

韩志松,白俊艳,曾凡林,等.小尾寒羊 *GHR*、*GHRH*、*GHRHR* 基因多态性与肉质性状的关联分析[J].江苏农业科学,2023,51(8):145-149.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.08.021

小尾寒羊 *GHR*、*GHRH*、*GHRHR* 基因多态性与肉质性状的关联分析

韩志松¹,白俊艳²,曾凡林²,李静云²,何豫涵²,陈梦柯²,卢小宁²

(1. 辽宁省沙地治理与利用研究所,辽宁阜新 123000; 2. 河南科技大学动物科技学院/洛阳市动物遗传育种重点实验室,河南洛阳 471023)

摘要:主要分析 *GHR*、*GHRH*、*GHRHR* 基因的多态性,以及其与小尾寒羊肉质性状的关联,以期为优质绵羊新品种培育提供一定的参考依据。采用 PCR 技术,检测小尾寒羊群体中 *GHR*、*GHRH* 和 *GHRHR* 基因的多态性,利用 SPSS 软件分析以上 3 种基因的不同基因型与肉质性状的关联性。结果表明,*GHR* 与 *GHRHR* 共有 3 种基因型,分别为 II、ID、DD,而 *GHRH* 基因仅检测到 2 种基因型,分别为 II、DD。*GHR* 基因中 II 基因型频率最高,为 0.625, ID 的基因型频率为 0.313, DD 的基因型频率最低,为 0.063;多态信息含量 (PIC) 为 0.283,处于中度多态性 ($0.25 \leq \text{PIC} < 0.50$);小尾寒羊 *GHR* 基因的 DD 基因型肉质的色泽显著低于 ID、II 基因型 ($P < 0.05$)。*GHRHR* 基因中 II 基因型频率最高,为 0.687 5, DD 基因型频率最低,为 0.062 5, ID 基因型频率为 0.2500;多态信息含量为 0.258,处于中度多态性 ($0.25 \leq \text{PIC} < 0.50$);*GHRHR* 基因的 DD 基因型的剪切力显著高于 ID、II 基因型 ($P < 0.05$)。*GHRH* 基因中 DD 基因型频率最低,为 0.437 5, II 基因型频率最高,为 0.562 5;多态信息含量 (PIC) 为 0.371,处于中度多态性 ($0.25 \leq \text{PIC} < 0.50$);*GHRH* 不同基因型对于小尾寒羊的所有肉质性状影响不显著 ($P > 0.05$)。综上所述,*GHR* 基因、*GHRHR* 基因可以作为小尾寒羊提升肉质品质的候选基因之一。

关键词:小尾寒羊;*GHR* 基因;*GHRHR* 基因;肉质性状;关联分析

中图分类号:S826.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)08-0145-05

生长激素受体 (growth hormone receptor, 简称 GHR) 基因在 1976 年从兔的肝脏细胞的细胞膜上被发现^[1]。*GHR* 基因对于加利福尼亚兔的生长性能有促进作用^[2], 可以作为候选基因, 用来改善该奶牛群体的相关性能^[3]。*GHR*-F279Y 位点苯丙氨酸的编码 T 被酪氨酸编码 A 取代, 导致其脂肪、蛋白质和乳的产量有所降低^[4]。*GHR* 基因的 g.914T>A 的 T 等位基因与肌肉以及乳房的大小呈现出正相关性^[5]。*GHR* 基因还可以为安纳托利亚水牛早期选种提供一定的优势^[6]。生长激素释放激素 (growth hormone releasing hormone, 简称 GHRH) 是在下丘脑的弓状核中合成分泌的小分子多肽^[7]。*GHRH* 基因不仅是在种间还是种内都具有高度保守性^[8]。雄性小鼠缺乏 *GHRH* 会增加体力活动^[9]。

