

绵羊 *Izumol* 基因多态性及其与产羔数关联分析

胡文萍¹ 董新龙^{1,2} 田志龙¹ 汤继顺^{1,3} 刘秋月¹ 王翔宇¹ 狄冉¹ 张效生⁴
张金龙⁴ 王金玉^{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. 扬州大学 动物科学与技术学院,江苏 扬州 225009;
3. 安徽省农业科学院 畜牧兽医研究所,合肥 230031;
4. 天津市畜牧兽医研究所,天津 300381)

摘要 为研究 *Izumol* 基因多态性及与产羔数关系,本研究利用 PCR 和直接测序法对小尾寒羊和苏尼特羊的 *Izumol* 基因 DNA 序列进行扩增、测序和 BLAST 分析,并和本课题组前期绵羊重测序数据进行比对,筛选出 *Izumol* 基因 SNP 位点。同时,采用 Sequenom MassARRAY[®] 技术进行基因分型,并对其 SNP 位点的基因型和等位基因频率在各群体中的分布进行研究。结果表明:小尾寒羊 *Izumol* 基因 DNA 全长序列 3 385 bp,苏尼特羊 *Izumol* 基因 DNA 全长序列 3 382 bp;筛选出 8 个 *Izumol* 基因 SNP 位点,经过初步筛选,将在小尾寒羊、苏尼特羊、滩羊、萨福克羊、杜泊羊、草原藏羊这 6 个绵羊品种中位点分布没有差异的 SNP 位点排除,最终筛选获得的 g. 54412135A>G 和 g. 54412107C>A 2 个位点。*Izumol* 基因 g. 54412135A>G 位点存在 GG、GA 和 AA 3 种基因型,G 基因为优势等位基因;g. 54412107C>A 在多羔品种中存在 CC 和 CA 2 种基因型,而在单羔品种中存在 CC、CA 和 AA 3 种基因型,C 基因为优势等位基因,其基因型频率和基因频率在单、多羔绵羊群体间的分布差异均极显著($P < 0.01$);群体遗传学分析得出 g. 54412135A>G 多态位点在 6 个品种中的多态信息含量(PIC)都属于低度多态($PIC < 0.25$);g. 54412107C>A 多态位点在杜泊羊中属于中度多态($0.25 < PIC < 0.5$),在其他 5 个品种中都属于低度多态($PIC < 0.25$),然而,关联分析发现 *Izumol* 基因 g. 54412135A>G 和 g. 54412107C>A 位点的不同基因型与小尾寒羊不同胎次产羔数之间不存在显著关联($P > 0.05$)。

关键词 绵羊; *Izumol* 基因; 克隆; 多态性; SNP; 产羔数

中图分类号 S826.8

文章编号 1007-4333(2020)01-0095-10

文献标志码 A

Polymorphism of *Izumo1* gene and its association with litter size in sheep (*Ovis aries*)

HU Wenping¹, DONG Xinlong^{1,2}, TIAN Zhilong¹, TANG Jishun^{1,3}, LIU Qiuyue¹, WANG Xiangyu¹,
DI Ran¹, ZHANG Xiaosheng⁴, ZHANG Jinlong⁴, WANG Jinyu^{2*}, CHU Mingxing^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;
2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;
3. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China;
4. Tianjin Institute of Animal Sciences, Tianjin 300381, China)

收稿日期: 2019-06-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501941,31861143012,31402041); 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)

第一作者: 胡文萍,助理研究员,博士,主要从事动物遗传育种研究,E-mail:huwenping@caas.cn
董新龙,硕士研究生,E-mail:lzydongxinlong@163.com

通讯作者: 王金玉,教授,主要从事动物遗传育种研究,E-mail:jywang@yzu.edu.cn

储明星,研究员,主要从事羊优异繁殖性状分子机理研究,E-mail:mxchu@263.net

Abstract This study aimed to investigate the polymorphism of *Izumo1* gene and its association with litter size in sheep. The DNA sequences of *Izumo1* gene in Small Tail Han sheep and Sunite sheep were amplified and sequenced using PCR and direct sequencing, and then analyzed by BLAST. SNPs of *Izumo1* gene were screened out by comparing with the previous re-sequencing data of sheep in the laboratory. Sequenom MassARRAY® was used to genotype and the distribution of genotype and allele frequencies of the SNP loci in each group was studied. The results showed: The full lengths DNA sequence of *Izumo1* gene were 3 385 bp in Small Tail Han sheep and 3 382 bp in Sunite sheep. Eight SNP loci of *Izumo1* gene were screened out. After preliminary screening, the SNP loci with no difference to those of Small Tail Han sheep, Sunite sheep, Tan sheep, Suffolk sheep, Dorper sheep and Prairie Tibetan sheep were excluded. Two loci, g. 54412135A>G and g. 54412107C>A were finally selected. Polymorphism analysis showed that: There were three genotypes of GG, GA and AA in g. 54412135A>G locus of *Izumo1* gene in monotocous and polytocous breeds, and G gene was the dominant allele; There were CC and CA genotypes in g. 54412107C>A polytocous breeds, and CC, CA and AA genotypes in monotocous breeds. C gene was the dominant allele, the genotype frequency and allele frequency of this locus were significantly different among high fecundity and low fecundity sheep breeds ($P<0.01$). Population genetic analysis showed that: The polymorphism information content (PIC) of g. 54412135A>G polymorphism loci in six breeds belonged to low polymorphism ($PIC<0.25$). The g. 54412107C>A polymorphism locus belonged to moderate polymorphism ($0.25<PIC<0.5$) in Dorper sheep and low polymorphism ($PIC<0.25$) in the other five breeds. However, there was no significant association between the different genotypes of the *Izumo1* gene g. 54412135A>G and the g. 54412107C>A loci and litter size from different parity of Small Tail Han sheep ($P>0.05$) by the association analysis.

