华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕 士 学 位 论 文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

角鲨烯环氧酶（SQLE）对水牛泌乳的作用及其机制研究

THE ROLE AND MECHANISM OF SQUALENE EPOXIDASE（SQLE）IN LACTATION OF THE BUFFALO

研　　究　　生：　胡祥维

CANDIDATE　：　HU XIANGWEI

专业MAJOR　：　动物遗传育种与繁殖

：　ANIMAL GENETIC BREEDING AND REPRODUCTION

学　　号：　2017302110010

STUDENT NO

导　　师：　杨利国　教授

SUPERVISOR　：　PROFESSOR YANGLIGUO

中国武汉

WUHAN，CHINA

二〇二〇年六月

JUNE，　2020

万方数据

分类号：　　密级：否

华中农业大学硕士学位论文

角鲨烯环氧酶（SQLE）对水牛泌乳的作用及其机制研究

The Role and Mechanism of Squalene Epoxidase （SQLE） in Lactation of the Buffalo

硕士研究生：　胡祥维

学　　号：　**2017302110010**

指 导 教 师：　杨利国　教　授

指 导 小 组：　张淑君　教　授

霍立军　教　授

易建明　教　授

李　翔　副教授

熊家军　副教授

滑国华　副教授

梁爱心　副教授

何长久　副教授

周　扬　副教授

专业：动物遗传育种与繁殖　研究方向：动物生殖生理与生物技术

获得学位名称：农学硕士　　获得学位时间：**2020**年**6**月

华中农业大学动物科学技术学院

二〇二〇年六月

万方数据

本课题受国家现代农业技术体系（奶牛）项目（CARS-36）资助

This Study was Financially Supported by the Earmarked Fund for Modern Agriculture Industry Technology Research system

（CARS-36）

万方数据

目录

摘要 i
关键词 ii
ABSTRACT iii
KEYWORDS v
缩略语表 vi
1 前言 1
1.1 研究问题的由来 1
1.2 SQLE 基因研究进展 1
1.3 水牛分子育种的研究概述 2
1.3.1 水牛分子标记辅助选择的研究概述 2
1.3.2 水牛转基因育种的研究概述 3
1.4 水牛乳腺上皮细胞体外模型研究进展 4
1.5 研究的目的和意义 5
2 试验材料 6
2.1 试验样本 6
2.2 主要试剂与耗材 6
2.3 主要仪器 8
2.4 主要试剂的配制 8
3 试验方法 10
3.1 水牛 SQLE 基因多态性与泌乳性能关联分析 10
3.1.1 SNPs 的筛选与基因分型 10
3.1.2 单倍型分析 10
3.1.3 遗传参数计算和关联分析模型 10
3.2 SQLE 基因在各种组织中的表达 11
3.2.1 组织总 RNA 提取 11
3.2.2 cDNA 链反转录合成 11
3.2.3 单位 RNA 中基因表达量 12

万方数据

3.3 水牛乳腺上皮细胞的纯化和培养 13
3.4 siRNA 序列设计以及干扰效率检测 13
3.4.1 siRNA 序列设计和 mRNA 水平干扰效率检测 13
3.4.2 蛋白水平干扰效率检测 14
3.5 SQLE 基因过表达质粒构建 16
3.6 细胞增殖、周期和凋亡的检测 17
3.6.1 细胞增殖检测 17
3.6.2 细胞凋亡检测 17
3.6.3 细胞周期检测 17
3.7 脂类和酪蛋白的检测 18
3.7.1 上清中甘油三酯和酪蛋白检测 18
3.7.2 细胞中脂滴检测 18
3.8 乳腺上皮细胞生长和分泌相关基因的检测 19
3.9 数据统计方法 19
4 试验结果 20
4.1 水牛 SQLE 基因多态性及其与泌乳性能的关系 20
4.1.1 SQLE 基因多态性 20
4.1.2 基因型与泌乳性能的关系 22
4.1.3 水牛 SQLE 基因单倍型及其与泌乳性能的关系 24
4.2 各种组织中的 SQLE 基因表达量 25
4.3 纯化的乳腺上皮细胞 25
4.4 siRNA 干扰效率 26
4.5 过表达效果 27
4.6 SQLE 基因对细胞生长的调控作用 28
4.6.1 促进细胞增殖 28
4.6.2 抑制细胞凋亡 29
4.7 SQLE 基因对乳脂和乳蛋白质合成的调控作用 30
4.7.1 促进甘油三酯和脂滴合成 30
4.7.2 促进细胞乳蛋白的合成 31
4.8 促进细胞生长和分泌功能相关基因的表达 32

万方数据

5 讨论 33
6 结论 37
7 创新与不足 38
7.1 创新点 38
7.2 不足之处 38
参考文献 39
致谢 49

万方数据

摘要

水牛具有耐粗饲、抗逆性强和耐热等特性。我国水牛种质资源丰富，存栏量居世界第三。随着世界奶水牛产业的发展，本土水牛的乳用价值也得到了重视。但与地中海、摩拉和尼里-拉菲等国外品种相比，本土水牛的产奶量、乳脂率和乳蛋白率均偏低，严重制约了我国奶水牛产业的发展，因此，迫切需要提高本土水牛的产奶量和乳品质。

实验室前期研究发现，角鲨烯环氧酶（Squalene epoxidase，SQLE）在不同泌乳期乳腺组织中均有较高表达，推测SQLE基因可能参与水牛泌乳的调控。为了验证该假设，本研究从体内和体外两个方面探究SQLE基因的泌乳调节功能和作用机制。体内研究主要是利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱（Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry，MALDI-TOF-MS）方法对地中海水牛SQLE的5个单核苷酸多态性（Single Nucleotide Polymorphism，SNP）进行分型，并用SAS 9.4将SNP位点与水牛6项泌乳性能进行关联分析，分析SQLE基因的多态性与水牛泌乳性能的关系，旨在筛选作为分子标记的优势基因和优势单倍型，为建立水牛分子标记辅助选择提供技术支持；体外研究主要应用RNA干扰和过表达技术验证SQLE基因的功能，并测定细胞培养液上清中甘油三酯（TG）、β和κ-酪蛋白浓度及脂滴形成等指标，进一步分析SQLE基因对泌乳的调控及其作用机制。结果如下：

（1）SQLE基因某些多态位点与泌乳性能有关：g14238位点与乳蛋白率有关；g18858位点与高峰产奶量、270 d乳脂量及乳脂率有关；g22834位点与高峰产奶量、乳脂量、乳脂率、乳蛋白率有关，与270 d产奶量及乳脂量的相关性更显著。此外，发现一个包含g18858、g22146和g22834的单倍型模块，且与水牛乳脂量（率）有关。

（2）SQLE基因与泌乳有关：SQLE基因在乳腺、淋巴、肝、下丘脑、胃、大肠、大脑、垂体、肺、脾、卵巢、子宫、输卵管、肾和心脏mRNA水平的表达量，发现SQLE在乳腺表达量最高。

（3）SQLE基因促进水牛乳腺上皮细胞增殖并抑制细胞凋亡：在水牛乳腺上皮细胞（Bovine Mammary Gland Epithelial Cells，BMEC）中干扰SQLE会导致细胞周期阻滞在G1期，增殖能力下降，凋亡比例上升；而过表达SQLE后处于S期的细胞比

万方数据

例上升，增殖能力增强，凋亡比例下降。qRT-PCR结果显示干扰SQLE可引起4个生长相关基因（P21、PCNA、MYC和Bax）的表达量的变化，从而影响细胞的增殖和凋亡。

（4）SQLE基因促进水牛乳腺上皮细胞甘油三酯和酪蛋白的分泌：干扰细胞的SQLE基因，细胞培养液上清中甘油三酯（TG）、β和κ-酪蛋白浓度显著降低（$P<0.05$），脂滴形成呈减少趋势；过表达SQLE后，上清中甘油三酯（TG）和κ-酪蛋白浓度显著升高（$P<0.05$），脂滴形成呈增加趋势。qRT-PCR结果发现干扰SQLE可引起4个乳脂和乳蛋白代谢通路相关基因（SREBP1、JAK2、eIF4E和RPS6KB1）的表达量变化，从而影响细胞甘油三酯和酪蛋白的合成。

综上所述，角鲨烯环氧酶对水牛泌乳有调节作用。角鲨烯环氧酶对泌乳的调控机制包括既可通过促进乳腺上皮细胞增殖并抑制细胞凋亡，又可通过提高乳腺上皮细胞的乳蛋白和乳脂分泌功能促进泌乳。此外，SQLE基因序列中的3个多态位点与泌乳性状显著相关，可用于分子标记辅助选择技术的建立和转基因育种技术。

关键词：单 核苷酸多态性；泌乳性能；水牛乳腺上皮细胞；甘油三酯；酪蛋白；功能验证

万方数据

Abstract

The buffalo is resistant to coarse feeding, heatstress and diseasesandis, the number of buffaloes in my country ranks third in the world. With the development of buffalo milk industry in the world, improvement of milk yield has been paid more attention to indigenous buffalo in China. Compared with the induced breeds such as Mediterranean, Murra and Nili Ravi, the milk yield, milk protein percentage, milk fat percentage of indigenous buffaloes are on the low side, which seriously restricts the development of dairy buffalo industry in China. Therefore, it is urgent to improve the milk yield and quality of buffalo by molecular genetic techniques in China.In recent years, molecular breeding through marker assisted selection (MAS) and transgenic technology is atrend to improve cow's and buffalo's milk performance. The study of the regulation and mechanism of related genes on lactation is very important for the implementation of this technology.

The transcriptome sequencing results of our previous study showed that, the SQLE (Squalene epoxidase) gene expression in mammary gland tissues during different lactating stages is high, so we speculate that SQLE gene was associated with milking traits of buffalo, and it may be involve in the lactation regulation function of mammary gland. This study investigated the function and mechanism of SQLE genes by both in vivo and in vitro methods to check this hypothesis. This study investigated the function and mechanism of SQLE genes by both in vivo and in vitro methods to check this hypothesis. in vivo studies, we distinguished the genetype of 5 SNPs by MALDI-TOF-MS and analysed the correlation between SNPs and 6 milking traits of the buffalo by SAS 9.4, these aimed to screen dominant genes and dominant haplotypes as molecular markers and provide technical support for the establishment of buffalo molecular marker-assisted selection. In vitro studies, we studied the SQLE gene expression in various tissues and the effect of cell proliferation, apoptosis and their related genes, the concentration of triglyceride (TG), and various casein and lipid droplet formation after SQLE over expression or interference, these aimed to further analyze the role and mechanism of SQLE genes in lactation regulation.

(1) SQLE gene polymorphic lociare associated with milking traits of buffalo: Locus g14238 site was associated with milk protein percentage (P<0.05). Locus g18858 was

万方数据

associated with peak milk, 270 d milk fat ylied and milk fat percentage significantly (P<0.05); Locus g22834 was correlated with peak milk, milk fat yield and milk protein percentage (P<0.05). The correlation between locus g22834 and milk ylied during 270 d, milk fat percentage was more obvious (P<0.01). In addition, a haplotype block containg loci g18858, g22146 and g22834 was found to associate with trait of milk fat ylied （percentage）.

(2) SQLE gene was associated with milking: Using various organs of buffaloes collected during the lactation period in the laboratory, we detected the expression of SQLE in mammary gland, lymph, liver, hypothalamus, stomach, large intestine, brain, pituitary, lung, spleen, ovary, uterus, fallopian tube, kidney and heart at mRNA level, the results showed that the expression of SQLE gene is highest in mammary gland.

(3) SQLE gene promotes the proliferation and inhibit the apoptosis of bovine mammary gland epithelial cells（BMEC）. We explored the putative function of SQLE gene though the RNA interference (RNAi) and overexpression techniques. Then we found that SQLE gene treated with RNAi could block the cell cycle at G1 phase, decrease the ability of proliferation and increase the proportion of total apoptosis in buffalo mammary epithelial cells. Moreover, the capacity of cell proliferation increase, the number of cell at the S phase increased and the proportion of total apoptosis reduced afer SQLE over expression in BMEC. The results of qRT-PCR showed that SQLE gene treated with RNAi can affect the expression of 4 growth-related genes (P21、PCNA、MYC and Bax), thereby affecting the proliferation and apoptosis of BMEC.

(4) SQLE gene promotes the secretion of triglyceride and casein by BMEC: The concentration of triglyceride (TG) and β/κ-casein in the supernatant decreased (P<0.05) after SQLE gene treated with RNAi. Moreover, the concentration of triglyceride (TG) and β/κ-casein in the supernatant increased (P<0.05) and the formation of lipid droplets tended to increase after SQLE over expression in BMEC. The results of qRT-PCR showed that SQLE gene treated with RNAi could change the expression of 4 milk fat synthesis and casein metabolism-related genes (SREBP1, JAK2, eIF4E and RPS6KB1), thereby affecting the concentration of triglyceride and casein in BMEC culture supernatant.

In summary, squalene epoxidase has a regulatory effect on lactating buffalo. SQLE not only promote the proliferation and inhibit apoptosis of mammary epithelial cells, but also promote the secretion function of both milk protein and milk fat of mammary epithelial cells. Furthermore, there were 3 SNPs in the SQLE gene sequence associated

万方数据

with milking traits, which can be used in the establishment of molecular marker-assisted selection and transgenic breeding technology.

Key words: Single Nucleotide Polymorphism; Milking Trait; Bovine Mammary Epithelial Cells; Triglyceride; Casein; Functional Verification

万方数据

缩略语表(Abbreviation)

英文缩写 Abbreviations	英文全称 English Name	中文全称 Chinese Name
Bax	Bcl-2 associated X	Bcl-2相关X
BMEC	Bovine Mammary Gland Epithelial Cells	牛乳腺上皮细胞
ELISA	Enayme-Linked Immunos Orbent Assay	酶联免疫吸附反应
GWAS	Genome wide association study	全基因组关联分析
MAS	Marker Assisted Selection	分子标记辅助选择法
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry	基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱
MYC	Myelocytomatosis Viral Oncogene	细胞瘤病毒癌基因
P21	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1a	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PCNA	Proliferation Cell Nucleus Antigen	增殖细胞核抗原
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction	实时定量PCR
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction	反转录PCR
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	单核苷酸多态性
SREBP1	Sterol-Regulatory Element Binding Proteins1	固醇调节元件结合转录因子1

万方数据

1 前言

1.1 研究问题的由来

水牛品种资源丰富，根据核型可分为沼泽型（2n=48）和河流型（2n=50）。中国的水牛主要是沼泽型，原为役用和肉用（刘深贺 2019）。随着农业现代化水平的提高，水牛逐渐从役用转为乳用或乳肉兼用。水牛奶中含有的乳脂、乳蛋白、不饱和脂肪酸和微量元素等营养物质远高于普通牛奶，是制作双皮奶、酸奶和奶酪等乳制品的重要原材料，深受消费者的喜爱，市场前景广阔。然而我国水牛产奶量低，严重制约了奶水牛产业的发展。

从上世纪50年代开始，我国先后从国外引进摩拉、尼里-拉菲和地中海水牛，对本土水牛进行杂交改良。有文献报道摩拉水牛×尼里-拉菲水牛×本地水牛的杂交牛210 d产奶量比纯种水牛高，可达到1499.4 ± 105.3 kg，是本地水牛的2.4~3.4倍（唐善生 2014，Wang et al 2019），但是乳脂率和乳蛋白率分别为7.4%和4.4%，与纯种水牛相比略有降低（Wang et al 2019）。

意大利7万头地中海水牛生产性能测定的数据显示，地中海水牛奶乳脂率为8.2%，蛋白率为4.8%（Angela and De Marchi 2020）；意大利50万头地中海水牛生产性能测定数据显示，地中海水牛270 d乳产量达到2220 kg，乳脂率达到8.4%，蛋白率达到4.6%（Antonio 2013），高产群体泌乳期产奶量可达到2709±470 kg（李俊等 2016）。由此可知，地中海水牛泌乳量、乳脂率和乳蛋白率远远高于我国杂交水牛，因此我国急需对本土水牛进行遗传改良的先进育种技术。

分子育种可以从分子层面对遗传性状进行早期选择。与杂交育种相比，分子育种能准确把握育种方向，加快育种进程，具有更大潜力（Krawetz and Womble 2001）。本试验通过分析角鲨烯环氧酶（Squalene epoxidase，SQLE）基因对水牛泌乳的调节作用及其机制，旨在为建立分子育种方法奠定理论基础并提供技术支撑。

1.2 SQLE 基因研究进展

角鲨烯环氧酶基因定位于人第8号染色体长臂的2区4号亚带（8q24.1）（Nagai et al 1997），位于内质网的微粒体中，其表达产物可以通过催化鲨烯（squalenene，SQ）生成2, 3氧化鲨烯（2, 3-oxidosqualene），进一步合成羊毛甾醇，是胆固醇生物合成的限速酶之一（Seiki and Frishman 2009，Gill et al 2011，Houten et al 2013）。也有文献报道，SQLE可催化固醇类生物代谢中氧化阶段的第一步反应（Wanderset al

