

网络出版时间:2014-04-25 15:48

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.05.011

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.05.011.html>

安徽省 4 个地方鸡品种 OCX-32 基因外显子 4 的多态性及其与淮南麻黄鸡蛋品质的相关分析

李俊营¹, 詹 凯¹, 毕善辉², 刘 伟¹, 韩 涛³, 李绍全³

(1 安徽省农业科学院 畜牧兽医研究所, 安徽 合肥 230031; 2 安徽农业大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230036;

3 安徽皖西麻黄鸡禽业有限公司, 安徽 六安 237400)

【摘 要】 【目的】研究 OCX-32 基因在淮南麻黄鸡、五华鸡、淮北麻鸡和皖南三黄鸡等 4 个安徽省地方鸡品种中的遗传多态性及 OCX-32 基因与淮南麻黄鸡蛋品质的相关性, 为揭示这些群体的遗传特征提供基础数据。**【方法】**采用 PCR-RFLP 技术, 对淮南麻黄鸡、五华鸡、淮北麻鸡和皖南三黄鸡 4 个地方鸡品种的 OCX-32 基因外显子 4 进行遗传多态性研究, 并对外显子 4 遗传多态性与淮南麻黄鸡蛋品质的相关性进行分析。**【结果】**OCX-32 基因外显子 4 存在 A494C 1 个单核苷酸多态性位点。该位点在安徽省 4 个地方鸡品种中的基因频率和基因型频率分布差异不大, C 等位基因频率较高。4 个地方鸡品种群体在 A494C 位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态, 均表现为中度多态。相关分析结果表明, OCX-32 基因外显子 4 的 A494C 位点基因多态性与淮南麻黄鸡的开产蛋质量、30 周龄蛋质量、蛋白高度和哈氏单位显著相关($P < 0.05$); CC 基因型的开产蛋质量和 30 周龄蛋质量显著高于 AA 基因型, AA 和 CC 基因型的蛋白高度显著高于 AC 基因型, AA 基因型的哈氏单位显著高于 AC 基因型($P < 0.05$)。**【结论】**OCX-32 基因与淮南麻黄鸡蛋品质存在一定的相关性, 可作为发掘淮南麻黄鸡蛋品质的分子育种标记。

【关键词】 OCX-32 基因; 淮南麻黄鸡; 蛋品质; 安徽省

【中图分类号】 S831.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)05-0001-05

Polymorphisms of exon 4 of OCX-32 gene in four indigenous chicken breeds in Anhui Province and its relationship with egg quality of Huainan partridge chicken

LI Jun-ying¹, ZHAN Kai¹, BI Shan-hui², LIU Wei¹, HAN Tao³, LI Shao-quan³

(1 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Agricultural Academy of Anhui Province, Hefei, Anhui 230031, China;

2 College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China;

3 Anhui Wanxi Mahuangji Poultry Co., Ltd, Liu'an, Anhui 237400, China)

Abstract: 【Objective】 This study was aimed to analyze the genetic variations of OCX-32 gene of Huainan partridge chicken, Wuhua chicken, Huabei ma chicken and Wannan sanhuang chicken in Anhui Province, and investigate the relationship between OCX-32 gene and egg quality of Huainan partridge chicken in order to reveal these populations' genetic characteristics and provide data for marker-assisted selection of egg quality in future. **【Method】** The polymorphisms of exon 4 of OCX-32 gene were analyzed by PCR-RFLP technique in Huainan partridge chicken, Wuhua chicken, Huabei ma chicken, Wannan sanhuang chicken and the effects of genotypes of exon 4 in OCX-32 gene on egg quality traits of Huainan partridge

【收稿日期】 2013-04-15

【基金项目】 国家蛋鸡产业技术体系项目(CARS-41-K19); 安徽省农业科学院院长青年创新基金项目(13B0425)

