

# 荷斯坦母牛 *OSTF1* 基因多态性 及其与体细胞评分的关系

郎咸政<sup>1,2</sup> 刘小林<sup>1</sup> 储明星<sup>2</sup> 安永福<sup>3</sup> 狄冉<sup>2</sup> 方丽<sup>2</sup>

1. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100;

2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所/农业部畜禽遗传资源与利用重点开放实验室, 北京 100193;

3. 河北省畜牧兽医研究所, 保定 071000

**摘要** 设计5对引物 P1-P5, 利用 PCR-SSCP 技术检测 227 头荷斯坦母牛促破骨细胞因子 1 (osteoclast stimulating factor 1, *OSTF1*) 基因部分序列的多态性。结果发现只有 P3 扩增的外显子 7 区域存在 A45416G 和 C45436T 2 个突变位点, 其中 A45416G 突变位点导致蛋氨酸(M)变为缬氨酸(V)。经 SSCP 分析存在 AA、AB、BB、AC 和 CC 5 种基因型, 其频率分别为 0.515、0.366、0.075、0.035、0.009。用最小二乘法分析 *OSTF1* 基因多态性与荷斯坦母牛体细胞评分 (somatic cell score, SCS) 的关系, 结果表明: 对于 P3 扩增产物多态位点, BB 基因型 SCS 最小二乘均值显著低于 AA、AB、AC 基因型所对应的值 (均为  $P < 0.05$ ); AA、AB、AC 之间 SCS 最小二乘均值差异不显著 ( $P > 0.05$ )。BB 基因型为乳房炎抗性基因型。在中国荷斯坦奶牛群体中, *OSTF1* 基因 BB 基因型可作为改良奶牛乳房炎抗性性状的分子遗传标记。

**关键词** 荷斯坦母牛; *OSTF1* 基因; 乳房炎; 体细胞评分; PCR-SSCP

**中图分类号** S 823.9<sup>+</sup>12 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)06-0680-05

乳房炎 (mastitis) 是严重影响奶牛生产经济效益的常发病<sup>[1]</sup>。依赖抗生素和疫苗进行防治效果并不十分理想。随着抗病育种的兴起和发展, 筛选乳房炎抗性基因标记已成为近年的研究热点。

促破骨细胞因子 (osteoclast stimulating factor, *OSTF*) 是一种胞内信号蛋白, 由破骨细胞自身产生。它可通过细胞信号转导级联来加强破骨细胞的形成和骨吸收<sup>[2]</sup>。*OSTF* 由 2 个结构域 (SH3 和锚蛋白重复序列) 组成。SH3 结构域可与脊髓性肌萎缩症的决定基因 SMN (survival motor neuron) 第六外显子结合, 以此影响脊髓性肌萎缩症的发生<sup>[3]</sup>。锚蛋白重复序列则可能与组织分化有关<sup>[4]</sup>。Schwering 等<sup>[5]</sup>应用 DDRT-PCR 技术研究了健康和临床型乳房炎的奶牛乳腺组织中基因的差异表达, 发现 *OSTF1* 可能与乳房炎抗性相关, 可作为研究乳房炎的候选基因。

体细胞数 (somatic cell count, SCC) 是指每毫升乳汁中体细胞的数量, 它是目前许多国家提高奶牛

乳房炎抗性的首选性状<sup>[6]</sup>。体细胞评分 (somatic cell score, SCS) 和乳房炎的遗传相关在 0.30~0.98 之间。SCC/SCS 是通过选择间接降低乳房炎发生率的最适宜的单个性状, 对低 SCC/SCS 的公牛的遗传评定和选择可以降低乳房炎发生率<sup>[7-11]</sup>。

本研究对荷斯坦母牛 *OSTF1* 基因多态性进行分析, 初步探索 *OSTF1* 基因与牛乳中体细胞数/体细胞评分的关系, 以期作为奶牛乳房炎抗性标记辅助选择提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

227 头荷斯坦母牛 (57 头来自牛场 1, 60 头来自牛场 2, 58 头来自牛场 3, 52 头来自牛场 4) 血样采自河北省 4 个奶牛场。这些母牛是 5 头公牛的后代, 其数目分别为 41、43、46、47、50 头。实际第 1 胎 ( $n=72$ )、第 2 胎 ( $n=75$ ) 和第 3 胎 ( $n=80$ ) 分别作为 3 个胎次。2007 年, 这 4 个奶牛场母牛平均体细胞

