

刘宏祥, 徐文娟, 宋卫涛, 等. 高邮鸭群体 *MSTN*、*MyoD1* 和 *MyoG* 基因外显子中 SNP 位点的分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 604-612.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.03.023

高邮鸭群体 *MSTN*、*MyoD1* 和 *MyoG* 基因外显子中 SNP 位点的分析

刘宏祥, 徐文娟, 宋卫涛, 朱文奇, 胡艳, 姬改革, 李慧芳
(江苏省家禽科学研究所, 江苏 扬州 225125)

摘要: *MSTN*、*MyoD1* 和 *MyoG* 基因与禽类骨骼肌的生长发育密切相关。本试验以高邮鸭为素材, 对 *MSTN*、*MyoD1* 和 *MyoG* 3 个基因的外显子单核苷酸多态性(SNP)位点进行了鉴定, 并对这些位点对蛋白质的影响及群体遗传信息进行了分析。结果显示, *MSTN*、*MyoD1* 和 *MyoG* 3 个基因的外显子分别有 9 个、4 个和 7 个 SNP 位点, 其中具有中度多态的位点分别为 8 个、1 个和 5 个, 有义突变各 1 个, 这些有义突变均改变了相应蛋白质的理化性质以及二级结构。

关键词: *MSTN*; *MyoD1*; *MyoG*; 外显子; 单核苷酸多态性; 鸭

中图分类号: S834+.89 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2015)03-0604-09

Analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exons of *MSTN*, *MyoD1* and *MyoG* genes of Gaoyou duck

LIU Hong-xiang, XU Wen-juan, SONG Wei-tao, ZHU Wen-qi, HU Yan, JI Gai-ge, LI Hui-fang
(*Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225125, China*)

Abstract: There are strong relations between *MSTN*, *MyoD1*, *MyoG* genes and development of skeletal muscle. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the exons of *MSTN*, *MyoD1* and *MyoG* genes of Gaoyou duck were detected, and their influences on proteins and population genetics information were studied. There were nine, four SNPs and seven SNPs in the exons of *MSTN*, *MyoD1* and *MyoG* genes, respectively, among which, eight, one and five SNPs were moderate polymorphic. One sense mutation detected in each gene changed the protein physico-chemical characteristics and second structure.

Key words: *MSTN*; *MyoD1*; *MyoG*; exon; single nucleotide polymorphism (SNP); duck

动物机体的生长是一个复杂的生理过程, 对肌肉生长具有调节作用的因子很多, 其中重要的有 *MRFs* (Muscle regulation factors) 家族的 *MyoD1* 基因^[1]、*MyoG* 基因, 它们对肌肉生长具有正向调节功

能; 而 *TGFβ* 家族中的 *MSTN* 基因对肌肉生长具有负调控作用, 其功能的缺失在哺乳动物中能够引起肌肉的显著增大^[2-4]。

具有编码蛋白质功能的基因在 DNA 水平上的碱基序列变化将传递给蛋白质, 而蛋白质序列的改变将影响蛋白质二级结构以及高级结构, 甚至改变蛋白质的功能。基因组水平上的单个核苷酸的变异(SNP)在染色体上数量多、分布广, 而且能够稳定遗传。因此在动物遗传育种中, 对功能基因, 尤其直接编码蛋白质的外显子部分的 SNP 研究具有重要意义。

已有多个研究报道了哺乳动物(比如牛^[3, 5]、小

收稿日期: 2014-12-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172194); 江苏省科技支撑计划项目(BE2011329、BE2012460); 现代农业品种创新项目[CX(11)1030]

作者简介: 刘宏祥(1985-), 男, 江苏扬州人, 硕士, 主要从事家禽遗传育种与资源保护研究。(Tel) 13665203762; (E-mail) liuhongxiangzai@163.com

鼠^[6]、绵羊^[7-8]、狗^[9]) *MSTN* 基因外显子的错义突变导致了机体肌肉的显著增长。张跟喜等^[10]在 2011 年对边鸡的 *MSTN* 基因外显子 1 进行了 SNP 筛查,发现一个对边鸡生长有显著效应的 SNP 位点。

高邮鸭属于肉蛋兼用型地方品种,经过多年选育,目前高邮鸭群体性能已基本稳定。本试验运用单重 PCR 方法对高邮鸭群体的 *MSTN*、*MyoDI* 和 *MyoG* 3 个基因的外显子分别进行了 SNP 筛查,并分析筛查到有益突变导致氨基酸变化以及对蛋白质二级结构的影响,为高邮鸭群体后期的分群以及开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

