

蒙古羊 BMP15 全长 DNA 序列的克隆与分析

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

(1. 内蒙古农牧业科学院, 内蒙古 呼和浩特 010030; 2. 内蒙古农业大学 动物科学与医学学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: BMP15 基因主要在哺乳动物卵巢中表达, 对卵泡的发育和分化起重要作用。根据其他物种 BMP15 基因的保守序列设计特异性引物, 扩增蒙古羊的全长 DNA 序列。从蒙古羊的血液中提取总 DNA, 采用 PCR 技术扩增出蒙古羊 BMP15 DNA 序列。将此片段克隆到 PMD18-T 载体中, 经菌落 PCR 鉴定和 DNA 序列测定分析验证, 证实所克隆序列 BMP15 为骨形态发生蛋白, 符合骨形态发生蛋白基因的特征。序列分析表明, 该 DNA 包含两个外显子序列和一个内含子序列以及两端的非翻译序列, 全长 6 642 bp, 编码 393 个氨基酸, 蒙古羊与牛的同源性最高 (98.6%), 与猪的同源性为 90.5%。

关键词: 蒙古羊; BMP15; PCR; 克隆; 序列分析

中图分类号: S826 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)01-0055-05

Analysis and Cloning of Mongolian Sheep Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Full DNA

LIU Yong-bin^{1,2}, RONG Wei-heng^{1,2}, WANG Feng^{1,2}, HE Xiao-long², TIAN Chun-ying¹

(1. Inner Mongolia Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010030, China

2. College of Animals Science and Medicine, Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010018, China;)

Abstract: BMP15 has a important role to the development and differentiation of follicular and is specialized expressed in mammalian ovary. Specific primers was designed based on conserver sequence of the other animals, firstly, total DNA was extracted from blood of Mongolian sheep and the BMP15 DNA was amplified by PCR. The purified PCR product was cloned into PMD18-T vector. The results demonstrated that the Mongolian sheep BMP15 is belong to the family of bone morphogenetic protein. On the basis of comparing the sequence to cow and pig, the homologies of nucleotide were 98.6%, 90.5% respectively.

Key words: Mongolian sheep; Bone morphogenetic protein 15; PCR; Cloning; Sequencing analysis

骨形态发生蛋白 (BMPs) 家族是转化长因子超家族的一大类, 它们与两类特异体结合组成信号传导通路诱导细胞内的一系列生理活动。研究表明, 它们对雌性繁殖性有重要作用, 特别是对卵巢的作用尤为明显^[1]。已在多种动物 (鸡、牛、猪、羊、鼠等) 卵巢检测到了编码 BMP 2, 3, 3b, 4, 6, 7 和 15 的 mRNA。在不同品种绵羊中已发现控制多胎性状的主基因, 如 *FecB*、*FecX^L*、*FecX^H*、*FecX^G* 和 *FecX^H* 基因, 它们都是 BMPs 家族蛋白及相关蛋白基因突变而产生的。作为 BMPs 家族的成员之一, BMP15 在对哺乳动物的繁殖性能起重要作用, 能促进颗粒细胞增

殖, 对早期卵泡发育和分化十分重要^[2-5]。BMP15 已被证实人在人、小鼠、大鼠和绵羊卵母细胞中特异性表达的卵母细胞衍生因子。

迄今为止, 通过基因重组技术被分离和克隆的 BMPs 成员已有 40 多种, 并且这一数量还在不断增加。其中, 对 BMP15 研究最多的是该基因在绵羊的繁殖性能方面的研究, 本试验根据已知人和小鼠等 BMP15 基因保守序列, 设计并合成三对引物, 采用 PCR 法, 克隆得到蒙古羊 BMP15 基因全长 DNA 序列, 并对该序列进行分析。旨在为 BMP15 在蒙古羊繁殖性能方面的进一步研究提供理论基础。

收稿日期: 2009-01-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30560102)

作者简介: 刘永斌 (1977-), 男, 内蒙古土默特左旗人, 助理研究员, 博士, 主要从事分子生物学与动物遗传学研究。

通讯作者: 荣威恒 (1952-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 研究员, 博士生导师, 主要从事反刍家畜遗传育种与繁殖研究工作。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和克隆载体 菌株为大肠杆菌 DH5⁺ , 克隆载体为 pMD18-T 载体系统。

