

# 鸡 *lmbr1* 基因外显子 16 的 SNP 检测和单倍型分析

黄艳群<sup>1,2,3</sup>, 陈文<sup>1</sup>, 邓学梅<sup>4</sup>, 邱祥聘<sup>3</sup>, 李宁<sup>2\*</sup>, 吴常信<sup>4</sup>

(1. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002;

2. 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094;

3. 四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014; 4. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094)

**摘要:** 外显子 16 是鸡 *lmbr1* 基因最大的外显子, 本研究进行了该外显子在丝羽乌骨鸡和白洛克肉鸡间的 SNP 检测和单倍型分析。研究表明, 鸡 *lmbr1* 外显子 16 的 PCR-SSCP 基因型在两个品种间的分布存在明显差异, 测序从 24 个个体中检测到 4 个变异位点, 其中 T32C 变异在两个品种间存在明显差异, 丝羽乌骨鸡均含有 32T (纯合的 TT 或杂合的 TC), 白洛克肉鸡在 T32C 位点都为纯合的 CC; 单倍型分析从 24 个个体中检测到 5 种单倍型, 丝羽乌骨鸡和白洛克肉鸡的单倍型存在明显的差异, hap1 和 hap2 是丝羽乌骨鸡的特异性单倍型, hap5 是白洛克肉鸡的特异性单倍型, hap3 和 hap4 主要存在于白洛克肉鸡中, 在丝羽乌骨鸡中的比例极少。

**关键词:** 鸡; *lmbr1*; 外显子 16; SNPs; 单倍型

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)08-0781-05

## SNP Detection and Haplotype Analysis on Exon 16 of Chicken *lmbr1*

HUANG Yan-qun<sup>1,2,3</sup>, CHEN Wen<sup>1</sup>, DENG Xue-mei<sup>4</sup>, QIU Xiang-pin<sup>3</sup>,

LI Ning<sup>2\*</sup>, WU Chang-xin<sup>4</sup>

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University,

Zhengzhou 450002, China; 2. State Key Laboratory of Biotechnology,

China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 4. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** Exon16 is the biggest exon of chicken *lmbr1*, here we conduct the SNP detection and haplotype analysis on Silkies and White Plymouth Rock broiler. It shows that the distribution of exon 16 PCR-SSCP genotypes had clear difference between Silkies and White Plymouth Rock broiler, 4 variations were detected by sequencing from 24 individuals, the distribution of allele at T32C site had clear difference between Silkies and White Plymouth Rock broiler too, all the individuals of Silky have 32T allele (in homologous TT or heterozygous TC), while all White Plymouth Rock are homologous CC at T32C site. 5 haplotypes were detected from 24 individuals, the distribution of haplotypes between two breeds also had clear difference, hap1 and hap2 were the special haplotypes of Silkies, while hap5 was the special haplotype of White Plymouth Rock broiler, the hap3 and hap4 were mainly detected from White Plymouth Rock broiler, which were rare in Silkies.

**Key words:** chicken; *lmbr1*; exon16; SNPs; haplotype

收稿日期: 2006-09-07

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(G20000161); 河南省杰出青年基金(0612001700)

作者简介: 黄艳群(1968-), 女, 四川眉山人, 副教授, 博士, 主要从事家禽遗传育种教学和科研工作, E-mail: hyanqun@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 李宁, 主要从事动物分子遗传学研究, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

目前的研究表明 *lmbr1* 基因是影响肢体发育的关键候选基因<sup>[1~7]</sup>,被定位在人和小鼠轴前多趾(PPD)的关键候选区间<sup>[1,2]</sup>。在 Hx (Hemimelic extra-toes)突变小鼠胚胎发育的第 12 天,检测到了 *lmbr1* 基因表达的剧烈变化<sup>[2]</sup>,也检测到人类 ACHP(Acheiropodia,无手无脚)患者 *c7orf2/lmbr1* 基因的外显子 4 及基因组周围大约 5 kb 的特异性缺失<sup>[3,4]</sup>。

