

巴美肉羊 *INHA* 和 *INHBA* 基因多态性 与产羔数关系研究

索 峰¹ 刘永斌^{2,3} 特日格勒² 祁云霞^{1,2} 何小龙² 韩有胜¹ 张 莉³ 李虎山⁴ 荣威恒²

(1. 内蒙古农业大学 动物科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古农牧业科学院,
内蒙古 呼和浩特 010031; 3. 内蒙古赛科星繁育生物技术股份有限公司 内蒙古 呼和浩特 011517,
4. 巴彦淖尔市家畜改良站, 内蒙古 巴彦淖尔 015000)

摘要: 为了研究 *INHA* 和 *INHBA* 这两个基因对巴美肉羊产羔数的影响, 采用 PCR-SSCP 技术检测抑制素 α 亚基 (α -inhibin *INHA*) 和 β_A 亚基 (β_A -inhibin *INHBA*) 基因在巴美肉羊中的单核苷酸多态性。结果发现, 引物 1 和 6 扩增片段有多态性, 其余 3 对引物的扩增片段均不存在多态性。引物 1, 巴美肉羊有 2 种基因型 AB 型和 AA 型, 平均产羔数 AB 型比 AA 型多 0.17 只 ($P < 0.01$)。引物 4, 巴美肉羊存在 3 种基因型 (CC、DD 和 CD), 巴美肉羊平均产羔数 DD 型比 CC 型多 0.44 只 ($P < 0.01$)。引物 6, 巴美肉羊有 3 种基因型 (EE、FF 和 EF), EE 型比 EF 型平均产羔数多 0.21 只 ($P < 0.01$)。结果表明, 抑制素 α 亚基 (α -inhibin *INHA*) 和 β_A 亚基 (β_A -inhibin *INHBA*) 基因是影响巴美肉羊产羔数的重要基因。

关键词: 巴美肉羊; 抑制素 α 亚基基因; 抑制素 β_A 亚基基因; PCR-SSCP

中图分类号: S826 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)03-0115-05

Association of *INHA* and *INHBA* Genes Polymorphism with Prolificacy of Bamei Mutton Sheep

SUO Feng¹, LIU Yong-bin^{2,3}, TE Rigele², QI Yun-xia^{1,2}, HE Xiao-long², HAN You-sheng¹,
ZHANG Li³, LI Hu-shan⁴, RONG Wei-heng²

(1. College of Veterinary Medicine Inner Mongolia Agricultural University Huhhot 010018 China; 2. Inner Mongolia Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences Huhhot 010018 China; 3. Inner Mongolia Saikexing Reproductive Biotechnology Limited Company Huhhot 011517 China; 4. Bayannur Livestock Improvement Station Bayannur 015000 China)

Abstract: Single nucleotide polymorphism of the α -inhibin (*INHA*) and β_A -inhibin (*INHBA*) genes were detected in Bamei mutton sheep by PCR-SSCP. The results indicated that there were polymorphism in the amplified region for three primer pairs (1, 4 and 6), no polymorphism in the amplified region for other three primer pairs. For primer 1, two genotypes (AA and AB) were detected in Bamei mutton sheep. The ewes with mutation heterozygous genotype AB had 0.17 ($P < 0.01$) lambs more than those with Mutation homozygous genotype AA in Bamei mutton sheep. For primer 4, three genotypes (AA, AB and BB) were detected in Bamei mutton sheep. Sequencing revealed a mutation (G→A) at 857 bp of Exon 2 of the *INHBA* gene in genotype DD compared with genotype CC. This mutation did not result amino acid change. The ewes with mutation heterozygous genotype DD had 0.44 ($P < 0.01$) lambs more than those with Mutation homozygous genotype CC. For primer 6, three genotypes (EE, FF and EF) were detected. Sequencing revealed a mutation (A→T) at 288 bp of Exon 1 of the *INHA* gene in genotype FF compared with genotype EE. This mutation resulted amino acid change of Met→Lys. The ewes with mutation heterozygous genotype EE had 0.21 ($P < 0.01$) lambs more than those with Mutation homozygous genotype FF. These results preliminarily show that the *INHA* and *INHBA* genes were important genes that influence the prolificacy in Bam-

收稿日期: 2012-03-11

基金项目: 国家科技支撑项目 (2011BAD28B05); 内蒙古自然科学基金项目 (2010BS0406); 国家现代肉羊产业技术体系 (CARS-39)

作者简介: 索 峰 (1985-), 男, 江苏邳州人, 在读硕士研究生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

通讯作者: 刘永斌 (1977-), 男, 内蒙古土默特左旗人, 副研究员, 博士, 主要从事生物技术与牛羊育种研究。

ei mutton sheep.

