

山羊 *Pit-1* 基因遗传多态性及 与生长性能的相关性分析

王玺年, 王继卿, 胡江, 刘秀, 李少斌, 罗玉柱

(甘肃农业大学 动物科学技术学院, 甘肃省草食动物生物技术重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要:以河西绒山羊、陇东绒山羊、辽宁绒山羊和内蒙古绒山羊为研究对象,采用 PCR-SSCP 和测序技术对 *Pit-1* 基因第 6 外显子进行多态性研究,并分析该基因多态性与山羊体质量和体尺性状的关系.结果表明:*Pit-1* 基因第 6 外显子存在 2 个 SNPs 位点并形成 AA、AB、BB、AC 和 BC 5 种基因型, BB 为优势基因型.除内蒙古绒山羊外,其他 3 个山羊群体的基因型分布处于 Hardy-Weinberg 平衡状态.最小二乘法分析表明, AB 基因型个体的体质量、胸围显著高于 BC 基因型($P < 0.05$),其他基因型间差异不显著($P > 0.05$). *Pit-1* 基因是山羊生产育种应用中的一个有效遗传标记.

关键词:山羊; 垂体特异转录因子-1 基因; 单核苷酸多态性; 生产性状; 关联分析

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2013)02-0230-05

Correlation Analysis of Polymorphisms of *Pit-1* Gene with Production Traits in Goat

WANG Xinian, WANG Jiqing, HU Jiang, LIU Xiu, LI Shaobin, LUO Yuzhu

(Key Laboratory of Herbivorous Animal Biotechnology of Gansu Province,

College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Genetic polymorphisms of *Pit-1* gene was analyzed by sequencing and PCR-SSCP in Hexi cashmere goat, Longdong cashmere goat, Liaoning cashmere goat and Inner Mongolia cashmere goat, and the effects of genotype on body mass and body measurement traits of goat were also estimated in this study. The results showed that two SNPs (G/T, T/C), and five genotypes (AA, AB, BB, AC and BC) were detected in exon 6, and the BB was the predominant genotype. The genotype distributions of four populations were all in the Hardy-Weinberg equilibrium except for Inner Mongolia cashmere goat. The least square analysis indicated that body mass and heart girth of individuals with genotype AB were significantly higher than that of individuals with genotype BC ($P < 0.05$), and the other genotypes were no significant difference ($P > 0.05$). Therefore, it can be concluded that genotypes of *Pit-1* gene is an effective genetic marker in goat breeding.

Key words: goat; *Pit-1* gene; single nucleotide polymorphism; production traits; correlation analysis

垂体特异转录因子-1 (Pituitary specific transcription factor 1, *Pit-1*) 是动物垂体前叶特异表达的一种重要组织特异性转录因子,由 3 个功能区组成,

包括含有 129 个氨基酸的 N 端区、142 个氨基酸的 POU 蛋白区和 20 个氨基酸的 C 端区. *Pit-1* 基因及其表达产物能够识别特异的基因顺序并与之结合,

收稿日期: 2012-11-02 网络出版时间: 2013-01-24

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20130124.1001.008.html>

作者简介: 王玺年(1987—),男,硕士研究生;通信作者: 罗玉柱(1962—),男,教授,博士, E-mail: luoyz@gsau.edu.cn

基金项目: 甘肃省青年科技基金计划项目(1107RJYA060); 甘肃省科技重大专项(1102NKDM024); 2012 年甘肃省高校基本科研业务费; 甘肃省重点实验室建设项目(085RTSA004)

从而引起细胞内基因的转录,正向调控垂体前叶促乳素(PRL)、促甲状腺 β 亚单位(TSH- β)和生长激素(GH)基因的表达以及与自身调控元件结合,从而对动物的生长发育及繁殖性能起重要调控作用^[1-2]。

