

泰和丝毛乌骨鸡耐热性 AFLP 标记鉴别研究

胡小芬, 任 军*, 黄路生, 丁能水, 陈从英, 艾华水, 郭源梅, 花象柏, 周利华, 李 琳
(江西农业大学农业部/江西省动物生物技术重点开放实验室, 南昌 330045)

摘 要: 通过热应激试验, 将 45 羽泰和丝毛乌骨鸡分为 3 个耐热性差异极显著的组(强、中、弱), 用 25 对 AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 引物组合对这 3 个组的池 DNA 进行了 AFLP 分析, 结果发现, 25 对引物组合共检测到 1 800 余条 AFLP 扩增带。8 对引物扩增结果表现为单态, 17 对引物组合扩增结果有多态现象, 其中 E32/T32、E32/T38、E32/T49、E42/T32、E45/T32、E45/T48 6 对引物组合检测到了耐热性强鸡群池 DNA 所特有的多态条带, 而 E32/T48、E39/T48、E42/T38 和 E45/T33 4 对引物组合在耐热性差鸡群的池 DNA 中扩增到其特有的多态条带; 这些与耐热性相关的 AFLP 多态标记在转换为 STS 后, 对于日后定位、分离和鉴别鸡耐热性主效基因, 或利用标记辅助选育策略, 培育耐热性鸡新品系提供了有利的工作基础。

关键词: AFLP 标记; 耐热性; 泰和丝毛乌骨鸡

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2004)06-0601-04

鸡的个体耐热力具相对的恒定性和个体特异性, 不同鸡种具有明显不同的耐热性, 而且同一种群鸡中耐热个体与热应激个体的耐热力相差悬殊^[1]。这揭示鸡基因组中存在影响耐热性能的功能基因。筛选和鉴别与鸡耐热性主效基因紧密连锁的分子标记有利于最终分离、克隆和鉴别鸡耐热性基因, 对深入了解鸡热应激的发生机理和遗传机制, 培育鸡耐热品系, 解决养鸡业热应激损失具有重要的意义。

扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) 技术是 Vos 等创建的一项分子标记技术^[2]。AFLP 技术建立在 RFLP 和 RAPD 基础上, 对基因组 DNA 限制性酶切片段进行选择扩增, 检测多态性 DNA 标记。它克服了 RFLP 标记受探针来源限制和耗时费力的不足及 RAPD 标记不稳定性, 具备 RFLP 的可靠性和 RAPD 的方便性的优点。一次 AFLP 分析一般可获得 50~150 种分子标记, 一种酶切组合可利用的选择性引物组合可多达 4 096 种, 由此可产生 200 000~400 000 个 DNA 标记, 因而 AFLP 标记非常适用于标定目的基因或与之相连锁的分子标记^[3]。笔者尝试通过 AFLP 技术, 检测泰和丝毛乌骨鸡不同耐热性鸡群基因组混合 DNA 的遗传多样性,

筛选和鉴别与影响个体耐热性基因紧密相关的 AFLP 标记, 为今后的标记辅助选育耐热性鸡打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以泰和丝毛乌骨鸡为研究对象, 将 60 羽同批次、同鸡龄 (5 月龄)、健康无病的泰和丝毛乌骨鸡在 37~38℃ 的同一恒温室内 (相对湿度 65%) 停留 1~6 h, 每隔 1 h 监测试验鸡群的症状和体温, 体温测定采用数显式温度计, 感温探针插入鸡直肠 5 cm 深处。当体温升至 45℃ 左右后, 随时密切观察, 当受试鸡出现热休克症状时, 结束耐热性试验, 测量结束体温, 记录室内停留时间, 计算每只鸡每 10 min 的体温上升速度, 通过 3 次重复试验 (每次试验的间隔期为 1 周), 求其平均值, 以此代表个体耐热性。根据耐热性测定结果, 选取 45 个个体, 按耐热性强弱将它们划分为耐热性强、耐热性中等和耐热性差 3 大组, 每个组 15 个个体, 通过方差分析, 组间的耐热性差异极显著 (表 1)。血样均采自翅静脉。

