

# 牦牛 MSTN 基因内含子 2 多态性及与生长性状的相关性

梁春年 阎萍 刑成峰 裴杰 郭宪  
包鹏甲 丁学智 褚敏 朱新书

中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 兰州 730070

**摘要** 采用 PCR-SSCP 技术对大通牦牛、甘南牦牛和天祝白牦牛(共 277 头)肌肉抑制素基因(MSTN)内含子 2 的部分序列进行了多态性研究,分析该基因与牦牛生长性状的相关性。结果表明,牦牛 MSTN 基因内含子 2 存在 2 个等位基因和 3 种基因型。在该基因座上,甘南牦牛、天祝白牦牛呈 Hardy-Weinberg 平衡状态,大通牦牛呈不平衡状态。3 种基因型与牦牛部分生长性状的最小二乘法分析表明,MSTN 基因内含子 2 对成年牦牛胸围、体质量、胸围指数、体长指数和肉用指数均显著相关( $P < 0.05$ ),而不同基因型的牦牛体高、管围、体长和管围指数差异不显著。初步推断牦牛 MSTN 基因内含子 2 可作为牦牛标记辅助选择的遗传标记之一。

**关键词** 牦牛; MSTN 基因; 多态性; 遗传标记; PCR-SSCP

**中图分类号** S 823.8<sup>+</sup>5.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)03-0285-05

肌肉生长抑制素基因(myostatin, MSTN)属于 TGF- $\beta$  家族<sup>[1]</sup>,自 1997 年 McPherron 等<sup>[2]</sup>首先从鼠的骨骼肌文库获得了 cDNA 全长序列以来,人们相继克隆了羊、猪、马、人、鱼、鸡等 20 多种脊椎动物的 MSTN 基因<sup>[2]</sup>。家畜 MSTN 基因的活性丧失可导致肌肉增大,体质量增加。牛的 MSTN 基因定位于第 2 条染色体的端粒区,包含有 3 个外显子和 2 个内含子<sup>[3]</sup>。Kambadur 等人<sup>[4]</sup>对牛的 MSTN 基因研究发现,比利时蓝牛 MSTN 基因在第 3 外显子处有 11 个核苷酸缺失,皮埃蒙特牛 MSTN 基因在第 3 外显子处有 1 个突变(G $\rightarrow$ A),导致在蛋白质成熟区 Tyr 替代了 Cys,从而使 MSTN 基因丧失了抑制肌肉生长的活性,表现出双肌现象。Lee 等<sup>[5]</sup>对小鼠的 MSTN 基因进行剔除研究,发现基因缺失鼠肌肉增大,骨骼肌肌群分布更广泛,基因缺失鼠体质量较野生鼠大 2~3 倍,体质量的增大主要是肌肉增大的结果。

基因内含子可能调控基因表达,其中的某些碱基变异可能与遗传性状有关<sup>[6]</sup>。刘铮铸等<sup>[7]</sup>认为山羊 MSTN 基因内含子 2 不同基因型对体质量有显

著的影响,并推断 MSTN 基因可能是影响山羊体质量性状的主基因或与主基因相连锁。笔者对牦牛 MSTN 基因内含子 2 部分序列进行 SNP 检测,同时测定牦牛部分生长发育指标,分析不同基因型与牦牛生长发育指标的相关性,以期找到遗传标记,为牦牛 MSTN 基因的分子生物学研究及牦牛分子育种奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与主要试剂

成年天祝白牦牛血样 99 头份、成年甘南牦牛血样 104 头份、成年大通牦牛血样 74 头份,均经颈静脉采血 5 mL,用 ACD 抗凝后带回实验室,置于 -70 °C 低温保存待测。同时,对采血牦牛现场测定体斜长、体高、胸围、管围和体质量等指标。

