

李 平,李潇蒙,龙清孟,等. 贵州黑山羊 *BMP15* 基因多态性及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(9):77-81.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.09.014

贵州黑山羊 *BMP15* 基因多态性及生物信息学分析

李 平¹,李潇蒙²,龙清孟¹,毛世明¹,熊胜利¹,

陈大芳¹,谭晓山¹,周 迪¹,李 俊¹,唐明宗¹,申金容¹,尹杨莎¹

(1. 贵州省种畜禽种质测定中心,贵州贵阳 550018;2. 黔南民族职业技术学院现代山地农业工程系,贵州都匀 558002)

摘要:为探究 *BMP15* 在贵州黑山羊上的基因多态性,本研究以 102 只贵州黑山羊为试验对象,采用 PCR 产物直接测序技术对贵州黑山羊 *BMP15* 基因进行 SNP 多态位点检测。检测结果表明,*BMP15* 存在 1 个 SNP 位点在第二外显子 6 260 bp 处发生 C→G 突变,通过对其生物信息学分析发现,*BMP15* 基因的等位基因频率、mRNA 二级结构、蛋白质二级结构和三级结构预测在突变前后均有差异,翻译的蛋白质为亲水性的具有跨膜结构的不稳定性蛋白。本研究发现的 *BMP15* 基因在第二外显子上的突变,可为今后与性状相关联研究提供理论依据。

关键词:贵州黑山羊;*BMP15*;SNPs;生物信息学

中图分类号: S827.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)09-0077-05

骨形态发生蛋白 15(*BMP15*) 又称生长分化因子 9B,不仅能够促进颗粒细胞分裂、分化,而且能够抑制颗粒细胞中 *FSHR* 基因的表达^[1],同时能够促进卵泡发育^[6-7]。*BMP15* 基因由 1 个内含子与 2 个外显子构成,2 个外显子被内含子隔开,外显子全

长 1 176 bp,共编码 393 个氨基酸残基的前蛋白。通过大量研究发现,*BMP15* 基因可能与高繁殖性状有关,研究人员已在国内优良地方品种的绵羊上对 *BMP15* 基因展开相关研究,以期构建高繁殖力群体奠定基础。目前,已在少数绵羊品种上发现 *BMP15* 基因与繁殖性状有关联,在小尾寒羊上发现 *BMP15* 基因 B2 处突变对高繁殖性状影响作用十分明显^[4-5]。程俐芬等人研究发现 *BMP15* 基因在第一外显子中虽存在突变位点,但对绵羊繁殖性状并没有显著影响^[3]。吴翠玲等研究 6 个绵羊群体发现,*BMP15* 基因外显子 1 上在 58~60 bp 处有 3 个

收稿日期:2019-05-05

基金项目:贵州省农业攻关项目(编号:黔科合(2019)2279);中央引导地方科技发展专项资金[编号:黔科中央引地(2018)4015]。

作者简介:李 平(1989—),女,黑龙江鹤岗人,硕士研究生,研究方向为特种动物种质饲养。E-mail:840142213@qq.com。

通信作者:龙清孟,硕士,高级兽医师,研究方向为畜牧兽医。E-mail:920542302@qq.com。

[12] Lee F F, Lo S L. The use of Trizol reagent (phenol/guanidine isothiocyanate) for producing high quality two-dimensional gel electrophoretograms (2-DE) of dinoflagellates [J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 73(1): 26-32.

[13] 叶翠芳,杨 珂,张美英,等. 藻胆蛋白的提取、纯化及其体外抗紫外活性[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版),2013,34(5):522-526.

[14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-254.

[15] Xie C J, Wang D, Yang X Y. Protein extraction methods compatible with proteomic analysis for the cotton seedling [J]. Crop Science, 2009, 49(2): 395-402.

[16] Wang D Z, Lin L, Leo L C, et al. Comparative studies of four protein preparation methods for proteomic study of the dinoflagellate *Alexandrium* sp. using two-dimensional electrophoresis [J].

Harmful Algae, 2009, 8(5): 685-691.

