

优良的 BMPR-IB 基因型可提高 绵羊冷冻胚胎的受胎效果*

姚玉昌¹⁾ 田亮¹⁾ 韩红兵¹⁾ 陈学辉¹⁾ 陆明海³⁾
郭鹏程³⁾ 张超峰³⁾ 李 宁²⁾ 连正兴^{1,2)**} 李 武^{3)**}

(¹⁾中国农业大学动物科学技术学院, 北京 100094; ²⁾农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094;

³⁾东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030)

摘要 以控制 Booroola Merino 羊高繁殖力的 BMPR-IB 基因为候选基因, 以小尾寒羊及其杂交羊、东北半细毛羊、澳洲美利奴羊、德国肉用美利奴羊、萨福克羊、特克塞尔羊、夏洛莱羊为试验对象, 采用 PCR-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 方法进行基因单核苷酸多态性 (SNP) 检测和基因型分析, 同时研究基因对高繁殖力的影响. 研究表明: 小尾寒羊及其杂交羊、东北半细毛羊和夏洛莱羊群体中发现了与 Booroola Merino 羊相同的 A746G 碱基突变, 而小尾寒羊及其杂交羊群体的 B 等位基因频率明显高于其他 2 个品种. 另外 4 个品种中未发现此突变. 携带 B 等位基因的群体较非携带 B 等位基因群体排出更多的卵子, 排卵后黄体直径较小. 移植入冷冻胚胎后, ++、B+ 和 BB 3 种基因型群体的妊娠率分别为 38.78%、45.71% 和 66.67%. 由此推断, BMPR-IB 基因突变很有可能从增加卵巢排卵数和提高胚胎着床及妊娠建立效率两个方面同时影响绵羊高繁殖力性状. 所得 BB 型群体冻胚移植妊娠率明显高于 ++ 和 B+ 型群体, 已接近鲜胚移植水平, 通过 PCR-RFLP 方法进行基因型分析, 选用合适基因型群体作为胚胎移植受体, 有可能为提高绵羊胚胎移植受胎率提供新的方向.

关键词 绵羊, 高繁殖力, BMPR-IB 基因, 冷冻胚胎, 受胎率

学科分类号 S814.4

近年来, 对绵羊多胎性状分子标记的研究已引起国内外动物遗传育种界的普遍重视, 其中以控制 Booroola Merino 羊高排卵数及高产羔数的 Booroola 基因研究最为广泛和深入. 国外学者在研究 Booroola Merino 羊高繁殖力时发现, 其高排卵率和产羔数是由于携带 Booroola 基因所致, 该基因对排卵数呈加性效应, 对产羔数呈部分显性效应. 1 个拷贝的多胎主基因增加排卵数 1.3~1.6 个, 增加产羔数 0.9~1.2 个; 2 个拷贝增加排卵数 2.7~3.0 个, 增加产羔数 1.1~1.7 个. 此基因属于常染色体遗传, 通常认为这一遗传突变是由点突变、重复或缺失引起的^[1,2].

2001 年 Wilson、Souza 和 Mulsant 等学者几乎同时发现, 位于绵羊 6 号染色体上的骨形态发生蛋白 IB 型受体基因 (bone morphogenetic protein receptor-IB gene, BMPR-IB) 与 FecB 基因密切相关, 证明其中 249R 即为 FecB^B 等位基因, 并分析其可能的作用机理为: BMPR-IB 基因的配体

(GDF-5、BMP-4) 对绵羊颗粒细胞分泌孕酮具有强烈的抑制作用, 由于该基因编码区 A746G 碱基突变而导致了氨基酸序列的 Q249R 变化, 导致基因部分功能失活, 从而降低了其配体对颗粒细胞分泌孕酮的抑制作用, 促进颗粒细胞分化和卵泡成熟, 导致排卵数增加^[3~6]. Campbell 等^[7] (2003 年) 采用抑制内源性促性腺激素的作用, 并同时用相同水平外源促性腺激素作用于卵巢, 结果表明: 携带 B 等位基因群体仍然表现为高排卵率和较小的卵泡直径, 从而认为, BMPR-IB 基因突变是通过提高卵泡细胞对促性腺激素的敏感性而实现其生物学效应. 目前, 确切的作用机理还在进一步研究中.

