

李隐侠, 张俊, 钱勇, 等. 湖羊 *NR5A1* 基因 SNPs 筛选及其与产羔数的关联分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1): 124-132.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.01.020

湖羊 *NR5A1* 基因 SNPs 筛选及其与产羔数的关联分析

李隐侠^{1,2}, 张俊^{1,2}, 钱勇^{1,2}, 孟春花^{1,2}, 王慧利^{1,2}, 钟声^{1,2}, 曹少先^{1,2}

(1.江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏 南京 210014; 2.江苏省农业科学院动物品种改良和繁育重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 为探讨 *NR5A1* 基因能否作为湖羊产羔性状的候选基因, 同时寻找与湖羊繁殖性能相关的分子标记, 以高繁殖力湖羊为研究对象, 采用 DNA 池结合测序方法筛选 *NR5A1* 基因在湖羊中的 SNPs 位点, 并利用 PCR-RFLP 和 AS-PCR 方法进行多态位点分型, 利用 SPSS 软件分析不同基因型与湖羊产羔数的相关性。结果表明, 在湖羊 *NR5A1* 基因中检测到 6 个 SNPs 位点, 分析发现 *g.6052A/G* 位点为 *TaqI* 酶切位点, 其余 5 个位点处没有酶切位点存在。在湖羊群体中, *g.3362G/C* (GG、GC、CC)、*g.4342G/A* (GG、GA、AA)、*g.4666C/T* (CC、CT、TT)、*g.6052A/G* (GG、AG、AA) 和 *g.6991T/G* (TT、TG、GG) 位点均检测到 3 种基因型, 而 *g.5699C/G* 位点在湖羊群体中仅发现 2 种基因型 GG 和 GC。6 个位点的多态信息含量 (PIC) 从 0.306 到 0.375 不等, 均属于中度多态 ($0.25 < PIC < 0.50$), 杂合度 (*He*) 从 0.377 到 0.500, 在这 6 个 SNPs 位点中, 仅 *g.6052A/G* 位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。连锁分析发现, *g.3362G/C* 和 *g.6052A/G* 2 位点在湖羊群体中紧密连锁, 二者共构建了 8 种单倍型组合, AAGG 为主要的单倍型, 占总数的 35.90%, AGCG 和 AACG 次之, 分别占总数的 20.30% 和 18.75%。关联分析发现 *g.6052A/G* 位点 GG 型湖羊的平均产羔数显著高于 AA 型 ($P < 0.05$) 和 AG 型 ($P < 0.05$), 其余位点的各基因型在湖羊的头胎产羔数、二胎产羔数、三胎产羔数和平均产羔数间差异均不显著。AAGG 单倍型和 AACG 单倍型的二胎产羔数比 AGCG 单倍型的二胎产羔数分别多 0.40 ($P < 0.05$) 和 0.53 ($P < 0.01$), 差异显著。说明, *NR5A1* 基因对湖羊产羔数有一定的影响, *g.6052A/G* 位点、*g.3362G/C* 和 *g.6052A/G* 连锁可作为湖羊繁殖性能的有效遗传标记, 用于湖羊的分子选育。

关键词: 湖羊; *NR5A1* 基因; SNPs; PCR-RFLP; AS-PCR; 关联分析

中图分类号: S826 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)01-0124-09

SNPs selection of *NR5A1* and its association analysis with litter size in Hu sheep

LI Yin-xia^{1,2}, ZHANG Jun^{1,2}, QIAN Yong^{1,2}, MENG Chun-hua^{1,2}, WANG Hui-li^{1,2}, ZHONG Sheng^{1,2}, CAO Shao-xian^{1,2}

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Key Laboratory of Animal Breeding and Reproduction, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

收稿日期: 2016-05-18

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(14)5031]; 江苏省自然科学基金项目 (BK20140750); 国家自然科学基金项目 (31501934)

作者简介: 李隐侠 (1979-), 女, 河南固始人, 博士, 副研究员, 主要从事动物遗传育种与繁殖方面的研究。 (Email) liyxmh@126.com

通讯作者: 曹少先, (Email) sxcao@jaas.ac.cn

Abstract: In order to explore whether *NR5A1* gene can be used as a candidate gene of the litter size of Hu sheep, SNPs were screened and the correlation between different genotypes and litter size of Hu sheep were analyzed. High fecundity sheep were used as the research objective, the SNPs of *NR5A1* gene was screened using DNA pools combining with sequencing, and the correlations between different genotypes and litter size of Hu sheep were analyzed using SPSS software. Six SNPs locus were detected in

