

山羊 FSHR 基因 5' 端侧翼序列多态性对产羔性状的影响

姬云涛, 曹斌云

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了研究山羊 FSHR 基因对产羔性状的影响,用 RFLP-PCR 法对多胎和单胎布尔山羊、关中奶山羊和萨能奶山羊母羊 FSHR 基因 5' 端侧翼序列进行了多态性检测。结果发现,FSHR 基因 5' 端侧翼序列经 *Pst* I、*Hae* III、*Sin* I 和 *Taq* I 酶切,在多胎母羊和单胎母羊群体中均未表现出多态性;不同山羊群体 FSHR 基因 5' 端侧翼序列中各存在一些碱基的差异,但这些差异均未影响 FSHR 基因的转录和山羊的产羔性状。说明所检测的 FSHR 基因 5' 端侧翼序列这些酶切位点与山羊的产羔性状之间没有遗传连锁关系。

[关键词] 山羊;FSHR 基因;产羔性状;RFLP-PCR

[中图分类号] S827

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)09-0001-04

Effect of the 5'-flanking region of goat follicle-stimulating hormone receptor gene on yean trait

Ji Yun-Tao, CAO Bin-Yun

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Boer goat, Guanzhong goat and Xinongsaneng goat with multiplets and monovular traits were used to study the effect of follicle-stimulating hormone receptor gene on yean trait. Polymorphism of the 5'-flanking region of goat follicle-stimulating hormone receptor gene was analyzed by PCR-RFLP as the candidate gene. The result showed there wasn't polymorphism in goat. Difference of several bases were found by sequencing, but the transcription of follicle-stimulating hormone receptor gene and yean trait of goat were not affected, which showed that there was not the genetic linkage relationship between the four sites of 5'-flanking region of goat FSHR gene and its yean trait.

Key word: goat;FSHR gene;yeen trait;RFLP-PCR

促卵泡素(FSH)是调控动物繁殖活动的重要激素之一,对动物卵巢卵泡的生长、发育、分化、成熟和排卵更起着必不可少的作用。由于 FSH 是生物大分子,不能透过细胞膜,所以必须与位于靶细胞膜上的促卵泡素受体(FSHR)结合,通过受体介导将信息传递到靶细胞内,才能正常发挥其生物学功能^[1]。

有研究表明,FSHR 基因 5' 端多态位点的基因频率,在产双胎和产单胎的中国西门塔尔牛群体中差异显著^[2]。Abdennebi 等^[3]研究发现,多胎罗曼诺夫羊发育卵泡颗粒细胞中的 FSHR mRNA 水平均显著高于单胎法兰西岛羊,且颗粒细胞对促性腺激素反应的敏感性,前者也高于后者。众所周知,基因

收稿日期: 2006-08-10

基金项目: 国家“863”计划项目(2002AA242051)

作者简介: 姬云涛(1972-),女,安徽阜阳人,在读博士,主要从事动物生殖生理与生物技术研究。

通讯作者: 曹斌云(1955-),男,陕西周至人,教授,博士生导师,主要从事动物遗传育种与繁殖技术研究。

E-mail: caobinyun@yahoo.com.cn

表达是 DNA 上的遗传信息转录和翻译的过程,转录受基因 5'端序列的调控,故 5'端的序列结构直接关系到基因的功能。目前,有关 FSHR 基因对山羊多胎性状影响的研究还较少,对山羊 FSHR 基因 5'端侧翼序列与产羔性状关系的限制性片断长度多态性(RFLP)检测研究,国内外还未见报道。因此,本试验用 RFLP-PCR 法对多胎和单胎布尔山羊、关中奶山羊和萨能奶山羊 FSHR 基因 5'端侧翼序列进行了多态性检测,并通过序列测定来分析该基因多态性与山羊产羔性状的关系,旨在寻找与产羔数相关的遗传标记或确定该基因与山羊产羔性状遗传机制的关系,以期山羊高繁殖力的标记辅助选择和育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 山羊血样采集 54 只关中奶山羊血样采自陕西周至羊场;104 只萨能奶山羊血样采自陕西千阳县陕西萨能奶山羊良种繁育种场;96 只布尔山羊血样采自陕西麟游县陕西布尔山羊良种繁育中心,其中多胎母羊和单胎母羊各半,所有个体均具有完整的产羔记录(产羔 2 胎或 2 胎以上)。试验采用颈静脉采血,ACD 抗凝,样品均保存于 - 80 °C 冰箱,用于提取 DNA。

