

贺生中,狄和双,郑筱峰,等. 贵宾犬 *FSH β* 基因多态性与产仔数的相关性分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):24-26.

贵宾犬 *FSH β* 基因多态性与产仔数的相关性分析

贺生中,狄和双,郑筱峰,蒋珊珊,王丽华

(江苏畜牧兽医职业技术学院,江苏泰州 225300)

摘要:采用 PCR-SNP 的方法检测贵宾犬 *FSH β* 基因第 1 内含子、第 2 外显子中存在的点突变,并分析该基因对产仔数的影响。结果表明:在 *FSH β* 基因内含子和外显子中分别发现了 C979G 和 A257G 突变,外显子的 A→G 突变未影响氨基酸序列。内含子中的突变以 CG 型的频率最高,为 0.488 4,其次为 CC 型;在群体中 C 等位基因频率比 G 等位基因频率高。外显子中的突变以 AG 型的频率最高,为 0.627 9,其次为 GG 型;在群体中 G 等位基因频率比 A 等位基因频率高。贵宾犬群体纯合度为 0.509 7,多态信息含量为 0.370 1。在内含子中,CG 型产仔数比 CC 型高 0.67 条;在外显子中 AG 型产仔数比 GG 型高 0.76 条。但 2 个点突变的基因型与其他基因型相比产仔数差异不显著($P > 0.05$),表明 *FSH β* 基因多态与贵宾犬的产仔数不具有显著相关性。

关键词:犬;*FSH β* 基因;产仔数

中图分类号: S829.22 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0024-03

玩具贵宾犬作为小型室内玩赏犬深受人们的喜爱,市场需求量也较大。但是玩具贵宾犬体型较小,每胎产仔数约为 3 只。近年来在经济利益的驱使下,贵宾犬被大量繁殖,小群体近亲繁育现象导致贵宾犬良莠不齐,繁殖力降低。因此,提高贵宾犬的繁殖能力,建立高繁殖力贵宾犬的育种核心群,可以有效地满足市场的需求。近年来,在动物常规育种的基础上,越来越多的研究者尝试了采用候选基因法作为标记辅助选择依据,快速提高所选择的性状,并取得了一些成效。促卵泡素(follicle-stimulating hormone, FSH)是下丘脑-垂体-性腺轴中的主要激素之一,能促进颗粒细胞增生,刺激类固醇生产,刺激卵泡的生长和发育,影响生长卵泡的数量,激发卵泡的最后成熟,诱发排卵,在哺乳动物繁殖过程中起重要作用^[1]。FSH 由 α 、 β 2 个亚基组成,其中 β 亚基参加了受体结合的过程^[2]。到目前为止,*FSH β* 基因多态性与猪、牛、羊等

动物的生产性能的关系研究较多^[3-8],而犬类的研究报道甚少。本研究以 PCR-SNP 的方法检测玩具贵宾犬 *FSH β* 中潜在的点突变,分析点突变引起的等位基因在群体中的分布情况,并分析产仔数在不同基因型之间的差异,为快速、大量繁殖玩具贵宾犬提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以江苏省泰州市某宠物犬扩繁基地中饲养的 43 只玩具贵宾犬为试验素材。腿部静脉采血 5 mL,采用肝素抗凝,离心去除大部分血浆,采用血液基因组提取试剂盒提取 DNA,直接用于 PCR 扩增。

1.2 PCR 引物的设计

根据 GenBank 中公布的犬 *FSH β* 基因序列(No. HQ385979)在第 1 内含子末端和第 2 外显子末端设计一对引物 FSH1, F:TTCCCGAATGCTTTAGCCTGACTC, R:TTCCTGCTGCGGCTCTCCGAAG,扩增长度 277 bp,退火温度 58 ℃,扩增 *FSH β* 基因的第 2 外显子序列。引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。

1.3 PCR 扩增

PCR 扩增体系为 50 μ L:10 \times PCR buffer(without Mg^{2+})

kinase;conservation of a three-kinase module from yeast to human [J]. Physiol Rev,1999,79(1):143-180.

[12] 廖夏林,金卫根. 内源性一氧化氮的生物学效应[J]. 曲阜师范大学学报:自然科学版,2000,26(4):83-84.

[13] 郝军,石宏,赵松,等. 靶向抑制人 SREBP-1 基因对高糖刺激下人肾小管上皮细胞脂滴形成的影响[J]. 中国药理学通报,2009,25(3):371-377.

