

SSH法结合定量 PCR 技术研究双肌臀猪肌肉组织的差异表达基因*

李文海** 邓学梅** 李 宁 王少华 赵毅强 杜正霖 张 然 吴克亮 吴常信***

(中国农业大学动物科技学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要 利用抑制性消减杂交技术 (suppression subtractive hybridization, SSH) 成功地构建了双肌臀与非双肌臀大白猪肌肉组织差异表达的消减 cDNA 文库, 获得有效克隆 686 个. 对整个文库测序分析, 共获得 587 条有效序列. 利用 BLAST 在线软件与 GenBank、GenBank EST 和 Tigr Porcine EST 等数据库进行同源序列比较, 发现其中有 11 个未知新序列, 可能代表“双肌臀”大白猪肌肉组织特异表达的新基因. 对文库中所包含的兰尼啶受体基因 (*RYR1*)、钙依赖性蛋白激酶基因 (*CAMK2*)、人类胰岛素生长因子结合蛋白-7 基因 (*IGFBP7*), 以及 695 号、882 号和 480 号 3 个新基因进行了实时荧光定量 PCR 检测, 结果显示: *RYR1*、*CAMK2* 及 *IGFBP7* 基因在双肌臀猪肌肉组织 RNA 池中的表达量, 分别为对照的非双肌臀猪肌肉组织 RNA 池中表达量的 1.87、1.90 和 1.85 倍; 695 号、882 号和 480 号 3 个新的 ESTs 在双肌臀猪肌肉组织 RNA 池中的表达量为非双肌臀猪肌肉组织 RNA 池中表达量的 1.48、1.44 和 1.78 倍. 这提示我们, 上述基因的上调表达很可能与猪双肌臀性状的发生有密切的关系, 可以作为研究该性状的候选基因.

关键词 双肌臀大白猪, 抑制性消减杂交, 基因差异表达, 荧光定量 PCR

学科分类号 Q7

“双肌臀”大白猪是在 1997 年被发现并命名的, 其典型特征是前后躯特别丰满, 肌肉发育突出, 尤其是背最长肌、股二头肌、半腱肌轮廓明显, 臀部圆, 呈球状, 尾根上方有一深凹窝, 整体呈现双脊背双臀. 这种猪具有生长速度快、产肉率高、瘦肉率高等优点, 数年来备受养殖业的关注^[1], 但在目前的育种群体中还存在该性状遗传不稳定的问题.

近年来, 人们对“双肌臀”大白猪的分子发育机理开展了研究. 肌肉生长抑制素基因 (*myostatin*, *MSTN*) 曾作为研究的热点. *MSTN* 基因对肌肉生长具有负调控作用, 与小鼠及“双肌”肉牛的肌肉发达密切相关. 但姜运良 (2002 年)、李绍华 (2004 年) 等^[2,3]在“双肌臀”大白猪 *MSTN* 基因多态性分析中均没有检测到该基因保守性区域碱基的改变或缺失. 迄今为止, 还没有发现遗传效应较为显著的猪“双肌臀”性状候选基因.

本研究利用抑制性消减杂交技术构建了双肌臀大白猪肌肉组织上调表达的消减 cDNA 文库, 对消减文库进行了全文库测序, 发现了表达上调的基因以及新的 ESTs. 应用实时荧光定量 PCR 技术对差异表达基因进行了定量分析, 验证了部分基因在双肌与非双肌猪群体中表达的差异. 为发现新的候

选基因, 进一步研究猪双肌性状发育的分子机理奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本组织来源. 实验猪由北京顺新龙养殖有限责任公司提供. 从引种群中选择 3 窝 2.5 月龄仔猪, 每窝都包含具有明显双肌臀性状的猪和不具有双肌臀性状的猪, 从每窝猪中挑选出双肌臀性状最明显的猪和不具有双肌臀性状的猪各 1 头, 组成双肌臀猪和非双肌臀猪的配对组合. 新鲜采取每头猪的最末胸椎处背最长肌, 迅速放入液氮中速冻, 然后转入 -80℃ 冰箱中保存.

1.1.2 主要试剂. RNA 提取及反转录酶购自 Invitrogen 公司, 抑制消减杂交试剂盒购自 Clontech 公司, 定量 PCR 采用 ABI 公司 5700SDS 型荧光定量 PCR 仪, 以及该公司生产的 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒.

