

山西猪种及其杂种群体 *H-FABP* 基因的 PCR-RFLP 研究

杨文平¹, 曹果清¹, 薛尚军², 刘建华¹, 李步高¹, 周忠孝¹

(1. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801; 2. 大同种猪场, 大同 037000)

摘要: 利用 PCR-RFLP 技术对马身猪、山西白猪及其杂种群体共 286 头猪的心脏脂肪酸结合蛋白 (*H-FABP*) 基因 5'-上游区 (*Hinf* I -RFLP) 和第二内含子内 (*Hinf* I * -RFLP 和 *Hae* III -RFLP) 的遗传变异进行了研究。结果表明: (1) 在 *Hae* III -RFLP 位点上, 马身猪均为 *DD* 纯合子, 而其他猪群在此位点上均存在变异, 马身猪的杂种群体在该位点上只有两种基因型 (*DD*、*Dd*); (2) 在 5'-上游区的 *Hinf* I -RFLP 位点上, 杜洛克猪 × 山西白猪的杂种群体只有 *HH* 基因型, 而其他群体都表现出多态性, 马身猪等位基因 *h* 的频率为 0.9727; (3) 在第二内含子内的 *Hinf* I * -RFLP 位点上, 马身猪表现出两种基因型 (*BB*、*Bb*), 等位基因 *B* 的频率为 0.9667; (4) 在 *Hinf* I * -RFLP 和 *Hae* III -RFLP 位点上, 所有猪群均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

关键词: 猪; *H-FABP* 基因; PCR-RFLP; 多态性

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)06-0882-05

Research on the Polymorphism of Heart Fatty Acid-binding Protein Gene in Shanxi Pig Breeds and Their Crossbred Populations Using PCR-RFLP

YANG Wen-Ping¹, CAO Guo-Qing¹, XUE Shang-Jun², LIU Jian-Hua¹, LI Bu-Gao¹, ZHOU Zhong-Xiao¹

(1. College of Animal Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2. Datong Pig Breeding Farm, Datong 037000, China)

Abstract: The genetic variation in 5'-upstream (*Hinf* I -RFLP) and the second intron (*Hinf* I * -RFLP, *Hae* III -RFLP) of heart fatty acid-binding protein (*H-FABP*) gene were detected with PCR-RFLP in 286 pigs including Mashen, Shanxi white pig and their crossbred populations. The results showed as follows: (1) Mashen presented only *DD* genotype while other populations varied, and Mashen crossbred populations had only 2 genotypes (*DD*, *Dd*) at the *Hae* III -RFLP site; (2) At the *Hinf* I -RFLP site of the 5'-upstream region, the crossbred population of Shanxi white pig and Duroc presented only *HH* genotype while other populations varied. Frequency of *h* allele in Mashen was 0.9727. (3) At the *Hinf* I * -RFLP site of the second intron, only Mashen presented 2 genotypes (*BB*, *Bb*), and frequency of *B* allele was 0.9667. (4) At the *Hae* III -RFLP and *Hinf* I * -RFLP sites, all populations were in Hardy-weinberg equilibrium.

Key words: pig; *H-FABP* gene; PCR-RFLP; polymorphism

收稿日期: 2004-08-22; 修回日期: 2005-02-22

基金项目: 山西省科技厅攻关项目资助 (编号: 991016) [Supported by key project of the department of science and technology of Shanxi province (No. 991016)]

作者简介: 杨文平 (1971—), 女, 山西应县人, 在读博士, 讲师, 研究方向: 分子数量遗传学。E-mail: yangwenping518@163.com

通讯作者: 周忠孝 (1935—), 男, 山东泰安人, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子数量遗传学。Tel: 0354-6288585; E-mail: tgzxx@public.yz.sx.cn