1.1.2 试验动物 蒙古羊, 血样采自内蒙古自治区锡林郭勒盟黑城子示范牧场, 用 ACD 抗凝, -70 保存。

1.2 总 DNA 的提取

总 DNA 提取方法见参考文献[6]。

1.3 引物设计

参考 GenBank 中已发表的人、鼠、牛的 *BMP15* 基因 cDNA 序列, 按照引物设计的一般原则, 利用引物设计软件 Primer3.0 和 DNASTar5.01 筛选出作为绵羊 *BMP15* 基因序列的 PCR 扩增引物, 引物由大连宝生物 (TaKaRa) 工程有限公司合成。引物序列及片段大小如下:

外显子 1 扩增引物

P1 :5'-TGCTGCCAGCCTTTCATTTTTC-3'

预计扩增 619 bp

5'-GACCCGCGGCTTCCTCTGC-3'

外显子 2 扩增引物

P2 :5'-AGCTTCAGTTTCCTCGICT-3'

预计扩增 1 108 bp

5'-ACCTTTGCCGICACCTG-3'

内含子扩增引物

P3 :5'-GCCCCACCTTGCCCCCTGATTIC-3'

预计扩增 5 799 bp

5'-AACCTGCGCCCCCTTGIGATTIC-3'

1.4 PCR 扩增及其产物纯化

PCR 扩增体系 20 μ L: 模板 DNA、引物、Ex *Taq* 酶和三蒸水。PCR 条件: 94^o 预变性 3 min; 94^o 变性 45 s, 55^o 退火 45 s, 72^o 延伸 1 min, 循环 35 次, 最后 72^o 延伸 3 min, 4^o 保存。外显子 1、外显子 2、内含子退火温度分别为 55, 53, 60^o。4^o 保存。产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。按大连宝生物公司凝胶回收试剂盒操作手册标准纯化步骤对含片断凝胶进行回收纯化。

1.5 克隆质粒选择及与目的基因的连接

选择 pMD18-T 载体; 将 PCR 产物、pMD18-T 载体、Ligation Mix, 16^o 连接 2 h。

1.6 阳性克隆的筛选

制备感受态细胞; 用连接液连接载体与目的片段, 制备感受态细胞进行转化; 取转化菌液涂于含 IPTG 和 X-Gal LB 平板, 37^o 培养过夜; 挑选菌落中

的白斑, 于 LB 培养基中 37^o 摇床过夜; 以碱裂解法提取质粒经 *EcoR* 和 *Hind* 双酶切后, 进行琼脂糖凝胶电泳鉴定及菌液 PCR 鉴定。将鉴定正确的 6 个阳性克隆质粒送大连宝生物公司进行序列测定。

2 结果与分析

2.1 总 DNA 的提取

蒙古羊基因组 DNA 在 0.8% 的琼脂糖凝胶中电泳, 条带清晰, 致密 (图 1)。

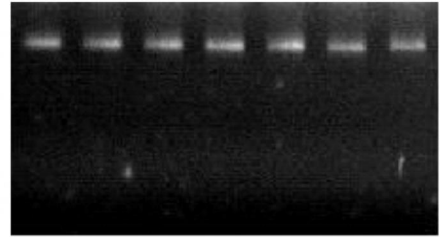
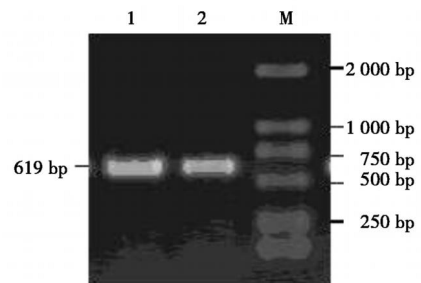


