



中国荷斯坦牛乳铁蛋白启动子区-131C>T和-28A>C位点SNP与泌乳性状、乳房炎和生产寿命的关联分析

王梦琦 倪炜 唐程 郭佳禾 张慧敏 李明勋 杨章平 毛永江*

扬州大学 动物科学与技术学院, 扬州 225009

* 通讯作者, cattle@yzu.edu.cn

摘要 乳房炎是危害奶牛业最严重的疾病,并对奶牛(*Bos taurus*)泌乳性能和生产寿命产生显著影响。为探索乳铁蛋白基因(lactoferrin gene, *LF*) 5'非翻译区(untranslating region, UTR)多态性对荷斯坦牛生产性状的影响,本研究根据*LF*基因5'-UTR区序列,利用PCR直接测序法对低体细胞评分(somatic cell score, SCS)和高SCS样本各20个样本进行SNP筛查,在此基础上利用飞行质谱法对866头中国荷斯坦牛*LF*基因5'-UTR区-131C>T和-28A>C位点多态性进行检测,同时收集所检测牛只奶牛群体改良计划(dairy herd improvement, DHI)泌乳相关性状记录、临床乳房炎和生产寿命等信息,利用多因素方差分析法、生存分析的Cox回归等方法分析以上SNP位点对泌乳性状、临床乳房炎发生次数和生产寿命的影响。结果表明*LF*-131C>T位点对SCS和乳糖有极显著影响($P<0.01$),*LF*-28A>C位点对日产奶量、乳脂率、蛋白率、乳糖和总固体的影响均达到极显著水平($P<0.01$)。*LF*-28A>C位点对奶牛生产寿命有显著影响($P<0.05$),CC基因型个体生产寿命显著低于AA基因型。*LF*-131C>T对生产寿命有影响,但差异不显著。本研究表明*LF*-131C>T和*LF*-28A>C对提高奶牛泌乳性能和延长生产寿命具有重要意义,该研究结果可为奶牛的抗病育种和提高经济效益提供科学依据。

关键词 中国荷斯坦牛, 乳铁蛋白, 泌乳性状, 乳房炎, 生产寿命

中图分类号 S823 **文献标识码** A

Association Analysis on the SNP of *LF* -131C>T and *LF* -28A>C with Milk Performance, Clinical Mastitis and Lifetime for Chinese Holstein (*Bos taurus*)

WANG Meng-Qi NI Wei TANG Cheng GUO Jia-He ZHANG Hui-Min LI Ming-Xun YANG Zhang-Ping MAO Yong-Jiang*

College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

* Corresponding author, cattle@yzu.edu.cn

Abstract Clinical mastitis is a kind of the most serious disease with high incidence in dairy industry, and has been plagued in the development of dairy industry. It has significant effects on milk performance and lifetime which will cause huge economic losses in milk production process. It's very important to study the related genes about mastitis for the improvement of milking traits and elongation of lifetime of cows with molecular techniques, and scientific basis would be provided for the breeding of anti-disease and improvement of economic benefits of dairy farm. In order to verify the effects of lactoferrin gene polymorphism on the production traits of Chinese Holstein (*Bos taurus*), SNPs of *LF* gene were selected by PCR and direct

