

VLDL 双向选择肉鸡群 SSR 指纹分析

白秀娟, 乔宪凤, 李 辉, 王宇祥, 唐志权

(东北农业大学动物科技学院, 哈尔滨 150030)

摘要:对初步进行 VLDL 双向选择的三个世代高、低脂群肉鸡进行 SSR 指纹分析, 评定各基因座基因频率的变化, 进而判断 SSR 标记与肉鸡肥度性状 VLDL 的相关关系, 为低脂肉鸡的早期选育奠定基础。5 个微卫星引物一个未扩增出产物, 其余 4 个引物扩增出 14 个微卫星位点。各位点在高、低脂系中的基因频率经卡方检验, 一世代有一个基因座的基因频率差异显著($P < 0.05$); 二世代两个基因座差异显著; 三世代共检测到 4 个基因座差异显著。

关键词:肉鸡; SSR 指纹; 遗传相关

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2002)02-0149-03

SSR Fingerprinting in Broiler Selected for Very Low Density Lipoprotein (VLDL)

BAI Xiu-juan, QIAO Xian-feng, LI Hui, WANG Yu-xiang, TANG Zhi-quan

(Faculty of Animal Science and Technology, North-east Agricultural University, Haerbin 150030, China)

Abstract: SSR fingerprints were analyzed in three generations of fat line (FL) and lean line (LL) of broiler chickens. Changes in gene frequencies of every locus were evaluated. Thus the relationship between SSR markers and VLDL (a trait representing fat mass of broiler), which is the basis for early selection of LL broiler, was examined. Fourteen microsatellite locus were successfully amplified with 4 of 5 primers used. The results of χ^2 test for the gene frequencies of every locus show that one locus was significantly different in generation 1 ($P < 0.05$), two in generation 2 and 4 in generation 3.

Key words: broiler; SSR fingerprinting; genetic correlation

微卫星 (microsatellite) 是指由 1~6bp 的碱基序列为核心, 呈串联重复分布于整个基因组的 DNA 序列。由于微卫星标记在基因组中具有数量大、分布均匀、多态含量丰富、显性遗传及检测方便等优点, 已成为遗传图谱构建、功能基因定位、标记-QTL (quantitative trait loci, QTL) 连锁分析、标记辅助选择、检测种群内遗传变异和种群间遗传距离等多项研究中的重要标记^[1~4]。

目前, 标记-性状连锁分析方法主要包括以标记为基础的 MB (marker based) 法和以性状为基础的 TB (Traits Based) 法^[5]。TB 法判断连锁关系的标准是根据群体中性状表型值不同的个体间标记基因频率的差异进行连锁分析, 其实质是由于标记位

点与影响性状的 QTL 间相互连锁 (linkage)。本研究利用 5 个微卫星标记检测双向选择肉仔鸡一世代、二世代、三世代基因频率的变化, 进而判断 SSR (simple sequence repeats, SSR) 标记与肉鸡肥度性状极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 的相关关系, 为进一步研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验用 AA 肉鸡共三个世代, 其中一世代 27 只 (高脂系 10 只; 低脂系 17 只); 二世代 60 只 (其中高脂系 35 只; 低脂系 25 只); 三世代 42 只 (高脂系 21 只; 低脂系 21 只), 颈静脉采血, EDTA 抗凝。

收稿日期: 2001-04-06; 修回日期: 2002-01-11

基金项目: 黑龙江省自然科学基金 (98SZ63XM06)、黑龙江省教委基金 (98SZ43XM04) 资助

作者简介: 白秀娟 (1963-), 女, 汉, 吉林省东丰县人, 农学博士, 专业为野生动物生态管理及分子育种。E-mail: bxj@0451.com

1.2 试剂与引物

蛋白酶 K、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶均为 Promega 公司产品。SSR 引物由东北林业大学野生动物资源学院动物遗传工程实验室合成,碱基序列见表 1。

表 1 微卫星引物序列
Table 1 SSR primer sequence

代码	正向引物(5'-3')	反向引物(3'-5')
1	ACACGTCCTGTGTACATGCCTGT	ACTGTCACAGTGGGTCATGGACA
2	TCCAGAGACAGTTGCTCCACATTC	GCAAGTTAFTTATTGTAGGGGCTC
3	GGATTACAGCACCTGAAGCCACTAG	AAACCAGCCATGGGTGCAGATTGG
4	ACCTCCTGCTGGCAAATAAAATT	TCACCTTTAGCTCCATCAGGATTCA
5	GCTGGAATGCAAGATGACACG	TGCGCCTTCATCAAGTAGAGCT

1.3 基因组 DNA 的提取

根据孟安明等^[6]方法提取基因组 DNA。

1.4 SSR-PCR 反应

PCR 扩增反应在 PTC-200 DNA 扩增仪上进行,反应总体积为 25 μ l,内含 50mmol/L 的 Tris-HCl (pH8.3),0.25g/L 的 BSA,2mmol/L 的 MgCl₂,1U 的 *Taq* DNA 聚合酶,每种 dNTP 各 200 μ mol/L,50ng 基因组 DNA,10pmol 引物,2% 甲酰胺。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 5min \rightarrow 30 \times (94 $^{\circ}$ C 1min \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 或 58 $^{\circ}$ C 40s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 40s) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 10min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C。

