

DOI: 10.1360/yc-007-0438

鸭生长激素基因内含子 2、3 多态性分析

许盛海¹, 包文斌^{1,2}, 黄军¹, 程金花¹, 束婧婷¹, 陈国宏¹

1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009;
2. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036

摘要: 根据鸭生长激素基因内含子 2、3 的序列设计 5 对引物, 利用 PCR-SSCP 方法对北京鸭、西湖野鸭、金定鸭、山麻鸭、荆江鸭、绍兴鸭等 6 个鸭品种进行了单核苷酸多态性分析, 并检测其多态性。结果共发现 8 个突变位点, 其中内含子 2 有 7 个: 2593 处 C-T, 2770 处 G-A, 2813 处 T-A, 2829 处 C-A, 2894 处 C-T, 2896 处 T-C, 3100 处 C-G; 内含子 3 有 1 个: 3270 处 A-G。统计结果显示, 这 8 个变异位点的基因型频率分布与品种有关, 在这些基因座的变异水平上, 北京鸭和绍兴鸭表现出了相当的品种保守性, 本研究所检测到的这些基因座可能与鸭的生产性能有关。

关键词: 鸭; 生长激素基因; 单核苷酸多态性

Polymorphic analysis of intron 2 and 3 of growth hormone gene in duck

XU Sheng-Hai¹, BAO Wen-Bin^{1,2}, HUANG Jun¹, CHENG Jin-Hua¹, SHU Jing-Ting¹, CHEN Guo-Hong¹

1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;
2. College of Animal Science and Technology, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China

Abstract: The single nucleotide polymorphism (SNP) of growth hormone gene was investigated in various breeds of duck, including Beijing ducks, Xihu mallards, Jinding ducks, Shan Partridge ducks, Jingjiang ducks and Shaoxing ducks. The primers for intron 2 and 3 in *GH* gene were designed based on the database of duck genomic sequence and the SNPs were detected by PCR-SSCP method. Eight SNPs were found among individuals within a breed, which were 2593(C-T), 2770(G-A), 2813(T-A), 2829(C-A), 2894(C-T), 2896(T-C), and 3100(C-G) in intron 2 and 3270(A-G) in intron 3. The analytic results showed that the frequencies of genotypes in different breeds were significantly different. Based on these SNPs, Beijing ducks and Shaoxing ducks represented their own unique conservativeness, indicating that these SNPs may have relationship with some productive traits of duck.

Keywords: duck; growth hormone gene; single nucleotide polymorphism

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一种单一肽链的蛋白质激素, 由 190 或 191 个氨基酸组成, 是一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生理功能基因, 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

收稿日期: 2006-07-03; 修回日期: 2006-09-06

基金项目: 许盛海(1981—), 男, 湖南人, 在读硕士, 研究方向: 动物遗传资源评价、保护与利用。E-mail: xsh_1216@126.com

作者简介: 陈国宏(1963—), 男, 江苏人, 教授, 博士, 研究方向: 动物遗传资源评价、保护与利用。Tel: 0514-7979230;

E-mail: ghchen@yzu.edu.cn.

在着连锁^[2]。

由于生长激素基因在医学、畜牧业生产和渔业生产中的重要作用, 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, 对鸭的GH基因的研究报道很少。Chen等^[3]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。在氨基酸水平上比较发现, 它与鸡GH 的同源性极高, 只有 4 个氨基酸的差异; 与人、大鼠和大马哈鱼相比, 同源性分别为 56%、73%和 40%。在核酸水平上与人、大鼠和大马哈鱼的cDNA序列相比, 同源性分别为 53%、75%和 53%。Kansaku等^[4]克隆并测定了鸭GH基因的全序列。该序列包含 5,219 个碱基对, 编码 216 个氨基酸, 包含 5 个外显子和 4 个内含子及 5' 和 3' 端调控区, 其中内含子 2、3 区段分别为 2438 ~ 3137, 3252 ~ 3614。到目前为止, 尚未见其他关于鸭GH基因分子水平上的公开报道。本研究对鸭生长激素基因内含子 2、3 进行SNP检测, 分析是否存在多态性, 比较不同品种的基因型频率并探讨不同基因型与鸭种质特性之间的关系, 为寻找鸭生产性状的遗传标记和构建鸭基因图谱奠定基础, 为今后育种过程中的标记辅助选择(MAS)提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本实验用的 49 只北京鸭来自宁波镇海江南家禽育种有限公司; 50 只西湖野鸭来自于杭州西湖畜禽养殖总场有限公司; 60 只山麻鸭、55 只荆江鸭、

