

GNRHR、IGF-1 基因对文昌鸡繁殖性状的遗传效应分析

吴旭^{1,2}, 王金玉^{1*}, 严美姣¹, 李慧芳², 陈宽维², 汤青萍², 朱文奇¹, 俞亚波¹

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 中国农业科学院家禽研究所, 扬州 225003)

摘要: 以控制文昌鸡繁殖性状的促性腺激素释放激素受体基因 (*GNRHR*) 和胰岛素样生长因子-1 基因 (*IGF-1*) 为候选基因, 采用 PCR-RFLP 技术检测 *GNRHR* 基因和 *IGF-1* 基因在文昌鸡中的单核苷酸多态性 (SNP), 同时对这 2 个基因与文昌鸡繁殖性状的相关性进行了研究。结果表明, *GNRHR* 基因内含子 1 的 537 bp 位置有 C→T 碱基的变异, 在文昌鸡中检测到 AA、Aa、aa 3 种基因型, A 等位基因的频率为 0.69, a 等位基因的频率为 0.31; 在 *IGF-1* 基因 5' 非翻译区 (5'UTR) 发现 C→T 碱基的变异, 改变了限制性内切酶 *Pst*I 识别位点, 经 PCR-RFLP 分析, 在文昌鸡中检测到 BB、Bb、bb 3 种基因型, B 等位基因的频率为 0.53, b 等位基因的频率为 0.47。对其基因型与所检测个体相应的繁殖性状采用 GLM 分析进行遗传效应研究, 结果表明, *GNRHR* 基因对 300 日龄产蛋数、400 日龄产蛋数有显著影响 (显性作用), *IGF-1* 基因对 300 日龄产蛋数有显著影响 (加性作用)。因此, 推测 *GNRHR* 基因和 *IGF-1* 基因可能是影响鸡繁殖性状的主效基因或与主效基因紧密连锁的标记基因, 并且能够在分子标记辅助选择中用于对鸡繁殖性状的遗传改良和固定。

关键词: 鸡; *GNRHR* 基因; *IGF-1* 基因; 繁殖; SNP

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)01-0031-05

Genetic Effects of *GNRHR* and *IGF-1* Genes on the Reproductive Traits in Wenchang Chicken

WU Xu^{1,2}, WANG Jin-yu^{1*}, YAN Mei-jiao¹, LI Hui-fang²,

CHEN Kuan-wei², TANG Qing-ping², ZHU Wen-qi¹, YU Ya-bo¹

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Institute of Poultry Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225003, China)

Abstract: Gonadotropin-releasing hormone receptor (*GNRHR*) gene and insulin-like growth factor 1 (*IGF-1*) gene which control the reproductive traits were studied as candidate genes on the Wenchang chicken (Chinese indigenous breed) in the present study. The single nucleotide polymorphism of *GNRHR* and *IGF-1* was detected for the association with the total egg production (NE), average days of continual egg-laying (ADCE) and number of double-yolked eggs (DYE) in Wenchang chicken. PCR-RFLP method was used for identification of genotypes. The frequency of restriction enzyme A/a alleles in the population was for *GNRHR* 0.69 (*Bpu*1102I A) and 0.31 (*Bpu*1102I a) and for *IGF-1* 0.53 (*Pst*I B) and 0.47 (*Pst*I b). χ^2 analysis of the two genes indicated that the frequencies of *GNRHR*, *IGF-1* fit Hardy-Weinberg equilibrium. The result showed that *GNRHR* *Bpu*1102I Aa genotype had greater number of eggs (300d) at 87.91 compared to 81.20 for *Bpu*1102I AA ($P < 0.01$). The *GNRHR* *Bpu*1102I Aa genotype had greater number of eggs (400 d) at 135.47 compared to 125.47 for *Bpu*1102I AA ($P < 0.01$). The *IGF-1* *Pst*I bb

收稿日期: 2006-02-06

基金项目: 国家科技基础条件平台 (2004DKA30450-04); 国家高技术研究发展计划 (2001AA243081)