鸡 *lmbr1* 基因与人和小鼠的 *c7orf2/lmbr1* 一样包含 17 个外显子,其转录序列编码 489 氨基酸的开放阅读框(ORF),最大外显子 16 为 162 bp,最小外显子 3 仅 40 bp<sup>[8]</sup>。鸡多趾性状的定位结果及人和鼠多趾性状的研究表明,*lmbr1* 基因是鸡多趾性状的关键候选基因<sup>[9~11]</sup>。本研究以鸡 *lmbr1* 基因外显子 16 为研究对象,分别采用 PCR-SSCP 和直接测序的方法进行五趾的丝羽乌骨鸡和四趾的白洛克肉鸡间单核苷酸多态性和单倍型分析,以期掌握它们在两个品种间的分布特点,为进一步分析该基因的功能打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

以中国农业大学用丝羽乌骨鸡和白洛克肉鸡建立的 F<sub>2</sub> 资源群体为研究素材,采用 PCR-SSCP 在亲代(P 代)的 40 只白洛克肉鸡和 32 只丝羽乌骨鸡中检测基因变异。翅下静脉采血,草酸盐抗凝,每个样品取 20 μL 鸡抗凝血,酚仿抽提法提取鸡红细胞中的基因组 DNA。

### 1.2 扩增引物及扩增条件

设计引物 Primer11 用于扩增外显子 16, F: 5' GATTTGATCTGCTTGGAGAC 3', R: 5' ATGCCTTCAGGAGCTCTTC 3' (图 2), 扩增片段长度为 150 bp。

PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min 进行 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。

### 1.3 测序条件

1.5% 的琼脂糖回收 Primer11 的 PCR 产物, GeneClean III 纯化, PCR 双向测序, 并分别从白洛克肉鸡和丝羽乌骨鸡中分别挑选 2 个包含 2 个或 2 个以上变异位点的样本进行克隆测序。克隆测序采用 PCR 回收产物与 pGEM-T 载体(Promega 公司)连接, 转化到 DH5 α, 挑选经过 X-gal 筛选的白斑,

经 PCR 扩增法进一步鉴定阳性克隆, 碱裂解法提取质粒, 每个样本挑选 4 个克隆在 PE 377 测序仪上测序。

### 1.4 PCR SSCP 条件

1 μL 的 PCR 产物加入到 5 μL 的上样缓冲液中, 瞬间离心, 变性。将变性 PCR 产物分别注入 16% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶(29:1)孔内, 15℃ 140 V 电泳 18 h, 银染, 判断基因型。

## 2 结果和分析

### 2.1 Primer11 的 PCR-SSCP 分析

采用 Primer11 对资源群体亲代的白洛克肉鸡和丝羽乌骨鸡进行 PCR-SSCP 分析, 检测到 3 种基因型(图 1), 并发现 PCR-SSCP 基因型在 P 代的丝羽乌骨鸡和白洛克肉鸡间存在明显的差异。所有的 AA 基因型个体都为 5 趾的丝羽乌骨鸡, 所有的 AB 和 BB 基因型个体都为 4 趾的白洛克肉鸡。

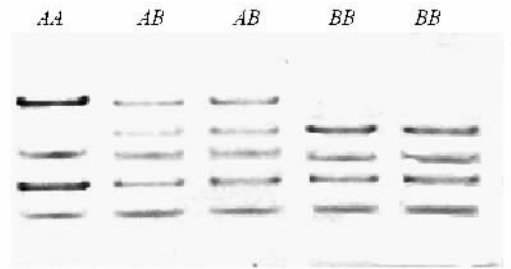


图 1 Primer11 检测到的 3 种 PCR-SSCP 基因型

Fig. 1 Three PCR-SSCP genotypes detected by Primer11

### 2.2 外显子 16 的单核苷酸多态

采用直接测序的方法, 从 24 只鸡中检测到 4 个变异位点。其中 G33A 变异预测氨基酸 Gly→Arg, 其余 3 个为沉默突变(图 2)。但 Gly→Arg 在自然群体里的比例很少, 在 24 个样本中仅检测到 2 个杂合子个体。

