

MyoG 基因对金华猪繁殖性状的影响

赵进¹, 聂光军², 张金枝¹, 郭晓令¹, 徐宁迎¹

(1. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310029; 2. 安徽工程科技学院, 芜湖 241000)

摘要:用 PCR-RFLP 方法对金华猪 I 系(109 头)、II 系(15 头)、III 系(25 头)的 MyoG 基因的第二内含子内(PCR1-*Msp* I -RFLP)和 3'-端(PCR2-*Msp* I -RFLP)位点进行了多态性分析。结果表明:PCR1-*Msp* I -RFLP 位点有 3 种基因型(AA、AB、BB),其基因型频率分别为 0.1544、0.3826、0.4631;PCR2-*Msp* I -RFLP 位点只有 2 种基因型(MM、MN),其基因型频率分别为 0.9953 和 0.0047。采用 SPSS 程序分析 MyoG 基因对金华猪繁殖性状的影响。结果表明:MyoG 基因对金华母猪初胎的总产仔数、二胎的产活仔数影响显著($P < 0.05$),而对其他胎次组合的总产仔数、产活仔数以及初生窝重没有显著影响($P < 0.05$)。

关键词:金华猪; MyoG 基因; 繁殖性状

中图分类号:Q953

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2005)06-0893-05

Influences of MyoG Gene on Reproductive Traits in Jinhua Pig

ZHAO Jin¹, NIE Guang-Jun², ZHANG Jin-Zhi¹, GUO Xiao-Ling¹, XU Ning-Ying¹

(1. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. Department of Biochemical Engineering, College of Technology and Science Anhui, Wuhu 241000, China)

Abstract: The genotypes in the second intron and 3' UTR region of myogenin gene in 149 Jinhua pigs (line I, 109; line II, 15; line III, 25) were detected by PCR-RFLP method. The results showed that three genotypes (AA, AB and BB) in the PCR1-*Msp* I -RFLP site were detected and their frequencies were 0.1544, 0.3826, 0.4631, respectively; MM and MN genotypes were found in PCR2-*Msp* I -RFLP site and their frequencies were 0.9953 and 0.0047. The effect of MyoG gene on the reproductive traits was analyzed using SPSS software. Significant associations were found between MyoG locus and total number born (TNB) in first parity ($P < 0.05$), and number born alive (NBA) in the second parity ($P < 0.05$), but no significant associations existed in other parity combinations of TNB, NBA and litter weight birth (LWB) ($P < 0.05$).

Key words: Jinhua pig; Myogenin gene; reproductive traits

肌细胞生成素(Myogenin, MyoG)是骨骼肌转录因子 MyoD 家族的成员之一,调控中胚层细胞分化为成肌细胞,促使成肌细胞增殖,使单核成肌细胞转变成多核的肌纤维,因而 Myogenin 被认为在 MyoD 家族中起关键调节作用^[1~4]。因此,猪 MyoG

基因的研究引起人们的广泛关注。林万华等^[5](2002)研究发现不同 MyoG 基因型间二花脸猪的初生重差异极显著($P < 0.01$)。Soumillion 等^[6](1997)采用 PCR-RFLPs 对猪的 MyoG 基因进行了分析,发现了 3 个 *Msp* I 酶切位点,分别位于基因

收稿日期:2004-08-17;修回日期:2004-09-28

基金项目:国家高技术研究发展计划项目(863 项目)(编号:2004AA213111)和国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号:G2000016104)[Supported by the Hi-Tech Research and Development Program of China (No. 2004AA213111), National Basic Research Program (973 Program) (No. G2000016104)]

作者简介:赵进(1977—),男,安徽合肥人,硕士,研究方向:动物遗传育种。Tel:0571-86971308。E-mail:zhaojin622@eyou.com

通讯作者:徐宁迎(1956—),男,浙江湖州人,博士,教授,博士生导师,研究方向:动物遗传育种。Tel:0571-86971199。E-mail:ningying@hznc.

