

拉萨白鸡 PMEL17 基因第 10 外显子序列突变的研究

冯 静¹, 石海仁¹, 鹏 达¹, 郑晓彤², 张 浩², 马雪英^{1*}

(1. 西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所, 西藏 拉萨 850009; 2. 中国农业大学动物科学技术学院, 中国 北京 100094)

摘 要:为研究拉萨白鸡显性白羽 PMEL17 基因第 10 外显子序列突变, 选用 5 世代 22 周龄的拉萨白鸡 228 羽作为试验材料, 采用 PCR-RFLP 技术分析拉萨白鸡的基因组 DNA 的 PMEL17 基因序列的第 10 外显子上是否存在 9 bp 的插入。结果表明: PMEL17 基因序列的第 10 外显子存在 9 bp 插入突变时, 扩增目的片段长度为 184 和 42 bp, 为 II 基因型纯合子的个体, 且为显性白羽纯合个体; PMEL17 基因序列的第 10 外显子存在 9 bp 插入突变, 且扩增目的片段长度为 217, 184 和 42 bp, 为 Ii 基因型的杂合的个体, 且为显性白羽杂合个体; PMEL17 基因序列的第 10 外显子不存在 9 bp 插入突变, 且扩增目的片段长度为 217 bp, 为 ii 基因型, 且为非显性白羽个体。通过本试验, 为拉萨白鸡今后育种工作的开展提供另一个思路, 通过分子选择 PMEL17 基因序列的第 10 外显子的 9 bp 插入突变作为拉萨白鸡羽毛颜色性状的功能基因的功能基因的分子选育提供了理论基础。

关键词:拉萨白鸡; PMEL17; 第 10 外显子; PCR-RFLP

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

Study on Sequence Mutations With Mutation of Exon 10 of PMEL17 Gene in Lhasa White Chicken

FENG Jing¹, SHI Hai-ren¹, PENG Da¹, ZHENG Xiao-tong², ZHANG Hao², MA Xue-ying^{1*}

(1. Institute of Animal Science, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Tibet Lhasa 850009, China; 2. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: In order to study the mutation of the 10th exon sequence of dominant white feather PMEL17 gene in Lhasa white chicken, 228 feather of Lhasa white chicken, aged 22 weeks and 5 generations, was selected as the experimental material to analyze the presence of 9 bp insertion on the 10th exon of PMEL17 gene sequence in the genomic DNA of Lhasa white chicken by PCR-RFLP technique. The results showed that when there was 9 bp insertion mutation in exon 10 of PMEL17 gene sequence, the amplified target fragment length was 184 and 42 bp, which was a homozygous individual of genotype II and a dominant white feather homozygous individual. The 10th exon of PMEL17 gene sequence had 9 bp insertion mutation, and the amplified target fragment length was 217, 184 and 42 bp. It was a heterozygous individual of Ii genotype and a dominant white-feather heterozygous individual. There was no 9 bp insertion mutation in exon 10 of PMEL17 gene sequence, and the amplified target fragment length was 217 bp, ii genotype and non-dominant white feather individual. This experiment provides another idea for future breeding of Lhasa white chicken, and provides a theoretical basis for molecular breeding of functional genes of Lhasa white chicken feather color traits by molecular selection of 9 bp insertion mutation of exon 10 of PMEL17 gene sequence.

Key words: Lhasa white chicken; PMEL17; Exon 10; PCR-RFLP

拉萨白鸡是以白来航鸡为父本、河谷藏鸡为母本杂交培育的良种蛋鸡, 属轻型蛋用品系^[1]。

显性白羽基因座是影响鸡羽色的一个重要基因

收稿日期: 2019-07-10

基金项目: 国家蛋鸡产业技术体系“拉萨综合试验站, 拉萨白鸡新品种培育”

作者简介: 冯 静 (1981-), 女, 四川名山人, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖调控, E-mail: fengjing0835@sina.com, * 为通讯作者: 马雪英 (1967-), 女, 研究员, 研究方向: 蛋鸡新品种培育与示范推广, E-mail: maxueying006@126.com。

