

新疆细毛羊和陕北细毛羊羊毛细度 候选基因的PCR-SSCP分析*

姚毅¹, 雷承志¹, 尹君亮², 刘福元², 陈玉林¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 新疆农垦科学院 畜牧兽医研究所, 新疆 石河子 832000)

[摘要] 选取60只新疆细毛羊和48只陕北细毛羊, 利用PCR-SSCP分子标记对其羊毛细度候选基因的5个位点(S₁, S₂, S₃, S₄, S₅)进行了多态性分析。结果表明, 2个绵羊品种在5个位点上A等位基因的频率均高于B等位基因。在S₁, S₅位点上, 新疆细毛羊和陕北细毛羊均检测到AA, AB, BB 3种基因型; 在S₂位点上, 新疆细毛羊检测到AA, BB, CC, DD 4种基因型, 陕北细毛羊检测到AA, AB, BB 3种基因型; 在S₃位点上, 新疆细毛羊检测到AA, AB 2种基因型, 陕北细毛羊检测到AA, AB, BB 3种基因型; 在S₄位点上, 新疆细毛羊和陕北细毛羊均检测到AA, BB 2种基因型。新疆细毛羊和陕北细毛羊的平均杂合度分别为0.445 0和0.399 7。新疆细毛羊PIC平均值为0.366 6, S₁, S₃, S₄和S₅位点均处于中度多态, 而S₂(PIC=0.555 1)处于高度多态; 陕北细毛羊PIC平均值为0.318 9, 5个位点均处于中度多态。以上结果表明, S₁, S₂, S₃, S₄和S₅ 5个位点可以作为有效的遗传标记用于优质细毛羊的遗传多样性分析, 2个绵羊品种群体内的遗传变异程度高, 遗传多样性丰富, 选择潜力大。

[关键词] 细毛羊; 羊毛细度; PCR-SSCP

[中图分类号] S826.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)12-0006-05

我国是个养羊大国。2003年统计资料表明, 我国存栏羊总数为3.41亿只, 饲养量位居世界第一, 其中绵羊1.57亿只, 占总数的46.04%^[1]。近年来, 世界羊毛生产及贸易突出的变化是超细型羊毛需求增加。因此, 加快超细细毛羊品种选育是我国细毛羊育种工作的重点。

目前, 该领域的研究热点之一是关于羊毛细度决定位点或相关基因的研究。McClaren等^[2]通过连锁分析已经将角蛋白辅助蛋白6.1(KAP6.1), KAP7和KAP8定位到绵羊的第1号染色体上, 将KAP1.1, KAP1.2, KAP1.3, KAP3.2定位到绵羊的21号染色体上。Henry等^[3]利用超细的美利奴羊和罗姆尼羊的回交群体, 测定了包括周岁体重、羊毛产量、平均纤维直径在内的多个性状, 同时用216个微卫星标记进行了基因组扫描, 找到了一个与羊毛纤维直径相关的位点($P < 0.05$)。Ponz等^[4]通过片段定位方法寻找控制羊毛性状的QTL, 利用法国的合成品系NR401对40个微卫星标记进行了分析, 结果发现在绵羊第3号、7号、25号染色体上有控制

毛长(SL)的QTL, 在第6号染色体上有控制毛纤维直径(WFD)的QTL, 在第7号染色体上有控制毛纤维直径变异系数的QTL。Cockett NE^[5]认为KAP6n和羊毛直径有关。目前, 人们虽已找到了决定羊毛纤维细度的位点或其所在的染色体, 但是还未找到控制羊毛细度的主效基因。我国目前关于羊毛细度方面的分子生物学研究报道较少。本试验对新疆细毛羊和陕北细毛羊的羊毛细度候选基因进行了PCR-SSCP分析, 以期找到控制羊毛细度的基因位点或者QTL, 以为细毛羊的遗传育种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 新疆细毛羊, 由新疆农八师141团羊场提供, 共60只, 均为成年母羊, 无血缘关系; 陕北细毛羊, 由陕北细毛羊种羊场提供, 共48只, 均为成年母羊, 无血缘关系。

1.1.2 SSCP引物 根据GeneBank中KAP1.1,

* [收稿日期] 2006-06-09

[基金项目] 农业部农业结构调整重大项目(05-07-03B); 新疆生产建设兵团博士基金项目(04SZJ-8)

[作者简介] 姚毅(1979-), 男, 山西河津人, 在读硕士, 主要从事动物遗传资源研究。

[通讯作者] 陈玉林(1964-), 男, 河南鄢陵人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传资源研究。E-mail: myxy11@263.net

