

猪微卫星多态与肌肉蛋白质含量关系的研究^{*}

毛永江¹, 姜勋平¹, 熊远著², 刘桂琼¹, 孙雪萍¹

(1 扬州大学 畜牧兽医学院, 江苏 扬州 225009;

2 华中农业大学 农业部猪遗传育种重点开放实验室, 湖北 武汉 430070)

[摘 要] 利用3头大白猪和7头梅山猪为父母本建立了F₂参考家系。F₁公猪5头, 母猪23头, 随机交配产生287头F₂个体。根据美国肉畜研究中心(USDA-MARC)公布的猪遗传连锁图谱, 在2号染色体上隔一定距离选取7个微卫星标记, 对F₂代135个个体进行扩增, 获得各标记位点基因型, 并测定了F₂代各个体背最长肌蛋白质含量, 进行统计分析。结果表明, 微卫星座位的杂合度为0.439 3~0.658 8, 多态信息含量为0.401 8~0.584 8; 除S0170外, 其余6个微卫星座位各基因型之间肌肉中蛋白质含量无显著差异($P > 0.05$)。S0170BC型肌肉中蛋白质含量显著高于其他几种基因型。

[关键词] 猪; 微卫星; 肌肉蛋白质

[中图分类号] S813.1 **[文献标识码]** A

[文章编号] 1671-9387(2004)11-0015-04

微卫星是存在于真核生物基因组中的大量高度可变重复序列, 重复长度一般为1~6 bp不等, 在整个基因组中均匀分布, 具有复等位性和共显性特点^[1]。与小卫星探针、RFLP和RAPD等分子标记相比, 微卫星具有数量大、分布广、分布均匀、多态性强、准确度高和分析操作简便等优点, 被广泛用于基因组连锁图构建、群体间亲缘关系分析、标记辅助选择等方面^[2]。

国内外学者在猪的微卫星应用于数量性状的标记辅助选择方面做了大量的工作, 如3号染色体SW 2427~SW 251区域与猪日增重、4号染色体S0101~S0107区域与背膘和腹脂、7号染色体S0064~S0066区域与胴体组成和初生重有很大关系^[3]等。赵书红等^[4]发现, 12号染色体上SW 1350极显著影响初生重、20日龄重、45日龄重及初生到45日龄平均日增重。苏玉虹等^[5]把影响猪生后60日龄平均日增重的数量性状位点(Quantitative Trait Locus, QTL)定位于2号染色体。左波等^[6]发现猪4号染色体上有显著影响脂肪沉积的QTL。屈彦纯等^[7]发现猪2号染色体上有显著影响活体估测瘦肉率、眼肌高度和最长肌大理石纹的QTL。姜勋平等^[8]利用24对微卫星对猪1, 2, 6号染色体上影响肌肉中蛋白质的QTL进行扫描, 发现这3条染色体上某些区段均存在影响肌肉中蛋白质的QTL。

但除此之外, 国内外近5年内均无有关猪微卫星与肌肉蛋白质含量关系的相关报道。

大白猪和梅山猪是当前猪生产中使用较多的2个重要猪品种。大白猪以生长快、胴体瘦肉率高而著称。梅山猪与大白猪相比, 生长慢、胴体瘦肉率低, 但肉质好、产仔多。本研究以大白猪和梅山猪杂交F₂代为对象, 探讨猪2号染色体上影响肌肉中蛋白质含量的遗传标记, 以期对猪的育种和生产提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物

资源家系来源于由3头大白猪公猪和7头梅山猪母猪交配产生的F₁, 从F₁中选出5头公猪和23头母猪随机交配产生287头F₂。随机选取其中的135头F₂育肥猪(66头公猪和69头母猪)。试验猪饲养在中国猪育种中心(武汉)。采用标准饲养方案, 每天饲喂2次, 自由饮水。育肥猪屠宰测定按标准方法进行^[9]。

1.2 基因组DNA制备和肌肉蛋白质含量的测定

屠宰前采集血样, 按文献^[10]制备基因组DNA。宰后取背最长肌, 用凯氏定氮法测定肌肉中蛋白质含量^[11]。

^{*} [收稿日期] 2003-09-26

[基金项目] 国家“973”重大基础研究项目(G2000016105)