座位, 该基因座位上的显性等位基因 I 对色素沉着, 尤其是真黑色素的合成有抑制作用^[2]。黑素小体是黑色素细胞和视黄醛色素上皮细胞中特殊的溶酶体相关的细胞器^[3]。目前在基因座共发现 4 种等位基因: I (显性白羽), I * S (Smoky, 烟灰色羽色), I * D (Dun, 暗褐色羽色), i (野生型)。Kerje 等^[4]对红色原鸡、白来航等不同品种鸡的 DNA 的 PMEL17 基因序列的第 10 外显子上的 9 bp 插入突变是显性白羽性状形成的主要原因, 所对应的等位

基因为 I,而隐性等位基因 i 不含该突变,由此可见,鸡的 PMEL17 基因编码区的插入或缺失突变与这些等位基因形成有关。鸡的 PMEL17 基因包括 12 个外显子,全长约 4.0 kb,共编码约 788 个氨基酸(GenBank 登录号:AY636127.1)。该基因编码一种黑素细胞特异性蛋白,这种存在于前黑素体基质中的蛋白对黑色素聚积以及黑素细胞的正常发育起着重要作用^[5]。前黑素小体蛋白(Premelanosome protein,PMEL)又称 PMEL17、silver^[6],由 Sliver 基因编码,主要在皮肤黑色素细胞、视网膜色素上皮细胞和眼色素层黑素细胞中进行表达,是黑素小体发育过程中的重要物质^[7-8]。

关于拉萨白鸡显性白羽 PMEL17 第 10 外显子序列突变的研究,目前尚未研究。本试验首次对拉萨白鸡的显性白羽基因 PMEL17 第 10 外显子序列突变进行了分析,为拉萨白鸡今后的羽毛性状的功能基因的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用 5 世代 22 周龄的拉萨白鸡 228 羽作为试验材料,其中花羽公鸡 8 羽,花羽母鸡 36 羽,白羽公鸡 71 羽,白羽母鸡 113 羽(表 1),是由西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所蔡功堂乡拉萨白鸡养殖基地提供。

1.2 试验方法

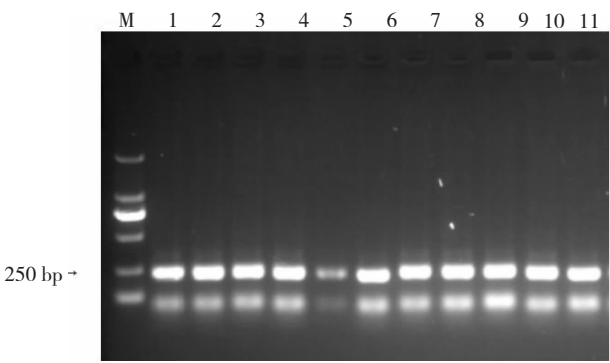
1.2.1 血液采集和 DNA 的提取 采用翅静脉采血 1.5 ~2.0 mL,并且加入同等量的无水乙醇,混匀,常温保存。利用 DNA 血液提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司)提取基因组 DNA,用 Nano-Drop 2000C 超微量分光光度计检测其核酸的浓度及其纯度。

1.2.2 引物设计 根据鸡的 PMEL17 基因第 10 外显子存在 9 bp 插入突变与显性白羽基因有关,Gen-Bank 登录号: AY636127.1,设计引物:上游 5'-AACGGCAACGGCTTGCTGTGG-3',下游 5'-CCG-GTAGGTGTAGGCAGCGGTG-3'^[9]。

1.2.3 试验试剂及试验仪器 DNA 血液提取试剂盒、*Taq* 酶(配套 10 × *Taq* Buffer,25 mmol/L Mg²⁺)、

表 1 不同羽色的拉萨白鸡数量

组别	花羽♂ (羽)	花羽♀ (羽)	白羽♂ (羽)	白羽♀ (羽)
数量	8	36	71	113
合计	228			



M:D2000,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 泳道为 PCR 扩增产物片段。片段长度为 217 bp 或 226 bp

