

6 个家兔群体 *KAP6.1* 基因的遗传多样性分析

吴添文, 冯凯, 何孟娟, 王晓明, 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: 设计了 2 对特异性引物, 经过序列拼接, 获得了家兔 *KAP6.1* 基因的全长 CDS 序列, 并采用 PCR-SSCP 方法对 6 个家兔群体 *KAP6.1* 基因的全长 CDS 序列进行分析。结果显示, *KAP6.1-1* 座位发现了 2 个等位基因, 3 种基因型, 且 A 755 G 突变处于该基因的增强子区域, 而 *KAP6.1-2* 座位未发现突变位点; 6 个家兔群体均处于哈代-温伯格平衡, 表现为中度或低度多态; 福建黑兔与九嶷山兔、有色獭兔与白色獭兔、皖系长毛兔与苏系长毛兔的不同基因型分布差异不显著 ($P > 0.05$), 而其他家兔群体彼此间的不同基因型分布存在显著 ($P < 0.05$) 或极显著差异 ($P < 0.01$)。

关键词: 兔; *KAP6.1* 基因; 遗传变异

中图分类号: S829.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)06-0666-06

Genetic diversity of *KAP6.1* gene in 6 rabbit populations

WU Tian-wen, FENG Kai, HE Meng-jie, WANG Xiao-ming, LI Bi-chun¹, WU Xin-sheng*

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

Abstract: Full-length CDS of *KAP6.1* gene was obtained by sequence assembly with 2 specific primers. Then the sequences in 6 rabbit populations were scanned by PCR-SSCP. The results showed that 3 genotypes and 2 alleles were found at *KAP6.1-1* loci, as well as the A 755 G mutation which was located at the enhancer region, while no mutation was found at *KAP6.1-2* loci. The distribution of these genotypes in all populations was consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium and presented either intermediate level or low level of diversity; and its difference was either significant ($P < 0.05$) or very significantly ($P < 0.01$) from one another populations except between Fujian black rabbit and Jiuyishan rabbit, chinchilla and white rex rabbit, wan-line and su-line angora rabbit ($P > 0.05$).

Key words: rabbit; *KAP6.1* gene; genetic diversity

对于毛用动物而言, 其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。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* 家族分为 3 类: 一类为高甘氨酸酪氨酸蛋白(high-glycine-tyrosine *KAPs*), 由 *KAP6.n* 多基因家族和单基因 *KAP7*、*KAP8* 编码; 一类为高硫蛋白(high-sulfer *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-sulfer *KAPs*), 由 *KAP4.n* 和

KAP5.n 多基因家族编码。基因大多为小片段, 大小为 0.6~1.5 kb, 并且都不含内含子^[1]。

目前已经证明了 *KAP* 基因家族在染色体上是成簇存在的, 高甘氨酸/酪氨酸 *KAP6*、*KAP7* 和 *KAP8* 连锁在一起, 而高甘氨酸/酪氨酸 *KAP* 又是羊毛中首先表达的蛋白^[2], 因此, 笔者认为高甘氨酸/酪氨酸 *KAP6*、*KAP7* 和 *KAP8* 对动物毛发的性质可能有比较大的影响。目前, 关于 *KAP* 基因家族的研究主要集中于人、羊^[3-7], 而对家兔 *KAP* 基因的研究少见报道。本研究以 6 个家兔群体为试验材料, 获得家兔

收稿日期: 2010-06-07

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(nycytx-44)

作者简介: 吴添文(1984—), 男, 福建泉州人, 博士研究生, 主要从事特种经济动物饲养研究, wt198472@163.com; *通讯作者, xinshengwu007@yahoo.com.cn

KAP6.1 基因 CDS 序列，并进行遗传变异检测，旨在为进一步探讨该基因能否作为家兔毛质性状的首选基因提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验动物

选取 6 个群体共 718 只家兔为试验材料，其中，福建黑兔(60 只)来自于福建省农业科学院；有色獭兔(143 只)和白色獭兔(101 只)均来自于浙江余姚兔场；九嶷山兔(72 只)来自于湖南九嶷山；皖系长毛兔(209 只)来自于江苏宜兴拉必得种兔场；苏系长毛兔(133 只)来自于江苏省农业科学院。

