

牛 *GPR54* 基因 C-816T/T-754C 品种间分布 及其与早熟性的关联

周梅¹, 王学故¹, 陈宏权^{1,2*}, 王扬¹, 邓丹妹¹, 胡利影¹, 马帮军¹, 王桂云¹, 张翼鹏¹

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室, 合肥 230036)

摘要: *GPR54* 基因是牛早熟性状的重要候选基因。以 42 头本地黄牛、44 头西门塔尔牛及其 116 头杂交育种群等为试验群体, 分析牛 *GPR54* 基因 5'调控区 C-816T/T-754C 在不同牛群体中的分布、启动子效率及其与牛早熟性状的关联性。提取牛耳组织或血液基因组后, 通过 PCR 产物测序鉴别 SNP 位点, 双荧光素酶报告基因验证其 SNP 位点对启动子效率的影响。结果表明, 在 *GPR54* 基因 CDS 上游 5'调控区检测到 T-754C 和 C-816T 2 个 SNP 位点; 西门塔尔牛和安徽地方黄牛分别只有 1 种基因型, 即 CCTT 和 TTCC, 单倍型存在连锁不平衡。报告基因验证 2 种单倍型的启动子有明显差异, 其中 -816CT-754 启动子的效率要比 -816TC-754 提高 34.31% ($P < 0.01$)。关联分析显示, 816CC754TT 基因型牛的初情期比 816TT754CC 基因型牛的初情期提前了 1.28 月。

关键词: 牛; 早熟性; *GPR54* 基因; SNP; 启动子

中图分类号: S823.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)03-0413-04

Distribution of C-816T/T-754C locus in the *GPR54* gene in different cattle breeds and their association with precocity

ZHOU Mei¹, WANG Xuegu¹, CHEN Hongquan^{1,2}, WANG Yang¹, DENG Danmei¹,
HU Liying¹, MA Bangjun¹, WANG Guiyun¹, ZHANG Yipeng¹

(1. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Key Laboratory of Anhui Local Livestock and Poultry Genetic Resources Conservation and Biobreeding of Anhui Province, Hefei 230036)

Abstract: The *GPR54* gene is an important candidate gene for bovine early maturity characters. Forty-two Anhui local cattles (AL), 44 Simmental cattles (ST), and 116 hybrid cattles (HC) from the breeding group of AL×ST were selected. The distribution of C-816T/T-754C locus in *GPR54* and their association with the precocity trait were analyzed in different cattle breeds. All DNA samples were extracted from the ear tissue or blood. SNP loci in target fragments were identified by sequencing the PCR products. The effects of the SNP loci on the promoter efficiency were validated using a dual luciferase report gene. The results showed that two SNP loci, T-754C and C-816T, in 5' regulatory region of the *GPR54* gene were detected. The genotypes of ST and AL were CCTT and TTCC, respectively, with linkage disequilibrium using the haplotype analysis. The efficiency difference between two haplotype promoters was significant in which the efficiency of -816CT-754 promoter increased 34.31% than that of -816TC-754 promoter ($P < 0.01$). A correlation analysis showed that cattle puberty of the 816CC754TT genotype was 1.28 months earlier than that of the 816TT754CC genotype ($P < 0.01$).

Key words: cattle; precocity; *GPR54* gene; SNP; promoter

启动青春期是家畜繁殖和生长发育的重要环节,近些年来 *GPR54*/Kiss 系统对青春期启动的调控作用引起了研究者的高度关注。*GPR54* 是 G 蛋白偶

连受体^[1], 包含 7 个跨膜的疏水结构域和 N-端的 3 个糖基化作用位点, kisspeptin 为其内源性配体^[2-3]。*GPR54* 基因在多种组织中表达^[4-5], 并随动情周期呈

收稿日期: 2015-03-27

基金项目: 国家自然科学基金 (31272402) 资助。

作者简介: 周梅, 硕士研究生。

* 通信作者: 陈宏权, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: chqchq@ahau.edu.cn

现周期性的变化^[6]; GPR54 与 kisspeptin 结合, 活化 GnRH 表达, 打开下丘脑—垂体—性腺轴, 启动青春期发育^[7]。可见, 研究 GPR54 对动物青春期启动的作用机理具有重要的意义。

哺乳动物的 *GPR54* 基因^[8]由 5 个外显子组成, 其表达产物同源性很高, 对牛 *GPR54* 基因的研究起步较晚。本试验通过克隆牛 *GPR54* 基因的 5'调控区, 检测其间的 SNP, 并利用双荧光素酶报告基因分析不同启动子型的效率, 探讨 *GPR54* 基因的分子生物学作用。

