

山东部分地方猪种 *MyoG* 基因 5' 端遗传多态性及遗传效应分析

薛慧良* 徐来祥

(曲阜师范大学生命科学学院, 曲阜 273165)

摘要 采用 PCR-SSCP 方法对莱芜猪、大蒲莲猪、沂蒙黑猪和里岔黑猪的肌细胞生成素 (*myogenin*, *MyoG*) 基因 5' 端进行单核苷酸多态性检测, 并分析 *MyoG* 基因对猪的初生重、60 日龄重、210 日龄重, 60~210 日龄平均日增重和背膘厚的影响。根据猪 *MyoG* 基因 5' 端的 DNA 序列 (U14331) 设计 3 对引物, 发现 5-2 引物对扩增的片段有多态性, 且存在 3 种基因型 (AA、AB、BB), 并对纯合子进行测序, 发现 2 080 位 G → A 突变。 χ^2 独立性检验表明, 基因型频率在莱芜猪和大蒲莲猪与沂蒙黑猪和里岔黑猪间存在显著差异 ($P < 0.05$)。固定效应模型分析结果表明, 初生重基因型间差异显著 ($P < 0.05$), 而 60 日龄重、210 日龄重、60~210 日龄平均日增重和背膘厚基因型间差异不显著 ($P > 0.05$)。最小二乘分析结果表明, BB 基因型与其他两种基因型比较有较小的初生重和日增重, 同 AA 和 AB 基因型比较差异极显著 ($P < 0.01$), 3 种基因型在初生重和 60~210 日龄日增重的大小排列顺序一致, 为 AA > AB > BB。因此, 推测基因型对个体的初生重和日增重存在一定的影响, 选择带有 A 等位基因的个体有望提高个体的初生重和日增重。

关键词 山东地方猪种; *MyoG* 基因; PCR-SSCP; 遗传多态性; 遗传效应

家畜产肉潜力与肌纤维数量和肌纤维生长是密切相关的^[1]。肌纤维是构成骨骼肌的基本单位。肌肉的生长主要依赖肌卫星细胞的增殖分化而导致肌纤维长度增加和周径增大, 而不是依赖肌细胞数目的增加^[2]。猪肌纤维在胚胎期 70 天时就已形成了, 肌纤维的生成是一个复杂的调控过程^[3]。

生肌决定因子 (*myogenic determining factor*, *MyoD*) 基因家族控制着肌肉的发育^[4]。*MyoD* 基因家族包括 4 种调节因子: 生肌决定因子 D1 (*myogenic determining factor D1*, *MyoD1*), 肌细胞生成素 (*myogenin*, *MyoG*), 生肌因子 5 (*myogenic factors 5*, *Myf5*), 生肌调节因子 4 (*myogenic regulatory factor 4*, *MRF4*)^[5]。*MyoG* 基因在肌细胞形成过程中起着中心调控作用, 其表达可以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的这一过程^[6,7]。*MyoG* 基因由 3 个外显子和 2 个内含子构成^[8]。*MyoG* 基因的遗传变异与肌纤维数量^[1], 生长速度相关, 并最终导致产肉量的变化^[9,10]。Soumillion 等^[9]用 PCR-RFLP 检测 *MyoG* 基因的多态性, 发现一个 *MspI* 酶切位点位于 3' 端, 一个位于第二内含子内, 一个为梅山猪特异性 *MspI* 酶切位点位于启动子内。申农 I 号猪 *MyoG* 基因的第二内含子和 3' 端存在多态性^[3]。在

MyoG 基因座上, 不同基因型间初生重、生长速度的差异显著, 而背膘厚基因型间差异不显著^[10]。在二花脸猪不同的 *MyoG* 基因型间, 初生重差异极显著 ($P < 0.01$), 但 20 日龄重、断奶重无显著差异^[11]。申农 I 号猪 *MyoG* 基因的不同基因型间初生重差异显著 ($P < 0.05$), 断奶重差异不显著^[12]。

