

哈萨克羊 *VRTN* 基因多态性与胸椎数量性状的关联分析

李慧向¹, 杨志江², 张梦丹¹, 刘莉¹, 倪伟¹, 胡圣伟^{1*}

(1. 石河子大学生命科学学院, 新疆 石河子 832000; 2. 新疆轻工职业技术学院食品与生物技术分院, 乌鲁木齐 830021)

摘要: *VRTN* 基因在胚胎的早期胸腔发育中起着重要作用, 并调节胸椎的数量和发育。为了研究哈萨克绵羊 *VRTN* 基因的单核苷酸多态性 (SNP) 与胸椎数目性状之间的关系, 使用聚合酶链反应单链构象多态性 (PCR-SSCP) 来检测 399 只哈萨克羊 *VRTN* 基因的多态性。通过独立卡方检验分析了哈萨克绵羊 *VRTN* 基因与胸椎数量性状的相关性, 并利用 DNA 测序技术证实了 PCR-SSCP 试验的结果。发现哈萨克绵羊的 SNP (rs82505838: C>T) 与胸椎数目显著相关 ($P<0.01$), 偏离哈迪温伯格平衡。研究结果表明, *VRTN* 基因 SNP (rs82505838: C>T) 可能影响哈萨克羊的胸椎数量, 可能被用作胸椎性状数量的标记和哈萨克羊未来分子遗传育种的分子标记位点。

关键词: 绵羊; PCR-SSCP; *VRTN*; 多胸椎

中图分类号: S826

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)03-0075-04

Association of *VRTN* Gene with Multi-Vertebrae and Quantitative Traits in Kazakh Sheep

LI Huixiang¹, YANG Zhijiang², ZHANG Mengdan¹, LIU Li¹, NI Wei¹, HU Shengwei^{1*}

(1. School of Life Science, Shihezi University, Shihezi 832000; 2. Xinjiang Light Industry Vocational and Technical College, Food and Biotechnology Branch, Urumqi 830021, China)

Abstract: *VRTN* genes play an important role in the early development of the thoracic of the embryo, and regulate the number and development of the thoracic vertebrae. To investigate the association between single nucleotide polymorphisms (SNP) of the *VRTN* gene and the thoracic vertebrae number in Kazakh sheep, we utilized the PCR-SSCP technique to examine the polymorphism of the *VRTN* gene in a sample of 399 Kazakh sheep. The correlation between the *VRTN* gene of Kazakh sheep and the quantitative traits of thoracic vertebrae was analyzed by independent chi-square test, and the results of PCR-SSCP experiment were confirmed by DNA sequencing technology. We discovered a significant association between the SNP (rs82505838: C>T) in Kazakh sheep and the thoracic vertebrae number ($P<0.01$), which notably deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium. The results indicated that the *VRTN* gene SNP (rs82505838: C>T) could influence the thoracic vertebrae count in Kazakh sheep and could serve as a marker for this trait and a molecular marker for future genetic breeding efforts in Kazakh sheep.

Key words: Sheep; PCR-SSCP; *VRTN*; Multi-vertebrae

在脊椎动物的骨骼中可以清楚地看到分段的身体特征^[1]。脊椎动物的身体被分段的脊椎分为颈椎、胸椎、腰椎、荐椎、尾椎等, 不同物种中脊椎数量不同, 而同种物种的脊椎数目一般是固定的^[2]。研究表明, 颈椎数量一般为 7 个, 而胸腰椎

区段会发生突变导致脊椎数目发生变异。野猪的胸腰椎数量为 19 个, 在欧洲商业猪的研究中发现其胸腰椎的数量为 20~23 个^[3]。而这种变化可能是商业育种中人工选择的结果, 事实证明胸腰椎数量的增加对畜牧业生产中产肉量的增加是有益的^[4]。

张立岭等^[5]对蒙古羊多脊椎性状进行调查分析表明, 增加 1 个胸椎使脊柱增加约 2.40 cm, 增加 1 个腰椎脊柱加长约 3.50 cm, 胸腰椎数目各增加一个时脊柱长度可以增加 5.90 cm。无论增加 1

