

Kiss-1 基因多态性与苏淮山羊产羔数的关联分析

李隐侠^{1,2}, 张俊^{1,2}, 钱勇^{1,2}, 李静心^{1,2}, 孟春花^{1,2}, 王慧利^{1,2}, 钟声^{1,2}, 曹少先^{1,2*}

(1. 江苏省农业科学院畜牧研究所, 南京 210014;

2. 江苏省农业科学院动物品种改良和繁育重点实验室, 南京 210014)

摘要: 为了研究 *Kiss-1* 基因多态性与苏淮山羊产羔数之间的关系, 本研究采用 DNA 池测序技术筛选苏淮山羊 *Kiss-1* 基因突变位点, 采用 AS-PCR 和 PCR-RFLP 方法检测 130 只苏淮山羊 *Kiss-1* 基因突变位点的多态性, 并分析其与产羔数的关联性。结果表明, 在苏淮山羊内含子 1 中发现 2 个突变位点 g. 2270C>T 和 g. 2510A>G, 其中 g. 2510A>G 位点有 3 种基因型 AA、AG 和 GG, 基因型频率分别为 0.209、0.496 和 0.295; g. 2270C>T 位点在苏淮山羊中共检测 3 种基因型(CC、CT 和 TT), 基因型频率分别为 0.143、0.750 和 0.107。关联分析发现, g. 2510A>G 位点 3 种基因型在苏淮山羊各胎产羔数和平均产羔数间差异不显著, g. 2270C>T 位点中 CC 型的二胎产羔数显著高于 CT 和 TT 型($P<0.05$)。单倍型分析发现, g. 2510A>G 和 g. 2270C>T 位点在苏淮山羊群体中共构建 8 种单倍型, 其中 AGCT 是主要的单倍型; 各单倍型与苏淮山羊产羔数的关联分析发现仅 AGCT 单倍型的头胎产羔数与 AACT 单倍型的头胎产羔数间差异显著, 其他单倍型在苏淮山羊的各胎产羔数间差异均不显著。综合以上研究表明, *Kiss-1* 基因的 g. 2270C>T 位点可能对苏淮山羊繁殖性状的选育具有一定的指导作用。

关键词: 苏淮山羊; *Kiss-1* 基因; PCR-RFLP; AS-PCR; 单倍型; 产羔数

中图分类号: S827; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)12-1917-07

Kiss-1 Gene Polymorphisms and Its Association with Litter Sizes in Suhuai Goats

LI Yin-xia^{1,2}, ZHANG Jun^{1,2}, QIAN Yong^{1,2}, LI Jing-xin^{1,2}, MENG Chun-hua^{1,2},

WANG Hui-li^{1,2}, ZHONG Sheng^{1,2}, CAO Shao-xian^{1,2*}

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

2. Key Laboratory of Animal Breeding and Reproduction, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To investigate the effects of the polymorphisms of *Kiss-1* gene on the reproductive traits of Suhuai goats, the mutations of *Kiss-1* gene were screened using DNA pool technology, the polymorphism of *Kiss-1* gene in 130 Suhuai goats were detected using AS-PCR and PCR-RFLP methods and its correlation with the litter size of Suhuai goats was analyzed. The results showed that 2 SNPs of g. 2270C>T and g. 2510A>G were found in *Kiss-1* gene intron 1 sequence of Suhuai goats. Three genotypes(AA, AG and GG) were found at g. 2510A>G locus in Suhuai goats, and the genotype frequency were 0.209, 0.496 and 0.295, respectively; at g. 2270C>T locus, 3 genotypes(CC, CT and TT) were detected in Suhuai goats and the genotype frequency were 0.143, 0.750 and 0.107, respectively. Association analysis showed that there was no significant difference among 3 genotypes (AA, AG and GG) of Suhuai goats in each parity litter size and average litter size at g. 2510A>G locus; at g. 2270C>T locus, the second parity litter

收稿日期: 2014-06-09

基金项目: 江苏省农业自主创新基金项目[CX(11)1032]; 公益性行业(农业)科研专项(201303143-06)

作者简介: 李隐侠(1979-), 女, 河南固始人, 助理研究员, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖方面的研究, E-mail: liyxmh@126.com

* 通信作者: 曹少先, 研究员, E-mail: caoshaoxian@163.com

size of CC genotype was significantly higher than those of CT ($P < 0.05$) and CC genotypes ($P < 0.05$). Haplotype analysis found 8 haplotypes and the first parity litter size of AGCT haplotype was significantly higher than that of AACT haplotype, and there existed no significant difference in litter size of Suhuai goats among other haplotypes. Therefore, it can be concluded that g. 2270C>T locus of *Kiss-1* gene may be a candidate molecular marker for reproductive traits selection in Suhuai goats.

