

# 云南乌骨绵羊乌质性状与 *TYR* 基因多态性的相关分析

杨舒黎, 毛华明, 舒文, 邓卫东

(云南农业大学云南省动物营养与饲料重点实验室, 昆明 650201)

**摘要:** 乌骨乌肉是乌骨绵羊的主要乌质性状。测定了乌骨绵羊、兰坪本地羊和罗姆尼羊血液 *TYR* 活性并分析了乌骨绵羊与乌骨鸡组织器官黑色素结构, 结果表明: 乌骨绵羊 *TYR* 活性显著高于兰坪本地绵羊和罗姆尼羊 ( $P < 0.05$ ); 乌骨绵羊黑色素与乌骨鸡黑色素的 IR 光谱基本一致, 黑色物质主要是真黑色素。克隆了绵羊 *TYR* 基因第一外显子长 667 bp 序列, 并检测了乌骨绵羊和非乌骨绵羊 *TYR* 基因多态性。结果发现, 检测的乌骨绵羊 *TYR* 基因第一外显子有两个变异位点, 分别位于第 64 和 154 号编码氨基酸上, 但都属于同义突变。通过对 64 号位置设计酶切位点检测 *TYR* 基因多态性, 结果发现, 该突变与乌质性状有关基因紧密连锁, *TYR* 基因上可能存在乌质性状相关功能突变位点。另外, *TYR* 基因多态性与毛色的表型相关极显著 ( $P < 0.01$ ), 该基因可能也是毛色功能基因。

**关键词:** 黑色素; *TYR* 活性; *TYR* 基因; 毛色

中图分类号: S826

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)03-0291-06

## Melanin Traits of Yunnan Black Bone Sheep and *TYR* Gene Polymorphism

YANG Shu-Li, MAO Hua-Ming, SHU Wen, DENG Wei-Dong

(Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed-stuff, Yunnan Agricultural University, Kunming, 650201, China)

**Abstract:** He "black bone and muscle" is cardinal melanin trait of black bone sheep. The black bone sheep and the native sheep in Lanping and Luomuni sheep were chosen as materials for the measurement of *TYR* activity of blood and melanin content of tissues and organs. Moreover, we compared characteristic structure of melanin of black bone sheep with silky fowls. The results showed as follows: *TYR* activity was significantly different between black and non-black bone sheep ( $P < 0.05$ ); the total character of infrared spectrum (IR) of melanin of black bone sheep resembled silky fowls; and melanin was eumelanin. We firstly cloned exon1 667 bp sequence of *TYR* gene and determined *TYR* gene polymorphism of black and non-black bone sheep by PCR-RFLP. Compared with sequence of *TYR* gene of non-black bone sheep, there were two nucleotide mutation sites in exon1 of black bone sheep, located in No. 64 and No. 154 amino acid codons, respectively; but they were synonymics mutation. We designed restriction site in codon 64 and check up *TYR* gene polymorphism. The result showed the mutation site together with the close linked gene influenced melanin trait deposition. It suggests there should be functional mutation related with melanin trait. Furthermore, there was significant correlation between *TYR* gene polymorphism and coat color of sheep ( $P < 0.01$ ), indicating *TYR* could influence synthesis of coat color of sheep.

收稿日期: 2005-04-15; 修回日期: 2005-06-27

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目(编号: 2002C0038M)和国家自然科学基金面上项目(编号: 30460089) [Supported by Natural Science Foundation of Yunnan Province (No. 2002C0038M) and National Natural Foundation of China (No. 30460089)]

作者简介: 杨舒黎(1976—), 女, 四川人, 在读博士, 研究方向: 动物营养与饲料科学。现联系地址: 中国农业科学院畜牧研究所反刍动物营养研究室, 北京 100094。Tel: 010-62815833, E-mail: yang shu li77@163.com

通讯作者: 毛华明(1963—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 动物营养。E-mail: maohm@vip.sina.com.

