

# BMP15 外显子 1 SNPs 检测及其与邵伯鸡母系产蛋性状的关联性分析

李春苗, 黎寿丰\*, 赵振华, 黄华云, 薛龙岗

(中国农业科学院家禽研究所, 扬州 225125)

**摘要:** 本研究旨在阐明骨形态发生蛋白 15(Bone morphogenetic protein 15, BMP15) 基因多态性与邵伯鸡母系产蛋性状之间的关系, 为鸡繁殖性状的标记辅助选择提供科学依据。采用 PCR-RFLP 技术检测 261 只邵伯鸡母系 BMP15 的基因多态性, 用最小二乘法分析该基因多态性与邵伯鸡母系产蛋性状的关系。发现 BMP15 基因外显子 1 序列中存在 3 个多态位点 C397T、A474G 和 C594T, 其中 C397T 位点 C→T 的突变使亮氨酸变为苯丙氨酸, 经 RFLP 检测, 3 个多态位点均发现 3 种基因型。 $\chi^2$  检验表明, 邵伯鸡母系在这 3 个位点均处于 Hardy-Weinberg 平衡。用最小二乘法分析这 3 个位点的多态性与邵伯鸡母系产蛋性状之间的关系, 结果发现, C397T 位点 TT 基因型个体的开产日龄显著早于 CT 型个体 ( $P < 0.05$ ), TT 型个体的 300 日龄产蛋数显著高于 CT 型个体 ( $P < 0.05$ ); A474G 位点 AA、AG 和 GG 型个体间的各性状差异均不显著 ( $P > 0.05$ ); C594T 位点 CC 型个体的开产日龄显著早于 CT 与 TT 型个体。3 个位点的合并基因型 TTAATT 对开产日龄、开产体质量、开产蛋质量、300 日龄平均蛋质量、300 日龄产蛋数均有显著影响 ( $P < 0.05$ )。对于邵伯鸡母系而言, TTAATT 是最有利基因型, 本研究结果初步表明, BMP15 基因合并基因型 TTAATT 可以作为邵伯鸡母系产蛋性状潜在的 DNA 分子标记。

**关键词:** 邵伯鸡; BMP15 基因; 产蛋性状

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)11-1825-08

## Detection of SNPs of Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Exon1 and Its Association with Egg Production Traits in Female Line of Shaobo Chicken

LI Chun-miao, LI Shou-feng\*, ZHAO Zhen-hua, HUANG Hua-yun, XUE Long-gang  
(Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225125, China)

**Abstract:** The objective of the present study were to elucidate the relationship between polymorphisms of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) gene and egg production traits in female line of Shaobo chicken and to provide a scientific basis for marker-assisted selection for reproductive traits of chicken. Polymorphisms of exon1 of BMP15 gene were detected in 261 female line of Shaobo chicken by PCR-RFLP. The relationship between polymorphisms of BMP15 gene and egg production traits in female line of Shaobo chicken was analyzed by least squares linear model. Three polymorphic sites C397T, A474G and C594T were found in exon1 of BMP15, and C397T mutation resulted in an amino acid change of leucine→phenylalanine. Three genotypes were found at all three mutation sites in 261 female line of Shaobo chicken by RFLP. Chi-square test showed that Shaobo chickens were in Hardy-Weinberg equilibrium. The relationship between three site polymorphisms of BMP15 gene and egg production traits in Shaobo chickens was analyzed by least squares linear model. The result showed that three genotypes (CC, CT and TT) were found

收稿日期: 2012-03-08

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-42-Z06); 江苏省“333”人才培养工程项目 (BRA2010162); 扬州市农业科技攻关项目 (YZ20102050)

作者简介: 李春苗 (1982-), 女, 安徽砀山人, 助理研究员, 硕士, 主要从事家禽分子遗传方面研究, E-mail: cherrylem@163.com

\* 通讯作者: 黎寿丰, E-mail: yzlsf3333@126.com

at C397T mutation locus, and individuals with TT genotype had significant younger age at first egg than that for CT ( $P < 0.05$ ), TT genotype birds had also significant more the total number of eggs at the age of 300 days than that for CT ( $P < 0.05$ ). Three genotypes (AA, AG and GG) were found at A474G mutation site, and there was no significant effect on egg production traits at the locus. Three genotypes (CC, CT and TT) were found at C594T mutation locus, and CC genotype had significant younger age at first egg than that for CT and TT ( $P < 0.05$ ). The combined genotype TTAATT also had significant genetic effects on age at first egg (AFE), weight at first egg (WFE), body weight at first egg (BWFE) and the total number of eggs with 300 age (EN) ( $P < 0.05$ ). The combined genotype TTAATT was the most favorable genotype. The result indicate that combined genotype TTAATT of *BMP15* gene is a potential DNA marker for improving egg production traits in female line of Shaobo chicken.

