

黄佳怡, 张玉宏, 许卫华. 地方槐猪和外来瘦肉型猪种 9 个关联突变位点的遗传变异分析 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (1): 20-28.

HUANG J Y, ZHANG Y H, XU W H. Genetic analysis of 9 proposed causative variants in local Huai pig and imported lean meat pig breeds [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (1): 20-28.

地方槐猪和外来瘦肉型猪种 9 个关联突变位点的遗传变异分析

黄佳怡^{1#}, 张玉宏^{2#}, 许卫华^{1*}

(1. 龙岩学院生命科学学院, 福建 龙岩 364012;

2. 龙岩市农业学校, 福建 龙岩 364031)

摘要: 旨在研究中国本土槐猪和引入瘦肉型猪 (杜洛克猪、大约克夏猪、长白猪) 在生长育肥相关基因 MC4R 和 MSTN、脊椎数量相关基因 NR6A1 和 VRTN、肉质性状相关基因 PHKG1 和 PRKAG3 以及病原感染相关基因 SYNGR2 和 FUT1 这 8 个基因 9 个 SNP 位点的遗传变异特征。利用竞争性等位基因特异性 PCR (KASP) 和聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 方法对突变位点进行基因分型, 根据原始文献对各位点进行有利等位基因判定, 并制作各猪种在各位点有利等位基因和不利等位基因的百分比示意图。结果: 槐猪在 NR6A1 基因突变位点存在一定多态性, 有利等位基因频率为 0.24, 其他位点表现为单一基因型, 其中, PHKG1、PRKAG3 突变位点为有利等位基因, 而在 MC4R、MSTN、VRTN、SYNGR2 和 FUT1 突变位点为不利等位基因; 杜洛克猪在 MC4R、NR6A1、VRTN、SYNGR2 和 FUT1 突变位点有利等位基因占优, 然而, PHKG1 基因不利等位基因仍有一定的比例; 大约克夏猪在 MC4R、SYNGR2、NR6A1 和 VRTN 基因突变位点有利等位基因占优, 而其他位点为不利等位基因; 长白猪在 MC4R、MSTN、PRKAG3 (p. Val249Ile) 和 SYNGR2 这 4 个基因突变位点不利基因占优; 杜洛克猪在 VRTN 基因、长白猪在 MC4R 基因突变位点处于遗传不平衡状态 ($P < 0.05$)。以上结果为槐猪品种保护与利用以及瘦肉型猪种分子遗传标记选育提供了有益的信息。

关键词: 槐猪; 瘦肉型猪; 因果突变; 分子遗传标记

中图分类号: S813 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)01-0020-09

Genetic analysis of 9 proposed causative variants in local Huai pig and imported lean meat pig breeds

HUANG Jiayi^{1#}, ZHANG Yuhong^{2#}, XU Weihua^{1*}

(1. College of Life Science, Longyan University, Longyan 364012, China;

2. Longyan Agricultural School, Longyan 364031, China)

Abstract: This study was to identify the characteristics of genetic variants associated with important traits such as growth and fattening (MC4R, MSTN), spinal number (NR6A1, VRTN), meat quality traits (PHKG1, PRKAG3), and pathogen infections (SYNGR2 and FUT1) in Chinese local Huai pigs and imported lean meat pigs. Competitive allele specific PCR (KASP) and PCR-RFLP were used for genotyping of the variants. Based on the original literature, favorable alleles were identified, and a schematic diagram of the percentage of favorable and unfavorable alleles was created. The results were as follows: A certain degree of polymorphism was presented at the NR6A1 gene variant in Huai pigs, with a favorable allele frequency of 0.24. The other sites exhibited a single genotype, among which the variants related to meat quality traits (PHKG1, PRKAG3) were favorable alleles, while the variants related to growth, fattening, and pathogen infection, such as MC4R, MSTN, VRTN, SYNGR2, and FUT1, were unfavorable alleles. Duroc pigs had favorable alleles at loci including MC4R, NR6A1, VRTN, SYNGR2, and FUT1, whereas a certain proportion of unfavorable alleles in the PHKG1 gene existed. Large Yorkshire pigs had favorable alleles at the mutation sites of MC4R, SYNGR2, NR6A1, and VRTN, while other sites were unfavorable alleles. Landrace pigs had unfavorable dominant alleles in the mutation sites of MC4R, MSTN, PRKAG3 (p. Val249Ile), and SYNGR2. Duroc pigs and Landrace pigs were in a genetic imbalance ($P < 0.05$) at the VRTN gene and at the MC4R gene. The above results provided useful information for the protection and utilization of Huai pig breeds, and for molecular genetic marker breeding of lean meat pig breeds.

Keywords: Huai pigs; lean meat type pigs; causative variants; molecular genetic marker

收稿日期: 2024-05-14; 修回日期: 2024-11-03

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2021J011096); 福建省大学生创新创业训练计划项目 (S202311312061)

第一作者: 黄佳怡, 女, 本科生; 张玉宏, 男, 本科, 高级讲师。[#]共同第一作者

* 通信作者: 许卫华, 博士, 副教授, 研究方向为动物遗传育种与繁殖, E-mail: xwh131@163.com。

鉴定与育种相关性状因果关联的遗传变异一直是遗传育种领域的难题之一。悉尼大学 Frank Nicholas 教授领衔的研究团队对单基因决定的质量性状（如遗传缺陷）以及数量性状关联遗传变异进行了在线汇编(Online Mendelian Inheritance in Animals, OMIA, <https://omia.org/home/>), 为动物孟德尔遗传变异研究提供了重要的依据。Johnsson 等^[1]对影响猪和牛重要经济性状的 13 个重要相关基因的变异进行了因果关联分析, 提出肌肉生长抑制素 (MSTN)、胰岛素样生长因子 2 (IGF2)、黑皮质素 4 受体 (MC4R)、孤儿核受体亚家族 6 成员 1 (NR6A1)、椎骨发育相关基因 (VRTN)、磷酸化激酶 1 (PHKG1)、磷酸腺苷激活蛋白激酶 (AMPK) 调节亚基 $\gamma 3$ (PRKAG3)、兰尼碱受体 1 (RYR1) 和突触回蛋白 2 (SYNGR2) 这 9 个基因变异与猪相关性状具有因果关系。

