

# 促黄体素 $\beta$ 基因多态性及其与济宁青山羊产羔数的关系

狄 冉<sup>1</sup>, 梁 琛<sup>2</sup>, 储明星<sup>1\*</sup>, 刘文忠<sup>2</sup>, 方 丽<sup>1</sup>, 马月辉<sup>1</sup>, 李 奎<sup>1</sup>

(1. 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;

2. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

**摘 要:** 为了解促黄体素  $\beta$  基因多态性与济宁青山羊产羔数的关系, 采用 PCR-SSCP 技术检测促黄体素  $\beta$  亚基 (Luteinizing hormone beta-subunit,  $LH\beta$ ) 基因 5' 调控区和 3 个外显子在高繁殖力 (济宁青山羊)、中等繁殖力 (波尔山羊) 和低繁殖力山羊品种 (辽宁绒山羊和安哥拉山羊) 中的单核苷酸多态性, 同时研究该基因对济宁青山羊高繁殖力的影响。结果表明: 山羊与绵羊的  $LH\beta$  基因核苷酸序列相似性为 98%。6 对引物中, 仅引物 P1 和 P5 扩增片段存在多态性。对于 P1 扩增片段, 在 4 个山羊品种中均检测到 AA、AB 和 BB 3 种基因型; 测序分析发现 BB 与 AA 基因型相比在 5' 调控区存在 2 处突变 202C→A 和 210C→T; 济宁青山羊 3 种基因型之间产羔数差异均不显著 ( $P>0.05$ )。对于 P5 扩增片段, 在济宁青山羊中检测到 CC、CD 和 DD 3 种基因型, 辽宁绒山羊中检测到 CC 和 CD 2 种基因型, 波尔山羊和安哥拉山羊中都只检测到 CC 基因型; 测序分析发现 DD 与 CC 基因型相比在外显子 2 存在单碱基突变 1124C→T; 济宁青山羊 CC、CD 和 DD 基因型频率分别为 0.38、0.44 和 0.18; DD 和 CD 基因型济宁青山羊平均产羔数分别比 CC 基因型的多 0.99 ( $P<0.01$ ) 和 0.87 只 ( $P<0.01$ )。济宁青山羊在 P1、P5 两个座位上都处于哈迪-温伯格平衡状态 (P1 座位:  $\chi^2=1.66, P=0.437$ ; P5 座位:  $\chi^2=1.22, P=0.544$ )。

**关键词:** 山羊; 繁殖力; 促黄体素  $\beta$  亚基基因; PCR-SSCP

中图分类号: S827.2; Q343.15

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)08-1171-08

## Polymorphism of Luteinizing Hormone Beta-subunit Gene and Its Relationship with Litter Size of Jining Grey Goats

DI Ran<sup>1</sup>, LIANG Chen<sup>2</sup>, CHU Ming-xing<sup>1\*</sup>, LIU Wen-zhong<sup>2</sup>,

FANG Li<sup>1</sup>, MA Yue-hui<sup>1</sup>, LI Kui<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Farm Animal Genetic Resources and Utilization of Ministry of Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

**Abstract:** In present study, the luteinizing hormone beta-subunit ( $LH\beta$ ) gene was selected as a candidate gene for the high prolificacy in Jining Grey goats. According to the sequence of ovine  $LH\beta$  gene, six pairs of primers were designed to detect single nucleotide polymorphisms in the 5' regulatory region, exon 1, exon 2 and exon 3 of ovine  $LH\beta$  gene in high prolificacy breed (Jining

收稿日期: 2008-06-10

基金项目: 国家 863 计划 (2006AA10Z139); 国家现代肉羊产业技术体系建设专项 (农科教发[2008]10 号); 国家自然科学基金项目 (30540052; 30871773); 国家 973 计划 (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); 中国农业科学院首批优秀科技创新团队专项资助

作者简介: 狄 冉 (1979-), 女, 山东泰安人, 博士, 主要从事分子遗传学研究, Tel: 010-62816001, E-mail: dirangirl@163.com

