

研究论文

Research Article

骨桥蛋白基因在黔北麻羊性腺轴中的表达及其对颗粒细胞中繁殖相关基因的影响

赵佳福^{1,2*} 周明帅^{1,2} 杨秀远^{1,2} 徐畅^{1,2}

1 贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 贵阳, 550025; 2 贵州大学动物科学学院, 贵阳, 550025

* 通信作者, jfzhao@gzu.edu.cn

摘要 本研究的目的是探究骨桥蛋白 (osteopontin, *OPN*) 基因与黔北麻羊 (*Capra hircus*) 繁殖性状间的关系。本研究通过 ProtParam 和 NetPhos 等生物在线软件对黔北麻羊 *OPN* 的理化性质和结构功能进行分析, 克隆 *OPN* 基因, 构建 *OPN* 基因的真核表达载体。运用实时定量 PCR 法检测 *OPN* 基因在单羔、多羔黔北麻羊的垂体、下丘脑、子宫、卵巢和输卵管中的表达情况。随后, 将 *OPN* 基因的真核表达载体转染至卵巢颗粒细胞中, 检测过表达 *OPN* 基因对繁殖相关基因骨形态发生蛋白 15 (bone morphogenetic protein 15, *BMP15*)、骨形态发生蛋白受体 1B (bone morphogenetic protein receptor 1B, *BMPR-1B*) 和促卵泡激素 β 亚基 (follicle stimulating hormone β -subunit, *FSH β*) 表达量的影响。生物信息学分析结果表明, *OPN* 是一种具有磷酸化位点的不稳定亲水性蛋白质, 其蛋白质分子的质量为 31 115.11 Da, 理论等电点为 4.39, 化学式为 $C_{1309}H_{2046}N_{368}O_{501}S_5$, 共编码 279 个氨基酸, 其中携带的正电荷残基总数 (Arg+Lys) 为 28 个, 负电荷残基总数 (Asp+Glu) 为 66 个。与其他动物相比, 黔北麻羊 *OPN* 基因与反刍动物绵羊和牛的同源性较高, 遗传距离较近。实时定量 PCR 结果表明, *OPN* 基因在多羔组黔北麻羊的垂体、下丘脑、卵巢中的表达量极显著高于单羔组的 ($P<0.01$), 且过表达 *OPN* 基因后, 极显著上调了繁殖相关基因 *BMP15* 的表达 ($P<0.01$)。以上结果说明, *OPN* 基因的表达量与黔北麻羊繁殖率呈正相关关系, 可作为影响黔北麻羊繁殖力的多羔候选基因进行深入研究。

关键词 黔北麻羊; 骨桥蛋白基因; 生物信息学分析; 卵巢颗粒细胞; 繁殖相关基因

Expression of Osteopontin Gene in the Gonad Axis of Qianbei Ma Goat and Its Effect on Reproductive Related Genes in Granulosa Cells

ZHAO Jiafu^{1,2*} ZHOU Mingshuai^{1,2} YANG Xiuyuan^{1,2} XU Chang^{1,2}

1 Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountainous Region, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang, 550025; 2 College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang, 550025

* Corresponding author, jfzhao@gzu.edu.cn

DOI: 10.13417/j.gab.042.000285

Abstract The aim of this study was to investigate the relationship between the osteopontin (*OPN*) gene and reproductive traits of Qianbei Ma Goat (*Capra hircus*). In this study, the physical and chemical properties and structural functions of *OPN* were analyzed by biological online software such as ProtParam and NetPhos, and the *OPN* gene was cloned and the eukaryotic expression vector of *OPN* gene was constructed. Real time quantitative PCR was used to analyze and detect the expression of *OPN* gene in the pituitary gland, hypothalamus, uterus, ovary and fallopian tube of Qianbei Ma goat in monotocous and polytocous lambs. Subsequently, the eukaryotic expression vector of *OPN* gene was transfected into ovarian granulosa cells to detect the effects of overexpression of *OPN* gene on the expression levels of reproductive-related genes bone morphogenetic protein 15 (*BMP15*), bone morphogenetic protein receptor 1B (*BMPR-1B*) and follicle stimulating hormone β -subunit (*FSH β*). Bioinformatics analysis results showed that *OPN* was an unstable hydrophilic protein with phosphorylation site. The mass of protein molecules was 31 115.11 Da, theoretical isoelectric point was 4.39, chem-

基金项目: 本研究由贵州省科技支撑计划 (黔科合支撑 [2022] 一般 089)、高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室 (贵州大学) 开放课题基金资助项目 (黔教合 KY 字 [2020] 244)、贵州大学引进人才科研项目 [贵大人基合字 (2020) 074 号] 及黔南州科技计划项目 [黔南科合 (2021) 27 号] 共同资助。

引用格式: 赵佳福, 周明帅, 杨秀远, 等, 2023. 骨桥蛋白基因在黔北麻羊性腺轴中的表达及其对颗粒细胞中繁殖相关基因的影响. 基因组学与应用生物学, 42(3): 285-294. [ZHAO J F, ZHOU M S, YANG X Y, et al., 2023. Expression of osteopontin gene in the gonad axis of Qianbei Ma goat and its effect on reproductive related genes in granulosa cells. Genomics and Applied Biology, 42(3): 285-294.]

ical formula was $C_{1309}H_{2046}N_{368}O_{501}S_5$, encoding 279 amino acids. The total number of positively charged residues (Arg+Lys) and negatively charged residues (Asp+Glu) was 28 and 66 respectively. Therefore, OPN was a negatively charged amino acid sequence. Compared with other animals, the *OPN* gene of Qianbei Ma goat had higher homology and closer genetic distance with sheep and cattle. The real time quantitative PCR results showed that the expression levels of *OPN* gene in the pituitary gland, hypothalamus and ovary of the multi-lambing group were significantly higher than those of the single lambing group ($P<0.01$), and the overexpression of *OPN* gene could significantly up-regulate the expression of reproductive related gene *BMP15* ($P<0.01$). These results indicate that the expression of *OPN* gene is positively correlated with the reproductive rate of goats, and it can be used as a candidate gene affecting the fecundity of Qianbei Ma goat for further study.

