

长顺绿壳蛋鸡 *OC-116* 基因变异对蛋壳品质的影响

吴磊^{1,2}, 覃媛钰^{1,2}, 谭光辉^{1,2}, 李杰章^{1,2}, 张依裕^{1,2*}

(1.贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2.高原山地动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 以长顺绿壳蛋鸡为试验对象, 采用 PCR 产物直接测序法, 对 *OC-116* 基因 g.45670562—g.45670994 和 g.45669431—g.45670163 区域进行单核苷酸多态性筛查; 运用一般线性模型, 分析多态位点对长顺绿壳蛋鸡蛋壳品质的遗传效应。结果显示: *OC-116* 基因存在 4 个 SNP 位点, 分别为位于第 2 外显子上的 g.45668081 G>T、第 3 外显子上的 g.45669143 T>C、第 3 内含子上的 g.45669061 A>G 和 g.45669101 T>A。g.45668081 G>T 和 g.45669143 T>C 为同义突变, 4 个 SNP 位点均表现为中度多态; 卡方(χ^2)检验表明, 4 个 SNP 位点的基因型分布均未偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$); 关联性分析结果表明, g.45669061 A>G 位点的 AA 和 AG 基因型的蛋壳厚度显著高于 GG 基因型的($P<0.05$), g.45669143 T>C 位点的 TT 和 CT 基因型的蛋壳强度和蛋壳厚度显著高于 CC 基因型的($P<0.05$), 揭示 g.45669061 A>G 和 g.45669143 T>C 位点可作为蛋壳性状选择的标记性位点。

关键词: 长顺绿壳蛋鸡; *OC-116* 基因; 单核苷酸多态性; 蛋壳品质

中图分类号: S831.91 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2019)06-0636-05

Effects of *OC-116* gene variation on eggshell quality in Changshun blue-eggshell chicken

WU Lei^{1,2}, QIN Yuanyu^{1,2}, TAN Guanghui^{1,2}, LI Jiezhong^{1,2}, ZHANG Yiyu^{1,2*}

(1.School of Animal Science, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2.Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction in the Plateau Mountainous Region, Ministry of Education, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: Using Changshun blue-eggshell chicken as the test object, single-nucleotide polymorphisms were screened in g.45670562-g.45670994 and g.45669431-g.45670163 of *OC-116* gene by direct sequencing of PCR products; the genetic effect of polymorphic loci on shell quality of Changshun blue-eggshell chicken was analyzed using a general linear model. The results show that there are 4 SNP loci in the *OC-116* gene, which are g.45668081 G>T on exon 2, g.45669143 T>C on exon 3, and intron 3 g.45669061 A>G and g.45669101 T>A. The g.45668081 G>T and g.45669143 T>C are synonymous mutations. The all four SNP loci show moderate polymorphism. The result of Chi square(χ^2) test showed that the genotype distribution of the four SNP loci localized in the range of Hardy-Weinberg equilibrium($P>0.05$). And, the correlation analysis showed that the g.45669061 A>G loci had eggshells of AA and AG genotypes with the thickness significantly higher than that of GG genotype($P<0.05$) and the g.45669143 T>C locus had eggshells of TT and CT genotypes owing significantly higher in egg shell strength and egg shell thickness than CC genotype($P<0.05$). This results reveal the g.45669061 A>G and g.45669143 T>C sites can be used as marker sites for eggshell trait selection.

Keywords: Changshun blue-eggshell chicken; *OC-116* gene; single nucleotide polymorphism; eggshell quality

