

湖南黑猪 *CMYA5* 基因与肌肉品质的相关性分析

朱吉¹, 刘建², 孙建帮¹, 杨仕柳², 李静如², 谭建坤², 彭英林^{1*}

(1.湖南省畜牧兽医研究所, 湖南 长沙 410131; 2.湘村高科农业股份有限公司, 湖南 娄底 417000)

摘 要:以湖南黑猪为研究对象,采用 PCR-RFLP 技术对原发性心肌症相关蛋白 5 基因(cardiomyopathy associated 5, *CMYA5*)进行多态性检测,并分析其对肌肉品质影响的遗传效应。试验结果:在猪群中发现 AA、AC 和 CC 3 种基因型,A、C 等位基因的频率分别为 0.287 5、0.712 5;湖南黑猪群体在 *CMYA5* 基因 *Bsp*II 位点上的多态信息含量和杂合度分别为 0.599 9 和 0.409 7,表明该位点处于中度多态;不同基因型个体的肌肉肌内脂肪、丝氨酸、饱和脂肪酸含量等 13 项指标间存在显著或极显著差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$),AA 型个体的肌内脂肪显著高于 AC 型($P<0.05$),单不饱和脂肪酸含量极显著高于 AC 型和 CC 型($P<0.01$);AC 型个体的风味氨基酸含量较 AA、CC 型丰富,其丝氨酸、精氨酸、脯氨酸、胱氨酸、甲硫氨酸含量显著或极显著高于 AA 型($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果表明,湖南黑猪 *CMYA5* 基因多态性与肌肉品质性状相关;该基因可作为猪肉品质性状候选基因。

关 键 词:湖南黑猪;原发性心肌症相关蛋白 5 基因;多态性;肌肉品质;候选基因

中图分类号:S828.8⁺9 文献标志码:A 文章编号:1007-1032(2012)01-0064-05

Association analysis between *CMYA5* gene and meat quality traits in Hunan black pig

ZHU Ji¹, LIU Jian², SUN Jian-bang¹, YANG Shi-liu², LI Jing-ru², TANG Jian-kun², PENG Ying-lin^{1*}

(1.Hunan Institute of Animal and Veterinary Science, Changsha 410131, China; 2.Xiangcun High-tech Agricultural Limited Company, Loudi, Hunan 417000, China)

Abstract: The cardiomyopathy associated 5 gene (*CMYA5*) was detected by PCR-RFLP, and the effect of the gene on meat quality traits in Hunan black pig was observed by variance analysis. The results showed that three genotypes, namely AA, AC and CC were found. The frequencies of alleles A and C were 0.287 5 and 0.712 5 respectively and the polymorphism information content and heterozygosity were 0.599 9 and 0.409 7 respectively, which revealed a moderate polymorphism in this site. There were significant differences in thirteen indexes mainly including intramuscular fat (IMF), serine acid, saturated fatty acid, ($P<0.05$ or $P<0.01$). In pigs with AA genotype, the content of IMF was significantly higher than that in pigs with AC genotype ($P<0.05$) and the content of monounsaturated fatty acid (MUFA) was significantly higher than that in the pigs with AA and AC genotypes ($P<0.01$). The content of flavour amino acid in AC genotype was higher than that in the other two genotypes, with the contents of serine acid, arginine, proline, cystine and methionine significantly higher than those in the AA genotype ($P<0.05$ or $P<0.01$). These results provide the evidence that the porcine *CMYA5* gene can act as a candidate gene of meat quality.

Key words: Hunan black pig; cardiomyopathy associated 5 gene (*CMYA5*); polymorphism; meat quality traits; candidate gene

原发性心肌症相关蛋白 5 基因(cardiomyopathy associated 5, *CMYA5*)又名 *myspryn*、*genethonin 3*、

收稿日期: 2011-08-09

基金项目: 国家“863”计划(2008AA101008)

作者简介: 朱吉(1981—),女,湖南望城县人,硕士,助理研究员,主要从事猪的遗传育种研究, ziteng111@126.com; *通信作者, peng_yinglin@126.com

