

山羊生长分化因子 9 基因外显子 2 的 PCR-SSCP 分析

吴泽辉¹, 储明星², 李学伟¹, 方丽², 叶素成², 刘忠慧³, 陈国宏³

(¹四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014; ²中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094; ³扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘要:【目的】寻找与产羔数相关的遗传标记, 为山羊高繁殖力的标记辅助选择提供科学依据。【方法】以控制 Belclare 绵羊和 Cambridge 绵羊高繁殖力的生长分化因子 9 (growth differentiation factor 9, GDF9) 基因为候选基因, 根据绵羊 GDF9 基因序列设计 4 对引物, 采用 PCR-SSCP 技术检测 GDF9 基因外显子 2 在高繁殖力山羊品种(济宁青山羊)以及低繁殖力山羊品种(波尔山羊、文登奶山羊、辽宁绒山羊、北京本地山羊)中的单核苷酸多态性, 同时研究该基因对济宁青山羊高繁殖力的影响。【结果】山羊与绵羊的 GDF9 基因外显子 2 核苷酸序列同源率为 99%(955/965)。引物 1 和引物 4 存在多态性。对于引物 1 扩增片段, 5 个山羊品种均检测到 AA、AB 和 BB 3 种基因型, 测序分析发现外显子 2 第 26 bp 处有 1 个 G→A 的单碱基突变, 但没有引起氨基酸改变; 济宁青山羊 A 等位基因频率为 0.9128, B 等位基因频率为 0.0872; AA 基因型济宁青山羊产羔数最小二乘均值比 AB 基因型的多 0.54 只 ($P < 0.01$), 比 BB 基因型的多 0.63 只 ($P < 0.01$)。对于引物 4 扩增片段, 5 个山羊品种均检测到 CC、CD 和 DD 3 种基因型, 测序分析发现外显子 2 第 792 bp 处有 1 个 G→A 的单碱基突变并且导致缬氨酸改变为异亮氨酸; 济宁青山羊 C 等位基因频率为 0.9266, D 等位基因频率为 0.0734; CC 基因型济宁青山羊产羔数最小二乘均值比 CD 基因型的多 0.57 只 ($P < 0.01$), 比 DD 基因型的多 0.62 只 ($P < 0.01$)。【结论】初步表明 GDF9 基因可能是控制济宁青山羊多胎性能的一个主效基因或是与之存在紧密遗传连锁的分子标记。

关键词: 山羊; 高繁殖力; 生长分化因子 9 基因; PCR-SSCP

PCR-SSCP Analysis on Exon 2 of Growth Differentiation Factor 9 Gene in Goats

WU Ze-hui¹, CHU Ming-xing², LI Xue-wei¹, FANG Li², YE Su-cheng², LIU Zhong-hui³, CHEN Guo-hong³

(¹College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014;

²Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094;

³College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract: 【Objective】The objectives of the present study were firstly to detect polymorphisms in the growth differentiation factor 9 (GDF9) gene, and secondly to investigate the association between GDF9 gene and high prolificacy in Jining Grey goats. These results will provide a scientific basis for marker-assisted selection for high prolificacy in goats. 【Method】The GDF9 gene which controls the fecundity of Belclare and Cambridge ewes was studied as a candidate gene for the prolificacy in Jining Grey goats. According to the sequence of ovine GDF9 gene, four primer pairs were designed to detect single nucleotide polymorphism of exon 2 of GDF9 gene in both high fecundity goat breed (Jining Grey goat) and low fecundity goat breeds (Boer goat, Wendeng dairy goat, Liaoning Cashmere goat, Beijing native goat) by PCR-SSCP. 【Result】The results indicated that the homology of nucleotide sequence of exon 2 of GDF9 gene between goats and sheep was 99 percent. The products amplified by primer 1 and primer 4 displayed polymorphism. For primer 1, three genotypes (AA, AB and BB) were detected in all five goat breeds. The sequencing results indicated that there was one single nucleotide mutation (G²⁶→A²⁶) at exon 2 of GDF9 gene in goats, but this mutation did not cause amino acid change. Frequency of allele A was 0.9128, frequency of allele B was 0.0872 in Jining Grey goats. The does with

