

丹系长白猪恶性高温综合症(pMHS) 基因的检测分析

王楚端¹, 陈清明¹, 李振宽², 李 宁³, 章 岩³

(1. 中国农业大学动物科技学院, 北京 100094; 2. 天津市宁河原种猪场; 3. 中国农业大学中心实验室)

摘 要: 采集 91 头丹系长白种猪耳组织样品, 用高盐法提取 DNA, 特异性扩增包含 C1843 在内的 CRC/RYR1660bp 片段, 用 HhaI 进行直接酶切, 根据电泳图谱确定 MHS 基因座位上的基因型。结果表明: 91 头丹系长白猪中, 杂合猪(MHS^N/MHSⁿ) 为 10 头, 占 10.98%, 纯合阴性猪 81 头占 89.02%, 没有发现纯合阳性猪。MHS^N 和 MHSⁿ 的基因频率分别为 0.9451 和 0.0549。结合国内已有的测定结果, 认为目前我国丹系长白猪群中 MHS^N 及 MHSⁿ 的基因频率分别为 0.9086 和 0.0914。

关键词: 丹系长白猪; 猪恶性高温综合症; MHS 基因; 基因诊断; PCR 扩增

中图分类号: S813.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0366-6964(2001)01-0028-05

猪恶性高温综合症(Porcine Malignant Hyperthemia Syndrome, pMHS) 是应激敏感猪在自然刺激因子(剧烈运动、争斗、分群、交配、运输等)和化学药品(麻醉剂、肌肉松弛剂等)作用下表现出的症候群, 又称为猪应激综合症, 主要有以下 3 种特征: 体温急剧升高, 可达 42~45 ℃; 呼吸困难、肌肉僵直甚至突然死亡; 屠宰后出现灰白, 松软, 渗水肉(PSE 肉)。MHS 影响猪的生长发育, 增加猪的死亡率, 使肉的质量下降, 因而引起猪育种者的高度重视。

MHS 的发生在遗传上呈隐性纯合基因型完全或不完全显性的单座位隐性遗传模式^[1]。MHS 基因是猪骨骼肌浆网(SR) 钙离子通道蛋白(CRC) 基因, 又称兰尼定受体(RYR1) 蛋白 I 基因, SR/CRCcDNA 序列 1843 位的 C→T 突变是迄今为止所发现的唯一与猪 MHS 表现有强相关和共分离的单碱基多态性。RYR1/CRC1843^C 即 MHSⁿ; RYR1/CRC1843^T 即 MHS^N^[2]。

本文根据猪 RYR1/CRCcDNA 序列 1843 位的 C→T 突变改变了 HhaI 识别位点, 设计了一对特异性扩增引物, 特异性扩增包含猪 RYR1/CRCcDNA 1843 位点在内的 660 bp 片段, 然后用 HhaI 限制性内切酶消化 PCR 扩增产物, 得到 MHS 座位 3 种基因型的特征性电泳带型, 对丹系长白猪群内 MHS 基因进行检测分析。

1 材料和方法

1.1 材料 丹系长白猪耳组织样取自天津市宁河原种猪场第二选育场, 共 91 个, 浸泡于 70% 乙醇中, -20 ℃ 冷冻保存。

收稿日期: 1999-03-21

作者简介: 王楚端(1968—), 男, 汉, 福建福安市, 副教授, 博士, 主要从事动物育种规划的研究。

1.2 DNA 抽提 取一小块(约 10 mg)耳组织,置入 1.5 ml 离心管,切碎;加入 0.4 ml 含蛋白酶 K(100~ 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的缓冲液,在 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化 24 h;10 000 r/min 离心 10 min,将上清液移入 1.5 ml eppendorf 管中,加入 1/4 体积的 5 mol/L NaCl,然后加入等体积氯仿,充分混匀,10 000 r/min 离心 10 min,将上清移入新管中,2 倍体积的预冷无水乙醇沉淀 DNA;将絮状 DNA 移入装有 70% 乙醇的新管,10 000 r/min 离心 10 min,真空抽干或置在室温下自然晾干;用 400 μl TE(pH8.0)充分溶解 DNA;取 1 μl 进行 PCR。

