

中国美利奴羊 *DLX3* 基因 3'UTR 的多态性及其与羊毛品质性状的关联分析

荣恩光¹, 王志鹏¹, 张志威¹, 杨 华², 李 辉^{1*}, 王 宁^{1*}

(1. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030; 2. 新疆农垦科学院畜牧兽医研究所, 石河子 832000)

摘要: 为探讨 *DLX3* 基因的多态性与绵羊毛品质及生长性状的关系, 本研究以 5 个品系的中国美利奴羊(新疆军垦型)为试验材料, 采用 PCR-RFLP 方法开展了 *DLX3* 基因 3'UTR 区 4 个 SNPs 的多态性检测。通过卡方检验分析了 4 个 SNPs 在各品系绵羊中的等位基因频率, 采用连锁不平衡分析构建了这 4 个 SNPs 的单倍型, 最后将单位点和单倍型分别与绵羊毛品质和生长性状进行关联分析。结果表明: 4 个 SNPs 在 5 个品系间的等位基因频率均存在极显著差异 ($P < 0.01$); 超细毛绵羊品系与其他 4 个品系间的基因型分布均存在极显著差异 ($P < 0.01$), 2 个多胎品系与其他 3 个品系间的基因型分布同样存在极显著差异 ($P < 0.01$); 相关分析显示, 这 4 个 SNPs 及其单倍型均对羊毛卷曲度有显著影响 ($P < 0.05$), 而对其他羊毛性状及生长性状无显著影响 ($P > 0.05$)。由此可见, 中国美利奴羊(新疆军垦型)*DLX3* 基因 3'UTR 区的多态性与绵羊毛发卷曲度性状显著相关, 可以尝试使用这些 SNPs 开展高品质细毛羊的分子标记辅助选择。

关键词: 中国美利奴羊(新疆军垦型); *DLX3* 基因; SNPs; 3'UTR

中图分类号: S826; Q343.15

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)03-0358-10

Polymorphism in 3'UTR of *DLX3* Gene and Its Association with Wool Quality Traits in Chinese Merino Sheep

RONG En-guang¹, WANG Zhi-peng¹, ZHANG Zhi-wei¹, YANG Hua², LI Hui^{1*}, WANG Ning^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, China)

Abstract: This experiment was designed to study the effects of polymorphism of *DLX3* gene on wool quality and growth traits in sheep. Five strains of Chinese Merino (Xinjiang Junken Type) sheep were used in the present study. The polymorphism in 3' untranslated region (UTR) of *DLX3* gene was detected and identified using DNA sequencing, and SNP genotyping was performed by PCR-RFLP analysis. Allele frequencies were analyzed by Chi-square test. Haplotypes were constructed by linkage disequilibrium analysis. The association between the SNPs and haplotypes and wool quality and growth traits were assessed by JMP4.0 software, respectively. The result showed that the allele frequencies for these four SNPs were significantly different among the five Chinese sheep strains ($P < 0.01$). The genotype distribution in super fine wool strain were different from that in the other four strains, and the genotype distribution in two prolificacy strains were significantly different from that in other three non-prolificacy strains ($P < 0.01$); Association analysis displayed that the four SNPs and their haplotypes had consistently significant effect on wool curvature ($P < 0.05$), but no significant effect on other traits ($P > 0.05$). The

收稿日期: 2011-05-04

基金项目: 国家转基因专项课题(2008ZX08009-002; 2009ZX08009-160B)

作者简介: 荣恩光(1986-), 男, 黑龙江讷河人, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: reg3641024@163.com

* 通讯作者: 李 辉, 教授, E-mail: lihui@neau.edu.cn; 王 宁, 教授, E-mail: wayane123@yahoo.com.cn

result indicate that polymorphisms of 3'UTR of *DLX3* gene are significantly correlated with wool curvature in Chinese Merino (Xinjiang Junken Type) sheep, and these SNPs can be used in molecular MAS for wool quality traits.

Key words: Chinese Merino (Xinjiang Junken Type) sheep; *DLX3* gene; SNPs; 3'UTR

DLX3(Distal-less homeobox 3)基因是同源异型框转录因子 *DLX* 基因家族中的一员^[1],在哺乳动物胎盘、皮肤、毛囊、牙齿、骨等多种组织中都有表达^[2]。*DLX3* 基因对于胎盘和骨发育十分重要^[3-4]。人类遗传病的研究表明,*DLX3* 基因的移码突变会造成 TDO(Tricho-dento-osseous syndrome)综合征^[5],而 *DLX3* 基因 c. 571-574delGGGG 4 碱基的缺失突变是形成 TDO 综合征的主要原因^[6]。另外 *DLX3* 基因 c. 561-562delCT 也可以引起较弱的 TDO 综合征^[7]。最近的研究还表明,TDO 在本质上可能是由于 *DLX3* 基因的功能缺失或单倍剂量不足(Haploinsufficiency)引起的^[8]。

DLX3 基因与毛囊发育以及毛发形成密切相关。基因敲除小鼠研究表明,*DLX3* 基因缺失会引起毛囊形态、分化以及周期性的改变,并导致毛干和内毛根鞘的形成发生障碍,从而造成全身性脱发。在毛囊分化过程中,*DLX3* 基因主要受 Wnt 通路调控,*DLX3* 调控 *Hoxc13* 和 *Gata3* 等转录因子的表达。研究发现 *DLX3* 和 *Smad1/5/8* 存在互作,从而介导 BMP(Bone morphogenetic protein)信号通路对毛囊分化的调控作用。敲除毛囊干细胞的 *DLX3* 基因,会导致毛囊静止期 BMP 信号消失,从而阻碍毛囊再次生长^[9]。BMP2 能够通过 *Smad1* 和 *Smad4* 在毛囊细胞中激活 *DLX3* 基因转录^[10]。最近的研究发现,miR-31 调控 *DLX3* 基因在皮肤和毛囊中的表达,从而对毛发正常生长以及毛纤维形成起到重要的作用^[11]。此外,*DLX3* 的 SUMO 化修饰可以促进 *DLX3* 基因的转录活性^[12],进而影响其对毛发形成的调控。以上这些研究表明 *DLX3* 是毛囊发育和毛发形成的重要调控基因。