MSTN 和 MC4R 是猪生长、育肥性状的候选基因。MSTN 基因被称为“双肌”基因, Stinckens 等^[2]克隆测序了猪 MSTN 基因, 发现了 1 个潜在的因果突变, 即启动子区域 g. 447A>g (g. 94629236T>C), 并发现 TC 基因型相对于 TT 基因型具有更低 MSTN 表达水平。MC4R 属于 G 蛋白偶联受体, 在大脑中表达, 调节食物摄入和能量消耗, Kim 等^[3]鉴定了 MC4R 基因一种错义突变 (p. Asp298Asn), 发现其与猪生长和肥胖性状显著相关。NR6A1 (p. Leu192Pro) 错义突变^[4]和 VRTN 基因的 1 个 291 bp 插入突变与猪脊椎数性状具有显著关联效应^[5]。RYR1 (p. Arg651Cys) 和 PRKAG3 (p. Arg250Gln) 是 2 个公认的影响肉质的基因突变^[1], 其中, RYR1 (p. Arg651Cys) 突变引起猪应激综合征, PRKAG3 (p. Arg250Gln) 亦称“RN+”基因, 突变引起“酸肉效应”, 实践中, 育种公司将这 2 个基因突变作为不利基因予以淘汰。此外, PHKG1 (g. 16830320C>A) 是 RYR1 (p. Arg651Cys) 和 PRKAG3 (p. Arg250Gln) 以外的另一个会导致猪产生 PSE 肉的基因突变^[6-7]。PRKAG3 基因的另一个突变类型 (p. Val249Ile) 对 PRKAG3 (p. Arg250Gln) 等位基因未分离的群体的糖原含量和肉质有显著影响^[8]。抗病性状方面, Burkhard 等^[9]研究表明, Δ SRCR5 猪 (CD163 第 7 外显子 SRCR5 缺失基因编辑猪) 对猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 感染具有完全抵抗力。岩藻糖转移酶基因 1 (FUT1) 和 SYNGR2 是另外 2 个与大肠杆菌和猪圆环病毒 2b 型 (PCV2b) 感染有关的候选基因, 其相应的基因变异影响机体的易感性。FUT1 被认为是 ECF18 受体基因, 其错义突变 (p. Ala103Thr) 影响大肠杆菌对猪小肠黏膜的黏附^[10]; SYNGR2 (p. Cys63Arg) 基因突变可以解释

PCV2b 病毒载量的 9.3% 的基因变异和 6.2% 表型变异^[11]。

鉴于部分因果关联的基因变异已经在商业育种公司实践中进行了筛选, 如 RYR1 (p. Arg651Cys), CD163 变异属于人工基因编辑突变体, 本研究选取了 9 个经济性状相关的、自然群体发生的基因突变 [MC4R、NR6A1、PHKG1、PRKAG3 (p. Arg250Gln)、VRTN、SYNGR2、MSTN、FUT1、PRKAG3 (p. Val249Ile)], 在中国地方猪种槐猪和 3 个瘦肉型商品猪种 (杜洛克猪、大约克夏猪、长白猪) 进行基因突变分析, 以期对槐猪的保种与利用、商品瘦肉型猪的分子遗传育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

于福建上杭县绿琦槐猪国家保种场采集槐猪耳组织 40 份 (公母各半), 于福建某国家生猪核心育种场采集杜洛克猪耳组织 40 份 (公母各半)、长白猪 38 份 (公母各半) 和大约克夏猪 42 份 (均为母猪), 放置于含 70% 酒精的离心管内, 通过冰盒运输带回实验室后, -20°C 冰箱保存备用。

1.2 因果关联的基因突变选取及信息分析

本文选择的基因突变均经过文献证实, 是与生长发育性状、脊椎数性状、肉质性状以及病原感染等经济重要性状具有因果关联的基因突变。根据各遗传变异原始文献和 Johnsson 等的综述文章^[1], 将这些突变基因或基因型效应进行了“有利”和“不利”的区分, 如: MC4R (p. Asp298Asn) 基因变异, A 等位基因具有更快的生长速度和更多的脂肪, 判定为“有利”等位基因; MSTN (g. 94629236T>C) 基因变异, TC 基因型相对于 TT 基因型具有更低 MSTN 表达水平, 再结合 MSTN 公认的肌肉生长抑制效应, 将 C 等位基因判定为“有利”等位基因。详细信息见表 1。

1.3 基因组 DNA 提取

根据 Thermo Scientific 公司基因组 DNA 抽提试剂盒 (货号: K0721), 提取耳组织 DNA。具体步骤如下: 称取 20 mg 的耳组织, 剪碎并放入 1.5 mL 离心管中; 加入 180 μL Digestion Solution 和 20 μL 蛋白酶 K, 振荡混匀, 56°C 水浴消化 3 h; 加入 20 μL RNase A, 振荡后室温静置 10 min; 加入 200 μL 裂解液涡旋振荡 15 s; 加入 400 μL 50% 乙醇振荡混匀, 转移溶液到 DNA 纯化柱后在 6 000 g 下离心 1 min, 离心后将纯化柱转移到新的 2 mL 收集管中; 加入 500 μL Wash Buffer 18 000 g 离心 1 min, 丢弃收集管中的液体; 加入 500 μL Wash Buffer 2 在 12 000 g 下离心

3 min, 将纯化柱转移到 1.5 mL 离心管中; 加入 200 μ L Elution Buffer 在室温下静置 2 min, 并于 8 000 g 下离心 1 min; 最后利用 Thermo Scientific

NanoDrop 2000 对基因组 DNA 质量、浓度进行检测, 质量合格的 DNA 分装于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 所选的遗传变异信息

