

# 猪 MB 基因外显子 3 的多态性分析

丁国杰<sup>1</sup>, 刘娣<sup>2\*</sup>, 戴秀丽<sup>1</sup>, 柴华<sup>1</sup>

(1. 黑龙江生物制品一厂药品研发中心, 黑龙江哈尔滨 150069; 2. 黑龙江省农业科学院, 黑龙江哈尔滨 150069)

**摘要** 以 MB 基因作为影响猪肉肉色的候选基因, 利用 PCR-SSCP 技术, 以野猪、野家杂种猪、民猪、大白猪、长白猪 5 个猪种为研究对象, 根据 GenBank 上猪的 MB 序列设计了 3 对引物, 对此基因的 3 个外显子进行 SNPs 检测。基因型检测结果表明: MB 基因在第 1、第 2 外显子上没有发现多态, 在第 3 外显子上检测到了多态。在第 3 外显子上的第 437 bp 处存在一个 T→C 的碱基突变, 该突变未导致氨基酸的改变, 属沉默突变。经计算各基因型频率、基因频率和试验统计表明: 随野猪、野家杂种猪、民猪、长白猪、大白猪肉色的变浅, 等位基因 N 的基因频率也呈下降趋势。

**关键词** 猪; MB 基因; SNPs; PCR-SSCP; 肉色

中图分类号 F320 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)11-03165-02

## Analysis of Polymorphism of MB Genes Exon 3

DING Guo-jie et al (The First Bio-products Manufactory of Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang 150069)

**Abstract** In this research, the MB genes were taken as the candidate gene which could influence the meat color. The wild boar, the crossbreed of the wild boar and pig, min pig, landrace, double muscle pig and large white pig were taken as the research materials. According to the MB gene sequences of swine in GenBank, three pairs of primers for MB were designed. PCR-SSCP technology was applied to detect SNPs of the genes exons. Detected results of genotype demonstrated that in the first and second primers, there was no polymorphism, and the polymorphism was examined in the third primers of MB. One mutant site (T → C) in the third primer of MB was at 438 bp and the mutation was silent. The computation of genotypic frequency and gene frequency, as well as statistical analysis demonstrated that with the decline of meat color of the wild boar and pig, min pig, landrace, double muscle pig and large white pig, the gene frequency of allelic gene N also declined in this trend.

**Key words** Pig; MB gene; SNPs; PCR-SSCP; Meat color

肉色是肉品外观评定的重要指标, 也是肉品生理学、生物化学及微生物学特性的外观表现。目前, 肉色表现性状的测定只能通过屠宰动物取样, 难以通过活体测定。如果在动物生长早期就能够预测成年后的肉色状况, 则具有很高的实际应用价值。为此, 笔者选择与肉色相关的候选基因 MB 基因, 采用 PCR-SSCP 技术对其多态性变化进行追踪, 试图找出与肉色相关的分子标记, 从而实现对动物肉色性状的标记辅助选择, 以期实现对肉色的早期预测, 应用于育种实践。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 以 5 个猪种的 431 个个体作为试验材料, 其中大白猪 173 头, 长白猪 102 头, 采自黑龙江省各大养猪场; 东北民猪 81 头, 采自黑龙江省兰西种猪场; 野家杂种猪 60 头, 野猪 15 头, 采自黑龙江省庆安县双峰林场。

**1.2 主要试剂** 限制性内切酶 BamHI、HindIII (大连宝生物工程有限公司), pMD18-T 载体 (大连宝生物工程有限公司), 胶回收试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司), 质粒提取试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司), DNA Marker DL 2 000 (大连宝生物工程有限公司), Taq DNA 聚合酶 (大连宝生物工程有限公司), 丙烯酰胺、甲叉 (上海华舜生物工程有限公司), 甲酰胺 (上海华舜生物工程有限公司), N,N,N',N'-四甲基乙二胺 TEMED (上海华舜生物工程有限公司), 二甲苯青 (上海华舜生物工程有限公司)。

**1.3 引物合成** PCR 的 3 对引物参照 Genbank 上的序列设计合成, 引物序列见表 1。

发现多态的第 3 对引物的 PCR 条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s; 61.8 °C 30 s; 72 °C 30 s; 进入第 2 步, 35 循环; 72 °C 5

位置	引物名称	引物序列
exon1	上游引物	5'—GGCTCAGCGACGGGGAAT—3'
	下游引物	5'—CCATGGCCTGCGACATCA—3'
exon 2	上游引物	5'—TAAGGGTCACCCGAGAC—3'
	下游引物	5'—CAGGGATCTGTGCTTGG—3'
exon 3	上游引物	5'—AGCCATCATCCAGTTCT—3'
	下游引物	5'—AAGCCCAGCTCCTTGAC—3'

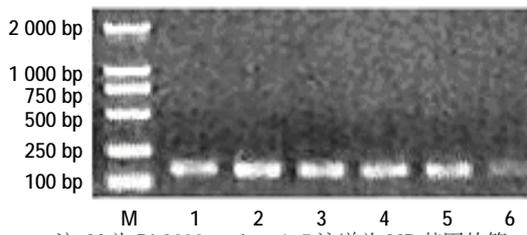
min; 4 °C 30 min。

**1.4 SSCP 分析** 4 μl PCR 产物和 6 μl 的上样缓冲液, 98 °C 变性 10 min, 然后冰浴 5 min, 使之保持变性状态。变性后的 PCR 产物进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。10 V/cm 电泳 8~9 h 后, 银染显色。

