

不同品种绵羊 $TGF-\beta 1$ 基因单核苷酸多态性及其与繁殖力关系的研究

高丽霞¹,李宏滨¹,杜立新^{1*},宋雪梅¹,李珍祖²,李善刚¹,魏彩虹¹

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 国家畜禽分子遗传育种中心,北京 100094;

2. 山东师范大学生命科学学院,济南 250014)

摘要:以小尾寒羊、滩羊、同羊、欧拉羊共计 196 头为研究材料,采用 PCR-SSCP 技术,对绵羊 $TGF-\beta 1$ 基因 6-7 外显子区间内的 805 bp 序列进行多态性分析,发现了一个多态位点。经克隆测序分析发现,第 6 内含子区内存在一个突变,该突变位点为第 7 外显子上游的第 294 位碱基处缺失了 AGAC(序列:gi76871756 中的 14 201 位)。对不同绵羊群的基因型和等位基因频率统计结果表明,多胎品种小尾寒羊以 AB 基因型为主。 χ^2 检验结果表明,单胎品种滩羊、同羊、欧拉羊以 BB 基因型为主,所有品种都处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

关键词: 转化生长因子 $\beta 1$;PCR-SSCP;单核苷酸多态性;绵羊

中图分类号:S826.2

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2008)02-0503-05

The Analysis for the Single Nucleotide Polymorphism of $TGF-\beta 1$ and Its Association with Reproduction in Different Breeds Sheep

GAO Li-xia¹,LI Hong-bin¹, DU Li-xin^{1*},SONG Xue-mei¹, LI Zhen-zu²,

LI Shan-gang¹,WEI Cai-hong¹

(1. National Center for Molecular Genetics and Breeding of Animal, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;

2. College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

Abstract: A single nucleotide polymorphism (SNP) of sheep 805 bp sequence in 6th intron region of transforming growth factor $\beta 1$ ($TGF-\beta 1$) gene was identified in 196 sheep among Small-tailed Han, Tong, Tan and Oula sheep by PCR-SSCP, which declared one mutation point. Comparative sequencing analysis of cloned products revealed a AGAC deletion at upstream 294 of exon 7 of $TGF-\beta 1$ gene (site 14 201 in gi76871756). The statistical results of genotype and allele frequency in different breeds showed that the genotype AB dominated in the Small-tailed Han sheep. The genotype BB was in majority in low-fecundity sheep. The results of χ^2 test indicated that all the populations were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Key words: $TGF-\beta 1$; PCR-SSCP; single nucleotide polymorphism(SNP); sheep

转化生长因子 $\beta 1$ ($TGF-\beta 1$) 是转化生长因子家族的重要成员,具有调整细胞生长、分化,参与创伤愈合、组织修复、胚胎发育等过程,并对细胞外基质

的形成、肿瘤发生和免疫系统方面具有重要的调节作用^[1-2]。到目前为止,对 $TGF-\beta 1$ 的研究主要集中于人和小鼠,在家畜中对绵羊和猪的研究也已有报

收稿日期:2007-01-22

基金项目:国家自然科学基金项目(30270949);“863”计划(2006AA10Z199)

作者简介:高丽霞(1977-),女,硕士生,内蒙古乌兰察布市人,主要从事动物分子育种的研究, E-mail:gaolix2008@yahoo.com.cn

* 通讯作者:杜立新,教授,博导, E-mail:lxdu@263.net

道。研究表明, TGF- β 1 与发育、疾病、免疫耐受性等的相关近年来越来越受到关注^[3-4]。TGF- β 1 与动物生殖有密切的关系, 在绵羊卵巢发育中, 颗粒细胞从初级卵泡阶段及内膜细胞从有腔卵泡前期就开始表达 3 种形式的 TGF- β , TGF- β 1 是卵泡发育过程形成中卵巢内重要的调控子^[5-7]。有关 TGF- β 1 在家畜、家禽尤其是与影响生产性能相关方面的研究还少见报道。本研究对绵羊 TGF- β 1 基因的多态性进行了分析, 旨在为筛选分子标记、应用标记辅助选择来实现绵羊的遗传改良提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

不同绵羊品种均采集血液样本, 共计 196 头, 其中: 小尾寒羊 93 头采自山东嘉祥种羊场, 滩羊 32 头、同羊 43 头、欧拉羊 28 头均为本实验室留存样品。

