

陶志云, 徐文娟, 朱春红, 等. 高邮鸭 *GH* 基因 SNP 位点及其与早期体质量的相关性[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1): 146-150.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.01.023

## 高邮鸭 *GH* 基因 SNP 位点及其与早期体质量的相关性

陶志云, 徐文娟, 朱春红, 宋卫涛, 章双杰, 刘宏祥, 李慧芳, 束婧婷  
(江苏省家禽科学研究所, 江苏 扬州 225125)

**摘要:** 生长激素(GH)是一种肽类激素,在促进生长和调节体内物质代谢等方面有重要作用。本试验通过检测 *GH* 基因在高邮鸭群体中的多态性,筛选与高邮鸭早期体质量相关的 *GH* 基因单核苷酸多态性(SNP)位点。在 *GH* 基因的第2外显子上发现1个A→G单核苷酸突变位点,形成AA、AG、GG 3种基因型,多态信息含量为0.235,该突变位点处于哈代-温伯格平衡状态。在高邮鸭早期生长发育过程中,GG基因型个体的体质量显著高于AA基因型个体和AG基因型个体。结果表明,GG基因型是体质量增长的优势基因型,可以作为高邮鸭早期选育的一个分子标记。通过加大对GG基因型的选育,可能会达到加快育种进程的目的。

**关键词:** 生长激素基因(*GH*); SNP; 体质量; 高邮鸭

**中图分类号:** S834.2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-4440(2017)01-0146-05

## Polymorphisms of *GH* gene and relationship between its genotypes and body weight in Gaoyou duck

TAO Zhi-yun, XU Wen-juan, ZHU Chun-hong, SONG Wei-tao, ZHANG Shuang-jie, LIU Hong-xiang,  
LI Hui-fang, SHU Jing-ting

(*Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225125, China*)

**Abstract:** Growth hormone (GH) is a peptide hormone, which plays an important role in promoting growth and modulating the metabolism. The polymorphisms of *GH* gene were detected, and the correlations between *GH* gene genotypes and body weight in early development were analyzed in Gaoyou duck. The results showed that one single nucleotide polymorphism (SNP), A→G, was detected in exon 2 of *GH* gene, which formed AA, AG and GG genotypes. The PIC was 0.235, and the mutation site was in Hardy-Weinberg Equilibrium in Gaoyou duck. The body weight of GG genotype was significantly higher than that of AA and AG genotypes in the early development of Gaoyou duck. The results showed that the GG genotype was a favorable genotype and could be used as a molecular marker for the early selection and breeding of Gaoyou duck. The progress of breeding may be accelerated by increasing the selection and breeding of GG genotype.

**Key words:** growth hormone gene(*GH*); SNP; body weight; Gaoyou duck

收稿日期: 2016-05-06

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[ CX(15)1010-03 ]; 扬州市科技计划项目( YZ2015039 )

作者简介: 陶志云(1979-), 女, 安徽凤阳人, 博士, 助理研究员, 主要从事家禽免疫及遗传育种方面的研究。(E-mail) zhiyun2@126.com

通讯作者: 李慧芳, (E-mail) lhxf\_002@aliyun.com.cn

生长激素(Growth Hormone, GH)是由脑垂体前叶嗜酸性细胞合成并分泌的一种单一肽链蛋白质激素,能显著提高动物体生长速度,促进肌肉生长,降低脂肪含量<sup>[1-2]</sup>。在禽类胚胎时期,注射外源GH可以显著提高鸡胚质量,促进长骨和软骨组织的发育,增加肉用商品鸡上市的体质量。在鸡的胚胎期

