

草原红牛 *CAPN3* 基因 多态性及与胴体性状的关联分析

刘博洋¹, 孟纪伦¹, 邱峥艳¹, 芦春艳¹, 秦立红¹, 张国梁², 赵志辉¹

(1. 吉林大学 畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062; 2 吉林省农业科学院, 吉林 公主岭 136100)

摘要: 采用 PCR-SSCP方法对 58头草原红牛钙激活中性蛋白酶 3基因 (*CAPN3*) 的单核苷酸多态性进行研究分析, 发现其外显子 1存在三种基因型 AA、AB和 BB, 测序发现, 在外显子 1的 124位存在碱基突变, 由原来的 A突变为 G, 氨基酸水平由天冬氨酸 A_{sp}变为天冬酰胺 A_{sn}。此 SNP位点在此前的研究中未见报道。经遗传多样性分析表明, 该位点等位基因 A占优势地位, 且三种基因型分布符合 Hardy-Weinberg平衡。通过显著性差异检验发现, *CAPN3*基因此位点的多态性对该牛群的屠宰率、净肉率和大理石花纹这三个性状有显著影响 ($P < 0.05$), 这将为 *CAPN3* 作为牛肉肉质性状候选基因提供进一步依据。

关键词: 草原红牛; *CAPN3*; 多态性; 胴体性状

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)02-0066-04

SNP Analysis of *CAPN3* Gene and Relationship with Meat Quality Traits of Chinese Red Steppes

LIU Bo-yang¹, MENG Ji-lun¹, QIU Zheng-yan¹, LU Chun-yan¹, QIN Li-hong¹,
ZHANG Guo-liang², ZHAO Zhi-hui¹

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China

2. Jilin Academy of Agriculture Sciences, Gongzhuling 136100, China)

Abstract The experiment was conducted to detect the genetic variations of *CAPN3* gene in Chinese Red Steppes. The polymorphisms in *CAPN3* gene in Chinese Red Steppes were detected by PCR-SSCP. The result of cloning and sequencing indicated that polymorphism of exon1 was due to base mutation of A[→]G in position 124 and there were three genotypes (AA, AB and BB). The analysis of variance was conducted and the results showed that Beef dressing percentage, meat percentage and marbling were significantly related with the different genotypes of *CAPN3* gene. The results of this research can provide the foundations for *CAPN3* as a beef tenderness candidate gene.

Key words Chinese red steppe; *CAPN3*; Polymorphisms; Meat quality traits

对于牛肉肉质性状的改良一直是肉牛育种中的重要课题, 寻找与之相关的候选基因, 进行标记辅助选择, 将是解决相关问题、加快肉牛育种进展的重要途径。草原红牛作为东北特有的地方杂交优良品种, 具有适应性强、抗病力强、肉质鲜美细嫩等优势, 是牛肉品质改良研究的较好研究对象。

钙激活中性蛋白酶 3 (calpain-3) 是一种特定的肌肉钙蛋白酶家族成员, 它是胞内非溶酶体性的限

制性蛋白水解酶, 由 *CAPN3* 基因编码。*CAPN3* 位于牛的 10号染色体上, 由于其对肢带型肌营养不良等疾病的显著影响^[1,2], 自从 20世纪 80年代 Sorimachi等^[3]从人类和大鼠骨骼肌中首先分离克隆出 *CAPN3* 基因以来, 对于它的研究渐渐成为了热点。但是有关它的确切生理功能和作用机制仍不完全清楚^[4]。根据实验和生物信息学分析表明, *CAPN3* 作为 Calpain家族的一个成员, 其表达水平和活性会显著影响肉质嫩度^[5], 并且存在着很强的遗传效

收稿日期: 2010-12-27

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2007BAD55B01); 国家“863”计划项目 (2008AA101010)

作者简介: 刘博洋 (1986-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 在读硕士, 主要从事分子遗传与动物育种研究。

通讯作者: 赵志辉 (1965-), 男, 河北无极人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子遗传与动物育种研究。

张国梁 (1967-), 男, 吉林舒兰人, 研究员, 博士, 主要从事肉牛育种研究。

应^[6]。本试验采用 PCR-SSCP 技术, 通过对 58 头草原红牛 *CAPN3* 基因的多态性及对胴体性状的影响进行了分析和讨论, 进而为在肉牛中进行与肉质性状相关的标记辅助选择提供遗传标记, 并为进一步研究 *CAPN3* 基因在调节体内涉及钙通路代谢的生理机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验动物