基金项目: 江苏省农业自主创新基金(No. CX(17)1005)、国家自然科学基金(No. 31372286)和江苏省企业研究生工作站

收稿日期: 2017-11-06 接受日期: 2017-12-27

sequencing for 20 cows with low SCS and 20 cows with high SCS according to the sequence of 5' untranslated region (UTR) of LF gene. Finally, LF-131C>T and LF-28A>C for 866 Chinese Holstein cows were detected by flight mass spectrometry. The dairy herd improvement production recordings information including the number of test cow, ID number of test cow's father, date of test, related genealogical information, test-day milk yield, fat content, protein content, somatic cell score, lactose, total solid, milk urea nitrogen, clinical mastitis and productive life of tested cows were collected from the management system of dairy farm. The effects of LF-131C>T and LF-28A>C on milk performances and lifetime were analyzed by multi factor variance analysis and Cox regression. The results showed that the dominant genotype of LF-131C>T and LF-28A>C loci were TT and AA with the frequency of 0.813 and 0.580, respectively. The dominant genes were T and A, respectively, and their frequencies were 0.903 and 0.762, respectively. Two loci were in the state of Hardy-Weinberg Equilibrium. LF-131C>T had extremely significant effects on SCS, lactose content and 305 days milk yield ($P<0.01$), the effects on test-day milk yield and protein content were close to significant level ($0.05<P<0.1$), but LF-131C>T did not have significant effects on fat content total solid and milk urea nitrogen ($P>0.05$). Multiple comparisons showed that individuals with genotype of LF-131CC had significantly higher 305 days milk yield and lower SCS and lactose content than that of LF-131 CT and TT. LF-28A>C extremely significantly affected test-day milk yield, fat content, protein content, lactose content, total solid and 305 days milk yield ($P<0.01$), but had no significant effects on SCS and MUN ($P>0.05$). Individual with LF-28 CC genotype had significantly higher fat content, protein content, total solid and 305 days milk yield and lower lactose content than that of LF-131 AA and AC, they also had significantly higher test-day milk yield than that of LF-131 AA. LF-28A>C had significant effects on production lifetime ($P<0.05$), individuals with CC genotype had shorter lifetime than that of AA genotype. LF-131C>T had effects on lifetime, but the effects were not significant. Relative researches about the association between LF-131C>T and LF-28A>C and clinical had important significance for improving milk performance and prolonging production life of dairy cows. It could provide scientific basis for disease resistance breeding and economic benefit improvement of dairy cows.

Keywords Chinese Holstein, Lactoferrin, Milk performance, Clinical mastitis, Lifetime

19世纪70年代初,乳铁蛋白(lactoferrin, LF)被先后从牛(*Bos taurus*)和人(*Homo sapiens*)乳汁中分离出,具有抑菌、抗病毒、免疫调节以及抗感染、中和内毒素的作用(Wakabayashi et al., 2004; Omata et al., 2001)。近年来关于荷斯坦牛乳铁蛋白基因多态性研究较多。王洪梅等(2009)在中国荷斯坦牛LF基因启动子区-926(G>A)、-915(T>G)、-478(>G)和编码区+72 (T>C)发现了4处突变;李国华等(2001)也在LF基因5'调控区域发现1段多肽区域,包括-926和-915位置分别发生G>A及T>G的突变,以及-839和-811位置分别为上C和T插入突变。Zheng等(2005)分析了奶牛5'端4 355 bp的多态性,发现该区域富含GC碱基,同时含有TATA框(TATA box/Hogness box)和很多转录因子结合位点(transcription factor binding sites, TFBS) (Zheng et al., 2005; Seyfert et al., 1994)。LF基因5'端SNP突

变,尤其是转录因子结合位点附近的SNP突变基因表达活性可能产生影响(Daly et al., 2006; O'Halloran et al., 2009)。Zheng等(2005)利用启动子缺失技术发现LF基因5'端543 bp已经能满足维持其基因的基本活性。O'Halloran等(2009)发现了3个与奶牛繁殖性能相关的SNP(c.-586 C>T, c.-190 G>A, -28 A>C);Pourzal等(2014)发现-190 A>G突变为潜在的SP1转录因子(transcription factor SP1, SP1)结合位点,且与产后生殖道感染有关。

奶牛乳房的健康状况与生产寿命具有相关性,生产寿命与乳房炎抗性间的相关系数为0.22~0.33(储明星等, 2002)。乳中体细胞数(somatic cell count, SCC)是反映乳房健康状况的重要指标,乳中SCC受饲养管理、气候、营养、环境等非遗传因素影响(Boujenane et al., 2015; Elhaig, Selim, 2015),同时也受遗传因素的影响。高SCC一般与高淘汰率相

关。据报道:牛群的生产寿命与乳中体细胞数呈负相关($r=-0.32$)(Archer et al., 2013)。

分子标记辅助选择(marker assisted selection, MAS)是提高畜禽重要经济性的育种方法之一。赵佳强(2013)研究发现叉头框 O1 (forkhead box O1, FoxO1)基因型对奶牛的总泌乳月数和使用年限有显著影响($P<0.05$)。然而由于生产寿命相关数据的收集需要较长的时间,且相关的分子标记尚不完善,国内此类研究并不多。目前 Komisarek 和 Doryenk(2009)以及 John 等(2011)发现一些基因与生产寿命有一定程度的相关性。因此,本研究利用 PCR-直接测序法和飞行质谱法分别对大样本奶牛群体 LF 基因的 SNP 位点进行筛选与检测,同时收集所检测牛只临床乳房炎和生产寿命等信息,利用方差分析、Cox 生存回归等方法分析 LF 基因多态性对泌乳性状、临床乳房炎和生产寿命的影响,以期改善奶牛泌乳性状、提高奶牛乳房炎抗性、延长生产寿命提供参考。

