

杨红,张勇,田启培,等.高脚鸡、矮脚鸡和百宜黑鸡 *GH* 基因多态性及生物信息学分析[J].江苏农业科学,2015,43(11):38-41.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.010

# 高脚鸡、矮脚鸡和百宜黑鸡 *GH* 基因多态性及生物信息学分析

杨红<sup>1</sup>,张勇<sup>1</sup>,田启培<sup>2</sup>,韦世文<sup>3</sup>,何琦<sup>4</sup>,杨隆<sup>1</sup>,王芳芳<sup>2</sup>

(1. 贵州大学高原山地动物遗传育种与繁殖省部共建教育部重点实验室/贵州大学动物科学学院/  
贵州省动物遗传育种与繁殖重点实验室,贵州贵阳 550025; 2. 贵州大学教学实验场,贵州贵阳 550025;  
3. 贵州省兴义市农业局品改站,贵州兴义 562400; 4. 贵州省贵阳市花溪区农业局,贵州贵阳 550025)

**摘要:**以高脚鸡、矮脚鸡和百宜黑鸡为研究对象,构建品种 DNA 池,PCR 扩增生长激素(*GH*)基因所有外显子和部分内含子序列,采用直接测序法对 3 个鸡种的 *GH* 基因进行多态性检测,利用生物信息学软件预测不同多态性位点对 *GH* 基因 mRNA 二级结构的影响,旨在通过对贵州胫长差异较大的高脚鸡、矮脚鸡和百宜黑鸡 *GH* 基因的多态性及其生物信息学进行分析,研究 *GH* 基因对不同鸡种胫骨发育的影响。结果表明:在高脚鸡、矮脚鸡和百宜黑鸡 3 个鸡种 *GH* 基因中共检测到 8 个 SNPs 位点,其中 A1133G、G1166A 位于第 2 内含子区,C2027G、C2030T 位于第 4 外显子区,G2152A 位于第 4 内含子区,G3347A 位于第 5 外显子区,T3416C 和 C3436T 位于 3' 非编码区。生物信息学分析显示位于外显子区的 3 个 SNPs 均为同义突变,对 *GH* 基因的 mRNA 二级结构有一定影响。

**关键词:**DNA 池;*GH* 基因;胫骨长度;SNPs;高脚鸡;矮脚鸡;百宜黑鸡

**中图分类号:**S831.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)11-0038-04

贵州省地形复杂、地貌特殊,具有丰富的地方鸡种资源,其中包括竹乡鸡、威宁鸡、黔东南小香鸡、高脚鸡、矮脚鸡、百宜黑鸡等。高脚鸡、矮脚鸡、百宜黑鸡均为贵州省特有的地方鸡种,在体型外貌尤其是胫骨长度上存在较大差异。高脚鸡是贵州省特有的地方品种,1982 年录入《贵州省畜禽品种志》,2006 年录入《中国畜禽资源名录》,其胫骨比其他品种鸡长 3~4 cm,公鸡平均胫长 13.62 cm、母鸡平均胫长 10.92 cm<sup>[1]</sup>。矮脚鸡分布于贵州省黔西南州兴义市,其胫长较普通鸡短,公鸡平均胫长 6.5 cm、母鸡平均胫长 5.9 cm<sup>[2]</sup>,1993 年录入《贵州省畜禽品种志》。百宜黑鸡为贵州优质地方鸡种,主产地为贵阳市乌当区百宜乡<sup>[3]</sup>,其胫骨长度介于高脚鸡和矮脚之间。

鸡生长激素(chicken growth hormone,cGH)是由垂体前叶合成和分泌的一种多肽类激素,由 191 个氨基酸组成。研究报道称该激素在鸡生长发育、骨骼生长、脂肪沉积、饲料转化及产蛋等方面具有调节作用<sup>[4]</sup>。该基因位于 1 号染色体,全长近 4 kb,由 5 个外显子和 4 个内含子组成,且内含子远大于外显子<sup>[5-6]</sup>。国内外学者相继发现 *GH* 基因的多态位点对鸡各类生长性状有特定影响<sup>[7-10]</sup>。对于贵州省境内部分鸡种的 *GH* 基因已有相关研究,如朱丽莉等对兴义矮脚鸡 *GH* 基因

