

# 鸡 FSHB 和 ESRA 基因 SNPs 分析与早期产蛋性能关系

周俊<sup>1</sup>, 虞德兵<sup>2</sup>, 洪坤月<sup>2</sup>, 汪峰<sup>2</sup>, 杜文兴<sup>2</sup>

(1 江苏畜牧兽医职业技术学院, 江苏泰州 225300; 2 南京农业大学 动物科技学院, 江苏南京 210095)

**摘要:** 采用 PCR-SSCP 法对 85 羽绿壳蛋鸡进行促卵泡激素 B 亚基 (FSHB) 和雌激素受体 A 亚基 (ESRA) 基因多态性检测并测序, 分析其与早期产蛋性状的关系。基因 FSHB 和 ESRA 都发现了多态, 测序结果表明: FSHB 启动子 2 位点有 3 处 SNPs, 分别是: A2464G, -450 插入碱基 A, A2405G。FSHB 外显子 3 有 1 处碱基突变, 即 A2447G; ESRA 基因 5'UTR 区有 4 处碱基变异, 分别是: A234G, T276C, T279C, C2102T。ESRA 基因内含子 1 区发现 3 处 SNPs, 分别是: T122C, A155G, C169T。与早期 (36 周) 产蛋关系分析表明, FSHB 基因调控区的 AA 基因型 36 周平均产蛋量显著高于 AB 型 ( $p < 0.05$ ), 没有发现 BB 型, 外显子 3 的 AA 型和 AB 型开产日龄呈显著相关 ( $p < 0.05$ ), 也没发现 BB 型; ESRA 基因 5'侧翼调控区的 CC 型和 CD 型 36 周平均产蛋量差异显著 ( $p < 0.05$ ), 而没发现 DD 型, 其他均不显著 ( $p > 0.05$ )。

**关键词:** 鸡; 促卵泡激素 B 亚基; 雌激素受体 A 亚基; 产蛋性能

**中图分类号:** S831.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2008)05-0049-04

## Single Nucleotide Polymorphisms in FSHB and ESRA Genes of Blue Eggshell Chicken and Association with Early Egg Production

ZHOU Jun<sup>1</sup>, YU De2bing<sup>2</sup>, HONG Kun2yue<sup>2</sup>, WANG Feng<sup>2</sup>, DU Wen2xing<sup>2</sup>

(1. Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary College, Taizhou 225300, China;

2. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Follicle-stimulating hormone beta (FSHB) subunit gene and estrogen receptor alpha (ESRA) subunit gene were selected as two candidates to screen the genomic variation by means of PCR-SSCP and sequences mensuration in blue eggshell chicken (85 individuals), and the association of FSHB and ESRA genes polymorphisms with early egg production traits were analyzed. Polymorphisms were detected in FSHB and ESRA genes, the results showed that three nucleotide variation at A2464G, 2450A insertion, A2405G, were identified in FSHB promoter region, and a nucleotide variation at A2447G in FSHB exon 3; Four SNPs, A234G, T276C, T279C, C2102T, were identified in ESRA 5' flanking regulation region, and three nucleotide variation at T122C, A155G, C169T in ESRA intron 1. Association analysis of early egg production traits showed that the egg number at 36 weeks of genotype AA was higher than that of AB ( $p < 0.05$ ), genotype BB was not found in FSHB promoter region; Moreover, in exon 3 site, the age at first egg was also significant difference between AA and AB ( $p < 0.05$ ), neither genotype BB was found. The egg number at 36 weeks was significant difference between CC and CD genotypes of ESRA 5' flanking regulation region ( $p < 0.05$ ) in blue eggshell chicken, genotype DD was not found. Rest is no difference ( $p > 0.05$ ).

**Key words:** Chicken; FSHB subunit gene; ESRA subunit gene; Egg production traits

促卵泡激素 (Follicular stimulate hormone, FSH) 是由动物垂体前叶嗜碱性细胞分泌的一种糖蛋白类促

性腺激素, 它是由两个非共价结合可解离的 A 和 B 亚基所组成的, 在下丘脑-垂体-性腺生殖轴中起

收稿日期: 2008-06-29

基金项目: 江苏省农业三项工程项目 (SX (2003) 046); 泰州市科技发展计划项目 (TL0812)