上个世纪 80 年代前对猪的遗传改良主要集中在提高生长速度,增加胴体瘦肉率。实践证明,这种育种计划是非常成功的^[1]。但是,在人们对膳食脂肪与健康关系认识不断提高的情况下,对肉的品质有了更高的要求,同时也受到众多科学工作者的关注。随着分子生物学的迅速发展,对肉质的研究已深入到分子水平。影响肉品质的因素很多,肌内脂肪(Intramuscular fat, IMF)含量的高低是影响猪肉品质的主要因素之一。肌内脂肪含量直接影响到肉的风味,含量越高,肉的口感越好。中国地方猪种的 IMF 含量高于国外品种,达 3% 以上,有的甚至达 6% ~ 7%^[2]。研究表明,心脏脂肪结合酸蛋白(Heart Fatty-Acid-Binding Protein, *H-FABP*)基因可作为影响肌内脂肪含量的候选基因。如能在中国地方猪中揭示出候选基因的多态性,将其作为供试群体研究多态位点及整个基因与性状的关系,将有所突破。

本文利用 PCR-RFLP 技术对山西地方猪种马身猪、培育中的品系山西白猪及其杂种群体 *H-FABP* 基因 5'-上游区及第二内含子的遗传变异进行了研究,为马身猪的保护、山西白猪的推广及进一步分析我国猪种 *H-FABP* 基因多态性及其与肌内脂肪含量等肉质性状相关性的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验猪选自大同种猪场。马身猪 61 头,山西白猪 64 头,大白猪 43 头,大白猪 × 马身猪(简称“大本”)30 头,杜洛克猪 × 马身猪(简称“杜本”)22 头,大白猪 × 山西白猪(简称“大山”)31 头,杜洛克猪 × 山西白猪(简称“杜山”)35 头。耳组织块 0.5 ~ 1.0 g。

1.2 方法

1.2.1 猪的基因组 DNA 的提取

按常规的酚/氯仿抽提法提取基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增

两对引物按照 Gerbens^[3]等发表的序列,由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列、PCR 产物的大小及位置见表 1。PCR 扩增反应体系为 25 μL,其中含有基因组 DNA 约 50 ng, 10 pmol 的引物, 200 μmol/L 的 dNTPs, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1.8 U *Taq* 酶(上海生工生物工程发展有限

公司)。扩增条件为:PCR1,样品经 95 °C 变性 5 min 后,95 °C 变性 1 min,58 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环后,72 °C 延伸 10 min;PCR2,样品经 95 °C 变性 3 min 后,95 °C 变性 1 min,59.8 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,32 个循环后,72 °C 延伸 10 min。

表 1 *H-FABP* 分析的引物序列、产物大小及位置

Table 1 Primer sequences, PCR product size and region for *H-FABP*

PCR-RFLP	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')	产物大小 Product size(bp)	扩增区域 Amplified region
PCR1	GGACCCAAGATGCCTACGCCG	693	5'-上游区
<i>Hinf</i> I	CAGCATCTTTGACCAAGAGG		5'-upstream
PCR2	ATTGCTTCGGTGTGTTTGG	816	第二内含子
<i>Hinf</i> I * / <i>Hae</i> III	TCAGGAATGGGAGTTATTGG		The second intron

1: *Hinf* I 和 *Hinf* I * 代表在不同区域的酶切反应;2: PCR 1 扩增区域与 GenBank 上注册的 X 98558 序列相对应;3: PCR 2 扩增区域与 GenBank 上注册的 Y 16180 序列相对应。

1: *Hinf* I and *Hinf* I * represent enzyme reactions in different region;2: PCR 1 amplified region corresponded to nucleotide sequence of GenBank Access No. X 98558; 3: PCR 2 amplified region corresponded to nucleotide sequence of GenBank Access No. Y 16180.