牛的 *GHRH* 基因可能是影响体质量的重要因素之一^[10]。*GHRH* 基因 mRNA 表达和生长性状相对于基因型 (+/-) 均表现出差异不显著^[11]。*GHRH* 类似物通过抗炎和抗氧特性使其在糖尿病视网膜病变早期具有保护神经血管作用^[12]。生长激素释放激素受体 (growth hormone releasing hormone receptor, 简称 GHRHR) 在细胞增殖、生长激素合成与分泌等方面都发挥着重要作用。迄今为止仅在异种动物、鸡和斑马鱼中发现的 *GHRHR* 同时容纳 *GHRH* 和 PRP^[13]。*GHRHR* 确定为 *GHI* 之后的第 2 个 *IGHD* 基因^[14]。*CREB3L2* 能够促进 *GHRHR* 启动子的活性^[15]。

InDel 多态性分子标记是基于插入/缺失位点 2 侧的序列设计特异引物进行 PCR 扩增的标记, 其本质仍属于长度多态性标记, 可利用便捷的电泳平台进行分型。InDel 标记准确性高、稳定性好, 避免了由于特异性和复杂性导致的后续分析模糊。此外, InDel 标记能扩增混合 DNA 样品和高度降解的微量 DNA 样品, 并进行有效分型。InDel 标记目前已开始应用于动植物群体遗传分析、分子辅助育种以及人类法医遗传学、医学诊断等领域^[16]。本研究以小

收稿日期:2022-08-17

基金项目:国家自然科学基金 (编号:31201777); 博士启动基金计划 (编号:20111148); 横向课题 (编号:横 20220047)。

作者简介:韩志松 (1977—), 男, 辽宁阜新人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为畜牧生态模式。E-mail: hanzhisongcy@163.com。

通信作者:白俊艳, 博士, 副教授, 研究方向为动物分子育种。E-mail: junyanbai@163.com。

尾寒羊为研究对象,对 *GHR*、*GHRH*、*GHRHR* 基因的 InDel 多态性与肉质性状进行关联分析,以此来探讨 *GHR*、*GHRH*、*GHRHR* 基因对小尾寒羊肉质性状的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取辽宁省沙地治理与利用研究所阜瑶牧业公司阜新市种羊场的小尾寒羊 164 只,通过颈静脉采血,并作 ACD 抗凝处理后的血样至于冰盒中,放入冰箱 -20 ℃ 保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 肉质性状指标测定 测定指标包括滴水损失、水分、蒸煮损失、色泽、粗蛋白、粗脂肪,测量方法参考张沅主编的《家畜育种学》^[17]。

1.2.2 引物设计 引物设计参考 Wu 等的研究^[18]。并由北京鼎国昌盛生物技术有限公司合成,引物信息见表 1。

表 1 引物信息

引物名称	片段大小 (bp)	引物序列(5' - 3')	退火温度 (℃)
GHRH - F	159 + 6	ACGACTGAAGCGATTACGAC	56
GHRH - R		TCCATCTGTAAAATGGGCATG	
GHR - F	77 + 23	CTGTGAAGTCTCACCAGTGC	53.2
GHR - R		GGATAGGCAGAAATGCTAAAG	
GHRHR - F	129	AACCCCTGTCTCAGTTTCTCC	68.5
GHRHR - R		GATCTCAGTCCTCACCTCCAA	

1.2.3 PCR 扩增及数据分析 PCR 扩增体系 15 μL:上下游引物各 1 μL,DNA 2 μL,2 × Tap PCR Master Mix 7.5 μL,dd H₂O 3.5 μL。PCR 扩增产物用 3% 浓度的琼脂糖凝胶进行检测。通过 SPSS 26.0 软件中的一般线性模型方法进行关联分析,最终以作图形式展示关联结果。

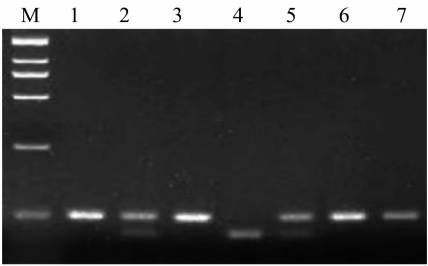
1.2.4 试验地点与时间 试验地点为河南科技大学动物科技学院动物遗传育种实验室,试验时间为 2021 年 4 月至 2022 年 4 月。

