

牛肌肉生长抑制素(MSTN)基因的检测、分型研究^{*}

孙少华¹ 李雷梅¹ 魏学蕊¹ 师守堃² 李 玉¹ 冯利民³

¹河北农业大学动物科技学院 保定 071001 ²中国农业大学动物科技学院 北京 100094 ³抚宁县利民牛场 秦皇岛 066300

摘要 本研究根据皮埃蒙特牛肌肉生长抑制素(MSTN)基因序列设计了3条特异性引物,以纯种皮埃蒙特牛、皮荷杂种牛和荷斯坦牛的DNA为模板,对是否携带MSTN基因的个体牛进行单核苷酸多态性分析,提出了一套牛肌肉生长抑制素基因检测分析以及准确鉴定其基因型的方法。

关键词 牛 双肌性状 肌肉生长抑制素基因 单核苷酸多态性

目前国内外牛肉用性状的研究主要集中在日增重、瘦肉量和肉质上。这些性状都必须等牛长大以后才能测量,尤其是产肉量和肉质屠宰后才有结果,这就在一定程度上影响了肉牛遗传进展。许多研究者一直在寻找能进行早期选择、易于度量的新性状或者分子标记。早在19世纪发现的牛“双肌”性状,即肩部、背部、臀部肌肉特别发达的个体,近年来的深入研究表明“双肌”牛是由于肌肉过度发育和脂肪发育不良造成,如比利时兰白花和皮埃蒙特牛与普通牛相比具有瘦肉量大9%~12%、脂肪少30%~39%的特点^[1~2]。McPherron等^[3]采用简并PCR(degenerate PCR)技术首次在小鼠中鉴别出一个GDF-8基因,该基因突变的小鼠显著大于正常小鼠,表现在骨骼肌的过度发育,单块肌肉要比正常小鼠的重2~3倍,这表明GDF-8是骨骼肌发育的一种负调控因子。根据小鼠GDF-8的序列,McPherron and Lee^[4]对牛的GDF-8基因(即肌肉生长抑制素基因,Myostatin gene)进行了克隆分析证实,GDF-8基因的突变是造成牛“双肌”的原因。这个主基因已被定位在牛2号染色体着丝粒末端上^[5~7]。考虑到牛“双肌”性状的诸多优点,本研究利用牛肌肉生长抑制素(Myostatin, MSTN)基因序列设计特异性引物,对国内引进的皮埃蒙特公牛及其杂交后代进行基因突变的检测和基因型鉴定与分析,这对肉牛良种的早期选择、品种鉴定,以及利用“双肌”基因提高肉牛生产性能均具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 样本采集及DNA的提取

选择13个具有表型“双肌”性状的纯种皮埃蒙特

公牛个体的冻精,并采集皮荷杂种牛(皮埃蒙特公牛(荷斯坦母牛)、野生型荷斯坦母牛血样各20头份,按照Sambrook^[8]方法提取DNA。

1.2 牛“双肌”基因(MSTN)的单核苷酸多态性分析

在牛品种中,意大利皮埃蒙特牛和比利时兰白花牛的“双肌”性状发生率较高。Mcpherron和Lee^[4]通过对皮埃蒙特牛MSTN基因的3个外显子测序研究后认为:在第三外显子处有一错义突变(G→A),即在蛋白质成熟区酪氨酸替代了胱氨酸(见图1)。致使肌肉生长抑制因子(Myostatin)的活性丧失,从而引起牛表现出“双肌”性状。

本研究根据皮埃蒙特牛MSTN基因测序图谱,利用单核苷酸多态性(SNPs)分析原理,提出了分型鉴定方法并设计了3个特异性引物。一个能与SNPs位点下游DNA序列完全互补的共用引物(D₃:5'-GGGGCCGGCTGAACCTCT-3');上游引物为两个等位基因的特异性引物,其中一个为与野生型牛DNA序列片段互补的引物(U₁:5'-GCCAAT-TACTGCTCTGGAGAACG-3'),另一个是与含有SNPs突变位点的(双肌牛)DNA序列互补的引物(U₂:5'-AAGGCCAATTACTGCTCTGGAGAAC-

```

                                     A
                                     ↑
1043 TGCTCTGGAGAATGTGAATTTGTATTT 1069
309  C S G E C E F V F 317 正常 Regular
      C S G E Y E F V F      突变 Mutation
```

图1 皮埃蒙特MSTN基因突变型与荷斯坦牛野生型基因序列比较模式图

Fig 1 Myostatin mutation in Piedmontese cattle compared with wild-type Holstein cattle

A-3'),该3个引物由上海生工生物工程公司合成。

PCR反应体系总体积为20μl,分别以纯种皮埃蒙特牛、皮荷本杂种牛和纯种荷斯坦牛的基因组总DNA为模板,每个模板50ng;每个dNTPs 0.2mMol, TagDNA酶浓度为1.0U;将3个引物(U₁ 0.5pmol、U₂ 0.5pmol和D₃ 1.0pmol)加入PCR反应体系中,在68℃退火温度下进行PCR扩增,扩增产物在8%聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,银染分析其基因型。

