

松辽白鹅 *Myf5* 基因 多态性与生产性能相关研究

吴俊波¹ 朴海仙¹ 金一^{1*} 李振远¹ 金海国²

(1. 延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002; 2. 吉林省农业科学院 畜牧分院, 吉林 公主岭 136100)

摘要:采用测序和单链构象多态(SSCP)的方法分析了 *Myf5* 基因在 3 个品种中的遗传分布、遗传变异及群体杂合性等群体遗传信息,并分析了 *Myf5* 基因对胴体性状及肉质性状的遗传效应。结果发现:(1)在此扩增片段存在多态性,得到 AA、AB 和 BB 等 3 种基因型。3 个品种中等位基因 A 占绝对优势,且主要以 AA 型存在。(2)在 *Myf5* 基因外显子 1 第 1344 处发生了单碱基的改变(A→G),第 1410 处发生了单碱基改变(G→C)。方差分析结果表明,不同基因型的宰前活重、屠体重、半净膛重、全净膛重、腿肌重、翅膀重与屠宰率性状间有显著差异,其它大部分生长和屠体性状无显著差异。

关键词:松辽白鹅; *Myf5* 基因; 遗传结构; 生产性能

中图分类号:S835.2 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2011)06-1171-05

An Analysis of Correlation between the Polymorphism of *Myf5* and Production Traits in Songliao Goose

WU Jun-bo¹, PIAO Hai-xian¹, JIN Yi^{1*}, Li Zhen-yuan^{1,2}, JIN Hai-guo²,

(1. Agriculture College of Yanbian University, Yanji 133002, China; 2. Animal Science Part of Jilin Province Academy of Agricultural Science, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: The population genetic information about genetic distribution, variation and heterozygosity of *Myf5* in three breeds was analyzed using PCR-SSCP. And the genetic effects of *Myf5* gene on fiber density and partial carcass traits were investigated. The results showed as follows: first of all, the amplified fragment possessed polymorphism including AA, AB and BB, three genotypes. Allele A held absolutely dominance in three different species of goose. Secondly, the single base was changed on 1344st spot of exon 1 of *Myf5* gene (A→G), and on 1410th spot of exon 1 of *Myf5* gene (G→C). The results of significance test showed that living weight, carcass weight, half-eviscerated weight, whole-eviscerated weight, leg muscle weight, wings weight and dressing percentage were significantly different in different genotypes, and other parts showed little or no difference.

Key words: Songliao goose; *Myf5* gene; genetic diversity; production traits

生肌决定因子(MRFs)家族基因控制着肌细胞的增殖和分化,与肌纤维的数量和大小都有密切的关系,因而对肉质和风味都有着非常重要的作用,该基因家族编码 4 种不同的转录因子,分别为 *MyoD*, *MyoG*, *Myf5*, 它们各自或协同控制着骨骼肌生成方面的关键调节因子,这些基因就是控制骨骼肌生成的

收稿日期:2011-09-01 修回日期:2011-11-02

基金项目:吉林省财政厅项目资助(2010)

作者简介:吴俊波(1987-),男,硕士生,主要从事动物繁殖与生物技术研究, E-mail: wujunbo@yahoo.cn; * 通讯作者:金一 教授,博士, E-mail: yijin@ybu.edu.cn.

关键调节因子^[1]。*MyoD* 家族基因属于生肌碱性螺旋-环-螺旋(bHLH) 转录因子,他能激活肌肉特定基因^[2-3]。目前 *MyoD* 和 *MyoG* 基因都得到了充分的研究,而 *Myf5* 作为其中的重要一员,在鹅上的研究报道甚少。*Myf5* 基因因其研究难度较大,然而其重要的地位及意义,已经引起研究者的重视。

松辽白鹅配套系是在现有鹅种的基础上,利用先进的分子育种方法培育出的肉鹅新品系,其生长速度快、绒肉产量高、繁殖性能好、肉质好、抗病力强。本研究选择了3个优秀肉鹅品种作为试验对象,用PCR-SSCP的方法对鹅 *Myf5* 基因外显子1区进行SNPs(Single Nucleotide Polymorphisms)检测,同时与屠宰性状进行相关分析,目的在于寻找与肉质等性状相关的遗传标记,为优质肉鹅的分子育种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

