

李平,龙清孟,张芸,等. 3 个山羊群体 *NPY-Y1R* 基因的多态性与繁殖性能[J]. 江苏农业科学,2020,48(17):171-174.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.033

# 3 个山羊群体 *NPY-Y1R* 基因的多态性与繁殖性能

李平<sup>1</sup>, 龙清孟<sup>1</sup>, 张芸<sup>3</sup>, 陈大芳<sup>1</sup>, 谭晓山<sup>1</sup>, 周迪<sup>1</sup>, 李潇蒙<sup>2</sup>, 李俊<sup>1</sup>, 冯文武<sup>1</sup>

(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生物工程系, 贵州都匀 558000;

3. 贵州省畜禽遗传资源管理站, 贵州贵阳 550018)

**摘要:**以贵州黑山羊、西州乌羊和努比亚 3 个品种为试验群体, 采用 PCR 产物直接测序技术检测 *NPY-Y1R* 基因的多态性, 并探讨其多态性对山羊繁殖性状的影响, 为山羊繁殖力的标记辅助选择和育种提供理论依据。利用 Excel 计算基因频率、基因型频率; 利用 POPGEN 软件计算遗传多态性参数纯合度、杂合度、有效等位基因数和多态信息含量并对 Hardy-Weinberg 平衡状态进行分析; 用 SPSS 软件对 3 个山羊群体 *NPY-Y1R* 基因多态性与产仔数进行相关性分析。结果表明, *NPY-Y1R* 基因外显子中检测到 1 个单核苷酸多态性 (SNP) 位点, *NPY-Y1R* 基因在外显子 2 处存在突变位点 G1141A, 3 个山羊群体在此突变位点处均存在 2 种基因型, 分别为 AG/GG; 贵州黑山羊、西州乌羊和努比亚  $\chi^2$  均未达到显著水平, 处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 贵州黑山羊和努比亚表现为低度多态, 西州乌羊表现为中度多态。AG 基因型个体在贵州黑山羊、西州乌羊、努比亚群体中产羔数显著高于 GG 基因型个体 ( $P < 0.05$ ), 呈现出 AG > GG 趋势。AG 基因型个体的山羊在后续的试验中待进一步认证, 结果可为初步判定山羊 *NPY-Y1R* 基因的突变与繁殖性能的研究奠定试验基础。

**关键词:** 贵州黑山羊; 西州乌羊; 努比亚山羊; *NPY-Y1R* 基因多态性; 繁殖性能

**中图分类号:** S827.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2020)17-0171-03

神经肽 Y1 受体 (*NPY-Y1R*) 是含有 36 个氨基酸残基的一种单链多肽, 广泛分布于中枢神经系统和外周神经系统, 与 YY 肽和胰多肽一起构成多肽家族<sup>[1-2]</sup>。科研人员在小鼠上研究发现, *NPY-Y1R* 基因敲除能够损害小鼠促性腺轴, 使小鼠对能量贮存感知的能力下降<sup>[3-4]</sup>, 同时发现 *NPY-Y1R* 基因在下丘脑中的表达受身体能量平衡变化的影响<sup>[5]</sup>, *NPY-Y1R* 基因在生殖功能调节与性发育中有重要作用, 可能是影响山羊产羔数性状的一个主效基因<sup>[6]</sup>。储明星等在山东济宁青山羊上研究发现 *NPY-Y1R* 基因的 EF 型济宁青山羊产羔数比 EE 型多 0.58 只 ( $P < 0.01$ ), 并且 F 等位基因与济宁青山羊性早熟和高繁殖力相关<sup>[1]</sup>。樊奇在贵州白山

