

DSG4 基因的 SNPs 筛查及其与裘用绵羊羊毛性状关系的研究

张 戈^{1,2}, 张元跃², 韩建林^{1,3}, 关伟军¹, 李颖康⁴, 许 斌⁴,
张秀陶⁴, 马月辉^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 农业部畜禽遗传资源与利用重点开放实验室, 北京 100193;

2. 湖南农业大学动物科技学院, 长沙 410128; 3. 国际家畜研究所, 肯尼亚内罗毕 001003;

4. 宁夏农业科学院畜牧兽医研究所, 银川 750002)

摘 要: 应用 PCR-SSCP 方法检测 118 只滩羊和 82 只小尾寒羊与滩羊杂交羊 DSG4 基因的多态性, 用最小二乘法分析该基因多态性与毛股长度和弯曲数的关系。结果发现 16 个 SNPs 和 1 个 TTG 插入/缺失, 其中在 5' 调控区和 3' 调控区各有 1 个 SNP; 11 个 SNPs 位于外显子区域, 其中 4 个为错义突变, TTG 插入/缺失使丝氨酸替换为异亮氨酸并引起甘氨酸的插入/缺失; 其余 3 个 SNPs 位于内含子区域。DSG4 基因编码区的 6 处碱基变异与 3' 调控区的 1 个 SNP 处于完全连锁不平衡, 组合基因型命名为 PPRR、PQRS 和 QQSS。杂交羊 QQSS 基因型的初生肩部毛股长度、初生肩部毛股弯曲数以及二毛(1 月龄左右)肩部毛股弯曲数的最小二乘均值极显著大于 PPRR 和 PQRS 基因型所对应的值 ($P < 0.01$); QQSS 基因型的二毛股部毛股弯曲数的最小二乘均值显著大于 PPRR 基因型 ($P < 0.05$), 但与 PQRS 基因型差异不显著 ($P > 0.05$)。滩羊 QQSS 基因型上述性状的最小二乘均值也大于 PPRR 和 PQRS 基因型, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。本研究初步表明, QQSS 基因型可能是裘用型绵羊毛股长度和弯曲数的有利基因型, 本研究的结果为阐明 DSG4 基因对绵羊羊毛性状的影响提供了较丰富的分子素材。

关键词: 滩羊; DSG4 基因; SNP; 羊毛性状

中图分类号: S826; Q343.15

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)05-0641-09

Polymorphism of DSG4 Gene and Its Association with Wool Traits in Fur Sheep

ZHANG Ge^{1,2}, ZHANG Yuan-yue², HAN Jian-lin^{1,3}, GUAN Wei-jun¹, LI Ying-kang⁴,
XU Bin⁴, ZHANG Xiu-tao⁴, MA Yue-hui^{1*}

(1. Key Laboratory of Farm Animal Genetic Resources and Utilization of Ministry of Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193,

China; 2. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 3. International Livestock Research Institute (ILRI), P. O. Box 30709,

Nairobi 001003, Kenya; 4. Animal Husbandry and Veterinary Institute, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Science, Yinchuan 750002, China)

Abstract: By SSCP assay, polymorphisms of DSG4 gene were screened in Tan sheep (n=118) and their crossbred with Small-tailed Han sheep (n=82) in this study. The relationship between polymorphisms of DSG4 gene and length and crimp number of scapular wool plait was analyzed by least square linear model. The results showed 16 SNPs and a TTG indel in sheep DSG4 gene, in which one each SNP located at 5' UTR and 3' UTR, respectively, 11 SNPs on coding region

收稿日期: 2010-05-05

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(nycytx-40-5); 科技支撑计划(2006BAD13B08; 2008BADB2B01); 转基因生物新品种培育科技重大专项(2008ZX08009-003)

作者简介: 张 戈(1983-), 男, 湖南邵东人, 博士, 主要从事畜禽分子资源研究, Tel: 010-62819590, E-mail: zg212109@163.com

* 通讯作者: 马月辉, 博士, 研究员, 博导, E-mail: yuehui.ma@263.net

with four of them leading to amino acid substitutions, and three SNPs on introns. The TTG indel led to an amino acid substitution from Ser to Iso and also a Gly indel. Interestingly, six variations in coding region and the SNP at 3'UTR were in complete linkage disequilibrium, forming combined genotypes named as PPRR, PQRS and QQSS. In the crossbreds, individuals with QQSS genotype had a significantly higher least square mean than individuals with genotype PPRR or PQRS on length of scapular wool plaits at birth ($P < 0.01$), crimp number of scapular wool plait at birth ($P < 0.01$), crimp number of scapular wool plaits at weaning ($P < 0.01$). The individuals with genotype QQSS also had a significantly higher crimp number of rump wool plait at weaning than individuals with genotype PPRR ($P < 0.05$). However, as for Tan sheep, the individuals with genotype QQSS only had a slightly higher least square mean than individuals with genotype PPRR or PQRS on the above traits ($P > 0.05$). These data preliminarily indicate QQSS is the most favorable genotype affecting length and crimp number of wool plait. These variations provide opportunities for further investigating the effects of *DSG4* on wool traits in sheep.

