

3 品种鹅 *Myostatin* 基因 3'-调控区 SNPs 群体遗传学分析

杨凤萍¹, 陈义权², 李世平¹, 李其松², 王金玉^{2*}

(1. 扬州大学生物科学与技术学院, 扬州 225009;

2. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009)

摘要: 利用已测得的鹅 *Myostatin* 基因 3'-调控区核苷酸序列设计 5 对 PCR-SSCP 引物, 对扬州鹅、皖西白鹅以及五龙鹅 3 品种家鹅该区域内单核苷酸多态性进行了分析, 并探索了单核苷酸多态性与生产性能之间的关系。结果表明, 检测到 A→G(88 位) 和 G→T(353 位) 2 个单碱基突变位点。88 位处, E 等位基因为优势等位基因, 具有 EE、EF 两种基因型, 以扬州鹅杂合子频率最高(0.550), 皖西白鹅 30 个个体仅有一例 EF 型; 353 位处, G 为优势等位基因, 具有 GG、GH 和 HH 3 种基因型, 3 品种均具有较高的 GG 基因型频率、较低的 HH 基因型频率。屠体性能分析发现, EF 基因型家鹅具有更高的屠体性能; 扬州鹅、皖西白鹅 GG 型个体的腿肌重和腿肌率显著高于 HH 型个体 ($P < 0.05$), 五龙鹅腿肌重、腿肌率具有 GG 型 > GH 型 > HH 型的趋势, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

关键词: 家鹅; *Myostatin* 基因 3'-调控区; SNPs; 屠体性状

中图分类号: S835.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)05-0442-05

SNPs Analysis of 3'-Regulatory Region of *Myostatin* Gene in Three Geese Breeds

YANG Feng-ping¹, CHEN Yi-quan², LI Shi-ping¹, LI Qi-song², WANG Jin-yu^{2*}

(1. College of Bioscience and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: 5 pairs of primers were designed to identify SNPs in 3'-regulatory region of *Myostatin* gene in 3 geese breeds, and the relativity of SNPs and slaughter characters was also analyzed. And the results showed that two SNPs were detected, which were A88G and G353T. Population genetic analysis indicated that there were EE and EF genotypes in 88 bp site, and E allele was a superior one. The frequency of EF genotype was especially high in Yangzhou geese (0.550), but very low in Wanxi White geese (0.033). In 353 bp site, three genotypes, GG, GH and HH were detected. The frequency of GG was the highest and that of HH was the lowest in 3 geese groups. The relativity analysis showed that individuals with EF had higher slaughter performances than those with EE. For leg muscle weight(LMW) and leg muscle percent(LMP), individuals with GG were significantly higher than those with HH in Yangzhou geese and Wanxi White geese ($P < 0.05$).

Key words: domestic goose; 3'-regulatory region of *Myostatin* gene; SNPs; slaughter characters

肌肉生长抑制素 (*Myostatin*) 基因属于 TGF- β 超家族成员, 对肌肉的生长起负调控作用。同一动

收稿日期: 2006-06-19

基金项目: 国家科技部农业科技成果转化资金(04EFN21320099); 江苏省高校自然科学基金计划(05KJB230159)

作者简介: 杨凤萍(1969-), 女, 江苏姜堰人, 博士, 讲师, 主要从事动物遗传育种与繁殖学研究

* 通讯作者: 王金玉, 教授, 博导, E-mail: jywang@yzu.edu.cn, Tel: 0514-7979075

物体在不同的发育时期^[1,2]、同一发育时期不同的组织中^[3,4]表达量都有所不同。不同动物体,特别是近缘物种,*Myostatin* 基因的同源性较高。目前对试验动物家鼠^[5,6]以及以产肉为主的畜禽,如牛、猪、禽等 *Myostatin* 基因的研究较为深入,有的已经进行了准确定位^[7~9]。本研究应用 PCR-SSCP 分析技术,拟探索我国饲养量较大、品种资源较为丰富的鹅 *Myostatin* 基因 3'-调控区内单核苷酸多态性 (SNP) 特点,并分析不同位点 SNPs 与屠体性能之间的关系,为进一步研究水禽 *Myostatin* 提供相关资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

