

Mx 基因抗性位点在 12 个地方鸡种中的分布及遗传结构分析

李慧芳, 陈宽维*, 韩 威, 朱云芬, 张学余, 王 强

(中国农业科学院家禽研究所, 扬州 225003)

摘要: 通过 PCR-RFLP 技术检测 Mx 基因 S631N 位点的抗性等位基因 A 和敏感性等位基因 G 在我国地方鸡种中的分布差异。结果表明: PCR-RFLP 能准确检测出抗性等位基因 A 与敏感性等位基因 G 在 12 个地方鸡种内的突变, 抗性等位基因 A 在所有群体内的基因频率平均为 0.304, 敏感性等位基因 G 的频率平均为 0.696; 12 个地方鸡种群体 Mx 基因 S631N 位点的观察杂合度平均为 0.657 2, Shannon 信息指数平均为 0.524 0。在该位点上, 12 个地方鸡种除仙居鸡显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡 ($P < 0.01$) 外, 其余 11 个群体均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P > 0.05$); 经 Ewens-Watterson 中性性检验, 该位点在各群体内(除白耳鸡群体外)都属于中性性选择。基于该位点等位基因频率构建的 UPGMA 聚类图将 12 个地方鸡种分为 3 大类, 聚类结果反映了 12 个地方鸡种在 Mx 基因抗性方面存在的差异和优势。

关键词: 鸡种; Mx 基因; 遗传结构; 聚类分析

中图分类号: S831.2; Q347

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)04-0487-06

The Genetic Distribution and Population Genetic Structure Analysis of Antiviral Resistant Mx Gene Locus in Twelve Chinese Indigenous Chicken Breeds

LI Hui-fang, CHEN Kuan-wei*, HAN Wei, ZHU Yun-fen, ZHANG Xue-yu, WANG Qiang
(Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225003, China)

Abstract: In the experiment, PCR-RFLP technique was used to detect the differences of the resistant and sensitive alleles distribution of S631N locus of Mx gene in twelve Chinese indigenous chicken populations. The results showed that the PCR-RFLP technique properly detected the mutation between resistant allele A and sensitive allele G. Among the twelve populations, the average frequencies of resistant allele A and sensitive allele G were 0.304 and 0.696, respectively. The average value of observed heterozygosity and Shannon's index at this locus were 0.657 2 and 0.524 0, respectively. Except for Xianju chicken, the other eleven populations were all in Hardy-Weinberg equilibrium at this locus ($P > 0.05$). Except for Baier chicken, the Ewens-Watterson test indicated that this locus was neutral in all the other populations. The dendrograms based on allele frequency divided the twelve indigenous chicken populations into three clusters, which reflected the difference and advantage of Mx antiviral property in twelve indigenous chicken populations.

Key words: chicken breed; Mx gene; genetic structure; clustering analysis

国内外学者对禽类抗性基因已开展了广泛的研究, 主要包括与马立克氏病、劳氏肉瘤病等抗性相关的主要组织相容性复合体(MHC)基因^[1-3]; 可抵抗

沙门氏菌、利什曼原虫编码天然抗性巨噬细胞蛋白-1(NRAMP1)基因^[4]及可产生多种广谱抗病毒蛋白的干扰素(IFN)基因^[5]等。到目前为止, 仅发现 Mx

收稿日期: 2008-03-13

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2008BADB2B08); 公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-039)

作者简介: 李慧芳(1974-), 女, 山西阳泉人, 博士, 副研究员, 主要从事家禽遗传育种与家禽资源保护研究, E-mail: lhxf_002@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 陈宽维(1955-), 男, 研究员, 主要从事家禽遗传育种与家禽资源保护研究, E-mail: ckw0079@163.com

蛋白基因(myxo-virus resistance gene)是抗禽流感病毒的基因^[6], Ko等^[7-8]证实631位氨基酸为天冬酰胺(Asn)的Mx蛋白具有抗禽流感病毒和棒状疱疹性口炎病毒活性,631位氨基酸为丝氨酸(Ser)的Mx蛋白不具有抗病毒活性。但国内关于此类研究尚未见报道。我国拥有丰富的地方鸡种资源,这些地方鸡种资源的特色鲜明,抗逆性强,是我国乃至世界上宝贵的家禽抗病育种素材。因此有必要检测Mx蛋白631位氨基酸编码位点的碱基突变在我国地方鸡种中的分布,为开展地方鸡种Mx基因抗性研究提供选材依据和筛选方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

