

蒙古羊 *BMP15* 基因外显子 1 位点多态性与产羔性能关系分析

刘永斌^{1,2}, 何小龙¹, 王 峰^{1,2}, 荣威恒^{1,2}, 田春英², 达 赖²

(1. 内蒙古农业大学 动物科学与医学学院, 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 010030)

摘要:采用 PCR-SSCP 技术对蒙古羊 *BMP15* 基因外显子 1 位点的单核苷酸多态性(SNP)进行了检测,并对其进行与产羔性能关系进行了分析。结果表明,在所检测的 116 个蒙古羊个体中, *BMP15* 基因在该位点均呈现多态性,具有 ++、A+ 和 AA 3 种基因型。测序分析表明,该段 DNA 序列中存在 3 个碱基的缺失,即编码区第 28, 29, 30 位碱基缺失,这个突变使野生型(++)氨基酸序列上相应的 10 号氨基酸残基亮氨酸(L)缺失,变成了突变基因型(AA),形成 B1 突变体;群体遗传学分析表明, B1 突变在双羔系中的发生频率高于单羔系中发生的频率, χ^2 适合性检验结果表明,两品系在该位点具有中度多态性并处于 Hardy-Weinberg 平衡状态($p > 0.05$);与产羔性能关系分析表明 B1 突变对蒙古羊产羔数无显著影响($p > 0.05$)。

关键词: 蒙古羊; *BMP15* 基因; 多态性; 产羔数

中图分类号: S826.82 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)05-0030-05

Polymorphism Analysis in *BMP15* Gene Extron1 Site and Its Association with Prolificacy in Mongolian Sheep

LIU Yong-bin^{1,2}, HE Xiao-long², WANG Feng^{1,2}, RONG Wei-heng^{1,2},
TIAN Chun-ying², DA Lai²

(1. College of Animals Science and Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China; 2. Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Sciences, Huhhot 010030, China)

Abstract: The single nucleotide polymorphism(SNP) at *extron1* site of *BMP15* gene of Mongolian sheep was studied by PCR-SSCP and its association with prolificacy was analyzed. The results indicated that the *BMP15* gene showed polymorphism in the 116 individuals and the genotypes ++, A+ and AA were found in Mongolian sheep. Sequencing analysis indicated that the 28th, 29th, 30th base in the encoding domain were lost in the DNA sequence, and the 10th amino acid residue of leucine(L) was lost by the mutation in the Wild Type(++) amino acid sequence, forming the B1 mutant and the genotype was AA. Population genetic analysis indicated that the B1 mutation occurring in twins lamb strain was higher than in single lamb strain, χ^2 test indicated that the two strains were in moderate polymorphism and at Hardy-Weinberg equilibrium($p < 0.05$) in this site. The B1 mutation had no significant effect on the litter size by analyzed the association of the polymorphism with high prolificacy in Mongolian Sheep.

Key words: Mongolian sheep; *BMP15* gene; Polymorphism; Litter size

蒙古羊是内蒙古自治区主要的地方良种,也是饲养量最大,生产性能较好,被市场广泛认可的一个品种,开展其种质特性研究,揭示其优良生产性能的遗传机制,对该品种的开发利用具有重要的意义。随着现代分子遗传学和育种学的发展,尤其是主效

基因理论的应用给由微效多基因控制的繁殖性状的选育带来了契机。通过研究绵羊多胎性能的遗传机制,并借助 DNA 分子标记技术,加快繁殖性状的选择进展,对于我国绵羊业的发展具有重大的意义。本研究以蒙古羊为研究对象,以 *BMP15* 基因作为绵

收稿日期: 2008-05-07

基金项目: 国家自然科学基金(30560102)

作者简介: 刘永斌(1977-),男,内蒙古呼和浩特人,助理研究员,博士,主要从事分子生物学与动物遗传育种研究。

通讯作者: 荣威恒(1952-),男,内蒙古人,研究员,博士生导师,主要从事动物遗传育种研究。

羊繁殖性状的候选基因进行分析,寻找和筛选控制产双羔和产单羔的基因,从分子水平探索蒙古羊产羔性状的分子遗传机理,以充分利用蒙古羊的有利性能,来提高我国肉用羊的繁殖力。