Keywords sheep; *Izumo1* gene; cloning; polymorphism; SNP; litter size

动物受精的成败决定种群能否在自然界稳定存在。哺乳动物受精过程中主要经历了精子获能、穿越放射冠、识别卵子透明带、发生顶体反应、精卵粘附与融合、卵母细胞第二极体排出、两性原核的融合等步骤^[1-2]。早期研究表明致育蛋白(Fertilin)存在于精子质膜上,是一种在精子-卵质膜粘附中起作用的精子表面蛋白,并可能参与受精卵融合^[3-6]。致育蛋白由 Fertilin α 和 Fertilin β 2 个亚基组成:敲除 Fertilin α 基因的雄性小鼠仍能生育^[7];敲除 Fertilin β 基因小鼠表现出雄性不育,主要原因不是质膜融合失败,而是精子无法与透明带粘附且从子宫向输卵管的迁移发生障碍^[8]。

Inoue 等^[9]发现精子表面蛋白 Izumo1 (Izumo sperm-egg fusion 1, Izumo1)与精卵结合相关。已有研究发现:卵子表面的 Juno 蛋白是 Izumo1 在卵子表面的受体^[10];Izumo1 和 Juno 的相互作用是精卵质膜融合所必须,Izumo1 和 Juno 也是目前发现的精子和卵子质膜上的第一个配体-受体蛋白对。Izumo 是免疫球蛋白超家族 (Immunoglobulin superfamily, IgSF) 的成员^[11-12]。而 *Izumol* 是 *Izumo* 基因家族的成员之一,*Izumo* 基因家族有 4 个成员,分别为 *Izumol*、*Izumo2*、*Izumo3* 和 *Izumo4*,拥有同源的 N 端结构域,“*Izumo* 结构域”。*Izumol*~3 是跨膜蛋白,均在睾丸上特异性表达。

Izumo1 也在人^[14]、小鼠^[9]、猪^[1]、绵羊^[15]等哺乳动物受精过程中表达。*Izumo4* 是可溶性蛋白,在包括睾丸的多种组织中表达^[9,13]。*Izumo1* 的细胞外结构域中有 1 个免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig) 结构域,并在成熟精子的顶层上表达,顶体反应之后, Ig 结构域在精子表面暴露。*Izumo1* 的 Ig 结构域上存在 1 个潜在的糖基化位点,在 C-末端还有 1 个跨膜结构域和 1 个短的胞质内尾巴,属 I 型膜蛋白。

NCBI 上公布的特克赛尔羊 *Izumol* 基因位于第 14 号染色体上,其 DNA 全长 3 326 bp,拥有 8 个外显子和 7 个内含子,编码 320 个氨基酸。*Izumol* 基因编码的蛋白质位于精子质膜内部,在精子上特异性表达^[14]。在顶体反应发生时,*Izumo1* 蛋白会从精子头部前端重新定位到发生融合的位点,包括整个精子头部和精子赤道部位,使得在顶体反应后暴露在精子头部的膜外。通过 *Izumol* 的抗体抑制试验能够明显地抑制精卵间的结合和融合过程^[1,9,11],将 *Izumo* 肽段直接注射到体内可以造成雌性小鼠免疫性不孕^[16]。*Izumo* 基因双敲除的雌性小鼠具有正常生育能力,但是雄性小鼠虽然能够正常生长、产生精子和进行交配,却无法产生后代。通过体外受精试验发现,*Izumol*^{-/-}雄性小鼠的精子虽然可以与去透明带卵母细胞正常结合,但不能继续融合而是积留在质膜外侧的卵周隙中无法完成受精

过程。将 *Izumo* 缺陷型精子注射到野生型卵母细胞中,能正常的产生子代,且其子代拥有正常的生育能力。人类精子也含有 *Izumo*,添加抗人类 *Izumo* 的多克隆抗体能使精子无法与去透明带的仓鼠卵融合^[9]。这些结果均表明 *Izumol* 参与介导并影响精卵融合过程。