1 材料与方法

1.1 样本及数据收集

于 2011 年 8 月和 2012 年 7 月在江苏省上海牛奶奶集团海丰奶牛场采集荷斯坦牛(*Bos taurus*)血样($n=905$)。10 mL 血液样本于尾静脉处采集,使用肝素钠进行抗凝处理,保存于 -20°C 。同时收集采样牛只 2010~2014 年度奶牛群体改良计划(dairy herd improvement, DHI)测定记录及相关系谱信息,主要信息包括牛号、父号、测定日期、测定日产奶量、乳脂率、乳蛋白率、乳糖、乳中干物质质量、乳中尿素氮及体细胞数等。血液采用传统苯酚氯仿法提取 DNA, -20°C 冷冻保存备用。由于提取 DNA 中损失、基因型判定和数据不完整等原因,最终用于分析的样本量为 866 头。临床乳房炎发病次数判断标准以及生产寿命相关指标计算标准参照前期研究结果(王梦琦等, 2017a; 2017b)。

1.2 LF 基因多态性检测

根据 LF 基因序列(GenBank No. NC_007320),设计引物如下:

F: CTGGTTCCTCAAGCACTTT;

R: GTCGCCCCAGGACCCAG。

其产物长度为 481 bp,退火温度为 60°C ,检测

LF 基因 5' 非翻译区(untranslating region, UTR)上游-444~+37 b 范围内 SNP。各选取 20 个高体细胞评分样本(5.85 ± 1.22)和低体细胞评分样本(1.02 ± 0.05)进行 PCR 扩增,PCR 扩增体系及程序同前期研究结果(王梦琦等, 2017a),扩增体系为 20 μL : 10 $\times$ buffer 2.0 μL , 25 mmol/L Mg^{2+} 1.5 μL , dNTP (10 mmol/L) 0.5 μL , Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL) 0.3 μL , 上、下游引物各(10 pmol/ μL) 1.0 μL , 模板 DNA (100 ng/ μL) 1.0 μL , ddH₂O 12.7 μL 。扩增程序: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 40 s, 60°C 复性 40 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环,最后 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。经琼脂糖凝胶电泳检测其扩增效果,后送至上海生物公司正反测序。LF 基因 5' 端 200 bp 内共发现 2 个 SNP 位点,分别是: -131C>T 和 -28A>C。采用飞行时间质谱法对筛查出的突变位点在大样本群体中对-131C>T 和 -28A>C 进行 SNP 分型检测。

1.3 统计分析

1.3.1 遗传效应分析

利用 SHEsis 软件对等位基因频率(allelic frequency)、基因型频率(genotypic frequency)、哈代温伯格平衡(hardy-weinberg equilibrium, HWE)检测等常规群体遗传学指标进行统计分析。

利用 SPSS16.0 软件中广义线性模型(general linear model, GLM)中的多因素方差分析法分析 LF-131 C>T 和 LF-28 A>C 对泌乳性能及乳中 SCS 的影响,并采用 Duncan's 法多重比较 SNP 不同基因型的泌乳性状,模型如下:

$$y=\mu+b+y+s+p+l+cs+snp+e$$

$$y_{305\text{DMY}}=\mu+b+y+s+p+snp+e$$

式中, y 为除 305 d 校正产奶量以外的各个泌乳性状的观察值; $y_{305\text{DMY}}$ 为 305 d 校正产奶量的观察值; μ 为群体平均值; b 为种公牛效应; y 为生产年度效应; s 为生产季节效应; p 为胎次效应(从第 1 胎到第 3 胎); l 为泌乳阶段效应,分为 3 个阶段,即产犊后 7~100 d、101~200 d 和 200~365 d; cs 为泌乳牛各胎次产犊季节效应; snp 为 LF-131 C>T 和 LF-28 A>C 基因效应; e 为残差效应(王梦琦等, 2017b)。

在进行数据关联分析过程中,为提高数据的整齐性及可靠性,筛选具有完整数据的记录进行分析,同时根据王梦琦等(2017b)研究结果对 DHI 测定日记录进行了限定,详细性状说明见表 1。

