

渤海黑牛 *MSTN* 基因 多态性位点与体尺性状的关联性分析

刘桂芬, 万发春, 刘晓牧, 谭秀文, 宋恩亮

(山东省农业科学院 畜牧兽医研究所, 山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室, 山东 济南 250100)

摘要: 为了研究渤海黑牛 *MSTN* 基因多态性与体尺性状的关系, 采用 PCR-SSCP 的方法对 578 头渤海黑牛的 *MSTN* 基因的编码区进行分析。结果显示: 外显子 1 和外显子 2 处没有发现多态性位点, 外显子 3 处发现两个多态性位点, 并且两个多态性位点所导致的基因型只有一种, 所扩增的产物经过聚丙烯酰胺电泳发现后, 有 3 种基因型。测序结果表明: 外显子 3 的 330 bp 处存在一个 G→A 转换; 336 bp 处存在一个 C→T 的转换, AA 型个体的序列与 GenBank 中的序列完全一致, 为野生型, BB 基因型为突变型。将不同基因型与渤海黑牛体尺性状进行了关联性分析, 结果发现, AA 基因型所对应的头长最小二乘均值要显著高于 AB 和 BB 基因型所对应的最小二乘均值, AA 基因型所对应胸围的最小二乘均值极显著的高于 AB 和 BB 基因型对应的最小二乘均值, AA 基因型对应腰角宽最小二乘均值极显著的高于 AB 和 BB 基因型对应的最小二乘均值, 并且 AB 基因型对应腰角宽最小二乘均值极显著的高于 BB 基因型对应的最小二乘均值, 其他体尺性状在这 3 种基因型上均无显著差异。

关键词: *MSTN* 基因; 多态性; 体尺性状; 渤海黑牛

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)01-0017-05

Analysis of the Association Between Polymorphisms of *MSTN* Gene and Body Size Indexes in Chinese Bohai Black Cattle

LIU Gui-fen, WAN Fa-chun, LIU Xiao-mu, TAN Xiu-wen, SONG En-liang

(Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of

Agriculture Sciences, Shandong Key Lab of Animal Disease Control and Breeding, Jinan 250100, China)

Abstract: The polymorphism of code region in *MSTN* gene were analyzed using PCR-SSCP in 578 Chinese Bohai Black Cattle, one polymorphism site has been found in exon 3 of *MSTN* but there are no polymorphism site have been found in exon1 and exon2. Results indicated that there were three genotypes, namely AA, AB and BB. The sequencing results showed that there is G→A transition in 330 bp of exon3, a C→T transition in 336 bp of exon3. The least squares means of head length was higher for genotype AA than for genotype AB and BB; the least squares means of heart girth was higher for genotype AA than genotype AB and BB; the least squares means of hip width was higher for AA than genotype AB and BB, and the least squares means of hip width was higher for AB than BB; the other body size have no dominant difference in three genotypes.

Key words: *MSTN*; Polymorphism; Body size indexes; Bohai Black Cattle

肌肉生长抑制素 (Myostatin, *MSTN*) 又称生长/分化因子-8 (GDF-8), 该基因可以抑制成肌细胞的增殖和最终分化, 从而影响出生后个体的肌细胞和肌纤维数量^[1]。Myostatin 基因编码 376 个氨基酸, 是由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 而在比利时

兰牛和皮埃蒙特牛中, 由于该基因的外显子 3 处有一个 11 bp 的缺失和一个碱基发生突变而造成牛“双肌”的性状^[2]。在牛上, *MSTN* 基因认为是对牛肉生产性状影响比较重要的因素之一, 在欧洲的几个牛品种中已经发现由 *MSTN* 基因的突变造成牛只

收稿日期: 2010-12-12

基金项目: 国家“863”计划项目 (2006AA10Z1E1; 2008AA101010); 山东省农业科学院高技术自主创新基金项目 (2007ycx019-02; 2006ycx021); 山东省地方良种肉牛提纯与新品系培育 (2007LZ015-06; 2008LZ016)

