

# *BMPR-IB* 基因多态性与湖羊产羔性能的关系

杨媛, 翁恺麒, 李拥军\*, 顾祝荣, 郭海燕

(扬州大学动物科学与技术学院, 江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 江苏扬州 225009)

**摘要** [目的]研究骨形态发生蛋白受体 IB(Bone morphogenetic protein receptor IB, *BMPR-IB*) 基因多态性与湖羊产羔性能的关系。[方法]采用 PCR 扩增、酶切和序列测定等方法对湖羊 *BMPR-IB* 基因型进行鉴定, 并分析 *BMPR-IB* 基因型与湖羊产羔数的关系。[结果]共检测到 3 种基因型, 并将其分别定义为 AA、AG、GG。测序结果表明, 等位基因 A 与 G 相比发生了 1 处碱基突变(A746G)。 *BMPR-IB* 基因在湖羊中存在多态性(AA、AG 和 GG); 湖羊中 A 等位基因的频率为 0.032, G 等位基因的频率为 0.968。AA、AG 和 GG 基因型频率分别为 0.006、0.053 和 0.941。AA、AG 和 GG 基因型湖羊的平均产羔数分别为 1.25、1.81 和 1.96。[结论] *BMPR-IB* 基因可能是湖羊多胎性能的主效基因, 可用于对湖羊产羔数的选择。

**关键词** 湖羊; *BMPR-IB* 基因; 产羔数

中图分类号 S826 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)26-0113-03

## Relationship between Polymorphism of *BMPR-IB* Gene and Lambing Performance of Hu Sheep

YANG Yuan, WENG Kai-qi, LI Yong-jun\* et al (College of Animal Science and Technology, Yangzhou University/Key Laboratory for Animal Genetic, Breeding, Reproduction and Molecular Design of Jiangsu Province, Yangzhou, Jiangsu 225009)

**Abstract** [Objective] To study the relationship between the polymorphism of bone morphogenetic protein receptor IB (*BMPR-IB*) gene and the lambing performance of Hu Sheep. [Method] The genotypes of *BMPR-IB* gene was identified by the methods of PCR amplification, enzyme digestion and sequencing. And the relationship between the genotypes of *BMPR-IB* and litter size of Hu Sheep was analyzed. [Result] Three genotypes were detected, and defined as AA, AG, GG, respectively. The sequencing results showed that the allele A and G had a base mutation (A746G), and there was *BMPR-IB* gene's polymorphism (AA, AG and GG) in Hu Sheep. The frequency of A allele in Hu Sheep was 0.032, the frequency of G allele was 0.968. The frequencies of AA, AG and GG genotype were 0.006, 0.053 and 0.941, respectively. The average litter size of Hu Sheep with AA, AG and GG genotypes were 1.25, 1.81 and 1.96, respectively. [Conclusion] *BMPR-IB* gene might be the major gene for the prolificacy of Hu Sheep, it could be used to select litter size of Hu Sheep.

**Key words** Hu Sheep; *BMPR-IB* gene; Litter size

我国绵羊的遗传资源和饲养数量均位居世界第一, 但出栏率仅 19.6%, 与世界平均水平(35%)相比明显偏低<sup>[1-2]</sup>。湖羊主要分布在江浙一带, 是我国著名的一级保护多胎品种。湖羊具有终年发情的特点, 且性成熟较早, 一年内可以完成出生、配种、产羔, 产羔率能达到 200%~250%<sup>[3-4]</sup>。湖羊的繁殖性状是其主要的经济性性状之一, 这一性状是由多基因控制, 因此寻找控制繁殖性状的主效基因对于提高其经济性性状具有重要意义。随着现代分子标记辅助选择技术的发展和运用, 湖羊繁殖性状的遗传改良有了新的方向和途径。

早在 1980 年就有研究表明绵羊的多胎性是由控制繁殖性状的基因发生突变所导致的, 并将该突变基因初步命名为 *FecB*, 该基因的功能是通过增加排卵数而提高产仔数<sup>[5-6]</sup>。骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)是转化生长因子(Transforming growth factor, TGF)超家族中最大的亚家族, 它们具有多功能性, 且在动物机体的各组织器官广泛分布, 参与动物的免疫系统、胚胎发育和生殖发育, 对哺乳动物的繁殖有着非常重要的影响<sup>[7-11]</sup>。*BMPR-IB* 基因对子宫内膜的发育有着直接或间接作用<sup>[12]</sup>。*BMPR-IB* 基因是由可编码 502 个氨基酸的 10 个外显子组成, 其编码序列长 1 509 bp<sup>[13]</sup>, 该基因在骨骼肌、脑和肾脏中有中度表达, 最重要的是在与绵羊繁殖有关的各器官(如卵巢、子宫、睾丸和前