1.3.2 奶牛临床乳房炎发生次数的统计分析

对 LF-131C>T 和 LF-28A>C 多态性对奶牛各胎次临床乳房炎发生次数的影响进行单因素方差分析,模型如下:

$$Y=\mu+G+e$$

式中: Y 为奶牛临床乳房炎发生次数的观察值, μ 为群体均值, G 为基因型的效应值, e 为随机误差。

用多因素方差分析模型分析各 SNP 位点不同基因型对奶牛生产寿命相关指标的影响,模型如下:

$$Y=\mu+S+M+G+e$$

式中: Y 为奶牛生产寿命相关指标的观察值, μ 为群体均值, S 为初产季节的效应值, 季节的划分同前; M 为初产月龄的效应值, G 为基因型的效应值, e 为随机误差。经过信息完整性筛选后,最终 647 头奶牛的相关记录进入分析。

1.3.3 生产寿命的生存分析

用 SPSS16.0 中 Cox 回归模型对 LF-131C>T 和

LF-28A>C 多态性对生产寿命相关指标的影响进行计算,同时绘制生存曲线,模型如下:

$$h_{(t|X)}=h_{0(t)} \exp (\beta_1 X_1+\beta_2 X_2)$$

式中: $h_{0(t)}$ 为基准风险函数,即所有变量取零时的 t 时刻的风险函数; X_1 、 X_2 分别为 LF-131C>T 和 LF-28A>C 不同基因型变量; β_1 、 β_2 为 LF-131C>T 和 LF-28A>C 不同基因型变量的回归系数。

1.4 生物信息学分析及数据统计

用软件 MatInspector(<http://www.genomatix.de/products/index.html>) (Cartharius et al., 2005) 对基因非编码区 5' 端的突变转录因子结合位点进行在线分析。

2 结果与分析

2.1 SNP 筛选分析

不同 SCS 水平奶牛的 PCR 产物测序结果发现 LF 基因 5' 端的 LF-131C>T 和 LF-28A>C 两个位

表 1 泌乳性状及 SCS 的群体平均水平

Table 1 The herd average level of milking traits and SCS

胎次 Parity	DHI 记录数/条 Records number	TDMY/kg	FC /%	PC/%	SCS	LC /%	TS/%	MUN / (g · 305 DMY/kg 100 mL ⁻¹)
1	7018	29.06±0.08	4.14±0.01	3.34±0.01	2.03±0.02	5.01±0.01	13.49±0.01	10.94±0.03
2	6741	33.06±0.12	4.36±0.01	3.38±0.01	1.82±0.02	4.94±0.01	14.05±0.02	12.52±0.04
3	6797	34.62±0.16	4.24±0.01	3.32±0.01	2.22±0.02	4.86±0.01	13.80±0.02	13.80±0.04
合计 Total	20556	32.21±0.07	4.25±0.01	3.35±0.01	2.02±0.01	4.95±0.01	13.77±0.01	12.17±0.02

DHI: 奶牛群体改良; TDMY: 测定日产奶量; FC: 乳脂率; PC: 乳蛋白; SCS: 体细胞数; LC: 乳糖; TS: 总固体; MUN: 尿素氮; 305DMY: 305 d 校正产奶量; 下同

DHI: Dairy herd improvement; TDMY: Test-day milk yield; FC: Fat content; PC: Protein content; SCS: Somatic cell score; LC: Lactose; TS: Total solid; MUN: Milk urea nitrogen; 305DMY: 305 Corrected days milk yield; The same below

表 2 LF-131C>T 和 LF-28A>C 位点基因频率、等位基因型频率及 χ^2 检验

Table 2 Genotypic and allelic frequency, and values of χ^2 test significance for LF-131C>T and LF-28A>C

SNPs	基 因 型 Genotype	基因型频率 Genotypic frequency	N	等位基因 Allele	χ^2
LF-131C>T	CC	0.007	6	C	0.700
	CT	0.180	156	T	
	TT	0.813	703		
LF-28A>C	AA	0.580	501	A	0.027
	AC	0.365	315	C	
	CC	0.056	48		

$\chi^2 < 5.99$ 表示该位点处于哈代温伯格平衡状态

$\chi^2 < 5.99$ means that the site is in Hardy-Weinberg equilibrium

点。这两个位点的后期大样本质谱分析结果表明LF-131C>T和LF-28A>C位点优势基因型分别为TT和AA,频率分别为0.813和0.580,T和A分别为这两个位点的优势基因,其频率各为0.903和0.762,这两个位点均符合HWE平衡分布规律(表2)。

2.2 LF-131C>T和LF-28A>C对泌乳性能及乳房炎发生次数的影响

LF-131C>T位点对SCS、乳糖和305 d校正产奶量(305 DWY)存在极显著水平的影响($P<0.01$),对日产奶量和乳蛋白率的影响也接近显著水平,而对乳脂率、总固体和MUN无显著影响($P>0.05$)(表3)。多重比较表明,CC型个体SCS和乳糖显著低于CT和TT型($P<0.05$)。

