固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1 基因多态性与育肥性状的关系

滑留帅[1],陈 宏[1,2],杨晓冰[1],杨 奇[3],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 生物技术研究所,江苏 徐州 210029;3 宁夏回族自治区畜牧工作站,宁夏 银川 756000)

[摘 要] 为了分析固原本地黄牛及其利木赞牛杂交群体(简称利杂群体)*Pit*-1 基因的多态性与育肥性状的关系,为固原本地黄牛下一步的杂交改良提供理论基础,利用 PCR-RFLP 技术研究了固原本地黄牛及其利杂群体共 178 个个体的 *Pit*-1 基因多态性,并分析了其与育肥个体育肥性状的相关性。结果表明,451 bp 的 PCR 产物被限制性内切酶 *Hin*f Ⅰ 消化后表现出多态性,固原本地黄牛及其利杂群体在该位点均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,等位基因 A/B 的频率分别为 0.303 9/0.696 1 和 0.161 4/0.838 6。与部分育肥性状的相关分析表明,在育肥的初期阶段,BB 型和 AB 型个体的精料料肉比均显著低于 AA 型个体($P<0.05$);7 月龄育肥牛 BB 型个体的胸深显著低于 AA 型,而胸宽显著高于 AA 型($P<0.05$);育肥牛 6~12 月龄体长增长量也表现出 BB 型个体优于 AB 型的趋势($P<0.05$)。初步认为,BB 基因型与优良的育肥性能显著相关,对 B 等位基因的选择有利于优良性状的改良。

[关键词] 固原本地黄牛;利木赞牛杂交群体;*Pit*-1 基因;PCR-RFLP;育肥性状

[中图分类号] S823.8^{+}12 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)12-0001-05

Association of polymorphism of *Pit*-1 gene with fattening traits in Guyuan local cattle and crossbreed of Limousin×local cattle

HUA Liu-shuai[1], CHEN Hong[1,2], YANG Xiao-bing[1], YANG Qi[3], LAN Xian-yong[1]

(1 *College of Animal Sciences and Technology, Northwest A & F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*; 2 *Institute of Biotechnology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu* 210029, *China*; 3 *Animal Husbandry Work Station in Ningxia, Yinchuan, Ningxia* 756000, *China*)

Abstract: PCR-RFLP was applied to analyze the polymorphisms of *Pit*-1 gene in 178 Guyuan local cattle and crossbreed of Limosin×local cattle, and then the association with fattening traits had been analyzed. The results showed that 451 bp PCR products digested with *Hin*f Ⅰ demonstrated polymorphisms in Guyuan local cattle and crossbreed of Limosin×local cattle which were all at Hardy-Weinberg equilibrium, and the frequencies of allele A/B were 0.303 9/0.696 1 and 0.161 4/0.838 6, respectively. The association of polymorphisms of *Pit*-1 gene with some fattening traits showed that the individuals with genotype BB and AB had lower concentrates to gain ratio in the first stage of the fattening than the individuals with genotype AA ($P<0.05$); the individuals with genotype BB had bigger chest width and smaller chest depth than the individuals with genotype AB ($P<0.05$), the individuals with genotype BB had better tendency in

* [收稿日期] 2006-11-06
[基金项目] 国家"863"高技术研究与发展计划项目(2006AA10Z197);宁夏宁南山区黄牛改良工程项目;西北农林科技大学拔尖人才支持计划项目
[作者简介] 滑留帅(1982-),男,河南偃师人,在读硕士,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。
[通讯作者] 陈 宏(1955-),男,陕西西安人,教授,博士生导师,主要从事分子生物技术与动物遗传育种研究。
E-mail:chenhong1212@263.net。

body length increment in 6－12 months than the individuals with genotype AB ($P<0.05$). So the genotype BB was significantly associated with the fine fattening performance and the selection of the allele B was better for the trait improvement.

