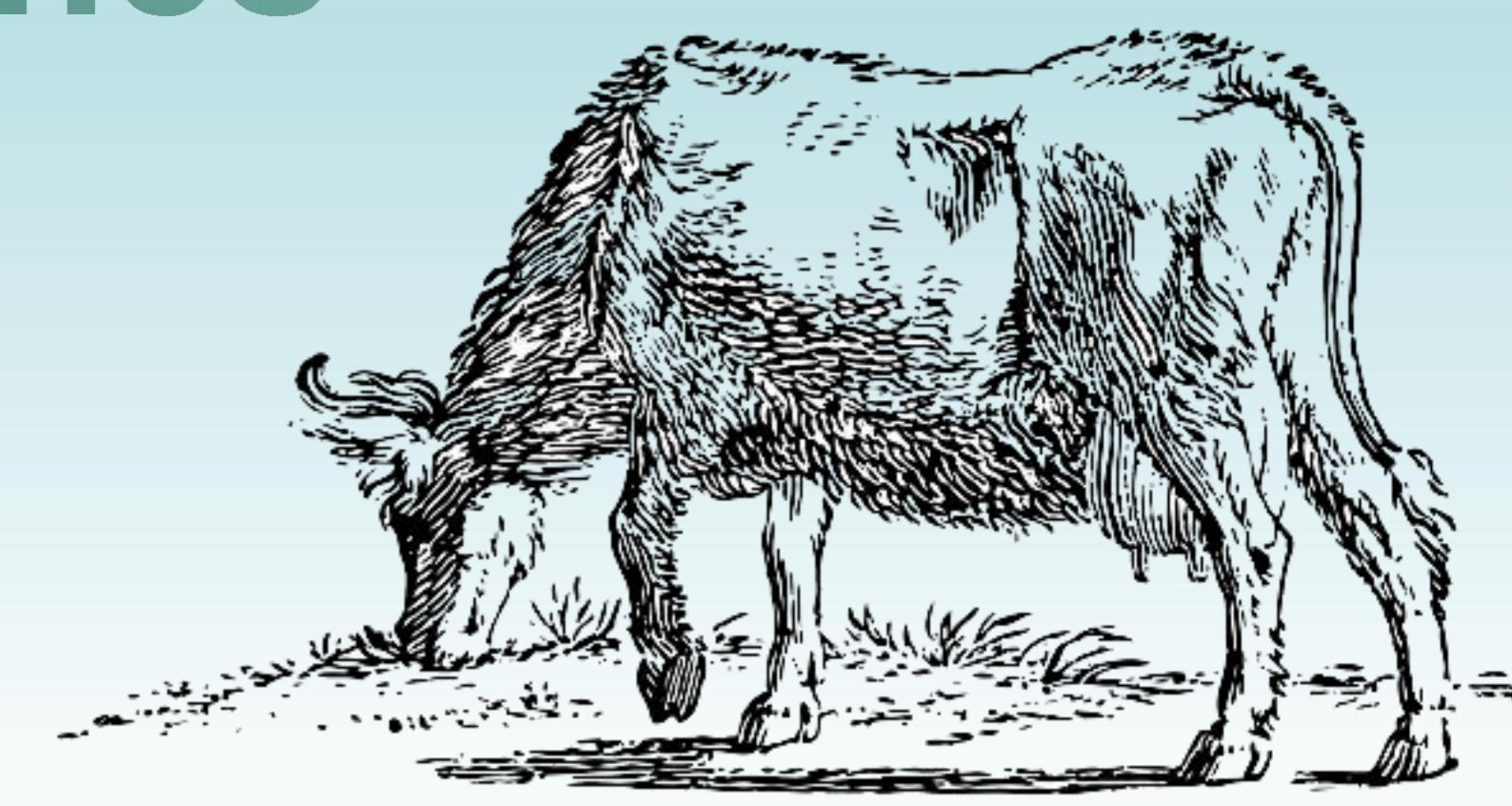




Excavation of variation of three fat deposit-related genes and their association with beef quality traits

三个脂肪沉积相关基因变异挖掘及其与牛肉品质性状关联研究

项目成员：张珂菁、竺蕾静、王志颖、吕润语 指导老师：蓝贤勇 教授
(动物科技学院)