Key words: Tan sheep; *DSG4* gene; SNP; wool traits

滩羊是我国特有的裘皮用绵羊,主要分布于宁夏回族自治区,是国家二级保护品种。滩羊皮,一般概念就是指的宁夏滩二毛皮,是指从滩羊产后 30 d 左右、毛长达 7~8 cm 时屠宰的羔羊身上剥取的皮。二毛皮毛绒长而弯柔、一般 6~9 道弯,色泽白而光滑,誉称中国裘皮之冠^[1-2]。小尾寒羊是肉、裘兼用型的高繁殖力绵羊品种,其裘皮品质优良,将小尾寒羊与滩羊杂交可以提高滩羊产羔率,同时对滩羊二毛皮品质的影响也不至于太大^[3]。滩羊二毛皮品质的选育主要依靠对毛股弯曲数的表型选择^[1,4-5]。

目前,候选基因研究已成为羊毛性状分子育种的重要内容^[6]。在皮肤中,桥粒对表皮细胞间的黏合具有重要作用;桥粒芯糖蛋白(Desmoglein, DSG)属于跨膜蛋白,是桥粒的组成成分^[7]。目前已发现 6 种 *DSG* 基因^[8],其中人 *DSG4* 基因长 37 kb,含有 16 个外显子和 15 个内含子,其 CDS 长 3 123 bp^[9]。Whitlock 等^[9]采用 RT-PCR 技术分析显示 *DSG4* 基因主要在人的皮肤、睾丸、前列腺和唾液腺表达。Kljuic 等^[10]研究发现 *DSG4* 蛋白在皮肤中的表达位于表皮基底层细胞和毛囊,他们还揭示了 *DSG4* 基因突变与人遗传性毛发稀少症(Localized autosomal recessive hypotrichosis, LAH)和小鼠披针状毛症(Lanceolate hair, lah)有关。该项研究阐明了 *DSG4* 蛋白是毛囊角化细胞间黏附的重要介质,参与调控毛囊的增殖与分化。绵羊 *DSG4* 基因已被定位在 23 号染色体,与微卫星标记 *AGLA269* 相邻^[11]。目前国内外尚未见对绵羊 *DSG4* 基因多态性进行研究的报道。本试验拟对该

基因在滩羊以及小尾寒羊与滩羊杂交羊中的多态性进行初步筛查,并分析这些多态与毛股长度和弯曲数的关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验共采用 200 只裘用型绵羊,其中 118 只滩羊的耳组织样本采自宁夏盐池滩羊繁育基地的 7 个父系半同胞家系,82 只小尾寒羊与滩羊的杂交羊(以下简称寒滩杂交羊)的耳组织样本采自宁夏畜牧所,包括 67 只寒滩 F₁ 代杂交羊和 15 只寒滩 F₁ 代羊与滩羊回交的 BC 代杂交羊。裘皮羊毛性状指标包括初生肩部毛股长度、初生肩部毛股弯曲数、二毛肩部毛股弯曲数和二毛股部毛股弯曲数,性状的原始数据由羊场技术人员提供。

用酚-氯仿抽提法提取基因组 DNA,溶于 TE 缓冲液,用双蒸水稀释至 50 ng · μL⁻¹。

1.2 引物设计

由于绵羊 *DSG4* 基因的全序列尚未知,以牛的 *DSG4* 基因(GenBank 基因登录号:537755)为模板采用 Primer 5.0 软件,设计 3 对引物(P1、P2 和 P3)分别扩增 *DSG4* 基因的 5'UTR 和外显子 1(对应牛 *DSG4* 基因 105~152 位)、外显子 2(1 2021~1 2056 位)、外显子 3(13 692~13 823 位)及其毗邻内含子的部分区域。以与牛 *DSG4* 基因 cDNA(GenBank 登录号为 XM_617938)同源性达 97% 的 2 条绵羊序列(GenBank 登录号为 DU312548 和 DU192175)为模板设计了 2 对引物(P4 和 P5),以期扩增 *DSG4*

基因的外显子 5 (17 462~17 606 位)、外显子 7 (18 647~18 781 位) 及其毗邻内含子的部分区域。参考 5 条与牛 *DSG4* 基因 cDNA 同源性达 94%~96% 的绵羊 EST 序列 (GenBank 登录号为 EE752650、EE757376、EE756890、EE751891 和

GO691893), 设计了 3 对引物 (P6、P7 和 P8) 扩增 *DSG4* 基因外显子 16 (38 363~39 130 位) 的大部分序列和 3'UTR 的部分序列。引物序列、与牛 *DSG4* 基因同源的产物位置、扩增产物大小及 PCR 反应退火温度见表 1。

表 1 绵羊 *DSG4* 基因扩增的引物序列、产物位置、扩增产物大小及 PCR 退火温度

Table 1 Primer sequence, products position, product size and PCR annealing temperature for *DSG4* gene in sheep

