

# 军牧1号白猪、杜洛克猪和藏猪的氟烷基因和酸肉基因多态性分布

印 崇 孙博兴 赵志辉 杨润军 白春艳 邢沈阳  
(吉林大学 畜牧兽医学院, 长春 130062)

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2012)01-0007-03

关键词: 军牧1号白猪; 杜洛克猪; 藏猪; 氟烷基因; 酸肉基因

摘 要: 为了研究军牧1号白猪、杜洛克猪和藏猪氟烷基因和酸肉基因的多态性分布情况, 试验采用PCR-RFLP方法对61头军牧1号白猪、51头杜洛克猪和51头藏猪的氟烷基因和酸肉基因多态性进行了检测。结果表明: 军牧1号白猪的氟烷基因表现为单一的NN型; 杜洛克猪的氟烷基因表现为多态性, 等位基因N的频率为0.1961, 基因型分布符合哈代-温伯格平衡( $\chi^2=3.0339$ ,  $P=0.0815$ ); 藏猪的氟烷基因表现为单一的nn型。3个猪种的酸肉基因均表现为单一的m/m型。

## The polymorphism distribution of halothane and Rendement napole gene in Junmu 1 white Duroc and Tibetan pigs

YIN Chong, SUN Bo-xing, ZHAO Zhi-hui, YANG Run-jun, BAI Chun-yan, XING Shen-yang  
(College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

**Key words:** Junmu1 white pig; Duroc pig; Tibetan pig; halothane gene; Rendement napole gene

**Abstract:** To detect the distribution of the polymorphism of halothane and Rendement napole gene in three breeds of swine. This research analyzed the genotypes of these two genes from sixty-one Junmu1 white, fifty-one Duroc and fifty-one Tibetan pigs. The result showed that the halothane genes in Junmu1 white pigs belonged to a single genotype of NN. In Duroc, the halothane gene showed polymorphism and the allelic frequency of N was 0.1961 ( $\chi^2=3.0339$ ,  $P=0.0815$ ). While the Tibetan pigs' halothane genes showed a single genotype of nn. The Rendement napole genes showed the only genotype of m/m in all three breeds of swine.

20世纪90年代以后,随着国外瘦肉型猪的引进,国内肉猪的生长速度、料肉比和瘦肉率等都有了很大的提高,但与此同时,常伴随着肉质质量的下降,其主要原因是在引入外来猪优良性状基因的同时,也引入了一些对肉质性状有不良影响的基因。氟烷基因和酸肉基因作为猪肉品质性状的主效基因,其突变型分别与猪应激综合征(PSS)<sup>[1]</sup>和酸肉密切相关,对猪肉品质的危害很大;因此在猪群体中进行氟烷基因和酸肉基因的检测和筛选是必不可少的。

研究采用PCR-RFLP方法检测了61头军牧1号白猪、51头杜洛克猪和51头藏猪氟烷基因和酸肉基因的多态性,旨在研究氟烷基因和酸肉基因在这3

个猪种中的多态性分布,并为下一步根据基因多态性进行选种和种群优化提供依据。

### 1 材料

#### 1.1 样本

军牧1号白猪61头、杜洛克猪51头、藏猪51头,选自吉林大学原种猪场。

#### 1.2 试剂

组织基因组DNA提取试剂盒, V-gene公司生产; Taq DNA聚合酶, 天根生化试剂公司生产; 限制性内切酶, TaKaRa公司生产; DNA Marker、dNTPs、引物, 购自宝泰克生物工程有限公司。

### 2 方法

#### 2.1 组织DNA的提取

仔猪打耳号时收集耳组织样本,置于75%乙醇溶液中,并于-20℃保存,用组织基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA。

#### 2.2 PCR的扩增

PCR引物参考伍少钦等<sup>[2]</sup>、梁全顺等<sup>[3]</sup>设计的引物,具体引物信息为氟烷基因:上游引物5'-TC-

收稿日期:2010-12-30;修回日期:2011-11-09

基金项目:吉林省科技厅资助项目(20080208)

作者简介:印 崇(1987-),男,硕士研究生,591984299@qq.com.