1 材料和方法

1.1 试验材料

72 只双羔蒙古羊血样采自内蒙古西乌珠穆沁旗,44 只单羔蒙古羊血样采自内蒙古农牧业科学院黑城子示范牧场,全部颈静脉采血,所采血样均为 10 mL/只,用 ACD 抗凝,采集到的样品置液氮冷冻后,带回实验室, - 70℃超低温冰箱中保存备用,并收集记录所采羊只的产羔记录。

1.2 主要试剂和溶液

蛋白酶 K、*Hind*Ⅲ和 *Eco*RⅣ限制性内切酶购于 Promega 公司;PMD18-T Vector, DNA Ladder 2 000 (分子量为 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100) bp, λ DNA/*Hind*Ⅲ Marker, IPTG, X-gal 购自 TaKaRa 公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购于天为时代生物技术有限公司;日常型质粒小量制备试剂盒购于 TaKaRa 公司;琼脂粉、琼脂糖、氨苄青霉素(Amp)、胰蛋白胨、酵母提取物、丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺(Bis)、N,N,N,N'-四甲基乙二胺(TEMED)、硫代硫酸钠购自上海生工公司;SDS 购于 Sigma 公司。

1.3 引物的设计与 PCR 扩增

根据绵羊 *BMP15* 基因外显子 1 DNA 序列(登录号:236078)设计一对特异性引物,扩增片段大小为 326 bp,引物由上海生工生物工程公司合成,引物序列:

5'-TGCCTGCCAGCCTTTCATTTTTC-

3'-GACCCGCGGCTTCCTCTGG-

PCR 反应程序:94℃预变性 3 min;94℃变性 45 s,59℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,循环 35 次;最后 72℃延伸 3 min,4℃保存。PCR 产物的检测:取 3 μ L 的 PCR 产物与 1 μ L 加样缓冲液混匀后,1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。电压 100 V,时间约为 30 min。

1.4 数据分析

1.4.1 序列分析 利用 Oligo 6.0 和 Primer primer 5.0 软件进行引物筛选;所有序列比对(Sequence alignment)均使用 DNASTar5.01 软件包的 EditSeq, SeqMan 以及 Megalign 等软件进行。酶切位点分析采用 DNASTar 软件包的 MapDraw 程序;利用 MEGA3.1 (Molecular evolutionary genetics analysis)软件统计确定多态位点、核苷酸总变异位点、简约信息位点以及点突变位点、转换/颠换(Ts/Tv)、核苷酸差异和序列

差异。

1.4.2 基因多态性检测方法 对 PCR-SSCP 结果个体基因型进行统计,计算基因频率和基因型频率,并进行 χ^2 检验。计算纯合度(H_o)^[1]、杂合度(H_e)^[1]、有效等位基因数(N_e)^[2]及多态信息含量(PIC)^[3]。采用 SAS 软件(Version8.0)GLM (General Linear Models)程序,依据分析的性状和试验具体情况建立模型,分析了外显子 1 位点不同基因型对产羔数的影响:

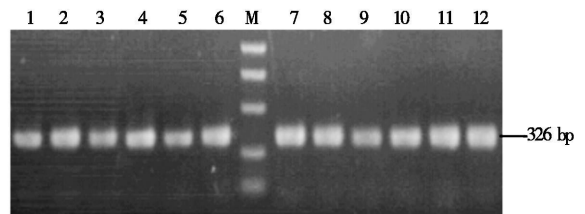
$$y_{ij}=u+G_i+e_j$$

其中: y_{ij} 为产羔数的记录值(第 1 胎产羔数和第 2 胎产羔数); u 为群体平均值; G_i 为第 i 种标记基因型的固定效应; e_j 为随机残差效应。

2 结果与分析

2.1 *BMP15* 基因外显子 1 位点的 PCR 扩增结果

利用特异性引物分别扩增了 116 个样品的 *BMP15* 基因的第 1 外显子位点的部分序列,通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物(图 1),与分子量 Marker DL2000 比较显示:在 250 bp 和 500 bp 之间有一条特异性片段,与预期扩增片段大小 326 bp 一致,条带清晰,符合 SSCP 试验要求。



1~ 6. PCR 扩增产物;M. Marker DL2000。

1~ 6. PCR results; M. Marker DL2000.

