

牛 TG 基因启动子区遗传变异与肉质和胴体性状的相关性研究

张路培¹,任红艳¹,甘乾福²,李俊雅^{1*},李恒德¹,许尚忠^{1,2*},高雪¹,陈金宝¹
(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 农业部畜禽遗传资源与利用重点开放实验室,北京 100193;
2. 西北农林科技大学动物科技学院,杨凌 712100)

摘要:以 8 个肉牛品种为试验材料,扩增 TG 基因启动子区,测序后发现 G82A 和 C422T 2 个突变位点。利用 SAS 软件采用最小二乘法拟合线性模型将 2 个位点的不同基因型与牛胴体组成和肉质性状进行关联分析。结果发现,C422T 位点与先前报道的大理石花纹等级无相关性,与其它胴体组成和肉质性状也未发现相关性。位于 C422T 位点上游的 G82A 位点与宰前活体质量和眼肌面积显著相关($P < 0.05$),GG 为有利基因型,G 等位基因为有利等位基因。因此,G82A 可能是影响牛胴体性状的分子标记。

关键词:牛;甲状腺球蛋白基因;肉质性状;胴体组成性状

中图分类号:S823.9⁺2;S813.1

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2009)03-0315-05

Genetic Variations in Promoter Region of TG Gene and Its Association with Carcass and Meat Quality Traits in Cattle

ZHANG Lu-pei¹, REN Hong-yan¹, GAN Qian-fu², LI Jun-ya^{1*}, LI Heng-de¹,
XU Shang-zhong^{1,2*}, GAO Xue¹, CHEN Jin-bao¹

(1. Key Laboratory of Farm Animal Genetic Resources and Utilization of Ministry Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: In this experiment, promoter region of TG gene from eight breeds was amplified and sequenced. Two SNPs were identified at position 82 and 422 of TG gene (X05380). The effects of these polymorphisms of TG gene on carcass and meat quality traits were analyzed. The results showed that C422T polymorphism had no association with marbling score and any other carcass and meat quality traits. G82A polymorphism significantly associated with live weight and loin muscle area(LMA)($P < 0.05$). Individuals with genotype GG and GA had significantly larger live weight and LMA than those with AA genotype ($P < 0.05$). In a word, G82A SNP might be a good DNA marker to be used in MAS for carcass traits.

Key words: cattle; thyroglobulin gene; meat quality traits; carcass composition traits

在肉牛育种中,由多基因控制的经济性状改良 动物育种和生产者提供了简便的选择方法。利用这些需要较长时间。与经济性状紧密连锁的分子标记为 些标记,可以有效的增加肉牛选择育种中的准确度,

收稿日期:2008-03-03

基金项目:创新团队基本科研业务费专项(ywf-td-2); 国家科技支撑计划(2006BAD01A10)

作者简介:张路培(1982-),男,河北石家庄人,博士,主要从事生物技术与家畜育种研究, E-mail: zhanglupei500@163.com;

任红艳(1975-),女,黑龙江黑河人,博士,主要从事动物遗传育种研究, E-mail: rhy75@sina.com

* 通讯作者:许尚忠,研究员,博导,主要从事动物分子数量遗传与家畜育种研究, Tel:010-62890940, E-mail: simmenta@vip.sina.com;
李俊雅,副研究员,主要从事动物分子数量遗传学研究, E-mail: jll@iascaas.net.cn

降低成本。

甲状腺球蛋白是由甲状腺分泌的一种糖蛋白,是三碘甲状腺氨酸(T3)和甲状腺素(T4)的前体。甲状腺球蛋白对机体代谢,脂肪细胞生长分化以及脂肪沉积有重要作用^[1-2]。脂肪沉积在肌束之间形成的大理石花纹,是影响牛肉质量的重要因素之一。1999年Barendse等发现位于牛甲状腺球蛋白(TG)基因启动子区域的C422T位点与长期育肥牛的大理石花纹显著相关。携带T等位基因(TT和CT基因型)的个体比CC基因型个体具有较高的大理石花纹评分等级。这个分子标记已经被成功运用于分子标记辅助选择^[3-4]。T3和T4同样对脂肪细胞的生长分化有重要作用^[1,5-6]。并且在日本黑牛中,T3和T4已被证明与大理石花纹的等级相关^[7]。但后来对瘤牛的研究发现C422T位点与背膘厚和眼肌面积相关,与大理石花纹等级无关^[2]。在韩牛的研究中,虽然C422T位点与大理石花纹等级评分相关,但是C等位基因的携带个体(CC和CT基因型)比TT基因型个体具有较高的大理石花纹评分^[8]。C422T位点与牛肉质和胴体组成性状相关性研究在国内尚未见相关报道,本研究以8个牛种为研究对象,对TG基因启动子区的遗传变异及其与牛肉质和胴体组成性状间的相关性进行研究。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验牛群体的来源、品种及样本数量见表1。

