

孕酮受体基因多态性及其与济宁青山羊产羔数关系

王凭青¹, 鲁浪¹, 储明星², 狄冉², 张宝云¹, 方丽², 马月辉², 李奎²

(¹重庆大学生物工程学院, 重庆 400030; ²中国农业科学院北京畜牧兽医研究所/农业部畜禽遗传资源与利用重点开放实验室, 北京 100193)

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】设计 15 对引物, 采用 PCR-SSCP 技术检测孕酮受体 (progesterone receptor, *PGR*) 基因全部 9 个外显子在济宁青山羊、波尔山羊、辽宁绒山羊和安哥拉山羊中的单核苷酸多态性, 同时研究该基因对山羊繁殖力的影响。【结果】只有引物 P1、P8 与 P9 扩增片段具有多态性。对于 P1 扩增片段, 济宁青山羊中检测到 AA、AB 和 BB 型, 其余山羊中均检测到 AA 和 AB 型; 测序表明 BB 与 AA 型相比有一处突变 (31G→A), 并导致丙氨酸变为苏氨酸; BB 基因型济宁青山羊产羔数最小二乘均值比 AB 基因型多 0.52 只 ($P < 0.05$), 比 AA 基因型多 0.98 只 ($P < 0.001$), AB 基因型济宁青山羊产羔数最小二乘均值比 AA 基因型多 0.46 只 ($P < 0.05$)。对于 P8 扩增片段, 济宁青山羊中只检测到 CC 型, 波尔山羊中检测到 CC 和 CD 型, 其余山羊中检测到 CC、CD 和 DD 型; 测序表明 DD 型和 CC 型相比有一处突变 (2810C→G), 未导致氨基酸改变。对于 P9 扩增片段, 济宁青山羊和波尔山羊中检测到 FF 和 FG 型, 其余山羊中检测到 FF、FG 和 GG 型; 测序表明 GG 型和 FF 型相比有一处碱基突变 (60128T→A), 未导致氨基酸改变; FF 基因型济宁青山羊产羔数最小二乘均值比 FG 基因型多 0.32 只 ($P > 0.05$)。【结论】本试验结果初步表明, *PGR* 基因可能是控制济宁青山羊多羔性的一个主效基因或是与之存在紧密遗传连锁的一个标记。

关键词: 山羊; 繁殖力; 孕酮受体基因; PCR-SSCP

Polymorphism of Progesterone Receptor Gene and Its Relationship with Litter Size of Jining Grey Goats

WANG Ping-qing¹, LU Lang¹, CHU Ming-xing², DI Ran², ZHANG Bao-yun¹, FANG Li², MA Yue-hui², LI Kui²

(¹Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400030; ²Key Laboratory of Farm Animal Genetic Resources and Utilization of Ministry of Agriculture/Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

Abstract: 【Objective】 The objectives of the present study were to search for genetic markers associated with high litter size and to provide a scientific basis for marker-assisted selection for high proliferation in goats. 【Method】 Fifteen pairs of primers were designed to detect single nucleotide polymorphisms of exon 1 to exon 9 of progesterone receptor (*PGR*) gene in Jining Grey, Boer, Liaoning Cashmere and Angora goats by PCR-SSCP. 【Result】 Only the products amplified by primers P1, P8 and P9 displayed polymorphisms. For primer P1, three genotypes (AA, AB and BB) were detected in Jining Grey goats, two genotypes (AA and AB) in other goat breeds. Sequencing revealed one mutation (31G→A) of *PGR* gene in the genotype BB in comparison to the genotype AA, and this mutation resulted in an amino acid change of Ala→Thr. The does with genotype BB had 0.52 ($P < 0.05$) or 0.98 ($P < 0.001$) kids more than those with genotype AB or AA, and the does with genotype AB had 0.46 ($P < 0.05$) kids more than those with genotype AA in Jining Grey goats. For primer P8, only one genotype (CC) was detected in Jining Grey goats, two genotypes (CC and CD) were detected in Boer goats, and three genotypes (CC, CD and DD) were detected in other goat breeds. Sequencing revealed one mutation (2810C→G) of *PGR* gene in the genotype DD in comparison to the genotype CC, and this mutation did not cause any amino acid change. For primer P9, two genotypes (FF and FG) were detected in Jining Grey and Boer goats, and three genotypes (FF, FG and GG) were detected in other goat breeds. Sequencing revealed one mutation (60128T→A) of *PGR* gene in the genotype

收稿日期: 2008-08-10; 接受日期: 2008-10-31

基金项目: 国家“863”计划课题 (2006AA10Z139)、国家现代农业产业技术体系建设专项资金 (农科教发[2008]10号)、国家自然科学基金项目 (30540052 和 30871773)、国家“973”计划课题 (2006CB102105)、北京市自然科学基金项目 (6062023)、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所“家畜种质资源研究和创新”科技创新团队项目 (ywf-td-1)

