

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

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 江苏扬州 225009; ²江苏君乐宝乳业有限公司, 江苏徐州 221721)

摘要: 【目的】探讨中国荷斯坦牛 CXCR1 基因编码区 SNP 突变与临床乳房炎和生产寿命的相关性。【方法】根据 CXCR1 基因编码区序列, 利用 PCR-直接测序法对低 SCS 和高 SCS 样本各 20 个样本进行 SNP 筛查, 最后对所选择的 4 个 SNP 位点利用飞行质谱法对 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和生产寿命等信息, 利用多因素方差分析法、Logistic 回归、Cox 生存回归等方法分析以上 SNP 位点突变与临床乳房炎发生次数和生产寿命的相关性。【结果】CXCR1 基因编码区共发现 13 个 SNP 位点 (291 C>T、333 C>G、337 A>G、365 C>T、570 A>G、642 A>G、735 C>G、816 A>C、819 A>G、980 A>G、995 A>G、1008 C>T 和 1068 A>G), 分为 4 个连锁群, 随后从每个连锁群中各选择 1 个 SNP 位点 (642 A>G、816 A>C、980 A>G 和 1068 A>G), 利用飞行质谱法对大样本中国荷斯坦牛进行检测。4 个 SNP 位点共有 9 种单倍型, 其中单倍型 GAGG 频率最高 (0.3141), 而单倍型 ACAA 频率最低 (0.0017)。CXCR1-642 与 2 胎牛患临床乳房炎次数有显著相关 ($P < 0.05$), AG 基因型个体 2 胎奶牛患临床乳房炎次数显著高于 AA 基因型 ($P < 0.05$), CXCR1-816 AA 基因型个体 3 胎奶牛患临床乳房炎次数显著低于 AC 和 CC 基因型 ($P < 0.05$), 其它 SNP 位点与各胎次临床乳房炎发生次数均无显著相关 ($P > 0.05$)。CXCR1-816 与奶牛离群月龄有极显著相关 ($P < 0.01$), 与奶牛生产月龄和离群胎次有显著相关 ($P < 0.05$), CXCR1-816 AA 基因型个体生产月龄、离群月龄和离群胎次均显著高于 CC 基因型个体 ($P < 0.05$), 而其它 SNP 位点对生产月龄、离群月龄和离群胎次均无显著相关 ($P > 0.05$)。Cox 生存分析表明: 只有 CXCR1-816 位点与奶牛生存时间有显著相关 ($P < 0.05$), CXCR1-816 CC 基因型个体在各时间段的生存概率均低于 AA 和 AC 基因型个体。【结论】CXCR1-816 A>C 突变与中国荷斯坦牛患临床乳房炎次数和生产寿命有显著相关, 在进一步验证其功能后, 可用于中国荷斯坦牛生产寿命的分子标记辅助选择。

关键词: 中国荷斯坦牛; CXCR1; SNP; 临床乳房炎; 生产寿命

Association Between SNPs in the CDS Regions of CXCR1 Gene and the Clinical Mastitis and Lifetime for Chinese Holstein

WANG MengQi¹, NI Wei¹, ZHANG HuiMin¹, YANG ZhangPing¹, WANG XiPu², JIANG YanSen², MAO YongJiang^{1,2}

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

Abstract: 【Objective】The objective of this study was to investigate the association between the SNPs in the coding sequence (CDS) of CXCR1 gene and the clinical mastitis and lifetime for Chinese Holstein. 【Method】SNPs in the CDS of CXCR1 gene were screened by using PCR and direct sequencing for 20 cows with low SCS and 20 cows with high SCS. Finally, the selected SNPs of CXCR1 gene for 866 Chinese Holstein cows were detected using flight mass spectrometry. The clinical mastitis

收稿日期: 2016-07-25; 接受日期: 2017-04-01

基金项目: 国家自然科学基金 (31372286)、江苏省优势学科 (PAPD)、江苏省企业研究生工作站资助

联系方式: 王梦琦, E-mail: 770406499@qq.com。通信作者毛永江, E-mail: cattle@yzu.edu.cn

and productive life of tested cows were collected from the management system of dairy farm. The association between the SNPs and the clinical mastitis and productive life of tested cows was analyzed using multi factor variance analysis, Logistic regression, Cox regression. 【Result】 A total of 13 SNPs were found in the CDS region of *CXCR1* gene (291 C>T, 333 C>G, 337 A>G, 365 C>T, 570 A>G, 642 A>G, 735 C>G, 816 A>C, 819 A>G, 980 A>G, 995 A>G, 1008 C>T and 1068 A>G), and these SNPs were divided into 4 linkage groups, and four SNPs were selected from each linkage group for further analysis (642 A>G, 816 A>C, 980A>G and 1068 A>G). A total of 9 haplotypes were observed for 4 SNPs of *CXCR1* gene, the GAGG haplotype frequency was the highest (0.3141), and the frequency of haplotype ACAA was the lowest (0.0017). *CXCR1*-642 A>G showed a significant association with the number of dairy cows suffering from clinical mastitis in second lactation ($P<0.05$). The number of dairy cows suffering from clinical mastitis for individual with AG genotype was significantly higher than that of AA genotype ($P<0.05$). The number of dairy cows suffering from clinical mastitis for individual with *CXCR1*-816 AA genotype was significantly higher than that of AC and CC genotypes ($P<0.05$). The other SNPs showed no significant association with the number of clinical mastitis. *CXCR1*-816 A>C mutation showed an extremely significant association with culling age ($P<0.01$) and a significant association with productive month and culling lactation ($P<0.05$). The productive month, culling age and culling lactation for the individual of *CXCR1*-816 AA were significantly higher than that of CC genotype ($P<0.05$). Cox regression showed that only *CXCR1*-816 showed significant association with the productive life ($P<0.05$), the survival probability of individual with CC genotype was significantly lower than that of AA and AC genotype in each time period. 【Conclusion】The mutation of *CXCR1*-816 A>C showed significant association with the clinical mastitis and lifetime for Chinese Holstein, and this SNP could be used for molecular marker-assisted selection of productive life for Chinese Holstein when the molecular function of this mutation were proved.

Key words: Chinese Holstein; *CXCR1*; SNPs; clinical mastitis; productive lifetime

0 引言

【研究意义】乳房炎是奶牛最常见的疾病之一，也是造成奶牛业损失最严重的疾病^[1-2]。奶牛患乳房炎后导致奶品质降低、产奶量下降，甚至危害到消费者的健康。奶牛生产寿命是指奶牛从第1次产犊到死亡或者淘汰之间的时间，它能够反映奶牛避免被淘汰的能力。奶牛的生产寿命是一个重要的经济指标，它在增加牧场主的收入和育种方面有重要的作用。有研究表明：荷斯坦牛的生产寿命与终生产奶量呈显著正相关^[3]，奶牛的产奶胎次从第3胎提高到第4胎，其效益将增加11%—13%^[4]。奶牛生产寿命与生产性能、繁殖性能及健康状况等紧密相关，其中临床乳房炎是造成奶牛淘汰的主要原因之一。临床乳房炎的遗传力为0.03—0.2^[5]，奶牛生产寿命的遗传力为0.029—0.072^[6]。由于临床乳房炎和生产寿命的遗传力均较低，直接选择很难获得理想的遗传进展。因此，结合分子标记辅助选择技术对乳房炎和生产寿命的研究越来越受到关注。【前人研究进展】趋化因子受体1 (chemokine receptor 1, *CXCR1*)属于G蛋白偶联受体的家族成员，目前至少有两种不同的类型(*CXCR1*和*CXCR2*)^[7]。I型受体(*CXCR1*)特异性地与白细胞介素-8 (Interleukin-8, *IL8*)结合，主要分布于中性粒细胞、单核细胞和G细胞；II型受体(*CXCR2*)除了与*IL8*结合外，还可以和生长调节癌基因 (Growth-regulated

