

猪 *MSTN* 基因的多态性和生长性状关联分析

刘晓琴^{1,2}, 马喜山¹, 唐中林^{1*}, 周 荣¹, 杨述林¹, 敖 红¹, 牟玉莲¹, 李 奎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. 湖南农业大学动物科学技术学院, 长沙 410128)

摘 要: 基于肌肉生长抑制素(Myostatin, *MSTN*)基因结构及功能研究报道, 将其作为猪生长发育性状的候选基因进行多态性检测与关联分析, 旨在为猪分子遗传标记提供依据。本研究以长白猪、大白猪、杜长大、通城猪、莱芜猪、五指山猪 6 个不同猪种基因组 DNA 为模板, 通过克隆测序鉴定 *MSTN* 基因启动子区、第 1 内含子区、第 2 内含子区、第 1 外显子区、第 2 外显子区及 3'UTR 区 SNPs 位点; 以长白猪和杜长大 2 个试验猪群为材料, 利用基质辅助激光解吸飞行时间质谱法对 *MSTN* 基因进行 SNP 分型。建立最小二乘法分析模型, 利用 SAS 软件分析数据。结果表明: 在 6 个猪种 76 个个体中, 共筛选出 16 个 SNPs, 其中有 4 个位于启动子区, 5 个位于第 1 内含子, 7 个位于第 2 内含子, 在外显子 1、外显子 2 和 3'UTR 区域并未检测到 SNP 位点。对 *MSTN* 基因的 4 个 SNPs 位点 (P1、P3、P4、P5; 其中 P1、P3、P4 位于启动子区, P5 位于内含子 1 区) 的生长性状关联分析显示, P4 和 P5 2 个位点的多态性与猪生长性状显著相关 ($P < 0.05$)。P4 和 P5 2 个位点具有作为分子标记辅助猪育种的潜在应用价值。

关键词: 猪; *MSTN*; 多态性; 生长性状; 关联分析

中图分类号: S828.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)07-1063-07

Polymorphism of *MSTN* Gene and Its Association with Growth Traits in Porcine

LIU Xiao-qin^{1,2}, MA Xi-shan¹, TANG Zhong-lin^{1*}, ZHOU Rong¹, YANG Shu-lin¹,
AO Hong¹, MU Yu-lian¹, LI Kui¹

(1. Key Laboratory for Farm Animal Genetic Resources and Utilization of Ministry of Agriculture of China, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Myostatin gene (*MSTN*) was regarded as a candidate gene for selection of porcine growth trait. In this study, the SNPs of *MSTN* gene had been detected and its association with porcine growth had been analyzed based on reports on its gene structure and function to put it as molecular genetic markers in porcine breeding. Using templates of genome DNA from 6 breeds including Landrace, Yorkshire, Duroc × (Landrace × Large White), Tongcheng pig, Wuzhishan pig, Laiwu pig, the SNPs were identified by cloning and sequencing of *MSTN* gene located in its promoter region, intron1, intron2, exon1, exon2 and 3'UTR. Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry method was used to genotype SNPs in *MSTN* gene in Landrace and Duroc × (Landrace × Large white) two experimental group and the data was assessed by SAS software. Total 16 SNPs were screened from 76 individuals of 6 breeds, of which 4 located in the promoter region, 5 located intron1, 7 located in intron2, while no SNPs was dis-

收稿日期: 2012-11-05

基金项目: 转基因重大专项(2011ZX08009-001); 国家 863 项目(2011AA100300); 广西家畜遗传改良重点实验室培育基地开放课题(桂牧科研 2012-27)

作者简介: 刘晓琴(1988-), 女, 湖南怀化人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖方面研究, E-mail: liuxiaoqin112@163.com

* 通信作者: 唐中林(1974-), 副研究员, E-mail: zhonglinqy_99@sina.com

covered in exon1, exon2 and its 3'UTR region. Association analysis of four SNPs (P1, P3 and P4 located in the promoter region; P5 located in intron1) in *MSTN* gene with growth traits indicated that P4 and P5 were significantly correlated ($P < 0.05$) with growth traits. Both P4 and P5 have the potential application value as molecular marker in porcine breeding.

