

猪 基因内含子遗传多态性与胴体及肉质性状的关联分析

余文敏^{1,2} 谢红涛¹ 徐永杰¹ 李德臻¹ 熊远著^{1*} 杨明柳²

1. 农业部猪遗传育种重点开放实验室/华中农业大学动物科技学院, 武汉 430070;
2. 广东温氏集团研究院, 广州 527400

摘要 克隆了大白、长白和梅山猪肌球蛋白轻链调控蛋白2基因(*MRLC2*)内含子2序列,经比对发现,在内含子2中18个碱基突变和8个碱基缺失,其中179 bp处的C/T突变引起 *Hin6I*酶切位点的改变,运用PCR-*Hin6I*RFLP对179头大白×梅山F₂代猪进行家系关联分析,结果表明该酶切位点与屠宰率呈极显著相关,表现为加性效应,CC基因型个体比CT基因型、TT基因型个体有更高的屠宰率;与大理石纹评分呈显著相关,CC基因型个体评分比CT基因型、TT基因型个体高。

关键词 猪;肌球蛋白轻链调控蛋白2基因;多态性;关联分析

中图分类号 S 828.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)02-0189-04

肌球蛋白是肌原纤维主要成分之一,可分为非传统肌球蛋白(unconventional myosin)和传统肌球蛋白(conventional myosin,肌球蛋白)^[1]。不论是何种来源的肌球蛋白均由轻链和重链组成,其中轻链又分为调节轻链和必需轻链2种^[2]。肌球蛋白轻链调控蛋白2(*MRLC2*)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶的底物,被有丝分裂因子活化蛋白激酶(MAPK)激活,其磷酸化在肌肉收缩中起关键作用^[3];在非肌肉细胞的肌动蛋白(actin)纤维化中也起重要作用^[4]。谢红涛等应用抑制消减杂交技术构建了梅山猪及其杂交F₁代梅大猪背最长肌间的正反向消减cDNA文库,筛选出了*MRLC2*基因,获得了该基因的cDNA全长,发现其编码172个氨基酸,与人、牛、狗、小鼠和大鼠的氨基酸序列分别具有98%、99%、98%、98%和97%的同源性,表明该基因的氨基酸序列非常保守^[5]。

本研究对猪*MRLC2*基因内含子遗传多态性与胴体性状及肉质性状进行相关分析,以期对猪的品质改良提供一定的遗传学依据。

材料与amp;方法

试验材料

DNA样品,大白、长白和梅山样品来自华中农

业大学精品猪场,以大白公猪和梅山母猪为父母本,交配生产F₁代。随机选留F₁公猪和F₁母猪。F₁随机交配繁殖。2004年随机选留F₂代个体179头采集血样,对生产性状进行测定^[6]。采用酚/氯仿常规方法提取基因组DNA,TE溶解,-20℃保存。

试验方法

1)引物设计。根据谢洪涛博士提交到NCBI网站上的猪*MRLC2*基因(登录号:DQ490129)的外显子的大小和边界,用Primer Premier 5.0软件设计引物。引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成。

引物信息如下:

扩增内含子的引物:Forward primer:5'-AGAACCCAACT-GACGCATAC-3',Reverse primer:5'-GTCTTTGCTTTCGCTCAT-3',1742 bp,用于酶切的引物:Forward primer:5'-ATGCGGGTGAACCTCGATGTA-3',Reverse primer:5'-CGTGAGTTGTGGGTTTGAT-3',530 bp。

2)PCR扩增。扩增内含子和酶切的PCR反应体系:2.5 μL 10×PCR缓冲液,2 μL MgCl₂ (25 mmol/L),2 μL 10 mmol/L dNTP Mixture,1 μL *TagE* (1 U/μL),上下游引物(10 mmol/L)各1 μL,1 μL DNA模板(50~100 ng/μL),用ddH₂O将体

