

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00599

北极狐 *GHR* 基因单核苷酸多态性及其与生长性状的相关性分析

杜智恒, 刘宗岳, 白秀娟

东北农业大学动物科技学院, 哈尔滨 150030

摘要: 文章采用单链构象多态性(PCR-SSCP)和 DNA 测序的方法检测了北极狐生长激素受体(Growth hormone receptor, *GHR*)基因的单核苷酸多态性(SNPs), 并针对该群体的特点建立合适的统计分析模型, 对 *GHR* 基因多态性与生长性状的相关性进行了分析。结果表明, 在北极狐 *GHR* 基因的外显子 1 和外显子 5 上发现了 4 个多态位点, 分别为 5'UTR 上的 G3A 和外显子 1 上的 C99T 突变, 外显子 5 上的 T59C 和 G65A 突变; *GHR* 基因 G3A 和 C99T 多态性与母狐的体重性状显著相关($P<0.05$), T59C 和 G65A 多态性与公狐的体重性状显著相关($P<0.05$), 与母狐的皮张长度性状极显著相关($P<0.01$)。因此, 可以利用以上点突变对北极狐的体重及皮张长度性状进行标记辅助选择研究, 以达到快速选育出快大、优质的北极狐的目的。

关键词: 北极狐; *GHR* 基因; 单核苷酸多态; 生长性状

Association analysis between SNPs of the growth hormone receptor gene and growth traits in arctic fox

DU Zhi-Heng, LIU Zong-Yue, BAI Xiu-Juan

Department of Animal Science, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China

Abstract: Using single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and DNA sequencing, single nucleotide polymorphisms (SNPs) of growth hormone receptor (*GHR*) gene were detected in an arctic fox population. Correlation analysis between *GHR* polymorphisms and growth traits were carried out using the appropriate model. Four SNPs, G3A in the 5' UTR, C99T in the first exon, T59C and G65A in the fifth exon were identified on the arctic fox *GHR* gene. The G3A and C99T polymorphisms of *GHR* were associated with female fox body weight ($P<0.05$) and the T59C and G65A polymorphisms of *GHR* were associated with male fox body weight ($P<0.05$) and the skin length of the female fox ($P<0.01$). Therefore, marker assistant selection on body weight and skin length of arctic foxes using these SNPs can be applied to get big and high quality arctic foxes.

Keywords: arctic fox; *GHR* gene; SNP; growth trait

随着毛皮动物养殖在全国各地铺天盖地的展开, 北极狐已逐渐成为我国各地饲养场主要的饲养品种。为了增加我国北极狐毛皮在国际市场上的竞争优

势, 各地饲养场不断加强育种力度并进行品种改良, 以达到提高北极狐毛皮质量的目的。即便如此, 我国狐的毛皮质量与发达国家相比, 仍然有一定的差

收稿日期: 2009-09-15; 修回日期: 2010-01-29

作者简介: 杜智恒(1980-), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 经济动物生产与动物遗传育种。Tel: 0451-55191636; E-mail: dzhh119@163.com

通讯作者: 白秀娟(1964-), 女, 教授, 博士, 研究方向: 经济动物生产与动物遗传育种。Tel: 0451-55191636; E-mail: bxj630306@163.com

距,使得提高狐的毛皮质量成为了人们研究的主攻方向。北极狐自身的生长优势,促使其逐渐成为此领域研究的热点,尤其在分子方面的研究也越来越受到关注。目前对北极狐基因的研究多集中于微卫星,而对一些核内重要的功能基因及其生物学功能的探索则相对较少,目前仅见Graphodatsky等^[1]通过G显带方法对北极狐、赤狐和狗的染色体图谱进行了比较研究;胡晓航^[2]对蓝狐生长激素(*GH*)基因的研究等。

大量研究已经表明,生长激素受体(*Growth hormone receptor, GHR*)在动物体内起着调节生长发育的重要作用^[3]。目前,人们对*GHR*基因的研究也主要集中在哺乳动物上,尤其对*GHR*基因的遗传多态性与动物生产性能的研究相对较多。如Falaki等^[4]在编码细胞内部分C端的DNA序列中发现了9个RFLP-*Taq* 基因型,并且该位点的多态性与意大利荷斯坦奶牛的乳蛋白百分含量相关。Blott等^[5]在Holstein-Friesian牛*GHR*基因部分编码区和内含子内发现了7个SNPs,其中第八外显子中的SNP导致受体跨膜区F279Y氨基酸的替换,从而影响牛的产奶性状。Maj等^[6]对*GHR*基因5'UTR的4个SNPs与波兰黑白花牛产肉性能的相关性进行了分析,结果发现这4个多态性位点的合并基因型对牛的饲料利用率和屠体重有显著影响。