Key words: Bamei mutton sheep; *Inhibin α* gene; *Inhibin β_A* gene; PCR-SSCP

抑制素(*Inhibin* ,*INH*) 主要由雌性动物卵巢颗粒细胞和雄性动物睾丸的 Sertoli 细胞分泌,能有效抑制垂体促卵泡素的合成与分泌^[1]。抑制素含有 α 和 β 2 个亚单位。迄今为止的研究结果表明,不同种属动物卵泡液抑制素的氨基酸序列差异很小,缺乏种属特异性。由此,人们认识到抑制素是一种亚基二聚体,由 α 亚基和 β_A 亚基构成的抑制素称为抑制素 A,由 α 亚基和 β_B 亚基构成的抑制素称为抑制素 B^[2]。猪 IB 有 AB 两型,牛和绵羊只发现 A 型 IB。人、猪、牛、鼠的 IB 结构类似,它们的 α 亚基 80% 以上具有同源性。但是,不同亚单位的组合对其生物活性具有重大影响。当 α 和 β 亚单位通过二硫键连接后显示抑制素的生物活性,主要表现为选择性地抑制垂体 FSH 的生成和分泌;而 2 个 β 亚单位组成的二聚体则是抑制素的拮抗剂(*Antagonist*) 称为活化素(*Activin*) ,表明对 FSH 分泌有促进作用。绵羊抑制素 β_A 基因(*β_A -inhibin* ,*INHBA*) 已被定位到染色体 4q26。Hiendleder 等^[3-8] 的研究发现, *INHBA* 基因对绵羊产羔数有显著影响。

巴美肉羊是以内蒙古当地细毛羊为母本,德国肉用美利奴羊为父本,历经二十余年培育的新品种,于 2007 年 5 月 15 日通过国家畜禽资源委员会审定验收,并正式命名为巴美肉羊《国家农业部第 878 号公告予以正式命名和公告》。但一直以来,巴美肉羊的产羔率低是制约巴美肉羊产业进一步发展的最大障碍,培育新型高产巴美肉羊是农牧民和畜牧育种工作者的迫切需求。

本研究以巴彦淖尔市巴美肉羊为试验材料,以 *INHA* 和 *INHBA* 基因为候选基因,采用 PCR-SSCP

方法,检测这 2 个基因在巴美肉羊中的多态性,分析其多态性对巴美肉羊产羔数的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

2011 年 3 月采集巴彦淖尔种羊场具有第 1 胎和第 2 胎产羔数记录的巴美肉羊 378 只母羊血样;颈静脉采血,所采血样均为 10 mL/只,用 ACD 抗凝, -20℃ 冻存。用天根血液提取试剂盒提取基因组 DNA,溶于 TE(10 mmol/L Tris-HCl (pH 值 8.0) , 1 mmol/L EDTA (pH 值 8.0)) 4℃ 保存。

1.2 主要试剂

宝生物 D335A 聚合酶混合液(*Premix Ex Taq*) 、克隆试剂盒、DNA 片段回收纯化试剂盒等均购自北京天根生物技术有限公司。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

根据 Thompson 1994 年发表的牛抑制素 β_A 亚基基因的 5'调控区以及外显子 1 和外显子 2 的序列(*GenBank* 登录号分别为 U16238 和 U16239) 设计 3 对引物,其中第一对引物扩增绵羊抑制素 β_A 亚基基因外显子 1,后 3 对引物扩增绵羊抑制素 β_A 亚基基因外显子 2。这 4 对引物扩增产物大小分别为 365 , 333 209 338 bp。并根据 Thompson 1994 年发表的牛抑制素 α 亚基基因 5'调控区以及外显子 1 共 908 bp 的序列(*GenBank* 登录号 U16237) ,设计 2 对引物扩增抑制素 α 亚基基因 5'调控区和外显子 1,这 2 对引物扩增产物大小分别为 226 bp 和 272 bp。引物由上海 Invitrogen 生物技术有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 PCR 扩增的引物序列

