

网络出版时间:2020-12-25 10:52 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2021.06.001
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20201224.1118.002.html

大别山牛 *PAX3* 基因多态性及其与 生长性状的关联分析

赵拴平,金 海,徐 磊,李 默,贾玉堂

(安徽省农业科学院 畜牧兽医研究所,畜禽产品安全工程安徽省重点实验室,安徽 合肥 230031)

【摘 要】【目的】探究 *PAX3* 基因多态性与大别山牛生长性状的相关性。【方法】采集 292 头安徽大别山成年(24~48 月龄)母牛的耳组织,并测定其体尺数据,提取 DNA 后,通过 PCR 和测序技术鉴定出大别山牛群体中 *PAX3* 基因的多态性,利用 POPGENE、Haploview 和 SHEsis 软件,分别对多态位点进行遗传多样性、哈代-温伯格平衡和单倍型分析,利用 SPSS 23.0 软件分析其与生长性状的相关性。【结果】在大别山牛 *PAX3* 基因第 4 内含子中检测到 3 个 SNPs 位点(g. 4718G>C、g. 4744T>C 和 g. 4757C>A),第 6 内含子中检测到 1 个 SNPs 位点(g. 78920C>T),4 个 SNPs 位点均存在 3 种基因型。遗传多样性分析发现,g. 4718G>C 位点属于低度多态($PIC \leq 0.25$),g. 4744T>C、g. 4757C>A 和 g. 78920C>T 位点均属于中度多态($0.25 < PIC \leq 0.50$),且除 g. 4757C>A 外,其余 3 个位点均处于哈代-温伯格平衡状态($P > 0.05$)。单倍型分析发现,4 个 SNPs 位点间无强连锁相关($r^2 < 0.33$),形成 13 种单倍型,其中频率大于 0.03 的单倍型有 6 个。相关性分析发现,g. 4718G>C 位点与大别山牛的十字部高显著相关($P < 0.05$);g. 4744T>C 位点与十字部高、腹围和腰角宽极显著相关($P < 0.01$);g. 4757C>A 位点与腰角宽显著相关($P < 0.05$);g. 78920C>T 位点与腹围极显著相关($P < 0.01$),与管围显著相关($P < 0.05$)。【结论】*PAX3* 基因第 4 内含子的 g. 4718G>C、g. 4744T>C 和 g. 4757C>A 位点以及第 6 内含子的 g. 78920C>T 位点多态性与大别山牛群体部分生长性状具有显著或极显著的相关性,可以作为大别山牛遗传选育的候选分子标记。

【关键词】 大别山牛;*PAX3* 基因;生长性状;SNPs 多态性

【中图分类号】 S823.8⁺12

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2021)06-0001-07

Polymorphism of *PAX3* gene and its association with growth traits of Dabieshan cattle

ZHAO Shuanping, JIN Hai, XU Lei, LI Mo, JIA Yutang

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Anhui Province Key
Laboratory of Livestock and Poultry Product Safety Engineering, Hefei, Anhui 230031, China)

Abstract:【Objective】The purpose of this study was to explore the correlation between *PAX3* gene polymorphism and growth traits of Dabieshan (DBS) cattle.【Method】Ear tissue and body measurement records of 292 DBS cattle at the age of 24—48 months were collected. DNA was extracted and polymorphisms of *PAX3* gene were identified by PCR and sequencing. Genetic diversity, Hardy-Weinberg equilibrium and haplotype of polymorphisms of *PAX3* gene were analyzed by POPGENE, Haploview and SHEsis software, respectively. Association between polymorphisms and growth traits was then explored by SPSS 23.0 analysis software.【Result】Three SNPs (g. 4718G>C, g. 4744T>C and g. 4757C>A) were identified

〔收稿日期〕 2020-05-25

〔基金项目〕 国家肉牛牦牛产业技术体系-合肥综合试验站项目(CARS-37);安徽省科技重大专项(18030701207);安徽省农业科学院科研团队项目(2020YL032)

〔作者简介〕 赵拴平(1984—),女,山西长治人,助理研究员,博士,主要从事肉牛分子育种研究。E-mail:zhaoshuanping@163.com

in intron 4 and one SNP (g. 78920C>T) was identified in intron 6 in the bovine *PAX3* gene. The genetic diversity analysis showed that g. 4718G>C was low polymorphism ($PIC \leq 0.25$), while g. 4744T>C, g. 4757C>A and g. 78920C>T were moderate polymorphism ($0.25 < PIC \leq 0.50$). Except for g. 4757C>A, other polymorphisms were in the state of Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$). Haplotype analysis showed that there was no strong linkage correlation between the 4 SNPs sites ($r^2 < 0.33$), and 6 of the 13 identified haplotypes had frequencies of greater than 0.03. There were 3 genotypes at each SNP. Correlation analysis showed that g. 4718G>C was significantly associated with height at hip cross in DBS population ($P < 0.05$), and g. 4744T>C had extremely significant association with height at hip cross, abdominal girth and hip width ($P < 0.01$). The g. 4757C>A was significantly associated with hip width ($P < 0.05$), and g. 78920C>T had extremely significant association with abdominal girth ($P < 0.01$) and significant association with shin circumference ($P < 0.05$). 【Conclusion】 The polymorphisms of g. 4718G>C, g. 4744T>C and g. 4757C>A in intron 4 and g. 78920C>T in intron 6 had significant or extremely significant correlation with growth traits of DBS cattle, indicating that these SNP sites could be used as candidate molecular markers for genetic breeding in DBS cattle.