的多态性研究中发现该鸡种在第一内含子区域存在较多变异<sup>[11]</sup>。黄波等在对贵州小香鸡 *GH* 基因研究中,对 *GH* 基因 2~3 外显子区域 SNP 位点进行了检测并开展了相关性分析<sup>[12]</sup>。本试验选择胫骨长度差异较大的高脚鸡、矮脚鸡、百宜黑鸡作为对象,研究 *GH* 基因的多态性,并进行生物信息学分析,旨在检测 *GH* 基因在不同胫长性状鸡种中的差异,以期探究 *GH* 基因多态性与胫骨生长发育的关系,为进一步研究影响胫骨发育机制的功能基因奠定工作基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 高脚鸡 92 个血样采自贵州省安顺市普定县,矮脚鸡 99 个血样采自贵州省黔西南州兴义市兴牧畜禽水产科技服务中心矮脚鸡养殖场,百宜黑鸡 69 个血样采自其中中心产区贵州省贵阳市百宜乡。每羽鸡翅下静脉采血 2~3 mL 于真空采血管中,肝素钠抗凝,-20℃保存。

1.1.2 主要试剂 血液基因组 DNA 提取试剂盒、2×Taq Master Mix、核酸染料、DL2000 DNA Marker 等试剂均购自上海生工生物工程技术服务有限公司。实验室自备试剂为去离子水、无水乙醇、TAE 缓冲液等。

### 1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取、检测及构建 DNA 池 运用上海生工生物工程技术服务有限公司血液基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,用含核酸染料的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其纯度,凝胶成像系统照相保存,并用紫外分光光度计测量 DNA 样品浓度,每个样品测量 3 次,取平均值。用 ddH<sub>2</sub>O 将所有 DNA 样品调至 100 ng/μL,各取 10 μL 构建品种 DNA 池<sup>[13]</sup>, -20℃保存备用。

收稿日期:2014-11-03

基金项目:贵州省科技计划(编号:黔合科 NZ 字[2012]3007 号);贵州省农业动植物育种专项(编号:黔农育专字[2012]10 号);浙江大学基本科研业务费专项资金(编号:2012XZZX003-1)。

作者简介:杨红(1990—),女,硕士研究生,研究方向为动物遗传育种与种质资源创新。Email:15085933126@139.com。

通信作者:王芳芳,女,高级畜牧师,主要从事家禽遗传育种及饲养管理工作。E-mail:1587676665@qq.com。

1.2.2 引物设计与 PCR 扩增 参照 GenBank (登录号为 NC\_006114.3) 提供的鸡 *GH* 基因序列, 运用 Primer Premier

6.0 和 Oligo 6.0 设计引物, 委托上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列及扩增条件如表 1。

表 1 *GH* 基因引物序列、退火温度、扩增长度及区域

引物名称	序列(5'→3')	退火温度(℃)	片段长度(bp)	扩增区域
P1	F:TCAAGCAACACCTGAGCAAC; R:TGGAACACCCATTAGAACTG	59	79	第 1 外显子, 部分第 1 内含子
P2	F:AAAACATGAGCACGTTAGGG; R:GGCACCAGATAGCTGAAAA	59	421	第 2 外显子, 部分第 1、2 内含子
P3	F:GTGCTCACCTCAACCTT; R:GGAGACCCTCTGTTCCATA	60	390	第 3 外显子, 部分第 2、3 内含子
P4	F:GCAGAAAGACACGGGTG; R:CGCAGGCTTCCATCAGTA	60	382	第 4 外显子, 部分第 3、4 内含子
P5	F:CCACTAGAAAACCTGGAGCAAA; R:TGCTGACGGGGAGGAAGG	60	345	第 5 外显子

1.2.3 PCR 反应体系及条件 PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, 即 2  $\times$  Taq Master Mix 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L, 上、下游引物各 1  $\mu$ L, DNA 模版 1  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 30 s (退火温度见表 1), 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 32 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 4  $^{\circ}$ C 保存。用含核酸染料的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 凝胶成像系统照相保存, 选取特异性好的样品送北京诺赛基因组研究中心测序。

