河南农业科学,2017,46(9):152-155
Journal of Henan Agricultural Sciences
doi:10.15933/j.cnki.1004-3268.2017.09.029

惠阳胡须鸡 *IGF－Ⅰ* 和 *GHRL* 基因多态性研究

李红伟[1],钟淡龙[1],陈　圆[1],吴晓燕[1],邹志冠[2]
(1.惠州学院 生命科学系,广东 惠州 516007;2.广东金种农牧科技股份有限公司,广东 惠州 516021)

摘要:以 *IGF－Ⅰ* 和 *GHRL* 基因为惠阳胡须鸡生长性状的候选基因,通过测序、酶切等方法对93日龄惠阳胡须鸡 *IGF－Ⅰ* 和 *GHRL* 基因多态性进行分析,并用GLM模型分析基因型与体质量的关联性。结果表明:*IGF－Ⅰ* 基因在第181位发生碱基突变,A突变为G,属于同义突变,*Bsm* Ⅰ酶切分析发现,*IGF－Ⅰ* 基因只有1种基因型,表明该位点在胡须鸡保种群中已经纯合;*GHRL* 基因在第124位发生碱基突变,T突变为G,改变了酶切位点,通过 *pfl*M Ⅰ酶切分析发现,*GHRL* 基因有3种基因型,即AA型、AB型和BB型。统计结果表明,93日龄惠阳胡须鸡3种基因型个体间体质量无显著差异。

关键词:惠阳胡须鸡;*IGF－Ⅰ* 基因;*GHRL* 基因;基因多态性
中图分类号:S831　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1004－3268(2017)09－0152－04

Study on Single Nucleotide Polymorphism(SNP) of *IGF-Ⅰ* and *GHRL* Gene in Huiyang Bearded Chickens

LI Hongwei[1],ZHONG Danlong[1],CHEN Yuan[1],WU Xiaoyan[1],ZOU Zhiguan[2]
(1. Department of Life Science,Huizhou University,Huizhou 516007,China;
2. Guangdong Jinzhong Agriculture and Animal Husbandry Co.,Ltd.,Huizhou 516021,China)

Abstract: In this study,*IGF-Ⅰ* and GHRL genes were chosen as candidate genes of growth traits in Huiyang bearded chicken. Sequencing and enzyme digestion were applied to assess the single nucleotide polymorphism of the two genes and the general linear model was used to analyze association between different genotypes and body weight on the 93rd day in Huiyang bearded chicken. The results showed that one mutation(A181G) was found in *IGF-Ⅰ* gene,but the mutation was synonymous. Only one genotype was detected by *Bsm* Ⅰ enzyme digestion in *IGF-Ⅰ* gene,which indicated that the mutation site had been homozygous in the conservation population of Huiyang bearded chicken. The results also showed that one mutation(T124G) was detected in *GHRL* gene. The mutation changed the cutting site of *pfl*M Ⅰ enzyme. Three genotypes(AA,AB,BB) of the *GHRL* gene were detected by the *pfl*M Ⅰ enzyme digestion. The association analyses showed that there was no significant difference among individuals with three genotypes in Huiyang bearded chicken on the 93rd day.

Key words: Huiyang beared chicken; *IGF-Ⅰ* gene; *GHRL* gene; genetic polymorphism

惠阳胡须鸡以特有的优良肉质和三黄胡须鸡的外貌特征而驰名,在育种、生产和外贸活鸡市场上都具有较高的经济价值,但存在生长速度慢等缺点。寻找与惠阳胡须鸡生长性状相关的候选基因,实施分子标记辅助选择育种十分必要。

IGF－Ⅰ全称胰岛素样生长因子,对动物生长发育有重要的调控作用,是调节动物生命活动的重要多肽生长因子之一[1]。Florini等[2]研究发现,*IGF－Ⅰ* 基因通过影响肌纤维的分化、增殖和蛋白质沉积,间接影响肌肉的生长速度。赵秀华等[3]研究发现,*IGF－Ⅰ* 基因部分单核苷酸多态性与京海黄鸡生长性状相关,认为可应用于标记辅助选择,加

收稿日期:2017－03－16
基金项目:广东省普通高校特色创新项目(2014KTSCX178);惠州学院博士启动基金项目(156020021)
作者简介:李红伟(1972－),男,云南禄丰人,讲师,博士,主要从事家禽遗传育种研究。E－mail:lhwcau@163.com