Key words: Suhuai goats; *Kiss-1* gene; PCR-RFLP; AS-PCR; haplotype; litter size

Kiss-1 基因于 1996 年在研究人黑素瘤细胞转移能力时首次被发现^[1], 定位于人类染色体 1q32-41, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成^[2]。在人类中, *Kiss-1* 基因编码含有 145 个氨基酸残基的 kisspeptin 蛋白前体, 经 2 次加工后产生不同的 kisspeptin 蛋白的变体, 包含 kisspeptin-54 (Kp54)、kisspeptin-14 (Kp14) 和 kisspeptin-13 (Kp13), 三者具有相似的生物学功能^[3]。kisspeptins 的同源受体为 GPR54 (G-protein coupled receptor 54), 1 个编码孤儿 G 蛋白偶联受体的基因^[4]。研究表明, 不论是 *Kiss-1* 基因还是其受体 (GPR54), 在雌性哺乳动物生殖方面都发挥着非常关键的作用^[5-7], 其中, *Kiss-1* 基因位于促性腺轴的上游, 激活促性腺激素释放激素 (GnRH) 神经元, 被认为是主要的青春期守门员和繁殖功能的调节剂^[8], 而 KISS-1-GPR54 通路在脑部的表达是青春期启动的催化剂^[9]。在人类和大鼠中, *Kiss-1* 基因与其受体 (GPR54) 的突变或者缺失可引起性腺功能的衰退, 从而导致繁殖功能的丧失^[5-7]。相反, 如果过表达 *Kiss-1* 基因, 则可诱导人类和啮齿类动物的性早熟^[10]。

在山羊中, G. L. Cao 等^[11]克隆了济宁青山羊的 *Kiss-1* 基因序列, 开放阅读框为 408 bp, 编码 135 个氨基酸残基, 其中包含 1 个 17 个氨基酸的信号肽; 同时发现了 5 个碱基突变位点 (G296C、G454T、T505A、G3433A 和 C3688A) 和 1 个 18 bp 的缺失 (1 960~1 977)。X. An 等^[12]在萨能奶山羊、关中奶山羊和波尔山羊 *Kiss-1* 基因中共发现了 11 个新的 SNPs: g. 384G>A、g. 1147T>C、g. 1417G>A、g. 1428_1429delG、g. 2124C>T、g. 2270C>T、g. 2489T>C、g. 2510G>A、g. 2540C>T、g. 3864_3865delCA 和 g. 3885_3886insACCCC, 其中 g. 384G>A、g. 2489T>C、g. 2510G>A 和 g. 2540C>T 位点多态性与产羔数显著关联。苏淮山羊是利用波尔山羊和徐淮山羊杂交后代, 采用传统杂交育种技术和现代分子辅助育种技术相结合, 拟培育出繁殖力高、生长速度快、适应性强的肉用山

羊新品种, 目前已横交第 2 个世代。

为了进一步提高苏淮山羊的繁殖性能, 本研究拟通过 DNA 池测序技术筛选苏淮山羊 *Kiss-1* 基因 SNPs, 分析 SNPs 多态性与产羔数的关系, 鉴定与苏淮山羊繁殖性能相关的分子标记, 为苏淮山羊的育种工作提供可靠的辅助选择遗传标记。

1 材料与方法

1.1 试验材料

130 只苏淮山羊由江苏省农业科学院六合动物试验基地统一饲养管理, 营养以及管理水平保持一致。其产羔资料由江苏省农业科学院六合动物试验基地提供。每个个体采集耳组织样, 置冰桶中带回实验室, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。组织样 DNA 的提取采用酚/仿抽提法, TE Buffer 溶解后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 主要试剂