Hu sheep population. *g.6052A/G* locus owned the *TaqI* enzyme site and other five SNPs were absent enzyme sites. In Hu sheep population, there were three genotypes in the loci of *g.3362G/C* (GG, GC, CC), *g.4342G/A* (GG, GA, AA), *g.4666C/T* (CC, CT, TT), *g.6052A/G* (GG, AG, AA) and *g.6991T/G* (TT, TG, GG) and only two genotypes in *g.5699C/G* (GG, GC) locus. The *PIC* of these six SNPs ranged from 0.306 to 0.375 and belonged to moderate polymorphism ($0.25 < PIC < 0.50$), the *He* ranged from 0.377 to 0.500, and only *g.6052A/G* locus was in Hardy-Weinberg equilibrium. Linkage analysis results showed that the locus of *g.3362 G/C* and *g.6052A/G* were close linkage, and they constructed eight haplotypes, among them, AAGG was the main haplotype counting for 35.90% of the total, followed by AGCG and AACG haplotypes counting for 20.30% and 18.75% of the total, respectively. Correlation analysis results showed that the average litter size of ewes with GG genotype at *g.6052A/G* locus were significant higher than that of AA and AG ($P < 0.05$), and there were no significant difference in litter sizes among other genotypes of other five loci. The ewes with AAGG and AACG haplotypes have 0.40 ($P < 0.05$) and 0.53 ($P < 0.01$) litter size more than that with AGCG haplotype in the second birth, and the difference was very significant. The results showed that *NR5A1* gene has certain influence to the litter size of Hu sheep, the single locus of *g.6052A/G* and the linkage of *g.3362 G/C* and *g.6052A/G* can be used as effective genetic markers in molecular breed of Hu sheep.

Key words: Hu sheep; *NR5A1*; SNPs; PCR-RFLP; AS-PCR; correlation analysis

NR5A1, 又名 *SF-1* 和 *Ad4BP*^[1], 是核受体 *NR5A* 家族中第 1 个被发现的成员, 也是一种重要的转录因子, 与哺乳动物雌性生殖、卵泡发育、类固醇生成等关系密切^[2-4]。*NR5A1* 于 1992 年在小鼠 Y1 细胞和牛肾上腺中首先被分离, 研究发现其在哺乳动物垂体、肾上腺、脾脏、皮肤和性腺等组织中均有表达, 在肾上腺和卵巢中高表达, 但在肝脏中不表达^[5]。Sadovsky 等^[6]研究发现 *NR5A1* 基因在内分泌和繁殖系统的发育和分化中发挥重要的作用。*NR5A1* 基因缺失的小鼠肾上腺和性腺发育不完全^[7], 卵泡颗粒细胞特异性敲除 *NR5A1* 基因的雌性小鼠胚胎期和出生时卵巢发育正常, 但成年个体不孕, 卵巢组织中缺乏黄体, 与 *ESR1* 和芳香酶敲除小鼠的表型一致, 因此颗粒细胞中 *NR5A1* 基因是维持雌性卵巢功能和繁殖力所必需的^[8-9]。大部分关于人类的研究结果表明 *NR5A1* 基因突变与性别发育紊乱相关联^[10-11]。Lin 等^[10]在 *NR5A1* 基因中发现了 4 个错义突变 (V15M、M78I、G91、L437Q) 与人类性别发育紊乱相关联; Achermann 等^[11]在人类研究中发现 *NR5A1* 一个是杂合的 G35E 突变, 破坏了 *NR5A1* 基因 p-box 初级 DNA 结合基序进而降低了靶基因的结和反式激活; 另一个是纯合的 R92Q 突变, 破坏了 *NR5A1* 基因 A-box 二级 DNA 结合基序, 从而导致了 *NR5A1* 基因活性的部分丢失。且 *NR5A1* 基因多态性与卵巢功能早衰有关联, 突变型个体血浆 E2 水平显著下降^[12], 说明 *NR5A1* 突变与哺乳动物性别发育和卵巢功能有重要关系。目前 *NR5A1* 基因

的相关研究仅集中在人类^[13]、大鼠^[14]、小鼠^[15]、牛^[16]和猪^[17], 羊的研究非常少, 几乎没有涉及基因多态性与绵羊繁殖性能的关联性研究。本研究以高繁殖力绵羊品种湖羊为研究对象, 采用 DNA 池测序法筛选 *NR5A1* 基因在湖羊群体中的 SNPs 位点、采用 PCR-RFLP 和 AS-PCR 方法对 SNPs 位点进行基因分型, 分析不同基因型与湖羊产羔数的关联性, 寻找与繁殖相关的遗传标记, 为绵羊的遗传选育提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

139 只湖羊由江苏省姜堰市海伦羊业有限公司统一饲养管理, 营养以及饲养管理条件一致。其产羔资料由公司提供。每个个体采集耳组织样, 置冰桶中带回实验室, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。组织样 DNA 的提取采用酚/仿抽提法, TE Buffer 溶解后 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 引物合成与 PCR 扩增

根据绵羊 3 号染色体中 *NR5A1* 基因序列 (序列号: NC_019460.1), 采用 Primer Premier 5.0 软件设计 4 对针对 *NR5A1* 基因内含子 3 的特异性引物 (P1~P4), 用于筛选湖羊 *NR5A1* SNPs 位点, 引物由上海捷瑞生物技术有限公司合成, 引物序列的相关信息见表 1。

PCR 反应体系为 $20.0\text{ }\mu\text{l}$, 含模板 DNA 60 ng 、*Taq* 聚合酶 ($5\text{ U}/\mu\text{l}$) $0.2\text{ }\mu\text{l}$ 、dNTP (10 mmol/L) 0.5