Tab.1 Sequences of primers used in PCR amplification

基因 Gene	引物 Primer	序列(5'→3') Sequence	扩增区域 Amplified region	片段大小/bp Length
<i>INHBA</i>	P1	F: 5'-GGCGAGTTGCTGGATT-3' R: 5'-GGCACCCACCTGATTC-3'	外显子 1 Exon 1	365
	P2	F: 5'-ATACGGATTGCCTGTG-3' R: 5'-CTCACAGTAGTTGGCGT-3'	外显子 2 Exon 2	333
	P3	F: 5'-AGGACATTGGCTGGAA -3' R: 5'-GGACATGGGTCTCAGCT-3'	外显子 2 Exon 2	209
	P4	F: 5'-CCAACTCAAGTCGTG-3' R: 5'-ATTCCCATCTCCTTCAC-3'	外显子 2 Exon 2	338
<i>INHA</i>	P5	F: 5'-CTGGCTTGCTCTGTCTCCC-3' R: 5'-CTGAGCCTTATCTCCCACTC-3'	5'调控区 5'regulatory region	226
	P6	F: 5'-CAGGGGAGACTATGTGGCTTC-3' R: 5'-CTGCAGCCGAAAAAGGATG-3'	外显子 1 Exon 1	272

PCR 扩增反应总体积为 25 μ L: Premix Ex Taq 12.5 μ L, 双蒸水 9.5 μ L, 上下游 10 μ mol/L 引物各 1 μ L, 模板 1 μ L, dNTP 终浓度 0.2 mmol/L, Mg^{2+} 终浓度为 2 mmol/L。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 退火 45 s (引物 P1、P2、P3、P5 退火温度分别为 62 $^{\circ}$ C、59 $^{\circ}$ C、57 $^{\circ}$ C、62 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。引物 P4 和 P6 的扩增采用递减 (TouchDown) PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 退火 45 s (引物 P4 和 P6 退火温度分别为 57 $^{\circ}$ C 和 63 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 引物 P4 和 P6 分别进行 12 个循环, 每个循环退火温度降低 0.5 $^{\circ}$ C; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 退火 45 s (引物 P4 和 P6 退火温度分别为 51 $^{\circ}$ C 和 57 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 引物 P4 和 P6 分别进行 20 个和 23 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 SSCP 分析

4 μ L PCR 产物和 6 μ L 加样缓冲液 (98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯酚、10 mmol/L EDTA (pH 值 8.0)、10% 甘油) 混匀, 在 PCR 仪上 98 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 然后冰浴 5 min。变性后 PCR 产物用非变性聚丙烯酰胺凝胶室温过夜电泳, 银染显色。这 6 对引物的聚丙烯酰胺凝胶浓度分别为 10%, 10%, 12%, 10%, 12%, 12%, 聚丙烯酰胺凝胶交联度均为 29:1, 电压分别为 160, 160, 150, 160, 150, 150 V, 电泳时间分别为 14, 12, 10, 12, 10, 12 h。用紫外凝胶成像仪拍照和分析。

1.5 克隆测序

对 SSCP 分析后不同基因型纯合个体的 PCR 产物, 用 DNA 片段快速纯化回收试剂盒纯化, 回收后的 DNA 片段用 pGEM-T 载体连接, 并转化 TOP10 感受态细胞, 用菌液作 PCR 底物, 对照 1.3 PCR 反应条件, 进行 PCR 反应鉴定。鉴定后送测序, 测序反应由北京华大生物技术有限公司完成。

2 结果与分析

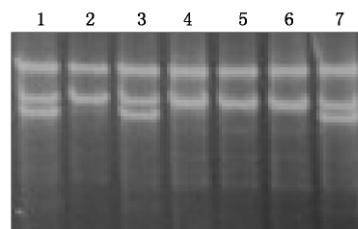
2.1 PCR 扩增

所设计的 6 对引物用于 PCR 扩增均获得了较好的结果, 片段长度与预期大小一致, 而且没有非特异扩增条带, 可以直接进行 SSCP 分析。

2.2 SSCP 检测

对 6 对引物扩增的 PCR 产物分别进行 SSCP 分析, 发现引物 P1、P4 与 P6 扩增片段有多态性, 其余 3 对引物的扩增片段均不存在多态性。引物 P1, 巴美肉羊有 2 种基因型 AB 和 AA 型 (图 1)。引物