图 1 蒙古羊基因组 DNA 电泳检测结果

Fig. 1 Result of Mongolian sheep genomic DNA by electrophoresis

2.2 PCR 结果

PCR 产物经琼脂糖电泳, 在紫外灯下观察。引物 1 所扩增片段在 600 bp 附近有一明显的条带, 与目的条带 619 bp 相符 (图 2); 引物 2 所扩增片段在

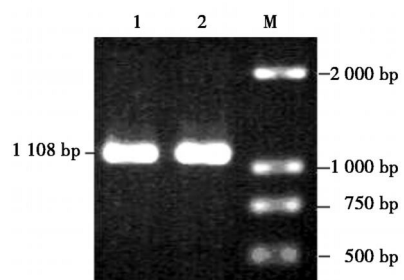


1, 2. PCR 扩增产物; M. DL2000 分子量标记。

1, 2. PCR products; M. DL2000 Marker.

图 2 蒙古羊 *BMP15* 基因 P8 引物的扩增产物检测结果

Fig. 2 PCR amplified products of P8 primer in Mongolian sheep *BMP15* gene



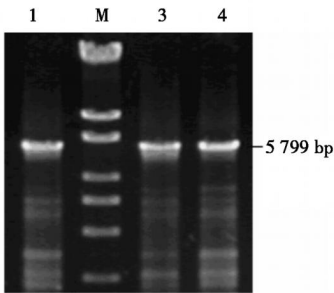
1, 2. PCR 扩增产物; M. DL2000 分子量标记。

1, 2. PCR products; M. DL2000 Marker.

图 3 蒙古羊 *BMP15* 基因 P7 引物的扩增产物检测结果

Fig. 3 PCR amplified products of P7 primer in Mongolian sheep *BMP15* gene

1 100 bp 附近有一明显的条带,与目的条带 1 108 bp 相符(图 3),引物 3 所扩增片段在 5 700 bp 附近有一明显的条带,与目的条带 5 799 bp 相符(图 4),与预期结果一致。



1,3,4. PCR 扩增产物; M. DL2000 分子量标记。
1,3,4. PCR products; M. DL2000 Marker.

图 4 蒙古羊 *BMP15* 基因 P8 引物的扩增产物检测结果

Fig.4 PCR amplified products of P8 primer
in Mongolian sheep *BMP15* gene

2.3 阳性克隆筛选和鉴定

挑选每个克隆各 10 个白斑菌进行质粒快速提取,而后以超螺旋 Maker (Supercoiled DNA Ladder Marker 2 087,3 049,3 997,5 026,6 133,8 023,10 085,11 849 bp)为对照,利用 2.5 %的琼脂糖凝胶进行电泳,初步筛选出可能为阳性的重组质粒,然后取 2 μL 用灭菌水稀释 10 倍的过夜培养菌液,进行菌落 PCR 鉴定,均扩增出明亮的目的条带(图 5 ~ 7),证明所鉴定的菌确为重组质粒。

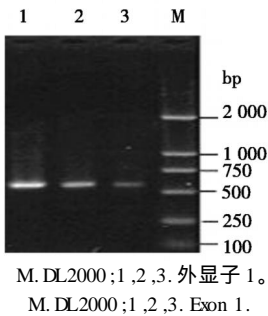
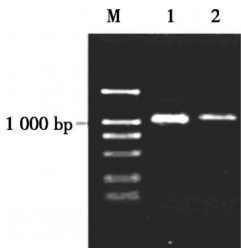


图 5 蒙古羊 *BMP15* 基因重组质粒外显子 1 PCR 鉴定

Fig.5 Identification of positive clone of Mongolian
sheep *BMP15* gene Exon 1



M. DL2000; 1,2. 外显子 2。
M. DL2000; 1,2. Exon 2.

图 6 蒙古羊 *BMP15* 基因重组质粒外显子 2 PCR 鉴定

Fig.6 Identification of positive clone of Mongolian
sheep *BMP15* gene Exon 2

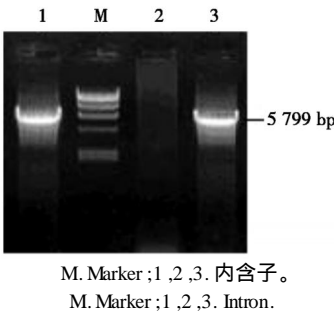


图 7 蒙古羊 *BMP15* 基因重组质粒内含子 PCR 鉴定
Fig.7 Identification of positive clone of Mongolian
sheep *BMP15* gene Intron