*TRIM76*或*DTNBP2*(dystrobrevin binding protein 2)。该基因在猪上位于2q21-24,是横纹肌特异表达基因,在胚胎发育过程中的表达存在明显的时空差异。该基因编码3 739个氨基酸,其相对分子质量为 4.13×10^5 ,等电点为4.71,只在骨骼肌和心肌中表达^[1]。

为了探索肌营养不良症的分子机制,Tkatchenko等^[2]分析了进行性假肥大性肌营养不良症(DMD)骨骼肌和正常肌肉的差异表达基因,发现正常肌肉*CMYA5*基因的表达量比DMD骨骼肌高出近10倍^[2]。Durham等^[3]利用DNA芯片技术检测野生型小鼠和*MEF2A*基因敲除小鼠的差异表达基因,发现*CMYA5*基因的表达量显著下降,与心肌线粒体Z线蛋白 α 辅肌动蛋白互作,位于*MEF2A*下游,可能参与了肌纤维的发生过程。Reynolds等^[4]发现*CMYA5*转录本起始位点上游-220 bp存在cAMP效应元件(cAMP-response element, CRE)结合蛋白(CRE binding protein, CREB)结合位点,其序列是TAACGTTA。CREB是PKA信号通路的主要效应分子。Reynolds等^[4-5]通过转录活性试验以及CRE位点突变试验,得出*CMYA5*是PKA-CREB信号转导通路的下游靶基因。

近年来,对*CMYA5*基因的研究主要集中在鸡、小鼠和人上^[6-7],关于猪的该基因的报道尚鲜见。笔者以*CMYA5*基因作为猪肉品质候选基因,初步探索其多态性及其与肌肉品质的相关性,旨在寻找与猪肉品质关联的遗传标记。

1 材料和方法

1.1 材料

以湘村高科农业股份有限公司湖南黑猪原种猪场的40头湖南黑猪为试验材料。试验猪在相同饲养管理条件下饲养,并全部进行屠宰测定。采集左侧胴体背最长肌1~3腰椎间背最长肌,按文献[8]、[9]的方法进行测定,测定性状包括肌肉常规化学成分和肌肉氨基酸、脂肪酸含量等3类31项指标。

1.2 方法

1.2.1 基因组的DNA提取

用酚-氯仿抽提法从猪肌肉组织样中提取基因组DNA;用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测其纯度;用紫外分光光度计测定其含量。稀释DNA样品至

50 ng/ μ L, -20 °C保存。

1.2.2 引物设计

参照文献[10]设计序列。

F: 5'-ACATAATACCAGAGCCCAAAC-3';

R: 5'-CTTTTGTGGCACTTTATCTACT-3'。

引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.3 PCR扩增

反应体系:10×Buffer 2.0 μ L, 50 mmol/L Mg^{2+} 0.6 μ L, 2 mmol/L dNTPs 1.5 μ L, 5 μ mol/L上、下游引物各1 μ L,模板DNA 50 ng, *Taq* DNA聚合酶 0.4 μ L,加超纯水至20 μ L。

反应条件:95 °C预变性5 min;94 °C变性30 s,60 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,37个循环;最后72 °C延伸5 min。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 RFLP分析

PCR产物酶切及基因分型 PCR产物经*Bsp*TI进行酶切,用2%的琼脂糖凝胶电泳检测,照像,统计基因型。酶切总体系为20 μ L,其中PCR产物10 μ L, *Bsp*TI内切酶(10 U/ μ L)2 μ L,10×Buffer 2 μ L,超纯水6 μ L,37 °C消化15 h。

1.3 数据分析

参照文献[10],用PopGene32计算等位基因频率、基因型频率、多态信息含量、有效等位基因数、群体杂合度和Hardy-Weinberg平衡检验。

用SPSS17.0的GLM(general linear model)配合下列模型进行方差分析,比较湖南黑猪的肌肉营养物质含量在各基因型之间的差异。

性状观察值=均数+基因型效应+随机残差效应。

2 结果与分析

2.1 PCR产物及酶切结果

PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,得到1条458 bp的特异性片段(图1)。PCR产物经限制性内切酶*Bsp*TI酶切后,产生了458/458、458/383/75和383/75 bp 3种带型,分别命名为AA、AC和CC型(图2)。由于75 bp片段较小,电泳时间较长,片段跑出了胶外,在图片上没有显示。

