

猪 *H-FABP* 基因多态性及其与肌肉脂肪含量的相关研究

姜延志¹, 刘晓研², 李芳琼², 李学伟^{2*}

(1. 四川农业大学生命科学与理学院, 雅安 625014; 2. 四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014)

摘要: 旨在研究猪 *H-FABP* 基因的遗传多态性及其与肌肉脂肪含量的遗传效应。利用 PCR-RFLP (*Hinf* I、*Msp* I、*Hae* III、*Hinf** I 4 种限制性内切酶) 分子标记技术检测了中国地方猪种雅南猪、大河猪, 培育品种大河乌猪以及杜洛克与长白和约克三元杂交商业群体共 148 头猪心脏型脂肪酸结合蛋白 (*H-FABP*) 基因 5'-上游区和第二内含子的遗传变异, 并利用固定效应模型分析了 *H-FABP* 基因在杜洛克与长白和约克三元杂交商业群体中对肌肉脂肪含量的遗传效应。结果表明: (1) 在 *Hinf* I 和 *Msp* I 位点上, 所有 4 个猪群都存在多态; 在 *Hae* III 位点上, 除雅南猪只出现单态外, 其余 3 个猪群都出现多态; 在 *Hinf** I 位点上, 除杜洛克与长白和约克三元杂交商业群体出现多态外, 其余 3 个猪群只表现单态。 (2) 4 个位点对肌肉脂肪含量的影响差异显著, 各基因型肌肉脂肪含量最小二乘均值关系即 Hh>HH, bb>Bb>BB, Aa>AA, DD>Dd>dd。结合 *H-FABP* 基因的生理功能和已有的研究结果来看, 可在特定的群体中将其作为影响猪肌肉脂肪含量的候选基因。

关键词: 猪; 心脏型脂肪酸结合蛋白基因; PCR-RFLPs; 肌肉脂肪含量

中图分类号: S828; Q343.15

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)07-0792-05

The Genetic Relationship between Polymorphism of *H-FABP* Gene and Intramuscular Fat Content in Pig

JIANG Yan-zhi¹, LIU Xiao-yan², LI Fang-qiong², LI Xue-wei^{2*}

(1. College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the genetic relationship between polymorphism of *H-FABP* gene and intramuscular fat content in swine. By using 148 pigs from four pig populations including Yanan, Dahe, Dawu and Duroc×(Yorkshire×Landrace), the genetic variations in 5'-upstream region and the second intron in porcine *H-FABP* gene were detected by PCR-RFLP with restriction enzyme *Hinf* I, *Msp* I, *Hae* III, *Hinf** I. Genetic effect of *H-FABP* gene on intramuscular fat content were analyzed by the fixed model in Duroc×(Yorkshire×Landrace) population. The results showed as follows: (1) 4 pig populations had polymorphism at *Hinf* I and *Msp* I sites; At *Hinf** I site, Duroc×(Yorkshire×Landrace) pig population had polymorphism, but other pig populations had no polymorphism; At *Hae* III site, 3 pig populations had polymorphism except Yanan pigs. (2) *H-FABP* gene increased intramuscular in the order of Hh>HH, bb>Bb>BB, Aa>AA, DD>Dd>dd. These results indicated that *H-FABP* gene could be regarded as candidate gene affecting intramuscular fat content in special pig populations.

Key words: swine; *H-FABP* gene; PCR-RFLPs; intramuscular fat content

收稿日期: 2009-06-22

基金项目: 国家科技支撑计划(2008BADB2B11-7); 四川农业大学青年科技创新基金(00731300)

作者简介: 姜延志(1975-), 男, 重庆开县人, 副教授, 博士, 主要从事猪遗传育种研究, Tel: 0835-2886103, E-mail: jiangyz04@163.com

