



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

王梦琦¹ 倪炜¹ 张慧敏¹ 杨章平¹ 王西朴² 蒋彦森² 毛永江^{1,2*}

1 扬州大学 动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2 江苏君乐宝乳业有限公司, 徐州 221721

*通讯作者, cattle@yzu.edu.cn

摘 要 Toll样受体1 (Toll like receptor 1, *TLR1*) 基因是牛(*Bos taurus*)重要的免疫基因之一,在免疫识别、炎症反应等方面有重要作用。为探讨 *TLR1* 启动子区 SNP 突变与中国荷斯坦牛乳中体细胞评分(somatic cell score, SCS)、临床乳房炎(clinical mastitis, CM)和泌乳性状的相关性,本研究根据 *TLR1* 基因启动子区序列,利用PCR-直接测序法对低SCS和高SCS各20个样本进行SNP筛查,将筛选到的 *TLR1*-245 G>T 利用飞行质谱法对866头中国荷斯坦牛进行检测,同时收集所检测牛只临床乳房炎发生情况、SCS和泌乳性状等信息,利用多因素方差分析SNP位点突变对相应指标的影响。结果表明, *TLR1* 基因启动子区700 bp范围内只发现 *TLR1*-245 G>T 1个SNP突变; *TLR1*-245 G>T 与中国荷斯坦牛日产奶量及SCS极显著相关($P<0.01$),与乳脂率、乳蛋白率、乳糖、总固体以及尿素氮含量无显著相关($P>0.05$),GG型个体日产量及SCS均显著低于GT和TT型个体($P<0.05$)。 *TLR1*-245 G>T 与奶牛患临床乳房炎次数显著相关($P<0.05$),TT型个体患临床乳房炎次数显著低于GG和GT型个体($P<0.05$)。研究结果为提高中国荷斯坦牛产奶量和控制乳中体细胞数的分子标记选择提供了参考资料。

关键词 中国荷斯坦牛, Toll样受体1(*TLR1*), SNP, 泌乳性状, 临床乳房炎

中图分类号 S823 **文献标识码** A

Correlation Between the Mutation of SNPs in the Promoter Region of *TLR1* and Mastitis Resistance and Milking Traits in Chinese Holstein (*Bos taurus*)

WANG Meng-Qi¹ NI Wei¹ ZHANG Hui-Min¹ YANG Zhang-Ping¹ WANG Xi-Pu² JIANG Yan-Sen² MAO Yong-Jiang^{1,2*}

1 College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2 Jiangsu Junlebao Dairy Co., Ltd., Xuzhou 221721, China

* Corresponding author, cattle@yzu.edu.cn

Abstract Toll like receptor 1 (*TLR1*) is one of the important immune genes for cattle (*Bos taurus*), which has significant effects on immune recognition and inflammatory response. To investigate the correlation between the SNPs in the promoter region of *TLR1* gene and somatic cell score (SCS), clinical mastitis (CM) and milking traits for Chinese Holstein cattle, the SNP in the promoter region of *TLR1* gene was screened by PCR and direct sequencing for 20 cows with low SCS and 20 cows with high SCS. Finally, *TLR1*-245 G>T for 866 Chinese Holstein cattle were detected using flight mass spectrometry. The SCS, CM and milking traits of

tested cattles were collected from the management system of dairy farm. The correlation between the SNPs and these traits of tested cattles was analyzed using multi-factor variance analysis. The results showed that only one transcription factor binding site for *TLR1*-245 G>T site (TATA binding protein, TBP) was found. The dominant genotype and gene of *TLR1*-245 were GT and T, and their frequencies were 0.487 and 0.584, respectively. The distribution of genotype was in the Hardy-Weinberg equilibrium. *TLR1*-245 G>T showed extremely significant correlation with test-day milk yield (TDMY) and SCS ($P<0.01$), and no significant correlation with fat content (FC), protein content (PC), lactose content (LC), total solid (TS) and milk urea nitrogen (MUN) ($P>0.05$). The individuals cattles with TT genotype had higher TDMY than that of GG and GT, and individuals cattles with GG genotype had the lowest TDMY. The SCS for individuals cattles with GG genotype were significantly higher than that of GT and TT genotype ($P<0.05$). *TLR1*-245 G>T showed significant correlation with the number of cattle suffering from CM ($P<0.05$), and the number of cattle suffering from CM for individuals with TT genotype was significantly lower than that of GG and GT genotype ($P<0.05$). These results provide a reference for the increase of milk yield and the control of SCS in Chinese Holstein cattles.

