

DOI: 10.1360/yc-007-0065

猪 *CAST* 基因多态性与肌纤维组织学特性及屠宰性状的相关性分析

武艳群, 吴旧生, 赵晓枫, 郭晓令, 徐宁迎

浙江大学动物科学学院, 杭州 310029

摘要: 采用3种限制性核酸内切酶对45头金皮(金华×皮特兰) F_2 代猪钙蛋白酶抑制蛋白基因(*CAST*)的第6外显子和第7外显子之间的片段进行了PCR-RFLP分析, 结果显示在第6内含子内均检测到*Msp* I、*Hinf* I和*Rsa* I酶切多态性。根据酶切结果将*CAST*基因分为3种基因型(*AACCEE*、*BBDDFF*、*ABCDEF*), 其基因型频率分别为0.1778, 0.2222, 0.6000。对背最长肌做连续性石蜡切片, 分别采用苏木精-伊红和肌球蛋白重链免疫组织化学方法染色并拍照, ImageJ软件统计肌纤维横截面积、密度、直径及MHC I型肌纤维的比例。采用SPSS程序分析了*CAST*不同基因型对金皮 F_2 代猪肌纤维组织学特性和屠宰性状的影响。结果表明:*BBDDFF*基因型个体的肌纤维横截面积和眼肌面积显著地高于*ABCDEF*基因型个体的肌纤维横截面积和眼肌面积($P < 0.05$)。

关键词: 金皮 F_2 代猪; *CAST*基因; 肌纤维; 免疫组织化学

Correlation between porcine *CAST* gene polymorphism with muscle fiber histological traits and carcass characteristics

WU Yan-Qun, WU Jiu-Sheng, ZHAO Xiao-Feng, GUO Xiao-Ling, XU Ning-Ying

College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

Abstract: Three polymorphisms were identified in the sixth intron of the *CAST* gene by PCR-RFLP using enzymes *Msp* I, *Hinf* I and *Rsa* I in 45 Jinpi F_2 pigs. However, only three genotypes *AACCEE*, *BBDDFF*, and *ABCDEF* were detected in those pigs and the genotype frequencies were 0.1778, 0.2222 and 0.6000, respectively. Longissimus dorsi muscles were moved for paraffin serial sections and stained with hematoxylin-eosin or myosin heavy chain (MHC) by immunohistochemistry respectively. Fiber cross-sectional area, fiber density, fiber diameter, the rate of MHC type I fiber and the carcass characteristics were recorded. Correlation analysis showed that the skeletal muscle fiber area and the eye muscle area of the *BBDDFF* individual were significantly higher than those of the *ABCDEF* individual ($P < 0.05$).

Keywords: Jinpi F_2 pig; Calpastatin gene; muscle fiber; immunohistochemistry

钙蛋白酶(calpain-calpastatin)系统由几种同型异构的蛋白水解酶组成, 在细胞内广泛存在, 该系统在肌原纤维蛋白的代谢更新及宰后肌肉嫩化过程中起着非常重要的作用^[1]。钙蛋白酶抑制蛋白(*CAST*)

是钙蛋白酶系统的主要成员之一, 是一种内源性专一抑制钙蛋白酶(calpain)活性的蛋白。它可以识别钙蛋白酶与钙离子结合而引起的构象变化, 并与之特异性结合, 从而调节肌肉内蛋白的水解速率及种

收稿日期: 2006-04-17; 修回日期: 2006-08-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(编号: 2004AA213110)资助 [Supported by The National High Technology Research and Development Program of China (No. 2004AA213110)]

作者简介: 武艳群(1982—), 女, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种, E-mail: wuyanqun19820117@126.com

通讯作者: 徐宁迎(1956—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种, E-mail: nyxu@zju.edu.cn

类^[2]。Barnoy等^[3]的研究表明,在胚胎期成肌细胞融合为多核细胞这一过程中CAST的表达量显著降低。

Rettenberger等^[4]将CAST基因定位于猪2号染色体上。Ernst等^[5]在猪2号染色体上发现了5个与CAST基因连锁的微卫星标记,进一步将其精确定位于2q2.1~q2.4上,并在扩增的1.6 kb长度的片段中发现了3个酶切多态性(*Msp*, *Hinf* 和 *Rsa*)位点。孙立彬等^[6]采用PCR-RFLP方法研究了猪CAST基因的多态性与肉质性状及背膘厚之间的关系,发现了不同基因型之间的肌内脂肪和背膘厚差异显著。程丰等^[7]分析了猪种与CAST基因多态性的关系,结果表明,不同的猪种之间CAST基因型频率存在着显著的差异。