**Key words:** melanin; TYR activity; TYR; coat color

国内外有关乌骨羊的报道有产生于三峡库区苗族土家族居住地的乌山羊,由于其唇、眼部、肛门、皮肤和舌呈乌色,肌肉及骨骼呈微乌色,因当地群众认为具有强化筋骨、醒神、补肾等功效而被称为“药羊”<sup>[1]</sup>。其次,山东省淄博市淄川区召口乡凤凰山一带也发现具有食用、药用、保健于一体的乌骨羊,该羊的皮、骨、唇舌、口腔均呈黑色<sup>[2]</sup>。在云南怒江也发现有乌骨绵羊的分布,且数量很少。毛华明等对云南乌骨绵羊的发现、分布和特征性状进行了详细的描述。从外貌粗看,与一般绵羊基本相同,其毛色有黑色、花色、黄色和白色;但通过仔细观察成年乌骨绵羊眼结膜呈褐色、腋窝皮肤呈紫色、犬齿和肛门乌黑;解剖后可见骨骼、肌肉、气管、肝、肾、胃网膜、肠系膜和羊皮内层等呈乌黑,表现为明显的乌骨乌肉特征;随着年龄的增长,颜色有越来越深的趋势,且该羊的乌骨乌肉特征是可遗传的<sup>[3]</sup>。现代医学证明,乌骨鸡的食用和药用价值主要在于其体内含有丰富的黑色素。云南乌骨绵羊表现出明显的乌骨乌肉的特征,如果该性状特征是由黑色素所引起,乌骨绵羊将有巨大研究开发价值。酪氨酸酶是黑色素合成的关键酶,所以,我们从黑色素的产生入手,分析乌骨绵羊与非乌骨绵羊各身体部位黑色素含量、酪氨酸酶活性,探讨酪氨酸酶影响黑色素合成的生化机制以及研究控制黑色性状的主要候选基因——TYR 基因,分析 TYR 基因变异与绵羊乌质性状之间的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验采用云南省怒江州兰坪县乌骨绵羊 40 只,兰坪本地绵羊 23 只,云南省寻甸县罗姆尼羊(非乌骨绵羊)21 只羊血液用于 TYR 活性的测定和 DNA 多态检测。采集乌骨绵羊 7 只、兰坪本地绵羊 4 只、罗姆尼羊 1 只以及云南武定乌骨鸡 2 只,取组织器官(包括皮肤、内脏、肌肉和骨骼)用于黑色素含量测定,样品放  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用;同时记录每只羊的毛色(黑、白、花)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 酪氨酸酶活性测定

根据 Scymour 和龙子江方法<sup>[4,5]</sup>作适当修改。

取试管 5 支,各加入 1 mL L-多巴溶液(2 mg/mL)和 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 为 7.0)2.8 mL,摇匀,放入  $25^{\circ}\text{C}$  恒温水浴锅中预热 10 min,再向上述试管中分别加入不同浓度的酪氨酸酶(TYR)标准溶液 1 mL,立即混匀,并准确计时,在第 2 min 时(反应完全)迅速加入 0.2 mL 硫脲-乙醇饱和液,混匀,终止反应,以 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液为空白对照管,在 722 分光光度计,波长为 475 nm 处测吸光值。血浆 TYR 活性的测定将上述步骤中酪氨酸酶标准溶液换成血浆 1 mL,其余同文献报道<sup>[4,5]</sup>。

#### 1.2.2 黑色素结构分析与含量测定

绵羊黑色素的提取方法参照乌骨鸡黑色素的提取方法(与南昌大学生命科学与食品工程学院胡泗才教授个人交流),略作改动。使用 Bluker Tensor27 FT-红外光谱(IR)仪,采用 KBr 压片法,在  $400\sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$  波数范围内对乌骨绵羊和乌骨鸡黑色素的基本结构特征进行光谱测定。

#### 1.2.3 TYR 基因序列分析

本研究根据人和小鼠模型动物酪氨酸酶基因的同源序列,(人:NC\_000011,小鼠:NT\_078527,大鼠:NW\_047561),设计 PCR 引物,扩增绵羊 TYR 基因外显子 I 相应的基因片段,测定绵羊 TYR 基因序列。引物序列如下:5' TGGCTGTTTTGTACTGCTG3'; 5' CCCTCCCATGTACTIONCATCTGT3'。PCR 产物经小量胶回收试剂盒(上海华舜生物工程公司)回收。PCR 产物序列测定由上海申友生物有限公司测序。通过 DNA 序列分析软件,比较乌骨绵羊和非乌骨绵羊的 DNA 序列,找出变异位点;在变异位点处寻找合适的核酸内切酶,然后对所有绵羊样品的 PCR 扩增产物进行酶切反应。根据酶切条带分析乌骨绵羊与非乌骨绵羊 TYR 基因多态性(*Eae* I 酶试剂来自于昆明丰科有限公司)。

#### 1.2.4 统计分析

利用 Oligo6.0 软件设计引物, DNASTAR5.0 软件编辑校对序列, SPSS11.0 对数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 乌骨绵羊、兰坪本地绵羊和罗姆尼羊比较屠宰观察

本实验共屠宰了 7 只乌骨绵羊,4 只兰坪本地

绵羊和 1 只罗姆尼羊。屠宰后乌骨绵羊的各组织器官肉眼观察均表现出明显乌色特征,其中气管、肾脏和骨骼最为明显,气管呈明显的黑色环状,肾实质、骨膜和髓质呈乌黑色。从肉眼看乌骨羊的乌色特征与年龄有关;屠宰的 7 只乌骨羊中,有 4 只颜色特别深,而另外年龄较小的 3 只颜色较浅(图 1)。



图 1 乌骨绵羊与非乌骨绵羊比较屠宰观察

乌骨绵羊:Black bone sheep;非乌骨绵羊:Non-black bone sheep.