2 结果与分析

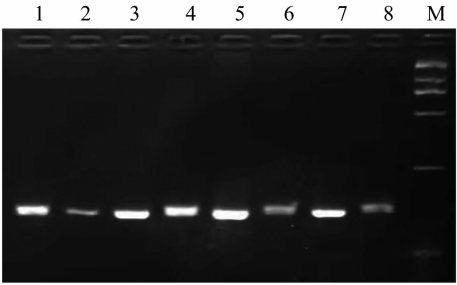
2.1 小尾寒羊 *GHR*、*GHRH*、*GHRHR* 基因的多态性检测

从图 1 可以看出,*GHR* 基因具有 3 种基因型,分别为 II 基因型、ID 基因型、DD 基因型。从图 2 可以看出,*GHRH* 基因具有 2 种基因型,分别为 II 基因

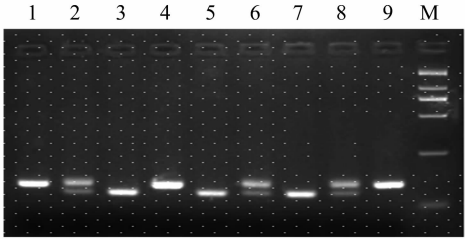
型、DD 基因型。从图 3 可以看出,*GHRHR* 基因具有 3 种基因型,分别为 II 基因型、ID 基因型、DD 基因型。



M—marker; 1, 3, 6, 7—II 基因型;
2, 5—ID 基因型; 4—DD 基因型
图1 *GHR* 基因的多态性检测结果



M—marker; 1, 4, 6, 8—II 基因型; 2, 3, 5, 7—DD 基因型
图2 *GHRH* 基因的多态性检测结果



M—marker; 1, 4, 9—II 基因型; 2, 6, 8—ID 基因型;
3, 5, 7—DD 基因型
图3 *GHRHR* 基因的多态性检测结果

2.2 小尾寒羊 *GHR*、*GHRH*、*GHRHR* 基因的群体遗传多样性

从表 1 可以看出,*GHR* 基因的 II 基因型频率最高,为 0.625;DD 基因型频率最低,仅有 0.063。等位基因 I 的频率最多,为 0.781;*D* 的频率较少,为 0.219。纯合度为 0.685,杂合度为 0.342,多态信息含量为 0.283,在群体中处于中度多态性(0.25 ≤ PIC < 0.50), χ^2 为 0.235,*P* 值为 0.628 > 0.05,说明 *GHR* 基因符合 Hardy - Weinberg 平衡。

GHRH 基因 II 基因型频率最高,为 0.563;DD 基因型频率较低,为 0.437。等位基因 I 的频率最高,为 0.536;*D* 的频率最小,为 0.437。纯合度为

0.508,杂合度为 0.492,多态信息含量为 0.371,在群体中处于中度多态性($0.25 \leq \text{PIC} < 0.50$), χ^2 为 32.000, P 值为 $0.000 < 0.001$,说明 *GHRH* 基因极显著偏离 Hardy – Weinberg 平衡。

GHRHR 基因的 ID 基因型频率为 0.250;DD 基因型频率最低,为 0.062;II 基因型频率最高,为

0.688。等位基因 I 频率最高,为 0.813;等位基因 *D* 频率最低,为 0.187。纯合度为 0.695,杂合度为 0.305,多态信息含量为 0.258,在群体中处于中度多态性($0.25 \leq \text{PIC} < 0.50$), χ^2 为 1.031, P 值为 $0.310 > 0.05$,说明小尾寒羊 *GHRHR* 基因位点符合 Hardy – Weinberg 平衡。