1.2 方法

所有个体均为随机抽样，耳缘静脉采血 5 mL，采用酚/氯仿法提取总 DNA^[8]。

1.2.1 引物设计

根据 GeneBank 中家兔 *KAP6.1* 基因(Accession No. M95718.1)序列，设计并合成了 2 对特异性较好的 PCR 引物，对家兔 *KAP6.1* 基因的全 CDS 序列进行扩增，并用于 PCR-SSCP 检测。引物由上海生物工程技术有限公司合成，引物信息见表 1。

表 1 引物信息
Table 1 The information of primer sequences

座位	引物序列	片段大小/ bp	退火温度/ °C
<i>KAP6.1-1</i>	5'-GATTCTCCACTGTGATTGTCT-3'	252	64
	5'-GAGGAGGAATGTAGGTGACTTG-3'		
<i>KAP6.1-2</i>	5'-TACATTCTCTCTTCTCCAC-3'	347	60
	5'-CCTGGGGTTCAGAAGTTC-3'		

1.2.2 PCR-SSCP 检测

PCR 扩增总体积为 20 μL：1 μL DNA 模板(100 ng/μL)，2 μL 10×PCR Buffer，1.5 μL dNTP(10 mmol/L)，上下游引物各 1 μL(10 pmol/μL)，*Taq* 酶为 0.2 μL(5 U/μL)，ddH₂O 13.3 μL。PCR 扩增程序：95 °C 预变性 5 min，94 °C 变性 40 s，适宜退火温度 40 s，72 °C 延伸 40 s，35 个循环，最后 72 °C 延伸 10 min。经 2% 琼脂糖电泳检测后，产物用于 SSCP 检测。2.5 μL PCR 产物和 7 μL 变性液，98 °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，由上海生工生物工程技术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。

1.2.3 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 结果与分析

2.1 家兔 *KAP6.1* 基因 CDS 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 *KAP6.1* 基因，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，获得 2 条家兔 *KAP6.1* 基因序列，分别为 585 bp 和 584 bp，包括全部的 CDS 区 237 bp，该序列与人、小鼠、绵羊、山羊的 *KAP6.1* 基因的同源性分别为 91%、90%、83% 和 80%。现已将该序列提交到 GeneBank 数据库(HM068868 和 HM068869)。

2.2 PCR-SSCP 分型

KAP6.1-1 座位的 PCR 产物经 SSCP 检测后，获得 3 种基因型(AA、AB、BB 型)，试验结果见图 1，而 *KAP6.1-2* 座位未检测出多态。*KAP6.1-1* 座位的测序结果，相对于 GeneBank 上原序列而言，均在 675、689、692、711 和 792 位点处有 5 处插入(图 2)。同时，*KAP6.1-1* 座位存在的 2 个等位基因中，A 基因型相对于 B 基因型在原序列的 694 位点上有 1 个插入(G)，并且发生 G 744 C 和 A 755 G 突变(图 3、4)。*KAP6.1-2* 座位的测序结果相对于原序列的 1036-1041 位点均存在 6 个碱基的缺失(图 5)，原序列所编码的氨基酸为 Gly-Tyr-Tly(ggctatggt)，而本研究中为 Gly(ggt)。

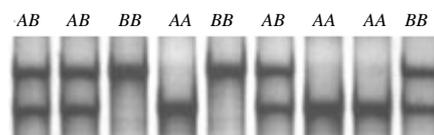


图 1 *KAP6.1-1* 座位的部分 PCR-SSCP 图谱
Fig.1 The PCR-SSCP page patterns of *KAP6.1-1* loci