作者简介: 刘桂芬 (1980-), 女, 山东菏泽人, 助理研究员, 博士, 主要从事动物分子遗传研究。

通讯作者: 万发春 (1974-), 男, 山东莒南人, 副研究员, 博士, 主要从事动物营养与饲料学研究。

双肌的表型性状^[3],而且这 11 bp 的突变很明显影响胴体的经济性状。与正常牛相比,双肌牛肌肉的过度肥大是由于肌纤维数目的增加,而不是由于肌纤维体积的增加^[4]。

渤海黑牛又名无棣黑牛,是我国唯一的黑毛品种,是全世界三大黑毛黄牛品种之一,全国良种牛育种委员会 1986 年把渤海黑牛列为全国八大名牛之一,1994 年出售到香港被港商誉为黑金刚,是在当地自然与社会条件下,经过长期驯化、选择和培育而成的优良肉役兼用型的地方品种。渤海黑牛肉质呈大理石状分布明显,产肉率高,肉质细嫩且口感好,含水量高,在全国地方良种黄牛品种中独具特色。

家畜的体尺数据直接反映家畜的体格大小和体躯的结构、发育等状况,也间接反映畜体的组织器官发育情况,它与家畜的生理机能、生产性能、抗病力以及对外界生活条件的适应能力等密切相关^[5]。本研究以渤海黑牛为研究对象,对渤海黑牛 *MSTN* 基因的编码区的 SNP 多态性进行了检测和分析,并对该基因的多态性位点与渤海黑牛体尺性状进行了关联性分析,以期寻找 *MSTN* 基因与渤海黑牛体尺性状相关的优势基因和优势基因型,为渤海黑牛的体尺性状的标记辅助选择以及为渤海黑牛的进一步选育提供理论参考依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

578 头渤海黑牛来自滨州市渤海黑牛原种场。采血的同时进行了牛只体尺数据的测量(主要包括:头长、体宽、颈长、体高、十字部高、尻高、臀端高、胸围、胸深、胸宽、体斜长、尻长、腰角宽、髻宽、坐骨结宽、管围),所采血样均为 10 mL,用 ACD 抗凝,于 -20℃ 冷冻保存。采用试剂盒提取牛基因组 DNA,

溶于 EB 中, -20℃ 冰箱中保存备用。

1.2 引物设计

根据 GenBank 上提供的牛的 *MSTN* 基因的完整序列,通过 Oligo 6.0 引物设计软件进行引物设计。

1.3 PCR 扩增

PCR 反应体系 (25 μL): 10 × PCR 缓冲液 (Mg²⁺) 2.5 μL, dNTPs mix (10 mmol/L) 2.0 μL, 上游引物 (10 pmol/μL) 0.6 μL, 下游引物 (10 pmol/μL) 0.6 μL, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.6 μL, 模板 DNA (100 ng/μL) 1.0 μL, 加灭菌双蒸水至 25 μL。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 35 个循环 (94℃ 变性 30 s, 52 ~ 60℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 30 ~ 35 s); 72℃ 终延伸 10 min; 4℃ 保存。

取 3 μL PCR 产物,加 4 μL Loading Buffer 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 SSCP 分析

取 2 μL PCR 产物与 6 μL 变性上样缓冲液混合,于 98℃ 变性 10 min,迅速冰浴 10 min 左右。变性后的 PCR 产物加于 8% ~ 12% 浓度的非变性聚丙烯酰胺凝胶中,110 V 稳定电压下电泳 10 ~ 15 h。电泳结束后,银染显色、拍照。

