

孟浩浩,许瑞霞,石国庆,等. 阿勒泰羊与新疆细毛羊 *ASIP* 基因多态性与被毛颜色的相关性[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):42-46.

# 阿勒泰羊与新疆细毛羊 *ASIP* 基因多态性与被毛颜色的相关性

孟浩浩<sup>1,2</sup>, 许瑞霞<sup>1,2</sup>, 石国庆<sup>2</sup>, 马春萍<sup>3</sup>, 张永胜<sup>3</sup>, 周月娥<sup>3</sup>, 万鹏程<sup>2</sup>, 代 蓉<sup>2</sup>

(1. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832000; 2. 新疆农垦科学院畜牧兽医研究所, 新疆石河子 832000;

3. 新疆石河子紫泥泉绵羊研究所, 新疆石河子 832000)

**摘要:**利用 PCR-SSCP 方法检测了阿勒泰羊和新疆细毛羊 *ASIP* 基因的多态性位点,并分析各 SNPs 位点与被毛毛色之间的关系。结果表明,阿勒泰羊 *ASIP* 基因外显子 2(g. 100 ~ 104 bp)存在 5 碱基丢失(D5:AGGAA),外显子 4(g. 5172 bp:T→A)存在非同义性突变(Ser→Cys);新疆细毛羊中只发现 *ASIP* 基因外显子 2(g. 100 ~ 104 bp)存在 5 碱基丢失(D5:AGGAA);阿勒泰羊 *ASIP* 基因 2 处 SNPs 与被毛毛色不相关( $P > 0.05$ ),而新疆细毛羊 *ASIP* 基因 5 碱基丢失与被毛毛色极显著相关( $P < 0.01$ )。

**关键词:**新疆细毛羊;阿勒泰羊;*ASIP* 基因;SNPs;毛色;PCR-SSCP

**中图分类号:** S813.8;S826.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0042-04

哺乳动物体内的色素分布广泛、种类多样,大量研究表明,黑色素细胞产生的酪氨酸源性色素(真黑素、褐黑素)是影响皮毛颜色的主要因素<sup>[1]</sup>。褐黑素为溶于碱的圆形红色颗粒,使皮肤、毛发表现为黄色、红色;真黑素比褐黑素难溶解,使皮肤和毛发表现为黑色、褐色<sup>[2]</sup>。动物表皮和毛囊中真黑素、褐黑素的相对表达量最终决定了动物毛色。

*ASIP* 是影响绵羊毛色的主要候选基因,在色素形成中起重要的调控作用<sup>[3]</sup>。它与  $\alpha$ -促黑色素细胞激素( $\alpha$ -MSH)竞争结合黑色素皮质激素受体 1(melanocortin-1, MC1R),使 MC1R 结构改变,抑制环磷酸腺苷(cAMP)酶系统,引起 cAMP 水平下降,通过级联反应,促进褐黑素的产生<sup>[4-5]</sup>。*ASIP* 基因在绵羊基因组中存在多个拷贝和等位基因<sup>[6]</sup>,编码的鼠灰信号蛋白由 133 个氨基酸残基组成。在研究藏羊、哈尔达绵羊等品种时发现,*ASIP* 基因与绵羊的毛色相关。人、马、牛、羊驼、兔、狗等物种 *ASIP* 基因多态性位点与毛色和肤色之间关系的研究已有大量报道,研究发现突变位点与毛色相关,但目前尚未深入探讨细毛羊该基因与毛色形成的关系。因为细毛羊经长期选育均为白色个体,由于生物多样性和种质特性的关系,其他绵羊、山羊的研究结果并不能完全反映新疆细毛羊中该基因的特点。笔者长期从事优质细毛羊的选育研究,在实际生产中发现了自然突变的黑色细毛羊个体,这为开展 *ASIP* 基因与细毛羊毛色形成的关系提供了极好的试验样本。

本研究以新疆细毛羊及阿勒泰羊为模型,探究 *ASIP* 基因 SNPs 位点与绵羊毛色的关系,以期为探明绵羊毛色形成的调控机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集及 DNA 提取

