

# 鸡 *ev21* 占位区和未占位区重复序列结构与羽速表型关系研究

张乐超<sup>1</sup>, 王 晗<sup>3</sup>, 张秀玲<sup>1,4</sup>, 刘春杨<sup>1</sup>, 王 麒<sup>1</sup>, 周荣艳<sup>1</sup>, 李祥龙<sup>2\*</sup>, 李兰会<sup>1\*</sup>

(1. 河北农业大学动物科技学院, 保定 071001; 2. 河北科技师范学院, 秦皇岛 066600;

3. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100; 4. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

**摘要:** 本试验旨在探讨鸡羽速基因型 *Hae* III 酶切鉴定方法的分子基础。以羽型明确的 6 个品系(太行鸡、坝上长尾鸡、大午粉鸡、海兰灰鸡、海兰褐鸡、海兰灰祖代四系鸡)313 份鸡基因组为模板, 利用 *Hae* III 酶切的 RFLP 试验进行羽速验证, 并对 *ev21* 占位区(OS)和非占位区(US)共有序列以及 OS 区特有序列进行酶切试验。结果表明: 1) Blast 分析发现 1 450 bp 为鸡 *ev21* 的 US 区域片段。海兰灰及其祖代四系和大午粉祖代的羽速基因型与 *Hae* III 酶切结果完全一致, 但太行慢羽公鸡、慢羽母鸡、坝上长尾慢羽公鸡和海兰褐慢羽鸡的一致率分别为 40.0%、27.6%、28.6% 和 0.0%; 2) 太行鸡和坝上长尾鸡 *ev21* 的 OS 和 US 区共有序列 538 bp 酶切鉴定结果与表型一致率达到 92% 以上, 其他品系(除海兰褐快羽公鸡为 0.0%)均为 100.0%; 3) 鸡 *ev21* 的 OS 区特异序列 1 440 bp 的扩增阳性率在太行慢羽公鸡、慢羽母鸡和快羽公鸡中的阳性率分别为 94.1%、65.5% 和 0.0%, 在海兰灰祖代鸡中分别为 100.0% 和 0.0%, 并且 1 440 片段不能被 *Hae* III 切开。综合分析 6 个品系 *ev21* 的 OS 和 US 区结构特征, 认为 US 区 *Hae* III 酶切位点变异不能作为慢羽和内源病毒 *ev21* 的鉴定依据, 而 OS 区的 *ev21* 插入与 1 440 bp 序列 *Hae* III 酶切位点的 A→G 突变和八碱基重复是紧密连锁的。

**关键词:** 鸡; 羽速; 占位区; 未占位区; *ev21*; *Hae* III 酶切

中图分类号: S831.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)06-0990-10

## Relation between Feather Speed and Gene Structure of Repeated Sequences of *ev21* Occupied-site and Unoccupied-site Regions in Chicken

ZHANG Le-chao<sup>1</sup>, WANG Han<sup>3</sup>, ZHANG Xiu-ling<sup>1,4</sup>, LIU Chun-yang<sup>1</sup>, WANG Qi<sup>1</sup>,  
ZHOU Rong-yan<sup>1</sup>, LI Xiang-long<sup>2\*</sup>, LI Lan-hui<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University,

Baoding 071001, China; 2. Hebei Normal University of Science & Technology,

Qinhuangdao 066600, China; 3. College of Animal Science and Technology,

Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 4. Institute of Animal Science,

Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** The aim of this study was to explore the molecular basis of *Hae* III digestion detection of genotypes of chicken feather speed in chicken. Three hundred and thirteen individuals in 6 strains of chickens (Taihang, Bashang Long-tail, Dawufen, Hy-line Gray, Hy-line Brown, progenitor of Hy-line Gray) with definite phenotype of feather speed were detected with RFLP. The common region of occupied site(OS) and unoccupied site(US) for 538 bp, also the specific region of OS for

收稿日期: 2017-01-06

基金项目: 河北省现代农业技术体系蛋鸡产业创新团队(HBCT2013090206); 河北省自然科学基金(C2015204176)

作者简介: 张乐超(1991-), 男, 河北藁城人, 硕士, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: 1596653383@qq.com

\* 通信作者: 李兰会, 副教授, 硕士生导师, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: lanhui13@163.com; 李祥龙, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: lixianglongen@yahoo.com

1 440 bp, were digested with *Hae* III. The results showed that: 1) The fragment for 1 450 bp was the unoccupied-site repeated sequence for *ev21* ascertained by Blast. The digestion detection results of *Hae* III for 1 450 bp were completely consistent with the phenotype of HY-line Gray and progenitors of HY-line Gray and Dawufen, but their consistency with Taihang slow-feather cock, Taihang slow-feather hen, Bashang Long-tail slow-feather cock and HY-line Brown slow-feather chicken were 40.0%, 27.6%, 28.6% and 0.0%, respectively. 2) The consistency was above 92% between digestion results of 538 bp and phenotype in Taihang and Bashang Long-tail chicken, and the other strains were 100.0% except for HY-line Brown fast-feather cock with 0.0%. 3) The positive rate of 1 440 bp fragment PCR in slow-feather Taihang cock, Taihang hen and fast-feather Taihang cock was 94.1%, 65.5% and 0.0%, respectively, and it was 100.0% and 0.0% in slow-feather and fast-feather progenitors of Hy-line gray, respectively. The 1 440 bp fragment could not be digested by *Hae* III and it could be a detection basis for *ev21*. The structure was analyzed comprehensively for the OS and US of *ev21* in 6 strains of chicken and it was concluded that the site recognized by *Hae* III enzyme in US could not be a detection base for slow-feather and *ev21*, while *ev21* insertion in OS and the site for *Hae* III digestion in 1 440 bp were linked with the mutation of A → G and 8 bases repeated.