80 只金定鸭均来自于江苏泰州国家水禽基因库; 50 只绍兴鸭来自绍兴市绍兴鸭原种场。

1.2 主要试剂

引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成; Taq DNA polymerase、dNTP 购自大连宝生物公司。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

根据 GenBank(登录号 AB158760)的鸭生长激素基因全序列设计 5 对引物(表 1)。

PCR扩增反应体系为 10 × PCR缓冲液 2 μL, 2.5 mmol/L dNTP 1 μL, 10 μmol/L引物(上游)0.5 μL, 10 μmol/L 引物(下游)0.5 μL, Taq 酶 1.0 U, 100 ng/μL DNA模板 1 μL, ddH₂O 14.8 μL。PCR 程序为 94 5 min 1 个循环; 94 50 s, 复性 50 s, 72 50 s 共 30 个循环; 72 10 min 1 个循环; 4 保温。PCR产物在 2%琼脂糖凝胶中电泳, 结束后用凝胶成像系统分析检测扩增结果。

1.4 SSCP 分析

5 μL PCR 产物加 5 ~ 6 μL 上样缓冲液(98%甲酰胺、0.025%溴酚蓝、0.025%二甲苯青、10 mmol/L EDTA(pH: 8.0)、2%甘油), 98 变性 10 min, 然后冰浴 5 min, 使之保持变性状态。变性后 PCR 产物在 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶(Acr:Bis=39:1)中电泳。150 V 电泳 6 ~ 9 h 后, 银染显色。

1.5 测序

根据 PCR-SSCP 分析结果, 选取不同基因型的纯合子(或杂合子)进行序列测定。PCR 产物经电泳鉴定后, 用胶回收试剂盒(BBI, Canada)回收目标片段、纯化后, 交由上海生工生物工程技术服务有限公司 ABI PRISM 377 DNA 自动测序仪完成序列测定。

表 1 PCR 扩增的引物序列

Table 1 Sequences of primers used in PCR amplification

序号 Serial number	序列 Sequences	位置 Location	PCR 产物大小(bp) PCR product size (bp)	复性温度() Annealing temperature()
	5'- CCTCGGGGCATCTCCTCATT -3' 5'- GCTGGCTGIATGTGGTGGGT -3'	2450 ~ 2701	252	62
	5'- AACCCACCACATACAGCC -3' 5'- GTTGGTTGGCACAGTAGC -3'	2681 ~ 2971	291	61
	5'- GCTACTGTGCCAACCAAC -3' 5'- GCATCATCCTTCCCTGTG -3'	2954 ~ 3238	285	58
	5'-TAGAGCCCCTGGTGCGAG-3' 5'- GCTCAGCGGTAGCGGGTT -3'	3113 ~ 3322	210	59
	5'- CAGTGCTTGCTGAGGTAT -3' 5'- ACCAGTGAAAACCGAAGA -3'	3321 ~ 3643	323	58

2 结果与分析

2.1 PCR-SSCP 分析结果

所有引物 PCR 扩增都获得了较好的结果,片段长度与所设计的扩增片段大小一致,而且没有非特异的条带,可以进行 SSCP 分析。PCR-SSCP 分析结果发现在 ~ 对引物中都存在多态性,第 对无多态。引物对 扩增的片段有 3 种基因型,分别定义为式 *AA*、*BB*、*AB*(图 1)。引物对 扩增的片段有 6 种基因型,分别定义为 *CC*、*DD*、*EE*、*CD*、*CE*、*DE*(图 2)。引物对 扩增的片段有 2 种基因型,分别定义为 *FF* 和 *FG*(图 3)。引物对 扩增的片段有 3 种基因型,分别定义为 *HH*、*II*、*HI*(图 4)。