[14] 王玉霞,孙永玉. PPAR γ 与多囊卵巢综合征胰岛素抵抗的研究[J]. 国外医学:妇幼保健分册,2004,15(3):185-187.

[15] Hardouin N, Nagy A. Gene-trap-based target site for cre-mediated transgenic insertion [J]. Genesis, 2000, 26(4):245-252.

收稿日期:2012-11-22

基金项目:江苏畜牧兽医职业技术学院院级课题(编号:ZD201006、ZD200910)。

作者简介:贺生中(1962—),男,江苏兴化人,教授,主要从事动物医学研究。E-mail:szh88@hotmail.com。

通信作者:王丽华,副教授,主要从事畜牧研究。E-mail:jstzwlh2008@163.com。

[7] Rutanen E M, Koistinen R W, Wahlstrom T, et al. Synthesis of placental protein 12 by human deciduas [J]. Endocrinology, 1985, 116(4):304-309.

[8] Lee P D, Giudice L C, Conover C A, et al. Insulin-like growth factor binding protein-1: recent findings and new directions [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1997, 216(3):319-357.

[9] Hayashi K, Carpenter K D, Welsh T H Jr, et al. The IGF system in the neonatal ovine uterus [J]. Reproduction, 2005, 129(3):337-347.

[10] 王冰,李宏亮,杨文英. 胰岛素信号转导通路与 β 细胞分泌功能的关系及机制 [J]. 中日友好医院学报, 2008, 22(1):57-58.

[11] Widmann C, Gibson S, Jarpe M B, et al. Mitogen-activated protein

5 μL 、10 mmol/L dNTPs 4 μL 、25 mmol/L MgCl_2 3 μL 、10 pmol/L 上下游引物各 2 μL 、5 U/ μL *Taq* 酶 0.4 μL 、100 ng/ μL DNA 模板 2 μL ，加 ddH₂O 至 50 μL 。

PCR 扩增条件：94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5min；94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，共 35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳，检测扩增结果。

1.4 测序

将获得的 PCR 产物直接送于上海桑尼生物科技有限公司进行凝胶回收、测序。

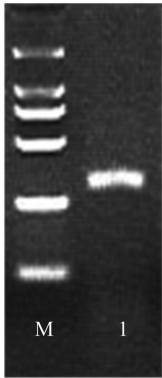
1.5 数据统计分析

统计基因型的数量，计算等位基因频率，并计算纯合度、杂合度和多态信息含量，用软件 SPSS 13.0 中单因素模式分析不同基因型间产仔数的差异。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

以犬基因组为模板，用引物 FSH1 进行 PCR 扩增，在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳检测 PCR 产物。电泳检测结果（图 1）显示，条带单一明显，长度约为 270 bp，与预期长度相符，初步分析为目的片段。



M—分子量标准；1—引物 FSH1 的 PCR 扩增产物
图1 PCR 产物的 1.2% 琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 PCR 产物测序结果

应用 PCR 产物直接测序方法检测贵宾犬 *FSH β* 基因第 2 外显子序列，通过 DNAMAN 软件进行序列比较，在 *FSH β* 基因扩增片段中共检测到 2 个点突变，分别为内含子 C979G 和外显子 A257G（图 2、图 3），外显子的 A - G 突变未影响氨基酸序列，为同义突变。

2.3 不同基因型（基因）频率分布情况

根据测序结果对贵宾犬群体进行基因型判别，*FSH* 内含子第 979 位的 C→G 突变共产生了 3 种基因型，以杂合子 CG 型的频率最高，为 0.488 4，其次为 CC 型；群体中 C 等位基因的频率比 G 等位基因频率高，2 个等位基因所占比例都比较接近 0.5（表 1）。外显子第 257 位的 A→G 产生了 3 种基因型，以杂合子 AG 型的频率最高，为 0.627 9，其次为 GG 型（表 2）。