Keywords Qianbei Ma goat; Osteopontin gene; Biological analysis; Ovarian granulosa cells; Reproduction related gene

近年来,随着社会经济的快速增长,人们对肉制品的多元化有了更高的要求,吃出健康、吃得放心已成为大众消费的主导理念。消费观念的转变使得我国对羊肉的需求逐年扩大,加之山羊(*Capra hircus*)优良品种少、繁殖率低等原因,使得羊肉在国内外市场供不应求。山羊繁殖性能和成活率是高效肉羊生产的基础,研究山羊繁殖性状的分子机理,开发繁殖新技术,对最大限度地发挥肉羊繁殖潜力,建立肉羊快速高效的良繁体系,促进农户增收、农户经济效益的快速增长具有重要作用。黔北麻羊(Qianbei Ma goat)作为贵州地方三大山羊品种之一,具有抗病力强、耐粗饲、适应性广、繁殖力高等特点(敖叶等, 2020),每胎平均产羔2只,产羔率达196%,是研究地方山羊繁殖性状的重要品种资源。

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)也被称为分泌型磷蛋白1(secreted phosphoprotein1, SPP1),在1985年,由Franzén和Heinegård(1985)从骨组织中分离出并将其正式命名。OPN由腺上皮细胞合成,受孕酮调节,其编码蛋白是富含甘氨酸-天冬氨酸-精氨酸序列的分泌型糖基化磷蛋白。研究发现该蛋白广泛存在于胎盘、子宫和乳汁中等(喇永富, 2016)。OPN广泛参与了神经和血管发育,免疫系统调节,介导细胞聚集、黏附和增殖等生理过程(罗仍卓么等, 2008),并在睾丸、胎盘、骨组织和卵巢等中表达,广泛参与了动物受精、胎盘形成(Kim and Shin, 2007; 毛建文, 2013)和胚胎着床(杨启鑫, 2020)等生殖过程。毛建文(2013)以大足黑山羊和河西绒山羊为研究对象,发现*OPN*基因第7个外显子的变异与山羊繁殖性能相关,可作为山羊繁殖性状选择的候选标记;杨春艳等(2016)在对水牛的研究中发现,*OPN*基因启动子上游1240 bp处,可能通过参与*OPN*的转录和表达量的调节,来影响水牛的超数排卵效果。以上结果说明*OPN*基因在动物繁殖调控方面发挥了重要作用。研究表明,繁殖性状与卵巢颗粒细胞(granulosa cells)密不可分。在

动物体中,卵泡与卵母细胞的发育成熟是影响哺乳动物繁殖效率的因素之一,颗粒细胞为卵母细胞提供发育生长所必需的细胞因子和激素(张丽萌, 2020)。对山羊相关的研究发现,骨形态发生蛋白15(bone morphogenetic protein 15, BMP15)、骨形态发生蛋白受体1B(bone morphogenetic protein receptor 1B, BMPR-1B)和促卵泡激素 β 亚基(follicle stimulating hormone β -subunit, FSH β)在维持卵巢正常功能、促进卵泡发育及成熟等方面发挥着重要作用(Mulsant et al., 2001; Galloway et al., 2002; 寸静宇等, 2019);BMP15参与卵母细胞发育和排卵的所有阶段(Lima et al., 2018),并且通过促进颗粒细胞增殖促进卵泡细胞的发育;BMPR-1B是绵羊高繁殖力的主效基因,控制排卵率和产仔数(Yao et al., 2019);FSH β 是卵巢发育和卵泡生长过程中的关键调控因子(Stamatiades et al., 2019),能决定促黄体素(luteinizing hormone, LH)和促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)产生的速度,从而调节卵泡发育。因此,BMP15、BMPR-1B和FSH β 常被作为动物繁殖性状的指标基因。OPN、BMP15、BMPR-1B和FSH β 不同基因型对母猪产仔数均有显著影响,表现出不同基因在不同物种之间的优势基因型不同(范一萍等, 2019; Pang et al., 2019; 贾梦雨等, 2022)。然而,以上结论均是对*OPN*基因突变位点与动物繁殖性状间的关联性分析,其表达量高低能否通过影响繁殖相关基因BMP15、BMPR-1B和FSH β 的表达影响山羊繁殖性能,目前还不清楚。因此,本实验通过实时定量PCR方法分析*OPN*基因在单羔、多羔黔北麻羊垂体、下丘脑、子宫、卵巢和输卵管中的表达情况,利用生物信息学方法分析*OPN*理化性质及蛋白结构功能,构建其过表达载体,转染至卵巢颗粒细胞中,再通过实时定量PCR方法检测过表达*OPN*基因后对繁殖相关基因BMP15、BMPR-1B和FSH β 表达量的影响,初步探究*OPN*基因与黔北麻羊繁殖性状间的关系。

1 结果

1.1 黔北麻羊 OPN 理化性质分析

利用在线工具 ProtParam 预测黔北麻羊 OPN 的理化性质。结果表明, OPN 分子的质量为 31 115.11 Da, 理论等电点为 4.39, 共编码 279 个氨基酸, 其中氨基酸占比最多的是丝氨酸 (Ser) 15.4%、天冬氨酸 (Asp) 11.8%、谷氨酸 (Glu) 11.8%、赖氨酸 (Lys) 7.5% 和亮氨酸 (Leu) 6.8%; 负电荷残基总数 (Asp+Glu) 为 66 个, 正电荷残基总数 (Arg+Lys) 为 28 个, 负电荷残基总数大于正电荷残基总数, 说明该基因氨基酸序列带负电荷; 化学

式为 $C_{1309}H_{2046}N_{368}O_{501}S_5$; 在哺乳动物网织红细胞体外、酵母 (*Saccharomyces*) 体内和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 体内, 半衰期 $T_{1/2}$ 分别为 30 h、20 h 以上和 10 h 以上, 脂肪指数为 53.15, 在肉汁中总平均含水率-1.219, 不稳定指数为 64.86, OPN 是不稳定蛋白质 (不稳定指数>40)。

1.2 黔北麻羊 OPN 磷酸化位点预测

在线软件 NetPhos 3.1 对黔北麻羊 OPN 磷酸化位点预测的结果显示 (图 1), OPN 氨基酸中具有 63 个潜在的磷酸化位点, 其中大于阈值的磷酸化位点有 54 个, 包括 42 个丝氨酸和 12 个苏氨酸磷酸化位点。

