

6 个家兔群体 *KAP3.1* 基因的遗传变异分析

吴添文, 何孟颀, 王晓明, 冯凯, 李碧春, 吴信生*

(扬州大学 动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 研究设计了 2 对特异性引物, 经过序列拼接首次获得了家兔 *KAP3.1* 基因的全长 CDS 序列, 同时采用 PCR-SSCP 法对 6 个家兔群体 *KAP3.1* 基因的全部 CDS 序列以及部分 5' 端和 3' 端序列进行 SNP 检测, 结果显示, *KAP3.1-1* 位点上发现 3 种基因型, 2 个等位基因, 在序列上发生了 C91T 突变, 为沉默突变; 而 *KAP3.1-2* 位点未检测到突变。6 个群体的基因型分布均处于 Hardy-Weinberg 平衡, 且表现为低度或没有多态。福建黑兔与九疑山兔, 福建黑兔与皖系长毛兔, 有色獭兔与白色獭兔, 九疑山兔与白色獭兔, 九疑山兔与皖系长毛兔之间不存在分布差异 ($P > 0.05$), 而其他家兔群体彼此之间的分布差异显著或极显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。研究为 *KAP3.1* 基因是否能作为家兔毛质性状选育工作的分子标记可提供一定参考。

关键词: 兔; *KAP3.1* 基因; 遗传变异

中图分类号: S829.121.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)04-0643-05

Genetic Variation Analysis of *KAP3.1* Gene in 6 Rabbit Populations

WU Tian-wen, HE Meng-jie, WANG Xiao-ming,
FENG Kai, LI Bi-chun, WU Xin-sheng*

(Animal Science and Technology College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Full-length CDS of *KAP3.1* gene was first obtained by sequence assembly with 2 specific primers. Then the sequences mentioned above in 6 rabbit populations was scanned by PCR-SSCP. The results showed that 3 genotypes and 2 alleles were found at *KAP3.1-1* loci, one SNP (C91T) which was silent mutation, while no mutation was found at *KAP3.1-2* loci. The distribution of these genotypes in all populations was consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium and showed low or no diversity; the distribution difference was significant or very significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) from one to each other population except Fujian black rabbit and Jiuyishan rabbit, Fujian black rabbit and wan-line angora rabbit, chinchilla and white rex rabbit, Jiuyishan rabbit and white rex rabbit, jiuyishan rabbit and wan-line angora rabbit ($P > 0.05$). This study suggested a theoretical reference for whether *KAP3.1* gene could be a molecular marker or not in the breeding of rabbit wool quality.

Key words: rabbit; *KAP3.1* gene; genetic variation

动物被毛有着重要的经济价值。寻找影响动物毛质性状的候选基因一直是众多研究的目标, 而目前研究主要集中于人和羊, 在家兔中的研究很少, 这大大制约了毛兔育种的进展。

收稿日期: 2010-04-27 修回日期: 2010-06-03

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (nycytx-44) 和江苏省高新技术项目 (BG2007325)

作者简介: 吴添文 (1984-) 男, 博士生, 主要从事特种经济动物饲养研究, E-mail: wtw198472@163.com; * 通讯作者: 吴信生, 教授, E-mail: xinshengwu007@yahoo.com.cn

角蛋白相关蛋白(keratin associated protein ,KAPs) 作为动物毛发的基本成分之一 ,对于毛发的性质起着重要的作用。KAP 蛋白分为 3 类: 一类为高甘氨酸酪氨酸蛋白(high - glycine - tyrosine KAPs) ,由 *KAP6. n* 多基因家族和 2 个单基因 *KAP7*、*KAP8* 编码; 一类为高硫蛋白(high - sulfur KAPs) ,由 *KAP1. n*、*KAP2. n* 和 *KAP3. n* 多基因家族编码; 还有一类为超高硫蛋白 KAP(Ultra - high - sulfur KAPs) ,由 *KAP4. n* 和 *KAP5. n* 多基因家族编码。基因大多为小片段 ,大小一般在 0.6 ~ 1.5 kb ,并且都不含内含子^[1]。目前 ,在哺乳动物中已对 *KAP1. n*^[2]、*KAP6. n*^[3-4]、*KAP3. 2* 等^[5-6] 基因进行了研究 ,但未见 *KAP3. 1* 基因的相关报导。因此本研究以 6 个家兔群体为试验材料 ,获得家兔 *KAP3. 1* 基因 CDS 序列并进行遗传变异检测 ,为进一步探讨该基因是否能作为家兔毛质性状的候选基因提供一定的理论参考。