Keywords Chinese Holstein cattle, Toll like receptor 1 gene (*TLR1*), SNP, Milking traits, Clinical mastitis (CM)

乳房炎是危害奶牛业最严重的疾病之一,发病率极高,对奶牛业造成的经济损失也最大,一直困扰着奶牛业的发展(Middleton et al., 2014; Sadeghi-Sefidmazgi et al., 2010)。奶牛(*Bos taurus*)乳房炎与乳中体细胞数(somatic cell count, SCC)有较强的遗传相关,其相关系数为 0.7 左右(Rupp, Biohard, 1999)。但由于 SCC 呈偏态分布,生产中对其进行转换为体细胞评分(somatic cell score, SCS)。因此,低 SCS 性状的选育已经成为当今奶牛育种工作的主要研究目标之一(Banus et al., 2006)。奶牛乳房炎、SCS 和泌乳性状与牛场的饲养管理和其他疾病等非遗传因素有一定关系(Chapinal et al., 2012; Boujenane et al., 2015; Elhaig, Selim, 2010),同时与遗传也有较大关系(John et al., 2011; Emanuelson et al., 1988)。因此,近年来国内外学者围绕奶牛乳房炎、SCS 和泌乳性状等进行了部分研究。通过对德国荷斯坦牛进行全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS),共发现 16 个 SNPs 和 10 个单倍型对乳中 SCS 的影响达到极显著水平,其中最为显著的 SNP 位于 6 号染色体上(Abdel-Shafy et al., 2014a; 2014b)。王晓等(2013)对 2 093 头北京地区中国荷斯坦牛进行 GWAS 分析,共检测到 6 个 SNPs 与乳房炎易感性及抗性显著相关。

Toll 样受体 1 (Toll like receptor 1, *TLR1*)是牛重要的免疫基因之一,在免疫识别、炎症反应等方面有重要作用(Shizuo et al., 2001; Takeda, Akira, 2005)。全基因组扫描发现位于 6 号染色体上的

TLR6-*TLR1*-*TLR10* 基因簇有显著影响泌乳性状和临床乳房炎的 QTL(Ogorevc et al., 2009; Klungland et al., 2001)。因此,*TLR1* 可作为奶牛乳房炎分子标记的候选基因之一(Jann et al., 2009)。近年来,围绕 *TLR1* 基因多态性进行了部分研究。李春苗等(2009)发现中国荷斯坦牛 *TLR1* 编码区(coding sequence, CDS)有 4 个 SNP 突变,但只有一个非同义突变。Russell 等(2012)对 *TLR1* 基因 5'端和 CDS 区 SNP 突变进行了检测,发现 -79 T>G 和 3'UTR SNP+2 463 C>T 显著影响临床乳房炎(clinical mastitis, CM)发生。启动子区(promotor region)是一段位于基因 5'端上游的 DNA 序列,不编码蛋白质,但却富含供 RNA 聚合酶特异性识别的序列和转录因子结合位点,从而控制基因表达;启动子区具有序列特异性、方向性、位置特性和种属特异性的特点(夏江东等, 2006)。启动子区的碱基突变及其功能研究对探索基因表达调控有重要意义。

近 20 年来,国内外利用分子标记法、候选基因法、全基因组扫描法及基因芯片对泌乳性状和乳房炎相关基因筛选、鉴定及功能分析,得到了很多有价值的成果(Jann et al., 2009; Strillacci et al., 2014)。但由于乳房炎所涉及的分子标记较多,加上不同牛群遗传背景不一致,所得结果有部分差异。因此,本研究对中国荷斯坦牛 *TLR1* 基因进行 SNP 检测,并收集被检测牛只 2010~2014 年奶牛群体改良计划(Dairy Herd Improvement, DHI)测定数据及临床乳房炎发生等信息,利用多因素方差法分

