

松辽白鹅 GH 基因多态性及与屠宰性能的相关分析

朴海仙^{1,2}, 金 一², 曹 阳¹, 金海国¹, 刘 臣^{*}, 赵 卓¹

(1. 吉林省农业科学院 畜牧分院, 吉林 公主岭 136100 2 延边大学 农学院, 吉林 延吉 133000)

摘要: 参照鸭 GH 基因序列设计引物扩增松辽白鹅 GH 基因外显子 2 和内含子 2 的部分序列, 并运用 PCR-SSCP 技术进行多态性分析。结果表明: 此扩增片段存在多态性, 得到 AA、AB 和 BB 等 3 种基因型。3 个品种中等位基因 A 占绝对优势, 且主要以 AA 型存在。在 GH 基因外显子 2 第 2 301 处发生了单碱基的突变 (C[→]T), 内含子 2 第 2 479 处发生了单碱基突变 (T[→]C)。方差分析结果表明: 不同基因型的宰前活重、屠体重、半净膛重、全净膛重、腹脂重、头重以及屠宰率性状间有显著差异, 其它大部分生长和屠体性状不显著。

关键词: 松辽白鹅; GH 基因; 屠宰性能

中图分类号: S835.311 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)06-1240-05

Correlation Analysis between the Polymorphism of GH and Carcass Quality in Songliao Goose

PIAO Haixian^{1,2}, JIN Yi², CAO Yang¹,
JIN Haiguo¹, LIU Chen^{1*}, ZHAO Zhuo¹

(1. Animal Science Part of Jilin Province Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China 2. College of Agronomy, Yanbian University, Yanji 133000, China)

Abstract A part of GH gene exon 2 and intron 2 sequence of Songliao goose was designed according to GH gene sequence of duck. The polymorphism of those genes was analyzed by PCR-SSCP. The results showed as follows: first of all, the amplified fragment possessed polymorphism including AA, AB and BB, three genotypes. Allele A held absolute dominance in three different species of goose. Secondly, the single base was changed on 2301st spot of exon 2 of GH gene (C[→]T), and on 2479th spot of intron 2 of GH gene (T[→]C). The results of significance test showed that living weight, carcass weight, half-eviscerated weight, whole-eviscerated weight, abdominal fat weight, head weight and dressing percentage were significantly different among different genotypes, and others showed no difference.

Key words Songliao goose; GH gene; carcass quality

生长激素 (Growth hormone, GH) 是由脑垂体前叶嗜酸性细胞合成和分泌的一种单一肽链的蛋白质激素, 由 190 或 191 个氨基酸组成, 是一种具有广泛生理功能的生长调节素^[1]。GH 能刺激所有机体组织的发育, 增加细胞的体积和数量, 还可以促进钙、磷和硫酸根在软骨中的沉积, 加速软骨基质的合成和

收稿日期: 2010-05-11 修回日期: 2010-10-22

基金项目: 吉林省财政厅资助项目

作者简介: 朴海仙 (1985-), 女, 硕士生, 主要从事特种经济动物繁殖与生物技术研究, E-mail: heasen520@163.com

* 通讯作者: 刘臣, 研究员, E-mail: liuchen3199@163.com

软骨细胞的分裂,使骨骺部的软骨生长,再钙化成骨,从而促进骨的生长^[2-3]。

GH 基因在猪牛羊等哺乳动物中已经展开了广泛研究,禽类 GH 基因的研究起步较晚,目前主要集中在鸡和鸭,在鹅中的报道还很少见。Kansaku 等^[4]克隆并测定了鸭 GH 基因的全序列。该序列包含 5 219 个碱基对,编码 216 个氨基酸,包含 5 个外显子和 4 个内含子。敖金霞等^[5]首次克隆测序获得了鹅 GH 基因的 cDNA 序列,全长 651 bp。与鸡和鸭的 GH 基因编码区高度保守,同源性分别达到 92% 和 99%。

松辽白鹅配套系是在现有鹅种的基础上,利用先进的分子育种方法培育出的肉鹅新品系,其生长速度快、绒肉产量高、繁殖性能好、肉质好、抗病力强。本研究以松辽白鹅为研究对象对鹅 GH 基因进行多态性分析,以期寻找特有的 SNP 标记,同时与屠宰性状进行相关分析,为寻找鹅生产性状的遗传标记奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

