

蒙古羊 *ADAMTS1* 基因外显子 3 多态性检测及在卵巢和子宫组织中差异表达分析

何小龙^{1,2}, 李 蓓³, 刘永斌^{2*}, 祁云霞^{1,2}, 吴江鸿^{1,2}, 特日格勒², 荣威恒²

(1. 中国科学院内蒙古草原研究中心, 呼和浩特 010031; 2. 内蒙古自治区农牧业科学院, 呼和浩特 010031; 3. 内蒙古农业大学动物科学学院, 呼和浩特 010018)

摘要: 为揭示蒙古羊卵巢组织差异表达基因 *ADAMTS1* 外显子 3 的遗传多态性及在单、双羔蒙古羊卵巢和子宫组织中的表达差异性, 本试验分别采用 PCR-SSCP 技术结合 DNA 直接测序技术对蒙古羊 *ADAMTS1* 基因外显子 3 的遗传多态位点进行了检测; 采用实时荧光定量 PCR (RQ-PCR) 技术对蒙古羊 *ADAMTS1* 基因在单、双羔蒙古羊卵巢和子宫组织中的差异表达量进行了分析。结果表明, 蒙古羊 *ADAMTS1* 基因的第 3 外显子第 141 碱基处存在 C→T 的点突变, 而该处突变未能引起氨基酸序列的变化, χ^2 适合性检验结果表明整个蒙古羊群体呈现低度多态 ($PIC=0.233$) 并处于 Hardy-Weinberg 非平衡状态 ($P<0.05$); RQ-PCR 检测结果表明 *ADAMTS1* 基因在双羔羊卵巢组织和子宫组织中的表达量均高于单羔羊, 分别是单羔羊相应组织表达量的 2.04 和 2.30 倍。结果表明, *ADAMTS1* 基因对于蒙古羊的多羔性状具有重要的作用, 是蒙古羊多羔主效基因。

关键词: 蒙古羊; *ADAMTS1* 基因; 多态性; 差异表达; 主效基因

中图分类号: S826.8⁺2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)03-0399-08

The Polymorphism Detection of Exon 3 and Differential Expression Analysis in Ovaries and Uterus of Mongolian Sheep *ADAMTS1* Gene

HE Xiao-long^{1,2}, LI Bei³, LIU Yong-bin^{2*}, QI Yun-xia^{1,2}, WU Jiang-hong^{1,2},
TE Ri-ge-le², RONG Wei-heng²

(1. Inner Mongolia Prataculture Research Center, Chinese Academy of Sciences, Huhhot 010031, China; 2. Inner Mongolia Academy of Agricultural & Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010031, China; 3. College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: This experiment was conducted to reveal the polymorphism of exon 3 of *ADAMTS1* gene which was differentially expressed between Mongolian sheep (MS) ovaries, and to analyze the different expression in single-bearing and biparous MS ovaries and uterus tissue. The polymorphism of *ADAMTS1* gene in exon 3 was detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and direct DNA sequencing technique, and differential expression in single-bearing and biparous MS ovaries and uterus tissue was detected by real-time quantitative PCR (RQ-PCR). The result showed that the *ADAMTS1* gene had a C→T point mutation for the base 141 in exon 3 coding region, but not caused the amino acid sequence changes. The results of χ^2 fitness test indicated that all the MS populations in low polymorphism ($PIC=0.233$) and not in Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.05$). The expression of *ADAMTS1* gene

收稿日期: 2012-09-21

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金博士基金项目(2011BS0406); 内蒙古自治区农牧业科学院青年创新基金项目(2011QNJJM01); 国家肉羊产业技术体系(CARS-39)

作者简介: 何小龙(1983-), 男, 陕西宝鸡眉县人, 博士, 主要从事生物技术与草食家畜育种研究, E-mail: hexiaolong1983@163.com

* 通信作者: 刘永斌, 研究员, E-mail: ybliu117@126.com

in biparous MS ovaries and uterus tissue was 2.04 and 2.30-fold that of single-bearing MS by using RQ-PCR. The results indicated that *ADAMTS1* gene was the major gene and played an important role to the MS fecundity traits.

Key words: Mongolian sheep; *ADAMTS1* gene; polymorphism; differential expression; major gene

