

籽鹅 *GH* 基因内含子 3 多态性及其与体重和屠体性状的关联分析

赵文明, 陈清, 程金花, 吴信生, 陈国宏*

(扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘要: 根据鸭生长激素基因内含子 3 的序列设计引物, 利用 PCR-SSCP 方法对籽鹅进行了单核苷酸多态性分析, 并检测其多态性。结果表明, 籽鹅生长激素基因内含子 3 长约 364 bp, 共发现了 7 个突变位点, 分别为 A160G、C167G、T264C 突变, 以及 AA 型个体在 176、177 位点 G、A 碱基缺失和 BB 型个体在 231、232 位点 C、T 碱基缺失。产生 AA、AB 和 BB 3 种基因型, 其中 BB 基因型为优势基因型, 且基因型频率表现为 $BB > AB > AA$; 卡方检验结果表明, 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$)。不同基因型与体重和屠体性状的关联分析结果表明: BB 基因型个体的 7 周龄体重、9 周龄体重、10 周龄体重、胸肌重、胸肌率及心脏重显著高于 AA 型个体 ($P < 0.05$); BB 基因型个体 8 周龄体重显著高于 AB 型个体 ($P < 0.05$); 在所分析的性状中, BB 基因型个体的均值最大, AB 型次之, AA 型最小。

关键词: 籽鹅; 生长激素基因; PCR-SSCP; 体重; 屠体性状

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)04-0443-06

Polymorphism of Intron 3 of Growth Hormone Gene and Its Relationship with Body Weight and Carcass Traits in Zi Geese

ZHAO Wen-ming, CHEN Qing, CHENG Jin-hua, WU Xin-sheng, CHEN Guo-hong*

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The single nucleotide polymorphism (SNP) of *GH* gene was investigated in Zi geese. The primers for intron 3 in *GH* gene were designed according to the homologous sequence of duck and the SNPs were detected by PCR-SSCP method. The results showed that the length of intron 3 of goose *GH* gene was about 364 bp, seven SNPs were detected, which were A160G, C167G and T264C, in addition, deletions were found at the base position 176, 177, 231 and 232, respectively, in the two kinds of homozygote. Three kinds of genotypes (AA, AB and BB) were detected and BB genotype was dominant in population, the frequency of genotypes were $BB > AB > AA$. The results of Chi-Square test indicated that the frequencies of *GH* gene fit with Hardy-Weinberg equilibrium in Zi geese. The correlation between the genotypes and body weight and carcass traits of Zi geese showed that 7 weeks body weight, 9 weeks body weight, 10 weeks body weight, breast muscle weight, breast muscle rate and heart weight of Zi geese with BB genotype were significantly higher than those with AA genotype ($P < 0.05$), 8 weeks body weight with BB genotype were significantly higher than those with AB genotype ($P < 0.05$). As the whole, the average values of these traits of the individuals with BB genotype were the highest, while those with AA genotype showed the lowest.

收稿日期: 2007-06-30

基金项目: 国家科技支撑计划重大专项项目(2006BDA01A09); 国家科技支撑计划重点项目(2006BDA14B06); 江苏省属高校自然科学基金研究面上项目(07KJB230138)

作者简介: 赵文明(1969-), 男, 江苏泰兴人, 博士生, 副教授, 主要从事动物遗传资源评价、保护与利用研究, E-mail: wzmzhao@yzu.edu.cn

* 通讯作者: 陈国宏(1963-), 男, 江苏扬州人, 教授, 博士生导师, E-mail: ghchen@yzu.edu.cn

Key words: Zi goose; growth hormone gene; PCR-SSCP; body weight; carcass traits

生长激素(Growth Hormone, GH)是由脑垂体前叶嗜酸性细胞合成和分泌的1种单一肽链的蛋白质激素,由190~191个氨基酸组成,是1种具有广泛生理功能的生长调节素^[1]。GH对动物体的影响主要表现为能显著提高生长速度,促进肌肉生长,降低脂肪含量。生长激素基因是一种重要的功能基因,对生长激素的合成和分泌进行调节和控制,与醛缩酶、cAMP依赖性蛋白激酶调节亚单位类型I存在着连锁^[2]。

