

# 山羊 *SKIP* 基因的分离、鉴定 及与生长性状的关联分析

熊琪<sup>1</sup> 张年<sup>1</sup> 李小姍<sup>2</sup> 李晓锋<sup>1</sup>  
索效军<sup>1</sup> 杨前平<sup>1</sup> 陶虎<sup>1</sup> 陈明新<sup>1</sup>

1.湖北省农业科学院畜牧兽医研究所/动物胚胎工程及分子育种湖北省重点实验室,武汉 430064;

2.华中农业大学农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室/

农业部猪遗传育种重点开放实验室/生猪健康养殖协同创新中心,武汉 430070

**摘要** 为研究 *SKIP* 基因对山羊生长发育的影响,并寻找与山羊生长性状相关的分子标记,利用绵羊与牛 *SKIP* 基因的同源序列设计引物,RT-PCR 扩增得到一段长 1 350 bp 的山羊 *SKIP* 基因表达序列,包括其完整编码区序列,编码 449 个氨基酸的蛋白。通过序列 Blast 比较和系统发育树的构建,发现山羊 *SKIP* 与绵羊 *SKIP* 序列相似性最高(99.52%)。利用生物信息学分析 *SKIP* 蛋白的理化性质,预测 *SKIP* 蛋白分子质量为 52 ku,等电点为 5.18,包含典型的疏水区域和磷脂酰肌醇 5-磷酸磷酸酶结构域,定位在细胞质(60.9%)和细胞核(26.1%)中。间接免疫荧光试验验证了 *SKIP* 的细胞定位,并发现位于细胞核中的 *SKIP* 在成肌细胞分化过程中转移到细胞质。通过波尔山羊和麻城黑山羊的 DNA 混池测序,发现 *SKIP* 内含子 2 有一处 G/A 突变,利用 PCR-RFLP 方法对波尔×麻城黑山羊 F2 代杂交后代进行基因分型,性状关联分析发现该单核苷酸多态性位点(SNP)与出生体质量、胸围、管围、身高等性状显著相关,等位基因 G 与生长呈正相关。

**关键词** 单核苷酸多态性位点;山羊;骨骼肌和肾脏富集的肌醇磷酸酶;生长性状;成肌分化

**中图分类号** S 827 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)06-0083-06

肌纤维的数目和大小直接影响家畜的胴体性状,肌纤维数目在出生前就已定型,由成肌细胞的分化进程所控制。肌醇磷酸酶(*SKIP*)在骨骼肌中高表达<sup>[1-2]</sup>,受成肌转录因子 *MyoD* 转录调控<sup>[1]</sup>,对成肌细胞的分化发挥着重要的负调控作用<sup>[3]</sup>。多物种的报道也显示 *SKIP* 基因与肌纤维发育密切相关:*SKIP* 基因杂合敲除小鼠的特征表型为比目鱼肌及股四头肌质量显著增加<sup>[4]</sup>;猪、牛等经济动物基因组内该基因的定位区域也多分布影响相关性状的 QTL,如猪肌纤维数目、大腿质量及犊牛出生体质量;猪 *SKIP* 基因内的多态可显著影响大白×梅山猪 F2 代群体的背最长肌高度等多项胴体性状<sup>[5]</sup>。*SKIP* 作为家畜骨骼肌生长发育的重要候选基因,目前还没有关于 *SKIP* 对山羊生长性状影响的研究报道。研究山羊 *SKIP* 基因多态性,将其与山羊的生长性状相关联,对于明确 *SKIP* 在山羊肌肉生长发育中的作用和了解山羊生长发育规律具有重要意义。

*SKIP* 最先是由 Ijuin 等<sup>[2]</sup> 在人中发现。*SKIP* 在体外优先水解磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PI-3,4,5-P3)和磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PI-4,5-P2)的 5 位磷酸,因而被鉴定为 5'-肌醇磷酸酶。由于 *SKIP* 的底物 PI-3,4,5-P3 是 PI3K-AKT 信号的第二信使,主要介导胰岛素、IGF1、IGF2 等生长因子的作用,早期报道多将 *SKIP* 作为潜在的糖尿病药物靶点,研究其对胰岛素敏感性、葡萄糖吸收及糖原合成等方面的影响<sup>[6-7]</sup>。自 *SKIP* 杂合敲除小鼠模型建立以来,人们逐渐认识到 *SKIP* 在骨骼肌发育中的作用,开始研究其调控骨骼肌发育的分子机制,且多在细胞水平探讨 *SKIP* 对成肌分化的调控机制,其不同生物体中的遗传多样性鲜有报道。本研究克隆了山羊 *SKIP* 基因,鉴定了它的分子特征,在成肌细胞分化的过程中观察到 *SKIP* 位置的转移,并以引进品种(波尔山羊)和本地品种(麻城黑山羊)为研究对象,分析 *SKIP* 基因的多态性及其对山羊生长