快育种进程。而刘大林等[4]研究认为,*IGF - Ⅰ* 基因可能控制着鸡的生长性状和屠体性状或与控制生长性状、屠体性状的主效基因连锁,可以把 *IGF - Ⅰ* 基因作为鸡生长、屠体性状的辅助标记基因。生长素(ghrelin, GHRL)是促进生长激素(growth hormone, GH)分泌的关键因子,可以调节机体生长发育、增加食欲、调节代谢及能量平衡、促进胃酸分泌等[5-10]。动物饥饿时,血液中的 GHRL 量增加,在促进摄食的同时减少了体内脂肪的消耗,引起动物体质量增加[11]。巢湖鸭 *GHRL* 基因多态性与胴体质量、半净膛质量和全净膛质量等屠体性状有显著相关性[12]。何丹林等[13]研究表明,鸡 *GHRL* 基因 C2100T 位点多态性与鸡的部分生长性状存在显著相关性。Fang 等[14]研究表明,*GHRL* 基因外显子 1 处的 8 bp 插入缺失多态性与鸡生长性状和屠体性状显著相关,而 *GHRL* 基因部分单核苷酸多态性与鸡腹脂质量、腿肌粗蛋白含量显著相关[15]。

综上可知,*IGF - Ⅰ* 和 *GHRL* 基因与鸡生长性状紧密相关。因此,以 *IGF - Ⅰ* 和 *GHRL* 基因为惠阳胡须鸡生长性状的候选基因,分析 *IGF - Ⅰ* 和 *GHRL* 基因多态性及其与体质量的关系,以期为今后惠阳胡须鸡育种中生长性状的分子标记辅助选择提供理论依据。

1　材料和方法

1.1　材料

100 份 93 日龄的惠阳胡须鸡血样采自广东金种农牧科技股份有限公司的惠阳胡须鸡保种场。将血样放入含肝素钠的采血管,-20 ℃保存。

1.2　引物设计与 PCR 扩增

IGF - Ⅰ 基因引物设计参照文献[3],*GHRL* 基因引物设计参照文献[15]。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1　*IGF - Ⅰ* 基因和 *GHRL* 基因的引物序列

基因	序列 (5′—3′)	退火温度/℃	片段大小/bp
IGF - Ⅰ	F:TACACATCTACCACTGTCAT	53.5	208
	R:TCCTCAGGTCACAACTCT		
GHRL	F:TATGCGTTCTGCTACTCTTT	52.0	534
	R:TGGAAGCGATCACTATACC		

IGF - Ⅰ、*GHRL* 基因的 PCR 扩增体系均为 25 μL:Green Mix 12.5 μL,无菌水 10.5 μL,上、下游引物各 0.5 μL,基因组 DNA 1 μL。

IGF - Ⅰ 基因扩增条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,53.5 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min;10 ℃保存。*GHRL*基因扩增条件:94 ℃预变性 2 min 30 s;94 ℃变性 30 s,52.0 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 45 s,共 32 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min;10 ℃保存。

将上述 PCR 扩增产物纯化后送到广州华大基因公司,利用 ABI - 3T30 仪器进行测序。

1.3　基因型检测

IGF - Ⅰ 基因酶切反应体系为 20 μL:*Bsm* Ⅰ酶 0.5 μL,10 × NE Buffer 2 μL,PCR 产物 17.5 μL。65 ℃条件下反应 15 min。*GHRL* 基因酶切反应体系为 20 μL:*pfl*M Ⅰ酶 0.5 μL,10 × NE Buffer 2 μL,PCR 产物 17.5 μL。37 ℃条件下反应 15 min。酶切产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,用凝胶成像分析仪拍照并进行基因分型。

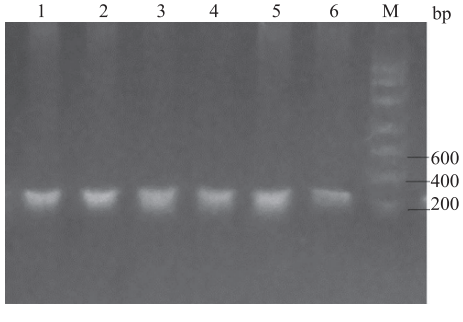
1.4　数据统计与分析

统计不同基因型个体的数量,计算基因型频率,并对多态性片段的基因型分布进行卡方适合性检验。利用 SPSS 17.0 统计软件中的 GLM 模型对基因多态性与体质量间的相关性进行最小二乘分析,统计结果均以平均值 ± 标准误表示。

