

黄牛 *Gli3* 基因第 10 外显子多态性及其与生长性状相关性*

王柯忆¹, 陈宏^{1,2*}, 王鑫磊¹, 赖新生¹, 于辉¹, 王谋¹, 蓝贤勇¹

(1. 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西杨凌 712100;

2. 徐州师范大学 细胞与分子生物学研究所, 江苏徐州 221116)

摘要: 利用 PCR-SSCP 和 DNA 测序技术研究 708 头黄牛 *Gli3* 基因第 10 外显子的多态性, 发现此外显子存在 SSCP 多态。对不同 SSCP 带型的对应片段进行测序分析, 共发现 2 个新的 SNP 多态位点 (NW_001494928:g. 205649T>C, 205754A>C), 这 2 个 SNP 完全连锁。南阳牛不同基因型与生长发育性状的相关性分析显示, CC 基因型个体的 24 月龄平均日增体质量指标显著大于 TT 基因型个体 ($P<0.05$), 其余各项指标基因型间差异不显著 ($P>0.05$)。因此, 该位点有可能作为南阳牛生长性状辅助选择的标记之一。秦川牛和郧县红牛群体中没有发现与该基因座多态显著相关的性状。

关键词: *Gli3*; 第 10 外显子; 黄牛; PCR-SSCP; 生长性状

中图分类号: S823.2⁺4

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2010)03-0001-05

Polymorphism of the Exon 10 of *Gli3* Gene and Correlation with Growth Traits in Cattle

WANG Keyi¹, CHEN Hong^{1,2*}, WANG Xinlei¹, LAI Xinsheng¹,
YU Hui¹, WANG Mou¹ and LAN Xianyong¹

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling Shaanxi 712100, China; 2. Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou Jiangsu 221116, China)

Abstract: In this study, polymorphism of exon10 locus (*E10*) at the coding region of the bovine *Gli3* gene were detected in 708 cattle, and polymorphism was detected at this locus. The fragments showing different SSCP (single strand conformation polymorphism) patterns were sequenced, and a total of two SNPs (NW_001494928:g. 205649T>C, 205754A>C) were found. The association analysis of different genotypes with some of the growth and development traits showed that the 24 month-aged individuals with genotype CC had a higher average daily gain than the individuals with genotype TT ($P<0.05$) in Nanyang cattle, while different genotypes had no significant association with growth traits in Qinchuan cattle population and Jiaxian red cattle population. It was suggest that this locus may be suitable to develop molecular markers in the marker-assisted selection (MAS) program for growth traits in Nanyang cattle, but non polymorphism at the locus was detected in Qinchuan cattle population and Jiaxian red cattle population.

Key words: *Gli3* gene; Exon10; Cattle; PCR-SSCP; Growth and development traits

Gli3 基因是 *Gli*-Kruppel 基因家族中的成员之一, 其参与的 Shh 信号通路在动物生长发育,

* 收稿日期: 2009-05-25 修回日期: 2009-09-20

基金项目: 国家 863 项目 (2006AA10Z197); 国家自然科学基金 (30771544); 国家支撑计划 (2006BAD01A10-5); 陕西省“13115”科技创新工程重点专项 (2008ZDKG-11); 农业部现代肉牛产业技术体系专项经费资助。

作者简介: 王柯忆 (1983-), 女, 山西曲沃人, 硕士研究生, 研究方向为生物技术与动物育种。E-mail: iwangke@163.com

* 通讯作者: 陈宏, 男, 陕西西安人, 教授, 从事生物技术与家畜育种研究。

尤其是骨骼、神经系统及肢体的发育过程中有重要作用。*Gli* 家族的 3 个基因编码的转录因子都含有 5 个高度保守的串联锌指结构以及组氨酸-半胱氨酸连接序列,这也进一步说明了该基因家族在发育过程中的重要性^[1-4]。*Gli3* 基因编码的蛋白质是 DNA 结合转录因子,调停 Shh 信号。*Gli3* 基因表达产物经过裂解后可形成抑制因子,它可以阻止 *Shh* 靶基因的表达,而 *Shh* 反过来还可以抑制 *Gli3* 裂解,这样在发育过程中 *Gli3* 和 *Shh* 相互制约,以保证正常形态的形成^[5-6]。突变基因已与包括基利 cephalopolysyndactyly 症候群(GCPS),Pallister-Hall 综合征(PHS),preaxial 趾 IV 型,并 postaxial 趾类型等若干疾病相关^[7-8]。McDermott 等利用组织原位杂交的方法,检测了 *Gli* 基因在体节形成过程中的表达形式,*Gli3* 基因在第一位节前的中胚层表达^[9]。Zhang X 等在 2006 年对 103 例单纯性马蹄内翻足患者 *Gli3* 基因的部分外显子进行突变筛查和关联分析,在第 4 外显子的 cSNP 差异无统计学意义,且在第 9 外显子中发现一个同义点突变。这些结果均暗示,*Gli3* 可能在 Shh 信号通路中发挥重要的调节作用,从而影响动物的生长和发育^[10]。