研究表明,*GHR*基因的突变会影响生物个体的生长发育,如人的LTD(Laron-type dwarfism)矮小症,性连锁矮小鸡等均是由于该基因突变所致^[7],说明该基因具有重要的研究价值。针对犬科动物,人们对该基因的研究相对较少,除了本文作者对北极狐*GHR*基因的克隆研究之外^[8],尚未见其他有关狐狸*GHR*基因方面的相关报道。本研究在前期研究的基础上,以*GHR*基因作为候选基因,在特定的群体中研究该基因的变异,并结合数量遗传学、生物统计学的方法分析这些变异对北极狐生长性状的影响程度,探讨其能否作为分子标记用于北极狐生长性状的标记辅助选择。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本研究所用样品均为大兴安岭图强林业局狐貉

养殖基地提供。共收集了708个个体的体组成性状,其中296个个体(母狐:91只;公狐:205只)有处死时的体重、体长和腹围记录,但没有皮张长度记录,412个个体(母狐:209只;公狐:203只)只有剥皮后的皮张长度记录。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取和检测

北极狐基因组DNA按SDS法提取,并溶于TE中,-20℃保存。用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法双重检测DNA的纯度和浓度,然后稀释成50 ng/μL备用。

1.2.2 引物设计

将北极狐*GHR*基因的cDNA序列(GenBank 登录号:EU304325)与UCSC上狗的全基因组序列进行Blast比对,找到*GHR*基因的9个外显子序列,根据这9个外显子序列设计9对引物,用于基因多态性的检测。引物信息见表1。

1.2.3 PCR 扩增及测序

PCR扩增体系为25 μL,包括:灭菌去离子水16.3 μL,50 ng/μL的DNA模板2.0 μL,10×Buffer 2.5 μL,2.5 mmol/L的dNTP 2.0 μL,10 pmol/μL的上下游引物各1 μL,0.5 U/μL的*Taq* DNA聚合酶0.2 μL。PCR扩增程序:94℃预变性7 min;94℃变性30 s,复性40 s(复性温度见表1),72℃延伸30 s,35个循环;最后72℃延伸10 min。

PCR产物经回收、纯化,连接到pMD18-T载体中,并将连接产物转化到DH5α感受态宿主菌中,挑取经PCR鉴定后的5个阳性白色菌斑培养。用试剂盒抽提质粒,经酶切进一步鉴定后送上海博亚公司进行测序。

1.2.4 序列分析

序列相似性分析通过NCBI数据库上的Nucleotide Blast搜索软件完成,序列比对使用DNAMAN生物软件对测序结果与NCBI数据库中登录号为EU304325的序列进行比对。

1.2.5 PCR-SSCP 检测

变性后的PCR产物在16%的非变性聚丙烯酰胺

表 1 *GHR* 基因 PCR-SSCP 的引物信息

引物名称	引物序列(5' - 3')	复性温度(℃)	产物大小(bp)	扩增区域
GR1	F: GTATGCAGTGATGATGGTC R: GAATGCGAAAGCAGAAC	55	167	外显子 1
GR2	F: CAGGGATGACTAATGGTT R: AGATAGGACGGTAGCTTG	54	198	外显子 2
GR3	F: ACCATACATTACCCTCTTG R: GGCTGCACCTTCTAATATA	56	191	外显子 3
GR4	F: TACCCTTCATTTCAGGAG R: ATCTAAAGCCGTGTCAAG	58	229	外显子 4
GR5	F: AATGCACAGTGCAACCAG R: CACTGGGACTCATTCACTTC	55	181	外显子 5
GR6	F: TCTTGAAAAGATGGACCCT R: TCACATGCAAATGGACTC	58	170	外显子 6
GR7	F: GTTTCAGACTTCCAGTTTCC R: CAAATGGAAACACATCTGG	54	165	外显子 7
GR8	F: CAAGGATTAAGATGCTG R: GTGATACAGATAGCTTGC	54	172	外显子 8
GR9	F: GGAAGGAAAATTAGAAGAGG R: CTTTTAACCTCTGTGGCTG	56	311	外显子 9

