

晏华春,马晓燕,依明·苏来曼,等.和田羊 *KRT35* 基因遗传多样性及其与羊毛长度的关联性分析[J].江苏农业科学,2016,44(4):28-30.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.008

和田羊 *KRT35* 基因遗传多样性及其与羊毛长度的关联性分析

晏华春,马晓燕,依明·苏来曼,刘红娇,韩煜茹,刘婷婷

(新疆农业大学动物科学学院,新疆乌鲁木齐 830052)

摘要:以随机采集的 400 只和田羊个体的血样为材料,利用 PCR-SSCP、DNA 测序等技术研究分析和田羊 *KRT35* 基因的多态性,并与羊毛长度进行关联分析。和田羊 *KRT35* 基因具有多态性,存在 3 种基因型,即 AA、AB 和 BB,且处于 Hardy-Weinberg 非平衡状态,多态信息含量(PIC)为 0.366 3,属于中度多态($0.5 > PIC > 0.25$)。测序结果显示,与原基因碱基序列相比,*KRT35* 基因编码区片段在 RT35 基因组 c.122 位置发生错义突变 T→C。关联分析结果表明,和田羊不同基因型之间羊毛长度差异均不显著。

关键词:和田羊;*KRT35* 基因;多态性;羊毛长度;关联分析

中图分类号:S826.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)04-0028-03

和田羊作为和田地毯产业链中的重要环节,其羊毛品质的提高将直接促进地毯质量的全面提升,将有力支撑地方经济的可持续发展。毛纤维具有高度的组织结构,其中毛纤维的 90% 是由角蛋白中间丝(keratin intermediate filament, KRT-IF)和角蛋白关联蛋白(keratin-associated proteins, KAPs)构成^[1-2]。研究发现,在美丽奴羊中,KAP1.1、KAP1.3、K33 等 KAPs 影响羊毛性状和品质^[3],KAP1-4 也影响羊毛性状^[4],KRT27、KRT85、KRT35、KRT31、KRT38、KAP6.1 和 KAP4.3 等影响毛囊分裂和毛囊结构^[5]。遗传因素涉及绵羊品种及其他重要功能基因,是影响绵羊经济性状

的基本因素^[6-7]。所以很多学者普遍通过基因方面的研究,认为多基因对毛绒性状影响较大,可能存在主效基因,因此当前的研究热点主要是毛绒纤维的角蛋白中间丝和角蛋白关联蛋白相关基因的研究。*KRT35* 基因是角蛋白中间丝蛋白家族之一,本试验选择优良的异质半粗毛短脂尾和田羊作研究对象,采用 PCR、DNA 测序等技术对和田羊 *KRT35* 基因进行多态性检测,并和其对应的羊毛长度进行关联性分析,主要为找到改善其羊毛长度分子标记位点,为新疆和田羊经济性状的选育、品种资源的保存提供一定的遗传学理论依据,从而达到对当地农牧民生活质量的提高。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验样本的采集 本试验选择年龄、个体差异小,健康无病的新疆和田羊 400 只,作为试验材料。采集血样是和田羊颈部静脉 5 mL,用枸橼酸钠抗凝,置于 -20℃ 长期冻存。

1.1.2 主要药品和试剂 *Taq* DNA 聚合酶、上下游引物、dNTPs、Marker、Tris 平衡酚、6×Loading buffer、10×PCR buff-

收稿日期:2015-03-11

基金项目:新疆维吾尔自治区高校科研计划科学研究重点项目(编号:XJEDU2013117)。

作者简介:晏华春(1988—),男,安徽阜阳人,硕士研究生,研究方向为动物遗传育种。E-mail:1939477313@qq.com。

通信作者:依明·苏来曼,维吾尔族,副教授,硕士生导师,研究方向为动物遗传育种。E-mail:ysulaiman@aliyun.com。

[3]徐立青,李积权,肖俊责,等.青海省 2 例新发布鲁杆菌病的调查分析[J].中国地方病学杂志,2008,27(3):348.

[4]徐立青,李超,许红星,等.2006—2008 年青海省人间布鲁氏菌病流行病学资料分析[J].中国媒介生物学及控制杂志,2010,21(4):389-390.

[5]王传清,李星.布鲁氏菌病的流行和研究现状及防控策略[J].中国动物检疫,2009,26(6):63-65.

[6]Estein S M, Cheves P C, Fiorentino M A, et al. Immunogenicity of recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* in rams and serum bactericidal activity against *B. ovis* [J]. Vet Microbiol, 2004, 102(3/4): 203-213.