Key words: pig; *MSNT*; polymorphism; growth traits; association analysis

肌肉生长抑制素(Myostatin, *MSTN*)是 TGF- β 超家族成员之一,最初由美国约翰霍普金斯大学医学院于 1997 年发现^[1],是肌肉发育的关键基因,它作为肌肉特异性的生长抑制因子,参与调控骨骼肌的生长发育。成肌细胞在 *MSTN* 的作用下,聚集在细胞周期的 G₀/G₁ 阶段并停止生长^[2-3]。在分化培养基中,通过在成肌细胞中过表达 *MSTN*,能够抑制多核肌管的形成^[2]。猪胚胎期第 21~35 天可以检测到 *MSTN* 表达,第 49 天该基因表达水平明显提高,妊娠第 105 天时开始降低,出生后 2 周达到最低水平^[4]。毛亮等将 *MSTN* 作为调节牦牛肌肉发育的靶基因,建立了牦牛 *MSTN* 重组成熟肽高效表达系统并纯化获得具有免疫原性的牦牛重组 *MSTN* 成熟肽,旨在提高牦牛产肉性能^[5]。唐大运等为进一步探索 Myostatin 的调控机理,建立了肌肉生长抑制素(Myostatin, *MSTN*)基因沉默的成纤维细胞系,为获得 *MSTN* 基因沉默的转基因羊奠定基础^[6]。李绍华等采用 PCR-SSCP 技术研究猪 *MSTN* 基因的第 3 外显子和第 2 外显子区域的 DNA 多态性,结果发现在这 2 个外显子中均存在多态性^[7]。同时,朱媛媛等采用 PCR-SSCP 技术在黄颡鱼 *MSTN* 基因第 1 内含子和第 3 外显子均检测出多态性^[8]。本研究将 *MSTN* 作为猪生长发育性状的候选基因进行了多态性检测与分析,旨在为猪分子遗传标记提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

收集整理来自 6 个不同猪种共 76 个个体,其中长白猪 18 头、大白猪 12 头、杜洛克猪 10 头、通城猪 12 头、莱芜黑猪 12 头、五指山猪 12 头,用于 *MSTN* 基因 SNPs 位点筛选。来自北京顺义猪场的 65 头长白猪和 307 头杜长大猪用于 *MSTN* 基因 SNP 分型。其中,长白猪共 6 窝,每窝产仔数:10、10、13、9、12 和 11。杜长大猪共 27 窝,每窝产仔数 9~15 头不等。采集耳组织放入 75%酒精中,−20 °C 保存。

1.2 猪的基因组 DNA 提取

猪耳组织中基因组 DNA 提取按照常规苯酚-氯仿方法进行,1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测基因组的浓度和纯度,−20 °C 保存。

1.3 引物设计

根据 NCBI 数据库所公布的猪 *MSTN* 基因序列(GenBank: EF490990. 1)及引物设计原则,利用 Oligo 6.0 软件共设计了 12 对引物(表 1),使 PCR 反应扩增的长度在 500~1 500 bp 之间,相邻 2 对引物所扩增的片段有 30~150 bp 左右的重叠序列,确保所扩增的片段覆盖完整的 *MSTN* 基因序列(5'UTR 和 3'UTR, 2 个内含子和 3 个外显子,总长度为 7 626 bp)。

1.4 PCR 扩增及产物回收

以上述 DNA 为模板,根据设计好的 12 对引物进行 PCR,扩增目的片段,引物信息如表 1 所示。扩增条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存,总体积 50 μ L。

利用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司),回收纯化 PCR 产物,具体操作步骤参见试剂盒附带说明书。

1.5 连接、转化、阳性克隆鉴定及测序验证

上述纯化回收所得的线性目的片段与 pMD18-T 载体进行连接。连接反应体系为 5 μ L,连接反应组分:PCR 回收产物 2 μ L;pMD18-T 载体 0.5 μ L;Solution I 2.5 μ L。置于 4 °C,过夜连接。

连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,挑取单克隆,选择初步鉴定为阳性克隆的菌液送上海英潍捷基有限公司进行测序验证。

