

水牛、大额牛和牦牛抑制素 α 亚基编码基因 外显子 1 多态性分析

苗永旺^{1,*,#}, 哈福^{1,#}, 高华山¹, 袁峰¹, 李大林², 袁跃云²

(1. 云南农业大学 动物科学技术学院分子遗传学实验室, 云南 昆明 650201; 2. 云南省家畜改良工作站, 云南 昆明 650225)

摘要: 为了揭示牛科物种 *INHA* 基因的遗传特征, 该文采用 PCR 产物直接测序法对水牛、大额牛和牦牛 *INHA* 基因外显子 1 及其侧翼序列进行多态性检测, 并结合已发表的包括牛科物种在内的一些哺乳动物数据进行了比较分析。结果表明, 在水牛 *INHA* 基因外显子 1 中存在 c.73C>A 替换, 为同义替换, 河流型和沼泽型水牛编码产物一致; 在大额牛的 *INHA* 基因外显子 1 中发现 c.62 C>T、c.187 G>A 替换, 分别引起 *INHA* 中氨基酸发生 p. P21L、p. V63M 改变, 两者均为相同性质氨基酸的替换; 在牦牛中发现 c.62 C>T、c.129A>G 替换, 前者也引起编码氨基酸发生 p. P21L 替换, 后者为同义替换。在 *INHA* 基因 5'侧翼区所测出的序列中, 水牛、大额牛和牦牛等物种内均未发现 SNP 位点, 但在种间发现存在 c. -6T>G 的替换, 大额牛、牦牛和普通牛均为 c. -6G, 而水牛为 c. -6T。在 *INHA* 基因内含子中, 水牛的第 31~36 位核苷酸处发现有 6 个碱基的缺失, 即 c. 262+31_262+36delTCTGAC; 该位点在河流型水牛中野生型(+/+)占主体, 而在沼泽型水牛中则缺失型(-/-)占主体。在大额牛、牦牛和普通牛等其它牛科物种的内含子中均未发现该缺失, 但与水牛相比, 大额牛、牦牛和普通牛内含子中发现缺失 c. 262+78_262+79delTG。序列比对显示, *INHA* 基因外显子 1 序列中 c. 43A 和 c. 67G 为水牛中所特有, 而 c. 173A 和 c. 255G 为大额牛、牦牛和普通牛所共有, c. 24C、c. 47G、c. 174T 和 c. 206T 为山羊所特有。大额牛、牦牛和普通牛间 *INHA* 基因外显子 1 序列差异较小, 而山羊和水牛与它们间的差异相对较大。

关键词: 水牛; 大额牛; 牦牛; 抑制素 α 亚基基因 (*INHA*) 外显子 1; 多态性

中图分类号: S823.8; Q75 **文献标志码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2012)04-0402-07

Polymorphisms of inhibin α gene exon 1 in buffalo (*Bubalus bubalis*), gayal (*Bos frontalis*) and yak (*Bos grunniens*)

MIAO Yong-Wang^{1,*,#}, HA Fu^{1,#}, GAO Hua-Shan¹, YUAN Feng, LI Da-Lin², YUAN Yue-Yun²

(1. Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Domestic Animal Breeding and Crossbreed-improvement Station of Yunnan Province, Kunming 650225, China)

Abstract: To elucidate the genetic characteristics of the bovine Inhibin α subunit (*INHA*) gene, the polymorphisms in exon 1 of *INHA* and its bilateral sequences were assayed using PCR with direct sequencing in buffalo, gayal and yak. A comparative analysis was conducted by pooled the results in this study with the published data of *INHA* on some mammals including some bovine species together. A synonymous substitution c.73C>A was identified in exon 1 of *INHA* for buffalo, which results in identical encoding product in river and swamp buffalo. In gayal, two non-synonymous but same property substitutions in exon 1 of *INHA*, viz. c.62 C>T and c.187 G>A, were detected, which lead to p. P21L, p. V63M changes in *INHA*, respectively. In yak, nucleotide substitution c.62C>T, c.129A>G were found in exon 1 of *INHA*, the former still causes p. P21L substitution and the latter is synonymous. For the sequence of the 5'-flanking region of *INHA* examined, no SNPs were found within the species, but a substitution, c. -6T>G, was found. The nucleotide in this site in gayal, yak and cattle was c. -6G, whereas in buffalo it was c. -6T. Meanwhile, a 6-bp deletion, namely c.