禽类蛋壳是抵挡外界物理损伤和微生物侵染的重要屏障。蛋壳品质的优劣性直接影响蛋的保

存、孵化率、破损程度等,而其优劣性受到蛋壳形成过程中矿化作用机制的影响^[1]。对鸡、火鸡、鹌鹑的全基因组和蛋白组学的研究结果显示,蛋壳基质蛋白是通过调控蛋壳的有机基质形成,进而调控蛋壳的纹理和超微结构来影响矿化过程,导致蛋壳的生物力学特性、结构和品质的变化^[2-3];因此,基质蛋白作为禽类蛋壳最重要的部分,它生成的数量与速度或许是影响蛋壳品质的主要因素。目前,已鉴定的蛋壳基质蛋白达 1 000 余种,且蛋壳基质蛋白 *OC-116* 和 *OCX-32* 含量最高,揭示了 *OC-116* 和 *OCX-32* 基因可能是影响蛋壳性能的关键控制基因或主效基因^[4]。*OC-116* 是跟随蛋壳进化而存在的蛋白质,研究表明这种蛋壳基质最早形成于恐龙时代,后来随着物种的发展而存在于爬行动物和鸟类中^[5]。*OC-116* 基因由 5 个外显子组成,其中外显子 5 序列较长,其他外显子均较短;*OC-116* 氨基酸序列中载有 2 个 N 糖基化位点和 2 个二硫化物结合物,在蛋壳形成过程中起主要作用^[6]。*OC-116* 基因只有在蛋壳开始钙化时才能发现其 mRNA 的表达,需经过修饰和剪辑才发挥其功能^[7]。*OC-116* 广泛存在于蛋壳的海绵层、锥体层以及子宫细胞的钙化活跃区域中。通过分子印迹研究^[8]发现,*OC-116* 也存在于蛋鸡的肥厚性软骨细胞和髓骨细胞中。杨凌霄等^[9]报道 *OC-116* 基因对蛋壳厚度和强度等品质具有重要的影响。在鸡个体发育早期,一旦成骨开始,*OC-116* 就参与了骨的形成,它的功能在进一步骨骼和矿化过程中得以保持,在成年之后参与蛋壳的形成^[10]。*OC-116* 还能显著影响蛋壳表面有机层的沉积,是鸡蛋壳中重要的基质组分^[11-12]。为解释蛋壳基质蛋白基因 *OC-116* 对鸡蛋壳质量的遗传效应,本研究以产蛋高峰期的长顺绿壳蛋鸡为试验对象,探讨 *OC-116* 基因变异与长顺绿壳蛋鸡蛋壳品质的关联性,旨在为长顺绿壳蛋鸡的保种选育和开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物

随机选择饲养于贵州大学动物科学学院实验

研究所的同日出雏、健康无病、同等管理条件下的 45 周龄长顺绿壳蛋鸡 100 只进行编号,对应收集个体产蛋记录,根据《家禽生产学》^[13]中蛋的构造和品质测定的方法测定蛋壳质量、蛋形指数等蛋壳品质相关指标。每只鸡翅静脉采血 1.0~1.5 mL,于-20 °C 冰箱保存。

1.2 主要试剂及仪器

血液基因组提取试剂盒(DC102)购自宏达尔生物科技有限公司;1.1×T3 Super PCR Mix 试剂、琼脂糖和 DM2000 购自重庆擎科生物技术有限公司;DYY-6C 型电泳仪购自北京市六一仪器厂;化学发光荧光全自动分析成像仪(Biosens SC710)购自上海山富科学仪器有限公司;梯度 PCR 仪(T960)购自香港力康生物医疗科技控股集团;蛋壳强度测定仪(EFR-01)和蛋品质分析仪(型号为 EA-01)购自北京天翔飞域仪器设备有限公司。

1.3 基因组 DNA 的提取

按照血液基因组提取试剂盒(DC102)操作说明书提取全血基因组 DNA。采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和 NANODROP 2000 DNA 浓度测定仪(Thermo Scientific)联合评估提取质量,稀释成 100 ng/μL,保存,备用。

1.4 引物合成及目的片段扩增

根据 NCBI 上收录的鸡 *OC-116* 基因序列(GenBank 登录号为 NC_006091.5)设计 2 对多态引物(表 1)。引物 *OC-F/R* 扩增区域从第 1 外显子到第 2 内含子,引物 *OC-F1/R1* 扩增区域从第 2 内含子到第 5 外显子。引物由重庆擎科生物技术有限公司合成。PCR 扩增反应体系:1.1×T3 Super PCR Mix 17 μL,基因组 DNA 模板 1 μL,上游引物和下游引物各 1 μL,总体积为 20 μL。反应程序:98 °C 预变性 2 min;98 °C 变性 10 s,60 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 10 s,共 35 个循环;72 °C 终延伸 2 min。于 135 V 电压下,用 1.3% 的琼脂糖凝胶电泳 25 min,选取特异性较好的 PCR 扩增产物,由上海生工生物工程股份有限公司进行单个测序。