LF-28A>C位点对日产奶量、乳脂率、蛋白率、乳糖、总固体和305 d校正产奶量有极显著影响($P<0.01$),而对SCS和MUN无显著影响($P>0.05$)(表3)。多重比较表明:CC型个体乳脂率、乳蛋白率和总固体显著高于AC和AA型($P<0.05$),但乳糖显著低于AC和AA型($P<0.05$),CC型个体日产奶量显著高于AA型($P<0.05$)。LF-131C>T和LF-28A>C对各胎次临床乳房炎发生次数均无显著影响($P>0.05$)(表4)。

2.4 LF-131C>T和LF-28A>C位点奶牛的生产寿命和生存分析

LF-131C>T和LF-28A>C对奶牛生产月龄、离群月龄和离群胎次的影响均未达到显著水平($P>$

表3 LF-131C>T和LF-28A>C位点不同基因型奶牛的泌乳性能

Table 3 The milk production traits for different genotypes of LF-131C>T and LF-28A>C

SNPs	基因型	DHI	TDMY /kg	FC /%	PC /%	SCS	LC/%	TS /%	MUN/(g · 100 mL ⁻¹)	305 DMY/kg
	Genotypes									
LF-131C>T	CC	179	34.49±10.80	4.27±0.68	3.32±0.34	1.64±1.36 ^b	4.8±0.33 ^b	13.7±1.21	12.34±2.88	10600±1485 ^a
	CT	3784	32.15±10.51	4.25±0.82	3.36±0.38	2.04±1.57 ^a	4.94±0.24 ^a	13.78±1.31	12.21±3.00	9901.29±1833 ^b
	TT	16569	32.19±10.65	4.25±0.81	3.35±0.38	2.02±1.59 ^a	4.95±0.23 ^a	13.77±1.30	12.16±2.91	9890.31±1928 ^b
	<i>F</i>		2.65	0.05	2.54	6.69	28.13	1.02	0.44	7.58
	<i>P</i>		0.070	0.950	0.080	0.000	0.000	0.360	0.640	0.000
LF-28A>C	AA	11895	32.01±0.10 ^b	4.25±0.01 ^b	3.35±0.00 ^b	2.01±0.01	4.95±0.00 ^a	13.78±0.01 ^b	12.16±0.03	9841±20 ^c
	AC	7390	32.42±0.12 ^{ab}	4.23±0.01 ^b	3.35±0.00 ^b	2.05±0.02	4.95±0.00 ^a	13.75±0.02 ^b	12.16±0.04	9957±25 ^b
	CC	1213	32.80±0.32 ^a	4.32±0.02 ^a	3.38±0.01 ^a	1.99±0.04	4.9±0.010 ^b	13.90±0.04 ^a	12.29±0.09	10100±60 ^a
	<i>F</i>		5.487	7.354	5.772	2.036	19.943	6.625	0.384	8.732
	<i>P</i>		0.004	0.001	0.003	0.131	0.000	0.001	0.681	0.000

同列数据上的不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同

Data in each column with lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$), the same below

表4 LF-131C>T和LF-28A>C位点各胎次临床乳房炎发生次数

Table 4 The number of clinical mastitis for LF-131C>T and LF-28A>C for different parity

SNPs	基因型	<i>N</i>	1胎	2胎	3胎	1~3胎合计
	Genotypes		Parity-1	Parity-2	Parity-3	Parity 1 to 3
LF-131C>T	CC	6	0.00±0.00	0.17±0.17	1.00±0.00	1.17±0.17
	CT	133	0.01±0.008	0.44±0.07	0.89±0.11	1.34±0.13
	TT	582	0.01±0.006	0.54±0.04	0.91±0.05	1.46±0.08
	<i>F</i>		0.659	1.112	0.036	1.448
	<i>P</i>		0.417	0.329	0.965	0.236
LF-28A>C	AA	423	0.01±0.01	0.54±0.04	0.86±0.06	1.40±0.08
	AC	260	0.02±0.01	0.52±0.06	0.98±0.09	1.52±0.12
	CC	37	0.03±0.03	0.27±0.11	0.97±0.26	1.27±0.30
	<i>F</i>		1.584	1.582	0.818	0.543
	<i>P</i>		0.192	0.206	0.442	0.581

表5 LF-131C>T和LF-28A>C位点不同基因型奶牛生产月龄、离群月龄和离群胎次
Table 5 The productive months, culling months and culling parity for LF-131C>T and LF-28A>C

