遗传 HEREDITAS (Beijing) 2008 年 6 月, 30(6): 741－746
ISSN 0253-9772 www.chinagene.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00741

猪 *CAPN1* 基因部分外显子及 3 'UTR 区的 SNPs 检测

杨秀芹[1], 刘慧[1], 郭丽娟[1], 关庆芝[1], 许尧[1], 刘娣[1,2]

1. 东北农业大学动物科技学院, 哈尔滨 150030;
2. 黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086

摘要: 以野猪、民猪和大白猪为研究对象, 根据网上公布的序列设计了 7 对引物, 采用测序、PCR-SSCP 和 PCR-RFLP 方法对 *CAPN1* 基因的部分外显子和 3′UTR 区进行了单核苷酸多态性检测和基因型分析, 探讨 *CAPN1* 基因多态性与瘦肉率和嫩度的关系。研究发现 11 个 SNPs, 其中 5 个位于外显子, 4 个位于内含子, 2 个位于 3′UTR 区, 外显子中的突变有一处是错义突变, 导致了蛋白质多肽链第 260 位氨基酸发生了 M/V 的替代。群体遗传学分析表明, 在所检测的各多态位点上, 野猪、民猪、大白猪 3 个品种间不同基因型的分布都存在着极显著的差异(P<0.01), 而野猪和民猪之间各基因型的分布差异不显著(P>0.05), 民猪和大白猪之间各基因型的分布存在着极显著的差异(P<0.01)。结合品种特性分析表明, P4、P6 引物和 3′ UTR 区 *Hin*fⅠ位点所检测的不同基因型和瘦肉率具有一定的相关性。

关键词: 猪; *CAPN1* 基因; 瘦肉率; 嫩度; PCR-SSCP; PCR-RFLP

Analysis of SNPs in partial exons and 3 'UTR of *CAPN1* in porcine

YANG Xiu-Qin[1], LIU Hui[1], GUO Li-Juan[1], Guan Qing-Zhi[1], XU Yao[1], LIU Di[1,2]

1. *College of Animal Science and Technology*, *Northeast Agricultural University*, *Harbin* 150030, *China*;
2. *Agricultural Academy of Heilongjiang Province*, *Harbin* 150086, *China*

Abstract: In this study, Wild boar, Min pig and Yorkshire were used to investigate the effect of *CAPN1* gene on lean meat percentage and tenderness. Seven pairs of primers for exons and 3 ′untranslated region of *CAPN1* gene were designed according to pig sequences from GenBank. Polymorphisms within exons were detected by PCR-SSCP method. SNPs in 3 ′ untranslated region were detected by DNA sequencing, and PCR-RFLP method was then developed to screen the population. Totally, 11 SNPs, of which 5 from exons including one missense mutation resulting in amino acid substitution of M/V at the position of 260, 4 from introns and 2 from 3′ untranslated region, were identified. Population genetics analysis showed that the distribution of genotypes among Yorkshire, Min pig and Wild boar were extremely significant difference (P<0.01), while there were no significant difference between Min pig and Wild boar (P>0.05), and extremely significant difference existed between Min pig and Yorkshire (P<0.01). Association of polymorphisms with breed characteristics indicated that

收稿日期: 2007–11–09; 修回日期: 2007–12–26
基金项目: 黑龙江省杰出青年基金(编号: JC-05-19)和黑龙江省科技攻关项目(编号: GB05B106)资助[Supported by Science Foundation for Distinguised Young Scholars of Heilongjiang Province (No. JC-05-19) and Key Program Item for Science and Technology of Heilongjiang Province (No. GB05B106)]
作者简介: 杨秀芹(1971–), 女, 黑龙江人, 博士, 副教授, 研究方向：动物分子遗传学。Tel: 013945694180; E-mail: xiuqin163@163. com
通讯作者: 刘娣(1963–), 女, 吉林人, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向：动物遗传育种与繁殖。Tel: 0451-86677458, 013803644211; E-mail: liudi1963@163.com

the mutations detected by P4, P6 primers and that resulting in the change of *Hin*f Ⅰ recognition site may be related to lean meat percentage.