收稿日期:2009-05-23;修回日期:2009-10-30

* 国家重点基础研究发展规划项目(2006CB102102)资助

** 通讯作者。E-mail: yzhxiong@mail.hzau.edu.cn

余文敏,男,1978年生,硕士。研究方向:分子遗传学与猪育种。E-mail: yuwenmin2005@yahoo.com.cn

系调整总体积为 25 μ L ;扩增内含子反应条件 :94 预变性 4 min ;94 变性 45 s ;59.4 退火 45 s ;72 延伸 60 s ,共 35 个循环 ,最后 72 延伸 10 min ,25 保存。用于酶切的 PCR 反应条件 :94 预变性 4 min ;94 变性 45 s ;60.5 退火 45 s ;72 延伸 30 s ,共 35 个循环 ,最后 72 延伸 10 min。

3) PCR 产物的酶切与电泳。取 8.5 μ L PCR 扩增产物中加入 0.5 μ L *Hin6I* (10 U/ μ L) ,1 μ L 10 \times H 缓冲液 37 消化 12 h ,1.5 % 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。

统计分析

根据 Liu^[7] 所述方法建立单标记回归统计模型 ,采用 SAS 统计软件 (SAS Institute Inc ,Version 8.0) Gln 程序进行单标记方差分析 ,同时采用 reg 程序计算基因加性效应和显性效应 ,并进行显著性检验 ,所采用模型为 : $Y_{ij} = \mu + G_i + S_j + b_{ij} + e_{ijk}$ 。 Y_{ij} 为性状表型值 , μ 为平均值 , G_i 为基因型效应 (包括基因加性效应和显性效应 ;加性效应用 -1, 0, 1 分别代表 AA、AB 和 BB 基因型 ,显性效应用 1, -1 和 1 分别代表 CC、CT 和 TT 基因型) ; S_j 为性别效应 , b_{ij} 为屠宰体重的回归系数 ; e_{ijk} 为残差效应。

结果与分析

基因的内含子扩增序列

PCR 产物 (图 1) 检测结果表明与预期长度一致 ,得到大小 1 800 bp 左右的目的片段。

```

Y1 GTGGTTACAAGTTGCTTTATTTTGTTCACCTTAACTATGTATGTCTCGAAATGTGTCATAA
Y2 GTGGTTACAAGTTGCTTTATTTTGTTCACCTTAACTATGTATGTCTCGAAATGTGTCATAA
Y3 GTGGTTACAAGTTGCTTTATTTTGTTCACCTTAACTATGTATGTCTCGAAATGTGTCATAA
M1 GTGGTTACAAGTTGCTTTATTTTGTTCACCTA-----TGTCTCGAAATGTGTCATAA
M2 GTGGTTACAAGTTGCTTTATTTTGTTCACCTA-----TGTCTCGAAATGTGTCATAA
M3 GTGGTTACAAGTTGCTTTATTTTGTTCACCTA-----TGTCTCGAAATGTGTCATAA
    
```

Y1、Y2、Y3、M1、M2 和 M3 分别代表大白和梅山。Y1、Y2、Y3、M1、M2 and M3 refer to Yorkshire and Meishan respectively.

图 3 MRLC2 基因的序列碱基缺失分析

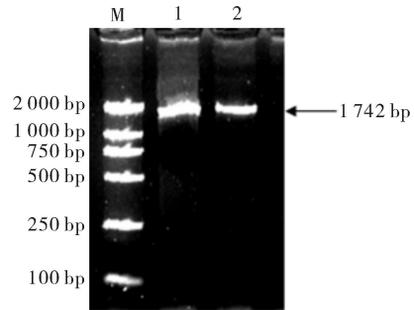
Fig. 3 Sequence analysis of base deletion in porcine of gene MRLC2

