

文禹梁, 郭晓飞, 马琳, 等. 绵羊 *BMPR1A* 基因组织表达及其多态性与产羔数的关联分析[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(4): 69-76.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.04.010

绵羊 *BMPR1A* 基因组织表达及其多态性 与产羔数的关联分析

文禹梁^{1,2}, 郭晓飞³, 马琳¹, 张效生³, 张金龙³, 赵生国², 储明星¹

1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所/农业农村部动物遗传育种与繁殖重点实验室, 北京 100193;

2. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州 730070; 3. 天津市畜牧兽医研究所, 天津 300381

摘要 为探索 *BMPR1A* 基因在不同生理时期(卵泡期和黄体期)和不同繁殖力(单羔组和多羔组)小尾寒羊组织表达特征及其多样性与小尾寒羊产羔数的关系, 采用 qPCR 技术检测 *BMPR1A* 基因在小尾寒羊 14 种组织中的表达特征。同时, 采用 Sequenom MassARRAY[®] SNP 技术对 *BMPR1A* 基因 3 个 SNPs 位点在大群中的多态性进行检测, 并与小尾寒羊产羔数进行关联。qPCR 结果显示, *BMPR1A* 在 14 种组织中均有表达, 其中在大脑、下丘脑和甲状腺组织高表达; *BMPR1A* 在卵泡期和黄体期多羔组下丘脑和卵巢组织表达量均高于单羔组, 但未达到显著水平。分型发现 *BMPR1A* 基因 g.41128335A>T 和 g.41127600C>T 位点在单、多羔绵羊品种间的基因频率和基因型频率达到显著水平。卡方适合性检验结果显示, 3 个 SNPs 在大多数绵羊品种中均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。关联分析结果发现, 3 个 SNPs 多态性与小尾寒羊各胎产羔数均无显著相关, 但 g.41128335A>T 和 g.41127598A>G 位点突变型产羔数基本上均高于野生型。以上结果初步表明, *BMPR1A* 基因表达与小尾寒羊产羔数增加存在一定程度的正相关, 但 3 个 SNPs 与小尾寒羊各胎产羔数均无显著关联, 说明它们可能均不是影响 *BMPR1A* 基因功能的关键位点。

关键词 绵羊; 小尾寒羊; 骨形态发生蛋白受体 1A 基因(*BMPR1A*); 基因表达; 单核苷酸多态性; 产羔数; 高繁殖力基因

中图分类号 S 826.8⁺9 文献标识码 A 文章编号 1000-2421(2020)04-0069-08

绵羊产羔数是一个复杂的数量性状, 受遗传、环境和激素水平等因素的调控, 遗传力低, 若依靠传统育种方法, 效率极低, 每个世代仅可提高 2% 的产羔数^[1]。随着现代生物技术的进步, 对于低遗传力的性状可利用标记辅助选择(marker assisted selection, MAS)来提高其选择效率, 因此, 为分子标记辅助选择提供有效的多态位点, 显得尤为重要。中国农业科学院北京畜牧兽医研究所肉羊遗传育种团队前期对 10 个绵羊品种共 99 个个体进行全基因组重测序, 并按照单、多羔进行分组, 使用 Fst 方法基于 Oar_3.1 版本筛选获得可能与绵羊产羔数相关的基因 *BMPR1A* 和 g.41128225A>T、g.41127598A>G、g.41127600C>T 共 3 个 SNPs 位点^[2]。研究发现, BMPs 在动物体内广泛分布, 在调控哺乳动物

早期胚胎发育、绵羊卵子成熟以及产羔等生理活动中发挥着重要作用^[3], 但 BMPs 须与特异性受体结合才能发挥生物学效应^[4]。Monsivais 等^[5]在小鼠的研究中发现, *BMPR1A* 基因的缺失将导致小鼠不孕。另外, 在人、小鼠、牛以及绵羊的研究发现, *BMPR1A* 基因在卵母细胞和颗粒细胞中均广泛表达^[6-9]。另外, Munehiro 等^[10]发现 *BMPR1A* 为人体毛囊形成和毛发更新所必需; 周丽等^[11]在皖西白鹅中发现 *BMPR1A* 第 8 外显子的一个单核苷酸多态性位点的突变与残脂率、绒朵长等羽绒品质指标显著相关。表明 *BMPR1A* 在毛皮等经济性状中也发挥重要的调控作用。

小尾寒羊为我国优良的地方绵羊品种, 本研究以单羔(*FecB*++型单羔)、多羔(*FecB*++型多羔)

收稿日期: 2019-09-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772580); 农业农村部动物遗传育种与繁殖(家禽)重点实验室开放课题(poultrylab2019-10); 天津市农业科学院青年科研人员创新研究与实验项目(201915); 国家肉羊产业技术体系专项(CARS-38); 中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IAS13); 农业科研杰出人才及其创新团队项目(农办人[2015]62号); 天津市农业科技成果转化与推广项目(201704020)