Key words: Guyuan local cattle; crossbreed of Limousin×local cattle; *Pit*-1 gene; PCR-RFLP; fattening trait

固原市位于宁夏回族自治区南部山区，靠近六盘山脉，是宁夏历史悠久的肉牛基地。20 世纪 70 年代以前，固原市的本地牛被当地农民俗称为“爬山虎”，身材矮小，生长缓慢，属于在山区役用的小型牛。由于固原市临近陕西并与甘肃接壤，70 年代以后，当地农民在养殖过程中，引进秦川牛对当地牛进行改良，或者直接引进秦川牛基础母牛，使得本地的“爬山虎”类型牛已经逐渐消失，绝大多数基础母牛都有很高的秦川牛血统，体型外貌和生产性能也更接近秦川牛，这样的群体构成了目前固原本地黄牛的主体。2000 年以后，固原市推行退耕还林还草政策，并将草畜产业作为第一支柱产业，开始大力推广利用木赞牛对当地牛的杂交改良，改传统的放牧兼舍饲饲养模式为纯舍饲养殖。肉牛在舍饲条件下的育肥性能直接影响养殖的效益，在选种时应将育肥性能作为重要的选择指标，加大选择力度，但是由于育肥指标不容易测得，所以遗传改良研究进展缓慢。

垂体特异性转录因子 1(pituitary-specific transcription factor 1，*Pit*-1)基因又称 *POU1F1* 基因，是 POU 结构域因子家族的一员，POU 结构域因子家族是一类转录调节因子，其共同特点是具有高度保守的 DNA 结合结构域(称为 POU 结构域)[1]。牛的 *Pit*-1 基因位于染色体 $1q^{21-22}$，由 6 个外显子和 5 个内含子组成[2]。*Pit*-1 对哺乳动物垂体前叶发育的作用具有重要意义，主要正向调控促甲状腺激素 β 亚单位(*TSHβ*)、生长激素(*GH*)和催乳素(*PRL*)基因的表达。由于促甲状腺激素、生长激素对哺乳动物生长发育、新陈代谢具有重要的调控作用，且能提高生长速度、降低脂肪沉积等；而催乳素对子宫环境、胚胎发育、产后泌乳等有影响，对产仔数、产活仔数、断奶重和断奶仔畜数等繁殖性状发挥效用，所以 *Pit*-1 基因被认为是研究生长发育、产奶、产羔等重要经济性状的候选分子标记基因之一[3-5]，同时推测 *Pit*-1 基因可能潜在影响动物的育肥性能。

为了分析固原本地黄牛及其利木赞牛杂交群体(简称利杂群体)*Pit*-1 基因多态性与育肥性状的关系，为固原本地黄牛下一步的杂交改良提供理论基础，本试验研究了 178 头固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1-*Hin*fⅠ基因座的多态性，并抽取了 24 个个体进行育肥性能测定，分析了 *Pit*-1-*Hin*fⅠ基因座多态性与育肥性状的关系，现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 *试验材料* 从固原市随机抽取 51 头本地黄牛和 127 头利木赞牛与本地黄牛杂交的子代(简称利杂牛)，颈静脉采血，ACD 抗凝，－80 ℃保存。然后从中选取 18 月龄和 6 月龄利杂牛公牛各 6 头，18 月龄和 6 月龄本地黄牛公牛各 6 头，共计 24 头进行育肥性能测定。育肥于 2005-11～2006-05 在固原市隆德县草原站进行，采用全混日粮模式，自由饮水，记录每头牛的日采食量，每月测量体重、体尺指标。

1.1.2 *主要试剂* 蛋白酶 K、*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Hin*fⅠ等购自 MBI(Fermantas)和上海生物工程有限公司。

1.2 固原本地黄牛及其利杂群体基因组 DNA 的提取

血样基因组 DNA 的提取采取酚氯仿法[6]。

1.3 固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1 基因的 PCR 扩增

引物序列参考文献[7]。上游序列：5′-AAACCATCATCTCCCTTCTT-3′；下游序列：5′-AATGTACAATGTGCCTTCTGAG-3′。序列由上海生物工程有限公司合成。PCR 反应体系为 25 μL：10×Buffer 2.5 μL，$MgCl_2$ (25 mmol/L) 2.0 μL，dNTPs(2.5 mmol/L)2.0 μL，*Taq* DNA 聚合酶(2 U/μL)0.5 μL，上、下游引物(10 pmol/μL)各 0.4 μL，模板 DNA(50 ng/μL)1.5 μL，加三蒸水至 25 μL。PCR 反应程序为：95 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，53.5 ℃复性 1 min，72 ℃延伸 30 s，34 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min。

