

王丽华,段修军,董 颺,等. 黑羽番鸭 GH 基因多态性与体质量、屠宰性能的相关性[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):30-33.

黑羽番鸭 GH 基因多态性与体质量、屠宰性能的相关性

王丽华¹,段修军^{1,2},董 颺^{1,2},孙国波^{1,2},卞友庆²

(1. 江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300; 2. 国家级水禽基因库,江苏泰州 225300)

摘要:以黑羽番鸭为素材,利用 PCR-SSCP 技术寻找该群体 GH 基因单核苷酸多态性(SNPs),并分析 SNPs 与体质量、屠宰性能的关联性。结果表明,在 GH 基因第 1 内含子上发现了 A1251C、A1322G、T1378C、G1440A 共 4 个 SNP,形成了 AA、AB、BB 3 种基因型,群体纯合度为 0.502 7,多态信息含量为 0.373 6。在番鸭早期生长发育过程中,BB 型公鸭体质量在不同周龄时处于最高值;在 13 周龄屠宰时,BB 型公鸭的宰前活质量、屠体质量、半净膛质量、全净膛质量显著高于 AA 型和 AB 型($P<0.05$);在内脏组织中,BB 型腹脂质量、心质量显著高于 AB 型($P<0.05$);AA 型、AB 型、BB 型 3 种基因型间屠宰指标百分比无显著差异($P>0.05$)。母鸭所有指标在 3 种基因型间均无显著差异($P>0.05$)。这些关联分析表明 B 基因可能是公鸭早期增重的有利基因,在母鸭上还需进一步验证。

关键词:黑羽番鸭;生长激素基因;体质量;屠宰性能

中图分类号: S834.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0030-04

目前,水禽生长方面的功能基因研究主要是围绕下丘脑-垂体-生长轴调节过程中的基因。生长激素(growth hormone, GH)是动物垂体前叶合成、分泌的一种单链蛋白类激素,具有种属特异性,在刺激生长、促进代谢、强化其他内分泌激素方面具有重要作用,还对动物生殖功能产生影响^[1]。通过对动物(包括人和畜禽)GH 基因的深入研究,目前已明晰其基本结构。通常,畜禽 GH 分子量为 21~22 ku,由 186~191 个氨基酸组成。动物 GH 基因一级结构主要有如下特点:包括人类在内的灵长类动物中, GH 基因拷贝数较多; GH 基因主要由 5~6 个外显子和 4~5 个内含子所组成,且 GH 基因的外显子数量和大小存在种间特异性; GH 基因的 cDNA 长度一般为 650~1 200 bp。在 1988 年,Chen 等首次克隆获得了 820 个碱基对的鸭 GH 基因 cDNA 序列,编码 216 个氨基酸,含有 1 个 27 个残基的信号肽,该序列与鸡高度同源^[2]。2004 年 GenBank 上才有了鸭 GH 基因全序列的报道,该序列包含了 5 219 个碱基对,同样编码 216 个氨基酸,包含了 5 个外显子和 4 个内含子。虽然有了鸭 GH 基因全序列,但是在各个鸭品种 GH 基因多态性方面开展的研究工作较少,鉴于此,本

试验拟采用 PCR-SSCP 方法检测黑羽番鸭 GH 基因序列中潜在的 SNPs,并分析不同基因型间体质量、屠宰性能之间的差异,为 GH 基因功能研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 试验对象

试验所用黑羽番鸭由江苏农牧科技职业学院提供,选择健康黑羽番鸭 135 只进行饲养,其中公鸭 70 羽,母鸭 65 羽。在初生(0 周龄)及 2、4、6、8、10、13 周龄时测定禁食 6 h 后的体质量;10 周龄时,从翅静脉采血 2 mL,采用肝素钠抗凝,用于提取 DNA。13 周龄时,对所有黑羽番鸭进行屠宰测定,测定指标为宰前活质量、屠体质量、半净膛质量、全净膛质量、腿肌质量、胸肌质量、肝质量、心质量、腺肌胃质量、腹脂质量等,用公式计算出相应指标占有的比例。

1.2 引物设计

根据 GenBank 中公布的水禽 GH 基因序列,设计了多对引物用于检测黑羽番鸭群体中存在的 SNPs。引物由生物公司进行合成。试验所用引物序列及信息见表 1。