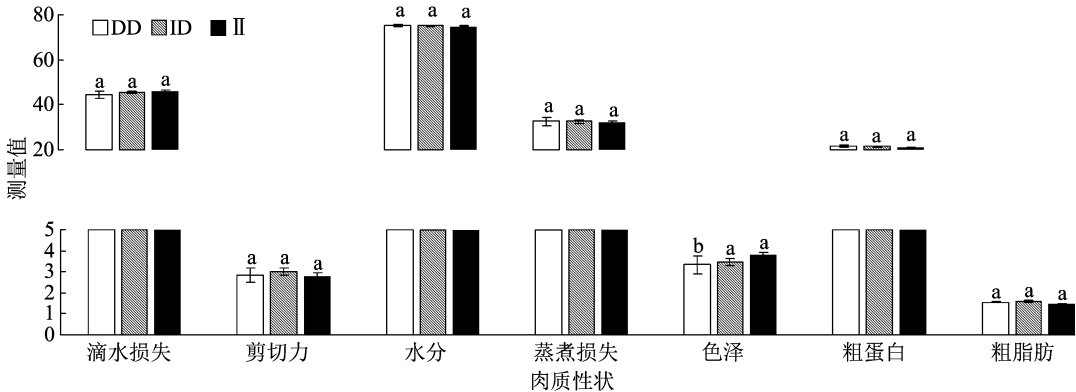
表 1 *GHR*、*GHRH*、*GHRHR* 基因的基因型频率、等位基因频率以及遗传特征参数

位点	基因型频率			等位基因频率		杂合度 (H_e)	纯合度 (H_o)	多态信息 含量(PIC)	有效等位 基因数(N_e)	χ^2	P 值
	ID	II	DD	I	D						
GHR	0.313	0.625	0.063	0.781	0.219	0.342	0.658	0.283	1.519	0.235	0.628
GHRH	0.000	0.563	0.437	0.563	0.437	0.492	0.508	0.371	1.969	32.000	0.000
GHRHR	0.250	0.688	0.062	0.813	0.187	0.305	0.695	0.258	1.438	1.031	0.310

2.3 小尾寒羊 *GHR*、*GHRH*、*GHRHR* 基因与肉质性状的关联分析

从图 4 可以看出,小尾寒羊 *GHR* 基因的 DD 基因型肉质色泽显著低于 ID、II 基因型($P < 0.05$),而滴水损失、剪切力、水分、蒸煮损失、粗蛋白、粗脂肪在 *GHR* 基因的不同基因型之间无显著差异($P >$

0.05)。从图 5 可以看出,*GHRH* 不同基因型对于小尾寒羊的所有肉质性状影响不显著($P > 0.05$)。从图 6 可以看出,*GHRHR* 基因的 DD 基因型个体的剪切力显著高于 ID、II 基因型个体($P < 0.05$),而滴水损失、水分、蒸煮损失、色泽、粗蛋白、粗脂肪在 *GHRHR* 基因的不同基因型之间无显著差异($P > 0.05$)。