研究背景与意义

牛肉品质与脂肪沉积密切相关，直接影响肉牛生产效益。但目前，我国肉牛育种相对滞后且优质品种匮乏，应加大肉牛育种改良。分子标记鉴定是加速分子育种的有力手段之一，其中InDel标记其准确性高、稳定性好、且检测简便，更易在牛肉品质性状的生产实践中推广应用。

CRY1/CRY2 基因均为生物钟基因，参与昼夜节律，与免疫系统和物质代谢密切相关，其转录可以影响细胞周期基因的表达，进而影响成骨、能量代谢、细胞增殖，也可以调节骨骼肌的生理功能。此外，时钟基因的破坏可导致血脂异常和肥胖。*HOXA11* 基因则在皮下和内脏脂肪中高表达，同时调控牛肢体骨骼发育和肌肉生长，进而导致肌肉重量的改变。

本研究选取*HOXA11*、*CRY1*、*CRY2*基因进行InDel位点挖掘并与脂肪沉积性状关联分析，并在获得显著关联结果基础上继续对其中之一*HOXA11*基因在不同组织和细胞上的mRNA表达水平进行了进一步的检测，以期阐明重要候选基因对脂肪沉积的影响，为肉牛育种改良提供有效的分子标记和实践参考。

材料与方法

样品采集及DNA提取

本研究收集705只山东黑牛遗传资源种群个体耳组织样品，运用高盐法分离、提取、纯化组织样品DNA，收集性状数据。

引物设计

根据Ensembl数据库找到*HOXA11*、*CRY1*、*CRY2*基因InDel位点，使用Primer 5.0设计引物。

基因分型和DNA测序

通过13 μL的反应体系进行PCR扩增，通过3.5%琼脂糖凝胶电泳和DNA测序结果确认其序列。

位点检测

进行PCR分型检测，筛选具有多态性的InDel位点，最终发现三个基因共有五个位点具有多态性。

数据处理和统计分析

采用Nei's方法、SHEsis平台、SPSS 25.0软件等进行统计分析计算相关结果。

实验结果

确定目标基因

采用文献计量学分析及GWAS方法确定脂肪沉积相关基因：

***CRY1*、*CRY2*、*HOXA11* 为目标基因。**

分析三个基因与肉质性状关系

1 *CRY1* 基因

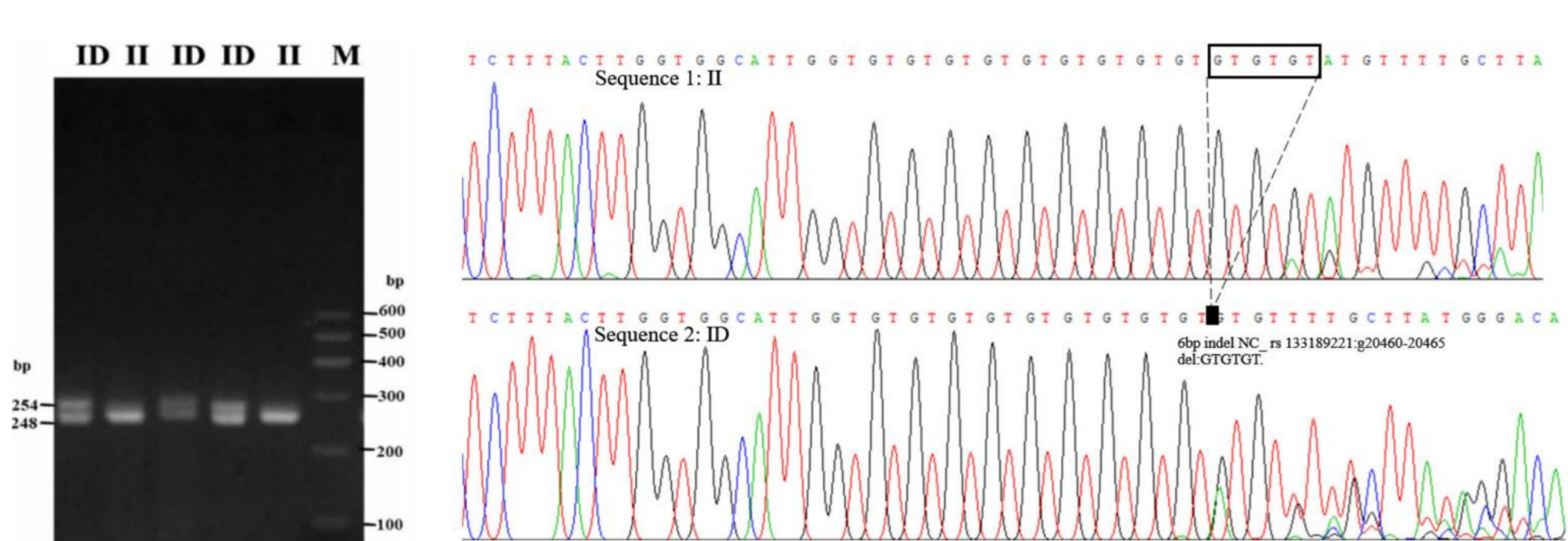


图1 *CRY1*基因上6-bp缺失鉴定结果

表1 SDBCGR群体中 *CRY1* 基因的群体遗传参数

基因型频率	等位基因频率	HWE	群体参数					
II	ID	I	D	P值	Ho	He	Ne	PIc
0.751 (n=325)	0.249 (n=108)	0.876	0.124	P<0.05	0.782	0.218	1.280	0.195

表2 *CRY1*基因6-bp缺失与牛肉品质性状相关性分析表

性别	肉质性状	观察到的基因型 (平均值 ± SE)		P值
		II	ID	