**Key words:** chicken; feather speed; occupied-site region; unoccupied-site region; *ev21*; *Hae* III digestion

A. S. Serebrovsky 首次提出影响羽毛生长发育的羽速基因位于 Z 染色体,其中快羽基因 k+ 为野生型隐性基因,而慢羽基因 K 为显性突变基因<sup>[1]</sup>。快慢羽速表型表现为雏鸡主翼羽和副主翼羽长度的明显差异,利用羽速表型进行雏鸡性别自体鉴别的技术在种禽业已被广泛推广使用<sup>[2-3]</sup>。Z 染色体基因序列 180 kb 的重复是慢羽形成的原因之一,慢羽 K 基因至少在一条 Z 染色体上存在两个同源区域:整合有内源白血病病毒 *ev21* 基因的占位区(OS)和无 *ev21* 的非占位区(US),慢羽鸡部分复制的 *PRLR* 和 *SPEF2* 基因将两个整合位点分隔开,US 区位于 Z 染色体 *PRLR* 和 *SPEF2* 基因间,而快羽 k+ 基因只有 US 区<sup>[4-6]</sup>。内源逆转录病毒 *ev21* 插入与羽速相关,但并不是慢羽表型的唯一原因<sup>[7]</sup>。

羽速类型的分子基础研究较深入,并建立了多种分子检测方法,M. H. Tixier-Boichard 等建立了基于 OS 和 US 区差异的 *ev21* 检测方法<sup>[8]</sup>。I. Levin 等发现慢羽 OS 区存在 1 个 A>G 转换,引起 TTAGT-TAG 8 个碱基的插入,破坏了 US 区 *Hae* III 的酶切识别位点 GGCC 序列,基于该位点变异建立了羽速表型的分子检测方法,并认为慢羽表型与 *ev21* 插入存在完全的遗传相关<sup>[9-10]</sup>。F. Iraqi 等利用 US 区 1 450 bp 片段 *Hae* III 酶切位点的差异性对白来航慢羽公鸡的基因型进行了鉴别<sup>[11]</sup>,认为该酶切检测方法可能不适用其他品种。M. G. Elferink 等建立了基于

176 324 bp 重复区域内 *PRLR* 和 *SPEF2* 基因连接断裂点的慢羽基因型检测方法<sup>[12]</sup>。

近年来,1 450 bp 酶切鉴定快慢羽的方法在国内广泛用于种鸡群的建立,李培周等利用该技术检测了贵妃鸡的羽速基因<sup>[13]</sup>,并对清远麻鸡进行了羽速分型<sup>[14]</sup>;李珊珊等利用该方法建立了麒麟公鸡纯合慢羽群体<sup>[15]</sup>。李竞一等采用同样的方法对慢羽鸡的 *ev21* 内源病毒进行了筛选<sup>[16]</sup>。

本试验利用 1 450 bp 酶切检测方法<sup>[11]</sup>,分析不同品种鸡 US 区结构特征与慢羽表型关系的差异性,建立 US 和 OS 区共有区域以及 OS 区特异区域的 *Hae* III 酶切方法,分析鸡的 US 和 OS 区以及 *ev21* 插入的结构特征,明确 1 450 bp 酶切方法应用于快慢羽鉴别和 *ev21* 病毒检测的分子基础欠缺性,为慢羽的遗传育种以及快慢羽表型的分子鉴定方法提供理论依据和参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

采集不同品种的鸡血液 DNA,包括河北省石家庄赞皇县天然公司柴鸡养殖场的太行鸡(经表型鉴定)、张家口坝上长尾鸡(经表型鉴定)、河北满城种鸡孵化场的海兰灰鸡(羽速自别雌雄,公鸡为慢羽杂合,母鸡为快羽)、河北满城种鸡孵化场的海兰褐鸡(羽色自别雌雄,羽速表型鉴定)、河北徐水大午农牧

集团种禽有限公司的大午粉祖代慢羽公鸡(白菜航品系)、河北邯郸华裕家禽有限公司的海兰灰祖代A、B、C和D四系鸡(A和B为快羽公鸡和母鸡,C和D为慢羽公鸡和快羽母鸡)。

