

中国草原红牛 *HTR2A* 基因多态性及与肉质性状的相关性分析

王思月¹, 云巾宴², 刘宇¹, 肖成¹, 赵玉民¹, 吴健^{1*}, 曹阳^{1*}

(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, 长春 130033; 2. 吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101)

摘要:以中国草原红牛为研究对象,通过PCR测序的方法对*HTR2A*基因5个外显子进行SNP筛查,发现外显子3第86 bp处和第164 bp处分别存在S₁、S₂两个SNP位点,对应突变为g.C86G、g.G164A,卡方检验表明S₁、S₂位点均处于Hardy-Weinberg平衡状态。对检测到的两个SNP位点进行连锁不平衡分析,发现S₁、S₂位点间D'=0.794、r²=0.350,属于强连锁。两个位点(S₁、S₂)共形成H₁(CG)、H₂(GA)、H₃(GG)、H₄(CA)4种单倍型,单倍型频率分别为0.570、0.234、0.163、0.033。结合肉质性状进行连锁分析,发现单倍型组合H₂H₃个体对应的肌内脂肪含量极显著高于H₃H₃个体(P<0.01),显著高于H₁H₂、H₁H₃(P<0.05),初步判断单倍型组合H₂H₃与肉牛肌内脂肪含量显著相关,可作为选育高肌内脂肪含量肉牛的参考标记。

关键词:草原红牛; *HTR2A* 基因; 基因多态性; 单倍型; 肉质性状

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)06-0096-05

Analysis of the Polymorphism of *HTR2A* Gene in Chinese Caoyuan Red Cattle and Its Correlation with Meat Quality Traits

WANG Siyue¹, YUN Jinyan², LIU Yu¹, XIAO Cheng¹, ZHAO Yumin¹, WU Jian^{1*}, CAO Yang^{1*}

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Beef Cattle Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Changchun 130033; 2. Jilin Academy of Agricultural Science and Technology, Jilin 132101, China)

Abstract: The study took the Chinese caoyuan red cattle as the research object. The 5 exons of the *HTR2A* gene were screened for SNP by PCR sequencing. Only two SNPs, S₁ and S₂, were found at the 86 bp and 164 bp of exon 3. The corresponding mutations are g.C86G and g.G164A. Chi-square test shows that S₁ and S₂ are in Hardy-Weinberg equilibrium. The two detected SNP were analyzed for linkage disequilibrium, and it was found that between S₁ and S₂, D' = 0.794, r² = 0.350, which is a strong linkage. Two sites (S₁, S₂) formed four haplotypes H₁ (CG), H₂ (GA), H₃ (GG), H₄ (CA), and the haplotype frequencies were 0.570, 0.234, 0.163, 0.033, respectively. Combined with meat quality traits for linkage analysis, it was found that the intramuscular fat content corresponding to the haplotype combination H₂H₃ individuals was extremely significantly higher than that of the H₃H₃ individuals (P<0.01), significantly higher than H₁H₂, H₁H₃ (P<0.05), preliminary judgment of the haplotype combination H₂H₃ is significantly related to the intramuscular fat content of beef cattle, and can be used as a reference marker for breeding beef cattle with high intramuscular fat content.

Key words: Chinese Caoyuan red cattle; *HTR2A* gene; Gene polymorphism; Haplotype; Meat quality traits

收稿日期: 2021-03-03

基金项目: 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-37); 吉林省重点科技研发项目(20180201039NY); 吉林省创新平台项目(20200602052ZP)

作者简介: 王思月(1994-), 女, 研究实习生, 硕士, 从事动物育种研究。

通讯作者: 吴健, 男, 博士, 研究员, E-mail: wujian0303@126.com
曹阳, 男, 博士, 研究员, E-mail: caoyang003@163.com