统一标准饲养的松辽白鹅 38 只于 90 日龄进行屠宰,采肝组织置液氮速冻,苯酚-氯仿法提取基因组 DNA, -80 °C 保存。

1.2 主要试剂

DNA 凝胶回收试剂盒购自 AXYGEN 公司; pMD18-T 载体试剂盒购自 Takara 公司; Taq 酶、DNTP 购自 TIANGEN 公司;感受态 DH5 α 由本实验室保存。

1.3 引物设计与 PCR-SSCP 检测

参照鸭 (Genbank: AB158760) 序列设计引物,引物序列包含第 2 外显子及第 2 内含子部分序列:上游引物为 5'-GGTGTCACTGGAGGGCTAA-3',下游引物为 5'-AACTGGACTGGGTGGAAG-3',由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。PCR 反应体系总体积为 25 μ L,其中 10 \times PCR 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 1 μ L, 10 μ mol/L 上、下游引物各 0.5 μ L, Taq 酶 1.0 U, 100 ng/ μ L DNA 模板 1 μ L,其余双蒸水补齐。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min,扩增产物用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 扩增产物经 98 °C 变性 10 min 用冰预冷 10 min 后,8% 变性聚丙烯酰胺凝胶 180 V 电泳 14~16 h 银染显色,分型。

1.4 序列测定

选取不同基因型的纯合子,使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的条带,克隆到 pMD18-T 载体,转入 DH5 α 感受态细胞,37 °C 培养过夜,对菌体进行 PCR 鉴定为阳性的细胞送北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。

1.5 统计分析

分型后计算基因型频率及基因频率,并进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。同时以不同基因型为标记效应组成固定模型,利用 SPSS12.0 统计软件对各生产性状进行方差分析,不同标记基因型之间生产性状指标(平均值 \pm 标准差)进行差异显著性检验和多重比较。线性模型如下: $Y_{ij} = \mu + marker_j + e_{ij}$ 其中: Y_{ij} :个体表型的记录值; μ :群体平均值; $marker_j$:标记基因型效应; e_{ij} :随机误差。

1.6 屠宰性能测定指标及测定方法

屠宰性能指标:本研究用宰前活重、屠体重、半净膛重、全净膛重、胸肌重、腿肌重、腹脂重、翅膀重、头重、爪重作为禽屠宰测定的主要指标,为了计算相关的率,可考虑测量屠宰重指标。

屠宰性能按照全国家禽育种协会 1984 年公布的“家禽生产性能与计算方法”进行。

2 结果与分析

2.1 鹅 GH 基因部分序列 PCR 扩增结果

PCR 扩增结果见图 1,扩增产物长度为 390 bp 没有非特异性条带,说明扩增产物良好,可以用于 SSCP 分析。

2.2 SSCP检测结果

经过 SSCP 分析, 共检测出 3 种基因型, 分别定义为 AA、AB、BB(图 2)。

2.3 序列分析结果

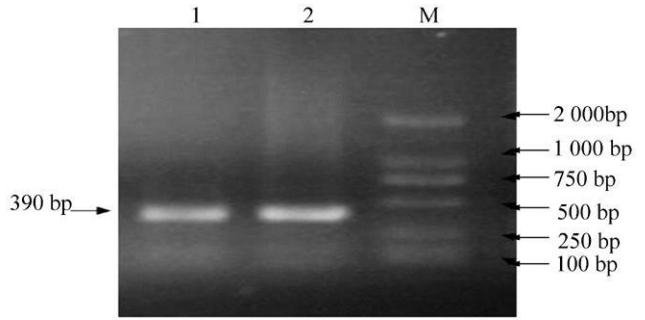
取 AA 和 BB 基因型个体进行测序并与原序列进行比对发现, 第 2 301 处发生了单碱基的改变 (C → T), 位于外显子 2 第 2 479 处发生了单碱基改变 (T → C), 位于内含子 2。

