

# 绵羊 *MyoG* 基因外显子的单核苷酸 多态性群体遗传学分析

刘永斌<sup>1,2</sup>, 王 峰<sup>1,2\*</sup>, 邓 凤<sup>2</sup>, 田春英<sup>1</sup>, 刘美霞<sup>4</sup>, 梁振军<sup>3</sup>, 荣威恒<sup>1</sup>

(1. 内蒙古畜牧科学院, 呼和浩特 010030; 2. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018;

3. 内蒙古生物制品厂, 呼和浩特 010030; 4. 内蒙古医学院第二附属医院, 呼和浩特 010030)

**摘 要:** 采用 PCR-SSCP 技术分析了肌细胞生成素(*MyoG*)基因外显子 1、2 在蒙古羊、无角陶赛特羊、德国肉用美利奴羊和白萨福克羊这 4 个绵羊品种的多态性。结果表明在在外显子 1(exon I)所扩增的片段中存在 3 种基因型(AA 型、AB 型和 BB 型), 在外显子 2(exon II)所扩增的片段中不存在多态性。对于 exon I 扩增片段, 4 个绵羊品种均检测到 AA 和 AB 基因型; BB 基因型只在蒙古羊、陶赛特羊和白萨福克羊中检测到。在 4 个绵羊品种中, 蒙古羊的 AA 基因型频率最高, 而其它 3 个品种羊是 AB 基因型频率高; A 等位基因频率明显高于 B 等位基因频率。exon I 的多态性片段测序分析表明: *MyoG* 基因第 305 处发生了单碱基突变(T→C), 并导致了所编码氨基酸由半胱氨酸变为精氨酸。

**关键词:** 绵羊; *MyoG* 基因; PCR-SSCP

中图分类号: S826.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)12-1294-06

## Analysis on Single Nucleotide Polymorphisms of Exon of *MyoG* Gene in Different Sheep Breeds

LIU Yong-bin<sup>1,2</sup>, WANG Feng<sup>1,2\*</sup>, DENG Feng<sup>2</sup>,

TIAN Chun-ying<sup>1</sup>, LIU Mei-xia<sup>4</sup>; LIANG Zhen-jun<sup>3</sup>, RONG Wei-heng<sup>1</sup>

(1. Inner Mongolia Academy of Animal Science, Huhhot 010030, China; 2. College of Animal Science and Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China; 3. Inner Mongolia Plant of Biology Leechdom, Huhhot 010030, China; 4. The Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Huhhot 010030, China)

**Abstract:** The polymorphisms of *myogenin* gene in Mongolian sheep, Poll Dorset sheep, German meat Merino sheep and Suffolk sheep were analyzed by PCR-SSCP. The results indicated that there were three genotypes(AA, AB and BB) detected by exon I, and there weren't polymorphism in exon II. To amplify fragments by exon I, AA and AB genotypes were detected in four sheep breeds. BB genotype was detected in Mongolian sheep, Poll Dorset sheep and Suffolk sheep. Frequency of AA genotype in Mongolian sheep was the highest, but frequency of AB genotype in other three breeds was high. Frequency of A allele was obviously higher than frequency of B allele in four sheep breeds. The polymorphic fragments amplified by exon I were cloned and sequenced, and the sequencing results showed that there was one single nucleotide mutation: T→C at cDNA 305 of *myogenin* gene in sheep, and this mutation resulted in an amino acid change: cysteine→arginine.

收稿日期: 2006-11-28

基金项目: 国家自然科学基金(30560102); 畜禽种质资源平台项目(2005DKA21101)

作者简介: 刘永斌(1977-), 男, 蒙古族, 博士, 主要从事牛羊遗传育种与分子生物学研究, Tel: 0471-3954205, E-mail: ybliu117@126.com

\* 通讯作者: 王 峰(1972-), 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究

**Key words:** sheep ; *MyoG* gene ; PCR-SSCP

肌细胞生成素 (Myogenin, *MyoG*) 基因在肌细胞分化过程中起着中心调节作用, 直接影响着动物的产肉能力<sup>[1,2]</sup>。从分子水平研究绵羊生长性状的候选基因和相关分子标记, 并以此为基础进行标记辅助选择, 是提高绵羊产肉能力和肉品质的有效手段之一, 也是改良我国绵羊品种、培育新的肉用品种的良好途径。

