

黑龙江省规模化猪场种猪 RYR I 基因多态性检测分析

张冬杰¹, 曹越², 何鑫森¹, 汪亮¹, 刘娣^{1,2}

(1. 黑龙江省农业科学院 畜牧研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学 动物科学技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:猪肉品质一直以来都是种猪培育过程中的一个关键指标。兰尼定 I 型受体基因(RYR I)是一个有效的影响猪肉品质的候选基因,它的第 615 位氨基酸突变是造成猪发生应激综合症,进而出现 PSE 肉的主要原因。因此,国内外很多猪场都对该基因进行了清除。为加速优质种猪选育进程,选择了黑龙江省 5 家规模化猪场,对猪场后备种猪的 RYR I 基因进行了基因分型与检测。结果表明:有 3 家猪场的后备种猪中有 nn 型个体,但数量非常少;5 家猪场内均有杂合型个体,占到所检个体的 10%~20%。说明黑龙江省种猪企业对 RYR I 基因的清除工作还有待加强,猪肉品质提升还有很大空间。

关键词:民猪;大白猪;RYR I 基因;多态性检测

中图分类号:S828 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)06-0075-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.06.0075

氟烷基基因又称兰尼定 I 型受体基因(Ryanodine receptor, RYR I),其编码区第 1 843 位的核苷酸如果发生由 C 到 T 的突变,将造成第 615 位的氨基酸发生由精氨酸到半胱氨酸的改变,从而造成其编码蛋白的结构和功能的改变^[1]。该点突变造成了内切酶 *Hha*I 酶切位点的改变,前人将存在酶切位点的定义为 NN 型,不存在酶切位点的定义为 nn 型。nn 型个体与 NN 型个体相比,具有生长速度快、高瘦肉率以及饲料报酬高等优势。但拥有此基因型的个体,也容易发生猪应激综合症。猪应激综合症是一种遗传缺陷病,当发生应激反应时,携带有 nn 基因型的个体会突然倒地抽搐、死亡,产生 PSE 肉,大大降低猪肉品质,给养猪生产造成巨大损失^[2]。鉴于此,虽然 nn 型个体具有一些生产上的优势,但在育种过程中,仍将其作为淘汰型个体处理。RYR I 基因发现较早,并在多个群体内得到了验证,它也是目前被广泛认可的分子标记之一,不存在品种间和地域间差异。

黑龙江省作为我国的一个养猪大省,生猪存

栏量和出栏量均位于国内前列,但缺少规模化的大型养殖场,多以中小型养殖场为主,生产水平较南方猪场略低。在这样的背景环境下,如何有效的利用现有资源,提升种猪生产性能,提高养殖效益就显得尤为重要。目前黑龙江省的规模化种猪场还多采用常规育种方法进行选种选配,常规育种方法的优势是技术理论体系成熟、易操作,缺点是选育时间长,仅能根据表型性状进行选择,后代性状易发生分离。因此,本研究拟对黑龙江省 5 家规模化猪场的 907 头后备种猪进行 RYR I 基因的多态性检测,将检测结果与常规育种相结合,指导猪场进行后备种猪的选留工作,加快优秀种猪的选育进程。

1 材料与方法

1.1 材料

试验样本来自 5 个猪场 2 个猪种的 907 头个体,经酒精棉消毒后对每头猪用耳号钳子夹取一小块耳组织放入提前准备好的装有 1 mL 75%乙醇的 EP 管中,常温下带回实验室,放入 4℃冰箱内保存。样本情况见表 1。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与 PCR 扩增 取 100 mg 左右耳组织样,按照常规的酚-氯仿提取法进行 DNA 的提取, -20℃保存。PCR 扩增用引物及扩增条件见参考文献[3]。

1.2.2 PCR 扩增产物电泳检测与鉴定 用 0.8% 琼脂糖凝胶对所扩增的 PCR 产物进行凝胶

收稿日期:2016-04-16

基金项目:黑龙江省科技厅省院科技合作专项资助项目(YS14B03)