随着生活水平的提高,消费者对于牛肉品质的需求越来越高,追求品质更高的牛肉产品已成为当今肉牛育种工作的主要任务。中国草原红牛是我国培育出来的第1个肉乳兼用型品种,具有抗逆性强、乳脂率高、肉质好等优点。为了更好地发挥草原红牛的品种优势,加速育种进程,分子育种技术发挥了积极作用,其关键在于有效的基因标记挖掘与应用^[1]。

神经递质血清素(5-hydroxytryptamine, 5-HT)也称为5-羟色胺,是调节中枢和外周功能的单胺,在情感行为、自主功能和认知等中枢调控过程中起决定性作用^[2]。神经递质血清素主要分5-HT₁~5-HT₇,共7个亚型。其中5-HT₂的受体分为5-HTR2A、5-HTR2B和5-HTR2C。5-HTR2A是G蛋白偶联受体家族中的一员,主要存在于大脑腹侧被盖区和伏隔核的多巴胺能神经元^[3]。*HTR2A*在生物学功能中有许多作用:包括大脑皮层的兴奋性^[4]、血小板聚集^[5]、平滑肌收缩^[6]、血管收缩和扩张^[7]、炎症过程^[8]和激素信号传导^[9]。*HTR2A*与能量平衡有关,大脑中神经递质血清素的消耗会导致食欲增长,引起肥胖^[10],同时药物处理会使血清素传递加快^[11-12]。脂质代谢是体内复杂并且十分重要的生化反应,保障代谢平衡才能够保证正常生理机能的运作,所以对生命活动具有重要意义^[13]。研究发现*HTR2A*基因可能与饮食失调有关,神经性厌食症患者的脑脊液(CSF)中血清素(5-HT)代谢产物降解产物的浓度较低^[14]。研究表明,*HTR2A*基因在旁分泌和神经循环的局部能够起到一定的作用,并且不同组织其特异性功能也有区别^[15]。目前已经鉴定14种以上的5-HTRs,除*HTR3*以外都是G蛋白偶联受体,其中中枢5-HT还能够通过激活脑中的*HTR2C*,起到减少食欲的作用。*HTR2A*基因对于延黄牛脂肪细胞分化具有一定作用,推测其可能影响脂代谢^[16]。本研究以中国草原红牛为试验对象,检测中国草原红牛*HTR2A*基因多态性,分析*HTR2A*基因与肉质性状的联系,希望能够为今后中国草原红牛牛肉品质改良有效遗传标记的筛选提供参考价值。

1 材料与方法

1.1 试验品种

随机选取中国草原红牛公牛58头,30月龄屠宰测定肉质性状。采集背最长肌组织,-80℃保存备用。

1.2 主要仪器及试剂

超微量分光光度计(Quawell-Q500)、气相色谱仪(GC-14CPTF)、高效液相色谱仪(WATERS 600)、PCR仪(T100)、色差计(X-RiteSP62)、基因组DNA提取试剂盒等均购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 肉质性状测定

参照《农业农村部肉牛生产性能测定技术规范》及《农业农村部农产品及加工品质量监督

检验测试中心(长春)》提供的方法进行肉质性状测定。

1.4 基因组DNA提取

基因组DNA采用Axygen试剂盒进行提取,并采用超微量分光光度计测定DNA的纯度和浓度,取5μL进行琼脂糖凝胶电泳的检测并保证其完整性。

1.5 引物设计及合成

参考GenBank发表的肉牛*HTR2A*基因DNA序列(登录号:NC_037339.1),利用Ensembl查找基因外显子(共5个),通过Primer 5.0设计引物,引物信息见表1。引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

