

牛 *MyoG* 基因单核苷酸多态性分析

杨漫漫¹, 刘洪瑜^{1,2}, 王恒¹, 王力生¹, 章孝荣^{1,2}, 刘旭光^{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)

摘要: 以皖东牛和广丰牛共 128 头牛为研究对象, 采用 PCR-RFLP 方法检测牛 *MyoG* 基因的多态性。结果表明, 在牛 *MyoG* 基因的外显子 466 碱基处发生 G>C 突变, 检测到 AA 和 AB 2 种基因型, 该位点的突变未引起氨基酸序列的变化。在皖东牛群体中 AA 基因型频率为 23.66%, AB 基因型频率为 76.34%; 在广丰牛群体中 AA 基因型频率为 17.24%, AB 基因型频率为 82.76%。皖东牛的多态信息含量 (PIC) 为 0.3606, 广丰牛为 0.3702, 在该位点均处于中度多态。卡方检验表明皖东牛群体处于哈代-温伯格不平衡状态 ($P < 0.05$); 广丰牛处于哈代-温伯格平衡状态 ($P > 0.05$)。

关键词: 牛; *MyoG* 基因; 多态性

中图分类号: S823.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)04-0547-05

Single nucleotide polymorphism analysis of *MyoG* gene in cattle

YANG Man-man¹, LIU Hong-yu^{1,2}, WANG Heng¹, WANG Li-sheng¹, ZHANG Xiao-rong^{1,2}, LIU Xu-guang^{1,2}

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

2. Anhui Provincial Key Laboratory of Local Livestock and Poultry Genetic Resources Conservation and BioBreeding, Hefei 230036)

Abstract: One hundred and twenty-eight cattles from Wandong and Guangfeng populations were used to detect the polymorphism of *MyoG* gene by PCR-RFLP method. The results show that a G>C mutation was occur in 466 base position of exon 1, and 2 types of genotypes (AA and AB) were found. The mutation had not caused the change of amino acid. Genotypic frequencies of AA and AB are 23.66% and 76.34% respectively in Wandong population, the genotypic frequency of AA is 17.24% and AB is 82.76% in Guangfeng population. The polymorphism information content (PIC) is 0.3606 in Wandong population and 0.3702 in Guangfeng population, which are all in average polymorphism situation. According to the χ^2 test, there is not in Hardy-Weinberg equilibrium in Wandong population ($P < 0.05$) and there is in Hardy-Weinberg equilibrium in Guangfeng population ($P > 0.05$).

Key words: cattle; *MyoG* gene; polymorphism

动物的产肉性能和肉质对产品的价格和生产者的经济效益均具有显著的影响, 动物的产肉性能取决于肌纤维细胞的数量及其生长状况。脊椎动物的肌纤维数目在胚胎时期就已经确定, 出生后不再增加, 肌肉的生长主要依赖于肌纤维长度和周径的增加。研究表明动物具有多的肌纤维数量将能产出更高品质的肉产品^[1]。生肌调节因子(myogenic regulatory factors, *MRFs*)家族是参与肌肉发生过程中分子调控的重要基因家族, 对骨骼肌的发生起重要的调节作用, 可激活肌肉的基因转录, 抑制细胞生长

周期, 促进细胞分化^[2]。*MRFs* 基因家族编码 4 种不同的肌肉特异性转录因子: 肌细胞决定因子(myogenic determining factor, *MyoD*)^[3]、肌细胞生成素(myogenin, *MyoG*)^[4]、生肌因子 5(*Myf5*)^[5]和生肌因子 6(*Myf6*)^[6]。其中, *MyoG* 调控着中胚层细胞分化为成肌细胞, 再由成肌细胞融合为肌纤维的过程^[7]。大量研究证明单独敲除 *MyoG* 基因的小鼠会由于严重的骨骼肌发育缺陷而死亡^[8-10]。因此 *MyoG* 基因表达或结构的改变, 均能够影响肌细胞的分化过程并最终影响成肌性能^[11]。

收稿日期: 2013-03-07

基金项目: 安徽农业大学青年科学基金重点项目 (2010zd05), 安徽省农业成果转化项目 (12040302077), 安徽省奶牛产业体系和安徽省肉牛产业体系共同资助。