图 1 蒙古羊 *BMP15* 基因外显子 1 位点的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplified products of Mongolian sheep

BMP15 gene exon1 site

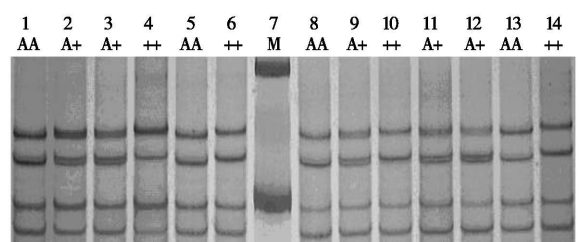


图 2 蒙古羊 *BMP15* 基因外显子 1 位点的 PCR-SSCP 检测结果

Fig. 2 Detection of *BMP15* gene exon1 site in Mongolian sheep by PCR-SSCP

2.2 *BMP15* 基因外显子 1 位点的 PCR-SSCP 分析

对已扩增的外显子 1 位点通过母液(Acr/Bis)为 29:1 的 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色进行 SSCP 分析,结果显示:蒙古羊在此段区域均表

现出 3 种不同条带,即存在多态性;这 3 种基因型分别命名为野生型 ++, 杂合型 A+ 和突变型 AA, 检测结果见图 2。即在泳道 1, 5, 8, 13 为 AA 型, 泳道 2, 3, 9, 11, 12 为 A+ 型, 泳道 4, 6, 10, 14 为 ++ 型。

将 ++ 和 AA 纯合型基因测序并利用 DNAsar 软件比对分析, 结果可以看出(图 3) ++ 型是在 150 bp 处 CTT 3 个碱基的缺失造成的, 进而导致了蒙古羊

BMP15 基因发生了移码突变, 即编码区第 28, 29, 30 位碱基缺失, 这个突变使野生型(++) 氨基酸序列上相应的 10 号氨基酸残基亮氨酸(L) 缺失, 变成了突变基因型(AA), 如图 4 所示。结果表明, 在蒙古羊群体中存在与 Belclare 和 Cambridge 羊相同的 B1 突变。



图 3 外显子 1 位点 AA、++ 两种序列的同源比较

Fig. 3 Alignment of similarity type of AA and ++ at exon1 site

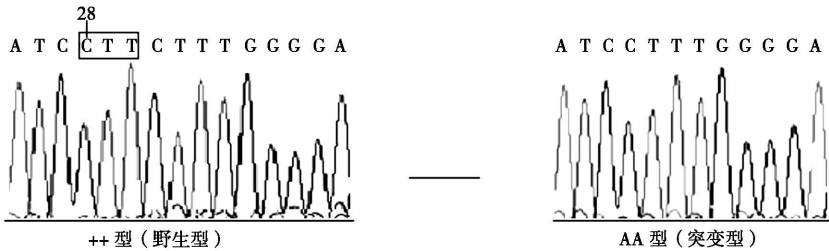


图 4 蒙古羊 *BMP15* 基因外显子 1 的多态峰图序列

Fig. 4 The polymorphic site in the exon1 of Mongolian sheep *BMP15* gene

2.3 蒙古羊 *BMP15* 基因外显子 1 位点的群体遗传学分析

等位基因是估计和比较遗传变异最基本的数

据。本研究从群体遗传学的角度分析统计了蒙古羊 *BMP15* 基因外显子 1 位点的基因型和等位基因频率, 统计分析结果表明(表 1), 蒙古羊单羔系的优势

基因型和优势基因分别为 ++ 和 +, 双羔系的优势基因型和优势基因分别为 A+ 和 A, 说明 B1 突变在双羔系中的发生频率高于单羔系中发生的频率。 χ^2 适合性检验结果表明两品系均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态($p > 0.05$)。