作者简介: 周俊 (1976-), 男, 江苏泰兴人, 讲师, 在读博士, 主要从事畜禽生产等方面的研究。

通讯作者: 杜文兴 (1961-), 男, 江苏张家港人, 副教授, 博士, 主要从事家禽生产研究。

到重要的作用。生长中的卵泡会由于 FSH 分泌量不足或其本身对 FSH 的不敏感而引起卵泡闭锁。研究证明, 给切除脑下垂体的母禽注射垂体前叶促卵泡素剂, 可促进发生萎缩的卵泡继续生长<sup>[1]</sup>。FSHB 亚基基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 它与 A 亚基结合后具有特异的生物学活性。研究表明, 家禽血浆中 FSHB 的含量受到光照、饥饿和年龄等多种因素的影响, 进而影响到家禽的产蛋量<sup>[2- 4]</sup>。雌激素受体 (Estrogen receptor, ESR or ER) 是一种与特异激素应答 DNA 元件相结合的激活转录因子, 有 ESRA、ESRB 2 种亚型, 它广泛存在于各种动物体内, 具有转录调控蛋白质的功能, 能影响雌激素基因在雌性脊椎动物组织的表达与调控, 从而对雌性繁殖周期中卵泡的生长发育发挥作用。

目前, 国内外对猪的 FSHB 和 ESRA 基因多态性的研究比较成熟。根据赵要风等<sup>[5]</sup>、陈杰等<sup>[6]</sup>、李盛霖等<sup>[7]</sup>、刘卫东等<sup>[8]</sup>、Rothschild 等<sup>[9]</sup>、姜运良等<sup>[10]</sup>、丁家桐等<sup>[11]</sup>、张冬杰等<sup>[12]</sup> 的研究, 发现猪的 FSHB

亚基和 ESRA 亚基基因存在丰富的多态性并证实与繁殖性能有关。但是, 关于鸡的 FSHB、ESRA 基因多态性研究很少, 本试验对绿壳蛋鸡 FSHB、ESRA 基因的多态性进行检测, 并通过测序找出 SNPs 位点, 分析其与绿壳蛋鸡 36 周产蛋性状间的关系, 以便为绿壳蛋鸡的品种选育和标记辅助选择提供理论依据。

# 1 材料和方法

## 111 试验鸡群

85 只绿壳蛋母鸡来自南京农业大学江浦农场, 翅下静脉采血, 用 ACD 抗凝, - 20℃ 保存备用。所采血样用常规的酚/氯仿抽提法提取基因组 DNA, 并稀释成 50 ng/μL 备用。记录鸡群产蛋性状。

## 112 PCR 扩增及分型

根据 GenBank 上登陆的鸡 FSHB (GenBank 序列号: AF467082) 和 ESRA (GenBank 序列号: NC 006090) 基因的序列, 应用 Primer Premier 5.10 设计引物。引物序列及各引物的 PCR 退火温度见表 1。

表 1 引物序列及退火温度

Tab. 1 Primers sequences of PCR SSCP and annealing in this study

引物编号 Primer code	引物序列 Sequences	产物长度/bp PCR length	退火温度/℃ Annealing temperature
FSHB pro 2	F: 5'TTATGTAGCCCACTGAGGA2'3' R: 5'ACGTCAATCCCAAAGTATA2'3'	171	59.5
FSHB exon 3	F: 5'GCAACATCCATGCCCTTACT2'3' R: 5'CGTGCCATTGTGTAAGTG2'3'	227	59
ESRA 5'UTR	F: 5'TGCCCTTCCAGTGCTCAC2'3' R: 5'CAGTGCCCTGAATCTGGTG2'3'	264	60
ESRA intron 1	F: 5'ATGCTTAGTAACATTGGAT2'3' R: 5'CTCTCACGAATGCTGTGGCC2'3'	305	55

PCR 反应体系为 15 μL: 10 × Buffer 11.5 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1 μL, 215 mmol/L dNTP 1 μL, 正反向引物各 1 μL, 5 U/μL Tag DNA 聚合酶 0.12 μL, 模板 DNA 115 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 55~ 60℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 45 s, 返回到变性过程, 运行 32 个循环, 72℃ 后延伸 10 min, 4℃ 保存。扩增产物加入变性剂在 98℃ 条件下变性 10 min, 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分型, 银染。PCR2 SSCP 结果呈共显性遗传, 其基因型直接反映表型。