**Key words:** Shaobo chicken; bone morphogenetic protein 15 gene; egg production traits

骨形态发生蛋白 15 (Bone morphogenetic protein 15, BMP15) 是  $\beta$ -转化生长因子 (TGF- $\beta$ ) 超家族的成员, 该家族成员大多数与哺乳动物的繁殖机能调节有关<sup>[1-3]</sup>。BMP15 基因是一种在卵巢中特异表达的卵母细胞衍生因子<sup>[4]</sup>, 许多研究表明, BMP15 基因对卵泡发育、优质卵泡的选择及排卵等雌性生殖过程的许多环节都起着关键作用<sup>[5-7]</sup>, 通过旁分泌的信号转导通路, 促使卵泡细胞进行有丝分裂和卵泡分化的发育过程<sup>[8-10]</sup>。Pasquale 等<sup>[11]</sup> 研究发现, 人类卵巢 BMP15 基因突变导致卵巢发育不全引起高促性腺激素性卵巢衰竭。Cheng 等<sup>[12]</sup> 研究发现, 人类 BMP15 基因可以作为一个卵子发生标记跟踪人类羊水肝细胞分化成卵母细胞样细胞的过程。Yan 等<sup>[13]</sup> 通过基因敲除试验已经证实, 小鼠缺乏 BMP15 基因将引发生殖障碍。Juengel 等<sup>[14]</sup> 研究发现对母羊的 BMP15 基因进行免疫可能造成卵泡过早的黄体化, 并对下次的排卵有所限制。Galloway 等<sup>[15]</sup> 研究发现, 羊 BMP15 基因部分功能缺失导致排卵率上升, 但当母绵羊 BMP15 基因发生 Inverdale 和 Hanna 突变导致 BMP15 基因功能丧失时, 将直接影响卵泡生成和发育, 因此推测该因子可能是排卵数和产仔数的主要决定基因。BMP15 基因在卵生类动物中的研究比较少, 直到 2007 年, Elis 等<sup>[16]</sup> 利用原位杂交和实时定量 RT-PCR 技术检测到 BMP15 基因在母鸡的卵泡中特定表达, 但排卵后, 表达量逐渐下降; 人工抑制卵巢中 BMP15 基因的作用, 发现类固醇合成急性调节蛋白减少, 因此推断 BMP15 基因对母鸡的繁殖力起着关键作用。但到目前为止, 还没有关于 BMP15 基因与母鸡产蛋性状关联性的相关报道。

邵伯鸡是中国农业科学院家禽研究所选育的具有青胫、麻羽特征的优质肉鸡配套系, 其母系为矮小型青胫麻羽品系。本研究以邵伯鸡母系母鸡为对象, 以 BMP15 基因为候选基因, 分析其 SNPs 及其产蛋性状间的关系, 以期邵伯鸡母系产蛋性状分子标记辅助选择积累理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 材料 在完全相同的饲养管理条件下采用个体笼养方式饲养并记录和统计邵伯鸡母系开产日龄、开产体质量、开产蛋质量、300 日龄平均蛋质量和 300 日龄产蛋数。于 300 日龄时, 在大群中随机选取母系母鸡 261 只, 翅下静脉采血 1.5 mL, 用柠檬酸葡萄糖抗凝,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存、备用。

1.1.2 主要试剂 Taq DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司、dNTPs 购自北京天根生物技术有限公司, Ear I、Hae II 和 Alw21 I 限制性内切酶均购自 MBI 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 用酚氯仿抽提法提取基因组 DNA, 溶于 TE 缓冲液 ( $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH8.0),  $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA (pH8.0)),  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。用紫外分光光度计和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的纯度, 并估计其含量, 稀释 DNA 样品至  $50\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。

1.2.2 引物设计 根据 GenBank 上公布的原鸡 BMP15 基因 DNA 序列 (GenBank 登录号: NC\_006091), 用 Primer5.0 软件设计 1 对长 517 bp 的引物, 由上海生工生物技术有限公司合成。

上游引物: 5'-GGGTTTTAGCCCTGATCTT-GCACTC-3'; 下游引物: 5'-ATCACCCATTGC-CACCACCTTACCT-3'。

1.2.3 PCR 扩增 PCR 扩增体系为 25  $\mu\text{L}$ : 10 $\times$  PCR 缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  上下游引物各 1.0  $\mu\text{L}$ , 2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs 2.0  $\mu\text{L}$ , 5  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  *Taq* DNA 聚合酶 0.5  $\mu\text{L}$ , 50  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  DNA 模板 1.0  $\mu\text{L}$ , 加超纯水至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 然后 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 58  $^{\circ}\text{C}$  复性 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 15 s, 35 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 PCR 产物测序及 SNPs 位点分析 将 PCR 产物送至上海英俊生物有限公司 ABI3730 测序仪测序, 用 DNASTar 和 Primer5.0 软件分析测序结果, 确定 SNPs 位点及酶切位点。

