

刘忠慧,李国辉,狄和双. *GH* 和 *CRBP4* 基因及合并基因型对仙居鸡产蛋数的遗传效应[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):300-302.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.087

# *GH* 和 *CRBP4* 基因及合并基因型 对仙居鸡产蛋数的遗传效应

刘忠慧<sup>1</sup>, 李国辉<sup>2</sup>, 狄和双<sup>1</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300; 2. 扬州大学,江苏扬州 225003)

**摘要:**以 *GH* 和 *CRBP4* 基因作为影响鸡繁殖性状的候选基因,采用 PCR-SSCP 方法检测仙居鸡 *GH* 基因外显子 4 和 *CRBP4* 基因外显子 3 区域的单核苷酸多态性,并分析 *GH*、*CRBP4* 单基因型及 2 个基因合并基因型与 65 周龄产蛋数的关联。结果表明:*GH* 基因 exon4 (C2338G/C2341T) 的突变和 *CRBP4* 基因 exon2 的突变 (C826T) 基因型 CC 型与该鸡品种的 65 周龄产蛋数显著相关 ( $P < 0.05$ ),AA、CC 型对产蛋数的加性效应分别为 3.56、3.60;合并基因型 AACC 型个体 65 周龄产蛋数与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ );2 个基因间的互作效应不显著 ( $P > 0.05$ )。

**关键词:***GH* 基因;*CRBP4* 基因;仙居鸡;基因合并;产蛋数

**中图分类号:**S831.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)08-0300-03

仙居鸡原产于浙江省台州市仙居县、临海市等地,是我国优良蛋用鸡品种。仙居鸡具有单冠、颈部细长、背部平直、尾羽高翘、羽毛紧密等特点,体型虽小但很健壮。公鸡羽毛呈黄色或红色,体质量约为 1.5 kg;母鸡羽毛多呈黄色,少呈黑色或花色,体质量约为 1 kg,500 日龄产蛋数为 180~200 枚。仙居鸡存在体质量小、繁殖性能不高的缺点,寻找与仙居鸡繁殖性能相关的候选基因,实施分子标记辅助选择是提高其产蛋数的有效途径。

生长激素 (growth hormone, GH) 是促进机体新陈代谢、提高动物瘦肉率、降低脂肪沉积的一种激素,主要由脑垂体分泌,通过与生长激素受体 (growth hormone receptor, GHR) 结合,并通过类胰岛素生长因子 (insulin-like growth factors, IGFs) 的媒介作用来促进细胞的增生与分化<sup>[1]</sup>。GH 编码的基因全长 3 901 bp,包括 4 个内含子和 5 个外显子,编码 191 个氨基酸<sup>[2]</sup>。*GH* 基因变异会影响家畜家禽生长发育、繁殖及其他生产性状,此项研究越来越受到人们的关注。

细胞视黄醇结合蛋白 (cellular retinol-binding proteins, CRBPs) 担任着转运维生素 A (视黄醇) 的任务,维生素 A 主要参与机体的视觉、胚胎发育、繁殖、细胞增殖与分化、脂类代谢等生理过程。畜禽机体自身不能直接合成维生素 A,必须通过食物间接获取。缺乏维生素 A 会影响鸡的体质量、饲料利用率、产蛋力、蛋质量、蛋品质、孵化率、免疫应答<sup>[3]</sup>;因此,细胞视黄醇结合蛋白参与视觉、繁殖、上皮细胞的维持、骨的生长发育等诸多生物学过程。鸡的细胞视黄醇结合蛋白 CRBPs 共有 4 种,CRBP4 是其中重要的一种,鸡的 *CRBP4* 基因位于 21 号染色体,有 3 个外显子<sup>[4]</sup>。