1 材料和方法

1.1 试验动物

本研究选取 6 个群体共 718 只家兔为试验材料。其中 福建黑兔(60 只) 来自于福建省农科院 ,有色獭兔(143 只) 和白色獭兔(101 只) 均来自于浙江余姚兔场 ,九疑山兔(72 只) 来自于湖南九疑山 ,皖系长毛兔(209 只) 来自于江苏宜兴拉必得种兔场和苏系长毛兔(133 只) 来自于江苏省农科院。所有个体均为随机抽样 ,耳缘静脉采血 5 mL 根据《分子克隆》中酚/氯仿法提取总 DNA^[7]。

1.2 引物设计

根据 GeneBank 中人、小鼠等物种 *KAP3. 1* 基因序列设计并合成了 2 对特异性引物 ,对家兔 *KAP3. 1* 基因的全 CDS 序列进行扩增 ,并用于 PCR - SSCP 检测。引物由上海生工生物工程有限公司合成 ,引物信息见表 1。

表 1 引物信息

Tab.1 The information of primer sequences

位点 Locus	引物序列 Primer sequence	片段大小/bp Product size	退火温度/°C Annealing temperature
KAP3. 1 - 1	5' - AAGCATTGAGACACCAAGACAT - 3'	257	58
	5' - AGCAGGATGGCACATAGATTTC - 3'		
KAP3. 1 - 2	5' - TGAGCCTGAAATCTATGTG - 3'	221	58
	5' - ATGGTGTAGGCAGAAGC - 3'		

1.3 PCR - SSCP 检测

PCR 扩增总体积为 20 μ L: 1 μ L DNA 模板 (100 ng/ μ L) ,2 μ L 10 \times PCR Buffer , 1.5 μ L dNTP (10 mmol/L) ,上下游引物各 1 μ L (10 pmol/ μ L) ,Taq 酶为 0.2 μ L (5 U/ μ L) ,ddH₂O 13.3 μ L。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min ,94 $^{\circ}$ C 变性 40 s ,适宜退火温度 40 s ,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s ,35 个循环 ,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。经 $\varphi = 2\%$ 琼脂糖电泳检测后 ,产物用于 SSCP 检测。2.5 μ L PCR 产物和 7 μ L 变性液 ,98 $^{\circ}$ C 变性 10 min ,冰浴 8 min。10 % 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Acr: Bis = 39: 1) ,120 V 电泳 14 ~ 16 h ,银染显色 根据其多态性进行分型。选取不同基因型的纯合子进行切胶回收 ,由上海生物工程有限公司进行双向测序。试验所用的 DNA 聚合酶和 dNTP 均购自宝生物工程(大连) 有限公司。

1.4 数据分析

统计基因型频率、等位基因频率、多态信息含量(PIC) 、期望杂合度(He) ,并对各群体基因型分布差异进行卡方检验 ,Align 软件进行序列比对和 SNP 位点筛查。

2 结果分析

2.1 家兔 *KAP3. 1* 基因序列的获得及其与其他物种的同源性比较

用设计的 2 对引物扩增家兔 *KAP3. 1* 基因 $\varphi = 2\%$ 琼脂糖电泳检测 ,扩增片段长度与预期片段大小一致 ,且特异性较好 ,经双向测序和序列拼接首次获得家兔 *KAP3. 1* 基因全长 CDS 序列 449 bp ,包括全部

的 CDS 区 297 bp, 该序列与小鼠、黑猩猩、人的 *KAP3.1* 基因的同源性分别为 88%、84% 和 83%。现已将该序列提交到 GenBank 数据库(HM147283)。

2.2 PCR - SSCP 分型

通过 SSCP 检测后发现 *KAP3.1* - 1 位点中呈现 3 种带型, 分别命名为 AA、AB 和 BB(图 1), 等位基因 A 和 B, 经测序和序列比对发现 C91T 突变, 处于编码区内, 但未引起氨基酸发生改变(均为丝氨酸), 为沉默突变(图 2); 而 *KAP3.1* - 2 位点均未能检测到多态。