试验动物选用吉林省农业科学院畜牧分院原种牛场饲养的草原红牛 58 头, 颈静脉采血, ACD 抗凝处理, - 80℃ 冷冻保存。屠宰和胴体性状采用常规

方法测量。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用 Axygen 公司 Animal Blood Genomic DNA Miniprep Kit 说明书方法对牛的全血进行提取。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 的纯度与浓度。

1.2.2 引物设计 根据 GenBank 数据库提供的牛 *CAPN3* 基因 (GenBank 登录号: NM_174260.2), 应用 Primer 5.0 软件对 *CAPN3* 基因的 4 个外显子设计引物, 引物由上海生工生物制品有限公司合成 (表 1)。

表 1 草原红牛 *CAPN3* 基因 PCR 引物序列及扩增产物

Tab 1 The sequences of primers				
名称 Name	序列 (5'-3') Sequence	产物长度 /bp Product length	位点 Site	Tm /℃
<i>CAPN3-1</i>	F: CAGAAATCCTTTAGTGCTCCTT	331	Exon1	62
	R: TGCCTCGGTGCCCTTGTGCTT			
<i>CAPN3-2</i>	F: TGGTTCGTATGAAGCCCT	154	Exon5	56
	R: GCAGCCCATGAGGGAACC			
<i>CAPN3-3</i>	F: GGATGTCCTACGATGATT	160	Exon10	52
	R: GGGAAGTTGCGGCAGCCT			
<i>CAPN3-4</i>	F: TCCAGGACCTCATCACT	204	Exon22	59
	R: ATCAGACTCCAAGCAAAG			

1.2.3 PCR 扩增 建立 25 μL PCR 反应体系: 基因组 DNA 0.5 μL, 10×Buffer (含 20 μmol/L Mg²⁺) 2.5 μL, dNTP (10 mmol/L) 0.5 μL, TaqDNA Polymerase (5 U/μL, 含 20 mmol/L MgCl₂) 0.5 μL, 10 μmol/L 上、下游引物各 0.5 μL, 灭菌去离子水 20 μL。PCR 扩增条件为: 95℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 退火温度 (表 1) 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存。取 4 μL PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 SSCP 分析 取 2 μL PCR 产物与 8 μL 变性 Buffer (98% 去离子甲酰胺, 10% 甘油, 10 mmol/L EDTA, 0.025% 二甲苯酚, 0.025% 溴酚蓝) 混匀, 98℃ 变性 10 min, 迅速冰浴 10 min, 用 12% 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) 电泳 (4℃, 160 V) 16~18 h, 硝酸银染色后在凝胶成像系统中拍照, 保鲜膜封好, 4℃ 保存。

1.2.5 克隆测序 对两种基因型样本 PCR 产物进行凝胶回收纯化, pMD-18T 载体连接、转化 DH5α 感受态, PCR 检测后送上海生工生物制品有限公司测序。

1.3 统计分析

采用 SPSS 13.0 统计软件分析草原红牛 *CAPN3* 各基因型与屠宰性状、肉质性状的相关性。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带与预期片段大小一致 (以外显子 1 为例, 331 bp) (图 1), 且没有非特异条带, 与理论值相符, 可用于后续的 SSCP 试验。

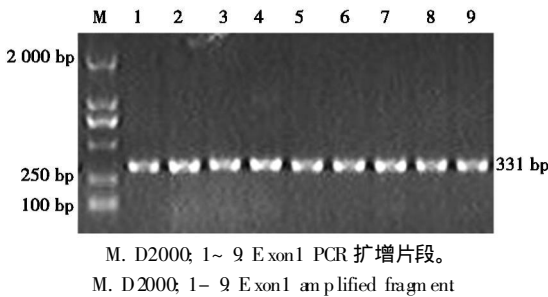


图 1 草原红牛 *CAPN3* 外显子 1 的 PCR 扩增结果
Fig 1 Exon1 amplified fragment of *CAPN3* gene

2.2 SSCP 分析结果

SSCP 分析结果显示: 只有第 1 对引物的 PCR 产物 SSCP 分析出现多态, 检测到 3 种基因型 AA、BB 和 AB (图 2)。

2.3 序列分析结果

3 种基因型测序结果比较显示多态性由片段中单碱基突变造成。BB 型序列与 GenBank (NM_

174260 2)中序列相同, AA 型在外显子 1 的 124 位存在碱基突变, 由原来的 A 突变为 G(图 3), 氨基酸水平则由 A_{sp}天冬氨酸变为 A_{sn}天冬酰胺, AB 型则是 A 与 B 的杂合体。遗传多样性分析显示该多态位点的 A 等位基因在群体中频率较高。