凝胶(Acr-Bis=29:1)中电泳。5 V/cm 电泳 10~12 h 后, 银染显色, 统计个体基因型。

1.2.6 统计模型与分析

根据本研究实验群体的特点, 构建如下线性回归模型:

$$y=\mu+G+S+G*S+e$$

y 为性状观察值, μ 为群体均数, G 为基因型固定效应, S 为性别观察值, $G*S$ 为基因型与性别的交互效应, e 为随机效应。使用统计软件 JMP7.0 检验基因型与公母狐体组成性状间的相关程度, 并估计性状的最小二乘均值。

2 结果与分析

2.1 引物扩增及 SSCP 检测结果

针对该基因本研究共设计了 9 对引物进行 PCR-SSCP 检测, 以北极狐的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶检测, 结果发现各对引物特异性扩增良好, 片段长度均与预期的大小一致。经过在不同浓度聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳条件下进行 SSCP 分析, 结果只在 GR1 和 GR5 这两对引物中检测到了多态, 其余 7 对引物均没有检测到多态。

2.1.1 引物 GR1 的 SSCP 检测结果

北极狐基因组 DNA 经 GR1 引物扩增后, PCR 产

物在 16% 的聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳条件下进行 SSCP 分析, 结果表明, 在不同个体中检测到了 4 种基因型, 分别命名为 AA 型、BB 型、AB 型和 CC 型 (图 1)。分别取两个 AA 型、两个 BB 型和两个 CC 型个体进行回收并克隆测序。结果表明, CC 型个体的基因序列和 GenBank 中登录号为 EU304325 中的序列一致; AA 型个体的基因序列在第 3 位点处发生了 (G→A) 转换, 该点突变是在 5' UTR 上; BB 型个体的基因序列在第 99 位点处发生了 (T→C) 转换, 该点突变是在外显子 1 上 (图 2)。通过序列分析表明, 第 99 位点处的 (T→C) 点突变导致了氨基酸的变化, 由 Leu 氨酸变成了 Ser 氨酸, 属于有义突变。

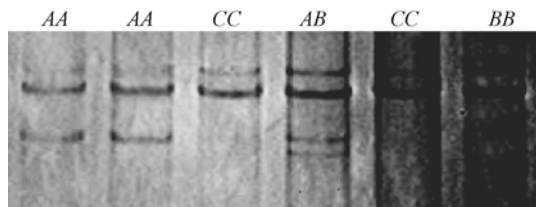


图 1 北极狐经引物 GR1 扩增所得到的不同基因型个体的 SSCP 结果

2.1.2 引物 GR5 的 SSCP 检测结果

北极狐基因组 DNA 模板经 GR5 引物扩增后, PCR 产物在 16% 的聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳条件下进行 SSCP 分析。结果表明, 在不同个体中检测到了 3 种基因型, 分别命名为 DD 型、EE 型和 EF 型 (图 3)。