\* 通讯作者: 储明星, E-mail: mxchu@263.net

Grey goat), medium prolificacy breed (Boer goat) and low prolificacy breeds (Liaoning Cashmere and Angora goats) by PCR-SSCP method. The results showed that the similarity in nucleotide sequence of goat and ovine *LH $\beta$*  gene was 98%, and only the products amplified by primers P1 and P5 displayed polymorphisms. For primer P1, three genotypes (AA, AB and BB) were detected in all four goat breeds. Sequencing revealed that two nucleotide substitutions (202C→A and 210C→T) at the 5' regulatory region of *LH $\beta$*  gene in the BB genotype compared with the AA genotype. The differences of the litter size between different genotypes were nonsignificant in Jining Grey goats ( $P > 0.05$ ). For primer P5, three genotypes (CC, CD and DD) were detected in Jining Grey goats, two genotypes (CC and CD) were detected in Liaoning Cashmere goats, and only one genotype CC was detected in Boer and Angora goats. Sequencing revealed one single nucleotide mutation (1124C→T) at exon 2 of *LH $\beta$*  gene in the DD genotype compared with the CC genotype. Genotype frequency of CC, CD and DD was 0.38, 0.44 and 0.18 in Jining Grey goats, respectively. The Jining Grey does with genotype DD or CD had 0.99 ( $P < 0.01$ ) or 0.87 ( $P < 0.01$ ) kids more than those with genotype CC. The fitness tests showed that the Jining Grey goat population was in Hardy-Weinberg equilibrium (P1 locus:  $\chi^2 = 1.66$ ,  $P = 0.437$ ; P5 locus:  $\chi^2 = 1.22$ ,  $P = 0.544$ ).

**Key words:** goat; prolificacy; luteinizing hormone beta-subunit gene; PCR-SSCP

促黄体素 (Luteinizing hormone, LH) 是由动物垂体前叶嗜碱性细胞合成和分泌的一种糖蛋白类促性腺激素, 由  $\alpha$  和  $\beta$  两个非共价结合且可解离的亚基组成。其中,  $\alpha$  亚基的氨基酸序列是保守的, 而  $\beta$  亚基则具有特异性, 作为功能亚基与受体结合, 是激素生物活性和免疫活性的决定因素<sup>[1]</sup>。LH 在动物卵泡发育和卵泡优势化过程中起重要作用, 高浓度 LH 可以保证优势卵泡的后期生长, 并对颗粒细胞进行调节, 促进排卵<sup>[2-3]</sup>。LH 还与促卵泡素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、抑制素 (inhibin, INH) 及一些生长因子协同作用, 促进卵泡的发育和排卵, 在动物的生殖过程中发挥重要作用。研究表明, 应用 LH 处理能有效提高绵羊的情期受胎率和总受胎率<sup>[4]</sup>; 与非多胎母羊相比, Booroola 多胎母羊具有较高的血浆 LH 浓度 ( $P < 0.05$ )<sup>[5-7]</sup>。高繁殖力和常年发情的小尾寒羊全年各月份、4 个季节、全年和发情期的血浆 LH 平均浓度均极显著高于 ( $P < 0.000 1$ ) 低繁殖力和季节性发情的细毛羊<sup>[8]</sup>。李利等对南江黄羊 *LH $\beta$*  基因的研究发现在 401 位点存在一个突变 (G→A 或 C), 但与产羔数没有显著相关 ( $P > 0.05$ )<sup>[9]</sup>。Penty 等<sup>[10]</sup> 将 *LH $\beta$*  基因定位到绵羊 14 号染色体, 该基因全长约 1 kb, 由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 编码 141 个氨基酸。因此我们将编码 *LH $\beta$*  的基因列为山羊高繁殖力的候选基因。

据《中国羊品种志》记载<sup>[11]</sup>, 在我国 20 个地方

山羊品种中, 大多数山羊品种繁殖力较低, 济宁青山羊繁殖力最高, 济宁青山羊平均产活羔数为 2.94, 辽宁绒山羊平均产活羔数为 1.18。波尔山羊平均产活羔数为 2.10<sup>[12]</sup>, 安哥拉山羊平均产活羔数为 1.31<sup>[13]</sup>。本研究以高繁殖力 (济宁青山羊)、中等繁殖力 (波尔山羊) 和低繁殖力山羊品种 (辽宁绒山羊和安哥拉山羊) 为试验材料, 采用单链构象多态性 (single strand conformation polymorphism, SSCP) 方法检测 *LH $\beta$*  基因在不同山羊品种中的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP), 并对具有 SSCP 多态性的 DNA 片段进行测序比较分析, 旨在寻找与山羊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 材 料

随机选择于 2005 年产羔的 153 只济宁青山羊母羊, 记录其胎次、产羔月份和产羔数, 这 153 只济宁青山羊母羊血样采自农业部济宁青山羊保种基地 (山东省嘉祥县)。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。颈静脉采血, 所采血样均为 10 mL·只<sup>-1</sup>, 用柠檬酸葡萄糖抗凝, -20 °C 冻存。用酚氯仿抽提法提取基因组 DNA, 溶于 TE 缓冲液 (10 mmol·L<sup>-1</sup>

Tris-HCl (pH8.0), 1 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA (pH 8.0), 4 °C 保存。