本实验采用具有优良肉质的本地金华猪与肉质相对较差的引进品种皮特兰猪杂交所产的金皮F₂代猪为研究对象,利用PCR-RFLP的方法检测金皮F₂代猪CAST基因型的频率,并采用肌球蛋白重链(MHC)单克隆抗体及苏木精-伊红染色剂,分别对猪背最长肌连续性石蜡切片进行免疫组织化学染色和常规染色。采用SPSS程序分析了CAST基因的不同基因型对金皮F₂代猪肌纤维组织学特性及屠宰性状的影响,为CAST基因作为猪肉品质性状标记辅助选择分子的可行性提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验猪来自浙江大学实验牧场。所有的猪在相同的饲养管理条件下,按正常营养标准饲养,生长至90 kg左右时采用颈动脉放血致死法,取血样迅速置-72℃冰箱中冷冻保存,背最长肌置入4%甲醛溶液中固定保存。

1.2 方法

1.2.1 试剂与引物

蛋白酶K、*Msp*、*Hinf*、*Rsa*、*Taq*酶和dNTP均购自上海生物工程技术服务有限公司;MHC-Slow和MHC-Fast单克隆抗体购自晶美生物工程有限公司。引物序列参照Ernst等并根据CAST DNA序列(GenBank登陆号:AY594692),利用Primer 5.0自行设计。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。PCR引物序列如下:上游引物5'-GCGTGCTCATAAAGAAAAAGC-3';下游引物5'-TGCTACACCAGTAACAG-3'。

1.2.2 DNA的提取和纯度测定

参照《现代分子生物学实验技术》^[8]提取猪基因组DNA。用分光光度计测定OD值,根据OD₂₆₀/OD₂₈₀判断DNA纯度,并稀释至50 mg/L。

1.2.3 PCR反应体系与反应程序

PCR反应体系:10×PCR缓冲液(含MgCl₂ 15 mmol/L)2.5 μL; dNTP (2.5 mmol/L)2.0 μL; 上下游引物(10 pmol/μL)各0.75 μL; 模板DNA 1.0 μL; *Taq* DNA酶(5 U/μL)0.4 μL; 加灭菌双蒸水至总反应体积25 μL。PCR反应条件:预变性94℃ 5 min, 进入循环:94℃ 40 s、56℃ 40 s、72℃ 1 min, 34个循环, 72℃ 延伸7 min、4℃ 保存, 1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

1.2.4 PCR-RFLP分析

酶切反应体系20 μL, 其中10 μL PCR产物, *Msp*、*Hinf*和*Rsa*3种限制性内切酶的添加量分别为1.5、0.5和1 U, 37℃水浴5 h。3%琼脂凝胶电泳检测酶切结果, 凝胶成像系统观察并记录。

1.2.5 切片的制作及苏木精-伊红染色

将4%甲醛固定的猪背最长肌样品修块后经常规脱水浸腊、石蜡包埋、切片机8 μm厚度连续切片、60℃烤片8 h至干燥常温保存。切片采用常规HE染色, 显微镜观察拍片。

1.2.6 免疫组织化学染色

(1) 切片经二甲苯溶液脱蜡6 min×2次, 无水乙醇4 min×2次, 90%酒精3 min, 80%酒精3 min, 70%酒精3 min, 蒸馏水3 min脱蜡、浸水。

(2) 0.5% H₂O₂溶液中浸泡10 min, 灭活内源性过氧化物酶活性; 在10 mmol/L柠檬酸缓冲液中放入水浴锅中加热至97℃煮沸作用20 min, 自然冷却至室温。

(3) 滴加10%正常兔血清作用10 min, 甩去血清后滴加肌球蛋白重链慢型单克隆抗体或快型单克隆抗体, 于-4℃冰箱过夜。

(4) TBS洗10 min×3次; 滴加生物素标记的二抗, 37℃湿盒孵育1 h。

(5) TBS洗10 min×3次, 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素抗生物素蛋白, 37℃湿盒孵育1 h。