万方数据

1998）。在SQLE转基因鼠中发现，肝脏中胆固醇和胆固醇酯的含量显著增加（Liu 2018）。用过表达实验证实，SQLE基因可以促进肝癌细胞的增殖和迁移（Sui et al 2015）。食管鳞状细胞癌细胞中SQLE基因沉默后，癌细胞增殖、迁移和侵袭被抑制（Qin et al 2017）。此外，Kim等（2019）研究表明，SQLE在侵袭性大肠腺癌肿瘤细胞前体中大量表达，参与细胞增殖、迁移和转移。利用该基因抑制剂NB-598处理的细胞，死亡率显著上升（Mahoney et al 2019）。在小鼠成肌细胞中沉默SQLE，可抑制脂肪和肌肉合成相关基因的表达（Jeongim et al 2017）

在高通量测序方面，目前尚没有与水牛泌乳性能相关的报道，只有几篇与肉质相关的研究。对伯克希尔猪肝脏组织RNA测序的结果中发现，SQLE基因多态性与猪背膘厚度、胴体重、肉色、脂肪成分和持水力显著相关。随后，用成肌细胞进行体外研究，发现SQLE参与调节猪的肉质性状（Jeongim et al 2017）。对肌内脂肪水平高和低的两组韩牛进行全基因组差异分析，筛选到包括SQLE基因在内的21个差异表达基因（Lee et al 2010）。对饲料中添加和不添加10%葡萄渣喂养的两组犊牛进行转录组测序，发现在添加10%葡萄渣喂养的犊牛中包括SQLE在内的胆固醇合成相关基因如法尼基二磷酸法尼基转移酶1（FDFT-1）、NAD（P）依赖性类固醇脱氢酶样（NSDHL）和甲基固醇单加氧酶（MSMO）、关键的脂质合成调节剂和固醇调节元件结合转录因子1（SREBP1）显著下调（Marco et al 2018）。

1.3 水牛分子育种的研究概述

分子育种是以分子数量遗传学为理论基础，结合分子诊断技术从DNA分子水平对遗传性状进行选择，实现品种改良的新型育种手段。其中分子标记辅助选择、全基因组关联分析、基因组育种和转基因育种发展最为迅速，是主要的分子育种技术。本研究着重于探究SQLE基因对水牛泌乳的作用及其作用机制，明确其育种价值。

1.3.1 水牛分子标记辅助选择的研究概述

利用DNA标记信息改善复杂性状的基因组育种技术，是最有效的方法（Meuwissen 2013，Georges et al 2018）。候选基因法和全基因组关联分析法是筛选水牛泌乳性能相关分子标记的常用方法。

准确获得分子标记的基础是获得该物种的全基因组序列。多数畜种（牛、羊、鸡、猪、马、黄牛和牦牛等）的全基因组测序（Williams 2005，Wade 2009，Faraut et al 2010）已经完成并用于分子育种，但水牛的研究起步较晚，2013年才出现依据黄

万方数据

牛基因组进行注释的水牛芯片（Wu et al 2013），水牛90K商业化芯片在2018年才更新注解信息，直到2019年，才发布水牛基因组全序列。在水牛基因组全序列没有发布之前，水牛泌乳性能的数量性状基因座（Quantitative Trait Locus，QTL）主要参考奶牛或者黄牛基因组序进行比对得到。因此，水牛基因组序列的发布不仅缩短了SNP和数量性状基因座的置信区间（Lopes et al 2014），还增加了所发现的SNP数目。

随着水牛信息的不断完善，全基因组关联研究（GWAS）技术在筛选水牛泌乳性能分子标记方面也取得一定进展，其中印度、巴西、埃及、菲律宾、意大利及中国等国基于简化基因组测序和90K水牛商业化芯片对摩拉、埃及、菲律宾和地中海水牛进行SNP与泌乳性能关联性分析，从中筛选出一批与泌乳性能紧密关联的基因（李俊 2018，El-Halawany et al 2017，Ak 2017，De Camargo G et al 2015，Camila et al 2017，Li et al 2010）。值得关注的是，广西水牛研究所与意大利农业委员会合作，成功研发出200K水牛芯片，目前这款芯片已应用到分子育种中。

应用候选基因法获得水牛泌乳性能相关分子标记也取得一定进展，发现了大批与乳脂率（STAT1、A2M、GHRL、DGAT1、STAT5A和LEP）、乳脂量（A2M和GHRL）、乳蛋白率（STAT1、A2M、GHRL、MTNR1A和CSN1S1）和产奶量（STAT1、DGAT1、STAT5A、BTN和OXT）相关的候选基因（杜超等 2017），但是，关于SQLE对泌乳是否有调节作用，尚无文献报道。

全基因组关联分析可以系统深入地寻找分子标记，但其可靠性主要取决于表型记录和系谱信息的准确性，对低频和罕见的变异检出率较低。2019年，本实验室以地中海水牛四个泌乳时期为研究对象得到转录组数据，结合GWAS数据进行分析得出一些关于泌乳性能的枢纽基因（邓廷贤 2019），本试验的研究对象SQLE即是通过这批转录组数据分析筛选得到的。

1.3.2 水牛转基因育种的研究概述

转基因育种是在已知编码蛋白基因、抗性基因、经济性状主效基因和数量性状基因座（quantitative trait locus，QTL）基础上，通过提取或合成遗传物质，并将其导入没有该遗传物质的受体内，并将重组基因导入胚胎细胞，整合到基因组，得到可稳定遗传的转基因动物的技术（Badenhorst et al 2018，Zhang et al 2014）。转基因育种具有克服动物种间生殖隔离和实现优良基因重组的优点，能高效培育符合人们需求的品种，加快育种进度，在改善水牛的生产性能方面具有很大潜力。

万方数据

牛泌乳性能改良的研究主要集中在奶牛上，研究人员已经相继培育出胰岛素样生长因子、β-酪蛋白和κ-酪蛋白转基因奶牛，其中转基因牛的牛奶中β-酪蛋白和κ-酪蛋白的含量分别提高了20%和100%（Brophy et al 2003）。中国农业大学在2010和2011年相继成功获得多不饱和脂肪酸转移酶（fat-1）的转基因奶牛和敲除β-乳球蛋白的转基因奶牛（Wu et al 2011，Yu et al 2011）。Shang等（2013）在水牛卵丘细胞中导入pEGFP-N1，成功获得可用于体细胞核移植的转基因细胞株；随后Lu等（2018）应用体细胞核移植技术获得重组细胞，培育成囊胚后移植到受体水牛子宫角、获得健康的转基因克隆水牛。就目前来看，转基因水牛处在初始研究阶段，而我国水牛体细胞核移植技术的成熟也为转基因育种提供了可靠的技术支持。自2008年来，我国高度重视转基因新品种的培育，不断改进的转基因技术也为水牛转基因育种提供了技术支持，转基因动物的研究和应用将会成为动物遗传育种的重点。

水牛转基因育种的发展除了受到转基因技术的局限外，还有一个较大的阻力，就是对功能基因了解太少，出现无基因可转的尴尬局面。因此，发现新基因和鉴定基因的功能，对于转基因育种技术的发展具有重要意义。另外，目前已经挖掘出大量与家畜经济性状相关联的SNP，不仅可以用于分子标记辅助选择的建立还可以利用基因编辑技术对其进行精确编辑达到转基因育种的目的。。

1.4 水牛乳腺上皮细胞体外模型研究进展

随着个体的成熟和乳腺的生长发育，乳腺上皮细胞也开始在激素的调控下发育成熟并参与乳汁的生成与分泌（Capuco et al 2001，Inman et al 2015）。有研究发现在泌乳期间，乳腺上皮细胞凋亡和数量减少会导致泌乳量的降低（Marion et al 2004，Inman et al 2015），所以乳腺上皮细胞的分子研究对于提高水牛乳品质和乳产量至关重要（Inman 2015，Zhang et al 2019）。体外培养的乳腺上皮细胞具有正常的的泌乳功能（Zavizion et al 1992），可以快速准确地反映乳汁分泌水平，是研究乳腺发育学和泌乳生物工程学的理想模型（Tong et al 2012）。

为了维持体外培养的BMEC正常生长和分泌功能，必须在培养液中添加一些激素。在建立奶牛BMEC的体外培养体系时，有研究发现PRL、HYD、胰岛素、醛固醇和HYD的组合对奶牛BMEC有良好的诱导作用（Tonelli and Sorof 2010）。而水牛BMEC体外培养体系的建立起步较晚，在2012年和2013年分别有学者成功建立了水牛BMEC系，并且证明体外培养的细胞可维持正常功能（Vijay et al 2012，Ramakant

万方数据

et al 2013）。段安琴等（2017）从高产水牛泌乳后期的奶中成功获得了BMEC，并在前人的基础上使用加入多种激素的培养液，证明水牛BMEC在体外仍具有分泌功能。在培养液中添加多种激素，包括催乳素（PRL）、胰岛素、表皮生长因子（EGF）、转铁蛋白（Lf）、孕酮及氢化可的松（HYD）等，可以维持增殖分化功能（韩哲先 2018），并通过JAK2和STAT5途径促进酪蛋白的合成（田青等 2013）。胰岛素在泌乳过程中能够加强PRL信号，且与表皮生长因子共同维持水牛BMEC的正常葡萄糖代谢功能。在细胞生长过程中会产生铁离子，对细胞的生长有一定危害，而转铁蛋白是一种铁结合的糖蛋白，可通过中和铁离子维持细胞中铁的平衡，并且转铁蛋白还具有抗菌的作用，可以减少细胞被污染的几率。HYD在其他激素的协同下可参与乳蛋白和乳脂的合成，维持体外培养BMEC的分泌功能（Casey et al 2010）。综上所述，在多种激素的协同作用下，体外培养水牛BMEC仍具有生长和和合成乳脂乳蛋白的能力，可用于泌乳功能的研究。

1.5 研究的目的和意义

为了解决我国水牛乳品质和产奶量低的问题，本试验利用已有意大利地中海奶水牛生产性能记录资料，通过分析SQLE基因多态性及其与6项泌乳性能指标的关系，以期找到与泌乳性能相关的基因型和单倍型，为建立分子标记辅助选择技术和转基因育种技术奠定基础。其次，取泌乳期水牛乳腺上皮细胞，应用RNA干扰和过表达技术，通过分析SQLE基因对乳腺上皮细胞生长、增殖、凋亡和分泌功能的影响，探讨SQLE基因对水牛泌乳的作用及其机制，为进一步利用该基因奠定基础。

万方数据

2 试验材料

2.1 试验样本

用于关联分析的384头地中海水牛分别来自意大利的4个牧场，6个泌乳性能数据由意大利水牛育种评估中心（ANASB）提供，该协会负责意大利水牛种群的官方畜群登记。这些水牛的DNA提取由本实验室完成（Li et al 2020）。

水牛乳腺组织取自3头泌乳期纯种地中海水牛。水牛泌乳期乳腺上皮细胞来自纯种摩拉水牛，由广西水牛研究所制备后提供。

2.2 主要试剂与耗材

表2-1 主要试剂及耗材

Table 2-1 Reagents and consumables and the suppliers

试剂与耗材	厂家
胎牛血清（FBS）	美国 Gibco 公司
DMEM/F12	美国Hyclone
0.25%胰蛋白酶消化液	美国 Gibco 公司
青链霉素混合液	美国 Gibco公司
OPTI-MEM	Life technology
二甲基亚砜（DMSO）	Sigma
Trizol Regent	Invitrogen
无水乙醇	上海国药集团化学试剂有限公司
氯仿	上海国药集团化学试剂有限公司
异丙醇	上海国药集团化学试剂有限公司
DEPC水	武汉谷歌生物科技有限公司
PCR引物	武汉擎科创新生物科技有限公司
琼脂粉	武汉市普博欣生物技术有限责任公司
RIPA 裂解液	武汉谷歌生物科技有限公司
PMSF	武汉谷歌生物科技有限公司
磷酸化蛋白酶抑制剂A、B液	武汉谷歌生物科技有限公司
50×Cocktail蛋白酶抑制剂	武汉谷歌生物科技有限公司
5×蛋白上样缓冲液	武汉谷歌生物科技有限公司
PVDF纤维素膜	美国密理博
蛋白Marker	Thermo
牛血清白蛋白组份	美国 Genview 公司
一抗、二抗洗脱液	武汉谷歌生物科技有限公司
NaCl	上海国药集团化学试剂有限公司
Tris-base	上海国药集团化学试剂有限公司

万方数据

续前页	
Tris-base	上海国药集团化学试剂有限公司
甘氨酸	上海国药集团化学试剂有限公司
Tween-20	上海国药集团化学试剂有限公司
细胞培养板	Corning
1.5mL 离心管	赛默飞世尔科技（中国）有限公司
0.2mL PCR 管	赛默飞世尔科技（中国）有限公司

表2-2 试剂盒及生产厂家

Table 2-2 The Kit and suppliers

试剂盒	厂家
Lipofectamine® RNAi MAX转染试剂盒	Invitrogen（13778-075）
Lipofectamine® RNAi MAX转染试剂盒	Invitrogen（13778-075）
Lipofectamine® LTX/PLUS转染试剂盒	Invitrogen（15338-030）
Thermo Fermentas 反转录试剂盒	Thermo（K1622）
SDS-PAGE凝胶制备试剂盒	武汉谷歌生物科技有限公司（G2003）
凯基Annexin V-FITC/ PI 细胞调亡检测试剂盒	南京凯基生物科技发展有限公司（KG1025）
凯基细胞 DNA 含量检测试剂盒（细胞周期）	南京凯基生物科技发展有限公司（KGA512）
Cell Counting Kit-8（CCK-8）细胞增殖-毒性检测试剂盒	日本同仁（CK-04）
THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 试剂盒	Toyobo（QPS-201T）
去内毒素质粒大提试剂盒	TIANGE（DP117）
质粒小提试剂盒	TIANGEN（DP103）
油红O染色试剂盒	Solarbio（G1262）
甘油三酯（TG）检测试剂盒	上海酶联（E11T0018）
α-Casein（CSN1）检测试剂盒	上海酶联（572830-1）
β-Casein（CSN2）检测试剂盒	上海酶联（572830-2）
κ-Casein（CSN3）检测试剂盒	上海酶联（572830-3）

表2-3 主要抗体及厂家

Table 2-3 The Main Antibodyand suppliers

抗体	编号	厂家
兔抗SQLE	ER1917-17	华安生物
兔抗Bax	2772S	Cell Signaling Techology（CST）
兔抗PCNA	10205-2-AP	武汉三鹰生物
兔抗GAPDH	B1034	北京博奥龙免疫技术公司
兔抗β-actin	B1033	北京博奥龙免疫技术公司
Hrp标记的二抗（山羊抗兔）	P1002	武汉启动子生物有限公司

万方数据

2.3 主要仪器

表2-4 主要仪器及厂家

Table 2-4 The main instrumentand suppliers

仪器	型号	厂家
微量移液器		Eppendorf
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州安泰
CO2恒温培养箱	150i	美国Thermo
倒置显微镜	OLYMPUS	IX51
低速离心机	Eppendorf	5702R
实时荧光定量 PCR 仪	ViiA7	ABI
伯乐细胞计数仪	Slides145-0011	Bio-Rad
电热恒温培养箱	ICV-450	日本 ASONE
电热恒温水浴锅	HW-SY11-K P2	北京长风仪器仪表有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG 9203A	上海精宏实验设备有限公司
全自动酶标仪	Multiskan MK3	Thermo scientific
流式细胞仪	BD Biosciences	FACSCalibur
Aquapro 超级纯水仪	AJY -0501	艾科浦
电子天平	BL1500	德国Sartorius
PCR 仪	EDC-810	东胜创新生物科技有限公司
电泳仪	JY300	美国Bio-Rad
微波炉		LG
微型高速离心机	C2500-R-230V	美国 Labnet

2.4 主要试剂的配制

（1）50×TAE电泳缓冲液：取Tris-base 242.0 g、冰乙酸57.1 mL、0.5 mol/L EDTA100 mL，充分溶解后调pH值至8.0，加蒸馏水定容为1L备用；

（2）2%琼脂糖凝胶：取2g琼脂糖，加入100 mL 1×TAE电泳缓冲液，在微波炉中加热融化；

（3）蛋白印迹电泳液（1×）：取3.02 g Tris-base、19 g 甘氨酸和1 g SDS，加双蒸水溶解，定容至1000 mL，pH调至8.3；

（4）蛋白印迹转膜缓冲液（1×）：取5.8 g Tris-base、2.9 g 甘氨酸和0.37 g SDS，加双蒸水溶解，加入200 mL甲醇，加双蒸水定容至1000 mL；