采集新疆农垦科学院试验羊场成年阿勒泰羊(黄色、白色各 1 只,黑色 11 只,棕色 96 只)及新疆细毛羊(棕色 5 只,白色 60 只)耳缘组织(图 1),利用酚-氯仿法提取组织 DNA,经琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测的合格样品放于 -20 ℃ 保存备用。

### 1.2 主要试剂

蛋白酶 K、无水乙醇、Tris-饱和酚、氯仿、常规 PCR 试剂(TaKaRa),琼脂糖、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺(Sigma 公司),DL 100 bp Marker(天根 Code:DM109),变性加样缓冲液[甲酰胺 98%、10 mmol/L EDTA(pH 值 8.0)、0.25% 溴酚蓝、0.25% 二甲苯青]、琼脂糖凝胶回收试剂盒(天根 Code:DP209)。

### 1.3 引物设计

根据 GenBank 数据库中绵羊 *ASIP* 基因(Genbank 登录号:EU420022)设计引物(表 1),这 3 对引物分别位于 *ASIP* 基因的外显子 2、3、4 上,引物由 Invitrogen 公司合成。

### 1.4 *ASIP* 基因核苷酸多态性分析

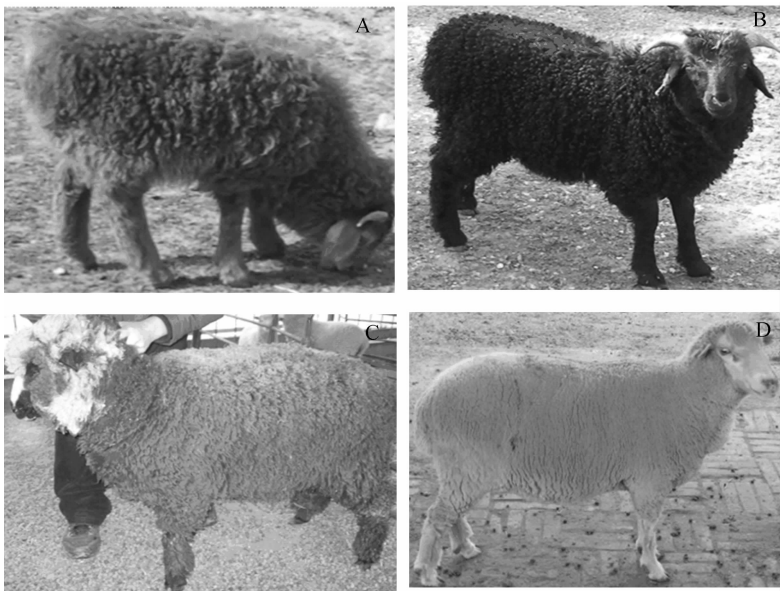
以提取的基因组 DNA 为模板,PCR 反应体系 20  $\mu$ L:模板 50 ng,Buffer 2  $\mu$ L,dNTP 1.6  $\mu$ L,上游/下游引物浓度各为 0.2 mmol/L,r Taq 酶 1.6  $\mu$ L,加 ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu$ L。PCR 扩增条件:94 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 变性 30 s、退火 30 s(表 1)、72 ℃ 延伸 30 s(共 35 个循环),72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,将特异性好的 PCR 产物与变性上样缓冲液混合后,98 ℃ 变性 5 min,立刻冰浴 10 min。用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(1 mm 厚度)检测,300 V 电压预电泳 5 min 使样品快速进入胶中,然后 4 ℃ 恒温 110 V 电压电

收稿日期:2013-10-14

基金项目:国家“863”计划(编号:2011AA100307-06);国家科技支撑计划(编号:2011BAD28B05-1);国家自然科学基金(编号:31001002、31360540)。