oncogene, *GRO*)、巨噬细胞炎性蛋白22 (Macrophage inflammatory protein-2, *MIP-2*)和中性粒细胞激活蛋白-2 (Neutrophil activating protein-2, *NAP-2*)等结合，*CXCR2*主要分布于中性粒细胞和髓样前体细胞系。*CXCR1*和*CXCR2*均具有介导活化中性粒细胞的作用，可促进中性粒细胞脱颗粒、释放贮存酶，增强中性粒细胞的吞噬功能，启动超氧离子释放，导致机体局部炎症反应，达到杀灭病原菌的目的^[8-9]。大量研究表明：*IL8*和*CXCR1*基因及其突变与奶牛乳房均存在一定的关系^[10-16]。周雷等^[17]通过对中国荷斯坦奶牛*CXCR1*基因外显子2进行多态性分析发现4个突变位点291 C>T、333 C>T、337 A>G和365 C>T，并且发现CCCTGGCC基因型组合个体具有低SCS和高产奶量的优势。奶牛的生产寿命与牛场的生产性能、饲养管理、日粮配合、环境、季节、其它疾病等非遗传因素有一定关系^[18]，同时与遗传也有一定关系^[19-20]。近年来，国内外围绕影响奶牛生产寿命的分子标记进行了部分研究，发现了部分有价值的结果。ASHWELL等^[21-22]分别在奶牛第2、12、16、21、23号染色体上发现了与其生产寿命相关的微卫星；HEYEN等^[23]在*BTA21*上发现了长度为85 cM的微卫星*ILSTS054*；KHATIB^[19-20]、KOMISAREK等^[24]、JOHN等^[25]又发现了ATP结合盒子亚家族G成员(ATP-binding cassette sub-family G member 2, *ABCG2*)、过氧化物酶体增殖物增殖受体 γ 辅激活因子(Peroxisome

proliferators-activated receptor- γ coactivator 1 A, *PPARGC1A*)、氧化低密度脂蛋白受体 1 (Oxidized low-density lipoprotein receptor 1, *OLR1*) 和硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 (stearoyl-CoA desaturase 1, *SCD1*) 与生产寿命有一定程度的相关性。CHEBEL 等^[26]发现 Leptin 基因 R4C 位点与奶牛生产寿命相关疾病的发生显著相关, TT 基因型个体真胃变位的发生率较高, 而 CT 型各种疾病的发病率最低。【本研究切入点】国内周雷等^[17]、徐敏等^[27]和官永强等^[28]检测了中国荷斯坦牛 CXCR1 基因部分编码区 (coding sequence, CDS) 序列 SNP 多态性, 并与泌乳性状进行了关联分析, 但尚未见对 CXCR1 基因整个 CDS 区 SNP 检测的报告, 也未见 CXCR1 基因 CDS 区 SNP 多态与临床乳房炎和生产寿命相关分析的报道。【拟解决的关键问题】本研究的目的是在检测中国荷斯坦牛 CXCR1 基因 CDS 区所有 SNP 突变基础上, 同时分析 SNP 多态与临床乳房炎和生存寿命的相关性, 以期为中国荷斯坦牛临床乳房炎及生产寿命的分子标记辅助选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2011 年 7—8 月于江苏省某大型奶牛场随机采集中国荷斯坦牛血样共 866 头。采用尾静脉采血 (10 mL/头), ACD 抗凝, -20℃ 冷冻保存备用。牧场基本情况如下: 全场共有奶牛 10 000 余头, 其中成年泌乳奶牛近 6 000 头, 散栏饲养, 鱼骨式挤奶大厅进行挤奶, 日挤奶三次, 采用全混合日粮 (Total Mixed Ration, TMR) 饲喂。

1.2 DNA 提取及 CXCR1 基因 CDS 区 SNP 突变检测

奶牛血液基因组 DNA 采用常规酚氯仿提取法, TE 溶解, 取部分 DNA 样品稀释至 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, -20℃ 保存备用。

根据 GenBank 公布的牛 CXCR1 基因 CDS 区序列 (登录号: NM_001105038.1), 用 Primer 5.0 软件设计引物 1 对如下: F: ATGACAATCATCCTGAAAGA, R: TCAGAGGGTAGTAGACGTGT。扩增产物长度为 1 082 bp, PCR 扩增体系如下: 总体积 20 μL , 其中包括 $10 \times \text{buffer}$ 2.0 μL , $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ 1.5 μL , dNTP ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.5 μL , Taq DNA 聚合酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.3 μL , 上下游引物各 ($10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1.0 μL , 模板 DNA ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1.0 μL , ddH₂O 12.7 μL 。扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 40 s, 56℃

复性 40 s, 72℃ 延伸 10 min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶 (0.05% EB) 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 SCS 样本 (5.85 ± 1.22) 和 20 个低 SCS 样本 (1.02 ± 0.05), 进行常规 PCR 扩增, 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。用 DNAMAN 软件对测序所得结果进行比对, 寻找突变位点, 并初步计算各基因各位点连锁程度。

经对 40 个样本的初步分析, CXCR1 基因 CDS 区共发现 13 个 SNP 位点, 分为 4 个连锁群, 故从 4 个连锁群中各选择 1 个 SNP 位点进行后续分析, 分别是: 642 A>G、816 A>C、980 A>G 和 1068 A>G 4 个 SNP 位点。对大样本 CXCR1 SNP 突变检测采用飞行时间质谱法 (MassARRAY® MALDI-TOF System, Sequenom, Inc., USA)。同时, 为保证 SNP 分析结果可靠性, 其中 40 个样本重复测定 2 次 (测试员并不知道这个 40 个是重复样本)。结果表明该方法 SNP 分型结果准确性为 100%。

1.3 临床乳房炎发生次数和生产寿命相关数据的收集

奶牛临床乳房炎以可以看到明显的乳房红肿、触摸有疼痛感和硬块或乳样呈豆腐样等症状为判断条件, 以兽医治疗记录为准。如果某奶牛在治愈后 10d 内又发病, 则算一次病例; 治愈后 10d 以上又发病的, 则算为新发病例。根据该原则记录每头奶牛从 2010 年 1 月到 2014 年 12 月共 5 年内各胎次发生临床乳房炎的次数。

根据采样牛只的出生时间、第一胎产犊时间、淘汰时间和胎次等信息, 计算出初产月龄、生产月龄 (或在群月龄)、离群月龄、离群胎次等信息, 作为生产寿命相关指标, 进行统计分析。

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 平衡检测等), 同时进行连锁不平衡分析^[29]。

1.4.2 关联分析 用多因素方差分析模型分析 CXCR1 基因 CDS 区各 SNP 位点不同基因型与奶牛各胎次临床乳房炎次数和生产寿命相关指标的相关性, 模型如下:

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

式中： Y 为各胎次临床乳房炎次数和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， M 为初产月龄的效应值， G 的基因型或单倍型的效应值， e 为随机误差。根据当地气候特点，初产季节划分如下：3—5 月为春季，6—8 月为夏季，9—11 月为秋季，12 月至次年 2 月为冬季。

由于部分牛只记录不完整，只选择同时具有 1—3 胎临床乳房炎记录的牛只进入方差分析。经筛选，最终有 721 头奶牛用于分析。对于生产寿命相关指标，只选择已淘汰，且同时具有出生、产犊等相关信息的牛只进行分析。经筛选，最终有 647 头奶牛用于分析。

1.4.3 生产寿命的生存分析 用 Cox 回归模型计算 CXCR1 基因 CDS 区各 SNP 位点不同基因型对生产寿命相关指标的影响，并制作生存曲线，由统计软件 SPSS（Ver 16.0）完成，模型如下：

$$h(t/X)=h_0(t) \exp (\beta_1 X_1+\beta_2 X_2+\beta_3 X_3+\beta_4 X_4)$$

式中：

$h_0(t)$ ：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 、 X_3 和 X_4 ：各 SNP 位点变量

β_1 、 β_2 、 β_3 和 β_4 ：各 SNP 位点变量的回归系数

2 结果

2.1 CXCR1 基因 CDS 区 SNP 筛查

通过对 20 头高 SCS 和低 SCS 奶牛用所设计的引物 PCR 扩增并测序，发现 CXCR1 基因 CDS 区共发现 13 个 SNP 位点，详细见表 1。经连锁分析，13 个 SNP 位点分为 4 个连锁群（图 1），故从 4 个连锁群中各选择 1 个 SNP 位点进行后续分析，分别是：642 A>G、816 A>C、980 A>G 和 1068 A>G 4 个 SNP 位点。

另外，由于 CXCR1 基因 SNP 的变化均发生在 CDS 区，因此 SNP 的变化可能导致所编码氨基酸的变化。根据 CXCR1 基因 CDS 区 SNP 导致氨基酸变化情况，制作各位点氨基酸变化情况如图 2 所示。CXCR1 基因 CDS 区共有 5 个非同义突变，I113V、K327R 和 H332R 3 个非同义突变是完全连锁的，属于如前所述第 2 个连锁群，V122A 和 H245Q 属于第 1 连锁群。第 3、4 两个连锁群均是同义突变，不导致氨基酸的变化。2 个非同义突变连锁群可以组成 4 种氨基酸单倍型。