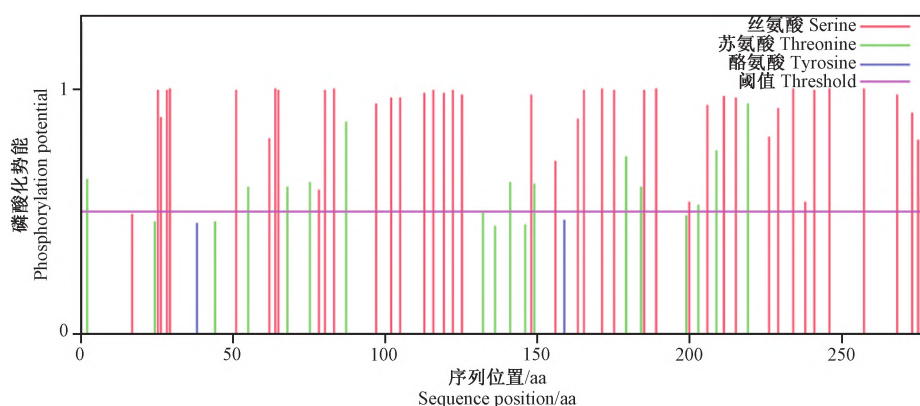


图 1 黔北麻羊 OPN 磷酸化位点的预测

Figure 1 Phosphorylation site prediction of OPN protein in Qianbei Ma goat

1.3 不同物种 OPN 氨基酸序列同源性分析及系统发育进化树的构建

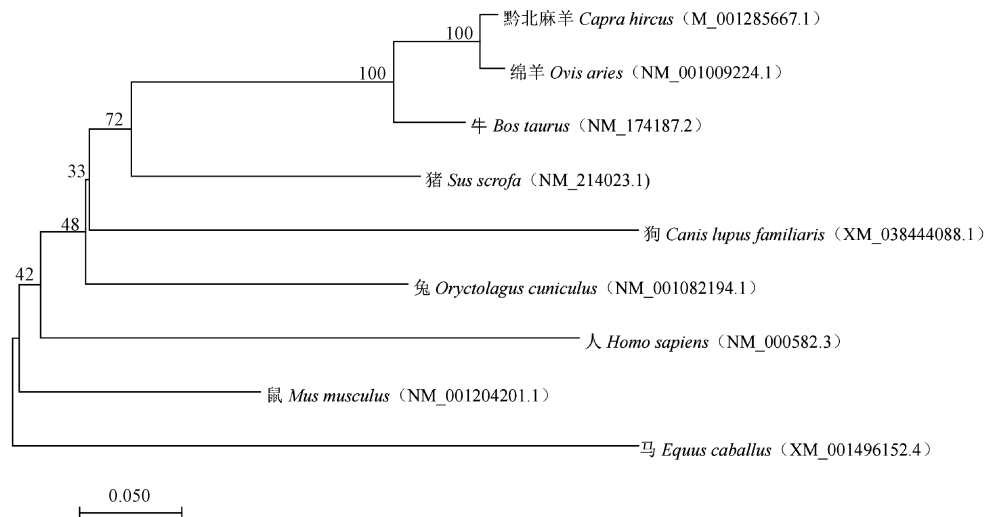
分别使用 Megalign 和 MEGA7 软件中的近邻相接法 (neighbor-joining method, NJ) 对不同物种的 OPN 氨基酸序列进行同源性比对及系统发育进化树构建, 结果如图 2 所示。由图 2 可知, 黔北麻羊 OPN 基因与绵羊 (*Ovis aries*) 及牛 (*Bos taurus*) 的相似性最高,

分别为 98.4% 和 92.2%, 而与狗 (*Canis lupus familiaris*)、人 (*Homo sapiens*)、兔 (*Oryctolagus cuniculus*)、马 (*Equus caballus*)、鼠 (*Mus musculus*) 和猪 (*Sus scrofa*) 的相似性都低于 80%, 说明在遗传进化过程中, OPN 基因序列保守性较低。系统发育进化树结果表明, OPN 基因与反刍动物牛和绵羊的遗传距离最近, 而与其他动物的遗传距离较远 (图 3)。

		相似性 Similarity/%										
差异性 Difference/%		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
	1		98.4	92.2	72.7	63.5	60.3	66.9	63.0	61.8	1	黔北麻羊 <i>Capra hircus</i> (M_001285667.1)
	2	1.6		92.7	71.4	63.4	60.7	66.7	62.9	61.6	2	绵羊 <i>Ovis aries</i> (NM_001009224.1)
	3	8.3	7.7		72.8	64.4	61.5	68.1	63.7	61.6	3	牛 <i>Bos taurus</i> (NM_174187.2)
	4	34.0	36.0	33.9		61.6	63.3	70.1	66.8	61.4	4	猪 <i>Sus scrofa</i> (NM_214023.1)
	5	49.6	49.9	448.0	53.4		58.5	65.3	59.8	56.1	5	狗 <i>Canis lupus familiaris</i> (XM_038444088.1)
	6	55.9	55.2	53.6	50.1	59.6		70.7	61.2	62.6	6	兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i> (NM_001082194.1)
	7	43.6	43.9	41.5	38.1	46.5	37.1		74.3	67.5	7	人 <i>Homo sapiens</i> (NM_000582.3)
	8	50.6	50.9	49.4	43.6	57.0	54.1	31.5		60.1	8	马 <i>Equus caballus</i> (XM_001496152.4)
	9	53.0	53.4	53.4	53.8	65.0	51.4	42.5	56.5		9	鼠 <i>Mus musculus</i> (NM_001204201.1)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		

图 2 不同物种 OPN 蛋白氨基酸序列相似性比较

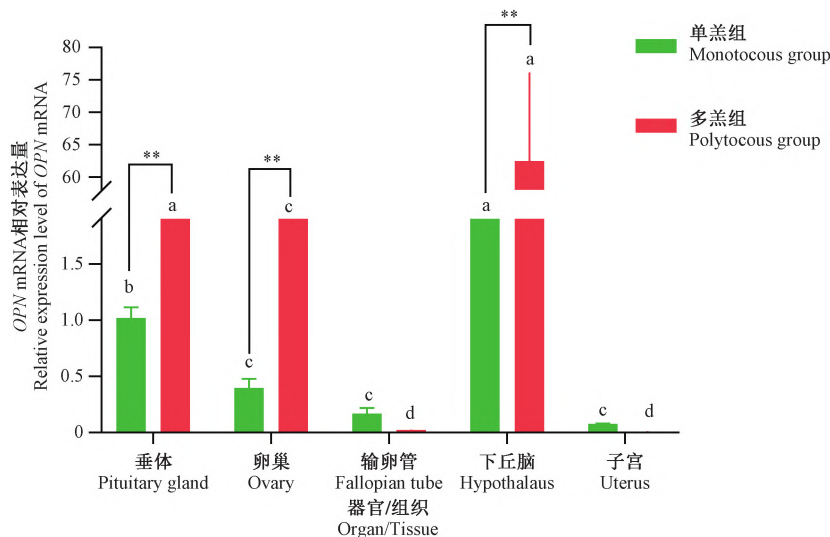
Figure 2 Comparison of amino acid sequence similarity of OPN protein in different species