作者简介:孟浩浩(1988—),男,江苏丰县人,硕士研究生,主要从事绵羊毛色相关基因的筛选与鉴定研究。E-mail:576270343@qq.com。

通信作者:代 蓉,副研究员,主要从事绵羊育种及养羊技术推广等工作。Tel:(0993)6683760;E-mail:dairong1@163.com。



A.棕色阿勒泰羊; B.黑色阿勒泰羊; C.棕色新疆细毛羊; D.白色新疆细毛羊  
图1 绵羊品种

表 1 PCR 引物及扩增退火温度

引物	引物序列 (5'→3')	产物大小 (bp)	退火温度 (℃)
ASIP-2	F:TCCTGGGATGGATGTC;R:TGGTTTCTCAGAGCCT	406	56
ASIP-3	F:GGCCTAAGTCCCAAGA;R:CATGCAACCCTGAAAA	315	54
ASIP-4	F:CCTCGGCGTTTCCCACA;R:CCCAACCCTAGCTGAGACTTCCTG	343	59

泳 22~24 h,经固定、银染、显色、终止、拍照判读结果。根据 PCR-SSCP 分型结果,将基因型不同的 PCR 产物琼脂糖凝胶回收后送华大基因公司测序。

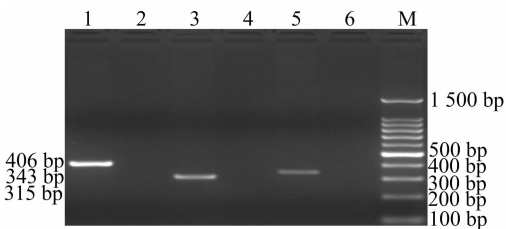
1.5 数据分析

根据聚丙烯酰胺凝胶电泳图,统计各位点的基因型个体数量,计算基因型频率及等位基因频率,卡方检验分析不同毛色的新疆细毛羊、阿勒泰羊基因型频率的分布是否存在显著差异。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

依据本研究设计的 3 对引物对新疆细毛羊、阿勒泰羊基因组进行扩增,经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,扩增效果良好,扩增大小与预期一致(图 2)。



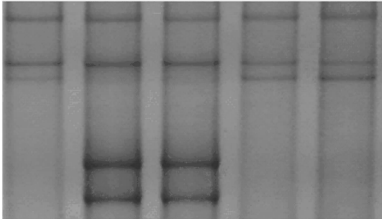
1—ASIP-2; 2—阴性对照; 3—ASIP-3; 4—阴性对照; 5—ASIP-4; 6—阴性对照; M—DL 100 bp marker

图2 ASIP 基因3对引物的 PCR 结果

2.2 ASIP 基因 PCR-SSCP 检测

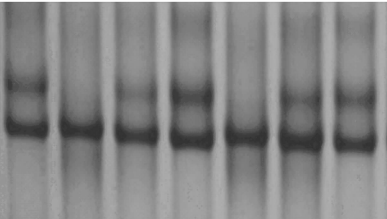
利用 PCR-SSCP 方法检测 ASIP 基因多态性。从图 3 可以看出,ASIP-2、ASIP-4 产物存在多态性,依据带型确定基因型,将其分别命名为 N5D5、N5N5、AB、BB。ASIP-3 无多态性。