1.2.5 酶切及基因型统计 酶切的反应体系为 20  $\mu\text{L}$ : PCR 扩增产物 7  $\mu\text{L}$ , 限制性内切酶 0.5  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$  缓冲液 2.0  $\mu\text{L}$ , 加超纯水至 20  $\mu\text{L}$ , *Ear* I、*Hae* II 和 *Alw*21 I 均用 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜消化, 3% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用 AlphaImager<sup>TM</sup> 2200 and 1220 Documentation and Analysis Systems (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA) 拍照和分析, 统计基因型。

1.2.6 群体遗传学分析 基因频率: 在 1 个基因座位上具有 2 个等位基因的情况下, 基因频率计算公式<sup>[17]</sup>:

$$p = \frac{2n_{AA} + n_{AB}}{2(n_{AA} + n_{AB} + n_{BB})};$$

$$q = \frac{2n_{BB} + n_{AB}}{2(n_{AA} + n_{AB} + n_{BB})}$$

其中:  $p$  是等位基因 A 的基因频率,  $q$  是等位基因 B 的基因频率,  $n_{AA}$ 、 $n_{AB}$ 、 $n_{BB}$  分别是群体中基因型 AA、AB 和 BB 型的个体数。

群体杂合度 (Heterozygosity, H): 由等位基因频率计算杂合度的公式<sup>[18]</sup>:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

其中:  $H$  为某一位点的杂合度,  $p_i$  为某一位点上第  $i$  个等位基因频率,  $n$  为某一位点的等位基因数。

多态信息含量 (Polymorphic information content, PIC): PIC 可根据 Bostein 等的公式进行计

算<sup>[19]</sup>。一个标记在群体中的 PIC 值是根据其等位基因的频率来计算的。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

其中:  $n$  为等位基因数目,  $p_i$  和  $p_j$  分别为第  $i$  和第  $j$  个等位基因在群体中的频率。

1.2.7 基因型与繁殖性状的关联分析 配合下列模型进行最小二乘分析, 比较邵伯母系母鸡的繁殖性状在各基因型之间的差异。

$$y_{ijk} = \mu + G_k + e_{ijk}$$

其中:  $y_{ijk}$  为各繁殖性状指标;  $\mu$  为群体均值;  $G_k$  为第  $k$  种基因型的固定效应,  $k=1, 2, 3$ ;  $e_{ijk}$  为随机残差效应。用 SAS(V8.12) 的 GLM (General Linear Model) 过程完成。

## 2 结果

### 2.1 测序及序列分析

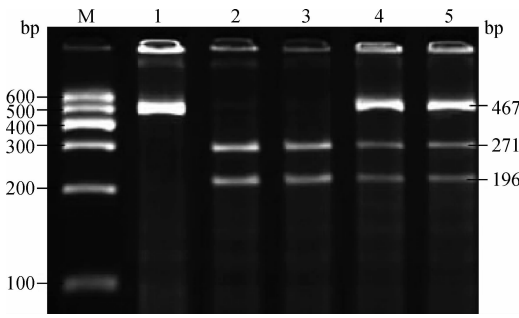
随机抽取 20 个样本进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物混合样进行测序, 结果 (图 1) 发现, BMP15 基因外显子 1 有 3 个位点发生突变, 分别为 BMP15 基因 DNA 序列 (GenBank 登录号: NC\_006091) 中第 397 bp 处 C $\rightarrow$ T 的突变导致 *Ear* I 酶切位点的产生, 并导致亮氨酸变为苯丙氨酸; 第 474 bp 处 A $\rightarrow$ G 的突变导致 *Hae* II 酶切位点的产生, 但没有导致氨基酸发生变化; 第 594 bp 处 C $\rightarrow$ T 的突变导致 *Alw*21 I 酶切位点的消失, 也没有导致氨基酸发生变化。

### 2.2 多态位点酶切

2.2.1 BMP15 基因外显子 1 C397T 位点 *Ear* I 酶切 C397T 位点 *Ear* I 酶切的 PCR 扩增产物为 517 bp, 根据电泳图和测序结果综合分析, 共有 3 种基因型: CC (467 bp/50 bp)、CT (467 bp/271 bp/196 bp/50 bp) 和 TT (271 bp/196 bp/50 bp), 其中, 由于 50 bp 片段太小, 在电泳时跑出胶外, 故在酶切图上没有表现出来, 结果见图 1。

2.2.2 BMP15 基因外显子 1 A474G 位点 *Hae* II 酶切 A474G 位点 *Hae* II 酶切的 PCR 扩增产物为 517 bp, 根据电泳图和测序结果综合分析, 共有 3 种基因型: AA (517 bp)、AG (517 bp/321 bp/196 bp) 和 GG (321 bp/196 bp), 结果见图 2。