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence	产物位置/ bp * Products position	产物大小/ bp Products size	退火温度/ °C Annealing temperature
P1	F: CAGCAGAGTCATCACCAG R: AAAAATGGAGCAAATCCC	-19~250	269	56
P2	F: TTATGAAAATTTATGCTTA R: GTTCTTTCTTTTATCTTTTA	11 982~12 174	193	48
P3	F: TGCTTAAGGTGAAGGAAT R: CTTACTCTGGCAATCGGAT	13 684~13 828	145	52
P4	F: ATTCTTGCTTAACTTCTTTT R: GTGTCACTCTACTTACTCGC	17 398~17 622	220	54
P5	F: AGAAAAGTGAATAATCAGA R: ATGGGGAAAAAGGAGTAGAA	18 569~18 817	244	55
P6	F: CCACGAAGGAGTAGGGTCT R: CCAAGTAAAGGGAGGTCAGT	38 428~38 622	195	63
P7	F: GCACTGACCTCCCTTTACTT R: CAACCATCACTCACGCTACT	38 601~38 964	364	64
P8	F: TAGTAGCGTGAGTGATGGTT R: ATGTTGGTGATTACAAGGTG	38 944~39 185	239	62

*. 对应于 GenBank 基因登录号为 537755 的牛 *DSG4* 基因序列的同源碱基位置

*. Homologous base positions corresponding to bovine *DSG4* gene (GeneID: 537755)

1.3 PCR 扩增及 SSCP 分析

15 μL 反应体系各组分的终浓度为: 绵羊基因组 100 ng、1 \times PCR buffer (含 Mg^{2+})、0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上下游引物、200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs、0.75 U *Taq* 酶。反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 退火温度 30 s, 72 °C 30 s, 进行 35 个循环; 最后 72 °C 再延伸 7 min。其中引物 P1 的 PCR 反应体系中只加入 0.5 U *Taq* 酶, 反应循环数减至 30 个。

2.0% 琼脂糖检测 PCR 产物后, 取 2~4 μL 产物和 10 μL 的上样缓冲液 (98% 去离子甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯青、2% 甘油、10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA) 混合, 98 °C 变性 10 min, 迅速插入冰中 10 min, 然后上样于 12% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶 (Acr : Bis = 29 : 1) 中。160~200 V, 4 °C 在 1 \times TBE 电泳液中电泳 12~14 h 后, 银染显带。

1.4 测序

根据 PCR-SSCP 分析结果, 选取不同基因型个体的 PCR 扩增产物交由北京三博生物技术有限公司进行纯化双向测序。

1.5 数据统计

利用 MEGA 4.0 软件^[12] 对测序结果进行比对及分析。采用卡方测验检测 Hardy-Weinberg 平衡。采用 SAS 6.12 中的 GLM (General Linear Model) 程序分析 *DSG4* 基因各变异位点的基因型与裘皮羊毛性状的关系。采用了以下模型:

$$Y = \mu + B + G + B \times G + e$$

式中, Y 为各羊毛性状的记录值; μ 为群体均值; B 为群体的固定效应; G 为基因型的固定效应; $B \times G$ 为群体和基因型的互作效应; e 为随机残差效应。BC 代杂交羊较少, 将其与 F_1 代作为同一群体。平均每个家系的个体数较少, 且绝大部分为母羊, 因此在模型中没有分析家系和性别的影响。

2 结果

2.1 SSCP 检测

除了 P6,其它位点的 SSCP 分析均检测到不同的带型,其中 P3 位点出现 12 种基因型,P1 位点只检测到 2 种基因型。SSCP 多态结果见图 1 和图 2 (其中 P3 位点只显示部分基因型)。

2.2 序列分析

对于 SSCP 分析检测到的各等位基因进行双向

测序,共确认 16 个 SNPs 和 1 个 TTG 插入/缺失(图 3-图 6)。其中 K 等位基因的序列与 GenBank 序列 DU312548、N 与 DU192175 以及 P 与 EE752650 和 EE757376 的同源性皆为 100%。R 等位基因的序列与 EE752650、EE756890、EE751891 和 GO691893 的同源性为 100%,与 EE757376 的同源性为 99%。

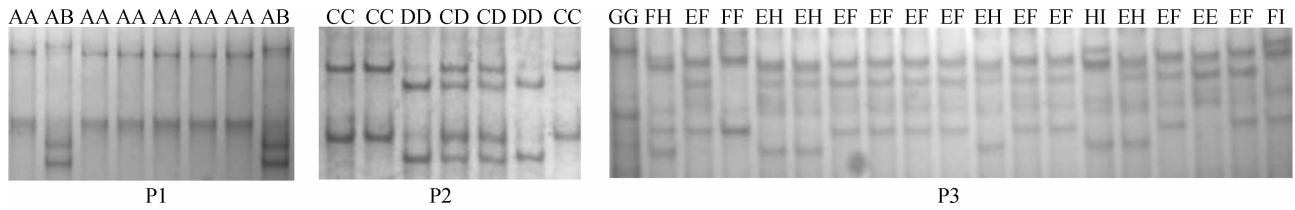


图 1 P1、P2 和 P3 位点的 SSCP 分析
Fig. 1 SSCP analysis of PCR products of P1, P2 and P3 loci