μl 、引物(100 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μl 、 MgCl_2 (25 mmol/L) 1.4 μl 和 10 \times 缓冲液 2.0 μl , 添加灭菌双蒸水至 20.0 μl 。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$

变性 30 s,退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,35 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

表 1 *NR5A1* 基因序列 SNPs 筛选及分型所用引物

Table 1 The primers for screening SNPs and genotyping of *NR5A1*

引物名称	序列(5'→3')	$T_m(^{\circ}\text{C})$	片段大小 (bp)	用途
<i>NR5A1</i> -P1	F:TCAAGGAGCTGGAGCTGA R:TGGGATGTTCTTCCGTGT	54	1 077	SNPs 筛选
<i>NR5A1</i> -P2	F:TAGGTGCCAGGATAAGTAGG R:GCTCAGAGGTGAGAAATGAA	54	1 279	
<i>NR5A1</i> -P3	F:GGGACAGTGAAATGGATGA R:TCAAGATGGGTCATTAGGC	52	1 180	
<i>NR5A1</i> -P4	F:AGAACGCCTAATGACCCA R:CTCTGTACCCAGACCTCGA	54	1 115	
<i>g.3362</i> P5	F1:CTATCTGTTTCCCTGTCTG F2:CTATCTGTTTCCCTGTCTC R:TGGGATGTTCTTCCGTGT	50	747	AS-PCR
<i>g.4342</i> P6	F: TAGGTGCCAGGATAAGTAGG R1: CTGACAATGCGCTCAAGG R2:TTGACAATGCGCTCAAGG	52	409	AS-PCR
<i>g.4666</i> P7	F1: ACAGAACAAGAGGCAGGGT F2:ACAGAACAAGAGGCAGGGC R:GCTCAGAGGTGAGAAATGAA	53	563	AS-PCR
<i>g.6052</i> P8	F:GGGACAGTGAAATGGATGA R:TCAAGATGGGTCATTAGGC	52	1 180	PCR-RFLP
<i>g.5699</i> P9	F:GGGACAGTGAAATGGATGA R1:GAGCGCCGGCTCTGTGAT R2:CAGCGCCGGCTCTGTGAT	55	422	AS-PCR
<i>g.6991</i> P10	F:AGAACGCCTAATGACCCA R1:ATGGAAAGCAAGTGCAAAG R2:CTGGAAAGCAAGTGCAAAG	52	558	AS-PCR

1.3 SNPs 筛选

每 5 个湖羊耳组织的 DNA 样组成一个 DNA 池,以 DNA 池为模板,对湖羊 *NR5A1* 基因进行 PCR 扩增,扩增产物回收后送往上海美吉生物技术有限公司测序,根据测序结果查找 SNPs 位点。

1.4 克隆测序

将回收纯化的目的片段与 PCR 2.1 载体充分混匀,在恒温金属浴中 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜,将全部连接液

转化到感受态细胞,涂于含氨苄抗性的 LB 板 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。挑取单克隆摇菌提质粒,PCR 鉴定阳性克隆送美吉生物公司进行测序。

1.5 基因分型

根据测序结果,*NR5A1* 基因共有 6 个 SNPs 位点,分别是 *g.3362G/C*、*g.4342G/A*、*g.4666C/T*、*g.5699C/G*、*g.6052A/G* 和 *g.6991T/G*。其中 *g.6052A/G* 突变为 *TaqI* 酶识别位点,用 PCR-RFLP

技术进行基因分型,其余 5 个 SNPs 位点用 AS-PCR (Allele-specific PCR) 方法分型,所用引物 P5~P10 序列信息见表 1。RFLP 技术 PCR 反应体系和程序同方法 1.2,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,Gold view (I 型核酸染色剂) 染色检测扩增结果。*TaqI* 内切酶酶切体系 15.0 μ l,含 PCR 产物 5.0 μ l、*TaqI* (10 U/ μ l) 0.5 μ l、10 \times 缓冲液 1.0 μ l 和灭菌双蒸水 9.0 μ l。37 $^{\circ}$ C 酶切 3 h。用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物,培清 JS-780 全自动凝胶成像分析仪进行成像分析。AS-PCR (Allele-specific PCR) 基因分型具体方法如下:每个位点设计 2 对引物,如 *g.3362* P5、*g.4342* P6、*g.4666* P7、*g.5699* P9、*g.6991* P10 (表 1),其中 *g.3362* P5 和 *g.4666* P6 中上游引物 3' 端最后一个碱基有差异,下游引物为共用引物, *g.4342* P6、*g.5699* P9、*g.6991* P10 中下游引物 3' 端最后一个碱基有差异,上游引物为共用引物。将每个位点的 2 对引物分别对同一样本进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,培清 JS-780 全自动凝胶成像分析仪进行成像分析。

1.6 数据分析

统计各位点基因型频率、等位基因频率、多态信息含量、群体杂合度,并进行卡方检验。利用 SPSS18.0 软件中 One-Way ANOVA 方法统计不同基因型与湖羊产羔数的关联性。