1.1.2 试剂和酶 Taq DNA 聚合酶、dNTPs 为 MBI 公司产品,全血基因组提取试剂盒购自北京鼎国生物技术发展中心,限制性内切酶购于大连宝生物工程有

限公司。

1.1.3 引物 以 Sairam 等^[4]报道的澳洲绵羊 FSHR 基因 5'端和第 1 外显子序列为模板设计 1

对引物,序列如下:上游引物 5' AATTCA TTTGT-GCCAGCATCC-3',下游引物 5' AGTTCGACCGCATCCCTG-3'。引物由上海生工合成,预期扩增片段长度约 967 bp。

1.2 山羊基因组 DNA 的提取

参照全血基因组提取试剂盒使用说明,从血液

1.3 山羊 FSHR 基因 5'端侧翼序列 PCR 扩增及产物检测

PCR 反应总体积 25.0 μL,反应体系组成为: Taq DNA 聚合酶(0.625 U/μL) 2.0 μL,10 ×PCR 缓冲液 2.5 μL,MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μL,dNTPs (2.0 mmol/L) 2.5 μL,引物(10 pmol/μL) 各 1.0 μL,DNA 模板(50 ng/μL) 2.0 μL,补双蒸水 12.0 μL。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 1 min,67 °C 1 min,72 °C 1 min,30 个循环;最后 72 °C 10 min,4 °C 保存。PCR 扩增反应在 PTC-200 基因扩增仪上进行。在 5 μL PCR 扩增产物中加入 1 μL 上样缓冲液,在体积分数 1.5 % 含 EB 的琼脂糖凝胶上电泳,3~5 V/cm 1 h,在凝胶成像仪上观察扩增结果并照相。

1.4 山羊 FSHR 基因 5'端侧翼序列 PCR 产物的酶切鉴定

酶切反应体系为:酶切反应总体积为 20 μL,其中 PCR 产物 7 μL,限制性内切酶分别为 1 μL,其他成分按酶切说明书添加,最后补双蒸水至 20 μL。不同限制性内切酶的反应条件及检测琼脂糖凝胶浓度如表 1 所示。

表 1 不同限制性内切酶的反应条件及检测琼脂糖凝胶浓度

Table 1 Condition of reaction and concentration of gel in different restricted enzymes

限制性内切酶 Incision enzyme	识别序列 Recognition sequence	反应温度/ °C Temperature	电泳琼脂糖凝胶浓度/(g · L ⁻¹) Agarose gel strength
<i>Pst</i> I	CTGCAG	37	20
	GACGTC		
<i>Hae</i> III	GGCC	37	20
	CCGG		
<i>Taq</i> I	TCGA	65	20
	AGCT		
<i>Sin</i> I	GGT/ ACC	37	20
	CCA/ TGG		

1.5 山羊 FSHR 基因 5'端侧翼序列的测定

选取布尔山羊、关中奶山羊和萨能奶山羊 3 个品种的单胎和多胎个体 PCR 产物,于 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳中回收,样品送上海博亚生物有限公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 山羊 FSHR 基因 5'端侧翼序列 PCR 扩增结果

对 3 个山羊品种的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物的电泳结果如图 1 所示。图 1 显示,扩