收稿日期: 2004-12-23; 接受日期: 2006-02-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30540052)和北京市自然科学基金资助项目(6062023)

作者简介: 吴泽辉(1974-), 男, 四川遂宁人, 硕士, 研究方向为分子遗传学。Tel: 0835-2882325; E-mail: wuzehui707@sohu.com。通讯作者储明星(1968-), 男, 研究员, 博士, 研究方向为分子数量遗传学。Tel: 010-62816001; Fax: 010-62895351; E-mail: mxchu@263.net

genotype AA had 0.54 ($P<0.01$) or 0.63 ($P<0.01$) kids more than those with genotype AB or BB in Jining Grey goats, respectively. For primer 4, three genotypes (CC, CD and DD) were detected in all five goat breeds. The sequencing results showed that there was one single nucleotide mutation ($G^{792}\rightarrow A^{792}$) at exon 2 of *GDF9* gene in goats, and this mutation resulted in an amino acid change: valine \rightarrow isoleucine. Frequency of allele C was 0.9266, frequency of allele D was 0.0734 in Jining Grey goats. The does with genotype CC had 0.57 ($P<0.01$) or 0.62 ($P<0.01$) kids more than those with genotype CD or DD in Jining Grey goats, respectively.

【Conclusion】 These results preliminarily showed that the *GDF9* gene is either a major gene that influences the prolificacy in Jining Grey goats or a molecular marker in close linkage with such a gene.

Key words: Goat; Prolificacy; Growth differentiation factor 9 gene; PCR-SSCP

0 引言

【本研究的重要意义】家畜的产仔(羔)数是经济价值十分巨大的数量性状。对山羊产羔数的选择不仅受到性别的限制,还受到年龄的限制,而且山羊的产羔数是一个遗传力很低的数量性状,其遗传力只有 0.1 左右,因此,难以用常规的育种技术来改良产羔数性状。标记辅助选择能够通过影响选择的时间、选择的强度以及准确性而极大地提高这类低遗传力性状的选择功效,而找到与这些数量性状基因座相连锁的分子遗传标记,则是实现标记辅助选择的先决条件。【前人研究进展】生长分化因子 9 (growth differentiation factor 9, *GDF9*) 是转化生长因子 β 超家族的一个新成员^[1]。Sadighi 等将绵羊 *GDF9* 基因定位在 5 号染色体上^[2]。*GDF9* 是由卵母细胞分泌的一种生长分化因子,它对早期卵泡的生长和分化起着重要的调节作用^[3~22]。Dong 等将敲除了 *GDF9* 外显子 2 的杂合子小鼠 *gdf9^{ml/+}* 进行杂交,发现纯合子 *gdf9^{ml/gdf9^{ml}}* 雄性小鼠能正常繁殖,而雌性小鼠则不育,主要原因是 *gdf9^{ml/gdf9^{ml}}* 雌性小鼠的卵泡发育到初级卵泡就停止而不能继续生长分化^[4]。Hanrahan 等根据影响绵羊繁殖力基因的命名法则,将 *GDF9* 基因编码区 1 184 bp 处的碱基突变 (C \rightarrow T) 命名为 *FecG^H* (G8 突变),发现 *FecG^H* 纯合子 Cambridge 母绵羊和 Belclare 母绵羊都不育,而杂合子 *FecG^H/FecG⁺* 母绵羊比野生型 *FecG⁺/FecG⁺* 母绵羊排卵数多,*FecG^H* 在 Belclare 母绵羊和 Cambridge 母绵羊中的排卵数效应估计值分别为 1.79 ± 0.548 枚 ($P<0.01$) 和 2.35 ± 0.386 枚 ($P<0.001$)^[23]。【本研究切入点】据《中国羊品种志》记载,在中国地方山羊品种中,济宁青山羊繁殖力最高,平均产活羔数为 2.94,辽宁绒山羊平均产活羔数为 1.18^[24]。波尔山羊平均产活羔数为 2.10^[25],文登奶山羊平均产活羔数为 1.83^[26],北京本地山羊基本为单胎。目前还没有山羊高繁殖力分子遗传基础研究的报道。【拟解决的关键问题】本研究以高繁殖力山羊品种

