

王兰萍,崔悦,马蕊,等. 滩羊群体产羔性状相关基因位点的遗传变异分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(23):35-37.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.010

滩羊群体产羔性状相关基因位点的遗传变异分析

王兰萍¹,崔悦¹,马蕊¹,刘丽雅¹,孙慧丽¹,耿荣庆²

(1. 盐城师范学院海洋与生物工程学院,江苏盐城 224051; 2. 盐城师范学院药学院,江苏盐城 224051)

摘要:采用 PCR-RFLP、PCR-SSCP 方法检测滩羊群体中与产羔性状相关基因位点的遗传变异,并分析其与产羔数的关系,为探讨滩羊产羔的分子机制提供依据。结果表明,滩羊群体中存在 *BMPR1B* 基因 *FecB* 位点突变 A746G,表现出 B/+ 和 +/+ 2 种基因型,B/+ 基因型和 +/+ 基因型的频率分别为 0.06 和 0.94,+/+ 基因型是群体中的优势基因型;等位基因 B 和 + 的频率分别为 0.03 和 0.97,等位基因 + 是群体中的优势等位基因。在滩羊群体中,未检测到 *GDF9* 基因的突变位点,表明该突变位点与滩羊的产羔性能无相关性。因此,*BMPR1B* 基因 *FecB* 位点可能是滩羊高繁殖力的重要调控基因之一,在一定程度上影响母羊的产羔性能。

关键词:滩羊;产羔性状;遗传变异;SNP 位点

中图分类号: S826.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0035-03

在绵羊育种中,产羔数是一个非常重要的经济性状。大多数绵羊品种为季节性发情和一胎单羔。然而,在长期的自然选择与人工选育过程中,人们也发现少数绵羊品种具有自然产多羔的遗传特性。例如,世界闻名的芬兰羊、湖羊、小尾寒羊等品种。

研究表明,绵羊存在影响产羔性状的主效基因^[1-3]。通过对绵羊高繁殖力性能基因组的分析,已经定位了生长分化因子 9(*GDF9*)、骨形态发生蛋白 15(*BMP15*)和骨形态发生蛋白受体 1B(*BMPR1B*)等基因,还根据表型发现了 *Woodlands* 基因、*Thoka* 基因和 *Lacaune* 基因以及根据表型推断存在 *Olkuska* 基因、*Belle-Ile* 基因,这些基因的遗传方式对

排卵率和产羔数的影响及其染色体定位已明确^[4-6]。特别是 *FecB* 基因和 *FecX* 基因,已应用于绵羊育种实践。

滩羊是蒙古羊的一个分支,能很好地适应干旱、荒漠化等生活环境,其生产的二毛裘皮和羔羊肉久负盛名,是我国一个非常珍贵的绵羊品种。然而,滩羊的繁殖力较低,1 年只能产 1 胎,且产羔率低。因此,如果能从基因水平找到滩羊繁殖力基因型与产羔性状之间的可靠稳定关系,对于品种的选育具有重要的意义。本研究通过检测滩羊群体与产羔性状相关基因的遗传变异位点,旨在揭示滩羊产羔性状的分子遗传机理,为滩羊多胎新品系的选育提供可借鉴的基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验动物及样本采集

试验动物为来自宁夏回族自治区中宁地区的滩羊。所有个体均选择健康的、有完整产羔记录的母羊,共 132 只,记录母羊产单羔和双羔的情况。颈静脉采集母羊抗凝血 5 mL,置于低温带回实验室,-20℃ 冷冻保存。

1.2 血液 DNA 提取与检测

采用血液 DNA 提取试剂盒提取血液样本基因组 DNA,试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。产品型号为血

收稿日期:2017-01-29

基金项目:江苏省自然科学基金(编号: BK20141259);江苏省“六大人才高峰”高层次人才(编号:2013-NY-025、2017-NY-100);

江苏省高等学校大学生创新创业训练计划(编号:201510324031Y)。作者简介:王兰萍(1976—),女,江苏海门人,硕士,副教授,主要从事动物遗传学研究。E-mail:lpwang76@163.com。

通信作者:耿荣庆,博士,教授,主要从事动物遗传育种研究。E-mail:rqgeng@163.com。

Genes,2008,37(1):52-59.

[2] Tseng C H, Knowles N J, Tsai H J. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus[J]. Virus Research,2007,123(2):190-203.

[3] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, et al. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new genotype and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strains[J]. Archives of Virology,2007,152(11):2059-2072.

[4] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, et al. Differential diagnosis between type-specific duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) and recent Korean DHV-1-like isolates using a multiplex polymerase chain reaction[J]. Avian Pathology,2008,37(2):171-177.