*农业结构调整重大技术专项资助项目 (05-07-04B).

** 通讯联系人.

连正兴. Tel: 010-62732681, Fax: 010-62732463,

E-mail: lianzhx@cau.edu.cn

李武. Tel: 0451-55107855, E-mail: liwu@neau.edu.cn

收稿日期: 2006-05-18, 接受日期: 2006-06-30

本研究以小尾寒羊及其杂交羊、东北半细毛羊、澳洲美利奴羊、德国肉用美利奴羊、萨福克羊、特克塞尔羊和夏洛莱羊为实验材料, 采用 PCR- 限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 方法进行单核苷酸多态性 (SNP) 检测和基因型分析, 通过腹腔内窥镜直接观察卵巢上的排卵数量及黄体直径, 并统计不同基因型绵羊移植入外源冷冻胚胎后的移植妊娠率, 旨在从两个不同角度进一步探讨 **BMPR-IB** 基因对绵羊高繁殖力的影响机制, 为更好地利用 **BMPR-IB** 基因提供理论依据和新的思路。

1 材料和方法

1.1 组织样本采集与处理

采集了胎次为 3 胎的经产、健康母羊共计 391 只, 其中小尾寒羊及其杂交羊(112 只)取自哈尔滨市爱地公司, 东北半细毛羊(185 只)取自牡丹江龙大羊场, 澳洲美利奴羊(25 只)、萨福克羊(18 只)、特克塞尔羊(15 只)取自黑龙江省胚胎中心, 德国肉用美利奴羊(24 只)、夏洛来羊(12 只)取自绥化市种畜场。取耳部组织样, 酚、氯仿抽提法提取基因组 DNA, 溶于 TE 缓冲液中, -20°C 保存。

1.2 引物设计

为便于大规模样品中的 A746G 突变体检测, 本研究参照 Wilson 等^[9](2001 年)的引物设计, 采用强制产生限制性酶切位点的方式, 使突变个体的 PCR 产物产生一个 *Ava* II 酶切位点, 而野生型个体不存在此位点。引物由上海生工生物工程公司合成, 序列为: FecBR 5' GTC GCT ATG GGG AAG TTT GGA TG 3'; FecBF 5' CAA GAT GTT TTC ATG CCT CAT CAA CAC GGT C 3'。

1.3 PCR 扩增

PCR 反应体系包括: 10×缓冲液 2.5 μl 、dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μl 、FecBR (10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μl 、FecBF (10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μl 、Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μl) 0.3 μl 、基因组 DNA (50 mg/L) 1.5 μl 、灭菌水 16.7 μl 。最佳反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 30 s, 62°C 30 s, 72°C 30 s, 35 个循环; 72°C 延伸 7 min。

PCR 产物经 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 取目标条带亮度合适且无杂带的产物进行下一步酶切鉴定。

1.4 酶切鉴定

酶切反应体系包括: PCR 产物 3.0 μl 、10×缓冲液 1.0 μl 、*Ava* II 内切酶(10 U/ μl) 0.5 μl 、灭菌

水 5.5 μl 。酶切条件为 37°C 水浴中反应 3 h。酶切产物经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 判定基因型。

1.5 数据获取

在发情季节里, 对所有供试羊埋植氟孕酮阴道栓(含氟孕酮 30IU) 进行同期发情处理。于埋植后第 12 天取出阴道栓, 第 18 天时利用腹腔内窥镜观察并记录母羊卵巢上的排卵数、黄体直径, 对符合胚胎移植受体标准的羊子宫内移入进口冷冻胚胎, 记录移植后妊娠率。

1.6 数据处理

根据试验群体特点, 构建以下线性模型进行最小二乘分析: $Y = \mu + G + L + H + e$ 。其中: Y 代表卵巢排卵数及其黄体直径的记录值; μ 代表群体的平均值; G 代表基因型固定效应; L 代表品种固定效应; H 代表场年季固定效应; e 代表随机残差效应。数据分析软件为 SAS 6.12 软件包。

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果

PCR 预扩增片段长度为 140 bp, 经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增产物与预扩增片段大小一致, 可以进行 RFLP 分析(图 1)。

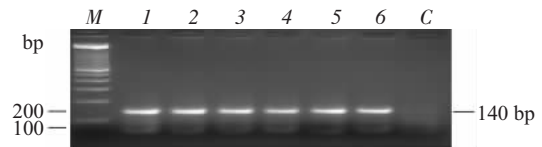


Fig. 1 PCR products of **BMPR-IB** gene

M: Marker (100 bp ladder); 1~6: PCR product; C: Control.

