金华猪 MyoG 基因多态性与部分生长性能的关系

赵 青[1], 钟土木[2], 徐宁迎[3]
(1 金华职业技术学院,浙江 金华 321017;2 浙江加华种猪有限公司,
浙江 金华 321053;3 浙江大学 动物科学学院,浙江 杭州 310029)

摘要:应用 PCR-RFLP 技术研究了金华猪肌细胞生成素(MyoG)的基因型,并用 SPSS 13.0 软件分析了各基因型与生长速度的相关性. 结果表明:金华猪肌细胞生成素基因具有 AA、AB、BB 3 种基因型,且不同基因型间的个体初生体质量、1~6 月龄体质量差异不显著($P>0.05$).

关键词:金华猪; 肌细胞生成素基因; PCR-RFLP; 生长性能
中图分类号:S811.5 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-411X(2010)02-0121-04

Study on the PCR-RFLP Polymorphisms of MyoG Gene and Its Relationships with Mass Traits in Jinhua Pigs

ZHAO Qing[1], ZHONG Tu-mu[2], XU Ning-ying[3]
(1 Jinhua College of Profession and Technology, Jinhua 321017, China; 2 Zhejiang Jiahua Pig Breeding CO., LTO., Jinhua 321053, China; 3 College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The myogenin gene of Jinhua pigs was genotyped by PCR-RFLP method and its genetic effect on growth performance was analyzed by SPSS 13.0 software. The results showed that there were three genotypes, namely AA, AB and BB, in Jinhua pigs, and no difference was found for genotypes AA, AB and BB at the birth mass, body mass at 1-month, 2-month, 3-month, 4-month, 5-month, 6-month and daily gain ($P>0.05$).

Key words: Jinhua pigs; myogenin gene; PCR-RFLP; growth performance

MyoG 基因家族编码螺旋一环一螺旋(bHLH)蛋白并调控着肌肉的分化与发育过程,肌细胞生成素基因(Myogenin),MyoG 基因是 MyoD 基因家族中唯一在所有骨骼肌肌细胞系中均可表达的基因,在肌细胞融合形成肌纤维的过程中起着中心调节作用. 林万华等[1]分析了二花脸猪不同的 MyoG 基因型间初生体质量差异极显著,这反映了 MyoG 基因可能影响二花脸猪的初生体质量及肌纤维数量. 金华猪是我国优良地方品种之一,具有产仔多,早熟易肥,屠宰率高等特点,尤以肉质细嫩鲜美著称. 但该品种也存在瘦肉率低,生长较慢等缺点. 赵进等[2-3]对金华猪 MyoG 基因的多态性及与繁殖性状的相关性分别进行了研究. 本试验采用 PCR-RFLP 法检测金华猪 MyoG 基因的多态性,分析其不同基因型对生长性状的影响,为寻找有效的遗传标记和在猪的育种实践中进行标记辅助选择提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 试验猪

选取 10 窝预产期相近的金华猪母猪所生的 73 头金华猪仔猪,按金华猪保种场常规日粮和方法饲养,试验在浙江加华种猪有限公司金华猪保种场进行,在试验期对每头试验猪测定个体初生和 1、2、3、4、5、6 月龄体质量. 当仔猪 2 月龄时,对每头猪由前腔静脉采取血样 5 mL,EDTA 抗凝,采用酚氯仿法抽提基因组 DNA, -20 ℃保存备用.

收稿日期:2009-06-22
作者简介:赵 青(1969—),女,副教授,硕士; 通信作者:徐宁迎(1956—),男,教授,博士,E-mail:nyxu@zju.edu.cn
基金项目:浙江省自然科学基金(Y306027);浙江省重大科技攻关项目(2006C004-(2))

1.2 试验方法

1.2.1 PCR 扩增 引物序列是引自 Soumillion 等[4]并由上海英骏生物技术有限公司合成. 引物序列、PCR 产物大小及扩增区域见表 1,PCR 扩增见图 1、图 2.

表 1 MyoG 基因 PCR-RFLP 引物

Tab. 1 PCR Primer sequences for PCR-RFLP

PCR-RFLP	引物序列	产物大小	扩增区域	多态性酶切位点位置
PCR1	5′-TGGACTGGATGGTTCAGACTGTG-3′ 5′-AGACAGTCTCAGTTGGGCATGG-3′	959 bp	外显子 2,3 及内含子 2	内含子 2 内
PCR2	5′-TCAGGAAGAACTGAAGGCTG-3′ 5′-GTTTCCTGGGGTGTTGC-3′	353 bp	3′-端侧翼序列	3′-端侧翼序列内