Key words: Dabieshan (DBS) cattle; *PAX3* gene; growth traits; SNPs polymorphism

中国黄牛是世界牛品种资源宝库的重要组成部分,按照地理分布区域的不同,分为北方黄牛、中原黄牛和南方黄牛 3 大类^[1]。大别山牛是中原黄牛的典型代表,主要分布于安徽省的太湖、岳西、桐城、潜山、金寨、宿松等县和湖北省大别山西部的黄陂、大悟、麻城等部分地市。长期以来,大别山牛作为农业生产的主要畜力,形成了耐粗饲、抗病力强、肉质细腻、善爬坡的优良特点,但同时也具有个体小、生长慢等不足。近年来,随着分子生物学技术的发展,利用分子标记辅助选择技术对大别山牛进行选育具有重要的现实意义。

PAX 基因家族普遍存在于各种生物中,编码 128 个氨基酸成对结构域,在胚胎细胞的发育和分化过程中发挥着重要作用^[2]。*PAX3* 是 *PAX* 基因家族成员之一,是肌祖细胞生存、迁移和分化的必需因子^[3-4]。在成熟的体细胞中,*PAX3* 基因通过与 *cis* 活性因子结合调节 *Myf5* 基因的表达,从而参与骨骼肌发育^[4]。此外,*PAX3* 基因可以通过多种途径促进细胞自我更新,诱导前体细胞发生定向迁移,促进特定细胞系进行定向分化^[5]。在人和小鼠胚胎发育过程中,*PAX3* 基因在细胞迁移、分化和器官形成中发挥着重要作用,其变异会引起神经嵴细胞功能障碍,进而导致胚胎发育畸形^[6-8]。在禽脊柱发育过程中,*PAX3* 基因转录因子对胚胎形态发生和细胞分化具有调节作用^[9]。在哺乳动物中,*PAX3* 基因可以促进羊肌卫星细胞的增殖,抑制其分化^[10]。近年来有研究发现,*PAX3* 基因单核苷酸多态性

(SNPs)与中国牛早期生长性状显著相关^[11],说明其对牛早期生长发育具有重要作用,但是否会影响其成年后经济性状有待进一步研究。为此,本研究采用 PCR 和测序技术,探究 *PAX3* 基因 SNPs 位点与成年大别山牛群体生长性状的相关性,旨在为大别山牛的遗传选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

292 头体况健康、无亲缘关系、24~48 月龄的成年大别山母牛,由国家肉牛牦牛产业技术体系合肥综合试验站试验基地安徽省阜阳市颍上县牛哥牧业科技有限公司和国家肉牛核心育种场安庆市太湖县久鸿农业综合开发有限责任公司提供。

1.2 样品采集及体尺指标测定

采集试验牛黄豆大小的耳组织,放入加有体积分数 75%乙醇的离心管中,冷藏于冰盒中带回实验室备用。采样同时测量试验牛的体斜长、体高、十字部高、胸围、腹围、管围、腰角宽、坐骨端宽等生长性状数据。

1.3 引物设计与合成

经前期试验初步筛查,牛 *PAX3* 基因在试验群体中仅第 4 和第 6 内含子存在 SNPs 位点。以 NCBI 数据库中牛 *PAX3* 基因 (GenBank 登录号: NC_007300.6) 为模板,利用 Primer 5.0 软件设计针对第 4 和第 6 内含子的引物,交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列信息见表 1。

表 1 牛 *PAX3* 基因的引物信息
Table 1 Primer information for bovine *PAX3* gene

目标片段 Fragment	引物序列(5′-3′) Sequence of primer (5′-3′)	片段长度/bp Fragment length	退火温度/℃ T _m
内含子 4 Intron 4	F:GCGAAGAGGAGGAGACCGA;R:AGATTCCGAGGGACTGTGAG	349	65
内含子 6 Intron 6	F:CTATGTACTTGAACATACGTGC;R:AGGAAGAGTGCTTTGGTGTA	283	58

1.4 *PAX3* 基因第 4 内含子和第 6 内含子多态性位点检测

利用天根生化科技(北京)有限公司的血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(DP304)进行牛组织样基因组提取,将提取好的 DNA 统一稀释至 100 ng/ μ L,冷藏备用。