*国家重点基础研究发展规划项目 (973) (TG2000016104) 和国家杰出青年基金资助项目 (39725022).

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 010-62732738, E-mail: chxwu@public.bta.net.cn

收稿日期: 2004-11-03, 接受日期: 2004-12-31

1.2 方法

1.2.1 RNA 池建立. 提取 3 对实验猪每一个体背最长肌的总 RNA, 用分光光度计测其吸光度值, 计算出每个个体 RNA 的浓度, 等量混合, 分别组建双肌臀猪和非双肌臀猪肌肉组织 RNA 池.

1.2.2 抑制消减 cDNA 文库构建.

a. PolyA- RNA 的纯化: 分别取双肌臀猪 RNA 池和非双肌臀猪 RNA 池各 1 mg, 使用 mRNA purification kit (QIAGEN 公司) 提取 PolyA-RNA, 并进行定性定量分析.

b. 抑制消减杂交: 以双肌臀猪 RNA 池的反转录所得 cDNA 为实验子 (tester), 非双肌臀猪 RNA 池的反转录所得 cDNA 为驱动子 (driver), 建立消减 cDNA 文库.

c. 消减效率检测: 用持家基因 α - 微管蛋白 (α -tubulin) 半定量 PCR 做消减效率的分析. 引物序列为 PF: 5' CAGGTCCTCAGGGCTTCTTG 3', PR: 5' GGATGGAGTTGTAGGGCTCA 3'; 退火温度为 60°C. 反应体系及条件按照试剂盒说明书进行, 循环数为 18~33 个.

d. 消减文库构建: 消减效率鉴定合格后, 取 1.0 μ l 差减 cDNA 片段、1.0 μ l pMD-T18 载体、5.0 μ l Solution I 溶液 (大连宝生物公司产品) 和 3 μ l Mili-Q 水混合, 16°C 连接过夜. 取 2 μ l 连接产物与 38 μ l DH10B 电激感受态细胞混合, 电转化, 加入 960 μ l SOC 培养基, 37°C 摇菌 40 min, 涂布于含 X-gal/IPTG Amp (50 mg/L) 的 LB 平板上, 过

夜培养. 挑取白色克隆, 点种于盛有 0.5 ml 液体 LB 培养基的 96 孔摇菌板, 37°C 100 r/min 培养过夜, 一部分加 80% 的甘油至甘油终浓度为 10%, 液氮速冻, -70°C 保种, 另一部分用于 PCR 扩增模板与测序.

1.2.3 文库的鉴定、测序与序列比对.

取 1 μ l 菌液进行菌体 PCR 扩增检测, 引物为 Nested primer 1 和 Nested primer 2R, 反应程序为: 94.0°C 3 min; 95.0°C, 10 s, 68.0°C, 3 min, 28 个循环.

文库鉴定合格后, 将整个文库进行测序. 将测序结果利用 BLAST 在线软件与 GenBank 数据库、GenBank EST 数据库和 Tigr Porcine EST 数据库进行同源序列比对分析.

1.2.4 实时荧光定量 PCR 鉴定.

根据比对结果, 从中挑出与肌肉肥大发育密切相关的 *RYR1*、*CAMK2*、*IGFBP7* 基因以及 695 号、882 号和 480 号 3 个未知新序列, 以本研究所构建 RNA 池为模板, 设计定量 PCR 引物, 以 *GAPDH* 基因为参照标准进行定量分析.

反应体系为: 模板 1.0 μ l, 10 $\times$ SYBR PCR 缓冲液 1.5 μ l, 25 mmol/L $MgCl_2$ 1.8 μ l, dNTP Blend 1.2 μ l, AmpliTaq Gold (5 U/ μ l) 0.075 μ l, AmpErase UNG (1 U/ μ l) 0.15 μ l, primer F (12.5 μ mol/L) 0.4 μ l, primer R (12.5 μ mol/L) 0.4 μ l, ddH₂O 8.475 μ l, 总体系为 15 μ l.

