

山羊 *FGF5* 基因单核苷酸多态性群体遗传学分析

高爱琴¹, 李 宁², 李金泉¹, 赵兴波²

(1. 内蒙古农业大学, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要: 为了研究成纤维细胞生长因子 5 (*FGF5*) 基因在山羊被毛生长中的作用, 进一步寻找与山羊被毛生长相关的遗传标记, 为山羊绒毛性状的标记辅助选择和育种提供一定的理论依据, 根据人和小鼠成纤维细胞生长因子 5 (*FGF5*) 基因的同源序列设计引物对山羊基因组进行 PCR 扩增, 将扩增片段进行克隆和测序, 并与人和小鼠的成纤维细胞生长因子 5 基因序列进行同源性比较, 确定扩增的片段为山羊的 *FGF5* 基因片段。采用 PCR-SSCP 技术分析了 *FGF5* 基因外显子在内蒙古绒山羊、辽宁绒山羊和文登奶山羊品种的多态性, 结果表明: *FGF5* 基因在 P1 和 P2 引物扩增片段中存在 PCR-SSCP 多态性, 而在 P3 和 P4 中没有发现多态。经克隆测序分析, 位于外显子 1 的引物 1 内存在 A[→]G 突变; 引物 2 中发生了碱基序列 C[→]T 的突变, 这 2 个突变位点均没有引起编码氨基酸的改变, 属于同义突变。对不同山羊品种的基因型和基因频率统计结果表明, 引物 1 中内蒙古绒山羊、辽宁绒山羊、文登奶山羊均以等位基因 B 为主, 且不同群体均处于 Hardy-Weinberg 平衡; 引物 2 中内蒙古绒山羊、辽宁绒山羊均以等位基因 E 为主, 而文登奶山羊的基因型频率与其他品种有显著差异; 内蒙古绒山羊、辽宁绒山羊在引物 2 位点的基因频率处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态, 而文登奶山羊的基因频率处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

关键词: 山羊; 成纤维细胞生长因子 5 基因; PCR-SSCP; 哈代-温伯格平衡

中图分类号: S827; S813.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2006)03-0071-06

Analysis on Single Nucleotide Polymorphisms of *FGF5* Gene in Different Goat Breeds

GAO Ai-qin¹, LI Ning², LI Jin-quan¹, ZHAO Xing-bo²

(1. Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China; 2. National Laboratory for Agribiotechnology of China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: In order to study the function of *FGF5* on goat hair growth and to find the genetic marker of goat hair, it was designed and aimed to identify the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *FGF5* gene in various goat breeds including Inner Mongolia cashmere goat, Liaoning cashmere goat and Wendeng dairy goat. The 4 pairs of primers for *FGF5* gene were designed based on the human and mouse genomic sequence. Two SNPs were identified in the goat *FGF5* gene by PCR-SSCP and sequencing. They were in the exon 1 region in different goat lines. In primer 3 and primer 4 no SNP. The sequence data showed that two SNPs found in the exon 1 region of the gene were A to T and C to T. Population genetic analysis indicated that genotype frequency of the P1 SNPs was similar in different breed, gene B is mean gene. All the population were in Hardy-Weinberg equilibrium state. For primer 2, frequency of the EE genotype in both cashmere goat was higher than in the Wendeng lines, Frequency of allele D in primer 2 in Wendeng goat was higher than that of other breeds. Both cashmere population were in Hardy-Weinberg equilibrium state but Wendeng goat was not in Hardy-Weinberg equilibrium state.

