

文章编号:1674-7054(2010)01-0067-05

海南猪杂交效果及海南猪 H-FABP 基因和 MyoG 基因 5'上游区域的遗传变异研究

吴科榜¹, 李笑春¹, 韩新畴¹, 莫 靡², 孙进达², 陈兴生², 陈斌玺³, 米华存³

(1. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 2. 海南省定安县畜牧兽医局, 海南 定安 571200;

3. 海南省畜牧技术推广站, 海南 海口 570203)

摘 要: 测定了海南猪、海南猪母猪与杜洛克公猪杂交后代的胴体性状、肉质性状, 并对脂肪酸结合蛋白(H-FABP)和肌细胞生成素(MyoG)基因的5'上游区域的遗传变异进行了分析。结果表明: 杂交黑猪与其母本海南猪相比, 活体重、胴体重、屠宰率、胴体长、瘦肉率均有提高, 且差异显著($P < 0.05$), 表现出较好的杂种优势; 骨率、皮率降低, 脂肪沉积性能提高, 而眼肌面积、皮厚变化不大。另外, 海南猪与杂交黑猪肉质均符合优良肉质标准, 杂交黑猪肉在滴水损失、大理石纹、水分、粗蛋白含量等方面优于海南猪, 表现出较好的杂种优势。海南猪 H-FABP 基因5'上游区域和 MyoG 基因5'上游区域遗传变异的基因型和等位基因频率, 为海南猪优良肉质性状的形成提供了遗传学依据。

关键词: 海南猪; 杂交; 肉质; 分子机理

中图分类号: S 828.8; S 813.3

文献标志码: A

海南猪是我国优良地方品种, 具有繁殖力高、适应性好、抗病力强、早熟、耐粗饲以及肉质好等优点, 但也有体型偏小、前期生长发育缓慢和瘦肉率低等缺点^[1-2]。笔者利用海南猪母猪做母本, 杜洛克公猪做父本进行二元杂交, F1代为海南杂交黑猪。通过比较海南猪与杂交黑猪的胴体性状、肉质性状, 分析杂交效果。同时, 对海南猪脂肪酸结合蛋白(H-FABP)和肌细胞生成素(MyoG)基因5'上游区域的遗传变异进行研究, 探讨海南猪优良肉质性状形成的分子机理, 旨在为海南猪品种的改良和育种提供可靠的科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 本试验选择7月龄, 体重相近的肥育海南猪30头(其中屠宰10头用于胴体性状和肉质性状分析), 海南杂交黑猪20头。试验猪由海南省定安县定安旭日猪场提供, 屠宰前空腹24 h。

1.1.2 血样 从海南猪的前腔静脉采血20 mL, 用EDTA抗凝, 4℃条件下运输。

1.1.3 引物设计与合成 本试验所用的引物是按照 Gerbens 等(1997)发表的序列设计, 由上海生工合成。引物序列分别为: H-FABP 基因引物 1: 5'-GGACCCAAGATGCCTACGCCG-3'; 引物 2: 5'-CTG-CATCTTTGACCAAGAGG-3'; MyoG 基因引物 1: 5'-GAGTCTCATCTGACTGACAC-3'; 引物 2: 5'-TCRCGCTCCTCCTGGTTGA-3'。

1.1.4 主要仪器设备 直插式精密 pH 计、电子天平(感量 0.000 1 g)、C-LM3 型数显式肌肉嫩度测定仪、恒温水浴锅、索氏脂肪提取器、恒温烘箱、消化炉、凯氏蒸馏装置、高压冷冻离心机、PCR 仪、恒温震荡培养箱、电泳仪、伯乐 GelDoc XRNING 凝胶成像系统等。

收稿日期: 2009-06-29

作者简介: 吴科榜(1961-), 男, 海南文昌人, 海南大学农学院高级畜牧师。

1.2 试验方法

1.2.1 胴体性状的测定 试验猪屠宰后以剥离分割法测定半边胴体性状,按国家现行标准 NY/T62—87 测定规程,分别测定活体重、胴体重、屠宰率、胴体长、背膘厚、眼肌面积、皮厚、瘦肉率、皮率、骨率和肥肉率等指标。