高邮鸭试验群体来源于江苏省高邮鸭集团,性成熟时从群体中随机选择 30 个体质量差异较小的个体进行试验。

1.2 主要仪器和试剂

主要仪器有:PCR 仪(型号:Gene Amp PCR,厂

家:Norwalk, CT. 06859 USA)、电泳仪(型号:JY600+,厂家:北京君意东方电泳设备有限公司)、全自动紫外与可见分析装置(型号:FR-200A,厂家:上海复日科技有限公司)、生物电泳图像分析系统(厂家:上海复日科技有限公司)。

主要试剂有:PCR 引物(由上海瀚宇生物工程有限公司合成,PAGE 级纯化)、PCR 反应试剂(上海有渔生物工程有限公司提供)。

1.3 DNA 的提取

对 30 个高邮鸭个体翅静脉采血,用酚-氯仿法抽提 DNA 并溶于超纯水中。将 DNA 原液 1:100 稀释并进行分光光度计检测,OD 值为 1.85~1.94。

1.4 引物设计

分别在 *MSTN* 基因 3 个外显子、*MyoDI* 基因 4 个外显子、*MyoG* 基因 5 个外显子区域附近设计合适的引物,其中 *MSTN*、*MyoDI* 和 *MyoG* 基因分别设计了 4、4 和 3 对引物。具体信息见表 1。

表 1 针对 *MSTN*、*MyoDI* 和 *MyoG* 基因外显子区域设计的引物

Table 1 The primers for the exons of *MSTN*, *MyoDI* and *MyoG* genes

基因	外显子	引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)	产物长度(bp)
<i>MSTN</i>	外显子 1	P1-1	F: CCTTGGAAATATATAAGGTACACCAG R: CCTGAGCAGGAGTTGTGTG	56	600
		P1-2	F: TTTGCCGTAGAGCGTAAAGC R: GCAAAGAGCGAAAGAATTGG	56	691
	外显子 3	P1-3	F: TGATTTGATAGTTTGTGTACAGAGA R: TGTTGAAACCTGCCGTATGGA	56	816
		P1-4	F: TGTCAACCACTGGGAAAAGA R: AACATCATTCTTTTCTGTGATGAA	56	828
<i>MyoDI</i>	外显子 1	P2-1	F: CATCGTATTCCCCATTGACA R: AACAGTGA CTCTCCCTAACCA	56	385
		P2-2	F: GGGTCTGTAGTTGGGAATG R: GAGGACGTACGCCAGCAG	59	838
	外显子 3	P2-3	F: GGAGGGGAGGCAAGTTAAGA R: GCTGTAACGCATCCCCATAC	56	474
		P2-4	F: TGTCTATAATTGGCATCCTTCA R: GCACAACAAACCAAGCAACA	56	922
<i>MyoG</i>	外显子 1	P3-1	F: GATGCGAGGAAGCAGCTTAG R: GGGAGGGGCACACTTTTATT	62	973
	外显子 2,3	P3-2	F: ATGGCAGTCCAGCTAC R: AGCTGAGCTGCCAAACCTC	56	454
		P3-3	F: TGGGCATTGTGCTGCTGTGA R: CGCCGGAGGGATAAATAGGA	59	1 084

1.5 PCR 产物扩增与测序

PCR 反应体系为 20 μl , 其中包括: 1.0 μl 模板 (50 ng)、2.0 μl Buffer 缓冲液 (1 \times)、0.6 μl 镁离子 (2 mmol/L)、2.0 μl dNTP (2 mmol/L)、0.2 μl Taq 酶 (1 U)、2.0 μl 引物混合液 (0.5 pmol/L), 余下用 H_2O 补足。PCR 反应条件为: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^\circ\text{C}$ 30 s, 按照表 1 中的退火温度退火 1 min 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 共 40 个循环; 最后 72 $^\circ\text{C}$ 后延伸 10 min。PCR 产物用 3% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测扩增效果。最后对产物进行纯化, 并送由上海翼和应用生物技术有限公司测序。

1.6 统计分析

1.6.1 多态信息含量 (PIC) $PIC = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2P_i P_j$, 其中 P_i 、 P_j 分别为第 i 、 j 个等位基因频率, n 为等位基因个数。

1.6.2 有效等位基因数 $NE = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2$, 其中 P_i 为某一位点上第 i 个等位基因的频率, n 为等位基因个数。

1.6.3 Hardy-Weinberg 平衡检验 假设某群体的某一位点等位基因有 A、B 两种, 其等位基因频率分别为 p 、 q 。该群体基因型有 AA、AB、BB 3 种, 基因型频率分别记为 D 、 H 和 R 。根据观测到的基因型频率, 可以计算出等位基因频率:

$$p = D + H/2, q = R + H/2$$

根据等位基因频率, 可以计算出理论的基因型频率:

$$D' = p^2, H' = 2pq, R' = q^2$$

根据样本含量、观测基因型频率和理论基因型频率, 可以分别计算出观测基因型频数和理论基因型频数。通过卡方检验:

$$\chi^2 = (D - D')^2 / D' + (H - H')^2 / H' + (R - R')^2 / R'$$

计算出卡方值。如果卡方值对应的概率大于 0.05, 那么可以认为该等位基因处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