表 1 试验所用引物序列及信息

引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度 (bp)	扩增区域	退火温度 (℃)
GH11	F:TACCATTGCGAACACGTCTG;R:GGAGAGTTGCTCAGATCTTG	194	5'端	55
GH12	F:CCTG GAGGTCTTCAAGAAAC;R:GGCAACAGTACCATCCTATC	186	内含子 1	56
GH13	F:GCTTTCCTCAACAGCATGACT;R:CCTGTCTGAAGCCTTGAATG	210	内含子 1	56
GH14	F:CGGCTCTATCCCATTAAAGAC;R:AGAGTTCCTAAGTGTACACAG	170	内含子 2	54
GH15	F:GAAGTCTCTGTACGTCTCTG;R:TCATCTCCACTTTGCTGCAG	180	外显子 2	54
GH16	F:CGAGCGTGTTAAGGAACAAC;R:GTTCACTGTCTTCAGTGAG	250	内含子 1	55

1.3 DNA 提取和检测

采用酚/氯仿法抽提黑羽番鸭基因组 DNA,并溶于 TE 中。用核酸浓度测定仪测定其浓度和纯度,然后稀释成 100 ng/μL 备用。

1.4 PCR 扩增

PCR 反应物组成:10×PCR buffer(不含 Mg²⁺) 2.5 μL、

收稿日期:2013-12-04
基金项目:中国农业科学院家养动物种质资源平台建设项目;江苏省农业三新工程项目[编号: SXGC(2013)361]。
作者简介:王丽华(1972—),女,辽宁营口人,硕士,副教授,主要从事家禽生产与科研工作。E-mail: jstzwlh2008@163.com。

10 mmol/L dNTPs 2 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L、10 pmol/L 上下游引物各 1 μ L、5 U/ μ L *Taq* 酶 0.2 μ L、100 ng/ μ L DNA 模板 1 μ L,加 ddH₂O 至 25 μ L。

PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,54 ~ 56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 PCR 产物检测及分型

PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳,结束后用凝胶成像系统检测扩增结果。条带单一清楚、长度大小符合的产物才能用 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离。点样前样品需要进行处理形成单链,经过 5 V/cm 的电压电泳过夜后,用银染显色,然后进行基因型分析。

1.6 测序

挑选纯合基因型的 PCR 产物进行切胶回收,连接到 PMD18-T 载体上转化到大肠杆菌 DH5 α 上,经过大量繁殖后,通过鉴定后提取质粒送公司进行测序分析。

1.7 统计分析

测序所得序列通过 DNAMAN 软件进行比对获得不同基因型之间具体的序列差异。采用 SPSS 13.0 软件中单因素方差法分析不同基因型之间体质量和屠宰性能的差异。

2 结果与分析

2.1 SSCP 检测结果

以黑羽番鸭基因组 DNA 为模板与所设计的 6 对引物分别进行 PCR 扩增,扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶检测,扩增片段与预期大小一致且特异性好,方可用于 SSCP 分析。

在 SSCP 结果分析中发现,只有引物 GH16 扩增的片段可以检测到多态,聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染结果见图 1。由图 1 可知,在黑羽番鸭群体中共检测到 3 种基因型,纯合子定义为 AA、BB,杂合子定义为 AB。

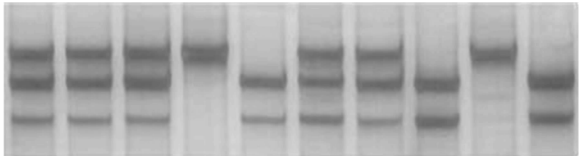


图1 引物GH16对黑羽番鸭PCR扩增产物的SSCP分析

2.2 不同纯合基因型的克隆和测序

取 AA、BB 基因型多个 PCR 产物进行回收、克隆、测序。AA 和 BB 基因型之间序列比较发现,存在 4 个单核苷酸变异,均位于第 1 内含子,分别为第 1 251 位点 A-C 突变、第 1 322 位点 A-G 突变、第 1 378 位点 T-C 突变、第 1 440 位点 G-A 突变(图 2)。