[7]Cloekaert A, Vizcaino N, Paquet J Y, et al. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future [J]. Veterinary Microbiology, 2002, 90(1/2/3/4): 229-247.

[8]薛红梅,徐立青,崔步云,等.3 株布氏菌的流行病学调查[J].现代预防医学,2014,41(23):4225-4226.

[9]Jubier-Maurin V, Boigegrain R A, Cloekaert A, et al. Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages [J]. Infection and Immunity, 2001, 69(8): 4823-4830.

[10]Edmonds M D, Cloekaert A, Elzer P H. *Brucella* species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis* [J]. Veterinary Microbiology, 2002, 88(3): 205-221.

[11]Boigegrain R A, Salhi I, Alvarez-Martinez M T, et al. Release of periplasmic proteins of *Brucella suis* upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25 [J]. Infection and Immunity, 2004, 72(10): 5693-5703.

er、EDTA、NaCl、Tris·HCl、SDS、无水乙醇、溴化乙锭、硼酸、二甲苯酚、过硫酸铵、溴酚蓝、琼脂糖、变性剂、聚丙烯酰胺、染色液、超纯水。

1.1.3 主要试验仪器 移液器, ZHJH C1112B 型超净工作台, BIOFUGE PRIMOR 型低温离心机, IKA MS3 型圆周振荡器, JY04S 型凝胶成像仪, Mini-6K 型微型离心机, PCR 仪, DYCIP-31CN 型琼脂糖水平电泳槽, PowerPac Basic 型电泳仪, 电冰箱, 电子天平, 微波炉。

1.2 试验方法

采用常规的酚/氯仿抽提法提取基因组 DNA, 溶于 TE 中, -20℃ 保存备用。用 1%~1.5% 的琼脂糖来检测提取的基因组 DNA 的效果。根据 *KRT35* 基因在 GenBank 中的序列, 用 Primer Premier 5.0 软件独立设计完成引物, 由上海生物工程技术有限责任公司合成。F: GGCTCGAAGCTCCATCAC; R: CCGTAGCTGCTAGCAAAGC。

1.2.1 PCR 反应条件体系和反应程序 PCR 反应条件体系: PCR Green Mixture 10 μL, 上游引物 (10 pmol/μL) 0.6 μL, 下游引物 (10 pmol/μL) 0.6 μL, 模板 DNA (50 ng/μL) 1.5 μL, 超纯水 7.3 μL, 总体积 20 μL。

PCR 反应的程序: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 退火温度 40 s, 72℃ 延伸 60 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。

PCR 产物的 SSCP 分析方法参考周延清等的方法^[8]进行。非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳: 取 10 μL PCR 产物和 7 μL 变性剂 98℃ 变性 10 min, 然后冰浴 30 min, 用 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶。电泳 300 V 50 mA 空跑 30 min, 预跑 10 min, 180 V 电泳 15 h 后银染显色。用凝胶成像系统拍照、分析、判定各种基因型。

1.2.2 测序 选择基因型不同的样品, PCR 扩增后对 PCR 原液直接测序。

1.3 数据处理

本试验数据经 Microsoft Excel 软件初步处理, 并用 SPSS 17.0 软件系统进行 One-way ANOVA 对不同处理间的处理效应进行方差分析。测定结果以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 提取 DNA 结果检测

本试验采用酚-氯仿抽提法从和田羊血样品中提取基因组 DNA。图 1 是提取 DNA 在 1% 的琼脂糖凝胶中的检测结果, 基因组 DNA 各泳道都有 1 条清晰的条带, 无拖尾现象。