作者简介: 王凭青 (1962—), 男, 湖北鄂州人, 教授, 博士, 研究方向为动物遗传育种。E-mail: wang_pq@21cn.com。通信作者储明星 (1968—), 男, 安徽贵池人, 研究员, 博士, 研究方向为分子数量遗传。Tel: 010-62819850; E-mail: mxchu@263.net

GG in comparison to the genotype *FF*, and this mutation did not cause any amino acid change. The does with genotype *FF* had 0.32 ($P>0.05$) kids more than those with genotype *FG* in Jining Grey goats. 【Conclusion】 These results preliminarily indicated that the *PGR* 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; progesterone receptor gene; PCR-SSCP

0 引言

【研究意义】产仔(羔)数对家畜来说蕴藏着巨大的经济价值。对山羊产羔数的选择受到性别和年龄的限制,而且山羊产羔数是一个遗传力只有 0.1 左右的数量性状,因此,用常规的育种技术很难改良产羔数性状。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。找到与这些数量性状基因座相连锁的分子遗传标记,是实现标记辅助选择的先决条件。【前人研究进展】孕酮影响内分泌系统和免疫系统,在受孕和维持妊娠中起关键作用,同时也是控制排卵、子宫和乳腺发育的重要因素^[1]。孕酮通过孕酮受体(progesterone receptor, *PGR*)介导^[2-4],孕酮受体存在 2 种不同的亚型结构:*A* 亚型(*PGR-A*)和*B*亚型(*PGR-B*),二者为同一基因编码,由 2 个不同的启动子在不同位置的翻译起始密码子分别转录和翻译^[5]。2 种亚型的结构在大多数脊椎动物中都是保守的,包括人和其它哺乳类动物^[6-7]。*PGR* 属于核受体促进生长发育和分化超家族,是配体活化的转录因子^[8],能与 DNA 特定序列结合,增强或抑制基因表达,从而调节生殖及形态发生等生理过程^[9]。自 1987 年 Misrahic 等^[10]克隆出人 *PGR* 基因的 cDNA 以来,对人 *PGR* 基因的研究越来越多,*PGR* 基因多态性的研究大部分集中在该基因与人类某些疾病的关联上^[11-17]。张利平^[18]将 *PGR* 基因作为绵羊高繁殖力候选基因对其外显子 4 进行了 PCR-SSCP 检测。目前未见 *PGR* 基因与山羊高繁殖力之间关系的研究报道。【本研究切入点】据《中国羊品种志》^[19]记载,济宁青山羊是中国繁殖力最高的山羊品种,平均产活羔数可达 2.94 只;辽宁绒山羊平均产活羔数为 1.18 只。波尔山羊平均产活羔数为 2.10 只^[20],安哥拉山羊平均产活羔数为 1.31 只^[21]。本试验以济宁青山羊、波尔(Boer)山羊、辽宁绒山羊和安哥拉(Angora)山羊为研究对象,分析 *PGR* 基因多态性与山羊繁殖力的关系。【拟解决的关键问题】采用单链构象多态(single strand conformation polymorphism, SSCP)方法检测 *PGR* 基因 9 个外显子在山羊品种中的单核苷酸多态性(single nucleotide

polymorphism, SNP),对具有 SSCP 多态性的 DNA 片段进行测序比较分析,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 试验材料

1.1.1 DNA 制备 在农业部济宁青山羊保种基地(山东省嘉祥县)随机选择 2006 年产羔的 140 只济宁青山羊母羊(分别是 5 只公羊的后代),记录其胎次、产羔月份和产羔数,并采集血样。40 只辽宁绒山羊母羊血样采自北京市门头沟区清水镇;40 只波尔山羊母羊和 40 只安哥拉山羊母羊血样均采自山西省沁水示范牧场(山西省沁水县郑庄镇)。颈静脉采血 10 ml/只,柠檬酸葡萄糖抗凝,−20℃冻存。酚氯仿抽提法提取基因组 DNA,溶于 TE buffer[10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0)], 4℃保存。

济宁青山羊胎次的划分:实际第 1 胎、第 2 胎和第 3 胎分别作为 3 个胎次。根据当地山羊生产实际划分产羔季节:产羔月份在 3—5 月的作为季节 1(春季),在 6—8 月的作为季节 2(夏季),在 9—11 月的作为季节 3(秋季),在 12—2 月的作为季节 4(冬季)。

