

刘琳玲,涂剑锋,郑军军,等. 水貂 *GHR* 基因 SNPs 检测及其与生长性状的关联分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(1):154-158.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.01.028

# 水貂 *GHR* 基因 SNPs 检测及其与生长性状的关联分析

刘琳玲,涂剑锋,郑军军,杨童奥,杨福合,王桂武

(中国农业科学院特产研究所/特种经济动物分子生物学国家重点实验室/农业部特种经济动物遗传育种与繁殖重点实验室,吉林长春 130112)

**摘要:**为了检测水貂 *GHR* 基因多态性及其与生长性状的相关性分析,寻找可用于选育水貂生长性状的分子遗传标记,以同龄同场的短毛黑水貂、红眼白水貂和咖啡水貂为研究对象,采用 PCR 产物直接测序检测 *GHR* 基因的单核苷酸多态性,利用 SPSS 19.0 软件将该基因多态性与水貂生长性状进行关联分析。结果表明,存在 3 个 SNPs 位点,分别为外显子 3 处的 g.82C>T 突变和外显子 10 处 g.350C>T 和 g.501C>T 突变;g.82C>T 位点与短毛黑水貂的体长显著相关;g.82C>T 位点与 3 种群体的体质量极显著相关;g.350C>T 位点与 3 种群体的体长极显著相关;g.501C>T 位点与短毛黑水貂的体长极显著相关;g.501C>T 位点与红眼白水貂的体长显著相关。因此,*GHR* 基因可作为候选基因辅助用于水貂群体生长性状的遗传改良。

**关键词:**水貂;*GHR* 基因;外显子;多态性;生长性状

**中图分类号:**S865.2<sup>+</sup>2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)01-0154-04

生长激素是由垂体细胞分泌的一种重要的内分泌激素,它具有广泛的生理调节功能,影响生长发育、繁殖和机体的代谢,作用机制非常复杂。生长激素受体是生长激素相应功能表达的特异性受体<sup>[1]</sup>。GH 与细胞膜上 GHR 结合后,靠 GHR 介导传递生物信息到靶细胞中产生生物效应。GHR 发生了改变,将会影响 GH 生理功能<sup>[2]</sup>。

GHR 是一种跨膜糖蛋白,属于细胞因子受体<sup>[3]</sup>。它有 600 多个氨基酸,不同物种其氨基酸的数量略有变化。大多数动物的生长激素受体基因中包含 10 个外显子和 9 个内含子。GHR 的分子多态性影响不同个体、不同组织中 GHR 的表达量或者功能上的差异。王真等发现,内蒙古白绒山羊 *GHR* 基因第 1 内含子中检测到 9-bp 插入缺失标记(InDel)位点,纯合插入基因型个体体质量、体长、胸围和胸宽均值显著大于杂合基因型个体<sup>[4]</sup>。刘芳等利用 SSCP 和测序技术发现塞北兔群体 *GHR* 基因

第 10 外显子有 2 处点突变,AA 基因型比 AB 基因型对塞北兔活体质量、胴体质量、前腿质量均有提高,差异显著( $P<0.05$ )<sup>[5]</sup>。陈炳霖等发现,在尼罗罗非鱼吉富品系群体中共保留 9 个 SNPs 位点,分布于 *GHR1* 基因(7 个)和 *GHR2* 基因(2 个)中;在尼罗罗非鱼埃及品系群体中共保留 5 个 SNPs 位点,分布于 *GHR1* 基因(4 个)和 *GHR2* 基因(1 个)中,在吉富品系群体 *GHR1* 和 *GHR2* 基因中共发现 6 个与优势生长性状显著相关的 SNPs 位点<sup>[6]</sup>。

近年来,牛、羊、猪、鸡等动物都开展了 *GHR* 基因多态性的研究,而水貂 *GHR* 基因研究相对较少。荣敏等选取明华黑色水貂、银蓝色水貂的公貂构建品种 DNA 池,对 *GHR* 基因的第 10 外显子进行 PCR 扩增并测序,发现 2 处 SNPs 突变,分别为 209 位点(T/C)、533 位点(C/A)<sup>[7]</sup>。本研究以 3 个群体水貂为研究对象,通过 PCR 扩增和 Sanger 测序技术对 *GHR* 基因进行 SNPs 位点检测,并对该基因突变位点与水貂生长性状进行关联分析,旨在筛查与水貂生长性状相关的分子遗传标记,以期为深入研究 *GHR* 基因调控水貂生长性状的功能提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 血样采集

