

SYNJI 基因 SNPs 与牛、绵羊角的关联性研究

楚康康, 孙志颖, 孙少华*, 乔冬雨, 刘媛

(河北农业大学 动物科技学院, 河北 保定 071001)

摘要: 为确定 *SYNJI* 基因与牛、羊角的关联性, 利用 PCR-SSCP 技术并以 3 个牛品种(荷斯坦奶牛(有角)、安格斯牛(无角)、海福特牛(无角))以及 3 个不同角型的羊品种河北小尾寒羊(无角)、无角道赛特、杂种蒙古羊(有角、无角)为样本, 对 *SYNJI* 基因进行了分析。结果表明: 未发现 *SYNJI* 基因 C3981T 位点的 SNP 与牛、绵羊角的有无存在关联。将不同角型的牛、羊 PCR 产物进行测序, 经过对比也没有发现突变位点, 只是牛羊品种间存在一个 C-T 突变。关于控制牛、绵羊角的基因, 还需进行更加深入的研究。

关键词: 牛、羊无角基因; *SYNJI* 基因; PCR-SSCP

中图分类号: S826 S823 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)07-0158-03

Association between SNPs of *SYNJI* Gene and the Horned/Polled Trait in Cattle and Sheep

CHU Kang-kang¹, SUN Zhi-ying, SUN Shao-hua*, QIAO Dong-yu, LIU Yuan

(Animal Science and Technology College, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: In order to define the relationship between the *SYNJI* gene and cattle or sheep having horns or not, the *SYNJI* gene in three cattle breeds: Holsteins, Angus, and Hareford and three sheep breeds: Small fat-tail sheep of Hebei, Poll Dorset, and Hybrid Mongolian sheep, which show different horn traits, was analyzed by PCR-SSCP. The results indicated that the *SYNJI* gene was not associated to the cattle and sheep horned/polled trait. Except for a C-T SNP existed between breeds of cattle and sheep, other SNP sites were not found. The results indicate that deep researches on the gene which control horns in *Bos taurus* and *Ovis aries* need to be further investigated.

Key words: Cattle and sheep polled gene; *SYNJI* gene; PCR-SSCP

在绵羊饲养过程中, 羊角易对羊造成频繁、严重的撞伤, 以致影响羊的体质量和皮张质量。在羊场, 无角羊有诸多的优点: 便于管理, 减少公羊角斗伤残造成的损失, 无角羊不易破坏围栏, 在舍饲或补饲时, 相同羊舍内容纳无角羊数要多于容纳有角羊数, 从饲料的转化效率来讲, 羊的一对大角也需要很多的营养物质转化而成^[1]。因此, 绵羊角的有无对畜牧生产具有重要意义。

控制牛、羊角的基因位点已经被分别定位在牛的 1 号染色体和羊 10 号染色体上^[2-3]。并且微卫星标记 TGLA49 和 BM6438 被认为与实际上决定牛

无角表型的基因非常接近^[4-6], 微卫星 AGLA226 距离控制羊角基因最近^[3]。但是, 具体的基因及其作用机制尚不十分清楚。Cargill 等^[6]分别对 12 头有角和 12 头无角的荷斯坦牛进行了多态性分析, 找出了 13 个与角有关的 SNPs(单核苷酸多态性), 其中一个位于 *SYNJI* 基因 3'UTR 的 SNP 与角密切相关。研究表明, *SYNJI* 基因的 3'UTR 是 micro RNA 控制基因表达的对象, 通过 silico 分析表明, 这个位于 3'UTR 的 SNP bSYNJI_C3981T 可能干扰 microRNA 的目标位点。目前国内外还没有关于绵羊角基因准确定位位点引物序列的报道。由

收稿日期: 2011-02-10

基金项目: 河北省自然科学基金(c2010000696)

作者简介: 楚康康(1985-), 男, 河北沧州人, 在读硕士研究生, 研究方向: 数量遗传与动物育种。E-mail: ckk8598@163.com

*通讯作者: 孙少华(1958-), 男, 河北沧州人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事牛羊生产学、动物遗传育种学研究。

E-mail: shaohuasun@sina.com

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

于牛与羊存在较高的同源性, 鉴于此, 本试验就牛和羊 *SYNJI* 基因与角的关联性进行了 SNPs 相关研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 测试绵羊群体由沧州青县安格斯公司、保定唐县饲养场提供。利用一次性真空采血管颈静脉采血, 肝素钠抗凝, 采集河北小尾寒羊 26 只、无角道赛特羊 16 只、各种角型的蒙古羊 46 只血液样品, -20°C 储存备用。牛的试验材料为河北农业大学动物科技学院储存样品。荷斯坦奶牛 25 头、安格斯牛 17 头、海福特牛 15 头。其中, 荷斯坦为有角品种, 安格斯为无角品种, 海福特为无角品种。

1.1.2 主要试剂 蛋白酶 K、苯酚、氯仿、Tris、PBS 缓冲液、PCR 反应试剂、琼脂糖、丙烯酰胺、DNA Marker、过硫酸铵、TEMED、硝酸银等。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 参照文献分子克隆实验指南的方法, 用酚-氯仿抽提法提取基因组, 溶于双蒸水中, -20°C 保存备用。