山东省地方猪种资源丰富而珍贵, 并各具独特的种质特性。如莱芜猪和大蒲莲猪是经过长期的自然选择和人工选择而形成的, 属于纯种繁育。具有耐粗饲, 抗逆性强, 繁殖力高和肉质好的特点, 但同时也存在产肉性能低的缺陷。沂蒙黑猪和里岔黑猪是在原种群的基础上, 与其他品种杂交, 经过长期选育而形成的, 在抗逆性、繁殖力和肉品质方面与原有地方猪种相比有不同程度的下降, 但其产肉性能得到相应的改善。

本研究以山东地方猪种莱芜猪、大蒲莲猪、沂蒙黑猪和里岔黑猪为材料, 对 *MyoG* 基因 5' 端进行系统的 SNP 检测, 并将其与猪的初生重、60 日龄重、

收稿日期: 2006-12-13 接受日期: 2007-04-17

曲阜师范大学科研启动项目 (No.2004) 和国家自然科学基金 (No.30470247 和 No.30670335) 资助

*通讯作者。Tel: 0537-4458169, E-mail: hui-liang-xue@163.com

210 日龄重、60~210 日龄日增重和背膘厚进行相关性分析,了解该基因同猪生长速度和瘦肉量的内在联系,有望为今后山东省及我国养猪业的保种和育种工作从分子水平上提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

以 92 头莱芜猪、79 头大蒲莲猪、73 头沂蒙黑猪和 68 头里岔黑猪作为试验动物。前腔静脉采血 10 ml, ACD 抗凝(6:1), -70 °C 保存备用。

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 的提取参照文献^[13]。

1.2.2 PCR-SSCP 过程 (1) 引物 根据猪 *MyoG* 基因 5' 端 DNA 序列(U14331), 利用 Primer3 软件设计引物, 由大连宝生物公司合成。引物序列见表 1。(2) PCR 扩增 PCR 扩增反应体系为: 2.5 μl 10× PCR 缓冲液, 1.5 μl 25 mmol/L MgCl₂, 1.0 μl 0.01 mmol/L 引物, 2.5 μl 2.0 mmol/L dNTPs, 0.2 μl 5U/μl Tag 酶, 2 μl 50 mg/L DNA。PCR 程序为: 94 °C 5 min; 95 °C 45 s, 退火温度(表 1)30 s, 延伸 72 °C 45 s, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 8 min, 4 °C 保存。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 用凝胶成像系统分析检测扩增结果。(3) SSCP 分析 取 1 μl PCR 产物和 5 μl 上样缓冲液 [98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯青、10 mmol/L EDTA (pH 8.0)、10% 甘油] 混匀, 98 °C 变性 10 min, 然后冰浴 5 min, 使之保持变性状态。变性后的 PCR 产物用 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Acr : Bis=29 : 1)。10 V/cm 电泳 10~11 h 后, 银

染显色。在 ABI 公司生产的 PRISM 377-96 型全自动 DNA 测序仪上, 以 BigDye terminator v2.0 为试剂, 采用 Sanger 双脱氧链终止法对纯合子进行测序。(4) 数据统计分析 计算 3 种基因型个体在不同猪种的分布, 对之进行差异显著性检验; 利用 SAS 软件包的 GLM 过程分析品种、场-年-季及 *MyoG* 基因型对猪的初生重、60 日龄重、210 日龄重、60~210 日龄平均日增重和背膘厚的影响。统计分析模型为:

$$Y_{ijkl} = u + B_i + f_{ys_j} + m_k + e_{ijkl}$$

其中: Y_{ijkl} : 为第 i 个品种, 在第 j 个场-年-季的第 k 种基因型个体的生产性能观察值; u : 为生产性能的最小二乘均值; B_i : 为品种的第 i 个水平对生产性能的效应值; f_{ys_j} : 为场-年-季的第 j 个水平对生产性能的效应值; m_k : 为基因型的第 k 个水平对生产性能的效应值; e_{ijkl} : 为对应于观察值的随机残差效应。

2 结 果

2.1 PCR-SSCP 分析结果

用所设计的引物以基因组 DNA 为模板进行 PCR 特异性扩增获得了较好的结果, 可以进行 SSCP 分析(图 1)。将 PCR 产物分别进行 SSCP 分析, 发现 5-2 引物扩增的片段有多态性, 检测到 3 种基因型, 分别定义为 AA、AB、BB(图 2)。并对 AA 和 BB 基因型进行测序, 发现 2 080 位 G → A 突变(图 3)。