合并基因型在植物育种中已得到应用并取得了良好效果<sup>[5]</sup>,在动物育种中也有报道。刘娟娟等研究表明,*ESR* 和 *FSH* 基因的合并基因型对地方猪种初产、经产胎次的产仔数具有显著影响<sup>[6]</sup>。在家禽育种上,洪坤月等采用 PCR-SSCP 法对太湖鸡促卵泡激素  $\beta$  亚基 (*FSH* -  $\beta$ ) 基因、生长素 (*GH*) 及其受体基因 (*GHR*) 进行多态性检测,结果发现产蛋量较高的合并基因型 AADD 可作为太湖鸡选育的参考<sup>[7]</sup>。于吉英等对 *NPY*、*ESR* 基因的联合效应进行分析,结果表明,合并基因型 AAAC 的 300 日龄产蛋数、400 日龄产蛋数、平均连产时间均最高<sup>[8]</sup>。李俊营等对淮南麻黄鸡 *CRBP4* 基因多态性与早期产蛋性状、蛋品质的相关性进行分析,结果表明,*CRBP4* 基因不同基因型和单倍型组合与淮南麻黄鸡开产蛋质量存在相关性<sup>[9]</sup>。张学余等对白耳鸡 *PRL*、*POU1F1* 基因及基因聚合对产蛋数的效应进行分析,结果表明,*PRL* 调控区的插入/缺失基因型 AA 型、*POU1F1* 基因 exon3 的突变 (A5331T) 基因型 CC 型与 72 周龄产蛋数显著相关 ( $P < 0.05$ )<sup>[10]</sup>。

本研究以仙居鸡为试验材料,分析 *GH* 基因、*CRBP4* 基因多态位点及 2 个基因多态位点合并对产蛋数的影响,以期进一步提高仙居鸡的产蛋性能。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

仙居鸡供试鸡群来源于浙江省辰阳县仙居鸡养殖基地,共 200 羽。于 12 周龄翅静脉采血 0.5 mL,血样送至实验室冷冻保存。记录从开产到 65 周龄的产蛋数。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用酚-氯仿抽提法提取仙居鸡基因组 DNA,TE 溶解后于 4℃ 冰箱储存备用。

1.2.2 引物设计与合成 根据 GenBank *GH* 基因 (登录号: D10484) 提交的序列设计 2 对引物,基因引物参考李俊营等的研究<sup>[9]</sup>,引物序列及相关信息见表 1。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

收稿日期:2015-06-24

基金项目:江苏省泰州市农业项目 (编号:TN201312)。

作者简介:刘忠慧 (1978—),女,内蒙古锡林浩特人,硕士,讲师,主要从事畜禽遗传育种研究。Tel: (0523) 86655207; E-mail: zhliu2003@126.com。

表 1 候选基因在染色体中的位置、引物序列、PCR 产物长度

基因	引物序列	片段长度 (bp)	染色体	退火温度 $T_m$ (℃)
<i>GH</i>	F:5'-AATCCCTTTGTGCATTTTCAGG-3';R:5'-CGCAGGCTTCCATCAGTA-3'	210	1	58.0
<i>CRBP4</i>	F:5'-TTCTTCTGTCAAAGGTATTG-3';R:5'-CTTCCTTCTGTAAGAACACAT-3'	243	21	52.5

1.2.3 PCR-SSCP 反应体系和条件 20 μL 扩增反应体系为:基因组 DNA 模板(100 ng/μL) 1.0 μL、10 × buffer (25 mmol/L) 2.0 μL、dNTP 0.8 μL、Mg<sup>2+</sup> (10 pmol/μL) 2.2 μL、上下游引物(10 mmol/L) 各 1 μL、*Taq* 酶(5 U/μL) 0.2 μL、灭菌蒸馏水 12.8 μL。PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 50 s,58 ℃ (*GH*)/52.5 ℃ (*CRBP4*) 退火 50 s,72 ℃ 延伸 50 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物于 4 ℃ 下保存,经 2% 琼脂糖检测,取 4 μL 扩增产物加入 8 μL 变性液,于 98 ℃ 变性 10 min,放冰水中淬火 5 min,取样至 10% 聚丙烯酰胺凝胶 120 V 电泳 12 h,银染显带。

