

# 湖羊、小尾寒羊及其杂交后代 *BMPR-IB* 基因多态性

徐小波<sup>1</sup>, 王公金<sup>1</sup>, 龚德宇<sup>1</sup>, 储国良<sup>2</sup>, 赵伟<sup>1</sup>, 花为华<sup>2</sup>, 刘亚柏<sup>2</sup>

(1. 江苏省农业科学院 畜牧研究所, 江苏 南京 210014; 2. 江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 江苏 镇江 212400)

**摘要:** 为提高肉用绵羊的杂交育种效果, 采用 PCR-RFLP 方法检测骨形态发生蛋白受体 IB 基因(*BMPR-IB*) 在湖羊、小尾寒羊、杜泊绵羊及杜湖、杜寒杂交  $F_1$  群体中的多态性。结果证明: 在湖羊和小尾寒羊中检测到两种基因型(BB 和 B+), 湖羊基因型频率分别为 0.909 和 0.091, 小尾寒羊基因型频率分别为 0.563 和 0.437; 在杜泊绵羊中只存在一种基因型(+ +); 而在杜湖和杜寒杂交绵羊中发现两种基因型(B+ 和 + +), 杜湖基因型频率分别为 0.875 和 0.125, 杜寒基因型频率分别为 0.786 和 0.214。

**关键词:** 湖羊; 小尾寒羊; 杜泊绵羊; 杂交羊; *BMPR-IB* 基因; PCR-RFLP

**中图分类号:** S826 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2010)03-0052-03

## Polymorphism of *BMPR-IB* Gene in Hu Sheep, Han Sheep, Dorper Sheep and Their Hybrids

XU Xiao-bo<sup>1</sup>, WANG Gong-jin<sup>1</sup>, DOU De-yu<sup>1</sup>, CHU Guo-liang<sup>2</sup>, ZHAO Wei<sup>1</sup>, HUA Wei-hua<sup>2</sup>, LIU Ya-bo<sup>2</sup>

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

2. Zhenjiang Institute of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212400, China)

**Abstract:** Polymorphism of Bone morphogenetic protein receptor IB(*BMPR-IB*) gene in Hu sheep(Hu), Han sheep(Ha), Dorper sheep(D) and their hybrids were detected by PCR-RFLP. The genotype frequencies(BB, B+ and + +) are 0.909, 0.091 and 0.563, 0.437 and 0.1, 0.0 and 0.875 and 0.125( $D \times Hu$ ), and 0.786 and 0.214( $D \times Ha$ ), respectively.

**Key words:** Hu Sheep; Han Sheep; Dorper Sheep; *BMPR-IB* gene; PCR-RFLP

国内外有关研究证明, 绵羊 *FecB* 基因是常染色体上的主基因, 对排卵率有很大的影响<sup>[1,2]</sup>。绵羊 *FecB* 基因实际为骨骼形成蛋白 IB 型受体基因(*BM-PR-IB*), 该基因被定位到 6 号染色体, 编码区由 10 个外显子组成, 长 1 509 bp, 编码 502 个氨基酸。在 Booroola 绵羊 *BMPR-IB* 基因编码序列中存在一个 A746G 突变(使得所表达的 249 号氨基酸由谷氨酰胺变成精氨酸), 正是这个突变(Q249R)与 Booroola 母羊的高繁殖力密切相关。

王根林等<sup>[3]</sup>通过“Forced”限制性酶切片段长度多态性 PCR 技术分析发现, 我国湖羊和小尾寒羊存在 Booroola(*FecB*) 多胎基因。但迄今国内外尚无杜泊绵羊及其与湖羊和小尾寒羊杂交后代多胎基因分析的报道。本试验尝试采用 PCR-RFLP 分子标记技术, 对杜泊绵羊及其杂交  $F_1$  杜湖绵羊和杜寒绵羊的

*BMPR-IB* 基因多态性进行了系统检测和统计分析, 并与湖羊和小尾寒羊相比较, 试图寻求建立一套与常规育种技术相结合的分子标记辅助选择技术, 用于指导肉用杜泊绵羊与湖羊或小尾寒羊等肉用绵羊杂交育种科研与生产实践。