目前对 *DLX3* 的研究主要集中在人和鼠上,羊 *DLX3* 基因的研究报道很少。哺乳动物的 *DLX3* 基因具有高度的同源性,鉴于 *DLX3* 基因在胎盘、骨组织以及毛囊发育中的重要作用,我们将 *DLX3* 基因作为影响绵羊重要经济性状的候选基因,开展了我国美利奴羊 *DLX3* 基因 3'UTR 区的多态性研究,并将中国美利奴羊的不同基因型与其部分性状进行关联分析,以期寻找到影响中国美利奴羊重要

经济性状的 SNP 位点。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究以 783 只中国美利奴羊(新疆军垦型)为试验材料。样本共包含 5 个品系,其中超细毛品系 160 只、毛用多胎品系 137 只、A 品系 171 只、B 品系 166 只、肉用多胎品系 149 只,各品系的个体均为母羊。采集绵羊耳组织,-20 °C 保存备用。采用常规的苯酚/氯仿法提取绵羊基因组 DNA。羊毛性状测定根据国家纤维检验标准并参考国际毛纺织组织(IWTO)纤维检测标准,对绵羊体侧部毛样进行自然长度、细度、卷曲度、污毛量、净毛率的测定,生产性能按照细毛羊鉴定标准进行测定。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据绵羊 *DLX3* 基因序列(GenBank 登录号:FJ654646.1),设计引物(表 1)扩增 *DLX3* 基因的 3'UTR 区。以绵羊的基因组 DNA 为模板,扩增 *DLX3* 基因的 3'UTR 区,并克隆测序。利用 DNAMAN 软件和 clustalx1.83 软件等对测序结果进行比对。对于发现的部分多态性位点,利用 Primer Premier 5.0 软件重新设计引物(表 1,SNP5 未检测)。此外,对文献报道的 *DLX3* 基因 3'UTR 区的 1 个 SNP 位点(SNP6)也设计合成了引物(表 1)^[13]。上述引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.2 多态性检测分析 多态性检测采用 PCR-RFLP 方法,引物序列、退火温度及扩增片段大小见表 1。其中 SNP1~SNP3 的 RFLP 分型体系:2 μL 的 PCR 产物,内切酶为 5 U *Eam*1104I(SNP1)、3 U *Hpy*188I(SNP2)、5 U *Taq* I(SNP3),1 μL Buffer,并用去离子灭菌水混合补至 10 μL 体系,分别于 37、37 和 65 °C 酶切过夜。酶切产物均经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测观察结果。SNP4 的 RFLP 分型体系:2 μL 的 PCR 产物,5 U *Msp* I 内切酶,1 μL Buffer,1 μL 0.1% BSA,并用去离子灭菌水混合补至 10 μL 体系,37 °C 酶切过夜。酶切产物经 14% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测观察结果。

表 1 引物的序列、退火温度和片段大小

Table 1 The primer sequences, annealing temperature and product size

位点 Site	引物序列(5'-3') Primer sequence	扩增长度/bp Product size	退火温度/°C Annealing temperature
DLX3 基因 3'UTR 区 3'UTR of DLX3 gene	F: AGCAGCAGCCGCTCAACCAG R: AGCTGGCTTCGTTCCCGTCCC	1 498	67.8
SNP1	F: ACTTACAGCAGCAGCCGCCTCAAC R: CCCAGTCTCACGGTCCAATGTCTTT	610	63
SNP2	F: AACCTCTCACGAAGGAACCC R: AGTCTCACGGTCCAATGTCTTT	508	59.5
SNP3	F: ACCTGTGGCTGTCTCCTTC R: CAATGCCCTTTGTCTTCCTAT	343	59.5
SNP4	F: TCCCGCCAAGACAGAGAAT R: GCCACATAAATAGGAAACCAC	273	56
SNP6	F: CCGACCACCCATTTCTTCT R: GGTTTGCTTTCCTGGTGTGT	232	60

基因型命名方式为:突变型用突变前后碱基命名,例如 T 到 C 的突变,则基因型表示为:TT、CC、TC 型;插入缺失型用 D(Delete)、I(Insert)表示,即基因型表示为:DD、II、ID 型。

1.2.3 统计分析

(1)根据中国美利奴羊试验群体的特点构建基因型效应统计模型: $Y = \mu + G + L + A + e$ 。

其中, Y 为性状的观测值, μ 为群体均值, G 为基因型效应(计算单倍型时为单倍型效应), L 为品系效应, A 为年龄效应, e 为剩余值效应。单倍型构建利用 SAS 9.1.3 软件的 Genetics 过程;基因型与连续性性状间的相关程度检验利用 JMP 4.0 统计软件,并估计性状的最小二乘均值;基因型与离散性性状(油汗)间的相关程度检验利用 SAS 9.1.3 软件的 CATMOD 过程。显著水平为 $P < 0.05$,极显著水平为 $P < 0.01$ 。利用 SAS 9.1.3 软件的 VARCOMP 过程估计方差组分,并计算各 SNP 及单倍型对卷曲度的遗传贡献率。