1.2.4 统计分析方法 采用 SPSS 11.5 软件 *LSD* 多重比较法对不同基因型的产蛋数进行比较。利用最小二乘法分析仙居鸡各基因型和产蛋数之间的关联,分析模型为  $Y_{ik} = u + G_i + I_k + B_{ik} + E_{ik}$ 。式中, $Y_{ik}$  为产蛋数记录值, $u$  为群体平均值, $G_i$  为 *GH* 标记基因的固定效应, $I_k$  为 *CRBP4* 标记基因的固定效应, $B_{ik}$  为上述 2 种标记基因间的互作效应, $E_{ik}$  为随机参差效应。

2 结果与分析

2.1 多态位点基因型分布和产蛋数比较

PCR-SSCP 检测结果表明,*GH* 基因和 *CRBP4* 基因均存在 3 个基因型(图 1、图 2)。把 DNA 测序结果所得序列与 GenBank 发表序列进行对比,结果(图 3、图 4)显示,*GH* 基因在 exon4 存在着 C2338G 和 C2341T 的突变,*CRBP4* 基因在 exon2 存在着 C826T 的突变。将 2 个基因的突变型分别定义为 AA、CC 型,无突变的基因分别定义为 BB、DD 型,杂合子分别定义为 AB、CD 型。

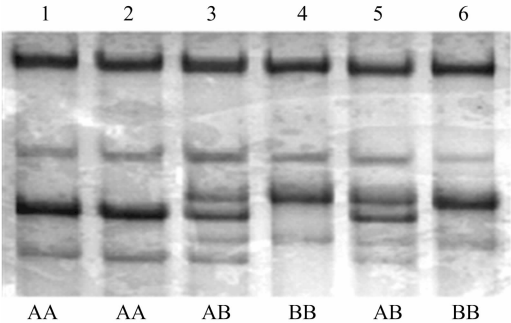


图1 GH 基因引物扩增片段的 SSCP 多态性检测结果

将 *GH* 基因多态位点与该鸡种产蛋数进行关联分析,*LSD* 多重比较表明:*GH* 基因中基因型 AA 个体的产蛋数显著高于 BB、AB 型个体( $P < 0.05$ );*CRBP4* 基因中基因型 CC 型与 65 周龄产蛋数显著相关,CC 基因型个体的产蛋数显著高于 DD、CD 型个体( $P < 0.05$ )。2 个基因多态位点基因型在仙居鸡群体中的分布,以及不同基因型与产蛋数的关联分析见表 2。*GH* 基因的 AA 基因型、*CRBP4* 基因的 CC 基因型在仙居鸡群

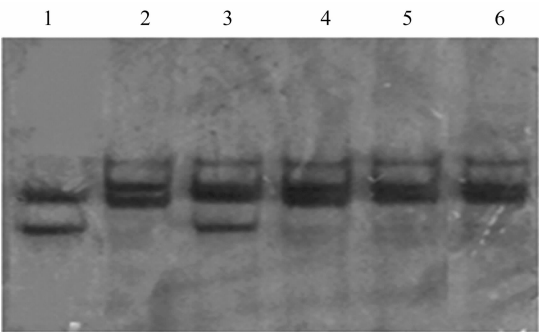
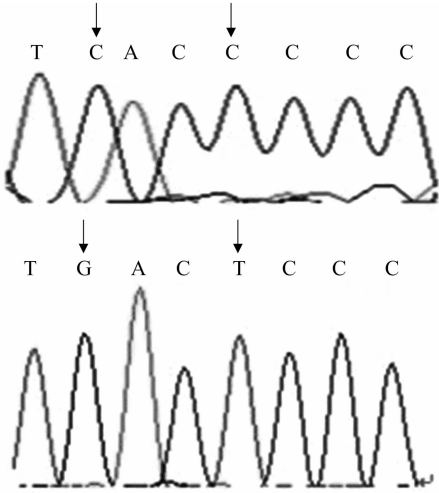