Woollard等^[3]利用原位核酸分子杂交技术将山羊 *Pit-1* 基因定位于1q21-22染色体区域,其CDS区为876 bp,编码291个氨基酸,由6个外显子和5个内含子组成。研究表明 *Pit-1* 基因位点的突变与小鼠矮小性状基因座(Dwarf locus)存在紧密连锁关系^[4];能够导致人类多个垂体前叶激素的缺乏和垂体形态异常,出现生长缓慢和个体矮小等症状,表现为联合垂体激素缺乏症(Combined pituitary hormone deficiency)^[5];Lan等^[6]利用PCR-RFLP方法发现山羊 *Pit-1* 基因存在 *Alu I* 酶切多态位点,生产性能相关性分析表明, D_1D_1 基因型的产奶量高于 D_1D_2 基因型,1周岁体质量也高于 D_1D_2 基因型;在猪^[7]和牛^[8]上发现该基因多态位点与生长性状和胴体性能组成存在关联,是标记早期生长性状较理想的候选基因。因此本研究将 *Pit-1* 基因作为山羊体尺和体质量性状的候选基因,利用PCR-SSCP和测序技术分析河西绒山羊(Hexi cashmere goat, HX)、陇东绒山羊(Longdong cashmere goat, LD)、辽宁绒山羊(Liaoning cashmere goat, LN)和内蒙古绒山羊(Inner Mongolia cashmere goat, IM) *Pit-1* 基因单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)和群体遗传多样性,并分析不同基因型与山羊体质量和体尺形状的相关性,以期作为山羊生长性状标记的辅助选择和肉用性能分子选育提供有效的遗传标记。

1 材料与方法

1.1 材料

172份河西绒山羊血样采自甘肃省肃北县石宝城乡,65份内蒙古绒山羊血样和157份辽宁绒山羊血样采自甘肃省环县惠农绒山羊繁育有限责任公司,94份陇东绒山羊血样采自环县虎洞乡。羊只颈静脉采血8 mL,加入2 mL ACD抗凝剂,置于-20℃冰箱冻存。用常规苯酚-三氯甲烷抽提法提取血液基因组DNA,溶于TE中,4℃条件保存。

用于生长性状相关性分析的内蒙古绒山羊和辽宁绒山羊均为成年母羊,体质量、体尺资料由环县惠农绒山羊繁育有限责任公司提供。

1.2 引物设计和PCR扩增体系

根据NCBI中山羊 *Pit-1* 基因序列(GenBank 登录号为FJ547813)和参考文献^[9]设计引物,扩增 *Pit-1* 基因第6外显子区域。引物序列:F:5'-AAAC-CATCATCTCCCTTCTT-3';R:5'-AATGTACAATGTGC-CTTCTGAG-3'。引物由大连宝生物工程有限公司合

成,去离子水溶解,-20℃条件保存。

20 μ L PCR反应体系中各组分分别为:dNTP(150 μ mol/L)0.3 μ L, Buffer(1.5 mmol/L, Mg^{2+})2.0 μ L,上下引物(10 pmol/ μ L)各0.5 μ L, *Taq* DNA聚合酶(0.5 U/ μ L)0.2 μ L, DNA模板(100 ng/ μ L)0.8 μ L,超纯水15.7 μ L。PCR扩增条件:95℃预变性4 min;95℃变性30 s,53.5℃退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环;最后72℃延伸10 min;4℃条件保存。PCR用ABI Veriti 梯度PCR仪进行扩增,扩增产物用10 g/L的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 PCR产物的SSCP检测

将8 μ L的变性缓冲液与2 μ L的PCR产物混匀,98℃变性10 min,迅速放入冰水混合物中冰浴5 min。变形后的PCR产物用140 g/L的非变性聚丙烯酰胺凝胶[$m(\text{Acr}):m(\text{Bis})=39:1$],220 V电压,18℃条件下电泳21 h。为确保电泳温度恒定,电泳槽与F12-ED型德国JULABO加热制冷循环器连接,在恒温温控室中电泳。电泳结束后用银染法^[10]染色后判定基因型。

1.4 统计分析

运用PopGene 32软件计算基因型频率、等位基因频率、纯合度(H_o)、杂合度(H_e)和有效等位基因数(N_e),并进行品种内基因型分布的Hardy-Weinberg平衡检验;采用PIC软件计算多态信息含量(PIC)。根据以下线性模型,利用SPSS(13.0)软件对不同基因型间的生长性状进行最小二乘均值估计。