图3 不同物种 *OPN* 基因的系统发育进化树Figure 3 Phylogenetic evolution tree of *OPN* gene in different species

1.4 *OPN* 基因在单羔、多羔黔北麻羊性腺轴中的表达

实时定量 PCR 结果显示, *OPN* 基因在单羔组和多羔组黔北麻羊垂体、卵巢、下丘脑中均有表达, 其相对表达量从高到低为下丘脑、垂体、卵巢, 且它们之间差异极显著 ($P < 0.01$), 在输卵管和子宫

内的表达量较低; 组间比较发现, *OPN* 基因在多羔组垂体、卵巢、下丘脑中的表达更高, 均极显著高于单羔组的 ($P < 0.01$) (图 4)。卵巢中卵泡的发育及成熟是影响山羊产羔数的重要因素, 因此推测 *OPN* 基因在卵巢中可能发挥积极作用, 与山羊繁殖性状呈正相关关系。



* 表示差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$); 不同小写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$), 相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

* represents significant difference ($P < 0.05$); ** represents extremely significant difference ($P < 0.01$); Different lowercase letters indicate extremely significant difference ($P < 0.01$), while the same lowercase letters indicate no significant difference ($P > 0.05$).

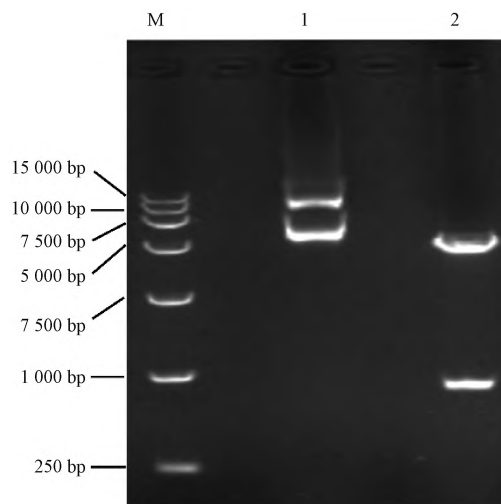
图4 *OPN* 基因在黔北麻羊单羔、多羔性腺轴中的表达Figure 4 Expression of *OPN* gene in monotocous and polytocous gonadal axis of Qianbei Ma goat

1.5 黔北麻羊 *OPN* 基因真核表达载体的构建

采用 *Xho* I、*Bam*H I 限制性内切酶对真核表达载体 pEGFP-C1-*OPN* 进行双酶切，产物经琼脂糖凝胶电泳检测，结果显示(图 5)，在泳道 1 中 5 500 bp 左右出现一条亮带，为 pEGFP-C1-*OPN* 真核表达载体的目的条带；在泳道 2 中 4 700 bp 和 1 000 bp 左右分别出现一条亮带，4 700 bp 左右条带代表 pEGFP-C1 空载体的目的条带，1 000 bp 左右条带代表目的基因 *OPN* 的条带。以上结果说明 *OPN* 基因已成功载入 pEGFP-C1 表达载体，表明 pEGFP-C1-*OPN* 真核表达载体构建成功。

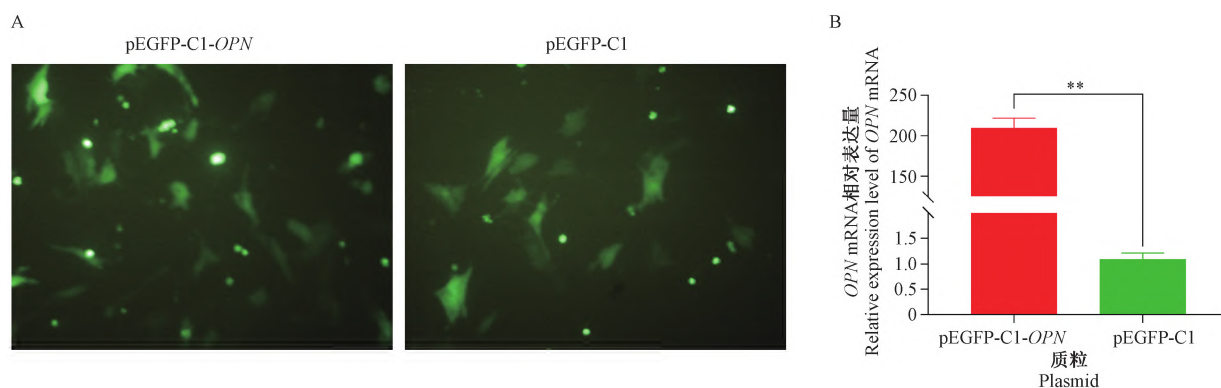
1.6 黔北麻羊 *OPN* 基因过表达效率检测

将 pEGFP-C1-*OPN* 和 pEGFP-C1 空载体质粒转染卵巢颗粒细胞 24 h 后，使用荧光蛋白法检测其转染效率，结果发现，两组细胞中绿色荧光蛋白数量基本一致(图 6A)。在转染 48 h 后，使用实时定量 PCR 检测两组细胞中 *OPN* 基因的表达量，结果(图 6B)表明，与 pEGFP-C1 组相比，pEGFP-C1-*OPN* 组能极显著上调 *OPN* 基因的表达 ($P < 0.01$)，表明 *OPN* 基因过表达载体构建成功且正确表达，可进行下一步实验。



M 表示 DNA Maker 15 000; 1. pEGFP-C1-*OPN* 重组载体鉴定结果; 2. pEGFP-C1-*OPN* 双酶切后的鉴定结果。
M represents DNA Maker 15 000; 1. Identification results of pEGFP-C1-*OPN* recombinant vector; 2. Identification results of pEGFP-C1-*OPN* double enzyme digestion.

