

山羊 *DCT* 基因启动子区甲基化水平、 SNP 与毛色特征关系研究

杜小龙¹, 王 麒¹, 张乐超¹, 葛琳涵¹, 刘小辉¹, 王 涵¹, 李兰会^{1,3*}, 李祥龙^{2*}

(1. 河北农业大学动物科技学院, 保定 071000; 2. 河北科技师范学院, 秦皇岛 066004;

3. 河北省牛羊胚胎工程技术研究中心, 保定 071000)

摘要: 旨在探究 *DCT* 基因启动子区甲基化水平和 SNP 突变对山羊毛色的影响, 为探索 *DCT* 基因调控山羊毛色变化的机理提供理论依据。本研究以山羊为试验动物, 对 *DCT* 基因启动子区进行 CpG 岛预测, 设计引物对预测的 2 个 CpG 岛富集区域进行亚硫酸氢盐甲基化测序, 使用甲基化水平分析软件 BISMA 统计甲基化位点, 比较唐山奶山羊(白色)和南江黄羊(黑色品系)两种不同毛色山羊群体 *DCT* 基因启动子区甲基化水平差异。克隆 *DCT* 基因核心启动子区, 筛选不同毛色山羊群体的 SNPs, 使用 JASPAR 和 Nsite 预测 SNPs 位点突变前后转录因子的改变, 并检测比较突变前后 *DCT* 基因启动子活性变化。结果, 成功克隆了山羊 *DCT* 基因启动子区甲基化序列及核心启动子区(g. -1045 ~ -318)。在 g. -348 ~ -150 区域和 g. +222 ~ +502 区域分别发现 6 个和 23 个甲基化位点, 其中 g. +312, g. +352 和 g. +400 位点与 g. +389 和 g. +404 位点白色山羊甲基化水平分别显著和极显著高于黑色山羊($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 并且 g. +222 ~ +502 区域白色山羊甲基化平均水平极显著高于黑色山羊($P < 0.01$)。在 *DCT* 基因核心启动子区的 g. -804 T > G, g. -705 C > T 和 g. -679 G > A, 3 个 SNPs 位点的基因型构成在白色山羊和 3 个有色山羊群体中存在差异, g. -804 T > G 突变导致该区域的 SOX10 转录因子结合位点缺失, *DCT* 基因启动子活性显著下降($P < 0.05$)。结果显示, 白色山羊 *DCT* 基因 g. +222 ~ +502 区域的高甲基化水平, g. -804, g. -714 和 g. -679 3 个位点的突变, 尤其是 g. -804 T > G 造成 SOX10 转录因子结合位点的缺失, 突变的 G 型 *DCT* 基因启动子活性显著降低。因此, *DCT* 基因启动子区 SNP 突变和高甲基化水平可能抑制了基因的表达从而形成山羊白色被毛。

关键词: 山羊毛色; *DCT* 基因; 启动子区; 甲基化; SNP

中图分类号: S827.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2019)02-0271-09

Study on the Relationship between Methylation Level, SNP in Promoter Region of *DCT* Gene and Hair Color in Goat

DU Xiaolong¹, WANG Qi¹, ZHANG Lechao¹, GE Linhan¹,
LIU Xiaohui¹, WANG Han¹, LI Lanhui^{1,3*}, LI Xianglong^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China; 2. Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao 066004, China; 3. Research Center of Cattle and Sheep Embryo Engineering Technique of Hebei, Baoding 071000, China)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the effects of the methylation and SNPs in *DCT* gene promoter region on the coat color of goats, and to provide a theoretical basis for explo-

收稿日期: 2018-05-14

基金项目: 河北省应用基础研究计划重点基础研究项目(15962901d); 河北省自然科学基金项目(C2015204176)

作者简介: 杜小龙(1993-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: 1464902509@qq.com; 王 麒(1993-), 男, 河北井陘人, 硕士, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: 15369307136@qq.com。杜小龙和王麒为同等贡献作者

* 通信作者: 李兰会, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: lanhui13@163.com; 李祥龙, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: lixianglongen@yahoo.com

