

猪微卫星多态性两种检测方法的比较研究*

霍金龙, 罗古月, 张娟, 潘伟荣, 张美, 曾养志

(云南农业大学, 云南省版纳微型猪近交系重点实验室, 云南昆明 650201)

摘要: 为了确定一种安全、有效的检测猪微卫星多态性的实验方法, 采用两种电泳和两种染色方法对大白猪基因组 DNA 进行了 6 个微卫星座位的 PCR 扩增, 并将扩增产物在 2.5% 的琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色, 然后又在 8% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳, AgNO_3 染色。结果表明两种方法检测出的等位基因数目和基因多态性水平存在差异, 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳在区分微小差异片段能力上明显优于 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳。

关键词: 猪; 微卫星; 琼脂糖凝胶电泳; 聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号: S 828.2 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 390X(2004)03 - 0314 - 04

Study on Comparison of Two Methods for Detecting Microsatellite Polymorphism in Pig

HUO Jin-Long, LUO Gu-Yue, ZHANG Juan, PAN Wei-rong, ZHANG Mei, ZENG Yang-Zhi

(Banna Mini-pig Inbred Lines Key Laboratory of Yunnan Province, Y A U, Kunming 650201, China)

Abstract: For the purpose of founding a kind of safe and efficient method to reveal the microsatellite polymorphism of pig, two methods (2.5% agarose gel electrophoresis and 8% polyacrylamide gel electrophoresis) were applied to detect polymorphism of 6 microsatellite loci in Large White pig. Result showed there was difference from the two methods that detect the number of allele and gene polymorphism, resolution of 8% polyacrylamide gel electrophoresis was higher than that of 2.5% agarose gel electrophoresis, the former has stronger ability of distinguishing between microscopical discrepancy fragments.

Key words: pig; microsatellite; agarose gel electrophoresis; polyacrylamide gel electrophoresis

微卫星是第 2 代分子标记, 它是以少数几个核苷酸为单位的多次串联重复 DNA 序列 (多为 1 ~ 6 个核苷酸), 其中两核苷酸的重复频率最高, 如 $(AC)_n$, 其重复在哺乳动物基因组中约 10 万个碱基中就发生 1 次, 按照重复结构的不同, 把微卫星分为完全重复型 (perfect) 和不完全重复型 (imperfect) 和复合型 (compound) 3 种, 除着丝粒及端粒外, 染色体的其它区域广泛分布有微卫星位点。它产生于点突变, 开始时拷贝数增加较少, 当突变导致的高突变位点出现时即可造成较快的扩增。微卫星又

被称为 SSRs (Simple Sequence Repeats, 简单序列重复) 或 STRs (Short Tandem Repeats, 短串联重复序列) 或 STRP (Short Tandem Repeat Polymorphism, 短串联重复序列多态性) 或 SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism, 简单序列长度多态性) 等。它具有数量多、分布广而均匀 (不仅存在于内含子中, 也存在于编码区及染色体上的其它任一区域), 多态性丰富, 个体专一性强, 分析操作简便、快速, 重复性、准确性和稳定性好, 呈孟德尔式共显性遗传等特点, 并适宜自动化、半自动化检测, 近年来被广泛用于

* 收稿日期: 2004 - 01 - 07

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (39830190)。

作者简介: 霍金龙 (1975 -), 男, 山西五寨人, 硕士, 主要从事动物分子遗传学。

基因定位、构建基因图谱、连锁分析、亲缘关系鉴定、畜禽遗传多样性评估、品种资源分类、构建系统发生树、群体遗传结构和遗传变异分析、预测杂种优势、标记辅助选择等众多方面^[1~7]。

1 材料与方法

1.1 DNA 样本制备

采集到 15 头大白猪的血样,每头前腔静脉采血 3 mL,采用盐析法提取血液白细胞 DNA。

1.2 基因组 DNA 的浓度、纯度测定

以 3 mL 纯水作空白对照,另于装有 2.97 mL 纯水的比色杯中加入 30 μ L 的基因组 DNA,充分混匀,使其稀释 100 倍,采用 755 B 紫外分光光度计于 260 nm 和 280 nm 波长处分别测定其 OD 值。DNA 的浓度为(μ g/mL) = $A_{260\text{ nm}} \times 50\mu\text{g/mL} \times 100$,根据 260 nm 波长处的 OD 值将 DNA 稀释成 20~30 ng/ μ L 的浓度;纯度测定根据 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 确定。如果 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值在 1.6~1.8 之间即可用于 PCR 扩增。