*MyoG* 基因是 *MyoD* 基因家族中唯一在所有骨骼肌细胞系均可表达的基因, 是骨骼肌分化所必需的因子, 其功能不可被其它生肌调节因子所代替, 控制着整个肌肉的发育过程, 从前体肌细胞的定型、增殖以及肌纤维的形成, 直到个体出生后的成熟和功能的完善, 都有生肌调节因子的参与<sup>[3,4]</sup>, 可激活肌肉的基因转录, 抑制细胞生长周期, 促进细胞分化<sup>[5]</sup>。因此 *MyoG* 基因家族对脊椎动物肌细胞分化和骨骼肌系统的发育成熟具有重要意义。Cieslak 等利用 PCR-RFLP 的方法证实了 *MyoG* 基因对猪的胴体性状有显著影响, 国内外的科研人员相继对猪、牛的 *MyoG* 基因进行了多态性研究, 推测并发现了 *MyoG* 基因的突变位点与猪、牛的初生重有关<sup>[6]</sup>, 但对绵羊的 *MyoG* 基因研究比较少。本研究利用候选基因法以蒙古羊、无角陶赛特羊、德国肉用美利奴羊和白萨福克羊为试验材料, 采用单链构象多态方法对在细胞生长和分化中起重要调节作用的 *MyoG* 基因进行单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP) 检测, 以比较 *MyoG* 基因在不同绵羊品种中的多态性, 并对其 SSCP 多态性的 DNA 片段进行测序比较分析, 旨在寻找与生长性状相关的分子遗传标记, 为绵羊生长性状的标记辅助选择和育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本来源

基因组 DNA 来自蒙古羊、无角陶赛特羊、德国肉用美利奴羊、白萨福克羊 4 个绵羊品种 169 个个体的血液, 采自 2 个牧场, 分别为黑城子示范牧场、内蒙古德美种羊场。用 ACD 抗凝,  $-70^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.2 主要试剂

蛋白酶 K、*EcoR* I 和 *Hind* III 限制内切酶购于 Promega 公司; pMD18-T Vector、DNA Ladder 2000 (分子量为 2 000、1 000、750、500、250、100

bp)、*Ex-Taq* DNA 聚合酶、IPTG、*X-gal* 购自 TaKaRa 公司; 凝胶 DNA 回收试剂盒、日常型质粒小量制备试剂盒购于杭州维特洁生化技术有限公司; 琼脂糖、琼脂粉、氨苄青霉素 (Amp)、胰蛋白胨、酵母提取物、丙烯酰胺、N, N'-亚甲双丙烯酰胺 (Bis)、N, N, N, N'-四甲基乙二胺 (TEMED)、硫代硫酸钠购自上海生工公司; SDS 购于 Sigma 公司。

### 1.3 总 DNA 的提取及检测

绵羊基因组 DNA 的提取参照《分子克隆实验指南》, 用酚/酚: 氯仿 (1:1)/氯仿: 异戊醇 (24:1) 抽提, 冰冷的无水乙醇沉淀 DNA, 自然晾干后用 TE 缓冲液溶解。琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 并用分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度, 将 DNA 样品稀释至约  $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ , 分装成小份  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.4 引物的设计及 PCR 扩增<sup>[7]</sup>

根据绵羊 *MyoG* mRNA (GenBank 登录号 AF433651) 和猪 *MyoG* 基因的部分序列 (GenBank 登录号 U14331), 用 DNASTar 5.01 软件在 exon I 和 II 处各设计 1 对引物。引物 1 扩增片段为 exon I 上的 325 bp, 引物 2 所扩增的片段为 exon II 上的 119 bp。2 对引物均由大连宝生物公司合成。引物序列为:

引物 1: F1 5'-TCC ACC TCC AGG GCT TTG A-3',

R1 5'-TGC AGG CGC TCT ATG TAC TG-3'。

引物 2: F2 5'-CCT CCA TTC TGT CTT GC-3',

R2 5'-GGG TCC TGG TCT CAC TTA-3'。

PCR 扩增体系  $15\ \mu\text{L}$ : 模板 DNA、引物、*Ex-Taq* DNA 酶和三蒸水。PCR 条件:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 40 s,  $59.1^{\circ}\text{C}$  (引物 1)/ $59.4^{\circ}\text{C}$  (引物 2) 退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 40 s, 40 (引物 1)/35 (引物 2) 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 8 min;  $4^{\circ}\text{C}$  保存。产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.5 SSCP 分析

