

民猪不同世代群体中 HAL 基因多态性检测及肉质关联分析

夏继桥^{1,2}, 汪亮¹, 何鑫淼¹, 王文涛¹, 吴赛辉¹, 丑有才², 马守正¹, 刘娣¹, 张冬杰^{1*}

(1.黑龙江省农业科学院畜牧研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2.黑龙江省大兴安岭农林科学院, 黑龙江 加格达奇 165000)

1 前言

猪肉是世界上消费量最多的肉类, 而中国是主要消费大国。据美国农业部对外农业服务部门在 2021 年 10 月 12 日发出的简讯通报预计 2022 年全球猪肉产量达到 1.042 亿吨, 中国猪肉产量接近 4 380 万吨, 占总量的 42.03%。猪肉是蛋白质、能量、维生素 B 族以及必需矿物质的极好来源。不断增长的人口和发展中国家不断增长的经济将继续增加对肉类生产的需求, 因此, 商业养猪者应努力提高效率并生产质量标准的猪肉, 以提高全球市场上的竞争力。

通常消费者通过肉的颜色来判定猪肉的质量, 而猪只屠宰后 pH 的下降速率决定了猪肉的质量, 通常将屠宰后 $pH_{45\text{min}}$ 低于 5.5 的猪肉, 称为 PSE 肉, 如果 pH 下降过快, 进而产生极端深色、干燥、紧实的猪肉 (DFD)。猪只屠宰后 pH 的变化规律见图 1。氟烷基因 (HAL) 被发现能够识别易患猪应激综合征 (PSS) 或恶性高热 (MH) 和 PSE 猪肉的猪。HAL 是一个参与机体细胞编码钙释放通道的重要基因, 其阴性突变影响

着 MH 的发生。HAL 产生的分子机理是猪 6 号染色体骨骼肌兰尼定受体 (RYR1) 基因 C1843 突变为 T1843, 导致第 615 位的精氨酸变为半胱氨酸, 从而引起蛋白结构和功能的改变。此时肌肉组织会释放出大量的 Ca^{2+} , 而受 RYR1 基因调节的 Ca^{2+} 通道不能及时关闭, 导致机体电解质平衡被打破, 乳酸积聚, 引起肌肉 pH 变化。与屠宰前充分休息和放松的动物相比, 屠宰前处于压力或应激下的动物往往具有更高的代谢率, 并且在屠宰后具有更高的糖原利用率和更低的 pH。

研究发现, 当携带隐性纯合氟烷基因 (HAL^{nn}) 猪只受到暴力驱赶、暴力屠宰、长途运输、气温变化和禁食等外界环境影响时, 会引起猪肉出水、肉色苍白、柔软或者 PSE、DFD 肉的产生, 严重影响猪肉品质, 有时甚至引起猪只猝死, 给企业效益带来损失。虽然 HAL^{nn} 基因给猪肉品质带来负向影响, 但是此基因对猪只胴体性状起着正向影响, HAL^{nn} 基因型猪只的背膘厚更低, 产肉更多, 瘦肉率更高。

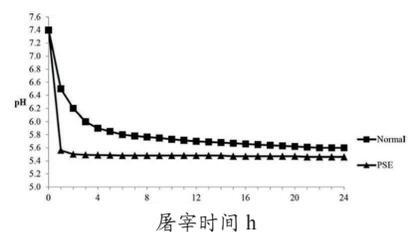


图 1 猪只屠宰后正常猪肉和 PSE 肉的变化规律

中国地方猪种具有相对较低的 HAL^{nn} 等位基因频率, 不同地方猪品种的 HAL 频率见表 1。民猪作为东北地区唯一的猪品种, 其等位基因 HAL^{nn} 频率相对较高。本团队一直进行民猪世代及专门化品系的选育工作, 为了获得肉质较好的民猪母猪群体, 对携带 HAL^{nn} 基因型猪只进行有计划的筛选和剔除工作。本试验针对专门化品系民猪群体中 6 个世代中的 3 个世代 (四、五、六世代) 母猪群体的 HAL 基因进行多态性检测以及与肉质关联分析, 此项研究有助于帮助团队掌握现有的民猪群体氟烷基因现状及分布规律, 为后续的保种和杂交育种工作提供可靠的数据支撑, 同时可为其他品种的地方猪选育工作提供借鉴。