1.2 试验方法

1.2.1 绵羊基因组 DNA 的提取 按《分子克隆实验指南》^[8]方法进行。

1.2.2 PCR 扩增与 SSCP 分析 根据 GenBank 发表的序列(登录号 gi76871756)设计引物。上游引物: 5'-TCCTCCCTTGCCCAAGTTACCG-3'; 下游引物: 5'-GGAGACCTAGTGCTAAAGAACCC-3'。预期扩增片段大小为 241 bp。

PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 67.6℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。2 μ L PCR 产物和 8 μ L Loading Buffer (98% 去离子甲酰胺, 10 mmol/L EDTA (pH8.0)、0.025% 溴酚蓝和 0.025% 二甲苯青), 98℃ 变性 10 min, 然后立即冰浴至少 5 min。12% 聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺: N,N-亚甲基双丙烯酰胺比值为 39:1)4℃ 稳流电泳 16 h, 银染显带。比照所有条带, 确定纯合子和杂合子带型。

1.2.3 PCR 产物的克隆与测序 采用上海生工试剂盒回收纯化 PCR 扩增产物, 纯化的 PCR 产物用 pMD19-T 载体连接转化 DH5 α 菌株, 提取重组质粒进行测序。

1.3 数据统计处理

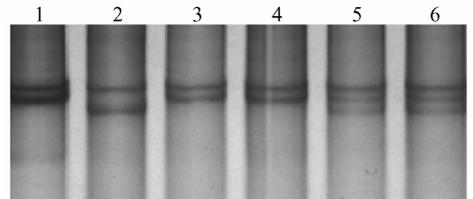
根据电泳图谱的显示, 统计基因型频率。并对结果进行适合性和独立性 χ^2 检验, 分析各群体在基因型频率上是否存在差异, 以及各群体是否处于

Hardy-Weinberg 平衡。将不同基因型结合小尾寒羊产羔数进行最小二乘分析。

2 结果与分析

2.1 PCR-SSCP 结果

在 4 个品种的 196 头绵羊中, 共检测到 3 种基因型, 分别为 AA、BB、AB, 电泳结果见图 1。测序结果表明, AB 基因型的碱基序列与 GenBank gi76871756 的序列一致, 纯合基因型 AA、BB 相比杂合基因型 AB 在 294 bp(序列 gi 76871756 中的 14 201 位) 缺失了 AGAC 4 个碱基, 而 BB 型相比 AA 型在 180 bp 处(序列 gi 76871756 中的 14 315 位) T 替换为 C, 测序结果见图 2。



5, 6. AB genotype; 1, 3, 4. BB genotype; 2. AA genotype

图 1 绵羊 TGF- β 1 基因第 6 内含子 PCR-SSCP 凝胶电泳

Fig. 1 Detection of allele PCR-SSCP in the intron 6 of TGF- β 1 gene in sheep

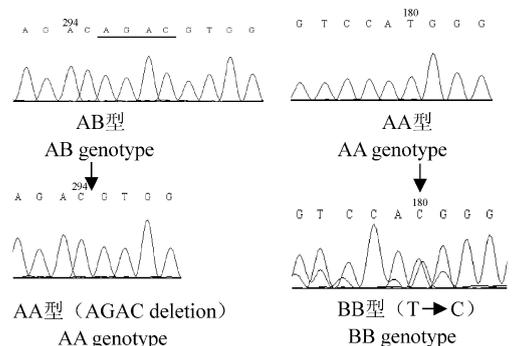


图 2 不同基因型测序结果

Fig. 2 Detection of different genotype sequence

2.2 对不同绵羊品种 TGF- β 1 基因 6-7 外显子的等位基因和基因型频率的分析

对小尾寒羊、同羊、滩羊、欧拉羊进行了 TGF- β 1 基因 6-7 外显子的基因型检测, 统计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。由表 1 可见, 在 4 个绵羊品种中, 均检测到 AA、

AB、BB 这 3 种基因型,且等位基因 B 略占优势,其频率在 0.512~0.734,适合性 χ^2 检验结果表明,4

个群体在该位点均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

表 1 4 个绵羊品种 *TGF-β1* 基因的基因型、等位基因频率

Table 1 Genotype and allele frequency of *TGF-β1* gene in 4 sheep breeds

品种 Breeds	数量 No.	等位基因频率 Allele frequencies		基因型频率 Genotype frequencies			χ^2
		A	B	AA	AB	BB	
		小尾寒羊 Small-tailed Han sheep	93	0.436	0.564	0.237(22/93)	
同羊 Tong sheep	43	0.488	0.512	0.326(14/43)	0.326(14/43)	0.349(15/43)	0.953
滩羊 Tan sheep	32	0.266	0.734	0.094(3/32)	0.344(11/32)	0.562(18/32)	0.283
欧拉羊 Oula sheep	28	0.393	0.607	0.321(9/28)	0.143(4/28)	0.536(15/28)	0.618