(2)多态信息含量(Polymorphism information content, PIC)和位点杂合度(Heterozygosity)根据 SAS 9.1.3 软件 Genetics 包的 Allele 过程计算得出。利用 Weir 等^[14]提出的算法计算杂合性基因多样性比率(F_{ST})的无偏估计值,公式如下:

$$F_{ST} = \frac{MSP - MSG}{MSP + (N_C - 1)MSG}$$

1.2.4 连锁不平衡分析及标签 SNP(Haplotype

tag SNP, htSNP)的选择 利用 Haploview 4.2 软件^[15],分析连锁不平衡程度。运行 Tagger 工具,根据 SNP 之间 $r^2 > 0.8$ 的原则选择 htSNP^[16]。单倍型块的划分采用 D' 值的 95%置信区间在 0.70~0.98 的相邻 SNP 被归入同一个单倍型块^[17]。

2 结果

2.1 SNPs 的发现及命名

选取 9 只中国美利奴羊的基因组 DNA 为模板扩增 DLX3 基因的 3'UTR 区,胶回收后的 PCR 扩增产物连接到 pMD18-T 载体上,克隆测序。DLX3 基因的 3'UTR 区扩增产物为 1 498 bp,序列比对后发现,在 3'UTR 区存在 5 个 SNPs 位点(图 1)。SNP 位点的命名以 DLX3 基因终止密码子后第 1 个碱基为 1,从而对各 SNP 统一命名(表 2)。除 SNP5 外,对其余 4 个 SNPs 位点均进行了多态性检测。另外还对 5 个品系中的 22 个个体进行测序,以寻找已知的 SNP6 位点,结果在试验群体中未发现该位点(结果未列出)。

2.2 多态性检测结果及基因型频率分析

针对 SNP1~SNP4 位点,用相应 PCR 引物(表 1)对中国美利奴羊 5 个品系的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,扩增片段与目的片段大小一致且特异性较好。采用 PCR-RFLP 分型方法进行个体基因型分析,分别产生 3 种基因型(图 2)。图 2 依次为 4

个位点的酶切结果。

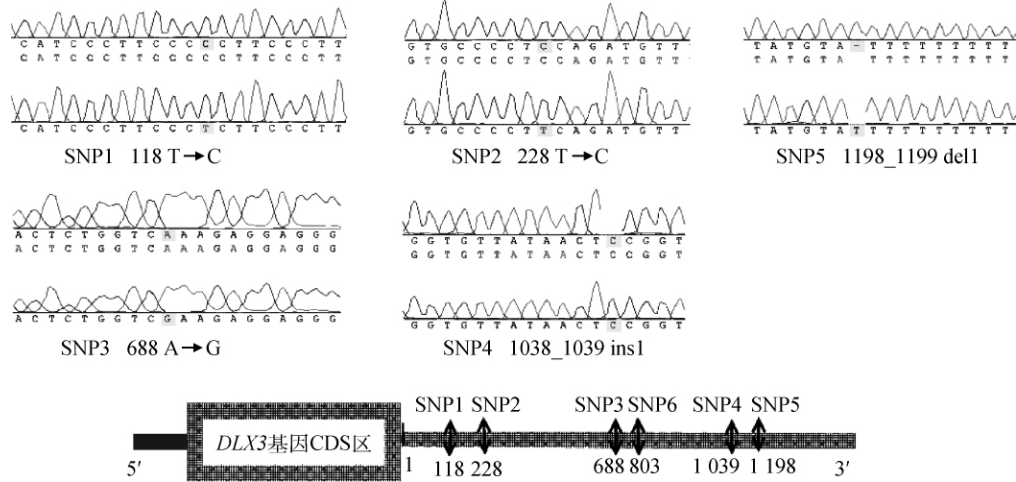


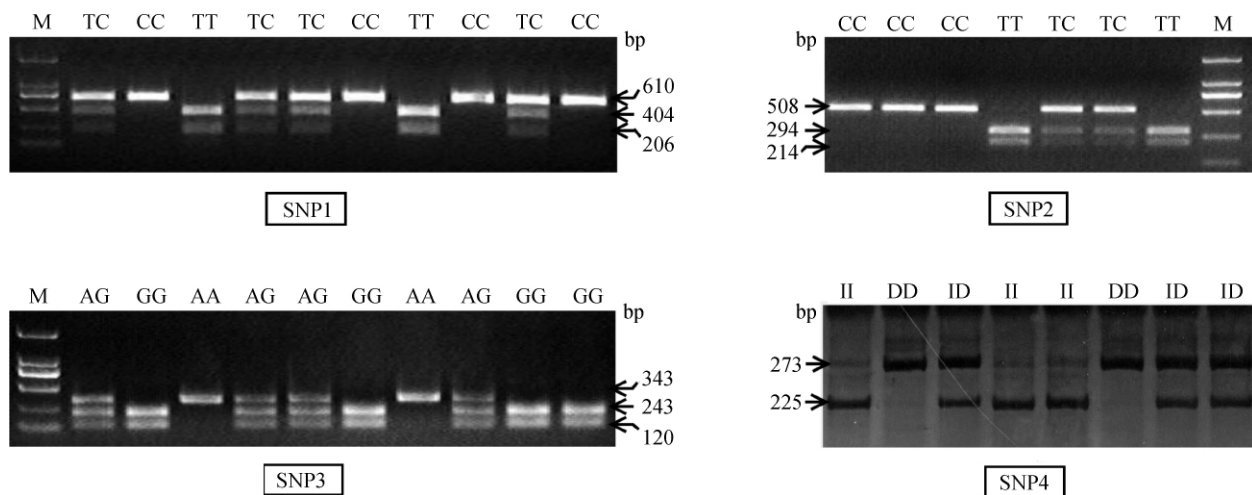
图 1 *DLX3* 基因 3'UTR 的多态位点

Fig. 1 The polymorphic sites in the 3'UTR of *DLX3* gene

表 2 绵羊 *DLX3* 基因 3'UTR 的 SNPs 位置及命名

Table 2 The positions and names of SNPs in the 3'UTR of sheep *DLX3* gene

位点 Site	位置 Position	变异类型 Variation type	命名 Name
SNP1	3'UTR	单点突变:T/C	c. * 118T > C
SNP2	3'UTR	单点突变:T/C	c. * 228T > C
SNP3	3'UTR	单点突变:A/G	c. * 688A > G
SNP4	3'UTR	单碱基插入:C	c. * 1038-1039 ins1
SNP6	3'UTR	单点突变:A/G	c. * 803A > G ^[13]