(济宁青山羊)以及低繁殖力山羊品种(波尔山羊、文登奶山羊、辽宁绒山羊、北京本地山羊)为试验材料,采用单链构象多态(single strand conformation polymorphism, SSCP)方法对在繁殖中起重要作用的 *GDF9* 基因进行单核苷酸多态性检测,以比较 *GDF9* 基因在不同山羊品种中的多态性,并对其 SSCP 多态性的 DNA 片段进行测序比较分析,旨在寻找与产羔数相关的遗传标记,为山羊高繁殖力的标记辅助选择提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

室内试验于 2004 年在中国农业科学院畜牧研究所动物分子育种研究室进行。

1.2 试验材料

1.2.1 DNA 制备 具有第 1 胎和第 2 胎产羔数记录的济宁青山羊母羊 93 只以及 16 只济宁青山羊公羊血样采自农业部济宁青山羊保种基地(山东省嘉祥县);辽宁绒山羊 38 只母羊、北京本地山羊 31 只母羊血样均采自北京市门头沟区清水镇;文登奶山羊 40 只母羊血样采自北京市兴绿原农牧发展有限责任公司(引自山东省);波尔山羊 28 只母羊血样采自安徽省畜禽品种改良站。采样时间为 2004 年 3 月~4 月,颈静脉采血,所采血样均为 10 ml/只,用 ACD 抗凝, -20℃ 冻存。用酚氯仿抽提法提取山羊基因组 DNA,溶于 TE(10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0)), 4℃ 保存。

1.2.2 主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、pGEM-T Easy 载体、DNA 片段回收纯化试剂盒、质粒提取纯化试剂盒等均购自北京鼎国生物技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 引物设计和 TouchDown PCR 扩增 根据 GenBank 发表的绵羊 *GDF9* 基因序列(GenBank 登录号 AF078545)^[8],用 Oligo 6.0 设计 4 对引物,扩增该基因的部分内含子、整个外显子 2 和 3' UTR。引

物序列见表 1。引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

PCR 扩增反应总体积为 25 μl ，包括：10 \times PCR 缓冲液 2.5 μl ，20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+} 1.8 μl ，2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 2.5 μl ，5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上下游引物各 2.5 μl 或 3.0 μl ，Taq DNA 聚合酶 1.5 U，50 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ DNA 模板 2.5 μl 。

表 1 PCR 扩增的引物序列

Table 1 Primer sequences used in PCR amplification

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence	位置(bp) ¹⁾ Location	引物添加量(μl) Quantity of primer	退火温度($^{\circ}\text{C}$) ²⁾ Annealing temperature
引物 1 Primer 1	F: GTTGGATTGTTTTCTCT R: CTCTTTTATCACCAGGTTG	3280~3298 3432~3450	2.5	58
引物 2 Primer 2	F: CAACCTGGTGATAAAAAGAG R: GTCGTTTCAGATACAAAAGC	3432~3450 3696~3714	2.5	60
引物 3 Primer 3	F: GCTTTTGTATCTGAACGAC R: GCTAAGTCTAAAGTCATGG	3696~3714 3966~3984	3.0	60
引物 4 Primer 4	F: CCATGACTTAGACTTAGC R: TGGTTTTACTTGACAGGAG	3966~3984 4271~4289	2.5	60

¹⁾ 对应于 GenBank AF078545 的位置；²⁾ 最初的退火温度

¹⁾ Location corresponding to GenBank AF078545; ²⁾ Annealing temperature of first PCR reaction