1 材料与方法

1.1 样品采集

检测的牛群分别为安徽本地黄牛 (42 头)、西门塔尔牛 (44 头) 以及皖北牛育种群 (本地黄牛和西门塔尔牛杂交育种群, 116 头), 其中本地黄牛分别来自亳州市和黄山市当地农户饲养牛群, 西门塔尔牛和育种群来自安徽亳州市肉牛综合试验站, 所有牛采集耳组织样品, 置于冰盒内带回实验室。

1.2 牛基因组 DNA 提取

取耳样 0.5 g, 酚-氯仿抽提法提取 DNA, 干燥后溶于适量 TE 中, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 4℃ 保存备用。酚、氯仿、无水乙醇、蛋白酶 K 等试剂均为分析纯。

1.3 引物设计

用 Primer Premier 5.0 在牛 *GPR54* 基因侧翼区设计引物, PCR 扩增牛 *GPR54* 基因的 5'侧翼区, 引物标记为 GPR: 上游: 5'-CGACGCGT GGCAGG CAGATTCTAACCCTAG-3'; 下游: 5'-GCCTCG AGATTGCCACCCTCTTCGTCCTGA-3'

GPR 引物的上下游分别含有 *Mae* II 和 *Nla* IV 酶切位点, 用于报告基因表达载体的构建。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 PCR 反应体系及程序

25 μL PCR 反应体系为: 10×*Taq* Buffer 2.5 μL, dNTPs 2.0 μL, 上下游引物各 1.0 μL, *Taq* 酶 0.5 μL, DNA 模板 1.0 μL, 加 ddH₂O 至 25.0 μL。PCR 反应 *Taq* 酶、dNTPs、Marker 等购自合肥佰杰生物公司。

PCR 反应程序为: 95℃ 5 min, 95℃ 45 s, 65℃ 退火 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环、再 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存。取 4 μL 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 PCR 产物测序分析

所有个体样品的 PCR 产物经测序分析其 SNP 位点, 3 次重复测序判型。

1.6 双荧光素酶报告基因检测

使用 GPR-2 引物进行 PCR 扩增, 参照陈华等^[9]的方法将不同基因的片段 (GPR) 定向插入 pGL3-basic 荧光素酶基因表达载体中, 构建 pGL3-GPR/promoter 表达载体, 采用脂质体瞬时转染法进行 293T 细胞转染, 以空质粒 pGL3-Basic 为对照, 用双荧光素酶报告基因检测系统在微孔板荧光检测仪上检测萤火虫荧光和海肾荧光强度。

内切酶 *Mae* II 和 *Nla* IV 购买自上海捷锐公司, T4 DNA 连接酶从北京全式金生物技术有限公司购买, PCR 产物回收试剂盒、高纯度质粒中量提取试剂盒从 Axygen 购买, IPTG 及 X-gal 购自华美生物公司, 蛋白胨和酵母粉从 Oxoid 购买, Neofectin 转染试剂购自 New England Biolabs 公司, 表达萤火虫荧光素酶质粒 pGL3-Basic、海肾荧光素酶质粒 pRL-CMV 和双荧光素酶报告基因检测系统购自 Promega 公司。

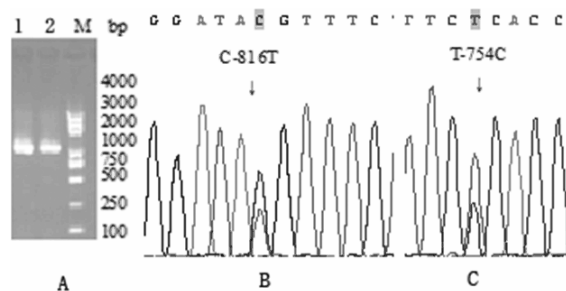
1.7 分析方法

统计基因频率, 分析不同品种牛基因频率分布之差异。计算萤火虫荧光素酶与内对照海肾荧光素酶观测值 (荧光强度) 的比值, 采用方差分析其在不同基因型之间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 *GPR54* 基因 5'侧翼区的 2 个 SNP 位点

经对 PCR 产物测序, 获得距离 CDS 起点上游 C-816T 和 T-754C 2 个 SNP 位点, 见图 1。2 个 SNP 位点相距 62 bp, 均为 C/T 的替换。



A: GPR 引物的 PCR 产物电泳图 (1.5%凝胶), 其中 1-2 为 PCR 产物, M 为 DL2000; B: *GPR54* 基因侧翼区 C-816T 位点核苷酸序列; C: *GPR54* 基因侧翼区 T-754C 位点核苷酸序列