就能检测到 GH,其 mRNA 的表达也间接证明 GH 在鸡胚胎的早期生长中具有一定的作用<sup>[3-6]</sup>。对 2 周龄的罗非鱼注射外源性 GH,显著增加了罗非鱼的体质量和体长<sup>[7]</sup>。鸭胚胎期垂体中 GH mRNA 表达量的检测结果表明,GH mRNA 在 13~27 胚龄的表达量呈逐渐上升趋势,说明 GH 在鸭早期发育中也可能具有重要作用<sup>[8]</sup>。而且,GH 基因型频率的分布与品种有关<sup>[9-10]</sup>。GH 基因编码区及调控区的 SNP 位点与鸭早期质量的增加、屠宰性能、生长速度、产蛋率等经济性状密切相关<sup>[11-18]</sup>。

高邮鸭是全国三大名鸭之一,生长发育快,肉质好,属于肉蛋兼用型的地方品种。本研究以高邮鸭为研究对象,拟采用 LDR 法对其 GH 基因单核苷酸的多态性进行筛选,并与高邮鸭早期的体质量进行关联分析,以期为早期快速生长鸭品种的选育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验选取 0 日龄高邮鸭 210 只,试验鸭在相同的日粮水平和环境条件下饲养。

### 1.2 样品采集

分别在 0 日龄、4 日龄、8 日龄、12 日龄、16 日龄和 20 日龄称质量并采血,采用一次性注射器从鸭翅下静脉中抽取 1 ml 血液,将其注入经高压灭菌并装有 200  $\mu$ l 2% 无菌乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝剂的 1.5 ml 离心管中,轻轻摇匀,记录翅号,-80  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.3 DNA 提取和 PCR 扩增

采用苯酚-氯仿法抽提基因组 DNA,经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测纯度和浓度,并将 DNA 稀释至 50 ng/ $\mu$ l,作为 PCR 扩增的模板。根据 GenBank 中鸭 GH 基因(登录号: NW\_004677199.1)的序列来设计包含 A241573G 位点的正反向引物,该引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。上游引物序列为 5'-CAGCTCTCAGGACTGGGTTT-3',下游引物序列为 5'-CTCCCCTGGTACTCACCATC-3',扩增片段长度为 829 bp。PCR 扩增体系为 20.0  $\mu$ l,包括 10 $\times$ Buffer 2.0  $\mu$ l、3 mmol/L  $Mg^{2+}$  0.6  $\mu$ l、dNTP(每种 2 mmol/L) 2.0  $\mu$ l、1 U/ $\mu$ l Taq 聚合酶 0.2  $\mu$ l、10  $\mu$ mol/L 上下游引物 Mix 2.0  $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 13.2  $\mu$ l。在 Perkin-Elmer Gene Amp PCR Systems 9600 上进行 PCR 扩增反应,PCR 扩增反应

程序为:先在 95  $^{\circ}$ C 下变性 2 min,然后进入循环程序(94  $^{\circ}$ C 变性 90 s,50  $^{\circ}$ C 退火 90 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s),共循环 40 次后于 72  $^{\circ}$ C 下延伸 10 min,得到 PCR 扩增产物。取 2  $\mu$ l 反应产物进行 3% 琼脂糖凝胶电泳检测,剩余反应产物于 -20  $^{\circ}$ C 下保存。

### 1.4 SNP 检测和基因型分型

对 PCR 产物进行连接酶检测反应(LDR),设计 3 条 LDR 探针,探针的序列为 Seq1: P-GCAT-GAACACAAACAAGACATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-FAM, Seq2: TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGCTACTGCGAGGGCTAAGATCAT, Seq3: TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGCTACTGGAGGGCTAAGATCAC。连接酶检测反应体系为 10.00  $\mu$ l,包括 4.00  $\mu$ l PCR 扩增产物、1.00  $\mu$ l 10 $\times$ Buffer、1.00  $\mu$ l Probe mix (2 pmol/ $\mu$ l)、0.05  $\mu$ l Taq DNA ligase (2 U/ $\mu$ l)、3.95  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O,充分混匀后短暂离心,最后加入 10  $\mu$ l 石蜡油。连接酶检测反应程序为:95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94  $^{\circ}$ C 变性 15 s,50  $^{\circ}$ C 退火 25 s,循环 40 次。反应完成后,在每个上样孔中加入 10.00  $\mu$ l Loading buffer 和 0.25  $\mu$ l ABI GS-500 ROX 荧光标记分子量标准,最后加入 0.50  $\mu$ l LDR 产物,充分混匀后上样。采用 ABI377 测序仪进行毛细管凝胶电泳测序,并用 GENESCAN 6.72 软件进行数据收集、泳道线校正、迁移片段大小测量以及内在分子量标准校正。LDR 反应产物由 ABI3730 型基因分析仪检测,通过 GeneMapper 分析软件对 LDR 产物长度和各基因型进行关联分析。

