

常年性和季节性发情绵羊品种 *HIOMT* 基因的 PCR-SSCP 分析

于成江¹,陈玉林¹,刘福元²,尹君亮²

(¹ 西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100;² 新疆农垦科学院 畜牧兽医研究所,新疆 石河子 832000)

[摘要] 【目的】探讨季节性与常年性发情绵羊品种在 *HIOMT* 基因序列上的差异,为培育常年性发情绵羊品种提供辅助选择标记(MAS)。【方法】采用基因克隆测序及 PCR-SSCP 技术,分析小尾寒羊、新疆细毛羊、多浪羊和阿勒泰羊共计 179 个个体的羟基吲哚-氧-甲基转移酶(*HIOMT*)的 3'非翻译区部分序列及其遗传多样性。【结果】在 *HIOMT* 基因的 3'非翻译区存在 PCR-SSCP 多态,共发现 AA、BB、CC、AB、AC 和 BC 6 种基因型,在小尾寒羊群体中发现以上 6 种基因型,在新疆细毛羊群体中发现除 CC 基因型外的其他 5 种基因型,在阿勒泰羊群体中发现 AA、BB、AB 和 BC 4 种基因型,在多浪羊群体中只发现了 AA、CC 和 AC 3 种基因型。与 AA 基因型相比,BB 基因型在第 94, 95, 96 和 201 bp 4 处发生了突变,CC 基因型在第 94, 201 和 217 bp 3 处发生了突变。Hardy-Weinberg 平衡检验显示,小尾寒羊和多浪羊群体处于平衡状态,新疆细毛羊和阿勒泰羊群体处于非平衡状态。小尾寒羊、新疆细毛羊和阿勒泰羊群体多态信息含量为高度多态($PIC > 0.5$),多浪羊群体为中度多态($0.25 < PIC < 0.5$)。经 χ^2 独立性检验后,常年性发情的小尾寒羊和多浪羊与季节性发情的新疆细毛羊和阿勒泰羊群体间基因频率差异极显著($P < 0.01$)。【结论】*HIOMT* 基因在不同绵羊品种中序列的差异性,可能是造成其季节性和常年性发情的原因之一。

[关键词] 绵羊;发情;*HIOMT*;PCR-SSCP

[中图分类号] S826.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)05-0012-05

PCR-SSCP analysis of the *HIOMT* gene in nonseasonal and seasonal estrous sheep breeds

YU Cheng-jiang¹, CHEN Yu-lin¹, LIU Fu-yuan², YIN Jun-liang²

(¹ College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; ² Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Agricultural Reclamation, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

Abstract: 【Objective】The gene sequence and polymorphism in Hydroxyindole-O-Methyltransferase (*HIOMT*) gene of 179 individuals including Xinjiang finewool sheep, Small Tail Han sheep, Aletai sheep and Duolang sheep were analyzed. 【Method】The study used gene sequencing and PCR-SSCP to analyze the sequencing of 3' untranslated region of *HIOMT* gene and its genetic diversity in 179 sheep. 【Result】The results indicated that there was polymorphism in 3' untranslated region of *HIOMT* gene. AA, BB, CC, AB, AC and BC genotypes were found. The six genotypes were all found in Small Tail Han sheep, five genotypes except for CC were found in Xinjiang finewool sheep, AA, BB, AB and BC genotypes were found in Aletai sheep, AA, CC and AC genotypes were found in Duolang sheep. Sequencing revealed four single nucleotide mutations in the BB genotype compared with the AA genotype, three single nucleotide mutations in

* [收稿日期] 2007-05-10

[基金项目] 新疆生产建设兵团博士基金项目(04BSZJ-8)

[作者简介] 于成江(1977—),男,吉林白山人,在读硕士,主要从事生物技术与家畜育种研究。E-mail:ychj7213@163.com

[通讯作者] 陈玉林(1964—),男,河南鄢陵人,教授,博士生导师,主要从事动物遗传资源研究。E-mail:myxy11@263.net

the CC genotype compared with the AA genotype. The results of Hardy-Weinberg equilibrium test indicated that Small Tail Han sheep, Duolang sheep reached the equilibrium ($P > 0.05$), but Xinjiang finewool sheep, Aletai sheep didn't ($P < 0.05$). Small Tail Han sheep, Xinjiang finewool sheep, Aletai sheep had high polymorphism information contents ($PIC > 0.5$), Duolang sheep had moderate polymorphism information contents ($0.25 < PIC < 0.5$). The *HIOMT* genotype distributions were significantly different ($P < 0.01$) between nonseasonal estrous sheep (Small Tail Han sheep, Dolang sheep) and seasonal estrous sheep (Xinjiang finewool sheep, Aletai sheep). 【Conclusion】 The sequence difference in different sheep breeds indicates that it is one possible reason leading to nonseasonal or seasonal estrous.