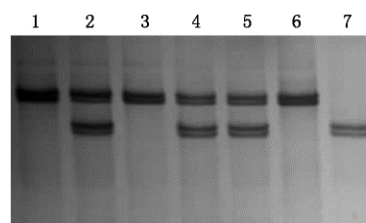
P4, 巴美肉羊存在 3 种基因型, DD、CC 和 CD 型 (图 2)。引物 6, 巴美肉羊有 3 种基因型 EE、FF 和 EF 型 (图 3)。



2 4 5 6. AA 型; 1 3 7. AB 型。
2 4 5 6. AA genotype; 1 3 7. AB genotype.

图 1 引物 1 对扩增片段的 SSCP 分析

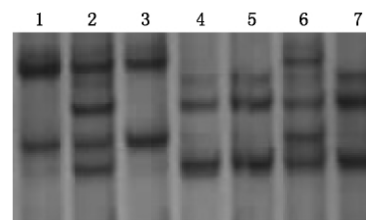
Fig. 1 SSCP analysis of PCR amplification using primer 1



1 3 6. CC 型; 7. DD 型; 2 4 5. CD 型。
1 3 6. CC genotype; 7. DD genotype; 2 4 5. CD genotype.

图 2 引物 4 对扩增片段的 SSCP 分析

Fig. 2 SSCP analysis of PCR amplification using primer 4



1 3. EE 型; 4 5 7. FF 型; 2 6. EF 型。
1 3. EE genotype; 4 5 7. FF genotype; 2 6. EF genotype.

图 3 引物 6 对扩增片段的 SSCP 分析

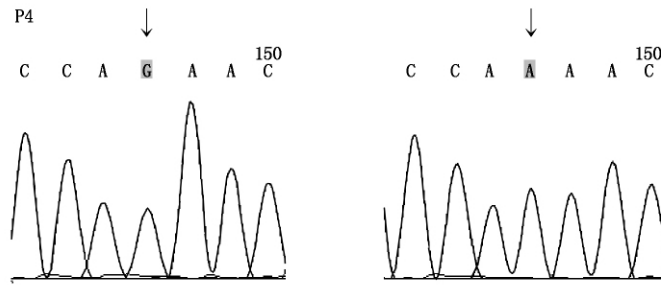
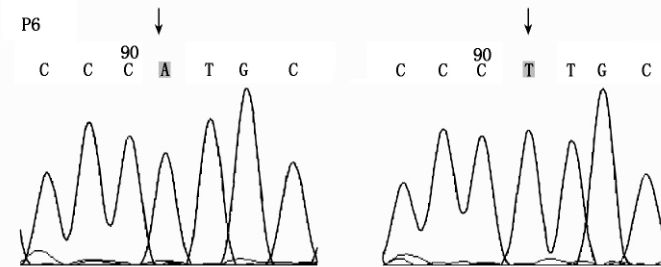
Fig. 3 SSCP analysis of PCR amplification using primer 6

2.3 序列分析结果

取 CC 和 DD 2 种基因型的 PCR 产物片段进行克隆、测序。DD 比 CC 型在外显子 2 第 857 位点有一处突变 (A \rightarrow G) (图 4), 该位点没有引起氨基酸序列的变化。取 EE 和 FF 2 种基因型的 PCR 产物片段进行克隆、测序。FF 型和 EE 型相比, 在 *INHA* 基因外显子 1 第 288 位点发生 1 处突变 (A \rightarrow T) (图 5), 该处突变引起氨基酸甲硫氨酸变为赖氨酸。

2.4 *INHA* 和 *INHBA* 基因在巴美肉羊中的遗传多态性

巴美肉羊中 *INHA* 和 *INHBA* 基因各对引物的等位基因频率和基因型频率见表 2。

图4 *INHBA* 基因引物 4 的 CC 和 DD 基因型 857 bp 处突变的测序峰Fig. 4 Sequences of CC and DD genotypes of mutation at 857 bp of *INHBA* gene图5 *INHA* 基因引物 6 的 EE 和 FF 基因型 288 bp 处突变的测序峰Fig. 5 Sequences of EE and FF genotypes of mutation at 288 bp of *INHA* gene表2 巴美肉羊 *INHA* 和 *INHBA* 基因的等位基因频率和基因型频率Tab. 2 Allele and genotype frequencies of *INHA* and *INHBA* gene in Bamei mutton sheep