析 SNP 突变对乳中 SCS、临床乳房炎发生情况和泌乳性状的影响,以期为提高中国荷斯坦牛泌乳性状和降低相关疾病发生率提供分子标记辅助选择的参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

来自 78 个公牛家系的 866 头中国荷斯坦牛 (*Bos taurus*) 血样分别于 2011-08 和 2012-07 采自江苏省大丰市江苏申牛牧业有限公司,每个公牛后代数 5~60 头不等。尾静脉采血 10 mL,肝素钠抗凝, -20 ℃ 冷冻保存备用。同时,所有实验奶牛饲养管理条件相同,均参加奶牛群体改良计划(Dairy Herd Improvement, DHI)测试。同时收集采样牛只 2010~2014 年度 DHI 测定记录及相关系谱信息。

1.2 DNA 提取、SNP 突变位点筛查及 SNP 分型

奶牛血液基因组 DNA 采用常规酚氯仿提取法, TE 缓冲液(Tris-EDTA buffer solution)溶解,取部分 DNA 样品稀释至 100 ng/μL, -20 ℃ 保存备用。根据 GenBank 公布的牛 (*Bos taurus*) *TLR1* 基因启动子序列(登录号: NP_001039969.1), 用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。

F: GGACATGGTTAGGAGGTGGA;

R: TTGTTGTGGGACAAATCCAA。

扩增产物长度预计为 668 bp, 碱基序列为 *TLR1* 基因-546 到 122 位。PCR 扩增体系: DNA 模板(浓度约 100 ng/μL) 400 ng, 正反向引物(100 μmol/L) 各 0.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶 0.13 μL, 10× PCR buffer 2.5 μL, dNTP Mixture 2 μL, 用灭菌蒸馏水补足至 25 μL。PCR 反应条件: 98 ℃ 预变性 10 min; 98 ℃ 10 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 60 s 为一个循环, 进行 32 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min; 最后 4 ℃ 保温 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 0.5 h 后, 紫外灯下观察结果, 并拍照。

从所采样本中选择 20 个高体细胞评分(somatic cell score, SCS)(5.85±1.22) 样本和 20 个低 SCS (1.02±0.05) 样本, 进行 PCR 扩增, PCR 扩增体系和程序如上所述。琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果, 送至上海生物公司正反测序。用 DNAMAN 软件对测序所得结果进行比对, 找出突变位点, 再对大样本采用飞行时间质谱法进行检测。

1.3 临床乳房炎发生次数的收集

奶牛临床乳房炎以看到明显的乳房红肿、触摸有疼痛感和硬块或呈豆腐样乳样等症状为判断条件, 以兽医治疗记录为准。如果某头奶牛在治愈后 10 d 内又发病, 则算 1 次病例; 治愈后 10 d 以上又发病的, 则算为新发病例。根据该原则记录每头奶牛 2010-01~2014-12 各胎次发生临床乳房炎的次数。

1.4 统计分析

1.4.1 遗传学分析

用遗传学软件 Shesis 进行常规群体遗传学统计分析, 包括基因频率、基因型频率、Hardy-Weinberg 平衡检测(Shi, He, 2005)。

1.4.2 SNP 对泌乳性状的影响

利用多因素方差分析法分析 *TLR1*-245 G>T 不同基因型对泌乳性状及乳中 SCS 的影响, 模型如下:

$$y = \mu + n + s + p + l + cs(p) + snp + e$$

其中: y 为测定日产奶量、乳脂率、乳蛋白率、乳糖、总固体、尿素氮(milk urea nitrogen, MUN)及 SCS 等性状的观察值; μ 为总体均值; n 为测试年度的固定效应; s 为测试季节的固定效应; p 为胎次的固定效应(从第 1 胎到第 3 胎); l 为泌乳阶段的固定效应, 分为 3 个阶段, 即产犊后 7~100 d、101~200 d 和 200~305 d; cs 为泌乳牛各胎次产犊季节效应; snp 为 *TLR1*-245 SNP 的固定效应; e 为残差效应。