绵羊的繁殖力是一个极其复杂的性状,受微效多基因控制,这些基因共同表达和相互作用最终形成了性状的表型,在性状的形成中起主要作用的基因被称为控制该性状的主效基因,目前已有多个主效基因被研究证实对于绵羊高繁殖力具有重要的调控作用。*ADAMTS* 家族(含 TSP 结构的去整合素金属蛋白酶, a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs, *ADAMTS*) 是一类新的金属蛋白酶亚家族,含凝血酶敏感蛋白母体的去整合蛋白和金属蛋白酶域的分泌性蛋白质,整合于细胞外基质或游离于血浆中发挥其生物学功能^[1]。*ADAMTS1* 是一个新发现的金属蛋白酶 *ADAMTS* 家族的一员,是运用 DD-RT-PCR 技术在鼠结肠癌细胞中被发现的,并且在炎症反应时上调^[2]。K. Kuno 等^[3] 以小鼠结肠 26 腺癌细胞克隆得到 *ADAMTS1* 基因的 cDNA 序列,因其翻译的蛋白质氨基酸序列与蛇毒金属蛋白酶和血小板反应素相似,因而命名为 *ADAMTS1*。D. L. Russell 等^[1] 研究表明 *ADAMTS1* 基因在排卵过程中的主要功能就是裂解卵丘卵母细胞复合体 (Cumulus-oocyte complex, COC) 基质多功能蛋白聚糖,在注射人绒毛膜促性腺激素 (Human chorionic gonadotrophin, HCG) 后 12~16 h 在 COC 的基质观察到大量的多功能蛋白聚糖的裂解,此时正是 COC 排入输卵管的时候,而 *ADAMTS1* 继续在排出的卵丘细胞上表达。因此 *ADAMTS1* 通过裂解多功能蛋白聚糖从而在排卵后快速破坏 COC 基质的结构完整性,所以 *ADAMTS1* 可能通过调节多功能蛋白聚糖和 COC 的基质来使得卵丘复合物更易于排出。由于蛋白聚糖可以抑制一些生长因子和促性腺激素,因此 *ADAMTS1* 还可以增加生长因子和促性腺激素的生物活性^[4]。此外, *ADAMTS1* 基因还对孕酮的合成具有重要影响,是合成孕酮的关键基因^[5]。*ADAMTS1* 基因的表达与 LH/HCG 的合成有关,同时在颗粒细胞中的表达直接影响着囊状卵泡生成。*ADAMTS1* 基因在卵丘细胞中的表达与卵母细胞的能育性也有关^[6]。在小鼠中,研究人员通过试验

证明 *ADAMTS1* 基因在排卵和受精过程中起着重要的作用, *ADAMTS1* 的活性可间接的影响到卵泡的形态, COC 的排卵和受精作用, 以及随后的硫酸软骨素蛋白多糖代谢和卵丘卵母细胞在受精后的降解^[7]。据此可以认为 *ADAMTS1* 在雌性动物的排卵过程中发挥着重要的作用。

在国内, 乐凯^[8] 和徐珊珊^[9] 等首先将 *ADAMTS1* 基因作为猪繁殖性状候选基因, 分别从表达规律、遗传效应和调控机制等方面进行了研究。为了研究蒙古羊的高繁特性, 本课题组前期采用抑制性消减杂交 (Suppression subtractive hybridization, SSH) 技术构建了发情期单、双羔蒙古羊的正反向 cDNA 文库, 在筛选差异表达基因时发现, *ADAMTS1* 基因在产双羔蒙古羊的卵巢组织中上调表达^[10], 进而采用电子克隆技术及 RT-PCR 方法对其进行了验证^[11], 并由此推测 *ADAMTS1* 基因对于蒙古羊繁殖调控具有重要的作用。本研究是在前期的研究基础之上, 将 *ADAMTS1* 基因作为蒙古羊高繁殖力候选基因, 对其遗传效应和表达规律做进一步的研究, 为揭示蒙古羊高繁殖性能的分子机理打下基础, 使蒙古羊这一宝贵资源能得到有效利用, 为提高我国肉用绵羊繁殖力及加快肉羊新品种选育提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2011 年 3 月采集巴彦淖尔种羊场具有第 1 胎和第 2 胎产羔数记录的 378 只蒙古羊母羊血样, 颈静脉采血, 所采血样为 8~10 mL·只⁻¹, 用 ACD 抗凝, -20 °C 冻存; 另外分别采集发情期的单羔蒙古羊 (5 只) 及产双羔的成年蒙古羊 (5 只) 的卵巢和子宫组织, 绵羊屠宰后立即采集以上新鲜组织并加入样品保护剂 Sample Protector 后立即放入液氮速冻, 然后转入冰箱 -80 °C 保存。

1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 中绵羊 *ADAMTS1* (GU437212) 基因及 *βactin* (NM_001009784) 基因序列进行引物设

计。首先在绵羊 UCSC 数据库中进行比对,根据比对结果进行外显子 3 区域引物设计,所设计的 PCR-SSCP 检测引物序列为上游:F: 5'-CCCCTGT-TCACGGAAGCT-3',下游:R: 5'-CGGGCAGTC-CTCGATGTT-3',预扩增大小为 175 bp;所设计的 RQ-PCR 检测引物序列及片段大小如下: β actin 基因 F: 5'-CACGGCATTGTCACCAACTG-3', R: 5'-CTCAAACATGATCTGGGTCATCTTC-3',预扩增大小为 159 bp;ADAMTS1 基因 F: 5'-ACTG-GCTATTCTTCGTTTTGC-3',R: 5'-TCTTTTTG-GAGTCTATGATGCG-3',预期扩增大小为 130 bp。引物由中美泰和生物技术(北京)有限公司合成。

