

牦牛 *MSTN* 基因内含子 遗传多样性研究

梁春年, 阎萍, 邢成峰, 王丁克, 裴杰, 郭宪, 曾玉峰, 包鹏甲, 褚敏

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃兰州 730050)

摘要:利用 PCR-SSCP 技术研究了 5 个牦牛群体共计 401 头个体的 *MSTN* 基因第 2 内含子的多态性。结果表明: 牦牛 *MSTN* 基因第 2 内含子存在多态性, 测序发现该片段第 192 bp 处有一个 A 到 G 的单碱基突变。所检测的 5 个牦牛群体中, 除新疆巴州牦牛群体未检测到 AA 基因型, 其他 4 个群体中均发现 AA、AB 和 BB 3 种基因型, 大通牦牛、甘南牦牛、青海高原牦牛群体中均以 BB 型为优势基因型, 而天祝白牦牛和新疆巴州牦牛则以 AB 为优势基因型。不同牦牛群体中均检测到 A、B 两个等位基因, 并且 B 基因频率均高于 A 基因频率, B 等位基因为各牦牛群体中的优势等位基因。各群体经 χ^2 检验, 在该基因座上, 甘南牦牛、天祝白牦牛、青海高原牦牛 3 个群体处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P > 0.05$), 大通牦牛、新疆巴州牦牛两个群体处于不平衡状态 ($P < 0.05$)。分析了 5 个牦牛群体的遗传结构, 发现大通牦牛的基因杂合度、有效等位基因数、多态信息含量等均最低, 分别为: 0.171, 1.207, 0.157; 而天祝白牦牛的基因杂合度, 有效等位基因数、多态信息含量等均最高, 分别为: 0.490, 1.961, 0.370; 新疆巴州牦牛的基因杂合度、有效等位基因数、多态信息含量等均略低于天祝白牦牛。

关键词:牦牛; *MSTN* 基因; 内含子; PCR-SSCP; 多态性

中图分类号: S823.031 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)05-0016-04

Analysis on Single Nucleotide Polymorphisms on Intron2 of *MSTN* Gene in Five Yak Breeds

LIANG Chun-nian, YAN Ping, XING Cheng-feng, WANG Ding-ke, PEI Jie, GUO Xian,
ZENG Yu-feng, BAO Peng-jia, CHU Min

(Lanzhou Institute of Animal Science and Veterinary Pharmaceutics, Chinese Academy of
Agriculture Sciences, Lanzhou 730050, China)

Abstract: The polymorphisms on intron2 of *MSTN* gene of 401 individuals in five yak breed were studied by PCR-SSCP assay. The results indicated that the amplified products have polymorphism. Sequencing revealed a A-G mutation at 192 bp on intron2 of *MSTN* gene in yak. Three genotypes containing AA, AB and BB were all detected in these yak breeds except that no AA genotype was presented in individuals of Bazhou yak. BB genotype was dominance ones in groups of Datong, Gannan and Qinghai highland yak while AB genotype was dominance in those of Tianzhu White yak and Bazhou yak. Alleles A and B were present in every observed yak breed and the allele B was in majority. For Gannan, Tianzhu White yak and Qinghai highland yaks, they were in Hardy-Weinberg equilibrium state, while obviously they were not in Hardy-Weinberg equilibrium state in Datong and Bazhou yak groups in the locus region by χ^2 test analysis. The results of heredity study on five yak breeds showed that the gene heterozygosis, allelomorph gene and polymorphism in Datong new breeds was 0.171, 1.207 and 0.157, respectively. And those in Tianzhu White yak was 0.490, 1.961 and 0.370, respectively. And those in Bazhou yak was lower than Tianzhu White yak.

