

务川黑牛 *STAT3* 基因启动子区 SNPs 与生长相关性状的关联分析

杨永强¹, 焦仁刚², 龚 俞², 谢海强¹, 惠嫣婷¹, 张依裕¹, 肖超能¹, 刘若余^{1*}

(1. 贵州大学动物科学学院/高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室/
贵州省动物遗传育种与繁殖重点实验室, 贵阳 550025; 2. 贵州省畜牧技术推广站, 贵阳 550001)

摘要: 为筛选 *STAT3* 基因启动子区 SNPs 及研究其对启动子功能元件和体尺性状的影响。选择品种差异较大的贵州荷斯坦奶牛和务川黑牛构建不同 DNA 池, 直接测序筛选 SNP 位点, PCR-RFLP 进行验证和基因分型, 并利用 114 头务川黑牛个体分析 SNPs 位点与 8 个体尺性状的相关性。结果表明: *STAT3* 基因 5' 调控区存在 7 个新 SNPs 位点, 分别为: G-449A、C-341A、A-322G、C-246A、G-240A、C-225T、A-103T, 提交 SNP 数据库得到登录号。生物信息学软件预测得到 *STAT3* 基因核心启动子区和 CpG 岛, SNP 位点导致附近大量转录因子结合位点消失和新位点产生。多态性位点对转录因子结合位点有显著影响, 但并不改变 CpG 岛大小。关联性分析结果表明, A-322G 对务川黑牛体重有极显著影响 ($P < 0.01$), A 等位基因为有利等位基因。与 AA 或 GG 纯合基因型相比, AG 基因型个体有更出色的体重性状。A-322G 可能作为影响肉牛生长性状的重要功能性 SNP, *STAT3* 基因可能作为肉牛选种选育的候选基因, 研究结果为进一步确定 *STAT3* 基因功能奠定试验基础。

关键词: *STAT3*; SNP; 启动子; 务川黑牛; 生长性状; 关联分析

中图分类号: S823; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)08-1205-08

Associations of Polymorphisms of Promoter Region of *STAT3* Gene with Growth Traits in Wuchuan Black Cattle

YANG Yong-qiang¹, JIAO Ren-gang², GONG Yu², XIE Hai-qiang¹,
HUI Yan-ting¹, ZHANG Yi-yu¹, XIAO Chao-neng¹, LIU Ruo-yu^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountainous Region, Ministry of Education/ Guizhou Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;
2. Animal Science and Technology Station of Guizhou, Guiyang 550001, China)

Abstract: The study aimed to screen the SNPs in the promoter region of *STAT3* gene in cattle and analyze the effect of SNPs on function elements of promoter and growth traits. Two cattle breeds (Wuchuan Black cattle and Guizhou Holstein cow) that possessed significant difference in breeds property were selected to construct DNA pools, SNP sites were screened by direct sequencing subsequently. PCR-RFLP was used to be genotyping and a total of 114 Wuchuan Black cattle were used to study the associations of SNPs with 8 growth traits. Results showed that 7 new single nucleotide polymorphism (SNP) sites including G-449A, C-341A, A-322G, C-246A, G-240A, C-225T and A-103T, respectively were found in the 5' flanking region of *STAT3* gene and then submitted the information of SNPs to NCBI to obtain accession numbers. Furthermore,

收稿日期: 2013-01-14

基金项目: 贵州省重大科技专项计划项目(黔科合重大专项字[2011]6009号)

作者简介: 杨永强(1989-), 男, 四川威远人, 硕士生, 主要从事分子遗传与动物育种研究, E-mail: yangyongqiang2000@126.com

* 通信作者: 刘若余, E-mail: liury04@163.com

bioinformatics tools were used to predict the core region of the promoter and CpG island. SNPs found in this study led to the disappearance of a large amount of transcription factors binding sites and the appearance of new sites, it also showed that SNP mutation didn't affect the range of CpG island dramatically by using various softwares. Association analysis demonstrated that A-322G had highly significant effects on body weight ($P < 0.01$), A allele was the favorable alleles. Moreover, animals with the genotype AG had the highest mean body weight than those with GG and AA genotypes, which suggested that A-322G was an important SNP marker affecting the cattle growth performance and *STAT3* gene could be applied in marker-assisted selection for improving growth performance in cattle. This work could lay the experimental foundation for the identification of function of *STAT3* gene in cattle.