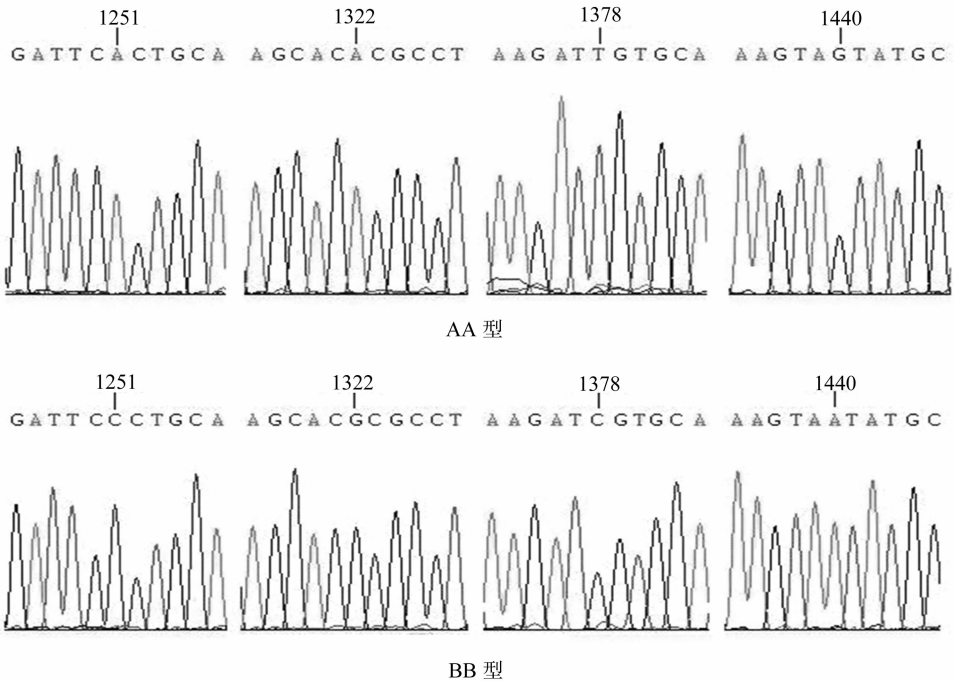


图2 引物GH16不同基因型间核苷酸序列比较

2.3 不同基因型(基因)频率在黑羽番鸭群体中的分布

在引物 GH16 检测到的不同基因型在黑羽番鸭群体中分布情况见表 2。由表 2 可知,杂合子 AB 型基因型频率最高,为 0.614 8;AA 型次之,为 0.229 6;BB 型最低,为 0.155 6。A 等位基因频率比 B 等位基因频率高 0.074 0。

表2 引物 GH16 不同基因型及等位基因在黑羽番鸭群体中的分布

素材	样本量 (羽)	基因型频率			等位基因频率	
		AA	AB	BB	A	B
黑羽番鸭	135	0.229 6	0.614 8	0.155 6	0.537 0	0.463 0

2.4 遗传特性分析

根据 GH 基因突变位点等位基因频率可推算出黑羽番鸭群体平均纯合度为 0.502 7,杂合度为 0.497 3,多态性信息含量为 0.373 6(表 3)。

表3 黑羽番鸭 GH 基因多态位点遗传参数

位点	纯合度	杂合度	多态信息含量 (PIC)
GH16	0.502 7	0.497 3	0.373 6

2.5 生产性能与多态位点的关联性分析

2.5.1 GH16 多态位点对体质量性能的影响 由表 4 可知, BB 型公鸭体质量在所有时间点均处于最高值, 初生时 BB 型公鸭体质量显著性高于 AA 型; 在 4、6、8 周龄时 3 种基因型

间体质量无显著差异; 在 2、10、13 周龄时, BB 型体质量显著性高于 AA、AB 型, AA 与 AB 型之间无显著差异。除 0 周龄外, 其他各周龄母鸭均以 BB 型体质量处于最高值; 母鸭各周龄不同基因型之间均无显著性差异。

