

利用 PCR-RFLP 技术测定种猪的氟烷基因型^{*}

何志平, 吕学斌, 陈晓晖

(四川省畜牧科学研究院, 成都 610066)

[摘 要] 采用 PCR-RFLP 方法对 61 头长白猪、56 头大约克猪和 30 头杜洛克猪进行了氟烷基因型检测。结果表明: 3 个品种猪群所含的氟烷应激基因分别为 5.73%, 0.89% 和 3.33%。建议在四川省种猪选育过程中, 应将氟烷基因型的检测作为种猪性能测定的内容之一, 及时淘汰携带氟烷基因的个体, 确保种猪质量。

[关键词] 种猪; 氟烷基因; PCR-RFLP

[中图分类号] S813.3; S828.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)02-0048-03

猪的氟烷基因, 是一种应激基因, 携带该基因的猪仅在受到自然刺激因子(如运输、高热、转群、争斗、饥饿等)的作用下, 会出现异常反应甚至死亡的现象。这种现象称为应激综合症(Porcine Stress Syndrome, PSS)。控制 PSS 的基因称为氟烷基因。研究表明, 猪的应激综合症主要是由猪兰尼受体(Ryanodine receptor, RYR1)基因(又称为氟烷基因 Hal)的突变引起的^[1~4]。PSS 主要发生于一些高瘦肉率猪种, 如皮特兰猪、长白猪、大约克夏猪等, 引起肉质下降, 产生 PSE (Pale soft exudative) 或 DFD (Dark firm dry) 劣质猪肉。据报道^[5], 英国劣质肉损失约为全部屠宰猪肉价值的 2.2%; 美国每年损失约为 3.2 亿美元。我国孙有平^[6]、蒋思文^[7]等曾采用 PCR-RFLP 诊断技术对猪氟烷基因型进行了研究。近年来, 四川各主要种猪场在对现有种猪选育的基础上, 还投入大量资金, 相继从国外引进了大批长白、大约克和杜洛克等优良种猪。为全面评价种猪的生产性能, 促进各猪场加强种猪选育工作, 除了对种猪进行常规生产性能测定外, 有必要对其进行氟烷基因型的 DNA 检测, 以了解氟烷应激基因在四川省种猪中的分布状况, 为种猪的选育和杂交利用提供有力依据和重要参考。

1 材料与方法

1.1 猪群来源和样本采集

检测猪群来自于四川省主要外种猪场, 长白猪

61 头, 大约克猪 56 头, 杜洛克猪 30 头。血液样品取自前腔静脉, 用 EDTA 抗凝。毛囊是在猪的背部, 采集 6~10 根猪毛, 放入灭菌的生理盐水中备用。

1.2 DNA 的提取

血样 DNA 的提取 取 3~6 μL 全血放入装有 1 mL 双蒸水的小离心管中, 静止 30 min, 去上清液, 加入 DNA 提取液 InstaGeneTM Matrix, 56 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min 后, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 随后 0 $^{\circ}\text{C}$ 急冷。

毛囊 DNA 的提取 取 4~6 根带毛囊的猪毛, 从根部剪取 0.3~0.4 cm 于小离心管中, 加 DNA 提取液 InstaGeneTM Matrix, 再加含蛋白酶 K 的缓冲液, 56 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h 30 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min, 使蛋白酶 K 失活, DNA 变性后, 放置 0 $^{\circ}\text{C}$ 急冷。

1.3 PCR 扩增的反应条件

10 $\times$ buffer (含 MgCl ₂ 15 mmol/L)	5 μL
dNTP (2.5 mmol/L)	2 μL
引物 A	2 μL
引物 B	2 μL
双蒸水	18.4 μL
模板 DNA	20 μL
Taq DNA polymerase	0.6 μL

反应体系为 50 μL , 所用引物 A 碱基序列为: 5'-TCCA GTTTGCCA CA GGCCTACCA-3'; 引物 B 碱基序列为 5'-ATTCACCG-GA GTGGA GTCTCTGA G-3'。将上述所有试剂

