

4 个牛群体 *MSTN* 基因第 1 外显子单核苷酸多态性分析

刘洪瑜^{1,2}, 杨漫漫¹, 姬云涛³, 刘旭光^{1,2}, 王力生^{1,2}

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室, 合肥 230036; 3. 阜阳师范学院生命科学学院, 阜阳 236037)

摘要: 以肌生成抑制素(*MSTN*)为候选基因, 采用 PCR-SSCP 技术检测了该基因第一外显子在皖东牛、皖南牛、和牛和西门塔尔牛 4 个群体中的多态性。通过 SNP 检测, 发现 *MSTN* 基因外显子 1 的 267 碱基发生 A→G 的同义突变, 在所检测牛群中存在 3 种基因型 (AA、GG、AG), A 等位基因为优势基因。该位点在 4 个牛群体中均处于中度多态。卡方检验表明皖东牛、皖南牛和和牛处于哈代-温伯格平衡状态($P>0.05$), 西门塔尔牛处于哈代-温伯格不平衡状态($P>0.05$)。

关键词: 牛; *MSTN* 基因; 多态性

中图分类号: S823.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)03-0380-05

Analysis on single nucleotide polymorphism of *MSTN* gene exon 1 in 4 cattles

LIU Hongyu^{1,2}, YANG Manman¹, JI Yuntao³, LIU Xuguang^{1,2}, WANG Lisheng^{1,2}

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

2. Anhui Provincial Laboratory of Local Livestock and Poultry Genetic Resources Conservation and Bio-breeding, Hefei 230036;

3. School of Life Sciences, Fuyang Teachers College, Fuyang 236037)

Abstract: Polymerase chain reaction single-stranded conformational polymorphism (PCR-SSCP) analysis was used to identify the exon 1 of myostatin gene (*MSTN*) mutation in Wandong, Wannan, Wagyu and Simmental cattle populations. The results showed that an A→G mutation was occur at position 267 in exon 1 which caused no amino acid change, and 3 types of genotypes (AA and AG, GG) were found. A allelic gene was superiority in the cattle populations. It was moderate polymorphisms in the tested 4 populations. The chi-square test showed that Wandong, Wannan and Wagyu cattle populations in Hardy - Weinberg equilibrium ($P>0.05$) and Simmental in Hardy - Weinberg disequilibrium ($P>0.05$).

Key words: cattle; *MSTN* gene; polymorphism

肌肉生长抑制素 (Myostatin, *MSTN*) 基因又称生长分化因子-8 (Growth differentiation factors 8, GDF-8), 是转化生长因子- β (TGF- β) 超家族中的一员^[1], 它具有 TGF- β 超家族的典型结构特点, 是近年来发现的一个重要的肌细胞生长的负调控因子^[2]。牛的 *MSTN* 基因被定位于 2 号染色体上, 全长 6631 bp, 包括 3 个外显子 2 个内含子, 编码了 375 个氨基酸, 并确认双肌性状为常染色体单基因隐性遗传^[3-4]。Kambadur^[5]和 McPherron^[6]等研究发现比利时蓝牛、皮埃蒙特牛 *MSTN* 基因外显子 3 的

碱基缺失或点突变导致了编码氨基酸的突变, 造成肌肉生长抑制素氨基酸功能的缺失, 表现为牛的“双肌”现象。McPherron 等^[1,7]运用基因打靶技术敲除小鼠体内的 *MSTN* 基因, 因该基因功能丧失导致小鼠骨骼肌的量极显著增加, 体重约为野生鼠 2 倍。Thomas^[8]、Taylor^[9]等通过实验证明了 *MSTN* 基因是通过抑制细胞的增生、肌细胞的生长从而达到抑制肌肉生长的作用。大量研究表明 *MSTN* 基因是调控动物肌肉生长的重要基因。

皖东黄牛是通过安徽省畜禽资源管理会审定的

收稿日期: 2013-11-22

基金项目: 安徽农业大学青年科学基金重点项目 (2010zd05), 国家自然科学基金 (31201788), 安徽省农业成果转化项目 (12040302077) 和安徽省肉牛产业技术体系专项经费共同资助。