2　结果与分析

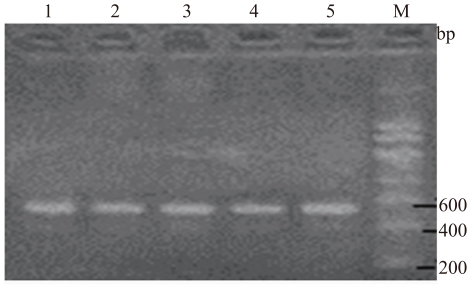
2.1　*IGF - Ⅰ*、*GHRL* 基因的 PCR 扩增结果

从图 1 和图 2 可以看出,*IGF - Ⅰ*、*GHRL* 基因特异性扩增良好,没有出现非特异性条带和引物二聚体,扩增片段长度与预期大小相符,可以进一步用来测序和酶切鉴定。



M. DNA Marker; 1—6. PCR 扩增产物

图 1　*IGF - Ⅰ* 基因的 PCR 扩增结果



M. DNA Marker; 1—5. PCR 扩增产物

图 2　*GHRL* 基因的 PCR 扩增结果

2.2 *IGF - I*、*GHRL* 基因测序结果

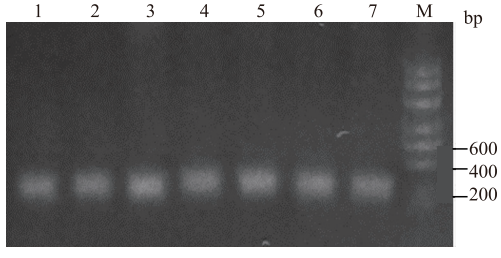
对 *IGF - I* 基因的测序结果进行分析，发现 1 个突变位点，突变位点在第 181 位，由 A 突变为 G，导致密码子 GAA 突变为 GAG，但没有改变编码氨基酸，属于同义突变。同时，对突变位点限制性酶切位点分析发现，未突变的 *IGF - I* 基因能被 *Bsm* Ⅰ酶切，突变后的 *IGF - I* 基因则不能被切开。可见，突变改变了酶切位点。

对 *GHRL* 基因的测序结果进行分析，发现 10 个突变位点，分别在第 124 位(T→G)、125 位(T→G)、234 位(T→C)、262 位(G→A)、410 位(G→A)、421 位(G→A)、450 位(G→A)、480 位(G→A)、510 位(G→A)、519 位(G→A)。这些突变位点都不在 *GHRL* 基因编码区上，因此不改变氨基酸序列。但对突变位点的限制性酶切位点分析发现，第 124 位的碱基突变影响了 *pfl*M Ⅰ酶切位点，未突变的 *GHRL* 基因能被 *pfl*M Ⅰ切开，而突变后的 *GHRL* 基因则不能被切开。

2.3 *IGF - I*、*GHRL* 基因的基因型分析结果

IGF - I 基因的 PCR 产物经 *Bsm* Ⅰ酶切后发现，只存在 1 种基因型(图 3)。因此，不需要进行该基因型分布的卡方适合性检验以及基因型与体质量的关联分析。

GHRL 基因的 PCR 产物经 *pflM* Ⅰ酶切(图 4)，发现 3 种基因型，分别为 BB、AB、AA 基因型。其中，BB 型样本 41 个，AB 型 18 个，AA 型 41 个。



M. DNA Marker; 1—7. 酶切产物

图 3 *IGF - I* 基因 PCR 产物的酶切结果

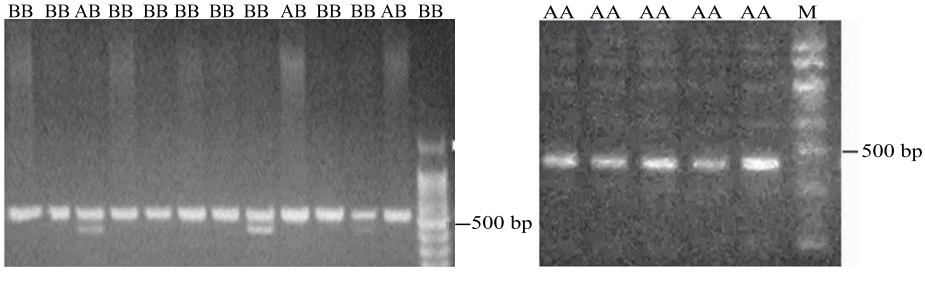


图 4 *GHRL* 基因 PCR 产物的酶切结果

2.4 *GHRL* 基因多态性分析

惠阳胡须鸡 *GHRL* 基因 AA、AB、BB 型 3 种基因型及等位基因的频率见表 2，A 和 B 等位基因的频率均为 0.5；χ^2 适合性检验表明，该位点没有处于哈代 - 温伯格平衡状态，表明该基因没有处于遗传平衡状态。