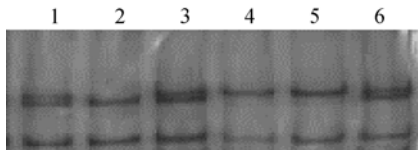


图 1 引物对 PCR 扩增产物的 SSCP 分析

1, 3, 6: *AB*; 2: *AA*; 4, 5: *BB*。

Fig. 1 SSCP analysis of PCR products amplified with primers

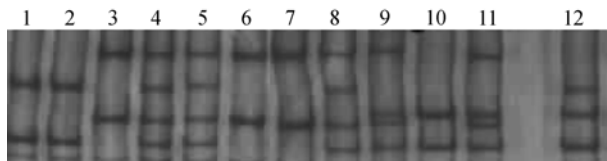


图 2 引物对 PCR 扩增产物的 SSCP 分析

1, 2: *DD*; 3, 6, 7: *CC*; 4, 5, 8: *CD*; 10: *EE*; 9, 11: *CE*; 12: *DE*。

Fig. 2 SSCP analysis of PCR product amplified with primers

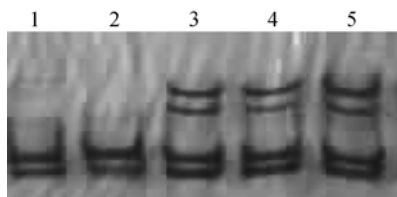


图 3 引物对 PCR 扩增产物的 SSCP 分析

Fig. 3 SSCP analysis of PCR product amplified with primers

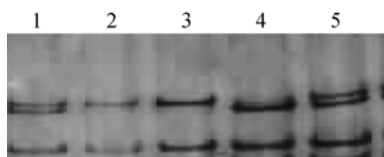


图 4 引物对 PCR 扩增产物的 SSCP 分析

1, 2: *FF*; 3, 4, 5: *FG*。1, 5: *HI*; 2, 3: *II*; 4: *HH*。

Fig. 4 SSCP analysis of PCR product amplified with primers with primers

2.2 序列分析结果

取 *AA* 和 *BB* 两种基因型的 PCR 产物片段进行纯化测序。结果 *BB* 型与 GenBank(AB158760)中的序列一致,定义为野生型。*AA* 型与 *BB* 型相比在第 2593 处有一个 C-T 的单碱基突变(图 5),定义为突变型。

取 *CC*、*DD* 和 *EE* 3 种基因型的 PCR 产物片段进行纯化测序。结果 *CC* 型与 GenBank(AB158760)中的序列一致,定义为野生型。*DD* 型与 *CC* 型相比在第 2829 处有一个 C-A 的单碱基突变。*EE* 型与 *CC* 型相比在第 2770, 2813, 2829, 2894, 2896 处分别发生 G-A, T-A, C-A, C-T, T-C 的单碱基突变(图 6)。因此 *DD*、*EE* 型定义为突变型。

取 *FF* 和 *FG* 两种基因型的 PCR 产物片段进行纯化测序。比较发现 *FF* 型与 GenBank(AB158760)中的基因序列一致,定义为野生型。*FG* 型与 *FF* 型相比在第 3100 处有一个 C-G 的单碱基突变(图 7),是杂合型。

取 *HH* 和 *II* 两种基因型的 PCR 产物片段进行纯化测序。结果 *HH* 型与 GenBank(AB158760)中的序列一致,定义为野生型。*II* 型与 *HH* 型相比在第 3270 处有一个 A-G 的单碱基突变(图 8),定义为突变型。

2.3 不同鸭种 *GH* 基因内含子 2、3 的基因型和基因频率分析

根据电泳图谱显示的表型,统计基因型频率。分别对 4 对引物不同基因型在 6 个鸭品种间的分布进行独立性检验(χ^2 检验),结果表明各对引物的基因型频率在鸭种中的分布差异极显著($P < 0.01$)(表 2)。

3 讨论

内含子是基因中无编码功能的插入序列,它为什么在编码蛋白质前要去掉,它有没有功能?作为数倍于外显子的内含子,如果一点功能也没有,这有悖于生物经济原理,单从进化上讲,这也是极其不利的。而实际上,内含子与生物等级成相关性。研究发现,对应于外显子每千个核苷酸序列,人的内含子平均长度为 6,825 个核苷酸,鸡为 1,800 个,果蝇为 600 个。可见,随着生物的进化,内含子的含量有增加的趋势^[5]。一般认为,内含子,尤其是第一、第二内含子可通过如下机制促进基因的表达:(1)某些内含子含有增强子或其它顺式作用因素,它们同某些蛋白质结合影响转录的起始和延伸;(2)内含子的剪接增加了 mRNA 在核内的稳定性,导致

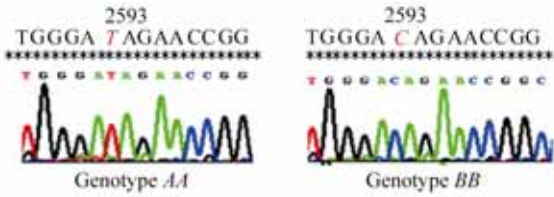


图5 AA和BB基因型2593处突变的测序峰图
Fig. 5 The mutation in 2593 nucleotide acid between AA and BB genotypes

在细胞质中积累更多成熟的mRNA; (3)内含子包含一些具有开放染色体功能的特殊序列, 它们通过影响核质成分、位置等来提高基因的表达。因而, 一般情况下采用基因组DNA的表达水平远高于cDNA^[6-10]。本研究中所发现的突变位于内含子, 但其是否会影响生长激素基因的表达, 还需要进一步研究。