* [收稿日期] 2001-06-01

[基金项目] 四川省科委“九五”重点科技攻关项目(1020101)

[作者简介] 何志平(1967-), 男, 四川射洪人, 副研究员, 硕士, 主要从事猪遗传育种研究。

及引物混入 PCR 导热管中, 混匀, 加 20 μL 石蜡油覆盖在其表面。

变性温度 94 1 m in, 退火温度 63 1 m in 和延伸温度 72 1 m in, 进行 35 个循环的 PCR 扩增, 然后 72 延伸 10 m in, 最后 4 保存。

1.4 酶切及电泳

质量分数 2% 的琼脂糖在 100 V 电压下, 30 m in 电泳检查 PCR 扩增产物, 将 10 μL PCR 扩增产物, 用 10 单位的 *Hha* I 内切酶在 37 下消化 3 h, 用质量分数 2% 琼脂糖, 在 30 V 电压下电泳 1.5~2

h, EB 染色 20~30 m in, 在紫外线成像系统中观察酶切图谱, 判别氟烷基基因型。

2 结果与分析

2.1 RYR1 基因的 PCR 扩增

从血样和毛囊中提取的 DNA 经过 PCR 扩增, 都能得到特异性产物, 其片段长度为 659 bp。但血样中产物的浓度较毛囊样品高, 说明血样 DNA 纯度比毛囊高而更易进行 PCR 扩增。图中小于 125 bp 的亮带为未扩增的 DNA 和聚合酶(图 1)。

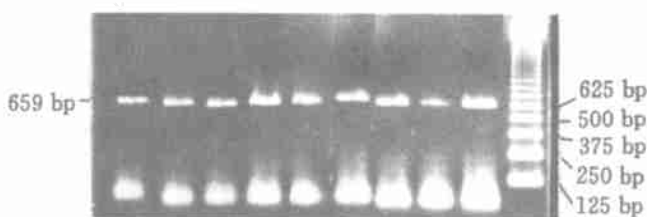


图 1 PCR 扩增图谱

Fig 1 Picture of PCR amplification

2.2 PCR 产物的酶切及氟烷基基因型的判定

Hha I 内切酶的识别位点为 5'-GCGC-3', 它存在于 Hal^n 链中, 当 RYR1 基因未发突变时, 1 843 碱基为胞嘧啶 C, 因此 *Hha* I 酶可把 659 bp 片段酶切成 493 bp 和 166 bp 2 个带, 即为氟烷基阴性纯合子 (Hal^{NN}); 当胞嘧啶突变为胸腺嘧啶 T 时, 则 *Hha* I

酶不能识别, 因此只能看见 1 条带, 为氟烷基阳性纯合子 (Hal^{nn}); 当 DNA 1 条染色体上的 DNA 分子发生突变, 而同源染色体 DNA 分子正常时, *Hha* I 酶只能识别 1 个 DNA 分子, 得到 659, 493 和 166 bp 3 条带, 为氟烷基杂合子 (Hal^{Nn}) (图 2)。



图 2 氟烷基基因型的酶切图谱

Fig 2 Digestion picture of PCR products

2.3 氟烷基基因在各品种中的分布

长白猪、大约克猪、杜洛克猪的氟烷基基因型检测结果见表 1。结果表明: 氟烷基基因在各品种中均未发现阳性纯合子 (Hal^{nn}); 而杂合子 (Hal^{Nn}) 在长白猪中

有 7 头, 在大约克夏猪有 1 头, 在杜洛克猪中有 2 头。由此得到长白猪中 Hal^n 基因频率为 5.73%, 大约克夏猪 Hal^n 基因频率为 0.89%, 杜洛克猪 Hal^n 基因频率为 3.33% (表 1)。

表 1 各品种氟烷基因型检测结果

Table 1 Detemining results of halothane gene in three breeds

品 种 Breeder	样本数 Number	Hal ^{NN}	Hal ^{Nn}	Hal ⁿⁿ	Hal ⁿ 频率/% Frequency of Hal ⁿ
长白猪 Landrace	61	54	7	0	5.73
大约克猪 Large white	56	55	1	0	0.89
杜洛克猪 Duroc	30	28	2	0	3.33

