

## 天津白猪 MHS 基因群体遗传结构分析

王楚端<sup>1</sup> 王作强<sup>2</sup> 陈清明<sup>1</sup> 李振宽<sup>2</sup> 李宁<sup>3</sup> 章岩<sup>3</sup>

(1 中国农业大学动物科技学院; 2 天津市宁河原种猪场; 3 中国农业大学中心实验室)

**摘要** 采集 46 头天津白种猪耳组织样,用高盐法提取 DNA,特异性扩增包含 C1843 在内的 CRC/RYR1 660 bp 片段,用 HhaI 进行直接酶切,根据电泳图谱确定 MHS 基因座位上的基因型。结果表明:46 头天津白猪中,杂合猪(MHS<sup>N</sup>/MHS<sup>n</sup>)为 5 头,占 10.87%,纯合阴性猪 41 头占 89.13%,没有发现纯合阳性猪。MSNN 和 MSN<sup>n</sup> 的基因频率分别为 0.9456 和 0.0544。

**关键词** 猪恶性高温综合症; MHS 基因; PCR

**分类号** S813.2

## Analysis of Genetic Distribution of Porcine MHS Gene for Tianjin White

Wang Chudian<sup>1</sup> Wang Zuoqiang<sup>2</sup> Chen Qingming<sup>1</sup> Li Zhenkuan<sup>2</sup> Li Ning<sup>3</sup> Zhang Yan<sup>3</sup>  
(1 College of Animal Science and Technology, CAU; 2 Tianjin Ninghe Stud Pig Farm; 3 Central Lab, CAU)

**Abstract** The DNA in tissue of ear skin of 46 Tianjin White are collected to test the gene and genotype frequencies of porcine Malignant Hyperthermia Syndrome (MHS) locus according to the electrophoresis diagram by means of the method of PCR-RFLP. The results show that the frequency of MHS<sup>N</sup>/MHS<sup>n</sup>, MHS<sup>N</sup>/MHS<sup>N</sup> and MHS<sup>n</sup>/MHS<sup>n</sup> genotypes are 10.87%, 89.13% and 0%, respectively. The frequency of MHS<sup>N</sup> gene and MHS<sup>n</sup> are 0.9456 and 0.0544.

**Key words** malignant hyperthermia syndrome; MHS gene; PCR

猪恶性高温综合症(porcine malignant hyperthermia syndrome, pMHS)是应激敏感猪在自然刺激因子(剧烈运动、争斗、分群、交配、运输等)和化学药品(麻醉剂、肌肉松弛剂等)作用下表现出的症候群,又称为猪应激综合症,主要有以下三种特征:①体温急剧升高,可达 42~45℃;②呼吸困难、肌肉僵直甚至突然死亡;③屠宰后出现灰白,松软,渗水肉(PSE 肉)。MHS 影响猪的生长发育、提高猪的死亡率、使肉的质量下降而引起猪育种者的高度重视。

MHS 的发生在遗传上呈隐性纯合基因型完全或不完全显性的单座位隐性遗传模式<sup>[1]</sup>。猪骨骼肌浆网(SR)钙离子通道蛋白(CRC)基因(又称兰尼定受体基因)RYR1/CRCcDNA 序列 1843 位的 C→T 突变是目前所发现的唯一决定猪 MHS 的变异,因此判断, MHS 基因(MHS<sup>n</sup>)即 RYR1/CRC1843C 等位基因;MHS 抗性基因(MHS<sup>N</sup>)即 RYR1/CRC1843T 等位基因<sup>[2]</sup>。

“天津白猪的选育”是天津市“八五”科技攻关项目,以繁殖性能好、抗寒性强的东北民猪为

收稿日期:1997-12-22

①王楚端,北京圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区),100094

母本,利用生长快、瘦肉率高的英系大白猪为父本,进行级进杂交,然后横交固定、继代选育以培育出生长肥育性能良好、胴体瘦肉率高,同时具备良好的繁殖性能的母亲本品系。本研究根据猪 RYR1/CRCcDNA 序列 1 843 位的 C→T 突变改变了 HhaI 识别位点,设计了一对特异性扩增引物,特异性扩增包含猪 RYR1/CRCcDNA 1843 位点在内的 660 bp 片段,然后用 Hha I 限制性内切酶消化 PCR 扩增产物,得到 MHS 座位 3 种基因型的特征性电泳带型,分析猪群内 MHS 基因的遗传结构,为下阶段的育种工作提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

天津白猪耳组织样取自天津市宁河原种猪场第一选育场,共 46 个样品浸泡于 70%乙醇中,-20℃冷冻保存。

### 1.2 DNA 抽提

取一小块(约 10 mg)耳组织,置入 1.5 mL 离心管,切碎;加入 0.4 mL 含蛋白酶 K(100~200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )的缓冲液,在 56℃水浴消化 24 h;10 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,将上清液移入 1.5 mL eppendorf 管中,加入 1/4 体积的 NaCl 5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,然后加入等体积氯仿,充分混匀,10 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,将上清移入新管中,2 倍体积预冷无水乙醇沉淀 DNA;将絮状 DNA 移入装有 70%乙醇的新管,10 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,真空抽干或置在室温下自然晾干;用 400  $\mu\text{L}$  TE(pH8.0)充分溶解 DNA;取 1  $\mu\text{L}$  进行 PCR 扩增。