ring the mechanism of *DCT* gene regulating the coat color of goats. Goats were used as experimental animals. The CpG island in the promoter region of goat *DCT* gene was predicted and two pairs of primers were designed for bisulfite methylation sequencing of the two CpG island enriched regions. Methylation level online analysis software, BISMA, was used to count the number of methylation sites and to compare the differences of methylation levels between Tangshan dairy goats (with white coat) and Nanjiang Huang goats (with black coat). Core promoter region sequence of *DCT* was cloned and SNPs were screened for goats with different coat colors. JASPAR and Nsite, the transcription factor online prediction software, were used to predict the transcription factor alterations with the mutation of SNPs, and promoter activity variation with the mutation of SNPs was detected. The methylation sequence and the core promoter region sequence (g. -1045 - -318) of goat *DCT* gene were successfully cloned. Six and 23 methylation sites were found in the g. -348 - -150 region and the g. +222 - +502 region, respectively. The methylation levels of white goats at the g. +312, g. +352 and g. +400 sites and at the g. +389 and g. +404 sites were significantly and extremely significantly higher than those of black goats ($P < 0.05$ and $P < 0.01$), respectively. And the average methylation level of white goats in g. +222 - +502 region was extremely significantly higher than that of black goats ($P < 0.01$). The genotype compositions of the 3 SNPs in the core promoter region, g. -804 T > G, g. -705 C > T and g. -679 G > A, was different between white goats and the 3 colorful goats. SOX10 transcription factor binding site disappeared with the g. -804 T > G mutation, and the promoter activity of the *DCT* gene was significantly decreased ($P < 0.05$). The higher methylation level in the g. +222 - +502 region of *DCT* gene in white goats, and the 3 mutations at g. -804, g. -714 and g. -679 sites, especially the g. -804 T > G mutation resulted in the loss of the SOX10 transcription factor binding site and the promoter activity of *DCT* with G genotype was significantly decreased. In conclusion, the SNP mutation and the higher methylation level in promoter region may suppress the expression of *DCT* gene and form the white coat color of goat.

Key words: goat coat color; *DCT* gene; promoter region; methylation; SNP

哺乳动物毛色是由色素决定的,决定毛色的物质基础主要是酪氨酸源性色素,即黑色素及其衍生物^[1-3]。多巴色素异构酶(dopachrometautomerase, *DCT*),也叫作酪氨酸酶相关蛋白2(TYRP2),是定位于黑素体膜上的跨膜蛋白,参与黑色素的生物合成过程。*DCT*主要控制5,6-二羟基吲哚羧酸与5,6-二羟基吲哚的比例,从而影响黑色素生成,因此是影响动物毛色的重要蛋白^[4-5]。Costin等^[6]发现,*DCT*属于I型膜蛋白,并通过化学分析显示,*DCT*突变体的黑素细胞中褐黑素产量增加,真黑素产量降低,因此在色素生物合成中*DCT*的酶活性决定了选择合成褐黑素途径还是真黑素途径。Guyon-neau等^[7]通过敲除小鼠*DCT*基因外显子1序列,使小鼠*DCT*基因的mRNA和蛋白表达缺失,但小鼠能够正常存活且除黑色素含量减少,使得小鼠出现了毛色变浅的表型外,在*DCT*基因正常表达部

位(如皮肤、视网膜色素上皮细胞和大脑)未发现任何畸形或异常情况。Okumura等^[8]利用辐射杂交和SNP连锁分析将猪*DCT*基因定位于11号染色体上,并发现了与猪毛色表型相关的SNP位点。

DNA甲基化主要位于富含CpG岛的启动子区或第一外显子区,一般发生在二核苷酸胞嘧啶的第五位碳原子上^[9]。启动子区与转录因子结合的DNA序列发生甲基化形成“转录抑制复合物”,可引起转录抑制^[10-15]。启动子单核苷酸多态性可能会引起基因上某些特异转录因子结合位点的改变,从而影响基因的表达^[16]。鉴于*DCT*基因表达在动物毛色中的重要作用,其表达水平受启动子和转录因子调控,而启动子活性和转录因子结合与基因甲基化和SNP突变密切相关,因此,研究*DCT*基因核心启动子区甲基化水平和单核苷酸多态性与毛色特征和启动子活性变化的关系对揭示*DCT*基因在动物

毛色形成中的作用具有重要意义。

本试验通过 CpG 岛预测、甲基化测序、多态性位点筛选、测序结果比对、转录因子在线预测及启动子活性检测,以期为探究 *DCT* 基因启动子区甲基化水平、SNP 突变对山羊毛色的影响提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料和试剂

用于多态性分析的 DNA 由唐山奶山羊、济宁青山羊、南江黄羊和南江黄羊黑色系血液样本中提取;甲基化检测所用 DNA 由唐山奶山羊和南江黄羊黑色系血液样本中提取。

EasyPure Genomic DNA Kit、TransStart Taq DNA Polymerase、EasyPure PCR Purification Kit 购自北京全式金公司,限制性内切酶 *Sac* I 和 *Xho* I、质粒载体 T-Vector PMD19、DNA Ligat1 on Kit 购自大连宝生物工程有限公司, San-Prep 柱式质粒 DNA 小量提取抽提试剂盒和 San-Prep 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生工公司,无内毒素质粒 DNA 大量提取试剂盒购自天根公司,双荧光素酶报告基

因检测试剂盒购自 Promega 公司,T4 连接酶和 Li-pofectamine2000 Transfection Reagent 购自 Thermo Fisher Science 公司,EZ DNA Methylation-Gold™ Kit 试剂盒购自 ZYMO 公司,A375 细胞、质粒载体 pGL3-basic 和 pRL-TK 均为本实验室保存。