2.2 基因（型）频率分布及连锁不平衡分析

利用飞行质谱法对 866 头奶牛群体 CXCR1 基因

表 1 CXCR1 基因 CDS 区 SNPs

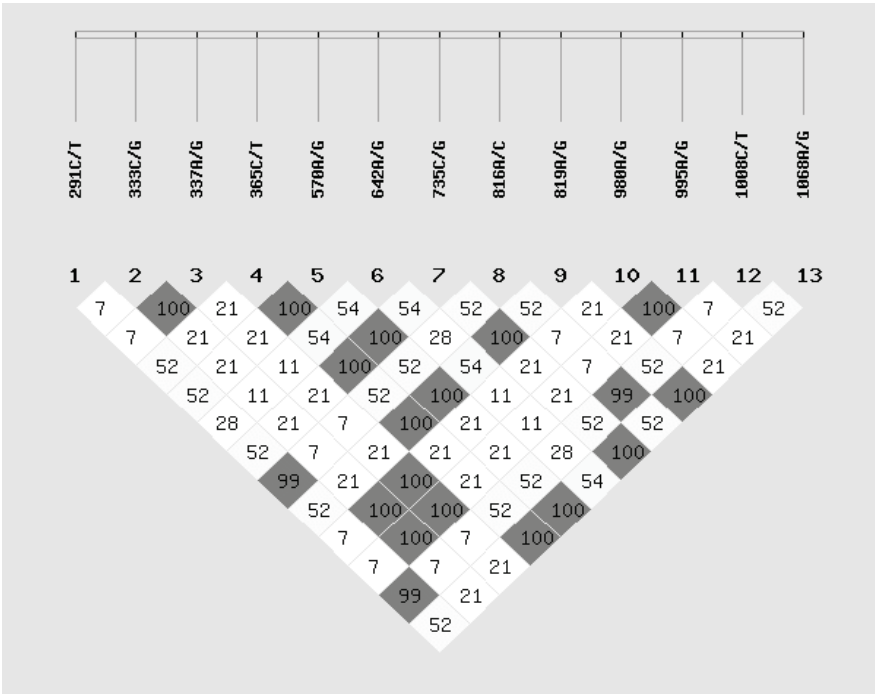
Table 1 The SNPs in the CDS of CXCR1 gene

CDS 区位置 <i>CXCR1</i> SNP position	碱基变化 Nucleotide change	氨基酸变化 AA change	连锁群 Linkage group	备注 Memo.
291	C>T		3	
333	C>G		2	新突变 new mutation
337	A>G	I113V	2	新突变 new mutation
365	T>C	V122A	1	
570	G>A		1	
642	A>G		4	新突变 new mutation
735	C>G	H245Q	1	
816	C>A		3	
819	G>A		1	
980	A>G	K327R	2	
995	A>G	H332R	2	
1008	C>T		3	
1068	A>G		1	

CDS 区 4 个 SNP 位点进行分型，所得基因频率、基因型频率分布及 Hardy-Weinberg 平衡检验结果见表 2。*CXCR1*-642、*CXCR1*-816、*CXCR1*-980 和 *CXCR1*-1068 4 个 SNP 位点优势基因型分别为 GG、CC、GG 和 GG 型，频率分别为 0.580、0.466、0.607 和 0.658，优势基因分别为 G、C、G 和 G，频率分别为 0.758、0.688、0.784 和 0.811。经分析，CXCR1 基因 4 个 SNP 位点均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。另外，CXCR1 基因 4 个 SNP 位点共有 9 种单倍型（表 3），其中单倍型 GAGG 频率最高（0.3141），而单倍型 ACAA 频率最低（0.0017）。

2.3 CXCR1 基因不同 SNP 位点临床乳房炎发病次数

CXCR1 基因不同 SNP 位点各胎次临床乳房炎发生次数见表 4。由表 4 可知：随着胎次增加，奶牛患临床乳房炎发生次数增加较快：1、2、3 胎及 1—3 胎共计发生临床乳房炎的平均次数分别为 0.01±0.01、0.52±0.03、0.91±0.05 和 1.44±0.07。*CXCR1*-642 与 2 胎牛、*CXCR1*-816 与 3 胎牛临床乳房炎发生次数有显著相关（ $P<0.05$ ），其它 SNP 位点与各胎次临床乳房炎发生次数均无显著相关（ $P>0.05$ ）。多重比较表明：2 胎牛 *CXCR1*-642 AG 基因型个体临床乳房炎发生次数（0.61±0.06）显著高于 AA 型（0.33±0.09），



图中数字为连锁不平衡系数 (r^2)，深色表示连锁不平衡系数较高，浅色表示连锁不平衡系数较低
The number in the map was the disequilibrium r^2 . The dark colour indicates high r^2 , and the light colour indicates low r^2

图 1 40 个个体 CXCR1 基因 CDS 区 SNP 位点连锁图

Fig. 1 The linkage map of SNP in the CDS of CXCR1 gene for 40 Holstein cows

表 2 CXCR1 基因 CDS 区 4 个 SNP 位点等位基因、基因型频率及 H-W 平衡检验

Table 2 The genotypic frequencies, alleles, and values of χ^2 test significance for 4 SNP in the CDS of CXCR1 gene

SNPs 或单倍型 SNPs or haplotypes	基因型 Genotype	基因型频率 Genotypic frequency	个体数 No.	等位基因 Alleles	基因频率 Allelic frequency	平衡检验 χ^2 值 χ^2 value for H-W test
CXCR1-642	AA	0.064	55	A	0.242	0.698
	AG	0.356	308	G	0.758	
	GG	0.580	502			
CXCR1-816	AA	0.089	77	A	0.312	1.219
	AC	0.445	385	C	0.688	
	CC	0.466	403			
CXCR1-980	AA	0.038	33	A	0.216	2.023
	AG	0.355	305	G	0.784	
	GG	0.607	521			
CXCR1-1068	AA	0.036	31	A	0.189	0.001
	AG	0.306	265	G	0.811	
	GG	0.658	569			

3 胎牛 CXCR1-816 AA 基因型个体临床乳房炎发生次数 (0.55 ± 0.10) 显著低于 AC 和 CC 型个体 (0.99 ± 0.08 和 0.90 ± 0.07)。