Keywords: pig; *CAPN1* gene; lean meat percentage; tenderness; PCR-SSCP; PCR-RFLP

μ-钙激活酶(μ-calpain)在机体内普遍表达，是肌肉组织中肌原纤维蛋白降解的主要酶，能够使包括Z线结合蛋白、肌钙蛋白-T、连接蛋白、肌间隙蛋白、M-线蛋白和原肌球蛋白等多种肌原纤维蛋白降解，产生大的多肽片段。因此，μ-钙激活酶不仅能够在动物宰后分解肌原纤维促进肉的嫩化[1~3]，而且还通过降解肌原纤维来影响活体组织中肌肉细胞的大小，对动物骨骼肌生长、瘦肉率的提高起着重要的调节作用[4]。

μ-钙激活酶是由大小两个亚基构成的异源二聚体，大亚基由*CAPN1* 基因编码，*CAPN1* cDNA体外表达产物如能正确折叠则具有全酶活性，表明小亚基不是钙激活酶行使活性所必须的，所以现在μ-钙激活酶也用来专门指大亚基。2000 年，Smith等[5]首次将*CAPN1* 作为牛肉嫩度的侯选基因，从此，人们开展了大量的*CAPN1*基因变异和肉嫩度的相关性研究，并已证实牛*CAPN1* 突变会显著影响肌肉嫩 度[6~9]。张增荣等[10]利用PCR-SSCP方法对鸡*CAPN1* 基因的编码区进行多态性检测，分析了优质肉鸡中不同基因型与生产性能的关系，结果发现有 2 个点突变与肌纤维密度存在着显著相关($P<0.05$)。目前，克隆得到的猪*CAPN1* mRNA(GenBank No. AF263610)长 2 994 bp，其中编码区长 2 142 bp，由 22 个外显子构成，3′UTR长 710 bp，5′UTR长 141 bp。杨秀芹 等[11]以嫩度和瘦肉率存在明显差异的大白猪和民猪为研究对象，对*CAPN1* 基因的部分外显子进行了PCR-SSCP分析，共寻找到 8 个SNPs，并且发现各多态位点不同基因型在两个猪种间的分布都存在着极显著的差异($P<0.01$)。本研究利用测序、PCR- SSCP和PCR-RFLP方法，继续在猪*CAPN1* 剩余的外显子及 3′UTR区寻找新的多态位点，探讨不同基因型在野猪、民猪、大白猪间的分布规律，并结合品种特性分析*CAPN1* 基因变异对嫩度、瘦肉率的影响，为进一步确定分子标记进而实现标记辅助选择提供基础。

瘦肉率一直是育种学家追求的目标，随着人们生活水平的提高，肉质的重要性也逐渐得到消费者和生产者的重视，嫩度是影响肉质的的一个重要方面，因此，对 *CAPN1* 基因进行多态性检测，并结合生产性状进行相关性分析，寻找能运用到生产实践中去的分子标记，具有一定的理论和实践意义。

1 材料和方法

1.1 材料

取野猪(14 头)、民猪(35 头)、大白猪(60 头)的耳组织样，通过酚-氯仿法提取基因组 DNA。

1.2 方法

1.2.1 PCR-SSCP 分析

根据 GenBank 上登录的 DNA 序列(GenBank No. DQ192642，DQ192643，DQ674244)，设计 6 对引物，利用 PCR-SSCP 方法对 *CAPN1* 基因的外显子进行多态性检测，引物序列及 PCR 反应条件见表 1。

将PCR产物与适量的上样缓冲液混匀，100℃水浴加热 10 min，冰浴 10 min，上样于非变性聚丙烯酰胺凝胶，凝胶的浓度根据扩增片断的长度不同而有所差别。室温下恒压 120 V电泳 14~16 h，电泳结束后用$AgNO_3$显色，待电泳条带清晰后换上去离子水停显，做基因型分析。对具单链构象多态性的PCR产物随机选取纯合基因型片段进行克隆、测序，进一步验证电泳分型结果。

1.2.2 PCR-RFLP 分析

根据 GenBank 上登录的 cDNA 序列(GenBank No. AF263610)的 3′UTR 区设计 1 对引物 F: 5′-TGT-GCTCTTCTGCCCTCG-3′ 和 R: 5′-TGGCACCCTC-ACAACTGATA-3′，通过测序对扩增片段进行单核苷酸多态性检测。随机选择 1 头野猪和 1 头民猪的基因组 DNA 作模板，进行 PCR 扩增、克隆、测序，将测序结果与 GenBank 上提供的序列比对后，发现有 2 个 SNPs 分别引起了限制性内切酶 *Hin*f Ⅰ/*Alw*N Ⅰ 识别位点的改变，据此建立 PCR-RFLP 检测技术，进行酶切多态性分析。