A: PCR amplification of primer GPR, electrophoresed with 1.5% agarose in which 1-2 lanes are PCR product of primer GPR, and M is Marker DL2000. B: The nucleotide sequences at C-816T site in 5' regulatory region of cattle *GPR54* gene. C: The nucleotide sequences at T-754C site in 5' regulatory region of cattle *GPR54* gene

图 1 *GPR54* 基因 5'侧翼区 2 个突变位点的核苷酸序列
Figure 1 The nucleotide sequences at C-816T and T-754C sites in 5' regulatory region of cattle *GPR54* gene

从测序获得结果可以看出, 2 个位点存在 -816CT-754 和 -816TC-754 连锁, 整个测试样本中 2 个 SNP 位点的频率分布见表 1。整个牛群中, 2 个 SNP 位点以 -816CT-754 和 -816TC-754 单倍型的形式存在和遗传。

2.2 C-816T 和 T-754C 在牛群中的分布

在地方黄牛、西门塔尔牛以及西杂育种群中, 西门塔尔牛和安徽地方黄牛只发现 1 种基因型, 而育种群中出现 4 种基因型, 即 C816CT754C、C816CT754T、C816TT754C 和 T816TC754C, 结果见表 2 所示。

2.3 -816CT-754 和 -816TC-754 的启动子效率比较

根据基因型分布, 西门塔尔牛的单倍型为 -816CT-754, 地方黄牛的单倍型为 -816TC-754。本研究以此 2 个单倍型为启动子, 利用双荧光素酶报告基因验证 -816CT-754 和 -816TC-754 的启动子在 293T 细胞中的启动子效率, 结果见表 3。其中 -816CT-754 启动子的效率要比 -816TC-754 提高 34.31% ($P<0.01$)。可见, 西门塔尔牛 *GPR54* 基因基于 C-816T 和 T-754C 2 个 SNP 位点的启动子效率是地方黄牛的 1.3431 倍。

表 1 *GPR54* 基因 C-816T 和 T-754C 2 个 SNP 位点的单倍型频率

Table 1 The haplotype frequencies of C-816T and T-754C sites in 5' regulatory region of cattle *GPR54* gene

单倍型 Haplotype	-816CT-754	-816CC-754	-816TT-754	-816TC-754	<i>D'</i>	r^2	χ^2
纯种牛群 Purebred population	0.5227	0.0	0.0	0.4773	1.0	1.0	88.0
育种牛群 Breeding population	0.7629	0.0043	0.0	0.2328	1.0	0.9763	113.25

表 2 不同基因型在牛群中的分布

Table 2 The genotypic distribution in different cattle populations

基因 Genotype	西门塔尔牛 Simmental		地方黄牛 Local cattle		育种群*Breeding population	
	频率 Genotypic frequency	观测数 Size of sample	频率 Genotypic frequency	观测数 Size of sample	频率 Genotypic frequency	观测数 Size of sample
C816CT754T	1.0000	44	0	0	0.5431	63
C816TT754C	0	0	0	0	0.4310	50
T816TC754C	0	0	1.0000	42	0.0172	2
C816CT754C	0	0	0	0	0.0086	1

育种群为本地黄牛和西门塔尔(父本)级进 2 代。 The 2nd generation of level crossing using Simmental as male-parent.

表 3 -816CT-754 和 -816TC-754 的双报告基因检测结果

Table 3 The results of the dual-luciferase reporter gene assay for -816CT-754 and -816TC-754 promoter activity of cattle *GPR54* gene in 293T cells

启动子型 Promoter	重复数 Number of replication	平均数±标准差 Mean±SD
pGL3-basic	7	0.3792±0.0754 ^C
pGL3-/promoter	7	1.9990±0.4149 ^B
-816CT-754	7	2.6849±0.3069 ^A

注: 平均数之间均存在极显著的差异, 且 $A>B>C$, $P<0.01$ 。

Note: The differences among the means are significant, $A>B>C$, $P<0.01$.