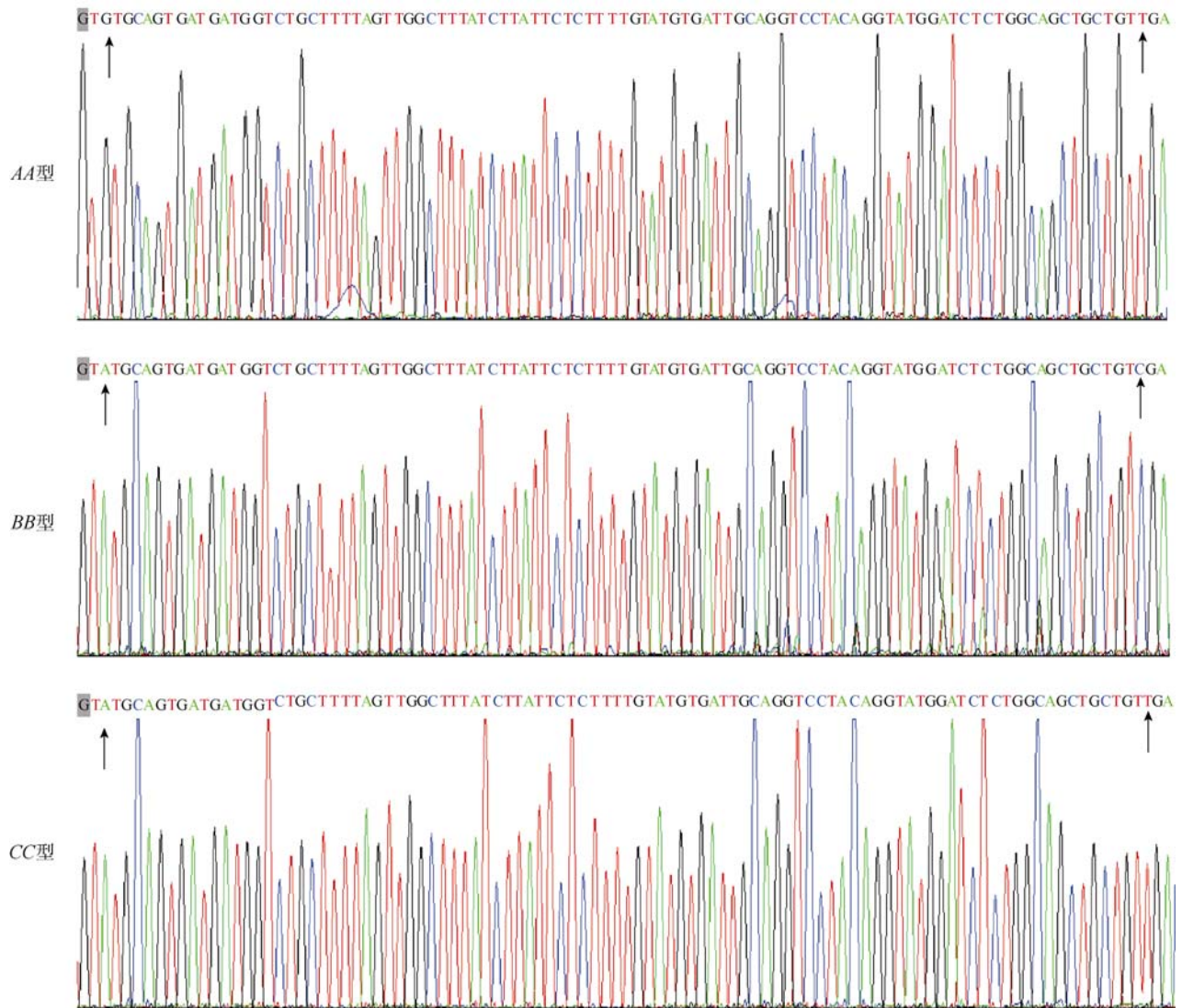


图 2 AA、BB 和 CC 基因型的测序结果

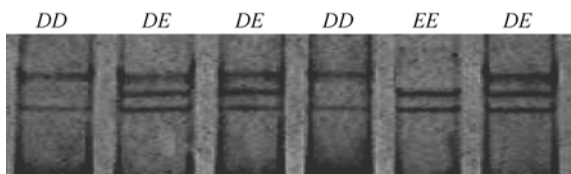


图 3 北极狐经引物 GR5 扩增所得到的不同基因型个体的 SSCP 结果

分别取两个 DD 型和两个 EE 型个体进行回收克隆测序。结果表明, DD 型个体的基因序列和 GenBank 中登录号为 EU304325 中的序列一致, 而 EE 型个体的基因序列在第 59 位点和 65 位点处分别发生了(T→C)转换和(G→A)转换(图 4)。通过序列分析表明, 这两点突变均未导致氨基酸上的变化, 属于同义突变。

2.3 GHR 基因多态性与北极狐生长性状的相关分析

对北极狐 GHR 基因多态性产生的不同基因型与生长性状作最小二乘分析, 结果发现 GHR 基因不同区域的 SNPs 对北极狐的生长性状有一定的影响(表 1)。其中第 1 外显子的 C99T 突变位点和第 1 内含子的 A144C 突变位点(登录号: EU304325)对北极狐的皮张长度性状影响显著($P<0.05$)。多重比较结果表明, AA 基因型个体皮张长度均值最大, 显著高于 AB 和 CC 基因型个体; AA、AB 和 CC 基因型个体的皮张长度与 BB 基因型个体差异均不显著(表 2)。

