

小尾寒羊 *AA-NAT* 基因克隆及其与繁殖性能的关系

孙晓笛¹, 储明星^{2*}, 王永娟¹, 黄冬维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 *AA-NAT* 基因 DNA 序列和绵羊该基因 mRNA 序列, 设计 5 对引物 (P1~P5), 每对引物分别扩增随机选取的 8 只小尾寒羊, PCR 产物克隆测序, 序列拼接获得小尾寒羊 *AA-NAT* 的 DNA 序列, 总长为 2 138 bp。序列比对发现 P3 的扩增产物中存在 C617T 的沉默突变。根据获得的小尾寒羊 *AA-NAT* 基因的 DNA 序列设计引物 P6, 利用 PCR-RFLP 技术分别在常年发情绵羊品种 (小尾寒羊、白杜泊) 和季节性发情绵羊品种 (滩羊、萨福克和特克塞尔) 中检测该位点的多态性。结果发现引物 P6 扩增片段在滩羊、萨福克和特克塞尔中均检测到 CC、CT 和 TT 3 种基因型, 在小尾寒羊和白杜泊中只检测到 CC 和 CT 2 种基因型; 该突变位点不同基因型分布在常年发情绵羊品种和季节性发情绵羊品种间存在显著差异 ($P < 0.05$); 小尾寒羊 CC 和 CT 基因型频率分别为 0.24 和 0.76, CC 型母羊平均产羔数比 CT 型多 0.48 只 ($P < 0.01$)。本研究结果初步表明, *AA-NAT* 基因 617 位点与绵羊的常年发情可能存在一定关联, C 等位基因可能是提高绵羊产羔数的一个潜在有效的标记。

关键词: 小尾寒羊; *AA-NAT* 基因; 常年发情; 产羔数; PCR-RFLP

中图分类号: S826

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)05-0739-07

Cloning of *AA-NAT* gene and its association with reproductive performance in Small Tail Han Sheep

SUN Xiao-di¹, CHU Ming-xing², WANG Yong-juan¹, HUANG Dong-wei², 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 AA-NAT* DNA sequence and sheep *AA-NAT* mRNA sequence, five pairs of primers (P1 to P5) were designed to amplify the whole DNA sequence of the *AA-NAT* gene in eight randomly selected individuals from Small Tail Han sheep. Through DNA sequencing and sequence assembly, a 2 138 bp DNA sequence was obtained. Meanwhile, one nucleotide transition (C617T) was identified in *AA-NAT* gene of Small Tail Han sheep. According to the obtained DNA sequence of the *AA-NAT* gene in Small Tail Han sheep, primer P6 was designed to detect C617T mutation of *AA-NAT* gene in year-round estrous sheep breeds (Small Tail Han and White Dorper sheep) and seasonal estrous sheep breeds (Tan, Suffolk and Texel sheep) by PCR-RFLP. The results showed that three genotypes (CC, CT and TT) were detected in Tan, Suffolk and Texel sheep and only two genotypes (CC and CT) were detected in Small Tail Han and White Dorper sheep. There were significant differences ($P < 0.05$) in genotype distribution between year-round estrus and seasonal estrus sheep breeds. In Small Tail Han sheep, genotype frequency of CC and CT was 0.24 and 0.76, respectively. And the Small Tail Han ewes with genotype CC had 0.48 ($P < 0.01$) lambs more than those with genotype CT. The present study preliminarily indicated that there may be some association between the 617 locus of *AA-NAT* gene and year-round estrus in sheep, and allele C of *AA-NAT* gene is a potential marker for improving litter size in sheep.

Key words: Small Tail Han sheep; *AA-NAT* gene; year-round estrus; litter size; PCR-RFLP

收稿日期: 2012-04-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101687), 国家现代肉羊产业技术体系建设专项资金(CARS-39)和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(2011cj-7)共同资助。

作者简介: 孙晓笛, 女, 硕士研究生。E-mail: sunxiaodi142@163.com

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

家畜的常年发情蕴藏着巨大的经济价值,遗传和环境因素共同影响动物的发情。环境因素包括食物供应、气温和光照周期等,其中光照周期是协调动物季节性发情与环境条件同步变化的主要环境因子,而松果腺分泌的褪黑激素则在这个光周期感受过程中处于神经内分泌调控系统的中枢位置^[1-2]。芳基烷基胺-N-乙酰转移酶(arylalkylamine-N-acetyltransferase, AA-NAT)是合成褪黑激素(melatonin, MLT)的关键调控酶^[3],故AA-NAT可能与动物的发情有着一一定的联系。