Key words: Goat; *FGF5* Gene; PCR-SSCP; Hardy-Weinberg equilibrium

收稿日期: 2005-12-11

基金项目: 国家自然科学基金地区重点基金与中国农业大学农业生物技术国家重点实验室联合资助(39969002)

作者简介: 高爱琴(1969-), 女, 河北蔚县人, 博士研究生, 副教授, 主要从事动物遗传育种研究工作; 李宁为通讯作者。

绒长是绒山羊的一个重要经济性状,属数量性状,经过多年的数量遗传学和传统育种方法的选育,该性状得到一定程度的提高,随着分子生物学的发展,从分子生物学的角度来研究影响山羊绒长的候选基因和相关分子遗传标记,并以此作为遗传标记对其进行标记辅助选择将是提高其表型的有效手段之一。近年来,在 DNA 水平上的 PCR-SSCP 技术对特定基因多态性的研究方法得到了广泛的应用^[1]。这些方法不受性别和年龄的限制,可用于寻找候选基因的变异。此类研究在国内对于山羊基因多态性方面的研究报道很少。

在小鼠中,有 70 多种基因突变影响被毛形态,许多突变对被毛的长度无影响,有些使被毛变短,到目前为止只有一种突变即安哥拉鼠(*angora*,最初命名为 *go* 基因突变)引起被毛变长^[2]。这一突变现象引起了众多学者的研究,研究证明安哥拉鼠是由成纤维细胞生长因子(*Fibroblast Growth Factor-5 FGF5*)突变引起的,以后的一系列试验表明,*FGF5* 是影响毛囊周期性活动及被毛生长的很重要的生长因子。Jean M. Herbert 等 1994 年利用基因打靶技术,构建载体,通过胚胎干细胞基因敲除使小鼠的 *FGF5* 基因出现无效突变纯合,在 *FGF5* 基因翻译起始位点下游 113 bp 第一外显子 *Sma*I 酶切位点处插入载体,使 *FGF5* 基因无效(*FGF^{neo}*)。研究发现 *FGF^{neo}* 纯合子后代出生时健康、正常,但出生后 21 d 时突变纯合鼠被毛明显比杂合子 *FGF^{neo/+}* 和野生型长,在试验期的一年中这种表型一直保持^[3]。

本研究以被毛性状不同的内蒙古绒山羊、辽宁绒山羊和文登奶山羊为试验材料,采用 SSCP 方法对在被毛性状中起重要作用的 *FGF5* 基因进行单核苷酸多态性(SNP)检测,以比较 *FGF5* 基因在不同品种中的多态性,并对其 SSCP 多态性的 DNA 片段进行测序比较分析,旨在研究不同山羊品种中 *FGF5* 基因与被毛生长的关系,试图寻找与毛长性状相关的遗传标记,为山羊绒毛性状的标记、辅助选择和育种提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

辽宁绒山羊 50 只母羊血样采自北京市门头沟区清水镇;文登奶山羊 50 只母羊血样采自北京市兴绿原农牧发展有限责任公司(引自山东省);内蒙古

绒山羊血样采自内蒙古阿尔巴斯种羊场。颈静脉采血,所采血样均为 10 mL/只,用 ACD 抗凝,−20℃冻存。用酚氯仿抽提法提取基因组 DNA,溶于 TE,4℃保存。

1.2 引物的设计和 PCR 扩增

根据 Genbank 中已发表的人和小鼠的 *FGF5* 基因的同源区域设计引物,对山羊的基因组进行扩增,扩增 *FGF5* 的外显子 1 和外显子 3 的片段,扩增片段在 200~300 bp。引物由上海生工生物公司合成。引物序列如下:

引物 1: F: 5'-TTCCCCGAGGCTATGTCCAC-3'

R: 5'-ACACGGTGCTACTGCTGCTG-3';

引物 2: F: 5'-AGCAGTAGCACCGTGTCTTG-3'

R: 5'-AGCCATTGACITTTGCCATCG-3';

引物 3: F: 5'-GATGACTGTAAGTTCAGGGAG-3'

R: 5'-CCAAAGCGAAACCTTCAGTCTG-3'

PCR 扩增体系为 25 μL: 10× 缓冲液 2.5 μL, Mg^{2+} 终浓度为 20 mmol/L, 引物 50 ng, dNTP 终浓度为 200 μmol/L, 1U *TapDNA* 聚合酶,模板 100 ng。PCR 扩增条件: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 1 min, 58℃(引物 1), 61℃(引物 2), 58℃, 复性 30 s, 72℃延伸 30 s, 30 个循环; 72℃延伸 10 min, 4℃保存。产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 PCR 产物的克隆和测序