2.4 CXCR1 基因不同 SNP 位点的生产寿命

在本研究中，结合奶牛出生、初产季节、初产月龄、淘汰日期等信息，用生产月龄、离群月龄和离群

CXCR1-CDS-TRANSLATION-AA	MTIILKDLNSSSYLWEGFEDEFENYSGTPPTEDYDYSPREISTETLNKYAVVVVYALVFLLSLGNSLVMVLVILYSRIGR	80
CXCR1-CDS-TRANSLATION-291-T	MTIILKDLNSSSYLWEGFEDEFENYSGTPPTEDYDYSPREISTETLNKYAVVVVYALVFLLSLGNSLVMVLVILYSRIGR	80
CXCR1-CDS-TRANSLATION-333-G	MTIILKDLNSSSYLWEGFEDEFENYSGTPPTEDYDYSPREISTETLNKYAVVVVYALVFLLSLGNSLVMVLVILYSRIGR	80
CXCR1-CDS-TRANSLATION-337-G	MTIILKDLNSSSYLWEGFEDEFENYSGTPPTEDYDYSPREISTETLNKYAVVVVYALVFLLSLGNSLVMVLVILYSRIGR	80
CXCR1-CDS-TRANSLATION-365-T	MTIILKDLNSSSYLWEGFEDEFENYSGTPPTEDYDYSPREISTETLNKYAVVVVYALVFLLSLGNSLVMVLVILYSRIGR	80
CXCR1-CDS-TRANSLATION-370-G	MTIILKDLNSSSYLWEGFEDEFENYSGTPPTEDYDYSPREISTETLNKYAVVVVYALVFLLSLGNSLVMVLVILYSRIGR	80
CXCR1-CDS-TRANSLATION-642-G	MTIILKDLNSSSYLWEGFEDEFENYSGTPPTEDYDYSPREISTETLNKYAVVVVYALVFLLSLGNSLVMVLVILYSRIGR	80
CXCR1-CDS-TRANSLATION-735-C	MTIILKDLNSSSYLWEGFEDEFENYSGTPPTEDYDYSPREISTETLNKYAVVVVYALVFLLSLGNSLVMVLVILYSRIGR	80
CXCR1-CDS-TRANSLATION-816-A	MTIILKDLNSSSYLWEGFEDEFENYSGTPPTEDYDYSPREISTETLNKYAVVVVYALVFLLSLGNSLVMVLVILYSRIGR	80
CXCR1-CDS-TRANSLATION-819-G	MTIILKDLNSSSYLWEGFEDEFENYSGTPPTEDYDYSPREISTETLNKYAVVVVYALVFLLSLGNSLVMVLVILYSRIGR	80
CXCR1-CDS-TRANSLATION-980-A	MTIILKDLNSSSYLWEGFEDEFENYSGTPPTEDYDYSPREISTETLNKYAVVVVYALVFLLSLGNSLVMVLVILYSRIGR	80
CXCR1-CDS-TRANSLATION-995-A	MTIILKDLNSSSYLWEGFEDEFENYSGTPPTEDYDYSPREISTETLNKYAVVVVYALVFLLSLGNSLVMVLVILYSRIGR	80
CXCR1-CDS-TRANSLATION-1008-T	MTIILKDLNSSSYLWEGFEDEFENYSGTPPTEDYDYSPREISTETLNKYAVVVVYALVFLLSLGNSLVMVLVILYSRIGR	80
CXCR1-CDS-TRANSLATION-1068-A	MTIILKDLNSSSYLWEGFEDEFENYSGTPPTEDYDYSPREISTETLNKYAVVVVYALVFLLSLGNSLVMVLVILYSRIGR	80
Consensus	mtiilkdlnsssylwegfedefenysgtpptedydyspreistetlnkyavvvviyalvfllslgnslvmvlvilysrigr	
II13V VI22A		
CXCR1-CDS-TRANSLATION-AA	SVDVYLLNLAMADLLFAMTLPIWAASKAKGWI FGTPLCKVA SLLKEVNFYSGILLACISMDRYLAIVHATRTLTQKRH	160
CXCR1-CDS-TRANSLATION-291-T	SVDVYLLNLAMADLLFAMTLPIWAASKAKGWI FGTPLCKVA SLLKEVNFYSGILLACISMDRYLAIVHATRTLTQKRH	160
CXCR1-CDS-TRANSLATION-333-G	SVDVYLLNLAMADLLFAMTLPIWAASKAKGWI FGTPLCKVA SLLKEVNFYSGILLACISMDRYLAIVHATRTLTQKRH	160
CXCR1-CDS-TRANSLATION-337-G	SVDVYLLNLAMADLLFAMTLPIWAASKAKGWI FGTPLCKVA SLLKEVNFYSGILLACISMDRYLAIVHATRTLTQKRH	160
CXCR1-CDS-TRANSLATION-365-T	SVDVYLLNLAMADLLFAMTLPIWAASKAKGWI FGTPLCKVA SLLKEVNFYSGILLACISMDRYLAIVHATRTLTQKRH	160
CXCR1-CDS-TRANSLATION-370-G	SVDVYLLNLAMADLLFAMTLPIWAASKAKGWI FGTPLCKVA SLLKEVNFYSGILLACISMDRYLAIVHATRTLTQKRH	160
CXCR1-CDS-TRANSLATION-642-G	SVDVYLLNLAMADLLFAMTLPIWAASKAKGWI FGTPLCKVA SLLKEVNFYSGILLACISMDRYLAIVHATRTLTQKRH	160
CXCR1-CDS-TRANSLATION-735-C	SVDVYLLNLAMADLLFAMTLPIWAASKAKGWI FGTPLCKVA SLLKEVNFYSGILLACISMDRYLAIVHATRTLTQKRH	160
CXCR1-CDS-TRANSLATION-816-A	SVDVYLLNLAMADLLFAMTLPIWAASKAKGWI FGTPLCKVA SLLKEVNFYSGILLACISMDRYLAIVHATRTLTQKRH	160
CXCR1-CDS-TRANSLATION-819-G	SVDVYLLNLAMADLLFAMTLPIWAASKAKGWI FGTPLCKVA SLLKEVNFYSGILLACISMDRYLAIVHATRTLTQKRH	160
CXCR1-CDS-TRANSLATION-980-A	SVDVYLLNLAMADLLFAMTLPIWAASKAKGWI FGTPLCKVA SLLKEVNFYSGILLACISMDRYLAIVHATRTLTQKRH	160
CXCR1-CDS-TRANSLATION-995-A	SVDVYLLNLAMADLLFAMTLPIWAASKAKGWI FGTPLCKVA SLLKEVNFYSGILLACISMDRYLAIVHATRTLTQKRH	160
CXCR1-CDS-TRANSLATION-1008-T	SVDVYLLNLAMADLLFAMTLPIWAASKAKGWI FGTPLCKVA SLLKEVNFYSGILLACISMDRYLAIVHATRTLTQKRH	160
CXCR1-CDS-TRANSLATION-1068-A	SVDVYLLNLAMADLLFAMTLPIWAASKAKGWI FGTPLCKVA SLLKEVNFYSGILLACISMDRYLAIVHATRTLTQKRH	160
Consensus	svcdvyllnlamadllfamt lpiwaaskakgw fgtplckv sllkevnfy sgilllacismdrylaivhatrtltqkrh	
CXCR1-CDS-TRANSLATION-AA	WVKFICLGIWALSIVILALPIFIFREAYQPPYSDELVCYEDLGANTTKWRMIMRVLPQTFGFLPLLVMFLFCYGFILRTLFS	240
CXCR1-CDS-TRANSLATION-291-T	WVKFICLGIWALSIVILALPIFIFREAYQPPYSDELVCYEDLGANTTKWRMIMRVLPQTFGFLPLLVMFLFCYGFILRTLFS	240
CXCR1-CDS-TRANSLATION-333-G	WVKFICLGIWALSIVILALPIFIFREAYQPPYSDELVCYEDLGANTTKWRMIMRVLPQTFGFLPLLVMFLFCYGFILRTLFS	240
CXCR1-CDS-TRANSLATION-337-G	WVKFICLGIWALSIVILALPIFIFREAYQPPYSDELVCYEDLGANTTKWRMIMRVLPQTFGFLPLLVMFLFCYGFILRTLFS	240
CXCR1-CDS-TRANSLATION-365-T	WVKFICLGIWALSIVILALPIFIFREAYQPPYSDELVCYEDLGANTTKWRMIMRVLPQTFGFLPLLVMFLFCYGFILRTLFS	240