第一作者简介:张冬杰(1980-),女,黑龙江省桦南县人,博士,副研究员,从事猪的分子遗传育种研究。E-mail: djzhang8109@163.com。

通讯作者:刘娣(1963-),女,吉林省长春市人,博士,教授,从事猪遗传育种与繁殖研究。E-mail:liudi1963@163.com。

电泳检测,取 5 μ L 的 PCR 产物加 2 μ L 的 6 \times Loading Buffer 混匀,120 V 电压下电泳 20 min。电泳结束后,利用紫外凝胶成像系统对 PCR 产物条带进行观察,如果 PCR 产物条带单一,且与预期长度相符,即进行下一步操作。

表 1 样本数量和来源

样本来源 Sample source	民猪 Minzhu	大白猪 Large white pig
伊春宝宇森林猪繁育养殖基地 Yichun Baoyu forest pig breeding base	295	17
哈尔滨鸿福种猪场 Harbin Hongfu pig farm	10	183
孙吴养猪合作社 Sunwu pig breedingcooperation		20
肇东甜草岗猪场 Zhaodong Tiancaogang pig farm	41	
哈尔滨信诚猪场 Harbin Xincheng pig farm	337	4

1.2.3 PCR-RFLP 检测 酶切反应体系: *Hha* I 1 μ L、DNA 12 μ L、10 \times NEBuffer 1.5 μ L、ddH₂O 0.5 μ L,总计 15 μ L。混匀,放入 37 $^{\circ}$ C 电热恒温培养箱过夜酶切。酶切产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测,检测方法同 1.2.2。

1.2.4 基因分型与统计方法 根据酶切产物条

带差异可将其分为 3 种基因型:酶切后只有 186 bp 一条带的个体基因型定为 nn 型;酶切后同时具有 186、126、60 bp 3 条带的个体定义为 Nn 型;酶切后有 126、60 bp 两条带的个体定义为 NN 型。根据每种基因型的检出个数,计算基因型频率与等位基因频率。

2 结果与分析

2.1 PCR-RFLP 结果

扩增的 *RYS* I 基因经 *Hha* I 内切酶酶切后,产生 3 种不同的基因型,分别为 nn、Nn 和 NN 型。对酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,并在紫外凝胶成像系统观察。酶切后的电泳图见图 1。

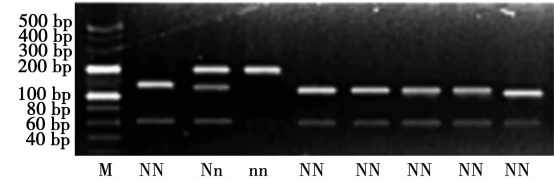


图 1 *RYS* I 基因 PCR-RFLP 电泳图

Fig.1 The PCR-RFLP result of *RYS* I

2.2 等位基因频率与基因型频率

由表 2 可知,黑龙江省猪场内无论民猪还是大白猪,均是 N 等位基因占优势,而作为需淘汰的 nn 型个体,仅在 3 个群体内检测到少量个体。但杂合子 Nn 型在所检群体内均有发现,大白猪的检出数量略高于民猪的。

表 2 5 家规模化猪场 *RYS* I 基因的基因型频率和等位基因频率

猪场 Pig farm	猪种 Pig breed	个体数 Number	基因型频率 Genotype frequency			等位基因频率 Allele frequency	
			NN	Nn	nn	N	n
伊春宝宇森林猪繁育养殖基地 Yichun Baoyu forest pig breeding base	民猪	295	0.7763	0.2203	0.0034	0.8865	0.1135
	大白猪	17	0.5882	0.4118	0	0.6088	0.3912
哈尔滨鸿福种猪场 Harbin Hongfu pig farm	民猪	10	0.8000	0.2000	0	0.9000	0.1000
	大白猪	183	0.7705	0.2240	0.0055	0.8825	0.1175
哈尔滨信诚猪场 Harbin Xincheng pig farm	民猪	337	0.8991	0.1009	0	0.9496	0.0504
	大白猪	4	0.7917	0.2083	0	0.8958	0.1042
肇东甜草岗猪场 Zhaodong Tiancaogang pig farm	民猪	41	0.8780	0.1220	0	0.9390	0.0610
孙吴养猪合作社 Sunwu pig breedingcooperation	大白猪	20	0.8500	0.1000	0.0500	0.9000	0.1000