以雄性红眼白水貂、短毛黑水貂和咖啡水貂为研究对象,其中红眼白水貂 112 只,短毛黑水貂 72 只,咖啡水貂 58 只,取自大连名威貂业有限公司。

收稿日期:2021-05-07

基金项目:吉林省预算内基本建设资金(编号:2020C035-2);中国农业科学院科技创新工程-特种动物育种科技创新团队(编号:CAAX-ASTIP-2016-USAOS02)。

作者简介:刘琳玲(1982—),女,福建福州人,硕士,副研究员,主要从事特种经济动物遗传育种研究。E-mail:liulinling\_600@126.com。

通信作者:王桂武,博士,研究员,主要从事特种经济动物遗传育种研究。E-mail:wangguiwu2005@163.com。

2018 年 12 月 15 日,在大连名威貂场,心脏采血于柠檬酸葡萄糖抗凝真空采血管中,−20 ℃冻存。记录水貂个体体质量和体长数据。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用北京全式金生物技术有限公司的全血基因组试剂盒提取基因组 DNA。提取后基因组 DNA 采用分光光度计法和琼脂糖凝胶电泳检测完整性、

纯度和浓度,−20 ℃冻存。

1.3 引物设计与合成

因水貂 *GHR* 基因序列信息未公布,所以就根据同属鼬科动物雪貂 *GHR* 基因的序列为参考来设计引物。GenBank 数据序列号为: NW\_004569142. 1, 利用引物设计软件 Primer Premier 5. 0 筛选 4 对引物,由上海生工生物工程有限公司合成(表 1)。

表 1 PCR 引物序列及相关信息

引物	扩增区域	序列(5'→3')	片段长度 (bp)	退火温度 (℃)
GHRQW1	启动子和外显子 1	F: CAGGAAGGACAGTGAAAAGC; R: CGGAAATCCACAGACATAAG	341	54. 5
GHRNW3	内含子 2 和外显子 3	F: CATACACCTGGATTGGAGC; R: GCAAGGAGGAGAATGAGAG	312	61
GHRNW6	内含子 5 和外显子 6	F: AGCCCTCTGCTCATTGTGTA; R: GCCGATTATTGCTGTTGCC	328	61
GHRW10	外显子 10	F: CAATGCCAGTGACGTGTGTG; R: GTAGCCGCACGATGAGAGAA	655	60. 4

1.4 PCR 扩增及测序

反应体系为 25 μL: Ex *Taq* DNA 聚合酶 0. 15 μL, 10 × PCR Buffer 2. 5 μL, 上下游引物各 0. 25 μL, 模板 DNA 1. 0 μL, dNTPs 2. 0 μL, 灭菌超纯水 18. 85 μL。

反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 30 s, *T<sub>m</sub>* (详见表 1) 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min; 4 ℃ 下保存。PCR 产物经 1. 5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 把目的片段切胶, 采用回收试剂盒回收纯化后, 送上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.5 SNPs 位点的查询与基因型的判定

利用 DNAMAN 软件对 *GHR* 基因序列进行比对, 分析检测 SNPs 位点。通过 Chromas 5. 0 软件根据测序峰图判定基因型, 单一峰是纯合基因型, 套峰是杂合基因型。

1.6 数据统计与分析

采用 Popgene 1. 32 软件统计纯合度、杂合度、基因型频率和等位基因频率等群体遗传参数。利用 SPSS 19. 0 软件一般线性模型的方法进行 SNPs 位点基因型与生长性状的关联分析, 以 *P* < 0. 05 为差异显著, *P* < 0. 01 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *GHR* 基因 PCR 产物检测

利用设计的 4 对引物对不同个体水貂 *GHR* 基因进行扩增, 1. 5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 由图 1 可知, GHRQW1 引物扩增片段长度为 341 bp, GHRNW3 引物扩增片段长度为 312 bp,

GHRNW6 引物扩增片段长度为 328 bp, GHRW10 引物扩增片段长度为 655 bp, 与预期设计扩增片段长度大小一致。

2.2 SNPs 位点的查询与基因型的判定

对纯化后的 4 个 PCR 产物进行测序, 通过 NCBI 上 Blast 比对分析发现序列与公布的雪貂序列同源性分别为 98. 77%、93. 23%、97. 81%、96. 92%, 说明克隆到的序列为水貂 *GHR* 基因序列。