在外显子 16 的 4 个变异位点中, 32T 和 33A 为丝羽乌骨鸡所特有, 而白洛克肉鸡在 T32C 和 G33A 位点特异性地都为纯合的 CC 和 GG, 而无杂合个体; 在 G94A 和 A138C 位点, 丝羽乌骨鸡的杂合子很少, 而白洛克肉鸡的杂合子比例很高。

### 2.3 外显子 16 单倍型分析

对测序的 24 个个体进行单倍型分析, 发现丝羽乌骨鸡的 12 个样本中有 9 个个体在所有位点都为纯合子, 3 个为杂合子; 白洛克肉鸡的 12 个样本中

		32	33	
1	GAAT <u>FI</u> ACTCG <u>ATT</u> GA <u>IC</u> TG <u>CT</u> GGAGACT <u>TT</u> GAAGGTT <u>TA</u> ACTGGCTG GGAAACTTCT			
		F		94
61	ATATGTGATF ATCTTACAAC TTGCTCTTTG CTATCAIGAC AACATGTGT CTGGTCAGAA			
		138		
121	AGTTCACTTCTGCTGTGCGA <u>GA</u> AGACCTCC TGAAGGCATT AG			
			R	

下划线所对应序列为引物序列,以阴影标示为检测到的变异位点

Primers were underlined, variations were showed in shadow

图 2 鸡 *lmbr1* 基因的外显子 16 序列

Fig. 2 Exon16 sequence of chicken *lmbr1*

有 4 个为纯合子,其余为杂合子。分别从白洛克肉鸡和丝羽乌骨鸡中选取 2 个杂合子样本进行克隆测序,并进一步采用 Phase2. 1. 1 软件进行单倍型的分割<sup>[12,13]</sup>,共得到 5 种单倍型(表 1),每个个体都得到唯一的单倍型组合。hap1 占 41.6%,hap3 和 hap5

各占 20.8%,hap4 占 12.5%,而 hap2 仅占 0.4%。如果位点间无连锁,4 个变异位点应产生 2<sup>4</sup> 种单倍型,而在本研究 24 个样本中仅检测到 5 个单倍型,显示位点处于紧密连锁不平衡状态。

表 1 鸡 *lmbr1* 基因外显子 16 的单倍型及分布

Table 1 Haplotype distribution of chicken *lmbr1* exon 16

单倍型 Haplotype	变异位点 Variation sites				单倍型数 Number	丝羽乌骨鸡 Silkies	白洛克肉鸡 White Plymouth Rock
	32	33	94	138			
hap1	T	G	G	C	20	20	
hap2	T	A	G	C	2	2	
hap3	C	G	G	C	10	1	9
hap4	C	G	A	C	6	1	5
hap5	C	G	A	A	10		10

其中从丝羽乌骨鸡检测到 4 种单倍型,hap1 单倍型是丝羽乌骨鸡的主体单倍型,发生频率为 83.3%,hap1 单倍型也是丝羽乌骨鸡的特异性单倍型,12 只丝羽乌骨鸡中除 1 个个体外,其余 11 个个体都含有 hap1 单倍型,hap1/hap1 纯合型是丝羽乌骨鸡的主要基因型,也是特异性基因型,在 12 个个体中仅 3 个体非 hap1/hap1 单倍型组合;其余 3 种单倍型的发生比率低,分别仅检测到 1 次或 2 次;hap2 单倍型也为丝羽乌骨鸡所特有,但在 11 只丝羽乌骨鸡中仅检测到 2 个个体,且为杂合型。在白洛克肉鸡检测到 3 种单倍型,无 hap1 和 hap2 单倍型,在 12 只白洛克肉鸡中,hap3 单倍型的发生频率为 37.5%,hap4 单倍型为 20.8%,hap5 单倍型为 41.7%,在丝羽乌骨鸡和白洛克肉鸡间,hap5 是白

