

郭海燕, 金 银, 李拥军, 等. *ESR* 基因多态性与湖羊产羔性能的关系[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(13): 126–128.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.13.035

ESR 基因多态性与湖羊产羔性能的关系

郭海燕, 金 银, 李拥军, 张 昊, 程国虎

(扬州大学动物科学与技术学院/江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 江苏扬州 225009)

摘要:利用 PCR-单链构象多态性(PCR-SSCP)技术及基因测序技术对湖羊进行了 *ESR* 基因的多态性检测及其与湖羊产羔数的统计分析。测序结果表明, 等位基因 G 与 C 相比发生了 1 处碱基突变(G363C)。*ESR* 基因在湖羊中存在多态性(CC、CG 和 GG); 湖羊中 C 等位基因的频率为 0.743, G 等位基因的频率为 0.257。CC、CG、GG 基因型频率分别为 0.564、0.357、0.079。湖羊 CG、GG、CC 基因型的平均产羔数分别为 1.98、1.80、1.96 只。数据分析结果表明, *ESR* 基因的多态性对湖羊产羔数的影响差异不显著($P \geq 0.05$)。

关键词:湖羊; *ESR* 基因; 产羔数

中图分类号: S826.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)13-0126-03

湖羊是我国著名的地方多胎品种羊, 也是我国一级保护地方畜禽品种, 主要分布在江、浙一带。湖羊 1 年 2 胎, 每胎多羔, 其产羔率能达到 200%~250%^[1]。绵羊的繁殖力是影响其经济效益的重要指标之一, 而湖羊又是我国著名的多胎品种, 因此研究其多胎的分子机制对于湖羊多胎资源的开发利用、新品种的培育以及生产实践都有着重要意义。

湖羊高产的繁殖性能是得到世界公认的, 因此探究并确定影响湖羊多胎的主效基因一直是国内外的研究热点。绵羊的多胎性状是由多种基因控制的, 且不同品种间控制多胎的主效基因也是不同的。有研究发现, 品种之间繁殖性能的差异主要取决于产仔母羊的基因, 与后代个体基因无太大关系, 且推断湖羊具有多胎的主基因, 并呈显性遗传^[2-3]。很多学者已证实了 *BMPR-1B* 可能是湖羊多胎性的主效基因, 而 *BMP15*、*GDF9* 等基因可能也参与并影响了湖羊的多胎机制^[4-6]。有研究证明湖羊存在 *FecB* 基因, 且湖羊全部为 *FecB* 基因纯合携带者^[7-8]。

雌激素受体(estrogen receptor, 简称 *ESR*)是核受体超家族的一员, 是一种配体依赖性的转录因子^[9]。*ESR* 能够转录调控蛋白质, 参与雌性动物性腺基因的表达与调控。*ESR* 结合配体之后与雌激素应答元件相互作用, 可以改变受雌激素调控基因的转录, 从而影响胚胎发育和系统分化^[10]。

许多研究都表明, *ESR* 基因在动物繁殖过程中发挥着重要作用, 而且已经确定 *ESR* 基因是影响猪产仔数的主效基因^[11-17]。研究发现, 将小鼠的 *ESR* 基因敲除后, 小鼠不能排卵, 这也证明了 *ESR* 基因与繁殖性能的重要联系^[18]。张小雪等对绵羊的 *ESR* 基因进行了详细的生物信息学分析, 发现绵羊的 *ESR* 基因主要位于细胞核中, 并且参与机体的转录调控过程^[19]。有研究认为 *ESR* 可能是控制湖羊和小尾寒羊多胎

性能的主效基因或与之存在紧密的连锁^[9,20]。贾立华等对小尾寒羊的 *ESR* 基因外显子 4 序列进行克隆与序列分析, 发现此段序列有很强的保守性^[21-22]。冯涛等也得出了相同结论, 发现哺乳动物 *ESR* 基因外显子 1、4 序列的保守性较强, 因此此段区域可能不是影响山羊高繁殖力的功能结构域^[23]。还有研究发现, *ESR* 基因第 5 外显子 Pvu II 多态性与动物的繁殖性能密切相关, 但该位点在不同群体中的效应不一致^[24-27]。此外, *ESR* 基因对胚胎发育及黄体期的影响及作用也一直是国内外研究热点^[28-30]。本试验通过研究湖羊 *ESR* 基因的多态性及其与产羔数的关系, 旨在为筛选湖羊多胎性候选基因提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物及血样采集