图2 CRBP4 基因引物扩增片段的 SSCP 多态性检测结果



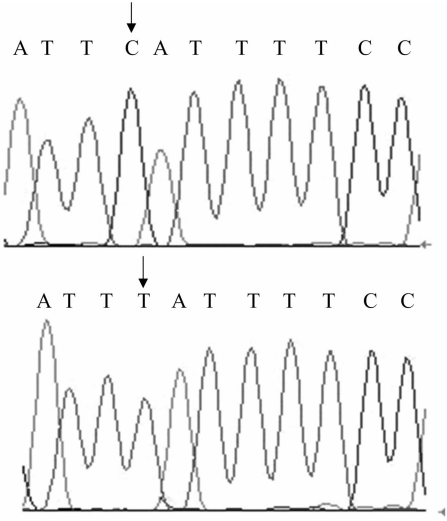
GH 基因 2 338 bp 处 C—G 的突变和 2 341 bp 处 C—T 的突变  
图3 GH 不同基因型测序结果

体中的比例分别为 34%、30%。 $\chi^2$  检验( $P_{GH} = 0.07 > 0.01$ ,  $P_{CRBP4} = 0.35 > 0.01$ )表明,仙居鸡群体在 2 个多态位点上处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

单基因效应分析(表 3)表明,*GH* 基因对产蛋数的影响表现为正加性效应(3.56)和负显性效应(-1.12),*CRBP4* 基因对 65 周龄产蛋数的影响表现为正加性效应(3.60)和负显性效应(-0.64)。分析 2 种基因型 CC 和 AA 间的互作效应,结果(表 4)表明,2 个基因间的互作效应不显著( $P > 0.05$ )。

2.2 GH、CRBP4 合并基因型与 65 周龄产蛋数比较

将影响 65 周龄产蛋数的 *GH*、*CRBP4* 基因的优势基因型 AA、CC 型进行合并,并以 8 组其他合并基因型作为对照。结果表明,*GH* 与 *CRBP4* 合并基因型 AACC 的 65 周龄产蛋数(除 AACD 型)均显著高于对照组合并基因型。合并基因 AACC 型个体与对照组合并基因型个体的 65 周龄产蛋数比较见表 5。扩繁 F1 代中 *GH* 和 *CRBP4* 有利合并基因型 AACC 的 72 周龄产蛋数高于扩繁的其他合并基因型 65 周龄产蛋数(表 5)。



CRBP4基因826 bp处C—T的突变  
图4 CRBP4不同基因型测序结果

表 2 GH 和 CRBP4 不同基因型产蛋数比较

基因	基因型	基因型频率	样本数(羽)	65 周龄产蛋数(枚)
GH	AA	0.34	68	164.96 ± 12.23a
	AB	0.43	86	160.25 ± 12.34b
	BB	0.23	46	157.85 ± 12.43b
CRBP4	CC	0.30	60	165.62 ± 11.73a
	CD	0.47	93	161.38 ± 12.42b
	DD	0.23	47	158.42 ± 11.85b

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。表 5 同。

表 3 GH 和 CRBP4 基因效应分析

基因	基因效应		
	加性效应	显性效应	显性度
GH	3.56	-1.12	-0.32
CRBP4	3.60	-0.64	-0.18

表 4 GH 和 CRBP4 优势合并基因型效应分析

变异来源	类型三平方差	均方	F 值	P 值	$Eta^2$	观测效能
GH 优势基因型 AA	716.43	716.43	4.96	0.028	0.018	0.65
CRBP4 优势基因型 CC	1 100.34	1 100.34	7.84	0.008	0.028	0.76
2 种优势基因型互作	46.76	46.76	0.38	0.604	0.001	0.10

表 5 GH 和 CRBP4 合并基因型个体 65 周龄产蛋数比较

类型	合并基因型	测定个体数(羽)	65 周龄产蛋数(枚)
优势合并基因型	AACC	18	167.53 ± 13.37a
	AACD	36	163.32 ± 12.28b
	AADD	14	159.98 ± 12.33bc
	ABCC	30	162.84 ± 11.45bc
其他合并基因型	ABCD	37	160.91 ± 13.26bc
	ABDD	19	159.19 ± 12.13c
	BBCC	12	160.77 ± 12.16bc
	BBCD	20	159.18 ± 13.76c
	BBDD	14	158.36 ± 13.54c

