

doi:10.7668/hbxb.2014.05.011

牦牛 *Agouti* 基因的克隆及编码区多态性研究

张建^{1,2}, 梁春年², 吴晓云², 张良斌², 郭宪², 裴杰², 阎萍^{1,2}

(1. 甘肃农业大学 动物科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 中国农业科学院 兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃省牦牛繁育重点实验室, 甘肃 兰州 730050)

摘要:以 *Agouti* 基因作为牦牛毛色调控的候选基因, 探索 *Agouti* 基因编码区序列多态性, 以期阐明 *Agouti* 与毛色形成的相关性及其毛色形成机理奠定基础。根据 GenBank 已发表序列(NM_206843)设计 1 对引物, 以天祝白牦牛和黑色被毛甘南牦牛皮肤总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 技术扩增, 成功获得了牦牛 *Agouti* 基因编码区序列。采用生物信息学方法预测分析 *Agouti* 基因及其编码蛋白的基本理化性质、信号肽、疏水性、二级结构等; 采用 DNA 混合池测序法和直接测序法, 检测牦牛 *Agouti* 基因编码区的序列变异。结果表明, 扩增得到的 *Agouti* 基因的编码区是一条长为 593 bp 的 DNA 序列。黑色甘南牦牛和天祝白牦牛皮肤的 *Agouti* 基因序列相同, 并与黄牛基本一致。将牦牛的 *Agouti* 基因序列命名为 *YAK ASIP*, 并且在 NCBI 数据库中注册该基因的登录号为 KJ630463。该基因含有一个长度为 402 bp 的开放性阅读框, 编码 133 个氨基酸。*Agouti* 基因编码蛋白属于亲水性蛋白, 有一个明显的信号肽, 含有多个磷酸化位点。其二级结构主要以 α 螺旋和无规则卷曲为主。*Agouti* 基因编码产物氨基酸邻接系统树表明, 牦牛 *Agouti* 与黄牛、绵羊等物种的 *Agouti* 氨基酸具有高度相似性, 并且牦牛 *Agouti* 基因编码区中无多态性位点。

关键词:牦牛; *Agouti* 基因; 克隆; 生物信息学分析; 多态性

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)05-0059-07

Cloning of *Agouti* Gene in Yak and Polymorphisms Detection

ZHANG Jian-yi^{1,2}, LIANG Chun-nian², WU Xiao-yun², ZHANG Liang-bin²,
GUO Xian², PEI Jie², YAN Ping^{1,2}(1. Faculty of Animal Science and Technology of Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;
2. Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences of CAAS, Laboratory of Yak Breeding Engineering, Lanzhou 730050, China)

Abstract: In yak, *Agouti* gene is a potential candidate gene in yak skin's color formation and regulation, investigate in *Agouti* gene sequence polymorphism lay the foundation for revealing yak skin and coat color genetic mechanisms. The presented study using DNA cloning techniques to obtain yak *Agouti* gene encoding sequences. Using bioinformatics tools to forecast the protein's basic physical, chemical properties, hydrophobicity, signal peptide and secondary structure. The polymorphisms of *Agouti* gene CDS were identified by DNA pools and direct sequencing in Yak. The results showed that the obtained *Agouti* was a 593 bp DNA sequence. Gannan black yak *Agouti* gene was identical with that of Tianzhu white yak. Also, yak *Agouti* gene was similar with Bos. The yak *Agouti* gene was named *YAK ASIP* and registered number in NCBI was KJ630463. This gene encode a hydrophilic protein which containing 133 amino acids. It contains a clear signal peptide and several phosphorylation sites. The secondary structure of the protein was α helix secondary structure and random coil. The *Agouti* and related proteins of *Bos grunniens*, *Bos taurus*, *Ovis aries* are close in the phylogenetic tree, which showed highly homology. The gene sequence detection showed that the yak *Agouti* gene was without any polymorphisms.