收稿日期: 2012-02-16; 接受日期: 2012-04-13

基金项目: 云南省应用基础研究重点项目(2007C0003Z); 国家自然科学基金项目(30660024); 云南省应用基础研究计划面上项目(2006C0034M);

国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2008AA101001); 云南省财政厅基金项目(槟榔江水牛种质特性研究)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yongwangmiao999@yahoo.com.cn

#共同第一作者(Authors contributed equally to the work)

第一作者简介: 苗永旺(1964—), 男, 博士, 教授, 从事动物遗传学教学和研究工作; 哈福(1974—), 男, 博士, 副教授, 主要从事动物繁殖学教学和科研工作

262+31_262+36delTCTGAC, was found in the intron of buffalo *INHA* gene. For this deletion, wild types (+/+) account for main part in river buffalo while mutant types (-/-) are predominant in swamp buffalo. This deletion was not found in gayal, yak and cattle, though these all have another deletion in the intron of *INHA*, c. 262+78_262+79delTG. The results of sequence alignment showed that the substitutions c. 43A and c. 67G in exon 1 of *INHA* are specific to buffalo, whereas the substitutions c. 173A and c. 255G are exclusive to gayal, yak and cattle, and c. 24C, c. 47G, c. 174T and c. 206T are specific to goat. Furthermore, there are few differences among gayal, yak and cattle, but there relatively great differences between buffalo, goat and other bovine species regarding the sequences of *INHA* exon 1.

Key words: Buffalo; Gayal; Yak; Inhibin α gene(*INHA*) exon 1; Polymorphism

抑制素(inhibin, INH)是一种主要由性腺细胞分泌的糖蛋白激素,由 α 亚基和 β 亚基通过二硫键接合而成(Thompson et al, 1994; Xue et al, 2004)。 α 亚基为抑制素的固有亚基, β 亚基包含两种结构相似的 β A 亚基和 β B 亚基。 α 亚基分别与 β A 亚基和 β B 亚基结合,被称作抑制素 A(inhibin-A)和抑制素 B(inhibin-B)(Thompson et al, 1994; Xue et al, 2004)。

抑制素能够对促卵泡素(follicle-stimulating hormone, FSH)的含量起到抑制作用(Thompson et al, 1994; Xue et al, 2004),从而调控雌性动物的卵泡生成。在雄性动物中,抑制素 α 亚基(inhibin α -subunit, *INHA*)主要存在于精原细胞、精母细胞和早期的精细胞中,是睾丸间质细胞和支持细胞增殖、分化和类固醇合成潜在的旁分泌和自分泌调节因子(Sang et al, 2011)。因此, *INHA* 编码基因为控制家畜繁殖性状的重要候选基因,具有很高的研究和利用价值。过去,对 *INHA* 基因的研究主要集中在人、猪、普通牛、山羊和绵羊等动物上(Thompson et al, 1994; Jeong et al, 2004; Xue et al, 2004; Zhou et al, 2007; Fallahian et al, 2009; Wu et al, 2009; Ding et al, 2011; Sang et al, 2011; Tang et al, 2011)。Ensembl 数据库(<http://www.ensembl.org/index.html>)中公布的普通牛 *INHA* 基因序列共含有 2 个外显子和 1 个内含子,第一外显子编码区长为 262 bp,第二外显子编码区长为 821 bp,内含子长 1 836 bp;该基因编码序列长 1 083 bp,共编码 360 个氨基酸。

家养水牛分为河流型和沼泽型两种类型(Zhang, 2000),有关水牛抑制素 α 亚基完整的编码区序列虽已有报道(Xie et al, 2009),但目前有关两类水牛 *INHA* 基因的遗传差异及群体遗传特征还未见报道。在牛科物种中,有关牦牛和大额牛 *INHA* 基因的研究也未见报道。本研究采用 PCR 产物直接测序法,对水牛、牦牛和大额牛的 *INHA* 基因外显子 1 进行了群体变异检测,并结合已发表的包括普通牛和山羊等牛科物种在内的一些哺乳动物同源序列