研究发现,MLT对生殖的调节有直接与间接两种途径。直接调节可作用于性腺,调节性腺分泌生殖激素^[4];MLT还可以作用于垂体前叶,调节垂体释放蛋白类激素,间接影响性腺分泌生殖激素^[5]。大量研究证实,MLT对绵羊的生殖系统有促进作用^[6-7]。短日照促进MLT的分泌,使LH脉冲式分泌频率增加,而LH脉冲频率是控制卵巢活动的重要内源性激素信号,从而使MLT成为联系外界环境和机体季节性繁殖的纽带^[8]。研究藏黄牛AA-NAT基因的序列发现,该基因的表达序列及编码氨基酸与亲缘关系较远的牦牛一致,而与亲缘关系较近的普通黄牛却有一定差异,这种差异可能与繁殖的季节性有关^[9]。AA-NAT的活性与MLT的合成分泌节律保持一致,任何影响AA-NAT基因表达的AA-NAT基因多态性都可能会造成个体间MLT的合成和分泌量的差别,并与MLT节律水平相关^[10-11],因此对绵羊AA-NAT基因多态性进行研究很有意义。

牛AA-NAT基因位于19号染色体,基因全长1843 bp,包括4个外显子和3个内含子,其中外显子1不翻译,其余3个外显子大小依次为240、155和445 bp,共编码207个氨基酸。人、大鼠、小鼠、猕猴、牛、绵羊的AA-NAT基因cDNA先后被分离和克隆,GenBank登录号分别为NM_001088、NM_012818、NM_009591、NM_001047127、NM_177509、NM_001009461。物种间AA-NAT基因序列的差异小,不同物种间氨基酸相似性为77%~96.1%,其中大鼠与小鼠的最高为96.1%,牛与绵羊的次之,为94.2%。

小尾寒羊^[12]和杜泊绵羊^[13]四季发情,滩羊^[12]、萨福克^[14]和特克塞尔^[15]均为季节性发情品种,其平均产羔数分别为2.61^[12]、1.52^[16]、1.02^[12]、1.41^[17]、1.41^[18]。本研究采用克隆测序获得小尾寒羊AA-NAT的DNA序列和多态信息,然后通过聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism,

PCR-RFLP)技术分析AA-NAT基因多态位点在上述5个绵羊品种中的基因型分布,并且对多态位点与小尾寒羊产羔数进行相关分析,旨在寻找与常年发情相关的遗传标记,为绵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2010年产羔的212只小尾寒羊母羊,记录其胎次、产羔月份和产羔数,这些小尾寒羊母羊血样以及43只成年白杜泊母羊血样均采自北京市昌平区北京盛世富民清真食品有限责任公司。43只成年萨福克母羊和46只成年特克塞尔母羊血样采自北京市顺义区北京奥鑫牧业有限公司;48只成年滩羊母羊血样采自宁夏盐池县滩羊选育场。均随机采样,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 buffer(10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl [pH 8.0], 1 mmol·L⁻¹ EDTA [pH 8.0]),4℃保存。

近些年来对小尾寒羊的产羔数或其它繁殖性状都没有进行选择。随机选择的212只小尾寒羊母羊是5只公羊的后代,其数目分别为40、41、43、43和45只。小尾寒羊胎次的划分是:实际第1胎($n=67$)、第2胎($n=70$)和第3胎($n=75$)分别作为3个胎次。产羔季节的划分是:产羔月份在3~5月的作为季节1(春季)($n=44$),在6~8月的作为季节2(夏季)($n=61$),在9~11月的作为季节3(秋季)($n=70$),在12~2月的作为季节4(冬季)($n=37$)。

1.2 引物设计

利用Primer Premier 5.0和Oligo 6.0软件,根据牛AA-NAT基因的DNA序列(GenBank登录号:NC_007317)和绵羊AA-NAT基因的mRNA序列(GenBank登录号:NM_001009461),设计5对引物(P1~P5)扩增小尾寒羊AA-NAT基因的DNA序列,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,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,其中2×Taq PCR Master Mix 10 μL(Biomed,北京),上下游引物各0.5 μL(10 μmol·L⁻¹),50 ng·μL⁻¹ DNA模板1.0 μL,去离子水8 μL。

