

山羊 *UBA52* 基因多态性及其与繁殖性能的关系

王永娟¹, 储明星^{2*}, 曹贵玲², 王金玉^{1*}, 狄冉², 方丽²

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009;

2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业部畜禽遗传资源与种质创新重点实验室, 北京 100193)

摘要: 根据牛 *UBA52* 基因序列, 设计 3 对引物 (U1~U3), 分别扩增随机选取的济宁青山羊和辽宁绒山羊样本, PCR 产物克隆测序, 序列比对结果显示仅在 U3 的扩增产物中发现 G63A 和 T181C 突变。设计引物 U4, 利用 PCR-RFLP 技术分别在性早熟、高繁殖力品种 (济宁青山羊、南江黄羊、马头山羊) 和性晚熟、低繁殖力品种 (辽宁绒山羊、内蒙古绒山羊、太行山羊) 中检测上述位点的多态性, 并分析 2 个突变位点对山羊性早熟和高繁殖力的影响。对于 G63A 位点, 在济宁青山羊和南江黄羊中检测到 GG、GA 和 AA 3 种基因型, 在马头山羊、辽宁绒山羊、内蒙古绒山羊、太行山羊中只检测到 GG 和 GA 基因型; 该突变位点不同基因型分布在性早熟品种和性晚熟品种间存在一定的差异; 济宁青山羊 GG、GA 和 AA 基因型频率分别为 0.53、0.44 和 0.03, AA 型和 GA 型母羊平均产羔数分别比 GG 型多 0.85 只 ($P<0.05$) 和 0.49 只 ($P<0.05$), AA 型与 GA 型之间差异不显著 ($P>0.05$)。对于 T181C 位点, 在南江黄羊和内蒙古绒山羊中检测到 CC、CT 和 TT 3 种基因型, 在济宁青山羊、马头山羊、辽宁绒山羊、太行山羊中只检测到 CC 和 CT 两种基因型; 该突变位点不同基因型分布在性早熟品种和性晚熟品种间没有明显差异; 济宁青山羊 CC 和 CT 基因型频率分别为 0.91 和 0.09, 两种基因型个体间产羔数差异不显著 ($P>0.05$)。本研究结果初步表明, *UBA52* 基因 63 位点与山羊的性早熟可能存在一定关联, A 等位基因可能是提高山羊产羔数的一个潜在有效的 DNA 标记。

关键词: 山羊; *UBA52* 基因; 性早熟; 产羔数; PCR-RFLP

中图分类号: S827

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)01-0007-07

Polymorphism of *UBA52* gene and its association with reproductive performance in goats

WANG Yong-juan¹, CHU Ming-xing², CAO Gui-ling², WANG Jin-yu¹, DI Ran², FANG Li²

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009;

2. Key Laboratory of Farm Animal Genetic Resources and Germplasm Innovation of Ministry of Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

Abstract: According to *Bos taurus UBA52* gene sequence, three pairs of primers (U1 to U3) were designed to clone goat *UBA52* and scan polymorphisms and one pair of primers to detect polymorphisms of *UBA52* in sexual precocious and high fecundity goat breeds (Jining Grey, Nanjiang Brown and Matou goats) and sexual late-maturing and low fecundity goat breeds (Liaoning Cashmere, Inner Mongolia Cashmere and Taihang goats) by PCR-RFLP. The results showed that there were only two base changes (G63A and T181C) in the product Cashmere and Taihang goats. There were certain differences in genotype distribution between the sexual precocious and sexual late-maturing goat breeds. In Jining Grey goats, the frequency of genotypes GG, GA and AA was 0.53, 0.44 and 0.03, respectively. And the Jining Grey goat does with genotype AA and GA had 0.85 ($P<0.05$) and 0.49 ($P<0.05$) kids more than those with genotype GG, respectively. No significant difference ($P>0.05$) was found in litter size between AA and GA genotype in Jining Grey goats. For the 181 locus, three genotypes (CC, CT and

收稿日期: 2011-07-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)(2006AA10Z139), 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-39), 国家重点基础研究发展计划(973)(2006CB102105), 国家自然科学基金项目(30871773), 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所基本科研业务费专项(2010jc-9)和中国农业科学院首批优秀科技创新团队专项共同资助。

作者简介: 王永娟, 女, 硕士研究生。E-mail:wangyongjuan-1986@163.com

* **通讯作者:** 储明星, 男, 研究员, 博士生导师。E-mail:mxchu@263.net

王金玉, 男, 教授, 博士生导师。E-mail:jywang@yzu.edu.cn

TT) were detected in Nanjiang Brown and Inner Mongolia Cashmere goats, only two genotypes (CC and CT) were in the other four goat breeds. No significant difference was found in genotype distribution between the sexual precocious and sexual late-maturing goat breeds. In Jining Grey goats, the frequency of genotypes CC and CT was 0.91 and 0.09, respectively. And there was no significant difference ($P>0.05$) in litter size between the only two genotypes CC and CT in Jining Grey goats. The present study preliminarily indicated that there may be some association between 63 locus of *UBA52* gene and sexual precocity in goats, and allele A of *UBA52* gene is a potential DNA marker for improving litter size in goats.