N5N5 N5D5 N5D5 N5N5 N5N5



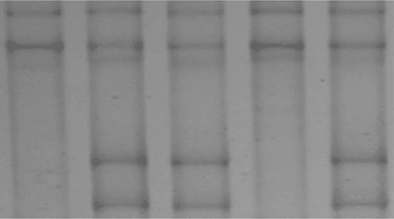
A. 阿勒泰羊ASIP-2片段的 SSCP 结果

AB BB AB AB BB AB AB



B. 阿勒泰羊ASIP-4片段的 SSCP 结果

N5N5 N5D5 N5D5 N5N5 N5D5



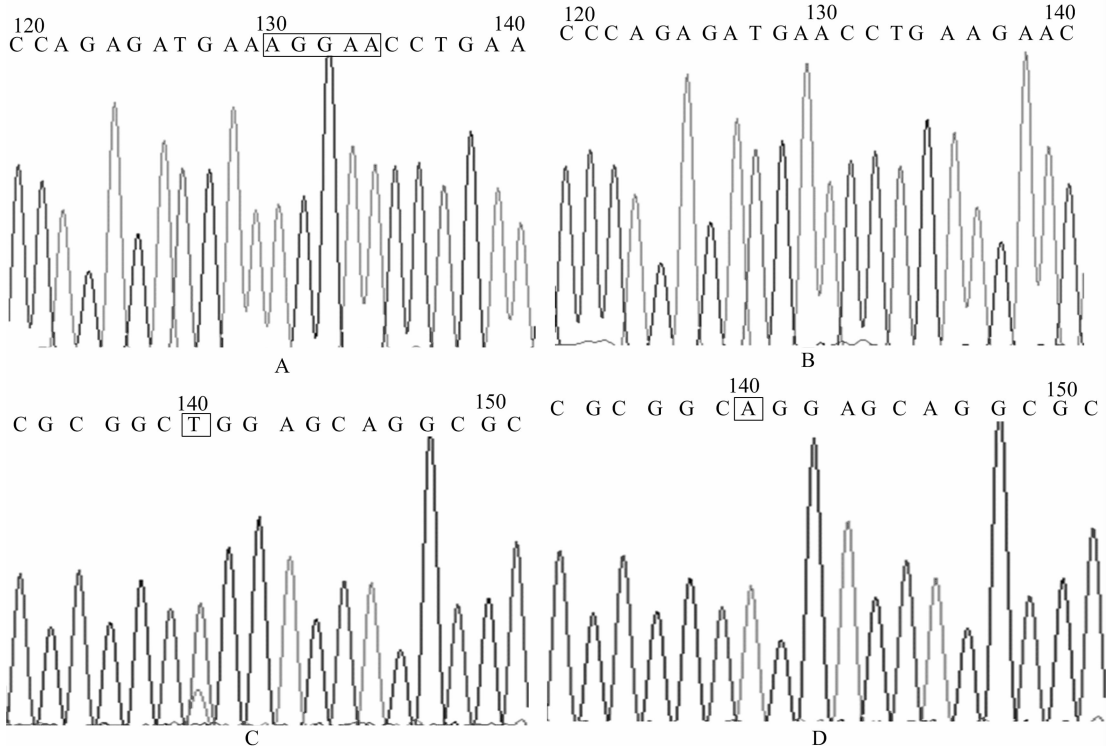
C. 新疆细毛羊ASIP-2片段的 SSCP 结果

图3 ASIP 基因PCR-SSCP 分析

2.3 序列分析

将阿勒泰羊、新疆细毛羊 *ASIP* 不同基因型的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳回收,送华大基因公司测序,部分测序结果见图 4。新疆细毛羊、阿勒泰羊 *ASIP*-2 引物扩增的目的片段出现许多重叠峰,因此采用 PCR 后 TA 克隆测序,发现这

2 种绵羊 *ASIP* 基因 CDS 的 100~104 bp 位置存在相同的 5 碱基丢失(D5:AGGAA);通过阿勒泰羊 *ASIP*-4 上游引物测序得到的碱基序列分析发现,外显子 4 中 g. 5172 bp 位置存在 A→T 的突变,导致原有氨基酸 Cys 变为 Ser(表 2)。



A、B. 外显子 2 突变分析结果,其中 A 为野生型(N5N5),B 为 5 碱基缺失的杂合突变型(N5D5);  
C、D: 外显子 4 突变分析结果,其中 C 为 T、A 碱基替换的突变杂合型(AB),D 为 A 碱基突变纯合型(BB)。