1.4 克隆测序

PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶检测后,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, 选择阳性克隆, 送至北京六合华大基因科技股份有限公司测序。每

个片段中选 8 个菌样进行测序, 然后将所测序列进行比对, 找出差异碱基。

表 1 小尾寒羊 *AA-NAT* 基因 PCR 扩增的引物序列、扩增区域、片段长度及退火温度

引物 Primer	引物序列 (5'→3')	扩增区域 Amplified region	片段长度/bp Fragment size	退火温度/°C Annealing temperature
P1	F:CAGCCAGCCACTGTAATCCTCC R:TCCTCCTGCTCTGTGCCCTTCTC	5'侧翼序列及外显子 1 5'flank region and exon 1	493	62
P2	F:TGGCTCTGTGGGGGAACATTAG R:TCGTCCAGATTCAGGGGCGAGTT	外显子 1→外显子 3 Exon 1→Exon 3	967	59
P3	F:CGGCGTGTGTTGAGATTGAGCGAG R:GAAGGTCAGTGAGCCCACGACGA	外显子 2→外显子 4 Exon 2→Exon 4	1 055	67
P4	F:GACTCGTGTCCACCCCTCG R:GCCGCCCTGCTCTCTCTTT	内含子 3→外显子 4 Intron 3→Exon 4	500	56
P5	F:CAGCAAGGCAAGGGCTCCGT R:CTCATTCTCCCCGTTCCACCATC	外显子 4 Exon 4	367	66

1.5 RFLP 分析及基因分型

经序列比对, 发现在 *AA-NAT* 基因第 617 位(相对于 GenBank 登录号为 NC_001009461 的绵羊 *AA-NAT* 基因 mRNA 序列的碱基位置)发生了 C→T 突变(该位点在 8 个测序菌样中有 5 个菌样测序为 C, 3 个测序为 T)。设计引物 P6, 扩增经序列拼接得到的小尾寒羊 *AA-NAT* DNA 序列上 1729~2052 的片段。其中上游引物序列为:

5'GCTCCGTCCTGCTCTGGCTCTAC3'

下游引物序列为:

5'AATCACCGTCTCCCTTCAGACCAA 3'

退火温度为 59°C。扩增的 324 bp 的片段用限制性内切酶 *BsiHKA I* 进行酶切。

酶切反应体系为 10 μL, 其中包括 1 μL 10× NEB Buffer 4、0.1 μL 100×BSA、0.4 μL 内切酶 *BsiHKA I* (10 U·μL⁻¹, NEB, 识别序列为 5'-GWGCW/C-3')、4 μL PCR 产物(引物为 P6)和 4.5 μL 灭菌双蒸水。65°C 温育 10 h, 然后用 2%琼脂糖凝胶电泳检测。用凝胶成像仪 AlphaImager™ 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, 比较小尾寒羊产羔数在不同基因型之间的差异:

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

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 ($i=1, 2, 3, 4, 5$); LS_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 ($l=1, 2$); 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

用引物 P1~P5 对小尾寒羊 *AA-NAT* 基因进行扩增, 所得 PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)。结果表明扩增片段与预期大小一致, 且特异性好。

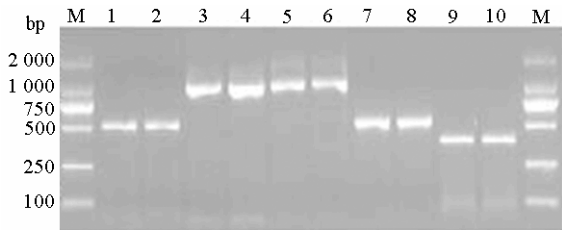
2.2 序列分析

用引物 P1、P2、P3、P4、P5 进行 PCR 扩增得到 5 个片段, 测序后经序列拼接获得一条长 2 138 bp 的 DNA 片段, 包括小尾寒羊 *AA-NAT* 基因的部分 5'侧翼序列 (200 bp) 和全部外显子和内含子序列 (1 938 bp)。该序列和牛 *AA-NAT* DNA 序列的同源性为 89.52%。