利用统一标准饲养的松辽白鹅38只于90日龄进行屠宰,采肝组织置液氮速冻,苯酚-氯仿法提取基因组DNA,-80℃保存。

1.2 主要试剂

DNA 凝胶回收试剂盒购自AXYGEN公司;pMD18-T载体试剂盒购自Takara公司; *Taq* 酶、DNTP购自TIANGEN公司;感受态DH_{5α}由本实验室保存。

1.3 引物设计与PCR扩增

根据鸡(Genbank:登录号X73250)用Premier5.0和Oligo6.0结合设计鹅 *Myf5* 基因外显子1部分特异引物,引物序列为:Upper:5'-CCAGTTCTCCCCATCCGA-3',Lower:5'-GGCAGGTGATAGTAGT-TCTCC-3',由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

PCR扩增总体积为25μL,其中10×PCR 2.5μL,2.5mmol/LdNTP 1μL,10μmol/L上、下游引物各0.5μL, *Taq* 酶1.0U,100ng/μLDNA模板1μL,其余双蒸水补齐。PCR反应条件:95℃预变性5min;94℃变性30s,56℃退火30s,72℃延伸30s,共30个循环,最后72℃延伸5min。扩增产物用ρ=1%的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR扩增产物经98℃变性10min,用冰浴冷10min后,ρ=8%变性聚丙烯酰胺凝胶180V电泳14~16h,银染显色,分型。

1.4 SSCP分析及测序

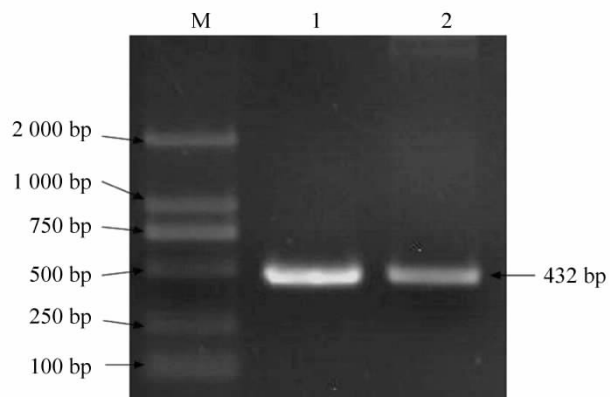
选取不同基因型的纯合子,使用DNA凝胶回收试剂盒回收目的条带,克隆到pMD18-T载体,转化入DH_{5α}感受态细胞,37℃培养过夜,对菌体进行PCR鉴定为阳性的细胞送北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。

1.5 统计分析

分型后计算基因型频率及基因频率,并进行Hardy-Weinberg平衡检验。同时以不同基因型为标记效应组成固定模型,利用SPSS12.0统计软件对各生产性状进行方差分析,不同标记基因型之间生产性状指标(平均值±标准差)进行差异显著性检验和多重比较。线性模型如下: $Y_{ij} = \mu + marker_j + e_{ij}$ 其中: Y_{ijk} :个体表型的记录值; μ :群体平均值; $marker_j$:标记基因型效应; e_{ij} :随机误差。

1.6 生产性能测定指标及测定方法

生产性能指标:本研究用宰前活重、屠体重、半净膛重、全净膛重、胸肌重、腿肌重、腹脂重、翅膀重、头重、爪重作为禽屠宰测定的主要指标,为了计算相关得率,可考虑测量屠宰重指标。生产性能屠宰性能按照全国家禽育种协会1984年公布的“家禽生产性能与计算方法”进行。



1 2: 扩增片段; M: D2000。

1 2: Amplification fragment; M: D2000.