Key words: sheep; estrous; *HIOMT*; PCR-SSCP

褪黑激素 (Melatonin, MLT) 是由松果腺和视网膜分泌的一种重要的内分泌激素。MLT 调节着雌激素对促性腺激素的抑制作用,从而调控着绵羊的季节性发情^[1]。在哺乳动物体内,MLT 的生成主要受去甲肾上腺素 (noradrenaline, NA) 的调控。NA 在 β 肾上腺素能受体 (β -AR) 激动剂的作用下提高了动物体内 cAMP 和 cGMP 的浓度, cGMP 浓度的增加使羟基吲哚-氧-甲基转移酶 (Hydroxyindole-O-Methyltransferase, *HIOMT*) 活性升高, *HIOMT* 使吲哚环羟基甲基化,催化完成了体内合成 MLT 的最后一步^[2]。因此, *HIOMT* 活性与 MLT 的分泌量呈正相关^[3]。 *HIOMT* 分子量为 76~78 ku, 由 2 个相似的大约 39 ku 亚单位组成。 *HIOMT* 在白天即高水平表达,夜间则表达水平更高 (为白天的 2 倍)。目前,关于 MLT 生物学的研究主要集中在 MLT 受体^[4-5]上,而有关 *HIOMT* 基因与绵羊发情关系的研究国内外尚未见报道。

本试验以常年性发情绵羊品种 (小尾寒羊和多浪羊) 及典型季节性发情绵羊品种 (新疆细毛羊和阿勒泰羊) 为研究对象,采用 PCR-SSCP 和克隆测序相结合的方法,分析了 *HIOMT* 基因在 4 个绵羊群体中的遗传多样性,探讨了季节性发情绵羊品种与常年性发情绵羊品种在 *HIOMT* 基因序列上的差异,以期为培育常年性发情绵羊品种提供辅助选择标记 (MAS)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 绵羊血样 供试绵羊品种为新疆细毛羊 (58 只)、小尾寒羊 (60 只)、多浪羊 (31 只)、阿勒泰羊 (30 只),均为成年母羊,来自新疆生产建设兵团农八师北野种羊场。血样采自绵羊颈静脉 (10 mL/只),肝素钠抗凝,迅速运回实验室, -20°C 冻存,备用。

1.1.2 主要试剂 蛋白酶 K、Tris 饱和酚、*Taq*

DNA 聚合酶、dNTPs、聚丙烯酰胺和 pMD18-T 等,均购自西安沃尔森生物技术有限公司;DNA 片段纯化回收试剂盒、甲叉和 TEMED 等,均购自北京鼎国生物技术有限公司。

1.2 绵羊基因组 DNA 的提取

用酚/氯仿抽提法^[6]提取绵羊基因组 DNA,溶于 TE 中, 4°C 保存备用。

1.3 绵羊基因组 DNA 的 PCR 扩增

1.3.1 引物设计 根据报道的牛 *HIOMT* 基因 cDNA 序列 (Accession No. J02671),通过 Primer 5.0 在 3' 侧翼区设计 1 对引物:上游引物序列为 F: 5' GGGGAACCTACGATGCTGTC 3',下游引物序列为 R: 5' CCTTGTCGCTGGGTTTAG 3'。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3.2 PCR 扩增 PCR 反应体系总体积为 15 μL : 10 $\times$ Buffer 1.5 μL (含 20 $\mu\text{mol/L}$ Mg^{2+}), dNTPs 1.0 μL (2.5 mmol/L), 上、下游引物各 0.25 μL (10 pmol/L), 模板 DNA 1.0 μL (80 ng/ μL), *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL (5 U/ μL), ddH₂O 10.8 μL 。PCR 扩增反应条件为: 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 40 s, 56.8°C 退火 30 s, 72°C 延伸 40 s, 共 32 个循环;最后 72°C 延伸 10 min, 4°C 保存。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.4 PCR 目的产物的验证