3 结论与讨论

近年来,动物基因组的研究迅速发展,基因转移、基因聚合等现代分子生物技术手段的应用使分子标记辅助选择(MAS)广泛应用于动植物的遗传改良,并取得了长足的进展。传统育种方法通过表现型间接对基因型进行选择,普遍存在选育效率低、周期长的缺点。本研究将传统方法与分子标记辅助选择相结合,以期获得更好的育种效果。

通过分析仙居鸡群体 CRBP4 和 GH 标记 2 个基因各基因型与产蛋数的关联,确定了 CRBP4 和 GH 的有利单个基因型为 AA、CC 型,其在仙居鸡群体中的分布比例分别达 30%、34%,且 GH、CRBP4 基因对 65 周龄产蛋数均一致表现为正加性效应与负显性效应,A、C 2 个等位基因位点对 65 周龄产蛋数表现为负效应。在 9 种合并基因型中,只有单基因合并后的 AACC 基因型个体的 65 周龄产蛋数显著高于其他组合合并基因型个体,分别比 GH 单基因 AA 型、CRBP4 单基因 CC 型的产蛋数提高了 2.57、1.91 枚,但差异均未达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。2 种优势单基因型间的互作效应并不显著 ( $P > 0.05$ ),与单基因型相比,合并基因型对产蛋数的主效作用 ( $Eta^2_{GH \times CRBP4} < Eta^2_{GH} < Eta^2_{CRBP4}$ ) 呈减弱趋势。CRBP4 基因对产蛋数的贡献大于 GH 基因,且观测能效值分别为 0.65、0.76,样本数量适中。

通过分子标记手段对与产蛋数关联的 CRBP4、GH 基因优势单基因型进行基因合并育种,能使仙居鸡的产蛋数有所提高,为基因合并在家禽育种中的进一步应用提供依据。

参考文献:

[1] Scanes C G, Proudman J A, Radecki S V. Influence of continuous growth hormone or insulin-like growth factor I administration in adult female chickens[J]. General and Comparative Endocrinology, 1999, 114(3): 315-323.

[2] Lamb I C, Galehouse D M, Foster D N. Chicken growth hormone cDNA sequence[J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(19): 9339.

[3] de Baere E, Speleman F, van Roy N, et al. Assignment of the cellular retinol-binding protein 2 gene (RBP7) to human chromosome band 3q23 by insitu hybridization[J]. Cytogenetics and Cell Genetics, 1998, 83(3/4): 240.

[4] 肖礼华. 鸡 CRBP4 基因家族克隆表达及其与繁殖性状的关联分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2011.

[5] 刘志文, 傅延栋, 刘雪萍, 等. 作物分子标记辅助选择的研究进展影响因素及其发展策略[J]. 植物学通报, 2005, 22(8): 89-92.

[6] 刘娟娟, 曾勇庆, 魏述东, 等. 8 个猪种 ESR 和 FSHβ 基因合并基因型与繁殖性状关系的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(3): 291-295.

[7] 洪坤月, 汪峰, 虞得兵, 等. 太湖鸡 PRL、PRIR 和 FSHβ 基因多态与前期产蛋性状关系研究[J]. 西北农业学报, 2007, 16(5): 11-14.

[8] 于吉英, 陈宽维, 肖小军, 等. ESR、POU1F1 基因对文昌鸡繁殖性状的遗传效应分析[J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(4): 49-51.

[9] 李俊营, 詹凯, 刘伟, 等. 淮南麻黄鸡 CRBP4 基因多态性与早期产蛋性状和蛋品质的相关性[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(2): 197-203.

[10] 张学余, 李国辉, 韩威, 等. PRL 和 POU1F1 基因及基因聚合对白耳鸡产蛋数的效应分析[J]. 安徽农业大学学报, 2010, 37(2): 249-252.