文禹梁, 博士研究生. 研究方向: 动物分子遗传学. E-mail: Yuliang_Wen@163.com

通信作者: 赵生国, 博士, 教授. 研究方向: 动物遗传资源. E-mail: zhaosg@gsau.edu.cn;

储明星, 博士, 研究员. 研究方向: 羊优异繁殖性状分子机制. E-mail: mxchu@263.net

小尾寒羊为试验材料,利用 qPCR(quantitative real time polymerase chain reaction)技术研究 *BMP1A* 基因在单、多羔小尾寒羊各组织的表达模式。并利用 Sequenom MassARRAY[®] SNP 技术对 3 个 SNPs 位点在大群中分型,再与小尾寒羊产羔数进行关联分析,旨在为更好地阐释绵羊产羔机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 样本采集

试验羊只来自山东省郓城县小尾寒羊种羊场,在经过 *FecB* 分型(*FecB*++型)的 2~3 岁健康的小尾寒羊母羊中,根据产羔记录随机挑选单羔和多羔母羊各 8 只,运输到天津市畜牧兽医研究所种羊场饲养。再从单羔和多羔母羊中各随机选 3 只,实施同期发情试验,操作流程参考文禹梁等^[4]的方法。屠宰后采集心、肝、脾、肺、肾、甲状腺、肾上腺、大脑、小脑、下丘脑、垂体、卵巢、子宫和输卵管共 14 种组织样品。将采集的新鲜组织放入 2 mL 的 RNase-

Free 冻存管并迅速放入液氮罐,后转移至 -80 °C 冰箱贮存备用。

1.2 血液 DNA 和组织 RNA 的提取和检测

绵羊血液 DNA 和组织 RNA 的提取步骤参阅 DNA、RNA 提取试剂盒(北京天根科技有限公司)。检测样本浓度和 OD 值后,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳对 DNA、RNA 质量进行检测。

1.3 目的基因引物设计及 cDNA 合成

根据 GenBank 提供的绵羊 *BMP1A* 编码区序列,利用 Primer Premier 3.0 软件设计跨外显子引物,由北京天一辉远生物科技有限公司合成。引物信息详见表 1。

利用反转录试剂盒(PrimeScript[™] RT Reagent Kit, TaKaRa, 日本)合成 cDNA,反转录反应体系(20 μ L)参照文禹梁等^[4]的方法。全程操作在冰上进行。反应条件为:37 °C 15 min,85 °C 5 s,对反转录产物品质进行鉴定,后将符合标准的 cDNA 保存于 -20 °C 冰箱备用。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in the present study

基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank ID	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物大小/bp Product size	退火温度/°C Annealing temperature	引物用途 Usage
<i>BMP1A</i>	NM_001280714.1	F:CCGTTGTGTACACAGGAGGAAT R:AGACACAATTGGCCGCAAAC	127	60	qPCR
<i>RPL19</i>	XM_004012836.3	F:AATGCCAATGCCAACTC R:CCCTTTCGCTACCTATACC	151	60	内参基因 Reference gene

1.4 实时荧光定量 PCR(qPCR)

荧光定量检测利用 Roche Light Cycler[®] 480 II 型硬广定量 PCR 仪进行。反应体系(20 μ L)和程序参考文禹梁等^[4]的方法。将备用 cDNA 样本 5 倍稀释后,以 2 倍梯度稀释获得稀释倍数为 1~128 倍共 8 个浓度样品用于标准曲线的绘制;用上述 cDNA 作为模板对 *BMP1A* 和 *RPL19* 分别进行 qPCR 分析。

1.5 基因分型

采用 Sequenom Mass ARRAY[®] SNP 技术对 *BMP1A* 基因 g.41128225A>T、g.41127598A>G 和 g.41127600C>T 在不同产羔数的绵羊品种中进行分型。分型样品为 704 个不同品种绵羊血样,包括 83 只湖羊、68 只策勒黑羊、23 只滩羊、70 只苏尼特羊和 80 只草原型藏羊以及有产羔数记录的 380 只小尾寒羊。其中小尾寒羊、湖羊以及策勒黑羊为多羔品种,其他都是单羔品种。分型的具体步骤参考马晓萌等^[12]的方法。分型样品为 40~80 ng/ μ L 的 DNA,每个样品量为 20 μ L。

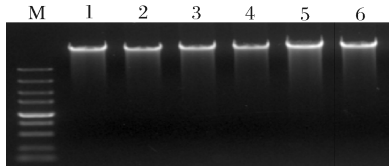
1.6 数据统计与分析

本试验所得目的基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[13]进行计算。利用 SPSS 19.0(IBM,美国)统计软件进行单因素方差分析,并利用最小显著差异(least significant difference, LSD)法进行多重比较。应用 Microsoft Excel 2016(Microsoft Excel,美国)软件统计绵羊 *BMP1A* 基因 3 个 SNPs 位点群体遗传学相关信息,计算公式参考 Guo 等^[14],随后进行哈迪-温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)检测。*BMP1A* 不同基因型与产羔性状的关联性分析模型参考文禹梁等^[4]。

