西北农业学报 2006, 15(6): 20~23
Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica

BMPR-IB 基因作为绵羊多胎性能候选基因的研究

朱二勇[1,2], 史洪才[1*], 武 坚[1], 刘明军[1], 简子健[2], 白 杰[3], 徐新明[2]
(1. 新疆畜牧科学院农业部家畜繁育生物技术重点开放实验室, 乌鲁木齐 830000;
2. 新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052; 3. 石河子大学, 新疆石河子 832000)

摘 要: 利用 BMPR-IB 基因作为湖羊、小尾寒羊及中国美利奴(新疆型)多胎类型多胎性能候选基因, 采用 PCR-RFLP 方法和聚丙烯酰胺凝胶电泳分析该基因在湖羊、小尾寒羊和中国美利奴(新疆型)多胎类型中的多态性, 并与其产羔数进行相关性分析, 结果 3 种羊在 BMPR-IB 基因编码序列 746 碱基处均检出与 Booroola Merino 相同的 A→G 突变, 可分为 3 种基因型(BB 型、B+ 型和 ++ 型)。湖羊中几乎全部为 BB 基因型; 小尾寒羊中以 BB 和 B+ 基因型为主; 中国美利奴(新疆型)多胎类型中以 B+ 基因型为主; BMPR-IB 基因与产羔数显著相关, 是上述 3 种羊的多胎主效基因。

关键词: 骨形态发生蛋白受体 IB 基因(BMPR-IB); 多胎性
中图分类号: S826 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2006)06-0020-04

Study on Bone Morphogenetic Protein Receptor IB as a Candidate Gene for Prolificacy in Sheep

ZHU Er-yong[1,2], SHI Hong-cai[1*], WU Jian[1], LIU Ming-jun[1], JIAN Zi-jian[2], BAI Jie[3] and XU Xin-ming[2]
(1. Xinjiang Academy of Animal Science The Key Lab. of Livestock Reproduction & Breed Biotechnology of MOA, Urumqi 830000, China; 2. The College of Animal Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 3. Shihezi University Shihezi Xinjiang 832000, China)

Abstract: BMPR-IB gene as a fecundity candidate gene was studied in Small Tail Han sheep, Hu sheep and Chinese Merino(Xinjiang type) fecundity line by PCR-RFLP. The results showed that there was a same mutation (A→G) of BMPR-IB gene in three breeds sheep as that in Booroola merino ewes. Three genotypes(BB、B+、++) were found and almost all were the genotype BB in Hu sheep, and the BB and B+ were inferior in Small Tail Han sheep, B+ was the major genotype in Chinese Merino (Xingjian type) fecundity line, The BMPR-IB gene is significantly related with the little size of sheep.

Key words: BMPR-IB gene; Fecundity

绵羊的繁殖力是其重要的经济性状之一, 而产羔数则是衡量绵羊繁殖力的重要指标。绵羊产羔性状的遗传力很低, 大约为 0.03~0.1 左右, 所以常规的选育方法很难提高这一性状。同时绵羊的多胎性是一个复杂的性状, 受到基因、年龄、季节和营养的影响, 其中基因是影响绵羊多胎性状的一个重要因素, 对绵羊多胎性主效基因的研究有望建立一种快速提高绵羊产羔性能的育种方法。随着 FecB 基因在 Booroola Merino 羊中的发现及研究的不断深入, 绵羊的多胎基因引起各国研究者的广泛关注。

骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMPs)是转化生长因子(transforming growth factor, TGF)超家族最大的亚家族, 它们是多功能的蛋白, 广泛分布于动物机体的各个部分, 参与动物的胚胎发育、免疫系统以及生殖发

收稿日期: 2006-02-23 修回日期: 2006-04-15
基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(No. 200421103)。
作者简介: 朱二勇(1981-), 男, 汉, 硕士研究生, 从事分子生物学研究工作。
*通讯作者。

育, 尤其在哺乳动物的繁殖中起重要作用[1~3], Mulsant[4] 等和 Wilson[5] 证明 Booroola 绵羊高繁殖力 FecB 座位被定位到绵羊 6 号染色体对应于人染色体 4q22-23 的区间, 该区间包含骨形态发生蛋白受体 IB(Bone morphogenetic protein receptor IB, BMPR-IB) 基因。BMPR-IB 基因编码序列长 1 509 bp, 由 10 个外显子组成, 编码 502 个氨基酸。随后, Mulsant 等、Wilson 等和 Souza 几乎同时报道了 Booroola 绵羊 BMPR-IB 基因高度保守的胞内激酶信号区域存在一个 A746G 突变[5], 该突变造成 249 号氨基酸由谷氨酰胺变成了精氨酸, 正是这个突变(Q249R) 与 Booroola 母羊高繁殖力完全正相关。

