



利用 HRM 技术对皮南牛 *MSTN* 基因 C313Y 位点快速分型

滑留帅¹, 白跃宇², 王 璟¹, 陈付英¹, 张子敬¹, 王风勤³, 徐照学¹, 王二耀¹

(1. 河南省农业科学院 畜牧兽医研究所, 河南省畜禽繁育与营养调控重点实验室, 郑州 450002;

2. 河南省种牛遗传性能测定中心, 郑州 450046; 3. 科尔沁牛业南阳有限公司, 河南南阳 473555)

摘要 旨在利用高分辨率熔解(HRM)技术建立一种皮南牛 *MSTN* 基因 C313Y 突变的快速分型方法, 进而统计 *MSTN* 基因 C313Y 突变在皮南牛群体中的突变频率, 以及突变对生产性能的影响。测量并统计 99 头皮南牛(母牛)的体尺和体质量指标, 然后分别利用 Sanger 测序法和 HRM 技术对皮南牛 *MSTN* 基因 C313Y 位点进行分型, 并利用一般线性模型分析突变对体尺和体质量指标的影响。结果表明, 皮南牛在 3 岁之后体尺和体质量指标均趋于稳定, 平均体高、体斜长、胸围、尻宽、尻长和体质量分别是(127.88±3.65) cm、(154.10±6.89) cm、(181.48±8.54) cm、(46.19±2.94) cm、(50.52±2.65) cm 和(471.34±53.78) kg。Sanger 测序法和 HRM 技术对 *MSTN* 基因 C313Y 位点的分型结果完全一致, 其中野生型(GG)、杂合型突变(GA)和纯合型突变(AA)的个体分别占 8.08%、70.7% 和 21.21%。关联分析表明, 杂合型突变(GA)和纯合型突变(AA)均能够显著提高皮南牛的体尺和体质量指标, 其中纯合突变型个体和杂合突变型个体的体质量比野生型个体分别显著提高 38.55% 和 10.32%。成功建立基于 HRM 的皮南牛 *MSTN* 基因 C313Y 位点快速分型方法, 该方法对于快速组建皮南牛 *MSTN* C313Y 纯合突变群体, 进而有效提高群体的体尺和体质量指标具有重要的应用价值。

关键词 *MSTN*; C313Y; 分型; HRM; 皮南牛

中图分类号 S8, Q38

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2019)12-1927-07

单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNPs)是指由 DNA 序列中某个特定位点上单个核苷酸发生变异(转换、颠换、插入和缺失)而引起的序列多态性。与其他分子标记相比, SNPs 具有分布广、密度高、遗传稳定、易于自动化检测等特点, 成为继限制性片段长度多态性和微卫星多态性这两代遗传标记后的第三代遗传标记^[1-2]。目前世界上关于 SNPs 的研究数据增长迅速, 相关研究对于疾病高危群体预测、疾病相关基因鉴定、药物设计和测试、生物起源进化、生物多样性评价、动植物遗传标记、品种改良等许多生命科学领域问题都起到重要的推动作用。

高分辨率熔解(High-resolution melting, HRM)技术, 是近几年来新兴起的一种 SNPs 检测方法。由于使用新型的饱和染料和高分辨率的仪器, HRM 通过 PCR 之后的高分辨率熔解曲线分析, 能够检测 PCR 片段中的单个碱基差异, 因

而可用于高通量的突变扫描、基因分型和甲基化分析等^[3-4]。由于该技术仅在标准 PCR 的基础上添加饱和荧光染料而无需使用序列特异性探针, 同时在 PCR 结束后直接运行高分辨率熔解曲线而无须电泳, 从而具有操作简便、快速、准确、通量高、成本低等特点, 并且实现了真正的闭管操作, 目前受到广泛关注^[4-5]。

双肌性状是指肌肉中肌纤维增多、全身肌肉总量显著增加而形成的一种表型。动物双肌性状首先在牛中发现, 双肌牛的最显著特征是肌纤维普遍肥大, 可引起牛肌肉质量平均增加 25%。由于具有显著的肉用优势, 双肌性状一直是家畜培育的关注热点。肌肉生长抑制素(Myostatin, *MSTN*)基因功能异常是导致动物双肌性状的遗传基础^[6-9]。目前在牛的 *MSTN* 基因上共发现了 6 个自然发生的功能缺陷型突变, 其中 C313Y 是在 *MSTN* 基因编码区第 938 位核苷酸发生 G

