

RIP140 基因多态性及其与济宁青山羊产羔数关系的研究

唐倩倩, 冯涛, 储明星*, 狄冉, 方丽

(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 *RIP140* 基因 mRNA 序列, 设计 5 对引物 (P1~P5), 利用每对引物分别扩增随机选取的济宁青山羊和辽宁绒山羊各 5 个个体, PCR 产物克隆测序, 获得山羊 *RIP140* 基因全部 CDS 序列。通过序列比对在此序列 822 位发现 C→T 的沉默突变。根据获得的山羊 *RIP140* 基因的 CDS 序列设计引物 P6, 采用 PCR-RFLP 技术检测 C822T 多态位点在高繁殖力品种 (济宁青山羊、贵州白山羊) 和低繁殖力品种 (辽宁绒山羊、波尔山羊、内蒙古绒山羊) 中的单核苷酸多态性, 并研究该基因对山羊产羔数的影响。结果发现, 引物 P6 扩增片段在济宁青山羊、贵州白山羊、辽宁绒山羊和波尔山羊中均检测到 CC、CT 和 TT 3 种基因型, 内蒙古绒山羊中只检测到 CT 和 TT 两种基因型。济宁青山羊 CC、CT 和 TT 基因型频率分别为 0.056、0.309 和 0.635, CC 型和 CT 型母羊平均产羔数分别比 TT 型多 0.81 只 ($P<0.05$) 和 0.65 只 ($P<0.05$), CC 型比 CT 型多 0.16 只 ($P>0.05$)。研究结果初步表明, *RIP140* 基因的 C 等位基因是提高山羊产羔数的一个潜在有效的 DNA 标记。

关键词: 山羊; *RIP140*; 高繁殖力; PCR-RFLP

中图分类号: S827

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)01-0014-05

Polymorphism of *RIP140* gene and its relationship with litter size of Jining Grey goat

TANG Qian-qian, FENG Tao, CHU Ming-xing, DI Ran, FANG Li

(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 the *Bos taurus RIP140* mRNA sequence, five pairs of primers were designed to amplify whole CDS sequence of *RIP140* gene in five randomly selected individuals from Jining Grey goats and Liaoning Cashmere goats, respectively. Through DNA sequencing and alignment, the whole CDS sequence of the goat *RIP140* gene was obtained. Meanwhile, one nucleotide transition (C822T) was identified in goat *RIP140* gene. According to the CDS sequence of the goat *RIP140* gene, primer P6 was designed to detect C822T mutation of *RIP140* gene in high prolificacy breeds (Jining Grey and Guizhou White goats) and low prolificacy breeds (Liaoning Cashmere, Boer and Inner Mongolia Cashmere goats) by PCR-RFLP. The results showed that three genotypes (CC, CT and TT) were detected in Jining Grey, Boer, Liaoning Cashmere and Guizhou White goats and only two genotypes (CT and TT) were detected in Inner Mongolia Cashmere goat. In Jining Grey goat, genotype frequency of CC, CT and TT was 0.056, 0.309 and 0.635, respectively. Jining Grey goat does with genotype CC or CT had 0.81 ($P<0.05$) or 0.65 ($P<0.05$) kids more than those with genotype TT, respectively. The Jining Grey goat does with genotype CC had 0.16 ($P>0.05$) kids more than those with genotype CT. These results preliminarily indicated that allele C of *RIP140* gene is a potential DNA marker for improving litter size in goats.

Key words: goat; *RIP140* gene; prolificacy; PCR-RFLP

受体相互作用蛋白 140 (receptor interacting protein 140, *RIP140*) 也称为 *NRIP1*, 是一种转录辅助抑制因子, 是最早被鉴定出来的核受体辅助因子之一。人 *RIP140* 基因位于染色体 12q11.2^[1], 由 4 个外

收稿日期: 2011-05-27

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)(No.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)(No.2006CB102105), 国家自然科学基金项目(No.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: 唐倩倩, 女, 硕士研究生。E-mail: tqq851208@126.com