图 1 拉萨白鸡 PMEL17 基因第 10 外显子 PCR 的凝胶图

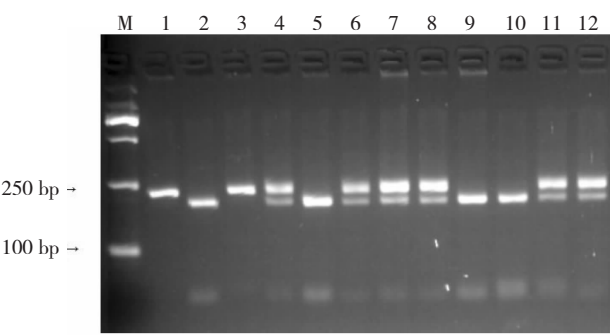
dNTP 均为天根生化科技(北京)有限公司;Nano-Drop 2000C 超微量分光光度计为美国(赛默飞)、DM2000 Marker 为汇天东方科技有限公司;BsrB I 内切酶、2 mL 10 × NEBuffer(内切酶配套)为 NEB 公司;PCR 仪为 BIO-RAD;电泳仪为北京六一仪器厂;UVP 凝胶成像仪为 BIO-RAD。

1.2.4 PCR 扩增体系及反应条件 PCR 扩增体系:反应体积为 20 μl,2 × *Taq* PCR masterMix 10 μl,10 pmol/L 上游引物 0.3 μl,10 pmol/L 下游引物 0.3 μl,40 ~50 ng/μl DNA 1.0 μl,加超纯水至 20 μl。

PCR 反应条件:95 ℃预变形 5 min,95 ℃ 30 s,67 ℃ 退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,34 个循环,72 ℃终延伸 7 min,12 ℃保存,最终反应产物 4℃冰箱保存。

1.2.5 RFLP 酶切体系及反应条件 RFLP 酶切体系:反应体积为 20 mL,PCR 反应产物 10 mL,0.5 mL *Bsr*BI 内切酶,2 mL 10 × NEBuffer(内切酶配套),1 μl 2.5 mM 的 MgCl₂,最后加超纯水至 20 μl。

RFLP 反应条件:将上述 RFLP 酶切反应体系加好后,充分混匀后,短暂离心,然后将其放入 37 ℃的恒温箱内反应 4 h 即可。



M:D2000,1、3 泳道为 ii 基因型;2、5、9、10 泳道为 II 基因型;4、6、7、8、11、12 泳道为 Ii 基因型

图 2 拉萨白鸡 PMEL17 基因第 10 外显子 PCE-RFLP 的凝胶图

表 2 拉萨白鸡 PMEL17 基因突变位点的基因型及其基因型频率分布

组别基因型	II 基因型	II 基因型频率	Ii 基因型	Ii 基因型频率	ii 基因型	ii 基因型频率
花羽♂(羽)	1	0.0044	0	0.0000	7	0.0307
花羽♀(羽)	1	0.0044	5	0.0219	30	0.1316
白羽♂(羽)	10	0.0439	44	0.1930	17	0.0745
白羽♀(羽)	19	0.0833	78	0.3421	16	0.0702
合计	31	0.1360	127	0.5570	70	0.3070

2 结果与分析

3 种基因型的检测结果为:花羽公鸡 II 基因型有 1 羽,基因型频率为 0.0044,Ii 基因型有 0 羽,基因型频率为 0.0000,ii 基因型有 7 羽,基因型频率为 0.0307;花羽母鸡 II 基因型有 1 羽,基因型频率为 0.0044,Ii 基因型有 44 羽,基因型频率为 0.0219,ii 基因型有 17 羽,基因型频率为 0.1316;白羽公鸡 II 基因型有 10 羽,基因型频率为 0.0439,Ii 基因型有 44 羽,基因型频率为 0.1930,ii 基因型有 17 羽,基因型频率为 0.0745;白羽母鸡 II 基因型有 19 羽,基因型频率为 0.0833,Ii 基因型有 78 羽,基因型频率为 0.3421,ii 基因型有 16 羽,基因型频率为 0.0702;总的 II 基因型有 31 羽,基因型频率为 0.1360,Ii 基因型有 127 羽基因型频率为 0.5570,ii 基因型有 70 羽,基因型频率为 0.3070(表 2)。