80 日龄扬州鹅 40 只,购自江苏省扬州高邮送桥镇扬州鹅种鹅场;110 日龄皖西白鹅 30 只,购自安徽省六安三十铺皖西白鹅种鹅场;110 日龄五龙鹅 30 只,购自山东省莱阳市五龙鹅原种繁育基地。

Taq 酶、dNTPs、甲酰胺、AgNO₃ 等购自上海生工生物工程公司。

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 家鹅翅静脉采血,酚/氯仿/异戊醇法抽提基因组 DNA,TE 溶解后 -20 °C 保存。DNA 纯度检测时的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.7~1.8 之间。

1.2.2 引物的设计 根据本研究室所测鹅 3'-调控区部分序列 (GenBank 登录号为 DQ291134) 设计 PCR-SSCP 扩增引物,扩增产物片断的长度控制在 100~300 bp,结果如下:3et1F:5'-GAGACCCACCACTTCATA-3',3et1R:5'-AATCACCAGTCATTAGGC-3';3et2F:5'-AAAAGACCAGAGAGTTGCCTAA-3',3et2R:5'-ACCTT GAA ACCTGCGTAT-3';3et3F:5'-AATCCATACGCAGGTTTC-3',3et3R:5'-AAGGATGATTCTGGTGGT-3';3et4F:5'-ATGGTAGTGTATTTAGCGTG-3',3et4R:5'-ATTTCTTGCGAATGTTGA-3';3et5F:5'-TAT-TCAACATTCGCAAGA-3',3et5R:5'-CTGTGCGCAACCAACTATT-3'。

所有引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2.3 PCR-SSCP 分析 PCR 扩增体系:10×buffer 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.2 μL,10 mmol/L dNTPs 1.0 μL,10 μmol/L 上游引物 1.5

μL,10 μmol/L 下游引物 1.5 μL,Pyrobest™ DNA Polymerase 0.2 μL,模板 1.0 μL,加双蒸水至 25 μL。PCR 程序为:95 °C 5 min;94 °C 1 min,55 °C 1 min,72 °C 1 min,30 个循环;72 °C 10 min,4 °C 保存。

扩增产物检测:取 5 μL PCR 产物与 15 μL 上样缓冲液 (95% 去离子甲酰胺,0.5% 溴酚蓝,0.5% 二甲苯青) 混匀,98 °C 变性 8 min 后,立即冰浴 5 min 后,上样于 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 (Acr:Bis 为 29:1) 中,10V/cm 电泳 8 h,银染显带。

1.2.4 统计分析 将具有多态的 PCR 扩增产物直接送宝生物工程大连有限公司进行纯化和测序。

应用 SPSS11.0 进行不同位点基因型与屠体性能间的相关分析。

2 结果与分析

2.1 PCR-SSCP 检测

利用 5 对引物进行 PCR-SSCP 分析,结果发现家鹅 *Myostatin* 基因 3'-调控区具有 2 个多态位点 (图 1、2)。基因型频率和等位基因频率统计结果见表 1 和表 2。

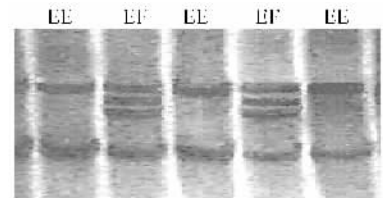


图 1 引物 3et1 PCR-SSCP 检测

Fig. 1 Detecting result of 3et1 primer

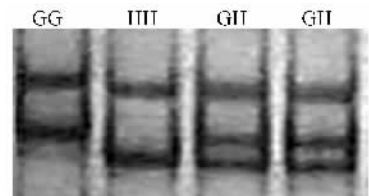


图 2 引物 3et3 PCR-SSCP 检测

Fig. 2 Detecting result of 3et3 primer

从表 1 可以看出,3 品种家鹅均以 E 等位基因占优势,未能检测到 FF 基因型的存在。扬州鹅杂合子频率最高 (0.550),而 30 个皖西白鹅个体仅检测到一例为杂合体。

表 1 引物 3et1 PCR-SSCP 检测到的基因型分布频率和等位基因频率

Table 1 The genotypes and alleles frequency screened by PCR-SSCP of primer 3et1

品种 Breeds	样本数 Number	基因型频率 Genotypes frequency			等位基因频率 Alleles frequency	
		EE	EF	FF	E	F
扬州鹅 Yangzhou	40	0.450(18)	0.550(22)	0(0)	0.725	0.275
皖西白鹅 Wanxi White	30	0.967(29)	0.033(1)	0(0)	0.983	0.017
五龙鹅 Wulong	30	0.800(24)	0.200(6)	0(0)	0.900	0.100
总计 Total	100	0.710(71)	0.290(29)	0(0)	0.855	0.145