由于GH基因在医学、畜牧业生产和渔业生产中的重要作用,因此对其基因结构和基因转录调控的研究开始得很早。与哺乳动物相比,禽类GH基因的研究起步较晚,且主要集中在鸡上。Chen等首次克隆并测定了鸭GH基因的cDNA序列,该序列包含820个碱基对,编码216个氨基酸,其27个残基的信号肽与大多数哺乳动物的长度一样^[3]。Kansaku等^[4]克隆并测定了鸭GH基因的全序列。该序列包含5219个碱基对,编码216个氨基酸,包含5个外显子和4个内含子。敖金霞等^[5]首次获得了鹅GH基因的cDNA序列,全长651bp,也是由5个外显子和4个内含子组成,与鸭和鸡的GH基因的编码区高度一致,同源性分别达到99%和92%。另外有关禽类生长激素基因的多态性与生产性能的相关性也有报道。Fotouhi等^[6]发现鸡GH基因中存在内切酶Msp I和Sac I的酶切位点,其中的一些位点与鸡的腹脂形成有关。Kuhnlein等^[7]发现鸡GH基因内含子上的一个Sac I-RFLP多态位点对开产日龄的推迟和产蛋性能的稳定性有显著影响。敖金霞等^[8]对莱茵鹅GH基因内含子2进行SSCP分析,发现了2个多态位点对个体体重有极显著影响。

籽鹅产于我国黑龙江省绥北和松花江地区,其中以肇东、肇源、肇州等市、县最多。其全身羽毛洁白,体形小而紧凑,成熟早,产蛋性能高,并因高产多子而得名。此外,籽鹅抗寒、耐粗饲能力较强,能在寒冷的气候和粗劣的饲养条件下保持高产,是世界上罕见的高产蛋鹅种之一^[9]。研究籽鹅的早期体重和屠体性状对于其早期选种和开发利用也具有重要意义。结合其他研究者的报道,一般GH基因外显子在品种内都比较保守,而且有研究表明鹅的内含子多态性与一些经济性状有关^[7-8],而且目前尚未有

关籽鹅GH基因多态性及其与生产性能关联分析的研究报道。本文以籽鹅为研究对象,对GH基因内含子3进行了PCR-SSCP检测和克隆测序,并对其多态性与体重和屠体性状进行了关联分析,为寻找鹅生产性状的遗传标记和构建鹅基因图谱奠定基础,为今后育种过程中的标记辅助选择(MAS)提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

在江苏高邮种鹅场随机抽取55只发育良好、健康的籽鹅(28♂,27♀)。鹅群常规饲养,10周龄时翅静脉采血,肝素钠抗凝。采用常规的酚/氯仿抽提方法提取基因组DNA^[10],4℃保存备用。

1.2 GH基因内含子3 PCR-SSCP检测

根据鸭GH基因的序列(AB158760)设计引物,Forward: 5'-CAGTGCTTGCTGAGGTAT-3', Reverse: 5'-ACCAGTGAAAACCGAAGA-3'。交由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PCR反应体系20 μL:10×PCR buffer 2 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 1 μL,10 μmol/L上下游引物各0.5 μL,Taq酶1.0 U,100 ng/μL DNA模板1 μL,ddH₂O 14.8 μL。PCR反应条件为:95℃预变性5 min;94℃变性50 s,58℃退火50 s,72℃延伸50 s,30个循环;72℃延伸10 min;4℃保存。PCR扩增产物98℃变性10 min后,经8%非变性聚丙烯酰胺凝胶200 V电泳6~8 h,银染显色。

1.3 GH基因内含子3克隆测序

根据鸭GH基因的序列设计1对引物,Forward: 5'-GATGATGCCAGCAGAAAT-3', Reverse: 5'-CCAGTGAAAACCGAAGAAG-3',由上海生工生物工程技术有限公司合成。根据PCR-SSCP分析结果,随机选择2个不同纯合子基因型个体的PCR产物进行克隆测序。反应体系同上,PCR条件为:95℃预变性5 min;94℃变性50 s,59℃退火50 s,72℃延伸50 s,35个循环;72℃延伸10 min;4℃保存。PCR产物在1%琼脂糖凝胶中电泳后,用DNA凝胶回收试剂盒回收纯化,将回收的片段连接到pMD19-T载体上,并转化DH5α大肠杆菌菌株,提取质粒,进行双酶切鉴定后交由上海生工生物工程技术有限公司测序。

