

DOI: 10.1360/yc-007-0977

利用鸡 F₂ 资源群体构建 1 号染色体遗传连锁图谱

柳晓峰¹, 王守志¹, 胡晓湘², 高宇², 王启贵¹, 张慧¹, 李宁², 李辉¹

1. 东北农业大学动物科技学院, 哈尔滨 150030;
2. 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094

摘要: 在鸡 1 号染色体上选取 23 个微卫星标记, 利用东北农业大学鸡 F₂ 资源群体构建了遗传连锁图谱。选用 369 只 F₂ 个体用于基因型测定。结果表明 23 个微卫星位点除 MCW0058 为低度多态, 其他位点均为中高度多态。构建的连锁图谱覆盖 1 号染色体全长, 总共 637.9 cM。MCW0115 和 ROS0025 标记顺序与 EL 图谱不同, 但与 WAU 图谱一致。其他标记顺序与 3 大参考家系标记顺序一致, 图谱总长和标记间距离大于 3 大参考家系。此连锁图谱的构建为数量性状位点 (QTL) 定位奠定了良好的基础。

关键词: 鸡; F₂ 资源群体; 微卫星; 连锁图谱

A genetic linkage map of chicken chromosome 1 in an F₂ resource population

LIU Xiao-Feng¹, WANG Shou-Zhi¹, HU Xiao-Xiang², GAO Yu², WANG Qi-Qui¹, ZHANG Hui¹, LI Ning², LI Hui¹

1. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;
2. National Laboratories for Agribiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China

Abstract: Three hundred and sixty-nine F₂ individuals produced from Northeast Agricultural University Resource Population (NEAURP) were genotyped by 23 fluorescent microsatellite markers on chromosome 1. The characterization of these microsatellites was moderate or high polymorphic except marker MCW0058 which was low polymorphic. The length of the sex averaged linkage map was 637.9 cM. The order of MCW0115 and ROS0025 disagreed with that of EL map, but consisted with that of W map. The intervals of markers were larger than those of three reference families.

Keywords: chicken; F₂ resource population; microsatellites; genetic linkage map

鸡作为一种重要的经济动物和模式生物, 对鸡基因组的研究重点在于定位影响重要经济性状的位点, 并利用这些信息来改良畜禽品种。过去的 15 年来, 伴随着人类基因组计划的开展, 家畜基因组计划也得到了高速发展, 分子生物学和数量遗传学的

结合, 使得标记辅助选择(MAS)的可操作性大大加强。选择与数量性状位点(Quantitative Trait Loci, QTL)相连锁的分子遗传标记(基因或非基因标记)即可实现对基因型的直接选择。这将大大加快育种进程。对 QTL 的检测和利用是实现从分子水平上对控

收稿日期: 2006-12-07; 修回日期: 2007-02-07

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(编号: NCET-04-0343), 国家自然科学基金重点项目(编号: 30430510)和国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2006AA10A120)资助 [Supported by the Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-04-0343), National Natural Science Foundation Key Project (No.30430510) and National High Technology Research and Development Project (863 Project) (No. 2006AA10A120)]

作者简介: 柳晓峰(1981-), 男, 黑龙江省双城市人, 硕士研究生, 研究方向: 动物遗传育种。Tel: 0451-55174145; E-mail: liuxiaofeng8110@sohu.com
通讯作者: 李辉(1963-), 男, 教授, 研究方向: 动物遗传育种。Tel: 0451-55191416; E-mail: lihui@neau.edu.cn

制畜禽重要经济性状的基因进行操纵的关键。基因组扫描法(也称为标记-QTL连锁分析)是QTL定位的主要策略之一。基因组扫描法检测QTL的步骤通常是:①进行实验设计;②选择遗传标记;③收集数据;④构建标记连锁图谱;⑤QTL的检测及QTL参数估计。由此可见,通过构建连锁图谱,将标记定位在染色体的相应位置,是进行QTL定位的前提。