df=1, $\chi_{0.05(1)}^2=3.84$, $\chi_{0.01(1)}^2=6.63$

2.3 不同绵羊品种 *TGF-β1* 基因 6-7 外显子基因型分布差异性检验

不同绵羊品种 *TGF-β1* 基因 6-7 外显子基因型分布差异检验的结果得出 $\chi^2=12.632$, $\chi_{0.05}^2 < \chi^2 < \chi_{0.01}^2$, $0.01 < P < 0.05$, 差异显著, 对其进行分割检验, 由表 2 可知, 小尾寒羊和滩羊、欧拉羊间 *TGF-β1* 基因型分布差异显著 ($P < 0.05$), 和同羊间基因型分布差异不显著。滩羊和同羊、欧拉羊之间 *TGF-β1* 基因型分布差异显著 ($P < 0.05$)。同羊和欧拉羊 *TGF-β1* 基因型分布差异不显著(表 2)。

表 2 不同绵羊品种 *TGF-β1* 基因型分布的 χ^2 独立性检验

Table 2 Chi-Square analysis of genotype distribution of *TGF-β1* in the different sheep breeds

	小尾寒羊 Small-tailed Han sheep	同羊 Tong sheep	滩羊 Tan sheep
同羊 Tong sheep	1.312 2	—	
滩羊 Tan sheep	4.828 2*	6.272 1*	—
欧拉羊 Oula sheep	6.272 5*	3.635 5	6.300 9*

*. 表示显著水平为 $0.01 < P < 0.05$

Value with * differ significantly at $0.01 < P < 0.05$

2.4 *TGF-β1* 基因不同基因型小尾寒羊产羔数的最小二乘均值及标准误

小尾寒羊产羔数的最小二乘均值关系为 $AB > BB > AA$, 3 种基因型间差异不显著 ($P > 0.05$)。 *TGF-β1* 基因不同基因型的小尾寒羊产羔数的最小二乘均值及标准误见表 3。

表 3 *TGF-β1* 基因不同基因型小尾寒羊产羔数的最小二乘均值及标准误

Table 3 Least squares mean and standard error for litter size of different genotypes

基因型 Genotypes	样本数 No.	最小二乘均值及标准误 Least squares mean \pm standard error
AA	22	1.94 \pm 0.93
AB	37	2.5 \pm 1.22
BB	34	2.05 \pm 0.85

2.5 潜在的调控元件及蛋白结合位点的预测

通过网站: <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH/html> TFSEARCH(ver1.3) 计算机软件对转化生长因子 $\beta 1$ 第 6 内含子内点突变造成的调控位点的改变进行了预测。预测结果(预测分值大于 85 有效)显示, AB 型由于多了 AGAC 4 个碱基, 相比 AA、BB 型产生了 3 个转录因子活化蛋白 AP-1(Activator protein 1), 见图 3。

201 TAGCCTGTGG AGACCGGTAA CTTGGGCAAG GGAGGA	Entry	Score
---	<u>M00174</u> AP-1	87.8
----->	<u>M00048</u> ADR1	87.7
---	<u>M00172</u> AP-1	87.6
----->	<u>M00109</u> C/EBPb	87.4
---	<u>M00188</u> AP-1	86.3
----->	<u>M00048</u> ADR1	86.2
A AB genotype		
201 CTGTGGAGAC CGGTAACCTG GGCAAGGGAG GA	Entry	Score
----->	<u>M00048</u> ADR1	87.7
----->	<u>M00109</u> C/EBPb	87.4
----->	<u>M00048</u> ADR1	86.2
B AA and BB genotypes		

图 3 潜在调控元件预测结果

Fig. 3 The predicted results of potential regulatory elements

3 讨论

TGF- β 1 是具有多种生物学功能的细胞因子,广泛存在于正常组织、细胞和转化细胞中。TGF- β 1 基因的表达在转录、翻译和释放环节存在调节^[9], TGF- β 1 基因多态性影响到血清中该因子的水平高低^[10]。功能基因的表达调控是多层次的,主要表现在转录、mRNA 的加工和翻译等环节,内含子虽然是基因中无编码功能的插入序列,但近年来不断有证据证实内含子对基因转录、mRNA 加工、mRNA 出核以及翻译都有着重要的调节作用^[11]。