雄性 (n=121)	腰肉 (kg)	4.27 ± 0.09 (n=41)	3.95 ± 0.11 (n=16)	0.042
	颈肉 (kg)	2.19 ± 0.13 (n=41)	4.27 ± 0.09 (n=15)	0.042
	毛重 (kg)	678.78 ± 5.69 (n=237)	656.49 ± 9.76 (n=74)	0.006
	屠宰重量 (kg)	328.83 ± 3.20 (n=206)	301.25 ± 6.68 (n=67)	6.20 × 10 ⁻⁷
	左肢重量 (kg)	209.90 ± 2.12 (n=206)	197.44 ± 5.16 (n=67)	0.028
	右肢重量 (kg)	210.41 ± 2.19 (n=206)	196.85 ± 5.18 (n=67)	0.018
	腰肉 (kg)	3.70 ± 0.05 (n=205)	3.37 ± 0.10 (n=67)	0.003
	腿肌 (kg)	1.96 ± 0.05 (n=206)	1.74 ± 0.05 (n=66)	0.016
	后展心 (kg)	1.59 ± 0.02 (n=202)	1.45 ± 0.05 (n=66)	0.002
	钱筋 (kg)	1.22 ± 0.02 (n=206)	1.13 ± 0.03 (n=67)	0.013
雌性 (n=312)	肋眼 (kg)	2.78 ± 0.028 (n=206)	2.62 ± 0.06 (n=67)	0.024
	牛肩峰 (kg)	1.96 ± 0.048 (n=192)	1.96 ± 0.05 (n=61)	0.006
	牛肩芯 (kg)	1.15 ± 0.029 (n=202)	1.00 ± 0.04 (n=66)	0.041
	嫩牛排 (kg)	5.35 ± 0.061 (n=205)	4.98 ± 0.14 (n=67)	0.019
	牛腩膜 (kg)	2.82 ± 0.04 (n=205)	2.62 ± 0.08 (n=67)	0.016
	牛腩 (kg)	7.88 ± 0.13 (n=206)	7.27 ± 0.27 (n=65)	0.029
	里脊肉 (kg)	10.28 ± 0.56 (n=80)	12.88 ± 1.06 (n=23)	0.036
	三角牛排 (kg)	4.55 ± 0.058 (n=206)	4.31 ± 0.12 (n=66)	0.046
	上三筋 (kg)	1.28 ± 0.018 (n=206)	1.19 ± 0.035 (n=67)	0.025
	牛里脊 (kg)	2.43 ± 0.038 (n=202)	2.24 ± 0.065 (n=65)	0.013
钱肉 (kg)	5.07 ± 0.095 (n=204)	4.65 ± 0.15 (n=67)	0.023	