在长期的人工选育过程中, 特定的品种在某些基因座上会渐渐地趋于纯合并固定, 表现为品种的保守性, 而另外一些受选择压力相对较小的基因座则可能表现出更丰富的多态性, 表现为品种的变异性。品种的保守性和变异性往往反映了它区别于另一个品种的种质特征。本文通过 PCR-SSCP 的方法检测到了鸭GH基因内含子2、3基因座的多态性, 从基因型频率在不同鸭种间分布的比较结果发现: 北京鸭除在内含子2的2,593处表现出变异性, 在其他位点都趋向于纯合保守, 表现了一定程度的品种保守性; 绍兴鸭几乎在所有位点都相对趋向于纯合保守, 也表现了较强的品种保守性; 而其他品种各个位点总体上具有丰富的多态性, 表现了品种的变异性。可见, 在生长激素基因内含子2、3的变异水平上, 北京鸭和绍兴鸭表现出了独特的种质特征。品

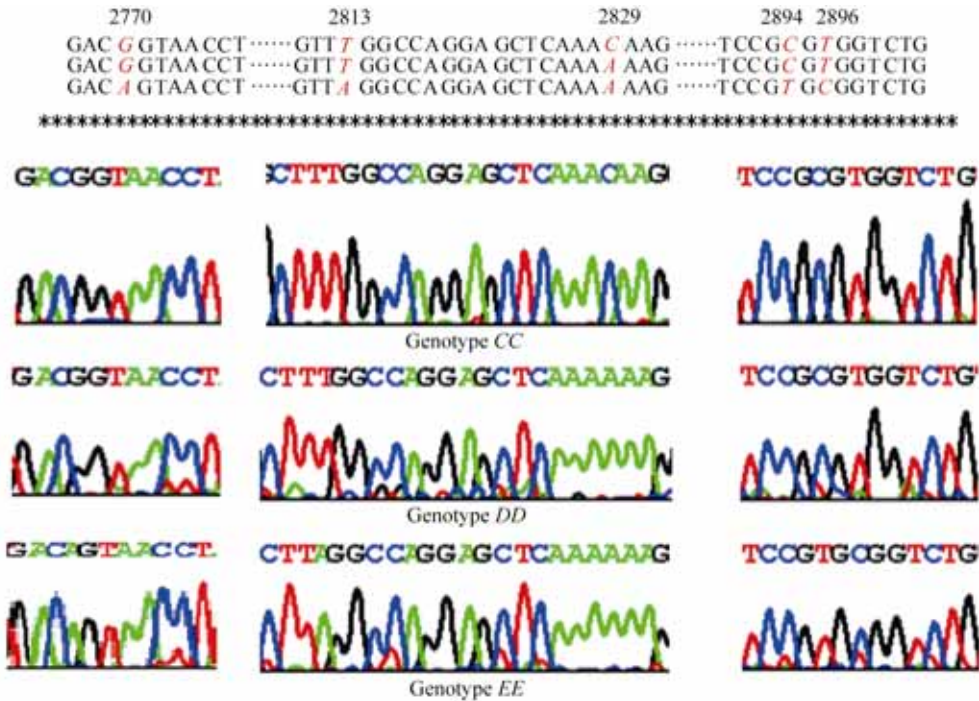


图6 CC、DD和EE基因型各处突变的测序峰图
Fig. 6 The mutations between CC, DD and EE genotypes

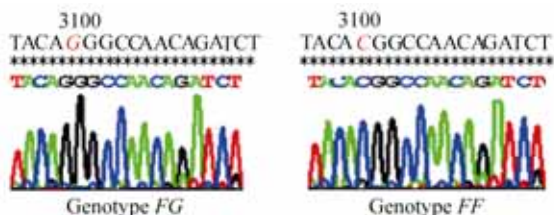


图7 FG和FF基因型3100处突变的测序峰图
Fig. 7 The mutation in 3100 nucleotide acid between FG and FF genotypes

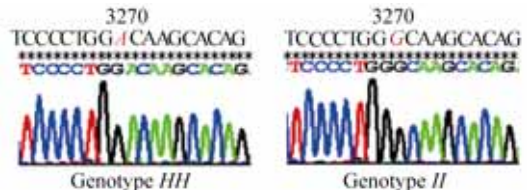


图8 HH和II基因型3270处突变的测序峰图
Fig. 8 The mutation in 3270 nucleotide acid between HH and II genotypes