2 材料与方法

2.1 试验动物与试验方法

采集民猪专门化品系第四、五、六世代母猪群体的耳样分别为 78 头、64 头和 50 头, 用耳缺钳采集“豆粒大”猪耳样装入含有 75%

基金项目: 国家生猪产业技术体系岗位科学家 (CARS-37); 黑龙江省生猪产业技术体系岗位试验站; 黑龙江省省属科研院所科研业务费项目 (CZKYF2020A004、CZKYF2021-2-C025)

作者简介: 夏继桥, 男, 博士研究生, 主要从事猪的饲养管理, xiajiqiao365@163.com

* 通信作者: 刘娣, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事地方猪资源保护和利用研究, liudi1963@163.com
张冬杰, 女, 研究员, 主要从事民猪资源的保护和利用研究, djzhang8109@163.com

酒精的 1.5 mL 的 EP 管中，将耳样完全浸泡，防止耳样变质，用于提取 DNA，DNA 提取参考 TIANGEN 试剂盒提取步骤进行。*HAL* 基因引物设计见表 2。根据 *HAL* 基因型测定结果，每个世代随机选取基因型 *HAL^{NN}*、*HAL^{Nn}* 各 3 头母猪进行屠宰，屠宰要求及肉质检测参考《猪业科学》2020 年 11 期《不同大豆蛋白源对巴民杂交猪生长性能、肉品质、肉营养成分以及氨基酸组成的影响》。

2.2 数据统计分析

采用 Excel 2016 整理试验数据并记录，用 SPSS Statistics 17.0 进行单因子方差分析和 Duncan's 多重比较，数据以“平均值 ± 标准差”表示， $P < 0.05$ 表示差异显著， $P < 0.01$ 表示差异极显著。

3 结果与分析

3.1 不同世代民猪群体 DNA 提取

采集样品个数共计 192 头，提取 DNA 结果见图 2，其中 1-78 泳道为第四世代母猪群体，79-142 泳道为第五世代母猪群体，143-192 泳道为第六世代母猪群体。结合 OD 值检测和电泳检测，质量满足实验要求，纯度浓度较高，完整性较好，且 DNA 总量可以满足后续实验要求。

3.2 *HAL* 基因 PCR 扩增

猪 *HAL* 基因经 PCR 扩增后，经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，只有 1 个条带，无任何杂带，产物大小为 659 bp，见图 3，可继续进行后续酶切试验。

3.3 *HAL* 基因酶切

猪 *HAL* 基因 PCR 产物经 HhaI 酶切之后，所得产物再经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离得到 2 种条带

型，分别为基因型 *HAL^{NN}* (166/493 bp) 2 条带型和基因型 *HAL^{Nn}* (166/493/659 bp) 3 条带型，无基因型 *HALⁿⁿ* (659 bp) 单条带型，见图 4；

其中第四世代母猪中有 *HAL^{NN}* 型 63 头，*HAL^{Nn}* 型 15 头；第五世代母猪中有 *HAL^{NN}* 型 54 头，*HAL^{Nn}* 型 10 头；第六世代母猪中有 *HAL^{NN}*

表 1 近 10 年中国地方猪 *HAL* 基因频率概况

序号	品种	头数/头	NN/ (%)	Nn/ (%)	nn/ (%)	<i>HALⁿ</i> 频率 (%)
1	北京黑猪	660	93.2	6.8	0	3.4
2	苏钟猪	180	90	10	0	5
3	二花脸猪	64	100	0	0	0
4	梅山猪	60	100	0	0	0
5	梅州土猪	71	94.4	2.8	2.8	4.2
6	民猪	48	70.83	25	4.17	16.67
7	黔邵花猪	40	100	0	0	0
8	豫西黑猪	22	36.36	59.09	4.55	34.09
9	宗地花猪	72	87.5	9.72	2.28	7.14
10	陆川猪	40	100	0	0	0
11	关中黑猪	26	92.31	7.69	0	3.85
12	宁乡猪	68	100	0	0	0
13	白洗猪	36	100	0	0	0
14	黔北黑猪	14	100	0	0	0
15	糯谷猪	22	100	0	0	0
16	从江香猪	29	100	0	0	0
17	五指山猪	90	100	0	0	0
18	临高猪	36	100	0	0	0
19	可乐猪	45	91.11	8.89	0	4.44
20	藏猪	51	0	0	100	100