1.2.2 引物合成 采用文献[5]提供的 SNPb-SYNJI_C3981T 引物序列, 序列号: ss105143728; 引物序列 F: 5'-AACCACCAGAGTAACAGACTA-CAC-3', R: 5'-CTGTCGGTGAAAGGATTTG-3'。

1.2.3 PCR 反应条件 PCR 反应体系为 $25\mu\text{L}$, 其中 $10\times$ Buffer $2.5\mu\text{L}$, 基因组 DNA $1\mu\text{L}$, 上、下游引物各 $1\mu\text{L}$, dNTPs $2\mu\text{L}$, Taq 酶 $0.3\mu\text{L}$, 超纯水 $17.2\mu\text{L}$ 。

PCR 扩增条件为: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 45 s, 59.4°C 退火 45 s, 2°C 延伸 45 s; 34 个循环, 72°C 延伸 10 min。

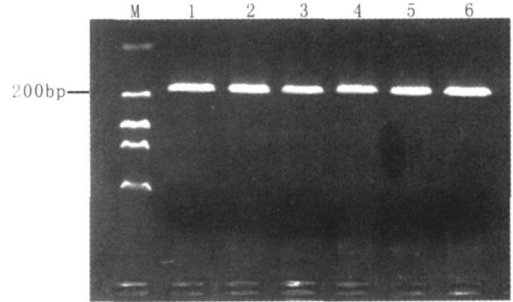
1.2.4 PCR-SSCP 分析 取 $7\mu\text{L}$ PCR 扩增产物, 加 $3\mu\text{L}$ 变性上样缓冲液(含质量分数 98% 去离子甲酰胺, 0.025% 二甲苯青, 0.025% 溴酚蓝, 5mol/L EDTA), 98°C 变性 10 min, 立即插入冰盒置于冰箱 -20°C 反应 10 min, 然后用 $10\mu\text{L}$ 微量移液器迅速加样于点样孔中。样品在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(Acr:Bis=29:1)中电泳。电泳结束后, 进行银染显带。

1.2.5 DNA 多态片段的测序 根据 PCR-SSCP 结果, 对不同纯合基因型个体的 PCR 扩增产物送交北京六合华大基因科技股份有限公司进行纯化测序。使用 Sequencher 4.8 软件对牛、羊角的表型进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

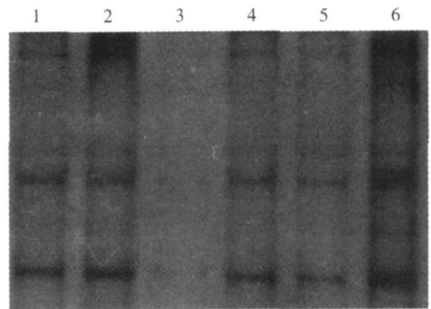
用所设计的引物对不同品种羊的基因组进行扩增, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 由图 1 可见, 扩增片段与目的片段大小一致(190bp), 且特异性好, 可进行 SSCP(单链构象多态性)分析。



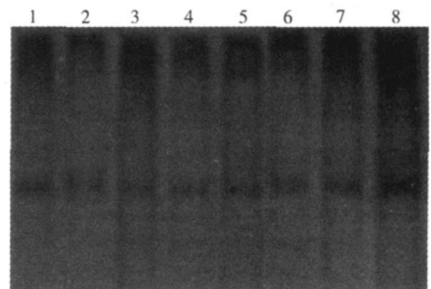
M 为 MarkerI 标准分子量; 1—6 为不同羊品种的 PCR 产物
图 1 部分供试羊 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果

2.2 SSCP 检测结果

对 PCR 扩增产物进行 SSCP 检测, 结果并没有发现多态性(图 2、图 3)。由图 2 可知, 在不同角型牛品种中并不存在多态性。3 个供试羊品种中, 无角道赛特羊和河北小尾寒羊都是无角品种。由图 3 可知, 不同角型的羊品种中不存在多态性。



1、2 为荷斯坦牛, 3、4、5 为安格斯牛, 6 为海福特牛
图 2 部分供试牛 *SYNJI* 基因 SSCP 检测图谱



1、2、3 为无角道赛特羊, 4、5 为大角杂种蒙古羊, 6 为无角杂种蒙古羊, 7、8 为河北无角小尾寒羊
图 3 部分供试羊 *SYNJI* 基因 SSCP 检测图谱