1.6.4 蛋白质理化性质分析 利用 ExPASy 网站中的 ProtParam 服务器 (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/>) 在线计算 MSTN、MyoD1 和 MyoG 蛋白质的理论等电点、分子量、正负电位氨基酸数目、不稳定系数、蛋白质亲水性及脂肪族氨基酸指数等理化性质。

1.6.5 蛋白质二级结构的预测 蛋白质二级结构是一级结构和三级结构之间的纽带, 也是通过一级结构预测三级结构的关键步骤^[11]。对 MSTN、MyoD1 和 MyoG 基因的外显子突变情况进行了筛查, 发现 3 个基因各有 1 个有义突变导致了氨基酸的变化。SSPro 4.0 (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu>) 可以使用神经网络与同源分析混合进行蛋白质二级结构预测^[12], 预测的结果较为准确可靠, 因此本试验使用该服务器作为蛋白质二级结构预测的工具。

2 结果与分析

2.1 MSTN、MyoD1 和 MyoG 3 个基因外显子突变位点分析

扩增产物经测序、对比, MSTN 外显子中发现 9 个 SNP 位点, 编号为 SNP1-1 ~ SNP1-9, 具体信息见表 2。SNP1-1 ~ SNP1-5 位于 CDS 区, 其中 SNP1-1 导致了甘氨酸 (G) 到丝氨酸 (S) 的变化, 其余为沉默突变。SNP1-6 ~ SNP1-9 位于非 CDS 区。

MyoD1 外显子中共发现 4 个 SNP 位点, 编号为 SNP2-1 ~ SNP2-4。这 4 个 SNP 位点均处于 CDS 区, 其中 SNP2-1 导致了蛋氨酸 (M) 向亮氨酸 (L) 的转变, 其他 3 个 SNP 位点均为沉默突变。

MyoG 外显子中共发现了 7 个 SNP 位点, 编号为 SNP3-1 ~ SNP3-7。这 7 个 SNP 位点均处于 CDS 区, 其中 SNP3-7 为有义突变, 导致谷氨酸 (E) 到天冬氨酸 (D) 的变化, 其余均为沉默突变。

2.2 MSTN、MyoD1 和 MyoG 3 个基因外显子的遗传多样性

对 30 个高邮鸭个体的 MSTN、MyoD1 和 MyoG 基因的基因型频率以及基因频率分别进行了统计, 统计结果分别见表 3、表 4 和表 5。

根据各个 SNP 位点的基因型分布情况, 对各个位点进行了 Hardy-Weinberg 平衡检验, 结果见表 6。MSTN 基因外显子所有突变位点均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态; MyoD1 基因突变位点 SNP2-2、SNP2-3 和 SNP2-4 均不处于 Hardy-Weinberg 平衡状态; MyoG 基因突变位点 SNP3-2、SNP3-3 和 SNP3-5 均不处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

表 2 *MSTN*、*MyoDI* 和 *MyoG* 基因突变位点Table 2 SNPs of *MSTN*, *MyoDI* and *MyoG* genes

基因	SNP 位点	外显子	杂合子类型	氨基酸变化	编码子位置	氨基酸位置	优势碱基
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-1</i>	外显子 1	GA	GGC/AGC(G/S)	1	26	A
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-2</i>	外显子 1	GA	ACG/ACA(T)	3	43	A
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-3</i>	外显子 1	CT	GAC/GAT(D)	3	108	C
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-4</i>	外显子 3	AG	GTA/GTG(V)	3	327	G
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-5</i>	外显子 3	CA	GGC/GGA(G)	3	334	A
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-6</i>	外显子 3	TC		非 CDS 区		CT
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-7</i>	外显子 3	GT		非 CDS 区		G
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-8</i>	外显子 3	AC		非 CDS 区		A
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-9</i>	外显子 3	AC		非 CDS 区		C
<i>MyoDI</i>	<i>SNP2-1</i>	外显子 1	AC	ATG/CTG(M/L)	1	4	A
<i>MyoDI</i>	<i>SNP2-2</i>	外显子 4	GA	GAG/GAA(E)	3	190	G*
<i>MyoDI</i>	<i>SNP2-3</i>	外显子 4	TC	ACT/ACC(T)	3	207	T*
<i>MyoDI</i>	<i>SNP2-4</i>	外显子 4	TC	CCT/CCC(P)	3	247	T*
<i>MyoG</i>	<i>SNP3-1</i>	外显子 1	CT	CTG/TTG(L)	1	43	C
<i>MyoG</i>	<i>SNP3-2</i>	外显子 1	GC	GTG/GTC(V)	3	79	G*
<i>MyoG</i>	<i>SNP3-3</i>	外显子 1	CG	CGC/CGG(R)	3	132	C*
<i>MyoG</i>	<i>SNP3-4</i>	外显子 3	CT	CAC/CAT(H)	3	157	CT
<i>MyoG</i>	<i>SNP3-5</i>	外显子 4	GA	ACG/ACA(T)	3	187	G*
<i>MyoG</i>	<i>SNP3-6</i>	外显子 5	GA	TCG/TCA(S)	3	203	G
<i>MyoG</i>	<i>SNP3-7</i>	外显子 5	GC	GAG/GAC(E/D)	3	222	C

