

牛肌肉生长抑制素基因变异位点遗传共适应性分析

王兰萍¹ 耿荣庆¹ 冀德君² 常洪² 常春芳² 李永红²

(1. 盐城师范学院 生命科学与技术学院 江苏 盐城 224051; 2. 扬州大学 动物科学与技术学院 江苏 扬州 225009)

摘要: 对6个牛种的 *MSTN* 基因编码区全长序列进行 PCR 扩增和测序,分析各群体基因变异位点间的遗传共适应性特性。结果表明,在检测到的8个单个变异位点中,3个位点处于遗传不平衡状态,其余的均处于遗传平衡;处于遗传极不平衡状态的变异位点可能与杂合子的缺少或者缺失存在相关性。在共显性-共显性作用模式下,在雷琼牛和巴州牦牛 *MSTN* 基因编码区的部分组合变异位点间存在遗传共适应性,而且遗传共适应起主要作用,维持着位点间的遗传平衡状态。

关键词: 牛; 肌肉生长抑制素基因; 遗传共适应; 遗传平衡; 连锁不平衡

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2011)01-0051-03

Analysis of Genetic Co-adaptability in Variation Sites of Bovine Myostatin Gene

WANG Lan-ping¹, GENG Rong-qing¹, JI De-jun²,
CHANG Hong², CHANG Chun-fang², LI Yong-hong²

(1. Life Science and Technology College of Yancheng Teachers University, Yancheng 224051, China;

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

Abstract: Complete coding sequences of myostatin gene were amplified by PCR and sequenced from six bovine species. Genetic co-adaptability were analyzed basing on the detected variation sites. The results showed that total eight single variation sites were detected and only three sites were in genetic disequilibrium, while other sites were in genetic equilibrium. There were relevancy between genetic disequilibrium sites and absent heterogosity or missing heterogosity. In the codominance-codominance model genetic co-adaptability was observed on partial combination sites of *MSTN* gene in Leiqiong cattle and Bazhou yak. Genetic co-adaptability also played a key role in maintaining genetic equilibrium between two combination sites.

Key words: Bovine; Myostatin gene; Genetic co-adaptability; Genetic equilibrium; Linkage disequilibrium

1973年, Nei^[1]将生物在进化过程中结构基因位点上表现出非等位基因间有一定程度的联合作用解释为基因间的互适应作用。1995年,常洪^[2]继而指出,群体的不同结构基因座上非等位基因间在进化历程中形成的高度协调和相互适应的能力,从而表现出某些特定的非等位基因组合比另外的非等位基因组合在群体中有更多的表现机会,并将这种非等位基因间的协调适应特性称为遗传共适应性。遗传共适应揭示了非等位基因间的相互协调和适应的特性,由于这种适应能力大小不同,从而导致某些特定的非等位基因组合比另外的非等位基因组合在群体中有更多的表现机会。既有的研究表明^[3-10],遗传共适应性是引起群体遗传平衡状态的重要因素,

已经在相关的研究中得到印证,进一步丰富和完善了群体遗传学理论。本研究在分析6个牛种肌肉生长抑制素(Myostatin, *MSTN*)基因编码区全序列遗传变异的基础上,探讨遗传共适应特性在群体中的存在与效应,以揭示基因位点间的真实遗传关系,认识遗传共适应特性在维持群体遗传平衡中的重要作用。

1 材料和方法

1.1 样本来源与处理

以没有杂交史的牛群为总体,以中心产区典型群简单随机抽样法,共采集到6个牛种的血液样本,包括新疆维吾尔自治区和静县巴音布鲁克区蒙古牛38头、广东省雷州市郊区的雷琼牛36头、新疆维吾

收稿日期: 2010-12-09

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目(08KJB230002; 09KJD230001); 国家自然科学基金项目(30571323); 江苏省高校“青蓝工程”资助