洛克肉鸡的特有单倍型。尽管 hap3 和 hap4 是丝羽乌骨鸡和白洛克肉鸡的共享单倍型,但白洛克肉鸡分别占了 90.0%和 83.3%。

#### 2.4 不同物种间外显子 16 的保守性

鸡 *lmbr1* 基因外显子 16 与人、鼠等物种的同源性比较表明,该区域在不同物种间具有高度的保守性,鸡与人的同源性为 85.8%,与鼠的同源性为 84.0%,鸡与狗的同源性为 87.0%,与大猩猩的同源性为 85.0%(图 3)。从全编码序列来看,鸡与人 *lmbr1*(NM\_022458)的同源性为 82.3%,与鼠(NM\_020295)的为 81.3%,而鸡与狗(xm\_539934)仅为 46.9%,与大猩猩(xm\_527963)仅为 56.5%,外显子 16 在 5 个物种间的同源性均呈现高于其全编码序列间同源性的特性。

Chicken	GAATTACTCGATTTGATCTGCTTGGAGACTTCGGAAGGTTTAACTGGCTGGGAAA	60
Chimpanzee	----C--A-----A-----C-----T-----T-----T-----	60
Dog	----C--A-----A-----T-----T-----T-----T-----	60
Human	----C--A-----A-----C-----T-----T-----T-----T-----	60
Mouse	----C--A----C-----A-----T-----A-----T-----T-----	60
Chicken	ATATTGTATTATCTTACAACCTTGCTCTTTGCTATCATGACAACATTGTGTCTGGTCAGAA	120
Chimpanzee	-----C-----T-----T-----TG-----C-----	120
Dog	-----C-----T-----T-----TG---C-----	120
Human	-----C-----T-----T-----TG-----C-----	120
Mouse	-----C-----T--A-----C--C-----T--A-----	120
Chicken	AGTTCACTTCTGCTGTGCGAGAAAGAGCTCCTGAAGGCATTAG	162
Chimpanzee	-A-----C-----A--T-----A--TT-C-----CC---	162
Dog	-A-----C-----A-----A--TT-C-----CC---	162
Human	-A-----C-----A--T-----A--TT-C-----CC---	162
Mouse	-A-----A--A--A--A-----A--TT-C-----CC---	162

图 3 不同物种间 *lmb1* 基因外显子 16 同源性比较Fig. 3 Homology comparison of exon 16 of *lmb1* among five species

### 3 讨论

在人和鼠上的研究表明 *lmb1* 基因与肢体的发育有关<sup>[1~7]</sup>。分析表明 *lmb1* 外显子 16 在物种间具有很高的保守性。本研究采用 PCR-SSCP 和测序的方法进行了鸡 *lmb1* 基因外显子 16 的 SNP 检测,发现 PCR-SSCP 基因型在丝羽乌骨鸡和白洛克肉鸡间的分布具有明显的差异;测序检测到了 4 个变异位点,发现 T32C 变异是丝羽乌骨鸡和白洛克肉鸡间的特异性位点,检测的丝羽乌骨鸡都含有 32T,而白洛克肉鸡都为纯合的 CC;两物种间的单倍型分布也有明显的差异,两个物种都有特异的单倍型。五趾是丝羽乌骨鸡的典型特征,而白洛克肉鸡都为四趾,本研究的结果显示了鸡 *lmb1* 基因可能与趾型有潜在关联。

通过测序建立测序基因型和 PCR-SSCP 基因型间的关系,以便进一步采用 PCR-SSCP 方法进行资源群体 F<sub>2</sub> 代的分析时发现:尽管 PCR-SSCP 基因型与测序结果都反映了丝羽乌骨鸡和白洛克肉鸡基因型间存在明显差异这样一个规律,却无法建立 Primer11 的 PCR-SSCP 基因型与测序获得的序列基因型间的对应关系,如 AB 基因型的不同个体的测序结果在某些位点上不完全一致。作者也曾采用 Primer11 进行 300 个 F<sub>2</sub> 代资源群体的 PCR-SSCP 分析,发现 AA 型过多,PCR-SSCP 的分布在 F<sub>2</sub> 代明显偏离孟德尔遗传分离规律。推测出现测序结果和 PCR-SSCP 不完全吻合的原因,可能是该区域尽