M. DNA 相对分子质量标准 DL 2000

M. DL 2000 marker

图 2 SNP1~ SNP4 酶切后的分型结果

Fig. 2 SNP genotyping of SNP1-SNP4 by PCR-RFLP

4 个 SNPs 位点在试验群体中的多态信息含量呈中度多态($0.25 < PIC < 0.5$),且位点杂合度都小于 0.5。 F_{ST} 值计算结果显示,SNP2 和 SNP3 的杂合性基因多样性的比率比 SNP1 和 SNP4 偏大(表 3)。SNP1~SNP4 在试验群体中基因型频率和等位基因频率的统计分析表明:这 4 个 SNPs 在 5 个品系中均检测出 a、b 2 个等位基因(将超细毛品系中高频等位基因定义为 a、低频等位基因定义为 b);在超细毛品系中,这 4 个 SNPs 都是以 a 等位基因为主,而在其他 4 个品系中以 b 等位基因为主;在超细毛品系、毛用多胎品系、A 品系、B 品系中都检测到了 3 种不同基因型,而在肉用多胎品系中却只检

出 2 种基因型;这 4 个 SNPs 在 5 个品系间的等位基因频率均存在极显著差异($P < 0.01$);卡方检验表明,除 SNP4 在毛用多胎品系中不符合 Hardy-Weinberg 外($P < 0.05$),其他 SNPs 位点在各品系中均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$),表中 P 值为校正后结果(表 4)。

SNP1~SNP4 位点在各品系间基因型分布的多重比较结果表明,超细毛品系与其他 4 个品系间的基因型分布均存在极显著差异($P < 0.01$),2 个多胎品系与其他 3 个非多胎品系间的基因型分布同样存在极显著差异($P < 0.01$),而 2 个多胎品系彼此间以及 A 品系与 B 品系间基因型分布没有显著差异(表 5)。

表 3 中国美利奴羊 *DLX3* 基因 3'UTR 的多态性分析

Table 3 Genitic diversity in the 3'UTR of *DLX3* gene in Chinese Merino sheep

SNP 位点 SNP site	多态信息含量 <i>PIC</i>	位点杂合度 Heterozygosity	位点纯合度 Homozygosity	杂合性基因多样性的比率 F_{ST}
SNP1	0.345 7	0.416 3	0.583 7	0.387
SNP2	0.331 6	0.389 5	0.610 5	0.395
SNP3	0.343 3	0.408 7	0.591 3	0.399
SNP4	0.345 9	0.417 6	0.582 4	0.385

$PIC > 0.5$ 为高度多态, $0.25 < PIC < 0.5$ 为中度多态, $PIC < 0.25$ 为低度多态

$PIC > 0.5$ means high diversity, $0.25 < PIC < 0.5$ means moderate diversity, $PIC < 0.25$ means low diversity

2.3 单个 SNP 与绵羊生长性状及羊毛品质性状的相关分析

利用 JMP 4.0 软件分别对单个 SNP 的基因型与绵羊生长性状及羊毛品质性状进行关联分析(模型 1),结果显示,SNP1~SNP4 变异位点均只对绵羊羊毛卷曲度性状有显著影响($P < 0.05$,表 6)。由此可见,*DLX3* 基因 3'UTR 变异对羊毛卷曲度有显著影响,对其他性状的影响有待于进一步研究。

对差异显著的卷曲度性状进行多重比较分析,结果表明,SNP1 的 TT 基因型个体的卷曲度显著高于 CC 基因型个体($P < 0.05$);SNP2 的 TT、TC 基因型个体的卷曲度显著高于 CC 基因型个体($P < 0.05$);SNP3 的 AA、AG 基因型个体的卷曲度显著高于 GG 基因型个体($P < 0.05$);SNP4 的 DD 基因型个体的卷曲度显著高于 II 基因型个体($P < 0.05$,表 7)。

2.4 连锁不平衡分析及标签 SNP 的选择

由 Haploview 中的 LD Plot 分析可知,SNP1、SNP2、SNP3 和 SNP4 处于强连锁状态,位于一个单倍型块中(图 3)。Tagger 结果分析显示,SNP2 为标签 SNP,SNP2 与 SNP1、SNP3、SNP4 之间的 r^2

值均大于 0.8,即 SNP2 可代替其他 SNPs 效应,由标签 SNP2 构建的单倍型可反映整个 *DLX3* 基因 3'UTR 的单倍型信息。此外,卡方检验表明这 4 个 SNPs 位点在全部分试验群体中都符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$)。

2.5 单倍型构建及与绵羊生长性状和羊毛品质性状的相关分析

利用上述所得到的 htSNP 构建 *DLX3* 基因 3'UTR 的单倍型,共得到 5 种单倍型,将频率小于 0.01 的单倍型去除,得到 3 种主要单倍型:CCGI、TTAD、TCAD。用 JMP 4.0 软件在中国美利奴羊的 5 个品系中进行单倍型与绵羊生长性状及羊毛品质性状的相关分析。结果表明单倍型效应同样仅对羊毛卷曲度性状有显著影响($P < 0.05$),对其他性状无显著影响($P > 0.05$,表 6)。对不同单倍型的卷曲度效应做多重比较分析,结果表明,TTAD 单倍型个体的羊毛卷曲度显著高于 CCGI 单倍型个体($P < 0.05$,表 8)。这 4 个 SNPs 位点对卷曲度性状的遗传贡献率范围为 0.39%~0.92%,而单倍型的遗传贡献率为 0.4%。