Table 1 Primers for quantitative PCR

Gene symbol	Primer symbol	Primer sequences	Length	Annealing temperature/°C
<i>RYR1</i>	<i>RYR1</i> -F	TGTCCCTCCT GGGTCACTAC	191 bp	58
	<i>RYR1</i> -R	CTTGCGGAAG AAGTTGAAGG		
<i>CAMK2</i>	<i>CAMK2</i> -F	GGGCAGGTACAGCACGTC	116 bp	56
	<i>CAMK2</i> -R	ATCGTGGCCATCAGACCTAC		
<i>IGFBP-7</i>	<i>IGFBP7</i> -F	AACTGCCCATCTGTTCCATC	179 bp	60
	<i>IGFBP7</i> -R	TGCAACCTGTGTGGCATAAT		
480	480-F	TGGGATTTGAGTGTGATGGA	136 bp	56
	480-R	ATGGGGAGATACCAGTGCAG		
695	695-F	ACGCTCAAGGGAACTCAGA	148 bp	58
	695-R	GAGGCGGAACATAAAATCCAA		
882	882-F	GCGTGGCCCTAAAAATACAA	148 bp	58
	882-R	GCTCCAGAGTTGGGAGTGAG		
<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i> -F	GGGCATGAAC CATGAGAAGT	162 bp	Control in reaction
	<i>GAPDH</i> -R	GTCTTCTGGG TGGCAGTGAT		

2 结果与分析

2.1 RNA 的提取及 RNA 池的建立

提取的总 RNA 用分光光度计检测, A_{260}/A_{280} 值处于 1.9~2.0 之间. 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 28 S 条带的亮度高于 18 S 条带, 前者约为后者的 1.5~2.0 倍, 5 S 条带弱. 表明本实验提取的总 RNA 符合构建文库的质量要求.

2.2 消减效率的检测

消减杂交做得是否成功, 可以通过对消减前后模板 PCR 扩增检测拷贝数的变化来确定. 按照 SSH 方法要求, 如果两者相差 5 个循环, 则认为消减效率比较高, 可用于文库的构建.

本研究选用持家基因 α -tubulin 来做消减效率的分析. 在 18、23、28 和 33 个循环结束时取 5 μ l PCR 产物, 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测. 如图 1 所示, 消减后 (S18, S23, S28, S33) 的样品中

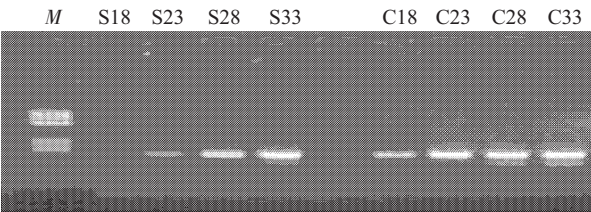


Fig.1 Half quantitative PCR for detection of subtraction efficiency

M: molecular marker; S18, S23, S28, S33: subtracted secondary PCR product with α -tubulin 3' and 5' primers at 18, 23, 28 and 33 cycles; C18, C23, C28, C33: unsubtracted secondary PCR product with α -tubulin 3' and 5' primers at 18, 23, 28 and 33 cycles.

α -tubulin 的扩增滞后于消减前 (C18, C23, C28, C33) 5~10 个循环. 说明本实验的消减杂交是成功的.

2.3 文库质量的鉴定

PCR 产物电泳检测结果表明(图 2), cDNA 克隆外源插入片段的大小在 100~1 500 bp 之间, 与 SSH 设计预期的插入片段大小吻合. PCR 产物为单一条带的克隆数为 686 个, 占克隆总数的 89.3%; PCR 产物为 2 条带的克隆数为 52 个, 占克隆总数的 6.8%; 产物为 3 条或以上的克隆有 21 个, 占克隆总数的 2.7%; 无条带的克隆有 9 个, 占克隆总数的 1.2%. 由此可见, 所建文库的质量良好, 可用于序列分析或杂交筛选.

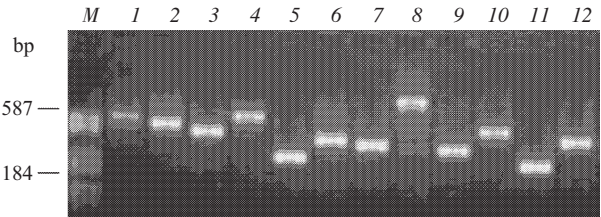


Fig.2 PCR products of SSH library

M: molecular marker; 1~12: PCR products of the single clones.