1.3 引物

本研究所涉及的 6 对微卫星引物均由中国科学院上海生物工程公司合成^[8]。

1.4 PCR 扩增

反应体系 30 μ L,其中模板 20~30 ng,10 \times Buffer 3 μ L, Mg^{2+} 1.4~2.0 mmol/L(因座位而异),dNTP 200 μ mol/L,引物(0.31~1.05 μ mol/L),Taq 酶 1.5 U。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,35 个循环[94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55~65 $^{\circ}$ C 退火 30 s(因座位而异),72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s],72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min,最后 4 $^{\circ}$ C 终止反应。

1.5 电泳

1.5.1 2.5% 琼脂糖凝胶电泳

称取 2.05 g 琼脂糖,倒入 250 mL 的锥形瓶中,加水到 80 mL 后于微波炉内煮沸,当冷却到 60 $^{\circ}$ C 左右时加入 4 μ L EB(初 10 mg/mL,终 0.5 μ g/mL)制成 10 cm \times 12.5 cm 的 2.5% 的琼脂糖凝胶,将 6 \times 溴酚蓝 2 μ L 和 10 μ L PCR 产物混匀后上样于点样孔中 60 V 电压电泳 3.5 h,凝胶自动成像仪上照像。

1.5.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染显色

1.5.2.1 8% 聚丙烯酰胺凝胶的制备^[9,10]

① 用胶带和 1% 的琼脂糖封闭玻璃板与垫片间的缝隙。

② 用移液管吸取 30% 的丙烯酰胺 13.35 mL

于烧杯中,加入 5 \times TBE 10 mL,用去离子水定容至 50 mL,混合均匀。

③ 向烧杯中加入 350 μ L 过硫酸铵和 25 μ L TEMED(四甲基乙二胺)混合后立即灌胶,然后插入梳子,室内聚合 1 h。

④ 凝胶聚合好后,拨出梳子,并用去离子水冲洗点样孔,把玻璃板小心放入电泳槽,再向上、下槽中加入 1 \times TBE,上槽要淹没短板。

1.5.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳^[5,6]

① 接上电极,打开电泳仪,150 V 电压预电泳 1 h。

② 在 PCR 产物中加入 1/5 体积的测序凝胶缓冲液,然后用微量加样器取 10 μ L 加样。

③ 上样完毕后 40 V 电压电泳过夜。

④ 150 V 电压电泳 1.5 h,以确保跑出的带紧凑且清晰。

⑤ 当溴酚蓝指示剂距下边 1~2 cm 时结束电泳。

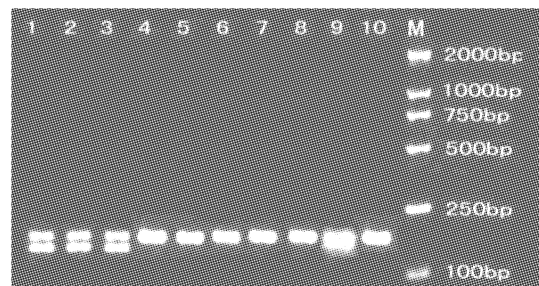


图 1 琼脂糖凝胶电泳经溴化乙锭染色结果

Fig. 1 Agarose gel was stained by EB

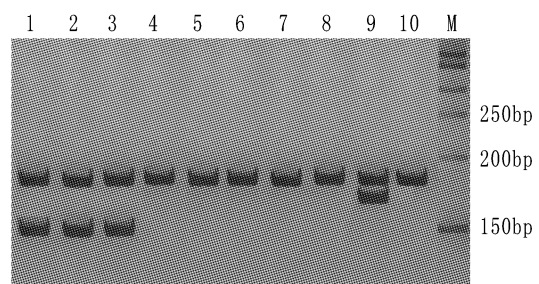


图 2 聚丙烯酰胺凝胶电泳经 $AgNO_3$ 染色结果

Fig. 2 Polyacrylamide gel was stained by $AgNO_3$

1.5.2.3 聚丙烯酰胺凝胶的银染^[11~16]

① 玻璃板的分离:电泳结束后,关闭电泳仪,放出电泳液,小心地揭开玻璃板,将凝胶剥离后放入已准备好的放有双蒸水的干净的瓷盘中,将瓷盘放在摇床上轻摇 1 min。

② 凝胶的固定:倒掉瓷盘中的水,加入固定液

(10%乙醇),在摇床上缓缓摇动 15 min.

③ 洗胶:倒掉瓷盘中的固定液,用双蒸水洗 2 次,共计 1 min.