1.4 固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1 基因的 PCR-RFLP 分析

酶切反应体系内含 10×缓冲液 R(含 BSA)2

μL，*Hin*fⅠ(10 U/μL)0.7 μL，PCR 产物 10 μL，补三蒸水至 20 μL，经瞬时离心后置于 37 ℃恒温水浴摇床中消化过夜，消化后 PCR 产物，用 4 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测、成像。

1.5 数据分析

基因型与基因频率、适合性 χ^2 检验均利用 POPGENE 软件完成。与生产数据的相关分析采用最小二乘线性模型，不同育肥阶段的方差分析模型为：

$$Y=\mu+\text{breed}+\text{marker}+e$$

式中：Y 为个体表型的记录值，μ 为群体平均值，breed 为品种效应，marker 为标记基因型效应，e 为随机误差。调用 SPSS 软件(13.0)的 GLM 程序，完成统计分析。

2 结果与分析

2.1 固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1 基因的 PCR-RFLP 分析

固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1 基因的 PCR 产物片段长度为 451 bp (图 1)，用 *Hin*fⅠ限制性内切酶消化后，表现出 3 种基因型(图 2)，AA 型 1 条带，长度为 451 bp；BB 型 2 条带，长度分别为 244 和 207 bp；AB 型 3 条带，长度分别为 451，244 和 207 bp。

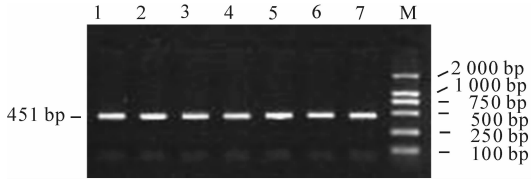

图 1 固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1 基因 PCR 产物的电泳结果

M. Marker DL2000；1～4. 本地黄牛群体不同个体；5～7. 利杂群体不同个体

Fig. 1 Electrophoresis of the PCR products of *Pit*-1 gene in Guyuan local cattle and crossbreed of Limousin×local cattle

M. Marker DL2000；1－4. Different individuals in Guyuan local cattle；5－7. Different individuals in crossbreed of Limousin×local cattle

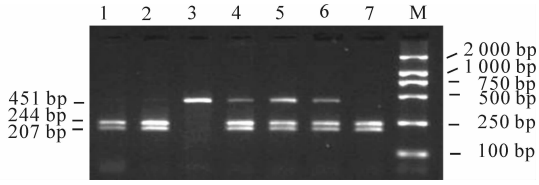

图 2 固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1-*Hin*fⅠ基因座的酶切电泳结果

M. Marker DL2000；3. AA 型；1，2，7. BB 型；4～6. AB 型

Fig. 2 Electrophoresis patterns of the *Pit*-1-*Hin*fⅠ loci in Guyuan local cattle and crossbreed of Limousin×local cattle

M. Marker DL2000；3. Genotype AA；1，2，7. Genotype BB；4－6. Genotype AB

2.2 固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1-*Hin*fⅠ基因座的遗传多态性

固原本地黄牛及其利杂群体在 *Pit*-1-*Hin*fⅠ基因座检测到多态性，且均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态(表 1)，等位基因 A/B 的频率分别为 0.303 9/0.696 1 和 0.161 4/0.838 6，同时本地黄牛在该位点上的位点杂合度、多态信息含量、有效等位基因数均高于利杂群体。

表 1 固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1-*Hin*fⅠ基因座的遗传多态性指标

Table 1 Genetic diversity of *Pit*-1-*Hin*fⅠ loci in Guyuan local cattle and crossbreed of Limousin×local cattle