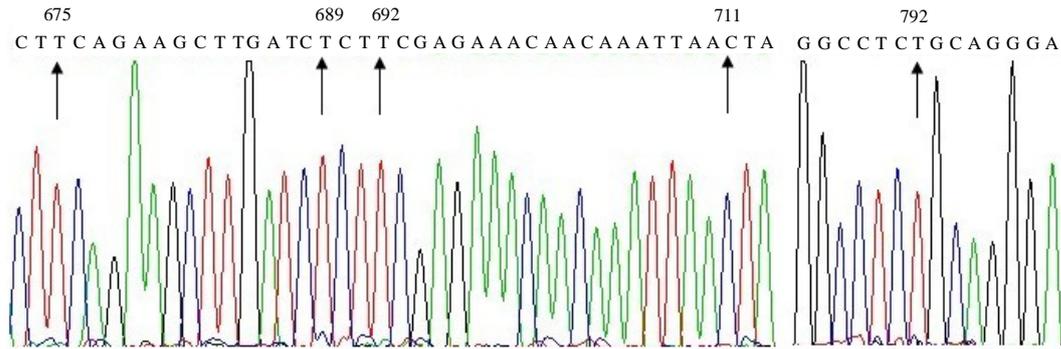


图2 KAP6.1-1 序列测序结果

Fig.2 The sequencing result of KAP6.1-1 loci

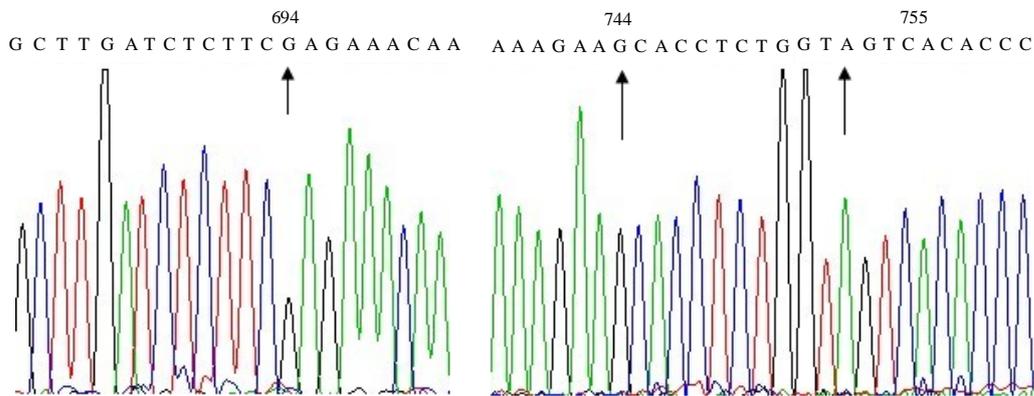


图3 KAP6.1-1 座位中 AA 基因型测序结果

Fig.3 The sequencing result of AA genotypes at KAP6.1-1 loci

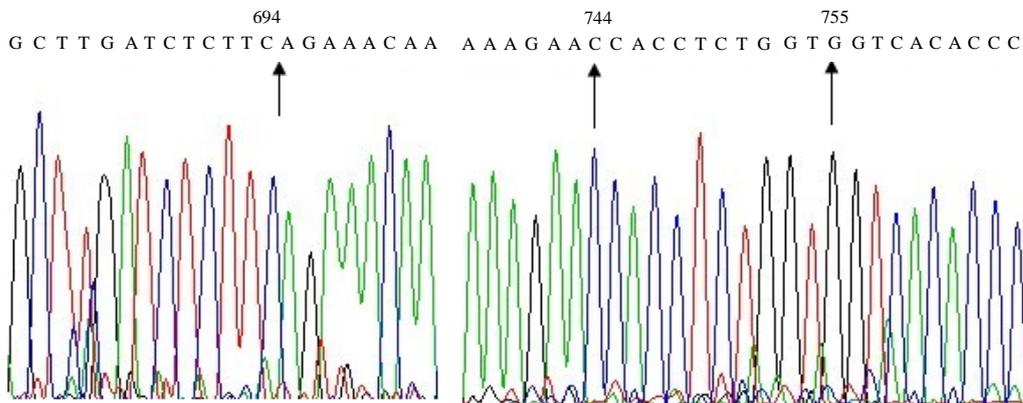


图4 KAP6.1-1 序列中 BB 基因型测序结果

Fig.4 The sequencing result of BB genotypes at KAP6.1-1 loci

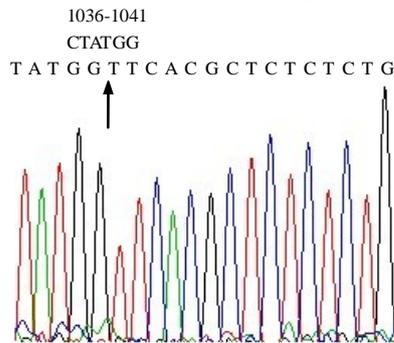


图5 KAP6.1-2 序列测序结果

Fig.5 The sequencing result of KAP6.1-2 loci

2.3 不同家兔群体 KAP6.1-1 座位的遗传多样性

所检测的群体中, 3 种基因型只在福建黑兔和九嶷山兔群体中同时被发现, 有色獭兔和白色獭兔群体均只检测到 AA、AB 基因型, 而皖系长毛兔和苏系长毛兔群体均只检测到 AA 基因型, 且 6 个家兔群体均处于哈代-温伯格平衡(表 2)。福建黑兔的期望杂合度和多态信息含量最高, 分别为 0.339 和 0.281, 表现为中度多态, 其他群体均为低度多态或