来源 Source	品种 Breed	样本数量/头 Number
河北大厂县 华安肉牛场	鲁西牛 Luxi	27
	秦川牛 Qinchuan	27
	晋南牛 Jinnan	22
	夏洛来 Charolais	29
	安格斯 Angus	18
	利木赞 Limousin	22
内蒙古通辽 三元肉牛场	西门塔尔 Simmental	29
	海福特牛 Hereford	28
	安格斯 Angus	28
内蒙古通辽宝龙山 肉牛场	西门塔尔 Simmental	28
	西门塔尔 Simmental	51

Taq DNA 聚合酶、dNTPs 购自普博欣公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公

司。

1.2 基因组 DNA 提取

用常规的酚-氯仿抽提法从冻存血样中提取基因组 DNA。用紫外分光光度计和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的纯度,并估计其含量,稀释 DNA 样品至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

1.3 引物设计

根据 GenBank 公布的牛 TG 基因 5'-UTR 及侧翼序列(X05380),并参考 Barendse 的引物序列^[3],用 Primer5.0 软件设计,由赛百盛生物技术有限公司合成。

上游引物 PU: 5'-GGGGGATGACTACGAG-TATGAC-3'; 下游引物 PD: 5'-AGCAGAC-CGAAGACCCATAG-3'。

PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 37 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 SNPs 位点测定及分型

PCR 回收产物送奥莱博公司 ABI3730 测序仪测序。比对结果确定 SNP 位点。

1.5 数据处理

对检测的基因型进行统计,计算出等位基因和基因型频率。在对基因型效应进行分析时,采用以下固定模型: $Y_{ijk} = \mu + CG_i + \text{Month}_k + \text{Marker}_j + e_{ijk}$ (Y_{ijk} : 个体表型记录, μ : 总体均数, CG_i : 同期组效应,包括品种和场固定效应, Marker_j : 标记基因型效应, Month_k : 月龄效应, e_{ijk} : 随机误差)。运用 SAS 软件分析 TG 基因 SNP 基因型与胴体组成和肉质性状的相关性。采用最小二乘法拟合线性模型。

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果

根据设计的引物扩增,得到 1 条 785 bp 特异性条带,包括启动子区和部分第 1 外显子(图略)。

2.2 测序结果 SNP 分析

通过拼接比对测序结果,发现预计的 C422T 位点位于 TG 基因的 422 位,同时发现另一突变是位于 82 位的 G/A 突变(图 1)。

2.3 等位基因频率与基因型频率

由表 1 可见,G82A 位点在不同群体中 G 等位基因频率最高。海福特群体中未发现 A 等位基因。GG 基因型频率最大,而 AA 基因型纯合个体只在

表 2 TG 基因 G82A 和 C422T 位点多态性和肉质性状、胴体组成性状的相关性分析

Table 2 Association analysis of TG gene polymorphisms with meat quality and carcass composition traits