取  $3\ \mu\text{L}$  PCR 产物和  $9\ \mu\text{L}$  变性上样缓冲液 (98% 甲酰胺、0.2 mol/L EDTA、0.025% 二甲苯氰, 0.025% 溴酚蓝) 混合,  $98^{\circ}\text{C}$  变性 10 min, 迅速插入碎冰中 10 min, 然后上样于 12% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶 (丙烯酰胺: N, N'-亚甲双丙烯酰胺 = 29:1) 中电泳, 120 V 电压下, 电泳 12 h。电泳结束后, 进行银染显带, 数码照相保存。

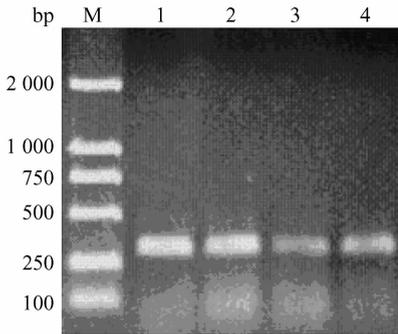
## 1.6 克隆测序

经 SSCP 分析后,不同纯合子基因型个体的 PCR 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳并纯化回收,用 pMD18-T 载体连接后,转化到已制备好的 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,酶切鉴定后,送大连宝生物公司测序。

## 2 结果

### 2.1 PCR 结果

引物 1 扩增出 *MyoG* 基因 exon I 的 325 bp 片段,扩增结果见图 1。由图可见 PCR 扩增产物的片段大小与预期大小一致。扩增条带清晰,特异性强,适于做 SSCP 分析。



M. DL2000 marker; 1-4. Amplified products of Mongolian, Poll Dorset, German meat Merino and Suffolk sheep genome DNA, respectively

图 1 外显子 1 的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Electroresis pattern of PCR product of exon I

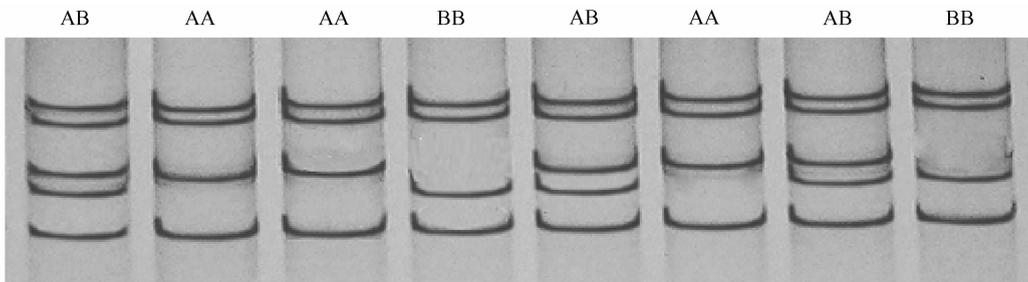


图 3 绵羊 *MyoG* 基因外显子 1 PCR-SSCP 结果

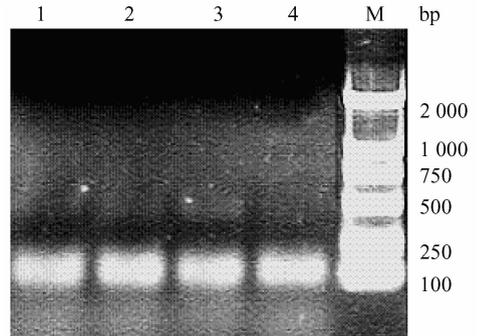
Fig. 3 PCR-SSCP results of exon I in sheep *MyoG* gene

有发现具有 PCR-SSCP 多态性(图 4)。

### 2.3 测序结果

对 *MyoG* 基因 exon I 位点两种纯合基因型 AA、BB 进行测序,测序结果用 DNASTar 序列分析软件进行同源比对,结果发现在其 *MyoG* 基因的第

引物 2 扩增出 *MyoG* 基因 exon II 的 119 bp 片段,扩增结果见图 2。从扩增检测结果可见,PCR 产物的特异性比较好,扩增效率较高,满足进行下一步非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的要求。



M. DL2000 marker; 1-4. Amplified product of different breeds sheep genome DNA

图 2 外显子 2 的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 2 Electroresis pattern of PCR product of exon II

