

文章编号 :1003-8701(2008)06-0030-02

朗德鹅 MSTN 基因外显子 3 多态性的研究

潘英树¹,张永宏¹,高妍²,郭丽君¹,
廉长江¹,邢沈阳¹,牛淑玲¹,赵志辉^{1*}

(1.吉林大学畜牧兽医学院,长春 130062;2.吉林大学实验动物中心,长春 130062)

摘要:肌抑制素基因(MSTN)属于转化生长因子-β超家族成员,其主要功能是负向调控肌细胞生长发育。为检测朗德鹅 MSTN 外显子 3 多态性,采用 PCR-SSCP 的方法,对肌生成抑制基因外显子 3 进行了分析,结果发现,该片段存在 PCR-SSCP 多态性;对具 DNA 多态性的片段测序分析发现:MSTN 基因外显子 3 第 1 023 处发生了单碱基的改变(A→G)。通过研究 MSTN 基因的多态性,为朗德鹅的选种和选育提供实验基础和理论依据。

关键词:朗德鹅;肌生成抑制素;外显子 3;多态性

中图分类号:S835

文献标识码:A

The PCR-SSCP Polymorphism of Landaise Goose MSTN Gene

PAN Ying-shu¹, ZHANG Yong-hong¹, GAO Yan², GUO Li-jun¹,

LIAN Chang-jiang¹, XING Shen-yang¹, NIU Shu-ling¹, ZHAO Zhi-hui^{1*}

(1.College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062;

2.The Center of Laboratory Animal, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: Myostatin is a transforming growth factor-beta family member that normally acts to limit skeletal muscle cell growth and development. In order to detect the polymorphism of the Landaise goose MSTN gene exon 3, the PCR-SSCP was to be used. The results showed that the fragments with SSCP polymorphism were sequenced. The sequencing results showed that there was single nucleotides mutation, A→G at 1023. This study is useful to the selection of Landaise goose.

Key words: Landaise goose; MSTN gene; Exon 3; Polymorphism

朗德鹅是当前世界上生产鹅肥肝的专用品种。肥肝是指水禽生长发育大体完成后,在短时期内人工强制填饲大量高能量饲料,经过一定的生化反应后在肝脏大量沉积脂肪形成的脂肪肝,其品质主要受遗传、品种和饲料等因素的影响。

肌抑制素基因(myostatin, MSTN)又称生长分化因子-8 (growth differentiation factor-8, GDF-8),是 1997 年美国 John Hopkins 大学医学院的一个研究小组在研究转化生长因子-β(TGF-β)时发

现的一种新的生长因子,该因子具有 TGF-β 共有的结构特征, MSTN 基因与 TGF-β 家族其他成员一样,在脊椎动物体内是高度保守的,其氨基酸序列有家族特征,由于 GDF-8 对骨骼肌的生长具有负调控作用^[1-2],被命名为生长/分化因子-8,属于转化生长因子-β (transforming growth factor beta, TGF-β)超家族成员^[3-5]。目前国内外众多学者对猪、牛、鸡 MSTN 基因做了大量的研究,发现其多态性与其生长发育有关^[6-7]。MSTN 主要功能是负向调控肌细胞生长发育^[8]。Gu ZL 等(2002)报道了鸡 myostatin 基因的单核苷酸多态性 (SNPs),并证明(Gu ZL 等 2004)不同基因型的鸡腹脂重、腹脂率、体重及胸肌率都有显著差异,说明 myostatin 基因在调节肌肉生长和分化、脂肪沉积中都有重要作用; MSTN 基因对脂肪沉积的影响, Alexandra C 等人

收稿日期:2008-06-20

基金项目:吉林大学农学部青年科研基金资助

作者简介:潘英树(1977-),男,硕士,讲师,主要从事动物分子遗传学方面的研究。

通讯作者:赵志辉,教授,博士生导师, E-mail: zhihuizhao@jljluh.pku.edu.cn

推测 MSTN 基因抑制脂肪沉积机制可能是 MSTN 基因直接作用于脂肪组织,调节其代谢过程^[9]。MSTN 基因的 SNPs 可以作为选择肌肉性状和胴体性状的分子标记。本实验通过研究 MSTN 基因的多态性,为朗德鹅的选种选育提供实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

120 支朗德鹅的组织样品采集于吉林朗德鹅业集团养殖场,采集的组织样品迅速置于液氮中,实验室 -70℃ 保存。

1.2 基因组 DNA 的提取

按照 TIANGEN 公司的 Animal Tissue Genomic DNA Mini-prep Ki 试剂盒说明进行提取。

1.3 引物设计

根据 GenBank 肌生成抑制素序列设计引物,上下游引物分别为 5'-CTAAACGTAGTAAAA-CAAAGGCAGC-3' 和 5'-AACATTTATTTA-CAAATATTGATG-3'。

1.4 目的片段 PCR 扩增的反应体系及条件

50 μL PCR 反应体系为 5.0 μL 10×buffer, 1.0 μL dNTP (10 mmol/L), 上下游引物各 2.0 μL (10 pmol/μL), 基因组 DNA 2.0 μL, Ex Taq E 0.25 μL (5 U/μL), 灭菌去离子水 37.75 μL。PCR 扩增条件为 95℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 45 s, 57℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 60 s, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 PCR 产物的 SSCP 分析