第 5 外显子的 T59C 突变位点和 G65A 突变位点对北极狐的体长性状有一定的影响趋势($P<0.2$), 对

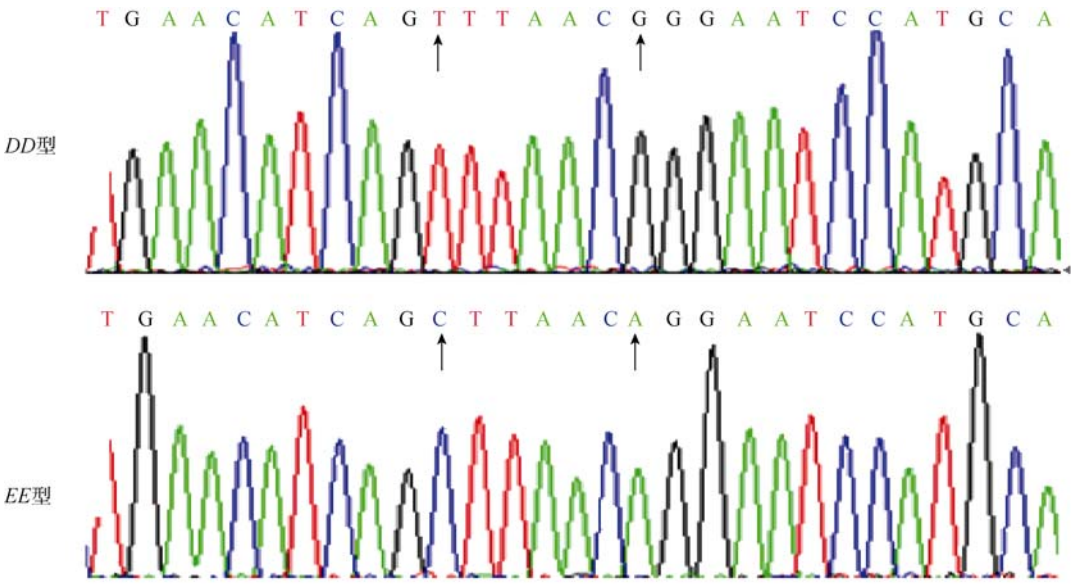


图 4 *DD* 和 *EE* 基因型的测序结果

表 1 *GHR* 基因多态位点对生长性状的影响(*P* 值)

生长性状	<i>GHR</i>	
	C99T&A144C	T59C&G65A
体重(kg)	NS	NS
体长(cm)	NS	0.1342
腹围(cm)	NS	NS
皮长(cm)	0.0237	0.0005

注: NS 表示 $P>0.2$ 。

表 2 C99T 和 A144C 突变对北极狐皮张长度的影响(最小二乘均值)

基因型	个体数	皮张长度(cm)
AA	76	102.47±1.014 ^a
AB	86	98.98±0.784 ^b
BB	40	100.373±1.376 ^{ab}
CC	249	99.24±0.454 ^b

注: 同一列间字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

北极狐的皮张长度性状影响极显著($P<0.01$)。多重比较结果表明, *DD* 基因型个体皮张长度最长, *DD* 和 *DE* 基因型个体皮张长度显著高于 *EE* 基因型个体; *DD* 基因型个体皮张长度与 *DE* 基因型个体差异不显著(表 3)。

表 3 T59C 和 G65A 突变对北极狐皮张长度的影响(最小二乘均值)

基因型	个体数	皮张长度(cm)
<i>DD</i>	193	100.34±0.5144 ^a
<i>DE</i>	157	100.07±0.570 ^a
<i>EE</i>	62	96.35±0.909 ^b

注: 同一列间字母不同表示差异显著($P<0.01$)。

2.4 *GHR* 基因多态性分别与公母狐生长性状的相关分析

对北极狐 *GHR* 基因多态性产生的不同基因型与生长性状作最小二乘分析, 结果发现 *GHR* 基因不同区域的 SNPs 对公母北极狐的生长性状均有一定的影响(表 4)。其中第 1 外显子的 C99T 突变位点和第 1 内含子的 A144C 突变位点(登录号: EU304325)对公母狐的皮张长度性状均有一定的影响趋势($P<0.2$); 对母狐的体重性状影响显著($P<0.05$), 多重比较结果表明, *BB* 基因型个体体重最高, 显著高于 *AA* 和 *AB* 基因型个体; *AA*、*AB* 和 *BB* 基因型个体的体重与 *CC* 基因型个体差异均不显著(表 5)。