用 DNAMAN 软件将所得的序列进行多重比对筛查 SNPs 位点, 结果显示, 外显子 3 存在 1 个 SNPs 位点 g. 82C > T, 外显子 10 有 2 处 SNPs 位点 g. 350C > T 和 g. 501C > T。g. 82C > T 和 g. 501C > T 都属于无义突变, g. 350C > T 属于有义突变, 氨基酸发生改变由丝氨酸变成苯丙氨酸(图 2)。

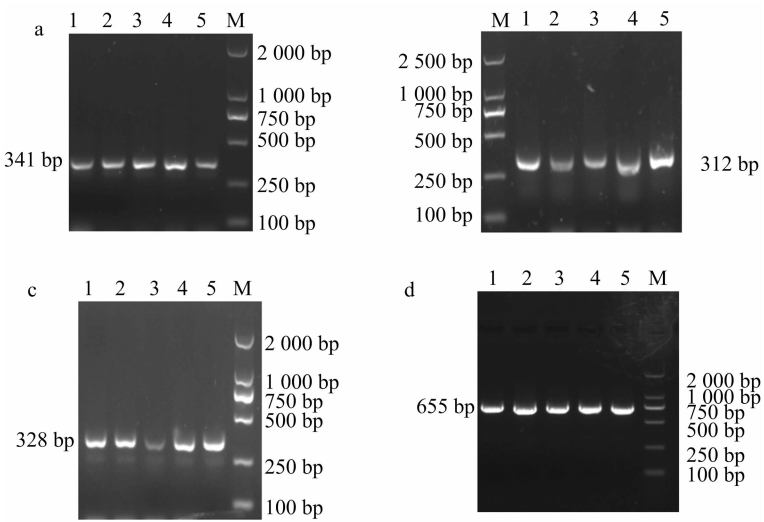
2.3 群体遗传结构分析

由表 2 可知, g. 82C > T 中 CT 为短毛黑和红眼白水貂的优势基因型, 咖啡水貂中 CC 为优势基因型, C 在 3 种水貂中为优势等位基因; g. 350C > T, 短毛黑水貂中 CT 为优势基因型, 红眼白水貂和咖啡水貂中 CC 为优势基因型, C 在 3 种水貂中为优势等位基因; g. 501C > T, CC 在 3 种水貂中为优势基因型, C 为优势等位基因。

由表 3 可知, 红眼白水貂的 g. 82C > T 位点和咖啡水貂的 g. 350C > T 位点是极显著偏离哈代 - 温伯格平衡状态 (*P* < 0. 01)。其他位点都处于哈代 - 温伯格平衡状态 (*P* > 0. 05)。

2.4 *GHR* 基因 SNPs 位点与水貂生长性状的关联分析

不同多态位点的基因型对体长和体质量的影响



M—DNA 相对分子质量标准；1~5—产物；  
a.GHRQW1；b.GHRNW3；c. GHRNW6；b. GHRW10  
图1 水貂 *GHR* 基因 4 对引物 PCR 扩增产物电泳