2.4 基因型频率及基因频率

根据分型结果对基因型频率及基因频率进行计算, 并进行 Hardy-Weinberg 平衡检验, 结果发现 AA、AB 和 BB 3 种基因型中 AA 基因型为优势基因型, 等位基因 A 为优势等位基因。 χ^2 检验发现该位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

2.5 不同基因型与屠宰性状的关系

对不同基因型的各个屠宰性状均值进行了差异显著性检验, 结果发现基因型 AB 的宰前活重、半净膛重均值显著高于基因型 AA、BB ($P < 0.05$), 其中基因型 AB 与 BB 个体间差异达到了极显著水平 ($P < 0.01$); 基因型 AB 的屠体重极显著高于基因型 AA、BB ($P < 0.01$); 基因型 AB 的全净膛重显著高于基因型 AA、BB ($P < 0.05$), 说明基因型 AB 对于宰前活重、屠体重、半净膛重、全净膛重这 4 个指标均有一定的正面影响。腹脂重



鹅 GH 基因 DNA 部分片段; M: D2000

图 1 鹅 GH 基因 PCR 扩增结果电泳检测图

Fig 1 GH gene PCR amplification results goose electrophoresis map

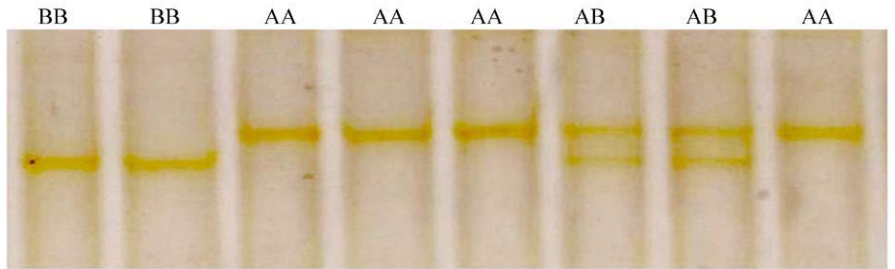


图 2 GH 基因扩增产物的 SSCP 分析

Fig 2 GH gene SSCP analysis of an amplified products

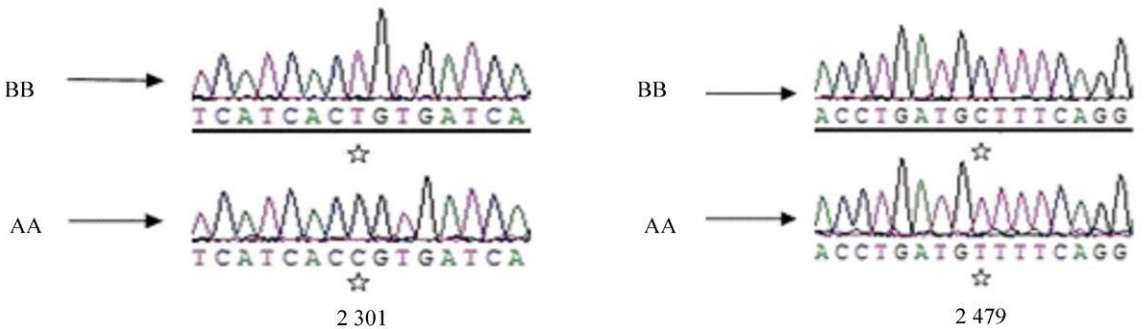


图 3 GH 基因不同基因型测序峰图比较

Fig 3 GH gene sequencing peak chart compares the different genotypes

表 1 松辽白鹅 GH 基因基因型频率及基因频率

Tab 1 GH gene Songliao goose genotype and gene frequency

基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency		χ^2
AA	BB	AB	A	B	
0.7632	0.0789	0.1579	0.8422	0.1578	3.2259

* χ^2 为对不同基因型分布的 Hardy-Weinberg 平衡检验值。

* χ^2 distribution of different genotypes for the Hardy-Weinberg equilibrium test values