1.1.2 主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、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天根生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计和 PCR 扩增 根据牛 *PGR* 基因 9 个外显子序列(GenBank 登录号 NC_007313)与绵羊 *PGR* 基因部分 mRNA 序列(GenBank 登录号 U_Z66555)设计 15 对引物,对山羊 *PGR* 基因 9 个外显子进行扩增。引物由上海英骏生物技术有限公司合成,引物序列见表 1。

PCR 扩增反应体系为 25 μl,包括:10 μmol·L⁻¹ 引物 2 μl; 10×PCR 缓冲液 2.5 μl; 2 mmol·L⁻¹ dNTPs 2.5 μl; *Taq* DNA 聚合酶 1 U; 50 ng·μl⁻¹ DNA 模板 3 μl; 20 mmol·L⁻¹ Mg²⁺ 1.5 μl, 超纯水 12.5 μl。

15 对引物的 PCR 扩增程序: 95℃预变性 5 min;

表 1 山羊孕酮受体基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of goat *PGR* gene

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	扩增区域 Amplified region	产物大小 Product size
P1	F: ATGACTGAGCTGAAGGCGA R: CGTCTGCCAGCGACTCTG	外显子 1 Exon 1	247 bp
P2	F: GCCGGACCCAGAGTCGCT R: GGCTCATGAGTGGGAGTAGGAC		269 bp
P3	F: CCAGCCGCCAGGGGGTCTC R: GAGCGCTGATCGCGTCTCCTC		289 bp
P4	F: CGGGAGGAGACGCGATCAG R: CGCCGTCATAGCTGTCCACCT		246 bp
P5	F: CTGCTGGAGGGTGACAGCTATG R: GGGAAGTCGGCAAGACG		284 bp
P6	F: GCCGCTTCGCCGACTTC R: GGCTGTTAGAGCTCAGGGGT		283 bp
P7	F: CTGCCGAGGTCTACCAGC R: GAAGAGGTGAGGAAAAGGAAGC	外显子 2 Exon 2	180 bp
P8	F: TAAATTGAGTACTTTGTTTTGCAT R: ACCTTCCATTGCCCTTTTA	外显子 3 Exon 3	184 bp
P9	F: TGTTTGTTTTTAGGACAGCATA R: GAAAACATCATCATTACCTCCA	外显子 4 Exon 4	148 bp
P10	F: TCTGTAGGCCGAAAAGTTTAA R: CTGGAGGTATCAGGTTTGCT	外显子 5 Exon 5	238 bp
P11	F: ACAGCAAACCTGATACCTCC R: TTTTATTACATGCTATTATATACAA		135 bp
P12	F: ACAGCAAACCTGATACCTCC R: TTTTATTACATGCTATTATATACAA	外显子 6 Exon 6	169 bp
P13	F: GTTTGTTTTGACGCGTTTACT R: AGAATATGTTCTTTTATCTTTCTAA	外显子 7 Exon 7	140 bp
P14	F: TTATCTTCTTACAGTTCCTT R: CTAAAAACAAAATACTTAT	外显子 8 Exon 8	192 bp
P15	F: GTTAAAAACAACAGCTTGTCAA R: TCACTTTTTATGAAAGAGAAGAG	外显子 9 Exon 9	169 bp

95℃变性 30 s, 退火 30 s (P1~P15 的退火温度分别为 65.0、49.0、59.0、63.0、63.0、57.0、48.0、56.0、63.0、58.0、58.0、53.0、51.0、48.0 和 43.0℃), 72℃延伸 20 s, 32 个循环; 最后 72℃延伸 10 min, 4℃保存。

1.2.2 SSCP 分析 2 μl PCR 产物和 7 μl 加样缓冲液 (98%甲酰胺、0.025%溴酚蓝、0.025%二甲苯氰、10 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0)、10%甘油) 混匀, 98℃变性 10 min, 然后冰浴 7 min。变性后 PCR 产物用交联度 (Acr : Bis) 为 39 : 1 的非变性聚丙烯酰胺凝胶 130 V 过夜电泳, 银染显色。用 AlphaImager™ 2200 and 1220 Documentation and Analysis Systems (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA) 拍照和分析。

1.2.3 克隆测序 对有多态的不同基因型的 PCR 扩增产物用柱式凝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*) TOP 10 菌株, 用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 2 个克隆分别测序。测序反应由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。

1.3 统计分析

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 *PGR* 各基因型之间的差异 (对 P1、P9 引物的基因型单独进行分析):

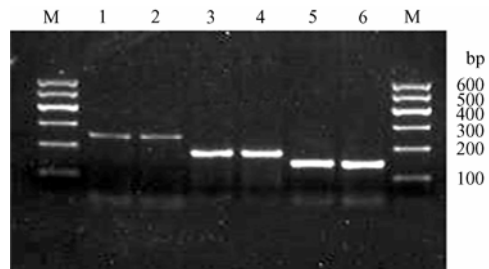
$$y_{ijklm} = \mu + S_i + KS_j + P_k + G_l + e_{ijklm}$$