选取具有第 1 胎和第 2 胎生产记录的湖羊, 共 342 只。采集湖羊颈静脉血液约 3 mL, 并记录耳标号, 羊全部来自江苏省太仓金仓湖羊场。采血用一次性采血盛血器, 并且提前在采血管中加入 ACD 抗凝剂(主要含枸橼酸、枸橼酸钠、葡萄糖)。血样用冰盒带回实验室后于 4℃ 保存, 以供提取 DNA。

1.2 DNA 的提取及检测

DNA 提取方法参照天根生化科技(北京)有限公司的血液基因组 DNA 提取试剂盒说明书, 提取后于 -20℃ 保存。

1.3 PCR 的扩增

ESR 的引物参照毕晓丹的方法^[9], 由铂尚生物技术(上海)有限公司合成。引物序列如下:

上游引物: 5'-TGCACCAGATCCAAGCCAACGA-3';

下游引物: 5'-CGGGTACCTGTAGAAGCGGGAG-3'。

PCR 反应体系 25 μL, 其中 DNA 1 μg, 上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 2 × *Taq* PCR MasterMix[天根生化科技(北京)有限公司]12.5 μL, ddH₂O 补至 25 μL。PCR 反应程序: 95℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 1 min, 57℃ 复性 90 s, 72℃ 延伸 1 min, 34 个循环; 72℃ 终延伸 7 min。产物用 2% 琼脂糖凝胶检测。

收稿日期: 2017-01-03

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(15)1007]。

作者简介: 郭海燕(1992—), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生, 研究方向为遗传育种与繁殖。E-mail: 1937750042@qq.com。

通信作者: 李拥军, 博士, 教授, 研究方向为养羊生产与羊的繁育。

Tel: (0514) 87996481; E-mail: lijy@yzu.edu.cn。

1.4 单链构象多态性(SSCP)检测多态性

取 5 μ L PCR 产物,并与 5 μ L 上样缓冲液(90% 去离子甲酰胺 9 mL,0.25% 溴酚蓝,0.25% 二甲苯青 FF,1 \times TBE 1 mL)混合后置于 PCR 管内,98 $^{\circ}$ C 变性 10 min,迅速放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱 10 min,使之保持变性状态。然后用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测(120 V,3 h),电泳结束银染显色,拍照分析。

1.5 公司测序

将提取的 DNA 全部送到无锡翼和应用生物技术有限公司进行测序及基因型的鉴定,并整理数据结果。

1.6 统计分析

收集整理湖羊的生产记录,计算湖羊 *ESR* 不同基因型及基因的频率。用 SPSS 22.0 处理数据,对不同 *ESR* 基因型的湖羊产羔数进行 LSD 多重比较,从而分析比较不同基因型与产羔数之间的关系。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

对 PCR 产物进行琼脂糖电泳检测,结果表明其特异性良好(图 1),目的条带长度符合预期,为 419 bp 左右,可直接进行 SSCP 分析。

2.2 SSCP 检测结果

将 PCR 产物进行 SSCP 分析,结果表明 *ESR* 基因存在多态性,扩增片段存在 3 种基因型,将其定义为 CC、CG 和 GG (图 2)。其中第 10 道为 CG,第 5 道为 GG,其余几道为 CC。