采用 SPSS 软件(Ver 16.0)中一般线性模型(General Linear Model, GLM)完成, 并用 Duncan 法对不同基因型泌乳性状进行多重比较。据当地气候特点, 测试季节和产犊季节划分如下: 3~5 月为春季, 6~8 月为夏季, 9~11 月为秋季, 12 月~次年 2 月为冬季。

在进行数据关联分析时, 为保证结果的可靠性, 数据不完整的记录不纳入分析, 同时对 DHI 测定日记录进行限定: 泌乳时间为产后第 7 天到第 305 天, 测定日产奶量为 5~60 kg, 测定日乳脂率为 2%~6%, 测定日乳蛋白率为 2%~5%, 乳糖为 3%~6%, 总固体为 9%~18%, MUN 为 1~25 g/100 mL, 乳中体细胞数($\times 1000$ 个/mL)为 1~9 999。在进行统计分析时, 先将乳中 SCC 利用如下公式转换为 SCS:

$$SCS = \log_2(SCC/100) + 3$$

并四舍五入保留整数,保证SCS符合正态分布。分析数据详细性状见表1。

1.4.3 SNP位点对奶牛临床乳房炎的影响

由于各胎次临床乳房炎发病次数为偏态分布。因此用平方根法对临床乳房炎发病次数原始数据进行转换,使其符合正态分布。公式为:

$$Y = \sqrt{X + 1}$$

式中X为原临床乳房炎发病次数,Y为转换后的各胎次临床乳房炎发病次数。

对于转换后的临床乳房炎发病次数,用多因素方差分析模型分析TLR1-245 G>T不同基因型对奶牛临床乳房炎发生次数的影响,模型如下:

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

式中:Y为转换后的各胎次临床乳房炎发病次数的观察值, μ 为群体均值,P为胎次的固定效应,S为初产季节的固定效应,M为初产月龄的固定效应,G为TLR1-245 G>T的基因型效应,e为随机误差。根据当地气候特点,季节划分如前所述。由于部分牛只记录不完整,只选择同时具有1~3胎临床乳房炎发病次数记录的牛只进入分析。经筛选,最终有722头奶牛进入分析。

1.5 转录因子结合位点分析

根据TLR1基因5'端序列,用软件MatInspector在线进行转录因子结合位点分析(Cartharius et al., 2005)。

2 结果与分析

2.1 TLR1基因SNP筛查

TLR1基因-546~+122 bp范围内只发现一个SNP位点(G>T),该位点位于启动子区-245 bp处。该位点不同基因型测序图如图1所示。生物信息学分析表明,TLR1-245 G>T只有1个转录因子结合位点:TATA结合蛋白(TATA binding protein, TBP)。

2.2 TLR1基因大样本质谱分析结果的遗传学分析

TLR1-245 G>T位点基因型频率、基因频率及Hardy-Weinberg平衡检验结果见表2。TLR1-245优势基因型和优势基因分别GT和T,频率分别为0.487和0.584,其基因型分布处于Hardy-Weinberg平衡状态($P < 0.05$)。

2.3 TLR1-245 G>T与泌乳性状的关联分析

TLR1-245 G>T与日产奶量和SCS极显著相

表1 本研究泌乳性状及SCS的描述性统计量

Table 1 Descriptive statistics of the milking traits and SCS in this study

胎次 Parity	DHI记录数 Records number	TDMY/kg	FC/%	PC/%	SCS	LC/%	TS/%	MUN/(g·(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: 奶牛群体改良计划; TDMY: 测定日产奶量; FC: 乳脂率; PC: 乳蛋白率; SCS: 体细胞评分; LC: 乳糖; TS: 总固体; MUN: 尿素氮; 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; The same below