目前,国际上针对QTL定位应用的标记主要是微卫星标记。微卫星标记具有多态性高,共显性,可稳定遗传等特点。微卫星标记侧翼序列保守程度高,可根据其侧翼序列设计引物,特异性扩增某一位点上的微卫星序列。微卫星与PCR技术结合可以在测序仪上实现大规模个体基因型检测。自从2000年拥有3大家系^[1~3]的3个实验室通力合作,将3大家系构建的遗传图谱充分整合,得到整合图谱2000(Consensus map 2000)^[4],对鸡的QTL定位研究逐渐开展起来。不同的实验室通过构建资源家系及利用整合图谱的标记信息,各自构建了遗传图谱并对一些重要经济性状进行定位研究。Hocking和Abasht等对现有鸡的QTL定位结果进行了总结^[5,6],文献报道在鸡1号染色体上定位了一些影响生长和体组成性状的QTL。在进行QTL定位之前,需要在群体中鉴定标记多态,定位标记位置,构建连锁图谱。本研究利用东北农业大学鸡F₂资源群体,选用鸡1号染色体上23个微卫星标记,构建了1号染色体遗传连锁图谱。该图谱覆盖1号染色体全长,平均标记密度27.7 cM,标记多态信息含量高,这为下一步定位影响鸡重要经济性状奠定重要基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 研究群体

采用东北农业大学构建的F₂代资源群体(NEAURP)为研究对象。F₀代由4只东北农业大学肉鸡高低脂双向选择品系公鸡为父本,24只白耳蛋鸡为母本;F₀代杂交后产生F₁代,F₁代避免全同胞半同胞交配产生F₂代,公母配种比例为1:6,F₂代出雏后按常规商品肉鸡饲养程序统一进行饲养管理。12周龄屠宰,采集不同时期生长和体组成性状。本研究选取4个F₁代全同胞家系,共计F₀22只,F₁28只,F₂369只用于基因组扫描。

1.1.2 微卫星标记的选取

根据网上公布的微卫星标记信息,选取鸡1号染色体上23对微卫星引物用于扩增,引物具体信息和3个参考家系图谱及整合图谱见网站<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>和<http://www.thearkdb.org/arkdb/do/getChromosomeDetails?accession=ARKSPC00000004>。引物5'端标有HEX(绿)或6-FAM(蓝)亚磷酸酰胺荧光基团,由北京奥科生物技术公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 基因型测定

常规苯酚-氯仿抽提法从禽血裂解液裂解的血样中提取DNA。PCR反应总体积为25 μL,含模板40 ng,1.5 mmol/L MgCl₂,50 mmol/L KCl,10 mmol/L Tris-HCl,10 mmol/L Triton-X-100,200 mmol/L dNTP,上下游各0.2 μmol/μL 1 U Taq DNA聚合酶。不同微卫星引物的复性温度不同,在55℃~60℃之间。PCR反应条件为:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,复性30 s,72℃延伸30 s,35个循环后72℃延伸7 min。用灭菌去离子水稀释PCR的扩增产物20~30倍,取1 μL稀释产物,加入等量上样缓冲液(含ROX350分子量内标)。上样前,95℃变性5 min,取出后立即置冰上。变性的PCR产物用6%的变性聚丙烯酰胺凝胶在ABI377序列分析仪上电泳3 h,收集胶图像。应用GENESCAN™3.0软件进行数据收集、泳道线校正、定义分子量内标,应用Genotyper™2.5软件进行基因分型。

1.2.2 统计分析

等位基因频率(P_i)、标记杂合度(H)和多态信息含量(PI_C)计算公式如下:

$$P_i = \frac{2ii + ij_1 + ij_2 + \Lambda + ij_n}{2N}$$

式中 P_i 为第 i 个等位基因频率; ii 为纯合复等位基因型个体数; ij_1, ij_2, \dots, ij_n 为含有等位基因 i 和与 i 共显性的第1到第 n 个等位基因的杂合个体数; N 为样本含量。

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

式中 P_i 为某一位点上第 i 个等位基因频率, n 为某一位点的等位基因数, H 为标记杂合度。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