用 ORF finder 软件结合 NCBI 上公布的绵羊 *AA-NAT* 基因的 mRNA 序列 (GenBank 登录号: NM_001009461) 和本研究获得的小尾寒羊 *AA-NAT* 基因的 DNA 序列, 预测小尾寒羊该基因的 ORF 序列为 624 bp, 编码 207 个氨基酸, 该基因编码的蛋白质属于 NAT-SF 家族。将得到的小尾寒羊 *AA-NAT* 基因的 ORF 序列和氨基酸序列与褐家鼠 (NC_005109)、人 (NC_000017)、牛 (NC_000176)、小鼠 (NC_000077) 4 个物种的 *AA-NAT* 基因的 ORF

序列和氨基酸序列进行同源性分析, 结果表明绵羊与褐家鼠、人、牛、小鼠 4 个物种的 ORF 序列同源性分别为 80.45%、83.49%、95.35%和 80.93%, 而氨基酸序列同源性分别为 77.29%、77.29%、94.20%和 77.78%。可见, *AA-NAT* 基因在牛和绵羊中 ORF 序列和氨基酸序列同源性较高。

用 Computer pI/Mw 程序预测小尾寒羊 *AA-NAT* 蛋白分子量约为 23.06 kDa, 理论等电点为 8.57。用 Signal P 3.0 预测小尾寒羊 *AA-NAT* 蛋白 N 末端不含信号肽, 是一种可溶性蛋白, 也无跨膜区。ProtScale 程序预测 *AA-NAT* 的疏水性图谱, 可知该蛋白含有 2 个主疏水区, 分别是 2-72 位、98-137 位。PSORT II 程序预测小尾寒羊 *AA-NAT* 蛋白在细胞质中定位的可能性是 89%, 其次可能定位在细胞核、囊泡分泌系统、内质网等部位。转录后修饰预测 (<http://au.expasy.org/tools>) 结果见图 2。



1,2: primer P1; 3,4: primer P2; 5,6: primer P3; 7,8: primer P4; 9,10: primer P5; M: DNA Marker 2000 (TIANGEN, Beijing)

图 1 P1~P5 引物的 PCR 产物

Figure 1 PCR products of P1-P5 primers

1 **MSIPSV**HCLK PSPLHLPSGI PGSPGRQRH
 31 TLPANEFRCL PEDAAGVFE IEREAFISVS
 61 GNCPLNLDEV QHFLLCPSEL SLGWFVEGRL
 91 VAFIIGSLWD EERLDESLA LHRPGGRSAH
 121 LHVLAVHRSF RQQGKGSVLL WRYLHHVGAQ
 151 PAMRRRAVLMC EDALVPFYQR FGFHPAGPCA
 181 IVVGSLTFTE MHCSLRGHAA LRRNSDR

图 2 小尾寒羊 *AA-NAT* 蛋白转录后修饰预测结果
 Figure 2 The prediction result of post-translation modification of *AA-NAT* protein in Small Tail Han sheep

图 2 中 S 和 T 代表 GalNAc O-糖基化位点。圆圈指示的丝氨酸和苏氨酸残基代表磷酸化的丝氨酸和苏氨酸残基位点。下划线代表蛋白激酶磷酸化位点。长方形指示的代表 NetAcet 软件预测的 N-乙酰基的底物。

将得到的小尾寒羊 *AA-NAT* 基因编码的氨基酸序列进行结构域的预测, 发现它有 UTRA、BEN 和 PTNI 3 个结构域, 分别位于 23-152、88-160 和 105-206 位。其中 UTRA 域是一个与转录调控相关的保守的配体结合域, 调节与之结合的小分子转录因子的活性。BEN 域介导组织中 DNA 与蛋白质和蛋白质与蛋白质之间的相互作用和转录过程。PTNI 域由底物同源域和磷酸结合域组成, 其中磷酸结合域可以在水分子的协调下, 介导丝氨酸和苏氨酸残基的相互作用。