### 1.3 PCR 扩增

PCR 反应液的组成成分如下:10×Taq buffer(15  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ )5  $\mu\text{L}$ ;DNTP(2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),2  $\mu\text{L}$ ;Primer(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),1  $\mu\text{L}$ ;dd  $\text{H}_2\text{O}$  40.5  $\mu\text{L}$ ;Taq Polymorase(5 U· $\mu\text{L}^{-1}$ )0.5  $\mu\text{L}$ ;DNA template(100~500  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )1  $\mu\text{L}$ 。

反应体积为 50  $\mu\text{L}$ ,特异性扩增引物序列为:正向引物 5'-TCCAGTTTGCCACCA GGTCTACCA-3',反向引物 5'-ATTACCCGGAGTGGAGTCTCTTGAG-3'。除 DNA 模板外混合其他反应液组分,以每管 49  $\mu\text{L}$  分装于灭菌的 0.5 mL 反应管中;加入 DNA 模板液 1  $\mu\text{L}$ ,混匀;每管加入 30  $\mu\text{L}$  矿物油覆盖在表面。PCR 反应条件:94℃,2 min 30 s;94℃,65 s;65℃,65 s;72℃,65 s,35 循环;72℃,7 min,PCR 仪为 PE 公司 9600 系统。

### 1.4 限制性内切酶消化及电泳鉴别 MHS 基因型

15  $\mu\text{L}$  PCR 反应产物,用 3  $\mu\text{L}$  Hha I 限制性内切酶消化 3 h,酶切产物在 2%胶经过 2.6~3.0  $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 电压下电泳 2~2.5 h,经 EB 染色 10 min,在紫外灯下观察酶切图谱,拍照判别 MHS 基因型。

### 1.5 基因型与基因频率的计算

$$\text{基因型频率} = \text{基因型个体数} / \text{测定样本数} \times 100\%$$

$$\text{基因频率 } p = P + R/2 \quad q = Q + R/2$$

式中: $p$ —— $\text{MSN}^{\setminus}$  基因频率; $q$ —— $\text{MSN}^{\setminus}$  基因频率; $P$ —— $\text{MHS}^{\setminus\setminus}$  基因型频率; $R$ —— $\text{MHS}^{\setminus n}$  基因型频率; $Q$ —— $\text{MHS}^{\setminus m}$  基因型频率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 目前天津白猪群体内 MHS 基因型频率及基因频率

本研究通过耳皮肤取样测定,得到所有测定猪预期的特征电泳图(表 1、图 1)。

在 46 头天津白猪中,发现杂合子 5 头,占 10.87%,纯合阴性猪 41 头占 89.13%,没有发现纯合阳性猪。MSN<sup>N</sup> 和 MSN<sup>n</sup> 的基因频率分别为 0.945 6 和 0.054 3。由于天津白猪是利用民猪作为母本、用英系大白猪作为父本进行杂交培育的,而民猪是我国著名的地方品种,所以迄今为止还没有关于出现应激综合症的报道,而英系大白猪是 90 年代初从英国引进的高瘦肉率品系,所以天津白猪猪群中的 MSN<sup>n</sup> 很可能来源于英系大白猪。为了提高商品猪的抗应激性和肉质,天津白猪作为母本品系,应该在下一阶段的选育中注意剔除 MSN<sup>n</sup> 基因。

表 1 MHS 座位 3 种基因型的特征电泳带型

Bp	HhaI(HinI 1) 5'-GCG ↓ C-3'		
	MSN <sup>NN</sup>	MSN <sup>Nn</sup>	MSN <sup>nn</sup>
660 bp		—	—
495 bp	—	—	
165 bp	—	—	