表 2 *HAL* 基因引物设计

基因	引物序列 (5' -3')	长度 (bp)	限制性内切酶
<i>HAL</i>	F: TCCAGTTTGCCACAGGTCCTACCA R: ATTCACCGGAGTGGAGTCTCTGAG	493/166; 659/493/166; 659	HhaI

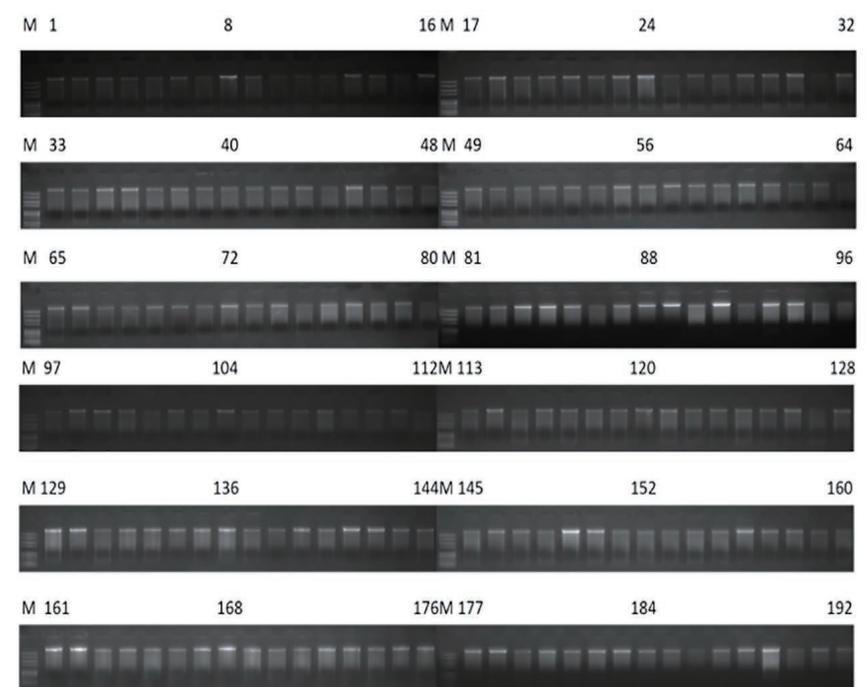


图 2 样本 DNA 提取电泳图

型 43 头, HAL^{Nn} 型 7 头 (见图 4)。

3.4 民猪不同世代 HAL 基因基因频率及多态性分析

3 个世代 HAL 基因的基因型频率和基因频率结果见表 3。基因型 NN 频率由四世代的 0.81 升高到六世代的 0.86, 基因型 Nn 频率由四世代的 0.19 降低到六世代 0.14; 基因频率 N 型由 0.90 升高到 0.93, 基因频率 n 型由 0.095 降低到 0.07; 3 个多态信息含量 (PIC) 数值均呈降低趋势, 但均处在 $PIC < 0.25$ 范围之内, 属于低度多态。

3.5 HAL 基因型与肉质性状的关联分析

3 个世代基因 HAL 多态性与 M11 肉质形状的关联分析结果见表 4。3 个世代的在 pH_{24h} 和肉色上的均值呈现 NN 型 $>$ Nn 型, 滴水损失均值呈现 NN 型 $<$ Nn 型; NN 型和 Nn 型在第四世代 pH_{24h} 、肉色以及滴水损失均差异不显著 ($P > 0.05$); 第五世代 NN 型的 pH_{24h} 显著大于 Nn 型 ($P < 0.05$); 第六世代 NN 型的滴水损失显著低于 Nn 型 ($P < 0.05$), 而 NN 型熟肉率显著升高 ($P < 0.05$), pH_{24h} 和肉色差异均不显著 ($P > 0.05$)。

4 讨论

猪 HAL 基因为典型的显隐性基因, 分别为显性纯合子 HAL^{NN} 、杂合子 HAL^{Nn} 以及隐性纯合子 HAL^{nn} , 而本试验中只产生了两种基因型, 为 HAL^{Nn} 和 HAL^{NN} 。对于中国地方猪来说, 一般只有基因型 HAL^{NN} , 如二花脸猪、梅山猪、陆川猪、宁乡猪和五指山猪等地方猪, 而本试验中 3 个世代的民猪群体的氟烷基因均为显性纯合子或杂合子, 原因可能是在民猪的近代选