2 μL 的 PCR 产物与 5 μL 的变性 buffer (98% 去离子甲酰胺, 10% 甘油, 10 mM EDTA, 0.025% 二甲苯青, 0.025% 溴酚蓝) 混匀, 98℃ 变性 10 min, 迅速冰浴 10 min, 在 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶 (丙烯酰胺:N,N'-亚甲双丙烯酰胺=29:1) 电泳 (4℃, 160V) 14 h。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 电泳结果

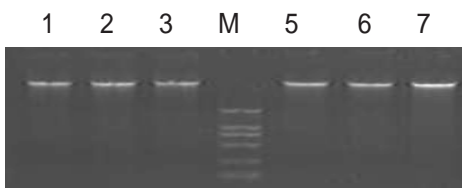


图 1 基因组 DNA 电泳图

M 为 D2000 标准分子量; 1~7 均为基因组 DNA

2.2 目的片段的 PCR 扩增结果

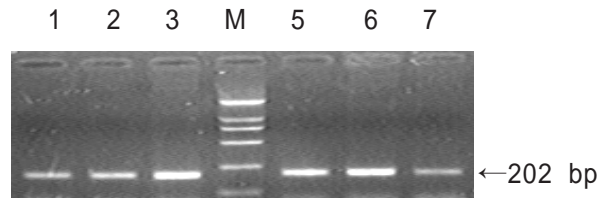


图 2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱

M 为 D2000 标准分子量; 1~6 均为 PCR 产物

2.3 SSCP 分析结果

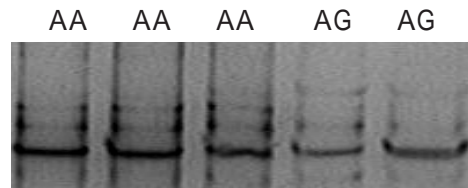


图 3 目的片段的 PCR-SSCP 分析结果

3 讨论

MSTN 与动物骨骼肌总量的调节有关,其功能的缺失会造成骨骼肌的异常肥大^[10]。在肉牛中, MSTN 的 3 个外显子上已发现 9 个影响氨基酸序列的变异,其中 6 个可导致“双肌”。近几年引进的“双肌臀”瘦肉型猪的后躯也十分发达,表现出类似肉牛的双肌现象^[11]。

MSTN 缺失除了影响骨骼肌发育外,还对脂肪沉积起抑制作用。这可能是由于肌肉和脂肪组织起源于相同的间充质干细胞, McPherron A C^[12] 通过实验证明了 MSTN 基因突变纯合体小鼠比对照组正常小鼠平均体脂肪减少 70%。关于 MSTN 调节脂肪代谢的机理,目前有 3 种假说: 它直接作用于脂肪组织,通过系统或在原地发挥作用; 骨骼肌中 MSTN 信号缺乏的间接效果,如肌生成抑制突变的骨骼肌组织可能改变能量代谢,防止体内脂肪的积累; 骨骼肌缺乏 MSTN 信号会影响假设的二级信使,它们由肌肉释放,作用于脂肪组织^[13]。

本研究发现朗德鹅 MSTN 基因外显子 3 第 1023 处存在多态性,发生了单碱基的改变 (A→G),但 MSTN 基因第 3 外显子的变异能否影响 MSTN 表达产物,还有待进一步研究。朗德鹅 MSTN 基因外显子 3 的多态性是否与脂重、腹脂率、体重、胸肌率尤其是肝脂率具有内在联系,尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Lin J, Arnold H B, Della-Fera M A, et al. Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decrease (下转第 102 页)

特定病原菌的寄主产生有害物质,通过竞争营养和空间等途径来减少病原菌的数量,从而减少病害发生。生物防治是目前国内外学者的研究热点,并将逐步成为农作物病虫害防治的重要手段之一。

2.6 嫁接

嫁接可减轻化感物质的毒害,如黄瓜和西瓜的根系分泌物对黄瓜和西瓜产生自毒作用,但对黑籽南瓜反而产生生长促进作用,因此,嫁接黑籽南瓜也是克服自毒作用的一种有效方法。吕卫光等采用云南黑子南瓜作砧木与丰产型黄瓜作接穗进行嫁接。结果表明:嫁接能促进连作黄瓜的生长,减轻黄瓜根结线虫病害,促进黄瓜根系对土壤养分的吸收,使黄瓜根际土壤电导率降低,减轻了由于土壤次生盐渍化所造成的盐害,提高黄瓜根际土壤微生物活性,对减轻黄瓜连作障碍,提高连作黄瓜的产量,具有一定的效果。

2.7 土壤消毒灭菌

土壤消毒可以杀死一些病菌和害虫。用化学药剂熏蒸土壤,可以防治土壤中的病菌、线虫,还能抑制杂草种子发芽。土壤消毒剂溴甲烷可有效杀灭土壤中的真菌、细菌、土传病害、昆虫、螨类和线虫等,减轻病虫害,提高产量。