1.2.2 肉质性状的测定

1) 肉色、肌肉 pH 值、嫩度、滴水损失、大理石纹:参照陈润生“优质猪肉的指标及其度量方法”^[2]进行测定。

2) 水分:105 ℃ 条件下烘干测定。

3) 肌间脂肪:采用索氏浸提法测定。

4) 粗蛋白:采用凯氏定氮法测定。

5) 结果判定原则:

① 肉色 3~4 分为理想肉色,1 分和 5 分为异常肉色,2 分为倾向异常肉色(轻度 PSE 肉),5 分为轻度 DFD 肉。

② pH 值 pH_1 正常值变动在 6.0~6.6。若 $pH_1 < 5.9$,同时伴有灰白肉色和大量渗出汁液,可判为 PSE 肉; pH_{24} 的正常值变动在 5.3~5.7。当 $pH_{24} > 6.0$ 时,又伴有暗紫色肉色和肌肉表面干燥,可判定为 DFD 肉。

③ 肌间脂肪 一般肉用型猪粗脂含量在 3.0%~4.0% 为理想值,对于个别中国地方猪种,肌肉脂肪含量超过 4.0% 也属理想值范畴。

④ 嫩度 肉剪切力值愈高表示肉愈老化,剪切力值愈低则肉愈嫩。对猪肉,平均剪切力值小于 4 kg,嫩度较好。

⑤ 滴水损失 滴水损失与肌肉保水力呈负相关,正常滴水损失的范围是 2%~6%,可作为参考值。

⑥ 大理石纹 3~4 分较理想。

1.2.3 海南猪 H-FABP 基因和 MyoG 基因 5'上游区域的遗传变异

1.2.3.1 海南猪 H-FABP 基因 5'上游区的遗传变异

1) DNA 提取:从血液中提取基因组 DNA 的方法参照《分子克隆实验指南》(第 2 版)进行。

2) PCR 扩增:PCR 扩增反应体系为 50 μ L,其中含有约 50 ng 基因组 DNA,10 pmol 的引物,200 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 的 dNTPs,1.5 mmol $\cdot$ L⁻¹ MgCl₂,1.5 u 的 Taq 酶。样品经 94 ℃ 变性 3 min 后,再进行扩增,94 ℃ 变性 1 min,62 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,32 个循环后,72 ℃ 延伸 10 min。

3) 扩增产物的酶切:用 Hinf I 酶切。酶切反应体系 20 μ L,扩增产物 10 μ L,限制性内切酶 5 u,37 ℃ 反应过夜。酶切产物用 $w=2\%$ 的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.3.2 海南猪 MyoG 基因 5'上游区的遗传变异

1) DNA 提取:从血液中提取基因组 DNA 的方法参照《分子克隆实验指南》(第 2 版)进行。

2) PCR 扩增:PCR 扩增反应体系为 50 μ L,其中含有约 50 ng 基因组 DNA,10 pmol 的引物,200 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 的 dNTPs,1.5 mmol $\cdot$ L⁻¹ MgCl₂,1.5 u 的 Taq 酶。样品经 94 ℃ 变性 3 min 后,再进行扩增,94 ℃ 变性 1 min,62 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,32 个循环后,72 ℃ 延伸 10 min。

3) 扩增产物的酶切:用 Msp 酶切。酶切反应体系 20 μ L,扩增产物 10 μ L,限制性内切酶 5 u,37 ℃ 反应过夜。酶切产物用 $w=2\%$ 的琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果与分析

2.1 肉质与胴体性状的测定

2.1.1 肉质性状的测定 从表 1 可以看出,海南猪与海南杂交黑猪肉色评分均在 3~4 分之间,为理想肉色;两种猪肉的 pH_1 和 pH_{24} 根据结果判定原则均属正常猪肉^[3];滴水损失海南杂交黑猪比海南猪低 2.69%,且差异显著($P < 0.05$),说明其肉质保水性能比母本好,表现出一定的杂种优势;海南杂交黑猪的

