

鸭生长激素(GH)基因编码区及调控区多态性分析

许盛海¹, 包文斌^{1,2}, 程金花¹, 黄 军¹, 张红霞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编码区及调控区的序列设计 8 对引物, 利用 PCR-SSCP 方法对北京鸭、西湖野鸭、樱桃谷鸭、金定鸭、山麻鸭、荆江鸭、绍兴鸭、缙云麻鸭等 8 个鸭种进行单核苷酸多态性分析。结果共发现 3 个突变位点, 分别为 230 处(C→G)、244 处(C→A)和 3 701 处(C→T)。前两处突变位于 5'调控区, 3 701 处突变位于编码区第 4 外显子, 但该编码区的突变是沉默突变, 3'调控区表现了高度的保守性。统计结果发现: (1) 在 5'调控区基因座上, 金定鸭的等位基因 B 频率显著高于其他品种; (2) 在外显子 4 基因座上, 基因型频率的分布与品种有关, 且肉用型鸭的 CC 基因型频率显著高于蛋用型。可以推测, 本研究检测到的基因座可能与生产性能相关。

关键词: 鸭; 生长激素基因; 单核苷酸多态性

中图分类号: S834.2

文献标识码: A

文章编号: 0336-6964(2007)09-0907-06

Polymorphism Analysis on Coding and Regulation Regions of Growth Hormone Gene in Duck

XU Sheng-hai¹, BAO Wen-bin^{1,2}, CHENG Jin-hua¹,
HUANG Jun¹, ZHANG Hong-xia¹, CHEN Guo-hong^{1*}

(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University,
Yangzhou 225009, China; 2. College of Animal Science and Technology,
Anhui Agricultural 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, Cherry Valley Meat ducks, Jinding ducks, Shan Partridge ducks, Jingjiang ducks, Shaoxing ducks and Jinyun Partridge ducks. Eight pairs of primers for coding and regulation regions of GH gene were designed based on the database of duck genomic sequence and the SNPs were detected by PCR-SSCP method. Three SNPs were found among individuals, which were 230(C→G), 244(C→A) in 5'-UTR and 3 701(C→T) in exon 4, respectively. However, the mutation at 3 701 was a silence mutation. And the 3'-UTR represented its own high conservativeness. The analysis results showed that: (1) At locus of 5'-UTR, the frequency of B allele in Jinding ducks was significantly higher than that in other breeds. (2) At locus of exon 4, the frequencies of genotypes in different breeds were significantly different, and the frequency of CC genotype in meat-type ducks were significantly higher than that in laying-type ducks. According to the results above, we can conclude that these SNPs may have relationship with some productive traits of ducks.

Key words: 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

收稿日期: 2006-08-07

作者简介: 许盛海(1981-), 男, 湖南怀化人, 硕士生, 主要从事动物遗传资源评价、保护与利用研究, E-mail: xsh-1216@sohu.com

* 通讯作者: 陈国宏(1963-), 男, 教授, 博导, 主要从事动物遗传资源评价、保护与利用研究, E-mail: ghchen@yzu.edu.cn

质激素,由 190~191 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^[3],对鸭的 GH 基因的研究报道很少。Chen 等^[4]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^[5]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(764~773,2 274~2 437,3 138~3 251,3 615~3 776,4 913~5 113)和 4 个内含子及 5'调控区(1~763)和 3'端调控区

(5 114~5 219)。到目前为止,尚未见其他关于鸭 GH 基因分子水平上的研究报道。本研究首次通过对鸭生长激素基因整个编码区及调控区的 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 材料与方法

1.1 材料

49 只北京鸭来自宁波镇海江南家禽育种有限公司;50 只西湖野鸭和 45 只樱桃谷鸭来自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 只金定鸭均来自江苏泰州水禽基因库;50 只绍兴鸭来自绍兴市绍鸭原种场;47 只缙云麻鸭来自浙江缙云麻鸭原种场。

1.2 主要试剂

引物由上海生工合成;Taq DNA polymerase、dNTPs 购自大连宝生物公司。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