CXCR1-CDS-TRANSLATION-370-G	WVKFICLGIWALSIVILALPIFIFREAYQPPYSDELVCYEDLGANTTKWRMIMRVLPQTFGFLPLLVMFLFCYGFILRTLFS	240
CXCR1-CDS-TRANSLATION-642-G	WVKFICLGIWALSIVILALPIFIFREAYQPPYSDELVCYEDLGANTTKWRMIMRVLPQTFGFLPLLVMFLFCYGFILRTLFS	240
CXCR1-CDS-TRANSLATION-735-C	WVKFICLGIWALSIVILALPIFIFREAYQPPYSDELVCYEDLGANTTKWRMIMRVLPQTFGFLPLLVMFLFCYGFILRTLFS	240
CXCR1-CDS-TRANSLATION-816-A	WVKFICLGIWALSIVILALPIFIFREAYQPPYSDELVCYEDLGANTTKWRMIMRVLPQTFGFLPLLVMFLFCYGFILRTLFS	240
CXCR1-CDS-TRANSLATION-819-G	WVKFICLGIWALSIVILALPIFIFREAYQPPYSDELVCYEDLGANTTKWRMIMRVLPQTFGFLPLLVMFLFCYGFILRTLFS	240
CXCR1-CDS-TRANSLATION-980-A	WVKFICLGIWALSIVILALPIFIFREAYQPPYSDELVCYEDLGANTTKWRMIMRVLPQTFGFLPLLVMFLFCYGFILRTLFS	240
CXCR1-CDS-TRANSLATION-995-A	WVKFICLGIWALSIVILALPIFIFREAYQPPYSDELVCYEDLGANTTKWRMIMRVLPQTFGFLPLLVMFLFCYGFILRTLFS	240
CXCR1-CDS-TRANSLATION-1008-T	WVKFICLGIWALSIVILALPIFIFREAYQPPYSDELVCYEDLGANTTKWRMIMRVLPQTFGFLPLLVMFLFCYGFILRTLFS	240
CXCR1-CDS-TRANSLATION-1068-A	WVKFICLGIWALSIVILALPIFIFREAYQPPYSDELVCYEDLGANTTKWRMIMRVLPQTFGFLPLLVMFLFCYGFILRTLFS	240
Consensus	wvkficlgiwalsvialalpififreayqppysdelvcyedlganttkwrmimrvlpqtfgflpllvmflfcygfiltlrlfs	
H245Q		
CXCR1-CDS-TRANSLATION-AA	AQMGC KHRAMRVIFAVVLVFLLCWLPYNLVIADTLMRAHVIAETCQRRNDIGRALDATEILGFLHSCNPLIYVFIGQK	320
CXCR1-CDS-TRANSLATION-291-T	AQMGC KHRAMRVIFAVVLVFLLCWLPYNLVIADTLMRAHVIAETCQRRNDIGRALDATEILGFLHSCNPLIYVFIGQK	320
CXCR1-CDS-TRANSLATION-333-G	AQMGC KHRAMRVIFAVVLVFLLCWLPYNLVIADTLMRAHVIAETCQRRNDIGRALDATEILGFLHSCNPLIYVFIGQK	320
CXCR1-CDS-TRANSLATION-337-G	AQMGC KHRAMRVIFAVVLVFLLCWLPYNLVIADTLMRAHVIAETCQRRNDIGRALDATEILGFLHSCNPLIYVFIGQK	320
CXCR1-CDS-TRANSLATION-365-T	AQMGC KHRAMRVIFAVVLVFLLCWLPYNLVIADTLMRAHVIAETCQRRNDIGRALDATEILGFLHSCNPLIYVFIGQK	320
CXCR1-CDS-TRANSLATION-370-G	AQMGC KHRAMRVIFAVVLVFLLCWLPYNLVIADTLMRAHVIAETCQRRNDIGRALDATEILGFLHSCNPLIYVFIGQK	320
CXCR1-CDS-TRANSLATION-642-G	AQMGC KHRAMRVIFAVVLVFLLCWLPYNLVIADTLMRAHVIAETCQRRNDIGRALDATEILGFLHSCNPLIYVFIGQK	320
CXCR1-CDS-TRANSLATION-735-C	AQMGC KHRAMRVIFAVVLVFLLCWLPYNLVIADTLMRAHVIAETCQRRNDIGRALDATEILGFLHSCNPLIYVFIGQK	320
CXCR1-CDS-TRANSLATION-816-A	AQMGC KHRAMRVIFAVVLVFLLCWLPYNLVIADTLMRAHVIAETCQRRNDIGRALDATEILGFLHSCNPLIYVFIGQK	320
CXCR1-CDS-TRANSLATION-819-G	AQMGC KHRAMRVIFAVVLVFLLCWLPYNLVIADTLMRAHVIAETCQRRNDIGRALDATEILGFLHSCNPLIYVFIGQK	320
CXCR1-CDS-TRANSLATION-980-A	AQMGC KHRAMRVIFAVVLVFLLCWLPYNLVIADTLMRAHVIAETCQRRNDIGRALDATEILGFLHSCNPLIYVFIGQK	320
CXCR1-CDS-TRANSLATION-995-A	AQMGC KHRAMRVIFAVVLVFLLCWLPYNLVIADTLMRAHVIAETCQRRNDIGRALDATEILGFLHSCNPLIYVFIGQK	320
CXCR1-CDS-TRANSLATION-1008-T	AQMGC KHRAMRVIFAVVLVFLLCWLPYNLVIADTLMRAHVIAETCQRRNDIGRALDATEILGFLHSCNPLIYVFIGQK	320
CXCR1-CDS-TRANSLATION-1068-A	AQMGC KHRAMRVIFAVVLVFLLCWLPYNLVIADTLMRAHVIAETCQRRNDIGRALDATEILGFLHSCNPLIYVFIGQK	320
Consensus	aqmgc khramrvifavvlvfl lclwlpynlviadt lmravhiaet cqrrndigr aldateilgflhscnpliyvfigqk	
K327R H332R		
CXCR1-CDS-TRANSLATION-AA	FRHGLLRIMAIRGLISKEFLAKDGRPSFVGSSSGNTSTT	359
CXCR1-CDS-TRANSLATION-291-T	FRHGLLRIMAIRGLISKEFLAKDGRPSFVGSSSGNTSTT	359
CXCR1-CDS-TRANSLATION-333-G	FRHGLLRIMAIRGLISKEFLAKDGRPSFVGSSSGNTSTT	359
CXCR1-CDS-TRANSLATION-337-G	FRHGLLRIMAIRGLISKEFLAKDGRPSFVGSSSGNTSTT	359
CXCR1-CDS-TRANSLATION-365-T	FRHGLLRIMAIRGLISKEFLAKDGRPSFVGSSSGNTSTT	359
CXCR1-CDS-TRANSLATION-370-G	FRHGLLRIMAIRGLISKEFLAKDGRPSFVGSSSGNTSTT	359
CXCR1-CDS-TRANSLATION-642-G	FRHGLLRIMAIRGLISKEFLAKDGRPSFVGSSSGNTSTT	359
CXCR1-CDS-TRANSLATION-735-C	FRHGLLRIMAIRGLISKEFLAKDGRPSFVGSSSGNTSTT	359
CXCR1-CDS-TRANSLATION-816-A	FRHGLLRIMAIRGLISKEFLAKDGRPSFVGSSSGNTSTT	359
CXCR1-CDS-TRANSLATION-819-G	FRHGLLRIMAIRGLISKEFLAKDGRPSFVGSSSGNTSTT	359
CXCR1-CDS-TRANSLATION-980-A	FRHGLLRIMAIRGLISKEFLAKDGRPSFVGSSSGNTSTT	359
CXCR1-CDS-TRANSLATION-995-A	FRHGLLRIMAIRGLISKEFLAKDGRPSFVGSSSGNTSTT	359
CXCR1-CDS-TRANSLATION-1008-T	FRHGLLRIMAIRGLISKEFLAKDGRPSFVGSSSGNTSTT	359
CXCR1-CDS-TRANSLATION-1068-A	FRHGLLRIMAIRGLISKEFLAKDGRPSFVGSSSGNTSTT	359
Consensus	frhgl l rimai r gliskeflakdgrpsfv gsssgntstt	

