

金崇富, 杨智青, 陈长宽, 等. 盐城地方鸡 *MSTN* 基因外显子 1 多态性及其与生产性能的相关性分析[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(6):1372-1376.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.06.027

## 盐城地方鸡 *MSTN* 基因外显子 1 多态性及其与生产性能的相关性分析

金崇富, 杨智青, 陈长宽, 陈应江, 侯福银, 时凯

(江苏沿海地区农业科学研究所, 江苏 盐城 224002)

**摘要:** 本研究以 *MSTN* 基因作为影响鸡生长性状和繁殖性状的候选基因, 采用 DNA 测序和 PCR-SSCP 技术分析 *MSTN* 基因单核苷酸多态性, 并与鸡的生产性能进行相关性分析。结果显示, 共发现 2 个 SNP 位点 (*G2100A* 和 *G2283A*), 其中 *G2283A* 位点 DD 基因型 16 周龄的体质量极显著高于 CC 基因型 ( $P < 0.01$ ), 并显著高于 CD 基因型 ( $P < 0.05$ ), CC 基因型 300 日龄产蛋数极显著的高于 DD 基因型 ( $P < 0.05$ )。 *G2100A* 位点 AA 和 AB 基因型的开产日龄显著早于 BB 基因型 ( $P < 0.05$ )。对基因型组合进行分析, 发现 AA×DD 基因型组合 16 周龄体质量、20 周龄体质量、300 日龄体质量最高, 可作为影响鸡生长性状的优秀基因型组合。

**关键词:** 鸡; 遗传多样性; *MSTN* 基因; 单核苷酸多态性

**中图分类号:** S831.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)06-1372-05

## Association of *MSTN* gene with growth and reproductive traits in Yancheng chicken

JIN Chong-fu, YANG Zhi-qing, CHEN Chang-kuan, CHEN Ying-jiang, HOU Fu-yin, SHI Kai

(Institute of Agricultural Sciences in the Coastal District of Jiangsu Province, Yancheng 224002, China)

**Abstract:** In this research, PCR-SSCP and DNA sequencing were used to detect the SNPs of *MSTN* gene in order to analyse their relationships with production traits in chicken. The results showed that two SNPs loci (*G2100A* and *G2283A*) were found. The body weight in DD genotype of *G2283A* was significantly higher than that of CC ( $P < 0.01$ ) and CD genotypes ( $P < 0.05$ ) at 16 weeks of age, and the number of eggs in CC genotype was significantly higher than that of the DD ( $P < 0.05$ ) at 300 days of age. The chickens in AA and AB genotypes of *G2100A* presented significant lower age at first egg than that of BB genotype ( $P < 0.05$ ). Combination of AA and DD genotypes can be considered as the dominant factors affecting chicken growth traits.

**Key words:** chicken; genetic diversity; *MSTN* gene; single nucleotide polymorphism (SNP)

McPherron 和 Lee<sup>[1]</sup> 于 1997 年首次在小鼠体内发现了肌肉生长抑制素基因, 命名为肌肉生长抑制

素 (*MSTN*), 又称 *GDF-8*。Sazanov 等<sup>[2]</sup> 在 1999 年将鸡的 *MSTN* 基因定位在 7p11, 张颖等、黄艳娜等对异育银鲫 *MSTN* 基因和猪 *MSTN* 基因进行了克隆和序列分析<sup>[3-4]</sup>。*MSTN* 通过与受体结合, 经过 Smad 蛋白的介导, 将信号传入细胞核, 作用于靶基因并调节肌肉生长<sup>[5]</sup>。目前关于 *MSTN* 基因的多态性及其与牛<sup>[6-8]</sup>、猪<sup>[9-10]</sup>、羊<sup>[11-12]</sup> 经济性状关联分析的报道较多, 而与鸡经济性状的关联分析报道较少。张跟

收稿日期: 2016-03-11

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目 (CX(14)5091)

作者简介: 金崇富 (1985-), 男, 江苏建湖人, 硕士, 助理研究员, 从事动物遗传育种与繁殖的研究。(Tel) 15189313501; (E-mail) jincf001@sina.com