## 113 统计分析

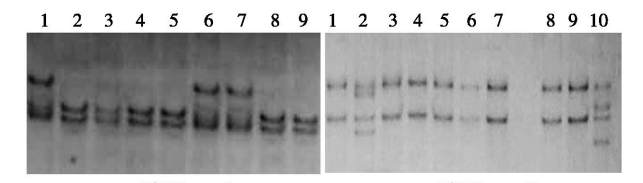
统计 FSHB 和 ESRA 各基因型检出个数, 计算基因型频率和基因频率, 运用 SPSS 13.10 软件统计分析基因型与产蛋性状相关性。

# 2 结果与分析

## 211 PCR2SSCP 和 SNPs 检测

经 PCR 扩增, 获得清晰的目的条带, 可以进行 SSCP 检测, 结果表明: 绿壳蛋鸡 FSHB 基因 2 个位点

都有多态性, 共有 3 种基因型, 但只发现了 2 种基因型。经测序知 FSHB pro 2 位点, 有 3 处 SNPs, 分别是: A2464G, 2450 插入碱基 A, A2405G; 外显子 3 有 1 处碱基突变, 即 A2447G, 这个突变发生在 FSHB cDNA 的 3'非编码区, 不参与 FSHB 蛋白氨基酸编码。



FSHB pro 2  
FSHB exon 3  
FSHB pro 2: 1, 6, 7 为 AB 型; 2, 3, 4, 5, 8, 9 为 AA 型。FSHB exon 3: 2, 10 为 AB 型; 其他都为 AA 型。  
FSHB pro 2: 1, 6, 7. AB genotype; 2, 3, 4, 5, 8, 9. AA genotype. FSHB exon 3: 2, 10. AB genotype; others. AA genotype.

图 1 绿壳蛋鸡促卵泡激素 B 亚基基因 PCR2SSCP 扩增结果  
Fig. 1 Results of follicle stimulating hormone beta (FSHB) subunit gene of blue eggshell chicken by means of PCR2SSCP

绿壳蛋鸡的 ESRA 基因 5'侧翼调控区和内含子

1 区也都存在多态, 共有 3 种基因型。ESRA 5c2UTR 区只发现 2 种基因型, 把杂合型 CD 测序并与 Gen2 Bank 上的序列比对, 发现有 4 处碱基差异, 分别是: A234G, T276C, T279C, C2102T。这 4 处 SNPs 均发生在 ESRA 基因 cDNA 的 5c 侧翼非编码区, 并不参与氨基酸编码。ESRA 基因内含子 1 位点发现 3 处 SNPs, 分别是: T122C, A155G, C169T。

212 绿壳蛋鸡早期产蛋性状间的相关性分析

绿壳蛋鸡早期产蛋性状间的相关性分析结果见表 2, 开产日龄与 36 周产蛋量呈极显著的负相关( $p<0.01$ ), 由此可以推断, 开产越早, 36 周龄产蛋量越多。

表 2 绿壳蛋鸡各性状间的相关分析(n= 85)

Tab.2 The correlation analysis between traits in blue eggshell chicken			
性状 Characters	蛋型指数平均 The average egg based index	30~ 31 周平均蛋重 The average egg weight of 30- 31weeks	36 周产蛋量 Production of eggs of 36 weeks
开产日龄 The day to start producing eggs	- 0.231	0.159	- 0.591**
蛋型指数平均 The average egg based index		0.030	0.167
30~ 31 周平均蛋重 The average egg weight of 30- 31weeks			- 0.174

注: \*\* 表示  $p<0.01$ 。Note: \*\* differ at  $p<0.01$  level respectively.

213 FSHB和ESRA 基因型频率和基因频率

根据检测样品的基因型及检出总数, 计算 FSHB 和 ESRA 的基因型频率和基因频率, 结果见表 3, 由表 3 可以看出, 绿壳蛋鸡 FSHB 基因 exon 3 位点和 pro2 位点都是 AA 型的频率最高, 且等位基因 A 的频率远高于等位基因 B 的频率; ESRA 的 5c 侧翼调控区基因型 CC 的频率最高, 没有发现 DD 型, 等位