[17] Wang W, Vignani R, Scali M, et al. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis [J]. Electrophoresis, 2006, 27(13): 2782-2786.

[18] Morgan K C, Wright J C, Simpson F J. Review of chemical constituents of the red alga *Palmaria palmate* (dulse) [J]. Economic Botany, 1980, 34(1): 27-50.

[19] 闰秋丽,郭兴凤. 海藻蛋白研究及应用进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(1): 179-1812.

[20] 高坤山. 珊瑚藻类钙化的研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 290-294.

[21] 赵宇鹏,周 伟,赵佩佩,等. 适用于条斑紫菜的双向电泳样品制备方法[J]. 海洋科学, 2013, 37(5): 19-24.

[22] 梁文裕,王 星,焦广飞,等. 发菜蛋白质组双向电泳技术的建立及优化[J]. 西北植物学报, 2009, 9(8): 1550-1556.

[23] 杨德明,张娅欣,沈少炎,等. 福建柏叶片蛋白质双向电泳技术优化[J]. 森林与环境学报, 2017, 37(1): 54-59.

碱基(CTT)缺失^[1]。本研究通过 PCR 产物直接测序技术并结合生物软件对贵州黑山羊 *BMP15* 基因进行多态性研究与生物信息学分析,预测 mRNA 二级结构、蛋白质二级结构、三级结构,以期为今后研究贵州黑山羊繁殖性状提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 血液 DNA 提取

102 只贵州黑山羊血液样本,来自册亨县冗渡镇贵州领头羊山地草牧业科技有限公司。血液 DNA 提取采用天根血液基因组 DNA 提取试剂盒,

提取后用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 进行检测,检测结果发现条带清晰明亮、无 RNA 和蛋白质等污染。通过微量紫外分光光度计检测 DNA 质量 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 均在 1.8 ~ 2.0 之间,说明 DNA 提取效果好,纯度高。

1.2 引物设计与合成

根据 NCBI 数据库中绵羊 *BMP15* 基因序列(登录号:NM_001114767.1)利用 Primer 5.0 软件设计 2 对引物,其目的片段覆盖全部外显子区域,引物序列见表 1。引物合成由上海英潍捷基贸易有限公司完成。

表 1 引物序列信息

基因	名称	引物序列(5′→3′)	引物大小 (bp)	退火温度 (℃)
<i>BMP15</i>	Exon1	F:GGAGCCTGGATGCTGTTACC;R:GCCCCAAGGCAATCTGTTCT	632	59
	Exon2	F:CTGAGCAGGTCTGTTAGGGAG;R:GACTGGGCAATCATACCTCA	920	62

1.3 PCR 扩增

贵州黑山羊基因组 DNA 采用天根血液基因组 DNA 提取试剂盒提取,以提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20.0 μL:PCR Mixture 10.0 μL,上、下游引物各 1.5 μL,DNA2.0 μL,蒸馏水 5.0 μL。PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,退火(退火温度见表 1)30 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min;4 ℃ 保存。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 PCR 扩增产物测序和基因序列分析

PCR 扩增产物,送往上海英潍捷基贸易有限公司进行双向测序。测序结果利用 SeqMan 软件进行序列分析,采用 MWSnap 测量 SNPs 等位基因的峰高值,根据 $A_i = B_i / (B_a + B_b)$, $i = a, b$ 公式估算各等位基因频率。利用生物信息学软件进行 mRNA 二级结构预测,蛋白质二级、三级结构预测。

2 结果与分析

2.1 DNA 检测结果

采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳对血液 DNA 进行检测,电泳结果显示基因组条带整齐、清晰明亮、无 RNA 和蛋白质等污染,并利用紫外分光光度计测量 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 均在 1.8 ~ 2.0 范围内。检测 DNA 结果表明提取的 DNA 可用于 PCR 扩增。

2.2 PCR 扩增产物检测结果

以 5 μL 扩增产物为样本用 1% 的琼脂糖凝胶

进行电泳检测,以 1 000 bp DNA Ladder Maker 作为分子量标记对照。检测结果见图 1,PCR 扩增产物条带整齐、清晰明亮、检测片段长度与目的片段一致,其扩增目的片段长度分别为 632 bp 和 920 bp,表明 2 对引物的特异性较好。