1.3 PCR-SSCP 检测方法

1.3.1 PCR 反应过程 PCR 反应程序:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 1 min,51.5 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,循环 30 次,最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。PCR 反应结束后,取 3 μ L 的 PCR 产物与 1 μ L 加样缓冲液混匀后,1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.2 SSCP 反应 取 4 μ L PCR 产物和 6 μ L 加样缓冲液(98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯酚、10 mmol \cdot L⁻¹ EDTA(pH 8.0)、10% 甘油)混匀,在 PCR 仪上 98 °C 变性 10 min,然后冰浴 5 min。变性后 PCR 产物用非变性聚丙烯酰胺凝胶室温电泳过夜,银染显色。用紫外凝胶成像仪拍照和分析。

1.3.3 克隆测序 对 SSCP 分型后不同基因型个体的 PCR 产物,用 DNA 片段快速纯化回收试剂盒纯化,回收后的 DNA 片段用 pGEM-T 载体连接,并转化 TOP10 感受态细胞,用菌液作 PCR 底物,对照 PCR 反应条件,进行菌液 PCR 反应鉴定。鉴定后送测序,测序反应由中美泰和生物技术(北京)有限公司完成。

1.4 RQ-PCR 反应过程

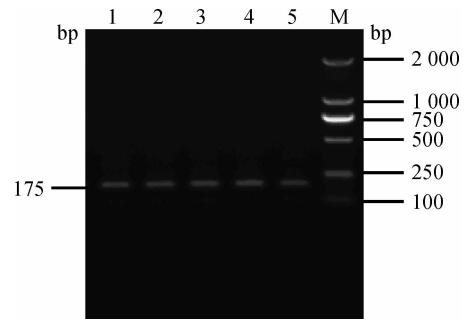
本试验采用 Two Step RT-PCR 反应,选择 Random Primer 和 Oligo dT Primer 进行反转录反应,反转录反应在普通 PCR 仪上进行,反转录反应按照 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) 试剂盒说明书进行,体系(10 μ L)如下:5 \times PrimeScript Buffer(For Real Time)2 μ L、PrimeScript^{RT} Enzyme Mix I 0.5 μ L、Oligo dT Primer(50 μ mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L、Random 6 mers(100 μ mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L、Total RNA 2 μ L、RNase Free dH₂O 4.5 μ L。反应条件:

37 °C 15 min、85 °C 5 s,产物 cDNA 可在 -20 °C 条件下长期保存。然后使用 SYBR® Premix Ex Taq™(Perfect Real Time) 试剂进行定量 PCR 反应,反应体系 20 μ L:SYBR Premix Ex Taq (2 \times) 10 μ L、Forward Primer (10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L、Reverse Primer (10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L、Rox 0.4 μ L、cDNA 2 μ L、ddH₂O 6.6 μ L。反应程序为 95 °C 30 s,95 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 20 s,共进行 40 循环,然后 72 °C 延伸 7 min。反应结束后,以蒙古羊的 β actin 基因作为内参基因,采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 定量分析方法,对蒙古羊 ADAMTS1 基因在单、双羔蒙古羊的卵巢和子宫组织进行差异表达量分析^[12-14]。

2 结果

2.1 蒙古羊 ADAMTS1 基因外显子 3 PCR-SSCP 检测结果

根据所设计的引物分别对蒙古羊 378 个样品的基因组进行了扩增,通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物(图 1),与 Marker DL2000 比较显示,在 100~250 bp 之间有一特异性条带,与预期扩增片段大小 175 bp 相一致,条带单一清晰,符合后续试验要求。



1~5. 引物 PCR 扩增结果;M. DL2000 相对分子质量标准

1-5. PCR products;M. DL2000 marker

图 1 蒙古羊 ADAMTS1 基因外显子 3 序列 PCR 扩增结果

Fig. 1 The PCR product of Mongolian sheep ADAMTS1 gene exon 3

对已扩增的 ADAMTS1 基因外显子 3 序列通过母液(Acr/Bis)为 29:1,12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和硝酸银染色进行 PCR-SSCP 分析,结果显示该序列在所检测的样品中存在 2 种带型,检测结果见图 2。

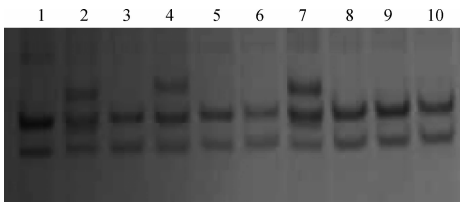


图 2 蒙古羊 *ADAMTS1* 基因外显子 3 的 PCR-SSCP 检测结果
 Fig. 2 The result of PCR-SSCP of Mongolian sheep *ADAMTS1* gene exon 3