图1 *Myf5* 基因PCR扩增产物电泳

2 结果与分析

2.1 鹅 *Myf5* 基因 PCR 扩增结果

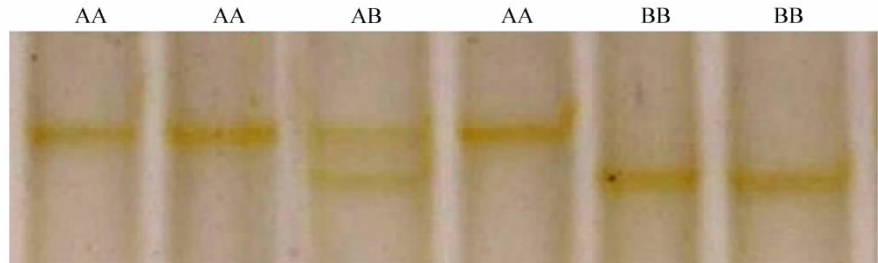
用设计的引物对不同品种鹅的基因进行扩增, PCR 产物用 $\rho = 1\%$ 琼脂糖检测。发现特异性扩增良好(图 1), 片段长度与预期的相符, 可直接进行 SSCP 分析。

2.2 SSCP 检测结果

结果该位点表现出 3 种基因型(命名为 AA、AB、BB)(图 2)。

2.3 不同基因型的纯合子个体的测序

在该点各取 2 个纯合子基因型的片段进行回收, 并进行测序。测试结果表明, 多态性是由该段序列中的 1 个核苷酸的点突变造成的(图 3), AA 和 BB 基因型个体进行测序并与原序列进行比对发现, 第 1344 处发生了单碱基的改变(A → G), 第 1410 处发生了单碱基改变(G → C) 均位于外显子 1。



1、2、4: AA; 3: AB; 5、6: BB。

图 2 *Myf5* 基因扩增产物的 SSCP 分析

Fig. 2 SSCP analysis on PCR amplification in different individuals of *Myf5* gene

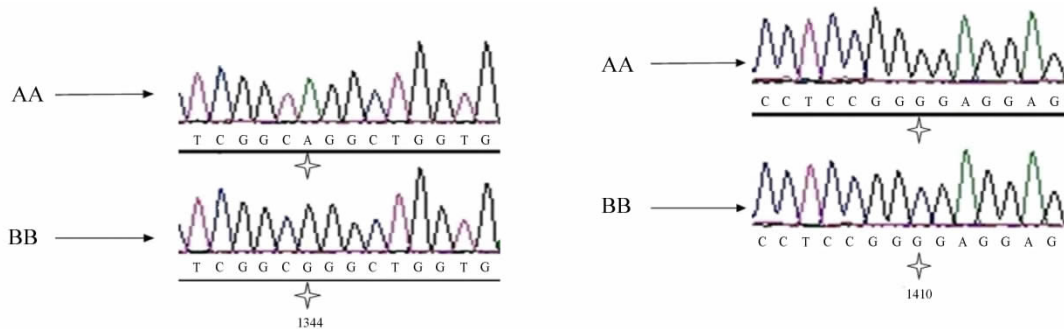


图 3 *Myf5* 基因 SNP 序列分析

Fig. 3 Sequence analysis on the isolated genotype of *Myf5* gene

2.4 基因型频率及基因频率

根据分型结果对基因型频率及基因频率进行计算, 并进行 Hardy - Weinberg 平衡检验, 结果发现 AA、AB 和 BB 3 种基因型中 AA 基因型为优势基因型, 等位基因 A 为优势等位基因。 χ^2 检验表明, 松辽白鹅 *Myf5* 基因外显子 1 引物扩增片段在检测群体中 χ^2 值达极显著水平 ($P < 0.01$), 故松辽白鹅群体在外显子 1 位点上处于 Hardy - Weinberg 不平衡状态。

表 1 松辽白鹅 *Myf5* 基因基因型及等位基因频率

Tab. 1 Genotype and allele frequencies of *Myf5* gene in different breeds

基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency		χ^2
AA	BB	AB	A	B	
0.789 (n = 30)	0.132 (n = 5)	0.079 (n = 3)	0.829	0.171	19.787

χ^2 为对不同基因型分布的 Hardy-Weinberg 平衡检验值。

χ^2 distribution of different genotypes for the Hardy-Weinberg equilibrium test values.