式中 P_i, P_j 分别为群体中第 i, j 个等位基因频率, n 为等位基因数。

用 Crimap ver2.4(DOS)^[7](<http://linkage.rockefeller.edu/soft/crimap>)构建遗传连锁图谱。首先, 将基因型数据整理成 .gen 文件; 用 prepare 命令形成调用文件; 用 twopoint 命令计算两两位点 LOD 值, LOD 值大于 3 的为连锁; 然后用 build 命令生成标记顺序; 用 flips2 命令验证标记顺序, 直到似然率对数值为最大, 用 built 命令确定图谱顺序和距离。

2 结果与分析

2.1 微卫星标记杂合度和多态信息含量

微卫星标记杂合度和多态信息含量统计见表 1。23 个标记检测到的等位基因数目为 2~8 个, 平均等

位基因数目为 4.17; 平均期望杂合度为 0.614; 平均多态信息含量为 0.555。

2.2 遗传连锁图谱构建

根据 Crimap 使用说明, 用 23 个微卫星标记构建东北农业大学鸡 F₂ 资源群体遗传连锁图谱。得到图谱总长度为 637.9 cM(图 1)。标记顺序与整合图谱基本一致, 标记间距离比整合图谱大。其中 MCW0115 和 ROS0025 标记顺序与 EL 图谱不同, 但与 WAU 图谱一致。

3 讨论

3.1 微卫星标记信息含量

微卫星具有数量多, 分布均匀, 多态程度高及共显性遗传等特点, 因而是 QTL 定位首选的遗传标记之一。从表 1 中可以看到, 所选用的 23 个微卫星在东北农业大学 F₂ 资源群体中观察到的等位基因数

表 1 微卫星标记参数

Table 1 Characterization of microsatellites

标记 Locus	等位基因数 No. of allele	个体数 N	杂合子数 Hets	纯合子数 Homs	观察杂合度 H(O)	期望杂合度 H(E)	多态信息含量 PIC
MCW0248	3	350	202	148	0.577	0.505	0.402
LEI0209	8	308	245	63	0.795	0.795	0.765
MCW0010	4	330	169	161	0.512	0.472	0.439
MCW0106	5	327	305	22	0.933	0.774	0.737
LEI0252	5	273	233	40	0.853	0.725	0.674
LEI0114	6	322	214	108	0.665	0.640	0.583
LEI0068	4	314	236	78	0.752	0.710	0.653
MCW0297	3	345	212	133	0.614	0.556	0.464
LEI0146	5	327	291	36	0.890	0.727	0.677
MCW0018	5	332	247	85	0.744	0.728	0.689
MCW0058	3	307	76	231	0.248	0.225	0.212
ADL0251	2	364	202	162	0.555	0.463	0.355
MCW0061	5	272	237	35	0.871	0.792	0.757
LEI0088	3	363	186	177	0.512	0.481	0.429
MCW0200	5	317	272	45	0.858	0.758	0.719
MCW0036	2	334	153	181	0.458	0.457	0.352
MCW0283	4	358	240	118	0.670	0.653	0.601
LEI0107	3	242	126	116	0.521	0.639	0.565
LEI0079	3	341	173	168	0.507	0.541	0.471
ADL0328	4	366	261	105	0.713	0.647	0.593
ROS0025	5	355	266	89	0.749	0.680	0.618
MCW0115	6	283	210	73	0.742	0.698	0.643
MCW0107	3	355	150	205	0.423	0.454	0.366