收稿日期:2019-04-20 修回日期:2019-06-26

基金项目:国家肉牛牦牛产业技术体系(CARS-38);河南省肉牛产业技术体系(S2013-08)。

第一作者:滑留帅,男,助理研究员,从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:hualishuai@163.com

通信作者:王二耀,男,研究员,主要从事动物发育及胚胎工程研究。E-mail:wangeryao666@qq.com

到 A 的突变,从而引起第 313 位氨基酸由半胱氨酸(C)转变为酪氨酸(Y),进而引起蛋白质失活,是皮埃蒙特牛的双肌遗传基础^[6-8]。皮南牛是在河南省南阳市新野县以南阳牛为母本,以皮埃蒙特牛为父本,通过导入杂交、级进杂交和横交固定等多个阶段选育而来的高档肉牛新品系^[10]。皮南牛具有优秀的肉用性能,包括生长速度快、肉质好、屠宰率高、高档牛肉切块率高等特点,因此深受市场欢迎。皮南牛作为皮埃蒙特牛的杂交牛,也部分继承了皮南牛的双肌性状。

本研究拟利用 HRM 建立一种 *MSTN* 基因 C313Y 突变的快速检测方法,进而分析目前皮南牛群体中 *MSTN* C313Y 突变的频率,以及突变对皮南牛生产性能的影响。研究结果对快速组建双肌皮南牛核心群,加强皮南牛的整体选育,进而促进中国肉牛产业的种质创新具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

样品采自河南省南阳市新野县。使用 $\varphi = 70\%$ 酒精清洁皮南牛(母牛)的耳缘部位后,用耳缺钳采集 0.3 cm^3 大小的耳缘组织样品。将样品用 PBS 清洗后,至于组织样品保存液中带回实验室, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.2 体尺测量和体质量估计

采集组织样品的同时,测量体高、体斜长、胸围、尻宽和尻长等体尺指标,并根据公式“体质量=体斜长 \times 胸围²/10 800”估算体质量^[2, 11]。

1.3 主要试剂

组织样品保存液(No. 9750, TaKaRa, 大连宝生物), $\varphi = 70\%$ 酒精, PBS 缓冲液, 组织样品基因组 DNA 提取试剂盒(No. DP304, 天根, 北京), 普通 PCR 试剂盒(No. KT221, 天根, 北京), HRM PCR 试剂盒(No. FP210, 天根, 北京)。

1.4 主要仪器

离心机, 琼脂糖凝胶电泳仪, 凝胶成像系统, 紫外分光光度计(NanoDrop, 美国), 普通 PCR 仪(Eppendorf, 德国), 荧光定量 PCR 仪(Light Cycler 96, 罗氏, 瑞士)。

1.5 基因组 DNA 的提取

使用组织样品 DNA 提取试剂盒提取样品中的基因组 DNA, 操作步骤参照试剂盒说明书。DNA 提取后, 使用紫外分光光度计检测 DNA 的质量浓度和纯度, 并进一步稀释至 $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

1.6 利用测序技术对样品 *MSTN* 基因 C313Y 位点分型

利用 PCR 扩增所有样品的 *MSTN* 基因(GenBank 登录号: NM_001001525.3) C313Y 位点。引物序列为 C313Y-F: CTAAGTGTG-GATTTTGAA, C313Y-R: TATAGCATATTA-ATTGGAGAC。PCR 产物长度为 200 bp , 退火温度为 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 。PCR 产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 然后根据测序结果对 *MSTN* 基因 C313Y 位点进行分型。

1.7 利用 HRM 技术对样品 *MSTN* 基因 C313Y 位点分型

使用 HRM 分型的引物为 BT-C313Y-F: TTGGATGGGATTGGATTAT, BT-C313Y-R: CA-CAAGATGGGTATGAGGA。PCR 产物长度为 104 bp 。PCR 反应体系参照试剂盒说明书, 其中 $20 \mu\text{L}$ 的反应体系包含 $2\times$ HRM analysis premix $10 \mu\text{L}$ 、上下游引物($10 \mu\text{mol}/\text{L}$)各 $0.6 \mu\text{L}$ 、基因组 DNA($50 \text{ ng}/\mu\text{L}$) $1 \mu\text{L}$ 。PCR 反应体系准备完成后, 置于荧光定量 PCR 仪中进行 HRM 分型, PCR 反应程序为: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 2 min , 40 个循环($95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 10 s , $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 20 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 30 s), 最后添加 1 次熔解曲线分析。