1　材料与方法

1.1　样本采集和 DNA 的提取

10 mL 的真空采血管从颈静脉处分别抽取湖羊 32 只母羊血样采自新疆石河子 142 团种羊场, 小尾寒羊 37 只母羊血样采自新疆岳普湖县小尾寒羊繁育基地, 中国美利奴(新疆型) 多胎品系 40 只母羊血样和中国美利奴单胎品系 47 只母羊血样采自新疆巩乃斯种羊场, 每只抽血 8 mL 左右, 经上下颠倒 6 次以上混合抗凝剂, 置冰盒内带回实验室。采用酚、氯仿法抽提绵羊的基因组 DNA, 得到的 DNA 加灭菌水溶解稀释后置 -20 ℃冰箱中备用。

1.2　引物合成

根据王根林等[6] 的方法, 在下游引物 3' 末端倒数第四个位置引入错配碱基(CGTC GGTC), 则会产生一个限制性酶 AvaII 酶切位点, 扩增产物大小为 140 bp, 引物由上海生工生物工程公司合成, 引物序列:

Forward: 5-'GTCGCTATGGGGAAGTTT-GGATG-3';

Reverse: 5-'CAAGATGTTTTCATGCCT-CATCAACACGGTC-3'.

1.3　PCR-RFLP 反应

PCR 反应总体积为 20 μL, 体系组成为: Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.12 μL, 10×PCR 缓冲液 2 μL, $MgCl_2$ (25 mmol/L) 2.0 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL, 提取的基因组 DNA 1 μL(50 μg 左右), 上、下游引物(0.1 μmol/L) 各 1.0 μL, 灭菌超纯水补至 20 μL。上下颠倒混匀, 短暂离心, 进行 PCR。PCR 反应采用 Touch-Down PCR 的方法: 94 ℃预变性 3 min; 94 ℃变性 30 s, 退火温度起始于 60 ℃, 终止于 53 ℃, 72 ℃延伸 30 s, 每重复循环 2 次降低退火温度 1 ℃, 也就是说在前 20 个 PCR 循环中, 退火温度从 60 ℃开始, 每循环 2 次退火温度降低 1 ℃, 直至降低到 52 ℃, 然后在 52 ℃的退火温度下继续循环 25 次; 最后 72 ℃延伸 3 min, 4 ℃保存。PCR 产物用限制性内切酶 AvaII 进行酶切, 反应体系为: 4 μL PCR 产物, 0.8 μL AvaII 酶, 2 μL AvaII 酶切缓冲液, 补灭菌超纯水至 20 μL, 37 ℃水浴 3 h, 之后全部上样于 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。

2　结果和分析

2.1　PCR 扩增

用设计的引物进行 PCR 扩增, 扩增片段为 140 bp, 产物上样于 2% 的琼脂糖凝胶电泳(图 1)。

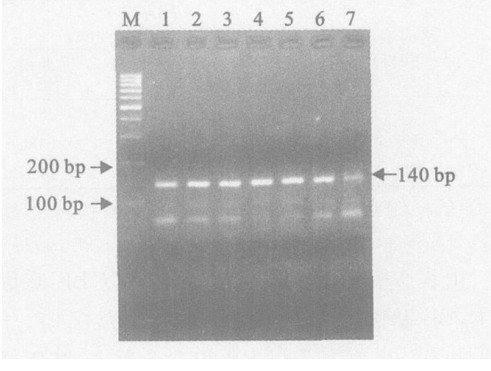
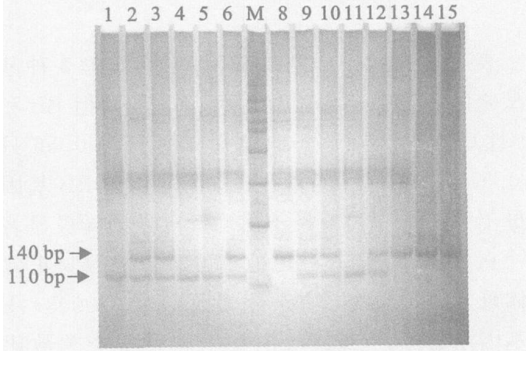


图 1　绵羊 BMPR-IB 基因的扩增结果

Fig. 1　PCR amplication product of BMPR-IB gene in different sheep breeds



7 为 maker; 1、4、5、11 为突变纯合型 BB, 2、3、6、9、10、12 为杂合型 B+, 8、13、14、15 为野生型++

7 maker; 1、4、5 and 11 mutation genotype BB; 2、3、6、9、10、12 heterozygote B+; 8、13、14、15 wild genotype ++

图 2　绵羊 BMPR-IB 基因扩增产物经 AVa 消化结果

Fig. 2　PCR amplication product of BMPR-IB gene digested By AVaII in different sheep breeds