2.3 测序结果分析

分别选取牛、羊不同角型个体的 PCR 产物(分

别是带角的荷斯坦牛和无角的海福特牛; 无角的河北小尾寒羊和大角的蒙古杂种羊) 送交华大基因公司进行测序。测序结果表明: 在 *SYNJ1* 基因的

3'UTR 并没有发现 C3981T 的突变(图 4—图 7), 只是由于物种间的差异, 在图 4—图 7 中黑框内显示的碱基牛的为 C, 而羊的为 T。

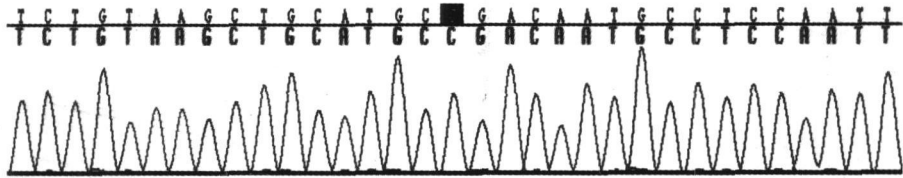


图 4 无角海福特牛测序结果

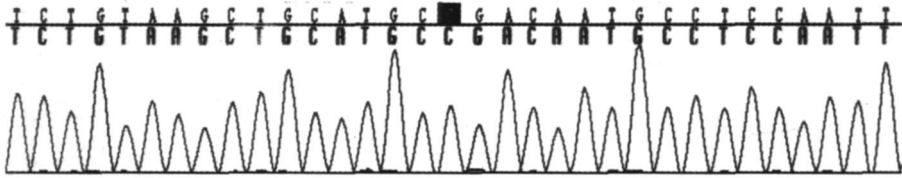


图 5 有角荷斯坦牛测序结果

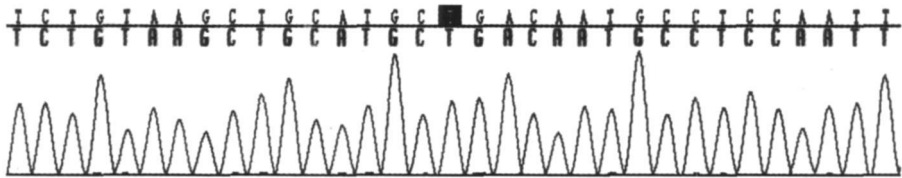


图 6 河北无角小尾寒羊测序结果

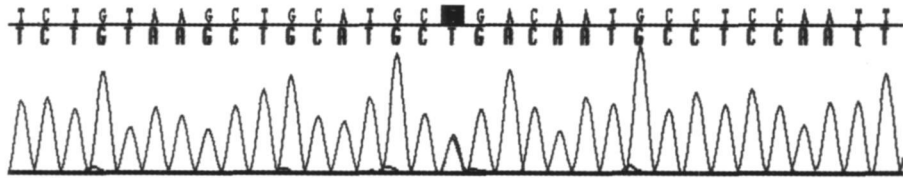


图 7 有角杂交蒙羊测序结果

3 讨论

有关牛角的研究, Wohlke 等^[7]对德国荷斯坦牛、利木赞牛、夏洛来牛、Pinzgauer 4 个品种重复了 Cargill 等^[6]的试验, 结果排除了 SNP bSYNJ1_C3981T 位点为控制牛无角性状的位点。本试验通过 PCR-SSCP 及基因测序的方法对有角荷斯坦牛、无角安格斯牛以及无角海福特牛 *SYNJ1* 基因的 3'UTR 进行了 SSCP 的分析, 结果也没有发现 C3981T 的突变, 这与 Wohlke 等^[7]的试验结果一致, 与 Cargill 等^[6]的报道不符。可能是由于试验条件及试验材料的不同所造成的。

目前, 国内外还没有关于绵羊角基因准确定位位点引物序列的报道。由于牛与羊存在较高的同源性, 所以本试验试图用牛的 *SYNJ1* 基因引物, 对羊该基因的 3'UTR 进行分析, 试图找出与羊角关联的单核苷酸多态性, 结果同样没有发现任何 SNPs。对于找出并控制牛、羊无角基因, 应进行更加深入的研究。

参考文献:

[1] 左北瑶. 中国美利奴羊(新疆型)无角类型培育理论依据及测交试验结果[J]. 中国草食动物, 2006 26(4): 3-6.

[2] Georges M, Drinkwater R, King T. *et al.* Microsatellite mapping of a gene affecting horn development in *Bos taurus*[J]. Nature Genetics 1993 4 206-210.

[3] Brennen R A, Davis S K, Sanders J O, *et al.* The polled locus maps to BTA1 in a *Bos indicus*× *Bos taurus* cross [J]. Journal of Heredity, 1996, 87: 156-161.

[4] Schmutz S M, Marquess F L, Berryere T G, *et al.* DNA marker assisted selection of the polled condition in Charolais cattle[J]. Mamm Genome, 1995, 6(10): 710-713.

[5] Montgomery G W, Henry H M, Dodds K G, *et al.* Mapping the Horns(Ho)locus in sheep: a further locus controlling horn development in domestic animals[J]. Hered, 1996, 87: 358-363.

[6] Cargill E J, Nissing N J, Grosz M D. Single nucleotide polymorphisms concordant with the horned/ polled trait in Holsteins[J], BMC Research Notes 2008 1: 128-137.

[7] Wohlke A, Pommerien N, Distl O. A synaptotagmin 1 (*SYNJ1*) single nucleotide polymorphism not responsible for polledness in German Holstein, Limousin, Charolais and Pinzgauer cattle[J]. Anim Genet, 2010 41(3): 335-341.