

CAPN1 基因的多态性与鸡肉质性状的关系研究

周国利, 郭彦, 吕鑫, 吴玉厚

(聊城大学 生命科学学院, 山东 聊城 252059)

摘要: 采用 PCR-SSCP 方法对寿光鸡 CAPN1 基因的外显子 14、外显子 20 及其侧翼区序列进行多态性检测, 并分析它们的多态性与部分肉质性状的关系。CE14 引物扩增的座位在群体发现 3 个单核苷酸多态性 (SNPs) 位点: g. 13715409 A>G、g. 13715387 T>C 位于外显子 14 中, g. 13715467 C>T 位于内含子 13 中; 共检测到 AA、AB、AC、BB、BC 及 CC 6 种不同基因型, 基因型频率分别为 0.238、0.273、0.197、0.095、0.102、0.095, 等位基因 A、B、C 的频率分别为 0.473、0.282、0.245。CE20 引物扩增的座位在群体发现 6 个 SNPs 位点: g. 13713224 C>A 位于外显子 20 中, g. 13713320 A>T、g. 13713289 G>A、g. 13713277 T>C 位于内含子 19 中, g. 13713185 T>C、g. 13713184 G>A 位于内含子 20 中; 共检测到 AA、AB、AC、BC、AD、BB、CD 及 DD 8 种不同基因型, 基因型频率分别为 0.122、0.354、0.197、0.143、0.061、0.034、0.048、0.041, 等位基因 A、B、C、D 的频率分别为 0.429、0.282、0.194、0.095。最小二乘统计分析结果表明, CE14 座位对胸肌 pHu、腿肌 pHu、肌肉脂肪含量、腿肌剪切力及胸肌蒸煮损失存在显著性影响 ($P < 0.05$), CE20 座位对胸肌 pHu 及胸肌蒸煮损失存在显著性影响 ($P < 0.05$)。

关键词: CAPN1 基因; 多态性; 肉质性状; 鸡; 关联分析

中图分类号: S831.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)07-0121-04

Associations of CAPN1 Gene Polymorphism with Meat Quality Traits in Chicken

ZHOU Guo-li, GUO Yan, LÜ Xin, WU Yu-hou

(College of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract: In this study, the polymorphism of CAPN1 gene in Shouguang chicken was detected using PCR-SSCP method and its relationship with some meat quality traits of Shouguang chicken was also analyzed. At CE14 locus, six genotypes of AA, AB, AC, BB, BC, and CC were found and their frequencies were 0.238, 0.273, 0.197, 0.095, 0.102, and 0.095, respectively. Frequencies of allele A, B and C were 0.473, 0.282, and 0.245, respectively. Three SNPs were revealed by sequencing, among which one was in the intron 13 (g. 13715467 C>T), and two were in the exon 14 of CAPN1 gene (g. 13715409 A>G and g. 13715387 T>C). At CE20 locus, eight genotypes of AA, AB, AC, BC, AD, BB, CD, and DD were found and their frequencies were 0.122, 0.354, 0.197, 0.143, 0.061, 0.034, 0.048, and 0.041, respectively. Frequencies of allele A, B, C, and D were 0.429, 0.282, 0.194, and 0.095, respectively. A total of six SNPs were identified at CE20 locus by sequencing, among which three were in the intron 19 (g. 13713320 A>T, g. 13713289 G>A, and g. 13713277 T>C), one was in the exon 20 (g. 13713224 C>A), and two were in the intron 20 (g. 13713185 T>C and g. 13713184 G>A) of CAPN1 gene. Statistical analysis indicated that

收稿日期: 2013-01-13

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2012CL19); 聊城大学博士启动基金项目 (31805)

作者简介: 周国利 (1975-), 男, 内蒙古赤峰人, 副教授, 博士, 主要从事分子遗传学与动物遗传育种研究。

E-mail: glzhou1975@163.com

the genotypes of CE14 locus showed a significant effect on pHuB, pHuL, IMF, SFL, and CLB ($P < 0.05$). The genotypes of CE20 locus showed a significant effect on pHuB and CLB ($P < 0.05$).