2.4 测序结果

克隆基因测序结果得到 *BMP15* 基因外显子 1 为 619 bp、外显子 2 为 1 108 bp、内含子为 5 799 bp,而且 PCR 产物序列均有预计重叠区,将所得序列用 ContigExpress 程序进行拼接,序列如图 8。

2.5 序列分析

将所拼接蒙古羊 *BMP15* 基因序列与人、鼠、牛等的 cDNA 序列已知基因组序列进行比对,结果发现蒙古羊 *BMP15* 基因序列包含了完整的 2 个外显子和 1 个内含子(图 8),2 个外显子的大小分别为 325 bp 和 857 bp,1 个内含子大小为 5 307 bp,且内含子 5 端均以 GT 起始,3 端均以 AG 结束,显然外显子和内含子之间的剪切序列符合 GT/AG 规则。蒙古羊 *BMP15* 基因与其他真核基因一样也存在这种剪接加工机制。得到的蒙古羊 *BMP15* 基因序列包括部分 5 端调控序列,完整的编码区序列、内含子序列、3 端调控序列。序列中 1 ~ 143 为 5 端调控序列,6 633 ~ 6 643 为 3 端调控序列;144 ~ 468,5 776 ~ 6 632 为编码区;469 ~ 5 775 为内含子。从不同物种间 *BMP15* 基因 cDNA 序列的同源性分析结果可以看出,哺乳物种之间 cDNA 序列同源性都达到了 80 %以上;从蒙古羊与禽类和鱼类物种之间的同源性来看,他们的同源性是最低的,也间接说明了物种进化上的差别,蒙古羊与牛的同源性最高(98.6 %),其次与猪(90.5 %);而其他物种之间,猪和牛的同源性最高,达到了 90.2 %,人和斑马鱼的同源性最低为 15.2 %。

3 讨论

Jennifer 等根据已经确定的 *BMP15* 基因序列及简并 PCR 的方法,克隆出了小鼠 *BMP15* 基因,参照小鼠的 *BMP15* 基因序列设计引物,克隆出人和大鼠的 *BMP15* 基因并测出其 DNA 序列,结果发现,人及其他动物的 *BMP15* 基因 DNA 序列相似。cDNA 序