### 2.2 SSCP 的检测

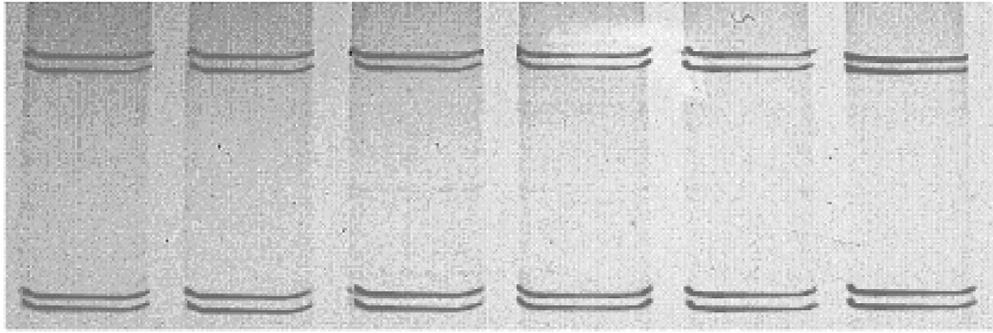
对绵羊 *MyoG* 基因 exon I 位点进行 PCR-SSCP 检测。结果所检测的 4 个品种绵羊 169 个个体,发现 *MyoG* 基因具有多态性,出现 AA、BB、AB 3 种基因型(图 3),即在 *MyoG* 基因的第 305 bp 处由 T  $\rightarrow$  C。碱基的突变引起了氨基酸的变异,即半胱氨酸(TGC)  $\rightarrow$  精氨酸(CGC)。

对绵羊 *MyoG* 基因 exon II 位点进行 PCR-SSCP 检测。所检测的 4 个品种绵羊的 169 个个体,没

305 bp 处有一个 T 突变为 C,由此导致等位基因 A 突变为等位基因 B(图 5)。

### 2.4 等位基因频率和基因型频率的统计

2.4.1 *MyoG* 基因 exon I 的 PCR-SSCP 的基因型及等位基因频率 对 4 个品种共 169 只绵羊的 *MyoG*

图 4 绵羊 *MyoG* 基因外显子 2 PCR-SSCP 结果Fig. 4 PCR-SSCP result of exon II in sheep *MyoG* gene

```

A T C T T G C G C A G C G C C A T BB
A T C T T G T G C A G C G C C A T AA
  
```

图 5 外显子 1 AA、BB 两种突变序列比较

Fig. 5 Alignment of mutation sequence of AA and BB at the site of exon I

基因 exon I 进行了 PCR-SSCP 检测, 它们的基因型及等位基因频率的计算结果见表 1。在这 4 个品种中, 蒙古羊的 AA 基因型频率占优势, 而其它 3 个品种是 AB 基因型频率占优势; 这 4 个品种等位基因 A 频率较等位基因 B 频率占优势, 等位基因 A 在蒙

表 1 不同基因型分布频率和等位基因频率

Table 1 Allele gene frequency and different genotypes frequency

品种 Breeds	数量 Number	基因型频率 Genotype frequencies			等位基因频率 Allele frequencies	
		AA	AB	BB	A	B
蒙古羊 Mongolia sheep	44	0.75(33)	0.18(8)	0.07(3)	0.84	0.16
无角陶赛特 Poll Dorset	43	0.23(10)	0.74(32)	0.03(1)	0.60	0.40
德国肉用美利奴 German Meat Merino	42	0.38(16)	0.62(26)	0(0)	0.69	0.31
白萨福克 Suffolk	40	0.35(14)	0.63(25)	0.02(1)	0.67	0.33

古羊中频率最高, 达 0.84; 无角陶赛特羊等位基因 A 频率最低, 为 0.60。

2.4.2 外显子 1 纯合度、杂合度、有效等位基因数及多态信息含量分析 表 2 可看出 exon I 这个位

点以蒙古羊的多态信息含量和杂合度最低, 它的遗传变异程度低, 选择能力小; 无角陶赛特羊的为最高, 选择能力较高; 另 2 个品种基本相同。

表 2 不同羊种 *MyoG* 基因多态位点纯合度 ( $H_o$ )、杂合度 ( $H_e$ )、有效等位基因数 ( $N_e$ ) 和多态信息含量 ( $PIC$ )Table 2 The genetic polymorphism parameters of *MyoG* gene in different sheep breeds