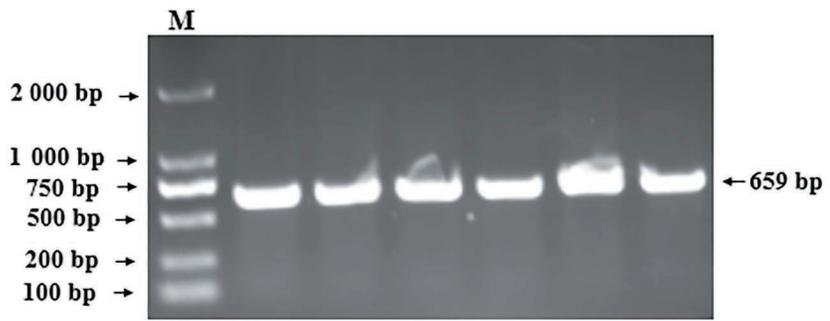


图 3 基因 HAL 的 PCR 产物电泳图

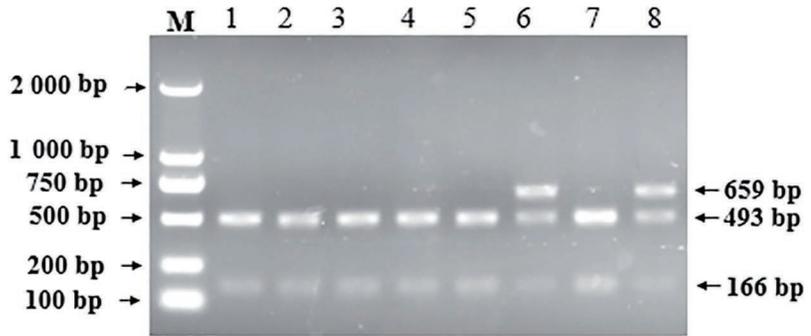


图 4 HAL 基因 PCR 产物酶切电泳图

(注: 泳道 1、2、3、4、5、7 为基因型 HAL^{NN} ; 泳道 6、8 为基因型 HAL^{Nn})

表 3 HAL 基因的基因型频率和基因频率

世代	头数/头			基因型频率			基因频率		多态信息含量
	NN	Nn	nn	NN	Nn	nn	N	n	
四世代	63	15	0	0.808	0.192	0.000	0.904	0.096	0.171 8
五世代	54	10	0	0.844	0.156	0.000	0.922	0.078	0.144 0
六世代	43	7	0	0.860	0.140	0.000	0.930	0.070	0.130 2

表 4 HAL 基因型与肉质性状的关联分析

世代	基因型	pH_{24h}	滴水损失/ (%)	肉色	系水力/ (%)
四世代	NN	5.78 ± 0.15	1.36 ± 0.21	3.72 ± 0.35	42.74 ± 2.56
	Nn	5.65 ± 0.22	1.52 ± 0.19	3.58 ± 0.26	42.56 ± 1.78
五世代	NN	5.82 ± 0.11^a	1.19 ± 0.23	3.58 ± 0.33	43.25 ± 3.76
	Nn	5.68 ± 0.12^b	1.46 ± 0.22	3.57 ± 0.26	42.42 ± 4.51
六世代	NN	5.81 ± 0.18	1.22 ± 0.11^a	3.83 ± 0.32	44.02 ± 5.79^a
	Nn	5.73 ± 0.25	1.50 ± 0.13^b	3.65 ± 0.39	41.67 ± 2.68^b

注: 同列不同小写字母表示不同组别间差异显著 ($P < 0.05$)

育过程中, 由于历史、地理以及人为因素, 民猪血统中已混入了外来猪种的血统。研究发现外来猪种中普遍存在氟烷基因 3 种基因型: 郑美丽等人对北京地区的种猪氟烷基因检测中发现长白猪和大白猪群体中含有 3 种基因型种猪; 同样杨明等人在皮特兰猪群体中也发现了隐性纯合子 HAL^{nn} 猪只。

研究基因频率有助于理解一个

物种的进化情况, 可以通过自然选择或者人工选择进行改变。遗传平衡定律即“哈代-温伯格定律”可以计算和描述群体中基因型频率与等位基因频率之间的关系。本试验中 3 个世代中 N 的基因频率为 90% 以上, 远远高于 n 的基因频率, 说明在猪只的长期进化过程中, 含 N 型基因猪只经自然选择后得到了保留, 为群体有利基因。