## 1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 参考李竞一等<sup>[16]</sup>的鸡羽速基

表1 PCR反应引物

Table 1 Primers for PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/℃ T <sub>m</sub>	产物长度/bp Length of products
F9	ATTGGTACTACAGAGAAGGTAGGAATATC	56	1 450
R23	GTAAGACTAACACAGTATTCTCGAGT		
538S	TTGATATGGTACTGGTGGAT	57	538
538A	TAGGCAAAGTGGAAGACA		
1440S	AGCCAGAGGCAACTTGAATA	68	1 440
1440A	CTGCTCCATACGGTACACCA		

1.2.2 PCR反应体系和反应程序 1 450、538和1 440 bp序列PCR体系均: Mix 5 μL, 正、反引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各0.5 μL, 基因组0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 2.5 μL。1 450 bp序列反应程序: 94℃预变性5 min; 94℃变性1 min, 56℃退火90 s, 72℃延伸2 min, 32个循环; 72℃延伸15 min。538 bp序列反应程序: 95℃预变性5 min; 95℃变性30 s, 57℃退火30 s, 72℃延伸33 s, 32个循环; 72℃延伸7 min。1 440 bp序列PCR反应程序: 95℃预变性5 min; 95℃变性30 s, 68℃退火90 s, 30个循环; 72℃延伸7 min。

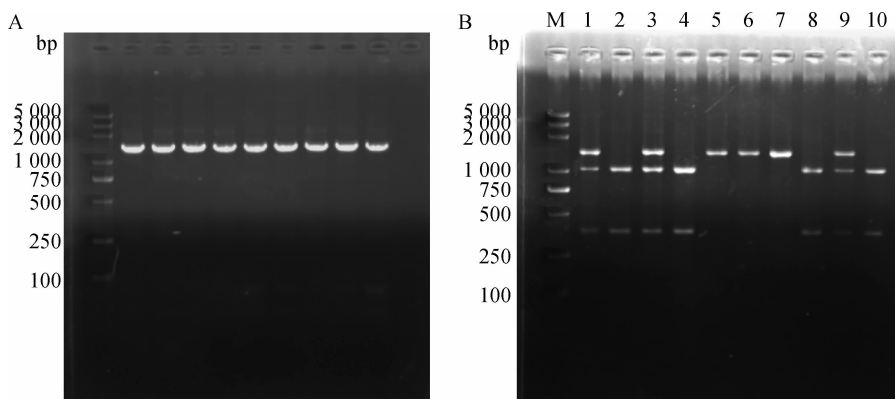
因型分子鉴定引物(F9和R23)扩增1 450 bp序列。根据NCBI数据库ev21病毒未占位区序列(X54093)和占位区序列(X54094)的共有序列, 设计包含Hae III酶切位点的引物对538S和538A; 基于X54094特异序列, 设计包含Hae III酶切位点的引物对1440S和1440A。引物序列见表1。

Hae III酶切体系和反应程序: 1 450、538和1 440 bp PCR产物各4 μL, ddH<sub>2</sub>O 13 μL, 10×M Buffer 2 μL, Hae III酶1 μL。混匀离心后, 37℃过夜酶切9~12 h, 酶切产物经1.5%琼脂糖凝胶检测。

## 2 结果

### 2.1 ev21的US区1 450 bp序列PCR和Hae III酶切鉴定

ev21内源病毒US区1 450 bp PCR扩增目的条带(图1A), 经Hae III酶切后, 凝胶检测如图1B所示。



A. 1 450 bp PCR产物。B. 1 450 bp片段Hae III酶切结果: 2、4、8、10. 野生型; 5、6、7. 突变型; 1、3、9. 杂合型  
A. PCR products of 1 450 bp. B. Hae III digestion result of 1 450 bp: 2, 4, 8, 10. Wild type; 5, 6, 7. Mutant type; 1, 3, 9. Heterozygous type

图1 太行鸡US区1 450 bp PCR和酶切结果

Fig. 1 Result of PCR and digestion of 1 450 bp in US of Taihang chicken

经华大测序获得的 1 450 bp 碱基序列与 NCBI 中 Nucleotide 数据库比对后,明确 1 450 bp 序列为鸡内源白血病毒 *ev21* 未占区序列,其中 g. CTTGGCCACT 的 GGCC 为 *Hae* III 内切酶的识别位点,酶切后表现为 1 068 和 392 bp 两条带(图 1B 的第 2、4、8 和 10 泳道)为野生型;g. CTTGGCCACT 序列中的第 1 个 G 突变为 A,并在第 2 个 G 后插入 TTAGTTAG 8 个碱基,序列变为 g. CTTAGTTTAGTTAGCCACT,形成 TTAG 4 碱基的连续 3 次重复,*Hae* III 酶切后表现为 1 条带(图 1B 的第 5、6 和 7 泳道)的突变型;如果鸡基因组 US 区为杂合体,存在 g. CTTGGCCACT 和 g. CTTAGTTTAGTTAGCCACT 两种序列,酶切后表现为 3 条带(图 1B 的 1、3 和 9 泳道)的杂合型。