表 4 引物 GH16 不同基因型间体质量比较

分类	基因型	样本量(羽)	体质量(g)						
			0 周龄	2 周龄	4 周龄	6 周龄	8 周龄	10 周龄	13 周龄
公鸭	AA	19	47.1 ± 4.73c	307.2 ± 34.97bc	810.8 ± 92.13a	1 561.5 ± 177.40a	2 164.4 ± 274.92a	2 677.1 ± 318.17b	3 118.4 ± 315.10b
	AB	38	50.1 ± 4.55ab	324.9 ± 27.38b	810.30 ± 93.291a	1 573.6 ± 172.16a	2 171.5 ± 249.53a	2 704.5 ± 307.56b	3 104.3 ± 325.37b
	BB	13	51.5 ± 2.71a	347.09 ± 31.16a	836.3 ± 96.96a	1 647.9 ± 187.35a	2 314.9 ± 219.97a	2 911.6 ± 176.92a	3 327.6 ± 214.13a
母鸭	AA	12	49.0 ± 3.91abc	299.4 ± 30.03c	611.1 ± 74.75b	1 150.8 ± 128.81b	1 511.2 ± 167.53b	1 762.3 ± 183.24c	1 862.0 ± 217.81c
	AB	45	48.9 ± 3.08abc	296.8 ± 31.65c	644.2 ± 67.14b	1 196.7 ± 111.31b	1 562.9 ± 139.29b	1 799.2 ± 137.27c	1 926.5 ± 159.46c
	BB	8	47.9 ± 2.26bc	301.5 ± 27.75c	659.1 ± 69.41b	1 246.5 ± 100.77b	1 600.4 ± 99.21b	1 851.9 ± 101.64c	1 945.5 ± 115.99c

注: 同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下表同。

2.5.2 GH16 多态位点对屠宰性能的影响 由表 5 可知, BB 型公鸭活质量、屠体质量、半净膛质量、全净膛质量均显著高于 AA 型、AB 型; 胸肌质量、腿肌质量、肝质量在 3 种基因型间无显著差异; BB 型腹脂质量、心质量显著高于 AB 型, AA

型与 BB 型、AB 型无显著差异; BB 型腺肌胃质量显著高于 AA 型, AB 型与 AA 型、BB 型无显著差异。
10 个屠宰质量指标在母鸭 3 种基因型之间均无显著差异。

表 5 引物 GH16 不同基因型间屠宰性能质量比较

分类	基因型	样本量(羽)	宰前活质量(g)	屠体质量(g)	半净膛质量(g)	全净膛质量(g)	胸肌质量(g)
公鸭	AA	19	3 118.4 ± 315.10b	2 841.8 ± 286.27b	2 653.2 ± 280.73b	2 451.2 ± 246.69b	218.6 ± 29.43a
	AB	38	3 104.3 ± 325.37b	2 857.6 ± 288.53b	2 658.0 ± 290.40b	2 467.7 ± 270.67b	220.4 ± 34.45a
	BB	13	3 327.6 ± 214.13a	3 060.4 ± 203.28a	2 838.9 ± 195.31a	2 645.9 ± 194.81a	238.2 ± 29.49a
母鸭	AA	12	1 862.0 ± 217.81c	1 689.8 ± 197.57c	1 541.7 ± 167.83c	1 388.1 ± 153.23c	125.4 ± 16.11b
	AB	45	1 926.5 ± 159.46c	1 738.6 ± 155.15c	1 595.3 ± 160.94c	1 458.6 ± 149.14c	135.4 ± 16.67b
	BB	8	1 945.5 ± 115.99c	1 736.7 ± 117.14c	1 567.5 ± 104.64c	1 450.3 ± 177.87c	134.7 ± 11.71b

分类	基因型	样本量(羽)	腿肌质量(g)	腹脂质量(g)	肝质量(g)	腺肌胃质量(g)	心质量(g)
公鸭	AA	19	137.9 ± 36.41a	42.5 ± 21.46ab	61.5 ± 11.53a	69.5 ± 15.87b	26.0 ± 7.71ab
	AB	38	148.4 ± 20.50a	37.1 ± 19.04b	60.3 ± 13.96a	72.8 ± 12.61ab	24.8 ± 3.90b
	BB	13	147.6 ± 15.96a	55.5 ± 24.91a	60.9 ± 12.88a	78.8 ± 8.85a	28.9 ± 5.24a
母鸭	AA	12	73.0 ± 8.05b	42.0 ± 16.54ab	31.1 ± 7.96b	52.9 ± 9.07c	14.3 ± 3.19c
	AB	45	74.0 ± 7.91b	41.1 ± 14.23ab	34.7 ± 7.78b	56.6 ± 8.28c	16.8 ± 2.81c
	BB	8	70.1 ± 9.62b	47.0 ± 11.56ab	36.4 ± 3.63b	55.4 ± 4.07c	16.6 ± 2.88c