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

显子和 3 个内含子组成, 编码区为连续序列, 无内含子结构, 全部位于第 4 外显子上, 编码含有 1 158 个氨基酸残基的蛋白, 分子量为 140 ku^[2]。*RIP140* 在生殖和能量代谢平衡方面都发挥着至关重要的作用^[3]。它对于女性的生育能力是必不可少的, 表现在它在女性排卵期影响卵母细胞的释放^[4]。此外, *RIP140* 还调节脂肪细胞^[5-6]、骨骼肌^[7]、肝脏的代谢活性^[8]和巨噬细胞的炎症反应^[9], 因此对 *RIP140* 基因多态性进行研究很有意义。有关 *RIP140* 基因与山羊生殖性状的研究尚未见文献报道。

据《中国羊品种志》记载, 在我国地方山羊品种中, 济宁青山羊、贵州白山羊、辽宁绒山羊、内蒙古绒山羊平均产活羔数分别为 2.94 只、2.74 只、1.18 只和 1.04 只^[10]。波尔山羊平均产活羔数为 2.10 只^[11]。本研究以高繁殖力品种(济宁青山羊、贵州白山羊)和低繁殖力品种(辽宁绒山羊、波尔山羊、内蒙古绒山羊)为试验材料, 采用测序和限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)方法分析 *RIP140* 基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP), 比较该基因在 5 个山羊品种中的多态性, 旨在寻找与高繁殖力相关的遗传标记, 为山羊高繁殖性能的标记辅助选择提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

随机选择于 2009 年产羔的 230 只济宁青山羊母羊(分别是 5 只公羊的后代), 记录其胎次、产羔月份和产羔数, 这些母羊血样采自农业部济宁青山羊保种基地(山东省嘉祥县), 55 只贵州白山羊采自贵州白山羊原种场(贵州省沿河土家族自治县), 59 只内蒙古绒山羊母羊血样随机采自内蒙古白绒山羊种羊场(内蒙古鄂尔多斯市鄂托克旗), 32 只波尔山羊母羊血样随机采自山西省晋城市沁水示范牧场(山西省沁水县郑庄镇), 80 只辽宁绒山羊母羊血样随机采自辽宁绒山羊育种中心(辽宁省辽阳市)。颈静脉采血, 所采血样均为 10 mL·只⁻¹, 用柠檬酸葡萄糖抗凝, -20℃冻存。用酚氯仿抽提法提取基因组 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。

济宁青山羊胎次的划分是: 实际第 1 胎($n=67$)、第 2 胎($n=75$)和第 3 胎($n=88$)分别作为 3 个胎次。根据当地山羊生产实际划分产羔季节: 产羔月份在 3~5 月的作为季节 1(春季) ($n=59$), 在 6~8 月的作为季节 2(夏季) ($n=55$), 在 9~11 月的作为

季节 3(秋季) ($n=65$), 在 12~2 月的作为季节 4(冬季) ($n=51$)。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、连接载体和感受态细胞等均购自北京天根生物技术有限公司, DNA 回收试剂盒购自北京博迈德科技发展有限公司。

1.3 引物设计

根据牛 *RIP140* 基因 mRNA 序列(GenBank 登录号: NC_007299)设计 6 对引物(P1~P6), 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。引物序列、扩增区域、产物大小和退火温度见表 1。

1.4 PCR 扩增和克隆测序

PCR 扩增体系为 25 μ L, 包括: 5 μ mol·L⁻¹ 引物 2.0 μ L; 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L; dNTPs 终浓度为 200 μ mol·L⁻¹; *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U; 50 ng· μ L⁻¹ DNA 模板 2.0 μ L; 20 mmol·L⁻¹ Mg²⁺ 1.5 μ L, 其余用超纯水补齐。6 对引物的 PCR 扩增条件: 95℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 退火 30 s(退火温度见表 1), 72℃延伸 30 s, 共 32 个循环; 最后 72℃延伸 7 min; 4℃保存。

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 Easy 载体连接, 并转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株, 酶切鉴定后阳性克隆在 3730 (ABI) 测序仪上测序。

1.5 PCR 产物酶切及基因分型

酶切的反应体系为 15 μ L: PCR 扩增产物 5 μ L, 限制性内切酶 *Alu* I 0.5 μ L, 10 \times 缓冲液 1.5 μ L, 加超纯水至 15 μ L, 37℃反应 5 h, 12%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺= 39: 1) 5 h, 电泳结束后, 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。

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 P6 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} 为产羔数的记录值; 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, $l=1, 2, 3$; e_{ijklm} 为随机残差效应。用 SAS (V8.12) 的 GLM (general linear model) 过程完成。