氨基酸变化栏中括号前的字母表示三联密码子的变化情况,括号中的字母表示氨基酸的变化情况;编码子位置栏中数字表示三联密码子中发生突变的碱基在密码子中的位置,非 CDS 区表示该突变不在 CDS 区中;优势碱基表示在突变位点的 2 个等位碱基在群体中出现频率较大的碱基;* 表示该位点的 2 个碱基在群体中的分布不符合 Hardy-Weinberg 平衡。

表 3 *MSTN* 基因 SNP 位点的群体信息Table 3 The population information about SNPs of *MSTN* gene

SNP 位点	等位基因型频率			等位基因频率	
	AA	AG	GG	A	G
<i>SNP1-1</i>	0.63(17)	0.33(9)	0.04(1)	0.80	0.20
<i>SNP1-2</i>	0.67(18)	0.30(8)	0.04(1)	0.81	0.19
<i>SNP1-3</i>	0.96(26)	0.04(1)	0(0)	0.98	0.02
<i>SNP1-4</i>	0.14(4)	0.43(12)	0.43(12)	0.36	0.64
<i>SNP1-5</i>	0.43(12)	0.43(12)	0.14(4)	0.64	0.36
<i>SNP1-6</i>	0.29(8)	0.43(12)	0.29(8)	0.50	0.50
<i>SNP1-7</i>	0.46(13)	0.43(12)	0.11(3)	0.68	0.32
<i>SNP1-8</i>	0.46(13)	0.43(12)	0.11(3)	0.68	0.32
<i>SNP1-9</i>	0.21(6)	0.46(13)	0.32(9)	0.45	0.55

括号内数字表示该等位基因型在检测群体中的观测个数。粗体表示有义突变。

表 4 *MyoD1* 基因 SNP 位点的群体信息Table 4 The population information about SNPs of *MyoD1* gene

SNP 位点	等位基因型频率			等位基因频率	
	AA	AC	CC	A	C
SNP2-1	0.90(27)	0.10(3)	0(0)	0.95	0.05
SNP2-2	0.29(7)	0.04(1)	0.67(16)	0.31	0.69
SNP2-3	0.08(2)	0.13(3)	0.79(19)	0.15	0.85
SNP2-4	0.13(3)	0(0)	0.88(21)	0.13	0.88

括号内数字表示该基因型在检测群体中的观测个数。粗体表示有义突变。

表 5 *MyoG* 基因 SNP 位点的群体信息Table 5 The population information about SNPs of *MyoG* gene

SNP 位点	等位基因型频率			等位基因频率	
	CC	CT	TT	C	T
SNP3-1	0.86(25)	0.14(4)	0(0)	0.93	0.07
SNP3-2	0.10(3)	0.34(10)	0.55(16)	0.28	0.72
SNP3-3	0.45(13)	0.34(10)	0.21(6)	0.62	0.38
SNP3-4	0.33(7)	0.33(7)	0.33(7)	0.50	0.50
SNP3-5	0.87(13)	0.13(2)	0(0)	0.93	0.07
SNP3-6	0.07(1)	0.40(6)	0.53(8)	0.27	0.73
SNP3-7	0.40(6)	0.27(4)	0.33(5)	0.53	0.47

括号内数字表示该等位基因型在检测群体中的观测个数。粗体表示有义突变。

根据等位基因频率计算出群体各个基因突变位点的多态信息含量(PIC)以及有效等位基因数(表6)。PIC值介于0.25和0.50之间为中度多态,可知MSTN基因外显子除了SNP1-3外,其他位点均为中度多态;MyoD1基因第4外显子的1个突变位点SNP2-2为中度多态,MyoG基因突变位点SNP3-2、SNP3-3、SNP3-4、SNP3-6和SNP3-7为中度多态;所

有其他突变位点均为低度多态。对于有效等位基因数,MSTN基因SNP1-3位点,MyoD1基因SNP2-1位点、SNP2-3位点和SNP2-4位点,MyoG基因SNP3-1位点和SNP3-5位点有效等位基因数均不超过1.4,与理论等位基因数2.0有较大差异,即这些位点遗传变异较小。有效等位基因数的分析结果与多态信息含量的结果相似。