④ 凝胶的氧化:倒掉瓷盘中的水,加入前处理液(1% HNO₃)氧化,在摇床上缓缓摇动 15 min.

⑤ 洗胶:倒掉瓷盘中的前处理液,用双蒸水洗 2 次,共计 1 min.

⑥ 凝胶的染色:倒掉瓷盘中的水,加入染色液(0.2% AgNO₃),在摇床上缓缓摇动染色 20 min.

⑦ 洗胶:倒掉瓷盘中的染色液,用双蒸水洗 2 次,共计 1 min.

⑧ 凝胶的显影:加少量显色液(3% Na₂CO₃)冲洗 15 s,再加一定体积显色液,轻摇瓷盘直到看到清晰的条带,一般为 5~6 min,时间不要过长,否则背景会过深(边摇边观察,棕褐色条带到一定强度后,马上终止)。

⑨ 终止显影:倒掉瓷盘中的显影液,迅速倒入定影液(10% HAC),缓缓摇动 2~3 min.

⑩ 识读序列:倒掉瓷盘中的定影液,用双蒸水

洗 2 次,每次 2 min,将凝胶放在空气中干燥,识读序列,并用数码相机摄像。

1.6 统计分析

根据聚丙烯酰胺凝胶 PCR 产物泳动距离进行结果判读,泳动距离最长的带设定为字母 a,依次为 b, c, d……,如果泳动距离一致,称单态性,若有差异称为多态性,即一条带为纯合子,两条带为杂合子,无扩增条带则为无效等位基因(null allele),记为 0. 然后计算出各座位的基因频率^[17-19]。

2 结果与分析

2.1 两种检测方法在 SW349 的部分结果比较

从图 1,图 2 可以看出 1,2,3 是杂合子,在图 1 中分离距离较小,但在图 2 中却很明显;9 也是杂合子,在图 1 中分离极不明显,但在图 2 中却可清楚的看出是两条带。

2.2 6 个微卫星引物序列及所检测到的等位基因片段及频率

表 1 微卫星多态性及其基因频率

Tab. 1 Microsatellite polymorphism and allele frequencies

微卫星引物	引物序列	等位基因	基因频率
SW349	CCTGTTGTAGGCTCCATGA	a	0.023 6
	CTAGGAGTCGGCCCTGAAC	b	0.324 9
		c	0.335 6
		d	0.315 9
SW769	GGTATGACCAAAAGTCCTGGG	a	0.357 1
	TCTGCTATGTGGGAAGAATGC	b	0.214 3
		c	0.428 6
SW781	CAACTACGTCCTTCTTTTTGCC	a	0.285 7
	GATCCTTGGTCTGAAACTTG	b	0.071 4
		c	0.642 9
SW782	TCTTCACATATGAGCACCAACC	a	0.246 8
	CGGAACAAGAGGAAGTACTG	b	0.321 7
		c	0.145 3
		d	0.035 8
		e	0.250 4
SW792	TACTGGGGTGAGCTTGTCTG	a	0.142 9
	TTCCCTCCTCTCCTCTTTCC	b	0.857 1
SW986	AGGAAGCAAAATCTTAAGAGGC	a	0.113 4
	GGTGAGCCAGGAACAAGTATG	b	0.257 8
		c	0.356 4
		d	0.272 4

从表 1 可以看出在座位 SW349, SW769, SW781, SW782, SW792 和 SW986 上分别检测出 4,

3, 3, 5, 2 和 4 个等位基因片段,多态性比较丰富。

3 讨论

微卫星的 PCR 扩增产物可以用琼脂糖电泳经溴化乙锭染色,也可以用聚丙烯酰胺凝胶电泳经 AgNO₃ 染色,大多数微卫星引物的 PCR 扩增产物用 2 种方法都可以分离,在扩增产物片段差异较大时,用琼脂糖凝胶即可很好的分离,但个别微卫星引物的 PCR 扩增产物在琼脂糖凝胶上分辨率太低,有时无法显示微卫星多态性,特别是只有微小差异的片段,当胶浓度达到 2.5% ~ 3.0% 都分不开,但在 8% 聚丙烯酰胺凝胶上分离较好,可清楚地判别带型。还有琼脂糖凝胶电泳虽然比较简单,易操作,所用时间也短,但 EB 有致癌性,且显色灵敏度也较差,丙烯酰胺也有神经毒,但当它聚合后就可认为没有毒性,且银染灵敏度比较高,微量的 PCR 产物就可跑出清晰的带型,是一种较好的分离微卫星的 PCR 扩增产物片段的方法。银染有时在主带外有显色较浅的影子带,可以通过改变退火温度、延伸时间、循环次数、模板量和控制银染时间等来减到最小程度。所以,在进行猪的多态性检测时,如果有条件应尽量用聚丙烯酰胺凝胶电泳 AgNO₃ 染色法^[20~22]。