表1 基因引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	片段	退火
		大小 (bp)	温度 (℃)
<i>HTR2A</i> -exon1	F:GGAATCTGTACCAAAGCGG	586	58
	R:ACGGCAACTTACACGGGTC		
<i>HTR2A</i> -exon2	F:GCAATGCAACCCAAGACTG	992	50
	R:GCACAATGCTTTATCTCCC		
<i>HTR2A</i> -exon3	F:ACAACAGCCTGAGTTCACA	469	50
	R:ATACTGTTCCACTTACCCACT		
<i>HTR2A</i> -exon4	F:AGTAATGCTCTTGCCTTCA	925	50
	R:CTCCAGTCTCCCAATGTTT		
<i>HTR2A</i> -exon5	F:TATTCACAGAGCTGCTGGC	556	58
	R:GAATCCAAAACGGAGCGGT		

1.6 PCR反应体系及条件

PCR反应体系(20μL):2×Taq Master Mix10μL,ddH₂O 8μL,DNA 1μL,上、下游引物各0.5μL。

PCR反应条件:95℃预变性2min,95℃变性30s,退火温度(见表1)30s,72℃延伸1min,共35个循环;72℃终延伸5min,产物4℃保存。

1.7 草原红牛*HTR2A*基因多态性检测

PCR扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测合格后,在苏州金唯智生物科技有限公司进行Sanger测序。通过DNAMAN软件对测序的结果进行分析,找到SNP位点。利用Chromas软件对测序波峰图进行进一步分析。

1.8 群体遗传分析及单倍型分析

测序结果整理后,计算基因频率、基因型频率。基因频率是指基因在某个群体所占有的比例。基因型频率是指某个特定基因型的个体占全群所有个体的比例。利用《家养动物遗传分析工具1.0》进行卡方检验,计算遗传纯合度(Ho)、遗

传杂合度(He)、有效等位基因数(Ne)和多态信息含量(PIC)。利用HaploView软件进行单倍型分析。

1.9 统计分析

利用SPSS 22.0软件进行单因素方差分析,比较中国草原红牛不同单倍型组合个体间肉用性状的显著性差异。结果以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 PCR测序结果

对比测序结果与参考序列(Genbank: NC_

037339.1)发现:S₁位点在HTR2A基因第3外显子编码区86 bp处存在C>G突变,突变导致氨基酸编码错义突变的产生(丝氨酸>半胱氨酸),形成CC、GG和CG3种基因型,存在C和G两种等位基因(图1)。S₂位点在HTR2A基因第3外显子编码区164 bp处存在G>A突变,突变导致氨基酸编码错义突变的产生(精氨酸>组氨酸),形成GG、AA和GA3种基因型,存在A和G两种等位基因(图2)。