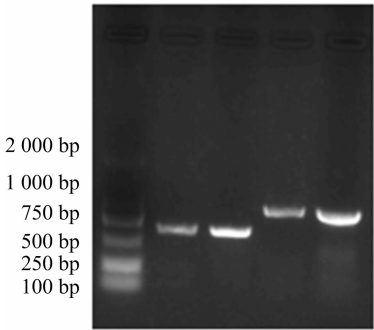


图 1 PCR 产物扩增电泳

2.3 扩增基因的测序

测序结果利用 SeqMan 软件查看,找到 1 个 SNP 位点,由图 2 可知,在第二外显子 6 260 bp 处发生 C→G 突变,exon2 - C 6 260 bp,利用 DNASTar 中的 EditSeq 软件进行分析发现,*BMP15* 基因编码的蛋白质突变前后发生改变,由 Gln 突变为 Glu,第二外显子上的突变为错义突变。

2.4 SNPs 等位基因频率估算

BMP15 基因 SNPs 等位基因的峰高值利用 MWSnap 软件进行测量,将其测量值代入公式,利用公式估算出突变前后等位基因频率,突变前为 0.485,突变后为 0.515,数据结果显示突变前后有差异。

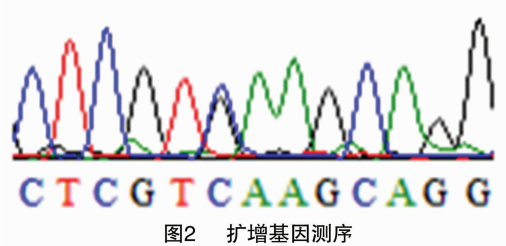


图2 扩增基因测序

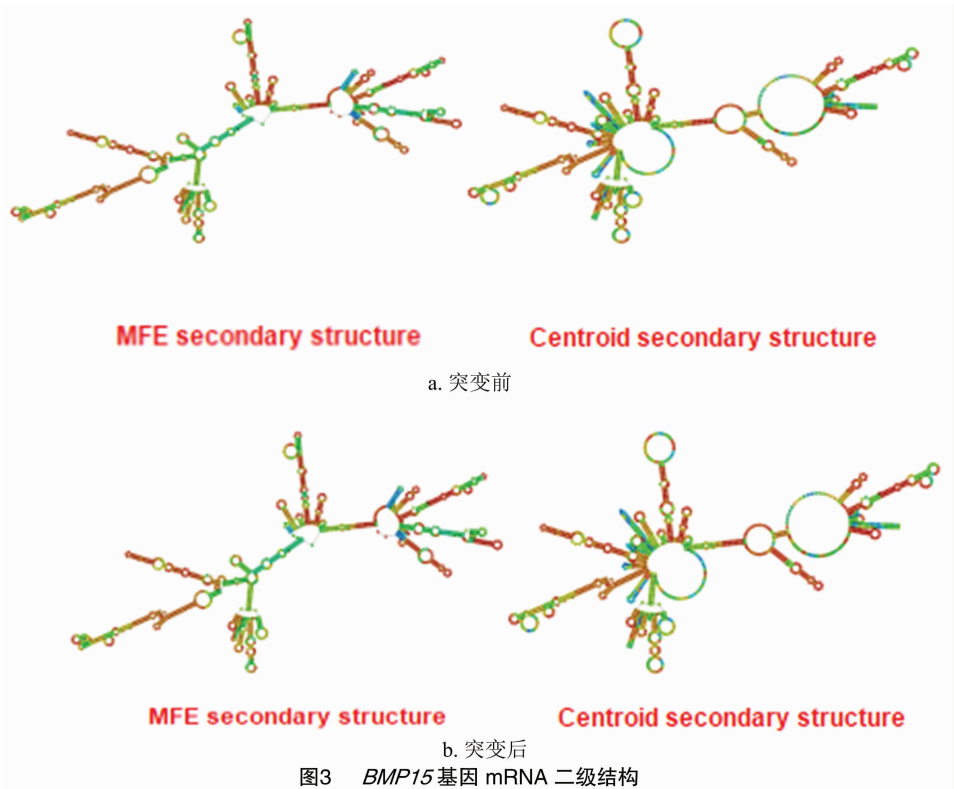


图3 BMP15基因 mRNA 二级结构

2.6 BMP15 的蛋白质理化特性分析

依照 *BMP15* 基因所编码的氨基酸序列,通过 <http://us.expasy.org/tools/protparam.html> 在线进行蛋白质理化特性分析。由表 3 可知,*BMP15* 基因分子式突变前为 $C_{1828}H_{2779}N_{515}O_{494}S_{14}$, 突变后为 $C_{1828}H_{2778}N_{514}O_{495}S_{14}$,在酵母菌中的半衰期突变前后均大于 3 min,在人体外红细胞中半衰期突变前后均大于 2.8 h,该蛋白属于不稳定性蛋白。利用 Antheprot 6.3 分析软件对 *BMP15* 蛋白的亲水性和易溶性进行分析,由图 4、图 5 可知,*BMP15* 蛋白的亲水指数范围为 $-1.91 \sim 2.72$;易溶性较强,皆为正

2.5 *BMP15* 基因 mRNA 二级结构分析