12个地方鸡种为:白耳鸡(BEI)、茶花鸡(CHA)、大骨鸡(DAG)、固始鸡(GUS)、狼山鸡(LAN)、鹿苑鸡(LUY)、藏鸡(TIB)、仙居鸡(XIA)、萧山鸡(XIS)、北京油鸡(YOU)、河南斗鸡(HEG)、泰和乌骨鸡(TAI),这些群体都来自国家地方禽种资源基因库。每个品种随机抽取60只,翅静脉采血,酚/氯仿法提取DNA,-20℃保存备用。

1.2 引物设计和限制性内切酶选择

Mx cDNA序列2032 bp处核苷酸G与A之间的突变,导致Mx蛋白631位氨基酸Ser(AGT)与Asn(AAT)之间发生转换^[7]。根据GenBank中鸡Mx基因序列(Z23168)设计引物,上游引物序列F:5'-CCTTCAGCCTGTTTTCTCCTTTAG-GAA-3'(intron 13),下游引物序列R1:5'-CAGAG-GAATCTGATTGCTCAGGCGAATA-3'(exon 14),引入限制性内切酶*Ssp*I酶切位点;下游引物R2:5'-CAGAGGAATCTGATTGCTCAGGCGT-GTA-3'(exon 14),引入限制性内切酶*Rsa*I酶切位点。引物由上海生工生物工程技术有限公司(Sangon)合成,限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa,Japan)。

1.3 PCR扩增和酶切检测

20 μL PCR反应体系为:10×buffer 2.5 μL, Mg²⁺ 1.5~1.8 mmol·L⁻¹, dNTP 200 μmol·L⁻¹, 引物 0.01 μmol·L⁻¹, *Taq*酶 1 U, DNA模板 50 ng,加ddH₂O至20 μL。PCR反应条件为:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,60℃退火1 min,72℃延伸1 min,30个循环;72℃延伸5 min;4℃保存。PCR扩增产物使用*Ssp*I、*Rsa*I限制性内切

酶37℃消化2.5 h,消化产物经10%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(120 V,3 h)和3%琼脂糖凝胶电泳(100 V,0.5 h)检测。

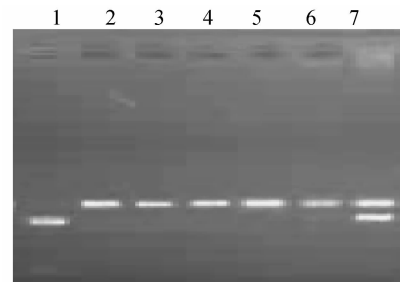
1.4 统计方法

各群体等位基因频率的Hardy-Weinberg平衡检验、Ewens-Watterson中性性检验、群体内遗传变异指标采用POPGENE软件计算;序列测定采用DNAMAN软件进行比对;聚类分析采用PHYLIP软件。

2 结果与分析

2.1 酶切产物检测

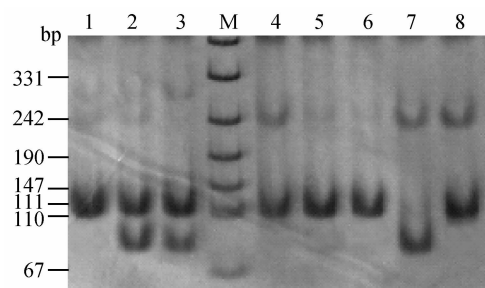
PCR扩增产物长度为100 bp(图略),经限制性内切酶*Ssp*I、*Rsa*I酶切后产生3种基因型,分别定义为AA、AG和GG。等位基因A存在*Ssp*I酶切位点,缺失*Rsa*I酶切位点;等位基因G存在*Rsa*I酶切位点,缺失*Ssp*I酶切位点。酶切产物电泳图见图1—图4。



AA. 1;GG. 2-6; AG. 7

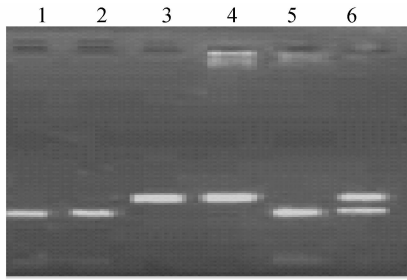
图1 *Ssp*I酶切产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose electrophoresis of digested fragments by *Ssp*I