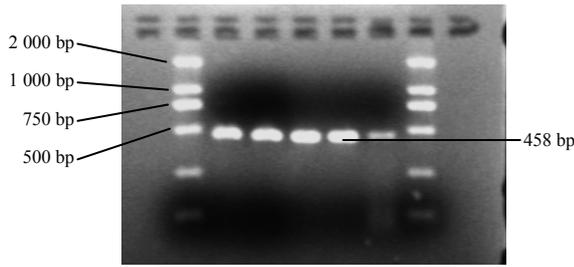


图1 CMYA5 基因扩增电泳结果

Fig.1 Electrophoretogram of CMYA5 gene amplified by PCR

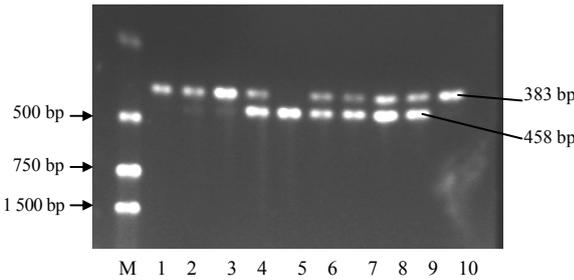


图2 CMYA5 基因片段的 BspTI 酶切电泳结果

Fig.2 Electrophoretogram of CMYA5 gene digested by BspTI

2.2 湖南黑猪 CMYA5 基因 BspTI 位点的基因型频率和等位基因频率

40头湖南黑猪中, AA、AC和CC基因型个体数分别为3、17、20头, 其基因型频率分别为0.075、0.425和0.500。A和C等位基因的频率分别为0.287 5和0.712 5。由此可见, 湖南黑猪群体中的CC纯合子比例较大, C等位基因占优势。

2.3 湖南黑猪 CMYA5 基因 BspTI 位点的群体遗传多态性

湖南黑猪群体在CMYA5基因BspTI位点上的多态信息含量和杂合度分别为0.599 9和0.409 7, 可见, 湖

南黑猪在该位点处于中度多态, 表明其遗传变异较大, 有望获得更大的遗传进展。经卡方适合性检验, 该群体在该位点的值为0.024 9, 表明该群体基因型分布达到了哈代温伯平衡状态($P > 0.05$)。

2.4 CMYA5 基因多态性与湖南黑猪肌肉品质性状的相关性

2.4.1 CMYA5 基因多态性与肌肉常规化学成分的相关性

由表1可见, AA型个体的水分含量极显著低于AC型和CC型($P < 0.01$); AA型个体的粗蛋白和肌内脂肪含量分别极显著和显著高于AC型($P < 0.05$ 或0.01)。3种基因型个体的粗灰分含量间差异不显著。

表1 CMYA5 基因不同基因型个体肌肉的常规成分

Table 1 Effect of different genotypes regarding CMYA5 gene on meat conventional ingredients

基因型	水分含量	粗蛋白含量	肌内脂肪含量	粗灰分含量
AA	(63.54±0.39)B	(23.97±0.33)A	(4.49±0.13)a	1.13±0.16
AC	(73.50±0.55)A	(19.89±0.47)B	(3.26±0.11)b	1.02±0.09
CC	(70.19±0.68)A	(21.18±0.45)AB	(4.06±0.19)ab	0.98±0.14

2.4.2 CMYA5 基因多态性与肌肉氨基酸含量的相关性

由表2可见, AC型个体的肌肉丝氨酸、精氨酸、脯氨酸含量显著高于AA型个体, 胱氨酸含量显著高于AA、CC型个体($P < 0.05$); AA型个体肌肉甲硫氨酸含量极显著低于AC、CC型个体, 酪氨酸含量极显著低于AC型个体($P < 0.01$), 其他基因型个体的肌肉氨基酸含量间差异不显著。

表2 CMYA5 基因不同基因型个体肌肉的氨基酸含量

Table 2 Effect of different genotypes regarding CMYA5 gene on content of meat amino acid