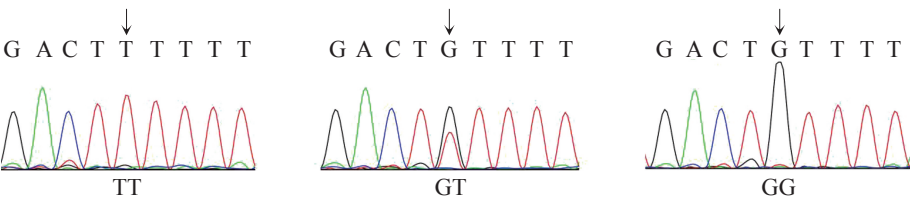


图1 TLR1-245位点3种不同基因型测序结果

Figure 1 The sequencing of 3 different genotypes for TLR1-245

箭头: 突变位点

Arrow: The mutation site

表 2 *TLR1*-245 位点基因频率、基因型频率及 Hardy-Weinberg 检验

Table 2 The genotype and allelic frequency, and values of χ^2 test significance for *TLR1*-245 in Chinese Holstein cows

SNPs	基因型 Genotype	基因型频率 Genotypic frequency	个体数 Number	等位基因 Allele	等位基因频率 Allelic frequency	平衡检验 χ^2 值 χ^2 value for Hardy-Weinberg test
<i>TLR1</i> -245	TT	0.340	293	T	0.584	0.001
	GT	0.487	419	G	0.416	
	GG	0.173	149			

表 3 中国荷斯坦牛 *TLR1*-245 G>T 不同基因型乳中 SCS 和泌乳性状

Table 3 The SCS and milking production traits of Chinese Holstein cows for different genotypes of *TLR1*-245 G>T

基因型 Genotype	DHI 记录数 DHI records number	TDMY/kg	FC/%	PC/%	SCS	LC/%	TS/%	MUN (g·(100 mL) ⁻¹)
GG	3262	31.44±0.19 ^c	4.23±0.01	3.34±0.01	2.09±0.03 ^a	4.95±0.00	13.75±0.02	12.07±0.06
GT	9957	32.23±0.11 ^b	4.25±0.01	3.35±0.00	2.03±0.02 ^b	4.95±0.00	13.77±0.01	12.16±0.03
TT	7185	32.56±0.13 ^a	4.25±0.01	3.35±0.00	2.00±0.02 ^b	4.95±0.00	13.78±0.02	12.23±0.04
方差分析 <i>F</i> 值 <i>F</i> value for ANOVA		13.387	0.876	2.422	4.895	0.081	0.989	0.723
方差分析 <i>P</i> 值 <i>P</i> value for ANOVA		0.000	0.425	0.087	0.008	0.922	0.365	0.489

不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 下同
Lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$), the same below

关($P<0.01$), 与乳蛋白率的相关接近显著水平($P=0.087$), 而与乳脂率、乳糖、总固体和尿素氮含量无显著相关($P>0.05$)(表 3)。多重比较结果表明, TT 型个体日产奶量极显著高于 GG 和 GT 型, 且 GT 型个体的日产奶量极显著高于 GG 型个体($P<0.01$), GG 型个体 SCS 显著高于 TT 和 GT 型($P<0.05$)。

2.4 奶牛临床乳房炎的发生情况

奶牛 1~3 胎内各胎次临床乳房炎发生详细情况见表 4。1 胎牛发生临床乳房炎相对较少, 99% 的奶牛(715 头)均没有临床乳房炎记录, 但 2 胎牛和 3 胎牛临床乳房炎发病率较高。34.60% 的 2 胎奶牛均患病至少 1 次以上, 3 胎奶牛患病至少 1 次的比例为 48.20%。如 1~3 胎综合计算, 仅有 39.5% 的奶牛没有临床乳房炎记录(285 头)。

2.5 *TLR1*-245 G>T 与临床乳房炎发生次数的关系

TLR1-245 G>T 不同基因型临床乳房炎发生次数见表 5。*TLR1*-245 G>T 与奶牛临床乳房炎发生次数有显著相关($P<0.05$)。多重比较表明, TT 型个体临床乳房炎发生次数(0.3269±0.002)显著低于 GG 和 GT 型个体(0.3773±0.004 和 0.4014±0.003)。