由表 6 可知, 不同基因型公鸭之间、不同基因型母鸭之间的屠宰率、半净膛率、全净膛率、胸肌率、腿肌率、腹脂均无显

著性差异。

表 6 引物 GH16 不同基因型间屠宰性能比例比较

种类	基因型	样本量(羽)	屠宰率(%)	半净膛率(%)	全净膛率(%)	胸肌率(%)	腿肌率(%)	腹脂率(%)
公鸭	AA	19	91.23 ± 4.08ab	85.08 ± 2.60a	78.66 ± 2.89ab	17.81 ± 1.38a	11.21 ± 2.84ab	1.70 ± 0.80b
	AB	38	92.11 ± 2.30a	85.60 ± 2.08a	79.48 ± 2.48a	17.82 ± 1.57a	12.07 ± 1.56a	1.51 ± 0.84b
	BB	13	92.01 ± 3.33ab	85.33 ± 2.87a	79.62 ± 5.49a	17.96 ± 1.24a	11.16 ± 0.87ab	2.11 ± 0.94b
母鸭	AA	12	90.76 ± 1.55ab	82.93 ± 2.87b	74.74 ± 4.29c	18.07 ± 1.25a	10.56 ± 0.94bc	2.98 ± 1.03a
	AB	45	90.23 ± 2.51ab	82.74 ± 3.37b	75.68 ± 3.88bc	18.58 ± 1.46a	10.18 ± 0.94bc	2.81 ± 0.91a
	BB	8	89.24 ± 1.79b	82.57 ± 2.46b	74.49 ± 7.14bc	18.68 ± 1.51a	9.72 ± 1.31c	3.24 ± 0.79a

3 讨论

目前已经开展了大量畜禽关于 GH 基因多态方面的研究, 结果表明其存在大量的多态位点, 以猪 GH 基因多态性研究成效最为显著。在猪 GH 基因 5' 端、编码阅读框和 3' 端序

列中总计 26 个 SNPs, 18 个在内含子上, 6 个在外显子 2 中, 1 个在外显子 3 中, 1 个在外显子 4 中, 某些 SNPs 对猪生产性能有显著性影响^[3-7]。牛 GH 基因多态性研究主要是分析其对产奶量、乳脂率、乳蛋白的影响程度^[8-10]。在禽类上, 鸡 GH 基因在禽类上研究较早^[11-15], 鸭研究处于相对落后阶段,

尚有许多工作需要开展。许盛海等在鸭中检测到了 11 个点突变,分别为 5'调控区序列 2 个,外显子 4 序列中 1 个,内含子 2 序列中 7 个,内含子 3 序列中 1 个^[16-17]。邹剑敏等在 *GH* 基因外显子上第 3 01 位点发现了 C-T 突变,分析了这个突变点对血浆中低密度脂蛋白 (LDL-C) 含量具有显著影响^[18]。吉文林等在我国 6 个地方鸭品种中检测到了 *GH* 基因 1 个 C-T 突变,位于外显子 4 中,分析了该突变在不同鸭群中的分布情况^[19];伍革民等应用 PCR-SSCP 技术分析了 5 个品种鸭 *GH* 基因潜在的点突变,检测序列覆盖了 5'和 3'调控区及部分外显子和内含子,共发现了 5 个多态位点^[20];李慧芳等发现 *GH* 基因第 4 外显子 C3701T 的突变对高邮鸭最长连产天数和双黄率有显著相关^[21]。

本试验设计了 6 对引物,其中引物 GH16 出现了多态位点,在第 1 内含子上发现了 4 个 SNP,分别为 G945A、T1039G、A1251C 和 A1322G,形成了 3 个基因型,分别为 AA 型、AB 型、BB 型。2 个等位基因的频率较为接近,黑羽番鸭的纯合度为 0.502 7,多态信息含量为 0.373 6,说明黑羽番鸭该位点上群体呈现中等多态。在杂合度越大、PIC 越高的群体中遗传变异的程度就越大,在选育过程中可进行选择的潜力越大;以此类推,在杂合度越小、PIC 越低的群体中遗传变异的程度就越小,对群体进行选择的潜力就越小。黑羽番鸭处于中等水平,说明对 *GH* 基因该位点还有选择空间。公鸭 13 周龄 BB 型的体质量(同宰前活质量)、屠体质量、半净膛质量、全净膛质量显著高于 AA 型和 AB 型,3 种基因型的胸肌质量与腿肌质量差异不显著;在内脏器官组织中,BB 型腹脂质量、心质量显著高于 AB 型;AA 型、AB 型、BB 型 3 种基因型间屠宰指标百分比无显著差异;母鸭所有指标在 3 种基因型间均无显著差异。畜禽的生产性能是由内在遗传因素和外在环境因素共同作用的结果,不同性别的鸭在其内在因素的影响下,可导致同一基因在性别之间所起作用效果存在差异,导致最终所起作用不同。