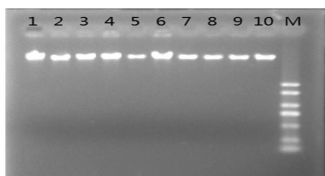


图1 和田羊基因组 DNA 检测
M—DNA 分子量为 marker; 1~10 分别为提取的 10 只和田羊 DNA 样

2.2 PCR 扩增结果

按照 PCR 扩增体系, 以和田羊血液中提取的 DNA 作为模板, 在 PCR 仪中扩增得到 PCR 产物, 然后经 1% 的琼脂糖

凝胶检测。结果表明扩增片段特异性良好, 长度约为 279 bp, 无引物带和其他杂带, 可以用于 PCR-SSCP 分析 (图 2)。

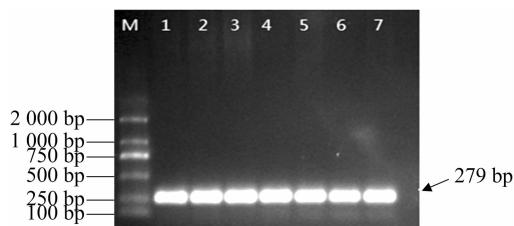


图2 *KRT35* CDS 区部分序列 PCR 扩增产物
M—DNA 分子量为 marker; 1~7 分别为不同个体的 PCR 扩增产物

2.3 PCR-SSCP 检测结果

条带清晰的 PCR 产物变性后通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行 SSCP 检测, 结果发现存在多态性, 并发现 3 种不同的基因型, 分别命名为 AA、BB 和 AB (图 3)。

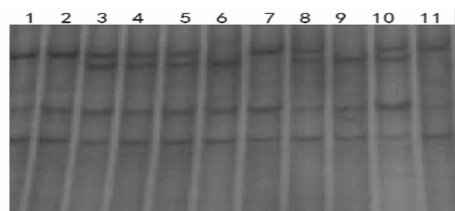


图3 *KRT35* 基因 PCR-SSCP 检测结果
泳道 1、2、7、11 为 AA 基因型; 3、4、5、8、10 为 AB 基因型; 6、9 为 BB 基因型

2.4 不同基因型序列测定

挑选 AA 型、BB 型和 AB 型的样品进行测序, 将不同基因型的测序峰图 (图 4) 与原序列 (登录号: EU216426) 比对。结果发现, *KRT35* CDS 区在 c. 122 处发生 T→C 突变, 因此该突变可能与羊毛性状有关。

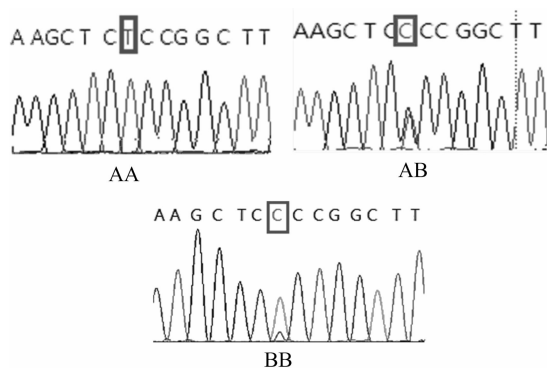


图4 不同基因型的测序峰图

2.5 测序图

KRT35 基因编码区片段在基因组 c. 122 处发生 T→C 的突变 (图 5)。

2.6 基因群体遗传结构分析

2.6.1 *KRT35* 基因的基因频率和基因型频率 通过分析发现, 该基因存在 AA、AB、BB 3 种基因型, 并且基因型的频率分别为 0.385、0.415、0.200; 等位基因 A、B 的频率分别为 0.593、0.407 (表 1)。KRT 35 基因的引物扩增产物在和田羊处于 Hardy-Weinberg 非平衡。

2.6.2 *KRT35* 基因的遗传参数值 基因的基因纯合度 (H_e)

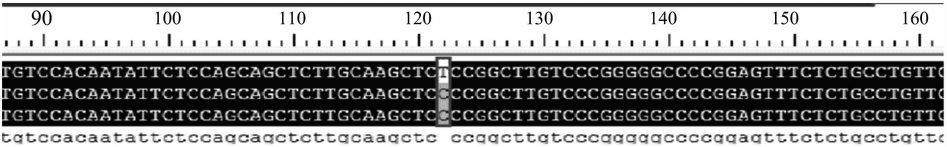


图5 KRT35 基因编码区片段 c.122 处突变

表 1 KRT35 基因的基因型频率和等位基因

和田羊	样本含量 (<i>n</i>)	基因型和基因型频率			等位基因频率		χ^2
		AA	AB	BB	A	B	
KRT35	400	0.385 (154)	0.415 (166)	0.200 (80)	0.593	0.407	7.906

为 0.517 1,杂合度(H_e)为 0.482 9。试验中和田羊 KRT35 基因的 PIC 为 0.366 3,属于中度多态位点(表 2)。因此优质毛群体遗传变异处于中等水平,同时此突变位点可用于和田羊遗传多样性的有效遗传标记。

