

山东地方山羊 BM P15基因多态性与产羔数性状关联分析

董传河 杜立新 *

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 国家畜禽分子遗传育种中心 北京 100193;
山东省农业管理干部学院 济南 250100)

摘要:利用 PCR、克隆测序、序列拼接获得山羊 (*Capra hircus*) BM P15基因全长。利用 F-CSGE 技术分析两个外显子,发现山羊 BM P15编码序列的第 901处发生了 A-G单碱基突变,该突变使得第 301位氨基酸(成熟蛋白质第 32位氨基酸)由丝氨酸变为甘氨酸。利用 LDR 技术对济宁青山羊、鲁北白山羊和沂蒙黑山羊进行突变检测,并进行其与产羔数的关联分析。结果表明,该突变对济宁青山羊产羔数没有显著影响,但对鲁北白山羊及沂蒙黑山羊产羔数均有显著影响 ($P < 0.05$)。GG型和 AG型的鲁北白山羊产羔数分别比 AA型多 0.34只 ($P < 0.01$)和 0.31只 ($P < 0.01$)。AG型沂蒙黑山羊的产羔数比 AA型多 0.13只 ($P < 0.01$)。初步表明,BM P15是控制鲁北白山羊和沂蒙黑山羊多胎性状的一个主效基因或是与之存在紧密遗传连锁的分子标记。

关键词:山羊;产羔数;BM P15; F-CSGE; LDR

中图分类号: Q291, S813.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2010) 01-59-11

Polymorphism Analysis of BM P15 Gene Related to Reproduction Trait of Goat Breeds in Shandong Province

DONG Chuan-He DU Li-Xin *

(National Center for Molecular Genetics and Breeding of Animal, Institute of Animal Sciences, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193; Shandong Agricultural Administrators' College, Jinan 250100, China)

Abstract The full-length BM P15 (GenBank: EU743938) gene was cloned in the goat, and its two exons were analyzed using the F-CSGE. The results showed that one single nucleotide was mutated (A-G) at 901 bp, and the mutation made the 32nd amino acid turn from serine to glycine. Mutation was detected using LDR, and its correlation with litter size was analyzed in 3 goat breeds including Jining grey goat, Lubei white goat and Yimeng black goat. The results showed that the mutation did not affect litter size in Jining grey goat, but significantly increased the litter size in Lubei white goat and Yimeng black goat ($P < 0.05$). The GG or AG genotype had 0.34 ($P < 0.01$) or 0.31 ($P < 0.01$) more kids when compared to that of AA genotype in Lubei white goat; the AG genotype had 0.13 ($P < 0.01$) more kids when compared to that of AA genotype in Yimeng black goat. These preliminary results show that the BM P15 gene is either a major gene that influences the reproductivity in Lubei white goat and Yimeng black goat or a molecular marker in close linkage with reproductivity.

基金项目 山东省自然科学基金项目 (No. Y2006D24), 国家十一五科技支撑计划项目 (No. 2006BAD01A11);

*通讯作者, E-mail: lxdu@263.net;

第一作者介绍 董传河,男,教授,农学博士;研究方向:动物分子育种; E-mail: dch0007@163.com.

收稿日期: 2009-05-23, **修回日期:** 2009-10-08

Key words: Goat(*Capra hircus*); Reproduction trait; *BMP15*; F-CSGE; LDR

*BMP15*是一种在卵巢表达的卵母细胞衍生生长因子,在正常情况下主要与卵巢自身产生的 *GDF9*协调作用于卵泡,以自分泌或旁分泌方式影响优势卵泡的发育及卵母细胞的生长^[1-2]。另外,在某些物种的垂体和睾丸中也发现 *GDF9*和 *BMP15*少量 mRNA的表达^[3],表明这些生长因子在调节哺乳动物生殖方面可能起着多重的调节作用。在不同绵羊(*Ovis aries*)品种 *BMP15* 基因中共发现 5 个点突变(*FecX*⁻、*FecX*^H、*FecX*^G、*FecX*^B、*FecX*^L),均显著影响绵羊产羔数性状。它们的共同特点是表型表现为纯合子不育,而杂合子排卵数增加^[4]。

本研究以绵羊多胎性状主效基因 *BMP15* 为候选基因,利用生物信息学和分子生物学技术,研究其对山羊(*Capra hircus*)产羔数性状的影响。利用荧光构象敏感凝胶电泳(fluorescence-based conformation sensitive gel electrophoresis, F-CSGE)技术^[5]检测山羊 *BMP15* 基因外显子突变位点,用连接酶检测反应(ligase detection reaction, LDR)技术^[6]对突变位点进行群体检测,并与产羔数进行关联分析,为山羊高繁殖力的标记辅助选择和多胎山羊育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 济宁青山羊母羊 201只,耳组织样采自济宁青山羊原种场及荷泽市养殖户。鲁北白山羊母羊 51只采自滨州市畜牧局鲁北白山羊保种场及当地养殖户。沂蒙黑山羊母羊 74只采自山东省临沂市平邑县养殖户。所采集样本均具有 1~5胎产羔记录。在耳尖用酒精棉消毒,用耳号钳剪取耳组织约 1 cm × 2 cm,于 70%酒精中 -20 冻存。用酚氯仿抽提法提取基因组 DNA,溶于 TE 缓冲液,4 保存^[7]。DNA 快速纯化回收试剂盒购自上海生物工程技术有限公司,克隆载体 pMD19-T Vector 购自 TaKaRa 公司, *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、菌株 TOP10 购自北京天根生物基因技

术有限公司, X-gal、IPTG 购自北京华美生物工程公司。Qiagen hotstar *Taq* 酶体系(酶 5 U/μl, buffer, Q-solution, Mg²⁺) 购自快而精德国生物技术有限公司。

1.2 *BMP15* 基因全长克隆测序

1.2.1 引物的设计 根据 GenBank 公布的绵羊(AF236078、AF236079)和牛(*Bos taurus*, NW_936601) *BMP15* 基因序列,外显子部分主要参考绵羊的序列,内含子主要参考牛的序列,采用 Primer 5.0 和 Oligo 6 软件设计 9 对引物,引物均由上海生物工程公司合成。引物序列及 PCR 产物大小见表 1。