其中: y_{ijklm} 为产羔数的记录值; μ 为群体平均值; S_i 为第 i 头公畜的固定效应; KS_j 为第 j 个产羔季节的固定效应; P_k 为第 k 个胎次的固定效应; G_l 为 *PGR* 基因第 l 种基因型的固定效应; e_{ijklm} 为随机残差效应。用 SAS (V8.12) 的 GLM (general linear model) 过程完成。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

所设计的 15 对引物用于 PCR 扩增都获得了特异性的产物, 片段长度与预期大小一致, 且没有非特异性扩增条带, 可直接进行 SSCP 分析。引物 P1、P8、P9 的扩增结果见图 1。



1、2: 引物 P1 的 PCR 产物; 3、4: 引物 P8 的 PCR 产物; 5、6: 引物 P9 的 PCR 产物; M: SD002 marker
1, 2: PCR products of P1; 3, 4: PCR products of P8; 5, 6: PCR products of P9; M: SD002 marker

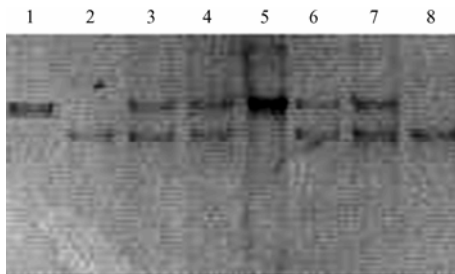
图 1 3 对引物的 PCR 产物

Fig. 1 PCR products of three pairs of primers

2.2 SSCP 检测

15 对引物扩增的 PCR 产物分别进行 SSCP 分析, 发现引物 P1、P8、P9 扩增片段具有多态性, 其余 12 对引物的扩增片段均不存在多态性。P1 扩增片段有 3 种基因型, 分别定义为 AA、AB 和 BB (图 2); P8

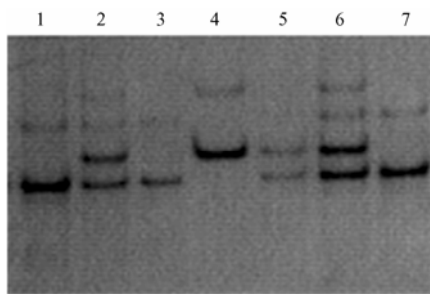
扩增片段也有 3 种基因型，分别定义为 *CC*、*CD* 和 *DD* (图 3)；P9 扩增片段也有 3 种基因型，分别定义为 *FF*、*FG* 和 *GG* (图 4)。



2, 8: *AA* 型; 3, 4, 6, 7: *AB* 型; 1, 5: *BB* 型
2, 8: *AA* genotype; 3, 4, 6, 7: *AB* genotype; 1, 5: *BB* genotype

图 2 不同山羊品种引物 P1 扩增片段的 SSCP 分析

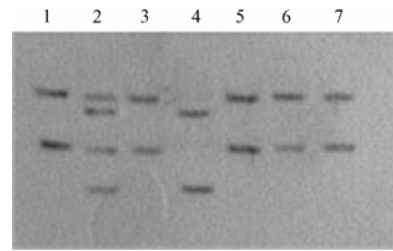
Fig. 2 SSCP analysis of PCR amplification using P1 in different goat breeds



1, 3, 7: *CC* 型; 2, 5, 6: *CD* 型; 4: *DD* 型
1, 3, 7: *CC* genotype; 2, 5, 6: *CD* genotype; 4: *DD* genotype

图 3 不同山羊品种引物 P8 扩增片段的 SSCP 分析

Fig. 3 SSCP analysis of PCR amplification using P8 in different goat breeds



1, 3, 5~7: *FF* 型; 2: *FG* 型; 4: *GG* 型
1, 3, 5-7: *FF* genotype; 2: *FG* genotype; 4: *GG* genotype

图 4 不同山羊品种引物 P9 扩增片段的 SSCP 分析

Fig. 4 SSCP analysis of PCR amplification using P9 in different goat breeds

2.3 序列分析

取 *AA* 和 *BB* 两种基因型的 PCR 产物片段进行克隆、测序。以牛的 *PGR* 基因 (GenBank 登录号 NC_007313) 为参照, *BB* 型与 *AA* 型相比在 31 bp 处发生 G→A 的单碱基突变, 并导致氨基酸由丙氨酸改变为苏氨酸 (图 5)。

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 2 810 bp 处发生 C→G 的单碱基突变 (图 6), 该突变没有引起氨基酸改变, 是沉默突变。