表 1　引物序列
Table 1　Primer sequences

引物 Primer	扩增位置 Location	扩增长度 Length (bp)	引物序列 Primer sequences(5′→3′)	复性温度 Annealing temperature(℃)
P1	Intron2, Exon3, Intron3	193	F: GTGGGAATAGGACTTGAGG R: GGAGAAAACACGCAGAAC	62
P2	Intron3, Exon4	169	F: CTGGGTGGAGACTGGTGG R: CTGGAAATGGAAGATGCC	60
P3	Exon6	169	F: GGTGAATGGCAGCTACGA R: GTCAATGGAGCAGCCCAG	60
P4	Intron6, Exon7, Intron7	220	F: GACACAGATGACAGAGCGTG R: CAGGGAGGTCAAGGGATG	56
P5	Exon8, Intron8	231	F: CTCTGGGGAACAGGTGAACT R: AACCCAGTCCCACGCAGA	63
P6	Exon11	170	F: CCACCTTCTGGGTGAACC R: GGCAAAGCCGATGGTCTC	59

2　结果与分析

2.1　PCR-SSCP 分析

2.1.1　电泳分型结果

所设计合成的 6 对引物在适宜的条件下都获得了特异性很好的 PCR 产物, 适合进行 SSCP 分析。再进一步优化非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和染色条件, 使每对引物都能得到清晰稳定的 SSCP 图谱。SSCP 检测后发现 P1、P2、P3 的扩增产物没有多态, P4、P5、P6 为多态性引物。多态性引物的 SSCP 结果如图 1。

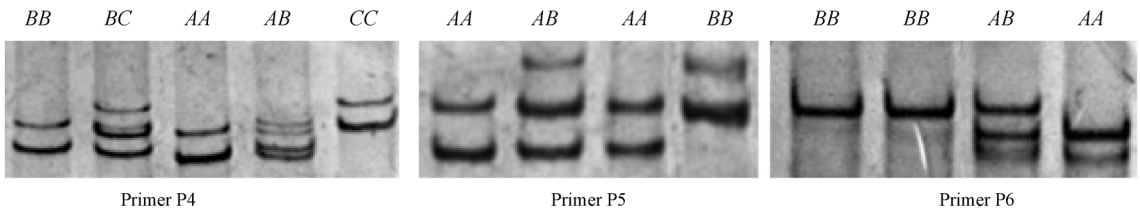

图 1　不同个体 *CAPN1* 基因的 SSCP 分析结果
Fig. 1　PCR-SSCP patterns for *CAPN1* gene of different individuals

2.1.2　克隆测序结果

每对引物随机选取纯合基因型片段进行克隆和测序, 并将测序结果与 GenBank 上提供的序列比对。共检测到 9 个 SNPs, 其中 5 个位于外显子, 并且外显子 7 上的突变导致了蛋白质多肽链第 260 位氨基酸发生了 M/V 的替代, 外显子 11 上的 4 个突变都是沉默突变。表 2 给出了测序所得的部分核苷酸序列及变异位置。

表 2　测序结果的比较
Table 2　Comparison of sequencing results

引物 Primer	基因型和部分核苷酸序列 Genotypes and partial neucleotide sequences	变异位置 Mutation site
P4	*AA* 型和 GenBank 上相同(Genotypes *AA* is the same as GenBank) *AA*: TTCTGGACATGG……GTACCCCCCC……CTGCAGGTGG……CTGTGGGTG *BB*: TTCTGGACATGG……GTA-CCCCCC……CTGAAGGTGG……CTGTGGGTG *CC*: TTCTGGACGTGG……GTA-CCCCCC……CTGCAGGTGG……CTGGGGGTG	Exon7: 19 bp Intron7: 4 bp Intron7: 29 bp Intron7: 74 bp
P5	*BB* 型和 GenBank 上相同(Genotypes *BB* is the same as GenBank) *AA*: GCCCGGGAGGCTTGAGGGGCTGTTCCGTGCTGC *BB*: GCCCGGGAGGCTTGAGAGGCTGTTCCGTGCTGC	Intron8: 37 bp
P6	*BB* 型和 GenBank 上相同(Genotypes *BB* is the same as GenBank) *AA*: TACGGGGGCCGTGAGTCGGGCT……ATTCGGACGCGACATGGAGA *BB*: TACGGGGGCCGTGAGTCAGGCT……ATTTGGCCGAGACATGGAGA	Exon11: 83 bp Exon11: 140 bp Exon11: 143 bp Exon11: 146 bp

注: 变异位点用方框标出。
Note: The mutant sites were boxed.