1.2 基因组 DNA 提取及 DNA 池的构建

参照常温全血裂解法提取基因组 DNA, 将同一组鸡群的所有个体 DNA 分别等量混合, 构建 3 组鸡群的 DNA 池, 用 TE 缓冲溶液稀释至终浓度 200~300 ng/μL, 用于 AFLP 分析。

1.3 AFLP 分析

1.3.1 基因组 DNA 的酶切和接头的连接 采用 *EcoRI*/*TaqI* 双酶切组合进行基因 DNA 的酶切和相

收稿日期: 2003-08-22

基金项目: 江西省自然科学基金“鸡耐热性 AFLP 标记鉴别研究”资助

作者简介: 胡小芬 (1975-), 女, 湖北潜江人, 硕士, 研究方向: 动物分子遗传与育种学

* 通讯作者: 任 军, 0791-3818116; renjunxau@hotmail.com

表1 耐热性试验方差分析结果

Table 1 Results of the square variance analysis for the heat tolerance experiment in Taihe silk fowl

分组	样本数	体重/g	初始体温/℃	结束体温/℃	停留时间/s	温度上升速率/(℃/10 s)
1	15	1 662±36.503 ^a	42.06±0.078 46 ^a	43.01±0.063 45 ^a	360.0±12.21 ^a	0.025 9±0.013 76 ^a
2	15	1 685±36.503 ^a	42.23±0.078 46 ^a	44.91±0.063 45 ^b	235.2±12.21 ^b	0.115 5±0.013 76 ^b
3	15	1 642±36.503 ^a	42.13±0.078 46 ^a	45.05±0.063 45 ^b	95.33±12.21 ^c	0.321 0±0.013 76 ^c

同列中相同字母表示差异不显著,不同字母之间表示差异显著

^{a,b,c} Values with different superscripts are significantly different at the 5% level

应接头的连接。第一步进行 *TaqI* 酶切: 1 μL 基因组 DNA, 5 U *TaqI* (TaKaRa, 大连), 4 μL 10× H buffer, 加超纯水至 40 μL, 65℃ 酶切 2 h。第二步为连接反应和 *EcoRI* 酶切同时进行: 40 μL *TaqI* 酶切产物, 10 U *EcoRI* (TaKaRa, 大连), 1 μL 5 pmol/μL *EcoRI* 接头, 1 μL 50 pmol/μL *TaqI* 接头, 1 μL 10 mmol/L ATP, 350 U T₄ DNA 连接酶(TaKaRa, 大连), 1 μL 10× H buffer, 加超纯水至 50 μL, 37℃ 连接和酶切 3 h, 将酶切-连接产物以 1: 10 的比例进行稀释备用。*TaqI* 和 *EcoRI* 的接头序列分别为:

TaqI 接头序列:

5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'

5'-GACGATGAGTCCTGAC-3'

EcoRI 接头序列:

5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'

5'-CGGTCAGGACTCAT-3'

1.3.2 限制性片段的扩增 AFLP 的扩增分为预扩增和选择性扩增 2 次扩增。E01/T01(forward: 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'; reverse: 5'-GAT GAG TCC TGA CCG AA-3') 和 E01/T02 (forward: 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'; reverse: 5'-GAT GAG TCC TGA CCG AC-3') 2 组引物组合用于预扩增。反应体系为: 5 μL 连接产物, 3 μL 25 mmol/L MgCl₂, 1 μL 10 mmol/L dNTP, 5 μL 10× PCR buffer, 1.5 μL 50 ng/μL E01, 1.5 μL 50

ng/μL T01(或 T02), 1.5 U *Taq* 酶(Sangon, 上海), 加超纯水至 50 μL。PCR 反应条件为: 94℃ 30 s, 56℃ 60 s, 72℃ 60 s, 共 20 个循环; 72℃ 延伸 5 min。用 1% 的琼脂糖电泳来检测是否有预扩增产物。将预扩增产物以 1: 20 的比例进行稀释, 用于选择性扩增。