1.3 PCR 扩增 PCR 反应液的组成成份见表 1。

表 1 PCR 反应液的组成成份
Table 1 The constituent of PCR resolution

组分 Constituent	数量 Amount	组分 Constituent	数量 Amount
10 \times Taq buffer(15 mmol/L MgCl ₂)	5 μl	Dd Water	40.5 μl
DNTP(2.5 mmol/L)	2 μl	Taq Polymerase (5U/ μl)	0.5 μl
Primer (10 $\mu\text{mol}/\text{L}/\mu\text{l}$)	1 μl	DNA template (100~ 500 ng/ μl)	1 μl

反应体积为 50 μl ,特异性扩增引物序列为:正向引物 5'-TCCAGTTTGC-CACCAGGTCCTACCA-3',反向引物 5'-ATTCACCGGAGTGGAGTCTCTTGAG-3'。除 DNA 模板外混合其它反应液组分,以每管 49 μl 分装于灭菌的 0.5 ml 反应管中;加入 1 μl DNA 模板液,混匀;每管加入 30 μl 矿物油覆盖在表面;PCR 反应条件 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min30 s;94 $^{\circ}\text{C}$ 65 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 65 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 65 s,35 循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。PCR 仪为 PE 公司 9600 系统。

1.4 限制性内切酶消化及电泳鉴别 MHS 基因型 15 μl PCR 反应产物,用 3 u Hha I 限制性内切酶消化 3 h,酶切产物在 2% 胶经过 2.6~ 3.0 v/cm 电压下电泳 2~ 2.5 h,经 EB 染色 10 min,在紫外灯下观察酶切图谱,拍照判别 MHS 基因型。

1.5 基因型与基因频率的计算

基因型频率(%) = 基因型个体数/测定样本数 \times 100

基因频率 $p = P + R/2$ $q = Q + R/2$

p : $M\text{S}^N$ 基因频率; q : $M\text{S}^n$ 基因频率; P : $M\text{S}^{NN}$ 基因型频率; R : $M\text{S}^{Nn}$ 基因型频率; Q : $M\text{S}^{nn}$ 基因型频率。

2 结果与讨论

2.1 猪 MHS 基因的检测方法 氟烷测定是识别 MHS 表型的最早和最为广泛利用的方法,其原理和操作均比较简单,但不能区分显性纯合体和杂合体,操作不当可能导致猪只死亡。血清 CK 水平及其它血液成分的测定对于预测 MHS 基因型是一种安全、客观和相对低廉的方法,但 CK 测定的准确性受猪体重、品种、健康状况、测定时间、采血方法及 CK 活性测定方法的影响。CK 测定通常和氟烷测定法结合使用,以便确定合适的应激反应的分级 CK 界限值。而 90 年代初发展起来的 PCR-RFLP 方法是对猪 MHS 基因的直接检测,具有采样方便、测定迅速、准确率高等优点。其准确度主要取决于 PCR 的可靠性、RFLP 分析的准确性、交叉污染及其它实验系统误差^[2]。这些可以在实验室里通过控制实验条件、严格操作规范及重复测定给予排除。目前许多国家及猪育种公司已利用这种方法对育种群进行 MHS 座位的基因型分

析,这对控制猪群的 MHSⁿ 基因频率具有重要意义。

本研究通过组织取样测定,得到所有测定猪预期的如表 2 所示的特征电泳图(见图 1)。

表 2 MHS 座位 3 种基因型的特征电泳带型
Table 2 The PCR-RFLPs for 3 genotypes in the MHS locus

	Hha I (Hinf I) 5'-GCG ↓ G-3'		
	MHS ^{NN}	MHS ^{Nn}	MHS ⁿⁿ
660 bp		—	—
495 bp	—	—	
165 bp	—	—	



图 1 丹系长白猪 RYR1 Hha I PCR-RFLP

Fig. 1 RYR1 Hha I PCR-RFLPs pattern of Danish Landrace

⊗ 第一道为阳性对照,其余为测定猪

⊗ The 1st lane is for MHSⁿⁿ contrast, the other lanes are for tested pigs.