图2 CXCR1 基因 CDS 区 AA 变化图

Fig. 2 The change of AA in the CDS of CXCR1 gene

表 3 CXCR1 基因 4 个 SNP 位点单倍型频率
Table 3 The haplotypes frequencies of 4 SNP, in the CDS of CXCR1 gene

单倍型 Haplotypes	CXCR1-642	CXCR1-816	CXCR1-980	CXCR1-1068	数量 N	频率 Frequencies
1	G	A	G	G	544	0.3141
2	G	C	G	G	318	0.1835
3	G	C	A	G	307	0.1773
4	A	C	G	A	188	0.1085
5	A	C	G	G	180	0.1041
6	G	C	G	A	126	0.0728
7	A	C	A	G	41	0.0235
8	G	A	A	G	25	0.0145
9	A	C	A	A	3	0.0017

表 4 CXCR1 基因不同 SNP 位点各胎次临床乳房炎发生次数
Table 4 The number of CM for SNPs of CXCR1 of different parities

SNPs	基因型 Genotypes	样本量 N	1 胎 Pairty-1	2 胎 Pairty-2	3 胎 Pairty-3	1—3 胎合计 Parity 1 to 3
CXCR1-642	A A	46	0.02±0.02	0.33±0.09 ^b	0.89±0.20	1.24±0.24
	A G	251	0.02±0.01	0.61±0.06 ^a	0.94±0.09	1.57±0.13
	G G	424	0.00±0.00	0.48±0.04 ^{ab}	0.89±0.06	1.38±0.08
	F		1.203	2.991	0.089	1.014
	P		0.301	0.050	0.915	0.363
CXCR1-816	A A	71	0.00±0.00	0.45±0.09	0.55±0.10 ^b	1.00±0.15
	A C	332	0.01±0.01	0.55±0.05	0.99±0.08 ^a	1.55±0.10
	C C	318	0.02±0.01	0.50±0.05	0.90±0.07 ^a	1.42±0.09
	F		0.361	0.473	3.508	1.879
	P		0.697	0.623	0.03	0.154
CXCR1-980	AA	27	0.00±0.00	0.33±0.11	0.96±0.26	1.30±0.26
	AG	256	0.00±0.00	0.46±0.05	0.87±0.07	1.34±0.10
	GG	433	0.02±0.01	0.57±0.05	0.92±0.07	1.50±0.09
	F		1.071	1.869	0.115	0.794
	P		0.343	0.155	0.891	0.452
CXCR1-1068	A A	25	0.00±0.00	0.32±0.14	0.92±0.28	1.24±0.31
	A G	214	0.03±0.02	0.62±0.07	0.90±0.09	1.55±0.13
	G G	482	0.00±0.00	0.48±0.04	0.91±0.06	1.40±0.08
	F		2.659	2.387	0.005	0.430
	P		0.071	0.093	0.995	0.651
	合计 Total	721	0.01±0.01	0.52±0.03	0.91±0.05	1.44±0.07

同列数据后标不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)
Data in each column with lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$)

胎次 3 个指标来度量奶牛的生产寿命。生产月龄从 13 到 58 个月不等 (图 3)，其中 36 个月最多，其次为 37 个月，平均为 36.86 ± 0.33 月。离群月龄从 26—85 不等 (图 4)，其中 64 最多，其次为 65，平均为 64.19 ± 8.30 。离群胎次从 1—5 胎不等 (图 5)，其中 3 胎最多，其次为 4 胎，平均为 3.04 ± 0.78 。

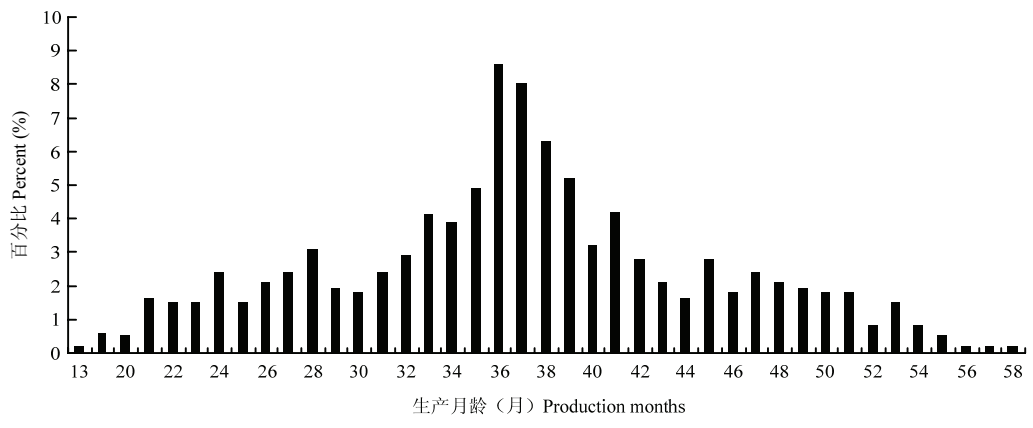


图 3 奶牛生产月龄分布
Fig. 3 The distribution of production months of cows

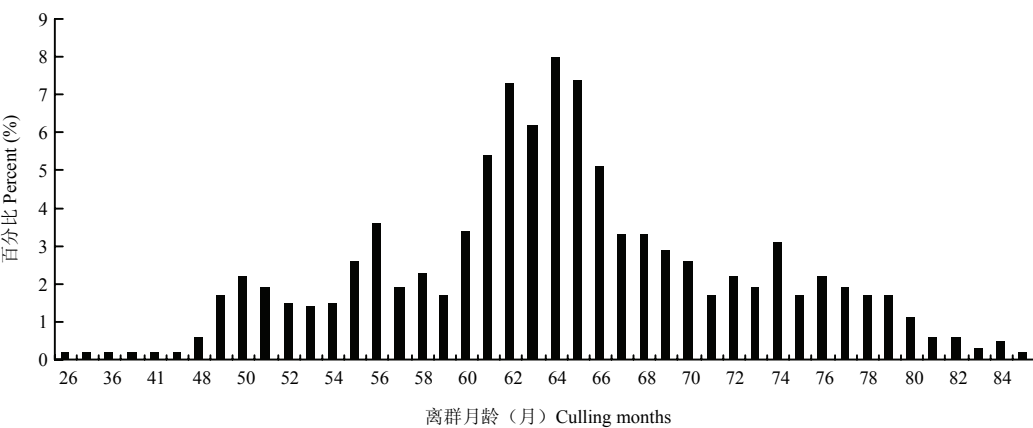


图 4 离群月龄分布
Fig. 4 The distribution of culling months of cows

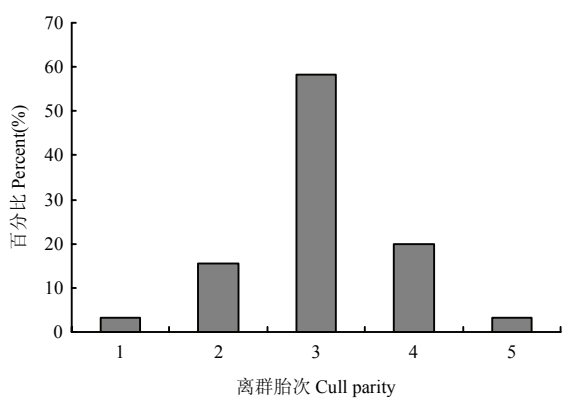


图 5 离群胎次分布
Fig. 5 The distribution of culling parities of cows

CXCR1 基因 CDS 区不同 SNP 位点奶牛生产月龄、离群月龄和离群胎次见表 5。由表 5 可知：*CXCR1*-816 基因型与奶牛离群月龄有极显著相关 ($P<0.01$)，*CXCR1*-816 基因型与奶牛生产月龄和离群胎次有显著相关 ($P<0.05$)，而其它 SNP 位点与生产月龄、离群月龄和离群胎次均无显著相关 ($P>0.05$)。多重比较表明：*CXCR1*-816 AA 基因型个体生产月龄、离群月龄和离群胎次均显著高于 CC 基因型个体 ($P<0.05$)。

2.5 生存分析

CXCR1 基因 CDS 区 4 个 SNP 位点的奶牛生存分析结果表明：仅有 *CXCR1*-816 位点与奶牛生存时间有显著相关 ($P<0.05$ ，表 6)。进一步分析发现：

CXCR1-816 CC 基因型个体生存时间显著低于 AA 和 AC 基因型（表 7）。CXCR1-816 不同基因型生存曲线见图 6。由图 6 可知：CXCR1-816 CC 基因型个体在各时间段的生存概率均低于 AA 和 AC 基因型个体。

表 5 CXCR1 基因不同 SNP 位点奶牛生产月龄、离群月龄和离群胎次
Table 5 The productive months, culling months and culling parity for SNPs of CXCR1 gene

SNPs	基因型 Genotypes	样本量 N	生产月龄（月） Productive months	离群月龄（月） Culling months	离群胎次 Culling parity
CXCR1-642	A A	36	37.56±1.48	65.50±8.13	3.06±0.92
	A G	231	37.56±1.48	63.34±9.11	3.00±0.76
	G G	380	37.11±0.41	64.58±7.76	3.07±0.78
	F		1.295	2.241	0.438
	P		0.275	0.107	0.645
CXCR1-816	A A	62	38.35±1.17 ^a	66.19±8.50 ^a	3.34±0.77 ^a
	A C	277	37.59±0.47 ^{ab}	65.04±7.76 ^{ab}	3.09±0.77 ^b
	C C	308	35.90±0.49 ^b	63.03±8.58 ^b	2.94±0.78 ^b
	F		3.591	5.066	4.060
	P		0.028	0.007	0.018
CXCR1-980	A A	25	37.96±1.33	64.08±7.09	3.08±0.70
	A G	224	36.60±0.52	64.17±7.41	3.00±0.72
	G G	394	37.01±0.44	64.27±8.86	3.07±0.82
	F		0.358	1.166	0.926
	P		0.699	0.322	0.428
CXCR1-1068	A A	24	36.77±1.88	62.71±10.59	2.92±0.78
	A G	195	36.35±0.63	63.72±9.03	2.98±0.80
	G G	428	37.10±0.39	64.49±7.80	3.07±0.77
	F		0.297	0.612	0.176
	P		0.743	0.543	0.838
合计 Total		647	36.86±0.32	64.19±8.30	3.04±0.78