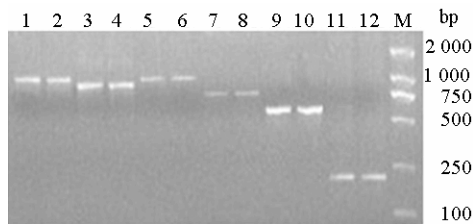
表 1 山羊 *RIP140* 基因 6 对引物序列、扩增区域、产物大小和退火温度

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	扩增区域 Amplified region	产物大小/bp Product size	退火温度/°C Annealing temperature
P1	F: GCGCGTTTCCCACCTGTCAGCGTA R: GTGACTGTGTCCGTTTCATCGGCTTA		1 022	65
P2	F: AGCCAGACCATAACCTAAGCCGATGA R: CCTATTGTGTGACTGCCGAATGC		923	64
P3	F: AGCCCTCTGCTAGCCAATAAAACAA R: CCTGGGTATGGAAATGTCTGCTGA	外显子 4 Exon 4	1 001	62
P4	F: TCTAAACGGACTGATGTGCGGTGCC R: TGCATACAGAAGGTGTCAACCAACC		764	65
P5	F: CTGTCTAATTACTGTGGAAGGTGAT R: GCTCTGCCTGATTTGTTGTGA		593	55
P6	F: TGAGTGAACCCTTGTCGTG R: GTCTTTCGCTTGCTACCTG		204	55

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

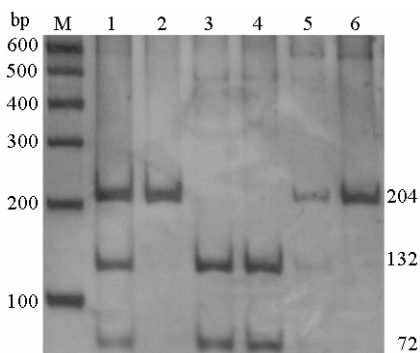
用 P1~P6 对 5 个山羊品种 *RIP140* 基因进行扩增, 所得 PCR 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明扩增片段与预期大小一致, 而且没有非特异扩增条带。引物 P1~P6 的扩增结果见图 1。



1,2: primer P1; 3,4: primer P2; 5,6: primer P3; 7,8: primer P4; 9,10: primer P5; 11,12: primer P6; M: 2000 bp DNA marker

图 1 6 对引物的 PCR 产物

Figure 1 PCR products of six pairs of primers



2,6:CC genotype; 1, 5: CT genotype; 3,4: TT genotype; M: 600 bp DNA marker

图 2 引物 P6 扩增片段的 RFLP 分析

Figure 2 RFLP analysis of PCR products of primer P6

2.2 引物 P6 扩增片段限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析

对引物 P6 在 5 个山羊品种中扩增的 PCR 产物用内切酶 *Alu* I 进行酶切, 根据电泳图和测序结果综合分析, 共有 3 种基因型: CC (204 bp)、CT (204/132/72 bp)、TT (132/72 bp) 结果见图 2。

2.3 P6 扩增片段序列分析

TT 基因型与 CC 基因型相比在第 822 位 (相对于 GenBank 登录号为 NC_007299 的牛 *RIP140* 基因序列的碱基位置) 发生了 C→T 突变 (图 3), 但没有导致氨基酸的改变。

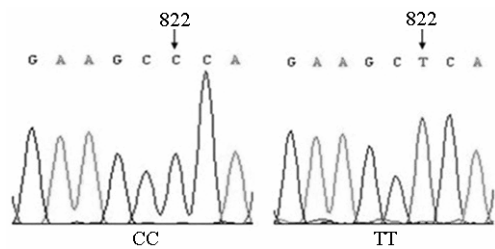


图 3 山羊引物 P6 中核苷酸突变位点

Figure 3 Nucleotide mutation of primer P6 in goats

2.4 *RIP140* 基因在不同山羊品种中的遗传多态性

以 5 个山羊品种基因型检测结果为依据, 统计了济宁青山羊、贵州白山羊、波尔山羊、内蒙古绒山羊和辽宁绒山羊 5 个山羊品种的基因型频率和等位基因频率见表 2。

2.5 山羊 *RIP140* 基因 CDS 序列同源性分析

用 NCBI 上的 ORF finder 软件结合牛 *RIP140* 基因的 mRNA 序列 (NC_007299) 和已获得的部分山羊 *RIP140* 基因序列预测山羊的 CDS 序列, 将其翻译为氨基酸序列, 和已发表的人 (NC_000021)、牛 (NC_007299)、大鼠 (NM_001100560)、小鼠