参照 F. Iraqi 和李竞一等的研究结果<sup>[11,16]</sup>:公鸡野生型酶切后 2 条带为快羽,突变型酶切后 1 条带为慢羽纯合体,杂合型酶切后 3 条带为慢羽杂合体;母鸡突变型为慢羽,野生型为快羽。对经表型鉴定的太行鸡(126 只)、坝上长尾鸡(36 只)、大午粉祖代鸡(20 只)、海兰褐鸡(47 只)、海兰灰鸡(10 只)和海兰灰祖代 A、B、C 和 D 四系鸡(74 只)进行 1 450 bp 的 RFLP 检测,汇总 6 个品种/系快慢羽公母鸡的酶切结果,见表 2。

根据 US 区 1 450 bp 酶切结果,从表 2 得出各品种/系鸡表型与酶切结果的矛盾性。25 只太行快

羽公鸡中,2 只鉴定为慢羽杂合体;35 只慢羽公鸡中 21 只为快羽,14 只为慢羽杂合体;37 只快羽母鸡中 1 只鉴定为慢羽;29 只慢羽母鸡中 21 只为快羽个体,8 只为慢羽杂合体。太行快羽公鸡、慢羽公鸡、快羽母鸡和慢羽母鸡酶切结果与表型分歧率分别为 8.0%、60.0%、2.7% 和 72.4%。36 只慢羽坝上长尾公鸡中 10 只鉴定为慢羽杂合体、25 只为快羽、1 只慢羽纯合体,与表型鉴定分歧率为 71.4%。可以发现慢羽表型与酶切结果出现严重矛盾。20 只大午粉祖代慢羽公鸡全部鉴定为慢羽纯合体,8 只海兰灰商品代慢羽公鸡全部鉴定为慢羽杂合体,2 只海兰灰商品代快羽母鸡鉴定为快羽,海兰灰祖代 A、B 系鉴定为快羽,C 系鉴定为慢羽公鸡纯合体,D 系鉴定为快羽母鸡,这 6 个品系的表型与酶切结果完全一致,分歧率为 0.0%。但需要指出的是海兰灰祖代 D 系为直接引进慢羽祖代种鸡,但经 1 450 bp 酶切检测为快羽(课题组采用其他分子检测方法验证为快羽母鸡)。海兰褐 11 只快羽公鸡和 13 只快羽母鸡酶切结果均为 2 条带,酶切鉴定与表型鉴定完全一致;而 12 只慢羽公鸡和 11 只慢羽母鸡酶切也为 2 条带,鉴定结果与表型完全不符。

以上结果表明,太行鸡、坝上长尾鸡和海兰褐的 US 区 1 450 bp 八碱基插入突变与羽速表型不相关,但该突变在海兰灰系列即白莱航品系中与慢羽表型紧密连锁。

表 2 6 个品种/系鸡 1 450 bp 片段酶切结果

Table 2 Digestion result of 1 450 bp for 6 breeds/strains of chicken

酶切类型 Types of digestion	太行鸡 Taihang				坝上长尾鸡 Bashang	大午粉 Dawufen	海兰灰 Hy-line Gray	
	公鸡 Cock		母鸡 Hen		公鸡 Cock	公鸡 Cock	公鸡 Cock	母鸡 Hen
	快 Fast	慢 Slow	快 Fast	慢 Slow	慢 Slow	慢 Slow	慢 Slow	快 Fast
突变型 Mutant type	0	0	1	0	1	20	0	0
野生型 Wild type	23	21	36	21	25	0	0	2
杂合型 Heterozygous type	2	14	0	8	10	0	8	0
分歧率/% Divergence rate	8.0	60.0	2.7	72.4	71.4	0.0	0.0	0.0

酶切类型 Types of digestion	海兰褐 Hy-line Brown				海兰灰祖代 Progenitor of Hy-line Gray			
	公鸡 Cock		母鸡 Hen		A 系	B 系	C 系	D 系
	快 Fast	慢 Slow	快 Fast	慢 Slow	A line	B line	C line	D line
突变型 Mutant type	0	0	0	0	0	0	18	0
野生型 Wild type	11	12	13	11	15	15	0	26
杂合型 Heterozygous type	0	0	0	0	0	0	0	0
分歧率/% Divergence rate	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0



### 2.3 占位区 1 440 bp 序列 PCR 和酶切结果

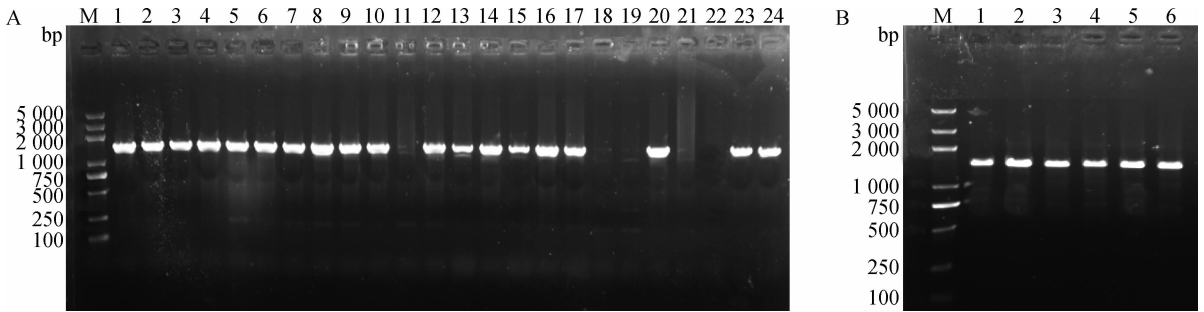
设计 1440S 和 1440A 引物扩增 OS 区特异序列 1 440 bp,琼脂糖凝胶电泳可见亮度很高的目的条带(图 3A)。1 440 bp 产物与 T3 载体连接测序后显示序列 *Hae* III 酶切位点处确有 8 个碱基插入,酶切位点消失。