### 1.5 数据分析

利用 SPSS16.0 软件对基因型频率和基因频率进行检验,分析其与早期体质量增长的相关性,并进行 Hardy-Weinberg 平衡卡方检验,计算多态信息含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 LDR 分型及 SNP 位点信息

采用 LDR 法对 210 只高邮鸭个体的 GH 基因进行分型。分型图如图 1 显示,基因型 AA 的 LDR 产物长度为 93 bp,基因型 GG 的 LDR 产物长度为 95 bp,基因型 AG 的 LDR 产物长度为 93 bp 和 95 bp 的混合。GH 基因具有 4 个外显子,在 NW\_004677199.1 序列中分别位于 238 579:238 661、238 955:241 790、241 882:242 140 和 243 707:245 977 处。由 AA 基因型、AG 基因型和 GG 基因型

的分型图谱(图 1)可知,AA 基因型和 GG 基因型均只有 1 个检测峰,AG 基因型有 2 个并列的检测峰。

在 *GH* 基因的 241 573 位点发现有 A→G 的突变(图 2),该位点位于 *GH* 基因外显子 2 的第 2 619 位点。

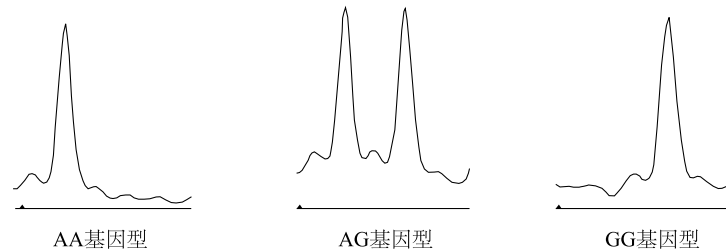


图 1 *GH* 基因 SNP 位点 3 种基因型分型图谱

Fig.1 The images of three genotypes of SNP loci in *GH* gene

241441 AAAACCACGA CCCTGCAGCA AAGTGGAGAG GAGTGGTGT TAACTGTCCTT CAGTGAGGGT GGCACCTGCA TATTACTTCC TGGCCTCTTC TGCCTGTGCT AACCTAAAG AATGCTTTGT TTGTGTTTAT GCA/GCGATCTT AGCCCTCCAG TGACACCCCA TCCCTTTTG CTGGATGTGC CCTC-GAGGCT TGTGCTGCTC CCAATGTTAC AAACAATGCT TTTTGCCTT AAGAATGATT 241680

序列中斜体加粗部分为 A241573G 突变位点。

图 2 SNP 位点所处 *GH* 基因第 2 外显子的部分序列

Fig.2 The part sequence in exon 2 of *GH* gene containing the SNP

## 2.2 *GH* 基因 A241573G SNP 位点在高邮鸭中的分布情况

根据 *GH* 基因 A241573G SNP 位点在高邮鸭中的基因型分布情况,对基因型频率和基因频率进行统计,共检测到 148 个 AA 基因型,58 个 AG 基因型,6 个 GG 基因型(表 1)。根据基因型的分布情况,利用 SPSS 软件中的皮卡逊卡方值对基因型频率进行卡方检验。表 1 显示,高邮鸭突变位点的  $\chi^2$  为 0.013 并且  $P>0.05$ ,表明高邮鸭在该突变位点上处于哈代-温伯平衡状态,所抽检的高邮鸭个体具有随机性。 $PIC$  值为 0.235,小于 0.250,说明这个 SNP 位点为低度多态(表 1)。