利用 EditSeq 软件进行 mRNA 二级结构分析发现,*BMP15* 基因 mRNA 的序列在突变前后翻译的氨基酸序列不同,使得 mRNA 结构改变。利用 <http://rna.tbi.univie.ac.at/bin/RNAfold.cgi> 软件进行 mRNA 二级结构预测,发现其突变前后的自由能均为 $-1\,201.75\text{ kJ/mol}$,突变前后具体的二级结构见图 3。

数,最大易溶性为 3.97。综上分析,*BMP15* 蛋白整体上表现为亲水性。利用在线跨膜蛋白数据库对 *BMP15* 的跨膜区域进行分析,由图 6 可知,实线表示跨膜方向由膜内向膜外,虚线表示跨膜方向膜外向膜内,2 种跨膜方向皆是由正数到负数再到正数的顺序,此蛋白具有跨膜结构。

2.7 *BMP15* 蛋白质二级结构分析

https://npsa-pr-ab1.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_Sopma.html 网页在线进行蛋白质二级结构预测;结果显示, α -螺旋(Alpha helix)、 β -转角(Beta turn)、扩展链、无规卷曲在突

表 3 蛋白质理化特性分析

名称	蛋白质分子量	等电点	正电荷氨基酸残基 (Arg + Lys) 总数	带负电荷氨基酸残基 (Asp + Glu) 数	不稳定系数
突变前	40 323.17	9.36	37	23	50.32
突变后	40 324.15	9.29	37	24	49.78



图4 BMP15 蛋白亲水性曲线



图5 BMP15 蛋白易溶性曲线

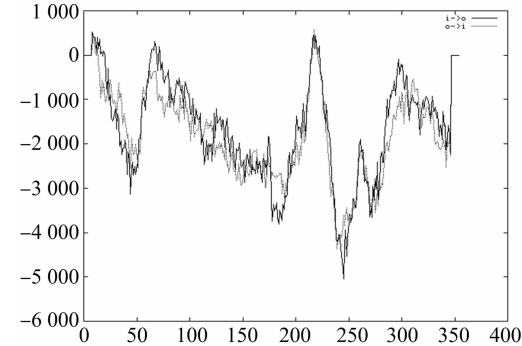


图6 BMP15 蛋白跨膜区域曲线

变位点前后均有改变(表 4)。利用 Protean 软件对 BMP15 蛋白质二级结构进行预测(图 7)。

表 4 蛋白质二级结构预测分析

名称	占比(%)			
	β -转角	α -螺旋	无规卷曲	扩展链
突变前	3.38	15.77	66.48	14.37
突变后	2.82	16.62	65.35	15.21