基因型	天门冬氨酸	苏氨酸	丝氨酸	谷氨酸	甘氨酸	丙氨酸	胱氨酸	缬氨酸	甲硫氨酸	异亮氨酸
AA	24.68±0.32	10.36±0.25	(10.86±0.21)b	40.74±0.90	9.95±0.22	14.11±0.38	(1.66±0.42)b	13.63±0.21	(4.33±0.09)B	11.29±0.18
AC	27.75±0.87	11.65±0.17	(12.61±0.23)a	44.11±1.21	11.65±0.41	15.86±0.43	(2.50±0.23)a	14.59±0.47	(6.54±0.19)A	12.10±0.33
CC	26.55±0.90	11.01±0.34	(11.97±0.32)ab	42.42±1.30	10.72±0.35	15.12±0.44	(1.88±0.56)b	14.25±0.52	(5.77±0.13)A	11.90±0.40

基因型	亮氨酸	酪氨酸	苯丙氨酸	赖氨酸	组氨酸	精氨酸	脯氨酸	必需氨基酸	风味氨基酸	总氨基酸
AA	19.35±0.49	(5.57±0.09)B	9.13±0.21	10.17±0.99	11.09±0.26	(13.33±0.29)b	(8.27±0.21)b	84.77±1.69	177.95±6.18	218.45±5.33
AC	21.29±0.55	(6.88±0.11)A	9.92±0.19	11.14±1.05	11.21±0.33	(15.54±0.39)a	(9.76±0.23)a	91.74±2.07	200.99±6.37	244.75±5.62
CC	21.02±0.54	(6.43±0.13)AB	9.69±0.33	12.24±1.27	11.50±0.34	(14.86±0.36)ab	(8.77±0.26)ab	91.61±2.45	191.67±5.29	236.11±6.02

2.4.3 *CMYA5* 基因多态性与肌肉脂肪酸含量的相关性

由表 3 可见, AA 型个体肌肉的反油酸、总饱和脂肪酸含量均显著高于 AC 型个体; 饱和脂肪

酸含量显著低于 AC 型个体($P<0.05$); 单不饱和脂肪酸极显著高于 AC 型和 CC 型个体($P<0.01$), 其他含量基因型个体肌肉的脂肪酸含量间差异不显著。

表 3 *CMYA5* 基因不同基因型个体肌肉的脂肪酸含量

基因型	肉豆蔻酸	棕榈酸	棕榈油酸	硬脂酸	反油酸	油酸	亚油酸
AA	1.56±0.05	24.13±0.63	4.78±0.19	10.16±0.26	(52.27±0.96)a	6.20±0.55	0.50±0.20
AC	1.53±0.04	26.17±0.79	4.03±0.22	11.10±0.30	(43.27±0.88)b	7.89±0.66	0.44±0.23
CC	1.51±0.07	24.90±0.67	4.73±0.26	11.28±0.24	(46.34±1.29)ab	7.43±0.99	0.77±0.29
基因型	二十烯酸	r-亚麻酸	亚麻酸	饱和脂肪酸	单不饱和脂肪酸	多不饱和脂肪酸	总不饱和脂肪酸
AA	0.56±0.15	1.27±0.13	1.11±0.38	(35.85±0.52)b	(63.63±0.42)A	1.48±0.33	(64.15±0.47)a
AC	0.52±0.21	0.86±0.11	0.63±0.34	(40.80±0.61)a	(58.68±0.87)B	0.52±0.23	(59.19±0.71)b
CC	0.71±0.19	1.32±0.14	1.03±0.50	(37.69±0.68)ab	(60.84±0.98)B	0.51±0.27	(62.34±0.68)ab

3 结论与讨论

a. *CMYA5* 基因的多态性及群体遗传分析。通过检测 *CMYA5* 基因在湖南黑猪的多态性分布, 发现 C 等位基因占优势。关于杜洛克、长白猪、大白猪、通城猪、清平猪、小梅山猪等猪种 *CMYA5* 基因 *Bsp*TI 位点的多态性检测结果显示, 除长白猪外, 其他猪种与湖南黑猪的检测结果一致, C 等位基因占优势, 其中清平猪和小梅山猪的 C 等位基因频率分别为 1 和 0.99。本试验中, 经卡方适合性检验, 该群体在该位点的值为 0.024 9, 表明该群体 *CMYA5* 基因的分布处于哈代温伯平衡状态, 说明就 *CMYA5* 基因的 *Bsp*TI 酶切位点而言, 该群体未经过选择。