图 3A 显示 11、18、19、21 和 22 泳道没有目的条带,1 440 bp 产物为占位区特异序列,上游引物与内源病毒 *ev21* 基因结合,鸡基因组中如无 *ev21* 插入,则扩增不出该目的片段。图 3B 为太行鸡 1 440 bp 酶切结果,均未被 *Hae* III 切开。太行鸡 121 个个体中的 52 个为 1 440 bp 扩增阳性,海兰灰祖代四系鸡 60 个个体中的 15 个为扩增阳性,全部没有

被 *Hae* III 切开。

由表 4 可知,1 440 bp 扩增检测的 121 只太行鸡,其中 34 只慢羽公鸡阳性率 94.1%,29 只慢羽母鸡阳性率 65.5%,25 只快羽公鸡阳性率为 0.0%,33 只快羽母鸡阳性率为 3.0%。海兰灰 A、B 和 D 系 45 个快羽个体全部为阴性,C 系 15 个慢羽个体全部为阳性。课题组采用其他分子检测方法对 *ev21* 的阳性率进行了检测,*ev21* 阳性个体的 1 440 bp 扩增也为阳性。

OS 区 1 440 bp 序列的 *Hae* III 酶切位点消失,同时该片段的 PCR 结果与鸡内源白血病病毒 *ev21* 的检测完全一致,可以将 1 440 bp 的 PCR 检测作为 *ev21* 的筛查方法。



A. 1 440 bp 片段 PCR 产物;B. 1 440 bp 片段的 *Hae* III 酶切结果

A. PCR products of 1 440 bp; B. *Hae* III digestion result of 1 440 bp

图 3 太行鸡 OS 区特异序列 1 440 bp PCR 产物和酶切结果

Fig. 3 PCR and digestion result of 1 440 bp for OS special region of Taihang chicken

表 4 太行鸡和海兰灰祖代鸡 1 440 bp 片段 PCR 结果

Table 4 PCR result of 1 440 bp for Taihang and progenitor of Hy-line Gray chickens

项目 Item	太行鸡 Taihang chicken				海兰灰祖代 Progenitor of Hy-line Gray			
	慢羽 Slow-feather		快羽 Fast-feather		A 系 A line	B 系 B line	C 系 C line	D 系 D line
	公鸡 Cock	母鸡 Hen	公鸡 Cock	母鸡 Hen				
阳性 Positive	32	19	0	1	0	0	15	0
阴性 Negative	2	10	25	32	15	15	0	15
阳性率/% Positive rate	94.1	65.5	0.0	3.1	0.0	0.0	100.0	0.0

### 2.4 占位区、未占位区和 *ev21* 插入结构特征

由 US 区 1 450 bp、*ev21* 占位区 1 440 bp、US 区和 OS 区共有序列 538 bp *Hae* III 酶切以及 *ev21* 的检测结果,推断得出太行鸡、海兰灰鸡、海兰褐鸡快慢羽 Z 染色体上 US 区、OS 区的 *Hae* III 酶切位点以及 *ev21* 插入的结构特征(图 4)。

由表 5 可知,太行慢羽公鸡的主要结构特征(图

4A)占总体的 58.1%,US 区 *Hae* III 酶切位点为野生型,OS 区有 *ev21* 的插入并失去酶切位点;第二种结构特征为:US 区酶切位点为杂合型、OS 区有 *ev21* 插入并失去酶切位点,该类型结构占总体的 35.5%(图 4B);第三种结构 US 区酶切位点为杂合型、OS 区是 US 区的完全重复或酶切位点发生突变,占 6.4%(图 4C)。

太行慢羽母鸡也有 3 种结构特征,第 1 种与慢羽公鸡的主要结构(图 4A)一致,占 65.5%;第 2 种与慢羽公鸡的第 3 种结构(图 5C)一致,占 27.6%;第 3 种结构特征为 US 区的 *Hae* III 酶切位点呈野生型纯合状态,OS 区为 US 区的完全重复(图 4D),占 6.9%。快羽太行公鸡有两种结构特征,第 1 种 US 区 *Hae* III 酶切位点呈野生型纯合状态(图 4E),占 92.0%;另一种结构只占 8.0%,US 区的 *Hae* III 酶切位点为杂合型(图 4F)。快羽太行母鸡全部为 US 区 *Hae* III 酶切位点为野生型纯合状态的图 4E 结构。

