

## 4 个绵羊品种 *GDF8* 基因多样性检测

潘 磊 王一民<sup>1</sup> 石国庆<sup>2</sup> 楼纪东 管 峰\*

(中国计量学院生命科学学院, 杭州 310018; <sup>1</sup>临安市农业局家畜良种推广站, 临安 311300; <sup>2</sup>新疆兵团绵羊繁育生物技术重点实验室, 石河子 832000)

**摘要** *GDF8* 是肌肉发育的负调控因子, 其功能失活会导致肌肉肥大。在特克塞尔羊中发现 *GDF8* 基因 3' UTR 区的 G → A 突变抑制了 *GDF8* 基因的表达, 造成携带突变的个体肌肉过度发育。本实验分析了 *GDF8* 基因该突变点在道赛特羊(57 只)、夏洛来羊(47 只)、罗姆尼羊(38 只)和湖羊(152 只)中的多样性。结果表明, 供试的 4 个绵羊品种中未发现该位点突变的个体, 推测该突变可能与品种有关。

**关键词** 绵羊; *GDF8*; SNP; 多样性

肌肉生长抑制素(myostatin, *MSTN*)基因是 Mcpherron 研究小组于 1997 年采用简并引物在小鼠骨骼肌中发现的, 是转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )超家族成员, 又称生长分化因子 8 (growth differentiation factor 8, *GDF8*)<sup>[1]</sup>, 主要功能为抑制肌肉的发育, 并能调节脂肪的形成<sup>[2,3]</sup>。研究发现, 当小鼠的 *GDF8* 基因被敲除后, 突变个体的肌肉要比野生型个体重 2~3 倍<sup>[1]</sup>, 随后, 牛的双肌效应也被证实是由于 *GDF8* 基因的突变所致<sup>[4]</sup>。随着研究的开展和深入, *GDF8* 基因及其编码蛋白序列及结构都相继被探明, 并发现 *GDF8* 及其功能在多种脊椎动物间具有高度保守性<sup>[4]</sup>。*GDF8* 基因的突变可能导致其功能失活, 目前已发现 *GDF8* 基因序列中存在多个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点和基因插入 / 缺失, 其影响了这些脊椎动物的肌肉发育<sup>[4-8]</sup>。Clop 等<sup>[9]</sup>在特克塞尔羊中发现了 *GDF8* 基因 3' UTR 区的 G → A 突变, 该突变抑制了 *GDF8* 基因表达, 使得携带该突变的绵羊个体表现为肌肉肥大。

为了探索国内部分绵羊品种资源的 *GDF8* 基因多样性并发掘肌肉发育潜能优良的个体, 为肉用绵羊的繁殖育种提供指导, 本实验对 4 个绵羊品种的 *GDF8* 基因 3' UTR 区 G → A 突变位点进行了检测。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

绵羊 DNA 样本采集: 道赛特羊(57 只)、夏洛来羊(47 只)和罗姆尼羊(38 只)样品采自新疆农垦科学院种羊场, 湖羊采自江苏苏州东山镇湖羊自然保护区

(40 只)和上海永辉种羊场(112 只); 每只羊无菌取耳组织后低温保存带回实验室, 酚-氯仿抽提基因组 DNA, TE 溶解后 -20 °C 保存备用。

#### 1.2 引物及 PCR 扩增

根据 GenBank 中 *GDF8* 序列(DQ530260)设计引物, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 上游引物: 5'-TTACTGTCATTGTATTCAAATCTCA-3'; 下游引物: 5'-CATTATAACCTAAAACCTGTTGTCTT-3'。PCR 扩增反应体积为 20  $\mu$ l, 其中 2  $\mu$ l 10 $\times$  缓冲液, 1  $\mu$ l 2.5 mmol/L dNTPs, 1.2  $\mu$ l 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 各 2  $\mu$ l 上下游引物(10  $\mu$ mol/L), 0.3  $\mu$ l 5 U/ $\mu$ l *Taq* DNA 聚合酶, 2  $\mu$ l DNA 模板, 加灭菌双蒸水至 20  $\mu$ l; 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 35 s, 54 °C 退火 35 s, 72 °C 延伸 40 s, 32 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