利用设计的引物进行 PCR 扩增,扩增体系为:2 $\times$ *Taq* Mix 12.5 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,DNA 模板 1 μ L,用 ddH₂O 补充至 25.0 μ L。PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 或 65 $^{\circ}$ C (具体温度依引物而定)退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 总延伸 5 min。扩增产物用 3.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,阳性样品送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果利用 DNASTar 和 Mutation Surveyor V4.0.8 软件进行分析。

1.5 数据统计与分析

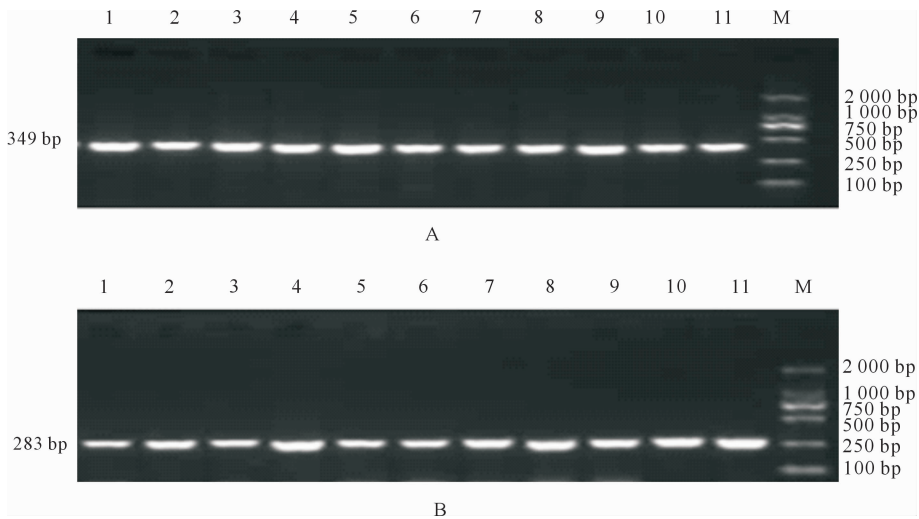
根据基因型分析结果,计算基因型频率和等位基因频率,利用 POPGENE 软件进行哈代-温伯格平衡检验^[12] 及多态信息含量(PIC)、遗传纯合度

(H_o)、遗传杂合度(H_e)和有效等位基因数(N_e)分析^[13-14];利用 Haploview 软件进行多态位点的连锁不平衡分析^[15],SHEsis 在线软件进行单倍型分析^[16];采用 SPSS 23.0 软件中的 GLM 模型^[17] 分析 SNPs 位点的基因型/单倍型组合与大别山牛群体生长性状的相关性,结果用“平均值 $\pm$ 标准误”表示,以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 为差异显著水平进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 大别山牛 *PAX3* 基因的 SNPs 位点

对大别山牛 *PAX3* 基因第 4 内含子和第 6 内含子区进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶检测结果(图 1)显示,目标片段大小与预期结果一致。利用 Mutation Surveyor V4.0.8 软件对测序结果进行分型,结果(图 2)显示,第 4 内含子区存在 3 个 SNPs 位点,分别为 g. 4718G>C、g. 4744T>C 和 g. 4757C>A;第 6 内含子区只存在 1 个 SNPs 位点,为 g. 78920C>T。



1~11. PCR 的扩增片段;M. D2000 Marker
1—11. Amplification products;M. Marker D2000

图 1 大别山牛 *PAX3* 基因第 4 内含子(A)和第 6 内含子(B)的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplification products of intron 4 (A) and intron 6 (B) in *PAX3* gene of DBS cattle