主要试剂: TaqDNA 聚合酶、dNTPs、蛋白酶 K、琼脂糖、溴化乙锭、Tris 饱和酚、DNA Ladder、V-gene 纯化试剂盒均购自北京经科生物工程公司,其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 试验方法

1) 基因组 DNA 的提取。采用常规的酚-氯仿

收稿日期: 2010-09-06

基金项目: 国家“863”项目(2008AA10Z137); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(BRF100101); 现代农业(肉牛)产业技术体系专项(MATS-Beef Cattle System); 甘肃省重大科技专项(0801NKDA036)

梁春年, 博士研究生, 副研究员. 研究方向: 动物遗传育种. E-mail: chunnian2006@163.com

通讯作者: 阎萍, 博士, 研究员. 研究方向: 牦牛遗传育种. E-mail: pingyan@sohu.com

抽提法从全血中提取牦牛基因组 DNA<sup>[8]</sup>。每 100  $\mu\text{L}$  全血中提取的 DNA 用 50  $\mu\text{L}$  的 TE 缓冲液溶解, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

2) 引物设计与合成。参照牛 *MSTN* 基因序列 (GenBank, AY850105), 用 Primer5.0 软件设计 1 对引物, 预期扩增长度为 323 bp。上游引物: 5'-TGGTATTTGGCAGAGCAT-3', 下游引物: 5'-AGGATGTGAAATGGGACA-3', 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

3) PCR-SSCP 反应条件。PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 其中 10  $\times$  buffer 2.0  $\mu\text{L}$ , dNTPs 1.6  $\mu\text{L}$  (2.5 mmol/L), 上、下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$  (10 mmol/L), *Taq* 酶 0.4  $\mu\text{L}$  (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 模板 0.8  $\mu\text{L}$ , 双蒸水 14.4  $\mu\text{L}$ 。反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 51.4  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 32 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  再延伸 10 min。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶检测后置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冷藏保存供 SSCP 分析。

扩增产物的 SSCP 分析, 2  $\mu\text{L}$  PCR 产物和 7  $\mu\text{L}$  变性剂 (98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯氰、10% 甘油、10 mmol/L EDTA, pH 8.0) 混匀, 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 min, 冰浴 10 min。变性后 PCR 产物以 10% 聚丙烯酰胺凝胶 (*m*<sub>丙酰胺</sub> : *m*<sub>甲叉双丙酰胺</sub> = 29 : 1) 常温电泳过夜, 银染显带。

4) PCR 产物回收、测序。对于具有单核苷酸构象多态性的 PCR 片段利用 *V*-gene 纯化试剂盒进行纯化, 经纯化的 PCR 扩增产物送上海生工生物工程技术有限公司测序。

### 1.3 数据处理

1) 计算基因型频率、基因频率及群体平衡性检验。某基因位点的 Hardy-Weinberg 平衡性检测采用皮尔逊  $\chi^2$  统计量。

2) 牦牛体尺指数计算。参照文献[9]的方法。

3) 基因多态性与牦牛生长发育性状的相关性分析。在数据处理中, 根据影响生长发育性状的因素不同, 考虑到品种效应、年龄和性别效应以及遗传效应, 分析时采用以下固定模型:  $y_{ijkm} = \mu + B_i + A_j + S_k + M_m + e_{ijkm}$

其中:  $y_{ijkm}$  为个体表型记录;  $B_i$  为品种效应;  $A_j$  为年龄效应;  $S_k$  为性别效应;  $M_m$  为标记基因型效应;  $e_{ijkm}$  为随机误差。SPSS 13.0 对数据进行分析, 并用最小二乘法拟合线性模型, 对各标记基因型间生长发育指标进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增与 SSCP 检测

*MSTN* 基因内含子 2 扩增结果见图 1。所扩增目的条带清晰, 无杂带, 长度为 323 bp, 与预期结果一致, 可直接进行 SSCP 分析。*MSTN* 基因内含子 2 的 PCR-SSCP 分析表明, 该位点存在 3 种基因型, 即 AA、AB、BB, 由 1 对等位基因 A 和 B 控制, 其电泳结果见图 2。