Fig.1 Organ color between black bone sheep and non-black bone sheep

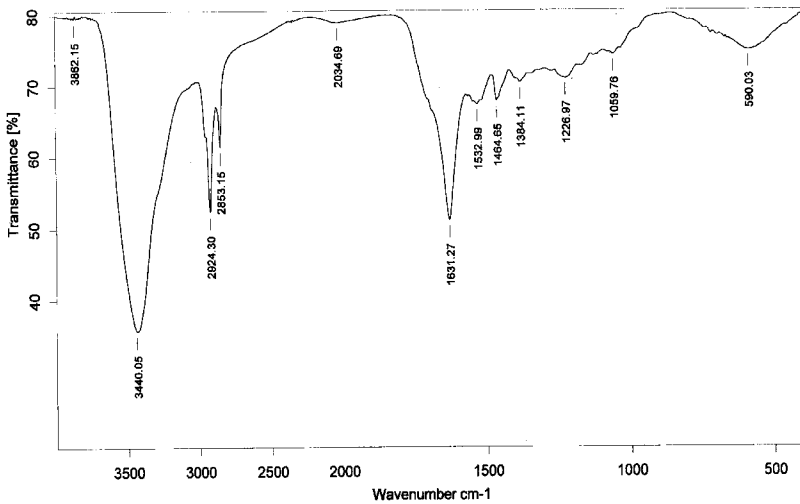
2.2 乌骨绵羊、兰坪本地绵羊及罗姆尼羊 TYR 活性测定(表 1)

表 1 不同浓度 TYR 标准溶液和对应吸光值  
Table1 Different concentration of TYR standard solution and corresponding absorbency

试管号 No. of test tubes	TYR 浓度(mg/mL)X Concentrate of TYR (mg/mL)X	吸光值(OD)Y Absorbance(OD)Y
1	0.0625	0.270
2	0.0925	0.294
3	0.1250	0.323
4	0.1550	0.412
5	0.2500	0.520

经相关分析, TYR 标准浓度和对应的吸光值之间有强相关( $r=0.985$ ),建立酪氨酸酶标准浓度回归曲线: $Y=1.4013X+0.1718$  ( $R^2=0.970$ )。这个结果与龙子江等所得到的回归方程  $y=1.9618x+0.1467$  ( $R^2=0.976$ ) 基本相似<sup>[5]</sup>。将各血浆样品所测的吸光值代入上述回归方程得到酪氨酸酶的含量。按 1 mg TYR 固体相当于 2 590 U,可计算出 TYR 的活性,即 1 mL 血浆 TYR 活性(U/mL) = 1 mL 血浆 TYR 含量(mg/mL) × 2 590(U/mg)。

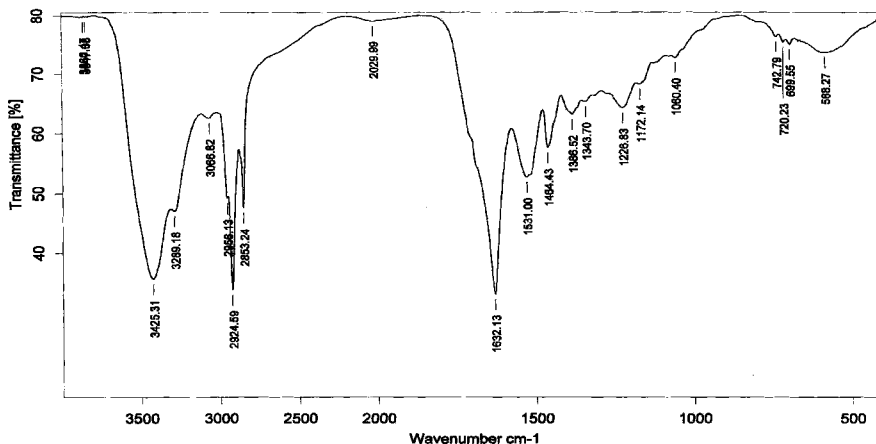
3 种绵羊 TYR 活性的测定结果为,乌骨绵羊血浆 TYR 的活性为  $471.81 \pm 336.06$  U/mL,显著高于兰坪本地绵羊的  $209.65 \pm 135.04$  U/mL 和罗姆尼羊的  $112.63 \pm 73.71$  U/mL ( $P < 0.01$ ),而兰坪本地绵羊和罗姆尼羊间 TYR 活性差异不显著 ( $P > 0.05$ )。



Sample : WY3	Frequency Range : 399.245 - 3996.31	Measured on : 27/12/2003
Technique : KBr 压片	Resolution : 4	Instrument : Tensor27
Customer : 031227r1	Zerofilling : 2	Sample Scans : 16
	Acquisition : Double Sided,For	