tgctgccagcctttcattttccttgccctatcctttgtgtagtgagagcctggatgctgttaccatgtaaaaggaaagggttaagcgttatcctttggcctttatcagaacat
gttctggaacaccaagcttttcaagatggtcctcctgagcatccttagaatcctcttttgggactggtgctttttatggaacataggggtccaaatga
cacaggttagggcagccctctattgccacacctgcctgagggccctaccttgccttgattcaggagctgctagaagaagccctggcaagcagc
agaggaagccggggtcttagggcatcccttacggtatattgctggagctgtaccagcgttcagctgacgcaagtggaacaccttagggaaaacc
gcaccattggggccaccatggtgaggtggtgagggcgtggttagttagcaaggcctctcagagtgagttatcatactattgttctggggagg
ggggggagaaaatgggggaagaaagttagaaaaagtgatctgtcaggtttctcagcgttccatgctacagggtaggtgtttcaaaagatggcacccttggga
gaacctggctccaaattgtctccctttagggctccaaatttaagaacagattgcttggggcctccctgagagcttctccagggcccaaggcaactcattgatgtcagct
cctagctttcaagaaggtttaatgcttattatcactgaaaattataactgagaatactcattatgttctgtggaggcgtgttctgttttttcttaagaacaaaagggtac
aggatgttgatgtgagaaatttacaaggcttcagaaggacagaacagcctcagacctgaagctgttattgtatttaactcctaatgatagggactccttagctgtcct
gaaaggcttagcctggtttttaaagaaaagggaacagagagcaaggttaaatgacttcagaggtgcacaaggatgggggtggcagagcaggttgagcttcagct
gtctgattttatagctgtccataactactaaggtgtttgaatgtcataccctgatactcctgtacacgaaagcagttttctgttttagactatgttctagtttgggttgggtaccaa
atgtatttggaaatttctgtttccctcatagttgcttctgttttaacatcttcattagagactgatctaggcgaatagttgggttcttagggcaatgaag
aaagccatcaatttcaagaaatcttgggaacctggtgaaatcaatcttaagcctttgtagtctcaagatgacaccagacatgatttacctcctcctcaagtaaaacaac
cacattcccttaagctaaacttttagtgtgtgtgtacatgtgccgggtatttaggacactgtacttttacaacattatcttcttaactcctcccaatatacatatgaagtgtgtgt
gcgaactcagttgtatctgattctttgtgaccccatggactataccctgccaggctcctctgtccatggaacttccagggcaagagtagctggcgtgggtgccatttccctcca
ggggacttcccatccagggatcaaaccacatcttctgttttctgcttggcaagaggttcttactactgctccactatggaatactatgaatataccattatatagggtg
aagaaaatgaagttcagtgtaacacagctagtaattaatagagctggttttcaaccgggcttccaggttcagagcctgtgttttaattacctgctgagctgactgcttaa
cagactttaattgagcacaagcactgtgttgggggttgggtataaaaaggcaataactgctcagaggagccccaactatagtagaatgatatataaagaacataatgggt
ggtacagcagcaaatgctttgaaaaaggataaacagtaggattcctggggcctcaagaaagaaatgggtgctacttagggcagaggaggggaatgctgaaatagttga
aaggcctcattggagagcagcatttgagccagacttgcagaagagtagaaagagactatgatacagggagggaaggtgacttctgattgagggaaaaagagataacttg
ataagggttggagattcactgcagaatatttattgaacgtttaagtgtagtggcattgttctaggtgttggatgtgatcaagatgggcacggctctgtgggtgagacaagta
agtaaacatggatagtagtaaatgtggttaagtgtaccaaagaaatgaataagtggtgtctgtagagaatagcaaaagaaatctccttcgcatgggattgtcagtgaaaggc
atgtttgaaaggtgagcatttgagctgaggtctgtaaggttaagaagcctggcactgagagagaggaaggaatgtgactgagcagaaggggaacacatgacaaaggcct
aaaggtggaacacagtagtctgaaagaaatgaaggaatcagagatggttggagcctgtagagagattgtagaggggtgtaggagatgaaatgaggtgaggtgaggtgagcag
tggtcattacaagcagctggtttcactcataagctgcataagtcattctgtacagatgatataggctagaagtagaatgcttagaattagccagatattctgtactgacc
atgggacatactggtatctaggagactgcgaagggatccagaatggatgacaagagaggttgggtctgatcattccatcagagagatgatccagctgaatcaagcgttctt
gagagctattccaggttcaatgcagagagatgtgtgagtcagacatttccctgaaaagtctgagcagaccccttctgcccctgatccttagcaacccacccctgcttcaggga
aatatgtgatgtcagggctgaaaggaaggcaggttccctaccagactgctgtagagattcgggttagttacttccagcaggggtggggcagatgtatgggtgggtgt
cttggaaagattatcacggatgggaagtatggatgaactcgaagaacattacaagcctggcttgagcttctgtgaatgatatcaagttaccccaacttggagggtgattat
agcatgagttggaacctgaactaaaaaaaattgatgtgttctactcatgtggaatataaaaaaaaattaaaaactcaaacagatcagattatgtttaccagcag
