

4 对微卫星 DNA 标记在 3 个绵羊品种中多态性的研究

张兴国¹, 石国庆², 柳楠^{*}, 任航宇³, 代蓉³, 刘国庆^{*} (1. 莱阳农学院动物科技学院, 山东青岛 266000; 2. 新疆农垦科学院畜牧兽医研究所, 新疆石河子 832000; 3. 合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230036)

摘要 选用无角道塞特、萨福克与中国美利奴肉羊品种群体, 耳组织提取基因组 DNA, 用 4 对微卫星引物进行 PCR 扩增, 通过电泳分型、凝胶成像系统分析各位点等位基因及全部个体的标记基因型, 计算基因频率、多态信息含量(PI)和杂合度等, 从分子水平上分析 4 个位点的遗传多态性。结果表明, CSSM18, OB2, MCM8, MCMA26 这 4 个位点的等位基因数分别为 14、15、13、13, 多态信息含量(PI)丰富, 杂合度高, 均属于高度多态性位点, 用于作为与生产性能相关的遗传标记是较理想的。

关键词 微卫星; 杂合度; 多态信息含量; 有效等位基因

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)09-02571-02

Study on Polymorphism of 4 Microsatellites DNA in 3 Sheep Breeds

ZHANG Xingguo et al (College of Animal Science and Technology, Laiyang Agricultural University, Qingdao, Shandong 266000)

Abstract In this study, a group of 161 sheep consisting of Dorset, Suffolk and Chinese Merino for meat was chosen and its population genetic polymorphism was analyzed at the level of molecule with the process of genome DNA extraction from ear tissue, PCR amplification of 4 primers fragment typing, allele of every locus and genotype analysis of all individuals with Gel Imaging system, calculation of allele frequencies polymorphism information content (PI) and Heterozygosity. The results showed that, the number of alleles in CSSM18, OB2, MCM8 and MCMA26 was 14, 15, 13 and 13, the polymorphism information content (PI) was abundant, and the heterozygosity was high. All of them were high polymorphic loci. So they were ideal loci genetic markers related to the production performance.

Key words Microsatellite; Heterozygosity; Polymorphism information content; Effective number of alleles

随着现代分子生物学技术的发展, 一些高效的分子遗传标记将各种畜禽的遗传图谱研究推向深入, 为将复杂的数量性状分解为多个数量性状基因座进行定位分析提供了研究单个基因特性的手段, 为动物育种从数量性状的表型操作深入到基因型操作奠定了基础。微卫星(microsatellite)又称为简单序列重复(simple sequence repeat, SSR), 作为一种分子遗传标记, 具有数量多且均匀分布在大多数真核及少数原核生物的基因组中、丰富的多态性、易于检测、具有保守性、等显性遗传等突出优点, 因此已被广泛应用于畜禽遗传育种之中^[1-3]。笔者利用微卫星标记技术研究新疆地区无角道塞特、萨福克与中国美利奴肉用绵羊群体的遗传多态性, 并对所列举微卫星位点的多态性进行统计分析, 旨在为进一步寻找与肉用生产性能相关的遗传标记提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 取样。在新疆建设兵团新湖种羊场提供的供试羊群体中随机抽样, 采集了无角道塞特(61 头)、萨福克(38 头)和中国美利奴(62 头)的新鲜耳组织样, -20℃ 冷冻保存。

1.1.2 主要试剂。PCR 反应试剂盒, 丙烯酰胺, 蛋白酶 K, RNAase, 苯酚, Tris, 过硫酸铵, EDTA, DNAMarker, TEMED, 硝酸银, 引物等。

1.1.3 主要仪器。iCyder PCR 仪, YJ 875 超净操作台, TY B 脱色摇床, UV 紫外分光光度计, DYY 垂直电泳槽, DYY 12 电脑三恒多用电泳仪, AB204 N 型电子天平, 3K30 高速冷冻离心机和 113 小型台式离心机, Gel Koc2000TM 凝胶自动成像系统。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取^[4]。用酚氯仿抽提法提取基因组, 溶于 TE 中, 置于 4℃ 保存。