(NM_173440) 和马 (XM_001500588) 5 个物种的 *RIP140* 基因的 CDS 序列和氨基酸序列进行比对, 结果表明山羊与人、牛、马、大鼠、小鼠的 CDS 序列/氨基酸序列同源性分别为 84.11%/91.63%、93.83%/95.85%、85.27%/92.65%、78.69%/88.13%、84.11%/91.28%。可见, *RIP140* 基因在 6 个物种中 CDS 序列和氨基酸序列同源性较高, 此区域较为保

守。

2.6 *RIP140* 基因对济宁青山羊产羔数的影响

由表 3 可知, 对于引物 P6, 济宁青山羊 CC 型和 CT 型平均产羔数分别比 TT 型多 0.81 只 ($P < 0.05$) 和 0.65 只 ($P < 0.05$), CC 型比 CT 型多 0.16 只 ($P > 0.05$)。

表 2 5 个山羊品种 *RIP140* 基因的等位基因频率和基因型频率
Table 2 Allele and genotype frequencies of *RIP140* gene in five goat breeds

引物 Primer	频率 Frequency	济宁青山羊 Jining Grey goat	贵州白山羊 Guizhou hite goat	波尔山羊 Boer goat	内蒙古绒山羊 Inner Mongolia Cashmere goat	辽宁绒山羊 Liaoning Cashmere goat
	数量 Number	230	55	32	59	80
P6	基因型频率 Genotype frequency	CC 0.056(13)	0.018(1)	0.031(1)	0.000(0)	0.012(1)
		CT 0.309(71)	0.364(20)	0.500(16)	0.136(8)	0.338(27)
		TT 0.635(146)	0.618(34)	0.469(15)	0.864(51)	0.650(52)
	等位基因频率 Allele frequency	C 0.211	0.200	0.281	0.068	0.181
		T 0.789	0.800	0.719	0.932	0.819

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.

表 3 *RIP140* 基因不同基因型济宁青山羊产羔数的最小二乘均值及标准误

Table 3 Least squares mean and standard error for litter size of different genotypes of *RIP140* gene in Jining Grey goats

引物 Primer	基因型 Genotype	母羊数 Number of does	产羔数 Litter size
P6	CC	13	2.85 ^a ±0.18
	CT	71	2.69 ^a ±0.14
	TT	146	2.04 ^b ±0.12

注: 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 have no significant difference ($P > 0.05$). Least squares means with the different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

3 讨论

RIP140 是一个高效蛋白, 对核受体超家族的多个成员具有调节作用, 如: 雌激素、孕激素、糖皮质激素受体^[16]。*RIP140* 虽然可与许多核受体以及大量转录因子发生作用^[12-13], 然而其在导致卵泡破裂过程中发挥的作用仍有待确定。研究发现 *RIP140* 基因敲除小鼠能生存下去, 卵泡形态正常但是雌性表现为不孕, 原因是无排卵现象, 卵子被困在无扩张的卵丘卵母细胞复合体 (cumulus oocyte complex, COC) 中, 卵泡不发生破裂^[14]。COC 扩张^[15]、卵泡破裂在排卵中必不可少, 可见 *RIP140* 在卵泡破裂的信号通路中发挥重要作用。另外基因敲除小鼠胚胎移植和卵巢移植试验表明小鼠孕期延长, 胎儿和幼崽的死亡率增加, 证明 *RIP140* 蛋白对于小鼠排卵和维持妊娠都发挥着重要的作用^[15]。

大量研究表明基因多态性与繁殖性能存在一定的关系。Caballero 等^[16]发现 *RIP140* 基因敲除的雌性小鼠有许多特征与人类子宫内膜异位症相似, 因此他们选择该基因作为候选基因探索其与女性子宫内膜异位症的关系, 在 *RIP140* 基因编码区发现 6 个突变, 分别是 G512A、A949G、A1608G、C1629G、C2695T、G3522T, 其中 G512A、C1629G 在 NCBI 单核苷酸数据库中有记录 (rs2229741、rs2229742), 后 5 个突变导致氨基酸的变化, 分别是: His221Arg、Ile441Val、Arg448Gly、Ser803Leu、Val1079Phe。分析表明 Arg448Gly 位点与子宫内膜异位症有一定的相关性。Mendoza 等^[17]研究西班牙女性自然绝经年龄 (ANM) 时发现 *RIP140* 基因的 rs2229741 (A/G) 位点与女性更年期提前相关, AA 基因型自然绝经年龄较低。