#### 1.3 基因型分析及判断

取 5  $\mu$ l PCR 产物参照内切酶 *Hpy*CH4IV 使用方法添加试剂, 酶切 1 h 后取 10  $\mu$ l 产物, 在 8% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 银染显色。PCR 产物长度为 326 bp, 其中野生型含有限制性内切酶 *Hpy*CH4IV 的酶切位点。因此, 若酶切后获得 28 bp 和 298 bp 的片段, 则判读为野生型, 表示供试羊的 *GDF8* 基因在 9 827 位的碱基为 G; 若酶切后只有 326 bp 的片段, 则判读为突变型, 表示供试羊的 *GDF8* 基因在 9 827 位的碱基为 A; 并挑选两种基因型个体将其进行 PCR 产物回收

收稿日期: 2009-04-08 接受日期: 2009-08-21

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No.2008AA101011)及国家自然科学基金(No.C120103)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 0571-86835772, Fax: 0571-86914449, E-mail: jlguanfeng@yahoo.com.cn

测序, 测序在上海英骏生物技术有限公司完成。

## 2 结果

PCR 产物为 *GDF8* 基因 9 800 位至 10 125 位, 长度为 326 bp, 结果与此相符; 供试羊样本 DNA 扩增产物经酶切后结果见图 1。由图 1 可知, 供试的 4 个绵羊品种所有个体均为 298 bp 的片段, 即在 *Hpy*CH4IV 酶切位点上未检测出多样性。测序结果见图 2, *GDF8* 基因 9 827 位的碱基均为 G。在本实验检测的 294 个绵羊个体中, 均未发现 *GDF8* 基因 3' UTR 区 G → A 突变个体。

## 3 讨论

### 3.1 *GDF8* 对肌肉发育的影响

*GDF8* 是肌肉生长发育的负调控因子, 与动物骨骼肌总量的调节有关, 其功能的缺失会造成骨骼肌的异常肥大<sup>[1,10]</sup>, 也会对脂肪生成和沉积产生影响<sup>[1,3,11]</sup>。*GDF8* 通过抑制成肌细胞周期中 G<sub>1</sub> 期到 S 期以及 G<sub>2</sub> 期到 M 期的发育过程, 并通过控制成肌细胞程序性凋亡来控制其数量, 并能抑制成肌细胞的分化, 从而抑制肌肉发育<sup>[12]</sup>。在 *GDF8* 基因敲除小鼠中, 其胫骨肌以及腓肠肌的肌纤维直径增加了 14%~49%<sup>[1]</sup>; *GDF8* 失活后肌纤维数量和肌纤维直径增加, 因此造成肌肉肥大<sup>[10]</sup>。之后, 在转基因小鼠中的研究发现, 肌肉过度发育小鼠肌纤维的数量及其直径分别增加了 40% 和 21%<sup>[13]</sup>。同时, *GDF8* 对肌肉的诱导作用是可逆的<sup>[12]</sup>, 不论是 *GDF8* 的过表达还是外源性 *GDF8* 的加入都能造成肌肉量的降低<sup>[10]</sup>, 糖皮质激素能诱导 *GDF8* 表达的增加<sup>[3]</sup>, 而卵泡抑素可以通过与 *GDF8* 的结合抑制其作用<sup>[13]</sup>。继 McPherron 等<sup>[1]</sup>自 *GDF8* 基因敲除小鼠研究并首次发现 *GDF8* 基因之后, 研究人员还在比利时蓝牛 *GDF8* 基因中发现了一个 *GDF8* 基因 11 bp 的碱基缺失与皮艾蒙特牛第三外显子上的错义突变, 该突变致使 *GDF8* 失活, 造成牛肌肉过度发育<sup>[4]</sup>。此外, Schuelke 等<sup>[8]</sup>发现一个男孩的 *GDF8* 基因非编码区发生 G → A 突变, 造成 108 bp 的碱基错误插入, 导致 mRNA 的错误剪切, 使男孩的腿部及手臂肌肉格外强壮。Guimaraes 等<sup>[6]</sup>在猪中发现了 *GDF8* 的 2 个 SNP 位点, 但在不同品种具有不同的突变频率。Mosher 等<sup>[9]</sup>发现在惠比特犬的 *GDF8* 基因第三外显子上发生的 2 bp 的缺失, 造成翻译的提前终止, 使 *GDF8* 功能缺失, 产生肌肉肥大现象。在几种动物中发现的 *GDF8* 不同突变造成了其功能缺

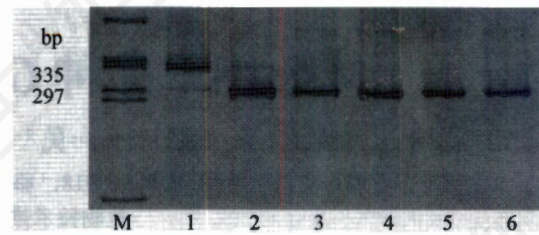


Fig.1 PCR product of *GDF8* digested by *Hpy*CH4IV  
M:  $\phi$ X174-*Hinc*II digest DNA marker; 1: PCR product; 2-6: digestion products.