图 2 乌骨绵羊黑色素特征结构的 IR 光谱图

Fig.2 The infrared spectrum of melanin of the black bone sheep



Sample : WJ1	Frequency Range : 399.245 - 3996.31	Measured on : 27/12/2003
Technique : KBr 压片	Resolution : 4	Instrument : Tensor27
Customer : 031227ir	Zerofilling : 2	Acquisition : Double Sided, For
		Sample Scans : 16

图 3 乌骨鸡黑色素特征结构的 IR 光谱图

Fig.3 The infrared spectrum of melanin in the black bone chicken

2.3 乌骨绵羊黑色素基本结构特征的初步研究 的 IR 光谱总体特征相似, 都有 5 组主要特征吸收峰, 通过比较发现, 乌骨绵羊黑色素和乌骨鸡黑色素 其特征峰波数、波数范围及其对应的结构<sup>[6,7]</sup>见表 2。

表 2 乌骨绵羊和乌骨鸡黑色素特征峰及其对应的结构

Table 2 Melanin characteristic peak and corresponding structure of black bone sheep and silky fowls

乌骨绵羊特征峰(cm <sup>-1</sup> ) Characteristic peak of black bone sheep(cm <sup>-1</sup> )	乌骨鸡特征峰(cm <sup>-1</sup> ) Characteristic peak of silky fowls(cm <sup>-1</sup> )	波数范围(cm <sup>-1</sup> ) Wave number range (cm <sup>-1</sup> )	对应结构 Corresponding structure
2924.30	2924.59	2852~2927	-CH-CH- 伸展 -CH-CH- stretch
2853.15	2853.24	2850~2859	-CH <sub>2</sub> - 伸展 -CH <sub>2</sub> - stretch
1631.27	1632.13	1619~1632	吡啶环, 吡喃酮环, 芳香共轭双键 Indole loop, pyrones loop, aromatic conjugated double bond
1532.99	1531.00	1510~1570	-NH- 伸展, -NO <sub>2</sub> 变型 -NH- stretch, -NO <sub>2</sub> derivative
1464.65	1464.43	1458~1464	脂肪 C-H 变型 Fat C-H derivative

比较乌骨绵羊黑色素和乌骨鸡黑色素的 IR 图谱, 总体光谱特征相似, 主要分子结构相同, 但主要特征峰的吸收强度有明显差异; 而且两种黑色素之间还存在着不同的吸收峰, 吸收峰的分布也有区别, 这说明乌骨绵羊黑色素和乌骨鸡黑色素在结构上还存在种类差异和个体差异。

## 2.4 乌骨绵羊 TYR 基因研究

### 2.4.1 绵羊 TYR 基因第一外显子碱基序列

绵羊酪氨酸酶基因(TYR)在国内外还没有全序列报道。因此我们根据人和老鼠 TYR 基因第一外显子序列设计引物首次克隆了绵羊 TYR 基因第一外显子序列(667 bp)(图 4)。通过同源性比较, 发现绵羊 TYR 基因核苷酸序列与牛(AF280808)有 97%的同源性, 与人(NM\_000372)有 85%的同源

性, 与猪(AF255610)有 89%的同源性, 与狗(AY336053)有 87%的同源性。

### 2.4.2 突变位点对编码氨基酸的影响

通过对 13 号乌骨绵羊和 21 号罗姆尼羊 TYR 基因外显子 1 测序比较, 检测到了两个变异位点。分别在 192 bp 处有一个编码第 64 位氨基酸-脯氨酸的第三密码子突变, 由 G 突变为 C, 属于同义突变; 第二个突变位点在 462 bp 处编码第 154 位丝氨酸的第三密码子突变, 由 C 突变为 T; 同样没有引起编码氨基酸的改变。因此, 对黑色素相关性状不直接起作用。由于没有检测绵羊的 TYR 基因全序列, 引起黑色素变异的主要突变位点还没有找到, 还需要进一步的测序和多态分析工作把它完善。

```

L21_60      GGCCACTTCC  CTCGAGCCTG  TGCCTCCTCC  AAGAGCCTGA
TGGAGAAGGA GTGCTGCCCC
W13_60      .....
L21_120     CCCTGGGCGG  GCGACGGGAG  CCCCTGTGGC  CGGCTCTCGG
GCAGGGGCTC CTGCCAGGAC
W13_120     .....
L21_180     GTCATTCTGT  CCACGGCACC  ACTGGGACCT  CAGTTCCCCT
TCACGGGGGT  GGACGACCCG
W13_180     .....
L21_240     GAGTCTTGGC  CCTCCATCTT  TTATAACAGA  ACCTGCCAGT
GCTTTGGCAA  CTTCATGGGA
W13_240     .....G.....
L21_300     TTCAATTGCG  GAAGTTGTAA  GTTTGGATTT  CGGGGACCCC
GCTGCACAGA  AAGGCGACTG
W13_300     .....
L21_360     CTGGTGAGAA  GAAACATCTT  TGATTTGAGT  GTCCCAGAGA
AGAACAAATT  TCTTGCTAT
W13_360     .....
L21_420     CTCACTTTGG  CAAAACATAC  CACCAGCCCA  GACTACGTCA
TCCCCACGGG  CACCTATGGC
W13_420     .....
L21_480     CAAATGAATC  ACGGAACAAC  GCCCCTGTTT  AATGACGTCA
GTGTTTATGA  CCTCTTTGTC
W13_480     .....C.....
L21_540     TGGATGCATT  ATTATGTGTC  AAGGGACACG  CTGCTTGGGG
ACTCTGAAGT  CTGGAGAGAC
W13_540     .....
L21_600     ATTGATTTTG  CTCATGAAGC  CCCAGGTTTC  TTGCCTTGGC
ATAGACTCTT  TTTGCTGCTG
W13_600     .....
L21_660     TGGGAACAGG  AAATCCAGAA  GCTCACTGGG  GATGAGAACT
TCACGATTCC  ATACTGGGAC
W13_660     .....
L21_667     TGGAGAG
W13_667     .....