收稿日期: 2020-05-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31660644); 兵团中青年科技创新领军人才计划项目 (2016BC001)

作者简介: 李慧向 (1986-), 女, 在读硕士, 研究方向为遗传学。

通讯作者: 胡圣伟, 男, 博士, 教授, E-mail: hushengwei@163.com

个胸椎还是增加1个腰椎,可使多脊椎羊羔的活重、胴体重、净肉重分别比普通羊多4.77~7.16 kg、4.13~5.50 kg、3.36~4.90 kg。本实验室先前的研究表明,多腰椎性状(T13L7)比正常性状(T13L6)的平均胴体长度和平均胴体重量增加1.88 cm、1.56 kg;多胸椎性状(T14L6)比正常性状(T13L6)的平均胴体长度和平均胴体重量增加2.86 cm、1.94 kg^[6]。在多脊椎性状调查中,相比较多胸椎性状与多腰椎性状,哈萨克羊平均胴体长度和平均胴体重量增加0.98 cm、0.38 kg^[7]。通过对正常胸椎及多胸椎的哈萨克羊进行全基因组分析,选出了与多胸椎发育相关的基因为位于7号染色体的*VRTN*基因^[8]。为了分析*VRTN*基因多态性,使用PCR-SSCP的方法进行鉴定*VRTN*与哈萨克羊多胸椎之间的关系。

1 材料方法

1.1 材料

1.1.1 样本

哈萨克羊样品均于石河子屠宰场采集(中国新疆石河子)。采样时记录哈萨克羊的表型,并于胸椎附近采集肌肉样本。共收集399个哈萨克绵羊肌肉样本,其中,13个胸椎的绵羊(T13L6)样本160份,14个胸椎的绵羊(T14L6)样本239个。冻存在-80℃冰箱中,用于提取DNA。

1.1.2 试剂

丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、NaOH、牛磺酸、二甲苯青、亲和硅烷、剥离硅烷、琼脂糖、TEMED、溴化乙锭、去离子甲酰胺、过硫酸铵、EDTA、DNA提取试剂盒(TIANGEN)。PCR引物的合成及测序在北京睿博兴科生物技术有限公司完成。

1.1.3 仪器

ZX-3D电热恒温水槽(金坛科兴仪器厂)、BIORAD凝胶成像系统(BIORAD公司)、恒温磁力搅拌器(常州国华电器有限公司)、PCR扩增仪(德国Eppendorf公司)、JY600C电泳仪(北京六一)、低温恒温槽(上海精密科学仪器有限公司)、JY-SCZ8型垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据先前的高通量测序结果^[8],选择*VRTN*基因上Fst值较高的SNP,并从NCBI基因库下载*VRTN*(GenBank登录号NC_040258.1)序列设计具有特异性的引物。使用具有较高Fst值(群体间分化指数,Fst值越大,说明遗传距离越远)的4个SNP位点进行试验,包括rs82503734、rs82504715、

rs82505838、rs82532443。4个SNP分别编号:SNP1、SNP2、SNP3、SNP4,并使用Primer 5.0软件进行引物设计,引物命名为F1-R1、F2-R2、F3-R3、F4-R4(表1)。

表1 *VRTN*基因的引物序列

序号	引物序列	大小	退火温度
F1	GGCTCATTCTCATCATTAGTCCAA	296 bp	58℃
R1	TCACCAGCCAGTTGACAAGCAT		
F2	GTTTACAGCTCTCGTCGCC	281 bp	60℃
R2	AATGTCACAGTTACAATGGGAA		
F3	CTATGGATACGGGAGCACA	118 bp	63℃
R3	CGTCTTACACCTTTCTCTCT		
F4	AATCTCAGGGAACCCCAAGG	156 bp	64℃
R4	TGAAAAATCCCATGAACAGAGA		

1.2.2 PCR扩增

提取DNA后,根据制造商的说明使用以下反应系统进行PCR扩增:5 μL的预混合物(Takara),0.5 μL的DNA模板(50 ng/μL),0.5 μL的上游和下游引物以及3.5 μL无RNase的ddH₂O。PCR在以下热循环条件下进行:95℃预变性3 min,95℃变性30 s,Tm变性30 s,72℃延伸30 s,终延伸于72℃3 min,一共35个循环。反应完成后,通过溴化乙锭染色的2%琼脂糖凝胶进行电泳检测PCR产物的质量。