基因的结果分析

扩增出含此 SNP 的部分片段 (530 bp) ,对该片段进行 PCR-*Hin6I* RFLP 分析 ,其中基因型 AA 为 1 条带 ,530 bp ;基因型 BB 为 2 条带 ,分别为 379 bp 和 151 bp ;基因型 AB 有 530 bp、379 bp、151 bp 3 条带。几种基因型的酶切带型如图 4 所示。

基因基因型在不同品种中的分布

利用 PCR-*Hin6I* RFLP 检测了大白、梅山和长



M. DL 2 000 marker ; 1. 大白 Yorkshire ; 2. 梅山 Meishan.

图 1 猪 MRLC2 基因内含子的扩增结果

Fig. 1 Amplification result of intron of porcine MRLC2 gene

内含子序列分析

经克隆测序 ,该序列长为 1 742 bp ,以 GT/AG 方式剪接 ,其中内含子序列大小为 1 416 bp ,利用 DNAStar 软件对所获得的大白与梅山 2 个猪种的 MRLC2 基因组序列进行比对 ,发现在该序列有 18 处突变 ,其中第 179 bp 处存在大白 C/梅山 T 的碱基突变 (图 2) ,引起了 *Hin6I* 限制性内切酶酶切位点的改变。在中国本地猪种梅山中有 8 个碱基的缺失 ,其中有 3 个 A 和 3 个 T 缺失 (图 3)。

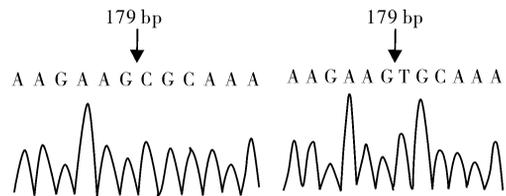


图 2 大白 C/梅山 T 的碱基突变

Fig. 2 Mutation of C/T base in Yorkshire and Meishan

白 3 个猪种中的基因型 ,在大白中 TT 和 CT 基因型分别为 2 头和 8 头 ,CC 基因型 20 头。长白中 TT 和 CT 基因型分别为 5 头和 7 头 ,CC 基因型 23 头 ,在梅山中主要为 TT 基因型 ,个别为 CT 及 CC 基因型 ,分别为 30 头、13 头和 2 头。在梅山猪中 T 等位基因占绝对优势 ,在大白和长白猪中 ,C 等位基因占优势 (表 1)。

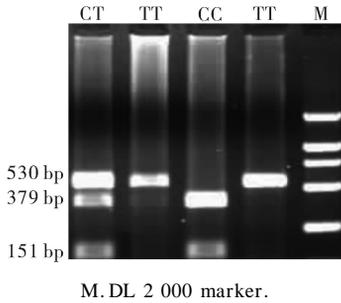


图 4 猪 *MRLC2* 基因部分内含子扩增产物酶切结果
Fig. 4 Genotyping result of PCR-Hin6FRFLP analysis of the porcine *MRLC2* gene

基因的多态性与胴体、肉质性状的关联分析

对 179 头大 × 梅 F_2 代猪 *MRLC2* 基因的内含子 2 SNP C179T *Hin6FRFLP* 不同基因型与猪胴体性状和肉质性状进行关联分析, 结果表明: *MRLC2* 基因内含子与屠宰率呈极显著相关, CC 基因型个体和 TT 基因型个体间差异显著; 与大理石纹评分呈显著相关, CC 基因型个体和 TT 基因型个体间差异显著(表 2)。

表 1 猪 *MRLC2* 基因部分内含子酶切多态性在不同品种猪中的分布结果¹⁾

Table 1 Distribution of *MRLC2*-*Hin6FRFLP* genotype and allele frequencies among different pig breeds

品种 Breed	样本数(头) Number	基因型频率 Genotypic frequencies			等位基因频率 Allelic frequencies		
		TT	CT	CC	T	C	² (HWE)
大白 Yorkshire	30	0.07(2)	0.27(8)	0.67(20)	0.20	0.80	0.74
长白 Landrace	35	0.14(5)	0.20(7)	0.66(23)	0.24	0.76	1.09
梅山 Meishan	45	0.67(30)	0.29(13)	0.04(2)	0.81	0.19	4.44

1) ²(HWE) = 哈德 - 温伯格平衡 ²值。The Hardy-Weinberg equilibrium chi-square(²) value.