1.2 引物设计

根据 NCBI(National Center for Biotechnology)中 GenBank 数据库公布的山羊 *DCT* 基因序列 (NC030819.1),结合真核生物启动子数据库(Eukaryotic Promoter Database,EPD)公布的小鼠和人的 *DCT* 启动子信息,截取位于山羊 *DCT* 基因 g. -2000~+1000 区域(外显子 1 第 1 个碱基定义为 +1 位)。利用在线软件 MethPrimer(<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>)预测 CpG 岛,参数设置为 Island size ≥ 100 ,Obs/Exp ≥ 0.6 ,GC Percent ≥ 50.0 。利用在线程序 NEBuilder (<http://nebuilder.neb.com/>)对预测的 CpG 岛序列设计甲基化测序引物(甲 1 和甲 2),核心启动子区引物(核 1)参考刘春杨等^[17]的研究,核 1 引物上下游序列 5'端分别引入 *Sac* I 和 *Xho* I 限制性酶切位点及保护碱基,引物序列及扩增条件见表 1。

表 1 核心启动子区扩增和甲基化水平检测引物

Table 1 Primers for amplifying core promoter region and detecting methylation level

引物名称 Primer name	上游引物(5'→3') Forward primer	下游引物(5'→3') Reverse primer	退火温度/℃ Annealing temperature	产物 长度/bp Length
甲 1	TGGTTTTTGAATTGA- GTTTAAGGTAAT	CCATCAAAAACCTCC- TCTAACAACTAA	60	199
甲 2	TGGGTAGTTTGTA- GGTTAAGGAATG	CTACCTTAAAAAA- AATTCCCTCCCTC	60	281
核 1	ctatcatgataggtaccgagctcTGGGT- GCTAAGTCATTTTC	gcttacttagatcgagatctcgagTTT- AATTGCCTTGAACCTCAG	65	728

小写字母为与载体的重叠区序列,下划线处为限制性酶切位点;大写字母为引物特异性序列

The lowercase letters are the region overlapped in vector; the underlined letters are restriction enzyme digestion sites, and the capital letters are the specific sequences of primers

1.3 山羊 *DCT* 基因启动子区序列的甲基化水平检测

按照 EZ DNA Methylation-Gold™ Kit 使用说明处理唐山奶山羊和南江黄羊黑色系各 3 只的基因组,以亚硫酸盐修饰后的基因组为模板进行扩增,甲 1 和甲 2 引物的扩增条件完全一致。PCR 扩增体系为 50 μ L:0.5 μ L TransStart Taq DNA Poly-

merase,36 μ L ddH₂O,5 μ L 10 \times Trans Start Taq Buffer,4 μ L 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs,2.5 μ L 修饰的 DNA 模板,上下游引物各 1 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 最终延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。纯化回收 PCR 产物,连接到

pMD19-Simple 载体,转化 DH5 α 感受态细胞,菌液 PCR 检测重组质粒,每个样本测序 10 个单克隆。利用甲基化水平分析软件 BISMA (<http://services.ibt.uni-stuttgart.de/BDPC/BISMA>) 统计甲基化位点,分析不同毛色山羊 *DCT* 基因甲基化水平差异。

1.4 山羊 *DCT* 基因核心启动子区 SNP 筛选和转录因子结合位点分析

对 24 只唐山奶山羊、27 只南江黄羊黑色系、28 只济宁青山羊和 20 只南江黄羊快长系,利用核 1 引物进行核心启动子区克隆。PCR 反应体系:10 \times PCR Buffer 5 μ L,dNTP(2.5 mmol \cdot L $^{-1}$)4 μ L,上下游引物(10 μ mol \cdot L $^{-1}$)各 1 μ L,基因组 DNA 2.5 μ L,TransStart Taq 酶(2.5 U \cdot μ L $^{-1}$)0.5 μ L,最后 ddH $_2$ O 补足至 50 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,65 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 0.5 min,35 个循环;最终 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4 $^{\circ}$ C 终止反应。纯化回收的 PCR 产物送华大基因公司进行测序,比对所有个体的 *DCT* 基因核心启动子区序列,筛选 SNP 变异位点。

将包含 SNP 位点的不同单倍型启动子序列利用 JASPAR (http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl) 和 Nsite (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=nsite&group=programs&subgroup=promoter>) 预测转录因子结合位点,分析 SNP 是否影响转录因子结合。

1.5 山羊 *DCT* 基因 g. -804 T > G 突变片段启动子活性分析

依照 1.4 的 PCR 反应体系和条件扩增 *DCT* 基因 g. -804 位点 T \rightarrow G 突变的两种单倍型基因序列,产物测序确定单倍型后纯化回收,用限制性内切