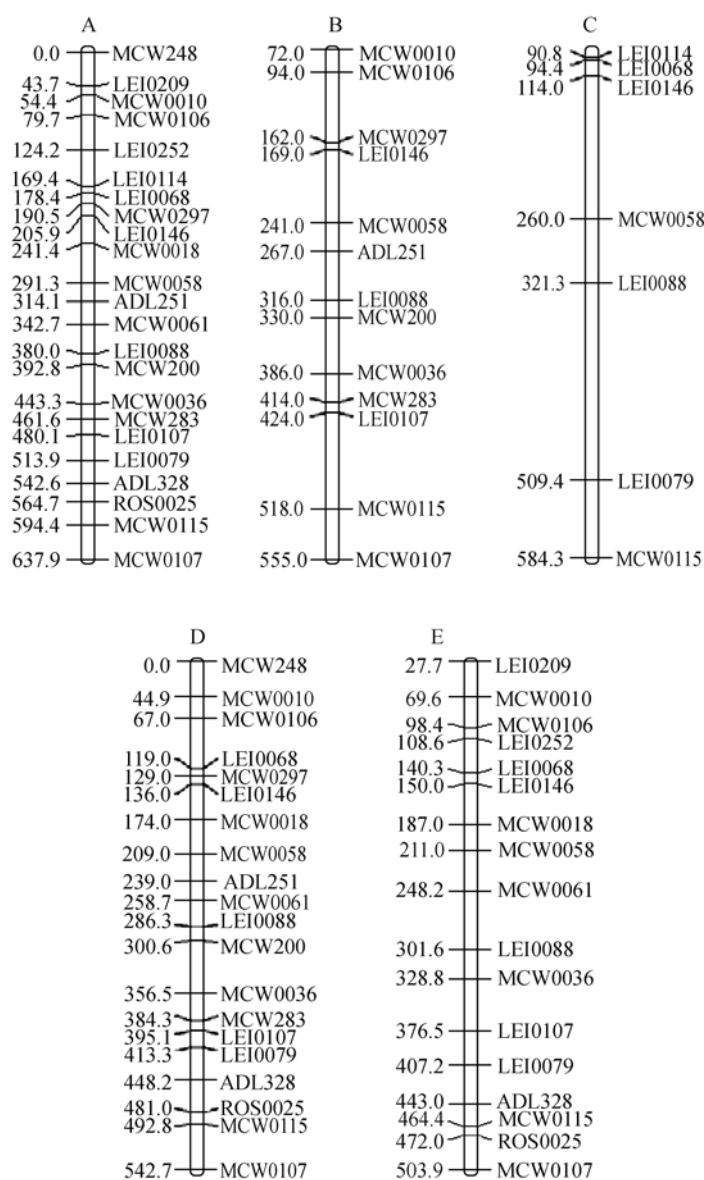


图1 东北农业大学F₂资源群体微卫星遗传连锁图谱与其他图谱的比较

A: 东北农业大学连锁图谱; B: 整合图谱; C: Compton 图谱; D: Wageningen 图谱; E: East lansing 图谱。对整合图谱、Compton 图谱、Wageningen 图谱、East lansing 图谱只标出本研究用到的 23 个标记。

Fig. 1 The comparison of linkage map of NEAURP on chromosome with other maps

A: Linkage map of NEAURP; B: Consensus map; C: Compton map; D: Wageningen map; E: East lansing map.

Twenty three markers used in this study was represented in the consensus map, Compton map, Wageningen map, East lansing map.

目 2~8 个, 杂合度处于 0.248~0.933 之间, 多态信息含量 0.212~0.765。对于一个标记, 如果它频繁出现的等位基因频率不超过 0.95, 则该标记是多态的, Jurg^[8]据此而将多态基因或位点定义为杂合度(或 PIC)不小于 0.10 的基因或位点。根据 Bostein 等^[9]提出的衡量标记变异高低程度的指标认为 $PIC \geq 0.5$

为高度多态, $PIC \leq 0.3$ 为低度多态, 0.3 和 0.5 之间为中度多态。根据表 1, 本实验所选用的微卫星杂合度、多态信息含量较高, 只有 MCW0058 为低度多态 ($PIC = 0.212$), 其他的标记均为中高度多态。以上结果表明微卫星多态信息含量丰富, 可以用于连锁图谱构建和 QTL 定位分析。