目前,对于 *Izumol* 基因的研究多在哺乳动物精卵融合方面。牛^[17]、猪^[1]、内蒙古白绒山羊^[14,18]、绵羊(品种未知)^[14,18]和斑马鱼^[19]的 *Izumol* 基因被成功克隆。内蒙古白绒山羊、绵羊(品种未知)2者的 *Izumol* 基因同源性高达 99.9%,并与牛、鼠和人 *Izumol* 基因高度同源^[18]。然而,*Izumol* 基因在各个物种中的多态性以及产生子代数目的相关性研究,特别是有关多羔和常年发情的高繁殖力绵羊小尾寒羊^[20-21] *Izumol* 基因的克隆,多态性检测及与产羔数的关联研究尚未见报道。本课题组前期对来自 10 个绵羊品种的 99 个个体进行了全基因组重测序,获得了大量的基因多态性数据。为研究 *Izumol* 基因的多态性及与产羔数的关系,本研究拟利用 PCR 和直接测序法对小尾寒羊和苏尼特羊 *Izumol* 基因 DNA 进行扩增和测序,并与本课题组前期绵羊重测序数据比对,在多羔和单羔绵羊群体中筛选出 SNP 位点,并采用 Sequenom MassARRAY® 技术进行 *Izumol* 基因分型,研究其 SNP 位点的各种基因型在各群体中的分布,以期获得与繁殖相关的候选 SNPs 位点,为绵羊遗传育种研究提供新的分子标记。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

选择 760 只年龄在 3 岁左右的经产绵羊,包括:有产羔数记录的多羔品种小尾寒羊 380 只;5 个单羔品种共计 380 只(单羔品种分别是苏尼特羊 100 只,滩羊 80 只,萨福克羊 39 只,杜泊羊 30 只,草原型藏羊 131 只)。其中:小尾寒羊来自山东省郓城县诚联小尾寒羊种羊场和山东省章丘市晟益牧业有限公司,苏尼特羊来自内蒙古巴彦淖尔市乌拉特中旗民羊牧业有限责任公司,滩羊来自宁夏盐池县宁夏朔牧盐池滩羊繁育有限公司,萨福克、杜泊羊来自北京市顺义区北京奥鑫牧业有限公司;草原型藏羊来自西藏当雄县。对所有绵羊进行颈静脉采血,每只绵羊分别采血 10 mL,经 EDTA 抗凝处理后 4 °C 保存备用。

$2 \times Taq$ PCR Master Mix(MT201-01)购自北京博迈德; TaKaRa LA *Taq*[®] with GC Buffer (RR02AG)、TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4. 0 (9762)、*E. coli* DH5 α Competent Cells (9057)、pMD[™] e18-T Vector Cloning Kit (6011)均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 DNA 提取及检测

参照血液基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)说明书提取 DNA。用 Nanodrop 2000 检测 DNA 的纯度和浓度,1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.3 引物设计与合成

根据绵羊 *Izumol* 基因全基因组序列(GenBank 登录号为:NC_019471.2),采用 Primer Premier 5.0 软件设计 *Izumol* 基因 DNA 序列扩增引物。*Izumol* 基因 DNA 序列较长,为了方便测序和提高测序准确度,故分段设计 4 对扩增引物,分别是 P1、P2、P3 和 P4。引物由北京天一辉远生物科技有限公司合成。引物序列、扩增片段大小及退火温度见表 1。

1.4 DNA 序列扩增

以提取的血液基因组 DNA 为模板,用上、下游分段引物扩增目的基因 DNA 序列。

使用 TaKaRa 公司高保真 LA *Taq* 酶体系进行 PCR 扩增,具体反应体系如下:0.25 μ L TaKaRa LA *Taq* (5 U/ μ L), 10 μ L $2 \times$ GC Buffer I (5 mmol/L Mg^{2+} Plus), 3 μ L dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 4.25 μ L RNase-free ddH₂O, 0.5 μ L 上游引物, 0.5 μ L 下游引物, 1.5 μ L 血液 DNA 模板,总计 20 μ L 反应体系。

1.4.2 PCR 反应程序

Izumol 基因:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s, Ta 退火温度退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,35 个循环;72 °C 延伸 8 min。反应结束后,PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测所得片段大小,将阳性扩增产物送上海生工生物工程有限公司克隆测序。

1.5 SNP 位点筛选

DNAMAN 软件进行多重比对和分析目的基因 DNA 序列,并结合 Chromas 软件中的峰图判断和本课题组前期重测序数据,以同一位点不同碱基出现比例 > 30% 认定为 SNP 位点。初步筛选得到 SNP 位点,鉴定同义突变和非同义突变。

表1 绵羊 *Izumol* 基因 DNA 扩增引物Table 1 Primers used for amplifying DNA of *Izumol* gene in sheep

引物名称 Primer name	用途 Usage	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	扩增片段/bp Product size	退火温度/℃ Annealing temperature
P1	分段扩增第1段	F:TCCGAGGGAGTGAGTCAGATAC R:ACAGGTCAGTGTTCGGGAGT	957	64
P2	分段扩增第2段	F:CCAGGACACAATCACGCCTCCA R:GTCTAAGAATTGCGGAGGTGAGA	970	64
P3	分段扩增第3段	F:TGGCTCCAGTCTCCACCCTCTT R:TGA ACTCCAGGCTCTGCAGACA	973	60
P4	分段扩增第4段	F:GGTGCCAGACTCCCATCTTC R:TAGCGTTACCTTCTCGGGT	1 097	64

1.6 基因分型

对筛选获得的目的基因 SNP 位点,通过 Sequenom MassARRAY® (Sequenom iPLEX™ assay, San Diego, CA) 基因分型系统对小尾寒羊、苏尼特羊、滩羊、萨福克羊、杜泊羊和草原型藏羊血液 DNA 样品进行 SNP 分型,试验步骤按照仪器操作指南进行。试验由北京君诺德生物技术有限公司完成。