表 2 猪 *MRLC2* 基因 *Hin6FRFLP* 基因型与胴体性状及肉质性状的统计分析¹⁾

Table 2 Statistical analysis of *MRLC2* *Hin6FRFLP* genotype with carcass and meat quality traits

性状 Traits	<i>MRLC2</i> PCR- <i>Hin6FRFLP</i> 基因型 <i>MRLC2</i> PCR- <i>Hin6FRFLP</i> genotype			基因效应 Genetic effect	
	TT 基因型 TT genotype	CT 基因型 CT genotype	CC 基因型 CC genotype	加性效应 Additive	显性效应 Dominance
屠宰率 Dressing percentage/ %	71.268 ± 0.731 a	72.600 ± 0.286 ab	73.861 ± 0.991 b	1.133 ± 0.443 *	- 0.033 ± 0.280
瘦肉率 Lean meat percentage/ %	56.445 ± 0.593 a	56.353 ± 0.357 a	57.568 ± 0.630 a	0.633 ± 0.449	0.322 ± 0.283
肩部膘厚 Backfat thickness at shoulder/ cm	3.151 ± 0.146 a	3.409 ± 0.071 a	3.467 ± 0.097 a	0.120 ± 0.088	- 0.060 ± 0.055
6~7 腰椎间膘厚 Backfat thickness at 6~7th thorax/ cm	2.622 ± 0.128 a	2.678 ± 0.067 a	2.651 ± 0.097 a	0.001 ± 0.077	- 0.008 ± 0.049
臀部膘厚 Backfat thickness at buttock/ cm	1.731 ± 0.137 a	1.953 ± 0.771 a	1.843 ± 0.120 a	0.040 ± 0.090	- 0.070 ± 0.057
大理石纹评分 Marbling score	4.050 ± 0.250 a	4.066 ± 0.025 ab	4.235 ± 0.012 b	- 0.080 ± 0.035	0.024 ± 0.024

1) 以上数值为最小二乘均值 ± 标准误, 数值后字母不相同表示差异显著, 加性效应负值表示 B 等位基因降低性状表型值, 其上标 * 表示 $P < 0.05$ 。All the data in the table are least square means ± standard error. Values in each line with different lower case superscripts are significantly different at $P < 0.05$. Negative values of the additive effects denote an decrease of the trait due to B allele. * $P < 0.05$.

讨论

本研究对大白、长白和梅山猪 *MRLC2* 基因内含子序列进行比对, 发现该内含子 2 中 179 bp 处有一 C/T 突变引起 *Hin6I* 酶切位点的改变, 此位点距 GT 剪接信号 18 bp, 且距剪接信号 100 bp 处有 8 个碱基缺失。该内含子突变和缺失有可能与基因的表达调控有关, 进而影响该基因在不同品种中表达。类似的情况在其它基因中也出现过, 例如在猪中 *IGF2* 基因在非编码区的突变影响着重要的遗传性状^[8], 在猪中的 *Leptin* 基因在非编码区的 C3469T

位点与平均日增重存在极显著相关, C3952G 位点与猪的体长和眼肌面积存在一定相关^[9]。

对大白、梅山和长白的 *MRLC2* 基因的内含子 2 进行多态性分析, 该基因内含子有丰富的基因多态性, 且多为碱基突变, 而在谢红涛的研究中该基因的氨基酸序列非常保守^[10]。通过对 *MRLC2* 基因的内含子 2 C179T 位点与胴体性状和肉质性状进行关联性分析, 发现该位点与屠宰率呈极显著相关, CC 基因型屠宰率明显高于 CT 基因型和 TT 基因型, 说明 C 等位基因的屠宰率显著高于 T 等位基因, 而且基因型不同时, TT 基因型与 CC 基因型之