收稿日期: 2010-09-30

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划课题 (2006BAD04A10)、北京市自然科学基金项目 (6022015)、国家“863”计划项目 (2008AA10Z144) 和陕西省“13115”科技创新工程项目 (2008ZDKG211)

郎咸政, 硕士, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: langxianzheng@163.com

通讯作者: 刘小林, 博士, 教授, 研究方向: 分子数量遗传学。E-mail: liuxiaolin@nwsuaf.edu.cn

数分别为 70、55、40、45 万/mL。经颈静脉采血，所采血样均为 10 mL/头，用柠檬酸葡萄糖抗凝，-20 °C 冻存。

### 1.2 主要试剂

*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA 回收试剂盒、pGM-T 载体均购自北京天根生物技术有限公司。

### 1.3 基因组 DNA 提取

用酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA，溶于 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 1 mmol/L ED-

TA(pH 8.0))，于 -20 °C 保存。用紫外分光光度计(UV-1, 中国上海)和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的纯度，稀释 DNA 样品至 50 ng/ $\mu$ L。

### 1.4 引物设计

根据 GenBank 上公布的牛 *OSTF1* 基因序列(NC\_007306)，用 Primer 5.0 和 Oligo 6.0 软件设计 5 对引物，由上海英骏生物技术有限公司合成。引物序列、目的片段长度、扩增区域及退火温度见表 1。

表 1 牛 *OSTF1* 基因外显子 PCR 扩增的引物序列、目的片段长度、扩增区域及退火温度

Table 1 Primer sequence, product size, amplified region and annealing temperature of PCR amplification for exons of bovine *OSTF1* gene

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	扩增长度/bp Product size	引物对应位点 <sup>1)</sup> Location	退火温度/°C Annealing temperature
P1	F: TTGGGTACTAAGCTGGTTT	160	42 789~42 807	54
	R: CATCTCAATCAAAAAGAATCAT		42 927~42 948	
P2	F: GCAAACAAAAAATGAGAATAT	187	44 340~44 361	51
	R: GTAACAAACAAACGCAAT		44 508~44 526	
P3	F: CAGGCTTTTATCCCATCTTT	182	45 354~45 375	53
	R: CGACAGGATTTACACACCT		45 516~45 535	
P4	F: TACTCTCTTGTATCAC	173	49 116~49 134	51
	R: TTTAAATGGTGTAAATTGGAT		49 269~49 288	
P5	F: GGCTGCTACTATAGAGTCTT	230	52 324~52 343	55
	R: GAACCTTCCCAATATTGAAT		52 533~52 553	

1) 对应于 GenBank 登录号为 NC\_007306 的牛 *OSTF1* 基因序列的碱基位置。Base positions corresponding to NC\_007306 of GenBank.

### 1.5 PCR-SSCP 分析

PCR 扩增总体积为 25  $\mu$ L，其中 10 $\times$  缓冲液(含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5  $\mu$ L，10  $\mu$ mol/L 上下游引物各 0.5  $\mu$ L，2.5 mmol/L dNTPs 2.0  $\mu$ L，50 ng/ $\mu$ L DNA 模板 3.5  $\mu$ L，2.5 U/ $\mu$ L *Taq* DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L，去离子水 15.5  $\mu$ L。扩增条件：95 °C 预变性 5 min；95 °C 变性 30 s，退火 30 s(温度见表 1)，72 °C 延伸 30 s，34 个循环；72 °C 延伸 10 min，4 °C 保存。产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

3  $\mu$ L PCR 产物和 7  $\mu$ L 变性剂(98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯氰、10 mmol/L EDTA(pH 8.0) 和 10% 甘油)混匀，98 °C 变性 10 min，然后冰浴 7 min。变性后 PCR 产物在 10%~12% 非变性聚丙烯酰胺：甲叉双丙烯酰胺(39:1)凝胶中常温过夜，电泳结束后，银染显带。用凝胶成像仪 AlphaImagerTM 2200 and 1220 Documentation and Analysis Systems (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA)拍照和分析，判定基因型。