1.8 统计分析

统计不同年龄段皮南牛体尺和体质量指标的均值。

利用一般线性模型(LSM)关联分析 *MSTN* 基因 C313Y 位点对体尺和体质量指标的影响, 公式如下^[12-13]:

$$Y = \mu + \text{age} + \text{gene} + e$$

其中 Y 为个体的表型值, μ 为群体均值, age 为年龄效应, gene 为 *MSTN* C313Y 的基因型效应, e 为随机误差。

2 结果与分析

2.1 皮南牛的体尺和体质量指标统计结果

共测定 99 头皮南牛的体尺指标, 个体年龄从 1 岁~6 岁不等。结果表明, 3 岁前属于皮南牛的快速生长期, 其中 1 岁平均体质量为 $(283.04 \pm 21.41) \text{ kg}$, 3 岁平均体质量为 $(444.29 \pm 56.57) \text{ kg}$ 。皮南牛在 3 岁之后体尺和体质量指标均趋于稳定, 平均体高、体斜长、胸围、尻宽、尻长和体质量分别是 $(127.88 \pm 3.65) \text{ cm}$ 、 $(154.10 \pm 6.89) \text{ cm}$ 、 $(181.48 \pm 8.54) \text{ cm}$ 、 (46.19 ± 2.94)

cm、(50.52 ± 2.65) cm 和 (471.34 ± 53.78) kg (表 1)。

表 1 皮南牛的体尺和体质量

Table 1 Body measurements and body masses of Pinan cattle

| 年龄 Age | 数量 Number | 体高/cm Body height | 体斜长/cm Body length | 胸围/cm Heart girth | 尻宽/cm Rump width | 尻长/cm Rump length | 体质量/kg Body mass |
|-----------|--------------|----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| 1 | 2 | 111.50 ± 6.36 | 125.50 ± 4.95 | 156.00 ± 2.83 | 37.00 ± 4.24 | 40.00 ± 1.41 | 283.04 ± 21.41 |
| 1.5 | 10 | 116.70 ± 2.71 | 132.70 ± 5.52 | 156.20 ± 6.41 | 40.20 ± 3.19 | 43.50 ± 3.27 | 300.61 ± 33.03 |
| 2 | 17 | 121.18 ± 3.78 | 140.29 ± 6.37 | 166.82 ± 7.24 | 41.41 ± 3.79 | 45.76 ± 3.95 | 363.07 ± 45.50 |
| 3 | 28 | 126.36 ± 4.83 | 152.00 ± 6.54 | 177.25 ± 9.09 | 44.54 ± 3.25 | 48.50 ± 2.85 | 444.29 ± 56.57 |
| 4 | 28 | 127.07 ± 3.38 | 153.64 ± 7.24 | 181.32 ± 9.08 | 45.61 ± 2.67 | 50.46 ± 3.00 | 469.56 ± 59.14 |
| 5 | 8 | 129.50 ± 4.44 | 153.50 ± 6.26 | 182.75 ± 8.15 | 48.13 ± 2.80 | 50.88 ± 1.46 | 474.72 ± 36.06 |
| 6 | 6 | 129.50 ± 3.02 | 157.00 ± 6.26 | 180.50 ± 7.48 | 46.33 ± 3.67 | 50.33 ± 2.42 | 475.12 ± 54.39 |
| 4~6 | 42 | 127.88 ± 3.65 | 154.10 ± 6.89 | 181.48 ± 8.54 | 46.19 ± 2.94 | 50.52 ± 2.65 | 471.34 ± 53.78 |