2.2 PCR RFLP 结果与分析

由于绵羊 BMPR IB 基因在 746 处有 1 个单核苷酸多态性位点 A-G 突变，经 AvaII 酶消化后，突变纯合子完全被切开，产生 110bp 和 30bp 的片段，记做 BB 型；杂合型部分被切开，产生 140，110 和 30bp 的片段，记做 B+；野生型不能被 AvaII 酶切开，消化后只有 140bp 的片段，记做++(图 2)。

2.3 BMPR IB 基因对产羔数的影响

采用 GLM 最小二乘分析方法对 BMPR IB 基因的产羔数的影响。

表 1 不同品种(系)绵羊 BMPR IB 基因型频率与基因频率

Table 1 The genotype frequency and gene frequency in different sheep breeds

品种(系) Breeds	只数 No.	基因型频率与基因频率 The genotype frequency and gene frequency				
		BB(只数)	B+(只数)	++	B	+
湖羊 Hu sheep	32	0.97(31)	0	0.03(1)	0.97	0.03
小尾寒羊 Small tailed han sheep	37	0.43(16)	0.46(17)	0.11(4)	0.66	0.34
中国美利奴(新疆型)多胎类型 Chinese Merino monotocous line	40	0.05(2)	0.7(28)	0.25(10)	0.4	0.6
中国美利奴单胎品系 Chinese Merino	47	0	0	1	0	1

表 2 不同绵羊中 BMPR IB 基因对产羔数的影响

Table 2 Effect on litter size in different sheep breeds

基因型 Genotype	小尾寒羊 Small tailed han sheep			中国美利奴多胎类型 Chinese merino			综合分析 Analyse for all sheep		
	记录数 N	平均产羔数 LSM	标准误 SE	记录数 N	平均产羔数 LSM	标准误 SE	记录数 N	平均产羔数 LSM	标准误 SE
++	4	2.2500	0.2857	10	1.6000	0.1807	62	1.5917[a]	0.1219
B+	17	2.7647	0.1386	28	2.1071	0.1080	45	2.1429[b]	0.1077
BB	16	2.8125	0.1429	2	3.0000	0.4041	49	2.3688[b]	0.1194

注：N 为总记录数，LSM 为 GLM 最小二乘中的平均产羔数，SE 为标准误。

Note: N means test number, LSM means lsmean, SE means standard error.

由表 1 知，检验出湖羊主要是以 BB 基因型为主，BB 基因频率是 0.97，B 频率为 0.97，+频率为 0.03；小尾寒羊以 BB 和 B+为主，基因频率为 0.43 和 0.46，B 频率为 0.66，+频率为 0.34；中国美利奴(新疆型)多胎类型以 B+型为主，基因频率为 0.7，新疆细毛羊单胎品系全部为++型。

表 2 的统计分析结果表明，小尾寒羊 3 种基因型之间产羔数差异不显著($P>0.05$)，但 BB 和 B+性型母羊分别比++型母羊多产羔 0.56 只和 0.51 只。中国美利奴多胎类型 B+、BB 基因型母羊和++基因型母羊平均产羔数差异极显著($P<0.01$)。综合分析几种羊可知产羔数与正常个体母羊产羔数比较差异极显著($P=0.0003$)，B+基因型母羊产羔数与正常个体母羊产羔数比较，差异也极显著($P=0.0016$)。这说明具有 BMPR IB 基因的纯合子或者杂合子母羊产羔数与该基因密切关联。

3 讨 论

湖羊主要分布于太湖地区，四季发情，繁殖率高，平均产羔率为 250%以上；小尾寒羊主要分布于华北平原，具有早熟多胎、全年发情的生殖特性，产羔率为 255.92%。这两个品种是我国最重要的多胎绵羊品种，研究其多胎机理有十分重要的意义。Booroola 母羊的 FecB 基因的确定为 BMPR IB 后，我国的科研人员对湖羊和小尾寒羊的多胎主效基因进行了研究。

王根林等[6]检测到小尾寒羊++型有产羔 3~5 头，且杂合型与突变纯合型产羔数相近。BB 基因型小尾寒羊第 2 胎产羔数比++基因型多产 1.02($P<0.01$)，B 等位基因对+等位基因的显性度为 0.82。柳淑芳等[7]报道小尾寒羊出产母羊 BB，B+，和++基因型平均产羔分别为 2.47、2.05 和 1.5，经产母羊 BB，B+，和++基因型平均产羔分别为 3.17、2.55 和 1.67。阎亚东等[8]报道小尾寒羊第一胎母羊 BB，B+和++基因型平均产羔数分别为 2.27，2.18 和 1.35，小尾寒羊第二胎母羊 BB、B+、++基因型平均产羔数分别为 2.52，2.43 和 1.50。BB 基因型小尾寒羊第一胎产羔数比++基因型多产 0.92 只($P<0.01$)，B 等位基因对+等位基因的显性度为0.8。