* 通讯作者: 李学伟, E-mail: lixuewei9125@126.com

肌内脂肪(intramuscular fat, IMF)与猪肉的感官特性密切相关^[1-2], 2%~3%的 IMF 含量对猪肉的食用特性是比较理想的^[3]。然而由于对瘦肉率的选择已使 IMF 含量降低到 1%~1.5%, 低于最佳范围, 如何能在保证瘦肉率(低背膘厚)的前提下提高 IMF 含量, 是育种者的新目标。Hovenier 等^[4]的研究结果表明, IMF 具有较高的遗传力($h^2 = 0.5$), 而与背膘厚的遗传相关是中等偏低的不利相关($r^2 = 0.37$), 故对 IMF 含量的遗传改良是可行的。在众多提高 IMF 含量的方法中, 标记辅助选择(MAS)被认为是行之有效的方之一。尤其象 IMF 这样的肉质性状, 当把标记信息纳入育种方案中, 可取得较快的遗传进展^[5]。

脂肪酸结合蛋白(fat acid binding proteins, FABPs)是小的细胞内蛋白质, 参与细胞内脂肪酸运输, 可将脂肪酸从细胞膜上运送到脂肪酸氧化和甘油三酯及磷脂的合成位置。作为细胞内类脂结合蛋白家族之一, 心脏型脂肪酸结合蛋白(heart-type fat acid binding protein, H-FABP)主要在心肌、骨骼肌和泌乳的乳腺中表达^[6]。Gerbens 等^[7-8]对猪 *H-FABP* 基因进行了克隆并将其定位于 6 号染色体上。Gerbens 等^[7]利用候选基因法的研究表明, *H-FABP* 基因的遗传变异与肌内脂肪含量存在相关, 在杜洛克猪中存在 *Hinf* I、*Msp* I 和 *Hae* III 酶 3 个多态性酶切位点, 并初步发现 *H-FABP* 基因的纯合单倍体“aaddHH”与高肌内脂肪含量相关。曹红鹤等^[9]发现了位于第二内含子的另一个多态位点(*Hinf** I-RFLP), 该位点与肌内脂肪含量密切相关。

本试验采用 PCR-RFLPs 方法, 以中国地方猪种雅南猪、大河猪, 培育品种大河乌猪以及杜洛克与长白和约克三元杂交商业群体共 148 头个体为研究对象, 首先对 *H-FABP* 基因 5'-上游区和第二内含子的突变位点等位基因和基因型频率在 4 个群体中的分布进行分析, 其次对杜洛克与长白和约克三元

杂交商业群体中 *H-FABP* 基因遗传变异与 IMF 含量关系进行研究, 为 *H-FABP* 基因作为候选基因提高猪 IMF 含量提供可靠依据。

1 材料与方法

1.1 试验猪群

四川农业大学动物遗传育种养猪研究室实验场雅南猪 26 头, 云南富源县大河猪保种场大河猪 10 头、大河乌猪(杜洛克×大河猪)10 头, 四川农业大学动物营养研究所实验场 DLY(杜洛克×(长白×约克))102 头。猪只饲养到约 90 kg 时屠宰, 取左半侧胴体倒数 3、4 肋骨处背最长肌约 200 g 和 10 g, 用于粗脂肪提取和基因组 DNA 制备, -20 °C 低温保存备用。

1.2 粗脂肪提取

粗脂肪提取用常规的索式提取法进行。

1.3 基因组 DNA 提取

用常规酚-氯仿法从肉样中提取基因组 DNA, TE 溶解, -20 °C 低温保存备用。

1.4 多态性分析

引物参照文献^[7]设计(上海生工合成), 引物序列、PCR 产物的大小及扩增区域见表 1。PCR 反应在 25 μ L 体系中进行, 其中包括 100 ng 的基因组 DNA, 20 pmol dNTPs, 上下游引物各 2.5 pmol, 1.2 U 的 *Taq* DNA 聚合酶。PCR 过程为: 94 °C 预变性 5 min; 然后 35 个循环, 每个循环 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min; 最后 72 °C 延伸 7 min。用 *Hinf* I (MBI, USA) 酶切 693 bp 的扩增产物, 用 *Msp* I、*Hae* III 和 *Hinf** I (MBI, USA) 分别酶切 816 bp 的扩增产物, 酶切反应体系为 20 μ L, 其中扩增产物为 15 μ L, 限制性内切酶为 4 U, 37 °C 反应 6 h。酶切产物用 3% 的琼脂糖凝胶电泳分析并确定基因型。