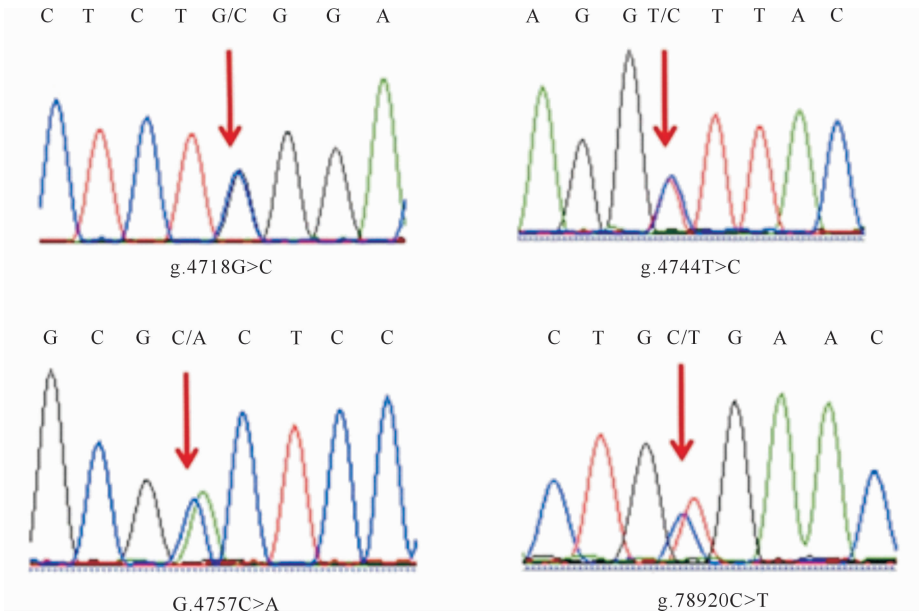


图 2 大别山牛 *PAX3* 基因 4 个 SNPs 位点图谱
Fig. 2 Maps of four SNPs sites of *PAX3* gene of DBS cattle

2.2 大别山牛 *PAX3* 基因 SNPs 位点的遗传参数

PAX3 基因各 SNPs 位点的基因频率和基因型频率分布如表 2 所示。在随机挑选的 292 头大别山牛群体中,*PAX3* 基因第 4 内含子区 g. 4718G>C 位点属于低度多态($PIC\leq 0.25$),且处于哈代-温伯格平衡状态($P>0.05$),等位基因 C 的频率远高于等位基因 G,CC 基因型为优势基因型;g. 4744T>C 位点属于中度多态($0.25<PIC\leq 0.50$),且处于哈

代-温伯格平衡状态($P>0.05$),等位基因 C 属于优势等位基因,TC 基因型为优势基因型;g. 4757C>A 位点属于中度多态($0.25<PIC\leq 0.50$),处于哈代-温伯格不平衡状态($P<0.05$),等位基因 C 属于优势等位基因,CC 基因型为优势基因型;g. 78920C>T 位点属于中度多态($0.25<PIC\leq 0.50$),处于哈代-温伯格平衡状态($P>0.05$),等位基因 C 属于优势等位基因,CT 基因型为优势基因型。

表 2 大别山牛群体 *PAX3* 基因 SNPs 的遗传参数
Table 2 Genetic parameters of SNPs in *PAX3* gene of DBS cattle

SNPs 位点 Loci	基因型频率 Genotypic frequency			等位基因频率 Allelic frequency		哈代-温伯格平衡 HWE		多样性参数 Diversity parameter			
	XX	XY	YY	X	Y	χ^2	P	H_o	H_e	N_e	PIC
g. 4718G>C	0.01	0.16	0.83	0.09	0.91	0.24	0.888	0.838	0.162	1.193	0.149
g. 4744T>C	0.13	0.44	0.42	0.35	0.65	0.26	0.880	0.542	0.458	1.844	0.353
g. 4757C>A	0.54	0.45	0.01	0.77	0.23	11.19	0.004	0.642	0.358	1.558	0.294
g. 78920C>T	0.40	0.47	0.13	0.64	0.36	0.04	0.980	0.537	0.463	1.864	0.356

注:对于 g. 4718G>C 位点而言,XX,XY,YY 分别代表 GG,GC,CC 基因型,X,Y 分别代表 G,C 等位基因,其他位点依此类推。 χ^2 . 卡方检验值; H_o . 遗传纯合度; H_e . 遗传杂合度; N_e . 有效等位基因数;PIC. 多态信息含量。
Note:For g. 4718G>C site,XX,XY and YY represent GG,GC and CC genotypes,respectively,X and Y represent G and C allele,and other sites follow this pattern. χ^2 represents Chi-square test value, H_o represents genetic homozygosity, H_e represents genetic heterozygosity, N_e represents effective number of alleles and PIC represents polymorphic information content.

2.3 大别山牛 *PAX3* 基因 SNPs 位点的连锁不平衡和单倍型分析

连锁不平衡和单倍型分析结果(表 3 和表 4)显示,4 个 SNPs 位点间无强连锁相关($r^2<0.33$),形成 13 种单倍型,其中频率大于 0.03 的单倍型有 6

个,Hap1 和 Hap2 频率最高,分别为 0.242 和 0.227。相关性分析结果显示,6 种单倍型形成的单倍型组合均与大别山牛群体的生长性状无显著相关性($P>0.05$)。

表 3 大别山牛 *PAX3* 基因 SNPs 位点的连锁不平衡分析

Table 3 Estimated values of linkage disequilibrium (LD) analysis between mutation sites in bovine <i>PAX3</i> gene					
SNPs 位点 SNPs loci	D'	r^2	SNPs 位点 SNPs loci	D'	r^2
SNP1-SNP2	0.776	0.033	SNP2-SNP3	0.848	0.124
SNP1-SNP3	0.379	0.043	SNP2-SNP4	0.452	0.068
SNP1-SNP4	0.424	0.023	SNP3-SNP4	0.360	0.028