2.5 各种基因型与生产性能的相关研究

对不同基因型的各个屠宰性状均值进行了差异显著性检验, 结果发现基因型 AA 的宰前活重、屠体

重、半净膛重、全净膛重、翅膀重各项均值显著高于基因型 BB ($P < 0.05$) ,其中基因型 AB 与 AA、BB 个体间差异不显著;说明基因型 AA 对于宰前活重、屠体重、半净膛重、全净膛重、翅膀重这 5 个指标均有一定的正面影响。腿肌重性状上基因型 BB 均值显著低于基因型 AA、AB ($P < 0.05$) ,说明基因型 BB 对腿肌重性状有一定的负面影响。在半净膛率性状中 基因型 AB 的均值显著高于基因型 AA ($P < 0.05$) ;在全净膛率性状中基因型 AB 的均值极显著高于基因型 AA ($P < 0.01$) ;说明基因型 AB 对半净膛率、全净膛率性状有一定的正面影响。在胸肌重、腹脂重、头重、爪重、屠宰率、胸肌率、腿肌率和腹脂率上没有发现显著差异。

表 2 *Myf5* 基因不同基因型对生产性状的影响

Tab.2 Effect of different genotypes of *Myf5* gene on production traits Songliao goose genotype and slaughter traits

性状 Traits	AA 型($n = 30$)	AB 型($n = 3$)	BB 型($n = 5$)
宰前活重/g	4 506.67 ± 65.08a	4 273.33 ± 205.78	4 076.00 ± 159.40b
屠体重/g	3 749.37 ± 54.98a	3 597.67 ± 173.86	3 406.00 ± 134.67b
半净膛重/g	3 404.20 ± 49.29a	3 318.33 ± 155.88	3 087.40 ± 120.75b
全净膛重/g	2 991.70 ± 43.17a	2 965.00 ± 136.52	743.40 ± 105.74b
胸肌重/g	496.40 ± 7.94	494.00 ± 25.09	457.80 ± 19.44
腿肌重/g	501.70 ± 6.93a	503.33 ± 21.91a	462.00 ± 16.97b
腹脂重/g	50.93 ± 3.14	46.00 ± 9.93	46.40 ± 7.69
翅膀重/g	445.33 ± 8.87a	421.00 ± 28.04	397.00 ± 21.72b
头重/g	159.67 ± 2.90	155.33 ± 9.18	144.40 ± 7.11
爪重/g	129.46 ± 2.84	117.67 ± 8.98	116.00 ± 6.95
屠宰率/%	83.20 ± 0.24	84.17 ± 0.76	83.52 ± 0.59
半净膛率/%	75.54 ± 0.30b	77.73 ± 0.96a	75.73 ± 0.74
全净膛率/%	66.41 ± 0.33B	69.44 ± 1.03A	67.25 ± 0.80
胸肌率/%	16.66 ± 0.23	16.66 ± 0.72	16.65 ± 0.55
腿肌率/%	16.81 ± 0.18	16.97 ± 0.57	16.80 ± 0.44
腹脂率/%	1.68 ± 0.11	1.55 ± 0.36	1.66 ± 0.28

同一行间小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$) ,大写字母不同表示差异极显著 ($P < 0.01$) 。

Different lowercase letters mean significant difference at 0.05 level ,different uppercase letters mean significant at 0.01 level.

3 讨 论

Myf5 基因在肌肉的生长过程中起非常重要的作用 ,它与肌纤维的数量和大小均匀有关系 ,因此研究 *Myf5* 基因将会对畜禽的产肉力、肉质及风味的改善具有十分重要的意义。

Kiefer 和 Hauschka 报道了 *Myf5* 在鸡胚中的动态表达变化 ,鸡胚肌肉发生过程中 *Myf5* 表达首先出现在 stage 3 的原条(primitive streak) 并在非肌中胚层中有短暂性低水平的表达。其后 ,*Myf5* 的表达伴随着肌节的发生而在预分节中胚层(pre-segmented mesoderm ,PSM) 中呈震荡性表达。其在 I - IV 体节中的表达也有动态的区域性变化^[4-6]。通过对 *Myf5* 过量和过少的表达实验 ,发现 *Myf5* 在脊椎动物的生肌过程中具有相当关键的作用 ,尤其是在肌分化阶段^[7]。Cooper 等^[8-9]认为 ,*MyoD* 和 *Myf5* 之间可能存在负反馈调控环 ,*Myf5* 促进 *MyoD* 基因的表达 ,而 *MyoD* 又抑制 *Myf5* 基因的表达。