Key words: goat; *UBA52* gene; sexual precocity; litter size; PCR-RFLP

泛素 (ubiquitin) 是一种广泛存在于各种真核生物中的小分子蛋白质,最初是1975年由Goldstein等人从牛胸腺中分离到的。泛素是由76个氨基酸残基组成的一条多肽,分子量为8.6 ku,是目前已知的最保守的真核蛋白之一^[1]。泛素主要功能是标记需要被分解掉的蛋白质,使其被水解,标记同一个靶蛋白往往需要4个或更多的泛素分子。

泛素基因家族主要编码2种泛素前体蛋白^[2]。第1种是多聚泛素,即以双联体(如UbB)或泛素链的线性重复形式(如UbC)存在;第2种是融合泛素蛋白,即与核糖体蛋白融合,如*UBA52*和*UBA80*^[3-4]。2种泛素基因都编码融合蛋白,而泛素只有在单体情况下才有活性,所以它们的编码产物要经过特异的蛋白酶切割才能参与到生命活动中^[5-7]。融合泛素基因编码的泛素单体通常作为分子伴侣参与核糖体的装配过程^[8-9]和延长羧末端延伸蛋白的寿命^[5]。

酵母、拟南芥、大鼠和人等*UBA52*基因的研究表明,翻译后的*UBA52*蛋白会被快速分解为泛素单体和52个氨基酸的羧末端延伸蛋白,并且羧末端延伸蛋白成为核糖体60S亚基的一个组成成分,在人的核糖体中为L40^[10]。Baker和Board等^[11]通过基因组序列分析,发现人的*UBA52*基因包含5个外显子,全长超过3400 bp,具有典型的核糖体蛋白的结构特征,如CpG岛所处位置、Sp1结合位点的存在、从嘧啶区开始转录、缺少一致的TATA基序等。同时,印记杂交分析显示该基因在淋巴细胞和胎盘中均有表达^[11]。1994年,Webb等^[12]经原位杂交将*UBA52*基因定位19p13.1-p12。目前,*UBA52*基因结构在不同生物中都有报道,在酵母、拟南芥、大麦和人中,*UBA52*基因超过一个拷贝,而在果蝇中只有一个拷贝^[13]。

本实验室应用抑制消减杂交技术成功构建了济宁青山羊与辽宁绒山羊幼年期、初情期、初情期同龄对照间下丘脑、垂体、卵巢-子宫、肾上腺的消减cDNA文库,结果表明*UBA52*基因出现的频次比较高,所以初步推测该基因可能与济宁青山羊的性早

熟、高繁殖力有关系。据《中国羊品种志》记载,在我国地方山羊品种中,济宁青山羊性早熟,一般在出生后2~3月龄达初情期,平均产活羔数为2.94只^[14];南江黄羊性早熟,母羊4月龄时就开始发情,平均产羔数为1.87只^[15],高繁殖系羊群平均胎产羔数达到2.17只^[16]。马头山羊性成熟较早,母羊初情日龄平均为107.9 d^[17],产羔数为1.92~2.00只^[14];辽宁绒山羊性晚熟,5月龄达初情期,平均产活羔数为1.18只^[14];内蒙古绒山羊性晚熟,5~6月龄达初情期,平均产活羔数为1.04只^[14];太行山羊一般在6~7月龄达初情期,产羔数由于地区不同差异很大,河南平均为1.03只,山西平均为1.10只,而河北平均为1.43只^[14]。

本研究以性早熟、高繁殖力山羊品种(济宁青山羊、南江黄羊、马头山羊)和性晚熟、低繁殖力山羊品种(辽宁绒山羊、内蒙古绒山羊和太行山羊)为实验材料,采用测序和限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)方法分析*UBA52*基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP),比较该基因在6个山羊品种中的多态性,旨在寻找与性早熟、高繁殖力相关的遗传标记,为山羊繁殖性能的标记辅助早期选择提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

