

鲁西黄牛 H-FABP基因的多态性 及其与肉质性状关系的分析

周国利,朱 奇,郭善利,吴玉厚
(聊城大学生命科学学院, 山东聊城 252059)

摘 要: 利用 PCR-RFLP方法在鲁西黄牛 H-FABP基因内发现了 1个变异酶切位点,为 intron 2上的 Hae III -RFLP 利用最小二乘线性模型对不同分子标记基因型效应值间肉质大理石花纹评分和嫩度性状差异显著性检验,结果表明:鲁西黄牛 H-FABP基因中 BB纯合基因型对牛肉嫩度剪切力值有较大的影响 ($P < 0.05$);对大理石花纹评分来说,3种基因型 AA AB和 BB之间差异不显著。

关键词: H-FABP基因;鲁西黄牛;PCR-RFLP;肉质性状

中图分类号: S823.8 1 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2005)03-0005-03

Analysis on Polymorphism of H-FABP Gene in Luxi Cattle and the Relationships with Meat Quality Traits

ZHO U Guo-li, ZHU Qi, GUO Shan-li and WU Yu-hou
(College of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng Shandong 252059, China)

Abstract One variant restriction sites of Luxi cattle H-FABP, HaeIII -RFLP in intron 2, was found by PCR-RFLP method. The association between genotype markers and the corresponding marbling and tenderness traits were analyzed by using general linear model at the level of DNA. The result was the B allele of Luxi cattle H-FABP gene intron 2, especially homozygous BB showed a highly significant positive effect on Warner-Bratzler Shear force of beef tenderness traits ($P < 0.05$); AA, BB and AB genotype no differ significantly effect on marbling.

Key words H-FABP gene; Luxi yellow cattle; PCR-RFLP; Meat quality traits

据研究,牛肉大理石花纹性状与牛肉的嫩度高度相关,较高水平的大理石花纹可以提高牛肉的嫩度、多汁性和风味,减少牛肉在烹调过程中嫩度的变化^[1]。10%左右的肌肉脂肪含量 (Intramuscular fat, IMF)可产生理想的大理石花纹,从而形成优质高档牛肉。因此可以对 IMF含量进行遗传改良,以提高品质。因为 IMF含量在活体中测定比较困难,所以在所有改进 IMF含量的方法中,利用候选基因法进行辅助选择应是最有效的方法^[2]。

在肉质性状的研究中,脂肪酸结合蛋白 (Fat-

ty acid-binding proteins, FABPs) 在脂肪酸生成过程中具有重要的生物学功能,参与细胞内脂肪酸的运输,调整细胞内脂肪酸的浓度^[3]。它们能在心肌和脂肪细胞中沉积甘油三酯,这是增加 IMF含量的主要方向^[4]。心脏脂肪酸结合蛋白 (Heart fatty acid-binding protein, H-FABP)基因已被克隆测序,故可作为影响 IMF含量的候选基因。Gerbens等学者几年来对 H-FABP基因的克隆、测序、遗传变异以及与猪部分生产性状的相关分析等方面做了大量的工作,认为这个基因可能影响猪的 IMF含量^[5]。鉴于他们的研究结果,本研

* 收稿日期: 2004-12-30 修回日期: 2005-02-14
基金项目: 山东省教育厅基金资助项目(鲁西黄牛肉质性状的分子数量遗传学机理与基础应用研究,资助号: J04C11)
作者简介: 周国利 (1975-),男,内蒙古赤峰市人,硕士,讲师,研究方向: 分子数量遗传学。

究以 H-FABP基因作为影响牛肉品质大理石花纹性状即 IMF含量的候选基因。同时,由于大理石花纹性状与嫩度性状的高度相关,也把牛 H-FABP基因作为影响嫩度性状的候选基因。

研究旨在分析鲁西黄牛 H-FABP基因 intron 2的多态性,并利用最小二乘线性模型分析不同基因型与肉质性状中的肉嫩度的 WBS值和大理石花纹评分的关系,为鲁西黄牛的肉质育种提供新思路。

1 材料与方法

1.1 样本

鲁西黄牛品种来自梁山和郓城两个保种中心,从每个中心分别随机选取 15头 15月龄、体重在 360 kg左右的鲁西黄牛,每头牛从前腔静脉采血约 10 mL,用 ACD抗凝, - 20℃冻存。用酚仿抽提法从血液中的白细胞提取 DNA。