表 2 引物 3et3 PCR-SSCP 检测到的基因型分布频率和等位基因频率

Table 2 The genotypes and alleles frequency screened by PCR-SSCP of primer 3et3

品种 Breeds	样本数 Number	基因型频率 Genotypes frequency			等位基因频率 Alleles frequency	
		GG	GH	HH	G	H
扬州鹅 Yangzhou	40	0.625(25)	0.250(10)	0.125(5)	0.750	0.250
皖西白鹅 Wanxi White	30	0.833(25)	0.100(3)	0.067(2)	0.883	0.117
五龙鹅 Wulong	30	0.600(18)	0.333(10)	0.067(2)	0.767	0.233
总样本 Total	100	0.680(68)	0.230(23)	0.000(9)	0.795	0.205

表 2 可以看出,3 品种家鹅均检测到较高频率的 GG 基因型,较低频率的 HH 基因型,G 等位基因为优势等位基因。

2.2 测序结果

对引物 3et1 的 2 种基因型进行序列测定以及 MegAlign 比对,结果表明,3et1 位点于 3'-调控区 88 bp 处产生了由 A → G 的单碱基突变(见图 3)。

对引物 3et3 的 2 种纯合基因型进行序列测定以及 MegAlign 比对,结果表明,3et3 位点于 3'-调控区 353 bp 处产生了 G → T 的单碱基突变(见图 4)。

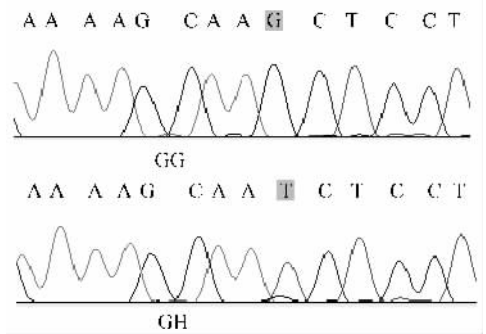


图 4 GG,GH 基因型序列测定(3et3 引物)
Fig. 4 Sequences of GG and GH (primer 3et3)

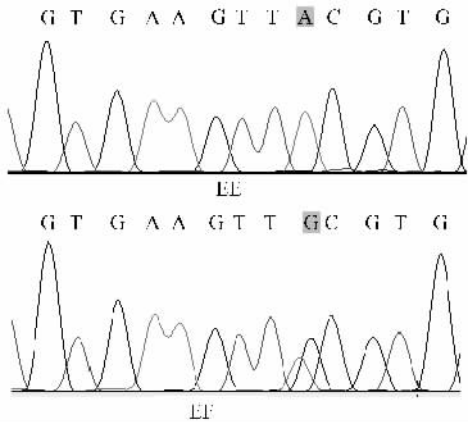


图 3 EE,EF 基因型序列测定(3et1 引物)
Fig. 3 Sequences of EE and EF by (primer 3et1)

2.3 SNPs 多态性与屠体性状之间的关联分析

2.3.1 引物 3et1 扩增多态性与屠体性状之间的关系 以五龙鹅群体作为主要研究对象进行分析发

现,EF 基因型个体的腿肌、胸肌、翅、腹脂、心肌、肝等平均重分别高出 EE 基因型个体均值 3.20、16.15、13.59、66.27、6.80、20.72 百分点;而半净膛重、全净膛重分别高出 EE 基因型个体 12.65 和 13.33 百分点,腿肌率、胸肌率、翅率、腹脂率等也都表现为 EF 基因型高于 EE 基因型。扬州鹅群体中,EF 型个体屠体性状也具有高于 EE 型个体的趋势。

2.3.2 引物 3et3 扩增多态性与屠体性状之间的关系 对 3 品种鹅群 3et3 位点的 3 种基因型进行屠体性能的关联分析,结果表明,不同基因型对腿肌重(LMW)与腿肌率(LMP)有一定影响(见表 3)。表中显示,80 日龄扬州鹅 GH 和 GG 型个体的腿肌率显著高于 HH 型个体($P < 0.05$)。110 日龄皖西白鹅 GG 型个体的腿肌重、腿肌率显著高于 GH 型个体($P < 0.05$),而 GG 型个体与 GH 型个体之间差