品种 Breed	引物 1 Primer-1						引物 4 Primer-4						引物 6 Primer-6								
	数量 /只 No.	基因型 频率/% Genotype frequency			等位基因 频率/% Allele frequency			数量 /只 No.	基因型 频率/% Genotype frequency			等位基因 频率/% Allele frequency			数量 /只 No.	基因型 频率/% Genotype frequency			等位基因 频率/% Allele frequency		
		AA	BB	AB	A	B	CC		DD	CD	C	D	EE	FF		EF	E	F			
巴美肉羊	378	129	0	249	0.671	0.329	248	161	8	79	0.808	0.192	311	104	99	108	0.508	0.492			
		0.341	0	0.659	0.671	0.329		0.649	0.032	0.319	0.808	0.192		0.334	0.318	0.347	0.508	0.492			

表3 *INHA* 和 *INHBA* 不同基因型巴美肉羊
产羔数的最小二乘均值及标准误Tab. 3 Least squares mean and standard error for
litter size of different genotypes of *INHA* and
INHBA gene in Bamei mutton sheep

引物 Primer	基因型 Genotype	样本数/只 No. of samples	最小二乘均值及标准误 Least squares mean ± standard error
引物 1 Primer 1	AA	129	1.26 ± 0.04a
	BB	0	
	AB	249	1.43 ± 0.03b
引物 4 Primer 4	CC	161	1.31 ± 0.04a
	DD	8	1.75 ± 0.16b
	CD	79	1.46 ± 0.06 ab
引物 6 Primer 6	EE	104	1.49 ± 0.05a
	FF	99	1.33 ± 0.05 ab
	EF	108	1.28 ± 0.04b

注: 同一引物具有不同字母肩标的平均值间差异极显著($P < 0.01$)。Note: Least square means with the different superscripts for the same pair of primer differ significantly($P < 0.01$).

2.5 *INHA* 和 *INHBA* 基因不同基因型的巴美肉羊产羔数的最小二乘均值及标准误

引物 P1, 引物 P4 和引物 P6 不同基因型巴美肉

羊产羔数的最小二乘均值及标准误见表 3。

3 结论与讨论

3.1 巴美肉羊 *INHA* 和 *INHBA* 基因的多态性

在绵羊中,已发现 *INHBA* 和 *INHA* 基因具有遗传多态性^[9-10]。本研究中美肉羊在 *INHBA* 基因和 *INHA* 基因上都有突变位点,巴美肉羊中没有检测到 BB 基因型,可能是因为采集样本较少。本研究中, *INHBA* 基因外显子 2 发生了一处碱基突变 (G→A),虽未改变编码的氨基酸序列,但从统计结果看较大影响了巴美肉羊的产羔率,是否对巴美该位点对巴美肉体的产羔率有影响,还需进一步深入研究。本研究中, *INHA* 基因外显子处发生一处突变 (A→T),该突变引起氨基酸甲硫氨酸变为赖氨酸 2 种氨基酸性质差别较大,但根据统计分析结果可看出,不同基因型影响巴美肉羊产羔率相对较小,改突变位点对巴美肉羊的深层影响结果,还需长时间进一步研究。