由于目前 GenBank 尚未公布绵羊 *HIOMT* 基因的任何序列,为了验证 PCR 产物是否为绵羊 *HIOMT* 基因上的序列,本试验将扩增产物进行了克隆测序。PCR 产物回收后与 pMD-18T 载体连接,转化 DH-5 α ,挑取白斑摇菌,菌液送至上海捷瑞生物技术有限公司进行测序。

1.5 绵羊 *HIOMT* 基因的 SSCP 分析

取 4 μL PCR 产物加入 6 μL 的上样缓冲液 (98% 去离子甲酰胺、10 mmol/L EDTA、0.025% 二甲苯青 FF、0.025% 溴酚蓝),然后 98°C 变性 10

min 后,迅速插入碎冰中,放置 10 min,使之保持单链状态。样品在预冷的 12% 非变性聚丙烯酰胺(丙烯酰胺:甲叉(质量比)=29:1)凝胶中,以 120 V 电压于 1×TBE 电泳 6 h,电泳结束后,进行银染显带并进行基因型判定。

1.6 绵羊 *HIOMT* 基因 PCR 产物的纯化回收及测序

经 SSCP 分析后,不同纯合子基因型个体的 PCR 产物用柱式胶回收试剂盒纯化回收,回收后的 DNA 片段送交上海生工生物工程技术有限公司进行双向测序。

1.7 统计指标

1.7.1 等位基因频率和基因型频率 基因型频率是指一个群体中某一性状的各种基因型之间的比率。PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 检测结果是共显性等位基因,故表型频率和基因型频率一致。

$$P_{AA} = N_{AA} / N. \quad (1)$$

式中: P_{AA} 为某一位点 AA 基因型频率, N_{AA} 为群体中具有 AA 基因型的个体数, N 为检测群体总数。

基因频率是指一个群体中某一基因对其等位基因的相对比率。计算公式为:

$$P_A = (2N_{AA} + N_{Aa1} + N_{Aa2} + N_{Aa3} + \dots + N_{Aan}) / 2N. \quad (2)$$

式中: P_A 为等位基因 A 频率, N_{AA} 为群体中具有 AA 基因型的个体数, N_{Aan} 为群体中具有 Aan 基因型的个体数, $a1 \sim an$ 为等位基因 A 的 n 个互不相同的复等位基因。

1.7.2 Hardy-Weinberg 平衡检测

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n (O_i - E_i)^2 / E_i. \quad (3)$$

式中: O_i 为第 i 个基因型实际个体数, E_i 为第 i 个基因型理论个体数。

1.7.3 多态信息含量(PIC) 用于对标记基因多态性的估计, $PIC > 0.5$ 为高度多态, $0.25 < PIC < 0.5$ 为中度多态, $PIC < 0.25$ 为低度多态。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2 - \sum_{i=1}^{m-1} \sum_{j=i+1}^m 2P_i^2 P_j^2. \quad (4)$$

式中: P_i, P_j 为第 i 和第 j 个群体中的等位基因频率, m 为等位基因数。

1.7.4 有效等位基因数(N_e) 有效等位基因数是基因纯合度的倒数,反映了等位基因间的相互影响,是衡量基因纯合度的一个指标,因此用来测定群体的遗传变异。

$$N_e = 1 / \sum_{i=1}^m P_i^2. \quad (5)$$

式中: P_i 为等位基因频率, m 为等位基因数。

1.7.5 位点杂合度(H) 杂合度是用来度量某一群体中特定位点上等位基因杂合程度的指标。

$$H = 1 - \sum_{i=1}^m P_i^2. \quad (6)$$

式中: P_i 为等位基因频率, m 为等位基因数。

1.7.6 Shannon's 信息熵(S) Shannon's 信息熵是用来测量基因变异的一个指标。

$$S = -\ln \sum_{i=1}^m P_i \ln P_i. \quad (7)$$

式中: P_i 为等位基因频率, m 为等位基因数。

2 结果与分析

2.1 绵羊 *HIOMT* 基因的 PCR 扩增产物及其测序结果

绵羊 *HIOMT* 基因序列的特异性扩增产物,经琼脂糖凝胶电泳检测长度约为 350 bp (图 1)。克隆测序后可知,PCR 产物长度为 354 bp,将所得序列与 NCBI 上相应序列进行在线 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>),确定该产物为绵羊 *HIOMT* 基因的部分序列。与人的 *HIOMT* 基因相比,此片段可能为绵羊 *HIOMT* 基因第 9 外显子部分序列(35 bp)和 3' 侧翼区部分序列(319 bp),测序结果正确,与本试验预期结果相符。