收稿日期:2017-05-10

基金项目:国家自然科学基金青年项目(31402051)

熊琪,博士,副研究员.研究方向:草食家畜的分子育种. E-mail: phenixxq@163.com

通信作者:陈明新,研究员.研究方向:草食家畜育种与繁殖. E-mail: 13807104106@163.com

性状的影响,以期解析不同品种、个体的生产性能差异提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物和样本收集

数据来源于开展杂交育种项目的湖北省农业科学院试验羊场。将麻城黑山羊( $n=10$ )和波尔山羊( $n=10$ )的基因组 DNAs 样本混池,用于筛选 *SKIP* 基因的多态性。收集 318 只波尔×麻城黑山羊 F2 代山羊的生长记录。生长记录包括:出生体质量(birth weight/BW, kg),断奶体质量(weaning weight/WW, kg),成年体长(body length/BL, cm),成年身高(body height/BH, cm),成年胸围(chest circumference/CHC, cm),成年管围(cannon circumference/CC, cm)。血液样本收集到抗凝管中,−80 °C 存储。DNA 从解冻的 1 mL 血液中提取,用

蒸馏水稀释至终质量浓度为 50 ng/μL。

### 1.2 引物设计、PCR 扩增和基因分型

利用 BLAST 程序,在绵羊的 EST 和 WGS 数据库中搜索与牛 *SKIP* 序列(GenBank 登录号:nw\_005392976.1)同源的 EST 和基因组片段。基于组装的重叠群序列,设计引物对 *SKIP*-F 和 *cSKIP*-R(表 1)扩增山羊 *SKIP* 的 cDNA 序列。根据多物种序列比对查找的保守序列,设计 9 对引物扩增山羊 *SKIP* 基因组的 DNA 序列(表 1)。DNA 序列变异利用 Mutation Surveyor™v4.0.4 软件查找。

PCR 和 RT-PCR 程序如下:94 °C 预变性 4 min,然后 94 °C 45 s,退火温度 45 s 以及 72 °C 90 s 循环 35 次,最后 72 °C 延伸 10 min。每个引物对的退火温度如表 1 所示。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳证实后纯化和克隆,克隆产物送测序公司双向测序。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers used in this study

引物 Primers	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	退火温度/°C Temperature	位置 Position	大小/bp Size
<i>cSKIP</i> -F	GGTACCGCCACCATGGAGGCCATGAG	75	编码区	1 350
<i>cSKIP</i> -R	CTCGAGTCAGATCTGTGGCTGGGCTTCAT			
<i>SKIP</i> -F1	CAGGACCGGCGAGGTTCAA	62	启动子-内含子 1	322
<i>SKIP</i> -R1	CGCCGAAGTGGGAAAGAGC			
<i>SKIP</i> -F2	GGCTTCCCTTCTCAGCATA	56	内含子 1-3	680
<i>SKIP</i> -R2	AACTGGGGTTTGGGTCTTT			
<i>SKIP</i> -F3	CCAGATTGCCTCATTTGGC	59	内含子 3-4	683
<i>SKIP</i> -R3	GGCAGGTGGCAGTTGATGA			
<i>SKIP</i> -F4	CTTCTGCCACCTACCAG	59	内含子 4-外显子 6	837
<i>SKIP</i> -R4	ATCCGAAAGTTCATGTCTCCA			
<i>SKIP</i> -F5	TTGGAGACATGAACTTTCGG	59	外显子 6-内含子 7	987
<i>SKIP</i> -R5	GGCTGGATCTAGTCCTGCTC			
<i>SKIP</i> -F6	ATTGCCTTTCCTCCAGGT	58	内含子 7-8	536
<i>SKIP</i> -R6	CTGTGTCAGACTCAGCCAAGG			
<i>SKIP</i> -F7	GTACACCATCAGTGACCATAAGCC ATAGCAT-	61	外显子 8-内含子 9	1 214
<i>SKIP</i> -R7	TATCTGCCTCCTCCC			
<i>SKIP</i> -F8	TCCTACAGGTGGGGCTGCG	59	内含子 9-11	439
<i>SKIP</i> -R8	TGCATTGCAGGCGGATCTT			
<i>SKIP</i> -F9	TGCCCTTGCCCTTCCACT	58	内含子 11-3'非翻译区	623
<i>SKIP</i> -R9	AGACCCTCTGCCACCCCTC			