2.2.3 BMP15 基因外显子 1 C594T 位点 *Alw*21 I 酶切 C594T 位点 *Alw*21 I 酶切的 PCR 扩增产物为 517 bp, 根据电泳图和测序结果综合分析, 共



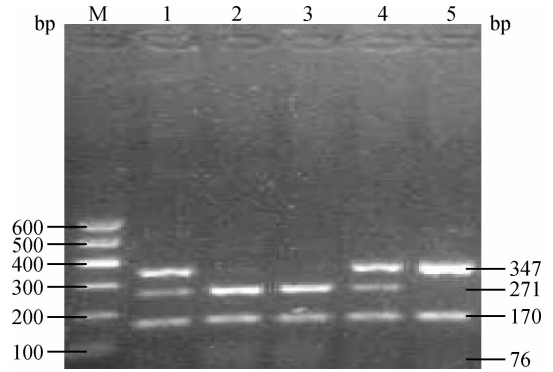
M. DNA 相对分子质量标准; 1. 基因型 CC; 2,3. 基因型 TT; 4,5. 基因型 CT

M. DNA marker I; 1. CC genotype; 2,3. TT genotype; 4,5. CT genotype

图 1 *BMP15* 基因外显子 1 *Ear* I 酶切结果

Fig. 1 Band patterns of exon1 of *BMP15* gene digested by *Ear* I

有 3 种基因型:CC(271 bp/170 bp/76 bp)、CT(347 bp/271 bp/170 bp/76 bp)和 TT(347 bp/170 bp), 结果见图 3。

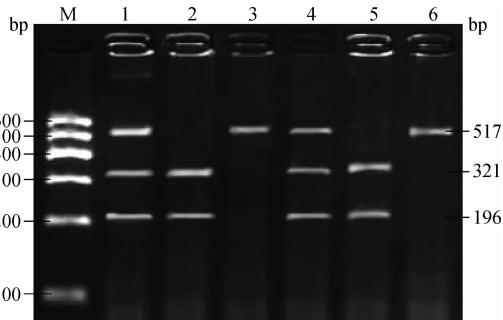


M. DNA 相对分子质量标准; 2,3. 基因型 CC; 5. 基因型 TT; 1,4. 基因型 CT

M. DNA marker I; 2,3. CC genotype; 5. TT genotype; 1,4. CT genotype

图 3 *BMP15* 基因外显子 1 *Alw21* I 酶切结果

Fig. 3 Band patterns of exon1 of *BMP15* gene digested by *Alw21* I



M. DNA 相对分子质量标准; 3,6. 基因型 AA; 2,5. 基因型 GG; 1,4. 基因型 AG

M. DNA marker I; 3,6. AA genotype; 2,5. GG genotype; 1,4. AG genotype

图 2 *BMP15* 基因外显子 1 *Hae* II 酶切结果

Fig. 2 Band patterns of exon1 of *BMP15* gene digested by *Hae* II

### 2.3 *BMP15* 基因 C397T、A474G 和 C594T 变异的遗传特性分析

邵伯鸡母系 *BMP15* 基因外显子 1 C397T、A474G 和 C594T 3 个位点的等位基因频率和基因型频率统计结果见表 1,3 个位点合并基因型和配子频率见表 2。对 3 个位点进行 Hardy-Weinberg 平衡检测见表 3。

表 1 *BMP15* 基因外显子 1 的等位基因频率和基因型频率

Table 1 Allele and genotype frequencies of exon1 of *BMP15* gene

多态位点	限制性内切酶	基因型	个体数	基因型频率	等位基因	等位基因频率
Polymorphic site	Restriction endonuclease	Genotype	No. of samples	Genotype frequency	Allele	Allele frequency
C397T	<i>Ear</i> I	C397C	54	0.206 9	C	0.438 7
		C397T	121	0.463 6	T	0.561 3
		T397T	86	0.325 9		
A474G	<i>Hae</i> II	A474A	48	0.183 9	A	0.455 9
		A474G	142	0.544 1	G	0.544 1
C594T	<i>Alw21</i> I	G474G	71	0.272 0		
		C594C	85	0.325 7	C	0.546 0
		C594T	115	0.440 6	T	0.454 0
		T594T	61	0.233 7		

表 2 BMP15 基因外显子 1 C397T、A474G 和 C594T 联合位点基因频率和配子频率

Table 2 Genotype and gamete-type frequencies based on C397T、A474G and C594T sites of exons2 of BMP15 gene