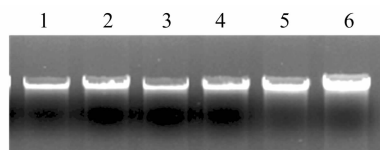
1.2.3 序列的校对、序列图峰高测量及等位基因频率估算 运用 DNA Star 软件对测序所得碱基序列和峰图进行校对, 分析其多态性。利用 DNA Star 中的 SeqMan 和 MWSnap 3 软件中的标尺测量各 SNPs 位点等位基因的相应峰高, 根据  $f_i = h_i / (h_1 + h_2)$  ( $i = 1, 2$ ) 估算等位基因频率。式中,  $f_i$  表示 SNP 位点某等位基因频率,  $h_1$  与  $h_2$  分别表示测序峰图上该等位基因 1、2 峰的高度<sup>[14]</sup>。

1.2.4 序列分析 利用在线软件 RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) 对 *GH* 基因突变前后编码区序列分别进行 mRNA 二级结构预测, 并进行比对分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 提取结果

将提取的 DNA 用含核酸染料的 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 结果见图 1。由图 1 可见, DNA 条带集中, 整齐明亮无拖尾, 可用于下一步试验。

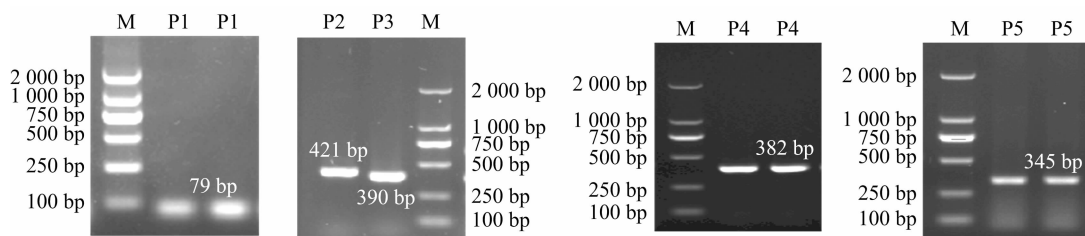


1~2—高脚鸡血液基因组DNA; 3~4—矮脚鸡血液基因组DNA; 5~6—百宜黑鸡血液基因组DNA

图1 鸡的血液基因组 DNA 提取检测结果

### 2.2 PCR 产物检测结果

PCR 产物用含核酸染料的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 2: 所检测片段与预期片段大小相符, 条带清晰、整齐无拖尾, PCR 产物特异性较好, 可用于进一步测序分析。



M—DL 2000 marker; P1~P5—各引物名称

图2 PCR 产物电泳检测结果

### 2.3 序列分析

在所扩增的序列中共发现 6 个 SNPs 位点: 第 2 内含子 A1133G、G1166A, 第 4 外显子 C2027G、C2030T, 第 4 内含子 G2152A, 第 5 外显子 G3347A, 3' 非编码区 T3416C、C3436T (图 3)。

### 2.4 等位基因频率估算

从表 2 可见, 3 个鸡种在 A1133G、G1166A、C2027G、G2152A、C3436T 这 5 个 SNPs 位点上基因频率存在较大差异。

### 2.5 *GH* 基因所有外显子 RNA 二级结构预测结果

采用在线软件 RNAfold web server 分别对在 *GH* 基因外显子中的 3 个 SNPs 位点 mRNA 进行预测, 结果见图 4。

## 3 讨论

鸡胫骨为全身长骨之一, 其生长过程受到多种激素及细

胞因子调控, 且存在不同的信号通路。*GH* 基因是调控禽类整个机体的重要激素, 具有加快肌肉和骨骼生长、促进生长发育及提高饲料报酬的作用<sup>[15-17]</sup>, 也有研究报道称 *GH* 基因可促进鸡长骨和软骨的发育<sup>[18]</sup>。朱丽莉等对贵州个体较小的矮脚鸡、小香鸡的 *GH* 基因进行了多态性分析, 发现较多变异位点, 通过关联性分析得到该基因对体斜长、胫长、胫围等生长性状有一定的影响<sup>[11-12]</sup>。

本研究对胫长差异较大的高脚鸡、矮脚鸡和百宜黑鸡的 *GH* 基因所有外显子和部分内含子进行了单核苷酸多态性检测, 发现了 8 个可能与胫长性状相关的 SNPs 位点, 分别为 A1133G、G1166A、C2027G、C2030T、G2152A、G3347A、T3416C、C3436T。其中 C2027G、C2030T 等 2 个 SNPs 位点位于第 4 外显子区, G3347A 位于第 5 外显子区, 3 个位于外显子区域的 SNP 位点均为同义突变。