表 3 ESRA 和 FSHB 的基因型频率和基因频率

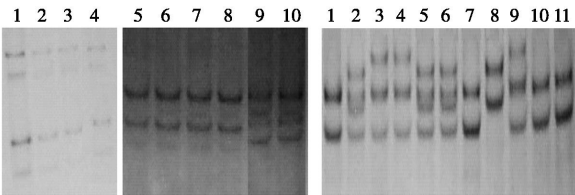
Tab.3 Distribution of genotypic and allelic frequencies of ESRA and FSHB						
基因名称 Gene name	基因型频率 Genotype frequencies			等位基因及频率 Allele and Frequency		$V^2$
	基因型 Genotype	个体数 Individual number	频率 Frequency	A/C/E	B/D/F	
FSHB pro 2	AA	75	0.93	0.96	0.04	0.009
	AB	6	0.07			
	BB	0	0			
FSHB exon 3	AA	76	0.94	0.97	0.03	0.005
	AB	5	0.06			
	BB	0	0			
ESRA 5c2UTR	CC	54	0.72	0.86	0.14	0.518
	CD	21	0.28			
	DD	0	0			
ESRA intron 1	EE	30	0.44	0.60	0.40	7.153
	EF	22	0.32			
	FF	16	0.24			

注:  $V_{0.105(1)}^2=31.84$ ,  $V_{0.105(2)}^2=51.99$ ,  $V_{0.10(2)}^2=91.21$ 。

214 FSHB和ESRA 基因型与产蛋性状关系

计算 FSHB 和 ESRA 各基因型的平均开产日龄, 蛋型指数, 30~ 31 周平均蛋重和 36 周平均产蛋数及标准差, 比较结果见表 4。

由表 4 可知, 绿壳蛋鸡 FSHB 基因 pro 2 位点 AA



ESR  $\alpha$  5'-UTR  
ESRA 5c2UTR: 5, 6, 7, 8 为 CC 型; 1, 2, 3, 4, 9, 10 为 CD 型。  
ESRA intron1: 1, 7, 10, 11 为 EE 型; 8 为 FF 型; 2, 3, 4, 5, 6, 9 为 EF 型。  
ESRA 5c2UTR: 5, 6, 7, 8. CC genotype; 1, 2, 3, 4, 9, 10. CD genotype.  
ESRA intron1: 1, 7, 10, 11. EE genotype;  
8. FF genotype; 2, 3, 4, 5, 6, 9. EF genotype.

图 2 绿壳蛋鸡雌激素受体 A 亚基 PCR2SSCP 扩增结果  
Fig.2 Results of estrogen receptor alpha(ESRA) subunit gene of blue eggshell chicken by means of PCR2SSCP

基因 C 频率为 0.86, D 的频率为 0.14, C 为优势基因; ESRA 的内含子 1 基因型 EE 的频率最高, FF 型的频率最低, 而且等位基因 E 的频率高于 F 的频率。经  $V^2$  检验, 基因型分布除 ESRA 内含子 1 基因处于 HardyWeinberg 不平衡状态外, 其他都处于平衡状态。

型和 AB 型 36 周平均产蛋量差异达显著水平( $p<0.05$ ); FSHB 基因外显子 3 的 AA 型开产日龄显著早于 AB 型的开产日龄( $p<0.05$ ), 36 周平均产蛋量也接近显著( $p=0.08$ ), 表明开产越早, 36 周产蛋量越多, 这与表 2 结果相符; ESRA 基因 5c 侧翼调控区的 CC 型

和CD型36周平均产蛋量差异显著( $p<0.05$ )。

表4 FSHB和ESRA不同基因型绿壳蛋母鸡产蛋性状间的比较

Tab. 4 Association between FSHB and ESRA genotypes and egg production traits in blue eggshell chicken						
基因名称 Gene name	基因型 Genotype	N	开产日龄 The day to start producing eggs	蛋型指数平均 The average egg-based index	30~ 31 周平均蛋重 The average egg weight of 30- 31 weeks	36 周产蛋数 Production of eggs of 36 weeks
FSHB pro 2	AA	75	148.171 ± 81.81	11.32 ± 0.05	451.55 ± 31.30	701.37 ± 101.47a
	AB	6	154.150 ± 61.41	11.31 ± 0.06	471.12 ± 51.23	611.50 ± 71.71b
	BB	0	0	0	0	0
FSHB exon 3	AA	76	148.153 ± 81.51a	11.32 ± 0.04	451.56 ± 31.38	701.24 ± 101.49
	AB	5	158.140 ± 71.80b	11.34 ± 0.07	471.35 ± 41.64	611.80 ± 81.23
	BB	0	0	0	0	0
ESRA 5cUTR	CC	54	149.148 ± 71.05	11.32 ± 0.05	451.89 ± 31.50	671.48 ± 91.71a
	CD	21	149.110 ± 121.98	11.32 ± 0.05	451.32 ± 31.31	731.57 ± 111.02b
	DD	0	0	0	0	0
ESRA intron 1	EE	30	147.160 ± 61.44	11.32 ± 0.05	461.22 ± 31.14	701.57 ± 91.71
	EF	22	149.118 ± 61.51	11.31 ± 0.04	441.45 ± 41.38	701.14 ± 91.05
	FF	16	149.163 ± 71.92	11.32 ± 0.05	461.04 ± 31.13	671.88 ± 91.56