表 1 *H-FABP* 基因 PCR-RFLPs 的引物序列、产物位置、相应的 PCR 产物大小、等位基因以及酶切片段的长度

Table 1 Primer sequences, products position and corresponding PCR products size

酶切位点 Site	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物大小/bp Product size	产物位置 Product position
<i>Hinf</i> I	GGACCCAAGATGCCTACGCCG CTGCATCTTTGACCAAGAGG	693 ^①	5'-upstream (1 125-1 818) ^①
<i>Msp</i> I、 <i>Hae</i> III、 <i>Hinf</i> * I	ATTGCTTCGGTGTGTTTGG TCAGGAATGGGAGTTATTGG	816 ^②	Intron 2(1 401-2 217) ^②

①. 产物位置与 GenBank 上注册的 X98558 序列相对应; ②. 产物位置与 GenBank 上注册的 Y16180 序列相对应

①. Product position corresponding to the sequence Acc. No X98558 in GenBank; ②. Product position corresponding to the sequence Acc. No Y16180 in GenBank

1.5 数据统计和分析

统计计算基因型和等位基因频率。根据固定效

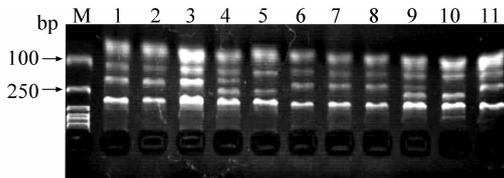
应模型, 利用 SAS 8.0 软件包 PROC GLM 过程分析基因型效应对 IMF 含量测定值的影响, 统计分析

模型为: $Y = \mu + G + e$, 其中: Y = 肌内脂肪含量测定值, μ = 群体均值, G = 基因型效应, e = 随机残差效应。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物的酶切结果

本研究选用了 4 种限制性内切酶, 每种 PCR-RFLP 的等位基因及相应的酶切片段长度为 H: 339/172/98/59/25 bp, h: 339/231/98/25 bp, A: 750/66 bp, a: 816 bp, D: 683/117/16 bp, d: 405/278/117/16 bp, B: 521/217/47/32 bp, b: 521/264/32 bp。在所研究的猪群中, 各内切酶酶切产物均出现不同程度的多态(图 1-图 4)。

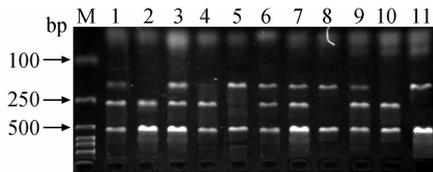


1~3, 6~8, 11. HH 基因型; 5, 10. hh 基因型; 4, 9. Hh 基因型; M. DNA Marker DL2000

1-3, 6-8, 11. HH; 5, 10. hh; 4, 9. Hh; M. DNA Marker DL 2000

图 1 *Hinf* I 酶切 693 bp 的 PCR 产物 3% 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 1 Agarose gel (3%) image of 693 bp PCR product with *Hinf* I



5, 8, 11. BB 基因型; 2, 4, 10. bb 基因型; 1, 3, 6, 7, 9. Bb 基因型; M. DNA Marker DL2000

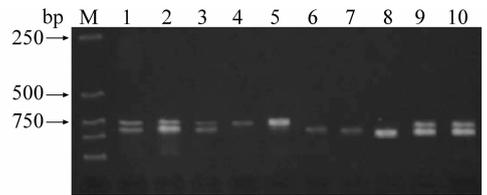
5, 8, 11. BB; 2, 4, 10. bb; 1, 3, 6, 7, 9. Bb; M. DNA Marker DL 2000

图 2 *Hinf*^{*} I 酶切 816 bp 的 PCR 产物 3% 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 2 Agarose gel (3%) image of 816 bp PCR product with *Hinf*^{*} I

2.2 等位基因和基因型频率

各猪群 *H-FABP* 基因的 PCR-RFLP 基因型分布及等位基因频率的统计结果见表 2。在 5'-上游区的 *Hinf* I-RFLP 位点上, 除 DLY 猪群只出现 2 种基因型 HH 和 Hh 外, 其它 3 个猪群都出现 3 种基因型, 其中大河猪和 DLY 猪等位基因 H 的频率较高, 分别为 0.800 和 0.961; 在第二内含子中的 *Hinf*^{*} I-RFLP 位点上, 只有 DLY 猪表现出多态性并出现 3 种基因型, 等位基因 b 的频率为 0.809, 在其余 3 个