2.2 PCR-RFLP 电泳分型结果

F/R 引物的扩增产物长 636 bp, 经 *Hin*f Ⅰ/*Alw*N Ⅰ酶切后, 都产生 3 种基因型, 分别命名为 *AA*、*AB*、*BB*。限制性内切酶 *Hin*f Ⅰ消化后, *AA* 型产生 404 bp、196 bp、 36 bp 3 个小片段, *BB* 型产生 600 bp 和 36 bp 2 个片段, *AB* 型由 4 个片段组成, 长度分别为 600 bp、404 bp、196 bp、36 bp。*Alw*N Ⅰ消化后, *AA* 型产生 357 bp 和 279 bp 2 个片段, *BB* 型由于造成了酶切位点的消失, 所以不能切开, 只有 636 bp 的片段, *AB* 型则有 636 bp、357 bp 和 279 bp 3 个片段(图 2)。

2.3 不同基因型在 3 个猪种中的分布

利用所设计的引物对野猪、民猪、大白猪 *CAPN1* 基因的编码区和 3′UTR 进行了基因型检测, 每对引物的检测数、基因型频率、基因频率、多态信息含量(*PIC*)等统计参数值见表 3。

χ^2独立性检验表明在所检测的各多态位点, 野

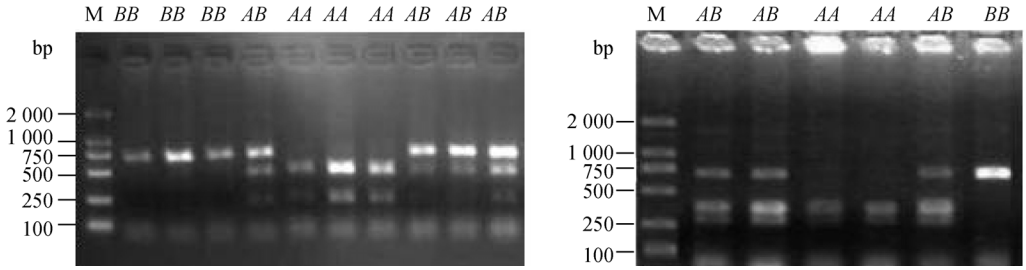

图 2 PCR 产物的酶切电泳图谱(左: *Hin*f Ⅰ酶切; 右: *Alw*N Ⅰ酶切)

Fig. 2 Agarose gel patterns of PCR products digested with *Hin*f Ⅰ (left)/*Alw*N Ⅰ (right)

表 3 3 品种猪 *CAPN1* 基因多态位点的统计参数值

Table 3 Statistic value of *CAPN1* gene among Wild boar, Min pig and Yorkshire at polymorphic sites

引物 Primer	品种 Breed	*AA*	*AB*	*BB*	*BC*	*CC*	*A*	*B*	*C*	*PIC*
P5	野猪 Wild boar	0.500 (7)	0.214 (3)	0.286 (4)	–	–	0.607	0.393	–	0.364
	民猪 Min pig	0.657 (23)	0.228 (8)	0.114 (4)	–	–	0.771	0.228	–	0.292
	大白 Yorkshire	1 (60)	0	0	–	–	1	0	–	0
P6	野猪 Wild boar	0.143 (2)	0.286 (4)	0.571 (8)	–	–	0.286	0.714	–	0.324
	民猪 Min pig	0.114 (4)	0.371 (13)	0.514 (18)	–	–	0.300	0.700	–	0.332
	大白 Yorkshire	0.567 (34)	0.350 (21)	0.083 (5)	–	–	0.742	0.258	–	0.310
P4	野猪 Wild boar	0.357 (5)	0.357 (5)	0.214 (3)	0	0.071 (1)	0.536	0.392	0.071	0.462
	民猪 Min pig	0.428 (15)	0.314 (11)	0.257 (9)	0	0	0.585	0.414	0	0.369
	大白 Yorkshire	0.033 (2)	0.083 (5)	0.25 (15)	0.300 (18)	0.33 (20)	0.074	0.442	0.480	0.476
*Hin*f Ⅰ 位点	野猪 Wild boar	0.286 (4)	0.500 (7)	0.214 (3)	–	–	0.536	0.464	–	0.394
	民猪 Min pig	0.400 (14)	0.371 (13)	0.229 (8)	–	–	0.586	0.414	–	0.368
	大白 Yorkshire	0.036 (4)	0.325 (27)	0.638 (53)	–	–	0.198	0.802	–	0.268
*Alw*N Ⅰ 位点	野猪 Wild boar	0.071 (1)	0.357 (5)	0.571 (8)	–	–	0.250	0.750	–	0.306
	民猪 Min pig	0.086 (3)	0.343 (12)	0.571 (20)	–	–	0.258	0.742	–	0.310
	大白 Yorkshire	0.036 (3)	0.687 (57)	0.277 (23)	–	–	0.380	0.620	–	0.360

