

绵羊抑制素 A 基因外显子 1 多态性及其与高繁殖力关系的研究

姜庆林^{1,2}, 储明星^{3*}, 陈国宏^{1*}, 方丽³, 狄冉³, 刘秋月³

(1. 扬州大学动物科技学院, 扬州 225009; 2. 广东省家禽科学研究所, 广州 510520;

3. 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: 采用 PCR-SSCP 技术检测抑制素 A (inhibin A, *INHA*) 基因外显子 1 在高繁殖力绵羊品种 (小尾寒羊和湖羊) 和低繁殖力绵羊品种 (多赛特羊、特克塞尔羊和德国肉用美利奴羊) 中的单核苷酸多态性, 同时研究该基因对小尾寒羊高繁殖力的影响。结果表明, 在所有 5 个绵羊品种中都存在 2 种基因型 (AA 和 AB)。高繁殖力的小尾寒羊和湖羊等位基因 B 的频率分别为 0.21 和 0.47, 低繁殖力的多赛特、特克塞尔和德国肉用美利奴 3 个绵羊品种 B 等位基因频率分别为 0.07、0.10 和 0.02。测序表明 AB 型和 AA 型相比在 *INHA* 基因外显子 1 中第 877 位发生 T→C 的碱基突变。独立性检验表明高繁殖力绵羊品种与低繁殖力绵羊品种之间 *INHA* 基因型分布差异显著 ($P<0.05$)。AB 型小尾寒羊平均产羔数比 AA 型多 0.57 只 ($P<0.01$)。

关键词: 绵羊; 高繁殖力; 抑制素 A 基因; PCR-SSCP

中图分类号: S826.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)06-0945-05

Polymorphism of exon 1 of *INHA* gene and its relationship with prolificacy in sheep

JIANG Qing-lin^{1,2}, CHU Ming-xing³, CHEN Guo-hong¹, FANG Li³, DI Ran³, LIU Qiu-yue³

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

2. Poultry Science Institute of Guangdong Province, Guangzhou 510520;

3. 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: Inhibin A (*INHA*) gene was studied as a candidate gene for the prolificacy of Small Tail Han sheep. Single nucleotide polymorphism of exon 1 of *INHA* gene was detected in both high fecundity breeds (Small Tail Han and Hu sheep) and low fecundity breeds (Dorset, Texel and German Mutton Merino sheep) by PCR-SSCP. Results indicated that there were two genotypes (AA and AB) in all five sheep breeds tested. Frequency of allele B was 0.21 and 0.47 in prolific Small Tail Han and Hu sheep, respectively. Frequency of allele B was 0.07, 0.10 and 0.02 in Dorset, Texel and German Mutton Merino sheep, respectively. Sequencing revealed a T→C mutation at 877 bp of exon 1 of *INHA* gene in the AB genotype in comparison to the AA genotype. The *INHA* genotype distributions were significantly different ($P<0.05$) among high fecundity sheep breeds and low fecundity sheep breeds. The Small Tail Han ewes with heterozygous genotype AB had 0.57 ($P<0.01$) lambs more than those with genotype AA.

Key words: sheep; prolificacy; *INHA* gene; PCR-SSCP

抑制素是一种糖蛋白激素, 能有效抑制垂体促卵泡素的合成与分泌。性腺是体内抑制素的主要来源^[1]。Mason 等^[2]已鉴别出 2 种抑制素, 具有共同的

α 亚基和不同的 β 亚基 (β_A 和 β_B)。由此人们认识到抑制素是一种亚基二聚体, 把 α 亚基和 β_A 亚基构成的抑制素称为抑制素 A。绵羊抑制素 A (inhibin A,

收稿日期: 2012-03-23

基金项目: 国家肉羊产业技术体系建设专项资金(CARS-39), 国家科技支撑计划(2006BAD13B08), 国家 973 计划(2006CB102105), 国家自然科学基金项目(30300248), 北京市自然科学基金项目(5042017)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ywf-rc-1)共同资助。