【参 考 文 献】

- [1] SCHNABEL R D, WARD T J, DERR N. Validation of 15 microsatellites for parentage testing in North American bison, Bison bison and domestic cattle[J]. *Animal Genetics*, 2000, 31, 360 - 361.
- [2] QUELLRR D C, STRASSMANN J E, HUGHS C R. Microsatellite and kinship[J]. *Trends in Ecology and Evolution*, 1993, 8: 285 - 288.
- [3] 牛荣, 商海涛, 魏泓, 等. 版纳小耳猪近交系 5 家系 35 个微卫星座位的遗传分析[J]. *遗传学报*, 2001, 28 (6): 518 - 526.
- [4] 苏玉虹, 熊远著, 张勤, 等. 猪 1, 3 号染色体微卫星位点多态性及遗传连锁图谱的构建[J]. *遗传学报*, 2002, 29(1): 16 - 20.
- [5] MEINHARDT L W, WULFF N A, BELLATO C M, et al. Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil[J]. *Fitopatologia Brasileira*, 2002, 27(2): 211 - 215.
- [6] ALVAREZ A E, WIEL C M, SMULDERS M J, et al. Use of microsatellites to evaluate genetic diversity and species relationships in the genus *Lycopersicon*[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2001, 103(8): 1 283 - 1 292.
- [7] RAHUL B N, SHEORAN J B, TANTIA M S, et al. Microsatellite sequences of mammals and their applications in genome analysis in pigs a review[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2002, 15(12): 1 822 - 1 830.
- [8] GARY A R, LESSON J A, JOHN W K, et al. A microsatellite Linkage Map of the Porcine Genome[J]. *Genetics*, 1994, 136: 231 - 245.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E. F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [10] 何忠效, 张树政. 电泳[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [11] 牛新华, 高宗华. 联合复合体的硝酸银染色技术[J]. *解剖学杂志*, 2002, 25(3): 296 - 298.
- [12] 张宇伟, 来茂德. 微卫星 DNA - 聚合酶链反应银染色检测结果的假阳性分析[J]. *中华病理学杂志*, 1999, 28(1): 53 - 54.
- [13] 高玉彤, 来茂德. 检测微卫星不稳定性的银染色方法[J]. *临床与实验病理学杂志*, 1998, 14(2): 193 - 194.
- [14] 许绍斌, 陶玉芬. 简单快速的 DNA 银染和胶保存方法[J]. *遗传*, 2002, 24(3): 335 - 336.
- [15] FRIED J, LUDWIG W, PSENNER R, et al. Improvement of ciliate identification and quantification: a new protocol for fluorescence in situ hybridization (FISH) in combination with silver stain techniques[J]. *Systematic & Applied Microbiology*, 2002, 25(4): 555 - 571.
- [16] CHEN H, WANG Z Y, JIN Y, et al. Drawing the protein fingerprints of *Cucumis sativus* and *Phaseolus vulgaris* by supersensitive Silver Stain SDS-PAGE method[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2000, 15(4): 108 - 111.
- [17] 里德伍克 D, 黑姆斯 B D. 核酸电泳技术[M]. 赵大健, 孙存, 齐义鹏译. 北京: 科学出版社, 1989.
- [18] 李瑞生, 陈振文. PCR 扩增近交系大鼠微卫星位点 DNA 多态性的研究[J]. *遗传*, 2001, 23(6): 539 - 543.
- [19] REMMERS E F, GOLDMUNTZ E A, ZHA H, et al. Linkage map of seven polymorphic markers on rat chromosome 18[J]. *Mamm Genome*, 1993, 4(5): 265 - 270.
- [20] 李新海, 焦少杰, 傅骏骅, 等. 两种凝胶电泳系统对 SSR 标记多态性的影响[J]. *华北农学报*, 2001, 16 (2): 43 - 48.
- [21] 张细权, 刘敬顺, 吴显华. 畜禽微卫星多态性的银染法显色[J]. *华中农业大学学报*, 1997, 18(增刊): 112 - 115.
- [22] 李瑞生, 陈振文, 宋德光, 等. PCR 扩增近交系大鼠微卫星位点 DNA 多态性的研究[J]. *遗传*, 2001, 23 (6): 539 - 543.