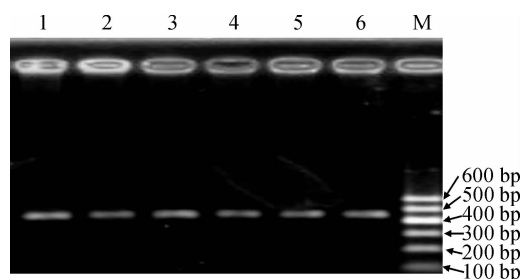
$$y_{ijk} = \mu + \text{Marker}_i + \text{Breed}_j + e_{ijk}$$

其中: y_{ijk} 为个体表型记录; μ 为总平均数; Marker_i 为标记基因型效应; Breed_j 为品种效应; e_{ijk} 为随机残差效应。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增及SSCP检测

PCR扩增产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测,得到的扩增条带清晰且特异性较好,大小约480 bp(图1),与目的片段大小一致。



1~6: PCR扩增产物;M:DNA marker DL 600。

图1 *Pit-1* 基因第6外显子PCR扩增产物检测

Fig.1 Detection of PCR products of goat *Pit-1* gene exon 6

SSCP 检测结果显示,山羊 *Pit-1* 基因第6外显子存在3个等位基因(A、B、C)和5种基因型(AA、AB、BB、AC、BC,图2).

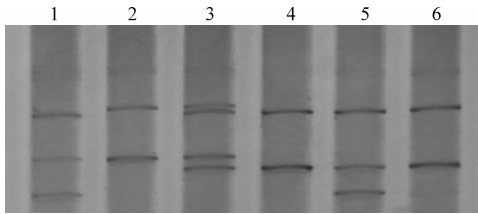
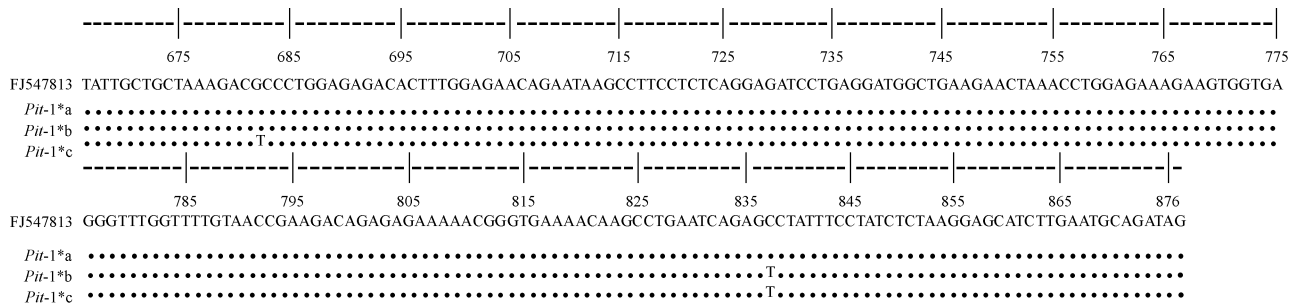


图2 山羊 *Pit-1* 基因第6外显子 SSCP 检测
1:AC 基因型;2: AA 基因型;3: AB 基因型;4,6: BB 基因型;5: BC 基因型.

图2 山羊 *Pit-1* 基因第6外显子 SSCP 检测

Fig.2 Detection of goat *Pit-1* gene exon 6 by PCR-SSCP



... 代表相同的核苷酸.

图3 山羊 *Pit-1* 基因第6外显子等位基因核苷酸序列比对结果

Fig.3 Alignment of different alleles sequences of goat *Pit-1* gene exon 6

群体共有基因型,AC 基因型在内蒙古绒山羊中未检测到,AA 和 AC 基因型在陇东绒山羊中未检测到. B 等位基因频率明显高于 A 和 C,说明 B 为4个山羊

2.2 序列分析与比较

选取不同基因型个体的 PCR 产物各2个进行克隆、测序. 结果如图3所示,A 等位基因的序列与 FJ547813 相同;B 等位基因在第837 bp 处发生 C/T 转换未引起氨基酸的改变,属同义突变;C 等位基因在第682 bp 和第837 bp 处发生 G/T 颠换和 C/T 转换,其中 G/T 颠换导致氨基酸由丙氨酸变为丝氨酸.