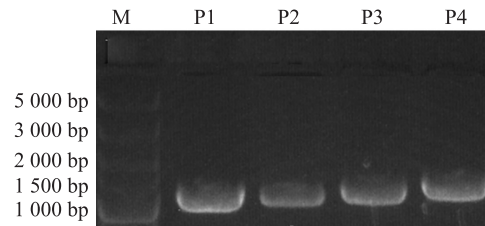
2 结果

2.1 PCR 产物扩增

利用设计的 4 对引物扩增湖羊 *NR5A1* 基因目的条带,产物经过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 1 所示,各引物的 PCR 条带特异性好,扩增片段大小与目的条带大小一致。

2.2 湖羊 *NR5A1* 基因多态位点的筛选

以湖羊 DNA 池为模板对 *NR5A1* 基因序列进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后测序。应用 DNASTar 软件对测序结果进行比对,根据测序峰图,在湖羊中发现 6 个 SNPs 位点 (图 2),分别命名为 *g.3362G/C*、*g.4342G/A*、*g.4666C/T*、*g.5699C/G*、*g.6052A/G* 和 *g.6991T/G*。



P1~P4: 湖羊 *NR5A1* 基因不同引物扩增基因片段; M: 5000 bp Marker。

图 1 湖羊 *NR5A1* 基因不同引物扩增产物电泳图谱

Fig.1 PCR amplification of *NR5A1* gene in Hu sheep

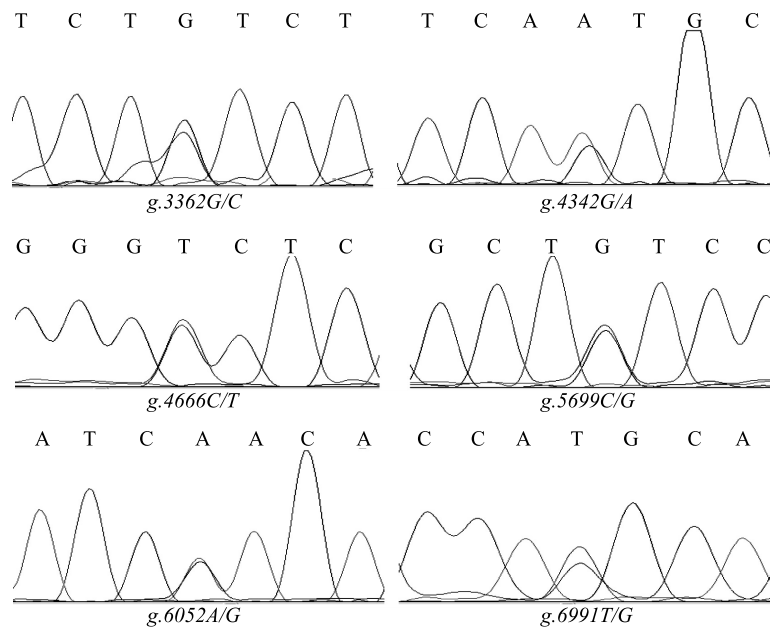
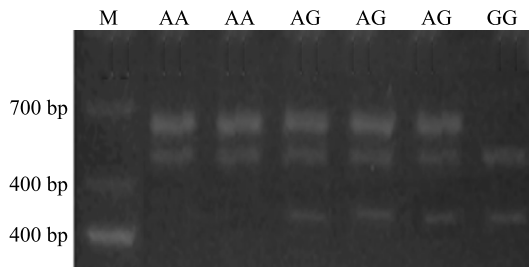


图 2 湖羊 *NR5A1* 基因 SNPs 位点筛选测序结果

Fig.2 Sequencing results of SNPs locus in *NR5A1* gene of Hu sheep

2.3 基因分型

2.3.1 *g.6052A/G* 位点 PCR-RFLP 分型 *NR5A1* 基因 *g.6052A/G* 位点处于 *TaqI* 酶切位点内,用 PCR-RFLP 方法进行分型试验。对 139 只湖羊样本进行 PCR 扩增,用琼脂糖凝胶电泳检测,片段长度与预期长度一致。用 *TaqI* 酶对 PCR 产物进行酶切后出现 3 种基因型 AA(615 bp、565 bp)、AG(615 bp、565 bp、406 bp、209 bp)和 GG(565 bp、406 bp、209 bp),电泳图谱见图 3。