作者简介: 杨漫漫, 女, 硕士研究生。E-mail: ouiswawai@ahau.edu.cn

* 通信作者: 刘旭光, 男, 副教授。E-mail: liuxuguang@ahau.edu.cn

皖东黄牛是通过安徽省审定的地方黄牛品种,主要分布在凤阳、定远、明光、来安、五河等皖东丘陵地区,该黄牛品种体型大,哺育能力强,肉用性能较好,在优质肉牛生产中具有较高的开发利用价值^[12]。广丰牛分布于江西省上饶市、景德镇等地区,具有体型紧凑、胸部发达、胸围率高、肉用性能好、肥育效果显著等优良特性^[13]。这些黄牛是南方地区黄牛的典型代表。

本试验以 *MyoG* 基因为候选基因,利用 PCR-RFLP 方法,对皖东牛和广丰牛 2 个黄牛群体 *MyoG* 基因进行了 SNPs 筛查,分析其在 2 个黄牛品种中的遗传效应,为黄牛品种遗传资源的合理利用和保护提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

来自 2 个群体的无血缘关系的肉牛血样 128 份,其中皖东黄牛(WD)血样 97 份,采自安徽省滁州市;广丰牛(GF)血样 31 份,采自江西省乐平市。所有血样均由颈静脉采血,置 EDTA_{K₂} 抗凝管中,低温保存带回实验室, -20℃ 保存备用。采用 DNA 提取试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)提取牛血液基因组 DNA,超微量紫外分光光度计测浓度和纯度,置 4℃ 备用。

1.2 引物设计

根据 NCBI 登录的牛 *MyoG* 基因序列(NCBI 登录号: AC_000173.1),分段设计从 5' 端至 3' 端的基因全长引物,扩增牛 *MyoG* 基因并用于 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。

1.3 PCR 扩增及测序

扩增反应体系为 12 μL,包括: 10 μmol·L⁻¹ 上下游引物各 0.5 μL; 2×Reaction Mix 6 μL; Golden DNA Polymerase 0.1 μL (2.5 U·μL⁻¹) (北京天根生化科技有限公司); 50 mg·L⁻¹ DNA 模板 0.5 μL; 超纯水 4.4 μL。PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, T_m °C (退火温度依引物而定) 复性 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR 扩增目的片段经回收纯化后,与 pEasy-T1 载体连接(北京全式金生物技术有限公司)转化至大肠杆菌感受态细胞,蓝白斑筛选阳性克隆,摇菌,进行菌落 PCR 鉴定,将鉴定正确的菌液送上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.4 RFLP 分析

将 PCR 产物克隆测序,对比测序结果后以限制性内切酶 *Nae* I (MBI 公司) 酶切分型。酶切反应体系为 10 μL, PCR 产物 5 μL; *Nae* I 内切酶 5 U, 缓冲液 4.8 μL。酶切 6 h 后,10% 聚丙烯酰胺凝胶 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 凝胶电泳检测分型。

1.5 数据统计分析

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

表 1 牛 *MyoG* 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of bovine *MyoG* gene

引物名称 Primer	引物序列 Sequence	扩增长度/bp Amplification length	位置 Location	T _m /°C
<i>MyoG1</i>	F: 5' -GAACTACCTGCCTGTCCACC-3'	739	Exon1	52
	R: 5' -AGGCCCTAACACCAGACG-3'			
<i>MyoG2</i>	F: 5' -TTCTCACCCATCTGTCCTG-3'	491	Exon2, Exon3	55
	R: 5' -GGTCCCTTGCTTTAATCTCC-3'			

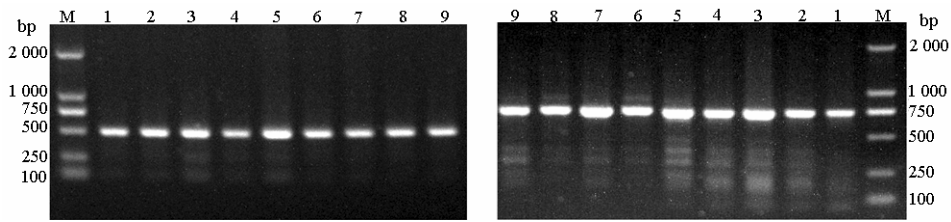
2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