的 3' 端,第二内含子内和启动子内,其中位于启动子内的酶切位点为梅山猪所特有。金华猪具有性成熟早、繁殖力高、肉质好等优点,是我国著名的地方品种,是一个独特的基因库。本实验利用 PCR-RFLP 的方法检测金华猪 *MyoG* 基因在 3 个品系中的多态性,并分析不同基因型对金华猪繁殖性能的影响,为金华猪的保种和利用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验猪来自金华猪 3 个品系的保种场,其中 I 系 109 头,II 系 15 头,III 系 25 头。繁殖性状测定值取自金华种猪场 1999~2003 年的繁殖记录,包括产活仔数(NBA)、总产仔数(TNB)和初生窝重(LWB)。

1.2 方法

1.2.1 试剂与引物

蛋白酶 K、*Msp* I、*Taq* I 酶和 dNTP 购自上海生工生物工程技术服务有限公司,引物序列是引自 Soumilion^[6] 等并由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR 引物序列如下。

PCR1: (forward) 5'-TGG ACT GGA TGG TTC AGA CTG TG-3';

(reverse) 5'-AGA CAG TCT CAG TTG GGC ATG G-3'。

PCR2: (forward) 5'-TCA GGA AGA ACT GAA GGC TG-3';

(reverse) 5'-GTT TCC TGG GGT GTT GC-3'。

1.2.2 DNA 的提取和纯度的测定

参照《现代分子生物学实验技术》^[7] 提取猪基因组 DNA。用分光光度计测定 OD 值,根据 OD_{260}/OD_{280} 判断 DNA 纯度。

1.2.3 PCR 反应体系与反应程序

PCR 反应体系: 10 × PCR 缓冲液(含 $MgCl_2$ 15 mmol/L)2.5 μL; dNTP(2.5 mmol/L)2.0 μL; 上下游引物各(10 pmol/μL)1.4 μL; 模板 DNA(25 ng/μL)4 μL; *Taq* DNA 酶(5U/μL)0.2 μL; 加灭菌双蒸水至总反应体积 25 μL。PCR 反应条件: 预变性 94°C 5 min, 进入循环: 94°C 45 s、58°C 50 s、72°C 1 min, 35 个循环, 循环结束后 72°C 延伸 8 min、4°C 保存, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.4 PCR-RFLP

在 25 μL 的扩增产物中均加入 2 U *Msp* I 酶。

置 37°C 恒温箱中消化 6 h, 酶切产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳分析, 拍照保存。

1.2.5 统计分析方法及模型

1.2.5.1 猪群各基因的基因型频率及基因频率的计算 猪群各基因的基因型频率及基因频率的计算方法参见文献[8]。

1.2.5.2 基因效应的统计分析 基因型数据: *MyoG* (PCR1) (AA, AB, BB); *MyoG* (PCR2) (MM, MN); 繁殖性状: NBA、TNB、BLW。

1.2.5.3 基因的独立效应模型 $y_i = \mu + \alpha_i + e_i$

其中 y_i 为性状测定值, μ 为总体平均数, α_i 为基因型效应值 ($i = AA, AB, BB, MM, MN$), e_i 为随机误差。

2 结果

2.1 基因型检测

MyoG 基因的 PCR1 扩增产物经 *Msp* I 限制酶酶切, 琼脂糖凝胶电泳后, 共检测出 418、370、264、171、154 bp 5 条带。定义等位基因 A (370 + 264 + 171 + 154 bp), B (418 + 370 + 171 bp), (如图 1)。PCR2 所扩增的 *MyoG* 基因片段长度为 353 bp, 存在一个 *Msp* I 多态性酶切位点, 定义等位基因 M (353 bp), N (219 + 134 bp)。