Key words: Yak; *Agouti* gene; Cloning; Bioinformatic analysis; Polymorphisms

牦牛 (*Bos grunniens*) 是以我国青藏高原为起源 地的重要家畜, 其是青藏高原居民赖以生存的主要

收稿日期: 2014-07-09

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD13B05); 国家公益性行业科研项目(201003061)

作者简介: 张建一(1988-), 女, 辽宁抚顺人, 在读硕士, 主要从事动物遗传育种研究。

通讯作者: 阎萍(1963-), 女, 山西运城人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种和繁殖研究。

生产生活资料^[1]。牦牛皮肤和被毛颜色通常以黑色和黑褐色为主。其中天祝白牦牛被毛以白色为主。毛和皮肤颜色主要由毛发和皮肤的色素决定,哺乳动物皮肤及毛发的颜色主要取决于黑色素细胞产生的真黑色素和褐黑色素的含量及二者间的比例^[2]。研究表明,真黑色素和褐黑色素的含量及比例受多途径和多因素控制。毛色形成的基因可能有 200 种,涉及的蛋白质和多肽可能有 100 多种^[3]。*Agouti* 基因(*Agouti* signaling protein gene, *Agouti*)是少数参与调控毛的质和量的基因之一,其通过调节色素合成中真黑色素(*Eumelanin*)和棕黑色素(*Phaeomelanin*)之间的转换来调控毛色形成。*Agouti* 基因编码刺豚鼠信号蛋白(*Agouti* signaling protein, *ASIP*)信号蛋白。*ASIP* 是调控黑色素细胞产生黑色素(黑色或棕色色素)或产生褐黑色素(黄色或红色色素)的一个重要开关^[3]。在黑色素形成的 α -MSH 诱导信号通路中,黑色素皮质受体(*Melanocortin1* receptor, *MC1R*)是毛色形成过程中的重要受体蛋白。*ASIP* 可与 α -MSH 或 ACTH 竞争结合 *MC1R*,引起细胞内环腺苷酸磷酸(*Cyclic adenosine mono phosphate*, *cAMP*)水平下降^[4]。*cAMP* 通过级联反应影响真黑色素的合成。*Agouti* 基因通过此方式抑制真黑色素生成,进而产生褐黑色素^[5]。因此,我们把 *Agouti* 基因作为牦牛毛色的候选基因,以期阐明毛色形成机理奠定基础。小鼠和人 *Agouti* 基因分别在 1992 年和 1994 年被发现并克隆^[6-8]。相继大鼠、狐狸、猪、绵羊、狗、牛和马的 *Agouti* 基因以及其相关基因被发现或克隆^[9-17]。Eizirik 等^[18]通过克隆和测序猫科动物的 *Agouti* 基因;发现家猫的 *Agouti* 基因发生 1-2 bp 的缺失与黑色性状形成有关。此外,研究表明绵羊被毛显性白色与 *Agouti* 基因高表达显著相关^[19]。*Agouti* 基因表达与白色绵羊皮肤和隐性黑色绵羊皮肤形成有关^[12,19-20]。但是,另有研究发现,绵羊黑色斑点皮肤和白色皮肤中, *Agouti* 基因的表达量无明显差异^[21]。应用分子克隆技术和分子遗传标记研究牦牛毛色候选基因,可为动物品种的改良提供科学依据。关于牛的毛色遗传学研究相对较少,关于牦牛 *Agouti* 基因的研究未见报道。本研究分别对天祝白牦牛和黑色的甘南牦牛 *Agouti* 基因编码区序列进行克隆。并利用 DNA 混合池测序法和直接测序法,对 *Agouti* 基因进行测序。通过检测 *Agouti* 基因编码区的突变位点,从分子水平上初步筛查天祝白牦牛和甘南牦牛的 *Agouti* 基因编码区多态位点。以期研究牦牛毛色性状的标记辅助选择和育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 样品采集

1.1.1 皮肤采集 皮肤组织于 2013 年 11 月采集(表 1),并置于液氮罐中保存。

表 1 皮肤样品采集表

Tab. 1 Information of yak skin samples

样品 Sample	来源 Sampling location	样本量/只 Sample size
A1-A6	甘肃省天祝藏族自治县 健康成年天祝白牦牛	6
B1-B6	甘南藏族自治州 健康成年黑色被毛甘南牦牛	6