Key words: *STAT3*; SNP; promoter; Wuchuan Black cattle; growth trait; association analysis

信号转导子和转录激活子(Signal transducers and activators of transcription, STAT)是信号通路调控蛋白和胞质中潜在的转录因子,含有 SH2 结构域、酪氨酸磷酸化位点和 DNA 结合和反式激活域^[1]。参与生长因子信号通路的主要有 *STAT1*、*STAT3*、*STAT5A* 和 *STAT5B*^[2]。*STAT1* 与 *STAT3* 形成异源二聚体或单独形成同源二聚体结合到目的基因启动子进而调节其表达水平^[3]。*STAT3* 蛋白既是一种胞质信号因子,又是胞核转录因子,参与细胞存活、增殖、转化和迁移等过程^[4-5]。*STAT3* 基因位于相邻 *STAT5A* 和 *STAT5B* 基因 40 kb 间隔区内^[6],并靠近 1 个位于 *STAT5B* 基因第 11 内含子高度多态的微卫星座位,该区域可能存在影响动物健康的 QTL^[7]。*STAT3* 基因表达水平在多个阶段被精确调控,包括配体与受体结合阶段^[8]、蛋白酪氨酸磷酸酶去磷酸化作用^[9]、SOCS 蛋白家族竞争作用^[10]以及激活的 STAT 蛋白抑制子(Protein inhibitor of activated STATs, PIAS)的封堵作用^[11]。*STAT3* 基因可被瘦素激活,在白介素-6(Interleukin 6, IL-6)信号通路中作为急性期反应因子调控免疫响应^[12]。人 *STAT3* 基因突变与高 IgE 综合征^[13-14]、哮喘^[15]、炎症反应、急慢性髓性白血病药物抗性^[16-17]等有显著关联。

STAT3 蛋白可作为转录因子参与 GH 等信号通路,但目前极少有报道其与肉牛生长性状的关联。基因启动子变异通过改变 RNA 聚合酶和转录因子与调控序列的结合影响基因表达水平。本试验选择务川黑牛和贵州荷斯坦奶牛 2 种生长性能差异明显的品种构建 DNA 池,直接测序后 BLAST 分析 *STAT3* 基因多态性,将多态位点信息提交至 SNP 数据库。生物信息学软件预测序列核心启动子区和

CpG 岛,并分析 SNPs 对转录因子结合位点等的影响。利用 PCR-RFLP 进行基因分型,并分析 A-322G 多态性位点与 8 个体尺性状间的关联性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

54 份贵州荷斯坦奶牛血样采自贵州贵阳三联乳业公司第二奶牛场,114 头务川黑牛来自于贵州务川仡佬苗族自治县仡佬牧业公司种牛场,全部为母畜。按照体尺测量标准,由同一人在试验群体大约 12 月龄时收集务川黑牛体尺性状,每个性状测 3 次,测定性状包括:体高、体斜长、胸围、管围、胸宽、胸深、腰高、体重。利用试剂盒(生工生物)提取基因组 DNA,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测提取效果,4 ℃ 保存备用。54 个贵州荷斯坦奶牛 DNA 和 54 个务川黑牛 DNA 调整相同浓度至 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,各取 5 μL 混合构建 2 个 DNA 池以筛选 *STAT3* 基因 5' 调控区 SNPs。利用 114 头务川黑牛资料进行基因分型和关联性分析。

1.2 引物设计和 DNA 扩增

参考牛 *STAT3* 基因 DNA 序列(GenBank 登录号:AC_000176.1),利用 Primer-BLAST 设计 1 对特异性引物,上游引物(5'→3')为:GGAACGAAGGGC-AGGGTTAAA;下游引物(5'→3')为:GCTGGGGT-GCTCGTCAGGGAT,退火温度为 63.2 ℃。PCR 扩增得到 *STAT3* 基因 5' 调控区及第 1 外显子部分序列总长 791 bp。构建 DNA 池进行 PCR 反应,PCR 反应体系为 25 μL :2×*Taq* PCR Master Mix 试剂 12.5 μL ,上、下游引物(浓度为 10 pmol· μL^{-1})各 1.5 μL ,基因组 DNA 2.5 μL ,三蒸水 7 μL 。采用 Bio-Rad 公司 PCR 扩增仪进行 DNA 扩增,PCR 扩

增条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 40 s, 60.6 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 50 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 凝胶成像系统观察电泳结果。PCR 产物送诺赛基因组研究中心有限公司进行双向测序, 3 次独立测序。用 DNAs-tar 对测序结果进行校正, BLAST 分析确定 SNPs。