取 *FF* 和 *GG* 两种基因型的 PCR 产物片段进行克隆、测序。*GG* 型与 *FF* 型相比在 60 128 bp 处发生 T→A 的单碱基突变 (图 7), 该突变没有引起氨基酸改变, 是沉默突变。

2.4 *PGR* 基因在不同山羊品种中的遗传多态性

4 个山羊品种 *PGR* 基因外显子 1、3、4 的基因型频率和等位基因频率见表 2。

经 χ^2 适合性检验, 济宁青山羊在 P1 位点上未达

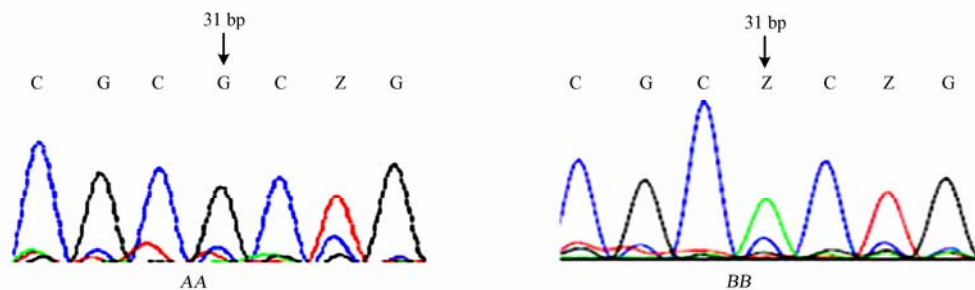


图 5 山羊 *PGR* 基因引物 P1 中 *AA*、*BB* 型的序列比较

Fig. 5 Sequence comparison of *AA* and *BB* genotypes of primer P1 of goat *PGR* gene

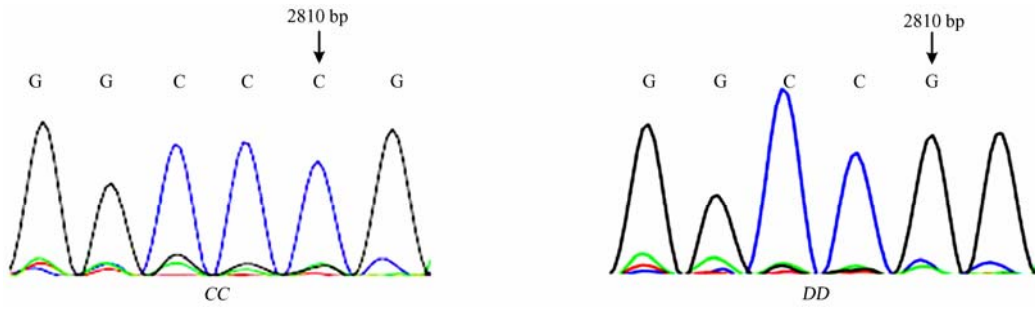


图 6 山羊 *PGR* 基因引物 P8 中 *CC*、*DD* 型的序列比较

Fig. 6 Sequence comparison of *CC* and *DD* genotypes of primer P8 of goat *PGR* gene

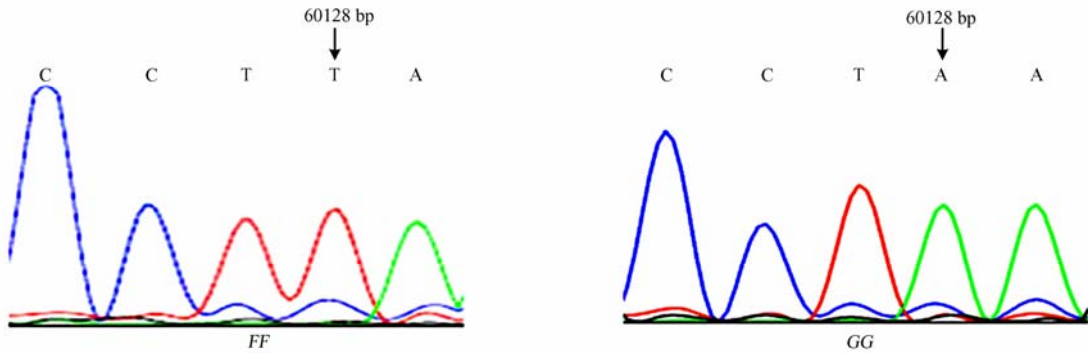


图 7 山羊 *PGR* 基因引物 P9 中 *FF*、*GG* 型的序列比较

Fig. 7 Sequence comparison of *FF* and *GG* genotypes of primer P9 of goat *PGR* gene

表 2 4 个山羊品种 *PGR* 基因外显子 1、3、4 的基因型频率和等位基因频率

Table 2 Genotype and allele frequencies of exons 1, 3, 4 of *PGR* gene in four goat breeds