2.3 6 个家兔群体的遗传多样性分析

在 6 个家兔群体的 *KAP3.1* - 1 位点上, A 等位基因均为优势等位基因, 除苏系长毛兔中并未检测到多态, 其余 5 个群体均为低度多态($PIC < 0.25$), 且 6 个群体均处于 Hardy - Weinberg 平衡(表 2)。

不同家兔群体 *KAP3.1* - 1 位点的不同基因型分布差异检验结果(表 3)显示: 福建黑兔与九疑山兔, 福建黑兔与皖系长毛兔, 有色獭兔与白色獭兔, 九疑山兔与白色獭兔, 九疑山兔与皖系长毛兔之间不存在分布差异($P > 0.05$), 而其他家兔群体彼此之间的分布差异显著或极显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

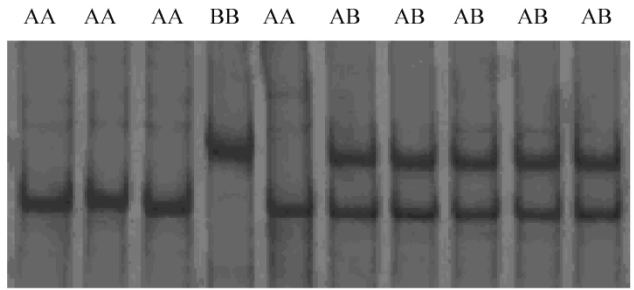


图 1 *KAP3.1* - 1 位点的部分 PCR - SSCP 胶图
Fig. 1 The PCR - SSCP PAGE electrophoresis patterns of *KAP3.1* - 1

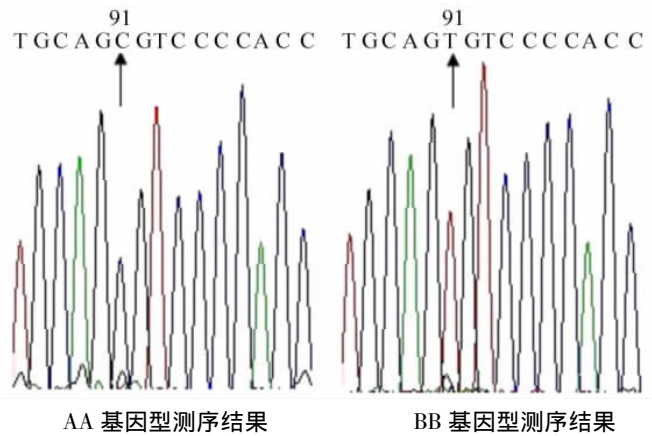


图 2 *KAP3.1* - 1 位点不同基因型测序结果
Fig. 2 The sequencing result of different genotypes

表 2 不同家兔群体 *KAP3.1* - 1 位点的遗传特性

Tab. 2 The characteristic of *KAP3.1* - 1 loci in 6 rabbit populations

群体 Populations	样本数 Samples	基因型频率 Genotype frequency			基因频率 Allele frequency		<i>He</i>	<i>PIC</i>	χ^2 Value
		AA	AB	BB	A	B			
FB	60	0.933 (56)	0.007 (4)	0.000 (0)	0.967	0.033	0.064	0.062	0.00
YT	143	0.769 (110)	0.203 (29)	0.028 (4)	0.871	0.129	0.225	0.200	0.31
BT	101	0.772 (78)	0.208 (21)	0.020 (2)	0.876	0.124	0.217	0.194	0.03
JY	72	0.903 (65)	0.097 (7)	0.000 (0)	0.951	0.049	0.093	0.089	0.00
WX	209	0.962 (201)	0.038 (8)	0.000 (0)	0.981	0.019	0.037	0.036	0.00
SX	133	1.000 (133)	0.000 (0)	0.000 (0)	1.000	0.000	0.000	0.000	0.00

表中 FB 为福建黑兔, YT 为有色獭兔, BT 为白色獭兔, JY 为九疑山兔, WX 为皖系长毛兔, SX 为苏系长毛兔, 当 $df = 1$ $\chi^2_{(0.01)} = 6.63$ $\chi^2_{(0.05)} = 3.84$; 当 $df = 2$ $\chi^2_{(0.01)} = 9.21$ $\chi^2_{(0.05)} = 5.99$ 。