Key words: CAPN1 gene; polymorphisms; meat quality traits; chicken; association analysis

鸡肉品质一直以来被消费者广泛关注,与肉质品质相关的因素主要有嫩度、风味、多汁性和肉色等^[1]。人们在改进肉质性状的研究上已经做了很多努力,但仍被一些遗传因素和环境因素制约,需要更进一步研究影响肉质性状的机制。钙激活蛋白酶(CAPN1)可降解肌原纤维蛋白,破坏肌原纤维的结构,从而使肌肉变嫩^[2]。因此,CAPN1 基因被认为是影响鸡肉嫩度的重要候选基因^[3-7]。本研究利用 PCR-SSCP 和测序方法,鉴定寿光鸡 CAPN1 基因的多态性,同时利用关联测试方法阐明其多态性与寿光鸡肉质性状的关系,旨在为优质寿光鸡的选育提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料与表型数据收集

以同一条件下饲养 9 周龄的 147 只寿光鸡为材料,翅静脉采血,ACD 抗凝,置于冰盒,带回实验室用于 DNA 的提取。测定的肉质性状包括胸肌 pHu (pHuB)、腿肌 pHu (pHuL)、肌红蛋白含量(MbC)、肌肉脂肪含量(IMF)、胸肌剪切力(SFB)、腿肌剪切力(SFL)、胸肌蒸煮损失(CLB)和腿肌蒸煮损失(CLL)。

1.2 DNA 的提取和 PCR 扩增

鸡血样基因组 DNA 的提取采用柱式全血基因组抽提试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司],提取后的 DNA 用 TE 缓冲液溶解,用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测和紫外分光光度计测定浓度,−20℃保存备用。

采用 PCR 扩增 CAPN1 基因的外显子 14 和外显子 20 及其部分侧翼区。参照 GenBank 中 NC_006090 序列设计 2 对引物,CE14 上游引物 5'-CGTGAGAAGGAGTAAAGGTG-3',下游引物 5'-AGGACTTGGCACAACAGTA-3';CE20 上游引物 5'-CAACTTTGTCTGCTGCCTG-3',下游引物 5'-CCCATCCACTTTAGCGTCT-3'。PCR 扩增反应体系为 25 μL,其中含有约 50 ng 基因组 DNA,10 pmol/L 的引物,200 μmol/L 的 dNTPs,1.5 μmol/L 的 MgCl₂,1.25 U Taq 酶。反应程序为:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,33 个循环;72℃延伸 7 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 CAPN1 基因多态性的检测及测序

利用 SSCP (single strand conformation polymorphism) 法鉴定外显子 14、外显子 20 及其侧翼区序列的多态性。取 2 μL PCR 产物和 5 μL 上样缓冲液[98% 甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯酚、10 mmol/L EDTA (pH 值 8.0)、10% 甘油]置于 PCR 管中,离心混匀,98℃变性 10 min,迅速置于冰中,冰浴 10 min。样品用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测,银染显带。用 Alpha 公司的凝胶成像分析系统拍照,进行基因型分析并记录结果。分别选择 2 个不同电泳条带的纯合基因型个体的 PCR 产物测序,进行序列分析。

1.4 数据处理

用 CERVUS 3.0 软件计算研究群体中的基因型和等位基因频率^[8]。计算所有座位的观察纯合度(Obs Ho)、期望纯合度(Exp Ho)、观察杂合度(Obs He)、期望杂合度(Exp He)、Nei's 期望杂合度(Nei He)、有效等位基因数(Ne)和多态信息含量(PIC)^[9-11]。构建最小二乘分析模型,分析所发现的多态位点与肉质性状指标的关系。其一般线性模型为: $Y_{ij} = \mu + Genotype_i + e_{ij}$ 。其中, Y_{ij} :性状的观察值; μ :群体平均值; $Genotype_i$:第 i 种标记基因型的固定效应; e_{ij} :随机残差效应。用 SPSS 11.0 的 GLM (General Liner Model) 进行分析。