近些年来对济宁青山羊的产羔数或其它繁殖性状都没有进行选择。济宁青山羊胎次的划分是:实际第 1 胎(n=48)、第 2 胎(n=51)和第 3 胎(n=54)分别作为 3 个胎次。产羔季节的划分是:产羔月份在 3~5 月的作为季节 1(春季)(n=40),在 6~8 月的作为季节 2(夏季)(n=36),在 9~11 月的作为季节 3(秋季)(n=45),在 12~2 月的作为季节 4(冬季)(n=32)。

表 1 山羊促黄体素  $\beta$  亚基基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of goat luteinizing hormone  $\beta$  subunit gene

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	扩增区域 Amplified region	产物大小/bp Product size
P1	F: ACCAGATCTTGGCCCTTG R: CCAAAGCCTGAGTCCAAC		291
P2	F: ATTGAAGCTACGCCCTC R: GAAGACACCCAAGGAGAAG	5'调控区	250
P3	F: TGATTTCTTGTACTCCCACC R: TGTTCACCTAGTCTTATACCTG		263
P4	F: ATTAGTGTCCAGGTTACCCAC R: TACTGCCCTCCCCACACTCTTC	5'调控区和外显子 1	231
P5	F: CCTGAGGCACTGGCCTTGTC R: CACCATGCTGGGGCAGTAGCC	外显子 2	195
P6	F: CATGGAACACTCAAGCTC R: TTAGAGGAAGAGGATGTCTG	外显子 3	274

F. 代表上游引物;R. 代表下游引物

F. Stands for forward primer; R. Stands for reverse primer

PCR 扩增体系为 25  $\mu$ L, 包括:5  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup> 引物 2  $\mu$ L;10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5  $\mu$ L;dNTPs 终浓度为 200  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup>;Taq DNA 聚合酶 1 U;50 ng ·  $\mu$ L<sup>-1</sup> DNA 模板 3  $\mu$ L;引物 P1~P6 所用的 Mg<sup>2+</sup> 终浓度分别为 2.0、1.5、1.5、1.5、1.0、1.5 mmol · L<sup>-1</sup>;其余用 ddH<sub>2</sub>O 补齐。

引物 P1、P2、P3、P4 的 PCR 扩增程序:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,退火温度(64.5、62.0、57.5、63.5 °C)30 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环;最后 72 °C 延伸 8 min;4 °C 保存。引物 P5 和 P6 的扩增采用了 Touchdown PCR 程序。P5 的 Touchdown 程序为:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,退火温度从 74 °C 开始,每 3 个循环降 1 °C,降

## 1.2 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天根生物技术有限公司。

## 1.3 引物设计和 PCR 扩增

根据 GenBank 发表的绵羊 LH $\beta$  基因 DNA 序列(S64695)<sup>[14]</sup>,用 Oligo 6.0 设计 6 对引物,扩增片段包括该基因的 5'调控区、外显子 1、外显子 2 和外显子 3。引物由上海英骏生物技术有限公司合成,引物序列见表 1。

至 70 °C,当退火温度为 70 °C 时设置 22 个循环,退火时间 30 s,各循环 72 °C 延伸 30 s;最后 72 °C 延伸 8 min;4 °C 保存。P6 的 Touchdown 程序为:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,退火温度从 63 °C 开始,每 3 个循环降 1 °C,降至 55 °C,当退火温度为 55 °C 时设置 14 个循环,退火时间 30 s,各循环 72 °C 延伸 30 s;最后 72 °C 延伸 8 min;4 °C 保存。产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.4 SSCP 分析

1.5  $\mu$ L PCR 产物和 6  $\mu$ L 上样缓冲液(98%去离子甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯青、10 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA(pH8.0)、10% 甘油)混匀,98 °C 变性 10 min,冰浴 10 min,然后非变性聚丙烯酰胺

凝胶室温电泳 4~5 h,银染显色。引物 P1~P6 所用的聚丙烯酰胺凝胶交联度(Acr : Bis)分别为 39 : 1,39 : 1,29 : 1,29 : 1,29 : 1,29 : 1,聚丙烯酰胺凝胶浓度分别为 10%、12%、12%、12%、12%、12%,电压分别为 130、140、160、160、160、160 V。最后拍照、分析。

### 1.5 克隆测序

将不同基因型纯合体的 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 DH5 $\alpha$  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 个克隆送北京诺赛基因组研究中心有限公司完成测序。

### 1.6 统计分析

对济宁青山羊 P1、P5 座位的基因型分布进行哈迪-温伯格平衡检验。

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 *LH $\beta$*  各基因型之间的差异(对 P1 和 P5 的基因型单独进行分析):