【作者简介】 李俊营(1980—), 男, 河南南阳人, 助理研究员, 主要从事家禽生产及遗传育种研究。

E-mail: lijunying2007@163.com

【通信作者】 詹 凯(1968—), 男, 安徽安庆人, 研究员, 主要从事家禽育种及生产研究。E-mail: zhankai633@126.com

chicken were estimated. 【Result】 A mutation of A to G was found in the exon 4 of OCX-32 gene (A494C). The genotype and allele frequencies in the four domestic breeds varied similarly and allele C was higher. The four populations were at Hardy-Weinberg equilibrium at A494C site ($P < 0.05$) and showed moderate polymorphism. Significant effects of A494C in the exon 4 of OCX-32 gene on egg weight at first laying, egg weight at 30th week, albumen height and Haugh unit were observed in Huainan partridge chicken population ($P < 0.05$). The chickens with CC genotype had higher egg weight of first laying and egg weight at 30th week than that of genotype AA genotype ($P < 0.05$). The albumen height of AA and CC genotype were higher than that of AC genotype ($P < 0.05$), and Haugh unit of AA genotype was higher than that of AC genotype in Huainan partridge chicken ($P < 0.05$). 【Conclusion】 OCX-32 gene affected egg quality and could be used as molecular breeding marker for egg quality of Huainan partridge chicken.

Key words: OCX-32 gene; Huainan partridge chicken; egg quality; Anhui Province

蛋品质是禽蛋生产中的一个重要经济性状,良好的蛋壳品质有助于减少因蛋壳破损造成的经济损失。因此,在蛋鸡育种中如何提高蛋品质受到相关研究人员的关注。近年来,随着鸡基因组测序图谱、SNP 草图及功能解析的不断完善,利用功能基因组学研究的技术和方法,发掘和利用影响蛋品质候选基因中的有效分子标记,是提高蛋品质的重要途径之一。

Ovocalycin-32(OCX-32)是一种蛋壳基质蛋白,由输卵管末端上皮细胞分泌到子宫液中,在蛋壳形成的终止阶段其表达量逐渐增加^[1-2],导致碳酸钙沉降的时间逐渐延长^[3-4],可能具有终止钙化的功能^[5]。OCX-32 由 275 个氨基酸(AA)组成^[6],主要分布在蛋壳的表层(即角质层),蛋壳角质层与外界环境中的病原微生物直接接触,是鸡蛋防御外界微生物侵袭的第一道屏障^[7-8],具有抗菌作用。有研究表明,编码 OCX-32 蛋白的基因对蛋壳品质和产蛋量具有显著影响^[9-12]。Dunn 等^[10]发现,OCX-32 基因的一个内含子单核苷酸多态性(SNP)与鸡蛋乳突层厚度显著相关;Uemoto 等^[11]发现,OCX-32 基因与产蛋率显著相关。蛋鸡产蛋性能影响着 OCX-32 基因的表达,低产蛋性能蛋鸡的 OCX-32 表达量较高,高产蛋性能蛋鸡反而表达量较低,这表明 OCX-32 基因是影响产蛋率的一个候选基因^[13]。

目前,有关 OCX-32 基因对蛋鸡生产性能和蛋品质影响的研究相对较少,其在我国地方家禽品种淮南麻黄鸡中的遗传多样性尚未见报道,而且淮南麻黄鸡生产中存在产蛋率低和蛋质量小等问题。本试验研究了安徽省 4 个地方鸡品种中 OCX-32 基因外显子 4 的遗传多态性,并分析了外显子 4 的多态性与淮南麻黄鸡蛋品质之间的相关性,旨在探寻与淮南麻黄鸡蛋品质密切相关的遗传标记位点,为淮

南麻黄鸡的选育提供理论依据和实践基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

皖南三黄鸡来源于安徽省池州市青阳县畜牧兽医站皖南三黄鸡原种场,样本量为 60 只;五华鸡来源于安徽省芜湖市繁昌县芜湖钟氏禽业有限公司,样本量为 120 只;淮北麻鸡来源于安徽省宿州市兴强养禽专业合作社,样本量为 60 只;淮南麻黄鸡来源于安徽省六安市安徽皖西麻黄鸡禽业有限公司,样本量为 308 只。其中淮南麻黄鸡于 18 周龄时转入产蛋舍个体笼饲养,记录开产蛋质量,在 30 周龄时连续 5 天测定 308 只鸡所产鸡蛋的质量、蛋形指数、蛋壳厚度和蛋壳强度等蛋品质指标,参照文献[14]的方法进行蛋品质测定。