根据 GenBank 的鸭生长激素基因全序列(AB158760)设计 8 对引物(见表 1)。

表 1 鸭 GH 基因编码区及调控区 PCR 扩增引物

Table 1 Primers of coding and regulation regions of GH gene for PCR

引物 Primers	序列 Sequences	位置/bp Location	PCR 产物大小 PCR product size/bp	退火温度 Annealing temperature/°C
P ₁	5'-AAAGCACCTGAGAACAAA-3' 5'-CTGGGACACCTCTGACATAA-3'	2~311	260	62
P ₂	5'-CTAACGATAAATGGGAAAC-3' 5'-CCCGCATAGATAGAAAGT-3'	60~395	136	55
P ₃	5'-AGGAGCACTTTCTATCTAT-3' 5'-GCAATGGTTCTACCTAAT-3'	72~580	209	55
P ₄	5'-GTAGCACCATTGCGAACA-3' 5'-GGCAATCCTCGTAAACTGA-3'	68~807	240	58
P ₅	5'-CACCCTCCTGTCCACTT-3' 5'-TCAGGCTAATGAGGAGATG-3'	248~2 476	229	56
P ₆	5'-TGGGTGATTTGGGATGTCTC-3' 5'-TGAAGTGCTCACAGATGGAA-3'	113~3 322	210	59
P ₇	5'-ACATTACAGAACACCTCACC-3' 5'-TACCTACTGCGACTTACCCT-3'	563~3 793	231	58
P ₈	5'-TAGAGCCCCTGGTGCGAG-3' 5'-GCTCAGCGGTAGCGGGTT-3'	867~5 219	353	60

PCR 扩增反应体系为 $10\times$ PCR 缓冲液 $2\ \mu\text{L}$, $2.5\ \text{mmol/L}$ dNTPs $1\ \mu\text{L}$, $10\ \mu\text{mol/L}$ 引物(上游) $0.5\ \mu\text{L}$, $10\ \mu\text{mol/L}$ 引物(下游) $0.5\ \mu\text{L}$, *Taq* 酶 $1.0\ \text{U}$, $100\ \text{ng}/\mu\text{L}$ DNA 模板 $1\ \mu\text{L}$, ddH_2O $14.8\ \mu\text{L}$ 。PCR 程序为 $94\ ^\circ\text{C}$ $5\ \text{min}$; $94\ ^\circ\text{C}$ $50\ \text{s}$, 退火 $50\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}$ $50\ \text{s}$, 30 个循环; $72\ ^\circ\text{C}$ $10\ \text{min}$; $4\ ^\circ\text{C}$ 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

$5\ \mu\text{L}$ PCR 产物加 $5\sim 6\ \mu\text{L}$ 上样缓冲液(98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯青、 $10\ \text{mmol/L}$ EDTA(pH8.0)、2% 甘油), $98\ ^\circ\text{C}$ 变性 $10\ \text{min}$, 然后冰浴 $5\ \text{min}$, 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 $6\sim 9\ \text{h}$ 后, 银染显色。

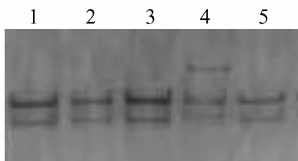
1.5 测序

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有限公司 ABI PRISM 377 DNA 自动测序仪完成序列测定。

2 结果与分析

2.1 PCR-SSCP 分析

所设计引物 PCR 扩增获得了较好的结果, 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 分析结果发现只在引物 P_1 和 P_7 中存在多态性。引物 P_1 扩增的片段有 2 种基因型, 分别定义为 AA 和 AB (见图 1)。引物 P_7 扩增的片段有 3 种基因型, 分别定义为 CC、DD、CD(见图 2)。



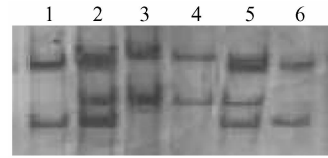
1, 2, 3, 5. AA; 4. AB

图 1 引物 P_1 的 PCR 扩增产物 SSCP 分析

Fig. 1 SSCP analysis on PCR product of primer P_1

2.2 序列分析

取 AA 和 AB 两种基因型的 PCR 产物片段进



1, 6. DD; 2, 5. CD; 3, 4. CC

图 2 引物 P_7 的 PCR 扩增产物 SSCP 分析

Fig. 2 SSCP analysis on PCR product of primer P_7

行纯化测序。比较发现 AA 型与 GenBank (AB158760) 中的基因序列一致, 定义为野生型。AB 型与 AA 型相比在 $5'$ 调控区 230 处(C \rightarrow G) 和 244 处(C \rightarrow A) 发生突变, 表现为杂合型(见图 3)。