2.2 PCR-RFLP 检测结果

PCR 扩增产物经 *Ava* II 内切酶酶切后, 经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果产生 3 种基因型(图 2)。BMPR-IB 基因 746 位点为 G 时(ggacc), 会产生限制性内切酶 *Ava* II 的酶切位点, PCR 产物经酶切后会产生 2 个片段 (110 bp 和 30 bp), 此基因型为 BB 型; 当 746 位点为 A 时(agacc), 不会产生 *Ava* II 的酶切位点, PCR 产物经酶切后只会有 1 个

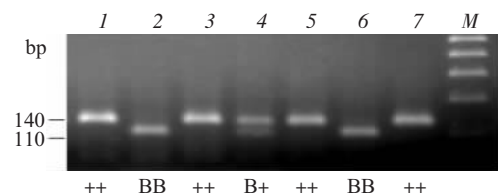


Fig. 2 PCR-RFLP result of **BMPR-IB** gene

M: Marker (100 bp ladder); 1~7: Digestion product.

片段(140 bp), 此基因型为 ++ 型; 当 746 位点为 G/A 时(g/agacc), PCR 产物经酶切后会有 3 个片段 (140 bp、110 bp 和 30 bp), 此基因型为 B+ 型.

2.3 BMPR-IB 基因在不同绵羊品种中的基因频率和基因型频率分析

根据 PCR-RFLP 检测结果, 分析了不同绵羊品种中 BMPR-IB 基因频率和基因型频率, 统计结果见表 1. 在国外引进肉用羊品种中, 只在夏洛莱

羊群体中检测到 B+ 型频率为 0.17, B 等位基因频率为 0.08, 其余品种(澳洲美利奴羊、德国肉用美利奴羊、萨福克羊、特克塞尔羊)所检测个体皆为 ++ 基因型, B 等位基因频率为 0; 东北半细毛羊群体中, 检测到 B+ 型频率为 0.03, BB 型频率为 0, B 等位基因频率为 0.02; 在小尾寒羊及其杂交羊群体中检测到 BB 型频率为 0.11、B+ 型频率为 0.56, B 等位基因频率为 0.39.

Table 1 The frequency of genotype and allele among different sheep breeds

Breed	No.	Genotype frequency			Gene frequency	
		BB	B+	++	B	+
Australian Merino sheep	25	0	0	1(25)	0	1
German Mutton Merino sheep	24	0	0	1(24)	0	1
Suffork sheep	18	0	0	1(18)	0	1
Texel sheep	15	0	0	1(15)	0	1
Charolais sheep	12	0	0.17 (2)	0.83 (10)	0.08	0.92
Small Tail Han sheep and Its Crosses	112	0.11(12)	0.56(63)	0.33(37)	0.39	0.61
Northeastern Half-fuzz sheep	185	0	0.03(6)	0.97(179)	0.02	0.98

The numbers in parenthesis are the detected numbers.

2.4 BMPR-IB 基因不同基因型群体的排卵数及黄体直径比较

图 3 结果表明: BMPR-IB 基因 BB 型群体的排卵数明显高于 B+ 型、++ 型群体的排卵数, 差异较显著 ($P < 0.01$); BMPR-IB 基因 BB 型和 B+ 型群体所对应的黄体直径小于 ++ 型群体所对应黄体直径, 差异显著 ($P < 0.05$), 而 BB 型和 B+ 型群体的黄体直径之间无显著差异 ($P > 0.05$).

2.5 BMPR-IB 基因不同基因型群体移植入冷冻胚胎后的移植妊娠率

不同基因型群体移入冷冻胚胎后表现出不同的移植后妊娠率, 结果见表 2. B+ 型群体移植后妊娠率为 45.71%, 高于 ++ 型群体 7%; BB 型群体则高于 B+ 群体 10%, 达到了 66.67%. 突变型纯合子的冷冻胚胎妊娠率接近了鲜胚移植的妊娠率.