（5）TBS缓冲液（10×贮存液）：取12.11 g Tris-base和87.75 g NaCl，用浓盐酸调节pH到7.4，加水定容到1000 mL；

（6）TBST缓冲液：量取1000 mL 1×TBS工作液，加1 mL Tween-20，现用现配；

万方数据

（7）5%BSA溶液：取0.1 g BSA，加入10 mL TBST电泳缓冲液，缓慢摇匀至溶解；

（8）75%乙醇溶液：量取75 mL无水乙醇，加入25 mL蒸馏水，混匀。

（9）PBS缓冲溶液（10×贮存液）：取80 g NaCl、2 g KCl、14.4 gNa_2HPO_4和2.4 gKH_2PO_4，加入1000 mL蒸馏水溶解，除菌后4℃保存。

（10）细胞普通培养液：45 mL DMEM/F12，5 mL胎牛血清，500 μL青链霉素双抗溶液混合，用0.22 μm的微孔滤膜在无菌操作台中过滤溶液，除菌分装于50 mL离心管中4℃保存。

（11）细胞功能培养液：45 mL DMEM/F12，5 mL胎牛血清，500 μL青链霉素双抗溶液，250 μg转铁蛋白，250 μg胰岛素，50 μg孕酮，50 μg氢化可的松，500 ng催乳素，500 ng EGF混合，用0.22 μm的微孔滤膜在无菌操作台中过滤溶液，除菌分装于50 mL离心管中4℃保存

万方数据

3 试验方法

3.1 水牛 SQLE 基因多态性与泌乳性能关联分析

3.1.1 SNPs 的筛选与基因分型

以 50 头地中海水牛总 DNA 组成的混合池为模板，通过 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/查找SQLE启动子、3′UTR、5′UTR、各外显子（±200 bp）及第一个外显子上游2000 bp处，并对其进行PCR扩增，扩增产物经2%的琼脂糖凝胶电泳检测后，委托深圳华大基因生物科技公司测序。根据序列峰图和NCBI BLAST功能比对分析，筛选SNP位点，以外显子第1个碱基记为1，以此往后累加的方法进行命名。

采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱方法(国鹏等 2019)，根据质谱峰的参数判定的分子质量值，分为高质量、中等质量和低质量分子，代表不同基因型。

3.1.2 单倍型分析

根据利用Haploview 4.2软件将所筛选的5个SNPs进行连锁不平衡分析，得到相对连锁的单倍型块；再利用Phase软件将单倍型与384个个体进行一一对应，得到不同的单倍型组合（Abraham 2010）。

3.1.3 遗传参数计算和关联分析模型

（1）基因型频率、等位基因频率计算基因型频率=基因型个体数/测定群体总数。等位基因 A 的频率为 $p^{(A)}=(R+1/2S)$，等位基因 B 的频率为 $q^{(B)}=(T+1/2S)$。式中:R、S、T 分别为 AA、AB、BB 基因型的频率。

（2）多态信息含量(PIC)=$1-\sum_{i=1}^{m} P_i^2-\sum_{i=1}^{m-1}\sum_{j=i+1}^{m} 2P_i^2P_j^2$。式中Pi和Pj分别为第i个和第j个等位基因在群体中的频率。

（3）杂合度(He)=$1-\sum_{i=1}^{m} Pi^2$ 计算式中:Pi 为第 i 个等位基因在群体中的频率。

采用SAS 9.4软件中的一般线性模型进行基因型和表型值之间的关联分析，分析模型为：

$$Y_{ijkl}=u+G_i+P_j+S_k+F_l+PS_{jk}+PF_{jl}+SF_{kl}+e$$

万方数据

式中，Y_{ijkl}为性状观察值；u为性状总平均值；G_i为基因型效应；P_j为胎次效应；S_k为季节效应；F_l为场次效应；PS_{jk}、PF_{jl}和SF_{kl}表示二因素互作效应；e为随机误差，假定服从（0，σ^2）分布。

3.2 SQLE 基因在各种组织中的表达

3.2.1 组织总 RNA 提取

将水牛组织从-80℃环境中取出，提取总RNA，具体步骤参照周正奎（2008）的实验方法操作。

（1）向冻存管中加入黄豆粒大小的组织块、磁珠和1 mL Trizol，配平放入匀浆机进行均浆直至组织块完全匀质化；

（2）冰上静置5 min，4℃离心（~296000 g）10 min后，将上清完全转移至1.5 mL EP管中；

（3）每管加入200μL预冷的氯仿，轻轻颠倒数次混匀，室温静置10 min；

（4）标记、封口，4℃离心（~296000 g）15 min，样品分层，上层水相，中层为蛋白层，下层酚相，RNA存在于上层水相中；

（5）吸取上层水相（约400 μL）于1.5 mL EP管中，加入等量预冷的异丙醇，充分混匀，室温静置10 min；

（6）标记、封口，4℃离心（~296000 g）10 min，此时可看到管底的白色RNA沉淀；

（7）弃上清，向沉淀中加入1 mL 75%无水冷乙醇漂洗2次（75%无水乙醇用DEPC水配制，现配现用），4℃离心（~13156 g）5 min，最后用移液枪将上清吸净；

（8）置于室温干燥5~10 min，加入适量DEPC水溶解；

（9）分装出2 μL测浓度，4 μL跑胶检测是否有降解，其余保存于-80℃备用。

3.2.2 cDNA 链反转录合成

反转录具体步骤参照FastQuant RT Kit（with gDNA）（TianGen）试剂盒方法说明（所有反应液均在冰上配制）。根据RNA相对浓度，以模板量为1 μg，计算反转录用样量X（μL）。

在无RNA酶的离心管中，加入2 μL 5×RT Buffer和X μL总RNA，最后加入RNA酶处理的超纯水将反应体积补至10 μL，混合均匀，42℃反应3 min。然后向第一步所得溶液中加入2 μL 0×Fast RT Buffer、1 μL RT Enzyme Mix 和2 μL FQ-RT Primer

万方数据

Mix，最后加入RNA酶处理的超纯水将总体系补到20 μL混合均匀，先42℃反应15 min，后95℃反应3 min。

3.2.3 单位 RNA 中基因表达量

从NCBI上查阅SQLE和基因水牛乳腺上皮细胞生长、脂类代谢和乳蛋白代谢相关基因的CDNA序列，利用premier5.0软件设计引物（表3-1）。

表3-1引物序列

Table 3-1 Primer Sequence

基因 Genes	引物序列 Primer sequences（5′→3′）	实验退火温度 Annealing temperature/℃
SQLE	F：TGGCCAAGGGAGAAGATGTCA	60
	R：CGGCAGACAGAAGAGGTGTGA	
GAPDH	F：AGGTTGTCTCCTGCGACTTC	60
	R：ATTCTCAGTGTGGTGGAGGTG	
PCNA	F：ACACTAAGGGCCGATAAGG	60
	R：ACAGCATATCCAATATGGCTGA	
P21	F：TTCTCTGGGTGGCACTCTCT	60
	R：CACAGGACAGAGGTGGGAAT	
SREBP1	F：AGTAGCAGCGGTGGAAGT	60
	R：GCAGCGGCTCTGGATT	
JAK2	F：TGAAGAAAACAGGTAATCAGACTGGA	60
	R：AACATTTTCTCGCTCAACAGCA	
RPS6KB1	F：AAATGCTGCTTCTCGTCT	60
	R：GTTCTTCCCAGTTAATATGTCT	
eIF4E	F：AAATGCTGCTTCTCGTCT	60
	R：TAGTGGTGGAGCCGCTCTTA	
siRNA SQLE	F：CCUAGAAGCCUCUCAGAAUTT	60
	R：AUUCUGAGAGGCUUCUAGGTT	

甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）是糖酵解反应中的一个酶，几乎在所有组织中都高水平表达，在同种细胞或者组织中的蛋白质表达量一般是恒定的，且不受转染试剂影响而保持恒定（zhang et al 2015），故本试验以GAPDH作为内参，在保证反转录所用总RNA为1 μg的前提下，反转录得到CDNA，然后进行qRT-PCR。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法对基因mRNA表达水平进行相对定量分析。扩增反应体系10 μL，具体步骤参照试剂盒说明书所述步骤操作（表3-2）。

万方数据

表3-2 qRT-PCR扩增反应体系

Table3-2 Reaction system for qRT-PCR

试剂	体积
SYBR Green PCR Master Mix	5μL
上游引物（10μM）	0.5μL
下游引物（10μM）	0.5μL
cDNA	1μL
H_2O	3μL
Total Volume	10μL

3.3 水牛乳腺上皮细胞的纯化和培养

由于原代乳腺上皮细胞中含有大量的成纤维细胞，本试验根据上皮细胞和成纤维细胞对胰蛋白酶耐受程度和表观形态上的差异，采用胰蛋白酶消化法对水牛乳腺上皮细胞与成纤维细胞进行分离（Tong et al 2012）。在胰蛋白酶的作用下，成纤维细胞在1~2 min左右完全脱壁，水牛乳腺上皮细胞4~5 min脱壁。加入胰蛋白酶后立即将细胞置于37℃无菌培养箱，1min后加入等体积细胞培养液终止消化，弃去胰蛋白酶后加入3 mL培养液，置于37℃、5%CO_2继续培养。由于水牛乳腺上皮细胞呈单层、鹅卵石和上皮样，纯化过程中以此为依据判断水牛乳腺上皮细胞是否纯化（Tong et al 2012）。为直观反映水牛乳腺上皮细胞的纯化程度，本试验通过对上皮细胞角蛋白18进行荧光标记，并检测角蛋白18阳性率，以阳性率大于90%为纯化判断标准（Fradette et al 2012）。

3.4 siRNA 序列设计以及干扰效率检测

3.4.1 siRNA序列设计和mRNA水平干扰效率检测

参考水牛SQLE基因序列，由上海吉玛制药技术有限公司设计4条干扰片段，在mRNA水平检测4条干扰片段在水牛乳腺上皮细胞中的干扰效率，转染过程参考Lipofectamine® RNAi MAX转染试剂盒（Invitrogen公司）转染步骤：

（1）当6孔板里细胞处于对数生长期，生长状态良好时进行试验，

万方数据

（2）每孔转染复合物的配制：分别向2支1.5 mL无菌EP管中各加入100 μL OPTI-MEM，其中一管加入3 μL浓度20 μmol/L的SQLE干扰片段，轻轻吹打混匀；向另一管中加入等量转染试剂RNAi MAX转染试剂轻轻吹打混匀，室温静置5 min后，将两管合为一管，轻轻吹打混匀，形成200 μL转染复合物，室温静置20 min；

（3）转染：静置期间，用PBS将细胞6孔板清洗两遍，弃掉废液，每孔加入400 μL OPTI-MEM，再将200 μL转染复合物缓慢滴加，得到干扰片段最终转染浓度为100 nmol/L。轻轻晃动细胞培养板使复合物与OPTI-MEM混匀，置于37℃、5%CO_2细胞培养箱中继续培养；

（4）换液：细胞转染后4~6 h弃去混合液，用PBS清洗一遍，每孔加入2 mL新鲜10%FBS培养液，继续培养以进行后续试验。

48 h后提取总RNA，以GAPDH基因为内参，用qRT-PCR技术检测SQLE基因的相对表达量。

3.4.2 蛋白水平干扰效率检测

RNA干扰SQLE基因48 h后，从水牛乳腺上皮细胞中提取总蛋白，具体步骤参照蛋白提取试剂盒操作方法说明进行：

（1）配制裂解液（1 mL体系）：1000 μL RIPA裂解液，20 μL 50×Cocktail蛋白酶抑制剂，磷酸化蛋白酶抑制剂A、B液各10 μL，10 μL PMSF；

（2）收细胞蛋白样：用预冷的PBS清洗细胞3次，最后一次要彻底吸干残留液。每孔细胞中加入120~150 μL蛋白裂解液，将细胞培养板置于冰上放置5 min，期间反复晃动培养板使裂解液与细胞充分接触。用干净的细胞刮刀将细胞及裂解液收集到1.5 mL EP管中；冰浴30 min，期间每隔10 min用200 μL移液枪反复吹打数次，确保细胞完全裂解。4℃（~296000 g）离心5 min，将上清收集至新的EP管中，即为细胞总蛋白。

然后对蛋白浓度进行检测并制样，本试验采用BCA蛋白浓度测定试剂盒（P0012S，碧云d）进行蛋白浓度测定。具体操作步骤如下：

（1）配制标准品：取0.8 mL蛋白标准配制液加入到蛋白标准（20 mg BSA）中，充分溶解后配制成25 mg/mL的蛋白标准溶液，取适量用PBS稀释至终浓度为0.5 mg/mL的标准品试剂；

万方数据

（2）配制BCA工作液：根据样品数量，按体积比50：1加入BCA的A和B工作液，充分混匀，BCA工作液室温24 h内稳定；

（3）96孔板的标准品孔中分别加入0、1、2、4、8、12、16、20 μL标准品，再用PBS将其它孔补足到20 μL；

（4）样品孔中每孔加入10 μL蛋白样品，再补加PBS至20 μL；

（5）每孔加入200 μL BCA工作液，37℃孵育30 min；

（6）利用酶标仪，检测波长为562 nm时各孔OD值，根据结果绘制蛋白浓度标准曲线，通过标准曲线计算出检测样品的蛋白终浓度。

（7）根据测得的各蛋白样品浓度，加入去离子水使各样品的蛋白浓度相同，加入蛋白上样缓冲液吹打混匀，煮沸5 min，冰上放置1 min，封口，-20℃保存备用。

最后采用蛋白免疫印迹方法（荣瑞娟等 2015）对蛋白质种类进行定性分析，具体步骤如下：

（1）检漏：用单蒸水将玻璃胶板洗净, 洗完后将其安装好。

（2）制胶：根据目的蛋白大小，选取合适的分离胶浓度。最后添加TEMED，加完后迅速用移液枪吹打混匀，将胶液注于玻璃板的空隙内。然后沿着玻璃板的一边小心注入无水乙醇，使胶面压平，室温放置1~2 h。分离胶凝固后，倒掉上层乙醇，用滤纸吸干，配制5%浓缩胶。每板加2 mL，配好后迅速注胶，插入点样孔排梳。插完后用烧杯内的剩余胶液补齐液面。室温静置放置1 h。待胶凝固后，将胶板放于电泳液中，将排梳拔出。SDS-PAGE分离胶和浓缩胶的配制成份参考SDS-PAGE凝胶制备试剂盒说明（G2003，谷歌生物）。

（3）点样：将已制好的蛋白样品煮沸5 min，冰上放置1 min；将蛋白样品吹打混匀后，加入各孔中，未加样孔用buffer补齐；

（4）电泳：电泳过程分为两步：先调节电泳仪恒压80 V，跑电泳1 h左右，目测样品跑到分离胶时，将电压调至120 V，判断目的蛋白得到充分分离后，可结束电泳。

（5）转膜：将玻璃板取出，用胶板缓慢撬开玻璃板。轻轻取出凝胶浸泡在转膜缓冲液中；剪下合适大小的PVDF膜，浸泡于甲醇中1~2 min进行激活。待PVDF膜两边保护纸完全浸透后，将PVDF膜放入转膜缓冲液中浸泡漂洗，同时充分浸泡两张转膜海绵垫和滤纸；按照黑色板-纤维垫-滤纸-凝胶-PVDF膜-滤纸-纤维垫-白色板顺序

万方数据

依次放好，每铺一层用玻璃棒擀走气泡；夹紧板后放入转膜仪内，调节恒流200 mA，转膜90 min。

（6）封闭：转膜完成后用TBS将PVDF膜漂洗10 min，用5%脱脂奶粉室温摇床封闭2 h。

（7）加一抗：按照相应抗体说明书的要求，用封闭液稀释一抗，4℃过夜孵育。

（8）加二抗：过夜孵育后取出PVDF膜，室温下用TBST漂洗3次，每次漂洗10 min；用TBST稀释HRP标记二抗，使PVDF膜浸泡于二抗孵育液中，室温摇床孵育2 h。

（9）洗膜：二抗孵育完成后用TBST充分洗涤PVDF膜3次，每次10 min；再用TBS洗涤3次，每次10 min。

（10）化学发光与成像：用ECL显色试剂盒（BIO-RED），A液与B液等比混合加入离心管中，用锡箔纸包裹避光，上下摇动混匀。显影时将漂洗好的PVDF膜正面朝上放置在干净的大皿中，均匀滴加适量的ECL显影液，置于ImageQuant LAS 4000 mini成像仪底盘，打开配套软件，调整焦距和曝光时间，成像得到蛋白免疫印迹化学显影图，用Image j软件分析灰度值（Tsukada et al 2006）。

3.5 SQLE 基因过表达质粒构建

依照NCBI查找SQLE的cDNA全序列，并委托武汉天一辉远生物公司合成过表达载体。利用内切酶Nhe I和BamH I，对重组质粒PCDNA3.1-SQLE进行双酶切，具体实验步骤根据试剂盒所述步骤操作，酶切反应体系如表3-3所示，酶切反应于37℃恒温培养箱中进行1 h。

表3-3 双酶切反应体系

Table 3-3 Double digestion system

名称 Name	体积 Volume
PCDNA3.1-SQLE	1 μL
NheI	1 μL
BamHI	1 μL
10×K buffer	2 μL
ddH_2O	15 μL