海兰褐慢羽公鸡和慢羽母鸡均呈典型的慢羽结构特征:US 区酶切位点为野生型,OS 区有 *ev21* 插

入无酶切位点(图 4A);快羽母鸡为典型的快羽结构(图 4E);而快羽公鸡结构与慢羽鸡的典型结构一致(图 4A),存在 US 区的重复结构 OS 区,并且有 *ev21* 插入。

海兰灰商品代慢羽公鸡 US 区的酶切位点呈杂合状态,OS 区有 *ev21* 插入无酶切位点(图 4B);海兰灰商品代快羽母鸡呈快羽的典型结构特征(图 4E)。海兰灰祖代 A 系和 B 系分别为快羽公鸡和母鸡,表现为快羽的典型结构特征(图 4E),D 系同样为快羽母鸡,结构如图 4E;C 系为慢羽公鸡:US 区酶切位点为突变纯合型、OS 区有 *ev21* 插入无酶切位点(图 4G)。

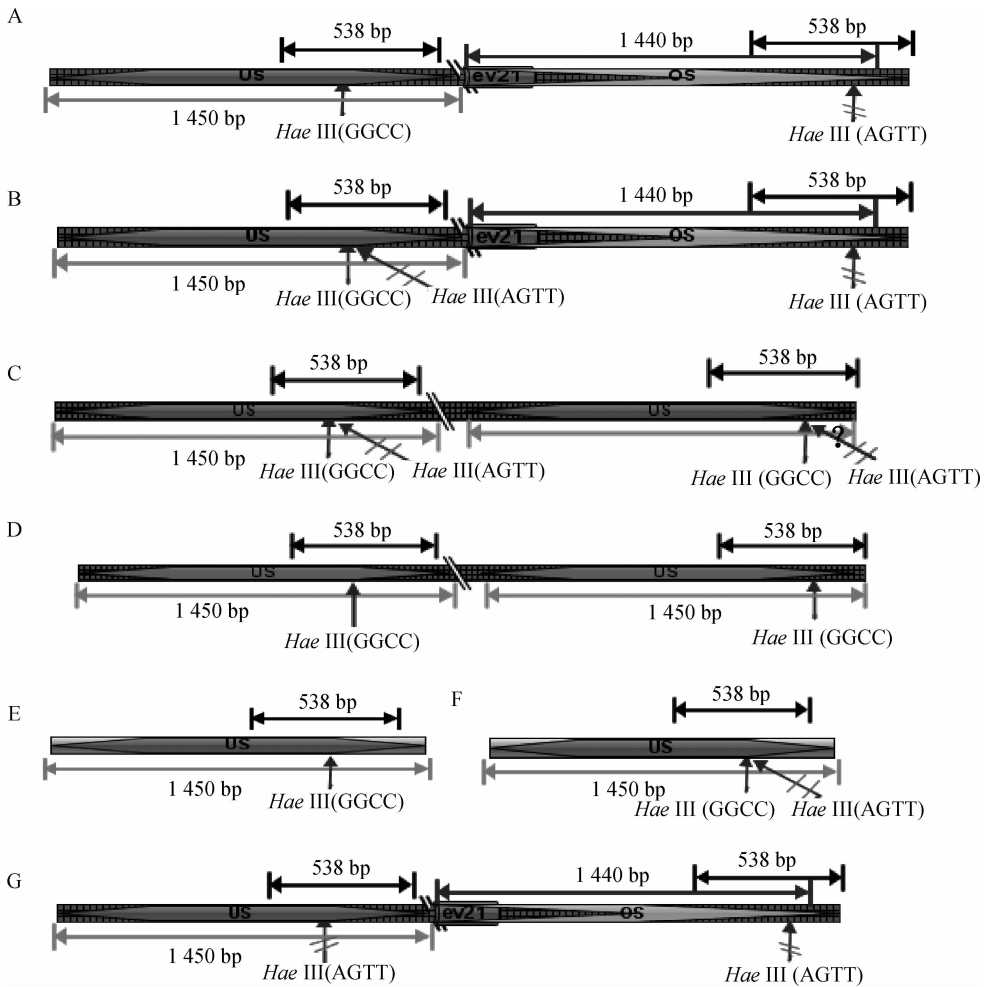


图 4 鸡 Z 染色体占位区、未占位区和 *ev21* 结构特征

Fig. 4 Structure characteristics of OS, US and *ev21* on Z chromosome of chicken

表 5 不同表型太行鸡占位区和未占位区酶切结果

Table 5 Digestion for occupied-site and unoccupied-site regions of Taihang chickens with various phenotype

表型 Phenotype	结构类型 Type	1 450 bp 酶切类型 1 450 bp digestion	538 bp 酶切类型 538 bp digestion	1 440 bp 阴阳性 Result of 1 440 bp	个体数 Number	构成比/% Proportion
慢羽公鸡 Slow-feather cock	A	2	3	1	18	58.1
	B	3	3	1	11	35.5
	C	3	3	0	2	6.4
快羽公鸡 Fast-feather cock	E	2	2	0	23	92.0
	F	3	3	0	2	8.0
慢羽母鸡 Slow-feather hen	A	2	3	1	19	65.5
	C	3	3	0	8	27.6
	D	2	2	0	2	6.9
快羽母鸡 Fast-feather hen	E	2	2	0	32	100.0