3 讨论

3.1 *TLR1* 基因 SNP 突变位点对泌乳性状和 SCS 的影响

TLRs 是近年来发现的天然免疫系统中的蛋白质分子, 是 *TLR*-白细胞介素 1 超家族的成员; 主要有两个功能: 识别病原体配体和信号传导天然免疫及适应性免疫应答(Charles et al., 2002)。因此, 在天然免疫和适应性免疫防御病原体中起着重要作用。其中 *TLR1* 和 *TLR4* 近几年成为人们的研究热点。

本研究首次发现 *TLR1* 基因 5'端近 700 bp 范围内-245 T>G 位点突变, 但没有发现 Russell 等(2012)对 *TLR1* 基因 5'端分析时所报道的-79 T>G 位点。Russell 等(2012)分析了 *TLR1* 基因 5 个 SNP 位点与临床乳房炎易感性的关系, 发现该基因 5'端-79 T>G 和 3'端 UTR 区+2 463 C>T 与乳房炎易感性有显著关联, -79 TT 和+2 463 TT 临床乳房炎发病率均显著低于该位点的杂合子和另一纯合子基因型($P<0.05$); 同时, 与 TT 和 TG 基因型相比, -79 GG 基因型个体 *TLR1* 基因表达量也较低。而李春苗等(2009)对 208 头中国荷斯坦牛 *TLR1* 基

表 4 奶牛 1~3 胎内发生临床乳房炎次数

Table 4 The numbers of the CM for cows from parity 1 to 3

临床乳房炎次数 The numbers of CM	1 胎 Parity 1		2 胎 Parity 2		3 胎 Parity 3		1~3 胎 Parity 1~3	
	样本量 Sample size	百分比/% Percent	样本量 Sample size	百分比/% Percent	样本量 Sample size	百分比/% Percent	样本量 Sample size	百分比/% Percent
0	715	99.00	472	65.40	374	51.80	285	39.50
1	5	0.70	173	24.00	190	26.30	177	24.50
2	2	0.30	44	6.10	78	10.80	111	15.40
3			20	2.80	40	5.50	67	9.30
4			12	1.70	19	2.60	30	4.20
5			1	0.10	15	2.10	23	3.20
6					3	0.40	17	2.40
7					3	0.40	4	0.60
8							3	0.40
9							2	0.30
10							3	0.40
合计 Total	722	100.0	722	100.0	722	100.0	722	100.0

表 5 *TLR1*-245 G>T 不同基因型奶牛患临床乳房炎发生次数

Table 5 The numbers of cows suffering from CM for different *TLR1*-245 G>T genotypes

基因型 Genotypes	样本量 Sample size	临床乳房炎发生次数 Numbers of CM
GG	114	0.3773±0.004 ^a
GT	348	0.4014±0.003 ^a
TT	250	0.3269±0.002 ^b
方差分析 <i>F</i> 值 <i>F</i> value for ANOVA		4.051
方差分析 <i>P</i> 值 <i>P</i> value for ANOVA		0.018

因 SNP 的关联分析表明, +1 596 A>G 显著影响乳中 SCC 含量, AA 型个体乳中具有较低 SCC。另外也发现临床乳房炎发病率较低的奶牛, 往往乳脂率和乳蛋白率均较高, 其原因可能是控制乳中酪蛋白含量的基因与牛 6 号染色体上 *TLR6*-*TLR1*-*TLR10* 族相距不到 28 Mb, 对乳成分的选择可能导致相邻的 *TLR1* 基因基因频率的改变, 从而对乳房炎易感性造成影响(Ogorevc et al., 2009)。本研究结果也有类似的趋势, *TLR1*-245 TT 型个体临床乳房炎发病次数均少于 GT 和 GG 型个体, 虽然 *TLR1*-245 G>T 突变与乳脂率和乳蛋白率无显著相关, 但是 TT 型个体奶牛乳脂率和乳蛋白率均高于 GG 型个体。在本研究中, *TLR1*-245 G>T 突变对日产奶量和乳中 SCS 均有显著影响; 该位点为