1.2.3 SSCP

将检测质量合格的3 μL PCR产物加入含有9 μL变性剂(含有95%去离子甲酰胺,1%二甲苯青,4%0.5 mol/L EDTA(pH 8.0))的EP管中,充分混合后在98℃下变性10 min。将EP管立即置于冰上骤冷(20 min)。对于PCR产物大于200 bp的样品,用10%中性丙烯酰胺凝胶电泳,而小于200 bp的样品用12%中性丙烯酰胺凝胶电泳。电泳在4℃和120 V下进行15 h。凝胶用硝酸银染色并拍照以进行分析^[9]。选取具有不同带型PCR产物进行测序分型。

1.2.4 统计分析

基因分型后,进行数据统计和统计分析。计算期望的频率和数量以验证Hardy-Weinberg平衡,并使用拟合优度卡方检验进行测试^[10]。P<0.05被认为具有统计学意义。所有统计分析均使用统计分析系统软件SPSS 19.0进行。

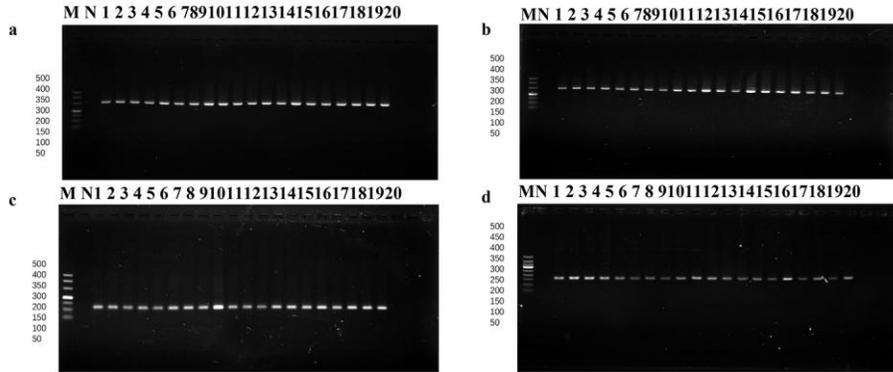
2 结果与分析

2.1 PCR扩增

通过测序结果分析选定了与多胸椎发育相关

的 *VRTN* 基因,为了验证 *VRTN* 基因的多态性与哈萨克羊多胸椎之间的关联性,提取了 160 只 T13L6 哈萨克羊和 239 只 T14L6 哈萨克羊的 DNA,用表 1