通讯作者: 陈应江, (Tel) 13705102062; (E-mail) ycaasjin@163.com

喜<sup>[13]</sup>在 4 个鸡品种的 *MSTN* 基因中共检测到 17 个突变,其中 10 个突变位于 5'调控区,4 个突变位于外显子 1,3 个突变位于外显子 3,编码区的突变均未导致氨基酸的改变。其中边鸡 *MSTN* 基因 5'调控区 3 个位点以及外显子区 2 个位点对边鸡的生长性状具有显著或极显著的影响( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),由此推测 *MSTN* 基因可能是影响边鸡生长性状的主效基因或者是与主效基因相连锁的一个标记。

本研究拟以 *MSTN* 基因作为影响盐城地方鸡生长及繁殖性状的候选基因,利用 PCR-SSCP 及 DNA 测序技术,对 *MSTN* 基因多态性进行研究,了解 *MSTN* 基因在 3 种基因型胸肌、腿肌和卵巢中的表达情况,分析鸡不同组织中 *MSTN* 基因的表达差异,为鸡生长性状和繁殖性状标记的辅助选择积累数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

345 只母鸡选自江苏沿海地区农业科学研究所生态养殖基地,记录其生长及繁殖性状(开产日龄、开产体质量、开产蛋质量、300 日龄蛋质量、300 日龄产蛋数、300 日龄体质量、16 周龄体质量、18 周龄体质量、20 周龄体质量),采集翅静脉血样 1.5 ml,ACD 抗凝,于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下保存。利用 DNA 提取试剂盒法抽提基因组 DNA。

### 1.2 引物设计及 PCR 扩增

根据 GenBank 中鸡的 *MSTN* 基因序列(GenBank 登录号为 AF346599.2),利用 primer 3(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)在线软件设计 *MSTN* 基因外显子 1 的 4 对引物 P1~P4,此项工作由上海生工生物工程有限公司完成。引物的详细信息见表 1。

表 1 引物信息

Table 1 The information of the primers

引物	引物序列(5'→3')	退火温度(°C)	长度(bp)	位置
P1	F:GAGGACATGAGCCTAATCAA	57	172	Exon1
	R:TCACTGCATCTTTTTCGCCTTT			
P2	F:AGAAAAGGGGAAAGGGAGA	58	176	Exon1
	R:TCCGTCTTTTCAGCGTTCT			
P3	F:GGCTCTGGATGGCAGTAGTC	59	162	Exon1
	R:TCCCTGCTAATGTTAGGTGCT			
P4	F:GCATTAGCAGGGACGTTAT	56	186	Exon1
	R:GAAAGCAGCAGGGTGTGTA			

### 1.3 PCR 扩增

*MSTN* 基因 PCR 扩增体系包括:DNA 1.0  $\mu\text{l}$ 、10×Buffer 2.0  $\mu\text{l}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ (25.0 mmol/L) 2.2  $\mu\text{l}$ 、上下游引物(10.0 pmol/ $\mu\text{l}$ )各 1.0  $\mu\text{l}$ 、dNTPs(10.0 mmol/L) 0.8  $\mu\text{l}$ 、*Taq* DNA 聚合酶(2.0 U/L) 0.2  $\mu\text{l}$ 、ddH<sub>2</sub>O 11.8  $\mu\text{l}$ ,总体系共 20.0  $\mu\text{l}$ 。

*MSTN* 基因 PCR 反应步骤为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 6 min;变性 30 s,退火(温度见表 1)30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,循环 30 次,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min,10  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.4 PCR-SSCP 分析

将 2.5  $\mu\text{l}$  PCR 产物加入到 7.5  $\mu\text{l}$  的变性缓冲液中,98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 min,然后迅速冰浴 5 min。将变性好的 PCR 产物点样加入到 10% 的聚丙烯酰胺凝胶中,先在 250 V 电压下预电泳 10 min,再于 140 V 电压下电泳 8~24 h。电泳结束后,进行银染显色并拍照记录结果。

### 1.5 统计分析

所有统计分析均采用 SPSS 统计软件的 GLM (General linear model)过程完成,多重比较采用 LSD 法。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR-SSCP 结果