参考文献:

- [1] Buggiotti L, Primmer C R. Molecular evolution of the avian growth hormone gene and comparison with its mammalian counterpart[J]. Journal of Evolutionary Biology, 2006, 19(3): 844-854.
- [2] 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.
- [3] Kirkpatrick B W, Huff B M. Detection of insertion polymorphisms in 5' flank and second intron of the porcine growth hormone gene[J]. Animal Genetics, 1991, 22(2): 192-193.
- [4] Larsen N J, Nielsen V H. Apal and Cfo I polymorphisms in the porcine growth hormone gene[J]. Anim Genet, 1993, 24(1): 71.
- [5] 郑茂恩, 潘登科, 冯书堂, 等. 小型猪生长激素基因启动子区 SNPs 分析[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(5): 639-644.
- [6] 陶 勇, 经荣斌, 任善茂, 等. 猪 *GH* 基因部分多态特征与早期体重的相关研究[J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(3): 217-220.
- [7] 帅素容, 李学伟, 朱 砺, 等. 11 个猪品种生长激素 (pGH) 基因多态性及其遗传分化研究[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(8): 753-759.
- [8] Falaki M, Prandi A, Corradini C, et al. Relationships of growth hormone gene and milk protein polymorphisms to milk production traits in Simmental cattle[J]. The Journal of Dairy Research, 1997, 64(1): 47-56.
- [9] Høj S, Fredholm M, Larsen N J, et al. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle[J]. Animal Genetics, 1993, 24(2): 91-95.
- [10] Lucy M C, Hauser S D, Eppard P J, et al. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production[J]. Domestic Animal Endocrinology, 1993, 10(4): 325-333.
- [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(2): 116-123.
- [12] Fotouhi N, Karatzas C N, Kuhnlein U, et al. Identification of growth hormone DNA polymorphisms which respond to divergent selection for abdominal fat content in chickens[J]. Theor Appl Genet, 1993, 85: 931-936.
- [13] 欧阳建华, 柳小春, 施启顺, 等. 鸡 *GH* 基因内含子 1 Msp 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(2): 122-127.
- [14] 李长春, 傅 田, 强巴央宗, 等. 藏鸡和隐性白羽鸡 *GH* 基因的 SNP 检测及其与生长性状间的关联分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38(11): 2327-2332.
- [15] 颜炳学, 邓学梅, 费 菁, 等. 鸡生长激素基因单核苷酸多态与生长及屠体性状的相关性[J]. 科学通报, 2003, 48(12): 1304-1307.
- [16] 许盛海, 包文斌, 程金花, 等. 鸭生长激素 (*GH*) 基因编码区及调控区多态性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(9): 907-912.
- [17] 许盛海, 包文斌, 黄 军, 等. 鸭生长激素基因内含子 2、3 多态性分析[J]. 遗传, 2007, 29(4): 438-442.
- [18] 邹剑敏, 李慧芳, 张汤杰, 等. *GH* 基因多态与生长期高邮鸭主要血浆生化指标及部分生产性状的相关分析[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(6): 602-607.
- [19] 吉文林, 许盛海, 徐 琪, 等. 6 个中国地方鸭品种生长激素 (*GH*) 基因编码区多态性分析[J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(12): 45-47.
- [20] 伍革民, 郗正林, 许晓凤. 5 个鸭品种生长激素基因座位遗传多态性检测[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(5): 1300-1301.
- [21] 李慧芳, 朱文奇, 宋卫涛, 等. 催乳素 (PEL) 和生长激素 (GH) 基因对高邮鸭产蛋性能的遗传效应分析[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(2): 263-268.