作者简介: 吴旭 (1976-), 男, 江苏南通人, 博士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: eleven@ihb.ac.cn

* 通讯作者: 王金玉, Tel: 0514-7979075, E-mail: jiywang@yzu.edu.cn

genotype had greater number of eggs (300 d) at 89.03 compared to 82.61 for *Pst* I BB ($P < 0.05$) and *Pst* I bb genotype also had greater number of eggs (400 d) at 137.84 compared to 127.82 for *Pst* I BB ($P < 0.05$). The *IGF-1* *Pst* I bb genotype had greater ADCE at 3.38 compared to 2.96, 2.78 for *Pst* I BB and Bb ($P < 0.05$). Two significant effects of genes' marker were found: *GNRHR* of dominant effect on number of eggs and *IGF-1* of additive effect on that. The current research supports the effects of *GNRHR* and *IGF-1* genes on reproductive traits of chickens.

Key words: chicken; *GNRHR*; *IGF-1*; reproduction; SNP

鸡的繁殖性状属多基因控制的数量性状,由一系列主基因或数量性状位点(Quantitative Trait Locus, QTL)决定。目前,定位数量性状位点的方法主要有基因组扫描和候选基因法2种。与基因组扫描相比,候选基因法并不需要特定品种杂交,只要发现1个候选基因位点上存在多态性,便可直接在商业品系中研究此多态性与目标性状之间的相关性,从而使试验群体的规模可以很大。因此,该法的研究较基因组扫描活跃得多^[1~4]。

促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)主要由下丘脑产生,通过信号传递,调节动物的繁殖性能。促性腺激素释放激素在体内的功能是由促性腺激素释放激素受体(Gonadotropin-releasing hormone receptor gene *GNRHR*)介导的,Ikemoto等^[5]认为GnRH及其受体的相互作用在繁殖性能调节中是一个关键位点。Kim等^[6]研究表明在试验动物中抑制GnRH及其受体基因的表达将极大抑制其生殖活动。由于*GNRHR*是通过下丘脑-垂体-性腺轴影响动物的繁殖,在哺乳动物中,这种影响可能是通过细胞的生长和凋亡实现的^[7]。Jiang等^[8]在大白×梅山猪资源家系F₂代进行了*GNRHR*的基因型鉴定,在3'端非编码区(3'UTR)发现C/G替代,碱基突变与初产母猪的黄体生成数显著相关。

胰岛素样生长因子-1(Insulin-like growth factor-I, IGF-I)属胰岛素家族成员,与胰岛素高度同源,是动物生长轴的重要基因之一,在细胞生长和分化调节中有重要作用^[9]。在下丘脑-垂体-性腺轴中,生长激素(GH)对机体的作用需要*IGF-1*的介导,研究证明,在非近交的白来航鸡中,*IGF-1*和*GHR*(生长激素受体)基因与鸡的体重^[10]和产蛋性能^[11]相关。Nagaraja等^[4]以白来航鸡为材料,在鸡*IGF-1*基因5'端区域发现一处*Pst* I的RFLPs,连锁分析表明,基因型与某些产蛋性状间存在相关。改变GH/IGF作用轴

可能会伴随着繁殖性能的下降,因此,*IGF-1*作为候选基因可能与产蛋性能或双黄蛋相关^[12]。

中国家禽地方品种是世界动物遗传资源的重要组成部分。我国多样化的地理、生态、气候条件形成了种质特性各具特色的家禽品种资源。这些地方品种为广大科研人员提供了宝贵的研究素材^[13]。本研究将*GNRHR*基因和*IGF-1*基因作为影响鸡繁殖性状的候选基因,利用PCR-RFLP技术分析文昌鸡(中国地方品种)群体的多态性及其对繁殖性能的影响,以期改良鸡繁殖性状的分子标记辅助选择提供更好的途径。

1 材料与方 法

1.1 试验动物及其性能测定

120只纯种文昌母鸡(引自海南文昌鸡原种场),饲养于中国农业科学院国家家禽性能测定站(江苏邵伯),在完全相同的饲养管理条件下饲养,参照美国NRC营养标准。每个个体单笼饲养,记录个体产蛋数,双黄蛋数。