表 6 CXCR1 基因 CDS 区 4 个 SNP 位点奶牛的 Cox 生存分析
Table 6 The Cox survival analysis of 4 SNPs of CXCR1 gene for dairy cows

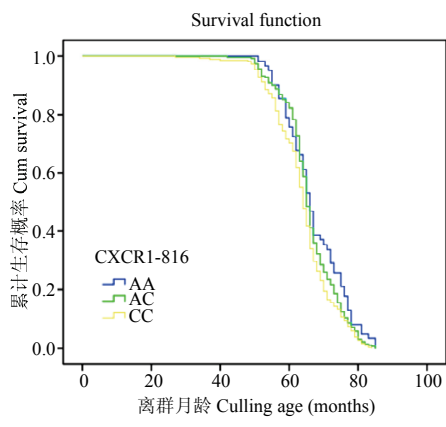
SNPs	B 值 B value	标准误 SE	Wald χ^2 值 Wald χ^2 value	显著水平 Sig.	相对危险度 RR	95%CI 上限 Lower of 95% CI for RR	95%CI 下限 Upper of 95% CI for RR
CXCR1-642	0.046	0.074	0.389	0.533	1.047	0.905	1.212
CXCR1-816	0.234	0.081	8.387	0.004	1.264	1.079	1.480
CXCR1-980	0.018	0.085	0.046	0.830	1.018	0.863	1.202
CXCR1-1068	0.099	0.100	0.992	0.319	1.105	0.908	1.343

3 讨论

3.1 CXCR1 基因遗传多态性分析

趋化因子受体和趋化因子在机体炎症发生时起着非常重要的作用，当奶牛发生乳房炎时 CXCR1 基因表达产物增多^[30]。本试验在中国荷斯坦牛第 2 号染色

体 CXCR1 基因 CDS 区共发现了 13 个 SNP 突变位点。PIGHETTI 等^[31]报道，CXCR1 基因 CDS 区共有 11 个 SNP 位点，也包括 4 个连锁群。本研究与之相比，333C>G、337A>G 和 642A>G 均为新发现的突变位点，并未发现 621A>G 位点，也分为 4 个连锁群，群内完全连锁。由于 621A>G 为终止密码子突变，会导致



横座标为离群月龄，纵座标为累积生存概率，图中曲线不同颜色表示不同基因型
The X axis demonstrates culling ages (months) while Y axis denotes the accumulative survival rate. The genotypes were indicated by curves in different colours

图 6 奶牛 *CXCR1*-816 不同基因型生存曲线
Fig. 6 The survival curve of cows for different genotypes of *CXCR1*-816

表 7 *CXCR1*-816 不同基因型生存时间平均数与中数的估计
Table 7 The estimation value of mean and median of survival time for different genotypes of *CXCR1*-816

<i>CXCR1</i> -816	样本量	平均数±标准误	中位数±标准误
	N	Mean±SE	Median±SE
AA	62	66.19a±1.08	65±0.84
AC	277	65.04a±0.47	64±0.34
CC	308	63.03b±0.49	63±0.42
合计 Overall	647	64.19±0.33	64±0.27

蛋白翻译提前终止，说明本研究所检测的中国荷斯坦牛群体中不存在该位点终止密码子突变。333C>G 和 337A>G 属于连锁群 2，642 A>G 为独立的连锁群，与其它位点不连锁。徐敏等^[27]分析了荷斯坦牛、西门塔尔牛、通江黄牛 3 个牛品种共 160 头个体 *CXCR1* 基因编码区多态性，在 CDS 区 643、735、819 位发现 3 个 SNP 位点。官久强等^[28,32]分析了 470 头中国荷斯坦牛 *CXCR1* 基因编码区的多态性，结果发现了 6 个 SNPs: 735 C>G、816 C>A、819 A>G、980 A>G、995 A>G 和 1008 C>T。本研究与上述研究相比较，多发现了 4 个 SNP 位点。

3.2 *CXCR1* 基因与临床乳房炎发病次数和生产寿命的关系

本研究所发现的 *CXCR* 基因 CDS 区 4 个 SNP 连锁群 (642 A>G、816 A>C、980A>G 和 1068 C>T)

内，*CXCR1*-642 位点与 2 胎奶牛发生乳房炎次数有显著相关 ($P<0.05$)。由于 *CXCR1*-642 位点为首次发现的位点，并且 *CXCR1*-642 位点与其他胎次临床乳房炎发生次数无显著相关 ($P>0.05$)，所以该结果有待进一步探索。*CXCR1*-980 和 *CXCR1*-1068 位点与临床乳房炎发病次数无显著相关 ($P>0.05$)，同时这两个位点与奶牛生存时间也无显著相关。*CXCR1*-816 位点与 3 胎临床乳房炎发病次数有显著相关 ($P<0.05$)，AA 基因型个体临床乳房炎发病次数显著低于 AC 和 CC 基因型个体。多因素方差分析和生存分析也表明：*CXCR1*-816 位点与奶牛生产寿命有显著相关，CC 型个体生存时间平均为 63.68 月，极显著低于 AA 型个体 (65.5 月)，CC 型比 AA 型奶牛提前淘汰 2 个月左右。可见临床乳房炎发病次数较少的基因型个体存活时间较长。综合以上 3 方面统计数据所得结果，发现 *CXCR1*-816 位点与 3 胎临床乳房炎发病次数及奶牛生产月龄、离群月龄和离群胎次均有显著相关，推测该位点及其连锁群的突变可能对其基因表达产生影响，从而影响乳房炎发病次数、生产寿命等相关指标，但这一推论有待进一步通过实验进行验证。因此，在种公牛站进行遗传评定工作中，增加 *CXCR1*-816 基因型检测，筛选其中 AA 型个体公牛并留种，逐渐淘汰后代中 CC 型母牛，可降低奶牛群体中临床乳房炎发病率，延长生产寿命，从而提高奶牛养殖的经济效益。

在本研究中，816 A>C、291 C>T、1008 C>T 及 3'端 792 G>A 和 1079 C>T 处于第三连锁群内^[31]，虽然 *CXCR1* 基因 CDS 区上述 3 个位点均为同义突变，没有造成 AA 改变。而 3'端 792 G>A 和 1079C>T 2 个突变位点，经 RNAhybrid 软件进行预测，均没有发现 miRNA 结合位点。由于本研究并未对 *CXCR1* 基因 5'端启动子区 SNP 突变及其与 CDS 区 SNP 进行连锁分析，在该基因 5'端启动子区是否存在与 CDS 区 816 A>C 完全连锁的突变并不得而知，也未见相关报道。因此，816 A>C 与奶牛临床乳房炎发病次数及生产寿命显著关联的遗传机制有待进一步深入研究。

另外，本研究也发现同一基因型在不同胎次间表现不一致，如 *CXCR1*-816 位点仅与 3 胎临床乳房炎发病次数有显著相关，而与 1 胎和 2 胎奶牛临床乳房炎发病次数无显著相关。造成该结果可能有以下几个原因：一是由于奶牛年青时抗病力较强，临床乳房炎等疾病性状发生率较低，从而造成统计结果不显著；二

是临床乳房炎本身的度量问题。在生产中临床乳房炎常以可以看到明显的乳房红肿、触摸有疼痛感和硬块或乳样呈豆腐样等症状为判断条件,并伴随着乳中体细胞数上升和血液中某些免疫因子发生变化。经转换后的体细胞数(也称为体细胞评分)与临床乳房炎有较高的遗传相关^[5],且在一个泌乳期中有多次记录,增加了结果判断的准确性。第三个原因是引起乳房炎的病原菌类型较为复杂。不同病原菌导致临床乳房炎的表现可能不一致,其发病机制也有所不同,这无疑增加基因型与病原菌间互作的复杂性。

4 结论

CXCR1-816 A>C 突变与中国荷斯坦牛患临床乳房炎次数和生产寿命有显著相关, CXCR1-816 CC 型基因型个体有较多的临床乳房炎发病次数和较短的生产寿命,因此被提前淘汰。在进一步验证其功能情况下,该位点可用于中国荷斯坦牛生产寿命的分子标记辅助选择。