注:SNP1、SNP2、SNP3 和 SNP4 分别代表 g. 4718G>C、g. 4744T>C、g. 4757C>A 和 g. 78920C>T;对于 SNP1-SNP2, D' 值和 r^2 值表示两位点间的连锁不平衡系数,其他组合依此类推。 $D'<1.0$ 表示两位点间发生过重组或突变, $r^2>0.33$ 表示两位点间强连锁不平衡。
Note:SNP1,SNP2,SNP3 and SNP4 represent g. 4718G>C,g. 4744T>C,g. 4757C>A and g. 78920C>T, respectively; For SNP1-SNP2, the values of D' and r^2 represent coefficient of LD between two sites,and others follow this pattern. $D'<1.0$ indicates there are recombination or mutation between sites,and $r^2>0.33$ indicates a strong LD between sites.

表 4 大别山牛 *PAX3* 基因 SNPs 位点的单倍型分析

Table 4 Haplotypes of <i>PAX3</i> gene and their frequencies in DBS cattle					
单倍型 Haplotype	g. 4718G>C	g. 4744T>C	g. 4757C>A	g. 78920C>T	频率 Frequency
Hap1	C	C	C	T	0.242
Hap2	C	T	C	C	0.227
Hap3	C	C	A	C	0.191
Hap4	C	C	C	C	0.143
Hap5	C	T	C	T	0.099
Hap6	G	C	A	T	0.034

注:不包括频率小于 0.03 的单倍型。
Note:Haplotype with frequency<0.03 was ignored in analysis.

2.4 大别山牛 *PAX3* 基因 SNPs 位点多态性与生长性状的相关性

PAX3 基因 SNPs 位点多态性与大别山牛群体生长性状的相关性分析结果(表 5)显示,4 个 SNPs 位点均与大别山牛群体部分生长性状显著($P<0.05$)或极显著相关($P<0.01$)。其中,g. 4718G>

C 位点与大别山牛的十字部高显著相关($P<0.05$),GG 基因型个体的十字部高显著优于 GC 和 CC 基因型个体($P<0.05$)。g. 4744T>C 位点与大别山牛的十字部高、腹围和腰角宽极显著相关($P<0.01$),TT 基因型个体的十字部高、腹围和腰角宽极显著优于 TC 和 CC 基因型个体($P<0.01$)。

表 5 大别山牛 *PAX3* 基因 SNPs 位点多态性与体尺性状的相关性分析

Table 5 Association of SNPs polymorphism of <i>PAX3</i> gene with growth traits of DBS cattle				
生长性状 Growth trait	g. 4718G>C			
	GG	GC	CC	P
体斜长/cm Body length	131.00±0.56	127.07±0.74	126.14±1.90	0.691
体高/cm Withers height	110.50±0.35	109.00±0.49	111.75±0.61	0.071
十字部高/cm Height at hip cross	120.60±0.79 a	110.15±0.29 b	110.11±0.59 b	0.041
胸围/cm Chest girth	159.00±1.27	151.59±0.68	147.61±1.51	0.219
腹围/cm Abdominal girth	172.37±1.41	167.59±1.57	168.44±1.52	0.235
管围/cm Shin circumference	17.23±0.14	17.72±0.21	17.08±0.25	0.361
腰角宽/cm Hip width	33.50±0.35	32.11±0.36	31.01±0.46	0.435
坐骨端宽/cm Hucklebone width	17.91±0.71	16.90±0.84	17.78±0.93	0.429
生长性状 Growth trait	g. 4744T>C			
	TT	TC	CC	P
体斜长/cm Body length	128.28±0.86	125.66±0.98	126.42±0.91	0.471
体高/cm Withers height	112.33±1.07	112.19±0.58	110.08±0.56	0.053
十字部高/cm Height at hip cross	115.18±0.93 A	109.32±0.44 B	109.28±0.47 B	0.001
胸围/cm Chest girth	152.00±0.93	149.73±1.10	145.76±1.77	0.080
腹围/cm Abdominal girth	177.08±1.46 A	168.45±1.49 B	163.53±1.55 B	0.001
管围/cm Shin circumference	17.28±0.67	17.07±0.78	17.36±0.74	0.576
腰角宽/cm Hip width	33.59±0.49 A	30.14±0.50 B	31.98±0.36 B	0.003
坐骨端宽/cm Hucklebone width	17.95±0.66	17.03±0.82	18.56±0.86	0.662