未发现多态。福建黑兔与九嶷山兔，有色獭兔与白色獭兔，皖系长毛兔与苏系长毛兔之间的不同基因型分布差异不显著($P>0.05$)，而其他家兔群体彼此

间的不同基因型分布存在显著($P<0.05$)或极显著差异($P<0.01$)(表 3)。

表 2 6 个家兔群体 *KAP6.1-1* 座位的遗传特性
Table 2 The characteristic of *KAP6.1-1* loci in 6 rabbit populations

群体	样本数	基因型频率			基因频率		<i>He</i>	<i>PIC</i>	χ^2
		AA	AB	BB	A	B			
FB	60	0.633(38)	0.300(18)	0.067(4)	0.784	0.216	0.339	0.281	0.26
YT	143	0.867(124)	0.133(19)	0.000(0)	0.934	0.066	0.123	0.116	1.03
BT	101	0.970(98)	0.030(3)	0.000(0)	0.985	0.015	0.030	0.029	0.00
JY	72	0.806(58)	0.153(11)	0.041(3)	0.882	0.118	0.208	0.187	1.65
WX	209	1.000(209)	0.000(0)	0.000(0)	1.000	0.000	0.000	0.000	0.00
SX	133	1.000(133)	0.000(0)	0.000(0)	1.000	0.000	0.000	0.000	0.00

FB、YT、BT、JY、WX、SX 分别为福建黑兔、有色獭兔、白色獭兔、九嶷山兔、皖系长毛兔、苏系长毛兔；当 $df=1$ 时， $\chi^2_{(0.01)}=6.63$ ， $\chi^2_{(0.05)}=3.84$ ；当 $df=2$ 时， $\chi^2_{(0.01)}=9.21$ ， $\chi^2_{(0.05)}=5.99$ 。下同。

表 3 6 个家兔群体 *KAP6.1-1* 座位的不同基因型分布差异 χ^2 检验结果

Table 3 χ^2 test of the distribution of genotypes in 6 rabbit populations

群体	YT	BT	JY	WX	SX
FB	18.91**	32.88**	4.95	83.46**	55.04**
YT		7.68	6.31*	29.35**	18.98**
BT			13.34**	6.27*	4.00*
JY				42.77**	27.76**
WX					0.00

以下为测序结果与 GenBank 中序列比对的结果(图 6)，6-1-1-F、6-1-1-R、6-1-2-F、6-1-2-R 分别代表 2 对引物的上下游序列，A、B 为不同基因型测序拼接结果。根据 NCBI 中对该基因序列特点的描述，本试验所扩增的 5'调控区序列包括(见以下 consensus 序列)：CAAT 盒(733-736)，增强子(749-757)，CACCC 盒(760-764)，TATA 盒(777-780) A 755 G 突变处于该基因的增强子区域。

3 讨论

对家兔的 *KAP6.1* 基因的全长 CDS 进行了 SSCP 检测，所获得的序列经 GeneBank 比对，与人、小鼠、绵羊、山羊等 *KAP6.1* 基因的同源性均达 80% 以上，说明该基因在不同物种中的同源性较高，在进化过程中比较保守。张亚妮等^[9]发现，*KAP6.1* 基因可以作为绒山羊产绒性状的候选基因。刘桂芬等^[10]选择

KAP6.1 基因的外显子区作为羊毛细度性状的候选基因，研究结果表明 *KAP6.1* 基因与羊毛细度显著相关。赵俊星等^[11]发现 *KAP6.1* 基因在辽宁绒山羊皮肤的表达量是岢岚当地山羊表达量的 1.3 倍。绵羊和人 *KAP6* 和 *KAP8* 家族成员的表达在皮质层的垂直方向上具有区段性，但鼠类在皮质层为均匀分布^[12]。

在 *KAP6.1-1* 座位上，肉兔(福建黑兔、九嶷山兔)的多态信息含量高于獭兔和毛兔，且只有福建黑兔表现为中度多态，原因可能是长毛兔、獭兔均是起源于肉兔，对于毛兔和獭兔的长期选育过程可能造成 B 等位基因频率的降低。

