

猪 *MyoD1* 基因的多态性检测及与肉质性状的关联分析*

邱海芳^{1,2} 汪超¹ 张庆德³ 刘榜^{1**}

1. 华中农业大学农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070;
2. 山东省潍坊市畜牧局, 潍坊 261041; 3. 华中农业大学动物科技学院, 武汉 430070

摘要 采用 PCR-RFLP 方法对通城、大白和长白 3 个纯种及长大通和大长通 2 个三元杂种共 5 个群体 *MyoD1* 基因第 1 内含子的多态性进行了研究, 并对多态位点与生长、胴体和肉质性状进行了关联分析。结果发现第 1 内含子第 257 位存在 1 个 A/C 颠换, 引起 *Dde* I 酶切位点的改变。PCR 产物经 *Dde* I 酶切后, 检测到 2 个等位基因, 3 种基因型, 其中通城猪中 C 等位基因的分布占主要优势, 大白、长白猪中 2 种等位基因的分布频率相近。关联分析结果表明, 不同的基因型与肉色评分和失水率相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); CC 基因型个体的肉色评分显著高于 AA 和 AC 基因型个体; 而 CC 基因型个体的失水率极显著低于 AA 基因型个体。研究结果进一步证明 *MyoD1* 基因是一个重要的肉质性状候选基因, 第 1 内含子第 257 位被 *Dde* I 限制性内切酶识别的多态位点为猪肉质性状的标记辅助选择提供分子标记, CC 基因型猪具有优良的肉质。

关键词 猪; *MyoD1* 基因; 多态性; 肉质性状

中图分类号 S 828.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)05-0593-04

猪的产肉力和肉质性状是猪遗传改良的重要目标性状, 这些性状的形成基础是骨骼肌的生长和发育。骨骼肌发生是在胚胎发育过程中, 由体节细胞经过一系列的增殖、迁移、分化, 最终形成骨骼肌组织的过程^[1-2]。在这一过程中有大量调节因子参与, 其中生肌调节因子 (myogenic regulatory gene, MRFs) 家族是参与肌肉发生过程分子调控的一个重要家族。*MyoD1* 是具有 bHLH (basic helix-loop-helix) 结构域的生肌因子家族成员之一, 又名 *Myf3* (myogenic factor 3, *Myf3*)。*MyoD1* 基因和同属 bHLH 家族的另一个基因 *Myf5* 的表达是胚胎发育过程中体节多能干细胞向肌细胞转变的一个关键步骤, 在调控肌肉发生的过程中, *MyoD1* 不仅可激活肌肉特异基因的转录, 而且也能激活自身的表达, 以维持肌发生^[3]。根据 *MyoD1* 基因的功能研究结果, 认为该基因是启动和维持骨骼肌细胞增殖和分化的一个主要调控基因。

猪 *MyoD1* 基因是生肌调节因子家族中第一个被发现和克隆的基因^[4]。Soumilion 等人 1997 年将猪 *MyoD1* 基因定位于 2 号染色体^[5]。该基因包

括 3 个外显子, 长度分别为 629、75、250 bp^[6]。在雅南猪、荣昌猪、杜洛克、长白等群体中, *MyoD1* 基因第 1 内含子存在一个能被 *Dde* I 限制性内切酶识别的多态位点, 此多态位点与胴体性状和肉质性状相关^[7]。在波兰大白、长白猪等群体中, *MyoD1* 基因第 1 外显子存在 2 个多态位点 C489T 和 G566C, 研究人员对此多态位点的不同基因型在群体中分布情况进行了分析。笔者通过测序发现了第 1 内含子变异位点, 并与通城、大白、长白猪及其杂种猪的生长、胴体、肉质性状进行了关联分析, 旨在寻找与猪生长、胴体和肉质关联的遗传标记, 继而为标记辅助选择提供分子标记。

1 材料与方法

1.1 材料

以地方猪种通城猪 39 头, 引进品种瑞典长白猪 23 头、英国大白猪 22 头, 杂交群体长大通 44 头、大长通 39 头共 167 头个体为试验材料。试验个体在相同饲养管理条件下饲养并全部进行屠宰测定, 测定方法根据国家标准《瘦肉型种猪性能测定技术规