作者简介: 姜庆林, 男, 硕士研究生。E-mail: jq11979@126.com

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

陈国宏, 男, 教授, 博士生导师。E-mail: ghchen@yzu.edu.cn

INHA) 基因已被定位到染色体 2q41→q43, 由 2 个外显子和 1 个内含子组成^[3]。一些研究表明 *INHA* 基因对绵羊和山羊产羔数都有显著影响^[4-12]。据《中国羊品种志》^[13]记载, 山东小尾寒羊平均产活羔数为 2.61, 湖羊平均产活羔数为 2.29。多赛特羊平均产活羔数为 1.45, 特克塞尔羊平均产活羔数为 1.41^[14]。本研究以高繁殖力绵羊品种(小尾寒羊和湖羊)和低繁殖力绵羊品种(多赛特羊、特克塞尔羊和德国肉用美利奴羊)为试验材料, 采用单链构象多态(single strand conformation polymorphism, SSCP)方法对抑制素 A 基因外显子 1 进行单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)检测, 以比较该基因在不同绵羊品种中的多态性, 并对具有 SSCP 多态性的 DNA 片段进行测序比较分析, 旨在寻找与产羔数相关的遗传标记, 为绵羊高繁殖力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 2004 年产羔的 123 只小尾寒羊母羊(4 只公羊的后代), 记录其胎次、产羔月份和产羔数, 这些小尾寒羊母羊血样采自山东省嘉祥县种羊场。30 只多赛特母羊、30 只特克塞尔母羊、21 只德国肉用美利奴母羊血样均采自北京高特牧业有限公司(北京市顺义区大孙各庄镇); 30 只湖羊母羊血样采自浙江省余杭湖羊场。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。

小尾寒羊胎次的划分是: 实际第 1 胎、第 2 胎和第 3 胎分别作为 3 个胎次。根据当地绵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), 在 6~8 月的作为季节 2(夏季), 在 9~11 月的作为季节 3(秋季), 在 12~2 月的作为季节 4(冬季)。

1.2 引物设计和 PCR 扩增

根据 Thompson 等^[15]发表的牛抑制素 A 基因 5' 调控区以及外显子 1 共 908 bp 的序列(GenBank 登录号 U16237)设计 1 对引物扩增绵羊抑制素 A 基因外显子 1 (637~908, 272 bp)。引物序列为:

F: 5'-CAGGGGAGACTATGTGGCTTC-3'

R: 5'-CTGCAGCCGAAAAAGGATG-3'

PCR 扩增反应总体积为 25 μL, 其中 50 ng·μL⁻¹ DNA 模板 3 μL, 10×缓冲液 2.5 μL, 2 mmol·L⁻¹ dNTP

2 μL, 20 mmol·L⁻¹ 的 Mg²⁺ 3 μL, 2 mmol·L⁻¹ 引物 2.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶(购自北京鼎国生物技术有限公司)为 1 U, 其余用超纯水补齐。扩增条件: 95℃预变性 5 min; 94℃变性 45 s, 60℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72℃延伸 10 min, 4℃保存。产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 SSCP 分析

取 2 μL PCR 产物置于 PCR 管中, 加 5 μL 上样缓冲液(98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯氰、10 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0)、10% 甘油), 离心混匀, 98℃变性 10 min, 迅速插入冰中, 放置 5 min, 使之保持变性状态。变性后 PCR 产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺(29:1)凝胶中 4℃电泳 14 h。电泳结束后, 银染显带。用 AlphaImagerTM 2200 and 1220 Documentation and Analysis Systems (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA)拍照和分析。

1.4 克隆测序

对 SSCP 分析后不同基因型的 PCR 产物用 DNA 片段快速纯化回收试剂盒(购自上海华舜生物公司)纯化, 回收后的 DNA 片段用 pMD18-T 载体(购自北京鼎国生物技术有限公司)连接, 并转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 菌株, 酶切鉴定后在 PE377 测序仪上测序。为获得基因型为杂合子的 PCR 产物的克隆测序结果, 挑取多个菌落, 增加样本克隆测序数量。测序反应由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.5 统计分析

配合下列模型进行最小二乘方差分析, 比较小尾寒羊产羔数在 *INHA* 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} 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; LS_j 为第 j 个产羔季节的固定效应; P_k 为第 k 个胎次的固定效应; 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。

采用卡方检验对不同绵羊品种 *INHA* 基因型分布进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增和 SSCP 检测