水分含量比海南猪低 11.98%, 差异显著 ($P < 0.05$), 而粗蛋白含量高 3.85%, 其差异达到显著水平 ($P < 0.05$), 说明其营养价值提高; 海南杂交黑猪的嫩度比海南猪的高, 说明其肌纤维在杂交后变粗, 但亦属正常范围; 肌间脂肪二者接近, 也均属国内优质猪的正常范围; 海南杂交黑猪的大理石纹较海南猪好, 为较理想值^[4-5]。

表 1 肉质性状测定结果			($\bar{x} \pm s$)
品种	海南猪	海南杂交黑猪	
肉色	3.64 ^a ± 0.13	3.70 ^a ± 0.09	
pH ₁	6.30 ^a ± 0.32	6.33 ^a ± 0.22	
pH ₂₄	5.52 ^a ± 0.07	5.53 ^a ± 0.11	
水分/%	75.91 ^b ± 0.83	63.93 ^a ± 1.29	
嫩度	2.95 ^a ± 0.14	3.44 ^a ± 0.13	
脂肪/%	4.09 ^a ± 0.93	4.36 ^a ± 1.08	
滴水损失/%	5.51 ^b ± 0.93	2.82 ^a ± 0.14	
大理石纹	2.55 ^a ± 0.21	3.20 ^a ± 0.14	
粗蛋白/%	21.76 ^a ± 0.60	25.61 ^a ± 1.23	

注: 横向肩注字母相同的表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同的表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.1.2 胴体性状的测定 由表 2 可知, 海南杂交黑猪与海南猪相比, 其活体重、胴体重、屠宰率、胴体长均变大, 且差异显著 ($P < 0.05$), 说明海南杂交黑猪在体重、体长和体型方面继承了杜洛克猪体大、生长发育快、增重快的优点, 显示出明显的杂种优势^[6]; 其瘦肉率提高 9.32%, 差异显著 ($P < 0.05$), 说明杂交猪的肉质性状得到很大的提高^[7]; 其平均膘厚及肥肉率增高, 两者差异显著 ($P < 0.05$); 其皮率降低 11.20%, 差异显著 ($P < 0.05$); 其骨率降低 5.91%, 差异显著 ($P < 0.05$), 说明杂交黑猪体躯的相对发育和骨骼发育程度较好^[6]; 其眼肌面积、皮厚略有提高, 但差异不显著。

表 2 胴体性状测定结果			($\bar{x} \pm s$)
测定指标	海南猪	海南杂交黑猪	
活体重/kg	35.75 ^b ± 6.54	106.5 ^a ± 3.18	
胴体重/kg	24.13 ^b ± 4.40	80.25 ^a ± 4.60	
屠宰率/%	67.51 ^b ± 2.08	75.32 ^a ± 2.06	
胴体长/cm	64.08 ^b ± 2.97	89.25 ^a ± 2.47	
平均膘厚/cm	1.52 ^b ± 0.81	3.78 ^a ± 0.50	
眼肌面积/cm ²	10.12 ^a ± 1.22	11.25 ^a ± 2.22	
皮厚/cm	0.43 ^a ± 0.10	0.43 ^a ± 0.10	
瘦肉率/%	40.31 ^b ± 3.76	49.63 ^a ± 8.49	
皮率/%	20.99 ^a ± 2.16	9.79 ^b ± 1.00	
骨率/%	14.86 ^a ± 3.14	8.95 ^b ± 0.54	
肥肉率/%	23.83 ^b ± 7.89	31.63 ^a ± 8.96	

注: 横向肩注字母相同的表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同的表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.1.3 品种不同对胴体及肉质性状的影响 本试验选择 7 月龄的海南猪与杂交黑猪作为研究对象, 海南猪性成熟早, 性成熟期为 5~6 月龄, 杂交黑猪性成熟慢, 性成熟期为 8~9 月龄。由于其品种属性不同, 故性成熟、体成熟年龄有差别, 因此, 对胴体性状、肉质性状的测定结果有一定程度的影响。但杂交黑猪屠宰月龄一般为 6 个多月, 因此, 本试验所选取的杂交黑猪已达到适宜的屠宰月龄, 其胴体与肉质性状的好坏直接关系到海南猪遗传特性的优劣及经济效益的高低。从生产实际来说, 比较成年海南猪与达到屠宰日龄的杂交黑猪之间胴体及肉质性状的差异更具有现实意义。