异不显著($P>0.05$)。110 日龄五龙鹅 GG 型、GH 型、HH 型个体间腿肌重、腿肌率差异不显著($P>$

0.05),但 3 种基因型间腿肌重及腿肌率表现出 GG 型>GH 型>HH 型的趋势。

表 3 3et3 引物不同基因型与屠体性状的关系

Table 3 The effects of three genotypes of primer 3et3 on slaughter characters

品种 Breeds	基因型 Genotype	个体数 Number	基因型频率 Frequency	腿肌重 LMW	腿肌率 LMP
扬州鹅 Yangzhou	GG	25	0.625	325.40±56.24 ^{ab}	15.84±1.26 ^a
	GH	10	0.250	344.00±16.92 ^a	16.86±1.15 ^b
	HH	5	0.125	275.60±19.89 ^b	14.42±0.45 ^c
皖西白鹅 Wanxi White	GG	25	0.833	459.31±48.17 ^a	18.31±0.76 ^a
	GH	3	0.100	398.80±40.56 ^{ab}	17.70±2.07 ^{ab}
	HH	2	0.067	389.47±65.34 ^b	16.80±0.11 ^b
五龙鹅 Wulong	GG	18	0.600	327.13±59.73 ^a	17.99±2.26 ^a
	GH	10	0.333	324.26±24.38 ^a	18.22±1.31 ^a
	HH	2	0.067	306.70±39.17 ^a	16.69±11.36 ^a

均值比较时,同一列具有字母相同者差异不显著($P>0.05$)

The difference is not significant between the two which have the same letter

3 讨论

3.1 家鹅 *Myostatin* 基因 3'-调控区同源性及单核苷酸多态性分析

McPherron 等^[10] 研究发现 *Myostatin* 基因在不同物种间高度保守,狒狒、绵羊和牛的 C-末端仅有 1~3 个碱基不同,斑马鱼与上述其它动物同源性为 88%。通过对本实验室获得的家鹅和虎皮鹦鹉(GenBank 登录号为 DQ295804)*Myostatin* 基因 3'-调控区进行比对分析,发现两者同源性高达 88.1%。比对结果还发现,两者与家鸡该序列的同源性分别高达 87.8%和 84.5%。由此表明,近缘物种间 *Myostatin* 基因 3'-调控区核苷酸序列的同源性也较高。

目前对 3'-调控区所具有的调控功能研究不多,有关单核苷酸多态性的报道甚少。Gu 等^[11] 检测到鸡 *Myostatin* 基因 3'-调控区的 2 个 SNP 位点,分别为 A→G(6 935 位)和 A→T(7 263 位)。本研究设计的 PCR-SSCP 引物涵盖了 3'-调控区 1 000 个碱基左右,检测到 A→G(88 位)与 G→T(353 位)2 个 SNP 位点。群体分析结果表明,88 位单碱基突变位点中,3 品种鹅群体均未能检测出纯合 FF 基因型,皖西白鹅群体具有较低的突变率,扬州鹅品种杂合子比例最高(55%)。353 位单碱基突变位点具有 3 种基因型,纯合 GG 基因型占优势,以皖西白鹅为最