列腺)中都有广泛表达<sup>[14]</sup>。研究表明, 控制多胎性能的基因是对应于人染色体 4q22~23 区间的 6 号常染色体 *BMPR-IB* 基因, 该基因的 1 对等位基因 A 与 G 相比发生了 1 处碱基突变(A746G), 使携带 *BMPR-IB* 突变基因母羊的颗粒细胞分化加快, 卵泡成熟加速, 进而使排卵数增多<sup>[15-16]</sup>。此外, 一些研究表明 Booroola 母羊高繁殖力与该突变完全相关<sup>[17-20]</sup>。笔者研究了湖羊 *BMPR-IB* 基因的多态性及其与产羔数的关系, 旨在为筛选湖羊多胎性候选基因提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 试验动物** 选取具有第 1 胎和第 2 胎生产记录的湖羊, 共 342 只。采集湖羊颈静脉血液约 3 mL, 并记录耳标号, 羊只全部来自于江苏省太仓金仓湖羊场。采血用一次性采血盛血器, 并且提前在采血管中加入 ACD 抗凝剂。血样用冰盒带回实验室后 4 °C 下保存, 以备提取 DNA。

**1.2 DNA 的提取及检测** 参照天根生化科技(北京)有限公司的血液基因组 DNA 提取试剂盒说明书来提取 DNA, -20 °C 下保存。

## 1.3 PCR 扩增与酶切

**1.3.1 PCR 扩增。** *BMPR-IB* 引物采用 Primer5 - blast 设计引物的方法, 由铂尚生物技术(上海)有限公司合成, 引物序列为: 上游引物为 5' - GTCGCTATGGGGAAGTTTGGATG - 3'; 下游引物为 5' - CAAGATGTTTTTCATGCCTCATCAACACG - GTC - 3'。

PCR 反应体系(25 μL)包括 DNA 1 μg、上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 2 × Taq PCR MasterMix(天根生化科技

**基金项目** 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(15)1007]。**作者简介** 杨媛(1994—), 女, 陕西渭南人, 本科生, 专业: 动物科学。\* 通讯作者, 教授, 博士, 从事养羊生产与羊的繁育研究。**收稿日期** 2017-06-24

有限公司)12.5  $\mu\text{L}$ ,用 ddH<sub>2</sub>O 补至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序如下:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,57  $^{\circ}\text{C}$  复性 90 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,34 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  终延伸 7 min。将 PCR 扩增产物进行 3% 琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.3.2 酶切。**用 *Ava*II 限制性核酸内切酶进行酶切,酶切体系为 20  $\mu\text{L}$ ,其中扩增产物为 5  $\mu\text{L}$ ,限制性内切酶 10 U,37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 3 h;酶切反应结束后,将 20  $\mu\text{L}$  消化液全部加样于 2.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳,电泳结束后在紫外凝胶成像系统中照相,根据酶切产生的条带确定基因型。

**1.4 序列测定** 将提取的 DNA 送至无锡翼和应用生物技术有限公司进行测序及基因型鉴定。

**1.5 数据统计与分析** 收集并整理湖羊的生产记录,计算湖羊 *BMPR-IB* 不同基因型及基因频率。使用 SPSS 22.0 统计软件对试验数据进行统计与分析,对不同 *BMPR-IB* 基因型的湖羊产羔数进行 LSD 多重比较,分析不同基因型与产羔数之间的关系。

## 2 结果与分析

**2.1 PCR 扩增结果** 从 342 个样品 PCR 产物中随机抽出 9 个 PCR 产物进行琼脂糖电泳检测,结果表明其特异性良好(图 1),目的条带长度符合预期,在 140 bp 左右。

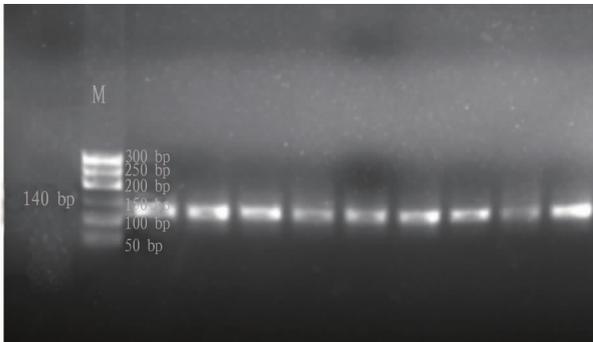


图 1 湖羊 *BMPR-IB* 基因的 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果  
Fig.1 The agarose gel electrophoresis detection results of PCR products of *BMPR-IB* gene in Hu Sheep