2.2 海南猪 H-FABP 基因和 MyoG 基因 5'上游区域的遗传变异

2.2.1 海南猪 H-FABP 基因 5'上游区和 MyoG 基因 5'上游区的 PCR 扩增 海南 H-FABP 基因序列 5'上游区片段为 693 bp, 海南 MyoG 基因序列 5'上游区片段为 983 bp(见图 1)。

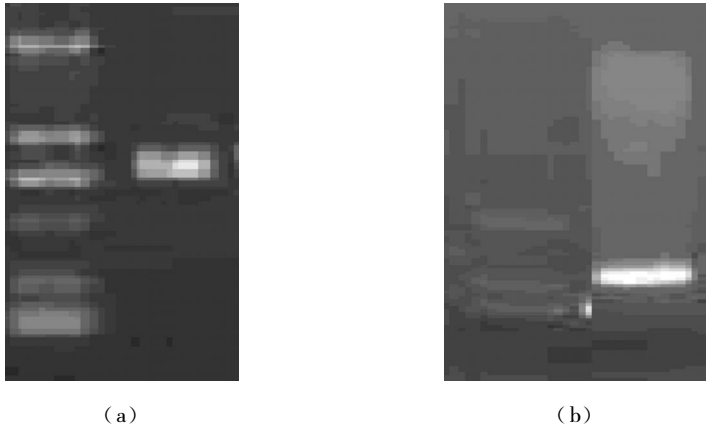


图1 H-FABP 基因 693bp 5'上游区(a) 和 MyoG 基因 983bp 5'上游区(b)

2.2.2 PCR 产物的酶切 脂肪酸结合蛋白(Fatty acid-binding protein, FABP) 是小的细胞内蛋白质, 参与细胞内脂肪酸的运输, 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。其中, 心脏脂肪酸结合蛋白(H-FABP) 作为细胞内类脂结合蛋白家族的成员, 主要在心肌、骨骼肌和泌乳的乳腺中表达, 是影响猪肌肉内脂肪(Intramuscular fat, IMF) 含量的候选基因。

从海南猪的 H-FABP 基因序列中可知, 在所扩增的 693 bp(1125 ~ 1818) 的片段中共有 4 个 Hinf I 酶切位点, 其中 1 321 位为多态位点, 这是由于 1 324 位的碱基 T 突变为 C 所致。笔者将该切点存在时产生的片段定为等位基因 H, 消失时产生的片段定为等位基因 h, 海南猪等位基因 H 的频率较高, 为 0. 63(见表 3)。本试验结果与国内报道的 H-FABP 基因在金华猪、香猪等著名地方品种基因型和等位基因频率相近^[8-9], 为海南猪具有肌肉内脂肪含量丰富的表型提供了遗传学依据。

表3 海南猪 H-FABP-RFLPs 的基因型和等位基因频率

基因	HH	Hh	hh	H
Hinf I	11	16	3	0. 63

肌细胞生成素(MyoG) 在肌纤维形成过程中起重要作用, 定位于 9 号染色体的 q2. 1 ~ q2. 6 区, 其表达可终止成肌细胞的增殖, 并调节单核成肌细胞融合为多核肌细胞这一过程, 其变异与肌纤维的变异存在关联。根据 Soumilion 的报道, 海南猪 MyoG 基因序列 5'上游区可能存在 1 个 Msp I 的多态性酶切位点。在所扩增的 30 头海南猪 983 bp 的 MyoG 基因序列 5'上游区片段中, 均未发现该位点。该结果与梅山猪等著名中国地方品种相同, 而与国外猪种不同^[10-11]。

3 结 论

本次试验结果表明, 海南猪及海南杂交黑猪肉质特性指标均符合我国优质猪肉标准, 且海南杂交黑猪在水分、粗蛋白、大理石纹、滴水损失等方面较海南猪为优, 表现出较好的杂种优势; 海南杂交黑猪胴体性状指标在活体重、胴体重、胴体长、屠宰率和瘦肉率等方面较母本高, 也表现出较好的杂种优势, 骨率、皮率较母本降低, 脂肪沉积性能较母本高, 但眼肌面积、皮厚变化不大。今后应以生长速度、眼肌面积作为重要的选育指标, 进一步提高生产性能和瘦肉率。