基因 (变异)	性状	变异类型	变异序列信息	等位基因效应	基因组位置 (Sscrofa11.1)	变异编号	参考文献
MC4R (p. Asp298Asn)	生长、脂肪沉积	错义突变	g. 160773437G>A	A 等位基因有更快的生长速度和更多的脂肪	Chr1: 160 773 437	rs81219178	[1, 3]
MSTN	肌肉增长 (双肌)	调控区域	g. 94629236T>C	TC 基因型相对于 TT 基因型具有更低的 MSTN 表达水平	Chr15: 94 629 236	rs332188828	[2]
PHKG1 (g. 16830320C>A)	糖原含量和肉质性状	剪接区域突变	g. 16830320C>A	A 等位基因具有较高的糖原含量	Chr3: 16 830 320	rs330928088	[1, 6-7]
PRKAG3 (p. Arg250Gln)	糖原含量和肉质性状	错义突变	g. 120863533C>T	T 等位基因具有较高的糖原含量 (“汉普夏效应”等位基因)	Chr15: 120 863 533	rs1109104772	[1, 12]
PRKAG3 (p. Val249Ile)	糖原含量和肉质性状	错义突变	g. 120863537C>T	T 等位基因具有较低的糖原含量和肉质评分	Chr15: 120 863 537	rs1108399077	[8]
NR6A1 (p. Leu192Pro)	脊椎数	错义突变	g. 265347265A>G	A 等位基因具有较高的脊椎数	Chr1: 265 347 265	rs326780270	[1, 4]
VRTN (g. 97615879-97615880ins)	脊椎数	插入突变	g. 97615879-97615880ins	插入等位基因具有更高的脊椎数	Chr7: 97 615 880	None	[1, 5]
SYNGR2 (p. Cys63Arg)	猪 PCV2 病毒载量	错义突变	g. 3797515A>G	A 等位基因具有较低的病毒载量	Chr12: 3 797 515	None	[1, 11]
FUT1 (p. Ala103Thr)	ECF18 大肠杆菌抗性	错义突变	g. 54079560T>C	T 等位基因为抗性基因	Chr6: 54 079 560	rs335979375	[10]

1.4 VRTN 引物及基因分型

参照文献 [11] 设计引物对, 引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。引物序列见表 2, 不同

基因型 PCR 产物的大小分别为: 野生型 120 bp, 突变型 411 bp, 杂合基因型有 120 bp 和 411 bp 两条带。

表 2 基因引物序列

基因 (变异)	引物序列 (5'→3')
VRTN (g. 97615879-97615880ins)	GGCAGGGAAGGTGTTTGTTA GACTGGCCTCTGTCCCTTG

根据 PCR 试剂盒 (Thermo Scientific 公司, 货号: K1081) 配制反应体系。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s、62 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束, 产物 -20 $^{\circ}$ C 保存待用。PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.5 竞争性等位基因特异性 PCR (KASP) 基因分型

1.5.1 特异性引物设计

根据 8 种基因突变位点变异的序列特征, 设计 KASP 特异性引物 (见表 3), 引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。

表 3 不同基因位点 KASP 引物信息

基因名称	突变位点编号	荧光信号	等位基因特异性上游引物 (5'→3')	下游共同引物 (5→3')
MC4R	rs81219178	FAM	CCTGATCATGTGTAATTCATCATCG	CCAGGGGATAGCAACAGATGAT
		VIC	CCTGATCATGTGTAATTCATCATCA	
MSTN	rs332188828	FAM	ACGTGAAAATCGTGCTCAGTTTT	AGATAGCTGACATTATCCTCTTGGT
		VIC	ACGTGAAAATCGTGCTCAGTTTC	
PRKAG3	rs1109104772	FAM	CCCACAAAGGTGCCGCTC	GATTCACCCTCAACTGTTCTCTCC
		VIC	CCCACAAAGGTGCCGCTT	
	rs1108399077	FAM	CTTTGCTTTGGTGGCCAACGGCA	CTCTGCCTCCCAGCCCCTCCTC
		VIC	CTTTGCTTTGGTGGCCAACGGCG	
PHKG1	rs330928088	FAM	GGTTCTCAGGCCCGACTCGC	CCTCACAGAAGCCAGCACCGTCA
		VIC	GGTTCTCAGGCCCGACTCGA	
FUT1	rs335979375	FAM	GGCGGCCGTTGAGCTGCCGT	GGCCGGTTTGGGAACCAGATGGG
		VIC	GGCGGCCGTTGAGCTGCCG	
NR6A1	rs326780270	FAM	AGGACAGTGTGGAGCCCA	ATTTGAGGAAGAAGCCAATCACTG
		VIC	AGGACAGTGTGGAGCCCG	
SYNGR2	SYNGR2	FAM	GAGAGCAGTACTGCGTGTTCAACT	GCCATAGCGGCAGGCGTCTCGT
		VIC	GAGAGCAGTACTGCGTGTTC AAC	

1.5.2 KASP 试验

所有样品 DNA 利用琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop ND-2000 进行定量分析, DNA 浓度根据检测物种不同进行调整, 浓度调整后的 DNA 进行 KASP 试验验证 (Mix 工作液配制、分装、DNA 样本分装、进行 PCR 程序), 试验结束后, 取出孔板, 进行数据扫描。利用 SDS 2.4 基因型软件根据所述荧光信号判断各个位点的基因型: FAM 和 VIC 数据分别绘制在 *x* 轴和 *y* 轴上。每个反应孔 FAM 和 VIC 值通过该特定孔参比染料 (ROX) 的值进行矫正, 将数据荧光值进行标准化处理, 获取每一个 PCR 反应孔 FAM 和 VIC 对应相对荧光值。根据相对荧光值, 对样品进行聚类分簇, 进一步根据样品簇和荧光类型确定基因型。

1.6 数据统计与分析

1.6.1 基因频率计算

基因频率: $P_i = [2(ii) + (ij_1) + (ij_2) + \dots + (ij_{n-1}) + (ij_n)] / 2n$, 其中: P_i 表示第 i 个等位基因的频率; i 表示纯合的复等位基因; ii 表示第 i 个等位基因纯合的个体数; j_n 表示与 i 共显的第 n 个等位基因; ij_n 表示含有 i 与 j_n 共显性等位基因的个体数; n 表示 1 个群体内个体的总数。