AA、AG 和 GG 为 3 种不同基因型;M 为 1 000 bp Marker。

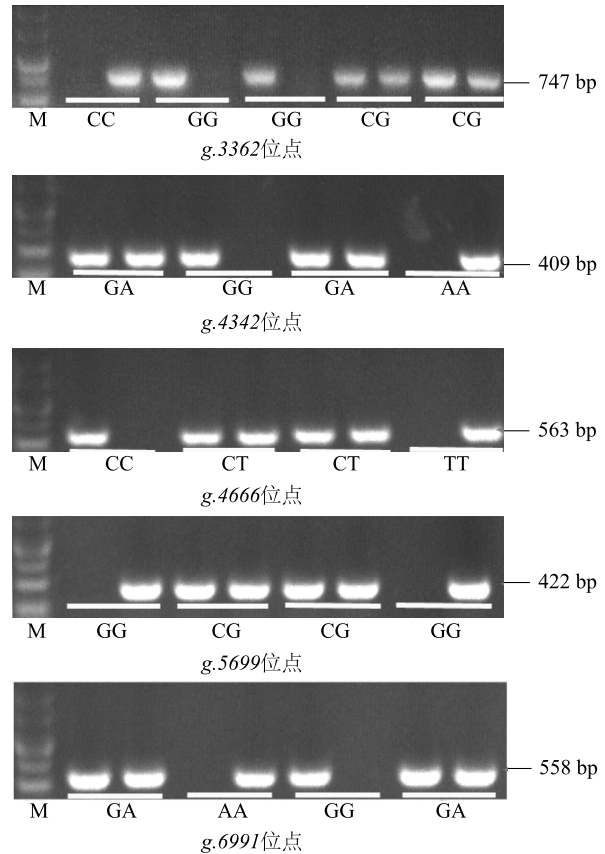
图 3 湖羊 *NR5A1* 基因 *g.6052A/G* 位点 PCR-RFLP 分型电泳图

Fig.3 PCR-RFLP electrophoresis at *g.6052A/G* locus in Hu sheep

2.3.2 *g.3362G/C*、*g.4342G/A*、*g.4666C/T*、*g.5699C/G*和 *g.6991T/G* 位点 AS-PCR 分型 湖羊 *NR5A1* 基因 *g.3362G/C*、*g.4342G/A*、*g.4666C/T*、*g.5699C/G*和 *g.6991T/G* 位点未发现酶切位点,选择 AS-PCR 方法进行基因分型。利用引物 *g.3362* P5、*g.4342* P6、*g.4666* P7、*g.5699* P9、*g.6991* P10 对 139 头湖羊 DNA 样本进行 PCR 扩增和电泳,根据不同引物扩增目的条带的有无进行基因分型,结果在湖羊中 *g.3362G/C*(GG、CG、CC)、*g.4342G/A*(GG、GA、AA)、*g.4666C/T*(CC、CT、TT)和 *g.6991T/G*(TT、TG、GG)位点发现 3 种基因型,而 *g.5699C/G* 位点在湖羊群体中仅发现 2 种基因型 GG 和 GC(图 4)。

2.4 *NR5A1* 基因多态位点的群体遗传学特征

NR5A1 基因 6 个 SNPs 位点在湖羊群体中的基因频率、基因型频率、多态信息含量和杂合度及 Hardy-Weinberg 平衡见表 2。从表 2 中可以看出,基因频率在 5 个 SNPs 位点中分布相对均匀,差别不大,但是在 *g.6052* 位点中 A 基因频率高达 74.80%,G 基因频率低达 25.20%。多态信息含量(PIC)从 0.306 到 0.375 不等,杂合度(He)从 0.377 到 0.500,在这 6 个 SNPs 位点中,仅 *g.6052A/G* 位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,其余 5 个位点均处于



CC、GG、CG、AA、AG、CT、TT 和 GA 为不同基因型;M 为 1 000 bp Marker。

图 4 湖羊 *NR5A1* 基因 SNPs 位点 AS-PCR 分型电泳图

Fig.4 AS-PCR electrophoresis of SNPs in Hu sheep

不平衡状态(表 2)。

2.5 *NR5A1* 基因突变位点不同基因型对湖羊产羔数的影响

NR5A1 基因 SNPs 位点多态性与湖羊各胎产羔数和平均产羔数的关联性分析结果见表 3。从表 3 可以看出:*g.6052A/G* 位点 GG 型湖羊的头胎产羔数和平均产羔数显著高于 AG 型($P < 0.05$),二胎产羔数中 GG 型比 AA、AG 型分别多 0.23 头和 0.33 头,三胎产羔数中 GG 型比 AA 和 AG 型分别多 0.32 头和 0.23 头,但是均没有达到显著水平($P > 0.05$)。其余位点各基因型湖羊的头胎产羔数、二胎产羔数、三胎产羔数和平均产羔数间差异均不显著($P > 0.05$),尽管 *g.3362* 位点的 CC 型的头胎产羔数比 GC 型多 0.21 头,*g.4342* 位点的 GG 型的三胎产羔数比 AA 型多 0.33 头,*g.5699* 位点的 GG 型二胎产羔数比 GC 型多 0.34 头,但是均未达到显著水平($P > 0.05$)。

表 2 *NR5A1* 基因 SNPs 各位点在湖羊群体中的基因型频率、基因频率、多态信息含量及杂合度Table 2 Frequencies of genotypes and alleles, expected heterozygosity (*He*), polymorphism information content (*PIC*) and test for fitness to Hardy-Weinberg equilibriums (*p-value*) of the SNPs of *NR5A1* in the common Hu sheep population