取 20 μL 含 SNP 位点的 PCR 产物用 10 U *Bgl* I (MBI Fermentas)在 37 °C 消化 4 h 后,在 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,酶切产物用溴化乙锭染色。

### 1.3 生物信息学分析

该蛋白的理论分子质量和等电点的预测性分析、亚细胞定位预测、跨膜区和信号肽预测,分别用在线软件 Compute pI/Mw ([http://au.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html)), ProtScale (<http://au.expasy.org/tools/protscale.html>), PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>), TMpred ([\[www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\\_form.html\]\(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\_form.html\)\)和 SignalP Server \(<http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>\)来实现。Clustal W 用来进行核苷酸序列比对,MEGA 4 用来构建系统发育树,CD-Search \(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>\)用来识别蛋白的保守结构域。](http://</a></p>
</div>
<div data-bbox=)

### 1.4 统计学分析和性状关联分析

利用基因计数计算等位基因频率。哈代-温伯格平衡(HWE)检验用于计算实际基因型分布与期望分布的偏差。使用 SPSS 19 的一般线性混合效应

模型(GLMMs)进行 *SKIP* 基因型与生长性状的关联分析。通过对每个性状进行多元回归和方差分析,确定后续分析的固定效应。对具有固定效应的所有可能组合的几种模型进行了测试,并对每种效应的意义进行了系统评估。每个非显著效应都以逐步的方式从模型中移除。最终模型为:

$$Y_{ikm} = \mu + i_i + a_k + d_m + e_{ikm} \quad (1)$$

$$Y_{ijm} = \mu + i_i + b_j + d_m + e_{ijm} \quad (2)$$

$$Y_{ijlm} = \mu + i_i + b_j + c_l + d_m + e_{ijlm} \quad (3)$$

$$Y_{im} = \mu + i_i + d_m + e_{im} \quad (4)$$

在所有模型中, $Y$  为性状值, $i$  为基因型固定效应, $a$  为公羊固定效应, $b$  为窝别固定效应, $c$  为性别固定效应, $d$  为动物随机效应, $\mu$  为单个性状的平均值, $e$  为随机误差。模型 1 用来分析 BW 和 BL,模型 2 用来分析 WW 和 CHC,模型 3 用来分析 BH,模型 4 用来分析 CC。另外,WW 还作为分析体尺性状(BL,BH,CHC 和 CC)基因型效应的协变量。

### 1.5 细胞培养

骨骼肌细胞 C2C12(小鼠)购自美国 ATCC 公司(no.CRL-1772)。细胞生长培养基是在 DMEM 培养液(Invitrogen 公司)添加 10% (体积/体积)的胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 g/mL 链霉素(Invitrogen 公司)。细胞在含 2% 马血清的 DMEM 液(Invitrogen)培养分化为肌管。

### 1.6 免疫荧光

将 C2C12 细胞( $1 \times 10^4$  细胞)培养在盖玻片上,添加含 10% 的胎牛血清或 2% 马血清的培养基培养或诱导分化。盖玻片先用 PBS 洗 2 次,加 3.7% 甲醛固定 15 min,再用 0.2% Triton X-100 渗透处理 5 min,然后用 PBS 洗 1 遍。用 *SKIP* 多克隆抗体(GeneTex)孵育 2 h 后,加荧光标记二抗或 FITC 标记的鬼笔环肽(Sigma)孵育 1 h,再用荧光显微镜观察细胞。