			济宁青山羊 Jining Grey goat	辽宁绒山羊 Liaoning Cashmere goat	波尔山羊 Boer goat	安哥拉山羊 Angora goat
数量	Number		132	40	37	40
P1	基因型频率	<i>AA</i>	0.21(28)	0.98(39)	0.54(20)	0.02(1)
	Genotype frequency	<i>AB</i>	0.64(84)	0.02(1)	0.46(17)	0.98(39)
		<i>BB</i>	0.15(20)	0.00(0)	0.00(0)	0.00(0)
等位基因频率	Allele frequency	<i>A</i>	0.53	0.99	0.77	0.51
		<i>B</i>	0.47	0.01	0.23	0.49
数量	Number		140	40	40	40
P8	基因型频率	<i>CC</i>	1.00(140)	0.13(5)	0.50(20)	0.55(22)
	Genotype frequency	<i>CD</i>	0.00(0)	0.83(33)	0.50(20)	0.38(15)
		<i>DD</i>	0.00(0)	0.04(2)	0.00(0)	0.07(3)
等位基因频率	Allele frequency	<i>C</i>	1.00	0.54	0.75	0.74
		<i>D</i>	0.00	0.46	0.25	0.26
P9	基因型频率	<i>FF</i>	0.96(135)	0.43(17)	0.85(34)	0.40(16)
	Genotype frequency	<i>FG</i>	0.04(5)	0.55(22)	0.15(6)	0.55(22)
		<i>GG</i>	0.00(0)	0.02(1)	0.00(0)	0.05(2)
等位基因频率	Allele frequency	<i>F</i>	0.98	0.70	0.93	0.68
		<i>G</i>	0.02	0.30	0.07	0.32

括号内的数字是个体数 The numbers in the brackets are the individuals that belong to the respective genotypes

到哈迪-温伯格平衡状态 ($\chi^2=10.16$, $P=0.006$), 表明济宁青山羊 P1 位点的基因型频率受到了选择、突变或迁移等因素的影响。济宁青山羊在 P9 位点上处于哈迪-温伯格平衡状态 ($\chi^2=0.05$, $P=0.977$), 表明济宁青山羊 P9 位点的基因型频率没有受到选择、突变或迁移等因素的影响。

2.5 固定效应对济宁青山羊产羔数的影响

对于 P1 扩增片段, 方差分析结果表明公羊、产羔季节和胎次对济宁青山羊产羔数都有影响 (均为 $P<0.05$), *PGR* 基因型对济宁青山羊产羔数也有影响 ($P<0.01$)。对于 P9 扩增片段, 方差分析结果表明公羊、产羔季节和胎次对济宁青山羊产羔数都有影响 (均为 $P<0.05$), *PGR* 基因型对济宁青山羊产羔数没有影响 ($P>0.05$)。不同 *PGR* 基因型的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。

表 3 不同 *PGR* 基因型的济宁青山羊产羔数的最小二乘均值及标准误差

Table 3 Least squares mean and standard error for litter size of different *PGR* genotypes in Jining Grey goats

引物 Primer	基因型 Genotype	样本数 No.	产羔数 Litter size
P1	AA	28	2.06±0.15 c
	AB	84	2.52±0.12 b
	BB	20	3.04±0.17 a
P9	FF	135	2.40±0.18 a
	FG	5	2.08±0.21 a

同一对引物具有相同字母肩标的平均值间差异不显著 ($P>0.05$), 同一对引物具有不同字母肩标的平均值间差异显著 ($P<0.05$)
Least squares means with the same superscript for the same pair of primer have no significant difference ($P>0.05$). Least squares means with the different superscripts for the same pair of primer differ significantly ($P<0.05$)

由表 3 可见, 对于引物 P1, *BB* 基因型济宁青山羊产羔数最小二乘均值比 *AB* 基因型的多 0.52 只 ($P<0.05$), 比 *AA* 基因型的多 0.98 只 ($P<0.001$), *AB* 基因型济宁青山羊产羔数最小二乘均值比 *AA* 基因型的多 0.46 只 ($P<0.05$)。对于引物 P9, *FF* 基因型济宁青山羊产羔数最小二乘均值比 *FG* 基因型的多 0.32 只 ($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 *PGR* 基因的多态性