1.2.2 引物的筛选与合成。从 GENE BANK 中查阅相关资料, 参考其研究结果, 选出位于 18 号染色体上的 4 个与绵羊肉用生产性能相关的微卫星位点。查出相应的微卫星引物序列, 引物交由上海生工生物工程公司合成。4 个微卫星位点的引物序列及 PCR 扩增反应条件见表 1。

表 1 选取的 4 个微卫星标记的引物序列及复性温度

微卫星基因座	引物序列(5' - 3')	退火温度
CSSM18-R	5-TgTgCATAATTgTgTCGgTCGgA-3	60
CSSM18-F	5-AggAATCCCTCTAgAAAgCaggC-3	
OB2-R	5-AAAggggCagATTCagTAICCA-3	60.5
OB2-F	5-CTgCCgATCCTCTgCTT-3	
MCM8-R	5-CagCCagCagCCTCTAAaggAC-3	60
MCM8-F	5-TggTgAAAggTgCTCTCAIACCag-3	
MCMA26-R	5-AgAgCTTTTAggACagCCACC-3	61.5
MCMA26-F	5-TCTCTgCTTCCagCCTTAITC-3	

1.2.3 PCR 反应条件。PCR 反应采用试剂盒优化, 体系为 15 μl: TaqE0.3 μl, 10×buffer1.5 μl, dNTP(含 2.5 mmol/L Mg²⁺) 1.2 μl, 引物(10 mmol/L) 各 0.75 μl, 模板 DNA(100 ng/μl) 1.2 μl, ddH₂O 9.3 μl。扩增程序为: 94℃, 4 min 35×(94℃, 30 s 引物退火温度, 30 s 72℃, 30 s) 72℃, 4 min 4℃ 保存备用。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳。用 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 采用快速银染法显色^[5-6], 照相, 图片保存。直接用 Gel Koc2000TM 凝胶自动成像系统所附带的软件进行等位基因分型, 并计算微卫星等位基因大小。

1.3 统计分析

1.3.1 微卫星标记的等位基因频率估计。微卫星标记各等位基因呈共显性遗传, 表型直接反映基因型, 故等位基因频率可根据简单计算算出。

基金项目 新疆建设兵团博士基金项目(2003-02); 新疆建设兵团绵羊繁育生物技术重点实验室开放基金项目(05KLS02)。

作者简介 张兴国(1982-), 男, 山东泰安人, 硕士研究生, 研究方向: 动物遗传育种。* 通讯作者, 副教授, E-mail: liugq.168@163.com。

收稿日期 2006-12-11

1.3.2 群体杂合度计算。群体杂合度的计算公式为:

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

式中, h 为各位点的杂合度; H 为各位点的平均杂合度; r 为位点数; P_i 为第 k 个位点第 i 个等位基因的频率。

1.3.3 多态信息含量。多态信息含量 PIC 的计算公式为:

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

式中, k 为等位基因数目; P_i 和 P_j 分别表示第 i 和 j 个等位基因的频率。

1.3.4 有效等位基因数(N_e)。 N_e 是基因一致度的倒数, 反映了等位基因间的相互影响, 也可作为群体遗传变异的一个测度。其计算公式为:

$$E = 1 / \sum_{i=1}^n P_i^2$$

式中, N_e 为有效等位基因数; P_i 为第 i 个有效等位基因频率。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取结果 提取基因组 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测, 亮度较大。说明提取的 DNA 在纯度、浓度上质量都较高。

2.2 微卫星引物扩增结果

2.2.1 扩增产物琼脂糖电泳检测。首先将 PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带亮度较好, 显示 PCR 扩增产物大小和质量均符合要求, 可以进一步用 10% 聚丙烯酰胺凝胶分析绵羊个体的标记基因型。

2.2.2 扩增产物聚丙烯酰胺电泳检测。对 4 个微卫星位点的 PCR 产物进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 得到 PCR 产物电泳检测结果(图 1~4)。