1.2 试验牛肉样的采集

试验牛宰杀后,其胴体存入 0~ 4℃的排酸间,经 3 d的排酸嫩化处理,然后开始牛肉高档部位的冷分割。从牛 12~ 13胸肋横切取下外脊。

1.3 试验牛肉品质性状的测定

牛肉大理石花纹的评定:对照美国农业部牛肉品质大理石花纹等级标准图确定眼肌横切面处大理石花纹等级(1~ 6级)。

牛肉嫩度的测定:国际上通常运用测定牛肉的华纳-布莱芝勒尔剪切力(Warner-Bratzler-Shear force, WBS)值来计量。

1.4 引物合成与 PCR

所用的一对引物是按照 Billich等发表的牛 H-FABP基因 mRNA序列(Acc. No X12710)与人类相应的基因组 DNA序列进行同源比较,然后利用 Primer3网站在线设计(www.genome.wi.mit.edu),由上海生物工程公司合成。引物序列为:5'-AGCCTACCACAATCATCGAAGTGAA-3'和 5'-2CAAGTGATGTCTCTTGTCCATTCCA-3'。

PCR反应总体积为 25 μ L。PCR反应体系组成:10倍扩增缓冲液[10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100] 2.5 μ L,模板 DNA 20~ 50 ng, dNTPs 终浓度为 200 μ mol/L,引物终浓度为 1.0 μ mol/L, Taq DNA聚合酶 1U, Mg²⁺ 浓度 1.5 mmol/L。PCR循环的最佳条件为:先 94℃变性 5 min,再 94℃ /

50 s 59℃ /50 s和 72℃ /1 min进行 29个循环,最后 72℃ /10 min。

1.5 H-FABP基因 intron2的多态性检测

选用 HaeIII (Promega, USA)限制性内切酶对 PCR产物进行酶切。反应体系为 15 μ L,其中扩增产物为 12 μ L,限制性内切酶 2U,然后加双蒸水至 15 μ L, 37℃反应 2 h。酶切产物经 2%的琼脂糖凝胶电泳(90V, 50 min)分离,用 EB染色后进行多态性分析。

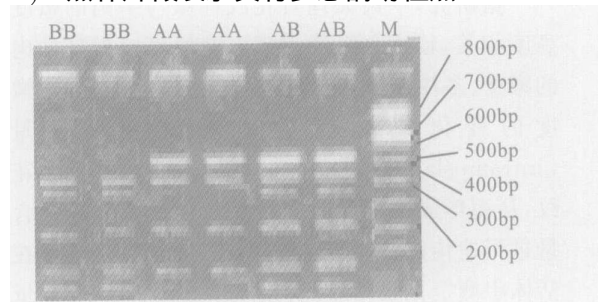
1.6 统计分析

配合下列模型进行最小二乘方差分析,比较肉质性状在不同基因型之间的差异: $Y_{ijk} = \mu + G_i + H_j + e_{ijk}$,其中: Y_{ijk} 为个体表型记录; μ 为群体平均值; G_i 是第 i 个基因型的固定效应; H_j 是场次的固定效应; e_{ijk} 是随机残差效应。用 SAS的 GLM(General Linear Model)过程完成。

2 结果与分析

2.1 H-FABP基因 intron 2的多态性

通过 PCR扩增获得了 2075bp大小的 H-FABP基因 intron 2的序列,用限制性内切酶 HaeIII对扩增产物进行酶切,检测到了 H-FABP基因 intron2的多态性。检测结果如下: 653bp 599bp 312bp 169bp 146bp 124bp和 73bp定为 AA基因型(653bp没有被酶切); 599bp 487bp 312bp 169bp 166bp 146bp 124bp和 73bp定为 BB基因型;两种都含有的定为 AB基因型(图 1)。黑体片段表示具有多态酶切位点。



BB、AA和 AB分别代表 BB、AA和 AB基因型; M: Marker。

BB、AA and AB are genotype of BB

AA and AB, respectively; M: Marker

图 1 HaeIII酶切 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳图谱 (146bp、124bp和 73bp片段在凝胶中没有显示)