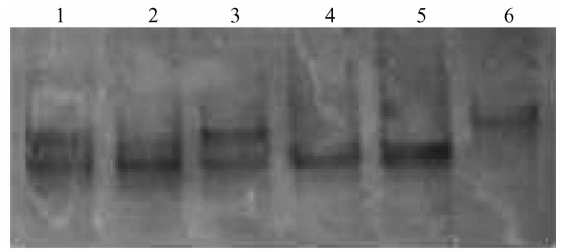
1.4 性能测定及统计分析

空腹称取1~10周龄体重,根据文献[11]屠宰性能测定方法,测定10周龄屠体重、屠宰率、半净膛重、半净膛率、全净膛重、全净膛率、胸肌重、胸肌率、腿肌重、腿肌率、腹脂重、腹脂率、内脏重、心脏重、肝脏重、肌胃重和腺胃重。基因及基因型频率根据Hardy-Weinberg平衡定律进行计算, $p = P + H/2$, $q = Q + H/2$, $x^2 = \sum d^2/e$,其中 $d = e - o$ 是期望值与观测值之差。其中 p, q 表示给定位点上等位基因的频率, P, H, Q 分别表示显性纯合子、杂合子、隐性纯合子的基因型频率。利用SPSS11.5软件的广义线性模型(General Linear Model, GLM)对各性状值与基因型间的关系进行最小二乘法估计。

2 结果与分析

2.1 PCR-SSCP 结果

PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶检测,扩增片段大小与预期结果一致,且没有非特异性条带,可直接进行SSCP分析,共检测出3种基因型,分别定义为AA、AB和BB(图1)。



AA, 6; BB, 2, 4, 5; AB, 1, 3

图1 GH基因内含子3扩增产物的SSCP分析

Fig. 1 SSCP analysis of PCR products of the intron 3 of GH gene

2.2 克隆测序结果

对2种纯合子基因型AA和BB个体进行克隆测序,PCR扩增产物经琼脂糖电泳,在400 bp左右出现1条清晰特异的条带,测序后得到413 bp的核苷酸序列,其中内含子3的片段大小为364 bp。并检测出7个SNPs位点,分别为A160G、C167G、T264C突变,以及AA型个体在176、177位点的G、A碱基缺失和BB型个体在231、232位点的C、T碱基缺失。测序峰图如图2所示。

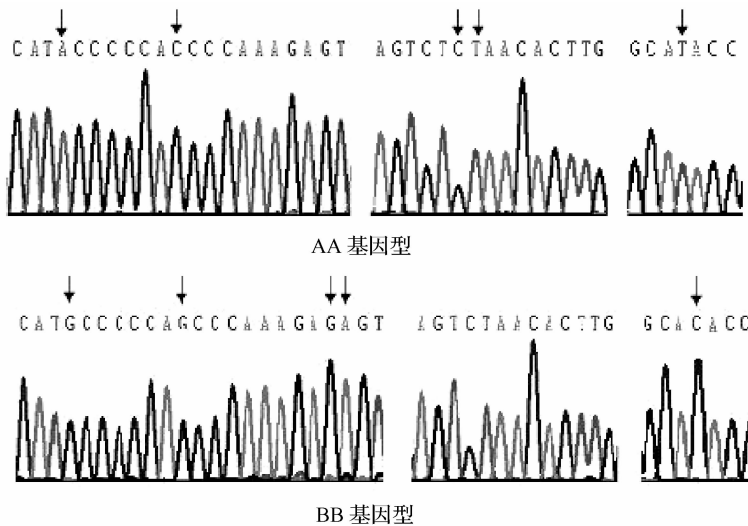


图2 AA和BB基因型突变的变异位点

Fig. 2 The mutations between AA and BB genotypes

2.3 GH基因内含子3多态性

籽鹅GH基因内含子3基因型和等位基因频率以及 χ^2 适合性检验结果见表1。结果表明,籽鹅无论公、母还是整个试验群均以BB基因型占大多数,AB基因型次之,AA基因型最少;等位基因B频率高于等位基因A近3倍。 χ^2 检验结果表明基因型