1.1.2 血液采集 在甘肃省天祝藏族自治县 2 个牦牛群体随机选择成年牦牛共 150 头,甘南藏族自治州 3 个牦牛群体随机选择成年牦牛 150 头。颈静脉采血 10 mL,ACD 抗凝($V_{\text{血液}}:V_{\text{ACD}}=6:1$),轻微振荡, -20°C 保存待用。

1.2 主要试剂

血液基因组 DNA 提取试剂盒、总 RNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、X-gal、IPTG、*Taq* 酶 Mix、反转录试剂盒、质粒提取试剂盒和大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 均为北京天根公司产品。限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*LA Taq* 聚合酶和 pMD19-T 克隆载体均购自大连 TaKaRa 公司。琼脂糖购自上海 YITO 公司。琼脂粉、酵母粉、胰蛋白胨均为 FISHER 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 引物设计与合成 参考 GenBank 所收录的黄牛 *ASIP* 基因 mRNA 序列(NM_206843),利用 Premier 5.0 与 Oligo 6.0 软件设计 1 对引物扩增 *Agouti* 基因编码区全长 PCR 引物(表 2,引物由上海生工公司合成)。同时参考 GenBank 收录的黄牛 *ASIP* 基因(AC_000170.1),采用交叉重叠原理设计 4 对引物对编码区进行扩增(表 3,引物由上海生工公司合成)。

表 2 牦牛 *ASIP* 基因克隆所用引物信息表

Tab. 2 Information of primer sequences for cloning within yak *ASIP* gene

引物 Primers	引物序列 Primer sequences	退火温度 / $^{\circ}\text{C}$ T_m	片段长 度/ bp Length
<i>ASIP</i> -I	F:5'-GAATCTAATCAGCGTCTCAA-3' R:5'-TGGTAGGTATCCCACAGTCT-3'	56.5	593

1.3.2 皮肤组织总 RNA 的提取 以成年天祝白牦牛皮肤组织和成年黑色被毛甘南牦牛皮肤为原材料,用 RNAsimple Total RNA kit 试剂盒提取皮肤组

织总 RNA,并进行琼脂糖凝胶电泳,鉴定 RNA 的完整性,于 -80 ℃ 保存待用。

表 3 鉴定牦牛 *ASIP* 基因突变位点所用引物信息表

Tab. 3 Information of primer sequences for scanning SNPs within yak *ASIP* gene

引物 Primers	引物序列 Primer sequences	退火温度/℃ T _m	片段长度/bp Length
A-1	F;5'-CCCTGGTCTTGTAAGTTGGA-3' R;5'-GTTATGTGTGCCCTCTGTGCT-3'	56.0	428
A-2	F;5'-CCAACCAAACCTTCATCC-3' R;5'-TAAGTCCAGTCCCATCCC-3'	54.0	378
A-3	F;5'-CGAGCCAGTAAAGTGTGAT-3' R;5'-GGAAAAGATTGGTTCGGGTT-3'	58.0	576
A-4	F;5'-CCACACTTCTACCACCCCTT-3' R;5'-CATACTCCATCTTGCTGCT-3'	57.0	632

1.3.3 RT-PCR 扩增 按照反转录试剂盒说明,在 PCR 管中加入 5 × PrimeScript Buffer 2 μL, RNase freed H₂O 7.5 μL,326 ng/μL 总 RNA 0.5 μL,振荡混匀,并于 42 ℃ 30 min,85 ℃ 5 s 条件下反应(大连 TaKaRa 公司)。以上述反应所得 cDNA 为模板扩增牦牛 *Agouti* 基因的编码区序列。PCR 反应体系: dNTP Mixture 16 μL, 10 × LAPCR Buffer II (Mg²⁺) 10 μL,25 mmol/L 的上下游引物各 4 μL, LA *Taq* DNA 聚合酶 1 μL,cDNA 模板 4 μL,加超纯水至 100 μL,混匀,每份 10 μL 分装成 10 管。反应程序:95.5 ℃ 5 min;95 ℃ 45 s,62 ℃ 45 s,72 ℃ 90 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。反应所得 PCR 产物经由 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化,回收产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.4 *Agouti* 基因的克隆 将上述过程回收的 PCR 产物连接到 pMD19-T 克隆载体上,16 ℃ 连接