2 4 基因频率与基因型频率

根据 SSCP 结果定义的基因型进行分析, 该草原红牛群体中 CAPN3 基因各基因型频率及基因频率见表 2。其中 BB 基因型频率较高, AA 型次之, 杂合子 AB 型最少, 等位基因 B 在群体中占有绝对优势。对结果进行适合性 χ^2 检验, $P > 0.05$, 差异不显

著, 所以该群体处于 Hardy-Weinberg 平衡。

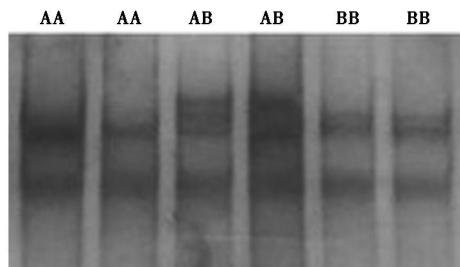


图 2 草原红牛 CAPN3 外显子 1 的多态性位点 SSCP 检测结果
Fig 2 Patterns of SSCP for CAPN3 exon1

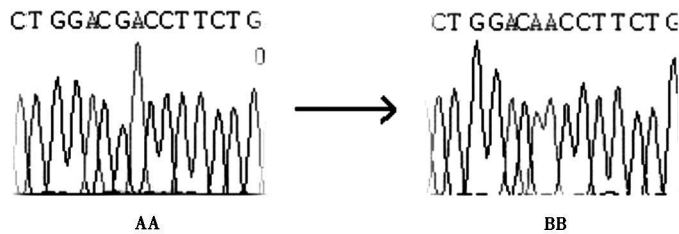


图 3 突变位点的测序结果
Fig 3 Sequence comparison of different genotype in CAPN3 gene exon1

表 2 CAPN3 外显子 1 的基因频率和基因型频率

Tab 2 Allele and genotype frequencies of CAPN3 gene in Red Cattle

等位基因 Allele	基因频率 Gene frequency	基因型 Genotype	碱基突变 Mutation	个体数 Individuals number	基因型频率 Genotype frequency
A	0.29310	AA	G	13	0.22414
		AB	A/G	8	0.13793
B	0.70690	BB	A	37	0.63793

2 5 不同基因型对草原红牛胴体性状的影响

采用 SPSS 13.0 中 One-Way ANOVA 分析 CAPN3 基因外显子 1 不同基因型对草原红牛胴体

性状的影响, 结果见表 3。CAPN3 基因外显子 1 不同基因型在该草原红牛群体中屠宰率、净肉率和大理石花纹这三个性状存在显著差异 ($P < 0.05$)。

表 3 草原红牛 CAPN3 外显子 1 不同基目型各性状均值差异显著性检验

Tab 3 Least squares means of meat slaughter traits obtained for the genotype at the exon1

性状 Characters	基因型 Genotype		
	AA	AB	BB
胴体重	334.8750±60.61927	322.4000±42.89872	304.6429±22.53505
屠宰率	62.7638±5.34340a	59.1720±1.73821	58.6814±3.303050b
净肉率	51.1125±5.73214a	46.9780±0.85640b	47.3171±2.39993b
脂肪覆盖率	87.5000±2.67261	89.0000±2.23607	87.0000±3.31662
眼肌面积	140.9725±28.87088	132.9960±12.83801	145.1576±18.88911
pH 值	5.7063±0.37500	5.8575±0.34837	5.7400±0.45653
肉色	3.7500±0.88641	4.2000±0.83666	4.1429±0.91026
大理石花纹	3.5000±0.53452a	4.0000±0.70711	4.1905±0.67964b
失水率	10.5200±3.66924	11.4780±3.69304	12.5205±3.35926
滴水损失	2.1813±0.40734	2.1340±0.91808	2.4290±1.42433
肌纤维直径	26.4125±2.70905	25.6340±3.04393	26.4271±4.83149
剪切力	3.5638±0.95397	3.3300±0.61388	3.7886±0.93392

注: 不同小写字母间表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Note: Least squares means with different small letter within the same column differ significantly ($P < 0.05$).

3 讨论

本研究克隆了草原红牛 *CAPN3* 基因 4 个外显子, 并利用 PCR-SSCP 方法对其单核苷酸突变进行了群体遗传学分析, 发现一个新的 SNP 位点, 即外显子 1 的 124 位存在碱基突变, 由原来的 A 突变为 G, 氨基酸水平由天冬氨酸 A_{sp} 变为天冬酰胺 A_{sn}。遗传多样性分析表明, 该位点等位基因 A 占优势地位。存在三种基因型 AA、AB 和 BB, 三种基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。发现基因型的分布与胴体性状存在着显著的关联, 其中, 基因型 AA 在屠宰率、净肉率方面显著优于基因型 BB, 基因型 BB 在大理石花纹方面显著优于基因型 AA, 基因型 AB 基本处于两者之间, 差异不显著。说明等位基因 G 对草原红牛胴体屠宰率和净肉率有一定正面影响, 对大理石花纹有一定负面影响, 对其他性状影响不显著, 这些结果与 *CAPN3* 的生物学功能相一致。