1.2.2 PCR 扩增 PCR 扩增体系为 25 μl,包括: 10 × buffer 2.5 μl, Mg²⁺ (10 mol/L) 2.0 μl, dNTP (2 mmol/L) 2.0 μl, 引物 (5 pmol/L) 各 0.3 μl, *Taq* DNA 聚合酶 (2 U/μl) 1.0 μl, 模板 (50 ng/μl) 1.0 μl, 其余用 ddH₂O 补齐。各对引物 PCR 扩增条件: 94 预变性 3 min; 94 变性 30 s; 退火 30 s, 72 延伸, 退火温度和延伸时间见表 1; 35 个循环; 72 延伸 10 min; 4 保存。PCR 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 克隆测序 扩增片段用上海生工凝胶回收试剂盒回收,回收后的 DNA 片段用 pMD19-T 载体连接, 16 过夜,构建重组质粒,并转染 Top10 菌株,涂布在含有氨苄青霉素的 LB 平板上以筛选克隆子。阳性克隆子接种到含氨苄青霉素的培养基上进行培养,以菌液为模板进行 PCR 扩增以鉴定重组克隆,能扩增出与目的片段大小相同的特异性条带的阳性克隆菌液送样测序,测序反应由北京诺赛基因组研究中心有限公司在 ABI 公司的 3730XL 测序仪上进行。

1.2.4 生物信息学分析 对测序结果进行 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 比对验证,构建 contig 重叠群,拼接完整片段,进行生物信息学分析。

1.3 山羊 *BMP15* 外显子 F-CSGE 分析

1.3.1 引物设计 设计一对引物横跨山羊

BM P15 第一外显子,设计两对引物横跨第二外显子。在上游引物的 5' 标记 HAX 荧光,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列及 PCR 产物大小见表 2。

表 1 *BM P15* 基因扩增引物序列Table 1 Primer sequence used in PCR amplification for *BM P15* gene

引物 Primer	序列 (5' - 3') Sequence	片段大小 (bp) Product size	位置 (bp) Location	退火 (°C) Annealing	延伸 (s) Extension
P1	F: TGCCTGCCAGCCTTTCA TT R: A GGGTGTCCACTTGCGTCA	392	92 ~ 110 ^a 465 ~ 483 ^a	62.3	30
P2	F: CTCACGGTATA TGCTGGAGCTG R: GCCTGGCA TATGGTAA GC	1 159	429 ~ 450 ^a 1 366 ~ 1 383 ^c	51.6	60
P3	F: CTCTGCTTACGCTGTCCTG R: CTGCCCTTTCCCTTTCAGACCTT	2 107	846 ~ 863 ^c 2 931 ~ 2 952 ^c	51.6	120
P4	F: TGGA TACAGGGA GGGAA GTG R: TCCAA GTTTCAGGGTCAAAA	1 486	2 084 ~ 2 103 ^c 3 550 ~ 3 569 ^c	62.0	60
P5	F: GGTTGGAGAGTGA GCGAAA TA R: CAGA TGCCA TGA TCTTCGTT	592	3 421 ~ 3 441 ^c 3 993 ~ 4 012 ^c	60.3	40
P6	F: GATTGCCGGGA GAA GTA TCA R: GAACCAAAAACACGCCAGGCA TC	744	3 854 ~ 3 873 ^c 4 576 ~ 4 597 ^c	65.0	40
P7	F: GCA GAGGTTGA GA TGGTTGGATG R: TCACTCA TACCCCTAGACGG	957	4 494 ~ 4 516 ^c 26 ~ 45 ^b	67.2	50
P8	F: TCCAGGTTCAA TCGCACAG R: CTTCCAAAGACCAA GTGTC	1 224	13 ~ 34 ^b 1 215 ~ 1 236 ^b	67.0	90
P9	F: TCCCTCCACCCCTTTTCA R: CACCTTTGCCGTACCTT	318	941 ~ 958 ^b 1 242 ~ 1 258 ^b	56.0	20

a 对应于 GenBank AF236078 的位置; b 对应于 GenBank AF236079 的位置; c 对应于 GenBank NW_936601 的位置。

a Location corresponding to GenBank AF236078; b Location corresponding to GenBank AF236079; c Location corresponding to GenBank NW_936601.

表 2 山羊 *BM P15* 外显子 F-CSGE 引物序列Table 2 Primers sequence of F-CSGE for *BM P15* exon of goat

引物 Primer	序列 (5' - 3') Sequence	片段大小 (bp) Product size
CD1-F CD1-R	HAX-TTGTCTGAACACCAA GCTTTT CCCCACCA GAACAA TATA GTATGA	384
CD2-1-F CD2-1-R	HAX-CA GGCTCCTGGCACA TACA G AACTCTTTTCA GGCCTTTA GGG	432
CD2-2-F CD2-2-R	HAX-CTCA GA GTGTTCA GAA GACCAAA CTGGGCAA TCA TACCC TCA T	449

1.3.2 PCR 扩增 TE 稀释引物至终浓度为 50 pmol/μl 的原液,等比混合各引物原液为 Primer mixture 溶液。PCR 反应采用 20 μl Qiagen 体系: 10 × buffer 2.0 μl, 100 mmol/L

Mg²⁺ 0.6 μl, 20 mmol/L each dNTP 2.0 μl, Qiagen hotstar Taq 酶 (5 U/μl) 0.2 μl, 5 × Q-Solution 0.2 μl, Primer mixture (5 pmol/L) 0.4 μl, DNA 模版 (50 ng/L) 1.0 μl, ddH₂O 补足至 20 μl

PCR 扩增程序为: 95 °C 15 min (Qiagen HotStar Taq 酶获得活性); 94 °C 变性 30 s, 60 °C 复性 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。

1.3.3 构建异源双链 随机选出 20 个样本, 以其中一个样本的 PCR 产物作为对照, 其余样本 PCR 产物分别与对照 PCR 产物混合后, 利用 6 步梯度逐次降温法于 9600 (ABI) PCR 扩增

仪构建异源双链: 98 5 min; 98 ~ 90 5 min; 90 ~ 80 5 min; 80 ~ 75 10 min; 75 ~ 60 10 min; 60 ~ 40 20 min; 40 ~ 25 20 min。反应完成后半小时内进行荧光 构像敏感凝胶电泳 (F-CSGE)检测。

1.3.4 荧光 构像敏感凝胶电泳 (F-CSGE)

取 0.5 μl PCR 产物、0.5 μl ROX、0.5 μl 葡聚糖蓝 (50 mg/ml)、0.5 μl 新鲜的去离子甲酰胺混合样,毛细管吸取 1.2 ~ 1.5 μl 上样。377 自动测序仪电泳环境设置: 2 kV, 4 h, 30 , 1 × TBE,电泳 4 h 后停止。利用 Genemapper 软件进行电泳结果分析。

1.3.5 DNA 测序 F-CSGE 检测为阳性的样本重新 PCR, PCR 产物利用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 产物经纯化后于上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.4 山羊 BM P15 基因突变位点 LDR 检测及与产羔数的关联分析

1.4.1 用于 LDR 反应的小片段 PCR 引物设计 根据 F-CSGE 和克隆测序结果,确定 A901G 突变位点进行基于 LDR 反应的 SNP 群体检测。重新设计引物扩增小片段,包含 A901G 位点, PCR 产物大小为 449 bp。引物序列为 Forward: 5 -CTCA GAGTGTTCAGAA GACC-