羊和川东白山羊 2 个群体中发现, AB 基因型山羊产羔数显著高于 AA 基因型 ( $P < 0.05$ ), 而在古蔺马羊、贵州白山羊和川东白山羊 3 个群体中 AA 型和 AB 型之间的初生质量最小二乘均值没有显著差异 ( $P > 0.05$ )<sup>[2]</sup>。目前, *NPY-Y1R* 基因在山羊上的研究并不是很多, 本研究以贵州黑山羊、西州乌羊、努比亚 3 个山羊群体为研究对象, 利用分子遗传标记辅助选择手段, 研究 *NPY-Y1R* 基因在 3 个山羊群体中的多态性及对繁殖性状的影响, 旨在为选育山羊高产仔率品种和培育高繁殖性状羊群提供理论依据, 并应用于在实践生产中。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验样品采集自贵州省黔西南布依族苗族自治州册亨县冗渡镇贵州领头羊山地草牧业科技有限公司。采取前腔颈静脉采血方式, 采集 93 只经产贵州黑山羊、72 只西州乌羊、63 只努比亚的血液, 于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存血液备用。整理收集 3 个品种山羊产仔记录数据。

### 1.2 血液 DNA 提取

血液样本 DNA 提取采用天根生化科技 (北京)

收稿日期: 2019-10-15

基金项目: 贵州省科技厅农业攻关项目 [编号: 黔科合 (2019) 2279]; 中央引导地方科技发展专项资金项目 [编号: 黔科中央引地 (2018) 4015]; 贵州省主要畜禽基因大数据分析与应用研究科技创新人才团队 [编号: 黔科合平台人才 (2019) 5615 号]。

作者简介: 李平 (1989—), 女, 黑龙江鹤岗人, 硕士研究生, 畜牧师, 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。

有限公司生产的血液基因组 DNA 提取试剂盒,用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 质量进行检测。通过超微量紫外分光光度计 NanoDrop - ONE 检测 DNA  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  比值。

表 1 引物序列信息

基因	片段名称	引物序列 (5'→3')	片段大小 (bp)	退火温度 (℃)
NPY - Y1R	Exon2 - 1	CACAGCCATGATCTCCACTTGT TGCTTGCTTCAGAGATG	187	59
	Exon2 - 2	CAGCATGATGGACAAGATGAGAGA ACACAAGTGGAGATCATGGCTGTGAG	219	60

1.4 PCR 扩增

以贵州黑山羊、西州乌羊和努比亚基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 20 μL,其中 PCR Mixture 10.0 μL,上、下游引物各 0.5 μL,DNA 模板 1.0 μL,加蒸馏水至反应体系为 20 μL。PCR 反应条件: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,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 5 min;4 ℃ 保存。

1.5 PCR 产物测序

用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测,凝胶成像系统观察电泳结果。选择条带单一、清晰明亮、产量高的 PCR 产物送上海立菲生物技术有限公司进行双向测序。用 DNASTar 软件中的 SeqMan 对序列结果进行分析。

1.6 遗传多态性分析

应用数据统计软件计算 NPY - Y1R 基因的基因频率、基因型频率。利用 POPGEN 软件计算遗传多态性参数纯合度( $H_o$ )、杂合度( $H_e$ )、有效等位基因数( $N_e$ )和多态信息含量(PIC),并对 Hardy - Wein - berg 平衡状态进行分析。

1.7 NPY - Y1R 基因与产仔数关联性分析

利用 SPSS 软件对 3 个品种山羊群体 NPY - Y1R 基因多态性与产仔数进行关联性分析,结果以(平均值 ± 标准误)表示,以  $P < 0.05$  为差异显著性判断标准。

2 结果与分析

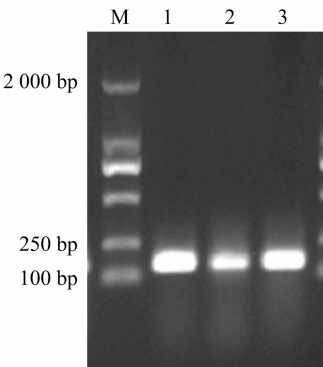
2.1 DNA 检测结果

提取的贵州黑山羊、西州乌羊和努比亚血液基因组 DNA 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,条带清晰明亮,无 RNA 和蛋白质等污染(图 1)。利用超微量紫外分光光度计 Nano Drop - ONE 检测 DNA,  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  值在 1.8 ~ 2.0 之间,说明 DNA 提取效