增出的 DNA 片段大小与预期结果一致,且无其他杂带出现,可以判定其为目的条带,对 PCR 产物含量高、条带单一并且整齐的,可用来进行限制性内切酶酶切。

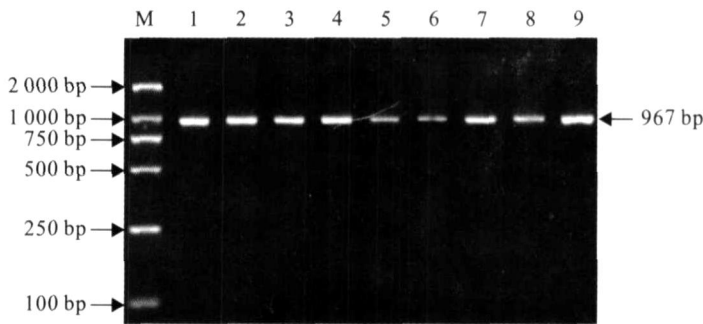


图 1 山羊 FSHR 基因 5 端侧翼序列 PCR 扩增产物的电泳图
M. DL2000;1~4. 布尔山羊;5~6. 关中奶山羊;7~9. 萨能奶山羊

Fig. 1 Electrophoresis result of PCR of 5' flanking of FSHR gene in goat
M. DL2000;1 - 4. Boer goat ;5 - 6. Guanzhong dairy goat ;7 - 9. Saneng dairy goat

2.2 山羊 FSHR 基因 5'端侧翼序列 PCR 产物酶切结果

3 个山羊品种 FSHR 基因 5 端侧翼序列 PCR 产物经 *Pst* I、*Hae* III、*Sin* I 和 *Taq* I 4 种限制性

内切酶酶切后,用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,均只检出一种带型(图 2),说明在所检测的山羊群体中均无多态性现象。

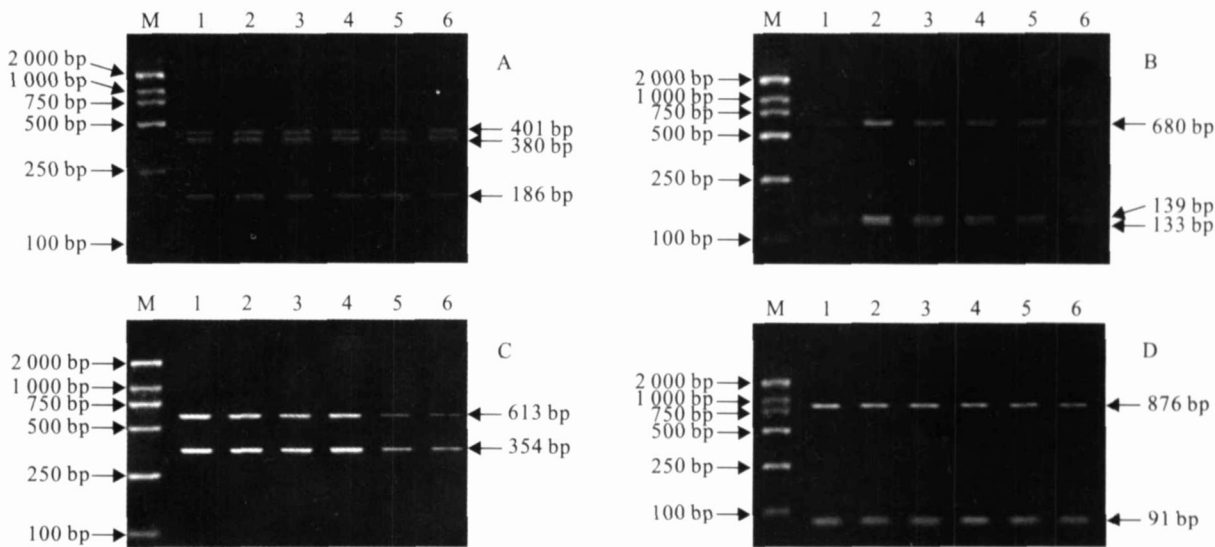


图 2 山羊 FSHR 基因 5 端侧翼序列限制性内切酶酶切产物的电泳图
A. *Pst* I 酶切产物;B. *Hae* III 酶切产物;C. *Sin* I 酶切产物;D. *Taq* I 酶切产物