酶 *Sac* I 和 *Xho* I 双酶切回收产物和表达载体 pGL3-basic。取线性化载体 50 ng,纯化回收 PCR 目的片段 250 ng,5 μ L 2 \times Lightning Cloning Master Mix,ddH $_2$ O 补足至 10 μ L,50 $^{\circ}$ C 水浴条件下反应 1 h,连接目的片段与 pGL3-Basic,获取重组质粒。鉴定阳性的重组质粒瞬时转染 A375 细胞,48 h 后收获并裂解细胞,检测萤火虫荧光素酶荧光值(F)和海肾荧光素酶荧光值(R),计算相对荧光素酶活性(F/R),并与阴性对照(Basic)的相对荧光素酶表达量做比,以消除不同转染批次的系统误差。比较鉴定核心启动子区 g. -804 T > G 突变前后的 *DCT* 基因启动子活性。

1.6 数据分析

利用 SPSS24.0 中描述统计的列联表进行 χ^2 检验,分析白色唐山奶山羊与其他毛色山羊 SNP 位点基因型频率的差异性和黑白两种毛色山羊 *DCT* 基因碱基位点甲基化率的差异;利用单因素方差分析对不同片段的启动子活性进行分析,Duncan's 多重比较组间差异;利用独立样本 *t* 检验分析黑白两种山羊 *DCT* 基因 CpG 岛区域平均甲基化水平差异。 $P < 0.01$ 为统计学差异极显著, $P < 0.05$ 为统计学差异显著。

2 结果

2.1 山羊 *DCT* 基因 CpG 岛预测

预测得到 *DCT* 基因 g. -2000~+1000 区域 2 处 CpG 岛序列,分别位于 *DCT* 基因 g. -258~-158 和 g. +144~+438 区域。如图 1 所示,特异性甲 1 和甲 2 引物扩增片段分别为 g. -348~-150 和 g. +222~+502。

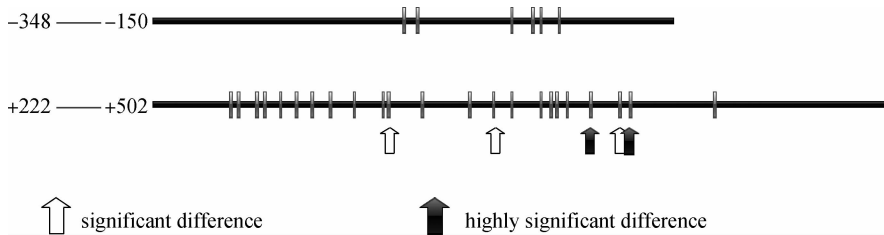


图 1 预测的甲基化位点

Fig. 1 Methylation sites predicted

2.2 山羊 *DCT* 基因启动子区序列甲基化水平检测

检测黑色和白色两种毛色山羊各 3 个个体的 10 个单克隆序列,发现 *DCT* 基因 g. -348~-150 区域包含 6 个甲基化位点,g. +222~+502 区域包

含 23 个甲基化位点(图 1)。g. -348~-150 区域两种毛色各位点甲基化水平统计结果见表 2,6 个位点的甲基化水平在白色和黑色山羊间均无显著差异($P > 0.05$),白色山羊平均甲基化水平($90.3 \pm$

2.9%) 高于黑色山羊 ($(89.4 \pm 2.5)\%$), 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

两种毛色山羊 *DCT* 基因 g. +222~+502 区域各位点甲基化水平统计结果见表 3。白色山羊平均甲基化水平 ($(90.6 \pm 5.3)\%$) 极显著高于黑色山羊 ($(83.7 \pm 8.5)\%$) ($P < 0.01$), 其中, g. +312、

g. +352 和 g. +400 位点白色山羊甲基化水平显著高于黑色山羊 ($P < 0.05$), g. +389 和 g. +404 位点白色山羊甲基化水平极显著高于黑色山羊 ($P < 0.01$)。其他位点甲基化水平白色和黑色山羊间差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 两种毛色山羊 *DCT* 基因 g. -348~-150 区域甲基化水平差异

Table 2 Methylation differences of two goat populations with different coat colors in g. -348-150 region of *DCT* gene %

山羊 Goat	位点 Site						$\bar{X} \pm S_x$
	g. -252	g. -247	g. -211	g. -203	g. -200	g. -193	
白色 White	91.7	90.0	85.0	91.7	90.0	93.3	90.3 ± 2.9
黑色 Black	88.3	88.3	86.7	93.3	88.3	91.7	89.4 ± 2.5
P 值 P value	0.543	0.769	0.793	0.729	0.769	0.729	0.597

表 3 两种毛色山羊 *DCT* 基因 g. +222~+502 区域甲基化水平差异

Table 3 Methylation differences of two goat populations with different coat colors in g. +222-502 region of *DCT* gene %