[作者简介] 毛永江(1974-), 男, 贵州江口人, 讲师, 在读博士, 主要从事动物遗传育种研究。E-mail: myj1999@sohu.com

1.3 微卫星分型

根据美国肉畜研究中心(USDA-MARC)公布的猪遗传连锁图谱,在2号染色体上选取7个相隔一定距离的微卫星作为扩增对象。各微卫星引物序列见表1。PCR反应体积为20 μL,其中包括5.0 μL模板DNA,0.2 μL Taq 酶(5 U/μL),1.6 μL dNTPs (2.5 mmol/L),每种引物1.0 μL (75

ng/μL), 7.6 μL ddH₂O, 1.6 μL MgCl₂ (25 mmol/L), 2.0 μL 10×buffer。PCR反应程序如下:先94℃变性3 min,然后按下面程序进行35个循环,94℃1 min,56℃45 s,72℃1 min;最后72℃5 min。PCR产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染后分型。

表1 微卫星引物序列

Table 1 The primer sequence of microsatellites

微卫星 Microsatellites	正向引物序列 Forward primer sequences	反向引物序列 Reverse primer sequences
SWR2516	GTGCA TTA TCGGGA GGTA TG	ACCCTGTA TGA TACTGTAACTCTGG
SW 1201	CCAA CCAACCAACA GAAAAC	CGGCACTGGTAACTCCAA TT
S0170	AGCTCTGA TTA GACCCCTA GTCTA	TAA GCCACAA TGGGAACTCCTTAC
SW 1883	CCA TTTGGGGTGCA TTTTTTG	CTA TTGGTGGTAAA GGA GCA GC
SW 1879	AGACACA TGACATA TGTGTTTAC	AGCA TTTGTTTCTGGTTACTTTTAG
SW 2192	TGGAAA TAA TCTCTGA GGA GGG	CTA TA TGCCA TG GTT GCA GC
SWR308	TCCA GTCCCTTGGTCTCTTG	TTA GCCTGGGAACTTCCA TG

1.4 统计分析

用根井正利^[12]提出的公式计算基因的杂合度,多态信息含量(Polymorphic Information Content, PIC)由Botstein 公式^[13]计算:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{j=1}^{n-1} \sum_{i=1}^n 2(P_i P_j)^2,$$

式中, P_i, P_j 分别为群体中第*i, j*个等位基因频率,*n*为等位基因数。

用SAS软件的GLM过程计算猪肌肉中蛋白质含量的均值和标准差,比较不同性别和不同微卫星位点基因型间的差异(如果某个微卫星座位具有某个基因型的个体数<4时,该基因型不参加多重

比较统计,在表中也未能列出)。

2 结果与分析

2.1 各微卫星基因频率及杂合度

各微卫星基因频率、杂合度及多态信息含量见表2。由表2可以看出,微卫星座位计算的杂合度0.439 3~0.658 8,群体基因杂合度均值为0.551 5。其中SW 1201等位基因数为4个,杂合性最低,而SWR 2516等位基因数为3个,杂合性最高。多态信息含量在0.401 8~0.584 8,群体均值为0.478 8。各微卫星座位多态信息含量变化规律与杂合性变化规律一致。

表2 微卫星座位的杂合度和多态信息含量

Table 2 The heterozygosity and PIC of microsatellite loci

微卫星 Microsatellite	等位基因数 Allelic number	基因频率 Gene frequency	杂合度 Heterozygosity	多态信息含量 PIC
SWR2516	3	0.275, 0.400, 0.325	0.658 8	0.584 8
SW 1201	4	0.725, 0.154, 0.107, 0.014	0.439 3	0.401 8
S0170	3	0.204, 0.575, 0.221	0.578 9	0.515 0
SW 1883	3	0.115, 0.571, 0.314	0.562 1	0.486 6
SW 1879	3	0.614, 0.336, 0.050	0.507 6	0.420 0
SW 2192	3	0.450, 0.500, 0.050	0.545 0	0.441 5
SWR308	3	0.479, 0.439, 0.082	0.571 3	0.477 0
平均Average	3.142 9		0.551 5	0.478 8

2.2 不同性别肌肉中蛋白质含量

群体肌肉蛋白质含量平均为0.241 1±0.031,其中公猪蛋白质含量为24.52%,母猪为23.86%,公猪比母猪高0.66个百分点,但两者间无显著差异($P>0.05$)。这表明在分析猪肌肉中蛋白质含量时,可不考虑性别效应。