2.2.3 等位基因数、等位基因频率和遗传参数。微卫星 MCMB8 在道赛特羊、萨福克羊和中国美利奴羊 3 个群体中共

发现有 13 个等位基因, 等位基因范围 135~155; 微卫星 CSSM8 共发现 14 个等位基因, 等位基因范围 119~147; 微卫星 MCMA26 共发现 13 个等位基因, 等位基因范围在 184~215; 微卫星 OB2 共发现 15 个等位基因, 等位基因范围在 198~268, 基因频率分布不均匀。根据 4 个微卫星座位各等位基因的基因频率计算了 H 、 E 和 HC (表 2)。

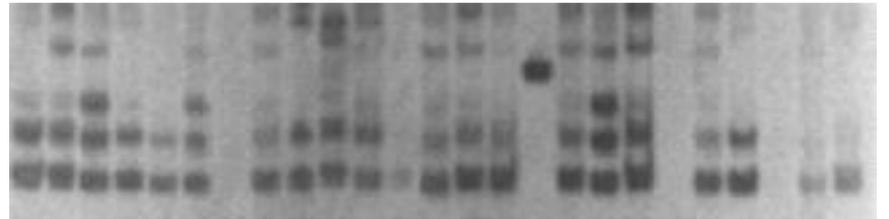


图1 微卫星标记 MCMB8 扩增的部分电泳结果

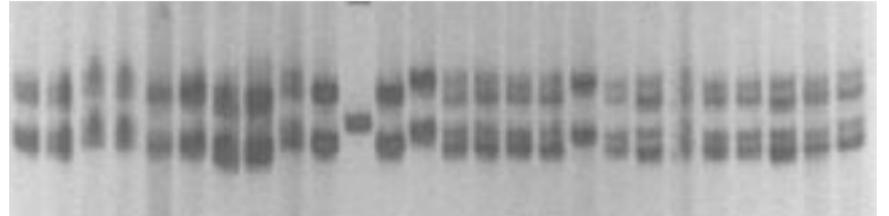


图2 微卫星标记 CSSM8 扩增的部分电泳结果

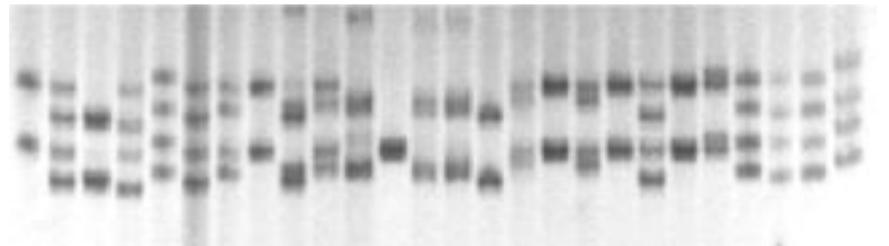


图3 微卫星标记 MCMA26 扩增的部分电泳结果

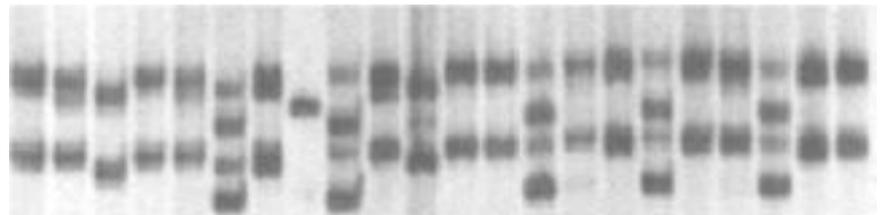


图4 微卫星标记 OB2 扩增的部分电泳结果

表2 4 个微卫星座位在 3 个绵羊品种中的杂合度、多态信息含量和有效等位基因数

品种	MCMB8			CSSM8			MCMA26			OB2		
	杂合度	有效基	多态信息	杂合度	有效基	多态信息	杂合度	有效基	多态信息	杂合度	有效基	多态信息
	H	因数E	含量HC	H	因数E	含量HC	H	因数E	含量PIC	H	因数E	含量HC
道赛特	0.889 8	9.07	0.875 4	0.837 0	6.13	0.822 1	0.925 2	13.37	0.916 7	0.854 3	6.86	0.837 1
萨福克	0.891 3	9.20	0.880 9	0.811 3	5.30	0.784 0	0.821 4	5.60	0.796 3	0.789 5	4.75	0.722 0
中国美利奴	0.832 8	5.98	0.823 1	0.861 7	7.23	0.842 1	0.887 6	8.89	0.874 3	0.822 3	5.63	0.801 1