Key words: Yak; *MSTN* gene; Intron; PCR-SSCP; Polymorphisms

肌肉生长抑制素(MSTN)基因属于转化生长因子超家族成员,是近年来发现的一类重要的肌肉生长负调控因子,它通过抑制 MyoD 家族成员转录活

性负向控制肌细胞的生长发育,其表达量与肌肉重量的变化呈负相关^[1]。在家畜中,*MSTN* 基因的活性丧失可导致肌肉增大,体重增加^[2]。因此有关

收稿日期:2009-07-08

基金项目:国家高技术研究与发展计划“863”项目(2008AA10Z137);甘肃省农业生物技术项目(GS022-A41-052)

作者简介:梁春年(1973-),男,甘肃武威人,在读博士,副研究员,主要从事动物遗传育种研究。

通讯作者:阎萍(1963-),女,山西人,研究员,主要从事牦牛遗传育种研究。

MSTN 基因的研究近几年来一直是十分活跃的研究领域,到目前为止,对牛、绵羊、山羊、猪、马等家畜的 *MSTN* 基因的多态性都有研究报道^[3,4],但程度不同,对牛和猪 *MSTN* 基因的研究最多,而对牦牛 *MSTN* 基因的研究几乎是空白。因此,本研究利用 PCR-SSCP 技术分析了 *MSTN* 基因在 5 个牦牛群体中的多态性,以期找到可行的遗传标记,为牦牛 *MSTN* 基因的分子生物学研究及牦牛分子育种奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物及血样采集 采集天祝白牦牛血样 99 头份;甘南牦牛血样 104 头份;大通牦牛血样 74 头份;青海高原牦牛血样 74 份;新疆巴州牦牛血样 50 份。血样的采取与处理:从颈静脉采血 5 mL,用 ACD 抗凝后低温保存带回实验室,置于 -80 °C 冰箱保存待测。

1.1.2 酶和试剂 饱和酚、氯仿、酒精、蛋白酶 K、EDTA、Tris-Cl、硼酸等国产试剂均购自兰州鹏程生物技术公司;100 kb DNA Marker、琼脂糖、*Taq* DNA 聚合酶(250 U)等均购自大连宝生物工程有限公司;V-gene 纯化试剂盒购自 Omega 公司。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用常规的酚-氯仿抽提法从牦牛血样中提取全血 DNA^[5]。从 100 μL 血样中提取的 DNA 用 50 μL 的 TE 缓冲液溶解沉淀,4 °C 保存。

1.2.2 引物设计与合成 根据 GenBank 数据库中登陆的牛 *MSTN* 序列(登录号:AY850105),利用引物设计软件 Primer5.0 设计扩增产物大小为 323 bp 的一对引物,上游为:5'-TGGTATTTGGCAGACAT-3',下游为:5'-AGGATGTGAAATGGGACA-3',由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.3 PCR-SSCP 反应条件 PCR 反应体系总体积为 20 μL。其中 10 × Buffer 2.0 μL, dNTPs 1.6 μL (2.5 mmol/L), 上、下游引物各 0.4 μL (10 mmol/L), *Taq* 酶 0.4 μL (5 U/μL), 模板 0.8 μL, 高压灭菌水 14.4 μL。反应程序:95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 45 s, 51.4 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 32 个循环;72 °C 延伸 10 s, 最后 4 °C 保温。PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶检测。

PCR 产物在变性剂的作用下,98 °C 变性 10 min, 然后在 12% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行分离,用银染法进行定影、显影。

1.2.4 PCR 产物回收、测序 对于具有单核苷酸构象多态性的 PCR 片段利用 V-gene 纯化试剂盒进行纯化,经纯化的 PCR 扩增产物送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.3 统计方法

1.3.1 计算基因型频率和基因频率,并进行 χ^2 检验。

1.3.2 遗传多样性评价指标^[6] 多态信息含量(Poly-morphism information content, PIC), 式中 P_i 、 P_j 分别为群体中第 i 、 j 个等位基因频率, n 为等位基因数。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 P_i P_j$$

有效等位基因数(Effective number of alleles, N_e), 式中: P_i 为群体中第 i 个等位基因频率, n 为等位基因数。

$$N_e = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2$$

基因纯合度(Homozygosity, H_o)与基因杂合度(Heterozygosity, H_e), 式中: P_i 为群体中第 i 个等位基因频率, n 为等位基因数。

$$H_o = \sum_{i=1}^n (P_i)^2$$

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n (P_i)^2$$

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

MSTN 基因第 2 内含子扩增结果见图 1, 结果表明,目的条带清晰,无杂带,大小为 323 bp,与预期结果一致,可直接进行 SSCP 分析。

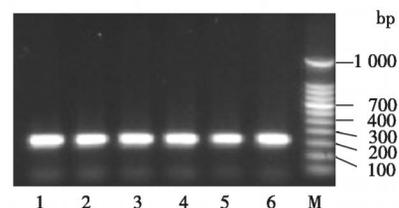


图 1 牦牛 *MSTN* 基因第 2 内含子的 PCR 扩增产物电泳
Fig. 1 PCR products of the 2nd intron of yak *MSTN* gene