采用 PCR-SSCP 分析发现,P1、P3 2 对引物扩增片段中没有碱基突变,P2 引物扩增片段表现 3 种带型,定义为 AA、AB 和 BB(图 1),P4 引物扩增片段也显示 3 种带型,定义为 CC、CD 和 DD(图 2)。

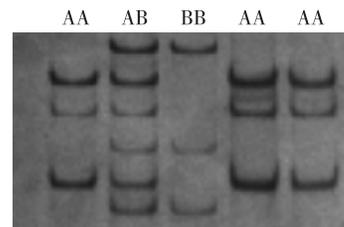


图 1 引物 P2 的 PCR SSCP 分析结果

Fig. 1 SSCP analysis of PCR amplified product using primer P2

### 2.2 序列分析结果

不同基因型的 PCR 产物片段测序结果发现,BB 型与 AA 型相比在 2 100 bp 处发生了 G→A 突变

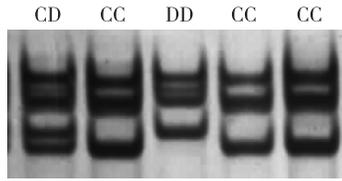


图 2 引物 P4 的 PCR SSCP 分析结果

Fig. 2 SSCP analysis of PCR amplified product using primer P4

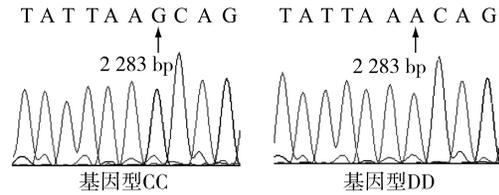


图 4 P4 引物扩增片段 CC 和 DD 型的序列比较

Fig. 4 Sequence alignment of MSTN gene of CC and DD genotypes using primer P4 in chickens

(图 3), DD 型与 CC 型相比在 2 283 bp 处发生了 G→A 突变(图 4)。

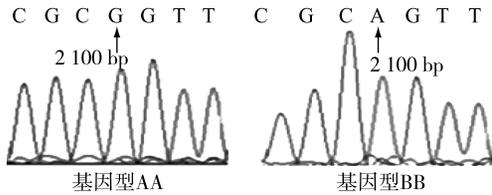


图 3 P2 引物扩增片段 AA 型和 BB 型的序列比较

Fig. 3 Sequence alignment of MSTN gene of AA and BB genotypes using primer P2 in chickens

### 2.3 MSTN 基因与生产性能的相关性

2.3.1 MSTN 基因 G2100A、G2283A 位点与生长性状的相关性 P2、P4 扩增产物的基因型与盐城地方母鸡生长性状的相关分析结果见表 2。由表 2 可知, P2 引物扩增产物 3 种基因型在 8 周龄、12 周龄、16 周龄、20 周龄和 300 日龄时体质量均差异不显著 ( $P>0.05$ )。P4 引物扩增产物 3 种基因型在 8 周龄、12 周龄、20 周龄和 300 日龄时体质量均差异不显著 ( $P>0.05$ ), 而在 16 周龄时 DD 基因型鸡的体质量极显著高于 CC 型 ( $P<0.01$ ), 并显著高于 CD 基因型 ( $P<0.05$ )。

表 2 G2100A、G2283A 位点基因型与生长性状的相关性

Table 2 Association of genotypes with growth performance at SNP loci G2100A and G2283A

多态位点	基因型	8 周龄体质量 (g)	12 周龄体质量 (g)	16 周龄体质量 (g)	20 周龄体质量 (g)	300 日龄体质量 (g)
G2100A	AA	486.76±11.78a	895.52±15.65a	1 135.06±17.40a	1 346.46±21.87a	1 774.68±33.32a
	AB	474.42±10.56a	881.06±16.92a	1 095.84±17.40a	1 320.10±21.87a	1 753.16±34.98a
	BB	501.25±22.49a	949.10±38.96a	1 137.32±32.70a	1 348.62±41.11a	1 840.10±63.22a
G2283A	CC	479.48±11.50a	895.19±19.01a	1 084.91±18.71abA	1 311.30±24.55a	1 784.72±40.15a
	CD	492.90±18.34a	912.60±38.96a	1 122.76±14.77aAB	1 336.41±19.38a	1 806.05±31.34a
	DD	502.60±33.34a	949.10±55.09a	1 198.98±35.42bB	1 387.82±46.47a	1 800.93±88.64a