间差异显著。该位点 T 等位基因在梅山猪中为优势基因, C 等位基因在梅大及大白中为优势基因, 这与外来猪种的屠宰率高于中国地方猪种相吻合; 而与大理石纹评分呈显著相关, CC 基因型及 CT 基因型的以上各性状数值均显著大于 TT 基因型, C 等位基因可以作为屠宰率和肉质性状选择的潜在基因。本研究是在大白和梅山杂交 F₁ 代和父母代差异表达的基础上获得的分子标记, 此基因遗传多态性位点为猪屠宰率和肉质性状的分子标记辅助选择, 或者作为与屠宰率、肉质性状关联紧密的 DNA 标记位点的标记辅助选择提供了新的佐证。

参 考 文 献

- [1] YE D, MA T Y. Cellular and molecular mechanisms that mediate basal and tumour necrosis factor- α -induced regulation of myosin light chain kinase gene activity[J]. *J Cell Mol Med*, 2008(4):1331-1346.
- [2] HE W Q, PENG Y J, ZHANG W C, et al. Myosin light chain kinase is central to smooth muscle contraction and required for gastrointestinal motility in mice [J]. *Gastroenterology*, 2008(2):610-620.
- [3] IZUMI T, HANAWA H, SAEKI M, et al. Cardiac contractile proteins and autoimmune myocarditis[J]. *Mol Cell Biochem*, 1993, 119:67-71.
- [4] IWASAKI T, MURATA-HORI M, ISHITOBI S, et al. Diphosphorylated MRLC is required for organization of stress fibers in interphase cells and the contractile ring in dividing cells[J]. *Cell Struct Funct*, 2001(6):677-683.
- [5] XIE H T, LEI M G, XIONG Y Z, et al. Molecular cloning and functional analysis of MRLC2 differentially expressed in Meishan \times Yorkshire F₁ crossbreeds and their parents, Meishan pigs[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2006, 38:788-794.
- [6] 熊远著, 邓昌彦. 种猪测定原理及方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999:57-118.
- [7] LIU B H. Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis[M]. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1998:404-409.
- [8] BRAD A, FREKING S K, MURPHY A W. Identification of the single base change causing the callipyge muscle hypertrophy phenotype, the only known example of polar overdominance in mammals[J]. *Genome Res*, 2002, 12:222-231.
- [9] 刘德武, 杜颖军, 张豪, 等. 猪 Leptin 基因的 SNP 筛查及其与生长性状的关联分析[J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(2):251-257.
- [10] 谢洪涛. 梅山 \times 大白 F₁ 代与其亲本梅山猪背最长肌间差异表达基因的克隆鉴定及特征分析[D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2006:56-57.

Genetic Polymorphisms in Intron of Porcine MRLC2 Gene and Correlation with Meat Quality and Carcass Traits

YU Wen-min^{1,2} XIE Hong-tao¹ XU Yong-jie¹ LI De-zhen¹ XIONG Yuan-zhu¹ YANG Ming-liu²

1. Key Laboratory of Swine Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture/ College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Guangdong Wins Group Academy, Guangzhou 527400, China

Abstract In this study, we obtained the sequence of intron 2 of the porcine *MRLC2* gene from Yorkshire, Landrace and Meishan pig. Eighteen SNPs and 8 bases deficiency were detected by sequence analysis. The single nucleotide polymorphism (SNP) of C179T in intron 2 was significantly associated with dressing percentage. The SNP showed significantly additive effect. Individuals of the CC genotype had significantly higher dressing percentage than those of TT and CT genotype. CC genotype had significantly higher meat marbling than TT genotype and CT genotype.

Key words pig; *MRLC2* gene; polymorphisms; correlation analysis

(责任编辑:边书京)