表 4 育种群中 *GPR973* 不同基因型牛的初情期月龄

Table 4 The first oestrus age of cows among different genotypes in Wanbei breeding group

母牛基因型 Genotype of cow	初情期月龄(平均值±标准误差) The months of first oestrus age of cows (mean±SE)	头数 Size of sample
816CC754TT	10.44±0.08 ^C	63
816CT754TC	10.86±0.11 ^B	50
816TT754CC	11.72±0.29 ^A	2
816CC754TC	10.51	1

2.4 C-816T 和 T-754C 变异与牛初情期的关联性
比较育种群不同基因型牛初情期月龄结果见表

4 所示。816CC754TT 基因型牛的初情期比较育种群不同基因型牛初情期月龄结果见表 816TT754CC 基因型牛的初情期提前了 1.28 月, 而

816CC754TT 启动子的效率要比 816TT754CC 提高 1.3431 倍,可见 *GPR54* 基因的变异与牛早熟性具有一定的关联性。

3 讨论

本试验在牛 *GPR54* 基因 5'侧翼区所检测出的 C-816T 和 T-754C 位点,西门塔尔牛和安徽地方黄牛分别拥有 CCTT 和 TTCC 2 种不同的纯合型,分析显示属于-816CT-754 和-816TC-754 单倍型。在用西门塔尔牛和本地黄牛的杂交育种群中也证实检存在这 2 种单倍型,可见本文检测的 SNP 是品种之间的差异,而品种内则相当保守,这与张翼鹏等^[10]的研究结论一致,可以被运用来检测培育牛的遗传背景组成,以及牛早熟性标记辅助选择。储明星等^[11]在羊的 *GPR54* 基因中发现多个其他突变位点,并分析发现其中的两个等位基因与济宁青山羊的高繁殖力和性早熟相关联,但这 2 个位点是否可用作肉牛早熟性和生长发育性能的遗传标记还需要进一步的研究。

在牛 *GPR54* 基因起始密码子前约 140 bp 处预测存在一个 TATA 盒子,经同源性比较,其他各个物种 TATA 盒子也在相同的位置。通过荧光素酶报告基因检测证明克隆得到的 DNA 片段具有很强的启动活性,但是对于 *GPR54* 基因启动子的基本转录活性区域、启动活性最强片段和负调控元件结合区域我们还未知。为进一步的研究探索 *GPR54* 基因的转录调控可结合预测到的启动子和潜在转录因子结合位点设计合理的引物,克隆不同长度的 *GPR54* 基因启动区域通过报告基因进行研究。

GPR54 基因的多态位点 T-754C 位于转录因子 CBF1 的结合位点。转录因子 CBF1 (C-promoter binding factor-1) 是哺乳动物 Notch 信号途径最重要的核内调控因子^[12],识别并结合特定 DNA 序列 GTGGGAA^[13-14]。本试验初步证明 T-754C 位点与 *GPR54* 基因启动子的转录活性存在相关性,可进一步研究证实其与 CBF1 转录活性的关联性。

参考文献:

- [1] Muir A I, Chamberlain L, Elshourbagy N A, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(31): 28969-28975.
- [2] Manuel T S. *GPR54* and kisspeptin in reproduction[J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12 (5): 631-639.
- [3] Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G-protein-coupled receptor *GPR54*[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(37): 34631-34636.
- [4] 王雪松, 汤军. 新的生殖激素调控系统 KISS-1/*GPR54*[J]. 国外医学计划生育/生殖健康分册, 2006, 25(4): 197-199.
- [5] Funes S, Hedrick J A, Vassileva G, et al. The KISS-1 receptor *GPR54* is essential for the development of the murine reproductive system[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312(4): 1357-1363.
- [6] Navarro V M, Castellano J M, Fernandez F, et al. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, *GPR54*, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide[J]. *Endocrinology*, 2004, 145: 4565-4574.
- [7] Kaiser U B, Kuohung W. Kiss-1 and *GPR54* as new players in gonadotropin regulation and puberty[J]. *Endocrine*, 2005, 26(3): 277-284.
- [8] Juan R, Manuel T S. KISS-1 system and reproduction: comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2007, 539(1-3): 132-140.
- [9] 陈华, 陈宏权, 周倩倩, 等. 猪 *THRSP* 基因 5'侧翼区序列转录调控活性的鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(3): 329-334.
- [10] 张翼鹏. 牛 *GPR54* 基因 5'调控区的 SNPs 及其启动子效率研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2011.
- [11] 储明星, 冯涛, 狄冉, 等. 哺乳动物性早熟相关基因的研究进展[J]. *遗传*, 2009, 31(1): 13-28.
- [12] Ling P D, Hsieh J J, Ruf I K, et al. EBNA-2 upregulation of Epstein-Barr virus latency promoters and the cellular CD23 promoter utilizes a common targeting intermediate, CBF1[J]. *Journal of Virology*, 1994, 68(9): 5375-5383.
- [13] Tun T, Hamaguchi Y, Matsunami N, et al. Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-Jx[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(6): 965-971.
- [14] Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini M E. Notch signaling[J]. *Science*, 1995, 268(5208): 225-232.