### 1.6 克隆测序

挑取不同带型个体各 5 个进行 PCR 扩增，PCR 产物用 DNA 快速纯化回收试剂盒纯化，回收后的

DNA 片段用 pGM-T 载体连接，并转化到大肠杆菌 (*E. coli*) Top10 菌株，鉴定后选 3 个送金唯智生物科技(北京)有限公司测序。

### 1.7 体细胞数的测定

用丹麦生产的电子计数器(Series 300 Fossomatic Type 75200)测定 227 头荷斯坦母牛牛乳中的体细胞数，每月测定 1 次，连续测 10 次，平均值作为母牛该胎次的体细胞数。方差分析中假设检验要求误差应当正态分布以及亚组方差应当是齐性的。因而，SCC 数据在分析之前必须进行转换。Ali 等<sup>[12]</sup>报道未转换的 SCC 数据广泛的偏离正态性和齐性，SCC 的对数转换是获得正态分布的最佳方法。体细胞评分(SCS=[log<sub>2</sub>(SCC/100)]+3，其中 SCC 单位为千/mL)是正态分布的，已被美国奶牛群改良合作计划接受为 SCC 的标准记录尺度<sup>[12]</sup>。记录母牛的牛号、父号、所在牛场、所处胎次、体细胞评分。

### 1.8 数据分析

配合下列模型进行最小二乘分析，比较奶牛体细胞评分在 *OSTF1* 基因型之间的差异。

$$y_{ijklm} = \mu + S_i + H_j + P_k + G_l + e_{ijklm}$$

其中： $y_{ijklm}$  为体细胞评分值； $\mu$  为群体均值； $S_i$  为第  $i$  头公牛的固定效应， $i=1,2,3,4,5$ ； $H_j$  为第  $j$  个奶牛场的固定效应， $j=1,2,3,4$ ； $P_k$  为第  $k$  个胎次的固定效应， $k=1,2,3$ ； $G_l$  为第  $l$  种基因型的固定效应， $l=1,2,3,4,5$ ； $e_{ijklm}$  为随机残差效应。用 SAS (V 8.12) 的 GLM (general linear model) 过程完成。

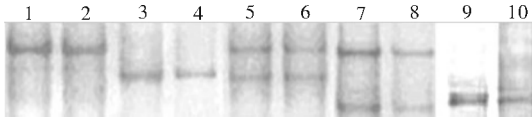
## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 产物

用引物 P1~P5 分别对提取的荷斯坦母牛基因组 DNA 进行扩增，所得 PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明扩增片段与目的片段大小一致且特异性好，可以直接进行 SSCP 分析。

### 2.2 SSCP 检测

引物 P1~P5 的 PCR 产物分别进行 SSCP 分析，结果发现引物 P3 扩增片段有多态性，其余 4 对引物的扩增片段都不存在多态性。P3 扩增产物共检测到 5 种基因型，分别定义为 AA、AB、BB、AC、CC (图 1)。



1,2:AA; 3,4:BB; 5,6:AB; 7,8:AC; 9,10:CC.

图 1 引物 P3 扩增产物的 SSCP 分析

Fig. 1 SSCP analysis of PCR amplification products of primer P3

### 2.3 序列分析

取 AA、BB 和 CC 三种基因型的 PCR 产物片段进行克隆、测序。BB 型与 AA 型相比在 45 416 bp 处有 A→G 的突变 (图 2)，导致第 124 个编码氨基酸的改变 (蛋氨酸变为缬氨酸)。CC 型与 AA 和 BB 型相比在 45 436 bp 处有 C→T 的突变 (图 2)，没有引起编码氨基酸的变化。

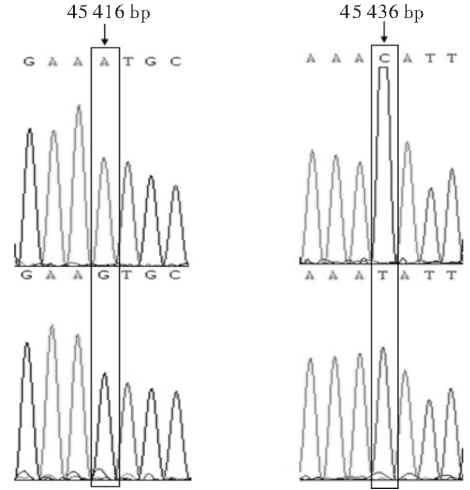


图 2 荷斯坦母牛 OSTF1 基因的 2 个 SNPs

Fig. 2 Two SNPs of OSTF1 gene in Holstein cows

### 2.4 OSTF1 基因的等位基因频率和基因型频率

荷斯坦母牛 OSTF1 基因 P3 扩增片段的等位基因频率和基因型频率统计结果见表 2。其中，基因型频率和等位基因频率均以 AA 型最高。

表 2 荷斯坦母牛 OSTF1 基因的等位基因频率和基因型频率  
Table 2 Allele and genotype frequencies of OSTF1 gene in Holstein cows