[5] Ding C Y, Zhang D B. Molecular analysis of duck hepatitis virus type

1[J]. Virology,2007,361(1):9-17.

[6] 张艳芳,罗薇,刘内生,等. 鸭肝炎病毒的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(7):171-175.

[7] 刘艳,李冰清,孟红. 小 RNA 病毒 3C 蛋白酶及其裂解底物[J]. 生物技术通报,2014(8):46-51.

[8] Luckow V A, Lee S C, Barry G F, et al. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*[J]. Journal of Virology,1993,67(8):4566-4579.

[9] Altmann F, Staudacher E, Wilson I B, et al. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins[J]. Glycoconjugate Journal,1999,16(2):109-123.

液基因组柱式小量提取试剂盒(0.1~1.0 mL),操作流程按产品说明书进行。

提取的基因组 DNA 用灭菌超纯水溶解后,通过琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量后,再用微量分光光度计测定 DNA 样品浓度和纯度。根据测定的 DNA 样品浓度值,将样品稀释成 100 ng/ μ L 备用。

1.3 引物设计、PCR 扩增与检测

引物设计:根据 Chu 等发表的引物^[7],用于 PCR 扩增 *BMPRI* 基因片段(目标大小为 140 bp),上、下游引物序列分别为 5'-GTCGCTATGGGAAGTTTGATG-3'和 5'-CAAGATGTTTTTCATGCCTCATCAACACGGTC-3'。根据 Våge 等发表的 *GDF9* 基因序列^[5],设计引物用于扩增基因片段(目标大小为 196 bp),上、下游引物序列分别为 5'-AGGAGAGTGCAGCTCTGAA-3'和 5'-CAGTCCCTTTACAGTATCG-3'。引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

扩增与检测:PCR 扩增体系:采用 25 μ L,包括 10 \times buffer 2.5 μ L,25 mmol/L $MgCl_2$ 2.0 μ L,10 mmol/L dNTP 2.0 μ L,10 pmol/ μ L 的上、下游引物各 1 μ L,5 U/ μ L *Taq* 酶 0.2 μ L,DNA 模板 1 μ L,剩余体积用灭菌超纯水补足。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}C$ 5 min;94 $^{\circ}C$ 1 min,60 $^{\circ}C$ 30 s,72 $^{\circ}C$ 30 s,共 32 个循环;72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min 后 4 $^{\circ}C$ 保存。PCR 扩增结束后,取 2 μ L 扩增产物,以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测是否扩增出特异性目标条带。

1.4 遗传变异的检测与统计分析

采用 *Ava* II 限制性内切酶对 *Fec B* 基因的 PCR 扩增产物进行酶切检测。酶切反应体系为 20 μ L,其中 PCR 扩增产物 5 μ L,10 \times 缓冲液 2 μ L,10 U/ μ L *Ava* II 限制性内切酶 0.5 μ L,灭菌超纯水 12.5 μ L。振荡并短暂离心后放入水浴锅中,酶切反应条件为 37 $^{\circ}C$ 水浴 2 h。取 5 μ L 酶切产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,在凝胶成像系统中观察结果。选取不同基因型个体的 PCR 扩增产物直接进行双向测序。

采用琼脂糖凝胶回收纯化试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司)对 *GDF9* 基因的 PCR 扩增产物纯化后,送南京金斯瑞生物科技有限公司进行双向测序,核对测序峰图,确保测序结果准确。

根据母羊产羔生产性能记录,结合试验检测结果,统计分析相关基因型频率与等位基因频率,并分析其与产羔性能之间的关系。

2 结果与分析

2.1 *BMPRI* 基因的 PCR 扩增与检测结果

图 1 为 *BMPRI* 基因扩增结果,所有的 DNA 样品中都

能够特异性地扩增出 1 条明亮的特异性条带,其分子大小与预期一致。

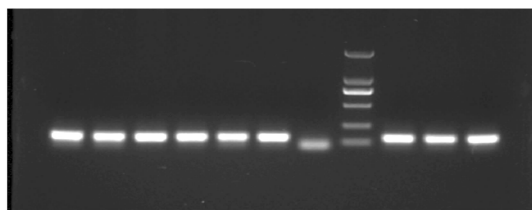


图1 *BMPRI* 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测

将扩增的 *BMPRI* 基因片段回收纯化后,进行 PCR-RFLP 分析。如果 *BMPRI* 基因在第 746 位点发生 A \rightarrow G 突变时,会产生 *Ava* II 酶切位点,PCR 扩增产物酶切后产生 110 bp 和 30 bp 的片段;如果该位点没有发生突变时,就不存在 *Ava* II 酶切位点,只产生 140 bp 的片段。根据国内外命名规则,出现 140/140 bp 带型称为 +/+ 野生型,出现 110/30 bp 带型称为 B/+ 杂合型,出现 110/110 bp 带型称为 B/B 纯合基因型。