AA. 7; AG. 2,3; GG. 1,4-6,8; M. DNA marker

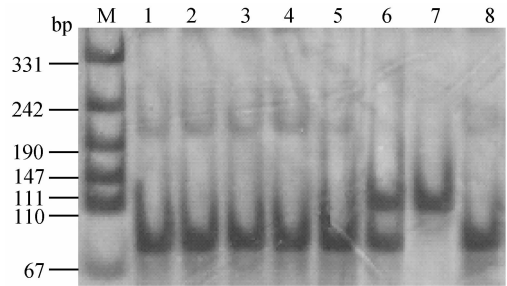
图2 *Ssp*I酶切产物聚丙烯酰胺凝胶电泳图
Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis of digested fragments by *Ssp*I



AA. 3,4;GG. 1,2,5; AG. 6

图 3 Rsa I 酶切产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Agarose electrophoresis of digested fragments by Rsa I



AA. 7;AG. 6;GG.1~5,8;M. DNA marker

图 4 Rsa I 酶切产物聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 4 Polyacrylamide gel electrophoresis of digested fragments by Rsa I

2.2 序列测定

选择 AA 和 GG 基因型的 DNA 样本进行测

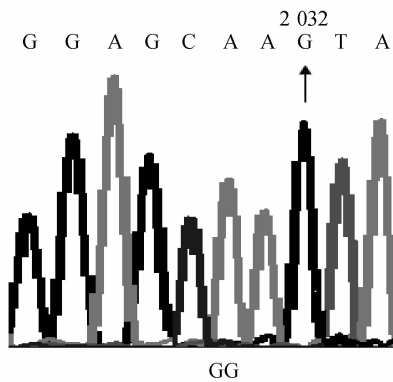
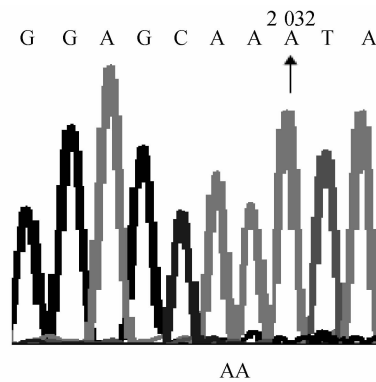


图 5 不同基因型测序图谱

Fig. 5 Sequence of different genotypes

序,测序结果见图 5。



2.3 各群体 Mx 基因 S631N 位点的等位基因频率分布

12 个地方鸡种中,大骨鸡、北京油鸡和河南斗鸡在 Mx 基因 S631N 抗性位点上呈现极端分布,缺失 AA 基因型。运用适合性检验和似然率检验 2 种方法对抗性位点的基因频率分布进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,结果除仙居鸡显著偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P < 0.01$)外,其余各群体内该位点均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态($P > 0.05$)(表 1)。

2.4 各群体 Mx 基因 S631N 位点的中性性检验

12 个地方鸡种群体 Mx 基因 S631N 抗性位点分布情况的 Ewens-Watterson 中性性检验(表 2)结果表明,除在白耳鸡群体内位于 95% 置信区间之外,在其余各群体内均位于 95% 置信区间,属于中性性位点。

2.5 Mx 基因 S631N 位点的群体遗传变异分析

由表 3 可知,北京油鸡的观察杂合度(0.933 3)最高,藏鸡的观察杂合度(0.416 7)最低。Levene's 期望杂合度的预测趋势与观察值相一致,Nei's 期望杂合度的预测趋势与观察值差异较大。白耳鸡的有效等位基因数(1.999 4)最高,油鸡(1.068 9)最低。12 个地方鸡种群体的 Shannon 信息指数平均为 0.524 0。

2.6 基于 Mx 基因 S631N 位点等位基因频率的聚类分析

基于 Mx 基因 S631N 抗性位点等位基因频率构建的 UPGMA 聚类图(图 6),将 12 个地方鸡种分为 3 大类:第一类包括白耳鸡、茶花鸡、藏鸡;第二类包括大骨鸡、北京油鸡、鹿苑鸡、河南斗鸡;第三类包括固始鸡、泰和乌骨鸡、狼山鸡、仙居鸡、萧山鸡。