液 (98%甲酰胺、0.025%溴酚蓝、0.025%二甲苯氰、10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA (pH8.0)、10%甘油) 混匀，98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min，然后冰浴 10 min，使之保持变性状态。变性后 PCR 产物用非变性聚丙烯酰胺凝胶 4 $^{\circ}\text{C}$ 电泳。电泳 16 h 后，银染显色。引物 1、2、3、4 的聚丙烯酰胺凝胶交联度分别为 49 : 1、29 : 1、29 : 1、49 : 1，聚丙烯酰胺凝胶浓度分别为 14%、10%、14%、12%，电压分别为 140、140、170、180 V。

1.3.3 克隆测序 由于山羊 *GDF9* 基因序列还未见报道，笔者将 SSCP 分析后没有多态和有多态的不同基因型纯合体的 PCR 扩增产物用柱式胶回收试剂盒回收纯化；回收后的 DNA 片段用 pGEM-T Easy 载体连接，并转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株，用鼎国公司质粒提取试剂盒提取质粒作为测序模板进行测序，每一种基因型单独挑两个克隆分别测序。测序反应由北京鼎国生物技术有限公司完成。

1.3.4 数据处理 配合下列模型进行最小二乘方差分析，比较济宁青山羊产羔数在 *GDF9* 基因型之间的差异 (对引物 1 和引物 4 的基因型单独进行分析)：

$$y_{ijkl} = \mu + \text{HYS}_i + \text{P}_j + \text{G}_k + e_{ijkl}$$

其中： y_{ijkl} 为产羔数的记录值； μ 为群体均值； HYS_i 为第 i 个场年季的固定效应； P_j 为第 j 个胎次的固定效应； G_k 为第 k 种基因型的固定效应； e_{ijkl} 为随机残差效应。用 SAS(6.12 版本)的 GLM(general linear model) 过程完成。

Touchdown PCR 程序^[27]为：95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 1 个循环；94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，58 $^{\circ}\text{C}$ 或 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，每 2 个循环下降 1 $^{\circ}\text{C}$ ，72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，20 个循环；94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，48 $^{\circ}\text{C}$ 或 50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，14 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 min；4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

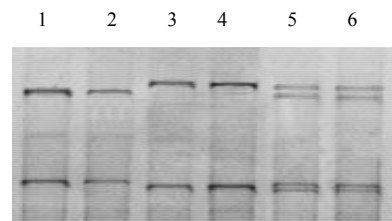
1.3.2 SSCP 分析 1.5 μl PCR 产物和 6 μl 加样缓冲

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增和 SSCP 检测

所设计的 4 对引物用于 PCR 扩增都获得了较好的结果，片段长度与预期大小一致，而且没有非特异扩增条带，可以直接进行 SSCP 分析。

对 4 对引物扩增的 PCR 产物分别进行 SSCP 分析，发现引物 2 和引物 3 扩增片段没有多态性，引物 1 和引物 4 扩增片段有多态性。引物 1 扩增片段有 3 种基因型，分别定义为 AA、BB 和 AB (图 1)；引物 4 扩增片段有 3 种基因型，分别定义为 CC、DD 和 CD (图 2)。

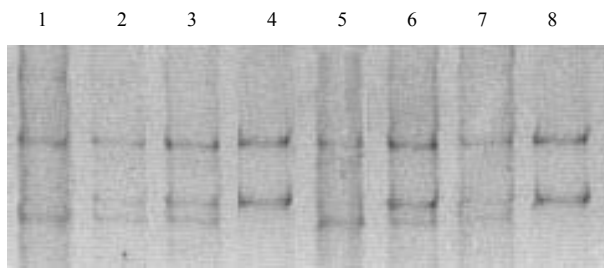


1、2: AA 型(济宁青山羊); 3、4: BB 型(辽宁绒山羊); 5、6: AB 型(波尔山羊)

1, 2: AA genotype (Jining Grey goats); 3, 4: BB genotype (Liaoning Cashmere goats); 5, 6: AB genotype (Boer goats)

图 1 引物 1 对不同山羊品种扩增片段的 SSCP 分析

Fig. 1 SSCP analysis of PCR amplification using primer 1 in different goat breeds