2.4 消减文库的全文库测序与分析

将文库送至北京华大基因公司, 进行全文库单向测序扫描. 引物为 M13-21 正向引物, 菌种为 DH10B, 载体为 pMD-T18. 测序成功的条件为: $Q > 20$, 长度 >100 bp. 根据这个条件, 获得合格序列 587 条.

Table 2 Molecular functional clustering of the genes in the SSH library

Class of gene function	Numbers of gene	Class of gene function	Numbers of gene
Cell adhesion molecule	2	Nucleic acid binding	29
Chaperone	1	Oxidoreductase	1
Cytoskeletal protein	14	Phosphatase	5
Extracellular matrix	3	Protease	1
Hydrolase	8	Select calcium binding protein	4
Ion channel	2	Select regulatory molecule	5
Isomerase	3	Signaling molecule	1
Kinase	2	Synthase and synthetase	4
Ligase	5	Transcription factor	8
Lyase	2	Transferase	1
Membrane traffic protein	4	Transporter	5
Miscellaneous function	3		

将此 587 条序列利用 BLAST 软件与 GenBank 数据库、GenBank EST 数据库和 Tigr Porcine EST 数据库进行比对分析, 比对条件为: 匹配区域长度 >50 且相似度 >80% 为标准. 发现文库中有 11 个 ESTs 序列在三个数据库中都找不到同源片段或同源性无法满足要求. 这 11 个 EST 可能代表了新基因.

2.5 消减文库比对结果的聚类分析

根据匹配区域长度 >50 且相似度 >80% 为标准的比对结果, 最后有 518 条序列找到了同源基因. 剔除其中的冗余序列, 最终在我们的文库中共得到了 371 个不同的同源基因. 将这 371 个基因在 <http://panther.appliedbiosystems.com> 网站上按分子功能为标准进行聚类分析(表 2), 只有 113 个序列得到了功能分类.

2.6 荧光定量 PCR 检测

为了更准确地鉴定 SSH 文库中差异表达基因的可靠性, 选择 *RYR1* (兰尼啶受体)、*CAMK2* (钙依赖性蛋白激酶)、*IGFBP7* (类胰岛素生长因子结合蛋白 7) 等 3 个与肌肉肥大发育密切相关的基因,

及本文库中获得的 3 个新的 ESTs 进行实时定量 PCR 检测.

荧光定量 PCR 的可靠性由两个主要参数来代表, 首先分析拟合标准曲线的相关系数, 只有当相关系数 $r > 0.9800$, 定量的结果才比较可信. 本研究定量 PCR 结果中, 每个样品的相关系数均符合 $r > 0.9850$. 另外, 要求做 3 个以上的实验重复, 重复的效果由动力学曲线和融解曲线的吻合性来反映. 本研究对每个样本做了 4 次重复, 4 次重复的标准曲线、动力学曲线和融解曲线的结果吻合性都达到了要求.

数据整理并进行 t 检验(表 3), *IGFBP7* 基因在双肌臀猪和非双肌臀猪 RNA 池中的表达量差异显著 ($P < 0.05$); 695 号、480 号、882 号 ESTs 和 *RYR1*、*CAMK2* 两个基因在双肌臀猪和非双肌臀猪 RNA 池中的表达量差异均为极显著 ($P < 0.01$). *RYR1*、*CAMK2*、*IGFBP7* 在双肌臀猪肌肉组织中表达量分别达到了非双肌臀猪的 1.87、1.90 和 1.85 倍. 695、882 和 480 3 个 ESTs 在双肌臀猪中表达量也接近或超过非双肌臀猪的 1.5 倍.

Table 3 t -Test of the gene expression differentiation between double-muscling and non-double-muscling pigs

Gene or clone symbol	<i>RYR1</i>	<i>CAMK2</i>	<i>IGFBP7</i>	480	695	882
Gene expression of double-muscling RNA pool ¹⁾	104.85	2.40	11.6	36.11	13.79	4.58
Gene expression of non-double-muscling RNA pool ¹⁾	56.10	1.26	6.27	20.84	9.33	3.18
P value	0.001 7	0.003 5	0.031	0.005 1	0.002 7	0.005 8
Times of gene expression differentiation	1.87	1.90	1.85	1.73	1.48	1.44

¹⁾Data in these two lines are relative value emended by *GAPDH* gene.