A.C.P.Silveira 等人对杜洛克杂交猪后代氟烷基因型进行分析,发现 N 型的基因频率为 70%, n 型的基因频率为 30%, 这与郑美丽对大白猪、长白猪群体中氟烷基因类型及占比,杨明对皮特兰猪群体中的氟烷基因类型及占比以及各位学者对中国地方猪种群中氟烷基因类型及占比的研究结果基因频率 N 大于 n 一致。本试验中的民猪专门化品系从第四世代到第六世代选育历经近 5 年,虽然 N 的基因频率在不断增加,但是提高幅度不大,仅提高了 0.026,这个结果一方面说明了课题组对 n 型基因进行有目的的剔除起到了作用,常规测定选育方法有助于改善猪的经济性状,但是常规测定选育方法需要大量的时间和人力费用。随着生物技术的进步,使用标记辅助选择(MAS)的基因组选择(GS),结合准确的系谱记录,可以更快地提供结果,并具有较高

的准确性和可靠性。

目前 HAL 作为猪肉质评判的重要基因之一,已在规模化猪场种猪选育的分子标记辅助选择育种中得到应用。Q.W.Shen 等研究发现,阴性氟烷基因会导致猪只放血后早期能量的消耗,引起机体内 2, 6-二磷酸果糖的增加,诱导糖酵解过程中关键酶磷酸果糖激酶的激活,引起 AMPK 激活,从而导致糖酵解加速, pH 下降增速。而本试验中所有屠宰猪只的猪肉 pH_{24h} 均高于 5.5,说明猪肉质量均合格,其中 HAL^{NN} 基因型的猪肉具有较高的 pH,第五世代中 HAL^{NN} 基因型的 pH 显著高于 HAL^{Nn} 基因型,与 De Smet 等人研究中屠宰的最终 pH 与三种氟烷基因型之间没有显著差异的结果不同,可能原因是本试验的屠宰量较少,影响了统计分析结果。Culau 等人观察到猪肉的平均颜色为 2.41 ± 0.56,略低于正常分

数 3.0, 低于本试验的肉色平均值,他们还发现杂合子 HAL^{Nn} 和隐性 HALⁿⁿ 猪的背最长肌肉色明显比纯合优势动物的苍白; A.C.P.Silveira 等人同样发现了 HAL^{NN} 和 HAL^{Nn} 基因型之间的滴水损失值存在显著差异,其中 n 等位基因的值更大,相反,基因型 HAL^{NN} 肉具有更高的系水力,有助于后期肉类的生产加工,此外,他们还发现猪只背最长肌肌内粗脂肪含量与 HAL 基因型无关。

4 结论

本试验结果发现,民猪母猪群体中氟烷基因只含有 HAL^{NN}、HAL^{Nn} 中两种基因型,经过 3 个世代的选育, N 型基因频率在增加;与杂合子 HAL^{Nn} 基因型猪相比,显性纯合子 HAL^{NN} 基因型猪只具有更优的猪肉品质。

(收稿日期: 2022-09-18)

广告

《猪业科学》征稿启事

《猪业科学》杂志是由中华人民共和国新闻出版总署正式批准公开发行的优秀期刊,全彩色印刷,内容充实、实用,每期一个主题,充分挖掘、深度报道、全面分析,反映猪产业的最新成果、发展动态和市场经济信息。本刊主要栏目有主题策划、国际瞭望、猪场兽医、营养与饲料、环境与设施、猪群保健、遗传改良、生产管理、地方猪种、猪场人才等,为中国猪业提供全方位多角度的多源化发展思路。现向国内外专家、学者诚征稿件。

来稿要求及注意事项如下:

1. 来稿要求原创,观点新颖明确,数据真实准确,条理清晰,语句通顺,内容详实,无著作权争议。
 2. 一般要求稿件字数不超过 6 000 字,不少于 4 000 字。
 3. 来稿请使用法定计量单位,文中计量单位用符号表示,如 h(小时);d(天);kg(千克);m(米)等。
 4. 投稿文责自负,切勿一稿多投。
 5. 投稿时请详细填写作者详细地址,电话等相关信息。
 6. 投稿方式:请将稿件发送到 tjswineonline@163.com;或通过猪业科学网站(<http://www.csis.cn>)在线投稿。联系电话:022-28311200
- 欢迎广大作者踊跃投稿。