KAP1.3和KAP6.1基因全序列,用Primer 5.0引物设计软件,针对5个基因位点,设计5对特异性引物(表1)。引物由上海生工生物工程公司合成。

表1 绵羊SSCP引物的序列及退火温度

Table 1 Sequence of SSCP primer in sheep and annealing temperature

位点 Sites	序列 Sequence	退火 温度/ Annealing tempera- ture
S ₁	F: CCGCCCATCCTACTGTGGA R: TTTTGTGTGGACGCGACTAG	55.5
S ₂	F: GTGAGACCGGCTGTGGCATTTGC R: GGGTGGACGAGGGTTGGGTA	60
S ₃	F: ACTTCTCCAA GCA TCCCA R: ACACTCTGGCCGACACCG	58.5
S ₄	F: GCTTCGTGCCCTCTACAT R: ATTTGAACAA GTTA TACCTTAG	52
S ₅	F: TCTACCCGA GAACAA CCT R: CTACGGTGCTTTCTGAGA	55.5

1.1.3 试剂及仪器 Taq DNA 聚合酶, dNTPs, 50 bp Ladder 为广州东盛生物科技有限公司产品; 丙稀酰胺和亚甲基双丙稀酰胺等均为北京鼎国生物技术有限公司产品; DYCZ-24B 型垂直电泳槽和 DYY-6C 稳流稳压电泳仪均为北京市六一仪器厂生产; PTC-200TM 型 PCR 仪为美国 PE 公司产品; Bio-Rad GD XRS 凝胶成像系统为美国产品。

1.2 绵羊血样的采集

无菌采取绵羊血样, 10 mL/只, 用肝素钠抗凝, 置于-20℃保存备用。

1.3 绵羊血液DNA的提取

绵羊血液DNA的提取采用常规酚抽提法, 具体参考文献[6]。提取的DNA样品进行琼脂糖凝胶电泳检测, 并用紫外分光光度计测定DNA的浓度和纯度。若OD₂₆₀/OD₂₈₀比值小于1.6, 说明样品中含有较多的蛋白质或酚, 应进行纯化; 若比值大于1.8, 则应考虑纯化去除RNA。合格的DNA样品用TE稀释至50 ng/μL, 4℃保存备用。

1.4 绵羊DNA的PCR扩增

反应体系总体积13 μL, 其中, 10×Buffer 1.0 μL, 25 mmol/L的MgCl₂ 0.8 μL, 2.5 mol/L的dNTP 1.0 μL, 0.5 U/μL的Taq DNA聚合酶2.5 μL, 5 pmol/μL的上下游引物各2 μL, 50 ng/μL的模板DNA 2 μL, ddH₂O 3.7 μL。反应条件: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 退火30 s, 72℃延伸45 s, 共34个循环; 72℃延伸10 min, 4℃保存。退火温度

依据使用引物而定, 详见表1。PCR扩增产物用100 g/L的非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 电泳条件为110 V, 14~16 h, 电泳结束后, 用银染法^[7]染色。

1.5 数据统计与分析

电泳结束后, 使用Bio-Rad GD XRS 凝胶成像系统照像, 分析并判断各位点的基因型。试验数据采用SPSS 11.0进行统计分析。

1.5.1 基因频率 基因频率是指一个群体中某一基因对等位基因的相对比率。设某一基因位点有A和B两个等位基因, 基因频率分别为p和q, 则

$$p = (2X + Y)/2N \quad q = (2Z + Y)/2N$$

式中, X为具有AA基因型的个体数; Z为具有BB基因型的个体数; Y为具有AB基因型的个体数; N为总个体数。

1.5.2 基因型频率 基因型频率指群体中某一性状的各种基因型之间的比率。基因型频率=基因型个体数/测定群体总数。

1.5.3 χ^2 适合性检验

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

式中, E_i 为理论次数; O_i 为实际观察次数。

1.5.4 有效等位基因数(N_e)

$$N_e = 1 / \sum p_i^2$$

式中, p_i 为基因频率; m为等位基因数。

1.5.5 位点杂合度(h)

$$h = 1 - \sum p_i^2$$

式中, p_i 为基因频率; m为等位基因数。

1.5.6 多态性信息含量(PI)

$$PI = 1 - \sum p_i^2 - \sum_{j=1}^{m-1} \sum_{i=1}^m 2p_i^2 p_j^2$$

式中, m为等位基因数; p_i 和 p_j 分别为等位基因i和j的频率。

2 结果与分析

2.1 新疆细毛羊SSCP检测结果

由图1可知, 新疆细毛羊S₅位点存在单核苷酸多态性, 共有3种基因型: 下面2条相距较远的带型为AA基因型(泳道5~8, 10), 2条相距较近的带型为BB基因型(泳道9), 具有4条带的带型为AB基因型(泳道1~4)。