图 5 pEGFP-C1-*OPN* 载体的双酶切结果
Figure 5 Results of double digestion of pEGFP-C1-*OPN* vector



**表示差异极显著 ($P < 0.01$) ; $n = 3$ 。

** represents extremely significant difference ($P < 0.01$) ; $n = 3$.

图 6 黔北麻羊 *OPN* 基因转染效率和 *OPN* 基因的相对表达量检测

(A) 黔北麻羊 *OPN* 基因转染效率检测; (B) *OPN* 基因的相对表达量检测

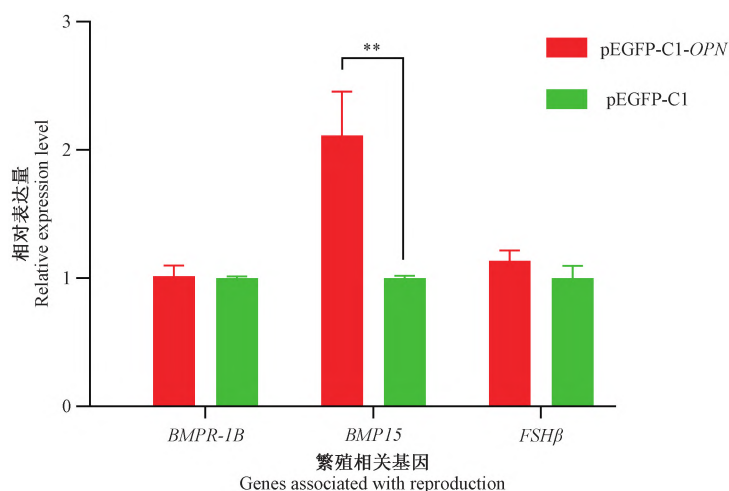
Figure 6 Detection of transfection efficiency and relative expression level of *OPN* gene in Qianbei Ma goat

(A) Detection of transfection efficiency of *OPN* gene in Qianbei Ma goat; (B) Detection of relative expression level of *OPN* gene in Qianbei Ma goat

1.7 过表达 *OPN* 基因对黔北麻羊繁殖相关基因的影响

转染颗粒细胞 48 h 后，实时定量 PCR 检测 pEGFP-C1-*OPN* 和 pEGFP-C1 组中繁殖相关基因

BMPR-1B、*BMP15* 和 *FSHβ* 的表达量，结果表明，过表达 *OPN* 基因后，极显著上调 *BMP15* 基因的表达 ($P < 0.01$)，上调了 *BMPR-1B* 和 *FSHβ* 基因的表达，但差异不显著 ($P > 0.05$) (图 7)。



**表示差异极显著 ($P < 0.01$); $n = 3$ 。

** represents extremely significant difference ($P < 0.01$); $n = 3$.

图7 过表达 *OPN* 基因对繁殖相关基因表达量的影响

Figure 7 Effect of overexpression of *OPN* gene on the expression of reproduction-related genes

2 讨论与结论

OPN 是一种高度磷酸化的多功能分子,在调节免疫、组织修复、血管生成、组织重建等生物学过程中都扮演着重要角色,近年来人们还发现它也参与哺乳动物的繁殖调控。研究发现,*OPN* 可能参与了精子的发生及成熟过程,并与精子的活力和受精能力密切相关(刘倩等, 2013),在猪精液中 *OPN* 基因表达量与窝产活仔数呈正相关(陈云等, 2020)。此外, *OPN* 能够与整联蛋白结合以促进细胞与细胞之间的附着和交流(Garlow et al., 2002),这是由于 *OPN* 基因存在介导细胞附着信号转导高度保守的 RGD 基序(Sodek et al., 2000), *OPN* 这种信息传递、细胞黏附、迁移、增殖的作用对子宫-胚胎组织营养的传导具有重要作用。

在羊上的研究发现, *OPN* 能在绵羊子宫的特定部位发挥独特作用,通过对组织和血液等基质植入营养来支持胎盘、胎儿生长和发育(Dunlap et al., 2008),且其表达量的增加与妊娠子宫内血管生成的增加有关。*OPN* 基因在绵羊胎盘中高度表达,是胚胎着床的重要介质,而且在黄体期, *OPN* 的表达水平是周期依赖性的,其表达峰值在黄体期(Tremaine and Fouladi-Nashta, 2021)。此外,对胚胎着床过程的研究发现, *OPN*、 $\beta 3$ 整合素亚基(ITGB3)、一氧化氮合酶 3(NOS3)共同参与了这一调控过程。Frank 等(2021)研究发现, ITGB3 参与了包括绵羊在内的多个物种的黏附级联,其

在绵羊胚胎中的丢失,降低了 *OPN* 和 *NOS3* 基因的表达,从而改变了子宫内膜中营养物质的运输及胚胎生长所需的尿囊血管的发育;在大足黑山羊上的研究发现, *OPN* 与 *VEGF*、*RAPGEF3* 等基因共同参与了对滋养细胞增殖、侵袭、迁移和融合的调节(Luo et al., 2021)。本研究通过分析 *OPN* 在不同繁殖率黔北麻羊卵巢、输卵管、子宫、垂体、下丘脑中的表达情况,发现 *OPN* 在多羔组黔北麻羊垂体、下丘脑和卵巢中的表达量显著高于单羔组的($P < 0.01$),表达量依次为下丘脑>垂体>卵巢。这一研究结果与 Dunlap 等(2008)在绵羊上的研究具有一定差异,分析原因可能是由于课题组在子宫的采样部位和采样时羊只所处的发情周期有关。

由于“下丘脑-垂体-性腺”轴精密调控着卵泡的发育及闭锁退化,而卵泡的发育程度直接影响了卵巢中卵泡数量、卵巢分泌功能和个体生殖能力(郭艺璇, 2018)。在卵泡的发生与发育过程中,卵巢颗粒细胞扮演着重要角色,其生理状态与卵巢功能直接相关,通过调节细胞增殖、分化、周期和凋亡来控制卵泡生长、发育和闭锁(王健宏和周惠芳, 2013)。研究发现 *BMP15* 基因在哺乳动物卵泡发育中发挥重要作用(刘霜等, 2016; 覃玉凤等, 2017),且 *BMP15* 突变与颗粒细胞早熟及卵泡体积变化密切相关(Galloway et al., 2000);此外,由颗粒细胞分泌的 FSH、LH 等激素为卵泡的生长发育创