1.2 试验药品及基因组DNA提取

限制性内切酶、蛋白酶K、*Taq* DNA聚合酶、dNTPs等均购自上海生工。鸡翅下静脉采血,常规酚/氯仿法抽提DNA,电泳检测后,溶于TE溶液中,-20℃保存。

1.3 引物设计与合成

参考Dunn^[14]发现的SNP,对*GNRHR*基因内含子1部分片断进行特异性扩增,引物序列如下: Forward: 5'-GGTGTCTGAGGCTCATTTC A-3', Reverse: 5'-TAGCAATCGCTT-GCCCAGA-3'。采用Nagaraja等^[4]发表的引物,扩增*IGF-1*基因5'非编码区域,引物序列如下: Forward: 5'-GAC-TATACAGAAAGAACCAC-3', Reverse: 5'-TATCACTCAAGTGGC-TCAAGT-3'。引物由上海生工合成。

1.4 PCR 产物的扩增与酶切

GNRHR 基因内含子 1 的 PCR 反应体系为:10 ×PCR buffer 2.5 μL,10 mmol/L dNTPs 1 μL,20 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL,FP 1 μL,RL 1 μL,*Taq* 酶 0.2 μL(1U),模板 DNA 1 μL,DdH₂O 16.8 μL,总体积 25 μL。PCR 循环参数如下:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s,58 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 60 s,35 循环;72 °C 延伸 10 min。取 10 μL PCR 扩增产物,加入限制性内切酶 *Bpu*1102I (10U/μL) 1 μL、10×Loading Buffer 2 μL、加水至终体积为 20 μL。37 °C 酶切反应过夜。酶切产物用 3% 的琼脂糖凝胶以 10V/cm 电压电泳 1 h,紫外透射台观察扩增结果,Bio-Rad 多功能成像系统进行凝胶成像。

IGF-1 基因 5'非翻译区域的 PCR 反应体系同上,PCR 循环参数如下:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 45 s,60 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 60 s,35 循环;72 °C 延伸 10 min。取 8 μL PCR 扩增产物,加入限制性内切酶 *Pst*I (10U/μL) 1 μL、10×Loading Buffer 2 μL、加水至终体积为 20 μL。37 °C 酶切反应过夜。检测同上操作。

1.5 数据统计与分析

对文昌母鸡多态片断的基因型分布进行 χ^2 独立性检验,以了解每种类型在群体中的分布情况。PCR-RFLP 标记条带效应值的最小二乘分析模型:

$$Y_{ik} = u + G_i + I_k + B_{ik} + E_{ik}$$

Y_{ik} : 产蛋数的记录值; u : 群体平均值

G_i : *GNRHR* 标记基因型的固定效应

I_k : *IGF-1* 标记基因型的固定效应

B_{ik} : 两种标记基因型的互作效应

E_{ik} : 随机参差效应

根据以上线性模型,采用 SPSS (11.0) 的 GLM (General Linear Model) 和回归分析法 (REG 程序),分析基因型对繁殖性状的遗传效应。如果基

因型间无互作,采用单标记回归统计模型:

$$Y_i = u + G_i + E_i \text{ 或 } Y_k = u + I_k + E_k$$

2 结果与分析

2.1 *GNRHR* 基因多态性与繁殖性能的相关分析

2.1.1 *GNRHR* 基因的基因频率和基因型频率
GNRHR 基因的 PCR 产物经 *Bpu*1102I 酶切表现多态性(图 1)。AA 型由 400 bp 条带组成,Aa 型由 400、255、145 bp 条带组成,aa 型由 255、145 bp 条带组成。经统计,AA/Aa/aa 基因型频率分别为 0.45/0.48/0.07,等位基因 A/a 的频率为 0.69/0.31,该位点处于 Hardy-Wenberg 平衡状态。