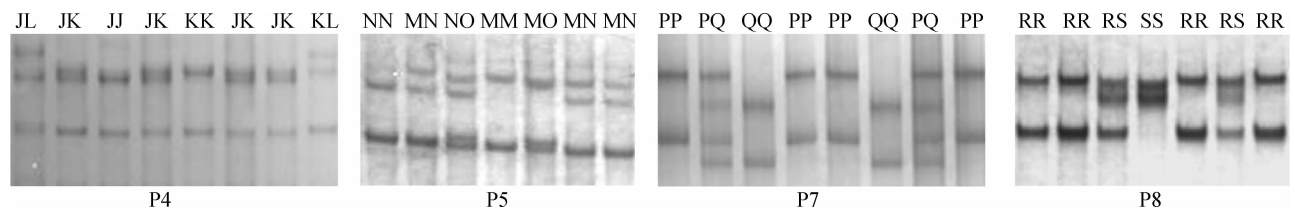
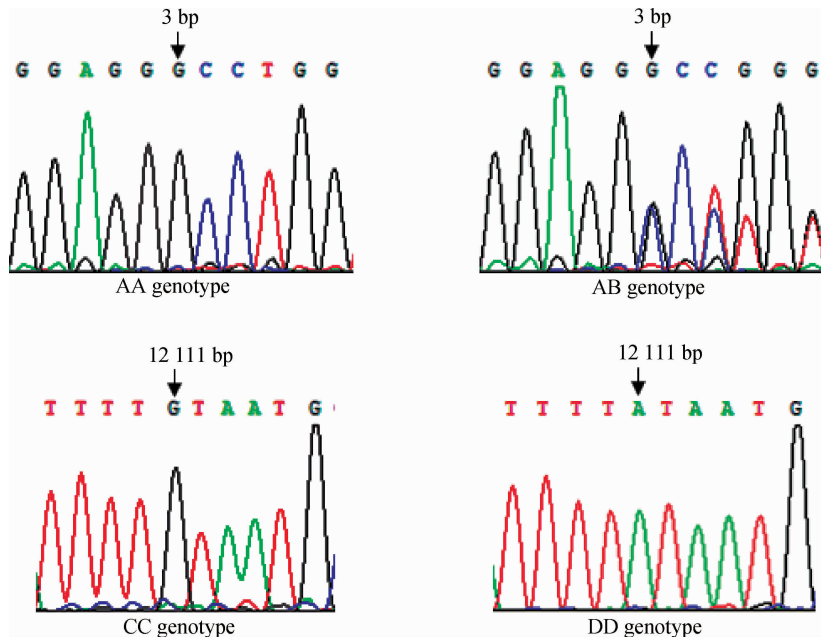


图 2 P4、P5、P7 和 P8 位点的 SSCP 分析
Fig. 2 SSCP analysis of PCR products of P4, P5, P7 and P8 loci



AA 和 AB 基因型的序列为反向测序结果;图中标注的变异碱基位是指对应牛 *DSG4* 基因序列的同源碱基位置。下同
Sequences of AA and AB genotypes are shown in reverse direction. Numbers located above the variations are referred to homologous base positions corresponding to bovine *DSG4* gene. The same as below
图 3 绵羊 *DSG4* 基因 P1 和 P2 位点的部分序列分析比较
Fig. 3 Partial sequence comparison of P1 and P2 loci of *DSG4* gene in sheep