管只有 150 bp,却包含了过多的变异位点,产生了较多的变异组合,使常规的 PCR-SSCP 方法无法将这些条带有效分开。

建议采用 PCR-SSCP 基因型进行群体单核苷酸多态分布检测时,出现的所有 PCR-SSCP 基因型均应选择 2 个或 2 个以上个体进行 PCR 测序,确定 PCR-SSCP 基因型所对应的测序基因型,也进一步验证 PCR-SSCP 基因型和测序基因型是否一致,而不能简单地仅分别选择一个纯合子进行测序来推测杂合子的测序基因型,或选用杂合子的测序结果来推测纯合子的变异位点,尤其在包含 2 个以上变异位点的情况下。

### 4 小结

4.1 发现 PCR-SSCP 基因型在丝羽乌骨鸡和白洛克肉鸡间有明显的差异。

4.2 测序表明在这段序列有 4 个变异位点,T32C 变异在在丝羽乌骨鸡和白洛克肉鸡间有明显的差异,丝羽乌骨鸡都含有 32T 等位基因,白洛克肉鸡都为纯合的 CC。

4.3 单倍型分析检测到 5 种单倍型,丝羽乌骨鸡和白洛克肉鸡都有其品种特异性的单倍型。

### 参考文献:

- [1] Heus H C, Hing A, van Baren M J, et al. A physical and transcriptional map of the preaxial polydactyly locus on chromosome 7q36[J]. Genomics, 1999, 57(3):

- 342~351.
- [ 2 ] Clark R M, Marker P C, Kingsley D M. A novel candidate gene for mouse and human preaxial polydactyly with altered expression in limbs of Hemimelic extra-toes mutant mice[J]. *Genomics*, 2000, 67(1): 19~27.
- [ 3 ] Escamilla M A, DeMille M C, Benavides E, *et al.* A minimalist approach to gene mapping: locating the gene for acheiropodia, by homozygosity analysis[J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 66(6): 1 995~2 000.
- [ 4 ] Ianakiev P, van Baren M J, Daly M J, *et al.* Acheiropodia is caused by a genomic deletion in *c7orf2*, the human orthologue of the *lmbr1* gene[J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(1): 38~45.
- [ 5 ] Clark R M, Marker P C, Roessler E, *et al.* Reciprocal mouse and human limb phenotypes caused by gain- and loss-of-function mutations affecting *lmbr1*[J]. *Genetics*, 2001, 159(2): 715~726.
- [ 6 ] Horikoshi T, Endo N, Shibata M, *et al.* Disruption of the *C7orf2/Lmbr1* genic region is associated with preaxial polydactyly in humans and mice[J]. *J Bone Miner Metab*, 2003, 21(1): 1~4.
- [ 7 ] Lettice L A, Horikoshi T, Heaney S J, *et al.* Disruption of a long-range cis-acting regulator for *Shh* causes preaxial polydactyly[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(11): 7 548~7 553.
- [ 8 ] Maas S A, Fallon J F. Isolation of the chicken *Lmbr1* coding sequence and characterization of its role during chick limb development[J]. *Developmental Dynamics*, 2004, 229: 520~528.
- [ 9 ] Warren D C. Inheritance of polydactyly in the fowl [J]. *Genetics*, 1944, 29: 217~231.
- [10] Crawford R D. *Poultry Breeding and Genetics*[M]. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Company Inc, 1990. 209~237.
- [11] Pitel F, Bergé R, Coquerelle G, *et al.* Mapping the naked Neck (NA) and Polydactyly (PO) mutants of the chicken with microsatellite molecular markers[J]. *Genet Sel Evol*, 2000, 32: 73~86.
- [12] Stephens M, Smith N, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data [J]. *American Journal of Human Genetics*, 2001, 68: 978~989.
- [13] Stephens M, Donnelly P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data [J]. *American Journal of Human Genetics*, 2003, 73: 1 162~1 169.