2 结果与分析

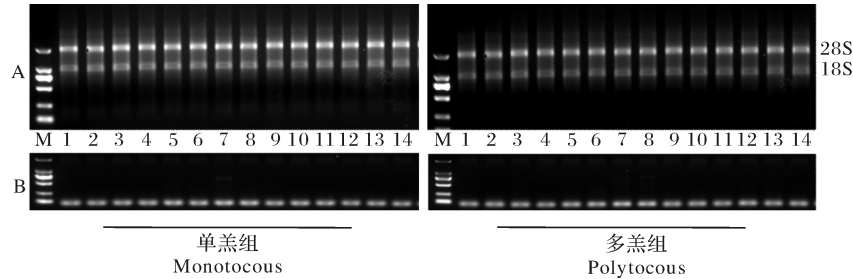
2.1 DNA 检测结果

提取不同品种绵羊血液基因组 DNA,并通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 1 所示。所提出的血液基因组 DNA 条带单一且无杂带,浓度与纯度良好,满足后续试验要求。



M:DL5000 DNA marker; 1:小尾寒羊 Small Tail Han sheep; 2:湖羊 Hu sheep; 3:苏尼特羊 Sunite sheep; 4:策勒黑羊 Cele black sheep; 5:滩羊 Tan sheep; 6:草原型藏羊 Prairie Tibetan sheep.

图 1 不同品种绵羊 DNA 电泳图
Fig.1 Electrophoresis of DNA of different sheep breeds



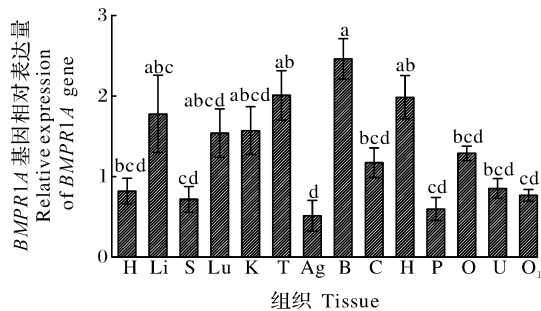
M:DL2000 DNA marker; 1:心脏 Heart ; 2:肝脏 Liver; 3:脾脏 Spleen; 4:肺脏 Lung; 5:肾脏 Kidney; 6:甲状腺 Thyroid; 7:肾上腺 Adrenal gland; 8:大脑 Brain; 9:小脑 Cerebellum; 10:下丘脑 Hypothalamus; 11:垂体 Pituitary; 12:卵巢 Ovary; 13:子宫 Uterus; 14:输卵管 Oviduct.

图 2 小尾寒羊 14 种组织 RNA 电泳(A)及 cDNA(B)检测图

Fig.2 Electrophoresis of RNA(A) and cDNA (B) in 14 tissues of Small Tail Han sheep

2.3 *BMPR1A* 的组织表达

1) *BMPR1A* 基因在卵泡期不同组织间的表达模式。*BMPR1A* 基因组织表达特征如图 3 所示。



H:心脏 Heart; Li:肝脏 Liver; S:脾脏 Spleen; Lu:肺脏 Lung; K:肾脏 Kidney; T:甲状腺 Thyroid; Ag:肾上腺 Adrenal gland; B:大脑 Brain; C:小脑 Cerebellum; H:下丘脑 Hypothalamus; P:垂体 Pituitary; O:卵巢 Ovary; U:子宫 Uterus; O₁:输卵管 Oviduct. 不同小写字母代表差异显著($P < 0.05$)。Different small letters represent significant difference($P < 0.05$).

图 3 *BMPR1A* 基因在小尾寒羊卵泡期各组织中的表达

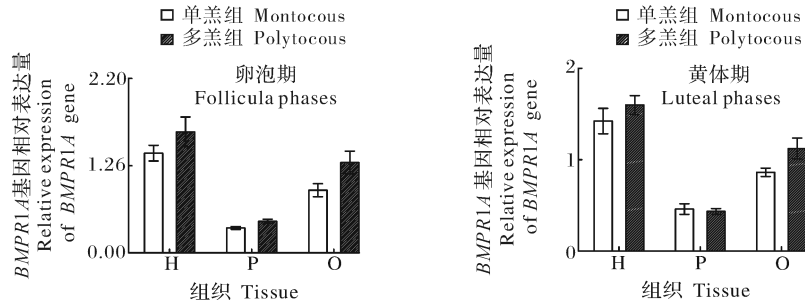
Fig.3 Relative expression of *BMPR1A* gene in various tissues of Small Tail Han sheep in follicular phase

2.2 RNA 检测结果

提取上述 14 种组织总 RNA,并使用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测其质量。如图 2A 所示,提取的组织总 RNA 无明显降解,28S 和 18S 条带清晰可见,灰度值约为 2 : 1。利用 Nanodrop2000 微量分光光度计检测提取 RNA 样本浓度和 OD 值, D_{260} / D_{280} 均在 1.9~2.1,说明提取的 RNA 纯度较高。以反转录之后的 cDNA 为模板对 *RPL19* 基因进行扩增,结果如图 2B 所示,*RPL19* 基因在 14 种组织中扩增效果良好,满足 qPCR 实验要求。