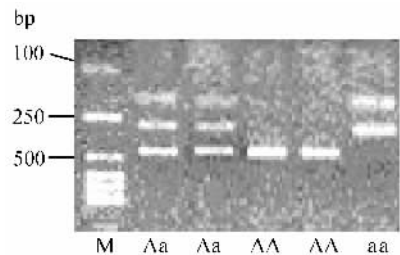


图 1 文昌鸡 *GNRHR* 基因 PCR 产物的 *Bpu*1102I 酶切电泳 (M:250 bp ladder)

Fig. 1 PCR-RFLP pattern for *GNRHR* intron 1 with *Bpu*1102I digestion

2.1.2 *GNRHR* 基因多态性与产蛋性能的相关分析

由于基因间无互作,根据单标记回归统计模型,采用 SPSS (11.0) 对数据进行 GLM 过程分析。计算不同基因型产蛋数、平均连产天数、双黄蛋数的最小二乘均数,并进行显著性检验。采用模型 ($Y = \text{总体均数} + \text{GNRHR 基因型 1} + \text{GNRHR 基因型 2} + \text{参差}$) 所估计出来的偏回归系数各代表:*GNRHR* 基因型 1 为加性效应值,其基因型 AA、Aa、aa 分别给予赋值 -1、0、1;*GNRHR* 基因型 2 为显性效应值,其基因型 AA、Aa、aa 分别给予赋值 1、-1、1,并进行显著性检验,结果见表 1。

表 1 文昌鸡 *GNRHR* 基因不同基因型与繁殖性能的相关性

Table 1 Correlation analysis between genotypes of *GNRHR* and reproductive traits in Wenchang chicken

性状 Traits	基因型 Genotype			加性效应 Additive	显性效应 Dominant
	AA	Aa	aa		
300 日龄产蛋数 300d NE	81.20 ^b	87.91 ^A	86.23 ^{AB}	0.111	-0.242*
400 日龄产蛋数 400d NE	125.47 ^b	135.47 ^a	135.83 ^{ab}	0.204	-0.197*
平均连产天数 ADCE	2.87	3.08	3.19	0.062	-0.061
双黄蛋数 DYE	0.37	0.29	0.35	-0.001	0.046

数值为最小二乘均数,标有相同字母表示差异不显著,*、小写字母表示差异显著,大写字母表示差异极显著。下同

All the dates in the table are least square means. a, b Means within a row with no common superscript differ significantly at *, $P < 0.05$, small letter- $P < 0.05$; Capitals- $P < 0.01$. The same as below

由表1可见, *GNRHR* 基因多态性与繁殖性状中的300、400日龄产蛋数显著相关。经多重比较发现, *GNRHR*^{Aa} 基因型个体比 *GNRHR*^{AA} 基因型个体300日龄产蛋数高8.26% ($P < 0.01$); *GNRHR*^{Aa} 基因型个体比 *GNRHR*^{AA} 基因型个体400日龄产蛋数高7.97% ($P < 0.05$)。结果显示, *GNRHR* 基因以显性作用, 对300日龄产蛋数产生的显性效应值为-0.242 ($P < 0.05$), 对400日龄产蛋数产生的显性效应值为-0.197 ($P < 0.05$)。

2.2 IGF-1 基因多态性与繁殖性能的相关分析

2.2.1 IGF-1 基因的基因频率和基因型频率

IGF-1 基因的PCR产物经 *Pst*I 限制酶消化后表现多态性(图2)。其中等位基因B仅表现为621 bp条带, 等位基因b则表现为257 bp和364 bp条带。经统计分析, 文昌鸡群体中BB/Bb/bb基因型频率分别为0.32/0.41/0.27, 等位基因B/b的频率为0.53/0.47, 该位点处于Hardy-Wenbergh平衡状态。

2.2.2 IGF-1 基因多态性与产蛋性能的相关分析

亦采用单标记回归统计模型及GLM过程分析, *IGF-1* 基因型1为加性效应值, 其基因型BB型、Bb型、bb型分别给予赋值-1、0、1; *IGF-1* 基因型2为显性效应值, 其基因型BB型、Bb型、bb型分别给予