2.2 SSCP 检测

MSTN 基因第 2 内含子 PCR-SSCP 分析表明,该片段表现多态性,其电泳结果见图 2。该片段 3 种表现型,即 AA、AB、BB 型,由一对等位基因 A 和 B 控制。

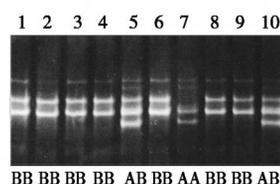


图 2 牦牛 *MSTN* 基因第 2 内含子的 PCR-SSCP 图谱
Fig. 2 PCR-SSCP analysis on 2nd intron of *MSTN* gene in yak

2.3 序列分析

将两个纯合基因型个体的 PCR 产物进行纯化后送上海生工生物工程技术有限公司测序,结

果发现 AA 型与 BB 相比,在第 192 bp 处有一个 A G 的单碱基突变(图 3)。

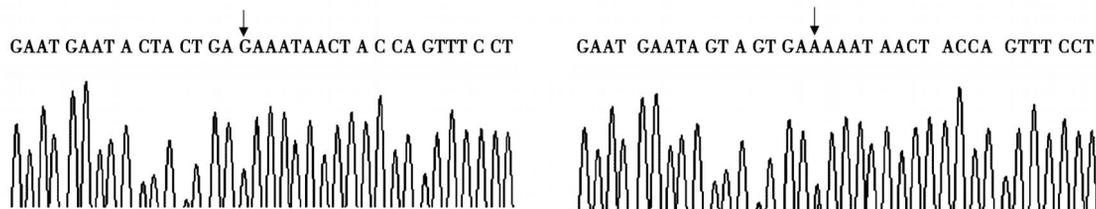


图 3 牦牛 MSTN 基因第 2 内含子基因座测序图谱

Fig. 3 The sequencing map of the 2nd intron of yak MSTN gene

2.4 基因座的遗传多态性分析

表 1 列出了 5 个群体 MSTN 基因第 2 内含子基因座的 PCR-SSCP 基因频率和基因型频率。由表 1 可见,在所检测的 5 个牦牛群体中,除新疆牦牛群体未检测到 AA 基因型,其他 4 个群体中均发现 AA, AB 和 BB 3 种基因型,在大通牦牛、甘南牦牛、青海高原牦牛群体中均以 BB 为优势基因型,而在天祝白牦牛和新疆巴州牦牛群体中则以 AB 为优势基因

型。不同牦牛群体中均检测到 A, B 两个等位基因,并且 B 基因频率相对高于 A 基因频率, B 等位基因为各牦牛群体中的优势等位基因。各群体经过 χ^2 检验,在该基因座上,甘南牦牛、天祝白牦牛、青海高原牦牛 3 个群体处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ($P > 0.05$),大通牦牛、新疆巴州牦牛 2 个群体处于不平衡状态。

表 1 5 个群体 MSTN 基因第 2 内含子基因座的 PCR-SSCP 基因频率和基因型频率

Tab. 1 Gene and genotype frequencies at 2nd intron of MSTN gene in five populations

群体 Breed	样本含量 Number	各基因型个体数 Number of each genotype			基因型频率 Genotypic frequencies			基因频率 Allelic frequencies		位点平衡检测 Locus equilibrium χ^2 test
		AA	AB	BB	AA	AB	BB	A	B	
大通牦牛 Datong yak	74	3	8	63	0.041	0.108	0.851	0.095	0.905	10.069
甘南牦牛 Gannan yak	104	5	24	75	0.048	0.231	0.721	0.164	0.837	2.537
天祝白牦牛 Tianzhu white yak	99	15	55	29	0.152	0.556	0.293	0.430	0.570	1.772
青海高原牦牛 Qinghai highland yak	74	4	20	50	0.054	0.270	0.656	0.189	0.811	1.049
新疆巴州牦牛 Xinjiang Bazhou yak	50	0	32	18	0	0.640	0.360	0.320	0.680	11.073