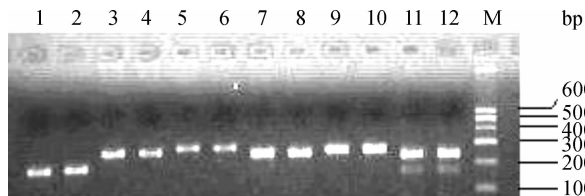
$$y_{ijkl} = \mu + S_i + P_j + G_k + e_{ijkl}$$

其中, $y_{ijkl}$ 为产羔数的记录值; $\mu$ 为群体平均值; $S_i$ 为第*i*个产羔季节的固定效应, $i=1,2,3,4$ ; $P_j$ 为第*j*个胎次的固定效应, $j=1,2,3$ ; $G_k$ 为*LH $\beta$* 基因第*k*种基因型的固定效应, $k=1,2,3$ ; $e_{ijkl}$ 为随机残差效应。用 SAS(V8.12)的 GLM 过程完成。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增

所设计的 6 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,可以直接进行 SSCP 分析。6 对引物的扩增结果见图 1。



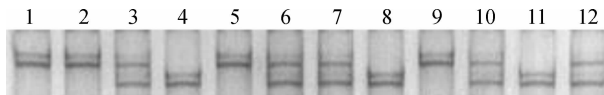
1,2. P5; 3,4. P6; 5,6. P1; 7,8. P2; 9,10. P3; 11,12. P4; M. DNA marker

图 1 6 对引物对山羊 *LH $\beta$*  的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of goat *LH $\beta$*  using six pair of primers

### 2.2 SSCP 检测

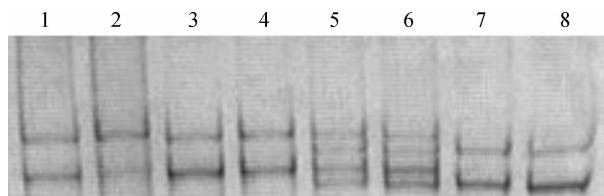
对 6 对引物扩增的 PCR 产物分别进行 SSCP 分析,发现 P1 和 P5 扩增片段存在多态性,其余 4 对引物的扩增片段均不存在多态性。P1 扩增片段有 3 种基因型,分别为 AA、AB 和 BB(图 2);P5 扩增片段也有 3 种基因型,分别为 CC、CD 和 DD(图 3)。



1,2,5,9. AA 型;3,6,7,10,12. AB 型;4,8,11. BB 型  
1,2,5,9. AA genotype; 3,6,7,10,12. AB genotype; 4,8,11. BB genotype

图 2 不同山羊品种 P1 扩增片段的 SSCP 分析

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



1,2,3,4. CC 型; 5,6. CD 型;7,8. DD 型  
1,2,3,4. CC genotype; 5,6. CD genotype; 7,8. DD genotype

图 3 不同山羊品种 P5 扩增片段的 SSCP 分析

Fig. 3 SSCP analysis of PCR amplification using P5 in different goat breeds

### 2.3 序列分析

将克隆测序各片段经 BLAST,连接出山羊 *LH $\beta$*  基因 5'调控区和 3 个外显子的全长共 1 300 bp,与绵羊该序列的相似性为 98%。

测序结果显示 BB 与 AA 基因型相比在 202 和 210 bp 处分别有 C→A 和 C→T 突变(图 4);DD 与 CC 基因型相比在 1 124 bp 处有 1 个 C→T 的单碱基突变(图 5),该突变没有引起氨基酸改变,是沉默突变。

### 2.4 *LH $\beta$* 基因在不同山羊品种中的遗传多态性

4 个山羊品种中 *LH $\beta$*  基因 2 对引物扩增片段的等位基因频率和基因型频率见表 2。

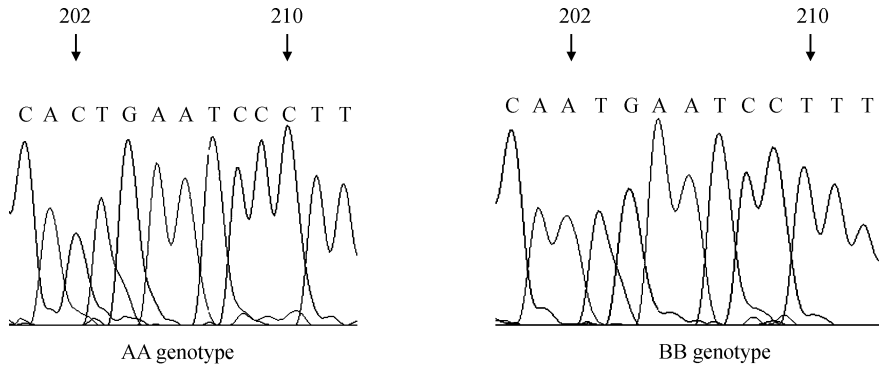


图 4 山羊引物 P1 中 AA、BB 基因型 202 和 210 bp 处突变的测序峰图  
 Fig. 4 Sequence comparison of mutations at 202 and 210 bp of AA and BB genotypes of primer P1 in goat *LH $\beta$*  gene