SNPs	基因型 Genotypes	N	生产月龄/月 Productive months	离群月龄/月 Culling months	离群胎次 Culling parity
LF-131C>T	C C	5	35.60±1.21	63.00±2.65	3.00±0.00
	C T	115	37.22±0.77	64.63±8.81	3.07±0.77
	T T	527	36.80±0.37	64.11±8.22	3.04±0.79
	F		0.080	0.235	0.094
	P		0.923	0.790	0.910
LF-28A>C	A A	377	37.35±0.43	64.56±8.40	3.10±0.81
	A C	236	36.13±0.54	63.75±8.28	2.97±0.70
	C C	33	36.33±1.41	63.15±7.27	2.88±0.86
	F		1.769	0.980	2.597
	P		0.171	0.376	0.075

表6 LF-131C>T和LF-28A>C位点奶牛的Cox生存分析
Table 6 The Cox survival analysis of LF-131C>T and LF-28A>C for dairy cows

SNPs	β 值 β value	Wald χ^2 值 Wald χ^2 value	P	相对危险度 Relative risk	95%置信区间上限 Upper of 95% CI	95%置信区间下限 Lower of 95% CI
LF-131	1.181	3.712	0.054	3.259	0.980	10.841
LF-28	0.177	4.431	0.035	1.193	1.012	1.407

表7 LF-28A>C不同基因型生存时间
Table 7 The survival time of cow with different genotypes of LF-28A>C

LF-28A>C	N	平均数±标准误 $\bar{X} \pm SE$	中位数±标准误 Median±SE
AA	377	64.57±0.43 ^a	64±0.36
AC	236	63.75±0.54 ^{ab}	63±0.45
CC	33	63.15±1.27 ^b	64±0.94
合计Overall	646	64.19±0.33	64±0.27

0.05), LF-28A>C对离群胎次有影响,但差异不显著(表5)。LF-131C>T和LF-28A>C奶牛生存分析结果表明:LF-28A>C位点对奶牛生存时间的影响达到显著水平($P<0.05$), LF-131C>T对奶牛生存时间有影响但差异不显著(表6)。进一步对LF-28A>C进行分析表明:AA基因型平均生存时间显著高于CC型(表7),特别是在60月龄以后,CC基因型的生存概率显著低于AA和AC基因型(图1)。

3 讨论

3.1 LF-131C>T和LF-28A>C对泌乳性能的影响

LF-131C>T位点对SCS和乳糖有极显著影

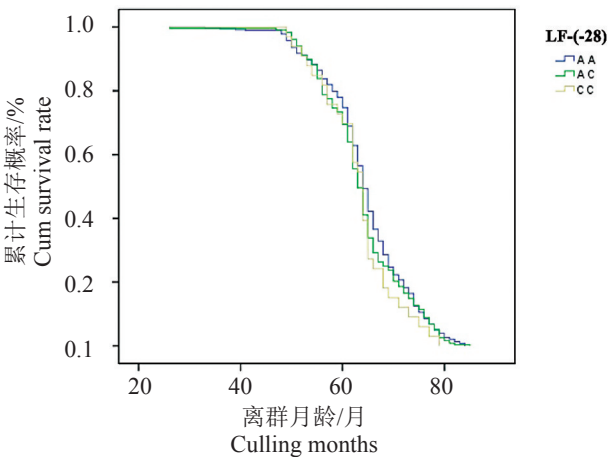


图1 LF-28A>C不同基因型的生存曲线
Figure 1 The survival curve for different genotypes of LF-28A>C

响,对日产奶量和乳蛋白率有影响,但差异不显著。生物信息学分析表明:LF-131有3个潜在转录因子结合位点:B-细胞内表达的POZ范围锌指蛋白(POZ domain zinc finger expressed in B- Cells, BCL6),信号传导及转录激活因子(signal transducers and activators of transcription, STAT)和硒代半胱氨酸 t-RNA 活化因子(selenocysteine tRNA gene transcription-activating factor, STAF)。BCL6是一个

主要导致辅助性T细胞分化的转录因子,其可通过对编码转录因子B淋巴细胞诱导成熟蛋白1(blymphocyte induced maturation protein1, Blimp-1)基因正调控域1(positive regulatory domain 1, *PRDM1*)进行负调控,也可以调节STAT依赖性的IL4 B淋巴细胞反应;而STAT为信号转导和转录激活蛋白的简称,在炎症相关基因表达启动及信号转导中发挥重要作用。该位点突变可能导致以上转录因子结合位点发生改变,从而导致下游基因的表达产生影响,进一步影响乳中SCS。