AAA-3 ; Reverse: 5 -CTGGGCAA TCA TACCC-TCAT-3。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.4.2 用于 LDR 反应的小片段 PCR 扩增 PCR 反应采用 20 μl Qiagen 系:包括 2.0 μl PCR-buffer (10 ×), 0.6 μl Mg²⁺ (100 mmol/L), 2.0 μl dNTP (每种均为 20 mmol/L), 0.2 μl Taq 酶 (5U/μl), 4.0 μl Q-solution (4 ×), 0.4 μl primer (5 pmol/L), 1.0 μl 基因组 DNA (50 ng/L), 最后加入 9.8 μl 去离子水。

在 Perkin-Elmer Gene Amp PCR Systems 9600 上设置如下程序: 95 变性 15 min, 94 30 s, 59 1 min, 72 1 min, 35 个循环, 最后 72 延伸 7 min。反应结束后,取 2 μl 反应产物在 3.0% 琼脂糖凝胶, 0.5 × TBE 中电泳, 检测反应是否成功。剩余样品保存于 -20 。

1.4.3 LDR 探针设计 对待检测的 A901G 位点,在突变位点上游设计两条特异性探针,一条探针的 3 末端碱基与 A 对应,另一条探针的 3 末端碱基与 G 对应,两条特异性探针的长度相差 2 个碱基,便于后期检测。在该位点的下游设计一条末端带有 FAM 修饰的通用探针 (蓝色荧光),通用探针的 5 端磷酸化,以便与特异性探针连接,三条特异性探针序列见表 3。

表 3 用于 LDR 反应的探针序列 Table 3 The probe sequences for LDR

探针 Probe	序列 (5' - 3') Sequences	LDR 长度 (bp) LDR length
A901G_MODIFY	P-GACTTGAAAA GGGTGGAGGGAACACTTTTTTTTTTTTTTTT-FAMA	
901G_A	TTTTTTTTTTTTTTTGA TCCCA GCCCA GCTGCTGGAA GCT	82
A901G_G	TTTTTTTTTTTTTTTTTGA TCCCA GCCCA GCTGCTGGAA GCC	84

1.4.4 探针的稀释 TE 溶液稀释探针至终浓度为 50 mol/L 的原液, -20 保存。探针工作液浓度为 5 mol/L。

1.4.5 LDR 反应和检测 在 200 μl 的 PCR 反应管中,分别加入 1 μl buffer (10 ×), 1 μl Probe Mix (各 Probe 等比混合), 0.05 μl 连接酶 (40 U/μl), 6.95 μl 去离子水,最后加入 1 μl PCR 反应产物。将 PCR 反应管放入 PCR 仪进行连

接反应,程序为 95 变性 2 min, 94 30 s, 60 2 min, 35 个循环。

LDR 反应产物由 ABI PRISM-377 DNA 测序仪检测,根据 LDR 产物的长度判断各基因型。各取 1 μl LDR 连接产物与 1 μl ABI GS-500 ROX 荧光标记分子量标准及 1 μl 去离子甲酰胺上样液混合, 95 加热变性 2 min, 冰中骤冷,于 5% 聚丙烯酰胺和 5 mol/L 尿素中

3 000 V电泳 2.5 h,应用 GENESCAN™ 672软件进行数据收集、泳道线校正、迁移片段大小测量和校正内在分子量标准,应用 Genemapper软件进行数据分析和基因分型。

1.4.6 统计分析方法 配合模型 进行最小二乘方差分析,比较各品种产羔数在不同基因型之间的差异。模型 : $y_{jkm} = \mu + F_j + P_k + G_l + e_{jkm}$ 。为了研究基因突变对多胎品种山羊的影响,把品种作为固定效应,配合模型 进行最小二乘方差分析,比较产羔数在不同基因型之间的差异。模型 : $y_{jkm} = \mu + B_i + F_j + P_k + G_l + e_{jkm}$ 。其中, y_{jkm} 、 y_{ijkm} 为产羔数的记录值; μ 为群体均值; B_i 为第 i 个品种的固定效应; F_j 为第 j 个场固定效应; P_k 为第 k 个胎次的固定效应; G_l 为第 l 种基因型的固定效应; e_{jkm} 、 e_{ijkm} 为随机残差效应。用 SAS (V8.12) 的 GLM (General Linear Model) 过程完成。

2 结果

2.1 基因全长克隆测序结果 各片段 PCR扩

增结果均与目的片段大小一致,经克隆测序所得到的测序结果经 BLAST 比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>),均是目的片段,各片段长度分别为 395 bp、1 136 bp、2 090 bp、1 335 bp、596 bp、688 bp、980 bp、1 224 bp、318 bp,根据各相邻片段的重叠部分,把全部片段连接成一个完整的 BM P15 基因。

首先进行开放阅读框 (open reading frame, ORF) 分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>),序列全长 6 648 bp,由两个外显子组成,第一外显子 328 bp,第二外显子 851 bp,共编码 394 个氨基酸,中间被 5 309 bp 的内含子隔开,基因序列已提交 GenBank 并获基因登录号 (Accession: EU743938),编码序列与氨基酸对应关系如图 1。根据 GSDS 绘制基因图 (图 2)。