1、5: *CC* 型(济宁青山羊); 4、8: *DD* 型(文登奶山羊); 2、3、6、7: *CD* 型(辽宁绒山羊)

1, 5: *CC* genotype (Jining Grey goats); 4, 8: *DD* genotype (Wendeng dairy goats); 2, 3, 6, 7: *CD* genotype (Liaoning Cashmere goats)

图 2 引物 4 对不同山羊品种扩增片段的 SSCP 分析

Fig. 2 SSCP analysis of PCR amplification using primer 4 in different goat breeds

2.2 序列分析

将克隆测序各片段经 BLAST 分析后, 连接出山羊 *GDF9* 基因外显子 2 的全长共 965 bp, 该序列已被 GenBank 收录(登录号 AY681349), 与绵羊 *GDF9* 基因外显子 2 的同源性为 99% (955/965)。

取 *AA* 和 *BB* 两种基因型的 PCR 产物片段进行克

隆、测序。*BB* 型与 *AA* 型相比在外显子 2 第 26 bp 处有 1 个 G→A 的单碱基突变。将该突变的核苷酸序列翻译为氨基酸序列, 发现编码的第 141 位氨基酸未改变, 仍为亮氨酸, 因此为沉默突变。

取 *CC* 和 *DD* 两种基因型的 PCR 产物片段进行克隆、测序。*DD* 型与 *CC* 型相比在外显子 2 的第 792 bp 处有 1 个 G→A 的单碱基突变。将该突变的核苷酸序列翻译为氨基酸序列, 发现第 396 位氨基酸由缬氨酸改变为异亮氨酸。

2.3 *GDF9* 基因在不同山羊品种中的遗传多态性

5 个山羊品种中 *GDF9* 基因外显子 2 的等位基因频率和基因型频率见表 2。由表 2 可见: 对于引物 1, 5 个山羊品种都出现 *AA*、*AB* 和 *BB* 3 种基因型, 其中济宁青山羊、北京本地山羊和波尔山羊中主要是 *AA* 纯合基因型个体, *A* 是优势等位基因; 文登奶山羊和辽宁绒山羊中 *B* 是优势等位基因。对于引物 4, 5 个山羊品种中都出现 *CC*、*CD* 和 *DD* 3 种基因型, 其中济宁青山羊中主要是 *CC* 纯合基因型个体, *C* 是优势等位基因; 其余 4 个山羊品种中大多数是 *CD* 基因型个体, 文登奶山羊和辽宁绒山羊中 *D* 是优势等位基因, 北京本地山羊和波尔山羊中 *C* 是优势等位基因。

表 2 5 个山羊品种中 *GDF9* 基因外显子 2 的等位基因频率和基因型频率

Table 2 Allele and genotype frequencies of exon 2 of *GDF9* gene in five goat breeds

		济宁青山羊	文登奶山羊	辽宁绒山羊	北京本地山羊	波尔山羊
		Jining Grey goat	Wendeng dairy goat	Liaoning Cashmere goat	Beijing native goat	Boer goat
数量 N		109	40	38	31	28
引物 1 Primer 1	基因型频率	<i>AA</i> 0.8624(94)	0.1250(5)	0.1579(6)	0.8710(27)	0.6071(17)
		<i>AB</i> 0.1009(11)	0.3750(15)	0.4737(18)	0.0645(2)	0.1786(5)
		<i>BB</i> 0.0367(4)	0.5000(20)	0.3684(14)	0.0645(2)	0.2143(6)
等位基因频率	<i>A</i>	0.9128	0.3125	0.3947	0.9032	0.6964
	<i>B</i>	0.0872	0.6875	0.6053	0.0968	0.3036
引物 4 Primer 4	基因型频率	<i>CC</i> 0.8807(96)	0.0750(3)	0.1316(5)	0.4516(14)	0.3571(10)
		<i>CD</i> 0.0918(10)	0.4750(19)	0.5263(20)	0.4516(14)	0.4286(12)
		<i>DD</i> 0.0275(3)	0.4500(18)	0.3421(13)	0.0968(3)	0.2143(6)
等位基因频率	<i>C</i>	0.9266	0.3125	0.3947	0.6774	0.5714
	<i>D</i>	0.0734	0.6875	0.6053	0.3226	0.4286