作者简介: 王兰萍(1976-),女,江苏海门人,副教授,硕士,主要从事动物遗传学研究。

通讯作者: 常洪(1939-),男,四川成都人,教授,主要从事动物遗传资源评价、保护与利用研究。

尔自治区和静县巴音布鲁克区的巴州牦牛 32 头、云南省泸水县老窝乡的独龙牛 36 头、江苏省东台市郊区的海子水牛 36 头以及广西水牛研究所的尼里-拉菲水牛 36 头。血液样本采用常规的苯酚-氯仿法提取总 DNA^[11]。

1.2 试验分析

根据 Shibata 等^[12]发表的普通牛 *MSTN* 基因全序列(GenBank 登录号 AB076403)设计 3 对引物,分段扩增出 *MSTN* 基因编码区全序列。引物由上海生物工程公司合成 3 对引物序列依次为:引物 1: P1 5'-GGCTTGGCGTTACTCAAAAGC-3', P2 5'-CTCCTCCTTACATACAAGCCAGCAG-3'; 引物 2: P1 5'-GTTTCATAGATTGATATGGAGGTGTTTCG-3', P2 5'-ATAAGCACAGGAACTGCTAGTTATT-3'; 引物 3: P1 5'-GAAATGTGACATAAGCAAAAATGATTAG-3', P2 5'-ATACTCTAGGCTTATAGCCTGTGGT-3'。

PCR 反应体系为 50 μ L, 含 10 \times Buffer 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 2.5 mmol/L 混合 dNTP 2 μ L, 10 pmol/ μ L 的上、下游引物各 1 μ L, 5 U/ μ L *Taq* DNA polymerase 0.3 μ L, DNA 模板 100 ng, 以灭菌水补足剩余体积。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 60 s, 53 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 共 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 扩增产物首先用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测效果, 然后将检测到特异性目标片段的 PCR 产物纯化后直接送上海生物工程公司, 在 ABI Prism 3730 全自动序列分析仪上进行双向测序。

1.3 数据统计分析

1.3.1 结构基因座遗传平衡检验 单个基因座位和组合基因座位的遗传平衡检验均采用适合性检验公式^[4]。

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n (O_i - E_i)^2 / E_i$$

式中 O_i 和 E_i 分别为第 i 类基因型的观察数和理论期望值。

1.3.2 遗传不平衡系数 (*GUC*)、连锁不平衡系数 (*D*) 和遗传共适应系数 (G_{ca}) 的计算^[4]:

$$GUC = \sum_{i=1}^n |O_i - E_i| / C_i$$

式中 O_i 为组合基因型实际频率, E_i 为组合基因型期望频率, C_i 为组合基因型实际遗传组合数。

$$D = \frac{1}{n_i \cdot n_j} |X_{ij} - X_i \cdot X_j|$$

$$\chi_D^2 = n \cdot D^2 / (X_{A1} \cdot X_{A2} \cdots X_{Ai} \cdot X_{B1} \cdot X_{B2} \cdots X_{Bj})$$

式中 n_i 和 n_j 分别为 A、B 两座位的等位基因

数, X_{ij} 为 A、B 两座位组合基因型 $A_iA_jB_jB_j$ 配子的频率, X_i 和 X_j 分别为基因的频率; χ_D^2 为连锁不平衡系数的卡方检验, n 为样本数, X_{A1} 和 X_{B1} 分别为 A、B 两座位的等位基因的频率。遗传共适应系数是遗传不平衡系数与连锁不平衡系数之差, 即

$$G_{ca} = GUC - D$$

2 结果与分析

2.1 变异位点及其遗传平衡检验

测序结果表明, 在蒙古牛、雷琼牛、巴州牦牛和独龙牛种群中检测到变异位点, 而在海子水牛和尼里-拉菲水牛中未发现变异。表 1 列出了各种群中单个变异位点的基本信息和遗传平衡的 χ^2 检验结果。从遗传平衡检验可以看出, 在所检测到的变异位点中, 只有蒙古牛的外显子 2 第 39 位、雷琼牛的外显子 1 第 111 位以及独龙牛的外显子 2 第 264 位处于遗传极不平衡状态 ($P < 0.01$), 其余的变异位点均处于遗传平衡状态。处于遗传极不平衡状态的变异位点可能与杂合子的缺少(雷琼牛外显子 1 第 111 位观察到的杂合子数目远少于理论值)或者缺失(蒙古牛外显子 2 第 39 位和独龙牛外显子 2 第 264 位均没有观察到杂合子)存在相关性。