BMPR1A 呈广谱表达,无组织特异性。*BMPR1A* 基因在大脑、下丘脑和甲状腺组织表达量较高,以垂体组织中的 *BMPR1A* 基因 mRNA 的相对表达量作为参照,大脑和下丘脑表达量分别为垂体组织的 4.13 倍和 3.33 倍,均极显著高于垂体表达量($P < 0.01$)。在卵巢、子宫和输卵管组织中表达量分别为垂体组织的 2.16 倍($P = 0.051$)、1.43 倍($P = 0.46$)和 1.29 倍($P = 0.62$)。另外,*BMPR1A* 在甲状腺、肝脏、肺脏和肾脏组织呈现较高水平的表达,但仅甲状腺组织表达量达到显著水平,为垂体组织表达量的 3.37 倍($P < 0.001$)。

2) *BMPR1A* 基因在性腺轴组织间的表达模式。对不同情期单羔组和多羔组小尾寒羊下丘脑-垂体-卵巢性腺轴组织进行定量分析,结果如图 4 所示。*BMPR1A* 在卵泡期多羔组下丘脑、垂体和卵巢中表达量均高于单羔组;在黄体期下丘脑和卵巢组织中,*BMPR1A* 基因在多羔组表达量也高于单羔组,在垂体组织中单羔组表达量则高于多羔组,但均未达到显著水平($P > 0.05$)。



H: 下丘脑 Hypothalamus; P: 垂体 Pituitary; O: 卵巢 Ovary.

图 4 *BMPR1A* 基因在小尾寒羊性腺轴组织中的表达

Fig.4 Relative expression of *BMPR1A* gene in gonadal axis tissues of Small Tail Han sheep

2.4 *BMPR1A* 基因多态性

BMPR1A 基因 g.41128335A>T(图 5A)、g.41127598A>G(图 5B)、g.41127600C>T(图 5C) 位点可能存在突变纯和致死现象,因此只存在 2 种分型结果如图 5 所示。以 g.41127600C>T 为例, 基因型,分别为杂合型 AT 和野生纯合型 AA。

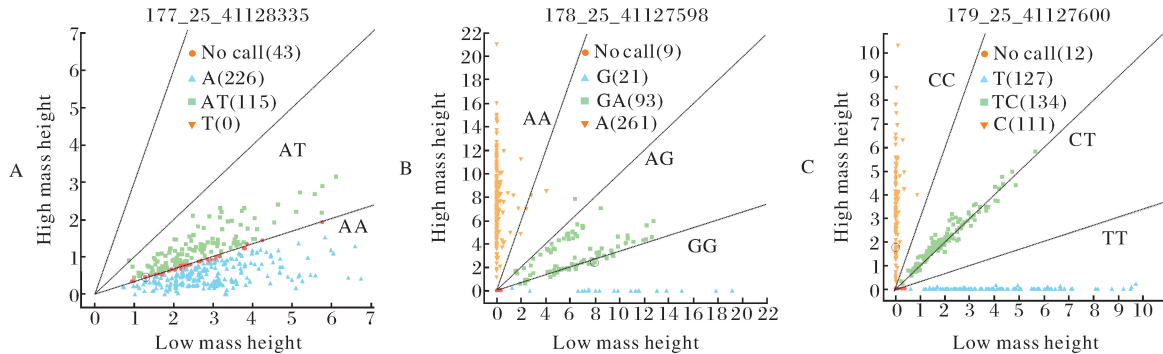


图 5 *BMPR1A* 基因分型结果

Fig.5 Genotyping of *BMPR1A*

表 2 *BMPR1A* 基因不同 SNPs 位点在单、多羔绵羊品种中的基因型频率和等位基因频率

Table 2 Genotype and allele frequencies of different SNPs of *BMPR1A* gene in monotocous and polytoeous sheep breeds

位点 Locus	基因型 Genotype	基因型频率(样本数) Genotype frequency(Number)		卡方检验 χ^2 test (P value)	等位基因 Allele	基因频率 Allele frequency		卡方检验 χ^2 test (P value)
		单羔 Monotocous	多羔 Polytoeous			单羔 Monotocous	多羔 Polytoeous	
g.41128335A>T	AA	0.62(105)	0.88(431)	0.00	A	0.81	0.94	0.00
	AT	0.38(65)	0.12(59)					
	TT	—	—					
g.41127598A>G	AA	0.68(112)	0.66(337)	0.35	A	0.80	0.77	0.26
	AG	0.25(41)	0.23(118)					
	GG	0.07(12)	0.11(57)					
g.41127600C>T	CC	0.35(57)	0.23(120)	0.01	C	0.54	0.44	0.00
	CT	0.38(63)	0.42(219)					
	TT	0.27(45)	0.35(181)					

注: $P < 0.05$ 表示差异显著 Note: $P < 0.05$ indicates the difference was significant.