3 讨 论

“双肌”现象最初在肉牛和绵羊中报道, 肉牛的双肌性状是由肌肉生长抑制素基因 (*MSTN*) 突变造成的^[4], 绵羊的双肌基因则被定位于 2 号染色体上, 另外, 在 18 号染色体上还发现了与绵羊后躯肥大密切相关的美臀基因 (*Callipyge*)^[5]. “双肌臀猪”这个概念是参照“双肌牛”的概念而提出来的, 1997 年, 中国农业大学动物科技学院的吴常信教授等在加拿大引种时发现, 在大白猪猪群中有个别猪的背部、臀部肌肉异常发达, 类似牛的双肌性状. 随后将这些猪引入中国, 并命名为“双肌臀”大白猪. 在皮特兰猪中也发现过类双肌现象. 但由于皮特兰猪应激敏感性高, 肉品质差, 使得皮特兰猪

的“双肌”性状没有得到推广. 在“双肌臀”大白猪选育中发现双肌性状具有明显的可遗传性. 但是, 该性状遗传还不稳定. 双肌臀猪遗传学基础至今没有定论, 有人分析了 *MSTN* 基因和 *Callipyge* 基因在不同猪群体中的多态性, 但没有发现上述基因与猪“双肌”性状间存在显著的相关性. 由此可见, 虽然在不同物种中都存在相类似的双肌性状, 但其遗传基础可能有很大差异, 即不同物种具有不同的双肌基因. 因此, 有必要利用抑制消减杂交等手段筛选猪特有的“双肌”性状的主效基因^[6], 以阐明双肌臀猪的遗传基础.

抑制性消减杂交技术 (SSH) 是 1996 年由 Diatchenko 等^[7]提出的, 它基于杂交二级动力学和抑制 PCR 原理富集实验子 (tester) 特异表达的基因. 本实验中, 通过消减杂交对 tester (双肌) 和 driver

(非双肌)的 mRNA 共同片段进行了消减,并通过抑制性 PCR 特异性扩增 tester (双肌)特异表达的 cDNA 片段,使双肌臀猪肌肉组织特异表达的基因在文库中得以富集。

荧光定量 PCR (fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR) 技术是近年来发展起来的对模板 DNA 片段进行定量研究的方法,该技术在 PCR 反应系统中引入了荧光标记探针或荧光染料,具有可实时监测、高特异性、高灵敏性和高精确性的特点^[8],是目前用于检测基因差异表达的一种快速有效的方法。本研究利用 FQ-PCR 技术检验了双肌臀猪和非双肌臀猪肌肉组织 SSH 文库中 3 个已知功能基因和 3 个新的 EST 的差异表达,结果表明其表达差异均在 1.5~2.0 之间。由此说明所构建 SSH 文库有效地富集了双肌臀猪肌肉组织特异表达的基因,可以进一步通过杂交等手段筛选影响猪双肌性状的主效基因。同时,已鉴定的 6 个基因可以作为猪双肌性状的候选基因,做进一步的研究。

肌肉的发达程度取决于肌纤维的数量和直径。因此,肌肉的过度发育归根结底在于肌纤维数量的增生和/或肌纤维的肥大。影响肌纤维发育的基因很多,本研究在所建立的 SSH 文库中选取了 *RYR1*、*CAMK2* 和 *IGFBP7* 基因做定量 PCR 研究。3 个基因的表达差异倍数分别是 1.87、1.90 和 1.85 倍。

RYR1 (兰尼啶受体基因,俗称氟烷基因)的研究主要集中于该基因对肉质的影响。猪 *RYR1* 基因的单碱基突变 C¹⁸⁴³→T¹⁸⁴³,导致受体蛋白 Arg⁶¹⁵→Cys⁶¹⁵,从而引起骨骼肌肌浆网 Ca²⁺ 通道功能异常,在应激因子作用下,肌质中较长时间维持较高浓度的 Ca²⁺ 水平,使骨骼肌持续收缩,产生过量的 CO₂、乳酸和热^[9],从而使猪屠体品质出现酸软、渗水等问题。但该基因的作用是多方面的,Vries 等研究发现,在氟烷应激阳性猪中,肌纤维的直径较大^[7]。朱砺等^[10]的试验也证实,氟烷阳性纯合子个体 (nn) 的肌纤维面积明显大于阴性纯合子个体 (NN) 和杂合子个体 (Nn),而阴性纯合子个体 (NN) 和杂合子个体 (Nn) 间差异不显著。本研究所采用的实验猪中并不存在氟烷阳性纯合子个体 (nn)。但 *RYR1* 基因在双肌臀猪和非双肌臀猪骨骼肌中的表达量呈现明显的差异,这提示我们 *RYR1* 基因的表达量提高可能会对肌肉的肥大发育有一定的作用,但目前还未见到 *RYR1* 基因表达水平与肌肉发育关系的报道。