3.2 *INHA* 和 *INHBA* 基因与绵羊产羔数的关系

Hiendleder 等^[10]报道, *INHA* 基因对绵羊产羔数有显著影响, 对 391 只 Meriolandschafe 母羊的 1 585 窝产羔数动物模型进行分析显示, 该基因替代效应达到 0.08 只羔羊。Hiendleder 等^[11]报道, *INHBA* 基因对绵羊产羔数有显著影响, 对 389 Merinolandschafe 母羊的 1 562 窝产羔数动物模型进行分析显示, 该基因替代效应达到 0.04 只羔羊 (0.25 σ A); 对 155 只东弗里生乳用绵羊的 620 窝产羔数动物模型进行分析显示, 该基因替代效应达到 0.09 只羔羊。Jaeger 等^[9]对 1 000 次产羔记录的初步统计分析表明 *INHAA*、*INHBA* 和 *INHBB* 对绵羊产羔数都有显著的基因效应。Leyhe 等^[12]报道, 绵羊 *INHBA* 基因座 TaqIA 等位基因频率随品种平均产羔数的增加而增加。Hiendleder 等^[13]报道, *INHBA* 基因座等位基因 A 的频率与绵羊品种平均产羔数呈正相关, A 基因频率在野生绵羊 (平均产羔数为 1.1) 中为 0.0, 在 Romanov 绵羊 (平均产羔数为 3.0) 中为 0.65, *INHBA* 基因座对东弗里生绵羊产羔数的影响非常显著。

本研究中, DD 基因型产羔数明显高于其他 2 种 CC 和 CD 基因型, 但 DD 基因型频率相对很少, 如何进一步通过此基因型巴美肉羊自交培育新品系, 还需要对抑制素和其他影响巴美肉羊产羔率的基因进行更深入、广泛地研究。本研究中, 只对巴美肉羊的基因型做了相关分析, 接下来, 要对巴美肉羊的来源品种德国美利奴羊和蒙古羊的 *INH* 基因做相应的分析, 结合繁殖率高的绵羊品种, 做比较分析, 进一步弄清巴美肉羊在本试验中的基因型和繁殖率的相关性。进一步检测巴美肉羊种公羊, 筛选出相应的基因型群体, 与已检测的巴美肉羊相应基因型个体自交, 选出 DD 型、EE 型和 AB 型群体, 进一步研究繁殖率的高低, 为以后的巴美肉羊育种工作做一个试验基础。

参考文献:

- [1] 余 琼. 抑制素研究进展 [J]. 动物科学与动物医学, 2004, 9(1): 27–29.
- [2] 庄海滨, 储明星, 李学伟, 等. 绵羊抑制素 β_A 基因多态性及其与产羔数关系的研究 [J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(1): 52–57.
- [3] 周文然, 储明星. 小尾寒羊高繁殖力候选基因 *INHA* 的研究 [J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(1): 32–36.
- [4] 杨利国. 动物繁殖学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 66–68.
- [5] 马勇江, 马 毅. 抑制素及其对动物繁殖的影响 [J]. 甘肃畜牧兽医, 2000(5): 38–40.
- [6] 李晓丽, 郭志云, 曾宪垠. 抑制素的研究进展及其在动物繁殖中的应用 [J]. 四川畜牧兽医, 2003(11): 30–32.
- [7] 田秀娥, 孙红霞, 王永军. 3 个绵羊群体 *INHA* 基因的遗传多态性及其对产羔数的影响 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010(1): 23–29.
- [8] Xue Y, Chu M X, Zhou Z X. Advances on inhibin genes [J]. Hereditas, 2004, 26(5): 749–755.
- [9] Jaeger C, Hiendleder S. Cosmid cloning and characterization of the coding regions and regulatory elements of the ovine α -(*INHA*), β_A -(*INHBA*) and β_B -inhibin (*INHBB*) genes [J]. Animal Genetics, 1994, 25(2): 33.
- [10] Hiendleder S, Lewalski H, Jaeger C, et al. Nucleotide sequence of ovine [alpha]-inhibin (*INHA*) genes and evaluation of RFLP marker effects on reproductive performance [J]. Animal Genetics, 1996a, 27(2): 91–92.
- [11] Hiendleder S, Lewalski H, Jaeger C, et al. Genomic cloning and comparative sequence analysis of different alleles of the ovine β_B -inhibin/activin (*INHBA*) gene as a potential QTL for litter size [J]. Animal Genetics, 1996, 27(2): 119.
- [12] Leyhe B, Hiendleder S, Jaeger C, et al. Pronounced differences in the frequency of Taq I beta A 2 inhibin alleles between sheep breeds with different reproductive performance [J]. Animal Genetics, 1994, 25: 41–43.
- [13] Hiendleder S, Leyhe B, Jaeger C, et al. Molecular characterization of ovine α -, β_A - and β_B -inhibin/activin alleles [J]. Journal of Animal Breeding and Genetics, 1996b, 113: 363–372.