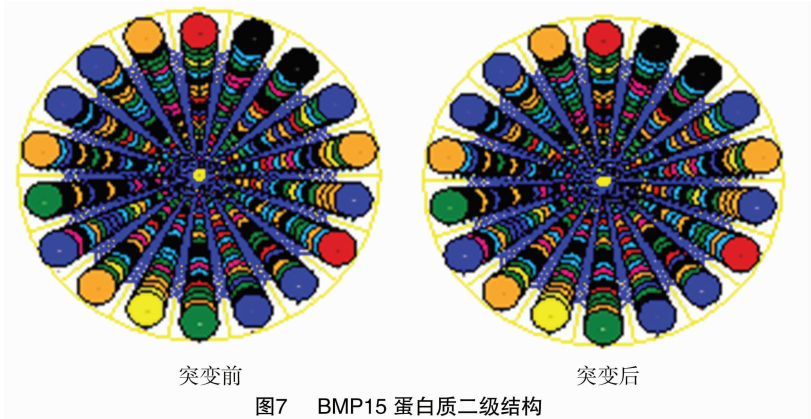


图7 BMP15 蛋白质二级结构

2.8 BMP15 蛋白质三级结构分析

<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> 网页在线进行蛋白质三级结构预测,分析显示突变前和突变后的变化具体结构,见图 8。

3 讨论

近年,研究人员不断地挖掘 BMP15 基因突变位点^[8-9],并且有研究发现 BMP15 基因是控制绵羊高繁殖性状的主效基因之一^[10-11],目前已在 Inverdale 绵羊、Hanna 绵羊和 Lacaune 绵羊等国外品种中发现 BMP15 基因与产羔性状相关的多个不同突变位点^[15]。田志龙等人在绵羊上对 BMP15 基因进行多态性研究,发现 g.50971423T > C 位点处存在 3 种

基因型,分别是 TT、TC 和 CC,在单羔和多羔品种间其基因型频率和等位基因频率均差异显著($P < 0.05$)^[12]。胡珊等对山羊 BMP15 基因进行生物信息学分析,发现山羊 BMP15 基因编码区长 1 185 bp,编码 394 个氨基酸,BMP15 蛋白是一个具有亲水性的不稳定的碱性蛋白^[2]。何远清等在 6 个山羊品种中找到了 B4 突变^[13],林尖兵等也在贵州白山羊中找到了 B4 突变^[14]。

本研究发现贵州黑山羊 BMP15 基因在第二外显子 6 260 bp 处发生 C→G 突变。朱韶华等研究发现 BMP15 第二外显子第 755 位点发生的 T→C 突变(AC 型)对蒙古羊 1 胎产双羔影响十分显著^[16]。通过生物信息学分析,结果显示,BMP15 基因突变前后所编码的氨基酸序列发生改变,此突变为错义突