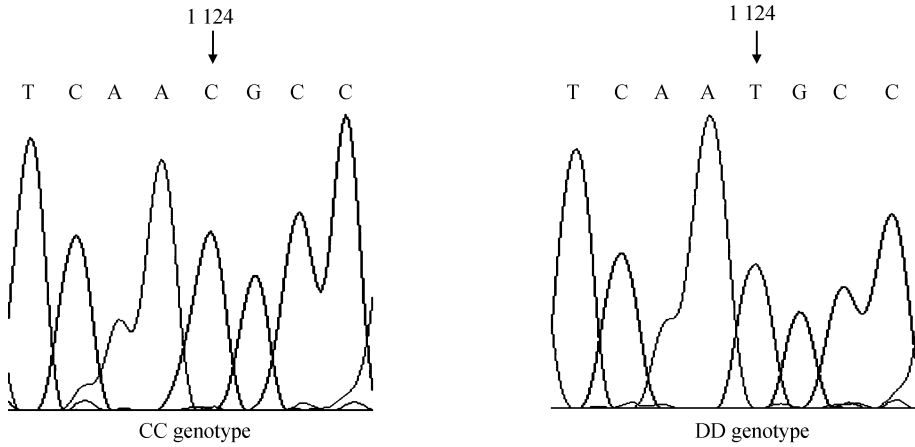


图 5 山羊引物 P5 中 CC、DD 基因型 1 124 bp 处突变的测序峰图  
 Fig. 5 Sequence comparison of mutation at 1 124 bp of CC and DD genotypes of primer P5 in goat *LH $\beta$*  gene

表 2 4 个山羊品种中 *LH $\beta$*  基因的等位基因频率和基因型频率

Table 2 Allele and genotype frequencies of *LH $\beta$*  gene in four goat breeds

品 种 Breed		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 N	153	40	40	40	
P1	基因型频率	AA	0.58(89)	0.45(18)	0.05(2)	0.58(23)
	Genotype frequency	AB	0.39(59)	0.25(10)	0.82(33)	0.37(15)
		BB	0.03(5)	0.30(12)	0.13(5)	0.05(2)
		等位基因频率	A	0.77	0.57	0.46
	Allele frequency	B	0.23	0.43	0.54	0.24
P5	基因型频率	CC	0.38(58)	0.28(11)	1.00(40)	1.00(40)
	Genotype frequency	CD	0.44(67)	0.72(29)	0.00(0)	0.00(0)
		DD	0.18(28)	0.00(0)	0.00(0)	0.00(0)
		等位基因频率	C	0.60	0.64	1.00
	Allele frequency	D	0.40	0.36	0.00	0.00

括号内的数字是个体数

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

由表 2 可见, P1 的扩增片段在 4 个山羊品种中都检测到 AA、AB 和 BB 3 种基因型, 在波尔山羊中 B 等位基因频率较高, 其余 3 个品种中都是 A 等位基因频率较高; P5 的扩增片段在济宁青山羊中检测到 CC、CD 和 DD 3 种基因型, 在辽宁绒山羊中检测到 CC 和 CD 2 种基因型, 在其余 2 个山羊品种中都只检测到 CC 基因型。

经检验, 济宁青山羊在 P1、P5 两个座位上都处于哈迪-温伯格平衡状态 (P1 座位:  $\chi^2 = 1.66, P = 0.437$ ; P5 座位:  $\chi^2 = 1.22, P = 0.544$ ), 这与检测的济宁青山羊来自一个随机交配大群体的一个随机样本是一致的, 表明济宁青山羊这 2 个座位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, 方差分析结果表明产羔季节和胎次对济宁青山羊产羔数都有显著影响 (分别为  $P = 0.036$  和  $P = 0.031$ ),  $LH\beta$  基因型对济宁青山羊产羔数没有显著影响 ( $P = 0.063$ )。对于 P5 扩增片段, 方差分析结果表明产羔季节、胎次和  $LH\beta$  基因型对济宁青山羊产羔数都有显著影响 (分别为  $P = 0.042$ 、 $P = 0.035$  和  $P = 0.008$ )。不同  $LH\beta$  基因型的 153 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。

表 3 不同  $LH\beta$  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  $LH\beta$  genotypes in Jining Grey goats