SSR-PCR 扩增产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,硝酸银染色。电泳缓冲液为 1 \times TBE,电压 250V。

1.5 统计分析

(1)根据不同微卫星引物扩增产物分布结果,统计三个世代肉鸡高、低脂系不同基因座的平均基因频率,计算公式为:

$$P = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n f_i$$

上式中,P 为某一微卫星标记检测的基因频率, f_i 为第 i 个体的扩增带类型,有带记为 1,无带记为 0, n 为检测的个体数。

(2)应用卡方检验检验各世代高、低脂系肉鸡在不同基因座上基因频率的差异程度。

2 结 果

2.1 SSR 扩增带的多态性

5 个引物在三个世代鸡群中,除 1 号引物扩增不到产物外,其余 4 个微卫星 DNA 标记均表现出多态性,其中 3、4、5 对引物均检测到 4 个等位基因,2 号引物有 2 个等位基因。图 1 是 2 号引物的扩增图谱。

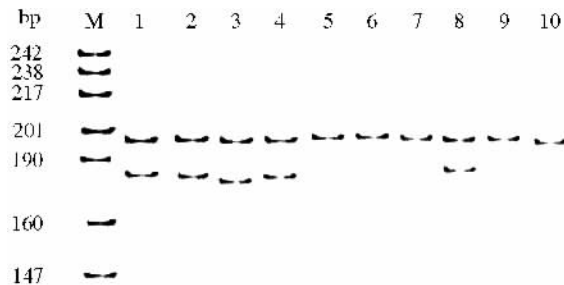


图 1 引物 2 扩增二世代肉鸡 1~10 个体电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of the products amplified with primer 2

2.2 微卫星各基因座基因频率

通过统计计算,微卫星各基因座在肉鸡三个世代高、低脂系中的基因频率见表 2。

表 2 三个世代高、低脂系鸡群微卫星基因频率

Table 2 The gene frequency of microsatellite between fat line and lean line of three generation

引物号	等位基因	一世代		二世代		三世代	
		高脂系	低脂系	高脂系	低脂系	高脂系	低脂系
2 号引物	A	0.800	0.9167	0.7778	0.5833	0.7143	0.9048
	B	0.6667	0.3333	0.3611	0.4583	0.4286	0.3810
3 号引物	A	0.8667	0.8333	0.8611	0.6667	0.7619	0.7143
	B	0.1333	0.0833	0.3333	0.2917	0.1905	0.1905
	C	0.0667	0.1667	0.1944	0.2500	0.4762	0.1905
	D	0.6667	0.1500	0.0278	0.2500	0.0952	0.3333
4 号引物	A	0.4667	0.5000	0.6667	0.5833	0.4762	0.6667
	B	0.7333	0.4167	0.3333	0.5417	0.6190	0.3333
	C	0.2000	0.5330	0.4722	0.2083	0.3330	0.5238
	D	0.4000	0.3333	0.3333	0.2917	0.6333	0.2857
5 号引物	A	0.8667	1.0000	1.0000	1.0000	0.9524	0.8095
	B	0.9333	0.9167	0.7500	0.7083	0.4286	0.9048
	C	0.6667	0.5833	0.5556	0.5833	0.1905	0.9048
	D	0.6667	0.6667	0.5	0.3333	0.5714	0.3333

经卡方检验表明:一世代高、低脂系肉鸡仅有 4 号引物 C 基因座的基因频率差异显著($P < 0.05$);二世代除 4 号引物 C 基因座的基因频率差异显著外,3 号引物 D 基因座的基因频率差异也显著;三世代检测到高、低脂系肉鸡 3 号引物 D 基因座、4 号引物 C 基因座及 5 号引物 B、C 基因座的差异显著,其中 5 号 B、C 基因座的差异达到极显著($P < 0.01$)。

3 讨 论

3.1 SSR 标记与肉鸡 VLDL 相关分析

本实验研究的动物群是经双向选择的高、低脂系肉鸡,其选择性状是血浆 VLDL 浓度。经过三个世代的选择,肉鸡高、低脂系 VLDL 已有明显差异。本研究 4 对引物共检测到 14 个基因座,从 SSR 基

因座的基因频率看, 一代只有 4 号引物 C 位点的基因频率差异显著 ($P < 0.05$); 二代则出现一新位点即 3 号引物 D 基因座, 同时 4 号引物 C 基因座的基因频率差异仍显著; 三代共检测到 4 个基因位点差异显著, 两个基因座是一、二代检测到的, 但其差异程度仍为显著, 而新检出的两个基因座差异达到极显著。实验结果表明, 随着选择代数的增加, 高、低脂系肉鸡某些 SSR 基因座的频率发生改变, 据此可以说, 这些基因座与选择性状是相关的。