赋值1、-1、1, 并进行显著性检验。

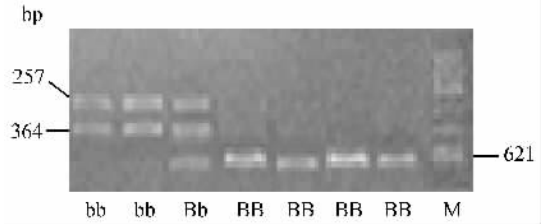


图2 文昌鸡 *IGF-1* 基因 PCR 产物的 *Pst*I 酶切电泳 (M: PBR322/MspI)

Fig. 2 PCR-RFLP pattern for 5' UTR of *IGF-1* with *Pst*I digestion

经 *Pst*I 酶切的 *IGF-1*-*Pst*I 基因的不同基因型与繁殖性能的相关分析见表2。由表2可知, *IGF-1*^{bb} 个体300与400日龄产蛋数分别比 *IGF-1*^{BB} 型个体高7.77% ($P < 0.05$) 和7.84% ($P < 0.05$); *IGF-1*^{bb} 个体300日龄产蛋数比 *IGF-1*^{Bb} 型个体高7.34% ($P < 0.05$); *IGF-1*^{bb} 个体平均连产天数分别比 *IGF-1*^{BB} 型个体和 *IGF-1*^{Bb} 型个体长0.42d ($P < 0.05$) 和0.60d ($P < 0.05$)。结果显示, *IGF-1* 基因以加性作用, 对300日龄产蛋数产生的加性效应值为0.199 ($P < 0.05$)。

表2 文昌鸡 *IGF-1* 基因不同基因型与繁殖性能的相关性

Table 2 Correlation analysis between genotypes of *IGF-1* and reproductive traits in Wenchang chicken

性状 Traits	基因型 Genotype			加性效应 Additive	显性效应 Dominant
	BB	Bb	bb		
300日龄产蛋数 300d NE	82.61 ^a	82.94 ^a	89.03 ^b	0.199 [*]	0.106
400日龄产蛋数 400d NE	127.82 ^a	128.56 ^{ab}	137.84 ^b	0.177	0.089
平均连产天数 ADCE	2.96 ^a	2.78 ^a	3.38 ^b	0.114	0.143
双黄蛋数 DYE	0.34	0.29	0.42	0.034	0.053

3 讨论

3.1 *GNRHR* 基因多态性与文昌鸡繁殖性能的关系

本研究分析了 *GNRHR* 基因标记对文昌鸡的影响。Dunn等^[14]发现, 在商品代肉鸡群体中, *GNRHR* 基因标记对鸡的双黄蛋产量有加性作用, 当排除父本效应时发现, *GNRHR* 对双黄蛋和产蛋数分别具有加性效应 ($t = 2.18, df = 612$) 和显性效应 ($t = 2.36, df = 612$)。在本试验中, 笔者未发现 *GNRHR* 基因对双黄蛋的加性效应, 这可能是观察值过少的缘故, *GNRHR* 基因对文昌鸡300、400日龄产蛋数都有显著影响, 以显性方式作用, 这与Dunn等^[14]

研究结果一致。在本研究中 *GNRHR* 基因的 aa 基因型观察数较少, 需要扩大样本数作进一步研究。

3.2 *IGF-1* 基因多态性与文昌鸡繁殖性能的关系

Nagaraja等^[4]同样采用 *Pst*I 酶进行PCR-RFLP分析, 也分离出+/+、+/-、-/- 3种基因型。分析其与蛋用性状的关系时发现, -/- 基因型的蛋重较正常的轻, 而+/- 基因型的蛋壳较重, 基因型间与体重、摄食及产蛋率等性状无关, 其结果表明 *IGF-1* 参与了体内的钙代谢活动。但在本试验中发现, *IGF-1* 基因对文昌鸡300日龄产蛋数有显著影响, 以加性方式作用, 而且与文昌鸡的连产性状相关。这说明, *IGF-1* 基因可能与繁殖数量性状位

点有一定的距离,因而 IGF-1 基因和数量性状之间的关系可能随着种群、品系和家系的不同而不同。目前功能基因在不同试验条件下所取得的试验结果还不能进行比较,这是因为对于基因的作用模式和影响因素还不是很清楚。