表3 不同家兔群体 KAP3.1-1 位点的不同基因型分布差异检验

Tab.3 χ^2 test of the distribution of genotypes in all populations

群体 Populations	YT	BT	JY	WX	SX
FB	7.89*	7.20*	0.40	0.88	9.05**
YT		0.17	6.25*	31.27**	34.86**
BT			5.47	27.80**	33.59**
JY				3.68	13.39**
WX					5.21*

表中 FB 为福建黑兔, YT 为有色獭兔, BT 为白色獭兔, JY 为九疑山兔, WX 为皖系长毛兔, SX 为苏系长毛兔, 当 $df=1$ $\chi^2_{(0.01)}=6.63$ $\chi^2_{(0.05)}=3.84$; 当 $df=2$ $\chi^2_{(0.01)}=9.21$ $\chi^2_{(0.05)}=5.99$ 。

3 讨论

目前,已有学者对人、羊等动物的 KAPs 家族基因进行了研究^[8-12],但是关于 KAP3.1 基因研究却未见报道。本研究根据多个物种 KAP3.1 基因的保守区设计了 2 对特异性引物,首次获得了家兔 KAP3.1 基因的全长 CDS 序列,结果揭示,该基因序列与小鼠、黑猩猩和人的同源性均达 83% 以上,说明该基因在不同物种中的同源性较高,在进化过程中相对比较保守。

通过 SSCP 检测后发现在家兔 KAP3.1 中的 KAP3.1-1 位点的多态信息含量都较低,各群体的整齐度较高。原因可能是长毛兔、獭兔均是起源于肉兔,长期的选育过程可能对该基因的影响不大。

基因表达是基因经过转录、翻译、产生有生物活性的蛋白质的整个过程,是个体正常生长、发育和适应环境的基础。碱基变异特别是编码区的变异可能影响蛋白质表达调控,进而影响细胞表型和表型性状的变化。本研究中仅在 KAP3.1-1 位点上的发现突变,为 C91T 突变,但所编码的氨基酸并未发生改变,均为丝氨酸(AGC-AGT)。但目前有文献报导,同义突变虽不改变编码的氨基酸,但因为改变了核苷酸序列,有可能影响涉及转录后加工,影响切接信号顺序,影响启动子区重要碱基等,改变 mRNA 的构象、降低 mRNA 的稳定性等^[13-15],最后都可能影响基因的表达。

目前,对家族基因的研究已成为热点,可能单个基因的突变未能造成性状的改变,需要该家族其它基因的协同作用。对此,我们正在对该家族的其它基因进行研究。同时,我们将进一步开展对家兔个体毛质性状的测定工作,并通过其它长毛兔的杂交组合分析,研究 KAP3.1-1 位点中 91 位点的同义突变是否影响到该基因的表达及如何作用于家兔毛质性状。

参考文献:

[1]康慧琴,金梅.羊绒蛋白质组表达差异的国内外研究进展[J].安徽农学通报,2007,13(9):46-47.
 [2]Itenge - Mwezaa T O,Forresta R H J,McKenzie G W et al. Polymorphism of the KAP1.1, KAP1.3 and K33 genes in Merino sheep[J]. Molecular and Cellular Probes,2007(21):338-342.
 [3]刘桂芬,田可川,张恩平,等.优质细毛羊羊毛细度的候选基因分析[J].遗传,2007,29(1):70-74.
 [4]赵俊星,任有蛇,岳文斌,等.KAP6.1 基因在两个山羊品种间的表达差异[J].草食家畜,2007,12(137):4-6.
 [5]Rufaut N W, Pearson A J, Nixon A J, et al. Identification of differentially expressed genes during a wool follicle growth cycle induced by prolactin[J]. Journal of Investigative Dermatology,1999,113(6):865-872.
 [6]宦霞娟.獭兔 KAP 和 FGF5 基因的多态性与其经济性状的关系研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2009.
 [7]Sambrook J, Russell, D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001:49-56.
 [8]Kazunori Shibuya, Izumi Obayashi, Shuichi Asakawa, et al. A cluster of 21 keratin-associated protein genes within introns of another gene on human chromosome 21q22.3[J]. Genomics, 2004(83):679-693.
 [9]Mclaren R J. Linkage mapping of wool keratin and keratin-associated protein genes in sheep [J]. Mammalian Genome, 1997, 8:938-940.
 [10]Michae A, Rogers, Lutz Langbein. Characterization of a first domain of human high glycine-tyrosine and high sulfur keratin-associated protein (KAP) genes on chromosome 21q22.1[J]. Biol Chem, 2002, 277(50):48993-49002.