表 2 惠阳胡须鸡 *GHRL* 基因的基因型和等位基因频率

项目	基因型			等位基因		χ^2
	AA	AB	BB	A	B	
频率	0.41(41)	0.18(18)	0.41(41)	0.5	0.5	40.96

注：$df = 1$，$\chi^2_{0.05(1)} = 3.84$，$\chi^2_{0.01(1)} = 6.64$；括号内为样本数。

2.5 *GHRL* 基因型与惠阳胡须鸡体质量的关联分析

由表 3 可知，*GHRL* 基因多态性与 93 日龄惠阳胡须鸡体质量不存在显著相关性，3 种基因型个体体质量间的差异均不显著。

表 3 *GHRL* 基因多态性与生长性状的关联分析

基因型	个体数/只	体质量/g
AA	41	1 020.00 ± 129.83[a]
AB	18	1 035.00 ± 89.73[a]
BB	41	1 065.80 ± 77.17[a]

注：同列相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)。

3 结论与讨论

3.1 *IGF - I* 基因与 *GHRL* 基因多态性

SNPs 指基因组中某个单核苷酸变异引起的 DNA 序列多态性，包括 DNA 中的碱基替换、颠换(嘧啶和嘌呤之间的替换)、单个碱基的插入或缺失等的变化。赵秀华等[3]在京海黄鸡中发现，*IGF - I* 基因外显子 3 序列的 60 bp 处有 A→G 突变，属于同义突变，χ^2 独立性检验显示，京海黄鸡在该位点处于哈代 - 温伯格平衡状态。丁馥香等[16]在边鸡中发现，*IGF - I* 基因第 3 外显子区域存在 2 个碱基的突变，一个是同义突变，另一个突变导致了编码氨基

酸的改变。Amills 等[17]对鸡 *IGF – Ⅰ* 基因 5′侧翼区分析,发现了 A→C 突变。这些结果说明,鸡 *IGF –Ⅰ* 基因第 3 外显子为易发生突变的区域。本研究发现,在惠阳胡须鸡的 *IGF – Ⅰ* 基因第 3 外显子区域中检测到 1 个突变位点(A→G),属于同义突变,改变了 *Bsm* Ⅰ 酶切位点。通过酶切鉴定,发现只有 1 种基因型,推测该基因位点在该胡须鸡保种群中已经纯合。

Nie 等[15]在 5 个中外鸡品种和 1 个 F_2 代群体中,通过对 *GHRL* 基因 5′侧翼区扩增,发现了 6 个 SNPs。方梅霞等[18]在杏花鸡 × 隐性白洛克鸡 F_2 代资源群体中,用同样的引物对 *GHRL* 基因 5′侧翼区进行扩增测序,发现相同的 6 个 SNPs。本研究中,用同样的引物进行扩增测序,在 *GHRL* 基因 5′侧翼区发现了 10 个 SNPs,其中 5 个为未曾报道的新 SNPs。以上结果提示,*GHRL* 基因 5′侧翼区为碱基突变的热点区域。有研究表明,非编码区存在着影响基因表达调控的元件,如启动子、增强子等,也是基因反式作用因子的特异结合区域[19]。本研究中发现的这些突变位点的变异是否影响 *GHRL* 的基因转录效率需要进一步研究。

3.2　*GHRL* 基因多态性对惠阳胡须鸡生长性状的影响

近年来,关于 *GHRL* 基因的多态性与动物机体生长、脂肪沉积等的相关性研究已经成为家禽育种领域的热点。罗开鹏等[20]研究表明,*GHRL* 基因突变位点(C345T)影响贵州黑山羊生长性状,该位点有望作为山羊生长性状的一个标记辅助选择位点。鸡 *GHRL* 基因 C2100T 位点多态性与鸡的部分生长性状存在显著相关性[13]。