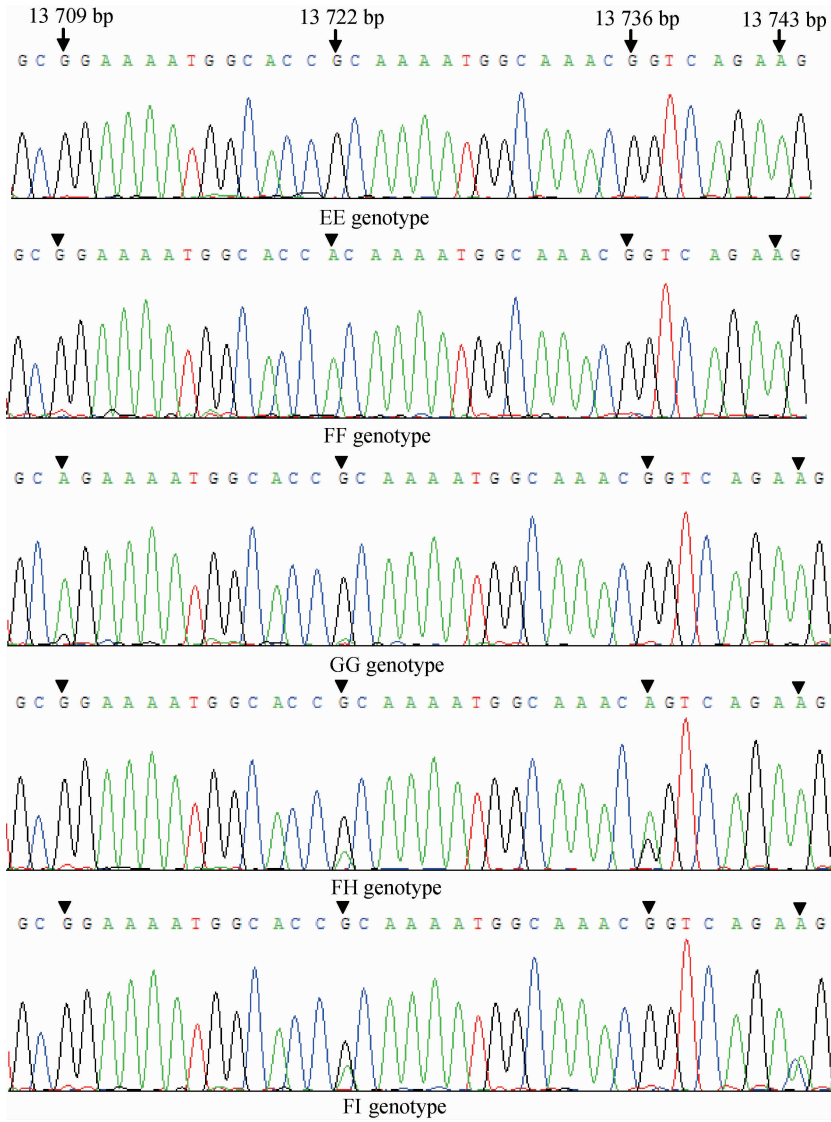


图 4 绵羊 *DSG4* 基因 P3 位点的部分序列分析比较
 Fig. 4 Partial sequence comparison of P3 locus of *DSG4* gene in sheep

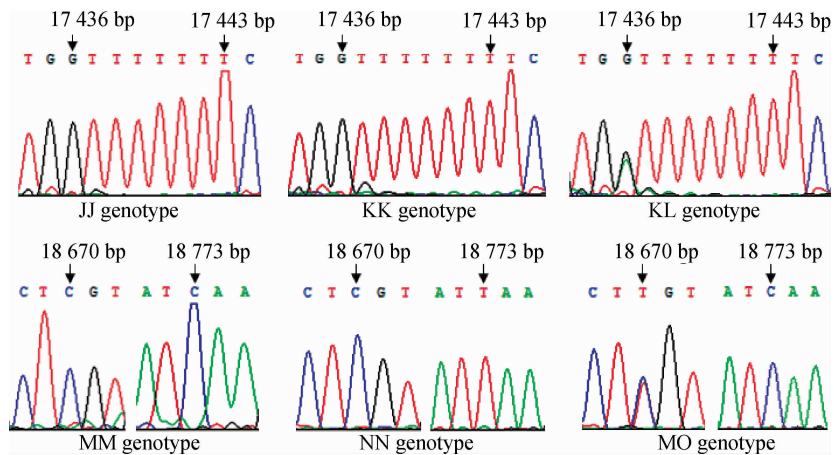


图 5 绵羊 *DSG4* 基因 P4 和 P5 位点的部分序列分析比较
 Fig. 5 Partial sequence comparison of P4 and P5 loci of *DSG4* gene in sheep

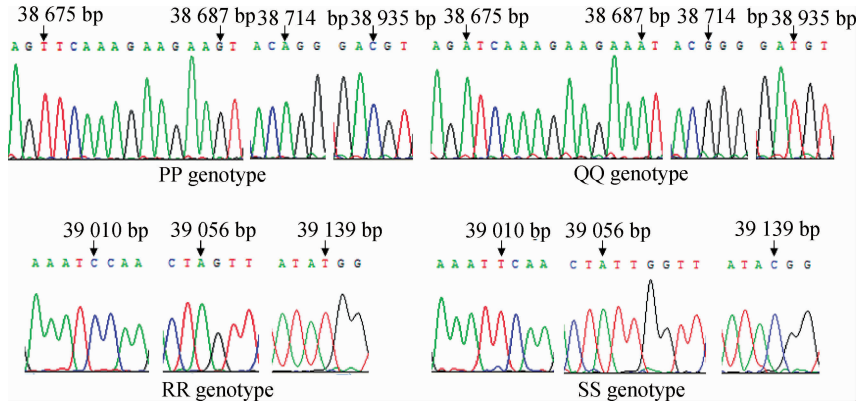


图 6 绵羊 *DSG4* 基因 P7 和 P8 位点的部分序列分析比较

Fig. 6 Partial sequence comparison of P7 and P8 loci of *DSG4* gene in sheep

通过与牛 (GenBank 登录号为 XM_617938)、小鼠 (AY227349)、大鼠 (AY314982) 和人 (AY227350) 的 *DSG4* 基因编码序列进行比较, 可以较有把握的推断 3delC 位于 5' UTR 内, 39139T > C 位于 3' UTR 内, 12111G > A、17436G > A、17444delT 位于内含子区域, 其它 11 个 SNPs 位于编码区。其中 13722G > A 使丙氨酸替换为苏氨酸、38675T > A 使苯丙氨酸替换为异亮氨酸、38687A > G 使甲硫氨酸替换为缬氨酸、38714G > A 使甘氨酸替换为精氨酸, 而 39057_39059delTTG 则使异亮氨酸替换为丝氨酸并导致甘氨酸的缺失。