在相应预扩增的引物后再加 2 个选择性碱基, 进行选择扩增。本试验选用了 5 条 *EcoRI*+ 3 选择性引物和 5 条 *TaqI*+ 3 选择性引物(表 2), 共形成 25 对引物组合。选择性扩增的反应体系为: 5 μL 预扩增产物, 1.2 μL 25 mmol/L MgCl₂, 0.4 μL 10 mmol/L dNTP, 2 μL 10× PCR buffer, 0.3 μL 50 ng/μL *EcoRI*+ 3 引物, 0.6 μL 50 ng/μL *TaqI*+ 3 引物, 1 U *Taq* 酶(Sangon, 上海), 加超纯水至 20 μL。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 30 s; 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 120 s, 每个循环退火温度降低 0.7℃, 共 13 个循环; 再进行另外 23 个循环的扩增, 条件为: 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 120 s。预扩增和选择性扩增均在 PTC-200 梯度 PCR 仪(MJ Research, USA)上进行。用 2% 的琼脂糖电泳来检测选择性扩增是否有产物。

1.3.3 变性聚丙烯酰胺电泳及银染 取 10 μL 变性选择性扩增产物(5 μL 选择性扩增产物, 5 μL 上样缓冲液), 通过 21× 40 cm 6% 聚丙烯酰胺变性胶(7 mol/L 尿素, 19 ary: 1 bis) 在 0.5× TBE 中以 45 W 恒定功率电泳分离, 预电泳 0.5 h, 上样后电泳 2~ 3 h。电泳结束后, 将黏着胶的玻璃放入固定液(10%

表2 AFLP 选择性引物

Table 2 Selective amplification primers used in AFLP analysis

	<i>EcoRI</i> 引物序列	<i>TaqI</i> 引物序列
	<i>EcoRI</i> selective primer sequences	<i>TaqI</i> selective primer sequences
1	E32 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA C-3'	T32 5'-GAT GAG TCC TGA CCG AAA C-3'
2	E33 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC A-3'	T33 5'-GAT GAG TCC TGA CCG AAA G-3'
3	E39 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAG A-3'	T38 5'-GAT GAG TCC TGA CCG AAC T-3'
4	E42 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAG T-3'	T48 5'-GAT GAG TCC TGA CCG ACA C-3'
5	E45 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAT G-3'	T49 5'-GAT GAG TCC TGA CCG ACA G-3'

表 3 耐热性 AFLP 标记筛选结果

Table 3 AFLP polymorphic markers associated with chicken heat tolerance

组别 Group	AFLP 引物组合 AFLP primer combinations									
	E32/T32	E32/T38	E32/T49	E42/T32	E45/T32	E45/T48	E32/T48	E39/T48	E42/T38	E45/T33
强 Strong	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
中 Mid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
差 Weak	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
数量 No.	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1

强代表耐热性强组, 中代表耐热性中组, 差代表耐热性差组; + 代表有条带, - 代表没有条带

Strong represents the strongest heat resistance group; Mid represents modest heat resistance group; Weak refers to the heat susceptible group. + / - refer to the presence or absence of the polymorphic marker

冰乙酸) 中固定 20 min, 用超纯水清洗 3 次, 每次 2 min; 然后在染色液(1 g 硝酸银, 1.5 mL 甲醛, 加超纯水配成 1 L 溶液) 中摇动染色 30 min, 用超纯水清洗 5~ 10 s; 接着在显影液(30 g 无水碳酸钠, 1.5 mL 甲醛, 200 μ L 新配的 10% 硫代硫酸钠, 加超纯水配成 1 L 工作液) 中摇动显影 2 min, 加入等体积的 10% 冰乙酸中定影, 最后用超纯水中冲洗 2 次, 数码相机拍照留底。