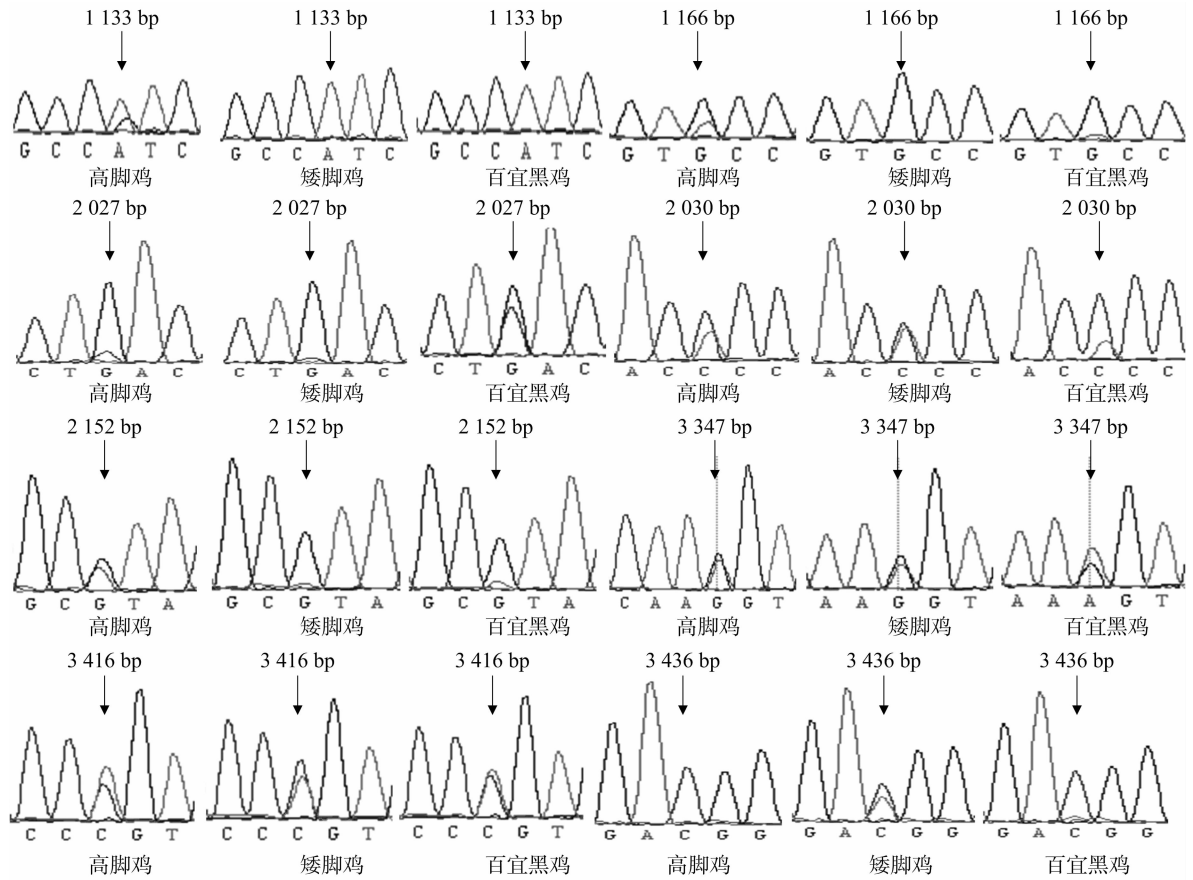


图3 3 个贵州地方鸡种 6 个 SNPs 位点测序峰图

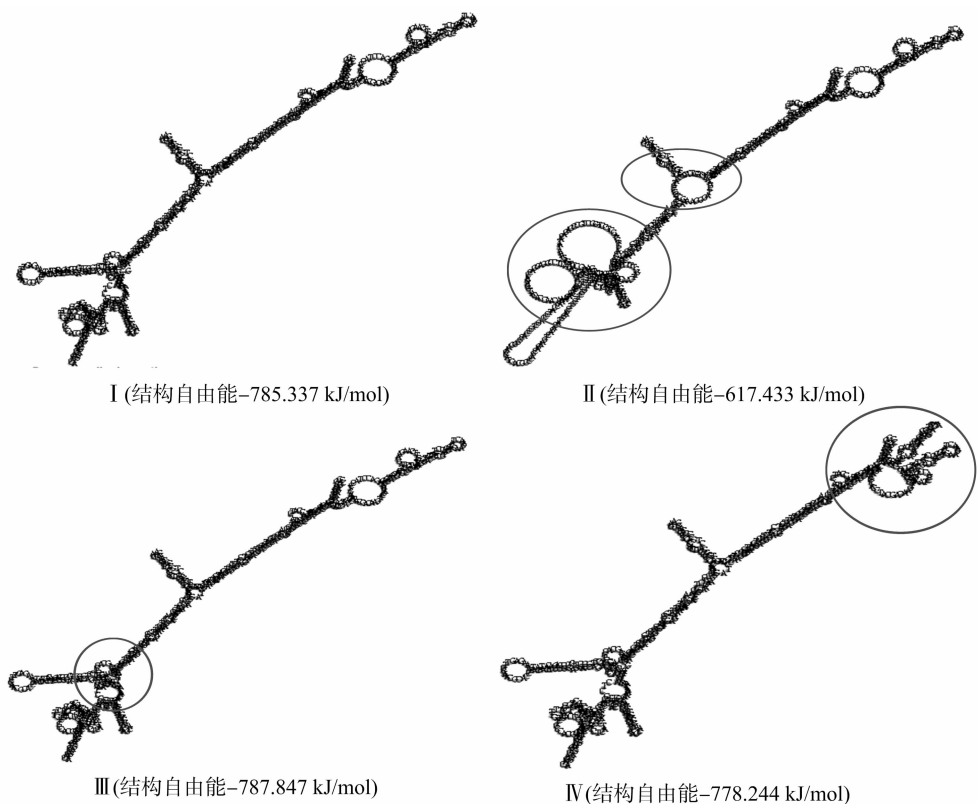
表 2 3 个贵州地方鸡种 *GH* 基因 SNPs 等位基因频率估算结果

SNPs	所处位置	等位基因频率		
		高脚鸡	百宜黑鸡	矮脚鸡
A1133G	第 2 内含子	A(0.78)	A(1)	A(1)
		G(0.22)	G(0)	G(0)
G1166A	第 2 内含子	G(0.69)	G(0.90)	G(0)
		A(0.31)	A(0.10)	A(1)
C2027G	第 4 外显子	C(0.12)	C(0.40)	C(0.07)
		G(0.88)	G(0.60)	G(0.93)
C2030T	第 4 外显子	C(0.62)	C(0.78)	C(0.54)
		T(0.38)	T(0.22)	T(0.46)
G2152A	第 4 内含子	G(0.56)	G(0.85)	G(0.90)
		A(0.44)	A(0.15)	A(0.10)
G3347A	第 5 外显子	G(0.55)	G(0.37)	G(0.57)
		A(0.45)	A(0.63)	A(0.43)