2.3 *DSG4* 基因等位基因和基因型频率

除 P2 外, 其它 6 个位点上的优势等位基因在两群体间皆相同。P7 和 P8 位点间的基因型组合只有 PPRR、PQRS 和 QQSS 3 种, 而理论上还可存在 PPRS、PPSS、PQRR、PQSS、QQRS 和 QQRR 基因型, 说明此两位点间的基因型分布处于完全连锁不平衡。*DSG4* 基因 7 个多态位点的等位基因和基因型频率在滩羊和寒滩杂交羊中的分布见表 2。P3、P4 和 P5 位点上存在多个 SNPs, 根据表 2 和单倍型的不同, 统计出每一个 SNP 的等位基因和基因型频率 (文中没有列出)。卡方检验表明仅滩羊在 12111G > A ($P < 0.01$)、13722G > A 和 17444delT ($P < 0.05$) 显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡。

2.4 固定效应对毛股长度和弯曲数的影响

对于各多态位点, 方差分析结果表明群体效应 (滩羊和寒滩杂交羊) 对毛股长度和弯曲数都有显著影响 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 群体与基因型的交互效应对毛股长度和弯曲数的影响都不显著 ($P > 0.05$)。对于 P4 位点, 基因型对初生肩部毛股长度和二毛肩部毛股弯曲数有显著影响 ($P < 0.05$)。对于 P7 和 P8 位点, 基因型对初生肩部毛股长度、初生肩部毛股弯曲数、二毛肩部毛股弯曲数和二毛股部毛股弯曲数都有极显著影响 ($P < 0.01$)。滩羊和寒滩杂交羊 P4、P7 和 P8 位点不同基因型上述性状的最小二乘均值比较见表 3。

由表 3 可知, 对于 P4 位点, 寒滩杂交羊 JJ 基因型初生肩部毛股长度、初生肩部毛股弯曲数以及二毛肩部毛股弯曲数的均值显著大于 KK、JK、JL 和 KL 基因型 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); JJ 基因型二毛股部毛股弯曲数的均值大于 KK、JK、JL 和 KL 基因型, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。对于 P7 和 P8 位点, 寒滩杂交羊组合基因型 QQSS 初生肩部毛股长度、初生肩部毛股弯曲数和二毛肩部毛股弯曲数的均值极显著大于 PPRR 和 PQRS 基因型 ($P < 0.01$); QQSS 基因型二毛股部毛股弯曲数的均值显著大于 PPRR 和 PQRS 基因型 ($P < 0.05$), 而 PQRS 基因型的均值也显著大于 PPRR 基因型 ($P < 0.05$)。滩羊 QQSS 基因型上述性状的均值也大于 PPRR 和 PQRS 基因型, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 滩羊和寒滩杂交羊 *DSG4* 基因 7 个多态位点的等位基因和基因型频率Table 2 Allele and genotype frequency of seven loci for *DSG4* gene in Tan sheep and its crossbred with Small-tailed Han sheep

引物 Primer	滩羊(118) Tan sheep (118)				寒滩杂交羊(82) Small-tailed Han×Tan sheep (82)			
	基因型 Genotype	基因型频率 Genotype frequency	等位基因 Allele	等位基因频率 Allele frequency	基因型 Genotype	基因型频率 Genotype frequency	等位基因 Allele	等位基因频率 Allele frequency
	P1	AA	0.82(97)	A	0.91	AA	0.96(80)	A
	AB	0.18(21)	B	0.09	AB	0.04(2)	B	0.02
	CC	0.15(17)	C	0.47	CC	0.30(25)	C	0.54
P2	DD	0.21(25)	D	0.53	DD	0.22(18)	D	0.46
	CD	0.64(76)			CD	0.48(39)		
	EE	0.24(28)	E	0.51	EE	0.20(16)	E	0.46
	FF	0.06(7)	F	0.34	FF	0.18(15)	F	0.38
	GG	0	G	0.05	GG	0.02(2)	G	0.08
	EF	0.44(52)	H	0.04	EF	0.34(28)	H	0.07
	EG	0.04(5)	I	0.06	EG	0.09(7)	I	0.01
P3	EH	0.05(6)			EH	0.07(6)		
	EI	0.03(4)			EI	0.03(2)		
	FG	0.04(5)			FG	0.01(1)		
	FH	0.01(1)			FH	0.05(4)		
	FI	0.07(8)			FI	0		
	GH	0.01(1)			GH	0.01(1)		
	HI	0.01(1)			HI	0		
	JJ	0.15(17)	J	0.45	JJ	0.13(11)	J	0.38
	KK	0.20(24)	K	0.48	KK	0.26(21)	K	0.50
P4	JK	0.51(60)	L	0.07	JK	0.37(30)	L	0.12
	JL	0.10(12)			JL	0.13(11)		
	KL	0.04(5)			KL	0.11(9)		
	MM	0.40(47)	M	0.64	MM	0.40(33)	M	0.63
	NN	0.06(7)	N	0.30	NN	0.15(12)	N	0.37
P5	MN	0.43(51)	O	0.06	MN	0.45(37)	O	0
	MO	0.05(6)			MO	0		
	NO	0.06(7)			NO	0		
	PP	0.42(49)	P	0.67	PP	0.52(43)	P	0.71
P7	QQ	0.08(10)	Q	0.33	QQ	0.10(8)	Q	0.29
	PQ	0.50(59)			PQ	0.38(31)		
	RR	0.42(49)	R	0.67	RR	0.52(43)	R	0.71
P8	SS	0.08(10)	S	0.33	SS	0.10(8)	S	0.29
	RS	0.50(59)			RS	0.38(31)		