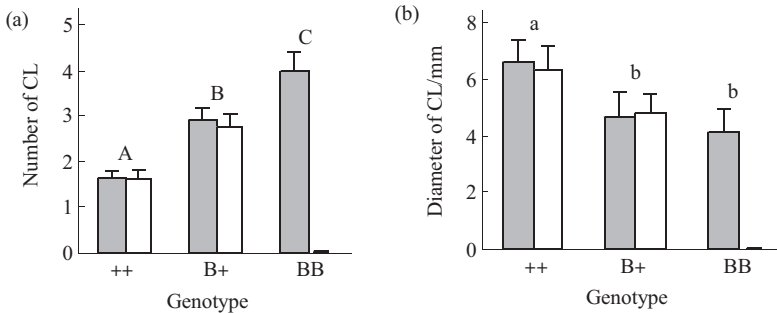


Fig. 3 Least squares mean for ovulation rate (a) and diameter (b) of corpora lutea of different BMPR-IB genotype

■: Small tail han sheep and its crosses; □: Northeastern Half-fuzz sheep. A-B-C: Least squares means with no common letter differ significantly ($P < 0.01$); a-b: Least squares means with no common differ significantly ($P < 0.05$).

Table 2 The pregnant rates of freezed embryo of different BMPR-IB genotypes after being transferred

Genotype	No.	Pregnant rate
++	49	38.78(19/49)
B+	35	45.71(16/35)
BB	6	66.67(4/6)

3 讨 论

BMPR-IB基因编码一个转化生长因子β亚基(TGFβ)受体家族成员,为BMP(bone morphogenetic protein)和GDF(growth and differentiation factors)配体的一种I型受体,从昆虫到哺乳动物的很多组织中都有分布,是具有调节生长和发育等重要功能的蛋白质^[8]. BMPR-IB基因在绵羊的雌、雄性生殖系统中都有所表达,如卵巢、睾丸、子宫和前列腺等,并且在脑、骨骼肌和肾脏中也有一定程度的表达^[9]. Mulsant等^[9]研究绵羊BMPR-IB基因时发现4处突变点:其中基因的3'非翻译区存在2处突变;编码区1113碱基存在1处突变,但此突变未造成氨基酸的改变,属同义突变;在编码区746碱基处发生A→G突变,该突变点导致野生型的谷氨酰胺变为精氨酸(Q249R)变化,导致基因部分功能失活,促进颗粒细胞分化和卵泡成熟,导致排卵数增加,且卵泡直径和排卵后黄体直径均明显小于野生型^[9,10]. Gonzalez-Bulnes等^[10](2004年)对携带BMPR-IB基因的老龄绵羊和青年绵羊进行了对比研究后认为,BMPR-IB基因突变导致排卵率升高,主要是由于其减少了卵泡的闭锁所致.BMPR-IB基因突变对绵羊的出生体重、出生后增长速度及初情期到来的月龄上并无显著影响^[11].

国外学者在研究Booroola Merino羊高繁殖力时发现,BMPR-IB基因的突变与其密切相关,在Garole羊和Javanese羊群体中亦检测到相同的突变形式^[12].国内学者在我国高繁殖力绵羊品种(小尾寒羊和湖羊)BMPR-IB基因相应突变位置也发现了相同的突变形式,且B等位基因频率很高,而在低繁殖力品种(滩羊、中国美利奴单胎系)中未发现此突变或B等位基因频率很低^[13,14],此突变显著提高了2个高繁殖力绵羊品种的产羔数.

本研究结果表明:BMPR-IB基因突变导致编码氨基酸Q249R突变,显著地提高了绵羊的排卵数,BB型群体羊较++型群体多排2.4个卵子($P < 0.01$),且BB型和B+型群体羊的黄体直径明显小于++型群体羊.在影响绵羊产羔数的多种因素中,

排卵数是最为重要的,排卵数与产羔数呈正相关,由于BMPR-IB基因突变导致小尾寒羊及其杂交羊排卵数的提高,从而进一步增加了其产羔数.本研究所得结果为BB型群体羊高产羔数提供了直接的证据.