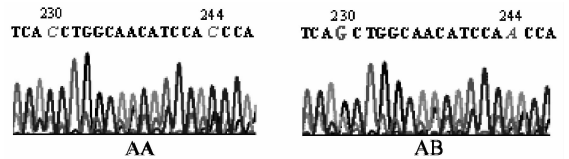


图 3 AA 型和 AB 型图谱及序列比较

Fig. 3 The mutations in 230 and 244 nucleotide between AA and AB genotypes

取 CC 和 DD 两种基因型的 PCR 产物片段进行纯化测序。结果 DD 型与 GenBank (AB158760) 中的序列一致, 定义为野生型。CC 型与 DD 型相比在处于第 4 外显子的 3 701 处发生 C \rightarrow T 的突变, 定义为突变型。将突变型的核苷酸序列演绎成氨基酸序列后, 发现突变后该处的氨基酸仍然为天冬酰胺(N) (位于胞外区的第 125 位氨基酸), 因此该突变是一个沉默突变(见图 4)。

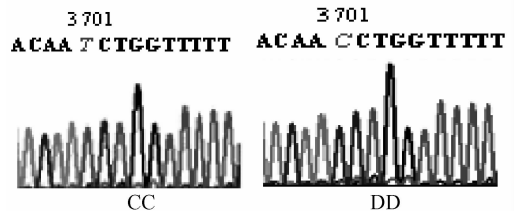


图 4 CC 和 DD 基因型 3 701 处突变的测序峰图

Fig. 4 The mutation in 3 701 nucleotide between CC and DD genotypes

2.3 不同鸭种 GH 基因两个基因座的基因型和基因频率分析

2.3.1 不同鸭种 GH 基因 $5'$ 调控区的基因型和基因频率分析 根据电泳图谱显示的表型, 统计基因型频率并计算出基因频率。对结果进行适合性 χ^2

检验,以观察各群体是否处于 Hardy-Weinberg 平衡。该 SNP 位点只在荆江鸭、金定鸭、绍兴鸭中存在,由表 2 可见,金定鸭的等位基因 B 的频率明显

高于荆江鸭和绍兴鸭。适合性 χ^2 检验结果表明,各群体在该位点的基因频率均处于 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$)。

表 2 3 个鸭种 GH 基因 5'调控区的基因型和基因频率

Table 2 The frequencies of genotype and allele in GH 5'-UTR in there duck breeds

品种 Breeds	样本数 Number	AA	AB	BB	A	B	χ^2
荆江鸭 Jingjiang ducks	55	0.891(49)	0.109(6)	0(0)	0.945	0.055	1.090
金定鸭 Jinding ducks	80	0.675(54)	0.325(26)	0(0)	0.837	0.163	2.370
绍兴鸭 Shaoxing ducks	50	0.920(46)	0.080(4)	0(0)	0.960	0.040	1.140

括号内的数据是个体数。 $\chi_{0.05(2)}^2 = 5.99$, $\chi_{0.01(2)}^2 = 9.21$ 。下同

The data in brackets means the number of individuals. The same as below

2.3.2 不同鸭种 GH 基因外显子 4 的基因型和基因频率分析 根据电泳图谱显示的表型,统计基因型频率并计算出基因频率。对结果进行适合性 χ^2 检验,以观察各群体是否处于 Hardy-Weinberg 平衡。由表 3 可见,该 SNP 位点在北京鸭、西湖野鸭和樱桃谷鸭等肉用型鸭种中以等位基因 C 为主,分

别为 0.724、0.630 和 0.811;而在荆江鸭、金定鸭、山麻鸭、绍兴鸭等蛋用型鸭种中以等位基因 D 为主,基因频率在 0.642~0.950。适合性 χ^2 检验结果表明,除山麻鸭外,各群体在该位点的基因频率均处于 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$)。