表 1 蒙古羊 *BMP15* 基因外显子 1 位点基因型和基因频率分布

| Tab. 1 Genotype distribution and allele frequencies of <i>BMP15</i> gene exon1 site in Mongolian sheep | | | | | | | |
|--|-----------|-------------------------------|-----------|-----------|----------------------------|-------|------------|
| 品种 Breeds | 只数 No. | 基因型频率 Genotype frequencies | | | 基因频率 Allele frequencies | | χ^2 值 |
| | | ++ | AA | A+ | + | A | |
| 单羔系 Single lamb | 44 | 0.614(27) | 0.023(1) | 0.364(16) | 0.795 | 0.205 | 0.607 |
| 双羔系 Double lamb | 72 | 0.194(14) | 0.389(28) | 0.417(30) | 0.403 | 0.597 | 1.291 |

注: * .表示差异显著, $0.01 < p < 0.05$; ** .表示差异极显著, $p < 0.01$ 。 $df = 2$, $\chi^2_{0.05} = 5.99$, $\chi^2_{0.01} = 9.21$ 。表 2 同。

Note : * .Means significant difference($0.01 < p < 0.05$); ** .Means most significant difference($p < 0.01$). The same as Tab. 2.

杂合度(He)、有效等位基因数(Ne)和多态信息含量(PIC)都是评价群体内遗传多样性的指标。通常情况下,当 $PIC > 0.5$ 时,该座位为高度多态; $0.5 > PIC > 0.25$ 时,为中度多态; $PIC < 0.25$ 时,为低度多态。对于一个群体而言, PIC 值高,等位基因数目多,杂合度大,说明该位点的遗传变异程度大,有较

大的选择潜力^[4,5]。从表 2 可以看出,蒙古羊群体的 PIC 都处于 0.25~0.5,说明蒙古羊群体在该位点具有中度多态性。对两品系的外显子 1 位点基因型频率分布进行 χ^2 独立性检验结果表明,蒙古羊单双羔品系间基因型分布差异极显著($p < 0.01$)。

表 2 蒙古羊 *BMP15* 基因外显子 1 多态位点的多态参数及不同基因型在蒙古羊群体中分布的差异显著性检验

| Tab. 2 The genetic polymorphism parameters of <i>BMP15</i> gene exon 1 polymorphism site and the χ^2 test of genotype in Mongolian sheep | | | | | |
|--|---|-------|-------|-------|------------|
| 类群 Groups | 遗传多态参数 Genetic polymorphism parameters | | | | χ^2 值 |
| | Ho | He | Ne | PIC | |
| 单羔系 Single lamb | 0.674 | 0.326 | 1.484 | 0.273 | 28.418** |
| 双羔系 Double lamb | 0.519 | 0.481 | 1.927 | 0.365 | |

2.4 *BMP15* 基因外显子 1 位点与蒙古羊双羔繁殖力关系的研究

对蒙古羊双羔系的 72 只个体进行了 B1 突变与产羔数关系的研究,结果见表 3。由表 3 可以看出, ++、A+ 和 AA 基因型各群体第一胎平均产羔数分

别为 1.750, 1.567 和 1.593, 各群体之间差异均不显著($p > 0.05$); ++、A+ 和 AA 基因型各群体第二胎平均产羔数分别为 1.875, 1.733 和 1.815, 各群体之间差异均也不显著($p > 0.05$),说明 B1 突变对蒙古羊产羔数无显著影响。

表 3 不同基因型的蒙古羊产羔数的最小二乘分析

| Tab. 3 Least squares mean(LSM) for litter size of different genotypes in Mongolian sheep | | | |
|--|----------------|---|---|
| 基因型 Genotype | 样本数 Numbers | 第一胎平均产羔数 Mean litter size at 1st lambing | 第二胎平均产羔数 Mean litter size at 2nd lambing |
| ++ | 14 | 1.750±0.164a | 1.875±0.125a |
| A+ | 30 | 1.567±0.092a | 1.733±0.082a |
| AA | 28 | 1.593±0.096a | 1.815±0.076a |

注: 同列比较均值上肩标不同表示差异显著($p < 0.05$) 或显著($p < 0.01$)。
Note: Values in same columns, different letters means significant difference ($p < 0.05$) or most significant difference ($p < 0.01$).