中设计的引物进行 PCR 扩增,PCR 扩增结果见图 1。PCR 产物具有较好的特异性,可以进行下一步试验。

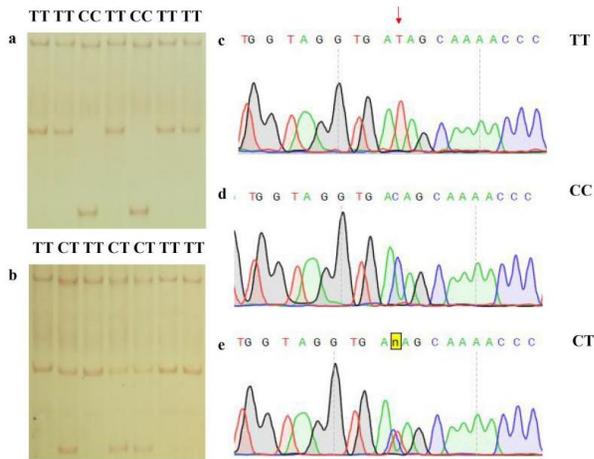


注:a、b、c、d分别为SNP1、SNP2、SNP3、SNP4,M为500 bp Maker,N为空白对照

图1 琼脂糖凝胶结果

2.2 SSCP 分析

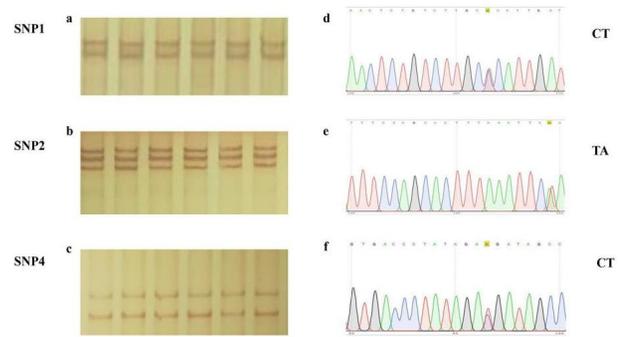
选择的 4 个 SNP 扩增后进行 SSCP 试验,结果发现在 4 个 SNP 中只有 SNP3 具有基因多态性(图 2)。如图 2 所示,SNP3 具有三种不同的带型。对三种带型的 PCR 产物进行测序可知,三种带型的基因型分别为 TT 基因型、CC 基因型和 CT 基因型。



注:a、b为SSCP结果,c、d、e为测序结果

图2 SNP3 结果分析

SSCP 结果表明,其他 3 个 SNP 不具有基因多态性,都只有一种条带(图 3)。基因分型后发现 SNP1 为 CT 基因型,SNP2 为 TA 基因型,SNP4 为 CT 基因型,SNP1、SNP2 和 SNP4 都为杂合子。



注:a、b、c为SSCP结果,d、e、f为测序结果

图3 SNP1、SNP2、SNP4 结果

2.3 统计分析

对 SNP3 在 399 只哈萨克羊中的基因型进行统计,通过 SPSS 软件进行分析,分析结果见表 2。在 160 只 T13L6 性状的哈萨克羊中,TT 基因型数量为 37,CC 基因型数量为 66,CT 基因型数量为 57;T 基因频率为 0.41,C 基因频率为 0.59。在 239 只 T14L6 性状的哈萨克羊中,TT 基因型数量为 158,CC 基因型数量为 25,CT 基因型数量为 56;T 基因频率为 0.78,C 基因频率为 0.22。从两种性状哈萨克羊中可以观察到发生了 C>T 的基因突变。SPSS 结果表明卡方值为 81.101,*VRTN* 基因的 SNP3 与多胸椎性状具有关联性($P<0.001$),偏离哈迪温伯格平衡。SNP3 可能是多胸椎性状的分子标记。

表 2 *VRTN* 基因的 SNP3 统计结果

胸椎数	总样本数	基因型			基因频率		χ^2	P 值
		TT	CC	CT	T	C		
T13L6	160	37	66	57	0.41	0.59	81.101	0
T14L6	239	158	25	56	0.78	0.22		

3 讨 论

SNP是丰富的基因突变体。与罕见的突变不同,SNPs要求等位基因的基因型频率不低于1%^[11]。根据SNP位于基因组中的位置,可以将其分为基因编码区SNP、基因间SNP和基因外围SNP。SNP位于基因组的非编码区占多数,且对个体的表型影响较小,但是此区域内的SNP在群体遗传学和生物进化研究中可用作遗传标记^[12]。目前,SNP已在畜牧业中广泛用作分子标记。在研究猪椎骨数量变异的过程中,发现1号染色体上的SSC1与椎骨数量性状具有相关性^[13]。研究表明,*NR6A1*基因中的C>T突变在该蛋白的192位引起缬氨酸到亮氨酸的突变,最终影响了猪腰椎数量的变化,使6个腰椎变成7个腰椎^[14]。同时,在启动子区域插入291 bp的片段和g.19034 A>C突变会影响*VRTN*基因的表达水平,从而导致猪胸椎数量增加,并且该突变具有明显的剂量依赖性,每增加一个基因突变,脊椎数量增加0.55~0.6个^[15]。猪中影响多脊椎的研究是较完善较全面的,当然多脊椎性状在其他动物中也进行了研究。在对小鼠体内进行*VRTN*基因敲除的试验中发现,*VRTN*基因缺失导致小鼠胚胎致死,表明*VRTN*是脊椎发育必需的^[16]。