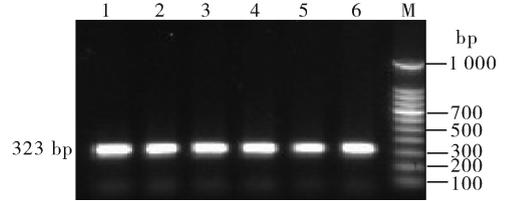


图 1 牦牛 *MSTN* 基因内含子 2 的 PCR 扩增产物电泳  
Fig. 1 PCR products of the 2nd intron of yak *MSTN* gene

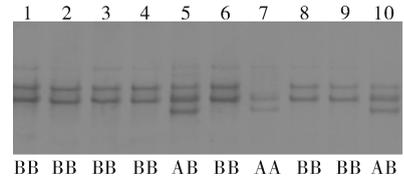


图 2 牦牛 *MSTN* 基因内含子 2 的 PCR-SSCP 图谱  
Fig. 2 PCR-SSCP analysis at the 2nd intron of yak *MSTN* gene

### 2.2 序列分析

将 2 个纯合基因型个体的 PCR 产物进行纯化后经上海生工生物工程技术有限公司测序, 结果发现 AA 型与 BB 型相比, 在扩增片段的第 192 bp 处有 1 个 A 转换 G 的单碱基突变 (图 3)。

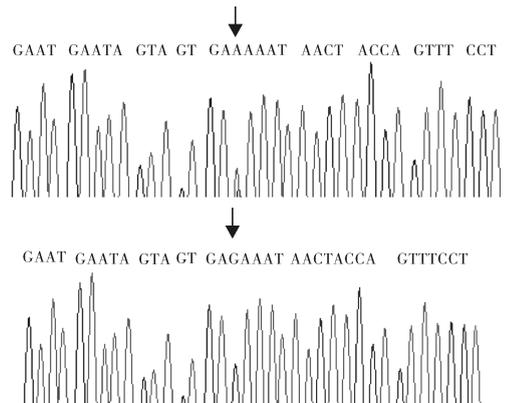


图 3 牦牛 *MSTN* 基因内含子 2 基因座测序图谱  
Fig. 3 The sequencing map of the 2nd intron of yak *MSTN* gene

### 2.3 基因座的遗传多态性分析

由表 1 可知,在所检测的 3 个牦牛群体中均发现 AA、AB 和 BB 3 种基因型,大通牦牛、甘南牦牛群体中均以 BB 为优势基因型,而天祝白牦牛群体中以 AB 为优势基因型。不同牦牛群体中均检测到

A 和 B 2 个等位基因,且 B 基因频率相对高于 A 基因频率,B 等位基因为各牦牛群体中的优势等位基因。 $\chi^2$  检验结果显示,在该基因座上,甘南牦牛、天祝白牦牛 2 个群体处于 Hardy-Weinberg 平衡状态 ( $P>0.05$ ),而大通牦牛群体处于不平衡状态。

表 1 3 个群体 *MSTN* 基因内含子 2 基因座的 PCR-SSCP 基因频率和基因型频率  
Table 1 Gene and genotype frequencies of PCR-SSCP at intron 2 of *MSTN* gene in three populations

群体 Breed	样本数 Number of samples	各基因型个体数 Number of each genotype			基因型频率 Genotypic frequencies			基因频率 Allelic frequencies		位点平衡检测 Locus equilibrium
		AA	AB	BB	AA	AB	BB	A	B	$\chi^2$ test
大通牦牛 Datong yak	74	3	8	63	0.041	0.108	0.851	0.095	0.905	10.069
甘南牦牛 Gannan yak	104	5	24	75	0.048	0.231	0.721	0.164	0.837	2.537
天祝白牦牛 Tianzhu White yak	99	15	55	29	0.152	0.556	0.293	0.430	0.570	1.772