2.3 与其它猪种的比较

通过对已报道的其它猪种 *RYS* I 基因多态性统计结果分析可知,我国地方猪除了大河猪存在 nn 型个体外,其它猪种均无 nn 型个体。淳安

花猪、从江香猪、荷包猪和监利猪全部为 NN 型个体,其它猪种存在 Nn 型杂合子。3 个培育品种,因为在培育过程中都曾引入过引进猪种的血统,所以都存在 Nn 型和 nn 型个体。5 个引进猪种

中,皮特兰所检的 79 个个体全部为 nn 型,这与它极度易发生应激的特性相符。其它引进猪种中均存在不同比例的 Nn 型和 nn 型个体,而且同一猪种内的 N 和 n 等位基因频率并不相同,比如大白

猪,n 等位基因频率有 3.08%、1.60%、17.00%和 6.68%,上下波动范围较大,推测这与猪场内是否开展过 nn 型个体淘汰选育工作有关。

表 3 其它猪种 RYR I 基因 的基因型频率和等位基因频率
Table 3 The genotype and allele frequency of RYR I gene of other pig breeds

猪种 Pig breed	品种类型 Breed type	个数 Number	基因型频率/% Genotype frequency			等位基因频率/% Allele frequency		文献来源 Literature resources
			NN(CC)	Nn(CT)	nn(TT)	N(C)	n(T)	
军牧 I 号	培育品种	400	82.50	16.70	0.80	90.83	9.17	[3]
苏淮猪		130	75.38	22.89	1.74	86.82	13.18	[4]
三江白猪		216	88.43	7.41	4.16	92.13	7.87	[5]
淳安花猪	地方猪种	34	100	0	0	100	0	[6]
从江香猪		200	100	0	0	100	0	[7]
梅山猪		27	88.89	11.11	0	94.44	5.56	[8]
撒坝猪		17	94.12	5.88	0	97.06	2.94	[9]
保山猪		44	95.45	4.55	0	97.73	2.27	[9]
大河猪		39	94.87	0.00	5.13	94.87	5.13	[9]
滇南小耳猪		54	96.30	3.70	0	98.15	1.85	[9]
荷包猪		83	100	0	0	100	0	[10]
监利猪		49	100	0	0	100	0	[11]
杜洛克	引进猪种	225	70.22	28.00	1.78	84.22	15.78	[9]
长白		146	92.47	6.85	0.68	95.89	4.11	[9]
大约克		389	94.09	5.66	0.26	96.92	3.08	[9]
杜洛克		364	89.60	10.20	0.30	94.60	5.40	[12]
大约克		370	96.80	3.20	0.00	98.40	1.60	[12]
长白		280	98.20	1.80	0.00	99.10	0.90	[12]
大约克		225	76.00	14.00	10.00	83.00	17.00	[13]
杜洛克		61	100	0	0	100	0	[14]
长白		118	79.66	17.80	2.54	88.56	11.44	[14]
大约克		232	88.79	9.50	2.16	93.32	6.68	[14]
皮特兰		79	0	0	100	0	100	[14]
汉普夏		41	100	0	0	100	0	[14]

3 结论与讨论

分子标记辅助育种技术提出至今已经将近 20 年,但真正可用于分子标记辅助育种的分子标记并不是很多,截止到 2010 年,得到大家公认的分子标记位点有兰尼定 1 型受体基因(RYR I)、胰岛素样生长因子 2 型基因(IGF2)、黑皮质素受体 4 基因(MC4R)和肌肉生长抑制素基因(MSTN)^[15]。随着二代测序技术及全基因组

关联分析(GWAS)技术的飞速发展,又有多个 SNP 位点被发现,如影响仔猪腹泻抗性的 muc4 基因^[16],影响猪脊椎数的 VRTN 基因等^[17],但是还没有达到大面积推广使用的程度。RYR I 基因是目前为数不多的被大家广泛接受的用于种猪选育中的分子标记之一,全国很多省份的大型种猪场均对该基因开展了清除工作。黑龙江省在分子标记辅助育种方面略显滞后,中小型猪场依旧采用常规育种技术进行繁育,大型规模化猪场也

鲜有使用该技术的。分子标记辅助育种可以快速提高生产效率,缩小育种的世代间隔,尤其是在清除劣势基因方面更具有独特的优势。本研究结果表明,黑龙江省后备种猪群内还有很多个体携带有 RYR I 基因的 n 等位基因,还需要开展大范围的清除工作。

参考文献:

[1] 蒋思文,熊远著,邓昌彦,等.猪 RYR I 基因的 PCR-RFLP 分析和氟烷基因利用的研究[J].中国畜牧杂志,1997,33(2):9-10.