本试验所扩增 *KAP6.1* 基因的 5'端序列的基本元件(CAAT 盒、增强子、CACCC 盒、TATA 盒)与绵羊 *KAP6.1* 基因的 5'端序列的基本元件^[13]一致，推测可能该基因在 2 种动物中的表达机制相同。相对于原序列，分别在 5'端侧翼区发现 5 处插入突变和 CDS 区域 6 个碱基的缺失，这可能与所选取的家兔品种不同有关。*KAP6.1-1* 座位存在 2 种基因型，A 基因型相对 B 基因型在原序列的 694 位点上有 1 个插入(G)，并发生了 G 744 C 和 A 755 G 突变，而 A 755 G 突变处于该序列的增强子区域，可能对 *KAP6.1* 基因的表达有影响。根据 NCBI 中对于该序列的描述，*KAP6.1* 基因的 5'端侧翼区同时也是

```

> 6-1-1-F                                     GA TTCTCCCACT GTGATTGTCT
> A                                             GA TTCTCCCACT GTGATTGTCT
> B                                             GA TTCTCCCACT GTGATTGTCT
> 兔 KAP6  gatttaggat gattaagtga aagtctagtt tgaggtagga ttctcccaact gtgattgtct
541 -----
Consensus  gatttaggat gattaagtga aagtctagtt tgaggtagGA TTCTCCCACT GTGATTGTCT

> A      CCTCTCAAAG AGCCATTGAT TGGATAAGCA AAATCAAAC TGAGCAACCA AACAAAGTAA
> B      CCTCTCAAAG AGCCATTGAT TGGATAAGCA AAATCAAAC TGAGCAACCA AACAAAGTAA
> 兔 KAP6  cctctcaaag agccattgat tggataagca aatcaaac tgagcaacca aacaagtaa
601 -----
Consensus  CCTCTCAAAG AGCCATTGAT TGGATAAGCA AAATCAAAC TGAGCAACCA AACAAAGTAA

> A      ACCTCCATAA AACTTCAGAA GCTTGATCTC TTC-AGAAAC AACAAATTA CTAGATTACT
> B      ACCTCCATAA AACTTCAGAA GCTTGATCTC TTCGAGAAAC AACAAATTA CTAGATTACT
> 兔 KAP6  acctccataa aact-cagaa gcttgatc-c t-cgagaaac aacaattaa -tagattact
661 -----
Consensus  ACCTCCATAA AACTTCAGAA GCTTGATCTC TTC-AGAAAC AACAAATTA CTAGATTACT
                *           * * *
> A      CATAAAATGA GCCAATGAAA GAACCACCTC TGGTGGTCAC ACCCACACTG AAATCATATA
> B      CATAAAATGA GCCAATGAAA GAAGCACCTC TGGTAGTCAC ACCCACACTG AAATCATATA
> 兔 KAP6  cataaaatga gccaatgaaa gaagcacctc tggtagtcac acccacactg aaatcatata
721 -----
Consensus  CATAAAATGA GCCAATGAAA GAACCACCTC TGGTAGTCAC ACCCACACTG AAATCATATA
                *           *
< 6-1-1-R                                     CAAGTCA CCTACATTCC TCCTC
> 6-1-2-F                                     TACATTCC TCCTCCTTCT
> A      AAAAGGGCCT CTGCAGGGAG AACTCTCCAG ACTCAAGTCA CCTACATTCC TCCTCCTTCT
> B      AAAAGGGCCT CTGCAGGGAG AACTCTCCAG ACTCAAGTCA CCTACATTCC TCCTCCTTCT
> 兔 KAP6  aaaagggcct c-gcaggag aactctccag actcaagtca cctacattcc tctccttct
781 -----
Consensus  AAAAGGGCCT CTGCAGGGAG AACTCTCCAG ACTCAAGTCA CCTACATTCC TCCTCCTTCT
                *

> 6-1-2-F      CCAC
> A      CCACCCAAGG ACAACCTCAA CAACCAACAC CATGTGTGGC TACTACGGAA ACTACTATGG
> B      CCACCCAAGG ACAACCTCAA CAACCAACAC CATGTGTGGC TACTACGGAA ACTACTATGG
> 兔 KAP6  ccacccaagg acaacctcaa caaccaacac catgtgtggc tactacggaa actactatgg
841 -----
Consensus  CCACCCAAGG ACAACCTCAA CAACCAACAC CATGTGTGGC TACTACGGAA ACTACTATGG
> A      TGGCCGTGGC TATGGATGCT GTGGCTACGG AGGCCTGGGC TATGGCTATG GAGGCCTGGG
> B      TGGCCGTGGC TATGGATGCT GTGGCTACGG AGGCCTGGGC TATGGCTATG GAGGCCTGGG
> 兔 KAP6  tggccgtggc tatggatgct gtggctacgg aggcctgggc tatggctatg gaggcctggg
901 -----
Consensus  TGGCCGTGGC TATGGATGCT GTGGCTACGG AGGCCTGGGC TATGGCTATG GAGGCCTGGG
> A      CTGTGGCCTT GGCTCCTACT ATGGCTGTGG CTACCGCAGA CTGGGCTGTG GCTATGGCTG
> B      CTGTGGCCTT GGCTCCTACT ATGGCTGTGG CTACCGCAGA CTGGGCTGTG GCTATGGCTG
> 兔 KAP6  ctgtggcctt ggetcctact atggctgtgg ctaccgcaga ctgggctgtg gctatggctg
961 -----
Consensus  CTGTGGCCTT GGCTCCTACT ATGGCTGTGG CTACCGCAGA CTGGGCTGTG GCTATGGCTG
> A      TGGCTATGGC TATGG----- -TTCACGCTC TCTCTGTGGC TGTGGCTATG GCTATGGATC
> B      TGGCTATGGC TATGG----- -TTCACGCTC TCTCTGTGGC TGTGGCTATG GCTATGGATC
> 兔 KAP6  tggctatggc tatgg----- gttcacgctc tctctgtggc tgtggctatg gctatggatc
1021 -----
Consensus  TGGCTATGGC TATGG----- -TTCACGCTC TCTCTGTGGC TGTGGCTATG GCTATGGATC
                *****
> A      TGGCTATGGC TCTGGCTTTG GCTACTACTA CTGAGGATAC CAAAGGAGCC TCTCACCTC
> B      TGGCTATGGC TCTGGCTTTG GCTACTACTA CTGAGGATAC CAAAGGAGCC TCTCACCTC
> 兔 KAP6  tggctatggc tctggctttg gctactacta ctgaggatag caaaggagcc tctcaccctc
1081 -----
Consensus  TGGCTATGGC TCTGGCTTTG GCTACTACTA CTGAGGATAC CAAAGGAGCC TCTCACCTC
< 6-1-2-R      TTG AACAGTTCTG AACCCAGG
> A      AACAAATTG AACAGTTCTG AACCCAGG
> B      AACAAATTG AACAGTTCTG AACCCAGG
> 兔 KAP6  aacaacattg aacagttctg aacccagga attc
1141 -----
Consensus  AACAAATTG AACAGTTCTG AACCCAGG attc
    
```