2.2 基因频率和基因型频率在不同猪种的分布

3 种基因型在不同猪种的分布不一致(表 2), 莱芜猪和大蒲莲猪种 B 等位基因的频率高于 A 等位基因的频率, 而沂蒙黑猪和里岔黑猪种则是 A 等位基因的频率高于 B 等位基因的频率。3 种基因型在不同

表 1 猪肌细胞生成素基因 5' 端的引物序列

| 引物名称 | 引物序列 | 退火温度(°C) | PCR 产物长度(bp) |
|------|--------------------------------|----------|--------------|
| 5-1 | 5'-AGAGAGTCTCATCTGACTGACACA-3' | 54 | 154 |
| | 5'-CTACTCGCCAGTCCCAAAGA-3' | | |
| 5-2 | 5'-CGCCCAGCTAGGAGTAATTG-3' | 52 | 209 |
| | 5'-ATGTGATTCCCCTTCCCTCT-3' | | |
| 5-3 | 5'-CTTAGAGGGGGCTCAGGTTT-3' | 55 | 151 |
| | 5'-CATGGGGTCAGAAAAGACTTG-3' | | |



图 1 5-2 引物的 PCR 扩增结果(209 bp)

M: 100 bp DNA marker。

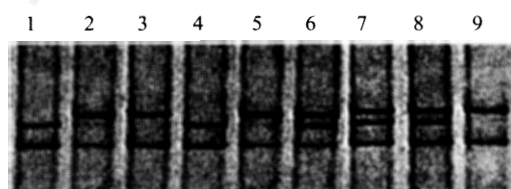


图 2 5-2 引物的 PCR 扩增产物的 SSCP 检测结果(12% PAGE)

2、3、5、9: AA 基因型; 1、4: BB 基因型; 6、7、8: AB 基因型。

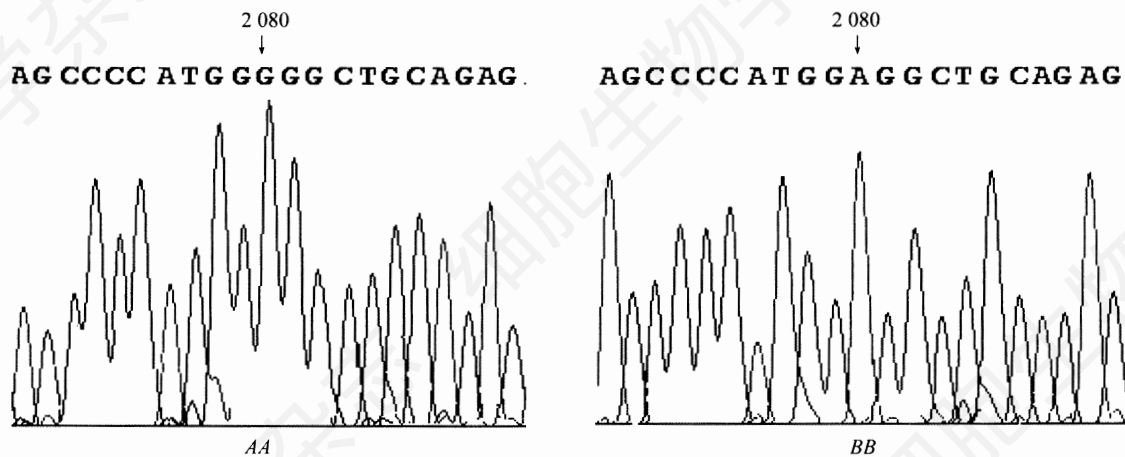


图3 AA 基因型和BB 基因型的序列比较

表2 基因型频率和基因频率在不同猪种的分布(5-2 引物)

| 基因型和基因频率 | 莱芜猪 | 大薄莲猪 | 沂蒙黑猪 | 里岔黑猪 |
|----------|----------|----------|----------|----------|
| AA | 0.20(18) | 0.22(17) | 0.63(46) | 0.54(37) |
| AB | 0.12(11) | 0.29(23) | 0.21(15) | 0.28(19) |
| BB | 0.68(63) | 0.49(39) | 0.16(12) | 0.18(12) |
| A | 0.26 | 0.36 | 0.73 | 0.68 |
| B | 0.74 | 0.64 | 0.27 | 0.32 |