将 PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶中电泳并回收,连接在 PMDT 载体上,转化到大肠杆菌 DH5α,酶切鉴定后在 PE377 测序仪上测序。将测序结果提交网站比较,以检测是否为需要的序列。

1.4 PCR-SSCP 法检测单核苷酸多态

2 μL PCR 产物和 5 μL 的上样缓冲液(98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯青、10 mmol/L EDTA (pH8.0)、10% 甘油), 98℃变性 10 min, 迅速插入冰中,放置 5 min,使之保持变性状态。样品在 14% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳。电泳结束后,进行银染显带。最后进行 SSCP 分析。

2 结果与分析

2.1 SSCP 检测结果

2.1.1 引物 1 的 SSCP 检测结果 2 对引物的扩增产物进行 SSCP 检测,在外显子 1 的 2 对引物中发现多态。但在外显子 3 的引物中没有发现多态,在外显子引物 1 扩增片段上发现 3 种基因型,分别命名为 AA, AB 和 BB(图 1)。

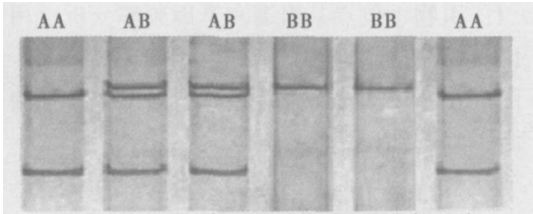


图1 外显子1第1对引物对不同山羊品种扩增片段的SSCP分析

Fig.1 SSCP analysis of PCR amplification using the first primer of exon1 in different goat breeds

2.1.2 引物1不同基因型的纯合子个体的克隆测序及分析 对第一对引物扩增所得到的纯合子个体进行克隆测序,引物P1扩增片段具SSCP多态性测序所得的部分核苷酸序列如下,并标出了差异位点。与AA基因型相比,具BB基因型的DNA片段存在单碱基的突变,即位于cDNA序列距第一个起始位点130处发生A→G,该突变没有引起氨基酸的改变,属同义突变(图2,3)。

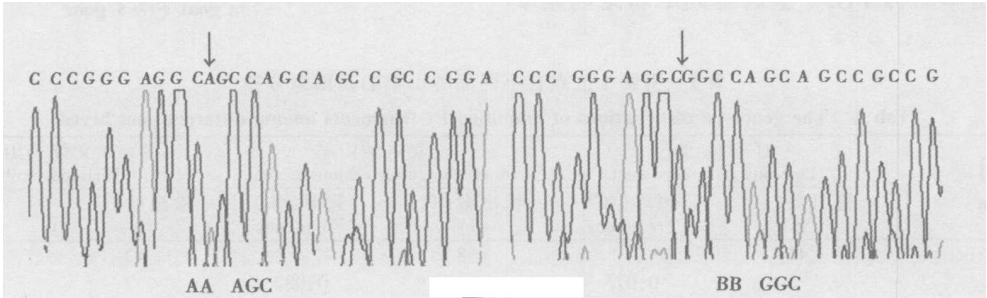


图2 *FGF5* 的外显子1引物1的不同基因型多态峰图序列

Fig.2 The polymorphic site in the first primer 1 of exon 1

C CCGGGAGGCGGCCAGCAGCCGCC cDNA 序列
*****A***** AA 基因型
*****G***** BB 基因型

图3 山羊 *FGF5* 基因 AA、BB 基因型序列比较

Fig.3 Sequence comparison of AA and BB genotype in goat *FGF5* gene

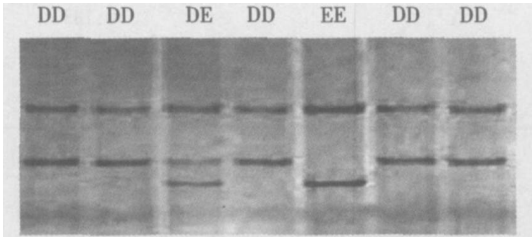


图4 外显子1第2对引物对不同山羊品种扩增片段的SSCP分析

Fig.4 SSCP analysis of PCR amplification using the second primer of exon 1 in different goat breeds