3.3 GNRHR 基因与 IGF-1 基因的协同作用

Hanrahan 等^[15]发现生长分化因子 GDF9 和 BMP15 两个基因上的自然突变位点,证明这两个基因的突变在绵羊 Belclare 和 Cambridge 中是与杂合子母羊的排卵率增加以及纯合子的不育相关的。另外,该研究还指出,在 GDF9 和 BMP15 两个基因上同时突变的绵羊比仅一个基因上突变的绵羊有更多的排卵率。

鸡繁殖性能是受微效多基因和环境因素影响的复杂的数量性状,本研究在对 GNRHR 基因和 IGF-1 基因间的协同效应进行分析时,未发现它们的互作。其中的原因可能有以下两条:首先可能是文昌鸡品种的原因,其次,GNRHR 基因和 IGF-1 基因间分别与其它主效基因处于连锁不平衡,但它们之间并没有互作。综上所述,GNRHR 基因和 IGF-1 基因分别对文昌鸡繁殖性能产生作用,而且它们可能是影响鸡繁殖性状的主效基因或与主效基因紧密连锁的标记基因,能够用于对鸡的繁殖性状进行分子标记辅助选择。

参考文献:

- [1] Rothschild M, Jacobson C, Vashe D, *et al.* The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:201~205.
- [2] Rothschild M F, Solter M. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock[J]. Probe, 1997, 8: 13~20.
- [3] Short T H, Rothschild M F, Southwood O I, *et al.* Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines of pigs[J]. J Anim Sci, 1997, 75: 3 138~3 142.
- [4] Nagaraja S C, Aggrey S E, Yao J, *et al.* Trait association of a genetic marker near the IGF-I gene in egg-laying chicken[J]. J Hered, 2000, 91: 150~156.
- [5] Ikemoto T, Enomoto M, Park M K. Identification and characterization of a reptilian GnRH receptor from the leopard gecko[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2004, 214 (1-2): 137~147.
- [6] Kim J H, Kim H J, Noh H S, *et al.* Suppression by ethanol of male reproductive activity[J]. Brain Research, 2003, 989 (1): 91~98.
- [7] Takekida S, Deguchi J, Samoto T, *et al.* Comparative analysis of the effects of gonadotropin-releasing hormone agonist on the proliferative activity, apoptosis, and steroidogenesis in cultured porcine granulosa cells at varying stages of follicular growth[J]. Endocrine, 2000, 12:61~67.
- [8] Jiang Z H, Gibson J P, Archibald A L, *et al.* The porcine gonadotropin-releasing hormone receptor gene (GNRHR): genomic organization, polymorphisms, and association with the number of corpora lutea[J]. Genome, 2001, 44(1): 7~12.
- [9] Scanes C G, Proudman J A, Radecki S V. Influence of continuous growth hormone insulin-like growth factor I administration in adult female chickens[J]. General and Comparative Endocrinology, 1999, 114: 315~323.
- [10] Feng X P, Kuhnlein U, Fairfull W R, *et al.* Association of a genetic marker near the growth hormone receptor gene with juvenile body weight in chickens[J]. J Hered, 1998, 89: 355~359.
- [11] 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]. Anim Genet, 1997, 28: 116~123.
- [12] Hocking P M, Bernard R, Wilkie R S, *et al.* Plasma growth hormone and insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentrations at the onset of lay in ad libitum and restricted broiler breeder fowl[J]. Br Poult Sci, 1994, 35: 299~308.
- [13] 程光潮,黄凡美,周勤宣,等.中国地方鸡种种质特性[M].上海:上海科学技术出版社,2000.
- [14] Dunn I C, Miao Y W, Morris A, *et al.* A study of association between genetic markers in candidate genes and reproduction traits in one generation of a commercial broiler breeder hen population [J]. Heredity, 2004, 92: 128~134.
- [15] Hanrahan J P, Gregan S M, Mulaant P, *et al.* Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*)[J]. Biol Reprod, 2004, 70 (4):900~909.