通信作者:邢沈阳(1958-),女(回族),教授,本科,硕士生导师.

CAGTTTGCCACAGGTCCTACCA -3',下游引物 5'-ATTCACCCGGAGTGGAGTCTCTGAG -3',片段长度为 659 bp,退火温度为 61 °C。酸肉基因:上游引物 5'-GAGGCCCAAATAAGTCAATGTA -3',下游引物 5'-ACCGGGGTCAAATGCTC -3',片段长度为 616 bp,退火温度为 62 °C。

PCR 反应体系(25 μL): DNA 模板 1 μL,上、下游引物各 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶 1 μL, Taq Buffer 2.5 μL, Dntp 2 μL, 去离子水 17.5 μL。

反应条件:95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 35 s,退火温度参照引物退火温度,退火时间 35 s,72 °C 延伸 35 s,共 35 个循环;72 °C 再延伸 10 min。

2.3 酶切反应

氟烷基因的 PCR 扩增产物使用 Alw211 进行酶切;酸肉基因的扩增产物使用 BsrB I 进行酶切。酶切反应体系为 10 μL,其中 PCR 产物 5 μL、限制性内切酶 0.5 μL、限制性内切酶缓冲液 1 μL、去离子水 3.5 μL,酶切温度为 37 °C,内切酶 Alw211 的酶切时间为 10 h,内切酶 BsrB I 的酶切时间为 8 h。

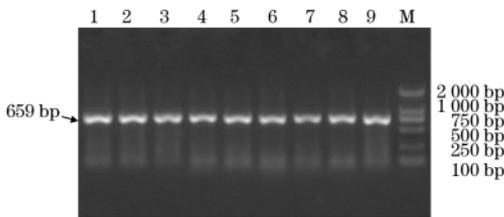
2.4 数据的统计处理

对测得的基因型进行计数,计算其基因频率和基因型频率,并用卡方( $\chi^2$ )检验多态位点的基因型频率分布是否符合 Hardy - Weinberg 平衡。

3 结果

3.1 氟烷基因和酸肉基因目的片段扩增结果

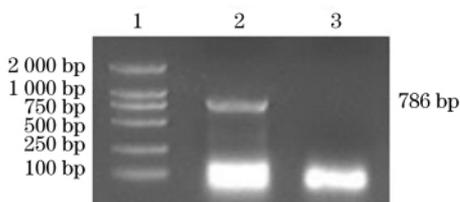
用 1% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 扩增产物,部分电泳结果见图 1、图 2。



1~9. 氟烷基因; M. DL-2 000 Marker。

图 1 氟烷基因扩增结果

Fig 1 The result of amplification of halothane gene



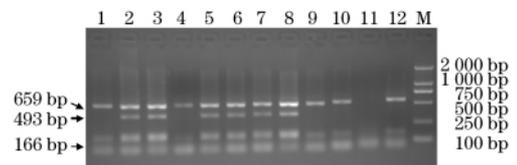
1. DL-2 000 Marker; 2~3. 酸肉基因。

图 2 酸肉基因扩增结果

Fig 2 The result of amplification of Rendement Napole

3.2 限制性内切酶酶切结果

用上述酶切体系对 2 个 PCR 目的片段进行酶切,所得产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳,当氟烷基因未发生突变时,内切酶 Alw211 可将长度为 659 bp 的 PCR 扩增产物切成长度分别为 493 bp 和 166 bp 的 2 个片段(电泳可见 493 bp 和 166 bp 2 条带),基因型为 NN; 氟烷基因 2 条 DNA 链均发生突变时,Alw211 则无法识别酶切位点,扩增片段不能被酶切,电泳结果只有 1 条 659 bp 的条带,基因型为 nn; 当氟烷基因有一条 DNA 链发生突变,而另一条链正常时,一条 DNA 链可以被酶切,而另一条链则无法被内切酶识别,因此电泳可观察到片段长度为 659,493,166 bp 的 3 条带,基因型为 Nn(见图 3)。