注: 同一基因区段同列不同小写字母表示差异显著( $p<0.05$ )。  
Note: Means in the same column with different lowercase significantly differ at  $p<0.05$ .

3 讨论

鸡的产蛋性能是重要的经济性状,但其遗传力较低,直接选择收效甚微,随着分子生物技术的发展,人们开始寻找可用于标记辅助选择的主基因或遗传标记。近年来,通过PCR2RFLP及PCR2SSCP等方法,已检测出FSHB基因和ESRA基因在羊、猪、牛上存在丰富的多态,与繁殖性能相关。本试验对鸡的FSHB基因调控区和外显子3,ESRA基因的5c侧翼调控区和内含子1区进行PCR2SSCP检验,发现绿壳蛋鸡的以上4个基因位点都存在突变,与早期产蛋性状关系分析表明:FSHB基因pro2位点AA型和AB型36周平均产蛋量差异达显著水平( $p<0.05$ );FSHB基因外显子3的AA型开产日龄显著早于AB型的开产日龄( $p<0.05$ );ESRA基因5c侧翼调控区的CC型和CD型36周平均产蛋量差异显著( $p<0.05$ )。本试验结果说明,ESRA基因和FSHB基因在鸡上也存在多态,显著影响绿壳蛋鸡早期的产蛋性能,可以作为与繁殖性能相关的分子标记运用于绿壳蛋鸡的选育。

参考文献:

[1] 杨山,李辉.现代养鸡[M].北京:中国农业出版社,2002:35-36.  
[2] Lewis P D, Perry G C, Morris T R. et al. Effect of constant and of changing photoperiod on plasma LH and FSH concen2

trations and age at first egg in layer strains of domestic pullets [J]. Br Poult Sci, 1998, 39(5): 662- 670.  
[3] Lewis P D, Ciccone N, Sharp P J, et al. Light intensity can in2fluence plasma FSH and age at sexual maturity in domestic pullets[J]. Br Poult Sci, 2005, 46(4): 506- 509.  
[4] 额尔敦木图,陈耀星,王子旭,等.单色光对蛋鸡产蛋高峰期的影响[J].中国农业大学学报,2007,12(1): 11.  
[5] 赵要风,李 宁,陈永福,等.猪FSHB2亚基基因RFLP的研究初报[J].畜牧兽医学报,1998,29(1): 23- 26.  
[6] 陈 杰,姜志华,刘红林,等.二花脸猪FSHB亚基位点PCR2SSCP标记与产仔数关系初探[J].南京农业大学学报,1999,22(2): 55- 58.  
[7] 李盛霖,林长光,朱志明,等.大白、长白及其杂交母猪FSHB基因多态性与繁殖性状的相关分析[J].福建农业学报,2006,21(4): 7.  
[8] 刘卫东,吴常信,陶 立.中国地方品种淮猪FSHB亚基、ESR和HAL基因的多态性及其产仔效应分析[J].中国畜牧杂志,2006(15): 1.  
[9] Rothschild M F, Larson R G, Jacobsen C, et al. Pvu 2 polymorphism at the porcine estrogen receptor(ESR) locus[J]. Animal Genetics, 1991, 22: 448.  
[10] 姜运良,李 宁,习欠云,等.猪雌激素受体基因(ESR)点突变的PCR2SSCP检测[J].遗传,2000,22(4): 214- 216.  
[11] 杜晓惠.鸡多趾候选基因的SNPs及表达差异研究[D].雅安:四川农业大学,2005.  
[12] 张冬杰,杨国伟,刘 娣.猪雌激素受体基因(ESR)一个新多态位点的发现[J].遗传,2006,28(1): 007.