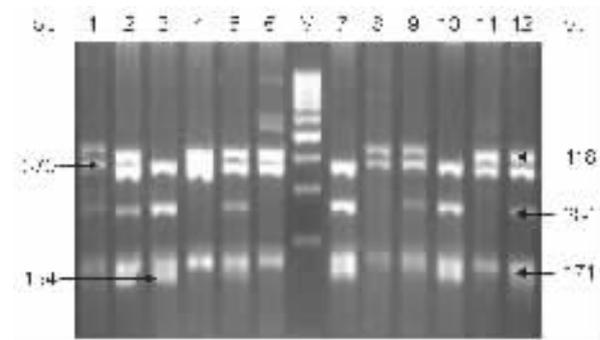


图 1 *MyoG* 基因(PCR1) *Msp* I 酶切后图谱

1、2、5、9 和 12 为 AB 基因型; 3、7 和 10 为 AA 基因型; 4、6、8 和 11 为 BB 基因型; M: Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder。

Fig.1 Profile of *MyoG* gene digested by *Msp* I

1、2、5、9、12: AB genotype; 3、7、10: AA genotype; 4、6、8、11: BB genotype; M: Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder.

2.2 基因型频率

MyoG 基因在金华猪 3 个品系中的基因和基因型频率, 由表 1 所示。金华猪中等位基因 A 和基因

型 AA 频率最高的为金华 II 系,分别为 0.9 和 0.8;同时金华猪中等位基因 B 和基因型 BB 频率最高的为金华 III 系,分别为 0.88 和 0.8。

表 1 MyoG (PCR1) 基因和基因型频率

Table 1 The frequency of the MyoG (PCR1) gene and genotype

品系 Line	基因型频率			基因频率		标准差 (SD) Standard deviation
	Genotype frequency			Gene frequency		
	AA	AB	BB	A	B	
I 系 Line I	0.0917	0.4587	0.4495	0.3211	0.6789	0.0316
II 系 Line II	0.8000	0.2000	0.0000	0.9000	0.1000	0.0548
III 系 Line III	0.0400	0.1600	0.8000	0.1200	0.8800	0.0460
总计 Total	0.1544	0.3826	0.4631	0.3456	0.6544	0.0275

表 2 所列为 MyoG (PCR2) 基因和基因型频率。由表 2 看出,MyoG (PCR2) 位点在金华猪 II 系和 III 系中是单态的,但在 I 系中杂合率也很低,只出现一例 MN 基因型;整个实验群体中等位基因 M 的频率高达 0.9969,这与林万华等^[9](2003)报道的“中国地方猪种几乎表现为单一的 M 基因”相一致。

表 2 MyoG (PCR2) 基因和基因型频率

Table 2 The frequency of the MyoG (PCR2) gene and genotype

品系 Line	基因型频率			基因频率		标准差 (SD) Standard deviation
	Genotype frequency			Gene frequency		
	MM	MN	NN	M	N	
I 系 Line I	0.9938	0.0062	0	0.9969	0.0031	0.0031
II 系 Line II	1	0	0	1	0	0
III 系 Line III	1	0	0	1	0	0
总计 Total	0.9953	0.0047	0	0.9977	0.0023	0.0023

表 3 MyoG (PCR1) 基因对金华猪总产仔数的效应

Table 3 The effect of MyoG (PCR1) gene on TNB of Jinhua pigs

MyoG (PCR1)	初产 First parity			二胎 Second parity			经胎 Late parity			所有胎次 All parity		
	N	TNB	SD	N	TNB	SD	N	TNB	SD	N	TNB	SD
	AA	2	5.50 ^a	2.12	4	9.00	2.71	13	11.92	1.89	19	10.63
AB	24	9.75 ^b	2.69	21	10.76	3.25	73	11.32	2.92	118	10.90	2.98
BB	32	9.19	2.67	29	9.45	3.31	132	11.17	3.26	193	10.58	3.28
Total	58	9.29	2.73	54	9.93	3.27	218	11.26	3.08	330	10.70	3.15
加性效应 Additive effect		1.85			0.26			-0.38			-0.03	
显性效应 Dominant effect		2.41			1.54			-0.23			0.30	

注:肩标 a 与 b 之间表示差异显著。加性效应 = $(BB - AA)/2$;显性效应 = $AB - (AA + BB)/2$;TNB(total number born);SD(standard deviation)。下同。

Notes: Subscript a and b indicate significant differences between the means. Additive effect = $(BB - AA)/2$;Dominant effect = $AB - (AA + BB)/2$;TNB(total number born);SD(standard deviation)。