1.7 统计分析

用 Popgene 32(version 3.2)软件和 PIC-CALC 程序对获得的 SNP 位点分型结果进行处理,计算其杂合度 H_e (Heterozygosity)、多态信息含量 PIC (Polymorphism information content) 等。采用 SPSS 18.0 软件卡方检验对 2 个品种的各 SNPs 位点基因型频率和基因频率进行差异显著性检验,并与产羔数进行相关性分析。相关性分析模型为:

$$y_{ijkl} = \mu + \text{Genotype}_i + P_j + S_k + e_{ijkl}$$

式中: y_{ijkl} 为性状观察值; μ 为总体均数;Genotype_{*i*} 为基因型效应; P_j 为胎次效应; S_k 为场次效应; e_{ijkl} 为随机误差。假定 e_{ijkl} 相互独立,服从 $N(0, \sigma^2)$ 分布。

2 结果与分析

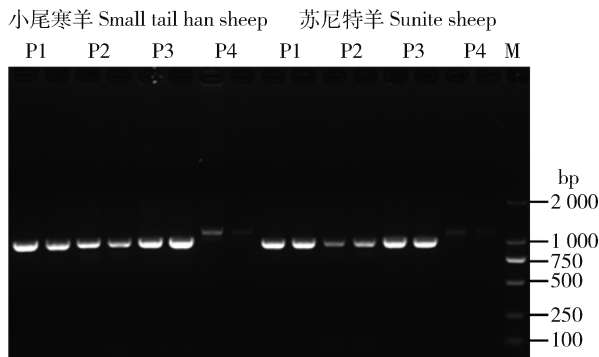
2.1 血液 DNA 检测结果

利用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测小尾寒羊和苏尼特羊组织 DNA 的纯度、浓度和完整性。检测结果发现, D_{260nm}/D_{280nm} 比值都在 1.8~2.0 范围内,浓度均在 30 ng/μL 以

上,电泳条带合格,可用于后续试验。

2.2 DNA 序列扩增结果

凝胶电泳结果显示 PCR 扩增的 DNA 片段条带明亮且单一,大小与设计一致,说明扩增结果良好(图 1)。使用 DNAMAN 软件对测序得到的 DNA 片段进行序列拼接,成功得到 2 种绵羊 *Izumol* 基因完整 DNA 序列。特克赛尔羊 *Izumol* 基因 DNA 全长序列为 3 326 bp,本试验扩增得到的小尾寒羊 *Izumol* 基因 DNA 全长序列 3 385 bp,苏尼特羊 *Izumol* 基因 DNA 全长序列 3 382 bp。BLAST 结果显示二者与特克赛尔羊 *Izumol* 基因 DNA 序列的相似性都高于 95%。与 NCBI 数据库中提供的特克赛尔羊 *Izumol* 基因 DNA 序列相比:在



M: DL2 000 DNA 分子量标记; P1~P4: 绵羊 *Izumol* 基因 DNA 扩增引物。

M, DL2 000 DNA marker; P1 - P4, primers used for amplifying DNA of *Izumol* gene in sheep.

图 1 *Izumol* 基因序列分段扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of segmental amplification products of *Izumol* gene

Izumol 基因 DNA 序列 605 bp 位置,小尾寒羊和苏尼特羊分别多出了 57 和 55 bp 的序列(57 bp: ACCCCCCACCCCCCGCGCAGATGAGGCCA-CACTGGAAAAGGCATCCTGGAGTTTG; 55 bp: ACCCCCCACCCCCCGCGCAGATGAGGCCACA-CTGGAAAAGGCATCCTGGAGTTTG)。

2.3 SNP 位点筛选结果分析

用 4 对引物分别对小尾寒羊和苏尼特羊的 60 个样品进行目的基因序列的 SNP 位点筛选,对 PCR 扩增特异性好的单一条带进行双向测序,测序峰图清晰可辨的位点用于 SNP 统计共获得了 5 个 SNP 位点(g. 54409483A>G, g. 54410565A>G,

g. 54411606C>A, g. 54411750T>C, g. 54411792A>G)(图 2)。另外结合本课题组前期对 10 个绵羊品种的 99 个个体进行的全基因组重测序数据,筛选得到 *Izumol* 基因的另外 3 个 SNP 突变位点(g. 54409033T>A, g. 54412107C>A, g. 54412135A>G)。共筛选得到 8 个潜在的 SNPs 位点,6 个位于外显子区域,均为错义突变,2 个位于 5' UTR。其中 A/G 转换的数量最多,共有 4 个;T/C 转换的数量为 1 个;C/A 颠换 2 个;T/A 颠换 1 个;不存在 G/C 颠换和 G/T 颠换。转换的数量占总检测到的 SNPs 位点的 62.5%,颠换占 37.5%。