图4 *ASIP* 基因外显子 2、外显子 4 序列突变分析

表 2 *ASIP* 基因中检测到的突变位点

外显子	突变位点	氨基酸改变
2	100~104 bp(D5:AGGAA)	移码突变
4	5172 bp(A→T)	半胱氨酸→丝氨酸

2.4 *ASIP* 各基因型频率与基因频率

从表 3、表 4 可知,本研究中检测到阿勒泰羊、新疆细毛羊外显子 2 有 2 种基因型(N5N5、N5D5),在阿勒泰羊中 N5N5 基因型频率较高,而新疆细毛羊中结果恰好相反。经卡方检验发现,该基因型与阿勒泰羊毛色不存在相关性( $P>0.05$ ),但与新疆细毛羊毛色显著相关( $P<0.01$ )。外显子 4 中检测到 2 种基因型(AB、BB),经卡方检验发现,该位点基因型与 2 种绵羊的毛色不相关( $P>0.05$ )。

3 结论与讨论

阿勒泰羊毛色以棕红色或淡棕色为主,纯黑、纯白、纯黄的阿勒泰羊不多<sup>[7]</sup>;新疆细毛羊以白色为主,黑色或其他毛色的新疆细毛羊稀少。在本研究样品中,棕色阿勒泰羊和白色新疆细毛羊占多数,纯黑、纯白、纯黄的阿勒泰羊及棕色细毛羊个体数较少。为使研究结果更为直观,本研究没有采集头部、四肢与身体毛色相异的阿勒泰羊组织样。

*ASIP* 是影响绵羊毛色的主要候选基因,在绵羊基因组中存在多个拷贝和等位基因<sup>[6]</sup>。*ASIP* 编码的鼠灰信号蛋白由 133 个氨基酸残基组成,在不同品种绵羊中 SNPs 位点存在差异;藏羊的 *ASIP* 基因外显子 2 只存在 5 bp(g. 100~104 bp: AGGAG)的丢失<sup>[8]</sup>;澳大利亚美利奴绵羊<sup>[6]</sup>、哈萨克羊<sup>[9]</sup>外显子 2 既存在 5 bp(g. 100~104 bp: AGGAG)丢失,又存在 9 bp(g. 10~19 bp: AGCCGCCTC)丢失。研究表明,美利奴羊的显性白色受 *ASIP* 基因、AHCY 编码区及 *ITCH* 启动子区域的影响,多拷贝的 *ASIP* 基因编码区受临近的多个 *ITCH* 启动子调控,导致显性白色表型<sup>[6]</sup>;有关藏羊毛色与 *ASIP* 基因拷贝数的研究表明,藏羊纯白与纯黑表型与 *ASIP* 基因拷贝数不相关<sup>[8]</sup>。本研究结果与以往对藏羊<sup>[8]</sup>、美利奴羊<sup>[6]</sup>、哈萨克羊<sup>[9]</sup>的研究结果一致;*ASIP* 基因外显子 3 中没有发现 SNPs 位点。阿勒泰羊 *ASIP* 基因外显子 2 存在 5 bp(g. 100~104 bp: AGGAG)丢失,这与已往研究结果相同。但在供试阿勒泰羊、新疆细毛羊样品中没有发现该品种绵羊存在 9 bp 丢失,可能是由于部分毛色表型的羊个体数较少,致使其没有被检测到,可通过扩大样品量再筛查。

阿勒泰羊原名为福海大尾羊,为新疆地方品种,肉脂兼用粗毛羊,是哈萨克羊的一个优良类群<sup>[10]</sup>。阿勒泰羊毛色以棕红色或淡棕色为主,部分阿勒泰羊头部为黄色或黑色,纯黑、纯白、纯黄的阿勒泰羊不多<sup>[7]</sup>。新疆细毛羊为新疆毛肉兼用