1.3 生物信息学分析

生物信息学软件根据数学模型或不同算法预测结果, 不同软件可能因计算方法和阈值设定的差异得到不同的预测结果, 利用多种软件比较分析可最大限度提高预测准确性, 充分发挥其参考价值。将突变前后序列递交在线软件, 得到预测结果后进行分析。

启动子预测: Promoter SCAN: <http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>; Neural Network Promoter Prediction: http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html; Promoter 2.0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>; 转录因子结合位点预测: Tfsitescan: <http://www.ifti.org/>; TESS: <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>; TF-SEARCH: <http://www.cbrc.jp/research/db/TF-SEARCH.html>; Softberry: <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>; GeneBuilder: <http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/genebuilder.html>; CpG 岛预测: Bio-soft: http://www.bio-soft.net/sms/cpg_island.html; MethPrimer: <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>; Webgene: <http://zeus2.itb.cnr.it/cgi-bin/wwwcpg.pl>; CpG Island Searcher: <http://www.uscnorris.com/cpgislands2/cpg.aspx>。

1.4 基因分型和关联性分析

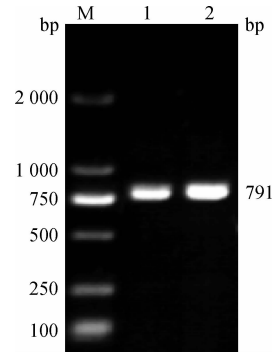
采用 PCR-RFLP 方法对 SNPs 位点所有个体进行基因型检测。反应体系为: PCR 产物 5 μ L, 内切酶 *Sau96 I* 0.5 μ L (10 U \cdot μ L⁻¹), 10 \times reaction buffer 1 μ L, ddH₂O 3.5 μ L。37 °C 水浴 12 h。2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物。利用 SPSS 软件计算等位基因频率、基因型频率, 进行 χ^2 检验, 分析该位点是否偏离 Hardy-Weinberg 平衡状态。最小二乘法进行标记与性状间关联性分析。

2 结果

2.1 DNA 池的 PCR 产物测序

设计特异性引物分别扩增出务川黑牛和荷斯坦奶牛 *STAT3* 基因目的序列共 791 bp (图 1)。扩增产物经胶回收纯化后进行双向测序, BLAST 分析

共发现 7 个 SNPs, 以 *STAT3* 基因第 1 外显子第 1 位为 +1 位, SNPs 位点分别为: G-449A、C-341A、A-322G、C-246A、G-240A、C-225T、A-103T (图 2), 与 NCBI 中 SNP 数据库比较发现均为新的突变位点, 将 SNP 信息递交到数据库, 得到登录号分别为: ss550898467、ss538994499、ss538994501、ss538994505、ss538994507、ss538994509、ss538994511。对于 2 个生长性能差异明显的牛种, 务川黑牛生长性能优于荷斯坦奶牛, 两者在这几个 SNPs 位点上表现出不同多态性特征, 本研究发现的 SNPs 可能在不同牛种中普遍存在。



M. DNA 相对分子质量标准 DL2000; 1. 务川黑牛 DNA 池 PCR 产物; 2. 贵州荷斯坦奶牛 DNA 池 PCR 产物
M. DL2000 marker; 1. PCR product of Wuchuan Black cattle DNA pooling; 2. PCR product of Guizhou Holstein cow DNA pooling

图 1 务川黑牛和贵州荷斯坦奶牛 *STAT3* 基因 DNA 池结果

Fig. 1 Results of DNA pooling of *STAT3* in two breeds

2.2 *STAT3* 基因启动子预测

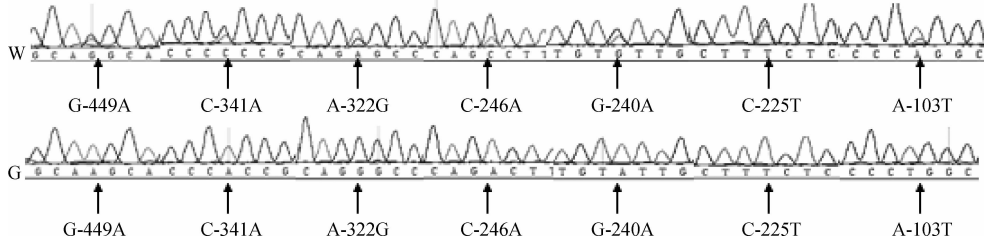
利用 3 种不同软件进行启动子预测, 除 Promoter2.0 外, 其余软件均预测得到核心启动子区, 结果见表 1。并有 TATA box、GC box、GAGA box、CCACT 序列等启动子重要元件。Neural Network Promoter Prediction 软件在 -132 bp 处发现 1 个可能的核心启动子区域, 而 Promoter SCAN 软件预测在 -637 ~ -387 bp 和 -329 ~ -79 bp 存在 2 个核心启动子区域。大部分 SNPs 位于核心启动子区域, 其突变可能在调控 *STAT3* 基因表达中发挥重要作用。