## 2 结果与分析

### 2.1 山羊 *SKIP* 基因克隆

基于绵羊 EST 数据库检索的序列重叠群,引物对 *SKIP*-F 和 *cSKIP*-R 扩增了 1 350 bp 的序列(图 1),包含了编码 449 个氨基酸的完整编码区序列。根据 NCBI 中的 HomoloGene 数据库,山羊 *SKIP* 比人(448 个氨基酸)、牛(416 个氨基酸)和绵羊(416 个氨基酸)的同源基因要长,比小鼠(468 个氨基酸)和猪(450 个氨基酸)的同源基因要短。基

于 NCBI 中最近发布的山羊基因组序列数据库,核苷酸序列 BLAST 比对发现,*SKIP* 与山羊 19 号染色体中的一段序列(GenBank 登录号 AJPT01177202.1)具有完全的相似性,表明 *SKIP* 位于山羊 19 号染色体。

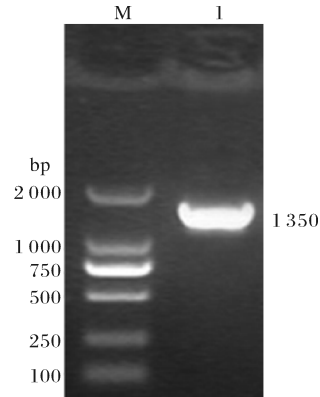


图 1 *SKIP* 基因 mRNA 的 RT-PCR 扩增结果

Fig.1 RT-PCR amplification result of *SKIP* gene

### 2.2 序列同源性和系统发育树分析

为明确山羊 *SKIP* 与其他脊椎动物的系统发育关系,构建了系统发育树(图 2)。系统发育分析显示,山羊 *SKIP* 与绵羊(99.52%)、牛(97.84%)和猪(89.76%)的亲缘关系较近,与人(78.12%)、小鼠(74.16%)及鸡(55.9%)的亲缘关系较远。

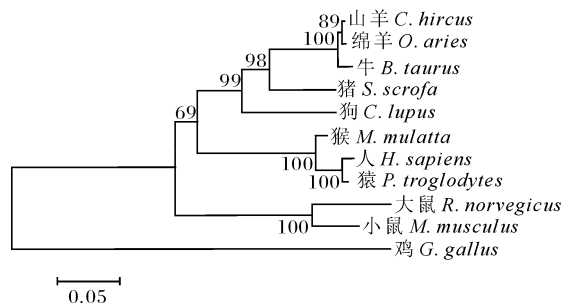


图 2 山羊 *SKIP* 蛋白的系统进化树

Fig.2 The phylogenetic tree of caprine *SKIP* protein

### 2.3 *SKIP* 蛋白的物理化学特性

*SKIP* 的预测蛋白质分子质量和 pI 值分别为 52.0 ku 和 5.18,它包含在物种之间保守的典型磷脂酰肌醇 5-磷酸磷酸酶(COG5411)结构域(图 3)。ProtScale 程序的亲水分析表明 *SKIP* 蛋白含有典型的疏水区域,其最大亲水和疏水值分别为 2.278 和 -2.922。PSORT II 程序的亚细胞定位预测分析表明,大部分蛋白质位于细胞质中(概率为 60.9%),有些位于细胞核中(概率为 26.1%),少量位于线粒体和细胞骨架(概率分别为 8.7%和 4.3%)。TM-

pred 程序的跨膜(TM)区域预测表明,SKIP 是潜在 TM 蛋白,模型预测它从 345 到 366 的氨基酸残基

是 TM 段。SignalP 3.0 的信号肽预测显示,该多肽在其氨基酸中不含有信号肽,是非分泌性蛋白质。

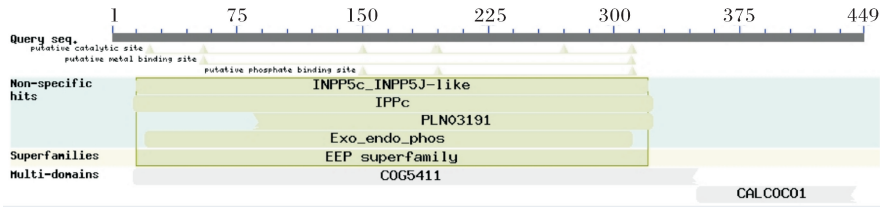


图 3 山羊 SKIP 蛋白的保守结构预测

Fig.3 Prediction for conserved domain of caprine SKIP protein

2.4 多态性检测和关联分析

序列比较显示 SKIP 内含子 2 的 290 bp 处有 1 个 G/A 突变(图 4A),引起 Bgl I 酶切位点的改变。利用 PCR-RFLP 方法对包含有 Bgl I 位点的片段进行扩增,获得了 3 种基因型:GG(410 bp 和

