

小尾寒羊GnRHR基因多态性与产羔性状关联分析

寸静宇 龚 蕾*

大理农林职业技术学院 云南大理 671000

摘要: 为了揭示GnRHR基因在小尾寒羊的多态性与产羔数的关系, 深入了解其对小尾寒羊多羔的作用。本研究采用Sequenom MassARRAY® SNP 技术对380只小尾寒羊和共380只的滩羊、苏尼特羊、策勒黑羊、湖羊和草原型藏羊GnRHR基因1个单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphism, SNP)的多态性进行检测, 并与小尾寒羊产羔数进行关联分析。分型发现GnRHR基因g.83379464C>G位点基因型频率和等位基因频率在单、多羔品种间差异均不显著 ($P>0.05$); 另外, g.83379464C>G在策勒黑羊中表现为中度多态($0.25<PIC<0.5$), 在其他绵羊品种中均表现为低度多态($PIC<0.25$); 卡方适合性检验表明, g.83379464C>G在各个绵羊品种中均处于Hardy-Weinberg 平衡状态($P>0.05$); 关联分析表明, GnRHR 基因的g.83379464C>G位点的多态性与小尾寒羊各胎产羔数差异均不显著 ($P>0.05$)。本研究发现, GnRHR基因的g.83379464C>G位点虽然对产羔数有一定影响, 但可能并不是影响绵羊产羔数的关键位点。

关键词: 绵羊; 多羔; GnRHR基因; SNP; 关联;

Correlation analysis of GnRHR gene polymorphism and lambing traits in small tail Han sheep

Jingyu Cun, Lei Gong*

Dali Vocational and Technical College of Agriculture and Forestry, Dali, Yunnan 671000, China

Abstract: In order to reveal the relationship between the polymorphism of GnRHR gene and lambing performance in small-tailed Han sheep, and to gain a better understanding of its effect on the high fecundity of this breed, this study used the Sequenom MassARRAY® SNP technology to detect the polymorphism of one single nucleotide polymorphism (SNP) site in the GnRHR gene in 380 small-tailed Han sheep, as well as in 380 sheep from other breeds, including Tan, Sunite, Chele black, Hu, and grassland-type Tibetan sheep. The genotyping results showed that the genotype frequency and allele frequency of the GnRHR gene g.83379464C>G site were not significantly different between single- and multiple-lamb breeds ($P>0.05$). Additionally, g.83379464C>G showed moderate polymorphism in Chele black sheep ($0.25<PIC<0.5$) and low polymorphism in other sheep breeds ($PIC<0.25$). The chi-square test showed that g.83379464C>G was in Hardy-Weinberg equilibrium in all sheep breeds ($P>0.05$). Association analysis revealed that the polymorphism of the g.83379464C>G site in the GnRHR gene was not significantly associated with the difference in the lambing performance of small-tailed Han sheep ($P>0.05$). This study found that although the g.83379464C>G site of the GnRHR gene may have some influence on lambing performance, it may not be the key site affecting sheep fecundity.

Keywords: Sheep; Prolificacy; GnRHR gene; SNP; association

促性腺激素释放激素受体是G蛋白偶联受体家族的一员, 其特征是通过七个跨膜结构域连接形成的细胞外和细胞内封闭环。GnRHR是由丘脑下部神经内分泌细胞合成的一种十肽, 是下丘脑-垂体-性腺轴的关键神经内分泌调节因子[1]。GnRHR缺失会导致排卵障碍, 进而发生不育, GnRHR基因还可以与其它激素和生长因子(如GDF9、FSH、LH)产生协同作用。敲除了GnRHR将造成GnRH受体在所有中枢和外周组织中缺失, 使垂体中GnRHR被破坏, 导致下游缺乏性类固醇, 从而影响了其生殖和非生殖功能中被阻断。国内外研究者发现, GnRHR的多态性与贵州黑山羊[2]、波尔山羊、萨能奶山羊、和伊拉克绵羊的繁殖性状都有关联。

目前, 全基因组重测序是功能基因挖掘最主要的方式之一[3-5], 本实验室前期对10个绵羊品种99个绵羊个体进行全基因组重测序[6], 筛选出与小尾寒羊产羔数相关的候选基因GnRHR的g.83

379464C>G位点。本试验在小尾寒羊群体中, 使用Taqman探针法对FecB基因进行分型, 确定了小尾寒羊FecB基因突变++型中产单羔和产多羔的个体, 并以此为研究对象, 对GnRHR基因g.83379464C>G SNP位点进行研究, 以探讨GnRHR基因多态性与小尾寒羊产羔数之间的关系, 为小尾寒羊多羔性状的机理研究提供参考。