合并基因型	个体数	基因型频率	等位基因	等位基因频率
Recombined genotype	No. of samples	Genotype frequency	Allele	Allele frequency
C397CA474GC594C	12	0.046 0	CAC	0.083 3
C397CA474GC594T	13	0.049 8	CAT	0.091 0
C397CA474GT594T	12	0.046 0	CGC	0.194 4
C397CG474GC594C	17	0.065 1	CGT	0.069 9
C397TA474AC594T	12	0.046 0	TAC	0.078 5
C397TA474AT594T	12	0.046 0	TAT	0.203 1
C397TA474GC594C	16	0.061 3	TGC	0.189 7
C397TA474GC594T	44	0.168 6	TGT	0.090 0
C397TG474GC594C	23	0.088 1		
C397TG474GC594T	14	0.053 6		
T397TA474AT594T	24	0.092 0		
T397TA474GC594T	32	0.122 6		
T397TA474GT594T	13	0.049 8		
T397TG474GC594C	17	0.065 1		

由表 2 可见, 3 个位点合并基因型仅出现 14 种, 而 CCAACC、CCAACCT、CCAATT、CCGGCT、CCGGTT、CTAACCC、CTAGTT、CTGGTT、TTA-

ACC、TTAACT、TTAGCC、TTGGCT、TTGGTT 等合并基因型均未检测到。

表 3 3 个多态位点 Hardy-Weinberg 平衡检测与群体遗传学参数

Table 3 Hardy-Weinberg equilibrium testing and population genetics analysis at three polymorphic sites

多态位点	$\chi^2$	$P$	杂合度	杂合度方差	多态信息含量	有效等位基因数
Polymorphic site			Heterozygosity	Heterozygosity variance	Polymorphism information content	Effective number of alleles
C397T	0.897 7	$P > 0.05$	0.492 5	0.062 5	0.371 2	1.970 4
A474G	3.230 8	$P > 0.05$	0.496 1	0.062 5	0.373 1	1.984 6
C594T	2.437 5	$P > 0.05$	0.495 8	0.062 5	0.372 9	1.983 2

表 3 的  $\chi^2$  检验表明: 邵伯鸡母系在 BMP15 基因外显子 1 的 3 个多态位点 C397T、A474G、C594T 均达到了 Hardy-Weinberg 平衡, 表明邵伯鸡母系在这 3 个位点的基因型频率均没有受到选择、突变或迁移等因素的影响; 且这 3 个多态位点均处于中度多态, 表明这 3 个位点的多态性较高, 变异程度较大, 存在较大的选择潜力, 对这 3 个位点的选择有望获得较大的遗传进展。

#### 2.4 单位点多态性与邵伯母鸡繁殖性状的关联性分析

对邵伯母鸡系群体 BMP15 基因 3 个多态位点 C397T、A474G 和 C594T 的单位点与繁殖性状进行

方差分析, 结果见表 4。

由表 4 可知, 对于多态位点 C397T, 不同基因型个体在开产日龄和 300 日龄产蛋数间差异显著, 表现为 TT 型个体的开产日龄显著早于 CT 型个体 ( $P < 0.05$ ), 与 CC 型个体差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 300 日龄产蛋数显著高于 CT 型个体 ( $P < 0.05$ ), 与 CC 型个体差异不显著 ( $P > 0.05$ )。对于多态位点 A474G, 不同基因型个体间各产蛋性状指标差异均未达到显著水平 ( $P > 0.05$ )。对于多态位点 C594T, 不同基因型个体开产日龄差异显著, 表现为 CC 型个体的开产日龄显著早于 CT 型与 TT 型个体 ( $P < 0.05$ )。

## 2.5 联合位点多态性与邵伯鸡母系产蛋性状的关联分析

C397T、A474G 和 C594T 的联合位点与产蛋性状进行方差分析,结果见表 5。

对邵伯鸡母系群体 *BMP15* 基因 3 个多态位点

表 4 *BMP15* 基因 3 个酶切多态位点不同基因型与产蛋性状的关联分析

Table 4 Correlation analysis of different genotypes of three polymorphic sites of *BMP15* gene with egg productive traits

多态位点 Polymorphic site	基因型 Genotype	个体数 No. of samples	开产日龄/d Age at first egg	开产体质量/g Body weight at first egg	开产蛋质量/g Egg weight at first egg	300 日龄平均蛋质量/g Average egg weight at 300 days	300 日龄产蛋数/枚 Total egg production at 300 days
C397T	C397C	54	154.2±10.2 <sup>ab</sup>	1 768.6±143.6	36.5±3.0	38.2±2.7	105.6±3.2 <sup>ab</sup>
	C397T	121	158.9±12.3 <sup>b</sup>	1 747.7±137.6	36.2±3.9	37.0±3.5	100.9±2.6 <sup>a</sup>
	T397T	86	153.1±9.3 <sup>a</sup>	1 735.3±142.9	35.8±5.5	36.6±3.9	107.7±4.9 <sup>b</sup>
A474G	A474A	48	156.3±8.2	1 710.3±129.6	36.4±3.6	37.0±3.9	106.2±4.4
	A474G	142	156.7±9.7	1 755.1±108.9	36.2±4.3	36.8±3.8	107.8±1.3
	G474G	71	154.3±7.7	1 703.1±121.1	35.9±3.8	37.1±3.4	107.3±2.3
C594T	C594C	85	153.0±11.1 <sup>a</sup>	1 700.4±121.3	35.8±4.2	36.4±3.7	110.6±7.8
	C594T	115	157.1±11.7 <sup>b</sup>	1 742.5±103.5	36.3±4.1	37.0±3.5	105.4±6.3
	T594T	61	157.5±10.4 <sup>b</sup>	1 761.2±146.7	36.4±6.5	37.4±4.3	108.2±2.4