图 6 6 个家兔群体 *KAP6.1-1* 不同基因型序列比对结果

Fig.6 Sequence blast results of *KAP6.1* gene in 6 rabbit populations

KAP7 和 *KAP8* 等高甘氨酸/酪氨酸的基因的 5'侧翼区, 但该变异及 CDS 区域 6 个碱基的缺失是否真正影响了 *KAP6.1*、*KAP7* 和 *KAP8* 等基因的表达调控和家兔的生产性能还有待研究。

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] Powell B C, Rogers G E. Characterization of a hair (wool) keratin intermediate filament gene domain [J]. *Investigative Dermatol*, 1994, 102: 171-177.
- [3] Itenge-Mwezaa T O, Forresta R H J, McKenzia 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Tsutomu 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.
- [7] 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.
- [8] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 49-56.
- [9] 张亚妮, 张恩平, 吴迪, 等. *KAP*基因的多态性与辽宁绒山羊经济性状的关系研究[J]. *中国农业科学*, 2007, 40 (9): 2062-2067.
- [10] 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.
- [11] 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): 4-6.
- [12] Yutaka, Shimomura. Human hair keratin-associated proteins[J]. *Department of Dermatology*, 2005, 10: 230-233.
- [13] 郭旭东, 毛舒燕, 宝明涛, 等. 绵羊角蛋白关联蛋白 *KAP6-1* 基因 5'端调控区的分子克隆及测序结果比较[J]. *内蒙古大学学报: 自然科学版*, 2007, 38(1): 58-63.

责任编辑: 王赛群
英文编辑: 罗文翠