由表 2 可知,在所检测的 3 个牦牛群体中,大通牦牛的基因杂合度、有效等位基因数、多态信息含量均最低,而天祝白牦牛的基因杂合度、有效等位基因数、多态信息含量均最高。3 个牦牛品种的多态信息含量均低于 0.5,为低度多态。

### 2.4 牦牛 *MSTN* 基因内含子 2 多态性与生长发育性状相关性

由表 3 可知,*MSTN* 基因内含子 2 对成年牦牛胸围、体质量、胸围指数、体长指数和肉用指数等均有显著影响 ( $P<0.05$ )。

表 2 3 个群体 *MSTN* 基因内含子 2 基因座遗传多态性指标

Table 2 Genetic diversity indices at intron 2 of *MSTN* gene in three populations

群体 Population	基因杂合度 He	有效等位基因数 Ne	多态信息含量 PIC
大通牦牛 Datong yak	0.171	1.207	0.157
甘南牦牛 Gannan yak	0.273	1.376	0.237
天祝白牦牛 Tianzhu White yak	0.490	1.961	0.370

AB 型的牦牛胸围、体质量和肉用指数等极显著高于 BB 型 ( $P<0.01$ ),但与 AA 型牦牛差异不显著 ( $P>0.05$ ); AB 型的牦牛胸围指数极显著高于 AA 和 BB 型,但 AA 和 BB 型间差异不显著; AA 型的牦牛体长指数与 BB 型之间差异达显著水平 ( $P<0.05$ ),但与 AB 型差异不显著;不同基因型对成年牦牛体高、管围、体长和管围指数等的影响均不显著。

表 3 不同基因型对牦牛生长发育性状的影响<sup>1)</sup>

Table 3 Effects of different genotypes on production of intron 2 of *MSTN* gene

性状 Traits	基因型 Genotypes			基因型效应 Genotype effect	
	AA	AB	BB	F	P
体高/cm Body height	105.25±6.99	103.95±8.64	104.79±9.18	0.284	0.753
胸围/cm Heart girth	139.45±9.52 B	144.81±12.37 A	136.80±13.73 B	8.744	0.001
管围/cm Cannon circumference	14.58±1.40	14.98±1.27	14.63±1.27	1.959	0.144
体斜长/cm Body slanting length	115.00±7.17	113.39±9.02	110.94±12.19	1.909	0.151
体质量/kg Body weight	157.06±22.23 B	169.05±38.25 A	147.48±42.67 B	7.717	0.002
胸围指数 Index of chest circumference	132.91±11.30 b	139.65±10.15 a	131.70±9.12 b	19.151	0.060
体长指数 Index of body slanting length	109.88±11.52 a	109.43±8.62 ab	106.04±9.36 b	3.559	0.030
管围指数 Index of cannon circumference	13.88±0.38	14.46±1.24	14.02±1.28	3.334	0.068
肉用指数 Beef performance index	149.86±23.77 B	161.80±28.53 A	139.19±33.73 B	12.005	0.001

1) 同一行不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ), 不同大写字母表示差异极显著 ( $P<0.01$ )。Values with different small letter in the same raw means significant difference ( $P<0.05$ ); values with different scapital letter in the same raw means very significant difference ( $P<0.01$ ).