2.3 山羊 *Pit-1* 基因第6外显子基因频率和基因型频率在不同群体间的分布

4个山羊群体 *Pit-1* 基因第6外显子的基因型频率、等位基因频率及 χ^2 适合性检验结果见表1. 在检测到的5种基因型中,AB、BB 和 BC 基因型为4个

群体的优势等位基因. 经 χ^2 适合性检验,*Pit-1* 基因第6外显子中内蒙古绒山羊偏离 Hardy-Weinberg 平衡状态,其他群体均处于平衡状态.

表1 4个山羊群体 *Pit-1* 基因第6外显子的基因型频率和等位基因频率

Tab.1 Genotype frequency and allele frequency of *Pit-1* gene exon 6 in four different goat populations

群体	基因型频率				等位基因频率			χ^2	
	AA	AB	BB	AC	BC	A	B		C
河西绒山羊 HX	0.070	0.252	0.461	0.061	0.156	0.226	0.665	0.109	0.306
辽宁绒山羊 LN	0.037	0.191	0.698	0.022	0.052	0.143	0.820	0.037	0.156
陇东绒山羊 LD	0.000	0.277	0.532	0.000	0.191	0.138	0.766	0.096	0.245
内蒙古绒山羊 IM	0.058	0.174	0.698	0.000	0.070	0.145	0.820	0.035	0.032

2.4 山羊 *Pit-1* 基因第6外显子的遗传多态性分析

杂合度(He)和有效等位基因数(Ne)用来度量群体内遗传变异,其值的高低反映了群体内个体的均质度. 由表2可知,河西绒山羊的杂合度最高,为0.470,表示其遗传多样性最丰富,遗传变异程度高;内蒙古绒山羊的杂合度最低,为0.241,其遗传变异程度最小. 多态信息含量(PIC)是衡量标记多态性较好的指标,4个山羊群体均处于中度多态(0.25 < PIC < 0.50),其中河西绒山羊最高,为0.438.

表2 4个山羊群体 *Pit-1* 基因第6外显子遗传多态性分析
Tab.2 The genetic polymorphism of *Pit-1* gene exon 6 in four different goat populations

群体	纯合度	杂合度	有效等位基因数	多态信息含量
河西绒山羊 HX	0.530	0.470	0.495	0.438
辽宁绒山羊 LN	0.735	0.265	0.306	0.276
陇东绒山羊 LD	0.532	0.468	0.385	0.351
内蒙古绒山羊 IM	0.759	0.241	0.306	0.275

2.5 山羊 *Pit-1* 基因第 6 外显子不同基因型与生长性状的相关性分析

对 *Pit-1* 基因第 6 外显子不同基因型与生长性状进行最小二乘均值分析,结果见表 3 和表 4。由表 3 可以看出群体和基因型对山羊体质量、体尺性状有显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)的影响。由表 4 可知,AB 基因型个体的体质量、胸围和胸围指数均显著高于 BC 基因型($P < 0.05$),其他基因型间差异不显著。不同基因型个体的体长、体高和体长指数差异均不显著($P > 0.05$),但 BC 基因型个体的表型值

明显低于 AB 基因型个体的表型值。

表 3 利用最小二乘法分析各变因对生长性状的影响¹⁾
Tab.3 Effects of the source of variations on the measured traits

变异来源	自由度	F 值					
		体质量	体高	体长	胸围	胸围指数	体长指数
品种	1	9.88**	1.08	5.80*	2.34	3.06	1.05
基因型	4	11.02*	7.09	4.95	8.89*	6.37*	3.35

1) * 表示差异显著, $P < 0.05$; ** 表示差异极显著, $P < 0.01$ 。

表 4 不同基因型与体质量、体尺性状的最小二乘均值和标准误¹⁾

Tab.4 The LSM and SE of the association between genotypes and body mass, body measurement traits

基因型	数量	体质量/kg	体高/cm	体长/cm	胸围/cm	体长指数	胸围指数
AA	20	44.000 ± 9.524ab	64.812 ± 1.942	68.312 ± 3.187	78.750 ± 5.973ab	1.054 ± 0.024	1.214 ± 0.058ab
AB	40	46.894 ± 12.342a	65.340 ± 2.200	69.383 ± 3.529	80.403 ± 7.668a	1.061 ± 0.025	1.228 ± 0.074a
BB	117	44.400 ± 11.658ab	64.954 ± 1.956	68.246 ± 3.336	78.085 ± 5.111ab	1.050 ± 0.030	1.201 ± 0.046ab
AC	14	45.428 ± 9.988ab	65.000 ± 1.556	69.142 ± 3.167	78.143 ± 3.167ab	1.064 ± 0.016	1.202 ± 0.013ab
BC	31	40.267 ± 11.659b	64.533 ± 1.736	67.933 ± 3.205	77.067 ± 3.226b	1.052 ± 0.029	1.194 ± 0.028b