M. DL2000;1~2. 布尔山羊;3~4. 关中奶山羊;5~6. 萨能奶山羊

Fig. 2 Electrophoresis result of 5' FSHR gene of goat PCR products digested by incision enzyme

A. Digested by *Pst* I;B. Digested by *Hae* III;C. Digested by *Sin* I;D. Digested by *Taq* I
M. DL2000;1 - 2. Boer goat ;3 - 4. Guanzhong dairy goat ;5 - 6. Saneng dairy goat

2.3 山羊 FSHR 基因 5'端侧翼序列 PCR 产物的测序结果

用软件 Primer 7.0 进行 *Pst* I、*Hae* III、*Sin* I 和 *Taq* I 4 种限制性内切酶切点分析,限制性片段长度的检测结果见表 2。

由图 2 和表 2 可知,4 种限制性内切酶酶切后

均表现一种带型,所扩增片段存在 2 个 *Pst* I 酶切位点;3 个 *Hae* III 酶切位点;1 个 *Sin* I 酶切位点和 1 个 *Taq* I 酶切位点。

测序结果显示,同一山羊品种内 FSHR 基因 5'端侧翼序列扩增区的同源性和多胎的差异;不同山羊品种间同源性不同,其中布

尔山羊与关中奶山羊 FSHR 基因 5'端侧翼序列扩增区的同源性为 98.96%,布尔山羊与萨能奶山羊 FSHR 基因 5'端侧翼序列扩增区的同源性为 99.17%,关中奶山羊与萨能奶山羊 FSHR 基因 5'端侧翼序列扩增区的同源性为 99.79%。表明不同品种山羊 FSHR 基因 5'端侧翼序列中存在个别碱基的差异,但这些差异并未影响 FSHR 基因的转录和山羊的产羔性状。

表 2 山羊 FSHR 基因 5'端侧翼序列 PCR-RFLP 的检测结果

限制性内切酶 Incision enzyme	限制性片段长度/ bp Length of restriction fragment
<i>Pst</i> I	401,380,186
<i>Hae</i> III	680,139,133,15
<i>Sin</i> I	613,354
<i>Taq</i> I	876,91

3 讨 论

雷雪芹等^[5]用 FSHR 基因 5'端侧翼序列的 PCR-RFLP 对牛进行了标记,结果在秦川牛和黑白花奶牛两个品种中出现优势等位基因不一致的现象,即在秦川牛中双胎母牛的 A 基因频率和 AA 基因型频率分别高于单胎母牛的 A 基因频率和 AA 基因型频率;在黑白花奶牛中双胎母牛的 B 基因频率和 BB 基因型频率均高于单胎母牛的 B 基因频率和 BB 基因型频率,表明 FSHR 基因 5'端侧翼序列的 PCR-RFLP 标记,在一个品种内单胎母牛和双胎母牛之间有一定趋势,但两个品种的趋势不同,这与魏伍川等^[6-7]的研究结果不同。

雷雪芹等^[8]对小尾寒羊和同羊的 FSHR 基因 5'端侧翼序列进行限制性内切酶 *Taq* I 的酶切,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳发现,检测结果有较大的差异,说明多胎绵羊品种与单胎绵羊品种之间在 FSHR 基因 5'侧翼区和第一外显子区段存在差异,但未进一步研究该差异是否与产羔数有关以及进行产羔性状与分子标记间的连锁分析。魏伍川等^[9]采用 *Taq* I 酶切分析了 38 头小尾寒羊样品的 FSHR 基因 5'侧翼序列端转录启动调控区序列,检测结果未发现多态性。宋美玲等^[10]对布尔山羊的 FSHR 基因进行 PCR-SSCP 多态性分析,在远端转录启动调控区发现 1 个单核苷酸多态性(SNP)位点。柳淑芳等^[11-12]对小尾寒羊的 FSHR 基因 5'端侧翼序列进行 *Pst* I、*Hae* III、*Taq* I 和 *Sin* I 酶切位点检测,结果表明,在大群体的小尾寒羊和滩羊中均无多