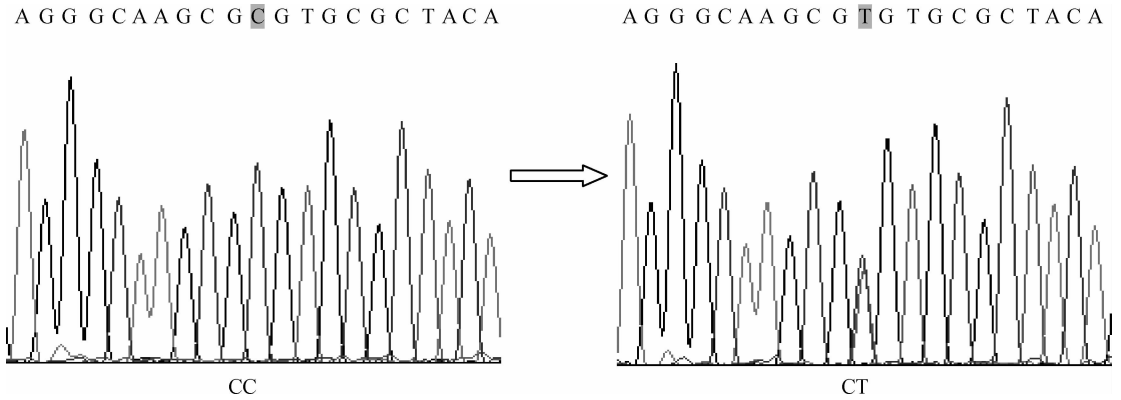


图 3 CC 基因型与 CT 基因型测序峰图比较
 Fig. 3 The chromatogram of the CC and CT genotypes

从群体遗传学的角度分析蒙古羊 *ADAMTS1* 基因外显子 3 突变位点的基因型和等位基因频率 (表 1)。从表 1 可以看出, 对于此突变位点, χ^2 适合性检验结果表明蒙古羊单羔群体处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P > 0.05$), 多羔群体处于 Hardy-

Weinberg 非平衡状态 ($P < 0.05$), 而整个蒙古羊群体也处于 Hardy-Weinberg 非平衡状态 ($P < 0.05$)。造成此种原因极有可能是试验采样不均衡和采样群体数量少所致。

表 1 蒙古羊 *ADAMTS1* 基因外显子 3 位点基因型和基因频率分布

Table 1 Genotype and allele frequencies of *ADAMTS1* gene exon 3 in different groups

品种 Breeds	样本含量 No.	基因型频率/% Genotype frequencies			等位基因频率/% Allele frequencies		χ^2	
		CC	CT	TT	C	T		
蒙古羊 Mongolian sheep	单羔 Single-bearing	224	0.830(186)	0.170(38)	0.000(0)	0.915	0.085	1.924
	多羔 Biparous	154	0.377(58)	0.623(96)	0.000(0)	0.688	0.312	31.578**
整个群体 Whole population	378	0.646(244)	0.354(134)	0.000(0)	0.823	0.177	17.544**	

d : df=2 $\chi^2(0.05)=5.99; \chi^2(0.01)=9.21$. * .01 < P < 0.05; ** . P < 0.01

蒙古羊 *ADAMTS1* 基因外显子 3 突变位点的纯合度 (H_o)、杂合度 (H_e)、有效等位基因数 (N_e) 和多态信息含量 (PIC) 见表 2。通常情况下, 当

$PIC > 0.5$ 时, 该座位为高度多态; $0.5 > PIC > 0.25$ 时, 为中度多态; $PIC < 0.25$ 时, 为低度多态。对于一个群体而言, PIC 值高, 等位基因数目多, 杂合度

大,说明该位点的遗传变异程度大,有较大的选择潜力。从表 2 中可以看出,多羔群体的 $0.5 > PIC >$

0.25,为中度多态,整个群体低度多态。

表 2 蒙古羊 *ADAMTS1* 基因外显子 3 位点的纯合度、杂合度、有效等位基因数及多态信息含量分析

Table 2 The genetic polymorphism parameters of *ADAMTS1* gene exon 3 in different groups

群体 Groups		遗传多态参数 Genetic polymorphism parameters			
		<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>N_e</i>	<i>PIC</i>
蒙古羊 Mongolian sheep	单羔 Single-bearing	0.844	0.156	1.184	0.143
	多羔 Biparous	0.571	0.429	1.752	0.337
整个群体 Whole population		0.724	0.276	1.382	0.233

2.2 RQ-PCR 扩增结果分析

在对提取的 RNA 进行反转录试验后,首先设置温度梯度对最佳退火温度进行确定(一般选择 Ct 值最小的退火温度),得到 β actin 和 *ADAMTS1* 基因的最佳退火温度同为 60℃。然后将每个样品先进行预实验,选择 Ct 值最小的样品的 cDNA 作为