本试验是通过 780 羽母鸡、161 羽公鸡翅静脉采血,提取 DNA,然后通过 PCR-RFLP 技术对其分析,最后将含有 Ii 基因型和 ii 基因型的母鸡 60 羽和含有 Ii 基因型和 ii 基因型的 9 羽公鸡组群,将其种蛋进行孵化试验,在 22 周龄的时候,将其最后所得的 228 羽拉萨白鸡进行翅静脉采血,通过 PCR-RFLP 技术对其分析,结果表明:Ii 基因型的最多,有 127 羽,Ii 基因型频率为 0.5570,其中花羽公鸡不含有 Ii 基因型,花羽母鸡含有 5 羽 Ii 基因型,其基因型频率为 0.0219,白羽公鸡含有 44 羽 Ii 基因型,其基因型频率为 0.1930,白羽母鸡含有 Ii 基因型 78 羽,其基因型频率为 0.3412;ii 基因型的有 70 羽,位居第二,ii 基因型频率为 0.3070,其中花羽公鸡有 7 羽 ii 基因型,其基因型频率为 0.0307,花羽母鸡含有 30 羽 ii 基因型,其基因型频率为 0.1316,白羽公鸡含有 17 羽 ii 基因型,其基因型频率为 0.0745,白羽母鸡含有 ii 基因型 16 羽,其基因型频率为 0.0702;II 基因型的含量最少,有 31 羽,基因型频率为 0.1360,其中花羽公鸡含有 1 羽 II 基因型,其基因型频率为 0.0044,花羽母鸡含有 1 羽 II 基因型,其基因型频率为 0.0044,白羽公鸡含有 10 羽 II 基因

型,其基因型频率为 0.0439,白羽母鸡含有 19 羽 II 基因型,其基因型频率为 0.0833。

本研究采用 PCR-RFLP 技术分析拉萨白鸡的基因组 DNA 的 PMEL17 基因序列的第 10 外显子上是否存在 9 bp 的插入,发现(图 1~2)PMEL17 基因序列的第 10 外显子存在 9 bp 插入突变时,扩增目的片段长度为 184 和 42 bp,为 II 基因型纯合子的个体,且为显性白羽纯合个体;PMEL17 基因序列的第 10 外显子存在 9 bp 插入突变,且扩增目的片段长度为 217,184 和 42 bp,为 Ii 基因型的杂合的个体,且为显性白羽杂合个体;PMEL17 基因序列的第 10 外显子不存在 9 bp 插入突变,且扩增目的片段长度为 217 bp,为 ii 基因型,且为非显性白羽个体。

3 讨论

在本试验中,其显性白羽杂合个体最多,为 127 羽,基本符合 Ii 基因型个体占总个体数(228 羽)的 1/2,非显性白羽基因 ii 的个体为 70 羽,基本符合 ii 基因型个体占总个体数(228 羽)的 1/4。在此研究基础上,根据实际需要,将其 II 基因型的个体单独组群,就可以得到显性白羽纯合个体;也可以将 Ii 显性杂合个体和 ii 非显性白羽个体组群,从而挑选出我们所需要的基因型;也可以将 ii 基因型单独组群,从而得到花色羽的个体。

动物毛色的形成过程与黑色素的产生和沉淀关系紧密,超过 127 个基因影响毛色的形成过程^[10],但大多数基因是控制黑色素合成或作用于黑色素合成的通路上。动物毛色和羽色一直是育种工作者关注的重要性状,主要受到动物体内黑色素产生和沉积的影响,是多个基因共同作用的结果。黑色素的产生和沉积主要发生在黑素小体的淀粉样纤维结构上^[11-13],PMEL17 基因所编码的前黑素小体蛋白是这一过程所不可或缺的。本研究与 Kerje 等^[4]发现,PMEL17 基因在第 10 外显子上 9 bp 的插入是鸡显性白性状的主要原因,揭示了鸡显性白性状的分子作用、Berson 等^[5]报道的鸡 PMEL 基因编码一种黑色素细胞特异性蛋白,这种存在于前黑素体基质