1.2 主要试剂

蛋白酶 K、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DL 2000 DNA Marker、琼脂糖、DNA 片段回收试剂盒等均购于宝生物工程(大连)有限公司,酚、氯仿等试剂购于上海生工生物工程技术有限公司。根据 GenBank 上公布的 OCX-32 基因序列(GenBank 登录号:NM_204534 和 AADN02021077.1),用 Primer 5.0 软件设计 1 对引物(上游:5'-TGTTTCTGATGAAGAGCCAGA-3',下游:5'-CTTTGCCACTCTGTAGGCTGT-3'),用于 OCX-32 基因第 4 外显子扩增^[11]。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 鸡基因组 DNA 的提取

试验鸡翅静脉采集血样 1.5 mL/只,ACD 抗凝,低温带回实验室后于 -80 ℃ 保存。采用苯酚/氯仿法提取鸡血液基因组 DNA,用 TE 溶液将 DNA 样品稀释成 50 ng/μL 的溶液备用。

1.4 OCX-32 基因外显子 4 的 PCR 扩增及 PCR-*Nco* I-RFLP 酶切

1.4.1 PCR 扩增 PCR 反应体系总体积为 20 μ L,其中含有 10 $\times$ PCR buffer(不含 Mg^{2+}) 2.0 μ L, 20 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μ L, 10 mmol/ μ L 4 $\times$ dNTPs Mix 0.4 μ L, 10 pmol/L 上下游引物各 1.0 μ L, 5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μ L 和 50 ng/ μ L DNA 模板 1.0 μ L,加灭菌双蒸水至 20 μ L。PCR 反应程序:94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}C$ 变性 40 s,59 $^{\circ}C$ 退火 40 s,72 $^{\circ}C$ 延伸 50 s,35 个循环;72 $^{\circ}C$ 延伸 8 min,4 $^{\circ}C$ 保存。PCR 扩增产物用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.2 PCR-*Nco* I-RFLP 酶切体系为:3 μ L PCR 产物、10 U/L 的限制性内切酶 *Nco* I 0.1 μ L、10 $\times$ buffer 1.5 μ L,加灭菌双蒸水至 15 μ L,混匀后于 37 $^{\circ}C$ 恒温水浴锅中酶切过夜,次日用 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测,Alpha Innotech 凝胶成像系统照相分析。根据特征条带类型判定基因型。

1.5 数据统计分析

利用软件 POPGEN(Version 1.31)计算基因型

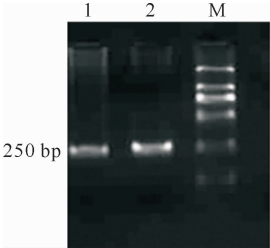


图 1 五华鸡 OCX-32 基因外显子 4 的扩增结果
1,2. PCR 产物;M. DL 2000 DNA Marker
Fig. 1 PCR amplification products of exon 4 in OCX-32 gene of Wuhua chicken
1,2. PCR products;M. DL 2000 DNA Marker

频率、等位基因频率、杂合度(*He*)、有效等位基因数(*Ne*)和多态信息含量(*PIC*)。对数据进行卡方检验,参考文献[15]的方法检验 Hardy-Weinberg 平衡状态。

考虑到试验鸡群遗传背景一致,饲养管理相同,构建如下一般线性模型: $Y_{ijk} = \mu + G_j + e_{ijk}$ 。式中: Y_{ijk} 表示各个体性状测定值, μ 表示群体均值, G_j 表示基因型效应, e_{ijk} 表示随机误差。