表 5(续) Continued Table 5

生长性状 Growth trait	g. 4757C>A			
	CC	CA	AA	P
体斜长/cm Body length	126.61±0.93	126.13±1.03	120.50±0.63	0.638
体高/cm Withers height	110.89±0.54	111.94±0.65	106.50±0.77	0.255
十字部高/cm Height at hip cross	110.66±0.68	109.75±0.42	110.50±0.21	0.676
胸围/cm Chest girth	148.21±1.68	148.66±1.03	142.50±0.77	0.825
腹围/cm Abdominal girth	169.51±1.52	165.24±1.62	162.00±0.42	0.165
管围/cm Shin circumference	17.24±0.78	17.24±0.71	15.50±0.70	0.376
腰角宽/cm Hip width	32.21±0.47 a	30.37±0.45 b	28.00±0.28 c	0.039
坐骨端宽/cm Hucklebone width	18.52±1.17	16.75±1.60	16.00±0.15	0.509

生长性状 Growth trait	g. 78920C>T			
	CC	CT	TT	P
体斜长/cm Body length	126.51±0.85	126.82±0.67	129.50±0.87	0.388
体高/cm Withers height	109.78±0.67	110.99±0.61	110.04±0.58	0.470
十字部高/cm Height at hip cross	110.16±0.51	109.07±0.57	111.44±0.83	0.355
胸围/cm Chest girth	147.57±1.04	149.80±1.11	150.67±0.97	0.303
腹围/cm Abdominal girth	158.78±1.53 A	169.56±1.60 B	170.96±1.67 B	0.006
管围/cm Shin circumference	16.86±0.18 a	17.19±0.65 ab	17.81±0.68 b	0.048
腰角宽/cm Hip width	31.58±0.44	30.47±0.46	32.22±0.23	0.275
坐骨端宽/cm Hucklebone width	16.98±0.75	16.80±0.23	18.00±0.15	0.573

注:同一 SNPs 位点同行数据后标不同小写字母表示差异显著($0.01 < P < 0.05$),标不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),相同字母或无字母表示差异不显著($P > 0.05$)。

Note: Different lowercase letters mean significant difference at same SNP loci ($0.01 < P < 0.05$), different uppercase letters mean extremely significant difference ($P < 0.01$), and no letters or same letters mean no difference ($P > 0.05$).

g. 4757C>A 位点与大别山牛的腰角宽显著相关($P < 0.05$),CC、CA 和 AA 基因型个体的腰角宽两两均差异显著($P < 0.05$),且 CC 基因型个体优于 CA 和 AA 基因型个体($P < 0.05$)。g. 78920C>T 位点与腹围极显著相关($P < 0.01$),与管围显著相关($P < 0.05$),TT 和 CT 基因型个体的腹围均值极显著优于 CC 基因型个体($P < 0.01$),TT 基因型个体的管围均值显著优于 CC 基因型个体($P < 0.05$)。

3 讨论与结论

近年来,随着分子生物学技术的发展,分子标记辅助育种技术(MAS)在生物育种中发挥着极其重要的作用,鉴定出一系列与生物表型性状相关的 DNA 分子标记^[18-19]。PAX 基因家族普遍存在于各种生物中,在肌肉生长发育过程中发挥重要的调控作用。PAX3 基因突变可造成黑素细胞合成和神经嵴发育异常,从而造成毛发皮肤低色素、虹膜异色以及颅面骨骼、牙齿及四肢等异常,最终表现为瓦登伯革氏综合症^[20-21]。在癌症研究中发现,PAX3 基因参与调控癌细胞的增值、分化和迁移,沉默 PAX3 基因能显著抑制肿瘤生长,降低肿瘤微血管密度,已经成为研究肿瘤发生发展的重要标记基因之一^[22]。在小鼠发育过程中,PAX3 基因通过与 Aryl 碳氮化合物(AHR)互作抑制环境对小鼠颅面发育的影

响^[23],通过 mTORC1 通路作用于肌卫星细胞而使其对外界环境刺激产生防御^[24],通过调控肌细胞的增殖、分化、迁移等影响小鼠的体质量等表型性状^[25]。此外,有研究发现,PAX3 基因 g. 580T>G、g. 4617A>C 和 g. 79018Ins/del G 位点与南阳牛、秦川牛、鲁西牛和郟县红牛部分体尺性状显著相关^[11]。因此研究 PAX3 基因遗传变异对我国地方品种大别山牛生长发育的影响至关重要。

牛 PAX3 基因定位于 2 号染色体体质量相关 QTL 区域^[26],其编码蛋白质分布于细胞核中,对细胞迁移、组织器官的分化和形成起着重要的调控作用。本研究采用 PCR 和测序技术首次对 292 头大别山牛 PAX3 基因进行多态性分析,结果发现 4 个 SNPs 位点:g. 4718G>C、g. 4744T>C、g. 4757C>A 和 g. 78920C>T。在 g. 4718G>C、g. 4744T>C 和 g. 78920C>T 位点,大别山牛群体均处于哈代-温伯格平衡状态($P > 0.05$),说明群体遗传未受到人工干预或未发生遗传突变,选择压力较小。在 g. 4757C>A 位点,大别山牛群体处于哈代-温伯格不平衡状态($P < 0.05$),可能是试验所选大别山牛群体数量较少或人工选育对此位点的选择压力较大^[27-28]。遗传多样性分析发现,g. 4744T>C、g. 4757C>A 和 g. 78920C>T 位点属于中度多态($0.25 < PIC \leq 0.50$),g. 4718G>C 位点属于低度多