表 6 *MSTN*、*MyoD1* 和 *MyoG* 3 个基因的遗传多样性Table 6 Genetic diversity of *MSTN*, *MyoD1* and *MyoG* genes

基因	SNP 位点	多态信息含量 (<i>PI</i> C)	有效等位基因数 (<i>N_e</i>)	哈代-温伯平衡 (Hardy-Weinberg)
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-1</i>	0.271 8	1.480 2	0.99
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-2</i>	0.256 2	1.432 2	1.00
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-3</i>	0.035 7	1.037 7	1.00
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-4</i>	0.353 8	1.849 1	0.94
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-5</i>	0.353 8	1.849 1	0.94
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-6</i>	0.375 0	2.000 0	0.75
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-7</i>	0.341 1	1.773 8	1.00
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-8</i>	0.341 1	1.773 8	1.00
<i>MSTN</i>	<i>SNP1-9</i>	0.372 1	1.977 3	0.95
<i>MyoD1</i>	<i>SNP2-1</i>	0.090 5	1.105 0	0.96
<i>MyoD1</i>	<i>SNP2-2</i>	0.337 4	1.753 4	0*
<i>MyoD1</i>	<i>SNP2-3</i>	0.218 1	1.331 8	0.05*
<i>MyoD1</i>	<i>SNP2-4</i>	0.194 8	1.280 0	0*
<i>MyoG</i>	<i>SNP3-1</i>	0.120 2	1.147 3	0.92
<i>MyoG</i>	<i>SNP3-2</i>	0.319 7	1.665 3	0*
<i>MyoG</i>	<i>SNP3-3</i>	0.360 0	1.889 9	0*
<i>MyoG</i>	<i>SNP3-4</i>	0.375 0	2.000 0	0.31
<i>MyoG</i>	<i>SNP3-5</i>	0.116 7	1.142 1	0*
<i>MyoG</i>	<i>SNP3-6</i>	0.314 6	1.642 3	1.00
<i>MyoG</i>	<i>SNP3-7</i>	0.373 9	1.991 2	0.13

粗体表示有义突变。

2.3 突变导致的蛋白质理化性质的改变

MSTN、*MyoD1* 和 *MyoG* 野生型蛋白质及突变型蛋白质的理化性质分析结果见表 7。*MSTN* 突变型蛋白质与野生型蛋白质相比,除了分子量变化之外,其不稳定系数变大(由 44.80 变为 45.83),亲水性变强(疏水性指数由-0.405 变为-0.406),其他如理

论等电点、正负电位点数以及脂肪族系数均没有变化。*MyoD1* 突变型蛋白质与野生型蛋白质相比,分子量变小,亲水性变弱(疏水性指数由-0.917 变为-0.910),脂肪族系数变大。*MyoG* 突变型蛋白质与野生型蛋白质相比,除了分子量变小之外,其理论等电点与不稳定系数均变小,疏水性没有变化。

表 7 蛋白质理化性质

Table 7 Protein physico-chemical properties

蛋白质	分子量	理论等电点	正电位点数	负电位点数	不稳定系数	总平均疏水性	脂肪族系数
<i>MSTN</i> -RAW	42 817.1	6.27	46	48	44.80	-0.405	80.83
<i>MSTN</i> -SNP	42 847.1	6.27	46	48	45.83	-0.406	80.83
<i>MyoD1</i> -RAW	28 133.1	6.94	29	30	74.85	-0.917	56.15
<i>MyoD1</i> -SNP	28 115.1	6.94	29	30	74.85	-0.910	57.70
<i>MyoG</i> -RAW	25 793.0	5.19	27	36	67.37	-0.640	75.68
<i>MyoG</i> -SNP	25 779.0	5.18	27	36	65.93	-0.640	75.68