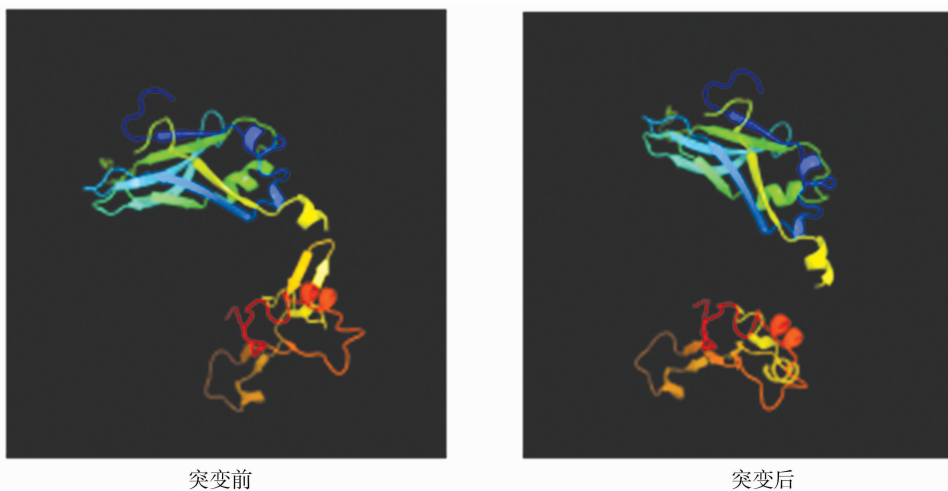


图8 BMP15 蛋白质三级结构

变;BMP15 蛋白为具有跨膜结构的亲水性不稳定性蛋白。胡珊等研究发现,BMP15 蛋白是一个不稳定的碱性蛋白^[2]。本研究在 *BMP15* 基因上也有同样的发现。有研究表明,*BMP15* 第二外显子的突变可能与动物繁殖性状相关,本研究在第二外显子上找到突变位点,后续将结合第二外显子突变与繁殖性状作进一步的研究,以期今后与性状相关联研究提供理论依据。

参考文献:

- [1] 吴翠玲,宗兴龙,赵卓,等. 6 个绵羊群体 *BMP15*、*GDF9* 基因多态性分析[J]. 中国畜牧兽医,2018,45(8):2236-2246.
- [2] 胡珊,方乾,李浩,等. 山羊 *BMP15* 基因生物信息学分析[J]. 家畜生态学报,2018,39(8):13-19.
- [3] 程俐芬,姬爱国,王清祥. 骨形态发生蛋白 *BMP15* 基因与绵羊繁殖性能关系的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2017,44(8):2392-2397.
- [4] 储明星,成荣,陈国宏,等. 小尾寒羊和湖羊高繁殖力候选基因 *BMP15* 的研究[J]. 安徽农业大学学报,2005,32(3):278-282.
- [5] 黄顺国,额尔和花,王新燕等. 绵羊多胎基因 *BMPr-1B*、*BMP15* 的研究进展[J]. 农业科学研究,2007,28(3):68-71.
- [6] Peng J, Wigglesworth K, Rangarajan A, et al. Aminoacid 72 of mouse and human *GDF9* mature domain is responsible for homodimer bioactivities but has subtle effects on *GDF9*; *BMP15* heterodimer activities[J]. Biology of Reproduction,2014,91(6):142.
- [7] Paulini F, Melo E O. The role of oocyte - secreted factors *GDF9* and *BMP15* in follicular development and oogenesis[J]. Reproduction in

Domestic Animals,2011,46(2):354-361.

- [8] Lassoued N, Benkhilil Z, Woloszyn F, et al. *Fec XBar*: a novel *BMP15* mutation responsible for prolificacy and female sterility in Tunisian Barbarine Sheep[J]. BMC Genetics,2017,18(1):43-53.
- [9] 董新龙,胡文萍,贺小云. 等绵羊 *BMP15* 组织表达特征及 *Fec XGr*、*Fec XO* 和 *G971A* 突变的检测[J]. 农业生物技术学报,2016,24(12):1810-1819.
- [10] Galloway S M, Mc N P, Cambridge L M, et al. Mutations in an oocyte - derived growth factor gene (*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage - sensitive manner[J]. Nature Genetics,2000,25(3):279-283.
- [11] Hanrahan J P, Gregan S M, Mulsant P, et al. Mutations in the genes for oocyte - derived growth factors *GDF9* and *BMP15* are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*) [J]. Biology of Reproduction,2004,70(4):900-909.
- [12] 田志龙,刘秋月,王翔宇,等. 绵羊 *BMP15* 基因多态性及其与产羔数的关联分析[J]. 中国畜牧杂志,2018,54(7):23-27.
- [13] 何远清,储明星,王金玉,等. 6 个山羊品种高繁殖力候选基因 *BMP15* 多态性研究[J]. 安徽农业大学学报,2006(1):61-64.
- [14] 林尖兵,杜智勇,覃成,等. 贵州白山羊 *BMP15* 基因多态性研究[J]. 畜牧与兽医,2007(12):21-24.
- [15] 朱兰,兰蓉,邵庆勇,等. 云南黑山羊新品种和龙陵黄山羊高繁基因的研究[J]. 畜牧与兽医,2018,50(2):1-6.
- [16] 朱韶华,张利平,马晓明,等. 3 种绵羊 *BMP15* 基因第二外显子多态性及与产羔数的相关性分析[J]. 基因组学与应用生物学,2019,38(1):74-81.