引物 Primer	基因型 Genotype	样本数 No.	产羔数 Litter size
P1	AA	89	2.90 ± 0.20 <sup>A</sup>
	AB	59	2.72 ± 0.18 <sup>A</sup>
	BB	5	2.14 ± 0.15 <sup>A</sup>
P5	CC	58	2.25 ± 0.21 <sup>B</sup>
	CD	67	3.12 ± 0.20 <sup>A</sup>
	DD	28	3.24 ± 0.30 <sup>A</sup>

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极显著 ( $P < 0.01$ )

Least square means with the same superscript for the same pair of primer have no significant difference ( $P > 0.05$ ). Least square means with the different superscripts for the same pair of primer differ significantly ( $P < 0.01$ )

由表 3 可见, 对于 P1 扩增片段, 济宁青山羊 3

种基因型之间产羔数差异均不显著 ( $P > 0.05$ )。对于 P5 扩增片段, DD 和 CD 基因型济宁青山羊平均产羔数分别比 CC 基因型的多 0.99 只 ( $P < 0.01$ ) 和 0.87 只 ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

### 3.1 $LH\beta$ 基因的多态性

促黄体素的 cDNA 已从人、猪、大鼠、牛、绵羊等几个物种中分离和鉴定<sup>[10,15-18]</sup>, 已知的  $LH\beta$  基因总的片段长度大约为 1.5 kb。d' Angelo-Bernard 等使用大鼠  $LH\beta$  cDNA 作为探针, 从绵羊垂体 pBR322 cDNA 文库中分离出包含绵羊  $LH\beta$  亚基 cDNA 的克隆, 并获得了绵羊  $LH\beta$  亚基完整的 DNA 序列, 结果表明确定的绵羊  $LH\beta$  氨基酸序列与牛有 98% 的相似性, 与猪有 84% 的相似性, 与大鼠有 81% 的相似性, 与马属动物有 74% 的相似性, 与人有 69% 的相似性<sup>[19]</sup>。编码该激素  $\beta$  亚基基因的突变往往会使动物的生殖过程出现障碍。  $LH\beta$  基因突变的研究目前主要集中在人类生殖系统疾病方面<sup>[20-21]</sup>, 在羊、牛、猪等物种中的研究报道还不多。Valdes-Socin 等<sup>[22]</sup> 在一个青春期延迟的男性患者中发现  $LH\beta$  基因的一个错义突变 (Gly36Axp) 造成 LH 不分泌, 从而引起不育。Lofrano-Porto 等<sup>[23]</sup> 在 1 个家族 2 位男性和 1 位女性中同时发现其  $LH\beta$  基因 5' 端剪切位点的纯合型突变 IVS2+1G→C, 该突变破坏了 mRNA 的剪切, 造成 LH 不分泌, 两性都表现为不育。人  $LH\beta$  基因另外 2 个突变位点 (Trp8Arg/Ile15Thr) 被证明与促性腺激素不足型性腺机能减退 (hypogonadotropic hypogonadism, HH) 没有相关性<sup>[24]</sup>。王爱华等在猪  $LH\beta$  基因的 3 个外显子以及 3' 调控区内都没有发现任何突变位点, 仅在 2 个内含子中各发现 1 个多态性位点<sup>[25]</sup>。李利等用酶切的方法对南江黄羊  $LH\beta$  基因的研究发现在 401 位点存在 1 个突变 (G→A 或 C), 与产羔数没有显著相关 ( $P > 0.05$ ), 但 AA 基因型母羊第 2 胎后产羔数与窝重有增加的趋势<sup>[9]</sup>。

本研究在山羊  $LH\beta$  基因 5' 调控区发现 2 处突变 202C→A 和 210C→T, 在 4 个山羊品种中都检测到了 3 种基因型 (AA、AB 和 BB); 在外显子 2 的 1 124 bp 处检测到 C→T 突变, 只在济宁青山羊中检测到了全部 3 种基因型 (CC、CD 和 DD), 辽宁绒山羊中没有 DD 基因型, 而在波尔山羊和安哥拉山羊 2 个外来品种中都只检测到 CC 基因型, 这可能