重的蛋白对黑色素聚集以及黑素细胞正常发育起作用、Martinez等^[14]报道的小鼠 *silv* 基因的突变导致体内黑色素细胞的丢失,从而使得毛色变为银灰色、Menottiraymond等^[15]报道的在家猫上,SILVER位点的突变同样对黑色素的产物存在着一定的影响、李蓓等^[16]报道的银灰色被毛与 PMEL 基因多态性紧密相关、刘小军等^[17]报道的坝上长尾鸡 PMEL17 基因是影响羽色形成的重要基因,通过和其他基因互作对皮肤毛色形成以及其他组织色素形成均有作用、姚文成等^[18]报道的 PMEL17 基因的多态性与鸭羽毛性状具有一定的关联性相一致。

4 结 论

通过本试验,为拉萨白鸡今后育种工作的开展提供另一个思路,通过分子选择 PMEL17 基因序列的第 10 外显子的 9 bp 插入突变作为拉萨白鸡羽毛颜色性状的功能基因的分子选育提供了理论基础。

参考文献:

- [1]单增群佩,扎西,次仁多吉,等. 拉萨白鸡的选育[J]. 西藏畜牧兽医,1991(1):10-19.
- [2]Smyth J R. Genetics of Plumage Skin and Pigmentation in Chickens [A]. In: Crawford RD. Poultry Breeding and Genetics[C]. Elsevier Science, NY, 1990.
- [3]Marks M S, Seabra M C. The melanosome: membrane dynamics in black and white[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001, 2(1): 738-748.
- [4]Kerje S, Sharma P, Gunnarsson U, et al. The Dominant white, Dun and Smoky color variants in chicken are associated with insertion/deletion polymorphisms in the PMEL17 gene[J]. Genetics, 2004, 168(3): 1507-1518.
- [5]Berson J F, Harper D C, Tenza D, et al. Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies[J]. Molecular Biology of The Cell, 2001, 12(11): 3451-3464.
- [6]WATT B, RAPOSO G, MARKS M S. PMEL17: An amyloid determi-

- nant of organelle structure [A]. RIGACCI S, BUCCIANINI M. Functional amyloid aggregation [M]. Trivan drum; Research Signpost, 2010: 89-113.
- [7]李丽莎,李祥龙,毛艳朋. 山羊 PMEL 基因生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(8): 47-50.
- [8]BROUWENSTIJN N, SLAGER E H, BAKKER A B, et al. Transcription of the gene encoding melanoma-associated antigen gp100 in tissues and cell lines other than those of the melanocytic lineage[J]. British Journal of Cancer, 1997, 76(12): 1562-1566.
- [9]邓雪梅,赵娟娟,张熙悦. 一种鸡显性白羽基因的鉴定方法[P]. 中华人民共和国国家知识产权局, CN 104711339 A, 2015-06-17.
- [10]Passeron T, Mantoux F, Ortonne J. Genetic disorders of pigmentation[J]. Clin Dermatol, 2005, 23(1): 56-67.
- [11]杜站宇,徐超,宋兴超,等. Pmel17 在黑素小体成熟过程中的关键作用[J]. 家畜生态学报, 2016, 37(2): 1-7.
- [12]Leonhardt R M, Vigneron N, Hee J S, et al. Critical residues in the PMEL/Peml17 N-terminus direct the hierarchical assembly of melanosomal fibrils[J]. Molecular Biology of the Cell, 2013, 24(7): 964-981.
- [13]李丽莎,彭永东,郑晓宁,等. 山羊 PMEL 基因启动子活性及转录调控原件分析[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(5): 826-835.
- [14]Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, et al. The murine silver locus: coding and expression of a single transcript truncated by the silver mutation[J]. Mammalian Genome, 1999, 10: 1168-1171.
- [15]Menottiraymond M, David V A, Eizirik E, et al. Mapping of the domestic cat 'SILVER' coat color locus identifies a unique genomic location for silver in mammals[J]. Journal of Heredity, 2009, 100(1): S8-S13.
- [16]李蓓,何小龙,赵一萍,等. 马毛色遗传的分子基础与应用[J]. 遗传, 2010, 32(2): 1133-1140.
- [17]刘小辉,周荣艳,彭永东,等. 坝上长尾鸡 peml17 基因核心启动子的鉴定[J]. 生物工程学报, 2018, 34(11): 1750-1759.
- [18]姚文成,王统苗,吴允,等. 鸭 PMEL17 基因多态性与羽毛性相关性研究[J]. 中国家禽, 2018, 40(6): 10-14.