对双酶切后的质粒进行EB染色，凝胶电泳后，在300 nm波长的紫外激发下进行显色。

万方数据

3.6 细胞增殖、周期和凋亡的检测

3.6.1 细胞增殖检测

CCK-8中含有2-(2-甲氧基-4-硝基苯基）-3-(4-硝基苯基）-5-(2,4-二磺酸苯）-2H-四唑单钠盐（WST-8），WST-8可被细胞中的脱氢酶还原成一种高度溶于水的橙黄色甲瓒，甲瓒的生成量细胞数目成正比（田钰琪等 2019）。酶标仪检测甲瓒的荧光强度细胞，以此表示细胞增殖能力。检测步骤按CCK-8细胞增殖检测试剂盒所示说明操作。

将细胞传代至96孔板，隔夜培养后，转染处理，收样检测细胞活力，具体步骤参照检测试剂盒（CCK-8）操作方法说明进行操作。每个处理5个复孔，置于37℃、5%CO_2培养箱培育48 h。每孔加入90 μL 10%完全培养液及10 μL CCK-8，注意避免产生气泡。将培养板用锡箔纸包裹后放入孵育箱避光孵育150 min，拿出培养板检测OD值（450 nm处的吸光度）。

3.6.2 细胞凋亡检测

细胞转染48 h后，收集所要检测的细胞。参照王秀莉（2015）所述和凯基Annexin V-FITC/ PI细胞凋亡检测试剂盒操作方法说明检测细胞凋亡，具体步骤如下：

待处理细胞用不含EDTA胰酶消化5~10 min，倒置显微镜下观察，待细胞变圆，加入等体积的细胞培养液终止消化，吹打细胞转移至10 mL离心管，离心（~465 g）5 min。弃上清，用PBS洗涤细胞2~3次，离心（~465 g）5 min。弃上清，收集细胞；加入500 μL Binding Buffer 悬浮细胞；加入5 μL Annexin V-EGFP 混匀后，加入5 μL Propidium Iodide混匀；室温、避光，反应5~15 min，1 h内流式细胞仪检测。

3.6.3 细胞周期检测

细胞转染48 h后，收集所要检测的细胞。利用碘化丙啶（PI）与DNA结合产生可被检测的红色荧光的原理检测细胞所处时期。具体步骤依据王秀莉（2015）所述和凯基细胞DNA含量检测试剂盒（细胞周期）的操作说明书。

（1）待处理细胞用不含EDTA胰酶消化5~10 min，倒置显微镜下观察，待细胞变圆后，加入等体积的细胞培养液终止消化。吹打细胞转移至10 mL离心管，离心（~465 g）5 min。

（2）弃上清，用PBS洗涤细胞2~3次，离心（~465 g）5 min。弃上清，收集细胞；向细胞沉淀中加入500 μL 70%冷乙醇进行固定，混匀后4℃过夜；

万方数据

（3）离心去除固定液，用预冷PBS洗涤2~3次，离心（~465 g）5 min。弃上清，收集细胞；

（4）向细胞沉淀加入80 μL RNaseA，混匀，置于37℃恒温水浴锅中30 min；

（5）再加入300 μL PI染色混匀，4 ℃避光反应30 min；

（6）流式细胞仪检测：PI用氩离子激发荧光，激发光波长为488 nm，发射光波长大于630 nm，产生红色荧光。

3.7 乳腺上皮细胞培养液中脂类和酪蛋白的检测

3.7.1 甘油三酯和酪蛋白检测

收集干扰或过表达SQLE后水牛乳腺上皮细胞培养液上清，用ELISA试剂盒检测细胞培养上清中甘油三酯和酪蛋白的浓度，其中甘油三酯检测试剂盒的灵敏度为0.0001 mmol/L，酪蛋白检测试剂盒的灵敏度为0.0001 μg/mL，试验进行3次生物学重复。ELISA检测方法参照试剂盒说明书（上海酶联试剂盒）进行，具体操作步骤如下：

（1）从室温平衡 20 min 后的铝箔袋中取出所需板条，设置标准品孔和样本孔，标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μL。

（2）样本孔先加待测样本 10 μL，再加样本稀释液 40 μL；空白孔不加。

（3）除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶（HRP）标记的检测抗体 100 μL，用封板膜封住反应孔，37℃水浴锅或恒温箱温育 60 min；

（4）弃去液体，吸水纸上拍干，每孔加满洗涤液，静置 1 min，甩去洗涤液，吸水纸上拍干，重复洗板 5 次；

（5）每孔加入底物 A、B 各 50 μL，37℃避光孵育 15 min；

（6）每孔加入终止液50 μL，15 min内，在450 nm波长处测定各孔的OD值。

3.7.2 脂滴检测

油红O染色是一种红色脂溶性染料，可以更直观呈现甘油三酯的分泌量（Kim et al 2016）。在12孔板中RNA干扰或过表达SQLE后，检测脂滴形成的情况。具体检测步骤参照油红O染色试剂盒说明书进行，事先将细胞铺在玻片上培养，实验处理完毕后，将PBS洗两遍，加ORO Fixative固定液固定20~30 min。弃去固定液，用蒸馏水洗2次。加入60%异丙醇浸洗5 min。弃去60%异丙醇后加入新配制好的ORO Stain，浸染10~20 min。弃去染色液，水洗2~5次，直到无多余染液。加入Mayer苏木素染色

万方数据

液， 染1~2 min（时间不宜长），立即弃去染液后水洗2~5次。加入ORO Buffer染1 min后弃去，然后加入蒸馏水覆盖细胞并在显微镜下观察。

3.8 乳腺上皮细胞生长和分泌相关基因的检测

用qRT-PCR和蛋白免疫印迹技术检测干扰SQLE后水牛乳腺上皮细胞中8个细胞生长和分泌相关基因的相对表达量。所选生长相关基因为促增殖基因细胞瘤病毒癌基因（myelocytomatosis viral oncogene，MYC）和增殖相关蛋白增殖细胞核抗原基因（proliferation cell nucleus antigen，PCNA）、周期相关基因细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A基因（cyclin dependent kinase inhibitor 1A，P21）和促凋亡蛋白Bcl-2相关X基因(Bcl-2 associated X，Bax) （Li et al 2012）。所选脂质代谢相关基因为转录调控基因胆固醇调节元件结合蛋白1（Sterol-regulatory element binding proteins 1，SREBP1）(Bionaz and Loor 2008)。所选乳蛋白代谢相关基因为mTOR通路（eIF4E）和JAK2-STAT5通路（RPS6KB1和JAK2）(Bionaz and Loor 2011)。所用引物序列见表3-1。

3.9 数据统计方法

采用 Bio-Rad IQ5 软件及 Microsoft Office Excel 分析实时定量 PCR 数据；用 Modfit 软件分析细胞周期以确定细胞周期分布。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因、细胞活力和细胞周期分布相对表达量，试验数据来自至少 3 次独立重复试验。用 Graphpad Prism 5.0 软件对数据进行方差分析或 t 检验、统计学差异分析和作图，相对表达量的结果均使用平均值±标准误（Mean ± SEM）表示。P <0.05 为有统计学意义（*），P<0.01 差异为极显著（**）。

万方数据

4 试验结果

4.1 水牛SQLE基因多态性及其与泌乳性能的关系

4.1.1 SQLE基因多态性

混合池测序和SNP分型的结果显示SQLE共有5个SNP位点，分别为g14238（T>G）、g16409（T>C）、g18858（A>G）、g22146（A>C）和g22834（T>C），其中g14238位于第6个内含子区域；g16409和g18858位于第7个内含子区域；g22146和g22834位于第9个内含子区域（图4-1和图4-2）。分析筛选的5个SNP基因型频率、等位基因频率、杂合度（Heterozygosity）和多态信息含量（PIC），发现在试验群体中g16409的杂合度最高，为0.5；g22146的杂合度最低，为0.1，g16409、g18858和g22834位点属于中度多态（PIC>0.25）；g14238和g22146位点属于低度多态（PIC<0.25，表4-1）。

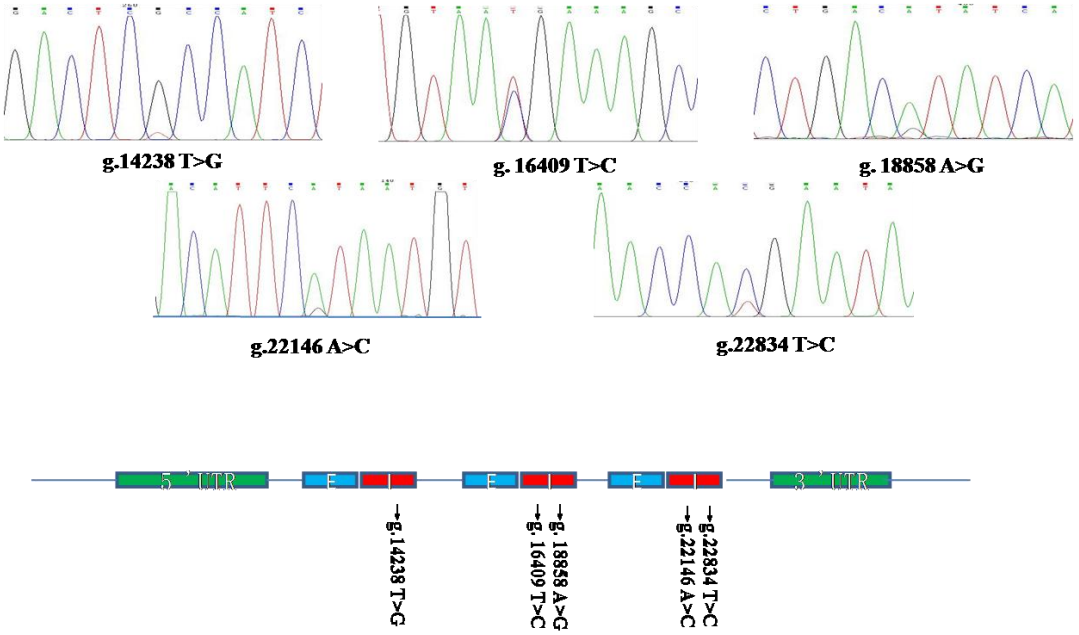

图4-1 SQLE **SNP位点及其分布（绿色代表5′ UTR和3′ UTR，蓝色和红色分别代表外显子和内含子区域）。**

Fig.4-1 The resule of Screening and positions of five SNPs in SQLE**. Yellow, green represent 5′UTR and 3′UTR, blue, and red box represent exons and introns, respectively.**

万方数据

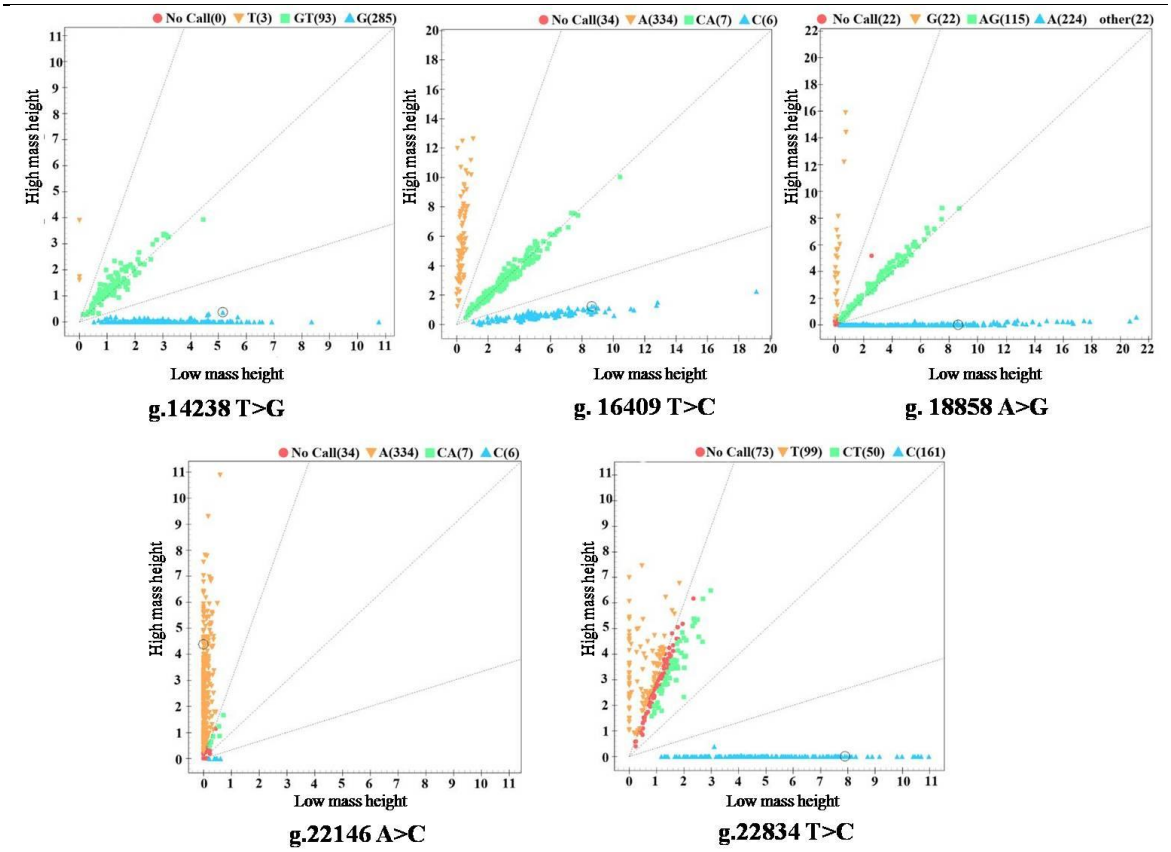

图4-2 SQLE基因型聚类图（橙色和蓝色是纯合子，绿色是杂合子，红色为无法判别的基因型）

Fig. 4-2 The clustering graph of SQLE genotype (Orange and blue are homozygous, green is heterozygous, and red is an unidentifiable genotype)

.

万方数据

表4-1 SQLE**基因5个SNP位点在水牛群体中的遗传信息**

Table 4-1. The genetic information about five identified SNPs of the SQLE **gene in buffalos.**

多态位点（SNPs）	定位（Location）	基因型（Genotypes）	基因型频率（Genotype frequency）	等位基因（Allele）	等位基因频率（Allele frequencies）	杂合度（Heterozygosity）	多态信息含量（PIC）
g14238	intron6	GT	0.2	G	0.9	0.2	0.2
		GG	0.7	T	0.1		
		TT	0.0				
g16409	intron7	CC	0.2	C	0.5	0.5	0.4
		TT	0.3	T	0.5		
		TC	0.5				
g18858	Intron7	GG	0.1	G	0.2	0.3	0.3
		AA	0.6	A	0.8		
		GA	0.3				
g22146	Intron9	CA	0.0	A	1.0	0.1	0.1
		AA	1.0	C	0.0		
		CC	0.0				
g22834	Intron9	CC	0.5	C	0.5	0.5	0.4
		TT	0.3	T	0.5		
		CT	0.2				

4.1.2 基因型与泌乳性能的关系

将5个SNP与泌乳性能进行关联分析，发现有3个SNP与产奶性能有关，其中g14238与270 d与乳蛋白率显著关联（P<0.05），但基因型间没有显著差异；g18858与高峰产奶量、270 d乳脂量和乳脂率显著关联（P<0.05），且GG基因型在270 d乳脂量和乳脂率上显著高于AA基因型而在高峰泌乳上没有明显差异；g22834与6个泌乳性能都有显著关联，其中TT基因型在270 d产奶量、乳脂量、乳脂率和乳蛋白率上显著高于CT或AA基因型，CT基因型在高峰产奶量和乳蛋白量上显著高于CC或AA基因型（P<0.01，表4-2）。

万方数据

表4-2 SQLE**基因5个SNP位点与水牛泌乳性能（平均值±标准误）的关系**

Table 4-2 The relationship between five SNPs of SQLE **gene and milking traits of buffalos（Mean±SEM）**

多态位点（SNPs）	基因型（Genotype）	高峰奶量（PM/kg）	270 d产奶量（MY/kg）	乳脂量（FY/kg）	乳脂率（FP/%）	乳蛋白量（PY/kg）	乳蛋白率（PP/%）
g14238	GG	14.4±0.4	2782.5±84.9	220.3±7.4	8.0±0.2	126.7±4.0	4.6±0.1
	GT	14.5±0.4	2831.4±83.6	223.6±7.3	7.9±0.2	126.7±3.9	4.6±0.5
	TT	14.3±1.0	2793.5±201.2	211.9±17.6	7.7±0.4	126.7±9.4	4.6±0.1
	Pvalue	0.8	0.4	0.5	0.6	0.6	0.0
g16409	CC	14.7±0.5	2882.4±98.3	224.3±8.4	7.9±0.2	128.6±4.6	4.6±0.1
	TC	14.5±0.5	2781.7±93.7	222.1±8.0	8.0±0.2	127.3±4.4	4.6±0.1
	TT	14.5±0.5	2753.6±98.7	220.6±8.5	8.0±0.2	125.0±4.6	4.6±0.1
	Pvalue	0.5	0.3	0.7	0.3	0.2	0.4
g18858	AA	15.2±0.4	2804.0±53.6	240.9±8.6	8.1±0.1 ^{a}	130.0±2.4	4.6±0.0
	AG	15.4±0.4	2825.0±52.0	247.2±6.5^{b}	8.2±0.1 ^{b}	130.2±2.3	4.6±0.0
	GG	15.7±0.5	2778. 4±71.4	248.7±8.9 ^{b}	8.2±0.2 ^{ab}	128.7±3.2	4.6±0.0
	Pvalue	0.0	0.6	0.0	0.0	0.8	0.9
g22146	AA	15.4±0.4	2973. 4±74.3	243.5±6.4	8.2±0.1	136.6±3.5	4.6±0.0
	CA	15.8±0.8	2977. 5±155.3	244.8±13.4	8.3±0.3	137.7±7.3	4.6±0.1
	CC	16.0±0.8	2973. 4±74.3	250.5±11.8	8.1±0.3	141.8±6.4	4.6±0.1
	Pvalue	0.5	0.6	0.8	0.9	0.6	1.0
g22834	CC	14.1±0.5^{a}	2617.3±92.7^{a}	220.1±7.3^{a}	7.9±0.2^{a}	127.0±2.3^{ab}	4.6±0.0^{ab}
	CT	14.7±0.5^{b}	2818.8±99.4^{b}	224.2±7.9^{ab}	7.7±0.2^{b}	130.0±2.6^{a}	4.6±0.0^{a}
	TT	14.5±0.5^{a}	2761. 9±87.9^{b}	229.9±7.0^{b}	7.9±0.2^{a}	126.0±2.1^{b}	4.6±0.0^{b}
	Pvalue	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

万方数据

续表4-2

注：PM：高峰奶量，MY：270 d泌乳量，FY：270 d乳脂量，FP：乳脂率，PY：270 d乳蛋白量，PP：乳蛋白率；同列不同肩标字母表示差异显著（*P*<0.05）。

PM:Peak Milk, MY:270 d Milk Yield, FY: 270 d Fat Yield, FP:Fat Percentage, PY:270 d Protein Yield, PP:Protein Percentage;

[a,b] within the same column with different superscripts means *P*<0.05.