人类 *Gli3* 基因定位于染色体 7p13。人的 *Gli3* 基因全长 299 kb(小鼠为 271 kb,大鼠为 82.5 kb),包括 15 个外显子(大鼠只有 5 个)和 14 个内含子(大鼠只有 4 个)。人的 *Gli3* 基因 cDNA 序列有 5 054 bp,有完整的编码序列 4 743 bp(NM_000168)。其 5' 靠近外显子 1 附近有一个 CpG 岛,CpG 岛和保守区可能是潜在的启动子或调控元件。*Gli3* 基因位于牛 4 号染色体上,由 13 个外显子和 12 个内含子组成。Martin 等在 2007 年证明 *Gli3* 的变异可能使小鼠体质量增加^[11]。国内有关动物上 *Gli3* 基因的研究报道很少,且多是关于鸡的,而作为大家畜的黄牛在国内尚未见 *Gli3* 基因多态性报道。

1 材料与方法

1.1 试材

随机抽取无亲缘关系的 4 个品种黄牛 708 头,颈静脉采血,放入加有 ACD 抗凝剂的离心管中,然后摇匀迅速放入冰盒中带回实验室,−80℃ 超低温冰箱保存待用。南阳黄牛生长性状的资料来自于南阳牛场的生产记录,秦川牛和郟县红牛

体尺数据由笔者现场测定。血样基因组 DNA 的提取按 Chen 等的方法^[12]。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中牛 *Gli3* 基因序列(NW_001494928)设计 1 对引物(由上海生物工程技术服务有限公司合成),对牛的基因组进行扩增。引物及扩增片段:上游引物:5' CTTTCATTCACTTGGAGC 3';下游引物:5' ACGACAATGGAACAGGCT 3'。

1.2.2 PCR 扩增体系(15 μL) 10×Buffer(含 Mg²⁺) 2.5 μL;4 mmol/L dNTP 2.0 μL;引物(上下游等体积混合 10 pmol/L) 0.5 μL; Taq DNA Polymerase(北京,鼎国,0.5 U/L) 2.0 μL; DNA 模板 30 ng;加水至 15 μL。

1.2.3 PCR 扩增条件 95℃预变性 5 min;94℃变性 40 s,50.2℃复性 35 s,72℃延伸 40 s,35 个循环;72℃延伸 10 min;4℃保存。扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 PCR-SSCP 检测与扩增产物的测序 5 μL PCR 产物和 5 μL 的上样缓冲液(98%甲酰胺、0.025%溴酚蓝、0.025%二甲苯氰、10 mmol/L EDTA(pH 8.0)、10%甘油)混匀,98℃变性 10 min,然后冰浴 10 min,使之保持单链状态。样品在 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳。电泳结束后,进行银染显带,Kodak 凝胶成像系统照相分析,判型。经 SSCP 分析后,对不同基因型个体的 PCR 扩增产物送交上海生物工程技术服务有限公司直接在 ABI3730 自动测序仪上测序。

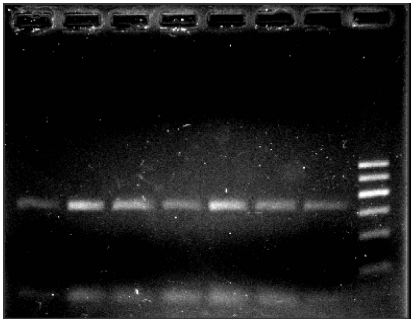
1.2.5 数据分析 利用 PopGen32 软件计算遗传多态性指标;用 SPSS 13.0 软件的一般线性模型(GLM)分析个体基因型对牛生长性状的影响。 $Y = u + age + marker + MA + e$,式中 Y 为性状表型值, u 为群体平均值, $marker$ 为基因型效应, age 为年龄效应, MA 是年龄与基因型之间的互作效应, e 为环境效应。

2 结果与分析

2.1 *Gli3* 基因 PCR-SSCP 分析

检测 4 个牛品种 *Gli3* 基因第 10 外显子的多态性,发现此位点存在 SSCP 多态,表现 2 种 SSCP 基因型(CC 和 TT),未发现有 CT 基因型(图 1,2)。序列分析显示:CC 型与 GenBank 中 NW_001494928 序列对应位置完全一致,TT 型与 NW_001494928 序列进行比对发现在该序列对应的