(6) TBS洗5 min×3次, DAB显色5~10 min, 显微镜下观察, 双蒸馏水浸泡3 min×2次终止显色。

(7) 苏木精复染核, 常规水洗、脱水、透明、封片。显微镜观察, 拍照。

1.3 统计分析

1.3.1 猪群各基因型的频率及基因频率的计算

猪群各基因型的频率及基因频率的计算方法参见文献[9], 采用以下线性模型分析各种基因型的效应:

$$y_{ij} = \mu + g_i + e_{ij}$$

上式中 y_{ij} 为基因型 i , 第 j 个观察值, g_i 为基因型 i 的遗传效应值, e_{ij} 为随机误差。

1.3.2 肌纤维组织学性状的统计分析

采用 Image J 软件对 HE 染色拍照结果进行肌纤维密度、肌纤维横截面积、肌纤维直径统计; 并对免疫组织化学染色拍照结果进行 MHC 型肌纤维比例统计。

2 结果

2.1 基因型检测

CAST 基因的 PCR 产物经 *Msp* 限制性内切酶酶切, 3% 琼脂糖凝胶电泳后, 共检测出 275、502、370、276 bp 4 条带。定义等位基因 A(275+502+646 bp) 和 B(275+502+370+276 bp)(如图 1)。

PCR 产物经 *Hinf* 限制性内切酶酶切, 3% 琼脂糖凝胶电泳后, 共检测出 163、503、174、372、211 bp 5 条带。定义等位基因 C(666+372+174+211 bp) 和 D(163+503+372+174+211 bp)(图 2)。

CAST 基因产物经 *Rsa* 限制性内切酶酶切, 3% 琼脂糖凝胶电泳后, 共检测出 649、340、162、183、89 bp 5 条带。定义等位基因 A(649+340+162+272 bp) 和 B(649+340+162+183+89 bp)(图 3)。

2.2 基因型频率

金皮 F₂ 代 CAST 基因经 *Msp*、*Hinf* 和 *Rsa* 酶切后, 如果每种酶切有 3 种基因型, 那么可能存在 27 种基因型, 但在本实验中只发现了 AACCEE、BBDDFF、ABCDEFF 等 3 种基因型, 其基因型频率分

别为 0.1778, 0.2222, 0.6000。

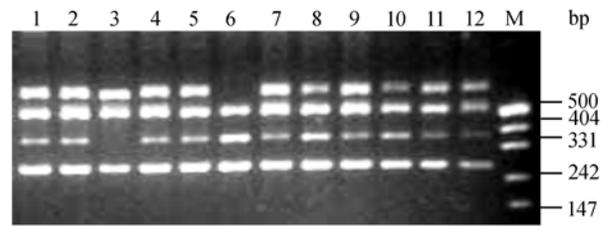


图 1 CAST 基因 *Msp* I 酶切后图谱
1、2、4、5、7~12: AB 基因型; 3: AA 基因型; 6: BB 基因型; M: Marker 为 500 bp。

Fig. 1 Profile of CAST gene digested by *Msp*

1, 2, 4, 5, 7-12: AB genotype; 3: AA genotype; 6: BB genotype; M: DNA marker (500 bp).

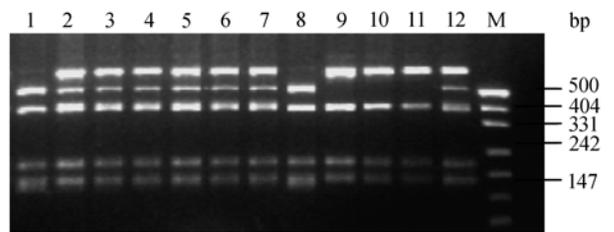


图 2 CAST 基因 *Hinf* 酶切后图谱
2~7、12: CD 基因型; 9~11: CC 基因型; 1 和 8: DD 基因型; M: 基因 marker 为 500 bp。

Fig. 2 Profile of CAST gene digested by *Hinf*

2-7, 12: CD genotype; 9-11: CC genotype; 1, 8: DD genotype; M: DNA marker (500 bp).