同一位点具有相同字母肩标的平均值间差异不显著( $P>0.05$ ),同一位点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 site have non-significant difference ( $P>0.05$ ). Least squares means with the different superscripts for the same site differ significantly ( $P<0.05$ )

表 5 *BMP15* 基因合并基因型与产蛋性状的关联分析

Table 5 Correlation analysis of *BMP15* gene combined genotypes with egg productive traits

合并基因型 Combined genotype	个体数 No. of samples	开产日龄/d Age at first egg	开产体质量/g Body weight at first egg	开产蛋质量/g Egg weight at first egg	300 日龄平均蛋质量/g Average egg weight at 300 days	300 日龄产蛋数/枚 Total egg production at 300 days
C397CA474GC594C	12	158.5±3.4 <sup>ns</sup>	1 682.0±145.9 <sup>ns</sup>	38.3±2.8 <sup>*</sup>	37.9±0.5 <sup>ns</sup>	96.0±7.7 <sup>*</sup>
C397CA474GC594T	13	152.5±2.1 <sup>ns</sup>	1 669.0±103.6 <sup>ns</sup>	37.3±1.6 <sup>*</sup>	35.8±1.7 <sup>ns</sup>	104.5±3.5 <sup>ns</sup>
C397CA474GT594T	12	166.0±1.3 <sup>*</sup>	1 701.0±121.7 <sup>ns</sup>	37.3±1.5 <sup>*</sup>	42.2±2.6 <sup>*</sup>	90.0±6.8 <sup>*</sup>
C397CG474GC594C	17	153.7±3.6 <sup>*</sup>	1 820.2±139.1 <sup>ns</sup>	34.8±2.4 <sup>ns</sup>	36.8±1.5 <sup>ns</sup>	102.3±3.3 <sup>*</sup>
C397TA474AC594T	12	163.5±0.6 <sup>*</sup>	1 717.0±132.2 <sup>ns</sup>	37.0±2.5 <sup>*</sup>	37.6±1.7 <sup>ns</sup>	95.0±14.1 <sup>*</sup>
C397TA474AT594T	12	162.0±2.8 <sup>*</sup>	1 756.0±138.3 <sup>ns</sup>	36.5±1.5 <sup>ns</sup>	37.2±1.4 <sup>ns</sup>	107.0±5.6 <sup>ns</sup>
C397TA474GC594C	16	157.5±1.7 <sup>*</sup>	1 867.0±162.7 <sup>ns</sup>	37.4±2.6 <sup>*</sup>	36.1±2.2 <sup>ns</sup>	104.1±3.1 <sup>ns</sup>
C397TA474GC594T	44	159.4±1.4 <sup>*</sup>	1 759.9±126.6 <sup>ns</sup>	36.1±1.4 <sup>ns</sup>	37.2±1.8 <sup>ns</sup>	99.1±2.0 <sup>*</sup>
C397TG474GC594C	23	152.7±2.8 <sup>ns</sup>	1 654.0±102.5 <sup>ns</sup>	34.7±2.9 <sup>ns</sup>	35.9±1.7 <sup>ns</sup>	105.4±2.1 <sup>ns</sup>
C397TG474GC594T	14	158.5±3.3 <sup>*</sup>	1 897.0±101.3 <sup>*</sup>	37.5±2.4 <sup>*</sup>	39.8±2.0 <sup>*</sup>	100.5±6.1 <sup>*</sup>
T397TA474AT594T	24	152.0±2.9	1 648.5±108.6	34.6±2.7	35.1±2.1	115.4±6.0
T397TA474GC594T	32	153.8±3.9 <sup>ns</sup>	1 762.3±126.4 <sup>ns</sup>	35.1±1.5 <sup>ns</sup>	36.1±1.7 <sup>ns</sup>	105.9±5.7 <sup>ns</sup>
T397TA474GT594T	13	167.0±4.2 <sup>*</sup>	1 926.0±137.2 <sup>*</sup>	42.2±1.9 <sup>*</sup>	44.5±1.7 <sup>*</sup>	97.5±4.9 <sup>*</sup>
T397TG474GC594C	17	152.9±2.9 <sup>ns</sup>	1 702.0±122.6 <sup>ns</sup>	36.3±2.7 <sup>ns</sup>	37.7±1.8 <sup>ns</sup>	105.8±6.5 <sup>ns</sup>