表 4 基因型频率及等位基因频率在不同品系绵羊中的分布及卡方独立性检验和 Hardy-Weinberg 平衡检验
Table 4 The distribution of genotypes and allele frequencies in different sheep strains and Chi-square test for independence and Hardy-Weinberg equilibrium test

SNP 位点 SNP site	品系 Line	个体数 Sample	基因型频率(频数) Genotype frequency (number)						等位基因频率 Allele frequency		Hardy-Weinberg χ^2 (P value)	χ^2 值 (P 值) χ^2 value (P value)
			TT		TC		CC		T(a)	C(b)		
			TT	TC	TC	CC	CC					
SNP1	超细毛品系 Super fine wool strain	160	0.325(52)	0.506(81)	0.169(27)	0.578	0.422	0.23(P=0.632)				
	毛用多胎品系 Prolific wool strain	137	0.007(1)	0.343(47)	0.650(89)	0.179	0.821	3.87(P=0.073)				
	A 品系 A strain B 品系 B strain	171 166	0.140(24) 0.127(21)	0.421(72) 0.530(88)	0.439(75) 0.343(57)	0.351 0.392	0.649 0.608	0.98(P=0.322) 2.10(P=0.147)			$\chi^2 = 178.07$ ($P = 1.9 \times 10^{-37}$)	
SNP2	肉用多胎品系 Prolific meat strain	149	0(0)	0.255(38)	0.745(111)	0.128	0.872	3.18(P=0.073)				
	超细毛品系 Super fine wool strain	160	0.319(51)	0.494(79)	0.187(30)	0.566	0.434	0.004(P=0.951)				
	毛用多胎品系 Prolific wool strain A 品系 A strain B 品系 B strain	137 171 166	0.007(1) 0.082(14) 0.096(16)	0.299(41) 0.398(68) 0.488(81)	0.694(95) 0.520(89) 0.416(69)	0.157 0.281 0.34	0.843 0.719 0.66	2.35(P=0.125) 0.04(P=0.842) 1.25(P=0.264)			$\chi^2 = 183.15$ ($P = 1.6 \times 10^{-38}$)	
SNP3	肉用多胎品系 Prolific meat strain	149	0(0)	0.242(36)	0.758(113)	0.121	0.879	2.81(P=0.129)				
	超细毛品系 Super fine wool strain	160	0.325(52)	0.506(81)	0.169(27)	0.578	0.422	0.23(P=0.632)				
	毛用多胎品系 Prolific wool strain A 品系 A strain B 品系 B strain	137 171 166	0.007(1) 0.135(23) 0.121(20)	0.321(44) 0.421(72) 0.518(86)	0.672(92) 0.444(76) 0.361(60)	0.168 0.345 0.380	0.832 0.655 0.62	3.06(P=0.080) 0.80(P=0.371) 1.66(P=0.198)			$\chi^2 = 183.62$ ($P = 1.2 \times 10^{-38}$)	
SNP4	肉用多胎品系 Prolific meat strain	149	0(0)	0.248(37)	0.752(112)	0.124	0.876	2.99(P=0.128)				
	超细毛品系 Super fine wool strain	160	0.325(52)	0.506(81)	0.169(27)	0.578	0.422	0.23(P=0.632)				
	毛用多胎品系 Prolific wool strain A 品系 A strain B 品系 B strain	137 171 166	0.007(1) 0.140(24) 0.127(21)	0.350(48) 0.421(72) 0.530(88)	0.643(88) 0.439(75) 0.343(57)	0.182 0.351 0.392	0.818 0.649 0.608	4.16*(P=0.048) 0.98(P=0.322) 2.10(P=0.147)			$\chi^2 = 176.52$ ($P = 4.2 \times 10^{-37}$)	
SNP5	肉用多胎品系 Prolific meat strain	149	0(0)	0.255(38)	0.745(111)	0.128	0.872	3.18(P=0.073)				

表 5 不同位点在各品系间基因型分布的多重比较结果

Table 5 Multiple comparisons of individual genotypes of SNP1 to SNP4 among these five different strains

品系 Strain	超细毛品系 Super fine wool strain	毛用多胎品系 Prolific wool strain	A 品系 A strain	B 品系 B strain
毛用多胎品系 Prolific wool strain	SNP1; $P=2.9 \times 10^{-20}$			
	SNP2; $P=7.5 \times 10^{-21}$			
	SNP3; $P=3.3 \times 10^{-21}$			
	SNP4; $P=5.7 \times 10^{-20}$			
A 品系 A strain	SNP1; $P=6.5 \times 10^{-8}$	SNP1; $P=5.7 \times 10^{-6}$		
	SNP2; $P=9.2 \times 10^{-12}$	SNP2; $P=6.9 \times 10^{-4}$		
	SNP3; $P=2.9 \times 10^{-8}$	SNP3; $P=3.7 \times 10^{-6}$		
	SNP4; $P=6.5 \times 10^{-8}$	SNP4; $P=7.8 \times 10^{-6}$		
B 品系 B strain	SNP1; $P=5.9 \times 10^{-6}$	SNP1; $P=2.3 \times 10^{-8}$	SNP1; $P=0.12$	
	SNP2; $P=5.1 \times 10^{-8}$	SNP2; $P=8.5 \times 10^{-7}$	SNP2; $P=0.15$	
	SNP3; $P=1.5 \times 10^{-6}$	SNP3; $P=2.5 \times 10^{-8}$	SNP3; $P=0.20$	
	SNP4; $P=5.9 \times 10^{-6}$	SNP4; $P=3.9 \times 10^{-8}$	SNP4; $P=0.12$	
肉用多胎品系 Prolific meat strain	SNP1; $P=1.9 \times 10^{-26}$	SNP1; $P=0.14$	SNP1; $P=1.9 \times 10^{-9}$	SNP1; $P=3.3 \times 10^{-13}$
	SNP2; $P=1.1 \times 10^{-25}$	SNP2; $P=0.30$	SNP2; $P=3.2 \times 10^{-6}$	SNP2; $P=4.3 \times 10^{-10}$
	SNP3; $P=8.1 \times 10^{-27}$	SNP3; $P=0.22$	SNP3; $P=2.3 \times 10^{-9}$	SNP3; $P=1.5 \times 10^{-12}$
	SNP4; $P=1.9 \times 10^{-26}$	SNP4; $P=0.11$	SNP4; $P=1.9 \times 10^{-9}$	SNP4; $P=3.3 \times 10^{-13}$