**2.2 湖羊 *BMPR-IB* 基因酶切结果** 由于湖羊 *BMPR-IB* 基因的 1 对等位基因 A 与 G 相比发生了 1 处碱基突变(A746G),因此对湖羊 *BMPR-IB* 基因经酶切后进行扩增,将扩增产物进行琼脂糖电泳检测,得到 110 和 140 bp 2 种带型(图 2)。在所检测的羊群中共有 3 种基因型,设与 PCR 原液条带相同的个体为 AA 基因型,同时含有 110 和 140 bp 条带的个体为 AG 基因型,只含有 110 bp 条带的个体为 GG 基因型。

**2.3 不同基因型测序结果** 为确定 *BMPR-IB* 基因的突变位点,将 AA、AG 与 GG 基因型的 PCR 产物送交无锡翼和应用生物技术有限公司进行测序。测序结果表明,等位基因 A 与 G 相比发生了 1 处碱基突变(A746G)。测序结果如图 3 所示。

**2.4 湖羊 *BMPR-IB* 基因型及基因频率** 检测结果表明,在 342 个湖羊样本中,2 个为 AA 型,18 个为 AG 型,322 个为 GG 型。经计算,等位基因 G 和等位基因 A 的基因频率分别

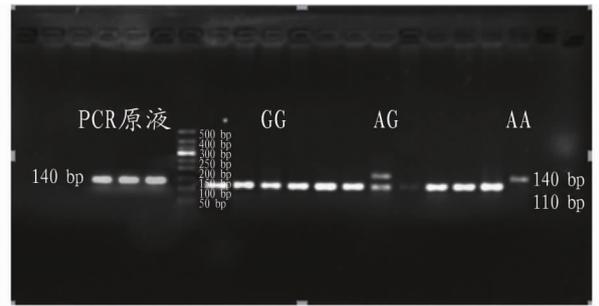


图 2 湖羊 *BMPR-IB* 基因酶切结果

Fig.2 The enzyme digestion results of *BMPR-IB* gene in Hu Sheep

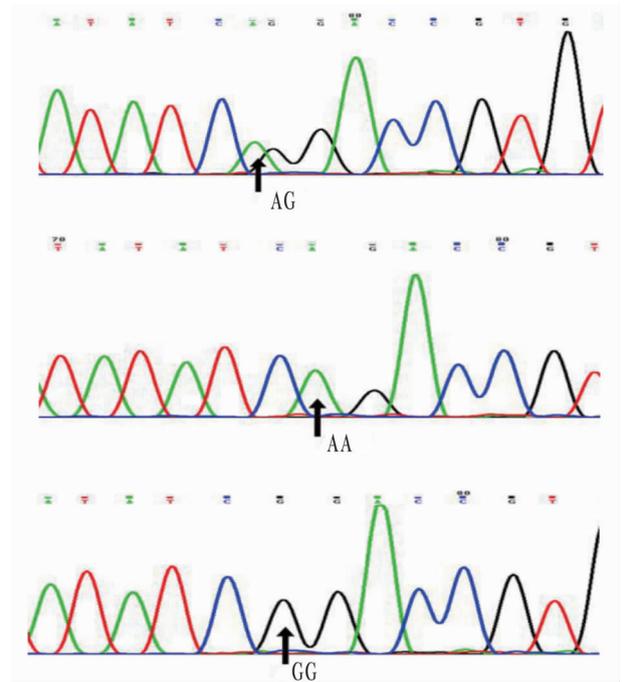


图 3 不同基因型 *BMPR-IB* 测序结果

Fig.3 *BMPR-IB* sequencing results of different genotypes

为 0.968 和 0.032。AA、AG 和 GG 基因型频率分别为 0.006、0.053 和 0.941,湖羊 AA、AG 和 GG 基因型的平均产羔数分别为 1.25、1.81 和 1.96。

**2.5 湖羊 *BMPR-IB* 基因的不同基因型产羔数比较** 由表 1 可知,AA、AG、GG 基因型第 1 胎产羔数差异显著( $P < 0.05$ );AA 与 AG、GG 基因型第 2 胎产羔数差异显著( $P < 0.05$ ),但 GG 基因型与 AG 基因型间差异不显著( $P \geq 0.05$ )。整体来看,AA 与 AG、GG 基因型的产羔数差异显著( $P < 0.05$ ),GG 与 AG 基因型产羔数间差异不显著( $P \geq 0.05$ )。