本研究对部分试验羊子宫内移入冷冻胚胎,探讨移植后胚胎着床及妊娠建立的情况,研究结果表明:携带B等位基因群体羊的胚胎着床率要明显高于非携带B等位基因群体,B+型群体较++型群体高7个百分点,BB型群体为66.67%,已经接近鲜胚移植的水平,但出现此结果的根本原因还不十分明确,笔者分析有可能为孕酮分泌量的不同所引起.孕酮是一种重要的类固醇激素,通过刺激子宫内膜腺体分泌和抑制子宫肌肉收缩而促进胚胎着床并维持妊娠,主要由卵巢上的黄体分泌^[15]. McNatty等^[16]通过对携带B等位基因绵羊颗粒细胞进行体外培养后证明,其所含cAMP含量及孕酮产生量都要高于普通绵羊.Xia^[17](2003年)对Booroola Merino绵羊的内分泌研究表明:在发情周期中黄体阶段的大部分时间里,携带B等位基因绵羊体内孕酮浓度高于非携带B等位基因绵羊,且孕酮浓度开始升高的时间偏早,但在卵泡阶段并不出现这种情况.在妊娠阶段早期,由于携带B等位基因绵羊卵巢上存在更多的黄体,且黄体的发育更为迅速,所以其孕酮浓度水平在发情后的6天时已经接近正常水平,但非携带B等位基因绵羊则需要大约20天^[17].因此,理想的孕酮浓度水平很有可能促进早期妊娠建立,对胚胎着床率产生显著的影响.

从目前所得到的结果看,BMPR-IB基因突变可能影响着胚胎着床及妊娠建立,此结果仍需进一步的试验验证.但可以预见,随着对其作用机理的深入探讨,可为研究胚胎着床及妊娠建立提供一种新的思路.目前绵羊冷冻胚胎移植后受胎率一般为40%~50%,就近几年情况看,还没有大的突破,上升幅度并不大.从本试验所得结果推断,移植后受胎率应该还有上升的空间,可以通过PCR-RFLP方法进行基因多态性检测和基因型分析,选用合适基因型群体作为胚胎移植受体,从而提高胚胎移植受胎率提供新的方向.

参 考 文 献

1 Davis G H, Montgomery G W, Allision A J, *et al.* Segregation of a major gene influe-ncing fecundity in progeny of Booroola sheep. New Zealand Journal of Agricultural Research 1982, 25 (4): 525~529

- 2 Piper L R, Bindon B M, Davis G H. The single gene inheritance of the high litter size of the Booroola Merino. In: Land R B, Robinson D W, eds. *Genetics of Reproduction in Sheep*. London: Butterworths, 1985. 115~125
- 3 Wilson T, Wu X Y, Juengel J L, *et al.* Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod*, 2001, **64** (4): 1225~1235
- 4 Souza C J, MacDougall C, Campbell B K, *et al.* The Booroola(fecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type I B(BMPRI-B) gene. *J Endocrinol*, 2001, **169** (2): R1~R6
- 5 Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, *et al.* Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (9): 5104~5109
- 6 Fabre S, Pierre A, Pisselet C, *et al.* The Booroola mutation in sheep is associated with an alteration of the bone morphogenetic protein receptor-IB functionality. *J Endocrinol*, 2003, **177** (3): 435~444
- 7 Campbell B K, Baird D T, Souza C J H, *et al.* The FecB (Booroola) gene acts at the ovary: *in vivo* evidence. *Reproduction*, 2003, **126** (1): 101~111
- 8 Raftery L A, Sutherland D J. TGF-beta family signal transduction in *Drosophila* development: from Mad to Smads. *Developmental Biology*, 1999, **210** (2): 251~268
- 9 Souza C J H, Moraes J C F, Chagas L M. Effect of the Booroola gene on time of ovulation and ovulatory dynamics. *Anim Reprod Sci*, 1994, **37**: 7~13
- 10 Gonzalez-Bulnes, Souza C J H, Campbell B K, *et al.* Effect of ageing on hormone secretion and follicular dynamics in sheep with and without the booroola gene. *Endocrinology*, 2004, **145**(6): 2858~2864
- 11 Abella D F, Cognie Y, Thimonier J, *et al.* Effects of the FecB gene on birth weight, postnatal growth rate and puberty in Booroola x Merinos d'Arles ewe lambs. In: *Animal Research*. France: EDP Sciences, Les Ulis, 2005, **54** (4): 283~288
- 12 Davis G H, Galloway S M, Ross I K, *et al.* DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the booroola (FecB) mutation. *Biology of Reproduction*, 2002, **66** (6): 1869~1874
- 13 柳淑芳, 姜运良, 杜立新. BMPR-IB 和 BMP15 基因作为小尾寒羊多胎性能候选基因的研究. *遗传学报*, 2003, **30** (8): 755~760
Liu S F, Jiang Y L, Du L X. *Acta Genetica Sinica*, 2003, **30** (8): 755~760
- 14 王启贵, 钟发刚, 李辉, 等. 绵羊产羔性状主效基因检测研究, 遗传, 2005, **27** (1): 080~084
Wang Q G, Zhong F G, Li H, *et al.* *Hereditas(Beijing)*, 2005, **27** (1): 080~084
- 15 张忠诚 主编. 家畜繁殖学. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 2000. 49
Zhang Z C. *Reproduction in Farm Animals*. 3rd. Beijing: China Agriculture Press, 2000. 49
- 16 McNatty K P, Kieboom L E, McDiarmid J, *et al.* Adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate and steroid production by small ovarian follicles from Booroola ewes with and without a fecundity gene. *J Reprod Fertil*, 1986, **76** (1): 471~480
- 17 Xia Y, O'Shea T, Murison R, *et al.* Concentrations of progesterone, follistatin, and follicle-stimulating hormone in peripheral plasma across the estrous cycle and pregnancy in merino ewes that are homozygous or noncarriers of the Booroola gene. *Biology of Reproduction*, 2003, **69** (3): 1079~1084