第 205649 和 205754 碱基位置都发生了 T>C 和 A>C 转换,且二者连锁发生。将该突变的核苷酸序列翻译为氨基酸序列,发现编码的氨基酸未改变,前者仍编码丙氨酸,后者位于内含子区域,



DNA 分子量标准为 Marker I DNA molecular weight marker is Marker I

图 1 *E10* 基因座 PCR 扩增结果(336 bp)

Fig. 1 PCR products of the *Gli3* gene at *E10* locus (336 bp)

因此为沉默突变。

2.2 *Gli3* 基因遗传多态性指标分析

经检验,*Gli3* 基因第 10 外显子的等位基因频率 (P_C/P_T)在秦川牛、南阳牛和郟县红牛 3 个品种中的比率分别为 0.44/0.56、0.60/0.40、0.46/0.54,荷斯坦牛未检测到 TT 基因型(表 1)。

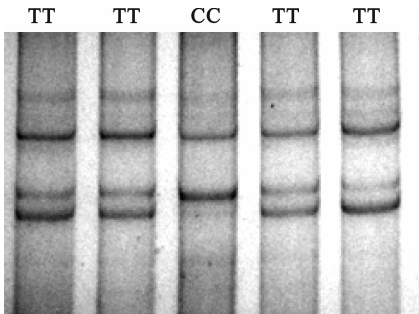


图 2 *E10* 基因座的 PCR-SSCP 结果

Fig. 2 Detection of the PCR-SSCP in the *Gli3* gene at *E10* locus

表 1 4 个牛品种 *E10* 基因座的突变率分析

Table 1 The substitutions analysis of *E10* polymorphic locus in the 4 populations

品种 Breed	样本量 Sample size	CC 基因型 CC Genotypes	TT 基因型 TT Genotypes	等位基因频率 Allele frequencies	
				P_C	P_T
秦川牛 Qinchuan	287	125	162	0.44	0.56
南阳牛 Nanyang	187	112	75	0.60	0.40
郟县红牛 Jiaxian red	139	64	75	0.46	0.54
荷斯坦 Holstein	95	95	0	1.00	0.00

表 2 不同牛品种间 *E10* 多态基因座基因型分布的卡方独立性检验

Table 2 Chi-Square analysis of genotype distribution of the *E10* polymorphic locus in the 4 populations

品种 Breed	秦川牛 Qinchuan	南阳牛 Nanyang	郟县红牛 Jiaxian red	荷斯坦 Holstein
秦川牛 Qinchuan		0.001	0.598	0.000
南阳牛 Nanyang	11.284 * *		0.016	0.000
郟县红牛 Jiaxian red	0.277	5.778 *		0.000
荷斯坦 Holstein	90.613 * *	52.159 * *	74.651 * *	

注:上三角表示不同品种基因型频率分布的 P 值,下三角表示不同品种基因频率分布的 χ^2 值;标有 * 和 * * 的数值显著水平分别为 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 。

Note:Right triangle data showed P value of genotype distribution,left triangle data showed χ^2 of genotype. Value with * and * * differ significantly at $P<0.05$ and $P<0.01$,respectively.

不同牛品种间多态基因座基因型分布的卡方独立性检验结果显示:荷斯坦牛与其它品种的牛差异极显著($P<0.01$)。南阳牛与秦川牛差异极显著($P<0.01$),与郟县红牛间差异显著($P<0.05$),其余品种间差异不显著($P>0.05$)。

2.3 *Gli3* 基因多态性与生长性状的关联分析

表 3 列出了南阳牛 *Gli3* 基因 *E10* 基因座不同基因型与体质量、体高、体斜长、胸围、坐骨端宽和平均日增体质量的最小二乘均值差异显著性检验结果。结果显示,CC 型个体的 24 月龄平均日增体质量显著大于 TT 型个体($P<0.05$)。其余

各项指标基因型间差异不显著($P>0.05$)。

表 4 列出了秦川牛 *Gli3* 基因 *E10* 基因座不同基因型之间体高、十字部高、体斜长、腰角宽、胸围、尻长和体质量最小二乘均值差异显著性检验结果。所有各项指标基因型间差异不显著($P>0.05$)。

表 5 列出了郟县红牛 *Gli3* 基因 *E10* 基因座不同基因型与体高、十字部高、体斜长、腰角宽、胸围、尻长、坐骨端宽、管围和体质量最小二乘均值差异显著性检验结果。所有各项指标基因型间差异不显著($P>0.05$)。