表 3 阿勒泰羊 *ASIP* 基因型频率和基因频率

引物	毛色	基因型	数量 (只)	基因型频率				基因频率				卡方检验 $\chi^2$
				N5D5	N5N5	AB	BB	N5	D5	A	B	
<i>ASIP</i> -2	黄色	N5D5	0	1								4.956
		N5N5	1		1			1				$P>0.05$
	白色	N5D5	1	1				0.5	0.5			
		N5N5	0									
	黑色	N5D5	3	0.23				0.88	0.12			
		N5N5	10		0.77							
	棕色	N5D5	11	0.17				0.92	0.08			
		N5N5	55		0.83							
<i>ASIP</i> -4	黄色	AB	1			1				0.5	0.5	3.111
		BB	0									$P>0.05$
	白色	AB	1			1				0.5	0.5	
		BB	0									
	黑色	AB	4			0.67				0.33	0.67	
		BB	2				0.33					
	棕色	AB	6			1				0.5	0.5	
		BB	0									

表 4 新疆细毛羊 *ASIP* 基因型频率和基因频率

引物	毛色	基因型	数量 (只)	基因型频率		基因频率		卡方检验 $\chi^2$
				N5D5	N5N5	N5	D5	
<i>ASIP</i> -2	白色	N5D5	44	0.73		0.63		11.349
		N5N5	16		0.27		0.37	$P<0.01$
	棕色	N5D5	0					
		N5N5	5		1	1		

细毛羊<sup>[11]</sup>,毛色单一,以白色为主,其他颜色的个体极少。笔者在长期绵羊育种过程中发现了自然突变的棕色新疆细毛羊,这为探讨细毛羊毛色的形成、筛选与之相关的基因提供了极好的研究材料。现在已知功能的基因多是利用小鼠等模式生物的研究结果。棕色或其他颜色的细毛羊很少,因此是研究表型与基因型是否相关的好材料。

有研究表明,*ASIP* 基因的 SNPs 位点与毛色形成相关,如 g. 100 ~ 104(D5:AGGAA)5 bp 丢失导致转录框改变,翻译提前结束,产生只有 63 个氨基酸残基的蛋白,使 *ASIP* 蛋白中重要的半胱氨酸信号区域(氨基酸:91 ~ 130)丢失。哈尔达绵羊中 D5 纯合基因型是决定隐性黑的因素,但不是唯一因素<sup>[3]</sup>。g. 10 ~ 19(D9:AGCCGCCTC)9 bp 丢失导致 3 肽的丢失,可能影响转运前导序列的功能,但不影响剩下的蛋白质功能,g. 5172T→C 导致氨基酸 123 位点 Cys→Ser,可能破坏了 Cys 的高度保守信号区域<sup>[6]</sup>。g. 5051 G→C(同义性突变)、g. 5172 A→T(非同义性突变)是 2 个单核苷酸突变,藏羊<sup>[8]</sup>的 *ASIP* 基因中没有发现 g. 5051 处存在突变,只发现 g. 5172 AA、g. 5172 AT 2 种基因型,且该位点 SNP 与毛色不相关。*ASIP* 基因不同的 SNP 位点组成的不同单倍型与毛色相关,如 N9N5T 单倍型是美利奴绵羊白色表型所必要的<sup>[6]</sup>。*ASIP* 基因的拷贝数也与绵羊毛色相关,Massese 绵羊为意大利特有品种,*ASIP* 在灰色 Massese 绵羊中为单一拷贝,在黑色 Massese 绵羊中为多拷贝<sup>[12]</sup>。本研究发现,阿勒泰羊 *ASIP* 基因只存在 2 处突变:(1) g. 100 ~ 104 bp(D5:AGGAA);(2) g. 5172 bp(T→A),卡方检验发现,这 2 处突变与毛色不相关( $P>0.05$ )。新疆细毛羊 *ASIP* 基因只发现 1 处缺失突变:

g. 100 ~ 104 bp:AGGAA,而且新疆细毛羊 N5D5 的基因型频率比阿勒泰羊高,卡方检验发现,细毛羊中 D5 突变与毛色存在极显著相关性( $P<0.01$ )。本研究中阿勒泰羊的研究结果与藏羊<sup>[8]</sup>、哈萨克羊<sup>[9]</sup>中 *ASIP* 基因 g. 100 ~ 104(D5:AGGAA)5 bp 丢失,g. 5172 bp(T→A)位点与毛色相关性分析结果一致;新疆细毛羊 *ASIP* 基因 g. 100 ~ 104(D5:AGGAA)5 bp 丢失的研究结果与哈尔达绵羊<sup>[3]</sup>的一致。本研究还发现,g. 5172 bp 处只有 AB、BB 2 种基因型,没有发现 AA 型,该结果与以往研究报道的几个绵羊品种的分析结果一致。