频率和等位基因频率在不同性别间分布差异不显著($\chi^2 = 0.22, P > 0.05$);公鹅群、母鹅群以及整个试验群在GH基因内含子3上都处于Hardy-Weinberg平衡状态($P > 0.05$), χ^2 值分别为1.68、0.45和1.96。

表 1 籽鹅 *GH* 基因 PCR-SSCP 基因型和等位基因频率 (n = 55)Table 1 Genotype and allele frequencies of *GH* gene by PCR-SSCP in Zi geese (n=55)

性别 Sex	样本数 No.	基因型频率 Genotype frequencies			等位基因频率 Allele frequencies		χ^2 值 χ^2 value
		AA	AB	BB	A	B	
		公 Male	28	0.143(4)	0.250(7)	0.607(17)	
母 Female	27	0.111(3)	0.296(8)	0.593(16)	0.259 0	0.741 0	0.45 ^{ns}
总计 Total	55	0.127(7)	0.273(15)	0.600(33)	0.263 5	0.736 5	1.96 ^{ns}

χ^2 值为对不同基因型分布的 Hardy-Weinberg 平衡检验值; 上标 ns 表示没有达到显著水平 ($P > 0.05$)

χ^2 values means the test values of different genotype to Hardy-Weinberg balance; Means with ns in column are no significant difference ($P > 0.05$)

2.4 不同基因型与体重和屠宰性状的关联分析

本研究中样本的公母比例接近一半, 且由上面的结论已知基因型在公母群体中分布差异不显著, 采用最小二乘法 and 多重比较分析整个群体不同基因型间体重和屠体性状的差异, 结果见表 2 和 3。从表 2 可以看出: 各基因型与 7、8、9 和 10 周龄体重间存在显著相关 ($P < 0.05$), 在 7、9、10 周龄体重上, 基因型为 BB 的个体显著高于 AA 个体 ($P < 0.05$), 而 AA 与 AB 个体和 AB 与 BB 个体间差异不显著

($P > 0.05$), 且 3 种基因型个体之间存在 $AA < AB < BB$ 的关系; 而在 8 周龄体重上, 基因型为 BB 的个体显著高于 AB 个体 ($P < 0.05$), 其它基因型之间差异不显著 ($P > 0.05$)。从表 3 可以看出: 在屠宰性状上各基因型与胸肌重、胸肌率和心脏重存在显著相关 ($P < 0.05$), BB 型个体的胸肌重, 胸肌率和心脏重最高, 显著高于基因型 AA ($P < 0.05$)。另外, 不同的基因型在 1 周龄体重等性状上差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 籽鹅 *GH* 基因内含子 3 与体重的关系Table 2 The relationship between *GH* gene intron 3 and bodyweight of Zi geese

基因型 Genotypes	样本数 No.	7 周龄体重/g 7 weeks bodyweight	8 周龄体重/g 8 weeks bodyweight	9 周龄体重/g 9 weeks bodyweight	10 周龄体重/g 10 weeks bodyweight
AA	7	1 302.14 ± 174.69 ^b	1 632.86 ± 258.14 ^{ab}	1 777.43 ± 249.49 ^b	1 888.14 ± 318.44 ^b
AB	13	1 397.46 ± 209.03 ^{ab}	1 638.31 ± 204.59 ^b	1 940.62 ± 260.04 ^{ab}	2 086.92 ± 273.68 ^{ab}
BB	27	1 519.52 ± 259.67 ^a	1 824.33 ± 301.42 ^a	2 029.22 ± 311.14 ^a	2 190.19 ± 317.49 ^a

带有不同肩标的平均数间差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Means with the different superscripts within the same column differs significantly ($P < 0.05$). The same as below

表 3 籽鹅 *GH* 基因内含子 3 与部分屠体性状的关系Table 3 The relationship between *GH* gene intron 3 and part carcass traits of Zi geese