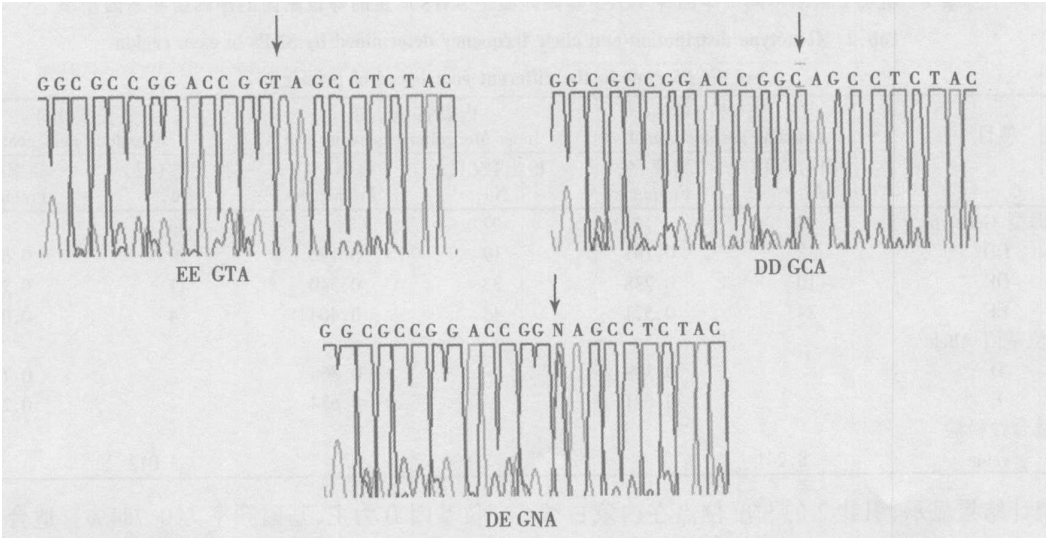


图5 *FGF5* 的外显子1引物2的不同基因型多态峰图序列

Fig.5 The polymorphic site in the first primer 2 of exon 1

2.1.3 外显子 1 中引物 2 的序列分析 对引物 2 扩增产物进行 SSCP 检测,发现 3 种基因型,分别命名为 DD、EE 和 DE(图 4)。

2.1.4 引物 2 不同基因型的纯合子个体的克隆测序 在 SSCP 中呈现多态性的 PCR 产物用玻璃奶试剂盒回收、直接测序,进一步证实了多态性位点的存在(图 5)。结果表明,DD 基因型与 EE 基因型比较在相应的位点有一个 C→T 的突变,这个碱基变化没有引起氨基酸的变化,属同义突变(图 5,6)。

2.2 不同山羊品种 *FGF5* 基因型频率和基因频率分析

2.2.1 引物 1 位点基因型和基因频率分析 用引物 1 对内蒙古绒山羊、辽宁绒山羊和文登奶山羊进行了 *FGF5* 基因型检测,计算了不同山羊品种的基因型频率和基因频率(表 1)。

GCCGGACCGGCAGCC TCTACTGC cDNA 序列
***** C ***** DD 基因型
***** T ***** EE 基因型

图 6 *FGF5* 基因 DD、EE 基因型序列比较
Fig.6 Sequence comparison of DD and EE genotype in goat *FGF5* gene

表 1 引物 1 位点在不同品种山羊的基因型分布
Tab.1 The genotype distributions of amplified P1 fragments among different goat breed

