

# 不同绵羊品种 FGF5 基因的多态性分析

高爱琴<sup>1</sup>, 李 宁<sup>2</sup>, 赵兴波<sup>2</sup>, 李金泉<sup>1</sup>

(1. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018;

2. 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

**摘要:** 根据人和小鼠成纤维细胞生长因子 5(FGF5)基因的同源序列设计引物对绵羊基因组进行 PCR 扩增, 将扩增片段进行克隆和测序, 并与人和小鼠的成纤维细胞生长因子 5 基因序列进行同源性比较, 确定扩增的片段为绵羊的 FGF5 基因片段。采用 PCR-SSCP 技术分析了 FGF5 基因外显子在小尾寒羊、湖羊、藏羊、中国美利奴等 4 个绵羊品种的多态性。结果表明: FGF5 基因在 P1 和 P2 引物扩增片段中存在 PCR-SSCP 多态性。经克隆测序分析, 位于外显子 1 的引物 1 扩增产物存在 G→T 突变, 该突变位点使编码的氨基酸发生 A→S 的改变; 引物 2 扩增产物发生了碱基序列 C→T 的突变, 这一突变位点没有引起编码氨基酸的改变, 属于同义突变。对不同绵羊品种的基因型和基因频率统计结果表明, 引物 1 扩增产物小尾寒羊、湖羊、藏羊以等位基因 A 为主, 而中国美利奴羊则以等位基因 B 为主, 且各群体均处于 Hardy-Weinberg 平衡; 引物 2 扩增产物小尾寒羊、湖羊、中国美利奴羊均以等位基因 E 为主, 而藏羊的基因型频率与其它品种有显著差异, 中国美利奴羊在引物 2 位点的基因频率处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态。

**关键词:** 绵羊; 成纤维细胞生长因子 5 基因; PCR-SSCP

中图分类号: S828.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)04-0326-05

## PCR-SSCP Analysis of FGF5 Gene in Different Sheep Breeds

GAO Ai-qin<sup>1</sup>, LI Ning<sup>2</sup>, ZHAO Xing-bo<sup>2</sup>, LI Jin-quan<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China; 2. The State Key Laboratory for Agribiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** FGF5 is a member of the FGF superfamily. It is specifically expressed in hair follicles cells and functions as a negative regulator of follicle anagen. This study was designed and aimed to identify the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of FGF5 gene by PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) in various sheep breeds including Small Tail Han sheep, Hu sheep, Tibetan sheep, Chinese Merino sheep. The 3 pairs of primers for FGF5 gene were designed based on the human and mouse genomic sequence. Two SNPs were identified in the sheep FGF5 gene by PCR-SSCP and sequencing. They were in the exon 1 region in different sheep lines. The result of these analysis indicated that the polymorphisms are due to two single point mutation G to T and C to T at base position 122 and 385, respectively. Population genetic analysis indicated that genotype frequency of the P1 SNPs in Chinese Merino sheep were quite different from other tested sheep breed. Frequency of the BB genotype was much higher in Chinese Merino sheep while the AA genotype was much lower than other breed. The genotype frequency of P1 was significantly different in the tested sheep lines ( $P < 0.01$ ). All the population were in Hardy-Weinberg equilibrium state. For primer 2, frequency of the EE genotype in Tibetan sheep was higher than those in the other lines, Frequency of allele E in primer 2 (P2) in Tibetan sheep was higher than that of other breed. All the population were in Hardy-Weinberg equilibrium state except Chinese Merino sheep.