本试验的标准品,将标准品按照 10^n 梯度稀释(10 倍梯度稀释)5~6 个梯度进行标准曲线的制作。最后将要分析的样品(每个样品 5 个重复)和标准品放在同一检测条件下进行反应得到 β actin 和 *ADAMTS1* 基因的扩增曲线和熔解曲线分别见图 4 和 5。

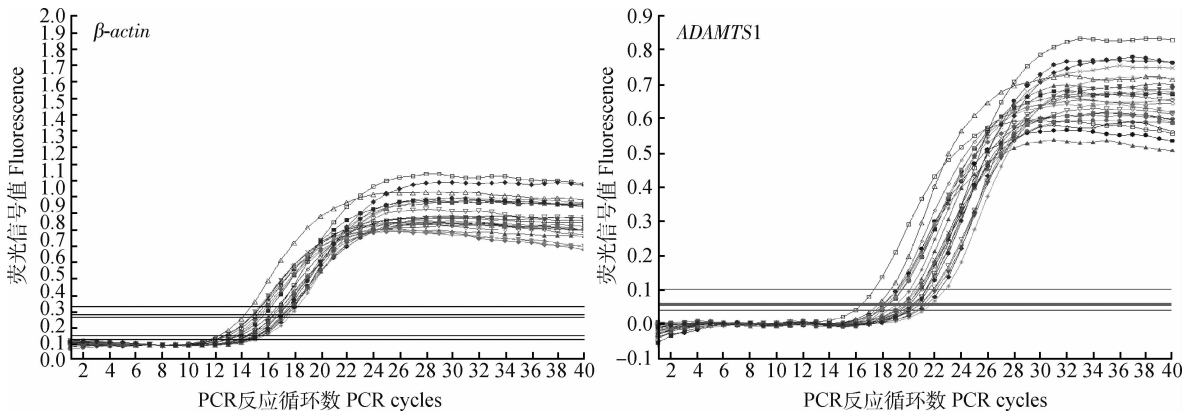


图 4 各样品及标准品 β actin 和 *ADAMTS1* 基因的扩增曲线

Fig. 4 The amplification chart of β actin and *ADAMTS1* genes under different samples and standards

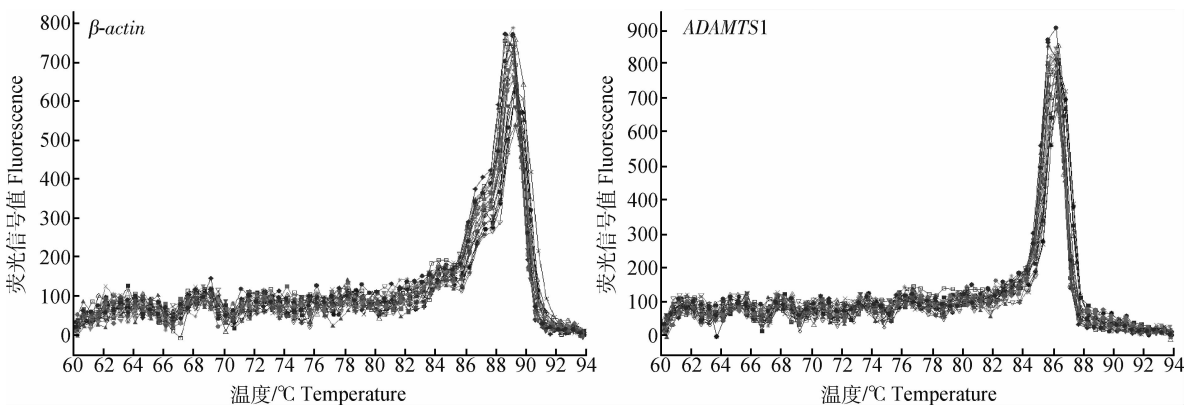


图 5 各样品及标准品 β actin 和 *ADAMTS1* 基因的熔解曲线

Fig. 5 The melting curve chart of β actin and *ADAMTS1* genes under different samples and standards

由图可见 β actin 基因和 *ADAMTS1* 基因的扩

增曲线均呈现“S”形,说明各基因的动力学曲线整体

平行性较好,曲线拐点清楚,基线平而无明显上扬趋势现象。熔解曲线显示梯度模板熔解曲线集中。目的基因与内参基因的扩增产物的 T_m 值均一,熔解曲线上只有 1 个明显的峰,表明在实时荧光定量 PCR

过程中,荧光强度均来自于特异性的扩增产物,目的基因及内参基因没有产生非特异性扩增及引物二聚体。根据以上扩增结果系统自动给出了 $\beta actin$ 基因和 $ADAMTS1$ 基因的定量结果及标准曲线见图 6。