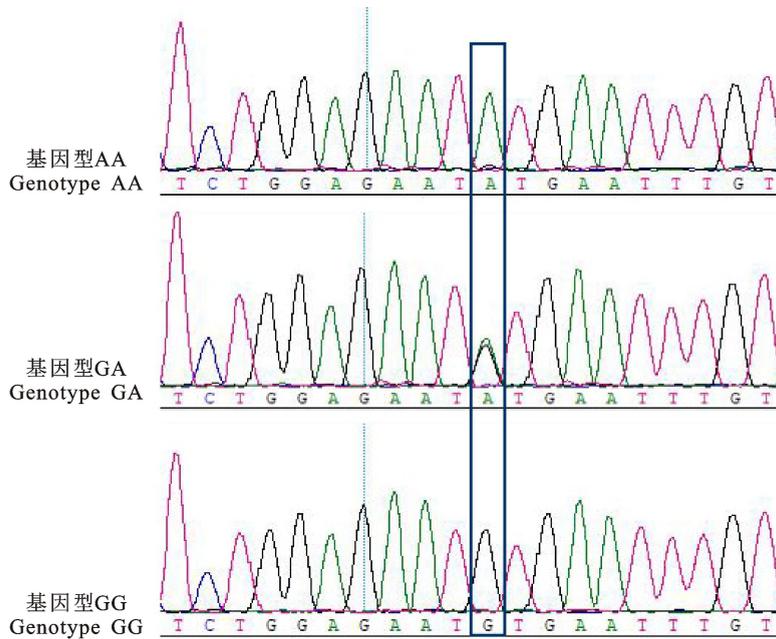
注:数值为“平均值±标准差”。

Note:the values were displayed as “Mean ± SD”.

2.2 样品的测序分型结果

利用 Sanger 测序的方法对皮南牛 *MSTN* 基因 C313Y 位点进行分型(图 1),其中纯合子个体

测序结果为单峰,而杂合子个体测序结果为双峰。分型结果表明,GG 型个体 8 个(8.08%),GA 型个体 70 个(70.7%),AA 型个体 21 个(21.21%)。



方框内展示的是 C313Y 突变位点,GG 型和 AA 型均为纯合子,因此仅有一个独立的峰,而 GA 型杂合子有一个双峰,且该双峰的高度通常为相邻峰高的一半左右 The C313Y locus is shown in the box, in which, the genotype GG and AA are homozygous, so there is only one independent peak, while the genotype GA is heterozygous, so there is a double peak and normally, the height of the double peak is just half of the height of the adjacent peaks

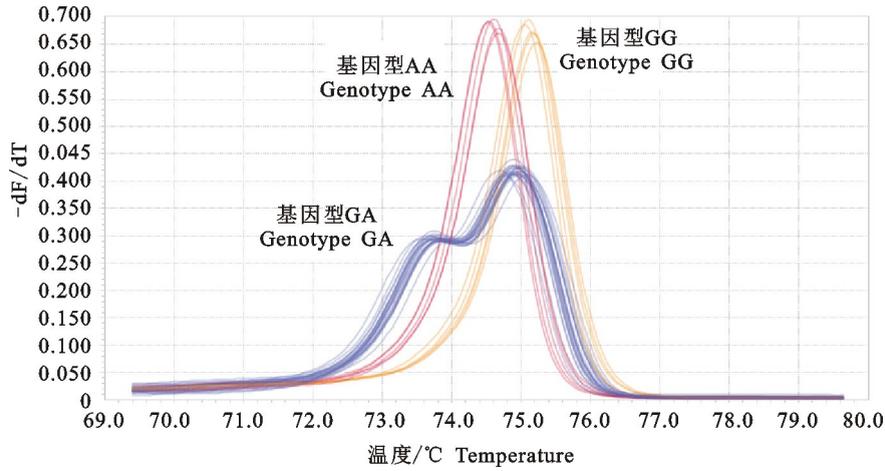
图 1 皮南牛 *MSTN* 基因 C313Y 位点的测序分型示意图

Fig. 1 Genotyping of *MSTN* C313Y in Pinan cattle by Sanger sequencing

2.3 样品的 HRM 分型结果

利用 HRM 法对所有个体进行再次分型,分型结果见图 2。不同的基因型具有不同的熔解曲线模式,其中 GG 型和 AA 型均为单峰,但出现的温度不同,GA 型为双峰且峰高低于 GG 型和 AA

型,依据此熔解曲线模式可以简单快速地对个体进行分型。分型结果表明,GG 型个体 8 个,GA 型个体 70 个,AA 型个体 21 个,与 Sanger 测序结果完全一致。



X轴是温度,Y轴为荧光强度对温度的负一阶导数(-dF/dT)。其中GG型和AA型个体均为单峰,且AA型个体的峰出现较早(左侧),而GG型个体的峰出现较晚(右侧)。GA型个体为双峰,且峰高低于GG型和AA型。The X-axis is the temperature and the Y-axis is the negative first derivative of the fluorescence intensity versus temperature (-dF/dT). The GG genotype and AA genotype are all single peaks, and the peak of the AA genotype appears earlier (left side) than the GG genotype (right side). The GA genotype has double peaks, and the peak heights are lower than genotype GG and genotype AA.