收稿日期: 2005-06-10

作者简介: 高爱琴(1969-), 女, 博士生, 主要从事动物遗传育种学研究。E-mail: Gaoaiqin999@163.com

\* 通讯作者: 李 宁, 教授, 博导, 主要从事分子遗传学研究。E-mail: ninglibau@public3.bta.net.cn

**Key words:** sheep; FGF5 gene; PCR-SSCP

在鼠中,有 70 多种基因突变影响被毛形态,许多突变对被毛的长度无影响,有些使被毛变短,到目前为止只有一种突变即 angora 鼠(最初命名为 go 基因突变)引起被毛变长<sup>[1]</sup>。这一突变现象引起了众多学者的兴趣,研究证明安哥拉鼠是由 FGF5 突变引起的。Hebert 等<sup>[2]</sup> 1994 年利用基因打靶技术,构建载体,通过胚胎干细胞基因敲除使小鼠的 FGF5 基因出现无效突变纯合,在 FGF5 基因翻译起始位点下游 113 bp 第 1 外显子 SmaI 酶切位点处插入载体,使 FGF5 基因无效(FGF<sup>neo</sup>)。研究发现 FGF<sup>neo</sup> 纯合子的后代出生时健康,正常,但出生后 3 周时突变纯合鼠被毛明显比杂合子 FGF<sup>neo/+</sup> 和野生型长,在试验期一年中这种表型一直保持<sup>[2]</sup>。一系列试验表明成纤维细胞生长因子(Fibroblast Growth Factor-5 FGF5)是影响毛囊周期性活动及被毛生长的很重要的生长因子<sup>[3,4]</sup>。

本研究以毛长不相同的小尾寒羊、湖羊、藏羊和中国美利奴羊为试验材料,采用单链构象多态方法对在产毛性状中起重要作用的 FGF5 基因进行单核苷酸多态性检测,以比较 FGF5 基因在不同品种绵羊中的多态性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

36 只小尾寒羊血样采自山东省嘉祥种羊场;32 只湖羊母羊血样采自浙江省余杭湖羊场;45 只中国美利奴羊采自新疆生产建设兵团农八师 151 团紫泥泉种羊场(新疆石河子市)。40 只藏绵羊采自西藏灵芝地区,颈静脉采血,所采血样均为 10 mL/只,用 ACD 抗凝,-20 °C 冻存。用酚氯仿抽提法提取基因组 DNA,溶于 TE 中,4 °C 保存。用于 PCR-SSCP 分析。

### 1.2 引物的设计和 PCR 扩增

根据 GenBank 中已发表的人和小鼠的 FGF5 基因的同源区域设计引物,对绵羊的基因组进行扩增,扩增 FGF5 的外显子 1 和外显子 3 的片段,扩增片段在 200~300 bp。引物由上海生工生物公司合成。引物序列如下:

引物 1:F:5' TTCCCCGAGGCTATGTCCAC -3',R:5' ACACGGTGCTACTGCTGCTC -3'

引物 2:F:5' AGCAGTAGCACCGTGTCTTC-

3',R:5' AGCCATTGACTTTGCCATCC -3'

引物 3:F:5' GATGACTGTAAGTTCAGG-GAG -3',R:5' CCAAAGCGAACTTCAGTCTG -3'

PCR 扩增条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,58 °C (引物 1),61 °C (引物 2),58 °C (引物 3),复性 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min;4 °C 保存。产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.3 PCR 产物的克隆和测序

将 PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶中电泳并回收,连接在 PMDT 载体上,转化到大肠杆菌 DH5a,酶切鉴定后在 PE377 测序仪上测序。将测序结果提交 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> 网站比较,以检测是否为需要的序列。

### 1.4 PCR-SSCP 法检测单核苷酸多态

2 mL PCR 产物和 5 μL 的上样缓冲液(98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯青、10 mmol EDTA (pH8.0)、10% 甘油),98 °C 变性 10 min,迅速插入冰中,放置 5 min,使之保持变性状态。样品在 14% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳。电泳结束后,进行银染显带。最后进行单链构象多态性(SS-CP)分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 外显子 1 中引物 1 的序列分析

2.1.1 引物 1 扩增片段的 PCR-SSCP 分析结果对引物 1 扩增产物进行 SSCP 检测,在外显子 1 引物 1 扩增片段上发现 3 种基因型,分别命名为 AA、AB 和 BB,见图 1。

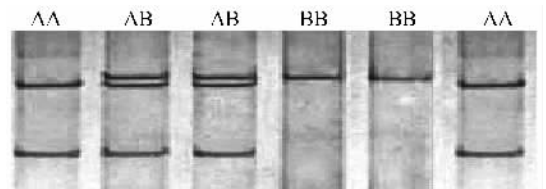


图 1 外显子 1 第 1 对引物对不同绵羊品种扩增片段的 SSCP 分析

Fig. 1 SSCP analysis of PCR amplification using the first primer of exon1 in different sheep breeds