3.2 遗传连锁图谱

本研究所选用的 23 个微卫星标记覆盖 1 号染色体全长, 构建图谱长度为 637.9 cM, 平均标记密度 27.7 cM。标记顺序与整合图谱和其他 3 个参考家系相比(图 1), 发现有 13 个标记位于整合图谱上, 其他 10 个标记分别定位在 3 个参考家系上。标记间顺序基本与整合图谱和 3 个参考家系的顺序一致。ROS0025 和 MCW0115 顺序与 EL 图谱顺序相反, 但与 WAU 图谱一致, 而在 Compton 图谱上没有标记 ROS0025, 整合图谱上 ROS0025 的位置也不确定。通过查询 NCBI 数据库, 发现 ROS0025(UniSTS: 280260)的物理位置为 170574250-170574452; 而 MCW0115(UniSTS:280138)的物理位置为 174821191-174821431。即 MCW0115 的物理位置更靠近标记 MCW0107(UniSTS:280130)(物理位置为 186899174-186899284)。这说明这两个标记的顺序在我们构建的图谱中是合理的。本研究得到的图谱标长度大于整合图谱和 3 个参考家系, 标记间距离与整合图谱和 3 个参考家系有一定差别。从图 1 中可以看出, 3 大参考家系本身定位的标记距离也有较大差别。产生这种情况的原因可能是由于选用的标记数目不同, 标记数目的增多会导致观察到更多的重组信息, 从而使图谱的总长度变大。另外一个原因就是群体不同, 高宇^[10]利用中国农业大学建立的丝羽乌骨鸡和法国明星肉鸡杂交的 F₂ 群体构建连锁图谱, 在 1 号染色体上选用了 17 个微卫星标记, 得到的图谱长度为 621.2 cM。3 个参考家系所用的杂交祖代也各不相同。如 Compton 资源家系所用的群体考虑的是抗病性能, 作图时仅用了 52 个个体; Wageningen 群体考虑的是生长性状, 所用个体有 460 个; East Lansing 家系作图群体也比较少, 仅有 56 个个体^[1-3]。个体数较少导致图谱长度较小, 另外由于所用群体遗传背景的不同, 发生重组的情况也各不相同, 造成标记遗传距离有所差别。本研究选用了 369 个 F₂ 个体用于作图, 亲本与上述群体都不相同, 所以导致标记间距离与其他资源群体构建的连锁图谱标记间

距离有一定的差别。

该遗传图谱标记距离与其他参考家系有一定差别, 但标记顺序基本一致, 标记密度合适, 标记杂合度和多态信息含量较高, 这为应用东北农业大学鸡 F₂ 资源群体进行鸡重要经济性状 QTL 定位研究奠定了良好的基础。

参考文献(References):

- [1] Bumstead N, Palyga J. A preliminary linkage map of the chicken genome. *Genomics*, 1992, 13: 690-697.
- [2] Levin I, Santagelo L, Cheng H, Crittenden L B, Dodgson J B. An autosomal genetic linkage map of the chicken. *Journal of Heredity*, 1994, 85: 79-85.
- [3] Groenen MAM, Crooijmans RPMA, Veenendaal A, Cheng HH, Siwek M, Van Der Poel, JJ. A comprehensive microsatellite linkage map of the chicken genome. *Genomics*, 1998, 49: 265-274.
- [4] Groenen MAM, Cheng HH, Bumstead N, Benkel BF, Briles WE, Burke T, Burt DW, Crittenden LB, Dodgson J, Hillel J, Lamont S, Ponce De Leon A, Soller M, Takahashi H, Vignal A. A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Research*, 2000, 10: 137-147.
- [5] Hocking PM. Review of QTL mapping results in chicken. *World's Poultry Science Journal*, 2005, 61: 215-226.
- [6] Abasht B, Dekkers JCM, Lamont SJ. Review of Quantitative Trait Loci identified in the chicken, *Poultry Science*, 2006, 85: 2079-2096.
- [7] Green P, Falls K, Crooks S. Documents for CRI-MAP, Version 2.4. St Louis, Washington University School of Medicine, 1990.
- [8] Jurg O. Analysis of Human Genetic Linkage (Translated by Yang D). Beijing: China Agricultural University Publication, 1999, 15-16.
- [9] Bostein D. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314-331.
- [10] GAO Yu. Mapping and candidate gene analysis for important traits loci in chicken [Dissertation]. Beijing: China Agricultural University, 2006.
高宇. 鸡重要表型性状定位与候选基因的分析研究 [学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2006.