1.6.2 基因遗传连锁平衡性分析

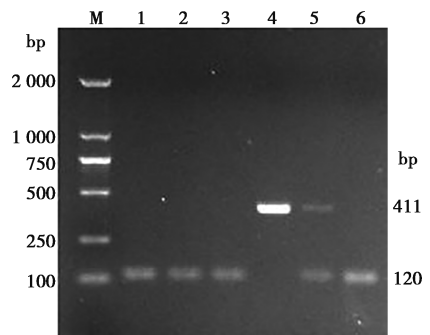
根据 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律, 并通过 χ^2 适合性检验, 分析判断 4 种猪群的基因型频率是否存

在基因平衡。在 Excel 电子表格中, 根据各基因型频率、基因频率计算 χ^2 值, 用 CHIDIST 函数进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 PCR 基因型判定

从图 1 可见, VRTN 基因野生型、突变型和杂合基因型 PCR 产物大小与预期一致。

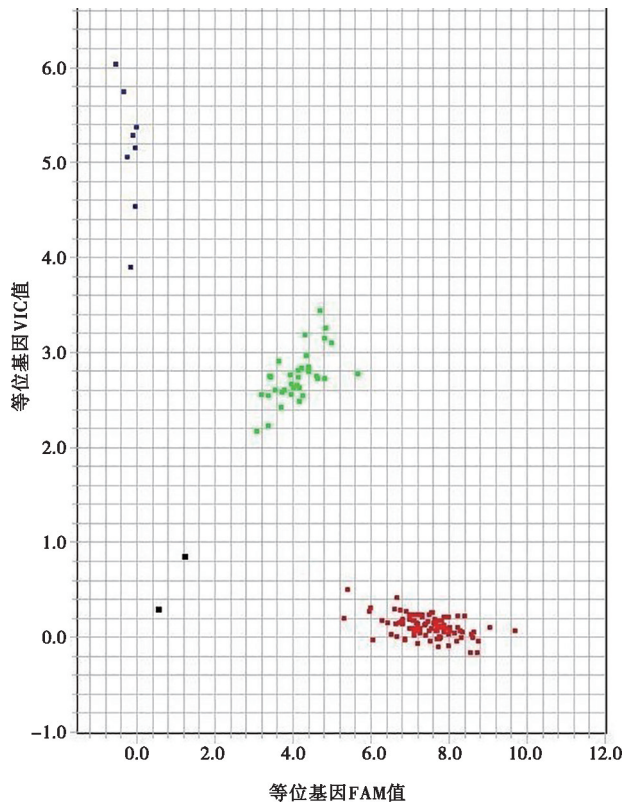


M. DNA Marker 2000; 1~3. 缺失或野生纯合基因型 (Del/Del); 4. 插入纯合基因型 (Ins/Ins); 5. 杂合基因型 (Del/Ins)。

图 1 VRTN 基因 PCR 基因型判定

2.2 KASP 基因分型

利用 SDS 2.4 基因型软件根据所述荧光信号判断各个位点的基因型, 以 MSTN rs332188828 基因分型为例, KASP 信号聚类结果见图 2。



注：蓝色表示基因型 YY，红色表示基因型 XX，绿色表示基因型 XY，黑色表示未检测到信号。

图 2 KASP 信号聚类(以 MSTN rs332188828 基因分型为例)

2.3 各猪种基因频率检测

2.3.1 杜洛克猪各遗传变异位点检测

根据 PCR 和 KASP 基因分型结果，对杜洛克猪在各遗传变异位点进行基因频率和遗传平衡分析，结果见表 4。从表 4 可以看出：杜洛克猪在 NR6A1 基因表现为有利等位基因 A（基因频率为 1.0）；未发现 PRKAG3/rs1109104772 位点“汉普夏效应”等位基因 T；其他 7 个基因位点均表现出一定的多态性，且在 MC4R、VRTN、SYNGR2 和 FUT1 这 4 个基因位点有利基因占优，PHKG1 不利等位基因 A 仍有一定的比例（A 基因频率为 0.12）；杜洛克猪在 VRTN 处于遗传不平衡状态（ $P < 0.05$ ）。

2.3.2 大约克夏猪各遗传变异位点检测

根据 PCR 和 KASP 基因分型结果，对大约克夏猪在各遗传变异位点进行基因频率和遗传平衡分析，结果见表 5。从表 5 可以看出：大约克夏猪在 PHKG1、NR6A1 基因位点表现为有利等位基因；PRKAG3/rs1108399077 位点几乎表现为不利等位基因 C（等位基因频率为 0.99）；未发现 PRKAG3/rs1109104772 位点“汉普夏效应”等位基因 T；其他 5 个基因位点均表现出一定的多态性，且在 MC4R、SYNGR2 和 VRTN 这 3 个基因位点有利基因占优。

表 4 杜洛克猪各遗传变异位点检测结果

基因/变异编号	基因型 (个体数)	等位基因频率	遗传平衡 (P 值)
MC4R/rs81219178	AA (21) GG (1) GA (18)	A (0.75) G (0.25)	0.449
MSTN/rs332188828	TT (13) CC (7) TC (20)	C (0.42) T (0.58)	0.989
PRKAG3/rs1108399077	TT (3) CC (17) TC (20)	T (0.33) C (0.67)	0.677
PRKAG3/rs1109104772	CC (42) TT (0) CT (0)	C (1.00) T (0)	/
PHKG1/rs330928088	CC (30) AA (0) CA (10)	C (0.88) A (0.12)	0.665
NR6A1/rs326780270	AA (40) GG (0) AG (0)	A (1.00) G (0)	/
VRTN (g. 97615879-97615880ins)	Del/Del (13) Ins/Ins (16) Del/Ins (11)	Ins (0.54) Del (0.46)	0.018
FUT1/rs335979375	TT (15) CC (11) TC (14)	T (0.55) C (0.45)	0.180
SYNGR2 (p. Cys63Arg)	AA (11) GG (7) AG (22)	A (0.55) G (0.45)	0.781