山羊 Goat	位点 Site											$\bar{X} \pm S_x$
	g. +252	g. +255	g. +262	g. +265	g. +271	g. +277	g. +283	g. +290	g. +299	g. +310	g. +312	
白色 White	90.0	93.3	93.3	91.7	90.0	85.0	91.7	81.7	83.0	90.0	<u>95.0^a</u>	90.0
黑色 Black	83.3	90.0	81.7	80.0	85.0	78.3	90.0	83.3	90.0	91.7	<u>81.7^b</u>	93.3
P 值 P value	0.283	0.509	0.053	0.067	0.408	0.345	0.752	0.810	0.283	0.752	<u>0.023</u>	0.509

山羊 Goat	位点 Site											$\bar{X} \pm S_x$
	g. +343	g. +352	g. +359	g. +370	g. +374	g. +376	g. +380	g. +389	g. +400	g. +404	g. +436	
白色 White	91.7	<u>96.7^a</u>	100.0	83.3	93.3	86.7	95.0	<u>91.7^A</u>	<u>93.3^A</u>	<u>80.0^A</u>	98.3	<u>90.6 ± 5.3^A</u>
黑色 Black	91.7	<u>86.7^b</u>	95.0	80.0	81.7	80.0	85.0	<u>73.3^B</u>	<u>78.3^B</u>	<u>55.0^B</u>	91.7	<u>83.7 ± 8.5^B</u>
P 值 P value	1.000	<u>0.048</u>	0.079	0.637	0.053	0.327	0.068	<u>0.008</u>	<u>0.018</u>	<u>0.003</u>	0.094	<u>0.002</u>

下划线表示差异显著位点。同列标记不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 标记不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)
Underline show the for sites with significant difference. The data marked with different lowercase letters are significantly different ($P < 0.05$), those marked with different capital letters are extremely significantly different ($P < 0.01$)

2.3 山羊 *DCT* 基因核心启动子区 SNP 和不同毛色山羊群体的基因型分布

DCT 基因核心启动子区共发现 4 个 SNPs 位点,

依次为 g. -804 位点的 T>G, g. -714 位点的 T>C, g. -705 位点的 C>T 和 g. -679 位点的 G>A 突变, 分别定义为 SNP1、SNP2、SNP3 和 SNP4 (图 2)。

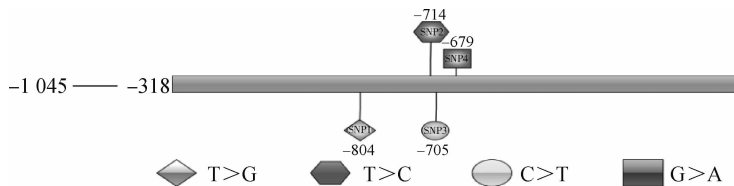


图 2 *DCT* 基因启动子区 SNPs 位点示意图

Fig. 2 Schematic diagram of SNPs sites in core promoter region of *DCT* gene

Hardy-Weinberg 平衡分析发现,除济宁青山羊在 SNP2 位点偏离了平衡状态外,其它群体和其它位点都处于平衡状态,SNP 的群体分布结果见表 4。白色的唐山奶山羊 SNP1 突变与其它 3 个有色群体存在显著差异,其中济宁青山羊与南江黄羊和南江黄羊黑色系的 T 等位基因频率分别显著和极显著高于唐山奶山羊($P < 0.05$, $P < 0.01$),唐山奶山羊的 TT 基因型频率低于其它群体,而 GG 基因型频率高于其它群体。唐山奶山羊 SNP2 的 T 等位基因频率显著高于济宁青山羊($P < 0.05$),但与其它山羊间没有显著差异($P > 0.05$),这可能与济宁青山羊该位点的不平衡状态有关。唐山奶山羊 SNP3 的基因频率与其它 3 个群体间均存在显著差异,C 等位基因频率极显著高于济宁青山羊和南江黄羊($P < 0.01$),显著高于南江黄羊黑色群体($P < 0.05$),CC 基因型频率高于 3 个有色群体。SNP4

位点 A 等位基因频率白色唐山奶山羊极显著高于 3 个有色群体($P < 0.01$),而 GG 基因型频率低于有色群体。综上,4 个 SNPs 位点中的 g. -804 T > G、g. -705 C > T 和 g. -679 G > A 变异可能与山羊的白色和有色被毛特征形成相关。

2.4 山羊 DCT 基因 SNP1 的两种基因型片段转录因子和启动子活性差异

通过 JASPAR 和 Nsite 的转录因子预测分析发现,SNP1(g. -804 T > G)位点的突变型 G 序列较野生型的 T 序列缺失了 SOX10 的结合位点,如图 3A。将野生型与突变型核心启动子序列构建双荧光素酶报告基因,并测试表达活性,结果如图 3B 所示。突变型的等位基因 G 序列启动子活性(2.08)比野生型 T 序列(5.84)显著降低($P < 0.05$),下降 2.8 倍;虽然突变型活性是阴性对照(pGL3-Basic)的 2.08 倍,但与阴性对照没有显著差异($P > 0.05$)。