项目 Item	辽宁绒山羊 Liaoning cashmere goat		内蒙古绒山羊 Inner Mongolian cashmere goat		文登奶山羊 Wandeng milk goat	
	检出数(只) No.	频率(%) Frequency	检出数(只) No.	频率(%) Frequency	检出数(只) No.	频率(%) Frequency
基因型 Genotype	41		98		42	
AA	3	0.073	8	0.082	2	0.048
AB	9	0.220	25	0.255	8	0.190
BB	29	0.707	65	0.663	32	0.762
等位基因 Allele						
A		0.183		0.209		0.143
B		0.817		0.791		0.857
适合性检验 χ^2 value		2.894		3.619		2.074

统计结果显示,引物 1 的 SNP 位点在内蒙古绒山羊、辽宁绒山羊和文登奶山羊中均以等位基因 B 为主,基因频率在 0.791%~0.857%。适合性 χ^2 检验结果表明,各群体在该位点的基因频率均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态(各群体 χ^2 均小于 $\chi^2_{0.05}$)。

2.2.2 引物 2 扩增产物基因型和基因频率分析 用引物 2 对内蒙古绒山羊、辽宁绒山羊和文登奶山羊进行了 *FGF5* 基因型检测,计算了不同山羊品种的基因型频率和基因频率(表 2)。

表 2 引物 2 位点不同山羊品种 *FGF5* 基因外显子 SNPs 产生的等位基因的基因型和基因频率
Tab.2 Genotype distribution and allele frequency determined by SNPs in exon region of *FGF5* gene in the different goat breed of primer 2

项目 Item	辽宁绒山羊 Liaoning cashmere goat		内蒙古绒山羊 Inner Mongolian cashmere goat		文登奶山羊 Wandeng milk goat	
	检出数(只) No.	频率(%) Frequency	检出数(只) No.	频率(%) Frequency	检出数(只) No.	频率(%) Frequency
基因型 Genotype	42		97		44	
DD	8	0.191	19	0.196	29	0.659
DE	10	0.238	33	0.340	11	0.250
EE	24	0.571	45	0.464	4	0.091
等位基因 Allele						
D		0.309		0.366		0.784
E		0.691		0.634		0.216
适合性检验 χ^2 value		8.241		7.630		3.012

统计结果显示,引物 2 的 SNP 位点在内蒙古绒山羊、辽宁绒山羊品种中以等位基因 E 为主,基因频率在 0.634%~0.691%,而在文登奶山羊中以等

位基因 D 为主,基因频率为 0.784%。适合性 χ^2 检验结果表明,文登奶山羊群体在该位点的基因频率处于 Hardy-Weinberg 平衡状态(群体 χ^2 小于 $\chi^2_{0.05}$)，

而内蒙古绒山羊和辽宁绒山羊在该位点的基因频率处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态(群体 χ^2 均大于 $\chi^2_{0.05}$)。

2.3 不同品种山羊基因型频率显著性检验

表 3 山羊群体中 *FGF5* 各基因型分布
Tab.3 The *FGF5* genotype distributions

among different goat breeds					
SNPs	基因型 Geno- type	品种 Breeds			χ^2
		辽宁 绒山羊 Liaoning cashmere goat	内蒙古 绒山羊 Inner Mongoliar cashmere goat	文登 奶山羊 Wandeng milk goat	
引物 1 突变	AA	3	8	2	$\chi^2= 3.741$ $p> 0.05$
	AB	9	25	8	
	BB	29	65	32	
	合计	41	98	42	
引物 2 处突变	DD	8	19	29	$\chi^2= 13.189$ $p< 0.01$
	DE	10	33	11	
	EE	24	45	4	
	合计	42	97	44	

统计不同品种山羊在不同突变位点的基因型分

表 4 不同山羊 *FGF5* 基因多态位点纯合度、杂合度、有效等位基因数和多态信息含量

Tab.4 The genetic polymorphism parameters of *FGF5* gene polymorphism loci in dirrerent goat breeds