1.6 MALDI-TOF-MS 法 SNP 分型及数据分析

利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法对 *MSTN* 基因进行 SNP 分型。对多态位点的等位基因频率和基因型频率进行统计分析。建立最小二乘法分析模型(模型 I 和模型 II),利用 SAS (Version 9.0)软件对试验猪群的多态位点的基因型或合并基因型与生长性状进行关联性分析。统计分析模型:

表 1 用于 PCR 扩增的引物

Table 1 Primers for PCR reactions

引物 Primer	引物序列(5'-3') Sequence of primers	扩增长度/bp Product length	扩增区域 Amplification region	退火温度/℃ Annealing temperature
Pr1	GCCCTCTGGTCAAATGAGAACTGGC GAGCTGTTTCCAGGCGAAGTT	1 348	启动子- 外显子 1	55.0
Pr2	GGTGTGGCAAGTTGTCTCTC CTCTTTTCCCTCCTACTTAC	620	外显子 1- 内含子 1	55.2
Pr3	ACGACGGAAACGATCATTAC CATTTCAGGCTATCTCAAAAC	1 257	内含子 1	55.2
Pr4	GCTTACAATGACAGCATGG AGACACTGTGGAGGAACATC	314	内含子 1	56.4
Pr5	AGTTGCTCAGTGTGTCTCGT TGTAGGAGTCTTGACGGGTCT	600	内含子 1- 内含子 2	56.4
Pr6	AGACCCGTCAAGACTCCTAC GGTTTTAACACACTTGGCAC	662	外显子 2- 内含子 2	56.4
Pr7	TACTTGCTCTTCTGGTTCATCTC CCTGCCCAATCTTTTCCCTCCAT	529	内含子 2	60.0
Pr8	ATGGAGGAAAAGATTGGGGCAGG AGCATCGAGATTCTGTGAGTG	776	内含子 2- 外显子 3	57.6
Pr9	ACACACCAAAAAGATCCAGGAG ATTCACCAGAACACAAGGAG	666	外显子 3-3'UTR	59.9
Pr10	CATGCCTGGAGTATGCTACAGT CACCAGCCATTCAGCCTATTG	504	3'UTR	53.4
Pr11	CAAGTTCCCATTTCCTATTC CATTACATTATACAGCCATC	673	3'UTR	56.4
Pr12	GATGGCTGTATAATGTGAA AAAGCAACCTAACCAGAAC	492	3'UTR	55.0

模型 I: $y_{ijkl} = \mu + B_i + S_j + G_k + e_{ijkl}$;

模型 II: $y_{ijklm} = \mu + B_i + S_j + G_{ak} + G_{bl} + (G_{ak} \times G_{bl}) + e_{ijklm}$ 。

模型 I 用来分析单个多态位点的基因型效应对体重的影响,模型 II 用来分析 2 个多态位点的基因型效应对体重的影响。其中, y 为表型性状(初生重和 21 日龄断奶重)的观察值; μ 为群体的均值; B_i 为第 i 个品种的效应; S_j 为性别 j 的效应; G_k 为基因型 k 的效应; G_{ak} 为 a 位点基因型 k 的效应; G_{bl} 为 b 位点基因型 l 的效应; $G_{ak} \times G_{bl}$ 为 a 位点 k 基因型和 b 位点 l 基因型间的互作效应; e 为随机残差。

2 结 果

2.1 *MSTN* 基因 SNPs 位点筛选

利用所设计的 12 对引物,分别对 6 个猪种,共

76 个个体 *MSTN* 基因进行 PCR 扩增和测序分析。共筛选出 16 个 SNPs 位点,如表 2 所示,其中 4 个 SNPs 位点位于 5'UTR 区,5 个 SNPs 位点位于第 1 内含子,7 个 SNPs 位点位于第 2 内含子。然而,在 *MSTN* 基因外显子和 3'UTR 区均未检测到多态位点的存在。

对所筛选出的 SNPs 位点在所研究的群体中进行统计分析发现:在所检测的 6 个品种 76 个个体中,P1 多态位点出现在长白猪、杜洛克猪和通城猪中;P2 多态位点出现在长白猪、大白猪和通城猪中;P4 和 P5 位点出现在通城猪和五指山猪中,且每个位点仅具有显性纯合子和杂合子,而未检测到隐性纯合子;P6 位点出现于长白猪和莱芜猪中;P7、P10 和 P13 位点仅出现在五指山猪中,且 P10 位点等位