指标 Index	本地黄牛群体 Local cattle	利杂群体 Crossbreed of Limousin×local cattle
基因型频率($P_{AA}/P_{AB}/P_{BB}$)Genotype frequency	0.098 0/0.411 8/0.490 2	0.007 9/0.307 1/0.685 0
基因频率(P_A/P_B)Gene frequency	0.303 9/0.696 1	0.161 4/0.838 6
位点纯合度 Homozygosity	0.576 9	0.729 3
位点杂合度 Heterozygosity	0.423 1	0.270 7
多态信息含量(PIC)Polymorphism information content	0.333 6	0.234 1
有效等位基因数(Ne)Effective number of alleles	1.733 4	1.371 2
哈代－温伯格平衡检验 Hardy-Weinberg equilibrium test	平衡 Equilibrium	平衡 Equilibrium

2.3 固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1-*Hin*fⅠ基因座不同基因型与育肥性状的相关分析

考虑品种效应、标记基因型效应及其互作效应，在不同年龄阶段对其育肥性状进行两因素方差分析，结果见表 2。由表 2 可知，在育肥第 1 阶段，BB 型和 AB 型个体的精料料肉比均显著低于 AA 型个

体($P<0.05$),7 月龄育肥牛 BB 型个体的胸深显著低于 AA 型个体,而胸宽显著高于 AA 型个体($P<0.05$);育肥牛 6～12 月龄体长增长量也表现出 BB 型个体优于 AB 型的趋势($P<0.05$)。18 月龄组和 6 月龄组具有相同的趋势。

表 2　固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1-*Hin*fⅠ基因座不同基因型间最小二乘均值的差异显著性检验

Fig. 2　Least square analysis between *Pit*-1-*Hin*fⅠ genotypes in Guyuan local cattle and crossbreed of Limousin×local cattle

基因型 Genotype	精料料肉比 Concentrates to gain ratio		6～12 月龄总增重/kg Weight gain in the 6－12 months
	育肥第 1 阶段 The first stage of the fattening	育肥全期 The fattening	
BB	4.58±0.26 a	3.971±0.169	129.63±4.84
AB	4.86±0.48 a	4.187±0.292	120.25±8.39
AA	7.66±1.07 b		
基因型 Genotype	**6～12 月龄体长增长量/cm Body length increment in 6－12 months**	**7 月龄胸深/cm Chest depth in 7 months**	**7 月龄胸宽/cm Chest width in7 months**
BB	22.75±1.25 a	40.13±1.43 a	38.56±0.76 a
AB	11.00±2.17 b	52.25±2.47 b	31.00±1.30 b

注:同一列数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different small letters in the same column indicate significant difference at the level of $P<0.05$.

3　讨　论

3.1　固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1-*Hin*fⅠ基因座的遗传多态性分析

刘波等[8]研究认为,利木赞牛与秦川牛杂交后代中 B 等位基因的频率为 0.819,大于秦川牛群体(0.768),同时秦川牛群体在该位点上的多态信息含量高于利木赞牛杂交群体。本研究分析了固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1-*Hin*fⅠ基因座的多态性,发现 B 等位基因为优势等位基因,相应的 BB 基因型为优势基因型,同时用利木赞牛杂交改良提高了本地黄牛该位点上 B 等位基因的频率,与利木赞牛改良秦川牛的趋势一致。固原本地黄牛及其利杂群体在该位点上均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,说明人工选育对该位点的选择压力不大,因此,在后期的杂交改良工作中,应该加强肉牛育肥性能的选择,加大育肥性能较差肉牛的淘汰力度,以提高固原本地黄牛整体的育肥性能。同时,本地黄牛在该位点上的位点杂合度、多态信息含量、有效等位基因数均高于利杂牛,说明本地黄牛的遗传资源相对丰富,也从侧面说明需要进一步加强人工选择的强度。