## 1 材料和方法

### 1.1 血样采集与 DNA 提取

32 只杜泊绵羊、77 只湖羊、16 只小尾寒羊、16 只杜湖杂交  $F_1$  羔羊、28 只杜寒杂交  $F_1$  羔羊血样采自江苏丘陵地区镇江农科所肉用绵羊繁育基地。每只羊颈静脉采血 2~4 mL, 加 0.2 mL 肝素钠抗凝, 低温暂时保存。采用血液基因组提取试剂盒(天根公司产)按照试剂盒使用说明书程序操作, DNA 提取后溶于 TE Buffer (10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)),

1 mmol/L EDTA( pH 8.0 ) , -20℃ 保存备用。

### 1.2 引物的设计与合成

根据绵羊 *BMPR-IB* 基因序列设计一对引物 , 并委托上海生工生物公司合成。该引物存在一个突变点 , 可使突变体的扩增产物产生一个 *Ava* II 酶切位点 , 不携带突变的扩增产物则无此酶切位点。

引物序列为: F: 5'-GTCGCTATGGGAAGTTTG-GATG-3'; R: 5'-CAAGATGTTTTCATGCCTCATCAA-CACGGTC-3'。

### 1.3 PCR 扩增与电泳

采用 9600 型基因扩增仪( 美国 PE 公司) 进行 PCR 扩增。反应总体积 25 μL , 其中基因组 DNA 约 50 ng , 2 × MasterMix( 大连天根公司产品) 12.5 μL , 引物 F 和 R 各 1 μL( 10 μmol/L ) , 补充 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL。

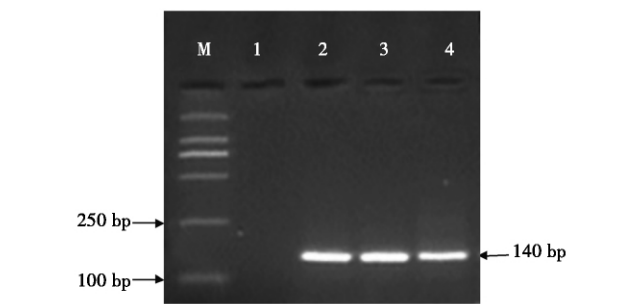
PCR 扩增条件与步骤为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s , 60℃ 退火 30 s , 72℃ 延伸 30 s , 40 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min 后 4℃ 保存。扩增后 , PCR 反应产物采用常规 2.5% 琼脂糖凝胶电泳法分离扩增区带。

酶切反应总体积 10 μL , 其中 PCR 产物为 4 μL , 限制性内切酶 *Ava* II 酶( 大连宝生物公司产品) 4 U , 补充酶切缓冲液和 ddH<sub>2</sub>O 至 10 μL。反应液 37℃ 温育 3 h , 酶切产物采用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳分离检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增及 *Ava* II 酶切

采用引物 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 对 5 种绵羊群体基因组 DNA 分别进行扩增后 , 其扩增产物通过 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离 , 得到了一条 140 bp 左右的区带 , 且特异性好 , 与预期扩增片段( 140 bp ) 大小一致( 图 1 )。

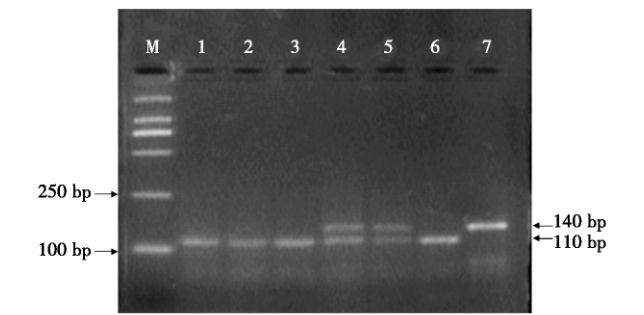


M. Marker; 1. 阴性对照; 2~4. PCR 产物。  
M. Marker; 1. Negative control; 2~4. PCR products.

图 1 *BMPR-IB* 基因 PCR 扩增结果  
Fig.1 PCR amplification of *BMPR-IB* gene

140 bp 区带经 *Ava* II 内切酶消化处理后 , 用 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 , 所有绵羊血样共检出 3 种带型 , 每只个体血样分别属于其中某种带型( 图 2 )。显示一条区带( 即 140 bp ) 为 “+ +” 基因型