所设计的引物用于 PCR 扩增获得了较好的结果, 片段长度与预期大小一致, 而且没有非特异扩增条带, 可以直接进行 SSCP 分析。

对扩增的 PCR 产物进行 SSCP 分析, 发现扩增

片段有多态性。扩增片段有 2 种基因型, 分别定义为 AA 和 AB (图 1)。

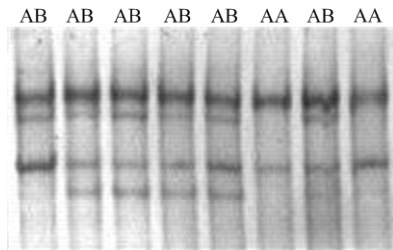


图 1 不同绵羊品种扩增片段的 SSCP 分析

Figure 1 SSCP analysis of PCR products in different sheep breeds

2.2 序列分析

取 AA 和 AB 2 种基因型的 PCR 产物片段进行克隆测序, 结果发现 AA 型与 GenBank U16237 序列一致, 定义为野生型, 而在 AB 型的测序图中发现第 877 bp 处出现了双峰, 有 1 个 T→C 的单碱基突变 (图 2)。将该突变的核苷酸序列翻译为氨基酸序列, 发现编码第 77 位氨基酸 (天冬氨酸) 未发生

改变, 因此为沉默突变。

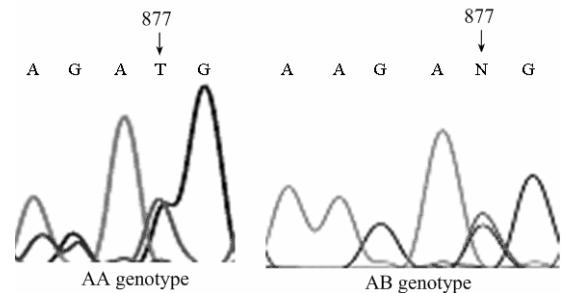


图 2 绵羊 *INHA* 基因 AA、AB 基因型 877 bp 处突变的测序峰图

Figure 2 The mutation at the 877 nucleotide between AA and AB genotypes of *INHA* gene in sheep

2.3 不同绵羊品种 *INHA* 基因型频率和等位基因频率分析

对小尾寒羊、湖羊、多赛特羊、德国肉用美利奴羊和特克塞尔羊进行了 *INHA* 基因型检测, 计算了不同绵羊品种的基因型频率和等位基因频率, 统计结果见表 1。

表 1 5 个绵羊品种 *INHA* 基因的等位基因频率和基因型频率
Table 1 Allele and genotype frequencies of *INHA* gene in five sheep breeds

品种 Breed	样本数 No. of samples	等位基因频率 Allele frequency		基因型频率 Genotype frequency		
		A	B	AA	AB	BB
小尾寒羊 Small Tail Han sheep	123	0.79	0.21	0.59(72)	0.41(51)	0.00(0)
湖羊 Hu sheep	30	0.53	0.47	0.07(2)	0.93(28)	0.00(0)
特克塞尔羊 Texel sheep	30	0.90	0.10	0.80(24)	0.20(6)	0.00(0)
多赛特羊 Dorset sheep	30	0.93	0.07	0.87(26)	0.13(4)	0.00(0)
德国肉用美利奴羊 German Mutton Merino sheep	21	0.98	0.02	0.95(20)	0.05(1)	0.00(0)

注: 括号内的数字表示不同基因型的个体数。

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

表 2 *INHA* 基因型分布在 5 个绵羊品种中的差异检验

Table 2 Test of differences for genotype distributions of *INHA* gene in five sheep breeds

品种 Breed	湖羊 Hu sheep	多赛特羊 Dorset sheep	特克塞尔羊 Texel sheep	德国肉用美利奴羊 German Mutton Merino sheep
小尾寒羊 Small Tail Han sheep	30.99***	8.35*	8.62*	8.25*
湖羊 Hu sheep		22.84***	23.11***	22.74***
多赛特羊 Dorset sheep			0.47	0.10
特克塞尔羊 Texel sheep				0.37

$df=(2-1)(3-1)=2$, $\chi^2(df=2, 0.05)=5.99$, $\chi^2(df=2, 0.01)=9.21$, $\chi^2(df=2, 0.001)=13.82$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

由表 1 可见, 5 个绵羊品种都出现了 2 种基因型 (AA 和 AB), 都没有纯合型 BB。高繁殖力的小尾寒羊和湖羊等位基因 B 的频率分别为 0.21 和 0.47; 低繁殖力的多赛特、特克塞尔和德国肉用美利奴 3 个绵羊品种 B 等位基因频率分别为 0.07、0.10 和 0.02。