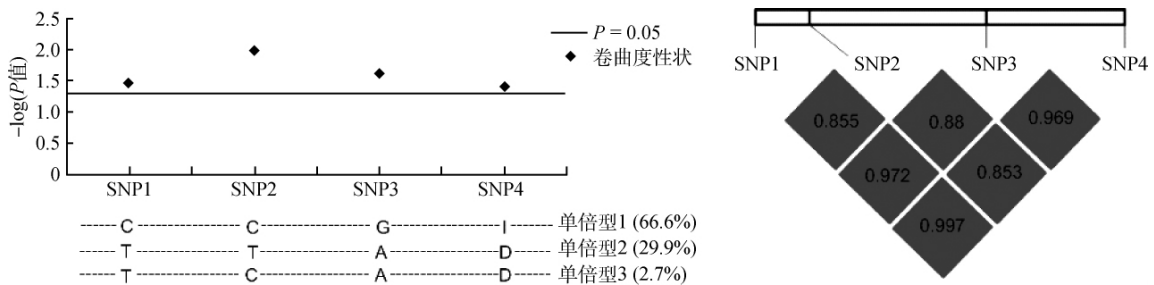
表 6 单位点及单倍型对绵羊毛品质和生长性状的影响(P 值)

Table 6 The influence of individual SNPs and haplotypes on sheep wool quality and growth traits(P value)

性状 Trait	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	单倍型 Haplotype
毛纤维直径 Average wool fiber diameter	0.605 5	0.674 5	0.799 5	0.603 7	0.334 1
细度标准差 Fineness SD	0.887 1	0.954 5	0.932 9	0.869 5	0.214 7
细度离散 Coefficient of variation of fibre diameter	0.895 9	0.669 2	0.860 6	0.896 1	0.547 7
油汗 Sticky sweating	0.882 0	0.943 3	0.837 1	0.848 5	—
卷曲度 Wool curvature	0.034 1*	0.010 6*	0.024 2*	0.039 2*	0.034 9*
污毛量 Fleece weight	0.484 8	0.508 1	0.335 8	0.484 8	0.388 1
毛自然长度 Wool fibre length	0.959 4	0.704 4	0.880 7	0.966 7	0.423 5
剪前体质量 Body weight before shearing	0.746 4	0.753 5	0.834 0	0.746 4	0.783 1
剪后体质量 Body weight after shearing	0.420 1	0.581 5	0.450 5	0.420 1	0.930 3

*. 表示影响显著($P < 0.05$); —. 代表没得到结果

*. Represents the difference is significant($P < 0.05$); —. Represents no result



x 轴表示 SNPs, y 轴表示 $-\log(P \text{ 值})$, 右图阴影部分表示 r^2 值大于 0.8

The x-axis indicates SNP ID and y-axis indicates $-\log(P \text{ value})$. The shadow boxes in the right graph indicate r^2 values more than 0.80

图 3 DLX3 基因 3'UTR 区 SNPs 的关联分析及单倍型构建

Fig. 3 Single marker association analysis and haplotype construction of SNPs of 3'UTR in DLX3 gene

表 7 不同 SNPs 位点的不同基因型对绵羊羊毛卷曲度的影响(最小二乘均值±标准误)

Table 7 The influence of different genotypes of SNP1-SNP4 on wool curvature (Least square means±standard errors)

SNP 位点 SNP site	基因型 Genotype	卷曲度 Wool curvature
SNP1	CC	12.29±0.10 ^a
	TC	12.57±0.11 ^{ab}
	TT	12.86±0.20 ^b
SNP2	CC	12.27±0.10 ^a
	TC	12.63±0.11 ^b
	TT	12.94±0.22 ^b
SNP3	AA	12.88±0.20 ^a
	AG	12.59±0.11 ^a
	GG	12.29±0.10 ^b
SNP4	DD	12.87±0.20 ^a
	ID	12.57±0.11 ^{ab}
	II	12.30±0.10 ^b

同一 SNP 位点内同列数据含有不同肩标字母表示差异显著($P<0.05$),含有相同肩标字母表示差异不显著($P>0.05$)

^{a, b}. Means within a row with different superscript differ significantly ($P<0.05$)

表 8 不同单倍型对绵羊羊毛卷曲度的影响(最小二乘均值±标准误)

Table 8 The influence of different haplotypes on wool curvature (Least square means±standard errors)

单倍型 Haplotype	卷曲度 Wool curvature
CCGI	12.39±0.06 ^a
TCAD	12.26±0.29 ^{ab}
TTAD	12.71±0.09 ^b

同列数据后含有不同肩标字母表示差异显著($P<0.05$),肩标字母相同表示差异不显著($P>0.05$)

^{a, b}. Means within a row with different superscripts differ significantly ($P<0.05$)

3 讨 论

近年来,*DLX3* 基因以其在胎盘、毛囊及骨发育中的重要作用而备受关注。笔者在绵羊 *DLX3* 基因的 3'UTR 区发现了 5 个 SNPs,并对其中的 4 个进行了研究。研究显示,这 4 个 SNPs 在试验群体中的多态信息含量呈中度多态($0.25<PIC<0.5$),表明这些遗传标记能够提供较合理的信息量。且这些 SNPs 的位点杂合度值都小于 0.5,这表明各位点在试验群体间的遗传变异较小。位点杂合度和多态信息含量所表现的趋势一致,都是 SNP4 最大、

