

海东鸡 *CAPN1* 基因 3'UTR 多态性及其与体尺性状的关联性

赵莉媛¹,赵香珍²,张娟^{3*}

(1. 青海畜牧兽医职业技术学院,青海 湟源 812100; 2. 乐都县畜牧兽医站,
青海 乐都 810700; 3. 宁夏大学 农学院,宁夏 银川 750021)

摘要: 利用 PCR - SSCP 技术对海东鸡 *CAPN1* 基因多态性进行分析,研究 *CAPN1* 基因多态位点与体尺性状之间的相关性。结果表明,海东鸡 *CAPN1* 基因 3'UTR 存在 c. *1114T > C 转换,对应 2 种等位基因 T 和 C,等位基因 T 为优势等位基因;该群体 *CAPN1* 基因检测区域为中度多态($0.25 < PIC < 0.50$),偏离了 Hardy - Weinberg 平衡状态。*CAPN1* 基因 3'UTR 的多态性对体斜长、胸宽和胸骨长有显著性影响,对胫长有极显著影响,对胸深、胸围和髋宽无显著性影响。

关键词: 海东鸡; *CAPN1* 基因; PCR - SSCP; 体尺性状

中图分类号: S831 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004 - 3268(2016)02 - 0138 - 04

Polymorphism of 3'UTR of *CAPN1* Gene and Its Association with Body Size of Haidong Chicken

ZHAO Liyuan¹, ZHAO Xiangzhen², ZHANG Juan^{3*}

(1. Qinghai Vocational and Technical Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Huangyuan 812100, China;
2. Animal Husbandry and Veterinary Station of Ledu County, Ledu 810700, China;
3. School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: To explore the polymorphism of *CAPN1* gene in Haidong chicken populations and to evaluate it as a candidate molecular marker associated with body size, PCR-SSCP method was used to detect the polymorphism of *CAPN1* in sixty Haidong chickens. The 3'UTR of *CAPN1* gene in Haidong chicken had the transition of c. *1114T > C, corresponding to the 2 alleles of T and C, and the allele T was the dominant allele. The detection region of *CAPN1* gene with $0.25 < PIC < 0.50$ was middle genetic diversity, and was not Hardy-Weinberg equilibrium state at these locus. The two genotypes had significant influence on body length, chest breadth and chest bone length, and they significantly affected phalanx length. But they had no significant influence on chest depth, heart girth and thurl width. All the results implied that the *CAPN1* gene could be a candidate gene.

Key words: Haidong chicken; *CAPN1* gene; PCR-SSCP; body size

钙蛋白酶(CAPN)是存在于果蝇属和所有脊椎动物细胞中的一种钙激活中性半胱氨酸内肽酶^[1],其在肌肉生长、信号转导及膜蛋白裂解等方面发挥十分重要的作用^[2]。*CAPN1* 是钙蛋白酶家族成员之一,也是降解肌原纤维蛋白的主要酶之一,该酶的

活性与肌肉增长和宰后嫩度的变化密切相关^[3]。因此,可以从分子生物学角度对肌肉嫩度性状的遗传本质问题进行分析。大量研究表明,*CAPN1* 基因与鸡肉嫩度、肌纤维密度等肉质性状及屠宰性状相关^[4-7]。

收稿日期:2015-08-16

基金项目:宁夏自然科学基金项目(NZ15011)

作者简介:赵莉媛(1981-),女,青海乐都人,讲师,本科,主要从事家禽生产研究。

* 通讯作者:张娟(1982-),女,宁夏中卫人,副教授,博士,主要从事家禽遗传育种研究。E-mail:shiningstar2013@sina.cn

海东鸡风味独特、肉质鲜嫩、脂肪含量低,是青海省半农半牧区生态放养和生产特色优质鸡肉最适合的鸡种^[8]。鉴于基因碱基突变可能影响畜禽的生长性状,本研究应用 PCR-SSCP 技术和直接测序技术检测海东鸡 CAPNI 基因 3'UTR 的 SNP 位点,分析其多态位点对海东鸡体尺性状的遗传效应,以期发现影响海东鸡体尺性状的标记位点,为青藏高原海东鸡的选种选育及资源利用提供参考。

1 材料和方法

1.1 血样采集、DNA 提取及体尺性状测定

选取青海省乐都县土桥村农户同条件下散养的月龄相近的海东鸡 60 只,各翼下静脉采血 5 mL,医用采血管保存,低温带回实验室,冷冻保存。用苯酚-氯仿法从冻存血样中提取海东鸡基因组总 DNA^[9]。体尺性状测定包括体斜长、胸深、胸宽、胸围、胸骨长、髋宽、胫长。