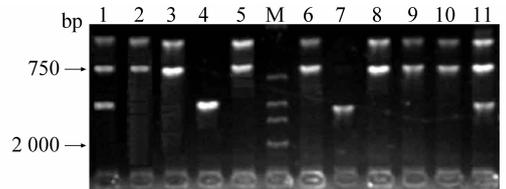


4, 5. AA 基因型; 6~8. aa 基因型; 1~3, 9, 10. Aa 基因型; M. DNA Marker DL2000

4, 5. AA; 6-8. aa; 1-3, 9, 10. Aa; M. DNA Marker DL2000

图 3 *Msp* I 酶切 816 bp 的 PCR 产物 3% 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 3 Agarose gel (3%) image of 816 bp PCR product with *Msp* I



4, 7. DD 基因型; 2, 3, 5, 6, 8~10. dd 基因型; 1, 11. Dd 基因型; M. DNA Marker DL2000

4, 7. DD; 2, 3, 5, 6, 8-10. dd; 1, 11. Dd; M. DNA Marker DL 2000

图 4 *Hae* III 酶切 816 bp 的 PCR 产物 3% 琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 4 Agarose gel (3%) image of 816 bp PCR product with *Hae* III

猪群中都只存在 bb 一种基因型; 本次试验的一个重要发现就是检测到在第二内含子的 *Msp* I-RFLP 位点上存在多态性, 且多态性在所研究的 4 个群体中均有发现, 在雅南猪、大河猪和 DLY 猪中存在的是 AA 和 Aa 2 种基因型, A 为优势等位基因, 其频率分别为 0.943、0.800 和 0.809, 在大乌猪中则是以 Aa 和 aa 2 种基因型存在, a 为优势等位基因, 其频率为 0.750; 在第二内含子内的 *Hae* III-RFLP 位点上, 雅南猪只出现 DD 基因型, 其它猪种均表现出多态性, 但大河猪只有 DD 和 Dd 2 种基因型。

2.3 IMF 含量与基因型效应的相关性分析

在 DLY 三元杂交猪群体中对 *H-FABP* 基因遗传变异与 IMF 含量关系进行研究, 统计分析发现, 所有 4 个位点对 IMF 含量的影响差异显著, 各基因型 IMF 最小二乘均值结果见表 3。在 *Hinf* I-RFLP 位点上, 基因型 HH 和 Hh 的 IMF 含量的最小二乘均值分别是 2.392% 和 3.496%, 差异极显著 ($P < 0.01$), 基因型 Hh 对 IMF 含量的效应值较大。在 *Hinf*^{*} I-RFLP 位点上, 基因型 BB、Bb 和 bb 的 IMF 含量的最小二乘均值分别是 2.359%、2.450% 和

表 2 4 个猪群 *H-FABP* PCR-RFLPs 的基因型和等位基因频率的分布Table 2 Genotype and allele frequencies of PCR-RFLPs of the *H-FABP* gene in 4 pig populations

多态位点 SNPs	基因型和等位基因 Genotype and allele	雅南猪 Yanan	大河猪 Dahe	大河乌猪 Dahewu	三元杂交猪 DLY
<i>Hinf</i> I	HH	6	7	4	94
	Hh	9	2	2	8
	hh	11	1	4	0
	H	0.404	0.800	0.500	0.961
<i>Hinf</i> * I	h	0.596	0.200	0.500	0.039
	BB	0	0	0	7
	Bb	0	0	0	25
	bb	26	10	10	70
<i>Msp</i> I	B	0.000	0.000	0.000	0.191
	b	1.000	1.000	1.000	0.809
	AA	23	6	0	63
	Aa	3	4	5	39
<i>Hae</i> III	aa	0	0	5	0
	A	0.943	0.800	0.250	0.809
	a	0.057	0.200	0.750	0.191
	DD	26	9	2	4
	Dd	0	1	6	41
	dd	0	0.000	2	57
	D	1.000	0.950	0.500	0.293
	d	0.000	0.050	0.500	0.707

3.048%，基因型 bb 和 BB 之间差异极显著 ($P < 0.01$)，基因型 bb 和 Bb 之间差异显著 ($P < 0.05$)，基因型 bb 对 IMF 含量的效应值最大。在 *Msp* I-RFLP 位点上，基因型 AA 和 Aa 的 IMF 含量的最小二乘均值分别为 2.527% 和 3.361%，差异极显著