由表 2 可知,在所检测的 5 个牦牛群体中,大通牦牛的基因杂合度、有效等位基因数、多态信息含量等均最低,分别为:0.171, 1.207, 0.157;而天祝白牦牛的基因杂合度、有效等位基因数、多态信息含量等

均最高,分别为:0.490, 1.961, 0.370;新疆巴州牦牛的基因杂合度、有效等位基因数、多态信息含量等均略低于天祝白牦牛。

表 2 5 个群体 MSTN 基因第 2 内含子基因座遗传多态性指标

Tab. 2 Genetic diversity indices at 2nd intron of MSTN gene in five populations

群体 Population	基因杂合度 He	基因纯合度 Ho	有效等位基因数 Ne	多态信息含量 PIC
大通牦牛 Datong yak	0.171	0.829	1.207	0.157
甘南牦牛 Gannan yak	0.273	0.727	1.376	0.237
天祝白牦牛 Tianzhu white yak	0.490	0.510	1.961	0.370
青海高原牦牛 Qinghai highland yak	0.307	0.693	1.443	0.260
新疆巴州牦牛 Xinjiang Bazhou yak	0.435	0.565	1.771	0.340

3 讨论

很多研究表明, MSTN 基因虽然在动物进化过程中很保守,但也存在多态性。Lee 等^[7]分析了一种双肌表型动物—皮埃蒙特牛的 MSTN 基因,发现 MSTN 基因有两处发生了突变,第一突变点是外显子 1 中的一个 C 变成 A,使第 94 个氨基酸—亮氨酸

被苯丙氨酸取代;第二突变点是外显子 3 中的一个 G 变成了 A,使得第 313 个氨基酸处半胱氨酸被酪氨酸取代^[8,9]。Grobet^[10,11]检测了 10 个欧洲牛品种的 32 头双肌牛,发现了 7 个 DNA 多态性,其中 5 个推测造成了蛋白质功能的改变,1 个为保守氨基酸替换,另一个为沉默 DNA 突变,在内含子中检出了 4 个 DNA 多态型。在肉牛中, MSTN 的 3 个外显子上

已发现 9 个影响氨基酸序列的变异,其中 6 个可导致“双肌”^[12,13],冀德君等^[14]研究了中国普通牛、瘤牛、大额牛和牦牛 4 个牛属该基因外显子区核苷酸序列的变异,结果显示,4 个中国牛种的 *MSTN* 基因发现 7 个核苷酸多态位点,牦牛在 2 个位点上存在区别于瘤牛和普通牛独特碱基。本研究利用 PCR-SSCP 方法分析了中国的 5 个地方牦牛群体 *MSTN* 基因第 2 内含子的多态性,发现在第 192 bp 处有一个 A 到 G 的单碱基突变。表现为两个等位基因 A 和 B,其中 B 等位基因在所检测的 5 个牦牛群体中均属于优势等位基因;在新疆巴州牦牛群体中未检测到 AA 基因型,其他 4 个群体中均发现 AA、AB 和 BB 3 种基因型,在大通牦牛、甘南牦牛、青海高原牦牛群体中均以 BB 为优势基因型,而在天祝白牦牛和新疆巴州牦牛群体中则以 AB 为优势基因型。据此推断,B 等位基因可能对牦牛的生长发育、产肉性能有正效应,所以在长期的人工选育过程中受到正向选择,处于优势地位。