进行了比较分析,以揭示牛科物种 *INHA* 基因外显子 1 的序列差异及其群体遗传特征。

1 材料与方法

1.1 材料

148 头水牛样品分别采自 3 个河流型和 11 个沼泽型水牛群体,河流型水牛样品包括槟榔江水牛 35 头、摩拉水牛 12 头、尼里-拉菲水牛 10 头,共 57 头;沼泽型水牛样品包括湖南滨湖水牛 4 头、恩施水牛 7 头、盐津水牛 8 头、福安水牛 9 头、东流水牛 7 头、信丰水牛 6 头、滇东南水牛 8 头、江西滨湖水牛 7 头、富钟水牛 10 头、德昌水牛 18 头、德宏水牛 7 头,共 91 头。8 头大额牛样品采自云南省怒江州;牦牛样品共 12 头,其中 8 头采自西藏自治区,4 头采自云南省迪庆州中甸县。每头牛取耳组织或肌肉样,低温带回实验室, -80°C 冻存。

由 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载了不同哺乳动物 *INHA* 基因第 1 外显子序列,用于比较分析。序列包括:水牛: EU884446;普通牛: U16237、M13273、NM_174094、L20601;山羊: EF602161、HQ699620、JN620334、JN620335;牦牛: JN572112;猪: AK235034、AK234503、AK347411、DQ356013、M13980、NM_214189;人: NM_002191、X04445、AK292340、BC006391、BC039076、BT006954、CU675381、M13144、M13981;猴: NM_001032955 和黑猩猩: XM_001148064。由 Ensembl 数据库中下载了人和普通牛 *INHA* 基因全序列(ENSG00000123999, ENSBTAG00000009972)也用于比较分析。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用酚/氯仿抽提法(Joseph & David, 2002)提取基因组 DNA,经紫外分光光度法检测其纯度和浓度,TE 缓冲液稀释为 50 ng/ μL ,保存于 4°C 备用。

1.3 PCR 引物设计和 PCR 扩增

根据普通牛 *INHA* 基因全序列(登录号:

ENSBTAG0000009972)并参考 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中水牛和普通牛该基因 mRNA 序列(登录号: EU884446、BC109837、M13273、NM_174094),采用 Oligo 6 软件设计扩增 *INHA* 基因外显子 1 及其旁侧序列的引物。PCR 引物也作为测序引物。上游引物: 5'-GTAGAAGAGGGCGGTGGT-3', 下游引物: 5'-TCCTGAAATGTA GCGTTAT-3'。PCR 反应体系为 25 μ L, 包含 10 \times buffer 2.5 μ L(Mg²⁺为 1.5 mmol/L), 上、下游引物各 0.4 μ mol/L, dNTP 2.5 mmol/L, Taq 酶 1.25 U, DNA 模板 100 ng。PCR 程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后, 94 $^{\circ}$ C 35 s, 57 $^{\circ}$ C 35 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min 终止反应。

1.4 PCR 产物回收及测序

PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测效果, PCR 扩增效果好的样品, 经回收纯化后, 送北京百泰克生物技术有限公司进行正、反链双向测序。

1.5 数据分析

使用 DNASTar 6.0 软件包(DNAstar Inc.)对测序数据进行核对编辑后, 用 Clustal X 软件(Thompson et al, 1994)对序列进行比对。各物种序列一致性分析采用 DNASTar 软件包进行, 再用 MEGA 4.0 软件(Tamura et al, 2007)进行突变位点输出, 并采用 Kimura 双参数模型构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 物种内序列变异分析

本研究获得水牛 *INHA* 基因外显子 1 及其两侧序列长度为 496 bp, 包括外显子 1 序列 262 bp, 5'侧翼序列 40 bp 和内含子序列 194 bp。经比对, 各牛科物种 *INHA* 基因外显子 1 序列长度相同, 各物种内序列一致性在 99.2%~99.6%之间。