DNA 提取所用试剂购于南京生工生物工程有限公司; PCR 所用试剂购于上海博彩生物有限公司; PCR 引物由上海捷瑞生物公司合成。

1.3 PCR 扩增

根据 GenBank 数据库中山羊 *Kiss-1* 基因序列 (序列号为 GU142847), 采用 Primer premier 5.0 软件设计引物 P1, 扩增苏淮山羊 *Kiss-1* 基因内含子 1 部分序列。以苏淮山羊 DNA 池为模板进行 PCR 扩增, 引物的退火温度和片段长度见表 1。PCR 反应总体积 $20\text{ }\mu\text{L}$, 含模板 DNA 60 ng , *Taq* 聚合酶 ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.2\text{ }\mu\text{L}$, dNTP ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.5\text{ }\mu\text{L}$, 引物 ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, MgCl_2 ($25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1.4\text{ }\mu\text{L}$, $10\times$ 缓冲液 $2\text{ }\mu\text{L}$, 添加灭菌双蒸水至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s , 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 。

1.4 SNP 筛选

PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 目的片段割胶用 DNA 胶回收试剂盒回收后, 送往上海美吉生物公司测序。根据序列峰图, 筛选

SNPs 位点。

1.5 基因分型

根据测序结果,选择 *Kiss-1* 基因内含子中 2 个突变位点(g. 2270C>T 和 g. 2510A>G)为研究对象进行基因分型。g. 2510A>G 位点为 *Pvu*Ⅲ 酶切位点,可用 PCR-RFLP 方法进行基因分型。具体方法:以苏淮山羊 DNA 为模板,以 P1 为引物扩增含 g. 2510A>G 位点的 DNA 片段,PCR 反应体系和 PCR 反应程序如 1.3。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,EB(溴化乙锭)染色检测扩增结果。采用 *Pvu*Ⅲ 内切酶对 PCR 扩增产物进行酶切,酶切反应体系 20 μ L,含 PCR 产物 4 μ L、*Pvu*Ⅲ(10 U \cdot μ L⁻¹)

0.5 μ L、10 \times 缓冲液 2 μ L 和灭菌双蒸水 13.5 μ L。37 $^{\circ}$ C 酶切 3 h。用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物,EB 染色,培清 JS-780 全自动凝胶成像分析仪进行成像分析。

g. 2270C>T 位点所在处没有酶切位点的存在,选择 AS-PCR(Allele-specific PCR)方法进行基因分型。具体方法:设计 2 对引物 P2 和 P3(表 1),上游引物 3'端最后 1 个碱基有差异,下游引物为共用引物。将这 2 对引物分别对同一样本进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,EB 染色,培清 JS-780 全自动凝胶成像分析仪进行成像分析。

表 1 引物序列及 PCR 反应参数

Table 1 Primer sequences and the parameters of PCR reaction

引物 Primer	引物序列(5'—3') Primer sequences	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature	产物长度/bp Length	用途 Purpose
P1	AATAACAATGTCATCACCGC GGAAGGCACTTCACATACAA	58	341	SNPs 筛选和 PCR-RFLP 分型
P2	AACAGGCATGCCTAAGTAGC GGAAGGCACTTCACATACAA	59	354	AS-PCR 分型
P3	AACAGGCATGCCTAAGTAGT GGAAGGCACTTCACATACAA	59	354	AS-PCR 分型

1.6 数据分析

利用 SPSS18.0 软件中的 One-Way ANOVA 方法统计不同基因型与苏淮山羊产羔数的关联性。

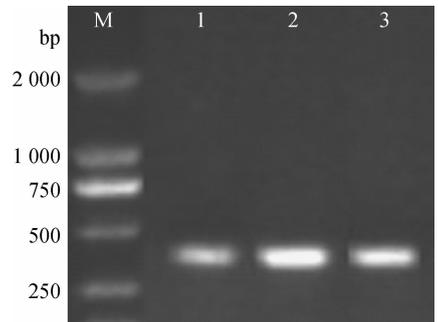
2 结果

2.1 苏淮山羊 *Kiss-1* 基因多态位点的筛选

以苏淮山羊 DNA 池为模板对 *Kiss-1* 基因内含子 1 部分序列进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)后测序。根据测序峰图,在苏淮山羊 *Kiss-1* 基因内含子 1 中发现 2 个 SNPs 位点(图 2),分别命名为 g. 2510G>A 和 g. 2270C>T。