3 结论与讨论

3.1 微卫星 DNA 在家畜遗传多态分析的应用 与 RFLP 比较, 微卫星在进化过程中受选择压力较小, 能够更加准确地反映群体分化过程及亲缘关系, 而 RFLP 适合分析较大的进化关系, 如属、种间差异, 微卫星则适宜检测群体内个体间差异。与 RAPD 比较, 由于它们产生的机理不同, 其特点各有千秋。微卫星为共显性遗传, 在基因型检测上较为方便, 便于自动化分析, 可以方便地对群体间的关系进行个体鉴定^[7-8]。

3.2 群体内的遗传参数分析 有效等位基因数是衡量群体遗传变异的一个指标。不同品种在同一微卫星座位上等位基因数目和频率的差异体现出其遗传上的差异。该研究所测 3 个绵羊群体的有效等位基因数在 13~15, 不同等位基因间片段大小的差异不等, 说明群体遗传变异较大。遗传杂合度反映了各群体在基因座位上的遗传变异。平均基因杂合度的大小近似地反映出遗传结构变异程度的高低, 杂合度越

高, 表明群体遗传多样性越高。各绵羊品种的杂合度为 0.837 0~0.925 2, 说明该 3 个品种绵羊群体之间的变异程度很高。多态信息含量是衡量片段多态性的较好指标^[9]。Botstein 等^[10] 提出了衡量基因变异程度高低的的多态信息含量指标: 当 $PIC > 0.5$ 时, 该基因座位为高度多态基因座位; 当 $HC 0.25 \sim 0.5$ 时, 为中度多态基因座位; 当 $HC < 0.25$ 时, 则为低度多态基因座位。该研究的 4 个微卫星座位均表现出了高度多态性, $PIC 0.722 0 \sim 0.880 9$, 说明试验所选 4 个微卫星为高度多态, 是普遍适合于绵羊肉用生产性状的多态标记。

参考文献

- [1] 吕慎金, 马月辉, 耿社民. 微卫星标记对绵山羊品种资源的评价[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2002(10): 10-12.
- [2] 刘伟敏, 熊远著, 蒋思文, 等. 微卫星标记及在家畜遗传育种研究中的应用[J]. 湖北农业科学, 2000(2): 55-58.
- [3] TAUTZ D. Hyper variability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(16): 6463-6467.

(上接第2572 页)

- [4] J 萨姆布鲁克,EF 弗里奇,马尼阿蒂斯EF. 分子克隆 M .2 版. 沈桂芳,毛江森,译. 北京:科学出版社,1998.
- [5] 刘云芳,高剑峰,潘晓亮,等. 绵羊全血中 DNA 的微量提纯 J]. 石河子大学学报:自然科学版,1997,1(2) :136 - 138.
- [6] 石锐,郭长虹. 聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 的银染方法 J]. 生物技术,1998,8(5) :46 - 48.
- [7] 储明星,程金华,过纬. 微卫星标记 OarAE101 和 BM329 在五个绵羊品

种中的初步研究 J]. 遗传学报,2001,28(6) :510 - 517.

- [8] 赵宗胜,王根林,郭继刚,等. 中国美利奴 新疆军垦型 绵羊9 个微卫星基因座多态性研究 J]. 遗传,2006,28(8) :939 - 944.
- [9] 贾斌,赵宗胜,李大全,等. 新疆3 个地方品种绵羊微卫星遗传分析 J]. 石河子大学学报:自然科学版,2005,4(2) :194 - 199.
- [10] BOISSEIND, WHITE R L. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Genet, 1980, 32 :314 - 331.