RAW 表示野生型,SNP 表示突变型。

2.4 突变导致蛋白质二级结构的变化

2.4.1 MSTN 蛋白质二级结构的变化 *MSTN* 基因外显子 1 中筛查到的有义突变导致了第 26 位氨基酸由甘氨酸到丝氨酸的变化。通过软件分析, *MSTN* 蛋白质在 5~8 位置由折叠变成了螺旋, 在 17~18

位置、19~22 位置由卷曲变成了螺旋, 在 136、190 位置由卷曲变成了折叠(图 1)。折叠、螺旋、卷曲的比例由野生型的 26.13%、15.73%、58.14% 分别变成突变型的 25.87%、18.13%、56.00%。

```

MSTN-RAW: CCHH[EEEE]HHHHHHHH[CC]CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHH (1~54)
MSTN-SNP: CCHH[HHHH]HHHHHHHH[HC]HHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHH (1~54)
MSTN-RAW: HHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHCCCCCCCCC (55~108)
MSTN-SNP: HHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHCCCCCCCCC (55~108)
MSTN-RAW: CCCCCCEEEEECCCCCCCCCCCC[CE]EEEECCCCCCCCCHHEEEEEEEEC (109~162)
MSTN-SNP: CCCCCCEEEEECCCCCCCCCCCC[CE]EEEECCCCCCCCCHHEEEEEEEEC (109~162)
MSTN-RAW: CCCCCCEEEEEEECCCCCCCCCCCC[CE]EEEECCCCCEEEEECHHHHHHC (163~216)
MSTN-SNP: CCCCCCEEEEEEECCCCCCCCCCCC[CE]EEEECCCCCEEEEECHHHHHHC (163~216)
MSTN-RAW: CCCCCCEEEEEEECCCCCCCC[CE]EEEECCCCCEEEEECCCCCCCCCCCC (217~270)
MSTN-SNP: CCCCCCEEEEEEECCCCCCCC[CE]EEEECCCCCEEEEECCCCCCCCCCCC (217~270)
MSTN-RAW: ECCCCCCEEEEECEEECHHCCCC[CE]EECEEECEEECECCCCCCCCCHHH (271~324)
MSTN-SNP: ECCCCCCEEEEECEEECHHCCCC[CE]EECEEECEEECECCCCCCCCCHHH (271~324)
MSTN-RAW: HHHHHHCCCCCCCC[CE]EEEEEEEEEEEECCCC[CE]EEEEEEEEEEEEEEEC (325~375)
MSTN-SNP: HHHHHHCCCCCCCC[CE]EEEEEEEEEEEECCCC[CE]EEEEEEEEEEEEEEEC (325~375)

```

RAW 表示野生型; SNP 表示突变型。黑色背景表示突变型与野生型蛋白质二级结构间有变化。H 表示螺旋, E 表示拉长的折叠股, C 表示卷曲。括号中的数字表示每一行最后的氨基酸在蛋白质中的位置。

图 1 *MSTN* 野生型与突变型蛋白质二级结构的比较
Fig. 1 The alignment of wild-type and mutated *MSTN* protein secondary structures

2.4.2 *MyoD1* 蛋白质二级结构的变化 *MyoD1* 基因外显子 1 中的有义突变导致了第 4 位氨基酸从蛋氨酸到亮氨酸的变化。通过软件分析, *MyoD1* 蛋白质在 4~5 位置由野生型的卷曲变成突变型的螺旋,

在 30 位置由野生型的折叠变成突变型的卷曲(图 2)。折叠、螺旋、卷曲的比例由野生型的 2.78%、26.98%、70.24% 分别变成突变型的 2.38%、27.78%、69.84%。

```

MyoD1 RAW: CCC[CC]CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC[CE]CCCCCCCCCHHHHHHHHHHHCCCCC (1~54)
MyoD1 SNP: CCC[HH]CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC[CE]CCCCCCCCCHHHHHHHHHHHCCCCC (1~54)
MyoD1 RAW: CHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHH (55~108)
MyoD1 SNP: CHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHH (55~108)
MyoD1 RAW: HHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC (109~162)
MyoD1 SNP: HHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC (109~162)
MyoD1 RAW: CCCCCCCCCCCCC[CH]HHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC (163~216)
MyoD1 SNP: CCCCCCCCCCCCC[CH]HHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC (163~216)
MyoD1 RAW: CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC[CE]EEEC (217~252)
MyoD1 SNP: CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC[CE]EEEC (217~252)

```

RAW 表示野生型; SNP 表示突变型。黑色背景表示突变型与野生型蛋白质二级结构间有变化。H 表示螺旋, E 表示拉长的折叠股, C 表示卷曲。括号中的数字表示每一行最后的氨基酸在蛋白质中的位置。

图 2 *MyoD1* 野生型与突变型蛋白质二级结构的比较
Fig. 2 The alignment of wild-type and mutated *MyoD1* protein secondary structures

2.4.3 *MyoG* 蛋白质二级结构的变化 *MyoG* 基因的第 5 外显子的一处突变导致了第 222 位氨基酸从谷氨酸到天冬氨酸的改变。通过软件分析, *MyoG* 蛋白质在 149、200、211 位置由野生型的螺

旋变成突变型的卷曲(图 3)。突变型的折叠所占比例 0.88% 没有变化, 螺旋、卷曲的比例分别从野生型的 30.40%、68.72% 变成突变型的 29.07%、70.04%。