多脊椎现象存在多种脊椎动物中,如猪、牛、羊、小鼠^[3,6,16-17],其中家畜动物的多个品种中都具有多脊椎现象。因为多脊椎现象最早是在欧洲猪中进行先验研究,研究机制较明确。虽然国内品种猪中存在同样的多脊椎现象,但是不同物种之间多脊椎的可能关联基因是否存在差异,以及同一物种中由于地理差异和饮食差异之间是否存在差异这些都不得而知。在多个品种羊中发现多脊椎现象,例如蒙古羊、小尾寒羊、多浪羊,哈萨克羊中一样存在多脊椎现象^[5,6,18-20],但是多脊椎现象在绵羊中的机制还不明确。

在先前的研究中,发现哈萨克羊的胸椎数量有所变化,而哈萨克羊的胸椎数量增加时,其生产性能也更好。全基因组重测序分析表明,*VRTN*基因是调节绵羊胸椎数量的主要基因,但*VRTN*基因与绵羊胸椎数量的关系尚不清楚。因此,本研究采用PCR-SSCP技术及DNA测序技术对399只哈萨克羊的*VRTN*基因进行了研究。在*VRTN*基因的rs 82505838基因位点发现了一个C>T碱基突变。在该基因座的优势基因型为T,胸椎的T基因频率为0.78($P<0.001$),T13L6与T14L6之间

差异极显著,说明该SNP位点与多胸椎性状之间具有关联性,该SNP基因座可能是哈萨克羊多胸椎的分子标记。有研究表明基因型与生产性能之间有一定的关系^[21],因此在绵羊的养殖生产中可以有目的地选择优势基因型TT基因型和CT基因型的绵羊,培育出具有多胸椎的绵羊,从而提高绵羊的产肉量。

4 结 论

用PCR-SSCP及DNA测序技术研究399只具有不同数目胸椎的哈萨克羊*VRTN*基因的4个候选SNP。哈萨克绵羊*VRTN*基因的SNP(rs82505838的C>T)与多胸椎发育具有关联性,可能是哈萨克羊多胸椎的分子标记。这项研究将为繁殖胸椎数量增加的优质高产绵羊奠定理论基础。

参考文献:

- [1] Gossler A, de Angelis M H. 6 Somitogenesis[J]Current topics in developmental biology, 1997, 38: 225-287.
- [2] Burke A C, Nelson C E, Morgan B A, et al. Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology[J]. Development, 1995, 121(2): 333-346.
- [3] King J W B, Roberts R C. Carcass length in the bacon pig; its association with vertebrae numbers and prediction from radiographs of the young pig[J]. Animal Science, 1960, 2(1): 59-65.
- [4] King J W B. The heritability of carcass traits in British bacon pigs[J]. Proceedings of the British Society of Animal Production, 2016, 1957: 49-69.
- [5] 张立岭,斯琴毕力格. 动物脊柱的进化与蒙古羊脊椎变异间的关系[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1997(3): 1-6.
- [6] 李村院,詹倩茜,李晓悦,等. 新疆哈萨克羊和阿勒泰羊多脊椎性状分析[J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(3): 59-62.
- [7] Li C, Zhang X, Cao Y, et al. Multi-vertebrae variation potentially contribute to carcass length and weight of Kazakh sheep [J]. Small Ruminant Research, 2017, 150: 8-10.
- [8] Hu S, Li C, Li M, et al. Whole-genome resequencing reveals loci associated with thoracic vertebrae number in sheep[J]. Frontiers in genetics, 2019, 10:1-8.
- [9] Chu M X, Jiao C L, He Y Q, et al. Association between PCR-SSCP of bone morphogenetic protein 15 gene and prolificacy in Jining Grey goats[J]. Animal biotechnology, 2007, 18(4): 263-274.
- [10] Haber M. Exact significance levels of goodness-of-fit tests for the Hardy-Weinberg equilibrium[J]. Human heredity, 1981, 31(3): 161-166.
- [11] Brookes A J. The essence of SNPs[J]. Gene, 1999, 234(2): 177-186.
- [12] Syvänen A C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms[J]. Nature Reviews Genetics, 2001, 2(12): 930-942.