## 2.3 *GH* 基因 A241573G SNP 与高邮鸭早期体质量增长性状的关联分析

对 *GH* 基因 SNP 位点不同基因型和鸭早期增长的体质量进行关联分析,结果(表 2)表明,在 0 日龄时,高邮鸭体质量与基因型无显著相关性( $P>0.05$ ),3 个基因型个体间的体质量差异不显著。4 日龄、8 日龄、16 日龄和 20 日龄的体质量与 A241573G 位点显著相关( $P<0.05$ ),基因型 GG 个体在各日龄阶段的体质量显著高于基因型 AA 和基因型 AG 的个体,而基因型 AA 的个体与基因型 AG 的个体相比,各日龄体质量的差异不显著,说明 GG 基因型为优势基因型。

表 1 *GH* 基因的 A241573G SNP 位点在高邮鸭中的分布情况

Table 1 Distribution of A241573G SNP of *GH* in Gaoyou duck

参数	基因型		
	AA	AG	GG
基因型频数	148.000	58.000	6.000
基因型频率	0.700	0.270	0.030
理论基因型频数	147.810	58.420	5.770
A 基因频率	0.835		
G 基因频率	0.165		
$\chi^2$	0.013		
$P$	0.544		
多态信息含量	0.235		
有效等位基因数	1.380		

表 2 *GH* 基因的 A241573G SNP 位点与鸭早期体质量增长的相关性

Table 2 Correlation between A241573G SNP of *GH* and body weight in Gaoyou duck

性状	基因型			$P$ 值
	AA	AG	GG	
0 日龄体质量	43.22±4.53a	44.30±4.42a	47.40±1.40a	0.190
4 日龄体质量	80.52±1.27b	81.93±1.94b	97.47±4.97a	0.028
8 日龄体质量	158.23±3.47b	157.24±5.08b	204.00±5.77a	0.028
12 日龄体质量	268.68±6.82b	262.48±10.13b	344.00±4.62a	0.065
16 日龄体质量	416.07±10.30b	416.24±14.56b	540.67±2.33a	0.044
20 日龄体质量	590.21±13.63b	588.50±20.38b	775.33±8.57a	0.020

### 3 讨论

在畜禽育种中, GH 基因常被看作一个重要的候选基因。对猪的研究结果表明, GH 基因具有丰富的多态性, 且其多态性与生产性能、繁殖性能相关<sup>[19-22]</sup>。羊 GH 基因 5' 调节区域、内含子 4、3' 非翻译区的核苷酸突变均与生长性状相关<sup>[23]</sup>, 第 3 内含子 98 bp 处的突变也与其生长性状相关<sup>[24]</sup>。另有研究报道, 羊的产奶性能也与 GH 基因的多态性有关<sup>[25]</sup>。鱼类 GH 基因的多态性与生长性状具有相关性<sup>[26-27]</sup>。对家禽 GH 基因的研究相对较晚, 但也取得了很大进展。大量研究结果表明, 鸡 GH 基因单核苷酸的多态性与生长性能、繁殖性能等均相关<sup>[28-31]</sup>。