表 4 4 个 SNPs 位点在 4 个山羊群体的等位基因频率和基因型频率

Table 4 Allele frequency and genotype frequency of the 4 SNPs in 4 goat populations

突变位点 Mutation site	群体 Population	等位基因频率 Allele frequency		基因型频率 Genotype frequency			χ^2	P 值 P value
		T	G	TT	TG	GG		
SNP1	唐山奶山羊	0.577	0.423	0.417	0.417	0.167	—	—
	济宁青山羊	0.804	0.196	0.607	0.393	0.000	4.100	0.042
	南江黄羊黑	0.852	0.148	0.704	0.296	0.000	6.885	0.000
	南江黄羊	0.975	0.025	0.950	0.050	0.000	15.788	0.000
SNP2	唐山奶山羊	0.917	0.083	0.833	0.167	0.000	—	—
	济宁青山羊	0.566	0.434	0.185	0.741	0.074	16.639	0.000
	南江黄羊黑	0.926	0.074	0.889	0.074	0.037	0.030	0.862
	南江黄羊	0.775	0.225	0.600	0.350	0.050	3.478	0.062
SNP3	唐山奶山羊	0.729	0.271	0.500	0.458	0.042	—	—
	济宁青山羊	0.426	0.574	0.037	0.778	0.185	9.526	0.002
	南江黄羊黑	0.623	0.377	0.185	0.667	0.148	4.775	0.029
	南江黄羊	0.450	0.550	0.100	0.700	0.200	7.099	0.008
SNP4	唐山奶山羊	0.646	0.354	0.417	0.458	0.125	—	—
	济宁青山羊	0.929	0.071	0.857	0.143	0.000	12.821	0.000
	南江黄羊黑	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	22.950	0.000
	南江黄羊	0.975	0.025	0.950	0.050	0.000	14.529	0.000

χ^2 和 P 为唐山奶山羊与其它 3 个山羊群体的等位基因频率差异比较的统计量

χ^2 and P are statistics for comparing difference of allele frequency of Tangshan dairy goat with the other 3 populations, respectively

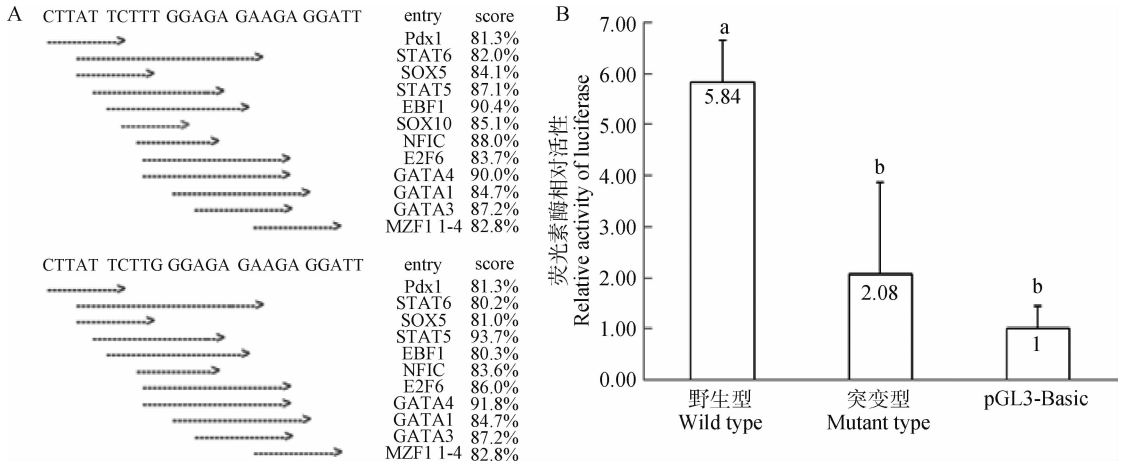


图3 *DCT* 基因核心启动子区 g. -804 T > G 突变前后转录因子和启动子活性变化

Fig. 3 Changes of transcription factors and promoter activity caused by g. -804 T > G mutation in core promoter region of *DCT* gene

3 讨论

DNA 的甲基化会影响基因的转录表达^[9], 本试验检测了黑色和白色两种毛色山羊 *DCT* 基因两处 CpG 岛的 DNA 甲基化水平, 结果显示, g. +222~+502 区域中有 5 个甲基化位点在白色山羊中的甲基化水平显著或极显著高于黑色山羊。但处于第一外显子上游启动子区的 CpG 区域的甲基化水平在两种毛色山羊中没有差异, 说明启动子区的甲基化水平可能不参与调控不同毛色的形成, 而处于内含子区的 g. +222~+502 区域在两种毛色中的甲基化差异对基因表达存在调控作用。由于 DNA 的甲基化修饰会抑制基因的转录表达^[10-15], 因此可以推测, g. +222~+502 区域的高甲基化水平抑制了山羊 *DCT* 基因的表达, 使得山羊毛色变浅。而之前的研究证明, *DCT* 基因在浅毛色动物体内的表达量低于深毛色动物^[18], 进一步说明了 g. +222~+502 区域的甲基化与山羊不同毛色的形成有关。