两对引物扩增结果如图 1 所示, *MyoG1* 引物扩增片段为 739 bp(右图), *MyoG2* 引物扩增片段为 491 bp(左图), 与预期扩增片段大小一致, 特异性扩增良好且没有明显的非特异性条带, 可进行后续试验。

2.2 单核苷酸多态性鉴定

通过测序结果的比对(图 2), 显示牛 *MyoG* 基因 466 位具有 G→C 的突变位点, 该位点是 *Nae* I 的酶切位点, PCR-RFLP 后出现了 2 种带型, 结合测序判定其片段大小分别为: 739 bp; 739 bp、407 bp、332 bp, 分别命名为 AA、AB, 未检测到 BB 基因型个体(图 3)。



M. DNA Marker DL2000 Marker; 1-9. PCR 扩增产物
M. DNA Marker DL2000 Marker; 1-9. PCR amplified products

图 1 牛 *MyoG* 基因 PCR 扩增产物

Figure 1 PCR amplification products of bovine *MyoG* gene

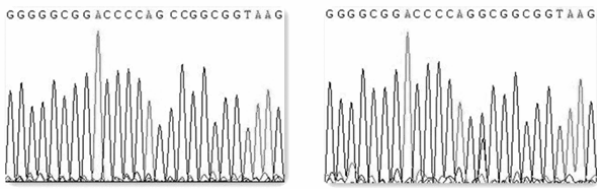


图 2 牛 *MyoG* 基因测序结果图谱对比

Figure 2 The comparison of bovine *MyoG* gene sequence

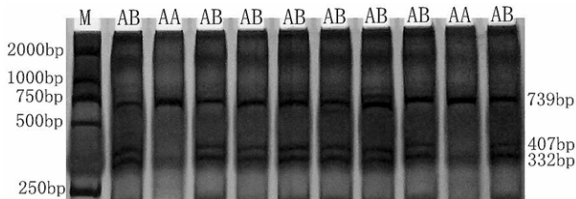


图 3 牛 *MyoG* 基因 PCR-RFLP

Figure 3 PCR-RFLP of bovine *MyoG* gene

2.3 牛 *MyoG* 基因单核苷酸多态性分析

基因频率和基因型频率见表 2, 皖东牛 AB 基因型频率为 76.34%, 广丰牛 AB 基因型频率为 82.76%, 在 2 个群体中均占主导地位。

基因座在群体中的杂合度、有效等位基因数、多态信息含量 (PIC) 及 χ^2 检验见表 3。由表 3 可以看出, 皖东牛群体的多态信息含量为 0.360 6, 处于 0.25~0.50 之间, 表明该位点处于中度多态。经过 χ^2 适合性检验, 皖东牛群体在该位点的 χ^2 值为 35.449 0, 大于 5.991, 处于哈代-温伯格不平衡状态 ($P < 0.05$); 广丰牛的多态信息含量为 0.370 2, 处于中度多态, 在该位点的 χ^2 值为 0.960 6, 小于 5.991, 处于哈代-温伯格平衡状态 ($P > 0.05$)。

表 2 牛 *MyoG* 基 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 *MyoG* gene

品种 Breed	个数 <i>N</i>	基因型频率/% Genotypic frequency		基因频率/% Allelic frequency	
		AA	AB	A	B
皖东牛 WD	97	23.66	76.34	61.83	38.17
广丰牛 GF	31	17.24	82.76	56.90	43.10

表 3 牛 *MyoG* 基因 SNP 位点在群体中的多态信息含量(PIC)、杂合度(H)、有效等位基因数(Ne)及 χ^2 检验

Table 3 The genetic polymorphism parameters of the SNP loci of *MyoG* gene in cattle

品种 Breed	多态信息含量 <i>PIC</i>	杂合度 <i>H</i>	有效等位基因数 <i>Ne</i>	χ^2
皖东牛 WD	0.360 6	0.472 0	1.894 0	35.449 0*
广丰牛 GF	0.370 2	0.490 5	1.962 7	0.960 6

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。 $\chi^2_{0.05} = 5.991$ 。

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

3 讨论

MyoG 基因是 *MRFs* 基因家族中唯一在所有骨骼肌细胞系均可表达的基因^[14], 在肌细胞分化过程中, *MyoG* 基因的表达能够终止成肌细胞增殖并调控单核成肌细胞融合成多核肌管^[15], 是骨骼肌分化所必需的一种正调控因子^[16]。Joanna 等^[11]采用