由表 2 可知, *BMPR1A* 基因 g.41128335A>T 基因频率和等位基因频率达到显著水平 ($P < 0.05$), 而 g.41127598A>G 位点未达到显著水平。

表 3 *BMPRI1A* 基因不同 SNPs 位点在 7 个绵羊品种中的群体遗传学分析
Table 3 Population genetic analysis of different SNPs of *BMPRI1A* gene in 7 sheep breeds

位点 Locus	品种 Breed	基因型 频率 Genotype frequency			等位基 因频率 Allele frequency		多态信息 含量(PIC) Polymorphism information content	杂合度 Heterozygosity (H_E)	有效等位 基因数 Effective number of allele (N_E)	卡方检验 (P 值) χ^2 test (P value)
		AA	AT	TT	A	T				
g.41128335A>T	小尾寒羊 Small Tail Han sheep	0.90	0.10	0.00	0.95	0.05	0.09	0.09	1.10	0.34
	湖羊 Hu sheep	0.57	0.43	0.00	0.78	0.22	0.28	0.34	1.51	0.05
	策勒黑羊 Cele black sheep	0.77	0.23	0.00	0.89	0.11	0.18	0.20	1.25	0.55
	滩羊 Tan sheep	0.87	0.13	0.00	0.94	0.06	0.11	0.12	1.14	0.59
	苏尼特羊 Sunite sheep	0.27	0.73	0.00	0.64	0.36	0.36	0.46	1.86	0.00
	草原型藏羊 Prairie Tibetan sheep	0.94	0.06	0.00	0.97	0.03	0.06	0.06	1.07	0.77
			AA	AG	GG	A	G			
g.41127598A>G	小尾寒羊 Small Tail Han sheep	0.64	0.22	0.14	0.75	0.25	0.30	0.37	1.58	0.00
	湖羊 Hu sheep	0.55	0.40	0.05	0.75	0.25	0.30	0.37	1.59	0.58
	策勒黑羊 Cele black sheep	0.87	0.05	0.08	0.90	0.10	0.17	0.19	1.23	0.00
	滩羊 Tan sheep	0.70	0.22	0.08	0.80	0.20	0.27	0.31	1.46	0.14
	苏尼特羊 Sunite sheep	0.80	0.19	0.01	0.89	0.11	0.17	0.19	1.24	0.82
	草原型藏羊 Prairie Tibetan sheep	0.69	0.30	0.01	0.84	0.16	0.24	0.27	1.37	0.36
			CC	CT	TT	C	T			
g.41127600C>T	小尾寒羊 Small Tail Han sheep	0.23	0.45	0.32	0.46	0.54	0.37	0.50	1.98	0.11
	湖羊 Hu sheep	0.06	0.45	0.49	0.28	0.72	0.32	0.41	1.69	0.40
	策勒黑羊 Cele black sheep	0.46	0.19	0.35	0.56	0.44	0.37	0.49	1.98	0.00
	滩羊 Tan sheep	0.32	0.41	0.27	0.52	0.48	0.37	0.50	2.00	0.40
	苏尼特羊 Sunite sheep	0.17	0.37	0.46	0.36	0.64	0.35	0.46	1.86	0.10
	草原型藏羊 Prairie Tibetan sheep	0.49	0.36	0.15	0.67	0.33	0.35	0.44	1.80	0.09

注: $P > 0.05$ 表示位点在该品种中处于哈代温伯格平衡状态。Note: $P > 0.05$ indicates that the locus is in Hardy-Weinberg equilibrium.

对 *BMPRI1A* 基因不同 SNPs 位点在 7 个绵羊品种中的群体遗传学分析发现(表 3), g.41128335A>T 位点在小尾寒羊、策勒黑羊、滩羊以及草原型藏羊品种中处于低度多态($PIC < 0.25$), 在湖羊和苏尼特羊中处于中度多态($0.25 < PIC < 0.5$); g.41127598A>G 位点在策勒黑、苏尼特和草原型藏羊品种中处于低度多态($P < 0.25$), 在小尾寒羊、湖羊和滩羊品种中处于中度多态($0.25 < PIC < 0.5$); g.41127600C>T 位点在所有绵羊品种中均处于中度多态($0.25 < PIC < 0.5$)。卡方检验结果表明, 除了苏尼特羊的 g.41128335A>T 位点和小尾寒羊、策勒黑羊的

g.41127598A>G 位点以及策勒黑羊的 g.41127600C>T 位点外, 其余位点在各品种中均处于哈代温伯格平衡状态($P > 0.05$)。

2.5 *BMPRI1A* 基因多态位点与小尾寒羊产羔数的关系

由表 4 得知, *BMPRI1A* 基因 3 个 SNPs 位点与小尾寒羊产羔数均无显著相关($P > 0.05$)。但在 g.41128335A>T 和 g.41127598A>G 位点中, 突变型产羔数均高于杂合型和野生型, 而 g.41127600C>T 位点的突变型则低于杂合型和野生型产羔数。

表 4 *BMPR1A* 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Table 4 Least squares means and standard errors of litter size of different genotypes of SNPs of *BMPR1A* gene in Small Tail Han sheep