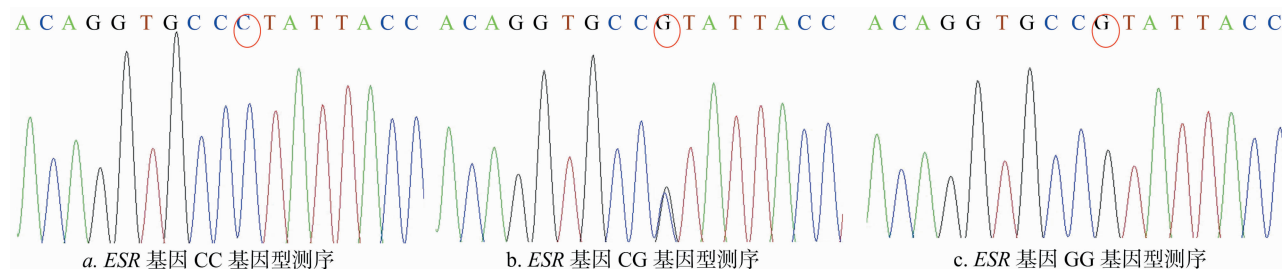


图3 *ESR* 基因不同基因型测序结果

2.4 湖羊 *ESR* 基因型及基因频率

检测结果表明,在 342 只湖羊样本中,193 只是 CC 型,122 只是 CG 型,27 只是 GG 型。经计算,C 等位基因的频率为 0.743,G 等位基因的频率为 0.257。CC 基因型频率为 0.564,CG 基因型频率为 0.357,GG 基因型频率为 0.079。

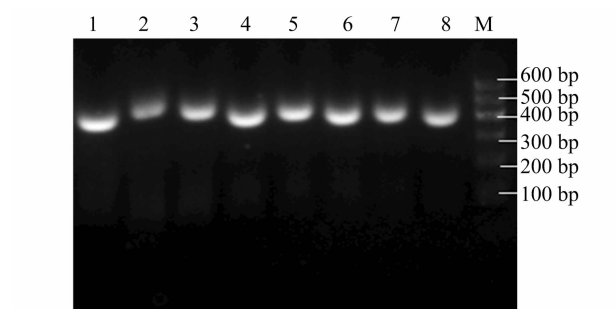


图1 湖羊 *ESR* 基因的 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果

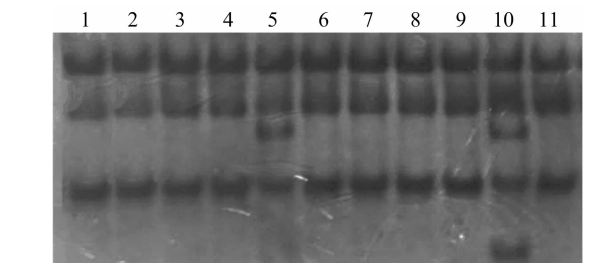


图2 湖羊 *ESR* 基因 PCR 产物 SSCP 检测结果

2.3 不同基因型测序结果

为确定 *ESR* 基因的突变位点,将 CC、CG 和 GG 基因型的 PCR 产物送无锡翼和应用生物技术有限公司测序。根据测序结果可知,等位基因 G 与 C 相比,发生了 1 处突变(G363C),测序结果见图 3。

2.5 湖羊 *ESR* 不同基因型的产羔数的均值及标准误

由表 1 可知,根据第 1 胎产羔记录,GG 与 CC、CG 产羔数差异显著,CC、CG 之间差异不显著。根据第 2 胎湖羊产羔记录,CC、CG、GG 基因型的产羔数差异不显著。从整体水平看,CC、CG、GG 基因型的产羔数差异不显著。

表 1 湖羊不同 *ESR* 基因型频率、平均值及标准误差

基因型	样本数 (只)	基因型频率	第 1 胎平均值及标准误 (只)	第 2 胎平均值及标准误 (只)	第 1、第 2 胎平均值及标准误 (只)
CG	122	0.357	1.934 \pm 0.065a	2.025 \pm 0.064a	1.980 \pm 0.500a
GG	27	0.079	1.593 \pm 0.144b	2.000 \pm 0.151a	1.800 \pm 0.151a
CC	193	0.564	1.850 \pm 0.051a	2.062 \pm 0.057a	1.956 \pm 0.530a

注:同行数值后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),相同字母为差异不显著($P \geq 0.05$)。

3 讨论与结论

毕晓丹通过研究高繁殖力绵羊品种与低繁殖力绵羊品种的 *ESR* 基因的多态性,发现 *ESR* 基因外显子 1 的第 363 处发生了 C-G 突变,在小尾寒羊中 AB、BB 基因型比 AA 基因型

多产 0.51、0.70 只羔羊,并认为 *ESR* 基因可能是控制小尾寒羊多胎的主效基因或与之存在紧密的连锁^[9]。董文艳等对湖羊 *ESR* 基因第一外显子部分序列进行多态性检测^[20],结果与毕晓丹的研究结果^[9]相似,*ESR* 基因也发生了 C-G 的突变,并认为 *ESR* 基因可能是控制湖羊多羔性能的 1 个主效基