遗传多态参数 Genetic polymorphism parameters	P1				P2			
	Ho	He	Ne	PIC	Ho	He	Ne	PIC
辽宁绒山羊 Liaoning cashmere goat	0.701	0.299	1.426	0.254	0.573	0.427	1.746	0.336
内蒙古绒山羊 Inner Mongoliar cashmere goat	0.669	0.331	1.494	0.276	0.536	0.464	1.866	0.356
文登奶山羊 Wandeng diary goat	0.755	0.245	1.324	0.215	0.661	0.339	1.512	0.281

从表 4 可看出两个多态位点中,P1 位点 3 个品种的多态信息含量和杂合度表明,内蒙古绒山羊和辽宁绒山羊彼此接近,均为中度多态,文登奶山羊为低度多态($PIC< 0.25$);在 P2 位点,3 个品种均达到中度多态,辽宁绒山羊比内蒙古绒山羊的杂和度和多态信息含量稍高,但 2 个品种的多态信息含量没有大的差异,3 个品种中以文登奶山羊的多态信息含量为最低。

3 讨论

在鼠中 *FGF5* 基因对被毛的影响已研究得很深入,已证实该基因的突变对被毛的长度有显著影响,用试验方法也检测到基因在皮肤毛囊的表达,同时用体外注射蛋白产物进一步验证了 *FGF5* 的蛋白产物对不同时期毛囊生长的影响^[5-9]。本研究分析了 *FGF5* 基因在不同山羊的多态性。不同品种山羊群体遗传学分析表明,引物 1 的 SNP 位点在内蒙古绒山羊、辽宁绒山羊和文登奶山羊中均以等位基因 B

布情况并进行卡方独立性检验。不同品种山羊的基因型分布结果列于表 3。

对以上 3 个群体进行基因型频率独立性 χ^2 检验发现,引物 1 各群体的基因型频率差异不显著 ($P> 0.05$);引物 2 各群体的基因型频率差异极显著 ($P< 0.01$)。

2.4 不同品种山羊各位点纯合度(Ho)、杂合度(He)、有效等位基因数(Ne)及多态信息含量(PIC)分析

多态信息含量和杂合度(又称基因多样性)都是评价群体内遗传多样性的一个指标。多态性的标准是: $PIC> 0.5$ 时,为高度多态; $0.25< PIC< 0.5$ 时为中度多态; $PIC< 0.25$ 时,为低度多态。对于一个群体而言,PIC 高,等位基因数目多,杂合度大,表明该位点的遗传变异程度高,有较大的选择潜力。不同品种山羊各位点纯合度、杂合度、有效等位基因数及多态信息含量分析结果列于表 4。

为主,基因频率在 0.791~ 0.857。适合性 χ^2 检验结果表明,各群体在该位点的基因频率均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态(各群体 χ^2 均小于 $\chi^2_{0.05}$)。经卡方检验,品种间的基因型频率差异不显著 ($P> 0.05$)。引物 2 的 SNP 位点在内蒙古绒山羊、辽宁绒山羊品种中以等位基因 E 为主,基因频率在 0.634~ 0.691,而在文登奶山羊中以等位基因 D 为主,基因频率为 0.784。适合性 χ^2 检验结果表明,文登奶山羊群体在该位点的基因频率处于 Hardy-Weinberg 平衡状态(群体 χ^2 小于 $\chi^2_{0.05}$),而内蒙古绒山羊和辽宁绒山羊在该位点的基因频率处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态(群体 χ^2 均大于 $\chi^2_{0.05}$)。造成群体在某个位点的基因不平衡的原因可能有以下几种:(1) 对种畜的选择的影响。(2) 对经济性状选择的影响。(3) 对环境的适应性。(4) 人工授精技术的应用。(5) 样本容量的限制。内蒙古绒山羊和辽宁绒山羊羊中 E 等位基因频率最高,而在文登奶山羊中以 D 等位基因频率最高,可能是因为:不同羊种所