表 1 牛 *MSTN* 基因变异位点及其遗传平衡检验

Tab. 1 Variation sites and genetic equilibrium testing of bovine *MSTN* gene

牛种 Bovine species	变异位点 Variation sites	平衡检验 χ^2
蒙古牛	外显子 2 第 39 位(exon2 ³⁹)	18.998 6**
雷琼牛	外显子 1 第 111 位(exon1 ¹¹¹)	10.812 0**
	外显子 1 第 267 位(exon1 ²⁶⁷)	0.062 1
	外显子 1 第 282 位(exon1 ²⁸²)	0.014 6
	外显子 2 第 39 位(exon2 ³⁹)	0.148 9
巴州牦牛	外显子 3 第 51 位(exon3 ⁵¹)	0.326 5
	外显子 3 第 336 位(exon3 ³³⁶)	0.016 7
独龙牛	外显子 2 第 264 位(exon2 ²⁶⁴)	12.997 4**

注: * . 差异显著 ($P < 0.05$); ** . 差异极显著 ($P < 0.01$)。表 2 3 同。

Note: * . Represents significant difference ($P < 0.05$); ** . Represents extreme significant difference ($P < 0.01$). The same as Tab. 2 3.

2.2 两个基因位点间组合的遗传平衡检验

将雷琼牛和巴州牦牛种群中具有 2 个及其以上的变异位点按照共显性-共显性作用模式两两组合, 然后检验所有组合位点的遗传平衡状态(表 2)。在所有受检测的组合位点中, exon1¹¹¹-exon1²⁶⁷、exon1¹¹¹-exon1²⁸²和 exon1¹¹¹-exon2³⁹组合位点处于极不平衡状态, 其他组合座位均处于遗传平衡状态。所有处于遗传极不平衡状态的都是与 exon1¹¹¹ 位点形成的组合, 表明可能是由于 exon1¹¹¹ 位点在单个状态下处于极不平衡状态引起。

表 2 两个基因位点间自由组合的遗传平衡检测

Tab. 2 Genetic equilibrium test of random combination sites⁴

组合位点 Combination sites	平衡检验 χ^2	组合位点 Combination sites	平衡检验 χ^2
exon1 ¹¹¹ - exon1 ²⁶⁷	7.921 1**	exon1 ¹¹¹ - exon1 ²⁸²	9.146 7**
exon1 ¹¹¹ - exon2 ³⁹	9.578 0**	exon1 ²⁶⁷ - exon1 ²⁸²	0.286 5
exon1 ²⁶⁷ - exon2 ³⁹	0.716 0	exon1 ²⁸² - exon2 ³⁹	2.193 7
exon3 ⁵¹ - exon3 ³³⁶	0.078 1		

表 3 遗传不平衡系数、连锁不平衡系数和遗传共适应系数

Tab. 3 The coefficients of genetic disequilibrium linkage disequilibrium and genetic co-adaptation

组合位点 Combination sites	遗传不平衡系数 GUC	连锁不平衡系数 D	χ^2_D	遗传共适应系数 Gca
exon1 ²⁶⁷ - exon1 ²⁸²	0.030 6	0.026 7	9.042 0**	0.003 9
exon1 ²⁶⁷ - exon2 ³⁹	0.018 2	0.037 6	6.346 7*	-0.019 4
exon1 ²⁸² - exon2 ³⁹	0.0110	0.040 1	14.024 5**	-0.029 1
exon3 ⁵¹ - exon3 ³³⁶	0.0209	0.042 7	8.824 1**	-0.028 1