2.4 不同绵羊品种 *INHA* 基因型分布差异检验

不同绵羊品种 *INHA* 基因型分布差异检验结果见表 2。

由表 2 可知, 高繁殖力绵羊品种 (小尾寒羊和湖羊) 之间基因型分布差异极显著 ($P<0.001$); 高繁殖力绵羊品种 (小尾寒羊) 与低繁殖力绵羊品种

(多赛特羊、特克塞尔羊和德国肉用美利奴羊)之间基因型分布差异都显著($P<0.05$);高繁殖力绵羊品种(湖羊)与低繁殖力绵羊品种(多赛特羊、特克塞尔羊和德国肉用美利奴羊)之间基因型分布差

异都极显著($P<0.001$);低繁殖力绵羊品种(特克塞尔羊、多赛特羊和德国肉用美利奴羊)之间基因型分布差异都不显著($P>0.05$)。

表 3 *INHA* 基因不同基因型小尾寒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 exon 1 of *INHA* gene in Small Tail Han sheep

基因型 Genotype	样本数 No. of samples	产羔数 Litter size
AA	72	2.30 ^b ±0.17
AB	51	2.87 ^a ±0.19

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 ($P<0.01$).

2.5 *INHA* 基因不同基因型小尾寒羊的产羔数

INHA 基因不同基因型的小尾寒羊产羔数的最小二乘均值及标准误见表 3。

由表 3 可知,杂合型 AB 小尾寒羊平均产羔数比 AA 型多 0.57 只($P<0.01$)。

3 讨论

3.1 绵羊和山羊 *INHA* 基因的多态性

绵羊和山羊的 *INHA* 基因都具有遗传多态性^[4-12,16-18]。周文然等^[6]在小尾寒羊、考力代绵羊 *INHA* 基因外显子 1 中发现 T877C 突变,中国美利奴绵羊、南非肉用美利奴绵羊没有发生该突变。田秀娥等^[7]在滩羊和蒙古羊 *INHA* 基因 5' 调控区检测到 A282G 突变,在滩羊和蒙古羊外显子 2 发现 A470T 突变,在滩羊、蒙古羊和小尾寒羊外显子 2 发现 G903A 突变。滑国华等^[9]在马头山羊、努比山羊、波尔山羊和海门山羊 *INHA* 基因编码区检测到 G284A 突变。Hou 等^[12]在西农萨能奶山羊、关中山羊和波尔山羊 *INHA* 基因 5' 调控区检测到 1 个 C80G 突变并在 126 位发现 1 个 G 的插入突变 (/126G)。Zi 等^[18]在乐至黑山羊、藏山羊 *INHA* 基因编码区检测到 A167G (His56Arg)、A205G(Met69Val)、A1041G 3 个突变。本研究在 5 个绵羊品种的 *INHA* 基因外显子 1 中都检测到 T877C 突变,但都没有检测到纯合基因型 BB。产生这种结果的原因可能有:(1)在这些绵羊中突变纯合子致死,比如在胚胎期死亡或在到达繁殖年龄之前死亡;(2)由于本研究所检测的样本数较少,应增加绵羊品种数、扩大样本数作进一步分析。

3.2 *INHA* 基因与绵羊和山羊产羔数的关系

鉴于抑制素在 FSH 反馈调节中的作用以及在卵巢内起生长因子的作用,抑制素基因被提出作为繁殖性能的候选基因^[19]。Jaeger 等^[4]对 1 000 次产羔

记录的初步统计分析表明 *INHA* 对绵羊产羔数具有显著的基因效应。Hiendleder 等^[5]报道 *INHA* 基因对绵羊产羔数有显著影响,391 只 Merinolandschafe 母羊 1 585 窝产羔数动物模型分析显示该基因替代效应达到 0.08 只羔羊。*INHA* 是影响小尾寒羊^[6]和巴美肉羊^[8]产羔数的重要基因。田秀娥等^[7]发现 *INHA* 对滩羊、蒙古羊和小尾寒羊产羔数都有显著影响。研究发现 *INHA* 基因对山羊产羔数也有显著影响^[9-12]。本研究表明 *INHA* 基因对小尾寒羊产羔数有显著影响。*INHA* 基因型在几个绵羊品种之间的分布以及各种基因型绵羊的实际产羔两方面的研究结果都表明 *INHA* 基因可能是影响湖羊和小尾寒羊高繁殖力的一个主效基因。但由于本研究检测的品种数和样本数较少,所获结论只是初步的,还需增加绵羊品种数和样本数、进行标记与产羔性能关联作深入研究。