根据在 GenBank 上公布的各种动物的数据,BLAST 比对结果显示,山羊与牛 BM P15 基因同源性为 90.72%,与绵羊和牛的编码序列同源性均为 98%,氨基酸序列同源性分别为

```

1  atggtcctcctgagcatccttagaatccttcttcttggggactgggtgctttttatggaacatagggtccaaatgacacaggtagggcgag
M V L L S I L R I L L W G L V L F M E H R V Q M T Q V G Q
91  ccctctattgcccacctgctgaggccccctaccttgcccoctgattcaggagctgctagaagaagcccttggaagcagcagaggaagccg
P S I A H L P E A P T L P L I Q E L L E E A P G K Q Q R K P
181  cgggtcttagggcatccctcacgggtatgtgtggagctgtaccagcttcagctgacgcaagtggacaccctagggaaacccgaccatt
R V L G H P S R Y M L E L Y Q R S A D A S G H P R E N R T I
271  gggccaccatggtgaggtggtgagggcctgctgtagttagcaaggcctctcagaggctcctggcacatagaccctggactttcct
G A T M V R L V R P L A S V A R P L R G S W H I O T L D F P
361  ctgagaccaaacgggtagcataccaacttagtcagagccactgtggtttaccgccatcagcttcaacctattccccacctctcctgcl
L R P N R V A Y Q L V R A T V V Y R H Q L H T H S H L S C
451  catgtggagccctgggggcagaaaagcccaaccaatcactttccttcttcaggaaaggctccccaaagccttccctgtgccccaaact
H V E P W G Q K S P T N H F P S S G R G S P K P S L L P K T
541  tggacagagatgatatcatggaacatgttggcaaaagctctggaatcacaagggcgagggtctctacgactccgcttcgtatgtcag
W T E M D I M E H V G Q K L W N H K G R R V L R L R F V C Q
631  cagccaagaggtagtgagttctttagttctggtggcattcatcattgacactgtcttctgttactgtatttcaatgacact
Q P R G S E V L E F W W H G T S S L D T V F L L L Y F N D T
721  cagagtgttcagaagaccaaacctctccctaaaggcctgaaagagtttacagaaaagacccttctcttctctgaggaggctcgtcaa
Q S V Q K T K P L P K G L K E F T E K D P S L L L R R A R Q
811  gcaggcagttatgcatctgaagtctcggccccctcaggaggcagctgagggcctgaaagtaaccaggttccctccacccttttcaagtc
A G S I A S E V P G P S R E H D G P E S N Q C S L L H P F Q V
901  ggcttcaccagctgggtgatcactggtatctgctcccctctctatccccaaactactgttaaggagatgtcctcctgggtacta
G F Q Q L G W D H W I I A P H L Y T P N Y C K G V C P R V L
991  tactatggtctcaattctcccaatcatgccaatcaccgaacctgtcaatgagctggtgagatcagaatctccctcagccttctctgtc
Y Y G L N S P N H A I I Q N N E L V D Q N V P Q P S C V
1081 ccttataagtatgtccattagcatccttctgattgaggcaatgggagtatcttgtacaaggagatgagggtatgattgccagtc
P Y K Y V P I S I L L I E A N G S I L Y K E Y E G M I A Q S
1171 tgcacatgcagg 1182
C T C R

```

图 1 山羊 BM P15 编码序列与氨基酸对应关系

Fig 1 The CD s sequence and predicted amino acid sequence of goat BM P15

98%和 97%。山羊、牛、猪 (*Sus scrofa*) (NP_001005155.1) 的蛋白质均为 394 个氨基酸,而

绵羊为 393 个。比较哺乳动物的氨基酸序列均含有二个 N 糖基化位点和 6 个保守的半胱氨

酸残基,山羊、绵羊和牛的蛋白质氨基酸序列 266 ~ 269 均为 RRAR,为弗林蛋白酶切位点,人 (*Homo sapiens*) (NP_005439.1)、猪和大鼠 (*Rattus norvegicus*) (NP_067702.1)的弗林蛋

白质酶切序列与反刍动物虽然不同,但也符合 RXXR 的序列规则,成熟蛋白均为 125 个氨基酸残基 (图 3)。

2.2 山羊 BM P15外显子 F-CSGE分析结果

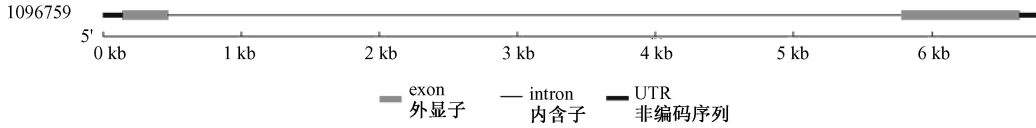


图 2 山羊 BM P15 基因结构

Fig 2 The genetic structure of caprine BM P15

CAPRA_HIRCUS 山羊	MVLLSILRILLWGLVLFMEHRVQMTQVGGPSIAHLPEAFTPLIQLLE	50	EAPGKQKRPV. LGHPSTRMLEYQRSADASGHPRENRITGATMVRLV	99
OVIS_ARIES 绵羊	MVLLSILRI. LLWGLVLFMEHRVQMTQVGGPSIAHLPEAFTPLIQLLE	49	EAPGKQKRPV. LGHPSTRMLEYQRSADASGHPRENRITGATMVRLV	98
BOS_TAUROS 牛	MVLLSILRI. LLLWGLVLFMEHRVQMTQVGGPSIAHLPEAFTPLIQLLE	49	EAPGKQKRPV. LGHPSTRMLEYQRSADASGHPRENRITGATMVRLV	99
SUS_SCROFA 猪	MVLLSILRI. LLLWGLVLFMEHRVQMTQVGGPSIAHLPEAFTPLIQLLE	49	EAPGKQKRPV. LGHPSTRMLEYQRSADASGHPRENRITGATMVRLV	99
HOMO_SAPIENS 人	MVLLSILRI. LFLCELVLFMEHRVQMTQVGGPSIAHLPEAFTPLIQLLE	49	EESFGKQKRPV. LGHPSTRMLEYQRSADASGHPRENRITGATMVRLV	99
RATTUS_NORVEGICUS 大鼠	MALLTILRI. LLWGMVLFMEHRVQMTQVGGPSIAHLPEAFTPLIQLLE	49	EAPGKEM. IQWV. QGYPLRMVLMLEYQRSADASGHPRENRITGATMVRLV	97
▽				
CAPRA_HIRCUS 山羊	PLASVARPLRGSWHIQTLLFPLRPNRVAYQLVRATVYVRHQLHLTHSHLS	149	CHVEFWQKSPVTHFFSSGRGSSKPSLLPKWTMMDIMEHVGQKLVNHHG	199
OVIS_ARIES 绵羊	PLASVARPLRGSWHIQTLLFPLRPNRVAYQLVRATVYVRHQLHLTHSHLS	148	CHVEFWQKSPVTHFFSSGRGSSKPSLLPKWTMMDIMEHVGQKLVNHHG	198
BOS_TAUROS 牛	PLASVARPLRGSWHIQTLLFPLRPNRVAYQLVRATVYVRHQLHLTHSHLS	149	CHVEFWQKSPVTHFFSSGRGSSKPSLLPKWTMMDIMEHVGQKLVNHHG	199
SUS_SCROFA 猪	PLVNGARPLRGSWHIQTLLFPLRPNRVAYQLVRATVYVRHQLHLTHSHLS	149	CHVEFWQKSPVTHFFSSGRGSSKPSLLPKWTMMDIMEHVGQKLVNHHG	199
HOMO_SAPIENS 人	PLTSVARPHRGTHIQLLGFPLRPNRVAYQLVRATVYVRHQLHLTHSHLS	149	CHVEFWQKSPVTHFFSSGRGSSKPSLLPKWTMMDIMEHVGQKLVNHHG	199
RATTUS_NORVEGICUS 大鼠	PSASAMLLRGSWHIQTLLFPLASNEVAYQLVRATVYVRHQLHLTHSHLS	147	CHVEFWQKSPVTHFFSSGRGSSKPSLLPKWTMMDIMEHVGQKLVNHHG	196
▽				
CAPRA_HIRCUS 山羊	RRVLRLEFVCCQPRGSEVLEFVWHGTSSTLDVTFVILLYFDNDTQ. SVQKTKP	248	LPKGLKEFTEKDFSLILRRARAGTASEVPGFSREHDGFPESNQLSLHFP	298
OVIS_ARIES 绵羊	RRVLRLEFVCCQPRGSEVLEFVWHGTSSTLDVTFVILLYFDNDTQ. SVQKTKP	247	LPKGLKEFTEKDFSLILRRARAGTASEVPGFSREHDGFPESNQLSLHFP	297
BOS_TAUROS 牛	RRVLRLEFVCCQPRGSEVLEFVWHGTSSTLDVTFVILLYFDNDTQ. SVQKTKP	248	LPKGLKEFTEKDFSLILRRARAGTASEVPGFSREHDGFPESNQLSLHFP	298
SUS_SCROFA 猪	RRVLRLEFVCCQPRGSEVLEFVWHGTSSTLDVTFVILLYFDNDTQ. SVQKTKP	248	LPKGLKEFTEKDFSLILRRARAGTASEVPGFSREHDGFPESNQLSLHFP	298
HOMO_SAPIENS 人	HRTLRLEFVCCQPRGSEVLEFVWHGTSSTLDVTFVILLYFDNDTQ. SVQKTKP	248	LPRGMEEFMERES. LLRRTKADGTSAEVTSASSKGSFPENQLSLHFP	296
RATTUS_NORVEGICUS 大鼠	RRVLRLEFVCCQPRGSEVLEFVWHGTSSTLDVTFVILLYFDNDTQ. ESAQAAL	245	LARGQEELTDRESFPLILRRARAGTASEVPGFSREHDGFPESNQLSLHFP	295
(125)				
CAPRA_HIRCUS 山羊	QVSPQQLGDWHIIFAPHLTYPNCKGCFPRVLYHGLNSFNHAIIQNLVNE	348	LVDQVFPQSCVPPYKVPVPSILLLEANGSILLYKEYEGMIAQSICR	394
OVIS_ARIES 绵羊	QVSPQQLGDWHIIFAPHLTYPNCKGCFPRVLYHGLNSFNHAIIQNLVNE	347	LVDQVFPQSCVPPYKVPVPSILLLEANGSILLYKEYEGMIAQSICR	393
BOS_TAUROS 牛	QVSPQQLGDWHIIFAPHLTYPNCKGCFPRVLYHGLNSFNHAIIQNLVNE	348	LVDQVFPQSCVPPYKVPVPSILLLEANGSILLYKEYEGMIAQSICR	394
SUS_SCROFA 猪	QVSPQQLGDWHIIFAPHLTYPNCKGCFPRVLYHGLNSFNHAIIQNLVNE	348	LVDQVFPQSCVPPYKVPVPSILLLEANGSILLYKEYEGMIAQSICR	394
HOMO_SAPIENS 人	QVSPQQLGDWHIIFAPHLTYPNCKGCFPRVLYHGLNSFNHAIIQNLVNE	346	LVDQVFPQSCVPPYKVPVPSILLLEANGSILLYKEYEGMIAQSICR	392
RATTUS_NORVEGICUS 大鼠	KVSPQQLGDWHIIFAPHLTYPNCKGCFPRVLYHGLNSFNHAIIQNLVNE	345	LVRNSVPLQSCVPPYKVPVPSILLLEANGSILLYKEYEGMIAQSICR	391