遗传多态参数 Genetic polymorphism parameter	蒙古羊 Mongolia sheep	无角陶赛特 Poll Dorset	德国肉用美利奴 German Meat Merino	白萨福克 Suffolk
$H_o$	0.73	0.52	0.57	0.56
$H_e$	0.27	0.48	0.43	0.44
$N_e$	1.37	1.92	1.75	1.79
$PIC$	0.23	0.36	0.34	0.34

2.4.3 外显子1的基因频率在不同品种绵羊中分布的独立性检验 外显子1的基因频率在不同品种羊中进行 $\chi^2$ 独立性检验,结果表明,此位点在不同品种羊中基因型分布存在显著性差异(见表3)。蒙

古羊与无角陶赛特羊、德国肉用美利奴羊、白萨福克羊的基因型分布存在极显著差异( $P < 0.01$ );无角陶赛特羊、德国肉用美利奴羊与白萨福克羊这3个品种羊之间差异不显著( $P > 0.05$ )。

表3 外显子1的基因型在不同品种中分布的差异显著性检验  
Table 3 The  $\chi^2$  test of genotype of exon I locus in different sheep breeds

品种 Breeds	蒙古羊 Mongolia sheep	无角陶赛特 Poll Dorset	德国肉用美利奴 German Meat Merino	白萨福克 Suffolk
蒙古羊 Mongolia sheep				
无角陶赛特 Poll Dorset	26.73**			
德国肉用美利奴 German Meat Merino	18.42**	2.97		
白萨福克 Suffolk	17.29**	1.42	1.06	

\*\* .  $P < 0.01$

### 3 讨论

相关研究表明:脊椎动物肌肉组织中的肌纤维在胚胎期即已形成,出生后其纤维数不再改变,肌肉的生长主要依赖肌细胞的增殖分化而导致肌纤维长度增加和周径增大,而不是依赖细胞的增生或者说肌细胞数目的增多,即个体的肌纤维数决定了个体的产肉能力。而肌纤维的形成受到生肌调节因子MRF家族(包括MyoD家族、MYF-5、MYF-6)的调控,这些蛋白质代表控制骨骼肌生成很多方面的关键调节因子。其中肌细胞生成素(Myog)是骨骼肌分化所必需的因子,在肌细胞的形成过程中起着中心调控作用,其表达可终止成肌细胞的增殖,并调节单核成肌细胞融合为多核肌细胞这一过程<sup>[9,10]</sup>。因此,可以将Myog基因作为绵羊生长性状的候选基因来研究,通过对Myog基因结构的分子克隆及生物学功能分析,将有利于进一步理解其在肌细胞生长和发育上所起的作用,可以为提高绵羊的生产性能开辟新方法。

Myog基因exon I检测到一个等位基因,3种基因型;exon II没有检测到等位基因,这与Sabourin等<sup>[5]</sup>通过PCR-SSCP的方法对猪Myog基因的exon I、II进行多态性研究结果基本一致。在exon I位点,这4个品种等位基因A频率较等位基因B频率占优势。本试验结果显示,4个品种绵羊在exon I位点遗传杂合度彼此差异不大,蒙古羊杂合度最低;无角陶赛特羊杂合度最高。这些结果与各个品

种绵羊的遗传组成基本一致,蒙古羊是我国内蒙古的地方品种,遗传组成相对单一;而其它3个品种是从国外引进的培育品种,为多品种的杂交后代,遗传杂合度自然很高。在exon I位点上,蒙古羊的PIC为0.23,为低度多态,说明该品种的等位基因数目少,杂合度小,表明该位点的遗传变异程度低,选择潜力小;其它3个品种PIC为0.34~0.36,为中度多态,说明该位点在这3个品种羊中的变异程度相似<sup>[6]</sup>。

中国羊网报道无角陶赛特羊、德国肉用美利奴羊、萨福克羊和蒙古羊3月龄胴体重分别为23、20、17和8 kg。可见,这4个绵羊品种的产肉性能关系是无角陶赛特羊>德国肉用美利奴羊>萨福克羊>蒙古羊。本试验中,对于exon I扩增片段,高产肉性能的无角陶赛特羊BB基因型频率低于低产肉性能的蒙古羊BB基因型频率。这表明BB基因型与绵羊高产肉性能有一定的负相关,还需要增加绵羊品种数,扩大样本量进行分子标记与产肉性能关联等深入研究。因此,分析Myog基因的多态性对肉羊产肉性能的影响,寻找影响产肉性能的主效基因,通过标记辅助选择和标记辅助导入技术指导肉羊的育种改良,缩短育种周期,对加快肉羊业的发展有重要的理论意义。

### 参考文献:

- [1] 刘永斌,邓 凤,王 峰,等. 肌细胞生成素基因的研究进展[A]. 全国养羊生产与学术研讨会论文集[C]. 2006. 87~88.