## 3 讨论与结论

绵羊作为经济动物,为人们提供肉和毛皮。随着社会的发展,其产量已不能满足人类的需求,主要是因为绵羊为单胎短日照动物,生产力低下,严重限制了绵羊业的发展。湖羊作为我国特有的多胎品种,研究其多胎机制对于绵羊业的发展具有重要作用。

很早以前,育种学家便开始关注湖羊的多胎性,许多学者通过研究湖羊的内分泌机制和表型特点,对其选育进行指

导,明显提高了湖羊的产羔率。管峰等<sup>[21]</sup>对湖羊的 *BMPR-IB* 基因进行多态性检测发现,该湖羊群体中只检测出 *BB* 基因,因而在湖羊中的基因效应完全一致,所以认为 *BMPR-IB* 基因不是湖羊多胎的主效基因,对该湖羊群体进行选育后仍

然可以提高其产羔率。闫亚东等<sup>[19]</sup>认为湖羊 *BMPR-IB* 基因与其他单胎品种差异显著,所以 *BMPR-IB* 基因是导致湖羊多胎性状的主效基因。

表 1 湖羊不同 *BMPR-IB* 基因型频率与产羔数

Table 1 The genotype frequency and litter size of different *BMPR-IB* genotypes of Hu Sheep

<i>BMPR-IB</i> 基因型 <i>BMPR-IB</i> genotype	样本数 Sample size	基因型频率 Genotype frequency	产羔数 Litter size		
			第 1 胎 The first parity	第 2 胎 The second parity	平均值 Mean
AA	2	0.006	1.000 ± 0.000 c	1.500 ± 0.500 b	1.250 ± 0.250 b
AG	18	0.053	1.667 ± 0.140 b	1.944 ± 0.189 a	1.810 ± 0.100 a
GG	322	0.941	1.875 ± 0.040 a	2.062 ± 0.761 a	1.960 ± 0.030 a

注: 同列不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

Note: Different small letters in the same column indicate significant differences ( $P < 0.05$ )

该试验的样本数为 342 个,将全部样本送交无锡冀和应用生物技术有限公司测序鉴定基因型,结果发现 AA、AG 和 GG 基因型频率分别为 0.006、0.053 和 0.941。对 *BMPR-IB* 与湖羊产羔数的关系进行了分析,结果发现 AA、AG 和 GG 基因型之间的产羔数存在显著差异,这与吴丽丽等<sup>[22]</sup>的研究结果相一致,但与管峰等<sup>[21]</sup>的研究结果不一致,这可能是由于参照对象不同。该试验结果表明,*BMPR-IB* 基因可能是湖羊多胎性能的主效基因,可用于对湖羊产羔数的选择。

#### 参考文献

- [1] 贾建磊,张利平,丁强,等. 绵羊 *BMPR-IB* 基因第 7 外显子多态性与产羔性状的相关性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016,44(1):7-13.
- [2] 杨燕燕. 影响蒙古羊双羔群体繁殖性状候选基因的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2009.
- [3] 殷子惠. 绵羊骨形态发生蛋白受体 *IB Q249R* 突变的检测及其对小尾寒羊产羔数的效应分析[D]. 泰安:山东农业大学,2005.
- [4] 史洪才,武坚. 我国对湖羊和小尾寒羊多胎基因的研究[J]. 草食家畜, 2004(4):14-16.
- [5] 贾存灵. 小尾寒羊多胎性状主要候选基因及繁殖相关基因表达量研究[D]. 北京:中国农业大学,2005.
- [6] 杨华,张永胜,何其宏,等. 中国美利奴羊多胎品系选育中多胎性状分离与 *BMPR-IB* 基因型的相关性分析[J]. 中国草食动物科学,2009,29(1):16-18.
- [7] GALLOWAY S M, MCNATTY K P, CAMBRIDGE L M, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner[J]. Nature genetics, 2000, 25(3):279-283.
- [8] LAN Z J, GU P, XU X, et al. *GCNF*-dependent repression of *BMP-15* and *GDF-9* mediates gamete regulation of female fertility[J]. Embo journal, 2003,22(16):4070-4081.
- [9] LAWSON K A, DUNN N R, ROELEN B A, et al. *Bmp4* is required for the

generation of primordial germ cells in the mouse embryo[J]. Genes & development, 1999,13(4):424-436.