3.2　固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1 基因多态性与育肥性能的关系

Frisch 等[9]发现,人 *Pit*-1 基因 172 bp 处单核苷酸突变使精氨酸变成了终止密码,*Pit*-1 蛋白提前转录终止,导致 GH、PRL、TSHβ 缺乏,垂体前叶发育不良,幼年时期甲状腺机能减退等症状,注射甲状腺素和生长激素能获得较好的治疗效果。这表明 *Pit*-1 在调节这些基因的表达中具有重要作用。*Pit*-1 的 POU 区域突变导致垂体前叶发育不全、垂体细胞(催乳素细胞、生长激素细胞和促甲状腺素细胞)明显缺少,表明 *Pit*-1 在这 3 类细胞的发生学上有重要意义[10]。Joundy 等[11]研究发现,*Pit*-1 基因和 *GH* 基因的表达对牛早期发育有影响,认为 *Pit*-1 基因不仅可作为牛生长性状的重要候选基因之一,而且也可作为其他物种的候选基因。

Yu 等[12]研究发现,猪 *Pit*-1-*Msp*Ⅰ的 CC 基因型个体初生体重较 DD 基因型高 0.12 kg,且背膘厚等相关测量指标均高于 DD 基因型个体;滕勇等[13]分析了猪的 *Pit*-1-*NIa*Ⅲ位点,发现国外优良瘦肉型猪群的等位基因 H 频率较高,这与 Yu 等[12]对长白、杜洛克等国外瘦肉型猪种的 *NIa*Ⅲ酶切多态性分析结论相符。推断等位基因 H 可能直接影响猪瘦肉率、生长速度等性状,发挥正效应,但也可能与某个真正影响上述性状的基因紧密连锁,发挥互作效应。滑留帅等[14]研究表明,关中奶山羊和贵州黑山羊在 *Pit*-1-*Hin*fⅠ基因座上不存在多态性;而利用 PCR-SSCP 揭示该基因位点仍存在多态性,其中关中奶山羊存在 A/B/C 3 种构型,贵州黑山羊仅存在 A 型一种。禽类如火鸡和鸡 *Pit*-1 基因由 7 个外显子和 6 个内含子构成,姜润深等[15-16]比较了家禽 *Pit*-1 基因的结构与哺乳动物的差异,认为 *Pit*-1 基因可作为家禽生长、发育、繁殖等重要性状的候选基因。Renaville 等[5]对意大利荷斯坦公牛的研究结果表明,*Pit*-1 基因的 B 等位基因对乳产量、乳蛋白产量和体尺指标有利。Di 等[3]对肉牛 *Pit*-1 基因的

第 6 外显子的 *Hin*fⅠ酶切分析表明，BB 基因型与腰肉厚存在显著相关。Aduli 等[17]将日本牛与牛胸宽的一个 QTL 定位于牛 BTA1 的 91 cM 处，该位点在 BMS119 和 BMS019 标记之间，并且 *Pit*-1 基因位于该 QTL 所在的区域内。所以牛的 *Pit*-1 基因可以作为牛胸宽的一个 QTL 候选基因。本研究结果表明，7 月龄育肥牛 BB 型个体的胸深显著低于 AA 型，而胸宽显著高于 AA 型，这种体型在生产中更接近于优秀肉牛的体型，与 Aduli 等[17]的研究结果一致。刘波等[8]研究了秦川牛及其杂种牛群体 *Pit*-1 基因多态性及其与体重、体尺等生长性状指标之间的相关性，发现 AB、BB 基因型个体在胸围、十字部高指标上显著高于 AA 型个体，初步认为 B 等位基因与优良生产性能相关。本研究结果表明，固原本地黄牛及其利杂群体 BB 型个体，6～12 月龄体长增长量显著高于 AA 型个体（$P<0.05$），同时在育肥的初期阶段，BB 型和 AB 型个体较 AA 型具有更高的精料饲料报酬（$P<0.05$），据此认为位于固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1-*Hin*fⅠ基因座的 B 等位基因对育肥性能有利。