不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。图 5、图 6 同

图4 小尾寒羊 *GHR* 基因与肉质性状的关联结果

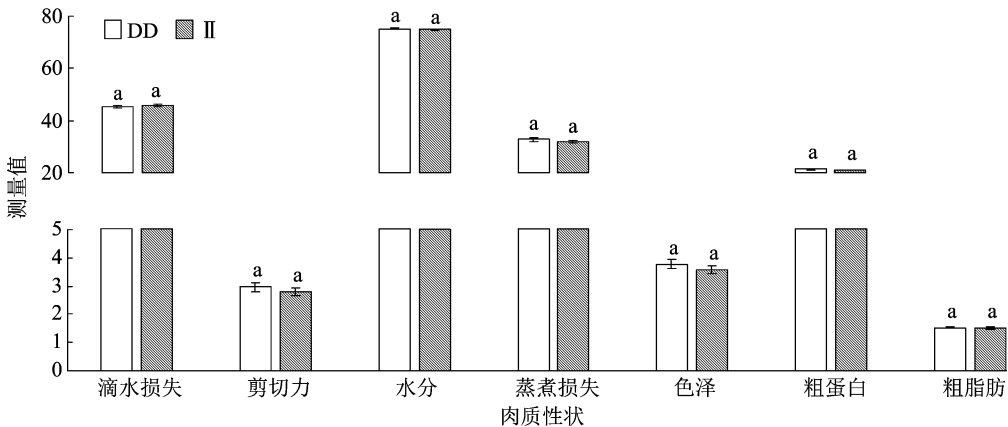
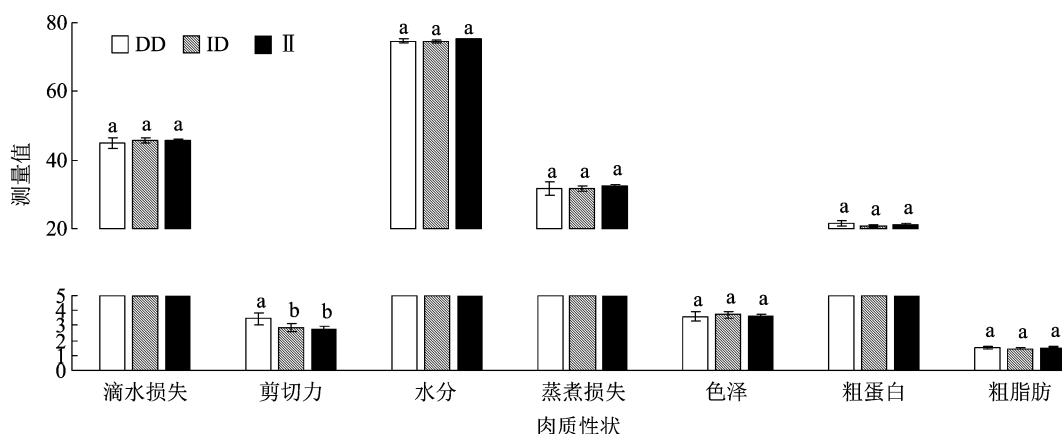


图5 小尾寒羊 *GHRH* 基因与肉质性状的关联结果

图6 小尾寒羊 *GHRHR* 基因与肉质性状的关联结果

3 讨论与结论

目前,对于 *GHR*、*GHRH*、*GHRHR* 这 3 种基因的研究大多数都集中在其生长性状的相关分析,但是对于这 3 种基因的关于肉质性状的关联分析却较少,而且多数的研究都集中在牛等其他动物身上,有关绵羊类的研究非常少。

3.1 *GHR* 基因的多态性

在不同年龄的西罗希山羊品种中,*GHR* 基因的 1 个 SNP 与体质量存在显著影响^[19]。*GHR* 基因 T229C 位点对牛的宰前活质量、屠宰率、胴体质量、净肉率、肉骨比、脂肪覆盖率、头质量、胴体产肉率、前蹄质量、后蹄质量、大理石花纹评分和剪切力影响显著^[20]。在家兔群体中,*GHR* 基因的外显子上发现 2 个突变位点,分别是 2 067 (C/T)、1 797 (T/C),在 1 797 (T/C) 位点中不同基因型肉用性状之间使用最小二乘分析结果显示,在不同基因型个体间差异不显著 ($P > 0.05$),而 2 067 (C/T) 突变位点在胴体质量、背腰质量、35 日龄体质量、70 日龄体质量、前腿质量、皮质量和后腿质量等屠宰性状及肌内蛋白质含量和干物质含量等肉质性状的最小二乘均值杂合型 MN 型个体显著优于 MM 型、NN 型个体 ($P < 0.05$)^[21]。本研究中 *GHR* 基因仅与小尾寒羊的肉肉质色泽存在显著相关性,可以推测出 *GHR* 基因可以作为小尾寒羊提升肉质品质的候选基因之一。