LF-28A>C对日产奶量、乳脂率、蛋白率、乳糖和总固体的影响均达到了极显著水平($P<0.01$)。LF-28A>C有4个潜在转录因子结合位点:雌激素反应元件(estrogen response elements, ERE), GATA结合因子(GATA binding factors, GATA), RXR异源二聚体结合位点(RXR heterodimer binding sites, RXRF)和STAF。其中GATA-1是红细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞等细胞成熟所必需成分之一,其基因突变可导致小鼠(*Mus musculus*)因无法形成成熟的红细胞而在胚胎发育早期过程中死亡(Fujiwara et al., 1996),人(*Homo sapiens*)的基因突变也可导致的先天性贫血和血小板减少(Campbell et al., 2013)。该位点突变有可能导致以上转录因子GATA1结合位点发生改变,从而导致下游基因的表达产生影响,进一步影响乳中脂肪和蛋白质的合成。

3.2 LF-131C>T和LF-28A>C位点对奶牛的生产寿命的影响

LF基因-28A>C位点对奶牛淘汰时间有显著影响,AA基因型个体淘汰时间显著高于CC型。但在前期分析中,并没有发现该位点对临床乳房炎发生次数的影响。鉴于该位点为TATA框,同时也为重要转录因子GATA的结合位点。Zabolewicz等(2014)的研究表明,该位点对乳中乳铁蛋白含量显著影响,AA型乳中乳铁蛋白含量显著高于CC型,并由此导致CC型个体更容易感染疾病,造成生产寿命较低。本研究中,该位点对临床乳房炎患病次数并未达到显著水平。由于各方面原因,本研究未能收集到繁殖疾病方面的数据,也有可能是由于各基因型繁殖疾病发生率不一样,从而导致对生产寿命产生显著影响,特别是2胎以上的奶牛更是如此。Cox分析表明,LF-131C>T对生产寿命有影响,但是差异不显著($0.05<P<0.1$)。鉴于以上结

果,可以初步认为LF基因对生产寿命有较大程度的影响,但其机制值得进一步研究。

4 结论

本研究通过利用多因素方差分析法、Cox生存回归等方法分析866头中国荷斯坦牛LF基因5'-UTR区-131C>T和-28A>C位点多态性对泌乳性状、临床乳房炎发生次数和生产寿命的影响。结果发现LF-131C>T位点对SCS、乳糖和305 d产奶量有极显著影响。LF-28A>C位点对日产奶量、乳脂率、蛋白率、乳糖、总固体和305 d产奶量的影响均达到了极显著水平,对临床乳房炎发生次数无显著影响,但对牛生存时间的影响达到显著水平。LF-28A>C AA基因型平均生存寿命显著高于CC型,特别是在60月龄以后,CC基因型的生存概率显著低于AA和AC基因型。因此LF-131C>T可用于中国荷斯坦牛降低乳中乳糖含量和提高对乳房炎抗性的分子标记辅助选择,而LF-28A>C可为改善中国荷斯坦牛泌乳性能或延长生产寿命的选择育种提供参考。

参考文献

- 储明星,石万海,邝霞,等. 2002. 奶牛乳房炎与经济性状之间关系的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 38(5):44-46. (Chu M X, Shi W H, Kuang X, et al. 2002. Research progress on the relationship between mastitis and economic traits in dairy cows [J]. Chinese Journal of Animal Science, 38(5):44-46.)
- 李国华,张沅,李宁. 2001. 奶牛乳铁蛋白基因部分序列的PCR-SSCP分析[J]. 农业生物技术学报, 9(2):139-141. (Li G H, Zhang Y, Li N. 2001. Analysis on the partial sequence of bovine lactoferrin gene by PCR-SSCP[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 9(2): 139-141.)
- 王洪梅,孔振兴,王长法,等. 2009. 奶牛乳铁蛋白基因5'侧翼区遗传多态性及其与乳腺炎关联性分析[J]. 遗传, 31(4): 393-399. (Wang H M, Kong Z X, Wang C F, et al. 2009. Genetic polymorphism in 5'-flanking region of the lactoferrin gene and its associations with mastitis in Chinese Holstein cows[J]. Hereditas, 31(4): 393-399.)
- 王梦琦,倪炜,张慧敏,等. 2017. 中国荷斯坦牛CXCR1基因编码区SNP多态与临床乳房炎和生产寿命的关联分析[J]. 中国农业科学, 50(12):2359-2370. (Wang M Q, Ni W, Zhang H M, et al. 2017. Association between SNPs in the CDS regions of CXCR1 gene and the clini-