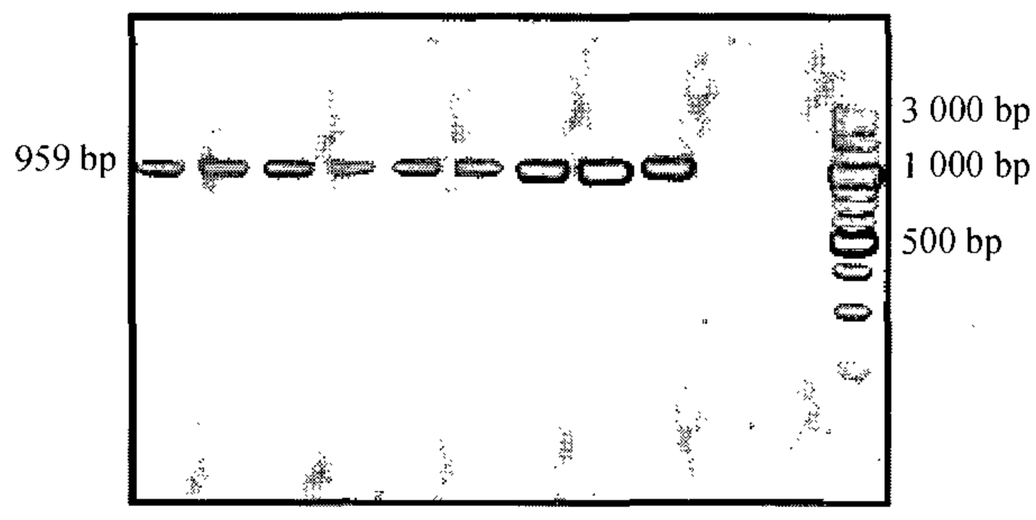


图 1 MyoG 基因 PCR1 扩增图

Fig. 1 Amplification of MyoG by PCR1

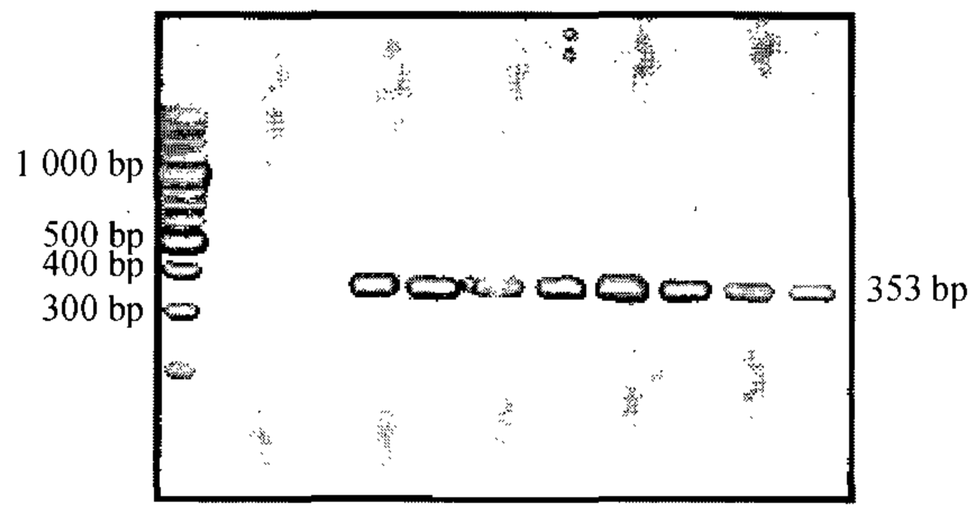


图 2 MyoG 基因 PCR2 扩增图

Fig. 2 Amplification of MyoG gene by PCR2

PCR 反应体系均为 15 μL,其中 10 × buffer1.5 μL,$MgCl_2$(25 mmol/L)1.2 μL,dNTP(10 mmol/L)0.375 μL,引物(10 pmol/L)各 0.45 μL,模板 DNA 1 μL,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL,其余由灭菌双蒸水补足. PCR 扩增程序:94 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 30 s,56~58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,40 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min,4 ℃保存. 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物.