图 3 哺乳动物 BM P15 氨基酸序列比较

Fig 3 Comparison of the predicted amino acid sequences for different species BM P15

黑色三角和方框所示为保守的 2 个 N 糖基化位点,空三角表示内含子连接处,箭头和方框所示为弗林蛋白酶切位点,方框表示保守的 6 个半胱氨酸残基,括号内数字表示成熟蛋白氨基酸序列。

Filled triangle and Boxed sequences indicate the four potential N-glycosylation sites, Open triangle position of the single intron; arrow and Boxed sequences, the RRAR putative processing site and predicted start of the mature processed peptide; Boxed sequences indicate the six cysteine residues that are conserved across species, and Numbers in brackets above the lines indicate amino acid positions of mature peptide

2.2.1 PCR 结果 根据 BM P15 两个外显子设计的 3 对引物进行 PCR 扩增,扩增产物用 3% 的琼脂糖凝胶电泳检测 (图 4),片段大小与目的片段一致,特异性高,可以用于 F-CSGE 分析。

2.2.2 F-CSGE 结果 对构建的异源双链进行 F-CSGE,电泳截图见图 5。结果 CD1 和 CD2-1 均只有一个电泳峰图,同源双链和异源双链电

泳峰图相同,说明这两个片段上没有检测到 SNP。CD2-2 异源双链有两个电泳峰图,一个与同源双链相同,只有一个峰;另外一个有两个峰,说明异源双链之间有错配,该片段存在 SNP。

2.2.3 测序结果 选择 CD2-2 具单峰和双峰的不同个体,重新进行 PCR 扩增,纯化后测序。结果显示,BM P15 编码序列的第 901 处发生了

A G单碱基突变,该突变使得第 301 位氨基酸(成熟蛋白质第 32 位氨基酸)由丝氨酸变为

甘氨酸(图 6),将该突变命名为 *BM P15A901G* 突变。

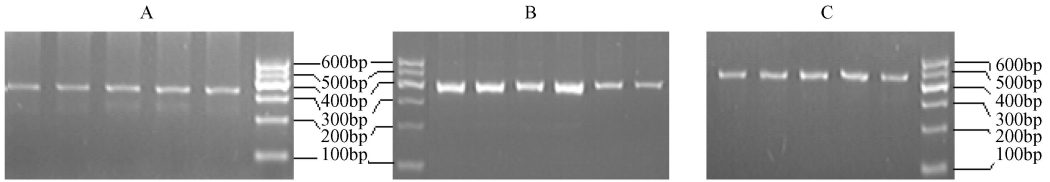


图 4 *BM P15*基因用于 F-CSGE分析的 PCR扩增产物的电泳图

Fig 4 The PCR product electrophoresis of *BM P15* gene for F-CSGE analysis

A: CD1 PCR 扩增产物, 384 bp;
 B: CD2-1 PCR 扩增产物, 432 bp; C: CD2-2 PCR 扩增产物, 449 bp。
 A: PCR product of CD1 (384 bp); B: PCR product of CD2-1 (432 bp);
 C: PCR product of CD2-2 (449 bp).