作者简介: 刘洪瑜, 博士, 讲师。

* 通信作者: 王力生, 副教授。E-mail: wanglisheng@ahau.edu.cn

优良地方黄牛品种, 该品种体型大, 肉用性能好, 在优质肉牛生产中具有较高的开发利用价值^[10]; 皖南牛分布于安徽省歙县、黟县、等地区, 具有体型紧凑、胸部发达、后臀肌肉丰满、肉用细嫩、肥育效果显著等优良特性^[11]。本研究利用 PCR-SSCP 技术分析了皖南牛、皖东牛等 4 个牛群体的 *MSTN* 基因编码区的多态性, 并分析了多态位点在不同牛群体中的遗传效应, 为黄牛的分子标记选择提供试验素材。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究供检测黄牛 DNA 样本 213 份, 其中皖东黄牛血样 96 份, 采自安徽省滁州市定远、明光、凤阳等县市; 皖南牛血样 31 份, 采自安徽省铜陵市

久昌生态农业科技有限公司及池州市尤洋湖农业有限公司; 日本和牛血样 30 份, 采自安徽省畜禽保护中心及亳州天达集团; 西门塔尔牛血样 56 份, 采自安徽省亳州市天达集团。所有血样均采用颈静脉采血, 保存在 EDTAK₂ 抗凝管中, 置于低温环境带回实验室, -20℃ 保存。采用 DNA 血液提取试剂盒 (北京全式金生物有限公司) 提取基因组 DNA, 微量紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度, 置 4℃ 备用。

1.2 引物设计

参考 NCBI 登录的牛 *MSTN* 基因序列 (NCBI 登录号: AC_000159) 设计引物, 扩增牛 *MSTN* 基因第 1 外显子全长序列, 并用于 SNP 筛查。引物信息见表 1, 由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 牛 *MSTN* 基因引物序列
Table 1 Primer sequences of bovine *MSTN* gene

引物名称 Name of primer	引物序列 Sequence of primer	扩增长度/bp Amplification length	Tm/℃
MS1	CCATGCAAAAACACTGCAAATC TACTCACACTCCGTGGGCAT	241	55
MS2	CTCCTAACATCAGCAAAGATG GATCGGTTTCTCATGAACAC	238	55

1.3 PCR 扩增及 PCR-SSCP 分析

扩增反应体系为 20 μL, 包括: 10 μmol·L⁻¹ 上下游引物各 0.3 μL; Premix Taq 10 μL (宝生物工程 (大连) 有限公司); 50 mg·L⁻¹ DNA 模板 1 μL; 其余用超纯水补齐。PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR-SSCP 反应体系: PCR 产物 2 μL, 加入 8 μL 上样缓冲液 (95% 去离子甲酰胺, 10 mmol·L⁻¹ EDTA, 0.05% 二甲苯青, 0.05% 溴酚蓝)。在 PCR 仪中 98℃ 变性 10 min, 立即冰浴 10 min。12% 聚丙烯酰胺凝胶 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 电泳检测, 银染判型。

1.4 测序

挑选不同带型的样品, 每种带型分别选取 3 个不同的个体, 重新扩增, PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后回收纯化目的片段, 目的片段与 pEasy-T 载体 (北京全式金生物有限公司) 链接, 转化感受态细胞, 蓝白斑筛选阳性克隆, 摇菌并进行菌液 PCR 鉴定, 鉴定正确的菌液送上海生工生物有限公司测序。

1.5 数据分析

计算各群体的基因型频率、等位基因频率、有效等位基因数 (Ne)、群体遗传杂合度 (He) 和多态信息含量 (PIC), 并进行哈代-温伯格平衡检测。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

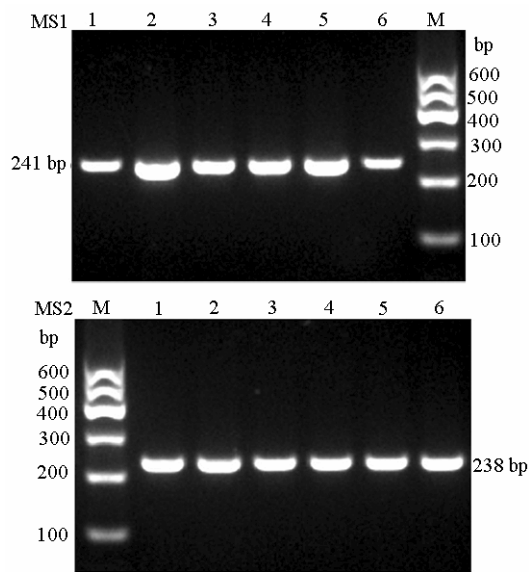
PCR 扩增结果如下图所示, MS1 引物扩增片段为 241 bp (图 1 左), MS2 引物扩增片段为 238 bp (图 1 右), 扩增片段条带清晰明亮、特异性好、无杂带, 可进行后继的试验。