1.2.2 PCR-RFLP 检测 MyoG 基因的 PCR 扩增产物用 *Msp* I 酶进行酶切,具体条件为:buffer 2 μL,*Msp* I酶(10 U/μL)0.2 μL,PCR 产物 10 μL,ddH_2O 8 μL,置于 37 ℃水浴锅中消化过夜,酶切产物用 20 g/L的琼脂糖凝胶电泳分析,拍照保存.

1.2.3 统计分析 所有生长数据均用 Excel 建立数据库,根据酶切图谱进行基因分型,结合表型利用 SPSS 13.0 软件对金华猪不同基因型的初生体质量至 6 月龄体质量进行方差分析,选择 Duncan's 法进行多重比较,采用一般线性模型进行基因型与生长性状的相关性分析.

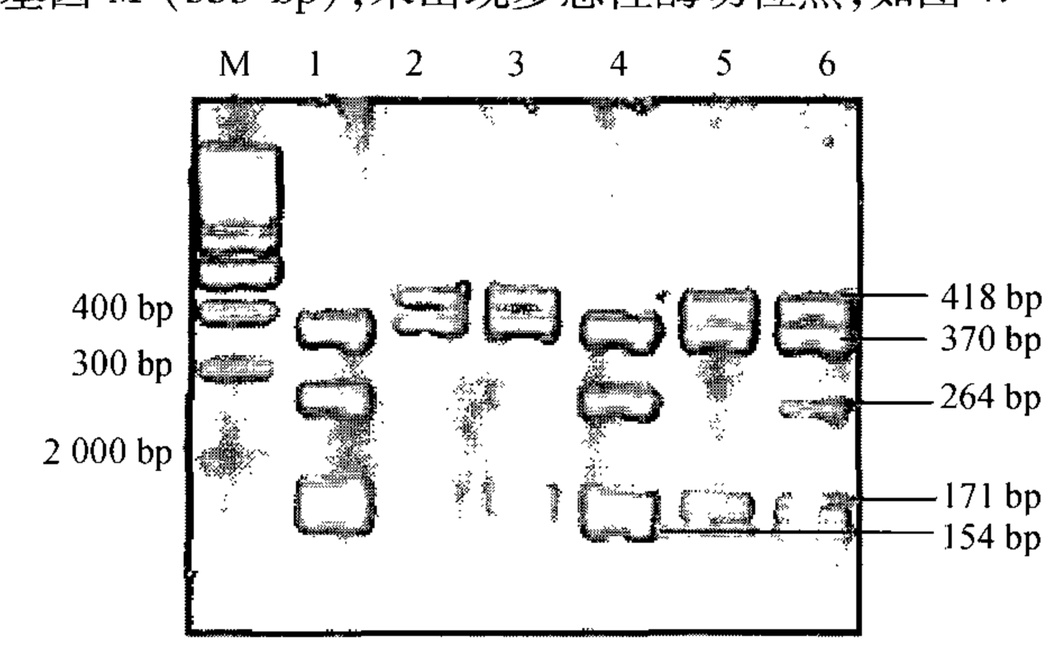
基因的线性模型:$y_i = \mu + \alpha_i + e_i$.

其中 y_i 为性状测定值,μ 为总体平均数,α_i 为基因型效应值(i = AA,AB,BB,MM,MN),e_i 为随机误差.