在 *INHA* 基因外显子 1 序列中, 发现水牛 *INHA* 基因编码区第 73 位核苷酸处(本文以水牛序列起始密码子第一位核苷酸为+1 记录突变位点)存在一个 SNP 位点, 即为 c.73C>A 颠换, c.73C 和 c.73A 基因频率分别为 0.8851 和 0.1149, 但此 SNP 并没有引起编码氨基酸的改变。在沼泽型水牛中, 发现该位点存在 c.73C 和 c.73A 两个等位基因, 但 c.73A 等位基因仅以杂合状态存在。在河流型水牛中, 摩拉水牛和尼里-拉菲水牛只存在等位基因 c.73C, 而槟榔江水牛却含有 c.73C 和 c.73A 两个等位基因, 基因频率分别为 0.90 和 0.10, c.73A 也仅以杂合状态存在。

在大额牛中, 检测到 *INHA* 基因编码区第 62、187 位核苷酸处存在 c.62 C>T、c.187 G>A 替换, 前者引起了 *INHA* 中相应位置氨基酸由脯氨酸(Pro, P)变为亮氨酸(Leu, L), 即 p. P21L; 后者引起了相应氨基酸由缬氨酸(Val, V)变为甲硫氨酸(Met, M), 即 p. V63M, 两者均为相同性质氨基酸的替换。*INHA* 基因编码区 c.62 C>T 的非同义替换也发现存在牦牛中。此外, 在牦牛该基因编码区第 129 位核苷酸处发现存在 c.129A>G 替换, 但该替换为同义替换。在大额牛群体中发现的 c.62 C>T、c.187 G>A 及在牦牛群体中发现的 c.62 C>T、c.129A>G 替换均只存在于杂合个体中。各 SNP 位点及其群体遗传组成信息见表 1。

在所得到的 40 bp 的 5'侧翼序列中, 水牛、大额牛和牦牛物种内均未发现 SNP 位点; 在种间, 发现大额牛与牦牛序列完全一致, 但它们与水牛的 5'侧翼序列在-6 位核苷酸上存在差异, 在水牛中该位置为 c. -6T, 在大额牛与牦牛中为 c. -6G。与已发表的普通牛序列相比, 发现普通牛中该位点也为 c. -6G。

表 1 牛科物种 *INHA* 基因外显子 1 序列的 SNP 位点及其基因型、基因频率
Tab. 1 Bovine species SNPs, corresponding genotypes and gene frequencies in *INHA* exon 1

物种 Species	变异位点 Variable sites	基因型/个体数 Genotype/Individual number			等位基因/基因频率 Allele/Gene frequency		P 值 ^c P value ^e
		WW	Wm	mm	W ^a	m ^b	
河流型水牛 River buffalo	c.73 C>A	CC/51	CA/6	AA/0	C/0.9474	A/0.0526	> 0.05
沼泽型水牛 Swamp buffalo	c.73 C>A	CC/63	CA/28	AA/0	C/0.8462	A/0.1538	> 0.05
大额牛 Gayal	c.62 C>T	CC/5	CT/3	TT/0	C/0.8125	T/0.1875	> 0.05
牦牛	c.187 G>A	GG/5	GA/3	AA/0	G/0.8125	A/0.1875	> 0.05
牦牛	c.62 C>T	CC/9	CT/3	TT/0	C/0.8750	T/0.1250	> 0.05
牦牛	c.129 A>G	AA/9	AG/3	GG/0	A/0.8750	G/0.1250	> 0.05
荷斯坦奶牛 ^d Holstein cow ^d	c.132 A>G	AA/16	AG/18	GG/6	A/0.6250	G/0.3750	> 0.05

^a 野生型等位基因 (wild-type allele); ^b 突变型等位基因 (mutant-type allele); ^c Hardy-Weinberg 平衡检验概率(Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium); ^d 荷斯坦奶牛(holstein cow), 数据引自 (the data was cited from): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ss.cgi?Subsnp_id=46526661.