1.2 试剂

蛋白酶 K、Tris 饱和酚、EDTA、SDS、氯仿、去离子甲酰胺、丙烯酰胺、N,N,N',N'-四甲基乙二胺均购自北京天根公司;4S Green Nucle Acid、琼脂糖等购自生工生物工程(上海)股份有限公司;pMD19-T 载体、DNA 快速纯化回收试剂盒、DH5 α 感受态细胞、X-gal、IPTG 均购自大连宝生物公司。

1.3 引物设计与 PCR 扩增

依据 NCBI 已发布的原鸡 CAPNI 基因序列(NM_205303),利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 和 Select Primer 设计 1 对特异性引物,用于扩增海东鸡 CAPNI 基因的 3'UTR(预期片段长度 384 bp)。引物序列:F 为 5'-CCAGAAGAGAACGGAGGCCAA-3',R 为 5'-AGGTTGCAGCAGGAGGTATT-3',由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系总体积 25 μ L:DNA 模板 1 μ L,上、下游引物各 1.2 μ L,Taq 预混酶 15 μ L,ddH₂O 6.6 μ L。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,60.5 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 34 个循环;72 °C 再延伸 10 min,4 °C 保存备用。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 SSCP 电泳及等位基因序列测定

取 4 μ L PCR 产物加入到 12 μ L 变性液(98% 去离子甲酰胺、0.025% 溴酚蓝、0.025% 二甲苯氰、10 mmol/L EDTA)中,放置于普通 PCR 仪上 98 °C 高温变性 10 min,然后迅速转移到冰上冷却 10 min。再将变性后的混合物加入到 14% 的聚丙烯酰胺凝胶上,350 V 高压预电泳 30 min 后,300 V 电压、电泳槽液体循环温度 18 °C 条件下电泳 20.5 h。电泳

结束后,用银染法染色并判定基因型^[10],纯合型个体的 PCR 产物直接送华大公司测序,杂合型个体参照文献[9]的方法处理。

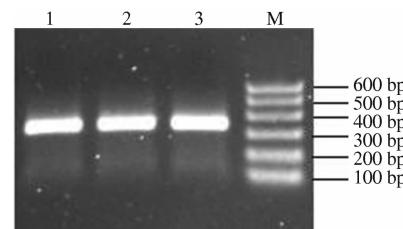
1.5 统计分析

运用 Genpop 软件统计突变位点的各遗传参数并进行卡方检验^[11-12]。关联分析采用独立效应模型,使用 SPSS 19.0 软件建立模型,进行基因型与海东鸡生长性状间的关联分析,结果以平均值±标准误来表示。统计模型: $Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$,其中, Y_{ij} 为个体表型值, μ 为群体均值, G_i 为基因型的固定效应, e_{ij} 为随机误差效应。

2 结果与分析

2.1 CAPNI 基因 PCR 扩增效果

海东鸡 CAPNI 基因 3'UTR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,条带清晰、特异性好,片段长度与预期相符(图 1),可以用于 SSCP 电泳。



M. DNA Marker; 1—3. CAPNI 基因 3'UTR 扩增产物

图 1 海东鸡 CAPNI 基因 3'UTR 扩增结果

2.2 海东鸡 CAPNI 基因 PCR-SSCP 检测

海东鸡 CAPNI 基因 3'UTR 共检测到 T 和 C 2 个等位基因,形成 TT、CT 2 种带型(图 2)。

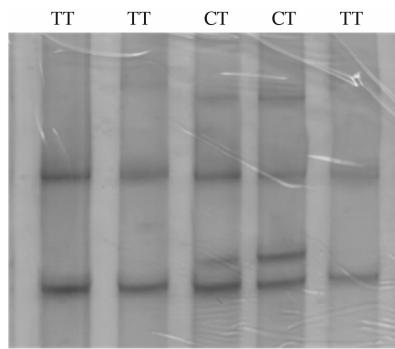


图 2 海东鸡 CAPNI 基因 3'UTR PCR 产物 SSCP 检测结果

2.3 序列测定结果

将海东鸡 CAPNI 基因测序结果与鸡 CAPNI 基因(GenBank: NM_205303)3'UTR 序列比对分析,同源性达到 95% 以上,表明扩增产物的确为海东鸡 CAPNI 基因。c.*1 114T>C 的转换,属于同义突变,未引起氨基酸的改变(图 3)。