本试验中，固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit*-1-*Hin*fⅠ基因座的 BB 基因型与优良生产性能显著相关，对 B 等位基因的选择有利于育肥性状的改良。同时，*Pit*-1-*Hin*fⅠ基因座 B 等位基因的频率可作为利木赞牛杂交改良效果的一个衡量指标，试验中利杂群体 *Pit*-1-*Hin*fⅠ基因座 B 等位基因的频率高于本地黄牛群体，说明用利木赞牛的杂交改良在育肥性能上具有正向作用，可以继续加强这个方向的改良工作。

[参考文献]

[1] 杨歧生，吴　敏. POU 同源域蛋白的结构及发育中的功能[J]. 生物化学与生物物理进展，1999，26(2)：114-117.

[2] Woollard J，Tuggle C K，Ponce F A，et al. Rapid communication：Localization of *POU*1*F*1 to bovine，ovine，and caprine $1q^{21-22}$[J]. Journal of Animal Science，2000，78：242-243.

[3] Di Stasio L，Saratore S，Albera A. Lack of association of *GH*1 and *POU*1*F*1 gene variants with meat production traits in Piemontese cattle[J]. Animal Genetics，2002，33：61-64.

[4] Tu T P，Sun S H，Wahls S，et al. Cloning of the full length *Pit*1 (*POU*1*F*1) cDNA and a novel alternative *Pit*1 transcript，and functional studies of their encoded proteins[J]. Animal Biotechnology，2001，12(1)：1-19.

[5] Renaville R，Gengler N，Vrech E，et al. *Pit*-1 gene polymorphism，milk yield，and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls[J]. Journal Dairy Science，1997，80：3431-3438.

[6] Chen H，Leibenguth F. Studies on multilocus fingerprints，RAPD markers and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*Carassius auratus gibelio*)[J]. Biochemical Genetics，1995，33：297-306.

[7] Woollard J，Schmitz C B，Freeman A E，et al. Rapid communication，*Hin*fⅠ polymorphism at the Bovine *Pit*-1 locus[J]. Journal of Animal Science，1994，72：32-67.

[8] 刘　波，陈　宏，蓝贤勇，等. 秦川牛及其杂种牛 *POU*1*F*1 基因多态与生长性能相关性[J]. 中国农业科学，2005，38(12)：2520-2525.

[9] Frisch H，Kim C，Hausler G，et al. Combined pituitary hormone deficiency and pituitary hypoplasia due to a mutation of the *Pit*-1 gene[J]. Clin Endocrinol (Oxf)，2000，52：661-665.

[10] Roux M，Bartke A，Dumont F，et al. Immunohistological study of the anterior Pituitary gland-pars distalis and pars intermedia-in dwarf mice[J]. Cell Tissue Res，1982，223：413-420.

[11] Joundy E M，Lechniak D，Petrik J，et al. Expression of growth hormone and its transcription factor，*Pit*-1，in early bovine development[J]. Molecular Reproduction and Development，2003，64：275-283.

[12] Yu T P，Schmitz C B，Rothschild M F，et al. Expression pattern，genomic cloning and RFLP analyses of the swine *Pit*-1 gene[J]. Animal Genetics，1994，25(4)：229-233.

[13] 滕　勇，经荣斌，宋成义. 猪 *POU*1*F*1 基因部分序列变异和同源性分析[J]. 遗传，2004，26：815-821.

[14] 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[J]. Animal Biotechnology Bulletin，2006，10(1)：519-521.

[15] 姜润深，杨　宁. 家禽垂体特异转录因子 *POU*1*F*1 研究进展[J]. 遗传，2004，26(6)：957-961.

[16] Jiang R，Li J，Qu L，et al. A new single nucleotide polymorphism in the chicken pituitary-specific transcription factor (*POU*1*F*1) gene associated with growth rate[J]. Anim Genet，2004，35：344-346.

[17] Aduli Enoch Othniel MALAU-ADULI，Tomomi N，Takatoshi K，et al. Mapping the quantitative trait loci (QTL) for body shape and conformation measurements on BTA1 in Japanese Black cattle[J]. Animal Science Journal，2005，26：19-27.