2.3 不同微卫星位点各基因型肌肉中蛋白质含量

从不同微卫星位点基因型肌肉中蛋白质含量及显著性检验结果(表3)可以看出,除S0170外,其余6个微卫星位点各基因型之间肌肉中蛋白质含量无显著差异($P>0.05$)。S0170 BC型肌肉中蛋白质含量最高,显著高于其他几种基因型。

表 3 不同微卫星基因型肌肉中蛋白质含量及显著性检验

Table 3 The protein content of muscle for different m icrosatellite genotypes and the significant test

位点 Loci	基因型 Geno- type	样品数 Sample No.	蛋白质含量/% Protein content
SWR2516	AA	12	0.234 0±0.031 5
	AB	26	0.241 8±0.018 2
	AC	24	0.233 2±0.038 8
	BB	18	0.244 6±0.033 2
	BC	44	0.246 1±0.027 4
	CC	8	0.240 0±0.051 7
SW 1201	AA	69	0.238 2±0.025 5
	AB	34	0.238 7±0.030 9
	AC	21	0.250 5±0.038 7
S0170	AA	4	0.232 1±0.021 4b
	AB	36	0.235 0±0.027 2b
	AC	9	0.235 4±0.016 6b
	BB	32	0.241 5±0.030 3b
	BC	50	0.247 5±0.036 5a
SW 1883	AB	25	0.247 2±0.029 2
	AC	7	0.233 0±0.019 9
	BB	34	0.243 9±0.037 6
	BC	58	0.236 5±0.029 5
	CC	8	0.252 9±0.023 6
SW 1879	AA	45	0.244 3±0.030 1
	AB	61	0.240 2±0.030 4
	AC	10	0.246 0±0.029 8
	BB	12	0.239 9±0.039 1
	BC	4	0.214 8±0.035 0
SW 2192	AA	24	0.234 1±0.017 2
	AB	65	0.244 9±0.035 2
	BB	29	0.241 1±0.035 8
	BC	10	0.234 6±0.015 1
SWR 308	AA	32	0.248 8±0.042 0
	AC	54	0.243 6±0.028 9
	AD	11	0.231 1±0.016 3
	CC	24	0.234 8±0.027 6
	CD	10	0.234 5±0.015 3

注: 标不同字母者表示差异显著($P < 0.05$)。
Note: Data with different letters indicate they differ significantly ($P < 0.05$).

3 讨论与结论

用微卫星对猪生长性状和肉质性状进行基因定

位研究的报道较多。Wang 等^[14]用美国 Iowa 州立大学的参考家系(梅山或民猪与美国猪杂交)研究 4 号和 7 号染色体 QTL 的分布情况,发现 4 号染色体存在显著影响断奶重、平均日增重、眼肌面积及肉色的 QTL,7 号染色体上有显著影响背膘厚、肉色、肉硬度、出生重的 QTL。Milan 等^[15]用梅山猪与大白猪杂交的 F₂ 代群体研究发现,生长速度 QTL 定位于 4 号和 7 号染色体上。Malek 等^[16,17]利用覆盖猪全部基因组的 125 对微卫星,对由 2 头巴克夏和 9 头约克夏杂交的 525 头 F₂ 代群体进行全基因组扫描,寻找与猪生长和肉质性状有关的 QTL,发现 16 条染色体上有显著影响生长性状的 QTL,并定位于 1~4,6~9,11,13~14 和 X 染色体上;同时 16 条染色体上有显著影响肉质性状的 QTL,并定位于 1~2,4~8,10~15,17~18 和 X 染色体上。Nezer 等^[18]对由皮特兰和长白猪建立的资源家系进行全基因组扫描,发现 2 号染色体上有显著影响瘦肉率和脂肪沉积的 QTL,7 号染色体上有显著影响平均日增重和胴体长的 QTL,此外,显著影响脂肪沉积的 QTL 还存在于 1,7 和 13 号染色体。本研究结果表明,S0170 显著影响肌肉中蛋白质含量,BC 型肌肉中蛋白质含量显著高于其他几种基因型,这为猪肉品质性状的选种提供了一个可选择的指标。但由于在国外文献中未查到有关猪微卫星与肌肉蛋白质含量的相关报道,因此无法与其进行比较。

姜勋平等^[8]利用基因组扫描法发现,1 号染色体的 SW 1332 和 SW 2130 之间、2 号染色体的 SWR 2516 和 SW 1201 之间、6 号染色体的 SW 322 和 SW 607 之间有影响肌肉中蛋白质含量的 QTL (SWR 2516 和 SW 1201 在 2 号染色体上的位置分别为 0 和 44.8),而 S0170 在 2 号染色体上的相对位置为 59.5。这说明影响肌肉中蛋白质的 QTL 不仅可能存在于多条染色体上,而且在同一条染色体上也可能存在多个位点。为了找出影响猪肌肉中蛋白质的全部 QTL,应增加微卫星数量,进行全基因组扫描研究。

致谢: 在实验过程中得到丁家桐教授、丁利军、丁志丽、汤道玲的帮助,在此表示衷心感谢!