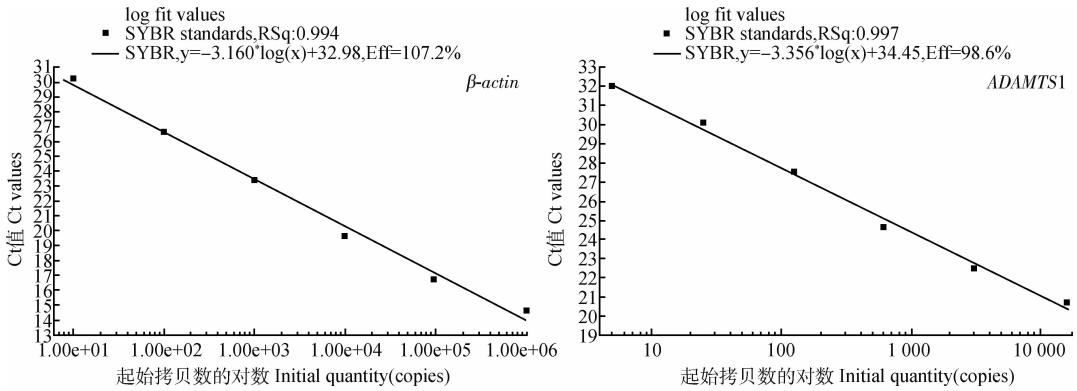


图 6 $\beta actin$ 和 $ADAMTS1$ 基因的标准曲线
Fig. 6 The standard curve of $\beta actin$ and $ADAMTS1$ genes

由图 6 可以得到 $\beta actin$ 基因的扩增曲线回归方程为 $y = -3.160x + 32.98$, 扩增曲线的相关系数 $r^2 = 0.994$, 扩增效率 $E = 1.072$; $ADAMTS1$ 基因的扩增曲线回归方程为 $y = -3.356x + 34.45$, 扩增曲线的相关系数 $r^2 = 0.997$, 扩增效率 $E = 0.986$ 。标准曲线 X 轴表示起始模板浓度 (\log_2), Y 轴表示 Ct 值, 各方程拟合度较好, 基本呈现线性关系。

一般认为, 扩增曲线回归方程相关系数 (r^2): 大于 0.98, 越接近 1, 结果可信度越高; 扩增效率 (E): 0.8~1.2, 越接近 1, 越理想。相对定量常用的方法是 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (比较 Ct 值法)。此方法基于 2 个假设: 扩增效率为 1, 每个 PCR 循环产物的量都成倍数增长, 这可以通过扩增效率的验证来解决; 有合适的内参以纠正上样量的误差。基于以上分析, 本试验采

用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 $ADAMTS1$ 基因在单、双羔蒙古羊卵巢和子宫组织中的表达量进行了相对定量分析, 分别选择 5 只双羔羊和 5 只单羔羊的卵巢和子宫组织作为研究对象, 以 $\beta actin$ 基因为对照内参基因, 对 $ADAMTS1$ 基因的表达进行了定量研究, 以单羔羊的定量结果作为对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对 $ADAMTS1$ 基因在单双羔蒙古羊卵巢和子宫组织中的表达量进行了相对定量分析, 计算结果见表 3。从表 3 看出, $ADAMTS1$ 基因在双羔羊卵巢组织和子宫组织中的表达量均高于单羔羊, 分别是单羔羊相应组织表达量的 2.04 倍和 2.30 倍。根据结果可以推测 $ADAMTS1$ 基因对于蒙古羊的多羔性状具有重要的作用, 是蒙古羊多羔主效基因。

表 3 $ADAMTS1$ 基因的平均 Ct 值及相对定量计算结果

Table 3 The mean Ct value and relative content of $ADAMTS1$ gene

样品 Samples		$ADAMTS1$ 基因平均 Ct 值	$\beta actin$ 基因平均 Ct 值	ΔCt 值	$\Delta\Delta Ct$ 值	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值
		The mean Ct value of $ADAMTS1$ gene	The mean Ct value of $\beta actin$ gene			
卵巢	单羔 Single-bearing	21.97±0.67	15.90±0.49	6.07	0.00	1.00
Ovaries	双羔 Biparous	20.18±0.52	15.14±0.88	5.04	-1.03	2.04
子宫	单羔 Single-bearing	19.46±0.95	14.62±0.48	4.84	0.00	1.00
Uterus	双羔 Biparous	18.44±0.45	14.80±0.48	3.64	-1.20	2.30