2 结 果

25 对 AFLP 引物组合中, E32/T33、E35/T32、E35/T38、E35/T48、E35/T49、E39/T33、E39/T38 和 E39/T49 8 对引物组合未检测到多态标记; 在其它 17 对产生多态标记的引物组合中, E32/T32、E32/T38、E32/T49、E42/T32、E45/T32、E45/T48 6 对引物组合检测到了耐热性强鸡群池 DNA 所特有的多态谱带; 而 E32/T48、E39/T48、E42/T38 和 E45/T33 4 对引物组合在耐热性差鸡群的池 DNA 中扩增到其特有的多态条带(表 3)。多态条带分子量较小, 亮度稍弱(图 1)。

3 讨 论

选用同一鸡场同一品种同一批次的鸡群作为研究对象, 在同样的热应激条件下(36~ 37 $^{\circ}$ C、湿度 65%、停留时间 1~ 6 h), 根据不同个体的热耐受力, 构建成耐热性差异极显著的 3 大组的池 DNA。从基因组水平看, 鸡群皆来自同一鸡种—泰和乌骨鸡, 该鸡种作为江西省古老的地方鸡种之一, 已有多年的选育历史, 品种的遗传纯度很高, 对不同组试验鸡群而言, 明显的表型差异仅体现在对热的耐受性方面, 因而就整体遗传背景而言, 3 类池 DNA 的基因组同源性极

高, 但在影响耐热性的基因位点上存在着遗传变异。通过筛选足够数量的, 遍布整个基因组的分子标记, 有可能鉴别到与鸡耐热性基因位点相关联的分子标记。

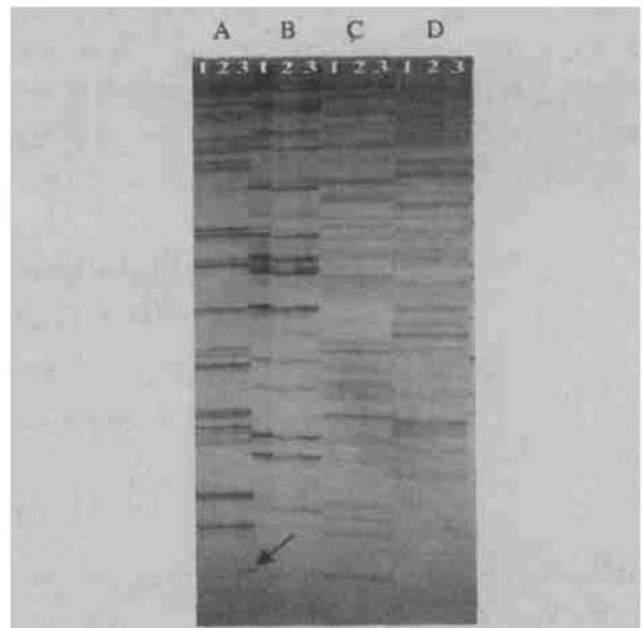


图 1 4 组 AFLP 引物组合凝胶电泳图像

A. E32/T32 电泳图谱; B. E32/T48 电泳图谱;
C. E39/T49 电泳图谱; D. E39/T48 电泳图谱

1. 耐热性弱组; 2. 耐热性中组; 3. 耐热性强组。箭头表示特异条带

Fig. 1 The AFLP band patterns generated by four primer combinations

A. The AFLP band patterns generated by E32/T32;
B. The AFLP band patterns generated by E32/T48;
C. The AFLP band patterns generated by E39/T49;
D. The AFLP band patterns generated by E39/T48;

1. The weak heat-resistance group; 2. the modest heat-resistance group; 3. the strongest heat-resistance group; the specific polymorphic fragment is indicated by arrow