在 *INHA* 基因内含子所测出的序列中, 水牛的第 31~36 位核苷酸处发现有 6 个碱基的缺失, 即 c. 262+31_262+36delTCTGAC, 将之命名为等位基因“-”; 而将水牛中无 6 个碱基缺失的类型命名为等位基因“+”。在河流型水牛中, 摩拉水牛和尼里-拉菲水牛该位置均为无缺失类型, 对应的基因型为+/+, 而槟榔江水牛却含有+/+, +/-和-/-三种基因型个体, 所占比例分别为 71.43%(25/35)、20.00%(7/35)和 8.57%(3/35); 在沼泽型水牛中该位置存在+/+, +/-和-/-三种基因型, 所占比例分别为 2.20%(2/91)、29.67%(27/91)和 68.13%(62/91)。在大额牛、牦牛和已发表的普通牛 *INHA* 基因内含子中均未发现该缺失, 但与水牛序列相比, 发现它们在内含子的第 78~79 位核苷酸处有 2 个碱基的缺失, 即 c. 262+78_262+79delTG。

2.2 物种间 *INHA* 基因外显子 1 序列差异

本文所测序列与 NCBI 数据库上已发表的牛科物种和人、猪等物种的同源序列进行比对, 确定各物种的单倍型。由水牛 *INHA* 基因外显子 1 序列变异定义两种单倍型: buffalo^C 和 buffalo^A; 由水牛 *INHA* 基因外显子 1 及其内含子序列变异共同定义 4 种单倍型: buffalo^C(+), buffalo^C(-), buffalo^A(+) 和 buffalo^A(-)。依据 *INHA* 基因外显子 1 序列变异, 在大额牛中定义两个单倍型: gayal¹¹ 和 gayal¹²; 在牦牛中定义两个单倍型: yak¹¹ 和 yak¹²; 在普通牛中, 定义 3 个单倍型: cattle¹¹、cattle¹² 和 cattle¹³; 山羊中也定义 3 个单倍型: goat¹¹、goat¹² 和 goat¹³。各单倍型及其相应的蛋白质编码序列差异见图 1 和图 2。

牛科物种 *INHA* 基因外显子 1 与猪和灵长类同源序列差异较大。牛科物种与猪的序列一致性在 89.7%~90.9%之间, 与灵长类序列一致性在 83.3%~85.2%之间。而各牛科物种间 *INHA* 基因外显子 1 序列一致性在 95.8%~100%之间, 其中, 大额牛、牦牛和普通牛间序列 *INHA* 基因外显子 1 序列差异较小, 序列一致性在 98.9%~100%之间, 单倍型 cattle¹³ 与 yak¹¹ 序列一致; 而山羊、水牛与大额牛、牦牛和普通牛间序列差异相对较大, 山羊与它们间序列一致性在 95.8%~97.3%之间; 水牛与它们间序列一致性在 97.0%~98.5%之间; 水牛与山羊之间序列一致性在 96.6%~97.3%之间。

通过物种间序列比对, 发现 *INHA* 基因外显子 1 序列中 c. 43A、c. 67G 和 c. 73A 为水牛所特有, 其中 c. 43A、c. 67G 导致水牛 *INHA* 第 15、23 位相应氨基酸分别为精氨酸(Arg, R)和缬氨酸(Val, V), 即

p. 15R 和 p. 23V, 而在其他物种中该位置核苷酸均为 c. 43G、c. 67C, 相应的编码氨基酸分别为甘氨酸(Gly, G)和亮氨酸(Leu, L), 即 p. 15G 和 p. 23L。其中, p. G15R 为非相同性质氨基酸的替换, p. L23V 为相同性质氨基酸的替换。值得注意的是, *INHA* 基因外显子 1 序列中 c. 173A 和 c. 255G 为普通牛、大额牛和牦牛所共有, 而在其他牛科物种中为 c. 173C 和 c. 255A, 前者差异引起了普通牛、大额牛和牦牛的 *INHA* 第 58 位编码氨基酸由脯氨酸(Pro, P)变为组氨酸(His, H), 为非相同性质氨基酸的替换; 而后者为同义替换。在山羊中, *INHA* 基因外显子 1 序列中 c. 24C、c. 47G、c. 174T 和 c. 206T 为山羊所特有, 在其他物种中该位置分别为 c. 24G、c. 47A、c. 174C 和 c. 206G, 其中, c. 24G>C、c. 47A>G 和 c. 206G>T 替换分别引起了在山羊 *INHA* 第 8、16 和 69 位编码氨基酸改变为 p. L8F(F 为苯丙氨酸, Phe)、p. H16R 和 p. R23M, p. L8F 和 p. H16R 替换为相同性质氨基酸的替换, 而 p. R23M 为非相同性质氨基酸的替换。