2.8 烟雾剂熏蒸

烟雾剂熏蒸可有效减轻蔬菜病虫害危害,减少化学农药的残留。在温室内部用硫磺粉拌锯末点燃进行烟雾熏蒸,可防治白粉虱、红蜘蛛及白粉病等。当前使用的烟雾剂由农药原药和发热剂、助燃剂等采用特殊方式配制而成。点燃后农药均匀受热,烟雾能均匀分布于植物表面,起到杀菌防虫的作用。

2.9 蒸汽消毒

蒸汽消毒法可通过高压密集的蒸汽,杀死土

壤中的有害生物,改善土壤团粒结构,提高土壤通透性和排水性,无污染。蒸汽消毒的方法有地表覆膜消毒法、埋设地下管道法以及负压消毒法。也可利用专用土壤消毒的可移动全自动蒸汽消毒机。

参考文献:

[1] 李文庆,张民,李海峰. 大棚土壤硝酸盐状况研究[J]. 土壤学报, 2002(2): 283-287.

[2] 何传龙,徐继平,王世祥,等. 大棚土壤障碍因子形成及调控技术的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2003, 31(6): 10-40.

[3] 胡承孝. 武汉市菜园土硝酸盐的持留和运移[J]. 土壤通报, 1993, 24(3): 118-120.

[4] 张春兰,张耀东,朱建春,等. 施用稻草对防治保护地土壤盐渍化的作用[J]. 土壤, 1994(3): 146-148.

[5] 郭文忠,刘声锋,李丁仁,等. 设施蔬菜土壤次生盐渍化发生机理的研究现状与展望[J]. 土壤, 2004, 36(1): 25-29.

[6] 刘德,吴凤芝. 哈尔滨市郊蔬菜大棚土壤盐分状况及其影响[J]. 北方园艺, 1998(6): 1-3.

[7] 陈晓红,邹志荣. 温室蔬菜连作障碍研究现状及防治措施[J]. 陕西农业科学, 2002(12): 16-17, 20.

[8] 童有为,陈淡飞. 温室土壤次生盐渍化的形成和治理途径研究[J]. 园艺学报, 1991, 18(2): 159-162.

[9] 吴凤芝,赵凤艳,刘元英. 设施蔬菜连作障碍原因综合分析与防治措施[J]. 东北农业大学学报, 2000, 31(3): 241-247.

[10] 孙令强,耿广东,王倩,等. 设施蔬菜土壤次生盐渍化及其克服对策[J]. 蔬菜, 2004(12): 22-23.

[11] 唐咏,梁成华,刘志恒,等. 日光温室蔬菜栽培对土壤微生物和酶活性的影响[J]. 沈阳农业大学学报(自然科学版), 1999, 30(1): 16-19.

[12] 殷永娟,张春兰,姚惠琳. 增施秸秆对蔬菜保护地土壤微生物的影响[J]. 土壤通报, 1996(5): 1108-1115.

[13] 郑军辉,叶素芬,喻景权. 蔬菜作物连作障碍产生原因及生物防治[J]. 中国蔬菜, 2004(3): 56-58.

[14] 吕卫光,张春兰,袁飞,等. 嫁接减轻设施黄瓜连作障碍机制初探[J]. 华北农学报, 2000, 15(增刊): 153-156.

(上接第 31 页)

adipogenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 291(3): 701-706.

[2] Thomas M, Langley B, Berry C, et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation[J]. Biol. Chem, 2000, 275: 40235-40243.

[3] 刘铮铸,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.

[4] 刘娣,刘和平,张向吉,等. 抑肌素基因研究进展[J]. 畜牧兽医杂志, 2000, 19(1): 13.

[5] 李兴美,范巍,张彬,等. 鲤鱼肌肉生长抑制素基因(MSTN)的克隆及其组织表达特征[J]. 水生生物学报, 2007, 31(5): 643-648.

[6] 刘铮铸,李祥龙,巩元芳,等. 山羊肌肉生长抑制素(MSTN)基因 HphI 酶切多态性分析[J]. 中国兽医学报, 2007, 27(4): 591-594.

[7] 姜运良,李宁,杜立新,等. 猪肌肉生长抑制素基因 5' 调控

区 T→A 突变与生长性状的关系分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(5): 413-416.

[8] 胡兰,郭东新,胡锐,等. 大骨鸡中 MSTN 基因表达规律性的研究[J]. 动物科学与动物医学, 2003, 20(11): 42-44.

[9] 张增荣,朱庆. 肌肉生长抑制素(MSTN)基因的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2007(1): 19-21.

[10] Lee SJ, McPherron A C. Myostatin and the control of skeletal muscle mass[J]. Curr Opin Genet Dev, 1999, 9(5): 604-607.

[11] 刘铮铸,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.

[12] McPherron A C, Lee S J. Suppression of body fat accumulation in Myostatin-deficient mice[J]. Clin Invest, 2002, 109(5): 595-601.

[13] Bogdanovich S, Krag TOB, Barton E R, et al. Functional improvement of dystrophic muscle by Myostatin blockade[J]. Nature, 2002, 420(6914): 418-421.