图2 皮南牛 MSTN 基因 C313Y 位点的 HRM 分型

Fig. 2 Genotyping of MSTN C313Y in Pinan cattle by HRM

2.4 MSTN C313Y 突变对生长性状的影响

利用 LSM 对 MSTN 基因 C313Y 位点的不同基因型与皮南牛体尺和体质量指标进行关联分析(表 2),结果表明,杂合型突变(GA)和纯合型

突变(AA)均能够显著提高皮南牛的体尺和体质量指标,GA 型个体的体质量比 GG 型个体提高 10.32%($P < 0.01$),而 AA 型个体比 GG 型个体则提高 38.55%($P < 0.01$)。

表 2 皮南牛 MSTN 基因 C313Y 位点不同基因型与体尺和体质量间的关联分析

Table 2 Associations between MSTN C313Y and body measurements and body masses of Pinan cattle

| 基因型 Genotype | 体高/cm Body height | 体斜长/cm Body length | 胸围/cm Heart girth | 尻宽/cm Rump width | 尻长/cm Rump length | 体质量/kg Body mass |
|-----------------|----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| GG | 120.01±0.91 A | 141.47±1.56 A | 167.80±1.90 Aa | 42.37±0.72A | 46.88±0.68 a | 374.22±11.93 A |
| GA | 124.95±0.56 Ba | 148.04±0.96 B | 172.54±1.17 Ab | 43.73±0.44A | 47.81±0.42 a | 412.86±7.35 B |
| AA | 129.17±1.58 Bb | 155.67±2.73 C | 189.50±3.32 B | 49.17±1.25 B | 50.42±1.20 b | 518.49±20.83 C |
| (GA-GG)/GG×100 | 4.12 | 4.64 | 2.83 | 3.21 | 1.98 | 10.32 |
| (AA-GG)/GG×100 | 7.63 | 10.03 | 12.93 | 16.05 | 7.54 | 38.55 |

注:数值为“平均值±标准误”。同列不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note:the values were displayed as “Mean ± SE”. In the same column, the difference between values marked with different capital letter was extremely significant ($P < 0.01$), while the different lower letter showed significant difference ($P < 0.05$).

3 讨论

伴随着关联分析数据和功能验证数据的不断积累,SNPs 在动物遗传育种工作中发挥着越来越重要的作用。其主要应用形式包括以单标记为主的标记辅助选择(Marker assisted selection, MAS)和多标记为主的全基因组选择(Genomic selection, GS)。从理论上讲,全基因组选择包含的遗传信息更多,选择也更准确,是未来分子育种的主要方式^[14-15]。但在动物选育生产实践中,

有些经济性状属于质量性状,例如毛色^[16]、蛋壳颜色^[17]、角形^[18]等,往往受单基因或单突变控制;有些经济性状虽然属于数量性状,但存在极显著的主效基因,或同样受到单突变的控制,例如产仔数^[19]、肌肉沉积^[20]、PSE 肉^[21]等。这些情况下,利用单标记辅助选择即可实现巨大的遗传进展,因而不断优化单个 SNP 的分型方法仍然具有重要的价值。

在育种实践中,能否开展高通量检测是一种 SNP 分型方法能否得到广泛应用的重要影响因

素。高通量检测方法总体上可以分为两类,第一类是针对同一个样品并行检测多个位点,例如芯片、下代测序等技术,主要应用于全基因组选择。第二类是针对同一个位点并行检测多个样品,例如 Taqman、KASP、质谱等技术,主要应用于单标记为主的标记辅助选择。尽管目前已经有许多高通量单标记分型技术被开发和应用,但各类方法都有需要继续改进的地方,包括成本、步骤、精度、时间等多个方面^[1, 22]。高分辨率熔解曲线作为新出现的 SNP 分型技术,其拥有许多优点,包括无需使用荧光标记探针,不受突变种类和突变位点的限制,具有高灵敏度和特异性、高通量、操作简单灵活、成本低、闭管操作等^[4-5],有望成为重要的第二类高通量检测技术。本研究利用 HRM 对 *MSTN* C313Y 突变进行分型,结果表明与测序分型结果完全一致,但检测成本和检测时间却远远少于测序分型,进一步证明 HRM 用于 SNP 分型的优越性。