($P < 0.01$)，基因型 Aa 对 IMF 含量的效应值最大。在 *Hae* III-RFLP 位点上，基因型 DD、Dd 和 dd 的 IMF 含量的最小二乘均值分别为 3.852%、2.919% 和 2.091%，基因型 dd 与 DD 和 Dd 之间差异极显著 ($P < 0.01$)，基因型 DD 对 IMF 含量的效应值最大。

表 3 *H-FABP* 基因不同位点各基因型 IMF 最小二乘均值Table 3 Least squares means for IMF value of different of respective sites in *H-FABP* gene

多态位点 SNPs	基因型 Genotype	个数/个 Number	最小二乘均值/% LSM	标准差/% SD	最小值/% Min	最大值/% Max
<i>Hinf</i> I	HH	94	2.392 ^B	0.780	0.500	3.730
	Hh	8	3.496 ^A	1.470	1.390	5.110
	hh	0				
<i>Hinf</i> * I	BB	7	2.359 ^{Bb}	0.385	1.540	2.490
	Bb	25	2.450 ^{ABb}	1.018	0.500	5.110
	bb	70	3.048 ^{Aa}	0.827	0.620	3.900
	AA	63	2.527 ^B	0.732	0.500	3.730
<i>Msp</i> I	Aa	39	3.361 ^A	0.779	1.080	5.110
	aa	0				
	DD	4	3.852 ^A	0.230	2.030	2.260
<i>Hae</i> III	Dd	41	2.919 ^A	1.037	0.500	5.110
	dd	57	2.091 ^B	0.851	0.620	3.900

同一列标有不同字母为差异显著；小写字母表示显著水平为 $P < 0.05$ ，大写字母表示显著水平为 $P < 0.01$

Values with different letters in the same row differ significantly; the lowercase letters show the level of 0.05; the capital letters show the level of 0.01

3 讨论

3.1 *H-FABP* 基因的遗传变异

不同猪种的遗传特性是在一定的自然和社会条件下，通过人们的不断选育而形成的，品种的遗传基础越广泛，其 DNA 多态性就会越丰富。本研究中，在 *Hinf* I 位点上，所有 4 个猪群都存在多态，基因频率与 Gerbens 等^[7]、林万华等^[10]、庞卫军等^[11-12]

的检测结果基本一致，即国外 DLY 猪群优势等位基因为 H，而中国地方猪种雅南猪优势等位基因为 h。在第二内含子 *Hinf** I 位点上，除 DLY 群体出现多态外，其余 3 个群体均只出现 bb 基因型，这与张桂香等^[13]研究的结果有一定差异。在 *Msp* I 位点上，除大河乌猪外，其余 3 个猪群 A 为优势等位基因；在 *Hae* III 位点上，中国地方猪种雅南猪只出现基因型 DD，而 DLY 群体等位基因 d 为优势基因。

在以上 2 个位点,本研究的结果与 Gerbens 等^[7]、林万华等^[10]研究结果基本一致,而与曹红鹤等^[9]的研究结果有一定差异,原因可能主要是群体遗传背景和样本数大小所致。

3.2 *H-FABP* 基因对 IMF 含量的遗传效应

本研究对 *H-FABP* 基因 4 个多态位点出现的 10 种基因型与 IMF 含量的遗传效应分析表明,各基因型肌内脂肪含量最小二乘均值关系即 $Hh > HH, bb > Bb > BB, Aa > AA, DD > Dd > dd$ 。Gerbens 等^[7-8]对杜洛克猪的分析表明,aaddHH 型个体的肌内脂肪含量比 AADDhh 型个体高约 0.4%,并认为 *Msp* I 和 *Hae* III RFLP 位点具有加速遗传效应;其他一些学者也得到类似的结果^[10-12,14];而西班牙一组学者在对一个地方猪种的研究中却得到相反的结果,这表明一个基因座位对某种数量性状的遗传效应有时会因群体的遗传学背景不同而不同。在我们所分析的群体中,由于在 *Hinf* I 和 *Msp* I 2 个位点上只分别出现两种基因型,对另外 2 种纯合基因型的遗传效应无法分析。这有可能是样本数较小所致,也有可能是 DLY 群体的遗传背景所致。尽管最近十年来有关猪 *H-FABP* 基因对肌内脂肪含量的遗传效应研究较多,但在不同的品种和同一品种不同的遗传背景下,结果出现一定的差异,*H-FABP* 基因对肌内脂肪含量的遗传效应的影响尚需在不同的群体中进一步研究。为了在育种中通过 MAS 去提高 IMF 含量,我们应寻找更多的与 IMF 含量相关的标记位点。从 *H-FABP* 基因的生理功能和已有的研究结果来看,可在特定的群体中将其作为影响肌内脂肪含量的候选基因。