表 3 南阳牛*GLI3* 基因 *E10* 基因座不同基因型之间最小二乘均值差异显著性检验

Table 3 Least square analysis between genotype of <i>E10</i> locus in <i>GLI3</i> gene and growth traits of Nanyang cattle		基因型 Genotype	
		CC ($\bar{x} \pm SE$)	TT ($\bar{x} \pm SE$)
月龄 Age	生长性状 Growth trait		
初生 Birth	体质量/kg Body weight	30.01±0.45	29.83±0.35
	体质量/kg Body weight	158.61±3.18	161.17±2.48
6 月龄 Six months	体高/cm Body height	105.92±0.85	106.03±0.66
	体斜长/cm Body length	105.89±0.96	105.53±0.75
	胸围/cm Chest girth	128.53±1.19	129.39±0.93
	坐骨端宽/cm Hucklebone width	18.10±0.23	18.53±0.18
	日增体质量/kg Average daily gain	0.71±0.02	0.73±0.01
	体质量/kg Body weight	221.56±3.89	223.14±3.04
12 月龄 Twelve months	体高/cm Body height	113.69±0.63	114.17±0.49
	体斜长 /cm Body length	117.28±1.22	116.73±0.95
	胸围 /cm Chest girth	140.97±1.30	141.73±1.02
	坐骨端宽/cm Hucklebone width	20.75±0.27	20.81±0.21
	日增体质量/kg Average daily gain	0.35±0.02	0.34±0.02
	体质量/kg Body weight	293.22±5.24	302.78±4.09
18 月龄 Eighteen months	体高/cm Body height	120.58±0.64	120.93±0.50
	体斜长/cm Body length	129.58±1.21	129.32±0.94
	胸围 /cm Chest girth	155.58±1.44	156.58±1.13
	坐骨端宽/cm Hucklebone width	23.31±0.31	23.19±0.25
	日增体质量 /kg Average daily gain	0.40±0.03	0.44±0.02
	体质量 /kg Body weight	368.47±6.80	369.51±5.31
24 月龄 Twenty-four months	体高/cm Body height	125.97±0.70	126.61±0.55
	体斜长 /cm Body length	138.83±1.24	137.80±0.97
	胸围 /cm Chest girth	169.56±1.66	168.89±1.30
	坐骨端宽 /cm Hucklebone width	25.63±0.39	25.26±0.31
	日增体质量 /kg Average daily gain	0.42±0.02a	0.37±0.01b

注:数值为平均值±标准误;在同一行中标有 a,b 为差异显著($P<0.05$)。
Notes: Estimates are given as $\bar{x} \pm SE$. Data with a different letter (a,b) within the same line differ significantly at $P<0.05$, reselectively.

表 4 秦川牛*GLI3* 基因 *E10* 基因座不同基因型之间最小二乘均值差异显著性检验

Table 4 Least square analysis between genotype of *E10* locus in *GLI3* gene and growth traits of Qinchuan cattle

生长性状 Growth trait	基因型 Genotype	
	CC ($\bar{x} \pm SE$)	TT ($\bar{x} \pm SE$)
体高 /cm Body height	91.20±1.56	93.36±1.49
十字部高 /cm Height at hip cross	95.90±1.63	98.59±1.55
体斜长 /cm Body length	94.05±1.61	95.09±1.54
腰角宽 /cm Hip width	26.75±1.28	26.96±1.22
胸围 /cm Heart girth	112.10±2.60	112.36±2.48
尻长 /cm Rump length	31.80±0.64	32.82±0.61
体质量 /kg Body weight	119.25±7.29	121.33±6.95

表 5 郟县红牛*GLI3* 基因 *E10* 基因座不同基因型之间最小二乘均值差异显著性检验

Table 5 Least square analysis between genotype of *E10* locus in *GLI3* gene and growth traits of Jiaxian red cattle

生长性状 Growth trait	基因型 Genotype	
	CC ($\bar{x} \pm SE$)	TT ($\bar{x} \pm SE$)
体高 /cm Body height	124.99±0.69	125.65±0.84
十字部高 /cm Height at hip cross	124.38±0.81	125.29±0.98
体斜长 /cm Body length	151.03±1.29	151.94±1.57
腰角宽 /cm Hip width	44.19±0.42	45.02±0.51
胸围 /cm Heart girth	177.25±1.16	179.01±1.41
尻长 /cm Rump length	48.29±0.44	48.86±0.53
坐骨端宽 /cm Hucklebone width	24.89±0.52	24.77±0.63
管围 /cm Circumferance of cannon bone	17.15±0.14	17.20±0.17
体质量 /kg Body weight	476.49±8.95	490.40±10.87