2 结果与分析

2.1 PCR-RFLP 检测结果

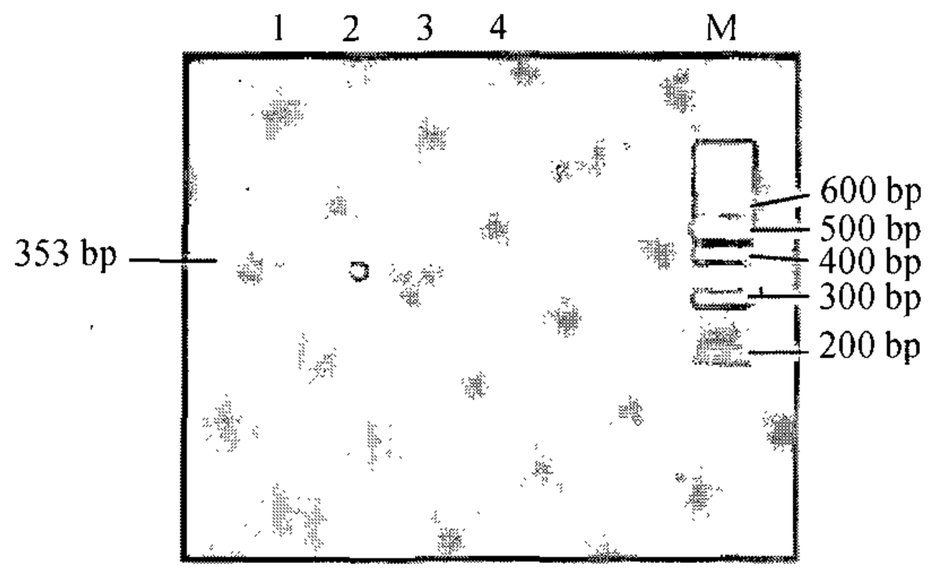
MyoG 基因的 PCR1 扩增产物片段长度为 959 bp,经 *Msp* I 限制性内切酶酶切,琼脂糖凝胶电泳后,共有 3 个 *Msp* I 酶酶切位点,检测出 3 种 418、370、264、171、154 bp 5 条带. 定义(370 + 264 + 171 + 154) bp 为等位基因 A,(418 + 370 + 171) bp 为等位基因 B,如图 3. PCR2 所扩增的 MyoG 基因片段长度为 353 bp,据 Soumillion 等[4]报道 5′- 端调控区域中可能存在一梅山猪特异性 *Msp*I 酶切位点,定义 353 bp 为等位基因 M,(219 + 134) bp 为等位基因 N. 然而,本研究的金华猪经 *Msp* I 限制性内切酶酶切,只出现等位基因 M (353 bp),未出现多态性酶切位点,如图 4.



3、6 为 AB 基因型;2、5 为 BB 基因型;1、4 为 AA 基因型;M: Gene Ruler by 100 bp ladder.

图 3 MyoG 基因 PCR1 - *Msp* I 酶切后图谱

Fig. 3 Digestion of MyoG gene PCR1 product by *Msp* I



1 ~4 为 MM 基因型, M:Gene Ruler by 100 bp ladder

图 4　MyoG 基因 PCR2 - *Msp* I 酶切后图谱

Fig. 4　Digestion of MyoG gene PCR2 product by *Msp* I

2.2　MyoG 基因的基因型及基因型频率

MyoG 基因 PCR1 *Msp* I-RFLP 基因型个体数 AA 为 2,AB 为 14,BB 为 57;基因型频率 AA 为 0.03,AB 为 0.19,BB 为 0.78;等位基因频率 A 为 0.12,B 为 0.88. 结果表明,金华猪试验群体中 BB 型个体居多,占 0.78;AA 型个体最少,占 0.03.

MyoG 基因 PCR2 *Msp* I-RFLP 基因型个体数 MM 为 73,MN 为 0,NN 为 0;基因型频率 MM 为 1,MN 为 0,NN 为 0;等位基因频率 M 为 1,N 为 0. 结果表明,金华猪 MyoG 基因 PCR2 在此位点是单态的.

2.2　MyoG 基因多态与生长性能的相关性分析

根据 MyoG 不同基因型进行分组,检验不同基因型个体各阶段的体质量,结果(表 2)表明,AB 型个体的 1、2、4、5、6 月龄体质量均高于 AA、BB 型,但不同基因型间的个体初生、1、2、3、4、5、6 月龄体质量差异不显著($P>0.05$).