2.2 单核苷酸多态性

PCR-SSCP 后出现了 3 种带型, 分别命名为 AA、AG 和 GG (图 2)。通过测序结果的比对 (图 3), 发现牛 *MSTN* 基因第 1 外显子 267 位具有 A>G 的碱基突变位点。该位点的碱基突变未引起氨基酸的变化。

2.3 牛 *MSTN* 基因单核苷酸多态性分析

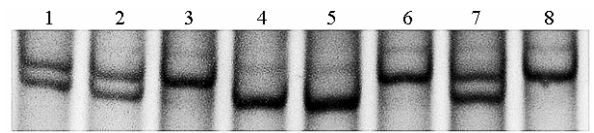
基因频率和基因型频率见表 2, AA 基因型在 4 个牛群体中均为优势基因型, 其中西门塔尔牛最高, 为 0.7321, 和牛最低, 为 0.5667。



M. DNA Marker I; 1~6. PCR 扩增产物
M. DNA Marker I; 1-6. PCR amplified products

图 1 牛 MS1 和 MS2 基因的 PCR 扩增产物

Figure 1 PCR amplification products of bovine MS1 and MS2 gene



AA: 泳道 3、6、8; AG: 泳道 1、2、7; GG: 泳道 4、5
AA: Lane 3, 6 and 8; AG: Lane 1, 2 and 7; GG: Lane 4 and 5

图 2 牛 MSTN 基因 PCR-SSCP 图

Figure 2 PCR-SSCP of bovine MSTN gene

基因座在群体中的杂合度、有效等位基因数、多态信息含量及 χ^2 检验见表 3。多态信息含量及杂合度是度量群体遗传变异的重要参数，两者越低，表明遗传一致性越高。由表 3 可以看出，4 个牛群体在该位点的多态信息含量 (PIC) 分别为 0.3047、0.2995、0.3318 和 0.2503，均处中度多态。经过 χ^2 适合性检验，皖东牛、皖南牛和和牛群体在该位点的 χ^2 值均小于 5.991，处于哈代-温伯格平衡状态 ($P < 0.05$)，西门塔尔牛在该位点的 χ^2 值为 8.5747，大于 5.991，处于哈代-温伯格不平衡状态 ($P > 0.05$)。

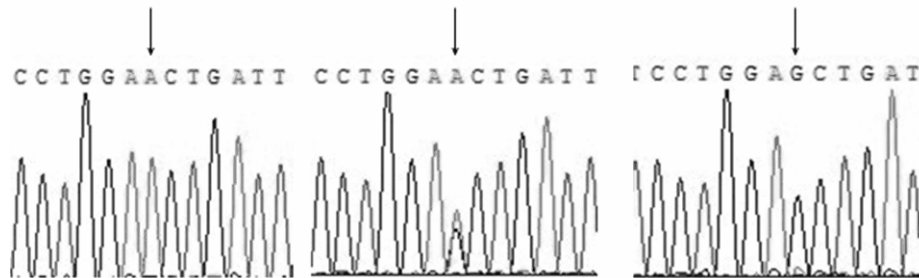


图 3 牛 MSTN 基因测序结果对比

Figure 3 The comparison of bovine MSTN gene sequences

表 2 牛 MSTN 基因 SNP 位点的基因型频率和基因频率

Table 2 Genotype frequencies and gene frequencies of the SNP site of bonive MSTN gene

品种 Breed	个数 N	基因型频率 Genotypic frequency			基因频率 Allelic frequency	
		AA	AG	GG	A	G
皖东牛 Wandong cattle	96	0.5729	0.3542	0.0729	0.7500	0.2500
皖南牛 Wannan cattle	31	0.6129	0.2903	0.0968	0.7581	0.2419
和牛 Wagyu cattle	30	0.5667	0.2667	0.1666	0.7000	0.3000
西门塔尔牛 Simmental cattle	56	0.7321	0.1786	0.0893	0.8214	0.1786

表 3 牛 MSTN 基因 SNP 位点在群体中的遗传参数检验

Table 3 The genetic parameters of the SNP loci of MSTN gene in 4 kinds of cattles