NM_205303.seq CCAGAAAGAGAAGGGGGCAAGCAGCAGCGGGGAGTCTGTAGTTCACTGCACCTAGCTTGGGCAGCTGCTTAGAGGCCAG
Haidong chicken.seq CCAGAAAGAGAAGGGGGCAAGCAGCAGCGGGGAGTCTGTAGTTCACTGCACCTAGCTTGGGCAGCTGCTTAGAGGCCAG
NM_205303.seq TCGAGGAGCACACTGGGGCTATCCACCCGGCAGGGAGGGTGGGAGCTGTGGGGGGAGAGAGGGAGGGAGGACTGTGTTTG
Haidong chicken.seq TCGAGGAGCACACTGGGGCTATCCACCCGGCAGGGAGGGTGGGAGCTGTGGGGGGAGAGAGGGAGGGAGGACTGTGTTTG
NM_205303.seq CTTGCTCCAGTGTCTCATCCCCGTGTCATGTGCTACCTGTCCCAGGGAGCATCAGCAGATGCTGCCCGCTCGCTTAGGC
Haidong chicken.seq CTTGCTCCAGTGTCTCATCCCCGTGTCATGTGCTACCTGTCCCAGGGAGCATCAGCAGATGCTGCCCGCTCGCTTAGGC
NM_205303.seq AGGGCAGTTGGTCATGGGGAACCCAGGGTGGAGAAGTACACCTCTTAATGCCATTGCCACTCATCAGCACTAAAC
Haidong chicken.seq AGGGCAGTTGGTCATGGGGAACCCAGGGTGGAGAAGTACACCTCTTAATGCCATTGCCACTCATCAGCACTAAAC
NM_205303.seq ATGACCAAAGCACGGAGTCAGCTGGTCAGGACACTGGTGTCAATACTCCGTGCAACCT
Haidong chicken.seq ATGACCAAAGCACGGAGTCAGCTGGTCAGGACACTGGTGTCAATACTCCGTGCAACCT

图 3 海东鸡 *CAPN1* 基因 3'UTR 等位基因核苷酸序列对比

2.4 海东鸡 *CAPN1* 基因 3'UTR 遗传特征

由表 1 可以看出,海东鸡 *CAPN1* 基因 3'UTR 检测区等位基因 T 为优势等位基因,频率为 0.733 3。多态信息含量 (PIC) 为 0.314 6,介于 0.25 和 0.50,

属中度多态,说明检测区域多态性较丰富。有效等位基因数 (*Ne*) 为 0.391 1,期望杂合度 (*He*) 为 0.395 5,纯合度 (*Ho*) 为 0.604 5。卡方检验表明,海东鸡在该位点偏离了 Hardy - Weinberg 平衡状态。

表 1 海东鸡 *CAPN1* 基因 3'UTR 多态性的群体遗传参数

基因型频率		等位基因频率		群体遗传学参数				χ^2 值
TT	CT	T	C	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>Ne</i>	<i>PIC</i>	
0.466 7	0.533 3	0.733 3	0.266 7	0.604 5	0.395 5	0.391 1	0.314 6	0.017 3

2.5 海东鸡 *CAPN1* 基因 3'UTR 多态性与体尺性状的关联分析

由表 2 可知, *CAPN1* 基因 3'UTR 的多态性对体斜长、胸宽和胸骨长有显著性影响,对胫长有极显著影响,但对胸深、胸围和髋宽无显著性影响。进一步多重比较表明,TT 基因型的体斜长、胸骨长显著高于 CT 型,而 TT 基因型的胸宽显著低于 CT 型。TT 基因型个体的胫长极显著高于 CT 型个体。可见, *CAPN1* 基因可以作为影响海东鸡体尺性状的候选基因。

表 2 *CAPN1* 基因 3'UTR 不同基因型与体尺性状的关联分析

体尺性状	基因型	
	TT	CT
体斜长	25.170 ± 2.969aA	23.396 ± 2.588bA
胸深	11.810 ± 1.684aA	11.063 ± 1.164aA
胸宽	6.108 ± 1.249aA	6.790 ± 0.669bA
胸围	30.048 ± 2.479aA	28.917 ± 2.339aA
胸骨长	15.214 ± 2.272aA	13.708 ± 2.216bA
髋宽	7.562 ± 0.577aA	7.350 ± 0.626aA
胫长	8.119 ± 1.274aA	7.138 ± 0.974bB

注:同行数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$);不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

3 结论与讨论

畜禽肌肉蛋白质的增加取决于肌肉蛋白合成速度和降解速度。在动物屠宰后贮藏嫩化的过程中, *CAPN1* 基因通过降解肌原纤维使肉的嫩度增加。大量研究表明, *CAPN1* 是影响畜禽肉质嫩度和机体生长的主效基因^[13-14],且 *CAPN1* 基因在不同鸡品种