3 讨论

Gli3 基因是 *Gli*-Kruppel 基因家族中的成员之一,编码含有 5 个串联锌指结构的转录因子,牛的 *Gli3* 基因共包括 13 个外显子。其参与的 Shh 信号通路在动物生长发育,尤其是骨骼,神经系统及肢体的发育过程中有重要作用。

现阶段对影响牛生长发育过程的基因的多态性研究较多,但 *Gli3* 基因多态性与生长性状的相关性还未见报道。笔者首次研究牛 *Gli3* 基因的多态性,发现 2 个新的 SNP 多态位点(NW_001494928:g. 205649T>C,205754A>C),这 2 个 SNP 也是完全连锁,前者位于编码区,后者处于内含子区域。此 SSCP 多态位点表现 2 种 SS-CP 基因型(CC 和 TT),未发现 CT 基因型。可能是样本量不够,未检测到。本文检测到 *Gli3* 基因编码区的 SNP 与牛的生长发育性状相关,但所发现的突变是否影响该基因的表达及活性的发挥还有待于进一步验证。

不同牛品种间 *Gli3* 基因的第 10 外显子基因型分布的卡方独立性检验结果显示,荷斯坦牛基因型分布与南阳牛、秦川牛和郟县红牛存在显著差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$),南阳牛与秦川牛差异极显著($P<0.01$),与郟县红牛间差异显著($P<0.05$),其余品种间差异不显著($P>0.05$)。这说明选择压力和乳用方向的选育造成了候选基因基因型分布的改变,而肉用牛品种之间基因型分布也存在显著差异,说明各个肉牛品种的选育程度不同。

本文首次对 *Gli3* 基因第 10 外显子的多态性与秦川牛、南阳牛和郟县红牛生长性状的相关性进行了分析,发现南阳牛 CC 基因型的 24 月龄的平均日增体质量与 TT 基因型的差异达到了显著水平($P<0.05$),其余各项指标基因型间差异不显著($P>0.05$)。秦川牛和郟县红牛群体中没有发现与该基因座多态显著相关的性状。

参考文献:

- [1] Ruppert J M, Kinzler K W, Wong A J, *et al.* The GLI-Kruppel family of human genes[J]. *Mol Cell Biol*, 1988, 8: 3104-3113.
- [2] Arheden K, Ronne M, Mandahl N, *et al.* In situ hybridization localizes the human putative oncogene GLI to chromosome subbands 12p13. 3-14. 1[J]. *Hum Genet*, 1989, 82(1): 1-2.
- [3] Ruppert J M, Vogelstein B, Arheden K, *et al.* *Gli3* encodes a 190-kilodalton protein with multiple regions of GLI similarity[J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10: 5408 - 5415.
- [4] Matsumoto N, Fujimoto M, Kato R, *et al.* Assignment of the human GLI2 gene to 2q14 by fluorescence in situ hybridization[J]. *Genomics*, 1996, 36(1): 220-221.
- [5] Theil T, Alvarez-Bolado G, Walter A, *et al.* *Gli3* is required for Emx gene expression during dorsal telencephalon development[J]. *Development*, 1999, 126: 3561-3571.
- [6] Aza-Blanc P, Kornberg T B. Ci: a complex transducer of the hedgehog signal[J]. *Trends Genet*, 1999, 15: 458-462.
- [7] Tommeurp N, Nielsen F. A familial reciprocal translocation t(3;7)(p21.1;p13) associated with the Greig polysyndactyly-craniofacial anomalies syndrome[J]. *Am J Med Genet*, 1983, 16: 313-321.
- [8] Kang S, Allen J, Graham J M, *et al.* Linkage mapping and phenotypic analysis of autosomal dominant Pallister-Hall syndrome[J]. *J Med Genet*, 1997, 34: 441 - 446.
- [9] Aileen M, Marcus G, Thomas E, *et al.* *Gli2* and *Gli3* have redundant and context-dependent function in skeletal muscle formation[J]. *Development*, 2005, 132: 345 - 357.
- [10] Zhang X, Jin C L, Liu L Y, *et al.* Association and mutation analysis of *Gli3* gene in idiopathic talipes equinovarus[J]. *Chin J Med Genet*, 2006, 23: 551-554(in Chinese with English abstract)
- [11] Martin B, Lapouble E, Chaix Y. Involvement of the *Gli3* (extra-toes) gene region in body weight in mice[J]. *Scientific World Journal*, 2007(7): 83-86.
- [12] Chen H, Leibenguth F. Studies on multilocus fingerprints RAPD markers and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Biochem Genet*, 1995, 33: 297-306.