固有的种质特征;样本容量有限;还有可能是该位点与被毛性状相关,绒山羊是异质被毛,而文登奶山羊是同质被毛;文登奶山羊是粗毛,而绒山羊除粗毛外还有物理性质优良的绒毛,由于在长期的饲养中没有对奶山羊的被毛进行选择,所以在该位点处于平衡状态,而在对绒山羊产绒性状的长期选择中受到性状选择的影响,使该位点的基因频率不平衡。遗传杂合度是度量群体遗传变异的一个最适指标。在山羊群体,两个多态位点中,P1 位点 3 个品种的多态信息含量和杂合度内蒙古绒山羊和辽宁绒山羊彼此接近,均为中度多态,文登奶山羊为低度多态($PIC < 0.25$);在 P2 位点,3 个品种均达到中度多态,辽宁绒山羊比内蒙古绒山羊的杂和度和多态信息含量高,但两个品种的多态信息含量没有大的差异,3 个品种中以文登奶山羊的多态信息含量为最低。对于山羊品种文登奶山羊是处于相对封闭环境中的地方品种,遗传组成相对单一,遗传杂合度相对较低,而在两个绒山羊品种,内蒙古绒山羊的遗传杂合度和多态信息含量比辽宁绒山羊稍高,可能是由于为当地为提高产绒量,曾经导入过辽宁绒山羊等其他外血而造成。

本研究仅对不同山种绵羊 *FGF5* 蛋白基因多态性作了初步的探索,我们需要通过扩大样本量进一步研究 *FGF5* 的基因多态性。同时,记录不同品种、不同个体的产绒性状,进一步分析基因多态性与绒山羊生产性能的关系,寻找与 QTL 相连锁的标记,通过 MAS 检测与标记连锁的目标基因,进行目的基因型选择。本研究得到的 2 个单核苷酸多态性位点为今后畜禽绒用性状的研究提供一定的分子基础。同时不同山羊品种中 *FGF5* 基因多态位点的分布也为我们进一步揭示这些山羊品种的遗传多样性提供

了新的遗传标记。

参考文献:

- [1] 朱月春. PCR-SSCP 银染法在基因突变分析中的应用[J]. 昆明医学院学报, 1999, 20(2): 43-46.
- [2] Pennycuik P R, Raphael K A. The angora locus (go) in the mouse hair morphology, duration of growth cycle and site of action[J]. J Clin Invest, 1999, 104(7): 855-64.
- [3] Hebert J M, Rosenquist T, Gotz J. Martin GR *FGF5* as a regulator of the hair growth cycle evidence from targeted and spontaneous mutations[J]. Cell, 1994, (7-8): 1017-1025.
- [4] 赵俊丽, 吴登俊. 绵羊 QTL 定位的研究进展[J]. 四川畜牧兽医, 2001, 28(10): 29-30.
- [5] Suzuki S, Ota Y, Ozawa K, et al. Dual-mode regulation of hair growth cycle by two *FGF-5* gene products[J]. J Invest Dermatol, 2000, 114(3): 456-63.
- [6] Pethö-Schramm A, Müller H J, Paus R. *FGF5* and the murine hair cycle[J]. Arch Dermatol Res, 1996, 288(5-6): 264-266.
- [7] Suzuki S, Kato T, Takimoto H, et al. Localization of rat *FGF-5* protein in skin macrophage-like cells and *FGF-5* protein in hair follicle possible involvement of two *FGF-5* gene products in hair growth cycle regulation[J]. J Invest Dermatol, 1998, 111(6): 963-72.
- [8] Ito C, Saitoh Y, Fujita Y, et al. Decapeptide with fibroblast growth factor (*FGF*) 5 partial sequence inhibits hair growth suppressing activity of *FGF-5* [J]. J Cell Physiol, 2003, 197(2): 272-283.
- [9] Ota Y, Saitoh Y, Suzuki S, et al. Fibroblast growth factor 5 inhibits hair growth by blocking dermal papilla cell activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(1): 169-176.