4.1.3 水牛SQLE基因单倍型及其与泌乳性能的关系

SQLE基因的5个位点的连锁不平衡分析结果显示，有1个由3个SNP（g18858、g22146和g22834）组成、处于完全连锁状态的单倍型块（图4-3）。由于g22146属于低度多态，不参与泌乳性能的分析，所以共得到3个单倍型组合，分别是H1H1、H1H3和H2H3，频率分别为48.70%、17.60%及13.94%（表4-3）。为进一步探究SNPs与泌乳性能的相关性，将单倍型组合与6项泌乳性能进行关联分析，结果发现有3个单倍型与270 d乳脂量和乳脂率显著相关（*P*<0.05）。其中，H2H3型（226.10±7.13 kg）群体的270 d乳脂量显著高于H1H1型（216.88±7.14 kg，*P*<0.05，表4-3）。

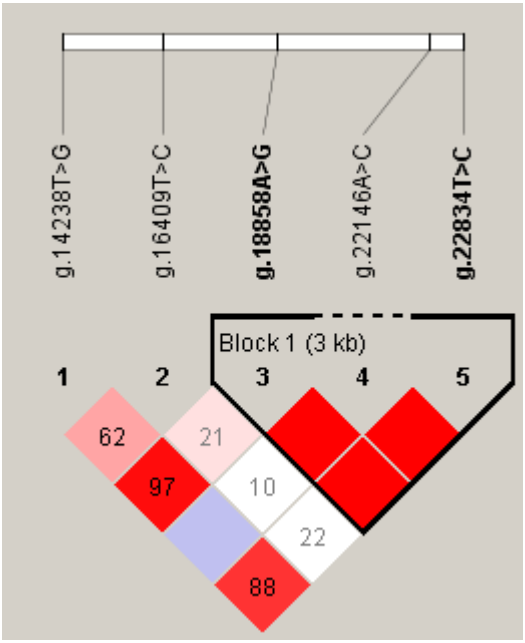

图4-3 SQLE**基因5个SNP位点中3个出现连锁不平衡性**

Fig.4-3 The linkage disequilibrium of 3 in 5 SNP loci in SQLE **gene**

万方数据

表4-3. 单倍型组合与水牛泌乳性能（平均值±标准误）的关系

Table4-3. The relationship between the haplotype and milking traits of buffalos（Mean±SEM）

Block1	H1H1	H1H3	H2H3	Pvalue
序列（Sequence）	CA/CA	CA/TG	TA/TG	
数量（Number）	187	67	53	
频率（Frequencies）%	48.7	17.6	13.9	
高峰奶（PM/Kg）	14.3±0.5	14.6±0.5	14.4±0.5	0.6
270 d产奶量（MY/Kg）	2723.3±105.0	2722.0±107.2	2805.9±103.4	0.5
乳脂量（FY/Kg）	216.9±7.1^{a}	226.5±7.6^{ab}	226.1±7.1^{b}	0.0
乳脂率（FP/%）	7.8±0.2	8.0±0.2	7.9±0.2	0.0
乳蛋白量（PY/Kg）	123.2±4.9	124.0±5.0	127.9±4.8	0.3
乳蛋白率（PP/%）	4.6±0.1	4.6±0.1	4.6±0.5	0.7

4.2 各种组织中 SQLE 基因表达量

检测各种器官组织中的SQLE基因mRNA相对表达情况，发现在乳腺、淋巴、肝、下丘脑、胃、大肠、大脑、垂体、肺、脾、卵巢、子宫、输卵管、肾和心脏组织中表达量依次降低最低（图4-4a）。

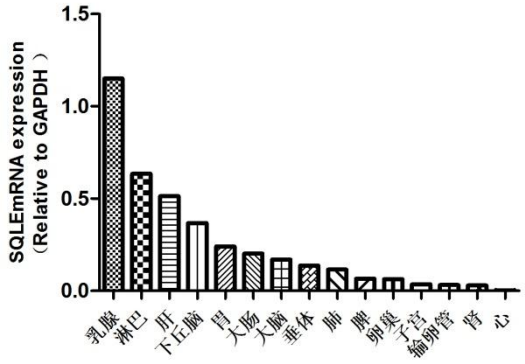

图4-4 S*QLE*在各器官相对表达水平

Fig 4-4 Relative expression levels of SQLE **in various organs**

4.3 纯化的乳腺上皮细胞

以水牛乳腺上皮细胞呈单层、鹅卵石和上皮样为依据判断，持续观察细胞形态。用上皮细胞角蛋白18进行荧光标记结果显示，在纯化的乳腺上皮细胞中，角蛋白18阳性率大于90%（图4-5），说明已获得纯化的水牛BMEC，可以进行后续试验。

万方数据

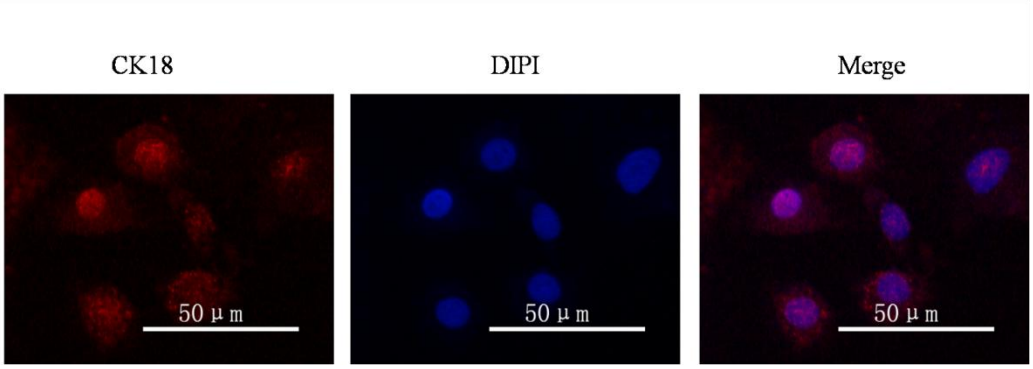

图4-5 用细胞角蛋白18(红色荧光)的水牛乳腺上皮及其细胞核（蓝色荧光，DAPI染色），标尺为50 μm。

Fig.4-5 CYT18(red) and nucleus(DAPI,blue) in BMEC. Scale bar, 50 μm.

4.4 siRNA干扰效率

将siRNA-2031、siRNA-1843、siRNA-1103、siRNA-1960（si-SQLE）（表4-4）和阴性对照（NC）片段分别瞬时转染到分离培养的水牛BMEC中48 h后，qRT-PCR结果显示，以转染组siRNA-1960的干扰效率最佳，达到95%（P<0.001，图4-5a）；蛋白免疫印迹质结果显示，该转染组的SQLE蛋白水平相对表达量下调63%（图4-6b），说明si-SQLE可用于后续试验。

表4-4.干扰片段名称及序列

Table4-4. The name and sequence of interference fragment

干扰片段名称	序列	
	sense（5'-3'）	antisense（5'-3'）
siRNA -2031	CCUAGAAGCCUCUCAGAA UTT	AUUCUGAGAGGCUUCUA GGTT
siRNA -1843	GCACCGCAGUUUAAAGCA ATT	UUGCUUUAAACUGCGGU GCTT
siRNA -1103	CCUAUAUUCUGUCAGCCU UTT	AAGGCUGACAGAAUAUA GGTT
siRNA -1960	CCAAGGAAUUUGAGAGAA UTT	AUUCUCUCAAAUUCCUU GGTT

万方数据

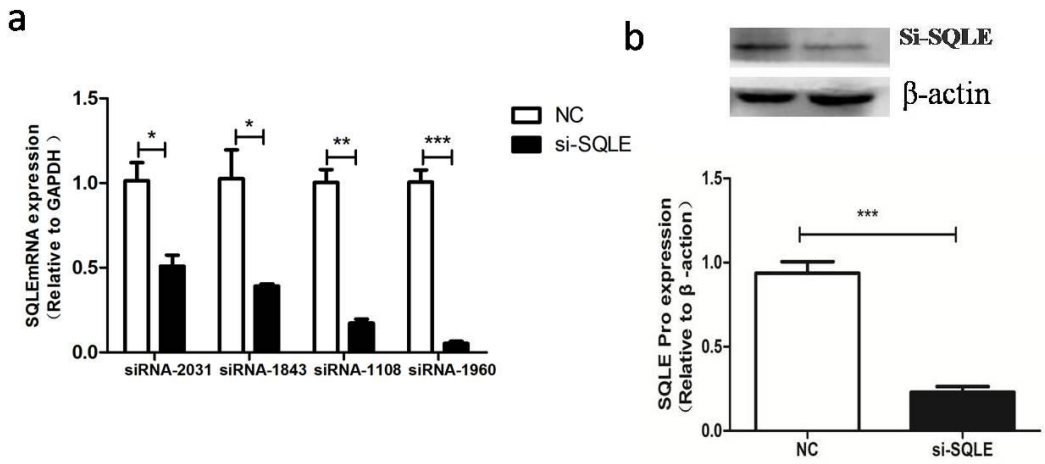

图4-6 水牛乳腺上皮细胞分别转染4条si-SQLE片段后SQLE基因mRNA（a）和蛋白（b）水平的表达。*表示*P*<0.05；表示*P*<0.01；***表示*P*<0.001。**

Fig.4-6 The interference rate at the mRNA (a) and protein (b) level after BMECS were transfected with4 siRNA SQLE **by qRT-PCR.and Western Blot. ****P*<0.05** *P*<0.01, *** *P*<0.001.**

4.5 过表达效果

对合成的PCDNA3.1-SQLE过表达载体（图4-7a）进行双酶切，电泳结果显示有1731 bp和5394 bp两条条带（图4-7b），与预期相符（1737 bp和5388 bp）。取20 uL质粒检测序列，比对结果显示，酶切测序片段与目的片段完全匹配，可进行下一步试验。qRT-PCR结果显示重组质粒在mRNA水平的表达量上调了60倍（图4-7c）。

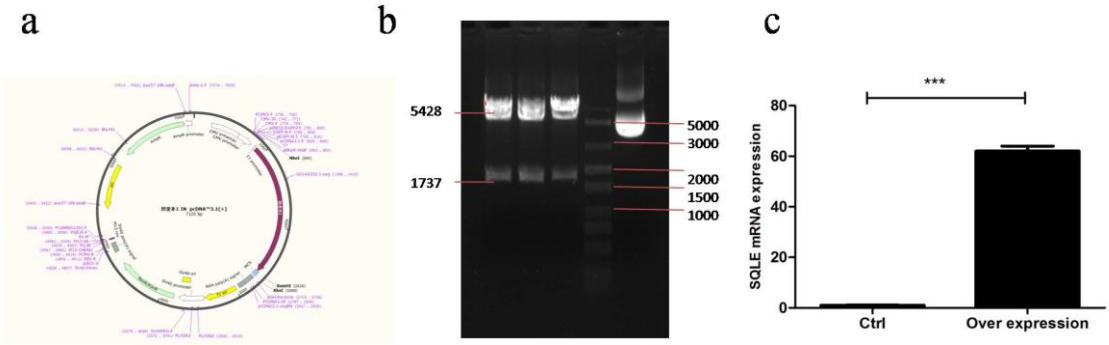

图4-7 合成的过表达质粒PCDNA3.1-SQLE**结构（a）、质粒双酶切电泳图（b，1、2和3为双酶切后片段的3次重复，4为Marker，5为PCDNA3.1-SQLE片段的质粒全长）及过表达效率。**

Fig4-7 Structure map of overexpression plasmids (a), the results of double enzyme (b, 1, 2 and 3 are the plasmid length of PCDNA3.1 and SQLE**,4 is the Marker, 5 is the plasmid length of PCDNA3.1-**SQLE**) and the efficiency of overexpression.**

万方数据

4.6 SQLE基因对细胞生长的调控作用

4.6.1 促进细胞增殖

对乳腺上皮细胞进行转染siRNA或过表达质粒处理，48 h后，用CCK-8检测细胞活力。发现siRNA干扰SQLE基因后，细胞增殖能力下降32%（*P*<0.001），过表达SQLE基因后细胞增殖能力上升23%（*P*<0.01，图4-8b）。

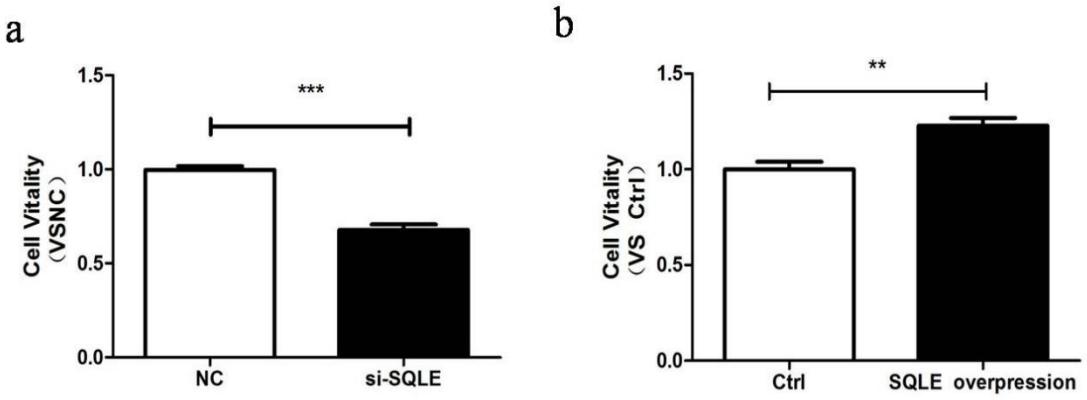

图4-8 RNA干扰（a）或过表达（b）SQLE后，水牛乳腺上皮细胞的活力。表示*P*<0.01；***表示*P*<0.001。**

Fig.4-8 The vitality of BMEC after knockdown (left) or overexpression (right) SQLE gene. *****P*<0.01; ******P*<0.001.