过夜,构建重组质粒。将重组产物转化大肠杆菌 (*E. coli*) DH5α 菌中,于 37 ℃,100 r/min 培养 90 min,涂于含有 X-gal、IPTG、Amp⁺ 抗性的 LB 固体培养基上,37 ℃ 过夜培养。挑取白色阳性单克隆菌落,并接种于 LB 液体培养基中,200 r/min 过夜培养。经菌液 PCR 对所获得的大肠杆菌进行检测,并进行双酶切鉴定。将 PCR 产物和双酶切鉴定重组质粒送至华大公司测序。

1.3.5 *Agouti* 基因序列的生物信息学分析 采用 ORF Finder 在线程序预测出扩增所得牦牛 *Agouti* 基因的开放阅读框;牦牛 *Agouti* 基因蛋白质的基本理化性质和疏水性性质运用 ProtScale 在线软件分析;运用 SignalP 3.0 和 TMHMM 2.0 在线分析程序预测蛋白质的信号肽位点、跨膜区域和磷酸化位点;采用 Motifscan 在线分析软件预测该蛋白的功能和结构域,蛋白质的二级结构采用 SOPMA 在线预测网站预测。具体网址见表 4。

表 4 生物信息学分析预测相关网站

Tab. 4 Bioinformatics analysis and forecast related websites

功能 Function	网址 Website	功能 Function	网址 Website
相似性搜索 Sequence blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov		
信号肽预测 Signal P	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/		
跨膜结构分析 TMHMM	http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	磷酸化位点预测 Phosphorylation sites prediction	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos
疏水性分析 ProtScale	http://web.expasy.org/protscale/	蛋白二级结构预测 SOPMA	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl

从 NCBI 数据库下载 7 个物种的 *ASIP* 基因编码蛋白序列,包括 XM_005260412.1 (*Homo sapiens*, 人)、NM_001007263.1 (*Canis lupus familiaris*, 狗)、NM_206843.2 (*Bos taurus*, 牛)、NM_001011647.1 (*Sus scrofa*, 猪)、NM_001134303.1 (*Ovis aries*, 羊)、NM_001122939.1 (*Oryctolagus cuniculus*, 兔)、NM_001164017.1 (*Equus caballus*, 马),多序列比对及其相似性分析运用 MegAlign 软件分析。系统进化分析运用 MEGA 5.0 软件。

1.3.6 基因组 DNA 提取 利用血液基因组 DNA 提取试剂盒,提取基因组 DNA,稀释到 30 ~ 32 ng/μL,其余母液 -80 ℃ 保存。

1.3.7 基因组 DNA 池构建 构建 8 个 DNA 混合池,分为 2 组,每组 4 个(表 5)。单个牦牛基因组 DNA 混合池的制备:随机选取稀释后 DNA 样品 30 份,每份样品各取 1 μL,混合均匀,组成 1 个牦牛基因组 DNA 混合池。为避免重复,制备混合样时严格标记记录。

表 5 牦牛 DNA 混合池分组

Tab. 5 Information of primer sequences for cloning within yak *ASIP* gene

组号 Group	品种 Cultivar	含量/个 Size	样本量/只 Sample size
T1	天祝白牦牛	4	120
G1	甘南牦牛	4	120

1.3.8 PCR 扩增 PCR 扩增体系 (25 μ L): 包括约 30 ng/ μ L 的基因组 DNA 1 μ L, 灭菌超纯水 9.5 μ L, 2 \times Taq PCR MasterMix (内含 Taq DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 、dNTPs 等) 12.5 μ L, 10 pmol 的上下游引物各 1 μ L。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 复性 45 s (退火温度见表 2), 72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.9 DNA 测序分析 PCR 扩增产物均送往上海生工生物有限公司进行测序。根据 DNA 混合池的测序结果, 再对个体进行直接测序。