- [10] 桑林华,储明星,王金玉,等. 绵羊高繁殖力候选基因 *BMPR-IA* 的研究[J]. 畜牧兽医学报,2006,37(9):852-857.
- [11] 刘昌乙,李晓勇,王纯. 骨形态发生蛋白研究的某些进展[J]. 成都体育学院学报,1995(1):81-85.
- [12] 王启贵,钟发刚,李辉,等. 绵羊 *BMPR-IB* 基因多态性与其产羔数的相关研究[J]. 草食家畜,2003(2):20-23.
- [13] 朱二勇,史洪才,武坚,等. *BMPR-IB* 基因作为绵羊多胎性能候选基因的研究[J]. 西北农业学报,2006,15(6):20-23.
- [14] WILSON T, WU X Y, JUENGEL J L, et al. Highly prolific booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein *IB* receptor (*ALK-6*) that is expressed in both oocytes and granulosa cells[J]. Biology of reproduction, 2001,64(4):1225-1235.
- [15] 葛燕,张家骅. 骨形态发生蛋白在动物繁殖上的研究进展[J]. 动物医学进展,2006,27(6):33-37.
- [16] SOUZA C J, MACDOUGALL C, MACDOUGALL C, et al. The booroola (*FecB*) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 *B* (*BMPRI1B*) gene[J]. Journal of endocrinology, 2001, 169(2):1-6.
- [17] MULSANT P, LECERF F, FABRE S, et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-*IB* is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérim ewes[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2001,98(9):5104-5109.
- [18] 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.
- [19] 闫亚东,储明星,曾勇庆,等. 小尾寒羊和湖羊高繁殖力候选基因 *BMPR-IB* 的研究[J]. 农业生物技术学报,2005,13(1):66-71.
- [20] 王生宝,张英杰,刘月琴,等. 不同绵羊品种 *BMPR-IB* 基因多态性与产羔数的关系研究[J]. 湖南农业科学,2009(12):8-10.
- [21] 管峰,艾君涛,刘守仁,等. *BMPR-IB* 和 *BMP15* 基因作为湖羊多胎性能候选基因的研究[J]. 家畜生态学报,2005,26(3):9-12.
- [22] 吴丽丽,赵晓枫,张立凡,等. 湖羊 *BMPR-IB*、*BMP15* 和 *GDF9* 基因的 *RFLP* 分析[J]. 中国草食动物科学,2011,31(4):9-12.

(上接第 92 页)

- [20] 聂鲲,赵建庄. *QuEChERS*-气相色谱法同时测定水果中多种农药残留量[J]. 江西农业大学学报,2016,38(6):1174-1183.
- [21] 李云飞,彭云霞,张承聪. 气相色谱-质谱联用仪测定果蔬中 12 种农药残留量[J]. 云南大学学报(自然科学版),2004(S1):176-180.
- [22] 吴岩,姜冰,徐义刚,等. *QuEChERS*-液相色谱-串联质谱法同时测定果蔬中 16 种农药残留[J]. 色谱,2015,33(3):228-234.
- [23] 李蓉,储大可,张朋杰,等. *QuEChERS/HPLC-MS/MS* 法测定黄瓜、菜心、葡萄、香蕉中 127 种农药残留[J]. 分析测试学报,2015,34(5):502-511.
- [24] 宋淑玲,李重九,马晓东,等. 蔬菜中残留农药的石墨化碳黑净化和气相色谱-质谱检测方法[J]. 分析化学,2008,36(11):1526-1530.
- [25] KOESUKWIWAT U, LEHOTAY S J, MIAO S, et al. High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using *QuEChERS* and low-pressure gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry[J]. Journal

of chromatography A, 2010,1217(43):6692-6703.

- [26] 周莉,王新全,徐浩,等. 液相色谱-串联质谱法测定叶菜类蔬菜中 16 种农药的基质效应研究[J]. 理化检验(化学分册), 2011,47(12):1398-1401.
- [27] VAN EECKHAUT A, LANCKMANS K, SARRE S, et al. Validation of bio-analytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009,877(23):2198-2207.
- [28] 刘进玺,秦珊珊,冯书惠,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食用菌中农药多残留的基质效应[J]. 食品科学,2016,37(18):171-177.
- [29] 苏萌,艾连峰. 液相色谱-串联质谱基质效应及其消除方法[J]. 食品安全质量检测学报,2014,5(2):511-515.
- [30] AMATE F C, UNTERLUUGAUER H, FISCHER J R, et al. Development and validation of a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of aflatoxins, dyes and pesticides in spices[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 397(1):93-97.