态性现象。

本研究所检测的 *Pst* I、*Hae* III、*Taq* I 和 *Sin* I 4 种酶切位点在关中奶山羊、萨能奶山羊、布尔山羊 3 个山羊品种的多胎和单胎群体中均无多态性,表明所检测山羊 FSHR 基因 5'端侧翼序列这些酶切位点与其产羔性状遗传机制无关。但由于实际试验中大约一半的 SNP 并不改变限制性酶切位点^[13],所以本试验所检测山羊 FSHR 基因 5'端侧翼序列中可能还存在其他尚未被检测到的 SNP 位点。聚丙烯酰胺凝胶电泳比琼脂糖凝胶电泳分辨率高,而本试验只对 *Taq* I 酶切进行了琼脂糖凝胶电泳检测,而未进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,所以不能确定是否也存在雷雪芹等^[8]的研究结果。故仍需对 FSHR 基因全序列继续研究,以期找到影响 FSHR 基因表达量和活性的原因所在,进而发现并确定 FSHR 基因与产羔性状的相关性。

[参考文献]

[1] Ranniki A S,Zhang F P,Huhtaniemi I T. Ontogeny of follicle stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary[J]. Mol Cell Endocrinol,1995,107:199-208.

[2] 魏伍川,许尚忠. 牛促卵泡素受体基因转录启动调控区的序列分析和多态性研究[J]. 畜牧兽医学报,2002,33(5):417-423.

[3] Abdennebi L,Monget P. Comparative expression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor in ovarian follicles from high and low prolific sheep breeds[J]. Biology of Reproduction,1999,60:845-854.

[4] Sairam M R,Subbarayan V S R. Characterization of the 5'flanking region and potential control elements of the ovine follicle stimulating hormone receptor gene[J]. Mol Reprod Develop,1997,48(4):480-487.

[5] 雷雪芹,陈宏,徐廷生,等. FSHR 基因的 PCR-RFLP 对牛双胎性状的标记分析[J]. 中国农学通报,2003,19(4):7-10.

[6] 魏伍川,许尚忠. 牛 FSHR 基因 5'端侧翼序列的分析和多态性研究[J]. 畜牧兽医学报,2002,33(5):417-423.

[7] 魏伍川,许尚忠,张英汉,等. 牛促卵泡素受体基因多态性的频率差异研究[J]. 湛江师范学院学报,2003,24(3):29-32.

[8] 雷雪芹. 牛羊多胎性状的 DNA 分子标记研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2002.

[9] 魏伍川,余晓天,许尚忠. 小尾寒羊促卵泡素受体基因 5'端侧翼序列的 *Taq* I 酶切多态性分析[J]. 草食家畜,2003(1):58-60.

[10] 宋美玲,马向明,王建民. 波尔山羊 FSHR5'端侧翼序列的 SNP 多态性及超排效果分析[J]. 家畜生态学报,2006,27(4):25-28.

[11] 柳淑芳. 小尾寒羊多胎性状相关基因的鉴定和遗传研究[D]. 山东泰安:山东农业大学,2004.

[12] 柳淑芳,杜立新,王爱华. 羊 FSHR 基因 5'端侧翼序列启动调控区的生物学特性[J]. 遗传,2006,28(4):427-431.

[13] 高秀丽,景奉香,杨剑波,等. 单核苷酸多态性检测分析技术[J]. 遗传,2005,27(1):110-122.