表 1 12 个地方鸡种群体 Mx 基因 S631N 位点的等位基因频率和基因型频率

Table 1 The frequency of genotypes and alleles of S631N locus in 12 Chinese indigenous populations

品种 Breed	数量 No.	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency		适合性检验法 Chi-square test		似然率检验法 Likelihood ratio test	
		AA	AG	GG	A	G	χ^2	<i>P</i>	G^2	<i>P</i>
萧山 XIS	60	0.033	0.433	0.533	0.250	0.750	2.609 8	0.1062	3.130 9	0.076 8
白耳 BEI	60	0.233	0.517	0.250	0.492	0.508	0.038 1	0.8451	0.038 1	0.845 1
藏鸡 TIB	60	0.283	0.583	0.133	0.575	0.425	2.057 8	0.1514	2.087 2	0.148 5
泰和 TAI	60	0.100	0.433	0.467	0.317	0.683	0.003 1	0.9559	0.003 1	0.955 9
仙居 XIA	60	0.317	0.100	0.583	0.367	0.633	37.841 4	0	41.139 5	0
鹿苑 LUY	60	0.033	0.283	0.683	0.175	0.825	0.045 4	0.8312	0.044 2	0.833 4
大骨 DAG	60	0.000	0.117	0.883	0.058	0.942	0.195 7	0.6581	0.371 9	0.541 9
油鸡 YOU	60	0.000	0.067	0.933	0.033	0.967	0.053 1	0.8177	0.103 4	0.747 7
固始 GUS	60	0.100	0.450	0.450	0.325	0.675	0.017 9	0.8935	0.017 9	0.893 3
狼山 LAN	60	0.033	0.500	0.467	0.283	0.717	3.001 9	0.0831	3.365 6	0.066 5
斗鸡 HEG	60	0.000	0.250	0.750	0.125	0.875	1.134 6	0.2867	2.007 2	0.156 5
茶花 CHA	60	0.467	0.367	0.167	0.650	0.350	2.469 9	0.1160	2.428 7	0.119 1
平均 Average	/	0.133	0.342	0.525	0.304	0.696				

表 2 12 个地方鸡种群体 Mx 基因 S631N 位点的中性性检验

Table 2 The Ewens-Watterson test for neutrality of S631N locus in 12 Chinese indigenous populations

品种 Breed	观察值 Observed F*	F 平均值 Mean F*	方差 SE*	95%置信下限 L95*	95%置信上限 U95*
萧山 XIS	0.638 0	0.818 0	0.027 3	0.502 3	0.983 5
白耳 BEI	0.500 1	0.821 8	0.026 4	0.503 5	0.983 8
藏鸡 TIB	0.511 2	0.813 4	0.027 9	0.503 5	0.983 5
泰和 TAI	0.567 2	0.816 2	0.028 3	0.502 2	0.983 8
仙居 XIA	0.535 6	0.820 3	0.027 7	0.503 5	0.983 8
鹿苑 LUY	0.711 2	0.813 5	0.028 4	0.502 2	0.983 8
大骨 DAG	0.890 1	0.813 9	0.028 2	0.501 2	0.983 8
油鸡 YOU	0.935 6	0.811 2	0.027 9	0.502 2	0.983 8
固始 GUS	0.561 3	0.812 8	0.029 3	0.502 2	0.983 8
狼山 LAN	0.593 9	0.808 3	0.029 9	0.501 2	0.983 8
斗鸡 HEG	0.781 2	0.814 2	0.027 1	0.501 2	0.983 8
茶花 CHA	0.545 0	0.814 0	0.028 9	0.501 2	0.983 8
平均 Average	0.647 5	0.814 8	0.028 1		

3 讨论

3.1 Mx 基因 S631N 抗性位点检测和等位基因频率分布

本试验采用的 2 种限制性内切酶均能准确检测出地方鸡种 Mx 基因抗性位点 A/G 间的突变, 12 个地方鸡种群体内抗性等位基因 A 的频率平均为 0.304, 敏感性等位基因 G 的频率平均为 0.696。