注: 括号内的数字为检测的个体数。

Note: The numbers detected were shown in bracket.

猪、民猪、大白猪 3 个品种间不同基因型的分布都存在着极显著的差异($P<0.01$), χ^2分割检验表明野猪和民猪之间各基因型的分布差异不显著($P>0.05$), 民猪和大白猪之间各基因型的分布存在着极显著的差异($P<0.01$)。

3 讨 论

提高家畜瘦肉率和嫩度对畜牧业来说具有非常重要的经济意义。活体中肌肉蛋白质的增加取决于肌肉蛋白合成速度和降解速度, μ-钙激活酶作为肌原纤维主要蛋白降解的关键因素, 过量表达可导致肌肉合成速度减慢, 瘦肉率和产出降低。在动物宰后贮藏柔嫩化的过程中, μ-钙激活酶通过降解肌原纤维使肉的嫩度增加。大量的研究表明*CAPN1* 是影响肌肉嫩度和增长的潜在主效基因或与主效基因连锁[5~11]。本研究以嫩度和瘦肉率具有明显差异的大白猪、野猪和民猪为研究对象, 对猪*CAPN1* 基因的部分外显子及 3′UTR进行了多态性分析, 探讨不同基因型在种间的分布规律, 为进一步揭示*CAPN1* 基因多态性与功能提供基础。

P4 引物在外显子 7 上检测到一个 A/G 的错义突变, 导致了蛋白质多肽链上氨基酸的替代, 利用 prosite 软件对 *CAPN1* 的蛋白功能位点分析后发现该错义突变位于μ-钙激活酶大亚基的催化结构域内, 表明该突变有可能会影响μ-钙激活酶对肌原纤维蛋白的降解活性。

群体遗传学分析发现 3 个猪种在 P4 引物所检测的多态性中, 野猪和民猪以 *A* 为优势基因, *AA* 基因型频率占优势, 在这 2 个群体内没有检测到 *C* 等位基因, 大白猪却以 *C* 为优势基因, *CC* 基因型频率显著高于其他基因型频率, 品种内基因频率的分布截然不同, 品种间基因型的分布也存在着极显著的差异。对 P6 引物的群体遗传学分析也存在着类似情况, 野猪和民猪都以 *B* 为优势基因, *BB* 基因型频率明显高于其他基因型频率, 而大白猪以 *A* 为优势基因, *AA* 基因型频率也明显高于其他基因型频率。在 3′UTR 的 *Hin*fⅠ位点, 野猪和民猪都是以 *A* 为优势基因, 基因频率分别为 0.535 和 0.586; 大白猪以 *B* 为优势基因, 基因频率为 0.802, 呈明显的偏态分布。

综上所述, 民猪和大白猪在 P4、P6 多态性引物及 3′UTR 区的 *Hin*fⅠ位点的优势基因型正好相反。民猪是我国的地方猪种, 肉质鲜美, 脂肪含量高, 平均瘦肉率为 46%, 大白猪是引进的瘦肉型猪种, 平均瘦肉率高达 61%, 品种的这些特性提示我们 P4、P6 引物和 3′UTR 区 *Hin*fⅠ位点所检测的不同基因型和瘦肉率具有一定的相关性。但是由于缺乏合适的实验群体和相应的个体性状记录, 导致本实验还不够完善, 上述多态位点与瘦肉率和嫩度的相关性研究将是我们下一步工作的重点。