2.1.2 引物 1 不同基因型的纯合子个体的克隆测序及

分析 对第 1 对引物扩增所得到的纯合子个体进行克隆测序,结果表明:AA 型与 BB 型相比突变个体与正常个体间存在一处碱基差异,为碱基序列距翻译起始

位点(ATG)122 位置上发生 G→T 的单碱基突变,进一步证实了多态性位点的存在,这个突变序列可使氨基酸由 S(丝氨酸)变为 A(天冬氨酸),结果见图 2。

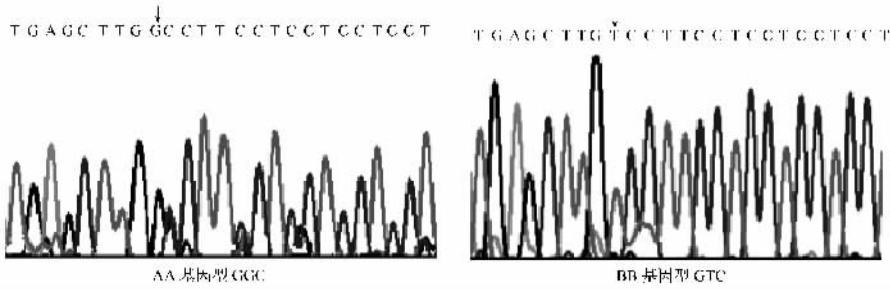


图 2 FGF5 的外显子 1 引物 1 的不同基因型多态峰图序列

Fig. 2 The polymorphic site in the first primer1 of exon1

2.2 外显子 1 中引物 2 的序列分析

2.2.1 引物 2 扩增片段的 PCR-SSCP 分析结果 对引物 2 扩增产物进行 SSCP 检测,发现 3 种基因型,分别命名为 DD、EE 和 DE,结果见图 3。

化,属同义突变。

2.2.2 引物 2 不同基因型的纯合子个体的克隆测序 在 SSCP 中呈现多态性的 PCR 产物用玻璃奶试剂盒回收、直接测序,进一步证实了多态性位点的存在,结果见图 4。结果表明 DD 基因型与 EE 基因型比较距翻译起始位点 385 个碱基位置上有一个 C→T 的突变。这个碱基变化没有引起氨基酸的变

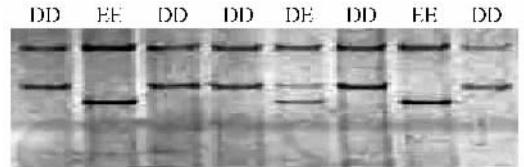


图 3 外显子 1 第 2 对引物对不同绵羊品种扩增片段的 PCR-SSCP 分析

Fig. 3 SSCP analysis of PCR amplification using the second primer of exon1 in different sheep breeds

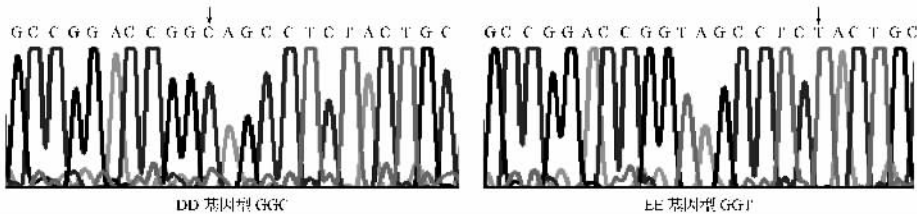


图 4 FGF5 基因外显子 1 引物 2 的多态峰图序列

Fig. 4 The polymorphic site in the second primer of exon1

2.3 不同绵羊品种 FGF5 基因型频率和基因频率分析

2.3.1 引物 1 片断基因型和基因频率分析 用引物 1 对小尾寒羊、湖羊、藏羊,中国美利奴羊进行了 FGF5 基因型检测,计算了不同绵羊品种的基因型频率和基因频率,统计结果见表 1。

上 4 个群体进行基因型频率独立性  $\chi^2$  检验发现,各群体的基因型频率差异极显著( $P < 0.0001$ )。适合性  $\chi^2$  检验结果表明,各群体在该位点的基因频率均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态(各群体  $\chi^2$  均小于  $\chi^2_{0.05}$ )。

统计结果显示,引物 1 的 SNP 位点在地方品种小尾寒羊、湖羊、藏羊等羊中以等位基因 A 为主,基因频率在 0.692~0.818,而在培育品种中国美利奴中则以等位基因 B 为主,基因频率为 0.600。对以

2.3.2 引物 2 扩增产物基因型和基因频率分析 用引物 2 对小尾寒羊、湖羊、藏羊,中国美利奴羊进行了 FGF5 基因型检测,计算了不同绵羊品种的基因型频率和基因频率,统计结果见表 2。