T3416C	3'非编码区	T(0.61)	T(0.53)	T(0.43)
		C(0.39)	C(0.47)	C(0.57)
C3436T	3'非编码区	C(1)	C(0.92)	C(0.61)
		T(0)	T(0.08)	T(0.39)

各 SNPs 位点分析发现,在第 2 内含子区 A1133G 处,只有高脚鸡发生了突变,矮脚鸡与百宜黑鸡均未发生突变;第 4 内含子 G2152A 处,高脚鸡的优势碱基为 G,矮脚鸡与百宜黑鸡的优势碱基则为 A;3'非编码区 C3436T 处,高脚鸡未发现 SNPs 位点,而矮脚鸡、百宜黑鸡却存在突变。这表明高脚鸡在 A1133G、G2152A、C3436T 这 3 个 SNPs 位点上与其他 2 个

鸡种存在较大差异,推测这 2 个 SNPs 位点可能对高脚鸡胫骨长度有较大影响。在 G1166A、C2027G 位点处,矮脚鸡发生突变的基因频率与高脚鸡和百宜黑鸡差异较大,推测这 2 个 SNPs 位点可能与矮脚鸡胫骨较短存在相关性。同时,在 C2027G 位点处,这 3 个贵州地方鸡种的优势碱基均为 G,而 GenBank(登录号为 NC\_006114.3)中所报道的则为 C,这可能是贵州地方鸡种的一个共同特征,同时也是贵州地方鸡种与其他鸡种之间所存在的普遍差异。