用流式细胞仪检测细胞周期，结果发现siRNA处理的水牛BMEC处于G1期的比例显著增多（*P*<0.01），处于G2期的比例显著减少（*P*<0.05，图4-9a）；过表达处理的BMEC处于S期的数量显著增多（*P*<0.05），处于G1和G2期的细胞数量没有显著变化（图4-9d）。

万方数据

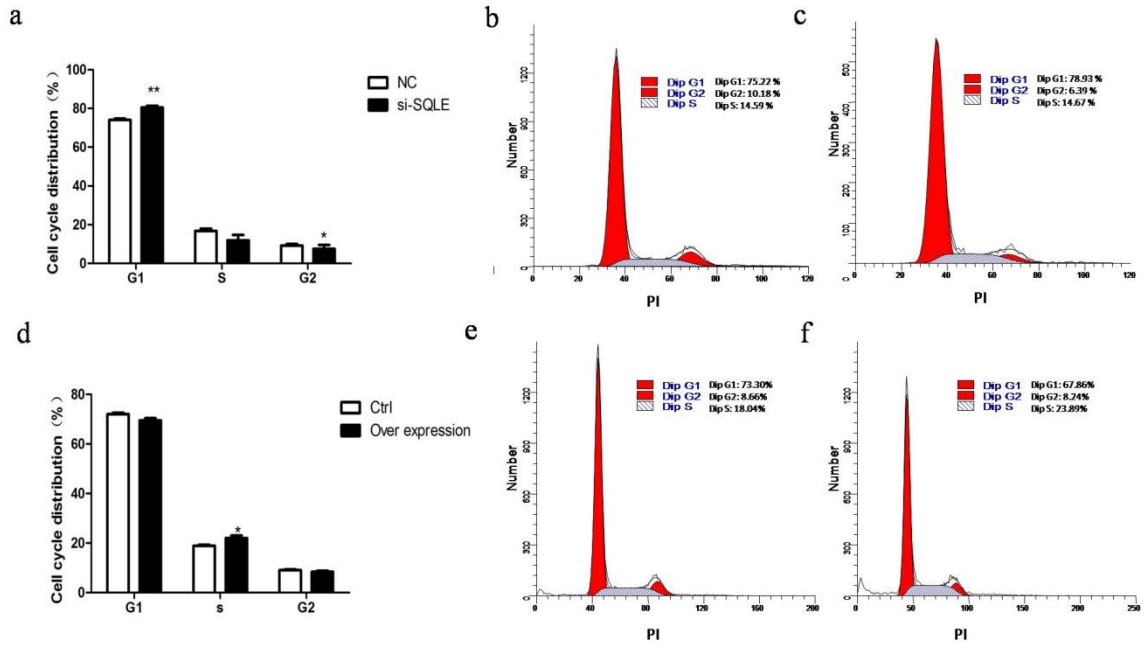

图4-9 水牛乳腺上皮细胞RNA干扰（a、b和c）或过表达（d、e和f）SQLE**后，用周期试剂盒检测处于不同时期的细胞比例（a和d）和各期细胞分布图（b和e是对照组，c和f是处理组）。*表示*P*<0.05；**表示*P*<0.01。**

Fig 4-9 Percentage (a and d) and distribution (b and e as the controls, c and f as the treatments) of different cell cycles after RNA interference (a, b and c) or overexpression (d, e and f) of SQLE **in buffalo mammary epithelial cellsby cell cycles detection kit.**

***P*<0.05; ** *P*<0.01**

4.6.2 抑制细胞凋亡

对乳腺上皮细胞进行干扰或过表达SQLE基因处理，48 h后，用凋亡试剂盒检测细胞凋亡情况，发现RNA干扰处理的细胞早期凋亡和晚期凋亡比例均极显著增多（*P*<0.001），总凋亡率上升7倍，图4-10a），相反过表达处理的水牛BMEC早期凋亡和晚期凋亡比例极显著减少（*P*<0.05，图4-10d），总凋亡率下降72%。

万方数据

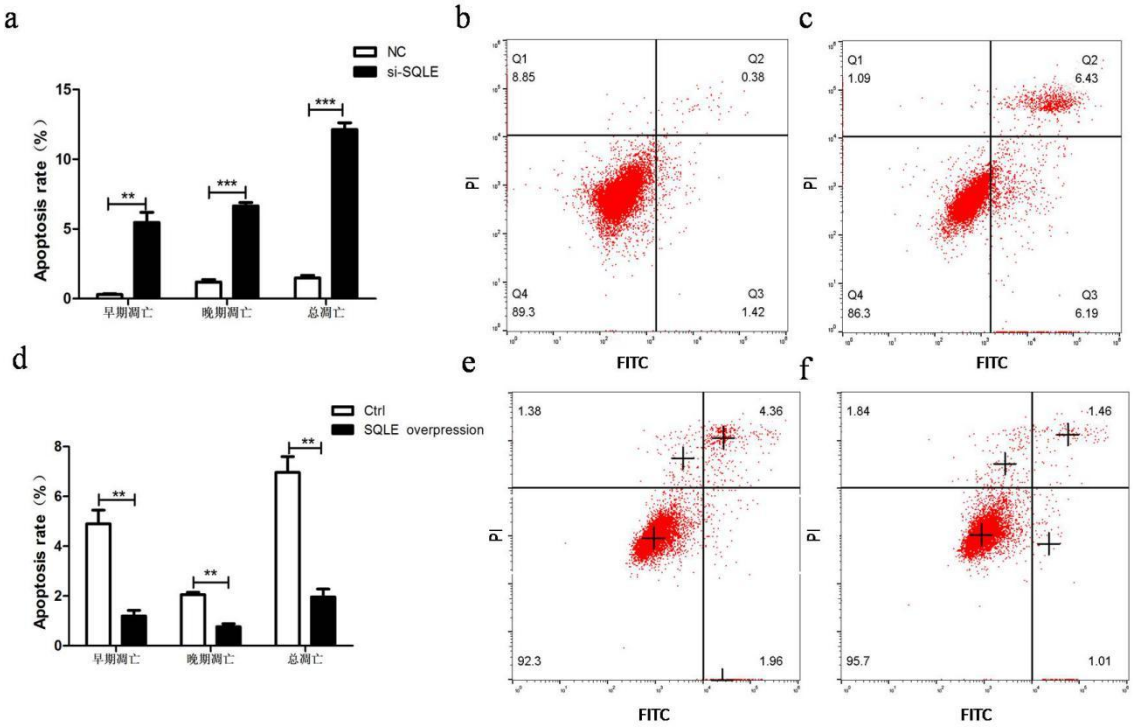

图4-10 水牛乳腺上皮细胞RNA干扰（a、b和c）或过表达（d、e和f）SQLE**后，用凋亡试剂盒检测细胞早期和晚期凋亡比例（a和d）和各类凋亡细胞分布图（b和e是对照组，c和f是处理组）。*表示*P*<0.05；**表示*P*<0.01；***表示*P*<0.001。**

Fig 4-10 Percentage (a and d) and distribution (b and e as the controls, c and f as the treatments) of apoptosis cellsafter RNA interference (a, b and c) or overexpression (d, e and f) SQLE **in buffalo mammary epithelial cellsby cell apoptosis detection kit,.. * *P*<0.05; ** *P*<0.01; *** *P*<0.001.**

4.7 SQLE基因对乳脂和乳蛋白质合成的调控作用

4.7.1 促进甘油三酯和脂滴合成

对乳腺上皮细胞进行RNA干扰处理后发现上清中甘油三酯浓度显著下降（图4-11a），细胞脂滴生成能力呈减弱趋势（图4-11b）。相反，过表达处理的细胞上清中，甘油三酯浓度显著上升（图4-11c），细胞脂滴生成能力呈增强趋势（图4-11d）。

万方数据

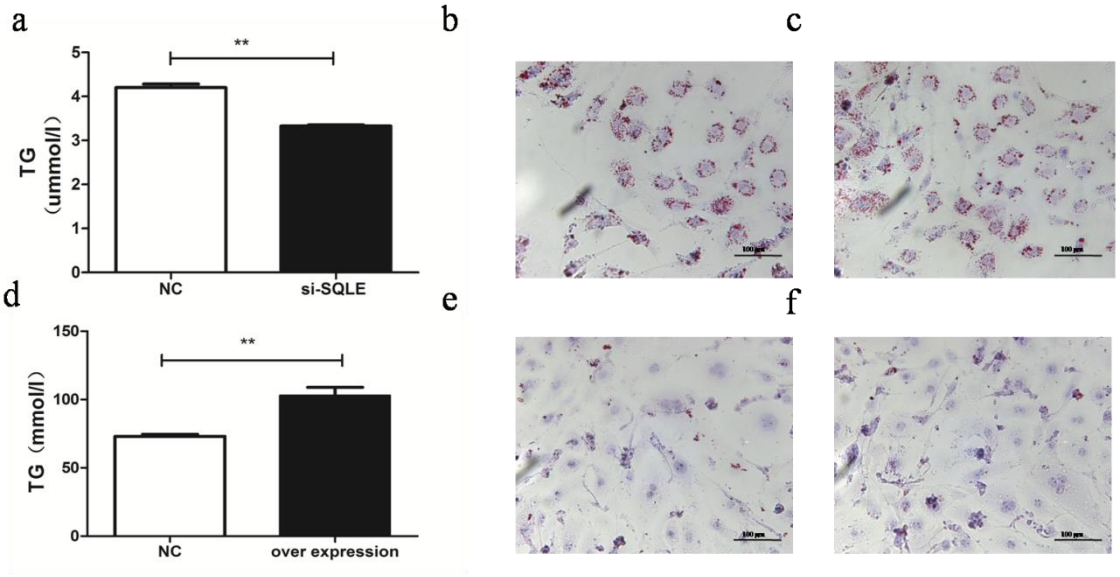

图4-11 水牛乳腺上皮细胞RNA干扰（a、b和c）或过表达（d、e和f）SQLE**后，上清中甘油三脂浓度（a和d）和脂滴分泌情况（c和f为处理组，b和e为对照组）。标尺为100 μm，**表示*P*<0.01。**

Fig.4-11 The concentrationof triglyceride (a and d) and lipid droplet secretion (b and e as the controls, c and f as the treatments)in BMECafter RNA interference (a and c) or overexpression (d and f) SQLE **in buffalo mammary epithelial cells. Scale bar, 100 μm, ** *P*<0.01.**

4.7.2 促进细胞乳蛋白的合成

将水牛乳腺上皮细胞进行干扰处理，发现培养液上清中β/κ-酪蛋白的浓度显著降低（*P*<0.05），但α-酪蛋白浓度没有明显差异（图4-12a）。水牛乳腺上皮细胞过表达SQLE基因后，上清中κ-酪蛋白的浓度显著上升（*P*<0.05），但α/β-酪蛋白的浓度却没有显著变化（图4-12b）。

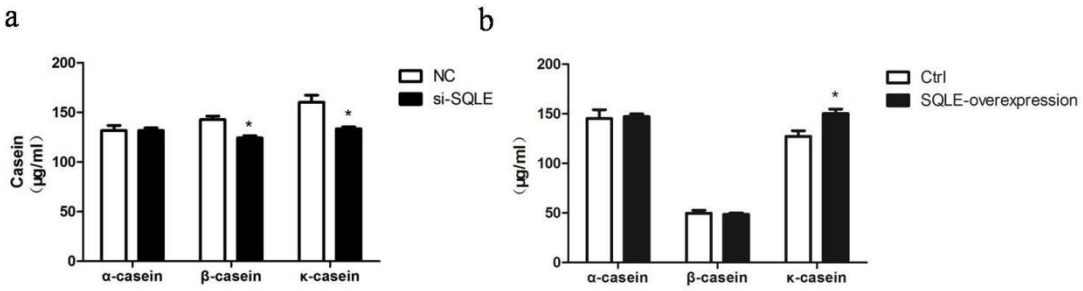

图4-12 水牛乳腺上皮细胞RNA干扰（a）或过表达（b）SQLE**后，培养液上清中α/β/κ-酪蛋白含量。*表示*P*<0.05。**

Fig.4-12 The concentration of casein in culture supernatant after RNA interference (a) or overexpression (b) SQLE **in buffalo mammary epithelial cells. * *P*<0.05.**

万方数据

4.8 促进细胞生长和分泌相关基因的表达

由于细胞的数量也是影响上清中甘油三酯和酪蛋白浓度的重要因素，所以本试验以GAPDH为内参检测细胞生长和分泌能力相关基因的表达量。siRNA处理48 h后，用qRT-PCR和WB技术检测单位RNA和蛋白中细胞生长和分泌相关基因的表达，发现增殖和周期相关基因MYC、PCNA、P21极显著下调，凋亡相关基因Bax极显著上调（*P*<0.01，图4-13b）；乳脂代谢相关基因SREBP1和乳蛋白合成相关基因eIF4E、RPS6KB1和JAK2表达量显著下调（*P*<0.05，图4-13a）。

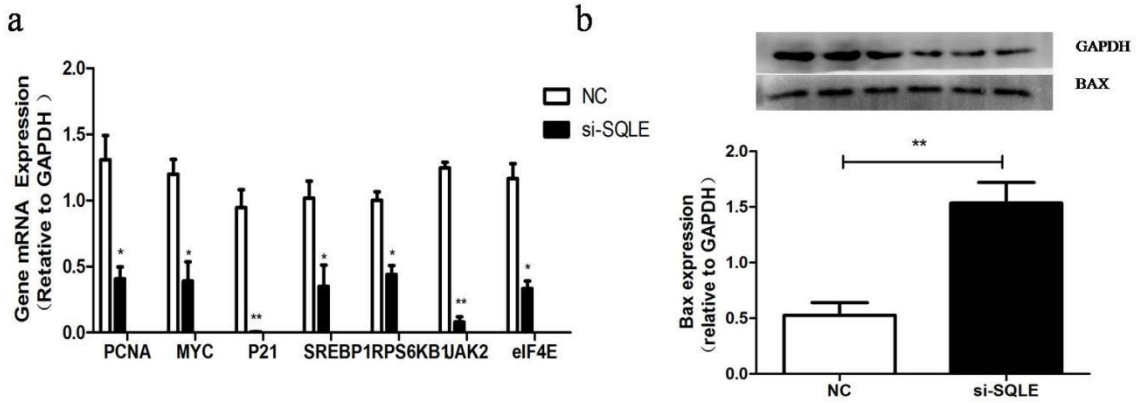

图4-13 水牛乳腺上皮细胞RNA干扰SQLE后，与增殖、周期、凋亡、乳脂和酪蛋白合成相关基因的相对表达情况（a）和Bax基因相对表达量（b）。*表示*P*<0.05；**表示*P*<0.01。**

Fig.4-13 Relative expression of genes related to proliferation, cycle, apoptosis, milk fat synthesis and casein synthesis after RNA interference SQLE in buffalo mammary epithelial cells. * *P*<0.05; ** *P*<0.01.

万方数据

5 讨论

水牛奶产业在我国的发展比较缓慢，与摩拉、尼里-拉菲和地中海相比，本土水牛产奶量、乳脂量率和乳蛋白率较低。杂交育种虽然在一定程度上改善了泌乳性能，但进展缓慢。因此，挖掘泌乳相关基因，利用先进的分子育种技术快速提升本土水牛的泌乳性能刻不容缓。

前期研究表明SQLE在泌乳期乳腺中有较高表达，提示SQLE可能与水牛泌乳密切相关。它是如何参与泌乳的呢？本试验通过分析SQLE的遗传参数及其与泌乳性能的关系，以水牛乳腺上皮细胞为模型，研究其对泌乳的作用及其机制。本试验从体内和体外两个方面展开，体内试验显示SQLE多态性与泌乳性能有关；体外试验显示与其它器官相比，SQLE在泌乳期水牛乳腺中表达量最高；沉默SQLE会抑制细胞增殖，促进凋亡，抑制脂和乳蛋白的合成，过表达SQLE会促进细胞增殖，抑制凋亡，促进乳脂和乳蛋白的合成。在体内和体外的试验都表明SQLE与泌乳有关。

杂合度和多态位点信息量常被用来衡量群体的遗传变异程度，杂合度和多态位点的数值越大，群体的变异程度越高。

在SQLE基因中，g22146和g14238的杂合度和多态位点信息量较低，表明其群体变异度低，不适合育种。而g16409、g22146和g22834的杂合度和多态位点信息含量相对较高，其中g16409和g22834完全连锁且与泌乳性能显著相关，有较好的选择效果。

g18858位点处GG基因型270 d乳脂量比AA基因型平均高出7.79 kg，乳脂率高出0.12%，说明核苷酸由A突变为G提高了乳脂的合成量。g22834位点处的TT基因型270 d产奶量比CC基因型平均高出144.62 kg，乳脂量平均高出9.78 kg，说明核苷酸由T突变为C降低了产奶量和乳脂的合成量，可以通过基因编辑手段将A和C人工改变成G和T，运用到转基因育种。由于多个位点的连锁对表型的影响可能会比单个位点更大（Orozco et al 2009，Horne et al 2004），所以单倍型与泌乳性能的关联结果更加可靠。本试验发现，H2H3（TA/TG）单倍型模块与乳脂率和270 d乳脂量显著相关，且H2H3群体的270 d乳脂量显著高于H1H1（CA/CA）（$P<0.05$），平均高于9.22 kg，产奶量有增加的趋势。今后可加大对TA/TG型个体的选育，扩大其数目。