是由国内外品种在该位点的差异所致。

### 3.2 $LH\beta$ 基因与繁殖性能的关系

Kumar 通过建立  $LH\beta$  基因敲除小鼠模型阐明了该基因对哺乳动物繁殖性能的影响<sup>[26]</sup>。 $LH\beta$  基因敲除小鼠能够存活但出生后性腺不再发育,没有繁殖能力。 $LH\beta$  基因敲除的雄性小鼠表现为睾丸变小,血浆和睾丸内的睾酮水平降低,精子发育全部停留在精原细胞阶段; $LH\beta$  基因敲除的雌性小鼠表现为性腺机能低下,血浆中雌激素和孕激素的水平降低,卵泡不发育,黄体缺失,这表明  $LH\beta$  基因对哺乳动物的性成熟和生殖能力起着至关重要的作用。此外,还发现多种转录因子如孤核受体、类固醇生成因子-1、早期生长应答蛋白 1 等通过与  $LH\beta$  基因启动子区直接结合而对该基因的表达进行调控<sup>[27-29]</sup>,该基因其它区域是否存在调控位点尚不明确。本研究在山羊  $LH\beta$  基因 5'调控区检测到了 2 处突变,尽管这些突变与产羔数没有显著相关( $P>0.05$ ),但 5'调控区很可能存在某种转录因子的识别位点,这些位点可能与转录因子结合,从而直接影响  $LH\beta$  基因的表达。因此不同品种之间 LH 表达量的差异可能与该区域的多态性有关,这有待进一步研究证实。

另外,本研究在山羊  $LH\beta$  基因外显子 2 检测到 1124C→T 突变,该突变与产羔数极显著相关( $P<0.01$ )。虽然该突变没有引起氨基酸改变,但可以推测该位点可能与控制济宁青山羊高繁殖力的主效基因存在连锁关系。

本研究虽然没有检测  $LH\beta$  基因内含子是否存在多态性,但已有研究表明某些基因的内含子也参与基因的表达调控,内含子对基因的特异性表达是必不可少的<sup>[30-31]</sup>,因此进一步分析山羊  $LH\beta$  基因内含子序列、检测是否存在 SNP 位点以及这些突变位点是否会影响  $LH\beta$  基因的表达量同样具有很高的价值。由于本研究检测的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。

## 4 结论

本研究在 4 个山羊品种  $LH\beta$  基因 5'调控区都检测到 3 种基因型(AA、AB 和 BB),发现 2 处突变 202C→A 和 210C→T;对于该基因外显子 2,只在济宁青山羊中检测到全部 3 种基因型(CC、CD 和 DD),辽宁绒山羊中没有检测到 DD 基因型,而在波尔山羊和安哥拉山羊两个外来品种中都只检测到

CC 基因型,在 1 124 bp 处检测到 C→T 突变,且该突变与产羔数极显著相关。

### 参考文献:

- [ 1 ] PIERCE J G, PARSONS T F. Glycoprotein hormones: structure and function[J]. *Annu Rev Biochem*, 1980, 50:465-469.
- [ 2 ] CAMPBELL B K, SCARAMUZZI R J, WEBB R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle[J]. *J Reprod Fert (Supplement)*, 1995, 49:335-350.
- [ 3 ] 罗文祥, 祝 诚. IGF-I、IGF结合蛋白-2和LH受体 mRNA 在卵泡闭锁中的表达调控[J]. *中国科学 C 辑*, 2000, 43(3):272-279.
- [ 4 ] PICAZO R A, COCERO M J, BARRAGÁN M L, et al. Effects of LH administration at the end of an FSH superovulatory regimen on ovulation rate and embryo production in three breeds of sheep[J]. *Theorriogenology*, 1996, 45(5):1065-1073.
- [ 5 ] MCNATTY K P, HUDSON N, HENDERSON K M, et al. Differences in gonadotrophin concentrations and pituitary responsiveness to GnRH between Booroola ewes which were homozygous (FF), heterozygous (F+) and non-carriers (++) or a major gene influencing their ovulation rate[J]. *J Reprod Fert*, 1987, 80(2):577-588.
- [ 6 ] FLEMING J S, GREENWOOD P J, HEATH D A, et al. Expression of gonadotrophin subunit genes in sheep that were homozygous carriers and non-carriers of the Booroola fecundity gene  $FecB^B$  [J]. *J Reprod Fert*, 1995, 103(2):315-321.
- [ 7 ] HEATH D A, CALDANT M, MCNATTY K P. Relationships between the number of immunostaining gonadotropes and the plasma concentrations of gonadotrophins in ewes with and without the  $FecB^B$  gene [J]. *J Reprod Fert*, 1996, 106(1):73-78.
- [ 8 ] 张英杰, 刘月琴, 储明星. 小尾寒羊高繁殖力和常年发情内分泌机理的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2001, 32(6):510-516.
- [ 9 ] 李 利, 张红平, 吴登俊. 南江黄羊  $LH\beta$  基因序列多态性与产羔数的相关分析[J]. *吉林农业大学学报*, 2006, 28(5):567-569.
- [ 10 ] PENTY J M, LORD E A, DODDS K G, et al. Linkage of LHB and MAG to GPI on sheep chromosome 14[J]. *Mammalian Genome*, 1995, 6(4):299-300.
- [ 11 ] 《中国羊品种志》编写组. 中国羊品种志[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989:92-93, 98-101.