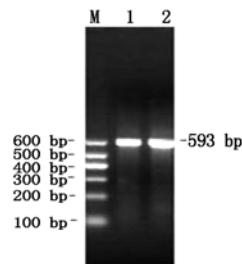
2 结果与分析

2.1 牦牛 *Agouti* 基因克隆

PCR 产物经由 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 2 条接近于 600 bp 的片段 (图 1)。

由图 1 可知, 在近 600 bp 处出现特异性条带, 并与目的条带大小相符合。并未出现非特异性条

带, 表明此引物扩增特异性强。天祝白牦牛和甘南牦牛的目的 PCR 扩增结果基本相同。2 条条带经割胶回收、克隆测序, 结果显示, 克隆到的 *Agouti* 基因是 1 条长 593 bp 的 DNA 序列, 命名为 YAK *ASIP*, 提交至 GenBank, 基因序列登入号为 KJ630463。通过在线软件 Blast 发现天祝白牦牛, 甘南牦牛与黄牛同源性均在 99% 以上。



M. DNA 分子质量标准; 1. 天祝白牦牛 RT-PCR 产物;
2. 甘南牦牛 RT-PCR 产物。

M. DNA Marker; 1. Tianzhu yak PCR products; 2. Gannan yak PCR products.

图 1 天祝白牦牛与甘南牦牛 *Agouti* 基因 RT-PCR 产物电泳

Fig. 1 Electrophoresis results of *Agouti* gene

使用 NCBI 的 ORF Finder 在线程序对克隆得到的牦牛 *Agouti* 基因序列进行开放性阅读框分析, 得知 *Agouti* 基因含有 1 个长度为 402 bp 的开放性阅读框, 编码 133 个氨基酸, 起始密码为 ATG, 终止密码为 TGA, 其与黄牛编码的氨基酸序列高度相似 (图 2)。

```
11 atggatgtcagcgcctcctccttgctacettgctggtctgctg
M D V S R L L L A T L L V C L
56 tgcctcctcactgcctacagccacctggcaccctgaggaaagccc
C F L T A Y S H L A P E E K P
101 agagatgaaggaacctgaagaacaactcttccatgaacctgttg
R D E R N L K N N S S M N L L
146 gatttcccttctgtctctatcgttgccgctgaacaagaatccaaa
D F P S V S I V A L N K K S K
191 aagatcagcagaaatgaagcggaaaagaagaaagaccttccaaag
K I S R N E A E K K K R P S K
236 agaaaggctccgatgaagaacgtggcaccggacccggccccggcgg
R K A P M K N V A R T R P P P
281 cctacccccctgcgtggccaccggcgacagctgaagcctccagcg
P T P C V A T R D S C K P P A
326 tccgcctgctgcagccgtgcgccttctgccagtgccgcttcttc
S A C C D P C A F C Q C R F F
371 cgcagcgcctgctcctgcgcgtgctcaacccacctgctga 412
R S A C S C R V L N P T C *
```

图 2 天祝白牦牛和甘南牦牛 *Agouti* 基因和编码蛋白的序列

Fig. 2 The sequences of Tianzhu yak and Gannan yak *Agouti* gene and amino acids

2.2 *Agouti* 蛋白的理化性质预测

通过 Proteomics Server 预测氨基酸序列的分子量、稳定性指数、等电点、脂溶性指数、亲水性指数。由此我们得到 *ASIP* 基因碱性氨基酸残基 (Arg + Lys) 总数为 25, 酸性氨基酸残基 (Asp + Glu) 总数为 10, 在溶液中, 不稳定指数为 55.30, 脂溶性指数为 68.27, 总平均亲水性指数为 -0.403, 分子量为 14.83 kDa, 理论等电点为 9.63, 氨基酸总数为 133。