2.4 遗传特性分析

由表 3 可知，贵宾犬在这 2 个点突变上纯合度均为 0.509 7，杂合度为 0.490 3，多态信息含量为 0.370 1。

2.5 突变位点与产仔数的相关性

本试验分析了不同位点产生的基因对贵宾犬产仔数的影

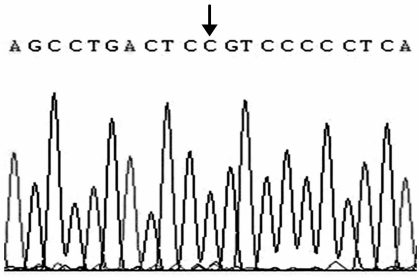


图2 *FSH β* 基因内含子第 979 位点的 C→G 突变

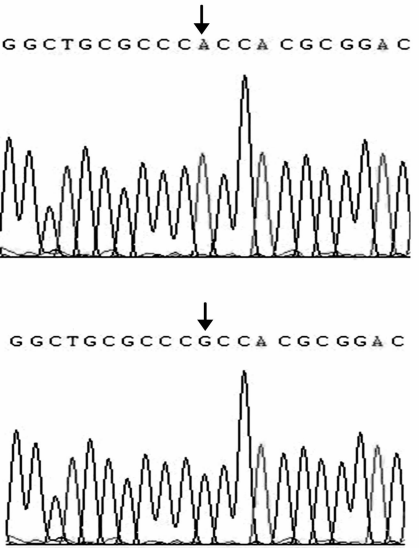


图3 *FSH β* 基因外显子第 257 位点的 A→G 突变

表 1 *FSH β* 基因内含子 C979G 突变在贵宾犬群体中的基因型及等位基因频率分布

品种	样本量	基因型频率			基因频率	
		CC	CG	GG	C	G
贵宾犬	43	0.325 6	0.488 4	0.186 0	0.569 8	0.430 2

表 2 *FSH β* 基因外显子 A257G 突变在贵宾犬群体中的基因型及等位基因频率分布

品种	样本量	基因型频率			基因频率	
		AA	AG	GG	A	G
贵宾犬	43	0.116 3	0.627 9	0.255 8	0.430 2	0.569 8

表 3 贵宾犬群体不同位点遗传参数

位点	纯合度	杂合度	多态信息含量
C979G	0.509 7	0.490 3	0.370 1
A257G	0.509 7	0.490 3	0.370 1

响。由表 4 可见,在 C979G 位点产生的 3 个基因型中,CG 基因型的产仔数最高,其次为 GG 基因型,CC 基因型产仔数最少,但是三者差异未达显著水平。在 A257G 位点产生的 3 个基因型中,以杂合子 AG 基因型产仔数最高,平均为 3.85 只/胎;AA 基因型产仔数次之,平均为 3.20 只/胎,GG 基因型产仔数最低,比 AG 基因型低近 0.76 只/胎,同样不同基因型间的差异也未达显著水平。

表 4 不同基因型之间产仔数的比较

位点	基因型	样本量	产仔数(只/胎)
C979G	CC	14	3.14 ± 0.95
	CG	21	3.81 ± 1.03
	GG	8	3.75 ± 1.39
A257G	AA	5	3.20 ± 0.84
	AG	27	3.85 ± 1.06
	GG	11	3.09 ± 1.14

3 讨论

犬的繁殖性状遗传力低,采用常规的选择方法来提高群体的繁殖性能,收效甚微。随着功能基因研究的不断深入,尤其是人类功能基因研究计划的启动,尝试采用分子标记对提高产仔数开展标记辅助选择是提高犬繁殖性状的途径之一。

FSH 的合成和分泌受到下丘脑分泌的 GnRH 和性腺内类固醇激素的影响。初生雌性哺乳动物的血液中 FSH 含量很低,随着动物的年龄增长而缓慢上升;到初情期后,垂体才大量分泌并释放 FSH,使血液中 FSH 的浓度大幅度升高。在猪、羊等家畜动物中,高产仔数的个体血液中的 FSH 浓度要比同类个体中产仔数少的个体高^[9-11]。在牛、羊的研究中已证实抑制素所引起的排卵率的增加也最终归因于 FSH 浓度的上升^[12-14]。近年来,国内许多研究者尝试了将 *FSHβ* 基因作为影响哺乳动物产仔数性状的一个候选基因,在该基因的突变研究中取得了一些成果。在不同猪品种中,该基因结构存在较多的点突变,并且它们对产仔数有相似的效应^[3-5],说明该基因对猪的繁殖性状有显著影响。同样,羊和牛的 *FSHβ* 点突变研究也表明它可能是控制多胎性状的一个主效基因或是与主效基因存在精密遗传连锁的一个标记^[6-8]。