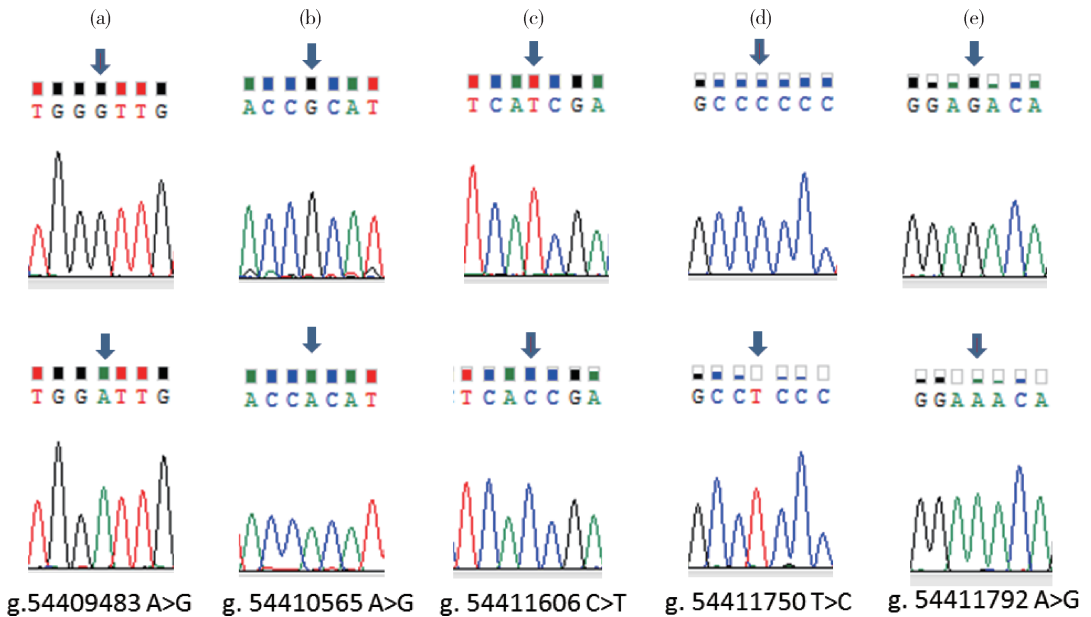


图 2 通过扩增获得的 5 个 *Izumol* 基因 SNP 位点

Fig. 2 Five SNPs of *Izumol* gene obtained by amplification

2.4 *Izumol* 基因 SNP 位点与绵羊产羔性状关联分析

根据分型所获得的数据,对上述 8 个位点进行初步筛选,将在单、多羔绵羊群体中位点分布没有差异的 SNP 位点排除,最终筛选获得的 g. 54412135A>G 和 g. 54412107C>A 2 个位点。通过基因分型发现:*Izumol* 基因 g. 54412135A>G 位点在多羔和单羔绵羊品种中存在 GG、GA 和 AA 3 种基因型,g. 54412107C>A 在多羔品种中存在 CC 和 CA 2 种基因型,而在单羔品种中存在 CC、CA 和 AA 3 种基因型(表 2)。g. 54412135A>G 位点在小尾寒羊、滩羊和草原型藏羊品种中存在 GG、GA 和 AA 3 种基因型,而在苏尼特羊中存在 GG 和

GA 2 种基因型,在萨福克羊和杜泊羊中仅有 GG 1 种基因型;g. 54412107C>A 在小尾寒羊、苏尼特羊、萨福克羊和草原型藏羊品种中存在 CC 和 CA 2 种基因型,而在滩羊和杜泊羊品种中存在 CC、CA 和 AA 3 种基因型(表 3)。*Izumol* 基因的 g. 54412107C>A 位点的基因型频率和基因频率在单、多羔绵羊群体间的分布差异均极显著($P < 0.01$)。

利用 Popgen 32 软件统计分析绵羊 *Izumol* 基因 2 个品种各 SNP 位点的多态性。由表 3 可知,在 6 个品种中的 g. 54412135A>G 多态位点多态信息含量(PIC)都属于低度多态($PIC < 0.25$);杜泊羊的 g. 54412107C>A 多态位点属于中度多态($0.25 <$

PIC<0.5),在其他5个品种中都属于低度多态(PIC<0.25);仅苏尼特羊的g.54412135A>G多态

位点处于哈代温伯格平衡,6个绵羊品种的g.54412107C>A多态位点,均处于哈代温伯格平衡。

表2 在单、多羔绵羊品种 *Izumol* 基因 2 个位点的基因型频率和等位基因频率分析

Table 2 Genotype and allele frequencies of two SNPs of *Izumol* gene in monotocous and polytocous sheep

位点 Locus	基因型 Genotype	多羔中基因 型频率	单羔中基因 型频率	卡方检验 (<i>P</i> 值) χ^2 test (<i>P</i> value)	等位基因 Allele	多羔基因 频率	单羔基因 频率	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
		Genotype frequency in multiparous sheep	Genotype frequency in uniparous sheep			Allele frequency in multiparous sheep	Allele frequency in uniparous sheep	
g.54412135A>G	GG	0.88	0.87	0.97	G	0.93	0.93	0.82
	GA	0.11	0.12		A	0.07	0.07	
	AA	0.01	0.01					
g.54412107C>A	CC	0.92	0.81	0.00	C	0.96	0.89	0.00
		0.18	0.16		A	0.04	0.11	
	AA	0.00	0.03					

注: $P<0.01$ 表示差异极显著。

Note: $P<0.01$ indicates extremely significant difference.