引物 Primer	基因型 Genotype	个体数 Number of samples	基因型频率 Genotype frequency	等位基因 Allele	等位基因频率 Allele frequency
P3	AA	117	0.515	A	0.716
	AB	83	0.366		
	BB	17	0.075	B	0.258
	AC	8	0.035		
	CC	2	0.009	C	0.026

### 2.5 固定效应对牛乳中体细胞评分的影响

对于 P3 多态位点，方差分析结果表明公牛、牛场、胎次、基因型对牛乳中体细胞评分都有显著影响 (均为  $P < 0.05$ )；荷斯坦母牛 OSTF1 基因 P3 不同基因型的体细胞评分最小二乘均值及标准误差见表 3 (其中 CC 基因型由于个体数太少，不予考虑)。

由表 3 可知，对于 P3 多态位点，SCS 最小二乘均值的关系是  $BB < AC < AB < AA$ ；AA、AB、AC 之间 SCS 最小二乘均值差异不显著 ( $P > 0.05$ )；BB 基因型 SCS 最小二乘均值显著低于 AA、AB、AC 基因型所对应的值 (均为  $P < 0.05$ )。可初步得出结论：BB 基因型为乳房炎抗性基因型。

表 3 荷斯坦母牛 *OSTF1* 基因 P3  
不同基因型的体细胞评分最小二乘均值及标准误<sup>1)</sup>

Table 3 Least squares means and standard errors for  
somatic cell scores of different genotypes of  
P3 of *OSTF1* gene in Holstein cows

引物 Primer	基因型 Genotype	样本数 Number of samples	体细胞评分 Somatic cell score
P3	AA	117	4.18±0.12 a
	AB	83	4.10±0.16 a
	BB	17	3.27±0.19 b
	AC	8	4.04±0.21 a

1) 具有相同小写字母的平均值间差异不显著 ( $P>0.05$ ), 具有不同小写字母的平均值间差异显著 ( $P<0.05$ )。Least squares means with the same lowercase letter have no significant difference ( $P>0.05$ ). Least squares means with the different lowercase letter have significant difference ( $P<0.05$ ).

### 3 讨论

#### 3.1 *OSTF1* 基因多态性

*OSTF1* 基因多态性较为丰富, 目前在 NCBI 数据库中收录牛的 *OSTF1* 基因 SNP 位点有 21 个, 但相关的文献报道却很少。

本研究中, 检测到荷斯坦母牛 *OSTF1* 基因存在 A45416G、C45436T 突变位点。共出现 5 种基因型 (AA、AB、BB、AC、CC), 未发现 BC 基因型, 其原因可能是因为检测样本数量小, 且 BC 基因型频率较低。因此, 需要扩大样本量作进一步探讨。

#### 3.2 *OSTF1* 基因与体细胞评分的关系

有关 *OSTF1* 基因的报道还比较少。Reddy 等<sup>[2]</sup> 通过免疫印迹分析, *OSTF1* 在细胞溶菌产物中表达, 并且发现 *OSTF1* 与 c-致敏反应细胞的亲和力很高。锚蛋白结构域介导蛋白质之间的相互作用, 跟多种配体结合, 也可能与疾病发生相关。另外, 破骨细胞具有特殊的吸收功能, 参与某些局部炎症病灶的吸收。在破骨细胞的活化和骨质吸收过程中, 需要多种炎症因子参与反应<sup>[13]</sup>, 如白细胞介素、肿瘤坏死因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子和干扰素等。因此, *OSTF1* 可能对于炎症发生具有病理生理影响。

本研究检测到的 *OSTF1* 基因 2 个突变位点 (A45416G、C45436T) 所产生的不同基因型对 SCS 影响显著, 其中 A45416G 可能是与突变造成氨基酸的改变而引起蛋白质变化有关。本研究结果初步表明 *OSTF1* 基因 A45416G 多态位点的 B 等位基因

与荷斯坦母牛较低 SCS 显著相关 ( $P<0.05$ ), A 等位基因与较高 SCS 显著相关 ( $P<0.05$ ), 这表明 *OSTF1* 基因的 B 等位基因具有作为乳房炎抗性遗传标记的潜在有效性。C45436T 多态位点的 C 等位基因由于检测到个体数太少, 需进一步扩大样本进行验证研究。