[参考文献]

[1] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(16): 6463- 6467.
[2] 吴登俊, 马丁·费尔斯特. 家畜基因组遗传多态性标记-微卫星标记研究进展[J]. 国外畜牧科技, 1999, 26(1): 33- 35

- [3] 彭中镇, 赵书红, 李 奎, 等. 猪数量性状基因及其标记研究进展[J]. 国外畜牧科技, 1999, 26(1): 28- 32
- [4] 赵书红, 杨晓鹏, 刘 榜, 等. 猪 12 号染色体几个微卫星标记与部分生产性状的关系研究[J]. 华中农业大学学报, 2000, 19(4): 360- 362
- [5] 苏玉虹, 熊远著, 张 勤, 等. 大白猪×梅山猪资源家系生长性状QTL 的检测[J]. 遗传学报, 2002, 29(7): 607- 611
- [6] 左 波, 熊远著, 苏玉虹, 等. 利用 24 个微卫星进行猪数量性状座位定位及其遗传效应分析[J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(2): 139- 146
- [7] 屈彦纯, 邓昌彦, 熊远著, 等. 猪 2 号染色体遗传连锁图谱的构建与QTL 定位分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(11): 972- 976
- [8] 姜勋平, 熊远著, 邓昌彦, 等. 猪肌肉蛋白质含量的QTL 分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(12): 1068- 1072
- [9] 熊远著. 种猪测定原理及方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999
- [10] 熊远著. 猪生化及分子遗传实验导论[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999
- [11] 何照范, 张迪清. 保健食品化学及其检测技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998
- [12] 根井正利. 分子群体遗传学与进化论[M]. 王家玉, 译. 北京: 农业出版社, 1983
- [13] Franz P. Population Genetics in Animal Breeding[M]. New York and London: Plenum Press, 1983
- [14] Wang L, Yu T P, Tuggle C K, et al. A directed search for quantitative trait loci on chromosomes 4 and 7 in pigs[J]. J Anim Sci, 1998, 76: 2560- 2567.
- [15] Milan D, Bidnel J P, Roy L P, et al. Current status of QTL detection in Large White×Meishan Crosses in France[Z]. Australin: Proc 6th World Congr Genet Appl Livest Prod, 1998, 26: 414- 417.
- [16] Malek M, Dekkers J C, Lee H K, et al. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig I: growth and body composition[J]. Mamm Genome, 2001, 12: 630- 636
- [17] Malek M, Dekkers J C, Lee H K, et al. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig II: meat and muscle composition[J]. Mamm Genome, 2001, 12(8): 637- 645
- [18] Nezer C, Moreau L, Wagenaar D, et al. Results of a whole genome scan targeting QTL for growth and carcass traits in a Pietrain×Large White intercross[J]. Genet Sel Evol, 2002, 34(3): 371- 387.

Study on relationship between polymorphisms of microsatellite and protein percentage of muscle in swine

MAO Yong-jiang¹, JIANG Xun-ping¹, XIONG Yuan-zhu², LIU Gui-qiong¹, SUN Xue-ping¹

(1 Animal Science and Veterinary Medicine College, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China;

2 Key Laboratory of Swine Breeding and Genetics, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: A resource population was developed by intercross with three Large White and seven Meishan pigs. 287 F₂ offspring were born by random mating from five boars and twenty three sows. The genome DNA of 135 F₂ offspring were amplified and typed by seven selected microsatellites on chromosome 2, according to the linkage map of pig from American Meat Animal Research Center (USDA-MARC). The protein content was detected from muscle. The results show that the heterozygosity of seven microsatellite loci was from 0.439 3 to 0.658 8. The Polymorphic Information Content (PIC) was from 0.401 8 to 0.584 8. No significant effects were observed between protein content and different genotype of microsatellite loci except S0170. The protein content of BC was significantly higher than others for S0170 ($P < 0.05$).

Key words: swine; microsatellite; protein in muscle