注：左侧等位基因为有利遗传变异，右侧等位基因为不利遗传变异；Ins 为插入突变等位基因，Del 为缺失或野生型等位基因；/表示该位点已经纯合，无需进行遗传平衡分析，下同。

表 5 大约克夏猪各遗传变异位点检测结果

基因/变异编号	基因型 (个体数)	等位基因频率	遗传平衡 (P 值)
MC4R/rs81219178	AA (16) GG (6) GA (20)	A (0.62) G (0.38)	0.998
MSTN/rs332188828	TT (28) CC (4) TC (10)	C (0.21) T (0.79)	0.165
PRKAG3/rs1108399077	TT (0) CC (41) TC (1)	T (0.01) C (0.99)	0.997
PRKAG3/rs1109104772	CC (42) TT (0) CT (0)	C (1.00) T (0)	/
PHKG1/rs330928088	CC (42) AA (0) CA (0)	C (1.00) A (0)	0.665
NR6A1/rs326780270	AA (42) GG (0) AG (0)	A (1.00) G (0)	/
VRTN (g. 97615879-97615880ins)	Del/Del (12) Ins/Ins (16) Del/Ins (14)	Ins (0.55) Del (0.45)	0.174
FUT1/rs335979375	TT (4) CC (17) TC (21)	T (0.35) C (0.65)	0.790
SYNGR2 (p. Cys63Arg)	AA (8) GG (7) AG (27)	A (0.51) G (0.49)	0.179

2.3.3 长白猪各遗传变异位点检测

根据 PCR 和 KASP 基因分型结果，对长白猪在各遗传变异位点进行基因频率和遗传平衡分析，结果见表 6。从表 6 可以看出：长白猪在 PHKG1、PRKAG3/rs1109104772、FUT1、NR6A1 等 4 个等位基因未出现分离现象，其中，PHKG1、NR6A1 基因位点表现为有利等位基因，FUT1 基因位点表现为不

利等位基因，未发现 PRKAG3/rs1109104772 位点“汉普夏效应”等位基因 T；其他 5 个基因位点均表现出一定的多态性，其中，MC4R、MSTN、PRKAG3/rs1108399077、SYNGR2 这 4 个等位基因位点不利基因占优，VRTN 等位基因有利基因占优；长白猪在 MC4R 位点处于遗传不平衡状态 ($P < 0.05$)。

表 6 长白猪各遗传变异位点检测结果

基因/变异编号	基因型 (个体数)	等位基因频率	遗传平衡 (P 值)
MC4R/rs81219178	AA (0) GG (9) GA (29)	A (0.38) G (0.62)	0.001
MSTN/rs332188828	TT (22) CC (0) TC (16)	C (0.21) T (0.79)	0.259
PRKAG3/rs1108399077	TT (0) CC (32) TC (6)	T (0.08) C (0.92)	0.870
PRKAG3/rs1109104772	CC (38) TT (0) CT (0)	C (1.00) T (0)	/
PHKG1/rs330928088	CC (38) AA (0) CA (0)	C (1.00) A (0)	/
NR6A1/rs326780270	AA (38) GG (0) AG (0)	A (1.00) G (0)	/
VRTN (g. 97615879-97615880ins)	Del/Del (8) Ins/Ins (10) Del/Ins (20)	Ins (0.53) Del (0.47)	0.950
FUT1/rs335979375	TT (0) CC (38) TC (0)	T (0) C (1.00)	/
SYNGR2 (p. Cys63Arg)	AA (0) GG (18) AG (20)	A (0.26) G (0.74)	0.089

2.3.4 槐猪各遗传变异位点检测

根据 PCR 和 KASP 基因分型结果，对槐猪在各遗传变异位点进行基因频率和遗传平衡分析，结果见表 7。从表 7 可以看出：槐猪只在 NR6A1 基因存在多态性，有利等位基因 A 的频率占 0.24；其他 8 个位点表现为单一基因型，在 3 个肉质相关的突变位点

(PRKAG3/rs1108399077、PRKAG3/rs1109104772 和 PHKG1/rs330928088) 均未发现不利等位基因，而在 MC4R、MSTN、VRTN、SYNGR2 和 FUT1 这 5 个与生长育肥、脊椎数和抗病感染突变位点表现为不利等位基因 (以瘦肉型猪种表型因果关联为参照)。

表 7 槐猪各遗传变异位点检测结果

基因/变异编号	基因型 (个体数)	等位基因频率	遗传平衡 (P 值)
MC4R/rs81219178	AA (0) GG (40) GA (0)	A (0) G (1.00)	/
MSTN/rs332188828	TT (40) CC (0) TC (0)	C (0) T (1.00)	/
PRKAG3/rs1108399077	TT (0) CC (40) TC (0)	T (1.00) C (0)	/
PRKAG3/rs1109104772	CC (40) TT (0) CT (0)	C (1.00) T (0)	/
PHKG1/rs330928088	CC (40) AA (0) CA (0)	C (1.00) A (0)	/
NR6A1/rs326780270	AA (0) GG (19) AG (21)	A (0.26) G (0.74)	0.079
VRTN (g. 97615879-97615880ins)	Del/Del (0) Ins/Ins (39) Del/Ins (1)	Ins (0.01) Del (0.99)	0.997
FUT1/rs335979375	TT (0) CC (40) TC (0)	T (0) C (1.00)	0.180
SYNGR2 (p. Cys63Arg)	AA (0) GG (39) AG (1)	A (0) G (0.99)	0.997

2.4 各猪种有利与不利等位基因百分比情况

根据表 4~7 中各猪种在 9 个遗传突变位点的等位基因频率，制作各猪种在各位点有利等位基因和不利等位基因频率的百分比示意图。从图 3 可以看出：槐猪在生长、脊椎数量和病原感染等位点不利等位基因已经纯合或接近纯合 (NR6A1 (p. Leu192Pro) 位