通过海南猪肉质相关基因的研究表明, 海南猪 H-FABP 基因的基因型和等位基因频率与金华猪、香猪等地方品种相近, 海南猪 MyoG 基因 5'上游区域的遗传变异与梅山猪等地方品种相近。该结果为解释海南猪具有的肌纤维细且致密, 肌肉内脂肪含量丰富的表型提供了遗传学依据。

参考文献:

- [1] 《中国家畜家禽品种志》编委会. 中国猪品种志[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1986.
- [2] 陈润生. 优质猪肉的指标及其度量方法[J]. 养猪业, 2002, 2(3): 1-5.
- [3] 张永泰. 猪应激综合征(PSS)与劣质肉(PSE)[J]. 养猪, 2003(2): 51.
- [4] 刘敬顺, 彭国良, 刘小红. 浅议猪肉品质的测定和影响因素[J]. 广东畜牧兽医科技, 2000, 22(2): 7-9.
- [5] 陈代文, 张克英, 胡祖禹. 猪肉品质特征的形成原理[J]. 四川农业大学学报, 2002, 20(1): 60-66.
- [6] 熊文中, 吴德, 杨凤, 等. 国内外对太湖猪杂交肥育性能和胴体性状的研究[J]. 畜牧与兽医, 1998, 30(2): 87-88.
- [7] 柴静国, 朱文亮, 陈曙光, 等. 英系大白猪生长性能及胴体性状的测定[J]. 养猪, 1997(3): 28-29.
- [8] 彭先文, 梅书棋, 程妮, 等. 4个猪种 H-FABP 基因 5'-上游区和第二内因子的遗传变异[J]. 湖北农业科学, 2005(1): 84-87.
- [9] 张桂香, 曹红鹤, 王立贤, 等. 9个猪种 H-FABP 基因 5'-上游区和第二内因子的遗传变异[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(4): 340-343.
- [10] 薛慧良, 周中孝, BO Wen, 等. 猪 MyoG 基因 3'端 PCR-SSCP 遗传多态性及其遗传效应(英文)[J]. 生态学杂志, 2007, 26(4): 505-508.
- [11] 薛慧良, 徐来祥. 山东部分地方猪种 MyoG 基因 5'端遗传多态性及遗传效应分析[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29: 623-626.

Study of Hybridization Effects of Hainan Pigs and Genetic Variation of H-FABP and MyoG 5'Upstream Sequence of Hainan Pigs

WU Ke-bang¹, LI Xiao-chun¹, HAN Xin-chou¹, MO Fei², SUN Jin-da², CHEN Xing-sheng²,
CHEN Bin-xi³, MI Hua-cun³

(1. College of Agriculture, Hainan University, Hainan Key Lab of Tropical Animal Reproduction & Breeding
and Epidemic Disease Research (Being built), Animal Genetic Engineering Key Lab of Haikou, Haikou 570228, China;

2. Dingan Animal Husbandry and Veterinary Bureau, Dingan 571200, China;

3. Hainan Animal Husbandry Technology Extension and Service Station, Haikou 570203, China)

Abstract: Carcass traits and meat quality traits of Hainan Pigs, Black Pigs (Hainan Pigs ♀ × Duroc ♂) were measured, and the genetic variation of H-FABP and MyoG 5' upstream sequence of Hainan Pigs were analyzed. The results indicated that the live weight, carcass weight, dressing percentage, carcass length and lean yield of Black Pigs were higher than that of Hainan Pigs ($P < 0.05$), bone percentages, skin percentages were lower than that of Hainan Pigs, fat deposition capability was higher than that of Hainan Pigs, and the changes of loin eye area and skin thickness were not significant. The meat quality of Hainan Pigs and Black Pigs attained fine meat quality criteria, drip loss, marbling, moisture, crude protein concentration of Black Pigs were superior to that of Hainan Pigs. The gentype and gene frequency of genetic variation of H-FABP and MyoG 5' upstream sequence of Hainan Pigs set an important genetic basis for the formation of fine meat quality traits of Hainan Pigs.

Key words: Hainan Pigs; crossing performance; meat quality; molecular mechanism