3 讨论

ADAMTS1 不仅在雌性生殖器官的发育中起着重要的作用,同时在卵巢中与促卵泡素(FSH),促黄体素(LH),孕酮受体(PR),组织蛋白酶 L 等一起通过复杂的调控机制控制着排卵。目前,鼠的 *ADAMTS1* 基因定位于 16 号染色体,人的定位于 21 号染色体,猪的定位于 13 号染色体。使用 RT-PCR 和 Western 技术,研究人员在成熟哺乳动物的正常组织中并没有发现 *ADAMTS1* 基因的表达。但是,研究人员在鼠的胚胎期发育过程中发现,*ADAMTS1* 基因在胚胎期 10~18 d,在卵巢、脑、胎盘、心脏、肺脏、肢芽、肝脏、脾脏和肾中都有大量表达,表明 *ADAMTS1* 基因在哺乳动物的胚胎发育过程中扮演着重要的角色。无论是否性成熟,小鼠卵巢中 *ADAMTS1* 基因都没有表达。但是在注射 PMSG 和 hCG 后 4 h *ADAMTS1* 的表达量达到可观水平,12 h 后到达顶峰,随后迅速递减,到 24 h 后 *ADAMTS1* 停止表达,而这时正是排卵前期的最后阶段。随后,在体外培养的小鼠颗粒细胞^[15]或 COC^[16]中,观察到同样的现象。乐凯^[8]根据获得的猪的 *ADAMTS1* 基因的 DNA 序列,分别以大白和梅山猪 DNA 作为模板进行扩增、克隆并测序,经过序列比对发现了 2 个 SNP。第 7 外显子 72 bp 处出现碱基 C/G 颠换,导致 622 位氨基酸由精氨酸变为脯氨酸;第 7 内含子 512 bp 处出现碱基 G/A 转换。本研究采用 PCR-SSCP 技术结合直接基因测序技术对蒙古羊 *ADAMTS1* 基因第 3 外显子的多态位点进行了检测,结果发现在 *ADAMTS1* 基因第 3 外显子第 141 碱基处发生由 C→T 的点突变,结果出现双峰,通过进一步对所编码区氨基酸序列比对发现,该处突变前后所编码的氨基酸一致,该突变未能引起氨基酸序列的变化。

D. Boerboom 等^[17]研究 *ADAMTS1* 基因在马卵巢中的表达发现,注射 hCG 后 12 h *ADAMTS1* 在颗粒细胞的表达增加,30 h 后回到基础水平,然后 33~39 h 又重新升高;在卵泡内膜细胞,所有的时间点都发现有 *ADAMTS1* 基因 mRNA 的足够表达,而仅仅只在注射 hCG 后 33 h 才短暂的升高。这些数据首次表明 *ADAMTS1* 基因在马颗粒细胞中的表达是一种新的延长的双向调节的模式,在卵泡内膜细胞中是可调式表达。在啮齿目动物,则是快速单向诱导调节。并且卵泡膜细胞是马排卵前卵

泡的 *ADAMTS1* 和 PR 表达的重要场所,而原位杂交的研究表明在啮齿目动物卵巢的表达仅限于颗粒细胞。对 *ADAMTS1* 基因在牛的排卵前卵泡中表达的变化发现,排卵前的促性腺激素峰能显著的增加从优势卵泡中提取出来的颗粒细胞和膜细胞的 *ADAMTS1* 的 mRNA 水平。在黄体,*ADAMTS1* mRNA 转录产物存在于黄体期的所有阶段,从黄体早期获得的黄体组织中 *ADAMTS1* mRNA 的表达水平最高^[18]。在绵羊中,研究人员发现,*ADAMTS1* 基因通过鞘氨醇-1-磷酸受体基因的刺激参与内皮细胞的合成^[19]。K. M. Doyle 等^[20]研究指出 PR 主要通过 C/EBP 结合区域, NF-1-样因子,和 Sp1/Sp3 (GC-I,-II and-III) 结合区域来调节 *ADAMTS1* 的表达,LH 主要是通过激活腺嘌呤环化酶和产生 cAMP 而调节 *ADAMTS1*,PR 和组织蛋白酶 L 的 SP1/3 结合区域对于 LH 所诱导的 *ADAMTS1* 的表达具有重要作用,LH 诱导 *ADAMTS1* 是不依赖于 PR 的,而是通过另一条信号转录通路,并且证明 LH 和 PR 既独立又相互协同的调节 *ADAMTS1* 在体内排卵前卵泡的颗粒细胞上的最大表达。本试验中根据 *ADAMTS1* 基因的 Ct 值,以单羔羊的定量结果作为对照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对 *ADAMTS1* 基因在单、双羔蒙古羊卵巢组织和子宫组织中的表达量进行了相对定量分析,结果得到 *ADAMTS1* 基因在双羔羊卵巢组织和子宫组织中的表达量均高于单羔羊,分别是单羔羊相应组织表达量的 2.04 和 2.30 倍。