括号内的数字是个体数

The numbers in the brackets are the individuals that belong to the respective genotypes

2.4 *GDF9* 基因不同基因型的济宁青山羊产羔数的最小二乘均值

不同 *GDF9* 基因型的 93 只济宁青山羊母羊产羔数的最小二乘均值及标准误差见表 3。

由表 3 可见: 对于引物 1, *AA* 基因型济宁青山羊产羔数最小二乘均值比 *AB* 基因型的多 0.54 只 ($P<0.01$), 比 *BB* 基因型的多 0.63 只 ($P<0.01$), 产

羔数最小二乘均值在 *AB* 基因型和 *BB* 基因型之间没有显著差异 ($P>0.05$)。对于引物 4, *CC* 基因型济宁青山羊产羔数最小二乘均值比 *CD* 基因型的多 0.57 只 ($P<0.01$), 比 *DD* 基因型的多 0.62 只 ($P<0.01$), 产羔数最小二乘均值在 *CD* 基因型和 *DD* 基因型之间没有显著差异 ($P>0.05$)。

表 3 不同 *GDF9* 基因型的济宁青山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 *GDF9* genotypes in Jining Grey goats

引物 Primer	基因型 Genotype	样本数 No. of samples	最小二乘均值及标准误 Least squares mean \pm standard error
引物 1 Primer 1	AA	79	2.96a \pm 0.22
	AB	10	2.42b \pm 0.26
	BB	4	2.33b \pm 0.35
引物 4 Primer 4	CC	81	2.98a \pm 0.20
	CD	9	2.41b \pm 0.27
	DD	3	2.36b \pm 0.34

同一引物内具有不同字母的平均值间差异极显著($P<0.01$)

Least squares means with the different letters within the same primer differ ($P<0.01$)

3 讨论

3.1 羊 *GDF9* 基因的多态性

Sadighi 等用 *Msp* I 酶切绵羊 *GDF9* 全基因得到了 13.5 kb 和 7.45 kb 的片段, 同时发现在 *Hind*III 中也存在多态性^[2]。李碧侠等用 SSCP 和克隆测序等方法发现小尾寒羊、湖羊、多赛特羊和萨福克羊等绵羊在 *GDF9* 基因外显子 1 的第 152 bp 处发生了单碱基突变 (A \rightarrow G), 并导致氨基酸的改变 (天冬酰胺 \rightarrow 天冬氨酸)^[28]。Hanrahan 等扩增 Cambridge 绵羊和 Belclare 绵羊 *GDF9* 基因的外显子 1、部分内含子和大部分外显子 2 共 5 个片段, 经 SSCP 和直接测序在外显子 2 中共发现 8 个单核苷酸多态, 其中有 3 个核苷酸的改变 (分别位于编码区 471 bp 处的 C \rightarrow T、477 bp 处的 G \rightarrow A 和 978 bp 处的 A \rightarrow G) 没有导致氨基酸的改变。4 个 G \rightarrow A 突变导致了氨基酸的改变, 它们分别是: 位于编码区 260 bp 处的第 87 个氨基酸残基由精氨酸改变为组氨酸, 并且引起了 *Hha* I 酶切位点的消失; 编码区 721 bp 处的第 241 个氨基酸残基由谷氨酸改变为赖氨酸; 蛋白前区 994 bp 处的第 332 个氨基酸残基由缬氨酸改变为异亮氨酸; 编码区 1 111 bp 处的第 371 个氨基酸残基由缬氨酸改变为蛋氨酸, 由于这些突变或发生在弗林蛋白酶切之前, 或在成熟蛋白的未加工蛋白处, 所以它们的改变并没有导致 *GDF9* 基因功能的改变。而位于编码区 1 184 bp 处的碱基突变 C \rightarrow T 导致位于编码区第 395 个氨基酸残基由丝氨酸改变为苯丙氨酸, 由于此突变位于成熟蛋白的编码区, 所以导致了 *GDF9* 基因功能的改变^[23]。