1.3 引物设计与合成

引物参照储明星等的引物设计方法<sup>[1]</sup>,合成 NPY - Y1R 基因 2 个外显子的引物序列见表 1。引物由上海立菲生物技术有限公司合成。

果好,纯度高。结合图像及检测结果判断提取的 DNA 纯度与质量可满足后续试验要求。



1—贵州黑山羊 DNA; 2—西州乌羊 DNA; 3—努比亚 DNA; M—DL2000DNA Marker

图1 山羊基因组 DNA 检测结果

2.2 PCR 产物检测结果

NPY - Y1R 基因 PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,分别在 187、219 bp 处有清晰条带,与预期片段大小一致。

2.3 测序结果分析

经测序发现 3 个山羊群体在 NPY - Y1R 基因的第 2 外显子 2 上的 G1141A 位点处有突变,并且 3 个山羊群体均存在 2 种基因型,分别为 AG、GG 型,存在多态性见图 2。3 个山羊群体在 NPY - Y1R 基因第 2 外显子 1 上,均未发现多态性。

2.4 NPY - Y1R 基因的基因型频率和等位基因频率

3 个品种山羊群体 NPY - Y1R 基因在 G1141A 位点上,不同基因型的基因型频率、等位基因频率和群体遗传多态性见表 2。3 个群体 NPY - Y1R 基因的 G1141A 位点 G 等位基因频率高于 A 等位基因频率,G 为优势等位基因;GG 基因型频率高于 AG,GG 为优势基因型。3 个品种山羊群体  $\chi^2$  均未达到显著水平,处于 Hardy - Weinberg 平衡状态。3

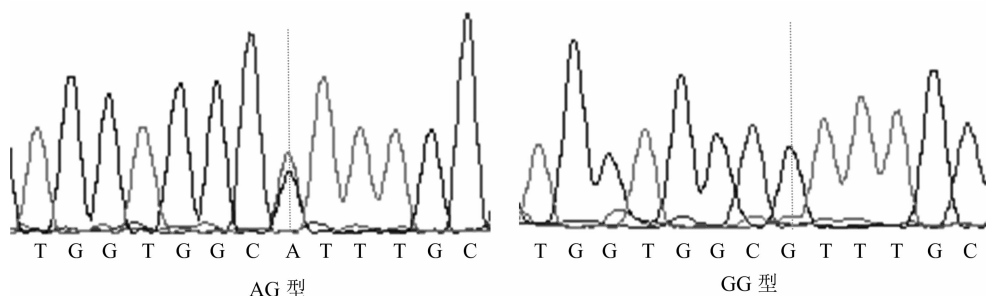


图2 *NPY-Y1R* 基因测序结果

表2 3 个山羊群体 *NPY-Y1R* 基因的基因型频率、等位基因频率及遗传多态性

群体	样本量 (只)	基因型频率		等位基因频率		$\chi^2$	$H_o$	$H_e$	$N_e$	PIC
		GG	AG	G	A					
贵州黑山羊	93	0.87	0.13	0.93	0.07	0.00	0.13	0.87	1.15	0.12
西州乌羊	72	0.62	0.38	0.81	0.19	0.21	0.38	0.62	1.62	0.31
努比亚	63	0.75	0.25	0.88	0.13	0.20	0.25	0.75	1.33	0.22

注: $\chi^2_{0.05(1)} = 3.841$ 。 $\chi^2_{0.01(1)} = 6.635$ 。

个品种的基因纯合度均较高。根据多态信息含量的标准: $PIC \geq 0.50$  为高度多态, $0.50 > PIC \geq 0.25$  为中度多态, $PIC < 0.25$  为低度多态,贵州黑山羊和努比亚表现为低度多态,西州乌羊表现为中度多态。