收稿日期: 2009-12-09; 修回日期: 2010-06-09

* 国家自然科学基金项目 (30771536) 资助

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

邱海芳, 女, 1981 年生, 博士研究生. 研究方向: 动物遗传育种. E-mail: qiuhaifang@126.com

程》进行,测定性状包括达上市体质量(通城猪为 75 kg、国外品种或杂种为 90 kg)日龄、试验期日增质量、屠宰率、背膘厚、眼肌面积、后腿肉骨率、pH 值、失水率、滴水损失、肉色、肌内脂肪含量、剪切力等生长、胴体和肉质性状。屠宰时采集猪血样,利用常规的苯酚/氯仿抽提方法提取基因组 DNA,DNA 样品 -20°C 低温保存备用。

1.2 引物设计

根据 GenBank 发布的 *MyoD1* 基因序列(U12574),运用 Primer 5.0 设计引物如下,扩增出 *MyoD1* 基因第 1 内含子 631 bp 片段。Intron1-PF: 5'-TCTCGGTATATCGCCAGTGTG-3'; Intron1-PR: 5'-TTCCCTGTATCATCTCCCAGGA-3'。引物由北京奥科生物技术有限公司合成。

1.3 PCR 扩增

PCR 扩增体系(10 μL):DNA 模板(50 ng/ μL) 1 μL , $10\times$ Buffer 1 μL , Mg^{2+} 0.6 μL (1.5 mmol/L),dNTPs 混合物(各 2.5 mmol/L) 0.25 μL ,引物(10 pmol/L) 0.3 μL ,*Taq* 酶(1 U/ μL) 0.25 μL ,加灭菌双蒸水补足至 10 μL 。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 25 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖进行电泳检测。利用胶回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)回收扩增片段,回收产物在北京奥科生物技术有限公司测序。测序结果通过软件 DNASTar 中的 SeqMan 进行序列分析,寻找 SNP 位点。

1.4 基因型分析

经过电泳检测的 PCR 产物 3 μL ,加入 2 U 的 *Dde* I 限制性内切酶,10 \times Buffer 1 μL ,加水补至 10 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 3~4 h 后电泳检测,紫外灯下拍照并判断基因型。

1.5 统计分析

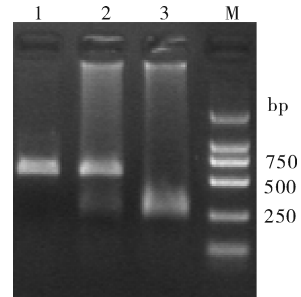
基因及基因型频率根据 Hardy-Weinberg 平衡定律进行计算, $p = D + H/2$, $q = R + H/2$, $\chi^2 = \sum d^2/e$,其中 $d = e - o$,是期望值与观测值之差, p 、 q 表示给定位点上的等位基因的频率。根据试验猪群本身所固有的特点及其性状特征,构建一般线性模型: $Y_{ijk} = \mu + G_i + S_j + C_k + \epsilon_{ijk}$ (y_{ijk} 是性状观察值, μ 为总体均数, G_i 为基因型效应, S_j 为性别效应, C_k 为组合效应, ϵ_{ijk} 为随机参差效应,其中,假定服从 $N(0, \sigma^2)$ 分布),利用软件 SPSS 10.0 对各性状值与

酶切后产生的基因型之间进行关联分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 与 PCR-RFLP 结果

利用 PCR 方法扩增了猪 *MyoD1* 基因第 1 内含子 513 bp 的核苷酸片段。测序结果表明 *MyoD1* 基因第 1 内含子存在 1 个 A257C 颠换位点,此突变产生了 *Dde* I 的酶切位点。酶切后存在 3 种基因型,CC 型(513 bp)、AC 型(513 bp+254 bp+259 bp)和 AA 型(254 bp+259 bp),见图 1。



M. Marker; 1. CC 基因型 CC genotype; 2. AC 基因型 AC genotype; 3. AA 基因型 AA genotype.

图 1 *MyoD1* 基因第 1 内含子 *Dde* I 酶切结果

Fig.1 Band patterns of the intron 1 of *MyoD1* gene digested with *Dde* I

2.2 通城、大白和长白 *MyoD1* 基因型及其等位基因频率

利用 PCR-RFLP 方法对试验猪群进行检测,分型后计算出基因型频率和等位基因频率,由表 1 可以看出,5 个群体都出现 2 种等位基因,共 3 种基因型,其中通城猪 C 等位基因的分布占主要优势,达 0.78,大白、长白、长大通和大长通 2 种等位基因的分布频率相近。

