

五华鸡 *Mx* 基因 A2032G 变异位点与禽白血病关联分析

牛娟娟¹, 张群刚¹, 陈兴勇¹, 盛昌树², 耿照玉^{1*}

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽省芜湖市繁昌县动物疫病预防与控制中心, 芜湖 241200)

摘要: *Mx* 基因是具有抗禽流感病毒作用的基因。为探讨 *Mx* 基因 A2032G 变异位点是否与禽白血病有关, 本试验采用 PCR-RFLP 方法, 检测了 99 只 56 周龄五华鸡 *Mx* 基因多态性, 并与禽白血病进行关联分析。检测群体 *Mx* 基因 2032 位点存在 2 个等位基因 A、G, 频率分别为 3.03% 和 96.97%; 两种基因型 AG、GG, 频率分别为 6.06% 和 93.94%。卡方适合性检验显示, 该群体 *Mx* 基因 2032 位点的分布偏离 Hardy-Weinberg 平衡。分析这 2 种基因型与禽白血病阳性率的相关性显示, AG 型群体禽白血病阳性率为 16.67% 低于 GG 型阳性率 58.06%。基于上述结论, 则阴性群体中 AG 型个体多于 GG 型, 以 40 只 1 日龄禽白血病阴性鸡群为对照, 相同方法检测 *Mx* 基因 2032 位点突变率, 共检测到 3 种基因型 AA、AG、GG, 其频率分别为 2.50%、5.00% 和 92.50%, 与上述结论不符。推测五华鸡 GG 型为禽白血病易感群体, 禽白血病阳性检出率可能随日龄而发生变化, 且 AG 基因型的禽白血病易感率低于 GG 基因型。

关键词: 五华鸡; *Mx* 基因; PCR-RFLP; 禽白血病

中图分类号: S858.31

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2014)04-0601-04

Association analysis of A2032G mutation of the *Mx* gene with avian leukosis in Wuhua chickens

NIU Juanjuan¹, ZHANG Qungang¹, CHEN Xingyong¹, SHENG Changshu², GENG Zhaoyu¹

(1. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Wuhu Center for Animal Disease Control and Prevention, Wuhu 241200)

Abstract: In order to verify the correlation between the M2032 locus of *Mx* gene and avian leukosis in Wuhua chickens, PCR-RFLP method was used to analyze the polymorphism of the *Mx* gene at 2032 locus. The frequencies of allele A and G at that locus in the experimental group were 3.03% and 96.97%, respectively. Two genotypes, AG and GG, were detected in 99 Wuhua chickens, with the frequencies of 6.06% and 93.94%, respectively. Chi-square test showed that the frequencies of the *Mx* gene were significantly deviated from Hardy-Weinberg equilibrium. The correlation between genotypes and avian leukosis indicated that the positive rate of avian leukosis in group of AG genotype (16.67%) was numerically lower than that of GG genotype (58.06%). Accordingly, the number of AG genotype would be larger than that of GG genotype. Forty one-day old Wuhua chickens negatively in avian leukosis were used to detect the polymorphism of the *Mx* gene using the same method described as above; however, frequencies of genotypes AA, AG, GG were 2.50%, 5.00% and 92.50%, respectively, which was inconsistent with the above conclusion. We speculate that the GG genotype of Wuhua chickens might be susceptible to avian leukemia. The positive rate of avian leukosis may vary with age. The susceptibility of avian leucosis of AG genotype would be much lower than that of GG genotype.

Key words: Wuhua chicken; *Mx* gene; PCR-RFLP; avian leukosis

禽白血病病毒(Avian leukosis virus, ALV)是以引起禽各种造血细胞肿瘤性增生为特征的一类反转录病毒。根据病毒的囊膜蛋白与宿主细胞特异性相

关的不同抗原可分为 A-J 10 个亚型, 其中 A、B、C、D、E 和 J 亚型可以自然感染鸡群^[1]。禽白血病在世界范围内爆发, 给养禽业造成严重损失^[2]。近年来,

收稿日期: 2013-11-06

基金项目: 安徽省科技攻关项目(12010302058)资助。

作者简介: 牛娟娟, 硕士研究生。E-mail: 398286082@qq.com

* 通信作者: 耿照玉, 教授。E-mail: gzy@ahau.edu.cn

禽白血病的广泛传播也制约了我国养禽产业的发展,不仅表现在各亚型 ALV 的混合感染,并且同个鸡体内还发现 2 种致肿瘤病毒病的共感染^[3-4]。目前常规饲养管理和药物疫苗不能从根本上控制禽白血病的发生,而从遗传上提高禽类抗病能力的抗病育种途径可能是解决问题的有效方法。