3 讨 论

3.1 利用 PCR-RFLP 技术可准确诊断猪氟烷基因

氟烷基因型的检测方法有 3 种, 一是氟烷麻醉法, 二是血液遗传标记选择法, 三是 PCR-RFLP 法。第一种方法是采用氟烷麻醉人工诱发猪的应激综合症, 活体鉴别猪应激敏感性, 但这种方法不能识别氟烷杂合子和氟烷阴性猪, 且误差大; 第二种方法的准确性亦不高; 第三种方法是从血样或毛囊中提取 DNA, 采用 PCR 扩增方法, 根据 RYR1 基因中的 C 突变为 T 导致内切酶 *Hha*I 切点消失, 运用 *Hha*I 酶切图谱来鉴别氟烷基因型, 该方法能准确鉴定猪的氟烷基因型, 是目前应用较为广泛的一种 DNA 分子诊断方法。血样中 DNA 纯度较高, 便于 PCR 扩增, 但血样的采集要保定猪只, 通常体重在 30 kg

左右的仔猪采用该法, 对成年猪往往采集毛囊, 提取 DNA。

3.2 氟烷基因型检测是种猪生产性能测定的重要内容

种猪性能测定是猪群遗传改良的重要技术措施之一, 在对种猪进行生长发育性能、肥育性能等常规及生产性能测定的同时, 还应从分子遗传结构方面进行性能测定, 特别是氟烷基因型检测。

近年来, 四川省加大了种猪遗传改良的速度, 投入了大量资金, 从国外引进性能优良的外种猪, 用于生产中的杂交改良。本研究通过对全省主要种猪场的长白猪、大约克夏猪和杜洛克猪等种猪的初步抽检表明, 3 个品种猪群均含有一定比例氟烷应激基因。因此, 在种猪选育中应及时淘汰携带氟烷基因的个体, 确保种猪质量。

[参考文献]

- [1] Harbitz I, Kristen T, Bosnes M, et al DNA sequence of the skeletal muscle calcium release channel cDNA and verification of the Arg 615-Cys 615 mutation, associated with porcine malignant hyperthermia, in Norwegian Landrace pigs[J]. Animal Genetics, 1992, 23: 395- 402
- [2] Fujii J. Detection of the HAL gene in swine: a point mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor gene (RYR1) [J]. Animal Genetics, 1993, 21: 56- 61.
- [3] Brenig B, Brem G. Molecular cloning analysis of the porcine "halothane" gene[J]. Arch Tierz, 1992, 35(12): 129- 135
- [4] Fujii J, Otsu K, Zorzato F, et al. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia[J]. Science, 1991, 253: 448- 451.
- [5] Hall J T. Economic importance of pork quality Proc Pork Quality Symposium ppix-xii[J], Br Med J, 1972, 2: 145
- [6] 孙有平, 包承玉. 通过猪毛监测丹麦长白猪氟烷基因的变异[J]. 畜牧兽医学报, 1996, 27(2): 137- 141
- [7] 蒋思文, 吴桢方, 熊远著. 用聚合酶链反应技术鉴别猪的氟烷基因型[J]. 华中农业大学学报, 1995, 14(5): 473- 475

Porcine halothane genotype detemination by PCR-RFLP

HE Zhi-ping, LU Xue-bin, CHEN Xiao-hui

(Sichuan Academy of Animal Sciences, Chengdu 610066)

Abstract: Halothane genotypes of 61 Landrace, 56 Large white and 30 Duroc were determined by PCR-RFLP. The results show that there exist Hal genes in three breeds and their gene frequency are 5.73%, 0.89% and 3.33%, respectively. It is suggested that Hal determination should be included in performance testing in order to cull individuals with Hal genes and ensure breeder quality.

Key words: breeder; halothane gene; PCR-RFLP