Seyama 等^[9]检测的 17 个鸡品种(包括白莱航、白洛克、洛岛红及名古屋等日本鸡种)36 个品系及 3 个原鸡品种共计 280 个个体该位点等位基因频率分布为 A:0.592, G:0.408; Balkissoon 等^[10]检测的 28 个蛋用、肉用和兼用型祖代鸡及其商品系共计 1 275 个个体该位点等位基因频率分布: 蛋用型 A 为 0.779, G 为 0.221; 肉用型 A 为 0.021, G 为 0.979; 兼用型 A 为 0.281, G 为 0.719。本研究结果与上

表 3 Mx 基因 S631N 位点的群体遗传变异分析

Table 3 The genetic variation analysis of S631N locus in 12 indigenous chicken breeds

品种 Breed	观察值		Levene's 期望值		Nei's 期望杂合度	有效等位	信息指数 Shannon's index
	Observed value		Expected value		Expected	基因数	
	Hom	Het	Hom	Het	heterozygosis(<i>H</i>)	<i>N_e</i>	
萧山 XIS	0.553 9	0.440 7	0.634 9	0.365 1	0.362 0	1.567 3	0.547 9
白耳 BEI	0.483 3	0.516 7	0.495 9	0.504 1	0.499 9	1.999 4	0.693 0
藏鸡 TIB	0.416 7	0.583 3	0.507 1	0.492 9	0.488 8	1.956 0	0.681 9
泰和 TAI	0.566 7	0.433 3	0.563 6	0.436 4	0.432 8	1.763 0	0.624 3
仙居 XIA	0.900 0	0.100 0	0.531 7	0.468 3	0.464 4	1.867 2	0.657 2
鹿苑 LUY	0.716 7	0.283 3	0.708 8	0.291 2	0.288 8	1.406 0	0.463 7
大骨 DAG	0.883 3	0.116 7	0.889 2	0.110 8	0.109 0	1.123 4	0.222 4
油鸡 YOU	0.933 3	0.066 7	0.935 0	0.065 0	0.064 4	1.068 9	0.146 1
固始 GUS	0.550 0	0.450 0	0.557 6	0.442 4	0.438 7	1.781 7	0.630 6
狼山 LAN	0.500 0	0.500 0	0.590 5	0.409 5	0.406 1	1.683 8	0.596 1
斗鸡 HEG	0.750 0	0.250 0	0.774 9	0.220 6	0.218 8	1.280 0	0.376 8
茶花 CHA	0.633 3	0.366 7	0.541 2	0.458 8	0.455 0	1.834 9	0.647 4
平均 Average	0.657 2	0.342 2	0.644 2	0.355 4	0.352 3	1.610 9	0.524 0

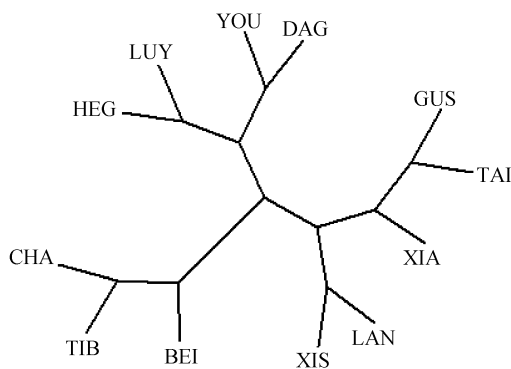


图 6 12 个地方鸡种 UPGMA 聚类图

Fig. 6 UPGMA dendrogram of 12 chicken breeds

述文献的结果均存在一定差异。据 Li 等^[11]推测造成国内外不同鸡种在该位点抗性等位基因频率分布上存在差异的原因,可能是环境的改变(如禽流感等)及对生产性能的选择强度作用造成的;但 Balkissoon 等认为虽然等位基因频率在不同类型品种(品系)中发生了分离并存在较大差异,但这种差异在各类型形成之初(即祖代间)可能就已经存在,而不是由环境选择作用、生产性能的选择强度作用或通过连锁基因的“搭车”作用造成的。

本试验中,Hardy-Weinberg 平衡检验表明,该位点等位基因频率在各地方鸡种群体中已经固定,并没有进行过针对性的人工选择;而且,Ewens-Watterson 中性检验表明该位点属选择中性性。这

与 Hou 等^[12]通过序列比对分析不同物种 Mx 基因进化模式所获得的结果相一致;而且我国地方鸡种在品种形成历史过程中没有经历高强度的生产性能选择,因此推测该位点等位基因频率在我国地方鸡种群体中的差异,也有可能是在各品种形成之初就已经存在。