品种 Breed	多态信息含量 PIC	杂合度 H	有效等位基因数 Ne	χ^2
皖东牛 Wandong cattle	0.3047	0.3750	1.6000	0.2963
皖南牛 Wandong cattle	0.2995	0.3668	1.5793	1.3478
和牛 Wagyu cattle	0.3318	0.4200	1.7241	3.9985
西门塔尔牛 Simmental cattle	0.2503	0.2934	1.4152	8.5747*

注: PIC > 0.5 为高度多态, 0.25 < PIC < 0.5 为中度多态, PIC < 0.25 为低度多态。 $\chi_{0.05}^2 = 5.991$

Note: PIC > 0.5 high polymorphism; 0.25 < PIC < 0.5 intermediate polymorphism; PIC < 0.25 low polymorphism. $\chi_{0.05}^2 = 5.991$

3 讨论

目前国内外对模式动物及畜禽 *MSTN* 基因的碱基突变做了大量研究, 一致认为该基因多态与生长发育相关, 且负调控肌细胞生长发育。在比利时蓝牛和皮埃蒙特牛中 *MSTN* 基因缺失 11 bp 和外显子 3 中的 G→A 突变, 从而导致了“双肌”牛^[7]; Esmailzadeh 等^[12]在利木赞牛群体中发现了 *MSTN* 的变异体 F94L, 这种突变类型的纯合子动物和正常的动物相比肌肉量明显增大; 姜运良等人曾对猪 *MSTN* 成熟功能区的研究发现 5'调控区的 T→A 突变与猪后期日增重^[13]和大白猪的初生重^[14]有关; 顾志良等^[15]研究发现鸡 *MSTN* 基因 P93/94 位点的突变与胸肌重显著相关, 突变型比野生型具有更高的胸肌重。

牛 *MSTN* 基因多态性丰富, 平均每 100 bp 有 1 个 SNP 位点^[16]。Grobet 等^[17]研究发现牛 *MSTN* 基因外显子 1 的突变引起了第 94 位氨基酸由 Phe→Leu, 后来 Lee 等人^[18]证实这个氨基酸的突变会改变 *MSTN* 前体蛋白对 *MSTN* 的抑制作用; Grisolia 等^[19]利用 ssDNA 将天然存在于皮埃蒙特牛中的 *MSTN* 基因多态性片段定植到胎牛成肌细胞中, 发现利用 ssDNA 可以使 *MSTN* 基因实现点突变; 孙少华等人^[20]利用 SNPs 分析对纯种皮埃蒙特牛、皮荷杂交牛和荷斯坦牛单核苷酸突变基因 *MSTN* 的成功检测提供了牛“双肌”基因的检测方法; 常春芳等^[21]在中国雷琼牛、蒙古牛、独龙牛与巴州牦牛 4 个牛品种 66 个样本中发现了 *MSTN* 基因外显子 2 的 3 个 SNPs 位点; 冀德君等^[22]研究了中国瘤牛、普通牛、牦牛和大额牛 4 个牛属 *MSTN* 基因外显子区核苷酸序列的变异, 发现了 7 个核苷酸多态位点; 吕文发等^[23]采用 CRS-RFLP 法检测到已知 *MSTN* 基因外显子 1 的突变位点在西门塔尔牛、利木赞牛和夏洛莱牛 3 个肉牛品种的也具有分型; 咎林森等人^[24]采用 PCR-SSCP 法对秦川牛、南阳牛进行检测, 结果发现南阳牛中存在双肌个体; 史明艳等^[25]研究发现皮埃蒙特牛、南阳牛第 3 外显子 938 位存在 G→A 突变; 梁春年等^[26]对牦牛 *MSTN* 基因全序列克隆测序发现在基因编码区的 417 位存在一个 C→T 碱基突变。

上述研究表明了 *MSTN* 基因的多态性丰富, 本研究在皖南牛等 4 个牛群体中发现了 *MSTN* 基因第 1 外显子 267 位 A→G 的碱基突变也证实了这一点。皖东牛是 2011 年经安徽省畜禽资源管理会审定的地方黄牛品种, 皖南牛具有肉用体型, 这些牛群体在该位点尚有选择空间, 可加大人工的选择强度。

在接下来的研究工作中, 将进一步检测该位点与体尺性状的关联分析, 并在不同的群体中进一步验证, 为寻找有效的分子遗传标记位点, 为改良我国特有的地方品种和加快国内优良肉牛品种的选育进程提供参考。

参考文献:

- [1] Mcpherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member[J]. Nature, 1997, 387(6628): 83-90.
- [2] Dunner S, Charlier C, Farnir F, et al. Towards interbreed IBD fine mapping of the mh locus: double-muscling in the Asturiana de los Valles breed involves the same locus as in the Belgian Blue cattle breed[J]. Mamm Genome, 1997, 8(6): 430-435.
- [3] Charlier C, Coppieiers W, Farnir F, et al. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome2 [J]. Mamm Genome, 1995(6): 788-792.
- [4] Masabanda J, Pirottin D, Poncelet D, et al. A cytogenetic map of the muscular hypertrophy(mh) region on bovine chromosome2 [J]. Anim Genet, 1998, 29 (Suppl): 33.
- [5] Kambadur R, Sharma M, Smith T P, et al. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle[J]. Genome Res, 1997, 7: 910-915.
- [6] Mcpherron A C, Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 12457-12461.
- [7] McPherron A C, Lee S J. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2002, 109(5): 595-601.
- [8] Thomas M, Langley B, Berry C, et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation[J]. The Journal Biological Chemistry, 2000, 275(51): 40235-40243.
- [9] Taylor W E, Bhasin S, Artaza J, et al. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001, 280: E221-E228.
- [10] 安徽发现新畜禽遗传资源—皖东黄牛通过省级鉴定[J]. 北方牧业, 2012, 12: 11.
- [11] 国家畜禽遗传资源委员会编. 中国畜禽遗传资源志 牛志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 5.
- [12] Esmailzadeh A K, Bottema C D K, Sellick G S, et al. Effect of the myostatin F94L substitution on beef traits[J]. Journal of Animal Science, 2008, 86(5): 1038-1046.
- [13] Jiang Y L, Li N, Du L X, et al. Relationship of T→A mutation in the promoter region of myostatin gene with growth traits in swine[J]. Acta Genetica Sinica, 2002, 29(5): 413-416.
- [14] Jiang Y L, Li N, Fan X Z, et al. Associations of T→A mutation in the promoter region of myostatin gene with birth weight in Yorkshire pigs[J]. Asian-Aust J Anim Sci, 2002, 15(11): 1543-1545.
- [15] 顾志良, 朱大海, 李宁, 等. 鸡 myostatin 基因单核苷酸多态性与骨骼肌和脂肪生长的关系[J]. 中国科学(C 辑), 2003, 33(3): 273-280.

- [16] Dunner S, Miranda M E, Amigues Y, et al. Haplotype diversity of the *myostatin* gene among beef cattle breeds[J]. *Genet Sel Evol*, 2003, 35(1): 103-118.
- [17] Grobet L, Poncelet D, Royo L J, et al. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle[J]. *Mamm Genome*, 1998, 9: 210-213.
- [18] Lee S J, Mcpherron A C. Regulation of myostatin activity and muscle growth[J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2001, 98(16): 9306-9311.
- [19] Grisolia A B, Curi R A, De Lima V F M, et al. Targeted nucleotide exchange in bovine myostatin gene [J]. *Animal Biotechnology*, 2009, 20(1): 15-27.
- [20] 孙少华, 李雪梅, 魏学蕊, 等. 牛肌肉生长抑制素(MSTN)基因的检测、分型研究[J]. *中国农业科技导报*, 2001, 3(6): 66-67.
- [21] 常春芳, 冀德君, 常洪, 等. 中国 4 个牛种 MSTN 基因外显子 2 多态性分析与其系统发生关系研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36 (14): 5790-5791, 5793.
- [22] 冀德君, 常洪, 常春芳, 等. 中国牛属 4 个物种 MSTN 基因的遗传变异研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(6): 701-704.
- [23] 吕文发, 杨连玉, 贺实伟, 等. 中国西门塔尔牛、利木赞牛和夏洛莱牛 MSTN 基因多态性分析[J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(6): 852-854, 868.
- [24] 咎林森, 史明艳, 王勇强. 秦川牛、南阳牛双肌基因的 PCR-SSCP 检测[J]. *中国农学通报*, 2003, 19(5): 7-9.
- [25] 史明艳, 咎林森, 李保兰, 等. 牛 Myostatin 基因单核苷酸多态性分析[J]. *中国农业通讯*, 2005, 21(6): 24-25.
- [26] 梁春年, 丁学智, 包鹏甲, 等. 牦牛 MSTN 基因分子克隆及序列分析[J]. *华北农学报*, 2013, 28(1): 76-81.