- CRY1* 基因存在4个InDel位点，其中rs133189221位点具有多态性，是位于内含子1上的6-bp的缺失；仅存在II和ID两种分型；呈低度遗传多态性。
- 在山东黑牛遗传资源 (SDBCGR) 群体 (n=433) 中发现该位点的缺失突变与肉牛的腹肉重、屠宰重量、牛肩峰重等20个肉质性状显著相关。在多数肉质性状中，II基因型表现明显优于ID基因型。

2 *CRY2* 基因

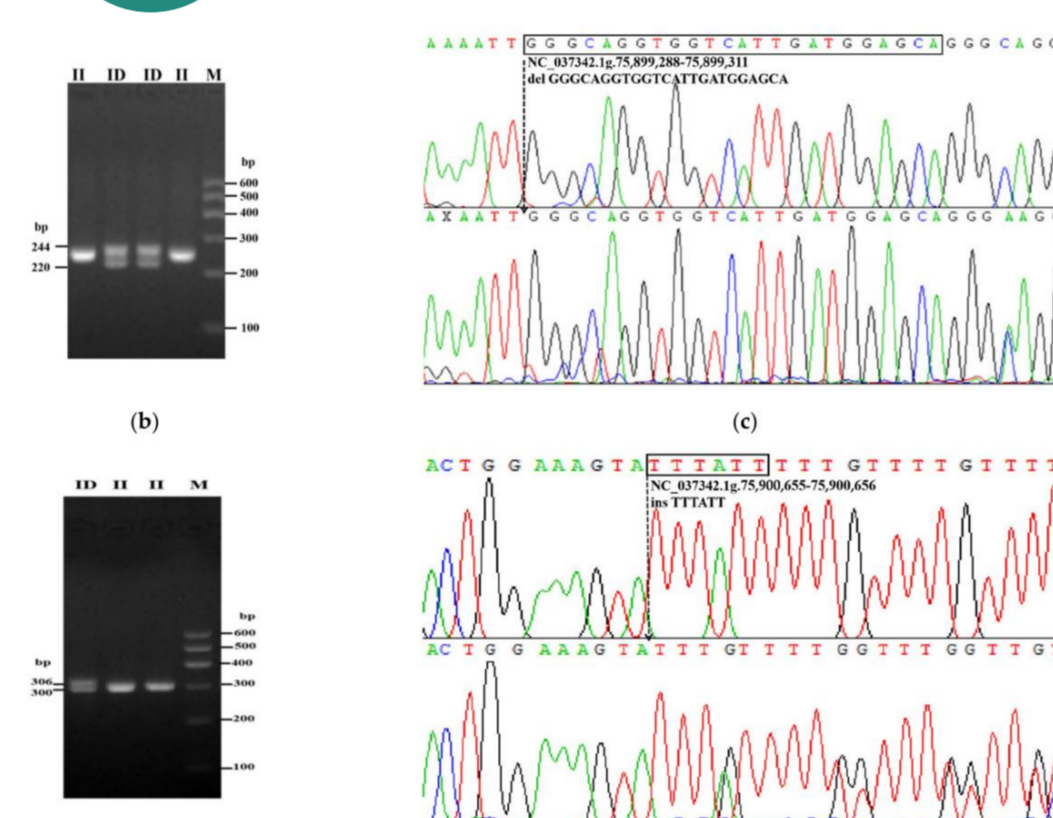


图2 *CRY2*基因上*CRY2*-P6 (b,c) 和*CRY2*-P7 (d,e) InDel鉴定结果

表3 SDBCGR群体中 *CRY2* 基因的群体遗传参数

位点	种多态性	基因型频率	等位基因频率	HWE	Ho	He	Ne	PIc
<i>CRY2</i> -P7	702	0.931 (n=653)	0.067 (n=47)	0.001	0.931	0.069	1.369	0.062
<i>CRY2</i> -P6	702	0.622 (n=433)	0.378 (n=269)	0.001	0.389	0.611	0.508	1.461

表5 *CRY2*基因*CRY2*-P7与牛肉品质性状相关性分析表

肉质性状	观察到的基因型 (平均值 ± SE)		P值
	II	ID	
毛重 (kg)	3.44 ± 0.07 (n=19)	1.38 ± 0.04 (n=33)	0.046
腰肉重 (kg)	9.24 ± 0.34 (n=48)	7.89 ± 0.47 (n=45)	0.001
腿肌 (kg)	4.74 ± 0.40 (n=186)	4.08 ± 0.41 (n=117)	0.041
后展心 (kg)	1.18 ± 0.04 (n=233)	1.26 ± 0.04 (n=100)	0.001