2.2 基因分型

2.2.1 g. 2270C>T 位点 AS-PCR 分型 *Kiss-1* 基因 g. 2270C>T 位点未发现酶切位点,选择 AS-PCR 方法进行基因分型。利用引物 P2、P3 对 130 头苏淮山羊 DNA 样本进行 PCR 扩增和电泳,根据不同引物扩增目的条带的有无进行基因分型,结果在苏淮山羊 g. 2270C>T 位点发现 3 种基因型:CC、CT 和 TT 型(图 3)。



1~3. 不同苏淮山羊 DNA 模板扩增的 *Kiss-1* 基因片段; M. DNA 相对分子质量标准(下同)

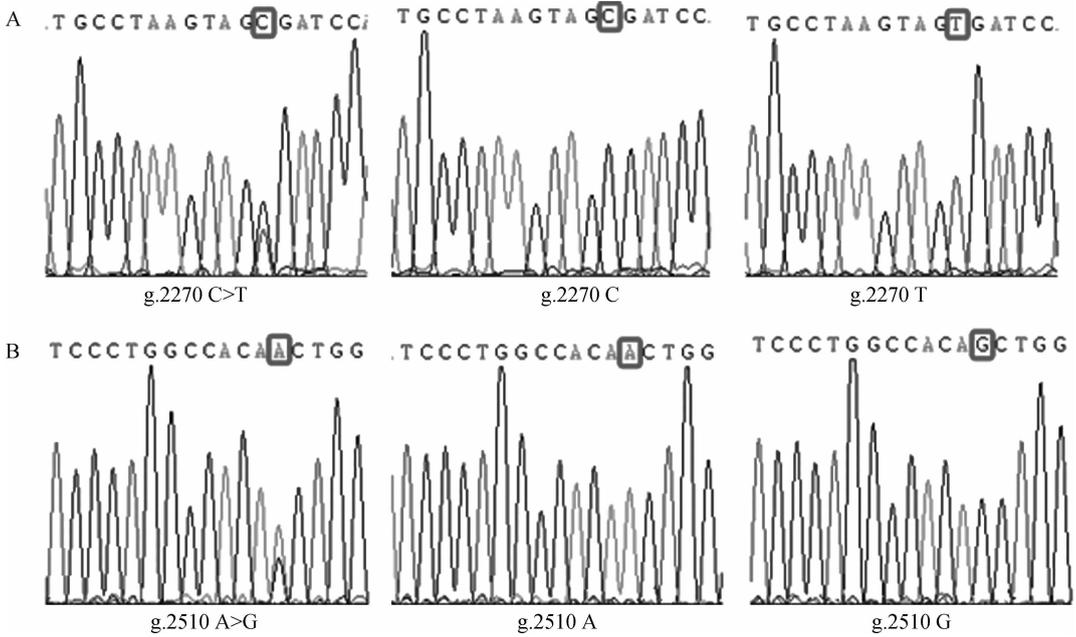
1-3. *Kiss-1* gene fragments of different DNA template in Suhuai goats; M. Marker(the same as below)

图 1 苏淮山羊 *Kiss-1* 基因片段扩增产物电泳图谱

Fig. 1 PCR amplification of *Kiss-1* gene in Suhuai goats

2.2.2 g. 2510G>A 位点 PCR-RFLP 分型

Kiss-1 基因 g. 2510G>A 位点处于 *Pvu*Ⅲ 酶切位点内,用 PCR-RFLP 方法进行分型试验。对 130 只苏淮山羊样本进行 PCR 扩增,用琼脂糖凝胶电泳检测,片段长度与预期长度一致。用 *Pvu*Ⅲ 酶对 PCR 产物进行酶切后出现 3 种基因 AA(431 bp)、AG