性状上基因型 BB 均值显著低于基因型 AA、AB ($P < 0.05$), 说明基因型 BB 对腹脂重性状有一定的负面影响。基因型 AB 的头重均值显著高于基因型 BB ($P < 0.05$), 说明基因型 AB 对头重性状有一定的正面影响。在屠宰率性状中, 基因型 AB 的均值显著高于基因型 AA、BB ($P < 0.05$), 说明基因型 AB 对屠宰率有一定的正面影响。在胸肌重、腿肌重、翅膀重、爪重、屠宰率、半净膛率、全净膛率、胸肌率、腿肌率和腹脂率性状上没有发现显著差异。

表 2 松辽白鹅 GH 基因基因型与屠宰性状的关系

Tab 2 GH gene Songliao goose genotype and slaughter traits

性状 Traits	AA 型 (n = 29)	AB 型 (n = 6)	BB 型 (n = 3)
宰前活重 /g BW	4 266.21 ± 149.85 ^b	4 580.00 ± 109.59 ^a	4 026.67 ± 154.98 ^{bb}
屠体重 /g CW	3 547.97 ± 144.62 ^b	3 848.83 ± 98.09 ^a	3 326.67 ± 138.71 ^B
半净膛重 /g SEW	3 235.55 ± 139.40 ^b	3 487.17 ± 86.62 ^A	3 071.67 ± 122.51 ^{bb}
全净膛重 /g EW	2 861.21 ± 130.35 ^b	3 050.50 ± 66.73 ^a	2 754.33 ± 94.37 ^b
胸肌重 /g BMW	393.99 ± 8.30	453.84 ± 18.26	396.34 ± 25.82
腿肌重 /g LMW	427.18 ± 17.62	479.84 ± 16.76	424.99 ± 23.70
腹脂重 /g AW	55.86 ± 2.82 ^a	52.67 ± 6.21 ^a	45.67 ± 8.78 ^b
翅膀重 /g WR	430.38 ± 15.82	436.50 ± 12.79	404.67 ± 18.09
头重 /g TH	151.17 ± 2.05 ^{ab}	160.33 ± 4.50 ^a	143.67 ± 6.36 ^b
爪重 /g CR	124.68 ± 2.18	125.67 ± 4.80	116.33 ± 6.79
屠宰率 /% CP	83.14 ± 1.8 ^b	84.04 ± 3.9 ^a	82.58 ± 5.5 ^b
半净膛率 /% SEP	75.84 ± 1.34	76.19 ± 1.75	76.30 ± 1.06
全净膛率 /% EP	67.11 ± 1.33	66.64 ± 1.73	68.32 ± 1.04
胸肌率 /% BMP	13.77 ± 0.16	14.88 ± 0.35	14.39 ± 0.49
腿肌率 /% LMP	14.93 ± 0.14	15.73 ± 0.32	15.43 ± 0.45
腹脂率 /% AP	1.92 ± 0.10	1.71 ± 0.23	1.76 ± 0.32

同行不同小写字母数值间差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母数值间差异极显著 ($P < 0.01$)。

Peer different lower case letters significant differences between values ($P < 0.05$), between the values of different capital letters were significantly different ($P < 0.01$).

3 讨论

Chen 等^[6]首次克隆、测定了鸭 GH 基因的 cDNA 序列。颜炳学等^[7]以明星肉鸡和丝羽乌骨鸡杂交的 F2 代鸡群为试验材料, 通过 PCR-RFLP 方法对 GH 基因进行多态性检测, 在内含子 3 和 4 中各发现一处碱基突变, 内含子 3 中 *EcoRV* 酶切基因型与腹脂性状显著相关。GH 促进肌肉生长的效应主要是通过 GH-IGF-1 轴来实现^[8]。鸡上 GH 是在它的受体的介导下抑制卫星细胞的分化, 促进细胞的增殖, 从而增加产肉量^[9]。GH 对机体生长、发育的促进作用, 主要从肌肉、脂肪和骨骼三方面表现出来, 在哺乳动物如猪中, GH 通过对营养物质向不同组织的分配等途径来调控肌肉、脂肪的发育^[10]。禽类 GH 基因的多态性与生产性能相关性研究也有报道。Fotoubi 等^[11]发现鸡 GH 基因中存在内切酶 *MspI* 和 *SacI* 多态性, 其中一些位点与鸡腹脂形成有关。陈清等^[12]推测鹅 GH 基因可能是控制某些屠宰性状的主效基因或者控制这些性状的主效基因连锁。