## 3 讨论

### 3.1 MSTN 基因多态性

有研究表明, *MSTN* 基因虽然在动物进化过程中很保守,但也存在多态性。牛的 *MSTN* 基因多态性丰富,平均每 100 bp 有 1 个单核苷酸多态性<sup>[10]</sup>。Fahrenkrug 等<sup>[11]</sup>分析了一种双肌表型动物——皮埃蒙特牛的 *MSTN* 基因,发现 *MSTN* 基因有 2 处发生了突变,该基因的突变造成双肌牛比普通牛肌肉增加 20%~25%,饲料转化率提高。Grobet 等<sup>[12]</sup>检测了 10 个欧洲牛品种的 32 头双肌牛,发现了 7 个 DNA 多态型,其中 5 个突变推测造成了蛋白质功能的改变,1 个为保守氨基酸替换,另 1 个为沉默 DNA 突变,在内含子中检出了 4 个 DNA 多态性。本研究分析了中国 3 个牦牛群体 *MSTN* 基因内含子 2 的多态性,发现在所扩增片段第 192 bp 处有 1 个 A 到 G 的单碱基突变。表现为 2 个等位基因 A 和 B,其中 B 等位基在所检测的 3 个牦牛群体均属于优势等位基因;在 3 个群体中均发现 AA、AB 和 BB 3 种基因型,在大通牦牛、甘南牦牛群体中均以 BB 为优势基因型,而在天祝白牦牛中则以 AB 为优势基因型。本研究发现在 *MSTN* 基因内含子 2 这一基因座上,甘南牦牛、天祝白牦牛 2 个群体处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,而大通牦牛处于不平衡状态。这可能是由于大通牦牛是一个培育品种,经过了长期的定向人工选择,因而造成了群体的不平衡;对于甘南牦牛、天祝白牦牛这 2 个群体,可能由于这一基因座的选择压力不强,因此在人工选择、迁徙和遗传漂变等各种因素的作用下该基因座处于动态平衡中。这提示牦牛育种工作者,在甘南牦牛、天祝白牦牛这 2 个群体的改良过程中,必须加大人工选育力度,坚决淘汰生长速度慢和生产性能低下的个体,以打破平衡状态,选育出优良品种。

### 3.2 牦牛 *MSTN* 基因内含子 2 多态性与生长发育性状相关性

*MSTN* 基因是畜禽生产力的重要候选基因,并成为提高畜禽肉产量研究的焦点。Casas 等<sup>[13]</sup>研究表明:*MSTN* 基因对皮埃蒙特牛 C313Y 突变肉牛出生质量、断奶质量、周龄质量及难产存在明显的遗传效应。笔者对牦牛 *MSTN* 基因内含子 2 基因座表现的多态性与其部分生长发育指标进行相关分析的结果表明, *MSTN* 基因内含子 2 对成年牦牛胸

围、体质量、胸围指数、体长指数和肉用指数等均有显著影响,推测 *MSTN* 基因内含子 2 基因座的 B 等位基因可能在自然选择和人工选择的过程中,发生核苷酸突变,突变为 A 等位基因,而这种在自然选择和人工选择双重作用下发生的突变,可能与牦牛高的生长发育成正相关。这一结论与牦牛 *MSTN* 基因内含子 2 基因座的 B 等位基因频率比较高的遗传背景相吻合,也与携带 A 等位基因的基因型个体有较好的生长发育相一致。因此,在牦牛的育种工作中, *MSTN* 基因内含子 2 基因座表现的多态有可能做为一种遗传标记,通过对有利基因型的选择,加快牦牛的遗传改良步伐。