同列内以最有利均值为对照(黑体表示);\*表示与对照差异显著( $P<0.05$ );\*\*表示与对照差异极显著( $P<0.01$ );ns表示差异不显著( $P>0.05$ )

The data with the most advantageous mean was chosen as the control in the same column; \* means significant different with the control ( $P<0.05$ ); \*\* means extremely significant different with the control ( $P<0.01$ ); ns means not significant with the control ( $P>0.05$ )

由表 5 可知,合并基因型个体对开产日龄、开产体质量、开产蛋质量、300 日龄平均蛋质量和 300 日龄产蛋数均有显著影响。合并基因型 TTAATT 个体的开产日龄最早,开产体质量最轻,开产蛋质量最轻,300 日龄平均蛋质量最轻,300 日龄产蛋数最多,可见,开产日龄越早的个体,开产蛋质量越轻,300 日龄产蛋数也越多,这与数量遗传学中蛋质量与产蛋数呈负相关的结论相一致。

### 3 讨论

BMP15 基因作为控制繁殖性状的主效基因或候选基因在国内外许多物种已被报道。Monteagudo 等<sup>[20]</sup>在 Rasa Aragonesa 绵羊的 BMP15 基因外显子发现 1 个新的突变,导致 17 bp 碱基缺失,出现开放阅读框置换,终止密码子提前,结果发现出现碱基缺失的杂合体出现很高的产羔数,年产羔数高达 2.66 只,而群体平均年产羔数只有 1.36 只,缺失可能导致纯合体出现卵巢功能早衰症。Shabir 等<sup>[21]</sup>对 85 只考代力母羊和当地的喀什米尔母羊的 BMP15 基因内含子区域进行 PCR-SSCP 分析,发现 A、B 2 种等位基因和 AA、AB 2 种基因型,同源性分析发现这 2 种羊与济宁青山羊的 DNA 序列同源性达到 97.8%。Chand 等<sup>[22]</sup>在人卵巢功能早衰症患者中检测到出现该症状的患者的 BMP15 基因存在 3 个突变位点,2 个位于 5' 端非翻译区(31T→G,71C→G),另一位点在第一外显子(387G→A)。Liu 等<sup>[23]</sup>对中国多囊性卵巢综合征病人的 BMP15 基因的编码区进行多态性分析,结果发现 34C→G、109G→C、169C→G、288G→C 和 598C→T 5 个多态位点,这些多态位点可能与多囊性卵巢综合征有关。Hou 等<sup>[24]</sup>采用 PCR-RFLP 方法检测梅山猪和大白猪的 BMP15 基因多态性,结果发现 AA 型母猪群体的产仔数和产活仔数极显著高于 BB 型母猪群体;AB 型母猪群体的头胎产仔数和产活仔数极显著高于 AA 型和 BB 型母猪群体。

本研究利用 PCR-RFLP 方法对邵伯鸡母系 BMP15 基因外显子 1 区域进行 SNPs 检测,结果发现 3 个突变位点,分别为 C397T 位点 C→T 的突变导致亮氨酸变为苯丙氨酸;A474G 位点 A→G 的突变没有引起氨基酸的变化,但该位点丙氨酸(Ala, A)的 2 个密码子 GCA→GCG 互换;C594T 位点 C→T 的突变没有引起氨基酸的变化,但该位点丝氨酸(Ser, S)的 2 个密码子 AGC→AGU 互换。这可

能是本研究中不同基因型个体对产蛋性状影响有差异的原因。研究结果表明,C397T 位点显著影响邵伯鸡母系的开产日龄和 300 日龄产蛋数,TT 型个体具有较早的开产日龄和较多的 300 日龄产蛋数。A474G 位点不同基因型个体在产蛋性状上差异不显著。C594T 位点 CC 型个体具有较早的开产日龄。3 个位点的合并基因型 TTAATT 对开产日龄、开产体质量、开产蛋质量、300 日龄平均蛋质量和 300 日龄产蛋数均产生了显著影响,这可能是 3 个位点存在正向协同作用,使得合并基因型对产蛋性状各指标的影响均达到了显著水平。这也证明了 BMP15 基因对母鸡的繁殖性状发挥着重要的调控作用。另外,本研究还发现,合并后效应最大的合并基因型并不是效应最大的单个基因型的组合,这可能是各位点间的正向协同作用和负向作用共同作用的结果,因此以合并基因型进行选种选育可能会得到更大的遗传进展。