表 1 引物序列信息

引物名称	引物序列(5'—3')	检测区域	片段长度/bp
OC-F/R	CCACCACAGGCACATTTTTA GGGCTGTTAATGGGGTATCA	g.45667787—g.45668219	433
OC-F ₁ /R ₁	TCCAATCAATAACCCCATCAA ATCCACCTTACCCAGCCAGT	g.45668618—g.45669350	733

1.5 SNPs 筛查和统计分析

运用 DNASTar 筛查 SNP 位点, 统计各 SNP 位点的等位基因频率和基因型频率; 根据 NEI 等^[14]和 BOTSTEIN 等^[15]报道的方法计算观察杂合度、有效等位基因数和多态信息含量; 运用 SPSS 18.0 建立数据库; 彭娜等^[16]报道的方法, 运用一般线性统计模块分析各 SNP 位点基因型与长顺绿壳蛋鸡蛋壳品质指标的相关性。

2 结果与分析

2.1 OC-116 基因的 SNPs 鉴定

运用 DNASTar 的 MegAlign 和 Editseq 对测序结果进行序列比对, 共检测到 4 个新的 SNP 位点(图 1)。在引物 OC-F/R 扩增的目的片段中发现 1 个 SNP 位点, 即位于第 2 外显子上的 g.45668081 G>T。在 OC-F₁/R₁ 扩增的目的片段中发现 3 个 SNP 位点, 分别是位于第 3 内含子上的 g.45669061 A>G 和 g.45669101 T>A 及位于第 3 外显子上的 g.45669143 T>C。