本研究中, 湖羊几乎全是 BB 基因型, 小尾寒羊以 BB 基因型和 B+ 基因型为主, 中国美利奴(新疆型)多胎类型中以 B+ 基因型为主。BB, B+, 和++ 基因型母羊平均产羔数分别为 2.36、2.14 和 1.59 只, BB 基因型、B+ 基因型母羊产羔数与正常个体母羊产羔数比较, 差异极显著, BB 基因型和 B+ 基因型比++ 基因型母羊产羔数平均多产 0.77 和 0.55 只, 经过统计分析得出 BMPR-IB 基因与产羔数显著相关, 结合国内相关研究结果, 可以确定是上述三种羊的多胎主效基因。

中国美利奴(新疆型)多胎类型是新疆畜牧科学院从 20 世纪 90 年代起利用湖羊和中国美利奴羊(新疆型)培育而成的, 是成功利用了湖羊的多胎基因的一个典型。本研究为利用 BMPR-IB 基因进行辅助育种提供了科学依据, 为新疆本地绵羊的快速选育工作奠定了基础。

参考文献:

[1] Galloway S M, Mcnatty K P, cambridge L M, *et al*. Mutations in an oocyte derived growth factor gene (BMP15) carse increased ovulation rate and infertility in a dosage sensitive manner[J]. NatureGenetics, 2000, 25: 279~283.

[2] Zi Jian Lan, Peili Gu, Xueping Xu, *et al*. GCNF dependent repression of BMP 15 and GDF-9 mediates gamete regulation offemale fertility[J]. EMBO Journal, 2003, 22: 4070~4081.

[3] Lawson K A, Dunn N RoelenB A, Zeinstra L M, *et al*. Bmp4 is required for the generation of prinortlial gem cells in the mouse embryo[J]. Genetics Development, 1999, 13: 424~436.

[4] Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, *et al*. Mutation in Bone morphogenetic protein receptor IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2001, 98: 5104~5109.

[5] Wilson T, Wu X Y, Juengel J, *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: 1225~1235.

[6] 王根林, 毛鑫智, 赵宗盛, 等. 分析发现我国湖羊和小尾寒羊存在(FecB)多胎基因[J]. 南京农业大学学报, 2003, 26(1): 104~106.

[7] 柳淑芳, 姜运良, 杜立新. BMPR IB 和 BMP15 基因作为小尾寒羊多胎性能候选基因的研究[J]. 遗传学报, 2003, 30(8): 755~760.

[8] 阎亚东, 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.

欢迎订阅 2007 年《水土保持通报》

《水土保持通报》创刊于 1981 年, 双月刊, 中文版, 属环境科学学科, 连续 4 届被定为我国中文核心期刊。主管单位为中国科学院, 由中国科学院水利部水土保持研究所和水利部水土保持监测中心联合主办。为《中国科技论文统计源期刊》,《中国科学引文数据库统计源期刊》,《中文核心期刊要目总览》, 以及日本《科学技术文献速报(JICST)》,《中国期刊精品荟萃》等收编。根据《中国科学引文数据库》引证报告, 2000~2004 年《水土保持通报》连续 4 年影响因子居中国科技期刊前 300 名之列; 连续 5 年总被引频次排名居中国科技期刊前 300 名之列, 其中有 2 年位居前 200 名之列。本刊主编李锐, 郭索彦先生。ISSN 1000-288X, CN61-1094/X。开本为大 16 开, 160 页/期, 国内发行代号: 52-62, 国外发行代号: 4721BM, 定价: 14.0 元/册。

办刊宗旨: 紧密跟踪水土保持学科的发展方向, 及时报道本学科前沿领域科学理论、技术创新及其实践应用研究最新成果, 积极引导和推动水土保持学科和水土保持实践的发展与繁荣。报道内容: 土壤侵蚀、旱涝、滑坡、泥石流、风蚀等水土流失灾害的现状与发展动向; 水土流失规律研究、监测预报技术研发成就与监测预报结果; 水土流失治理措施与效益分析; 水土流失地区生态环境建设与社会经济可持续发展研究; 计算机、遥感工程、生物工程等边缘学科新技术、新理论、新方法在水土保持科研及其实践中的应用; 国外水土流失现状及水土保持研究新动态等。读者对象: 从事水保科技研究、教学与推广的科教工作者及有关行政管理人员; 国内外环境科学、地学、农业、林业、水利等相关学科科教人员及大专院校师生。

地址: 陕西省杨凌区西农路 26 号《水土保持通报》编辑部
邮编: 712100　　电话: 029-87018442　　传真: 029-87012210
E mail: bulletin@ms.iswc.ac.cn　　http://www.iswc.ac.cn