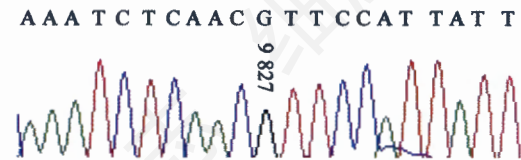


Fig.2 A portion of sequencing result of *GDF8* gene (at 9 827 is G)

失并表现肌肉发达, 但目前对于绵羊 *GDF8* 多样性研究报道尚少, Clop 等<sup>[9]</sup>发现在特克塞尔羊 *GDF8* 基因的 3' UTR 区发生的 G → A 突变导致一个 mir1 和 mir206 的靶位点的产生, 这些 miRNA (microRNA) 通过介导翻译下调而降低 *GDF8* 的浓度, 促使肌肉肥大的产生。Li 等<sup>[14]</sup>分析了 24 个山羊品种和 8 个绵羊品种 *GDF8* 基因部分内含子 2 序列的 SNP 位点, 结果在山羊的检测区域发现了 7 个多态性位点, 而在绵羊的检测区域却未发现多态性位点。Zhou 等<sup>[15]</sup>在新西兰杂交的罗姆尼绵羊中发现了 2 个 SNP 位点。在绵羊中发现的这些突变由于研究较少, 对表型性状的关系尚待进一步研究。本研究中, 在湖羊、道赛特羊、夏洛来羊和罗姆尼羊中均未发现 *GDF8* 基因 3' UTR 的突变, 由于本研究样本数量较少, 目前尚不能完全断定这些品种是否存在这一突变, 因此推测该突变还可能与绵羊品种有关。

### 3.2 *GDF8* 中 G → A 突变对肌肉发育的影响

Clop 等<sup>[9]</sup>在特克塞尔绵羊中发现 *GDF8* 基因 3' UTR 区发生 G → A 突变时将能产生一个 mir1 和 mir206 的靶位点, 这些 miRNA 在骨骼肌中过表达, 抑制 *GDF8* 基因的翻译, 从而造成特克塞尔羊肌肉肥大; 而对人与鼠的 SNP 数据分析显示, 这些变异会产生大量可能对表型变异有作用的 miRNA 靶位点。与此不谋而合的是, 在特克塞尔羊中一个促进肌肉强壮的 QTL



与 *GDF8* 基因同样被定位于绵羊 2 号染色体上<sup>[9,16]</sup>, 推测 *GDF8* 的变化将有可能影响此 QTL, 从而进一步协同或拮抗影响肌肉发育。

McPherron 等<sup>[1,4]</sup>在对小鼠和牛的 *GDF8* 多样性研究中发现, 两种动物的突变型与野生型的体重有明显差异, 推测这是由于在牛的养殖中, 为了获得更多的牛肉而通过一代代的选育使其产肉量已经接近极限, 但小鼠中却没有类似选择。而 Mosher 等<sup>[5]</sup>对灰狗与惠比特犬的对比中发现, 在惠比特犬中发现的 *GDF8* 突变在灰狗中很少, 认为这是由于 *GDF8* 的功能失活突变对惠比特犬的短跑性能有利而对灰狗的长跑性能不仅益处不大, 甚至可能是有害的。因此在长期的人工选育过程中会不自觉地惠比特犬中将 *GDF8* 突变的基因型保留而将灰狗中的突变体予以排除。因此, 相对山羊而言, 绵羊的运动性能较差, 而且山羊肉的脂肪含量比绵羊肉低, 而体外被毛山羊要远少于绵羊, 这也可能是在人类驯养的过程中可能存在不自觉地选择山羊中肌肉发达的表型, 但对于绵羊的选择依据不在此。在特克塞尔羊中 *GDF8* 基因 3' UTR 区 G → A 突变发生率为 99%, 但在夏洛来羊等其他 11 个品种的羊中, 该突变率仅为 1%<sup>[9]</sup>。孟详人等<sup>[17]</sup>对我国 11 个绵羊品种 *GDF8* 基因 3' UTR 区的研究中也发现了特克塞尔羊的 G → A 突变, 但在其他品种中均未发现该突变。