基因型 Genotypes	样本数 No.	胸肌重/g Breast muscle weight	胸肌率/% Breast muscle rate	心脏重/g Heart weight
AA	7	56.86 ± 12.48 ^b	4.30 ± 0.68 ^b	15.14 ± 2.41 ^b
AB	14	78.83 ± 25.80 ^{ab}	5.50 ± 0.40 ^{ab}	17.00 ± 2.22 ^{ab}
BB	30	89.189 ± 29.12 ^a	5.90 ± 1.43 ^a	17.33 ± 2.51 ^a

3 讨 论

本研究采用 PCR-SSCP 分析发现了鹅 GH 基因内含子 3 的单核苷酸多态性,共产生 3 种基因型。结果表明,BB 基因型占大多数,而且籽鹅在 GH 基因内含子 3 上纯合子的比例比较高,为 0.727,说明目前籽鹅的纯度较高,对籽鹅的系统保种和选育的效果较好,这也与实际情况是一致的。 χ^2 适合性检验表明,籽鹅在 GH 基因内含子 3 变异位点已经达到 Hardy-Weinberg 平衡状态。这说明长期的人工选择对籽鹅 GH 基因没有造成影响。

不同基因型间体重和屠体性状的最小二乘分析结果表明,在各性状上 BB 基因型个体性状值均高于 AA 和 AB 型,且在 7、9、10 周龄体重和胸肌重、胸肌率、心脏重上显著高于 AA 型个体($P < 0.05$),在 8 周龄体重上显著高于 AB 型个体($P < 0.05$),即基因型 BB 显著影响这些性状($P < 0.05$)。这提示 GH 基因内含子 3 的 BB 基因型与籽鹅早期生长(7~10 周龄)以及胸肌和心脏的发育关系密切。籽鹅 GH 基因的不同基因型与早期体重和屠宰性能的关联分析表明了生长激素对机体的生长发育的促进作用,这一研究结果表明 BB 基因型可以作为筛选高的早期体重和胸肌重、胸肌率、心脏重的候选分子遗传标记,为今后鹅的育种工作提供分子标记辅助选择参考。

内含子是基因序列中不编码氨基酸的序列,现有的研究表明内含子具有以下功能^[12-14]:在高等生物中,内含子的长度远大于外显子,大部分随机突变会发生在内含子中,内含子的存在使得高等生物对突变的耐受能力大大增强;某些内含子中间碱基的变异影响了剪接,从而导致疾病;内含子可能与基因的表达调控有关;某些编码基因可能位于内含子中。因此,本试验中虽然内含子 3 不参与蛋白质的合成,但它的变异可能会影响 GH 基因外显子的“协调”,或者发挥出“位置效应”,也可能是它影响了 GH 基因表达过程中正确的剪切进而影响了蛋白质的翻译^[15],最终影响了该基因对籽鹅早期生长和体组成发育的作用和功能,但具体原因还需要进一步研究。

本试验根据鸭 GH 基因同源序列设计 1 对引物扩增鹅内含子 3 片段,克隆测序得到内含子 3 片段大小为 364 bp。同时序列结果显示,所克隆的鹅 GH 基因内含子 3 符合以 GT 开头,以 AG 结尾的

规则。同源性分析结果显示,鹅与鸭 GH 基因内含子 3 的同源性为 93%,但是与鸡的同源性仅为 75%,且在长度上存在差异,鹅内含子 3 大小为 364 bp,而鸡的为 301 bp。另有报道,鸡的 GH 基因内含子长度比哺乳动物的长很多^[16]。研究表明,同源基因的内含子序列在近亲缘关系的物种中相似性很高,而在亲缘关系较远的物种中相似性很低^[17],本研究得到的结论与此相符。同时,内含子是碱基突变较多的区域,所以这种差异很可能是长期的物种进化造成的。