Fig. 1 Agarose gel image of digested PCR production with HaeIII (fragment of 146bp, 124bp and 73bp no display in gel)

3种基因型, AA、AB和 BB与两种等位基因。

A和 B的频率见表 1

表 1 H-FABP基因 intron2的基因型频率和等位基因频率

Table 1 Frequencies of genotype and allele of intron 2 of the H-FABP gene						
牛场 Herd	牛个体数目 Number of cows	基因型 Genotype H-FABP-HaeIII			等位基因 Allele	
		AA	AB	BB	A	B
梁山 Liangshan	15	0.56	0.33	0.11	0.725	0.275
郓城 Yuncheng	15	0.59	0.31	0.10	0.745	0.255
总计 Total	30	0.575	0.32	0.105	0.735	0.265

2.2 H-FABP基因 intron2的多态性与肉质性状的关系

各基因型的肉质性状的最小二乘平均值及标准误差见表 2。从表 2可以看出, BB基因型所对应的 WBS值最小二乘平均值显著高于 AA和 AB基因型所对应的 WBS值 ($P < 0.05$)。而 WBS值越高,肉质性状就越差。AA和 AB基因型所对应的 WBS值的最小二乘平均值之间没有显著性差异。对于大理石花纹评分值来说, 3种基因型所对应的大理石花纹评分值的最小二乘平均值之间没有显著性差异。由此可见, A等位基因或 AA基因型可以作为肉质性状中肉嫩度的一个分子标记辅助选择的依据。

表 2 H-FABP-HaeIII不同基因型的肉质性状的最小二乘均值及标准误差

Table 2 Least squares means and standard errors for meat quality traits with different H-FABP-HaeIII genotypes				
基因型	Phenotype	AA	AB	BB
样本数		17	10	3
WBS		3.08±0.48	3.98±0.32	5.83±0.73
大理石花纹评分值		5.67±0.77	5.48±0.71	5.4±0.69

注: 同行中具有不同字母肩标的平均值间差异显著 ($P < 0.05$)。
Note: Means with the different superscripts within the same row differ significantly ($p < 0.05$).

3 讨论

利用引物扩增牛 H-FABP基因跨越第二外

显子、第二内含子和第三外显子区域的约 2075bp 的 PCR产物,发现 HaeIII多态性,当多态性切点存在时产生 BB基因型酶切图谱。从表 2可以看到,利用最小二乘线性模型对不同分子标记基因型效应值间肉质性状指标差异显著性检验结果表明: 此基因座位的不同基因型对牛肉品质大理石花纹评分的最小二乘效应值之间差异不显著,可认为此基因座位对大理石花纹性状影响不大。但此基因座位中的 B等位基因,尤其是 BB纯合基因型对牛肉嫩度 WBS值有较大的影响,而 WBS值越大嫩度品质越差。因此,在肉牛育种中,要加快肉品质嫩度的遗传进展,可以通过选择含 A等位基因或 AA纯合基因型个体作为辅助选择依据。

由于实验样本含量较小,因此还需要较大的实验样本群体来进一步验证此位点作为选育肉牛候选基因的可靠性。

参考文献:

[1] Wulf D M, Tatum J D, Green R D, *et al.* Genetic influences on beef longissimus alatability in Charo lais²and Limousin²sired steers and heifers [J]. J Anim Sci, 1996, 74: 2394~ 2405.

[2] 曹红鹤, 李宏滨, 王立贤. FABPs作为猪肌内脂肪性状候选基因的研究进展 [J]. 国外畜牧科技, 1999, 26(6): 31~ 33.

[3] Veerkamp J H, Maatman R G H J. Cytoplasmic fatty acid binding proteins: their structure and genes [J]. Progress in Lipid Research, 1995, 34: 17~ 25.

[4] Cameron N D, Enger M B. Fatty acid composition of lipid in longissimus dorsi muscle of Duroc and British Landrace pigs and its relationship with eating quality [J]. Meat Sci, 1991, 29: 295~ 307.

[5] Gerbens F, Rettenberger G. Effect of genetic variants of the heart fatty acid binding protein gene on intramuscular fat and performance traits in pigs [J]. J Anim Sci, 1999, 77: 846~ 852.