性状 Trait	G82A			P-value
	GG	AG	AA	
宰前活体质量/kg Live weight	561.456±3.774 ^a	537.336±13.582 ^a	438.254±55.420 ^b	0.030 [*]
胴体质量/kg Carcass weight	312.525±2.506	298.452±9.020	236.348±36.807	0.054
屠宰率/% Dressing percentage	55.626±0.204	55.571±0.736	53.748±3.003	0.824
大理石 1-7 Marbling score	2.164±0.062	2.370±0.224	1.840±0.912	0.618
眼肌面积/cm ² LM area	72.839±0.689 ^a	68.611±2.480 ^a	52.277±10.120 ^b	0.048 [*]
背膘厚/cm Backfat thickness	1.055±0.029	1.064±0.105	0.540±0.430	0.482
平均日增质量/(kg·d ⁻¹) Average daily gain	0.618±0.012	0.574±0.043	0.315±0.176	0.168
性状 Trait	C422T			P-value
	CC	CT	TT	
宰前活体质量/kg Live weight	556.704±4.017	558.010±5.587	556.288±17.586	0.982
胴体质量/kg Carcass weight	310.486±2.598	311.630±3.769	310.790±11.375	0.969
屠宰率/% Dressing percentage	55.613±0.202	55.870±0.292	55.831±0.882	0.759
大理石 1-7 Marbling score	2.173±0.067	2.112±0.098	2.446±0.309	0.570
眼肌面积/cm ² LM area	72.314±0.747	71.767±1.084	79.468±3.271	0.083
背膘厚/cm Backfat thickness	1.055±0.031	1.077±0.045	0.780±0.135	0.116
平均日增质量/(kg·d ⁻¹) Average daily gain	0.610±0.012	0.605±0.018	0.543±0.055	0.488

^{a,b}. 表示不同基因型间差异显著 ($P < 0.05$)

^{a,b}. Within a row, least square means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$)

鲁西牛中检测到 1 头。C422T 位点在不同群体中 C 等位基因频率最高。CC 基因型频率最高,但在利木赞、鲁西牛和秦川牛群体中未检测到 TT 基因型。

2.4 基因型与性状相关分析

分别对 2 个位点的 3 种基因型与牛胴体组成和肉质性状进行相关性分析。本研究中,未发现先前报道的 C422T 位点与大理石花纹等级和其它胴体组成、肉质性状相关。G82A 位点与宰前活体质量和眼肌面积存在显著相关,与其它性状未发现相关性。GG 和 GA 基因型个体宰前活体质量和眼肌面积显著高于 AA 型个体。G 等位基因为有利等位基因。

3 讨论

TG 基因作为脂肪沉积的候选基因已有研究。牛 TG 基因已测序并发现数个多态位点,但未发现这些位点与脂肪或大理石花纹有关^[9-11]。Barendse 发现牛 TG 基因 C422T 突变与育肥牛的大理石花纹等级相关^[3]。该位点位于 TG 基因的启动子区域,包含控制基因转录的重要序列^[12-13]。但后来 Thaller 等在德国荷斯坦牛和夏洛来牛的研究中发现,该位点只与荷斯坦牛背最长肌肌内脂肪含量有关,而在夏洛来群体中未检测到相关性^[14]。在瘤牛中,Casas 等发现 C422T 位点与背膘厚和眼肌面积相关,与大理石花纹等级无关^[2]。Rincker 等未发现所研究的西门塔尔牛群体中基因型与大理石花纹

等级以及化学测定的肌内脂肪含量存在相关性^[15]。与先前的研究相比,Shin 等发现在韩牛中该位点与大理石花纹相关,但 CC 和 CT 基因型与 TT 基因型相比具有较高的得分^[8]。本研究中,同样未发现 C422T 位点与大理石花纹得分及其它肉质和胴体组成性状的相关性。这些不一致的结果,有可能是由于群体的数量、遗传背景不同,统计方法的不同造成的。某个 SNP 位点在一个群体中与 QTL 紧密连锁,而在另外一个遗传背景不同的群体中却有可能没有相关性。但我们更应该注意到,包括胴体组成和肉质性状在内的数量性状是由多基因控制的,基因之间存在互作。在一个群体中与某个性状相关的分子标记,在另外的群体中也可能由于其它基因的作用而对该性状无影响或有不同的影响^[16]。因此,该位点对大理石花纹的影响还需进一步扩大群体进行检测。

对 TG 基因启动子区遗传变异的研究主要集中在 C422T 位点。在韩牛的研究中报道了 C257T 和 A335G 2 个 SNP 位点,但未发现其与胴体组成和肉质性状相关^[8]。本研究在 C422T 位点上游发现 1 个新 SNP 位点(G82A)。通过相关性分析发现,该位点与宰前活体质量和眼肌面积相关。虽然在生理上与宰前活体质量和眼肌面积相关的胴体质量和平均日增质量未发现与该位点相关,但统计结果表现出一定相关的趋势(P 值分别为 0.054 和 0.168)。