由图 2 可知,所有母羊个体的 PCR 扩增产物酶切表现为 2 种类型,一种为单条带,另一种为 2 条带。酶切结果为单条带的代表纯合野生型 +/+ (140/140 bp),2 条带的代表杂合型 B/+ (140/110 bp),即在滩羊群体中只检测到 2 种基因型,即 +/+ 型和 B/+ 型,没有检测到纯合突变类型 B/B。

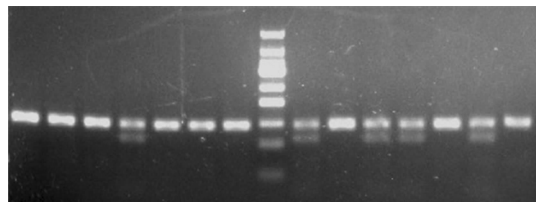


图2 *BMPRI* 基因 PCR 扩增产物的酶切电泳检测

将扩增的 *BMPRI* 基因片段回收纯化后,直接进行双向测序。测序结果分别与山羊 12S rRNA 和 *MC1R* 基因全序列比对表明,所扩增的条带即为目标基因片段。

从滩羊单羔组和双羔组中分别选择 B/+ 和 +/+ 2 种基因型的 PCR 扩增产物,随机选取 3 个样本进行测序分析。2 种基因型的测序峰图见图 3。运用序列比对软件对测序结果进行分析发现,B/+ 基因型发生与 Booroola Merino 绵羊相同的基因突变位点,也就是在编码区第 746 bp 处发生 A \rightarrow G 碱基突变,该突变位点导致其所编码的第 249 位氨基酸从谷氨酰胺突变为精氨酸;而 +/+ 基因型在相应的位点未发生突变,仍然编码谷氨酰胺。

2.2 *GDF9* 基因的 PCR 扩增与检测结果

GDF9 基因的扩增结果显示,所有的 DNA 样品中都能够

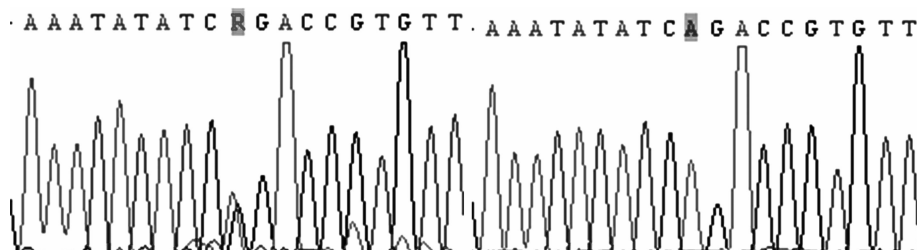


图3 2种基因型的测序峰图

特异性地扩增出 1 条明亮的特异性条带,其分子大小与预期一致。将扩增的 *GDF9* 基因片段进行 PCR-SSCP 分析,所有个体只出现 1 种类型的条带(图 4),表明该区域未发现突变位点。将扩增的 *GDF9* 基因片段回收纯化后,直接进行双向测序进一步验证了 PCR-SSCP 分析,即扩增的 *GDF9* 基因片段在群体中无突变。

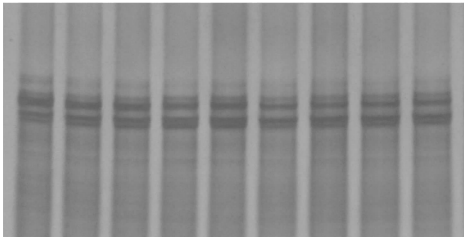


图4 *GDF9*基因 PCR 扩增产物的 SSCP 分析

2.3 基因型频率与等位基因频率统计分析

BMP1B 基因的 *FecB* 位点基因型频率与等位基因频率统计结果见表 1。由表 1 可知,在滩羊群体中,无论是在产单羔个体还是产双羔个体中,均没有检测到纯合突变型(B/B 基因型),但都检测到了杂合型(B/+型)和野生型(+/+型)。在产双羔个体中,杂合型(B/+型)和野生型(+/+型)的基因型频率分别为 0.57 和 0.43,杂合型(B/+型)是群体中的优势基因型;等位基因 B 和 + 的频率分别为 0.29 和 0.71,等位基因 + 是群体中的优势等位基因。在产单羔个体中,杂合型(B/+型)和野生型(+/+型)的基因型频率分别为 0.07 和 0.93,野生型(+/+型)是群体中的优势基因型;等位基因 B 和 + 的频率分别为 0.03 和 0.97,等位基因 + 是群体中的优势等位基因。在整个滩羊群体中,杂合型(B/+型)和野生型(+/+型)的基因型频率分别为 0.12 和 0.88,野生型(+/+型)是群体中的优势基因型;等位基因 B 和 + 的频率分别为 0.03 和 0.97,等位基因 + 是群体中的优势等位基因。