基因 G 在五指山猪中具有相对较高的频率;P15 位点在所检测的 76 个个体中,其碱基 A 的数目在所分析的个体中有所差异,即使在同一品种内,不同个

体间的 A 碱基的数目也是不同;P16 多态位点仅出现在莱芜猪和通城猪中。

表 2 MSTN 基因多态位点在不同品种间的分布

Table 2 Distribution of MSTN polymorphisms in different breeds

位点 Site	所在位置/bp Location	突变位点 Mutation	长白猪 Landrace	大白猪 Large White	杜洛克猪 Duroc	莱芜猪 Laiwu	通城猪 Tongcheng	五指山猪 Wuzhishan
P1	435 (5'UTR)	A→G	A/G	A	G	A	G	A
P2	447 (5'UTR)	A→G	A/G	A/G	A	A	A/G	A
P3	543 (5'UTR)	G→A	G	G	G/A	G	G	G
P4	879 (5'UTR)	T→A	T	T	T	T	T/A	T/A
P5	1 735 (Intron 1)	G→A	G	G	G	G	G/A	G/A
P6	2 099 (Intron 1)	C→T	C/T	C	C	C/T	C	C
P7	2 882 (Intron 1)	T→C	T	T	T	T	T	T/C
P8	2 970 (Intron 1)	C→T	C/T	C	C	C	C	C
P9	3 013 (Intron 1)	A→G	G/A	A	A	A	A	A
P10	5 173 (Intron 2)	A→G	A	A	A	A	A	A/G
P11	5 258 (Intron 2)	T→C	T	T	T	T	C	T
P12	5 380 (Intron 2)	C→T	C	C	T/C	C	C	C
P13	5 479 (Intron 2)	T→C	T	T	T	T	T	T/C
P14	5 520 (Intron 2)	A→G	A	A	G/A	A	A	A
P15	5 567~5 582 (Intron 2)	Poly A			数目在个体间存在差异 2~5 个碱基			
P16	5 762 (Intron 2)	T→C	T	T	T	T/C	T/C	T

2.2 质谱法 SNP 分型

由于 P2 位点的引物与其他位点对应的引物无法同时进行多重 PCR 反应,依据所筛选的 16 个 SNPs 位点在 MSTN 基因 DNA 序列上的位置,本研究选取了 P1、P3、P4、P5、P6、P7、P8、P9 和 P10 共 9 个位点(其中 P1、P3 和 P4 位于启动子区,P5、P6、P7、P8 和 P9 位于第 1 内含子区,P10 位点位于第 2 内含子区),利用 MALDI-TOF-MS 法分析 65 头长白猪和 307 头杜长大猪的 9 个多态位点的基因型。结果表明:在所选择的 9 个 SNPs 位点中,P1、P3、P4 和 P5 位点在长白猪和杜长大猪 2 个群体内呈多态现象,而 P6、P7、P8、P9 和 P10 位点在所分析的 2 个群体中无多态现象(数据略)。

2.3 多态位点的关联性分析

2.3.1 生长性状统计 对长白猪和杜长大猪 2 个品种初生重和 21 日龄断奶重进行统计分析,数据以“平均数±标准差”来表示,统计结果如表 3。

2.3.2 等位基因频率和基因型频率 对 SNPs 分型结果进行统计分析,计算 SNPs 位点在长白猪和杜长大猪中的等位基因频率和基因型频率。

表 3 猪初生重和 21 日龄断奶重统计分析结果

Table 3 Statistical results of birth and weaning weight of pigs

品种 Breed	个体数 Number	初生重/kg Birth weight	21 日龄断奶重/kg 21 days-weaning weight
长白猪	65	1.35±0.30	5.85±1.24
杜长大猪	307	1.43±0.31	6.06±1.25