2.2 丹系长白猪 MHS 基因型频率及基因频率 在 91 头丹系长白猪中,发现杂合子 10 头,占 10.98%,纯合阴性猪 81 头占 89.02%,没有发现纯合阳性猪。MHS^N 和 MHSⁿ 的基因频率分别为 0.9451 和 0.0549。孙有平等(1996 通过猪毛检测了 56 头丹麦长白猪的 MHS 基因型,检测出纯合阳性猪 1 头(1.79%),杂合猪 18 头(32.14%),纯合阴性猪 37 头(66.07%)^[3]。MHS^N 和 MHSⁿ 的基因频率分别为 0.82 和 0.18;李来记(1996)测定了 28 头丹系长白猪 MHS 基因型,发现 2 头杂合猪(7.14%),26 头纯合阴性猪(92.86%),MHS^N 和 MHSⁿ 的基因频率分别为 0.9643 和 0.0357^[2]。综合以上 3 个实验研究的结果,目前我国丹系长白猪群中纯合阳性猪比较为 0.27%,杂合猪 17.14%,纯合阴性猪比例 82.59%,MSN^N 及 MHSⁿ 的基因频率分别为 0.9086 和 0.0914。

从已有的关于长白猪 MHS^N 基因频率的报道来看,不同品系的长白猪 MHSⁿ 基因频率差别较大,如:加系 13.7%,美系 22.0%,英系 25.4%(O'Brien et al, 1993)^[4],比系 100%,德系 46%,德系母猪系 14%(Knorr et al., 1994)^[5]。这种差别主要来自两个方面的影响:抽样及样本含量的效应;不同国家和地区各品系选择目标及方案的差异。

2.3 MHS 基因对猪主要经济性状的影响 MHS 基因对猪的主要经济性状具有一定的表型效应:对于繁殖性能,MHS 纯合阳性母猪的出生窝数、出生个体重及断奶窝数较低(Lampo et al. 1983; Webb et al. 1979)^[6,7];对于生长肥育性能,阴性纯合猪的日增重比杂合猪及阳性纯合猪快,但 3 种基因型猪的饲料转化效率没有差异(Jensen et al., 1985)^[8];对于胴体性能,阳性纯合猪及杂合猪的屠宰率及胴体瘦肉量较阴性纯合猪高(Jones et al., 1988; Wood et al., 1990)^[9,10];对于肉质性状,3 种基因型猪的 PSE 发生率有显著差别(Simpson and Webb,

1989)^[11], MHS 基因是导致劣质肉的重要遗传因子。对于抗应激性, 经氟烷测定的应激敏感猪应激死亡率为 9%, 而氟烷阴性猪应激死亡率为 1% (Webb and Simpson, 1986)^[12]。关于 MHS 基因对猪主要经济性状的影响, 不同的研究之间存在一定差异, 这主要与猪的遗传背景、经济性状的测定方法及抽样方法有关。

由于肉质与应激敏感性具有密切关系, 应激敏感个体的肉质都比较差, 作为抗应激性的选择, 人们发展了氟烷测定、CK 测定以及 MHS 基因测定法, 目前已可以准确地评定 MHS 座位的基因型。采用活体 MHS 基因检测对肉质的改良无疑是可行的, 但猪抗应激性状的选择并不能消除 PSE 等肉质问题, 在氟烷阴性群体中同样存在肉质问题。例如在加拿大, 应激敏感猪只占产生 PSE 肉个体的 20% (Jones, 1991)^[13]。3 种基因型猪群中均存在 PSE 肉, 甚至在有的纯合阴性群体中, PSE 肉的发生率高达 51.7% (Pommier et al. 1993)^[14]。因此, 肉质的遗传机制没有清楚之前, 应该进行常规肉质性状的选择, 同时注意环境及管理因素对肉质的影响。

关于 MHSⁿ 基因在猪育种中的应用问题, 笔者认为存在两种途径: 在 MHS^{NN} 猪群体中培育高瘦肉率品系, 在整个繁育体系中消除 MHSⁿ 基因; 培育 MHS^{NN} 母猪系, 利用现有的高瘦肉率公猪系而不考虑其 MHS 基因型, 甚至培育 MHS 易感公猪系, 通过杂交生产商品代杂合猪, 从而达到利用 MHSⁿ 基因的目的。无论采用哪种途径, 应以确定 MHS 座位基因型与生产性状的关系为前提, 在此之前, 第一种途径更加适合。

参考文献:

- [1] Grashorn M. Comparison of different hypotheses for the inheritance of halothane susceptibility[J]. *J Animal Breed Genetic*, 1988, 105: 204~ 217.
- [2] 李来记. 猪 MHS 基因分子遗传学基础与应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 1996, 56~ 57.
- [3] 孙有平, 包承玉. 通过猪毛检测丹麦长白猪氟烷基因的变异[J]. *畜牧兽医学报*, 1996, 27(2): 1337~ 141.
- [4] O'Brien P J, et al. Use of a DNA Based test for the mutation associated with porcine stress syndrome (malignant hyperthermia) in 10000 breeding swine[J]. *JAVAMA*, 1993, 203: 842~ 851.
- [5] Knorr C, et al. Calcium-release channel genotypes in several pig population associations with halothane and CK reactions[J]. *J Anim Breed Genet*, 1994, 111: 243~ 252.
- [6] Lampo W, et al. Effect of stress susceptibility on some reproductive traits in Belgian Landrace pigs[J]. *Livestock Production Science*, 1985, 13: 279~ 287.
- [7] Webb A J, Jordan C H. The halothane test in genetic improvement programme: Experiment with Pietrain/Hampshire pigs[J]. *Act Agric Scandi*, 1979, 21(Suppl): 418~ 426.
- [8] Jensen P, et al. Performance and carcass characteristics of pigs with known genotypes for halothane susceptibility[A]. In: J. B. Ludvigsen(ED). *Stress Susceptibility and Meat Quality in Pigs*[M]. 80-87. European Assoc of Anim Prod Publ. No. 33. Rome.
- [9] Jones S D M, et al. Body proportion and carcass composition of pigs with known genotypes for stress susceptibility tested for different periods of time prior to slaughter[J]. *Can J Anim Sci*, 1988 68: 139~ 149.
- [10] Wood J D, Cameron N D. Genetics of meat quality in pigs[A]. *Proceeding of the 5th World Congress on genetics Applied to Livestock Production*[C]. 1994, 19: 458~ 464.
- [11] Simpson S P, Webb A J. Growth and carcass performance of British Landrace pigs heterozygous and the halothane locus[J]. *Anim Prod*, 1989, 49: 503~ 509.
- [12] Webb A J, Simpson S P. Performance of British Landrace pigs selected for high and low incidence of halothane sensitivity. 2, Growth and carcass traits[J]. *Anim Prod*, 43: 492~ 503.

- [13] 王楚端. 北京迪卡猪杂交繁育体系育种规划最优化研究[D]. 北京: 中国农业大学 1995, 18.
- [14] Pommier S A, Houde A. Effect of the genotypes for malignant hyperthermia syndrome on the quality characteristics of commercial pork loins[J]. J Anim Sci. 1993 71: 420~ 425.

TEST AND ANALYSES OF PORCINE MHS GENE FOR DANISH LANDRACE

Wang Chudian¹, Chen Qingming¹, Li Zhenkuan²,
Li Ning³, Zhang Yan³

(1. College of Animal Science and Technology, Chinese Agricultural University, Beijing 100094; 2. Tianjin Ninghe Primary Pig Breeding Farm, Tianjin, 301504; 3. Centre Lab of Chinese Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: The DNA in tissue of ear skin of 91 Danish Landrace were collected to test the gene and genotype frequencies of porcine Malignant Hyperthermia Syndrome(MHS) locus with the method of PCR-RFLP. The results show that the frequency of MHS^N/MHS^N , MHS^N/MHS^n are 10.98%, 89.02%, respectively, no MHS^n/MHS^n genotypes are found. The frequency of MHS^N gene and MHS^n are 0.9451 and 0.0549. Combining the other test result in China, it is said that the population of Danish Landrace in the country have MHS^N gene and MHS^n gene with frequencies of 0.9086 and 0.0914, respectively.

Key words: Danish Landrace; Malignant Hyperthermia Syndrome; MHS gene; Gene diagnoses; PCR

• 书讯 •

储明星博士和师守望^方教授编著的《奶牛体型线性评定及其应用》一书已由中国农业科技出版社于 1999 年 8 月正式出版。该书内容丰富,反映了近 10 余年来奶牛体型线性评定这一新技术、新方法的发展概况,还介绍了美国、加拿大、瑞典荷斯坦公牛系谱信息以及美国娟姗牛系谱信息,对于从事奶牛遗传育种科研和生产实践的科技人员是一本不可多得的参考书。该书 28 万字,精装印刷,每本定价 45 元。邮购请通过邮局汇款,款到发书,免费挂号邮寄。联系地址: 100094 北京中国农业科学院畜牧研究所; 电话: (010) 62816001, 联系人: 储明星。