Lee 等^[10]在基因水平上的研究显示 ,在哺乳动物中 *Myf5* 的调控机制是比较复杂的。S. Maak 等^[11]做了更加深入的研究表明 ,鼠、兔、人、猪、牛、狗和鸡上相应的基因区域内的各种调控因子中(H1 和 2; M6EH) 自始至终都是高度保守的。这些调控因子的功能在转基因小鼠中都经过了检测 ,并且它们在小鼠胚胎发生时其功能在不同区域进行独立的时空表达^[13-15]。

本实验采用 PCR - SSCP 技术检测了松辽白鹅 *Myf5* 基因的多态性 ,得到了 3 种基因型 ,AA 基因型为优势基因型 ,等位基因 A 占主要优势。A、B 两个等位基因 频率分别为 0.829 和 0.171; AA、AB、BB 3

种基因型频率分别为 0.789、0.079 和 0.132。 χ^2 检验结果表明,该位点处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态 ($P < 0.01$)。这可能与群体纯合度较高和对某些性状的选种选留有关,说明该群体仍有待进一步调整。

本研究发现不同基因型的宰前活重、屠体重、半净膛重、全净膛重、腿肌重、翅膀重与屠宰率性状间有显著差异,其它大部分生长和屠体性状无显著差异。AA 基因型个体有相对高的均值,故该基因型可作为筛选部分高屠宰率性状的分子标记,从而达到提高松辽白鹅生长水平的目的。因此,有必要对该基因作为与鹅生长性状相关的候选基因进行更加深入的研究。

参考文献:

- [1] Naidu P S, Ludolph D C, To R Q, et al. Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(5): 2707-2718.
- [2] Kim H S, Park E W, Yoon D H, et al. Partial sequence of the Bovine (*Bos taurus coreanae*) myogenic factor encoding gene *MyoD* [J]. *Asian-Aust J Anim Sci*, 1999, 12(5): 689-694.
- [3] Rudnicki M A, Schlegelsberg P N, Stead R H, et al. *MyoD* or *Myf5* is required for the formation of skeletal muscle [J]. *Cell*, 1993, 75(7): 1351-1359.
- [4] Black B L, Martin J F, Olson E N. The mouse MRF4 promoter is trans-activated directly and indirectly by muscle-specific transcription factors [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(7): 2889-2892.
- [5] Ernst C W, Vaske D A, Larson R G, et al. Rapid communication: Msp I restriction fragment length polymorphism at the swine MYF6 locus [J]. *Journal of Animal Science*, 1994, 72(3): 799.
- [6] Goureau A, Garrigues A, Tosser-Klopp G, et al. Conserved synteny and gene order difference between human chromosome 12 and pig chromosome 5 [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 2001, 94(1-2): 49-54.
- [7] Tatusova T A, Madden T L. Blast 2 sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 174(2): 247-250.
- [8] 朴海仙, 金一, 曹阳, 等. 松辽白鹅 GH 基因多态性及与屠宰性能的相关分析 [J]. *江西农业大学学报*, 2010, 32(6): 1240-1244.
- [9] Cooper R N, Tajbakhsh S, Mouly V, et al. In vivo satellite cell activation via *Myf5* and *MyoD* in regenerating mouse skeletal muscle [J]. *J Cell Sci*, 1999, 112(17): 2895-2901.
- [10] Twardzik D R, Mikovits J A, Ranchalis J E, et al. γ -interferon-induced activation of latent transforming growth factor- β by human monocytes [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1990, 593: 276-284.
- [11] Cieslak D, Kuryl J, Kapelanski W, et al. Relationship between genotypes at *MYOG*, *MYF3* and *MYF5* loci and carcass meat and fat deposition traits in pigs [J]. *Animal Science Papers and Reports*, 2002, 20(2): 77-92.
- [12] Maak S, Neumann K, Swalve H H. Identification and analysis of putative regulatory sequences for the *MYF5/MYF6* locus in different vertebrate species [J]. *Gene*, 2006, 379(9): 141-147.
- [13] Welsh J, Petersen C, McClelland M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping [J]. *Nucl Acid Res*, 1991, 19(2): 303-306.
- [14] Williams J G, Anne R K, Kenneth J L, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucl Acids Res*, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [15] Yablonka R Z, Rudnicki M A, Rivera A H, et al. The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking *MyoD* [J]. *Dev Biol*, 1999, 210(2): 440-455.