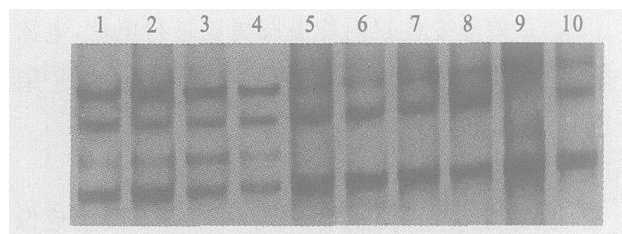


图1 新疆细毛羊S₅位点电泳图谱
1~4为AB型;5~8,10为AA型;9为BB型

Fig 1 PCR with S₅ site in fine-wool sheep breeds of Xinjiang
1-4 is AB genotype; 5-8, 10 is AA genotype; 9 is BB genotype

2 2 2 个绵羊品种在5个位点上的等位基因频率

新疆细毛羊和陕北细毛羊2个绵羊品种在S₁, S₂, S₃, S₄和S₅5个位点上的等位基因频率见表2。由表2可知,在S₁~S₅位点上,新疆细毛羊和陕北细毛羊等位基因A的频率均大于B。除S₄位点外,其他位点新疆细毛羊A等位基因频率均小于陕北细毛羊的A等位基因频率,这说明新疆细毛羊比陕北细毛羊的遗传多样性丰富。

表2 新疆细毛羊和陕北细毛羊在5个位点的等位基因频率

Table 2 Allelic frequencies of 5 sites in the fine-wool sheep breeds of Xinjiang and Shaanbei

位点 Site	品种 Breed	等位基因 A llelic	等位基因频率 Gene frequ- ency	位点 Site	品种 Breed	等位基因 A llelic	等位基因频率 Gene frequ- ency
S ₁	X	A	0.666 7	S ₃	X	A	0.633 3
		B	0.333 3			B	0.366 7
S ₂	S	A	0.697 9	S	S	A	0.781 3
		B	0.302 1			B	0.218 7
		A	0.516 7			A	0.783 3
		B	0.316 7			B	0.216 7
	X	C	0.083 3	S ₄	X	A	0.666 7
		D	0.083 3			B	0.333 3
S	S	A	0.677 1		X	A	0.766 7
		B	0.322 9			B	0.233 3
					S	A	0.770 8
						B	0.229 2

注: X 代表新疆细毛羊; S 代表陕北细毛羊。下表同。

Note: X indicate the fine-wool sheep breeds of Xinjiang, S indicate the fine-wool sheep breeds of Shaanbei. The following table is same.

2 3 2 个绵羊品种在5个位点上的等位基因数、 h 和 PIC

为高度多态, $0.5 > PIC > 0.25$ 的位点为中度多态, $PIC < 0.25$ 的位点为低度多态。新疆细毛羊的多态信息含量最高为0.555 1, 最低为0.281 8, 平均为0.366 6, 陕北细毛羊的多态信息含量最高为0.345 6, 最低为0.283 4, 平均为0.318 9。这说明, 对新疆细毛羊而言, S₁和S₃~S₅位点为中度多态, S₂位点高度多态; 对陕北细毛羊而言, 5个位点均中度多态。

由表3可知, 新疆细毛羊的平均有效等位基因数为1.872 4, 陕北细毛羊平均为1.674 3。新疆细毛羊的杂合度最高为0.618 9, 最低为0.339 4, 平均为0.445 0; 陕北细毛羊的杂合度最高为0.444 4, 最低为0.341 8, 平均为0.399 7。多态信息含量(PIC)是衡量位点多态性的一个重要指标, $PIC > 0.5$ 的位点

表3 新疆细毛羊和陕北细毛羊在5个位点的有效等位基因数、杂合度和多态信息含量

Table 3 Numbers of effective allelic, h and PIC of 5 sites in the fine-wool sheep breeds of Xinjiang and Shaanbei

位点 Site	品种 Breed	有效等位基因数 Number of effective allelic	杂合度 h	多态信息含量 PIC
S ₁	X	1.799 9	0.444 4	0.345 6
	S	1.728 9	0.421 6	0.332 7
S ₂	X	2.624 0	0.618 9	0.555 1
	S	1.776 8	0.437 2	0.341 6
S ₃	X	1.867 1	0.464 4	0.356 5
	S	1.519 3	0.341 8	0.283 4
S ₄	X	1.513 8	0.339 4	0.281 8
	S	1.799 9	0.444 4	0.345 6
S ₅	X	1.557 1	0.357 8	0.293 8
	S	1.546 6	0.353 4	0.291 0
平均 A verage	X	1.872 4	0.445 0	0.366 6
	S	1.674 3	0.399 7	0.318 9