同列数据相同多态位点中不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ), 同列数据相同多态位点中不同大写字母表示差异极显著 ( $P<0.01$ )。

2.3.2 MSTN 基因 G2100A、G2283A 位点与繁殖性状的相关性 P2、P4 扩增产物的基因型与盐城地方母鸡繁殖性状的相关分析见表 3。由表 3 可知, P2 引物扩增产物 3 种基因型在开产体质量、开产蛋质量、300 日龄蛋质量和 300 日龄产蛋数上均无显著性差异 ( $P>0.05$ ), 而 AA 和 AB 基因型的开产日龄显著早于 BB 基因型 ( $P<0.05$ )。P4 引物 3 种基因型母鸡间的开产体质量、开产蛋质量、开产日龄和 300 日龄蛋质量均无显著性差异 ( $P>0.05$ ), 而 CC 型个体 300 日龄的产蛋数显著高于 DD 基因型 ( $P<0.05$ )。

2.3.3 MSTN 基因 G2100A、G2283A 位点交互与生长性状的相关性 G2100A、G2283A 位点基因型组合对生长性状的交互效应见表 4。由表 4 可知, AA×DD 和 BB×DD 基因型组合在 16 周龄体质量极显著高于 AA×CC、AB×CD 和 BB×CC 基因型组合 ( $P<0.01$ ), 显著高于 AB×DD、AA×CD 基因型组合 ( $P<0.05$ )。AA×DD 基因型组合在 20 周龄体质量极显著高于 AB×CC 和 AB×DD 基因型组合 ( $P<0.01$ ), 显著高于 AA×CC、AA×CD、AB×CD、BB×CC 和 BB×CD 基因型组合 ( $P<0.05$ )。AA×DD 基因型组合在 300 日龄体质量显著高于 AA×CC 基因型组合 ( $P<0.05$ )。

表 3 *G2100A*、*G2283A* 位点基因型与繁殖性状的相关性Table 3 Association of genotypes with reproductive traits at SNP loci *G2100A* and *G2283A*

多态位点	基因型	开产体质量(g)	开产蛋质量(g)	开产日龄(d)	300日龄蛋质量(g)	300日龄产蛋数
<i>G2100A</i>	AA	1 571.88±26.14a	32.82±0.78a	172.08±1.51a	50.80±0.62a	94.43±1.82a
	AB	1 545.83±27.44a	32.69±0.65a	171.72±1.51a	49.84±0.64a	92.02±1.89a
	BB	1 653.22±49.60a	32.90±1.56a	178.87±2.83b	49.95±1.12a	89.29±3.31a
<i>G2283A</i>	CC	1 559.45±30.47a	32.35±0.73a	172.44±1.72a	49.79±0.71a	94.66±2.08b
	CD	1 591.73±23.78a	32.78±0.78a	173.39±1.36a	50.24±0.54a	92.05±1.56ab
	DD	1 566.22±67.27a	35.78±2.08a	175.08±3.26a	50.49±1.41a	84.78±4.10a

同列数据相同多态位点中不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

表 4 *G2100A*、*G2283A* 位点不同基因型组合与生长性状的相关性

Table 4 The relationship between different genotype combinations and growth traits

基因型组合	8周龄体质量(g)	12周龄体质量(g)	16周龄体质量(g)	20周龄体质量(g)	300日龄体质量(g)
AA×CC	473.21±10.24a	881.06±16.92a	1 097.86±29.54Aab	1 312.52±37.62ABa	1 727.28±58.18a
AA×DD	504.40±23.58a	949.10±38.96a	1 315.85±86.12Bb	1 534.83±77.56Bb	1 992.07±119.93b
AA×CD	483.29±7.73a	892.43±12.81a	1 137.00±22.24ABa	1 344.24±28.32ABa	1 790.41±43.08ab
AB×CC	479.48±11.50a	895.19±19.01a	1 066.73±30.45Aab	1 279.30±39.78Aab	1 722.39±61.93ab
AB×DD	473.70±16.67a	895.25±27.61a	1 096.17±49.73ABa	1 250.79±63.33Aab	1 711.54±107.21ab
AB×CD	474.12±7.99a	885.25±13.24a	1 106.00±23.44Aab	1 345.12±29.85ABa	1 816.85±47.97ab
BB×CC	479.69±15.97a	889.85±26.87a	1 055.74±49.72Aab	1 310.42±63.33ABa	1 786.74±97.92ab
BB×DD	502.60±33.34a	912.60±55.09a	1 294.76±60.90Bb	1 504.93±109.60ABb	1 985.28±169.61ab
BB×CD	461.57±14.09a	862.54±23.28a	1 156.23±46.04ABab	1 332.43±58.63ABa	1 844.35±90.66ab