PCR-RFLP 方法检测到 *MyoG* 基因 3'端的 *MspI* 的酶切多态位点与波兰大白猪的日增重、瘦肉率等性状相关。郭云雁等^[17]在大白猪和北京黑猪群体中发现 *MyoG* 基因外显子 1 的 A2512G 的突变位点, 且该突变位点与猪的肌纤维面积、直径及密度相关。牛的肌纤维数量取决于胚胎发育的 70 d, *MyoG* 基因在肌肉发生过程中肌纤维形成时的作用是不可替

代的。因此, *MyoG* 基因的遗传变异极有可能会导致肌纤维数量的改变, 成为牛生长性状的主要基因或遗传标记, 将直接影响产肉潜力和肌肉品质^[18]。

MyoG 基因在动物生长调控中的重要作用引起了学者的广泛关注, 目前国内外关于 *MyoG* 基因在牛上的研究逐渐增多。Muroya 等^[19]采用半定量 RT-PCR 方法检测到 *MyoG* 基因在牛不同部位的肌肉组织中的表达量并无差异。王珊等^[20]以秦川牛为研究对象, 通过克隆、测序及生物信息学分析等技术方法研究发现牛 *MyoG* 基因与猪、人和小鼠相应序列有较高的同源性, 且在不同物种之间具有一定的保守性。王秋华等^[21]通过构建表达载体并转染细胞后进行双报告基因活性检测的方法克隆了日本和牛 *MyoG* 基因的启动子并进行了生物信息学分析, 该启动子含有多个 E-box 结构并具有肌肉特异性。

在牛 *MyoG* 基因的多态性研究方面, 王珊^[22]使用 *Hinf I* 内切酶发现了 *MyoG* 基因启动子区域该酶的酶切多态位点, 并且该位点与牛体质量、胸围、体长指标具有相关性; Bhuiyan 等^[23]采用 RFLP 法分析了韩牛、西门塔尔牛、安格斯牛、赫里福牛、短角牛、婆罗牛等 7 个牛品种的 *MYRs* 家族 4 个基因外显子核苷酸序列, 发现 *MyoG* 基因存在 4 个 SNP 位点, 并且 g.1111C>G 突变位点与韩牛活重显著相关; 薛梅等^[24-25]通过 PCR-SSCP 技术检测了秦川牛、鲁西牛、鲁杂牛、南阳牛、夏南牛、郟县红牛 6 个牛品种的 *MyoG* 基因多态性, 发现了外显子 1 的 T314C 突变及外显子 3 的 A2109G 突变, 且这 2 个突变位点均与牛的体斜长、体高等性状相关。

本研究利用 PCR-RFLP 技术, 检测了皖东牛和广丰牛两个群体的 *MyoG* 基因的多态性, 发现了 *MyoG* 基因第 1 外显子 466 位存在 G→C 的碱基突变, 检测到 AA、AB 2 种基因型, 其中 AA 型为纯合型, AB 型为杂合型, 该位点的突变未引起氨基酸序列的变化。AA 基因型在 2 个黄牛群体中均占优势地位。2 个黄牛群体 *MyoG* 基因的 *PIC* 分别为 0.360 6 和 0.370 2, 表明在该位点处于中度多态, 哈代-温伯格平衡 χ^2 独立性检验表明, 皖东牛群体在该位点处于 Hardy-Weinberg 非平衡状态; 广丰牛群体在该位点处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。皖东牛是 2011 年经安徽省审定的地方黄牛品种, 初步具有肉用体型, 在该位点的选择空间不大, 而广丰牛尚有较大的选择空间, 可加大人工选择强度。在下一步的研究工作中, 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, 进而实现标记辅助选择

奠定基础。

MRFs 基因在动物肌肉生长方面具有重要功能, 其中 *MyoG* 基因在肌细胞分化过程中更是起着中心调控作用。因此了解它的结构及遗传变异对家畜产肉潜力的分子育种, 提高家畜的生产力具有重要的理论意义和实践价值。

参考文献:

- [1] Rehfeldt C, Fiedler I, Dietl G, et al. Myogenesis and post-natal skeletal muscle cell growth as influenced by selection[J]. *Livest Prod Sci*, 2000, 66:177-188.
- [2] Murray J C, Daack-Hirsch S, Buetow K H, et al. Clinical and epidemiologic studies of cleft lip and palate in the Philippines[J]. *Cleft Palate Craniofac J*, 1997, 34(1): 7-10.
- [3] Davis R L, Weintraub H, Lassar A B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts[J]. *Cell*, 1987, 51(6): 987-1000.
- [4] Wright W E, Sassoon D A, Lin V K. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to *MyoD*[J]. *Cell*, 1989, 56(4): 607-617.
- [5] Braun T, Buschhausen-Denker G, Bober E, et al. A novel human muscle factor related to but distinct from *MyoD1* induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts[J]. *EMBO J*, 1989, 8(3): 701-709.
- [6] Buckingham M, Bajard L, Chang T, et al. The formation of skeletal muscle: From somite to limb [J]. *J Anat*, 2003, 202(1): 59-68.
- [7] Neville C M, Schmidt M, Schmidt J. Response of myogenic determination factors to cessation and resumption of electrical activity in skeletal muscle: A possible role for myogenin in denervation supersensitivity [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 1992, 12(6): 511-527.
- [8] Weintraub H, Davis R, Tapscott S, et al. The *MyoD* gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage [J]. *Science*, 1991, 251(4995): 761-766.
- [9] Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, et al. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect [J]. *Nature*, 1993, 364(6437): 532-535.
- [10] Yun K, Wold B. Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1996, 8(6): 877-889.
- [11] Wyszynska-Koko J, Pierzchala M, Flisikowski K, et al. Polymorphisms in coding and regulatory regions of the porcine *MYF6* and *MYOG* genes and expression of the *MYF6* gene in *m.longissimus dorsi* versus productive traits in pigs[J]. *J Appl Genet*, 2006, 47(2): 131-138.
- [12] 国家畜禽遗传资源委员会. 中国畜禽遗传资源志牛志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 5.
- [13] 安徽发现新畜禽遗传资源—皖东黄牛通过省级鉴定[R]. 北方牧业, 2012(12): 11.
- [14] Hasty P, Bradley A, Morris J H, et al. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene[J]. *Nature*, 1993, 364: 501-506.
- [15] Pas M F, Visscher A H. Genetic regulation of meat production by embryonic muscle formation a review[J]. J

- Anim Breed Genet, 1994, 111(1/6): 404-412.
- [16] Wright W E, Sassoon D A, Lin V K. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD [J]. Cell, 1989, 4(56): 607- 617.
- [17] 郭云雁, 程笃学, 张龙超, 等. *MyoG* 和 *c-fos* 基因多态性及其合并基因型与猪肌纤维性状的关联分析[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(2): 188-196.
- [18] 何远清, 储明星, 王金玉. 肌细胞生成素基因的研究进展[J]. 遗传, 2004, 26(2): 235-238.
- [19] Muroya S, Nakajima I, Chikuni K. Related expression of MyoD and Myf5 with myosin heavy chain isoform types in bovine adult skeletal muscles[J]. Zoolog Sci, 2002, 19(7): 755-761.
- [20] 王珊, 陈宏, 蔡欣. 牛 *MyoG* 基因启动子的克隆与序列分析[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(8): 12-16.
- [21] 王秋华, 曹允考, 李树峰, 等. 牛 *MyoG* 基因启动子的克隆及功能的初步分析[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(1): 37-43.
- [22] 王珊. 秦川牛及其杂交后代生长发育性状几个候选基因的遗传分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- [23] Bhuiyan M S A, Kim N K, Cho Y M, et al. Identification of SNPs in MYOD gene family and their associations with carcass traits in cattle [J]. Livestock Science, 2009, 126(1): 292-297.
- [24] Xue M, Zan L S, Gao L, et al. A novel polymorphism of the myogenin gene is associated with body measurement traits in native Chinese breeds [J]. Genet Mol Res, 2011, 10(4): 2721-2728.
- [25] 薛梅, 咎林森, 王洪宝, 等. 6 个黄牛群体 *MyoG* 基因单核苷酸多态性及其与体尺性状的相关性[J]. 西北农林科技大学学报, 2011, 7(39): 35-42.