2.3 系统发育分析

基于各物种 *INHA* 基因外显子 1 不同单倍型序列构建的系统发育树, 见图 3。在系统发育树上, 普通牛、大额牛和牦牛间表现出较近的遗传关系, 它们聚在一个较大的支系上, 而水牛和山羊等物种分别聚在各自独立的分支上, 且有较高的支持率, 表现出水牛、山羊与大额牛、牦牛和普通牛间遗传关系较远。

3 讨论

本文在水牛群体中, 尽管检测出 *INHA* 基因外显子 1 存在 c.73C>A 替换, 但为同义替换, 河流型和沼泽型水牛在编码产物上相一致。对于该基因内含子序列中的 c. 262+31_262+36delTCTGAC 缺失而言, 河流型水牛倾向于+/+基因型, 而沼泽型水牛则倾向于-/-基因型。在槟榔江水牛 *INHA* 基因外显子 1 中存在 c.73C>A 替换以及在其内含子中存在 c. 262+31_262+36delTCTGAC 缺失, 提示槟榔江水牛与国外著名的摩拉水牛和尼里-拉菲水牛相比, 选育程度低, 并存在沼泽型水牛基因渗入, 这与以往对该水牛的报道相一致(Miao et al, 2011)。在大额牛群体中发现的 c.62 C>T、c.187 G>A 及在牦牛群体中发现的 c.62 C>T、c.129A>G 替换, 在遗传上是连锁的, 且处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。由于在

	111111112224445566677 78
Species	23478134567913424768378945 67
buffalo ^c	-W.LQLLAQGRHGHIPVDPPGRPVMMRRED-QA
buffalo ^A	-.....G.....LL.....H.....-..
cattle ¹¹	-.....G.....LL.....H.....-..
cattle ¹²	-.....G.....LL.....H.....-..
cattle ¹³	-.....G.....LL.....H.....-..
gayal ¹¹	-.....G.....LL.....IM.....-..
gayal ¹²	-.....G.....L.....L.....H.....-..
yak ¹¹	-.....G.....LL.....H.....-..
yak ¹²	-.....G.....L.....L.....H.....-..
goat ¹¹	-....F...GR...L.....M.....-..
goat ¹²	-....F...GR...L.....H.....M.....-..
goat ¹³	-....F...GR...L.....V.....-..
pig	-P...RSG...Q.L..A.....E-ET
pig	-P...RSG...Q.L..A.....E-ET
human	VLHLF.T..G.SQLLA.AR..LTH..EEET
human	VLHLF.T..G.SQLLA.AR..LTH..EEET
chimpanzee	VLHLF.T..G.SQLLA.AR..LTH..EEET
monkey	VLPLF...G.SQ.LASVR.LLT..TEEET

图 2 *INHA* 基因外显子 1 序列各单倍型相应的编码氨基酸差异

Fig. 2 Amino acid differences encoded by haplotype sequences of *INHA* exon 1 among various species

图中氨基酸排列以水牛 *INHA* 蛋白起始氨基酸为起点, 点(•)代表与水牛氨基酸序列相一致, 横线(-)代表氨基酸缺失。

Numbering is scored relative to start amino acid in *INHA* in buffalo. Dots (•) denote the buffalo amino acid sequence. Dashes (-) indicate the deletions of nucleotides in the sequence.

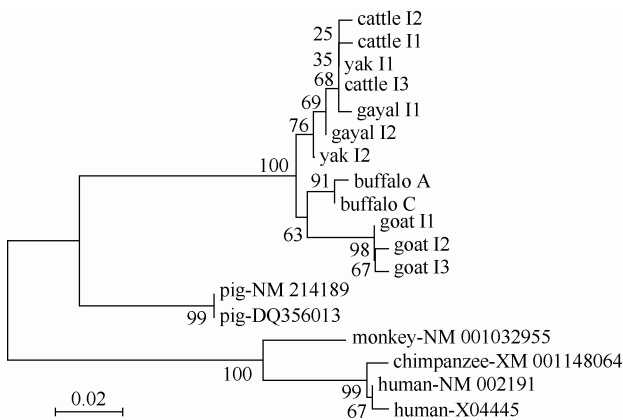


图 3 基于各物种 *INHA* 基因外显子 1 单倍型序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on haplotype sequences of *INHA* exon 1 in various species