2.3 *STAT3* 基因 5' 调控区转录因子结合位点预测

采用 Tfsitescan、TESS、TFSEARCH 等生物学软件对 *STAT3* 基因转录因子结合位点进行预测和综合分析。结果 (表 2) 表明: 递交序列包含 Sp1、AP-2、T-Ag、CREB、E4F1、ATF/CREB、ADR1、c-

Myb、LXR- α 、IL-6、NF-1 等对 *STAT3* 基因表达起重要调控作用的转录因子结合位点。将突变后的序列重新提交,比较发现突变造成大量原本存在的转录因子结合位点消失,而产生一些新的转录因子结合位点,且均发生在突变位点附近,TFSEARCH 软件预测

结果如图 3,C-341A、A-322G、G-240A 和 C-225T 均对附近转录因子结合位点造成影响。本研究发现的 SNP 导致预测的转录因子结合位点发生巨大改变,可能对 *STAT3* 基因表达调控发挥重要作用。



G. 贵州荷斯坦奶牛; W. 务川黑牛

G. Guizhou Holstein cow; W. Wuchuan Black cattle

图 2 不同牛品种 *STAT3* 基因 DNA 池的 PCR 产物测序和 BLAST 分析结果

Fig. 2 Sequencing and BLAST of *STAT3* PCR products in two breeds

表 1 启动子预测结果

Table 1 Results of promoter prediction

软件 Software	起始位点/bp Start site	终止位点/bp Termination site	评分 Score
Neural Network Promoter Prediction	-132	-82	0.94
Promoter 2.0	-	-	-
Promoter SCAN	-637	-387	1.00
	-329	-79	0.64

表 2 不同软件预测 *STAT3* 基因转录因子结合位点结果

Table 2 Prediction of transcription factors binding sites of *STAT3* gene

软件 Software	转录因子结合位点总数		评分为 10 的转录因子结合位点数	
	Number of TFBS		Number of TFBS with score 10	
	突变前 Pr-M	突变后 Po-M	突变前 Pr-M	突变后 Po-M
Tfsitescan	387	405	10	9
TESS	379	385	—	—
GeneBuilder	255	252	4	4
Softberry	62	69	—	—
TFSEARCH	218	219	15	14

2.4 *STAT3* 基因 5'调控区 CpG 岛预测

启动子区 CpG 岛通常处于非甲基化状态,可与特异性转录因子结合,但异常甲基化的 CpG 岛显著降低与反式作用因子的结合活性,DNA 甲基化可直接干扰特异性转录因子与启动子序列结合进而抑制基因表达^[18]。本研究利用 Webgene 和 MethPrimer 等 4 种生物信息学软件预测目标序列 CpG 岛(图 4),以 GC 含量大于 50%,Obs/Exp 比值>0.6 和 CpG 岛范围大于 100 bp 为判定标准,以转录起始位点为 0 位,上、下游分别以正、负号标明,各软件在目

的序列中均预测有 CpG 岛存在,几种软件预测结果基本相近(表 3),说明 *STAT3* 启动子序列中 CpG 岛可能对其功能发挥具有重要作用,本研究发现的 SNPs 处于各软件预测的 CpG 岛区,SNPs 导致 Bio-soft 预测原本存在的-600 bp 处 CpG 岛消失,主要由 G-449A 突变引起,总体来看其他 SNPs 对核心启动子范围和起始位点无明显影响,说明 SNPs 位点通过影响 *STAT3* 启动子区甲基化水平而调控基因表达的可能性较小。