表 3 滩羊和寒滩杂交羊 *DSG4* 基因 P4、P7 和 P8 位点不同基因型毛股长度和弯曲数的最小二乘均数及标准误Table 3 Least square means and standard errors for length and crimp number of wool plait of different genotypes at P4, P7 and P8 loci of *DSG4* gene in Tan sheep and its crossbreds with Small-tailed Han sheep

位点 Site	群体 Population	基因型 Genotype	初生肩部	初生肩部	二毛肩部	二毛股部
			毛股长度 Length of scapular wool plait at birth	毛股弯曲数 Crimp number of scapular wool plait at birth	毛股弯曲数 Crimp number of scapular wool plait at weaning	毛股弯曲数 Crimp number of rump wool plait at weaning
P4	滩羊 Tan sheep	JJ	5.14±0.22(14)	4.00±0.26(14)	4.93±0.27(15)	4.53±0.25(17)
		KK	4.93±0.17(22)	3.86±0.21(22)	4.50±0.23(22)	4.21±0.21(24)
		JK	4.81±0.11(54)	3.87±0.13(54)	4.71±0.14(58)	4.28±0.13(60)
		JL	4.82±0.25(11)	3.91±0.29(11)	4.55±0.32(11)	3.82±0.31(11)
		KL	5.10±0.37(5)	4.20±0.43(5)	5.00±0.47(5)	4.20±0.46(5)
P4	寒滩杂交羊 Small-tailed Han×Tan sheep	JJ	5.00±0.27(9) ^{aA}	4.44±0.32(9) ^{aA}	4.67±0.35(9) ^A	3.83±0.42(6)
		KK	4.33±0.19(19) ^b	3.16±0.22(19) ^B	3.37±0.24(19) ^B	3.07±0.27(14)
		JK	4.22±0.15(30) ^b	3.37±0.18(30) ^B	3.50±0.19(30) ^B	3.13±0.21(24)
		JL	3.90±0.25(11) ^B	3.35±0.29(11) ^b	3.18±0.32(11) ^B	3.17±0.42(6)
P7/P8	滩羊 Tan sheep	PPRR	4.88±0.12(46)	3.78±0.14(46)	4.51±0.15(45)	4.14±0.14(49)
		PQRS	4.81±0.12(49)	3.94±0.14(49)	4.77±0.14(56)	4.28±0.13(55)
		QQSS	5.25±0.26(10)	4.20±0.30(10)	5.11±0.35(9)	4.70±0.32(10)
P7/P8	寒滩杂交羊 Small-tailed Han×Tan sheep	PPRR	4.13±0.13(41) ^A	3.25±0.15(41) ^A	3.29±0.16(41) ^A	2.88±0.20(25) ^a
		PQRS	4.18±0.15(29) ^A	3.34±0.18(29) ^A	3.47±0.19(30) ^A	3.31±0.20(26) ^b
		QQSS	5.06±0.29(8) ^B	4.50±0.34(8) ^B	5.00±0.39(7) ^B	4.25±0.50(4) ^c

同位点同群体同列内具有不同大写字母肩标的平均值间差异极显著 ($P < 0.01$), 具有不同小写字母肩标的平均值间差异显著 ($P < 0.05$); 括号内为有性状记录的个体数

Least square means with different capital letters for the same vertical column, locus and sheep population differ very significantly ($P < 0.01$); Least square means with different small letters for the same vertical column, locus and sheep population differ significantly ($P < 0.05$). Numbers of samples with phenotypic records are shown in brackets

3 讨论

DSG4 蛋白对于皮肤毛囊的增殖与分化具有重要的调控作用^[10,13]。近年来,许多研究发现 *DSG4* 基因突变与哺乳动物毛发异常有关。Kljuic 等^[10] 研究发现遗传性毛发稀少症 (LAH) 病人的 *DSG4* 基因存在一处 5 kb 的缺失突变 (Ex5_8del), 患披针状毛症 (Lah) 小鼠的 *DSG4* 基因也出现了 2 个位于编码区的突变 (Y196S 和 746insT)。Messenger 等^[14]、Zlotogorski 等^[15]、Shimomura 等^[16] 相继报道错义突变 A129S、P267R 和 S192P 与人的毛发异常有关。Jahoda 等^[13]、Meyer 等^[17]、Bazzi 等^[18] 的研究则表明 *DSG4* 基因突变引起大鼠毛发异常, 包括错义突变 E228V、无义突变 Q306X 和涵盖 9 个外显子的缺失突变 Ex2_10del。DSG4 蛋白为跨膜蛋白,