SNP2 最小,推测这可能与羊品系的形成及后期的改良和保种有关。 F_{ST} 值表示随机取自每个亚群体 2 个配子间的相互关系,它用来测量亚群体间的遗传分化程度,SNP2 和 SNP3 的 F_{ST} 值比 SNP1 和 SNP4 偏大,表明 SNP2、SNP3 在试验群体中的遗传分化程度相对较高。4 个 SNPs 位点在整个试验群体中均处于 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$),这表明多态性指标与遗传变异呈正相关。此外 4 个 SNPs 在各品系中均检测到了 a、b 2 个等位基因,并且这 4 个 SNPs 在不同品系间的等位基因频率都存在极显著差异($P<0.01$),这表明中国美利奴羊品系间确实存在着遗传结构的差异性。

研究中发现超细毛品系中 a 等位基因为优势基因,而在其他 4 个品系中 b 等位基因为优势基因,并且超细毛品系与其他 4 个品系在基因型分布上均存在着极显著差异。人和小鼠的研究表明,*DLX3* 基因在调控毛囊分化和毛发周期性方面发挥着重要作用,同时 *DLX3* 基因与毛发形态和毛纤维形成密切相关^[9, 11, 18]。到目前为止,还没有 *DLX3* 基因对绵羊毛囊生长发育和羊毛性状作用的相关报道,基于人和小鼠的研究结果以及我们的 SNP 检测和关联分析结果,笔者推测 *DLX3* 基因在绵羊毛囊发育过程中同样发挥重要作用,可能是影响羊毛品质性

状的重要基因。同时鉴于超细毛品系与其他品系之间的显著差异,笔者推测等位基因 a、b 可能与绵羊毛的细度性状有关。

研究中还发现,这 4 个 SNPs 在超细毛品系、毛用多胎品系 A 品系、B 品系中都检出了 3 种不同基因型,而在肉用多胎品系中却只检出 2 种基因型。Drouilhet 等^[13]在法国 Lacaune 绵羊中发现, *DLX3* 基因 3'UTR 上一个单点突变也存在相似的偏态分布,并与 Lacaune 绵羊的排卵率和产仔数有关。尽管我们在中国美利奴羊中未检测到该位点,但检测的 4 个 SNPs 在多胎群体和非多胎群体中存在极显著差异。这提示 *DLX3* 基因也可能是中国美利奴羊多胎性状的标记基因或功能基因, SNP1~SNP4 可作为中国美利奴羊多胎性状选择和鉴定的潜在分子标记。

本研究对试验群体没有进行有目的的选择,全部试验羊只有少部分个体有系谱信息,因此我们在统计分析时将试验动物作为随机群体处理,在最小二乘分析中也没有考虑家系效应。关联分析结果表明, *DLX3* 基因 3'UTR 的单位点和单倍型都与绵羊毛的卷曲度相关。卷曲是细毛羊毛的特征之一,它对纺织品质量和织物风格有很大影响,在羊毛生产和羊毛品质方面都是非常重要的判定指标。卷曲是由于毛发正副皮质双层结构和毛囊生长的周期性所造成的^[19-20],毛囊是控制毛发生长和毛纤维品质的重要结构^[21],而 *DLX3* 是调控毛囊发育的重要基因^[9]。研究证实,人类 TDO 综合症的主要病因是由于 *DLX3* 基因突变引起的^[5],其临床表现包括人毛发的卷曲。由此我们推测绵羊 *DLX3* 基因可能是调控羊毛卷曲度的主效基因或标记基因。尽管国内外对毛发卷曲机制的相关研究进行过相继报道,但人类对毛发的卷曲模式与亚结构之间的关系知之甚少,毛发宏观的分子形态及细胞学基础也未完全阐明^[22],因此,要证明 *DLX3* 基因是否为影响羊毛卷曲度性状的主效基因,还需要做进一步深入研究。

序列分析显示,哺乳动物 *DLX3* 基因 3'UTR 区具有高度的保守性,这预示着 *DLX3* 基因的 3'UTR 区在哺乳动物 *DLX3* 基因的表达调控中发挥重要作用。目前,在基因 3'UTR 上已发现 50 余种 motifs,这些 motifs 主要调控 mRNA 稳定性、亚细胞定位以及翻译效率等^[23-25]。*DLX3* 基因 3'UTR 区的功能元件分析显示,本研究发现的 SNPs 均不

存在于这些已知的 motifs 中。miRNA 是一类非编码小 RNA 分子,它是一类重要的反式调控因子,参与转录后基因表达调控^[26]。3'UTR 也是 miRNA 的结合和作用位点,miRNA 结合位点的突变能够影响 miRNA 对靶基因表达,导致性状的改变^[27]。*DLX3* 基因 3'UTR 区存在多个 miRNA 的结合位点,本研究发现的 4 个 SNPs 位点位于多个 miRNA 的结合区。本研究推测 *DLX3* 基因 3'UTR 区的这 4 个 SNPs 位点可能会影响 miRNA 与 *DLX3* 基因 3'UTR 区的结合,从而引起 *DLX3* 基因表达改变,进而造成相关性状的变化。

中国美利奴羊的培育从 1972 年开始^[28],中国美利奴羊(新疆军垦型)多品系的育成为细毛羊毛品质相关基因的研究提供了良好的试验材料。候选基因的选择对高品质细毛羊的培育具有重要意义,本研究将 *DLX3* 基因作为绵羊育种的一个候选基因,对 3'UTR 区进行多态性及关联性分析,这为中国美利奴羊在毛用和繁殖等育种方向的基因标记辅助育种提供了依据,并为绵羊 *DLX3* 基因的功能研究奠定了基础。