位点 Locus	基因型 Genotype	第一胎 First parity		第二胎 Second parity		第三胎 Third parity	
		样本数 Number	产羔数(LSM±SE) Litter size	样本数 Number	产羔数(LSM±SE) Litter size	样本数 Number	产羔数(LSM±SE) Litter size
g.41128335A>T	AA	322	1.87±0.04	194	2.12±0.06	79	2.38±0.74
	AT	34	2.00±0.11	19	2.21±0.18	4	2.50±0.58
	TT	—	—	—	—	—	—
g.41127598A>G	AA	238	1.85±0.04	145	2.11±0.62	63	2.43±0.11
	AG	48	1.88±0.10	27	2.30±0.14	14	2.43±0.23
	GG	83	1.98±0.07	48	2.45±0.11	12	2.58±0.25
g.41127600C>T	CC	86	1.93±0.07	48	2.19±0.11	11	2.73±0.25
	CT	119	1.82±0.06	72	2.18±0.09	37	2.55±0.14
	TT	171	1.87±0.05	105	2.02±0.07	41	2.46±0.13

注:—表示该位点在大群中不存在该基因型。Note:— means the genotype does not exist in sheep.

3 讨论

3.1 *BMPR1A* 基因在哺乳动物组织中的表达和功能

BMPR1A 作为 BMP/SMAD 信号通路 I 型受体,可与不同类型配体特异性结合,在哺乳动物胚胎发育期垂体前叶的形成、卵巢颗粒细胞的发育和多功能干细胞的增殖和分化等方面发挥着重要的作用^[15-17]。本研究发现 *BMPR1A* 基因在小尾寒羊 14 种组织呈广谱表达无组织特异性,说明其对小尾寒羊各个器官发挥正常的生理功能起重要作用。卵巢是重要的生殖器官,可直接影响卵泡发育、排卵等生理过程。另外, Rajesh 等^[18] 研究发现,在水牛卵巢颗粒细胞和卵泡膜细胞中均可检测到 *BMPR1A* 基因的表达,并且根据卵泡直径和 E_2 含量将卵泡分为 4 种类型,发现在优势卵泡(直径 $d > 13$ mm, E_2 含量 > 180 ng/mL)颗粒细胞和卵泡膜细胞中的 mRNA 是其他卵泡类型的 1.5~2.0 倍。另外, Costa 等^[19] 在山羊卵巢中测得 *BMPR1A* 在直径为 0.2 mm 卵泡的 mRNA 表达水平高于 0.1 mm 的卵泡,这也说明 *BMPR1A* 在卵泡发育方面发挥着积极的作用。本研究发现, *BMPR1A* 基因在卵泡期和黄体期多羔组卵巢组织表达量均高于单羔组,表明该基因可能积极参与调控卵巢功能,在多羔组卵巢组织的高表达也预示着其在卵泡发育过程发挥着不可或缺的作用,并且与小尾寒羊多羔性状存在一定的联系。另外,在胚胎发育方面, *BMPR1A* 同样也发挥着积极作用。Miura 等^[20] 在小鼠胚胎体外培养的试验中发现, *BMPR1A* 对小鼠内脏内胚层 (anterior visceral endoderm, AVE) 的迁移起决定性作用, *BMPR1A* 基因缺失的小鼠因不能诱导中胚层

的生成而于胚胎期死亡^[21-22]。在印度绵羊中, Goyal 等^[23] 研究结果显示 *BMPR1A* 在高繁殖力组卵巢组织中的表达量显著高于低繁殖力组,与本研究 *BMPR1A* 在卵泡期和黄体期多羔组卵巢组织中的表达量均高于单羔组结果相符,这也再次表明 *BMPR1A* 基因的表达与小尾寒羊多羔性状存在一定的联系。

3.2 *BMPR1A* 基因多态性与产羔数的关系

BMPR1A 基因 3 个 SNPs 位点均位于绵羊 25 号染色体第 8 号内含子上。3 个位点均为内含子突变,未引起氨基酸的改变。但内含子突变也可能控制基因转录活性并影响目的基因的功能。关于内含子变异影响目的基因功能和表型的报道有很多。秦川牛 *TRAF6* 基因第六内含子 17 628 bp 处 T→C 的突变与其体质量和体尺等生长性状显著相关 ($P < 0.05$); 小尾寒羊 *SMAD1* 基因第 5 内含子 (g.12487190G>T) 的突变与产羔数显著相关 ($P < 0.05$)^[24]。桑林华等^[25] 研究发现, *BMPR1A* 基因在高繁殖力(小尾寒羊、湖羊)和低繁殖力(多赛特羊、特克赛尔羊、德国肉用美利奴羊)绵羊品种中共检测出 AA、AB 和 BB 3 种基因型,与产羔数关联分析发现 AB 型小尾寒羊产羔数比 AA 型多 0.15 只,但差异不显著 ($P > 0.05$)。本研究发现 g.41128335A>T 和 g.41127600C>T 位点在单、多羔绵羊品种间的基因频率和等位基因频率达到显著差异水平 ($P < 0.05$),初步表明这些位点可能与绵羊的产羔数相关;并且 3 个 SNPs 位点在不同绵羊品种中表现出不同的选择潜力,这可能是由于某些绵羊品种遗传资源的匮乏,也可能与各绵羊品种样本量不同有关。与产羔数关联分析发现, g.41128335A>T 和 g.41127598A>G 位点的突变型产羔数均高于野