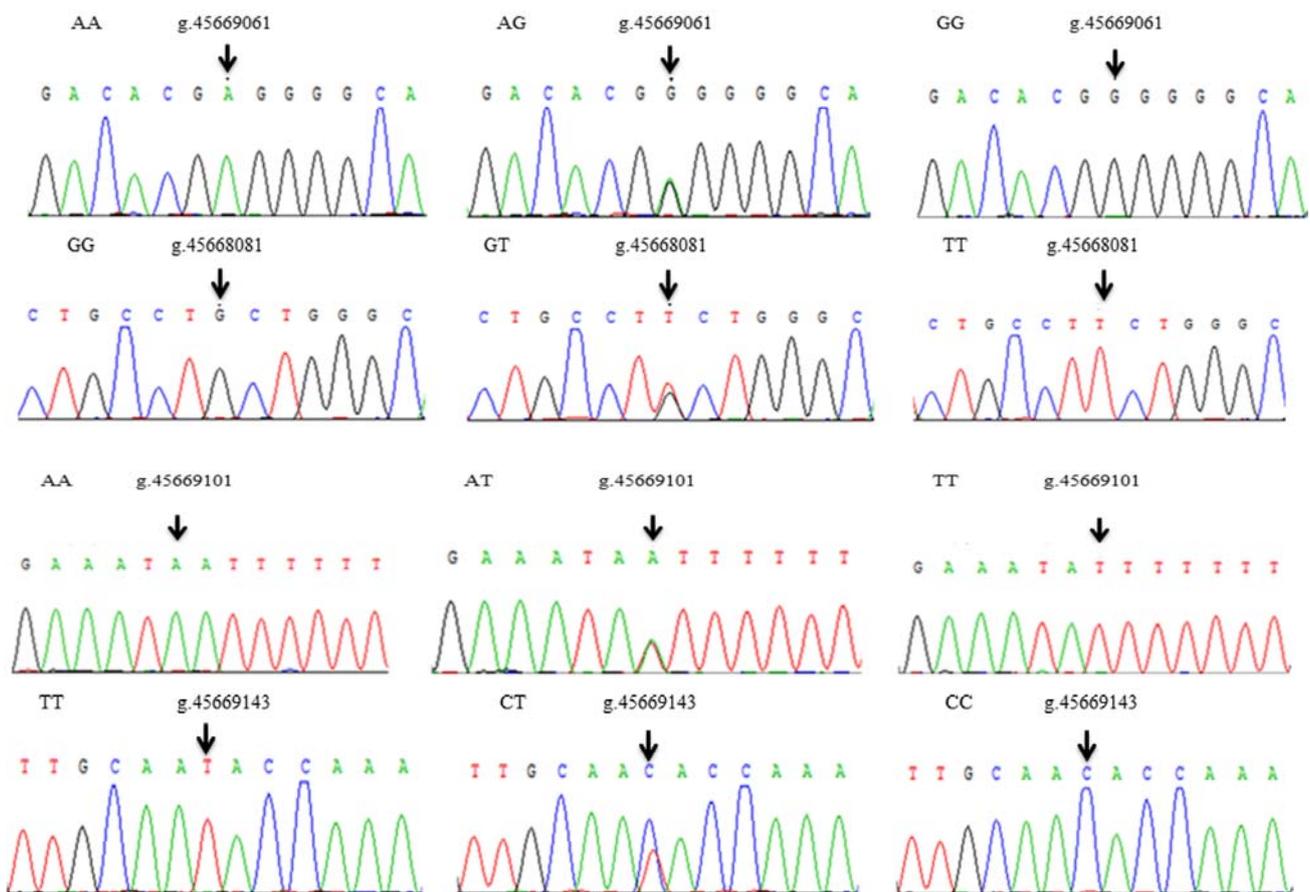


图 1 OC-116 基因 PCR 测序结果

Fig.1 Sequencing peak map of OC-116 gene

2.2 *OC-116* 基因多态位点的遗传多样性分析

由表 2 可知, 4 个 SNP 位点 g.45668081 G>T、g.45669061 A>G、g.45669101 T>A 和 g.45669143 T>C 的优势等位基因分别为 G、A、T 和 T, 其频率分别为 0.600、0.717、0.650 和 0.733; 4 个 SNP_s

多态信息含量在 0.25~0.50 内, 均为中度多态; 通过卡方(χ^2)检验发现, 4 个 SNP 位点的 χ^2 均小于 5.99, 说明 4 个 SNP 位点基因型分布均未偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$)。

表 2 *OC-116* 基因多态位点的遗传特性
Table 2 Genetic characteristics of polymorphisms loci of *OC-116* gene

SNP 位点	基因型频率							
	GG	GT	TT	AA	AG	AT	CT	CC
g.45668081 G>T	0.333(20)	0.533(32)	0.134(8)					
g.45669061 A>G	0.067(4)			0.500(30)	0.433(26)			
g.45669101 T>A			0.433(26)	0.134(8)		0.433(26)		
g.45669143 T>C			0.533(32)				0.400(24)	0.067(4)

SNP 位点	等位基因频率				杂合度	有效等位基因数	多态信息含量	χ^2
	G	T	A	C				
g.45668081 G>T	0.600	0.400			0.480	1.923	0.365	0.741 3
g.45669061 A>G	0.283		0.717		0.406	1.684	0.324	0.270 0
g.45669101 T>A		0.650	0.350		0.455	1.835	0.352	0.136 1
g.45669143 T>C		0.733		0.267	0.361	1.642	0.314	0.031 0

括号内为基因型频数; $\chi^2_{0.05(2)}=5.99$ 。

2.3 *OC-116* 基因多态位点与长顺绿壳蛋鸡蛋壳品质的关联性分析

由表 3 可知, g.45669061 A>G 位点的 AA 和 AG 基因型的蛋壳厚度与 GG 基因型间的差异有统

计学意义($P<0.05$), g.45669143 T>C 位点的 CT 和 TT 基因型的蛋壳强度和蛋壳厚度与 CC 基因型间的差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 3 长顺绿壳蛋鸡 *OC-116* 基因多态位点与蛋壳品质的关联性分析结果