造了良好的环境,精准地调控着卵泡的生长发育 (Matsuda et al., 2012; Baufeld and Vanselow, 2013),随着卵泡的不断发育, *BMPR-1B* 表达水平逐渐升高 (Li et al., 2021),而且研究还发现 *BMPR-1B* 表达水平的降低会导致卵泡颗粒细胞的凋亡 (Yao et al., 2019)。因此, *BMP15*、*BMPR-1B* 和 *FSHβ* 常被作为产羔标志基因。为验证 *OPN* 基因与繁殖指标基因间的关系,本研究通过过表达 *OPN* 基因,观察上调 *OPN* 基因后对颗粒细胞中繁殖相关基因表达的影响,进而判断 *OPN* 基因不同表达水平与黔北麻羊繁殖性状的关系。结果发现,过表达 *OPN* 基因后,上调了繁殖相关基因 *BMP15*、*BMPR-1B* 和 *FSHβ* 的表达,其中 *BMP15* 达到极显著差异水平 ($P < 0.01$),这与刘霜等 (2016) 在金堂黑山羊、藏山羊中的结果一致,推测 *OPN* 基因可能是通过调控 *BMP15*、*BMPR-1B* 和 *FSHβ* 等繁殖相关基因来调控山羊排卵数,从而影响山羊的产羔数。

3 材料与方法

3.1 实验动物

实验动物来自贵州省富兴畜牧业开发有限公司黔北麻羊养殖场,选择体质健康、繁殖记录完整清晰、繁殖性能正常、3 周岁且平均体重约为 45 kg 的单羔和多羔黔北麻羊各 3 只 (连续 2 胎产双羔以上为多羔组,连续 2 胎产单羔为单羔组),根据《羊屠宰操作规程》(DB22/T2740—2017) 在发情第 1 天按照动物伦理 (EAE GZU-2021-T083) 要求进行屠宰,迅速采集下丘脑、卵巢、子宫、输卵管和垂体组织,

使用锡箔纸包好置于液氮中,带回实验室于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用,用于提取组织 RNA。黔北麻羊卵巢颗粒细胞由课题组前期参考高可心 (2018) 的方法,分离鉴定后冻存。

3.2 主要试剂及仪器

Trizol、反转录试剂盒购自美国赛默飞世尔科技有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒、 $50\times$ TAE (Acetate-EDTA buffer, Tris 乙酸盐 EDTA 缓冲液) 缓冲液、琼脂糖、荧光定量 PCR mix、DL15 000 DNA Marker、质粒提取试剂盒购自美国爱思进生物技术有限公司;pEGFP-C1 空载体、*Xho* I、*Bam*H I 限制性内切酶、T4 DNA ligase、细胞培养瓶购自贵州西宝生物有限公司;DMEM/F12 (1:1) 培养基、胎牛血清、青链霉素、PBS 缓冲液均购自美国 Invitrogen 生命技术有限公司;PCR 扩增仪 (型号为 C100)、实时荧光定量 PCR 仪 (型号为 CFX96)、化学发光凝胶成像系统购自美国伯乐生命医学产品有限公司。

3.3 引物的设计及合成

根据 NCBI 基因库中 *OPN* 基因 mRNA 序列 (XM_013964504.2) CDS 区,利用 Primer 5.0 引物设计软件设计 *OPN* 基因 CDS 区克隆引物及实时定量 PCR 引物,其中用于基因克隆的上、下游引物分别添加 *Xho* I 和 *Bam*H I 酶切位点,实时定量 PCR 实验以 β -actin 为内参基因,繁殖相关基因引物序列参考文献 (洪磊等, 2020),引物由北京擎科生物科技有限公司合成,引物信息见表 1。

表 1 基因克隆及 RT-qPCR 引物信息
Table 1 Gene cloning and RT-qPCR primer information

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	片段大小/bp Fragment size/bp	酶切位点 Restriction enzyme cutting site
<i>OPN</i>	F: CCCTCGAGATGACCATGAGAATTGCA	840	<i>Xho</i> I
	R: CGGGATCCTCAGTTGACCTCAGAAGA		<i>Bam</i> H I
<i>OPN</i>	qF: TTTTCACTCCACCTTTCCCTA	133	
	qR: AAGTCCTCCTCTGTGGCATC		
β -actin	qF: GGTGCCCATCTACGAGG	154	
	qR: CTTGATGTCACGGACGATT		

3.4 生物信息学分析

利用 Protparam (<https://web.expasy.org/prot-param/>) 预测 *OPN* 的理化性质。利用 NetPhos3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 数据库分析 *OPN* 磷酸化位点。利用 NCBI ([https://](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

www.ncbi.nlm.nih.gov/) 数据库搜索其他物种 *OPN* 氨基酸序列信息,通过 DNASTar (V7.1.0) 中的 Megalign 程序和 MEGA (V7.0.26) 软件分析不同物种 *OPN* 氨基酸序列同源性并构建系统发育进化树。

3.5 实时定量 PCR 检测 *OPN* 基因在黔北麻羊性腺轴组织中的表达

采用 Trizol 法提取黔北麻羊不同性腺轴组织总 RNA, 超微量分光光度计检测其浓度和纯度 (OD_{260}/OD_{280} 为 1.8~2.0) 后, 按照反转录试剂盒说明书反转录获得 cDNA。将 cDNA 稀释至相同浓度作为模板, 采用实时定量 PCR 检测 *OPN* 基因在单羔、多羔黔北麻羊下丘脑、卵巢、子宫、输卵管和垂体组织中的表达。反应体系为 10 μ L: RT-qPCR mix 5 μ L、cDNA 1 μ L、10 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ L、3 μ L ddH₂O; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 70 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 添加 RT-qPCR 自带的熔解曲线, 反应 35 个循环。以 β -actin 为内参基因, 每组 3 个重复。

3.6 *OPN* 亚克隆载体及重组表达载体的构建

根据琼脂糖凝胶电泳结果, 按照目的基因条带大小, 将含有目的基因的条带按照 Axygen 胶回收试剂盒使用说明进行回收。将回收的 *OPN* 片段在 T4 DNA ligase 的作用下与 pEGFP-C1 载体连接, 并转化 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性菌落扩繁, 双酶切和测序鉴定正确后保存备用。