- [2] Wright W E, Sassoan D A, Lin V K. Myogen in a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD[J]. *Cell*, 1989, 56: 607~617.
- [3] Hughes S M, Schiaffino S. Control of muscle fiber size: a crucial factor in ageing [J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1999, 167: 307~312.
- [4] Tepas M F W, Visscher A H. Genetic regulation of meat production by embryonic muscle formation are view[J]. *Anim Breed Genet*, 1994, 111: 404~412.
- [5] Sabourin L A, Girgis-Gabardo A, Seale P, *et al.* Reduced differentiation potential of primary MyoD<sup>-/-</sup> Myogenic cells derived from adult skeletal muscle [J]. *J Cell Biol*, 1999, 144(4): 631~643.
- [6] 林万华, 黄路生. 猪肌细胞生成素基因的研究进展 [J]. *国外畜牧科技*, 2000, 27(1): 29~31.
- [7] 邓 凤, 田春英, 刘国平, 等. 羊肌细胞生成素基因内含子的克隆及序列分析 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2006, 18(3): 30~34.
- [8] 周国利, 朱 奇, 吴玉厚, 等. *Myogenin* 基因的分子生物学综述 [J]. *生物技术*, 2005, 15(1): 90~91.
- [9] Naidu P S, Ludolph D C, To R Q, *et al.* Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15: 2 707~2 718.
- [10] Olson E N, Brennan T J, Chakraporty T, *et al.* Molecular control of myogenesis: antagonism between growth and differentiation [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1991, 104: 7~13.

## 动物疫情速递

### 俄罗斯发生猪瘟

2007年10月23日,俄罗斯向OIE报告了猪瘟疫情。疫情始于9月24日,于2007年10月2日得到确诊。属于临床病例,依靠临床诊断、实验室检测确诊。病原是猪瘟病毒。俄罗斯联邦动物卫生中心(FGI-ARRIAH)(位于弗拉基米尔的Yur'evets,国家实验室)的PCR和核酸测序结果均呈阳性。疫区位于滨海边疆区Zherebhatjevo V. I. (Smoljaninovo村)的1个农场,有298头易感猪、160例病例、死亡90例,销毁127例;F1猪群显示出与此类似的猪瘟临床症状。在疫区周围3 km的范围内展开了例行的流行病学调查,未发现新病例。对全国猪只的免疫正在实行。感染来源尚不清楚。俄罗斯采取的控制措施有国内限制移运、疫区紧急免疫、感染房舍/设施消毒、检疫。俄罗斯未禁止免疫,也未对动物进行治疗。俄罗斯上一次发生猪瘟是2005年。

### 比利时发生狂犬病

2007年10月25日,比利时向OIE报告了狂犬病疫情。此次疫情始于2007年10月19日,于10月22日得到确诊。属于临床病例,病原是弹状病毒,依靠怀疑、临床检查、实验室检查(基础及高级)和尸体剖检作出诊断。疫区位于佛兰芒-布拉班特Beersel,感染动物是犬,有2条疑似犬。2007年7月8日私人从摩洛哥空运进口了1只4周龄宠物狗。在10月17日首次观察到临床症状。10月19日布鲁塞尔的一兽医诊所接诊了该病例,并于10月20日对其实施了安乐死。尸体于10月20日被送往Pasteur研究所进行诊断,10月22日采用直接免疫荧光法检测抗原,结果为阳性,10月24日,从培养的神经母细胞瘤分离到了狂犬病病毒。此外,来自此家庭第2条狗同样被实施了安乐死,检测结果在报告时还未公布。在该家庭未发现其他可疑动物。目前已经开始流行病学调查,以确定没有其它人或动物受到威胁。感染来自非法的动物移动。比利时采取的控制措施有筛检、感染场地/住宅消毒、扑杀,允许免疫,未对动物进行治疗。比利时上一次发生狂犬病是1999年。

(摘译自OIE网站)