表4 *CRY2*基因*CRY2*-P6与牛肉品质性状相关性分析表

肉质性状	观察到的基因型 (平均值 ± SE)		P值
	II	ID	
毛重 (kg)	765.36 ± 7.93 (n=181)	669.73 ± 24.90 (n=11)	0.004
背部肌腱 (kg)	0.85 ± 0.02 (n=91)	0.72 ± 0.05 (n=6)	0.041
牛腩膜 (kg)	3.60 ± 0.07 (n=91)	2.71 ± 0.21 (n=6)	0.002
右肢重量 (kg)	230.41 ± 3.14 (n=91)	201.00 ± 15.02 (n=5)	0.036
钱筋 (kg)	1.49 ± 0.03 (n=91)	1.15 ± 0.13 (n=6)	0.002
牛腩膜 (kg)	7.69 ± 0.13 (n=90)	6.13 ± 0.48 (n=6)	0.004
三角侧翼 (kg)	7.13 ± 0.13 (n=106)	6.08 ± 0.35 (n=9)	0.020
肋眼 (kg)	12.39 ± 0.19 (n=105)	11.09 ± 0.32 (n=10)	0.044
高肋 (kg)	18.72 ± 0.48 (n=106)	13.25 ± 1.56 (n=10)	0.001
牛里脊 (kg)	6.10 ± 0.09 (n=103)	5.69 ± 0.12 (n=10)	0.012
牛腩膜 (kg)	3.01 ± 0.03 (n=376)	2.79 ± 0.11 (n=33)	0.034
厚侧翼 (kg)	11.41 ± 0.12 (n=376)	10.38 ± 0.38 (n=33)	0.017
右肢重量 (kg)	209.08 ± 1.75 (n=377)	196.60 ± 5.38 (n=33)	0.042
去骨短排骨 (kg)	1.24 ± 0.02 (n=372)	1.10 ± 0.06 (n=32)	0.033

- 在 *CRY2* 基因上发现了位于内含子区域的24-bp缺失 (*CRY2*-P6) 和6-bp插入 (*CRY2*-P7)。*CRY2*-P7 有中度遗传多态性，*CRY2*-P6 则遗传多态性较低。
- 在 SDBCGR 群体 (n=705) 中发现两个多态性位点与毛重、钱筋重、里脊重、牛腩重等近20个肉质性状显著相关，纯合型个体表现优异。