3.7 pEGFP-C1-*OPN* 转染至卵巢颗粒细胞

将分离鉴定后的山羊卵巢颗粒细胞从液氮中取出, 迅速于 37 $^{\circ}$ C 水浴中溶解, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃掉上清, 加入适量培养基, 反复吹打混匀, 按照每孔 30 万个细胞的含量, 将细胞均匀加入 6 孔板中, 随后再加入 2 mL 完全培养基培养过夜; 第 2 d, 更换 3% 血清的无抗生素培养基, 根据 LipofectamineTM 2000 Reagent 转染试剂盒使用方法, 转染 pEGFP-C1-*OPN* 和 pEGFP-C1 空载体质粒, 转染 24 h 后, 使用倒置显微镜观察细胞转染效率。

3.8 检测 *OPN* 过表达效率及其对繁殖基因的影响

转染 pEGFP-C1-*OPN* 和 pEGFP-C1 空载体质粒 48 h 后, 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 逆转录为 cDNA 后, 将 cDNA 稀释至相同浓度作为模板, 首先使用 qPCR 检测 *OPN* 基因在 2 组细胞中的表达量, 随后再次使用 RT-qPCR 检测过表达 *OPN* 基因后对繁殖相关基因 *BMP15*、*BMPR-1B* 和 *FSHB* 的表达量的影响, 进一步分析 *OPN* 基因与黔北麻羊繁殖性状的关系。

3.9 数据分析

实时定量 PCR 数据结果使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算, 结果由 3 次的重复实验所得, 以平均值 $\pm$ 标准差表示。在不同组织中, 采用多重比较的方法, 相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$); 不同字母表示差异极显著 ($P<0.01$)。在相同组织中, 采用 *t* 检验, “*”表示差异显著 ($P<0.05$), “**”表示差异极显著 ($P<0.01$)。所有结果使用 SPSS (v 19.0) 数据分析和 GraphPad Prism (v 9.0) 图形分析软件分别进行相关数据的统计分析和图表处理。

作者贡献

赵佳福是项目的构思者及负责人, 也是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 周明帅、杨秀远、徐畅参与了实验研究、数据分析和论文初稿的撰写工作; 赵佳福负责论文的修改和定稿。全体作者都已阅读并同意最终的文本。

参考文献

- 敖叶, 陈祥, 周志楠, 等, 2020. *SMAD1* 基因对黔北麻羊卵巢颗粒细胞的影响及组织表达分析. 畜牧兽医学报, 51(7): 1607-1618. [AO Y, CHEN X, ZHOU Z N, et al., 2020. Effect of *SMAD1* gene on ovarian granulosa cells and its tissue expression analysis in Qianbei Ma goats. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 51(7): 1607-1618.]
- 陈云, 王凯, 周乐乐, 等, 2020. 骨桥蛋白在长白公猪生殖细胞中的表达及其与繁殖性能的相关性. 中国畜牧兽医, 47(8): 2536-2543. [CHEN Y, WANG K, ZHOU L L, et al., 2020. Expression of *OPN* in germ cells of Landrace boar and its correlation with reproductive performance. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 47(8): 2536-2543.]
- 寸静宇, 刘秋月, 王翔宇, 等, 2019. 小尾寒羊 *FSHB* 和 *LHB* 基因在生殖轴的表达研究. 中国畜牧杂志, 55(1): 37-41. [CUN J Y, LIU Q Y, WANG X Y, et al., 2019. Expression of *FSHB* and *LHB* genes in the reproductive axis in small tail Han sheep. Chinese Journal of Animal Science, 55(1): 37-41.]
- 范一萍, 王晓梅, 贾启涛, 等, 2019. 猪 *PRLR* 和 *FSHB* 基因多态性检测及其与繁殖性状的关联分析. 中国畜牧兽医, 46(3): 774-781. [FAN Y P, WANG X M, JIA Q T, et al., 2019. Polymorphism of *PRLR* and *FSHB* genes and its association analysis with reproductive traits in pigs. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 46(3): 774-781.]
- 高可心, 2018. *RUNX1* 和 *RUNX2* 在奶山羊卵巢颗粒细胞中的