### 参 考 文 献

- [1] 冯瑞章. 浅谈奶牛乳房炎[J]. 甘肃畜牧兽医, 2008, 38(1): 34-35.
- [2] REDDY S V, ROODMAN G D. Control of osteoclast differentiation[J]. Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression, 1998, 8(1): 1-17.
- [3] KURIHARA N, MENAA C, MAEDA H, et al. Osteoclast-stimulating factor interacts with the spinal muscular atrophy gene product to stimulate osteoclast formation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(44): 41035-41039.
- [4] LUX S E, JOHN K M, BENNETT V. Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins[J]. Nature, 1990, 344(6261): 36-42.
- [5] SCHWERIN M, CZERNEK-SCHAFFER D, GOLDAMMER T, et al. Application of disease associated differentially expressed genes-mining for functional candidate genes for mastitis resistance in cattle[J]. Genetics Selection Evolution, 2003, 35(Suppl 1): 19-34.
- [6] AXFORD R F E, BISHOP S C, NICHOLAS F W, et al. Breeding for disease resistance in farm animals [M]. 2nd Edition. Wallingford: CABI Publishers, 2000: 243-252.
- [7] MRODE R A, SWANSON G J T. Genetic and statistical properties of somatic cell count and its suitability as an indirect means of reducing the incidence of mastitis in dairy cattle[J]. Animal Breeding Abstracts, 1996, 64(11): 847-857.
- [8] COFFEY E M, VINSON W E, PEARSON R E. Potential of somatic cell concentration in milk as a sire selection criterion to reduce mastitis in dairy cattle[J]. Journal of Dairy Science, 1986, 69(8): 2163-2172.
- [9] EMANUELSON U, DANELL B, PHILIPSSON J. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell counts, and milk production estimated by multiple-trait restricted maximum likelihood[J]. Journal of Dairy Science, 1988, 71(2): 467-476.
- [10] PHILIPSSON J, RAL G, BERGLUND B. Somatic cell count as a selection criterion for mastitis resistance in dairy cattle[J]. Livestock Production Science, 1995, 41(3): 195-200.
- [11] RENEAU J K. Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control[J]. Journal of Dairy Science, 1986, 69(6): 1708-1720.
- [12] ALI A K A, SHOOK G E. An optimum transformation for somatic cell concentration in milk[J]. Journal of Dairy Science,

1980,63(3):487-490.

therapies for rheumatoid arthritis[*J*]. *Nature Reviews*

[13] McINNES I B, LIEW F Y. Cytokine networks-towards new

*Rheumatology*,2005(1):31-39.

## Polymorphisms of *OSTF1* gene and their relationship with somatic cell score in Holstein cows

LANG Xian-zheng<sup>1,2</sup> LIU Xiao-lin<sup>1</sup> CHU Ming-xing<sup>2</sup> AN Yong-fu<sup>3</sup> DI Ran<sup>2</sup> FANG Li<sup>2</sup>

1. *College of Animal Science and Technology, Northwest Science  
University of Agriculture & Forestry, Yangling 712100, China;*

2. *Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences/  
Key Laboratory of Farm Animal Genetic Resources and Utilization of  
Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China;*

3. *Hebei Animal Science and Veterinary Medicine Institute, Baoding 071000, China*

**Abstract** The genetic polymorphisms of partial sequence of *OSTF1* (osteoclast stimulating factor 1) gene in 227 Holstein cows were detected by PCR-SSCP with five pairs of primers P1-P5. Two polymorphic sites, A45416G and C45436T of primer P3 were found, and A45416G mutation caused amino acid change (methionine→valine). Five genotypes (AA, AB, BB, AC and CC) were found in Holstein cows, and the genotype frequencies of AA, AB, BB, AC and CC were 0.515, 0.366, 0.075, 0.035 and 0.009, respectively. The relationship between polymorphisms of *OSTF1* gene and somatic cell score (SCS) in Holstein cows was analyzed by least squares linear model. Least squares mean of SCS for BB genotype was significantly lower than that for AA, AB or AC ( $P < 0.05$ ), and no significant difference was found in least squares mean of SCS between other genotypes ( $P > 0.05$ ). So genotype BB was mastitis resistant and it may be used as a molecular genetic marker to improve the phenotype of anti-mastitis in Chinese Holstein dairy cows.

**Key words** Holstein cows; *OSTF1* gene; mastitis; somatic cell score; PCR-SSCP

(责任编辑:边书京)