乳腺上皮细胞的活力和数量与泌乳量息息相关，提高细胞的增殖能力对提高水牛产奶量有重要意义。在水牛BMEC中干扰SQLE表达后，增殖相关基因PCNA及

万方数据

MYC相对表达量显著下调（*P*<0.05）；促凋亡基因Bax相对表达量显著上调（*P*<0.05）；周期相关基因P21相对表达量显著下调（*P*<0.05）。

PCNA和MYC都参与细胞DNA的扩增，且PCNA主要在G1期有较高表达，是细胞增殖状态的指标（Moldovan et al 2007，Wojciech and Alicja 2010），敲低SQLE后，PCNA和MYC的表达量显著下调会使细胞阻滞在G1期，从而减弱细胞增殖能力。Bax促进线粒体孔的形成并增加膜通透性导致凋亡因子的释放（Eskes 1997，Vyssokikh et al 2002），Bax表达量的增加直接促进细胞凋亡。值得注意的是，P21是细胞周期G1/S的监控点，当细胞染色体DNA在G1/S期受到损害时，P21可被激活。其表达量的下降会导致监测功能丧失和G2/M的阻滞（Bedelbaeva et al 2010）。但本试验中P21表达量的下调并没有导致细胞的增殖和G2期的阻滞。有文献报道，P21不只有抑制细胞增殖的作用，它还可以通过与cyclin/cdk结合形成复合物推动细胞周期的进行，进而起到促进细胞分裂的作用（zhang et al 2007）。人胃癌细胞研究结果显示，P21下调后细胞增殖受到抑制，细胞周期阻滞在G1期（宋军等 2018）。本试验中P21可能通过促进细胞分裂这一途径调控细胞增殖。

另一方面，SQLE具有催化活性，是类固醇生物合成中的限速酶。在肝癌细胞中，过表达SQLE会促进胆固醇酯的生物合成诱导细胞增殖和迁移（Sui et al 2015）。猜想SQLE基因也可能同时通过调节胆固醇的合成间接调控乳腺上皮细胞的生长，这还需要进一步探究。

甘油三酯在内质网上合成，是牛奶中乳脂的主要成分，对牛奶的口感起关键作用，是决定乳品质的重要因素（Sun et al 2017，Yang et al 2017）。在甘油三脂方面，本研究发现干扰SQLE后，细胞上清中甘油三酯浓度下降了21%（*P*<0.05），而在过表达SQLE后，上清中甘油三酯浓度上升了41%（*P*<0.01）。由于细胞的数目对甘油三脂的浓度有影响，无法判断SQLE基因对甘油三脂合成的影响。进一步的验证发现干扰SQLE后，乳腺上皮细胞中脂滴的合成呈减弱趋势，而过表达SQLE后脂滴合成呈增强趋势。qRT-PCR结果表明RNA干扰SQLE基因后水牛BMEC中SREBP1基因相对表达量显著降低（*P*<0.05）。已有研究表明，SREBP1是激活调控脂肪和甘油三酯合成基因的主要转录因子（Edwards et al 2000，Anderson et al 2007）。在奶牛乳腺上皮细胞中过表达SREBP1，乳脂合成相关基因脂肪酸结合蛋白（FABP）基因和乙酰辅酶A羧化酶（ACC）基因表达水平在SREBP1过表达后显著上升，上清液中甘油三酯的浓度也随之增加；沉默SREBP1后，FABP基因和脂质积累相关基因乙酰辅酶

万方数据

A结合蛋白（ACBP）基因的表达水平下调（Li et al 2014，李楠 2014）。在水牛乳腺上皮细胞中，随着SREBP1基因的沉默FABP、硬脂酰辅酶A去饱和酶（SCD）和过氧化物酶体增殖激活物受体γ（PPARγ）这些调控脂肪合成和代谢的基因表达水平也在下调（陈秋明 2016）。说明SREBP1基因不止可以通过激活甘油三酯合成相关基因促使乳脂合成还可能通过调控脂质积累促进乳脂生成。而在关联分析结果中发现SQLE基因多态性与乳脂率（量）有关，单倍型与乳脂率（量）也有关，优势单倍型个体提高了9.2 kg的270 d乳脂量。推测SQLE基因对促进水牛乳脂合成有一定作用。

乳蛋白由α-酪蛋白、β-酪蛋白和κ-酪蛋白共同构成，其中β-酪蛋白占主要比重。乳蛋白在核糖体上合成，经内质网、高尔基体运输和加工后排出胞外（Bai et al 2008），是决定乳品质的重要因素（Costa et al 2019）。本试验中，敲低SQLE后水牛乳腺上皮细胞上清中β-酪蛋白及κ-酪蛋白浓度显著降低（$P<0.05$），总蛋白浓度下降了47%；过表达SQLE后，上清中κ-酪蛋白浓度显著升高（$P<0.05$），总蛋白浓度上升了24%。由于细胞的数目对酪蛋白的浓度有影响，无法判断SQLE基因对酪蛋白合成的影响。在mRNA水平检验SQLE基因对水牛乳腺上皮细胞酪蛋白合成相关基因相对表达量的影响，结果发现RNA干扰SQLE基因后，乳蛋白代谢通路相关基因（JAK2、eIF4E和RPS6KB1）的相对表达量显著降低（$P<0.05$）。已有研究表明，PI3K-AKT-mTOR和PRL-JAK2-STAT5是乳蛋白合成的主要的信号调控通路（Wang and Proud 2006，Rosen and Wyszomierski 2010，史琳琳等 2013，Tian et al 2016），且mTOR信号通路和JAK2/STAT5通路可以相互协助共同合成乳蛋白（史琳琳 2013）。本试验中干扰SQLE基因后eIF4E、RPS6K1和JAK2表达量显著下调（$P<0.05$），有文献报道在mTOR信号通路中，4EBP1和RPS6K1通过mTOR的激活调控蛋白质的翻译（Rius et al 2010）。被激活的4EBP1发生磷酸化与elF4E分开，elF4E结合翻译起始因子启动mRNA翻译出蛋白质（Burnett et al 1998）。而在JAK2/STAT5信号通路中，被激活的JAK2可以使STAT5发生磷酸化，磷酸化的STAT5激活乳蛋白合成相关基因的转录，从而调控乳蛋白的合成（Christian et al 2007），综上所述SQLE可能通过调控酪蛋白合成相关通路基因的表达参与酪蛋白的合成代谢，SQLE调控酪蛋白合成的具体机制还需要进一步探究。值得注意的是，作为乳蛋白含量占比最高的β-酪蛋白过表达SQLE后浓度没有显著变化，而在关联分析结果中发现SQLE基因多态性与乳蛋白率（量）有

万方数据

关，而单倍型与乳蛋白率（量）无关，且优势基因型个体只提高了4 kg的270 d乳蛋白量。推测SQLE基因对促进水牛乳蛋白合成的作用不大。

综上所述，本试验从体内和体外验证了SQLE在参与泌乳调控。其作用机制包括，SQLE可通过调控增殖凋亡相关基因影响细胞增殖从而影响产奶量，通过调控乳脂代谢相关基因影响甘油三酯合成从而影响产奶量乳脂量（率），通过调控乳蛋白代谢相关基因影响酪蛋白合成从而影响乳蛋白量（率）。

本试验探索了一个与泌乳有关的新基因，发现了与泌乳有关的3个SNP，并初步探究了其对泌乳的作用及其机制，为分子标记辅助选择的建立和转基因育种的应用提供参考。

万方数据

6 结论

为了探究SQLE基因是否对水牛泌乳有调节作用及其分子机制，本试验从体内和体外2个方面进行了研究，结果如下：

（1）SQLE基因多态性与泌乳性能有关，说明该基因参与泌乳调控。SQLE基因有3个SNP位点和1个单倍型模块与泌乳性能显著相关，可为分子标记辅助选择的建立提供参考。

（2）与淋巴、肝、下丘脑、胃、大肠、大脑、垂体、肺、脾、卵巢、子宫、输卵管、肾和心器官相比，SQLE在水牛泌乳期乳腺中表达量最高，说明该基因参与泌乳调控。

（3）SQLE促进细胞生长的作用机制是包括上调P21、PCNA和MYC促进细胞增殖，下调Bax的表达抑制细胞凋亡

（4）SQLE促进细胞分泌能力的作用机制包括上调乳脂代谢和乳蛋白代谢相关基因SREBP1、JAK2、eIF4E和RPS6KB1的表达促进细胞甘油三酯和酪蛋白的合成。

万方数据

7 创新与不足

7.1 创新点

（1）在水牛SQLE基因DNA上筛选出了与水牛泌乳性能相关的3个SNPs，并筛选出1个与270 d乳脂量显著相关的单倍型，可为分子标记辅助选择和转基因育种的运用提供参考。

（2）发现SQLE在水牛乳腺中表达量最高。

（3）验证了SQLE基因参与水牛乳腺上皮细胞生长和分泌功能的调控，为水牛转基因育种研究提供参考。

7.2 不足之处

（1）本文初步探究了SQLE基因在水牛乳腺上皮细胞生长及分泌功能的调控机制，但具体的调控通路仍需要进一步探究。另外SNP的生物功能还需要具体探究。

（2）SQLE的遗传效应尚不明确，需要进一步计算优势基因型和优势单倍型的遗传力、育种值和遗传系数等参数，另外SNPs与已知影响泌乳性能的QTL区段的距离还不清楚，需要进一步分析。

万方数据

参考文献

1. 陈秋明．SREBP1 基因在水牛乳腺上皮细胞中的功能研究．[硕士学位论文]．南宁：广西大学图书馆，2016
2. 邓廷贤．基于组学数据鉴定奶水牛泌乳性能枢纽基因及 TUBA1C 功能验证．[博士学位论文]．武汉：华中农业大学，2019
3. 杜超，魏鹏飞，郭妮妮，王晨，杨利国，滑国华．水牛泌乳性能分子标记研究进展．中国畜牧杂志，2017，53(05)：10-16
4. 段安琴，庞春英，朱鹏，邓廷贤，陆杏蓉，马小娅，梁莎莎，梁贤威．水牛乳汁中乳腺上皮细胞的分离培养及鉴定．中国畜牧兽医，2017，44(11)：3243-3249
5. 国鹏，封元，顾亚玲，王瑜，蔡正云，刘丽元，母童，冯小芳，蒋秋斐，张娟．黑安格斯牛UCP基因多态性位点与生长性状的关联分析．黑龙江畜牧兽医，2019(15)：6-9+14+175
6. 韩哲先．催乳素对奶牛乳腺干细胞体外增殖和分化的影响．[硕士学位论文]．呼和浩特：内蒙古农业大学，2018
7. 李俊，李梓芃，李赞，刘爽，梁爱心，杨利国．意大利地中海奶水牛泌乳规律及影响因素研究．中国奶牛，2016，(11)：13-16
8. 李俊．水牛繁殖和泌乳性状候选基因筛选及 IGFBP7 基因功能解析．[博士学位研究生]．武汉：华中农业大学，2018
9. 李楠．SREBP1在奶牛乳腺上皮细胞乳脂合成中的功能研究．[博士学位研究生]．哈尔滨：东北农业大学，2014
10. 刘深贺.水牛耐热性和抗热应激方法及耐热基因鉴定研究.[博士学位研究生].武汉：华中农业大学，2019
11. 荣瑞娟．Western Blot 检测转基因水稻 PMI 蛋白质．[硕士学位研究生]．保定：河北农业大学，2015
12. 史琳琳，赵锋，高学军，李庆章．乳蛋白合成信号通路的研究进展．中国畜牧兽医，2013，40(1)：137-142
13. 史琳琳．奶牛乳腺上皮细胞 JAK2-STAT5 和 mTOR 信号通路协同调控乳蛋白合成．[硕士学位研究生]．哈尔滨：东北农业大学，2013

万方数据

14. 宋军，马赛君，罗建华，刘卉，徐丽，李丽，张智广，周瑞祥．褪黑素借下调 CDC25A 与 p21 表达及磷酸化抑制人胃癌细胞增殖.解剖学杂志，2018，41(06)：32-35+63
15. 唐善生．广西奶水牛业发展现状与思考．广西农学报，2014，29(01)：50-52
16. 唐一通，肖娜，李智山，范晓航，余燕敏，姚劲松．单核苷酸多态性检测方法研究进展．现代生物医学进展，2013，13(27)：5393-5397
17. 田青，季昀，庞学燕，王洪荣．胰岛素对奶牛乳腺上皮细胞酪蛋白合成调节机理的研究．动物营养学报，2013，25(03)：550-560
18. 田钰琪，周晓潮，赵妍，顾响响，赓迪，王春梅．WST-8 方法用于蓝藻细胞活力的检测．基因组学与应用生物学，2019，38(08)：3554-3558
19. 王秀莉，赵世萍，姜鹏．过氧化氢诱导细胞凋亡及细胞周期停滞.实验教学与仪器，2015，32(11)：39-40
20. 张得芳，马秋月，尹佟明，夏涛．第三代测序技术及其应用．中国生物工程杂志，2013，33(05)：125-131
21. Aboumohamed G, Kaesemeyer WH, Papapetropoulos A, Catravas JD.CaldwellRW. Nitroglycerin (NTG), but not sodium nitroprusside (SNP), increases vascular cGMP levels via an L-arginine dependent and L-NAME sensitive pathway. *J Am Cardiol*, 1996, 27:105-105
22. Abraham JE, Maranian MJ, Driver KE, Platte R, Kalmyrzaev B, Baynes C, Luccarini C, Shah M, Ingle S, Greenberg D, Eart HM, Dunning AM. Pharoah PDP, Caldas C. CYP2D6 gene variants: association with breast cancer specific survival in a cohort of breast cancer patients from the United Kingdom treated with adjuvant tamoxifen.*Breast Cancer Res*, 2010, 12:R64
23. Anderson SM, Rudolph MC, Mcmanaman JL. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: its not just about milk protein synthesis!. *Breast Cancer Res*, 2007, 9: 204
24. Angela C, De Marchi NR. Phenotypic characterization of milk yield and quality traits in a large population of water buffaloes. *Animals*, 2020, 10: 327
25. Antonio B. Buffalo livestock and products in europe. *Buffalo Bulletin*, 2013, 32: 50-74
26. Badenhorst PE, Panter S, Palanisamy R, Georges S, SMouradov A, Mason J, Spangenberg GC. Molecular breeding of transgenic perennial ryegrass (Lolium

万方数据

perenne L.) with altered fructan biosynthesis through the expression of fructosyltransferases. *Molecular Breeding*, 2018, 38: 21

27. Bai WL, Yin RH, Zhao SJ, Zheng YC, Zhong JC, Zhao ZH. Short Communication: Characterization of a κ-Casein Genetic Variant in the Chinese Yak, Bos grunniens. *J Dairy Sci*.2008, 91: 1204
28. Bedelbaeva K, Snyder A, Gourevitch D, Clark L, Zhang XM, Leferovich J, Cheverud JM, Lieberman P, Heber-Katz E. Lack of p21 expression links cell cycle control and appendage regeneration in mice. *P Natl Acad Sci Usa*, 2010, 107: 5845-5850
29. Bionaz M, PeriasamyK, Rodriguez-Zas SL, Everts RE, Lewin HA, Hurley WL, Loor JJ. Old and new stories: revelations from functional analysis of the bovine mammary transcriptome during the lactation cycle. *Plos One*, 2012, 7: e33268
30. Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, WellsD, L"HuillierP, Laible G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of β-casein and κ-Casein. *Nature Biotechnology*, 2003, 21:157-162.
31. Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *P Natl Acad Sci Usa*. 1998, 95: 1432-1437
32. Camila, Da, Costa, Barros, Daniel, Jordan, De, Abreu, Santos, Rusbel. Use of single-step genome-wide association studies for prospecting genomic regions related to milk production and milk quality of buffalo.*J Dairy Res*, 2017, 85: 1-5
33. Capuco AV, Wood DL, Baldwin RL, Mcleod KR, Paape MJ. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bst. *J Dairy Sci*, 2001, 84: 2177-2187
34. Casey TM, Boecker A, Chiu JF, Plaut K. Glucocorticoids maintain the extracellular matrix of differentiated mammary tissue during explant and whole organ culture., 2010, 224: 76-86
35. Christian S, David E L, Thomas D. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Bio Chemi*, 2007, 282: 20059-20063
36. Cinar MU, Akyuz B, Arslan K, Ilgar EG. Genotyping of the kappa-casein and beta-lactoglobulin genes in Anatolian water buffalo by PCR-RFLP. *Int J Dairy Technol*, 2016, 69: 308-311