### 3.3 内含子对基因功能的调控作用

内含子是基因组中的一种重要元件,在维持基因特定功能方面有重要作用。一些基因的内含子突变会引起基因表达效率的变化<sup>[6]</sup>。Short 等<sup>[14]</sup>研究发现,雌激素受体  $\alpha$  基因的内含子中存在与繁殖和生产性状密切相关的突变位点,ESRA 第一内含子突变导致猪的总产仔数增加 16%,产活仔数增加 4%。赵要凤等<sup>[15]</sup>研究指出,卵泡刺激素在第一内含子中存在 1 个 *Bam*H I 突变位点,该位点突变导致猪的产仔数增加 14.8%。本研究检测到的与牦牛生长性状相关的突变位于 *MSTN* 基因内含子 2 区域,其具体意义还有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] THOMAS M, LANGLEY B, BERRY C, et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 40235-40243.
- [2] McPHERRON A C, LEE S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene[J]. *Proceeding National Academic Science*, 1997, 94: 12457-12461.
- [3] CHARLIER C, COPPIETERS W, FARNIR F, et al. The mh-gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2 [J]. *Mamm Genome*, 1995, 6(11): 788-792.
- [4] KAMBADUR R, SHARMA M, SMITH T P L, et al. Mutations in myostatin (GDF-8) in double muscled Belgian Blue and piedmontese cattle [J]. *Genome Research*, 1997, 7: 910-915.
- [5] LEE S J, ALEXANDRA C. Regulation of myostatin activity and muscle growth [J]. *Proceeding National Academic Science*, 2001, 98(16): 9306-9311.
- [6] 王悦冰, 郎志宏, 黄大昉. 内含子对基因表达规律的影响[J]. *生物技术通报*, 2008(4): 1-4.
- [7] 刘峥铸, 李祥龙, 巩元芳, 等. *MSTN* 基因内含子 2 多态性与山

- 羊体重性状相关研究[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(8): 745-748.
- [8] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning [M]. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989: 463-469.
- [9] 王根林. 牛生产学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [10] DUNNER S, MIRANDA M E, AMIGUES Y, et al. Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds [J]. Genetics Selection Evolution, 2003, 35(1): 103-118.
- [11] FAHRENKRUG S C, CASAS E, KEELE J W, et al. Technical note: direct genotyping of the double-muscling locus (mh) in Piedmontese and Belgian Blue cattle by fluorescent PCR [J]. Journal of Animal Science, 1999, 77: 2028-2030.
- [12] GROBET L, PONCELET D, ROYO L J, et al. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle [J]. Mammalian Genome, 1998, 9(3): 210-213.
- [13] CASAS E, KEELE J W, FAHRENKRUG S C, et al. Quantitative analysis of birth, weaning and yearling weights and calving difficulty in Piedmontese crossbreds segregating an inactive myostatin allele [J]. Journal of Animal Science, 1999, 77: 1686-1692.
- [14] SHORT T H, ROTHSCCHILD M F, SOUTHWOOD O I, et al. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines [J]. Journal of Animal Science, 1997, 75: 3138-3142.
- [15] 赵要凤, 张顺, 李宁, 等. 香猪、民猪 FSH- $\beta$  亚基因位点的多态性分析[J]. 遗传, 1997, 19(1): 27-28.

## Association of single nucleotide polymorphism at intron 2 of *MSTN* gene with growth traits in yak

LIANG Chun-nian YAN Ping XING Cheng-feng PEI Jie GUO Xian  
BAO Peng-jia DING Xue-zhi CHU Min ZHU Xin-shu

*Lanzhou Institute of Animal Science and Veterinary Pharmaceutics,  
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China*

**Abstract** The PCR-SSCP polymorphism of myostatin (*MSTN*) gene sequence of intron 2 and its correlation with growth traits were investigated in 277 individuals from one cultivated yak breeds (Datong yak) and two native breeds (Gannan and Tianzhu White yak). The results showed that there were two alleles and three genotypes in the locus of *MSTN* gene intron 2. They were at Hardy-Weinberg equilibrium state in this locus while Datong yak obviously was unequilibrium. The least square analysis showed that the different genotype of *MSTN* intron 2 had a significant effect on partial traits of growth including heart girth, body weight, index of chest circumference, index of body slanting length, beef performance index ( $P < 0.05$ ). However the genotype did not affect body height, cannon circumference, body slanting length, index of cannon circumference significantly ( $P > 0.05$ ). In conclusion, the mutation of *MSTN* intron 2 could be used as the molecular genetic marker for yak breeding.

**Key words** yak; *MSTN* gene; polymorphism; genetic marker; PCR-SSCP

(责任编辑: 边书京)