因或与之存在紧密遗传连锁的 1 个标记。李广录以中国美利奴羊、湖羊、罗米丽羊和罗米丽 × 中国美利奴(新疆军垦型)为研究对象,检测其 *ESR* 基因的 5' 非翻译区片段的多态性,结果显示 4 种绵羊均出现多态性^[10]。狄冉等采用 PCR - SSCP 技术分析 *ESR* 基因外显子 4 在高繁殖力绵羊品种(小尾寒羊和湖羊)和低繁殖力绵羊品种(特克塞尔、中国美利奴、考力代和杜泊)中的单核苷酸多态性,结果显示 *ESR* 基因在这 6 个绵羊品种中均不存在多态性,说明所检测的 *ESR* 基因外显子 4 序列可能不是影响绵羊高繁殖力的功能结构域^[22]。

本试验使用的所有湖羊均来自江苏省太仓金仓湖羊场,此羊场是新建羊场,羊群刚购进不久,且未经过选育,羊场只有湖羊第 1、2 胎的生产记录。经统计分析,本次试验羊第 1 胎平均产羔 1.86 只,第 2 胎试验羊平均产羔 2.04 只,此羊场湖羊的整体生产水平未达到通常文献中报道的每胎 2.30 只羔羊。因此该羊场湖羊的群体构成及其胎次因素可能会对本试验结果造成一定影响。

本试验结果显示,检测的 342 只湖羊中 *ESR* 基因存在多态性,分别为 CG、CC 和 GG。经检测发现 *ESR* 基因外显子 1 的第 363 处发生了 C - G 突变。根据湖羊产羔数的统计分析结果可知,CG、CC、GG 之间的产羔数并无显著差异。而这一结果与毕晓丹等的研究结果^[9,20]相悖,他们的研究表明,等位基因 B(B 等同于本试验中的等位基因 G)与绵羊的产羔数呈正相关。笔者认为造成这一现象的原因,与上述提及的该羊场的羊群结构以及胎次因素可能有关。湖羊是世界著名的多胎品种,其多胎性能是由多个主效基因控制的,本试验只是单一地分析了 *ESR* 基因与湖羊多胎性能的关系。因此,要确定 *ESR* 基因与湖羊繁殖性能的确切关系,还应进行多基因的联合分析,以寻找各个候选基因之间的联系。就本研究而言,笔者认为可以在后续试验中进一步获取该羊场更多的胎次数据以及扩大样本数量,从而进一步验证 *ESR* 基因与湖羊产羔数的关系。

本试验表明,*ESR* 基因多态性对湖羊产羔性能无显著影响。

参考文献:

- [1] 史洪才,武 坚. 我国对湖羊和小尾寒羊多胎基因的研究[J]. 草食家畜,2004(4):14 - 16.
- [2] 姜运良,吴常信. Booroola Merino 绵羊多胎基因 *FecB* 的研究进展[J]. 中国畜牧杂志,1999(4):51 - 53.
- [3] 石国庆. 湖羊多胎机制研究[D]. 南京:南京农业大学,2006.
- [4] 吴丽丽,赵晓枫,张立凡,等. 湖羊 *BMPR - IB*、*BMP15* 和 *GDF9* 基因的 RFLP 分析[J]. 中国草食动物,2011,31(4):9 - 12.
- [5] 王启贵,钟发刚,李 辉,等. 绵羊 *BMPR - IB* 基因多态性与其产羔数的相关研究[J]. 草食家畜,2003(2):20 - 23.
- [6] 孙红霞,田秀娥,王永军. *BMPR - IB*、*BMP15* 和 *GDF9* 基因作为滩羊繁殖性状主效候选基因的研究[J]. 西北农业学报,2009,18(5):17 - 21.
- [7] 王根林,毛鑫智,George H D,等. DNA 分析发现我国湖羊和小尾寒羊存在 Booroola (*FecB*) 多胎基因[J]. 南京农业大学学报,2003,26(1):104 - 106.
- [8] 管 峰,艾君涛,刘守仁,等. *BMPR - IB* 和 *BMP15* 基因作为湖羊多胎性候选基因的研究[J]. 家畜生态学报,2005,26(3):9 - 12.
- [9] 毕晓丹. 小尾寒羊高繁殖力候选基因 *ESR* 的研究[D]. 延吉:延边大学,2005.
- [10] 李广录. 绵羊繁殖性状相关的几个功能基因的多态性分析[D]. 石河子:石河子大学,2008.
- [11] 胡建伟,杨晓琼,余永华. 中外猪种 *ESR* 基因多态性与繁殖性状相关研究[J]. 上海畜牧兽医通讯,2014(2):20 - 23.
- [12] 武建亮,徐 利,周海深,等. 猪繁殖性状主效基因及其合并基因型对产活仔数的影响[J]. 猪业科学,2016(2):118 - 121.
- [13] 管玲玉,马力鹏,刘丽娟,等. *FSH - β* 和 *ESR* 基因多态性对大白猪产活仔数的影响[J]. 猪业科学,2015(1):114 - 115.
- [14] 李 俊,陈美娟,许钟峰,等. 环江香猪 *FSH - β* 、*ESR* 及 *ZARI* 基因多态性分析[J]. 基因组学与应用生物学,2015(3):495 - 499.
- [15] Rothschild M, Jacobson C, Vaske D, et al. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1996,93(1):201 - 205.
- [16] Green S, Walter P, Kumar V, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v - erb - A[J]. Nature,1986,320(658):134 - 139.
- [17] 丁家桐,葛红山,姜勋平,等. 猪雌激素受体基因与产仔数和乳头数的关系研究[J]. 南京农业大学学报,2002,25(2):79 - 81.
- [18] Hewitt S C, Korach K S. Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues[J]. Reproduction,2003,125(2):143 - 149.
- [19] 张小雪,潘香羽,李发弟,等. 绵羊 *ESR* 基因生物信息学分析[J]. 甘肃农业科技,2014(9):30 - 33.
- [20] 董文艳,陈阿琴,王争光,等. 湖羊高繁殖力候选基因 *ESR* 的研究[J]. 浙江农业学报,2009,21(6):561 - 564.
- [21] 贾立华,储明星,陈宏权,等. 小尾寒羊雌激素受体基因外显子 4 的克隆与序列分析[J]. 中国畜牧兽医,2008,35(2):60 - 63.
- [22] 狄 冉,贾立华,储明星,等. 绵羊雌激素受体基因外显子 4 多态性分析[J]. 中国畜牧兽医,2008,35(12):89 - 92.
- [23] 冯 涛,赵有璋,狄 冉,等. 山羊雌激素受体(*ESR*)基因部分外显子多态性分析[J]. 农业生物技术学报,2009,17(2):237 - 242.
- [24] 张淑君,熊 远,邓昌彦,等. 猪产仔数分子标记及其效应分析[J]. 生物技术通报,2003(2):36 - 39.
- [25] 田 勇,李学伟,李芳琼,等. 四川省外种猪 *ESR* 基因对繁殖及生长性状的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医,2004(10):12 - 14.
- [26] 彭淑红,徐宁迎,孙万元,等. 金华猪雌激素受体基因的分布及其对头胎产仔数的影响[J]. 中国畜牧杂志,2004,40(3):30 - 31.
- [27] 孟庆利,刘铁铮. 猪雌激素受体基因 *Pvu II* 酶切片段多态性与产仔性能的关系[J]. 江苏农业学报,2005,21(1):49 - 52.
- [28] Whittle W L, Holloway A C, Lye S, et al. The pattern of glucocorticoid and estrogen receptors may explain differences in steroid dependency of intrauterine prostaglandin production at parturition in sheep[J]. Journal of the Society for Gynecologic Investigation,2006,13(7):506 - 511.
- [29] Reynolds L P, Haring J S, Johnson M L, et al. Placental development during early pregnancy in sheep: estrogen and progesterone receptor messenger RNA expression in pregnancies derived from *in vivo* - produced and *in vitro* - produced embryos[J]. Domestic Animal Endocrinology,2015,53:60 - 69.
- [30] Tasende C, Rodríguez - Piñón M, Acuña S, et al. Corpus luteum life span and pituitary oestrogen and progesterone receptors in cyclic and gonadotrophin - releasing hormone - treated anoestrous ewes[J]. Reproduction Fertility and Development,2005,17(7):721 - 726.