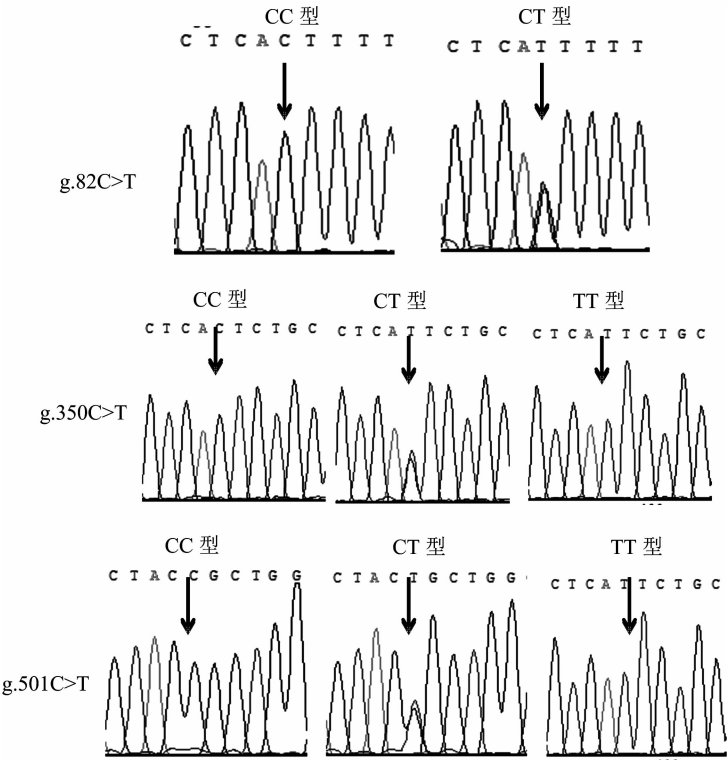


图2 水貂 *GHR* 基因 SNPs 位点

响结果见表 4。由表 4 可知,g. 82C > T 在短毛黑水貂群体中 CC 基因型的体长显著高于 CT 基因型,在红眼白水貂群体和咖啡水貂群体中体长差异不显著。g. 82C > T 在短毛黑水貂群体、红眼白水貂群体和咖啡水貂群体中 CC 基因型的体质量极显著高于 CT 基因型。g. 350C > T 在短毛黑水貂群体、红眼白水貂群体和咖啡水貂群体中 CC 基因型的体长极显

著高于 TT 基因型极显著高于 CT 基因型;g. 350C > T 在短毛黑水貂群体中 CC 基因型的体质量极显著高于 CT 基因型和 TT 基因型,而 CT 基因型和 TT 基因型体质量无差异;g. 350C > T 在红眼白水貂群体和咖啡水貂群体中体质量差异不显著。g. 501C > T 在短毛黑水貂群体和咖啡水貂群体中体长和体质量无差异;g. 501C > T 在红眼白水貂群体中 CC 基

表 2 基因型频率和基因频率

突变位点	基因型与等位基因	基因频率		
		短毛黑水貂	红眼白水貂	咖啡水貂
g. 82C > T	CC	0.472(34)	0.384(43)	0.639(39)
	CT	0.528(38)	0.616(69)	0.361(29)
	C	0.736	0.692	0.681
	T	0.264	0.308	0.319
g. 350C > T	CC	0.319(23)	0.759(85)	0.485(33)
	CT	0.445(32)	0.188(21)	0.177(12)
	TT	0.236(17)	0.053(6)	0.338(23)
	C	0.542	0.853	0.574
g. 501C > T	T	0.458	0.147	0.426
	CC	0.931(67)	0.75(84)	0.691(47)
	CT	0.069(5)	0.179(20)	0.191(13)
	TT	0	0.071(8)	0.118(8)
	C	0.965	0.839	0.787
	T	0.035	0.161	0.213

表 3 遗传多态性

群体	位点	多态信息含量	杂合度	有效等位基因	卡方值	P 值
短毛黑水貂	g. 82C > T	0.313	0.389	1.635	6.15	>0.05
	g. 350C > T	0.373	0.496	1.986	0.37	>0.05
	g. 501C > T	0.065	0.067	1.071	0.05	>0.05
红眼白水貂	g. 82C > T	0.335	0.426	1.743	16.12	0.000 1
	g. 350C > T	0.219	0.251	1.335	3.09	>0.05
	g. 501C > T	0.234	0.269	1.369	5.25	>0.05
咖啡水貂	g. 82C > T	0.34	0.335	1.505	3.07	>0.05
	g. 350C > T	0.369	0.489	1.958	9.86	0.001 7
	g. 501C > T	0.279	0.335	1.505	4.92	>0.05

注:多态信息含量 <0.25 为低度多态;0.25 < 多态信息含量 <0.5 为中度多态;多态信息含量 >0.5 为高度多态。

因型体长和 CT 基因型无差异,CC 基因型和 CT 基因型的体长显著高于 TT 基因型,g. 501C > T 在红眼白水貂群体中体质量无显著差异。

3 讨论

将 g. 82C > T 和 g. 501C > T 进行氨基酸序列分析发现,氨基酸未改变,均属于同义突变。但同义突变也会影响到 mRNA 和蛋白质的表达。由于遗传密码的简并性,一个蛋白质序列可由许多不同的同义 mRNA 编码序列编码。同义密码子的使用曾经被认为是功能中立的,但现在有证据表明,它是由进化选择形成,影响蛋白质生物发生的其他方