济宁青山羊230只母羊血样采自农业部济宁青山羊保种基地(山东省嘉祥县);南江黄羊50只母羊血样采自四川省南江县南江黄羊原种场;马头山羊51只母羊血样采自湖北省十堰市;辽宁绒山羊65只母羊血样采自辽宁绒山羊育种中心(辽宁省辽阳市);内蒙古绒山羊58只母羊血样采自内蒙古白绒山羊种羊场(内蒙古鄂尔多斯市鄂托克旗);太行山羊55只母羊血样采自河南省武陟县。均随机采样。颈静脉采血,所采血样DNA,溶于TE缓冲液(10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0), 4℃保存。

随机选择的 230 只济宁青山羊是 5 只公羊的后代, 记录其胎次、产羔月份和产羔数。将济宁青山羊实际第 1 胎 ($n=70$)、第 2 胎 ($n=75$) 和第 3 胎 ($n=85$) 分别作为 3 个胎次。根据当地山羊生产实际将 3~5 月生产的作为春季产羔 ($n=61$), 6~8 月生产的作为夏季产羔 ($n=52$), 9~11 月生产的作为秋季产羔 ($n=68$), 12~2 月生产的作为冬季产羔 ($n=49$)。

1.2 引物设计

利用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.0 软件, 根据牛的 *UBA52* 基因序列 (GenBank 登录号: NC_007305) 设计 4 对引物 (U1~U4), 由生工生物工程 (上海) 有限公司合成, 引物名称、引物序列、扩增区域、片段长度及退火温度见表 1。

1.3 PCR 扩增

PCR 扩增反应体系 20 μL , 包括 2.0 μL 山羊基因组 DNA 模板 ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、2.0 μL dNTPs ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 天根)、上下游引物各 0.5 μL ($10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、0.5 μL *Taq* DNA 聚合酶 ($2.5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 天根)、2 μL 的 $10 \times$ buffer (不含 Mg^{2+}) 和 1.5 μL Mg^{2+} ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 其余用双蒸水补足。

扩增程序为 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 退火 (退火温度见表 1) 30 s, 72°C 延伸 30 s, 进行 35 个循环; 最后 72°C 延伸 5 min, 4°C 保存。

1.4 克隆测序

PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶分离, 用 DNA 片段快速纯化回收试剂盒 (TaKaRa, 大连) 回收, 回收片段插入 pMD18-T 载体 (TaKaRa, 大连)。重组质粒转入 *E. coli* JM109 感受态细胞, 酶切鉴定阳性克隆, 送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序。每个样本至少测 3 个克隆, 然后将所测序列进行比对, 找出差异核苷酸。

1.5 RFLP 分析及基因分型

酶切反应体系为 10 μL , 其中包括 $10 \times$ NEB Buffer 1 μL 、内切酶 *Nco* I ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, NEB, 识别序列为 5'-C/CATGG-3') 0.25 μL 和 PCR 产物 3 μL (U3 为引物), 然后用灭菌双蒸水补充至 10 μL 。而 *Rsa* I 的酶切反应体系为: $10 \times$ T Buffer 1 μL 、0.1% BSA 1 μL 、*Rsa* I ($10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, TaKaRa, 大连, 识别序列为 5'-GT/AC-3') 0.5 μL 和 PCR 产物 4 μL (U4 为引物), 然后用灭菌双蒸水补充至 10 μL 。 37°C 消化 5 h, 然后用 12% 聚丙烯酰胺凝胶 (丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺=39:1) 电泳检测, 银染显带。用凝胶成像仪 AlphaImagerTM 2200 and 1220 Documentation and Analysis Systems (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA) 拍照和分析, 统计基因型。

表 1 山羊 *UBA52* 基因 PCR 扩增的引物序列、扩增区域、片段长度及退火温度

Table 1 Primer sequence, amplified region, fragment size and annealing temperature for goat *UBA52* gene

引物名称 Primers	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	扩增区域 Amplified region	片段长度/bp Fragment size	退火温度/ $^\circ\text{C}$ Annealing temperature
U1	F:GGGCTGGCTTGGACTAAACCT R:AAGATGACACTGGGGAACACTGG	外显子 2 Exon 2	343	62.5
U2	F:CCTTTTGACAGATTGGGGTAA R:AACACTGATGGAGACGCTTTT	外显子 3 Exon 3	401	44
U3	F:CCAAGGGGTTCTGATGTAGCC R:GCAAAGGAGAAGCAGGTGGAA	内含子 3→外显子 5 Intron 3 → exon 5	409	57
U4	F:CGCCAGCTCGCTCAGAAGTA R:GCAAAGGAGAAGCAGGTGGAA	外显子 4 及内含子 4 Exon 4 and intron 4	248	58