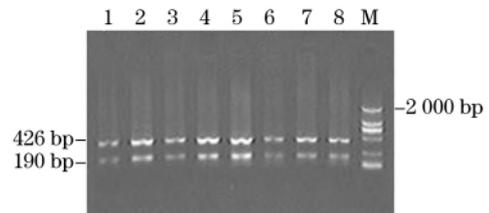
1 4 9 10 12. nn 基因型; 2 3 5 6 7,

8. Nn 基因型; 11. 空白对照; M. DL-2 000 Marker。

图 3 氟烷基因用 Alw211 酶切后电泳结果

Fig 3 The result of electrophoresis of halothane gene after digested by Alw211

酸肉基因在使用 BsrB I 酶切后,其完全突变型 rn/rn 会被完全切开,电泳可看到 426 bp 和 190 bp 的 2 条带;若仅一条链突变即 Rn/rn 基因型则被酶切开一条链,出现 616 bp、426 bp 和 190 bp 3 条带;野生型即 RN/RN 基因型则完全不被酶切,只形成 616 bp 的条带(见图 4)。



1~8. rn/rn 基因型; M. DL-2 000 Marker。

图 4 酸肉基因用 BsrB I 酶切后电泳结果

Fig 4 The result of Rendement Napole gene after digested by BsrB I

3.3 氟烷基因、酸肉基因的基因频率和基因型频率在 3 个猪种中的分布结果(见表 1 2)

4 讨论

氟烷基因和酸肉基因是猪 DNA 标记辅助选择(MAS)育种中的主要筛选目标<sup>[4]</sup>。其中,氟烷基因的隐性突变纯合子会提高猪的瘦肉率、料肉比和生长

表1 氟烷基因 Alw211 酶切位点的基因型频率  
和基因频率

Table 1 Genotypic frequency and allelic frequency  
of the restriction enzyme cutting site of Alw211  
for halothane gene

群体	样本数	基因型频率			$\chi^2$	P	等位基因频率	
		NN	Nn	nn			N	n
军牧1号白猪	61	1	0	0	-	-	1	0
杜洛克猪	51	0	0.392 2	0.607 8	3.033 9	0.081 5	0.196 1	0.803 9
藏猪	51	0	0	1	-	-	0	1
总计	163	0.374 2	0.122 7	0.503 1	91.799 8	-	0.435 6	0.564 4

表2 酸肉基因 BsrB I 酶切位点的基因型频率  
和基因频率

Table 2 Genotypic frequency and allelic frequency  
of the restriction enzyme cutting site of BsrB I for  
Rendement Napole gene

群体	样本数	基因型频率			$\chi^2$	P	等位基因频率	
		RN/RN	RN/rn	rn/rn			RN	rn
军牧1号白猪	61	0	0	1	-	-	0	1
杜洛克猪	51	0	0	1	-	-	0	1
藏猪	51	0	0	1	-	-	0	1
总计	163	0	0	1	-	-	0	1

速度,但容易发生应激综合征<sup>[1]</sup>。在本研究中,军牧1号白猪的氟烷基因全部为NN型,而马焕等<sup>[5]</sup>在2009年的研究结果则表明军牧1号白猪种群中氟烷基因N和n等位基因的频率分别为0.9083和0.0917,说明经过近2年的筛选,军牧1号白猪种群中的氟烷基因n等位基因已经被基本去除。

彭先文等<sup>[6]</sup>的研究发现,杜洛克猪的氟烷等位基因N频率为0.923;而在本研究中,杜洛克群体中的氟烷基因N等位基因的频率仅为0.1961,经 $\chi^2$ 检验P值为0.0815,故差异不显著( $P>0.05$ ),说明氟烷基因在杜洛克猪种中保持Hardy-Weinberg遗传平衡。本研究结果与彭先文等<sup>[6]</sup>的研究结果差别很大,可能是由于本研究中选用的杜洛克猪群体数量较小、亲缘关系较近造成的。