表 1 引物 1 扩增片段在不同品种绵羊的基因型分布

Table 1 The genotype distributions of amplified fragments among different sheep breed

	小尾寒羊		湖羊		藏羊		中国美利奴	
	Small Tail han sheep		Hu sheep		Tibetan sheep		Chinese Merino sheep	
	检出数	频率	检出数	频率	检出数	频率	检出数	频率
	N	Frequency	N	Frequency	N	Frequency	N	Frequency
基因型 Genotype	30		26		34		45	
AA	21	0.700	18	0.692	28	0.818	10	0.222
BB	9	0.000	6	0.077	6	0.000	16	0.422
AB	0	0.300	2	0.231	0	0.182	19	0.356
等位基因 Allele								
A		0.850		0.808		0.909		0.400
B		0.150		0.192		0.091		0.600
适合性检验								
$\chi^2$	0.324		2.134		0.318		3.025	

表 2 引物 2 扩增片段在不同品种绵羊的基因型分布

Table 2 The genotype distributions of amplified fragments among different sheep breed

	小尾寒羊		湖羊		藏羊		中国美利奴	
	Small Tail Han sheep		Hu sheep		Tibetan sheep		Chinese Merino sheep	
	检出数	频率	检出数	频率	检出数	频率	检出数	频率
	N	Frequency	N	Frequency	N	Frequency	N	Frequency
基因型 Genotype	34		30		35		39	
DD	25	0.735	18	0.600	6	0.171	31	0.784
DE	8	0.235	8	0.267	12	0.486	5	0.081
EE	1	0.030	4	0.013	17	0.343	3	0.135
等位基因 Allele								
D		0.843		0.733		0.343		0.851
E		0.157		0.267		0.657		0.149
$\chi^2$	0.131		3.037		2.001		8.646	

统计结果显示,引物 2 的 SNP 位点在小尾寒羊、湖羊、中国美利奴羊等羊中以等位基因 D 为主,基因频率在 0.733~0.851,而在藏羊中则以等位基因 E 为主,基因频率为 0.657。对以上 4 个群体进行基因型频率独立性  $\chi^2$  检验发现,各群体的基因型频率差异极显著( $P < 0.001$ )。适合性  $\chi^2$  检验结果表明,小尾寒羊、湖羊、藏羊等群体在该位点的基因频率均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态(各群体  $\chi^2$

均小于  $\chi^2_{0.05}$ ),而中国美利奴羊在该位点的基因频率均处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态。

2.3.3 不同品种绵羊各位点纯合度、杂合度、有效等位基因数及多态信息含量分析 多态信息含量(PIC)和杂合度(He)都是评价群体内遗传多态性的一个指标。不同品种山羊各位点纯合度、杂合度、有效等位基因数及多态信息含量分析,结果见表 3。

表 3 不同绵羊 FGF5 基因多态位点纯合度(Ho)、杂合度(He)、有效等位基因数(Ne)和多态信息含量(PIC)

Table 3 The genetic polymorphism parameters of FGF5 gene polymorphism loci in different sheep breed

遗传多态参数	P1				P2			
	Ho	He	Ne	PIC	Ho	He	Ne	PIC
小尾寒羊 Small Tail Han sheep	0.745	0.255	1.342	0.222	0.735	0.265	1.360	0.230
湖羊 Hu sheep	0.670	0.310	1.450	0.262	0.643	0.357	1.556	0.244
藏羊 Tibetan sheep	0.835	0.165	1.198	0.152	0.549	0.451	1.821	0.349
中国美利奴 Chinese Merino sheep	0.520	0.480	1.923	0.365	0.746	0.254	1.340	0.221