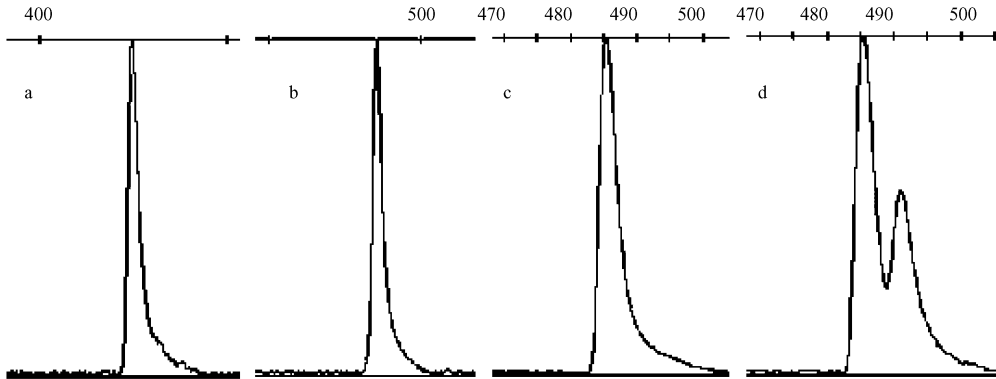


图 5 F-CSGE图谱

Fig 5 F-CSGE electropherograms of homoduplex and heteroduplex

a: CD1 PCR 产物同源双链与异源双链均为一单峰;
 b: CD2-1 PCR 产物同源双链与异源双链均为一单峰;
 c: CD2-2 PCR 产物同源双链为一单峰; d: CD2-2 PCR 产物异源双链为一双峰。
 a: Homoduplex and Heteroduplex formed in the mixture of PCR products amplified from CD1;
 b: Homoduplex and Heteroduplex formed in the mixture of PCR products amplified from CD2-1;
 c: Homoduplex formed in the mixture of PCR products amplified from CD2-2; d: Heteroduplex formed in the mixture of PCR products amplified from CD2-1.

2.3 山羊 *BM P15*基因突变位点 LDR 检测及与产羔数的关联分析

2.3.1 用于 LDR 反应的小片段 PCR 扩增结果

PCR 结果见图 7, 片段大小 449 bp, 与目的片段一致, 无非特异性扩增, 可以用于 LDR 反应。

2.3.2 LDR 检测结果

LDR 反应产物由 ABI PRISM-377 DNA 测序仪检测, 根据 LDR 产物的长度判断各基因型(图 8)。*BM P15* 基因 A901G 多态性位点呈 A/G 二态性, 当等位基因

为 A 时, 形成连接酶反应红色荧光产物片段长度是 82 bp, 当等位基因为 G 时, 片段长度是 84 bp, 共检测到 A/A、G/G 及 A/G 3 种不同的基因型, 对应的 LDR 产物片段长度分别是 82 bp、84 bp 及 82 bp + 84 bp 混合。

2.3.3 *BM P15*基因遗传效应统计分析结果

2.3.3.1 基因频率和基因型频率分析结果
各品种基因频率和基因型频率见表 4, 3 个品种均检测到 3 种基因型, 经卡方检验, 鲁北白山羊

和沂蒙黑山羊处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 而济宁青山羊不符合 Hardy-Weinberg 定律。在 济宁青山羊和鲁北白山羊中, G 为优势等位基因, 而在沂蒙黑山羊中 A 为优势等位基因。

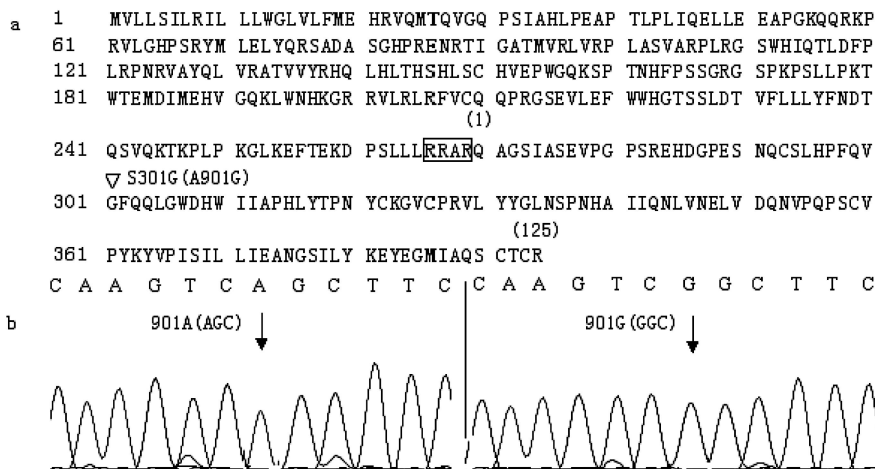


图 6 山羊 BMP15 蛋白质序列和突变位点

Fig 6 Goat BMP15 sequence and mutations

a: 预测蛋白质序列, 氨基酸在成熟肽中的位置用括号表示, 弗林蛋白酶切位点 RRHR 用方框表示, 三角符号表示氨基酸突变位点; b: 山羊 BMP15 基因一个引起氨基酸改变的突变位点的核苷酸置换。

a: Predicted amino acid sequence of goat BMP15 protein. Amino acid positions in the mature peptide are in parentheses. Boxed sequences indicate the RRHR Furin protease cleavage site and predicted start of the mature processed peptide. The triangles indicate positions of mutations that confer amino acid substitutions.
 b: Nucleotide substitutions of BMP15 mutations that change an amino acid compared with wild-type goat sequence.

表 4 BMP15 基因在 3 个山羊品种中的等位基因频率和基因型频率

Table 4 Allele and genotype frequencies of BMP15 gene in three goat breeds

		品种 Breed			
		济宁青山羊 Jining Grey goat	鲁北白山羊 Lubei White goat	沂蒙黑山羊 Yimeng Black goat	
BMP15	基因频率	A	0.24	0.43	0.74
A901G	Gene frequency	G	0.76	0.57	0.26
	基因型频率	AA	0.15 (31)	0.20 (10)	0.58 (43)
	Genotype frequency	GG	0.68 (136)	0.33 (17)	0.11 (8)
		AG	0.17 (34)	0.47 (24)	0.31 (23)

括号内数字为检测个体数。Number detected in parenthesis

2.3.3.2 不同品种基因型频率分布比较结果
 比较不同品种基因型频率分布情况, 卡方检验结果见表 5, 3 个品种相互之间均存在极显著的差异 ($P < 0.01$)。

2.3.3.3 BMP15 基因突变位点的遗传多态信息
 3 个品种 BMP15 基因突变位点的遗传多态信息见表 6, 3 个品种均属于中度多态, 遗

表 5 不同山羊品种 BMP15 基因型分布的卡方检验
 Table 5 χ^2 analysis of genotypes distribution of BMP15 among different goat breeds

品种 Breed	鲁北白山羊 Lubei White goat	沂蒙黑山羊 Yimeng Black goat
济宁青山羊 Jining Grey goat	24.39	75.24
鲁北白山羊 Lubei White goat		20.26