b. *CMYA5* 基因多态性与肌内脂肪含量的关系。多项研究证实, 肌内脂肪对鲜猪肉的嫩度、多汁性和风味特性均具有改善作用。本研究结果表明, 肌内脂肪含量从高到低分别是 AA(4.49%)、CC(4.06%)、AC(3.26%) 型, 其中 AA 型个体的肌内脂肪显著高于 AC 型($P<0.05$), 与文献[10]中的研究结果(AA 型个体肌内脂肪含量最低)完全相反, 可见该基因对不同猪种肌内脂肪的影响存在差异, 也可能是由试验样本含量偏小、不同猪种遗传背景和饲养管理不同等多种原因导致。

c. *CMYA5* 基因多态性与肌肉氨基酸含量的关系。氨基酸数量、种类和比例是评价猪肉中蛋白质及猪肉品质的重要指标^[11-12], 丝氨酸等鲜味氨基酸被逐渐受到关注, 猪肉的“鲜美”一定程度上取决于这些氨基酸含量的高低。本试验结果表明, 不同

基因型个体的丝氨酸、胱氨酸、甲硫氨酸、精氨酸、脯氨酸等风味氨基酸含量存在显著或极显著差异。AA、AC、CC 基因型中, AC 型个体的风味氨基酸含量较其他 2 种更丰富, 丝氨酸、精氨酸、脯氨酸、胱氨酸、甲硫氨酸含量显著或极显著高于 AA 型。

d. *CMYA5* 基因多态性与肌肉脂肪酸含量的关系。肌内脂肪酸的组成与肉质存在着极大的相关性, 除硬脂酸外, 饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸(油酸)的含量与肉香味及整体可接受程度呈正相关, 与多不饱和脂肪酸呈负相关^[13-16]。本试验不同基因型个体脂肪酸含量不同, AC 型个体的饱和脂肪酸含量显著高于 AA 型个体; AA 型个体的单不饱和脂肪酸含量极显著高于 AC 型和 CC 型。

本研究结果初步表明, 湖南黑猪 *CMYA5* 基因的多态性与肌肉品质性状相关。鉴于本试验结果与其他学者研究结果不尽相同, 且关于该基因多态性与猪肌肉化学成分相关性的研究尚少, 加上肌肉成分测量的成本高, 本研究中湖南黑猪供试群体偏小, 应进一步加强对 *CMYA5* 基因的研究, 以挖掘其影响肉质性状的分子标记。

参考文献:

- [1] Benson M A, Tinsley C L, Blake D J. Myospryn is a novel binding partner for dysbindin in muscle[J]. J Biol Chem, 2004, 279(11): 10450-10458.
- [2] Tkatchenko A V, Pietu G, Cros N, et al. Identification of altered gene expression in skeletal muscle from Duchenne muscle dystrophy patients[J]. Neuromuscul Disord, 2001, 11(3): 269-277.