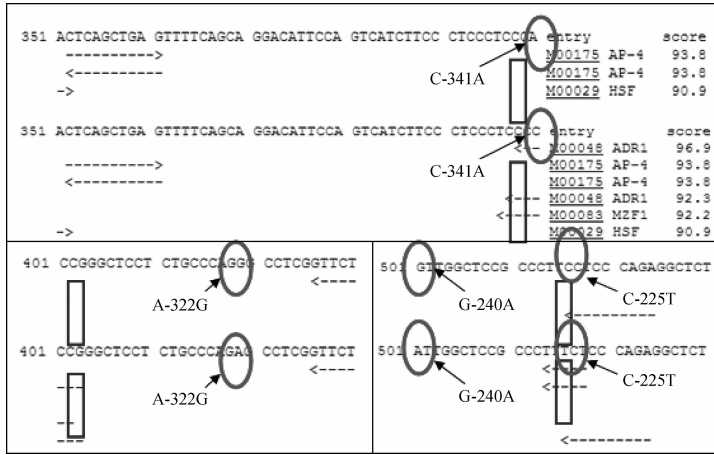


图 3 TFSEARCH 软件转录因子结合位点预测结果

Fig. 3 Change of transcription factors binding sites by SNP mutation for TFSEARCH

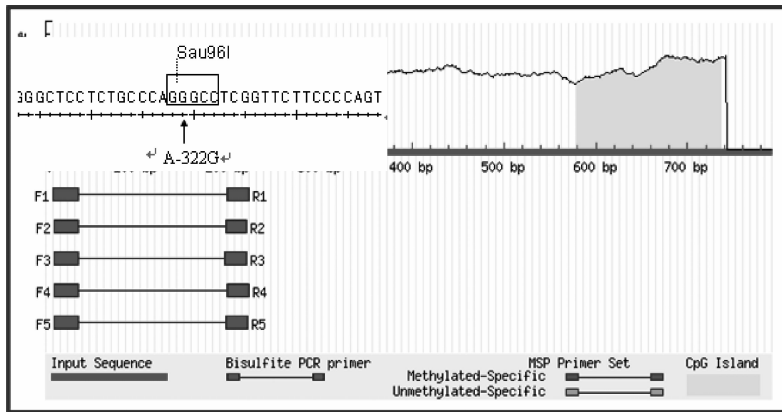


图 4 MethPrimer 软件预测 CpG 岛结果

Fig. 4 Prediction of CpG island of *STAT3* gene by MethPrimer software

表 3 不同软件预测 *STAT3* 基因启动子区 CpG 岛

Table 3 Prediction of CpG island of *STAT3* gene by various software

软件 Software	CpG 岛数 Number of CpG island		大小/bp Size				CpG 岛范围/bp Range of CpG island				GC 含量% Content of GC					
			突变前 Pr-M		突变后 Po-M		突变前 Pr-M		突变后 Po-M		突变前 Pr-M		突变后 Po-M			
	突变前	Pr-M	突变后	Po-M	突变前	Pr-M	突变后	Po-M	突变前	Pr-M	突变后	Po-M	突变前	Pr-M	突变后	Po-M
MethPrimer	2		2		100		100		-690~-591		-690~-591		50		50	
					158		158		-161~-4		-161~-4		66		66	
					265		265		-739~-474		-739~-474		55		55	
Bio-soft	3		2		201		—		-600~-401		—		58		—	
					284		284		-233~+51		-233~+51		64		64	
CpG Island					791		791		-739~+51		-739~+51		55		55	
Searcher	1		1		339		339		-739~-401		-739~-401		55		54	
Webgene	1		1		284		284		-233~+51		-233~+51		64		64	