3.2 Mx 基因 S631N 位点的群体遗传变异分析和聚类分析

遗传杂合度和 Shannon 信息指数^[13]是衡量群体间遗传多态性及变异分化水平的测度。本研究中,12 个地方鸡种群体内 Mx 基因 S631N 位点的平均观察杂合度达 0.657 2,平均信息指数为 0.524 0,表明在该基因位点上各群体的遗传多样性较丰富,遗传变异程度较高;基于该位点等位基因频率构建的 UPGMA 聚类图将 12 个地方鸡种分为 3 大类,反映了 12 个地方鸡种在 Mx 基因 S631N 位点抗性方面存在的差异和优势:第一类为高抗性类别,A 频率 0.49~0.65,包括白耳鸡、茶花鸡、藏鸡;第二类为低抗性类别,A 频率 0.03~0.18,包括大骨鸡、北京油鸡、鹿苑鸡、河南斗鸡;第三类为中等抗性类别,A 频率 0.25~0.37,包括固始鸡、泰和乌骨鸡、狼山鸡、仙居鸡、萧山鸡。关于上述聚类结果是否与各品种实际抗性表现相符合,目前正在对不同基因型群体进行攻毒试验加以验证,研究结果将进一步为选育素材的选择提供理论依据。

4 结 论

4.1 建立的 PCR-RFLP 法能准确检测出 Mx 基因抗性等位基因 A 与敏感性等位基因 G 在地方鸡种内的突变。

4.2 该位点属于选择中性,12 个地方鸡种群体(除仙居鸡)均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

参考文献:

- [1] 徐日福,李奎,陈国宏,等.中国地方鸡种 MHC-BLII 新等位基因的遗传多态性研究[J].遗传学报,2007,34(2):109-118.
- [2] NIKOLICH Z J, FREMONT D H, MILEY M J, et al. The role of MHC-polymorphism in anti-microbial resistance[J]. *Microbes and Infection*, 2004, 6(5): 501-512.
- [3] NIIKURA M, LIU H C, DODGSON J B, et al. A comprehensive screen for chicken proteins that interact with proteins unique to virulent strains of Marek's disease virus[J]. *Poultry Science*, 2004, 83: 1117-1123.
- [4] LIU W, KAISER M G, LAMONT S J, et al. Natural resistance-associated macrophage protein 1 gene polymorphisms and response to vaccine against or challenge with *Salmonella enteritidis* in young chicks[J]. *Poultry Science*, 2003, 82(2): 259-266.
- [5] 韦琴,彭贵青,金梅林,等.鸡 r-干扰素基因的克隆、原核表达及抗病毒效果研究[J].生物工程学报,2006,22(5):737-743.
- [6] 丁兆忠,苗向阳,孙世铎.抗禽流感病毒转基因鸡研究进展[J].中国畜牧兽医,2006,33(11):41-43.
- [7] KO J H, JIN H K, ASANO A, et al. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene[J]. *Genome Research*, 2002, 12: 595-601.
- [8] KO J H, TAKADA A, MITSUHASHI T, et al. Native antiviral specificity of chicken Mx protein depends on amino acid variation at position 631[J]. *Animal Genetics*, 2004, 35: 119-122.
- [9] SEYAMA T, KO J H, OHE M, et al. Population research of genetic polymorphism at amino acid 631 in chicken Mx protein with different antiviral activity[J]. *Biochemical Genetics*, 2006, 44(10): 432-443.
- [10] BALKISSOON D, STAINES K, McCAULEY J, et al. Low frequency of the Mx allele for viral resistance predates recent intensive selection in domestic chickens[J]. *Immunogenetics*, 2007, 59(8): 687-691.
- [11] LI X Y, QU L J, YAO J F, et al. Skewed allele frequencies of an Mx gene mutation with potential resistance to avian influenza virus in different chicken populations[J]. *Poultry Science*, 2006, 85(7): 1327-1329.
- [12] HOU Z C, XU G Y, SU Z, et al. Purifying selection and positive selection on the myxovirus resistance gene in mammals and chickens[J]. *Gene*, 2007, 396: 188-195.
- [13] 朱砺,李学伟,帅素容,等. MyoD 基因在不同猪种中的分布及群体遗传结构分析[J].畜牧兽医学报,2007,38(1):1-7.