CAPN3 单个碱基突变导致蛋白质水平变化, 进而导致表型变化的例子常有报道^[7,8], Cafe 等^[9]发现, *CAPN3* 作为标记基因对牛肉嫩度有显著影响。对于牛来说, 由于肉质性状由微效多基因共同决定, 受各种复杂因素影响, 所以目前对于肉质性状单核苷酸多态性 (SNPs) 的研究已进入全基因组关联分析 (Genome wide association study GWAS) 时代, 并已得到很多方面的应用^[10]。GWAS 结果在很大程度上增加了人们对各性状的分子遗传学机制的理解, 但也显现出很大的局限性, 如通过 GWAS 发现的许多 SNP 位点并不影响蛋白质中氨基酸, 导致许多大样本研究出现假阳性或假阴性结果, 而与性状真正关联的 SNP 难以发现, 其结果在其他群体难以重复。本试验采取 PCR-SSCP 方法, 能够准确定位 SNP 位点, 确定 *CAPN3* 基因 DNA 和氨基酸水平变化, 结果可信。但由于本试验缺乏合适的试验群体以及样本量较少等限制条件, 导致试验结果还不够完善, 扩大样本量, 优化试验设计将是下一步工作的重点。

大理石花纹是影响牛肉嫩度的主要因素, 它取自牛背最长肌第 12~13 肋骨处, 横切观察眼肌面积内红肉与脂肪的交杂程度。大理石花纹明显多的牛肉品质就好, 可参照样板来评定等级。在我国生产供应 4~5 星级涉外饭店、高级宾馆中, 评论牛肉品质的重要主要依据是大理石花纹的多少与优劣, 因此在选用高档牛肉如牛柳、西冷、眼肉时, 应重视大理石花纹的等级。*CAPN3* 基因对肉质嫩度的影响已有报道^[11], 本研究通过生物信息学分析发现,

CAPN3 基因定位于牛的 10 号染色体上, 该区域可能存在一个较为显著的肉质性状 QTL, 进一步证实 *CAPN3* 基因可作为影响牛肉品质的一个重要候选基因。

参考文献:

- [1] Richard I Broux O, Akkand V, *et al* Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A [J]. *Cell* 1995, 81(1): 27-40
- [2] Bkzquez L, Azpitarte M, Sáenz A, *et al* Characterization of novel *CAPN3* isoforms in white blood cells: an alternative approach for limb-girdle muscular dystrophy 2A diagnosis [J]. *Neurogenetics* 2008, 9(3): 173-182
- [3] Sormachi H, Inajoh-Ohmi S, Emori Y, *et al* Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and p-types [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(33): 20106-20111.
- [4] Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, *et al* Structure, activation, and biology of calpain [J]. *Diabetes* 2004, 53(11): 12-18
- [5] Lian M A, Bekhit A E D, Stevenson B, *et al* Up and down-regulation of longissimus tenderness parallels changes in the myofibril-bound calpain3 protein [J]. *Meat Science* 2004, 67: 433-445.
- [6] Beckmann J S, Spencer M J Calpain3, the "gatekeeper" of proper sarcomere assembly, turnover and maintenance [J]. *Neuromuscul Disord* 2008, 18(12): 913-921.
- [7] deMoro A, Lutjeharms D, Impaglizzo A, *et al* Calpain3 is a rapid action unidirectional proteolytic switch central to muscle remodeling [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(8): 11940
- [8] Nascimben A C, Fanin M, Tasca E, *et al* Transcriptional and translational effects of intronic *CAPN3* gene mutations [J]. *Human Mutation* 2010, 31: 1658-1669
- [9] Cafe L M, McIntyre B L, Robinson D L, *et al* Production and processing studies on calpain-system gene markers for tenderness in Brahman cattle 2. Objective meat quality [J]. *J Anim Sci* 2010, 88(9): 3059-3069.
- [10] Guo Y M, Ai H S, Ren J, *et al* A whole genome scan for quantitative trait loci for leg weakness and its related traits in a large F₂ intercross population between White Duroc and Ethiopean [J]. *J Anim Sci* 2009, 87: 1569-1575.
- [11] Barendse W, Harrison B E, Bunch R J Variation at the Calpain 3 gene is associated with meat tenderness in zebu and composite breeds of cattle [J]. *BMC Genetics* 2008, 9: 41.