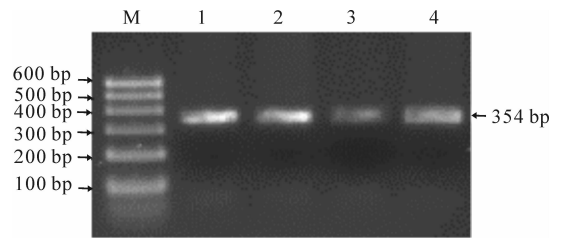


图 1 绵羊 *HIOMT* 基因的 PCR 扩增结果
M. Marker 1; 1~4 个绵羊品种的 PCR 结果扩增(354 bp)

Fig. 1 PCR amplification product of *HIOMT* gene in different sheep breeds

M. Marker 1; 1~4. PCR product for four sheep breeds

2.2 绵羊 *HIOMT* 基因的 SSCP 检测结果

对 PCR 扩增产物进行 SSCP 分析后,在供试的 4 个绵羊品种中共发现 6 种基因型,其中有 3 种纯合子和 3 种杂合子,分别命名为 AA、BB、CC、AB、BC 和 AC(图 2)。在小尾寒羊群体中共检测到 AA、BB、CC、AB、AC 和 BC 6 种基因型,在新疆细毛羊群体中检测到 AA、BB、AB、AC 和 BC 共 5 种基因型,在阿勒泰羊群体中共检测到 AA、BB、AB 和 BC 4 种基因型,在多浪羊群体中检测到 AA、CC 和 AC

共 3 种基因型。

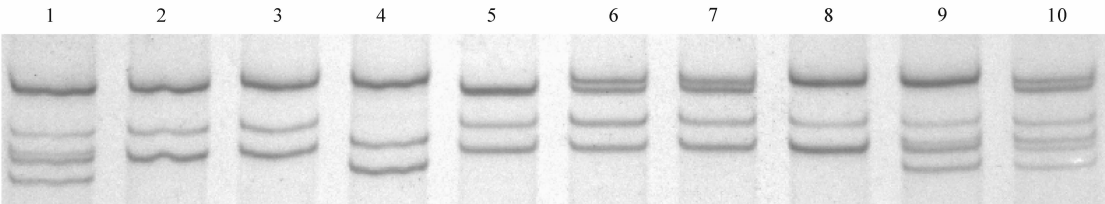


图 2 不同绵羊品种 *HIOMT* 基因扩增片段的 SSCP 分析结果
1,9. AC 型;2,3,8. AA 型;4. CC 型;5. BB 型;6,7. AB 型;10. BC 型

Fig. 2 SSCP analysis of PCR amplification of *HIOMT* gene in different sheep breeds
1,9. Genotypes AC;2,3,8. Genotypes AA;4. Genotypes CC;5. Genotypes BB;6,7. Genotypes AB;10. Genotypes BC

2.3 绵羊 *HIOMT* 基因 PCR 产物的序列分析结果
经 SSCP 分析后,不同纯合子基因型个体的 PCR 产物经纯化回收后进行双向测序,将所得的序列经分析软件 DNAMAN 比对,结果(图 3)发现,在

HIOMT 基因扩增片段的第 94,95,96,201 和 217 bp 共 5 处发生了突变,与 AA 基因型相比,BB 基因型在第 94,95,96 和 201 bp 4 处发生了突变,CC 基因型在第 94,201 和 207 bp 3 处发生了突变。