基因启动子的活性调控机制已有较多研究^[19-22], 但单核苷酸变异引起的序列多态性对启动子活性影响的研究尚不多见, 其可能会影响基因的转录表达, 其中发生在相关转录因子结合位点的序列变异会阻碍转录因子与 DNA 序列的结合, 从而抑制基因的表达^[23]。部分位点的变异会导致毛色的改变^[6-8], Guyonneau 等^[7]的研究即是由于某一位点的突变, 导致产生了鼠毛色变浅的表型。本试验所检测的变异位点 g. -804、g. -714 和 g. -679 在唐山奶山羊中的等位基因频率与其它 3 种毛色山羊群

体存在显著差异, 而唐山奶山羊被毛颜色为白色, 其它 3 个群体皆为有色群体, 揭示 g. -804、g. -714 和 g. -679 3 个位点的突变可能与山羊白色毛色形成有关。

已有研究表明, SOX10 能够激活 *DCT* 基因的表达^[24], 课题组的前期研究发现, 点突变引起 SOX10 转录因子结合位点的 3 处突变缺失, 均造成 *DCT* 基因启动活性的显著降低^[17]。本研究中, 白色唐山奶山羊 SNP1 的 G 等位基因频率显著高于 3 个有色山羊群体, 同时发现, 该突变引起 SOX10 转录因子结合位点的缺失, 通过双荧光素酶活性检测发现, 缺失 SOX10 的突变 G 型序列启动子活性降低到阴性对照水平。另外, 课题组对皮肤转录组数据分析发现, 唐山奶山羊 *DCT* 基因表达显著低于南江黄羊黑色系(未发表)。这一结果充分证明了 SOX10 对 *DCT* 基因具有正向调控作用, 同时说明 *DCT* 基因启动子区的 g. -804T > G 突变引发 SOX10 转录因子结合位点的缺失, 继而引起 *DCT* 基因转录启动活性降低, mRNA 表达水平下降, 这与唐山奶山羊的白色被毛特征有关。

本试验在山羊 *DCT* 基因核心启动子区发现了 4 个 SNPs, 只有 SNP1 位点变化引起 SOX10 转录因子结合位点缺失, 并未发现其他 SNP 引起转录因子结合变化, 也可能这些突变位点改变了其它未知的参与 *DCT* 基因转录调控的转录因子的结合, 从而在不同毛色个体中起到调控作用。

4 结论

白色山羊 *DCT* 基因 g. +222~+502 区域的

高甲基化水平, g. -804, g. -714 和 g. -679 3 个位点的突变, 尤其是 g. -804 T > G 造成 SOX10 转录因子结合位点的缺失, 突变的 G 型序列显著降低 DCT 基因的启动子活性。因此 DCT 基因启动子区 SNP 突变和高甲基化水平可能抑制了基因的表达从而形成山羊白色被毛。

参考文献 (References):