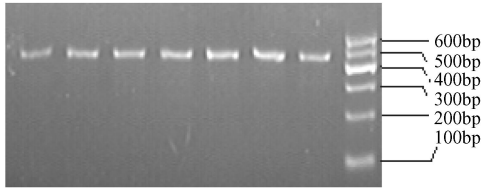


图 7 *BM P15*基因用于 LDR分析的 PCR扩增产物的电泳图

Fig 7 The PCR product electrophoresis of *BM P15* gene for LDR analysis

表 6 3个山羊品种 *BM P15*基因的纯合度、杂合度、有效等位基因数和多态信息含量

Table 6 The genetic polymorphism parameters of *BM P15* gene in three breeds of goat

品种 Breed	多态信息 含量 Polymorphism information content	杂合度 Heterozy- gosity	有效等位 基因数 Effective number of alleles
济宁青山羊 Jining Grey goat	0.30	0.36	1.57
鲁北白山羊 Lubei White goat	0.38	0.49	1.96
沂蒙黑山羊 Yimeng Black goat	0.31	0.39	1.63

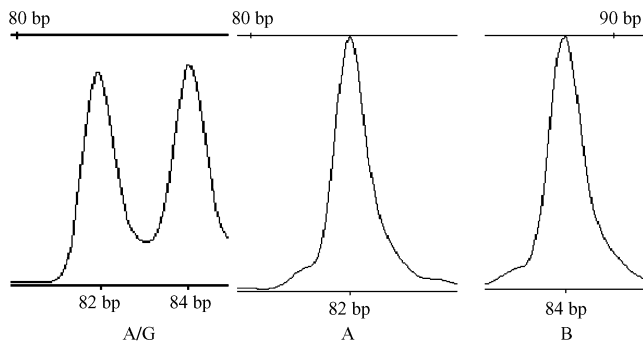


图 8 *BM P15*基因 A901G位点 LDR图谱

Fig 8 The profile for LDR in A901G mutation of *BM P15*

传变异程度依次为白山羊 >黑山羊 >青山羊。

2.3.3.4 *BM P15*基因多态性与产羔数之间的关系分析 根据模型 进行分析, *BM P15*突变位点的基因型对济宁青山羊产羔数没有显著影响,但对鲁北白山羊产羔数有显著影响 ($P < 0.05$), GG型、AG型分别比 AA型多 0.34只 ($P < 0.01$)和 0.31只 ($P < 0.01$),而 GG型和 AG型之间没有显著差异。对沂蒙黑山羊的产羔数有显著影响 ($P < 0.05$), AG型比 AA型多 0.13只 ($P < 0.01$),其他各基因型之间没有显著差异 (表 7)。

把品种作为固定效应,根据模型 对两个多胎品种济宁青山羊和鲁北白山羊的产羔数进行分析,方差分析结果见表 8,各基因型的最小二乘均值见表 9。由表可知,品种对产羔数有显著影响 ($P < 0.05$),胎次、场别对产羔数均有极显著的影响 ($P < 0.01$),而 *BM P15*基因型对产羔数没有显著影响。

表 7 *BM P15*突变基因型对 3个山羊品种产羔数的最小二乘均值及标准误

Table 7 Least squares means and standard error of the *BM P15* mutation site genotypes for litter size in three breeds of goat

品种 Breed	基因型 Gene type	最小二 乘均值 Least squares mean	标准误 Standard error	概率 $P_r > t $
济宁青山羊 Jining Grey goat	AA	2.76	0.11	<0.000 1
	AG	2.73	0.11	<0.000 1
	GG	2.71	0.06	<0.000 1
鲁北白山羊 Lubei White goat	AA	2.23 ^A	0.12	<0.000 1
	AG	2.54 ^B	0.08	<0.000 1
	GG	2.56 ^B	0.09	<0.000 1
沂蒙黑山羊 Yimeng Black goat	AA	1.06 ^A	0.03	<0.000 1
	AG	1.18 ^B	0.04	<0.000 1
	GG	1.17 ^{AB}	0.08	<0.000 1

同品种比较,不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$).
Values in same breed with capital letter mean $P < 0.01$.

表 8 模型 GLM 过程对多胎山羊品种 BM P15 基因进行方差分析的结果

原因 Source	自由度 df	平方和 Squares	均方 Mean square	F 值 F Value	概率 Pr > F
模型 Model	13	153.97	11.84	19.42	<0.000 1
误差 Error	598	364.66	0.61		
总和 Corrected total	611	518.63			
品种 Breed	1	3.965	3.97	6.50	0.011 0
胎次 Parity	6	88.10	14.68	24.08	<0.000 1
场别(品种) Fam	4	61.56	15.39	25.24	<0.000 1
基因型 Geno type	2	0.35	0.17	0.28	0.752 8

表 9 BM P15 基因突变基因型对多胎山羊品种产羔数的最小二乘均值及标准误

Table 9 Least squares means and standard error of the BM P15 mutation site genotypes for litter size in fecundity breeds of goat

基因型 Gene type	最小二乘均值 Least-squares means	标准误 Standard error	概率 Pr > t
AA	2.54	0.09	<0.000 1
AG	2.62	0.07	<0.000 1
GG	2.60	0.06	<0.000 1

3 讨论

3.1 关于 BM P15 基因 目前发表的哺乳动物的 *BM P15* 基因都是由两个外显子组成,中间被一个很大的内含子所分隔,牛为 5 440 bp,山羊为 5 309 bp,猪 (NC_010461.1) 为 4 978 bp,人 (NC_000023.10) 为 4 645 bp,小鼠 (*Mus musculus*) (NC_000086.6) 为 3 555 bp,大鼠 (NC_005120.2) 为 3 623 bp。内含子的大小差别较大,但亲缘关系较近的物种其内含子大小更加接近,比如牛与山羊较接近,小鼠与大鼠较接近。尽管内含子有较大的差别,但蛋白质的大小基本一致,特别是成熟蛋白大小完全一样,都含有 6 个半胱氨酸残基,说明 *BM P15* 是高度保守的。

3.2 关于 BM P15 基因突变 本研究发现在山羊的 *BM P15* 编码序列的第 901 处发生了 A G 单碱基突变,该突变使得第 301 位氨基酸(成熟蛋白质第 32 位氨基酸)由丝氨酸变为甘氨酸,属于两个不带电的极性亲水性基团之间