括号内为个体数。

表3 不同基因型在不同猪种分布的差异 χ^2 检验(5-2 引物)

| 品种 | 大薄莲猪 | 沂蒙黑猪 | 里岔黑猪 |
|------|--------|-----------|-----------|
| 莱芜猪 | 1.9703 | 14.7761** | 12.4505** |
| 大薄莲猪 | | 9.4452* | 8.7090* |
| 沂蒙黑猪 | | | 1.3993 |

莱芜猪与沂蒙黑猪, 里岔黑猪比较, * $P<0.05$; 大薄莲猪与沂蒙黑猪, 里岔黑猪比较, ** $P<0.01$ 。

表4 利用最小二乘分析各变因对各个生长性状的影响

| 变异来源 | 自由度 | F 值 | | | | |
|-------|-----|---------|----------|----------|----------------|--------|
| | | 初生重 | 60 日龄重 | 210 日龄重 | 60 ~ 210 日龄日增重 | 背膘厚 |
| 品种 | 3 | 9.774** | 10.583** | 21.007** | 14.572** | 5.705* |
| 场-年-季 | 3 | 0.643 | 1.407 | 1.044 | 2.016 | 0.378 |
| 基因型 | 2 | 4.922* | 1.073 | 1.575 | 2.031 | 0.442 |

品种间初生重, 60 日龄重, 210 日龄重, 60 ~ 210 日龄日增重, ** $P<0.01$, 背膘厚, * $P<0.05$; 基因型间, 初生重, * $P<0.05$ 。

表5 不同基因型生长性状的最小二乘均值及标准误

| 基因型 | 初生重 | 60 日龄重 | 210 日龄重 | 60~210 日龄日增重 | 背膘厚 |
|-----|--------------------------|-------------|----------------|-----------------------------|-------------|
| AA | 1.592±0.323 ^a | 8.214±0.847 | 123.335±18.047 | 143.173±20.337 ^a | 6.553±0.907 |
| AB | 1.574±0.315 ^a | 7.947±1.771 | 117.473±17.336 | 135.225±21.453 ^a | 6.742±1.075 |
| BB | 1.517±0.248 ^b | 8.036±0.823 | 120.047±17.905 | 132.463±18.072 ^b | 6.778±0.866 |

同一性状组合中上标不含相同字母的两值间差异极显著($P<0.01$)。

猪种分布多重比较结果表明, 莱芜猪与沂蒙黑猪和里岔黑猪比较差异极显著($P<0.01$); 大薄莲猪与沂蒙黑猪和里岔黑猪比较差异显著($P<0.05$); 莱芜猪与大薄莲猪, 沂蒙黑猪与里岔黑猪比较差异均不显著($P>0.05$) (表 3)。

2.3 基因型与生长性状的关联性分析

最小二乘分析结果表明, 基因型对初生重有显著影响($P<0.05$), 对其他性状均无显著影响($P>0.05$) (表 4)。其中 BB 基因型同其他两种基因型比较有较小的初生重和日增重, 同 AA 型和 AB 比较差异极显著($P<0.01$), 3 种基因型在初生重和日增重的大小排列

顺序一致, 为 AA>AB>BB (表 5)。

3 讨论

本研究以 *MyoG* 基因作为影响猪生长和胴体性状的候选基因, 采用 PCR-SSCP 方法对 *MyoG* 基因 5' 端进行系统的 SNP 检测, 发现 5-2 引物扩增的片段上有多态性, 且存在 3 种基因型(AA、AB、BB)。统计结果发现, 莱芜猪和大薄莲猪 B 等位基因的频率较高, 而沂蒙黑猪和里岔黑猪 A 等位基因的频率较高。3 种基因型在不同猪种分布的独立性检验(χ^2 检验)结果表明, 莱芜猪和大薄莲猪与沂蒙黑猪和里岔黑猪比

较差异显著($P<0.05$)。莱芜猪和大蒲莲猪是山东省固有的地方品种,而沂蒙黑猪和里岔黑猪是在原种群的基础上,与其他品种杂交,经过多年选育而形成的,基本上保持了原有地方猪的特色,但某些性状与原有地方猪种比较还是存在差异。因此推测,莱芜猪和大蒲莲猪与沂蒙黑猪和里岔黑猪在生长速度和胴体性状方面的差异可能与该基因的分布有关。