点存在多态性)；3 个瘦肉型猪种在 PRKAG3 (p. Arg250Gln) 和 PHKG1 (g. 16830320C>A) 位点有利等位基因已经纯合或接近纯合 (杜洛克猪在 PHKG1 (g. 16830320C>A) 位点仍有少量不利等位基因)，其他突变位点均呈现一定的多态性。

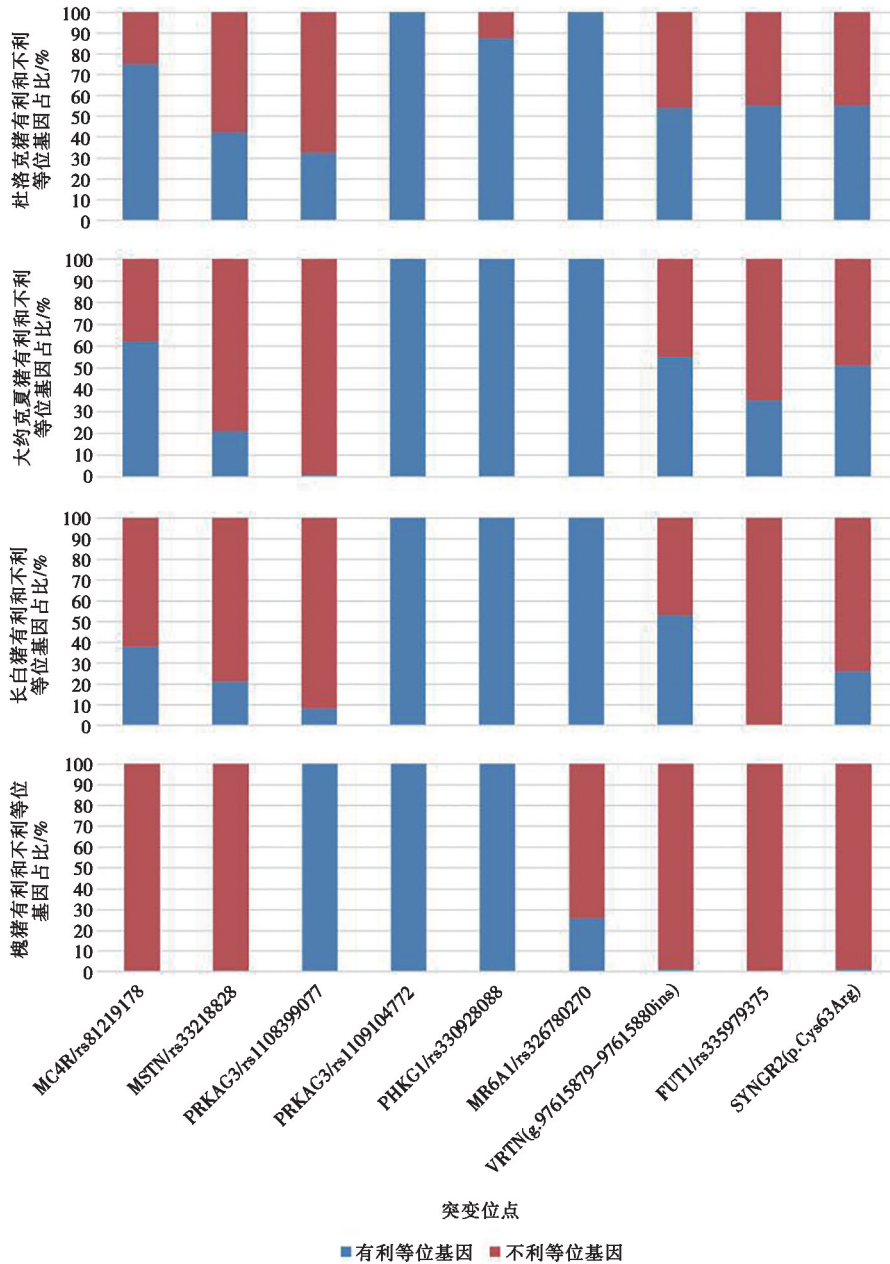


图3 各猪种9个遗传变异位点等位基因分型示意

3 讨论

在人类^[13]和 小鼠^[14]中, MC4R 和 黑素皮质激素受体辅助蛋白 2 (MRAP2) 可以形成复合物并控制能量平衡, 从而调节体重和肥胖。在猪中, MC4R 的错义变体 (p. Asp298Asn) 被认为与生长和肥胖有关, Kim 等^[3]使用了来自 6 个不同品种、样本含量相对较大的群体 (分别为 1 740、1 194 和 231), 首次证实了 MC4R 的错义突变 (p. Asp298Asn) 与生长和背膘性状有因果关联, 随后用人细胞系体外验证了 2 个等位基因突变的分子功能, 发现 Asn 等位基因突变导致正常受体功能缺失和黑素皮质素信号传导的减少^[15]。Zhang 等^[16]进一步证明了 Asp298Asn 突变降

低了 MC4R 或 MC4R-MRAP2 复合物的组成活性和细胞表面表达, 这可能影响能量平衡。本研究发现杜洛克猪、大约克猪、长白猪和槐猪 Asn 突变 (A 等位基因) 等位基因频率分别为 0.75、0.62、0.38 和 0, 其中, 长白猪在该位点处于连锁不平衡状态, 这可能与各品种选育程度有关, 也提示 MC4R (p. Asp298Asn) 突变是一种有价值的分子育种标记。

MSTN 基因是动物育种中的超级明星基因, 被发现是肌肉量的负调控基因。在一些牲畜物种中, MSTN 基因的自然突变可以产生农业上理想的“双肌”表型。然而, 其他一些牲畜物种或品种缺乏这些理想的变体。基因修饰, 特别是基因编辑, 为诱导或模拟牲畜基因组中自然发生的突变提供了前所未有