表3 6个绵羊品种中 *Izumol* 基因的 2 个 SNPs 位点的群体遗传学分析

Table 3 Genetic polymorphism information of *Izumol* gene two SNPs in six sheep breeds

位点 Allele	群体 Breed	基因型频率			等位基因 频率		多态信 息含量 PIC	杂合度 HE	有效 等位 基因数 NE	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
		Genotype frequency			Allele frequency					
		GG	GA	AA	G	A				
g.54412135A>G	小尾寒羊 Small Tail Han sheep	0.88	0.11	0.01	0.93	0.07	0.12	0.13	1.15	0.01
	滩羊 Tan sheep	0.8	0.17	0.03	0.89	0.11	0.18	0.20	1.25	0.04
	苏尼特羊 Sunite Sheep	0.89	0.11	0	0.94	0.06	0.10	0.10	1.12	0.56
	萨福克羊 Suffolk sheep	1	0	0	1	0	0	0	1	NA
	杜泊羊 Dorper sheep	1	0	0	1	0	0	0	1	NA
	草原藏羊 Prairie Tibetan sheep	0.89	0.09	0.02	0.93	0.07	0.12	0.13	1.15	0.04

表 3(续)

位点 Allele	群体 Breed	基因型频率 Genotype frequency			等位基因 频率 Allele frequency		多态信 息含量 PIC	杂合度 HE	有效 等位 基因数 NE	P 值 P value
		GG	GA	AA	G	A				
g. 54412107C>A	小尾寒羊 Small Tail Han sheep	0.96	0.04	0	0.96	0.04	0.07	0.08	1.08	0.42
	滩羊 Tan sheep	0.83	0.16	0.01	0.91	0.09	0.14	0.16	1.19	0.81
	苏尼特羊 Sunite Sheep	0.97	0.03	0	0.98	0.02	0.03	0.03	1.03	0.88
	萨福克羊 Suffolk sheep	0.66	0.34	0	0.83	0.17	0.24	0.28	1.40	0.20
	杜泊羊 Dorper sheep	0.15	0.50	0.35	0.40	0.60	0.37	0.48	1.93	0.84
	草原藏羊 Prairie Tibetan sheep	0.86	0.14	0	0.93	0.07	0.12	0.13	1.15	0.65

注： $P>0.05$ 表示位点在该品种中处于哈代温伯格平衡状态； $P<0.05$ 表示位点在该品种中不处于哈代温伯格平衡状态。

Note: $P>0.05$ indicates the locus was under Hardy-Weinberg equilibrium. $P<0.05$ indicates the locus was not under Hardy-Weinberg equilibrium.

Izumol 基因 g. 54412135A>G 和 g. 54412107C>A 位点的不同基因型与小尾寒羊产羔数的关联分析统

计结果。可看出 2 个位点不同基因型与小尾寒羊不同胎次产羔数之间,不存在显著关联($P>0.05$)(表 4)。

表 4 *Izumol* 基因 2 个多态位点的不同基因型与小尾寒羊产羔数的关联分析

Table 4 Association of different SNP genotypes of the *Izumol* gene with litter size in Small Tail Han sheep

位点 Locus	基因型 Genotype	第 1 胎 样本数 No. of the 1 st parity	第 1 胎 最小二乘均 值及标准误 Litter size of the 1 st parity	第 2 胎样 本数 No. of the 2 nd parity	第 2 胎最小 二乘均值及 标准误 Litter size of the 2 nd parity	第 3 胎 样本数 No. of the 3 rd parity	第 3 胎最小 二乘均值 及标准误 Litter size of the 3 rd parity
g. 54412135 A>G	AA	5	1.60±0.35	5	2.20±0.39	2	4.00±0.72
	GA	39	2.21±0.13	41	2.46±0.13	20	2.95±0.23
	GG	296	2.16±0.05	326	2.23±0.05	108	2.83±0.10
g. 54412107 C>A	CC	313	2.14±0.04	339	2.26±0.05	119	2.87±0.09
	CA	25	2.00±0.16	30	2.10±0.16	10	2.80±0.32

3 讨论与结论

基因序列的外显子区域是相对保守的,因此在外显子区 SNP 位点比较少,因此,外显子出现变异的频率仅为内含子等区域的 $1/5^{[22]}$ 。外显子区域中发生变异的影响远 > 内含子区,因为外显子的变异可能会造成氨基酸的改变,从而改变蛋白质的性质与功能,然而,真核生物基因表达调控非常复杂,是基因与多种转录因子共同参与、相互作用的结果。基因的非翻译区(UTR)常常参与基因的表达调控。5'UTR 常常可以决定转录的水平 and 方式,而 3'UTR 可以调控 mRNA 的稳定性^[23-25]。因此,外显子区和 5'UTR 的基因变异常常会直接影响生物性状,在遗传育种的研究中意义重大。

自 2005 年 Inoue 等^[9]发现 Izumo1 与精卵结合相关后,其功能和作用机制的研究在哺乳动物中展开,虽有报道陆续克隆了牛^[17]、猪^[1]、山羊^[14,18]、绵羊^[14,18]和斑马鱼^[19]的 *Izumo1* 基因,而对于其单核苷酸多态性关注度并不高,*Izumo1* 基因在各个物种中的多态性与产生子代数目的相关性的研究还未见报道。目前在 Ensemble 数据库 (http://asia.ensembl.org/Ovis_aries/Transcript/ProtVariations?db=core;g=ENSOARG00000012130;)中发布的绵羊(*Ovis aries*) *Izumo1* 基因的 SNPs 位点只有 7 条记录。本研究在 *Izumo1* 基因 DNA 序列中筛选到 8 个 SNPs 位点,丰富了绵羊 *Izumo1* 基因的单核苷酸多态性。其中,在外显子区筛选到 6 个 SNPs 位点并均为错义突变,遗憾的是无法在 6 个绵羊品种中进行基因分型,只有 2 个处于 5'UTR 中的位点分型成功。