通过克隆测序还得出鹅 GH 基因内含子 3 多态性是 A160G、C167G、T264C 突变以及 AA 基因型 176、177 位点 G、A 碱基缺失和 BB 基因型 231、232 位点 C、T 碱基缺失所造成的,其中包括两种类型的变异:单个碱基突变和缺失。突变是生物进化的基础,目前已经广泛认为它是造成基因组差异的主要原因之一^[18]。随着研究的深入,人们认识到突变不仅包括狭义上的碱基突变,即转换和颠换,还包含能造成移码突变的一个和多个碱基的插入及缺失^[19]。而且已有研究预见插入/缺失突变对于基因组进化的贡献比碱基突变要大得多^[20]。本文在籽鹅群体 GH 基因内含子 3 中首次发现了 2 处缺失,这一研究结果将为我国地方鹅种及家禽的起源、进化和分子系统发育分析增添新的理论依据。

参考文献:

- [1] 程治平. 内分泌生理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1984.
- [2] YERLE M, MANSAIS Y, THOMSEN P D, et al. Location of the porcine hormone gene to chromosome 12P^{1.2}-P^{1.5}[J]. Anim Genet, 1993, 24(2): 129-131.
- [3] CHEN H T, PAN F M, CHANG W C. Purification of duck growth hormone and cloning of the complementary DNA[J]. Biochim Biophys Acta, 1988, 949(2): 247-251.
- [4] KANSAKU N, ZADWORN Y D, GUÉMENE D. Genomic cloning of duck growth hormone[EB/OL]. NCBI, GENE BANK, 08-JAN-2004.
- [5] 敖金霞, 李 辉, 王启贵, 等. 鹅生长激素基因的克隆和表达特性[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(5): 552-555.
- [6] FOTOUHI N, KARATZAS C N, KUHNLEIN U, et al. Identification of growth hormone DNA polymorphisms which respond to divergent selection for abdominal fat content in chickens[J]. Theoretical and

- Applied Genetics, 1993, 85: 931-936.
- [7] KUHNLEIN U, NI L, WEIGEND S, et al. DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: response to selection for disease resistance and association with egg production [J]. *Animal Genetics*, 1997, 28(2): 116-123.
- [8] 敖金霞, 李 辉, 王启贵, 等. 鹅生长激素基因内含子 2 单核苷酸多态性与体重性状的相关研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2006, 42(7): 9-11.
- [9] 陈国宏. 中国禽类遗传资源[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004.
- [10] 欧阳建华, 孙 汉, 李海华, 等. 鸡胰岛素样生长因子-1 基因的遗传多态性与其体重的关系[J]. *畜牧兽医学报*, 2003, 34(6): 525-529.
- [11] 陈伟生. 畜禽遗传资源调查技术手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [12] SONTHEIMER E J. Bridging sulfur substitutions in the analysis of pre-RNA splicing [J]. *Methods*, 1999, 18(1): 29-37.
- [13] TOSI M. Molecular genetics of C1 inhibitor[J]. *Immunobiology*, 1998, 199: 358-365.
- [14] MALLETT J, HOUHOU L, PAJAK F, et al. The cholinergic locus: ChAT and VAcHT genes [J]. *Physiol Paris*, 1998, 92: 145-147.
- [15] 李长春, 傅 田, 强巴央宗, 等. 藏鸡和隐性白羽鸡 GH 基因的 SNP 检测及其与生长性状间的关联分析[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(11): 2 327-2 332.
- [16] 孙 逊. 生长激素的结构与功能[J]. *国外医学生理、病理科学与临床分册*, 1999, 19(1): 6-9.
- [17] 王 宁, 陈润生. 基于内含子和外显子的系统发育分析的比较[J]. *科学通报*, 1999, 44(19): 2 095-2 102.
- [18] 陈玲玲, 彭贵子, 张伟丽, 等. 突变在基因组进化中的意义[J]. *遗传*, 2006, 28(5): 631-638.
- [19] ZHANG Z, GERSTEIN M. Patterns of nucleotide substitution, insertion and deletion in the human genome inferred from pseudogenes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(18): 5 338-5 348.
- [20] EDWARDS J D, LEE V M, MCCOUCH S R. Sources and predictors of resolvable indel polymorphism assessed using the rice as a model[J]. *Mol Gen Genomics*, 2004, 271: 298-307.