第 5 外显子的 T59C 突变位点和 G65A 突变位点对公狐的腹围和体长性状均有一定的影响趋势($P<0.2$); 对公狐的体重性状影响显著($P<0.05$), 多重比较结果表明, *DD* 基因型个体体重显著低于 *DE* 基因型个体, *DD*、*DE* 基因型个体的体重与 *EE* 基因型个体的差异均不显著(表 6)。而对母狐的皮张长度性状则影响极显著($P<0.01$), 多重比较结果表明, *DD* 和 *DE* 基因型个体皮张长度显著大于 *EE* 基因型个体, *DD* 基因型个体的皮张长度与 *DE* 基因型个体的差异不显著(表 7)。

3 讨论

生长激素通过与其受体结合, 激活一系列信号

表 4 *GHR* 基因多态位点对生长性状的影响(*P* 值)

生长性状		<i>GHR</i>	
		C99T&A144C	T59C&G65A
体重(kg)	母狐	0.0338	NS
	公狐	NS	0.0446
体长(cm)	母狐	NS	NS
	公狐	NS	0.0781
腹围(cm)	母狐	NS	NS
	公狐	NS	0.0814
皮长(cm)	母狐	0.0572	0.0001
	公狐	0.1351	NS

注: NS 表示 $P>0.2$ 。

表 5 C99T 和 A144C 突变对母狐体重的影响(最小二乘均值)

基因型	个体数	体重(kg)
AA	13	7.25 ± 0.404^a
AB	33	7.55 ± 0.274^a
BB	6	9.00 ± 0.598^b
CC	39	7.96 ± 0.253^{ab}

注: 同一列间字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

表 6 T59C 和 G65A 突变对公狐体重的影响(最小二乘均值)

基因型	个体数	体重(kg)
DD	13	10.05 ± 0.296^a
DE	68	10.83 ± 0.184^b
EE	10	10.42 ± 0.395^{ab}

注: 同一列间字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

表 7 T59C 和 G65A 突变对母狐皮张长度的影响(最小二乘均值)

基因型	个体数	皮张长度(cm)
DD	83	96.58 ± 0.955^a
DE	90	96.73 ± 0.851^a
EE	36	91.09 ± 1.216^b

注: 同一列间字母不同表示差异显著($P<0.01$)。

传导通路,发挥其促生长和调控新陈代谢的作用。*GHR*基因敲除后,小鼠生长缓慢。*GHR*基因的突变可能会改变受体蛋白功能域结构,从而影响机体的生长速度。目前,国内外学者围绕*GHR*基因的多态性与动物的生长性状相关性展开了一系列的研究。Curi等^[9]对牛*IGF1*和*GHR* 5 调节区微卫星标记进行研究,结果发现在Nellore杂交牛、Canchim牛和西门塔尔、安格斯杂交牛中*GHR*的L/S替代对日增重和体重有显著影响。Hale等^[10]在安格斯牛群中发现*GHR*

基因启动区的(TG)_n微卫星多态,其纯合基因型对安格斯牛的断奶重和胴体重有明显影响。

本研究依据前人研究的结果,将*GHR*基因确定为影响北极狐生长性状的候选基因。在大兴安岭图强林业局北极狐群体中研究了*GHR*基因4个位点的多态性对整个群体生长性状的影响和这4个位点的多态性分别对公母狐群体生长性状的影响。检测结果表明,北极狐*GHR*基因(外显子1)C99T和A144C突变位点导致的4种基因型对该群体的皮张长度性状影响显著($P<0.05$)。通过序列分析表明,C99T点突变导致了氨基酸上的变化,由Leu氨酸变成了Ser氨酸,属于有义突变。氨基酸的改变可能会引起其蛋白功能的改变,因此该点值得进一步研究。多重比较结果表明,AA基因型个体皮张长度均值最大,显著高于AB和CC基因型个体,说明AA基因型为该群体的有利基因型。针对该点分别对公母狐进行研究时发现,该突变位点对公母狐皮张长度性状均有影响($P<0.2$),说明该点的作用在北极狐性别上没有明显差异。另外,该点突变导致的AA、AB、BB和CC4种基因型对母狐体重性状影响显著($P<0.05$)。说明就体重性状而言,该点在母狐群体中的作用要大于公狐群体。多重比较结果表明,BB基因型个体体重显著高于AA和AB基因型个体,说明BB基因型是影响母狐体重的有利基因型。因此可以尝试应用该标记位点对北极狐皮张长度性状和母狐的体重性状进行标记辅助选择。