产羔数是绵羊重要的繁殖性状,已有研究对其研究主要聚焦在母羊排卵方面,发现了诸如生长分化因子 9(GDF9)、骨形态发生蛋白 15(BMP15)和骨形态发生蛋白受体 IB(BMPRI1B)等高繁殖力主效基因^[26-30],尤其是显著影响小尾寒羊排卵数的 *BMPRI1B* 基因 *FecB* 突变^[31]。精子 Izumo1 蛋白,作为一种跨膜蛋白,主要对哺乳动物受精过程中的精卵融合具有重要作用^[9],能够通过和卵子的识别和融合影响受精过程,猜测其可能对于绵羊繁殖也至关重要^[14]。Inoue 等^[9]利用重组 Izumo 蛋白制备的多克隆抗体进行免疫标识,发现小鼠 Izumo 蛋白大小为 56.4 ku,仅在睾丸组织中表达。Kim 等^[1]研究证实 *Izumo1* 蛋白位于精子质膜内部,在精子

上特异性表达,只在精卵融合时才会在精子头部检测到。本研究只对小尾寒羊母羊进行了产羔数的关联分析,发现 *Izumo1* 基因的 2 个多态性位点与小尾寒羊母羊不同胎次产羔数之间不存在显著关联。推测 *Izumo1* 基因可能在母羊个体本身并没有重要的生物学作用,与母羊的产羔数性状并不相关。在其他物种中,*Izumo1* 是否与产生子代数量相关有待进一步研究。*Izumo1* 作为精卵质膜融合的关键性配体蛋白,直接决定了精子是否能够正常与卵子发生融合,推测 *Izumo1* 基因可能与公羊的繁殖力性状有关。本研究克隆了完整的小尾寒羊和苏尼特羊的 *Izumo1* 基因,并在 *Izumo1* 基因中获得了 8 个 SNPs 位点。其中:*Izumo1* 基因的 g. 54412107C>A 位点基因型频率和等位基因频率在单、多羔绵羊群体间的分布差异均极显著。*Izumo1* 基因 g. 54412135A>G 和 g. 54412107C>A 位点的不同基因型和小尾寒羊不同胎次的产羔数之间没有显著关联($P>0.05$)。

参考文献 References

- [1] Kim E, Kim J S, Lee Y, Song B S, Sim B W, Kim S U, Saitoh T, Yazawa H, Nunoya T, Chang K T. Molecular cloning, characterization of porcine IZUMO1, an IgSF family member[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2013, 48(1): 90-97
- [2] Kim E, Yamashita M, Kimura M, Honda A, Kashiwabara S, Baba T. Sperm penetration through cumulus mass and *Zona pellucida* [J]. *The International Journal of Developmental Biology*, 2008, 52(5-6): 677-682
- [3] Myles D G, Primakoff P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg[J]. *Biology of Reproduction*, 1997, 56(2): 320-327
- [4] Yuan R Y, Primakoff P, Myles D G. A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1997, 137(1): 105-112
- [5] Evans J P, Schultz R M, Kopf G S. Roles of the disintegrin domains of mouse fertilins α and β in fertilization[J]. *Biology of Reproduction*, 1998, 59(1): 145-152