1.2.3 限制性内切酶酶切

选用 *Hinf* I 和 *Hae* III (Promega, USA) 两种限制性内切酶酶切 PCR 扩增产物,酶切反应体系为 12 μL,其中扩增产物 10 μL,限制性内切酶 2 U,37 °C 反应过夜。酶切产物用 2.5% 或 3% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

2 实验结果

2.1 PCR 产物的酶切结果

Hinf I、*Hae* III 和 *Hinf* I * 的酶切产物均出现多态性,每种 PCR-RFLP 的等位基因及相应的酶切片段长度见表 2。

5'-上游区中 *Hinf* I -RFLP: 分析猪 X 98558 *H-FABP* 基因序列可知,PCR 1 所扩增的 693 bp 的片段中共有 4 个 *Hinf* I 切点,其中 1 321 位为多态性酶切位点,将该切点存在时产生的片段定义为等位基因 *H*,消失时产生的片段定义为等位基因 *h*(图 1)。

表 2 *H-FABP* PCR-RFLPs 的等位基因及相应酶切片段的长度

Table 2 The alleles and corresponding fragment lengths of *H-FABP* PCR-RFLPs

PCR-RFLP	等位基因 Allele	片段大小 Fragment lengths(bp)
<i>Hinf</i> I	<i>H</i>	339 + 172 + 98 + 59 + 25
	<i>h</i>	339 + 231 + 98 + 25
<i>Hae</i> III	<i>D</i>	683 + 117 + 16
	<i>d</i>	405 + 278 + 117 + 16
<i>Hinf</i> I *	<i>B</i>	521 + 217 + 47 + 32
	<i>b</i>	521 + 264 + 32

注:黑体数字表示多态片段的大小。

Note: Bold numbers are the lengths of polymorphic fragments.

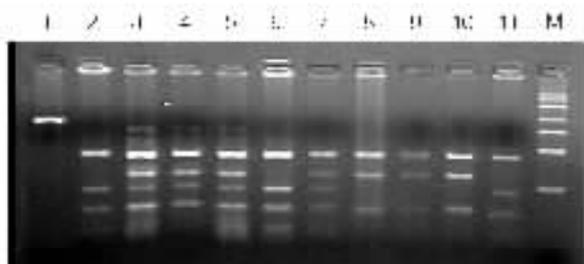


图 1 *Hinf* I 酶切 693 bp 的琼脂糖凝胶 (2.5%) 电泳图谱

1: PCR 产物; 2, 6, 11: *HH*; 3, 4, 5, 7: *Hh*; 8~10: *hh*。

Fig. 1 Agarose gel image of digested 693 bp PCR product with *Hinf* I

1: PCR product; 2, 6, 11: *HH*; 3, 4, 5, 7: *Hh*; 8~10: *hh*; M: 100 bp DNA marker.

第二内含子中 *Hae* III-RFLP 和 *Hinf* I *-RFLP: 据 GenBank Y 16180 序列可知, PCR 2 所扩增的 816 bp 片段中, 存在 3 个 *Hae* III 酶切位点, 其中 1 811 位为多态切点, 将该切点存在时产生的片段定义为等位基因 *d*, 不存在时产生的片段定义为等位基因 *D* (图 2)。

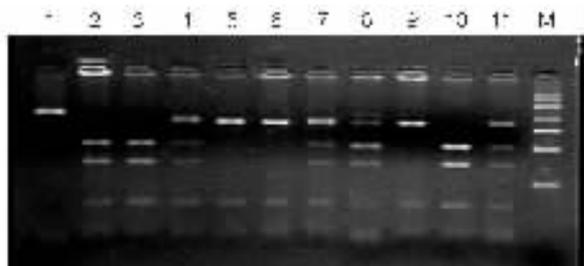


图 2 *Hae* III 酶切 816 bp 的琼脂糖凝胶 (2.5%) 电泳图谱

1: PCR 产物; 2, 3, 10: *dd*; 4, 7, 8, 11: *Dd*; 5, 6, 9: *DD*。

Fig. 2 Agarose gel image of digested 816 bp PCR product with *Hae* III

1: PCR product; 2, 3, 10: *dd*; 4, 7, 8, 11: *Dd*; 5, 6, 9: *DD*; M: 100 bp DNA marker.