AFLP 因其具有多态检测率高的优势, 适合于基因定位和标记辅助选择的研究。英国 Plastow 等结合混合分离分析法 (pool and segregation, PAS) 和 AFLP 标记技术, 以 PIC 公司商业化品系猪群为研究材料, 鉴别到 1 个与猪显性白毛色基因紧密相关的 AFLP 标记 (COL1), 将此标记转化为序列标记位点 (Sequence tagged site, STS) 标记后, 为商业猪种 (系) 毛色性状的大规模标记辅助选育提供了便捷的基因检测技术^[4]。从本试验结果来看, 25 对 AFLP 引物共检测到 1 800 余条扩增带, 每条带都代表着基因组特定的核苷酸区段 (基因座位), 因而这 1 800 余种标记揭示了受试鸡群基因组在 1 800 个基因座位的遗传信息, 可见 AFLP 标记的信息含量丰富。在 1 800 余个 AFLP 标记中, 有 7 个多态标记为耐热性强鸡群池 DNA 所特有, 另有 5 个多态标记只出现在耐热性差鸡群的池 DNA 中。这些与耐热性相关联的多态标记揭示出 3 类鸡群存在的群体差异性, 它们经序列分析, 转化为 STS, 可进一步在资源家系分离群和商业鸡群中进行基因型分析, 开展与耐热性能的关联性研究, 这不仅有利于鸡耐热性分子机理的深入研究,

而且这类 STS 在资源家系分离群的应用研究, 可为日后鸡耐热性基因的分离、克隆和定位研究打下了坚实的基础。此外, 若此类 STS 被证实与鸡耐热性密切相关, 将为最终育成鸡耐热性新品系提供快速有效的标记辅助选择方法, 有利于南方热带、亚热带地区夏季养鸡生产中热应激问题的解决。

参考文献:

- [1] 花象柏. 鸡热应激与抗热应激[M]. 江西科学技术出版社, 1993.
- [2] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(21): 4407~4414.
- [3] 任 军, 黄路生. AFLP 标记与动物基因组遗传分析[J]. *Animal Biotechnology Bulletin*, 2000, 7(1): 27~31.
- [4] Plastow G S, Kuiper M, Wales R, et al. AFLP for mapping and QTL detection in commercial pigs[A]. *Proceeding of the 6th WCGALD* [C]. Armidale, Australia: Universidad de New England. 1998, 26: 209~212.

Screening and Identification of AFLP Markers Associated with the Heat Tolerance in Taihe Silky Fowl

HU Xiao-fen, REN Jun, HUANG Lu-sheng, DING Neng-shui, CHEN Cong-ying,
AI Hua-shui, GUO Yuan-mei, HUA Xiang-bai, ZHOU Li-hua, LI Lin
(*Jiangxi Provincial Key Laboratory for Animal Biotechnology,
Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China*)

Abstract: Heat stress experiment was performed using 60 purebred Taihe silky fowl individuals, of which 45 chickens were classified into three groups (strong, middle and weak) with significant difference in heat tolerance. A total of 25 AFLP *EcoR* I / *Taq* I primer combinations were used to detect the genetic variation of three pooled DNA each of the three groups. More than 1 800 fragments were amplified, none of polymorphic fragment was detected by 8 primer combinations. Specific polymorphic fragments were revealed in the pool DNA of the strong heat tolerance group using E32/T 32, E32/T 38, E32/T 49, E42/T 32, E45/T 32 and E45/T 48 primer combinations, and specific polymorphic fragments were detected in the pool DNA of the weak heat tolerance group by E32/T 48, E39/T 48, E42/T 38 and E45/T 33 primer combinations. Those polymorphic markers associated with heat tolerance can be developed into sequence tagged sites (STS), which are useful for mapping, isolation and characterization of major gene affecting chicken heat tolerance, ultimately providing a powerful tool for marker assistant selection (MAS) on chicken heat tolerance.

Key words: amplified fragment length polymorphism; heat tolerance; Taihe silky fowl