2 4 两个绵羊品种在 5 个位点上的基因型频率

通过对新疆细毛羊和陕北细毛羊基因型的

PCR-SSCP 检测, 可计算出两个绵羊品种在 5 个检测位点上的基因型频率, 结果见表 4。

表 4 新疆细毛羊和陕北细毛羊在 5 个位点上的基因型频率及其 χ^2 值

Table 4 Genotype frequency and χ^2 of 5 sites in the fine-wool sheep breeds of Xinjiang and Shaanbei

位点 Site	基因型 Genotype	基因型频率 Genotype frequency		χ^2 值 χ^2 value	
		X	S	X	S
S ₁	AA	0 550 0	0 520 8	13 528 8 ^{**}	1 230 1
	AB	0 233 3	0 354 2		
	BB	0 216 7	0 125 0		
S ₂	AA	0 516 7	0 541 7	141 881 9 ^{**}	6 984 8 [*]
	AB	-	0 270 8		
	BB	0 316 7	0 187 5		
	CC	0 083 3	-		
S ₃	DD	0 083 3	-	12 035 5 ^{**}	5 196 4
	AA	0 266 7	0 666 7		
	AB	0 733 3	0 229 2		
S ₄	BB	-	0 104 1	39 570 0 ^{**}	6 673 8 ^{**}
	AA	0 783 3	0 333 3		
	AB	-	0 666 7		
S ₅	BB	0 216 7	-	0 038 0	8 086 5 [*]
	AA	0 583 3	0 666 7		
	AB	0 366 7	0 208 3		
	BB	0 050 0	0 125 0		

注: *. 表示差异显著 ($P < 0.05$); **. 表示差异极显著 ($P < 0.01$); -. 表示未检测到该基因型。

Note: *. indicates significant difference ($P < 0.05$), **. indicates quite significant difference ($P < 0.01$); -. indicate no site

由表 4 可见, 在 S₁, S₅ 位点上, 供试新疆细毛羊和陕北细毛羊均检测到 AA, AB, BB 3 种基因型, S₁ 位点上新疆细毛羊和陕北细毛羊的基因型频率分别为 0 550 0, 0 233 3, 0 216 7 和 0 520 8, 0 354 2, 0 125 0, S₅ 位点上的基因型频率分别为 0 583 3, 0 366 7, 0 050 0 和 0 666 7, 0 208 3, 0 125 0; 在 S₂ 位点上, 新疆细毛羊检测到 AA, BB, CC 和 DD 4 种基因型, 陕北细毛羊检测到 AA, AB, BB 3 种基因型, 其基因型频率分别为 0 516 7, 0 316 7, 0 083 3, 0 083 3 和 0 541 7, 0 270 8, 0 187 5; 在 S₃ 位点上, 新疆细毛羊检测到 AA, AB 2 种基因型, 其基因型频率分别为 0 266 7, 0 733 3, 陕北细毛羊检测到 AA, AB, BB 3 种基因型, 其基因型频率分别为 0 666 7, 0 229 2 和 0 104 1; 在 S₄ 位点上, 新疆细毛羊检测到 AA, BB 2 种基因型, 其基因型频率分别为 0 783 3 和 0 216 7, 陕北细毛羊检测到 AA, AB 2 种基因型, 其基因型频率分别为 0 333 3 和 0 666 7。

3 讨论与结论

等位基因频率是用来表示一个种群中基因多样性的, 或者说是基因库的丰富程度, 是估计群体内和群体间遗传关系的基础。本试验中, 在 S₂ 位点上, 新疆细毛羊检测到 AA, BB, CC, DD 4 种基因型, 这与

刘桂芬^[8]对新疆优质细毛羊遗传多样性及羊毛细度候选基因的研究结果类似。除 S₄ 位点外, 其他位点新疆细毛羊 A 等位基因频率均小于陕北细毛羊, 这说明新疆细毛羊比陕北细毛羊的遗传多样性丰富。

有效等位基因数是基因纯合度的倒数, 其表示等位基因间的相互影响。等位基因在群体中分布的均匀性越好, 则有效等位基因数越接近实际检测到的等位基因数的绝对数。同时, 有效等位基因数多的品种, 其杂合度和多态信息含量相应也高。本试验结果发现, 新疆细毛羊和陕北细毛羊的平均有效等位基因数分别为 1.872 4 和 1.674 3, 说明新疆细毛羊的杂合度及多态信息含量明显高于陕北细毛羊。