与哺乳动物相比, 禽类 GH 基因的研究起步较晚, 且主要集中于鸡和鸭。本实验采用 PCR-SSCP 技术检测了松辽白鹅 GH 基因的多态性, 得到了 3 种基因型, AA 基因型为优势基因型, 等位基因 A 占主要优势。 χ^2 检验结果表明, 松辽白鹅群体处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 说明其在该位点受到的选择作用较小。

本研究发现不同基因型间的宰前活重、屠体重、全净膛重、半净膛重、腹脂重、头重以及屠宰率性状间有显著差异。AB 基因型个体有相对较高的均值, 故该基因型可作为筛选部分高屠宰性状的分子标记, 从而达到提高松辽白鹅生长水平的目的。此结果是否能在实际生产中应用, 是下一步要研究的课题。

参考文献:

- [1]程治平. 内分泌生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 64-70
- [2]徐日福, 孙如宪. 肉鸡血浆生长激素含量与屠体性状的相关[J]. 山东家禽, 1998(2): 12-13
- [3]敖金霞, 李辉, 王启贵, 等. 鹅生长激素基因内含子 2 单核苷酸多态性与体重性状的相关研究[J]. 中国畜牧杂志, 2006, 42(7): 9-11
- [4]Kansaku N, Zadwomy D, Guenene D. Genomic cloning of duck growth hormone[J]. NCBI GenBank, 2004
- [5]敖金霞, 李辉, 王启贵, 等. 鹅生长激素基因的克隆和组织表达[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(5): 552-555
- [6]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
- [7]颜炳学, 邓学梅, 费菁, 等. 鸡生长激素基因单核苷酸多态性与生长及屠体性状的相关性[J]. 科学通报, 2003, 48(12): 1304-1307
- [8]张小玲. 鸡生长激素基因的多态性与屠宰和肉质性状间的相关分析[D]. 成都: 四川农业大学, 2006
- [9]Halvøy O V, Hodil A M et al. The effects of growth hormone on avian skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation[J]. Gen Comp Endocrinol, 1996, 101(1): 43-52
- [10]Eherton T D. Porcine growth hormone: a central metabolic hormone involved in the regulation of adipose tissue growth[J]. Nutrition, 2001, 17(10): 789-792
- [11]Fotoubi N, Karatzas C N, Kublein U, et al. Identification of growth hormone DNA polymorphism which respond to divergent selection for abdominal fat content in chickens[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 85(88): 931-936
- [12]陈清, 赵文明, 程金花, 等. 鹅 GH 基因内含子 3 多态性及其与体重和屠宰性能相关分析[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2008, 29(1): 41-44

(上接第 1223 页)

- [34]罗春霞, 张映琦, 迟路湘, 等. 蜕皮甾酮对大鼠局灶性脑梗死的保护作用及机制初讨[J]. 西南国防医药, 2009, 19(2): 176-178
- [35]侯麦花, 蔺茂强, 朱文元. 神经酰胺及其相关皮肤病[J]. 临床皮肤科杂志, 2009, 38(4): 270-271
- [36]魏静, 张伟敏, 钟耕. 神经酰胺对皮肤生理作用及其在化妆品中应用[J]. 粮食与油脂, 2007(1): 21-24
- [37]林文群, 陈忠, 刘剑秋. 野生香料小鱼仙草资源开发利用[J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(6): 28-30
- [38]Lee D H, Kim S H, Eun J S, et al. *Mosk dianthera* inhibits mast cell-mediated allergic reactions through the inhibition of histamine release and inflammatory cytokine production[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2006, 216(3): 479-484
- [39]张磊, 李俊, 余世春, 等. 山香圆总黄酮的抗炎作用[J]. 安徽医科大学学报, 2003, 38(3): 185-188
- [40]Zhang L, Li J, Yu S C, et al. Therapeutic effects and mechanisms of total flavonoids of *Turpinia arguta* Seen on adjuvant arthritis in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2008, 116(1): 167-172
- [41]陈鹭颖, 刘锡钧. 山蜡梅对小鼠的减肥作用[J]. 海峡药学, 2002, 14(5): 30-33