表 4 不同多态性位点的基因型与水貂毛长表型的关联分析

位点	群体	基因型	生长性状	
			体长 (cm)	体质量 (kg)
g. 82C > T	短毛黑水貂	CC	44.66 ± 2.526a	1.992 ± 0.108A
		CT	43.47 ± 2.432b	1.793 ± 0.124B
	红眼白水貂	CC	47.03 ± 2.979	2.675 ± 0.130A
		CT	47.91 ± 2.698	2.367 ± 0.124B
g. 350C > T	咖啡水貂	CC	49.28 ± 1.356	2.754 4 ± 0.191A
		CT	49.41 ± 1.240	2.358 6 ± 0.191B
	短毛黑水貂	CC	46.63 ± 1.807A	1.966 ± 0.167A
		CT	41.85 ± 1.296B	1.857 ± 0.118B
g. 501C > T	红眼白水貂	TT	44.11 ± 1.530C	1.845 ± 0.154B
		CC	48.93 ± 1.619A	2.471 ± 0.206
	咖啡水貂	CT	42.79 ± 0.514B	2.549 ± 0.152
		TT	45.64 ± 0.748C	2.485 ± 0.196
g. 501C > T	短毛黑水貂	CC	50.36 ± 0.895A	2.608 ± 0.333
		CT	47.71 ± 0.469B	2.593 ± 0.187
	红眼白水貂	TT	48.81 ± 0.602C	2.545 ± 0.218
		CC	44.10 ± 2.526	1.892 ± 0.157
g. 501C > T	短毛黑水貂	CT	43.30 ± 2.775	1.864 ± 0.066
		CC	47.80 ± 2.796a	2.482 ± 0.197
	咖啡水貂	CT	47.60 ± 2.703a	2.462 ± 0.182
		TT	45.06 ± 2.542b	2.579 ± 0.212
g. 501C > T	咖啡水貂	CC	49.70 ± 1.232	2.577 ± 0.252
		CT	48.31 ± 1.109	2.571 ± 0.162
g. 501C > T	咖啡水貂	TT	48.88 ± 0.991	2.657 ± 0.495

注:不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ );不同大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ );无字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

面,而不仅是指定蛋白质的氨基酸序列<sup>[8]</sup>。同义稀有密码子现在已知在多种功能中发挥着重要的作用,包括调节共翻译折叠、共价修饰、分泌和表达水平。Meijer 等发现,人类 *UPBI* 基因的一个同义突变会影响每个 mRNA 片段的拼接<sup>[9]</sup>。Cheng 等发现,*IGF1* 的同义突变影响基因的表达水平、基因的稳定性和蛋白质的结构,改变了与受体结合的亲和力<sup>[10]</sup>。g. 82C > T 和 g. 501C > T 位点影响机理有待进一步探究。

g. 350C > T 属于有义突变,氨基酸发生改变由丝氨酸变成苯丙氨酸。有义突变改变了氨基酸,就会改变蛋白质的结构和理化性质,影响蛋白质的高级结构,有可能会改变蛋白质的功能。有义突变能够稳定遗传,所以意义非常重大。

红眼白水貂的 g. 82C > T 位点和咖啡水貂的 g. 350C > T 位点极显著偏离哈代 - 温伯格平衡状态

( $P < 0.01$ ), 可能与群体的不断选育有关。其他位点都处于哈代 - 温伯格平衡状态( $P > 0.05$ )。短毛黑水貂的 g. 501C > T 位点、红眼白水貂的 g. 350C > T 和 g. 501C > T 是低度多态, 显示这些位点的遗传变异较小, 可能在群体选育过程中未受到选择有关。GHR 能影响动物的生产性能。闫海龙等采用降落 PCR 方法在陕北白绒山羊 *GHR* 基因第一内含子上发现一段 9 bp 插入缺失, 共出现 II、ID、DD 3 种基因型<sup>[11]</sup>; 相关分析结果表明, 在体质量、髁宽、体高、荐高和胸深指标上, 基因型 ID 或 DD 个体相比较 II 型个体更具显著性优势。海汀等发现, *GHR* 基因 T2416C、T3490C 和 A7500G 这 3 个突变位点与麦洼牦牛管围极显著相关<sup>[12]</sup>。冉雪琴等采用 PCR 和基因克隆技术测定贵州矮马生长激素受体基因(*GHR*)外显子 10 的核苷酸序列, 得到 10 个单倍型, 贵州矮马 *GHR* 基因外显子 10 中的多态性变化可能影响贵州矮马的生长发育<sup>[13]</sup>。杨慧等找到猪 *GHR* 基因 G1248A 位点, G1248A 位点对巴 × 长  $F_2$  代生长性状的影响表现为: 2 月龄 GG 基因型个体的胸围尺寸显著大于 AA、AG 基因型个体<sup>[14]</sup>。本研究发现, 水貂 *GHR* 基因外显子 3 处的 g. 82C > T 位点在 3 个品种中产生了 CC、CT 这 2 种基因型, CC 基因型为优势基因型, 在体质量方面, CC 与 CT 基因型个体间存在极显著差异; 在体长方面, 只在短毛黑水貂中 CC 与 CT 基因型个体间存在显著差异。水貂 *GHR* 基因外显子 10 处的 g. 350C > T 位点在 3 个品种中产生了 CC、CT、TT 这 3 种基因型, 在体长方面, CC 基因型、CT 基因型与 TT 基因型间存在极显著差异; 在体质量方面, 只在短毛黑水貂中存在极显著差异, 红眼白水貂和咖啡水貂群体中无差异。可能是试验群体小, 可扩大群体进行试验。水貂 *GHR* 基因外显子 10 处的 g. 501C > T 位点在红眼白水貂和咖啡水貂群体中有 CC、CT、TT 这 3 种基因型, 而在短毛水貂中只有 CC、CT 这 2 种基因型。g. 501C > T 在红眼白水貂群体中 CC 基因型和 CT 基因型的体长显著高于 TT 基因型。*GHR* 基因可作为水貂生长性状的候选基因。