- [23] 杨苗. 具有 ACC 脱氨酶活性促生细菌的筛选、鉴定及其接种效应研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [24] 胡琳, 靳新影, 李靖宇, 等. 沙漠生物土壤结皮中可培养芽孢杆菌对植物种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 华北农学报, 2019, 34(S1): 143-152.
- [25] 徐瑛, 郭晓农, 蔡德育. 解淀粉芽孢杆菌 GB03 对藜麦生长影响的初探[J]. 大麦与谷类科学, 2019, 36(5): 10-14.
- [26] 厉彦芳, 王春阳, 谢菁菁, 等. 侧孢短芽孢杆菌 B8 抑制植物病毒及促进番茄生长作用研究[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(7): 11-16.
- [27] 刘拴成, 杨进成, 马丽华, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 提高玉米生长和产量的效应[J]. 玉米科学, 2010, 18(6): 78-82, 85.
- [28] 贺积强, 李登煜, 张小平, 等. 紫色土硅酸盐细菌的表型特征及溶磷解钾能力[J]. 应用与环境生物学报, 2003(1): 71-77.
- [29] 牛鑫斌, 杨慧, 孙健光, 等. 三株固氮类芽孢杆菌的特点及其对中国青菜的产量和土壤酶活性的影响[J]. 微生物学报, 2018, 58(7): 1213-1223.
- [30] Kim S Y, Sang M K, Weon H Y, et al. Characterization of Multifunctional *Bacillus* sp. GH1-13[J]. The Korean Journal of Pesticide Science, 2016, 20(3): 189-196.
- [31] 宋金秋, 吾鲁木汗·那孜尔别克, 张缙, 等. 具有 ACC 脱氨酶活性的胶股蓝根际细菌的分离鉴定及其促生作用[J]. 吉首大学学报(自然科学版), 2014, 35(5): 43-50.
- [32] 崔曼, 尹彦舒, 张梦琦, 等. 一株大蒜根际细菌特性研究及其对田间大蒜产量和土壤酶活性的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2019(1): 173-179.

(责任编辑:刘洪霞)

(上接第 78 页)

- [13] Mikawa S, Hayashi T, Nii M, et al. Two quantitative trait loci on *Sus scrofa* chromosomes 1 and 7 affecting the number of vertebrae[J]. Journal of Animal Science, 2005, 83(10): 2247-2254.
- [14] Chung A C, Katz D, Pereira F A, et al. Loss of orphan receptor germ cell nuclear factor function results in ectopic development of the tail bud and a novel posterior truncation[J]. Molecular and Cellular Biology, 2001, 21(2):663-677.
- [15] Mikawa S, Sato S, Nii M, et al. Identification of a second gene associated with variation in vertebral number in domestic pigs[J]. BMC genetics, 2011, 12(1): 5-18.
- [16] Duan Y, Zhang H, Zhang Z, et al. *VRTN* is required for the development of thoracic vertebrae in mammals[J]. International Journal of Biological Sciences, 2018, 14(6): 667-681.
- [17] 韩浩园, 王绍强, 黄洁萍, 等. 秦川牛多脊椎性状调查[J]. 中国牛业科学, 2013, 39(6): 78-79.
- [18] 韩立霞, 孙少华, 白瑞景, 等. B 细胞异位基因 2(*Btg2*)多态性与河北小尾寒羊多脊椎性状的关联分析[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(1): 81-86.
- [19] 刘建明, 孙少华, 韩立霞, 等. *ActR II B* 基因单核苷酸多态性与小尾寒羊多脊椎变异的关联研究[J]. 畜牧兽医学报, 2010(8): 29-32.
- [20] 韩立霞. 河北小尾寒羊多脊椎调控基因 *Btg2* 和 *NR6A1* 的多态性分析[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
- [21] 刘志刚, 陈范骏, 王庆祥. 密度对不同玉米基因型产量及其构成因素的影响[J]. 吉林农业科学, 2014, 39(1): 10-12.

(责任编辑:刘洪霞)