Table 3 Correlation analysis between *OC-116* gene polymorphisms and egg quality in Changshun blue-eggshell chicken

SNP 位点	基因型	蛋质量/g	蛋形指数	蛋壳强度/(N·cm ⁻³)	蛋壳厚度/mm	蛋壳质量/g
g.45668081 G>T	GG	52.350±5.566	1.326±0.079	30.190±12.146	0.270±0.023	5.267±0.750
	GT	49.263±4.613	1.348±0.088	28.231±11.681	0.263±0.020	4.852±0.571
	TT	49.675±4.443	1.410±0.081	22.500±9.164	0.280±0.026	5.168±0.612
g.45669061 A>G	AA	49.967±5.359	1.376±0.070	27.140±12.730	(0.272±0.026)a	4.968±0.631
	AG	51.615±4.325	1.307±0.081	31.323±9.180	(0.266±0.014)a	5.233±0.622
	GG	44.950±3.182	1.420±0.141	24.650±2.333	(0.240±0.024)b	4.210±0.283
g.45669101 T>A	AA	50.300±6.461	1.385±0.117	17.125±6.674	0.246±0.023	4.858±0.765
	AT	51.164±4.313	1.309±0.075	34.414±9.754	0.273±0.016	5.143±0.652
	TT	49.408±5.486	1.383±0.070	24.442±10.552	0.268±0.024	4.961±0.647
g.45669143 T>C	CC	44.950±3.182	1.420±0.141	(20.650±2.333)b	(0.240±0.024)b	4.210±0.283
	CT	51.575±4.515	1.297±0.075	(30.458±9.018)a	(0.265±0.132)a	5.248±0.647
	TT	50.100±5.205	1.379±0.068	(28.050±12.825)a	(0.273±0.249)a	4.974±0.610

同一 SNP 位点内同列数据后的不同字母示基因型间差异显著($P<0.05$)。

3 结论与讨论

本研究中, 采用 PCR 产物直接测序法, 在长顺绿壳蛋鸡 *OC-116* 基因中筛选出 4 个 SNP 位点, 其

中 g.45668081 G>T 和 g.45669143 T>C 位于在外显子上, 为同义突变, 并没有引起氨基酸的改变, g.45669061 A>G 和 g.45669101 T>A 位于内含子上。杂合度和多态信息含量表示群体内遗传变异的程

度,其值的高低反映了群体内个体的均质度,遗传变异大,数值就高,对育种越有利^[17]。对4个SNP位点进行遗传特异性分析得出,多态信息含量均为中度多态,对群体遗传分化较有利。通过卡方(χ^2)检验发现,4个SNP位点基因型分布均未偏离Hardy-Weinberg平衡($P>0.05$),说明突变未受到漂变和选择等因素的影响^[18]。对长顺绿壳蛋鸡OC-116基因4个突变位点基因型的蛋壳品质指标进行关联性分析,结果表明,g.45669061 A>G位点的AA和AG基因型的蛋壳厚度显著高于GG基因型的($P<0.05$),g.45669143 T>C位点的TT和CT基因型的蛋壳强度和蛋壳厚度显著高于CC基因型的($P<0.05$),这与夏佳豪^[19]研究的OC-116基因对汶上芦花鸡蛋壳厚度有显著影响的结论一致。DUNN等^[20]对OC-116单核苷酸多态(SNP)的研究表明,OC-116能够影响钙离子的沉积,与鸡蛋的蛋形指数、蛋壳厚度以及蛋壳弹性强度密切相关。

本研究所发现SNP位点中,OC-116基因上的g.45669061和g.45669143变异位点对长顺绿壳蛋鸡蛋壳强度和蛋壳厚度有明显影响,与前人研究结果一致。

综上,在长顺绿壳蛋鸡OC-116基因上发现的4个SNP位点中,位于内含子上的g.45669061 A>G位点和位于外显子上的g.45669143 T>C突变位点最可能影响蛋壳品质,有待后期进一步研究。