2 结果与分析

2.1 CAPN1 基因的多态性

在 CE14 座位中,发现了 AA、AB、AC、BB、BC 和 CC 6 种不同的基因型,通过测序发现 3 个单核苷酸多态性(SNPs)位点,1 个在内含子 13 中,该突变为 g. 13715467 C>T (NW_001471679.1,下同);另外 2 个在外显子 14 中,分别是 g. 13715409 A>G 和 g. 13715387 T>C (图 1)。

在 CE20 座位中,发现了 AA、AB、AC、BC、AD、BB、CD 和 DD 8 种基因型,通过测序共发现 6 个 SNPs 位点,其中 3 个在内含子 19 中,分别是 g. 13713320 A>T, g. 13713289 G>A 和 g. 13713277 T>C;1 个在外显子 20 中,是 g. 13713224 C>A;另外 2 个在内含子 20 中,分别是 g. 13713185 T>C 和 g. 13713184 G>A (图 2)。CE14 和 CE20 座位的基因型及其等位基因频率见表 1,群体遗传参数见表 2。



图 1 CE14 座位的 PCR-SSCP 电泳图谱及其不同基因型对应的测序峰

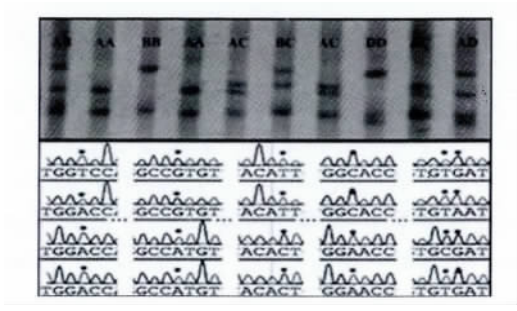


图 2 CE20 座位的 PCR-SSCP 电泳图谱及其不同基因型对应的测序峰

表 1 CE14、CE20 座位基因型及其等位基因频率

| 项目 | CE14 座位基因型 | | | | | | | | |
|--------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | AA | AB | AC | BB | BC | CC | A | B | C |
| 等位基因频率 | 0.238 | 0.273 | 0.197 | 0.095 | 0.102 | 0.095 | 0.473 | 0.282 | 0.245 |

| 项目 | CE20 座位基因型 | | | | | | | | | | | |
|--------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | AA | AB | AC | BC | AD | BB | CD | DD | A | B | C | D |
| 等位基因频率 | 0.122 | 0.354 | 0.197 | 0.143 | 0.061 | 0.034 | 0.048 | 0.041 | 0.429 | 0.282 | 0.194 | 0.095 |

表 2 CE14、CE20 座位部分群体遗传学参数

| 座位 | Obs Ho | Obs He | Exp Ho | Exp He | Nei He | Ne | PIC |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|
| CE14 | 0.421 | 1.0578 | 0.359 | 4.0640 | 6.0636 | 3.2749 | 8.0564 |
| CE20 | 0.193 | 9.0806 | 1.0305 | 9.0694 | 1.0690 | 6.3.232 | 0.0635 |

2.2 CAPN1 基因多态性与鸡肉质性状的关联分析

对研究群体的最小二乘统计分析结果表明,CE14 座位中的多态性对鸡肉质性状 pHuB、pHuL、IMF、SFL 和 CLB 有显著影响($P<0.05$)。携带基因型 AB 的个体比携带基因型 AC 的个体有较高的 pHuB($P<0.05$),携带基因型 BC 的个体比携带基因型 AB、AC、BB 和 CC 的

个体有较低的 pHuL ($P<0.05$),携带基因型 BB 的个体比携带基因型 AA 和 AC 的个体有较高的 IMF($P<0.05$),携带基因型 AC 和 CC 的个体比携带基因型 AA、AB 和 BC 的个体有较高的 SFL($P<0.05$),携带基因型 AA 和 AB 的个体比携带基因型 AC、BC 和 CC 的个体有较高的 CLB($P<0.05$) (表 3)。CE20 座位中的多态性对 pHuB 和 CLB 有显著影响($P<0.05$)。携带基因型 AA 的个体比携带基因型 AB 的个体有较高的 pHuB($P<0.05$),携带基因型 AC 的个体比携带基因型 BC 的个体有较高的 CLB($P<0.05$) (表 4)。