态($PIC \leq 0.25$),说明大别山牛群体在 g. 4718G>C 位点遗传多样性较低,在其他 3 个位点遗传多样性丰富。

本研究发现 *PAX3* 基因 SNPs 位点与大别山牛群体部分体尺性状具有显著或极显著相关性,这与 Xu 等^[11]的研究结果一致,进一步证实 *PAX3* 基因对我国地方品种牛的生长发育具有重要影响。然而,本研究中的 SNPs 位点与 Xu 等^[11]研究中的 SNPs(g. 580T>G 和 g. 79018Ins/del G)均位于 *PAX3* 基因内含子区,不参与转录过程,遗传变异不会引起氨基酸改变,这可能与基因内含子区可以作为转录调控的增强子或抑制子影响转录效率,通过调节核小体位置控制 DNA 结合而调节转录过程有关^[29-30],从而发挥其生物学功能。因此,本研究结果可以作为 *PAX3* 基因影响大别山牛生长发育的重要证据之一。

[参考文献]

[1] 邱 怀. 中国牛品种志 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1986.

Qiu H. The Chinese cattle breeds [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press,1986.

[2] Jostes B, Walther C, Gruss P. The murine paired box gene, *PAX7*, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system [J]. Mechanisms of Development,1990,33(1):27-37.

[3] Magli A, Schnettler E, Rinaldi F, et al. Functional dissection of *PAX3* in paraxial mesoderm development and myogenesis [J]. Stem Cells,2013,31(1):59-70.

[4] Bajard L, Relaix F, Lagha M, et al. A novel genetic hierarchy functions during hyPAXial myogenesis: *PAX3* directly activates *Myf5* in muscle progenitor cells in the limb [J]. Gene Development,2006,20(17):2450-2464.

[5] Boudjadi S, Chatterjee B, Sun W, et al. The expression and function of *PAX3* in development and disease [J]. Gene,2018,666:145-157.

[6] Lagha M, Mayeuf-Louchart A, Chang T, et al. Itm2a is a *PAX3* target gene, expressed at sites of skeletal muscle formation *in vivo* [J]. PLoS One,2013,8(5):e63143.

[7] Bae C J, Park B Y, Lee Y H, et al. Identification of *PAX3* and *Zic1* targets in the developing neural crest [J]. Development Biology,2014,386(2):473-483.

[8] Zhang J, Zhang L, Liu X, et al. Expression of *Cx43* and *PAX3* proteins in the human placental villi and decidua during early pregnancy [J]. Bio-medical Material and Engineering,2014,24(6):3841-3847.

[9] Lin J, Wang C, Yang C, et al. *PAX3* and *PAX7* interact reciprocally and regulate the expression of cadherin-7 through indu-

cing neuron differentiation in the developing chicken spinal cord [J]. Journal of Comparative Neurology,2016,524(5):940-962.

[10] Ling Y H, Sui M H, Zheng Q, et al. miR-27b regulates myogenic proliferation and differentiation by targeting *PAX3* in goat [J]. Scientific Reports,2018,8(1):3909.

[11] Xu Y, Cai H, Zhou Y, et al. SNP and haplotype analysis of paired box 3 (*PAX3*) gene provide evidence for association with growth traits in Chinese cattle [J]. Molecular Biology,2014,41(7):4295-4303.

[12] Yeh F C, Yang R, Boyle T B J, et al. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis [M]. Canada: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta,1997.

[13] Nei M, Roychoudhury A K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance [J]. Genetics,1974,76:379-390.

[14] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics,1980,32:314-331.

[15] Barrett J C, Fry B, Maller J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps [J]. Bioinformatics,2005,21:263-265.

[16] Shi Y Y, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci [J]. Cell Research,2005,15:97-98.

[17] Wu S, Ning Y, Raza S H A, et al. Genetic variants and haplotype combination in the bovine *CRTC3* affected conformation traits in two Chinese native cattle breeds (*Bos Taurus*) [J]. Genomics,2019,111(6):1736-1744.

[18] Goddard M E, Hayes B J. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes [J]. Nature Reviews Genetics,2009,10(6):381-391.

[19] Hayes B, Goddard M. Genome-wide association and genomic selection in animal breeding [J]. Genome,2010,53(11):876-883.

[20] 李 进, 关 静, 张 静, 等. *PAX3* 基因突变相关 Waardenburg 综合征家系及散发患者基因型与表型特征分析 [J]. 中华耳科学杂志,2020,18(2):232-236.