- 表达调控机理及功能研究, 博士学位论文. 咸阳: 西北农林科技大学. [GAO K X, 2018. Regulation and function of runt-related transcription factors (RUNX1 and RUNX2) in goat granulosa cells, Dissertation for Ph.D. Xianyang: Northwest A & F University.]
- 郭艺璇, 2018. 精氨酸基于 NO 途径参与调控限饲母羊卵泡发育机制的研究, 博士学位论文. 南京: 南京农业大学. [GUO Y X, 2018. Study of arginine on folliculogenesis in nutrient restriction ewes through nitric oxide pathway, Dissertation for Ph.D. Nanjing: Nanjing Agricultural University.]
- 洪磊, 陈祥, 唐文, 等, 2020. 黔北麻羊 *SRD5A2* 基因干扰载体构建及其对产羔相关基因表达的影响. 畜牧兽医学报, 51(12): 2980-2990. [HONG L, CHEN X, TANG W, et al., 2020. Construction of *SRD5A2* gene interference vector and its effect on the expression of lambing related genes in Qianbei Ma goats. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 51(12): 2980-2990.]
- 贾梦雨, 李尚, 刘刁, 等, 2022. 母猪繁殖性状分子遗传标记研究进展. 黑龙江畜牧兽医, (1): 38-43. [JIA M Y, LI S, LIU D, et al., 2022. Advances in molecular genetic markers for reproductive traits in sows. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, (1): 38-43.]
- 喇永富, 2016. 绵羊生长候选基因克隆与组织表达及其 SNPs 与生长性状关联分析, 硕士学位论文. 兰州: 甘肃农业大学. [LA Y F, 2016. Cloning and expression of growth candidate genes and their SNPs association with growth traits in sheep, Thesis for MS. Lanzhou: Gansu Agricultural University.]
- 刘倩, 谢青贞, 黄伟, 等, 2013. 骨桥蛋白在雄性小鼠生殖系统中的表达及意义. 武汉大学学报(医学版), 34(2): 183-187. [LIU Q, XIE Q Z, HUANG W, et al., 2013. Expression and potential role of osteopontin in the testis, epididymis and epididymal sperm of mouse. Medical Journal of Wuhan University, 34(2): 183-187.]
- 刘霜, 郑杰, 卢建远, 等, 2016. 山羊卵巢中 *BMP15*、*GDF9* 和 *BMPRII* 基因的表达量研究. 畜牧与兽医, 48(5): 66-70. [LIU S, ZHENG J, LU J Y, et al., 2016. Study on the expression of *BMP15*, *GDF9* and *BMPRII* genes in goat ovary. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 48(5): 66-70.]
- 罗仍卓么, 王立贤, 孙世铎, 2008. 猪 *OPN* 基因与繁殖性状的关联分析. 农业生物技术学报, 16(3): 412-416. [LUORENG Z M, WANG L X, SUN S D, 2008. Genetic polymorphism of pig gene *OPN* and its correlation with reproductive traits. Journal of Agricultural Biotechnology, 16(3): 412-416.]
- 毛建文, 2013. 山羊 *OPN* 基因多态性及其与胎盘效率、产羔数的关联分析, 硕士学位论文. 重庆: 西南大学. [MAO J W, 2013. The relationship of *OPN* gene with the placental efficiency and the litter number in goat (*Capra hircus*), Thesis for MS. Chongqing: Southwest University.]
- 覃玉凤, 李维, 陈瑶生, 等, 2017. *BMP15* 基因研究进展. 农业生物技术学报, 25(2): 324-334. [QIN Y F, LI W, CHEN Y S, et al., 2017. Advances in *BMP15* gene research. Journal of Agricultural Biotechnology, 25(2): 324-334.]
- 王健宏, 周惠芳, 2013. 中药干预对卵巢颗粒细胞分泌功能及相关因子表达影响的研究进展. 中国中西医结合杂志, 33(4): 573-576. [WANG J H, ZHOU H F, 2013. Research progress on the effect of traditional Chinese medicine intervention on secretory function and expression of related factors of ovarian granulosa cells. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 33(4): 573-576.]
- 杨春艳, 郑海英, 尚江华, 等, 2016. 水牛 *FSHR*、*INHA*、*LHCGR*、*OPN* 基因多态性与超数排卵性状的关联分析. 畜牧与兽医, 48(5): 75-78. [YANG C Y, ZHENG H Y, SHANG J H, et al., 2016. Association analysis between *FSHR*, *INHA*, *LHCGR* and *OPN* gene polymorphism and superovulation traits in buffalo. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 48(5): 75-78.]
- 杨启鑫, 2020. SPP1 蛋白在小鼠早期妊娠子宫中的表达研究. 硕士学位论文, 哈尔滨: 东北林业大学. (YANG Q X, 2020. Expression of sphingosine-1-phosphate phosphatases 1 in mouse uterus during early pregnancy. Thesis for MS, Harbin: Northeast Forestry University.)
- 张丽萌, 2020. FHL2 对绵羊卵巢颗粒细胞功能的影响及机制研究, 博士学位论文. 保定: 河北农业大学. [ZHANG L M, 2020. Effect and mechanism of FHL2 on the function of ovary granulosa cells in sheep, Dissertation for Ph.D. Baoding: Hebei Agricultural University.]
- BAUFELD A, VANSELOW J, 2013. Increasing cell plating density mimics an early post-LH stage in cultured bovine granulosa cells. Cell Tissue Res., 354(3): 869-880.
- DUNLAP K A, ERIKSON D W, BURGHARDT R C, et al., 2008. Progesterone and placental increase secreted phosphoprotein one (SPP1 or osteopontin) in uterine glands and stroma for histotrophic and hematotrophic support of ovine pregnancy. Biol. Reprod., 79(5): 983-990.
- FRANK J W, STEINHAUSER C B, WANG X Q, et al., 2021. Loss of ITGB3 in ovine conceptuses decreases conceptus expression of *NOS3* and *SPP1*: implications for the developing placental vasculature. Biol. Reprod., 104(3): 657-668.
- FRANZÉN A, HEINEGÅRD D, 1985. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. Biochem. J., 232(3): 715-724.

- GALLOWAY S M, GREGAN S M, WILSON T, et al., 2002. Bmp15 mutations and ovarian function. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 191(1): 15-18.
- GALLOWAY S M, MCNATTY K P, CAMBRIDGE L M, et al., 2000. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.*, 25(3): 279-283.
- GARLOW J E, KA H, JOHNSON G A, et al., 2002. Analysis of osteopontin at the maternal-placental interface in pigs. *Biol. Reprod.*, 66(3): 718-725.
- KIM S, SHIN T, 2007. Immunohistochemical study of osteopontin in boar testis. *J. Vet. Sci.*, 8(2): 107-110.
- LI H X, XU H W, AKHATAYEVA Z, et al., 2021. Novel indel variations of the sheep *FecB* gene and their effects on litter size. *Gene*, 767: 145176.
- LIMA F, BEZERRA F, SOUZA G B, et al., 2018. Influence of interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha on the *in vitro* growth, maturation and mitochondrial distribution of bovine oocytes from small antral follicles. *Zygote*, 26(5): 381-387.
- LUO N J, CHENG W Q, ZHOU Y M, et al., 2021. Screening candidate genes regulating placental development from trophoblast transcriptome at early pregnancy in Dazu black goats (*Capra hircus*). *Animals*, 11(7): 2132.
- MATSUDA F, INOUE N, MANABE N, et al., 2012. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J. Reprod. Dev.*, 58(1): 44-50.
- MULSANT P, LECERF F, FABRE S, et al., 2001. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérino ewes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(9): 5104-5109.
- PANG P F, LI Z Z, HU H, et al., 2019. Genetic effect and combined genotype effect of *ESR*, *FSH β* , *CTNNAL1* and *miR-27a* loci on litter size in a Large White population. *Anim. Biotechnol.*, 30(4): 287-292.
- STAMATIADIS G A, CARROLL R S, KAISER U B, 2019. GnRH—a key regulator of FSH. *Endocrinology*, 160(1): 57-67.
- SODEK J, GANSS B, MCKEE M D, 2000. Osteopontin. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 11(3): 279-303.
- TREMAINE T D, FOULADI-NASHTA A A, 2021. Steroid regulation of secreted phosphoprotein 1 (SPP1) expression in ovine endometrium. *Reprod. Fertil. Dev.*, 33(4): 257-269.
- YAO Y L, REHEMAN A, XU Y F, et al., 2019. miR-125b contributes to ovarian granulosa cell apoptosis through targeting BMPRI1B, a major gene for sheep prolificacy. *Reprod. Sci.*, 26(2): 295-305.

(责任编辑 蹇慧)