对各群体内 *MyoD1* 基因第 1 内含子 *Dde* I 酶切位点的不同基因型分布进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。结果表明除通城和长大通群体显著偏离外($P < 0.05$),其他各群体内 *MyoD1* 的分布都处于 Hardy-Weinberg 平衡状态($P > 0.05$),说明就 *MyoD1* 基因的 *Dde* I 酶切位点而言,这些群体都未经过选择。

2.3 *MyoD1* 基因与胴体性状之间的关联分析

利用 SPSS 中的 GLM 程序进行 *MyoD1* 基因型与生长、胴体和肉质性状之间的关联分析,结果显示 *MyoD1* 基因不同基因型与肉色和失水率显著相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。CC 基因型个体的肉色

表 1 *MYOD1* 基因第 1 内含子多态位点基因型以及基因频率分布¹⁾

Table 1 Genotype and allele frequency of polymorphism of intron 1 of *MYOD1*

品种 Breed	样本 Sample	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency		χ^2 值 χ^2 value
		AA	AC	CC	A	C	
通城 Tongcheng pig	39	0.03	0.38	0.59	0.22	0.78	4.31*
长白 Landrace	23	0.26	0.43	0.31	0.48	0.52	3.28
大白 Yorkshire	22	0.18	0.41	0.41	0.39	0.61	3.72
长大通 LYT	44	0.11	0.43	0.46	0.33	0.67	5.12*
大长通 YLT	39	0.26	0.31	0.43	0.41	0.59	0.87

1) χ^2 值为不同基因型分布的 Hard-Weinberg 平衡检验值; * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。 χ^2 values means the test values of different genotype to Hard-Weinberg balance. Means with * in column are significant difference ($P < 0.05$).

评分显著高于 AA 和 AC 基因型个体 ($P < 0.05$); 而 CC 基因型个体的失水率极显著低于 AA 基因型个体 ($P < 0.01$), 也低于 AC 基因型个体, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 *MYOD1* 基因第 1 内含子多态位点对肉色和失水率的影响¹⁾

Table 2 The effects of polymorphism of intron 1 of *MYOD1* on meat color and water loss

项目 Item	个体数 Number	肉色评分 Color score	失水率/% Water loss
基因型 Genotype	AA	26	2.75 ± 0.94
	AC	64	2.99 ± 0.92
	CC	77	3.31 ± 0.98
P 值 P value	AA-AC		0.281
	AA-CC		0.010**
	AC-CC		0.047*

1) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

猪 *MyoD1* 基因第 1 内含子的 *Dde* I 酶切位点的多态性较丰富。通城猪中 C 等位基因占优势, 而大白、长白、长大通和大长通群体中 A 等位基因和 C 等位基因频率相近。基因型的分布大都符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。与生长、胴体和肉质性状的关联分析结果显示, 该基因与失水率和肉色评分性状显著关联。肉色是肌肉的生理学、生物化学和微生物学变化的外部体现, 是肌肉重要的感官和食用品质之一。新鲜的猪肉色泽鲜红, 适口性好, 很受消费者欢迎; 颜色过深, 肉质粗硬, 口感不好; 颜色过浅, 肌肉的 pH 值低, 肉较酸。在通城猪肉中无一例异常肉色的出现, 肉色评分全部在正常范围内, 从这一点也验证了国内地方品种的通城猪具有优秀肉质的种质特性^[8]。失水率是衡量肌肉保水性的指标。它不仅影响肉的色香味、营养成分、多汁性、嫩度等食用品质, 而且有着重要的经济意义。如果肌肉的保水性能差, 那么在屠宰后至加工前的过程中,

肌肉会因为失水而失重, 造成经济损失。因此, 色泽好、保水性能高的肌肉, 其品质好, 经济价值也高。

本文的研究结果显示, CC 基因型个体的肉色评分显著高于 AA 和 AC 基因型个体 ($P < 0.05$), 而 CC 基因型个体的失水率极显著低于 AA 基因型个体 ($P < 0.01$)。因此, CC 基因型的个体肉质较好, 经济价值较高。Cie ślak 等^[9]对 *MyoD1* 基因第 1 内含子多态与胴体性状间的相关性分析发现, 基因型对胴体品质性状产生显著影响。Verner 等^[10]研究发现, *MyoD1* 基因第 1 内含子多态与肌内脂肪含量存在显著差异。朱砺等^[7]的研究结果显示 *MyoD1* 基因第 1 内含子多态位点与胴体性状和肉质性状相关。本研究结果发现 *MyoD1* 基因第 1 内含子多态与肉质性状失水率和肉色评分存在显著关联。国内外的研究均说明 *MyoD1* 基因的变异与猪胴体和肉质性状相关, 是胴体性状和肉质性状候选基因。