- cal mastitis and lifetime for Chinese Holstein[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 50(12):2359-2370.)
- 王梦琦, 倪炜, 张慧敏, 等. 2017. 中国荷斯坦牛 *TLR1* 基因启动子区 SNP 多态与乳房炎抗性和泌乳性状的关联分析[J]. *农业生物技术学报*, 25(3):397-404. (Wang M Q, Ni W, Zhang H M, et al. 2017. Correlation between the mutation of SNPs in the promoter region of *TLR1* and mastitis resistance and milking traits in Chinese Holstein [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 25(3):397-404.)
- 赵佳强. 2013. 中国荷斯坦奶牛生产寿命、体型线性性状分子标记的研究[D]. 硕士学位论文, 华中农业大学, 导师: 易建明, pp. 28-29. (Zhao J Q. 2013. Research on molecular markers and productive life, linear type traits of Holstein cattle in China[D]. Thesis is for M.S., Huazhong Agricultural University, Supervisor: Yi J M, pp. 28-29.)
- Archer S C. 2013. Influence of somatic cell count in heifers on lifetime milk yield and disease management[D]. Thesis for Ph.D., University of Nottingham, Supervisors: Green M J, Wapenaar W, pp: 99-102.
- Boujenane I, Aïmani J E, By K. 2015. Effects of clinical mastitis on reproductive and milk performance of Holstein cows in Morocco[J]. *Tropical Animal Health & Production*, 47(1):207-11.
- Campbell A E, Wilkinson-White L, Mackay J P, et al. 2013. Analysis of disease-causing GATA1 mutations in murine gene complementation systems[J]. *Blood*, 121 (26): 5218-5227.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, et al. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites[J]. *Bioinformatics*, 21(13):2933-42.
- Daly M, Ross P, Giblin L, et al. 2006. Polymorphisms within the lactoferrin gene promoter in various cattle breeds[J]. *Animal Biotechnology*, 17(1): 33-42.
- Elhaig M M, Selim A. 2015. Molecular and bacteriological investigation of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in domestic bovines from Ismailia, Egypt[J]. *Tropical Animal Health & Production*, 47(2):271-6.
- Fujiwara Y, Browne C P, Cunniff K, et al. 1996. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (22): 12355-12358.
- John B C, George R, Wiggans L M, et al. 2011. Genome-wide association analysis of thirty one production, health, reproduction and body conformation traits in contemporary U. S. Holstein cows[J]. *BMC Genomics*, 12(408): 1471-2164.
- Komisarek J, Dorynek Z. 2009. Effect of *ABCG2*, *PPARGC1A*, *OLR1* and *SCD1* gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls[J]. *Journal of Applied Genetics*, 50: 125-132.
- O'Halloran F, Bahar B, Buckley F, et al. 2009. Characterisation of single nucleotide polymorphisms identified in the bovine lactoferrin gene sequences across a range of dairy cow breeds[J]. *Biochimie*, 91(1):68-75.
- Omata Y, Satake M, Maeda R, et al. 2001. Reduction of the infectivity of *Toxoplasma gondii* and *Eimeria stiedai* sporozoites by treatment with bovine lactoferrin[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 63(2): 187-190.
- Pourzal F, Sharifiyazdi H, Mirzaei A. 2014. Assessment of a single-nucleotide polymorphism in specific protein 1 (SP1)-binding site of the Lactoferrin promoter region as potential genetic markers for uterine infection in dairy cows[J]. *Comparative Clinical Pathology*, 23(5): 1315-1319.
- Seyfert H M, Tuekoriez A, Interthal H, et al. 1994. Structure of the bovine lactoferrin-encoding gene and its promoter [J]. *Gene*, 143: 265-269.
- Wakabayashi H, Kurokawa M, Shin K, et al. 2004. Oral lactoferrin prevents body weight loss and increase cytokine responses during *Herpes simplex virus type 1* infection of mice[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(3): 537-544.
- Zabolewicz T, Barcewicz M, Brym P, et al. 2014. Association of polymorphism within *LTF* gene promoter with lactoferrin concentration in milk of Holstein cows[J]. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17(4):633-641.
- Zheng J, Ather J L, Sonstegard T S, et al. 2005. Characterization of the infection-responsive bovine lactoferrin promoter[J]. *Gene*, 353(1):107-117.

(责任编辑 侯小锋)