在本实验检测的 4 个品种共计 294 个绵羊个体中, 均未发现 *GDF8* 基因 3' UTR 区 G → A 突变。这一结果与孟详人等<sup>[17]</sup>的报道一致。推测此 G → A 突变可能仅存在于某些绵羊品种或只存在于特克塞尔羊中, 并且其基因频率受到人工选择的影响。因此, 在肉用绵羊育种中可以以标记辅助手段, 适当导入携带该突变的特克塞尔血统, 以便提高肉羊的产肉性能。

#### 参考文献(References)

- [1] McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member, *Nature*, 1997, 387(6628): 83-90
- [2] Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S. Role of myostatin in metabolism, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2004, 7(4): 451-457
- [3] Joulia-Ekaza D, Cabello G. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects, *Exp Cell Res*, 2006, 312(13): 2401-2414
- [4] McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(23): 12457-12461
- [5] Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, et al. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs, *PLoS Genet*, 2007, 3(5): e79
- [6] Guimaraes SEF, Stahl CH, Lonergan SM, et al. Myostatin promoter analysis and expression pattern in pigs, *Livestock Science*, 2007, 112(1-2): 143-150
- [7] Kocabas AM, Kucuktas H, Dunham RA, et al. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1575(1-3): 99-107
- [8] Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child, *N Engl J Med*, 2004, 350(26): 2682-2688
- [9] Clop A, Marcq F, Takeda H, et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep, *Nat Genet*, 2006, 38(7): 813-818
- [10] Lee SJ, McPherron AC. Myostatin and the control of skeletal muscle mass, *Curr Opin Genet Dev*, 1999, 9(5): 604-607
- [11] Whittemore LA, Song K, Li X, et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength, *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 300(4): 965-971
- [12] Thomas M, Langley B, Berry C, et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation, *J Biol Chem*, 2000, 275(51): 40235-40243
- [13] Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(16): 9306-9311
- [14] Li XL, Wu ZL, Liu ZZ, et al. SNP identification and analysis in part of intron 2 of goat *MSTN* gene and variation within and among species, *J Hered*, 2006, 97(3): 285-289
- [15] Zhou H, Hickford JG, Fang Q. Variation in the coding region of the myostatin (*GDF8*) gene in sheep, *Mol Cell Probes*, 2008, 22(1): 67-68
- [16] Johnson PL, McEwan JC, Dodds KG, et al. A directed search in the region of *GDF8* for quantitative trait loci affecting carcass traits in Texel sheep, *J Anim Sci*, 2005, 83(9): 1988-2000
- [17] 孟详人, 郭 军, 赵倩君, 等. 11 个绵羊品种 *MSTN* 基因非翻译区的变异, *遗传*, 2008, 30(12): 1585-1590

## Detection of Genetic Diversity of *GDF8* Gene in Four Sheep Breeds

Lei Pan, Yi-Min Wang<sup>1</sup>, Guo-Qing Shi<sup>2</sup>, Ji-Dong Lou, Feng Guan\*

(College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; <sup>1</sup>Agricultural Bureau of Lin'an City, Fine Breed of Livestock Promotion Station, Lin'an 311300, China; <sup>2</sup>The Key Sheep Breeding and Reproduction Biotechnology Laboratory of Xinjiang Production and Construction Group, Shihezi 832000, China)

**Abstract** *GDF8* is a negative regulator of skeletal muscle growth and functional inactivation of it causes a significant increase in muscle mass. The allele in Texel sheep is characterized by a G to A transition in the 3' UTR of *GDF8* gene that contributes to the muscular hypertrophy of carrier. In this study, the mutation site of *GDF8* gene was analyzed in 4 sheep breeds including Dorset sheep (57), Charollais sheep (47), Romney sheep (38) and Hu sheep (152). The results showed that no carrier of this mutation site was found in these sheep breeds. It supposed that this mutation concerned with some certain sheep breed.

**Key words** sheep; *GDF8*; SNP; genetic diversity

Received: April 8, 2009

Accepted: August 21, 2009

The work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2008AA101011) and the National Natural Science Foundation of China (No.C120103)

\*Corresponding author. Tel: 86-571-86835772, Fax: 86-571-86914449, E-mail: jlguanfeng@yahoo.com.cn