4 结 论

本研究对中国美利奴羊(新疆军垦型) *DLX3* 基因 3'UTR 区进行克隆、测序分析,共发现 5 个 SNPs 位点。对其中 4 个 SNPs 位点的检测结果表明,各 SNP 位点在整个试验群体中均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。关联分析结果表明,这 4 个 SNPs 及其单倍型都对羊毛卷曲度有显著影响,提示 *DLX3* 基因可能是影响羊毛卷曲性状的主效基因。

参考文献:

- [1] BENDALL A J, ABATE-SHEN C. Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development [J]. *Gene*, 2000, 247(1-2): 17-31.
- [2] BEANAN M J, SARGENT T D. Regulation and function of Dlx3 in vertebrate development [J]. *Dev Dyn*, 2000, 218(4): 545-553.
- [3] CHOI S J, ROODMAN G D, FENG J Q, et al. *In vivo* impact of a 4 bp deletion mutation in the *DLX3* gene on bone development [J]. *Dev Biol*, 2009, 325(1): 129-137.
- [4] CHOI S J, SONG I S, RYU O H, et al. A 4 bp deletion mutation in *DLX3* enhances osteoblastic differ-

- entiation and bone formation *in vitro* [J]. *Bone*, 2008, 42(1): 162-171.
- [5] PRICE J A, BOWDEN D W, WRIGHT J T, et al. Identification of a mutation in *DLX3* associated with tricho-dento-osseous (TDO) syndrome [J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(3): 563-569.
- [6] DUVERGER O, LEE D, HASSAN M Q, et al. Molecular consequences of a frameshifted *DLX3* mutant leading to Tricho-Dento-Osseous syndrome [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(29): 20198-20208.
- [7] WRIGHT J T, HONG S P, SIMMONS D, et al. *DLX3* c. 561-562delCT mutation causes attenuated phenotype of tricho-dento-osseous syndrome [J]. *Am J Med Genet A*, 2008, 146(3): 343-349.
- [8] NIEMINEN P, LUKINMAA P L, ALAPULLI H, et al. *DLX3* homeodomain mutations cause tricho-dento-osseous syndrome with novel phenotypes [J]. *Cells Tissues Organs*, 2011, 194(1): 49-59.
- [9] HWANG J, MEHRANI T, MILLAR S E, et al. *Dlx3* is a crucial regulator of hair follicle differentiation and cycling [J]. *Development*, 2008, 135(18): 3149-3159.
- [10] PARK G T, MORASSO M I. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) transactivates *Dlx3* through *Smad1* and *Smad4*: alternative mode for *Dlx3* induction in mouse keratinocytes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(2): 515-522.
- [11] MARDARYEV A N, AHMED M I, VLAHOV N V, et al. Micro-RNA-31 controls hair cycle-associated changes in gene expression programs of the skin and hair follicle [J]. *FASEB J*, 2010, 24(10): 3869-3881.
- [12] DUVERGER O, CHEN S X, LEE D, et al. Sumoylation of *DLX3* by *SUMO1* promotes its transcriptional activity [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(2): 445-452.
- [13] DROUILHET L, LECERF F, BODIN L, et al. Fine mapping of the *FecL* locus influencing prolificacy in Lacaune sheep [J]. *Anim Genet*, 2009, 40(6): 804-812.
- [14] WEIR B S, COCKERHAM C C. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure [J]. *Evolution*, 1984, 38(6): 1358-1370.
- [15] BARRETT J C, FRY B, MALLER J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(2): 263-265.
- [16] CARLSON C S, EBERLE M A, RIEDER M J, et al. Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium [J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 74(1): 106-120.
- [17] GABRIEL S B, SCHAFFNER S F, NGUYEN H, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome [J]. *Science*, 2002, 296(5576): 2225-2229.
- [18] RADOJA N, GUERRINI L, LO I N, et al. Homeobox gene *Dlx3* is regulated by p63 during ectoderm development: relevance in the pathogenesis of ectodermal dysplasias [J]. *Development*, 2007, 134(1): 13-18.
- [19] GALBRAITH H. Fundamental hair follicle biology and fine fibre production in animals [J]. *Animal*, 2010, 4(09): 1490-1509.
- [20] ROGERS G E. Biology of the wool follicle: an excursion into a unique tissue interaction system waiting to be re-discovered [J]. *Exp Dermatol*, 2006, 15(12): 931-949.
- [21] SCHLAKE T. Determination of hair structure and shape [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2007, 18(2): 267-273.
- [22] THIBAUT S, BARBARAT P, LEROY F, et al. Human hair keratin network and curvature [J]. *Int J Dermatol*, 2007, 46(Suppl 1): 7-10.
- [23] ANDKEN B B, LIM I, BENSON G, et al. 3'-UTR SIRF: a database for identifying clusters of whort interspersed repeats in 3' untranslated regions [J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8: 274.
- [24] MIGNONE F, GISSI C, LIUNI S, et al. Untranslated regions of mRNAs [J]. *Genome Biol*, 2002, 3(3): S4.
- [25] WINTER J, ROEPCKE S, KRAUSE S, et al. Comparative 3'UTR analysis allows identification of regulatory clusters that drive *Eph/ephrin* expression in cancer cell lines [J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2780.
- [26] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [27] LANDI D, GEMIGNANI F, BARALE R, et al. A catalog of polymorphisms falling in microRNA-binding regions of cancer genes [J]. *DNA Cell Biol*, 2008, 27(1): 35-43.
- [28] 刘守仁, 丁宜生, 唐玉芬, 等. 中国美利奴羊新疆军垦型的培育 [J]. *新疆农垦科技*, 1988, (3): 13-16.

(编辑 郭云雁)