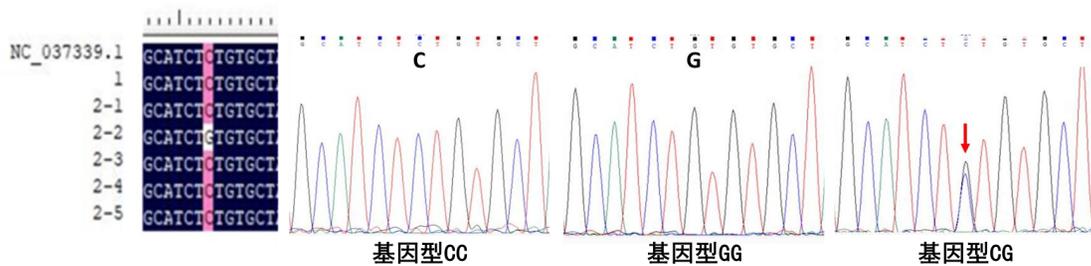


图1 HTR2A基因第3外显子g.C86G突变测序比对结果

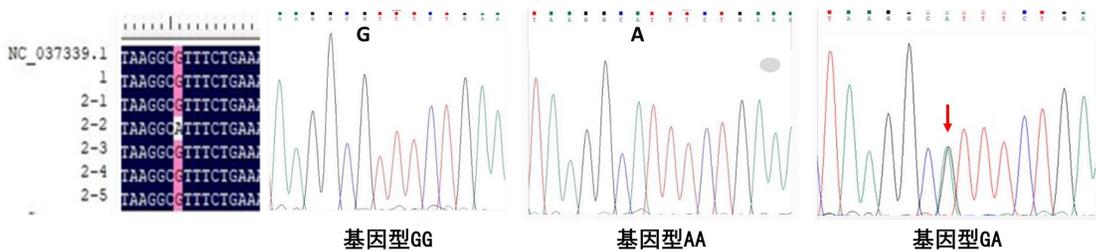


图2 HTR2A基因第3外显子g.G164A突变测序比对结果

2.2 中国草原红牛HTR2A基因遗传多样性分析

根据基因分型结果对HTR2A基因S₁和S₂位点遗传多样性进行分析,结果见表2。HTR2A基因S₁位点的CC、GG和CG的基因型频率分别为31.03%、10.35%和58.62%;C和G等位基因频率分别为60.34%和39.66%;CG为优势基因型,C为优势等位基因。HTR2A基因S₂位点的GG、AA和

GA的基因型频率为50.00%、3.45%和46.55%;G和A等位基因频率分别为73.28%和26.72%;GG为优势基因型,G为优势等位基因。经卡方检验,中国草原红牛HTR2A基因的S₁、S₂位点均处于Hardy-Weinberg平衡状态(P>0.05)。群体中遗传纯合度(Ho)、遗传杂合度(He)、有效等位基因(Ne)和多态信息含量(PIC)见表3。

表2 HTR2A基因的基因型频率和基因频率

基因	样本量	基因型频率(%)			基因频率(%)	
		CC	GG	CG	C	G
HTR2A-S ₁	58	31.03(18)	10.35(6)	58.62(34)	60.34(70)	39.66(46)
		GG	AA	GA	G	A
HTR2A-S ₂	58	50.00(29)	3.45(2)	46.55(27)	73.28(85)	26.72(31)

2.3 单倍型分析

对检测到的两个SNPs位点进行连锁不平衡分析。分析发现S₁、S₂位点间D'=0.794、r²=0.350,属于强连锁。两个位点(S₁、S₂)共形成H₁(CG)、H₂(GA)、H₃(GG)、H₄(CA)4种有效单倍型,单倍型频率分别为0.570、0.234、0.163、0.033。

表3 HTR2A基因S₁、S₂位点的遗传特性

基因	遗传纯合度	遗传杂合度	有效等位基因	多态信息含量
HTR2A-S ₁	0.521	0.479	1.919	0.364
HTR2A-S ₂	0.608	0.392	1.644	0.315

2.4 *HTR2A* 基因不同单倍型个体间肌内脂肪含量性状差异显著性检验

利用 SPSS Statistis one-way ANOVA 的分析方法,分析 *HTR2A* 基因不同单倍型与肌内脂肪性状的

相关性。由表4可知,单倍型组合 H_2H_3 个体对应的肌内脂肪含量极显著高于 H_3H_3 个体 ($P<0.01$),显著高于 H_1H_2 、 H_1H_3 ($P<0.05$)。由此说明 *HTR2A* 基因单倍型组合 H_2H_3 与肌内脂肪性状显著相关。

表4 *HTR2A* 基因单倍型与肉质性状的连锁分析

单倍型组合	H_1H_2	H_1H_3	H_2H_3	H_3H_3
压榨水分(%)	25.18±4.57	25.35±3.51	24.73±4.62	26.55±6.54
熟肉率(%)	50.95±6.30	51.55±5.36	51.57±6.10	47.59±1.86
失水率(%)	19.05±4.80	18.41±5.03	17.55±9.23	19.28±3.68
滴水损失(%)	0.98±0.35	0.88±0.33	0.74±0.01	0.89±0.46
肌内脂肪含量(%)	2.79b±1.13	2.87b±1.20	4.75Aa±0.12	1.52Bb±0.15

注:不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$),不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$)