用 TFSearch 软件预测 *AA-NAT* 基因 5'非编码区的转录因子结合位点, 结果见图 3。

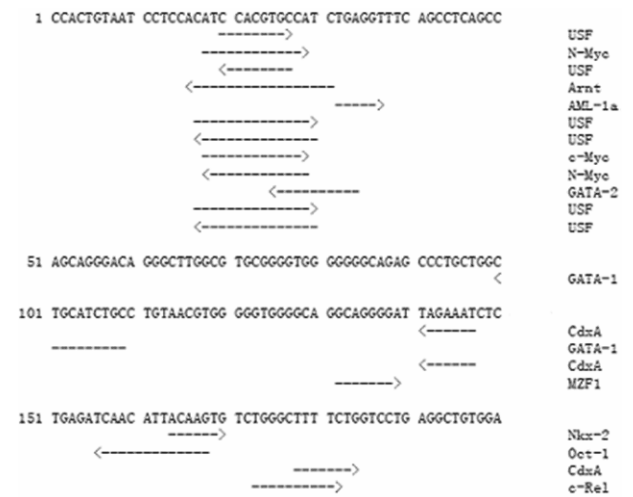


图 3 小尾寒羊 *AA-NAT* 基因 5'非编码区可能的转录因子结合位点

Figure 3 The prediction result of transcription factor binding sites in 5'noncoding region in *AA-NAT* gene of Small Tail Han sheep

分析这些转录因子的功能, 发现部分转录因子 (USF、GATA 等) 与动物的繁殖活动密切相关。例如, 邹东霆等^[19]在研究转录因子上游刺激因子在大鼠不同组织中的分布时发现, 在卵巢组织中, USF1 在发育卵泡和闭锁卵泡中均为强阳性表达, USF2 则在闭锁卵泡中强阳性表达, 在发育卵泡中表达较弱, 说明转录因子 USF 与卵泡的发育有关。研究发现, GATA 家族在动物生殖细胞系的分化和生殖过程中各激素的调节上都有着必不可少的作用^[20-21], GATA-4 有助于性腺分化的启动和性腺的发育成熟^[22], 而 GATA 因子的大量结合会诱导 GnRH 大量分泌, 进而直接影响 FSH 和 LH 等激素的分泌^[21]。此外, Myc 与动物生长和发育的调控也有关系^[23]。

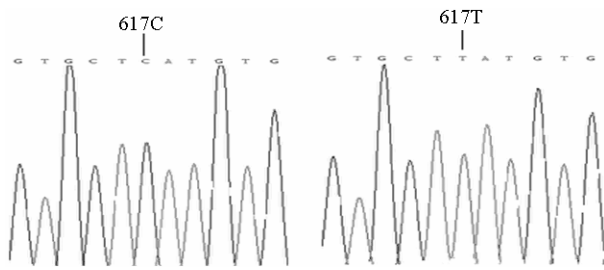


图 4 小尾寒羊 *AA-NAT* 基因 617 位点核苷酸突变

Figure 4 Nucleotide mutation at locus 617 in Small Tail Han sheep *AA-NAT* gene

2.3 核苷酸突变分析

用 5 对引物(P1~P5)扩增小尾寒羊基因组并测序分析, 结果在 P3 的扩增产物上发现 1 个突变位点 C617T (位点参照 NCBI 公布的绵羊 mRNA 序列)。CT 基因型与 CC 基因型相比在第 617 位发生了 C→T 突变, 但没有导致氨基酸改变, 为沉默突变 (图 4)。

2.4 引物 P6 扩增片段 RFLP 分析

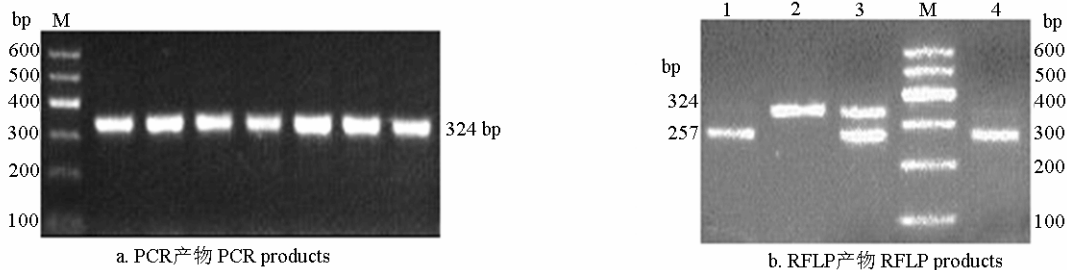
对测序发现的 617 位点处的 C→T 突变, 设计

引物 P6, 对扩增产物(见图 5a)用限制性内切酶 *BsiHKA I* 在小尾寒羊、白杜泊、滩羊、萨福克和特克塞尔 5 个绵羊品种中进行 RFLP 检测, 如图 5b 所示, 共有 3 种基因型: CC(257/67 bp)、CT(324/257/67 bp)、TT (324 bp)。