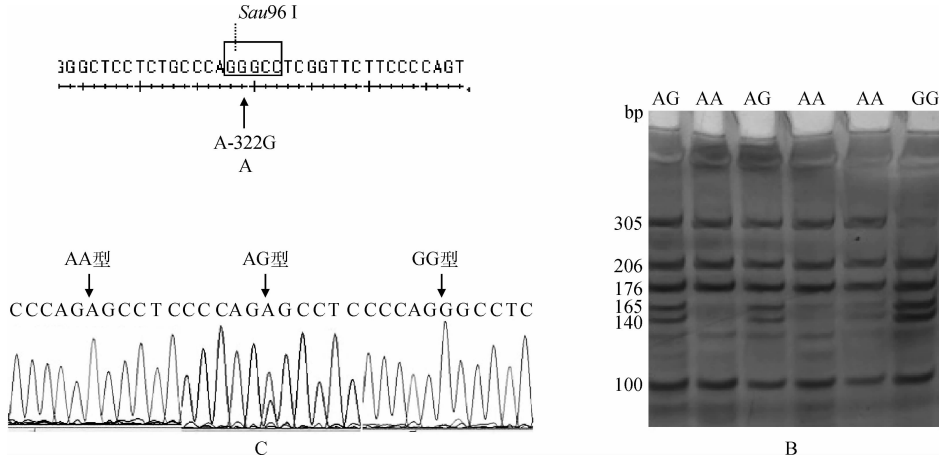
2.5 PCR-RFLP 结果及关联性分析

本研究发现, A-322G 突变位点存在于限制性内切酶 *Sau96 I* 的识别序列, 利用 114 头务川黑牛

个体进行基因分型。3 种基因型分别为: AA 型 (100、176、206、305 bp), AG 型 (100、140、165、176、206、305 bp), GG 型 (100、140、165、176、206 bp), 见

图 5。挑选务川黑牛不同基因型个体的 PCR 产物进行直接测序,测序峰图见图 5。结果表明,在该群体中 A 等位基因为优势等位基因,频率达到 0.622 8, A-322G 位点中 AA 和 AG 基因型频率接近,GG 基因型频率最低,符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P >$

0.05)(表 4),表明务川黑牛 A-322G 位点的基因型频率没有受到选择、突变或迁移等因素影响。随后利用基于 SNP 位点分析的最小二乘分析模型进行 A-322G 与 8 个体尺性状间关联性分析,结果见表 5。



A. A-322G 位于 *Sau96 I* 识别序列。B. PCR-RFLP 检测结果: AA 型(100、176、206、305 bp),AG 型(100、140、165、176、206、305 bp),GG 型(100、140、165、176、206 bp)。C. 务川黑牛 *STAT3* 基因 A-322G 位点不同基因型测序图

A. A-322G mutation site located in the recognition of restriction site for *Sau96 I*. B. Detection result of PCR-RFLP; Strands with 100, 176, 206, 305 bp for AA genotype, 100, 140, 165, 176, 206 bp for GG genotype, 100, 140, 165, 176, 206, 305 bp for AG genotype appeared at this locus. C. DNA sequences of A-322G site of *STAT3* gene for Wuchuan Black cattle

图 5 A-322G 位点 PCR-RFLP 分析结果
Fig. 5 The PCR-RFLP analysis of A-322G in *STAT3* gene

表 4 A-322G 在务川黑牛群体中等位基因和基因型频率

Table 4 Allele and genotype frequencies at A-322G locus of *STAT3* gene in Wuchuan Black cattle

群体 Population	数量 Number	基因型频率(个体数) Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency		卡方检验 χ^2 (HWE)
		AA	AG	GG	A	G	
务川黑牛 Wuchuan Black cattle	114	0.421 1(48)	0.403 5(46)	0.175 4(20)	0.622 8	0.377 2	2.493 9

表 5 *STAT3* 基因中 A-322G 与务川黑牛体尺性状的关联性分析

Table 5 Association analysis of A-322G SNP with body measurement traits at Wuchuan Black cattle *STAT3* gene

SNP	基因型 Genotype	性状 Trait							
		WH/cm	BL/cm	HG/cm	CC/cm	CW/cm	CD/cm	HH/cm	BW/kg
A-322G	AA	109.30±2.49	135.17±7.99	153.26±9.84	18.19±1.21	29.10±6.38	54.24±2.25	108.05±4.35	290.96±8.58 ^a
		110.22±1.44	134.78±9.30	157.64±14.14	18.08±1.42	31.36±6.75	54.50±2.84	109.62±3.69	304.00±8.11 ^b
	AG	107.99±2.69	134.55±8.89	152.17±6.22	18.00±0.85	28.57±5.56	54.82±2.14	109.15±2.87	282.66±9.21 ^a
		107.99±2.69	134.55±8.89	152.17±6.22	18.00±0.85	28.57±5.56	54.82±2.14	109.15±2.87	282.66±9.21 ^a
	GG	107.99±2.69	134.55±8.89	152.17±6.22	18.00±0.85	28.57±5.56	54.82±2.14	109.15±2.87	282.66±9.21 ^a
		107.99±2.69	134.55±8.89	152.17±6.22	18.00±0.85	28.57±5.56	54.82±2.14	109.15±2.87	282.66±9.21 ^a
P 值 P value		0.152	0.958	0.093	0.827	0.139	0.672	0.140	0.004

表中数值为“平均值±标准差”。同列数值间不同肩标小写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。WH. 体高; BL. 体斜长; HG. 胸围; CC. 管围; CW. 胸宽; CD. 胸深; HH. 腰高; BW. 体重