3 讨论

神经递质血清素不仅对中枢调控过程起重要作用,对能量平衡也有决定性影响。5-羟色胺敏感神经元可募集众多下游信号分子,保持能量平衡。此类效应使脂肪减少,从而缓解2型糖尿病^[17]。与此同时,血清素也能作用外周组织并调节自主神经通路,从而对葡萄糖代谢产生影响。现阶段研究表明,5-羟色胺的选择性消耗特性能导致饮食过量产生肥胖^[18]。通过脑室内注射血清素抑制色氨酸氢化酶,降低大脑5-羟色胺的水平,引发大鼠食欲过盛并导致体重增加。*HTR2A* 的过表达能促进脂肪细胞的生成,增加脂质量; *HTR2A* 的干扰则对脂肪细胞生成有一定抑制作用^[19]。关于使用药物促进5-羟色胺传递来治疗厌食的事例在早先时期就已有发生。此类调节作用表明这种神经递质在维持能量平衡中的重要作用^[20]。

目前, *HTR2A* 基因对脂肪酸代谢等相关研究尚浅。研究表明: SERT 的选择性抑制剂可以促进5-HT活性,并且与体重减轻有关^[21]。在食用高脂肪高热量的食物后,阻碍5-HT生成能够减少体重增长,增加棕色脂肪组织(BAT)中的产热活性和降低白色脂肪组织(WAT)中的脂肪生成。5-HT的过量表达会加快脂肪细胞的产生,增加脂质量, *HTR2A* 基因的干扰也会对脂肪细胞生成具有一定的抑制作用^[22]。

本研究在中国草原红牛 *HTR2A* 基因第3外显子处发现 S_1 、 S_2 两个突变位点 G/C、A/G, 优势等位基因分别为 C、G。群体遗传多态性(PIC)均为中度多态,说明该遗传标记具有一定的遗传潜力和

选育潜力。但 *HTR2A* 基因单倍型组合 H_2H_3 是否为影响中国草原红牛脂肪酸代谢的关键单倍型,还需要进一步扩大样本数量进行系统分析,届时将能更准确地为中国草原红牛改良提供有效的遗传标记。

参考文献:

- [1] 肖成,曹阳,于永生,等. *TNNI* 基因对家畜肉质性状的影响进展[J]. 东北农业科学, 2020, 45(5): 69-72.
- [2] 赵晨. 5-羟色胺对小鼠中缝背核区域 $K_v7.4$ 通道的调节及其在抑郁中的作用[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
- [3] 刘玥汐,杨艳杰,王琳,等. 5-*HTR2A* rs6313 基因多态性与女性单相抑郁及自杀行为关联性[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(6): 727-729.
- [4] Niesler B, Frank B, Kapeller J, et al. "Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-*HT3* serotonin receptor-like genes *HTR3C*, *HTR3D* and *HTR3E*." *Gene* 2003, 310(1-2): 101-111.
- [5] Celada P, Puig M V, Artigas F. Serotonin modulation of cortical neurons and networks[J]. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 2013, 7(25): 25.
- [6] De Clerck F, Xhonneux B, Leysen J, et al. Evidence for functional 5-*HT2* receptor sites on human blood platelets[J]. *Biochemical Pharmacol*, 1984, 33(17): 2807-2811.
- [7] Cohen M L, Fuller R W, Wiley K S. Evidence for 5-*HT2* receptors mediating contraction in vascular smooth muscle[J]. *Journal of Pharmacology & Experimental*, 1981, 218(2): 421-425.
- [8] Mc Lennan P L, Taylor D A. Antagonism by ketanserin of 5-HT-induced vasoconstriction unmasks a 5-HT-induced vasodilation[J]. *European Journal of Pharmacol*, 1984, 104(3-4): 313-318.
- [9] Van de Kar L D, Javed A, Zhang Y, et al. 5-*HT2A* receptors stimulate *ACTH*, corticosterone, oxytocin, renin, and prolactin release and activate hypothalamic *CRF* and oxytocin-expressing cells[J]. *Journal of Neuroscience*, 2001, 21(10): 3572-3579.