```

图 4 绵羊 *TYR* 基因第一外显子碱基序列

L21 代表 21 号罗姆尼羊;W13 代表 13 号乌骨羊。

Fig.4 Sequence of the first exon of sheep *TYR* gene

L21 denotes No. 21 Luomuni sheep and W13 denotes No. 13 black bone sheep.

#### 2.4.3 绵羊 RFLP 检测结果与分析

取 20  $\mu$ L *Eae* I 酶切产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳拍照(图 5),酶切片段总长为 425 bp。

由于第二个突变位点没有相应的限制性内切酶检测,因此本实验只对第一变异位点用限制性酶 *Eae* I 对所有样本进行检测,结果如表 3。

建立 *TYR* 基因的诊断方法(PCR-RFLP),即通过 *Eae* I 内切酶对第一突变位点(192 bp 处)检测了 53

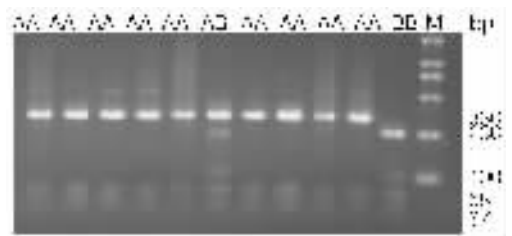


图 5 酶切产物检测

Fig.5 The product of enzyme cutting

表 3 样本群体中各扩增片段的基因频率

Table 3 Gene frequency of amplified fragments in the sample population

基因型 Genotype	乌骨绵羊 Black bone sheep			兰坪本地绵羊 Lanping native sheep			罗姆尼羊 Luomuni sheep		
	AA	AB	BB	AA	AB	BB	AA	AB	BB
基因型频数 Genotype Number	24	5	0	11	6	0	0	4	3
基因 Gene	A			A			B		
基因频率(%) Gene frequency(%)	91.4			82.4			17.6		
							28.6		
							71.4		

个样本的多态性。同 13 号乌骨绵羊纯合基因型序列相同的为 AA 型,同 21 号罗姆尼羊纯合基因型序列相同的为 BB 型,杂合子为 AB 型。对乌骨绵羊、兰坪本地羊以及罗姆尼羊 3 个群体基因型频率进行卡方检验,卡方值为 29.1738 ( $P < 0.01$ ),3 种基因型在 3 个群体分布差异极显著;乌骨绵羊与兰坪本地绵羊的基因型分布没有差异,卡方值为 1.9197 ( $P > 0.05$ );两个群体合并与罗姆尼羊相比,基因型分布差异极显著,卡方值为 22.7586 ( $P < 0.01$ );等位基因 A 在兰坪乌骨羊中出现的频率高达 0.914;等位基因 B 在罗姆尼羊出现的频率为 0.714。虽然此突变位点为同义突变,对黑色素相关性状不直接起作用,但我们可以把这个突变位点作为与乌质性

状有关基因紧密连锁的 SNP 标记,从而为乌骨绵羊的早期选择和间接选择提供了一个有力的辅助分子标记。

#### 2.4.4 TYR 基因型同 TYR 活性间的关系

将兰坪乌骨绵羊、兰坪本地绵羊和罗姆尼羊作为一个群体以 AA、AB、BB 基因型分类。AA 型绵羊 TYR 活性极显著高于 AB 型,AB 型又极显著高于 BB 型 ( $P < 0.01$ )。