位于 *PGR* 基因上的 SNP 位点十分丰富。Johnatty 等^[22]研究了位于人 *PGR* 基因外显子 4 的一个多态位点

V660L (rs1042838), 以及分别位于启动区、外显子 5 和外显子 8 的另外 3 个多态+44C/T (rs518162)、H770H (rs1042839) 和 Q886Q (rs500760), 结果表明, 多态位点 V660L (rs1042838) 与乳腺癌的发生有较明显的关联, 而其余 3 个多态位点则与乳腺癌的发生无明显的关联。Ehn 等^[23]研究了 415 个新生儿家庭中父本、母本以及新生儿 *PGR* 基因 8 个外显子上 17 个 SNP 位点突变和内含子 G 中 306 个碱基对 Alu 的正向重复插入引起的多态, 同时对 92 个早产儿母亲的 *PGR* 基因进行测序分析, 研究者认为, 母本或者胎儿任意一方 *PGR* 基因上的多态都有可能引发早产, 但并未发现能够明确导致早产的突变序列。张利平^[18]对 53 只小尾寒羊、25 只无角多赛特羊和 35 只蒙古羊的 *PGR*-exon 4 做了 PCR-SSCP 检测, 发现小尾寒羊由 AA、AB、BB 三种基因型组成。在与 NCBI 所公布的绵羊 mRNA 序列比对后, 发现 *BB* 型存在 4 个突变位点: 第一突变点在扩增 *PGR*-exon 4 限制性片段 (270 bp) 的 70 bp 处, 突变点 C→T; 第二突变点在 115 bp 处, 突变点 C→T; 第三突变点在 226 bp 处, 突变点 C→T; 第四突变点在 246 bp 处, 突变点 T→C, 该突变使缬氨酸变为丙氨酸。

本试验针对山羊 *PGR* 基因设计了 15 对引物, 发现 3 个 SNP 位点, 分别位于外显子 1、外显子 3 和外显子 4。其中外显子 3 中, 高繁殖力的济宁青山羊没有等位基因 *D*, 其原因值得研究。

3.2 *PGR* 基因与繁殖性能的关系

研究表明, 多羔绵羊通常具有卵泡发育早、卵泡在较小直径时排卵、排卵数较多、卵泡中的颗粒细胞较少和黄体重量较轻等特点^[24]。孕酮受体基因在促进动物生殖系统的发育以及维持正常生殖功能中起非常重要的作用。由于 *PGR-A* 和 *PGR-B* 是由同一个基因编码从 2 个不同的 ATG 信号起始转录, 预示在体内 *PGR* 基因中任一个 ATG 的突变将导致一种亚型的选择性表达缺失^[9]。利用基因敲除技术, 对小鼠 *PGR* 基因进行敲除, 研究发现 *PGR* 基因在调控雌性哺乳动物排卵和胚泡着床中起重要作用^[25-27]。Lydon 等^[28]发现敲除 *PGR* 基因的突变小鼠的胚胎期发育正常并能发育到成熟期, 雄性具有生殖功能, 但雌性不育, 生殖系统表现异常, 包括不能排卵、乳腺发育受抑制、子宫畸形、发炎、无脊柱前凸等性行为。研究发现^[18], 在 *PGR*-exon 4 基因型分布上, 多羔四季繁殖品种小尾寒羊与非多羔四季繁殖品种无角多赛特羊和非多羔季节繁殖品种蒙古羊之间存在差异 ($P<0.01$), 而无角

多赛特羊和蒙古羊之间差异不显著 ($P>0.05$), 多羔小尾寒羊突变基因 B 频率较高, 突变基因 B 可以作为多羔分子标记, 但对四季繁殖和季节繁殖无影响。

4 结 论

本试验在山羊 *PGR* 基因中发现 3 个单核苷酸多态性位点, 初步表明 *PGR* 基因可能是控制济宁青山羊多羔性的一个主效基因或是与之存在紧密遗传连锁的一个标记。由于检测品种数和样本数较少, 所获得的结论只是初步的, 值得增加山羊品种数、扩大样本数、进行标记与产羔性能关联作深入研究。