本试验采用 PCR 产物直接测序的方法,检测了 *FSHβ* 基因内含子和第 2 外显子在贵宾犬群体中存在的分布情况。在内含子第 979 位点检测到了 C→G 突变,以杂合子 CG 型的频率最高,GG 纯合子频率最小,贵宾犬群体以 C 等位基因为主。在内含子点突变与贵宾犬产仔数相关性分析中发现,CG、GG 基因型的产仔数较高,初步显示 G 等位基因对提高贵宾犬产仔数有效应。在 *FSHβ* 基因第 2 外显子第 257 位发现了 A→G 点突变,但是未影响氨基酸序列发生变化,为同义突变;在贵宾犬群体中 AG 基因型的频率最高,其中 G 等位基因频率较高,为主效基因。该点突变与贵宾犬产仔数相关分析中发现,杂合子 AG 型的产仔数最高,比纯合子 GG 型高近 0.76 条/胎,说明只有在这 2 个等位基因均存在时才能提高

贵宾犬产仔数。

本试验研究了 *FSHβ* 基因点突变对贵宾犬产仔数的影响,初步发现一些基因型的产仔数较高,但是与其他基因型相比差异不显著,因此关于这 2 个点突变对贵宾犬的产仔数影响到什么程度,还有待提高样品量进一步研究。

参考文献:

[1] Marshall J C, Kelch R P. Gonadotropin - releasing hormone: role of pulsatile secretion in the regulation of reproduction [J]. N Engl J Med, 1986, 315 (23): 1459 - 1468.

[2] Jameson J L, Becker C B, Lindell C M, et al. Human follicle - stimulating hormone β - subunit gene encodes multiple messenger ribonucleic acids [J]. Mol Endocrinol, 1988, 2 (9): 806 - 815.

[3] 刘婵娟, 曾勇庆, 魏述东, 等. 8 个猪种 *ESR* 和 *FSHβ* 基因合并基因型与繁殖性状关系的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40 (3): 291 - 295.

[4] 罗仍卓么, 王立贤, 孙世铎. 北京黑猪 *FSHβ* 亚基基因的多态性与繁殖性状的关联分析 [J]. 遗传, 2007, 29 (12): 1497 - 1503.

[5] 刘卫东, 吴常信, 陶立. 中国地方品种淮猪 *FSHβ* 亚基、*ESR* 和 *HAL* 基因的多态性及其产仔效应分析 [J]. 中国畜牧杂志, 2006, 42 (15): 4 - 7.

[6] 梁琛, 储明星, 张建海, 等. *FSHβ* 基因 PCR - SSCP 多态性及其与济宁青山羊高繁殖力关系的研究 [J]. 遗传, 2006, 28 (9): 1071 - 1077.

[7] 吴飞, 田兴贵, 杨正梅, 等. 贵州小香羊 *FSHβ* 基因第 2 外显子 SSCP 多态性分析 [J]. 贵州农业科学, 2010, 38 (2): 159 - 160.

[8] 任春明, 字向东, 张重庆, 等. 麦洼牦牛和九龙牦牛 *FSHβ* 基因的 PCR - SSCP 分析 [J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2007, 33 (1): 88 - 91.

[9] Wilkins J F. Method of stimulating ovulation rate in Merino ewes may affect conception but not embryo survival [J]. Anim Reprod Sci, 1997, 47 (1/2): 31 - 42.

[10] 方晓敏, 孟翠, 任守文, 等. 6 个主效基因在苏种猪分子育种中的应用价值 [J]. 江苏农业学报, 2012, 28 (5): 1074 - 1078.

[11] Fleming T S, Greenwood P J, Heath D A, et al. Expression of gonadotrophin subunit genes in sheep that were homozygous carriers and non - carriers of the Booroola fecundity gene *FecB* [J]. J Reprod Fertil, 1995, 103 (2): 315 - 321.

[12] 魏锁成, 巩转娣, 董江陵, 等. 阿拉瑞林主动免疫对绵羊垂体 GnRHR、FSHR 和 LHR 表达及卵巢 GnRHR 分布的影响 [J]. 江苏农业学报, 2012, 28 (1): 114 - 120.

[13] Al - Obaidi S A R, Bindon B M, Findlay J K, et al. Plasma follicle stimulating hormone in Merino ewes immunized with an inhibin - enriched fraction from bovine follicular fluid [J]. Animal Reproduction Science, 1987, 14 (1): 39 - 51.

[14] Scaramuzzi R J, Adams N R, Baird D T, et al. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe [J]. Reprod Fertil Dev, 1993, 5 (5): 459 - 478.