对一个群体而言, PIC 高, 等位基因数目多、杂合度大, 则该位点的遗传变异性就高, 有较大的选择潜力。本试验结果显示, 新疆细毛羊的 PIC 最高值为 0.555 1, 最低值为 0.281 8, 平均值为 0.366 6, 其中 S₂ 位点处于高度多态, 这与刘桂芬^[8]关于新疆优质细毛羊多态信息含量的研究结果 (0.358 8) 相近; 陕北细毛羊 PIC 最高值为 0.345 6, 最低值为 0.283 4, 平均为 0.318 9。结果表明, S₁~ S₅ 可以作为有效的遗传标记用于优质细毛羊的遗传多样性分析。

基因杂合度又称基因多样性, 其反映了群体遗传变异程度的大小, 是度量群体遗传变异的一个最

适参数。本试验结果表明,新疆细毛羊的平均值为0.445 0,与刘桂芬^[8]的研究结果(0.417 4)相近,陕北细毛羊的平均值为0.399 7。新疆细毛羊的平均杂合度高于陕北细毛羊,说明新疆细毛羊遗传多样性比陕北细毛羊丰富,选择潜力很大,可以用于改良其他品种。

[参考文献]

- [1] 贾志海. 我国养羊业发展机遇面临的挑战与对策[J]. 现代畜牧兽医, 2005(4): 1-2
- [2] McLaren R. J. L linkage mapping of wool keratin and keratin-associated protein genes in sheep[J]. Mammalian Genome, 1997, 8: 938-940
- [3] Henry H M. A genome screen for QTL for wool traits in a MerinoX Romney backcross flock[J]. Mammalian Genome, 1998, 8: 938-940
- [4] Ponz R. A assessment of genetic variation explained by markers for wool traits in sheep via a segment mapping approach[J]. Mammalian Genome, 2001, 12: 569-572
- [5] Cockett N. E. Analysis of the sheep genome[J]. Physiol Genomics, 2001, 7: 69-81
- [6] 萨姆布鲁克斯. 分子克隆试验指南[M]. 3版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2003
- [7] 雷雪芹. 牛羊多胎性状的DNA分子标记研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2002
- [8] 刘桂芬. 新疆优质细毛羊遗传多样性及羊毛细度候选基因的分析[D]. 新疆乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2005

The PCR-SSCP analysis about the candidate gene of the fineness of wool in the fine-wool sheep breeds of Xinjiang and Shaanbei

YAO Y¹, LEI Cheng-zhi¹, YIN Jun-liang², LIU Fu-yuan², CHEN Yu-lin¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Agricultural Reclamation, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

Abstract: The polymorphism of the candidate gene (S_1, S_2, S_3, S_4, S_5) was detected in the fineness of wool between 60 Xinjiang and 48 Shanbei sheep's by PCR-SSCP. The result showed: The frequency of A allele was obviously higher than that of B allele in the five spots of the two fine-wool sheep breeds. In loci S_1, S_5 , three genotypes (AA, AB, BB) were detected in two fine-wool sheep breeds. In locus S_2 , four genotypes (AA, BB, CC, DD) were detected in fine-wool sheep breeds of Xinjiang and three genotypes (AA, AB, BB) were detected in fine-wool sheep breeds of Shaanbei. In locus S_3 , two genotypes (AA, AB) were detected in fine-wool sheep breeds of Xinjiang and three genotypes (AA, AB, BB) were detected in fine-wool sheep breeds of Shanbei. In locus S_4 , two genotypes (AA, BB) were detected in fine-wool sheep breeds of Xinjiang and two genotypes (AA, AB) were detected in fine-wool sheep breeds of Shanbei. The average heterozygosity of fine-wool sheep breeds of Xinjiang and Shanbei were 0.445 0 and 0.399 7. The locus S_2 ($PI = 0.555 1$) of fine-wool sheep breeds of Xinjiang was highly polymorphic, the average PI was 0.366 6, and the other four loci (S_1, S_3-S_5) were medium polymorphic. In Shanbei's the five loci were medium polymorphic, the average PI was 0.318 9. The results showed, five loci (S_1-S_5) could be used as the efficient genetic marker to analyze the genetic diversity in fine-wool sheep. There were high genetic variability and rich genetic diversity in two fine-wool sheep breeds.

Key words: fine-wool sheep; fineness of wool; PCR-SSCP