但是鉴于 HRM 的分型原理,在实际操作中也有一些需要注意的问题。首先,在检测的片段内最好只存在一个 SNP,过多的 SNPs 往往会造成峰形混乱,进而干扰判型结果,因此扩增片段长度往往要求小于 100 bp。其次,HRM 依赖于高精度的荧光定量 PCR 仪,理想的熔解速度为 0.1~0.3 °C/s,如果设备精度不能满足要求则同样会干扰判型结果。再次,HRM 依赖于饱和荧光染料,因此 PCR 试剂要求优质且稳定。总之,HRM 分析结果依赖于靶点复杂度、模板纯度、高度特异性的 HRM PCR 试剂盒、高精度的荧光定量 PCR 仪等多个方面,需要在应用时根据具体情况进行优化。

虽然 *MSTN* 基因功能失活在家畜中可表现出显著增加肌肉产量的双肌性状,但自然发生的能够引起家畜表现双肌表型的 *MSTN* 变异类型非常有限^[23-24],其中蓝白花牛和皮埃蒙特牛是比较典型的代表^[6]。利用现有双肌肉用品种改良本地品种,更是一个十分漫长的过程。在本研究中,*MSTN* C313Y 杂合型突变(GA)和纯合型突变(AA)均能够显著提高皮南牛的各项体尺和体质量指标,且纯合突变比杂合突变具有更大的提高效果。因此,基于分子标记辅助选择 *MSTN* C313Y 纯合突变个体,对于皮南牛的综合选育具有重要的意义。而本研究中开发的基于 HRM 技术对 *MSTN* 基因 C313Y 位点快速分型的方法也

具有广泛的应用价值,并且对于其他畜禽的分子标记辅助选择也具有一定的参考价值。

4 结论

成功建立基于 HRM 的皮南牛 *MSTN* 基因 C313Y 位点快速分型方法,该方法对于快速组建皮南牛 *MSTN* C313Y 纯合突变群体,大幅度提高群体的体尺和体质量指标具有重要应用价值。

参考文献 Reference:

- [1] 赵杰,游新勇,徐贞贞,等. SNP 检测方法在动物研究中的应用[J]. 农业工程学报,2018,34(4):299-305.
ZHAO J, YOU X Y, XU ZH ZH, et al. Review on application of SNP detection methods in animal research [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2018, 34(4): 299-305.
- [2] 滑留帅. 固原本地黄牛及其利杂群体育肥屠宰性能与相关分子标记研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2007.
HUA L SH. Research on fattening and slaughter performance and molecular marker analysis in Guyuan local cattle and crossbreed of *Limousin* × *Local cattle* [D]. Yangling Shaanxi: Northwest A & F University, 2007.
- [3] GUNDRY C N, VANDERSTEEN J G, REED G H, et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes[J]. *Clinical Chemistry*, 2003, 49(3): 396-406.
- [4] 刘自增,吴周良,阎萍,等. 高分辨率熔解曲线分析应用的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2013,40(8):105-111.
LIU Z Z, WU ZH L, YAN P, et al. Research progress on the application of high-resolution melting curve analysis [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2013, 40(8): 105-111.
- [5] 王冬梅,李俊,杨红敏,等. 高分辨率熔解曲线 HRM 在 SNP 检测中的应用[J]. 基因组学与应用生物学,2015, 34(4):892-895.
WANG D M, LI J, YANG H M, et al. Application of high resolution melting curve in SNP detection[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34(4): 892-895.
- [6] 王建起,曹文广. Myostatin 基因及其与动物双肌性状间关系的研究进展[J]. 中国农业科学,2014,47(8):1577-1587.
WANG J Q, CAO W G. Myostatin and its double-muscling phenotype in animals [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(8): 1577-1587.
- [7] 刘博,韩志国,高腾云. 牛双肌基因遗传机制及研究进展[J]. 中国农学通报,2011,27(1):333-336.
LIU B, HAN ZH G, GAO T Y. Progress in the study on genetic mechanism of the cattle Myostatin gene[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(1): 333-336.
- [8] 尉翔栋,吕晨晨,朱肖亭,等. 利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术制备牛 *MSTN* 基因编辑胚胎[J]. 河南农业科学,