2.3 MyoG (PCR1) 基因对金华猪总产仔数的效应

采用独立效应线性模型分析 MyoG 基因的不同基因型对金华猪不同胎次的总产仔数效应(胎次组分为初产、二胎、经胎以及所有胎次)。结果表明(表 3),初产和二胎的加性效应分别为 1.85,0.26,经胎和所有胎次的加性效应分别为 -0.38,-0.35;显性效应依次分别为 2.41,1.54,-0.23,0.30。在初产中,MyoG (PCR1) 基因的 AA 和 AB 基因型对金华猪总产仔数有显著的影响($P < 0.05$);其余的影响均不显著($P < 0.05$);MyoG (PCR1) 的等位基因对金华猪总产仔数的加性效应,随着胎次不同而变化,总产仔数性状分别在 MyoG 基因的等位基因 B 与等位基因 A 的加性效应均存在初产、二胎、所有胎次、经胎依次降低的趋势。

2.4 MyoG (PCR1) 基因对产活仔数的效应

MyoG (PCR1) 基因对产活仔数的效应列在表 4。由表 4 可见,初产和二胎的加性效应分别为 1.74,-0.17,经胎和所有胎次的加性效应分别为 -0.63,-0.31;显性效应依次分别为 1.52,1.58,0.12,0.33。在二胎中,MyoG (PCR1) 基因的 AB 和 BB 基因型对金华猪产活仔数有显著影响($P < 0.05$);其余的影响均不显著($P < 0.05$);MyoG (PCR1) 的等位基因对金华猪产活仔数的加性效应,随着胎次不同而变化,产活仔数性状分别在 MyoG 基因的等位基因 B 与等位基因 A 的加性效应均存在初产、二胎、所有胎次、经胎依次降低的趋势。

2.5 MyoG (PCR1) 基因对初生窝重的效应

表 5 所列为不同 MyoG (PCR1) 基因型 (AA, BB, AB) 对金华猪初生窝重的效应。

表 4 *MyoG*(PCR1)基因对金华猪产活仔数的效应
Table 4 The effect of *MyoG*(PCR1)gene on NBA of Jinhua pigs

<i>MyoG</i> (PCR1)	初产 First parity			二胎 Second parity			经胎 Late parity			所有胎次 All parity		
	N	NBA	SD	N	NBA	SD	N	NBA	SD	N	NBA	SD
AA	2	5.50	2.12	3	9.33	2.31	13	11.31	1.80	18	10.33	2.61
AB	24	8.75	2.23	19	10.74 ^a	2.18	69	10.80	2.85	112	10.35	2.73
BB	31	8.97	2.60	29	9.00 ^b	3.01	124	10.06	3.38	184	9.71	3.23
Total	57	8.75	2.48	51	9.67	2.78	206	10.38	3.15	314	9.97	3.04
加性效应 Additive effect		1.74			-0.17			-0.63			-0.31	
显性效应 Dominant effect		1.52			1.58			0.12			0.33	

注 (Note): NBA(number born alive)。

表 5 *MyoG*(PCR1)基因对金华猪初生窝重的效应
Table 5 The effect of *MyoG*(PCR1)gene on LWB of Jinhua pigs

<i>MyoG</i> (PCR1)	初产 First parity			二胎 Second parity			经胎 Late parity			所有胎次 All parity		
	N	LWB	SD	N	LWB	SD	N	LWB	SD	N	LWB	SD
AA	1	1.50	0.00	2	4.00	0.00	8	15.51	19.20	11	12.14	17.08
AB	12	5.67	2.44	10	7.22	2.51	50	11.66	16.36	72	10.04	13.88
BB	22	6.10	3.02	15	5.82	3.01	76	8.26	6.24	113	7.51	5.48
Total	35	5.82	2.86	27	6.20	2.81	134	9.96	12.02	196	8.70	10.22
加性效应 Additive effect		2.30			0.91			-3.62			-2.31	
显性效应 Dominant effect		1.87			2.30			-0.22			0.22	