表 3 8 个鸭种 GH 基因外显子 4 的基因型和基因频率

Table 3 The frequencies of genotype and allele in GH exon 4 in eight duck breeds

品种 Breeds	样本数 Number	CC	CD	DD	C	D	χ^2
北京鸭 Beijing ducks	49	0.551(27)	0.347(17)	0.102(5)	0.724	0.276	0.850
西湖野鸭 Xihu mallards	50	0.380(19)	0.50(25)	0.120(6)	0.630	0.370	0.266
荆江鸭 Jingjiang ducks	55	0.018(1)	0.436(24)	0.546(30)	0.236	0.764	2.403
金定鸭 Jinding ducks	80	0.000(0)	0.300(24)	0.700(56)	0.150	0.850	0.631
山麻鸭 Shan Partridge ducks	60	0.050(3)	0.617(37)	0.333(20)	0.358	0.642	6.955 *
绍兴鸭 Shaoxing ducks	50	0.000(0)	0.100(5)	0.900(45)	0.050	0.950	0.130
缙云麻鸭 Jinyun Partridge ducks	47	0.043(2)	0.340(16)	0.617(29)	0.213	0.787	0.220
樱桃谷鸭 Cherry Valley Meat ducks	45	0.667(30)	0.289(13)	0.044(2)	0.811	0.189	0.050

2.4 不同鸭种 GH 基因两个基因座的基因型分布差异检验

2.4.1 不同鸭种 GH 基因 5' 调控区的基因型分布差异检验 对以上种群进行基因型频率独立性 χ^2 检验,由表 4 可见,荆江鸭和绍兴鸭之间差异不显著,但金定鸭和荆江鸭、金定鸭和绍兴鸭之间差异显著。

表 4 3 个鸭种 GH 基因 5' 调控区的基因型分布差异检验

Table 4 Test of difference for genotype distribution on 5'-UTR of GH in three duck breeds

品种 Breeds	金定鸭 Jingding ducks	绍兴鸭 Shaoxing ducks
荆江鸭 Jingjiang ducks	8.40**	0.26
金定鸭 Jingding ducks		10.40**

$$\chi_{0.05(1)}^2 = 3.84, \chi_{0.01(1)}^2 = 6.63$$

2.4.2 不同鸭种 GH 基因外显子 4 的基因型分布差异检验 对以上种群进行基因型频率独立性 χ^2 检验。由表 5 可见,除北京鸭与西湖野鸭,北京鸭与樱桃谷鸭,荆江鸭与金定鸭,荆江鸭与山麻鸭,荆江鸭与缙云麻鸭,金定鸭与缙云麻鸭之间基因型分布差异不显著外,其余各鸭种两两之间均存在显著或极显著的基因型分布差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

GH 具有广泛的生理功能,影响几乎所有的组织类型,其作用靶组织包括骨、软骨、脂肪组织、免疫系统和生殖系统,甚至对脑组织和造血系统也有作用^[6,7]。GH 是动物出生后调节生长的最主要激素,可对机体大部分组织的糖、脂肪、蛋白质和核酸的代谢起调节作用^[8,9]。生产实践中,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,

表 5 8 个鸭种 GH 基因外显子 4 的基因型分布差异检验

Table 5 Test of difference for genotype distribution on exon 4 of GH in eight duck breeds

品种 Breeds	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	缙云麻鸭 Jinyun Partridge ducks	樱桃谷鸭 Cherry Valley Meat ducks
北京鸭 Beijing ducks	3.00	42.99**	67.27**	34.85**	65.54**	38.50**	1.81
西湖野鸭 Xihu mallards		32.05**	55.37**	20.76**	62.16**	30.79**	8.02*
荆江鸭 Jingjiang ducks			4.38	5.56	16.25**	1.33	54.44**
金定鸭 Jinding ducks				20.38**	7.10**	3.86	80.02**
山麻鸭 Shan Partridge ducks					36.39**	8.72*	47.16**
绍兴鸭 Shaoxing ducks						11.14**	72.83**
缙云麻鸭 Jinyun Partridge ducks							48.31**

$$\chi_{0.05(1)}^2 = 3.84, \chi_{0.01(1)}^2 = 6.63; \chi_{0.05(2)}^2 = 5.99, \chi_{0.01(2)}^2 = 9.21$$