PCR 2 所扩增的 816 bp 片段中, 存在 3 个 *Hinf* I *-RFLP 酶切位点, 其中 1 968 位发现了多态性的存在^[11]。当 3 个切点都存在时产生的片段定义为等位基因 *B*, 无多态切点时产生的片段定义为等位基因 *b* (图 3)。

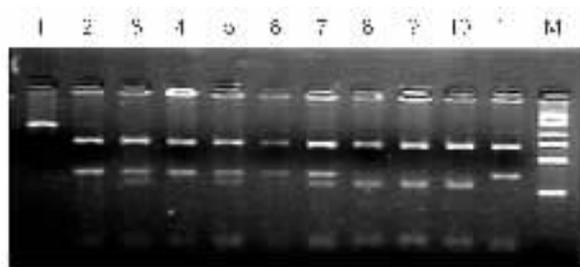


图 3 *Hinf* I * 酶切 816 bp 的琼脂糖凝胶 (2.5%) 电泳图谱

1: PCR 产物; 2, 4, 6, 11: *bb*; 3, 5, 7, 8: *Bb*; 8~10: *BB*。

Fig. 3 Agarose gel image of digested 816 bp PCR product with *Hinf* I *

1: PCR product; 2, 4, 6, 11: *bb*; 3, 5, 7, 8: *Bb*; 8~10: *BB*; M: 100 bp DNA marker.

2.2 *H-FABP*-RFLPs 的基因型及基因频率分布 (表 3)

在 *Hinf* I -RFLP 位点上, 除山西白猪、大本及杜本外, 其他种群 χ^2 值均小于 5.99, 即这些群体均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。在 *Hae* III-RFLP 和 *Hinf* I *-RFLP 位点上, 所检测猪群均处于 Hardy-Weinberg 平衡状态。

3 分析与讨论

3.1 在 *Hinf* I -RFLP 位点上, 被检测的杜洛克猪 × 山西白猪全部为 *HH* 基因型, 大白猪、大白猪 × 山西白猪、大白猪 × 马身猪、杜洛克猪 × 马身猪等所有个体均未发现 *hh* 基因型, 马身猪群体中未发现 *HH* 基因型。外来猪种及其与山西白猪的杂交群体含有较高频率的等位基因 *H*, 而马身猪则含有较高频率的等位基因 *h*。与李桢等 (2003) 的研究相比, 本研究中大白猪的等位基因频率与之相近似 (0.9302 vs 0.91)^[4]。由表 3 可以看出, 国外猪种与马身猪杂交的群体中等位基因 *H* 的频率较马身猪纯种的高。

3.2 在 *Hae* III-RFLP 位点上, 被检测的猪群除马身猪外均表现多态性。马身猪在该位点均表现为 *DD* 型。林万华等 (2002) 研究结果表明, 6 个中国地方猪种在该位点均表现为 *DD* 型^[5]。张桂香等 (2002)

表 3 猪 *H-FABP*-RFLPs 的基因型及等位基因频率Table 3 Genotypes and allele frequencies of the *H-FABP*-RFLPs in pig population

PCR-RFLP	Genotype	马身猪	山西白猪	大白猪	大山	杜山	大本	杜本
	& Allele fre.	Mashen pig	Shanxi white pig	Yorkshire	Dashan	Dushan	Daben	Duben
<i>Hinf</i> I	<i>HH</i>	0	44	37	24	35	3	4
	<i>Hh</i>	3	6	6	7	0	26	17
	<i>hh</i>	52	12	0	0	0	0	0
	<i>H</i>	0.0273	0.7581	0.9302	0.8870	1.0000	0.5517	0.5952
	χ^2 value	5.1993	31.3689**	0.4373	0.1330	0.0000	19.1440**	8.7833*
<i>Hae</i> III	<i>DD</i>	61	7	1	7	4	17	8
	<i>Dd</i>	0	17	26	17	12	13	14
	<i>dd</i>	0	39	15	7	19	0	0
	<i>D</i>	1.0000	0.2460	0.3333	0.5000	0.2857	0.7833	0.6818
	χ^2 value	0.0000	3.9143	5.7508	0.2904	0.5834	2.1231	3.9031
<i>Hinf</i> I *	<i>BB</i>	56	6	1	3	4	14	8
	<i>Bb</i>	4	19	22	15	13	15	10
	<i>bb</i>	0	39	19	13	18	1	4
	<i>B</i>	0.9667	0.2422	0.2857	0.3387	0.3000	0.7167	0.5909
	χ^2 value	2.8598	1.8084	2.7365	0.1130	0.2776	1.1229	0.0603