Mx 基因(myxo-virus resistance gene),即抗粘液病毒基因,是到目前为止发现的具有抗禽流感病毒作用的基因^[5],其作用受到 IFN α/β 调节,并且抗性和易感性属于常染色体上单一显性等位基因遗传,分别受 Mx^+ 或 Mx^- 等位基因的控制。Ko 等^[6-7]发现 *Mx* 基因 cDNA 第 2032 位处存在 A→G 的突变(S631N),当 *Mx* 基因 cDNA 第 2032 位的碱基为 A 时, *Mx* 蛋白第 631 位氨基酸为天冬酰胺(Asn),该蛋白具有抗流感病毒和棒状疱疹性口炎病毒的活性;当第 2032 位的碱基 A 替换为 G 时,氨基酸由 Asn 替换为丝氨酸(Ser)则无抗病毒活性。自从证实了鸡 *Mx* 蛋白的抗病毒活性与该基因 cDNA 第 2032 位的碱基突变有关,许多研究分析其多态性与鸡经济性状、免疫性状等之间的关联^[8-10],评估通过 *Mx* 基因 A2032G 变异位点对鸡群体抗流感病毒能力进行遗传改良的可能性和可行性。同时研究发现 *Mx* 蛋白还具有较强的抗新城疫病毒生物活性^[11-12],但是目前关于 *Mx* 蛋白基因是否具有抗禽白血病病毒的研究尚未报道,因此本研究试图探讨鸡 *Mx* 基因 A2032G 是否与禽白血病抗性相关。五华鸡是安徽省优良肉蛋兼用型地方品种,2009 年已被认定为国家级新发现畜禽遗传资源,本试验以五华鸡为试验材料,采用禽白血病病毒抗体 ELASA 检测其 ALV 的活性,并结合 PCR-RFLP 方法检测 *Mx* 基因 A2032G 位点处的多态性,进一步分析该多态位点是否与禽白血病有关,为今后将其作为鸡抗禽白血病的有效遗传标记奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

56 周龄五华鸡(99 只)来自安徽省繁昌县钟氏禽业有限公司,另取禽白血病病毒抗体 ELASA 检测为阴性的 1 日龄五华鸡 40 只,翅静脉采血后放入肝素钠抗凝管,天根血液 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, -20℃ 保存备用。

1.2 引物设计

参照刘艳等^[9]的方法设计引物:

F: 5'-CCTTCAGCCTGTTTTCTCCTTTTAGGAA-3'
R: 5'-CAGAGGAATCTGATTGCTCAGGCGTGTA-3'

扩增片段大小为 100 bp,退火温度为 60℃,引物交由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 PCR-RFLP 酶切

PCR 扩增体系为 20 μ L,由 10 μ L Mix, 7 μ L ddH₂O, 1 μ L 上游引物, 1 μ L 下游引物, 1 μ L DNA 构成,反应条件为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环后 72℃ 延伸 5 min,最后放入 4℃ 保存备用。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其扩增结果。PCR-RFLP 反应体系为 32 μ L,分别为 10×Buffer Tango 2 μ L, ddH₂O 18 μ L, PCR 产物 10 μ L, *Rsa* I 2 μ L,轻轻混匀后于 PCR 仪 37℃ 控温 3.5 h, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。

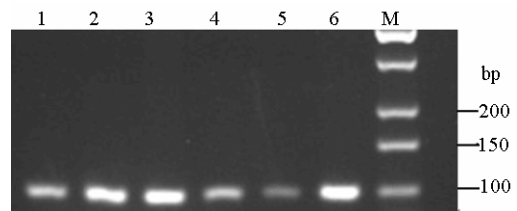
1.4 数据分析

基因频率和基因型频率根据 Hardy-Weinberg 平衡定律进行计算, $p=P+H/2$, $q=Q+H/2$, $\chi^2=\sum d^2/e$, 其中 $d=e-o$ 是期望值与观测值之差, p 、 q 表示给定位点上的等位基因频率。