1.5 数据统计分析

基因多态性与牛体尺性状的关联分析统计多态位点的基因频率和基因型频率,并进行 χ^2 适合性检验,分析在该位点群体是否偏离 Hardy-Weinberg 平衡。采用 SAS (Version 8.02) 的 GLM 程序对 *MSTN* 基因多态性与体尺性状进行关联分析,不同基因型对应的体尺性状用最小二乘均数 ± 标准误 (LSM ± SE) 来表示,其线型模型如下:

$$y_{ij} = u + G_i + e_{ij}$$

式中 y_{ij} 为性状观察值; u 为群体均值; G_i 为第 i 个个体的基因型效应; e_{ij} 为随机误差效应。

表 1 牛 *MSTN* 基因 PCR-SSCP 分析所用引物

Tab. 1 The *MSTN* gene primers in cattle

引物 Primers	上游序列(5'-3') Upstream sequence	下游序列(5'-3') Downstream sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	产物长度/bp Production length
E1	GTTTGGCTTGGCGTTACTCA	GCCGTCACCTGCTGGCATCTC	58	397
E2	CTAACGCAAGTGAAGGAAA	CTGGAAGGTTACAGCAAGA	58	346
E3	ATGCTGTGCTTACCTCTAA	TAGCCTGTGCTACATAATTCA	60	376

2 结果与分析

2.1 *MSTN* 基因的结构图

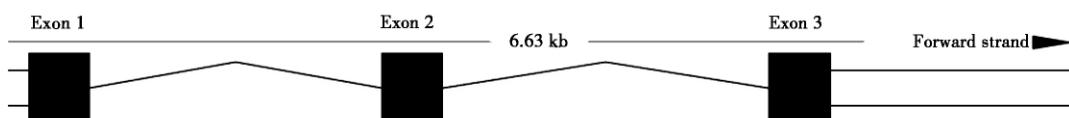


图 1 *MSTN* 基因 3 个外显子的位置和长度

Fig. 1 The location and length of 3 exons in *MSTN*

牛的 *MSTN* 基因结构见图 1, GenBank 上的登录号为 NM_001001525。根据图 1 显示,牛的 *MSTN* 基因共有 3 个外显子和 2 个内含子。

2.2 PCR-SSCP 检测

利用所设计的引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 获得了较好的结果, 片段长度与预期大小一致, 且没有非特异性条带, 可进行 SSCP 分析。

对 PCR 扩增产物进行 SSCP 检测, 在外显子 1 和外显子 2 中均没有发现多态性位点, 而在外显子 3 (E3) 中发现两个多态位点, 而且两个多态性位点所导致的基因型只有一种, 分别定义为 AA、BB、

AB。

2.3 *MSTN* 基因的测序结果

从 E3 引物中, 各随机抽取 2 种纯合基因型个体的 PCR 产物进行回收测序, 利用 DNAMAN 软件对测序结果进行比对, 同时分别与 GenBank 报道的序列进行比对, 结果显示: 外显子 3 的 330 处存在一个 G→A 转换; 336 处存在一个 C→T 的转换, 见图 2 3。AA 型个体的序列与 GenBank 中的序列完全一致, 为野生型, 则 BB 基因型为突变型。

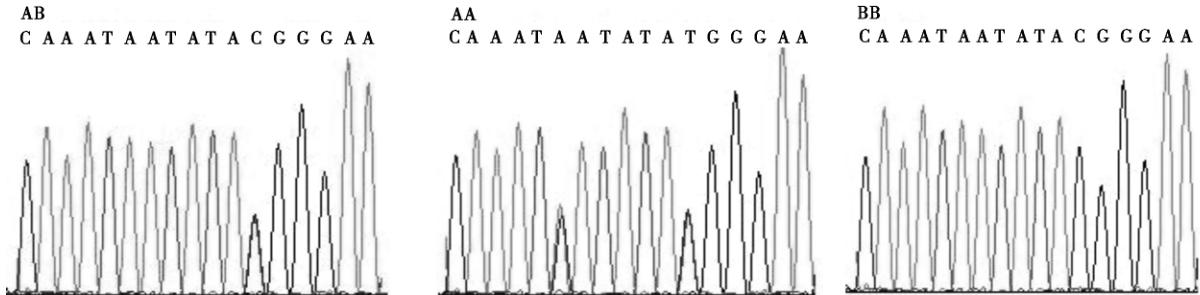


图 2 *MSTN* 基因 3 种基因型的测序结果

Fig. 2 The sequencing results of three genotype in *MSTN*

2.4 突变前后转录因子结合位点的预测

利用网站: <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html> 上的 TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites (ver1.3) 软件对突变发生前后可能发生的转录因子结合位点的改变进行预