统计分析结果表明,基因型对初生重和日增重有显著影响($P<0.05$),对60日龄重、210日龄重和背膘厚无显著影响($P>0.05$)。其中BB基因型同其他两种基因型比较有较小的初生重和日增重,同AA基因型和AB基因型比较差异极显著($P<0.01$),3种基因型在初生重和日增重的大小排列顺序为AA>AB>BB。提示选择带有A等位基因的个体有望提高个体的初生重和日增重。该研究中基因型对初生重和日增重有显著影响,与Tepas等^[10],林万华等^[11]和高勤学等^[12]的研究结果一致。

根据本试验得到的MyoG基因的不同基因型在不同猪种分布的差异及基因型与初生重和日增重间的相关性,推测MyoG基因是影响猪生长速度的候选基因,可应用于猪保种和育种过程中的标记辅助选择,提高选种的效率和准确性。

参考文献(References)

- [1] te Pas MF *et al.* *J Anim Sci*, 2000, **78**: 69
- [2] 姜运良等. *农业生物技术学报*, 1999, **7**: 201
- [3] 刘梅等. *上海农业学报*, 2003, **19**: 80
- [4] Olsen EN. *Mol Cell Biochem*, 1991, **104**: 7
- [5] Edmondson DG *et al.* *J Biol Chem*, 1993, **268**: 755
- [6] Wright WE *et al.* *Cell*, 1989, **56**: 607
- [7] Weintraub H *et al.* *Science*, 1991, **251**: 761
- [8] Friday BB *et al.* *Differentiation*, 2003, **71**: 217
- [9] Soumillon A *et al.* *Mamm Genome*, 1997, **8**: 564
- [10] te Pas MF *et al.* *J Anim Sci*, 1999, **77**: 2352
- [11] 林万华等. *农业生物技术学报*, 2002, **10**: 367
- [12] 高勤学等. *中国兽医学报*, 2005, **25**: 330
- [13] Sambrook J *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 16

Genetic Polymorphisms and Genetic Effects of 5' of MyoG Gene in Shandong Native Pig Breeds

Hui-Liang Xue*, Lai-Xiang Xu

(College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China)

Abstract Single-nucleotide polymorphisms of 5' of the *MyoG* gene were tested using PCR-SSCP in the different pig breeds including Laiwu, Dapuliang, Yimeng Black, and Licha Black pigs, and the effects of the *MyoG* gene on the birth weight, the 60-day body weight, the 210-day body weight, the daily gain between 60-day and 210-day and the backfat thickness were also analyzed. On the basis of the published DNA sequence of the porcine *MyoG* gene (U14331), three pairs of primers were designed, and one polymorphism was found in the PCR product amplified with 5-2 primers, and three genotypes (AA, AB, BB) exist. Amplicons were sequenced, and G→A mutation was detected at 2 080 site. Results of χ^2 test showed that the Laiwu and the Dapuliang pig breeds differ significantly ($P<0.05$) in genotype distribution from the Yimeng Black and Licha Black pig breeds. On the basis of the fixed effect model, significant differences were found in the birth weight among the different *MyoG* genotypes, whereas no significant differences existed in the 60-day body weight, the 210-day body weight, the daily gain between 60-day and 210-day and the backfat thickness. Using least square analysis, it was seen that individuals of the BB genotype had significantly less ($P<0.01$) birth weight and daily gain between 60-day and 210-day than those of the AA and AB genotypes, with the order being AA>AB>BB. These results suggest that the genotype has significant effects on the individual birth weight and the daily gain, and that the selection of the A allele is favored with regard to the birth weight and the daily gain.

Key words Shandong native pig breeds; *MyoG* gene; PCR-SSCP; genetic polymorphisms; genetic effects

Received: December 13, 2006 Accepted: April 17, 2007

This work was supported by the Project of Qufu Normal University for Scientific Research Initiation (No.2004) and the National Natural Science Foundation of China (No.30470247 and No.30670335)

* Corresponding author. Tel: 86-537-4458169, E-mail: huiliangxue@163.com