水牛、大额牛和牦牛群体中发现的 SNPs 为同义替换或相同性质氨基酸的替换, 揭示各牛科物种 *INHA* 基因外显子 1 的不同单倍型在功能上差异不大, 提示牛科物种内 *INHA* 基因在功能上具有一定的保守性。

各物种序列比对及系统发育分析结果表明, 大额牛、牦牛和普通牛间 *INHA* 基因外显子 1 序列差异较小, 序列一致性较高, 而山羊和水牛与它们的

差异相对较大, 这揭示大额牛、牦牛和普通牛间遗传关系较近, 它们的 *INHA* 基因在功能上具有相似性; 而山羊和水牛与它们间遗传关系较远, *INHA* 基因在功能上可能与大额牛、牦牛和普通牛存在一定差异性。这种差异是否与水牛的繁殖率普遍偏低, 以及山羊较高的繁殖率有关, 需进一步深入研究。该基因 5'侧翼序列第-6 位核苷酸, 在大型牛、牦牛和普通牛中均为 c. -6G 型, 而在水牛中为 c. -6T 型, 也揭示大额牛、牦牛和普通牛间较近的遗传关系。以往研究揭示, 该区域在普通牛中为转录因子 Ap-2(activator protein 2)的作用位点(Thompson et al, 1994), 以上差异是否反映水牛 *INHA* 基因在表达上与大型牛、牦牛和普通牛有差异需进一步研究。在水牛内含子序列中发现的 c. 262+31_262+ 36del TCTGAC 缺失, 在其他物种中都不存在, 说明该缺失可能是水牛中独有的。另外, 在大型牛、牦牛和普通牛发现的 c. 262+78_262+79delTG 缺失可作为区分水牛的分子标记; 在 *INHA* 基因外显子 1 序列中为普通牛、大额牛和牦牛所特有的核苷酸 c. 173A 和 c. 255G, 在水牛中特有的核苷酸 c. 43A、c. 67G, 在山羊中特有的核苷酸 c. 24C、c. 47G、c. 174T、c. 206T, 可作为分子标记进行水牛、山羊与普通牛、大额牛和牦牛 3 个物种间的区分。以上标记可用于畜产品种类等方面的鉴定, 在畜牧生产上加以利用。

已有研究结果揭示, 体内 *INHA* 水平与成年男性的精子数量和睾丸体积呈正相关(Sang et al, 2011), 与女性卵巢早衰相关(Jeong et al, 2004; Fallahian et al, 2009)。在中国荷斯坦牛中, *INHA* 基因外显子 1 的 c.132A>G 替换(参考文献中为 c.192A>G)与超数排卵效果相关, 与精子顶体完整率有显著的相关, 即 GG 基因型较 AA 基因型个体具有较高的精子顶体完整率和较好的超数排卵效果(Sang et al, 2011; Tang et al, 2011)。本研究在水牛、大额牛和牦牛群体中未发现 c.132A>G 型个体, 即群体中均为 GG 基因型个体。在小尾寒羊 *INHA* 基因外显子 1 中发现 c.231T>C 替换与繁殖力性状具有一定关联性, CC 型个体比 TT 个体具有较高的繁殖力(Zhou et al, 2007)。本研究在水牛、大额牛和牦牛群体中未发现 c. 231C 型, 即它们群体中均为 TT 基因型个体。以上结果是否在一定程度上揭示了水牛、大额牛和牦牛的精子顶体完整率高和超数排卵效果好及它们的繁殖力(它们多为单胎)比绵羊低, 尚需进一步验证。有人在波尔山羊 *INHA* 基因外显子 1 中发现 SNP c.129G>A, 但并未发

现该 SNP 与繁殖性状有直接关系(Wu et al, 2009)。本研究在大额牛、牦牛和普通牛中也发现存在 c.129A 型, 但在水牛中只有 c.129G。

参考文献:

- Ding CY, Chen B, Liu XQ, He CQ. 2011. Association analysis of polymorphisms in *INH1A* gene with litter size in pigs [J]. *Chn J Anim Sci*, 47(1): 6-9. [丁朝阳, 陈斌, 柳小春, 贺长青. 2011. *INH1A* 基因多态性与猪产仔数的相关性分析. 中国畜牧杂志, 47(1): 6-9.]
- Fallahian M, Pouresmaeili F, Azizi F, Zali MR, Samani EM, Kharaziha P. 2009. Existence of inhibin α -subunit gene mutation in a population of Iranian women with premature ovarian failure [J]. *Int J Endocrinol Metab*, 7(2): 67-71.
- Jeong HJ, Cho SW, Kim HA, Lee SH, Cho JH, Choi DH, Kwon H, Cha WT, Han JE, Cha KY. 2004. G769A variation of inhibin α -gene in Korean women with premature ovarian failure[J]. *Yonsei Med J*, 45(3): 479-482.
- Joseph S, David WR. 2002. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. [M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor: CSHL Press, 483-485.
- Miao YW, Li DL, Yuan F, Liang JP, Li WZ, Liu W, Li ZR, Zhang CX. 2011. Analysis of genetic characterization of Binglangjiang buffalo using mtDNA D-loop sequences [J]. *J Yunnan Agric Univ: Nat Sci*, 26(5): 625-633. [苗永旺, 李大林, 袁峰, 梁建平, 李卫真, 刘伟, 李卓然, 章纯熙. 2011. 利用 mtDNA D-loop 序列为遗传标记分析槟榔江水牛的群体遗传特征. 云南农业大学学报: 自然科学版, 26(5): 625-633.]
- Sang L, Du QZ, Yang WC, Tang KQ, Yu JN, Hua GH, Zhang XX, Yang LG. 2011. Polymorphisms in follicle stimulation hormone receptor, inhibin alpha, inhibin beta A, and prolactin genes, and their association with sperm quality in Chinese Holstein bulls [J]. *Anim Reprod Sci*, 126(3-4): 151-156.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol* 24(8): 1596-1599.
- Tang KQ, Li SJ, Yang WC, Yu JN, Han L, Li X, Yang LG. 2011. An MspI polymorphism in the inhibin α gene and its associations with superovulation traits in Chinese Holstein cows [J]. *Mol Biol Rep*, 38(1): 17-21.
- Thompson DA, Cronin CN, Martin F. 1994a. Genomic cloning and sequence analyses of the bovine α -, β_A - and β_B -Inhibin/activin genes [J]. *Eur J Biochem*, 226(3): 751-764.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994b. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res*, 22(22): 4673-4680.
- Wu WS, Hua GH, Yang LG, Wen QY, Zhang CY, Zoheir KM, Chen SL. 2009. Association analysis of the *INH1A* gene with litter size in Boer goats [J]. *Small Rumin Res*, 82(2-3): 139-143.
- Xie TS, Nong W, Zhang XM, Huang YQ, Cui KQ, Shi DS. 2009. Cloning and prokaryotic expression of swamp buffalo Inhibin alpha subunit gene [J]. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, (8): 14-17. [谢体三, 农微, 张新民, 黄雅琼, 崔奎青, 石德顺. 2009. 水牛抑制素 α 亚基基因的克隆与原核表达. 黑龙江畜牧兽医, (8): 14-17.]
- Xue Y, Chu MX, Zhou ZX. 2004. Advances on inhibin genes[J]. *Hereditas*, 26(5): 749-755. [薛昱, 储明星, 周忠孝. 2004. 抑制素基因的研究进展. 遗传, 26(5): 749-755.]
- Zhang CX. 2000. Chinese Buffalo Science [M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press. [章纯熙. 2000. 中国水牛科学[M]. 南宁: 广西科学技术出版社.]
- Zhou WR, Chu MX, Sun SH, Fang L, Ye SC. 2007. A candidate gene *INH1A* for prolificacy of small Tail Han sheep [J]. *J Agric Biotechnol*, 15(1): 32-36. [周文然, 储明星, 孙少华, 方丽, 叶素成. 2007. 小尾寒羊高繁殖力候选基因 *INH1A* 的研究[J]. 农业生物技术学报, 15(1): 32-36.]