4 结 论

H-FABP 基因 4 个多态位点(*Hinf* I、*Msp* I、*Hae* III、*Hinf** I)基因型和等位基因频率在中国地方猪种雅南猪、大河猪,培育品种大河乌猪以及杜洛克与长白和约克三元杂交商业群体中存在不同程度的分布,4 个多态位点对肌内脂肪含量的影响差异显著。结合 *H-FABP* 基因的生理功能和已有的研究结果来看,可在特定的群体中将其作为影响肌内脂肪含量的候选基因。

参考文献:

[1] WOOD J D, ENSER M, MONCRIEFF C B, et al. Effects of carcass fatness and sex on the composition and quality of pig meat [C]//34th International Congress of Meat Science and Technology, 1988, (8-9): 562-564.

- [2] FERNANDEZ X, MONIN G, TALMANT A, et al. Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat-1. Composition of the lipid fraction and sensory characteristics of m. longissimus lumborum [J]. *Meat Sci*, 1999, 53(1): 59-65.
- [3] BEJERHOLM C, BARTON-GADE P. Effect of intramuscular fat level on eating quality in pig meat [C]//In Proceedings of the 32nd European Meeting of Meat Research Workers, 1986, 8:24-29.
- [4] HOVENIER R, KANIS E, van ASSELDONK T, et al. Genetic parameters of pig meat quality traits in a halothane negative population [J]. *Livest Prod Sci*, 1992, 32(4): 309-321.
- [5] MEUWISSEN T, GODDARD M. The use of marker haplotypes in animal breeding schemes [J]. *Genet Sel Evol*, 1996, 28(2): 161-176.
- [6] VEERKAMP J H, MAATMAN R G. Cytoplasmic fatty acid binding proteins; their structure and genes [J]. *Prog Lipid Res*, 1995, 34(1): 17-52.
- [7] GERBENS F, RETTENBERGER G, LENSTR J A, et al. Characterization, chromosomal localization and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein gene [J]. *Mamm Genome*, 1997, 8(5): 328-332.
- [8] GERBENS F, de KONING D J, HARDERS F L, et al. The effect of adipocyte and heart fatty acid-binding protein genes on intramuscular fat and backfat content in Meishan crossbred pigs [J]. *J Anim Sci*, 2000, 78(3): 552-559.
- [9] 曹红鹤,王立贤,张桂香,等. 猪 *H-FABP* 基因多态性片段的序列分析 [J]. *遗传*, 2002, 24(2): 146-148.
- [10] 林万华,黄路生,任 军,等. 中外十个猪种 *H-FABP* 基因遗传变异的研究 [J]. *遗传学报*, 2002, 29(1): 12-15.
- [11] 庞卫军,孙世铨,李 影,等. 西部地区主要猪种和野猪 *H-FABP* 基因分子标记与 IMF 含量关系 [J]. *遗传*, 2005, 27(3): 351-356.
- [12] PANG W J, BAI L, YANG G S. Relationship among *H-FABP* gene polymorphism, intramuscular fat content, and adipocyte lipid droplet content in main pig breeds with different genotype in western china [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(6): 515-524.
- [13] 张桂香,曹红鹤,王立贤,等. 9 个猪种 *H-FABP* 基因 5-上游区和第二内含子的遗传变异 [J]. *畜牧兽医学报*, 2002, 33(4): 340-343.
- [14] 彭先文,梅书棋,李良华,等. 湖北白猪及其杂交后代 *H-FABP* 基因型与相关性状关系研究 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(2): 570-575.