测, 预测值大于 85 有效。

A→G 转换未导致任何转录因子结合位点的改变; T→C 的转换, 导致氨基酸由苯丙氨酸变为亮氨酸, 从而使得一个转录因子 CdxA 结合位点的缺失, 预测值为 86.4 (图 4)。

```
GGACAAA TAATATACGGGAAGATTCCAGCCATGGTAGTAGTATCGCTGTGGGTGTTTCATG
--G--Q--I--I--Y--G--K--I--P--A--M--V--V--D--R--C--G--C--S--*
--G--Q--I--I--Y--G--F--I--P--A--M--V--V--D--R--C--G--C--S--*
```

图 3 *MSTN* 基因外显子 3 的多态性位点改变前后的氨基酸序列变化

Fig. 3 Sequence change of binding sites for fore-and aft-transcription factors in exon3 of *MSTN*

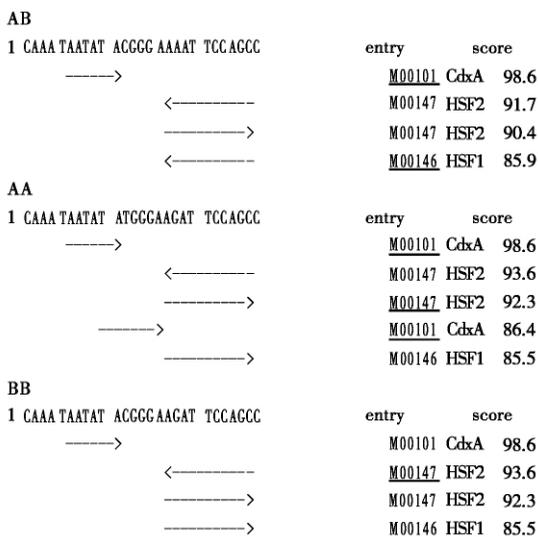


图 4 E3 位点突变前后转录因子结合位点的预测

Fig. 4 Prediction of binding sites for fore-and aft-transcription factors in E3

2.5 多态位点基因频率及基因型频率的统计分析

从表 2 可以看出, 在检测的 577 头渤海黑牛的个体中, *MSTN* 基因的外显子 3 处发现的多态性所构成的基因型频率 AA 型为主, 占到 0.92, 其余 2 个基因型频率比较少, 分别为 0.02 和 0.07。对应的基因频率 A 为 0.93, B 为 0.08。

2.6 基因多态性与渤海黑牛体尺性状的关联分析

利用 SAS (Version 8.02) 软件的 GLM 程序对位点的多态性与渤海黑牛体尺性状进行关联性分析, 结果见表 3。结果发现, AA 基因型所对应的个体头长显著高于 AB 和 BB 基因型个体, AA 基因型所对应的个体胸围极显著的高于 AB 和 BB 基因型个体, AA 基因型对应的个体腰角宽极显著的高于 AB 和 BB 基因型个体, 并且 AB 基因型个体的腰角宽极显著的高于 BB 基因型个体, 其他体尺性状在这 3 种基因型上均无显著差异。

表2 渤海黑牛 *MSTN* 基因多态性位点 PCR-SSCP 的基因型频率和等位基因频率

Tab.2 The gene frequency and genotype frequency of *MSTN* gene in Bohai black cattle

总样本数 The sample numbers	基因型频率 Genotype frequency			基因频率 Gene frequency	
	AA	AB	BB	A	B
577	0.92	0.02	0.07	0.93	0.08

表3 *MSTN* 基因位点多态性与渤海黑牛体尺性状的相关分析

Tab.3 The correlation analysis between polymorphisms of *MSTN* gene and body size index in Bohai black cattle