2.5 *AA-NAT* 基因在不同绵羊品种中的遗传多态性

AA-NAT 基因的这个突变位点在 5 个绵羊品种中的等位基因频率及基因型频率见表 2。P6 扩增片段在滩羊、萨福克和特克塞尔中均检测到 CC、CT 和 TT 型, 在小尾寒羊和白杜泊中仅检测到 CC 和 CT 型。CT 基因型在各品种中都处于优势。除特克塞尔外, C 等位基因都是优势等位基因。

经检验, 除滩羊外, 其它 4 个绵羊品种在该位点均处于哈迪-温伯格不平衡状态 (小尾寒羊: $\chi^2=79.45$, $P=0.000$; 白杜泊: $\chi^2=7.22$, $P=0.027$; 滩羊: $\chi^2=2.09$, $P=0.351$; 萨福克: $\chi^2=12.93$, $P=0.002$; 特克塞尔: $\chi^2=7.94$, $P=0.02$)。



Bands 1 and 4: CC genotype; Band 2: TT genotype; Band 3: CT genotype; M: DNA Marker I

图 5 引物 P6 扩增产物的电泳分析

Figure 5 Electrophoresis analysis of amplification products with primer P6

表 2 5 个绵羊品种中 *AA-NAT* 基因 SNP 的等位基因及基因型频率

Table 2 Allele and genotype frequencies of the SNP in *AA-NAT* in five sheep breeds

项目 Item		小尾寒羊 Small Tail Han sheep	白杜泊 White Dorper	滩羊 Tan sheep	萨福克 Suffolk	特克塞尔 Texel
数量 Number		212	43	48	43	46
基因型频率 Genotype frequency	CC	0.24(51)	0.42(18)	0.21(10)	0.16(7)	0.09(4)
	CT	0.76(161)	0.58(25)	0.60(29)	0.77(33)	0.69(32)
	TT	0(0)	0(0)	0.19(9)	0.07(3)	0.22(10)
等位基因频率 Allele frequency	C	0.62	0.71	0.51	0.55	0.43
	T	0.38	0.29	0.49	0.45	0.57
H-W test	χ^2	79.45***	7.22*	2.09	12.93**	7.94*

括号内的数字是个体数 The numbers in the brackets are the individuals that belong to the respective genotypes.

2.6 不同绵羊品种中 *AA-NAT* 基因型分布检测

对 617 位点的不同基因型在 5 个绵羊品种中的分布进行差异性检验 (见表 3)。结果表明, 617 突变位点的基因型频率在常年发情的绵羊品种 (小尾寒羊和白杜泊) 和季节性发情的绵羊品种 (滩羊、

萨福克和特克塞尔) 之间差异显著 ($P<0.05$), 小尾寒羊和白杜泊之间差异不显著 ($P>0.05$), 滩羊、萨福克以及特克塞尔三者之间也无显著差异 ($P>0.05$), 表明该突变位点可能和绵羊的常年发情有关。

表 3 AA-NAT 基因 617 位点在 5 个绵羊品种中的基因型分布差异

Table 3 Test of difference of the 617 locus genotype distributions of AA-NAT in five sheep breeds

品种 Breed	小尾寒羊 Small Tail Han sheep	白杜泊 White Dorper	滩羊 Tan sheep	萨福克 Suffolk
白杜泊 White Dorper	5.74			
滩羊 Tan sheep	41.21***	11.34**		
萨福克 Suffolk	15.74***	8.94*	3.52	
特克塞尔 Texel	50.48***	19.69***	2.73	4.51

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

表 4 AA-NAT 基因不同基因型小尾寒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 in AA-NAT gene in Small Tail Han sheep

座位 Locus	基因型 Genotype	母羊数 Number of ewes	产羔数 Litter size
617	CC	51	2.51 ^a ±0.14
	CT	161	2.03 ^b ±0.09

注：具有不同字母肩标的平均值间差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: Least squares means with the different superscripts differ significantly ($P < 0.01$).