( 简称野生型 ) , 2 条区带( 即 110 bp 和 30 bp ) 为 “BB” 基因型( 简称纯合突变型 ) , 3 条区带( 即 140 bp、110 bp、30 bp ) 为 “B + ” 基因型( 简称杂合突变型 )。30 bp 区带由于分子量小 , 通过 2.5% 琼脂糖凝胶电泳后迁移至泳道末端 , 而不易分辨 , 但并不影响基因型分析。



M. Marker; 1 2 3 6. BB 基因型; 4 5. B + 基因型; 7. + + 基因型。  
M. Marker; 1 2 3 6. BB Genotype; 4 5. B + Genotype; 7. + + Genotype.

图 2 *BMPR-IB* 基因 *Ava* II 酶切结果  
Fig.2 PCR-RFLP pattern for *BMPR-IB* gene with *Ava* II digestion

### 2.2 *BMPR-IB* 基因型分布

由于绵羊 *BMPR-IB* 基因在 746 位点存在一个核苷酸的突变( 即 A→G ) , 因此该位点为 A 时( 即野生型 , + + ) , 不会产生 *Ava* II 内切酶的酶切位点 , 酶切处理后仍然是一条 140 bp 区带; 该位点为 G 时( 即纯合突变型 , BB ) , 会产生 *Ava* II 内切酶的酶切位点 , 酶切后得到 2 条区带( 即 110 bp 和 30 bp ) ; 该位点为 A/G 杂合时( 即杂合突变型 , B + ) , 酶切后呈现 3 条区带( 即 140 bp、110 bp 和 30 bp )。各品种基因与基因型频率列于表 1 , 湖羊、杜湖杂交羊的 B 基因及 BB 基因型频率均高于小尾寒羊扩杜寒杂交羊 , 而杜泊羊中未发现 B 基因的存在。

采用 SPSS11.0 软件进行不同基因型与不同绵羊品种的卡方独立性检验结果( 表 2 )。表明亲本杜泊绵羊、湖羊、小尾寒羊基因型频率差异极显著 ( *P* < 0.01 ) ; 杜湖绵羊和杜寒绵羊基因型频率差异不显著 ( *P* > 0.05 ) ; 杜泊绵羊与杜湖绵羊或杜寒绵羊基因型频率差异极显著 ( *P* < 0.01 )。

## 3 讨论

本试验中湖羊和小尾寒羊 *BMPR-IB* 多胎基因 PCR-RFLP 分析结果与闫亚东<sup>[4]</sup>和王启贵等<sup>[5,6]</sup> 相关报道基本一致 , 进一步证明了湖羊和小尾寒羊普遍存在 BB 和 B + 两种基因型 , 均未发现 + + 基因型的存在 , 这两种基因型分布存在多态性特征。但是 , 本试验中 B 基因及 BB 基因型频率均高于其他报道 , 而 B + 基因型频率相应较低 , 是被测样本数少

还是被测群体确在差异尚待证实。此外 ,柳淑芳等<sup>[7]</sup>报道在所检测的 164 只小尾寒羊样本中 ,发现少量( 11 只) 野生型基因型的存在 ,与目前国内现有其他研究结果相悖。

表 1 不同绵羊品种 *BMPR-IB* 基因的基因频率和基因型频率

品种 Breeds	基因频率 Gene frequency		基因型频率 Genotype frequency		
	B	+	BB	B +	+ +
湖羊 Hu sheep	0.955	0.045	0.909	0.091	0.000
小尾寒羊 Han sheep	0.782	0.218	0.563	0.437	0.000
杜泊羊 Dorper sheep	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000
杜湖 Hybridized Hu sheep	0.438	0.562	0.000	0.875	0.125
杜寒 Hybridized Han sheep	0.393	0.607	0.000	0.786	0.214

表 2 不同绵羊品种基因型分布的卡方检验

	湖羊 Hu sheep	小尾寒羊 Han sheep	杜泊羊 Dorper sheep	杜湖 Hybridized Hu sheep
小尾寒羊 Han sheep	12.44( 0.000)			
杜泊羊 Dorper sheep	93.00( 0.000)	32.00( 0.000)		
杜湖 Hybridized Hu sheep	43.95( 0.000)	8.25( 0.016)	19.77( 0.000)	
杜寒 Hybridized Han sheep	58.14( 0.000)	12.81( 0.002)	19.85( 0.000)	0.273( 0.601)

注: 括号内的数为 P 值。  
Note: The numbers in parentheses are P value.