万方数据

37. CostaA, Lopez-Villalobos N,Sneddon WN, Shalloo L, FranzoiM, De Marchi, MPenasa, M. Invited review: Milk lactose-Current status and future challenges in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 2019, 102: 5883-5898
38. De Camargo G, RR A, M F, R P, DF C, D S, S L, A R, S M, H T. Prospecting major genes in dairy buffaloes. *Bmc Genomics*, 2015, 16: 872
39. Deng T, Pang C, Lu X, Zhu P, Duan A, Tan Z, Huang J, Li H, Chen M, Liang X. De novo transcriptome assembly of the chinese swamp buffalo by rna sequencing and ssr marker discovery. *PLoS One*, 2016, 11: e147132
40. Dimauro C, Nicoloso L, Cellesi M, Macciotta NPP, Crepaldi P. Selection of discriminant SNP markers for breed and geographic assignment of Italian sheep. *Small Ruminant Res*, 2015, 128: 27-33
41. Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim BioPhys Acta*, 2000, 1529: 113
42. El-Halawany N, Abdel-Shafy H, Shawky AEMA, Abdel-Latif MA, El-Moneim OMA. Genome-wide association study for milk production in egyptian buffalo. *Livestock Science*, 2017, 198: 10-16
43. Eskes R, AntonssonB, Osen-Sand A, MontessuitS, Richter C, Sadoul R, MazzeiG, Nichols A, Martinou J C. Bax-induced cytochrome c release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on mg^{2+} ions. *J cell biol*, 1997, 143: 217-224
44. Faraut T, Kijas JW, Maddox JF, Mcewan JC, Oddy VH, Raadsma HW, Wade C, Wang J, Wang W, Xun X. The sheep genome reference sequence: a work in progress. *Animal Genetics*, 2010, 5: 449-453
45. Fradette J, Godbout MJ, Michel M, Germain L. Localization of Merkel cells at hairless and hairy human skin sites using keratin 18. *Biochem Cell Biol*, 2011, 73:635-639
46. Georges M, Charlier C, Hayes B. Harnessing genomic information for livestock improvement. *Nat Rev Genet*, 2018, 135-156
47. Gill S, Stevenson J, Kristiana I, Brown AJ. Cholesterol-dependent degradation of squalene monooxygenase, a control point in cholesterol synthesis beyond hmg-coa reductase. *Cell Metabolism*, 2011, 13: 260-273

万方数据

48. Houten SM, Schneiders MS, Wanders RJA, Waterham HR. Regulation of Isoprenoid/Cholesterol Biosynthesis in Cells from Mevalonate Kinase-deficient Patients. *J Biol Chem*, 2013, 278: 5736-5743
49. Inman JL, Robertson C, Mott JD, Bissell MJ. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *DeveloPment*, 2015, 142: 1028-1042
50. Jeongim H,Seulgi K, Jung HH, Da HP,Tae WK,Deok GK,Go E Y,Hwa CP,Sang MA, Chul WK.Squalene epoxidase plays a critical role in determining pig meat quality by regulating adipogenesis, myogenesis, and ROS scavengers. *Sci ReP*, 2017, 7: 16740
51. Jiang SY,Li H,Tang JJ, Wang J, Luo J,Liu B,Wang JK, Shi XJ, Cui HW, Tang J, Yang F,Wei Qi, Qiu WW，Song BL.Discovery of a potent HMG-CoA reductase degrader that eliminates statin-induced reductase accumulation and lowers cholesterol.*Cell Metabolism*, 2018, 9: 1-13
52. KimJH, Kim CN, Kang DW. Squalene Epoxidase Correlates E-Cadherin Expression and Overall Survival in Colorectal Cancer Patients:The Impact on Prognosis and Correlation to Clinicopathologic Features. *J Clin Med*, 2019, 8: 632-642
53. Kanazin V, Talbert H, See D, Decamp P, Nevo E, Blake T. Discovery and assay of single-nucleotide polymorphisms in barley (Hordeum vulgare). *Plant Mol Biol*, 2018, 48: 529-537
54. Kim EK, Lee SH, Jhun JY, Byum JK, Jeong JH, Lee SY, Kim JK, Choi JY, Cho ML. Metformin prevents fatty liver and improves balance of white/brown adipose in an obesity mouse model by inducing FGF21.*Mediators Inflamm*. 2016, 2016:5813030
55. Krawetz SA, Womble DD. Design and implementation of an introductory course for computer applications in molecular genetics: a case study. *Molecular Biotechnology*, 2001, 17: 27-41
56. Lander, S. E. The New Genomics: Global Views of Biology. *Science*, 1996, 274: 536-539
57. LiBJ, LiuKQ, Weng QN, Li PH, Wei W, Li, QF,Chen J, Huang RH, Wu WJ, Liu HL. Rna-seq analysis reveals new candidate genes for drip loss in a Pietrain×Duroc×Landrace×Yorkshire population.*Animal Genetics*, 2016, 47: 192-199
58. Lee SH, Gondro C, Werf JVD, Kim NK, Lim DJ, Park EW, Oh DJ, Gibson JP, Thompson JM. Use of a bovine genome array to identify new biological pathways for beef marbling in Hanwoo (Korean Cattle). *BMC Genomics*, 2010, 11: 623.

万方数据

59. Li GC, Zhang Z, Ma XJ, Gu WL, Wang YN, Li J. Are biomarkers correlated with recurrence patterns in patients with resectable gastric adenocarcinoma.*Mol Biol Rep*, 2012, 39:399‐405
60. Li J, Liu J, Sun D, Ma P, Ding X, Ying Y, Qin Z, Thomas M. Genome Wide Association Studies for Milk Production Traits in Chinese Holstein Population. *PLoS One*, 2010, 5: e13661
61. Li J, Liu JJ, Liu SH, Campanile G, Salzano A, Gasparrini B, Plastow G, Zhang CY, Wang ZQ, Liang AX, Yang LG. Genome-wide association study for buffalo mammary gland morphology. *J Dairy Res*, 2020, 87:27-31.
62. Liu D, Wong CC, Fu L, Chen H, Zhao L, Li C, Zhou Y, Zhang Y, Xu W, Yang Y. Squalene epoxidase drives NAFLD-induced hepatocellular carcinoma and is a pharmaceutical target. *Sci Transl Mede*, 2018, 10:9840
63. Lopes MS, Bastiaansen JWM, Harlizius B, Knol EF, Bovenhuis H. A Genome-Wide Association Study Reveals Dominance Effects on Number of Teats in Pigs. *PLoS One*, 2014, 9: e105867
64. Lu FH, Luo C, Li QY, Wei YM, Deng HY, Wang XL, Li XP, Jiang JR, Deng YF. Efficient generation of transgenic buffalos (bubalus bubalis) by nuclear transfer of fetal fibroblasts expressing enhanced green fluorescent protein. *Scientific Reports*, 2018, 8: 740.
65. Mahoney CE, Pirman d,Chubukov V.A chemical biology screen identifies a vulnerability of neuroendocrine cancer cells to SQLE inhibition. *Nature Communications*, 2019, 10: 1-14
66. Marco, Iannaccone, Ramy, Elgendy, Mery, Giantin, Camillo, Martino, Daniele, Giansante. RNA Sequencing-Based Whole-Transcriptome Analysis of Friesian Cattle Fed with Grape Pomace-Supplemented Diet.*Animals*, 2018, 8: 10-3390
67. Marion B, Jocelyne G, Hélène Jammes. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. *ReProd Nutr Dev*, 2004, 44: 499-508
68. Meuwissen T, Hayes B, Goddard M. Accelerating Improvement of Livestock with Genomic Selection. *Annu Rev Anim Biosci*, 2013, 1: 221-237
69. Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell*, 2007, 129: 679

万方数据

70. Nagai M, Sakakibara J, Wakui K,Fukushima Y, Igarashi S, Tsuji S, Arakawa M. Localization of the squalene epoxidase gene (SQLE) to human chromosome region 8q24.1, *Genomics*. 1997, 44:141-143.
71. LiN, Zhao F, Wei CJ, Liang MY, Zhang N, Wang CM, Li QZ, Gao XJ. Function of srebp1 in the milk fat synthesis of dairy cow mammary epithelial cells. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 16998-17013
72. Pradhan AK. Identification of genetic variant in buffalo genome using ddRAD sequence. *CanJ Biotech*, 2017, 1: 20
73. Ramakant, Kaushik, Karn, Pratap, Singh, Archana, Kumari, Manoj, Kumar, Singh. Isolation, characterization, and EGFP expression in the buffalo (Bubalus bubalis) mammary gland epithelial cell line. *In Vitro Cell Dev-An*, 2013, 49: 1-7
74. Rius AG, Appuhamy JADR, Cyriac J, Kirovski D, Becvar O, Escobar J, Mcgilliard ML, Bequette BJ, Akers RM, Hanigan MD. Regulation of protein synthesis in mammary glands of lactating dairy cows by starch and amino acids. *J Dairy Sci*, 2010, 93: 3127
75. Rosen JM, Wyszomierski SHD. Regulation of milk protein gene expression.*Ann Ny Acad Sci*, 2010, 478: 63-76
76. Sambrook J, Williams J, Sharp PA, Grodzicker T. Physical mapping of temperature sensitive mutations of adenovirus. *J Mol Biol*,1975, 97: 369-390
77. Seiki S, Frishman WH. Pharmacologic inhibition of squalene synthase and other downstream enzymes of the cholesterol synthesis pathway: a new therapeutic approach to treatment of hypercholesterolemia. *CardiolRev*, 2009, 17: 70-76
78. Shang JH, Yang CY, Qin J, Zheng HY, Shang JH, Yang CY, Qin J, Zheng HY, Liu HZ. A preliminary study on stable transfection of EGFP in buffalo cumulus cells. *Buffalo Bulletin*, 2013, 32: 436-438
79. Sui Z, Zhou J, Cheng Z. Squalene epoxidase (SQLE) promotes the growth and migration of the hepatocellular carcinoma cells. *Tumour Biol*, 2015, 36: 6173-6179
80. Sun J, Liu J, Huang B, Kan X, Chen G, Wang W, Fu S. Kisspeptin-10 induces β-casein synthesis via gpr54 and its downstream signaling pathways in bovine mammary epithelial. Cells. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 2621
81. Thompson SL, Burrows R, Laub RJ, Krisans SK. Cholesterol synthesis in rat liver peroxisomes. Conversion of mevalonic acid to cholesterol. *J Biol Chem*, 1988, 262: 17420-17425

万方数据

82. Tian Q, Wang HR, Wang MZ, Wang C, Liu SM. Lactogenic hormones regulate mammary protein synthesis in bovine mammary epithelial cells via the mTOR and JAK–STAT signal pathways. *Anim Prod Sc*, 2016, 56: 1803
83. Tonelli QJ, Sorof S. Induction of Biochemical Differentiation in Three-Dimensional Collagen Cultures of Mammary Epithelial Cells from Virgin Mice. *Differentiation*, 2010, 22: 195-200
84. Tong HL, Li Q, Gao X, Yin D. Establishment and characterization of a lactating dairy goat mammary gland epithelial cell line. *In Vitro Cell Dev-An*, 2012, 48: 149-155
85. Tsai HY, Robledo D, Lowe NR, Bekaert M, Taggart JB, Bron JE, Houston RD. Construction and annotation of a high density snp linkage map of the atlantic salmon genome. *G3 Genesgenetics*, 2016, 6: 2173-2179
86. Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warre ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, 2005, 439: 811-816
87. Vicky, Howe, Laura J, Sharpe, Anika V, Prabhu, Andrew, J.New insights into cellular cholesterol acquisition: promoter analysis of human HMGCR and SQLE, two key control enzymes in cholesterol synthesis.*BBA-Mol Cell Biol L*, 2017, 1862: 647-657
88. Vijay A, Nilambra D, Surender S, Kumar SN, Jena MK, Dhruba M, Dang AK, Mishra BP, Mukhopadhyay TK, Kaushik JK. Establishment and Characterization of a Buffalo (Bubalus bubalis) Mammary Epithelial Cell Line. *PLoS One*, 2012, 7: e40469
89. Vyssokikh MY, Zorova L, Zorov D, Hei mlich G, Jürgensmeier JM, Brdiczka D. Bax Releases Cytochrome c Preferentially from a Complex Between Porin and Adenine Nucleotide Translocator. Hexokinase Activity Suppresses this Effect. *MolBiol ReP*, 2002, 29: 93-96
90. Wade CM GESS. Genome Sequence, Comparative Analysis, and Population Genetics of the Domestic Horse. *Science*, 2009, 326: 865-867
91. Wanders RJ, romeijn GJ. Cholesterol biosynthesis, peroxisomes andperoxisomal disorders: mevalonate kinase is not only deficient inZellweger syndrome but also in rhizomelicchondrodysplasiapunctata. *JInherit Metab Dis*,1998, 21:309-312

万方数据

92. Wang, X. The mTOR Pathway in the Control of Protein Synthesis. *Physiology*, 2006, 21: 362-369
93. Wang J, He Y, Pang K, Zeng Q, Guo H. Changes in Milk Yield and Composition of Colostrum and Regular Milk from Four Buffalo Breeds in China during Lactation. *J Sci Food and Agr*, 2019, 99: 5799-5807
94. Williams JL. The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. *Rev Sci Tech*, 2005, 24: 379-391
95. Wojciech S, Alicja Z. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann Bot-London*, 2010, 7: 1127-1140
96. Wu JJ, Song LJ, Wu FJ, Liang XW, Yang BZ, Claire WD, Geoff EP, Cheng ZR, Shi DS, Liu QY, Yang LG, Zhang SJ. Investigation of transferability of bovinesnp50 beadchip from cattle to water buffalo for genome wide association study. *Mol Biol ReP*, 2013, 40: 743-750
97. Wu X, Ouyang HS, Duan B, Pang D, Zhang L, Yuan T, Xue L, Ni DB, Cheng L, Dong SH, Wei ZY, Li L, Yu M, Sun QY, Chen DY, Lai LX, Dai YF, Li GP. Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids. *Transgenic Research*, 2012, 21: 537-543
98. Yang WC, Guo WL, Zan LS, Wang YN, Tang KQ. Bta-miR-130a regulates the biosynthesis of bovine milk fat by targeting peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Anim Sci.* 2017, 100: 2898-2906
99. Yu S, Luo J, Song Z, Ding F, Dai Y, Li N. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (blg) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Research*, 2011, 21: 1638-1640
100. Zavizion B, Politis I, Gorewit RC. Bovine mammary myoepithelial cells. 1. isolation, culture, and characterization. *J Dairy Sci*, 1992, 75: 3367-3380
101. Zhang JY, Zhang F, Hong CQ, Giuliano AE, Cui XJ, Zhou GJ, Zhang GJ, Cui YK. Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells, *Cancer BioMed*, 2015, 12: 10-22
102. Zhang M, Ma CY, Lv DW, Zhen SM, Li XH, Yan YM. Comparative Phosphoproteome Analysis of the Developing Grains in Bread Wheatunder Well-Watered and Water-Deficit Conditions. *J Proteome Res*, 2014, 13: 4281-4297

万方数据

103.Zhang MQ, Gao JL, Liao XD, Huang TH, Zhang MN, Wang MQ, Tian Y, Bai J, Zhou CH. miR-454 regulates triglyceride synthesis in bovine mammary epithelial cells by targeting PPAR-γ. *Gene*, 2019, 691: 1-7

104.Zhang QY, Tang Y, Jin QT, Li J, Chen YA. SQLE inducesepithelial-to-mesenchymal transition by regulating of miR-133b in esophageal squamous cell carcinoma. *Acta Bioch Bio Ph Sin*, 2017, 49: 138-148.

105.Zhang Y, Wang Z, Magnuson NS. Pim-1 Kinase-Dependent Phosphorylation of $p21^{Cip1/WAF1}$ Regulates Its Stability and Cellular Localization in H1299 Cells. *Mol Cancer Res*, 2007, 5: 909-922.

万方数据

致谢

春风和煦，万物生长，叶要从芽里钻出来，我也要随着时节从校园的怀抱里脱离，完成这场奔赴与别离的宴会。在这3年的时光里，最感谢的是我的导师杨利国教授，感谢他给了我深入学习的机会，提供了华中农业大学这个平台，感谢在我发生意外时给予的安慰及鼓励。

衷心感谢感谢张淑君老师、霍立军老师、熊家军老师、滑国华老师、梁爱心老师、李翔老师、何长久老师、周扬老师、刘桂琼老师、赵书红老师等对我课题的设计的指导及意见，使我能够顺利完成学业。

衷心感谢我的师兄邓廷贤、刘深贺及叶挺柱对我实验上悉心指导及生活上的帮助，感谢李俊师兄、孙旭阳师兄、姜婷婷师姐、李赞师姐、张家祯师兄、李梓芃师兄、祖卓鑫师兄、周子超师兄、杜超师兄、乔同师兄、熊琪师姐、李可可、安志高、陈超、张雪婷、张燊、邵宝顺、华丽萍、孟飞、刘清华、张溪予、杨婵、毛鑫、周迪、游思、孙晖、曹家瑄、胡琰、周家宴、邢焕松及赵鑫哲等给予我的生活及实验的帮助，感谢杨帅师弟、袁婧师妹、许学林师妹及刘双行师弟等对我实验的协助。在实验的学习之余，感谢张欣欣师妹对我精神上的支持，让我的研究生生涯更充实，思想更成熟。

感谢广西水牛研究所的帮助，感谢提供水牛乳腺上皮细胞。

感谢论文评审的各位专家老师和参与论文答辩的各位教授，感谢给予我的指导及帮助。

最后感谢我的父母、朋友对我无怨无悔的支持与包容，感谢每一位帮助过我的老师、同学、朋友们，再次向您们致以最真挚的的祝福。

万方数据