2.3 牦牛 *Agouti* 基因编码蛋白的疏水性/亲水性预测和分析

利用位于 ExPASy 的 ProtScale 在线软件进行疏

水性分析, Window size 设置为 9。从图 3 的分析结果得知, *ASIP* 在第 10, 11 位氨基酸处有最大值 2.978, 在第 31 位氨基酸处有最小值 -3.556。第 5~22 位氨基酸之间有明显疏水区, 第 25~39 位及第 57~79 位氨基酸之间有明显亲水区。整条多肽链表现为亲水性。

2.4 牦牛 *Agouti* 基因编码蛋白信号肽和跨膜区分析

利用在线 TMHMM 软件进行分析, 牦牛 *ASIP* 蛋白没有跨膜结构域。并发现此编码蛋白的所有氨基酸均位于膜外, 说明牦牛 *Agouti* 基因编码蛋白是一

2.7 牦牛 *Agouti* 基因编码蛋白的系统发育分析

从 NCBI 数据库中收集 7 个物种的 *Agouti* 基因编码蛋白序列,使用 MegAlign 软件进行相似性分析,可知牦牛 *Agouti* 基因编码蛋白与其他物种的 ASIP 基因编码蛋白序列具有较高的相似性,均在

70% 以上。牦牛与黄牛 *Agouti* 基因相应编码的氨基酸序列同源性均高于 99% (图 7)。通过邻接法 (Neighbor-joining) 构建了 8 个物种的 *Agouti* 基因系统发育树 (图 8)。结果显示,牦牛与黄牛、羊在系统发育树中遗传距离最相近。

	1	2	3	4	5	6	7	8	
1		76.6	82.5	82.5	81.8	79.6	81.8	81.0	1 马 <i>Equus caballus</i>
2	28.0		78.8	78.8	71.5	75.2	73.0	72.3	2 人 <i>Homo sapiens</i>
3	20.0	24.9		83.2	81.8	81.8	83.2	82.5	3 狗 <i>Canis lupus familiaris</i>
4	20.0	24.9	19.1		83.2	79.6	84.7	84.7	4 猪 <i>Sus scrofa</i>
5	21.0	35.8	21.0	19.1		75.9	97.8	97.1	5 羊 <i>Ovis aries</i>
6	23.9	30.2	21.0	23.9	29.1		77.4	76.6	6 兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i>
7	21.0	33.5	19.1	17.2	2.2	27.0		99.3	7 黄牛 <i>Bos taurus</i>
8	21.9	34.6	20.0	17.2	3.0	28.0	0.7		8 牦牛 <i>Bos grunniens</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	

图 7 *Agouti* 基因编码蛋白相似性分析

Fig. 7 Analysis of *Agouti* signaling protein in different species

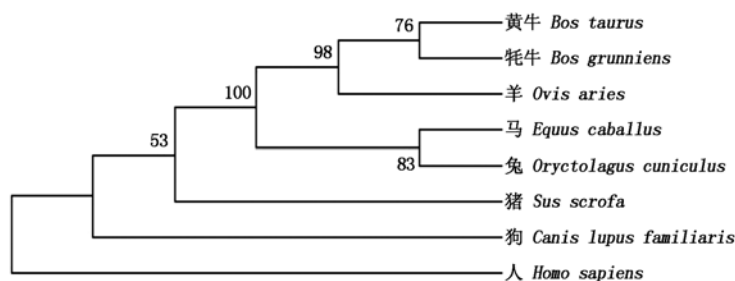


图 8 NJ 法构建的 *Agouti* 基因系统发育树

Fig. 8 *Agouti* gene phylogenetic tree by Neighbor-joining

2.8 牦牛 *Agouti* 基因混合池测序及直接测序结果

DNA 测序引物 A-1、A-2、A-3、A-4 扩增的 PCR 产物,并用 DNASTar 进行序列拼接比对,得牦牛与黄牛序列 (AC_000170.1) 具有高度相似性。DNA 混合池测序牦牛 *Agouti* 基因编码区无突变位点。为验证结果,分别随机选取天祝白牦牛 DNA (30 份) 和甘南牦牛 DNA (30 份)。以单个 DNA 为模板扩增并直接测序,测序结果表明,牦牛 *Agouti* 基因编码区无突变位点。