的机会。到目前为止,已经使用不同的基因修饰工具生成了各种 MSTN 编辑的牲畜物种^[17]。Stinckens 等^[2]克隆并测序了猪 MSTN 基因,发现了 1 个可能的因果突变,即启动子中的 g.447A>g (本研究中 g.94629236T>C),该突变将 MEF3 结合位点 8 位的 G 核苷酸变为 A 核苷酸,从而破坏 MEF3 结合位置,TC 基因型相对于 TT 基因型具有更低 MSTN 表达水平。本研究也发现,杜洛克猪、大约克猪、长白猪和槐猪在 MSTN 基因突变(C 等位基因)等位基因频率分别为 0.42、0.21、0.21 和 0,与各品种肌肉量的选育方向呈现一定的相关性。

猪椎骨的数量与肉类生产能力相关。野猪是家猪的祖先,有 19 块脊椎骨,欧洲商品猪的品种有 21 到 23 节脊椎骨,这可能是商业育种对体型选育的结果。本研究发现, NR6A1 (p. Leu192Pro) 错义突变在 3 个瘦肉型猪种已经纯合了,均表现为有利基因型,而槐猪在该位点呈现一定的多样性,有利等位基因(T 等位基因)频率为 0.26;杜洛克猪、大约克猪、长白猪和槐猪在 VRTN 基因位点插入突变有利基因(Ins 等位基因)频率分别为 0.54、0.55、0.53 和 0.01,其中,杜洛克猪群处于连锁不平衡状态。徐盼等^[18]研究表明 NR6A1 (p. Pro192Leu) 位点在姜曲海猪、枫泾猪和杜洛克猪群已经纯合,分别为 CC (本文对应为 GG)、CC 和 TT (本文对应为 AA) 基因型,而在苏姜猪群表现中度多态性,与本研究中槐猪结果一致;VRTN 基因位点在枫泾猪群已经纯合,均为 Del/Del 基因型,与本研究槐猪 VRTN 基因位点状态一致,而在苏姜猪、姜曲海猪和杜洛克猪群存在遗传变异,提示我国地方猪种间在 2 个脊椎相关突变位点遗传变异均不一致。

本研究所有猪种均未发现“汉普夏效应”等位基因,即 PRKAG3 (p. Arg250Gln) 均为有利基因,然而在该基因另一个突变位点 PRKAG3 (p. Val249Ile),杜洛克猪、大约克猪、长白猪和槐猪有利等位基因(T 等位基因)频率分别为 0.33、0.01、0.08 和 1.0。PRKAG3 (p. Val249Ile) 突变对 PRKAG3 (p. Arg250Gln) 等位基因未分离的群体的糖原含量和肉质有显著影响^[8],本研究发现槐猪在该位点为有利等位基因,而 3 个瘦肉型猪为不利等位基因占优,可能提示,PRKAG3 (p. Val249Ile) 突变是我国地方猪种区别于外来瘦肉型猪种的 1 个有价值的分子遗传标记。本研究中,除了杜洛克猪群在 PHKG1 (g.16830320C>A) 位点仍有一定的不利等位基因频率(A 等位基因频率为 0.12),其他 3 个猪种均已纯合,表现为有利等位基因 C,结果与杨广礼等^[19]在野猪和松辽黑猪研究结果一致,表明杜洛克

猪仍需要对该位点进行选择。

近年来,非洲猪瘟肆虐,猪抗病的研究再次成为热点。Walker 等利用 GWAS^[11]和基因编辑工具^[20]证实了 SYNGR2 (p. Arg63Cys) 基因的错义突变是猪对 PCV2b 病毒载量的因果突变。梁凯欣等^[21]研究表明,SYNGR2 基因敲除或 p. Arg63Cys 点突变显著降低 PCV2 对 PK15 细胞的感染能力和增殖能力。上述研究表明 SYNGR2 (p. Arg63Cys) 突变是一种有价值的分子遗传标记。本研究发现,杜洛克猪、大约克猪、长白猪和槐猪在 SYNGR2 (p. Arg63Cys) 基因有利突变(A 等位基因)等位基因频率分别为 0.55、0.51、0.26 和 0,结果表明,中国地方猪种可能对 PCV2b 具有更高的敏感性,但仍需要进一步的临床研究。FUT1 (p. Ala103Thr) 突变是另一个研究证实的、对 ECF18 细菌产生抗性的因果突变^[10,22-23]。本研究发现,杜洛克猪、大约克猪、长白猪和槐猪在 FUT1 (p. Ala103Thr) 基因有利突变(T 等位基因为抗性)等位基因频率分别为 0.55、0.35、0 和 0,槐猪的研究结果和 Wang 等^[22]发现类似,该研究认为,相比西方猪品种,中国地方猪品种缺乏对 ECF18 细菌产生抗性的基因型,发病的风险相对更高。此外, Petit 等^[23]发现法国野猪中的抗性等位基因仅以非常低的频率出现,该猪种也具有更高易感性。

本研究结果表明, MSTN (g.94629236T>C) 突变和 PRKAG3 (p. Val249Ile) 突变仍具有进一步研究价值和潜在的应用价值。对于有一定多态性的遗传变异依然可以利用传统的分子标记、基因芯片等方法进行分子辅助育种,对于群体未分离的因果突变,随着 CRISPR/Cas9 等基因编辑工具在猪上的不断应用^[24],也可以采用单点或多点一步法等基因编辑方法进行进一步的分子功能研究和育种应用。如 Guo 等^[25]对多个密码子区域的胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (IGFBP-3)、MSTN、MC4R 和细胞因子信号转导抑制因子 (SOCS2) 以及 Ren 等^[26]对 IGF2、氨肽酶 N (ANPEP)、CD163 和 MSTN 基因同时进行了多基因编辑。

4 结论

本研究对槐猪和 3 个瘦肉型猪种(杜洛克猪、大约克猪和长白猪)在 9 个经证实的因果突变位点的遗传变异进行了分析,发现中国本土槐猪在这些突变位点缺乏多态性,肉质性状均为有利遗传变异,而生长育肥与抗病性状缺乏有利等位基因,瘦肉型商用猪种在上述突变位点均呈现一定的多态性,体现了商业育种对各位点的选择。总之,对于依然存在的多态性位点可以进行育种选择,对于完全表现为不利等位