Preponderance Genotype of BMPR-IB Improves The Pregnant Rate of Embryo-transfer in Sheep*

YAO Yu-Chang¹⁾, TIAN Liang¹⁾, HAN Hong-Bing¹⁾, CHEN Xue-Hui¹⁾, LU Ming-Hai³⁾,
GUO Peng-Cheng³⁾, ZHANG Chao-Feng³⁾, LI Ning²⁾, LIAN Zheng-Xing^{1,2)**}, LI Wu^{3)**}

¹⁾College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

²⁾State Key Laboratories for Agro-biotechnology, Beijing 100094, China;

³⁾College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Bone morphogenetic protein receptor-IB gene(BMPR-IB)which controls the fecundity of Booroola Merino ewes was studied as candidate genes on the high prolificacy in sheep. Seven sheep breeds, small tail han sheep and its crosses, Northeastern Half-fuzz sheep, Australian Merino sheep, German Mutton Merino sheep, Suffork sheep, Texel sheep and Charolais sheep, were used. Single nucleotide polymorphism of BMPR-IB gene was detected in all sheep breeds by PCR-RFLP. The results showed that there was a same A746G mutation in BMPR-IB gene as that of Booroola Merino ewe, the frequency of B allele in the small tail han sheep and its crosses was significantly higher than that of the other two breeds, and the same mutation did not exist in other four breeds. The sheep carrying the B allele were able to ovulate more ova than non-gene carriers, and ovulating at a smaller diameter. The pregnant rates with respect to frozen embryo were 38.78%, 45.71% and 66.67% for the ++, B+ and BB animals, respectively. However, the results of present study showed that the A/G mutation in BMPR-IB gene

appeared to positively affect both ova number and pregnancy process, which suggests that BMPR-IB gene play an important role in the regulation of sheep prolificacy. So ideal genotype sheep by PCR-RFLP as recipient is selected. It provides a new approach to improve pregnancy rate of embryo transfer.

Key words sheep, prolific, BMPR-IB, frozen embryo, pregnancy rate

*This work was supported by a grant from Agriculture Ministry Program (05-07-04B).

**Corresponding author .

LIAN Zheng-Xing. Tel: 86-10-62732681, Fax: 86-10-62732463, E-mail: lianzhx@cau.edu.cn

LI Wu. Tel: 86-451-55107855, E-mail: liwu@neau.edu.cn

Received: May 18, 2006 Accepted: June 30, 2006