目前 ,国内外尚未见有关杜泊羊及其与湖羊或小尾寒羊杂交种的 *BMPR-IB* 基因分析的报道。本试验对 36 只杜泊绵羊血样进行了分析 ,未发现 *BM-PR-IB* 基因突变型存在 ,所有分析的杜泊绵羊仅存在一种 *BMPR-IB* 基因型 ,即野生型。在杜泊绵羊与湖羊或小尾寒羊杂交的 F<sub>1</sub> 羊群中 ,发现存在杂合突变型或野生型两种基因型 ,未发现纯合突变型基因型 ,此结果与杜泊羊、湖羊、小尾寒羊亲代的基因型基本相符。经统计分析杜泊绵羊与杜湖绵羊、杜寒羊基因型频率差异极显著 ,这说明通过杜泊羊与湖羊和小尾寒羊杂交后 ,杂交后代羊群的繁殖性能遗传性状有可能得到有效改善<sup>[8]</sup>。作为培育肉用多胎绵羊的母本 ,杂交后代能否将其多胎性能继承和保持下来 ,是品种选育的关键。在湖羊和小尾寒羊群体中 ,均存在一些非多胎个体 ,以致杂交后代会出现野生型个体 ,可能将影响其繁殖力。因此 ,应尽可能剔除非多胎基因( 野生型) 个体<sup>[9]</sup>。

本研究描述的 *BMPR-IB* 多胎基因分子标记技术尚需扩大样本数量 ,进一步验证其准确性。在肉用型杜湖和杜寒杂交绵羊选育过程中 ,在以杂交后代表现繁殖性能等性状鉴定与比较为基础的常规育种的同时 ,运用该项测定技术 ,淘汰杂交后代中野生基因型个体 ,选择杂合突变基因型个体进行世代横交固定<sup>[10]</sup> ,在继代选育群中逐步提高突变基因的频率 ,从而可望育成高繁殖性能的优质肉用杂交绵羊新品系( 种) ,使基因工程朝着产业化方向发展<sup>[11]</sup>。

参考文献:

[1] Mulsant P. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(9): 5104-5109.

[2] Wilson T. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor( ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells [J]. Biol Reprod, 2001, 64(4): 1225-1235.

[3] 王根林,毛鑫智,George H Davis,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.

[4] 闫亚东,储明星,曾勇庆,等. 小尾寒羊和湖羊高繁殖力候选基因 BMPR-IB 的研究 [J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(1): 66-71.

[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] 王启贵,钟发刚,李辉,等. 绵羊产羔性状主效基因检测研究 [J]. 遗传, 2005, 27(1): 80-84.

[7] 柳淑芳,姜运良,杜立新. *BMPR-IB* 和 *BMP15* 基因作为小尾寒羊多胎性能候选基因的研究 [J]. 遗传学报, 2003, 30(8): 755-760.

[8] 徐小波,王公金,于建宁,等. 湖羊、小尾寒羊与肉用杜泊羊杂交试验 [J]. 内蒙古农业科技, 2009(2): 49-50, 95.

[9] 王建华,何其宏,张永胜,等. 中国美利奴多胎细毛羊及杂交后代多胎性状基因型分析 [J]. 中国草食动物, 2004, 24(4): 12-13.

[10] 储明星. 利用分子育种技术选育肉用多胎绵羊新品系 [J]. 中国农业科技导报, 2004, 6(6): 15-19.

[11] 财音青格乐. 基因工程及其产业 [J]. 内蒙古农业科技, 1999(增刊): 26-27, 29.