近年来, 对鸭 GH 基因单核苷酸突变研究的报道越来越多, 在 GH 基因第 1 内含子上发现 2 个与黑羽番鸭体质量和屠宰性能相关的 SNP 位点 (G945A 和 T1039G)<sup>[11]</sup>。GH 基因第 1 内含子上有 4 个与黑羽番鸭早期体质量增加相关的 SNP 位点 (A1251C、A1322G、T1378C、G1440A)<sup>[12]</sup>。番鸭 GH 基因内含子 3 上的 1 个 A→G 突变与产蛋性能相关<sup>[13-14]</sup>。Mazurowski 等在鸭 GH 基因第 2 内含子上发现与体质量相关的核苷酸突变位点<sup>[15]</sup>。有研究发现高邮鸭 GH 基因 C3701T 突变 (位于 GH 基因第 4 外显子) 与血浆生化指标、部分生产性状以及产蛋性状相关<sup>[16-17]</sup>。此外, 在西湖鸭、樱桃谷鸭、山麻鸭、荆江麻鸭、金定鸭、北京鸭、绍兴鸭、缙云麻鸭的同一位点, 即 GH 基因 3 701 处也发现了 C→T 的突变, 且相关性分析结果表明, 该突变位点与全净膛率显著相关<sup>[9-10, 18]</sup>。上述研究结果表明, GH 基因在提高动物生长速度和生产性能等方面具有非常重要的作用。本研究在高邮鸭 GH 基因第 2 外显子第 2 619 位上发现的 A→G 突变是 1 个新的 SNP 位点, 丰富了鸭 GH 基因的多态信息。相关性分析结果表明, GG 基因型更有益于早期体质量的增长, 但 GG 基因型在高邮鸭群体中所占的比例较低。因此, 应加大对 GG 基因型的选择, 以培育出早期快速增长的高邮鸭品种。

### 参考文献:

- [1] ETHERTON T D, BAUMAN D E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals [J]. Physiological Reviews, 1998, 73(3): 745-761.
- [2] 王金玲, 王摇永, 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.
- [3] BURNSIDE J, LIOU S S, COGBURN L A. Molecular cloning of the chicken growth hormone receptor complementary deoxyribonucleic acid; mutation of the gene in sex-linked dwarf chickens [J]. Endocrinology, 1991, 128(6): 3183-3192.
- [4] VASILATOSYOUNKEN R, ZHOU Y, WANG X, et al. Altered chicken thyroid hormone metabolism with chronic GH enhancement *in vivo*: consequences for skeletal muscle growth [J]. Journal of Endocrinology, 2000, 166(3): 609-620.
- [5] 赵茹茜, 李四桂, 陈伟华, 等. 胚胎及新生期蛋鸡和肉鸡垂体生长激素基因表达的比较研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32(1): 5-10.
- [6] 颜炳学, 邓学梅, 费菁, 等. 鸡生长激素基因单核苷酸多态与生长及屠体性状的相关性 [J]. 科学研究, 2003, 48(12): 1304-1307.
- [7] 苗田田. 外源生长激素注射对尼罗罗非鱼骨骼肌生长及 GH-IGFS 生长轴基因表达的影响 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- [8] 单艳菊, 束婧婷, 徐文娟, 等. 不同鸭种胚胎期和出雏早期生长轴 GH、GHR 和 IGF-1 基因 mRNA 差异表达分析 [J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(4): 421-427.
- [9] 吉文林, 许盛海, 徐琪. 6 个中国地方鸭品种生长激素 (GH) 基因编码区多态性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(12): 45-47.
- [10] 许盛海, 包文斌, 程金花, 等. 鸭生长激素 (GH) 基因编码区及调控区多态性分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(9): 907-912.
- [11] 董飏, 段修军, 孙国波, 等. GH 基因对黑羽番鸭体质量和屠宰性能的遗传效应分析 [J]. 浙江农业学报, 2015, 27(1): 22-27.
- [12] 王丽华, 段修军, 董飏, 等. 黑羽番鸭 GH 基因多态性与体质量、屠宰性能的相关性 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 30-33.
- [13] WU X, YAN M J, LIAN S Y, et al. GH gene polymorphisms and expression associated with egg laying in muscovy ducks (*Cairina moschata*) [J]. Hereditas, 2014, 151(1): 14-19.
- [14] 吴旭, 严美姣, 刘丽平, 等. 促性腺激素释放激素基因 (GnRH) 和生长激素基因 (GH) 对番鸭产蛋性能的遗传效应分析 [J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(3): 289-295.
- [15] MAZUROWSKI A, FRIESKE A, KOKOSZYNSKI D, et al. Examination of growth hormone (GH) gene polymorphism and its association with body weight and selected body dimensions in ducks [J]. Folia Biologica, 2015, 63(1): 43-50.
- [16] 邹剑敏, 李慧芳, 张汤杰, 等. GH 基因多态与生长期高邮鸭主要血浆生化指标及部分生产性状的相关分析 [J]. 江苏农业学报, 2007, 23(6): 602-607.
- [17] 李慧芳, 朱文奇, 宋卫涛, 等. 催乳素 (PRL) 和生长激素 (GH) 基因对高邮鸭产蛋性能的遗传效应分析 [J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(2): 263-268.
- [18] 杨军, 罗家琴, 唐登华, 等. 荆江麻鸭 GH 基因第 4 外显子 SNP 及其与屠体性状的关联研究 [J]. 中国家禽, 2011, 33