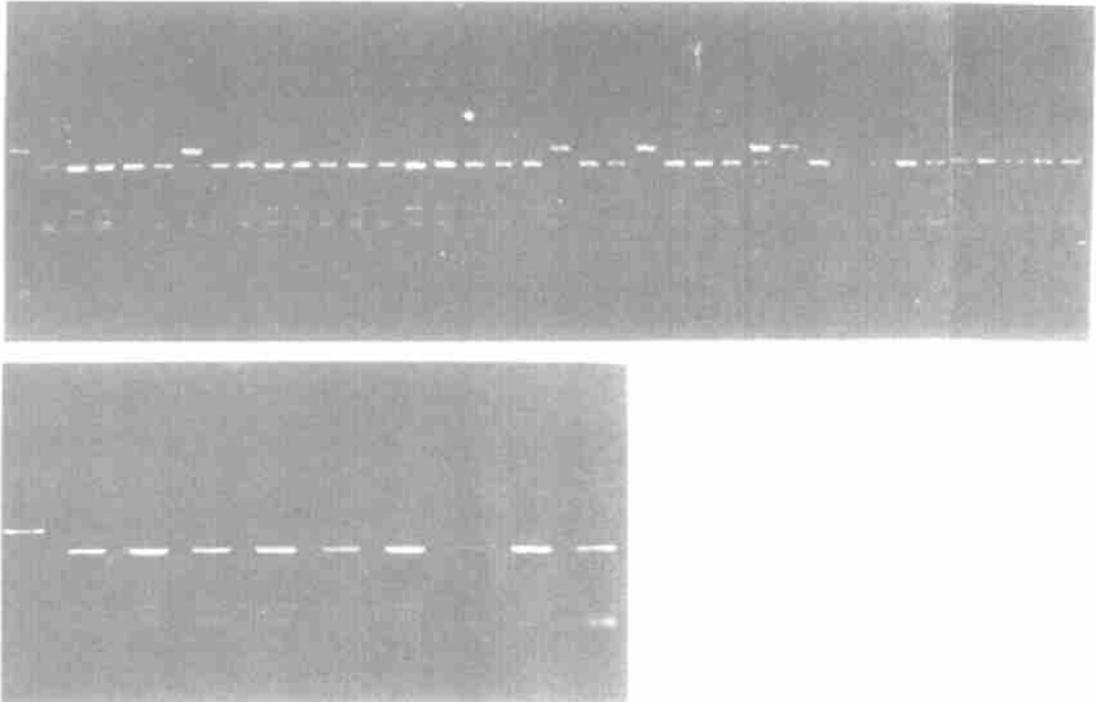


图 1 天津白猪 RYR1 Hha I PCR-RFLP

第一道为阳性对照,其余为测定猪

从已有的关于瘦肉型猪种 MSN<sup>n</sup> 基因频率的报道来看,皮特兰为 99%、比系长白 100%、

德系长白为46%,而其他品系的长白猪为3%~25%,大白猪MSN<sup>+</sup>频率为0.0~9.9%<sup>[2~5]</sup>。测定结果的变异主要来自两个方面的因素:①抽样及样本含量的效应;②不同国家和地区各品系选择目标及方案的差异。

## 2.2 MHS与肉质的关系

在养猪发达国家,由于过去一直强调猪瘦肉率、日增重及饲料报酬的高强度选择,导致MSN<sup>+</sup>基因频率升高,猪抗应激性下降,猪在育肥期间及运输过程的死亡率提高,PSE肉质的发生率也明显提高,造成很大经济损失。如美国每年由于猪PSE肉的经济损失达2.3~3.2亿美元。同时应激敏感猪往往具有很高的瘦肉率,在市场对瘦肉量具有很高要求时,这种瘦肉率和抗应激性之间的矛盾将成为猪育种的重要问题。

由于肉质与应激敏感性具有密切关系,应激敏感个体的肉质都比较差,作为抗应激性的选择,人们发展了氟烷测定、CK测定以及MHS基因测定法,现应用MHS基因测定法已可以准确地评定MHS座位的基因型。采用活体MHS基因检测对肉质的改良无疑是可行的,但对猪抗应激性状的选择并不能完全消除PSE等肉质问题,在MHS阴性群体中同样存在肉质问题。例如在加拿大,应激敏感猪只占产生PSE肉个体的20%<sup>[6]</sup>。三种基因型猪群中均存在PSE肉,甚至在有的纯合阴性群体中,PSE肉的发生率高达51.7%<sup>[7]</sup>。因此,在肉质的遗传机制还没有搞清楚之前,应该进行常规肉质性状的选择,同时还要注意环境及管理因素对肉质的影响。

## 参 考 文 献

- 1 Grashorn M. Comparison of different hypotheses for the inheritance of halothane susceptibility. *J Animal Breed Genetic*, 1988, 105: 204~217
- 2 李来记. 猪MHS基因分子遗传学基础与应用研究. [博士论文]. 中国农业大学, 1996, 56~57
- 3 Webb A J, et al. Porcine stress syndrome in pig breeding. *Proceeding of the 2nd World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. 1982, Vol. 5: 588~609
- 4 O'Brien P J, et al. Use of a DNA Based test for the mutation associated with porcine stress syndrome (malignant hyperthermia) in 10 000 breeding swine. *JAVAMA*, 1993, 203: 842~851
- 5 Knorr C, et al. Calcium-release-channel genotypes in several pig population-associations with halothane and CK reactions. *J Anim Breed Genet*, 1994, 111: 243~252
- 6 王楚端. 北京迪卡猪杂交繁育体系育种规划最优化研究. [博士论文]. 中国农业大学, 1995; 18
- 7 Pommier S A, Houde A. Effect of the genotypes for malignant hyperthermia syndrome on the quality characteristics of commercial pork loins. *J Anim Sci*, 1993, 71: 420~425