4 个 SNPs 位点在 2 个群体中的等位基因频率和基因型频率统计结果如表 4 所示:在长白猪和杜长大猪中,P1 多态位点均出现 AA、AG、GG 3 种基因型,在长白猪中,等位基因 G 的频率较高,为 0.546,在杜长大猪中,等位基因 G 的频率较高,为 0.803;P3 多态位点在长白猪中具有 AA、AG 和 GG 3 种基因型,等位基因 A 的频率较高,为 0.531,在大白杜长大猪中具有 AG 和 GG 2 种基因型,等位基因 G 的频率较高,为 0.897;P4 多态位点在长白猪和杜长大猪中仅具有 TT 和 TA 2 种基因型,等位基因 T 在长白猪和杜长大猪中均具有非常高的

基因频率,分别为 0.954 和 0.993;P5 多态位点在长白猪和杜长大猪中具有 GG 和 GA 2 种基因型,等

位基因 G 在这 2 个群体中的频率很高,分别为 0.954 和 0.993。

表 4 *MSTN* 基因 4 个不同多态位点的基因频率和基因型频率

Table 4 Allele frequencies and genotype frequencies of *MSTN* gene in four different polymorphisms

位点 Site	品种 Breed	个体数 Number	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency	
			GG	AG	AA	G	A
P1	长白猪	65	0.231	0.631	0.138	0.546	0.454
	杜长大猪	307	0.632	0.342	0.026	0.803	0.197
P3	长白猪	65	0.108	0.723	0.169	0.469	0.531
	杜长大猪	307	0.795	0.205	0	0.897	0.103
P4	长白猪	65	0.908	0.092	0	0.954	0.046
	杜长大猪	307	0.987	0.013	0	0.993	0.007
P5	长白猪	65	0.908	0.092	0	0.954	0.046
	杜长大猪	307	0.987	0.013	0	0.993	0.007

2.3.3 基因型与体重的相关 利用最小二乘法分别对 P1、P3、P4 和 P5 位点的多态性与猪初生重和 21 日龄断奶重进行关联性分析。不同基因型对应的初生重和 21 日龄断奶重用最小二乘均数来表示。关联分析结果显示:P1 和 P3 2 个位点的基因型效应与猪初生重和 21 日龄断奶重均无显著相关性($P>0.05$),P4 和 P5 2 个位点则表现出显著相关($P<0.05$)(数据略)。

对于 P4 和 P5 多态位点:如表 5 所示,P4 位点在 2 个群体中,TT 基因型个体和 TA 基因型个体间的初生重和 21 日龄差异显著($P<0.05$),TA 基因型个体的初生重和 21 日龄断奶重分别比 TT 基因型个体重 0.26 和 0.57 kg。P5 位点在 2 个群体中,GA 基因型个体和 GG 基因型个体间的初生重和 21 日龄断奶重差异显著($P<0.05$)GA 基因型个

体的初生重和 21 日龄断奶重分别比 GG 基因型个体重 0.26 和 0.57 kg。

P1 和 P4 合并基因型分析结果如表 6 所示,P1 和 P4 合并基因型效应与猪初生重和 21 日龄断奶重均无显著相关性($P>0.05$)。

P4 和 P5 合并基因型分析结果如表 6 所示,在所研究分析的 2 个群体中,由于 P4 和 P5 位点的基因型呈完全连锁,因此在 2 个群体中仅检测到 2 种合并基因型 TTGG 和 TAGA,而合并基因型效应与 P4 或 P5 单个多态位点的基因型效应是一致的:合并基因型 TTGG 个体和 TAGA 基因型个体之间的初生重和 21 日龄断奶重差异显著($P<0.05$),TAGA 基因型个体的初生重和 21 日龄断奶重分别比 TTGG 型个体重 0.26 和 0.57 kg。

表 5 *MSTN* 基因 P4 位点和 P5 位点多态性与体重的关联性分析

Table 5 Polymorphisms and body weight association analysis of *MSTN* gene in P4 and P5 site

多态位点 Polymorphism	个体数 Polymorphism	基因型 Genotype	初生重/kg Birth weight	21 日断奶重/kg 21 days-weaning weight
P4	362	TT	1.38±0.02 ^b	5.93±0.11 ^b
	10	TA	1.64±0.10 ^a	6.50±0.48 ^a
P5	362	GG	1.38±0.02 ^b	5.93±0.11 ^b
	10	GA	1.64±0.10 ^a	6.50±0.48 ^a