270 bp),GA(680 bp,410 bp 和 270 bp)和 AA(680 bp)(图 4B)。SKIP 的等位基因分布表明,波尔山羊和麻城黑山羊在这个位点均有多态。表 2 列出了等位基因频率和哈迪-温伯格平衡(HWE)检验 P 值。2 个品种的 SNP 均符合哈迪-温伯格平衡。

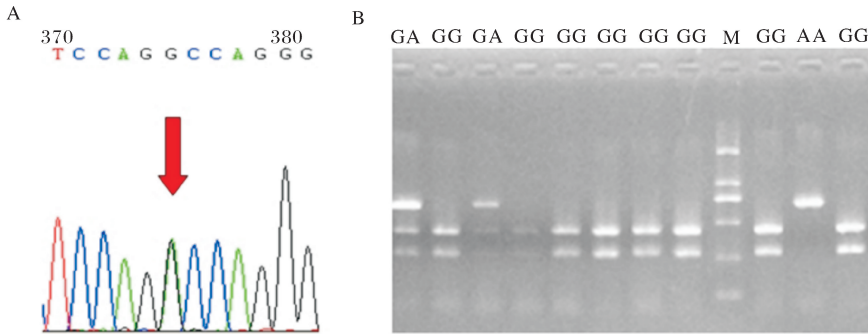


图 4 山羊 SKIP 基因的 SNP 测序图谱(A)及 PCR-Bgl I -RFLP 基因分型电泳图(B)

Fig.4 SNP detected in caprine SKIP gene, as shown by sequencing chromatograms (A) and PCR-Bgl I -RFLP analysis (B)

表 2 山羊 SKIP 突变位点在不同山羊品种中的基因频率及哈迪-温伯格平衡分析

Table 2 Allele frequency differences between different breeds at the caprine SKIP SNP locus

品种 Breeds	数量 Number	基因型 Genotype			等位基因频率 Allele frequency		哈迪-温伯格检验 P 值 Hardy-Weinberg test P value
		GG	GA	AA	G	A	
波尔山羊 Boer goat	36	10	20	3	0.606 1	0.393 9	0.122 0
麻城黑山羊 Macheng black goat	29	21	7	1	0.844 8	0.155 2	0.669 1

选用 318 只波尔×麻城黑山羊 F2 代山羊个体,进行 SKIP 基因型与生长性状的关联分析。发现 SKIP 的 G/A 突变与出生体质量(BW; P < 0.05)、胸围(CHC; P < 0.05)、管围(CC; P < 0.05)

和体高(BH; P < 0.05)显著相关(表 3)。与 AA 基因型相比,GG 基因型显示较高的 BW、CHC、CC 和 BH。等位基因 G 似乎与 BW、CHC、CC 和 BH 值的增加有关。

表 3 山羊 SKIP 基因型与生长性状的关联分析

Table 3 Association analysis of caprine SKIP genotypes with growth traits

性状 Traits	基因型 Genotype			P 值 P value
	GG (N=208)	GA (N=81)	AA (N=29)	
出生体质量/kg BW	2.474±0.368a	2.736±0.541a	1.921±0.454b	0.032
胸围/cm CHC	67.870±5.114a	62.563±5.621b	58.500±9.192b	0.013
管围/cm CC	9.976±0.934a	10.126±0.676a	8.100±1.273b	0.021
身高/cm BH	63.130±2.245a	59.920±3.026a	59.216±2.693b	0.043

注:含不同小写字母的最小二乘均值(±标准误)间差异显著(P < 0.05)。Notes:Least square mean values (±SE) with different letters are significantly different with upper case superscripts at P < 0.05.