References

- [1] MIDDLETON J R, SAEMAN A, FOX L K, LOMBARD J, HOGAN J S, SMITH K L. The National mastitis council: A global organization for mastitis control and milk quality, 50 years and beyond. *Journal of Mammary Gland Biology & Neoplasia*, 2014, 19(3-4): 241-251.
- [2] 何阳花. CD4 与 STAT5b 基因单核苷酸多态性与 SCC 及产奶性状的关联分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2009.
HE Y H. Association analysis between the single nucleotide polymorphism of CD4 and STAT5b gene and SCC and milk traits[D]. Beijing: China Agricultural University, 2009.(in Chinese)
- [3] 李芬, 周娟, 马云, 张立岗. 奶牛生产寿命和产奶量的相关性研究. *中国牛业科学*, 2006, 32(6):12-14.
LI F, ZHOU J, MA Y, ZHANG L G. Study of association between production life of dairy cattle and its milk yield. *China Cattle Science*, 2006, 32(6):12-14.(in Chinese)
- [4] WOLFOVA M, WOLF J, KVAPILIK J, KICA J. Selection for profit in cattle: I. Economic weights for purebred dairy cattle in the Czech Republic. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90: 2442-2455.
- [5] KOECK A, LOKER S, MIGLIOR F, KELTON D F, JAMROZIK J, SCHENKEL F S. Genetic relationships of clinical mastitis, cystic ovaries, and lameness with milk yield and somatic cell score in first-lactation Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97:5806-5813.
- [6] ZHANG Q, GULDBRANDTSEN B, THOMASEN J R, LUND M S, SAHANA G. Genome-wide association study for longevity with whole-genome sequencing in 3 cattle breeds. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99:7289-7298.
- [7] HOCH R C, SCHRAUFSTAETTER I U, COCH RANE C G. *In vivo*, *in vitro*, and molecular aspects of interleukin-8 and interleukin-8 receptors. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine*, 1996, 128(2): 134-145.
- [8] WOLF M, DELGADO M B, JONES S A, DEWALD B, CLARK-LEWIS, BAQQIOLINI M. Granulocyte chemotactic protein 2 acts via both IL8 receptors, CXCR1 and CXCR2. *European Journal of Immunology*, 1998, 28(1): 164-170.
- [9] PAAPE M, MEHRZAD J, ZHAO X, DETILLEUX J, BURCENICH C. Defense of the bovine mammary gland by polymorpho-nuclear neutrophil leukocytes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2002, 7(2): 109-121.
- [10] BAGGIOLINI M, DEWALD B, MOSER B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Advances in Immunology*, 1994, 55(55):97-179.
- [11] BANNERMAN D D, PAAPE M J, LEE J W, ZHAO X, HOPE J C, RAINARD P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology*, 2004, 11(3): 463-472.
- [12] RIOLLET C, RAINARD P, POUTREL B. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2000, 7: 161-167.
- [13] BARBER M R, YANG T J. Chemotactic activities in nonmastitic and mastitic mammary secretions: Presence of interleukin-8 in mastitic but not non-mastitic secretions. *Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology*, 1998, 5(1): 82-86.
- [14] LEYVA-BACA I, SCHENKEL F, SHARMA B S, JANSEN G B, AND KARROW N A. Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine CCL2, IL8, CCR2 and IL8RA genes and their association with health and production in Canadian Holsteins. *Animal Genetics*, 2007, 38(3):198-202.
- [15] YOUNGERMAN S M, SAXTON A M AND PIGHETTI G M. Novel single nucleotide polymorphism and haplotypes within the bovine CXCR2 gene. *Immunogenetics*, 2004, 56: 355-359.
- [16] YOUNGERMAN S M, SAXTON A M, OLIVER S P AND PIGHETTI G M. Association of CXCR2 polymorphisms with subclinical and clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of Dairy*

- Science*, 2004, 87: 2442-2448.
- [17] 周雷, 王洪梅, 王长法, 柳楠, 侯明海, 李秋玲, 仲跻峰. 中国荷斯坦牛 CXCR1 基因第二外显子新 SNPs 与乳腺炎的关联分析. 畜牧兽医学报. 2011, 42(8):1063-1070.
- ZHOU L, WANG H M, WANG C F, LIU N, HOU M H, LI Q L, ZHONG J F. New genetic polymorphisms within Exon 2 of Chinese Holstein Cattle CXCR1 gene and its association with mastitis. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, 42(8):1063-1070. (in Chinese)
- [18] CHAPINAL N, BARRIENTOS A K, KEYSERLINGK M A G, GALO E, AND WEARY D M. Herd-level risk factors for lameness in free-stall farms in the northeastern United States and California. *Journal of Dairy Science*, 2012, 96(1):318-328.
- [19] KHATIB H, HEIFETZ E, DEKKERS J C. Association of the protease inhibitor gene with production traits in Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(3):1208-1213.
- [20] KHATIB H, SCHUTZKUS V, CHANG Y M, ROSA G J. Pattern of expression of the uterine milk protein gene and its association with productive life in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(5):2427-2433.
- [21] ASHWELL M S, REXROAD C E, MILLER R H, VANRADEN P M, DA Y. Detection of loci affecting milk production and health traits in an elite US Holstein population using microsatellite markers. *Animal Genetics*, 1997, 28(3): 216-222.
- [22] ASHWELL M S, VAN TASSELL C P. Detection of putative loci affecting milk, health, and type traits in a US Holstein population using 70 microsatellite markers in a genome scan. *Journal of Dairy Science*, 1999, 82(11): 2497-2502.
- [23] HEYEN D W, WELLER J I, RON M, BAND M, BEEVER J E, FELDMESSER E, DA Y, WIGGANS G R, VANRADEN P M, LEWIN H A. A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiological Genomics*, 1999, 1(3):165-175.
- [24] KOMISAREK J, DORYNEK Z. Effect of ABCG2, PPARGC1A, OLR1 and SCD1 gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. *Journal of Applied Genetics*, 2009, 50: 125-132.
- [25] COLE J B, GEORGE R, WIGGANS L M, SONSTEGARD T S, LAWLORJR T J, CROOKER B A, VAN TASSELL C P, YANG J, WANG S W, MATUKUMALLI L K, YANG D. Genome-wide association analysis of thirty one production, health, reproduction and body conformation traits in contemporary U. S. Holstein cows. *BMC Genomics*, 2011, 12(408): 1471-2164.
- [26] CHEBEL R C, SUSCA F, SANTOS J E. Leptin genotype is associated with lactation performance and health of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91(7):2893-2900.
- [27] 徐敏, 平富强, 陈仕毅, 赖松家, 刘益平. CXCR2 基因多态性与奶牛乳房炎和乳品质的关联. 遗传, 2008, 30: 463-468.
- XU M, PING F Q, CHEN S Y, LAI S J, LIU Y P. Study on the relationships between polymorphisms of CXCR2 gene and milk quality and mastitis of dairy cow. *Herditas*, 2008, 30:463-468.(in Chinese)
- [28] 官久强, 王洪梅, 王长法, 李秋玲, 李建斌, 帅素容, 侯明海, 仲跻峰. 中国荷斯坦牛白介素 8 受体基因编码区多态性与乳腺炎的关联分析. 中国农业科学, 2010, 43(5): 1057-1065.
- GUAN J Q, WANG H M, WANG C F, LI Q L, LI J B, SHUAI S R, HOU M H, ZHONG J F. Genetic Polymorphisms Within the Coding Regions of IL8R Gene and Its Association with Mastitis Trait in Chinese Holstein Cattle. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(5): 1057-1065. (in Chinese)
- [29] SHI Y Y, HE L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Research*, 2005, 15(2):97-98.
- [30] LEE J W, BANNERMAN D D, PAAPE M J, HUANG M K, ZHAO X. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Veterinary Research*, 2006, 37(2):219-229.
- [31] PIGHETTI G M, KOJIMA C J, WOJAKIEWICZ L, RAMBEAUD M. The bovine CXCR1 gene is highly polymorphic. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2011, 145 (1-2): 464-470.
- [32] 官久强, 王洪梅, 王长法, 李秋玲, 仲跻峰, 侯明海, 帅素容. 中国荷斯坦牛 CXCR1 基因编码区的遗传多态性. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(6): 47-52.
- GUAN J Q, WANG H M, WANG C F, LI Q L, ZHONG J F, HOU M H, SHUAI S R. Genetic polymorphisms within the coding regions of CXCR1 gene in Chinese Holstein cattle. *Journal of Northwest A & F University (Nat. Sci. Ed.)*, 2009, 37(6): 47-52. (in Chinese)

(责任编辑 林鉴非)