基因型 Gene type	头长 Head length	额宽 Frontal width	颈长 Neck length	体高 Body height	十字部高 Height at the hip cross	尻高 Rump height	臀端高 Pin bone height	胸围 Heart girth
AA	44.06 ± 0.12 a	21.51 ± 0.09	45.38 ± 0.28	122.41 ± 0.22	121.85 ± 0.32 a	124.76 ± 0.24	114.28 ± 0.30	170.98 ± 0.51 A
AB	46.20 ± 0.86 b	22.10 ± 0.66	47.70 ± 2.03	121.70 ± 1.62	123.00 ± 2.35 a	125.60 ± 1.77	115.70 ± 2.19	159.70 ± 3.68 B
BB	44.22 ± 0.44 a	21.16 ± 0.34	45.23 ± 1.04	121.67 ± 0.83	124.58 ± 1.20 b	126.31 ± 0.91	115.55 ± 1.21	173.00 ± 1.88 B

基因型 Gene type	胸深 Heart depth	胸宽 Heart width	体斜长 Body length	尻长 Rump length	腰角宽 Waist corner width	髻宽 Trurl width	坐骨结节宽 Tuber ischii width	管围 Circumference of cannon
AA	62.46 ± 0.23	36.33 ± 0.19	147.51 ± 0.70	47.96 ± 0.14	43.86 ± 0.23A	38.12 ± 0.14	14.94 ± 0.08	16.53 ± 0.08
AB	63.50 ± 1.64	34.80 ± 1.36	150.90 ± 5.07	47.70 ± 1.02	43.10 ± 1.67AB	37.90 ± 1.01	14.05 ± 0.60	17.47 ± 0.59
BB	62.58 ± 0.85	36.05 ± 0.70	147.06 ± 2.60	47.89 ± 0.53	46.47 ± 0.86B	39.10 ± 0.52	15.13 ± 0.31	16.95 ± 0.30

注: 数字后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: Different small and capital letters mean significant differences at 0.05 and 0.01 level respectively.

3 讨论

MSTN 基因作为肌肉生长的负调控因子,在畜牧业上得到了广泛重视,它已经成为畜禽肉质性状的一个主要的标记基因^[5-8]。一个群体如果能筛选出 *MSTN* 基因突变的个体,通过育种可以培育出新的产肉率高的优良畜种。*MSTN* 突变缺失的动物不仅骨骼肌增多而且肉质好,这恰好合乎人们所追求的高瘦肉率、肉质好的育种目标。一些研究表明, *MSTN* 基因在日本和牛的肥育阶段对肌肉的大理石花纹的沉积具有很重要的作用^[6-11]。*MSTN* 基因影响肌纤维的数量和组成,如 *MSTN* 基因敲除的小鼠的肌肉产量是野生型小鼠的 2~3 倍。在对双肌羊个体的研究中发现 *MSTN* 基因的编码区没有碱基的差异,但是在 C 端和 N 端发现有与该基因表达有关的位点^[12]。在猪上,在加系“双肌臀”大白猪中没有检测到保守区域碱基的改变和缺失,在外显子 2 处发现的突变经过分析与生产性状间无显著相关^[13]。在牛上已经发现的 *MSTN* 基因的突变中,有许多突变为沉默突变,或发生在内含子或非翻译区,不至于造成肌肉生长抑制素功能的重大丧失^[14]。

目前在对已经研究的渤海黑牛群体中,没有发现明显的双肌性状个体,而且 *MSTN* 基因的突变个体在体尺性状上并没有优势,这在一定程度上说明 *MSTN* 基因导致双肌现象还是具有品种差异。从对渤海黑牛外显子 3 处 *MSTN* 基因多态性分析发现,没有突变的个体 AA 基因型占整个研究群体的 92%,这从一方面也解释了渤海黑牛存在双肌个体现象比较少的原因。能否通过对渤海黑牛 *MSTN* 基因的特定修饰获得

MSTN 基因缺失的后代,这将对提高渤海黑牛产肉量具有重要意义,也为今后渤海黑牛的保种工作提供基础。另外,体尺性状虽然在一定程度上说明牛只个体发育情况,但是并不能直接反映肌肉产量、肌肉发育等指标,因此下一步工作需要将渤海黑牛肉质和脂肪发育相关的性状完善,与 *MSTN* 基因相结合进行进一步分析。另外,在 *MSTN* 基因的非编码区进行分析,试图找到与渤海黑牛肌肉和脂肪相关的非沉默突变位点。