中都存在多态性^[6,15]。真核生物 mRNA 的 3'UTR 对细胞的表型、生长、分化起重要作用,该区域也是与其他细胞内因子相互作用的重要位点^[16]。本研究发现,海东鸡 *CAPN1* 基因 3'UTR 区存在 2 种基因型 (TT 和 CT) 和 2 个等位基因 (T 和 C),T 等位基因频率 (0.733 3) 远大于 C 等位基因频率 (0.266 7),呈明显的偏态分布,这与郭彦等^[15]报道的寿光鸡及杨秀芹等^[17]报道的大白猪群体在 *CAPN1* 基因 3'UTR 区的等位基因分布规律是一致的。多态信息含量和遗传杂合度是群体内遗传变异大小的评定指标,数值越高,遗传变异越大。本研究中,海东鸡群体在该位点表现为中度多态 ($0.25 < PIC < 0.50$),该位点偏离 Hardy - Weinberg 平衡状态。

本研究结果显示,海东鸡 *CAPN1* 基因 3'UTR 区的多态位点与其体斜长、胸宽、胸骨长和胫长等体尺性状都有一定的相关性。TT 基因型的体斜长、胸骨长显著高于 CT 型,而 TT 基因型的胸宽显著低于 CT 基因型。TT 基因型个体的胫长极显著高于 CT 基因型个体。提示, *CAPN1* 基因可以作为影响海东鸡体尺性状的候选基因。因此,TT 基因型对于鸡的生长性能可能具有一定改善作用,本研究结果为进一步开发利用及保护青海海东鸡品种资源提供了参考依据。

参考文献:

- [1] 黄萌,侯冠彧,李俊雅,等.钙蛋白酶-3 基因多态性与牛胴体性状的关联分析 [C]//中国牛业健康发展与科技创新——中国畜牧兽医学会第七届养牛学分会

- 2009 年学术研讨会论文集. 南京:中国畜牧兽医学
会,2009.
- [2] Gitler D, Spira M E. Real time imaging of calcium-induced
localized proteolytic activity after axotomy and its relation to
growth cone formation [J]. *Neuron*, 1998, 20(6): 1123-1135.
- [3] Hopkins D L, Thompson J M. Inhibition of protease activi-
ty. Part 1. The effect on tenderness and indicators of pro-
teolysis in ovine muscle [J]. *Meat Science*, 2001, 59:
175-185.
- [4] Li T S, Liu F M, Tang H. The correlation analysis of be-
tween the measure of chicken muscle tenderness and traits
[J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*,
2004, 35(2): 171-177.
- [5] 高海军. *CAPN1* 基因对鸡肌肉嫩度性状的遗传效应及
其表达规律研究 [D]. 扬州:扬州大学,2010.
- [6] 张增荣,蒋小松,杜华锐,等. *CAPN1* 基因多态性与鸡
肉性状的关联性分析 [C]//安全优质的家禽生
产——第十五次全国家禽学术讨论会论文集. 广州:
华南理工大学出版社,2011.
- [7] 张增荣,朱庆,蒋小松,等. 钙蛋白酶 1 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.
- [8] 张军霞,杨葆春,张静. 青藏高原海东鸡屠宰性能与肌
肉品质分析 [J]. *现代畜牧兽医*, 2012(3): 24-26.
- [9] 胡江. 牛 *ADRB3*、*CAPN1* 和 *CAPN4* 基因多态性及其对
生长和胴体性状的影响 [D]. 兰州:甘肃农业大
学,2010.
- [10] Byun S, Fang Q, Zhou H, et al. An effective method for
silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide
gels [J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 385: 174-175.
- [11] 胡宝利. 不同年龄秦川牛胴体性状与肉质性状的研
究 [D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2001: 69-71.
- [12] 姚玉妮, 阎萍, 梁春年, 等. 不同地方品种牦牛 *IGF1*
基因的 PCR - SSCP 分析 [J]. *中国草食动物*, 2008
(3): 9-11.
- [13] Smith P L, Casas E, Rexroad III C E, et al. Bovine *CAPN1*
maps to a region of *BTA29* containing a quantitative trait
locus for meat tenderness [J]. *J Anim Sci*, 2000, 78
(10): 2589-2594.
- [14] Page B T, Casas E, Heaton M P, et al. Evaluation of sin-
gle nucleotide polymorphisms in *CAPN1* for association
with meat tenderness in cattle [J]. *Journal of Animal
Science*, 2002, 80(12): 3077-3085.
- [15] 郭彦,周国利,吕鑫,等. 鸡 *CAPN1* 基因 3'UTR 多态性
及其与肉质性状的关联分析 [J]. *中国畜牧兽医*,
2010, 37(12): 104-107.
- [16] 王海震,王莹,刘定干. 真核生物 mRNA 3'非翻译区
的功能 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(9):
980-985.
- [17] 杨秀芹,刘慧,郭丽娟,等. 猪 *CAPN1* 基因部分外显子
及 3'UTR 区的 SNPs 检测 [J]. *遗传*, 2008, 30(6):
741-746.