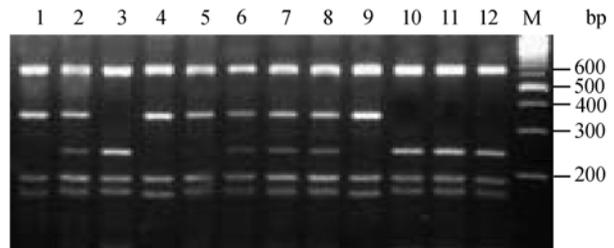


图 3 CAST 基因 *Rsa* 酶切后图谱
2、6~8: EF 基因型; 3、10~12: EE 基因型; 1、4 和 9: FF 基因型; M: 基因 marker 为 2,000 bp。

Fig. 3 Profile of CAST gene digested by *Rsa*

2, 6-8: EF genotype; 3, 10-12: EE genotype; 1, 4, 9: FF genotype; M: DNA marker (2,000 bp).

表 1 金皮 F₂ 猪 CAST 基因的基因型分布及基因频率

Table 1 The genotype of CAST gene and the gene frequency

品种(头数) Breed (number)	PCR-RFLP 基因型分布及基因频率 The genotype of CAST gene and the gene frequency				
	AACCEE	BBDDFF	ABCDEFF	A/C/E	B/D/F
金皮 F ₂ (45)	0.177 8 (8)	0.2222 (10)	0.6000 (27)	0.6680	0.3320

2.3 背最长肌肌纤维染色结果

苏木精-伊红染色法(HE染色)是最为常用的组织切片染色方法,也是适合研究肌纤维的一种染色方法,苏木精将肌纤维细胞核染成蓝紫色,伊红将肌纤维细胞质染成桃红色,两种组织对比十分明显,(图4:A)。

免疫组织化学染色是一种根据抗原抗体特异性结合并显色的方法来检测目标物质是否存在的一种化学染色技术。本实验通过肌球蛋白重链单克隆抗体与肌球蛋白重链特异性结合反应,运用酶标显色方法来检测肌纤维类型组成。MHC-Slow 单克隆抗体阳性细胞呈现黄棕色,属 I 型肌纤维(图 4: B); MHC-Fast 单克隆抗体阳性细胞,呈现黄棕色,属 II 型肌纤维(图 4: C)。

2.4 CAST基因对金皮F₂代猪肉品质性状的效应

2.4.1 CAST基因对金皮F₂代猪肌纤维性状的效应

采用独立效应线性模型分析了 CAST 基因的不同基因型对金皮F₂代猪肌纤维特性(包括肌纤维横截面积、肌纤维直径、肌纤维密度和慢肌比例)的效应,结果表明(表2)CAST基因的BBDDFF和ABCDEF基因型对肌纤维横截面积有显著的不同影响($P < 0.05$),ABCDEF基因型个体比BBDDFF基因型个体肌纤维横截面积小 13.43%; 对其余性状的的影响均不显著。

2.4.2 CAST基因对金皮F₂代猪屠宰性状的效应

CAST基因的不同基因型对金皮F₂代猪屠宰性状(包括眼肌面积、眼肌系水力、眼肌pH_{45m}值和眼肌导电率)的效应列在表 3。由表 3 可以看出,CAST

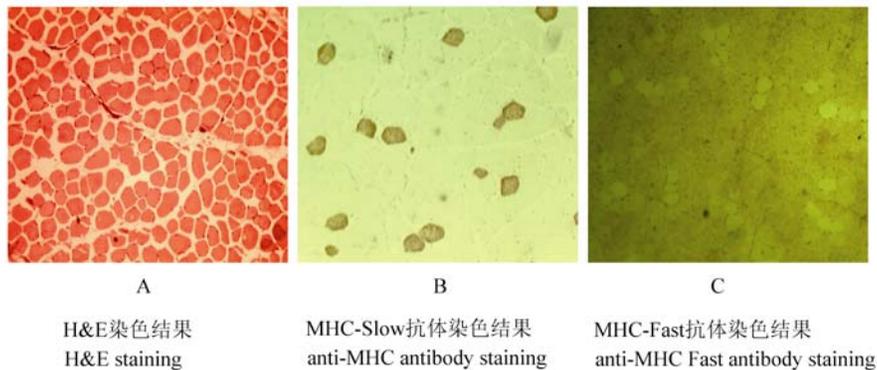


图 4 背最长肌肌纤维横切面石蜡切片染色结果观察图(100×)