3.2 *GHRH* 基因的多态性

GHRH 激动剂可以减轻诱导的小鼠神经抑郁、焦虑和认知缺陷,并且降低氧化应激标志物,促红细胞生成素和胰岛素生长因子-1 表达上调,并明显降低了小鼠在睡眠期间的间歇性缺氧时的水迷宫缺陷^[22]。*GHRH* 除了影响内分泌作用和代谢以

外,在炎症和疼痛的调节中同样发挥作用。可以通过注射 *GHRH* 表达质粒的方法来提高绵羊的增质量和生长速率。PCR 结果显示,经 pM - *GHRH* 处理后的绵羊中几乎没有质粒残留,并且也不存在器官肿大或相关的病理^[23]。在朝鲜牛群体中,*GHRH* 基因在 9 kb 全基因区域内共发现 12 个单核苷酸多态性,结果显示 -4241A > T 与 EMA 和 CW 呈显著相关,表明 *GHRH* 基因多态性可能是影响肉牛胴体产量的重要遗传因素之一^[24]。本试验结果与之存在差异,这可能是由于所选的动物种类不同,而导致的结果存在差异,本试验结果中的 *GHRH* 基因与小尾寒羊肉质性状的无显著相关性,故不可以作为小尾寒羊肉质形状的候选基因。

3.3 *GHRHR* 基因的多态性

GHRHR 基因的 2 种单倍型的效应大于其他任何基因,表明 *GHRHR* 可能是迄今为止发现的影响人类身高正常变异的最重要基因之一^[25]。在南阳牛、陕县红牛和秦川牛中发现 *GHRHR* 的 4 个位点共检测出 10 个 SNPs,而且对陕县红牛的管围存在极显著的影响 ($P < 0.01$),对其体高、体斜长、腰角宽、体质量、十字部高、尻长和胸围有显著影响 ($P < 0.05$);对南阳牛 0 ~ 6 月龄平均日增质量、6 月龄体质量、体斜长和 6 ~ 12 月龄平均日增质量有明显的影响 ($P < 0.05$)^[26]。本研究中 *GHRHR* 基因仅与小尾寒羊的剪切力存在显著相关性,可以推测出 *GHRHR* 基因可以作为小尾寒羊提升肉质品质的候选基因之一。

参考文献:

- [1] Tsushima T. Technics of growth hormone receptor assay [J]. Nihon Rinsho, 1976, 34 (3): 461 - 465.