2.7 固定效应对小尾寒羊产羔数的影响

方差分析结果表明公羊、产羔季节、胎次对小尾寒羊产羔数都有显著影响(均为 $P < 0.05$)。AA-NAT 基因不同基因型小尾寒羊产羔数的最小二乘均值与标准误见表 4。

由表 4 可知,对于 617 位点,小尾寒羊 CC 型母羊平均产羔数比 CT 型多 0.48 只 ($P < 0.01$),2 种基因型个体间产羔数差异极显著。

3 讨论

季节性繁殖动物对光照的敏感性主要是通过 MLT 进行调控,MLT 能刺激短日照动物(如绵羊和鹿等)的繁殖活动^[24]。MLT 可作用于性腺,调节性腺分泌生殖激素^[4],还能改变黄体细胞和卵巢颗粒细胞的细胞形态^[25-26]。MLT 也可以通过调节雌二醇(E2)对垂体的负反馈来间接影响 FSH 和 LH 的分泌^[5]。除了对生殖系统有调节功能外,近年发现,MLT 还有镇静、催眠^[27]、抗衰老^[28]、免疫兴奋^[29]、调节内分泌^[30]的功能等。

本研究中,选择调节 MLT 合成的关键限速酶 AA-NAT 为研究对象,选择对光照比较敏感的常年发情和季节性发情的绵羊品种,旨在探究该基因在不同发情季节的绵羊品种中存在的差异,找出与发情性状相关的分子标记。通过克隆得到了小尾寒羊 AA-NAT 的 DNA 序列,总长 2 138 bp,将其进行 BLAST 同源序列分析,其外显子与绵羊的 mRNA 匹配率为 97.30%,表明所得序列正确。通过对 AA-NAT 基因的多态性进行检测,在外显子 4 上发现 1 个突变位点,但没有改变氨基酸序列。虽为同义突变,但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^[31],进而对繁殖产生影响。对这个突变位点不同基因型在 5 个绵羊品种中的分布进行差异性检验,结果在小尾寒羊和白杜泊中只检测到 CC 和 CT 两种基因型,可能的原因是:TT 基因型绵羊趋向于季节性发情,繁殖率低,在长期的自然选择中被淘汰,也可能是检测的样本数还不够多。推测 AA-NAT 基因 617 位点可能与绵羊的常年发情有某些关联,同时关联分析初步表明该位点的 C 等位基因可能具有增加绵羊产羔数的作用,可能是提高绵羊产羔数的一个潜在有效的标记。

本研究中小尾寒羊的样本都来自同一个羊场,所以个体间可能存在一定亲缘关系。另外,小尾寒羊数量也明显多于其它几个品种,这将影响到被测绵羊的有效群体大小和最终检测到的关联程度的意义。因此,本研究的结论只是初步的,值得增加绵羊品种数、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] Reiter R J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions [J]. *Endocr Rev*, 1991, 12(2):151-180.
- [2] Olcese J. The mammalian pineal gland and reproduction. Controversies and strategies for future research [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1995, 377(1): 1-14.
- [3] Blomeke B, Golka K, Griefahn B, et al. Arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT) genotype as a personal trait in melatonin synthesis[J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2008, 71(13-14): 874-876.
- [4] Sanchez-Barcelo E J, Mediavilla M D, Zinn S A, et al. Melatonin suppression of mammary growth in heifers[J]. *Biol Reprod*, 1991, 44(5): 875-879.