生纯合型,这与桑林华等^[25]的研究结果相符。而g,41127600C>T位点的突变型产羔数则低于杂合型和野生纯合型。因此,本研究推测 *BMPR1A* 基因3个SNPs位点对产羔数有一定的影响,可为更好地阐释绵羊产羔机制奠定基础。

参考文献 References

- [1] MIAO X, LUO Q. Genome-wide transcriptome analysis between Small-tail Han sheep and the Surabaya fur sheep using high-throughput RNA sequencing[J]. *Reproduction*, 2013, 145(6): 587-596.
- [2] PAN Z, LI S, LIU Q, et al. Whole-genome sequences of 89 Chinese sheep suggest role of RXFP2 in the development of unique horn phenotype as response to semi-feralization[J]. *Giga science*, 2018, 7(4): 1-15.
- [3] TAN S, FENG B, YIN M, et al. Stromal *Senp1* promotes mouse early folliculogenesis by regulating *BMP4* expression[J/OL]. *Cell Biosci*, 2017, 7(1): 36 [2019-09-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28770041/>. DOI: 10.1186/s13578-017-0163-5.
- [4] 文禹梁, 王翔宇, 郭晓飞, 等. 不同产羔数小尾寒羊 *BMP4* 基因表达及其错义突变与产羔数关联分析[J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27(1): 80-88. WEN Y L, WANG X Y, GUO X F, et al. *BMP4* gene expression in Small Tail Han Sheep (*Ovis aries*) with different litter size and association analysis between its missen mutation and litter size[J]. *Journal of agricultural biotechnology*, 2019, 27(1): 80-88(in Chinese with English abstract).
- [5] MONSIVAIS D, CLEMENTI C, PENG J, et al. Uterine *ALK3* is essential during the window of implantation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(3): E387-E395.
- [6] MOHAMAD K, JULIA M, ANTOINE B, et al. BMP system expression in GCs from polycystic ovary syndrome women and the *in vitro* effects of *BMP4*, *BMP6*, and *BMP7* on GC steroidogenesis[J]. *Eur J Endocrinol*, 2013, 168(3): 437-444.
- [7] SELVARAJU S, FOLGER J K, GUPTA P. Stage-specific expression and effect of bone morphogenetic protein 2 on bovine granulosa cell estradiol production: regulation by cocaine and amphetamine regulated transcript[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2013, 44(3): 115-120.
- [8] LIMA I M T, ROSSETTO R, DUARTE A B G, et al. *BMPRI*B 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.
- [9] SOUZA C J, MACDOUGALL C, MACDOUGALL C, et al. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (*BMPRI1B*) gene[J]. *J Endocrinol*, 2001, 169(2): R1-R6.
- [10] MUNEHIRO Y, MASAHISA Y, MASAKO K, et al. *BMPRI1A* signaling is necessary for hair follicle cycling and hair shaft differentiation in mice[J]. *Development*, 2004, 131(8): 1825-1833.
- [11] 周丽, 夏婷婷, 陈兴勇, 等. 皖西白鹅 *BMPRI1A* 基因多态性及其与羽绒性状的关联分析[J]. *江西农业大学学报*, 2014, 36(4): 828-832. ZHOU L, XIA T T, CHEN X Y, et al. A study on SNPs expression of *BMPRI1A* and its association with down traits in Wanxi- white goose[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2014, 36(4): 828-832(in Chinese with English abstract).
- [12] 马晓萌, 轩俊丽, 王慧华, 等. *TXNRD1* 基因多态性与乌珠穆沁绵羊生长性状的关联分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(5): 909-921. MA X M, XUAN J L, WANG H H, et al. *TXNRD1* gene polymorphisms and its association with growth traits in Ujumqin sheep[J]. *Chinese journal of animal and veterinary sciences*, 2016, 47(5): 909-921 (in Chinese with English abstract).
- [13] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [14] GUO X F, HU W P, DI R, et al. Two single nucleotide polymorphisms sites in $\alpha 1$ -AT gene and their association with somatic cell score in Chinese Holstein cows[J/OL]. *J Biol Res-thesalon*, 2017, 24(1): 8 [2019-09-10]. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1186/s40709-017-0065-z.pdf>. DOI: 10.1186/s40709-017-0065-z.
- [15] BERNARD V, VILLA C, AUGUSTE A, et al. Natural and molecular history of prolactinoma: insights from a *Prlr*^{-/-} mouse model[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(5): 6144-6155.
- [16] YANG S, YUAN Q, NIU M, et al. *BMP4* promotes mouse iPS cell differentiation to male germ cells via *Smad1/5*, *Gata4*, *Id1* and *Id2*[J]. *Reproduction*, 2017, 153(2): 211-220.
- [17] KIM S Y. Insights into granulosa cell tumors using spontaneous or genetically engineered mouse models[J]. *Clin Exp Reprod Med*, 2016, 43(1): 1-8.
- [18] RAJESH G, MISHRA S R, PAUL A, et al. Transcriptional and translational abundance of bone morphogenetic protein (BMP) 2, 4, 6, 7 and their receptors *BMPRI1A*, *1B* and *BMPRI2* in buffalo ovarian follicle and the role of *BMP4* and *BMP7* on estrogen production and survival of cultured granulosa cells[J]. *Res Vet Sci*, 2018, 118: 371-388.
- [19] COSTA J J, PASSOS M J, LEITÃO C C, et al. Levels of mRNA for bone morphogenetic proteins, their receptors and SMADs in goat ovarian follicles grown *in vivo* and *in vitro*[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2012, 24(5): 723-732.
- [20] MIURA S, SINGH A P, MISHINA Y. *Bmpr1a* is required for proper migration of the AVE through regulation of *Dkk1* expression in the pre-streak mouse embryo[J]. *Dev Biol*, 2010, 341(1): 246-254.
- [21] HIRSCHHORN T, LEVI-HOFMAN M, DANZIGER O, et al. Differential molecular regulation of processing and membrane expression of type-I BMP receptors: implications for signaling[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(14): 2645-2662.
- [22] 肖朝庭, 储明星, 傅衍. 骨形态发生蛋白及其受体在哺乳动物繁殖中的作用[J]. *中国畜牧兽医*, 2006, 33(7): 9-13. XIAO C T,