### 3 讨论

在鼠中 FGF5 基因对被毛的影响已有很深入的研究,证实该基因的突变对毛被的长度有显著影响,用试验方法也检测到基因在皮肤毛囊的表达,同时用体外注射蛋白产物进一步验证了 FGF5 的蛋白产物对不同时期毛囊生长的影响<sup>[3,4]</sup>。本文分析了 FGF5 基因在不同绵羊的多态性,不同品种绵羊群体遗传学分析表明,外显子引物 1 扩增片段多态性位点在中国美利奴绵羊的基因型频率分布与其他的品种有很大的差异,其 BB 基因型频率为 0.422,而在小尾寒羊和藏绵羊品种中 BB 基因型频率为零,AA 基因型频率在中国美利奴品种中仅为 0.222,而其它品种中以 A 基因占优势;经卡方检验,品种间的基因型频率差异极显著( $P < 0.01$ ),在这几个绵羊品种中中国美利奴羊的毛长相对较长,而且与其它 3 个品种相比中国美利奴羊的毛被属于同质毛被,而 3 个地方品种的毛被属于异质毛被,在鼠中已经证明 FGF5 基因对毛长有显著影响,但没有对该基因对被毛的其它品质是否有影响进行研究,尽管样本含量不是很大,但笔者推测等位基因 B 可能与绵羊被毛的长度或毛被的品质有关。对于引物 2,不同品种绵羊群体遗传学分析表明,4 个品种均检测到 3 种基因型,在小尾寒羊,湖羊和美利奴羊中 DD 基因型频率明显高于藏羊的基因型,在这 3 个品种中 D 基因是优势基因,而在藏绵羊中却是 DE 和 EE 基因型频率高于其它品种,E 基因是藏绵羊的优势基因。群体适合性检验证实引物 2 突变位点在中国美利奴羊中基因频率均处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态。造成群体在某个位点的基因不平衡的原因可能有以下几种:(1)对种畜的选择的影响。(2)对经济性性状选择的影响。(3)对环境的适应性。(4)人工授精技术的应用。(5)样本容量的限制。中国美利奴羊中 D 等位基因频率最高,而在藏羊中 E 等位基因频率最高,可能是因为:中国美利奴羊和藏羊适应不同的生态环境条件的结果;不同羊种所固有的种质特征;样本容量有限;还有可能是该位点与产毛性状相关,在对美利奴羊产毛性状的长期选择中受到性状选择的影响,使该位点的基因频率不平衡。遗传杂合度(又称基因多样性)是

度量群体遗传变异的一个最适指标。本研究结果显示,在绵羊群体两个多态位点中,P1 位点以藏绵羊的多态信息含量和杂合度最低,分别为 0.165 和 0.152,中国美利奴羊为最高,分别为 0.480 和 0.365,小尾寒羊和湖羊的多态信息含量和杂合度彼此接近;在 P2 位点,藏羊显示出中度多态,PIC 为 0.349,其余位点在各品种中均表现为低度多态;这些结果与不同群体羊的遗传组成基本一致,中国美利奴羊是培养品种,澳洲美利奴为父本级进阿尔泰羊和哈萨克羊的高代杂种羊,遗传杂合度自然很高。

本文仅对不同品种绵羊 FGF5 基因多态性作了初步的探索,我们需要通过扩大样本量进一步研究 FGF5 的基因多态性。同时,记录不同品种,不同个体的产毛性状,进一步分析基因多态性与绵羊生产性能的关系,寻找与 QTL 相连锁的标记,通过 MAS 检测与标记连锁的目标基因,进行目的基因型选择。本研究得到的 2 个单核苷酸多态性位点为今后畜禽毛用性状的研究提供一定的分子基础。同时不同绵羊品种中 FGF5 基因多态位点的分布也为我们进一步揭示这些绵羊品种的遗传多样性提供了新的遗传标记。

### 参考文献:

- [1] Pennycuik P R, Raphael K A. The angora locus (go) in the mouse; hair morphology, duration of growth cycle and site of action[J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(7): 855~864.
- [2] Hebert J M, Rosenquist T, Gotz J, *et al.* FGF5 as a regulator of the hair growth cycle; evidence from targeted and spontaneous mutations[J]. *Cell*, 1994, 78: 1 017~1 025.
- [3] Suzuki S, Ota Y, Ozawa K, *et al.* Dual-mode regulation of hair growth cycle by two FGF-5 gene products [J]. *J Invest Dermatol*, 2000, 114(3):456~463.
- [4] Suzuki S, Kato T, Takimoto H, *et al.* Localization of rat FGF-5 protein in skin macrophage-like cells and FGF-5S protein in hair follicle; possible involvement of two FGF-5 gene products in hair growth cycle regulation[J]. *J Invest Dermatol*, 1998, 111(6): 963~972.
- [5] 张慧茹,郭晓霞.宁夏滩羊血红蛋白基因多态性与体重相关性的研究,甘肃畜牧兽医,2000,30(2):6~8.