### 3 讨论

1 450 bp 序列为 *ev21* 未占位区序列,该序列在海兰灰及其祖代的快羽群体中存在内切酶 *Hae* III 的识别序列:g. CTTGGCCACT,而在其慢羽群体中该位点突变为 g. CTTAGTTAGTTAGCCACT,失去内切酶 *Hae* III 的识别位点。F. Iraqi 等以此为基础建立了白菜航鸡慢羽基因型的检测方法<sup>[11]</sup>,1 450 bp 序列 *Hae* III 酶切后 2 条带为快羽,3 条带为慢羽杂合体,1 条带为慢羽纯合体。L. D. Bacon 等发现,白菜航鸡的慢羽表型与 *ev21* 的插入完全相关<sup>[6]</sup>,其 US 区 *Hae* III 酶切位点的基因型与 OS 区完全一致,OS 区有 *ev21* 插入酶切位点为突变型,慢羽鸡的 US 区无 *ev21* 插入但酶切位点也为突变型,但快羽鸡只有 US 区,并且其酶切位点为野生型,所以可以通过 US 区 *Hae* III 酶切位点的特征判断白菜航品系(海兰灰及其祖代)的羽速表型和基因型。

但国内品种太行鸡和坝上长尾鸡以及引进品种海兰褐的羽速表型与 *ev21* 未占位区 *Hae* III 酶切位点的基因型并不相关。太行慢羽鸡和快羽公鸡 US 区酶切识别位点有两种基因型:野生纯合型和杂合体,快羽母鸡为野生纯合体,而慢羽 OS 区有 *ev21* 插入的酶切位点为突变型,也有慢羽 OS 区仅是 US 区的重复,所以不能根据 US 区酶切位点基因型判断羽速表型。而快羽和慢羽的海兰褐 US 区酶切位点均为野生纯合体,也不能利用此位点作为表型判断依据。

本试验通过 OS 区特异序列 1 440 bp 的扩增,明确了 OS 区即为 *ev21* 插入的区域,所以可以通过 1 440 bp 片段的扩增结果判断 *ev21* 的整合性,并可作为筛选无内源 *ev21* 病毒种鸡的检测方法。携带有内源白血病毒 *ev21* 的慢羽白菜航鸡对外源淋巴白血病毒免疫性能减退,并且有生产性能下降和死亡率升高等不良性状<sup>[9]</sup>。快慢羽的种鸡配套系利用羽速表型进行雌雄鉴别不仅节约生产成本,并有利于雏鸡的生产发育,所以筛选无内源病毒的慢羽种鸡群对提高种鸡的生产水平是非常必要的。A. Smith 等利用 PCR 技术检测内源白血病毒遗传元件<sup>[17]</sup>。本试验利用 1 440 bp 片段的扩增检测太行鸡发现,慢羽公鸡有 5.9% 的 *ev21* 阴性率,慢羽母鸡有 34.5% 的阴性率。

1 440 bp 片段扩增阳性的太行鸡 52 个个体和海兰灰祖代 C 系 15 个个体进行 *Hae* III 酶切检测,发现全部为突变型,酶切位点全部为 AG 突变后插入 TTAG 四碱基的 2 次重复序列,形成 TTAG 的 3 次重复,该特异重复序列与 *ev21* 插入的关系需要进一步深入研究。

为进一步分析该突变位点与鸡羽型的关系,选取 OS 和 US 区包含该突变位点的共有区域为模板设计引物,对目的产物 538 bp 片段进行 *Hae* III 酶切。除海兰褐快羽公鸡外,酶切结果与表型鉴定结果的一致率在 92% 以上。与 US 区 1 450 bp 酶切相比,鉴定准确率大大提高,可以作为快慢羽的粗略鉴定方法。陈忠等利用双重 PCR 鉴定快慢羽获得



了高于 94% 的准确率<sup>[18]</sup>, M. G. Elferink 等提出了荧光定量 PCR 技术鉴定快慢羽基因型的方法<sup>[12]</sup>, G. X. Bu 等检测了慢羽 *PRLR* 基因重复的结构特征<sup>[19]</sup>, 本课题组利用双重 PCR 灰度值的检测方法对鸡羽速基因进行鉴定, 准确率高, 操作简单方便(已申报专利)。

#### 4 结 论

鸡 US 区 *Hae* III 酶切位点变异不能作为慢羽和内源病毒 *ev21* 的鉴定依据, 而 OS 区的 *ev21* 插入与 1 440 bp 序列酶切位点的 A→G 突变和八碱基重复是紧密连锁的, 1 440 bp PCR 扩增可以作为筛选 *ev21* 阴性的慢羽种鸡检测方法。