同列数据不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ );同列数据不同大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ )。

2.3.4 *MSTN* 基因 *G2100A*、*G2283A* 位点交互与繁殖性状的相关性 *G2100A*、*G2283A* 位点基因型组合对繁殖性状的交互效应见表 5。由表 5 可知, BB×CD 基因型组合的开产日龄显著晚于 AA×CD 和 AB×CC 基因型组合( $P<0.05$ )。AA×DD 和 BB×DD

基因型组合的开产体质量极显著高于 AB×DD 基因型组合( $P<0.01$ ), AA×DD、BB×DD 和 BB×CD 基因型组合的开产体质量显著高于 AA×CC、AA×CD、AB×CC、AB×CD 和 BB×CC 基因型组合( $P<0.05$ )。

表 5 *G2100A*、*G2283A* 位点不同基因型组合与繁殖性状的相关性

Table 5 The relationship between genotype combinations and reproductive traits

基因型组合	开产体质量(g)	开产蛋质量(g)	开产日龄(d)	300日龄蛋质量(g)	300日龄产蛋数
AA×CC	1 523.52±45.21ABa	32.72±0.68a	172.18±2.69ab	49.96±1.12a	94.93±4.43a
AA×DD	1 770.65±93.19Bb	32.90±1.56a	179.25±5.55ab	51.53±2.17a	85.00±8.58a
AA×CD	1 581.67±33.48ABa	32.51±0.51a	170.43±2.03a	51.16±0.81a	89.62±3.19a
AB×CC	1 528.90±48.12ABa	32.45±0.76a	169.06±2.77a	49.38±1.25a	96.58±4.96a
AB×DD	1 417.85±83.35Aab	34.85±1.09a	171.50±4.53ab	50.91±1.77a	93.83±7.01a
AB×CD	1 577.50±37.28ABa	33.00±0.52a	174.11±2.14ab	49.98±0.85a	88.69±3.37a
BB×CC	1 550.67±76.09ABa	34.56±0.98a	177.33±4.53ab	49.55±1.77a	93.17±7.01a
BB×DD	1 897.11±131.79Bb	36.00±2.20a	180.57±4.19ab	48.95±3.06a	81.00±12.64a
BB×CD	1 671.43±70.45ABb	33.97±0.93a	177.50±7.84b	50.81±1.63a	88.00±6.49a

同列数据不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ );同列数据不同大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 *MSTN* 基因的多态性及其与生产性能的相关性分析

近年来有关鸡 *MSTN* 基因多态性的报道越来越多,张跟喜<sup>[13]</sup>分别对京海黄鸡、AA 鸡、尤溪麻鸡和边鸡进行检测,发现 4 个鸡种外显子 1 区域均有 3 个突变,与边鸡的生产性能进行关联分析时发现,0 周龄、4 周龄、6 周龄、8 周龄、10 周龄、12 周龄、14 周龄和 16 周龄鸡的体质量都差异显著( $P < 0.05$ )。顾志良<sup>[14]</sup>分析 9 个鸡种 *MSTN* 基因 5' 和 3' 调控区以及部分编码区的多态性,在 5' 和 3' 调控区分别发现 5 个和 2 个多态位点,并且 *MSTN* 基因的多态性与屠体质量、胸肌质量、腿肌质量显著相关( $P < 0.05$ )。本研究通过 PCR-SSCP 和 DNA 测序技术发现盐城地方鸡种 *MSTN* 基因外显子 1 有 2 处突变,分别为 *G2100A* 和 *G2283A*,与生产性能关联分析结果显示,*G2283A* 位点 DD 基因型在 16 周龄的体质量极显著高于 CC 基因型( $P < 0.01$ ),并显著高于 CD 基因型( $P < 0.05$ ),CC 基因型 300 日龄产蛋数极显著高于 DD 基因型( $P < 0.05$ );*G2100A* 位点 AA、AB 基因型开产日龄显著早于 BB 基因型( $P < 0.05$ )。这些结果表明位点 *G2283A* 与生长性状显著相关,*D* 等位基因为体质量的增效基因,*C* 等位基因为体质量的减效基因,DD 型可以在生产中固定,可作为影响鸡生长性状的候选基因型。