AA	GGGGAACCTA	CGATGCTGTC	TTGGCCACAA	AGTGAGCCCT	GCAGCGTGTG	ACCCCCCCCCGC	60
BB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	60
CC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	60
94—96							
AA	CATGACGCAA	CGCCTGTGAT	GAAGAGGCGG	TGTTGGTCAC	GTTTCGTTTC	TGCCTTTTCT	120
BB	-----	-----	-----	--- CCA ---	-----	-----	120
CC	-----	-----	-----	--- C ---	-----	-----	120
AA	TCTTTTTTCC	CCTTGTTTTC	CGTCTATTTT	ACGCTTTTCT	TGTTTTCTTG	CCCTGTCGAG	180
BB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	180
CC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	180
AA	GGATATGAGG	TTTATGCCCA	201 TGGATGGTCA	217 CTTTGCGTTC	TATCTTGCTT	TCTTTCATTA	240
BB	-----	-----	C-----	-----G---	-----	-----	240
CC	-----	-----	C-----	-----A---	-----	-----	240
AA	TCCTTATTTT	CATTTCATTC	CAGTCCATTC	TATTTTGCTT	CCTTCCTGTG	AGGGAGTGAA	300
BB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	300
CC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	300
AA	GGTCTGAGAT	GAGGTTCTCT	CTGGGTGGCG	GTGGCCCTAA	ACCCAGCGAC	AAGG	354
BB	-----	-----	-----	-----	-----	-----	354
CC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	354

图 3 绵羊 *HIOMT* 基因 AA、BB 和 CC 基因型序列的比较

Fig. 3 Sequence comparison of AA, BB and CC genotypes of *HIOMT* gene in sheep

2.4 不同绵羊品种 *HIOMT* 基因的遗传多态性
和基因型频率见表 1。
不同绵羊品种 *HIOMT* 基因的等位基因频率

表 1 不同绵羊品种 *HIOMT* 基因的等位基因频率和基因型频率

Table 1 Gene and genotype frequencies of *HIOMT* in different sheep breeds

项目 Item		小尾寒羊 Small Tail Han sheep	新疆细毛羊 Xinjiang finewool sheep	阿勒泰羊 Aletai sheep	多浪羊 Duolang sheep
基因型频率 Genotype frequency	AA	0.383 3(23/60)	0.241 3(14/58)	0.466 7(14/30)	0.419 4(13/31)
	BB	0.016 7(1/60)	0.275 9(16/58)	0.300 0(9/30)	0.000 0(0/31)
	CC	0.200 0(12/60)	0.000 0(0/58)	0.000 0(0/30)	0.064 5(2/31)
	AB	0.066 7(4/60)	0.275 9(16/58)	0.100 0(3/30)	0.000 0(0/31)
	AC	0.333 3(20/60)	0.034 5(2/58)	0.000 0(0/30)	0.516 1(16/31)
	BC	0.000 0(0/60)	0.172 4(10/58)	0.133 3(4/30)	0.000 0(0/31)
等位基因频率 Gene frequency	A	0.583 3	0.396 6	0.516 6	0.677 4
	B	0.050 0	0.500 0	0.416 7	0.000 0
	C	0.366 7	0.103 4	0.066 7	0.322 6
χ^2 适合性检验(χ^2 值)		平衡(7.528 6)	不平衡(33.522 2)	不平衡(16.237 9)	平衡(0.942 9)
Chi-square test(χ^2 value)		Balance(7.528 6)	Unbalance(33.522 2)	Unbalance(16.237 9)	Balance(0.942 9)

由表 1 可知,在常年性发情的小尾寒羊和多浪羊群体中等位基因频率大小顺序均为 $A>C>B$,其中 A 等位基因的频率分别达到 0.583 3 和 0.677 4,且经 χ^2 检验后这两个群体在该位点均达 Hardy-Weinberg 平衡状态;而在季节性发情的新疆细毛羊和阿勒泰羊群体中 C 等位基因的频率均最低,分别为 0.103 4 和 0.066 7,且经 χ^2 检验后这两个群体在该位点均处于 Hardy-Weinberg 非平衡状态。

由表 2 可知,4 个供试绵羊群体的 H 值均处于 0.25~0.5,小尾寒羊、新疆细毛羊和阿勒泰羊群体的 PIC 值均在 0.5 以上,表现为高度多态($PIC>$