1.6 统计分析

配合下列模型进行最小二乘方差分析, 对引物 U3 和 U4 的基因型进行分析, 比较济宁青山羊产羔数在不同基因型之间的差异:

$$y_{ijklm} = \mu + S_i + KS_j + P_k + G_l + e_{ijklm}$$

其中: y_{ijklm} 是产羔数的记录值; μ 为群体均值; S_i 为第 i 只公羊的固定效应 ($i=1,2,3,4,5$); KS_j 为第 j 个产羔季节的固定效应 ($j=1,2,3,4$); P_k 为第 k 个胎次的固定效应 ($k=1,2,3$); G_l 为第 l 种基因型的固

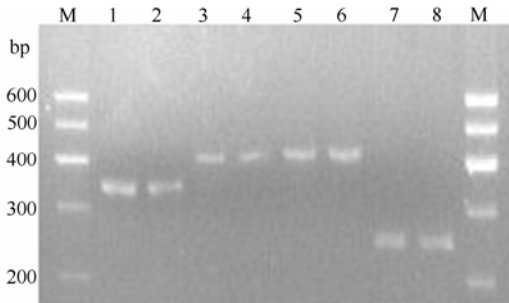
定效应; e_{ijklm} 为随机残差效应。用 SAS (V8.12) 的 GLM (General Linear Model) 过程完成。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增及序列分析

用 U1~U4 对 6 个山羊品种 *UBA52* 基因进行扩增, 所得 PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明扩增片段与预期大小一致, 且均得到特异性片段 (扩增结果见图 1)。由引物 U1~U4 扩增出的

目的片段长度分别为 343 bp、401 bp、409 bp、248 bp，分别扩增出外显子 2、外显子 3、内含子 3 至外显子 5、外显子 4 及其右侧翼区。



Bands 1 and 2, product of U1; Bands 3 and 4, product of U2; Bands 5 and 6, product of U3; Bands 7 and 8, product of U4; M, DNA Marker I (TIANGEN, Beijing)

图 1 U1~U4 引物的 PCR 产物

Figure 1 PCR products of U1~U4 primers

用 NCBI 上的 ORF finder 软件结合牛 *UBA52* 基因的 mRNA 序列 (NC_007305) 和已获得的部分山羊 *UBA52* 基因序列预测山羊的 ORF 序列为 387 bp，预测编码 128 个氨基酸残基。与人 (NC_000019)、牛 (NC_007305)、小鼠 (NC_000074)、野猪 (NC_010444)、猕猴 (NC_007876) 5 个物种的

UBA52 基因的 ORF 序列和氨基酸序列进行同源性分析，结果表明山羊与人、牛、小鼠、野猪、猕猴 5 个物种的 ORF 序列同源性分别为 92.51%、92.51%、91.99%、94.83%和 93.02%，而氨基酸序列同源性均为 100%。可见，*UBA52* 基因在 6 个物种中 ORF 序列和氨基酸序列同源性较高，此区域高度保守。

2.2 核苷酸突变分析

用 3 对引物(U1~U3)扩增济宁青山羊和辽宁绒山羊基因组并测序分析，结果显示只在 U3 的扩增产物上发现 2 个突变位点(G63A 和 C181T)。

AA 基因型与 GG 基因型相比在第 63 位发生了 G→A 突变 (图 2)。TT 基因型与 CC 基因型相比在第 181 位发生了 C→T 突变 (图 2)，但没有导致氨基酸改变，为沉默突变。

2.3 引物 U3 和 U4 扩增片段 RFLP 分析

63 位点处的 G→A 突变使得新序列可被限制性内切酶 *Nco* I 识别，所以可对 U3 扩增产物直接进行 RFLP 检测，如图 3a 显示，共有 3 种基因型：GG (409 bp)、GA (409/347/62 bp)、AA (347/62 bp)。因为 62 bp 相对较短，当两条长片段区分开时，62 bp 已在聚丙烯酰胺凝胶外了，故酶切图上未显示。