参考文献:

- [1] Woodruff T K, Besecke L M, Groome N, et al. Inhibin A and inhibin B are inversely correlated to follicle-stimulating hormone, yet are discordant during the follicular phase of the rat estrous cycle, and inhibin A is expressed in a sexually dimorphic manner [J]. *Endocrinology*, 1996, 137(12): 5463-5467.
- [2] Mason A J, Hayflick J S, Ling N, et al. Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor-beta [J]. *Nature*, 1985, 318(6047): 659-663.
- [3] Brunner R M, Goldammer T, Hiendleder S, et al. Comparative mapping of the gene coding for inhibin- α (*INHA*) to chromosome 2 in sheep and cattle [J]. *Mammalian Genome*, 1995, 6(4): 309.
- [4] Jaeger C, Hiendleder S. Cosmid cloning and characterization of the coding regions and regulatory elements of the ovine α -(*INHA*), β_A -(*INHBA*) and β_B -inhibin (*INHBB*) genes [J]. *Animal Genetics*, 1994, 25(Suppl.2): 33.
- [5] Hiendleder S, Lewalski H, Jaeger C, et al. Nucleotide sequence of ovine α -inhibin (*INHA*) genes and evaluation of

- RFLP marker effects on reproductive performance [J]. *Animal Genetics*, 1996, 27(Suppl.2): 91-92.
- [6] 周文然, 储明星, 孙少华, 等. 小尾寒羊高繁殖力候选基因 INHA 的研究 [J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15(1): 32-36.
- [7] 田秀娥, 孙红霞, 王永军. 3 个绵羊群体 INHA 基因的遗传多态性及对产羔数的影响[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2010, 38(1): 23-29.
- [8] 索峰, 刘永斌, 特日格勒, 等. 巴美肉羊 INHA 和 INHBA 基因多态性与产羔数关系研究[J]. *华北农学报*, 2012, 27(3): 115-119.
- [9] 滑国华, 陈世林, 姚红卫, 等. 山羊抑制素 α 亚基因 *Hae* II 酶切多态性及其与产羔数性状的关联分析[J]. *遗传*, 2007, 29(8): 972-976.
- [10] Wu W S, Hua G H, Yang L G, et al. Association analysis of the INHA gene with litter size in Boer goats [J]. *Small Ruminant Research*, 2009, 82(2): 139-143.
- [11] 赵中权, 李周权, 张家骅. INH α 亚基因的多态性与山羊产羔数的相关性分析[J]. *中国畜牧杂志*, 2012, 48(5): 11-13; 42.
- [12] Hou J, An X, Li G, et al. Exploring polymorphisms and their effects on reproductive traits of the INHA and INH β A genes in three goat breeds [J]. *Anim Sci J*, 2012, 83(4): 273-278.
- [13] 《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: 50-52; 55-58.
- [14] 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.
- [15] Thompson D A, Cronin C N, Martin F. Genomic cloning and sequence analyses of the bovine alpha-, beta A- and beta B-inhibin/activin genes. Identification of transcription factor AP-2-binding sites in the 5'-flanking regions by DNase I footprinting [J]. *Eur J Biochem*, 1994, 226(3): 751-764.
- [16] Hiendleder S, Leyhe B, Jaeger C, et al. Molecular characterization of ovine α -, β_A - and β_B -inhibin/activin alleles [J]. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 1996, 113: 363-372.
- [17] Sise J A, Tou H M, Montgomery G W. A *Taq* I polymorphism at the ovine α -inhibin locus [J]. *Animal Genetics*, 1991, 22(2): 195.
- [18] Zi X D, Xu H W, Wang Y. Variation in sequences and mRNA expression levels of inhibin subunits α (INHA) and β_A (INHBA) genes between prolific and nonprolific goat breeds [J]. *Mol Reprod Dev*, 2012, 79(4): 238.
- [19] 薛昱, 储明星, 周忠孝. 抑制素基因的研究进展[J]. *遗传*, 2004, 26(5): 749-755.