3 讨论

在生态系统中,一个群体中不同位点间非等位基因非随机组合造成的群体不平衡称为遗传不平衡。在生物进化过程中,遗传共适应差异、连锁不平衡、突变、选择、遗传漂变等多种因素都能够引起群体的遗传不平衡现象^[13]。然而,迄今为止,绝大多数的研究没有区分连锁不平衡与遗传共适应在群体遗传平衡的重要作用,而是笼统地将两者混为一谈。实际上,连锁不平衡和遗传共适应有着很大的区别,两者的形成原因存在本质的区别。连锁不平衡是根据连锁和交换引起的,不同位点的非等位基因间必须存在遗传重组,并且所有的位点都位于同一条染色体上;而遗传共适应不一定要求遗传重组,涉及的位点既可以分布于同一条染色体上,也可以分布于不同的染色体上。本研究中,所有处于遗传不平衡的组合位点间均存在强烈的连锁不平衡,就不能够确定遗传共适应的存在,因为遗传不平衡极有可能是由连锁不平衡引起的;相反地,处于遗传平衡的组合位点均处于连锁不平衡或者连锁极不平衡状态,在这种情况下,是什么力量维持着两个组合位点在群体中处于遗传平衡状态呢?在排除了选择、突变、遗传漂变、基因流动等因素的干扰后,必定是遗传共适应的作用打破了两个座位间的连锁不平衡,并且与连锁不平衡起着相反的作用。这也是符合确定两个位点间存在遗传共适应常用的方法之一,即从组合位点间遗传平衡但连锁不平衡的情况下推断遗传共适应的存在^[8]。由此可见,在雷琼牛和巴州牦牛肌肉生长抑制素基因编码区的部分组合变异位点间

2.3 遗传共适应性分析

对各组合位点进行的连锁不平衡检验表明,所有处于遗传不平衡的3个组合位点均存在强烈的连锁不平衡,而处于遗传平衡的组合位点均处于连锁不平衡或者连锁极不平衡状态。因此,可以认为 exon1²⁶⁷ - exon1²⁸²、exon1²⁶⁷ - exon2³⁹、exon1²⁸² - exon2³⁹和 exon3⁵¹ - exon3³³⁶组合位点可能存在遗传共适应。表3列出了这4个组合位点的遗传不平衡系数、连锁不平衡系数和遗传共适应系数。

存在遗传共适应性,而且遗传共适应起主要作用,维持着位点间的遗传平衡状态。

参考文献:

- [1] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided population [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1973, 70: 3321 - 3323.
- [2] 常洪. 家畜遗传资源学纲要[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 28 - 135.
- [3] 秦国庆. 藏山羊遗传标记及其遗传共适应研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 1997.
- [4] 刘小林. 黄河中下游流域固有山羊群体的系统地位及遗传共适应特性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 1999.
- [5] 沈伟, 耿社民, 潘庆杰, 等. 群体遗传不平衡条件下的结构基因遗传共适应的研究[J]. 遗传, 2003, 25(3): 295 - 298.
- [6] 常国斌, 常洪, 刘向萍, 等. 中国野生鹌鹑群体遗传共适应特性研究[J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2005, 35(5): 452 - 461.
- [7] 潘庆杰, 李晓林, 闵令江, 等. 群体遗传不平衡条件下的遗传共适应现象及其遗传分析[J]. 遗传, 2007, 29(5): 643 - 648.
- [8] 耿荣庆, 常洪, 王兰萍, 等. 湖羊结构基因座遗传共适应性分析[J]. 遗传, 2007, 29(2): 201 - 205.
- [9] 王兰萍, 耿荣庆, 常洪. 长江三角洲白山羊扬州群体的遗传共适应特性[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(4): 451 - 454.
- [10] 李晓林, 潘庆杰, 闵令江, 等. 野猪群体结构基因遗传共适应特性的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(3): 262 - 267.
- [11] 王兰萍, 耿荣庆, 冀德君, 等. 牛肌肉生长抑制素基因编码区全序列的分子进化特征[J]. 华北农学报, 2009, 24(4): 50 - 53.
- [12] Shibata M, Ohshima K, Kojima T, et al. Nucleotide sequence of myostatin gene and its developmental expression in skeletal muscles of Japanese Black cattle [J]. Anim Sci J, 2003, 74: 383 - 390.
- [13] 常洪. 中国家畜遗传资源研究[M]. 西安: 陕西人民教育出版社, 1998: 243 - 249.