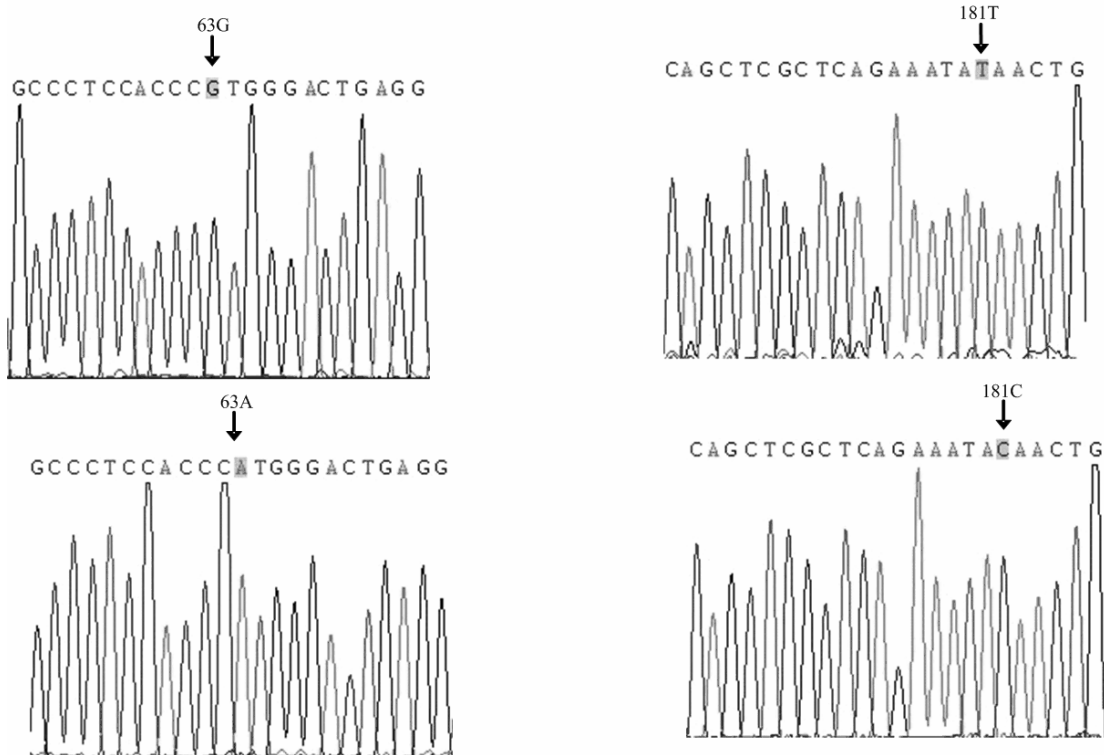


图 2 山羊核苷酸突变

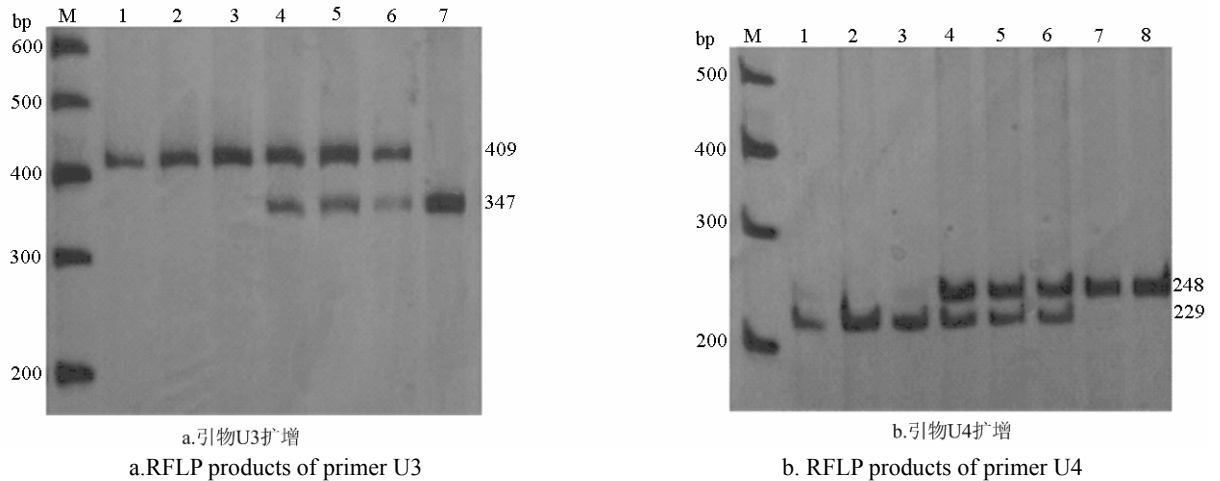
Figure 2 Nucleotide mutation in goats

设计一对新引物 U4 检测 181 位点处的 C→T 突变, 可用限制性内切酶 *Rsa* I 直接进行 RFLP 检测, 如图 3b 显示, 共有 3 种基因型: CC(229/19 bp)、CT (248/229 bp)、TT (248 bp)。因为 19 bp 相对较短, 当两条长片段区分开时, 19 bp 已在聚丙烯酰胺凝胶外了, 故酶切图上未显示。