- [2] Gencheva D G, Velikov K P, Veleva P M. Association analysis of nucleotide polymorphisms in growth hormone (GH) and its receptor (GHR) with body weight in Californian rabbits[J]. World Rabbit Science, 2022, 30(1): 95–102.
- [3] Cobanoglu O, Kul E, Gurcan E K, et al. Determination of the association of *GHR/AluI* gene polymorphisms with milk yield traits in Holstein and Jersey cattle raised in Turkey[J]. Archives Animal Breeding, 2021, 64(2): 417–424.
- [4] Komisarek J, Michalak A, Walendowska A. The effects of polymorphisms in *DGATI*, *GH* and *GHR* genes on reproduction and production traits in Jersey cows[J]. Animal Science Papers and Reports, 2011, 29(1): 29–36.
- [5] Fedota O M, Lysenko N G, Ruban S Y, et al. The effects of polymorphisms in growth hormone and growth hormone receptor genes on production and reproduction traits in Aberdeen – Angus cattle (*Bos taurus* L., 1758) [J]. Cytology and Genetics, 2017, 51(5): 352–360.
- [6] Erdoğan M, Tekel İ M, Çel İkeloğlu K, et al. Associations of SNPs in *GHR* gene with growth and milk yield of Anatolian buffaloes[J]. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 2021, 45(6): 1080–1086.
- [7] 马冬梅, 韩林强, 白俊杰. 大口黑鲈 *GHRH* 基因启动子区域序列分析及其活性检测[J]. 海洋渔业, 2016, 38(4): 383–390.
- [8] 王金玲, 王永, 刘鲁蜀, 等. 草地藏系绵羊生长激素释放激素基因部分 cDNA 的克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 595–599.
- [9] Leone S, Shohreh R, Manippa F, et al. Behavioural phenotyping of male growth hormone – releasing hormone (GHRH) knockout mice [J]. Growth Hormone & IGF Research, 2014, 24(5): 192–197.
- [10] Zhang B, Zhao G F, Lan X Y, et al. Polymorphism in *GHRH* gene and its association with growth traits in Chinese native cattle[J]. Research in Veterinary Science, 2012, 92(2): 243–246.
- [11] Ma D M, Han L Q, Bai J J, et al. A 66 – bp deletion in growth hormone releasing hormone gene 5′ – flanking region with largemouth bass recessive embryonic lethal[J]. Animal Genetics, 2014, 45(3): 421–426.
- [12] Thounaojam M C, Powell F L, Patel S, et al. Protective effects of agonists of growth hormone – releasing hormone (GHRH) in early experimental diabetic retinopathy[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(50): 13248–13253.
- [13] Tam J K, Chow B K, Lee L T. Structural and functional divergence of growth hormone – releasing hormone receptors in early sarcopterygians: lungfish and *Xenopus* [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53482.
- [14] Cohen E, Belkacem S, Fedala S, et al. Contribution of functionally assessed GHRHR mutations to idiopathic isolated growth hormone deficiency in patients without GH1 mutations [J]. Human Mutation, 2019, 40(11): 2033–2043.
- [15] Ariyasu D, Kubo E, Higa D, et al. Decreased activity of the GHRHR and GH promoters causes dominantly inherited GH deficiency in humanized GH1 mouse models [J]. Endocrinology, 2019, 160(11): 2673–2691.
- [16] 杨洁, 赫佳, 王丹碧, 等. InDel 标记的研究和应用进展[J]. 生物多样性, 2016, 24(2): 237–243.
- [17] 张沅. 家畜育种学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2018.
- [18] Wu M L, Zhao H D, Tang X Q, et al. Novel InDels of *GHR*, *GHRH*, *GHRHR* and their association with growth traits in seven Chinese sheep breeds[J]. Animals, 2020, 10(10): 1883.
- [19] Sharma A, Dutt G, Sivalingam J, et al. Novel SNPs in *IGF1*, *GHR* and *IGFBP-3* genes reveal significant association with growth traits in Indian goat breeds[J]. Small Ruminant Research, 2013, 115(1/2/3): 7–14.
- [20] 施雪奎. 肉牛 *CAPNI*、*CAST*、*GHR*、*SCDI* 基因多态性及与胴体、肉质性状的相关性研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2011.
- [21] 乔西波. 家兔 *GH*、*GHR* 及 *MSTN* 基因多态性及其与产肉性状的关系[D]. 泰安: 山东农业大学, 2010.
- [22] Nair D, Ramesh V, Li R C, et al. Growth hormone releasing hormone (GHRH) signaling modulates intermittent hypoxia – induced oxidative stress and cognitive deficits in mouse[J]. Journal of Neurochemistry, 2013, 127(4): 531–540.
- [23] Meng Q Y, Chen Z Q, Yu Z Q, et al. Increased body weight via injecting myogenic expression growth hormone – releasing hormone (GHRH) plasmid DNA into sheep [J]. Animal Biotechnology, 2004, 15(2): 175–192.
- [24] Cheong H S, Yoon D H, Kim L H, et al. Growth hormone – releasing hormone (GHRH) polymorphisms associated with carcass traits of meat in Korean cattle[J]. BMC Genetics, 2006, 7: 35.
- [25] Johansson A, Jonasson I, Gyllensten U. Extended haplotypes in the growth hormone releasing hormone receptor gene (*GHRHR*) are associated with normal variation in height[J]. PLoS One, 2009, 4(2): e4464.
- [26] 张存芳. 黄牛 *PTHRP*、*GHRH* 和 *GHRHR* 基因 SNP 及其与生长性状关联分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.