转录因子 TBP 结合位点。TBP 对启动很多基因转录有重要作用, 同时也为 RNA 聚合酶 I 和聚合酶 III 的重要组成部分, 对蛋白质表达有重要影响。因此, *TLR1*-245 G>T 的突变可能影响转录因子 TBP 的结合位点, 从而对相关基因的表达调控产生影响, 进而影响日产奶量和乳中 SCS 等性状。但要验证这一假设, 需要用双荧光素酶报告基因和凝胶迁移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)等手段对该位点突变后 *TLR1* 及上下游基因的表达进行检测。

3.2 *TLR1* 基因 SNP 突变位点与临床乳房炎的相关性

本研究中, *TLR1*-245 G>T 突变与 SCS 有显著相关, GG 型个体奶牛 SCS 显著高于 GT 和 TT 型个体, 同时与奶牛临床乳房炎发生次数也有显著相关, TT 型个体临床乳房炎发生次数均低于 GG 和 GT 型个体。总的来说, TT 基因型乳中 SCS 和患临床乳房炎次数均是最低的, 这可能是因为 *TLR1*-245 G>T 为转录因子 TBP 的结合位点, 而 TBP 主要结合在 T 碱基上, TBP 与 TATA box 结合后, 形成的构象有利于其与其他转录因子及 RNA 聚合酶的结合, 从而激活转录(黄雯, 王春新, 1996), 使 TBP 对 TT 型个体的调控强度大于对 GG 和 GT 型个体, 从而使 TT 型个体 *TLR1* 等免疫基因表达量较高, 以便对入侵的细菌进行调控, 以保证奶牛乳房健康。

4 结论

TLRI 基因是牛重要的免疫基因之一,在免疫识别、炎症反应等方面有重要作用。本研究通过利用 PCR 直接测序法对低 SCS 和高 SCS 各 20 个样本 *TLRI* 基因启动子区进行 SNP 筛查,将筛选到的 *TLRI*-245 G>T 利用飞行质谱法对 866 头中国荷斯坦牛进行检测,同时利用多因素方差分析法分析该位点突变与临床乳房炎发生情况、SCS 和泌乳性状等的相关性。结果表明, *TLRI*-245 G>T 与乳中 SCS 和日产奶量有极显著相关($P<0.01$), TT 型个体奶牛日产奶量显著高于其他基因型个体,并且其 SCS 显著低于 GG 型个体。 *TLRI*-245 G>T 突变与奶牛临床乳房炎发生次数有显著相关($P<0.05$), TT 型个体临床乳房炎次数显著低于 GG 和 GT 型个体。 *TLRI*-245 G>T 突变对中国荷斯坦牛乳中 SCS 和日产奶量及临床乳房炎发生次数有显著的遗传效应,可为相关性状分子标记辅助选择提供参考。