3 *HOXA11* 基因

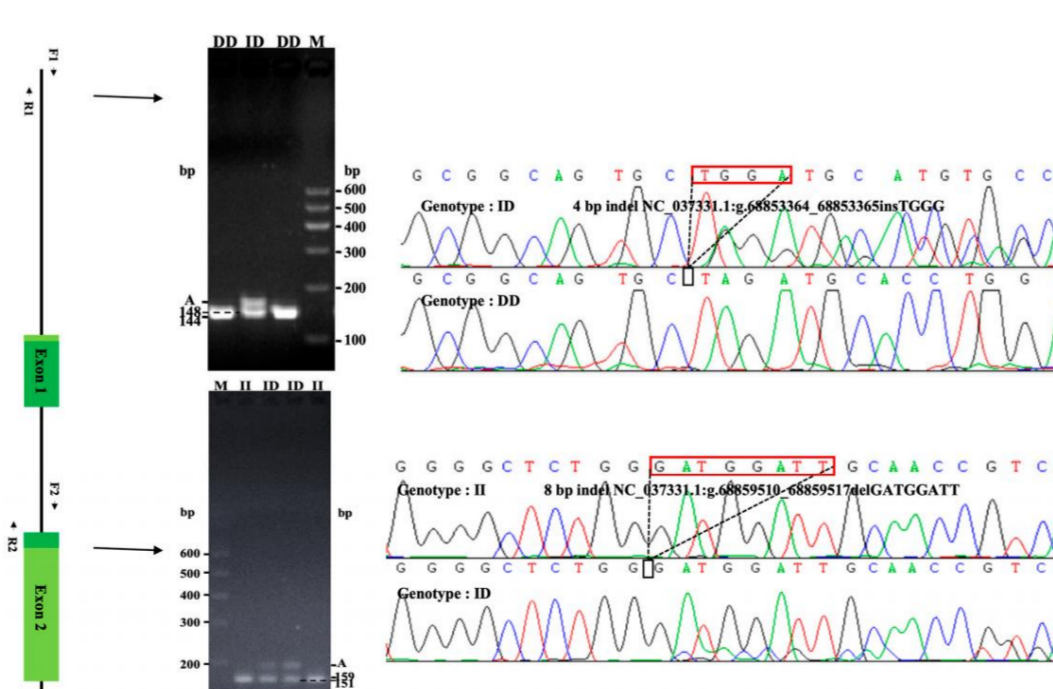


图3 *HOXA11*基因上P1-Ins-4-bp和P2-Del-8-bp InDel鉴定结果

表6 SDBCGR群体中*HOXA11* 基因内InDel的遗传参数

位点	种多态性	基因型频率	等位基因频率	HWE	Ho	He	Ne	PIc
P1-Ins-4-bp	640	0.993 (n=639)	0.007 (n=4)	0.001	0.993	0.007	1.008	0.008
P2-Del-8-bp	640	0.993 (n=639)	0.007 (n=4)	0.001	0.993	0.007	1.008	0.008

表7 *HOXA11*基因P1-Ins-4-bp与牛肉品质性状相关性分析表

肉质性状	观察到的基因型 (平均值 ± SE)		P值
	ID	II	
牛腩 (kg)	1.30* ± 0.14 (n=79)	1.67* ± 0.24 (n=180)	0.002
颈肉 (kg)	1.30* ± 0.14 (n=79)	1.67* ± 0.24 (n=180)	0.004

- 在 *HOXA11* 基因上发现了位于上游区域的4-bp插入和内含子区域的8-bp的缺失；两个突变均具有低多态性。
- 在 SDBCGR 群体 (n=640) 中发现 *HOXA11* 两个缺失突变位点与牛肩重、舌根重、背部肌腱重等11个肉质性状显著相关，且多数性状纯合型个体表现优异。

表8 *HOXA11*基因P2-Del-8-bp与牛肉品质性状相关性分析表

肉质性状	观察到的基因型 (平均值 ± SE)		P值
	ID	II	
背部肌腱 (kg)	0.55* ± 0.06 (n=6)	0.71* ± 0.01 (n=363)	0.008
金钱腱 (kg)	1.06* ± 0.02 (n=6)	1.21* ± 0.01 (n=366)	2.84 × 10 ⁻⁴
后侧翼 (kg)	9.47* ± 0.53 (n=6)	11.37* ± 0.11 (n=363)	0.034
牛腩肉 (kg)	14.17* ± 0.17 (n=6)	15.92* ± 0.28 (n=323)	9.09 × 10 ⁻⁷
三角形厚翼 (kg)	2.09* ± 0.1 (n=6)	2.53* ± 0.03 (n=367)	0.040
三角形侧翼 (kg)	3.79* ± 0.08 (n=6)	4.78* ± 0.05 (n=367)	1.00 × 10 ⁻⁶
颈肉 (kg)	3.90* ± 0.15 (n=6)	4.73* ± 0.04 (n=365)	0.018
小里脊肉 (kg)	2.00* ± 0.18 (n=6)	2.43* ± 0.03 (n=358)	0.043
牛腩脂肪 (kg)	4.48* ± 0.96 (n=4)	3.36* ± 0.11 (n=82)	0.045

3 *HOXA11* 基因表达分析

发现*HOXA11*基因在肌肉和脂肪组织中高表达，提示它可能参与了肌肉和脂肪发育的调控。进一步检测了*HOXA11*基因在不同分化时期的脂肪细胞和成肌细胞中的表达，发现其与相关的标志基因表达呈正相关(*C/EBPα* (P=0.042), *DES* (P=0.018), *MyHC* (P=0.012), *MyoG* (P=0.004)),表明其可能参与脂肪和肌肉细胞的分化。