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ ($\chi_{0.05(2)}^2 = 5.99$, $\chi_{0.01(2)}^2 = 9.21$)

研究结果表明,所研究的中国地方猪种中除了一头皖南华猪表现为 *Dd* 型外,其余均表现为 *DD* 型^[6]。说明中国地方猪种在该位点遗传品质的纯合度高。Gerbens 等对 153 头猪的 *H-FABP* 基因表达与肌内脂肪含量关系的研究结果表明,*dd* 型个体的肌内脂肪含量比 *DD* 型和 *Dd* 型个体的低^[7]。绝大多数中国地方猪种在 *H-FABP* 基因的 *Hae* III-RFLP 位点表现为 *DD* 型,这与中国地方猪属于脂肪型猪肌内脂肪含量高相吻合。大白猪 × 马身猪、杜洛克猪 × 马身猪两个群体的等位基因 *D* 的频率较高,且只检测到两种基因型 *DD* 和 *Dd*,按照上述说法,推断马身猪与国外猪种杂交可以提高肌内脂肪含量。杜洛克猪 × 山西白猪群体的等位基因 *D* 的频率较低,可能是受母本影响造成的。山西白猪等位基因 *D* 的频率仅为 0.2460。

3.3 在 *Hinf* I * -RFLP 位点上,被检测的猪群均表现出多态性。马身猪检测到 *BB* 和 *Bb* 两种基因型,等位基因 *B* 的频率为 0.9667,其余的猪群均检测到 3 种基因型。山西白猪、大白猪 × 马身猪、杜洛克猪 × 马身猪等群体等位基因 *B* 的频率分别为 0.2422、0.7167 和 0.5909。在本研究中,含有马身猪血统的猪群等位基因 *B* 的频率较高,是否影响到

肌内脂肪含量有待于进一步研究。

4 结 论

4.1 山西马身猪在 3 个位点的基因频率明显以 *D*、*h*、*B* 占有优势,且表现出遗传品质的纯合度高,是一种良好的遗传资源,有必要进行保护。

4.2 培育中的品系山西白猪在 3 个位点均表现出多态性。等位基因 *H* 的频率较高,达 0.7581,等位基因 *D*、*B* 的频率较低,分别为 0.2460 和 0.2422。

4.3 大白猪 × 马身猪、杜洛克猪 × 马身猪两个群体在 *Hinf* I -RFLP 和 *Hae* III-RFLP 两位点上分别检测到 *HH* 和 *Hh*、*DD* 和 *Dd* 两种基因型,杜洛克猪 × 山西白猪在 *Hinf* I -RFLP 位点上只有一种基因型 *HH*。

参 考 文 献(References):

- [1] SU Yu -Hong, XIONG Yuan -Zhu, DENG Chang -Yan. The progress of mapping QTL affecting meat quality in pig. *Hereditas* (Beijing), 2000, 22(5): 334~338.
苏玉虹,熊远著,邓昌彦. 猪的肉质性状基因定位研究进展. 遗传, 2000, 22(5): 334~338.
- [2] CHEN Xiao-Hua. Theory and Practicum of Swine Breeding. Bei-

jing: Publish House of Agriculture, 1990, 32~35.

陈效华. 猪育种的理论与实践. 北京: 农业出版社, 1990, 32~35.

- [3] Gerbens F, Rettenberger G, J A Lenstra, J H Veerkamp, M F te Pas. Characterization, chromosomal localization and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein gene. *Mammalian Genome*, 1997, 8(5): 328~332.