同列数据后所标字母相异表示差异显著($P<0.05$),所标字母相同表示差异不显著($P>0.05$)。下同

Different letters in the same line means significant difference between the treatments($P<0.05$), same letter in the same line means not significant difference between treatments($P>0.05$). The same as below

表 6 P1 和 P4 位点、P4 和 P5 位点合并基因型对体重的最小二乘均数

Table 6 The least square means of the combination genotypes for P1 and P4 sites, P4 and P5 sites in body weight

合并基因型 Combination of genotypes		个体数 Number	初生重/kg Birth weight	21 日龄断奶重/kg 21 days-weaning weight
P1	P4			
GG	TT	209	1.44±0.03	5.93±0.14
GA	TT	138	1.35±0.03	5.95±0.14
GA	TA	8	1.42±0.11	6.04±0.58
AA	TT	14	1.35±0.08	5.91±0.41
AA	TA	3	1.50±0.22	6.97±0.91
P4	P5			
TT	GG	362	1.38±0.02 ^b	5.93±0.11 ^b
TA	GA	10	1.64±0.10 ^a	6.50±0.48 ^a

3 讨论

3.1 MSTN 基因 SNPs

迄今为止,有报道称在 Texel 绵羊 *MSTN* 基因 3'UTR 区域存在一个 SNP 位点,miR-1 和 miR-206 通过调节该突变靶位点^[9-10]进而导致了 Texel 绵羊体重显著增加。本研究通过对猪 *MSTN* 基因 SNP 位点扫描,发现其 3'UTR 区没有突变。*MSTN* 基因 3'UTR 序列是否在同一物种或不同物种间具有与编码序列同样地高度保守性,还有待于进一步研究分析。

3.2 转录因子结合位点的预测

本研究利用 TFSEARCH(<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 转录因子结合位点预测工具,对多态位点突变前后转录因子结合位点的变化进行预测。虽然 P1 位点 A→G 的突变增加 1 个 Evi-1 转录因子结合位点,但 P1 位点并非处于功能性或保守区域,属于沉默突变,而 P1 位点的关联性分析也证实了该突变属于沉默突变。P2 位点 A→G 的突变导致增加了 1 个 v-Myb 转录因子结合位点,v-Myb 的前体是 c-Myb,v-Myb 在细胞内能够编码一个瞬时核蛋白,通过自身及其前体 c-Myb 实现对肌肉细胞生长分化的抑制^[11]。P3 和 P4 位点突变分别导致减少和增加了 2 个 CdxA 转录因子的结合位点。作为一个同源异形盒基因,CdxA 参与 Myf-5 的表达调控,促进肌肉的生长发育,而利用 MATINSPECTOR 软件对 P4 多态位点

突变前后转录因子结合位点的变化进行预测发现,该位点突变打断了 1 个 MSX1 转录因子的结合位点^[12],MSX1 与成肌调控因子 MyoD、Pax3 等发生作用,调控骨骼肌细胞的分化过程^[13]。

3.3 猪 *MSTN* 基因多态性与体重的关联性分析

对所检测出的 4 个 SNP 位点的多态性与猪初生重和 21 日龄断奶重进行关联性分析,结果表明:P1 位点多态性与猪初生重和 21 日龄断奶重无显著相关性($P>0.05$),A. Stinckens 等发现 P1 位点并非位于已知的功能性或者保守区域内,可能是一个沉默突变而不会对基因的表达产生影响^[14]。

P4 位点在 2 个群体中呈现多态性,具有 TT 和 TA 2 种基因型。牛和猪 *MSTN* 基因在该位点同样具有多态性^[15-16]。本研究发现,P4 位点等位基因 A 出现于长白猪、大白猪、通城猪和五指山猪中,并且长白猪和大白猪 A 等位基因频率相对通城猪和五指山小型猪要低。与此同时,在长白猪和杜长大猪 2 个群体中,该位点从未检测到 AA 基因型^[17]。