3 讨论

近年的研究表明,*Agouti* 基因与动物毛色的形成有很大关系。ASIP 为旁分泌信号因子,与 α -MSH 竞争性结合 MC1R 受体,使 cAMP 水平下降,导致真黑色素的合成阻断,激活褐黑色素的合成途径^[5]。

本研究利用 RT-PCR 技术,首次从牦牛中克隆到 *Agouti* 基因,命名为 YAK ASIP。该序列长 593 bp。黑色甘南牦牛和白色天祝白牦牛的 *Agouti* 基因序列和其编码的蛋白序列相同。黑色甘南牦牛和天祝白色牦牛的 *Agouti* 基因编码 133 个氨基酸的 ASIP 多肽,与已发表黄牛 ASIP 对应核苷酸序列进行比对,发现天祝白牦牛,甘南牦牛与黄牛同源性均

在 99% 以上。牦牛与黄牛 *Agouti* 基因相应编码的氨基酸序列同源性均高于 99%。上述特征分析结果说明本试验克隆所得序列确为与色素调节密切相关的牦牛 *Agouti* 基因序列。同时也表明 *Agouti* 基因在牛中较为保守。该编码蛋白具有 *Agouti* 基因家族保守的序列特征,其二级结构主要由 α 螺旋和无规则卷曲组成。并有一明显信号肽,表明该蛋白为所需 ASIP 旁分泌信号因子^[3]。多序列比对和系统进化分析结果显示,牦牛与黄牛、羊的 *Agouti* 基因编码蛋白序列具有高度相似性。表明 *Agouti* 基因在生物进化上的保守性。同样,也反映 *Agouti* 基因在不同物种上的结构稳定性和生物体功能的重要性。

本试验采用了 DNA 混合池测序和直接测序法对牦牛 *Agouti* 基因编码区多态性进行了研究,结果发现牦牛皮肤中 *Agouti* 基因编码区无突变位点。这与 Girardot 等^[9]的研究结果一致。Voise 等^[22]对不同种族、不同肤色和不同颜色头发人群的 *Agouti* 基因进行检测,同样未发现人的 *Agouti* 基因编码区具有多态性。Kanetsky 等^[23]发现,人的 *Agouti* 基因非转录区存在多态,且与黑发、褐眼呈显著相关。Stefan 等^[24]发现,马 *Agouti* 基因非编码区碱基替换与黑马隐性黑毛有关联。Olison 等^[25]认为,*Agouti* 等

位基因的非编码区多态性可能与毛色有关。由以上研究结果可推测, *Agouti* 基因通常在非编码区变异影响基因表达, 进而影响毛色形成。这暗示着牦牛的 *Agouti* 基因调控方式可能与人、马相似, 与非编码区变异有关。可能由于样本量有限, 对于牦牛 *Agouti* 基因的编码区是否存在结构变异还需进一步研究。

关于 *Agouti* 基因的结构和表达调控是后续研究的重点。这为揭示牦牛 *Agouti* 基因调控毛色分子遗传机制提供科学依据, 同时对揭示牦牛品种毛色的遗传多样性、提高牦牛品种分子育种水平具有重要理论和实践意义。

参考文献:

- [1] 阎 萍. 牦牛养殖使用技术问答[M]. 兰州: 甘肃民族出版社, 2007.
- [2] Ito S, Wakamatsu K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals; a comparative review[J]. *Pigment Cell Research*, 2003, 16(5): 523 – 531.
- [3] Valverde P, Healy E, Jackson I, et al. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans[J]. *Nature Genetics*, 1995, 11(3): 328 – 330.
- [4] Aberdam E, Bertolotto C, Sviderskaya E V, et al. Involvement of microphthalmia in the inhibition of melanocyte lineage differentiation and of melanogenesis by agouti signal protein[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(31): 19560 – 19565.
- [5] Hida T, Wakamatsu K, Sviderskaya E V, et al. Agouti protein, mahogunin, and attractin in pheomelanogenesis and melanoblast-like alteration of melanocytes; a cAMP-independent pathway[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2009, 22(5): 623 – 634.
- [6] Bultman S J, Klebig M L, Michaud E J, et al. Molecular analysis of reverse mutations from nonagouti (a) to black-and-tan (a(t)) and white-bellied agouti (Aw) reveals alternative forms of agouti transcripts[J]. *Genes & Development*, 1994, 8(4): 481 – 490.
- [7] Bultman S J, Michaud E J, Woychik R P. Molecular characterization of the mouse agouti locus[J]. *Cell*, 1992, 71(7): 1195 – 1204.
- [8] Kwon H Y, Bultman S J, Loffler C, et al. Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the agouti gene[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(21): 9760 – 9764.
- [9] Girardot M, Martin J, Guibert S, et al. Widespread expression of the bovine *Agouti* gene results from at least three alternative promoters[J]. *Pigment Cell Research*, 2005, 18(1): 34 – 41.
- [10] Virador V M, Santis C, Furumura M, et al. Bioactive motifs of agouti signal protein[J]. *Experimental Cell Research*, 2000, 259(1): 54 – 63.
- [11] Våge D I, Lu D, Klungland H, et al. A non-epistatic interaction of agouti and extension in the Fox, *Vulpes vulpes* [J]. *Nature Genetics*, 1997, 15(3): 311 – 315.
- [12] Royo L J, Alvarez I, Arranz J J, et al. Differences in the expression of the *ASIP* gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: evidence from the rare Xalda sheep breed[J]. *Animal Genetics*, 2008, 39(3): 290 – 293.
- [13] Rieder S, Taourit S, Mariat D, et al. Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*) [J]. *Mammalian Genome*, 2001, 12(6): 450 – 455.
- [14] Miller M W, Duhl D M, Vrieling H, et al. Cloning of the mouse *agouti* gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation[J]. *Genes & Development*, 1993, 7(3): 454 – 467.
- [15] Kuramoto T, Nomoto T, Sugimura T, et al. Cloning of the rat agouti gene and identification of the rat nonagouti mutation[J]. *Mammalian Genome*, 2001, 12(6): 469 – 471.
- [16] Kerns J A, Newton J, Berryere T G, et al. Characterization of the dog *Agouti* gene and a nonagouti mutation in German Shepherd Dogs[J]. *Mammalian Genome*, 2004, 15(10): 798 – 808.
- [17] Drögemüller C, Giese A, Martins-Wess F, et al. The mutation causing the black-and-tan pigmentation phenotype of Mangalitza pigs maps to the porcine ASIP locus but does not affect its coding sequence[J]. *Mammalian Genome*, 2006, 17(1): 58 – 66.
- [18] Eizirik E, Yuhki N, Johnson W E, et al. Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family[J]. *Current Biology*: CB, 2003, 13(5): 448 – 453.
- [19] Norris B J, Whan V A. A gene duplication affecting expression of the ovine *ASIP* gene is responsible for white and black sheep[J]. *Genome Research*, 2008, 18(8): 1282 – 1293.
- [20] Parsons Y M, Fleet M R, Cooper D W. Isolation of the ovine agouti coding sequence[J]. *Pigment Cell Research*, 1999, 12(6): 394 – 397.
- [21] Penagaricano F, Zorrilla P, Naya H, et al. Gene expression analysis identifies new candidate genes associated with the development of black skin spots in Corriedale sheep[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2012, 53(1): 99 – 106.
- [22] Voise J, Box N F, van Daal A. A polymorphism study of the human *Agouti* gene and its association with MC1R[J]. *Pigment Cells Research*, 2001, 14: 264 – 267.
- [23] Kanetsky P A, Swoyer J, Panossian S, et al. A polymorphism in the agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2002, 70(3): 770 – 775.
- [24] Stefan R, Sead T, Denis M, et al. Mutations in the Agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*) [J]. *Mammalian Genome*, 2001, 12(6): 450 – 455.
- [25] Olison T A. The genetics of cattles[J]. Wallingford Oxon: CAB International, 1999.