#### 2.4.5 TYR 基因型、TYR 活性及黑色素含量的相关分析

测定黑色素含量的乌骨绵羊 5 只,兰坪本地绵羊 4 只,罗姆尼羊 1 只, TYR 基因型以及相对应各组织器官黑色素含量见表 4。

表 4 TYR 基因型、TYR 活性及黑色素含量的相关分析

Table 4 Relationship among TYR genotypes, TYR activity and melanin content

基因型 Genotype	Tyr (U/mL)	黑色素含量(%) Melanin content(%)								
		肋骨 Rib	背肌 Eye muscle	肝脏 Liver	气管 Trachea	脾 Spleen	舌 Tongue	肺 Lung	肾脏 Kidney	心脏 Heart
AA	657.86 <sup>a</sup>	0.09	0.32	1.03	0.58	0.442	0.3	0.47	0.501	0.515
AB	608.65 <sup>a</sup>	0.08	0.26	0.65	—	—	—	—	—	—
BB	137.27 <sup>b</sup>	0.03	0.27	0.92	0.46	0.338	0.17	0.35	0.496	0.592

注:“—”代表未测;竖排肩注字母相同表示差异不显著 ( $P > 0.05$ );字母不同者表示差异显著 ( $P > 0.05$ )。

Note: “—” denote undetermined sample, the same letter on the upper right side of the data in a same row means there is no significant difference between them ( $P > 0.05$ ), the different letter means the statistical difference ( $P < 0.05$ ).

从表 4 看出,AA 型绵羊 TYR 活性显著高于 BB 型;除了心脏黑色素含量略低于 BB 型绵羊以外,其

余 8 个组织器官的黑色素含量都较 BB 型绵羊高。

#### 2.4.6 TYR 基因型与毛色间的关系

表 5 不同绵羊 TYR 基因型与毛色间的关系

Table 5 Relationship between TYR genotype and coat color of different sheep

基因型 Genotype	乌骨绵羊(29 只) Black bone sheep			兰坪本地绵羊(17 只) Lanping native sheep			罗姆尼羊(7 只) Luomuni sheep		
	W	B	B and W	W	B	B and W	W	B	B and W
AA	4%	75%	21%	18%	55%	27%	0	0	0
AB	0	60%	40%	0	50%	50%	100%	0	0
BB	0	0	0	0	0	0	100%	0	0

注:“W”代表白色;“B”代表黑色。

Note: “W” is abbreviative signal of white; “B” is abbreviative signal of black.

从表 5 可以看出,乌骨绵羊和兰坪本地绵羊中:AA 型和 AB 型绵羊以黑色居多,AA 型分别为 75% 和 55%,AB 型分别为 60% 和 50%,无 BB 型;而罗姆尼羊只有 AB 型和 BB 型,且毛色都为白色。由表 6 也可以看出:AA 型以黑色居多,占样本数的 68.6%;而 BB 型绵羊全是白色。对表 6 进行  $\chi^2$  检验, $\chi^2 = 17.543 (P < 0.01)$ ,表明绵羊 TYR 基因型与毛色表型极显著相关。

表 6 所有绵羊 TYR 基因型与毛色间的关系

Table 6 relation between TYR genotype and coat color of all sheep

基因型 Genotype	样本数 Number of sample	黑色 Black	花色 Black and white	白色 White
AA	35	24(68.6%)	8(22.9%)	3(8.5%)
AB	15	6(40%)	5(33.3%)	4(26.7%)
BB	3	0(0%)	0(0%)	3(100%)

## 3 讨 论

### 3.1 乌骨绵羊、兰坪本地绵羊及罗姆尼羊 TYR 活性比较

TYR 是黑色素合成过程中的限速酶,其活性高低决定着黑色素合成的种类与数量,高水平的 TYR 活性导致真黑素产生<sup>[8]</sup>。乌骨绵羊具有较高的 TYR 活性,暗示真黑素产生的可能。另外,乌骨绵羊血浆颜色要比兰坪本地绵羊深,血浆比色值显著高于兰坪本地绵羊( $P < 0.01$ ),甚至有几只乌骨绵羊的血清(浆)呈现明显的浅黑色。因此,可以初步确定乌骨绵羊高 TYR 活性导致了大量真黑素的合成,且能够在血液中存在,浅黑色血清(浆)可能是由于黑色素细胞的迁移造成的,这可能也是造成乌骨乌肉特征的主要原因。对于非乌骨绵羊(兰坪本地绵羊和罗姆尼羊),TYR 活性相对很低,意味着黑色素生成量较少,或是合成的主要是褐色素(浅黑素),因此未表现出乌骨乌肉性状。当然,TYR 是黑色素形成的必要条件,但在黑色素合成过程中还有许多因素影响黑色素的种类与产量,可能还有尚未清楚的机制控制着黑色素在体内的分布。