P5 引物和 3′UTR 区的 *Alw*NⅠ位点的基因型分布没有呈现出明显的种间分布规律。

本研究中的野猪采自黑龙江小兴安岭地区, 在种属划分上应属于东北亚种[12], 在所检测的每个多态位点, 不同基因型在野猪和民猪中的分布都不存在着显著差异($P>0.05$), 也从一个侧面证明了民猪的东北野猪起源。

多态信息含量是评价群体内遗传多样性的指标, $PIC<0.25$ 为低度多态, $0.25<PIC<0.5$ 为中度多态, $PIC>0.5$ 为高度多态。本研究中所检测的 3 个猪种在不同多态位点的 *PIC* 值除了大白猪在 P5 引物为 0 外, 其它各位点都在 0.268~0.476 之间, 说明 *CAPN1* 基因在这 3 个群体内遗传变异较大, 具有丰富的多态性。并且除了 P4 引物所检测的多态位点外, 在其他位点, 民猪的 *PIC* 值都大于大白猪, 这和民猪的遗传基础广泛, 选育程度低是一致的。

参考文献(References):

[1] Koohmaraie M. The role of Ca^{2+}-dependent proteases (calpains) in postmortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, 1992, 74(3): 239–245.[DOI]

[2] Morgan JB, Wheeler TL, Koohmaraie M, Savell JW, Crouse JD. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in longisimus muscle of young bulls and steers. *J Anim Sci*, 1993,71(6): 1471–1476.

[3] Rowe LJ, Maddlck KR, Longergan SM, Huff-Lonergan E. Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of μ-calpain. *J Anim Sci*, 2004, 82(11): 3254–3266.

[4] Fox JEB, Goll DE, Reynolds CC, Phillips DR. Identification of two proteins (actin-binding protein and P235) that are hydrolyzed by endogenous Ca^{2+} -dependent protease during platelet aggregation. *J Biol Chem*, 1985, 260(2): 1060–1066.

[5] Smith PL, Casas E, RexroadⅢCE, Kappes SM, Keele JW. Bovine *CAPN1* maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *J Anim Sci*, 2000, 78(10): 2589–2594.

[6] Page BT, Casas E, Quaas RL, Thallman RM, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, White SN, Bennett GL,

Keele JW, Dikeman ME, Smith TPL. Association of markers in the bovine *CAPN1* gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *J Anim Sci*, 2004, 82(12): 3474–3481.

[7] Page BT, Casas E, Heaton MP, Cullen NG, Hyndman DL, Morris CA, Crawford AM, Wheeler TL, Koohmaraie M, Keele JW, Smith TPL. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in *CAPN1* for association with meat tenderness in cattle. *J Anim Sci*, 2002, 80(12): 3077–3085.

[8] Casas E, White SN, Riley DG, Smith TPL, Brenneman RA, Olson TA, Johnson DD, Coleman SW, Bennett GL, Chase CC. Assesment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in Bos indicus cattle. *J Anim Sci*, 2005, 83: 13–19.

[9] White SN, Casas E, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, Riley DG, Chase CC, Johnson DD, Keele JW, Smith TPL. A new single nucleotide polymorphism in *CAPN1* extends the current tenderness marker test to include cattle of Bos indicus, Bos Taurus, and crossbred descent. *J Anim Sci*, 2005, 83(1): 13–19.

[10] ZHANG Zeng-Rong, ZHU Qing, JIANG Xiao-Song, DU Hua-Rui. Study on correlation between single nucleotide polymorphism of *CAPN1* gene and muscle tenderness and carcass traits in chicken. *Hereditas*(*Beijing*), 2007, 29(8): 982–988.
张增荣, 朱庆, 蒋小松, 杜华锐. 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. 遗传, 2007, 29(8): 982–988.

[11] YANG Xiu-Qin, LIU Hui, GUO Li-Juan, XU Yao, LIU Di. The mutation site analysis on *CAPN1* gene of Wild boar, Min pig and Yorkshire. *Hereditas*(*Beijing*), 2007, 29(5): 581–586.
杨秀芹, 刘慧, 郭立娟, 许尧, 刘娣. 野猪、民猪、大白猪μ-钙激活酶基因的变异位点分析. 遗传, 2007, 29(5): 581–586

[12] XIAO Zeng-Gu. Animals in Liaoning. Shenyang: Liaoning Scientific and Technical Publishes, 1988, 204–206.
肖增禂. 辽宁动物志. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1998, 204–206.