A. g. 2270C>T 位点杂合子和纯合子测序图; B. g. 2510A>G 位点杂合子和纯合子测序图

A. Heterozygous and homozygous sequencing diagram of g. 2270C>T locus; B. Heterozygous and homozygous sequencing diagram of g. 2510A>G locus

图 2 苏淮山羊 *Kiss-1* 基因内含子 SNPs 位点筛选测序结果

Fig. 2 Sequencing results of SNPs locus in *Kiss-1* gene of Suhuai goat

(431、338、93 bp)和 GG(338、93 bp),电泳图谱见图 4(93 bp 的条带过小,电泳时已经跑出凝胶,故图中不可见)。

2.3 *Kiss-1* 基因多态位点的群体遗传学特征

Kiss-1 基因 g. 2270C>T 和 g. 2510G>A 位点在苏淮山羊群体中的等位基因频率、基因型频率、多态信息含量和杂合度见表 2。g. 2270C>T 位点 C 和 T 等位基因频率分别为 0.520 和 0.480,CC、CT 和 TT 的基因型频率分别为 0.143、0.750 和 0.107,CT 型为优势等位基因型,卡方检验发现此位点处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态。g. 2510G>A 位点 A 和 G 等位基因频率分别为 0.457 和 0.543,AA、AG 和 GG 基因型频率分别为 0.209、0.496 和 0.295,AG 型为优势等位基因型,卡方检验发现此位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。g. 2270C>T 和 g. 2510G>A 位点的 PIC 含量分别为 0.375 和 0.373,杂合度(H_e)分别为 0.499 和 0.496。

2.4 *Kiss-1* 基因突变位点不同基因型对苏淮山羊产羔数的影响

Kiss-1 基因 g. 2270C>T 和 g. 2510G>A 位点多态性与苏淮山羊各胎产羔数和平均产羔数的关联性分析结果见表 3。g. 2270C>T 位点 CC 型苏淮山羊的第二胎产羔数显著高于 TT($P<0.05$)和 CT 型($P<0.05$),CC 型的一、三胎产羔数和平均产羔数均高于 TT 型和 CT 型,但是差异不显著。g. 2510A>G 位点的 3 种基因型在苏淮羊的头胎产

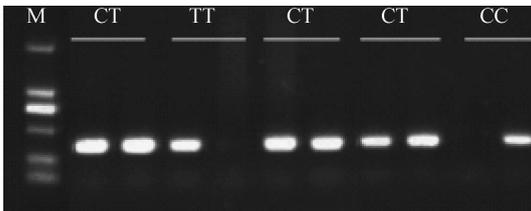


图 3 苏淮山羊 *Kiss-1* 基因 g. 2270C>T 位点 AS-PCR 分型电泳图

Fig. 3 AS-PCR electrophoresis at g. 2270C>T locus in *Kiss-1* gene in Suhuai goat

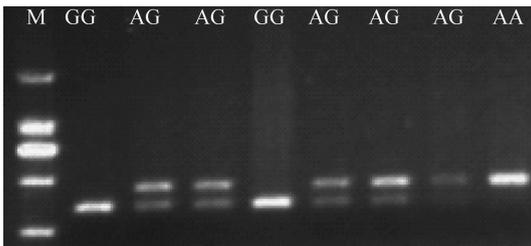


图 4 苏淮山羊 *Kiss-1* 基因 g. 2510A>G 位点 PCR-RFLP 分型电泳图

Fig. 4 PCR-RFLP electrophoresis at g. 2510A>G locus in *Kiss-1* gene in Suhuai goat

表 2 苏淮山羊 *Kiss-1* 基因突变位点的基因型和等位基因频率及遗传多样性Table 2 Allele frequency, genotype frequency of SNPs in *Kiss-1* gene of Suhuai goat

位点 Locus	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency		多态信息含量 <i>PI</i> C	杂合度 <i>He</i>
	CC	TC	TT	C	T		
g. 2270C>T	0.143	0.750	0.107	0.520	0.480	0.375	0.499
g. 2510A>G	AA	AG	GG	A	G	0.373	0.496
	0.209	0.496	0.295	0.457	0.543		