赵中权<sup>[7]</sup>的研究结果表明,藏猪的氟烷基因型全部为NN型;步宏等<sup>[8]</sup>的研究结果表明,与藏猪同属小型猪品系的五指山猪和版纳小耳猪的氟烷基因型也全部为NN型;而在本研究中,藏猪氟烷基因型全部为nn型,其原因可能是在引种过程中引入了外源的氟烷敏感基因且反复近交所致。

藏猪作为小型猪品系中的一个品种,是一种在生物医学研究中重要的人类疾病动物模型和理想的异种器官移植供器官猪种;因此在其筛选过程中应首先排除其发生应激综合征的可能。而本研究的结果表明,吉林大学原种猪场提供的藏猪不符合异种移植供

器官猪基因改造和医药实验用大动物选育的需要,可见对藏猪进行氟烷敏感基因的改良和筛选是必不可少的。

酸肉基因发现于1990年<sup>[9]</sup>,其显性突变等位基因RN的携带者肌肉中含有较多的肌糖原,这些肌糖原在猪被屠宰后转化为葡萄糖,进而糖酵解产生乳酸,从而降低了猪肉的终pH值<sup>[10]</sup>,影响猪肉的口感、色泽和系水力。到目前为止,仅见到酸肉基因的突变在汉普夏及有汉普夏血统的猪群体中有发现的报道,因此推测RN基因可能是由汉普夏亲本遗传给后代的。K. D. Miller等<sup>[11]</sup>的研究结果表明,汉普夏猪群体中酸肉等位基因RN的频率是0.630, A. C. Enfalt<sup>[12]</sup>的研究结果则是长白猪RN基因的频率约为0.045。目前,还没有在我国地方猪种中发现RN基因的报道<sup>[13]</sup>。

在本研究中,酸肉基因BrsB I酶切位点的多态性检测结果显示,163头被检猪的基因型均为rn/rn型,说明在军牧1号白猪、杜洛克猪和藏猪群体中不存在酸肉基因的突变。

#### 参考文献:

- [1] FUJII J, OTSU K, ZORZATO F, et al. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia [J]. Science, 1991, 253(5018): 448-451.
- [2] 伍少钦, 唐荣福, 吴志君, 等. PCR-RFLP方法检测猪的氟烷基因[J]. 广西畜牧兽医, 2007, 23(5): 214-216.
- [3] 梁全顺, 沈华伟, 关育芳, 等. 应用PCR-RFLP及PCR-SSCP技术检测猪RN基因的研究[J]. 福建畜牧兽医, 2005, 27(2): 5-6.
- [4] 王重龙, 陶立. 猪育种中DNA标记辅助选择方法的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(2): 42-47.
- [5] 马焕, 黄大鹏, 邢沈阳, 等. 军牧1号白猪肉质主效基因的多态性检测[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010(10): 19-21.
- [6] 彭先文, 梅书棋, 郭万正, 等. 氟烷基因PCR-RFLP检测技术在杜洛克猪和长白猪中的应用[J]. 养猪, 2006(6): 42-43.
- [7] 赵中权. 藏猪氟烷基因PCR-RFLP和序列多态性分析[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(1): 51-54.
- [8] 步宏, 刘戟, 李胜富, 等. 中国近交系猪的氟烷基因型研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2000, 14(5): 311-314.
- [9] LE ROY P, NAVEAU J, ELSEN J M, et al. Evidence for a new major gene influencing meat quality in pigs [J]. Genet Res, 1990, 55(1): 33-40.
- [10] 李国治, 连林生, 鲁绍雄, 等. 猪肉肉质性的评定及其主基因的研究进展[J]. 云南畜牧兽医, 2004(1): 8-10.
- [11] MILLER K D, ELLIS M, MCKEITH F K, et al. Frequency of the Rendement Napole RN-allele in a population of American Hampshire pigs [J]. J Anim Sci, 2000, 78(7): 1811-1815.
- [12] ENFALT A C. Pig meat quality: influence of breed, RN genotype and environment [J]. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae Agraria, 1997, (24): 02135.
- [13] 储明星. 影响猪肉质的主效基因RN的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2005, 37(1): 53-55.