表 2　金华猪 MyoG 不同基因型对其生长性能的影响[1)]

Tab. 2　Effects of MyoG gene on mass traits of Jinhua Pigs　　kg

基因型	体质量						
	初生	1 月龄	2 月龄	3 月龄	4 月龄	5 月龄	6 月龄
AA	0.85 ±0.10a	4.60 ±0.60a	12.50 ±0.50a	24.25 ±1.25a	31.00 ±1.25a	38.53 ±1.25a	47.93 ±1.25a
AB	0.80 ±0.06a	5.11 ±0.25a	12.77 ±0.72a	21.79 ±1.72a	31.69 ±3.02a	41.29 ±1.69a	51.36 ±1.25a
BB	0.78 ±0.02a	4.98 ±0.16a	12.54 ±0.33a	19.97 ±0.69a	31.10 ±1.30a	38.93 ±1.27a	48.98 ±1.45a
全部	0.78 ±0.02	5.00 ±0.14	12.58 ±0.29	20.48 ±0.64	31.52 ±1.16	39.16 ±1.08	49.50 ±1.17

1)表中数据为 $\bar{x}$ ± SE,凡同列数据后标有一个相同字母者,表示差异不显著($P>0.05$,Duncan's 法).

3　讨论

3.1　金华猪 MyoG 基因多态性分析

MyoG 基因第 2 内含子多态性位点根据 GenBankU14331 序列,PCR1 所扩增的片段大小为 959 bp,位于外显子 2、3 及内含子 2,其有 3 个 *Msp* I 酶酶切位点,产生 370、264、171 和 154 bp,共 4 个片段,其在 4 210 bp 处为多态性位点,当此酶切位点发生变异时,264 bp 和 154 bp 合并,产生 418 bp 的片段,共产生 3 个片段,即 418、370 和 171 bp. 本文定义(370 +264 +171 +154) bp 为等位基因 A,(418 +370 +171) bp 为等位基因 B. 由金华猪的电泳图谱可知,MyoG 基因在第 2 内含子区域有 3 种表现型(或称为基因型):AA、AB 和 BB 型.

MyoG 基因 32 端多态性位点根据 GenBankX89209 序列,为 3′-端侧翼序列,PCR2 所扩增的片段大小为 353 bp,只有 1 个 *Msp* I 酶酶切位点,产生 219 和 134 bp 2 个片段. 本文定义 353 bp 为等位基因 M,(219 +134) bp 为等位基因 N. 由金华猪的电泳图谱可知,金华猪在 32 端多态性位点只有 1 种表现型 MM,说明 PCR2 所扩增的片段处于外显子区域,无碱基变异. RFLP 是检测 SNP 的一种方法,无多态性,说明没有检测到单碱基突变.

林万华等[5]研究报道,在 PCR1 *Msp* I -RFLP 位点上,外来品种杜洛克、长白、大约克及培育品种南昌白猪极大多数个体表现为 AA 型,个别为 BB 型,而 6 个中国地方猪种除乐平花猪外,以 BB 型居多. 彭先文等[6]报道 PCR1 *Msp* I -RFLP 位点上,湖北白猪杂交后代优势基因型为 AA 型,没有发现纯合 BB 型. 本研究中金华猪群体中以 BB 型居多,与林万华等[5]和赵进等[3]检测结果相一致.

在 PCR2-RFLP 位点上,彭先文等[6]报道湖北白猪杂交后代表现为单态,未发现梅山猪特异性*Msp* I 多态性酶切位点. 金华猪表现单一的 MM 基因型,与林万华等[5]报道中国地方猪种几乎表现为单一的 M 基因检测结果相一致. 赵进等[3]曾在金华猪 I 系中,发现 1 例 MN 基因型,整个试验群体中等位基因 M 的频率高达 0.996 9,反应出金华猪在遗传品质上的纯质性. 但与蔡兆伟等[7]检测出的金华猪I系群体中 MM 与 MN 基因型频率(分别为 45%、46%) 不一致.