高(83.3%),而五龙鹅的杂合子比例最高(33.3%)。显然,2 个多态位点在 3 品种鹅中的表现有所不同。

3.2 SNPs 与屠体性能之间的关系

肌肉抑制素具有调节动物骨骼肌总量,使之保持在适当比例的功能,该基因功能区碱基的缺失或突变都有可能造成动物骨骼肌的异常肥大,肌肉量显著增加^[12]。有研究表明,非编码区碱基的突变或缺失,可通过影响基因正常的剪切和拼接而导致表达量的变化甚至功能的丧失^[11, 13]。Schuelke 等^[14] 研究发现,由于 *Myostatin* 基因内含子 1 的第 5 个核苷酸发生了由 A→G 的单碱基纯合突变,使剪接后的 *Myostatin* 基因 70%被改变,从而阻断了这一小分子蛋白质的合成,结果,该基因纯合突变的一名 5 岁德国男童腿部肌肉的横断面面积为同龄儿童的 2 倍,而皮下脂肪却只有同龄儿童的一半。Gu 等^[11] 发现鸡 *Myostatin* 基因 3'-调控区 7 263 位 A→T 的两个纯合基因型个体间胸肌重、胸肌率差异显著($P<0.05$)。Guernec 等^[15] 通过对 IGF-I/*Myostatin* 比例高、胸肌产量高的鸡进行筛选和传代,经 15 代的试验选择,胸肌和体重分别增加 21%、6%,而腹脂率降低了 33%。由此可见,加大家鹅 *Myostatin* 基因的研究力度,也可为培育高肌肉重、高体重及低脂率的新型鹅品种提供最可靠、最直接的手段。

本研究对不同日龄的 3 个鹅品种进行 SNP 位点与屠体性能进行相关分析,结果表明,3et1 位点 2

种基因型间屠体性状有一定差异,但因不具 FF 基因型未进行显著性检验。扬州鹅和皖西白鹅 3et3 位点的 3 种基因型与腿肌重、腿肌率有一定的相关性,G 基因表现出增效作用。尽管五龙鹅此 3 种基因型与个体腿肌重及腿肌率没有显著相关性,但表现出 GG>GH>HH 的趋势。本研究中尽管各鹅群体样本数不多,但该研究结果仍能够为加大样本量进一步分析提供依据。

参考文献:

- [1] Ji S, Losinski R L, Cornelius S G, *et al.* *Myostatin* expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation[J]. *Am J Physiol*, 1998, 275:1 265~1 273.
- [2] Gonzleza-Cadavid N F, Taylor W E, Yarasheski K, *et al.* Organization of the human *Myostatin* gene and expression in healthy men and HIV- infected men with muscle wasting[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 (25): 14 938~14 943.
- [3] Kocamis H, McFarland D C, Killefer J. Temporal expression of growth factor genes during myogenesis of satellite cells derived from the biceps femoris and pectoralis major muscles of the chicken[J]. *J Cell Physiol*, 2001, 186:146~152.
- [4] Kocabas A M, Kucuktas H, Dunhan R A, *et al.* Molecular characterization and differential expression of the *Myostatin* gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1 575: 99~107.
- [5] Szabo G, Dallmann G, Muller G, *et al.* A deletion in the *Myostatin* gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice[J]. *Mamm Genome*, 1998, 9(8):671~672.
- [6] McPherron A C, Lee S J. Suppression of body fat accumulation in *Myostatin* deficient mice[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(5): 595~601.
- [7] Smith T P, Lopez Corrales N L, Kappes S M, *et al.* *Myostatin* maps to the interval containing the bovine mh locus[J]. *Mamm Genome*, 1997, 8(10):742~744.
- [8] Sonstegard T S, Rohrer G A, Smith T P. *Myostatin* maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses [J]. *Anim Genet*, 1998, 29(1):19~22.
- [9] 杨凤萍, 王金玉, 陈义权, 等. 家鹅 *Myostatin* 基因 3'-UTR 序列分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(6):550~554.
- [10] Mcpherron A C, Lauler A M. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member[J]. *Nature*, 1997, 387(6 628):83~90.
- [11] Gu Z L, Zhang H F, Zhu D H, *et al.* Single nucleotide polymorphism analysis of the chicken *Myostatin* gene in different chicken lines[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(7):565~570.
- [12] Kambadur R, Sharma M, Smith T P, *et al.* Mutations in *Myostatin* (GDF8) in double-muscle Belgian Blue and Piedmontese cattle[J]. *Genome Res*, 1997, 7(9): 910~916.
- [13] Jiang Y L, Li N, Du L X, *et al.* Relationship of TvA mutation in the promoter region of *Myostatin* gene with growth traits in swine[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(5): 413~416.
- [14] Schuelke M, Wagner K R, Stolz L E, *et al.* *Myostatin* mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350 (26): 2 682~2 688.
- [15] Guerneq A, Berri C, Chevalier B, *et al.* Muscle development, insulin-like growth factor-I and *Myostatin* mRNA levels in chickens selected for increased breast muscle yield[J]. *Growth Horm IGF Res*, 2003, 13 (1): 8~18.