## 2.5 *NPY-Y1R* 基因不同基因型对不同品种羊产羔数的影响

利用 SPSS 软件对 3 个山羊群体 *NPY-Y1R* 基因多态性与产羔数进行相关性分析。从表 3 可以看出,贵州黑山羊 *NPY-Y1R* 基因 AG、GG 这 2 种基因型群体的平均产羔数分别为 1.75、1.15 只,AG 型产羔数比 GG 型多 0.60 只,2 个基因型之间产羔数差异显著;西州乌羊 *NPY-Y1R* 基因 AG、GG 这 2 种基因型群体平均产羔数分别为 1.63、1.15 只,AG 型产羔数比 GG 型多 0.48 只,2 个基因型之间产羔数差异显著;卢比亚 *NPY-Y1R* 基因 AG、GG 2 种基因型群体平均产羔数分别为 1.50、1.17 只,AG 型产羔数比 GG 型多 0.33 只,2 个基因型之间产羔数差异显著。

## 3 结论与讨论

近些年,研究人员不断地挖掘 *NPY-Y1R* 基因的突变位点,并且有研究发现 *NPY-Y1R* 基因可能是影响山羊产羔数性状的一个主效基因。国内外对 *NPY-Y1R* 基因在山羊上的研究较少。储明星等在济宁青山羊、波尔山羊、安哥拉山羊和内蒙古绒山羊上对 *NPY-Y1R* 基因进行多态性研究发现,在 G1141A 位点处 4 个山羊品种中都存在突变,为 CC

表3 *NPY-Y1R* 基因不同基因型与产羔数相关性分析

品种	基因型	样本数 (只)	产羔数 (只)
贵州黑山羊	GG	78	1.15 ± 0.37a
	AG	12	1.75 ± 0.50b
西州乌羊	GG	48	1.15 ± 0.38a
	AG	15	1.63 ± 0.52b
努比亚	GG	51	1.17 ± 0.38a
	AG	21	1.50 ± 0.55b

型与 CD 型 2 种基因型,CC 和 CD 基因型济宁青山羊上的产羔数差异不显著;在 C1330T 位点处济宁青山羊上存在突变,为 EE 型、EF 型 2 种基因型,EF 型济宁青山羊产羔数均值比 EE 型多 0.58 只,表明 *NPY-Y1R* 基因的 F 等位基因可能与济宁青山羊性早熟和高繁殖力相关<sup>[1]</sup>。

本试验在 3 个山羊群体 *NPY-Y1R* 基因外显子中检测到 1 个单核苷酸多态性 (SNP) 位点, *NPY-Y1R* 基因在外显子 2 处存在突变位点 G1141A,在此突变位点处 3 个山羊群体均存在 2 种基因型,分别为 AG、GG。产羔数关联分析显示, G1141A 位点与贵州黑山羊、努比亚试验群体繁殖性状显著相关,具体表现为贵州黑山羊、西州乌羊、努比亚 AG 基因型个体的产羔数均高于 GG 基因型个体,本试验推断 AG 基因型可能是贵州黑山羊、西州乌羊、努比亚繁殖性能的优势基因型, *NPY-Y1R* 基因的 G1141A 位点可望作为贵州黑山羊、西州乌羊、努比亚等繁殖性能选择的遗传标记而应用于山

李成伟,王 均,苏 航,等. 黑斑蛙腐皮病病原分离、鉴定及致病性研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(17):174-178.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.034

# 黑斑蛙腐皮病病原分离、鉴定及致病性研究

李成伟<sup>1</sup>,王 均<sup>2</sup>,苏 航<sup>2</sup>,耿 毅<sup>3</sup>

(1. 成都农业科技职业学院,四川成都 611130; 2. 内江师范学院,四川内江 641100; 3. 四川农业大学动物医学院,四川成都 611130)

**摘要:**为了解黑斑蛙养殖场大规模暴发腐皮病的病原,从患病蛙肝脏中分离获得 1 株革兰氏阴性杆菌(编号:QW),对其培养特性、生理生化特性、16S rRNA 和 *gyrB* 基因检测、致病性及药物敏感性进行分析。结果表明,菌株 QW 表型特征和理化特性与洛菲不动杆菌相似,16S rRNA 和 *gyrB* 基因在系统发育树上与洛菲不动杆菌聚集为一族,最终判定该菌为洛菲不动杆菌,是黑斑蛙上的一种新病原;致病性研究表明,该菌能够通过浸泡的方式感染黑斑蛙,具有较强的致病性,发病症状主要表现为皮肤溃烂和内脏器官出血,与自然发病症状一致;药敏试验表明,洛菲不动杆菌仅对四环素、氧氟沙星和氟苯尼考 3 种抗生素敏感。本研究鉴定出引起黑斑蛙腐皮病的病原为洛菲不动杆菌,并对其致病性进行研究,同时检测了其药物敏感范围,为该病临床防治用药提供理论依据。