0.5),而多浪羊表现为中度多态($0.25<PIC<0.5$)。以上结果说明,这 4 个绵羊群体在该位点均表现遗传变异比较大,具有较大的选择潜力。

常年性发情绵羊与季节性发情绵羊群体间等位基因频率差异显著性检验结果表明,常年性发情的小尾寒羊群体和季节性发情的新疆细毛羊、阿勒泰羊群体之间差异极显著($P<0.01$),常年性发情的多浪羊群体和季节性发情的新疆细毛羊、阿勒泰羊群体之间差异也极显著($P<0.01$),说明常年性发情绵羊与季节性发情绵羊群体间等位基因频率存在明显差异。

表 2 不同绵羊品种的 H 、 N_e 、 PIC 和 S
Table 2 H 、 N_e 、 PIC and S in different sheep breeds

绵羊品种 Sheep breed	位点杂合度 H	有效等位基因数 N_e	多态信息含量 PIC	信息熵 S
小尾寒羊 Small Tail Han sheep	0.428 9	2.095 5	0.522 8	0.183 8
新疆细毛羊 Xinjiang finewool sheep	0.494 7	2.392 4	0.582 0	0.053 4
阿勒泰羊 Aletai sheep	0.458 4	2.247 4	0.555 0	0.120 4
多浪羊 Duolang sheep	0.341 5	1.776 4	0.437 1	0.463 9

3 讨 论

前人对 $HIOMT$ 基因的研究主要集中在不同物种及组织中的表达活性方面^[7-8]。有研究表明^[9], $HIOMT$ 基因与其他影响 MLT 生成的酶不同,其表达受光照的影响较小。尽管如此,大量试验证实,在多个物种中 $HIOMT$ 基因参与了光周期/季节性调控的夜间 MLT 分泌峰值的形成,并调控绵羊的季节性发情^[8,10]。张小辉^[11]在自然光照条件下对不同绵羊品种 MLT 的季节性及昼夜变化规律进行了研究,发现季节性发情与常年性发情的绵羊品种 MLT 的季节性变化规律明显不同。迄今为止,季节性发情与常年性发情绵羊夜间 MLT 的差异是否与 $HIOMT$ 基因的多态性相关尚无定论。本试验是在研究 $HIOMT$ 基因 3'端多态性的基础上,进而分析其与绵羊发情的关系。

近年来,随着对基因表达调控机制的深入认识,对 3'端的研究越来越多^[12]。目前,普遍认为基因的 3'非翻译区涉及了基因转录后水平的调控过程,主要参与 mRNA 的稳定性、基因表达的定位以及翻译效率等生理进程的调控。本试验首次获得了绵羊 3'端 354 bp 序列,这为后续研究奠定了重要基础。

多态信息含量(PIC)是衡量位点多态性的一个参数。 PIC 值越大,群体内基因的一致性就越差,变异性就越高,选择的潜力就越大;反之, PIC 值越

小,说明群体变异程度越低,选择潜力就越小。在本试验中,各品种绵羊 $HIOMT$ 基因的 PIC 值在 0.437 1~0.582 0,其中多浪羊群体属于中度多态,其他群体都属于高度多态。但是各个品种绵羊群体的 PIC 值比较接近,说明在该位点各个品种绵羊中的变异程度相近,没有太大区别。

就本试验而言,供试绵羊的血样采自同一养殖场,保证了其气候和地理条件的一致性。针对 4 个供试绵羊品种共计 179 个个体 $HIOMT$ 基因的 PCR-SSCP 分析结果表明,在 $HIOMT$ 基因 3'非翻译区检测到了丰富的多态性(6 种基因型)。在常年性发情的小尾寒羊和多浪羊群体中,均检测到 CC 基因型,而在季节性发情的新疆细毛羊和阿勒泰羊群体中,均未检测到 CC 基因型,且 C 等位基因的基因频率在这两个绵羊品种中也较低;在常年性发情的多浪羊群体中没有检测到 B 等位基因,可能是由于样本量不足或者是该等位基因在此品种中很少存在。在对季节性发情和常年性发情绵羊的群体间基因频率进行 χ^2 检验后发现,季节性和常年性发情绵羊之间差异极显著($P<0.01$)。因此, $HIOMT$ 基因 3'非翻译区丰富的多态性可能是造成季节性和常年性发情绵羊发情差异的原因之一。当然,这一结果有待于在更大的群体中进行验证或对该基因的调控机理弄清后尚可定论。

(下转第 21 页)