- 2019,48(2):131-136.
- YU X D, LÜ CH CH, ZHU X T, *et al.* Preparation of bovine *MSTN* gene editing embryos using CRISPR-Cas9 gene editing technology[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2019, 48(2):131-136.
- [9] 杜晓华, 李积友, 韩登武, 等. 甘肃西门塔尔牛临泽类群 *MSTN* 基因外显子的多态性[J]. 西北农业学报, 2015, 24(11):29-34.
- DU X H, LI J Y, HAN D W, *et al.* Polymorphism analysis of *MSTN* gene exons of Linze simmental cattle in Gansu province [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2015, 24(11):29-34.
- [10] 王建钦. 皮南牛育种工作研究进展及产业化[J]. 中国牛业科学, 2015, 41(5):84-86.
- WANG J Q. Research progress and industrialization of breeding work in Pinan cattle[J]. *China Cattle Science*, 2015, 41(5):84-86.
- [11] 滑留帅, 陈宏, 杨晓冰, 等. 固原本地黄牛及其利杂群体 *Pit-1* 基因多态性与育肥性状的关系[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(12):1-5.
- HUA L SH, CHEN H, YANG X B, *et al.* Association of polymorphism of *Pit-1* gene with fattening traits in Guyuan local cattle and crossbreed of Limousin × Local cattle[J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2007, 35(12):1-5.
- [12] HUA L, WANG J, LI M, *et al.* An Asp7Gly substitution in *PPARG* is associated with decreased transcriptional activation activity[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(1):e86954.
- [13] 段鹏杰, 张慧林, 刘宇, 等. 秦川牛 *MYH8* 基因多态性及其与生长性状的关联分析[J]. 西北农业学报, 2016, 25(1):1-8.
- DUAN P J, ZHANG H L, LIU Y, *et al.* Polymorphism in *MYH8* gene and association with growth traits of Qinchuan beef cattle [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2016, 25(1):1-8.
- [14] 彭潇, 尹立林, 梅全顺, 等. 猪主要经济性状的基因组选择研究[J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(2):439-445.
- PENG X, YIN L L, MEI Q SH, *et al.* Genomic selection of major economic characters in pigs[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2019, 50(2):439-445.
- [15] 成海建, 姜富贵, 张清峰, 等. 全基因组选择技术在肉牛育种中的应用[J]. 中国牛业科学, 2018, 44(6):68-72.
- CHENG H J, JIANG F G, ZHANG Q F, *et al.* Application of whole genome selection technology in beef breeding[J]. *China Cattle Science*, 2018, 44(6):68-72.
- [16] DORSHORST B, HENEGAR C, LIAO X, *et al.* Dominant red coat color in Holstein cattle is associated with a missense mutation in the coatomer protein complex, Subunit Alpha (COPA) gene [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(6):e0128969.
- [17] 张昊, 申杰, 吴艳, 等. 鸡绿壳蛋基因分子鉴定方法在湖北地方鸡育种群体中的检测应用[J]. 中国家禽, 2016, 38(12):66-68.
- ZHANG H, SHEN J, WU Y, *et al.* Detection and application of the molecular identification method for green shell egg in Hubei local chicken breeding population[J]. *China Poultry*, 2016, 38(12):66-68.
- [18] MEDUGORAC I, SEICHTER D, GRAF A, *et al.* Bovine polledness - an autosomal dominant trait with allelic heterogeneity[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(6):e39477.
- [19] GUAN F, LIU S R, SHI G Q, *et al.* Polymorphism of *FecB* gene in nine sheep breeds or strains and its effects on litter size, lamb growth and development[J]. *Animal Reproduction Science*, 2007, 99(1):44-52.
- [20] MCPHERRON A C, LEE S J. Double muscling in cattle due to mutations in the Myostatin gene[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94(23):12457-12461.
- [21] 卞军平, 杨又兵, 娄然, 等. 豫西黑猪保种场氟烷基因的检测[J]. 河南科技大学学报(自然科学版), 2019, 40(4):72-75.
- BIAN J P, YANG Y B, LOU R, *et al.* Detection of the Halothane gene in breed herd of Yuxi Black pig[J]. *Journal of Henan University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2019, 40(4):72-75.
- [22] 汪维鹏, 倪坤仪, 周国华. 单核苷酸多态性检测方法的研究进展[J]. 遗传, 2006, 28(1):117-126.
- WANG W P, NI K Y, ZHOU G H. Approaches for SNP genotyping[J]. *Hereditas*, 2006, 28(1):117-126.
- [23] 吕文发, 杨连玉, 贺实伟, 等. 中国西门塔尔牛、利木赞牛和夏洛莱牛 *MSTN* 基因多态性分析[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(6):852-854, 868.
- LÜ W F, YANG L Y, HE SH W, *et al.* Analysis of Chinese Simmental, Limousin and Charolais of *MSTN* gene polymorphism[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2010, 30(6):852-854, 868.
- [24] 冀德君, 常春芳, 常洪, 等. 中国牛亚科 6 个物种 *MSTN* 基因外显子 2 多态性及分化研究[J]. 中国畜牧杂志, 2009, 45(1):1-4.
- JI D J, CHANG CH F, CHANG H, *et al.* Polymorphism and phylogenetic relationship of Myostatin gene exon 2 in 6 bovine species in China[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2009, 45(1):1-4.