本研究发现的 C822T 虽然是同义突变, 不引起

氨基酸的变化,但是其可能由于同一氨基酸对简并密码子的翻译效率不同,或转录水平的差异而导致蛋白质表达量上的改变^[18],进而对繁殖产生影响,关联分析初步表明 *RIP140* 基因的 C 等位基因可能具有增加山羊产羔数的作用,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] Cavallès V, Dauvois S, L'Horset F, et al. Nuclear factor *RIP140* modulates transcription activation by the estrogen receptor[J]. EMBO J, 1995, 14(15): 3741-3751.
- [2] 陈艳芳, 刘培庆, 汪煜华. 转录辅抑制因子 *RIP140* 在代谢组织中的作用及机制[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(6): 701-704.
- [3] 张锁, 侯丽辉, 吴效科. *RIP140* 在女性生殖和脂代谢中的作用[J]. 世界中西医结合杂志, 2008, 3(3): 183-184.
- [4] White R, Leonardsson G, Rosewell I, et al. The nuclear receptor co-repressor *nrip1 (RIP140)* is essential for female fertility [J]. Nat Med, 2000, 6(12): 1368-1374.
- [5] Christian M, Kiskinis E, Debevec D, et al. *RIP140*-targeted repression of gene expression in adipocytes[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(21): 9383-9391.
- [6] Seth A, Steel J H, Nichol D, et al. The transcriptional corepressor *RIP140* regulates oxidative metabolism in skeletal muscle [J]. Cell Metab, 2007, 6(3): 236-245.
- [7] Herzog B, Hallberg M, Seth A, et al. The nuclear receptor cofactor, receptor-interacting protein 140, is required for the regulation of hepatic lipid and glucose metabolism by liver X receptor [J]. Mol Endocrinol, 2007, 21(11): 2687-2697.
- [8] Zschiedrich I, Hardeland U, Krones-Herzig A. Coactivator function of *RIP140* for NFκB/RelA-dependent cytokine gene expression [J]. Blood, 2008, 112(2): 264-276.
- [9] Leonardsson G, Jacobs M A, White R. Embryo transfer experiments and ovarian transplantation identify the ovary as the only site in which nuclear receptor interacting protein 1/*RIP140* action is crucial for female fertility [J]. Endocrinology, 2002, 143(2): 700-707.
- [10] 《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.
- [11] Malan S W. The improved Boer goat[J]. Small Ruminant Research, 2000, 36(2): 165-170.
- [12] Christian M, White R, Parker M G. Metabolic regulation by the nuclear receptor corepressor *RIP140*[J]. Trends Endocrinol Metab, 2006, 17(6): 243-250.
- [13] White R, Morganstein D, Christian M, et al. Role of *RIP140* in metabolic tissues: connections to disease[J]. FEBS Lett, 2007, 582(1): 39-45.
- [14] Tullet J M, Pocock V, Steel J H, et al. Multiple signaling defects in the absence of *RIP140* impair both cumulus expansion and follicle rupture[J]. Endocrinology, 2005, 146(9): 4127-4137.
- [15] Leonardsson G, Steel J H, Christian M, et al. Nuclear receptor corepressor *RIP140* regulates fat accumulation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(22): 8437-8442.
- [16] Caballero V, Ruiz R, Sainz J A, et al. Preliminary molecular genetic analysis of the Receptor Interacting Protein 140 (*RIP140*) in women affected by endometriosis[J]. J Exp Clin Assist Reprod, 2005, 2:11.
- [17] Mendoza N, Sánchez-Borrego R, Galiano D, et al. Multi-genic combination of estrogen-related genes is associated with age at natural menopause in a Spanish population[J]. Menopause Int, 2009, 15(4): 150-156.
- [18] 吴宣富, 何玉琴, 张现伟, 等. 家族性偏头痛家系中发现的 *CACNA1A* 基因同义突变[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2008, 34(5): 296-299.