Data are represented as “means ± SEM”. Values with different lower case superscript letters are significantly different ($P < 0.01$). WH. Withers height; BL. Body length; HG. Heart girth; CC. Cannon circumference; CW. Chest width; CD. Chest depth; HH. Hip height; BW. Body weight

A-322G 位点对体重的影响达到极显著水平 ($P < 0.01$), 对胸围的影响接近显著性水平 ($P = 0.093$), 而对其他体尺性状无显著性影响。AG 杂合型个体比纯合型 (AA/GG) 个体体重更为出色, A-322G 对务川黑牛体尺性状有重要影响。

3 讨论

STAT 蛋白家族共有 7 个成员, 分别为 STAT 1~STAT 4、STAT5A、STAT5B、STAT6^[19]。在 GH 信号通路中, GH 首先诱导细胞膜受体 GHR 二聚体化, 进而导致 JAK2 激酶磷酸化而激活。激活的 JAK2 使自身及 GHR 的酪氨酸残基磷酸化, 活化的 JAK2 和 GHR 构成复合物吸引 STAT 蛋白等下游蛋白与其高亲和力位点结合, 激活的 STAT 蛋白形成同源或异源二聚体进入核内作为转录因子诱导相关基因表达^[20]。STAT3 蛋白作为信号因子在造血作用和介导免疫响应方面都发挥重要作用, 作为转录因子又通过调控目的基因表达参与分化、扩增、血管生成、新陈代谢和细胞凋亡等过程^[21-22]。STAT1 激活后可与 STAT3 蛋白构成异源二聚体复合物进入核内作为转录因子调控基因表达, H. Khatib 等^[23]通过牛体外受精试验证实 *STAT1* 和 *STAT3* 基因 SNP 位点与牛受精率和胚胎存活率显著相关, *STAT1* 和 *STAT3* 优势基因型的交互作用更能提高受精率和胚胎存活率。

目前 NCBI 中 SNP 数据库 *STAT3* 基因 5' 调控区仅有 rs136216875 一条信息。极少有报道 *STAT3* 基因与牛生长等性状关联。本试验在牛 *STAT3* 基因 5' 调控区鉴定得到 7 个新 SNPs, 务川黑牛作为贵州地方优良品种, 因其良好的生长和肉质性能深受养殖户喜爱, 其生长性能优于荷斯坦奶牛, 本研究发现的 SNPs 可能在不同牛种普遍存在。不同软件预测核心启动子区域有差异, 利用多种软件综合分析可最大限度提高预测准确性, 本研究所发现 SNPs 处于核心启动子区域, 其突变可能在调控 *STAT3* 基因表达中发挥重要作用。7 个 SNPs 突变均导致不同转录因子结合位点消失和产生新结合位点, 其中 A-322G 等对其附近的转录因子结合位点影响最大, 说明突变位点可直接影响特异转录因子与调控序列的结合。DNA 甲基化可显著降低靶基因表达水平, 4 种生物信息学软件均预测 *STAT3* 基因启动子区域具有范围较接近的 CpG 岛, 说明 DNA 甲基化水平对 *STAT3* 基因表达调控

有重要作用, 本研究发现的 SNPs 处于各软件预测的 CpG 岛区, 但对核心启动子范围和起始位点无明显影响, 说明 SNP 不在甲基化水平上影响 *STAT3* 基因表达水平。

本研究发现, A-322G 突变位点位于内切酶 *Sau96 I* 的识别序列, 利用 PCR-RFLP 对其进行基因分型, 发现 A 为优势等位基因, GG 基因型频率最低。关联性分析结果表明, A-322G 与体重有极显著关联, 而与胸围关联性接近显著水平, 但与其他性状未达到显著关联水平, 可能是因为样本数太少, 需要增大样本数, 提高生长相关性状测量的准确性后进行更深入研究。与 AA/GG 纯合型相比, AG 杂合型个体的体重更为出色, 这一结论对肉牛选种选育具有重要意义。A-322G 突变可能是重要的功能突变位点, 对 *STAT3* 基因 SNPs 研究结果为进一步分析 *STAT3* 启动子功能和阐明 *STAT3* 蛋白对肉牛生长所起作用奠定基础。