Fig. 4 Staining of paraffin cross-sections of longissimus dorsi muscle. Magnification, (100×)

表 2 CAST基因对金皮F₂代猪肌纤维性状的效应

Table 2 The effect of the CAST gene on muscle fiber characteristics of Jinpi F₂ pigs

CAST 型 Genotype	样本数 N	肌纤维横截面积(μm^2) Fiber cross-sectional area (μm^2)	肌纤维直径(μm) Fiber diameter (μm)	肌纤维密度 (mm^2) Fiber density (mm^2)	MHC I 型肌纤维 (%) Rate of MHC I fiber (%)
AACCEE	8	2335.02 ± 94.09	69.54 ± 1.69	343.96 ± 13.30	5.63 ± 0.86
BBDDFF	10	2514.94 ± 86.57 ^a	69.95 ± 1.48	345.06 ± 21.82	6.30 ± 1.65
ABCDEF	27	2177.16 ± 64.86 ^b	67.82 ± 1.45	334.26 ± 12.54	5.89 ± 0.43

注: 肩标 a 与 b 之间表示差异显著。

Note: Superscripts a and b indicate significant differences between the means ($P < 0.05$).

表 3 CAST基因对金皮F₂代猪屠宰性状的效应

Table 3 The effect of the CAST gene on carcass characteristics of Jinpi F₂ pigs

CAST 型 Genotype	样本数 N	眼肌面积 Eye muscle area	眼肌系水力 Water Holding capacity	眼肌pH _{45m} 值 pH _{45m} value	眼肌导电率 Conductance
AACCEE	8	32.63 ± 1.20	1.65 ± 0.23	6.28 ± 0.08	2.99 ± 0.28
BBDDFF	10	34.76 ± 1.54 ^a	1.50 ± 0.29	6.20 ± 0.04	2.62 ± 0.11
ABCDEF	27	30.92 ± 0.89 ^b	1.41 ± 0.09	6.20 ± 0.04	2.81 ± 0.07

注: 肩标 a 与 b 之间表示差异显著。

Note: Superscripts a and b indicate significant differences between the means ($P < 0.05$).

基因的BBDDFF和ABCDEF基因型对眼肌面积有显著的不同影响($P < 0.05$), ABCDEF基因型个体比BBDDFF基因型个体眼肌面积小12.42%;对其余性状的影响均不显著。

3 讨论

3.1 CAST基因的多态性

本实验采用PCR-RFLP技术,对CAST基因第六外显子到第七外显子之间的区域进行了扩增,得到了1,423 bp长度的DNA片段。采用Msp、Hinf和Rsa 3种限制性核酸内切酶进行酶切,在Msp酶切结果中发现了3个酶切位点,分别将PCR产物切为275、502、370和276 bp 4个长度的片段,其中370和276 bp之间酶切位点为多态位点;在Hinf酶切结果中发现了4个酶切位点,分别将PCR产物切为163、503、174、372和211 bp 5个长度的片段,其中163和503 bp之间酶切位点为多态位点;在Rsa酶切结果中发现了4个酶切位点,分别将PCR产物切为649、340、162、183和89 bp 5个长度的片段,其中183和89 bp之间酶切位点为多态位点。酶切结果中只发现了AACCEE、BBDDFF和ABCDEF 3种基因型,在Ernst和程丰的研究中也出现了类似的现象,具体的原因还没有分析出来,本实验也可能与实验样品数量太少有关。AACCEE、BBDDFF和ABCDEF 3种基因型频率分别为0.1778、0.2222和0.6000。

3.2 CAST基因对金皮F₂代猪肉质性状的效应

Lonergan等^[10]研究了牛的CAST基因RFLP多态性对肌肉嫩度的影响,结果显示影响不显著,但其选择研究的位点与本实验不同。Pringle等^[11]以杂交牛为对象进行实验,结果发现CAST与 μ -calpain的活性比值与肌肉的嫩度高度相关。孙立彬等采用PCR-RFLP方法研究了CAST基因的多态性与肌内脂肪、肌内蛋白、眼肌肉色、嫩度及背膘厚之间的关系,而本实验研究了CAST基因的多态性与眼肌面积、眼肌系水力、眼肌pH_{45m}值及眼肌导电率等屠宰性状的相关性。