- [3] Durham J T ,Brand O M ,Arnold M ,et al .Myospryn is a direct transcriptional target for *MEF2A* that encodes a striated muscle, alpha-actinin-interacting, costamere-localized protein[J] . J Biol Chem , 2006 , 281(10) : 6841-6849 .
- [4] Reynolds J G ,Mccalmon S A ,Tomczyk T ,et al Identification and mapping of protein kinase A binding sites in the costameric protein myospryn [J] . Biochim Biophys Acta , 2007 , 1773(6) : 891-902 .
- [5] Reynolds J G ,Mccalmon S A ,Donaghey J A ,et al Deregulated protein kinase A signaling and myospryn expression in muscular dystrophy[J] . J Biol Chem , 2008 , 283(13) : 8070-8074 .
- [6] Jaakko S , Gaele B , Karine C , et al . Interactions with M-band titin and calpain 3 link myospryn (*CMYA5*) to tibial and limb-girdle muscular dystrophies[J] . J Biol Chem , 2010 , 285(39) : 30304-30315 .
- [7] Li M ,Luo X ,Zhang X , et al . A common variant of the cardiomyopathy associated 5 gene (*CMYA5*) is associated with schizophrenia in Chinese population[J] . Schizophr Res , 2011 , 129:217-219 .
- [8] NY/T 821—2004 猪肌肉品质测定技术规范[S] .
- [9] 朱吉,彭英林,李述初,等.宁乡猪种质特性研究[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2008,34(1):47-51.
- [10] Xu X L , Xu X W , Yin Q , et al . The molecular characterization and associations of porcine cardiomyopathy associated 5(*CMYA5*) gene with carcass trait and meat quality[J] . Mol Biol Rep , 2010 , 38(3) : 2085-2090 .
- [11] 刘桂琼,曹勤忠,姜勋平,等.小梅山猪促卵泡素 β 基因多态性及其与繁殖性能的关系[J].中国畜牧杂志,2004,40(12):6-8.
- [12] 魏彩虹.甘肃黑猪合成系肌肉脂肪酸和氨基酸特征研究[J].甘肃畜牧兽医,2001(5):1-3.
- [13] 李庆岗,经荣斌.猪肌内脂肪酸的研究进展[J].饲料博览,2004(3):10-12.
- [14] 何俊,贺长青,刘正祥,等.新美系猪的生长肥育和肉用性状分析[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2011,37(2):195-198.
- [15] 周晓容,杨飞云,黄萍,等.营养水平对荣昌猪肌内脂肪、脂肪酸含量的影响研究[J].饲料工业,2010,31(23):14-17.
- [16] 郭添福,苏州,郭礼荣,等.猪肌内脂肪酸成分的研究进展[J].江西饲料,2010(1):3-6.

责任编辑:王赛群

(上接第31页)

- [4] Zeng G M ,Fu H Y ,Zhong H ,et al .Co-degradation with glucose of four surfactants ,CTAB , TritonX-100 , SDS and Rhamnolipid, in lipid culture media and compost matrix[J] . Biodegradation , 2007 , 18(3) : 303-310 .
- [5] 束良佐,朱育晓. $A1^{3+}$ 和阳离子型表面活性剂复合污染对玉米幼苗的影响[J].农村生态环境,2001,17(2):50-52,55.
- [6] Anthony G D ,David B , Scott F , et al . Safety evaluation of a high-lipid algal biomass from *Chlorella protothecoides* [J] .Regulatory Toxicology and Pharmacology ,2009 ,55(2) : 166-180 .
- [7] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会.水和废水监测分析方法[M].4版.北京:中国环境科学出版社,2002:715-721.
- [8] 石瑛,杜青平,谢树莲.1,4-二氯苯对蛋白核小球藻的毒性效应[J].环境科学研究,2007,20(3):133-136.
- [9] 岳文洁,王朝晖,王桥军,等.氯氟菊酯对海洋卡盾藻的毒性效应[J].生态毒理学报,2009,4(2):251-257.
- [10] Bradford M ,Bradford . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J] . Anal Biochemistry , 1976 , 72(1/2) : 248-254 .
- [11] Edwards R , Dixon D P , Walbot V . Plant glutathione S-transferases : Enzymes with multiple functions in sickness and in health[J] . Trends in Plant Science , 2000 , 5(5) : 193-198 .
- [12] Qin Yong rong , Nong Yan chun , Huang Jiang bin , et al . The Comparison of contents of malondialdehyde and proline in the area of karst area in North-western Guangxi Province[J] . Agricultural Science and Technology ,2011 , 12(4) : 469-473 , 575 .
- [13] Mario D , Mónica H , Luis A , et al . Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses[J] . Biochemical Engineering Journal , 2010 , 48(3) : 385-407 .
- [14] 水生生物监测手册编委会.水生生物监测手册[K].南京:东南大学出版社,1993:192-202.
- [15] 曹西华,俞志明.季铵盐类化合物灭杀赤潮异弯藻的实验研究[J].海洋与湖沼,2003,34(2):201-207.
- [16] 王林,赵冬至,邢小罡,等.脱镁叶绿素对浮游植物吸收特性的影响[J].海洋与湖沼,2009,40(5):596-602.
- [17] 李爱芬,陈敏,周百成.褐藻光合作用色素-蛋白质复合物—研究进展和问题[J].植物学通报,1999,16(4):365-371.
- [18] 江月玲,林植芳,彭长连.蛋白质修饰剂对盐藻光合作用的影响[J].热带亚热带植物学报,1998,6(1):1-7.

责任编辑:杨盛强