一、材料与方法

1.1 实验样品总共760只羊, 其中有产羔数记录的小尾寒羊380只, 共380只的多羔品种: 小尾寒羊(27)、湖羊(101)和策勒黑羊(48); 单羔品种: 苏尼特羊(21)、滩羊(22)和草原型藏羊(161)。

1.2 基因分型采用SequenomMassARRAY®SNP技术对GnRHR基因g.83379464C>G位点进行基因型检测。分型样品为DNA, 每个样品需要量为20 μ L, DNA浓度为40-80 ng/ μ L。

1.3 统计分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达量, 采用SPSS 19.0进行统计学分析数据差异显著性, 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行组间比较, 用最小显著差异法 (least significant difference, LSD) 进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

应用Microsoft Excel 2016软件统计绵羊GnRHR基因g.8337946 4C>G位点的等位基因频率、基因型频率、杂合度 (He)、多态信息含量 (PIC) 和有效等位基因数 (Ne), 然后进行Hardy-Weinberg平衡检验。

使用 $y_{ijkl} = \mu + LSi + Pj + Gk + eijkl$ 模型进行最小二乘方差分析。

用SPSS19.0软件程序中一般线性模型完成小尾寒羊基因型与产羔表型数据关联分析, 所有数据以“均值±标准误”表示。

二、结果与分析

2.1 GnRHR基因多态性分析分型发现GnRHR基因的SNP位点在单、多羔品种中均存在三种基因型, 见图1。

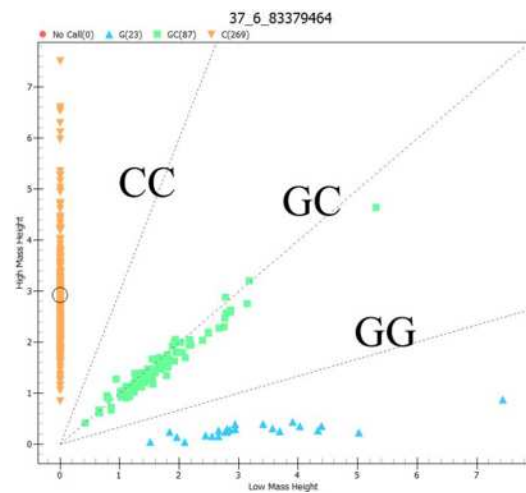


图1 GnRHR 基因分型结果

从表1可知, GnRHR基因g.8337946C>G位点基因型频率和等位基因频率在单、多羔品种间差异不显著 ($P > 0.05$); g.8337946 4C>G位点在多羔和单羔品种中CC为优势基因型, C为优势等位基因。

表1 GnRHR基因SNP位点在单、多羔绵羊品种中的基因型频率和等位基因频率

| 位点 | 基因型 | 多羔品种中 | | 卡方检验 (P值) | 等位基因 | 单羔品种中 | | 卡方检验 (P值) |
|----------------|-----|------------|------------|-----------|------|-------|------|-----------|
| | | 基因型频率 | 基因型频率 | | | 基因频率 | 基因频率 | |
| g.8337946 4C>G | CC | 0.78 (425) | 0.82 (167) | 0.068 | C | 0.81 | 0.84 | 0.265 |
| | CG | 0.18 (99) | 0.17 (35) | | G | 0.19 | 0.16 | |
| | GG | 0.04 (24) | 0.01 (2) | | | | | |

注: $P > 0.05$ 表示差异不显著。

从表2可知, GnRHR基因的g.8337946C>G位点在策勒黑羊品种中表现为中度多态 ($0.25 < PIC < 0.5$), 在小尾寒羊、滩羊、苏尼特羊、湖羊以及草原型藏羊5个品种中均表现为低度多态 ($PIC < 0.2$)。

另外, 卡方适合性检验结果表明, g.8337946C>G位点在各品种中均处于哈代温伯格平衡状态 ($P > 0.05$)。

表2 GnRHR基因SNP位点在不同绵羊品种中的群体遗传学分析

| 位点 | 品种 | 基因型频率 | | | 基因频率 | | 多态信息含量 | 杂合度 | 有效等位基因数 | 卡方检验 (P值) |
|----------------|-------|------------|-----------|-----------|------|------|--------|------|---------|-----------|
| | | CC | CG | GG | C | G | | | | |
| g.8337946 4C>G | 小尾寒羊 | 0.85 (334) | 0.14 (56) | 0.01 (5) | 0.92 | 0.08 | 0.14 | 0.15 | 1.18 | 0.14 |
| | 湖羊 | 0.77 (78) | 0.20 (20) | 0.03 (3) | 0.87 | 0.13 | 0.20 | 0.22 | 1.29 | 0.24 |
| | 策勒黑羊 | 0.25 (13) | 0.44 (23) | 0.31 (16) | 0.47 | 0.53 | 0.37 | 0.50 | 1.99 | 0.42 |
| | 苏尼特羊 | 0.86 (18) | 0.14 (3) | 0.00 (0) | 0.93 | 0.07 | 0.12 | 0.13 | 1.15 | 0.72 |
| | 滩羊 | 0.91 (20) | 0.09 (2) | 0.00 (0) | 0.95 | 0.05 | 0.08 | 0.09 | 1.10 | 0.82 |
| | 草原型藏羊 | 0.80 (129) | 0.19 (30) | 0.01 (2) | 0.89 | 0.11 | 0.17 | 0.19 | 1.23 | 0.86 |