(下转第 694 页)

参考文献:

- [1]毛盛贤,刘来福,黄远樟.冬小麦数量性状遗传差异及其在作物育种上的应用[J].遗传,1979,1(5):26-30.
- [2]彭传新,郭介华.陆地棉数量性状遗传差异的研究[J].中国农业科学,1988,21(4):26-32.
- [3]刘来福.作物数量性状遗传距离及其测定[J].遗传学报,1979,6(3):349-355.
- [4]许明辉.烟草数量性状遗传距离与杂种优势关系的研究[J].遗传,1999,21(5):47-50.
- [5]张锡顺,杨建国,杨若茵,等.蓖麻数量性状遗传距离与杂种优势关系的研究[J].中国农业科学,2006,39(3):633-640.
- [6]王学德,潘加驹.棉花亲本遗传距离与杂种优势间的相关性研究[J].作物学报,1990,16(1):32-37.
- [7]武耀廷,张天真,朱协飞,等.陆地棉遗传距离与杂种 F_1 、 F_2 产量及杂种优势的相关分析[J].中国农业科学,2002,35(1):22-28.
- [8]赵玉昌,曹栓柱,曹新川.陆地棉数量性状遗传距离与杂种优势关系的研究[J].塔里木大学学报,2008,20(1):20-23.
- [9]郝德荣,何林池,刘水东,等.抗虫棉数量性状遗传距离与杂种优势关系的研究[J].金陵科技学院学报,2008,24(4):50-55.
- [10]马丽华,许红霞.转*Bt*基因棉卡那霉素田间快速检测法[J].中国棉花,2000,27(12):11-12.
- [11]唐文武,肖文俊,黄英金,等.优异纤维品质陆地棉和转基因抗虫棉的杂种优势和亲子相关性[J].棉花学报,2006,18(2):74-78.
- [12]唐文武,黄英金,吴秀兰,等.优异纤维品质陆地棉与转基因抗虫棉的配合力及遗传效应分析[J].棉花学报,2009,21(5):415-419.
- [13]张正圣,李先碧,刘大军,等.陆地棉高强纤维品系和*Bt*基因抗虫棉的配合力与杂种优势研究[J].中国农业科学,2002,35(12):1450-1455.
- [14]Lee M, Godshalk E B, Lamkey K R, et al. Association of restriction fragment length polymorphisms among maize inbreds with agronomic performance of their crosses[J]. Crop Sci, 1989, 29: 1067-1071.
- [15]Smith O S, Smith J S C, Bowen S L, et al. Similarities among a group of elite maize inbred as measured by pedigree, F_1 grain yield, grain yield, heterosis and RFLPs[J]. Theor Appl Gene, 1990, 80: 833-840.

(上接第646页)

- [11]Shoichi Yahagi, Kazunori Shibuya, Izumi Obayashi, et al. Identification of two novel clusters of ultrahigh-sulfur keratin-associated protein genes on human chromosome 11q [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 318: 655-664.
- [12]Tutomu Soma, Masato Iino, Masahiro Tajima, et al. Expression of novel keratin associated protein 5 genes in the cuticle layer of human hair follicles [J]. Journal of Dermatological Science, 2005, 38: 110-112.
- [13]Chava Kimchi Sarfaty, Jung Mi Oh, In Wha Kim, et al. A "Silent" polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity [J]. Science, 2007, 315(5811): 525-528.
- [14]Jubao Duan, Mark S, Wain Wright. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (*DRD2*) affect mRNA stability and synthesis of the receptor [J]. Human Molecular Genetics, 2003, 12(3): 205-216.
- [15]Chamary J V, Parmley J L, Hurst L D. Hearing silence: nonneutral evolution at synonymous sites in mammals [J]. Nature Reviews Genetics, 2006, 7: 98-108.