参考文献:

- [1] MANN K, MANN M. The proteome of the calcified layer organic matrix of turkey (*Meleagris gallopavo*) eggshell[J]. *Proteome Science*, 2013, 11: 40.
- [2] MANN K, MANN M. Proteomic analysis of quail calcified eggshell matrix: a comparison to chicken and turkey eggshell proteomes[J]. *Proteome Science*, 2015, 13: 22.
- [3] HORVAT-GORDON M, YU F, BURNS D, et al. Ovocleidin(OC-116) is present in avian skeletal tissues[J]. *Poultry Science*, 2008, 87(8): 1618-1623.
- [4] MARIE P, LABAS V, BRIONNE A, et al. Quantitative proteomics provides new insights into chicken eggshell matrix protein functions during the primary events of mineralisation and the active calcification phase[J]. *Journal of Proteomics*, 2015, 126: 140-154.
- [5] ROWE P S N. Regulation of bone-renal mineral and energy metabolism: the PHEX, FGF23, DMP1, MEPE ASARM pathway[J]. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 2012, 22(1): 61-86.
- [6] KAWASAKI K, WEISS K M. Evolutionary genetics of vertebrate tissue mineralization: the origin and evolution of the secretory calcium-binding phosphoprotein family[J]. *Journal of Experimental Zoology Part B Molecular and Developmental Evolution*, 2006, 306B(3): 295-316.
- [7] SOCHA J K, SECHMAN A, MIKA M, et al. Effect of growth hormone on steroid concentrations and mRNA expression of their receptor, and selected egg-specific protein genes in the chicken oviduct during pause in laying induced by fasting[J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2017, 61: 1-10.
- [8] MANN K, HINCKE M T, NYS Y. Isolation of ovocleidin-116 from chicken eggshells, correction of its amino acid sequence and identification of disulfide bonds and glycosylated Asn[J]. *Matrix Biology*, 2002, 21(5): 383-387.
- [9] 杨凌霄,刘长国.鸡蛋壳Ovocleidin-116(OC-116)研究进展[J]. *中国家禽*, 2015, 37(22): 38-40.
- [10] 张权.鸡OC17基因克隆、表达及其Ser⁶¹位点对碳酸钙结晶功能研究[D].北京:中国农业大学,2015.
- [11] BARDET C, VINCENT C, LAJARILLE M C, et al. OC-116, the chicken ortholog of mammalian MEPE found in eggshell, is also expressed in bone cells[J]. *Journal of Experimental Zoology Part B Molecular & Developmental Evolution*, 2010, 314B(8): 653-662.
- [12] 张璐.蛋鸡蛋品质性状候选基因的DNA分子标记研究[D].石河子:石河子大学,2016.
- [13] 杨宁主.家禽生产学[M].2版.北京:中国农业出版社,2010.
- [14] NEI M, ROYCHOUDHURY A K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 1974, 76(2): 379-390.
- [15] BOTSTEIN D, WHITE RL, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [16] 彭娜,曾丹,王晓清等.中华鳖IGF2基因SNP标记与生长性状的关联分析[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2018, 44(1): 88-94.
- [17] 毛永江.中国牛亚科家畜六个群体遗传多样性与遗传分化及其统计方法的研究[D].扬州:扬州大学,2006.
- [18] 李俊营,詹凯,柏如东,等.淮南麻黄鸡CRBP2基因第3外显子PCR-SSCP多态性及其与蛋品质的相关分析[J]. *吉林农业大学学报*, 2014, 36(6): 697-700, 706.
- [19] 夏佳豪.汶上芦花鸡蛋品质及其候选基因遗传效应分析[D].泰安:山东农业大学,2018.
- [20] DUNN I C, WILSON P W, LU Z, et al. New hypotheses on the function of the avian shell gland derived from microarray analysis comparing tissue from juvenile and sexually mature hens[J]. *General & Comparative Endocrinology*, 2009, 163(1/2): 225-232.

责任编辑:邹慧玲
英文编辑:柳正