1) 同列数据后凡有一相同小写字母(或未标字母)者,表示差异不显著($P > 0.05$)。

3 讨论与结论

哺乳动物的生长发育需要多种转录因子和调控因子的参与。*Pit-1* 基因作为一类重要的垂体转录因子,能够激活或抑制相关细胞及其基因的特异性表达,表现出强烈的组织特异性,因此从分子机理上理解 *Pit-1* 基因的结构特征及表达方式显得尤为必要。Lan 等^[11]通过 RFLP 方法在陕北白绒山羊和波尔山羊 *Pit-1* 基因第 6 外显子检测到 1 个 T/C 碱基突变。本研究在该基因第 6 外显子区域发现了 G/T 和 C/T 2 个突变位点,形成 3 种等位基因,其中 G/T 颠换导致丙氨酸(Ala)转变为丝氨酸(Ser),属于错义突变,而 C/T 的转换并未导致氨基酸序列的改变,均编码丝氨酸。

本研究检测到的 5 种基因型在不同山羊群体中的分布存在差异,其中陇东绒山羊中未检测到 AA 和 AC 基因型,内蒙古绒山羊中未检测到 AC 基因型。这可能与样品收集过程中形成的遗传漂变及样本量少有关,因为陇东绒山羊和内蒙古绒山羊分别只检测了 94 和 65 只,样品数均少于河西绒山羊(172 只)和辽宁绒山羊(157 只),有可能导致部分基因型未被检测;也可能由于陇东绒山羊是辽宁绒山羊与子午岭黑山羊通过横交固定、自群繁育而成^[12],其遗传多样性还未被充分挖掘。有研究表明山羊、猪 *Pit-1* 基因多态性具有品种特异性,其等位基因和基因型在不同品种或群体间分布不均衡^[13-14],与本试验研究

结果一致。*Pit-1* 基因第 6 外显子基因频率在 4 个山羊群体中的分布表现出相同的趋势,均以 BB 基因型为优势基因型,B 为优势等位基因,这与曹婵等^[15]的研究结论一致。群体遗传变异分析表明,河西绒山羊的 H_e 、 N_e 和 PIC 均最高,辽宁绒山羊的最低。这表明河西绒山羊饲养粗放,人工选育水平低,导致遗传变异性较大。同时也说明河西绒山羊对环境的适应能力强,具有较大的选择潜力。辽宁绒山羊由于经历了高强度人工选择,表型趋于高产绒量,因此遗传变异程度低。4 个山羊群体 *Pit-1* 基因均处于中度多态,说明 4 个群体遗传变异较大,可望获得更多的遗传进展。 χ^2 检验表明除内蒙古绒山羊外,其他 3 个山羊群体均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,主要原因可能与人工选择强度和内蒙古绒山羊品种所固有的种质特征有关。

本研究对 *Pit-1* 基因不同基因型与山羊体尺、体质量性状进行了相关分析,结果显示 *Pit-1* 基因第 6 外显子的不同基因型对山羊体质量和胸围影响显著($P < 0.05$),与体高、体长的最小二乘均值差异不显著($P > 0.05$)。该多态位点是否会影响山羊的体高、体长,需要建立一个在该位点上产生分离的孟德尔群体进行进一步的分析。罗卫星等^[16]通过 PCR 直接测序法对贵州黑山羊 *Pit-1* 基因进行 SNP 筛查并分析屠宰性状的关联性,结果表明 Aa 型个体的眼肌面积、屠宰率、胴体质量以及腰部肌肉均显著低于 AA 和 aa 型个体,推测 *Pit-1* 基因多态性可能对山羊屠宰

性状有显著的遗传效应. 刘波等^[17]对秦川牛及其杂种牛的研究表明,*Pit-1* 基因多态性与牛体质量、胸围存在显著关联,可以作为牛生长性状的分子标记基因,与本研究结果一致. 本文得到的 *Pit-1* 基因与山羊生产性状之间的关系,为进一步揭示山羊群体的遗传多样性和生长性状分子育种提供了新的遗传标记. 由于 *Pit-1* 基因对动物生长激素基因、促乳素基因的转录表达起到正向调控作用,进而对畜禽的生长、繁殖和免疫等方面产生重要的影响,应进一步开展 *Pit-1* 基因多态性与繁殖、肉品质及抗病力相关性研究,为上述性状标记辅助选择 (Marker-assisted selection, MAS) 或标记连锁提供理论基础.