- [5] Recio J, Mediavilla M D, Cardinali D P, et al. Pharmacological profile and diurnal rhythmicity of 2-[125I]-iodomelatonin binding sites in murine mammary tissue [J]. *J Pineal Res*, 1994, 16(1):10-17.
- [6] English J, Poulton A L, Arendt J, et al. A comparison of the efficiency of melatonin treatments in advancing oestrus in ewes [J]. *J Reprod Fertil*, 1986, 77(2): 321-327.
- [7] Kennaway D J, Gilmore T A, Seamark R F. Effect of melatonin feeding on serum prolactin and gonadotropin levels and the onset of seasonal estrous cyclicity in sheep[J]. *Endocrinology*, 1982, 110(5):1766-1772.
- [8] Chemineau P, Martin G B, Saumande J, et al. Seasonal and hormonal control of pulsatile LH secretion in the dairy goat (*Capra hircus*) [J]. *J Reprod Fertil*, 1988, 83(1): 91-98.
- [9] 陈朝坚, 雷申, 文勇立, 等. 藏黄牛褪黑激素合成酶 *AA-NAT* 基因 cDNA 克隆及序列的比较分析[J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2010, 36(2): 220-225.
- [10] Roseboom P H, Coon S L, Baler R, et al. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland [J]. *Endocrinology*, 1996, 137(7): 3033-3045.
- [11] Klein D C, Roseboom P H, Coon S L. New light is shining on the melatonin rhythm enzyme: the first postcloning view [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 1996, 7(3):106-112.
- [12] 《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: 45-48; 50-52.
- [13] Elias E, Cohen D, Dayenoff P. Characteristics and indices of reproduction in Dorper sheep[J]. *J S Afr Vet Assoc*, 1985, 56(3): 127-130.
- [14] Robinson J E, Karsch F J. Refractoriness to inductive day lengths terminates the breeding season of the Suffolk ewe[J]. *Biol Reprod*, 1984, 31(4): 656-663.
- [15] Mandiki S N, Bister J L, Paquay R. Effects of suckling mode on endocrine control of reproductive activity resumption in Texel ewes lambing in July or November[J]. *Theriogenology*, 1990, 33(2): 397-413.
- [16] Cloete S W, Snyman M A, Herselman M J. Productive performance of Dorper sheep[J]. *Small Rumin Res*, 2000, 36(2): 119-135.
- [17] Abdulkhaliq A M, Harvey W R, Parker C F. Genetic parameters for ewe productivity traits in the Columbia, Suffolk and Targhee breeds [J]. *Journal of Animal Science*, 1989, 67(12): 3250-3257.
- [18] Casas E, Freking B A, Leymaster K A. Evaluation of Dorset, Finnsheep, Romanov, Texel, and Montadale breeds of sheep: II. Reproduction of F1 ewes in fall mating seasons [J]. *Journal of Animal Science*, 2004, 82(5): 1280-1289.
- [19] 邹东霆, 李冰, 付欣, 等. 转录因子上游刺激因子在大鼠不同组织中的分布[J]. 广州医学院学报, 2010, 38(3): 28-31.
- [20] Tremblay J J, Viger R S. GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(3): 977-986.
- [21] Vaskivuo T E, Anttonen M, Herva R, et al. Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(7): 3421-3429.
- [22] Li J, Chen W, Wang D, et al. GATA4 is involved in the gonadal development and maturation of the teleost fish tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *J Reprod Dev*, 2011, doi: 10.1262/jrd.11-131S.
- [23] Schreiber-Agus N, Stein D, Chen K, et al. Drosophila Myc is oncogenic in mammalian cells and plays a role in the diminutive phenotype[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(4):1235-1240.
- [24] 郭玉强, 蔡国宝, 刘艳婷, 等. 褪黑激素对绵羊季节性繁殖的调控机理[J]. 甘肃畜牧兽医, 2008, 38(1): 43-46.
- [25] Pang S F, Li L, Ayre E A, et al. Neuroendocrinology of melatonin in reproduction: recent developments[J]. *J Chem Neuroanat*, 1998, 14(3/4): 157-166.
- [26] 夏银, 汪兴生, 杨利国, 等. 褪黑激素主动免疫对蛋鸡生殖内分泌的影响[J]. 南京农业大学学报, 1996, (3): 75-78.
- [27] 付良青, 骆传环. 新型催眠药褪黑素的展望[J]. 国外医学药学分册, 1996, 23(4): 224-227.
- [28] 沈玉先, 岑德意, 魏伟, 等. 松果腺及褪黑素与衰老[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(5): 387-390.
- [29] Drazen D L, Klein S L, Yellon S M, et al. In vitro melatonin treatment enhances splenocyte proliferation in prairie voles[J]. *J Pineal Res*, 2000, 28(1): 34-40.
- [30] Gilad E, Laudon M, Matzkin H, et al. Evidence for a local action of melatonin on the rat prostate[J]. *J Urol*, 1998, 159(3): 1069-1073.
- [31] 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.