本研究设计 4 对引物, 采用 PCR-SSCP 技术检测 *GDF9* 基因外显子 2 在 5 个山羊品种中的单核苷酸多态性, 结果发现 2 个单核苷酸多态。外显子 2 第 26 bp 处有 1 个 G \rightarrow A 的单碱基突变, 但没有引起氨基酸改

变; 外显子 2 第 792 bp 处有 1 个 G \rightarrow A 的单碱基突变并且导致缬氨酸改变为异亮氨酸。

3.2 生长分化因子 9 基因与羊繁殖性能的关系

Hanrahan 等报道, 当 *GDF9* 基因野生纯合时, Belclare 母绵羊排卵数为 1.92 \pm 0.28 枚 ($n=11$), Cambridge 母绵羊排卵数为 2.27 \pm 0.49 枚 ($n=10$); 当 *GDF9* G8 突变纯合时, Belclare 母绵羊和 Cambridge 母绵羊都不育; 当 *GDF9* G8 突变为杂合子时, Belclare 绵羊和 Cambridge 绵羊排卵数都增加, 分别为 2.67 \pm 0.89 枚 ($n=1$) 和 4.28 \pm 0.31 枚 ($n=28$)^[23]。

Chu 等报道在 *GDF9* 基因外显子 1 中检测出的 AA 基因型所对应的小尾寒羊第一胎和第二胎产羔数最小二乘均值分别比 AB 基因型多 0.30 只 ($P<0.05$) 和 0.77 只 ($P<0.0001$)^[29]。

本研究结果初步表明 *GDF9* 基因可能是控制济宁青山羊多胎性能的一个主效基因或是与之存在紧密遗传连锁的分子标记。由于本研究中样本数较少, 值得增加山羊品种数、扩大样本数作深入研究。

4 结论

4.1 本研究采用 PCR-SSCP 技术发现 *GDF9* 基因外显子 2 在 5 个山羊品种中存在 2 个单核苷酸多态。外显子 2 第 26 bp 处有 1 个 G \rightarrow A 的单碱基突变, 没有引起氨基酸改变; 外显子 2 第 792 bp 处有 1 个 G \rightarrow A 的单碱基突变并导致缬氨酸改变为异亮氨酸。

4.2 本研究结果初步表明 *GDF9* 基因可能是控制济宁青山羊多胎性能的一个主效基因或是与之存在紧密遗传连锁的分子标记。

References

- [1] McPherron A C, Lee S J. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel

- pattern of cysteines. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268: 3444-3449.
- [2] Sadighi M, Bodensteiner K J, Beattie A E, Galloway S M. Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Animal Genetics*, 2002, 33: 244-245.
- [3] McGrath S A, Esquela A F, Lee S J. Oocyte specific expression of growth/differentiation factor 9. *Molecular Endocrinology*, 1995, 9: 131-136.
- [4] Dong J W, Albertini D F, Nishimori K, Kumar T R, Lu N, Matzuk M M. Growth differentiation factor 9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 1996, 383: 531-535.
- [5] Carabatsos M J, Elvin J, Matzuk M M, Albertini D F. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Developmental Biology*, 1998, 204: 373-384.
- [6] Hayashi M, McGee E A, Min G, Klein C, Rose U M, van Duin M, Hsueh A J. Recombinant growth differentiation factor 9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology*, 1999, 140: 1236-1244.
- [7] Elvin J A, Clark A T, Wang P, Wolfman N M, Matzuk M M. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Molecular Endocrinology*, 1999, 13: 1035-1048.
- [8] Bodensteiner K J, Clay C M, Moeller C L, Sawyer H R. Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biology of Reproduction*, 1999, 60: 381-386.
- [9] Vitt U A, Hayashi M, Klein C, Hsueh A J. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biology of Reproduction*, 2000, 62: 370-377.
- [10] Solovyeva E V, Hayashi M, Margi K, Barkats C, Klein C, Amsterdam A, Hsueh A J, Tsafiriri A. Growth differentiation factor-9 stimulates rat theca-interstitial cell androgen biosynthesis. *Biology of Reproduction*, 2000, 63: 1214-1218.
- [11] Joyce I M, Clark A T, Pendola F L, Eppig J J. Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, 2000, 63: 1669-1675.
- [12] Vitt U A, McGee E A, Hayashi M, Hsueh A J. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology*, 2000, 141: 3814-3820.
- [13] Elvin J A, Yan C, Matzuk M M. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2000, 97: 10288-10293.
- [14] Yan C N, Wang P, DeMayo J, Demayo F J, Elvin J A, Carino C, Prasad S V, Skinner S S, Dunbar B S, Dube L J, Celeste A J, Matzuk M M. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology*, 2001, 15: 854-866.
- [15] Hreinnsson J G, Scott J E, Rasmussen C, Swahn M L, Hsueh A J, Hovatta O. Growth differentiation factor 9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2002, 87: 316-321.
- [16] Juengel J L, Hudson N L, Heath D A, Smith P, Reader K L, Lawrence S B, O'Connell A R, Laitinen M P, Cranfield M, Groome N P, Ritvos O, McNatty K P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biology of Reproduction*, 2002, 67: 1777-1789.
- [17] Kaivo-Oja N, Bondestam J, Kamarainen M, Koskimies J, Vitt U, Cranfield M, Vuojolainen K, Kallio J P, Olkkonen V M, Hayashi M, Moustakas A, Groome N P, ten Dijke P, Hsueh A J, Ritvos O. Growth differentiation factor-9 induces Smad2 activation and inhibin B production in human granulosa-luteal cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2003, 88: 755-762.
- [18] Roh J S, Bondestam J, Mazerbourg S, Kaivo-Oja N, Groome N, Ritvos O, Hsueh A J W. Growth differentiation factor-9 stimulates inhibin production and activates Smad2 in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 2003, 144: 172-178.
- [19] Liao W X, Moore R K, Otsuka F, Shimasaki S. Effect of intracellular interaction on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 3713-3719.
- [20] Wang J, Roy S K. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction*, 2004, 70: 577-585.
- [21] Juengel J L, Hudson N L, Whiting L, McNatty K P. Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. *Biology of Reproduction*, 2004, 70: 557-561.

- [22] Liao W X, Moore R K, Shimasaki S. Functional and molecular characterization of naturally occurring mutations in the oocyte-secreted factors bone morphogenetic protein-15 and growth and differentiation factor-9. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279: 17391-17396.
- [23] Hanrahan J P, Gregan S M, Mulsant P, Mullen M, Davis G H, Powell R, Galloway S M. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 2004, 70: 900-909.
- [24] 《中国羊品种志》编写组. 中国羊品种志. 上海: 上海科学技术出版社, 1989: 92-93, 99-101, 101-102.
- The Editorial Section of "The Sheep and Goat Breeds in China". *The Sheep and Goat Breeds in China*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1989: 92-93, 99-101, 101-102. (in Chinese)
- [25] Malan S W. The improved Boer goat. *Small Ruminant Research*, 2000, 36: 165-170.
- [26] <http://www.infobase.gov.cn/sdgd/sda/ka04/4.htm>
- [27] Don R H, Cox P T, Wainwright B J, Baker K, Mattick J S. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19: 4008.
- [28] 李碧侠, 储明星, 王金玉. 绵羊 GDF9 基因 PCR-SSCP 分析. 遗传学报, 2003, 30: 307-310.
- Li B X, Chu M X, Wang J Y. PCR-SSCP analysis on growth differentiation factor 9 gene in sheep. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30: 307-310. (in Chinese)
- [29] Chu M X, Li B X, Wang J Y, Ye S C, Fang L. Association between PCR-SSCP of growth differentiation factor 9 gene and high prolificacy in Small Tail Han sheep. *Animal Biotechnology*, 2004, 15: 111-120.

(责任编辑 林鉴非)