表 3 CAPN1 基因 CE14 座位不同基因型肉质性状的最小二乘均值及标准误

| 性状 | 基因型 | | | | | |
|--------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | AA | AB | AC | BB | BC | CC |
| pHuB | 6.26±0.07 ^{ab} | 6.30±0.07 ^a | 6.06±0.08 ^b | 6.13±0.11 ^{ab} | 6.12±0.11 ^{ab} | 6.20±0.11 ^{ab} |
| pHuL | 6.22±0.12 ^{ab} | 6.39±0.11 ^a | 6.44±0.13 ^a | 6.47±0.18 ^a | 5.93±0.18 ^b | 6.47±0.18 ^a |
| MbC/(μmol/g) | 1.97±0.16 | 2.17±0.15 | 1.78±0.17 | 2.24±0.25 | 1.84±0.24 | 1.75±0.25 |
| IMF/% | 2.70±0.46 ^b | 3.77±0.43 ^{ab} | 2.69±0.51 ^b | 5.15±0.73 ^a | 3.17±0.70 ^{ab} | 4.40±0.73 ^{ab} |
| SFB/kgf | 1.69±0.10 | 1.70±0.10 | 1.72±0.11 | 1.61±0.16 | 1.69±0.15 | 1.51±0.16 |
| SFL/kgf | 1.58±0.07 ^b | 1.52±0.07 ^b | 1.84±0.08 ^a | 1.65 ^{ab} ±0.11 | 1.39±0.11 ^b | 1.76±0.11 ^a |
| CLB/% | 22.66±0.84 ^a | 22.16±0.79 ^a | 19.59±0.92 ^b | 21.62±1.33 ^{ab} | 18.46±1.28 ^b | 18.93±1.33 ^b |
| CLL/% | 22.09±1.39 | 20.69±1.30 | 21.36±1.53 | 22.31±2.20 | 18.09±2.13 | 20.00±2.20 |

注:同行肩标字母不同表示差异显著($P<0.05$);pHu 表示屠宰 24 h 后 pH 值,下同。

表 4 CAPN1 基因 CE20 座位不同基因型肉质性状的最小二乘均值及标准误

| 性状 | 基因型 | | | |
|--------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | AA | AB | AC | BC |
| pHuB | 6.42±0.11 ^a | 6.15±0.06 ^b | 6.19±0.09 ^{ab} | 6.15±0.10 ^b |
| pHuL | 6.20±0.17 | 6.54±0.10 | 6.31±0.13 | 6.54±0.16 |
| MbC/(μmol/g) | 1.97±0.26 | 2.07±0.15 | 2.16±0.21 | 1.90±0.24 |
| IMF/% | 4.29±0.87 | 3.70±0.51 | 4.31±0.69 | 3.33±0.81 |
| SFB/kgf | 1.88±0.16 | 1.53±0.09 | 1.70±0.13 | 1.61±0.15 |
| SFL/kgf | 1.61±0.12 | 1.60±0.07 | 1.50±0.09 | 1.58±0.11 |
| CLB/% | 22.53±1.29 ^{ab} | 21.83±0.76 ^{ab} | 23.07±1.03 ^a | 19.67±1.20 ^b |
| CLL/% | 20.73±2.12 | 22.66±1.24 | 20.74±1.69 | 19.40±1.97 |