2.4 *UBA52* 基因在不同山羊品种中的遗传多态性

UBA52 基因 2 个突变位点在 6 个山羊品种

中的基因频率及基因型频率见表 2。结果表明, 63 位点处, G 等位基因在 6 个山羊品种中都是优势等位基因, 且卡方适合性检验结果表明该位点基因型分布符合哈代-温伯格平衡($P>0.05$)。181 位点处, C 等位基因在 6 个山羊品种中都是优势等位基因, 且卡方适合性检验结果表明该位点基因型分布符合哈代-温伯格平衡($P>0.05$)。



a. RFLP products of primer U3
Bands 1, 2 and 3: GG genotype; Bands 4, 5 and 6: GA genotype; Band 7: AA genotype. M: DNA Marker I

b. RFLP products of primer U4
Bands 1, 2 and 3: CC genotype; Bands 4, 5 and 6: CT genotype; Bands 7 and 8: TT genotype. M: DNA Marker I

图 3 RFLP 电泳检测

Figure 3 Electrophoresis analysis of RFLP products

表 2 6 个山羊品种中 *UBA52* 基因两个 SNP 的等位基因及基因型频率
Table 2 Allele and genotype frequencies of the two SNPs in *UBA52* in six goat breeds

位点 Locus	频率 Frequency		济宁青山羊 Jining Grey goat	南江黄羊 Nanjiang Brown goat	马头山羊 Matou goat	辽宁绒山羊 Liaoning Cashmere goat	内蒙古绒山羊 Inner Mongolia Cashmere goat	太行山羊 Taihang goat
63	数量 Number		226	46	51	59	52	52
	基因型频率 Genotype frequency	GG	0.53(119)	0.39(18)	0.59(30)	0.81(48)	0.85(44)	0.90(47)
		GA	0.44(99)	0.44(20)	0.41(21)	0.19(11)	0.15(8)	0.10(5)
		AA	0.03(8)	0.17(8)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	等位基因频率 Allele frequency	G	0.75	0.61	0.79	0.91	0.92	0.95
		A	0.25	0.39	0.21	0.09	0.08	0.05
	H-W test	χ^2	5.40	0.35	3.43	0.62	0.36	0.13
181	数量 Number		227	33	51	65	58	55
	基因型频率 Genotype frequency	CC	0.91(206)	0.85(28)	0.96(49)	0.98(64)	0.71(41)	0.95(52)
		CT	0.09(21)	0.12(4)	0.04(2)	0.02(1)	0.27(16)	0.05(3)
		TT	0(0)	0.03(1)	0(0)	0(0)	0.02(1)	0(0)
	等位基因频率 Allele frequency	C	0.95	0.91	0.98	0.99	0.84	0.97
		T	0.05	0.09	0.02	0.01	0.16	0.03
	H-W test	χ^2	0.53	2.35	0.02	0.00	0.16	0.04

注: 括号内的数字是个体数。

Note: The numbers in the brackets are the individuals that belong to the respective genotypes.

2.5 不同山羊群体中 *UBA52* 基因基因型分布检测

对2个位点不同基因型在6个山羊品种中的分布进行差异性检验(见表3)。结果表明,63位点处的基因型频率在性早熟山羊品种(济宁青山羊、南江黄羊)与性晚熟山羊品种(辽宁绒山羊、内蒙古绒山羊、太行山羊)间存在显著差异,而性早熟品种

马头山羊只与性晚熟品种太行山羊有显著差异。说明该位点与山羊的性早熟可能存在一定关联。

181突变位点的基因型频率在性早熟和性晚熟品种之间的差异没有明显的规律,表明该突变位点可能和山羊的性早熟没有明显关系。

表3 *UBA52* 基因63位点(对角线上方)和181位点(对角线下方)在6个山羊品种中基因型分布差异

Table 3 Test of difference of 63 (above diagonal) and 181 locus (below diagonal) genotype distributions of *UBA52* gene in six goat breeds