- (14):32-35.
- [19] FRANCO M M, ANTUNES R C, SILVA H D, et al. Association of *PIT1*, *GH* and *GHRH* polymorphisms with performance and carcass traits in Landrace pigs [J]. Journal of Applied Genetics, 2005, 46(2):195-200.
- [20] WANG W, CHEN K, REN J, et al. Relationship of growth hormone (*GH* 2) genotypes with some production performances in pig [J]. Acta Genetica Sinica, 2002, 29(2):111-114.
- [21] CHENG W T, LEE C H, HUNG C M, et al. Growth hormone gene polymorphisms and growth performance traits in Duroc, Landrace and Tao-Yuan pigs [J]. Theriogenology, 2000, 54(8):1225-1237.
- [22] 王 婧,刘 颖,董文华,等. 长白猪和大白猪生长激素基因多态性及其对部分经济性状的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 2014, 50(11):1-4.
- [23] JIA J L, ZHANG L P, WU J P, et al. Study of the correlation between *GH* gene polymorphism and growth traits in sheep [J]. Genet Mol Res, 2014, 13(3):7190-7200.
- [24] 张恩宇,罗玉柱,李少斌,等. 甘肃高山细毛羊及其杂种羊 *GH* 基因第3内含子多态性与生长性状的相关性 [J]. 华北农学报, 2015, 30(5):71-76.
- [25] DETTORI M L, PAZZOLA M, PIRA E, et al. The sheep growth hormone gene polymorphism and its effects on milk traits [J]. J Dairy Res, 2015, 82(2):169-176.
- [26] 虎永彪,张艳萍,杜岩岩,等. 甘肃金樽生长激素基因多态性与生长性状的相关分析 [J]. 淡水渔业, 2014, 44(5):100-103.
- [27] 唐永凯,俞菊华,徐 跑,等. 吉富罗飞鱼 *GH* 基因的分离及其 SNPs 与增重的相关性 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2012, 38(4):422-425.
- [28] 裴勤嫻. 鸡 *GH* 基因和 *GHR* 基因多态性与早期生长性能的相关性研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2007.
- [29] 束婧婷,张 莹,尹平安,等. 清远麻鸡生长激素基因 (*GH*) 的 SNPs 检测及其对生长及繁殖性状的遗传效应 [J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(2):308-313.
- [30] SU Y J, SHU J T, ZHANG M, et al. Association of chicken growth hormone polymorphisms with egg production [J]. Genet Mol Res, 2014, 13(3):4893-4903.
- [31] 欧阳建华,柳小春,施启顺,等. 鸡 *GH* 基因内含子 1 *Msp* I 位点多态性及其与生长及繁殖性状的相关性 [J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(2):122-127.

(责任编辑:王 妮)