- [6] Wong G E, Zhu X L, Prater C E, Oh E, Evans J P. Analysis of fertilin α (ADAM1)-mediated sperm-egg cell adhesion during fertilization and identification of an adhesion-mediating sequence in the disintegrin-like domain[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(27): 24937-24945
- [7] Inoue N. Novel insights into the molecular mechanism of sperm-egg fusion via IZUMO1[J]. *Journal of Plant Research*, 2017, 130(3): 475-478
- [8] Cho C, Bunch D O, Faure J E, Goulding E H, Eddy E M, Primakoff P, Myles D G. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta[J]. *Science*, 1998, 281(5384): 1857-1859
- [9] Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs[J]. *Nature*, 2005, 434(7030): 234-238
- [10] Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright G J. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization[J]. *Nature*, 2014, 508(7497): 483-487
- [11] Okabe M, Adachi T, Takada K, Oda H, Yagasaki M, Kohama Y, Mimura T. Capacitation-related changes in antigen distribution on mouse sperm heads and its relation to fertilization rate *in vitro*[J]. *Journal of Reproductive Immunology*, 1987, 11(2): 91-100
- [12] Yamashita M, Yamagata K, Tsumura K, Nakanishi T, Baba T. Acrosome reaction of mouse epididymal sperm on oocyte *Zona pellucida*[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2007, 53(2): 255-262
- [13] Ellerman D A, Pei J M, Gupta S, Snell W J, Myles D, Primakoff P. Izumo is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm [J]. *Molecular Reproduction & Development*, 2009, 76(12): 1188-1199
- [14] Aydin H, Sultana A, Li S, Thavalingam A, Lee J E. Molecular architecture of the human sperm IZUMO1 and egg JUNO fertilization complex[J]. *Nature*, 2016, 534(7608): 562-565
- [15] Xing W J, Han B D, Wu Q, Zhao L, Bao X H, Bou S. Molecular cloning and characterization of *Izumol* gene from sheep and cashmere goat reveal alternative splicing[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(3): 1995-2006
- [16] Naz R K. Immunocontraceptive effect of Izumo and enhancement by combination vaccination[J]. *Molecular Reproduction & Development*, 2008, 75(2): 336-344
- [17] KIM E. Molecular cloning and characterization of *Izumol* gene from bovine testis [J]. *Journal of Animal Science and Technology*, 2015, 57: 16.
- [18] 邢万金. 绒山羊和绵羊 *Izumol* 和 *CD9* 基因的克隆及其相互作用的初步研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2009
- Xing W J. Molecular cloning and characterization of *Izumol* and *CD9* genes from sheep and cashmere goat and preliminary study on their interaction [D]. Huhahaote: Inner Mongolia University, 2009 (in Chinese)
- [19] 杜文文. *Izumol* 基因在斑马鱼精卵识别和融合过程中的功能研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2018
- Du W W. Study on the function of *Izumol* gene in the process of sperm-egg recognition and fusion in zebrafish [D]. Zhanjiang, Guangdong Ocean University, 2018 (in Chinese)
- [20] 田志龙, 刘秋月, 王翔宇, 狄冉, 胡文萍, 王玉琴, 张效生, 张金龙, 储明星. *CYP11A1*、*CYP17A1*、*CYP19A1* 基因在小尾寒羊下丘脑-垂体-卵巢轴的表达[J]. 中国农业大学学报, 2019, 24(4): 87-93
- Tian Z L, Liu Q Y, Wang X Y, Di R, Hu W P, Wang Y Q, Zhang X S, Zhang J L, Chu M X. Expression of *CYP11A1*, *CYP17A1* and *CYP19A1* genes in hypothalamus-pituitary-ovary axis of Small Tail Han sheep[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2019, 24(4): 87-93 (in Chinese)
- [21] 安雪姣, 潘章源, 赵生国, 李春艳, 田志龙, 狄冉, 刘秋月, 胡文萍, 王翔宇, 张效生, 张金龙, 蔡原, 储明星. 黄体期和卵泡期小尾寒羊 KiSS-1 与 RFRP-3 组织表达研究[J]. 中国农业大学学报, 2019, 24(2): 82-90
- An X J, Pan Z Y, Zhao S G, Li C Y, Tian Z L, Di R, Liu Q Y, Hu W P, Wang X Y, Zhang X S, Zhang J L, Cai Y, Chu M X. Tissue expression of KiSS-1 and RFRP-3 in Small Tail Han sheep at luteal and follicular periods[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2019, 24(2): 82-90 (in Chinese)
- [22] Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics [J]. *Genetics Selection Evolution*, 2002, 34(3): 275-305
- [23] Misquitta C M, Iyer V R, Werstiuk E S, Grover A K. The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2001, 224(1-2): 53-67

- [24] Garcia-Gras E A, Chi P, Thompson E A. Glucocorticoid-mediated destabilization of cyclin D3 mRNA involves RNA-protein interactions in the 3'-untranslated region of the mRNA [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(29): 22001-22008
- [25] Tebo J M, Datta S, Kishore R, Kolosov M, Major J A, Ohmori Y, Hamilton T A. Interleukin-1-mediated stabilization of mouse KC mRNA depends on sequences in both 5'- and 3'-untranslated regions [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(17): 12987-12993
- [26] Våge D I, Husdal M, Kent M P, Klemetsdal G, Boman I A. A missense mutation in growth differentiation factor 9 (GDF9) is strongly associated with litter size in sheep [J]. *BMC Genetics*, 2013, 14(1): 1
- [27] McNatty K P, Heath D A, Clark Z, Reader K, Juengel J L, Pitman J L. Ovarian characteristics in sheep with multiple fecundity genes [J]. *Reproduction*, 2017, 153(2): 233-240
- [28] Oraon T, Singh D K, Ghosh M, Kullu S S, Kumar R, Singh L B. Allelic and genotypic frequencies in polymorphic Booroola fecundity gene and their association with multiple birth and postnatal growth in Chhotanagpuri sheep [J]. *Veterinary World*, 2016, 9(11): 1294-1299
- [29] Ahlawat S, Sharma R, Roy M, Mandakmale S, Prakash V, Tantia M S. Genotyping of novel SNPs in *BMPRI1B*, *BMP15*, and *GDF9* genes for association with prolificacy in seven Indian goat breeds [J]. *Animal Biotechnology*, 2016, 27(3): 199-207
- [30] Estienne A, Lahoz B, Jarrier P, Bodin L, Folch J, Alabart J L, Fabre S, Monniaux D. BMP15 regulates the inhibin/activin system independently of ovulation rate control in sheep [J]. *Reproduction*, 2017, 153(4): 395-404
- [31] Mahdavi M, Nanekarani S, Hosseini S D. Mutation in *BMPRI1B* gene is associated with litter size in Iranian Kolehkoobi sheep [J]. *Animal Reproduction Science*, 2014, 147(3-4): 93-98

责任编辑: 杨爱东