- [12] MALAN S W. The improved Boer goat[J]. *Small Ruminant Research*, 2000, 36(2):165-170.
- [13] ROBERTS A J, REEVES J J. Kidding rates of Angora goats passively immunized against estrogens[J]. *J Anim Sci*, 1988, 66(10):2443-2447.
- [14] BROWN P, MCNEILLY J R, WALLACE R M, et al. Characterization of the ovine LH $\beta$ -subunit gene: the promoter directs gonadotrope-specific express in transgenic mice[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1993, 93(2):157-165.
- [15] YERLE M, DALENS M, GALMAN O, et al. Localization on pig chromosome 6 of five markers: GPI, APDE, TGFBI and PGD, carried by human chromosomes 1 and 19, using in situ hybridization[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1990, 54(1-2):86-91.
- [16] MELLINK C, LAHBIB-MASSAIS Y, YERLE M, et al. PCR amplification and physical localization of the genes for pig FSHB and LHB[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1995, 70(3-4):224-227.
- [17] CHIN W W, GODINE J E, KLEIN D R, et al. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the precursor of the beta subunit of rat lutropin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80(15):4649-4653.
- [18] VIRGIN J B, SILVER B J, THOMASON A R, et al. The gene for the beta subunit of bovine luteinizing hormone encodes a gonadotropin mRNA with an unusually short 5'-untranslated region[J]. *J Biol Chem*, 1985, 260(11):7072-7077.
- [19] d'ANGELO-BERNARD G, MOUMNI M, JUTISZ M, et al. Cloning and sequence analysis of the cDNA for the precursor of the beta subunit of ovine luteinizing hormone[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(2):2175.
- [20] ELTER K, EREL C T, CINE N, et al. Role of the mutations Trp-Arg and Ile15-Thr of the human luteinizing hormone beta-subunit in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Fertil Steril*, 1999, 71(3):425-430.
- [21] RAJKHOWA M, TALBOT J A, JONES P W, et al. Relevance of an immunological LH beta subunit variant in a UK population of healthy women and women with polycystic ovary syndrome[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1995, 43(3):297-303.
- [22] VALDES-SOCIN H, SALVI R, DALY A F, et al. Hypogonadism in a patient with a mutation in the luteinizing hormone beta-subunit gene[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(25):2619-2625.
- [23] LOFRANO-PORTO A, BARRA G B, GIACOMINI L A, et al. Luteinizing hormone beta mutation and hypogonadism in men and women[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(9):897-904.
- [24] BERGER K, BILLERBECK A E, COSTA E M, et al. Frequency of the allelic variant (Trp8Arg/Ile15Thr) of the luteinizing hormone gene in a Brazilian cohort of healthy subjects and in patients with hypogonadotropic hypogonadism[J]. *Clinics*, 2005, 60(6):461-464.
- [25] 王爱华, 李 宁, 吴常信. 猪 LH $\beta$  亚基基因的单核苷酸多态性研究[J]. *遗传*, 2002, 24(6):649-652.
- [26] KUMAR T R. Functional analysis of LHBeta knock-out mice[J]. *Mol Cell Endocrinal*, 2007, 269(1-2):81-84.
- [27] ROA J, VIGO E, CASTELLANO J M, et al. Opposite roles of estrogen receptor (ER)- $\alpha$  and ER- $\beta$  in the modulation of luteinizing hormone responses to kisspeptin in the female rat; implications for the generation of the preovulatory surge[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(4):1627-1637.
- [28] KAISER U B, HALVORSON L M, CHEN M T. Sp1, steroidogenic factor 1 (SF-1), and early growth response protein 1 (egr-1) binding sites form a tripartite gonadotropin-releasing hormone response element in the rat luteinizing hormone-beta gene promoter: an integral role for SF-1[J]. *Mol Endocrinal*, 2000, 14(8):1235-1245.
- [29] MAUDSLEY S, NAOR Z, BONFIL D, et al. Proline-rich tyrosine kinase 2 mediates gonadotropin-releasing hormone signaling to a specific extracellularly regulated kinase-sensitive transcriptional locus in the luteinizing hormone beta-subunit gene[J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(5):1216-1233.
- [30] HIROKI T, LIEBHABER S A, COOKE N E. An intronic locus control region plays an essential role in the establishment of an autonomous hepatic chromatin domain for the human vitamin D-binding protein gene [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(21):7365-7380.
- [31] IRIMIA M, ROY S W. Spliceosomal introns as tools for genomic and evolutionary analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(5):1703-1712.