**1.5 克隆测序** 将纯合型个体的 DNA 进行 PCR 扩增, 用浓度 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物回收, 回收长度约为 130 bp (第 3 对引物所扩增的片段), 将回收的 DNA 片段定向插入 T-载体中, 构建 T-载体-MB 重组质粒, 然后转入感受态大肠杆菌 DH5α, 进行 PCR 鉴定, 制备重组质粒 DNA, 最后用 Hind III 和 BamH I 双酶切重组质粒 DNA, 获得所需要的 130 bp 的 DNA 片段。

### 2 结果与分析

**2.1 PCR-SSCP 分析结果** 对发现多态的第 3 对引物 PCR 扩增见图 1, SSCP 的 3 种基因型 (MM MN NN) 的检测结果见图 2, 所检测的 5 个猪种表现出明显差异 (表 2)。



注: M 为 DL2000 marker, 1~5 泳道为 MB 基因的第 3 对引物的扩增片段, 6 泳道为空白。

图 1 PCR 产物的电泳检测

基金项目 黑龙江省科技攻关项目 编号:GB01B104)。

作者简介 丁国杰 (1974-), 女, 黑龙江绥化人, 畜牧师, 从事分子遗传学研究。\* 通讯作者。

收稿日期 2007-01-15

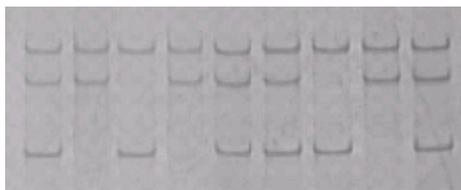


图2 第3对引物扩增片段的PCR-SSCP分析

表2 MB基因的第3对引物在5个猪种中的基因型分布、基因频率

群体	数目 头	基因型频率//%			等位基因频率//%		X <sup>2</sup>
		MM	MN	NN	M	N	
民猪	81	19.8 (16)	54.3 (44)	25.9 (21)	46.9	52.1	
长白	155	100 (155)	0 (0)	0 (0)	100.0	0	
大白猪	120	100 (120)	0 (0)	0 (0)	100.0	0	167.93
野家杂种猪	60	0 (0)	55 (33)	45 (27)	27.5	72.5	(P=0.001)
野猪	15	6.7 (1)	0 (0)	93.3 (14)	6.7	93.3	

注:括号内为检测个体数。

2.2 测序结果与分析 以东北民猪、野猪第3对引物所扩增的2种纯合片段MM型和NN型为样本,分别进行测序,并与GenBank上猪MB基因序列进行比较,发现不同猪种MM型均为野生纯合型,无变异;NN型均为突变纯合型,在437 bp处有1个点突变:T→Q(图3)。

MM TTGGTGCTGACGCCAGGGAGC

↓

NN TTGGTGCCGACGCCAGGGAGC

图3 突变位点

### 3 讨论与结论

野猪、野家杂种猪、民猪、大白猪、长白猪的肉色依次变

浅,而等位基因N的基因频率按此顺序呈下降趋势:0.933→0.725→0.521→Q(表2)。可见,随肉色的变浅,等位基因N的基因频率也降低。研究结果显示,野猪的等位基因N的基因频率比杂种猪的高。同时,统计结果也显示基因型在野猪和杂种猪间的分布差异并不显著(P>0.05)。原因可能是野猪和杂种猪间肉色相差太小,如果试验群体代表性稍差或群体不够大,则很难反映品种间存在的一些较小差别。民猪是进行肥猪育种过程中选育的品种,其等位基因N的基因频率下降,在该研究所采用的81个个体中等位基因N的基因频率很低,为0.521。大白猪、长白猪是以高瘦肉率为重要育种目标的,这几个猪种的等位基因N的基因频率为0。因此该研究得出一个趋势性的结果,即MB基因的等位基因N的基因频率一方面与肉色呈正相关,一方面与育种选择方向有关。所以在猪的育种中MB基因的等位基因N可能被作为肉色的选择标记。

### 参考文献

- [1] MOISEEVA S A, POSTNIKOVA G B. Mechanism of oxidation of oxymyoglobin by copper ions: comparison of sperm whale, horse, and pig myoglobins [J]. *Biochemistry (Mosc)* Jul, 2001, 66 (7): 780-790.
- [2] NEWCOM D W, STALDER K J, BAAS T J, et al. Breed differences and genetic parameters of myoglobin concentration in porcine longissimus muscle [J]. *J Anim Sci*, Aug, 2004, 82(8): 2264.
- [3] SUZUKI T, IMAI K. Evolution of myoglobin [J]. *Cell. Mol. Life Sci*, 1998, 54: 979-1004.
- [4] WELLER P A, PRICE M, ISENBERGH, et al. Myoglobin expression: Early induction and subsequent modulation of myoglobin and myoglobin mRNA during myogenesis [J]. *Molecular and Cellular Biology*, Dec, 1986, 3: 4539-4547.
- [5] 黄鸿兵, 徐幸莲. 肉的颜色与嫩度 [J]. *肉类研究*, 2003 (3): 12-14.