3.2 金华猪 MyoG 基因多态性与其生长性状的相关性分析

Pasmfw 等[8]在大约克猪上的研究结果表明，MyoG 基因对初生体质量、生长速度和瘦肉量有显著影响. 林万华等[1]对我国二花脸猪的研究结果显示，MyoG 基因 AB 型的猪比 BB 型猪的初生体质量大，不同基因型间二花脸猪的初生体质量差异极显著($P<0.01$). 高勤学等[9]在申农1号猪上的研究也证实 MyoG 基因对初生体质量有显著影响($P<0.05$)，并提出该基因可望应用于猪初生体质量的早期选择. 鲁绍雄等[10]研究发现，撒坝猪 MyoG 基因对其6月龄体质量和45日龄~6月龄日增体质量有着显著的影响($P<0.05$)，且都以 AB 型最高，而 AB 型与 BB 型间则无显著差异. 在本次研究中，金华猪 AB 型除初生及3月龄体质量外，多数阶段均高于其他2种基因型，但不同基因型在生长性状上未出现显著差异，具体原因有待于进一步研究.

参考文献:

[1] 林万华，黄路生，艾华生，等. MyoG 基因型对二花脸猪早期生长性状及肌肉组织学特性的影响[J]. 农业生物技术学报，2002，10(4)：367-372.

[2] 赵进，聂光军，张金枝，等. MyoG 基因对金华猪繁殖性状的影响[J]. 遗传，2005，27 (6)：893-897.

[3] 赵进，聂光军，张金枝，等. 金华猪肌细胞生成素基因的初步研究[J]. 养猪，2005(1)：23-24.

[4] SOUMILLION A，ERKENS J H，LENSTRA J A，et al. Variation in the porcine myogenin gene locus[J]. Mammalian Genome，1997，8：564-568.

[5] 林万华，高军，陈克飞，等. 猪 MyoG 基因的 PCR-RFLP 多态性分析[J]. 遗传，2003，25 (1)：22-26.

[6] 彭先文，梅书棋，孙华，等. 湖北白猪杂交后代 MyoG 基因型对部分生产性状的影响[J]. 华中农业大学学报，2007，26(6)：809-812.

[7] 蔡兆伟，罗玉衡，张金枝，等. 猪 Myo G 基因的多态性及其对岔路黑猪胴体和肉质的影响研究[J]. 家畜生态学报，2008，29(3)：11-14.

[8] PASMFW T，IONE S，HARDERS F L，et al. Influences of myogenin genotypes on birth weight，growth rate，carcass weight，backfat thickness and leanweight of pigs[J]. J Anim Sci，1999，77：2352-2356.

[9] 高勤学，刘梅，杨月琴，等. 猪 MyoG 基因的 PCR-RFLP 分型及其与生长性能和肌纤维数目的相关性分析[J]. 中国兽医学报，2005，25 (3)：330-332.

[10] 鲁绍雄，丁艳，李明丽，等. 撒坝猪 MyoG 基因 *Msp* I 多态性及其与部分生长性状的关系[J]. 云南农业大学学报，2007，22(3)：385-388

【责任编辑 柴 焰】

欢迎订阅 2010 年《华南农业大学学报》

《华南农业大学学报》是华南农业大学主办的综合性农业科学学术刊物. 本刊主要报道农业各学科的科研学术论文、研究简报、综述等，设有农学·园艺·土壤肥料、植物保护、生物学、林业科学、动物科学与兽医学、农业工程与食品科学、信息科学、基础科学、综述、简报等栏目. 本刊附英文目录和英文摘要. 读者对象主要是农业院校师生、农业科研人员和有关部门的专业干部.

本刊为《中国科学引文数据库》、《中国科技论文统计源(中国科技核心期刊)》及《中国学术期刊综合评价数据库》等固定刊源，并排列在中国科学引文数据库被引频次最高的中国科技期刊500名以内. 被《中文核心期刊要目总览》遴选为综合性农业科学核心期刊、植物保护类核心期刊. 为美国《化学文摘》、美国《剑桥科学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、英国《CABI》、英国《动物学记录》、《中国生物学文摘》及国内农业类文摘期刊等国内外多家著名文摘固定刊源.

国内外公开发行、季刊、A4幅面. 每期124页，定价10.00元，全年40.00元. 自办发行，参加全国非邮发报刊联合征订发行，非邮发代号：6573.

订阅办法：订阅款邮汇至：300385 天津市大寺泉集北里别墅17号，全国非邮发报刊联合征订服务部.

《华南农业大学学报》编辑部