阿勒泰羊属于哈萨克羊的一个分支<sup>[13]</sup>,经过人工选择培育使其体型、产肉等方面有别于哈萨克羊<sup>[7]</sup>。李洪涛等研究发现哈萨克羊中存在 D5、D9 缺失<sup>[9]</sup>,但本研究中阿勒泰羊样本中没有发现 D9 缺失突变,只检测到 D5 缺失。在阿勒泰羊中 D9 缺失突变是否存在还要通过进一步扩大样本数量进行分析。在发现有色细毛羊个体之前,由于缺少不同毛色的细毛羊个体,无法进行该基因与毛色相关的研究。本研究发现,*ASIP* 基因的 2 处 SNPs 与阿勒泰羊毛色不相关( $P>0.05$ ),但 D5 缺失突变与新疆细毛羊毛色存在极显著相关性( $P<0.01$ )。若要明确该基因在毛色形成中的具体调控方式和作用机制,还须要进一步分析其在毛囊中的表达量、基因拷贝变异数(CNV)及启动子区域的多态性等。

致谢:感谢新疆农垦科学院甘尚权副研究员在 SNP 分析中给予的指导和帮助;感谢张伟博士在 PCR-SSCP 试验中提供的帮助;感谢实验室周平、王立民、唐红老师的教导;感谢郭延华老师、韩猛立老师和张伟博士、李良远博士、熊燊源博士、李辉硕士、蒋立斌硕士在样品采集时的帮助。

王树香,李 明,高宝嘉. 正交设计优化油松 ISSR-PCR 反应体系[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):46-49.

# 正交设计优化油松 ISSR-PCR 反应体系

王树香<sup>1</sup>, 李 明<sup>1</sup>, 高宝嘉<sup>2</sup>

(1. 河北农业大学生命科学学院,河北保定 071001; 2. 河北农业大学林学院,河北保定 071001)

**摘要:**采用正交设计的方法对油松 ISSR-PCR 反应体系 5 因素(*Taq* DNA 聚合酶、 $Mg^{2+}$ 、模板 DNA、dNTPs、引物的浓度)在 4 水平上进行优化试验,PCR 结果用 SPSS 数据软件分析。结果表明:各因素不同水平对 PCR 反应结果都有显著的影响,且除 dNTP 因素外其他 4 因素影响均较大;筛选出各反应因素的最佳水平,建立油松 ISSR-PCR 的最佳反应体系(20  $\mu$ L)为:*Taq* DNA 聚合酶 1 U、模板 5  $\mu$ g/ $\mu$ L、 $Mg^{2+}$  2.0 mmol/L、dNTP 0.20 mmol/L、引物 0.4  $\mu$ mol/L;进行梯度退火试验,筛选出针对不同引物的最适的油松 ISSR 退火温度。该优化体系的建立为油松及其近缘种的系统学和种质资源鉴定及遗传多样性的研究奠定基础。

**关键词:**油松;分子标记;ISSR-PCR;反应体系;正交设计

**中图分类号:** S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0046-04

油松(*Pinus tabulaeformis*)为我国特有树种,是我国温带针叶林中主要的建群树种,在工业用材、城镇绿化和荒山造林中具有重要的价值。就目前研究的相关资料来看,国内关于油松的遗传多样性和遗传结构的研究较多。如李鑫等利用 RAPD、ISSR(inter simple sequence repeat,简单重复序列区间)等分子标记方法对天然油松群体作了遗传多样性分析<sup>[1-4]</sup>;郝真真等从表观上对 ISSR-PCR 进行了优化,并研究了油松种群遗传多样性和空间遗传结构特征<sup>[5]</sup>。ISSR 分子标记技