- [10] Berglund E D, Yong Xu, Elmquist J K, et al. Serotonin 2C receptors in pro-opiomelanocortin neurons regulate energy and glucose homeostasis[J]. Journal of Clinical Investigation, 2013, 123(12): 5061-5070.
- [11] Waldbillig R J, Bartness T J, Stanley B G. Increased food intake, body weight, and adiposity in rats after regional neurochemical depletion of serotonin[J]. Journal of Comparative and Physiological, 1981, 95(3): 391-405.
- [12] Nau Felix, Yu B N, Martin D, et al. Serotonin 5-HT_{2A} receptor activation blocks TNF- α mediated inflammation in vivo[J]. PLoS One, 2013, 8(10), e75426.
- [13] 赵聪哲, 胡忠昌, 张立春, 等. 大白猪 *pGH* 基因的多态性与生长性状的关联研究[J]. 东北农业科学, 2019, 44(2): 39-43.
- [14] Kaye, Walter H, Bailer U F, et al. "Neurobiology of anorexia nervosa: clinical implications of alterations of the function of serotonin and other neuronal systems"[J]. International Journal of Eating Disorders, 2005, 46(2): 144.
- [15] Gersh M D, Ross L L. Location of sites of 5-hydroxytryptamine storage and metabolism by radioautography[J]. Journal of Physiology, 1966, 186(2): 477-492.
- [16] Yun J, Jin H, Cao Y, et al. RNA-Seq Analysis Reveals a Positive Role of *HTR2A* in Adipogenesis in Yan Yellow Cattle [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(6):1760.
- [17] Heisler L K, Kanarek R B, Gerstein A. Fluoxetine decreases fat and protein intakes but not carbohydrate intake in male rats[J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 1997, 58(3):767-773.
- [18] Sohn J W, Xu Y, Jones J E, et al. Serotonin 2C receptor activates a distinct population of arcuate pro-opiomelanocortin neurons via TRPC channels[J]. Neuron, 2011, 71(3): 488-497.
- [19] Pessin J E, Sahiel A R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance[J]. Journal of Clinical Investigation, 2000, 106(2): 165-169.
- [20] Kim S P, Ha J M, Yun S J, et al. Transcriptional activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ requires activation of both protein kinase A and Akt during adipocyte differentiation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 399(1):55-59.
- [21] Serretti A, Mandelli L. Antidepressants and body weight: a comprehensive review and meta-analysis[J]. The Journal of Clinical Psychiatry [J]. 2010, 71(10): 1259-1272.
- [22] Simansky K J, Vaidya A H. Behavioral mechanisms for the anorectic action of the serotonin (5-HT) uptake inhibitor sertraline in rats: comparison with directly acting 5-HT agonists[J]. Brain Research Bulletin, 1990, 25(6): 953-960.

(责任编辑:王 昱)

(上接第95页)

- [23] 周 维, 田丹丹, 杨 扬, 等. 解淀粉芽孢杆菌 G9R-3 脂肽类化合物抑制香蕉枯萎病菌机理及防效评价[J]. 西南农业学报, 2019, 32(8): 1810-1816.
- [24] 王艾晶, 权春善, 王建华, 等. 洋葱伯克霍尔德菌 CF-66 环二肽的分离纯化及抑菌活性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(12): 43-48.
- [25] 魏贵香. 环二肽的研究进展[J]. 当代化工, 2020, 49(2): 406-409.
- [26] 宁荣彬, 孙海峰. 贝母类中药材病害防治研究进展[J]. 东北农业科学, 2018, 43(5): 34-37.
- [27] 张丽辉, 王永吉, 廖 林, 等. 生防菌 06-4 对魔芋软腐病的防治及机理的初步研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2011, 37(3): 286-289.

(责任编辑:王 昱)