4 号引物 C 基因座的基因频率在三个世代均表现差异显著, 其 P 值 (差异度) 三个世代分别为 0.0404、0.0377、0.0213, 可见差异越来越大, 表明与 VLDL 的相关最大。3 号引物 D 基因座的 P 值三个世代分别为 0.0638、0.0086、0.0501, 一代时为亚显著, 二代时达到极显著, 三代仍为显著, 可见该基因座的差异不具规律性变化, 是否与 VLDL 性状相关有待进一步检测分析。三代出现的 5 号引物 B、C 基因座, 在一、二代高、低脂系均差异不显著, 三代时 P 值达到 0.0011、0.0000 的极显著, 也许由检测分析上误差造成。

3.2 有关银染技术

聚丙烯酰胺凝胶具有极高的分辨率, 用于 DNA 分析时, 长度仅差 1 个核苷酸的 DNA 片段也能在凝胶上分开。但由于聚丙烯酰胺凝胶对荧光染料溴化乙锭的荧光有淬灭作用, EB 染色法很难检测到少于 10ng 的 DNA 条带。因此, PCR 扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 一般采用硝酸银染色 (银染) 的方法。

本实验对 Merril^[7]、Bassam^[8]、Sanguinetti^[9]、黄晓明^[10] 等报道的银染方法进行比较。Merril 的方法费时费力, 同时对所用试剂及水的纯度要求很高。特别是 Bassam 的银染法对所用试剂及水质要求特别严格, 如果药品及水的纯度达不到要求, 一般得不到满意结果。Sanguinetti 的方法用普通的试剂, 但对水的纯度要求很高, 蒸馏水能染出带, 但染出的胶面呈棕黑色, 与谱带的反差不大。黄晓明报道的方法, 染色流程时间长、繁琐, 染出的效果不甚理想。本研究在此 4 人的基础上, 探讨了影响银染效果的因素。影响银染效果的主要因素包括:

染色时间 硝酸银染色时间的长短, 决定银染效果。银染时间过短, 显带浅或不显带; 银染时间过长, 则胶面颜色较深而与谱带的对比度小。一般情况下, 不同厚度的凝胶, 染色时间不同; 硝酸银染

色液使用次数越多, 染色时间越长。

显色液温度 凝胶显影时间的快慢与显色液的温度有关。显色液温度一般在 10℃ 以内; 如果温度过高, 凝胶显影过快, 且胶面颜色较深。显影液一般不能重复使用。

及时停显 当胶面上显出 DNA 谱带后, 要用 7.5% 的冰醋酸及时停显。如果省去停显步骤或显液过慢, 则胶面特别是谱带区很快过显, 颜色急剧变深至黑, 影响染色效果。

PCR 产物上样量 聚丙烯酰胺凝胶具有极高的分辨率, 能检测到少于 10ng 的 DNA 条带。如果上样量过少, 则谱带浅而细; 如果上样量过高, 往往使两个相差 1~5 个碱基的条带连在一起, 难以分辨。具体的上样量, 依据 PCR 产物中 DNA 浓度和扩增循环次数而定。

另外, 染色用的水质也影响着银染的效果。同时, 在进行银染操作时, 一定要保证凝胶接触的所有器皿、手套等绝对清洁。

参 考 文 献 (References):

- [1] 龚炎长, 彭中镇, 师守堃. 畜禽微卫星的应用[J]. 中国畜牧杂志, 1998, 34(6): 51~52.
- [2] 何平. 真核生物中的微卫星及其应用, 遗传, 1998, 20(4): 42~47.
- [3] Buchanan F C, Adams L J, Littlejohn R P, Maddox J F, Crawford A M. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites[J]. Genomics, 1994, 22: 397~402.
- [4] Machugh D E, Loftus R F, Cunningham P, Bradley D G. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers[J]. Animal Genetics, 1998, 29(5): 333~340.
- [5] Vanhala T, Tuiskula-Haavisto M, Elo K, Vilki J, Maki-Tanila A. Evolution of Genetic Variability Genetic Distances Between Eight Chicken Lines Using Microsatellite Markers[J]. Poultry Science, 1998, 77: 783~790.
- [6] 孟安明, 齐顺章, 宫桂芬. 用四个探针产生的家禽 DNA 指纹图[J]. 生物化学与生物物理进展, 1993, 20(2): 139~142.
- [7] Merril C R, et al. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels show regional variation in cerebrospinal fluid proteins[J]. Science, 1981, 211: 1437~1438.
- [8] Brant J Bassam, Gustavo Caetano-Anollé. Silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. Applied Biotechnology, 1993, 42: 181~187.
- [9] Sanguinetti C J, et al. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels—polymerase chain reaction product recovery[J]. BioTechniques, 1994, 17: 915~919.
- [10] 黄晓明, 胡向阳, 宗卉, 高翼之. 二核苷酸重复多态性的非同位素检测及其在基因诊断中的应用[J]. 遗传学报, 1995, 22(2): 81~85.