3 结论与讨论

Hanrahan 等扩增 Belclare 和 Cambridge 绵羊 *BMP15* 基因的外显子 1 和外显子 2, 经 SSCP 和直接测序在编码区共发现 4 个单核苷酸多态, *BMP15* 基因核苷酸 28~30 位的碱基缺失, 导致编码区 10 号氨基酸残基亮氨酸缺失, 形成 B1 突变体, 该突变没有改变 *BMP15* 的功能; B2 突变是 *BMP15* 基因编码区第二外显子 718 bp 处发生了 C→T 转换, 使肽链编码区 239 位氨基酸由谷氨酰胺变成了终止子, B4 突变是 *BMP15* 基因编码区第二外显子 1 100 bp 处发生了 G→T 颠换, 使成熟肽链 99 位氨基酸发生了丝氨酸→异亮氨酸转换, B2 和 B4 突变将会导致的绵羊纯合个体不育, 而杂合子则多排卵^[6-10]。因此, 对于检测和鉴定绵羊群体中是否存在 *BMP15* 基因突变, 对于绵羊的早期选择和新品种培育以及绵羊商品父母带种群建立和物种多样性保护都具有重要意义。

因的外显子 1 位点的多态性及与产羔关系进行了分析, 研究结果表明: 在外显子 1 位点检测到与 Belclare 和 Cambridge 羊相同的 B1 突变, 表明影响 Belclare 绵羊和 Cambridge 绵羊排卵数的 *BMP15* B1 突变在蒙古羊群体中亦存在相同的作用, 测序分析表明, 该段 DNA 序列中存在 3 个碱基的缺失, 即编码区第 28, 29, 30 位碱基缺失, 这个突变使野生型(++) 氨基酸序列上相应的 10 号氨基酸残基亮氨酸(L) 缺失, 变成了突变基因型(AA), 形成 B1 突变体。尽管 B1 突变对蒙古羊产羔数没有显著影响, 但是 B1 突变发生频率在双羔系中较单羔系蒙古羊群体显著上升, 也说明 B1 突变的发生有一定指示性。下一步作者将研究蒙古羊 *BMP15* 基因 DNA 全序列的碱基突变情况, 以进一步探究 *BMP15* 基因其他突变位点与蒙古羊品种繁殖力之间的关系, 以期找到与产羔数相关的突变位点, 为选育内蒙古高繁殖力绵羊提供理论依据。

参考文献:

[1] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic dis-

本研究通过 PCR-SSCP 技术对蒙古羊 *BMP15* 基

- tance from a small number of individuals[J] . Genetics, 1978, 89: 583– 590.
- [2] 郭满才. 群体遗传变异的信息学模型研究[D] . 杨凌: 西北农林科技大学, 2002.
- [3] Vaiman D, Mercier D, Moazami Goudazi K, *et al*. A set of 99 cattle microsatellites characterization synteny mapping and polymorphism [J] . Mamm Genome, 1994, 5: 288– 297.
- [4] Hanrahan J P, Gegan 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] . Biol Reprod, 2004, 70(4): 900– 909.
- [5] Galloway S M, McNatty K P, Cambridge L M, *et al*. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene(*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosagesensitive manner[J] . Nat Genet, 2000, 25(3): 279– 283.
- [6] 储明星, 桑林华, 王金玉, 等. 小尾寒羊高繁殖力候选基因 *BMP15* 和 *GDF9* 的研究[J] . 遗传学报, 2005, 32(1): 38– 45.
- [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] 王启贵, 钟发刚, 李 辉, 等. 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.
- [9] 耿荣庆, 常 洪, 杨章平, 等. 湖羊起源及系统地位的研究[J] . 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2002, 30(3): 21– 28.
- [10] 巩元芳, 李祥龙, 刘铮铸, 等. 我国主要地方绵羊品种随机扩增多态 DNA 研究[J] . 遗传, 2002, 24(4): 423– 426.