## 2.5 SKIP 的细胞定位

对 SKIP 的免疫荧光分析发现在未分化的成肌细胞中,SKIP 定位于细胞质并集中在细胞核中;在分化的成肌细胞中,SKIP 集中在细胞质,在细胞核中仅呈点状分布(图 6),表明 SKIP 随着成肌分化从

细胞核转移到细胞质。同时,在未分化的成肌细胞中可清晰观察到肌动蛋白应激纤维,在分化的成肌细胞中,应激纤维变模糊,特别是在 SKIP 富集的细胞融合区域,验证了 SKIP 在肌动蛋白应激纤维重排中的作用。

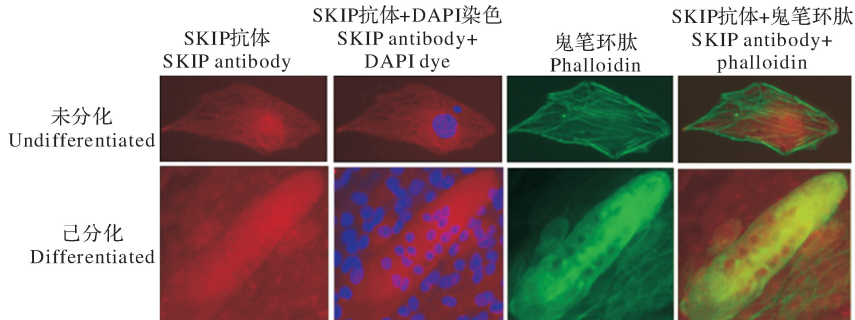


图 5 SKIP 在 C2C12 成肌细胞分化前后的细胞定位

Fig.5 Intracellular localization of SKIP in differentiating C2C12 myoblast cells

## 3 讨论

Ijuin 等<sup>[3,6]</sup>指出 SKIP 是肌肉细胞分化的关键调控因子,笔者前期研究发现,SKIP 在骨骼肌发育过程中表达上调,并由 MyoD 转录因子控制<sup>[1]</sup>,也表明 SKIP 在骨骼肌发育中发挥作用。但针对山羊的 SKIP 的研究鲜有报道。本研究克隆获得了山羊 SKIP 的 1 350 bp mRNA 序列,发现它位于山羊 19 号染色体,与绵羊 11 号染色体 q1.5-1.6 区域序列高度同源。该区域有影响胴体质量(屠宰)、热胴体质量和内部脂肪量的 QTL。通过扫描山羊 SKIP 基因组序列及性状关联分析,发现与山羊出生体质量显著相关的 1 个突变位点 G/A,其中等位基因 G 与生长性能的提高相关。与 AA 基因型相比,GG 基因型具有较高的出生体质量。这一结果与 SKIP 调控动物出生前骨骼肌纤维发育的报道是一致的。SKIP 基因多态与其他生长性状如胸围、管围和体高之间也存在显著相关性,在猪中,SKIP A17G 突变显著影响第一脊椎的胴体长度以及第一肋骨的胴体长度<sup>[5]</sup>。表明 SKIP 还与骨发育有关。尽管这一 SNP 位点位于山羊 SKIP 的第 2 内含子,可能不是差异表型的致因突变,但不能排除其与致因突变处于同一个连锁不平衡区域中;或者第 2 内含子 SNP 处有 SKIP 转录调控元件的结合位点,导致 SKIP 表达量的改变。

考虑到 SKIP 在肌肉细胞分化中的重要作用,本研究进行了 SKIP 在成肌分化前后的亚细胞定位。在未分化肌细胞中 SKIP 定位于细胞质并集中

于细胞核;响应分化信号后,大量 SKIP 从核内转移到细胞质。成肌分化涉及细胞形态改变,细胞迁移和细胞融合等事件。每一事件过程都需要一些细胞表面受体的相互作用,信号通路的激活以及肌动蛋白细胞骨架的重塑等。SKIP 可能通过水解 PI-4,5-P2 或 PI-3,4,5-P3 调节肌管融合过程中肌动蛋白细胞骨架的重排。作为 PI3K 的底物,PI-4,5-P2 本身就是调节肌动蛋白聚合的信号分子<sup>[8]</sup>。PI-3,4,5-P3 作为 PI3K-Akt 信号传导的第二信使,也介导生长因子诱导的肌动蛋白细胞骨架重排,导致应激纤维分解和膜皱褶的形成<sup>[9-10]</sup>。本研究发现 SKIP 聚集处肌动蛋白应激纤维变模糊,证实 SKIP 参与成肌分化过程中肌动蛋白细胞骨架重塑。