gtaaaaagggttggagagtgctgcgaataggtggaaggaggttaattgtgtggaataagcttggaacataggttgggtggtgatcctctgtatgtatatacagattgttgat
tatgaattatgattatgaattttgcacctgaaactgggatacataactaaaaaatcctgatgcatacaaacattcaagagcttcttagttgaaatcccaagcttactgaattcca
ggttcagtgattcagtggaaggaagaaattaggtagataatgttaattagcatggccatggttagtgactggacatggaaaaacagactggttctaaatagaaaaggag
tacgtcaaggctgtatctgcacctgcttatttaacttatatgcagagtagatcatgagaacactgggctggaaagacacaagctggaatcaagattgccgggacaaat
atcaataacctgagatagtagatgataccaccttatggcagaaggtgaagggaactaaagagcctcttgatgaaagtgaagaggaagtgaaaaagttggctttaa
gtcaacattcagaaaactaagatcatggcatcaggtcccatcctcatggaataatgatgggaaacagtgacagacttattttctgggctccaaatcactgcagatg
gtgactgcagccatgaattaaaaataaagacactgctccttggaaaggaaagttatgaccaacctaagttgcatattaaaaagcagagacattattttccaacaaagatc
catctagtcagggctatgggtttccagtagtcatgtatggatgtgatgttggactataaagggaagctgagcgtgaagaattgatcttttggactgtggtattggagaagac
tcttgagagctccctggactgcaaggtgatccaacactccatcctgggggaaatcagtccttaggtgttcatggaggagactgatgtgaaagtgaaactccaacttggc
cactgtgtgaaagagctgactaattggagatgacctgactgtgtgaaagattggggcgaagggaaggggacacaagaggttgagatggttggatggcatcaccaca
actcaatggacatgggttgggtgaactccaggagttggtgacagaggagcggcgtgctgttttgcattgggtgcacaagagctgcaacacagctgagcaactga
actgaactgatggttagtgataggtgaagatgacagaagggttttctgtattgacctttttgtaactgttgccttggacttggcagagaggcgcagaaggtcagagc
actgcaggtcctcttttaacgctttggccactaggtgtcagcatcagatttggaatataaataactctttgtagctcagctggttaagaatccctgcaatgcgagagacc
tcagttgatccctgggttgggaagatcgtggaaggggaagggtcaccacacagatttctggcctggagaattctatggactgtatagccatgaagtcgcaagaggt
cagacaaggtgagcagcttccattcaaaagtgcatttttaagtagacttttagttgaggtcattatagactggccttgttgaagacgggtatttacaatgaatggggt
aatgaagaatcatttccagtaaggaatggaaaaggagattgaggttaagggaagcctgcccaataatggaatagctgctcaagaaagaaatcaaatagaagcaa
aagtattaaatcctgtcccaactaggaataattatttttggcatctccaacccagatttgaagcaatagcagaccatacccccaatattggactgtcaccttaaaagctgcc
atctatagtgatatagcataaggaatttatttatttctgtattgttcaactccttcaatttggcactttttaaagtcagctaaataataatatacagacagattctgtatttg
agggttttctccgtctagggtatgagtgatctaaaaatgagccacaattgtcatctaaagggaagaaagacttggactcaaatcttatttcaacaaactggcttgtgtc
ctctggcatagcttctctgagcttctgctgcaaatgggaatgaactatcataaggctattgtgattcaagaacaaatgcatgaaagcatctaatacatta
tataagtgctcaatagatgctattatgacttaaatcatctcaaggctgctgtcagttttagtactgagcaggtctgttagagagactaaggctaggatataagaagctaacgct
ttgcttctgttcccttactaatgaggctcctggcacatatacagaccctggacttctccttgagaccaaacgggttagcatccaactagtcagagcca
ctgtgtgtttaccgccatcagcttccaccttaactcattccacctctcctgcatgtggagccctgggtccagaaaagcccaaccaatcacttct
cttcttcaggaagaggtcctcaagccttccctgttgcacaaaacttggacagagatggatatcatggaacatgttgggcaaaagcctctgga
atcacaagggggcaggggttctacgactccgcttctgtgtcagcagccaagaggttagtgagggttcttgagttctgttggtcagcttcat
cattggacactgtctcttctgttactgtatttcaatgacactcagagtggttcagaagaccaaacctctccctaaaggcctgaagagtttacag
aaaaagacccttctcttctttagggagggtcgtcaagcaggcagctattgcatcgggaagtctcctggccctccaggagcagtagggcctg
aaagtaaccagtggttccctccacccttttcaagttagcttccagcagctgggctgggatcactggatcattgtctcccatctctatacccca
actactgtaagggtatgtcctcgggtactacactatggtctcaattctcccaatcatgccatcatccagaacctgtcagtgagctggtgg
atcagaatgtccctcagccttctgtgtcccttataagtagttccattagcatccttctgattgaggcaaatgggagtagcttctgtacaagg
agtagtaggggtatgattgcccatgctgcacatgagggtgagggcaaggt