2 结果与分析

2.1 PCR-RFLP 检测结果

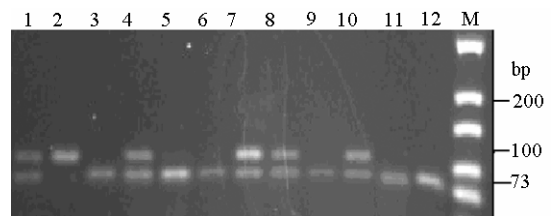
PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1), 片段大小为 100 bp, 与预期结果一致, 可以进行 RFLP 分析。由于 *Rsa* I 酶特异性识别位点 GTAC, 当 2032 位点未突变, 即 2032 位为 G 时,



1-6 为 PCR 产物, M 为 DNA Marker A
1-6 refer to PCR products, M refers to Marker A

图 1 *Mx* 基因 PCR 产物检测

Figure 1 Detection of *Mx* gene PCR products



1、4、7、8、10 为 AG 型, 3、5、6、11、12 为 GG 型, 2 为 AA 型, M 为 DNA Marker A

1, 4, 7, 8, and 10 refer to AG type; 3, 5, 6, 11, and 12 refer to GG type and 2 refers to AA type; M refers to Marker A

图 2 PCR-RFLP 琼脂糖凝胶电泳图谱

Figure 2 Patterns of PCR-RFLP on agarose gel

可以进行消化酶切, 消化后, 产生 GG 基因型 (73 bp/27 bp); 当该位点突变为 A 时, 则不被该内切酶 *Rsa* I 识别, 不可以酶切消化, 产生 AA 基因型 (100 bp); 当 2 个基因位点同时存在时, 产生 AG 基因型 (100 bp/73 bp/27 bp), 电泳图见图 2。

2.2 五华鸡 *Mx* 基因型频率和基因频率

以 56 周龄五华鸡为试验对象, *Mx* 基因经消化

酶切后产生 2 种基因型 GG、AG, 基因型频率分别为 93.94% 和 6.06%, 检测到 2 个等位基因 A、G, 基因频率分别为 3.03% 和 96.97% (见表 1)。卡方检验结果显示, 检测群体 *Mx* 基因 2032 位点在五华鸡群体分布中偏离 Hardy-Weinberg 平衡状态。GG 型群体的阳性检出率为 58.06%, 高于 AG 型的阳性检出率 16.67%。

表 1 *Mx* 基因 A2032G 突变位点与禽白血病关联分析

Table 1 Association analysis of A2032G mutation of the *Mx* gene with avian leukosis in Wuhua chickens

抗性指标 Resistance index	基因型 Genotype		总数/个 Quantity
	GG	AG	
ALV(+)	54	1	55
ALV(-)	39	5	44
总数/个 Quantity	93	6	99
基因型频率/% Genotype frequency	93.94	6.06	
阳性率/% Positive rate	58.06	16.67	

表 2 禽白血病阴性群体基因型频率分布

Table 2 Genotype frequencies' distribution in the negative experimental group in avian leukosis

抗性指标 Resistance index	基因型 Genotype			总数 Quantity
	AA	AG	GG	
ALV (-)	1	2	37	40
基因型频率/% Genotype frequency	2.50	5.00	92.50	

2.3 禽白血病阴性群体基因型频率分布

由表 2 可以看出, 禽白血病阴性群体中 AA 基因型频率为 2.50%, AG 基因型频率为 5.00%, GG 基因型频率为 92.50%。

3 讨论

Li^[13]等分析了矮小型白羽肉鸡 *Mx* 基因 2032 位点多态产生的基因型及频率分布, 其中 GG 型频率为 90.32%, AG 型为 8.06%, AA 型仅为 1.61%。李慧芳^[14]等分析了中国 12 个地方品种中 *Mx* 基因在群体中的频率分布, 其中 AA 型频率平均为 1.3%, 大骨鸡、油鸡、河南斗鸡均未检测到 AA 基因型。推测 AA 基因型在大部分鸡种中为非主导基因型。本试验主要研究了五华鸡禽白血病与网状内皮增生单/双阳性群体中 *Mx* 基因 2032 位点的多态分布, 该群体中亦未检测到 AA 基因型。再次分析五华鸡 1 日龄禽白血病阴性群体, AA 基因型频率仅为 2.5%, 与上述研究结果一致。环境的改变(如禽流感等)及对生产性能的高强度选择可能是导致该位点多态分布不平衡的主要原因^[15]。此外, 基因型频率的差异亦可能在品种形成之初即已存在, 而不受环境、人为因素或基因连锁的影响^[16]。