[2] 巨新义,帅素容,罗安治.猪 RYR I 基因对生产性能的效应研究[J].四川农业大学学报,1999,17(4):401-405.

[3] 马焕,赵伟,王大力,等.军牧 1 号白猪肉质主效基因的多态性检测分析[J].中国兽医学报,2011,31(1):129-132.

[4] 李隐侠,徐银学,陈杰,等.苏淮猪 7 个功能基因的多态性及其与生产性能的相关性[J].南京农业大学学报,2008,31(3):102-106.

[5] 耿忠诚,袁子国,刘德贵,等.三江白猪氟烷基因的基因频率分析[J].中国畜牧杂志,2005,41(10):26-28.

[6] 李庆海,祝荣,楼立峰,等.淳安花猪 5 个功能基因的多态性研究[J].浙江农业学报,2015,27(2):171-175.

[7] 王龙龙,冉雪琴,王嘉福.从江香猪 RYR I 基因 2 个 SNP 位点的多态性[J].贵州农业科学,2015,43(4):153-157.

[8] 朱锋钊,杜秀园,冉雪琴.梅山猪 RYR I 基因的 PCR-RFLP 检测[J].铜仁职业技术学院学报,2011,9(2):12-15.

[9] 白改翠,王崧,兰国湘,等.从 RYR1 基因角度探讨猪种资源的保护与选育利用[J].云南农业大学学报,2013,28(4):476-481.

[10] 丛玲,朱弘焱,苏玉虹.辽宁种猪氟烷基因位点多态性分析[J].现代畜牧兽医,2010(8):73-75.

[11] 刘文举,左本武,何年华,等.ESR 和 RYR1 基因的多态性在监利猪、大白猪及杂交大监猪群中分布特征的探讨[J].上海畜牧兽医通讯,2009(1):6-7.

[12] 阮国荣,肖石军,徐盼,等.福建省商业猪种 MUC13、IGF2 和 RYR1 基因主效位点的遗传变异分析[J].江西农业大学学报,2012,34(5):997-1002.

[13] 刘桂琼,丁家桐,姜勋平,等.RYR I 基因对母猪繁殖性能的影响[J].中国兽医学报,2002,22(4):392-394.

[14] 杜立新,王爱华,姜运良,等.猪 RYR I 基因的检测及其对生产性能的遗传效应[J].畜牧兽医学报,2001,32(6):481-486.

[15] 刘榜.猪分子育种研究进展[J].猪业科学,2010(1):90-91.

[16] 董文华,黄小国,夏日炜,等.大白猪 MUC4 基因多态性及其对 mRNA 表达和细胞因子水平的作用分析[J].中国畜牧杂志,2016,52(3):1-5.

[17] Yang J, Huang L, Yang M, et al. Possible introgression of the VRTN mutation increasing vertebral number, carcass length and teat number from Chinese pigs into European pig[J]. Sci Rep, 2016, 6:19240. doi: 10.1038/srep19240.

Analysis of Pig RYR I Gene Polymorphism in Heilongjiang Large Scale Pig Farm

ZHANG Dong-jie¹, CAO Yue², HE Xin-miao¹, WANG Liang¹, LIU Di^{1,2}

(1. Institute of Animal Industry, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: Pork quality is always a key indicator in the process of pig breeding. Ryanodine receptor type 1 gene is an effective candidate genes influence the quality of pork. Its 615th amino acid mutation is the main cause of porcine stress syndrome and PSE meat. Therefore, this gene was cleaned in many pig farm of domestic and overseas. The polymorphisms of RYR I of the reserved boar in 5 large scale pigs were detected by PCR-RFLP. The results showed that 3 pig farms had nn genotype individual, but the number was very little. The Nn genotype individual existed in 5 pig farms and occupied 10%~20%. These results indicated that the clean work of RYR I was remain to be strengthened and there was still a great space to improve the pork quality.

Keywords: Minzhu; large white pig; RYR I gene; polymorphism detection