Li J, Guan J, Zhang J, et al. Genotypical and phenotypical characteristics of *PAX3* mutations associated Waardenburg syndrome in families and sporadic patients [J]. Chinese Journal of Otology,2020,18(2):232-236.

[21] Li S, Guo M, Ruan B, et al. A novel *PAX3* mutation in a Chinese family with Waardenburg syndrome type 1 [J]. Genetic Testing Molecular Biomarkers,2020,24(5):249-255.

[22] Lu W L, Hu Y Y, Li Z N, et al. *PAX3* silencing suppresses gastric cancer proliferation and angiogenesis via MET/PI3K signaling [J]. Neoplasia,2020,67(5):304-311.

(3):190-207.

[19] Snyder E, Soundararajan R, Sharma M, et al. Compound heterozygosity for Y box proteins causes sterility due to loss of translational repression [J]. PLoS Genet, 2015, 11 (12): e1005690-e1005711.

[20] Matthew J S, Morayma M T, Kate V K, et al. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction [J]. Elife, 2016, 5(1): e19276-e19298.

[21] Nixon B, de Iuliis G N, Hart H M, et al. Proteomic profiling of mouse epididymosomes reveals their contributions to post-testicular sperm maturation [J]. Mol Cell Proteomics, 2019, 18 (Suppl. 1): S91-S108.

[22] Sullivan R, Mieusset R. The human epididymis: its function in sperm maturation [J]. Hum Reprod Update, 2016, 22 (5): 574-587.

[23] Sullivan R, Saez F, Girouard J, et al. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract [J]. Blood Cells Mol Dis, 2005, 35(1): 1-10.

[24] Adam R, Michael A E, Barry D S. SED1/MFG-E8: a bi-motif protein that orchestrates diverse cellular interactions [J]. J Cell Biochem, 2009, 106(6): 957-966.

[25] Ensslin M A, Shur B D. Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding [J]. Cell, 2003, 114(4): 405-417.

[26] Wong C W, Lam K K W, Lee C L, et al. The roles of protein disulphide isomerase family A, member 3 (ERp57) and surface thiol/disulphide exchange in human spermatozoa-zona pellucida binding [J]. Hum Reprod, 2017, 32(4): 733-742.

[27] Zhao X J, Tang R Z, Wang M L, et al. Distribution of PDIA3 transcript and protein in rat testis and sperm cells [J]. Reprod Domest Anim, 2013, 48(1): 59-63.

[28] Vella L J, Scicluna B J, Cheng L, et al. A rigorous method to enrich for exosomes from brain tissue [J]. J Extracell Vesicles, 2017, 6(1): 1348885-1348897.

[29] Kumar P G, Aslam K M, Haseeb Z, et al. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 5335-5344.

[30] Doyle L M, Wang M Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis [J]. Cells, 2019, 8(7): 727-750.

(上接第 7 页)

[23] Zalc A, Rattenbach R, Aurade F, et al. *Pax3* and *Pax7* play essential safeguard functions against environmental stress-induced birth defects [J]. Developmental Cell, 2015, 33(1): 56-66.

[24] Der Vartanian A, Quetin M, Michineau S, et al. *PAX3* confers functional heterogeneity in skeletal muscle stem cell responses to environmental stress [J]. Cell Stem Cell, 2019, 24(5): 958-973.

[25] Buckingham M, Relaix F. The role of *Pax* genes in the development of tissues and organs: *Pax3* and *Pax7* regulate muscle progenitor cell functions [J]. Annual Review of Cell Developmental Biology, 2007, 23: 645-673.

[26] McClure M, Morsci N, Schnabel R, et al. A genome scan for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle [J]. Animal Genetics, 2010, 41(6): 597-607.

[27] 姬秋梅, 唐懿挺, 张成福, 等. 西藏牦牛 mtDNA *cytb* 基因的序列多态性及其系统进化分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43 (11): 1723-1732.

Ji Q M, Tang Y T, Zhang C F, et al. Genetic diversity and evolution relationship of Tibet yaks inferred from mtDNA *cytb* [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2012, 43 (11): 1723-1732.

[28] 柴志欣, 罗晓林, 赵尚娟, 等. 西藏牦牛 *ADD1* 基因第 2 外显子的 PCR-SSCP 检测及序列分析 [J]. 生物技术通报, 2012, 1 (1): 124-129.

Chai Z X, Luo X L, Zhang S J, et al. PCR-SSCP detection and sequence analysis on exon2 of *ADD1* gene in Tibetan yak [J]. Biotechnology Bulletin, 2012, 1(1): 124-129.

[29] Greenwood T A, Kelsoe J R. Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene [J]. Genomics, 2003, 82(5): 511-520.

[30] Le H H, Nott A, Moore M J. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression [J]. Trends in Biochemical Science, 2003, 28(4): 215-220.