- [1] 吴宇婷. 哺乳动物毛色形成机制与影响因素[J]. 四川动物, 2011, 30(6):1003-1007.
WU Y T. The formation mechanism of mammal coat color and its possible influencing factors[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2011, 30(6):1003-1007. (in Chinese)
- [2] 王乐, 吕雪峰, 郑文新, 等. 动物毛色形成的原因和机制[J]. 草食家畜, 2009(1):20-21.
WANG L, LV X F, ZHENG W X, et al. The cause and mechanism of animal coat color formed[J]. *Grass-Feeding Livestock*, 2009(1):20-21. (in Chinese)
- [3] 张俊珍, 董常生, 范瑞文, 等. 哺乳动物毛色形成研究进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(S1):65-68.
ZHANG J Z, DONG C S, FAN R W, et al. Advance in pigment melanin of mammalian[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2006, 27(S1):65-68. (in Chinese)
- [4] 舒文, 毛华明. 黑色素的研究进展[J]. 国外畜牧学-猪与禽, 2003, 23(2):31-34.
SHU W, MAO H M. Research progress of melanin [J]. *Foreign Animal Husbandry - Pigs and Poultry*, 2003, 23(2):31-34. (in Chinese)
- [5] 刘伟兰, 李祥龙, 周荣艳, 等. 不同物种 TYRP2 基因完整编码区生物信息学分析[J]. 河南农业科学, 2011, 40(10):144-148.
LIU W L, LI X L, ZHOU R Y, et al. Bioinformatics analysis of complete coding regions of TYRP2 gene among 21 species[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2011, 40(10):144-148. (in Chinese)
- [6] COSTIN G E, VALENCIAJ C, WAKAMATSU K, et al. Mutations in dopachrome tautomerase (DCT) affect eumelanin/pheomelanin synthesis, but do not affect intracellular trafficking of the mutant protein[J]. *Biochem J*, 2005, 391(2):249-259.
- [7] GUYONNEAU L, MURISIER F, ROSSIER A, et al. Melanocytes and pigmentation are affected in Dopachrome Tautomerase knockout mice[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(8):3396-3403.
- [8] OKUMURA N, HAYASHI T, SEKIKAWA H, et al. Sequences and mapping of genes encoding porcine tyrosinase (TYR) and tyrosinase-related proteins (TYRP1 and TYRP2)[J]. *Anim Genet*, 2005, 36(6):513-516.
- [9] FENG J, FAN G P. The role of DNA methylation in the central nervous system and neuropsychiatric disorders[J]. *Int Rev Neurobiol*, 2009, 89:67-84.
- [10] JONES P A, TAKAI D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics [J]. *Science*, 2001, 293(5532):1068-1070.
- [11] SINGAL R, GINDER G D. DNA methylation[J]. *Blood*, 1999, 93(12):4059-4070.
- [12] MEEHAN R R, LEWIS J D, MCKAY S, et al. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs[J]. *Cell*, 1989, 58(3):499-507.
- [13] LEWIS J D, MEEHAN R R, HENZEL W J, et al. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA[J]. *Cell*, 1992, 69(6):905-914.
- [14] ZHANG Y, NG H H, ERDJUMENT-BROMAGE H, et al. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(15):1924-1935.
- [15] YU F, THIESEN J, STR TLING W H. Histone deacetylase-independent transcriptional repression by methyl-CpG-binding protein 2[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(10):2201-2206.
- [16] 李圣彦, 郎志宏, 黄大昉. 真核生物启动子研究概述[J]. 生物技术进展, 2014, 4(3):158-164.
LI S Y, LANG Z H, HUANG D F. Research progress on eukaryotic promoter[J]. *Current Biotechnology*, 2014, 4(3):158-164. (in Chinese)
- [17] 刘春杨, 张乐超, 王麒, 等. 山羊 DCT 基因启动子活性区及其转录因子调控探究[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(1):55-64.
LIU C Y, ZHANG L C, WANG Q, et al. The exploration of the promoter activity area and regulation by transcription factors of goat DCT gene[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(1):55-64. (in Chinese)
- [18] 高莉, 董常生, 赫晓燕, 等. 羊驼酪氨酸酶基因家族在不同毛色个体中的基因表达水平[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(7):895-899.
GAO L, DONG C S, HE X Y, et al. Gene expression levels of alpaca tyrosinase gene family in individuals of different colors[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica*

- Sinica*, 2008, 39(7): 895-899. (in Chinese)
- [19] 周纬男, 史铭欣, 乔书培, 等. 鸡 *Perilipin1* 基因启动子的克隆及分析[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(2): 249-259.
- ZHOU W N, SHI M X, QIAO S P, et al. Promoter cloning and analysis of chicken *Perilipin1* gene[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(2): 249-259. (in Chinese)
- [20] 刘 心, 刘 浩, 王义涛, 等. 人 LOXL2 启动子的鉴定与初步分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(5): 540-547.
- LIU X, LIU H, WANG Y T, et al. Structural and functional analysis of Human LOXL2 promoter[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 34(5): 540-547. (in Chinese)
- [21] 刘小辉, 彭永东, 周荣艳, 等. 坝上长尾鸡 *MITF* 基因核心启动子鉴定与分析[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(6): 1116-1123.
- LIU X H, PENG Y D, ZHOU R Y, et al. Identification and analysis of the core promoter of *MITF* gene in Bashang long-tail chicken[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(6): 1116-1123. (in Chinese)
- [22] 王 涵, 陈 焯, 周荣艳, 等. 蛋鸡胱硫醚 β 合酶基因启动子鉴定与分析[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(1): 211-217.
- WANG H, CHEN Y, ZHOU R Y, et al. Identification and analysis of promoter of Cystathionine beta synthase in layer[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(1): 211-217. (in Chinese)
- [23] 郭晓敏, 刘向萍, 常国斌, 等. 鸡 NLRC5 基因启动子多态性分析[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(11): 1845-1849.
- GUO X M, LIU X P, CHANG G B, et al. Polymorphism analysis of NLRC5 gene promoter of chickens[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2015, 35(11): 1845-1849. (in Chinese)
- [24] POTTERF S B, MOLLAAGHABABA R, HOU L, et al. Analysis of SOX10 function in neural crest-derived melanocyte development; SOX10-dependent transcriptional control of Dopachrome Tautomerase[J]. *Dev Biol*, 2001, 237(2): 245-257.

(编辑 郭云雁)