黑体字母为外显子；两外显子之间是内含子；下划线的为引物序列。

The black letters were exons and others were introns; Underline: Primers.

图8 蒙古羊 BMP15 基因 DNA 序列

Fig.8 DNA sequence of Mongolian sheep BMP15 gene

列全长为1 179 bp,包含2个外显子,2个外显子被1个内含子隔开,内含子的序列长度在人、小鼠和大鼠中有所不同,人的为4.2 kb,人、小鼠和大鼠的 *BMP* 基因的初级结构与生长分化因子9基因非常相似。*BMP15*、*GDF9* 和 *BMP6* 是卵母细胞分泌的生长因子,属于 TGF β 家族成员。卵母细胞分泌的这些生长因子可能是卵母细胞调节卵泡细胞活动的候选分子。*BMP15* 和 *GDF9* 的一个有趣的结构特征是它们均缺乏7个半胱氨酸的第4个半胱氨酸残基,这7个半胱氨酸在 TGF β 超家族40多个成员中是非常保守的。因为第4个半胱氨酸与链间二硫键的形成有关,可能的情况是 *BMP15* 和 *GDF9* 是单体或非共价地与异源二聚体蛋白和同源二聚体蛋白连锁。

通过同源性比较可知蒙古羊的 *BMP15* cDNA 序列与牛、人、小鼠和猪的序列同源性非常高。其中蒙古羊和牛的同源性最高,为98.6%;与猪的同源性为90.2%,与人的同源性为15.2%,与鼠的同源性最低为68.6%,而与禽类和鱼类动物之间,同源性最低,同源性在20%以上,因此,从不同物种间的同源性和系统进化关系可以看出,保守性和物种中的分类地位密切相关,分类地位越相近的物种序列的同源性程度就越高。这也表明,尽管 *BMP15* 基因在物种的进化中比较保守,就哺乳动物和鱼类比较而言,差异性还是比较大的,在功能上是否也存在较大的差异还需要进一步的研究。目前,有关 *BMP15* 基因功能的研究主要集中在小鼠和人上的研究,而在绵羊关于 *BMP15* 的研究主要在遗传标记方面的研究。

参考文献:

- [1] 刘永斌,王 峰,荣威恒. 骨形态发生蛋白的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学,2005,26(4):25-29.
- [2] Yan C,Wang P,DeMayo J, et al. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function[J]. Mol Endocrinol,2001,15(6):854-866.
- [3] Juengel J L,Hudson N L,Heath D A, et al. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep[J]. Biol Reprod,2002,67(6):1777-1789.
- [4] Otsuka F,Shimasaki S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function[J]. Mol Endocrinol,2001,15(6):854-866.
- [5] Lan Z G,Ju P,Xu X, et al. GDNF-dependent repression of BMP-15 and GDF-9 mediates gamete regulation of female fertility[J]. EMBO J,2003,22(16):4070-4080.
- [6] Chen H,Leibenguth F. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA of three farm animal species,cattle,sheep and goats [J]. Comp Biochem Physiol,1995,111B:643-649.
- [7] Otsuka F,Yao Z,Lee T H, et al. Bone morphogenetic protein 15:identification of target cells and biological functions[J]. J Biol Chem,2000,275:39523-39528.
- [8] 刘永斌,王 峰,田春英,等. 用 RACE 技术扩增并克隆牛 BMP4 基因3'端序列[J]. 生物技术,2006(6):47-49.
- [9] Shimasaki S,Moore K R,Otsuka F, et al. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction i[J]. Endocr Rev,2004,25:72-101.
- [10] 刘凤丽,刘永斌,王 峰,等. 中国部分绵羊品种 BMP-1B 基因 RFLP 多种性的研究[J]. 华北农学报,2007,22(4):151-154.