注: $P > 0.05$ 表示位点在该品种中处于哈代温伯格平衡状态

2.2 GnRHR基因多态位点与小尾寒羊产羔数的关系 由表3可知, GnRHR 基因g.83379464C>G的多态性与小尾寒羊各胎产羔

数均没有显著相关 ($P>0.05$)。该位点在第二胎和第三胎中杂合型CG的产羔数最高, 突变纯合型GG次之。

表3 GnRHR基因不同位点各基因型小尾寒羊产羔数最小二乘均值及标准误

| 位点 | 基因型 | 第1胎样本数 | 第1胎产羔数 | 第2胎样本数 | 第2胎产羔数 | 第3胎样本数 | 第3胎产羔数 |
|---------------|-----|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|
| g.83379464C>G | CC | 298 | 2.15±0.05 | 282 | 2.31±0.05 | 111 | 2.78±0.10 |
| | GG | 3 | 2.00±0.49 | 3 | 2.33±0.53 | 1 | 3.00±1.07 |
| | CG | 40 | 2.13±0.13 | 39 | 2.51±0.15 | 17 | 3.24±0.26 |

三、讨论

3.1 GnRHR基因与绵羊繁殖的关联GnRHR基因的g.83379464C>G位点基因型频率和等位基因频率在单、多羔品种间差异均不显著 ($P>0.05$); 分析发现该位点在策勒黑羊品种中均表现为中度多态($0.25<PIC<0.5$), 说明该位点在策勒黑羊中存在较强的选择潜力, 而它在其他5个品种中均表现为低度多态($PIC<0.25$), 暗示其在这些品种中选择潜力较低, 也进一步说明这个位点在不同的绵羊品种中的选择潜力也大不相同, 推测可能是某些品种的遗传多样性较贫乏的原因。另外, g.83379464C>G位点在各个绵羊品种中均处于哈代温伯格平衡状态($P>0.05$), 暗示该位点在适应性方面有一定的遗传优势。关联分析发现, GnRHR基因g.83379464C>G的多态性与小尾寒羊头三胎产羔数没有显著关联 ($P>0.05$)。值得注意的是, 该位点在第二胎和第三胎中杂合型CG的产羔数最高, 突变纯合型GG次之, 推测这个位点的CG杂合型在一定程度上增强了小尾寒羊的产羔能力。所以推测这个位点虽然对产羔数有一定影响, 但可能并不是影响绵羊产羔数的关键位点。

四、结论

本研究发现, 根据基因分型结果表明g.83379464C>G位点的多态性与小尾寒羊各胎产羔数没有显著关联, 暗示其可能不是调控小尾寒羊多羔性状的关键位点。

参考文献:

- [1]龙开旭,王英群,刘德玉,等.摩拉、尼里/拉菲种公牛促性腺激素释放激素受体(GnRHR)基因序列多态性检测及基因型分析[J].黑龙江畜牧兽医,2016,(17):46-49+288-289.
- [2]张劲松,龙威海,许厚强,等.贵州黑山羊GnRHR基因与繁殖性状相关性的研究[J].中国畜禽种业,2015,11(8):44-45.
- [3]宋娜娜,钟金城,柴志欣,等.三江黄牛全基因组数据分析[J].中国农业科学, 2017, 50(1):183-194.
- [4]潘章源,贺小云,刘秋月,等.全基因组测序(WGS)在畜禽群体进化和功能基因挖掘中的应用[J].农业生物技术学报,2016,24(12):1945-1954.
- [5]汪文强,赵生国,马利青,等.动物基因组学重测序的应用研究进展[J].畜牧兽医学报, 2016,47(10):1947-1953.
- [6]曾滔,赵福平,王光凯,等.基于群体分化指数FST的绵羊全基因组选择信号检测[J].畜牧兽医学报,2013,44(12):1891-1899.

通讯作者: 龚蕾, 女, 汉族; 出生年月:1993年7月-; 民族:汉族; 籍贯:云南大理; 学历:硕士研究生; 职称:助教; 研究方向:动物防疫检疫方向

[中图分类号] [文献标志码]A [文章编号]