### 4 结论

本研究对邵伯鸡母系 BMP15 基因外显子 1 区域进行克隆、测序分析,共发现 3 个 SNPs 位点,各位点在整个试验群体中均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。关联分析结果表明,C397T 和 C594T 位点及其单倍型对邵伯鸡母系的产蛋性状有显著影响,联合基因型 TTAATT 对邵伯鸡母系产蛋性状的影响尤为显著,本研究结果可为邵伯鸡母系产蛋性状标记辅助选择提供科学依据,提示 BMP15 基因可能是影响鸡繁殖性状的主效基因。

### 参考文献:

- [1] CHANG H, BROWN C W, MATZUK M M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- $\beta$  superfamily [J]. *Endocrine Rev*, 2002, 23(6): 787-823.
- [2] KNIGHT P G, GLISTER C. Local roles of TGF- $\beta$  superfamily members in the control of ovarian follicle development[J]. *Anim Reprod Sci*, 2003, 78(3): 165-183.
- [3] MCINTOSH C J, LAWRENCE S, SMITH P, et al. Active immunization against the proregions of GDF9 or BMP15 alters ovulation rate and litter size in mice [J]. *J Soc Reprod Fert*, 2012, 143(2):195-201.
- [4] SHIMASAKI S, MOORE R K, OTSUKA F, et al. The bone morphogenetic protein system in mammali-

- an reproduction[J]. *Endocrine Rev*, 2004, 25(1): 72-101.
- [5] PATRICIA D, GERARD K. The family of bone morphogenetic proteins[J]. *Kidney Int*, 2000, 57: 2207-2214.
- [6] OSTUKA F, SHIMASAKI S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand; its role in regulating granulosa cell mitosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(12):8060-8065.
- [7] CRAWFORD J L, MCNATTY K P. The ratio of growth differentiation factor 9; bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 348(1): 339-343.
- [8] PAULINI F, MELO E O. The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis [J]. *Reprod Domest Anim*, 2011, 46(2):354-361.
- [9] OTSUKA F, MCTAVISH K J, SHIMASAKI S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function [J]. *Mol Reprod Dev*, 2011, 78(1):9-21.
- [10] LIMA I M, BRITO I R, ROSSETTO R, et al. BMPRII and BMPRII mRNA expression levels in goat ovarian follicles and the *in vitro* effects of BMP-15 on preantral follicle development [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 348(1):225-238.
- [11] PASQUALE E D, BECK-PECCOZ P, PERSANI L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene[J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 75(1):106-111.
- [12] CHENG X, CHEN S, YU X, et al. BMP15 gene is activated during human amniotic fluid stem cell differentiation into oocyte-like cells[J]. *DNA Cell Biol*, 2012, 31(7): 1198-1204.
- [13] YAN C N, WANG P, DEMAYO J, et al. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function[J]. *Mol Endocrinol*, 2001, 15(6):854-866.
- [14] JUENGEL J L, QUIRKE L D, LUN S, et al. Effects of immunizing ewes against bone morphogenetic protein 15 on their responses to exogenous gonadotrophins to induce multiple ovulations[J]. *J Soc Reprod Fert*, 2011, 142(4):565-572.
- [15] GALLOWAY S M, MCNATTY K P, CAMBRIDGE L M, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner[J]. *Nat Genet*, 2000, 25:279-283.
- [16] ELIS S, DUPONT J, COUTY I, et al. Expression and biological effects of bone morphogenetic protein-15 in the hen ovary[J]. *J Endocrinol*, 2007, 194(3):485-497.
- [17] D·S·法尔康纳著, 储明星译, 师守堃校. 数量遗传学导论[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [18] C. C. LI 著; 吴仲贤译. 群体遗传学[M]. 北京: 农业出版社, 1981.
- [19] BOSTIEN D, WHILE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism [J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314-331.
- [20] MONTEAGUDO L V, PONZ R, TEJEDOR M T, et al. A 17 bp deletion in the bone morphogenetic protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed[J]. *Anim Reprod Sci*, 2009, 110(1):139-146.
- [21] SHABIR M, GANAI T A. Nucleotide sequencing and DNA polymorphism studies of BMP 15 gene in Corriedale and local Kashmir valley sheep (*Ovis aries*)[J]. *Gene*, 2012, 499(1):231-235.
- [22] CHAND A L, PONNAMPALAM A P, HARRIS S E, et al. Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure [J]. *Fert Ster*, 2006, 86(4):1009-1012.
- [23] LIU J, WANG B, WEI Z, et al. Mutational analysis of human bone morphogenetic protein 15 in Chinese women with polycystic ovary syndrome[J]. *Metab Clin*, 2011, 60(11):1511-1514.
- [24] HOU Z P, YIN Y L, HUANG R L, et al. Study on cloning and sequencing of pig bone morphogenetic protein-15 coding sequence[J]. *J Guangxi Agric Biol Sci*, 2006, 25(2):91-95.