本研究发现在 *MSTN* 基因第 2 内含子这一基因座上,甘南牦牛、天祝牦牛、青海高原牦牛 3 个群体处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,而大通牦牛、新疆巴州牦牛 2 个群体处于不平衡状态。这可能是由于大通牦牛是一个培育品种,经过了长期的定向人工选择,因而造成了群体的不平衡;经对新疆巴州牦牛基因抽样误差分析,巴州牦牛群体的不平衡可能是由于采样过程中采样群体偏小,抽样误差过大而造成了群体的不平衡;而甘南牦牛、天祝白牦牛、青海高原牦牛这 3 个群体,可能由于这一基因座的选择压力不强,因此在人工选择、迁徙和遗传漂变等各种因素的作用下该基因座处于动态平衡中。因此,这提示牦牛育种工作者,在甘南牦牛、天祝牦牛、青海高原这 3 个群体的改良过程中,必须加大人工选育力度,坚决淘汰生长速度慢和生产性能低下的个体,以打破平衡状态,选育出优良品种。

多态信息含量(PIC)和杂合度(He)都是群体内遗传变异的测度,其值的高低反映了群体内个体的均质度,遗传变异大,数值就高。Vaiman D 等^[15]提出了确定位点多态性的标准:PIC > 0.5 为高度多态座位,PIC < 0.25 为低度多态座位,0.5 > PIC > 0.25 为中度多态座位。本研究中,大通牦牛和甘南牦牛 *MSTN* 基因第 2 内含子基因座的多态信息含量分别为 0.157 和 0.237,呈现低度多态;天祝牦牛、青海高原牦牛和新疆巴州牦牛 *MSTN* 基因第 2 内含子基因座的多态信息含量分别为 0.370,0.260 和 0.340,属于中度多态。天祝白牦牛和新疆巴州牦牛的多态信

息含量、杂合度均大于大通牦牛、青海高原牦牛、甘南牦牛群体,表明天祝白牦牛和新疆巴州牦牛群体在该位点上的遗传多样性比大通牦牛、青海高原牦牛、甘南牦牛群体丰富。

参考文献:

- [1] Langley B, Thomas M, Bishop A. Myostatin inhibits myoblast differentiation by downregulating MyoD expression[J]. J Biol Chem, 2002, 277 (51): 49831 - 49840.
- [2] Thomas M, Langley B, Berry C, et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation[J]. J Biol Chem, 2000, 275 (51): 40235 - 40243.
- [3] 刘铮铸,李祥龙,巩元芳,等. 我国主要地方山羊品种 *MSTN* 基因的 *Mnl* 酶切多态性分析[J]. 河南农业科学, 2006(8): 131 - 134.
- [4] 王全喜,红海,张焱如. 蒙古马 *MSTN* 基因第三外显子的克隆及其 SSCP 研究[J]. 华北农学报, 2005, 20(3): 14 - 16.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. Second edition[M]. New York: Cold Spring Harbor, 1989: 463 - 469.
- [6] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32: 314 - 331.
- [7] Lee S J, Alexandra C, Mcpherron. Regulation of myostatin activity and muscle growth[J]. Proc Natl Acad Sci, 2001, 98: 9306 - 9311.
- [8] Kambadur R, Sharma M, Smith T P, et al. Mutations in myostatin (GDF-8) in double muscled Belgian Blue and piedmontese cattle[J]. Genome Res, 1997, 7: 910 - 915.
- [9] Mcpherron A C, Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94 (24): 12457 - 12461.
- [10] Grobet L, Poncelet D, Royo L J, et al. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle[J]. Mammalian Genome, 1998, 9 (3): 210 - 213.
- [11] Casas E, Stone R T, Keele J W, et al. A comprehensive search for quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the myostatin gene[J]. J Anim Sci, 2001, 79 (4): 854 - 860.
- [12] Karim L, Coppeters W, Grobet L, et al. Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay[J]. Animal Genetics, 2000, 31 (6): 396 - 399.
- [13] Miranda M E, Amigues Y, Boscher M Y. Simultaneous genotyping to detect myostatin gene polymorphism in beef cattle breeds[J]. J Anim Breed Genetic, 2002, 119(6): 361 - 366.
- [14] 冀德君,常洪,常春芳,等. 中国牛属 4 个物种 *MSTN* 基因的遗传变异研究[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(6): 701 - 704.
- [15] Vaiman D, Mecier D, Mozami-Goudarzik, et al. A set of 99 cattle microsatellites characterization synteny mapping and polymorphism[J]. Mammalian Genome, 1994, 5: 288 - 297.