本实验分析了CAST基因RFLP多态性与金皮F₂代猪背最长肌纤维横截面积、密度、直径及MHC型肌纤维比例等肌纤维组织学特性的相关性,结果发现ABCDEF基因型个体比BBDDFF基因型个体肌纤维横截面积小13.43%。根据陈润生等的研究结果可知肌纤维横截面积越小,肌间脂肪面积越大则肌肉的系水力越强,肉质越好。因而我们可以将ABCDEF作为肉质性状的优势基因型。

此外,本实验还研究了CAST基因RFLP多态性与金皮F₂代猪眼肌面积、眼肌系水力、眼肌pH_{45m}值和眼肌导电率等屠宰性状的关系。结果显示ABCDEF基因型个体比BBDDFF基因型个体眼肌面积小12.42%,从而进一步证明了CAST基因是一个对肉质相关性状非常有关的候选基因。

参考文献(References):

- [1] Taylor RC, Geesink GH, Thompson M, Koohmaraie, Goll DE. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *J Animal Sci*, 1995, 73: 1351-1367.
- [2] Geert H, Geesink GH, Koohmaraie M. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under postmortem conditions. *J Animal Sci*, 1999, 77: 2685-2692.
- [3] Barnoy S, Glaser T, Kosower NS. The role of calpastatin (the specific calpain inhibitor) in myoblast differentiation and fusion. *Biochem Biophys Res Comm*, 1996, 220: 993-998. [DOI](#)
- [4] Rettenberger G, Bruch J, Fries R. Assignment of 19 porcine type loci by somatic cell hybrid analysis detects new regions of conserved synteny between human and pig. *Mammalian Genome*, 1996, 7: 275-279. [DOI](#)
- [5] Ernst CW, Robic A, Yerle M, Wang L, Rothschild MF. Mapping of calpastatin and three microsatellites to porcine chromosome 2q2.1-q2.4. *Animal Genetics*, 1998, 29: 212-215. [DOI](#)
- [6] SUN Li-Bin, MENG-He, LI-Jing, BAI Chun-Yan, PAN Yu-Chun. Polymorphism analysis of porcine calpastatin gene by PCR-RFLP and its association with pork qualities and thickness of back fat. *Journal of Shanghai Jiaotong University*, 2005, 23(1): 57-62.
孙立彬, 孟和, 李婧, 白春艳, 潘玉春. 猪钙蛋白酶抑制蛋白基因 PCR-RFLP 多态性与肉质性状及背膘厚间的关系分析. *上海交通大学学报*, 2005, 23(1): 57-62.
- [7] CHENG-Feng, YU-Feng, WANG Jin-Yong, BAI Xiao-Qing. Analysis of CAST gene in three breeds by PCR-RFLP. *Animal Science & Veterinary Medicine*, 2004, 21(4): 267-270.
程丰, 郁枫, 王金勇, 白小青. 三个猪品种 CAST 基因 PCR-RFLP 分析. *动物科技*, 2004, 21(4): 267-270.
- [8] LU Sheng-Dong. *Molecule Biology Experiment Technology in Modern*. Beijing: Publishing Company of China Xiehe Medicine and Technology University, 1999.
卢圣栋. *现代分子生物学实验技术*. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1990.
- [9] Bruce SW. *Genetic Data Analysis—Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, 1990.
- [10] Lonergan SM, Ernst CW, Bishop MD, Calkins CR, Koohmaraie M. Relationship of restriction fragment length polymorphisms (RFLP) at the bovine calpastatin locus to calpastatin activity and meat tenderness. *J Animal Sci*, 1995, 73: 3608-3612.
- [11] Pringle TD, Harrelson JM, West RL, Williams SE, Johnson DD. Calcium-activated tenderization of strip loin, top sirloin, and top round steaks in diverse genotypes of cattle. *J Animal Sci*, 2000, 78: 2615-2621.