本研究分析了 *GHRL* 基因与 93 日龄惠阳胡须鸡体质量的关系,BB 基因型个体的平均体质量较 AA 基因型高,但 3 种基因型个体间体质量无显著差异。由于本研究样本量偏少,且只有 1 个日龄的体质量数据,可能会影响分析结果,所以需进一步扩大样本数量,收集多个日龄的体质量数据,进一步分析惠阳胡须鸡 3 种基因型与生长性状的关联性,以确定优势基因型,为今后惠阳胡须鸡育种中生长性状的分子标记辅助选择提供理论依据。

参考文献:

[1] Oksbjerg N, Gondret F, Vestergaard M. Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mammals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2004, 27(27): 219-240.

[2] Florini J R, Ewton D Z, Coolican S A. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis [J]. Endocrine Reviews, 1996, 17: 481-517.

[3] 赵秀华,王金玉,张跟喜,等. *IGF – Ⅰ* 与 *IGFBP – 1* 基因对京海黄鸡生长性状的遗传效应分析[J]. 畜牧兽医学报,2012,43(1):152-158.

[4] 刘大林,王金玉,魏岳,等. 京海黄鸡 *IGF – Ⅰ* 基因与生长和屠体性状的关联分析[J]. 中国畜牧杂志,2009(11):9-12.

[5] Kojima M, Hosoda H, Date Y, *et al*. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach[J]. Nature, 1999, 402: 656-660.

[6] Hayashida T, Murakami K, Mogi K, *et al*. Ghrelin in domestic animals: Distribution in stomach and its possible role[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2001, 21(1): 17-24.

[7] Kojima M, Kangawa K. Ghrelin, an orexigenic signaling molecule from the gastrointestinal tract[J]. Current Opinion in Pharmacology, 2002, 2(6): 665-668.

[8] Tschop M, Smiley D L, Heiman M L. Ghrelin induces adiposity in rodents[J]. Nature, 2000, 407: 908-913.

[9] Nakazato M, Murakami N, Date Y, *et al*. A role for ghrelin in the central regulation of feeding[J]. Nature, 2001, 409: 194-198.

[10] Wren A M, Small C J, Abbott C R, *et al*. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats[J]. Diabetes, 2001, 50(11): 2540-2547.

[11] 张爱玲,张丽,杨明明,等.鸟枪法筛选枯草芽孢杆菌基因强启动子及对黄牛 *GHRL* 基因的表达[J]. 华南农业大学学报,2011,32(3):92-96.

[12] 李俊营,詹凯,许月英,等. 巢湖鸭 *Ghrelin* 基因外显子 3 的单核苷酸多态性及其对屠体性状的影响[J]. 安徽农业科学,2010,38(14):7379-7381.

[13] 何丹林,方梅霞,聂庆华,等. 鸡 *Ghrelin* 基因 C2100T 位点与生长和脂肪性状的相关性 [J]. 广东农业科学,2007(4):73-81.

[14] Fang M, Nie Q, Luo C, *et al*. An 8 bp indel in exon 1 of Ghrelin gene associated with chicken growth[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2007, 32(3): 216-225.

[15] Nie Q, Fang M, Xie L, *et al*. Molecular characterization of the ghrelin and ghrelin receptor genes and effects on fat deposition in chicken and duck[J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2009. doi: 10.1155/2009/567120.

[16] 丁馥香,张跟喜,王金玉,等. 边鸡胰岛素样生长因子Ⅰ基因(*IGF – Ⅰ*)外显子 3 的多态性及其与繁殖性能的关系[J]. 农业生物技术学报,2010,18 (2): 313-317.

[17] Amills M, Jiménez N, Villalba D, *et al*. Identification of three single nucleotide polymorphisms in the chicken insulin-like growth factor 1 and 2 genes and their associations with growth and feeding traits[J]. Poultry Science, 2003, 82(10): 1485-1493.

[18] 方梅霞,徐海平,谢亮,等. *GHRL* 基因 5′侧翼区多态性对鸡生长和屠体性状的影响[J]. 中国农业科学,2011,44(12):2567-2574.

[19] Latchman D S. Gene regulation-A eukaryotic perspective [M]. London: Stanley Thornes Ltd., 1998.

[20] 罗开鹏,宋桃伟,孙岩岩,等. 山羊 *GHRL* 基因多态性及其与体重、体尺性状的关系研究[J]. 广东农业科学,2014,41(6):162-165.