普遍认为禽类 *Mx* 基因存在抗粘病毒活性, 其抗性受 631 位氨基酸 (2032 位碱基), 即 2032 位点为 A 时, 存在抗性, 2032 位点为 G 时, 抗性丢失, 即 AA 型或 AG 型抗禽流感病毒能力优于 GG 型^[17]。Ko^[18]等分析了 17 个鸡种和 3 个红色原鸡品种, 其中抗性和易感性 *Mx* 基因频率分别为 59.2% 和 40.8%。推测 G/A 多态性可能对其他疾病亦存在抗性。本试验 G/A 多态位点与禽白血病血清学检验结果关联分析, 分析成年母鸡基因型与疾病阳性率结果, 并与 1 日龄禽白血病阴性群体的基因型分布比较, 阴性群体 GG 基因型频率高于成年母鸡。由此推测, 禽白血病阳性检出率可能随日龄而发生变化, 且 AG 基因型禽白血病易感率低于 GG 基因型。

参考文献:

- [1] 崔治中. 鸡白血病及其鉴别诊断和预防控制[J]. 中国家禽, 2010, 32(8): 1-12.
- [2] Payne L N, Brown S R, Bunstead N, et al. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens[J]. J Gen Virol, 1991, 72: 801-807.
- [3] 刘绍琼, 王波. 817 肉杂鸡肉瘤组织分离出 A、J 亚型禽白血病病毒[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(3): 396-401.
- [4] 张振杰, 刘绍琼, 王波, 等. 地方品种皖南黄肉种鸡 ALV-J 与 REV 的共感染及其分子变异分析[J]. 中国农

- 业科学, 2011, 4(11): 2379-2386.
- [5] 丁兆忠, 苗向阳, 孙世. 抗禽流感病毒转基因鸡研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(11): 41-43.
- [6] Ko J H, Jin H K, Asano A, et al. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene[J]. *Genome Res*, 2002, 12(4): 595-601.
- [7] Ko J H, Takada A, Mitsuhashi T, et al. Native antiviral specificity of chicken Mx protein depends on amino acid variation at position 631[J]. *Animal Genet*, 2004, 35: 119-122.
- [8] 韩威, 李慧芳, 朱云芬, 等. 抗粘液病毒基因(Mx) S631N 多态位点与白耳鸡免疫性状和生产性能的关联分析[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(3): 556-561.
- [9] 刘艳, 王克华, 包文斌. 如皋鸡 Mx 基因 2032 位点多态性与经济性状的关联分析[J]. 中国畜牧杂志, 2009, 45(21): 1-4.
- [10] 王世波, 雷秋霞, 曹顶国, 等. 山东地方鸡种 Mx 基因遗传变异与免疫性状的关系[J]. 浙江农业学报, 2012, 24(6): 969-974.
- [11] 陈蕾, 江国托, 常维山, 等. 鸡 Mx 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(2): 203-206.
- [12] 倪黎纲, 吴晓伟, 程旭梅, 等. 鸡 Mx 蛋白基因诱变修饰及抗病活性[J]. 微生物学报, 2008, 48(6): 785-789.
- [13] Li X Y, Qu L J, Yao J F, et al. Skewed allele frequencies of an Mx gene mutation with potential resistance to avian influenza virus in different chicken populations[J]. *Poult Sci*, 2006, 85(7): 1327-1329.
- [14] 李慧芳, 陈宽维, 韩威, 等. Mx 基因抗性位点在 12 个地方鸡种中的分布及遗传结构分析[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(4): 487-492.
- [15] Bernasconi D, Schultz U, Staeheli P. The interferon induced Mx protein of chickens lacks activity [J]. *Interferon Cytokine Res*, 1995(15): 47-53.
- [16] Balkissoon D, Staines K, Mc Cauley J, et al. Low frequency of the Mx allele for viral resistance predates recent intensive selection in domestic chickens[J]. *Immunogenet*, 2007, 59(8): 687-691.
- [17] Sironi L, Ramelli P, Williams J L, et al. PCR-RFLP genotyping protocol for chicken Mx gene G/A polymorphism associated with the S631N mutation [J]. *Genet Mol Res*, 2010, 9(2): 1104-1108.
- [18] Seyama T, Ko J H, Ohe M, et al. Population research of genetic polymorphism at amino acid position 631 in chicken Mx protein with differential antiviral activity[J]. *Biochem Genet*, 2005, 10: 83-105.