注 (Note): LWB(litter weight born)。

从表 5 可以看出,初产和二胎的加性效应分别为 2.30,0.91,经胎和所有胎次的加性效应分别为 -3.62,-2.31;显性效应依次分别为 1.87,2.30,-0.22,0.22。各个胎次中,*MyoG* 基因对金华猪初生窝重的影响不显著 ($P < 0.05$);*MyoG*(PCR1)的等位基因对金华猪初生窝重的加性效应,随着胎次不同而变化,初生窝重性状分别在 *MyoG* 基因的等位基因 B 与等位基因 A 的加性效应均存在初产、二胎、所有胎次、经胎依次降低的趋势。

3 讨论

3.1 *MyoG* 基因的多态性

TePas 等^[9](1999)根据 *MyoG* 基因序列设计引物,运用 PCR-*Msp* I -RFLP 检测了 *MyoG* 的基因型,发现猪 *MyoG* 基因共有 3 个位点,第三个位点为梅山猪所特有的,初步揭示了 *MyoG* 基因的遗传变异与仔猪的初生重相关。林万华等^[10](2003)报道,对于 PCR1-*Msp* I -RFLP 位点,外来品种杜长大表

现为高频率的等位基因 A,其中 AA 型在杜洛克、长白和皮特兰等 3 个外来猪种中的频率分别为 0.2115、0.1077 和 0,而地方猪种中 AA 型频率最高的是玉山黑猪,为 0.7576。Cieslak 等^[11](2000)采用 RFLP 法分析了 229 头猪 *MyoG* 基因的遗传变异,用限制性 *Msp* I 酶切猪基因组 DNA,发现基因的 3'端非翻译区碱基长度为 4.9 kb 和 4.2 kb 的 DNA 片段是多态性片段。Beever 等^[12](1997)采用 RFLP 法分析了牛 *MyoG* 基因的遗传变异,发现 *MyoG* 基因座的等位基因数目为 3,并且 *MyoG* 等位基因分离符合孟德尔分离定律。

3.2 *MyoG* 基因对繁殖性状的效应

作为一种肌细胞特异性转录因子,*MyoG* 基因具有以下功能^[13]:(1)调节自身基因的表达;(2)与生肌因子其他成员相互作用,调节彼此基因的表达;(3)调节肌肉特异基因如肌肉肌酸激酶、肌钙蛋白、肌球蛋白轻链基因等的表达。同时 *MyoG* 基因对猪繁殖性状的效应,*MyoG* 基因对金华猪头胎总产

仔数与二胎产活仔数有显著影响 ($P < 0.05$), 这可能与金华猪具有高产仔数的性能相关, 也可能与 MyoG 基因在不同猪种中的表达差异有关; MyoG 基因对金华猪初生窝重的影响不显著 ($P < 0.05$), MyoG 可能作为微效基因对金华猪的初生窝重产生影响; MyoG(PCR1) 基因的等位基因对金华猪初生窝重的加性效应与胎次有关, MyoG 基因对金华猪初生窝重影响可能是通过加性遗传模式来实现的; 金华猪 MyoG(PCR1) 基因的等位基因 A 和基因型 AA 频率在金华 II 系中最高, 分别为 0.9 和 0.8, 而金华猪 MyoG(PCR1) 基因的等位基因 B 和基因型 BB 频率在金华 III 系中最高, 分别为 0.88 和 0.8, 反映出金华猪保种群由于长期的本品种繁育, 存在一定程度的近交累积, 导致基因分离, 从而使座位多态性信息量降低, 对基因频率和基因型频率影响较大; MyoG (PCR-2) 位点在金华猪 II 系和 III 系中是单态的, 但在 I 系中杂合率很低, MyoG (PCR2-Msp I -RFLP) 位点上表现为极强的一致性, 缺乏等位基因 N, 与 Soumillion^[6]、林万华^[10] 的检测结果相一致。

参 考 文 献 (References):