位点	等位基因	基因频率 (%)	基因型	基因型频率 (%)	多态信息含量	杂合度	<i>p-value</i>
<i>g.3362</i>	<i>G</i>	56.10	GG	40.30	0.371	0.493	3.93×10^{-5} *
	<i>C</i>	43.90	GC	31.60			
			CC	28.10			
<i>g.4342</i>	<i>G</i>	49.64	GG	9.35	0.375	0.500	5.57×10^{-13} *
	<i>A</i>	50.36	GA	80.58			
			AA	10.07			
<i>g.4666</i>	<i>C</i>	43.17	CC	8.63	0.370	0.491	1.54×10^{-6} *
	<i>T</i>	56.83	CT	69.06			
			TT	22.30			
<i>g.5699</i>	<i>G</i>	58.63	GG	17.27	0.367	0.485	8.95×10^{-17} *
	<i>C</i>	41.37	GC	82.73			
<i>g.6052</i>	<i>A</i>	74.80	AA	56.11	0.306	0.377	0.932 8
	<i>G</i>	25.20	AG	37.41			
			GG	6.47			
<i>g.6991</i>	<i>T</i>	60.66	TT	28.06	0.363	0.477	1.08×10^{-5} *
	<i>G</i>	39.34	TG	65.47			
			GG	6.47			

* 代表此位点处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态。

表 3 *NR5A1* 基因各位点不同基因型与湖羊产羔数的关联性

Table 3 Association analysis of genotypes and litter size of Hu sheep

位点	基因型	湖羊数量	头胎产羔数	二胎产羔数	三胎产羔数	平均产羔数
<i>g.3362</i>	GG	56	1.74±0.58a	1.85±0.69a	1.61±0.74a	1.77±0.26a
	GC	44	1.60±0.58a	1.76±0.68a	1.83±0.56a	1.71±0.32a
	CC	39	1.81±0.51a	1.72±0.45a	1.64±0.61a	1.77±0.35a
<i>g.4342</i>	GG	13	1.53±0.66a	1.67±0.50a	2.00±0a	1.80±0.38a
	GA	112	1.75±0.54a	1.73±0.61a	1.75±0.67a	1.75±0.32a
	AA	14	1.71±0.61a	1.90±0.74a	1.67±0.58a	1.73±0.23a
<i>g.4666</i>	CC	12	1.50±0.67a	1.67±0.50a	1.60±0.54a	1.63±0.24a
	CT	96	1.72±0.55a	1.77±0.56a	1.82±0.68a	1.78±0.33a
	TT	31	1.80±0.55a	1.68±0.80a	1.73±0.70a	1.70±0.29a
<i>g.5699</i>	GG	24	1.77±0.67a	2.11±0.92a	1.78±0.67a	1.80±0.27a
	GC	115	1.65±0.57a	1.77±0.53a	1.69±0.64a	1.74±0.32a
<i>g.6052</i>	AA	78	1.73±0.59ab	1.77±0.71a	1.68±0.69a	1.66±0.32bc
	AG	52	1.62±0.49b	1.67±0.63a	1.77±0.58a	1.76±0.29b
	GG	9	2.00±0.65a	2.00±0a	2.00±0.63a	2.01±0.10a
<i>g.6990</i>	TT	39	1.82±0.52a	2.00±0.79a	1.64±0.70a	1.78±0.22a
	TG	91	1.57±0.59a	1.70±0.56a	1.70±0.56a	1.70±0.34a
	GG	9	1.75±0.50a	1.75±0.50a	2.00±0.81a	1.95±0.37a

同一位点不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.6 NR5A1 基因突变位点单倍型分析

2.6.1 NR5A1 基因 *g.3362 G/C* 和 *g.6052A/G* 位点单倍型分型 经过连锁分析发现, *g.3362 G/C* 和 *g.6052A/G* 位点在湖羊群体中紧密连锁, 二者共构建了 8 种单倍型组合: 分别为 AGCG、AGCC、AAGG、AACC、AACG、GGCG、AGGG 和 GGCC, 分别占总数的 20.30%、10.90%、35.90%、5.47%、18.75%、2.34%、3.13% 和 3.13%。其中, 单倍型 AAGG 为主要的单倍型, 占总数的 35.90%, AGCG 和 AACG 次之, 分别为 20.30% 和 18.75%。

表 4 NR5A1 基因单倍型与湖羊产羔数的关联分析

Table 4 Association analysis of NR5A1 haplotype and litter size in Hu sheep

胎次	单倍型组合的产羔数(只)				
	AGCG	AGCC	AAGG	AACC	AACG
头胎	1.71±0.45a	1.58±0.49a	1.69±0.61a	1.86±0.35a	1.82±0.65a
二胎	1.47±0.50a	1.78±0.42ab	1.87±0.61b	1.83±1.06ab	2.00±0.53b
三胎	1.85±0.66a	1.57±0.72a	1.67±0.57a	1.50±0.50a	1.73±0.62a
平均	1.69±0.24a	1.52±0.47a	1.70±0.38a	1.83±0.29a	1.86±0.35a

同一行中相同的字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

NR5A1 是核受体 NR5A 家族中的重要成员之一, NR5A 家族在多能性、糖脂稳态平衡和类固醇生成等方面发挥关键作用^[18]。研究发现 NR5A 家族基因敲除的小鼠类固醇生成紊乱, 繁殖力明显下降, 可见 NR5A 家族是动物繁殖力的关键调节因子^[3,19]。湖羊是中国南方唯一多胎高繁殖力的绵羊品种, 其在中国低繁殖力绵羊品种改良和新品系培育中做出了一定的贡献, 目前关于 NR5A1 基因在湖羊群体中的 SNPs 位点及其与湖羊产羔数关联分析的研究还未见报道。