本研究利用最小二乘法对 P1、P3、P4 和 P5 位点的多态性与猪初生重和 21 日龄断奶重进行关联性分析,结果发现:P4 和 P5 位点多态性与猪初生重和 21 日龄断奶重均存在显著相关性($P<0.05$),2 个位点的杂合子 TA 和 GA 均为优势基因型,而野生基因型 TT 和 GG 均为劣势基因型;P4 和 P5 位点的合并基因型分析发现,TAGA 为优势基因型,TTGG 为劣势基因型,两者的初生重和 21 日龄断奶重差异显著($P<0.05$),且在上述 2 个模型中,性

别和品种效应对体重没有显著影响。

MSTN 基因 P4 和 P5 2 个位点的多态性与猪生长性状显著相关 ($P < 0.05$), 具有作为分子标记辅助猪育种的潜在应用价值, 但是这 2 个位点通过哪些机制参与调控了 *MSTN* 基因功能的发挥以及 2 个多态位点的基因型是否呈完全连锁, 还有待于进一步研究证实。

参考文献:

- [1] MCPHERRONA C, LEE S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene [J]. *Genetics*, 1997, 94: 12457-12461.
- [2] LANGLEY B, THOMAS M, BISHOP A, et al. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression [J]. *Biol Chem*, 2002, 277(51): 49831-49840.
- [3] JOULIA D, BERNARDI H, GARANDEL V, et al. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin experimental [J]. *Cell Res*, 2003, 286: 263-275.
- [4] 魏彩虹, 刘刚, 杜立新, 等. *DLK1* 和 *MSTN* 基因在绵羊妊娠中后期胎儿中的表达分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(4): 527-533.
- [5] 毛亮, 徐亚欧, 郑玉才, 等. 重组牦牛肌肉生长抑制素成熟肽的纯化及其免疫原性研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(8): 1210-1214.
- [6] 唐大运, 朱化彬, 吴健敏, 等. Myostatin 基因沉默绵羊成纤维细胞系的建立 [J]. *畜牧兽医学报*, 2011, 42(10): 1368-1373.
- [7] 李绍华, 熊远著, 郑嵘, 等. 猪 *MSTN* 基因多态性及其 SNPs 的研究 [J]. *遗传学报*, 2002, 29(4): 326-331.
- [8] 朱媛媛, 梁宏伟, 李忠, 等. 黄颡鱼 *MSTN* 基因多态性及其与生长性状的相关性分析 [J]. *遗传*, 2012, 34(1): 72-78.
- [9] XIE X H, LU J, KULBOKAS E J, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3'UTRs by comparison of several mammals [J]. *Nature*, 2005, 434: 338-345.
- [10] CLOP A, MARCQ F, TAKEDA H, et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(7): 813-818.
- [11] WESTON K, BISHOP J M. Transcriptional activation by the v-myc oncogene and its cellular progenitor, c-myc [J]. *Cell*, 1989, 58(1): 85-93.
- [12] BOMAN I A, KLEMETSDAL G, BLICHFELDT T, et al. A frameshift mutation in the coding region of the myostatin gene (*MSTN*) affects carcass conformation and fatness in Norwegian White sheep (*Ovis aries*) [J]. *Anim Genet*, 2009, 40(4): 418-422.
- [13] 程会军. 猪肌节同源型框基因 *MSX1* 的克隆、定位及其有效 siRNA 的筛选 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [14] STINCKENS A, LUYTEN T, BIJTTEBIER J. Characterization of the complete porcine *MSTN* gene and expression levels in pig breeds differing in muscularity [J]. *Anim Genet*, 2008, 39: 586-596.
- [15] STRATIL A, KOPČNÝ M. Genomic organization, sequence and polymorphism of the porcine myostatin (*GDF8*; *MSTN*) gene [J]. *Anim Genet*, 1999, 30(6): 462-478.
- [16] CRISÀ A, MARCHITELLI C, SAVARESE M C, et al. Sequence analysis of myostatin promoter in cattle [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 102(1-4): 48-52.
- [17] 马喜山. 猪骨骼肌发育相关基因的差异表达和多态性研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.

(编辑 程金华)