- [1] LIN Wan-Hua, HUANG Lu-Sheng. Newly research progress on porcine myogenin gene. *Pigs and Poultry*, 2000, 1(27): 29~31.
林万华, 黄路生. 猪肌细胞生成素基因的研究进展. 猪与禽, 2000, 1(27): 29~31.
- [2] JIANG Yun-Liang, LI Ning, WU Chang-Xin. Studies on the molecular biology of myogenesis (review). *Journal of Agriculture Biotechnology*, 1999, 7(2): 201~204.
姜运良, 李 宁, 吴常信. 肌肉生成的分子生物学研究进展. 农业生物技术学报, 1999, 7(2): 201~204.
- [3] LIU Chou-Sheng, ZHAO Xing-Bo, LI-Ning, ZHAO You-Zhang. Advances on functional gene of regulation of skeletal muscle growth in animals. *Chinese Journal of Animal Science*, 2003, 5(39): 48~49.
刘丑生, 赵兴波, 李 宁, 赵有璋. 动物肌肉生长发育调控的功能基因研究进展. 中国畜牧杂志, 2003, 5(39): 48~49.
- [4] HE Yuan-Qing, CHU Ming-Xing, WANG Jin-Yu. Research progress on myogenin gene. *Hereditas* (Beijing), 2004, 26(2): 235~238.
何远清, 储明星, 王金玉. 肌细胞生成素基因的研究进展. 遗传, 2004, 26(2): 235~238.
- [5] LIN Wan-Hua, HUANG Lu-Sheng, AI Hua-Shui, ZHOU Li-Hua, GUO Yuan-Mei. Influences of MyoG genotypes on early growth traits and muscular histological characteristics of Chinese Erhualian pig. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2002, 10(4): 367~372.
林万华, 黄路生, 艾华水, 周利华, 郭源梅. MyoG 基因型对二花脸猪早期生长性状及肌肉组织学特性的影响. 农业生物技术学报, 2002, 10(4): 367~372.
- [6] Soumillion Ann, Jo H F, Erkens, Johannes A, Lenstra. Genetic variation in the porcine myogenin gene locus. *Mammalian Genome*, 1997, 8: 564~568.
- [7] LU Sheng-Dong. *Molecule Biology Experiment Technology in Modern*. Beijing: Publishing Company of China Xiehe Medicine and Technology University, 1999.
卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.
- [8] Bruce S W. *Genetic Data Analysis—Methods for Discrete Population Genetic Data.*, Sinauer Associates, Inc. Sunderland, 1990.
- [9] Tepas M F W, Soumillion A N N, Harders F L. Influences of myogenin genotypes on birth weight, growth rate, carcass weight, backfat thickness, and lean weight of pigs. *J Anim Sci*, 1999, 77: 2352~2356.
- [10] LIN Wan-Hua, GAO-Jun, CHEN Ke-Fei, DING Neng-Shui, AI Hua-Shui, GUO Yuan-Mei, LI-Lin, HUANG Lu-Sheng. Polymorphism analysis of porcine myogenin gene by PCR-RFLP. *Hereditas* (Beijing), 2003, 25(1): 22~26.
林万华, 高 军, 陈克飞, 丁能水, 艾华水, 郭源梅, 李 琳, 黄路生. 猪 MyoG 基因的 PCR-RFLP 多态性分析. 遗传, 2003, 25(1): 22~26.
- [11] Cieslak D, Kapelanski W, Blicharski T, Pierzchala M. Restriction fragment length polymorphisms in myogenin and myf3 genes and their influence on lean meat content in pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2000, 117(1): 43~55.
- [12] Beever J E, Fisher S R, Guerin G, Lewin H A. Mapping of eight human chromosome 1 orthologs to cattle chromosome 3 and 16. *Mammalian Genome*, 1997, 8(7): 533~536.
- [13] DANG Xi-Tong, JIA Hong-Di, ZHANG Heng. The function and regulation of myogenic protein. *Progress in Physiological Science*, 1996, 27(2): 146~148.
党喜同, 贾弘提, 张 衡. 生肌蛋白的功能与调节. 生理科学进展, 1996, 27(2): 146~148.