表 1 滩羊 *FecB* 位点的基因型频率和等位基因频率

类型	样本数	基因型频率			等位基因频率	
		B/B	B/+	+/+	B	+
双羔	14	0(0)	0.57(4/7)	0.43(3/7)	0.29	0.71
单羔	118	0(0)	0.07(4/59)	0.93(55/59)	0.03	0.97
总群体	132	0(0)	0.12(8/66)	0.88(58/66)	0.03	0.97

3 讨论

国内外的研究表明,已经发现至少有多基因的多态性与增加绵羊的产卵率或产羔数密切相关。这些基因包括生长分化因子 9(*GDF9*)、骨形态发生蛋白 15(*BMP15*)和骨形态发生蛋白受体 IB(*BMP1B*)等^[4-5,7-8]。运用 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 等检测技术发现,我国小尾寒羊、湖羊、滩羊、中

国美利奴多胎品系和多浪羊等含有 *BMP1B*、*IB*、*BMP15* 和 *GDF9* 的多羔主效基因突变体,但各群体的等位基因频率存在差异性,其对不同绵羊品种的产羔效应也不完全相同^[7-9]。

本研究通过对 *BMP1B* 基因的特定位置 *FecB* 检测发现,在滩羊群体中存在 *FecB* 基因编码区 746 位点突变。在产双羔个体中,杂合型(B/+型)是群体中的优势基因型,而在产单羔个体则野生型(+/+型)是优势基因型;在整个滩羊群体中,野生型(+/+型)是群体中的优势基因型。因此,在滩羊产群体中,*BMP1B* 基因 *FecB* 位点在一定程度上影响产羔性能,*FecB* 位点可能是滩羊高繁殖力的重要调控基因之一。然而,尽管产双羔个体中 B/+ 基因型频率明显高于产单羔群体 B/+ 基因型频率,但 +/+ 基因型个体也存在产双羔的现象,提示滩羊群体中可能还存在其他控制多羔性状的基因。

Våge 等在检测挪威绵羊群体 *GDF9* 基因时,发现了 1 个全新的错义突变位点(c. 1111G→A),引起编码的氨基酸发生由 Val 到 Met 突变;与野生型基因型个体相比,突变型母羊个体平均至少多生产 0.46~0.57 只羔羊^[5]。然而,在本受检测的滩羊群体中,未检测到该突变位点,表明该突变位点与滩羊的产羔性能无相关性。

参考文献:

- [1] Notter D R. Genetic aspects of reproduction in sheep [J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2008, 43(2): 122-128.
- [2] 王建超,曹文广. 绵羊多胎主效基因研究进展[J]. *遗传*, 2011, 33(9): 953-961.
- [3] Notter D R. Genetic improvement of reproductive efficiency of sheep and goats [J]. *Animal Reproduction Science*, 2012, 130(3/4): 147-151.
- [4] Mullen M P, Hanrahan J P, Howard D J, et al. Investigation of prolific sheep from UK and Ireland for evidence on origin of the mutations in *BMP15* [*FecX(G)*, *FecX(B)*] and *GDF9* [*FecG(H)*] in Belclare and Cambridge sheep [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53172.
- [5] Våge D I, Husdal M, Kent M P, et al. A missense mutation in growth differentiation factor 9 (*GDF9*) is strongly associated with litter size in sheep [J]. *BMC Genetics*, 2013, 14: 1.
- [6] Martin P, Raoul J, Bodin L. Effects of the *FecL* major gene in the Lacauine meat sheep population [J]. *Genetics Selection Evolution*, 2014, 46: 48.
- [7] Chu M X, Yang J, Feng T, et al. *GDF9* as a candidate gene for prolificacy of Small Tail Han sheep [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(8): 5199-5204.
- [8] Chu M X, Jia L H, Zhang Y J, et al. Polymorphisms of coding region of *BMP1B* gene and their relationship with litter size in sheep [J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(6): 4071-4076.
- [9] Hua G H, Yang L G. A review of research progress of *FecB* gene in Chinese breeds of sheep [J]. *Animal Reproduction Science*, 2009, 116(1/2): 1-9.