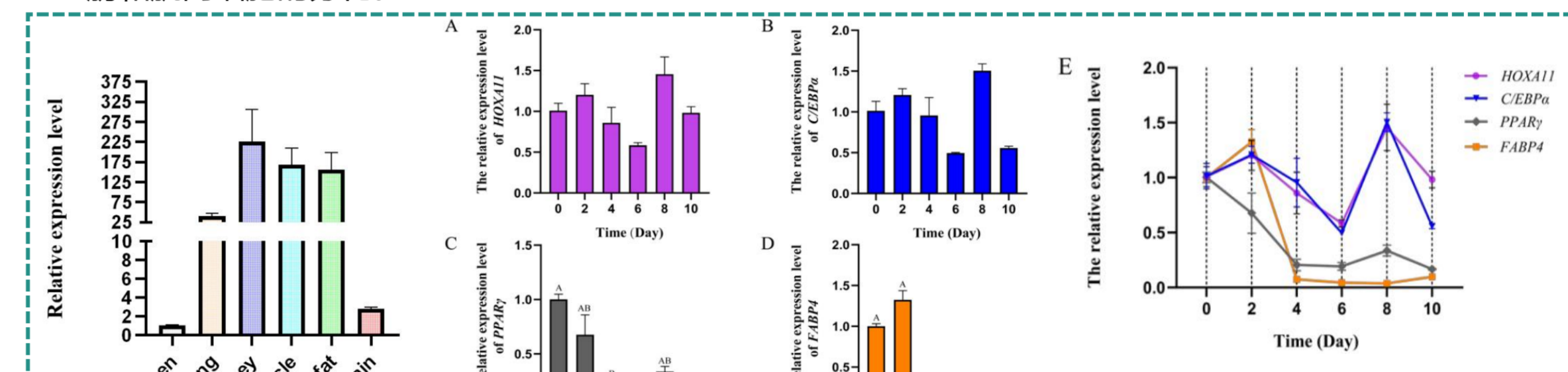


图5 通过qRT-PCR检测小牛不同组织中*HOXA11*的相对表达水平

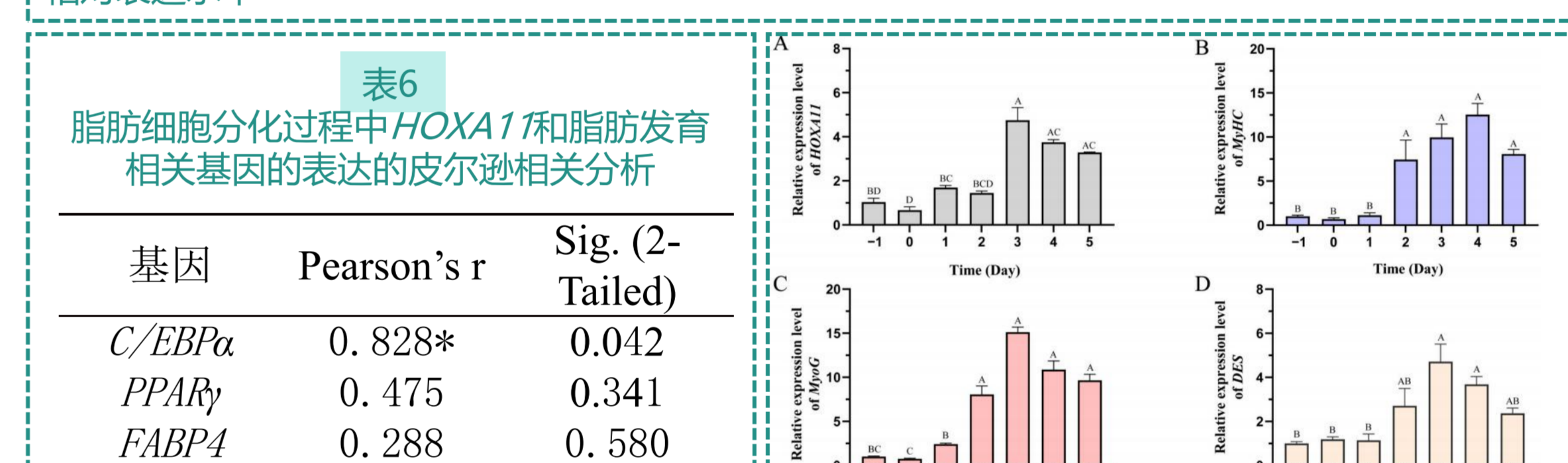


图6 脂肪细胞中*HOXA11*和脂肪发育相关基因的表达特征

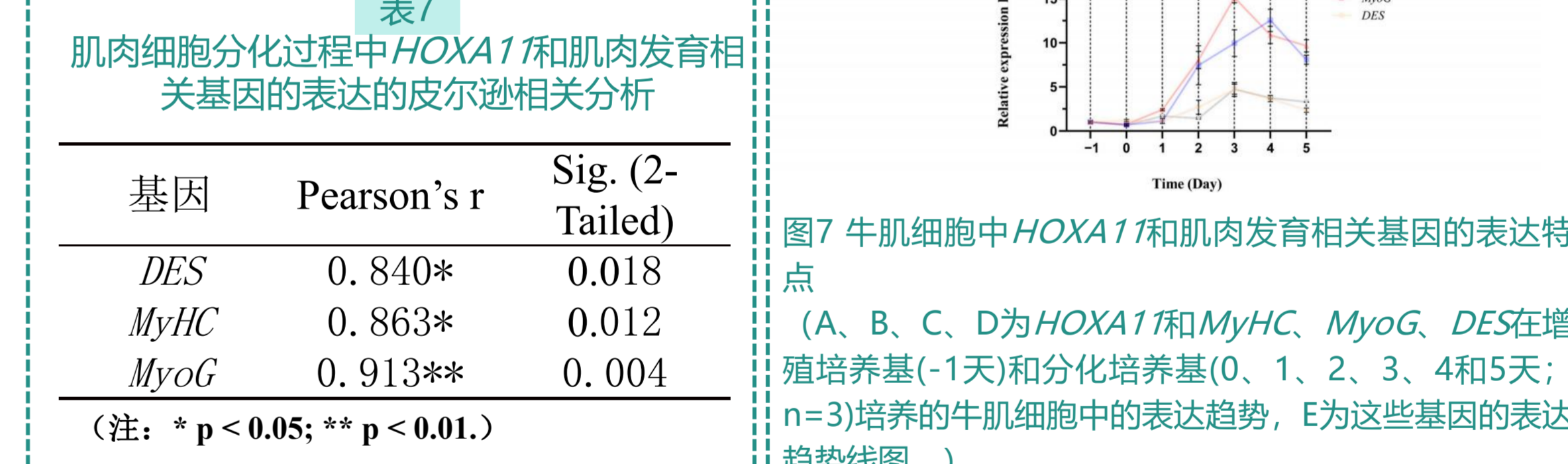


图7 肌细胞中*HOXA11*和肌肉发育相关基因的表达特征

表6 脂肪细胞分化过程中*HOXA11*和脂肪发育相关基因的皮尔逊相关分析

基因	Pearson's r	Sig. (2-Tailed)
<i>C/EBPα</i>	0.828*	0.042
<i>PPARγ</i>	0.475	0.341
<i>FABP4</i>	0.288	0.580

(注: * p < 0.05)

表7 肌细胞分化过程中*HOXA11*和肌肉发育相关基因的皮尔逊相关分析

基因	Pearson's r	Sig. (2-Tailed)
<i>DES</i>	0.840*	0.018
<i>MyHC</i>	0.863*	0.012
<i>MyoG</i>	0.913**	0.004

(注: * p < 0.05; ** p < 0.01.)

实验结论

- CRY1*、*CRY2*、*HOXA11* 基因中的5个InDel位点与肉牛屠宰重量、腹肉重、里脊重、牛腩重等肉质性状显著相关 (P<0.05或P<0.01)。
- HOXA11* 基因在肌肉和脂肪组织中高表达，同时，*HOXA11* 基因的表达特征与 *C/EBPα* (P=0.042)、*DES* (P=0.018)、*MyHC* (P=0.012) 和 *MyoG* (P=0.004) 的表达呈显著正相关。这些结果表明，*HOXA11* 可能参与牛成肌细胞和脂肪细胞的发育。

获得成就

- 第八届全国大学生生命科学竞赛创新创业类国家级二等奖；
- 以上成果以项目负责人为第一作者发表在SCI期刊Animal Biotechnology (JCR2区/IF=3.7)、并列第一作者发表在SCI期刊Cells (中科院大类二区/IF=6.0)、第三作者发表在SCI期刊Animals (中科院大类二区/IF=3.0)。
- 感谢大学生创新创业训练项目 (202210712103) 资助。



联系邮箱: zkj679@126.com (张珂菁)