本研究设计特异引物扩增湖羊 NR5A1 第 3 内含子的序列, 并且通过 DNA 池方法筛选其在湖羊群体中的 SNPs 位点, 并通过 PCR-RFLP 和 AS-PCR 方法进行分型。结果在湖羊群体中检测到 6 个 SNPs 位点, 分别为 *g.3362G/C*、*g.4342G/A*、*g.4666C/T*、*g.5699C/G*、*g.6052A/G* 和 *g.6991T/G*, 并且分析了其在湖羊群体中的遗传特性。结果显示 *g.3362G/*

2.6.2 单倍型组合与湖羊产羔数的相关性分析

由于一些单倍型数量较少, 在进行关联分析时, 只选取样本含量多的单倍型组合与湖羊的产羔数进行关联分析。对 NR5A1 基因各个单倍型组合与湖羊各胎次产羔数的关联分析结果见表 4。AAGG 单倍型和 AACG 单倍型的二胎产羔数比 AGCG 单倍型的二胎产羔数分别多 0.40 ($P<0.05$) 和 0.53 ($P<0.01$), 差异显著。AGCG 单倍型的三胎产羔数比 AACC 单倍型的三胎产羔数多 0.35 头, AACG 单倍型的平均产羔数比 AGCC 单倍型的平均产羔数多 0.34 头, 但是均未达到显著水平($P>0.05$)。

C、*g.4342G/A*、*g.4666C/T*、*g.6052A/G* 和 *g.6991T/G* 在湖羊群体中均有 3 种基因型存在, 只有 *g.5699C/G* 位点只检测到 GG 和 GC 基因型, 没有发现 CC 基因型存在, 其中 GC 基因型为优势基因型, 可能是因为检测的湖羊群体数量有限, CC 型的有无需要扩大群体进一步验证。

多态信息含量(PIC)、杂合度(He)等可用来衡量群体内的遗传多样性^[20], 湖羊群体中 NR5A1 基因筛选到的 6 个 SNPs 位点的 PIC 含量在 0.306 到 0.375 之间, 杂合度(He)从 0.377 到 0.500, PIC 大小与遗传多样性等级表明这些位点均属于中度遗传多态性^[12]。*g.6052A/G* 位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 其余 5 个 SNPs 位点均处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态。造成群体在某个位点的基因不平衡的原因可能有以下几种: (1) 对种畜选择的影响; (2) 对经济性状选择的影响; (3) 对环境的适应性; (4) 样本容量的限制^[21]。据此分析本研究中的 5 个处于不平衡状态的原因有可能与种畜的选择、环境和样本容量有关, 因为这些位点首次与湖羊繁殖性

状进行关联分析,后续有望作为分子标记用于湖羊繁殖性状的辅助选育。

研究发现卵巢功能不全的年轻女性 *NR5A1* 基因发生突变,突变型个体 *CYP11A1* 和 *AMH* 基因表达显著降低^[22],且 *NR5A1* 基因多态性与卵巢功能早衰有关联,突变型个体血浆 E2 水平显著下降^[12],说明 *NR5A1* 基因的多态性与繁殖性能相关。本研究通过关联分析发现,湖羊群体中 *NR5A1* 基因 6 个 SNPs 中 *g.6052A/G* 位点 GG 型湖羊的平均产羔数显著高于 AA 型($P<0.05$)和 AG 型($P<0.05$),其余胎次各基因型间差异不显著,因此推测 *g.6052A/G* 位点 G 等位基因可能有利于提高湖羊产羔数,胎次间差异不显著可能是由于湖羊个体间差异较大,标准误差较大导致的。

绵羊繁殖力性状是一个重要的经济性状,受主效基因的控制,同时也受多个基因和多个位点的相互调控^[12]。本研究中将 *NR5A1* 基因 6 个 SNPs 位点进行连锁分析,发现 *g.3362 G/C* 和 *g.6052A/G* 位点在湖羊群体中紧密连锁,这 2 个位点在湖羊群体中共构建了 8 种单倍型,AAGG 为主要单倍型。不同单倍型与湖羊各胎次产羔数的关联分析表明,AAGG 单倍型和 AACG 单倍型的二胎产羔数比 AGCG 单倍型的二胎产羔数分别多 0.40 ($P<0.05$)和 0.53 ($P<0.01$),差异显著。因此推断 *NR5A1* 基因 *g.6052A/G* 位点的 GG 基因型以及 *g.3362 G/C* 和 *g.6052A/G* 两连锁位点的 AAGG 单倍型和 AACG 单倍型可能有利于提高湖羊的繁殖性能,建议作为分子标记应用于高繁殖力绵羊的遗传选育。

本研究首次在湖羊群体中筛选 *NR5A1* 基因多态性并将其与湖羊产羔数进行关联分析。结果发现 *g.6052A/G* 位点的 GG 基因型以及 *g.3362 G/C* 和 *g.6052A/G* 两连锁位点的 AAGG 单倍型和 AACG 单倍型是湖羊繁殖性能的有利基因型,可以作为高繁殖力绵羊的遗传选育。