的替代。

在绵羊发现的 *FecX^L*、*FecX^H*、*FecX^G*、*FecX^B*、*FecX^L* 突变^[4],本研究未发现。Hua 等^[8]在波尔山羊、海门山羊、波尔山羊和黄淮山羊的杂交一代、黄淮山羊、努比山羊、马头山羊未发现 *FecX^L*、*FecX^H*、*FecX^G*、*FecX^B* 突变。焦彩兰等^[9]在济宁青山羊、内蒙古绒山羊、安哥拉山羊、波尔山未发现 *FecX^H*、*FecX^L* 突变。何清远等^[10]在济宁青山羊、波尔山羊、文登奶山羊、辽宁绒山羊、内蒙古绒山羊、北京本地山羊未发现 *FecX^G* 突变,检测到了 *FecX^B* 突变,但全部是杂合子,没有多态性。肖文杰等^[11]在济宁青山羊、波尔山羊、文登奶山羊、内蒙古绒山羊、安哥拉山羊和辽宁绒山羊未发现 *FecX^L* 突变。综合以上研究,说明绵羊和山羊 *BM P15* 基因遗传背景不同,因此对产羔数的影响模式也可能不同。

3.3 关于 BM P15 突变对产羔数的影响 目前在 *BM P15* 基因发现了 5 处突变对绵羊产羔数有显著的影响^[12-14],分别发生在 Hanna 绵羊 (*FecX^H*)、Inverdale 绵羊 (*FecX^L*)、Belclare 绵羊 (*FecX^G*)、Cambridge 绵羊 (*FecX^B*)、Lacaune 绵羊 (*FecX^L*),突变位点各不相同,分别为 Q23Ter, V31D、Q239Ter, S367I, C53Y,突变杂合体均具有较高的排卵数,而突变纯合个体则由于正常的卵巢卵泡发育受阻而不育。柳淑芳等^[15]在小尾寒羊群体中未检测到 *BM P15* 的 *FecX^L*、*FecX^H* 突变,王启贵等^[16]在湖羊、中国美利奴单胎品系及中国美利奴肉用和毛用多胎品系中未检测到 *BM P15* 的 *FecX^L* 突变。储明星等^[17]在小尾寒羊检测到 *BM P15* 基因 *FecX^B* 突

变,突变杂合基因型 (*AB*) 小尾寒羊平均产羔数高于野生纯合基因型 (*AA*)。

济宁青山羊、鲁北白山羊、沂蒙黑山羊都是山东省的地方品种,前二者都是长年发情,一胎多羔,后者季节发情,一般单羔^[18]。本研究发现,*BM P15A901G*突变对济宁青山羊产羔数没有显著影响,但对鲁北白山羊和沂蒙黑山羊产羔数有显著影响 ($P < 0.05$),在鲁北白山羊和沂蒙黑山羊两个品种中,都是 *AA* 型产羔数最低,有可能 *G* 等位基因影响产羔数,关于其影响产羔数的机制有待于进一步的研究加以证明。

把品种作为固定效应,对济宁青山羊和鲁北白山羊进行合并分析显示,品种对产羔数有显著影响,这是由于两个品种之间存在固有差异。胎次对产羔数有显著的影响,符合一般多胎家畜的繁殖规律。场别对产羔数有显著影响,首先是由于两个品种分别来自不同的饲养场,另外,同一品种也可能出现一定的差异。*BM P15A901G*突变对产羔数的影响并没有达到显著水平,可能由于此突变只对鲁北白山羊产羔数有显著影响,而对济宁青山羊产羔数没有显著影响,也可能由于存在其他影响其多胎性状的主效基因所致。

济宁青山羊和鲁北白山羊虽然发生了相同的突变,但对产羔数的影响不同,说明两者的多胎遗传机制不同,就像 *Hanna* 绵羊^[12]、*Cambridge* 绵羊^[13] 与小尾寒羊^[15] 不同一样。但并不能断定 *BM P15* 基因不是济宁青山羊多胎主效基因,因为一个基因经转录翻译成蛋白质才能发挥其生物学功能,因此需要在 mRNA 和蛋白质水平进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Parrott J A, Skinner M K. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. *Mol Reprod Dev*, 2000, 55 (1): 55 - 64.
- [2] Otsuka F, Shimasaki S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *PNAS*, 2002, 99 (12): 8060 - 8065.
- [3] Shimasaki S, Moore R K, Otsuka F, et al. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev*, 2004, 25 (1): 72 - 101.
- [4] 董传河,杜立新. *BMP15*对卵巢功能的调节及对生殖的影响. *动物学杂志*, 2008, 43 (4): 140 - 145.
- [5] Ganguly T, Dhulipala R, Godmilow L, et al. High throughput fluorescence-based conformation-sensitive gel electrophoresis (F-CSGE) identifies six unique *BRCA2* mutations and an overall low incidence of *BRCA2* mutations in high-risk *BRCA1*-negative breast cancer families. *Hum Genet*, 1998, 102 (5): 549 - 556.
- [6] Marilyn K, Cao W. Ligase detection reaction for identification of low abundance mutations. *Clinical Biochemistry*, 1999, 32 (4): 287 - 290.
- [7] 卢圣栋. 现代分子生物学试验技术 (2版). 北京:中国协和医科大学出版社, 2001, 61 - 70.
- [8] Hua GH, Yang L G, Ai J T, et al. None of polymorphism of ovine fecundity major genes *FecB* and *FecX* was tested in goat. *Anim Reprod Sci*, 2008, 108: 279 - 286.
- [9] 焦彩兰,储明星,王金玉,等. 山羊高繁殖力候选基因 *BM P15*的 RFLP分析. *扬州大学学报:农业与生命科学版*, 2006, (3): 35 - 38.
- [10] 何远清,储明星,王金玉,等. 6个山羊品种高繁殖力候选基因 *BMP15*多态性研究. *安徽农业大学学报*, 2006, 33 (1): 61 - 64.
- [11] 肖杰文,储明星,李学伟,等. 山羊 *BMP15*基因 *FecXL*突变的检测. *中国畜牧兽医*, 2008, 35 (3): 35 - 38.
- [12] Galloway S M, McNatty K P, Cambridge L M, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet*, 2002, 25: 279 - 283.
- [13] Hanrahan J P, Gregan S M, Mulsant P, et al. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors *GDF9* and *BMP15* are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 2004, 70: 900 - 909.
- [14] Fabre S, Pierre A, Mulsant P, et al. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006, (4): 20.
- [15] 柳淑芳,姜运良,杜立新. *BMPR-B*和 *BMP15*基因作为小尾寒羊多胎性能候选基因的研究. *遗传学报*, 2003, 30 (8): 755 - 760.
- [16] 王启贵,钟发刚,李辉,等. 绵羊产羔性状主效基因检测研究. *遗传*, 2005, 27 (1): 80 - 84.
- [17] 储明星,桑林华,王金玉,等. 小尾寒羊高繁殖力候选基因 *BMP15*和 *GDF9*的研究. *遗传学报*, 2005, 32 (1): 38 - 45.
- [18] 司俊臣. 山东省畜禽品种志. 深圳:海天出版社, 1999.