本试验结果证实了 5'-肌醇磷酸酶 SKIP 在骨骼肌分化和发育中的调节作用,并为山羊新品种选育提供了可供参考的遗传标记。

## 参 考 文 献

- [1] XIONG Q, CHAI J, ZHANG P P, et al. Myod control of skip expression during pig skeletal muscle development[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38(1): 267-274.
- [2] IJUIN T, MOCHIZUKI Y, FUKAMI K, et al. Identification and characterization of a novel inositol polyphosphate 5-phosphatase[J]. J Biol Chem, 2000, 275(15): 10870-10875.
- [3] IJUIN T, TAKENAWA T. Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (pip3) 5-phosphatase skeletal muscle- and kidney-enriched inositol polyphosphate phosphatase (skip) in myoblast differentiation [J]. J Biol Chem, 2012, 287 (37): 31330-31341.
- [4] IJUIN T, YU Y E, MIZUTANI K, et al. Increased insulin ac-

- tion in skip heterozygous knockout mice[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(17): 5184-5195.
- [5] XIONG Q, CHAI J, DENG C, et al. Characterization of porcine skip gene in skeletal muscle development; polymorphisms, association analysis, expression and regulation of cell growth in C2C12 cells[J]. *Meat Sci*, 2012, 92(4): 490-497.
- [6] IJUIN T, TAKENAWA T. Skip negatively regulates insulin-induced glut4 translocation and membrane ruffle formation[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(4): 1209-1220.
- [7] XIONG Q, DENG C Y, CHAI J, et al. Knockdown of endogenous skip gene enhanced insulin-induced glycogen synthesis signaling in differentiating C2C12 myoblasts [J]. *BMB Rep*, 2009, 42(2): 119-124.
- [8] TAKENAWA T, MIKI H. Wasp and wave family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement[J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(10): 1801-1809.
- [9] MARTIN S S, ROSE D W, SALTIEL A R, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is necessary and sufficient for insulin-stimulated stress fiber breakdown[J]. *Endocrinology*, 1996, 137(11): 5045-5054.
- [10] MARTIN S S, HARUTA T, MORRIS A J, et al. Activated phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to mediate actin rearrangement and glut4 translocation in 3t3-l1 adipocytes[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(30): 17605-17608.

## Isolation and identification of goat *SKIP* gene and its association with growth traits

XIONG Qi<sup>1</sup> ZHANG Nian<sup>1</sup> LI Xiaoshan<sup>2</sup> LI Xiaofeng<sup>1</sup> SUO Xiaojun<sup>1</sup>  
YANG Qianping<sup>1</sup> TAO Hu<sup>1</sup> CHEN Mingxin<sup>1</sup>

1. *Hubei Key Laboratory of Animal Embryo Engineering and Molecular Breeding, Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China;*

2. *Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education/Key Laboratory of Swine Genetics and Breeding of Ministry of Agriculture/ the Cooperative Innovation Center for Sustainable Pig Production, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** In order to explore the effect of the goat *SKIP* gene on growth and development, and find the molecular markers associated with growth trait in goats, primers were designed according to the homologous sequence of the bovine *SKIP* gene. A 1 350 bp expressed sequence of the goat *SKIP* gene was amplified by RT-PCR, including the complete coding sequence, encoding 449 amino acids. Through sequence comparison and phylogenetic analysis, it was found that the *SKIP* sequences between goat and sheep had the highest similarity (99.52%). Physical and chemical characteristics of the *SKIP* protein were predicted by bioinformatic methods. The predicted *SKIP* protein has a calculated molecular weight of 52.0 ku and a pI of 5.18, and contains a typical phosphatidylinositol 5-phosphate phosphatase (COG5411) domain which is conserved among species. Most of the *SKIP* protein was located in the cytoplasm (60.9%) and nucleus (26.1%), which was verified by indirect immunofluorescence assay. However, there was a dynamic transfer of *SKIP* from the nucleus to cytoplasm during myoblast differentiation. A single-nucleotide polymorphism (SNP) G/A was detected in the second intron of the *SKIP* in the Boer and Macheng Black goat breeds. PCR-RFLP was used to genotype this SNP in 318 F2 hybrids of Boer × Macheng Black goats. The SNP was significantly associated with four traits including birth weight, chest circumference, cannon circumference and body height. Allele G seemed to be associated with fast-growth trait.

**Keywords** single nucleotide polymorphism; goat; *SKIP*; growth trait; myoblast differentiation

(责任编辑:边书京)