**关键词:**黑斑蛙;洛菲不动杆菌;分离鉴定;致病性;药物敏感

**中图分类号:**S947.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)17-0174-05

黑斑蛙(*Pelophylax nigromaculatus*)属无尾目蛙科侧褶蛙属,在我国华北、华中、华南地区的平原和丘陵分布较广泛,也是我国近年来养殖蛙类中的主要品种之一。由于该品种是近年来扩大的养殖规模<sup>[1]</sup>,相对于其他传统养殖蛙类如牛蛙、虎纹蛙、美国青蛙的规模化养殖历程较短,疾病研究相对较少,发病后只能参考其他蛙类疾病进行比较处理,但水生动物不同种属间具有同病不同症、同症不同

病的特征。如牛蛙、虎纹蛙上常见的白内障、歪脖子疾病,这此疾病已报道的病原有气单胞菌、脑膜败血伊丽莎白菌、浅黄假单胞菌等<sup>[2-3]</sup>,而在黑斑蛙上的相同症状,病原却出现了肺炎克雷伯菌<sup>[4]</sup>。因此,应对不同品种、病原进一步区分研究。对于蛙类的腐皮症,已报道的有牛蛙和棘胸蛙由奇异变形杆菌感染引起<sup>[5-6]</sup>,但黑斑蛙的腐皮病未见相关报道。2019 年 6 月,四川省内江市某黑斑蛙养殖场出现黑斑蛙大面积死亡,主要表现为头部、背部及四肢出现不同程度的腐烂,剖解可见肝脏肿大、肾脏及肺部出血。本研究对其病原进行分离,并通过病原菌的形态特征、生理生化特性及 16S rRNA 和 *gyrB* 基因测序与系统发育分析进行鉴定,确定该病原菌的种属地位;然后通过人工感染试验确定该病原菌的致病性;最后通过药物敏感试验分析该病原

收稿日期:2019-09-10

基金项目:四川省淡水鱼产业技术体系创新团队建设项目(编号:2017SICAD003)。

作者简介:李成伟(1986—),男,四川泸州人,硕士,讲师,研究方向为水产动物疾病与免疫学。E-mail:lcw304@163.com。

通信作者:王 均,博士研究生,讲师,研究方向为水产动物疾病与免疫学。E-mail:wangjunzl@126.com。

羊的分子选育。

**参考文献:**

- [1] 储明星,冯 涛,赵有璋,等. 神经肽 Y-Y1 受体基因(NPY-Y1R)多态性及其与山羊繁殖性能关系[J]. 农业生物技术学报,2009,17(6):960-966.
- [2] 樊 奇. 中国西南地区山羊繁殖性能相关候选基因的研究[D]. 重庆:重庆大学,2012.
- [3] Gonzales C, Voirol M J, Giacomini M, et al. The neuropeptide Y Y1 receptor mediates NPY-induced inhibition of the gonadotrope axis under poor metabolic conditions[J]. The FASEB Journal, 2004, 18

(1):137-139.

- [4] Gamba M, Pralong F P. Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors; the role of leptin and insulin[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2006, 254:133-139.
- [5] Eva C, Serra M, Mele P, et al. Physiology and gene regulation of the brain NPY Y1 receptor[J]. Frontiers in Neuroendocrinology, 2006, 27(3):308-339. 9.
- [6] Pelliex C, Sauthier T, Domenighetti A, et al. Neuropeptide Y (NPY) potentiates phenylephrine-induced mitogen-activated protein kinase activation in primary cardiomyocytes via NPY Y5 receptors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(4):1595-1600.