#### 参考文献 (References):

- [1] SEREBROVSKY A S. Crossing-over involving three sex-linked genes in chickens[J]. *Am Nat*, 1922, 56(647): 571-572.
- [2] SOHN S H, KIM N Y, PARK D B, et al. Influence of early- and late-feathering phenotype on productive performance in the feather-sexing strains of Korean native chicken[J]. *Korean J Poult Sci*, 2013, 40(3): 263-270.
- [3] SOHN S H, PARK D B, SONG H R, et al. Genotype frequencies of the sex-linked feathering and their phenotypes in domestic chicken breeds for the establishment of auto-sexing strains[J]. *J Anim Sci Technol*, 2012, 54(4): 267-274.
- [4] LUO C L, SHEN X, RAO Y S, et al. Differences of Z chromosome and genomic expression between early- and late-feathering chickens [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5): 6283-6288.
- [5] ZHAO J, YAO J, LI F, et al. Identification of candidate genes for chicken early- and late-feathering[J]. *Poult Sci*, 2016, 95(7): 1498-1503.
- [6] BACON L D, SMITH E, CRITTENDEN L B, et al. Association of the slow feathering (K) and an endogenous viral (*ev21*) gene on the Z chromosome of chickens[J]. *Poult Sci*, 1988, 67(2): 191-197.
- [7] KANSAKU N, GUÉMÉNÉ D, NAKAMURA A, et al. Sequence characterization of K-gene linked region in various chicken breeds[J]. *J Poult Sci*, 2011, 48(3): 181-186.
- [8] TIXIER-BOICHARD M H, BENKEL B F, CHAMBERS J R, et al. Screening chickens for endogenous virus *ev21* viral element by the polymerase chain reaction[J]. *Poult Sci*, 1994, 73(10): 1612-1616.
- [9] LEVIN I, SMITH E J. Molecular analysis of endogenous virus *ev21*-slow feathering complex of chickens.: 1. Cloning of proviral-cell junction fragment and unoccupied integration site[J]. *Poult Sci*, 1990, 69(11): 2017-2026.
- [10] LEVIN I, SMITH E J. Association of a chicken repetitive element with the endogenous virus-21 slow-feathering locus[J]. *Poult Sci*, 1991, 70(9): 1948-1956.
- [11] IRAQI F, SMITH E J. Determination of the zygosity of *ev21*-k in late-feathering male white leghorns using the polymerase chain reaction[J]. *Poult Sci*, 1994, 73(7): 939-946.
- [12] ELFERINK M G, VALLÉ E A A, JUNGERIUS A P, et al. Partial duplication of the *PRLR* and *SPEF2* genes at the late feathering locus in chicken[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 391.
- [13] 李培周, 朱晓萍, 邝智祥, 等. 清远麻鸡羽速基因的分子检测及其与体重和冠高相关性分析[J]. 中国畜牧杂志, 2013, 49(7): 10-12.
- LI P Z, ZHU X P, KUANG Z X, et al. Molecular detection of feather speed and relation between crown height and body weight Qingyuan Partridge chickens [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2013, 49(7): 10-12. (in Chinese)
- [14] 李培周, 李 华, 杜炳旺, 等. 贵妃鸡羽速基因分子检测及相关早熟性状分析[J]. 中国家禽, 2013, 35(21): 5-8.
- LI P Z, LI H, DU B W, et al. Molecular detection of feathering locus and prematurity traits of princess chicken[J]. *China Poultry*, 2013, 35(21): 5-8. (in Chinese)
- [15] 李珊珊, 李东华, 吕福琨, 等. 慢羽系麒麟公鸡纯合个体分子检测方法的建立[J]. 河南农业科学, 2016, 45(7): 118-121.
- LI S S, LI D H, LÜ F K, et al. Establishment of molecular identification techniques for frizzle chicken early feathering and late feathering[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2016, 45(7): 118-121. (in Chinese)
- [16] 李竞一, 李荣妮, 王晓亮, 等. 慢羽鸡 *ev21* 结合位点缺失个体的检测[J]. 中国畜牧杂志, 2011, 47(11): 6-8.
- LI J Y, LI R N, WANG X L, et al. The detection for individuals without integration locus of *ev21* in

- slow feather chickens[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2011, 47(11): 6-8. (in Chinese)
- [17] SMITH A, BENKEL B F. Novel avian leukosis virus-related endogenous proviruses from layer chickens: characterization and development of locus-specific assays[J]. *Poult Sci*, 2009, 88(8): 1580-1585.
- [18] 陈 忠, 彭秀丽, 李世军, 等. 鸡快慢羽分子鉴定方法的建立及其应用[J]. *中国家禽*, 2010, 32(4): 11-13.  
CHEN Z, PENG X L, LI S J, et al. Establishment of the molecular approach to identify chicken's early/late feathering phenotype and its application[J]. *China Poultry*, 2010, 32(4): 11-13.
- [19] BU G X, HUANG G A, FU H, et al. Characterization of the novel duplicated *PRLR* gene at the late feathering *K* locus in Lohmann chickens[J]. *J Mol Endocrinol*, 2013, 51(2): 261-276.

(编辑 郭云雁)