#### 4 小结

本试验首次以 *GHR* 基因为候选基因探讨 SNPs 遗传变异与短毛黑水貂、红眼白水貂和咖啡水貂 3

种种群的生长性状相关性。关联分析发现 SNPs 位点与水貂的生长性状相关, *GHR* 基因可作为候选基因辅助用于水貂群体生长性状的遗传改良。

#### 参考文献:

- [1] Kopchick J J, Andry J M. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction [J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2000, 71(1/2): 293 - 314.
- [2] List E O, Duran - Ortiz S, Kopchick J J. Effects of tissue - specific GH receptor knockouts in mice [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2020, 515: 110919.
- [3] Argentsinger L S, Carter - Su C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. [J]. *Physiological Reviews*, 1996, 76(4): 1089 - 1097.
- [4] 王 真, 王 敏, 李 铭, 等. 内蒙古白绒山羊 *GHR* 和 *GDF9* 基因多态性及其与生产性状的相关性分析 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2020, 48(3): 1 - 8.
- [5] 刘 芳, 郝荣超, 王国华, 等. *GHR* 基因第 10 外显子与塞北兔生长发育性能相关性研究 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(9): 1865 - 1869.
- [6] 陈炳霖, 肖 炜, 邹芝英, 等. 两种尼罗罗非鱼 *GHR*、*IGF - I* 基因启动子区及编码区多态性与生长性状的相关性分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2020, 28(11): 2032 - 2047.
- [7] 荣 敏, 徐佳萍, 涂剑锋, 等. 水貂 *GHR* 基因的 DNA 池测序分析 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(19): 240 - 241, 299.
- [8] Chaney J L, Clark P L. Roles for synonymous codon usage in protein biogenesis [J]. *Annual Review of Biophysics*, 2015, 44: 143 - 166.
- [9] Meijer J, Nakajima Y, Zhang C, et al. Identification of a novel synonymous mutation in the human  $\beta$  - Ureidopropionase gene *UPBI* affecting pre - mRNA splicing [J]. *Nucleosides & Nucleotides*, 2013, 32(12): 639 - 645.
- [10] Cheng Y Y, Liu S, Wang G, et al. Porcine *IGF1* synonymous mutation alter gene expression and protein binding affinity with *IGFIR* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 116: 23 - 30.
- [11] 闫海龙, 白洋洋, 王 真, 等. *GHR* 基因 9 - bp InDel 与陕北白绒山羊体重和生长性状的关联研究 [J]. *家畜生态学报*, 2019, 40(2): 27 - 31.
- [12] 海 汀, 柴志欣, 钟金城. 麦洼牦牛 *GH*、*GHR*、*GHSR* 基因的 SNPs 检测及其与体尺性状的关联分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(4): 605 - 617.
- [13] 冉雪琴, 赵星艳, 王嘉福, 等. 贵州矮马 (*Equus caballus*) 生长激素受体基因 5 个单核苷酸位点的多态性研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(11): 1974 - 1986.
- [14] 杨 慧, 陈宝剑, 兰干球, 等. 猪 *GHR* 基因两个 SNPs 位点多态性与生长性状的关联分析 [J]. *南方农业学报*, 2014, 45(11): 2052 - 2057.