表 3 苏淮山羊 *Kiss-1* 基因突变位点不同基因型与产羔数的关联性分析Table 3 Litter size of Suhuai goat in different genotypes of *Kiss-1* gene at g. 2270C>T and g. 2510A>G loci

位点 Locus	基因型 Genotype	样本量 Number	头胎产羔数/只	二胎产羔数/只	三胎产羔数/只	平均产羔数/只
			1 st parity litter size	2 nd parity litter size	3 rd parity litter size	Average litter size
g. 2270C>T	CC	17	1.71±0.28 ^a	2.50±0.24 ^a	2.25±0.51 ^a	2.29±0.12 ^a
	TC	98	1.66±0.11 ^a	1.80±0.12 ^b	2.09±0.13 ^a	1.89±0.07 ^a
	TT	14	2.00±0.41 ^a	1.67±0.15 ^b	2.00±0.42 ^a	1.75±0.14 ^a
g. 2510A>G	AA	27	1.88±0.18 ^a	1.88±0.38 ^a	2.20±0.20 ^a	1.98±0.25 ^a
	AG	64	1.85±0.10 ^a	1.94±0.13 ^a	1.75±0.12 ^a	1.90±0.07 ^a
	GG	39	1.68±0.17 ^a	1.84±0.19 ^a	2.33±0.42 ^a	1.93±0.16 ^a

相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同

Same letter indicated no significant difference, different letters indicated significant difference at the 0.05 level. The same as below

羔数、二胎产羔数、三胎产羔数和平均产羔数间差异不显著。

2.5 *Kiss-1* 基因突变位点单倍型分析

2.5.1 *kiss-1* 基因 g. 2270C>T 和 g. 2510G>A 位点单倍型分型 经过分析发现, g. 2270C>T 和 g. 2510G>A 两位点在苏淮山羊群体中共构建了 8 种单倍型组合: AGCT、GGCT、AGTT、AGCC、GGCC、AACT、AATT 和 GGTT, 分别占总数的 44.4%、17.3%、3.7%、6.2%、7.4%、13.6%、6.2% 和 1.2%。其中, 单倍型 AGCT 为主要的单倍型, 占总数的 44.4%, GGCT 和 AACT 次之, 分别为 17.3% 和 13.6%。

2.5.2 单倍型组合与苏淮山羊产羔数的相关性分析 由于一些单倍型数量较少, 在进行关联分析时, 只选取样本含量大于 3 的单倍型组合与苏淮山羊的产羔数进行关联分析。对 *Kiss-1* 基因各个单倍型组合与苏淮山羊各胎次产羔数的关联分析见表 4。AGCT 单倍型的头胎产羔数比 AACT 单倍型的头胎产羔数分别多 0.68 头, 差异显著($P=0.012$),

单倍型 AGCC 的头胎产羔数比 AACT 多 0.80 头, 单倍型 AGCC 的二胎产羔数比 AGCT、GGCT 和 AACT 的二胎产羔数分别高 1.11、1.27 和 0.47 头, 但是均未达到显著水平; 单倍型 AGCC 的平均产羔数比 AGCT、GGCT 和 AACT 分别多 0.38、0.51 和 0.24 头, 未达到显著水平。

3 讨论

Kiss-1 基因在雌性动物生殖过程中发挥着重要的作用^[13]。到目前为止, 已有多个课题组将 *Kiss-1* 基因作为动物繁殖性状的候选基因进行研究: L. Huijbregts 等^[14]研究发现在人类 *Kiss-1* 基因 3' 非翻译区的 c. 645G>CA 位点突变与中枢性早熟显著相关; G. L. Cao^[11]等研究发现 *Kiss-1* 基因 296 位点的 C 等位基因和 1 960~1 977 的缺失与济宁青山羊的高产羔数显著相关; J. X. Hou^[15]等在山羊 *Kiss-1* 基因的内含子 2 中鉴定的 T2643C 位点与山羊的产羔数显著相关; X. An 等^[12]2013 年在 3 个山羊品种中检测到 *Kiss-1* 基因的 11 个突变位点, 其

表 4 *Kiss-1* 基因单倍型与苏淮山羊产羔数的关联分析Table 4 Association of *Kiss-1* haplotype with litter size in Suhuai goats