2 结果与分析

2.1 OCX-32 外显子 4 的 PCR 扩增及 PCR-*Nco* I-RFLP 酶切分析

OCX-32 基因第 4 外显子在 4 个地方鸡品种中的扩增产物均为 1 条 250 bp 的特异性条带,其中五华鸡的扩增结果见图 1。该片段经 PCR-*Nco* I-RFLP 检测,发现在 494 位核苷酸处存在 A $\rightarrow$ C 突变,表现为 3 种基因型(图 2):AA(250 bp)、AC(250 bp+194 bp+56 bp)和 CC(194 bp+56 bp),其中五华鸡的酶切结果见图 2。

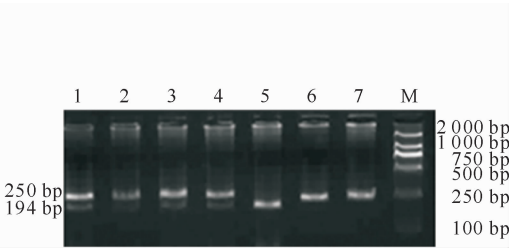


图 2 五华鸡 OCX-32 基因 A494C 位点的酶切结果
1~4. AC 基因型;5. CC 基因型;6,7. AA 基因型;
M. DL 2000 DNA Marker
Fig. 2 Enzyme digestion at A494C site on OCX-32 gene of Wuhua chicken
1—4. Genotype AC;5. Genotype CC;6,7. Genotype AA;
M. DL 2000 DNA Marker

2.2 不同品种鸡 OCX-32 基因外显子 4 的遗传多态性分析

4 个地方鸡品种 OCX-32 外显子 4 的基因型和

等位基因频率、杂合度(*He*)、多态信息含量(*PIC*)等指标的计算结果见表 1。

表 1 4 个品种鸡 OCX-32 基因外显子 4 A494C 位点的遗传多态性分析

Table 1 Genetic polymorphism indexes of A494C site at exon 4 in OCX-32 gene of four different chicken breeds

品种 Breeds	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency		<i>He</i>	<i>PIC</i>	卡方检验 χ^2 -test
	AA	AC	CC	A	C			
淮南麻黄鸡 Huainan partridge chicken	0.26	0.45	0.29	0.49	0.51	0.50	0.37	2.76
五华鸡 Wuhua chicken	0.24	0.47	0.29	0.48	0.52	0.50	0.37	0.26
淮北麻鸡 Huaibei ma chicken	0.21	0.56	0.24	0.49	0.51	0.49	0.37	0.48
皖南三黄鸡 Wannan sanhuang chicken	0.23	0.41	0.36	0.43	0.57	0.49	0.37	1.58

由表 1 可知,在 4 个地方鸡品种中,AC 基因型所占比例均较高,所检测样本群体均处于中度多态;卡方检验结果表明,4 个群体在 A494C 位点都处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

2.3 OCX-32 基因外显子 4 基因型与淮南麻黄鸡蛋品质的相关性分析

由表 2 可知,不同基因型对淮南麻黄鸡蛋形指数、蛋壳厚度、蛋壳强度、蛋黄色泽和蛋黄比率均无

表 2 淮南麻黄鸡 OCX-32 基因外显子 4 A494C 位点不同基因型与其蛋品质的相关性分析

Table 2 Relationship between genotypes of A494C site at exon 4 in OCX-32 gene and egg quality of Huainan partridge chicken

性状 Traits	基因型 Genotype			P 值 P value
	AA	AC	CC	
开产蛋质量/g Egg weight at first laying	32.87±3.11 a	34.02±3.73 ab	34.82±5.41 b	0.022
30 周龄蛋质量/(g·枚 ⁻¹) Egg weight at 30th week	42.96±2.53 a	43.46±2.71 ab	44.21±2.58 b	0.035
蛋形指数 Egg-shape index	1.28±0.04 a	1.28±0.06 a	1.28±0.04 a	0.827
蛋壳厚度/mm Shell thickness	0.42±0.02 a	0.42±0.02 a	0.42±0.03 a	0.969
蛋壳强度/(kg·cm ⁻²) Shell strength	4.75±0.61 a	4.73±0.60 a	4.90±0.65 a	0.215
蛋白高度/mm Albumen height	6.58±0.79 a	6.21±0.75 b	6.49±0.87 a	0.014
蛋黄色泽 Yolk color	5.99±0.93 a	5.89±1.00 a	5.87±0.92 a	0.749
哈氏单位 Haugh unit	86.10±4.88 a	84.12±4.39 b	85.30±5.28 ab	0.045
蛋黄比率/% Percent of yolk	31.78±1.86 a	31.74±2.36 a	31.58±1.69 a	0.818