Rapid Genotyping of the *MSTN* C313Y in Pinan Cattle Using High-resolution Melting Technology

HUA Liushuai¹, BAI Yueyu², WANG Jing¹, CHEN Fuying¹, ZHANG Zijing¹,
WANG Fengqin³, XU Zhaoxue¹ and WANG Eryao¹

(1. Henan Key Laboratory of Farm Animal Breeding and Nutritional Regulation, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan Breeding Cattle Genetic Performance Determination Center, Zhengzhou 450046, China;

3. Horqin Cattle Nanyang Limited Corporation, Nanyang Henan 473555, China)

Abstract The aim of this study was to establish a rapid detection method for the *MSTN* C313Y mutation of Pinan cattle using high-resolution melting (HRM) technology, and then to analyze the mutation frequency and mutation effect in Pinan cattle. The body size and body mass of 99 Pinan cattle were measured, then the Sanger sequencing and HRM method were used to genotype the *MSTN* C313Y in experimental population, and the associations between the mutation and growth performance were analyzed by General Linear Model. The results showed that the body size and body mass of Pinan cattle became stable after the age of three. The average body height, body length, heart girth, rump width, rump length and body mass were (127.88 ± 3.65) cm, (154.10 ± 6.89) cm, (181.48 ± 8.54) cm, (46.19 ± 2.94) cm, (50.52 ± 2.65) cm and (471.34 ± 53.78) kg, respectively. The genotyping results of the Sanger sequencing and HRM method were identical, in which the wild type (GG), heterozygous mutant (GA) and homozygous mutant (AA) individuals accounted for 8.08%, 70.7% and 21.21%, respectively. Association analysis showed that both heterozygous mutant (GA) and homozygous mutant (AA) could significantly improve the body size and body mass of Pinan cattle, and the homozygous mutation had a greater improvement than the heterozygous mutation. Compared with wild type individuals, the body mass of individuals with homozygous mutant and heterozygous mutant increased by 38.55% and 10.32%, respectively. Our work demonstrates the successful establishment of HRM-based rapid genotyping method for the *MSTN* C313Y in Pinan cattle. This method has great application potentials for the rapid establishment of Pinan cattle core group with homozygous mutants, which can also effectively improve the body size and body mass of the whole group.

Key words *MSTN*; C313Y; Genotyping; HRM; Pinan cattle

Received 2019-04-20

Returned 2019-06-26

Foundation item Henan Beef Cattle Industrial Technology System(No. CARS-38); National Beef Cattle Industrial Technology System(No. S2013-08).

First author HUA Liushuai, male, assistant research fellow. Research area: animal genetics, breeding and reproduction. E-mail: hualiusuai@163.com

Corresponding author WANG Eryao, male, research fellow. Research area: animal development and embryo engineering. E-mail: wangeryao666@qq.com

(责任编辑:顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)