胎次 Parity	单倍型组合 Haplotype combination			
	AGCT	GGCT	AGCC	AACT
头胎产羔数/只 1 st parity litter size	1.88±0.60 ^a	1.40±0.49 ^{ab}	2.00±0.82 ^{ab}	1.20±0.40 ^b
二胎产羔数/只 2 nd parity litter size	1.56±0.61 ^a	1.40±0.49 ^a	2.67±0.94 ^a	2.20±1.16 ^a
三胎产羔数/只 3 rd parity litter size	1.75±0.56 ^a	2.00±0.62 ^a	1.67±0.47 ^a	2.20±0.40 ^a
平均产羔数/只 Average litter size	1.73±0.34 ^a	1.60±0.31 ^a	2.11±0.68 ^a	1.87±0.54 ^a

中 $g. 384G > A$ 、 $g. 2489T > C$ 、 $g. 2510G >$ 和 $g. 2540C > T$ 位点突变与山羊的产羔数显著相关。苏淮山羊是利用波尔山羊和徐淮山羊的杂交后代,采用传统杂交育种技术和现代分子辅助育种技术相结合,拟培育出繁殖力高、生长速度快、适应强的肉用山羊新品种,目前已横交第 2 个世代,关于 *Kiss-1* 基因的多态性与苏淮山羊的产羔数之间关系的研究还未见报道。

本研究利用 DNA 池测序方法在苏淮山羊 *Kiss-1* 基因内含子 1 中发现 2 个多态位点 $g. 2270C > T$ 和 $g. 2510A > G$ 。多态信息含量 (PIC)、杂合度 (*He*) 等可用来衡量群体内的遗传变异^[16],苏淮山羊 *Kiss-1* 基因内含子 1 中的 $g. 2270C > T$ 和 $g. 2510G > A$ 位点 PIC 含量分别为 0.375 和 0.373,根据 PIC 大小与遗传多样性等级表明这 2 个位点均属于中度遗传多态性^[12]。 $g. 2270C > T$ 位点处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态,而 $g. 2510G > A$ 位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,表明 $g. 2270C > T$ 位点在苏淮山羊培育过程中受到人工选择和选育的影响。

关联分析发现,苏淮山羊 *Kiss-1* 基因 $g. 2270C > T$ 位点 CC 型的二胎产羔数、三胎产羔数和平均产羔数均高于 CT 和 TT 型,而且在二胎产羔数方面达到了显著水平,因此推测 C 等位基因可能有利于提高苏淮山羊产羔数,此结果与 X. P. An 等^[17] 的研究结果一致,说明 *Kiss-1* 基因的 $g. 2270C > T$ 位点与山羊的繁殖性能显著相关。 $g. 2510A > G$ 位点的多态性与苏淮山羊的产羔数之间差异不显著,这与 X. An 等^[12] 研究发现 *Kiss-1* 基因 $g. 2510A > G$ 与萨能奶山羊、关中奶山羊和波尔山羊产羔数相关联的结果并不一致,可能与受检的苏淮山羊群体大小有关,也可能因为同一位点在不同动物品种中发挥的作用不一样所致,例如在国外

绵羊品种中控制绵羊高繁殖力的主效基因 *bmp15* 与中国湖羊的高繁殖力性状却并不关联^[18]。动物的繁殖性能是相对比较复杂的数量性状,包括多个基因和多个位点的相互作用^[12]。本研究中将 *Kiss-1* 基因的 $g. 2270C > T$ 和 $g. 2510A > G$ 的单倍型进行了分析,发现这 2 个位点在苏淮山羊中共构建了 8 种单倍型,AGCT 为主要单倍型。不同单倍型与苏淮山羊各胎次产羔数的关联分析表明,AGCT 单倍型的头胎产羔数显著高于 AACT 单倍型,平均多 0.68 头羔,差异显著。AGCC 单倍型的头胎产羔数比 AACT 高 0.80 头羔,平均产羔数比单倍型 AGCT、GGCT 和 AACT 分别多 0.38、0.51 和 0.24 头,但是均未达到显著水平,主要是因为 AGCC 单倍型的苏淮山羊个体间头胎产羔数和平均产羔数差异太大,标准误过高所致。