降低脂肪含量^[10]。功能基因的表达调控是多层次的,主要表现在转录、mRNA 的加工和翻译等环节。编码区包含了编码蛋白质的外显子,5' 调控区包含了调控基因转录的启动子,3' 调控区包含了调控基因转录的终止子,它们对基因的表达和调控起到了关键性的作用。本研究利用 PCR-SSCP 方法共检

测到 3 个 SNP 位点,其中 5' 调控区发现了 2 处,编码区第 4 外显子 1 处(沉默突变),在 3' 调控区没有发现多态性,说明 3' 调控区是高度保守的区域。可见,占 GH 基因总长近 1/3 的编码区和调控区表现出了较高的保守性。这些 SNP 位点是否会影响到生长激素基因的表达,还需要通过对不同基因型个

体做定量或半定量 RT-PCR 等方法进行验证,也可以通过不同基因型个体血液中细胞因子的水平进行检测来研究。

从基因频率在不同鸭种间的比较结果发现 *GH* 基因 5'调控区在北京鸭、西湖野鸭、樱桃谷鸭、山麻鸭、缙云麻鸭中趋于纯合保守,在绍兴鸭、荆江鸭中变异也相对较小,而在金定鸭中表现出较大的变异性,这反映了金定鸭较为独特的种质特征。由此,笔者可否推测 *GH* 基因 5'调控区与决定某些符合育种者需要的性状基因相连锁,这还有待于进一步的研究。

编码区外显子 4 基因座的统计分析表明,基因型频率和基因频率分布与种群类型和品种有关。肉用型鸭 CC 基因型频率显著高于蛋用型,即等位基因 C 和 D 分别是肉用型和蛋用型的优势等位基因。另外,等位基因 C 频率最高的北京鸭和樱桃谷鸭属于优秀的高产肉型,而等位基因 D 频率最高的金定鸭和绍兴鸭属于优秀的高产蛋型鸭种^[11]。由此,可以推测本研究所检测到的基因座很可能与生产性能相关,因而该 SNP 可以作为研究鸭经济性状如生长速度、产蛋率等的候选分子标记。

本研究从基因角度研究品种的种质特征,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利用种质资源提供了依据。

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. 64~70.
- [2] Yerle M, Mansais Y, Thomsen P D, *et al.* Location

of the porcine growth hormone gene to chromosome 12P^{1.2}-P^{1.5}[J]. *Animal Genetics*, 1993, 24(2): 129~131.

- [3] 欧阳建华,柳小春,施启顺,等. 鸡 *GH* 基因内含子 1 *Ms ρ* I 位点多态性及其与生长及繁殖性状的相关性[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(1): 122~127.
- [4] 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.
- [5] Kansaku N, Zadworny D, Guemene D. Genomic cloning of duck growth hormone. NCBI, GenBank, 08-JAN-2004.
- [6] Etherton T D, Terry D, Bauman D E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals [J]. *Physio Rev*, 1998, 78: 745~761.
- [7] 孙 逊,朱尚权. 生长激素结构与功能[J]. *国外医学*, 1999, 19(1): 6~9.
- [8] Brook C G, Hindmarsh P C, Stanhope R. Growth and growth hormone secretion [J]. *Endocrinology*, 1988, 119(2): 179~184.
- [9] Verstegen M W, van der Hel W, Brandsma H A, *et al.* Effects of recombinant porcine somatotropin on metabolic rate in growing pigs [J]. *Animal Science*, 1991, 69(7): 2 961~2 970.
- [10] Phipps R H, Weller R F, Craven N, *et al.* Use of prolonged-release bovine somatotropin for milk production in British Friesian dairy cows [J]. *Agricultural Science*, 1990, 115(1): 95~104.
- [11] 陈国宏,王克华,丁 铲,等. 中国禽类遗传资源[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2004. 84~98.