注:在此座位中基因型 AD、BB、CD 和 DD 的数量太少,统计分析只在基因型 AA、AB、AC 和 BC 之间进行。

3 讨论

在家禽中,小家系的肌肉蛋白周转率和钙蛋白酶活性显著高于大家系的。相似地,蛋鸡的肌肉蛋白周转率和钙蛋白酶活性显著高于肉仔鸡^[12]。以上研究结果表明,钙蛋白酶的活性与肌肉蛋白的周转率是相关的。因此,本研究将 *CAPN1* 作为鸡肉肉质性状的候选基因,检测其外显子 14、外显子 20 及其侧翼区序列的多态性,并初步分析这些多态性的功能。研究表明^[11],CE14 座位的多态信息含量较小($PIC < 0.25$),而 CE20 座位有较高的多态信息含量($PIC > 0.5$)。本研究表明,CE20 座位的 *Obs He*、*Exp He*、*Nei He*、*Ne*、*PIC* 分别为 0.806 1、0.694 1、0.690 6、3.232 0、0.635 2,这些数值普遍高于 CE14 座位。说明 CE20 座位遗传多态性高于 CE14 座位,也反映了 *CAPN1* 基因在寿光鸡群体中具有较高的遗传多样性。

在鸡的群体中,关于影响肉质性状的精确标记尚不明确,前人也研究了 *CAPN1* 基因的多态性,以期寻找影响鸡肉质性状的相关标记^[5-7]。本研究中,CE14 多态性座位与鸡的胸肌 pHu、腿肌 pHu、肌内脂肪含量、腿肌剪切力及胸肌蒸煮损失呈显著相关($P < 0.05$)。CE20 多态性座位与鸡的胸肌 pHu 及胸肌蒸煮损失呈显著相关($P < 0.05$)。肌内脂肪含量对肉的嫩度、多汁性和风味特性均具有改善作用,而且肌内脂肪含量和蒸煮损失与肉的嫩度呈正相关^[13]。从这个角度推测,*CAPN1* 基因可以作为影响鸡肉质性状的一个潜在的候选基因,或该基因与影响肉质性状的主效基因连锁。本研究在寿光鸡群体中发现了 *CAPN1* 基因的一些新的多态性,并初步分析了其与肉质性状的关系,结果将为寿光鸡肉质性状的选择提供一定参考。

参考文献:

- [1] Jiang X S, Groen A F. Chicken breeding with local breeds in China[J]. J Anim Sci, 2000, 13: 1482-1498.
- [2] Mikami M A, Whiting H, Taylor M A J. Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin L and lysosomal lysates[J]. Meat Science, 1987, 21

(2): 81-97.

- [3] 张增荣,朱庆. 钙蛋白酶 I (*CAPN1*) 基因在不同鸡品系中的遗传多态性分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008 (3): 27-29.
- [4] 束婧婷,李慧芳,张莹,等. 鸡肉嫩度候选基因 *CAPN1* 多态性的检测研究[J]. 家畜生态学报, 2010, 31(2): 16-20.
- [5] 张增荣,朱庆,蒋小松,等. 钙蛋白酶 I (*CAPN1*) 基因多态性与鸡肉嫩度和屠体性状的相关研究[J]. 遗传, 2007, 29(8): 982-988.
- [6] Zhang Z R, Liu Y P, Zhu Q. Study on correlation analysis of single nucleotide polymorphism of *CAPN1* gene and meat quality and carcass traits in chickens[J]. Agricultural Sciences in China, 2007, 6(6): 101-105.
- [7] Zhang Z R, Liu Y P, Jiang X S, et al. Study on association of single nucleotide polymorphism of *CAPN1* gene with muscle fiber and carcass traits in quality chicken populations[J]. J Anim Breed Genet, 2008, 125(4): 258-264.
- [8] Marshall T C, Slate J, Kruuk L E B, et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations[J]. Mol Ecol, 1998, 7(5): 639-655.
- [9] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics, 1978, 89(3): 583-590.
- [10] Hines H C, Zikakis J P, Haenlein G F. Linkage relationships among loci of polymorphisms in blood and milk of cattle[J]. J Dairy Sci, 1981, 64: 71-76.
- [11] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in human using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Gene, 1980, 32: 314-331.
- [12] Johari S, Maeda Y, Okamoto S, et al. Comparison of calpain and calpastatin activities in skeletal muscle of broiler and layer chickens[J]. Br Poult Sci, 1993, 34 (4): 819-824.
- [13] 程丰,赵云焕,易本驰,等. 猪 *CAST* 基因 PCR-RFLPs 与肉质相关性的分析[J]. 河南农业科学, 2006(2): 105-108.