注:同行数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),标相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$)。

Note: Different lowercase letters in each row mean the difference is significant ($P<0.05$), while same lowercase letters in each row indicate that the difference is not significant ($P>0.05$).

3 讨 论

OCX-32 是壳腺分泌的一种基质蛋白,因具有抗菌和可能终止蛋壳钙化的功能而备受研究人员的关注^[16-17]。Takahashi 等^[18]研究发现,鸡 9 号染色体上具有影响蛋品质性状的数量性状基因座(QTL),并建议将 OCX-32 基因作为影响蛋品质性状的候选基因。OCX-32 基因位于鸡 9 号染色体上,包括 6 个外显子和 5 个内含子^[6],外显子 1 上存在 rs16680302 和 rs16680303 2 个突变位点^[11],外显子 2—6 上发现 28 个 SNPs 和 1 个碱基缺失^[19]。本试验发现,OCX-32 基因外显子 4 第 494 位点存在 A→C 的突变,安徽省 4 个地方鸡品种试验群体在 A494C 位点均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,4 个地方鸡品种群体均表现为中度多态,遗传多样性都比较丰富。这可能是由于 4 个家禽品种都是安徽省的地方品种,经过长期的进化与选择,在所处的生态环境条件下,形成了适应环境的遗传特性。

有研究表明,OCX-32 基因对鸡蛋的蛋品质(蛋壳颜色、蛋白高度、蛋质量、蛋黄质量、鸡蛋纵径长度和鸡蛋横径长度等)^[9,19]和产蛋率^[11]有显著影响。本试验表明,OCX-32 基因外显子 4 的 A494C 位点

显著影响($P>0.05$);但对开产蛋质量、30 周龄蛋质量、蛋白高度和哈氏单位影响显著($P<0.05$)。CC 基因型的开产蛋质量和 30 周龄蛋质量比 AA 基因型分别高 5.93%和 2.91%($P<0.05$);AA 和 CC 基因型的蛋白高度比 AC 基因型分别高 5.96%和 4.51%($P<0.05$);AA 基因型的哈氏单位比 AC 基因型高 2.35%($P<0.05$)。

基因多态性与淮南麻黄鸡开产蛋质量、30 周龄蛋质量、蛋白高度和哈氏单位显著相关($P<0.05$)。CC 基因型的开产蛋质量和 30 周龄蛋质量显著高于 AA 基因型;AA 和 CC 基因型的蛋白高度显著高于 AC 基因型;AA 基因型的哈氏单位显著高于 AC 基因型($P<0.05$)。针对淮南麻黄鸡生产中蛋质量小的缺点,C 等位基因型的选择有利于提高淮南麻黄鸡的蛋质量。但由于试验群体样本量的限制,C 等位基因是否可以作为提高蛋质量的有利基因,还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] Miksik I, Eckhardt A, Sedlakova P, et al. Proteins of insoluble matrix of avian (*Gallus gallus*) eggshell [J]. Connect Tissue Res, 2007, 48(1): 1-8.

[2] Hincke M T, Gautron J, Mann K, et al. Purification of ovocalyxin-32, a novel chicken eggshell matrix protein [J]. Connect Tissue Res, 2003, 44(Suppl. 1): 16-19.

[3] Dominguez-Vera J M, Gautron J, Garcia-Ruiz J, et al. The effect of avian uterine fluid on the growth behavior of calcite crystals [J]. Poultry Science, 2000, 79(6): 901-907.