本研究中所发现的 G82A 和 C422T 位点都位于 TG 基因的启动子区,但只检测到 G82A 位点与胴体性状相关。由于启动子区的结构和功能较复杂,G82A 和 C422T 位点对基因表达的影响机理还需进一步研究。甲状腺球蛋白碘化后的甲状腺激素对机体的生长、发育和新陈代谢有重要的作用^[17-18]。几乎所有组织的正常发育,氧消耗和代谢速率都需要甲状腺激素。甲状腺激素对骨的生长发育起重要作用^[19-21]。因此,G82A 位点有可能是影响牛生长发育性状的分子标记。

参考文献:

- [1] AILHAUD G, GRIMALDI P, NEGREL R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development[J]. *Annual Review of Nutrition*, 1992, 12: 207-233.
- [2] CASAS E, WHITE S N, RILEY D G, et al. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle[J]. *Journal of Animal Science*, 2005, 83 (1): 13-19.
- [3] BARENDSE W J. Assessing lipid metabolism[P]. International Patent Application; PCT 98/00882, 1999.
- [4] WOOD I A, MOSER G, BURRELL D L, et al. A meta-analytic assessment of a thyroglobulin marker for marbling in beef cattle[J]. *Genetics Selection Evolution*, 2006, 38 (5): 479-494.
- [5] DARIMONT C, GAILLARD D, AILHAUD G, et al. Terminal differentiation of mouse preadipocyte cells; adipogenic and antimitogenic role of triiodothyronine[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1993, 98 (1): 67-73.
- [6] SMAS C M, SUL H S. Control of adipocyte differentiation[J]. *Biochemical Journal*, 1995, 309 (Pt 3): 697-710.
- [7] MEARS G J, MIR P S, BAILEY D R C, et al. Effect of Wagyu genetics on marbling, backfat and circulating hormones in cattle[J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 2001, 81: 65-73.
- [8] SHIN S C, CHUNG E R. Association of SNP Marker in the Thyroglobulin Gene with carcass and meat quality traits in Korean cattle[J]. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, 2007, 20(2): 172-177.
- [9] DE MARTYNOFF G, POHL V, MERCKEN L, et al. Structural organization of the bovine thyroglobulin gene and of its 5'-flanking region[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1987, 164 (3): 591-599.
- [10] GEORGES M, LEQUARRE A S, HANSET R, et al. Genetic variation of the bovine thyroglobulin gene studied at the DNA level[J]. *Animal Genetics*, 1987, 18 (1): 41-50.
- [11] PARMA J, CHRISTOPHE D, POHL V, et al. Structural organization of the 5' region of the thyroglobulin gene. Evidence for intron loss and "exonization" during evolution[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1987, 196 (4): 769-779.
- [12] BEATO M. Gene regulation by steroid hormones[J]. *Cell*, 1989, 56 (3): 335-344.
- [13] PTASHNE M. How eukaryotic transcriptional activators work[J]. *Nature*, 1988, 335 (6192): 683-689.
- [14] THALLER G, KUHN C, WINTER A, et al. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle[J]. *Animal Genetics*, 2003, 34 (5): 354-357.
- [15] RINCKER C B, PYATT N A, BERGER L L, et al. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers[J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84 (3): 686-693.
- [16] GE W, DAVIS M E, HINES H C, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle[J]. *Journal of Animal Science*, 2003, 81 (3): 641-648.
- [17] OPPENHEIMER J H, SCHWARTZ H L, MARIASH C N, et al. Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level[J]. *Endocrine Reviews*, 1987, 8 (3): 288-308.
- [18] YEN P M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action[J]. *Physiological Reviews*, 2001, 81 (3): 1097-1142.
- [19] ALLAIN T J, MCGREGOR A M. Thyroid hormones and bone[J]. *Journal of Endocrinology*, 1993, 139 (1): 9-18.
- [20] MOSEKILDE L, ERIKSEN E F, CHARLES P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism[J]. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, 1990, 19 (1): 35-63.
- [21] ROSS D S. Hyperthyroidism, thyroid hormone therapy, and bone[J]. *Thyroid*, 1994, 4 (3): 319-326.