- [4] Li Zhen, CAO Hong -He, CHU Ming-Xing, LI Hong -Bin, MA Yue -Hui, ZHENG You -Min, ZHOU Zhong - Xiao. Study on the polymorphism of porcine heart fatty Acid-binding protein gene in eleven pig breeds using PCR-RFLP. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2003, 34 (4): 313~317.

李 桢, 曹红鹤, 储明星, 李宏滨, 马月辉, 郑友民, 周忠孝. 中外 11 个猪种 *H-FABP* 基因 PCR-RFLP 的研究. 畜牧兽医学报, 2003, 34(4): 313~317.

- [5] LIN Wan -Hua, HUANG Lu - Sheng, REN Jun, DENG Su -Hua, WANG Wen -Jun, LIU Bao - Sheng, ZHOU Li -Hua, CHEN Cong -Ying. Research on genetic variation of Heart Fatty Acid-binding

protein gene in ten pig breeds. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29 (1): 12~15.

林万华, 黄路生, 任 军, 邓素华, 王文君, 刘宝生, 周利华, 陈从英. 中外十个猪种 *H-FABP* 基因遗传变异的研究. 遗传学报, 2002, 29(1): 12~15.

- [6] ZHANG Gui -Xiang, CAO Hong -He, WANG Li -Xian, LI Hong -Bin, ZHENG You -Min. Genetic variation in 5'-upstream region and the second intron of *H-FABP* gene in nine pig breeds. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2002, 33(4): 340~343.

张桂香, 曹红鹤, 王立贤, 李宏滨, 郑友民. 九个猪种 *H-FABP* 基因 5'-上游区和第二内含子的遗传变异. 畜牧兽医学报, 2002, 33(4): 340~343.

- [7] F Gerbens, F J Verburg, H T B Van Moerkerk, B Engel, W Buist, J H Veerkamp, M F W te Pas. Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs. *Journal of Animal Science*, 2001, 79(2): 347~354.

欢迎订阅 2006 年《中国兽医科学》

《中国兽医科技》是由农业部主管、中国农业科学院兰州兽医研究所主办的兽医专业科技期刊。为全国中文核心期刊, 已被英国《动物学记录》数据库、国际农业和生物学中心文献数据库、中国科学引文数据库、中国科技论文与引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国生物学期刊引文数据库、中国生物学文献数据库等 10 余家国内、外著名检索系统与数据库收录。为全国百余种畜牧兽医类期刊中唯一获得国家期刊奖的期刊。

《中国兽医科技》从 2005 年第 1 期开始改版为兽医学学术类期刊。办刊宗旨是: 报道国内外兽医科学的研究进展和水平, 推广兽医科学研究成果, 反映国内外兽医科学研究动态, 探讨新的兽医学理论和研究方法。主要栏目有: 专家论坛、微生物学、寄生虫学、流行病学、药理学、中兽医学、普通病学、基础兽医学、综述专论、研究简报等。适于兽医科学研究人员、农业院校动物医学、动物科学专业师生阅读, 也适合各级畜牧兽医技术人员和各级畜牧兽医行政管理人员参考。

为保持改版为学术性期刊后内容和刊名的一致性, 经国家新闻出版总署批准, 从 2006 年起更名为《中国兽医科学》, 更名后定价不变。

《中国兽医科学》为月刊, 每月 20 日出版, A4 开本, 每册 88 码, 每期定价 6.00 元, 全年 72.00 元。由兰州市邮政局发行, 全国各地邮政局(所)均可订阅。如未能在当地订到或错过征订时间, 可直接汇款至本刊编辑部订阅。

中国标准连续出版物号: ISSN 1000-6419, 邮发代号: 54-33, 国外代号: M4191.
CN 62-1074/S

电话: (0931)8342195, 8310086(兼传真); 网址: <http://www.cjvst.com>

E-mail: cjvst@cjvst.com