术具有多态性水平高、可重复性好、DNA 用量少、成本低等优点,广泛用于群体遗传多样性分析和种质鉴别等研究<sup>[6-13]</sup>。但是,采用正交设计的方法对油松 ISSR-PCR 反应体系进行优化还无报道,因此,本试验利用正交设计从 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、引物、模板 DNA、 $Mg^{2+}$  等 5 个因素 4 个水平进行分析,优化并建立油松 ISSR-PCR 反应体系,从而提高 ISSR 分析结果的可靠性和重复性,为油松品种的分子鉴定、遗传多样性分析和品种改良奠定试验基础。

收稿日期:2013-11-01

基金项目:河北省自然科学基金(编号:C2008000231);河北农业大学科研基金(编号:QJ201230)。

作者简介:王树香(1977—),女,河北唐山人,硕士,实验师,主要从事微生物学、分子生态学研究。Tel:(0312)7528256;E-mail:wangshuxiang77@163.com。

通信作者:高宝嘉,博士,教授,主要从事生态学、森林有害生物管理研究。E-mail:baojigao@163.com。

## 参考文献:

- [1] 刘琳玲,邢秀梅,王桂武,等. *Agouti* 基因的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医,2011(8):37-38.
- [2] 庞有志. 兔的毛色遗传与家兔育种[J]. 中国养兔,2008(10):30-35.
- [3] Royo L J, Alvarez I, Arranz J J, et al. Differences in the expression of the *ASIP* gene are involved in the recessive black coat colour pattern in sheep: evidence from the rare Xalda sheep breed[J]. *Animal Genetics*, 2008, 39(3):290-293.
- [4] 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.
- [5] 姜俊兵,赵志军,贺俊平,等. *Agouti* 在不同颜色被毛羊驼皮肤组织中的表达[J]. 畜牧与兽医,2007,39(4):38-41.
- [6] Norris B J, Whan V A. A gene duplication affecting expression of the ovine *ASIP* gene is responsible for white and black sheep[J]. *Genome Research*, 2008, 18(8):1282-1293.
- [7] 王大星,徐 冬. 阿勒泰羊品种遗传资源调查报告[J]. 草食家

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

油松选于河北省辽河源国家级森林公园(北纬 41°00'~41°10'、东经 118°30'~118°40'),采集当年生针叶置于冰盒中带回实验室,置于 -70℃ 超低温冰箱中保存备用。试验用 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP 购自上海宝生科技发展有限公司,引物(USB811)由上海宝生科技发展有限公司合成。

畜,2009(2):38-40.

- [8] 韩吉龙,岳耀敬,裴 杰,等. 藏羊刺鼠信号蛋白基因(*Agouti*)的多态性及不同颜色被毛皮肤组织中 *Agouti* 与小眼畸形相关转录因子基因(*MITF*)表达的定量分析[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(3):338-347.
- [9] 李洪涛,曾献存,张文祥,等. 哈萨克绵羊 *MC1R* 和 *ASIP* 基因多态性及表达量与被毛颜色表型相关性的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(3):366-375.
- [10] 夏热甫·居马依,刘江虎,古丽沙拉·加别力. 关于阿勒泰羊品种发展趋势的探讨[J]. 新疆畜牧业,2011(3):43-44.
- [11] 巴登加甫,木拉提汗,杨菊清,等. 新疆细毛羊沧桑五十年[J]. 中国草食动物,2006,26(1):38-39.
- [12] Fontanesi L, Dall'olio S, Beretti F, et al. Coat colours in the Massese sheep breed are associated with mutations in the *agouti* signalling protein(*ASIP*) and melanocortin 1 receptor(*MC1R*) genes[J]. *Animal*, 2011, 5(1):8-17.
- [13] 王 乐,高维明,郑文新,等. 新疆富蕴县阿勒泰羊毛绒品质分析[J]. 草食家畜,2011(2):31-32.