* 基金项目:河北省自然科学基金项目(398092)资助

2 结果与分析

肉牛“双肌”基因(MSTN)的PCR扩增产物见图2。由图2看出,含有纯合突变MSTN基因的皮埃蒙特牛PCR扩增产物(3,4,6,9道)为102bp纯合带(MM),该基因序列从1034号位到1133号位;野生型的荷斯坦牛的PCR扩增产物(1,2,5,8道)为99bp纯合带(mm),该基因序列从1034号位到1133号位。皮埃蒙特牛与荷斯坦牛的杂种后代牛的PCR扩增产物(7道)为102bp和99bp两条杂合带(Mm)。其分析结果:13头皮埃蒙特纯种公牛全为突变纯合型个体,20头皮荷杂种牛全为杂合型个体,20头荷斯坦牛全为野生纯合型个体,这与实际情况相符。

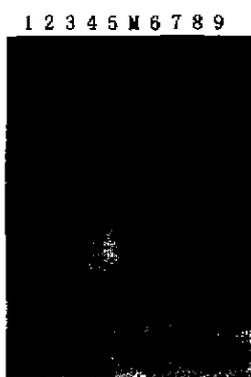


图2 牛MSTN基因PCR产物电泳图谱
Fig 2 Banding patterns of PCR amplified for myostatin gene

对于任何牛,采用SNPs技术,以基因组总DNA为模板,利用设计的三条特异性引物,并通过PCR扩增、聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、染色分析,就能检测

出该牛是否携带“双肌”基因(MSTN),是否为突变纯合体、杂合体、还是普通野生基因型的个体。

3 讨论与结论

单核苷酸多态性(SNPs)是继RFLPs和微卫星

DNA标记之后的第三代分子遗传标记,它较微卫星DNA具有更高的多态性和遗传稳定性,检测SNPs对于研究基因组或基因片段中何种类型的碱基替换、插入或缺失是非常有效的^[9]。本研究利用SNPs分析对皮埃蒙特牛单核苷酸突变基因MSTN的成功检测就说明了这一点。根据MSTN序列特点提出的分型鉴定方法并设计了3条特异性引物,在国内首次能检测出牛“双肌”基因(MSTN)的个体携带者,以及准确地鉴定其基因型,这对肉用牛良种早期选择、品种鉴定、基因型育种以及利用双肌基因提高肉牛生产性能均具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Arthur, P. F. Double muscling in cattle: A review. *Aust. J. Agric. Res.* 1995, 46: 1493~1515
- 2 Wheeler, T. L., L. V. Cnndiff, R. M. Koch, et al. Characterization of different biological types of steers (Cycle IV): Wholesale, subprimal, and retail product yields. *J. Anim. Sci.* 1997, 75: 2387~2403
- 3 McPherron A. C., A. M. Lawler, and S. J. Lee. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature (Lond.)* 1997, 387: 83~90
- 4 McPherron A. C., and S. J. Lee. Double-muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12457~12461
- 5 Charlier, C., W. Coppetiers, F. Farnir, et al. The mh gene causing double muscling in cattle maps to bovine chromosome 2. *Manum. Genome.* 1995, 6: 788~792
- 6 Dunner, S., C. Charlier, F. Farnir, et al. Towards interbreed 1BD 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. *Manum. Genome.* 1997, 8: 430~435
- 7 Casas, E., J. W. Keele, S. D. Shackelford, et al. Association of the muscle hypertrophy locus with carcass traits in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 1998, 76: 468~473
- 8 Sambrook J, et al. *Molecular cloning a laboratory manual*, second edition, Cold Spring Harbor Lab. Press
- 9 杨昭庆, 洪坤宇. 单核苷酸多态性的研究进展. *国外医学遗传学分册*, 2000, 23(1): 4~8

Detecting and Genotyping for Bovine Myostatin Gene

Sun Shaohua¹ Li Xuemei¹ Wei Xuerui¹ Shi Shoukun² Li Yu¹ Feng Limin³

¹ College of Animal Science and Technology, HAU Baoding 071001 ² College of Animal Science and Technology, CAU Beijing 100094 ³ Feedlot of Limin Funing county Qinhuangdao 066300

Abstract Based on sequence in bovine of myostatin gene(double muscle gene), 3 special primers were designed. DNA of Piedmontese, Piedmontese (Holstein crossbred and Holstein cattle) was as PCR template. Double-muscle gene was analysed by single nucleotide polymorphisms. The result was proposed that a accurate method of detection bovine myostatin gene and genotype.

Key words Bovine Double-muscle Myostatin gene Single nucleotide polymorphisms