#### 3.2 *MSTN* 基因不同位点互作效应分析

日常生产可通过选择对生产性状影响显著的 2 个或多个基因的 SNPs 或者单基因的多个 SNPs 进行标记辅助,这样选择的危险要比单基因或单个位点小。多基因的基因型组合效应并不是单基因基因型效应的简单相加,在分析多基因调控的数量性状时,需要同时对多个 SNPs 组成的基因型组合进行分析,这样才能得到基因与性状之间的真实相关性。

本研究对 2 个多态位点基因型组合与繁殖性状进行相关性分析结果显示,AA×CD 基因型组合和 AB×CC 基因型组合开产日龄早,AA×DD 基因型组合和 BB×DD 基因型组合开产体质量高;与生长性状相关性分析结果显示,AA×DD 基因型组合和 BB×

DD 基因型组合在 16 周龄体质量高,AA×DD 基因型组合在 20 周龄体质量最高,AA×DD 基因型组合在 300 日龄体质量最高。可见 AA×DD 基因型组合可作为影响鸡生长性状的优势基因型组合。

#### 参考文献:

- [1] 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(23): 12457-12461.
- [2] SAZANOV A, EWALD D, BUITKAMP J, et al. A molecular marker for the chicken myostatin gene (*GDF8*) maps to 7p11 [J]. Anim Genet, 1999, 30(5): 388-389.
- [3] 张颖,李冰,朱健,等. 异育银鲫中科 3 号 *MSTN* 基因的克隆与序列分析 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 40-44.
- [4] 黄艳娜,李莉,韦玲静,等. 陆川猪肌肉生长抑制素基因的克隆与序列分析 [J]. 南方农业学报, 2014, 45(4): 659-663.
- [5] THOMAS M, LANGLEY B, BERRY C, et al. Myostatin, a megative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation [J]. J Biol Chem, 2000, 275(51): 40235-40243.
- [6] GROBET L, MARTIN L J, PONCELET D, et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle [J]. Nat Genet, 1997, 17: 71-74.
- [7] WIENER P, WOOLLIAMS J A, FRANK-LAWALE A, et al. The effects of a mutation in the myostatin gene on meat and carcass quality [J]. Meat Science, 2009, 83: 127-134.
- [8] 张润锋,陈宏,雷初朝,等. 3 个黄牛品种的 myostatin 5' 调控区多态与生长性状的相关分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(12): 1273-1278.
- [9] 肖功炎,赖贻海. “双肌臀”大白猪生长情况的观察 [J]. 中国畜牧杂志, 1999, 35(4): 46.
- [10] 李绍华. 猪 *MSTN* 基因多态性及其分子标记的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2001.
- [11] HICKFORD J G, FORREST R H, ZHOU H, et al. Polymorphisms in the ovine *myostatin* gene (*MSTN*) and their association with growth and carcass traits in New Zealand Romney sheep [J]. Anim Genet, 2010, 41(1): 64-72.
- [12] BOMAN I A, KLEMETS DAL 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] 张跟喜. 边鸡遗传多样性及 *myostatin* 基因对生长和繁殖性状的遗传效应研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2011.
- [14] 顾志良,张海峰,朱大海,等. 鸡 *myostatin* 基因单核苷酸多态性的群体遗传学分析 [J]. 遗传学报, 2002, 29(7): 565-570.

(责任编辑:王妮)