### 3.2 乌骨绵羊黑色素基本结构特征

与乌骨鸡黑色素特征吸收峰一样,乌骨绵羊黑色素的 5 组主要吸收峰中,以  $1\ 632 \sim 1\ 619\ \text{cm}^{-1}$  最强,说明乌骨绵羊黑色素分子中具有明显的吡啶环

结构特征。袁纓综合运用元素分析、电子能谱和红外光谱技术,基本确定乌骨鸡黑色素属于真黑素,其分子结构是以吡啶环为主体,其周围连接其他一些芳香或烯烃类及羧基等基团的化合物<sup>[9]</sup>;其报道与 Muroya 等的研究结果基本一致<sup>[10]</sup>。而乌骨绵羊黑色素结构中吡啶环也占相当大的比例,具有明显的吡啶环结构特征,因此可以基本确定乌骨绵羊黑色素也属于真黑素。

### 3.3 TYR 基因型同毛色的相关性

对 TYR 基因报道主要认为它突变后引起白化。有关 TYR 基因对动物毛色的影响也只是从生化合成方面讨论酪氨酸酶对黑色素生成的影响。对于乌骨绵羊和兰坪本地绵羊 3 种基因型中:AA 型和 AB 型绵羊以黑色居多,无 BB 型,而罗姆尼羊 3 种基因型中只有 AB 型和 BB 型,且毛色都为白色。TYR 基因多态性与毛色的表型相关极显著, ( $P < 0.01$ ),推测等位基因 A 可能参与控制毛色的黑色表型,等位基因 B 可能参与控制白色表型。Fleet 等认为绵羊被毛色素的缺乏是由于黑素细胞的不足,而不是黑色素代谢发生障碍,而是由一系列白色斑点基因作用所引起的<sup>[11]</sup>。牛酪氨酸酶基因一直被认为是决定毛色的位点之一<sup>[12]</sup>。TYR 是黑色素合成过程中的关键酶,TYRP1、TYRP2 影响着 TYR 酶的活性和稳定性<sup>[13]</sup>,因此,一般也常把这两个基因作为哺乳动物毛色变异的主要候选基因,但人和其他动物体内酪氨酸酶蛋白家族的差异很小,所以不能简单的以 TYR 多态性分析动物正常毛色色素变异,而应从多方面考虑。

### 3.4 TYR 基因、TYR 基因型及 TYR 活性与黑色素含量的相关分析及对黑色性状的影响

酪氨酸酶是黑色素合成的关键酶,编码酪氨酸酶的 TYR 基因也就成了研究乌质性状的重要候选基因。从 TYR 基因型、TYR 活性以及黑色素含量 3 者的研究结果来看,乌骨绵羊的 TYR 活性显著高于兰坪本地绵羊和罗姆尼羊,AA 型绵羊 TYR 活性,显著高于 AB 型,AB 型又显著高于 BB 型( $P < 0.01$ )。乌骨绵羊具有较高的 TYR 活性,暗示真黑素产生的可能。乌骨绵羊体组织器官黑色素含量高于非乌骨绵羊,而 AA 型绵羊中,除了心脏黑色素含量略低于 BB 型绵羊黑色素含量以外,其余 8 个组织器官的黑色素含量都较 BB 型绵羊(罗姆尼羊)高;这些结果表明了 TYR 基因的变异影响着酪氨酸酶的活性;

而酪氨酸酶活性大小又影响着黑色素沉积量的多少。Brumbaugh 等用正常鼠的酪氨酸酶 cDNA 对  $c^a/c^a$  鸡黑色素细胞进行体外治疗, 结果能产生正常的黑色素, 证明  $c^a/c^a$  是酪氨酸酶突变产生的<sup>[14]</sup>。Aigner 等实验证实了鼠科野生型酪氨酸酶基因不仅能在转基因兔子中表达而且可能使白化病的兔子恢复正常<sup>[15]</sup>。这些研究都表明了酪氨酸酶是黑色素合成过程中一个很重要的关键酶, 如果酪氨酸酶基因突变或酶的活性丧失, 都将引起黑色素代谢紊乱, 导致机体组织表达异常<sup>[15]</sup>。本实验检测到了乌骨绵羊 *TYR* 基因第一外显子两个变异位点, 虽然都为同义突变, 对黑色素相关性状不直接起作用, 但我们可以把这个突变位点作为与乌质性状有关基因紧密连锁的 SNP 标记, 推测酪氨酸酶基因可能存在乌质性状相关的功能突变位点, 这还需要进一步对全基因序列进行检测。当然也不排除可能存在有其他黑色素相关基因与该标记紧密连锁。由于黑色素合成机制极为复杂, 许多研究认为黑色素的生成可能是有多个基因位点编码产物共同参与调控的复杂级联过程<sup>[16]</sup>, 因此, 绵羊乌质性状的分子机理还有待进一步深入研究。