研究表明,二胎产羔数的多少往往是决定一只山羊是否多产的一项非常有价值的指标^[19]。本试验中,单个 SNP 分析发现, $g. 2270C > T$ 位点的 CC 型的二胎产羔数、三胎产羔数和平均产羔数均高于 CT 和 TT 型,而且在二胎产羔数方面达到了显著水平;单倍型分析发现,AGCT 单倍型的头胎产羔数显著高于 AACT 单倍型,而其他单倍型与苏淮山羊的产羔数间差异不显著。综合以上的研究结果推断 $g. 2270C > T$ 位点可能对苏淮山羊繁殖性状的选育具有一定的指导意义。

参考文献:

- [1] LEE J H, MIELE M E, HICKS D J, et al. *Kiss-1*, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88(23): 1731-1737.
- [2] OHTAKI T, SHINTANI Y, HONDA S, et al. Metastasis suppressor gene *Kiss-1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor [J]. *Nature*, 2001, 411:

- 613-617.
- [3] KOTANI M, DETHEUX M, VANDEBOGAERDE A, et al. The metastasis suppressor gene *Kiss-1* encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(37): 34631-34636.
- [4] MUIR A, CHAMBERLAIN L, ELSHOURBAGY N, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide *Kiss-1* [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(31): 28969-28975.
- [5] DE ROUX N, GENIN E, CAREL J, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the *Kiss1*-derived peptide receptor GPR54 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(19): 10972-10976.
- [6] D' ANGLEMONT DE TASSIGNY X, FAGG L A, DIXON J P, et al. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional *Kiss1* gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(25): 10714-10719.
- [7] MESSENGER S, CHATZIDAKI E, MA D, et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(5): 1761-1766.
- [8] PINILLA L, AGUILAR E, DIEGUEZ C, et al. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanism [J]. *Physiol Rev*, 2012, 92(3): 1235-1316.
- [9] 乔丽丽, 莱德培. *KISS1*-GPR54 基因与儿童性早熟 [J]. 国际儿科学杂志, 2011, 38(5): 242-244.
- [10] SILVEIRA L G, NOEL S D, SILVERIA-NETO A P, et al. Mutations of the *Kiss1* gene in disorders of puberty [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(5): 2276-2280.
- [11] CAO G L, CHU M X, FANG L, et al. Analysis on DNA sequence of *Kiss-1* gene and its association with litter size in goats [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(8): 3921-3929.
- [12] AN X, MA T, HOU J, et al. Association analysis between variants in *Kiss1* gene and litter size in goats [J]. *BMC Genet*, 2013, 14: 63.
- [13] 王 军, 吕文发, 娄玉杰. *Kiss-1*/GPR54 系统在雌性哺乳动物生殖中的作用 [J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(4): 59-61.
- [14] HUIJBREGTS L, ROZE C, BONAFE G, et al. Dna polymorphisms of the *Kiss-1* 3' untranslated region interfere with the folding of a G-rich sequence into G-quadruplex [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 351: 239-248.
- [15] HOU J X, AN X P, WANG J G, et al. New genetic polymorphisms of *Kiss-1* gene and their association with litter size in goats [J]. *Small Ruminant Res*, 2011, 96: 106-110.
- [16] 王柯忆, 赖新生, 张春雷, 等. 南阳牛 *Gli-3* 基因多态性及其与生长性状的相关性 [J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(6): 1103-1107.
- [17] AN X P, HAN P, HOU J X, et al. Molecular cloning and characterization of *Kiss1* promoter and effect of *KISS1* gene mutations on litter size in the goat [J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(4): 4308-4316.
- [18] HUA G H, YANG L G. A review of research progress of *FecB* gene in Chinese breeds of sheep [J]. *Anim Reprod Sci*, 2009, 116(1-2): 1-9.
- [19] WANG Y Q, LI Y X, ZHANG N N, et al. Polymorphism of exon 2 of *BMP15* gene and its relationship with litter size of two Chinese goats [J]. *Asian Austral J Anim Sci*, 2011, 24: 905-911.

(编辑 郭云雁)