品种 Breed	济宁青山羊 Jining Grey goat	南江黄羊 Nanjiang Brown goat	马头山羊 Matou goat	辽宁绒山羊 Liaoning Cashmere goat	内蒙古绒山羊 Inner Mongolia Cashmere goat	太行山羊 Taihang goat
济宁青山羊 Jining Grey goat		13.86**	2.17	16.34**	18.08**	25.13***
南江黄羊 Nanjiang Brown goat	7.24		10.80*	22.99***	23.77***	29.68***
马头山羊 Matou goat	1.56	3.71		6.73	8.47	13.59**
辽宁绒山羊 Liaoning Cashmere goat	4.31	7.21	0.64		0.21	1.83
内蒙古绒山羊 Inner Mongolia Cashmere goat	18.02**	3.01	12.20*	18.94***		0.79
太行山羊 Taihang goat	0.82	3.03	0.14	1.42	11.12*	

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

表4 *UBA52* 基因不同基因型济宁青山羊产羔数的最小二乘均值与标准误

Table 4 Least squares mean and standard error for litter size of different genotypes of the two loci in *UBA52* gene in Jining Grey goats

位点 Locus	基因型Genotype	母羊数 Number of does	产羔数 Litter size
63	GG	119	2.09 ^b ±0.11
	GA	99	2.58 ^a ±0.16
	AA	8	2.94 ^a ±0.20
181	CC	206	2.36 ^a ±0.10
	CT	21	2.12 ^a ±0.18

注:同一对引物具有相同字母肩标的平均值间差异不显著($P > 0.05$),具有不同字母肩标的平均值间差异显著($P < 0.05$)。

Note: Least squares means with the same superscript for the same pair of primer have no significant difference ($P > 0.05$). Least squares means with the different superscripts for the same pair of primer differ significantly ($P < 0.05$).

2.6 *UBA52* 基因对济宁青山羊产羔数的影响

UBA52 基因不同基因型济宁青山羊产羔数的最小二乘均值与标准误见表4。对于63位点,济宁青山羊AA型和GA型母羊平均产羔数分别比GG型多0.85只($P < 0.05$)和0.49只($P < 0.05$),AA型与GA型之间差异不显著。对于181位点,济宁青山羊只有CC和CT两种基因型,两种基因型个体间产羔数差异不显著($P > 0.05$)。

列,预测含387bp的ORF,编码128个氨基酸。同源性比对结果显示,山羊*UBA52*基因的ORF序列和氨基酸序列与人、牛、小鼠、野猪、猕猴5种哺乳类动物同源性较高。先前研究表明,拟南芥^[9]与人^[11]的*UBA52*蛋白序列仅有7个氨基酸不同,而果蝇^[13]与人类只有3个氨基酸不同。这说明*UBA52*基因在进化上高度保守。

作为泛素基因家族重要的一员,目前对*UBA52*基因研究越来越深入。Sun等^[18]研究推测*UBA52*基因与糖尿病性肾病变的病理学有关,且是由位于启动子区的调控元件转录调节的。2007年,Yao等^[19]

3 讨论

本研究克隆了山羊*UBA52*基因部分DNA序

研究发现, 当大鼠外伤性脑损伤时, 大脑皮层和海马中 *UBA52* 的 mRNA 水平都会明显下降。而在最近对牡蛎的研究中, 当细菌入侵牡蛎时, *UBA52* 基因的表达亦会下降^[20], 说明 *UBA52* 在免疫系统上发挥重要作用。也有资料表明, *UBA52* 基因可能参与了精子形成过程。Martínez-Heredia 等^[21]在 2006 年利用双向电泳和飞行质谱分析从人精子标本中检测到人 *UBA52* 基因, 并推测其可能参与精子中蛋白的转换过程。另有报道^[10]发现, 在圆形精子和长形精子细胞中泛素结合蛋白增加, 在成熟精子中其量较低, 在精原和精母细胞中其量微弱。精子形成过程中泛素结合蛋白的大量出现与消失, 也说明大量泛素结合蛋白参与了精子形成过程。陈碧等^[22]通过酵母双杂交和细胞外的 GST pull-down 证明了人 *UBA52* 与人蛋白激酶 CK2 α 之间存在相互作用, 但尚不清楚这种相互作用对精子发生机制的影响。以上研究结果显示 *UBA52* 基因的功能较多, 该基因可能还有其它功能, 这也是本实验选择 *UBA52* 基因在山羊上开展研究的原因之一。