表 2 KRT35 基因的基因纯合度、杂合度、有效等位基因和多态信息含量

基因	<i>n</i>	H_o	H_e	N_e	PIC
KRT35	400	0.517 1	0.482 9	1.933 8	0.366 3

注:PIC < 0.25 为低度多态位点;0.25 ≤ PIC ≤ 0.5 为中度多态位点;PIC > 0.5 为高度多态位点。

2.7 不同基因型与羊毛长度

用 SPSS 分析软件对和田羊优质毛品系 KRT35 基因扩增片段的不同基因型与羊毛长度进行方差分析,从分析结果可知,AA、BB 和 AB 3 种基因型的羊毛长度差异不显著(表 3)。差异不显著的原因可能是该位点对羊毛长度性状产生的效应不大,或与样本的个数、数据变异程度大等因素有关。

表 3 不同基因型与羊毛长度关联分析结果

基因型	羊毛长度(cm)
AA(<i>n</i> = 154)	15.84 ± 2.34a
AB(<i>n</i> = 166)	15.78 ± 2.21a
BB(<i>n</i> = 80)	15.46 ± 2.05a

3 结论与讨论

等位基因频率是用来表示一个种群中基因多样性的,它是估计种群内和种群间遗传关系的基础。本试验中,KRT35 基因纯合度为 0.517 1,杂合度为 0.482 9,有效等位基因数为 1.933 8。多态信息含量为 0.366 3,属于中度多态位点的范畴。对于一个群体来说,多态信息含量、等位基因数目和杂合度是能够决定群体遗传变异程度的,遗传变异性越高,选择潜力就越大。本试验 KRT35 基因处于中等遗传变异,该突变位点有可能可以作为和田羊遗传多样性的有效遗传标记。

通过对 KRT35 基因 PCR - SSCP 分析和测序发现,在 KRT35 基因第 122 碱基处发生 T→C 的突变,把含有不同基因型的和田羊羊毛长度数据进行关联分析,来研究基因的突变对羊毛生长的影响。从分析结果可知,AA、BB 和 AB 3 种基因型的羊毛长度差异均不显著。刘桂芬把 KAP1.1、

KAP1.3 的部分序列、KAP6 - 1 的外显子区作为候选基因,并与羊毛细度的性状进行关联分析,得出 KAP1.1、KAP1.3 中位点 W08667 与羊毛细度显著相关($P < 0.05$),KAP6 - 1 外显子 W06933 与羊毛细度也显著相关($P < 0.05$)^[9]。王丽萍等将甘肃高山型细羊毛 KRT35 基因与羊毛弯曲度进行关联分析,结果优质毛品系不同基因型之间羊毛弯曲度差异不显著^[10]。

试验中和田羊 KRT35 基因的多态信息含量是 0.366 3,属于中度多态位点。因此该群体遗传变异处于中等水平,具有较大的选择潜力。本试验通过 KRT35 基因 PCR - SSCP 分析和测序发现,在 122 碱基处发生 T→C 的突变,并把毛性状(长度)与基因位点进行了关联分析,结果 AA、BB 和 AB 3 种基因型的羊毛长度差异均不显著。

参考文献:

[1] 赵有璋. 羊生产学 [M]. 北京:中国农业出版社,2005.
[2] 李树伟. 影响绵羊毛纤维与毛囊结构及生产性状的分子机理研究 [D]. 长春:吉林大学,2008.
[3] Itenge M T, Forrest R H, Mckenzie G W, et al. Polymorphism of the KAP1. 1, KAP1. 3 and K33 genes in Merino sheep [J]. Mol Cell Probes, 2007, 21 (5/6): 338 - 342.
[4] Gong H, Zhou H T, Hickford J H. Polymorphism of the ovine keratin - associated protein 1 - 4 gene (KRTAP1 - 4) [J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37 (7): 3377 - 3380.
[5] 马依拉·吐尔逊. 6 个 KRT 基因在中国美利奴羊(新疆型)中的遗传多态性及其与毛性状的关联性分析 [D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2013.
[6] 张富全, 刘武军. 新疆阿克苏绒山羊发展对策与政策分析 [J]. 草食家畜, 2003 (6): 3 - 6.
[7] 肖光伟, 许宗运. 南疆绒山羊的培育 [J]. 家畜生态, 2002, 23 (2): 35 - 37.
[8] 周延清, 杨清香, 张改娜. 生物遗传标记与应用 [M]. 北京:化学工业出版社, 2008: 104 - 105.
[9] 刘桂芬. 新疆优质细羊毛遗传多样性及羊毛细度候选基因的分析 [D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2005.
[10] 王丽萍, 杨博辉, 岳耀敬, 等. 甘肃高山型细羊毛 KRT35 基因序列遗传多态性分析 [J]. 贵州农业科学, 2010, 38 (4): 142 - 144, 148.