, Heringstad B, Lewandowska-Sabat A, et al. Identification of candidate genes affecting chronic subclinical mastitis in Norwegian Red cattle: combining genome-wide association study, topologically associated domains and pathway enrichment analysis[J]. Anim Genet, 2020, 51(1): 22-31.
- [6] Murata Y, Yamashiro T, Kessoku T, et al. Up-Regulated MicroRNA-27b Promotes Adipocyte Differentiation via Induction of Acyl-CoA Thioesterase 2 Expression[J]. Biomed Research International, 2019, 2019: 2916243.
- [7] 廖 辉. *ADAMTS2* 和 *ADAMTS4* 基因对牛前体脂肪细胞分化及脂质沉积的影响[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2017.
- [8] 于永生, 李兆华, 罗晓彤, 等. 松辽黑猪肌肉脂肪沉积相关基因的筛选[J]. 东北农业科学, 2016, 41(1): 91-94.
- [9] 胡成华, 张国梁, 于洪春, 等. 草原红牛导入丹麦红牛血的研究[J]. 东北农业科学, 2005, 30(2): 43-47.
- [10] 于洪春. 草原红牛产肉性能的观察[J]. 中国畜牧杂志, 1997(6): 30-31.
- [11] Zhang H M, Xia H L, Jiang H R, et al. Longissimus dorsi muscle transcriptomic analysis of Yunling and Chinese simmental cattle differing in intramuscular fat content and fatty acid composition[J]. Genome, 2018, 61(8): 549-558.
- [12] 黄 兴, 柴志欣, 王 会, 等. 西藏牦牛 *MyoDI* 基因多态性及与生长性状的关联性分析[J]. 西南农业学报, 2019, 32(2): 439-445.
- [13] 张 娟, 母 童, 蔡正云, 等. *UCP* 基因多态性及与黑安格斯牛生长性状的关联分析[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(7): 1195-1202.
- [14] Basoli V, Santaniello S, Cruciani S, et al. Melatonin and Vitamin D Interfere with the Adipogenic Fate of Adipose-Derived Stem Cells[J]. International Journal of Molecular Science, 2017, 18(5): 1464-1466.
- [15] Moffat C, Bhatia L, Nguyen T, et al. Acyl-CoA thioesterase-2 facilitates mitochondrial fatty acid oxidation in the liver[J]. Journal of Lipid Research, 2014, 55(12): 2458-2470.
- [16] Sun S S, Wu Y X, Cheng M L, et al. Experimental study of silybin-phospholipid complex intervention on amiodarone-induced fatty liver in mice[J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2019, 27(1): 45-50.

(责任编辑:王 昱)

(上接第 65 页)

- [8] Xian Q, Hu L, Chen H. Removal of nutrients and veterinary antibiotics from swine wastewater by a constructed macrophyte floating bed system[J]. Journal of Environmental Management, 2010, 91(12): 2657-2661.
- [9] 郭童天, 刘博文, 汤学友, 等. 干旱预处理对一年生黑麦草耐盐性的影响[J]. 草地学报, 2018, 26(2): 435-440.
- [10] 范 燕. 黑麦草种子萌发、幼苗生长及建植耐盐性的比较研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2016.
- [11] 刘 璐, 张跃群, 王 婧, 等. 重度盐胁迫下 12 个地被草种萌发期的耐盐性比较[J]. 草业科学, 2019, 36(11): 2806-2819.
- [12] 张 磊, 侯云鹏, 王立春. 盐碱胁迫对植物的影响及提高植物耐盐碱性的方法[J]. 东北农业科学, 2018, 43(4): 11-16.
- [13] Kimberly A Green, Carla J Eaton, Matthew S. A homologue of the fungal tetraspanin Pls1 is required for *Epichloë festucae* expression formation and establishment of a mutualistic interaction with *Lolium perenne*[J]. Molecular Plant Pathology, 2019, 20(7): 961-975.
- [14] 郭 园, 张玉霞, 于华荣, 等. 13 个油菜品种苗期生长、生理指标比较及抗盐碱性分析[J]. 东北农业科学, 2016, 41(4): 32-36.
- [15] 邓小红, 姬拉拉, 王锐洁, 等. 红豆和白扁豆种子萌发和生长对盐胁迫的响应及其生理机制[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2019, 27(8): 1218-1225.
- [16] 陈 彬, 秦 楚, 张喜斌. 盐胁迫下五种禾本科牧草幼苗生理生化变化研究[J]. 宁夏农林科技, 2016, 57(11): 11-13, 21.
- [17] 王 静, 自红州, 李黄维, 等. 盐胁迫对短花针茅幼苗生长及抗氧化同工酶的影响[J]. 北方园艺, 2018(14): 77-82.
- [18] 李 冉, 郭 鑫, 王倩南, 等. 盐胁迫下三种柳枝稷生理特性及同工酶研究[J]. 中国草地学报, 2019, 41(6): 43-52.
- [19] 赵 颖, 魏小红, 赫亚龙, 等. 混合盐碱胁迫对藜麦种子萌发和幼苗抗氧化特性的影响[J]. 草业学报, 2019, 28(2): 156-167.
- [20] 隋益虎, 吴雪艳, 胡能兵, 等. NaCl 胁迫下 4 种辣椒 POD 同工酶谱及活性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(12): 5414-5420.
- [21] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 6.
- [22] 周国权, 巫光宏, 黄翠颜, 等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳的快速脱色方法[J]. 植物生理学通讯, 2006(1): 95-97.
- [23] Chowdhury M A, Slinkard A E. Genetic diversity in grasspea (*Lathyrus sativus* L.) [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2000, 47(2): 163-169.
- [24] Toyomasu T, Zennoyzi A. On the application of isozyme electrophoresis to identification of strains in *Lentinus edodes*[J]. Mushroom Science, 1981, 11: 675-684.
- [25] 刘 强, 王庆成, 王占武. 抗氧化酶活性作为植物抗盐性评价指标的有效性[J]. 广东农业科学, 2014, 41(24): 49-53.
- [26] 方婧雯, 邬 燕, 刘志华. 盐胁迫对罗布麻种子萌发及生理特性的影响[J]. 作物杂志, 2018(4): 167-174.

(责任编辑:王 昱)