表 2 不同鸭品种的基因型频率比较

Table 2 Comparison of genotype frequencies in different duck breeds

品种 Breeds	北京鸭 Beijing ducks	西湖野鸭 Xihu mallards	荆江鸭 Jingjiang ducks	金定鸭 Jinding ducks	山麻鸭 Shan Partridge ducks	绍兴鸭 Shaoxing ducks	χ^2
样本数 Number	49	50	55	80	60	50	
引物对 Primers							
AA	0.918(45)	0.6(30)	0.6(33)	0.625(50)	0.433(26)	0.5(25)	43.82**
AB	0	0.02(1)	0.109(6)	0.013(1)	0.167(10)	0.08(4)	
BB	0.082(4)	0.38(19)	0.291(16)	0.362(29)	0.4(24)	0.42(21)	
引物对 Primers							
CC	0.735(36)	0.48(24)	0.364(20)	0.288(23)	0.433(26)	0.84(42)	86.66**
CD	0.245(12)	0.26(13)	0.509(28)	0.425(34)	0.45(27)	0.14(7)	
DD	0.02(1)	0.08(4)	0	0.137(11)	0.05(3)	0	
CE	0	0.16(8)	0.091(5)	0.10(8)	0.017(1)	0.02(1)	
DE	0	0.02(1)	0.018(1)	0.05(4)	0.05(3)	0	
EE	0	0	0.018(1)	0	0	0	
引物对 Primers							
FF	1(49)	1(50)	0.927(51)	0.9875(79)	0.567(34)	1(50)	107.04**
FG	0	0	0.073(4)	0.0125(1)	0.433(26)	0	
引物对 Primers							
HH	0.714(35)	0.58(29)	0.546(30)	0.525(42)	0.667(40)	0.94(47)	38.73**
HI	0.245(12)	0.30(15)	0.418(23)	0.425(34)	0.217(13)	0.06(3)	
II	0.041(2)	0.12(6)	0.036(2)	0.05(4)	0.117(7)	0	

注: 括号内的数据是表示基因型个体数。**: $P < 0.01$ 。

Note: Data in the brackets mean the number of different genotypes. **: $P < 0.01$.

种间的差异是在长期不断的选择中形成。北京鸭和绍兴鸭两者分别属于优秀的高产肉型和高产蛋型鸭种^[11], 可以推测本研究所检测到的这些基因座可能与生产性能有关, 这值得我们继续进行更加深入系统的研究。本研究从分子生物学角度研究鸭品种的种质特征, 在DNA分子水平上揭示品种之间的差异, 为丰富鸭种的种质特性资料库和充分保护利用优质鸭种质资源提供理论依据。

参考文献(References):

- [1] CHENG Zhi-Ping. Physiology of Endocrine. Beijing: People's Medical Press, 1984, 64-70.
程治平主编. 内分泌生理学. 北京: 人民卫生出版社, 1984, 64-70.
- [2] Yerle M, Mansais Y, Thomsen PD, Gellin J. Location of the porcine hormone gene to chromosome 12P^{1.2}-P^{1.5}. *Anim Genet*, 1993, 24(2): 129-131.
- [3] Chen HT, Pan FM, Chang WC. Purification of duck growth hormone and cloning of the complementary DNA. *Biochim Biophys Acta*, 1988, 949(2): 247-251.
- [4] Kansaku N, Zadworny D, Guemene D. Genomic cloning of duck Growth hormone. NCBI GenBank, 08-JAN-2004.
- [5] Deutsh M, Long M. Intron-exon structures of eukaryotic model organisms. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(15): 3219-3228.
- [6] Colman A. Production of proteins in the milk of transgenic livestock: problems, solutions, and successes. *Am J Clin Nutr*, 1996, 63(4): 639-645.
- [7] Maniatis T, Reed R. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature*, 2002, 416(6880): 499-506.
- [8] Furger A, O'Sullivan JM, Binnie A, Lee B, Proudfoot NJ. Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes Dev*, 2002, 16(21): 2792-2799.
- [9] Manlv JL. Nuclear coupling: RNA processing reaches back to transcription. *Nat Struct Biol*, 2002, 9(11): 790-791.
- [10] Chen J, Hayes P, Roy K, Sirotak FM. Two promoters regulate transcription of the mouse folylpolyglutamate synthetase gene three tightly clustered Sp1 sites within the first intron markedly enhance activity of promoter B. *Gene*, 2000, 242(1-2): 257-264.
- [11] CHEN Guo-Hong, WANG Ke-Hua, WANG Jin-Yu, DING Chan, YANG Ning. Poultry Genetic Resources in China. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Press, 2004, 84-98.
陈国宏, 王克华, 王金玉, 丁铲, 杨宁. 中国禽类遗传资源. 上海: 上海科学技术出版社, 2004, 84-98.