蛋白质的磷酸化及去磷酸化是细胞内极为重要的生物活性调节机制。催化蛋白质磷酸化的酶是蛋白激酶,催化蛋白质去磷酸化的酶是蛋白磷酸酶,这 2 种酶的活性依赖于 Ca²⁺ 和 CaM (calmodulin, 钙调素) 的蛋白激酶 (如 Ca²⁺/CaMK II)^[11]。Ca²⁺/CaMK II 是一种多功能的蛋白激酶,在神经细胞的功能调节中起着重要作用。Gruver 等^[12] (1993 年) 对心肌研究亦发现,胞内 Ca²⁺ 增加激活 Ca²⁺/CaM 依赖的激酶,导致培养的心肌细胞产生肥大反应。钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) 和钙调磷酸酶 (calcineurin) 相互作用,共同调节着肌肉中蛋白质的磷酸化及去磷酸化,共同影响着肌肉的生长与发育。神经系统的活动控制着肌肉收缩功能和肌肉基因表达。现在,研究者已开始用药理学和遗传学的方法来研究调节神经活动对肌纤维类型及其发育程度产生影响的信号传导通路。因此,本研究根据基因表达分析的结果提出 *CAMK2* 基因应在骨骼肌肥大发育的研究中受到重视。

IGFs (类胰岛素生长因子) 与肌纤维的发育关系很密切,高表达的 IGF 会导致肌肉的过度发育而肥大。IGFs 在血液中大部分与 IGFBP (类胰岛素生长因子结合蛋白) 结合,形成三元复合物,延长 IGFs 的半衰期,并维持血液中 IGFs 的水平。已有研究证实,IGFBP7 主要有两类功能:一是具有依赖 IGFs 的功能,IGFBP7 在血管中参与 IGFs 的运输,延长 IGFs 的半衰期,调控 IGFs 与 IGFs 受体的结合,从而间接和直接地调控 IGF 生物活性;其次,IGFBP7 还具有不依赖 IGFs 活性的功能,它是一种典型的肿瘤生长抑制因子,能有效地抑制肿瘤的生长和发育^[13,14]。IGFBP7 表达量的提高为运送更多的 IGF 到肌肉中发挥作用提供了载体保障,为肌肉的肥大发育提供了另一种途径。

根据本研究的结果推测,*RYR1*、*CAMK2*、*IGFBP7* 基因和 695 号、882 号和 480 号 3 个新 EST 表达量的提高与肌肉的肥大发育关系密切,可以把它们作为猪双肌臀性状的候选基因来进行更深层次功能的研究。

参 考 文 献

- 1 任广志,刘金章,张青海,等.双肌臀大白猪生长性能及胴体性状的研究.中国畜牧杂志,2002,38 (5): 28~29
Ren G Z, Liu J Z, Zhang Q H, et al. Chinese Journal of Animal Science, 2002, 38 (5): 28~29
- 2 姜运良,李 宁,吴常信,等.不同品种猪肌肉生长抑制素基因单核苷酸多态性分析.遗传学报,2001,28 (9):840~845

