

# 臺灣努比亞山羊腦下垂體特異性轉錄因子與鈣蛋白酶抑制蛋白基因DNA序列多態性分析

顏念慈<sup>(1)</sup>、陳若菁<sup>(1)</sup>、陳芄諭<sup>(2)</sup>、馮瑋慈<sup>(2)</sup>、陳水財<sup>(1)</sup>、林德育<sup>(1)</sup>、張秀鑾<sup>(2)</sup>、吳明哲<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>行政院農業委員會畜產試驗所 <sup>(2)</sup>國立屏東科技大學動物科學與畜產系

## 前言

Arash et al.,(2010)應用雌波爾山羊與六個候選基因( Liptin, Calpastatin, MSTN, POUF1, IGF1及 SCD)，應用SSCP-RFLP分生技術進行基因頻率調查，發現有高的基因頻率在波爾山羊 Calpastatin B對偶基因(0.54)、Liptin3 T對偶基因 (0.64)及POUF1 T對偶基因(0.68)，並宣稱此3個對偶基因已被認為對山羊與牛的生長與肉質有利的基因。腦下垂體特異性轉錄因子(pituitary transcription factor,POUF1)，是POU蛋白家族中幾種同源異型蛋白之一。在哺乳動物垂體發育和激素作用過程中起重要作用。( [http://en.wikipedia.org/wiki/Pituitary-specific\\_positive\\_transcription\\_factor\\_1](http://en.wikipedia.org/wiki/Pituitary-specific_positive_transcription_factor_1))。Lan 等2009對大陸養的波爾與中國山羊進行POUF1基因PCR-RFLP分析，分出CC，CT及TT基因型，T的基因頻率在0.757~0.976。鈣蛋白酶抑制蛋白 (Calpastatin, CAST)是鈣蛋白酶 I (CAPN1, 又稱 $\mu$ -calpatin)和鈣蛋白酶 II (CAPN2, 又稱 $m$ -calpatin)的內源性抑制蛋白。目前已經對牛和豬等物種的CAST基因進行了分子生物學及功能方面的研究，科學家們認為CAST基因是影響肉質性狀的重要候選基因。但是CAST基因在綿羊上的研究較少。本研究目的主要探討努比亞山羊腦下垂體特異性轉錄因子(pituitary specific transcription factor, POU1f1)與鈣蛋白酶抑制蛋白基因(Calpastatin, CAST)DNA序列多態性。

## 材料與方法

- 一、腦下垂體特異性轉錄因子(pituitary transcription factor,POUF1)：是依照NCBI的DQ826413 DNA序列設計一對引子，去PCR增殖91頭努比亞種羊DNA，得到481 bp片斷，再應用一組適當引子進行定序，將試驗所得POU1f1之序列與GenBank 編號DQ826413序列比對。
- 二、鈣蛋白酶抑制蛋白(Calpastatin, CAST)：依照Mohsen *et al.* (2014)設計之一對引子，CAST-253F(5'GTTATGAATTGCTTTCTAC TC-3')以及CAST-253R(5'-ATACGATTGAGAGACTTCAC-3')，經58°C 30秒鐘黏合(annealing)，循環35次，增殖174頭努比亞種羊DNA DNA全長254bp之片段，再應用一組適當引子進行定序，將試驗所得POU1f1之序列與 GenBank 編號 DQ414516序列比對。

## 結果與討論

DQ826413序列是撒能奶山羊的腦下垂體特異性轉錄因子(POU1f1)第六外蜆子基因片段序列。試驗所得比對結果發現 91頭努比亞山羊之腦下垂體特異性轉錄因子基因位置10-446之序列共有8個位置發生變異，在序列位置18-19有CT置換成TC，本試驗所得在序列位置18-19有CT置換成TC，約佔27.5% (25/91)。在DQ826413序列位置48、102及365處核苷酸分別為T,G,C，然找不到一頭努比亞山羊之POU1f1基因是T,G,C，此三處核苷酸

The aim of this study was to investigate the DNA sequence polymorphism of pituitary specific transcription factor (POU1f1) and Calpastatin (CAST) in Nubian goat. Two groups of primers were designed to amplify DNA fragments of Nubian goat and then applied two groups of appropriate primers to sequence. The sequence of POU1f1 was compared with the sequence of DQ826413 in GenBank. It was found that there were 8 site substitutions between positions 10-446 of the pituitary-specific transcription factor gene in 91 Nubian goats. And CT was replaced with TC at position 18-19. Three positions differed from the alignment sequence between positions 45-370. There were T, G, T/G; G, T, G/T and C, T, C/T nucleotide type at positions 48, 102 and 365, respectively. There were 6 sequence types at positions 437-439. The sequence of the CAST obtained was compared with the sequence of DQ414516, showed that (1) there were 18 site substitutions in the 254 bp fragment of CAST gene of 174 Nubian goats, six nucleotide variations were transition substitution, and position 157 of all goat CAST gene had G-A transition substitution. (2) There were 0-6 repeats of 5'-GT 2 bp after position 60. (3) At position 63, there were T, G and T / G nucleotide types. Based on the above results, it was found that the DNA sequence analysis of POU1f1 and CAST gene in Nubian goat could produce more polymorphism, which would be applied to Nubian goat economic performance related research.

分別為T,T,T的努比亞山羊有55頭，約佔60.4%(55/91)。在位置437-439之間序列有6型序列，DQ826413序列在位置437-439之間序列為GCA，努比亞山羊亦以GCA為多，約佔41.8%(38/91)其次為CAA(27.5%)，詳如表1。

表 1. POU1f1序列位置437-439序列型統計表

序列型	GCA	CAA	GAA	CCA	GAC	GGA	合計
頭數	38	25	10	10	4	4	91

將試驗所得CAST之序列與DQ414516序列比對，結果發現(1)174頭努比亞山羊CAST基因位置1-254之序列共有18個位置發生變異，有6處同類置換，CAST基因位置之變異分別為5(T-G)，9(T-A)，11(G-T)，12(C-T)，16(C-T)，18(A-C)，22(C-T)，26(A-G)，60(G/T/G/T)，61T-G)，63(T,G,G//T)，65(G-T)，68(G-T)，69(T-G)，70(A-G)，71(G-T)，73(G-T)，157(G-A)，其中全部山羊CAST基因位置157有G-A同類置換。(2)在序列位置60後有5'-GT 2 bp的重複序列0-6個。(3)在位置63有T與G及T/G型。DQ414516序列是綿羊的鈣蛋白酶抑制蛋白第六外蜆子基因片段序列，而本試驗全部山羊CAST基因位置157有G-A同類置換，或許可以此來區分綿羊與山羊，再者，在DQ414516序列位置60後有5'-GT 2 bp的重複序列2個，而本試驗所得重複序列以0(63頭)與2(63頭)較多，亦有達6者(如表2)。

表 2. CAST序列位置60後有5'-GT 2 bp的重複序列個數統計表

重複序列個數	0	1	2	3	4	5	6	合計
頭數	63	9	63	2	2	8	27	174

## 結論

綜合以上結果顯示努比亞山羊POU1f1與CAST基因DNA序列分析可產生較多之多態性，可進一步應用於其經濟性能相關研究。