## 参 考 文 献 (References):

- [1] YANG Jia-Da, JIAN Cheng-Song, WEI Hong, ZHU Wen-Shi, WU Kai-Ping, YAO Jia-Zhi, CAI Zhi-Hua. RAPD analysis to wu goats and small-xiang goats. *Hereditas* (Beijing), 2001, 23(6): 521~525.  
杨家大, 简承松, 魏泓, 朱文适, 吴开平, 姚家志, 蔡志华. 乌羊和小香羊的 RAPD 分析. 遗传, 2001, 23(6): 521~525.
- [2] ZHANG Ji-Yue. The black bone sheep of the Phoenix hill. *Anhui Agriculture*, 2003, 1: 26.  
张继跃. 珍希特养新秀-凤凰山乌骨羊. 安徽农业, 2003, 1: 26.
- [3] MAO Hua-Ming, DEND Wei-Dong, SUN Shou-Rong, SHU Wen, YANG Shu-Li. Study on discovery and characteristic trait of black bone sheep in Yunnan. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2005, 20(1): 89~93.  
毛华明, 邓卫东, 孙守荣, 舒文, 杨舒黎. 云南乌骨绵羊的发现及其特征性状的研究. 云南农业大学学报, 2005, 20(1): 89~93.
- [4] Scymour H. Separation, purification and properties of two tyrosinases from hamster melanoma. *The Journal of Biological Chemistry*, 1963, 238(7): 2351~2357.
- [5] LONG Zi-Jiang, LÜ Xiao-Ying, FAN Yan, BAI Mei, WANG Yuan-Xun. Study on content of tyrosine in the blood and hemorrhage in vitiligo animal pathological pattern. *Journal of Anhui*

*TCM College*, 2000, 19(5): 53~54.

龙子江, 吕晓英, 樊彦, 白玫, 王元勋. 白癜风模型动物酪氨酸酶含量及血液流变性改变. 安徽中医学院学报, 2000, 19(5): 53~54.

- [6] GONG Lan-Ying. *Organic Chemistry Analysis Laboratory Tutorial*. Shanghai: East China Normal University Press, 1998, 255~269.  
贡兰影. 有机分析实验教程. 上海: 华东师范大学出版社, 1998, 255~269.
- [7] YUAN Ying, BAI Qing-Yu, WU Xiao-Ling. Study on melanin EPR of white silky fowls. *Chinese Journal of TCM*, 1992, 17(11): 14~15.  
袁纓, 白庆余, 吴晓玲. 乌鸡黑素顺磁共振波谱的研究. 中国中药杂志, 1992, 17(11): 14~15.
- [8] DENG Xue-Mei. Construction of chicken resource population for gene mapping and genetic analysis of melanin and other quality traits [Dissertation]. China Agricultural University, 2001.  
邓学梅. 用于鸡基因定位的资源群体的建立和黑色素等质量性状的遗传分析 [学位论文]. 中国农业大学, 2001.
- [9] YUAN Ying, YUAN Xing, BAI Qing-Yu. A preliminary study on some basic structural characteristic of the melanins isolated from white silky fowls. *Acta Zoologica Sinica*, 1993, 39(3): 287~289.  
袁纓, 袁星, 白庆余. 乌骨鸡黑素的一些初步结构特征的初步研究. 动物学报, 1993, 39(3): 287~289.
- [10] Muroya S, Tanabe R, Nakajima I, Chikuni K. Molecular characteristics and site specific distribution of the pigment of the silky fowl. *The Journal of Veterinary Medicine Science*, 2000, 62(4): 391~395.
- [11] Fleet M R, Smith D H, Pourbeik T. Age-related changes in pigmentation traits of adult merino sheep. *Wool Tech Sheep Breed*, 1991, 39(1): 24~34.
- [12] Adalsteinsson S, Bjarnadottir S, Vage D I, Jonmundsson J V. Brown coat color ice landic cattle produced by the loci extension and agouti. *The Journal of Heredity*, 1995, 86(5): 395~398.
- [13] WANG Qiu-Feng. Tyrosinase-related protein family. *Chinese Journal of Aesthetic Medicine*, 2003, 12(1): 100~103.  
王秋枫. 酪氨酸酶相关蛋白家族. 中国美容医学, 2003, 12(1): 100~103.
- [14] Brumbaugh J A, Bargar T W, Oetting W S. A "new" allele at the c pigment locus in the fowl. *Hereditas*, 1983, 74: 331~336.
- [15] Aigner B, Besenfelder U, Seregi J, Frenyo L V. Expression of the murine wild-type tyrosinase gene in transgenic rabbits. *Transgenic Research*, 1996, 5(6): 405~411.
- [16] Jimbow K. Biological role of tyrosinase-related protein and its relevance to pigmentary disorders (vitiligo vulgaris). *Dermatol*, 1999, 26(11): 734~737.