综上所述, *MyoD1* 基因第 1 内含子多态与胴体性状和肉质性状相关, 因此建议把 *MyoD1* 基因作为影响胴体和肉质性状的分子标记。邱海芳等^[11]的研究还发现猪 *MyoD1* 区域与人和小鼠是保守的, 而且这个区域存在影响生长和肉质性状的 QTL, 揭示 *MyoD1* 基因在肌肉发育过程中发挥了重要作用, 这为 *MyoD1* 基因的功能研究奠定了基础。 *MyoD1* 基因第 1 内含子的变异是否受转录水平调控, 是否由 *MyoD1* 区域基因的相互作用引起, 有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] TEPAS M W, VISSCHER H. Genetic regulation of meat production by embryonic muscle formation—a review[J]. J Anim Breed Genet, 1994, 111: 404-412.
 [2] OLSON N, BRENNAN J, CHAKRABORTY T, et al. Molecular control of myogenesis: antagonism between growth and

- differentiation[J]. *Mol Cell Biochem*, 1991, 104: 7-13.
- [3] BERKES A, TAPSCOTT J. *MyoD* and the transcriptional control of myogenesis[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2005, 16: 585-595.
- [4] WEINTRAUB H, DAVIS R, TAPSCOTT S, et al. The *MyoD* gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage[J]. *Science*, 1991, 251: 761-766.
- [5] SOUMILLION A, RETTENBERGER G, VERGOUVE N, et al. Assignment of the porcine loci for *MyoD* to chromosome 2 and *MYF5* to chromosome 5[J]. *Anim Genet*, 1997, 28: 37-38.
- [6] CHANG H, FERNANDES K, CHANTLER D. Cloning and *in vivo* expression of the pig *MyoD* gene[J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 1995, 16: 243-247.
- [7] 朱砾, 李学伟. *MyoD* 基因在不同猪种中的 PCR-RFLP 遗传多态性及其遗传效应研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(8): 761-766.
- [8] 邱海芳, 刘榜, 董心洁, 等. 通城猪肉质性状分析[J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(3): 398-399.
- [9] CIE ŚLAK D, KAPELA ŃSKI W, Blicharski T, et al. Restriction fragment length polymorphism in myogenin and myf3 genes and their influence on lean meat content in pigs [J]. *J Anim Breed Genet*, 2000, 117: 43-55.
- [10] VERNER J, HUMPLICEK P, KNOLL A. Impact of MYOD family genes on pork traits in Large White and Landrace pigs [J]. *J Anim Breed Genet*, 2007, 124: 81-85.
- [11] 邱海芳, 樊斌, 徐学文, 等. 猪 2 号染色体 MYOD1 区域的 RH 定位和连锁定位[J]. *湖北大学学报*, 2009, 31(2): 172-175.

PCR-RFLP Polymorphism Detection and Relationship with Meat Quality Traits of *MyoD1* Gene in Pig

QIU Hai-fang^{1,2} WANG Chao¹ ZHANG Qing-de³ LIU Bang¹

1. Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Weifang Animal Husbandry Bureau, Weifang 261041, China;

3. College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract PCR-RFLP technique was applied in this study to analyze the polymorphism of intron 1 of porcine *MyoD1* gene in 3 pure breeds (Tongcheng, Landrace, Yorkshire) and 2 crossbred breeds (LYT, YLT). There was a base transition in the 257th nucleotides of intron 1 (C-A), which lead to the change of *Dde* I digestion site. PCR products digested with *Dde* I indicated that there were two alleles, three genotypes. The C allele was predominant in Tongcheng pigs, while the frequency of A allele and C allele was close in other groups. The relationship with growth, carcass and meat quality traits revealed that different genotypes were related with meat color score and water loss rate ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Meat color score with CC genotype was significant higher than AA and AC genotype ($P < 0.05$), but the water loss rate was extremely significant lower than that with AA genotype ($P < 0.01$). So the meat quality of individual with CC genotype was better. These results confirmed that *MyoD1* gene was an important candidate gene for meat quality, and the polymorphism of the 257th nucleotides of intron 1 offered molecular marker for marker assisted selection of porcine meat quality.

Key words pig; *MyoD1* gene; polymorphism; meat quality

(责任编辑:边书京)