4 结论

本研究预测到 *STAT3* 核心启动子区域, 并在 5' 调控区筛选到多态性位点, 其对 *STAT3* 转录因子结合位点有显著影响, 但不影响 CpG 岛范围。A-322G 位点与体重有极显著关联, 而对其他生长相关性状影响不显著。AG 为优势基因型, 具有杂合子基因型的个体体重性状最为优越。A-322G 可能是重要的功能 SNP 位点, 而 AG 杂合基因型可能作为肉牛标记辅助选择的靶点, *STAT3* 基因有望成为肉牛生长相关的候选基因, 这一结论对肉牛选种选育具有重要意义。

参考文献:

- [1] CALO V, MIGLIAVACCA M, BAZAN V, et al. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 197(2):157-168.
- [2] LANNING N J, CARTER-SU C. Recent advances in growth hormone signaling [J]. *Rev Endocr Metab Disorders*, 2006, 7(4):225-235.
- [3] HERRINGTON J, SMIT L S, SCHWARTZ J, et al. The role of STAT proteins in growth hormone signaling [J]. *Oncogene*, 2000, 19(21):2585-2597.
- [4] BUETTNER R, MORA L B, JOVE R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention [J]. *Clin*

- Cancer Res*, 2002, 8(4):945-954.
- [5] HIRANO T, ISHIHARA K, HIBI M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors [J]. *Oncogene*, 2000, 19(21): 2548-2556.
- [6] MOLENAAR A, WHEELER T, MCCRACKEN J, et al. The STAT 3-encoding gene resides within the 40 kbp gap between the STAT 5A-and STAT 5B-encoding genes in cattle [J]. *Anim Genet*, 2000, 31(5):339.
- [7] MEYER L, BROCKMANN G, SCHWERIN M, et al. A highly polymorphic GT-repeat in the bovine STAT5B encoding gene on BTA19 [J]. *Anim Genet*, 1999, 30(1):72-73.
- [8] BILD A H, TURKSON J, JOVE R. Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis [J]. *The EMBO J*, 2002, 21(13):3255-3263.
- [9] XU D, QU C K. Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway [J]. *Front Biosci J Virt Lib*, 2008, 13: 4925-4932.
- [10] CROKER B A, KIU H, NICHOLSON S E. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway [J]. *Semi Cell Dev Biol*, 2008, 19: 414-422.
- [11] SHUAI K. Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins [J]. *Cell Res*, 2006, 16(2):196-202.
- [12] AKIRA S. IL-6-regulated transcription factors [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29(12):1401-1418.
- [13] WJST M, LICHTNER P, MEITINGER T, et al. STAT3 single-nucleotide polymorphisms and STAT3 mutations associated with hyper-IgE syndrome are not responsible for increased serum IgE serum levels in asthma families [J]. *Eu J Hum Genet*, 2008, 17 (3):352-356.
- [14] HOLLAND S M, DELEO F R, ELLOUMI H Z, et al. STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome [J]. *New Eng J Med*, 2007, 357(16):1608-1619.
- [15] LITONJUA A A, TANTISIRA K G, LAKE S, et al. Polymorphisms in signal transducer and activator of transcription 3 and lung function in asthma [J]. *Respir Res*, 2005, 6: 52.
- [16] ZHONG Y, FENG J, CHEN B, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) gene polymorphisms are associated with treatment outcomes in acute myeloid leukemia [J]. *Int J Lab Hematol*, 2012, 34(4):383-389.
- [17] NAIR R R, TOLENTINO J H, HAZLEHURST L A. Role of STAT3 in Transformation and Drug Resistance in CML [J]. *Front Oncol*, 2012, 2: 30.
- [18] TAMURA G, YIN J, WANG S, et al. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas [J]. *J Natl Cancer Ins*, 2000, 92 (7):569-573.
- [19] DARNELL JR J E. STATs and gene regulation [J]. *Science*, 1997, 277(5332):1630-1635.
- [20] KIU H, NICHOLSON S. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways [J]. *Growth Factors*, 2012, 30(2):88-106.
- [21] SEITA J, ASAKAWA M, OOEHARA J, et al. Interleukin-27 directly induces differentiation in hematopoietic stem cells [J]. *Blood*, 2008, 111(4):1903-1912.
- [22] HANKEY P. Regulation of hematopoietic cell development and function by Stat3 [J]. *Front Biosci*, 2009, 14(1):5273-5290.
- [23] KHATIB H, HUANG W, MIKHEIL D, et al. Effects of signal transducer and activator of transcription (STAT) genes STAT1 and STAT3 genotypic combinations on fertilization and embryonic survival rates in Holstein cattle [J]. *J Dairy Sci*, 2009, 92(12):6186-6191.

(编辑 郭云雁)