参考文献:

- [1] TUGGLE C K, TRENKLE A. Control of growth hormone synthesis[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 1996, 13(1): 1-33.
- [2] COHEN L E, WONDISFORD F E, RADOVICK S. Role of PIT-1 in the gene expression of growth hormone, prolactin, and thyrotropin[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1996, 25(3): 523-540.
- [3] WOOLLARD J, TUGGLE C K, PONCE DE LEÓN F A. Rapid communication: Localization of POU1F1 to bovine, ovine, and caprine 1q21-22 [J]. *J Anim Sci*, 2000, 78(1): 242-243.
- [4] BANERJEE-BASU S, BAXEVANIS A D. Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors [J]. *Nucl Acids Res*, 2001, 29(15): 3258-3269.
- [5] COHEN L E, RADOVICK S. Molecular basis of combined pituitary hormone deficiencies[J]. *Endocrine Rev*, 2002, 23(4): 431-442.
- [6] LAN Xianyong, PAN Chunying, CHEN Hong, et al. An *AluI* PCR-RFLP detecting a silent allele at the goat *POU1F1* locus and its association with production traits [J]. *Small Rumin Res*, 2007, 73(1/3): 8-12.
- [7] BRUNSCH C, STERNSTEIN I, REINECKE P, et al. Analysis of associations of *PIT1* genotypes with growth, meat quality and carcass composition traits in pigs[J]. *J Appl Genet*, 2002, 43(1): 85-91.
- [8] ZHAO Q, DAVIS M E, HINES H C, et al. Associations of polymorphisms in the *Pit-1* gene with growth and carcass traits in Angus beef cattle [J]. *J Anim Sci*, 2004, 82(8): 2229-2233.
- [9] WOOLLARD J, SCHMITZ C B, FREEMAN A E, et al. *HinfI* polymorphism at the bovine *PIT1* locus[J]. *J Anim Sci*, 1994, 72(12): 3267.
- [10] BYUN S O, FANG Q, ZHOU H, et al. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels[J]. *Anal Biochem*, 2009, 385(1): 174-175.
- [11] LAN Xianyong, LI Mijie, CHEN Hong, et al. Analysis of caprine pituitary specific transcription factor-1 gene polymorphism in indigenous Chinese goats[J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(4): 705-709.
- [12] 马宁. 中国绒山羊研究[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 38-39.
- [13] 滑留帅, 蓝贤勇, 陈宏, 等. 关中奶山羊和贵州黑山羊 *Pit-1* 基因的 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 分析[C]// 中国畜牧兽医学学会畜禽遗传标记学分会. 第十次全国畜禽遗传标记研讨会论文集. 北京: 中国畜牧兽医学学会畜禽遗传标记学分会, 2006: 519-522.
- [14] STANČEKOVÁK, VAŠÍČEK D, PEŠKOVIČOVÁ D, et al. Effect of genetic variability of the porcine pituitary-specific transcription factor (PIT-1) on carcass traits in pigs [J]. *Anim Genet*, 1999, 30(4): 313-315.
- [15] 曹婵, 刘文忠, 乔丽英, 等. 四个山西地方山羊品种 *Pit-1* 基因多态性的研究[J]. *山西农业大学学报: 自然科学版*, 2010, 30(5): 389-392.
- [16] 罗卫星, 蔡惠芬, 王兴群, 等. 山羊垂体转录因子 *POU1F1* 基因多态性及其与屠宰性状相关性研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2011, 47(9): 5-9.
- [17] 刘波, 陈宏, 蓝贤勇, 等. 秦川牛及其杂种牛 *POU1F1* 基因多态性与生长性能相关性[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(12): 2520-2525.

【责任编辑 柴 焯】