基因的位点, 可以通过 CRISPR/Cas9 及其优化系统进行单点或一步法多点基因编辑育种。本研究为槐猪的保种与利用以及瘦肉型猪种的分子育种提供了有益的信息。

参考文献:

- [1] JOHNSON M, JUNGNICHEL M K. Evidence for and localization of proposed causative variants in cattle and pig genomes [J]. *Genetics Selection Evolution*, 2021, 53 (1): 67.
- [2] STINCKENS A, LUYTEN T, BIJTTEBIER J, et al. Characterization of the complete porcine *MSTN* gene and expression levels in pig breeds differing in muscularity [J]. *Animal Genetics*, 2008, 39 (6): 586–596.
- [3] KIM K S, LARSEN N, SHORT T, et al. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits [J]. *Mammalian Genome*, 2000, 11 (2): 131–135.
- [4] MIKAWA S, MOROZUMI T, SHIMANUKIS, et al. Fine mapping of a swine quantitative trait locus for number of vertebrae and analysis of an orphan nuclear receptor, germ cell nuclear factor (NR6A1) [J]. *Genome Research*, 2007, 17 (5): 586–593.
- [5] FAN Y, XING Y, ZHANG Z, et al. A further look at porcine chromosome 7 reveals *VRTN* variants associated with vertebral number in Chinese and Western pigs [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (4): e62534.
- [6] MA J, YANG J, ZHOU L, et al. A splice mutation in the *PHKG1* gene causes high glycogen content and low meat quality in pig skeletal muscle [J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10 (10): e1004710.
- [7] LIU Y, LIU Y, MAT, et al. A splicing mutation in *PHKG1* decreased its expression in skeletal muscle and caused PSE meat in Duroc × Luchuan crossbred pigs [J]. *Animal Genetics*, 2019, 50 (4): 395–398.
- [8] CIOBANU D, BASTIAANSEN J, MALEK M, et al. Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate-activated γ_3 -subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality [J]. *Genetics*, 2001, 159 (3): 1151–1162.
- [9] BURKARD C, OPRIESSNIG T, MILEHAM A J, et al. Pigs lacking the scavenger receptor cysteine-rich domain 5 of CD163 are resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 infection [J]. *Journal of Virology*, 2018, 92 (16): e00415–18.
- [10] MEIJERINK E, NEUENSCHWANDER S, FRIES R, et al. A DNA polymorphism influencing α (1, 2) fucosyltransferase activity of the pig *FUT1* enzyme determines susceptibility of small intestinal epithelium to *Escherichia coli* F18 adhesion [J]. *Immunogenetics*, 2000, 52 (1/2): 129–136.
- [11] WALKER L R, ENGLE T B, VU H, et al. Synaptogyrin-2 influences replication of porcine circovirus 2 [J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14 (10): e1007750.
- [12] MILAN D, JEON J T, LOOFT C, et al. A mutation in *PRKAG3* associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle [J]. *Science*, 2000, 288 (5469): 1248–1251.
- [13] FAN W, BOSTON B A, KESTERSON R A, et al. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome [J]. *Nature*, 1997, 385: 165–168.
- [14] HUSZAR D, LYNCH C A, FAIRCHILD-HUNTRESS V, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice [J]. *Cell*, 1997, 88: 131–141.
- [15] KIM K S, REECY J M, HSU W H, et al. Functional and phylogenetic analyses of a melanocortin-4 receptor mutation in domestic pigs [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2004, 26: 75–86.
- [16] ZHANG J, LI J, WU C, et al. The Asp298Asn polymorphism of melanocortin-4 receptor (MC4R) in pigs: evidence for its potential effects on MC4R constitutive activity and cell surface expression [J]. *Animal Genetics*, 2020, 51 (5): 694–706.
- [17] KALDS P, ZHOU S, HUANG S, et al. When less is more: targeting the myostatin gene in livestock for augmenting meat production [J]. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 2023, 71 (10): 4216–4227.
- [18] 徐盼, 刘林雨, 仲德, 等. 苏姜猪 NR6A1 和 VRTN 基因多态性及其与生产性状的关联分析 [J]. *畜牧与兽医*, 2022, 54 (4): 10–16.
- [19] 杨广礼, 章焕, 田慧月, 等. 野猪、松辽黑母猪及其杂交一代多性状功能基因分子遗传标记研究 [J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48 (3): 946–953.
- [20] WALKER L R, VU H L, MONTTOOT K L, et al. Functional and evolutionary analysis of host Synaptogyrin-2 in porcine circovirus type 2 susceptibility [J]. *PLoS Genetics*, 2023, 19: e1011029.
- [21] 梁凯欣, 钟海文, 宋长绪, 等. SYNGR2 影响猪圆环病毒 2 型体外增殖的研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54 (9): 3824–3835.
- [22] WANG S J, LIU W J, YANG L G, et al. Effects of *FUT1* gene mutation on resistance to infectious disease [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39 (3): 2805–2810.
- [23] PETIT G, GROSBOIS V, CHALVET-MONFRAY K, et al. Polymorphism of the α -1-fucosyltransferase (*FUT1*) gene in several wild boar (*Sus scrofa*) populations in France and link to edema disease [J]. *Research in Veterinary Science*, 2020, 131: 78–86.
- [24] 郑虎, 高美娟, 杨化强. 基因编辑技术在猪遗传育种中的研究进展 [J]. *畜牧与兽医*, 2024, 56 (1): 129–139.
- [25] GUO X, GENG L, JIANG C, et al. Multiplexed genome engineering for porcine fetal fibroblasts with gRNA-tRNA arrays based on CRISPR/Cas9 [J]. *Animal Biotechnology*, 2023, 34 (9): 4703–4712.
- [26] REN J, HAI T, CHEN Y, et al. Improve meat production and virus resistance by simultaneously editing multiple genes in livestock using Cas12i^{Max} [J]. *Science China Life Sciences*, 2024, 67 (3): 555–564.