参考文献

- 黄雯,王春新. 1996. TATA box 结合蛋白-DNA 复合物的三维结构[J]. 生物化学与生物物理进展, 23(1): 16-18. (Huang W, Wang C X. 1996. Three-dimensional structure of TBP/TATA-box complex[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 23(1): 16-18.)
- 李春苗,石万海,储明星,等. 2009. 荷斯坦母牛 *TLRI* 基因多态性及其与体细胞评分关系[J]. 中国农业科学, 42(6): 2118-2125. (Li C M, Shi W H, Chu M X, et al. 2009. Polymorphisms of *TLRI* gene and their relationship with somatic cell score in Holstein cows[J]. Scientia Agricultura Sinica, 42(6): 2118-2125.)
- 王晓,解小莉,王胜,等. 2013. 中国荷斯坦牛乳房炎易感性及抗性的全基因组关联分析[J]. 畜牧兽医学报, 44(12): 1907-1912. (Wang X, Xie X L, Wang S, et al. 2013. Genome-wide association study for mastitis susceptibility and resistance in Chinese Holstein[J]. Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 44(12): 1907-1912.)
- 夏江东,程在全,吴渝生,等. 2006. 高等植物启动子功能和结构研究进展[J]. 云南农业大学学报, 21(1): 7-14. (Xia J D, Cheng Z Q, Wu Y S, et al. 2006. Advances of the studleson functionand composition of plant promoter [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 21(1): 7-14.)
- Abdel-Shafy H, Bortfeldt R H, Reissmann M et al. 2014a. Short communication: Validation of somatic cell score-associated loci identified in a genome-wide association study in German Holstein cattle[J]. Journal of Dairy Science, 97(4): 2481-2486.
- Abdel-Shafy H, Bortfeldt R H, Tetens J, et al. 2014b. Single nucleotide polymorphism and haplotype effects associated with somatic cell score in German Holstein cattle[J]. Genetics Selection Evolution, 46: 35.
- Banus H A, Vandebriel R J, Ruiter H, et al. 2006. Host genetics of *Bordetella pertussis* infection in mice: Significance of Toll like receptor 4 in genetic susceptibility and pathobiology[J]. Infection and Immunity, 74(5): 2596-2605.
- Boujenane I, Aimani J E, By K. 2015. Effects of clinical mastitis on reproductive and milk performance of Holstein cows in Morocco[J]. Tropical Animal Health and Production, 47(1): 207-211.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, et al. 2005. MatInspector and beyond: Promoter analysis based on transcription factor binding sites[J]. Bioinformatics, 21(13): 2933-2942.
- Chapinal N, Barrientos A K, Keyserlingk M A G et al. 2012. Herd-level risk factors for lameness in free-stall farms in the northeastern United States and California[J]. Journal of Dairy Science, 96(1): 318-328.
- Charles A, Janeway J, Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition[J]. Annual Review of Immunology, 20(1): 197-216.
- Emanuelson, Danell U B, Philipsson J. 1988. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell counts, and milk production estimated by multiple-trait restricted maximum likelihood[J]. Journal of Dairy Science, 71(2): 467-476.
- Elhaig M M, Selim A. 2014. Molecular and bacteriological investigation of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in domestic bovids from Ismailia, Egypt[J]. Tropical Animal Health and Production, 47(2): 271-276
- Jann O C, King A, Corrales N L, et al. 2009. Comparative genomics of Toll like receptor signalling in five species[J]. BMC Genomics, 10(1): 1-15.
- 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.
- Klungland H, Sabry A, Heringstad B, et al. 2001. Quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in dairy cattle[J]. Mammalian Genome, 12(11): 1-15.

- 837-842.
- Middleton J R, Saeman A, Fox L K, et al. 2014. The national mastitis council: A global organization for mastitis control and milk quality, 50 years and beyond[J]. *Journal of Mammary Gland Biology & Neoplasia*, 19(3-4): 241-251.
- Ogorevc J, Kunej T, Razpet A, et al. 2009. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis[J]. *Animal Genetics*, 40(6): 832-851.
- Rupp R, Biochard D. 1999. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, production, udder type traits, and milking ease in first lactation Holsteins[J]. *Journal of Dairy Science*, 82(10): 2198-2204.
- Russell C D, Widdison S, Leigh J A, et al. 2012. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine Toll-like receptor 1 gene and association with health traits in cattle[J]. *Veterinary Research*. 43: 17-28
- Sadeghi-Sefidmazgi A, Moradi-shahrbabak M, Nejati-Javaremi A. 2010. Financial losses associated with clinical mastitis and somatic cell score in Holstein dairy cattle [J]. *Animal*, 5: 33-42.
- Shi Y Y, He L. 2005. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci [J]. *Cell Research*. 15(2): 97-98.
- Shizuo A, Kiyoshi T, Tsuneyasu K. 2001. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity [J]. *Nature Immunology*, 2: 675-680.
- Strillacci M G, Frigo E, Schiavini F, et al. 2014. Genome-wide association study for somatic cell score in Valdostana Red Pied cattle breed using pooled DNA[J]. *BMC Genetics*, 15: 106.
- Takeda K, Akira S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity[B]. *Musuring Immunigy*, 17(1): 1-14.

(责任编辑 靳晓霞)