[4] Hernandez-Hernandez A, Gomez-Morales J, Rodriguez-Navarro A B, et al. Identification of some active proteins in the process of hen eggshell formation [J]. Cryst Growth Des, 2008, 8(11):

4330-4339.

[5] Gautron J, Hincke M T, Nys Y. Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens [J]. *Connect Tissue Res*, 1997, 36(3): 195-210.

[6] Gautron J, Hincke M T, Panheleux M, et al. Ovocalyxin-32, a novel chicken eggshell matrix protein. isolation, amino acid sequencing, cloning, and immunocytochemical localization [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 39243-39252.

[7] Rose-Martel M, Du J, Hincke M T. Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(9): 2697-2706.

[8] Xing J, Wellman-Labadie O, Gautron J, et al. Recombinant eggshell ovocalyxin-32; Expression, purification and biological activity of the glutathione S-transferase fusion protein [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2007, 147(2): 172-177.

[9] Takahashi H, Sasaki O, Nirasawa K, et al. Association between ovocalyxin-32 gene haplotypes and eggshell quality traits in an F₂ intercross between two chicken lines divergently selected for eggshell strength [J]. *Anim Genet*, 2010, 41(5): 541-544.

[10] Dunn I C, Joseph N T, Bain M, et al. Polymorphisms in eggshell organic matrix genes are associated with eggshell quality measurements in pedigree Rhode Island Red hens [J]. *Anim Genet*, 2009, 40(1): 110-114.

[11] Uemoto Y, Suzuki C, Sato S, et al. Polymorphism of the ovocalyxin-32 gene and its association with egg production traits in the chicken [J]. *Poultry Science*, 2009, 88(12): 2512-2517.

[12] Dunn I C, Rodriguez-Navarro A B, Mcdade K, et al. Genetic variation in eggshell crystal size and orientation is large and these traits are correlated with shell thickness and are associated with eggshell matrix protein markers [J]. *Anim Genet*, 2012, 43(4): 410-418.

[13] Yang K T, Lin C Y, Liou J S, et al. Differentially expressed transcripts in shell glands from low and high egg production strains of chickens using cDNA microarrays [J]. *Anim Reprod Sci*, 2007, 110(1): 113-124.

[14] 李俊营,詹凯,李绍全,等. 淮南麻黄鸡 30 周龄蛋品质性状相关分析 [J]. *中国农学通报*, 2011, 27(32): 10-13.

Li J Y, Zhan K, Li S Q, et al. Correlated analysis on egg quality traits of Huainan partridge chicken at 30 weeks age [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(32): 10-13. (in Chinese)

[15] 张向楠,孙伟,储明星,等. 绵羊催乳素受体基因外显子 10 多态性及其与产羔数相关分析 [J]. *中国畜牧杂志*, 2012, 48(17): 1-6.

Zhang X N, Sun W, Chu M X, et al. Analysis on genetic polymorphism of exon 10 of prolactin receptor gene and its relationship with litter size of sheep [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2012, 48(17): 1-6. (in Chinese)

[16] Wellman-Labadie O, Picman J, Hincke M T. Antimicrobial activity of cuticle and outer eggshell protein extracts from three species of domestic birds [J]. *Br Poult Sci*, 2008, 49(2): 133-143.

[17] 左珂菁,张祥斌,冀君,等. 禽抗微生物肽的结构、分布及活性研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2008(4): 38-46.

Zuo K J, Zhang X B, Ji J, et al. Avian antimicrobial proteins: Structure, distribution and activity [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(4): 38-46. (in Chinese)

[18] Takahashi H, Yang D, Sasaki O, et al. Mapping of quantitative trait loci affecting eggshell quality on chromosome 9 in an F₂ intercross between two chicken lines divergently selected for eggshell strength [J]. *Anim Genet*, 2009, 40(5): 779-782.

[19] Fulton J E, Soller M, Lund A R, et al. Variation in the ovocalyxin-32 gene in commercial egg-laying chickens and its relationship with egg production and egg quality traits [J]. *Anim Genet*, 2012, 43(Suppl. 1): 102-113.