References

- [1] Arck P, Hansen P J, Mulac J B, Piccinni M P, Szekeres B J. Progesterone during pregnancy: endocrine-immune cross talk in mammalian species and the role of stress. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2007, 58: 268-279.
- [2] Shang Y F. Gene regulation by nuclear receptors. *Journal of Health Science*, 2002, 34: 440-449.
- [3] McKenna N J, Lanz R B, O'Malley B W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews*, 1999, 20: 321-344.
- [4] Graham J D, Clarke C L. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews*, 1997, 18: 502-519.
- [5] Horwitz K B, Mockus M B, Pike A W, Fennessey P V, Sheridan R L. Progesterone receptor replenishment in T47D human breast cancer cells. Roles of protein synthesis and hormone metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258: 7603-7610.
- [6] Shyamala G, Schneider W, Schott D. Developmental regulation of murine mammary progesterone receptor gene expression. *Endocrinology*, 1990, 126: 2882-2889.
- [7] Sartorius C A, Melville M Y, Hovland A R, Tunq L, Takimoto G S, Horwitz K B. A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B isoform. *Molecular Endocrinology*, 1994, 8: 1347-1360.
- [8] Tsai M J, O'Malley B W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual Review of Biochemistry*, 1994, 63: 451-486.
- [9] Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO Journal*, 1990, 9: 1603-1614.
- [10] Misrahic M, Atger M, d'Auriol L, Loosfelt H, Meriel C, Fridlansky F, Guiochon-Mantel A, Galibert F, Milgrom E. Complete aminoacid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1987, 143: 740-748.
- [11] McKenna N J, Kieback D G, Carney D N, Fanning M, McLinden J, Headon D R. A germline *Taq I* restriction fragment length polymorphism in the progesterone receptor gene in ovarian carcinoma. *British Journal of Cancer*, 1995, 71: 451-455.
- [12] Rowe S M, Coughlan S J, McKenna N J, Garrett E, Kieback D G, Carney D N, Headon D R. Ovarian carcinoma-associated *Taq I* restriction fragment length polymorphism in intron G of the progesterone receptor gene is due to an Alu sequence insertion. *Cancer Research*, 1995, 55: 2743-2745.
- [13] Hsieh Y Y, Chan I P, Wang H I, Chang C C, Huang C W, Lin C S. PROGINS Alu sequence insertion is associated with hyperprolactinaemia but not leiomyoma susceptibility. *Clinical Endocrinology*, 2005, 62: 492-497.
- [14] Govindan S, Ahmad S N, Vedicherla B, Kodati V, Jahan P, Rao K P, Ahuja Y R, Hasan Q. Association of progesterone receptor gene polymorphism (PROGINS) with endometriosis, uterine fibroids and breast cancer. *Cancer Biomarkers*, 2007, 3(2): 73-78.
- [15] Romano A, Delvoux B, Fischer D C, Groothuis P. The PROGINS polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2007, 38(1-2): 331-350.
- [16] De Vivo I, Huggins G S, Hankinson S E, Lescault P J, Boezen M, Colditz G A, Hunter D J. A functional polymorphism in the promoter of the progesterone receptor gene associated with endometrial cancer risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99: 12263-12268.
- [17] De Vivo I, Hankinson S E, Colditz G A, Hunter D J. A functional polymorphism in the progesterone receptor gene is associated with an increase in breast cancer risk. *Cancer Research*, 2003, 63: 5236-5238.
- [18] 张利平. BMPR-IB 基因和 PGR 基因作为小尾寒羊多胎候选基因的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2005.
Zhang L P. Study of BMPR-IB and PGR genes as the candidate genes for fecundity of Small Tail Han sheep[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2005. (in Chinese)
- [19] 《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, 98-101.
The Editorial Section of "Sheep and Goat Breeds in China". *Sheep and Goat Breeds in China*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1989: 92-93, 98-101. (in Chinese)

- [20] Malan S W. The improved Boer goat. *Small Ruminant Research*, 2000, 36(2): 165-170.
- [21] Roberts A J, Reeves J J. Kidding rates of Angora goats passively immunized against estrogens. *Journal of Animal Science*, 1988, 66: 2443-2447.
- [22] Johnatty S E, Spurdle A B, Beesley J, Chen X, Hopper J L, Duffy D L, Chenevix Trench G. Progesterone receptor polymorphisms and risk of breast cancer: results from two Australian breast cancer studies. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2008, 109(1): 91-99.
- [23] Ehn N L, Cooper M E, Orr K, Shi M, Johnson M K, Caprau D, Dagle J, Steffen K, Johnson K, Marazita M L, Merrill D, Murray J C. Evaluation of fetal and maternal genetic variation in the progesterone receptor gene for contributions to preterm birth. *Pediatric Research*, 2007, 62: 630-635.
- [24] Souza C J, Campbell B K, McNeilly A S, Baird D T. Bone morphogenetic proteins and folliculogenesis: lessons from the Booroola mutation. *Reproduction Supplement*, 2003, 61: 361-370.
- [25] Mulac J B, Mullinax R A, DeMayo F J, Lydon J P, Conneely O M. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science*, 2000, 289: 1751-1754.
- [26] Mulac J B, Lydon J P, DeMayo F J, Conneely O M. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100: 9744-9749.
- [27] Mulac J B, Conneely O M. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction*, 2004, 128(2): 139-146.
- [28] Lydon J P, DeMayo F J, Funk C R, Mani S K, Hughes A R, Montgomery C A Jr, Shyamala G, Conneely O M, O'Malley B W. Mice lacking progesterone receptors exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes and Development*, 1995, 9: 2266-2278.

(责任编辑 林鉴非)