4 结论

综合本试验的研究结果得出以下结论:通过对蒙古羊 *ADAMTS1* 基因第 3 外显子进行 PCR-SSCP 分型得到两种基因型,结合 DNA 测序发现其第 141 碱基处存在 C→T 的点突变,而该处突变未能引起所编码氨基酸序列的变化, χ^2 适合性检验结果表明整个蒙古羊群体呈现低度多态($PIC=0.233$)并处于 Hardy-Weinberg 非平衡状态($P<0.05$);RQ-PCR 检测结果表明 *ADAMTS1* 基因在双羔羊卵巢和子宫组织中的表达量分别是单羔羊的 2.04 和 2.30 倍,结果提示,*ADAMTS1* 基因对于蒙古羊的多羔性状具有重要的作用,是蒙古羊多羔主效基因。

参考文献:

[1] RUSSELL D L, DOYLE K M, OCHSNER S A, et

- al. Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation [J]. *Biol Chem*, 2003, 278(43): 42330-42339.
- [2] KUNO K, KANADA N, NAKASHIMA E, et al. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene [J]. *Biol Chem*, 1997, 272(1): 556-562.
- [3] KUNO K, TERASHIMA Y, MATSUSHIMA K. ADAMTS-1 is an active metalloproteinase associated with the extracellular matrix [J]. *Biol Chem*, 1999, 274(26): 18821-18826.
- [4] RICHARDS J S, RUSSELL D L, OCHSNER S, et al. Ovulation; new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response [J]. *Annu Rev Physiol*, 2002, 64: 69-92.
- [5] NAGASHIMA T, KIM J, LI Q, et al. Connective tissue growth factor is required for normal follicle development and ovulation[J]. *Mol Endocrinol*, 2011, 25(10):1740-1759.
- [6] YUNG Y, MAMAN E, KONOPNICKI S, et al. ADAMTS-1: a new human ovulatory gene and a cumulus marker for fertilization capacity[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 328(1-2):104-108.
- [7] BROWN H M, DUNNING K R, ROBKER R L, et al. ADAMTS1 cleavage of versican mediates essential structural remodeling of the ovarian follicle and cumulus-oocyte matrix during ovulation in mice[J]. *Biol Reprod*, 2010,83(4):549-557.
- [8] 乐 凯. 猪 ADAMTS1 基因的克隆、定位、表达规律、遗传效应和调控机理的研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2008.
- [9] 徐珊珊. 猪排卵率候选基因 ADAMTS1 的遗传效应分析[D]. 武汉:华中农业大学, 2008.
- [10] HE X, LI B, WANG F, et al. Identification of differentially expressed genes in Mongolian sheep ovaries by suppression subtractive hybridization [J]. *Anim Reprod Sci*, 2012, 133(1-2): 86-92.
- [11] 何小龙, 刘永斌, 王 峰, 等. 蒙古羊卵巢组织差异表达基因 ADAMTS1 的电子克隆及 RT-PCR 验证 [J]. 华北农学报, 2010, 25(3): 47-51.
- [12] DI M E, CANGEMI G, FILIPPETTI M, et al. Development and clinical validation of a real-time PCR using a uni-molecular Scorpion-based probe for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical isolates[J]. *New Microbiol*, 2007, 30(4): 415-421.
- [13] MORSCZEC C, KORENKOV M, NAGELSCHMID M, et al. Total RNA isolation of abdominal Hernia of rats for quantitative real-time reverse transcription (RT) PCR assays [J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2008, 38(1): 87-93.
- [14] SOBAJIMA S, SHIMER A L, CHADDERDON R C, et al. Quantitative analysis of gene expression in a rabbit model of intervertebral disc degeneration by real-time polymerase chain reaction[J]. *Spine J*, 2005, 5(1):14-23.
- [15] ROBKER R L, RUSSELL D L, ESPEY L L, et al. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(9): 4689-4694.
- [16] OTE M, MITA K, KAWASAKI H, et al. Characteristics of two genes encoding proteins with an ADAM-type metalloprotease domain, which are induced during the molting periods in *Bombyx mori* [J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2005, 59(2): 91-98.
- [17] BOERBOOM D, RUSSELL D L, RICHARDS J S, et al. Regulation of transcripts encoding ADAMTS-1 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motifs-1) and progesterone receptor by human chorionic gonadotropin in equine preovulatory follicles [J]. *Mol Endocrinol*, 2003, 31(3): 473-485.
- [18] MADAN P, BRIDGES PJ, KOMAR C M, et al. Expression of messenger RNA for ADAMTS subtypes changes in the periovulatory follicle after the gonadotropin surge and during luteal development and regression in cattle [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(5): 1506-1514.
- [19] DUNLAP K A, KWAK H I, BURGHARDT R C, et al. The sphingosine 1-phosphate (S1P) signaling pathway is regulated during pregnancy in sheep[J]. *Biol Reprod*, 2010, 82(5): 876-887.
- [20] DOYLE K M, RUSSELL D L, SRIRAMAN V, et al. Coordinate transcription of the ADAMTS-1 gene by luteinizing hormone and progesterone receptor [J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(10): 2463-2478.