真核生物的基因一般由若干个外显子和内含子组成,为断裂基因,外显子的功能是构成编码区编码功能蛋白,编码区内核苷酸的变异可能导致基因 mRNA 二级结构改变,进而导致蛋白质结构改变而影响其生物功能<sup>[15]</sup>。本研究中所检测出的 3 个 SNPs 位点均未引起所编码氨基酸改变,为同义突变。运用生物信息学软件进行进一步分析发现,所检测到的 3 个 SNPs 位点均导致了 *GH* 基因 mRNA 二级结构改变,使其最小自由能发生变化,从而影响 mRNA 二级结构稳定性。当 C2027G 发生 C→G 突变后,*GH* 基因 mRNA 二级结构最小自由能增加了 167.894 kJ/mol,其稳定性减弱;当 C2030T 发生 C→T 突变后,*GH* 基因 mRNA 二级结构最小自由能减少了 2.51 kJ/mol,其结构稳定性增加;当 G3347A 发生 G→T 突变后,*GH* 基因 mRNA 二级结构最小自由能增加了 7.093 kJ/mol,其结构稳定性减弱。*GH* 基因突变与鸡胫骨长度的关系及其引起的 mRNA 二级结构变化所发生的生物学意义将在后续试验中进一步加以研究。



I 是 C2027G 为 C、C2030T 为 C、G3347A 为 G 时 *GH* 基因 mRNA 二级结构；II 是 C2027G 为 G、C2030T 为 C、G3347A 为 G 时 *GH* 基因 mRNA 二级结构；III 是 C2027G 为 C、C2030T 为 T、G3347A 为 G 时 *GH* 基因 mRNA 二级结构；IV 是 C2027G 为 C、C2030T 为 C、G3347A 为 A 时 *GH* 基因 mRNA 二级结构

图4 C2027G、C2030T、G3347A 不同基因型 mRNA 二级结构预测图

#### 参考文献:

- [1] 金睿, 叶方, 朱明贵. 普定高脚鸡资源现状分析[J]. 现代农业科技, 2011(10): 331, 337.
- [2] 张福平, 华时尚, 傅筑荫, 等. 兴义矮脚鸡矮脚性状初步研究[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(2): 316-317.
- [3] 张小林, 阳光远. 百宜黑羽鸡的种质特性研究初探[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(4): 131-134.
- [4] 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.
- [5] Tanaka M, Hosokawa Y, Watahiki M, et al. Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region[J]. Gene, 1992, 112(2): 235-239.
- [6] Shaw E M, Shoffner R N, Foster D N, et al. Mapping of the growth hormone gene by in situ hybridization to chicken chromosome 1[J]. Journal of Heredity, 1992, 82(6): 505-508.
- [7] 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]. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 85(8): 931-936.
- [8] 聂庆华, 张细权, 杨关福, 等. 鸡生长激素基因的 PCR-RFLPs 分析[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(3): 282-285.
- [9] 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]. Animal Genetics, 1997, 28(2): 116-123.
- [10] 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.
- [11] 朱丽莉, 王闯, 傅筑荫, 等. 兴义矮脚鸡 *GH* 基因的多态性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(12): 96-99.
- [12] 黄波, 刘若余, 艾蓉, 等. 贵州小香鸡 *GH* 基因 SNP 与生长性状的相关性分析[J]. 中国家禽, 2012, 34(3): 30-33.
- [13] 李敬瑞, 丁远华, 向程举, 等. 猪 *DAZ* 基因的 DNA 池测序分析[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(8): 60-62.
- [14] 崔建勋, 杜红丽, 张细权. 利用 DNA 池和测序技术快速筛查 SNPs 及估算基因频率[J]. 遗传学报, 2005, 32(4): 372-377.
- [15] 聂庆华, 张细权, 杨关福. 鸡生长轴相关基因的研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(3): 305-312.
- [16] Rosselot G, Mcmurtry J P, Vasilatos Y, Younken R, et al. Effect of exogenous chicken growth hormone (cGH) administration on insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene expression in domestic fowl[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 1995, 114(1/2): 157-166.
- [17] 裴勤娟. 鸡 *GH* 基因和 *GHR* 基因多态性与早期生长性能的相关性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2007.
- [18] 高爱琴, 李金泉, 李宁, 等. 绵羊 *FGF5* 基因 SNP 的生物信息学分析[J]. 中国畜牧杂志, 2008, 44(5): 5-7.