参考文献:

- [1] IKEDA Y, LALA D S, LUO X, et al. Characterization of the mouse *FTZF1* gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression [J]. *Molecular Endocrinology*, 1993, 7(7): 852-860.
- [2] MŁYNARCZUK J, REKAWIECKI R. The role of the orphan receptor SF-1 in the development and function of the ovary [J]. *Reprod Biol*, 2010, 10(3): 177-193.
- [3] KIM K W, LI S, ZHAO H, et al. CNS-specific ablation of steroidogenic factor 1 results in impaired female reproductive function. [J]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24(6): 1240-1250.
- [4] YIN M, LYU M, YAO G, et al. Transactivation of micro RNA-383 by steroidogenic factor-1 promotes estradiol release from mouse ovarian granulosa cells by targeting RBMS1 [J]. *Mol Endocrinol*, 2012, 26(7): 1129-1143.
- [5] FALENDER A E, LANZ R, MALENFANT D, et al. Differential expression of steroidogenic factor-1 and FTF/LRH-1 in the rodent ovary [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(8): 3598-3610.
- [6] SADOVSKY Y, DORN C. Function of steroidogenic factor 1 during development and differentiation of the reproductive system [J]. *Reviews of Reproduction*, 2000, 5(3): 136-142.
- [7] LUO X, IKEDA Y, PARKER K L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation [J]. *Cell*, 1994, 77(4): 481-490.
- [8] JEYASURIA P, IKEDA Y, JAMIN S P, et al. Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function [J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(7): 1610-1619.
- [9] BUAAS F W, GARDINER J R, CLAYTON S, et al. *In vivo* evidence for the crucial role of SF1 in steroid-producing cells of the testis, ovary and adrenal gland [J]. *Development*, 2012, 139(24): 4561-4570.
- [10] LIN L, PHILIBERT P, FERRAZ-DE-SOUZA B, et al. Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46, XY disorders of sex development with normal adrenal function [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(3): 991-999.
- [11] ACHERMANN J C, ITO M, HINDMARSH P C, et al. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans [J]. *Nature Genetics*, 1999, 22(2): 125-126.
- [12] LAKHAL B, BEN-HADJ-KHALIFA S, BOUALI N, et al. Mutational screening of SF1 and WNT4 in Tunisian women with premature ovarian failure [J]. *Gene*, 2012, 509(2): 298-301.
- [13] FERLIN A, ROCCA M S, VINANZI C, et al. Mutational screening of *NR5A1* gene encoding steroidogenic factor 1 in cryptorchidism and male factor infertility and functional analysis of seven undescribed mutations [J]. *Fertil Steril*, 2015, 104(1): 163-169.

[1] IKEDA Y, LALA D S, LUO X, et al. Characterization of the mouse *FTZF1* gene, which encodes a key regulator of steroid

- [14] KAWABE S, YAZAWA T, KANNO M, et al. A novel isoform of liver receptor homolog-1 is regulated by steroidogenic factor-1 and the specificity protein family in ovarian granulosa cells [J]. *Endocrinology*, 2013, 54(4): 1648-1660.
- [15] KARPOVA T, RAVICHANDIRAN K, INSISIENMAY L, et al. Steroidogenic factor 1 differentially regulates fetal and adult leydig cell development in male mice [J]. *Biol Reprod*, 2015, 93(4): 83.
- [16] MLYNARCZUK J, WROBEL M H, REKAWIECKI R, et al. The expression of steroidogenic Factor-1 and its role in bovine steroidogenic ovarian cells during the estrus cycle and first trimester of pregnancy [J]. *Anim Reprod Sci*, 2013, 138(1/2): 74-81.
- [17] SMITH T P, SHOWALTER A D, SLOOP K W, et al. Identification of porcine Lhx3 and SF1 as candidate genes for QTL affecting growth and reproduction traits in swine [J]. *Anim Genet*, 2001, 32(6): 344-350.
- [18] MUSILLE P M, PATHAK M, LAUER J L, et al. Divergent sequence tunes ligand sensitivity in phospholipid-regulated hormone receptors [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(28): 20702-20712.
- [19] LABELLE-DUMAIS C, PARÉ J F, BÉLANGER L, et al. Impaired progesterone production in Nr5a2+/- mice leads to a reduction in female reproductive function [J]. *Biology of Reproduction*, 2007, 77(2): 217-225.
- [20] IMAMICHI Y, MIZUTANI T, JU Y, et al. Transcriptional regulation of human ferredoxin 1 in ovarian granulosa cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 370(1/2): 1-10.
- [21] 高爱琴, 李 宁, 李金泉, 等. 山羊 *FGF5* 基因单核苷酸多态性群体遗传学分析[J]. *华北农学报*, 2006, 21(3): 71-76.
- [22] PHILIBERT P, PARIS F, LAKHAL B, et al. *NR5A1* (*SF-1*) gene variants in a group of 26 young women with XX primary ovarian insufficiency [J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(2): 484-489.

(责任编辑:陈海霞)