- CHU M X, FU Y. Roles of bone morphogenetic proteins and their receptors in mammalian reproduction[J]. China animal husbandry and veterinary medicine, 2006, 33(7): 9-13 (in Chinese with English abstract).
- [23] GOYAL S, AGGARWAL J, DUBEY P K, et al. Expression analysis of genes associated with prolificacy in FecB carrier and noncarrier Indian sheep[J]. Anim Biotechnol, 2017, 28(3): 220-227.
- [24] 田志龙, 汤继顺, 孙庆, 等. 绵羊 SMAD1 基因组织表达及其多态性与产羔数关联分析[J]. 中国农业科学, 2019, 52(4): 755-766.
- TIAN Z L, TANG J S, SUN Q, et al. Tissue expression and polymorphism of sheep SMAD1 gene and their association with litter size[J]. Scientia agricultura sinica, 2019, 52(4): 755-766 (in Chinese with English abstract).
- [25] 桑林华, 储明星, 王金玉, 等. 绵羊高繁殖力候选基因 *BMPR1A* 的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(9): 852-857.
- SANG L H, CHU M X, WANG J Y, et al. Bone morphogenetic protein receptor 1A as a candidate gene for prolificacy of sheep[J]. Chinese journal of animal and veterinary sciences, 2006, 37(9): 852-857 (in Chinese with English abstract).

Tissue expression of *BMPR1A* gene and association analysis of polymorphism with litter size in sheep (*Ovis aries*)

WEN Yuliang^{1,2}, GUO Xiaofei³, MA Lin¹, ZHANG Xiaosheng³,
ZHANG Jinlong³, ZHAO Shengguo², CHU Mingxing¹

1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences/
Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100193, China;

2. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

3. Tianjin Institute of Animal Sciences, Tianjin 300381, China

Abstract To investigate the expression of *BMPR1A* in various tissues during different physiological periods (follicular and luteal phases) and in ewes of different fecundity (monotocous and polytocous), and to analyze the association of its polymorphism with litter size in Small Tail Han (STH) sheep, qPCR was used to detect the expression of *BMPR1A* in 14 tissues in STH sheep, meanwhile, Sequenom MassARRAY[®] SNP assay was applied to genotype three single nucleotide polymorphism sites (SNPs) of *BMPR1A* gene in different sheep breeds, and then the association between the *BMPR1A* polymorphism and litter size in STH sheep was analyzed. The results showed that the expression of *BMPR1A* in hypothalamus and ovary of polytocous ewes was higher than that of monotocous ewes, but did not reach a significant level ($P > 0.05$). From genotyping, the genotype and allele frequencies of g.41128335A>T and g.41127600C>T loci of *BMPR1A* were significantly different ($P < 0.05$) between polytocous and monotocous sheep breeds. The χ^2 test indicated that the three SNPs were under Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$) in most of the sheep breeds. Association analysis showed that three loci of *BMPR1A* gene had no significant association with the litter size of different groups of STH sheep ($P > 0.05$), and the litter size of mutation was higher than that of wild for g.41128335A>T and g.41127598A>G loci. Therefore, we concluded that there may be a certain positive correlation between the expression of *BMPR1A* gene and litter size in STH sheep, but the three SNPs had no significant association with the litter size of STH sheep, which indicated they may not be the key loci that affect the expression or function of *BMPR1A*.

Keywords sheep; Small Tail Han sheep; bone morphogenetic protein receptor 1A gene; gene expression; single nucleotide polymorphism; litter size; high fecundity gene