北极狐*GHR*基因(外显子5)T59C和G65A突变导致的DD、DE、EE3种基因型对整个群体体长性状有影响($P<0.2$),对皮张长度性状影响极显著($P<0.01$),对另两个性状没有影响($P>0.2$)。分别对公

母狐研究时发现, 该突变位点对公狐体重性状影响显著($P<0.05$), *DE* 基因型个体体重显著高于 *DD* 基因型个体。对母狐皮张长度性状影响极显著($P<0.01$), 母狐 *DD* 和 *DE* 基因型个体皮张长度均显著大于 *EE* 基因型个体。说明该点对体重和皮张长度性状的作用存在性别差异。该点的多重比较结果表明, *DE* 基因型个体在群体中各项指标均值均大于 *DD* 和 *EE* 基因型个体, 提示 *D* 等位基因和 *E* 等位基因的结合有利于北极狐的生长。可以将 *DE* 基因型作为影响北极狐生长的有利基因型, 尝试用此位点对母狐的皮张长度和公狐的体重性状进行标记辅助选择。

综合以上分析结果可以看出, *GHR* 基因的多态性对北极狐的体重和皮张长度性状有一定的影响, 表明 *GHR* 基因可能是影响北极狐生长性状的主效基因或与影响该性状的主效基因紧密连锁。

参考文献(References):

- [1] Graphodatsky AS, Yang F, Serdukova N, Perelman P, Zhdanova NS, Ferguson-Smith MA. Dog chromosome-specific paints reveal evolutionary inter and intrachromosomal rearrangements in the American mink and human. *Cytogenet Cell Genet*, 2000, 90(3-4): 275-278. [\[DOI\]](#)
- [2] 胡晓航. 银狐生长激素基因克隆与基因表达研究[学位论文]. 东北林业大学, 2005.
- [3] 孙逊, 朱尚权. 生长激素的结构与功能. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 1999, 19(1): 6-9.
- [4] Falaki M, Gengler N, Sneyers M, Prandi A, Massart S, Formigoni A, Burny A, Portetelle D, Renaville R. Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J Dairy Sci*, 1996, 79(8): 1446-1453. [\[DOI\]](#)
- [5] Blott S, Kim J, Moisisio S, Schmidt-Kuntzel A, Cornet A, Berzi P, Cambisano N, Ford C, Grisard B, Johnson D, Wong J, Vilkki J, Georges M, Farnir F, Coppieters W. Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics*, 2003, 163(1): 253-266.
- [6] Maj A, Oprzadek J, Dymchicki E, Zwierzchowski L. Association of the polymorphism in the 5' -noncoding region of the bovine growth hormone receptor gene with meat production traits in Polish Black-white cattle. *Meat Sci*, 2006, 72: 539-544. [\[DOI\]](#)
- [7] Godowski PJ, Leung DW, Meacham LR, Galgani JP, Hellmiss R, Keret R, Rotwein PS, Parks JS, Laron Z, Wood WI. Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(20): 8083-8087. [\[DOI\]](#)
- [8] 杜智恒, 宁方勇, 杨春山, 白秀娟. 北极狐 *GHR* 基因 cDNA 的克隆及序列分析. 兽类学报, 2009, 30(1): 65-73.
- [9] Curi RA, Oliveira HN, Silveira AC, Lopes CR. Effects of polymorphism microsatellites in the regulatory region of IGF1 and GHR on growth and carcass traits in beef cattle. *Anim Genet*, 2005, 136(1): 58-62. [\[DOI\]](#)
- [10] Hale CS, Herring WO, Shibuya H, Lucy MC, Lubahn DB, Keisler DH, Johnson GS. Decreased growth in Angus steers with a short TG-microsatellite allele in the P1 promoter of the growth hormone receptor gene. *Animl Sci*, 2000, 78(8): 2099-2104.