这些突变都位于编码胞外区的序列上, 表明胞外区可能对 *DSG4* 蛋白质的功能更为重要。

本研究在绵羊 *DSG4* 基因中检测到 16 个 SNPs 和 1 个 TTG 插入/缺失, 其中 13722G>A 引起胞外区的氨基酸替换。而 38675T>A、38687A>G、38714G>A 和 39057_39059delTTG 使胞内区的氨基酸发生改变, 关联分析结果进一步显示它们的不同组合基因型 (PPRR、PQRS 和 QQSS) 对毛股长度和弯曲数有显著影响 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。其中 QQSS 基因型对滩羊和寒滩杂交羊毛股长度和弯曲数都是有利的基因型, 但在杂交羊中对这些性状的效果更为明显; 这可能反映了胞内外氨基酸改变的组合效应: 杂交羊 QQSS 基因型个体 ($n=8$, F_1 代 5 只, BC 代 3 只) 在 13722G>A 位点全为 A 碱基的纯合子, 而滩羊 QQSS 基因型个体 ($n=10$, 分布于 6

个家系中)只有 4 例在 13722G>A 位点为 A 碱基的纯合子。P4 位点的基因型对毛股长度和弯曲数有显著影响($P<0.05$),则可能是 P4 与 P7 和 P8 位点的基因型存在连锁不平衡造成的,如滩羊和寒滩杂交羊 QQSS 基因型易和 JJ 基因型出现在相同个体(9/10 和 7/8)。但由于样本数量所限,特别是 QQSS 基因型数量颇少,本研究难以对其效应作出准确的评价。应增加样本数量,并要考虑胞内、外氨基酸改变的组合效应对羊毛性状的影响。

4 结 论

本研究结果初步表明 38675T>A、38687A>G、38714G>A、38935C>T、39010>C、39057_39059delTTG 和 39139T>C 突变位点构成的 QQSS 基因型可作为裘用绵羊毛股长度和弯曲数的有效标记。这些变异只构成两种单倍型并导致 5 个氨基酸改变,表明其影响羊毛性状具有潜在的功能基础,本研究结果可为绵羊羊毛性状的标记辅助选择提供科学依据。

参考文献:

- [1] 郑丕留,涂友仁,蒋英,等.中国羊品种志[M].上海:上海科学技术出版社,1988.
- [2] 陈翠英,王丽琼.论宁夏滩羊皮的来源和发展[J].西部皮革,2003,4:24-25.
- [3] 李思敏.小尾寒羊与滩羊裘用性能的比较[J].中国畜牧杂志,1999,35(2):41-42.
- [4] 马振东.滩羊二毛羔羊主要性状遗传相关的分析[J].中国草食动物,2001,3(1):20-21.
- [5] 张卿,刘发央,乔海云,等.滩羊与小尾寒羊杂交 F₁ 羔羊主要性状的相关和回归分析[J].甘肃农业大学学报,2009,44(1):41-43.
- [6] PURVIS I W, FRANKLIN I R. Major genes and QTL influencing wool production and quality: a review [J]. *Genet Sel Evol*, 2005, 37(1): S97-107.
- [7] GREEN K J, JONES J C. Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components [J]. *J FASEB*, 1996, 10(8): 871-881.
- [8] WHITTOCK N V. Genomic sequence analysis of the mouse desmoglein cluster reveals evidence for six distinct genes: Characterization of mouse DSG4, DSG5 and DSG6 [J]. *J Invest Dermatol*, 2003, 120(6): 970-980.

- [9] WHITTOCK N V, BOWER C. Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4 [J]. *J Invest Dermatol*, 2003, 120(4): 523-530.
- [10] KLJUIC A, BAZZI H, SUNDBERG J P, et al. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: Evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris [J]. *Cell*, 2003, 113(2): 249-260.
- [11] TETENS J, GOLDAMMER T, MADDOX J F, et al. A radiation hybrid map of sheep chromosome 23 based on ovine BAC-end sequences [J]. *Anim Genet*, 2007, 38(2): 132-140.
- [12] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [13] JAHODA C A, KLJUIC A, O'SHAUGHNESSY R, et al. The lanceolate hair rat phenotype results from a missense mutation in a calcium coordinating site of the desmoglein 4 gene [J]. *Genomics*, 2004, 83(5): 747-756.
- [14] MESSENGER A G, BAZZI H, PARSLEW R, et al. A missense mutation in the cadherin interaction site of the desmoglein 4 gene underlies localized autosomal recessive hypotrichosis [J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 125(5): 1077-1079.
- [15] ZLOTOGORSKI A, MAREK D, HOREV L, et al. An autosomal recessive form of monilethrix is caused by mutations in DSG4; clinical overlap with localized autosomal recessive hypotrichosis [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(6): 1292-1296.
- [16] SHIMOMURA Y, SAKAMOTO F, KARIYA N, et al. Mutations in the desmoglein 4 gene are associated with monilethrix-like congenital hypotrichosis [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(6): 1281-1285.
- [17] MEYER B, BAZZI H, ZIDEK V, et al. A spontaneous mutation in the desmoglein 4 gene underlies hypotrichosis in a new lanceolate hair rat model [J]. *Differentiation*, 2004, 72(9-10): 541-547.
- [18] BAZZI H, KLJUIC A, CHRISTIANO A M, et al. Intragenic deletion in the desmoglein 4 gene underlies the skin phenotype in the Iffa Credo "hairless" rat [J]. *Differentiation*, 2004, 72(8): 450-464.