- Jiang Y L, Li N, Wu C X, *et al.* Acta Genetica Sinica, 2001, **28** (9): 840~845
- 3 李绍华, 熊远著, 郑 嵘. 猪 MSTN 基因多态性及其 SNPs 的研究. 遗传学报, 2002, **29** (4): 326~331
- Li S H, Xiong Y Z, Zheng R, *et al.* Acta Genetica Sinica, 2002, **29** (4): 326~331
- 4 McPherron A C, Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94** (23): 12457~12461
- 5 Freking B A, Keele J W, Nielsen M K, *et al.* Evaluation of the ovine callipyge locus: II. Genotypic effects on growth, slaughter, and carcass traits. J Animal Sci, 1998, **76** (10): 2549~2559
- 6 Tanguy A, Guo X, Ford S E. Discovery of genes expressed in response to Perkinsus marinus challenge in Eastern (Crassostrea virginica) and Pacific (C. gigas) oysters. Gene, 2004, **338**(1):121~131
- 7 Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, *et al.* Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93** (12): 6025~6030
- 8 阳成波, 印遇龙, 龚建华, 等. 实时定量 PCR 研究进展及其应用. 中国预防兽医学报, 2003, **25** (5): 395~399
- Yang C B, Yin Y L, Gong J H, *et al.* Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2003, **25** (5): 395~399
- 9 姜勋平, 张 牧, 刘桂琼, 等. 猪 *RYR1* 基因对繁殖性能的影响. 江苏农业研究, 1999, **20** (1): 48~51
- Jiang X P, Zhang M, Liu G Q, *et al.* Jiangsu Agricultural Research, 1999, **20** (1): 48~51
- 10 朱 砾, 李学伟, 李芳琼, 等. 肌纤维生长的影响因素分析. 四川农业大学学报, 2002, **20** (1): 37~39
- ZHU L, LI X W, LI F Q, *et al.* Journal of Sichuan Agricultural University, 2002, **20** (1): 37~39
- 11 Edelman A M, Blumenthal D K, Krebs E G. Protein serine/ threonine kinase. Annu Rev Biochem, 1987, **56**: 567~580
- 12 Gruver C L, DeMayo F, Goldstein M A, *et al.* Targeted developmental overexpression of calmodulin induces proliferative and hypertrophic growth of cardiomyocytes in transgenic mice. Endocrinology, 1993, **133** (1): 376~388
- 13 Sprenger C C, Damon S E, Hwa V, *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1) is a potential tumor suppressor protein for prostate cancer. Cancer Res. 1999, **59** (10): 2370~2375
- 14 Haug K L, Wilson H M, Swisshelm K, *et al.* Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-related protein-1: an autocrine/ paracrine factor that inhibits skeletal myoblast differentiation but permits proliferation in response to IGF. Endocrinology, 2000, **141** (1): 100~110

Isolation of Differentially Expressed Genes in Double-muscling Large White Pig by SSH and Q-PCR Strategy*

LI Wen-Hai**, DENG Xue-Mei**, LI Ning, Wang Shao-Hua, ZHAO Yi-Qiang,
DU Zheng-Lin, ZHANG Ran, WU Ke-Liang, WU Chang-Xin***

(College of Animal Science and Technology & State Key Laboratory for Agro-biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Double-muscling pig is good at meat yielding, but the genetic reason for this trait was not clear till now. A SSH (suppression subtractive hybridization) library was built with cDNA from LD (longissimus dorsi) muscle of double-muscling pigs as tester, and that of non-double-muscling as driver. 686 clones in this library were single insertion. And they were all sequenced. The sequences were BLAST on line with the GenBank dbase, GenBank EST dbase and also the Tigr Porcine EST dbase, 11 of them were not matched in any of the databases which might represent new genes related to porcine double-muscling trait. 3 of the functional genes, which are *RYR1*, *CAMK2* and *IGFBP 7*, were chosen firstly to do quantitative PCR to confirm the expression differentiation between double-muscling LD tissue and non-double-muscling pigs LD tissue. The genes expressed in the former tissue were 1.87, 1.90, 1.85 times higher, respectively, than in the later tissue. 3 clones of the new ESTs were also detected with quantitative PCR, they were 1.48, 1.44 and 1.78 times higher in the former, respectively. These results implied that new candidate genes could be selected from the SSH library constructed in this research, and this could be a way to make the genetic base of double-muscling pig more clearly.

Key words double-muscling pig, suppression subtractive hybridization (SSH), gene differential expression, quantitative PCR (Q-PCR)

*This work was supported by a grant from The Special Funds for Major State Basic Research of China (TG2000016104) and National Outstanding Youth Fund of China (39725022).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-10-62732738, E-mail: chxwu@public.bta.net.cn

Received: November 3, 2004 Accepted: December 31, 2004