本实验室通过抑制消减杂交技术筛选济宁青山羊性早熟相关的基因, 结果显示 *UBA52* 基因在构建的消减文库中出现频次比较高。本实验通过对 *UBA52* 基因的多态性进行检测, 研究发现两个突变位点, 分别为内含子 3 区域的 G63A 和外显子 4 区域的 C181T 突变, 且后者的突变没有改变氨基酸序列, 为沉默突变。分别对两个突变位点不同基因型在 6 个山羊品种中的分布进行差异性检验, 结果显示, 63 突变位点不同基因型在性早熟品种和晚熟品种间存在一定的差异, 推测该位点可能与山羊的性早熟有某些关联。同时关联分析初步表明 *UBA52* 基因 63 位点处的 A 等位基因可能具有增加山羊产羔数的作用, 可能是提高山羊产羔数的一个潜在有效的 DNA 标记。由于本研究检测的品种数和样本数较少, 所获得的结论只是初步的, 值得增加山羊品种数、扩大样本数、进行标记与产羔性能关联作深入研究。

参考文献:

- [1] Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation [J]. Annual Review of Genetics, 1996, 30: 405-439.
- [2] Wiborg O, Pedersen M S, Wind A, et al. The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences[J]. EMBO J, 1985, 4(3): 755-759.
- [3] Hershko A and Ciechanover A. The ubiquitin system[J]. Annual Review of Biochemistry, 1998, 67:425-479.
- [4] Wilkinson K D. Roles of ubiquitylation in proteolysis and cellular regulation [J]. Annual Review of Nutrition, 1995, 15: 161-189.
- [5] Finley D, Bartel B and Varshavsky A. The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis [J]. Nature, 1989, 338(6214): 394-401.
- [6] Amerik A Y and Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1695(1/3): 189-207.
- [7] Wing S S. Deubiquitinating enzymes-the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2003, 35(5):590-605.
- [8] 王红梅, 祝诚. 泛素-蛋白水解酶复合体通路在生殖系统中的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(1): 31-34.
- [9] Callis J, Raasch J A, Vierstra R D. Ubiquitin extension proteins of Arabidopsis thaliana: Structure, localization, and expression of their promoters in transgenic tobacco[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(21): 12486-12493.
- [10] Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life [J]. The EMBO Journal, 1998, 17(24):7151-7160.
- [11] Baker R T and Board P G. The human ubiquitin-52 amino acid fusion protein gene shares several structural features with mammalian ribosomal protein genes [J]. Nucleic Acids Research, 1991,19(5):1035-1040.
- [12] Webb G C, Baker R T, Coggan M, et al. Localization of the human *UBA52* ubiquitin fusion gene to chromosome band 19p13.1-p12[J]. Genomics, 1994, 19(3): 567-569.
- [13] Cabrera H L, Barrio R, Arribas C. Structure and expression of the *Drosophila* ubiquitin-52-amino acid fusion-protein gene[J]. Biochemical Journal, 1992, 286(1): 281-288.
- [14] 《中国羊品种志》编写组. 中国羊品种志[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989: 98-101; 104-106; 92-93; 88-90; 93-95.
- [15] 何以俊, 严峻. 南江黄羊生长及其饲养管理[J]. 现代农业科技, 2005(3) :47-48.
- [16] 张红平, 王维清, 熊朝瑞, 等. 南江黄羊的种质特性[J]. 中国草食动物, 2004(专辑): 113-114.
- [17] 张作仁, 甘先华, 吴惠珍, 等. 马头山羊繁殖性能报告[J]. 养殖与饲料, 2003(8): 26-27.
- [18] Sun L, Pan X, Wada J, et al. Isolation and functional analysis of mouse *Uba52* gene and its relevance to diabetic nephropathy [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(33): 29953-29962.
- [19] Yao X L, Liu J, McCabe J T. Ubiquitin and ubiquitin-conjugated protein expression in the rat cerebral cortex and hippocampus following traumatic brain injury (TBI)[J]. Brain Research, 2007, 1182: 116-122.
- [20] Fu D K, Zhang Y, Yu Z N. Cloning and expression analysis of a ubiquitin gene (Ubl40) in the haemocytes of *Crassostrea hongkongensis* under bacterial challenge [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2011, 29(1): 80-86.
- [21] Martínez-Heredia J, Estanyol J M, Ballescà J L. Proteomic identification of human sperm proteins [J]. Proteomics, 2006, 6(15): 4356-4369.
- [22] 陈碧, 骆艳婷, 刘新光, 等. 酵母双杂交筛选与蛋白激酶 CK2 α 相互作用蛋白—泛素-52 氨基酸融合蛋白的鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(9): 826-832.