MyoG RAW:	CCCECC	(1~54)
MyoG SNP:	CCCECC	(1~54)
MyoG RAW:	CCCCCCCCCHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	(55~108)
MyoG SNP:	CCCCCCCCCHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	(55~108)
MyoG RAW:	CCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	(109~162)
MyoG SNP:	CCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	(109~162)
MyoG RAW:	CCCHHHHHHHHHHH	(163~216)
MyoG SNP:	CCCHHHHHHHHHHH	(163~216)
MyoG RAW:	CCCCCCCCCCC	(217~227)
MyoG SNP:	CCCCCCCCCCC	(217~227)

RAW 表示野生型;SNP 表示突变型。黑色背景表示突变型与野生型蛋白质二级结构间有变化。H 表示螺旋,E 表示拉长的折叠股,C 表示卷曲。括号中的数字表示每一行最后的氨基酸在蛋白质中的位置。

图3 MyoG 野生型与突变型蛋白质二级结构的比较

Fig.3 The alignment of wild-type and mutated MyoG protein secondary structures

3 讨论

禽类肌肉组织肌纤维的数量在胚胎期即已确定^[13],出壳后主要是通过已有肌纤维的卫星细胞相互融合而变得粗大^[14]。肌纤维的形成与发育受到 *MRF* 家族基因的正向调控, *MyoD1* 基因能够将多种类型的细胞转换为成肌细胞并促进肌细胞融合成肌管^[15], *MyoG* 基因的表达可终止成肌细胞的增殖,促进单核成肌细胞融合成多核成肌细胞^[16-17]。作为肌肉的负调控因子, *MSTN* 可以抑制成肌细胞的增殖和分化^[18]。 *MSTN* 不仅可以下调 *MyoD1* 基因的表达^[19-20],而且还是 *MyoD1* 的下游靶基因^[21]。 *MSTN*、*MyoD1* 和 *MyoG* 基因三者对肌肉的调节是相互协调保持相对的平衡,因此开展 *MSTN*、*MyoD1* 和 *MyoG* 3 个基因的 SNP 位点筛查对于生长发育有重要的科学意义。

本研究发现高邮鸭群体 *MSTN*、*MyoD1* 和 *MyoG* 基因外显子中分别有 9、4 和 7 个 SNP 位点。其中 *MSTN* 基因的所有 7 个 SNP 位点均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。鸭 *MyoD1* 基因和 *MyoG* 基因的多态性报道较少。Xu 等在北京鸭群体中发现 *MSTN* 基因 CDS 区 129 位置有 1 个 T/C 突变^[22],与本试验发现的 *SNPI-2* 位点(CDS 区第 129 位置) A/G 突变一致。该突变位点 2 个等位基因在北京鸭上频率接近,而在高邮鸭中 A 等位基因为优势基因,这可能与鸭不同遗传背景有关。除了本试验筛查到的 *MSTN* 基因外显子中的 7 个 SNP 位点,其他研究者也发现了其他多个 SNP 位点^[23-25],说明 *MSTN* 基因的多态性位点在鸭上非常丰富。

寇洁等^[26]对鸭 *MyoD1* 基因外显子 1 进行多态性检测,发现 1 处 C/G 的突变引起了氨基酸的变化,并且导致鸭屠体腿肌率的显著增加。王琼等^[27]对优质肉鸡研究结果表明, *MyoG* 基因 5' 调控区存在影响肌纤维生长发育的 SNP 位点。这些说明 *MSTN*、*MyoD1* 和 *MyoG* 基因是影响禽类肌肉生长的潜在候选基因。

氨基酸的总平均疏水性可以体现蛋白质的亲疏水性质,数值越高代表疏水能力越强,数值为负值表明该蛋白质为亲水性蛋白质^[28]。本研究发现, *MyoD1* 突变蛋白质相比原始蛋白质,总平均亲水性变小,即疏水性变强,这可能对蛋白质的折叠以及功能的发挥有一定的影响。蛋白质的不稳定系数小于 40,该蛋白质可认为是稳定的;不稳定系数大于 40,那么该蛋白质为不稳定蛋白质^[29]。 *MSTN*、*MyoD1* 和 *MyoG* 野生型蛋白质和突变型蛋白质不稳定系数均大于 40,说明这些蛋白质均为不稳定蛋白质,在动物机体内的半衰期时间较短。

基因外显子水平上的有义突变可以影响蛋白质的二级结构。本试验涉及的 3 个基因各有 1 处有义突变,通过蛋白质二级结构预测发现,这些有义突变导致的氨基酸变化均影响了蛋白质的二级结构。其中 *MSTN* 蛋白质 2 处连续的折叠和无规则卷曲均变成了螺旋结构; *MyoD1* 蛋白质 1 处无规则卷曲变成了螺旋结构,1 处折叠变成了无规则卷曲; *MyoG* 蛋白质 3 处螺旋结构均变成了无规则卷曲。

参考文献:

- [1] RUDNICKI M, SCHNEGELBERG P, STEAD R, et al. MyoD or

- Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle[J]. *Cell*, 1993, 75(7): 1351-1359.
- [2] GROBET L, MARTIN L, PONCELET D, et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle[J]. *Nature Genetics*, 1997, 17(1): 71-74.
- [3] KAMBADUR R, SHARMA M, SMITH T. Mutations in myostatin (GDF8) in double muscled Belgian blue and Piedmontese cattle [J]. *Genome Research*, 1997(7): 910-916.
- [4] WHITTEMORE L, SONG K, LI X, et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 300(4): 965-971.
- [5] MCPHERRON A C, LEE S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997(94): 12457-12461.
- [6] NISHI M, YASUE A, NISHIMATU S, et al. A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 293(1): 247-251.
- [7] 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]. *Nature Genetics*, 2006, 38: 813-818.
- [8] BOMAN I A, KLEMETS DAL G, NAFSTAD O, et al. Impact of two myostatin (MSTN) mutations on weight gain and lamb carcass classification in Norwegian white sheep (*Ovis aries*) [J]. *Genetics Selection Evolution*, 2010, 42(1): 4.
- [9] MOSHER D S, QUIGNON P, BUSTAMANTE C D, et al. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs[J]. *Plos Genetics*, 2007, 3(5): 779-785.
- [10] 张跟喜, 丁馥香, 是燕萍, 等. 肌肉生长抑制素基因 (MSTN) 外显子 1 的多态性及其与边鸡生长性状的关联分析[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(1): 122-127.
- [11] 王志新. 蛋白质结构预测的现状与展望[J]. *生命的化学*, 1998, 18(6): 19-22.
- [12] 吴祖建, 高芳鑫, 沈建国. 生物信息学分析实践[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [13] REMIGNON H, GARDAHAUT M F, MARCHE G, et al. Selection for rapid growth increases the number and the size of muscle fibres without changing their typing in chickens[J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 1995, 16(2): 95-102.
- [14] GROUNDS M D. Towards understanding skeletal muscle regeneration[J]. *Pathol Res Pract*, 1991, 187(1): 1-22.
- [15] WEINTRAUB H, TAPSCOTT S J, DAVIS R L, et al. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD[J]. *PNAS*, 1989, 86(14): 5434-5438.
- [16] NAIDU P S, LUDOLPH D C, TO R Q, et al. Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(5): 2707-2718.
- [17] OLSON E N, BRENNAN T J, CHAKRABORTY T, et al. Molecular control of myogenesis: antagonism between growth and differentiation[J]. *Mol Cell Biochem*, 1991, 104(1-2): 7-13.
- [18] JOULIA D, BERNARDI H, GARANDEL V, et al. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin[J]. *Experimental Cell Research*, 2003, 286(2): 263-275.
- [19] LANGLEY B, THOMAS M, BISHOP A. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(51): 49831-49840.
- [20] 阮井玲, 甄鑫, 刘娣, 等. Myostatin 通过 Smad3 下调 MyoD 的表达来抑制骨骼肌卫星细胞的分化[J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(5): 99-103.
- [21] SPILLER M P, KAMBADUR R, JEANPLONG F, et al. The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor *MyoD* [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(20): 7066-7082.
- [22] XU T S, GU L H, ZHANG X H, et al. Characterization of myostatin gene (MSTN) of Pekin duck and the association of its polymorphism with breast muscle traits[J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(3): 3166-3177.
- [23] LU J, HOU S, HUANG W, et al. Polymorphisms in the myostatin gene and their association with growth and carcass traits in duck [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(54): 11309-11312.
- [24] 卢俊清. 北京鸭肌肉生长抑制素基因 (MSTN) 多态性与骨骼肌和脂肪生长发育性状的关联性分析[D]. 中国: 中国农业科学院, 2008.
- [25] 刘倩, 陈永华, 蔡凤仙, 等. 高邮鸭生长抑制素基因外显子 3 多态性与腹脂率的关联分析[J]. *中国家禽*, 2012, 34(23): 27-30.
- [26] 寇洁, 李亮, 王继文. 5 个鸭品种 *MyoD* 基因外显子 1 的多态性及其与屠宰性状的关联分析[J]. *中国畜牧杂志*, 2011, 47(19): 10-12.
- [27] 王琼, 刘益平, 蒋小松, 等. *MyoG* 基因多态性与优质肉鸡屠宰性状和肉质性状的相关性分析[J]. *遗传*, 2007, 29(9): 1089-1096.
- [28] 薛庆中. DNA 和蛋白质序列数据分析工具[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2012.
- [29] WALKER J M. The proteomics protocols handbook[M]. Totowa: Humana Press, 2005.

(责任编辑: 袁伟)