渤海黑牛的优良特性,是适应未来市场需求,培育优质、高产、低耗畜种和利用杂交优势的宝贵遗传资源。由于对发掘其固有肉用性能的遗传潜力及遗传资源保护注意不够和杂交失度,纯种数量急剧下降。据报道,渤海黑牛种群越来越小,1987 年中心产区滨州市的存栏量为 5.65 万头,到 2006 年底,存栏量已不足 1 万头,已成为濒临灭绝的遗传资源。如何挖掘渤海黑牛的优良特性,保护渤海黑牛的优良资源,培育具有我国自主知识产权的肉牛新品种已经是迫在眉睫。

4 结论

MSTN 基因 AA 基因型和 AB 基因型对渤海黑牛的体尺性状有较大的影响,其中 AA 基因型所对应的头长、胸围和腰角宽的最小二乘均值相对于 AB 和 BB 基因型具有优势。*MSTN* 基因在渤海黑牛体尺性状的优势基因为 A 基因。

参考文献:

[1] Oksbjerg N, Gondret F, Vestergaard M. Basic principles of muscle development and growth in meat-producing mam-

- mals as affected by the insulin-like growth factor (IGF) system [J]. *Domest Anim Endocrin* 2004 27: 219 - 240.
- [2] Mcpherron A C ,Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene [J]. *Proc Natl Acad Sci* , 1997 94: 12457 - 12461.
- [3] Grobet L ,Royo Martin L J ,Poncelet D ,*et al.* Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle [J]. *Nat Genet* ,1997 17: 71 - 74.
- [4] Kambadur R ,Sharma M ,Smith T P L ,*et al.* Mutations in myostatin (GDF8) in Double-Muscled Belgian Blue and Piedmontese Cattle [J]. *Genome Research* ,1997 7: 910 - 915.
- [5] 曹少先 杨利国 赵文魁 ,等. 波尔山羊随机扩增多态 DNA 标记与体重和体尺的关系 [J]. *华中农业大学学报* 2001 20(2) : 159 - 163.
- [6] Sadkowski T ,Jank M ,Zwierzchowski ,*et al.* Gene expression profiling in skeletal muscle of Holstein-Friesian bulls with single-nucleotide polymorphism in the myostatin gene 5'-flanking region [J]. *J Appl Genet* 2008 49(3) : 237 - 250.
- [7] 梁春年 阎 萍 荆成锋 ,等. 牦牛 *MSTN* 基因内含子 II 遗传多样性研究 [J]. *华北农学报* 2009 24(5) : 16 - 19.
- [8] 王兰萍 耿荣庆 冀德君 ,等. 牛肌肉生长抑制基因编码区全序列的分子进化特征 [J]. *华北农学报* 2009 , 24(4) : 46 - 49.
- [9] Shibata M ,Matsumoto K ,Aikawa K ,*et al.* Gene expression of myostatin during development and regeneration of skeletal muscle in Japanese Black Cattle [J]. *J Anim Sci* , 2006 84: 2983 - 2989.
- [10] Boccard R ,Dumont B L. Effects of hereditary muscular hypertrophy on the musculature of cattle [J]. *Ann Genet Sel Anim* ,1974 6: 177 - 186.
- [11] Lunt D K ,Riley R R ,Smith S B. Growth and carcass characteristics of Angus and American Wagyu steers [J]. *Meat Sci* ,1993 34: 327 - 334.
- [12] 孟详人 郭 军 赵倩军 ,等. 11 个绵羊品种 *MSTN* 基因非翻译区的变异 [J]. *遗传* 2008 30(12) : 1585 - 1590.
- [13] 李绍华 熊远著 郑 嶸 ,等. 猪 *MSTN* 基因多态性及其 SNPs 的研究 [J]. *遗传学报* ,2002 29(4) : 326 - 331.
- [14] 姜运良 连正兴 李 宁 ,等. 肌肉抑制素基因的研究进展 [J]. *遗传* 2000 22(2) : 119 - 121.