在本研究中,所发现的 SNP 处于内含子区,是否会影响 TGF- β 1 的表达,还需要通过对不同基因型个体做定量或半定量 RT-PCR 进行验证,也可以通过对不同基因型个体血液中细胞因子的水平进行检测来研究。对突变区的预测显示杂合型比纯合型多了 3 个转录因子活化蛋白 AP-1。

AP-1 主要由 Jun、Fos、ATF 及 JDP 亚家族组成,亚家族单体以同源或异源二聚体的形式结合 DNA 靶序列,参与靶基因调节。AP-1 对各种刺激如应激、辐射或生长信号等作出生理或病理应答,参与细胞的增殖、分化和转化等过程,在肿瘤的形成、转移和侵袭中发挥重要作用,已有研究通过抑

制 AP-1 活性来发展抗肿瘤药物^[12]。朱槿等在研究中揭示 AP-1 蛋白参与了胚胎着床过程中的信号传导并可能与胚胎的早期分化有关^[13]。

本研究首次在绵羊中进行 TGF- β 1 单核苷酸多态分析,发现第 6 内含子区内存在一突变位点,该突变为第 7 外显子上游的第 294 位碱基处缺失了 AGAC。对不同绵羊群体的基因型和等位基因频率统计结果表明,在高繁殖力的小尾寒羊中以 AB 基因型为主,低繁殖力品种滩羊、同羊、欧拉羊以 BB 基因型为主,由此是否可以说明在多胎绵羊中 TGF- β 1 以杂合型存在,而在单胎品种以纯合型存在,还有待扩大样本进一步验证。杂合型比纯合型多了 3 个转录因子活化蛋白 AP-1,而高繁殖力的小尾寒羊正是以杂合型为主,是否说明 AP-1 与绵羊繁殖力有关尚需进一步验证。

参考文献:

- [1] RIDDHISH S, BRAD R, CAROLYN K H, et al. Allelic diversity in the TGF β 1 regulatory region: characterization of novel functional single nucleotide polymorphisms[J]. Hum Genet, 2006, 119: 61-74.
- [2] MCNATTY K P, JUENGEL J L, WILSON T, et al. Oocyte derived growth factors and ovulation rate in sheep[J]. Reproduction, 2003, 64(Suppl): 1-13.

- [3] MONTGOMERY G W ,GALLOWAY S M ,DAVIS G H,et al. Genes controlling ovulation rate in sheep [J]. *Reproduction*,2001,121:843-852.
- [4] RON W P, BABITA S, MELISSA J,et al. Immunohistochemical localization of TGF-b1, TGF-b2 and TGF-b3 in the mouse embryo; expression patterns suggest multiple roles during embryonic development [J]. *Cell Biology*, 1991, 115:1 091-1 105.
- [5] JEFFREY V M, LISA A S, CRAIG J T, et al. Transforming growth factor β expression in the porcine ovary: evidence that theca cells are the major secretory source during antral follicle development [J]. *Biology of Reproduction*, 1996, 54: 485-496.
- [6] JESSE GORE A, DANIEL P P, WILLIAM L M, et al. Differential regulation of follicle stimulating hormone by activin A and TGF β 1 in murine gonadotropes [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2005,3:73.
- [7] GEROLD U. Profiling molecular targets of TGF-b1 in prostate fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2005, 126:59-69.
- [8] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂,等译. 北京:科学出版社,2002:481-482.
- [9] 武艳萍,傅金恋,李 宁,等. 不同猪种 *TGF-β1* 基因单核苷酸多态性分析 [J]. *中国畜牧杂志*,2005,41 (4):11-13.
- [10] MOCHAMMAD I, EDDY S, MOHAMMAD S R. Decreased TGF- β 1 and IGF-1 protein expression in rat embryo skull bone in folic acid-restricted diet [J]. *Nutritional Biochemistry*,2006,17(1):51-56.
- [11] JENNIFER L J, ADRIAN H B, KAREN L R,et al. The role of transforming growth factor-beta (TGF-beta) during ovarian follicular development in sheep [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*,2004, 2:78.
- [12] 周长春,刘芝华,齐 军. AP-1 和肿瘤的关系研究进展 [J]. *世界华人消化杂志*,2006,14(1): 1-5.
- [13] 朱 瑾,周剑萍,张 炜. AP-1 蛋白在胚胎着床前后小鼠子宫内膜的表达 [J]. *现代妇产科进展*,2002,11 (2):122-124.